

Quy trình công nghệ sản xuất Cao định chuẩn và chế phẩm Cao lỏng Tam thất chế hỗ trợ điều trị ung thư (processed *Panax notoginseng*)

Chủ nhiệm đề tài: TS. Lê Thị Hồng Vân

NỘI DUNG

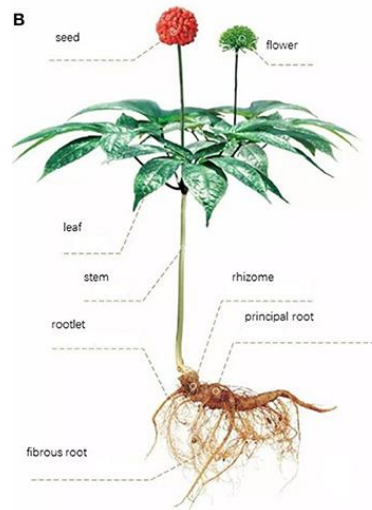
1. Đặt vấn đề
2. Mục tiêu của nhiệm vụ
3. Phương pháp nghiên cứu
4. Kết quả nghiên cứu
5. Bàn luận và kiến nghị



1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Tên khác: Tam thất bắc, Nhân sâm Tam thất, Kim bất hoán, Điền thất, ...

Tên khoa học: *Panax notoginseng* (Burk) F.H.Chen., Araliaceae



Toàn cây Tam thất



Nụ hoa Tam thất



Rễ củ Tam thất

Hình 1. Dược liệu Tam thất

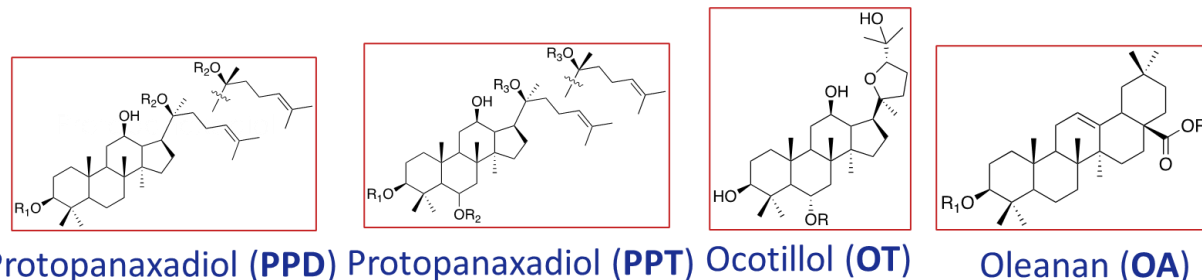
❖ Việt Nam:

Sản lượng: ~ 15-20 tấn/năm;

Phân bố: Hà Giang, biên giới tỉnh Vân Nam; Lào Cao, Cao Bằng, Sapa

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

❖ Thành phần hóa học Saponin



Bộ phận	PPD	PPT	OCT	Oleanan
Lá/ Thân	20(S)-25-OCH ₃ -PPD	20S-25-methoxydammaran-3β,12β,20-triol		
Hoa/ Hạt	FN-A, -B, -C, -D, N-FP2, F-O, gypenosid LXIX,-LXXI	N-R1, G-Re, G-Rg1, G-Rh1		
Rễ củ/ Thân rễ	G-Rb ₁ , G-Rd, G-F2, -Ra ₁ , -Ra ₂ , -Ra ₃ , -Rb ₂ , MG-Rb ₂ , -Rb ₃ , -Rc, N-Fd, Gyp-XVII, Rf, 20(S)-Rg ₂ , 20(S)-Rh ₁ , N-M, -N, -N-A, -C, -B, -D, -E, -Fa, -Fc, -Fe, -K, -L, -R4, Q-R ₁ , -I, -II, III, -V.	G-Re, G-Rg ₁ , N-R1, G-F1, 20-glucose R2, -R3, -R6, -U, -H, -M, -J, G-M7cd, -F4	24(R)-P-F11	G-Ro, N-G, -I

❖ Thành phần hóa học khác

Dencichine, flavonoid, carbonhydrate, essential oil, ...

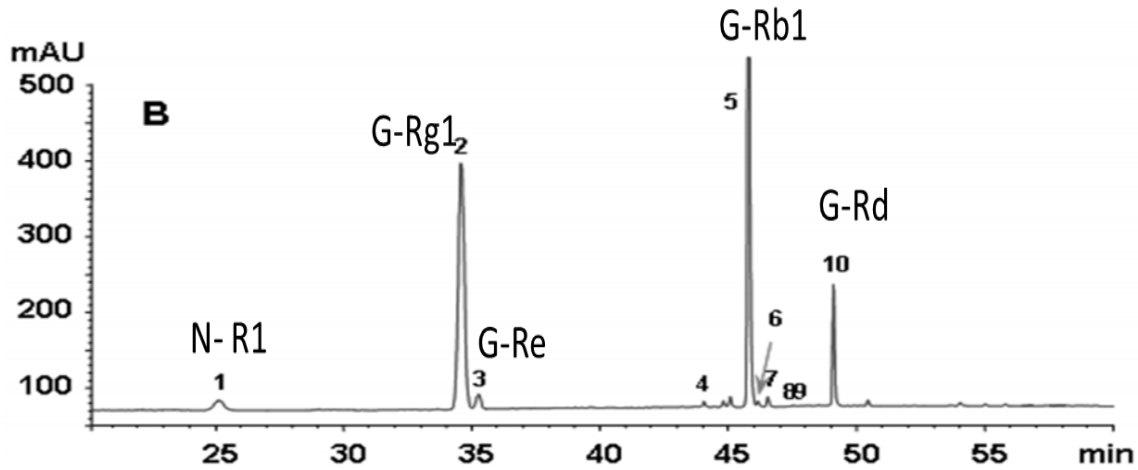
1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Tiêu chuẩn dược liệu Tam thất trong các Dược điển

