

# NGHIÊN CỨU ẢNH HƯỞNG CỦA QUÁ TRÌNH CHẾ BIẾN LÊN SỰ THAY ĐỔI THÀNH PHẦN HÓA HỌC SAPONIN VÀ TÁC DỤNG TĂNG LỰC CỦA SÂM VIỆT NAM

Lê Thị Hồng Vân\*, Nguyễn Ngọc Khôi\*, Nguyễn Minh Đức\*

## TÓM TẮT

**Mở đầu:** Sâm Việt nam (*Panax vietnamensis* Ha et Grushv. Araliaceae) là một loài *Panax* mới, cho đến nay chỉ mới phát hiện ở Việt nam. Hiện nay sâm Việt nam chỉ được dùng dưới dạng phơi sấy khô chứ chưa có nghiên cứu nào về bào chế dạng hồng sâm như Sâm Triều Tiên.

**Mục tiêu:** Mục đích của đề tài là nghiên cứu ảnh hưởng của việc chế biến Sâm Việt nam lên tác dụng tăng lực và sự thay đổi thành phần saponin của sâm Việt nam so với sâm Việt nam chưa chế biến.

**Đối tượng và phương pháp nghiên cứu:** Sâm Việt nam sau khi chế biến và trước khi chế biến được chiết xuất lấy phân đoạn saponin toàn phần. So sánh sự thay đổi thành phần saponin sử dụng phương pháp sắc ký lớp mỏng (SKLM) và sắc ký lỏng hiệu năng cao (HPLC). Thử nghiệm độc tính cấp và tác dụng tăng lực của Sâm Việt Nam trên mô hình "Chuột bơi kiệt sức của Brekman",

**Kết quả:** Có sự thay đổi rõ rệt thành phần saponin của sâm Việt nam sau khi chế biến. Ở liều thấp là 20 mg/kg chuột, cao saponin toàn phần của sâm Việt Nam sau khi chế biến đã có phát huy tác dụng làm kéo dài thời gian bơi ở chuột nhắt và có tác dụng tăng lực không thay đổi so với cao saponin toàn phần của sâm Việt Nam chưa qua chế biến

**Kết luận:** Sau khi chế biến thì ta nhận thấy sâm Việt Nam đã có sự thay đổi rõ rệt về thành phần hóa học saponin nhưng tác dụng tăng lực của nó vẫn không hề suy giảm.

**Từ khóa:** Sâm Việt Nam

## ABSTRACT

THE EFFECT OF STEAMING ON SAPONIN COMPONENTS AND ENDURANCE SWIMMING CAPACITY OF VIETNAMESE GINSENG PANAX VIETNAMESNIS HA ET GRUSHV.

Le thi Hong Van, Nguyen Ngoc Khoi, Nguyen Minh Duc

\* Y học Tp. Hồ Chí Minh \* Vol. 14 – Supplement of No 1 – 2010: 145-150

**Background:** Vietnamse ginseng (VG), a wild *Panax* species, discovered in the Central Vietnam in 1973, has been used in Vietnam for many purpose as ginseng *Panax ginseng* (PG), i.e., for treatment of many serious diseases and for enhancement of physical strength. This study was carried out to investigate changes in the saponin composition and endurance swimming capacity of vietnamese ginseng *Panax vietnamensis* Ha et Grushv., Araliaceae induced by steaming.

**Materials and Methods:** The raw VG root was obtained from Quang Nam province. Samples of the raw VG root were steamed for 2, 4, 6, and 8 h. The root was then dried at about 50 °C until constant weight. Dried VG were extracted with refluxing MeOH in a soxhlet extractor for 8 hours. After cooling the methanol was removed in vacuo. The residue was dissolved in water and then subjected to a column chromatography with Diaion HP-20. The total saponins was collected by evaporating to dryness in vacuo methanol fraction. Use a thin layer and high-

