

BỘ GIÁO DỤC VÀ ĐÀO TẠO      VIỆN KHOA HỌC VÀ CÔNG NGHỆ VIỆT NAM  
**VIỆN HOÁ HỌC CÁC HỢP CHẤT THIÊN NHIÊN**

**ĐOÀN LAN PHƯƠNG**

**NGHIÊN CỨU HOÁ HỌC VÀ HOẠT TÍNH SINH HỌC MỘT  
SỐ DẪN XUẤT TOCOPHEROL VÀ AXIT BÉO CÓ NGUỒN  
GỐC TỪ THIÊN NHIÊN**

Chuyên ngành: Hoá học các hợp chất thiên nhiên  
Mã số: 62.44.27.02

**TÓM TẮT LUẬN ÁN TIẾN SĨ HÓA HỌC**

**HÀ NỘI - 2010**

Công trình được hoàn thành tại:

-Phòng Hóa sinh biển - Viện Hoá học các Hợp chất thiên nhiên – Viện Khoa học và Công nghệ Việt Nam.

-Phòng thí nghiệm Hoá học- Viện nghiên cứu Hoá – Lý chất béo, Muenster, CHLB Đức.

**Người hướng dẫn khoa học:**

**1. PGS. TS. Phạm Quốc Long**

**2. TS. Bertrand Matthaus**

**Phản biện 1:** GS.TSKH. Phan Tổng Sơn

Trường Đại học Khoa học tự nhiên- Đại học Quốc Gia Hà Nội.

**Phản biện 2:** GS.TS. Phạm Thanh Kỳ

Trường Đại học Dược Hà Nội.

**Phản biện 3:** GS.TS. Lã Đình Mỡ

Viện Sinh thái và Tài nguyên Sinh vật.

Luận án sẽ được bảo vệ trước Hội đồng chấm luận án cấp nhà nước họp tại:  
Hội trường Viện Hoá học các Hợp chất thiên nhiên – Viện KH & CN Việt Nam  
vào hồi        giờ        ngày        tháng        năm 2010

Có thể tìm đọc luận án tại :

- Thư viện quốc gia
- Thư viện Viện Hoá học các Hợp chất thiên nhiên , Viện Khoa học và công nghệ Việt Nam

**DANH MỤC CÔNG TRÌNH ĐÃ CÔNG BỐ  
TRONG KHUÔN KHỔ LUẬN ÁN**

1.	Đoàn Lan Phương, Phạm Quốc Long, Bertrand Mathaus, (2009), “Chemical and Biological Studies of Seed of Vietnames Citrus Plant”, <i>Traditional and Alternative Medicine Research &amp; Policy Perspectives</i> , DAYA publishing House, ISBN 978-81-7035-614-1, pp.270-280.
2.	Đoàn Lan Phương, Phạm Quốc Long, Lành Thị Ngọc, Bertrand Matthaus, (2007), “Nghiên cứu đa biến về mối tương quan giữa tocopherol và thành phần axit béo trong dầu thực vật”, <i>Tạp chí khoa học và công nghệ</i> , tập 45, số 1B, trang 252-258.
3.	Đoàn Lan Phương, Phạm Quốc Long, Bertrand Matthaus and Klaus Vosmann, (2006), “Epoxy Acids in Vietnamese Seed Oil: <i>Hibiscus Sabadariffa</i> Lin. and <i>Chrysanthemum Coronarium</i> L.”, <i>International Symposium on Herbal Medicines, Phytopharmaceuticals &amp; other Natural Products</i> , Printed by Tharanjee Prints- 2804773, ISBN: 955-9244-30-2, pp. 238-245.
4.	Đoàn Lan Phương, Lưu Văn Huyền, Phạm Quốc Long, Bertrand Matthaus, (2005), “Các axit béo trong phân loại thực vật học”, <i>Tạp chí khoa học và công nghệ</i> , tập 43, số 5, tr.101-109.
5.	Phạm Quốc Long, Đoàn Lan Phương, Bertrand Matthaus, Klaus Vosmann, (2004), “Lipid composition and their relationship in oilseeds of Vietnam”, <i>Advances in Natural Sciences</i> , Vol.5, No.2, pp.151-164

# I. GIỚI THIỆU LUẬN ÁN

## 1. Đặt vấn đề

Nước ta thuộc khu vực nhiệt đới gió mùa, nóng và ẩm nên hệ thực vật rất phong phú và đa dạng cả về số lượng cũng như chất lượng. Trong số 10400 loài thực vật bậc cao đã được phát hiện có khoảng 564 loài là các cây có dầu. Chúng có một vai trò quan trọng trong tài nguyên thực vật nước ta và cuộc sống cộng đồng, không chỉ là nguyên liệu thiết yếu cho công nghiệp chế biến và xuất khẩu mà nhiều dầu hạt thực vật còn được sử dụng trong dân gian như các bài thuốc cổ truyền để điều trị các bệnh viêm nhiễm, chống lão hoá và một số căn bệnh hiểm nghèo. Trong khi một số dầu hạt thực vật chủ lực đã được nhà nước đầu tư áp dụng những công nghệ tiên tiến để sản xuất thì những nghiên cứu chuyên sâu khoa học và có hệ thống về lipit và các axit béo từ thiên nhiên ở nước ta gần như còn bỏ ngỏ. Từ những năm 1980 đã có một số thống kê số liệu của hơn 500 loài thực vật có dầu, trong đó phổ biến là 51 loài. Tuy nhiên các số liệu còn chưa được tập trung và do điều kiện về máy móc phân tích nên việc nghiên cứu thành phần, hàm lượng của các tocopherol và axit béo có hoạt tính sinh học vẫn chưa được quan tâm đến. Hiện nay các nghiên cứu liên quan đến chất béo ngày càng phát triển, lan rộng về cả đối tượng và các lĩnh vực nghiên cứu liên quan. Tại Mỹ và Đức đã xây dựng cơ sở dữ liệu trên mạng cho các thành phần dầu từ những loài hạt thực vật khác nhau và các số liệu này liên tục được cập nhật hàng năm. Tuy nhiên, cho đến nay hầu như chưa có một số liệu nào về thành phần dầu các hạt thực vật Việt Nam. Đề tài “*Nghiên cứu hoá học và hoạt tính sinh học một số dẫn xuất tocopherol và axit béo có nguồn gốc từ thiên nhiên*” nhằm góp phần bổ sung vào cơ sở dữ liệu mạng Quốc tế về thành phần dầu hạt thực vật Việt Nam và đưa ra các thông tin lý giải về những tác dụng chữa bệnh của chúng trong y học dân gian, định hướng sử dụng chúng.

## 2. Đối tượng nghiên cứu và nhiệm vụ của luận án.

Đối tượng nghiên cứu: 28 loài thực vật có hạt ở Việt Nam thuộc 5 họ: Brassicaceae, Cucurbitaceae, Sapindaceae, Rutaceae và Malvaceae.

Nhiệm vụ của luận án :

- Xác định hàm lượng và thành phần lipit, axit béo và dẫn xuất tocopherol có trong dầu hạt của 28 loài thực vật Việt Nam thuộc 5 họ: Brassicaceae, Cucurbitaceae, Sapindaceae, Rutaceae và Malvaceae. Phân tích, nhận dạng và chứng minh một số axit béo có cấu trúc đặc biệt.

- Khảo sát mối quan hệ giữa các axit béo và các dẫn xuất tocopherol trong dầu hạt thực vật Việt Nam.

- Phân lập, tinh chế và xác định cấu trúc axit béo có hoạt tính. Tạo chế phẩm từ axit

béo có hoạt tính; đánh giá độ an toàn và thăm dò một số tác dụng sinh học của chế phẩm đó trên động vật thực nghiệm (*in vivo*).

### 3. Những đóng góp mới và ý nghĩa thực tiễn của luận án

3.1. Lần đầu tiên nghiên cứu hệ thống về thành phần, hàm lượng tocopherol và các axit béo trong 28 loài cây có dầu, thuộc 5 họ thực vật: họ Cải (Brassicaceae), Bí (Cucurbitaceae), Bồ hòn (Sapindaceae), Cam (Rutaceae) và họ Bông (Malvaceae). Các axit sterculic, malvalic, vernolic và axit coronanic lần đầu tiên được tìm thấy ở hạt cây dâm bụt giấm *Hibiscus sabdraffi* L. Việt Nam.

3.2. Lần đầu tiên sử dụng phương pháp phân tích thành phần chính (PCA) để chứng minh được: mối tương quan di truyền giữa axit béo C18:3 với  $\gamma$ -tocopherol, axit C18:2 với  $\alpha$ -tocopherol, có thể khẳng định hạt thực vật có hàm lượng PUFA cao thì hoạt tính chống oxy hóa của chúng sẽ cao hơn các dầu hạt khác. Và dầu hạt của các cây thuộc bốn họ Cải, Cam, Bí, Bồ hòn có những axit béo đặc trưng là những "fingerprinter" C22:1 (họ cải), C16:0 và C18:3 (họ cam), C18:2 và C18:3 liên hợp (họ bí), C18:1 (họ bồ hòn). Có thể sử dụng các axit béo như các yếu tố hoá học trong phân loại thực vật (*chemotaxonomy*).

3.3. Tìm được điều kiện tối ưu cho phản ứng khử hóa axit  $\alpha$ -linolenic C18:3(9,12,15) thành các dẫn chất thiết yếu. Lần đầu tiên khảo sát hoạt tính chống oxy hóa và của dầu hạt 10 loài thực vật thuộc chi *Citrus*.

3.4. Tạo được chế phẩm OF27 từ một số axit béo đa nối đôi thiết yếu thuộc 2 họ n-6 (như GLA, ARA) và n-3 (như ALA, EPA, DHA), khảo sát độ an toàn và có tác dụng làm tăng năng lượng thần kinh, tăng sinh tổng hợp protein, tăng cường đáp ứng miễn dịch, ức chế đột biến và giảm tần suất xuất hiện khối u trên da của chế phẩm OF27. Kết quả này mở ra triển vọng ứng dụng chế phẩm OF27 như một thực phẩm chức năng trong cuộc sống.

### 4. Bố cục của luận án

Luận án gồm 149 trang với 36 bảng số liệu, 28 hình, với 153 tài liệu tham khảo và 55 trang phụ lục. Bố cục của luận án gồm: Mở đầu (2 trang), Chương 1: Tổng quan tài liệu (37 trang), Chương 2: Nguyên liệu và phương pháp nghiên cứu (9 trang), Chương 3: Thực nghiệm (19 trang), Chương 4: Kết quả và thảo luận (62 trang), Kết luận 2 trang, Danh mục các công trình đã công bố liên quan đến luận án (1 trang), Tài liệu tham khảo (17 trang).

## II. NỘI DUNG CỦA LUẬN ÁN

### MỞ ĐẦU

Phần mở đầu đề cập đến ý nghĩa khoa học, tính thực tiễn, đối tượng và mục đích nghiên cứu của luận án.

## **Chương 1. TỔNG QUAN TÀI LIỆU**

Phần này tổng hợp các tài liệu về:

- Hóa học, hoạt tính sinh học và ứng dụng của các dẫn xuất tocopherol
- Khái niệm và phân loại các axit béo, hoạt tính sinh học của các axit béo đa nối đôi và tác động của chúng vào các quá trình bệnh lý.
- Oxy hóa sinh học và tác động của các chất chống oxy hóa.

## **Chương 2. NGUYÊN LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU**

### **2.1. Nguyên liệu**

Nguyên liệu mẫu hạt thực vật của 28 loài, được TS. Trần Ngọc Ninh, Viện Sinh Thái Tài Nguyên giám định tên khoa học và lưu giữ tiêu bản tại Viện Hóa học các Hợp chất thiên nhiên.

### **2.2. Phương pháp chiết xuất và phân tích lipid, tocopherol và axit béo**

Theo tiêu chuẩn ISO, sử dụng thiết bị phân tích sắc ký lỏng cao áp (HPLC) và sắc ký khí (GC).

### **2.3. Phương pháp phân lập các axit béo**

Sử dụng các phương pháp sắc ký lớp mỏng, sắc ký cột thường và cột pha đảo. Thiết bị ghi phổ  $^1\text{H}$  và  $^{13}\text{C}$ -NMR: của máy Bruker 500MHz AVANCE, chuẩn nội TMS, dung môi  $\text{CDCl}_3$ .

### **2.4. Phương pháp nhận dạng cấu trúc các axit béo**

Được xác định dựa trên việc phân tích các số liệu phổ khối lượng, phổ cộng hưởng từ hạt nhân 1 chiều, 2 chiều và so sánh với các kết quả đã được công bố.

### **2.5. Phương pháp sử dụng thành phần axit béo trong *chemotaxonomy* và khảo sát mối tương quan giữa chúng với tocopherol**

Sử dụng phương pháp PCA (phân tích thành phần chủ yếu).

