

NGHIÊN CỨU ĐỊNH LƯỢNG β -ECDYSTERON VÀ THÀNH PHẦN HOÁ HỌC TỪ RỄ NGURU TẮT – *ACHYRANTHES BIDENTATA* BLUME THU TẠI TỈNH HUNG YÊN

Đến tòa soạn: 19-06-2025

Nguyễn Thi Duyên^{1*}, Trần Thị Tuyết², Hoàng Thị Ngọc Anh²

¹Viện Dược liệu, Bộ Y tế

²Đại học Đại Nam

*E-mail:nguyenduyen6784@gmail.com

SUMMARY

STUDY ON DETERMINATION OF β -ECDYSTERONE AND CHEMICAL CONSTITUENTS FROM THE ROOT OF *ACHYRANTHES BIDENTATA* BLUME, COLLECTED IN HUNGYEN

*In this study, we have developed a quantitative method β -ecdysterone in root samples of *Achyranthes bidentata* Blume collected in Hungyen. Only a sample (NT03) had β -ecdysterone content of 0.051 ± 0.001 %, while the others were below 0.03%. Four compounds including acutoside A (1), calendolide E (2), β -ecdysterone (3) and daucosterol (4) were isolated from NT03 sample. Their chemical structures were determined by MS, 1D-, 2D-NMR spectral methods, which were compared with the data reported in previous literature.*

Keywords: *β -ecdysterone, acutoside A, calendolide E, *Achyranthes bidentata**

1. MỞ ĐẦU

Nguru tất - *Achyranthes bidentata* Blume là cây di nhập từ Trung Quốc từ những năm 1960. Do cây thích hợp trồng ở miền núi, trung du và đồng bằng nên hiện nay được trồng ở nhiều tỉnh như: Lào Cai, Lạng Sơn, Quảng Ninh, Bắc Giang, Hà Nội, Hưng Yên, Thái Bình, Huế, Lâm Đồng và Kiên Giang [1]. Dược điển Việt Nam [2] chưa có chuyên luận định lượng Nguru tất nhưng Dược điển Đài Loan [3] quy định hàm lượng của β -ecdysterone không dưới 0,03 % so với khối lượng dược liệu khô tuyệt đối. Nguru tất là một thảo dược quý được ông cha ta sử dụng như một vị thuốc hành huyết, tán ứ, tiêu ung, lợi thấp, bổ can thận, mạnh gân cốt [4]. Ngày nay, nhiều hoạt tính của nguru tất được biết đến như: điều hoà miễn dịch

chống oxi hoá [5], chống viêm, chống ung thư [6, 7], chống loãng xương [8], bảo vệ thần kinh [9], hạ cholesterol máu và hạ huyết áp [10-11]. Theo thống kê của nhóm tác giả Chen Y. R. và cộng sự [12] năm 2024, nguru tất có 270 hợp chất được công bố gồm: hơn 90 terpenoid saponin (chủ yếu là các olean-saponin), 50 hợp chất phytosteroid và steroid-saponin, một vài polysaccharid [13], 28 alkaloid, 13 flavonoid và hơn 80 hợp chất khác. Tuy nhiên, các hoạt tính của nguru tất chủ yếu do các saponin và các polysaccharide. Việc đánh giá chất lượng của các mẫu thu thập được tại Hưng Yên giúp lựa chọn được mẫu thích hợp cho nghiên cứu hoá học, sản xuất sau này. Nghiên cứu thành phần hoá học là bổ sung dữ liệu cơ sở hoá học cho loài còn nhiều hạn chế ở Việt Nam.

2. THỰC NGHIỆM

2.1. Mẫu thực vật

10 mẫu rễ ngưu tất khô (NT1-NT10) thu vào tháng 2/2025 và 4/2025, tại các hộ trồng và chế biến tại 02 xã Văn Lâm và Khoái Châu Hưng Yên, được giám định tên khoa học tại Viện Dược liệu.

2.2. Hoá chất dung môi

Các dung môi công nghiệp *n*-hexan (H, Thái Lan), ethyl acetat (EtOAc, Singapore), methanol (MeOH, Trung Quốc), dicloromethan (DCM, Đài Loan) được chưng cất trước khi sử dụng cho sắc ký cột. Dung môi methanol, acetonitrile (Merck – Đức) đạt tiêu chuẩn phân tích. Chất chuẩn β -ecdysteron (Chem Faces, độ tinh sạch đạt 98,9%).

2.3. Thiết bị

Sử dụng bản mỏng nhôm tráng sẵn silica gel 60 F₂₅₄S và chất hấp phụ silica gel có kích thước hạt 70-230 và 230-400 mesh (Merck-Đức); đèn tử ngoại Camag UV cabinet 4 với 2 bước sóng 254 và 365 nm; Thiết bị LSMS-8045 của Shimadzu; Thiết bị NMR Bruker 600 & 150 MHz (Thụy Sĩ); hệ thống máy phân tích HPLC Shimadzu, Nhật Bản;...