\* Khoa Dược - Đại học Y Dược Tp. Hồ Chí Minh

Địa chỉ liên hệ: DS. Lê Thị Hồng Vân

ĐT: 0984711256

Email: levanph@gmail.com

performance liquid (HPLC) chromatographic pattern matching method to differentiate saponin fraction. In forced swimming with load paradigm, male Swiss albino mice were given orally either raw or steamed vietnamse ginseng vehicle performed an increase in swimming capacity before exhaustion compared with the control mice

**Results:** No difference between the raw and steamed form indicated the steaming process did not affect the physical strengthening of VG in this paradigm. No acute toxic signal was detected even in the highest steamed vietnamse ginseng dose that could be tested.

**Conclusion:** In summary, using pattern matching analysis, the raw and steamed samples were successfully differentiated. The steamed form showed numerous peaks were not distinct in the chromatogram of the raw samples indicated a lot of newly formed derivatives. However, pharmacological studies showed no differences in physical strengthening activities and toxicity between raw and steamed *Panax vietnamensis*.

**Key words:** *Panax vietnamensis*.

## ĐẶT VẤN ĐỀ

Sâm Việt nam (*Panax vietnamensis* Ha et Grushv. Araliaceae) là một loài *Panax* mới, cho đến nay chỉ mới phát hiện ở Việt nam. Cây sâm này được phát hiện vào năm 1973 tại đỉnh Ngọc Linh, thuộc Khu 5 cũ nên còn được gọi là sâm Ngọc linh hay sâm Khu 5. Đây là cây “thuốc giấu” rất quý của dân tộc Sê Đăng sống trên dãy Trường sơn với tác dụng tăng lực, chống mệt mỏi khi đi rừng, lao động và nhiều bệnh tật khác.

Cho đến nay đã có rất nhiều công trình nghiên cứu trong và ngoài nước về cây Sâm Việt Nam. Các công trình nghiên cứu đã chứng tỏ cây Sâm Việt Nam là một dược liệu quý, có thành phần hóa học phong phú và khá giống Nhân sâm Triều Tiên. Ngoài các saponin chính có trong sâm Triều Tiên như G-Rb<sub>1</sub>, G-Rb<sub>2</sub>, G-Rb<sub>3</sub>, G-Rc, G-Rd, G-Re, G-Rg<sub>1</sub> ..., sâm Việt Nam còn chứa các saponin khung dammaran có cấu trúc ocotillol chưa tìm thấy ở sâm Triều Tiên, đặc biệt là hợp chất majonosid R2 với hàm lượng lên đến 5,29%.(1)

Nhân sâm được biết đến với hai dạng dùng chủ yếu là Bạch sâm và hồng sâm. Hồng sâm được dùng phổ biến hơn vì sau khi chế biến thành phần hóa học thay đổi làm hồng sâm có thêm tác dụng bổ dưỡng, làm tăng thể lực, trí lực, chữa bệnh tim mạch, thần kinh suy nhược, bệnh tiểu đường, và đặc biệt hơn là tác dụng phòng chống ung thư, kháng viêm và chống oxy hóa...(3,4). Ngoài ra hồng sâm còn

có những ginsenosid mới không có trong bạch sâm như ginsenosid-Rg<sub>3</sub>, G-Rg<sub>5</sub>, G-Rg<sub>6</sub>, G-Rh<sub>2</sub>, G-Rh<sub>3</sub>, G-Rh<sub>4</sub>, G-Rs<sub>3</sub>.... Các thành phần mới này giúp tăng cường hoạt tính sinh học của hồng sâm với tác dụng phòng chống ung thư, kháng viêm, chống oxy hóa... Trong đó, tinh chất G-Rg<sub>3</sub> và G-Rh<sub>2</sub> đã được nghiên cứu phát triển như một thuốc chống ung thư. Hiện nay, sâm Việt Nam chỉ mới được sử dụng dưới dạng phơi sấy khô như bạch sâm và chưa có nghiên cứu nào về thành phần hóa học cũng như tác dụng dược lý của sâm Việt Nam khi chế biến như hồng sâm được công bố chính thức. Vấn đề đặt ra là liệu khi chế biến sâm Việt Nam thì thành phần hóa học và tác dụng dược lý có những thay đổi như thế nào so với trước khi chế biến hay không?

