

VIỆN DƯỢC LIỆU



HOÀNG MINH CHÂU

**NGHIÊN CỨU THÀNH PHẦN HÓA HỌC CHỦ YẾU VÀ
ĐỘNG THÁI TÍCH LŨY HOẠT CHẤT CỦA CÂY DÂY
THÌA CANH (*GYMNEMA SYLVESTRE* (RETZ.) R. Br. EX
SCHULT.)**

**CHUYÊN NGÀNH: DƯỢC LIỆU - DƯỢC HỌC CỔ TRUYỀN
MÃ SỐ: 9720206**

TÓM TẮT LUẬN ÁN TIẾN SỸ DƯỢC HỌC

HÀ NỘI - 2018

Công trình được hoàn thành tại :

- Khoa Hóa thực vật – Viện Dược liệu
- Khoa Dược, Đại học Quốc gia Seoul, Hàn Quốc.
- Khoa dược lý, trường Đại học Y Hà Nội.
- Bộ môn Thực vật, Đại học Dược Hà Nội.

Người hướng dẫn khoa học :

- PGS.TS Trần Văn Ôn
- PGS.TS Nguyễn Thị Bích Thu

Phản biện 1:

Phản biện 2:

Phản biện 3:

Luận án sẽ được bảo vệ trước Hội đồng đánh giá luận án cấp Viện họp tại :

Vào hồigiờ.....ngày.....tháng..... năm.....

Có thể tìm hiểu Luận án tại thư viện:

- Thư viện Quốc gia Việt Nam
- Thư viện Viện Dược liệu

DANH MỤC CÁC KÝ HIỆU, CHỮ VIẾT TẮT

AUC	: Diện tích dưới đường cong (Area under the curve)
COSY	: Phổ Cosy (Correlation Spectroscopy)
DMSO	: Dimethyl sulfoxid
DMEM	: Dulbecco's Modified Eagle's medium
DTT	: Dithiothreitol
DTC	: Dây thìa canh <i>Gymnema sylvestre</i>
ĐTĐ	: Đái tháo đường
EA	: Ethyl acetat
EDTA	: Acid ethylene diamin tetraacetic
ESI- MS	: Phổ khối lượng phun mù điện tử (Electron Spray Ionization Mass Spectrometry)
EtOH	: Ethanol
GAPDH	: Glyceraldehyd 3- phosphate dehydrogenase
Gla	: Acid glucuronic
Glc	: Glucose
GM	: Gymnemagenin
GS3	: Một phân đoạn chiết xuất Dây thìa canh
GS4	: Một phân đoạn chiết xuất của Dây thìa canh
G3PDH	: Glycerol - 3- phosphate dehydrogenase
HBA1C	: Chỉ số gắn kết của đường trên hemoglobin hồng cầu
HDL	: High density lipoprotein – Lipoprotein tỷ trọng cao
HE x 400	: Nhuộm Hematoxylin – Eosin, độ phóng đại 400 lần
HFD	: Chế độ ăn giàu chất béo (High fat diet)
HMBC	: Phổ tương tác dị hạt nhân qua nhiều liên kết (Heteronuclear Multiple Bond Connectivity)
HPLC	: Sắc ký lỏng hiệu năng cao (High- performance liquid chromatography)

HRESI MS : Phổ khối lượng phun mù điện tử phân giải cao (High resolution Electron Spray Ionization Mass Spectrometry)

HSQC : Phổ tương tác dị hạt nhân qua 1 liên kết (Heteronuclear Single Quantum Connectivity)

IR : Insulin receptor

NFD : Chế độ ăn bình thường (Normal fat diet)

NMR : Phổ cộng hưởng từ hạt nhân (Nuclear magnetic resonance Spectrometry)

NOESY : Phổ Noesy (Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy)

NP : Pha thường (Normal phase)

LOL : Giới hạn tuyến tính (Limit of Linear)

LOD : Giới hạn phát hiện (Limit of Detection)

LOQ : Giới hạn định lượng (Limit of Qualification)

PBS : Phosphate buffered saline

PTP1B : Protein tyrosine phosphatases

RP : Pha đảo (Reverse phase)

SD : Độ lệch chuẩn (Standard deviation)

STZ : Streptozocin

UA : Acid ursolic

Xyl : Xylose

¹H NMR : Phổ cộng hưởng từ hạt nhân proton (Proton Nuclear Magnetic Resonance Spectrometry)

2-NBDG : Glucose fluorescent 2-(N-(7-Nitrobenz-2-oxa-1,3-diazol-4-yl)Amino)-2-Deoxyglucose

2D-NMR : Phổ cộng hưởng từ hạt nhân 2 chiều (Two – dimension Nuclear magnetic resonance Spectrometry)

¹³C-NMR : Phổ cộng hưởng từ hạt nhân carbon 13 (Carbon-13 Nuclear Magnetic Resonance Spectrometry)

GIỚI THIỆU LUẬN ÁN

1. Tính cấp thiết của Luận án: Dây thìa canh (DTC) (*Gymnema sylvestre* (Retz.) R. Br. ex Schult.), thuộc chi *Gymnema* R.Br, phân bố rất rộng từ Tây Châu Phi sang Châu Úc, Châu Á. DTC đã được sử dụng trong nền Y học cổ truyền Ấn Độ từ hơn 2000 năm để điều trị Đái tháo đường (ĐTĐ), cho đến nay có hàng trăm nghiên cứu tại Ấn Độ và nhiều nước trên thế giới như Ấn Độ, Nhật Bản, Mỹ, Trung Quốc ...liên quan đến DTC, tập trung vào nghiên cứu thành phần hóa học, tác dụng sinh học, trong đó chủ yếu là tác dụng hạ đường huyết cũng như một số bệnh lý chuyển hóa khác.

Tại Việt Nam, Dây thìa canh bắt đầu được tập trung nghiên cứu từ năm 2008, trên các khía cạnh đa dạng sinh học, phân bố, độc tính, tác dụng hạ đường huyết, từ đó nghiên cứu phát triển tạo ra nhiều sản phẩm hạ đường huyết dưới dạng viên nang, viên nén, dạng trà túi lọc và cả dạng dược liệu khô đóng gói để sắc uống. Trong quá trình phát triển và ứng dụng trong thực tiễn DTC có nguồn gốc tự nhiên ở Việt Nam, xuất hiện nhiều vấn đề chưa được làm sáng tỏ như thành phần hóa học khác so với DTC ở Ấn Độ, từ đó khó đánh giá chất lượng dược liệu dựa trên hàm lượng hoạt chất, xác định thời gian thu hái cho chất lượng tốt nhất trong trồng trọt,... Lý do chính là thiếu các nghiên cứu về thành phần hóa học và tác dụng sinh học của các chất trong DTC. Từ những lý do trên, đề tài **”Nghiên cứu thành phần hóa học chủ yếu và động thái tích lũy hoạt chất của cây Dây thìa canh (*Gymnema sylvestre* (Retz.) R. Br. ex Schult.)”** được thực hiện với 2 mục tiêu chính.

2. Mục tiêu của Luận án:

2.1.Xác định cấu trúc hóa học các thành phần hóa học chính của lá Dây thìa canh Việt Nam.

2.2. Xác định sự thay đổi hàm lượng một số hoạt chất chính theo thời gian thu hái trong năm của lá Dây thìa canh.

Để đạt được mục tiêu trên, Luận án tiến hành nghiên cứu với các nội dung sau:

Về thành phần hóa học:

- Nghiên cứu phân lập và xác định cấu trúc các thành phần hóa học chính trong lá Dây thìa canh.

Về thử tác dụng sinh học:

- Thử tác dụng in vivo tác dụng hạ đường huyết của dịch chiết toàn phần lá Dây thìa canh.
- Thử tác dụng in vitro tác dụng hạ đường huyết của các chất phân lập được từ lá Dây thìa canh.

Về nghiên cứu động thái tích lũy hoạt chất:

- Xây dựng phương pháp định lượng hoạt chất chính trong lá Dây thìa canh.
- Theo dõi sự thay đổi hàm lượng hoạt chất của các mẫu lá Dây thìa canh thu hái trong năm.

3. Những đóng góp mới của Luận án:

3.1. Về thành phần hóa học:

- Phân lập được 8 chất, trong đó có 6 chất lần đầu tiên được công bố từ thực vật.
- Các chất phân lập được có cấu trúc khác với các chất đã công bố từ Dây thìa canh Ấn Độ.

3.2. Về tác dụng sinh học: Luận án cũng là nghiên cứu đầu tiên tiến hành thử tác dụng hạ đường huyết in vitro các chất phân lập được từ DTC Việt Nam.

3.3. Về động thái tích lũy hoạt chất: Luận án là nghiên cứu đầu tiên xây dựng phương pháp định lượng gymnemagenol, một aglycon thủy phân từ dịch chiết DTC, đại diện cho nhóm saponin khung olean có tác dụng hạ đường huyết.

Luận án cũng là nghiên cứu đầu tiên tại Việt Nam đánh giá tích lũy hoạt chất theo thời gian thu hái trong năm, theo đó chỉ ra xu hướng tích lũy hoạt chất Dây thìa canh tại vùng trồng cao nhất khi cây có thời điểm sinh trưởng trong thời tiết tự nhiên thuận lợi (tháng 5 và tháng 10), cũng như tích lũy hàm lượng hoạt chất thấp nhất trong điều kiện khắc nghiệt (mùa đông, tháng 2).

