

N., Minh P. N., Luyen N. D., Hung N. H., Dai D. N. (2023), Essential oils of the ginger plants *Meistera caudata* and *Conanomom vietnamense*: chemical compositions, antimicrobial, and mosquito larvicidal activities, *Zeitschrift für Naturforschung C*, 78(9-10), 337-344. 5. Bộ Y tế (2017), *Dược điển Việt Nam V - Tập 2, Phụ lục 12.7 - Định lượng tinh dầu trong dược liệu*, NXB Y học, Hà Nội, PL-274-275. 6. Nguyen L. T. K., Doan T. Q., Nguyen P. Q. D., Nguyen C. B. H., Tran L. T. T., Tran T. V. A., Nguyen H. T., Ho D. V. (2023), Phytochemical composition and bioactivities of essential oils from rhizomes of *Homalomena pendula* and *Homalomena cochinchinensis*, *Natural Product Communications*, 18(5), 1934578X231175263. 7. Tran T. H., Thuan V. T., Ha N. X., Van Hue N., Nguyen N. H., Nguyen T. H., Tuan N. H., Van Chen T., Hien N. T. T., Giang L. D. (2023), Chemical composition and antimicrobial activity of essential oil obtained from the rhizomes of *Kaempferia champasakensis*: *in vitro* and molecular docking studies, *Journal of Essential Oil Bearing Plants*, 26(4), 958-969. 8. Hadacek F., Greger H. (2000), Testing of antifungal natural products: methodologies, comparability of results and assay choice, *Phytochemical Analysis*, 11(3), 137-147. 9. Halgren T. A. (1999), MMFF VI. MMFF94s option for energy minimization studies, *Journal of Computational Chemistry*, 20(7), 720-729. 10. Eberhardt J., Santos-Martins D., Tillack A. F., Forli S. (2021), AutoDock Vina 1.2. 0: New docking methods, expanded force field, and python bindings, *Journal of Chemical Information and Modeling*, 61(8), 3891-3898. 11. Adams R. P. (2001), *Identification of essential oil components by gas chromatography/quadrupole mass spectroscopy*, Allured Publishing, Carol Stream, Illinois. 12. Angane M., Swift S., Huang K., Butts C. A., Quek S. Y. (2022), Essential oils and their major components: An updated review on antimicrobial activities, mechanism of action and their potential application in the food industry, *Foods*, 11(3), 464. 13. Vuuren S. F. van., Viljoen A. M. (2007), Antimicrobial activity of limonene enantiomers and 1, 8-cineole alone and in combination, *Flavour and Fragrance Journal*, 22(6), 540-544. 14. Han Y., Sun Z., Chen W. (2019), Antimicrobial susceptibility and antibacterial mechanism of limonene against *Listeria monocytogenes*, *Molecules*, 25(1), 33. 15. Merghni A., Noumi E., Haddad O., Dridi N., Panwar H., Ceylan O., Mastouri M., Snoussi M. (2018), Assessment of the antibiofilm and antitumor sensing activities of *Eucalyptus globulus* essential oil and its main component 1,8-cineole against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains, *Microbial Pathogenesis*, 118, 74-80. 16. Hriouech S., Akhouch A. A., Mzabi A., Chefchaou H., Tanghort M., Oumokhtar B., Chami N., Remmal A. (2020), The antistaphylococcal activity of amoxicillin/clavulanic acid, gentamicin, and 1,8-cineole alone or in combination and their efficacy through a rabbit model of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* osteomyelitis, *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2020(1), 4271017. 17. Sogabe S., Masubuchi M., Sakata K., Fukami T. A., Morikami K., Shiratori Y., Ebike H., Kawasaki K., Aoki Y., Shimma N., D'Arcy A. (2002), Crystal structures of *Candida albicans* N-myristoyltransferase with two distinct inhibitors, *Chemistry & Biology*, 9(10), 1119-1128. 18. Qiu X., Janson C. A., Smith W. W., Green S. M., McDewitt P., Johanson K., Carter P., Hibbs M., Lewis C., Chalker A., Fosberry A. (2001), Crystal structure of *Staphylococcus aureus* tyrosyl-tRNA synthetase in complex with a class of potent and specific inhibitors, *Protein Science*, 10(10), 2008-2016. 19. Ramón-Maiques S., Marina A., Guinot A., Gil-Ortiz F., Uriarte M., Fita I., Rubio V. (2010), Substrate binding and catalysis in carbamate kinase ascertained by crystallographic and site-directed mutagenesis studies: movements and significance of a unique globular subdomain of this key enzyme for fermentative ATP production in bacteria, *Journal of Molecular Biology*, 397(5), 1261-1275. 20. Sychantha D., Little D. J., Chapman R. N., Boons G. J., Robinson H., Howell P. L., Clarke A. J. (2018), PatB1 is an O-acetyltransferase that decorates secondary cell wall polysaccharides, *Nature Chemical Biology*, 14(1), 79-85.

Tạp chí Dược liệu, tập 30, số 1/2025 (Trang 18 - 24)

CHIẾT XUẤT, PHÂN LẬP VÀ ĐÁNH GIÁ TÁC DỤNG ỨNG CHẾ α -GLUCOSIDASE *IN VITRO* VÀ *IN SILICO* CỦA GINSENOSID Rđ TRONG SÂM VIỆT NAM

Chữ Lương Luân¹, Nguyễn Thị Vân Anh², Đặng Hoàng Hiệp³, Đặng Thị Ngân⁴, Nguyễn Thị Hoàng Anh⁴,
Nguyễn Ngọc Hiếu³, Vũ Văn Tuấn³, Phạm Hà Thanh Tùng³, Nguyễn Hữu Tùng^{3,*}

¹Phòng thí nghiệm Trọng điểm Công nghệ Enzym và Protein, Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, Đại học Quốc gia Hà Nội (VNU);

²Khoa Công nghệ Sinh học, Hóa học & Kỹ thuật Môi trường, Trường Đại học Phenikaa;

³Khoa Dược, Trường Đại học Phenikaa;

⁴Khoa Dược, Trường Đại học Y Dược, Đại học Quốc gia Hà Nội (VNU)

*Email: tung.nguyenhuu@phenikaa-uni.edu.vn

(Nhận bài ngày 15 tháng 6 năm 2024)