Trên cơ sở các vấn đề đã nêu ra chúng tôi tiến hành đề tài “Nghiên cứu ảnh hưởng của quá trình chế biến lên sự thay đổi thành phần hóa học saponin và tác dụng tăng lực của Sâm Việt nam” nhằm góp phần nâng cao giá trị điều trị và kinh tế của nguồn sâm quý Việt nam.

## ĐỐI TƯỢNG-PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

### Đối tượng

Thân rễ và rễ củ sâm Việt Nam tươi được thu hái tại Quảng Nam. Các chuẩn ginsenosid Rb<sub>1</sub>, Rd, and Rg<sub>1</sub> được phân lập từ các nghiên cứu trước đây với độ tinh khiết cao (trên 98%).

### Phương pháp nghiên cứu

#### Chế biến dược liệu

Thân củ và rễ củ sâm Việt Nam sau khi rửa sạch, khảo sát dược liệu về mặt vi phẫu, thử tinh khiết và định tính bằng sắc ký lớp mỏng.

Mẫu sâm tươi (R0) được đem sấy ở nhiệt độ 50°C đến khi đạt độ ẩm quy định cho dược liệu khô theo tiêu chuẩn DĐVN III (không quá 13%).

Mẫu sâm để chế biến được chia thành các phần đem hấp ở 100°C trong các khoảng thời gian 2, 4, 6 và 8 giờ lần lượt được đánh số S1, S2, S3 và S4. Sau đó các mẫu sâm đã hấp được đem sấy ở nhiệt độ 50°C cho đến khi đạt độ ẩm dưới 13%.

### **Chiết saponin toàn phần**

Các mẫu sâm được cắt lát và chiết bằng thiết bị chiết Soxhlet với dung môi là methanol 100% để thu lấy cao toàn phần.

Cao toàn phần được phân tách bằng cột pha đảo Diaion HP-20 với các dung môi rửa giải lần lượt là nước, methanol 100%, cloroform.

Dịch methanol 100% được cô quay thu hồi dung môi và sấy khô trong tủ sấy chân không thu được cặn saponin toàn phần.

### **Phân tích bằng sắc ký lớp mỏng**

Mẫu cao saponin toàn phần được hòa trong dung môi MeOH và được chấm với cùng một lượng mẫu trên bảng mỏng silicagel, sử dụng hệ dung môi CHCl<sub>3</sub>-MeOH-H<sub>2</sub>O (65:35:10; lớp dưới).

### **Phân tích bằng sắc ký lỏng hiệu năng cao**

Thực hiện chạy mẫu HPLC trên máy sắc ký lỏng hiệu năng cao Waters, detector PDA. Cột HPLC pha đảo: Sunfire C18 250 mm x 4,6 mm, 5 µm. Sử dụng hệ dung môi gradient acetonitril (A) và nước (B) theo tỉ lệ: 0–10 phút: 15% A, 85% B; 11–20 phút: 15%–25% A, 85%–75% B; 21–30 phút: 25%–35% A, 75%–65% B; 31–40 phút: 35%–40% A, 65%–60% B; 41–50 phút: 40%–45% A, 60%–55% B; 51–60 phút: 45%–50% A, 55%–50% B; 61–70 phút: 50%–25% A, 50%–75% B; 71–85 phút: 25%–15% A, 75%–85% B. Cân mẫu chính xác với khối lượng bằng nhau và hòa tan trong pha động, lọc mẫu với màng lọc kích thước 0,45

µm trước khi bơm. Thể tích mỗi lần bơm là 20 µl, tốc độ dòng 1,0 ml/phút, phát hiện ở bước sóng 206 nm.