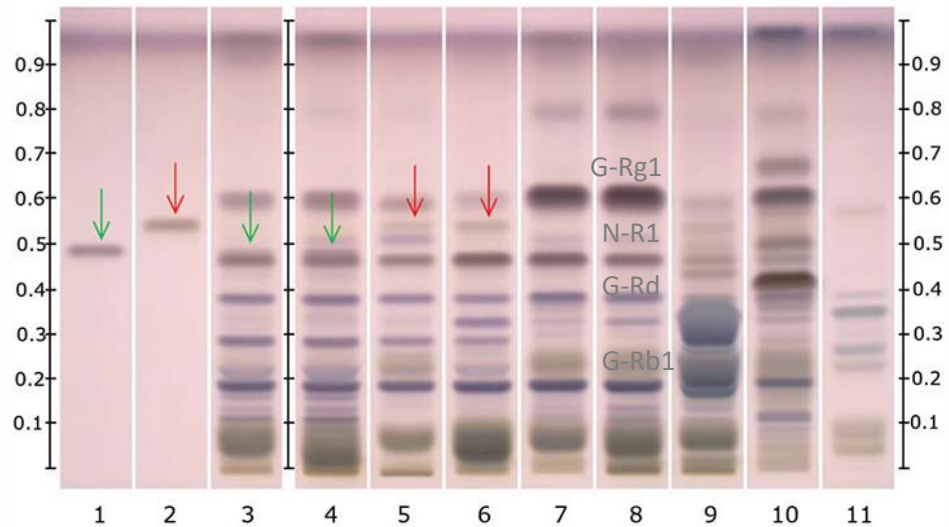
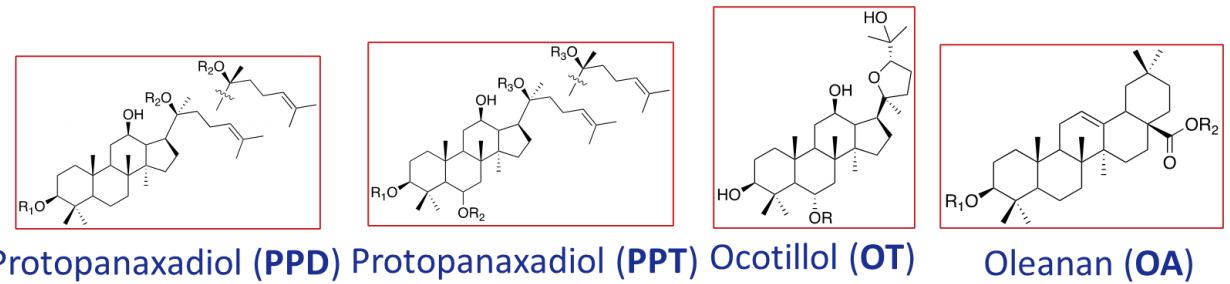
ĐDVN V	USP 42	BP2019	CP 2020
Tam thất bắc (rễ củ)	Tienchi Ginseng Root and Rhizome	Notoginseng Root	Notoginseng radix et rhizoma
Định tính SKLM: G-Rb1, G-Rg1, N-R1	Định tính SKLM: - G-Rg1 - <i>USP Panax notoginseng Root and Rhizome Dry Extract RS</i> (G-Rb1, G-Rd, G-Re, N-R1).	Định tính SKLM: arbutin and escin	Định tính: G-Rb1, G-Rg1, N-R1, G-Re
Định lượng: G-Rb1, G-Rg1, N-R1	Định lượng: - G-Rg1 - <i>USP Panax notoginseng Root and Rhizome Dry Extract RS</i> (G-Rb1, G-Rd, G-Re, N-R1).	Định lượng: G-Rb1, G-Rg1, G-Rf	Định lượng: G-Rb1, G-Rg1, N-R1
Tiêu chuẩn: N-R1 $\geq 0,4\%$. Tổng (G-Rb1, G-Rd, G-Rg1, N-R1) $\geq 5,0\%$.	Tiêu chuẩn: Tổng (G-Rb1, G-Rg1, G-Rd, G-Re, N-R1) $\geq 5,0\%$	Tiêu chuẩn: G-Rb1 + G-Rg1 $\geq 3,8\%$ <i>*Ghi chú:</i> - G-Rf để xác định độ phân giải.	Tiêu chuẩn: Tổng (G-Rb1, G-Rg1, N-R1) $\geq 5,0\%$.

