

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

LÊ THỊ HỒNG VÂN

**NGHIÊN CỨU THÀNH PHẦN HOÁ HỌC VÀ TÁC DỤNG
DƯỢC LÝ CỦA SÂM VIỆT NAM CHẾ BIẾN**

Chuyên ngành: Dược học cổ truyền
Mã số: 62720406

TÓM TẮT LUẬN ÁN TIẾN SĨ DƯỢC HỌC

Thành phố Hồ Chí Minh - Năm 2018

Công trình được hoàn thành tại:
ĐẠI HỌC Y DƯỢC THÀNH PHỐ HỒ CHÍ MINH

Người hướng dẫn khoa học:
GS. TS. NGUYỄN MINH ĐỨC
PGS. TS. NGUYỄN NGỌC KHÔI

Phản biện 1:

Phản biện 2:

Phản biện 3:

Luận án sẽ được bảo vệ tại Hội đồng chấm luận án cấp trường họp tại
ĐẠI HỌC Y DƯỢC THÀNH PHỐ HỒ CHÍ MINH
vào hồigiờ.....ngày.....tháng.....năm

Có thể tìm hiểu luận án tại:

- Thư viện Quốc gia Việt Nam
- Thư viện Khoa học Tổng hợp Thành phố Hồ Chí Minh
- Thư viện Đại học Y Dược Thành phố Hồ Chí Minh

DANH MỤC CÁC CÔNG TRÌNH NGHIÊN CỨU LIÊN QUAN TẠP CHÍ TRONG NƯỚC

1. Isolation of Ginsenoside Isomers from Processed Vietnamese Ginseng by Preparative HPLC. *Journal of Medicinal Materials* (2015).
2. Ginsenoside-Rk₁ and ginsenoside-Rg₅ isolated from processed Vietnamese ginseng. *Journal of Medicinal Materials* (2015).
3. Phân lập và thiết lập chất chuẩn majonosid-R₂ từ sâm Việt Nam (*Panax vietnamensis* Ha et Grushv.), *Tạp chí Dược học*, Số 53, tập 8, tr. 14-20, Tạp chí Dược học (2014).
4. Ginsenoside-Rk₃ and ginsenoside-Rh₄ isolated from processed Vietnamese ginseng (*Panax vietnamensis* Ha et Grushv.). *Journal of Medicinal Materials* (2013).

TẠP CHÍ QUỐC TẾ

5. Ginseng Saponins in Different Parts of *Panax vietnamensis*. *Chemical & pharmaceutical bulletin* 01/2015; 63(11):950-954.
6. Anti-inflammatory effects of vina-ginsenoside R₂ and majonoside R₂ isolated from *Panax vietnamensis* and their metabolites in lipopolysaccharide-stimulated macrophages. *International Immunopharmacology* 09/2015; 28(1):700-706.
7. Effects of steaming on saponin compositions and antiproliferative activity of Vietnamese ginseng. *Journal of ginseng research* 07/2015; 39(3).
8. Processed Vietnamese ginseng: Preliminary results in Chemistry and Biological activity, *Journal of Ginseng Research*, 2014, 38(2).

thư phổi A549: Tác dụng này tăng khi thời gian chế biến tăng và đạt cực đại ở khoảng thời gian chế biến 12 giờ. Tác dụng này được cho là có liên quan đến nồng độ của các ginsenosid được hình thành do quá trình chế biến là G-Rg₃, -Rg₅, -Rk₁ là các ginsenosid được chứng minh qua rất nhiều công trình nghiên cứu đối với tác dụng kháng ung thư.

Sự thay đổi tác dụng chống oxy hóa: Quá trình chế biến làm tăng tác dụng chống oxy hóa trên thử nghiệm DPPH khi chế biến ở 120 °C.

Tác dụng kháng viêm: Ở nhiệt độ chế biến cao hơn như ở 120 °C, hàm lượng saponin có aglycon thuộc khung OCT như M-R2 và V-R2 giảm dần trong khi hàm lượng P-RT₄ tăng lên, điều này cho thấy P-RT₄ chính là chất chuyển hóa của M-R2 do mất đi một phần đường glucose ở vị trí C-6 khá bền với nhiệt. M-R2 và V-R2 cũng cho thấy được chuyển hóa thành P-RT₄ và OCT qua đường uống. P-RT₄ và OCT có thể ngăn chặn biểu hiện các cytokin tiền viêm gây bởi LPS và kích hoạt yếu tố transcription NF-κB bằng cách ức chế gắn kết LPS với thụ thể TLR4 trên tế bào miễn dịch cũng như tế bào đại thực bào.

KIẾN NGHỊ

Các kết quả đạt được nêu trên là cơ sở khoa học để thực hiện các hướng nghiên cứu tiếp theo cho Sâm VN:

1. Kết quả phân tích thành phần và hàm lượng saponin cho thấy saponin có aglycon thuộc khung OCT chiếm đến hơn từ 36 ~ 75% saponin toàn phần. Kết quả này làm tiền đề cho các nghiên cứu về xây dựng tiêu chuẩn cho Sâm VN, đồng thời để thử nghiệm tác dụng sinh học của Sâm VN.

2. Có sự thay đổi đáng kể về thành phần hóa học sau chế biến. Do vậy, cần thêm các thử nghiệm *in vitro* trên các dòng tế bào ung thư khác và khảo sát thêm một số tác dụng sinh học của Sâm VN chế biến. Khảo sát điều kiện chế biến tối ưu cho một số tác dụng sinh học.

3. Nghiên cứu quy trình phân tích định tính và định lượng saponin trong Sâm VN với đầu dò MS nhằm xác định không chỉ các ginsenosid có aglycon thuộc khung PPD, PPT mà còn có các saponin có aglycon thuộc khung OCT.

GIỚI THIỆU LUẬN ÁN

1. Đặt vấn đề

Hồng sâm được chế biến từ Nhân sâm (*Panax ginseng* C.A. Meyer) theo phương pháp cổ truyền bằng cách hấp củ sâm tươi ở nhiệt độ cao. Quá trình chế biến làm thay đổi về mặt thể chất và thành phần hóa học, đặc biệt là thành phần ginsenosid. Đồng thời tác dụng sinh học được gia tăng như tác dụng kháng phân bào, kháng viêm, chống oxy hóa, chống kết tập tiểu cầu... Do vậy, Hồng sâm được cho là tốt hơn, đắt tiền hơn và sử dụng phổ biến hơn Bạch sâm. Sâm Việt Nam (*Sâm VN*, *Panax vietnamensis* Ha et Grushv.) được phát hiện từ năm 1973, đến nay đã được thế giới biết đến qua những nghiên cứu về thành phần hóa học và tác dụng dược lý. Nhóm nghiên cứu cũng đã sơ bộ khảo sát sự thay đổi thành phần Sâm VN bằng cách hấp ở khoảng 0-8 giờ. Quá trình chế biến Sâm VN tương tự theo cách của Hồng sâm làm gia tăng thành phần ginsenosid kém phân cực và làm giảm ginsenosid phân cực bị thay đổi trong quá trình chế biến.

Đề tài “Nghiên cứu thành phần hóa học và tác dụng dược lý của Sâm VN chế biến” được thực hiện với các mục tiêu sau:

- Phân tích, phân lập và xác định thành phần hóa học saponin trong Sâm VN.
- Phân lập và xác định cấu trúc thành phần saponin trong Sâm VN chế biến và khảo sát sự thay đổi thành phần hóa học saponin qua quá trình chế biến Sâm VN.
- Khảo sát tác dụng sinh học của Sâm VN chế biến và các thành phần saponin phân lập.

2. Tính cấp thiết của đề tài

Thành phần hóa học chủ yếu và quan trọng nhất của các loài thuộc chi *Panax* là saponin hay còn gọi là ginsenosid. Đã có 52 saponin được phân lập từ thân rễ và rễ củ và 8 ginsenosid mới từ lá Sâm VN với hiệu suất cao. Các saponin này có aglycon thuộc khung PPD, PPT và OCT, đặc biệt saponin OCT hiện diện trong Sâm VN hàm lượng rất cao mà không có hoặc với hàm lượng thấp trong các loài thuộc chi *Panax* khác. Sự khác biệt này tạo nên sự khác biệt về tác dụng sinh học cho Sâm

VN và hứa hẹn rất nhiều tác dụng mới cần được nghiên cứu. Do đó, việc phân tích thành phần hóa học saponin rất cần thiết nhằm bổ sung dữ liệu về thành phần và hàm lượng các saponin có trong Sâm VN.

Sâm VN đa số được sử dụng dưới dạng chưa chế biến ở dạng tươi hoặc phơi sấy khô thông thường. Do vậy việc nghiên cứu một dạng bào chế mới cũng như nghiên cứu sự thay đổi thành phần hóa học và tác dụng sinh học qua quá trình chế biến là cần thiết nhằm tạo ra một sản phẩm có chất lượng điều trị tốt và gia tăng giá trị sử dụng cho Sâm VN.

3. Những đóng góp mới của luận án

3.1. Quy trình phân tích

Đề tài đã xây dựng được quy trình phân tích định tính và định lượng các thành phần saponin PPD, PPT và OCT trong Sâm VN với phương pháp HPLC/UV ELSD.

3.2. Thành phần hóa học saponin

Đề tài đã phân lập được 28 hợp chất, trong đó:

- 6 ginsenosid lần đầu được phân lập trong Sâm VN chế biến: 20(S) G-Rg₃, 20(R) G-Rg₃, G-Rk₃, G-Rh₄, G-Rk₁ và G-Rg₅.
- 4 ginsenosid lần đầu được phân lập từ Sâm VN là: Notoginsenosid R2, notoginsenosid R4, ginsenosid Ra₁ và notoginsenosid D.
- 1 ginsenosid mới cấu trúc được xác định là 3-O- α -D-xylopyranosyl-(1 \rightarrow 2)- α -D-glucopyranosyl(1 \rightarrow 2)- α -D-glucopyranosyl-20(S)-protopanaxadiol 20-O- α -D-xylopyranosyl (1 \rightarrow 3)- α -D-xylopyranosyl (1 \rightarrow 6)- α -D-glucopyranosid.