2.4. Phương pháp định lượng β -ecdysteron

Xây dựng phương pháp định lượng β -ecdysteron

Độ ẩm của mẫu nghiên cứu được xác định theo phương pháp tại phụ lục 9.6 của Dược điển Việt Nam V [2].

Phương pháp định lượng β -ecdysteron trong ngưu tất được tham khảo tài liệu [3] kết hợp với hiệu chỉnh theo trang thiết bị thực tế.

Chuẩn bị mẫu

Dung dịch chuẩn: Dung dịch chuẩn gốc được chuẩn bị bằng cách hòa tan hoàn

toàn β -ecdysteron vào dung môi methanol, nồng độ 1 mg/ml. Các dung dịch chuẩn được chuẩn bị bằng cách pha loãng dung dịch chuẩn gốc với methanol đến các nồng độ 5, 10, 20, 30, 40, 50, 60 μ g/ml.

Dung dịch thử: Dược liệu: Cân chính xác khoảng 1,0 g mẫu thử đã xay nhỏ (đã xác định độ ẩm) vào bình tam giác dung tích 50 ml, thêm khoảng 20 ml dung dịch methanol (TT), siêu âm trong 30 phút ở nhiệt độ 40 °C, lọc dịch chiết qua giấy lọc, lặp lại quá trình chiết thêm 2 lần nữa. Gộp các dịch chiết rồi chuyển sang bình cất quay, cô đặc dung dịch, sau đó chuyển sang bình định mức 10 mL, thêm methanol vừa đủ đến vạch, trộn đều, dịch lọc được lọc qua màng lọc 0,45 μ m trước khi cho vào hệ thống sắc ký HPLC. Mỗi mẫu thử được thực hiện lặp lại 3 lần.

- *Điều kiện sắc ký:*

Cột C-18 Cosmosil-AR-II (250 x 4,6 mm, 5 μ m)

Pha động: Nước/Acetonitrile (85/15, v/v)

Tốc độ dòng: 1,0 ml/phút

Nhiệt độ lò cột: 40°C

Thể tích tiêm mẫu: 10 μ l

Bước sóng phát hiện 248 nm

Xây dựng đường chuẩn β -ecdysteron

Hàm lượng β -ecdysteron trong dung dịch thử được xác định dựa trên công thức:

$$C = \frac{S-b}{A} \times \frac{H}{100}$$

Xác định hàm lượng β -ecdysteron trong các mẫu rễ ngưu tất

Xác định hàm lượng β -ecdysteron trong các mẫu rễ ngưu tất được xác định dựa trên công thức:

$$X (\%) = \frac{C \times V \times 100}{m \times 1000000} \times \frac{100}{100-x}$$

Trong đó:

C: nồng độ β -ecdysteron trong dung dịch thử ($\mu\text{g/ml}$)

S: diện tích pic β -ecdysteron trong sắc ký đồ mẫu thử (mAu.s)

a, b: các hệ số của phương trình đường chuẩn

H: độ tinh khiết của β -ecdysteron (%).

X: hàm lượng chất cần phân tích trong dược liệu (%)

C: nồng độ chất cần phân tích trong dung dịch thử ($\mu\text{g/ml}$)

V: thể tích dung dịch thử (ml)

m: khối lượng dược liệu (g)

x: độ ẩm dược liệu (%)

Xử lý số liệu thực nghiệm

Phương pháp phân tích và xử lý kết quả chất chuẩn β -ecdysteron và mẫu dược liệu theo hướng dẫn của ICH [14] và tham chiếu theo các quy định của AOAC [15].

Xử lý số liệu thực nghiệm bằng phần mềm Empower 3 và Microsoft Excel 2020.

2.5. Chiết xuất và phân lập các hợp chất

Tiến hành 3 lần chiết 10 kg ngưi tấ khô thái kích thước 1-1,5 cm với cồn 80%, tại nhiệt độ 70 °C, với tỉ lệ dung môi/dược liệu 10/1, 8/1 và 6/1 (lít/kg). Loại bỏ dung môi dưới áp suất giảm thu được cao tổng (1,2 kg TNT, độ ẩm 7%, hiệu suất 12%). Phân bố 1,2 kg cao tổng vào 5 lít nước rồi chiết lần lượt với các dung môi có độ phân cực tăng dần dicloromethan và butanol. Loại bỏ dung môi dưới áp suất giảm thu được các cao tương ứng: cao dicloromethan (DNT, 27,1 g), cao butanol (BNT, 375 g) và cao nước (WNT, 797 g).