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

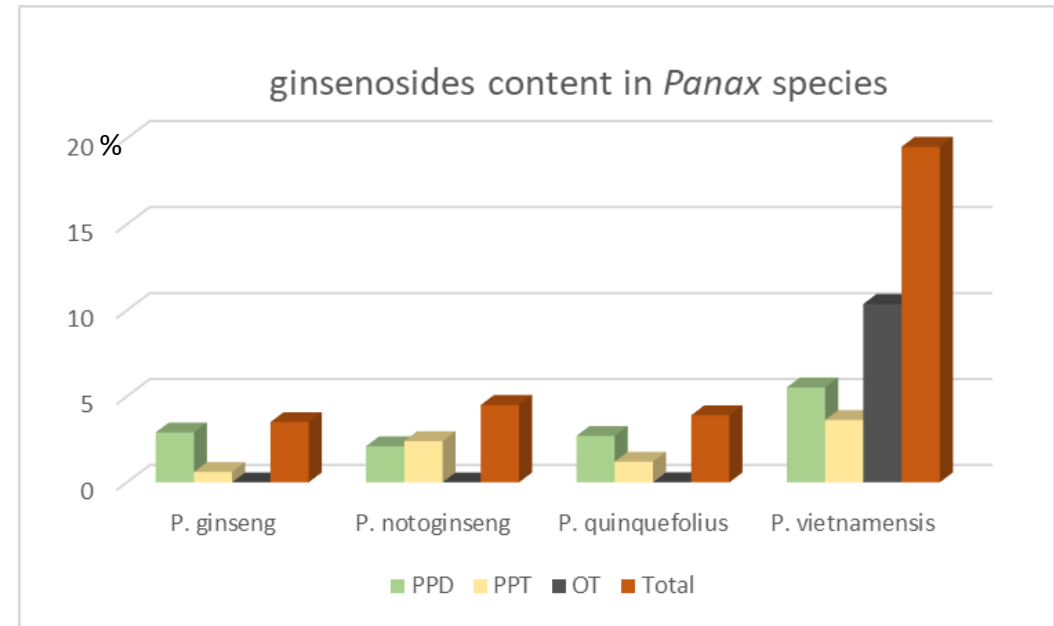
Thành phần hóa học Saponin



Hình 2. SKĐ HPLC phân tích mẫu củ Tam thất



Hình 3. HPTLC phân tích mẫu *Panax*



The radix of *P. notoginseng* contains about 8-10 % of total saponins

1. Wang, Z., Chen, Y., Pan, H., Wei, L., Wang, Y., & Zeng, C. (2015). *Chinese Herbal Medicines*, 7(2), 179-184

2. Guan J, Lai CM, Li SP: *J Pharm Biomed Anal.* 2007, 44: 996-1000

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Tác dụng sinh học

Tác dụng

Kháng tế bào ung thư

Ruột kết, gan, phổi, lympho, tụy, vú, trực tràng HCT-116.
Ức chế tăng sinh tế bào, apoptosis...

Tác dụng chống oxy hóa

Tạo phức chelat với ion kim loại cao, quét gốc tự do peroxide, hydroxyl, superoxide anion...

Tác dụng chống viêm

Kháng viêm thông qua ức chế sản sinh superoxide, leukotriene B4, NO, PGE2, iNOS và COX-2, TNF- α ,...

Tác dụng chống huyết khối

Cầm máu, làm ngừng chảy máu, tan huyết khối...

Tác dụng **bồi bổ, tăng lực** và nhiều tác dụng khác

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Nhân sâm và các dạng chế biến



Nhân sâm tươi



White ginseng
(Bạch sâm)



Red ginseng
(Hồng sâm)



Black ginseng
(Hắc sâm)