3.3. Sự thay đổi thành phần saponin của Sâm VN chế biến

Bằng phương pháp HPLC/ELSD, đề tài đã khảo sát sự thay đổi thành phần hóa học saponin của Sâm VN qua quá trình chế biến. Ginsenosid có aglycon thuộc khung PPD và PPT phân cực như G-Rg₁, -Re, -Rb, -Rd... bị chuyển hóa thành các ginsenosid PPD, PPT kém phân cực hơn như 20(S) G-Rh₁, 20(R)-Rh₁, 20(S)-Rg₃, 20(R)-Rg₃, -Rk₃, -Rh₄, -Rk₁ và -Rg₅. Ginsenosid có aglycon thuộc khung PPT kém bền hơn so với khung PPD. Saponin cấu trúc OCT do không có đường gắn vào vị trí C-20 nên tương đối bền ngay cả chế biến ở 120 °C trong 20 giờ.

3.4. Tác dụng sinh học

Sử dụng kỹ thuật Q-TOF-MS kết hợp ¹H-NMR đã xác định được 5 ginsenosid mới thuộc khung PPD có 4-6 phân tử đường trong cấu trúc. Hàm lượng của saponin tổng trong thân rễ, rễ củ và rễ con lần lượt là 195, 156 và 139 mg/g, cao hơn rất nhiều trong các loài *Panax* khác. Tỷ lệ của PPT:PPD:OCT lần lượt ở bộ phận thân rễ là 1:1,7:7,8; ở rễ củ là 1:1,6:5 và ở rễ con là 1:4,8:3,3.

2. Phân lập và xác định cấu trúc saponin có trong Sâm VN chế biến và khảo sát sự thay đổi thành phần saponin trong quá trình chế biến Sâm VN

Tổng cộng 28 thành phần đã được phân lập và xác định cấu trúc từ Sâm VN chế biến. Các saponin đã được công bố là: G-Rb₁, -Rc, -Rd, -Re, -Rg₁, N-R1, M-R1, M-R2, V-R2, P-RT₄, V-R11, V-R10 và các saponin mới lần đầu tiên được phân lập như N-R2 và các cặp đồng phân của saponin được hình thành do quá trình chế biến như: 20(S) và 20(R) G-Rh₁, 20(S) và 20(R) G-Rg₃, -Rk₃, -Rh₄, -Rg₁ và -Rg₅ bằng các kỹ thuật sắc ký thông thường, sắc ký pha đảo và prep-HPLC. Ngoài ra, có 4 ginsenosid mới gồm G-Ra₁, notoginsenosid R4, notoginsenosid D và một hợp chất chưa công bố trước đây là 3-O- β -D-xylopyranosyl-(1 \rightarrow 2)- β -D-glucopyranosyl(1 \rightarrow 2)- β -D-glucopyranosyl-20(S)-protopanaxadiol 20-O- β -D-xylopyranosyl (1 \rightarrow 3)- β -D-xylopyranosyl (1 \rightarrow 6)- β -D-glucopyranosid (SciFinder, tham khảo ngày 08-10-2017). Luận án thiết lập phương pháp phân lập các thành phần saponin có aglycon thuộc khung OCT đơn giản, hiệu quả và hiệu suất cao. Luận án cũng góp phần xây dựng dữ liệu phổ NMR của các saponin có aglycon thuộc khung PPD, PPT và OCT trong Sâm VN.

Quá trình chế biến Sâm VN ở 105 °C và 120 °C cho khuynh hướng thay đổi thành phần hóa học saponin tương tự nhau, tuy nhiên tốc độ thay đổi ở 105 °C chậm hơn so với 120 °C khoảng 1/3 lần. So với saponin có aglycon thuộc khung PPD và PPT, saponin khung OCT bền hơn, hầu như không thay đổi nhiều sau quá trình chế biến, có thể giải thích do OCT saponin không có liên kết kém bền tại vị trí C-20.

3. Tác dụng sinh học của Sâm VN

Sự thay đổi tác dụng ức chế tăng trưởng tế bào trên dòng tế bào ung

ginsenosid kém phân cực, đặc biệt là G-Rg₃, -Rg₅ và -Rk₁.

4.3.2. *Tác dụng chống oxy hóa*: tăng dần theo thời gian chế biến Sâm VN. Tuy nhiên khác với tác dụng ức chế tăng trưởng tế bào do các thành phần chính là các ginsenosid, tác dụng chống oxy hóa được cho là xuất phát từ các hợp chất phenolic và sản phẩm của phản ứng Maillard.

4.3.3. *Tác dụng kháng viêm*: P-RT₄ và OCT ức chế quá trình phosphoryl hóa của IRAK1, TAK1 và IκBα, cũng như hoạt hóa NF-κB trong gắn kết LPS với đại thực bào phúc mạc. Những hoạt chất này cũng ức chế mạnh biểu hiện của các yếu tố TNF-α, IL-1β, COX-2 và iNOS trong gắn kết LPS với đại thực bào phúc mạc. Hơn nữa P-RT₄ và OCT ức chế gắn kết LPS với thụ thể TLR4, là thụ thể nhận diện kiểu mẫu đáp ứng của LPS ở đại thực bào phúc mô thông qua có/không có transfected MyD88 siRNA, giống như ginsenosid-Re có aglycon thuộc khung PPT đã được công bố trước đó. Tuy nhiên, những chất chuyển hóa này không ảnh hưởng đến biểu hiện của thụ thể TLR4 trên đại thực bào phúc mạc gây bởi LPS. P-RT₄ và OCT có thể ngăn chặn biểu hiện các cytokin tiền viêm gây bởi LPS và kích hoạt yếu tố transcription NF-κB bằng cách ức chế gắn kết LPS với thụ thể TLR4 trên tế bào miễn dịch cũng như tế bào đại thực bào. Các cytokin được thể hiện thông qua sự kích hoạt của NF-κB. Nhiều yếu tố, bao gồm cả LPS, kích hoạt NF-κB. LPS gây ra biểu hiện IL-1β và TNF-α *in vitro* và *in vivo* trong các tế bào miễn dịch qua TLR4 liên kết con đường truyền tín hiệu NF-κB, qua đó thúc đẩy sự viêm sưng. Kết quả nghiên cứu cho thấy rằng sử dụng đường uống hợp chất V-R2, M-R2 từ Sâm VN có thể được chuyển hóa thành P-RT₄, giúp cải thiện tình trạng viêm bằng cách ức chế gắn kết LPS vào thụ thể TLR4 trên đại thực bào.

KẾT LUẬN

Theo nội dung đề ra, đề tài đã thu được kết quả như sau:

1. Phân tích thành phần saponin trong Sâm VN

Xây dựng quy trình định tính và định lượng 17 saponin trong các bộ phận thân rễ, rễ củ và rễ con của Sâm VN bằng kỹ thuật HPLC/ELSD.

Nghiên cứu tác dụng chống phân bào trên dòng tế bào ung thư phổi A549 cho thấy tác dụng của Sâm VN tăng sau khi chế biến. Tác dụng chống phân bào tăng và đạt cực đại ở khoảng 12 giờ sau chế biến.

Tác dụng chống oxy hóa gốc tự do DPPH cũng tăng khi thời gian chế biến tăng ngay cả đến 20 giờ sau chế biến ở 120 °C.

Saponin khung OCT (P-RT₄ và OCT) có tác dụng kháng viêm bằng cách ức chế gắn kết LPS vào thụ thể TLR4 trên đại thực bào.

4. BỐ CỤC LUẬN ÁN

Luận án gồm 143 trang: Mở đầu 2 trang, Tổng quan tài liệu 40 trang, Nguyên vật liệu và phương pháp nghiên cứu 22 trang, Kết quả nghiên cứu 57 trang, Bàn luận 16 trang, Kết luận và đề nghị 3 trang. Luận án có 37 bảng, 29 hình, 9 sơ đồ, 153 tài liệu tham khảo gồm 9 tài liệu tiếng Việt và 144 tài liệu tiếng Anh, 8 phụ lục (10 tiểu mục) thể hiện các kết quả thực nghiệm.

Chương 1. TỔNG QUAN TÀI LIỆU

1.1. Thực vật học các loài thuộc chi *Panax*: Ở Việt Nam có 4 loài thuộc chi *Panax* đã được công bố: *P. bipinnatifidus* Seem (Sâm vũ diệp); *P. notoginseng* (Tam thất): loài di thực trồng ở phía Bắc VN; *P. stipuleanatus* (Tam thất hoang) và *P. vietnamensis* (Sâm VN). Hai thứ của Sâm VN là *P. vietnamensis* var. *fuscidiscus* và *P. vietnamensis* var. *langbianensis*...

1.2. Thành phần hóa học của các loài thuộc chi *Panax*: Có 4 nhóm chính: Saponin, polyacetylen, polysaccharid và flavonoid. Đến nay, có khoảng hơn 300 saponin đã được phân lập từ các loài thuộc chi *Panax*. Thành phần saponin triterpenoid trong đó chủ yếu các ginsenosid đóng vai trò quan trọng đối với các tác dụng liên quan đã được công bố.

1.3. Thành phần hóa học và tác dụng sinh học từ các dạng chế biến khác nhau của các loài thuộc chi *Panax*: *Phương pháp chế biến Hồng sâm*: Nhân sâm ở dạng khô hay tươi được hấp ở nhiệt độ cao 98-105 °C ở thời gian khác nhau. *Thay đổi thành phần học*: Quá trình chế biến bằng nhiệt làm thay đổi thành phần saponin (ginsenosid) tạo các ginsenosid mới thông qua quá trình cắt đường ở vị trí C-20, C-3 hay C-6 (khó hơn) và khử nước tại vị trí C-20 của -OH tự do để hình thành

các ginsenosid kém phân cực. *Sự thay đổi tác dụng sinh học*: Đa số các tác dụng sinh học như tác dụng chống oxy hóa, tác dụng kháng tế bào ung thư, tác dụng bảo vệ gan,... đều tăng lên so với dạng chưa chế biến là Bạch sâm.