Tóm tắt

Ginsenosid Rđ là một trong bốn hoạt chất saponin chính được qui định trong chuyên luận dược liệu Sâm Việt Nam (*Panax vietnamensis* Ha & Grushv.) theo Dược Điển Việt Nam V bên cạnh ginsenosid Rg₁, ginsenosid Rb₁ và majonosid R₂. Trong nghiên cứu phát triển thuốc điều trị đái tháo đường typ 2, đích tác dụng phân tử enzym α -glucosidase đã và đang được quan tâm với một số hoạt chất ức chế enzym α -glucosidase được sử dụng trong điều trị như acarbose và miglitol. Theo đó, nghiên cứu của chúng tôi về thành phần ginsenosid Rđ được tiến hành và trình bày trong bài báo này bao gồm kết quả nghiên cứu hóa học (phân tích, phân lập và xác định cấu trúc hoá học) và kết quả bổ sung về đánh giá tác dụng ức chế α -glucosidase *in vitro* và *in silico*. Ginsenosid Rđ có tác dụng ức chế yếu α -glucosidase *in vitro* với giá trị IC₅₀ là 388,24 μ g/mL so với đối chứng dương acarbose có giá trị IC₅₀ là 129,81 μ g/mL. Tương tác của ginsenosid Rđ với α -glucosidase được phân tích bằng mô phỏng docking phân tử *in silico* với giá trị năng lượng liên kết tối ưu -8,1 kcal/mol trên cơ sở lực liên kết chính là liên kết hydro.

Từ khóa: Sâm Việt Nam, *Panax vietnamensis* Ha & Grushv., Araliaceae, Ginsenosid Rđ, Enzym α -glucosidase.

Summary
Study on Extraction, Isolation and α -Glucosidase Inhibition *in vitro* and *in silico* of Ginsenoside Rd from Vietnamese ginseng (*Panax vietnamensis* Ha & Grushv.)

Ginsenoside Rd is one of the four marker saponins in the rhizome of Vietnamese ginseng (*Panax vietnamensis* Ha & Grushsv.) indexed in the Vietnamese Pharmacopoeia V along with ginsenoside Rg₁, ginsenoside Rb₁, and majonoside R₂. In the drug development for type-2 diabetic treatment, enzyme α -glucosidase has become the promising molecular target of certain developed drugs such as acarbose and miglitol. In this regard, the present study to investigate ginsenoside Rd deals with the chemical contents (chromatographic analysis, isolation, and structural confirmation) and, especially, the additional findings on its α -glucosidase inhibitory effects *in vitro* and *in silico*. Ginsenoside Rd showed weak inhibitory effect on the activity of α -glucosidase *in vitro* with the IC₅₀ value of 388.24 μ g/mL in comparison with the positive control acarbose with the IC₅₀ value of 129.81 μ g/mL. The interactions of ginsenoside Rd with α -glucosidase were simulated by molecular docking analysis *in silico* with the optimal binding affinity of -8.1 kcal/mol based on the interactive hydrogen binding.

Keywords: Vietnamese ginseng, *Panax vietnamensis* Ha & Grushv., Araliaceae, Ginsenoside Rd, Enzyme α -glucosidase.

1. Mở đầu

Sâm Việt Nam (SVN, *Panax vietnamensis* Ha & Grushv.), một trong 12 loài thuộc chi Nhân sâm (*Panax*) thuộc họ Ngũ gia bì (Araliaceae), được các nhà khoa học phát hiện lần đầu ở vùng núi Ngọc Linh thuộc tỉnh Kon Tum và Quảng Nam vào năm 1973 và được định danh đầy đủ về mặt thực vật học năm 1985 [1],[2]. Giống như các loài sâm (*Panax*) nổi tiếng khác như sâm Triều Tiên (*P. ginseng*), sâm Mỹ (*P. quinquefolius*) và sâm tam thất/Trung Quốc (*P. notoginseng*), bộ phận được sử dụng làm dược liệu là phần dưới mặt đất với bộ phận chính là phần thân rễ (rhizome) có đặc điểm chia thành các đốt, mỗi đốt tương ứng cho một năm sinh trưởng nên còn được gọi là sâm đốt trúc. Là cây thuốc quý và đặc hữu của Việt Nam, SVN được ghi nhận trong danh mục Sản phẩm Quốc gia từ năm 2017 và ngày càng thu hút nhiều sự quan tâm nghiên cứu về phát triển nguồn dược liệu cũng như các sản phẩm chăm sóc sức khỏe theo y dược học hiện đại. Trong đó, cơ sở khoa học về thành phần hoạt chất của SVN đã và đang được tập trung nghiên cứu và kết quả cập nhật cho thấy saponin hay ginsenosid là thành phần chính của SVN với hơn 50 chất đã được xác định với các thành phần chính là ginsenosid Rd, ginsenosid Rg₁, ginsenosid Rb₁ và đặc biệt là majonosid R₂ có khung ocotillol độc đáo với vòng furan ở mạch nhánh [3],[4]; bên cạnh đó, cao chiết, phân đoạn saponin và một số ginsenosid như majonosid R₁ và majonosid R₂ thể hiện hoạt tính được lý kháng ung thư, bảo vệ gan và tác dụng trên thần kinh trung ương [3]. Tiếp theo các nghiên cứu của chúng tôi về SVN [5],[6], trong bài báo này chúng tôi trình bày kết quả nghiên cứu về ginsenosid Rd bao gồm phân tích hóa học và đặc biệt tác dụng ức chế α -glucosidase *in vitro* và *in silico*.

2. Nguyên liệu và phương pháp nghiên cứu

2.1. Nguyên liệu

Mẫu Sâm Việt Nam (6 năm tuổi) được thu hái trên núi Ngọc Linh thuộc huyện Nam Trà My, tỉnh Quảng Nam vào tháng 9/2019. Mẫu nghiên cứu được xác định bởi chuyên gia thực vật học, TS Đỗ Ngọc Đài từ Khoa Lâm nghiệp, Trường Đại học Kinh tế Nghệ An, Nghệ An dựa trên cơ

sở nguồn gốc và hình thái học. Mẫu tiêu bản (SVN_2019) được lưu giữ tại Trường Đại học Y Dược, Đại học Quốc gia Hà Nội và Khoa Dược, Trường Đại học Phenikaa, Hà Nội.