Fermented
ginseng

Thay đổi về thành phần hóa học saponin

→ **G-Rg₃, G-Rh₁**

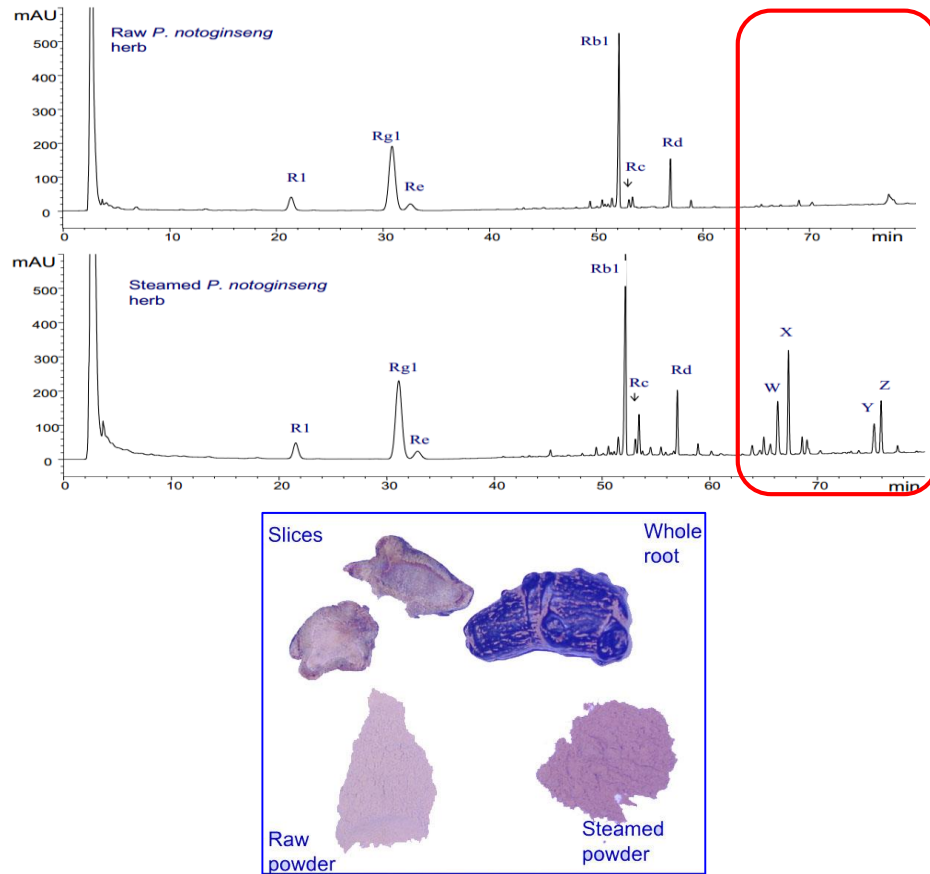
Thay đổi về tác dụng sinh học

→ **Tăng tác dụng ức chế tế bào ung thư và khối u**

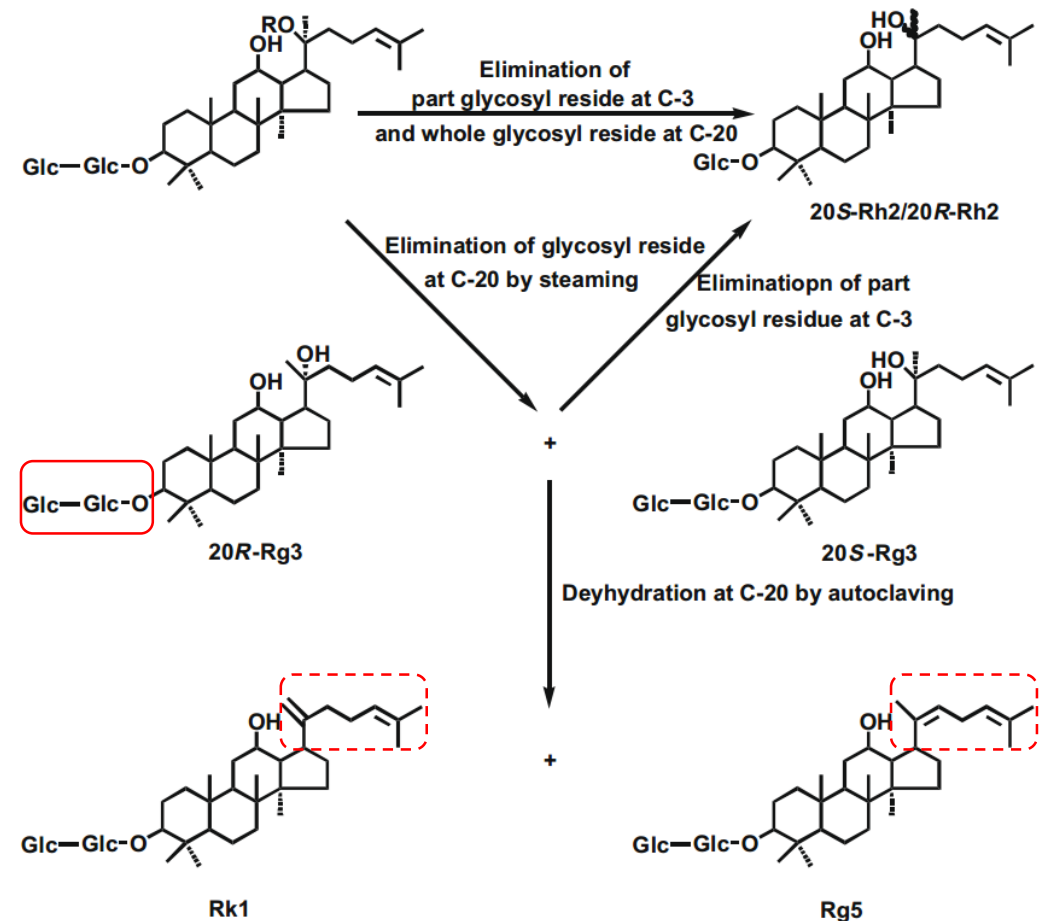
Hình 3. Các phương pháp chế biến Nhân sâm

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Chromatograms of raw and steamed *P. notoginseng*



S. Sun et al./Food Chemistry 118 (2010) 307–314



Hình 4. Tam thất chế và sự biến đổi thành phần hóa học



Cần thiết phát triển sản phẩm từ Tam thất trồng tại Việt Nam theo dạng chế biến làm gia tăng tác dụng kháng ung thư có chất lượng cao.

1. ĐẶT VẤN ĐỀ



1. ĐẶT VẤN ĐỀ



Một số chế phẩm ở thị trường Việt Nam

2. MỤC TIÊU ĐỀ TÀI

Mục tiêu chung của đề tài:

Nghiên cứu quy trình chiết xuất cao định chuẩn Tam thất chế (*Panax notoginseng*) và phát triển sản phẩm chứa cao Tam thất chế sử dụng trong hỗ trợ điều trị bệnh nhân ung thư.