1.4. Sâm Việt Nam: Tên khoa học: *Panax vietnamensis* Ha et Grushv., họ Ngũ gia bì (Araliaceae). Tên Việt Nam: Sâm Việt Nam, Sâm Ngọc Linh, Sâm Khu Năm, Sâm K5, Sâm đốt trúc.

1.4.1. Thành phần hóa học của Sâm VN: Thành phần chủ yếu là saponin thuộc nhóm dammaran. Sâm VN chứa một hàm lượng saponin có aglycon thuộc khung OCT rất cao, đặc biệt là majonosid-R2. Cho đến nay có khoảng 73 hợp chất saponin được phân lập từ Sâm VN.

1.4.2. Tác dụng dược lý của sâm VN: Tác dụng bồi bổ cơ thể, tăng lực, chống nhược sức; Tác dụng điều hòa các rối loạn chuyển hóa trong cơ thể; Tác dụng sinh thích nghi, chống stress, tăng sức đề kháng.

1.4.3. Sâm VN chế biến: Đa số được dùng dưới dạng tươi hay phơi sấy khô mà chưa có nhiều nghiên cứu về bào chế dạng Hồng sâm. Chế biến Sâm VN theo kiểu chế biến Hồng sâm cho thấy một số thay đổi trong thành phần saponin của Sâm VN. Thành phần saponin trong Sâm VN có sự thay đổi trong suốt quá trình hấp: Hàm lượng các ginsenosid chính như G-Rb₁, -Rd, -Rg₁ giảm đáng kể và xuất hiện của các pic mới và thể hiện rõ nhất ở mẫu Sâm VN chế biến trong 8 giờ. Tác dụng tăng lực của saponin toàn phần Sâm VN sau khi chế biến và trước khi chế biến không có sự khác biệt. Do đó, việc chế biến không ảnh hưởng đến tác dụng tăng lực – một tác dụng chính và quan trọng của Sâm VN.

Chương 2. ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Đối tượng nghiên cứu

2.1.1. Nguyên vật liệu: Sâm VN (*Panax vietnamensis* Ha et Grushv.) 6 tuổi được thu hái tại vườn sâm Trà Linh, Quảng Nam.

2.1.2. Hóa chất và dung môi: CHCl₃, MeOH, EtOH, EtOAc, *n*-BuOH, ACN, MeOH (Merck và J.T.Baker)...

2.1.3. Trang thiết bị: Máy HPLC Alliance 2695 XE, đầu dò PDA 2996 (Waters); Máy sắc ký lỏng Perkin Elmer 200 kết nối với đầu dò ELSD và Waters Acquity UPLC; NMR (Bruker) 500 MHz và 600 MHz.

2.1.4. Tế bào, động vật thí nghiệm: Dòng tế bào A549 (ATCC, Mỹ);

Chế biến sâm VN bằng cách hấp có hơi nước ở nhiệt độ 105 °C cho thấy xu hướng thay đổi tương tự như ở 120 °C về sự hình thành các ginsenosid ít phân cực ngoại trừ tốc độ chậm hơn. Tốc độ phản ứng tăng từ 2-3 lần khi nhiệt độ tăng 10 °C. Hiện tượng này cũng được quan sát trong nghiên cứu này. Tốc độ thoái giáng của ginsenosid tăng lên khoảng 3 lần khi nhiệt độ chế biến tăng thêm 15 °C. G-Rh₁ và G-Rg₃ đều có 2 dạng đồng phân 20(S) và 20(R). Dạng 20(S) của G-Rh₁ nguyên thủy có trong Sâm VN trong khi dạng 20(R) được hình thành và tăng dần sau thời gian chế biến. Tỷ lệ đồng phân 20(R)/20(S) của G-Rh₁ là 0,36 lần ở 2 giờ và tăng lên 0,83 lần sau 20 giờ chế biến ở 105 °C. G-Rg₃ cũng cho kết quả tương tự. Tỷ lệ đồng phân 20(R)/20(S) của G-Rg₃ là 0,55 ở 2 giờ và tăng lên 0,78 sau 20 giờ chế biến. Kết quả tương tự ở nhiệt độ chế biến 120 °C, tỷ lệ 20(R)/20(S) G-Rh₁ sau 2 giờ chế biến là 0,52 tăng lên 1,98 lần sau 20 giờ. Tỷ lệ 20(R)/20(S) G-Rg₃ sau 2 giờ ở nhiệt độ chế biến 120 °C là 0,78 và tăng lên đến 1,11 lần sau 20 giờ chế biến. Điều này cho thấy nhiệt độ chế biến càng tăng và thời gian chế biến càng dài thì càng gia tăng hàm lượng của đồng phân dạng 20(R). Trong khi đó tỷ lệ của hai cặp đồng phân lập thể G-Rk₁/G-Rg₅ và G-Rk₃/G-Rh₄, không thay đổi nhiều khi thời gian hoặc nhiệt độ chế biến tăng lên.

4.3. Sự thay đổi tác dụng sinh học do quá trình chế biến Sâm VN

4.3.1. *Tác dụng ức chế tăng trưởng tế bào*: tăng lên có ý nghĩa khi thời gian chế biến tăng. Tác dụng kháng phân bào đạt cực đại sau 12 giờ chế biến ở cả 105 °C và 120 °C. Điều đáng kể là tổng hàm lượng các ginsenosid kém phân cực được hình thành do quá trình chế biến cũng đạt cực đại sau 12 giờ chế biến. Giữa các ginsenosid kém phân cực này, các ginsenosid có aglycon thuộc khung PPD như G-Rg₃, -Rg₅ và -Rk₁ là những ginsenosid được chứng minh có tác dụng kháng phân bào mạnh hơn các ginsenosid PPT kém phân cực khác như G-Rh₁, -Rk₃ và -Rh₄ và các ginsenosid phân cực khác trong các dòng tế bào ung thư. Hàm lượng các ginsenosid này cũng đạt cực đại khoảng từ 12-14 giờ sau quá trình chế biến. Điều này chứng tỏ có mối quan hệ giữa tác dụng ức chế tăng trưởng tế bào và hàm lượng của các

hấp nhằm mục đích chuyển hóa hoàn toàn các ginsenosid cấu trúc phân cực PPT như G-Re, -Rg₁ thành các ginsenosid kém phân cực giúp cho quá trình phân lập các saponin có aglycon thuộc khung OCT một cách dễ dàng. Chỉ với phương pháp SKC cổ điển sử dụng pha đảo RP-18, các saponin có aglycon thuộc khung OCT đã được phân lập với số lượng lớn, đơn giản và hiệu quả. Một lượng nhỏ aglycon thuộc khung OCT được phân lập trong cao nước sau khi được tiếp tục chế biến bằng cách hấp ở nhiệt độ 120 °C trong 8 giờ.

–Đề tài cũng phân lập được panaxynol hiệu suất tương đối cao. Đây là thành phần rất kém bền sau khi phân lập, nhưng vẫn bền trong Sâm VN sau khi chế biến. Các thành phần polyacetylen đã được chứng minh có hoạt tính kháng phân bào mạnh trong rất nhiều nghiên cứu. Việc chế biến Sâm VN theo kiểu Hồng sâm không làm ảnh hưởng đáng kể đến panaxynol, một thành phần polyacetylen chính của Sâm VN cũng như *P. ginseng* có tác dụng sinh học mạnh.

4.2.2. Sự thay đổi thành phần và hàm lượng saponin trong Sâm VN

Dựa vào biểu đồ thay đổi các saponin có aglycon thuộc khung PPD, PPT và OCT ở 0 cho thấy các ginsenosid PPT bị thoái giáng nhanh hơn ginsenosid PPD. Sau 12 giờ chế biến ở 105 °C, không còn phát hiện saponin này trên SKĐ trong khi hàm lượng ginsenosid PPT kém phân cực đạt cực đại. G-Rd tương đối bền hơn so với G-Rb₁ và -Rb₂. G-Rd vẫn còn sau 20 giờ chế biến và các ginsenosid kém phân cực khung PPD vẫn tiếp tục tăng lên sau 20 giờ.

Hàm lượng saponin khung OCT thay đổi không nhiều sau quá trình chế biến do có liên kết glycosid bền tại vị trí C-6. Khoảng 84% saponin có aglycon thuộc khung OCT còn lại sau 20 giờ chế biến. Hàm lượng saponin P-RT₄ này tăng lên 70% sau 20 giờ chế biến. Điều này có thể thấy rằng P-RT₄ có thể được tạo thành do quá trình deglycosyl hóa của M-R1, M-R2 và V-R2 tại vị trí C-6. Tuy nhiên, M-R1, M-R2, V-R1 và V-R2 tương đối bền ngay cả sau 20 giờ chế biến ở 120 °C. Điều này thêm khẳng định saponin có aglycon thuộc khung OCT tương đối bền với nhiệt do không có nhóm glycosid tại vị trí C-20.

So sánh sự tương quan ở nhiệt độ chế biến 105 °C và 120 °C.

Chuột nhắt đực ICR (20-23 g, 6 tuần tuổi, RaonBio Inc., Hàn Quốc).

2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Phân tích thành phần saponin trong các bộ phận của Sâm VN

- Phân tích định tính bằng SKLM, HPLC/UV/ELSD và LC/MS
- Xây dựng quy trình định lượng và xác định hàm lượng saponin trong Sâm VN bằng HPLC/ELSD.

Chuẩn bị mẫu thử: Cân chính xác 100 mg bột Sâm VN của các bộ phận tương ứng cho vào ống nghiệm 12 ml, thêm chính xác 10 ml dung môi MeOH 70% đầy chặt nắp, siêu âm trong 40 phút ở 30 °C, ly tâm ở 1000 vòng/phút. Dịch chiết được lọc qua màng lọc 0,45 μm.