4. Ý nghĩa của Luận án: Luận án là nghiên cứu đầu tiên chỉ ra được sự khác biệt cơ bản giữa cấu trúc phân tử của các saponin phân lập từ *G.sylvestre* Ấn Độ và *G.sylvestre* Việt Nam, góp phần làm sáng tỏ thành phần hoạt chất đặc trưng của Dây thìa canh bản địa Việt Nam, tìm ra chất đại diện định lượng là gymnemagenol, từ đó giúp tiêu chuẩn hóa dược liệu này. Đồng thời Luận án cũng đóng góp giá trị thực tiễn khi xác định được thời điểm thu hái DTC cho hàm lượng hoạt chất cao nhất, góp phần nâng cao chất lượng sản phẩm đi từ DTC Việt Nam.

5. Cấu trúc của Luận án: Luận án gồm 4 chương, 30 bảng, 43 hình, 17 phức lục, 92 tài liệu tham khảo. Luận án gồm 124 trang, gồm các phần chính: Đặt vấn đề (02 trang), Tổng quan (31 trang), Nguyên vật liệu và Phương pháp nghiên cứu (13 trang), Kết quả nghiên cứu (60 trang), Bàn luận (14 trang), Kết luận (3 trang) và Đề xuất (01 trang).

NỘI DUNG CỦA LUẬN ÁN

CHƯƠNG 1. TỔNG QUAN

1.1. THỰC VẬT HỌC

1.1.1. Vị trí phân loại, đặc điểm thực vật và phân bố của chi *Gymnema* R. Br.

Năm 2009, Takhtajan đã công bố hệ thống phân loại trong đó xếp *Gymnema* R. Br. là một chi trong phân họ Asclepiadoideae của một họ lớn là Apocynaceae [17]. Cho đến nay, quan điểm này được thừa nhận rộng rãi trong các hệ thống phân loại quốc tế [31],[76]. Theo đó, *Gymnema* R. Br. là một chi thuộc phân họ Thiên lý (Asclepiadoideae), họ Trúc đào (Apocynaceae), bộ Long đởm (Gentianales), phân lớp Bạc hà (Lamiidae), lớp Ngọc lan (Magnoliopsida), ngành Ngọc lan (Magnoliophyta) [17].

Theo Danh lục các loài thực vật Việt Nam của Viện Sinh thái và Tài nguyên sinh vật xuất bản năm 2005, chi *Gymnema* tại Việt Nam có 8 loài là: *Gymnema albiflorum* Cost., *Gymnema alterniflorum* (Lour.) Merr., *Gymnema foetidum* Tsiang, *Gymnema griffithii* Craib, *Gymnema inodorum* (Lour.) Decne, *Gymnema latifolium* Wall ex Wight, *Gymnema reticulatum* (Moon) Alston, *Gymnema sylvestre* (Retz.) R. Br. ex Schult [6].

1.2. THÀNH PHẦN HÓA HỌC CHÍNH CỦA MỘT SỐ LOÀI THUỘC CHI *GYMNEMA* R. Br.

Thông qua việc tra cứu và các tài liệu đã công bố cho thấy, các hợp chất tinh khiết phân lập được từ các loài thuộc chi *Gymnema* R.Br chủ yếu thuộc các nhóm saponin tritecpenoid, flavonoid, peptid và một số nhóm khác.

Từ lá của một số loài thuộc chi *Gymnema* R.Br, các nhà khoa học đã phân lập được hơn 50 saponin tritecpen, trong đó có hơn 40 hợp chất có khung olean, số còn lại có khung dammaran. Từ *Gymnema alternifolium* (Lour.) Merr có ít nhất 19 saponin khung olean đã được phân lập. Từ *Gymnema inodorum* (Lour.) Decne cũng có 4 saponin khung olean đã được phân lập.

1.3. TÁC DỤNG HẠ ĐƯỜNG HUYẾT VÀ CHỐNG TĂNG LIPID HUYẾT CỦA MỘT SỐ LOÀI THUỘC CHI *GYMNEMA* R. Br

Các nghiên cứu về tác dụng sinh học của Dây thìa canh trên thế giới rất đa dạng, bao gồm tác dụng hạ đường huyết, chống tăng lipid huyết, chống loét, chống viêm và kháng khuẩn, chống stress, chống oxy hóa hay chống dị ứng và một số tác dụng khác. Trong khuôn khổ Luận án, chúng tôi tập trung tổng quan vào 2 tác dụng chính được nghiên cứu nhiều nhất là tác dụng hạ đường huyết và chống tăng lipid huyết.

1.4. MỘT SỐ NGHIÊN CỨU VỀ ĐỘNG THÁI TÍCH LŨY HOẠT CHẤT SAPONIN TRONG MỘT SỐ DƯỢC LIỆU

Các nghiên cứu đánh giá động thái tích lũy hoạt chất thường được tiến hành để so sánh hàm lượng hoạt chất trong cây theo tuổi cây, thời điểm sinh trưởng hoặc theo thời gian thu hái trong năm. Điều này giúp ích cho việc xác định tuổi thu hái dược liệu cho hàm lượng hoạt chất cao nhất cũng như thời điểm thu hái tối ưu, giúp nâng cao chất lượng dược liệu hay nâng cao hiệu suất chiết xuất hoạt chất. Phương pháp định lượng hoạt chất trong dược liệu thường dùng hiện nay là phương pháp sắc ký HPLC.

Hoạt chất đem định lượng và so sánh có thể là các chất cụ thể như các ginsenosid trong nhân sâm, cũng có thể là các aglycon thu được sau phản ứng thủy phân các saponin, được xem là chất đánh dấu đại diện cho nhóm chất như gymnemagenin với Dây thìa canh hay acid oleanolic với Nguu tất.

CHƯƠNG 2. NGUYÊN VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. NGUYÊN VẬT LIỆU NGHIÊN CỨU

- Nguyên liệu nghiên cứu được sử dụng trong các thí nghiệm là mẫu lá Dây thìa canh được thu hái tại vùng trồng của công ty Nam Dược tại xã Hải Lộc, huyện Hải Hậu, tỉnh Nam Định từ tháng 7 năm 2016 đến tháng 6 năm 2017 và được xác định tên khoa học là *Gymnema sylvestre* R. Br. ex Schult bởi

PGS.TS. Trần Văn Ôn, Trường Đại Học Dược Hà Nội và TS. Trần Thế Bách, Viện Sinh thái và Tài nguyên sinh vật – Viện Khoa học và Công nghệ Việt Nam. Mẫu nghiên cứu được lưu tại Bộ Môn Thực vật, trường Đại Học Dược Hà Nội.

- Động vật, hóa chất, dung môi đạt tiêu chuẩn thí nghiệm.

2.2. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.2.1. Nghiên cứu thành phần hóa học

- Chiết xuất các chất có trong dược liệu bằng phương pháp ngâm và chiết siêu âm với dung môi ethanol 60% . Phân lập các hợp chất trong dược liệu bằng phương pháp qua các cột sắc ký pha thuận, pha đảo, sắc ký loại cỡ và HPLC điều chế để thu được các chất tinh khiết.

- Xác định cấu trúc các chất phân lập được dựa trên phương pháp phổ bao gồm: phổ khối lượng phun mù điện tử, phổ khối lượng phun mù điện tử phân giải cao, phổ cộng hưởng từ hạt nhân một chiều (1D), hai chiều (2D) và đối chiếu với tài liệu tham khảo.

2.2.2. Nghiên cứu tác dụng sinh học

- Mẫu dược liệu lá Dây thìa canh Việt Nam *G. sylvestre* được chiết siêu âm 3 lần với ethanol 60% ở nhiệt độ 50°C trong 3 giờ. Dịch chiết được cô bay hơi dưới áp suất giảm ở 50°C. Cao khô thu được được hòa tan vào nước để thử tác dụng hạ đường huyết trên chuột.

- Nghiên cứu tác dụng hạ đường huyết trên chuột của dịch chiết Dây thìa canh bằng phương pháp nghiên cứu tác dụng hạ đường huyết của dịch chiết DTC theo mô hình sử dụng chuột nhất gây đái tháo đường typ 2 bằng chế độ ăn giàu chất béo và tiêm Streptozocin.

- Nghiên cứu tác dụng hạ đường huyết của các chất phân lập được bằng phương pháp xác định khả năng ức chế enzym PTP1B.

- Nghiên cứu ảnh hưởng độ hấp thu glucose của các chất phân lập bằng phương pháp đo độ hấp thu glucose trong tế bào mô mỡ 3T3-L1.

2.2.3. Nghiên cứu động thái tích lũy hoạt chất trong lá Dây thìa canh

- Xác định chất đại diện của Dây thìa canh là gymnemagenol bằng phương pháp chiết, thủy phân dịch chiết, phân lập bằng sắc ký cột, sắc ký HPLC điều chế, xác định cấu trúc gymnemagenol dựa trên phương pháp phổ bao gồm: phổ khối lượng phun mù điện tử, phổ khối lượng phun mù điện tử phân giải cao, phổ cộng hưởng từ hạt nhân một chiều (1D), hai chiều (2D) và đối chiếu với tài liệu tham khảo.

- Định lượng gymnemagenol và theo dõi động thái tích lũy hoạt chất: Gymnemagenol được pha với 1 dãy nồng độ 0,08; 0,04; 0,02; 0,01; 0,005; 0,0025 mg/ml và chạy đồng thời, trong cùng điều kiện với các mẫu thủy phân và xác định diện tích dưới đường cong của pic chất chuẩn. Thời gian lưu của gymnemagenol được xác định là 31,5 phút. Phương trình hồi quy tuyến tính của gymnemagenol đối chiếu trong nghiên cứu được xác định là $AUC = 161,662,666 \times \text{Nồng độ gymnemagenol} + 2,407,421$ ($r^2=0.99$). Hàm lượng gymnemagenol trong các mẫu dược liệu được xác định theo công thức:

$$\% \text{Gymnemagenol} = \frac{AUC - 2,407,421}{161,662,666} \times \frac{1}{2} \times \frac{\text{Khối lượng cao khô sau chiết}}{\text{Khối lượng dược liệu cân}} \times 100(\%)$$

Mỗi tháng phân tích trên 3 mẫu khác biệt. Tỷ lệ hàm lượng gymnemagenol của các mẫu được xác định là trung bình của 3 mẫu \pm SD.