Tiến hành sắc ký cột pha thường silica gel 370 g phân đoạn butanol (BNT) với hệ dung môi gradient DCM/MeOH (20/1-

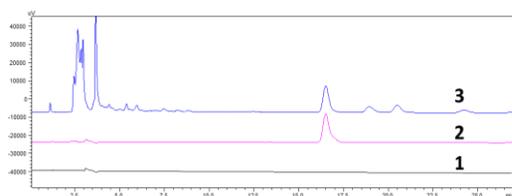
1/1, v/v) và rửa giải bằng MeOH 100% thu được 6 phân đoạn, ký hiệu là A-F. Hợp chất 4 (7 mg) thu được từ sắc ký cột silica gel phân đoạn B (867 mg) với hệ dung môi DCM/MeOH (10/1, v/v). Sắc ký cột pha thường silica gel phân đoạn C (C, 1,35 g) với hệ dung môi gradient DCM/MeOH (10/1-5/1, v/v) thu được 3 phân đoạn ký hiệu C1-C3. Hợp chất 3 (7 mg) thu được từ việc tinh sạch phân đoạn C2 (72 mg) với sắc ký cột YCM sử dụng hệ dung môi methanol/nước (5/1, v/v). Tiếp tục sắc ký cột pha thường silica gel phân đoạn D (9,1 g) với hệ dung môi gradient DCM/MeOH (7/1-1/1, v/v) thu được 4 phân đoạn ký hiệu là D1-D4. Lựa chọn phân đoạn D2 (923 mg) sắc ký cột sephadex với dung môi rửa giải MeOH 100% thu được 5 phân đoạn nhỏ ký hiệu là D2.1 – D2.5. Hợp chất 1 (27 mg) thu được từ việc tinh sạch phân đoạn D2.1 (120 mg) với sắc ký cột YCM sử dụng hệ dung môi methanol/nước (5/1, v/v). Hợp chất 2 (8 mg) thu được từ việc tinh sạch phân đoạn D2.3 (72 mg) với sắc ký cột YCM sử dụng hệ dung môi methanol/nước (3/1, v/v).

3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Định lượng β -ecdysteron trong các mẫu rễ ngưi tấ

Lựa chọn điều kiện sắc ký

Tham khảo tài liệu [3] về phương pháp định lượng β -ecdysteron trong rễ ngưi tấ, tiến hành sắc ký theo điều kiện sau: pha tĩnh cột C-18 Cosmosil-AR-II (250 x 4,6 mm, 5 μm); pha động: Nước/Acetonitrile (85/15, v/v); tốc độ dòng: 1,0 ml/phút; thể tích tiêm mẫu 10 μl ; nhiệt độ lò cột: 40 °C; bước sóng phát hiện 248 nm. Kết quả thu được (hình 1) cho thấy pic của chất cần phân tích đã tách hoàn toàn khỏi các pic khác trên sắc ký đồ mẫu thử, với thời gian lưu ($t_R = 16,5$ phút) phù hợp. Do đó, đề tài đã lựa chọn điều kiện trên cho sắc ký đồ mẫu thử.



Hình 1. Sắc ký đồ HPLC định lượng β -ecdysteron trong mẫu thử rễ ngưu tất

1: Mẫu trắng (dung môi), 2: Mẫu chuẩn β -ecdysteron, 3: Mẫu thử rễ ngưu tất

Xây dựng đường chuẩn β -ecdysteron

Tiến hành đo dung dịch chuẩn có nồng độ thay đổi từ 5 - 60 $\mu\text{g/ml}$ và áp dụng công

thức tính như trình bày ở phần 2.4 với chất chuẩn β -ecdysteron. Kết quả đường chuẩn của β -ecdysteron là: $y = 14151x - 4858,8$ với hệ số tương quan $R^2 = 0,9997$ đạt yêu cầu AOAC [15].

Định lượng mẫu thử

Áp dụng phương pháp đã xây dựng và công thức tính như trình bày ở phần 2.4, độ lặp lại của mỗi mẫu thử là 3 lần. Kết quả định lượng hàm lượng β -ecdysteron các mẫu thu thập tại Hưng Yên để lựa chọn nguyên liệu cho nghiên cứu hoá học và sản xuất được trình bày ở bảng 1.

Bảng 1. Kết quả định lượng hàm lượng β -ecdysteron trong 10 mẫu ngưu tất thu tại Hưng Yên

| STT | Kí hiệu mẫu | Nguồn gốc mẫu | Độ ẩm (%) | Hàm lượng β -ecdysteron ^(*) (%) |
|-----|-------------|--|--------------|--|
| 1 | NT01 | Sấy diêm sinh – Trung Trắc I, 4/2025 | 16,85 ± 0,62 | 0,025 ± 0,002 |
| 2 | NT02 | Sấy diêm sinh – Bình Minh I, 4/2025 | 17,25 ± 0,65 | 0,034 ± 0,001 |
| 3 | NT03 | Sấy khô – Trung Trắc II, 2/2025 | 7,25 ± 0,65 | 0,051 ± 0,001 |
| 4 | NT04 | Sấy diêm sinh - Trung Trắc III, 4/2025 | 18,25 ± 0,56 | 0,029 ± 0,001 |
| 5 | NT05 | Sấy diêm sinh – Bình Minh II, 4/2025 | 16,27 ± 0,66 | 0,027 ± 0,001 |
| 6 | NT06 | Sấy diêm sinh – Bình Minh III, 4/2025 | 17,86 ± 0,76 | 0,024 ± 0,001 |
| 7 | NT07 | Sấy diêm sinh – Bình Minh IV, 4/2025 | 16,52 ± 0,57 | 0,028 ± 0,001 |
| 8 | NT08 | Sấy diêm sinh - Trung Trắc IV, 4/2025 | 17,23 ± 0,58 | 0,028 ± 0,001 |
| 9 | NT9 | Sấy diêm sinh – Bình Minh V, 4/2025 | 18,25 ± 0,56 | 0,023 ± 0,001 |
| 10 | NT10 | Sấy diêm sinh - Trung Trắc V, 4/2025 | 16,25 ± 0,47 | 0,022 ± 0,001 |