### **2.6. Phương pháp nghiên cứu điều kiện tối ưu cho phản ứng khử hóa nối đôi của axit C18:3 $\Delta$ 9,12,15**

Sử dụng mô hình toán qui hoạch thực nghiệm trực giao bậc 2.

### **2.7. Các phương pháp nghiên cứu hoạt tính sinh học**

- Hoạt tính chống oxy hóa *in vitro* trên hệ DPPH.
- Phương pháp xác định độc tính cấp, bán cấp và tác dụng của chế phẩm OF27 tăng năng lực tâm thần kinh trên thần kinh trung ương, đến quá trình tổng hợp protein trên động vật, tăng hệ miễn dịch, làm giảm tần suất xuất hiện khối u trên da.

Các thí nghiệm được lý được thực hiện ở Học Viện Quân Y, theo quy định của WHO, Bộ Y tế về hiệu lực và an toàn thuốc trong nghiên cứu thuốc y học cổ truyền dân tộc.

### Chương 3. THỰC NGHIỆM

#### 3.1. Khảo sát hàm lượng dầu béo và thành phần tocopherol

Trình bày cụ thể phương pháp khảo sát và các số liệu khảo sát hàm lượng dầu béo, thành phần và hàm lượng tocopherol.

#### 3.2. Khảo sát thành phần- hàm lượng các axit béo trong dầu hạt thực vật

Trình bày cụ thể phương pháp và các số liệu khảo sát thành phần- hàm lượng các axit béo trong dầu hạt thực vật.

#### 3.3. Nhận dạng một số axit béo có cấu trúc đặc biệt trong dầu hạt *Hibiscus saldariffa* L.

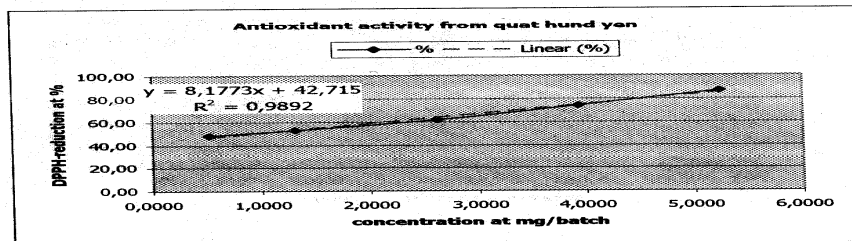
- Các axit cyclopropanoic (CPEFA) được nhận dạng sau khi dầu béo hạt *Hibiscus saldariffa* L. ở dạng methyl este đã phản ứng với  $\text{AgNO}_3/\text{MeOH}$  đem phân tích trên thiết bị GC. Kết quả thu được so sánh với chất chuẩn và phổ GC của CPEFA trước khi phản ứng với  $\text{AgNO}_3/\text{MeOH}$ .

- Các axit epoxy được nhận dạng trên GC bằng phản ứng methyl hóa trong môi trường  $\text{HCl}/\text{MeOH}$ . Kết quả thu được so sánh với chất chuẩn và phổ GC của các methyl ester các axit béo oxy mạch vòng trước khi phản ứng với  $\text{HCl}/\text{MeOH}$ .

#### 3.4. Khảo sát hoạt tính chống oxy hóa *in vitro* trong hệ DPPH của các dầu hạt thực vật thuộc chi *Citrus*.

Nêu cụ thể cách tiến hành và các số liệu đo được sau khi khảo sát hoạt tính chống oxy hóa *in vitro* trong hệ DPPH của các dầu hạt thực vật thuộc chi *Citrus* (hình 3.1).

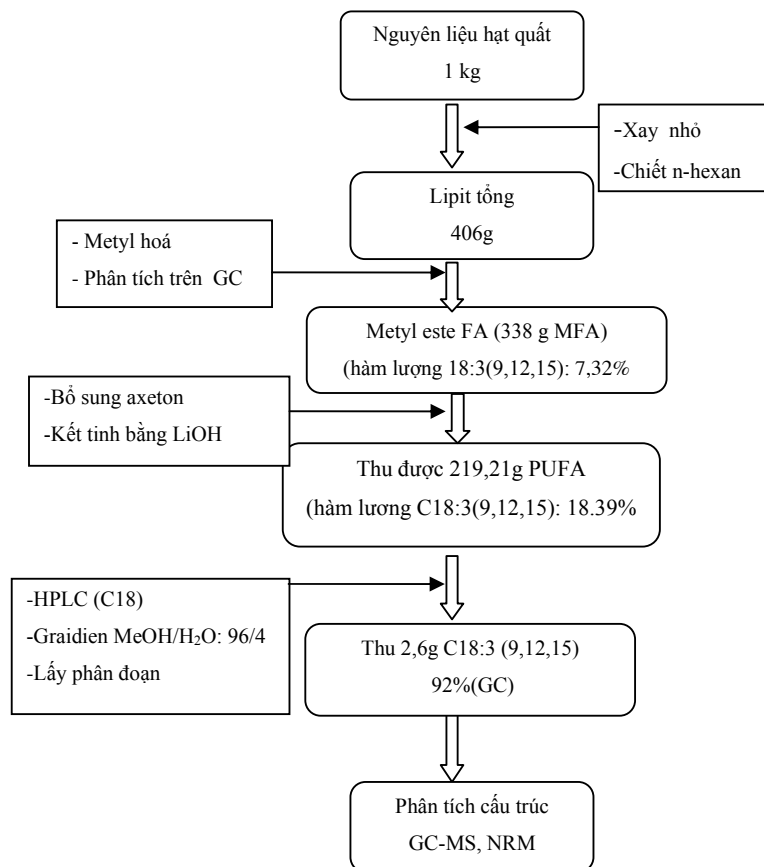
Sample 3		quat hung yen			
mg Extrakt at		1049			
ml H <sub>2</sub> O/Methanol 4/6		20			
delution series					
ml/measuring batch	absorption	mg/batch	µg DPPH /measuring batch	%	50% Wert
100	0,183	5,2450	35,1923	87,03	0,89
75	0,361	3,9338	69,4231	74,42	
50	0,538	2,6225	103,4615	61,87	
25	0,663	1,3113	127,5000	53,01	
10	0,723	0,5245	139,0385	48,76	



Hình 3.1: Đồ thị biểu diễn hoạt tính chống oxy hóa dịch chiết methanol của mẫu dầu quất ở các nồng độ khác nhau

#### 3.5. Phân lập và nhận dạng axit C18:3Δ<sup>9,12,15</sup> từ dầu hạt *Citrus japonica* Thunb.

Miêu tả quá trình phân lập axit C18:3 $\Delta$ 9,12,15 từ dầu hạt *Citrus japonica* Thunb. theo sơ đồ trình bày ở hình 3.2 và các số liệu phổ thực nghiệm.



**Hình 3.2:** Sơ đồ phân lập axit C18:3  $\Delta$ 9,12,15 từ dầu hạt quýt *Citrus Japonica* Thunb.

### 3.6. Phản ứng khử hóa nối đôi của axit C18:3 $\Delta$ 9,12,15

Cách tiến hành và số liệu phản ứng khử hóa nối đôi axit C18:3 $\Delta$ 9,12,15.

### 3.7. Phương pháp nghiên cứu chế phẩm OF27

Phần này trình bày cụ thể cách tạo chế phẩm OF27, nghiên cứu độ an toàn và tác dụng sinh học của chế phẩm OF27 trên động vật thực nghiệm (quá trình sinh tổng hợp protein, tăng năng lực tâm thần kinh, tăng đáp ứng miễn dịch, ức chế sự hình thành khối u)

## Chương 4. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

### 4.1. Khảo sát hàm lượng dầu béo và thành phần tocopherol

Kết quả phân tích cho thấy hàm lượng dầu béo trong các hạt họ Brassicaceae, Cucurbitaceae và Rutaceae tương đối đồng đều và khá cao, trung bình trên 35% trong khi ở họ Sapindaceae lại có sự khác nhau rõ rệt giữa các loài: *Litchi chinensis* Sonn: 1.4%, *Dimocarpus longan* Lour 4.9%, *Aesculus sinensis* Hort 18.3% và ở ba loài còn lại trên 30%. Nhóm chất hay được sử dụng như những chất chống oxy hóa tự nhiên đó là tocopherol có mặt trong 28 dầu hạt với hàm lượng tocols tổng thay đổi trong khoảng rộng từ



2,56mg/100g đến 936,1mg/100g và tồn tại chủ yếu dưới hai dạng  $\alpha$ -tocopherol,  $\gamma$ -tocopherol (bảng 4.2). Hàm lượng tocols tổng ở các loài thuộc họ Spindaceae cũng có sự khác biệt khá lớn như ở hạt vả *Litchi chinensis* cao nhất: 936,1mg/100g, tiếp theo là mắc kẹn *Aesculus sinensis*: 141,1mg/100g, ngược lại trong hạt chôm chôm *Nephelium lappaceum* chỉ có 2.56mg/100g và trong hạt mác rạc *Delavaya toxocarpa* là: 3.4mg/100g. Dạng  $\alpha$ -tocopherol chiếm ưu thế (90% so với dạng tocols tổng) trong dầu hạt thuộc chi *Citrus*. Sự đa dạng và khác biệt về hàm lượng các tocopherol và tocotrienol có trong dầu béo giữa các mẫu hạt thực vật Việt nam thể hiện ở dầu hạt quýt Sài Gòn *Citrus nobilis* var. *microcarpa* Hassk và quýt Thái Lan *Citrus nobinis* var. *chryoscarpa* Lamk dạng  $\gamma$ -tocopherol không xuất hiện thay vào đó chủ yếu là dạng  $\alpha$ -tocopherol và  $\alpha$ -tocotrienol. Dạng  $\gamma$ -tocopherol có mặt ở các loài thuộc họ Brassicaceae nhiều nhất (từ 24,0mg/100g đến 51,6mg/100g), các họ còn lại dưới 10mg/100g. Trong dầu hạt mướp đắng *Momordica charantia* cả hai dạng  $\alpha$ -tocopherol và  $\gamma$ -tocopherol cùng có mặt với hàm lượng cao: 39,8mg/100g và 49,2mg/g. Hàm lượng dầu béo ở hạt vả *L.chinensis* thấp nhưng hàm lượng tocols cao (276,8mg/100g) với thành phần khá phong phú:  $\alpha$ -tocopherol: 34,5mg/100g;  $\alpha$ -tocotrienol: 21,3mg/100g;  $\gamma$ -tocopherol: 8,8mg /100g và  $\gamma$ -tocotrienol: 19,7mg/100g. Đặc biệt dạng  $\delta$ -tocotrienol chỉ thấy trong dầu hạt vả với hàm lượng lớn: 181,5mg/100g; dạng  $\delta$ -tocopherol ở hạt dưa chuột leo *Cucumis sativus*: 91,3mg/100g.

#### 4.2. Khảo sát thành phần và hàm lượng axit béo

Ngoài những axit béo phổ biến thường gặp như: axit béo no (axit palmitic C16:0, axit stearic C18:0), axit béo không no (axit oleic C18:1, axit linoneic C18:2), một số dạng axit béo bất thường như: axit béo đa nối đôi liên hợp C18:3, axit cyclopropenoic, axit epoxy được tìm trong 5 loài (bảng 4.2).

Đã phát hiện sự khác thường trong thành phần 28 dầu hạt là sự có mặt của axit arachidic (20:0) trong hạt chôm chôm *Nephelium lappaceum* với hàm lượng lớn 33,24%, còn trong các dầu hạt khác axit này có mặt trong khoảng từ 0,07 đến 9,65%, đa phần dưới 1%. Hàm lượng axit palmitic trong khoảng từ 2,0% (*Brassica chinensis*) đến 29,21% (*Citrus grandis*), cao nhất trong chi *Citrus*. Axit stearic có mặt trung bình trên 20% trong dầu hạt họ Cucurbitaceae, trong khi ở bốn họ còn lại là dưới 2%. Tổng số axit béo không no có giá trị cao trong hai họ Brassicaceae và Rutaceae trên 70%. Chỉ có 6 loài hạt trong họ Brassicaceae mới có hàm lượng tổng số axit béo no thấp dưới 10%. Axit béo đa nối đôi liên hợp C18:3(9c,11t,13t) có lượng lớn ở dầu hạt mướp đắng *Momordica charantia* (60,60%) và dầu hạt gấc *Momordica conchinchinensis* (58,61%) thuộc họ Cucurbitaceae. Axit oleic 18:1 thấp (3,72%-7,92%) trong hạt mướp đắng, gấc, song ở các hạt còn lại có hàm lượng

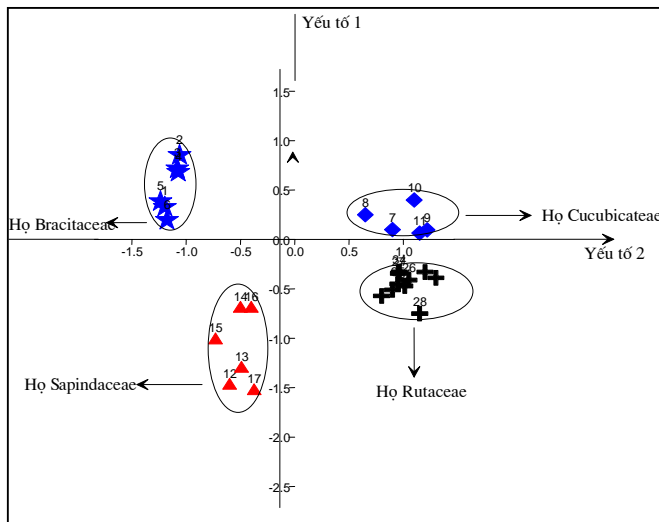
khá cao (16,36%-52,39%) chẳng hạt trong hạt bồ hòn (52,39%). Axit gadoleic C20:1 có mặt lượng lớn ở hạt hai loài: hạt óc chó (20,57%), hạt bồ hòn (37,49%), ở sáu loài thuộc họ Brassicaceae có lượng trung bình (8%) và ở hai mươi loài còn lại chứa hàm lượng  $\leq 1\%$ .