CHƯƠNG 3. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU

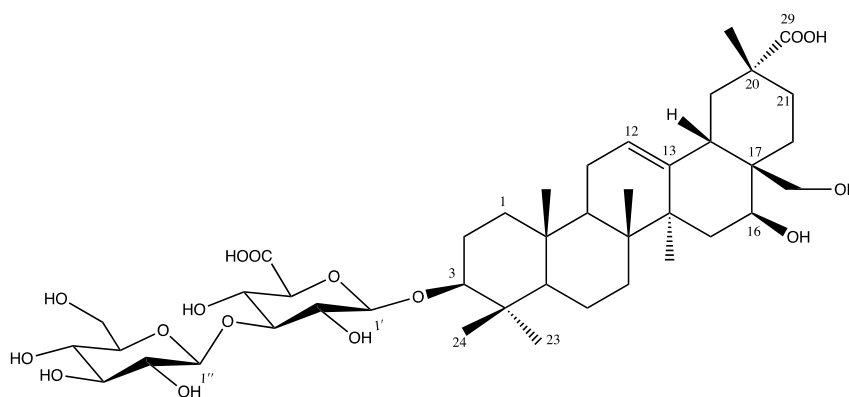
3.1. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU VỀ THÀNH PHẦN HÓA HỌC

3.1.1. Phân lập và xác định cấu trúc hóa học các chất đã phân lập được

Chất 1: **3 β ,16 β ,28-trihydroxyolean-12-en-29-oic acid 3-O- β -D-glucopyranosyl(1 \rightarrow 3)- β -D-glucuronopyranoside.**

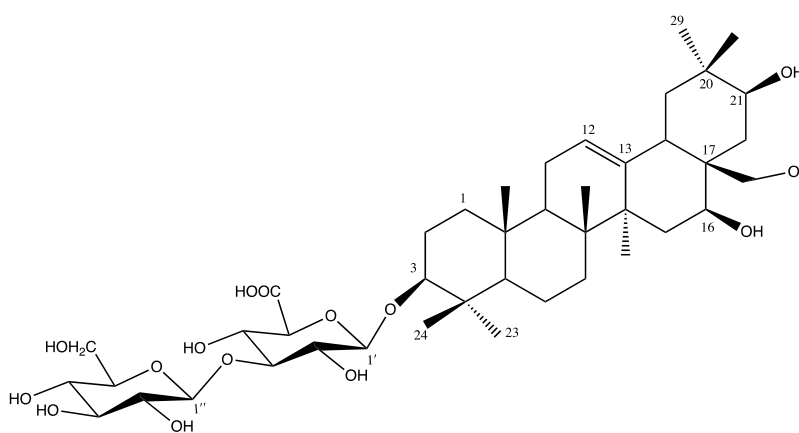
Chất 1 có bột vô định hình màu trắng. Phổ IR (cm^{-1}): 3399, 2943, 1706 cm^{-1} . Phổ ESI-MS m/z : 825,4315 $[M - H]^-$. Phổ $^1\text{H-NMR}$ (600 MHz): 0,97 (3H, s, H-23); 1,26 (3H, s, H-24); 0,81 (3H, s, H-25); 0,99 (3H, s, H-26); 1,38 (3H, s, H-

27); 5,31(1H, t, $J = 3,0$ Hz, H-12); 1,58 (3H, s, H-30); 4,97 (1H, d, $J = 7,2$ Hz, H-1'), 5,35 (1H, d, $J = 7,2$ Hz, H-1''). Phổ $^{13}\text{C-NMR}$ (150 MHz): 38,8 (C-1); 26,8 (C-2); 89,3 (C-3); 39,8 (C-4); 55,8 (C-5); 18,6 (C-6); 33,1 (C-7); 40,4 (C-8); 47,2 (C-9); 37,0 (C-10); 24,1 (C-11); 123,5 (C-12); 143,6 (C-13); 44,0 (C-14); 36,9 (C-15); 67,0 (C-16); 41,4 (C-17); 43,6 (C-18); 41,8 (C-19); 43,0 (C-20); 29,7 (C-21); 25,4 (C-22); 17,2 (C-23); 28,3 (C-24); 15,9 (C-25); 17,1 (C-26); 27,3 (C-27); 68,2 (C-28); 181,6 (C-29); 20,6 (C-30); 107,0 (C-1'); 74,7 (C-2'); 87,8 (C-3'); 71,8 (C-4'); 77,6 (C-5'); 172,5 (C-6'), 106,1 (C-1''); 75,9 (C-2''); 78,5 (C-3''); 72,0 (C-4''); 79,0 (C-5''); 62,7 (C-6'');



Hình 3.2. Cấu trúc hóa học chất 1

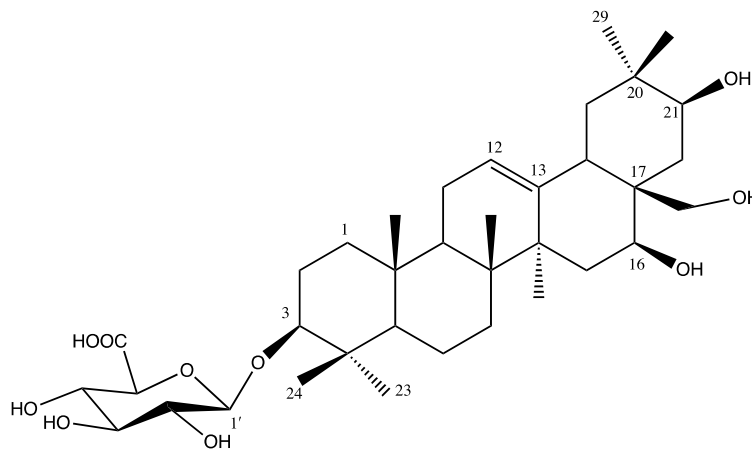
Chất 2: Sitakisogenin 3-O- β -D-glucopyranosyl (1 \rightarrow 3)- β -D-glucuronopyranoside.



Hình 3.4. Cấu trúc hóa học chất 2

Chất 2 thu được ở dạng bột vô định hình, màu trắng. Phổ **ESI-MS** m/z 811.4521 $[M - H]^-$. Phổ **1H -NMR** (600 MHz): 0,96 (3H, s, H-23); 1,27 (3H, s, H-24); 0,79 (3H, s, H-25); 0,96 (3H, s, H-26); 1,36 (3H, s, H-27); 1,25 (3H, s, H-29); 1,25 (3H, s, H-30); 5,29 (1H, t, $J = 3,0$ Hz, H-12); 4,95 (1H, d, $J = 7,5$ Hz, H-1'), 5,36 (1H, d, $J = 8,0$ Hz, H-1''); 4,27 (2H, dd, H-6''). Phổ **^{13}C -NMR** (150 MHz): 38,9 (C-1); 26,9 (C-2); 89,3 (C-3); 39,8 (C-4); 55,8 (C-5); 18,7 (C-6); 33,2 (C-7); 40,4 (C-8); 47,3 (C-9); 37,0 (C-10); 24,1 (C-11); 123,1 (C-12); 143,7 (C-13); 44,1 (C-14); 36,9 (C-15); 67,0 (C-16); 41,5 (C-17); 43,6 (C-18); 41,8 (C-19); 43,0 (C-20); 29,7 (C-21); 25,4 (C-22); 17,2 (C-23); 28,3 (C-24); 15,9 (C-25); 17,1 (C-26); 27,4 (C-27); 68,2 (C-28); 18,3 (C-29); 20,6 (C-30); 107,0 (C-1'); 74,5 (C-2'); 88,0 (C-3'); 72,1 (C-4'); 77,6 (C-5'); 172,5 (C-6'), 103,9 (C-1''); 73,1 (C-2''); 73,2 (C-3''); 69,3 (C-4''); 76,8 (C-5''); 63,0 (C-6'');

Chất 3: Sitakisogenin 3-O- β -D glucuronopyranosid.