(*): Kết quả tính trên mẫu khô tuyệt đối.

Kết quả bảng 1.1 cho thấy hàm lượng β -ecdysteron từ 10 mẫu Ngưu tất chia đều 02 xã Trung Trắc – Văn Lâm và Bình Minh - Khoái Châu, tỉnh Hưng Yên trong khoảng từ 0,022 – 0,051%, chủ yếu đạt hàm lượng dưới 0,03%, chỉ có một mẫu NT03 đạt 0,051 ± 0,001 đạt tiêu chuẩn dược điển Đài Loan. Kết quả định lượng này khá tương đồng với kết quả định lượng

β -ecdysteron của tác giả Nguyễn Thị Hà Ly và cộng sự [16] trong các mẫu ngưu tất thu tại Việt Nam cho kết quả từ 0,012 – 0,029 %. Đối với giá trị hàm ẩm 10 mẫu nghiên cứu cho thấy 09 mẫu (NT01-NT02 và NT04-NT10) - các mẫu sấy diêm sinh đều không đạt tiêu chuẩn dược điển Việt Nam quy định độ ẩm dược liệu không quá 15 %, chỉ 01 mẫu NT03 đạt tiêu chuẩn với giá trị độ ẩm là: 7,25 ± 0,65 %. Mặt khác,

trong nghiên cứu khác về định lượng saponin tổng số tính theo acid oleanolic bằng phương pháp HPLC và đo quang của 10 mẫu nghiên cứu trên, mẫu NT03 cho kết quả cao. Chính vì vậy, nhóm nghiên cứu lựa chọn mẫu NT03 để nghiên cứu thành phần hoá học và cho sản xuất.

3.2. Biện luận cấu trúc

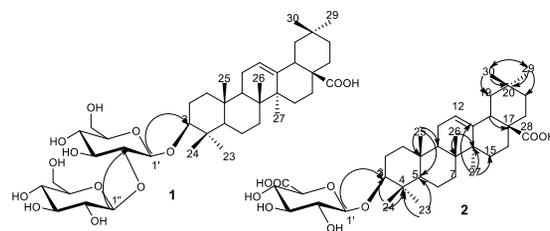
Hợp chất **1** phân lập được có dạng bột màu trắng.

Phổ 1D-NMR ($^1\text{H-NMR}$ và $^{13}\text{C-NMR}$) của hợp chất **1** (Xem dữ liệu trên bảng 2) cho tín hiệu đặc trưng của một olean-saponin – hợp chất phổ biến từ loài ngưu tất gồm: 7 tín hiệu *singlet* của các methyl; 01 tín hiệu oxy methin tại δ_{H} 3,28 (1H, dd, $J = 12,0 \& 2,4$ Hz, H-3), 01 tín hiệu olefin tại δ_{H} 5,46 (1H, br s, H-12) xác định cấu trúc olean-12-en; 2 proton anome tại δ_{H} 5,26 (1H, d, $J = 9,0$ Hz, H-1'') và 4,88 (1H, d, $J = 7,8$ Hz, H-1'); và 10 tín hiệu hydroxy methin của các phân tử đường trong khoảng 3,27 - 4,49. Hằng số tương tác J của 02 proton anome lần lượt là 9,0 và 7,8 Hz, xác định cấu hình beta của 2 phân tử đường. Phổ $^{13}\text{C-NMR}$ của hợp chất **1** cho tín hiệu 42 carbon gồm: 30 carbon thuộc khung olean và 12 carbon của hai phân tử đường gồm: Glc I tại δ_{C} 105,2, 82,6, 76,8, 72,6, 77,6 và 63,8; Glc II tại δ_{C} 105,6, 76,6, 78,0, 72,0, 77,8 và 62,9. Phân tích cấu trúc của đường và so sánh tài liệu cho thấy cấu trúc của 2 đường đều là β -D-glucopyranosid. Trên phổ HMBC cho các tương tác $\text{H} \rightarrow \text{C}$ của các nhóm methyl thuộc khung oleanolic (xem hình 2); tương tác giữa H-1' (δ_{H} 4,88) với C-3 (δ_{C} 89,6) cho xác định vị trí glycosid tại C-3; và tương tác giữa H-1'' (δ_{H} 5,26) với C-2' (δ_{C} 82,6) xác định liên kết cấu trúc đường là Glc(1 \rightarrow 2)Glc.