### **Thử nghiệm dược lý**

#### *Súc vật nghiên cứu*

Chuột nhắt trắng đực (chủng Swiss albino, 5–6 tuần tuổi, trọng lượng trung bình 20 ± 2 g) được cung cấp bởi viện Pasteur Nha Trang và được để ổn định ít nhất một tuần trước khi thử nghiệm. Chuột được nuôi trong các lồng nhựa có kích thước 22x34x25 cm, mỗi lồng 5–6 chuột. Chuột được nuôi đầy đủ bằng thức ăn: thực phẩm viên được cung cấp bởi viện Pasteur Nha Trang có bổ sung thêm giá đậu, rau xà lách, nước uống.

Thể tích cho uống hoặc tiêm là 10 ml/kg thể trọng chuột. Thời gian cho chuột uống thuốc ở các thử nghiệm khoảng 8 – 9 giờ sáng. Riêng thử nghiệm tăng lực, chuột được cho uống thuốc 60 phút trước khi cho bơi. Tất cả các thử nghiệm được tiến hành từ 9 giờ sáng đến 16 giờ chiều.

#### *Khảo sát tác dụng tăng lực, sức dẻo dai và bền bỉ Nghiệm pháp chuột bơi kiệt sức Brekhman*

Mô hình được mô tả bởi Brekhman năm 1969 và gần đây được mô tả bởi rất nhiều tác giả khác (4,5).

#### *Chuẩn bị*

Sau thời gian để ổn định, chuột được cho tập bơi 3 lần, mỗi lần 15 phút và cách nhau 2 ngày. Sau mỗi lần tập xong, chuột được cho sưởi khô dưới đèn 100 W đến khô hoàn toàn, thì trả chuột về lại lồng.

#### *Thử nghiệm*

Chuột được mang vào đuôi một gia trọng bằng 7% thể trọng của nó và được cho bơi trong một bể bơi nhựa có kích thước 28x46x29 cm, chiều cao của cột nước 26 cm, nhiệt độ nước là 29±1°C.

Chuột được cho bơi lần 1, thời gian bơi được tính từ lúc chuột được thả vào bể bơi, chuột bơi tự do cho đến mệt và chìm xuống khỏi mặt nước trong khoảng thời gian 7 giây

mà không thể trôi lên được nữa. Ngay lập tức vớt chuột lên, cho sưởi ấm dưới đèn cho đến khi phục hồi hoàn toàn. Thời gian chuột bơi được ghi nhận lại nhờ 1 đồng hồ bấm giờ. Thời gian bơi lần 1 được ký hiệu là  $T_0$ .

Cho chuột nghỉ ngơi và tiến hành chia lô thí nghiệm. Chuột được chia thành 4 lô với sự tương đương về trọng lượng và thời gian bơi lần 1 ( $T_0$ ):

Lô chứng: được cho uống nước cất.

Lô đối chiếu: được cho uống dung dịch saponin Nhân sâm toàn phần với liều 20 mg/kg chuột.

Lô thử 1: được cho uống cao saponin toàn phần của sâm Việt Nam trước khi chế biến (R0) với liều 20 mg/kg chuột.

Lô thử 2: được cho uống cao saponin toàn phần của sâm Việt Nam sau khi chế biến (S4) với liều 20 mg/kg chuột.

Sau khi nghỉ ngơi hồi phục hoàn toàn, chuột bắt đầu được cho dùng thuốc. Chuột trong mỗi lô được cho uống thuốc với liều tương ứng. Sau khi uống thuốc được 60 phút, chuột được cho bơi lần 2. Chuột cho uống nước cất và thuốc liên tục đến ngày thứ 7 và 14 sau khi cho chuột uống thuốc 60 phút, tiến hành cho chuột bơi lần 3 và lần 4.

*Lưu ý:* để tránh dao động giá trị bơi thì nên tiến hành thử nghiệm chuột bơi vào khoảng thời gian từ 11h đến 17h, đó là thời điểm mà sự chênh lệch về khả năng vận động của chuột là thấp nhất.