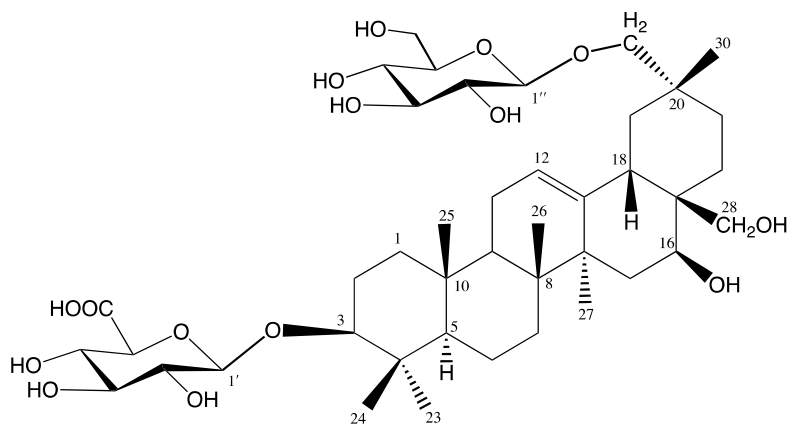
Hình 3.6. Cấu trúc hóa học chất 3

Chất 3 thu được ở dạng bột vô định hình màu trắng. Phổ **ESI-MS** m/z 649,3967 $[M - H]^-$. Phổ **1H -NMR** (800 MHz): 0,97 (3H, s, H-23); 1,27 (3H, s, H-24); 0,79 (3H, s, H-25); 0,97 (3H, s, H-26); 1,37 (3H, s, H-27); 1,25 (3H, s, H-29); 1,25 (3H, s, H-30); 5,29 (1H, t, $J = 3,0$ Hz, H-12); 5,02 (1H, d, $J = 7,7$ Hz, H-1'). Phổ **^{13}C -NMR** (200 MHz): 39,1 (C-1); 27,0 (C-2); 89,3 (C-3); 39,8 (C-4); 56,0 (C-5); 18,8 (C-6); 33,3 (C-7); 40,4 (C-8); 47,4 (C-9); 37,1 (C-10); 24,2 (C-11);

123,4 (C-12); 143,5 (C-13); 44,2 (C-14); 37,0 (C-15); 68,0 (C-16); 44,1 (C-17); 44,0 (C-18); 48,0 (C-19); 37,2 (C-20); 73,1 (C-21); 35,3 (C-22); 17,2 (C-23); 28,5 (C-24); 16,0 (C-25); 17,3 (C-26); 27,4 (C-27); 68,6 (C-28); 18,3 (C-29); 30,4 (C-30); 107,6 (C-1'); 75,8 (C-2'); 78,5 (C-3'); 73,8 (C-4'); 78,1 (C-5'); 173,4 (C-6').

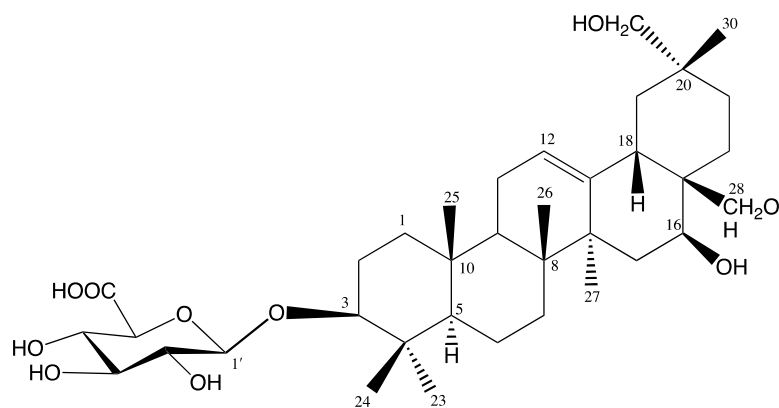
Chất 4: 29-O-(β -D-glucopyranosyl) gymnemagenol 3-O- β -D-glucuronopyranosid

Chất 4 thu được dạng bột vô định hình, màu trắng. Phổ ESI-MS m/z 811,4526 [M-H]⁻. Phổ ¹H-NMR (600 MHz): 1,00 (3H, s, H-23); 1,31 (3H, s, H-24); 0,83 (3H, s, H-25); 1,00 (3H, s, H-26); 1,33 (3H, s, H-27); 3,92 (3H, d, $J = 8,0$ Hz, H-29); 1,21 (3H, s, H-30); 5,29 (1H, t, $J = 3,0$ Hz, H-12); 5,04 (1H, d, $J = 7,8$ Hz, H-1'), 4,84 (1H, d, $J = 7,8$ Hz, H-1''). Phổ ¹³C-NMR (150 MHz): 39,1 (C-1); 27,0 (C-2); 89,2 (C-3); 39,9 (C-4); 56,0 (C-5); 18,8 (C-6); 33,3 (C-7); 40,5 (C-8); 47,4 (C-9); 37,0 (C-10); 24,1 (C-11); 123,0 (C-12); 144,1 (C-13); 43,9 (C-14); 37,0 (C-15); 67,2 (C-16); 41,8 (C-17); 44,1 (C-18); 42,2 (C-19); 36,1 (C-20); 29,6 (C-21); 25,7 (C-22); 17,3 (C-23); 28,5 (C-24); 16,0 (C-25); 17,2 (C-26); 27,4 (C-27); 69,0 (C-28); 82,0 (C-29); 20,5 (C-30); 107,6 (C-1'); 75,9 (C-2'); 78,5 (C-3'); 73,8 (C-4'); 78,1 (C-5'); 173,4 (C-6'), 105,9 (C-1''); 75,6 (C-2''); 79,0 (C-3''); 72,1 (C-4''); 78,9 (C-5''); 63,2 (C-6'').



Hình 3.8. Cấu trúc hóa học chất 4

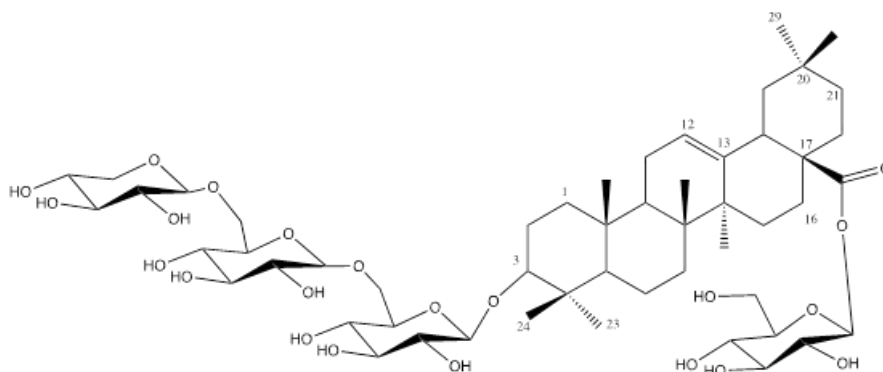
Chất 5: Gymnemagenol 3-O- β -D-glucuronopyranosid.



Hình 3.10. Cấu trúc hóa học chất 5

Chất 5 thu được dạng bột vô định hình, màu trắng, Phổ **ESI-MS** m/z 649,3985 $[M - H]^-$. Phổ **1H -NMR** (800 MHz): 1,02 (3H, s, H-23); 1,29 (3H, s, H-24); 0,83 (3H, s, H-25); 1,00 (3H, s, H-26); 1,39 (3H, s, H-27); 3,60 (2H, d, ovl, H-29); 1,22 (3H, s, H-30); 5,29 (1H, t, $J = 3,0$ Hz, H-12); 5,04 (1H, d, $J = 7,8$ Hz, H-1'), 4,84 (1H, d, $J = 7,8$ Hz, H-1''). Phổ **^{13}C -NMR** (200 MHz): 39,1 (C-1); 27,0 (C-2); 89,3 (C-3); 39,9 (C-4); 56,0 (C-5); 18,7 (C-6); 33,2 (C-7); 40,4 (C-8); 47,4 (C-9); 37,0 (C-10); 24,1 (C-11); 123,0 (C-12); 144,4 (C-13); 44,2 (C-14); 37,1 (C-15); 67,2 (C-16); 41,8 (C-17); 44,2 (C-18); 42,2 (C-19); 37,2 (C-20); 29,3 (C-21); 26,0 (C-22); 17,2 (C-23); 28,5 (C-24); 16,0 (C-25); 17,3 (C-26); 27,4 (C-27); 69,2 (C-28); 74,3 (C-29); 20,4 (C-30); 107,6 (C-1'); 75,9 (C-2'); 78,4 (C-3'); 73,8 (C-4'); 78,5 (C-5'); 173,2 (C-6').

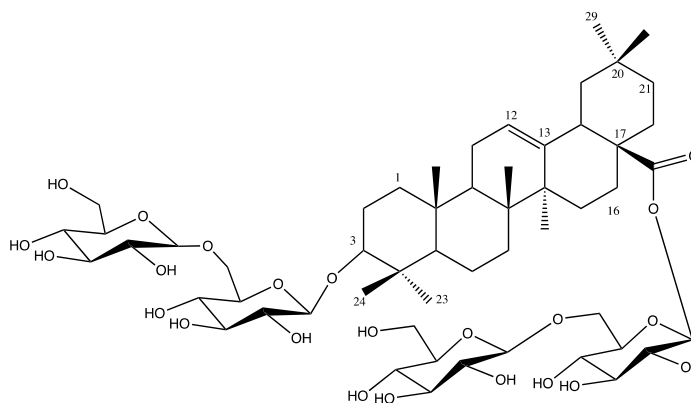
Chất 6: 3-O-[β -D-xylopyranosyl(1 \rightarrow 6)- β -D-glucopyranosyl(1 \rightarrow 6)- β -D-glucopyranosyl] oleanolic acid 28- β -D-glucopyranosyl ester.