2.2. Hóa chất, dung môi

Enzym α -glucosidase (23 U/mg) từ nấm *Saccharomyces cerevisiae*, chứng dương acarbose, dimethyl sulfoxid (DMSO) và cơ chất *p*-nitrophenyl- α -D-glucopyranosid (*p*NPG) được cung cấp bởi Sigma-Aldrich (Sigma-Aldrich, Singapore). Dung môi chạy sắc ký lỏng hiệu năng cao (High-performance liquid chromatography, HPLC) gồm acetonitril (ACN) và methanol (MeOH) đạt tiêu chuẩn LC được cung cấp bởi Merck (Merck, Đức) và Fisher Chemicals (Fisher Chemicals, Mỹ); các dung môi dùng trong chiết xuất, phân lập như ethanol (EtOH), methanol (MeOH), *n*-hexan (Hex), dicloromethan (CH₂Cl₂), cloroform (CHCl₃), ethyl acetat (EtOAc), *n*-butanol (BuOH) đều đạt tiêu chuẩn công nghiệp và được chưng cất lại trước khi dùng. Pha tĩnh dùng trong sắc ký cột là *silica gel* pha thường (70-230 và 230-400 mesh, Merck, Đức), *silica gel* pha đảo YMC ODS-A (30-50 μ m, YMC Co. Ltd., Nhật Bản). Bản mỏng tráng sẵn trên đế nhôm loại pha thường Kieselgel 60 F₂₅₄ và pha đảo TLC *Silica gel* 60 RP-18 F_{254S} (Merck, Damstadt, Đức). Phát hiện chất bằng đèn tử ngoại ở hai bước sóng 254 nm và 365 nm hoặc dùng thuốc thử là dung dịch H₂SO₄ 10 % và hơi nóng để phát hiện vết chất.

2.3. Thiết bị, dụng cụ

Năng suất quay cực đo trên máy Jasco DIP-360 digital polarimeter. Phổ khối ion hóa phun mù điện tử (ESI-MS) được đo trên máy AGILENT 1260 Series LC-MS/MS ion Trap (Agilent Technologies, Hoa Kỳ). Phổ cộng hưởng từ hạt nhân được đo trên máy Bruker Avance 600 NMR spectrometers (BrukerSpin, Đức). Phân tích HPLC được tiến hành trên hệ thống HPLC Agilent 1260 với đầu dò DAD (Agilent Technologies, Hoa Kỳ); cột Shimadzu Shim-pack GIST (4,6 $\times$ 150 mm; 5 μ m-C₁₈); nhiệt độ lò cột: 40°C; pha động: ACN (A)-nước cất (B), gradient: 0-11 phút: 21% A; 11-25 phút: 21-32% A; 25-35 phút: 32-40% A; 35-40 phút: 40-95% A; 40-60 phút: 95% A; tốc độ dòng: 1,0

mL/phút; thể tích tiêm: 20 μ L; bước sóng phát hiện UV: $\lambda = 196$ nm. Thiết bị tủ ấm Memmert, Đức và máy đo mật độ quang Microplate Photometer MPP-96 (Biosan, Đức) được sử dụng trong đánh giá tác dụng ức chế enzym α -glucosidase *in vitro*.

2.4. Chiết xuất và phân lập

Mẫu dược liệu Sâm Việt Nam (bộ phận thân rễ và rễ) sau khi phơi khô (50 g, độ ẩm 8,6%) được nghiền thô rồi tiến hành chiết siêu âm trong dung môi ethanol 80% (3 lần $\times$ 2 h $\times$ 150 mL) ở 45°C. Các dịch chiết ethanol được lọc qua giấy lọc, gom lại và cất loại dung môi dưới áp suất giảm cho 16,5 g cao chiết tổng ethanol. Lấy 16,0 g cao chiết hòa tan trong nước cất (200 mL) và chiết phân bố bằng EtOAc và *n*-BuOH (2 lần $\times$ 200 mL). Các phân đoạn EtOAc và BuOH được cất loại dung môi dưới áp suất giảm để thu được phân đoạn tương ứng EtOAc (2,4 g) và BuOH (8,4 g; phân đoạn tập trung saponin).

Trên cơ sở định hướng bằng sắc ký lớp mỏng, tiến hành sắc ký cột phân đoạn dịch chiết saponin toàn phân-BuOH (8,0 g) trên cột sắc ký *silica gel* ($\Phi 40$ mm $\times$ 300 mm) với hệ dung môi có độ phân cực tăng dần bao gồm CH_2Cl_2 -MeOH (10:1 $\rightarrow$ 1:1, v/v, mỗi phân đoạn 200 mL) thu được 6 phân đoạn ký hiệu là F1~F6. Từ phân đoạn F5 (250 mg), chạy sắc ký cột pha đảo với hệ pha động MeOH-H₂O (8:3, v/v, 1000 mL), sau đó được kết tinh lại trong $\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$ -H₂O thu được ginsenosid Rd (bột kết tinh màu trắng, 36 mg).

Ginsenosid Rd: bột kết tinh trắng; $t_{\text{pc}}^0 = 203$ -205°C; $[\alpha]_{\text{D}}^{20} = +20$ ($c = 0,8$, MeOH). ¹H NMR ($\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$, 600 MHz) δ_{H} 0,73; 0,89; 0,90; 1,05; 1,22; 1,54; 1,59; 1,59 (3H, s, $\text{CH}_3 \times 8$); 4,85 (1H, d, $J=7,8$ Hz, H-1' của Glc); 5,13 (1H, d, $J = 7,2$ Hz, H-1''' của Glc); 5,29 (1H, overlapped, H-24); 5,33 (1H, d, $J = 7,8$ Hz, H-1'' của Glc). ¹³C NMR ($\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$, 150 MHz): xem Bảng 1. ESI-MS (positive): m/z 969 $[\text{M} + \text{Na}]^+$ ($\text{C}_{48}\text{H}_{82}\text{O}_{18}$).