Tổng hợp số liệu phân tích thành phần axit béo của 28 loại hạt thực vật Việt nam cho biết hàm lượng axit béo no cao từ 46,98-51,31% thuộc về các hạt: nhãn, vải, chôm chôm. Mẫu hạt có hàm lượng axit béo một nối đôi chiếm từ 73,93%-77,55% là các hạt óc chó và bồ hòn. Các mẫu hạt gấc, mướp đắng và 10 loài hạt của chi *Citrus* có hàm lượng axit béo đa nối đôi cao nhất tới 65,61-77,89%, trong khi ở các mẫu hạt khác chỉ khoảng 3,19% - 21,13%. Việc có mặt các axit béo không no với hàm lượng cao đã nói lên giá trị hoạt tính sinh học của dầu nhân các loại hạt này đặc biệt là trong Y, dược và công nghiệp thực phẩm, đó chính là các axit béo đa nối đôi có hoạt tính sinh học và là giá trị đặc dụng của dầu béo loại hạt này.

### 4.3. Ứng dụng axit béo trong chemotaxonomy

#### 4.3.1. Sử dụng phương pháp phân tích thành phần chính (PCA):

Trong phân loại thực vật học người ta thường sử dụng nhiều dấu hiệu khác nhau như hình thái sinh lí- sinh hoá, sinh thái tập tính học và địa lí học để bổ sung hỗ trợ cho nhau. Ở Việt Nam, việc sử dụng thành phần các axit béo có mặt trong dầu hạt thực vật như các yếu tố hoá học để giúp cho phân loại thực vật (*chemotaxonomy*) hầu như chưa có tài liệu nào được công bố. Phương pháp phân tích thành phần chính (Principal component analysis-PCA) để xử lý hồi quy đa biến trong đó các biến có quan hệ tuyến tính với nhau trong các thành phần chính PC<sub>n</sub> (n- số thành phần chính được vận dụng vào các số liệu thành phần, hàm lượng giữa các axit béo của 27 mẫu dầu của 4 họ thực vật (hình 4.1). Trong đó những nhóm



khác biệt được phân biệt rõ ràng thông qua các vùng phân bố trên bản PCA. Các nhóm tương ứng với các số thứ tự của mẫu trên bảng 4.2 như nhóm: (a) các mẫu 1, 2, 3, 4, 5, 6 (màu xanh dương), (b) các mẫu 7, 8, 9, 10, 11 (màu xanh lá cây), (c) các mẫu 12, 13, 14, 15, 16, 17 (màu đỏ), (d) các mẫu 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27 (màu đen). Trên giản đồ các loài thuộc cùng một họ tập trung giạt về một phía, có sự phân bố khác nhau rõ ràng.

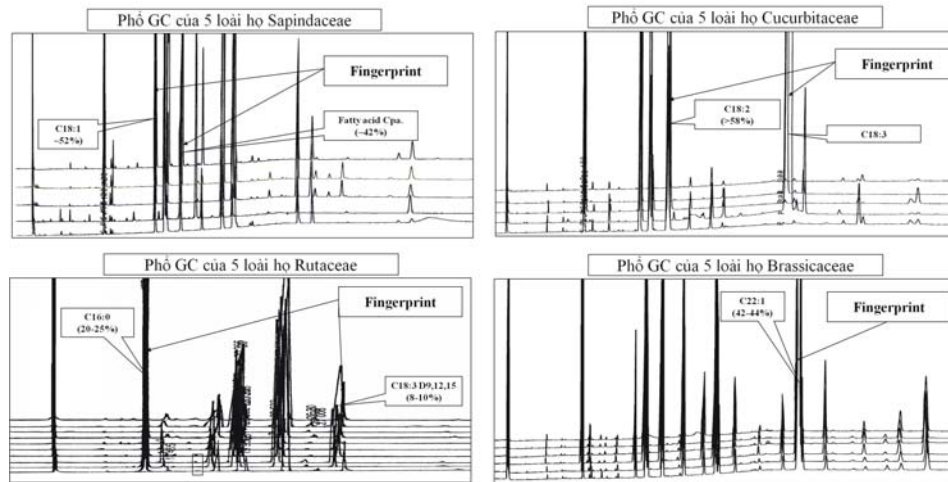
**Hình 4.1:** Giản đồ PCA (PC1-PC2) với số liệu đầu vào 10 thành phần axit béo của 27 mẫu hạt thực vật.

### 4.3.2. Các axit béo có vai trò như fingerprint

Ngày nay với sự phát triển không ngừng của khoa học và kỹ thuật, có rất nhiều phương pháp và công cụ để nghiên cứu các thành phần hóa học có mặt trong thảo dược, để đánh giá và quản lý chất lượng của thảo dược. Tuy nhiên trong thảo dược tồn tại rất nhiều hợp chất, nhiều hợp chất chỉ tồn tại với hàm lượng rất thấp, đôi khi không bền, dạng đồng phân, dễ bị phân hủy ngay được khi phân lập. Do đó việc sử dụng phương pháp phân lập thông thường rất gặp nhiều khó khăn trong việc đánh giá và kiểm soát thành phần của thảo dược. Trong điều kiện đó một phương pháp đang được phát triển và ứng dụng đó phương pháp sắc ký fingerprint, phương pháp này kết hợp với các phương pháp phân lập, xác định cấu trúc và hoạt tính đang được ứng dụng nhiều trong việc đánh giá, kiểm soát chất lượng dược liệu. Sự ra đời của phương pháp sắc ký fingerprint đã giúp cho việc xác định định tính và định lượng chất lượng các thảo dược nhanh chóng và độ chính xác đáng tin cậy. Trong thảo dược cũng tồn tại nhiều thành phần, trong đó có thành phần rất dễ bay hơi. Các thành phần dễ bay hơi này có những đặc trưng riêng biệt của từng loại thảo dược, chính những tính riêng biệt này tạo lợi thế cho việc xây dựng sắc ký fingerprint của các thảo dược theo phương pháp sắc ký khí. Một ví dụ điển hình của việc áp dụng sắc ký fingerprint trên hệ sắc ký khí là phân tích các dạng dầu béo trên hệ sắc ký khí. Kết quả phân tích này cũng cho ra một dạng thích hợp sắc ký fingerprint, dạng fingerprint này có thể được sử dụng để nhận dạng thảo dược. Sắc ký fingerprint đối với dầu béo dựa trên sự dịch chuyển thời gian lưu của các peak trên các sắc đồ và xác định với sắc đồ mẫu chất chuẩn để đánh giá các mẫu khác. Ngoài các axit béo thông thường trong dầu hạt thực vật còn có mặt một số axit béo có cấu trúc đặc biệt như C18:3, C20:1, C20:2, axit C20:3, C22: 2 đó là những yếu tố khác biệt đặc trưng giữa các chi, họ, ngành. Kết quả đã chỉ ra sự khác biệt ở 27 đối tượng nghiên cứu. Sự có mặt của axit erucic 22:1(n-9) trong dầu hạt họ Brassicaceae được chỉ ra nằm trong khoảng từ 35,69% (hạt cải củ *Raphanus sativus*) tới 44,20% (hạt cải ngọt *Brassica chinensis*). Rất hiếm khi axit erucic có mặt với hàm lượng lớn trong họ khác, thậm chí ở một số loài không có mặt, vì vậy axit này được coi như đặc điểm nhận dạng (*fingerprint*) để phân loại dựa trên thành phần hóa học (*chemotaxonomy*) của các loài thuộc họ Brassicaceae. Có thể xem những axit béo này giữ vai trò như *fingerprint* sử dụng trong *chemotaxonomy* (bảng 4.1, hình 4.2).

**Bảng 4.1:** Các axit béo như fingerprint trong họ Brassicaceae, Sapindaceae, Cucurbitaceae, Rutaceae

<i>Fingerprint</i>	16:0	18:1	18:2	18:3conj.	18:3n-3	22:1
Spindaceae		X				
Cucurbitaceae			X	X		
Brassicaceae						X
Rutaceae	X				X	



Hình 4.2: Các axit béo như fingerprint trong họ Brassicaceae, Sapindaceae, Cucurbitaceae, Rutaceae

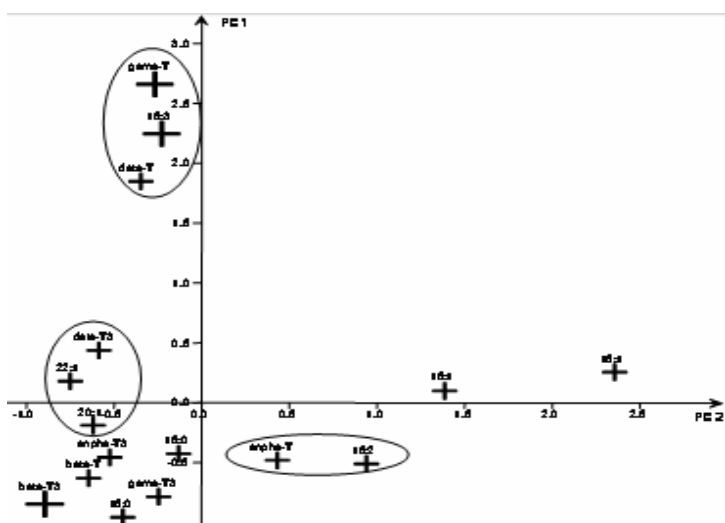
#### 4.4. Quan hệ giữa axit béo và tocopherol

Sử dụng phương pháp toán học để phân tích dữ liệu thành phần so sánh các FA 16:0, 16:1(n-7), 18:0, 18:1(n-9), 18:2(n-6), 18:3(n-3), 20:1(n-9), 22:1(n-9) và hàm lượng của các tocopherol-tocotrienol:  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$  ở 27 mẫu dầu của bốn họ thực vật khác nhau (bảng 4.2).