Hình 3.12. Cấu trúc hóa học chất 6

Chất 6 thu được là chất bột màu trắng; phổ IR (KBr) ν_{\max} : 3410 (OH), 1700 (COO-), 1620 (C=C), 1428, 1028 cm^{-1} ; $[\alpha]_{\text{D}}^{25}$ -10,2⁰ (*c* 0,1; MeOH). Phổ ESI-MS: (-) 911 [M-glucose-H]⁻. Phổ ¹³C-NMR (75 MHz): 38,7 (C-1); 26,7 (C-2); 89,0 (C-3); 39,5 (C-4); 55,9 (C-5); 18,5 (C-6); 33,1 (C-7); 39,9 (C-8); 48,0 (C-9); 37,0 (C-10); 23,8 (C-11); 123,0 (C-12); 144,0 (C-13); 42,1 (C-14); 28,2 (C-15); 23,4 (C-16); 47,0 (C-17); 41,7 (C-18); 46,3 (C-19); 30,8 (C-20); 34,0 (C-21); 32,5 (C-22); 28,2 (C-23); 17,0 (C-24); 15,6 (C-25); 17,5 (C-26); 26,7 (C-27); 176,4 (C-28); 33,1 (C-29); 23,7 (C-30); 106,9 (C Glu- SA1-1'); 75,0 (C Glu- SA1-2'); 78,3 (C Glu- SA1-3'); 71,5 (C Glu- SA1-4'); 77,0 (C Glu- SA1-5'); 70,4 (C Glu- SA1-6'). 105,4 (C Glu-SA2-1'); 75,6 (C Glu-SA2-2'); 78,6 (C Glu-SA2-3'); 71,6 (C Glu-SA2-4'); 76,9 (C Glu-SA2-5'); 69,8 (C Glu-SA2-6'). 106,0 (C Xyl- SA3-1'); 74,9 (C Xyl- SA3-2'); 78,1 (C Xyl- SA3-3'); 71,1 (C Xyl- SA3-4'); 67,1 (C Xyl- SA3-5'). 95,7 (C Glu-SB1-1'); 74,1 (C Glu-SB1-2'); 78,9 (C Glu-SB1-3'); 71,1 (C Glu-SB1-4'); 79,3 (C Glu-SB1-5'); 62,2 (C Glu-SB1-6').

Chất 7: 3-O- $[\beta$ -D-glucopyranosyl(1 \rightarrow 6)- β -D-glucopyranosyl] oleanolic acid 28- $[\beta$ -D-glucopyranosyl(1 \rightarrow 6)- β -D-glucopyranosyl]ester.

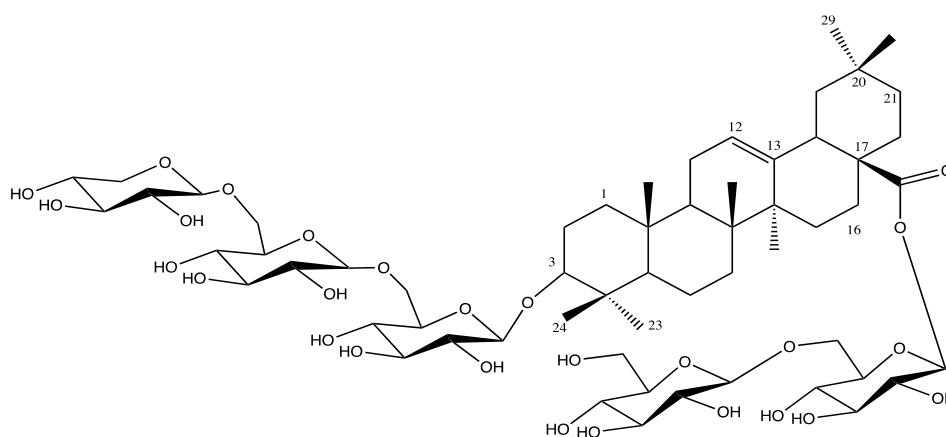


Hình 3.13. Cấu trúc hóa học chất 7

Chất 7 thu được là bột màu trắng; IR (KBr) ν_{\max} : 3415 (OH), 1708 (COO-) 1620 (C=C), 1430, 1058 cm^{-1} ; $[\alpha]$ -12,5⁰ (*c* 0,1; MeOH). Phổ ESI-MS *m/z*: 1103 [M-

H]. Phổ $^{13}\text{C-NMR}$ (75 MHz): 38,7 (C-1); 26,7 (C-2); 89,0 (C-3); 39,5 (C-4); 55,7 (C-5); 18,5 (C-6); 33,1 (C-7); 39,8 (C-8); 48,0 (C-9); 37,0 (C-10); 23,7 (C-11); 122,8 (C-12); 144,0 (C-13); 42,1 (C-14); 28,2 (C-15); 23,4 (C-16); 47,0 (C-17); 41,6 (C-18); 46,3 (C-19); 30,8 (C-20); 34,0 (C-21); 32,5 (C-22); 28,2 (C-23); 17,0 (C-24); 15,6 (C-25); 17,5 (C-26); 26,1 (C-27); 176,5 (C-28); 33,1 (C-29); 23,7 (C-30); 106,9 (C Glu- SA1-1'); 75,1 (C Glu- SA1-2'); 78,4 (C Glu- SA1-3'); 71,5 (C Glu- SA1-4'); 77,0 (C Glu- SA1-5'); 70,5 (C Glu- SA1-6'). 105,4 (C Glu-SA2-1'); 75,6 (C Glu-SA2-2'); 78,6 (C Glu-SA2-3'); 71,6 (C Glu-SA2-4'); 78,4 (C Glu-SA2-5'); 62,5 (C Glu-SA2-6'). 95,6 (C Glu-SB1-1'); 73,8 (C Glu-SB1-2'); 78,7 (C Glu-SB1-3'); 70,8 (C Glu-SB1-4'); 77,9 (C Glu-SB1-5'); 69,3 (C Glu-SB1-6'). 105,2 (C Glu-SB2-1'); 75,1 (C Glu-SB2-2'); 78,4 (C Glu-SB2-3'); 71,4 (C Glu-SB2-4'); 78,4 (C Glu-SB2-5'); 62,7 (C Glu-SB2-6').

Chất 8: 3-O-[β -D-xylopyranosyl(1 \rightarrow 6)- β -D-glucopyranosyl(1 \rightarrow 6)- β -D-glucopyranosyl] oleanolic acid 28-[β -D-glucopyranosyl(1 \rightarrow 6)- β -D-glucopyranosyl] ester.



Hình 3.14. Cấu trúc hóa học chất 8

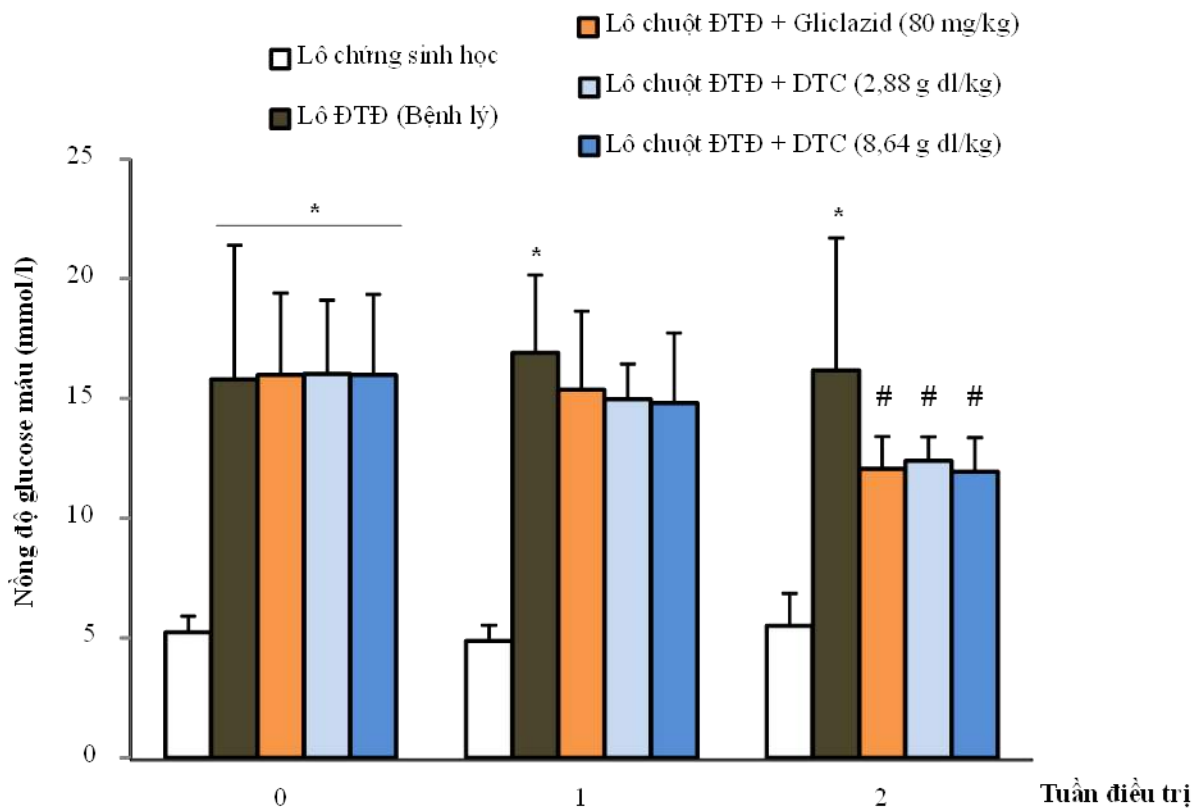
Chất **8** thu được là chất bột màu trắng với $[\alpha]_{\text{D}}^{25} -10,0^0$ (c 0,1; MeOH), Phổ HRESI-MS m/z : 1235,6188 $[\text{M-H}]^-$. Phổ IR: 3422 cm^{-1} , 1720 cm^{-1} , 1618 cm^{-1} . Phổ $^{13}\text{C-NMR}$ (75 MHz): 38,7 (C-1); 26,7 (C-2); 89,0 (C-3); 39,5 (C-4); 55,8 (C-5); 18,6 (C-6); 33,2 (C-7); 39,9 (C-8); 48,0 (C-9); 37,0 (C-10); 23,8 (C-11); 123,0 (C-12); 144,0 (C-13); 42,1 (C-14); 28,3 (C-15); 23,4 (C-16); 47,0 (C-17);