2.5. Đánh giá tác dụng ức chế α -glucosidase *in vitro*

Tác dụng ức chế α -glucosidase được thực hiện theo phương pháp của Li và cs. [7] với các bước chính như sau: Dây nồng độ của chất thử được chuẩn bị và pha loãng bằng dung dịch đệm phosphat 10 mM (pH = 7,0). Hỗn hợp phản ứng bao gồm mẫu thử (50 μ L), α -glucosidase (20 μ L; 0,5 U/mL), đệm phosphat (100 mM, pH = 7,0; 130 μ L) được ủ trong đĩa 96 giếng tại 37°C trong 10 phút. Sau đó, cơ chất *p*-nitrophenyl- β -D-glucopyranosid (*p*NPG; 2,5 mM) được cho vào từng giếng và tiếp tục ủ tại 37°C trong 60 phút. Tiếp đó, dừng phản ứng bằng cách thêm vào dung dịch Na_2CO_3 0,2 M (80 μ L/giếng) và đo quang tại bước sóng 405 nm. Khả năng ức chế (%) của mẫu thử được xác định theo công thức sau:

$$\% \text{ Ức chế} = 100 - 100 \times \frac{[(\text{OD}_{\text{thử}} - \text{OD}_{\text{trắng}})]}{(\text{OD}_{\text{đối chứng}} - \text{OD}_{\text{trắng}})}$$

Trong đó, $\text{OD}_{\text{thử}}$, $\text{OD}_{\text{trắng}}$ và $\text{OD}_{\text{đối chứng}}$ lần lượt là giá trị mật độ quang của mẫu thử, mẫu trắng và mẫu đối chứng. Giá trị IC_{50} (nồng độ ức chế 50%) được xác định bằng phần mềm máy tính TableCurve2Dv4.

2.6. Docking phân tử

Mô hình 3D của α -glucosidase (Code: 3WY1) được tải xuống từ cơ sở dữ liệu RCSB (www.rcsb.org). Phân tử sau khi được tải về được tiến hành xử lý thông qua công cụ Discovery Studio Visualizer bằng cách loại bỏ các phân tử nước và các nhánh phụ, chỉ giữ lại nhánh chính phục vụ cho thí nghiệm. Đối với các phối tử được sử dụng trong thí nghiệm (bao gồm ginsenosid Rd và aglycon của nó (Protopanaxadiol) cùng với chứng dương (Acarbose), công thức được dựng lại bằng phần mềm ChemDraw Office (ChemOffice Professional 16th ed., 2016), sau đó mô hình 3D được dựng và được tối ưu hóa năng lượng theo chương trình MMFF94s trong ChemOffice 3D Professional (16th ed., 2016). Để kiểm chứng độ tin cậy của phương pháp docking, phân tử acid (3*R*,5*R*,7*R*)-octan-1,3,5,7-tetracarboxylic được lựa chọn làm đối chứng để tiến hành dock lại nhằm xác định giá trị độ lệch bình phương trung bình gốc (RMSD). Phân tử này được tải về từ cơ sở dữ liệu PubChem và sau đó cũng được tối ưu hóa năng lượng trong Chem3D giống như các phối tử khác. Thí nghiệm docking được tiến hành với phần mềm Autodock Vina v1.1.2 (The Scripps Research Institute, La Jolla, CA, USA), trên cơ sở lựa chọn hai gridbox khác nhau cho dock tổng hợp và dock đặc hiệu. Kết quả sau đó được tiến hành xử lý và phân tích thông qua phần mềm Discovery Studio Visualizer v4.5 (BIOVA, San Diego, CA, Mỹ) và Pymol 2.5 (The PyMOL Molecular Graphics System, Schrödinger, LLC) [8],[9].

3. Kết quả và thảo luận

3.1. Chiết xuất, tinh chế và xác định cấu trúc hóa học của ginsenosid Rd

Kết hợp phương pháp chiết xuất dược liệu, chiết phân đoạn saponin toàn phần và phân lập, tinh chế sắc ký (sắc ký lớp mỏng, sắc ký cột pha thuận và pha đảo) thu được chất mục tiêu ginsenosid Rd.

Ginsenosid Rd thu được dưới dạng bột kết tinh màu trắng với nhiệt độ nóng chảy 203-205°C và góc quay cực $[\alpha]_{\text{D}}^{20} = +20$ ($c = 0,8$, MeOH). Cấu trúc hóa học của ginsenosid Rd được khẳng định bằng so sánh sắc ký và dữ liệu phổ hóa lý thực nghiệm bao gồm phổ khối lượng và phổ cộng hưởng từ. Phổ khối ESI-MS có đỉnh ion tại m/z 969 $[\text{M} + \text{Na}]^+$, kết hợp với phổ ¹³C-NMR phù hợp công thức phân tử $\text{C}_{48}\text{H}_{80}\text{O}_{18}$ ($M=946$) của ginsenosid Rd [10]. Trên phổ ¹H NMR ($\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$) xuất hiện các tín hiệu cộng hưởng singlet của 8 nhóm metyl bậc 3 tại δ_{H} 0,73, 0,89, 0,90, 1,05, 1,22, 1,54, 1,59 và 1,59 (3H, s, $\text{CH}_3 \times 8$); 2 proton oxymetin tại δ 3,72 (1H,

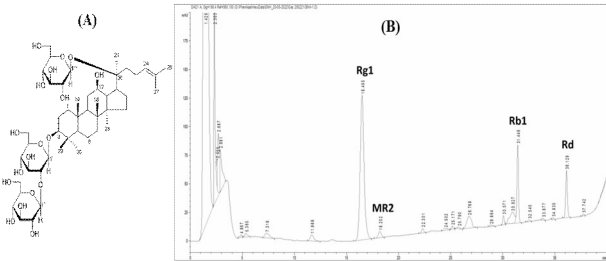
dd, $J = 11,6, 4,8$ Hz, H-3) và 3,80 (1H, m, H-12); một proton olefin tại δ 5,29 (1H, br t, $J = 6,4$ Hz, H-24) cùng với 3 proton anomeric của 3 phân tử β -D-glucose tại δ 4,85 (1H, d, $J = 7,2$ Hz, H-1'), 5,13 (1H, d, $J = 7,6$ Hz, H-1'') và 5,33 (1H, d, $J = 7,8$ Hz, H-1''') [9],[10]. Phổ ^{13}C NMR xuất hiện tín hiệu của 48 nguyên tử carbon, trong đó 18 nguyên tử carbon

của 3 phân tử glucose và 30 carbon của phần aglycon là một triterpen dammaran. Phân tích trong 30 carbon của phần aglycon có một nối đôi C-24/C-25, 3 tín hiệu carbon mang oxy tại δ 70,3 (C-12), 83,3 (C-20) và 89,0 (C-3) cùng với tín hiệu tại δ 18,3 (C-6) chứng tỏ aglycon là triterpen dammaran kiểu protopanaxadiol [10] (Bảng 1).