Phân tích HPLC/ELSD: *Hệ thống sắc ký*: Perkin Elmer series 200 HPLC kết hợp đầu dò ELSD. *Cột*: Phenomenex Gemini C18 (150 × 4,6 mm; 5 μm). *Pha động*: Nước (A) và ACN (B): 0-11 phút (21% B); 11-25 phút (21→32% B); 25-35 phút (32→40% B); 35-40 phút (40→95% B); 40-60 phút (95% B); 60-61 phút (95→21% B) và 61-71 phút (21% B). *Tốc độ dòng*: 1 ml/phút. *Thể tích bơm mẫu*: 20 μl. *Nhiệt độ cột*: 30 °C. *Đầu dò*: ELSD, nhiệt độ hóa hơi: 50 °C, áp lực khí nitơ 3,8 bar. Hàm lượng saponin (mg/g) trong các bộ phận thân rễ, rễ củ và rễ con của Sâm VN được xác định theo quy trình định lượng HPLC/ELSD:

$$\text{Hàm lượng (mg/g)} = \frac{10^{\frac{\lg(S)-b_0}{b}} \times 10.000}{m}$$

Trong đó: S: diện tích đỉnh thu được; b₀, b: hệ số của phương trình hồi quy nồng độ theo lg diện tích đỉnh; m: khối lượng được liệu khô (mg).

2.2.2. Nghiên cứu thành phần hóa học saponin của Sâm VN chế biến

- Chế biến Sâm VN, chiết xuất và phân lập các cao chiết, phân đoạn và thành phần Sâm VN: Bột sâm VN chế biến (1,5 kg) được chiết lần lượt với Et₂O và MeOH (Soxhlet). Dịch chiết MeOH được cô loại dung môi, chiết phân bố lần lượt với EtOAc và n-BuOH bão hòa nước. Cao chiết Et₂O, EtOAc và n-BuOH được tiếp tục sử dụng để phân lập bằng các phương pháp sắc ký khác nhau (prep-HPLC, semiprep-HPLC).

- Xác định cấu trúc: MS, Q-TOF-MS và 1D-NMR và 2D-NMR.
- Khảo sát sự thay đổi thành phần saponin theo điều kiện nhiệt độ và thời gian chế biến khác nhau bằng HPLC/ELSD: Sâm VN được chế biến ở 105 °C và 120 °C trong khoảng thời gian 0-20 giờ. Đánh giá sự thay đổi thành phần saponin bằng HPLC/ELSD.

2.2.3. Nghiên cứu tác dụng sinh học của Sâm VN chế biến

- Đánh giá tác dụng ức chế tăng trưởng tế bào của dòng tế bào ung thư phổi A549, tác dụng chống oxy hóa của Sâm VN ở điều kiện chế biến khác nhau (105 °C và 120 °C trong khoảng thời gian 0-20 giờ).
- Đánh giá hoạt tính và khảo sát cơ chế kháng viêm của M-R2, V-R2 và các chất chuyển hóa P-RT₄, OCT sử dụng đại thực bào phúc mạc phân lập từ chuột, xử lý với tác nhân kích thích phản ứng viêm LPS.

Chương 3. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU

3.1. Phân tích thành phần saponin trong các bộ phận của Sâm VN

3.1.1. Phân tích định tính thành phần saponin trong rễ con Sâm VN

Kết quả LC/MS và Q-TOF-MS định danh các pic chính trên SKĐ HPLC của rễ con Sâm VN được thể hiện ở **Bảng 3.10**.

Bảng 3.10. Kết quả LC/MS và Q-TOF-MS định danh các pic chính trên SKĐ HPLC của mẫu rễ con Sâm VN.

STT	Saponin	Pic	MW	Rt (phút)	[M-H] ⁻
1.	N-R1	1	932	14,51	931,52
2.	M-R1	2	816	15,47	815,48
3.	G-Rg ₁	3	800	19,22	799,48
4.	G-Re	4	946	19,65	945,54
5.	M-R2	5	786	20,75	785,46
6.	V-R11	6	786	21,92	699,42
7.	V-R1 + V-R2	7	828 (V-R2) 842 (V-R1)	29,03	827,78 841,90
8.	u1*	u1	1372	29,32	1371,6835
9.	u2	u2	1240	30,65	1239,6414
10.	u3	u3	1240	31,69	1239,6404
11.	N-R2	8	770	32,5	769,48
12.	u4	u4	1342	33,05	1341,67
13.	G-Rb ₁	9	1108	33,13	1107,9
14.	u5	u5	1209	34,11	1209,6268
15.	G-Rb ₂	10	1078	35,23	1077,90
16.	G-Rd	11	946	37,69	945,91

Dựa vào kết quả Q-TOF-MS, CTPT của 5 pic u1, u2, u3, u4 và u5 lần lượt được xác định là C₆₄H₁₀₈O₃₁, C₅₉H₁₀₀O₂₇, C₅₉H₁₀₀O₂₇, C₆₃H₁₀₆O₃₀ và C₅₈H₉₈O₂₆ dựa vào giá trị phân mảnh [M-H]⁻ 1371,6835 (C₆₄H₁₀₇O₃₁: 1371,6796), 1239,6414 (C₅₉H₉₉O₂₇: 1239,6373), 1239,6404 (C₅₈H₉₇O₂₆: 1239,6268), 1341,6690 (C₆₃H₁₀₅O₃₀: 1341,6691) và 1209,6268 (C₅₈H₉₇O₂₆: 1209,6268) với độ lệch khối ΔDa so với số khối lý thuyết lần lượt là 0,039; 0,041; 0,136; 0,009 và 0,000. Các pic này đều cho hấp thụ UV ở bước sóng 203 nm.

20(R)-Rh₁; 20(S) G-Rg₃ và 20(R)-Rg₃.

Bên cạnh các ginsenosid kém phân cực được hình thành do quá trình chế biến được phân lập nêu trên, đề tài cũng phân lập được các saponin khác như:

–4 ginsenosid phân cực có aglycon thuộc khung PPT gồm: G-Re, -Rg₁, N-R1, N-R2 với thu suất thấp hơn so với các đề tài trước. Trong đó N-R2 là ginsenosid lần đầu được phân lập trong Sâm VN. Điều này cho thấy saponin có aglycon thuộc khung PPT kém bền và bị chuyển hóa thành các ginsenosid kém phân cực khác có khung PPT. Kết quả hiệu suất phân lập phù hợp với kết quả phân tích HPLC.

–10 ginsenosid phân cực có aglycon thuộc khung PPD gồm: G-Rb₁, -Rb₂, -Rc, -Rd là các thành phần ginsenosid chính có trong Sâm VN chưa chế biến. Bên cạnh các ginsenosid trên, đề tài còn phân lập được 4 ginsenosid có aglycon thuộc khung PPD rất phân cực trong cấu trúc có từ 5-6 đường từ Sâm VN chế biến gồm notoginsenosid D (N-D), N-R4, G-Ra₁ và hợp chất **22** được xác định là 3-O-β-D-xylopyranosyl-(1→2)-β-D-glucopyranosyl(1→2)-β-D-glucopyranosyl-20(S)-protopanaxadiol 20-O-β-D-xylopyranosyl (1→3)-β-D-xylopyranosyl (1→6)-β-D-glucopyranosid. Điều này chứng tỏ ginsenosid có aglycon thuộc khung PPD khá bền so với khung PPT. Ở nhiệt độ chế biến 105 °C trong vòng 8 giờ, các thành phần ginsenosid phân cực có aglycon thuộc khung PPD vẫn còn hiện diện và được phân lập từ Sâm VN chế biến. Như vậy chứng tỏ ginsenosid có aglycon thuộc khung PPD phân cực tương đối bền ở nhiệt độ chế biến của Hồng sâm và thời gian chế biến 8 giờ.

–6 saponin có aglycon thuộc khung OCT gồm: M-R1, M-R2, P-RT₄, V-R2, V-R11 và OCT genin. Trước đây việc phân lập saponin có aglycon thuộc khung OCT như M-R2 thường phải sử dụng sắc ký lỏng điều chế do hai thành phần M-R2 và G-Rg₁ khó phân tách nhau trên SKC pha thuận hay pha đảo. Đồng thời việc sử dụng đầu dò UV ở bước sóng 203 nm để phát hiện cũng có nhiều hạn chế. Do vậy để phân lập các saponin có aglycon thuộc khung OCT, đặc biệt là thành phần chính M-R2, cao nước sau khi lắc phân bố với EtOAc đã được tiếp tục

ngiên cứu này cũng cho thấy một số ginsenosid mới với khối lượng phân tử lớn tương đương với 5-6 đường trong cấu trúc hiện diện chủ yếu trong rễ con Sâm VN và chưa được phân lập và xác định cấu trúc.

4.2. Thành phần saponin của Sâm VN chế biến

Sâm VN đa số được sử dụng ở dạng tươi hoặc phơi khô mà chưa có nhiều nghiên cứu về chế biến theo kiểu Hồng sâm hoặc Thái dương sâm. Hơn nữa, ngoài hai thành phần ginsenosid cấu trúc phổ biến là PPD và PPT, Sâm VN còn chứa hàm lượng lớn các saponin có aglycon thuộc khung OCT. Sự thay đổi cấu trúc của ginsenosid có aglycon thuộc khung PPD và PPT qua quá trình hấp (steaming) đã được thực hiện trong rất nhiều nghiên cứu trước đây, tuy nhiên đối với saponin có aglycon thuộc khung OCT thì chưa được khảo sát. Do vậy trong nghiên cứu này chúng tôi nghiên cứu thành phần saponin của Sâm VN chế biến và sự thay đổi thành phần hóa học saponin của Sâm VN chế biến theo kiểu Hồng sâm và Thái dương sâm ở 105 °C và 120 °C trong khoảng thời gian khác nhau từ 2 đến 20 giờ, đồng thời so sánh sự tương quan ở hai nhiệt độ chế biến.