Phổ khối ESI-MS của hợp chất **1** cho tín hiệu peak ion tại m/z : 745,5 $[\text{M}-\text{Cl}]^+$ gọi ý một công thức phân tử $\text{C}_{42}\text{H}_{68}\text{O}_{13}$ ($M = 781,0$).

Từ kết quả phân tích phổ 1D-, 2D-NMR, phổ khối ESI-MS và so sánh dữ liệu phổ [17], có thể xác định hợp chất **1** là 3-O- β -D-glucopyranosyl(1 \rightarrow 2)- β -D-glucopyranosyl oleanolic acid hay còn gọi là acutosid A. Hợp chất này được tra cứu trên phần mềm Scifinder chưa được công bố từ loài ngưu tất.

Hợp chất **2** phân lập được có dạng bột màu trắng. Phổ 1D-NMR (^1H , $^{13}\text{C-NMR}$) của hợp chất **2** cho tín hiệu đặc trưng của một olean-saponin tương tự như hợp chất **1** chỉ có một số khác biệt là: phổ $^1\text{H-NMR}$ của hợp chất **2** chỉ cho tín hiệu của 01 proton anome tại δ_{H} 4,37 (1H, d, $J = 7,8$ Hz, H-1') và 04 tín hiệu hydroxy methin của 01 phân tử đường trong khoảng 3,18 - 3,50; trên phổ $^{13}\text{C-NMR}$ của hợp chất **2** cho tín hiệu 01 phân tử glucuronopyranosid tại δ_{C} 106,8 (C-1'), 75,4 (C-2'), 77,8 (C-3'&C-5'), 73,6 (C-4') và 175,0 (C-6'). Trên phổ HMBC cho tương tác giữa H-1' (δ_{H} 4,37) với C-3 (δ_{C} 91,1) cho xác định vị trí glucosid tại C-3.



Hình 2. Tương tác $\text{H} \rightarrow \text{C}$ trên phổ HMBC của hợp chất **1** và **2**

Phổ khối ESI-MS của hợp chất **2** cho tín hiệu peak ion tại m/z : 633,5 $[\text{M}+\text{H}]^+$, phù hợp với công thức phân tử $\text{C}_{36}\text{H}_{56}\text{O}_9$ ($M = 632,8$).

Từ kết quả phân tích phổ 1D-, 2D-NMR, phổ khối ESI-MS và so sánh dữ liệu phổ [18], có thể xác định hợp chất **2** là 3-O- β -D-glucuronopyranosyl oleanolic acid hay còn gọi là calendolosid E. Hợp chất này được công bố từ Ngưu tất Trung Quốc chưa có công bố loài trồng ở Việt Nam.

Hợp chất **3** phân lập được có dạng bột nâu. Phổ $^1\text{H-NMR}$ của hợp chất **3** cho các tín hiệu đặc trưng cấu trúc của một sterol gồm: 5 tín hiệu *singlet* của methyl; 3 tín hiệu proton ở trường thấp đặc trưng cho liên kết với oxy tại δ_{H} 3,97 (1H, d, $J = 2,4$ Hz, H-3), 3,84 - 3,87 (1H, m, H-2), 3,17 (1H, t, $J = 16,2$ Hz, H-22); tín hiệu của 01 olefin tại δ_{H} 5,83 (1H, d, $J = 2,4$ Hz, H-7).

Trên phổ $^{13}\text{C-NMR}$ của hợp chất **3** cho tín hiệu của 27 carbon tương ứng trên phổ proton gồm: 5 nhóm methyl; 6 tín hiệu carbon có liên kết trực tiếp với oxy tại δ_{C} 85,2 (C-14), 78,4 (C-22), 77,9 (C-20), 71,3 (C-25), 68,7 (C-2) và 68,5 (C-3); tín hiệu của 1 cặp olefin (δ_{C} 168,0/122,1); và 01 carbonyl (δ_{C} 206,5). Các tín hiệu carbon khác (xem trong bảng 2) được xác định dựa trên việc gán vị trí tương ứng của hợp chất 20-hydroxyecdysone [19].

Phổ khối ESI-MS của hợp chất **3** cho tín hiệu tại m/z : 479,4 $[\text{M-H}]^-$, phù hợp với công thức phân tử $\text{C}_{27}\text{H}_{44}\text{O}_7$ ($M = 480,6$).

Như vậy, phân tích phổ 1D-NMR, phổ khối ESI-MS cùng với việc so sánh dữ liệu phổ [18] và định tính bằng TLC với chất chuẩn 20-hydroxyecdysone có thể khẳng định cấu trúc của hợp chất **3** là 20-hydroxyecdysone hay còn gọi là β -ecdysterone.