#### Đánh giá kết quả

So sánh diễn biến giữa các lô thí nghiệm.

So sánh thời gian bơi giữa lô chứng và lô đối chiếu với lô thử nghiệm 1 và 2 sau khi dùng thuốc, sau 7 ngày và sau 14 ngày.

Trong mô hình này, không tính theo thời gian bơi tuyệt đối của chuột mà tính thời gian bơi của chuột sau khi dùng thuốc ( $T_1$ ,  $T_{7\text{ngày}}$ ,  $T_{14\text{ngày}}$ ) gọi chung là  $T_i$  so với thời gian bơi lần 1 ( $T_0$ ), theo công thức:

$$X\% = (T_i / T_0) \times 100$$

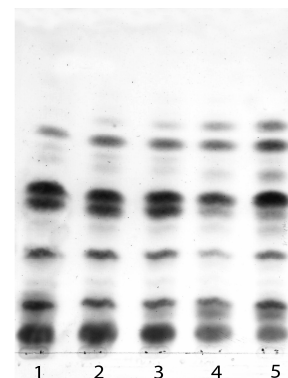
## Phân tích kết quả và thống kê

Các số liệu được trình bày là giá trị:  $TB \pm SEM$  (Standard Error of mean, sai số chuẩn của giá trị trung bình). Việc thống kê các số liệu được sử dụng phần mềm thống kê SPSS ver. 13. Phân tích các số liệu bằng phép kiểm Kolmogorov-Smirnov cho thấy có sự phân bố không bình thường ở một số dãy số liệu. Do đó, sử dụng phép kiểm Kruskal-Wallis tiếp theo là phép kiểm Mann-Whitney U test để so sánh sự khác biệt giữa các lô. Sự khác nhau được xem là có ý nghĩa khi giá trị  $p < 0,05$ .

## KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU

### Kết quả phân tích bằng sắc ký lớp mỏng

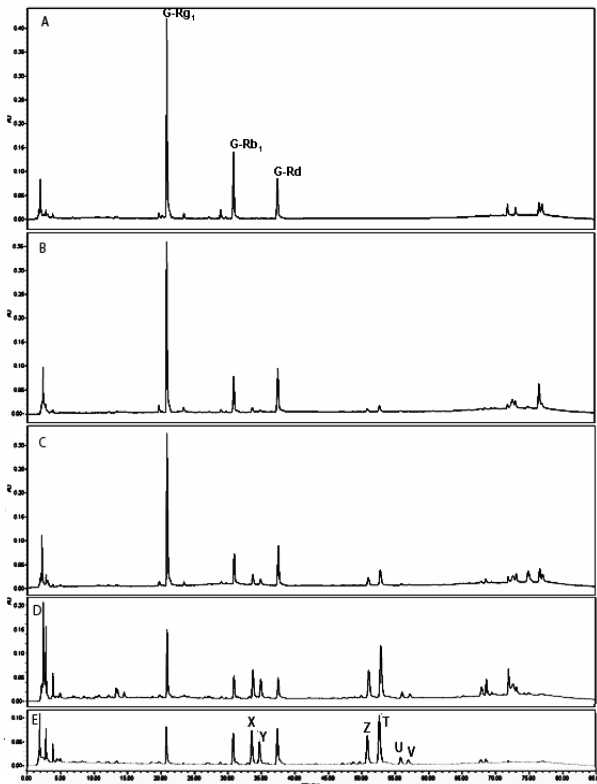
Trên sắc ký đồ của saponin toàn phần của các mẫu sâm R0, S1, S2, S3 và S4 có đa số các vết giống nhau về màu sắc và giá trị  $R_f$ . Tuy nhiên trên sắc ký đồ xuất hiện một vết mới ( $R_f = 0,64$ ) với độ đậm màu và kích thước các vết này tăng dần theo thời gian hấp các mẫu sâm, chứng tỏ có sự thay đổi về thành phần saponin trong quá trình chế biến.