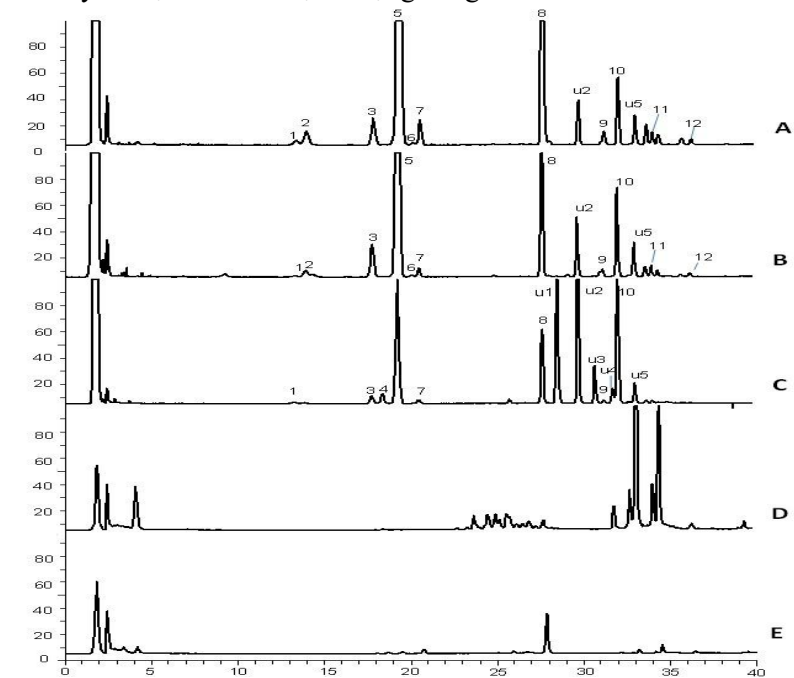
4.2.1. Phân lập và xác định thành phần hóa học của Sâm VN chế biến

Sử dụng các phương pháp chiết xuất và phân lập thường quy, kết hợp các phương pháp MPLC, semi-prep HPLC và prep HPLC, đề tài đã phân lập được 28 hợp chất: 25 saponin có aglycon thuộc khung PPD, PPT và OCT, 1 polyacetylen (panaxynol), hỗn hợp sistosterol và stigmasterol và daucosterol.

Các ginsenosid mới được tạo thành qua quá trình chế biến đa số là các cặp đồng phân 20(S) và 20(R) do quá trình khử đường (deglycosylation) của ginsenosid có aglycon thuộc khung PPD/PPT phân cực [85]. Trên SKLM, các ginsenosid này không táctơ nhau do vậy không thể sử dụng kỹ thuật SKC thông thường. Do vậy việc phân tách các ginsenosid này cũng khá phức tạp. Nghiên cứu này sử dụng kỹ thuật SKC cổ điển kết hợp HPLC điều chế để phân lập các đồng phân ginsenosid được hình thành do quá trình chế biến Sâm VN. Phương pháp HPLC điều chế cho thấy sự hiệu quả trong phân lập 4 cặp đồng phân như G-Rk₃ và -Rh₄; G-Rk₁ và -Rg₅; 20(S) G-Rh₁ và

3.1.2. Phân tích định tính và định lượng.

Sắc ký đồ định tính và định lượng bằng HPLC/ELSD Sâm VN



Hình 3.12. SKĐ HPLC/ELSD đại diện cho 5 bộ phận khác nhau của Sâm VN.

(A) Thân rễ; (B) Rễ củ; (C) Rễ con; (D) Lá; và (E) Thân (Nồng độ phân tích của mẫu Thân và Lá cao gấp 3 lần các mẫu khác). *Chú thích:* N-R1 (1), M-R1 (2), G-Rg₁ (3), G-Re (4), M-R2 (5), P-RT₄ (6), V-R11 (7), V-R1 + V-R2 (8), N-R2 (9), G-Rb₁ (10), G-Rb₂ (11), G-Rd (12) và 5 pic chưa xác định (u1-u5).

Kết quả cho thấy SKĐ của mẫu trên mặt đất (lá và thân) khác với mẫu dưới mặt đất.

Quy trình định lượng bằng phương pháp HPLC/ELSD

Bảng 3.13. Đường tuyến tính của 9 saponin chính với đầu dò ELSD

Saponin	Phương trình hồi quy	R ²	Khoảng tuyến tính (mg/ml)	LOQ (mg/ml)	LOD (mg/ml)
N-R1	$y = 16.095.158x^{1,6081}$	0,9985	0,013-1,040	0,0220	0,0060
G-Rg ₁	$y = 14.505.168x^{1,5687}$	0,9983	0,007-0,955	0,0220	0,0070
G-Re	$y = 15.540.853x^{1,6196}$	0,9977	0,013-1,075	0,0220	0,0070
M-R2	$y = 20.958.157x^{1,6685}$	0,9984	0,019-0,61	0,0190	0,0040
P-RT ₄	$y = 20.123.608x^{1,6351}$	0,9990	0,009-0,56	0,0160	0,0065
V-R11	$y = 4.707.057x^{1,6007}$	0,9994	0,055-1,69	0,0550	0,0260
V-R2	$y = 22.774.081x^{1,6510}$	0,9994	0,007-0,56	0,0130	0,0035
G-Rb ₁	$y = 30.016.270x^{1,6916}$	0,9991	0,007-0,495	0,0130	0,0038

Saponin	Phương trình hồi quy	R ²	Khoảng tuyến tính (mg/ml)	LOQ (mg/ml)	LOD (mg/ml)
G-Rd	$y = 28.974.603x^{1,7116}$	0,9993	0,007-0,495	0,0120	0,0039

Bảng 3.12. Kết quả độ đúng của 9 saponin chính trong Sâm VN

Saponin	ELSD				UV					
	Original (mg/g)	Thêm vào (mg/g)	Tim thấy (mg/g)	Tỉ lệ hồi phục (%)	R.S.D (%)	Original (mg/g)	Thêm vào (mg/g)	Tim thấy (mg/g)	Tỉ lệ hồi phục (%)	R.S.D (%)
N-R1					0,15	0,09	0,24	98	6,9	
G-Rg ₁	3,66	2,4	5,95	94,8	3,27	0,11	0,26	97,8	5,7	
		3,02	6,69	100,2	1,18	3,72	2,4	6,11	99,5	1,66
G-Re						0,1	0,17	81,6	0,3	
						0,09	0,12	0,19	84,5	0,4
M-R2	6,41	3,98	10,17	94,3	4,15					N.D ¹⁾
		4,98	11,21	96,5	0,4					
P-RT4	1,71	1,02	2,72	98,5	4,49					N.D
		1,23	2,81	89,4	0,9					
V-R11	0,67	0,52	1,17	111,5	4,06					N.D
		0,62	1,31	102,3	0,42					
V-R2	0,17	0,08	0,25	103,7	5,4					N.D
		0,1	0,28	101	6,36					
G-Rb ₁	1,01	1,0	1,98	97	2,3	1,0	2,01	101	1,62	
		1,2	2,12	92	7,63	1,01	1,2	2,15	96	5,75
G-Rd	0,56	0,52	1,05	95	0,96	0,52	1,1	106,3	2,86	
		0,63	1,13	90	3,07	0,56	0,63	1,19	98	6,45

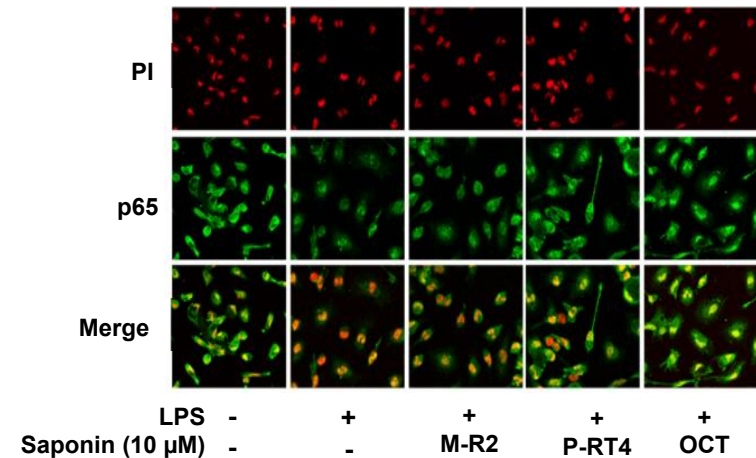
Bảng 3.14. Độ lặp lại trong ngày và liên ngày của phương pháp HPLC-ELSD

Saponin	ELSD			
	Trong ngày		Liên ngày	
	Hàm lượng (mg/g)	%R.S.D	Hàm lượng (mg/g)	%R.S.D
N-R1				
G-Rg ₁	35,8 ± 0,2	0,75	36,6 ± 1,1	3,03
G-Re				
M-R2	62,8 ± 0,3	0,51	64,1 ± 1,5	2,43
P-RT ₄	16,8 ± 0,2	1,4	17,6 ± 0,6	3,78
VR11	6,7 ± 0,2	3,03	7,7 ± 0,18	2,37
VR2	1,5 ± 0,05	3,77	1,7 ± 0,06	3,87
G-Rb ₁	10,1 ± 0,00	0,09	10,5 ± 0,3	2,96
G-Rd	5,6 ± 0,06	1,14	5,6 ± 0,12	2,26

Kết quả định lượng saponin trong thân rễ, rễ củ và rễ con Sâm VN

Bảng 3.16. Hàm lượng¹⁾ saponin trong các bộ phận thân rễ, rễ củ và rễ con

Loại	Saponin	CTPT	Thân rễ	Rễ củ	Rễ con
PPD	G-Rb ₁	C ₅₄ H ₉₂ O ₂₃	8,1 ± 2,8	10,1 ± 4,3	11,5 ± 3,7
	G-Rb ₂	C ₅₃ H ₉₀ O ₂₂	3,6 ± 2,1	2,2 ± 1,1	1,9 ± 0,5
	G-Rd	C ₄₈ H ₈₂ O ₁₈	2,3 ± 0,4	1,5 ± 0,5	1,7 ± 0,3
	u1 ²⁾	C ₆₄ H ₁₀₈ O ₃₁	N.D ⁷⁾	N.D	24,2 ± 4,9
	u2 ²⁾	C ₅₉ H ₁₀₀ O ₂₇	9,2 ± 2,3	12,1 ± 4,1	14,2 ± 4,6
	u3 ²⁾	C ₅₉ H ₁₀₀ O ₂₇	N.D	N.D	7,0 ± 1,3
	u4 ²⁾	C ₆₃ H ₁₀₆ O ₃₀	N.D	N.D	5,2 ± 0,9
	u5 ²⁾	C ₅₈ H ₉₈ O ₂₆	8,0 ± 3,2	5,3 ± 1,3	7,8 ± 3,6