41,7 (C-18); 46,3 (C-19); 30,8 (C-20); 34,0 (C-21); 32,6 (C-22); 28,3 (C-23); 17,1 (C-24); 15,7 (C-25); 17,6 (C-26); 26,1 (C-27); 176,6 (C-28); 33,1 (C-29); 23,7 (C-30); 106,9 (C Glu- SA1-1'); 75,0 (C Glu- SA1-2'); 78,3 (C Glu- SA1-3'); 71,5 (C Glu- SA1-4'); 77,0 (C Glu- SA1-5'); 70,4 (C Glu- SA1-6'). 105,4 (C Glu-SA2-1'); 75,6 (C Glu-SA2-2'); 78,6 (C Glu-SA2-3'); 71,6 (C Glu-SA2-4'); 77,0 (C Glu-SA2-5'); 69,9 (C Glu-SA2-6'). 106,0 (C Xyl- SA3-1'); 74,9 (C Xyl- SA3-2'); 78,1 (C Xyl- SA3-3'); 71,1 (C Xyl- SA3-4'); 67,1 (C Xyl- SA3-5'). 95,7 (C Glu-SB1-1'); 73,9 (C Glu-SB1-2'); 78,7 (C Glu-SB1-3'); 70,9 (C Glu-SB1-4'); 78,0 (C Glu-SB1-5'); 69,4 (C Glu-SB1-6'). 105,2 (C Glu-SB2-1'); 75,2 (C Glu-SB2-2'); 78,5 (C Glu-SB2-3'); 71,5 (C Glu-SB2-4'); 78,4 (C Glu-SB2-5'); 62,6 (C Glu-SB2-6').

KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU VỀ TÁC DỤNG SINH HỌC

3.2.1. Kết quả nghiên cứu tác dụng hạ đường huyết trên chuột

Kết quả điều trị chuột nhất gây đái tháo đường typ 2 bằng các mẫu thử được trình bày ở bảng.



Hình 3.16. Ảnh hưởng của mẫu thử lên nồng độ glucose máu của chuột nhắt trắng ĐTD typ 2 sau 2 tuần uống mẫu thử

**: $P < 0,001$ so sánh giữa các lô chuột bệnh lý so với lô chứng sinh học tại các thời điểm 0, 1 và 2 tuần; và so sánh giữa các lô chuột ĐTD trước khi được điều trị so với lô chứng sinh học*

#: $P < 0,05$ so sánh giữa các lô điều trị với lô bệnh lý sau 2 tuần điều trị

Kết quả cho thấy:

- Nồng độ glucose máu ở chuột ĐTD dùng gliclazid 80mg/kg/ngày và mẫu thử cả 2 liều ở thời điểm sau uống thuốc 1 tuần có xu hướng giảm so với lô mô hình nhưng sự khác biệt là chưa có ý nghĩa thống kê. Ở thời điểm sau 2 tuần, gliclazid và mẫu thử cả 2 liều đều có tác dụng làm giảm nồng độ glucose máu so với lô mô hình, sự khác biệt có ý nghĩa thống kê với $P < 0,05$. Không có sự khác biệt về mức độ giảm nồng độ glucose máu giữa gliclazid với mẫu thử cả 2 liều ($P > 0,05$).

3.2.2. Kết quả nghiên cứu tác dụng hạ đường huyết của các chất phân lập

3.3.2.1. Hoạt tính ức chế enzym PTP1B

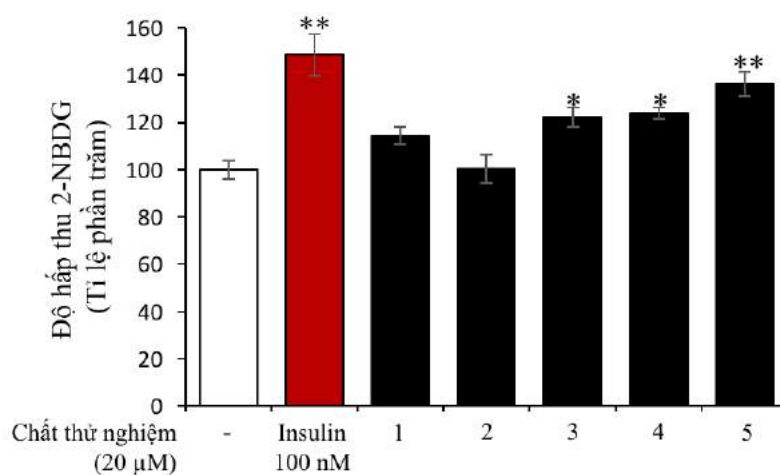
Bảng 3.10. Hoạt tính ức chế enzym PTP1B của các chất 1-8

Chất thử nghiệm (50 μM)	% khả năng ức chế
1	17,90 \pm 2,89
2	8,02 \pm 5,48
3	28,75 \pm 8,05
4	40,14 \pm 1,70
5	80,48 \pm 6,98
6	Không hoạt tính
7	Không hoạt tính
8	Không hoạt tính

Acid ursolic	99,10 ± 2,07
--------------	--------------

3.2.2.2. Hoạt tính hấp thu glucose trong tế bào 3T3-L1 của các chất

Các chất **1-5** có tác dụng ức chế PTP1B ở các mức độ khác nhau nên được tiếp tục nghiên cứu về khả năng tăng hấp thu glucose trên tế bào 3T3-L1 được thực hiện bằng phương pháp thử nghiệm sử dụng dẫn xuất glucose gắn huỳnh quang. Hoạt tính hấp thu tế bào có sự khác biệt ý nghĩa trên các tế bào được xử lý với các chất **3-5** ($p < 0,05$), trong đó chất **5** tác dụng tăng hấp thu glucose là mạnh nhất ($p < 0,01$). (Hình 3.26).

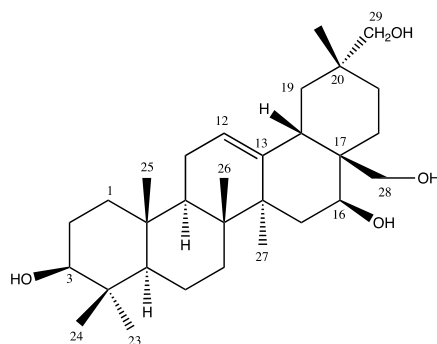


Hình 3.26. Ảnh hưởng của các chất 1-5 trên khả năng hấp thu dẫn xuất glucose gắn huỳnh quang vào trong tế bào mô mỡ 3T3-L1

3.3. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU ĐỘNG THÁI TÍCH LŨY HOẠT CHẤT

3.3.1. Chiết xuất, phân lập và xác định cấu trúc gymnemagenol

Gymnemagenol thu được ở dạng bột vô định hình, công thức phân tử $C_{30}H_{50}O_4$ được xác định dựa trên tín hiệu phân mảnh ion 519 $[M-H+HCOOH]^-$ ở chế độ quét ion âm và 497 $[M+Na]^+$ và 457 $[M-H_2O+H]^+$



Hình 3.28. Cấu trúc của gymnemagenol

3.3.2. Xây dựng phương pháp định lượng gymnemagenol và theo dõi động thái tích lũy hoạt chất trong DTC.

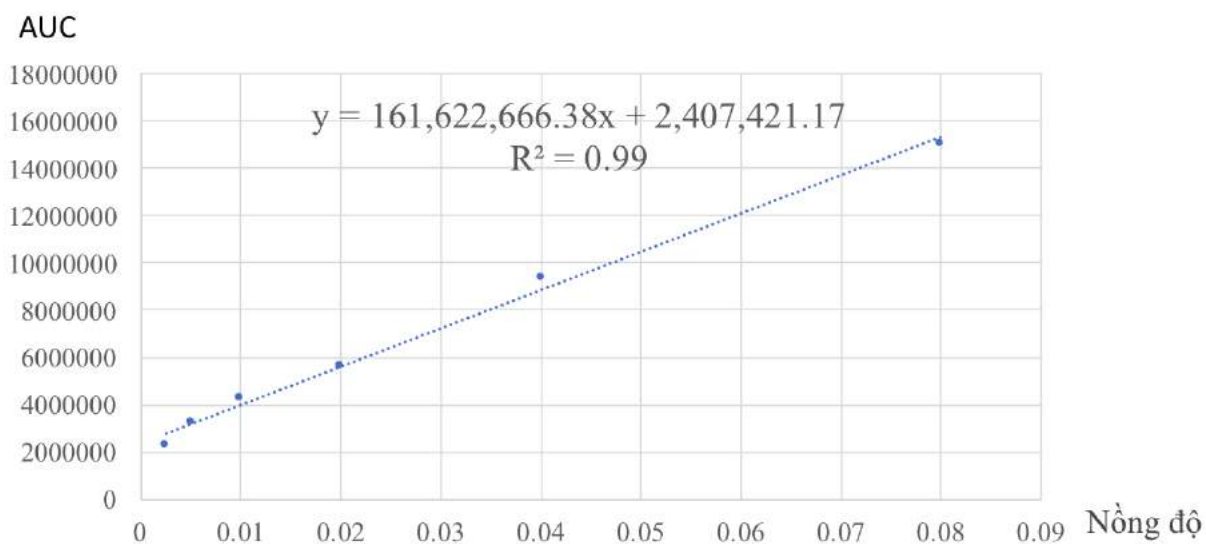
3.3.2.1. Chuẩn bị mẫu dược liệu và khảo sát điều kiện phân tích

3.3.2.2. Khảo sát tính thích hợp của hệ thống

3.3.2.3. Độ lặp lại của phương pháp

3.3.2.4. Khảo sát khoảng tuyến tính của phương pháp

Phương trình hồi quy tuyến tính của gymnemagenol đối chiếu trong nghiên cứu được xác định là $AUC = 161,662,666 \times \text{Nồng độ gymnemagenol} + 2,407,421$ ($R^2=0,99$).