Bảng 1. Dữ liệu phổ ^{13}C NMR của ginsenosid Rd trong pyridin- d_5

Phần aglycon			Phần đường		
	Ginsenosid Rd (Tinh chế)	Ginsenosid Rd (Tham khảo [10])		Ginsenosid Rd (Tinh chế)	Ginsenosid Rd (Tham khảo [10])
1	39,1	39,1	3-Glc		
2	26,6	26,7	1'	104,9	105,0
3	89,0	88,9	2'	83,3	83,3
4	39,6	39,6	3'	78,2	78,1
5	56,2	56,4	4'	71,5	71,6
6	18,3	18,5	5'	77,9	78,1
7	35,0	35,2	6'	62,5	62,7
8	39,9	40,0	Glc		
9	50,0	50,2	1''	105,6	105,9
10	36,7	36,9	2''	76,8	77,0
11	30,7	30,8	3''	78,8	79,1
12	70,3	70,2	4''	71,3	71,6
13	49,2	49,4	5''	78,1	78,1
14	51,3	51,4	6''	62,5	62,7
15	30,7	30,8	20-Glc		
16	26,6	26,7	1'''	98,1	98,2
17	51,8	51,7	2'''	75,0	75,0
18	15,8	15,9	3'''	78,1	78,1
19	16,1	16,3	4'''	71,3	71,6
20	83,3	83,3	5'''	77,9	78,1
21	22,4	22,4	6'''	62,6	62,7
22	35,9	36,0			
23	23,2	23,2			
24	125,8	125,9			
25	130,9	130,9			
26	25,6	25,8			
27	16,5	16,6			
28	28,0	28,0			
29	17,2	17,3			
30	17,7	17,8			

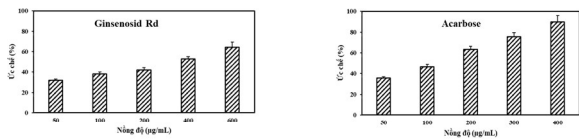
Trên cơ sở phân tích độ chuyển dịch hóa học cho thấy C-3 và C-20 có độ dịch chuyển về trường thấp chứng tỏ có phân tử đường đính vào. Dựa vào các phân tích trên và sự phù hợp với số liệu tương ứng phổ NMR công bố trong tài liệu tham khảo [10],[11] cho phép khẳng định cấu trúc hóa học của saponin tinh chế là ginsenosid Rd (Hình 1A), một saponin khung dammaran protopanaxadiol chính của SVN và một số loài sâm *Panax* nổi tiếng khác như sâm Triều Tiên (*P. ginseng*), sâm Mỹ (*P. quinquefolium*) và sâm tam thất (*P. notoginseng*). Độ tinh khiết và dấu vân tay sắc ký của ginsenosid Rd trong mẫu SVN nghiên cứu được phân tích bằng HPLC. Ginsenosid Rd tinh chế có độ tinh khiết hơn 96,0% và là thành phần ginsenosid chính của SVN (Hình 1B).



Hình 1. Cấu trúc hóa học của ginsenosid Rd (A) và sắc ký đồ của mẫu SVN nghiên cứu (B)

3.2. Đánh giá tác dụng ức chế α -glucosidase in vitro và in silico
3.2.1. Kết quả thử tác dụng ức chế α -glucosidase in vitro:
 Tác dụng ức chế α -glucosidase của ginsenosid Rd được thử tại các nồng độ 50, 100, 200, 400 và 600 $\mu\text{g/mL}$; acarbose được sử dụng làm chất đối chứng dương và giá trị phần trăm ức chế I (%)

của các mẫu thử ở các nồng độ khác nhau được trình bày ở Hình 2. Kết quả ở Hình 2 cho thấy khả năng ức chế α -glucosidase *in vitro* của 2 mẫu thử tỷ lệ theo nồng độ. Cụ thể, chất thử ginsenosid Rd ức chế tăng dần theo nồng độ từ 31,86% tại nồng độ 50 μ g/mL đến 64,19% tại 600 μ g/mL. Trong khi đó mẫu chuẩn dương acarbose thể hiện phần trăm ức chế từ 35,56 đến 89,75% trong dải nồng độ 50÷400 μ g/mL, phù hợp với dữ liệu công bố [12],[13],[14]. Trên cơ sở dữ liệu tương quan giữa nồng độ và phần trăm ức chế I (%), giá trị IC₅₀ của ginsenosid Rd và acarbose được xác định lần lượt là 388,24 μ g/mL và 129,81 μ g/mL. Kết quả cho thấy ginsenosid Rd có tác dụng ức chế yếu với hoạt động của α -glucosidase *in vitro*.



Hình 2. Tác dụng ức chế α -glucosidase *in vitro* của ginsenosid Rd và acarbose. Kết quả là giá trị trung bình của 3 thí nghiệm với sai số độ lệch chuẩn tương đối ($\pm$ SD).

3.2.2. Kết quả phân tích tác dụng α -glucosidase *in silico*:

Từ kết quả của thí nghiệm *in vitro*, có thể xác định ginsenosid Rd có tương tác với α -glucosidase. Về nguyên tắc, một chất ức chế enzym có thể theo cơ chế cạnh tranh, không cạnh tranh và hỗn hợp dựa trên nghiên cứu động học. Bên cạnh đó nghiên cứu mô phỏng *in silico* ngày

càng đóng vai trò quan trọng, cùng với phương pháp *in vitro* và *in vivo* thường qui để nghiên cứu đầy đủ tác dụng của hoạt chất trước khi thử nghiệm lâm sàng [8]. Trong nghiên cứu này, để góp phần đánh giá tương tác, cơ chế tác dụng ức chế α -glucosidase của ginsenosid Rd, phương pháp docking được tiến hành trên tổng hợp toàn phân tử cũng như đặc hiệu với trung tâm hoạt động. Mô phỏng docking toàn phân tử sử dụng grid box bao phủ toàn bộ cấu trúc phân tử enzym với mục đích xác định vị trí các phối tử dock vào với năng lượng liên kết thấp nhất. Giai đoạn này cũng xác định vị trí đích của enzym dock với thuốc chuẩn acarbose, từ đó tạo nên qui chuẩn cho vị trí của grid box trong giai đoạn dock đặc hiệu trên vùng hoạt động. Vị trí này cũng được sử dụng để xác định độ tin cậy của phương pháp docking, thông qua việc dock hai lần phối tử đối chứng (Hình 3). Kết quả dock cho thấy giá trị RMSD của thí nghiệm là 1,397 Å, nhỏ hơn giá trị tiêu chuẩn là 2.0 Å, cho thấy phương pháp docking là đáng tin cậy [9].