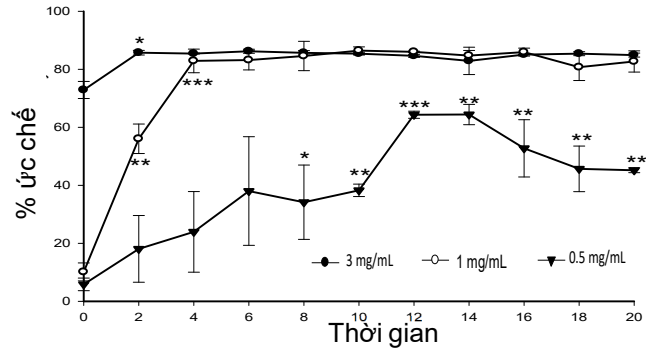


Hình 3.27. Tác dụng của M-R2, P-RT4 và OCT lên sự chuyển vị NF-κB vào nhân tế bào

Chương 4. BÀN LUẬN

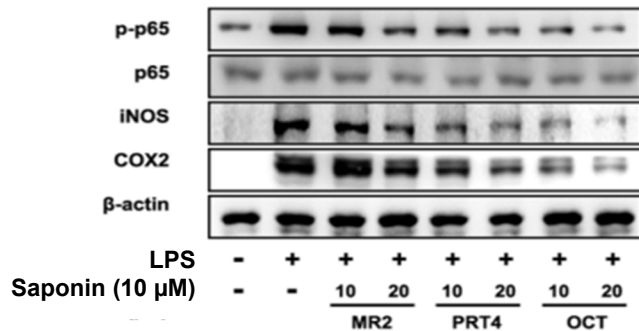
4.1. Phân tích thành phần saponin trong sâm VN

ELSD là một lựa chọn tối ưu cho việc định lượng các saponin trong các loài thuộc chi *Panax*, saponin có aglycon thuộc khung OCT. Saponin khung OCT là thành phần saponin chính của Sâm VN, chiếm hơn 50% hàm lượng saponin toàn phần gồm M-R2 (thành phần chính), M-R1, V-R2 chưa được phát hiện cũng như định lượng trong các nghiên cứu trước đây. Trong nghiên cứu này sử dụng đầu dò ELSD, các thành phần saponin có aglycon thuộc khung OCT đã được phát hiện và định lượng. Việc đánh giá thành phần, hàm lượng các saponin thuộc các nhóm này rất quan trọng để đánh giá tiêu chuẩn chất lượng cho Sâm VN cũng như định hướng cho các nghiên cứu về tác dụng sinh học và dược lý. Kết quả phân tích cho thấy Sâm VN khác các loài Sâm khác ở thành phần saponin cũng như hàm lượng saponin cao hơn gấp nhiều lần. Sử dụng phương pháp TLC điều chế, prep-HPLC kết hợp kỹ thuật xác định phổ khối Q-TOF-MS hiện đại, các ginsenosid mới trong Sâm VN đã được xác định. Phương pháp này rất hiệu quả, đơn giản và nhanh chóng, giúp định hướng cho việc phân lập các ginsenosid mới chưa được xác định cấu trúc trong Sâm VN. Kết quả



Biểu đồ 3.7. Sự thay đổi tác dụng kháng phân bào của Sâm VN chế biến ở 120 °C trên dòng tế bào ung thư phổi A549.

3.4.3. Tác dụng kháng viêm: P-RT₄ và OCT ở nồng độ 10 và 20 μM ức chế quá trình phosphoryl hóa của IRAK1, TAK1 và IκBα, cũng như hoạt hóa NF-κB trong gắn kết LPS với đại thực bào phức tạp. Những hoạt chất này cũng ức chế mạnh biểu hiện của các yếu tố TNF-α, IL-1β, COX-2 và iNOS trong gắn kết LPS với đại thực bào phức tạp. P-RT₄ và OCT có thể ngăn chặn biểu hiện các cytokine tiền viêm gây bởi LPS và kích hoạt yếu tố transcription NF-κB bằng cách ức chế gắn kết LPS với thụ thể TLR4 trên tế bào miễn dịch cũng như tế bào đại thực bào.

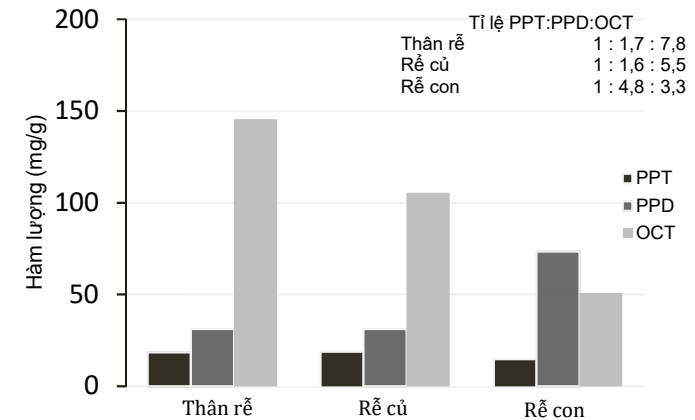


Hình 3.26. Tác dụng của M-R2, P-RT₄ và OCT trên biểu hiện của các yếu tố tham gia đường truyền tín hiệu viêm thông qua NF-κB khi xử lý với LPS

Loại	Saponin	CTPT	Thân rễ	Rễ củ	Rễ con
Tổng PPD³⁾			31,2 ± 9,9	31,3 ± 10,3	73,4 ± 11,7
PPT	G-Re	C ₄₈ H ₈₂ O ₁₈	1,1 ± 0,4	0,7 ± 0,5	6,1 ± 1,4
	G-Rg ₁	C ₄₂ H ₇₂ O ₁₄	10,9 ± 1,9	11,3 ± 2,2	4,9 ± 2,3
	N-R1	C ₄₇ H ₈₀ O ₁₈	3,5 ± 1,0	3,8 ± 1,3	2,6 ± 1,1
	N-R2	C ₄₁ H ₇₀ O ₁₃	3,0 ± 1,6	3,5 ± 1,4	1,7 ± 0,4
Tổng PPT⁴⁾			18,5 ± 3,0	19,2 ± 4,5	15,2 ± 3,5
OCT	M-R1	C ₄₂ H ₇₂ O ₁₅	7,2 ± 1,4	4,9 ± 1,5	1,8 ± 1,0
	M-R2	C ₄₁ H ₇₀ O ₁₄	93,5 ± 16,2	70,6 ± 15,1	26,5 ± 13,1
	P-RT ₄	C ₃₆ H ₆₂ O ₁₀	2,4 ± 0,5	1,2 ± 0,1	N.D
	V-R11	C ₄₁ H ₇₀ O ₁₄	8,7 ± 1,3	5,0 ± 1,4	6,3 ± 2,6
	V-R1 + V-R2 ⁵⁾	C ₄₄ H ₇₄ O ₁₅ (V-R1) C ₄₃ H ₇₂ O ₁₅ (V-R2)	33,7 ± 8,9	23,7 ± 4,9	16,2 ± 4,3
Tổng OCT⁶⁾			145,5 ± 23,5	105,4 ± 22,2	50,7 ± 20,7
Hàm lượng tổng			195,2 ± 35,3	155,9 ± 34,4	139,3 ± 29,9

- 1) Kết quả được thể hiện ở giá trị trung bình ± SD (n=6), mg/g (tính trên dược liệu Sâm VN khô).
- 2) Các pic chưa biết, được xác định thuộc nhóm PPD dựa vào kết quả Q-TOF-MS và ¹H-NMR. Hàm lượng của u1-u5 được tính toán dựa vào đáp ứng với đầu dò ELSD so với G-Rb₁.
- 3) PPD: G-Rb₁, -Rb₂, -Rd và u1-u5. 4) PPT: G-Re, -Rg₁, N-R1 và N-R2. 5) Được tính cho V-R2
- 6) OCT: M-R1, M-R2, P-RT₄, V-R1, V-R2 và V-R11. 7) N.D: không phát hiện.

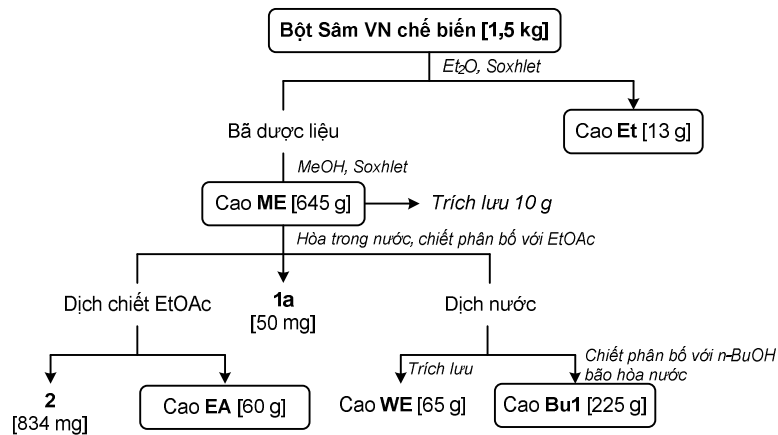
Hàm lượng saponin toàn phần của Sâm VN ở các bộ phận thân rễ, rễ củ và rễ con lần lượt là 195,2; 155,9; 139,3 mg/g dược liệu khô. Tỷ lệ hàm lượng saponin có aglycon thuộc khung PPT:PPD:OCT thể hiện trong **Biểu đồ 3.1**.



Biểu đồ 3.1. Biểu đồ so sánh hàm lượng các saponin chính nhóm PPT, PPD và OCT trong các bộ phận dưới mặt đất của Sâm VN.