Mục tiêu cụ thể:

- ✓ Nghiên cứu điều kiện chế biến TTC
- ✓ Tối ưu hoá quy trình chiết cao định chuẩn
- ✓ Xây dựng quy trình chiết cao định chuẩn và cao đặc TTC
- ✓ Nghiên cứu quy trình bào chế sản phẩm cao lỏng TTC
- ✓ Xây dựng TCCS cho cao chiết định chuẩn, cao đặc và thành phẩm cao lỏng TTC
- ✓ Đánh giá hoạt tính độc tế bào, độc tính cấp, độc tính bán trường diễn và tác dụng chống huyết khối, chống khối u *in vivo*.
- ✓ Nghiên cứu độ ổn định của cao chiết định chuẩn, cao đặc và thành phẩm cao lỏng TTC

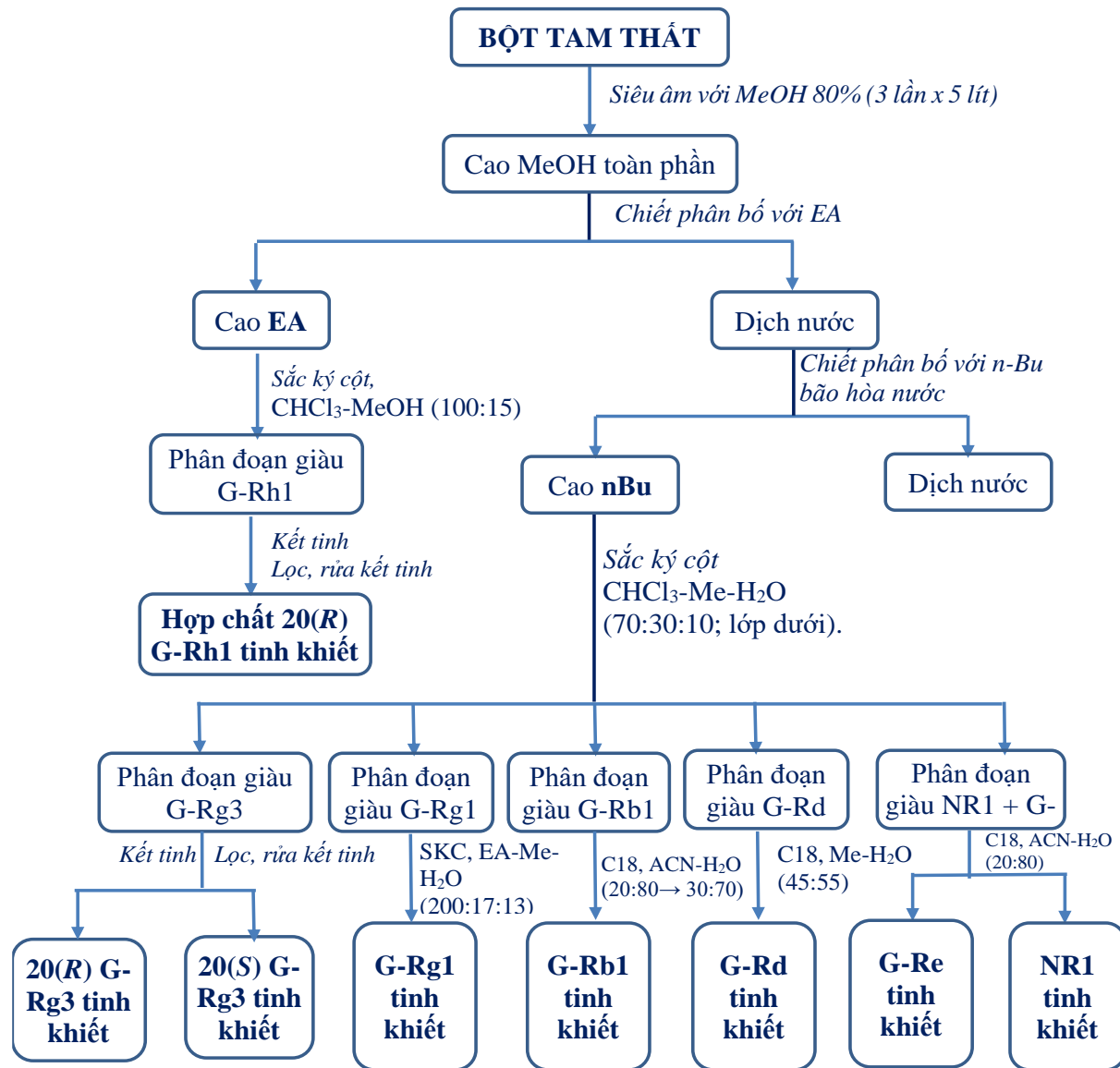
3. NỘI DUNG NGHIÊN CỨU

Sơ đồ quy trình nghiên cứu TTC



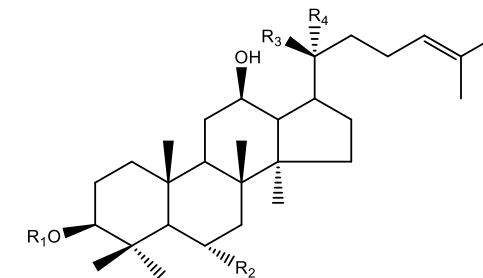
4. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU

1. Phân lập và tinh chế ít nhất 5 chất chuẩn làm việc từ Tam thất



Ghi chú: EA = ethyl acetate; Me = methanol; ACN= acetonitril

Hợp chất	Khối lượng (mg)	Cấu trúc dự đoán	Độ tinh khiết HPLC
1	540	20 (R) Ginsenosid Rh1	98,00%
2	470	20 (R) Ginsenosid Rg3	95,80%
3	217	20 (S) Ginsenosid Rg3	96,00%
4	505	Ginsenosid-Rg1	99,50%
5	670	Ginsenosid-Rd	99,02%
6	187	Ginsenosid-Re	99,99%
7	507	Notoginsenosid-R1	99,99%
8	739	Ginsenosid-Rb1	99,30%



Tên hợp chất	R1	R2	R3	R4
20(R)-G-Rh1 (1)	Glc ²⁻¹ Glc	H	CH ₃	OH
20(R)-G-Rg3 (2)	H	O-Glc	CH ₃	OH
20(S)-G-Rg3 (3)	H	O-Glc	CH ₃	OH
G-Rg1 (4)	H	O-Glc	O-Glc	CH ₃
N-R1 (5)	H	O-Glc ²⁻¹ Xyl	O-Glc	CH ₃
G-Re (6)	H	O-Glc ²⁻¹ Rha	O-Glc	CH ₃
G-Rd (7)	Glc ²⁻¹ Glc	H	O-Glc	CH ₃
G-Rb1 (8)	Glc ²⁻¹ Glc	H	O-Glc ⁶⁻¹ Glc	CH ₃

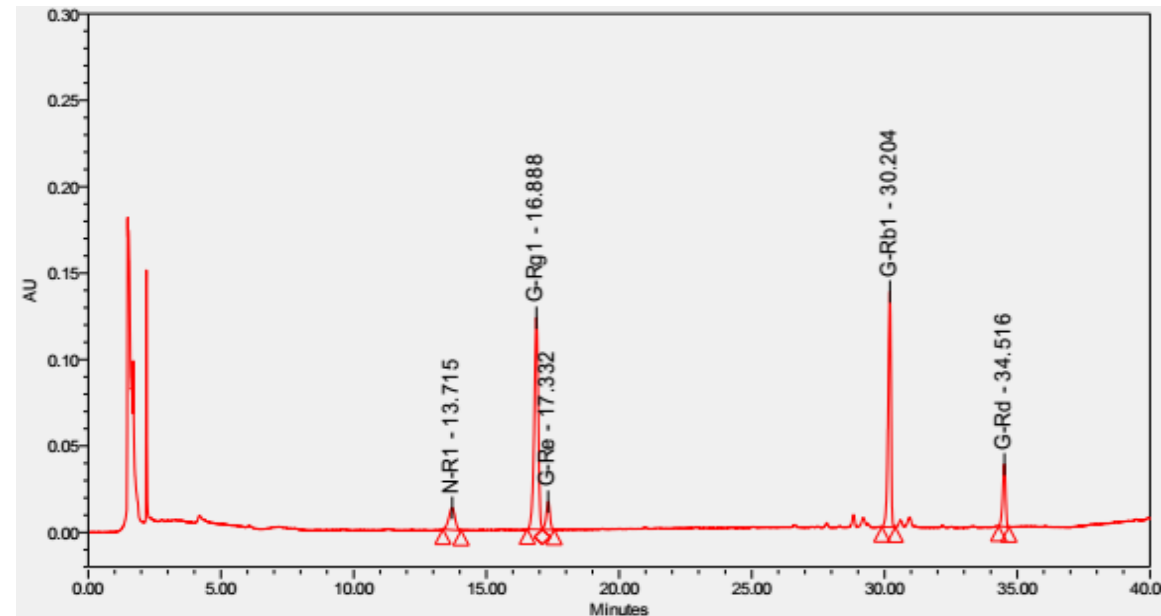
2. Đánh giá và phân tích nguồn nguyên liệu Tam thất

□ Quy trình định lượng saponin trong dược liệu Tam thất

- Máy sắc kí lỏng siêu hiệu năng UPLC Acquity H-class đầu dò PDA (Waters – Mỹ)
- Cột sắc kí: Phenomenex Gemini C18 (150 x 4.6 mm; 3 μm), tiền cột Phenomenex Gemini C18
- Bước sóng phát hiện: 203 nm
- Tốc độ dòng: 1.0 ml/phút
- Nhiệt độ cột: 30 °C
- Thể tích tiêm mẫu: 10 μl.
- Pha động: ACN (A) và nước (B).

Chương trình rửa giải tiệm tiến như sau:

Thời gian	%A	%B
0	79	21
11	79	21
25	68	32
35	60	40
40	40	60
41	5	95
50	5	95



Sắc ký đồ đại diện của mẫu dược liệu Tam thất

2. Đánh giá và phân tích nguồn nguyên liệu Tam thất

□ Nguồn nguyên liệu Tam thất (Hình ảnh đại diện)

Trung Quốc: Shangdong Analysis and Test center

Việt Nam: tỉnh Hà Giang và Lai Châu



#15 (08-HG-N50) KLTB: 19.86 g/củ



#23 (16-HG-80) KLTB: 11.31 g/củ



#24 (17-HG-32) KLTB: 32.93 g/củ



#28 (22-HG-x)



#30 (24-HG-DN)