Với docking toàn phân tử, grid box được dùng có kích thước 52×55×81 với tọa độ trung tâm được xác định theo trục x,y,z tương ứng là -9,31 Å, -12,60 Å và 11,65 Å. Đối với docking đặc hiệu trung tâm hoạt động, grid box có kích thước 25×25×25 với tọa độ là -6,61 Å, -16,10 Å và 19,57 Å, vị trí gridbox được xác định là trung tâm hoạt động của α -glucosidase dựa trên thuốc chuẩn acarbose, một chất ức chế cạnh tranh. Kết quả sau docking được thể hiện ở Bảng 2.

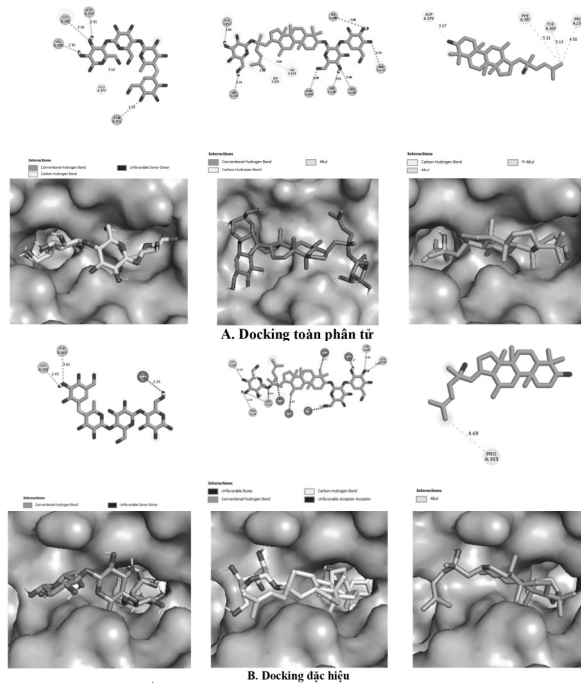
Bảng 2. Kết quả dock của các phối tử với α -glucosidase

Thông số Chất/Phối tử	Năng lượng liên kết (kcal/mol)		Các amino acid liên kết với phân tử (độ dài liên kết, Å)	
	Tổng hợp	Đặc hiệu	Tổng hợp	Đặc hiệu
Acarbose	-7,8	-6,2	Lys398 (3,39), Asp379 (2,91), Val380 (2,30), Asn301 (3,31), Glu377 (3,16)	Gly228 (2,45), Tyr389 (3,01)
Ginsenosid Rd	-8,1	+2,4	Glu212 (1,95), Asp215 (2,24), His209 (3,08), Asn174 (3,33), Arg158 (3,06), Asp126 (2,01), Gln160 (3,05), Leu213 (3,59), Lys134 (4,56)	Lys225 (3,10), Thr226 (2,20), Asn301 (2,99), Arg200 (3,09), Asp202 (2,32)
Protopanaxadiol	-7,8	-6,4	Asp379 (3,17), Phe397 (5,21), Tyr389 (5,13), Pro230 (4,58)	Pro303 (4,69)

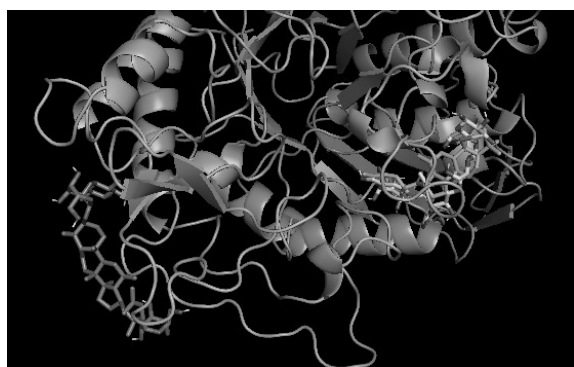
Trong kết quả dock toàn phân tử, acarbose và aglycon của ginsenosid Rd có năng lượng lần lượt là -7,8 kcal/mol và -8,1 kcal/mol. Dù vậy, dựa trên Bảng 2 và Hình 4, vị trí dock của hai chất này trên protein là khác nhau. Do ginsenosid Rd chỉ có tác dụng yếu với enzym nên có thể xác định vị trí mà phối tử này liên kết không phải là vùng hoạt động chính của protein. Khi xem xét kết quả dock đặc hiệu, acarbose cho ra năng lượng -6,2 kcal/mol với các amino acid tham gia liên kết tương đồng với dock toàn phân tử

(Tyr389 so với Lys398), xác nhận vị trí grid box khớp với vùng hoạt động. Nhưng khi dock phân tử ginsenosid Rd, năng lượng liên kết đạt +2,4 kcal/mol, tức phải cần hoạt hóa để tạo liên kết của phối tử với vùng hoạt động này. Như vậy kết quả mô phỏng cho thấy ginsenosid Rd không liên kết với enzym tại vùng hoạt động của enzym và theo đó gợi ý cơ chế ức chế enzym theo kiểu không cạnh tranh, khác với cơ chế cạnh tranh của acarbose đã được chứng minh đầy đủ bằng thực nghiệm. Tuy nhiên, kết quả docking của phối tử

aglycon (protopanaxadiol) cho thấy đặc điểm tương đồng với chất chuẩn acarbose, từ năng lượng liên kết của hai giai đoạn (cùng đạt -7,8 kcal/mol ở dock tổng hợp và -6,4 kcal/mol so với -6,2 kcal/mol ở dock đặc hiệu) và vị trí dock khá tương đồng (Hình 3). Như vậy, trong trường hợp ginsenosid Rd chuyển hóa thành aglycon của nó khi vào cơ thể, phân tử này có tác dụng ức chế enzyme tương đồng với acarbose theo kiểu cạnh tranh [14],[15].