**Hình 1.** Sắc ký đồ sắc ký lớp mỏng của R0 (1), S1 (2), S2 (3), S3 (4) và S4 (5)

### Kết quả phân tích bằng sắc ký lỏng hiệu năng cao

Khảo sát sự thay đổi thành phần các ginsenosid  $R_{g1}$ ,  $R_{b1}$  và  $R_d$  trong dịch chiết saponin toàn phần của các mẫu đo dựa vào thời gian lưu của hỗn hợp các chuẩn này.



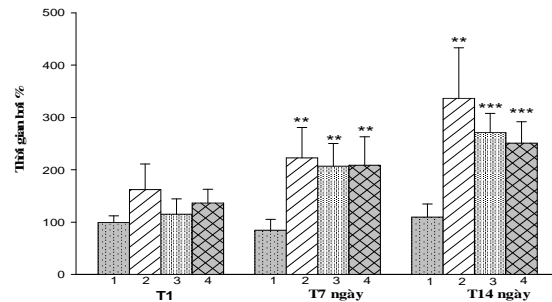
**Hình 2.** Sắc ký đồ saponin toàn phần của mẫu sâm Việt nam chưa chế biến R (A) và các mẫu sâm Việt nam đã qua chế biến (S1:B, S2:C, S3:D, S4:E); 6 peak mới X, Y, Z, T, U, V và G-Rg<sub>1</sub> (ginsenosid Rg<sub>1</sub>), G-Rb<sub>1</sub> (ginsenosid G-Rb<sub>1</sub>), G-Rd (ginsenosid G-Rd).

Sắc ký đồ HPLC của mẫu sâm Việt nam đã qua chế biến và chưa chế biến cho thấy có sự khác nhau. Sau khi được chế biến, các thành phần ginsenosid chính như G-Rb<sub>1</sub>, G-Rd và G-Rg<sub>1</sub> có trong mẫu sâm Việt nam chưa chế biến đã có sự thay đổi hàm lượng. Ngoài ra có một số lượng lớn các peak (ít nhất là 6) đã xuất hiện ở hai vùng chủ yếu: giữa 35 và 40 phút, và giữa 50 và 60 phút. Những peak này không có trong mẫu sâm chưa chế biến.

Có thể xem như 6 peak này dùng để phân biệt mẫu sâm đã chế biến và chưa chế biến. Thêm vào đó, có sự khác biệt ở sắc ký đồ của các mẫu sâm Việt nam đã chế biến khi thời gian hấp tăng lên. Tuy nhiên, có sự giảm hàm lượng của các peak chính như ginsenosid-Rg<sub>1</sub> và Rb<sub>1</sub>, điều này có thể xem là các peak mới được tạo thành là kết quả của sự thủy phân từ

các ginsenosid chính này. Trong khi đó ginsenosid Rd lại giảm một cách đáng kể ở mẫu sâm hấp 6 giờ và không thay đổi ở mẫu sâm hấp 2 và 4 giờ.

### Kết quả thử nghiệm tác dụng tăng lực của mẫu sâm đã chế biến và chưa chế biến



**Hình 3.** Biểu đồ đánh giá tác dụng tăng lực của cao saponin toàn phần của sâm Việt Nam trước khi chế biến và sau khi chế biến (S4)

(1): Lô chứng (n=8) (2): Lô đối chiếu (n=6)

(3): Lô thử 1 (n=7) (4): Lô thử 2 (n=10)

(\*\*): p < 0,01 so với lô chứng

(\*\*\*): p < 0,001 so với lô chứng

Dựa vào kết quả thống kê và biểu đồ thể hiện tác dụng tăng lực của sâm Việt Nam sau trước và sau khi chế biến ta nhận thấy:

Lô uống nước cất có thời gian bơi ở cả 4 lần không thay đổi.

Thời gian bơi của từng chuột ở lần 3, 4 (T<sub>7ngày</sub>, T<sub>14ngày</sub>) trong lô uống Nhân sâm và uống cao thuốc tăng có ý nghĩa so với thời gian bơi lần 2(T<sub>1</sub>).