Bảng 4.2: Thành phần - hàm lượng axit béo và tocopherol của 4 họ hạt đem phân tích PCA

TT	Tên mẫu hạt	AXIT BÉO								TOCOPHEROL							
		16:0	16:1	18:0	18:1	18:2	18:3	20:1	22:1	$\alpha T$	$\alpha T_3$	$\beta T$	$\gamma T$	$\beta T_3$	$\gamma T_3$	$\sigma T$	$\sigma T_3$
<b>Họ Brassicaceae</b>																	
1	<i>Raphanus sativus</i>	4.51	0.17	1.75	17.0	13.9	<b>8.7</b>	9.41	35.7	-	-	-	<b>51.6</b>	-	0.3	2.1	-
2	<i>Brassica campestris</i>	3.10	0.25	0.77	6.22	16.7	<b>10.8</b>	4.96	44.1	11.4	0.5	-	<b>44.5</b>	-	-	0.8	-
3	<i>Brassica sp.</i>	2.56	0.22	0.97	7.43	16.4	<b>11.0</b>	5.54	43.3	9.1	0.2	-	<b>36.3</b>	-	-	0.7	-
4	<i>Brassica juncea</i>	2.34	0.20	0.97	7.77	16.0	<b>11.8</b>	5.71	43.3	12.2	0.2	-	<b>31.0</b>	-	-	0.5	-
5	<i>Brassica chinensis</i>	1.99	0.16	1.22	18.1	11.7	<b>7.13</b>	7.24	44.2	14.0	0.1	-	<b>41.5</b>	-	-	1.1	-
6	<i>Brassica oleraceae</i>	3.64	0.15	0.74	16.6	11.9	<b>8.16</b>	9.08	42.1	13.0	0.2	0.1	<b>24.0</b>	-	-	0.8	-
<b>Họ Cucurbitaceae</b>																	
7	<i>Luffa cylindrica</i>	14	0.11	7.18	33.1	<b>42.9</b>	0.19	0.09	-	<b>32.0</b>	-	0.3	0.9	-	-	0.2	-
8	<i>Momordica bilaraotia</i>	2.10	-	26_3_72	4.94	0.07	0.07	-	39.8	-	0.1	49.2	-	3.0	-	-	-
9	<i>Cucurbita pepo</i>	17.7	0.06	7.98	15.5	<b>56.2</b>	0.23	0.09	-	<b>28.5</b>	-	-	1.2	0.9	0.5	0.4	-
10	<i>Momordica cochinchinensis</i>	2.05	-	18.0	7.92	10.5	0.24	0.25	-	17.6	-	0.3	9.3	-	-	0.2	-
11	<i>Cucumis sativus</i>	13.6	0.11	10.4	18.0	<b>54.3</b>	0.37	0.07	-	<b>17.5</b>	7.3	0.4	0.4	-	-	91.3	-
<b>Họ Sapindaceae</b>																	
12	<i>Delavaya toxocarpa</i>	4.20	0.05	2.12	39.1	2.72	0.62	37.5	0.91	0.2	2.9	-	0.1	0.2	-	-	-
13	<i>Dimocarpus longan</i>	12.1	0.18	8.04	36.9	8.40	2.65	1.90	-	13.9	0.2	0.2	9.2	-	-	0.3	-
14	<i>Litchi chinensis</i>	8.36	0.09	3.70	23.8	6.60	4.31	0.77	-	34.5	92.5	6.4	10.5	-	12.7	12.1	767.5
15	<i>Nephelium lappaceum</i>	4.12	0.34	5.16	36.2	2.99	0.20	8.24	1.06	0.7	0.7	-	0.4	-	0.4	0.4	-
16	<i>Sapindus mukorossi</i>	5.27	0.22	1.39	52.4	8.35	1.37	20.6	0.75	6.6	-	-	20.8	-	3.1	2.6	-

17	<i>Aesculus sinensis</i>	12.6	2.66	1.58	30.0	16.1	23.3	0.26	0.35	19.5	9.7	-	8.8	-	62.6	-	33.6
<b>Họ Rutaceae</b>																	
18	<i>Citrus nobilis</i> var. <i>microcarpa</i> Hassk	22.6	0.69	4.79	23.8	<b>42.50</b>	<b>4.37</b>	-	-	<b>11.6</b>	13.9	-	-	0.92	-	-	-
19	<i>Citrus nobilis</i> var. <i>chrysocarpa</i> Lamk	21.0	0.72	5.12	22.9	<b>44.9</b>	<b>5.33</b>	-	-	<b>24.57</b>	0.37					0.17	
20	<i>Citrus japonica</i> Thunb.	20.7	3.25	4.46	28.2	<b>33.9</b>	<b>8.60</b>	0.03	-	<b>18.95</b>	0.13		<b>1.84</b>			0.16	
21	<i>Citrus grandis</i> (L.) Osb var. <i>eradis</i>	27.7	0.70	3.62	27.8	<b>36.7</b>	<b>4.21</b>	-	-	<b>14.58</b>	0.37	0.05	<b>2.21</b>	0.19	0.56		
22	<i>Citrus grandis</i> (L.) Osbeck	29.0	0.40	3.62	22.6	<b>38.2</b>	<b>4.88</b>	0.02	-	<b>23.78</b>	0.24		<b>1.29</b>			0.30	
23	<i>Citrus grandis</i>	29.9	0.49	2.31	23.6	<b>37.6</b>	<b>5.07</b>	0.02	-	<b>14.02</b>	0.11		<b>0.66</b>				
24	<i>Citrus nobilis</i> Lour. var. <i>nobilis</i>	27.2	0.55	4.81	20.9	<b>41.5</b>	<b>3.70</b>	0.02	-	<b>26.84</b>	0.33		<b>0.55</b>			0.34	
25	<i>Citrus sinensis</i> (L.) Osb.	26.3	0.85	4.82	22.7	<b>39.7</b>	<b>4.43</b>	0.03	-	<b>18.73</b>	0.38		<b>0.38</b>	0.50			
26	<i>Citrus aurantifolia</i> (Christm &	22.5	0.84	3.74	23.4	<b>43.6</b>	<b>4.61</b>	0.03	-	<b>20.58</b>	0.60		<b>2.37</b>			1.41	
27	<i>Citrus limonia</i> Osb.	23.0	0.81	4.08	21.1	<b>43.4</b>	<b>6.05</b>	0.02	-	<b>14.69</b>	0.29		<b>0.11</b>			0.51	



Bằng phương pháp phân tích thành phần chính và thoái chuyển tuyến tính chỉ ra những khác biệt đáng kể về thành phần các axit béo và tocopherol. PCA được vận dụng nhằm tìm ra mối tương quan giữa các tocopherol và các FA ở các dầu thực vật khác nhau, mối quan hệ hóa học và hóa sinh trong hạt thực vật.

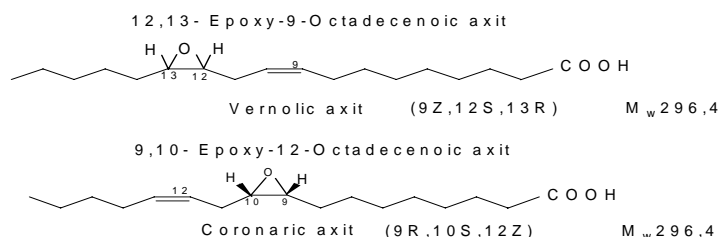
**Hình 4.3:** Mối tương quan giữa axit béo và tocopherol của 4 họ thực vật Việt Nam

Kết quả cho biết có mối tương quan âm tính giữa các  $\alpha$ -tocopherol và  $\gamma$ -tocopherol; mối tương quan dương tính giữa axit linolenic C18:2 với  $\alpha$ -tocopherol, axit C18:3 và  $\gamma$ -tocopherol (hình 4.3). Khi biết các axit linoleic(18:2) và axit linolenic (18:3) có hàm lượng cao trong dầu béo thì có thể suy đoán hàm lượng  $\alpha$ -tocopherol và tocopherol  $\gamma$  cũng sẽ có mặt với hàm lượng lớn trong dầu béo đó.

#### 4.5. Nhận dạng một số axit béo có cấu trúc đặc biệt trong dầu hạt *Hibiscus sabdariffa* L.

Các CPEFA được nhận dạng dưới dạng methyl este sau khi tham gia phản ứng với  $\text{AgNO}_3/\text{MeOH}$  kết hợp với phương pháp GC-MS. Kết quả đã xác định hàm lượng malvalic 18:CE và sterculic 19:CE trong dầu hạt *Hibiscus sabdariffa* L. là 1,33g/100g và 1,29g/100g. Thành phần axit epoxy được phân tích bằng phản ứng mở vòng epoxy của các

dẫn xuất metyl este trong môi trường axit kết hợp phương pháp GC-MS. Đã xác định được hàm lượng các axit vernolic và coronaric là 2,73g/100g .



#### 4.6. Khảo sát hoạt tính chống oxy hóa *in vitro* và thành phần axit đa nối đôi 18:3 của dầu hạt thuộc chi *Citrus*

##### 4.6.1. Đánh giá hoạt tính chống oxy hoá *in vitro* trong hệ DPPH của dịch chiết metanol từ hạt các loài thuộc chi *Citrus*

Đánh giá thông qua giá trị hấp thụ ánh sáng của dịch chiết metanol tổng các mẫu hạt. Các mẫu có giá trị: SC  $\geq$ 50% được coi là có dương tính để tiến hành các bước nghiên cứu tiếp theo. Số liệu phân tích ở bảng 4.3 cho thấy trong các đối tượng nghiên cứu 4 mẫu có hoạt tính chống oxy hoá ở các nồng độ khác nhau, đặc biệt mẫu số 3 (quất Hưng Yên *Citrus japonica* Thunb.) có giá trị SC% và axit C18:3 $\Delta$ 9,12,15 cao nhất (8,59%), vì vậy đây sẽ là đối tượng được tập trung nghiên cứu sâu trong giai đoạn tiếp theo. Tiếp đó là phân lập và tinh chế axit C18:3 $\Delta$ 9,12,15 từ dầu hạt quất *Citrus japonica* Thunb.

**Bảng 4.3:** Kết quả thử hoạt tính chống oxy hoá của các dịch chiết methanol chi *Citrus* trong hệ DPPH

Nồng độ ức chế tối thiểu (mg/l)	Giá trị SC (%)									
	Mẫu M1	Mẫu M2	Mẫu M3	Mẫu M4	Mẫu M5	Mẫu M6	Mẫu M7	Mẫu M8	Mẫu M9	Mẫu M10
100	58.89	56.91	<b>87.03</b>	45.78	60.81	46.21	44.58	33.66	24.59	43.02
75	49.68	46.85	<b>74.42</b>	40.04	55.78	39.48	35.93	26.51	22.47	36.00
50	34.94	34.02	<b>61.87</b>	34.66	45.50	33.38	28.92	20.69	22.82	22.96
25	28.07	17.65	<b>53.01</b>	27.92	33.03	20.69	21.40	13.89	21.55	20.84
10	22.89	6.09	<b>48.76</b>	24.95	24.03	18.14	18.43	14.32	20.55	16.23
<b>Kết quả</b>	<i>dương tính</i>	<i>dương tính</i>	<i>dương tính</i>	<i>âm tính</i>	<i>dương tính</i>	<i>âm tính</i>	<i>âm tính</i>	<i>âm tính</i>	<i>âm tính</i>	<i>âm tính</i>

M1: Quýt Sài Gòn, M2: Quýt Thái Lan, M3: Quất Hưng Yên, M4: Bưởi chua Hà Nội, M5: Bưởi da xanh, M6: Bưởi diều Hà Nội, M7: Cam Sài Gòn, M8: Cam Vinh, M9: Chanh Sài Gòn, M10: Chanh Vinh

#### 4.6.2. Phân lập và xác định cấu trúc axit C18: $\Delta$ 9,12,15 từ hạt quýt Hưng Yên *Citrus japonica* Thunb.

Để phân lập axit C18:3 $\Delta$ 9,12,15 đã tiến hành thực hiện phản ứng làm giàu PUFA từ dịch chiết lipid tổng theo sơ đồ ở hình 3.2. Dựa vào kết quả phân tích trên thiết bị GC đã chứng minh có sự thay đổi hàm lượng các axit béo sau phản ứng làm giàu PUFA như sau:

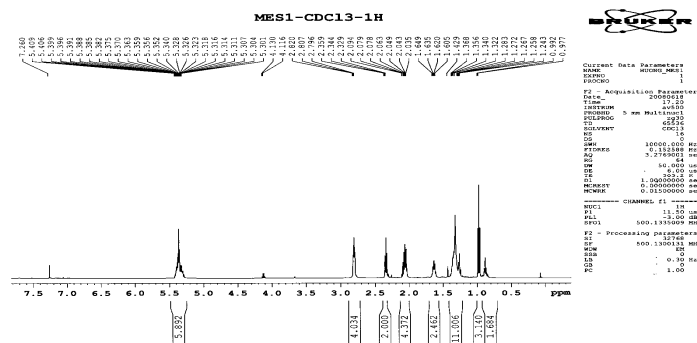
\* Hàm lượng axit no giảm: C16:0 từ 24.42% giảm xuống còn 5.01% và C18:0 từ 4.81% giảm xuống 0.62%

\* Hàm lượng axit không no tăng lên: C16:1(n-7) từ 3.26% tăng lên 4.95%, C18:1 (n-7) từ 17.82% tăng lên 21.39%, C18:1(n-9) từ 9.67% tăng lên 11,26%, C18:2(n-6) từ 32.68% lên 38.97%, riêng axit C18:3 $\Delta$ 9.12.15 tăng từ 7.32% lên 18.39%.

#### 4.6.3. Xác định cấu trúc của C18:3 $\Delta$ 9,12,15

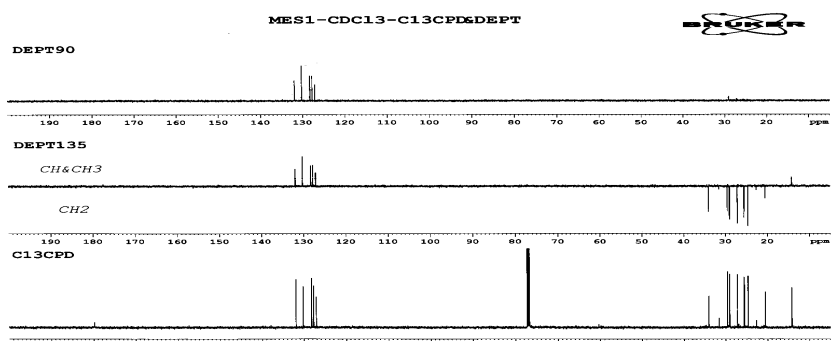
Bằng sắc ký cột trên pha đảo Rp18 dùng hệ dung môi rửa giải: MeOH/ H<sub>2</sub>O (94:6) đã phân lập được C18:3  $\Delta$ 9,12,15 (**MES1**).