Hình 3. Tương tác của các phối tử (theo thứ tự từ trái sang phải: acarbose, ginsenosid Rd, protopanaxadiol) với α -glucosidase thông qua mô hình 2D và 3D (A. Docking toàn phân tử, B. Docking đặc hiệu)



Hình 4. Vị trí các phối tử liên kết với α -glucosidase trong dock tổng hợp (màu xanh: acarbose; màu hồng: ginsenosid Rd; màu vàng: protopanaxadiol)

Hình 4 thể hiện cụ thể vị trí dock của các phối tử vào α -glucosidase và các amino acid tham gia liên kết dock phân tử thể hiện trên mô hình 2D và

3D. Có thể thấy mặc dù ginsenosid Rd tạo liên kết với nhiều amino acid hơn so với acarbose và protopanaxadiol, nhưng năng lượng liên kết lại không có sự khác biệt lớn do liên quan đến kích thước của phân tử, khi phân tử có kích thước nhỏ hơn khiến cho liên kết với các amino acid mạnh hơn dẫn đến năng lượng liên kết thấp hơn [16].

Như vậy, kết quả nghiên cứu cho thấy ginsenosid Rd thể hiện tác dụng ức chế enzyme α -glucosidase trên mô hình *in vitro* và *in silico*. Enzyme α -glucosidase là đích tác dụng phân tử quan trọng và là nền tảng cho nhóm thuốc tương ứng đã và đang được sử dụng trong hỗ trợ điều trị tiêu đường như acarbose, miglitol, voglibose...[14],[15]. Trong nghiên cứu này, acarbose được sử dụng làm chất đối chứng dương và kết quả thu được cho thấy ginsenosid Rd thể hiện tác dụng tuy yếu hơn nhưng với hàm lượng cao của ginsenosid Rd trong SVN (hàm lượng 0,5÷2,3% theo dược liệu khô) [3],[4] và quá trình chuyển hóa của ginsenosid Rd với các chất chuyển hóa hoạt động như compound K, ginsenosid Rg3 và aglycon protopanaxadiol cho thấy ginsenosid Rd tiềm năng trở thành hoạt chất ức chế α -glucosidase [17],[18]. Gần đây, tác dụng ức chế α -glucosidase của ginsenosid Rd và một số ginsenosid khác như ginsenosid Rc, ginsenosid Rb2 đã được công bố từ việc sàng lọc hiệu năng cao kết hợp *in vitro* và *in silico* sử dụng các chủng và mô hình enzyme khác nhau; do đó kết quả thu được trong nghiên cứu này cung cấp thêm cơ sở khoa học về tác dụng ức chế α -glucosidase của ginsenosid Rd nói riêng cũng như thành phần ginsenosid nói chung [19],[20]. Bên cạnh đó, lợi ích trong điều trị đái tháo đường của ginsenosid Rd đã được nghiên cứu theo nhiều cơ chế và mô hình khác nhau. Wei Wang và cs. đã chứng minh ginsenosid Rd có tác dụng làm giảm đường huyết theo cơ chế enzyme protein kinase B trong chuyển hóa glucose trên mô hình được lý phân tử thực nghiệm *in vivo* [21]. Trong một nghiên cứu khác trên mô hình *in vivo* [22], ginsenosid Rd thể hiện tác dụng điều hòa đường huyết qua tác dụng lên lợi khuẩn đường ruột,...cung cấp thêm minh chứng khoa học thực nghiệm về tiềm năng của ginsenosid Rd đóng vai trò là hoạt chất sinh học theo hướng điều trị đái tháo đường, đặc biệt là đái tháo đường typ 2.

4. Kết luận

Kết quả nghiên cứu về ginsenosid Rd bao gồm hóa học và tác dụng ức chế α -glucosidase, trong đó ginsenosid Rd có tác dụng ức chế yếu α -glucosidase *in vitro* với giá trị IC_{50} là 388,24 μ g/mL và được mô phỏng *in silico* tương tác giữa ginsenosid Rd với α -glucosidase với năng lượng liên kết. Các nghiên cứu *in vitro* và *in silico* là các nghiên cứu khởi đầu trong giai đoạn nghiên cứu tìm kiếm chất dẫn đường trong nghiên cứu

phát triển được chất mới, do đó kết quả nghiên cứu thu được trong nghiên cứu này bên cạnh góp phần giải thích lợi ích, công dụng chữa đái tháo đường của dược liệu SVN và các bài thuốc chứa SVN theo y học cổ truyền và y học dân gian còn cung cấp cơ sở khoa học cho việc phát triển các bước tiếp theo của SVN và hoạt chất ginsenosid Rd như nghiên cứu cơ chế sinh học phân tử,

nghiên cứu tác dụng dược lý *in vivo*, nghiên cứu xây dựng tiêu chuẩn hóa dược liệu SVN... để góp phần phát triển sản phẩm chăm sóc sức khỏe từ SVN theo tiêu chuẩn y dược học hiện đại.

Lời cảm ơn: Nghiên cứu này được tài trợ bởi Quỹ Phát triển khoa học và công nghệ Quốc gia (NAFOSTED) trong đề tài mã số 108.05-2019.01.