Hình 3.31. Đường chuẩn xác định hàm lượng gymnemagenol

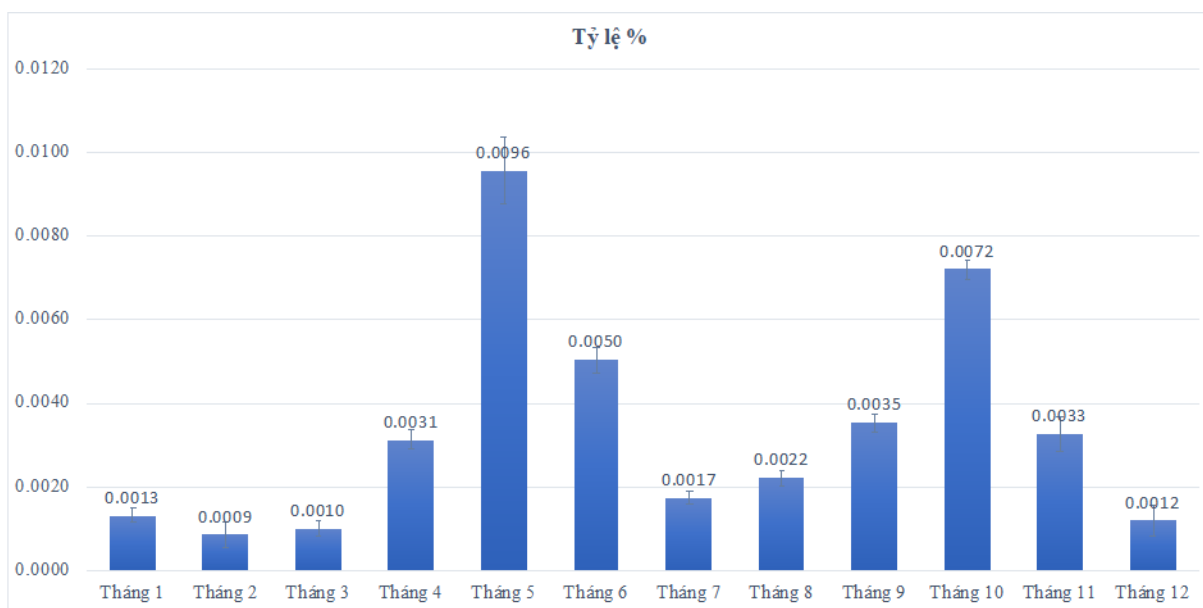
3.3.2.5. Độ đúng của phương pháp

3.3.2.6. Giới hạn của phương pháp

3.3.2.7. Định lượng gymnemagenol các mẫu Dây thìa canh theo các tháng thu hái

Các mẫu Dây thìa canh theo các tháng được chiết và xử lý theo quy trình tương tự như mục 2. Tỷ lệ % gymnemagenol của các mẫu được xác định là trung bình của 3 mẫu \pm SD. Hàm lượng gymnemagenol trong các mẫu tương ứng được xác định theo công thức:

$$\% \text{Gymnemagenol} = \frac{\text{AUC} - 2,407,421}{161,662,666} \times \frac{1}{2} \times \frac{\text{Khối lượng cao khô sau chiết}}{\text{Khối lượng dược liệu cân}} \times 100(\%)$$



Hình 3.33. Hàm lượng gymnemagenol trong các mẫu DTC thu theo các tháng

Sự tích lũy của gymnemagenol trong các mẫu có sự thay đổi theo các thời điểm trong năm. Tỷ lệ hàm lượng của gymnemagenol dao động từ khoảng 0,0009 – 0,0096%, tương ứng thấp nhất vào tháng 2 và cao nhất vào tháng 5. Hàm lượng gymnemagenol tăng cao vào 2 thời điểm tháng 5 và tháng 10.

CHƯƠNG 4. BÀN LUẬN

4.1. VỀ ĐỐI TƯỢNG NGHIÊN CỨU

Loài *G.sylvestre* là loài đã được nghiên cứu và ứng dụng nhiều nhất trên thế giới trong chi *Gymnema* R.Br, việc lựa chọn loài *G.sylvestre* để nghiên cứu trong Luận án giúp làm sáng tỏ sự khác biệt của giống cây bản địa Việt Nam so

với các nước khác, đặc biệt là so với giống *G.sylvestre* Ấn Độ, được xem như là nơi đầu tiên sử dụng Dây thìa canh làm thuốc. Đồng thời góp phần giúp chuẩn hóa nguồn nguyên liệu quý, ứng dụng vào thực tế sản xuất các sản phẩm hỗ trợ điều trị bệnh tiểu đường tại Việt Nam.

4.2. VỀ THÀNH PHẦN HÓA HỌC

Trong 8 chất phân lập được, có 1 chất có khung acid myrtylogenic (chất 1), 2 chất có khung sitakisogenin (chất 2 và 3), 2 chất có khung gymnemagenol (chất 4 và 5), và 3 chất có khung acid oleanolic (chất 6, 7 và chất 8).

Có 6 chất mới lần đầu tiên được phân lập và công bố từ thực vật:

Chất 1: 3- β ,16 β ,28-trihydroxyolean-12-en-29-oic acid 3-O- β -D-glucopyranosyl(1 \rightarrow 3)- β -D-glucuronopyranoside. **Chất 2:** Sitakisogenin 3-O- β -D-glucopyranosyl (1 \rightarrow 3)- β -D-glucuronopyranoside. **Chất 3:** Sitakisogenin 3-O- β -D-glucuronopyranoside. **Chất 4:** 29-O-(β -D-glucopyranosyl) gymnemagenol 3-O- β -D-glucuronopyranoside. **Chất 5:** Gymnemagenol 3-O- β -D-glucuronopyranoside. **Chất 8:** 3-O-[β -D-xylopyranosyl(1 \rightarrow 6)- β -D-glucopyranosyl(1 \rightarrow 6)- β -D-glucopyranosyl] oleanolic acid 28-[β -D-glucopyranosyl(1 \rightarrow 6)- β -D-glucopyranosyl] ester.

Có 2 hợp chất trùng với các tác giả Trung quốc đã công bố năm 2000 phân lập từ mẫu Dây thìa canh *G.sylvestre* thu tại tỉnh giáp với Việt Nam là khu tự trị tỉnh Quảng Tây:

Chất 6: 3-O-[β -D-xylopyranosyl(1 \rightarrow 6)- β -D-glucopyranosyl(1 \rightarrow 6)- β -D-glucopyranosyl] oleanolic acid 28- β -D-glucopyranosyl ester. **Chất 7:** 3-O-[β -D-glucopyranosyl(1 \rightarrow 6)- β -D-glucopyranosyl] oleanolic acid 28-[β -D-glucopyranosyl(1 \rightarrow 6)- β -D-glucopyranosyl] ester

Có sự khác biệt rất cơ bản giữa cấu trúc phân tử các saponin phân lập từ *G.sylvestre* Ấn độ với *G.sylvestre* Việt Nam và Trung Quốc. Các saponin phân

lập từ *G.sylvestre* Ấn độ, đặc trưng là các acid gymnemic đều có nhóm thế - OH hoặc O-Glc ở vị trí C23, trong khi các chất phân lập từ *G.sylvestre* Việt Nam và Trung Quốc đều không có nhóm này, điều này có thể lý giải do có sự sai khác về địa lý, các chất trong cây cũng có sự biến đổi.

4.3. VỀ TÁC DỤNG SINH HỌC

4.3.1. Về tác dụng hạ đường huyết của dịch chiết Dây thìa canh

Kết quả thí nghiệm của Luận án cho thấy dịch chiết DTC liều 2,88 g được liệu khô/kg/ngày và liều 8,64 g được liệu khô/kg/ngày có tác dụng hạ glucose máu và cải thiện cấu trúc vi thể của tụy chuột, trên chuột nhắt được gây mô hình đái tháo đường typ 2 bằng chế độ ăn giàu chất béo và tiêm STZ, khi cho uống liên tục trong 2 tuần. Kết quả nghiên cứu của Luận án phù hợp với kết quả nghiên cứu công bố năm 2008 của PGS.TS Trần Văn Ôn và TS. Phùng Thanh Hương trên Tạp chí Dược học: Cao chiết ethanol 90% lá DTC với liều tương đương 10g lá khô/ kg cân nặng chuột nhắt làm hạ glucose huyết trên chuột gây tăng glucose huyết bằng STZ, tác dụng cao nhất là ở 2 giờ và duy trì đến 4 giờ [4]. Tuy nhiên ở nghiên cứu này, các tác giả dùng cao chiết ethanol 90% lá DTC, cũng như thực nghiệm không so sánh với đối chứng dương, vì vậy Luận án đã tiến hành thử lại tác dụng hạ đường huyết in vivo trên chuột nhắt gây đái tháo đường typ 2 với cao chiết ethanol 60% lá DTC và có đối chiếu với chứng dương gliclazid.