Chất **MES1** thu được ở dạng dầu màu trắng. Phổ <sup>1</sup>H-NMR của MES1 xuất hiện tín hiệu của 6 duplet đặc trưng cho 6 proton olephine (-CH=) tại  $\delta$  5,32; 5,34; 5,35; 5,36; 5,37 và 5,28ppm (hình 4.4). Ngoài ra còn tín hiệu của một triplet tại  $\delta$  0,97ppm ứng với nhóm CH<sub>3</sub> đầu mạch, các tín hiệu còn lại ứng với các proton của nhóm CH<sub>2</sub> trong vùng từ 1,24 đến 2,82ppm.



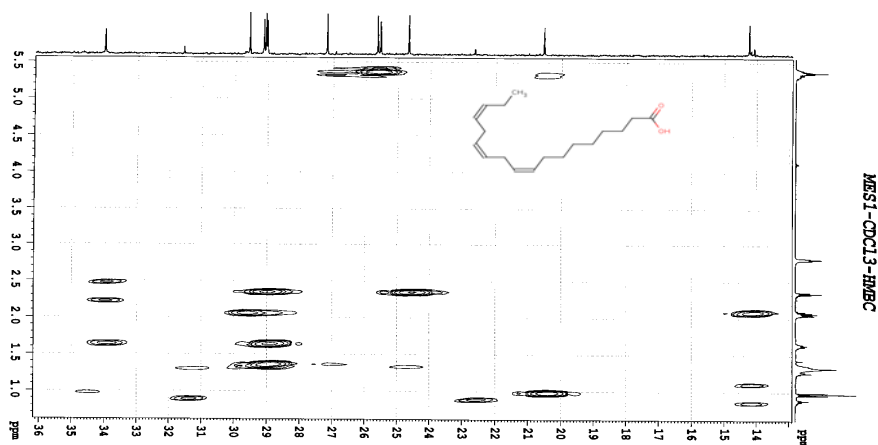
**Hình 4.4:** Phổ <sup>1</sup>H-NMR của axit C18:3 $\Delta$ 9,12,15

Các tín hiệu trên phổ <sup>13</sup>C-NMR và DEPT (hình 4.4) cho biết MES1 có tổng số 18 cacbon, gồm 1 nhóm methyl CH<sub>3</sub>, 10 nhóm metylen CH<sub>2</sub>, 6 nhóm metin CH= và 1 cacbon bậc 4 (C=O). Độ dịch chuyển hóa học giữa các proton và nguyên tử cacbon tương ứng đã được quy kết dựa vào phổ HSQC. Tín hiệu cộng hưởng tại  $\delta$  179,73 ppm đặc trưng cho nhóm C=O axit, tín hiệu của 6 nhóm metin (CH=) tại  $\delta_c$  131,96; 130,24; 128,29; 128,25; 127,77; và 127,13ppm, và tín hiệu của nhóm CH<sub>3</sub> đầu mạch tại  $\delta$  14,24ppm. Các tín hiệu còn lại nằm trong vùng 20,54 đến 34,02ppm là của 10 nhóm CH<sub>2</sub> mạch thẳng. Điều này hoàn toàn phù hợp với các tín hiệu trên phổ cộng hưởng từ <sup>1</sup>H-NMR và gợi ý cho thấy MES1 là một axit béo không no, mạch thẳng có 3 liên kết đôi trong phân tử.



**Hình 4.5:** Phổ DEP của axit C18:3Δ 9,12,15

Để xác định vị trí của các liên kết đôi trong phân tử MES1 chúng tôi đã dựa vào các tín hiệu cộng hưởng trên phổ tương tác xa HMBC. Phổ HMBC (hình 4.6) cho thấy tương tác của proton H-18 ( $\delta$  0,97ppm) với cacbon của nhóm CH<sub>2</sub> ở vị trí C-17 ( $\delta$  20,54ppm), mặt khác C-17 có tương tác với proton ở H-16 ( $\delta$  5,38ppm), điều này khẳng định nhóm CH<sub>3</sub> (ở vị trí C-18) cách nhóm CH= (ở vị trí C-16) bởi một nhóm metylen CH<sub>2</sub> (ở vị trí C-17). Ngoài ra, proton H-16 có tương tác với cacbon C-15 ( $\delta$  127,13ppm), và proton H-15 có tương tác với C-16 ( $\delta$  131,96ppm) và cacbon C-14 ( $\delta$  25,54ppm); H-14 ( $\delta$  2,08ppm) tương tác với C-13 ( $\delta$  128,29ppm). Proton H-13 ( $\delta$  5,36) lại tương tác C-12 ( $\delta$  128,25ppm); H-12 ( $\delta$  5,35ppm) lại tương tác với cacbon C-11 ( $\delta$  25,63ppm) và H-11 lại tương tác với cacbon C-10 ( $\delta$  127,77ppm), ngược lại H-10 ( $\delta$  5,34ppm) lại tương tác với cacbon C-9, C-11 và C-8. Như vậy từ các dữ liệu trên phổ HMBC đã chỉ ra chất MSE1 có 3 liên kết đôi tại C9-C10, C12-C13, C15-16 và mỗi nối đôi lại được xen kẽ nhau bởi một nhóm metylen (CH<sub>2</sub>). Trên phổ HMBC còn cho thấy có tương tác của cacbon C-1 ( $\delta$  179,83ppm) với proton H-2 ( $\delta$  2,34ppm) và H-3 ( $\delta$  1,63ppm), phân tích tiếp các số liệu phổ HMBC tương tác xa đã xác định được các nhóm CH<sub>2</sub> còn lại được liên kết với nhau tạo thành mạch dài.



**Hình 4.6:** Phổ <sup>13</sup>HMBC của axit C18:3 Δ 9,12,15

Các kết quả phân tích trên cho thấy MES1 là một axit béo không no, mạch dài gồm 18 nguyên tử các bon, có 3 liên kết đôi trong tử. Điều này hoàn toàn phù hợp với các dữ liệu



trên phổ khối và chạm electron EI-MS với pic ion phân tử xuất hiện tại  $[M]^+ = 278$ , tương ứng với công thức phân tử  $C_{18}H_{30}O_2$ . Do vậy MES1 được xác định là axit C18:3 $\Delta$ 9,12,15( $\alpha$ -linolenic). Vị trí các nối đôi cũng được khẳng định qua phản ứng khử hóa axit C18:3 $\Delta$ 9,12,15 bằng hydrazine .

#### 4.6.4. Phản ứng khử hoá nối đôi của axit C18:3 $\Delta$ 9,12,15 bằng hydrazin

Chúng tôi tiến hành phản ứng khử hóa nối đôi của axit C18:3 $\Delta$ 9,12,15 với 2 mục đích:

- Dùng phương pháp hóa học để chứng minh cấu trúc của axit C18:3(9,12,15), nếu sản phẩm sau phản ứng khử hóa nối đôi là C18:1(9), C18:1(12), C18:1(15) thì cấu trúc của chất ban đầu trước khi phản ứng sẽ là C18:3(9,12,15).

- Làm rõ cơ chế sinh tổng hợp các PUFA đi từ axit C18:3 $\Delta$ 9,12,15 ( $\alpha$ -linolenic), chuyển hóa ngược lại thành axit linoleic và các dẫn chất thiết yếu trong cơ thể sống.

*Điều kiện tối ưu cho phản ứng của Hydrazin với axit béo đa nối đôi cho hiệu suất tạo ra sản phẩm axit béo một nối đôi cao nhất:* tác nhân oxy hoá được lựa chọn là dung dịch  $H_2O_2$  30% để thực hiện phản ứng khử hoá nối đôi.

Sơ đồ tạo sản phẩm chung cho phản ứng Hydrazin với axit béo ba nối đôi

Nguyên liệu đầu axit béo ba nối đôi	Sản phẩm axit béo không no 2 nối đôi	Sản phẩm axit béo không no một nối đôi	Sản phẩm axit béo no
18: 3 $\Delta$ 9,12,15 $\rightarrow$	18: 2 $\Delta$ 9,12 18: 2 $\Delta$ 12,15 $\rightarrow$ 18: 2 $\Delta$ 9,15	18: 1 $\Delta$ 9 18: 1 $\Delta$ 12 18: 1 $\Delta$ 15	$\rightarrow$ 18:0

*Nhiệt độ tiến hành phản ứng:* được thực hiện ở 40°C, 50°C và 60°C, kết quả chứng minh tại nhiệt độ 60°C phản ứng chuyển hóa cho hiệu suất tốt nhất.

*5 yếu tố ảnh hưởng đến hiệu suất khử hoá nối đôi của phản ứng gồm:* nồng độ axit, nồng độ Hydrazin, nồng độ  $H_2O_2$ , nhiệt độ và thời gian tiến hành phản ứng. Do khối lượng thí nghiệm đối với qui hoạch thực nghiệm lớn hơn 3 yếu tố là rất lớn và cũng không cần thiết phải nghiên cứu hết cả năm yếu tố trên, vì vậy hai yếu tố cố định gồm: nồng độ  $H_2O_2$  30% và nhiệt độ phản ứng 60 °C được sử dụng trong quá trình nghiên cứu điều kiện tối ưu của ba yếu tố còn lại.

*\* Xây dựng phương trình hồi quy mô tả phản ứng khử hoá nối đôi của axit 18:3 $\Delta$  9,12,15 bằng Hydrazin*

##### a. Ma trận thực nghiệm của phản ứng

Các thí nghiệm được bố trí dựa theo ma trận thực nghiệm, kết quả được trình bày ở bảng 4.4, trong đó y (%) là hiệu suất thực tế của phản ứng chuyển hoá trên, tổng cộng có 15 thí nghiệm trong ma trận thực nghiệm bậc 2

Bảng 4.4: Ma trận thực nghiệm của phản ứng

N	x <sub>0</sub>	x <sub>1</sub>	x <sub>2</sub>	x <sub>3</sub>	x <sub>1</sub> x <sub>2</sub>	x <sub>1</sub> x <sub>3</sub>	x <sub>2</sub> x <sub>3</sub>	x <sub>1</sub> ' <sup>2</sup>	x <sub>2</sub> ' <sup>2</sup>	x <sub>3</sub> ' <sup>2</sup>	y (%)
1	+	-	-	-	+	+	+	0,27	0,27	0,27	33,7
2	+	+	-	-	-	-	+	0,27	0,27	0,27	34,6
3	+	-	+	-	-	+	-	0,27	0,27	0,27	34
4	+	+	+	-	+	-	-	0,27	0,27	0,27	43,4
5	+	-	-	+	+	-	-	0,27	0,27	0,27	35,7
6	+	+	-	+	-	+	-	0,27	0,27	0,27	45,1
7	+	-	+	+	-	-	+	0,27	0,27	0,27	36,3
8	+	+	+	+	+	+	+	0,27	0,27	0,27	43,7
9	+	1,215	0	0	0	0	0	0,746	-0,73	-0,73	43,4
10	+	-1,215	0	0	0	0	0	0,746	-0,73	-0,73	36,6
11	+	0	1,215	0	0	0	0	-0,73	0,746	-0,73	38,6
12	+	0	-1,215	0	0	0	0	-0,73	0,746	-0,73	39,4
13	+	0	0	1,215	0	0	0	-0,73	-0,73	0,746	44,9
14	+	0	0	-1,215	0	0	0	-0,73	-0,73	0,746	41,7
15	+	0	0	0	0	0	0	-0,73	-0,73	-0,73	44,6

Trong đó: x<sub>1</sub>, x<sub>2</sub>, x<sub>3</sub> là các yếu tố mã hoá trong phản ứng, y là hiệu suất thực tế của phản ứng thu được dựa theo sự bố trí thí nghiệm. Ở đây đã sử dụng các giá trị φ và d được tính sẵn cho mô hình kế hoạch hóa thực nghiệm bậc 2 tâm trực giao với n = 3: φ = 0,73; d = 1,215.