Hợp chất **4** phân lập được có dạng bột màu trắng. Trên phổ $^1\text{H-NMR}$ của hợp chất **4** có các tín hiệu đặc trưng của một sterol glucosid gồm: 6 nhóm methyl (δ_{H} 0,71, 1,03, 0,94, 0,83, 0,85, và 0,86; một nhóm hydroxymethin (δ_{H} 3,60); một proton olefin (δ_{H} 5,37); và 01 phân tử glucose tại δ_{H} 4,40 (1H, d, $J = 7,8$ Hz, H-1'), 3,38 (2H, m, H-3' , H-4'), 3,27 (1H, m, H-5'), 3,20 (1H, m, H-2'), 3,76 (1H, dd, $J = 12,0, 5,4$ Hz, H-6'a), 3,86 (1H, dd, $J = 12,0, 3,0$ Hz, H-6'b). Hằng số tương tác của proton anome là 7,8 Hz gợi ý cấu

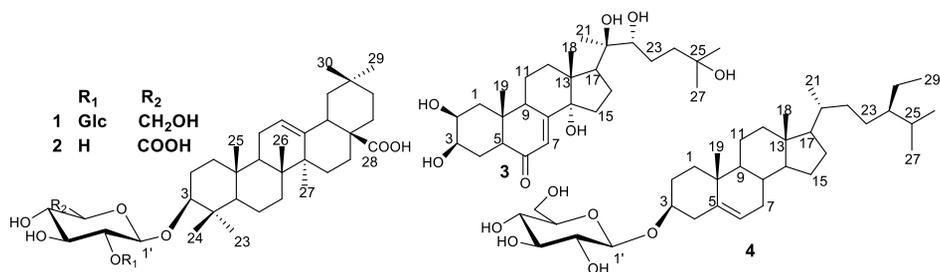
hình của gốc đường là β -D-glucopyranosyl. Mặt khác, trên sắc ký bản mỏng (*silica gel* 60 F₂₅₄S, Merck) với hệ dung môi triển khai DCM/MeOH (10/1, v/v), hợp chất **4** và chất đối chiếu daucosterol cho cùng một $R_f = 0,5$. Như vậy, phổ $^1\text{H-NMR}$, so sánh tài liệu tham khảo [20] và kết quả TLC với daucosterol nhận dạng hợp chất **4** là daucosterol.

4. Kết luận

Nghiên cứu thành công phương pháp định lượng β -ecdysterone bằng phương pháp sắc ký lỏng hiệu năng cao (HPLC) phù hợp với thiết bị thực tế theo tiêu chuẩn AOAC các mẫu rễ ngưu tất thu tại Hưng Yên. Hàm lượng β -ecdysterone mẫu NT03 đạt $0,051 \pm 0,001$, các mẫu khác đạt dưới 0,03 % ($0,022 \pm 0,001 - 0,029 \pm 0,001$ %). Mẫu NT03 là mẫu duy nhất sấy nhiệt và đạt tiêu chuẩn về độ ẩm với giá trị là: $7,25 \pm 0,65$ %. Chính vì vậy, mẫu NT03 được lựa chọn để nghiên cứu thành phần hoá học và xây dựng quy trình chiết xuất tạo sản phẩm hỗ trợ giảm lipid máu và xơ vữa động mạch. Bằng sắc ký cột pha thường, pha đảo, các phương pháp phổ tử phân đoạn butanol rễ mẫu NT03 đã phân lập và xác định được cấu trúc 04 hợp chất gồm: acutosid A (**1**), calendolosid E (**2**), β -ecdysterone (**3**) và daucosterol (**4**). Trong đó, hợp chất **1** lần đầu tiên được công bố từ rễ ngưu tất.

Lời cảm ơn:

Nghiên cứu này được hỗ trợ từ nguồn kinh phí của nhiệm vụ Khoa học và Công nghệ cấp Sở Khoa học và Công nghệ Hưng Yên “Nghiên cứu phát triển sản phẩm hỗ trợ giảm lipid máu và xơ vữa động mạch từ ngưu tất (*Achyranthes bidentata*), cúc hoa (*Chrysanthemum indicum*) và nghệ (*Curcuma longa*) trồng tại Hưng Yên”