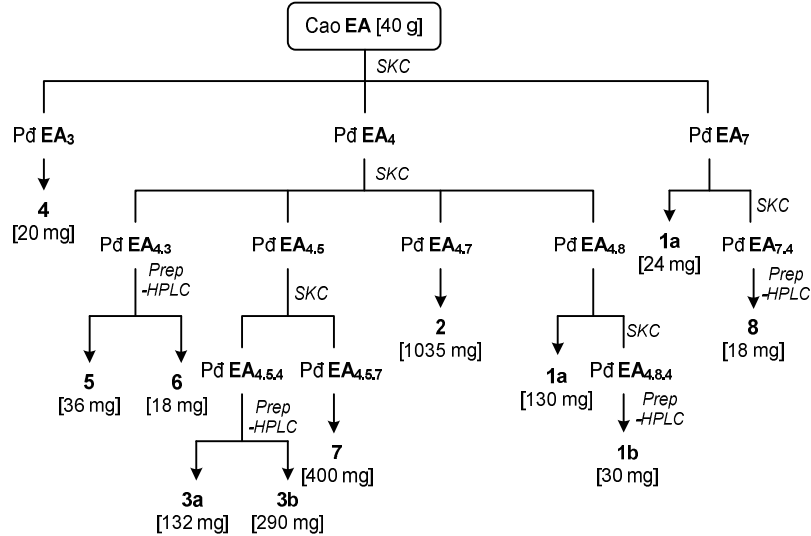
3.2. Thành phần saponin của sâm VN chế biến

3.2.1. Chiết xuất và phân lập saponin từ Sâm VN chế biến



Hình 3.15. Sơ đồ quy trình chiết các cao từ dược liệu Sâm VN chế biến

Kết quả phân lập thành phần từ cao EA được tóm tắt trong 0.



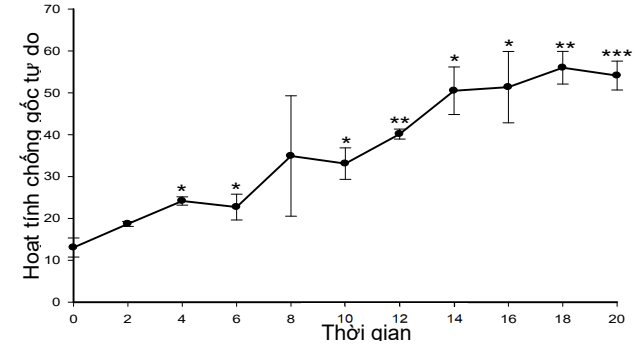
Hình 3.16. Sơ đồ phân lập các thành phần từ cao EA

Kết quả phân lập thành phần từ cao Bu1 được trình bày trong Hình 3.18.

Chú thích: 105, 120: tương ứng với nhiệt độ chế biến ở 105 °C và 120 °C. 0-2-4,...-20: tương ứng với thời gian chế biến 0 giờ (Sâm VN chưa chế biến), 2, 4,..., 20 giờ.

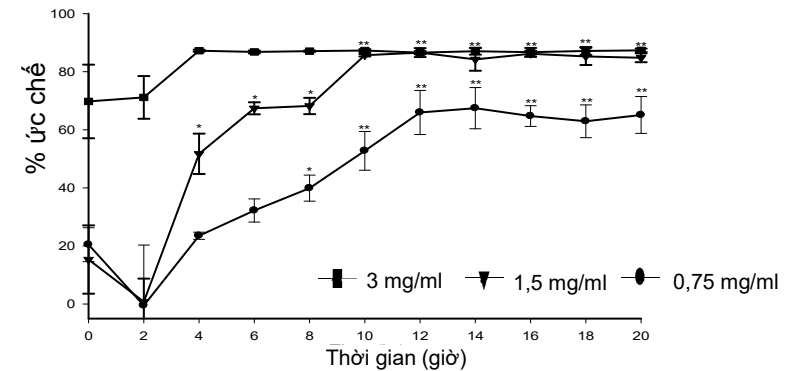
3.4. Sự thay đổi tác dụng sinh học của sâm VN sau chế biến

3.4.1. Tác dụng chống oxy hóa: Tác dụng chống oxy hóa của Sâm VN chưa chế biến (0 giờ) và Sâm VN chế biến từ 2- 20 giờ được thể hiện trong Biểu đồ 3.5.

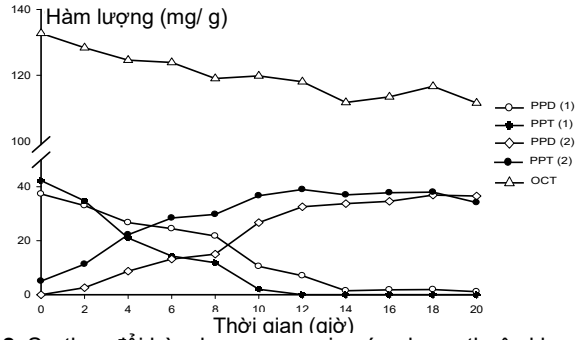


Biểu đồ 3.5. Hoạt tính chống gốc tự do DPPH của Sâm VN ở thời điểm chế biến khác nhau tại 120 °C.

3.4.2. Tác dụng ức chế tăng trưởng tế bào: Kết quả chế biến ở điều kiện 105 °C và 120 °C trong khoảng thời gian từ 2-20 giờ trên dòng tế bào ung thư phổi A549 được thể hiện trong Biểu đồ 3.6 và 3.7

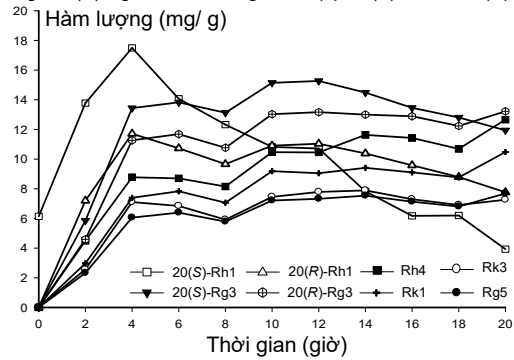


Biểu đồ 3.6. Tác dụng kháng phân bào của Sâm VN chế biến ở điều kiện 105 °C trong khoảng thời gian từ 2-20 giờ trên dòng tế bào ung thư phổi A549.



Biểu đồ 3.2. Sự thay đổi hàm lượng aglycon thuộc khung PPD, PPT và OCT trong quá trình chế biến Sâm VN ở 105 °C.

PPD (1): G-Rb₁, G-Rb₂, và G-Rd PPT (1): G-Re và G-Rg₁ OCT: M-R1, M-R2, V-R1 và V-R2.
PPD (2): 20(S) G-Rg₃, 20(R)-Rg₃, G-Rk₁ và -Rg₅. PPT (2): 20(S) G-Rh₁, 20(R) -Rh₁, G-Rk₃ và -Rh₄.

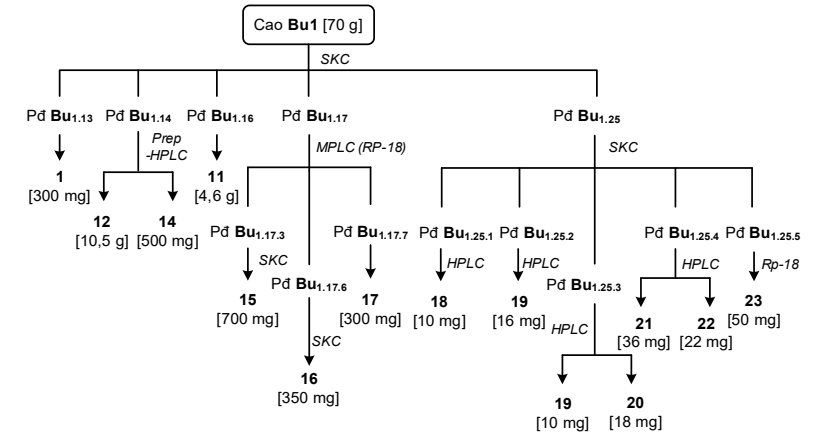


Biểu đồ 3.4. Sự thay đổi hàm lượng saponin kém phân cực khi chế biến Sâm VN ở 120 °C

So sánh sự thay đổi hàm lượng và thành phần saponin ở điều kiện 105 °C và 120 °C bằng hệ số tương quan SI (similarity index) được thể hiện trong **Bảng 3.26**.

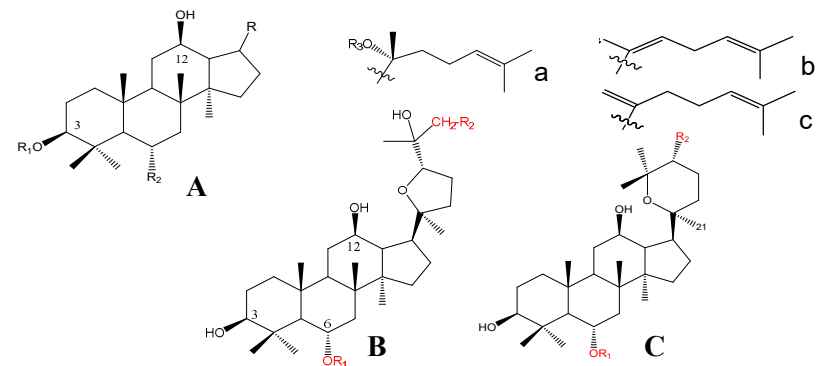
Bảng 3.26. Chỉ số tương quan giữa thành phần hóa học saponin của các mẫu Sâm VN chế biến ở 105 °C và 120 °C.

Nhiệt độ - Thời gian	120-0	120-2	120-4	120-6	120-8	120-10
105-0	0,903	0,693	0,530	0,468	0,420	0,421
105-2	0,902	0,753	0,585	0,525	0,480	0,478
105-4	0,837	0,861	0,687	0,632	0,592	0,585
105-6	0,789	0,903	0,743	0,691	0,652	0,635
105-8	0,774	0,918	0,774	0,722	0,683	0,664
105-10	0,663	0,819	0,883	0,835	0,796	0,772
105-12	0,628	0,785	0,903	0,877	0,836	0,815
105-14	0,602	0,780	0,900	0,905	0,872	0,851
105-16	0,601	0,774	0,902	0,906	0,868	0,852
105-18	0,594	0,762	0,901	0,906	0,863	0,857
105-20	0,596	0,770	0,901	0,909	0,881	0,869



Hình 3.18. Sơ đồ phân lập các thành phần từ Cao Bu1 Cao chiết WE tiếp tục được hấp ở 105 °C trong 8 giờ và được chiết phân bố lỏng lỏng với *n*-BuOH, phân đoạn *n*-BuOH được cô thu hồi dung môi thu được 10 g cao Bu2.