#### b. Xác định các hệ số của phương trình hồi quy

Các hệ số của phương trình hồi quy đối với mô hình quy hoạch thực nghiệm bậc 2 tâm trực giao được tính toán theo các công thức sau:

$$b_i = \frac{\sum_{u=1}^N x_{iu} \cdot y_u}{\sum_{u=1}^N x_{iu}^2}$$

$$b_{ij} = \frac{\sum_{u=1}^N x_{iu} \cdot x_{ju} \cdot y_u}{\sum_{u=1}^N (x_{iu} \cdot x_{ju})^2}$$

$$b_{ii} = \frac{\sum_{u=1}^N (x_{iu}^2 - \varphi) \cdot y_u}{\sum_{u=1}^N (x_{iu}^2 - \varphi)^2}$$

Sau khi sử dụng các phần mềm tin học để tính toán, các hệ số của phương trình hồi quy như sau:

b <sub>0</sub>	b <sub>1</sub>	b <sub>2</sub>	b <sub>3</sub>	b <sub>12</sub>	b <sub>13</sub>	b <sub>23</sub>	b <sub>11</sub>	b <sub>22</sub>	b <sub>33</sub>
39,713	3,229	0,669	1,734	0,813	0,813	-1,238	-2,394	-3,071	-0,161

#### c. Đánh giá tính có nghĩa của các hệ số của phương trình hồi quy

Bốn thí nghiệm được thực hiện thêm ở tâm để xác định giá trị phương sai tái sinh thí nghiệm. Hiệu suất của các thí nghiệm này lần lượt là 42,6; 41,6; 41,2 và 42,9, các giá trị  $t_{\text{tính}}$  được tính như sau:

$t_0$	$t_1$	$t_2$	$t_3$	$t_{12}$	$t_{13}$	$t_{23}$	$t_{11}$	$t_{22}$	$t_{33}$
39,713	13,262	2,748	7,121	2,852	2,852	4,344	6,206	7,96	0,415

Tra bảng các giá trị hằng số student, giá trị  $t_{\text{bảng}}$  theo bảng (mức ý nghĩa  $p=0.05$ ) là 3,18. So sánh các giá trị  $t_{\text{tính}}$  với giá trị  $t_{\text{bảng}}$  thấy được các giá trị  $t_2$ ,  $t_{12}$ ,  $t_{13}$  và  $t_{33}$  nhỏ hơn giá trị  $t_{\text{bảng}}$  do đó có thể kết luận rằng các hệ số  $b_2$ ,  $b_{12}$ ,  $b_{13}$  và  $b_{33}$  là các hệ số không có ý nghĩa và bị loại ra khỏi phương trình hồi quy và phương trình hồi quy sau khi đã loại bỏ các hệ số không có nghĩa như sau:

$$Y = 43.704 + 3.229 \cdot x_1 + 1.734 \cdot x_3 - 1.238 \cdot x_2 \cdot x_3 - 2.394 \cdot x_1^2 - 3.071 \cdot x_2^2 \quad (1)$$

d. *Đánh giá sự phù hợp của phương trình hồi quy.*

Tính giá trị  $F_{\text{tính}}$  (giá trị F theo chuẩn Fisher) theo các công thức dựa trên các tài liệu tham khảo [5], [125], thu được  $F_{\text{tính}}=6,16$ . Tra bảng giá trị F với  $f_1=6$ ,  $f_2=3$  cho giá trị  $F_{\text{bảng}} = 8,9$ . So sánh với giá trị  $F_{\text{tính}}$ , cho thấy  $F_{\text{tính}} < F_{\text{bảng}}$ , chứng tỏ rằng phương trình hồi quy mô tả đúng thực nghiệm.

Sử dụng phép biến đổi  $X_j = \frac{Z_j - Z_j^0}{\Delta Z_j}$  để đưa phương trình (1) về dạng biến thực.

$$Y = 6.966 + 0.256 \cdot Z_1 + 0.295 \cdot Z_2 + 0.14 \cdot Z_3 - 0.0008 \cdot Z_2 \cdot Z_3 - 0.001 \cdot Z_1^2 - 0.0012 \cdot Z_2^2 \quad (2)$$

$Z_1$ : hàm lượng tác nhân oxy hoá, dung dịch  $H_2O_2$  30%, từ 50 – 150  $\mu\text{mol}$ .

$Z_2$ : hàm lượng dung dịch  $N_2H_4$ , từ 50 – 150  $\mu\text{mol}$ .

$Z_3$ : thời gian phản ứng từ 30 đến 90 phút.

#### 4.6.4.3. *Xác định điều kiện tối ưu cho phản ứng khử hoá nôi đôi*

Điều kiện tối ưu của phản ứng khử hoá nôi đôi của axit béo không no theo lý thuyết chính là điều kiện để có cực đại của hàm mục tiêu biến thực (2) trong vùng quy hoạch. Sau khi tính toán cực đại của phương trình hồi quy (2) bằng thuật toán FLEXIPLEX (bằng ngôn ngữ lập trình Pascal) cho giá trị  $Y_{\text{Max}}=46,31\%$  tại  $Z_1 = 128,0$  ( $\mu\text{mol}$ );  $Z_2 = 92,9$  ( $\mu\text{mol}$ ); và  $Z_3 = 90$  (phút). Làm lại 3 thí nghiệm tại hàm lượng dung dịch  $H_2O_2$  30%: 128  $\mu\text{mol}$ ; hàm lượng  $N_2H_4$ : 93  $\mu\text{mol}$  và thời gian phản ứng là 90 phút cho kết quả sau:

STT	1	2	3	Trung bình
Hiệu suất (%)	45,9	46,5	46,1	46,17 $\pm$ 0,25

Kết quả trên chứng minh việc sử dụng mô hình quy hoạch hoá thực nghiệm bậc 2 tâm trực giao đối với nghiêm cứu phản ứng trên là hoàn toàn phù hợp và chính xác. Phương trình hồi quy (1) cho thấy hai yếu tố  $X_1$  (nồng độ  $H_2O_2$ ) và  $X_3$  (thời gian phản ứng) ảnh hưởng dương lên hiệu suất tạo sản phẩm axit béo một nôi đôi ( $b_1, b_3 > 0$ ), trong đó yếu tố 1

ảnh hưởng khá mạnh. Ngoài ra, hiệu suất của phản ứng trên còn chịu một tác động kết hợp của 2 yếu tố: hàm lượng của hydrazin và thời gian phản ứng thể hiện ở số hạng  $x_2x_3$ . Sự có mặt của 2 hệ số  $b_{11}$  và  $b_{22}$  chứng minh sự tác động mạnh của hai yếu tố bậc 2 của  $X_1$  (hàm lượng tác nhân oxy hóa) và  $X_2$  (hàm lượng hydrazin) lên hiệu suất tạo thành sản phẩm axit béo một nối đôi này.

#### 4.7. Nghiên cứu ứng dụng chế phẩm từ PUFA

##### 4.7.1 Nghiên cứu tạo chế phẩm

Trên cơ sở kết quả khảo sát hoạt tính sơ bộ của tất cả các mẫu dầu dạng nguyên chất và một số dạng công thức phối hỗn hợp giữa các loại dầu khác nhau chúng tôi đã tạo ra chế phẩm tối ưu OF27 có hoạt tính khả quan nhất đó là: dầu n-3 (từ mỡ cá biển) + dầu n-6 (từ dầu hạt thực vật) với tỉ lệ thích hợp  $n-6/n-3 = 10/1$ . Chế phẩm OF27 được nghiên cứu toàn diện về độc tính cấp, độc tính bán trường diễn và một số tác dụng dược lý, các thí nghiệm được tiến hành ở Khoa Dược, học viện Quân Y.

##### 4.7.2. Nghiên cứu an toàn của chế phẩm OF27

###### 4.7.2.1. Kết quả nghiên cứu độc tính cấp của OF27 theo đường uống

**Bảng 4.5:** Kết quả nghiên cứu độc tính cấp của OF27 theo đường uống

K	$x_i$ ( g/kg )	$m_i$	$n - m_i$	$\frac{m_i}{n - m_i}$	$m_i ( n - m_i )$	$z_i$	$m_i - z_i$
1	2,40	0	-	0/12	-	-	-
2	4,80	1	11	11/11	11	7	7
3	9,60	4	8	4/8	32	5	20
4	14,40	6	6	6/6	36	3	18
5	19,20	8	4	8/4	32	1	8
6	24,00	-	0	-	-	-	-
$\Sigma=6$		$\Sigma = 19$			$\Sigma = 111$		$\Sigma = 53$

Kết quả bảng trên cho thấy giá trị  $LD_{50} = 19,00 \pm 2,01$  g/kg thể trọng của chuột nhắt trắng theo đường uống (16,99 tới 21,01).

###### 4.7.2.2. Nghiên cứu độc tính bán trường diễn liều thấp của chế phẩm OF27

a. Nghiên cứu ảnh hưởng của OF27 theo đường uống trường diễn đối với trọng lượng cơ thể, gan, lách, thận động vật với liều 0,02 g/kg (bảng 4.6).

Kết quả ở bảng 4.6 cho thấy chỉ số tăng trọng lượng so sánh theo các nhóm sau 5 tuần và tỷ số này giữa các nhóm trắng, chứng, OF27 và thuốc tham chiếu khác nhau không có ý nghĩa thống kê ( $p > 0,05$ ), chứng tỏ chế phẩm OF27 nghiên cứu không làm ảnh hưởng đến

trọng lượng cơ thể chuột nghiên cứu. Đây là chỉ số quan trọng đánh giá thuốc mới khi nghiên cứu trường diễn.

**Bảng 4.6:** Chỉ số tăng trọng lượng trên các nhóm trắng, nhóm chứng, thuốc nghiên cứu và thuốc tham chiếu khi cho chuột nhắt trắng uống OF27 mức liều 0,02 g/kg

Nhóm		Trắng	Chứng CMC 2% (0,1ml/10g)	Thuốc n/c OF27 0,02 g/kg	Thuốc tham chiếu EBS <sub>1</sub> 0,5 g/kg
N/C	Thời gian N/C				
Tuần thứ I	n	12	12	12	10
	$\bar{x}$	17,43	17,39	18,29	20,35
	SD	4,11	5,15	1,12	1,70
Tuần thứ II	n	12	12	12	10
	$\bar{x}$	23,05	22,86	22,5	23,4
	SD	3,90	2,82	3,23	2,00
Tuần thứ III	n	12	12	12	10
	$\bar{x}$	23,67	22,96	22,29	25,35
	SD	1,90	2,20	2,00	3,20
Tuần thứ IV	n	12	12	12	10
	$\bar{x}$	24,05	23,45	22,33	26,60
	SD	2,92	2,74	3,11	2,60
Tuần thứ V	n	12	12	11	
	$\bar{x}$	25,12	24,5	25,91	Không thử
	SD	1,7	2,80	3,78	
P	p <sub>1,2</sub>	> 0,05			
	p <sub>2,3</sub>	> 0,05			
	p <sub>3,4</sub>	> 0,05			

b. Kết quả nghiên cứu trọng lượng cơ thể khi dùng OF27 trường diễn theo đường uống trên chuột nhắt trắng với liều 0,03 g/kg (bảng 4.7).

So sánh giữa các nhóm chứng, thuốc OF27 và thuốc tham chiếu về các chỉ tiêu trọng lượng cơ thể, sự khác nhau không có ý nghĩa thống kê ( $p > 0,05$ ).

Chế phẩm OF27 không làm ảnh hưởng đến trọng lượng cơ thể cũng như trọng lượng các tạng quan trọng quá trình chuyển hóa thuốc và của quá trình thải trừ thuốc với 2 mức liều đã sử dụng là 0,02 và 0,03 g/kg/24 giờ.

**Bảng 4.7:** Trọng lượng cơ thể khi cho uống trường diễn OF27 liều 0,03 g/kg

Nhóm N/C		Chứng dung môi 2% ( 0,1 ml/10g )	Thử chế phẩm OF27 0,03g/kg TLCT	Tham chiếu EBS1 0,5 g/kg TLCT
Thời gian				
Tuần thứ I	n	12	12	10
	$\bar{x}$	17,83	16,00	20,35
	SD	1,84	0,83	1,70
Tuần thứ II	n	12	12	10
	$\bar{x}$	23,82	19,08	23,40
	SD	1,54	1,72	2,00
Tuần thứ III	n	12	12	10
	$\bar{x}$	28,00	25,13	25,35
	SD	2,54	3,66	2,00
	n	12	12	10
Tuần thứ IV	$\bar{x}$	26,21	25,67	26,60
	SD	3,07	5,08	2,60
	n	12	12	
Tuần thứ V	$\bar{x}$	32,23	27,92	Không thử
	SD	2,14	4,79	
P		-	P(1,2) > 0,05	p(3,2) > 0,05 p(3,1) > 0,05

c. Kết quả nghiên cứu trọng lượng cơ thể, gan, lách, thận và tỷ số giữa trọng lượng mỗi tạng so với trọng lượng cơ thể khi dùng mức liều 0,02 g/kg (bảng 4.8).