Lô uống Nhân sâm có thời gian bơi tăng có ý nghĩa so với lô uống nước cất.

Lô uống cao saponin toàn phần sâm Việt Nam trước khi chế biến và sau khi chế biến với liều 20 mg/kg làm thời gian bơi tăng có ý nghĩa so với lô uống nước cất.

Lô uống Nhân sâm có thời gian bơi không khác so với hai lô uống cao saponin toàn phần sâm Việt Nam trước khi chế biến và sau khi chế biến.

## Đánh giá độc tính cấp

Trong thử nghiệm độc tính cấp, liều saponin toàn phần sâm Việt Nam trước khi chế biến và sâm Việt Nam sau khi chế biến (S4) cao nhất có thể cho chuột uống là 4 g/kg chuột. Đây cũng là liều tối đa với thể tích cho phép của cao thuốc có thể bơm cho chuột thử nghiệm uống 1 lần. Cao saponin toàn phần của sâm Việt Nam sau chế biến không thể hiện độc tính cấp đồng uống với liều tối đa có thể cho chuột uống.

## BÀN LUẬN

Từ kết quả sắc ký đồ SKLM và HPLC có thể khẳng định rằng qua quá trình chế biến, thành phần saponin trong sâm Việt Nam có sự thay đổi. Chất mới có thể hình thành do sự thủy phân cắt đứt một hay nhiều đơn vị đường của một hay nhiều saponin đã biết có trong thành phần của sâm Việt Nam. Dự đoán này được đưa ra dựa trên cơ sở các nghiên cứu đã có về sâm Triều Tiên, sâm Hoa Kỳ, tam thất được bào chế theo kiểu Hồng sâm.

Từ kết quả thực nghiệm cho thấy ngay cả ở liều thấp là 20 mg/kg chuột đã có phát huy tác dụng làm kéo dài thời gian bơi ở chuột nhắt. Như vậy, có thể xem cao saponin toàn phần của sâm Việt Nam sau khi chế biến có tác dụng tăng lực không thay đổi so với cao saponin toàn phần của sâm Việt Nam chưa qua chế biến.

## KẾT LUẬN

Sau khi chế biến sâm Việt Nam đã có sự thay đổi rõ rệt về thành phần hóa học saponin nhưng tác dụng tăng lực của nó vẫn không hề suy giảm. Từ đó mở ra một hướng nghiên cứu sâu rộng hơn về các tác dụng dược lý khác cũng như thành phần các chất mới tạo thành để có thể khai thác thêm các giá trị trị liệu khác của sâm Việt Nam sau khi chế biến một cách toàn diện hơn nhằm góp phần phục vụ chăm sóc sức khỏe con người.

## TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Duc NM, Kasai R, Ohtani K, Ito A, Nham NT, Yamasaki K, Tanaka O (1994) Saponins from Vietnamese ginseng, *Panax vietnamensis* Ha et Grushv. collected in central Vietnam. III Chem Pharm Bull (Tokyo). 42(3):634-40.
2. Jung K, Kim IH, Han D (2004) Effect of medicinal plant extracts on forced swimming capacity in mice. J Ethnopharmacol, 93, 75-81.
3. Kim, W. Y., Kim, J. M., Han, S. B., Lee, S. K., Kim, N. D., Park, M. K. et al. (2000). Steaming of ginseng at high temperature enhances biological activity. Journal of Natural Product, 63, 1702-1704.
4. Nam, K. Y. (2005). The comparative understanding between red ginseng and white ginseng. Journal of Ginseng Research, 29, 1-18.
5. Nguyen Minh Duc, Nguyen Ngoc Khoi, Le Thi Thuy Hang, Do Van Dung, Ho Viet Sang (2008) Ama kong's remedy, a folk vietnamese herbal formula, increases endurance swimming capacity of mice, Dược liệu, 6, 292-296.

---