Hình 3.19. Quy trình phân lập các hợp chất từ cao chiết Bu2.



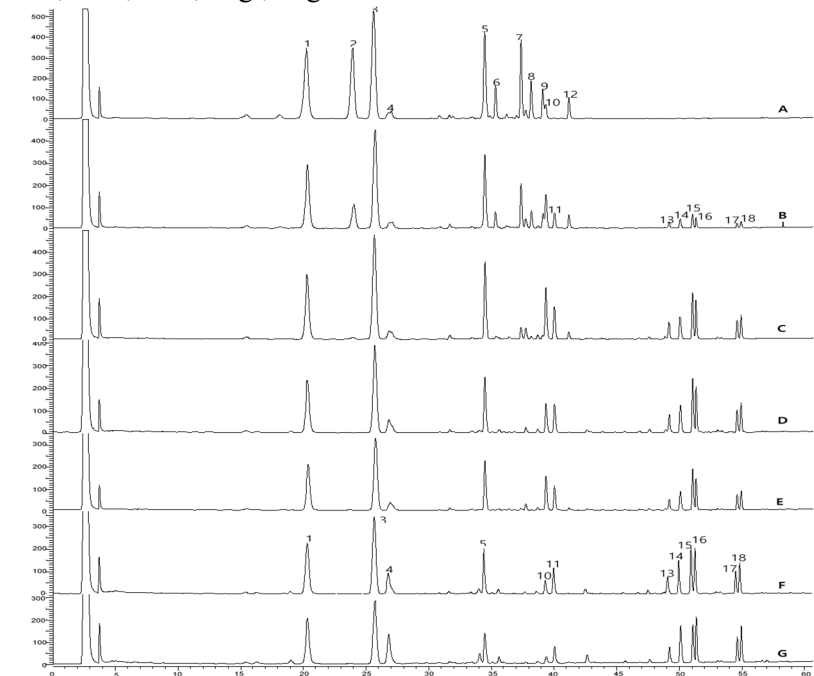
Bảng 3.22. Kết quả phân lập các thành phần từ Sâm VN và cảm quan, đặc điểm hóa học và khối phổ

STT	Hợp chất	Ký hiệu	Khung	R1	R2	R3	KL (mg)	Cảm quan	Độ tan	UV (nm)	ESI-MS/ Q-TOF-MS	CTPT
1	20(R) G-Rg ₃	1a	A-(a)	-Glc ² -Glc	-H	-H	664	Bột vô định hình, không màu	Kém tan/ MeOH	203	[M-H] ⁻ = 783,4909	C ₄₂ H ₇₂ O ₁₃
2	20(S) G-Rg ₃	1b	A-(a)	-Glc ² -Glc	-H	-H	30	-nt-	Tan tốt/ MeOH	203	[M-H] ⁻ = 783,8754	C ₄₂ H ₇₂ O ₁₃
3	V-R2	2	B	[6-Ac]-Glc ² -Xyl	-H	-H	2115	Tinh thể hình kim, không màu	-nt-	<198	[M-H] ⁻ = 827,4823	C ₄₃ H ₇₂ O ₁₅
4	20(S) G-Rh ₁	3a	A-(a)	-H	-Glc	-H	132	-nt-	-nt-	203	[M+COOH] ⁻ = 683,4396	C ₃₆ H ₆₂ O ₉
5	20(R) G-Rh ₁	3b	A-(a)	-H	-Glc	-H	290	-nt-	-nt-	203	[M+COOH] ⁻ = 683,4398	C ₃₆ H ₆₂ O ₉
6	Daucosterol	4					25	-nt-	-nt-	203		C ₃₅ H ₆₅ O ₆
7	20(S) G-Rk ₃	5	A-(b)	-H	-Glc	-H	36	-nt-	-nt-	203	[M+COOH] ⁻ = 665,4285	C ₃₆ H ₆₀ O ₈
8	20(S) G-Rh ₄	6	A-(c)	-H	-Glc	-H	18	-nt-	-nt-	203	[M+COOH] ⁻ = 666,0593	C ₃₆ H ₆₀ O ₈
9	P-RT ₄	7	B	-Glc	-H	-H	418,8	-nt-	-nt-	<198	[M+COOH] ⁻ = 699,4338	C ₃₈ H ₆₂ O ₁₀
10	N-R2	8	A-(a)	-H	-Glc ² -Xyl	-H	18	-nt-	-nt-	203	[M-H] ⁻ = 769,23	C ₄₁ H ₇₀ O ₁₃
11	G-Rk ₁	9	A-(b)	-Glc ² -Glc	-H	-H	40,5	Bột vô định hình, không màu	-nt-	203	[M-H] ⁻ = 765,4812	C ₄₂ H ₇₀ O ₁₂
12	G-Rg ₅	10	A-(c)	-Glc ² -Glc	-H	-H	42,1	-nt-	-nt-	203	[M-H] ⁻ = 765,4823	C ₄₂ H ₇₀ O ₁₂
13	M-R1	11	B	-Glc ² -Glc	-H	-H	4.870	-nt-	-nt-	<198	[M-H] ⁻ = 815,7859	C ₄₂ H ₇₂ O ₁₅
14	M-R2	12	B	-Glc ² -Xyl	-H	-H	10.800	-nt-	-nt-	<198	[M-H] ⁻ = 785,7787	C ₄₁ H ₇₀ O ₁₄
15	V-R11	13	C	-Glc ² -Xyl	-OH	-H	50	-nt-	-nt-	<198	M-H = 785,4673	C ₃₆ H ₆₄ O ₁₁
16	G-Rg ₁	14	A-(a)	-H	-Glc	-Glc	500	-nt-	-nt-	203	M-H = 799,4281	C ₅₀ H ₈₄ O ₁₉
17	N-R1	15	A-(a)	-H	-Glc ² -Xyl	-Glc	700	-nt-	-nt-	203	[M+Na] ⁺ = 965,5211	C ₄₂ H ₇₂ O ₁₄
18	G-Re	16	A-(a)	-H	-Glc ² -Rha	-Glc	350	-nt-	-nt-	203	[M+Na] ⁺ = 969,5288	C ₄₈ H ₈₂ O ₁₈
19	G-Rd	17	A-(a)	-Glc ² -Glc	-H	-Glc	300	-nt-	-nt-	203	[M+Na] ⁺ = 968,5296	C ₄₈ H ₈₂ O ₁₈
20	G-Rb ₂	18	A-(a)	-Glc ² -Glc	-H	-Glc ⁶ -Ara(p)	10	-nt-	-nt-	203	[M-H] ⁻ = 1077,5882	C ₅₃ H ₈₀ O ₂₂
21	G-Rb ₁	19	A-(a)	-Glc ² -Glc	-H	-Glc ⁶ -Glc	16	-nt-	-nt-	203	[M-H] ⁻ = 1107,5979	C ₅₄ H ₈₂ O ₂₃
22	G-Ra ₁	20	A-(a)	-Glc ² -Glc	-H	-Glc ⁶ -Ara ⁴ -Xyl	18	-nt-	-nt-	203	[M-H] ⁻ = 1239,6357	C ₅₉ H ₁₀₀ O ₂₇
23	N-R4	21	A-(a)	-Glc ² -Glc	-H	-Glc ⁶ -Glc ⁶ -Xyl	36	-nt-	-nt-	203	[M-H] ⁻ = 1209,6313	C ₅₈ H ₉₈ O ₂₆
24	Hợp chất 22	22	A-(a)	-Glc ² -Glc ² -Xyl	-H	-Glc ⁶ -Xyl ³ -Xyl	22	-nt-	-nt-	203	[M-H] ⁻ = 1341,6739	C ₆₃ H ₁₀₆ O ₃₀
25	N-D	23	A-(a)	-Glc ² -Ara(p)-Xyl	-H	-Glc ⁶ -Glc	50	-nt-	-nt-	203	[M-H] ⁻ = 1371,6835	C ₆₄ H ₁₀₆ O ₃₁
26	Panaxyl	24					2.000	Thế chất	Tan/	203		C ₁₇ H ₂₄ O

STT	Hợp chất	Ký hiệu	Khung	R1	R2	R3	KL (mg)	Cảm quan	Độ tan	UV (nm)	ESI-MS/ Q-TOF-MS	CTPT
27	Stigmasterol & sitosterol	25					200	Tinh thể hình kim, không màu	-nt-	203		C ₂₉ H ₄₈ O
28	OCT	26	B	-H	-H	-H	1.352	-nt-	-nt-	<198	[M+Na] ⁺ = 515,3713	C ₃₀ H ₅₂ O ₅

3.3. Nghiên cứu sự thay đổi thành phần hóa học saponin trong quá trình chế biến Sâm VN

SKĐ HPLC/ELSD đại diện của điều kiện 120 °C được thể hiện trong **Hình 3.24**. Sau khi chế biến, các thành phần phân cực có aglycon thuộc khung PPD, PPT như G-Rb₁, -Rd, -Re và -Rg₁ có thời gian lưu ở trước 40 phút bị giảm và chuyển hóa thành các ginsenosid cấu trúc kém phân cực hơn và thời gian lưu trên SKĐ HPLC ở sau 40 phút như G-Rh₁, -Rk₃, -Rh₄, -Rk₁, -Rg₃, -Rg₅.



Hình 3.24. SKĐ HPLC/ELSD đại diện Sâm VN chế biến ở 120 °C Sâm VN chưa chế biến (A), 2 giờ (B), 4 giờ (C), 8 giờ (D), 12 giờ (E), 16 giờ (F) và 20 giờ (G). Chú thích các pic: 1. M-R1; 2. G-Rg₁+R-Re; 3. M-R2; 4. pic 1; 5. V-R1+V-R2; 6. pic 2; 7. G-Rb₁; 8. G-Rc; 9. G-Rb₂; 10. 20(S)-Rh₁; 11. 20(R)-Rh₁; 12. G-Rd; 13. G-Rk₃; 14. G-Rh₄; 15. 20(S)-Rg₃; 16. 20(R)-Rg₃; 17. G-Rk₁; 18. G-Rg₅.