4.3.2. Về tác dụng hạ đường huyết của các chất phân lập từ Dây thìa canh

Tác dụng ức chế enzym PTP1B và hấp thu glucose vào tế bào 3T3-L1 của các chất phân lập từ DTC trong nghiên cứu cho thấy sự liên quan giữa cấu trúc và tác dụng khá rõ rệt. Cụ thể, các chất **6-8** gây tác dụng tăng hoạt tính của PTP1B thì cùng có khung là acid oleanolic với nhóm thế -COOH ở vị trí C28, trong công thức có rất nhiều (4-5) phân tử đường và không có acid glucuronic

trong cấu trúc. Trong khi đó tác dụng ức chế PTP1B ở các mức khác nhau có thể quan sát thấy ở các chất **1-5**, các chất này đều có chung đặc điểm là nhóm thế -COOH được gắn trên phân tử đường (tương ứng là acid glucuronic), số lượng phân tử nhóm thế đường trong phân tử ít (1-2). Kết quả này phù hợp với các nghiên cứu trước đây đều khẳng định hoạt chất của Dây thìa canh trên thế giới là các acid gymnemic mà đặc trưng cấu trúc của các chất này là sự tồn tại của acid glucuronic trong phân tử gắn ở vị trí C3 của khung tritecpen.

Một điều đáng lưu ý khác là trong cùng nhóm các chất có cùng nhóm thế 3β -O-glucuronide thì các chất có 1 phân tử đường (chất **3-5**) có xu hướng ức chế enzym PTP1B mạnh hơn các chất có 2 phân tử đường (Chất **1-2**). Xu hướng này cũng được thể hiện rõ trên tác dụng tăng hấp thu glucose vào tế bào khi các chất 3-5 có tác dụng tăng hấp thu glucose ($p < 0,05$) trong khi đó các chất **1-2** không thể hiện tác dụng này.

4.4. VỀ ĐỘNG THÁI TÍCH LŨY HOẠT CHẤT

Trong các khung chất aglycon xác định được trong nghiên cứu này thì khung gymnemagenol với 2 chất **4-5** cho tác dụng có ý nghĩa trên cả thử nghiệm ức chế PTP1B và tác dụng gây tăng hấp thu glucose vào tế bào. Do đó, tham khảo các nghiên cứu trước đây và dựa trên kết quả thu được khi so sánh hoạt tính của các chất chiết tách được trong Luận án này, gymnemagenol là aglycon được chọn làm chất đại diện phù hợp nhất để nghiên cứu động thái tích lũy hoạt chất trong Dây thìa canh Việt Nam.

Kết quả cho thấy sự tích lũy của gymnemagenol trong các mẫu DTC có sự thay đổi đáng kể theo các thời điểm trong năm. Tỷ lệ hàm lượng của gymnemagenol dao động từ khoảng 0,0009 – 0,0096%, tương ứng thấp nhất vào tháng 2 và cao nhất vào tháng 5. Hàm lượng gymnemagenol tăng cao vào 2 thời điểm tháng 5-6 và tháng 10.

KẾT LUẬN

1. Về thành phần hóa học

- Đã phân lập và xác định được cấu trúc hóa học của 8 chất từ lá của Dây thìa canh *Gymnema sylvestre* (Retz.) R. Br. ex Schult thu tại vùng trồng Hải Hậu, Nam Định, Việt Nam. Trong đó:

+ Có 6 chất mới lần đầu tiên phát hiện từ thực vật:

Chất 1: 3- β ,16 β ,28-trihydroxyolean-12-en-29-oic acid 3-O- β -D-glucopyranosyl(1 \rightarrow 3)- β -D-glucuronopyranoside. **Chất 2:** Sitakisogenin 3-O- β -D-glucopyranosyl (1 \rightarrow 3)- β -D-glucuronopyranoside. **Chất 3:** Sitakisogenin 3-O- β -D-glucuronopyranoside. **Chất 4:** 29-O-(β -D-glucopyranosyl) gymnemagenol 3-O- β -D-glucuronopyranoside. **Chất 5:** Gymnemagenol 3-O- β -D-glucuronopyranoside. **Chất 8:** 3-O-[β -D-xylopyranosyl(1 \rightarrow 6)- β -D-glucopyranosyl(1 \rightarrow 6)- β -D-glucopyranosyl] oleanolic acid 28-[β -D-glucopyranosyl(1 \rightarrow 6)- β -D-glucopyranosyl] ester.

+ Có 2 chất đã được công bố từ Dây thìa canh (*G.sylvestre*) mẫu thu tại Quảng Tây, Trung Quốc:

Chất 6: 3-O-[β -D-xylopyranosyl(1 \rightarrow 6)- β -D-glucopyranosyl(1 \rightarrow 6)- β -D-glucopyranosyl] oleanolic acid 28- β -D-glucopyranosyl ester. **Chất 7:** 3-O-[β -D-glucopyranosyl(1 \rightarrow 6)- β -D-glucopyranosyl] oleanolic acid 28-[β -D-glucopyranosyl(1 \rightarrow 6)- β -D-glucopyranosyl] ester.

- 8 chất phân lập được có cấu trúc hóa học khác với các chất đã được nghiên cứu và công bố từ Dây thìa canh Ấn Độ.

2. Về tác dụng sinh học

- Trên chuột nhất trắng gây đái tháo đường typ 2 bằng chế độ ăn giàu chất béo và tiêm streptozocin, lá Dây thìa canh liều 2,88 g dược liệu khô/kg chuột/ngày và liều 8,64 g dược liệu khô/kg chuột/ngày, uống liên tục trong 2 tuần có tác dụng hạ glucose huyết trên chuột nhất. Không có sự khác biệt về mức độ giảm nồng độ glucose máu giữa lô điều trị bằng gliclazid và lô điều trị bằng DTC ($p > 0,05$).
- Dây thìa canh liều 2,88 g dược liệu khô/kg chuột/ngày và liều 8,64 g dược liệu khô/kg chuột/ngày uống kiên tục trong 2 tuần cũng có tác dụng cải thiện về cấu trúc vi thể của tụy trên chuột nhất gây đái tháo đường typ 2.
- Trong 8 chất phân lập được từ Dây thìa canh, các chất 1-5 tương ứng có tác dụng ức chế enzym PTP1B ở các mức độ khác nhau trong đó chất 5 thể hiện tác dụng tốt nhất. Chất 5 cũng là chất có tác dụng tăng hấp thu glucose tế bào 3T3-L1 mạnh nhất.

3. Về động thái tích lũy hoạt chất

- Chất 4,5 được chứng minh có tác dụng hạ đường huyết trên in vitro mạnh nhất của Dây thìa canh Việt Nam loài *G. sylvestre*, aglycon của 2 chất này là gymnemagenol được chọn là chất đại diện để định lượng và theo dõi động thái tích lũy hoạt chất trong các mẫu dược liệu. Phương pháp định lượng gymnemagenol bằng HPLC đã được xây dựng và thẩm định.
- Tháng 5,6 và tháng 10 là thời gian có hàm lượng hoạt chất cao nhất trong Dây thìa canh. Hai tháng này có điều kiện thời tiết thuận lợi cho sinh trưởng và phát triển của Dây thìa canh, trùng với thời điểm cây cho sinh khối cao và hoạt chất tích lũy được cũng cao hơn và ngược lại. Mùa đông là thời điểm sinh khối dược liệu thấp và hàm lượng hoạt chất thấp nhất. Tháng 5,6 và tháng 10 là các thời điểm thu hái dược liệu DTC tốt nhất.

ĐỀ XUẤT

Từ các kết quả nghiên cứu thu được, đề có thể ứng dụng vào thực tiễn chuẩn hóa và nâng cấp sản phẩm hỗ trợ điều trị đái tháo đường từ Dây thìa canh *Gymnema sylvestre* (Retz.) R. Br. ex Schult, cần tiếp tục nghiên cứu:

- Đánh giá tác dụng hạ đường huyết trên chuột của các phân đoạn thu được.
- Đánh giá động thái tích lũy hoạt chất Dây thìa canh của nhiều vùng trồng, vùng thu hái khác nhau tại Việt Nam.
- Đánh giá động thái tích lũy hoạt chất Dây thìa canh của nhiều bộ phận dùng khác nhau như lá, thân, rễ, hoa, quả.

CÁC CÔNG TRÌNH ĐÃ CÔNG BỐ LIÊN QUAN ĐẾN

LUẬN ÁN TIẾN SỸ DƯỢC HỌC

1. **Hoàng Minh Châu**, Nguyễn Thị Bích Thu, Trần Văn Ôn, Đỗ Thị Hà . Thành phần hóa học của phân đoạn n - Hexan Dây thìa canh, *Tạp chí Dược liệu*, 2013, 18 (4) 248-253.
2. **Hoàng Minh Châu**, Nguyễn Thị Bích Thu, Trần Văn Ôn, Đỗ Thị Hà. Thành phần hóa học của phân đoạn nước dây thìa canh, *Tạp Chí Dược liệu*, 2014, 19 (2), 116-122.
3. **Hoàng Minh Châu**, Đỗ Thị Hà , Phạm Thị Thúy, Nguyễn Thị Thu, Nguyễn Thị Bích Thu, Trần Văn Ôn,. Thành phần hóa học của dịch chiết thủy phân trên mặt đất dây thìa canh, *Tạp Chí Dược liệu*, 2015, 20 (4), 227-231.
4. **Hoàng Minh Châu**, Phạm Hà Thanh Tùng, Oh Won Keun, Nguyễn Thị Bích Thu, Trần Văn Ôn, Trần Minh Ngọc. Triterpene glycosides isolated from *Gymnema sylvestre* (Retz) R.Br.Ex Schult, *JOURNAL OF MEDICINAL MATERIALS*, 2017, Vol. 22, No 5, 270-275.
5. Ha Thanh Tung Pham, **Minh Chau Hoang**, Thi Kim Quy Ha, Lan Huong Dang, Van On Tran, Thi Bich Thu Nguyen, Chul Ho Lee, Oh Won Keun. Discrimination of different geographic varieties of *Gymnema sylvestre*, an anti-sweet plant used for the treatment of typ 2 diabetes, *Phytochemistry* 150 (2018), 12-22.