Hình 3. Cấu trúc 04 chất (1-4) phân lập từ rễ ngưu tẩu

Bảng 2. Dữ liệu phổ của các chất 1-3

| STT | 1 ^{a,d} | | acutosid A ^{b,d} | 2 ^{a,e} | | calendulosid E ^{b,f} | 3 ^{a,e} | | β - ecdysteron ^{c,e} |
|-----|-------------------------------------|------------|------------------------------|-------------------------------------|------------|----------------------------------|-------------------------------------|------------|--|
| | δ_H (mult, J trong Hz) | δ_C | δ_C [17] | δ_H (mult, J trong Hz) | δ_C | δ_C [18] | δ_H (mult, J trong Hz) | δ_C | δ_C [19] |
| 1 | | 39,0 | 38,7 | | 39,8 | 38,2 | | 37,4 | 37,5 |
| 2 | | 26,6 | 26,6 | | 26,9 | 25,5 | 3,84 - 3,87 (m) | 68,7 | 68,7 |
| 3 | 3,28 (dd, 12,0&2,4) | 89,6 | 89,0 | 3,28 (dd, 11,4&4,2) | 91,1 | 87,8 | 3,97 (d, 2,4) | 68,5 | 68,5 |
| 4 | | 39,6 | 39,5 | | 40,2 | 38,7 | | 32,9 | 32,8 |
| 5 | | 56,1 | 55,8 | | 57,0 | 55,0 | | 51,8 | 51,8 |
| 6 | | 18,7 | 18,5 | | 19,3 | 17,8 | | 206,5 | 206,4 |
| 7 | | 33,4 | 33,2 | | 34,0 | 32,4 | 5,83 (d, 2,4) | 122,1 | 122,1 |
| 8 | | 40,0 | 39,7 | | 40,6 | 38,9 | | 168,0 | 167,9 |
| 9 | | 48,3 | 48,0 | | 49,0 | 47,1 | | 35,1 | 35,1 |
| 10 | | 37,2 | 36,9 | | 37,9 | 36,3 | | 39,3 | 39,3 |
| 11 | | 23,9 | 23,7 | | 24,5 | 23,4 | | 21,5 | 21,5 |
| 12 | 5,46 (br s) | 122,1 | 122,5 | | 123,6 | 121,4 | | 32,5 | 32,5 |
| 13 | | 145,1 | 144,9 | | 145,2 | 144,0 | | 48,7 | 48,7 |
| 14 | | 42,4 | 42,2 | | 42,9 | 41,3 | | 85,2 | 85,3 |
| 15 | | 28,2 | 28,3 | | 28,3 | 27,2 | | 31,8 | 31,8 |
| 16 | | 23,9 | 23,7 | | 24,1 | 22,9 | | 21,5 | 21,5 |
| 17 | | 48,3 | 46,7 | | 47,6 | 45,8 | | 50,5 | 50,5 |
| 18 | | 42,4 | 42,2 | | 42,7 | 40,8 | 0,99 (s) | 18,0 | 18,0 |
| 19 | 1,8&1,3 (m) | 47,1 | 46,5 | | 47,3 | 45,4 | 0,91 (s) | 24,4 | 24,4 |
| 20 | | 31,1 | 30,9 | | 31,6 | 30,4 | | 77,9 | 77,9 |
| 21 | | 33,4 | 34,2 | | 34,9 | 33,4 | 1,22 (s) | 21,1 | 21,1 |
| 22 | | 33,4 | 33,2 | | 33,8 | 32,2 | 3,17 (t, 16,2) | 78,4 | 78,4 |
| 23 | 1,25 (s) | 28,2 | 28,2 | 1,06 (s) | 28,5 | 27,6 | | 27,4 | 27,4 |
| 24 | 1,06 (s) | 16,8 | 16,8 | 0,85 (s) | 17,0 | 16,4 | | 42,4 | 42,4 |
| 25 | 0,87 (s) | 15,5 | 15,5 | 0,95 (s) | 15,9 | 15,1 | | 71,3 | 71,3 |
| 26 | 1,01 (s) | 17,7 | 17,4 | 0,81 (s) | 17,7 | 16,9 | 1,21 (s) | 29,0 | 29,1 |
| 27 | 1,31 (s) | 26,2 | 26,2 | 1,16 (s) | 26,4 | 25,5 | 1,22 (s) | 29,7 | 29,6 |
| 28 | | 179,9 | 180,2 | | 181,8 | *** | | | |
| 29 | 0,95 (s) | 33,4 | 33,2 | 0,91 (s) | 33,6 | 32,8 | | | |
| 30 | 1,03 (s) | 24,0 | 23,7 | 0,94 (s) | 24,0 | 22,7 | | | |

Glu 1/ GlcUA

| | | | | | | | | | |
|-------|---------------|-------|-------|---------------|-------|-------|--|--|--|
| 1' | 4,88 (d, 7,8) | 105,2 | 105,0 | 4,37 (d, 7,8) | 106,8 | 105,3 | | | |
| 2' | 4,17 (t, 9,0) | 82,6 | 83,5 | | 75,4 | 73,9 | | | |
| 3' | | 78,0 | 78,3 | | 77,8 | 76,6 | | | |
| 4' | | 72,6 | 71,7 | | 73,6 | 72,2 | | | |
| 5' | | 77,6 | 78,1 | | 77,8 | 76,6 | | | |
| 6' | | 63,8 | 62,9 | | 175,0 | 173,4 | | | |
| Glu 2 | | | | | | | | | |
| 1'' | 5,26 (d, 9,0) | 105,6 | 106,0 | | | | | | |
| 2'' | | 76,6 | 77,0 | | | | | | |
| 3'' | | 77,3 | 77,9 | | | | | | |
| 4'' | | 71,3 | 71,6 | | | | | | |
| 5'' | | 77,6 | 77,9 | | | | | | |
| 6'' | | 62,9 | 62,8 | | | | | | |

*** Tín hiệu carbon không rõ; ^a(đo máy 600 & 150 MHz); ^b(đo máy 125 MHz); ^c(đo máy 62,9 MHz); ^d(đo trong pyridin-*d*₅); ^e(đo trong methanol-*d*₄); ^f(đo trong DMSO-*d*₆).