**Bảng 4.8:** Kết quả nghiên cứu về trọng lượng cơ thể, trọng lượng các tạng ở mức liều 0,02 g/kg/24 giờ.

Chỉ tiêu		TLCT (g)	TL tạng (g)	TL tạng/10g TLCT	p	
Các tạng						
<b>Gan</b> (n=12)	Chứng	$\bar{x}$	24,50	1,84	0,75	-
		SD	2,80	0,42		
	Chế phẩm OF27	$\bar{x}$	22,25	1,62	0,72	>0,05
		SD	3,23	0,26		
<b>Lách</b> (n=12)	Chứng	$\bar{x}$	24,50	1,61	0,66	-
		SD	2,80	0,37		
	Chế phẩm OF27	$\bar{x}$	22,35	1,72	0,77	>0,05
		SD	3,23	0,64		
<b>Thận</b> (n=12)	Chứng	$\bar{x}$	24,50	2,67	1,09	-
		SD	2,80	0,87		
	Chế phẩm OF27	$\bar{x}$	22,25	2,29	1,12	>0,05
		SD	3,23	0,61		

Khi so sánh các tỷ số giữa trọng lượng của ba tạng quan trọng nhất trong quá trình chuyển hóa và thải thuốc là: gan, lách, thận tính theo 10 gam trọng lượng cơ thể của chuột nhất trắng thí nghiệm, tỷ lệ này không có sự khác biệt giữa nhóm chứng và nhóm thuốc nghiên cứu ( $p$  chứng thử  $> 0,05$ ). Như vậy khi dùng OF27 mức liều 0,02 g/kg/24 giờ, không ảnh hưởng đến trọng lượng cơ thể cũng như trọng lượng các cơ quan gan, lách thận.

d. Nghiên cứu ảnh hưởng của chế phẩm OF27 với các chỉ tiêu huyết học của động vật thí nghiệm cho uống bán trường diễn.

Một trong các chỉ tiêu có ý nghĩa hàng đầu khi xem xét ảnh hưởng của một chất nghiên cứu trên cơ thể sinh vật là các thông số về phân tử hữu hình trong máu. Vì thế chúng tôi đã tiến hành so sánh số lượng hồng cầu, bạch cầu, tiểu cầu và định lượng hemoglobin trên chuột nhất trắng khi được uống dài ngày chế phẩm OF27. Với mức liều đã sử dụng kết quả cho thấy OF27 không làm ảnh hưởng đến số lượng tế bào máu ngoại vi, không ảnh hưởng đến chức năng tạo máu của động vật thí nghiệm ( $p > 0,05$ ) (bảng 4.9).

**Bảng 4.9:** các thông số hóa sinh của động vật khi cho uống trường diễn chế phẩm OF27

Nhóm N/C		OF27 ( n = 12)		Chứng CMC ( n= 12)	
		Trước thí nghiệm	Sau thí nghiệm	Trước thí nghiệm	Sau thí nghiệm
<b>Số lượng Hồng cầu</b> ( $\times 10^{12}/L$ )	$\bar{x}$	5,12	5,36	4,35	3,96
	SD	0,67	0,84	0,77	0,33
	P	-	$< 0,05$	-	$< 0,05$
<b>Hemoglobin</b> (g/L)	$\bar{x}$	150,83	148,46	123,33	111,45
	SD	21,58	24,01	23,49	8,68
	P	-	$>0,05$	-	$>0,05$
<b>Bạch cầu</b> ( $\times 10^9/L$ )	$\bar{x}$	3,10	3,15	3,20	3,13
	SD	0,64	0,45	0,25	0,26
	P	-	$>0,05$	-	$>0,05$
<b>Tiểu cầu</b> ( $\times 10^9/L$ )	$\bar{x}$	478,00	492,81	430,66	454,00
	SD	56,53	68,40	58,40	75,67
	P	-	$>0,05$	-	$>0,05$

e. Nghiên cứu ảnh hưởng của chế phẩm **OF27** đến các thông số hóa sinh động vật khi cho uống trường diễn.

So sánh giữa các nhóm chứng, thuốc OF27 và thuốc tham chiếu về các chỉ tiêu trọng lượng cơ thể, sự khác nhau không có ý nghĩa thống kê ( $p > 0,05$ ).

Chế phẩm OF27 không làm ảnh hưởng đến trọng lượng cơ thể cũng như trọng lượng các tạng quan trọng quá trình chuyển hóa thuốc và của quá trình thải trừ thuốc với 2 mức liều đã sử dụng là 0,02 và 0,03 g/kg/24 giờ.

**Bảng 4.10:** Ảnh hưởng của chế phẩm OF27 đến các thông số hóa sinh của động vật khi cho uống trường diễn.

Nhóm N/C		Chế phẩm OF27 (n = 12)		Chứng (n = 12)	
		Trước TN	Sau TN	Trước TN	Sau TN
<b>SGOT</b> ( UI/L )	$\bar{x}$	178,55	181,96	223,28	245,10
	SD	12,35	17,34	50,23	41,70
	p	-	>0,05	-	>0,05
<b>SGPT</b> ( UI/L )	$\bar{x}$	67,39	65,18	58,50	65,84
	SD	15,18	9,46	13,17	12,64
	p	-	>0,05	-	>0,05
<b>Creatinin</b> ( $\mu$ mol/L )	$\bar{x}$	56,21	59,22	50,83	54,50
	SD	7,75	10,04	14,83	14,44
	p	-	>0,05	-	>0,05

Chức năng của gan được đánh giá qua chỉ tiêu enzym chuyển amin cho thấy OF27 chưa gây ảnh hưởng bất lợi cho chức năng gan. Chức năng của thận được đánh giá qua chỉ tiêu định lượng creatinin cho thấy OF27 không gây độc cho thận.

f. Nghiên cứu ảnh hưởng của OF27 đến các thông số mô bệnh học khi dùng trường diễn. Về cấu trúc vi thể, các tiêu bản gan, lách, thận đã được xử lý và các chuyên gia giải phẫu bệnh lý kết luận OF27 không làm ảnh hưởng đến hình thái và chức năng các cơ quan trọng nhất của quá trình chuyển hóa và thải trừ thuốc nghiên cứu.

#### 4.7.3. Kết quả nghiên cứu hiệu lực của chế phẩm OF27

4.7.3.1. Ảnh hưởng của chế phẩm OF27 đến quá trình sinh tổng hợp protein trên động vật thực nghiệm

**Bảng 4.11:** Kết quả nghiên cứu ảnh hưởng của chế phẩm OF 27 đến lượng protein ở huyết thanh động vật thực nghiệm (thỏ n=10)

	Xuất phát điểm	Sau 5 tuần dùng chế phẩm OF 27	Mức tăng (%)
<b>N</b>	10	10	
$\bar{x}$	53,53	64,04	19,63
<b>SD</b>	5,05	2,44	
<b>P</b>			< 0,05



Chế phẩm OF27 làm tăng sự tổng hợp protein ở động vật, điều này rất có ý nghĩa đối với việc nghiên cứu tác dụng của chế phẩm lên trung ương thần kinh.

4.7.3.2. Tác dụng của OF27 liều thấp (0,02g/kg) cho uống bán trường diễn trên năng lực tâm thần kinh của động vật thực nghiệm: làm cho năng lực tâm thần kinh của động vật thực nghiệm tăng lên rất rõ rệt.

Nhóm	Chứng (a)	RES (b)	RES+ OF27 (c)
<b>Số nhóm</b>	6	6	6
$\bar{x}$	8,42	1,75	5,33
SD	1,16	1,08	0,82
$\Sigma x$	50,50	10,50	32,00
$\Sigma x^2$	43,75	24,25	174,00
%	100%	20,78%	63,30%

#### 4.7. 3.3. Tác dụng OF27 lên điều biến miễn dịch

a. Tác dụng điều biến miễn dịch của chế phẩm OF27 theo hướng đáp ứng miễn dịch tế bào. khi sử dụng chế phẩm OF27 tăng khả năng tăng sinh tuyến ức có liên quan chặt chẽ đến tác dụng kích thích hệ thống miễn dịch tế bào lympho T ở tuyến ức của động vật non.

**Bảng 4.12:** Tác dụng điều biến miễn dịch của chế phẩm OF27 theo hướng đáp ứng miễn dịch tế bào

Mức liều	Nhóm nghiên cứu		Chứng	Chuẩn	Thử mg/10g
	n	$\bar{x}$	mg/10g TLCT	mg/10g TLCT	TLCT
1. Mức liều I (0,02g/kg TLCT)	n		10	10	10
	$\bar{x}$		14,87	6,72	9,50
	SD		1,04	0,42	0,37
	P		-	< 0,01	< 0,05
2. Mức liều II (0,03g/kg TLCT)	n		10	10	10
	$\bar{x}$		12,39	6,56	9,64
	SD		0,48	0,30	0,95
	P		-	< 0,01	< 0,05
3. Mức liều III (0,04g/kg TLCT)	n		10	10	10
	$\bar{x}$		13,37	6,52	8,80
	SD		0,52	0,54	1,25
	P		-	< 0,01	< 0,05

b. Tác dụng điều biến miễn dịch của chế phẩm OF27 theo hướng đáp ứng miễn dịch dịch thể. khi dùng chế phẩm OF27 trường diễn đã cho kết quả 2 loại kháng thể miễn dịch IgA(ImmunoglobulinA) và kháng thể bảo vệ IgG (Immunoglobulin G) tăng, tức là đáp ứng

theo chiều hướng kích thích. Riêng IgE (Immunoglobulin E) so sánh trước và sau thí nghiệm sự khác biệt không có ý nghĩa với  $p > 0,05$ .

#### 4.7.3.4. Tác dụng của chế phẩm OF27 trên mô hình micronucleus test ức chế khả năng đột biến (antimutagenicity)

**Bảng 4.13:** Tác dụng của chế phẩm OF27 trên mô hình micronucleus test ức chế khả năng đột biến (antimutagenicity)

Chỉ tiêu \ Nhóm nghiên cứu	Chứng	Thử
N	20	20
Giá trị MN- PCE/1000 PCE		
$\bar{x} \pm SD$	270,00 $\pm$ 29,30	148,20 $\pm$ 15,30
Tỷ lệ %	100,00	54,81
P	-	< 0,05

#### 4.7.3.5. Tác dụng làm giảm tần suất xuất hiện khối u trên da của chế phẩm OF27 trên mô hình thực nghiệm dùng DMBA (gây khối u trên da):

Kết quả nghiên cứu mối liên quan giữa hoạt tính chống oxy hóa và tác dụng giảm tần suất xuất hiện khối u trên da của chế phẩm OF27 trên mô hình thực nghiệm với các mức liều đã dùng có tác dụng làm giảm tần suất xuất hiện khối u trên chuột nhắt trắng của chế phẩm OF27 (n = 10 đối với mỗi nhóm).

Như vậy kết quả nghiên cứu tác dụng dược lý độc tính cấp và bán trường diễn trên động vật thực nghiệm cho thấy chế phẩm OF27 rất ít độc theo đường uống và hầu như không ảnh hưởng lên gan, lách, thận cũng như chỉ số sinh hoá, huyết học của các thể sống. Mặt khác các thí nghiệm về hiệu lực cho thấy chế phẩm OF27 làm tăng năng lượng tâm thần kinh, tăng sinh tổng hợp protein, tăng cường đáp ứng miễn dịch cả dạng tế bào và dịch thể. Điều đáng quan tâm là chế phẩm OF27 có khả năng ức chế đột biến antimutagenicity và giảm tần suất xuất hiện khối u trên da. Như vậy mở ra một triển vọng ứng dụng chế phẩm OF27 như một thực phẩm chức năng trong tương lai, ngoài ra phần nào củng cố thêm bằng chứng lâm sàng về sự liên quan giữa tỉ lệ n-3/n-6 axit béo đối với khả năng phòng ngừa bệnh tật của chúng đối với cơ thể sống.

## KẾT LUẬN

1. Hai tám loài cây ở Việt Nam thuộc 5 họ thực vật: Brassicaceae (cải), Cucurbitaceae (bí), Sapindaceae (bồ hòn), Rutaceae (cam), họ Malvaceae (bông) đã được nghiên cứu hệ thống về hàm lượng lipid, thành phần tocopherol và axit béo trong hạt. Các loài thuộc ba họ: cải, bí, cam có hàm lượng dầu khá cao (trung bình 35%) và hàm lượng

tocols tổng dao động trong khoảng từ 2,56mg/100g đến 276,8mg/100g (chủ yếu dưới hai dạng  $\alpha$ -tocopherol,  $\gamma$ -tocopherol). Hạt vải *Litchi chinensis* Sonn có dầu béo thấp nhất (1,4%) nhưng hàm lượng tocols phong phú, tocopherol tổng cao nhất (276,8mg/100g) và dạng  $\delta$ -tocotrienol (181,5mg/100g).

2. Đã phát hiện sự có mặt của các axit: axit malvalic (1,33g/100g), axit sterculic (0,5g/100g), axit vernolic, axit coronanic 2,73g/100g trong hạt cây dâm bụt giấm *Hibiscus sabdraffi* L. Việt Nam và chứng minh được cấu trúc hoá học của chúng dựa vào phản ứng hoá học đặc hiệu kết hợp phương pháp GC-MS.