Tài liệu tham khảo

1. Dung H. T., Grushvisky I. V. (1985), A new species of the genus *Panax* L., Araliaceae in Vietnam: *Panax vietnamensis* Ha et Grushv., *Bot. J. Vietnam*, 70, 518-522. Yang W. Z., Hu Y., Wu W. Y., Ye M., Guo D. A. (2014), Saponins in the genus *Panax* L. (Araliaceae): A systematic review of their chemical diversity, *Phytochemistry*, 106, 7-14. 2. Tung N. H., Thuong P. T. (2019), Vietnamese Ginseng (*Panax vietnamensis* Ha & Grushv.): phylogenetic, phytochemical, and pharmacological profiles, *Pharmacognosy Reviews*, 13(26), 59-62. 3. Hội đồng Dược điển Việt Nam (Bộ Y tế), Dược Điển Việt Nam V (2018), 1313-1315. 4. Vu V. T., Nguyen N. H., Anh N. T. H., Tung P. H. T., Thuong P. T., Tung N. H. (2023), Panaxindole, a novel indole alkaloid N-glucoside from the leaves of *Panax vietnamensis* Ha et Grushv. (Vietnamese ginseng), *Journal of Natural Medicines*, 77(4), 972-977. 5. Anh N. T. H., Ngan D. T., Dung D. M., Binh N. T. T., Hieu N. N., Tuan V. V., Tung N. H. (2024), Investigation on non-hydrophilic components from Vietnamese ginseng (*Panax vietnamensis* Ha & Grushv.), *Hue University Journal of Science: Natural Science*, 133, in press. 6. Li T., Zhang X. D., Song Y. W., Liu J. W. (2005), A microplate-based screening method for α -glucosidase inhibitors, *Natural Product Research and Development*, 10, 1128-1134. 7. Trott O., Olson A. J. (2010), AutoDock Vina: improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization, and multithreading, *Journal of Computational Chemistry*, 31(2), 455-461. 8. Ha N. T. T., Quan P. M., Tuyen N. V., Tra N. T., Anh L. T. T., Son N. T. (2022), Chemical constituents of *Alocasia odora* rhizomes and their biological activities: experimental and molecular docking approaches, *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 32, 819-826. 9. Nguyen M. D., Kasai R., Ohtani K., Ito A., Nguyen T. N., Yamasaki K., Tanaka O. (1994), Saponins from Vietnamese ginseng, *Panax vietnamensis* HA et Grushv. collected in central Vietnam. II, *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, 42(1), 115-122. 10. Agrawal P.K. (1992), NMR spectroscopy in the structural elucidation of oligosaccharides and glycosides, *Phytochemistry*, 31(10), 3307-3330. 11. Afrapoli F. M., Asghari B., Saeidnia S., Ajani Y., Mirjani M., Malmir M., Bazaz R. D., Hadjiakhoondi A., Salehi P., Hamburger M., Yassa N. (2012), *In vitro* α -glucosidase inhibitory activity of phenolic constituents from aerial parts of *Polygonum hyrcanicum*, *DARU Journal of Pharmaceutical Sciences*, 20(1), 1-6. 12. Tang H., Huang L., Sun C., Zhao D. (2020), Exploring the structure-activity relationship and interaction mechanism of flavonoids and α -glucosidase based on experimental analysis and molecular docking studies, *Food & Function*, 11, 3332-3350. 13. Ngoc L.M., Kim N. B., Son N. N., Khanh D. T. H., Tung B. T. (2022), *In vitro* and *in silico* screening of bioactive compounds from *Jasminum subtriplinerne* Blume as α -glucosidase inhibitor, *VNU Journal of Science: Medical and Pharmaceutical Sciences*, 38(1), 34-44. 14. Hossani U., Das A. K., Ghosh S., Sil P. C. (2020), An overview on the role of bioactive α -glucosidase inhibitors in ameliorating diabetic complications, *Food and Chemical Toxicology*, 145, 111738. 15. Dhorajiwala T. M., Halder S. T., Samant L. (2019), Comparative *in silico* molecular docking analysis of L-threonine-3-dehydrogenase, a protein target against African trypanosomiasis using selected phytochemicals, *Journal of Applied Biotechnology Reports*, 6, 101-108. 16. Kim D. H. (2018), Gut microbiota-mediated pharmacokinetics of ginseng saponins, *Journal of Ginseng Research*, 42(3), 255-263. 17. Jeong J. J., Le T. H. V., Lee S. Y., Eun S. H., Nguyen M. D., Park J. H., Kim D. H. (2015), Anti-inflammatory effects of vana-ginsenoside R2 and majonoside R2 isolated from *Panax vietnamensis* and their metabolites in lipopolysaccharide-stimulated macrophages, *International Immunopharmacology*, 28(1), 700-706. 18. Teng H., Chen L., Fang T., Yuan B., Lin Q. (2017), Rb2 inhibits α -glucosidase and regulates glucose metabolism by activating AMPK pathways in HepG2 cells, *Journal of Functional Foods*, 28, 306-313. 19. Wang H. P., Fan C. L., Lin Z. Z., Yin Q., Zhao C., Peng P., Zhang R., Wang Z. L., Du J., Wang Z. B. (2023), Screening of potential α -glucosidase inhibitors from the roots and rhizomes of *Panax* ginseng by affinity ultrafiltration screening coupled with UPLC-ESI-orbitrap-MS method, *Molecules*, 28(5), 2069. 20. Wang. W, Guan F., Sagratini G., Yan J., Xie J., Jin Z., Liu M., Liu H., Liu J. (2023), Ginsenoside Rd attenuated hyperglycemia via Akt pathway and modulated gut microbiota in streptozotocin-induced diabetic rats, *Current Research in Food Science*, 6, 100491. 21. Song X., Wang L., Fan D. (2022), Insights into recent studies on biotransformation and pharmacological activities of ginsenoside Rd. *Biomolecules*, 12(4), 512.

Tạp chí Dược liệu, tập 30, số 1/2025 (Trang 24 - 30)

**TỐI ƯU HÓA QUY TRÌNH CHIẾT XUẤT ĐỂ BẢO CHẾ CAO ĐẶC
TAN THÔNG PHONG DỰA TRÊN CHẤT ĐÁNH DẤU BERBERIN CLORID**

Bùi Hồng Cường^{1,*}, Bùi Thị Ngọc Huyền²

¹Khoa Dược liệu - Dược học cổ truyền, Trường Đại học Dược Hà Nội;

²Công ty Cổ phần Dược phẩm VCP

*Email: cuongbh@hup.edu.vn

(Nhận bài ngày 15 tháng 6 năm 2024)

Tóm tắt

Phương thuốc Tan thông phong gồm hoàng bá, thương truật, ngưu tất, hy thiêm, trị mấu, mộc qua được sử dụng trong y học cổ truyền để điều trị viêm khớp, gout. Cao đặc Tan thông phong được bảo chế bằng phương pháp chiết hồi lưu với hỗn hợp ethanol-nước ở quy mô phòng thí nghiệm. Berberin clorid (BBR) là thành phần hoạt chất chính của hoàng bá. Trong nghiên cứu này, quy trình chiết xuất để bảo chế cao đặc Tan thông phong được tối ưu hóa để tối đa hóa cả hàm lượng và hiệu suất chiết BBR bằng cách sử dụng thiết kế thí nghiệm D-optimal và mạng neuron nhân tạo. Các thông số tối ưu của quy trình