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Võ Văn Chi, (2018). *Từ điển cây thuốc Việt Nam*, Nhà xuất bản Y học, Hà Nội, tập 2, 332-333.
- Bộ Y tế, (2017). *Dược điển Việt Nam V*, tập 2, Nhà xuất bản Y học, Hà Nội, 1275-1276.
- Shih Chung Chen, (2019). *Taiwan Herbal Pharmacopeia 3rd Edition English Version*, 4-5.
- Võ Văn Chi, (2018). *Từ điển cây thuốc Việt Nam*, Nhà xuất bản Y học, Hà Nội tập 2, 332-333.
- Trần Huyền Trân, Phạm Anh Minh và cộng sự, (2023). Tác dụng tăng cường miễn dịch của cao chiết giàu polysaccharid từ Đảng sâm nam và Nguưu tât, *Tạp chí Dược liệu*, 28(5), 308-313.
- Ju Y., Liang H., et al., (2021). Isolation of triterpenoids and phytosterones from *Achyranthes bidentata* Bl. to treat breast cancer based on network pharmacology, *Nat. Prod. Res.*, 35(24), 5939-5942.
- Meng D. L., Li X., et al., (2005). A new phytosterone from *Achyranthes bidentata* B1, *J. Asian Nat. Prod. Res.*, 7(2), 181-4.
- Hua S., Zhang X., (2019). Effects of *Achyranthes bidentata* alcohol on proliferation capacity of osteoblasts and miRNA in Runx2, *Exp. Ther. Med.*, 18(3), 1545-1550.
- Peng S., Wang C., et al., (2018). *Achyranthes bidentata* polypeptide protects dopaminergic neurons from apoptosis in Parkinson's disease models both *in vitro* and *in vivo*, *Br. J. Pharmacol.*, 175(4), 631-643.
- Phạm Thủy Phương, Nguyễn Trọng Thông, et al., (2022). Tác dụng điều chỉnh rối loạn lipid máu của viên nang cứng “Hạ mỡ NK” trên lâm sàng, *Tạp chí nghiên cứu Y học*. 156(8), 74-83.
- Oh S. D., Kim M., et al. (2014). Effect of *Achyranthes bidentata* Blume on 3T3-L1 Adipogenesis and Rats Fed with a High-Fat Diet, *Evid Based Complement Alternat Med*. 158018.
- Chen, Y. R., Niu, Y. S., & Zhou, H. L. (2024). *Achyranthes bidentata* Blume (Amaranthaceae): a review of its botany, traditional uses, phytochemistry, pharmacology, and toxicology. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 76(8), 930-966.
- Wang C., Hua D., et al., (2015). Structural characterization and antioxidant activities of a novel fructan from *Achyranthes bidentata* Blume, a famous medicinal plant in China,

- Industrial Crops and Products*. 70, 427-434
14. Guideline, ICH Harmonised Tripartite (2005). "Validation of analytical procedures: text and methodology", Q2 (R1) 1.20: 05
 15. AOAC Research Institute (2016). "Guidelines for Standard Method Performance Requirements" AOAC Official Methods of Analysis, AOAC international, United States of America, Appendix F: 1-18.
 16. Nguyễn Thị Hà Ly, Nguyễn Thị Phương và cộng sự (2016). Định lượng hoạt chất trong dược liệu Ngưu tất tại Việt Nam bằng sắc ký lỏng hiệu năng cao, *Tạp chí Dược liệu*. 21(6), 397-401.
 17. Nagao, T., Tanaka, R., Iwase, Y., Hanazono, H., Okabe, H. (1991). Studies on the constituents of *Luffa acutangula* Roxb. I. Structures of acutosides A-G, oleanane-type triterpene saponins isolated from the herb, *Chemical and pharmaceutical bulletin*, 39(3), 599-606.
 18. Yin, M., Wang, X., Wang, M., Chen, Y., Dong, Y., Zhao, Y., & Feng, X. (2012). A new triterpenoid saponin and other saponins from *Salicornia europaea*, *Chemistry of Natural Compounds*, 48, 258-261.
 19. Girault J. P., Lafont R. D., (1988). The complete ¹H-NMR assignment of ecdysone and 20-hydroxyecdysone, *Journal of Insect Physiology*, 34(7), 701-706.
 20. Phan Minh Giang, Đỗ Thị Việt Hương, Dương Hồng Anh, Phạm Hùng Việt (2018). Xác định các steroid và triterpenoid trong than cây bần tay ma trắng, 23(2), 135-141.