3. Đã khẳng định được dầu hạt của các cây thuộc bốn họ Cải, Cam, Bí, Bò hòn có những axit béo đặc trưng là những ‘fingerprint’ C22:1 (họ cải), C16:0 và C18:3 (họ cam), C18:2 và C18:3 liên hợp (họ bí), C18:1 (họ bò hòn) và có thể sử dụng chúng như mã khóa phân loại hóa học.

4. Bằng phương pháp PCA và phân tích theo thống kê học xác định được mối tương quan di truyền giữa axit béo C18:3 với  $\gamma$ -tocopherol ( $r = 0,51$   $P < 0,05$ ) và axit C18:2 với  $\alpha$ -tocopherol ( $r=0,549$ ,  $P < 0,05$ ) và có thể khẳng định hạt thực vật có hàm lượng PUFA cao thì hoạt tính chống oxy hóa của chúng sẽ cao hơn các dầu hạt khác.

5. Kết quả khảo sát hoạt tính chống oxy hóa trên hệ DPPH của dầu hạt 10 loài thực vật thuộc chi *Citrus* cho thấy bốn mẫu: quýt Hưng Yên burred da xanh, quýt Sài Gòn, quýt Thái Lan có hoạt tính chống oxy hoá tốt nhất (có giá trị  $SC \geq 50\%$  lần lượt là: 87,03%, 60,81%, 58,89%, 56,91%).

6. Đã phân lập axit C18:3 $\Delta$  9,12,15 từ dầu hạt quýt Hưng Yên *Citrus japonica* Thunb. và nghiên cứu điều kiện tối ưu cho phản ứng khử hóa nối đôi C18:3 $\Delta$  9,12,15 bằng hydrazine là: 128  $\mu$ mol dung dịch H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 30%, hàm lượng N<sub>2</sub>H<sub>4</sub>: 93  $\mu$ mol và thời gian phản ứng là 90 phút.

7. Đã tạo được chế phẩm OF27 từ một số axit béo đa nối đôi thiết yếu thuộc 2 họ  $\omega$ -6 (như GLA, ARA) và  $\omega$ -3 (như ALA, EPA, DHA). Các nghiên cứu dược lí cho thấy chế phẩm OF27 ít độc theo đường uống có giá trị LD<sub>50</sub> = 19,00  $\pm$  2,01 g/kg thể trọng, với mức liều nghiên cứu 20mg/kg chế phẩm được coi là an toàn trên động vật thực nghiệm. Chế phẩm OF27 có khả năng làm tăng năng lượng thần kinh, tăng sinh tổng hợp protein, tăng cường đáp ứng miễn dịch, ức chế đột biến và giảm tần suất xuất hiện khối u trên da. Kết quả này mở ra triển vọng ứng dụng chế phẩm OF27 như một thực phẩm chức năng ứng dụng trong cuộc sống.

CỘNG HOÀ XÃ HỘI CHỦ NGHĨA VIỆT NAM

Độc lập - Tự do - Hạnh phúc

## TRÍCH YẾU LUẬN ÁN

### 1. TÓM TẮT MỞ ĐẦU

**Tác giả:** Đoàn Lan Phương

**Tên luận án:** “Nghiên cứu hóa học và hoạt tính sinh học một số dẫn xuất tocopherol và axit béo có nguồn gốc từ thiên nhiên”.

**Chuyên ngành:** Hoá học các hợp chất thiên nhiên

**Mã số:** 62.44.27.02

**Tên cơ sở đào tạo:** Viện Hoá học các hợp chất thiên nhiên

### 2. NỘI DUNG

**Mục đích và đối tượng nghiên cứu của luận án:**

- Nghiên cứu xác định hàm lượng và thành phần lipit, axit béo và dẫn xuất tocopherol có trong dầu hạt của 28 loài thực vật Việt Nam bao gồm 5 họ: Brassicaceae, Cucurbitaceae, Sapindaceae, Rutaceae và Malvaceae. Phân tích nhận dạng và chứng minh một số axit béo có cấu trúc đặc biệt.

- Nghiên cứu mối quan hệ giữa thành phần và hàm lượng các axit béo với các dẫn xuất tocopherol trong dầu hạt thực vật Việt Nam.

- Phân lập và tinh chế, xác định cấu trúc axit béo có hoạt tính sinh học. Tạo chế phẩm từ axit béo có hoạt tính, đánh giá an toàn và sơ bộ thăm dò một số tác dụng sinh học của chế phẩm này trên động vật thực nghiệm (*in vivo*).

***Các phương pháp nghiên cứu đã sử dụng:***

- Phương pháp thu thập mẫu và xử lý mẫu hạt thực vật: Mẫu hạt được thu thập, xác định tên khoa học và xử lý theo các tiêu chuẩn phân tích.
- Hàm lượng lipit từ mẫu hạt được chiết tách và xác định theo phương pháp ISO/DIS 659:1988 [81].
- Thành phần và hàm lượng tocopherol xác định theo phương pháp ISO/9936:1997 [80] và phân tích trên thiết bị sắc kí lỏng cao áp HPLC.
- Thành phần và hàm lượng axit béo xác định dưới dạng metyl este trên máy sắc kí khí với cột mao quản chuyên dụng theo phương pháp ISO/FDIS 5509:1998 .
- Phương pháp phân lập các hợp chất: Sắc ký lớp mỏng và sắc ký cột pha đảo chất hấp phụ Rp18.
- Phương pháp xác định cấu trúc của các hợp chất: Sắc kí khí khối phổ, phổ cộng hưởng từ hạt nhân một chiều và hai chiều.
- Phương pháp thử hoạt tính chống oxi hóa trên hệ DPPH.
- Phương pháp nghiên cứu độc tính cấp của chế phẩm nghiên cứu theo Abrham W.B (1978) và Turner A. (1965), quy định của WHO và Bộ Y tế.
- Phương pháp nghiên cứu hiệu lực của chế phẩm nghiên cứu theo Irwin Samuel (1967), Santos G.W và cộng sự (1968,1984), Lapis K. và cộng sự (1980).

***Các kết quả chính của luận án:***

1. Là công trình đầu tiên ở Việt Nam nghiên cứu hệ thống về thành phần, hàm lượng tocopherol và các axit béo trong 28 loài cây có dầu, thuộc 5 họ thực vật: họ Cải (Brassicaceae), Bầu Bí (Cucurbitaceae), Bồ hòn (Sapindaceae), Cam quít (Rutaceae) và họ Bông (Malvaceae).

2. Lần đầu tiên phát hiện sự có mặt của các axit sterculic, malvalic, vernolic, và axit coronanic trong hạt cây dâm bụt giấm Việt Nam *Hibiscus*

*sabdraffi* Lin và đã khảo sát chứng minh cấu trúc của chúng dựa vào phản ứng hóa học đặc hiệu kết hợp công cụ GC-MS.

3. Đã khẳng định được dầu hạt của các cây thuộc bốn họ Cải, Cam chanh, Bầu Bí, Bồ hòn đều có những axit béo đặc trưng riêng là những ‘fingerprinter’ C22:1 (Họ cải), C18:2 và C18:3 (Họ Cam chanh), C18:2 và C18:3 liên hợp (họ Bầu bí), C18:1 (họ Bồ hòn) và có thể sử dụng chúng như mã khóa phân loại hóa học.

4. Xác định được mối tương quan giữa các hàm lượng tocopherol – chất chống oxi hóa để bảo vệ axit béo với các tỉ lệ axit béo đa nối đôi – chất dễ bị oxi hóa (giữa axit béo C18:3 với gama-tocopherol, axit C18:2 với anpha-tocopherol). Bằng phương pháp PCA và phân tích theo thống kê học cho phép nhận ra là có mối tương quan di truyền giữa các thành phần tocopherol với các thành phần axit béo.

5. Trên cơ sở sàng lọc hoạt tính chống oxi hóa và khảo sát thành phần axit béo và tocopherol của 10 mẫu hạt thuộc chi Citrus cho thấy mẫu dầu quất Hưng Yên có hoạt tính chống oxi hóa cao nhất và hàm lượng axit anpha-linolenic lớn nhất. Đã chiết tách được lượng lớn axit anpha-linolenic dùng làm nguyên liệu để chuyển hóa thành các dẫn chất thiết yếu bằng phản ứng khử hóa, dùng ma trận thực nghiệm và tối ưu hóa các điều kiện khử hóa.

6. Đã tạo được chế phẩm OF27 từ một số axit béo đa nối đôi thiết yếu thuộc 2 họ n-6 (như ARA) và n-3 (như EPA, DHA). Các nghiên cứu được lí cho thấy chế phẩm OF27 ít độc theo đường uống và có khả năng làm tăng năng lượng thần kinh, tăng sinh tổng hợp protein, tăng cường đáp ứng miễn dịch, ức chế đột biến và giảm tần suất xuất hiện khối u trên da. Kết quả này mở ra triển vọng ứng dụng chế phẩm OF27 như một thực phẩm chức năng.

***Ý nghĩa khoa học và thực tiễn của luận án:***

Luận án đã tiến hành nghiên cứu tính an toàn và hiệu lực của chế phẩm OF27, kết quả nghiên cứu cho thấy chế phẩm OF27 được coi là an toàn trên động vật thực nghiệm và có tác dụng tăng cường quá trình tổng hợp protein trên động vật thực nghiệm khả năng làm tăng năng lực đáp ứng phản xạ thần kinh, làm hạn chế sự suy giảm năng lực tâm thần so với nhóm chứng đực 42,52% và 53,42% so với nhóm chứng

*Hà Nội, ngày 19 tháng 8 năm 2009*

**T/M TẬP THỂ HƯỚNG DẪN**

**NGHIÊN CỨU SINH**

**PGS.TS. Phạm Quốc Long**

**Đoàn Lan Phương**

## THÔNG TIN TÓM TẮT VỀ NHỮNG KẾT LUẬN MỚI CỦA LUẬN ÁN

**Tên đề tài:** “*Nghiên cứu hoá học và hoạt tính sinh học một số dẫn xuất tocopherol và axit béo có nguồn gốc từ thiên nhiên*”

**Mã số:** 62.44.27.02

**Chuyên ngành:** Hoá học các hợp chất thiên nhiên.

**Họ và tên NCS:** Đoàn Lan Phương

**Người hướng dẫn khoa học:** 1. PGS.TS Phạm Quốc Long  
2. TS. Bertrand Mathaus

**Cơ sở đào tạo:** Viện Hoá học các hợp chất thiên nhiên.

Những kết luận mới của luận án:

3.1. Là công trình đầu tiên ở Việt Nam nghiên cứu hệ thống về thành phần, hàm lượng tocopherol và các axit béo trong 28 loài cây có dầu, thuộc 5 họ thực vật: họ Cải (Brassicaceae), Bầu Bí (Cucurbitaceae), Bồ hòn (Sapindaceae), Cam quít (Rutaceae) và họ Bông (Malvaceae). Đã phát hiện sự có mặt của các axit sterculic, malvalic, vernolic, và axit coronanic trong hạt cây dâm bụt giấm *Hibiscus sabdraffi* Lin Việt Nam và chứng minh được mối tương quan di truyền giữa axit béo C18:3 với  $\gamma$ -tocopherol và axit C18:2 với  $\alpha$ -tocopherol.

3.2. Xác định dầu hạt của các cây thuộc bốn họ Cải, Cam chanh, Bầu Bí, Bồ hòn đều có những axit béo đặc trưng riêng là những "fingerprint" C22:1 (Họ cải), C18:2 và C18:3 (Họ Cam chanh), C18:2 và C18:3 liên hợp (họ Bầu bí), C18:1 (họ Bồ hòn) và có thể sử dụng chúng như mã khóa phân loại hóa học.

3.3. Tìm được điều kiện tối ưu cho phản ứng khử hóa axit  $\alpha$ -linolenic thành các dẫn chất thiết yếu và khảo sát hoạt tính chống oxy hóa và thành phần axit béo C18:3 của dầu hạt 10 loài thực vật thuộc chi *Citrus*.

3.4. Tạo được chế phẩm OF27 từ một số axit béo đa nối đôi thiết yếu thuộc 2 họ n-6 (như ARA) và n-3 (như EPA, DHA), khảo sát độ an toàn và có tác dụng làm tăng năng lượng thần kinh, tăng sinh tổng hợp protein, tăng cường đáp ứng miễn dịch, ức chế đột biến và giảm tần suất xuất hiện khối u trên da của chế phẩm OF27. Kết quả này mở ra triển vọng ứng dụng chế phẩm OF27 như một thực phẩm chức năng.

0

Hà Nội, ngày tháng năm 2009

**T/M TẬP THỂ CÁN BỘ HƯỚNG DẪN**

**NGHIÊN CỨU SINH**

**PGS.TS. Phạm Quốc Long**

**Đoàn Lan Phương**