#31 (25-HG-H)



#2 (02-TQ) KLTB: 12.58 g/củ



#3 (03-TQ) KLTB: 7.89 g/củ



#5 (05-TQ) KLTB: 14.04 g/củ



#6 (06-TQ) KLTB: 15.12 g/củ

2. Đánh giá và phân tích nguồn nguyên liệu Tam thất

□ Kết quả kiểm nguồn nguyên liệu Tam thất

STT	Lô	Độ ẩm (%)	Độ tro (%)	Hàm lượng % (mg/ 100 mg)					Tổng	PPT/PPD	G-Rb1+G-Rg1
				N-R1	G-Rg1	G-Re	G-Rb1	G-Rd			
1	01 - TQ	8,68		0,860	2,676	0,396	2,954	0,570	7,46	1,12	5,63
2	02 - TQ	9,65		1,359	3,300	0,593	3,920	0,720	9,89	1,13	7,22
3	03 - TQ	9,22	3,19	0,920	3,930	0,479	3,760	0,610	9,70	1,22	7,69
4	04 - TQ	8,58		1,380	5,900	0,576	4,760	0,960	13,58	1,37	10,66
5	05 - TQ	8,30	4,63	0,960	4,840	0,462	3,780	0,640	10,68	1,42	8,62
6	06 - TQ	9,22	2,55	1,060	4,010	0,511	4,820	0,890	11,29	0,98	8,83
7	01-HG_N	9,36	3,59	1,200	5,580	0,544	5,510	0,990	13,82	1,13	11,09
8	02-HG_N	8,85	3,22	1,430	4,890	0,675	4,910	0,950	12,85	1,19	9,8
9	03-HG_M1	9,26		1,200	3,320	0,649	5,150	0,790	11,11	0,87	8,47
10	04-HG_M2	8,28	3,30	0,810	3,070	0,318	2,380	0,440	7,02	1,49	5,45
11	05-HG-M3	8,30	3,22	1,150	4,370	0,557	4,220	0,760	11,06	1,22	8,59
12	06-HG_M4	8,50	3,31	1,590	3,880	0,481	4,420	0,740	11,11	1,15	8,3
13	07-HG_M5	9,13	3,96	1,600	4,650	0,813	4,990	0,860	12,91	1,21	9,64
14	08-HG-N50	10,04	3,52	1,320	5,700	0,648	7,820	1,840	17,33	0,79	13,52
15	09-HG-N60	10,12	3,06	1,000	4,550	0,801	8,650	1,530	16,53	0,62	13,2
16	10-HG-N70	10,02		0,970	3,570	0,482	4,490	0,700	10,21	0,97	8,06
17	11-HG-N80	11,00		0,870	4,860	0,574	5,280	0,690	12,27	1,06	10,14
18	12-HG-N90	9,81		0,870	4,520	0,359	4,300	0,850	10,90	1,12	8,82
19	13-HG-N100	10,52		1,110	3,930	0,493	3,820	0,550	9,90	1,27	7,75
20	14-HG-9	9,92		1,370	4,440	0,475	3,880	1,200	11,36	1,24	8,32

STT	Lô	Độ ẩm (%)	Độ tro (%)	Hàm lượng % (mg/ 100 mg)					Tổng	PPT/PPD	G-Rb1+G-Rg1
				N-R1	G-Rg1	G-Re	G-Rb1	G-Rd			
21	15-HG-10	10,63		1,180	5,220	0,384	4,040	0,800	11,62	1,40	9,26
22	16-HG-80	10,12		0,990	5,260	0,648	3,660	0,700	11,26	1,58	8,92
23	17-HG-32	10,18		1,260	5,460	0,455	7,230	1,750	16,15	0,80	12,69
24	18-HG-70	9,63		0,660	3,630	0,850	5,570	1,440	10,640	0,52	9,200
25	19-HG-60a	7,58		0,970	4,410	0,000	8,350	1,480	15,21	0,55	12,76
26	20-HG-60	9,06		0,970	4,980	0,689	6,040	1,030	13,71	0,94	11,02
27	21-HG-40	8,05		1,020	4,690	0,680	4,200	0,690	11,28	1,31	8,89
28	22-HG-X	7,65		0,820	6,040	0,855	4,990	0,880	13,58	1,31	11,03
29	23-HG-27	8,26	3,39	1,860	4,390	0,590	4,730	1,030	12,60	1,19	9,12
30	24 - HG - DN (Rễ củ)	9,03		0,830	4,980	1,353	5,000	1,090	13,25	1,18	9,98
31	24 - HG - DN (Thân rễ)	8,90		1,430	6,100	1,109	5,530	1,120	15,29	1,30	11,63
32	24 - HG - DN (Rễ con)	9,03		0,430	2,290	0,492	1,880	0,290	5,38	1,48	4,17
33	24 - HG - H (Rễ củ)	8,90		2,020	8,440	1,707	9,210	1,320	22,70	1,16	17,65
34	24 - HG - H (Thân rễ)			2,310	8,780	1,657	8,810	1,260	22,82	1,27	17,59
35	24 - HG - H (Rễ con)			2,210	7,070	1,284	6,780	1,060	18,40	1,35	13,85

3. Xây dựng tiêu chuẩn kiểm nghiệm đầu vào cho dược liệu Tam thất.

❖ Phân tích định lượng: HPLC với 5 chuẩn G-Rb1, -Re, -Rg1, -Rd và NR1

Điều kiện sắc ký:

- Máy sắc kí lỏng siêu hiệu năng UPLC Acquity H-class đầu dò PDA (Waters – Mỹ)
- Cột sắc kí: Phenomenex Gemini C18 (150 x 4.6 mm; 3 μm), tiền cột Phenomenex Gemini C18
- Bước sóng phát hiện: 203 nm
- Tốc độ dòng: 1.0 ml/phút
- Nhiệt độ cột: 30 °C
- Thể tích tiêm mẫu: 10 μl.
- Pha động: ACN (A) và nước (B).
- Chương trình rửa giải tiệm tiến như sau:

Thời gian	%A	%B
0	79	21
11	79	21
25	68	32
35	60	40
40	40	60
41	5	95
50	5	95

$$\text{Hàm lượng (\%)} = \frac{S_t \times C_c \times 1000}{S_c \times m}$$

Trong đó:

Sc: diện tích pic của chất phân tích trong dung dịch chuẩn.

St: diện tích pic của chất phân tích trong dung dịch thử.

Cc: nồng độ của chất phân tích trong dung dịch chuẩn (mg/ml).

m: khối lượng của mẫu thử (mg).

Lượng cân (mg)	Hàm lượng % (mg/ 100 mg)					Tổng	G-Rb1 + G-Rg1
	N-R1	G-Rg1	G-Re	G-Rb1	G-Rd		
100.7	1.741	4.072	0.568	4.548	0.992	12.60 %	9.12%
100.6	1.735	4.159	0.575	4.659	1.013		
100.1	2.006	4.665	0.615	4.901	1.071		
101.2	1.939	4.664	0.604	4.798	1.057		
Trung bình	1.860	4.390	0.590	4.730	1.030		

❖ Đề xuất tiêu chuẩn Tam thất:
+ Hàm lượng Σ 5 ginsenoside ≥ 8%

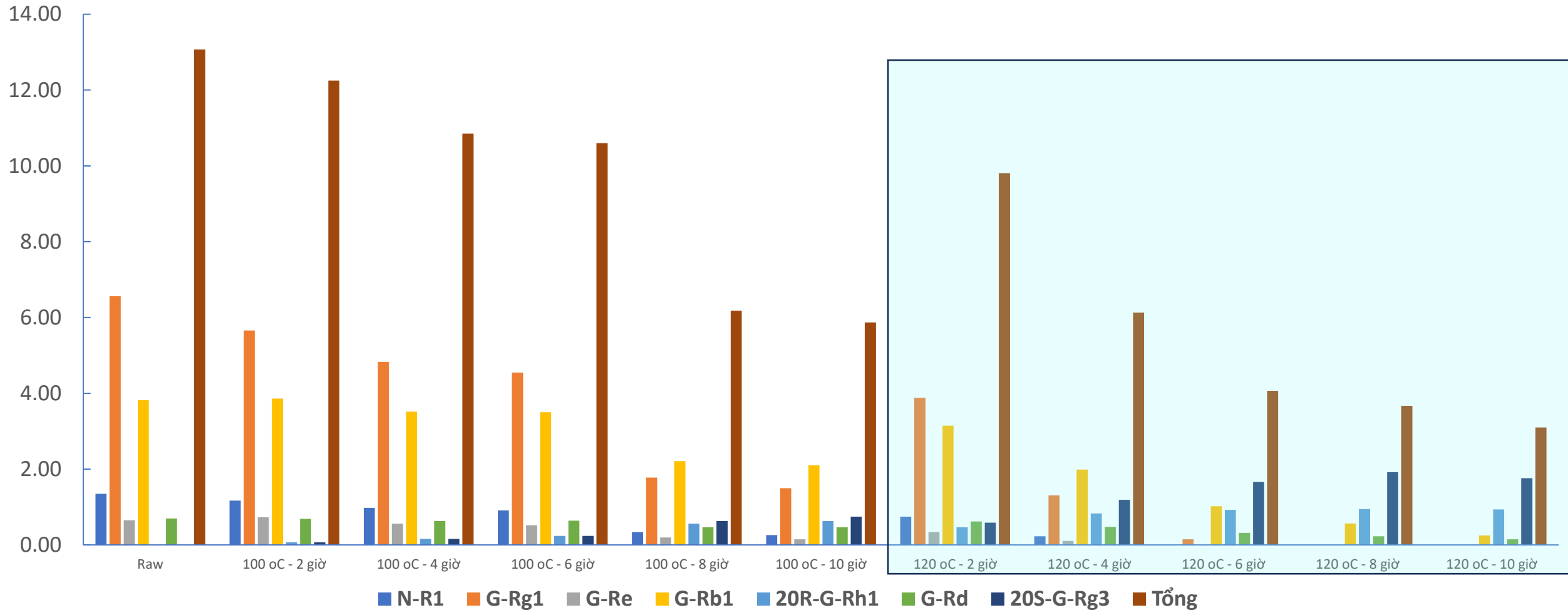
3. Xây dựng tiêu chuẩn kiểm nghiệm đầu vào cho dược liệu Tam thất.

STT	Các chỉ tiêu	Mức giới hạn
1	Độ ẩm	Không quá 12 %
2	Độ tro toàn phần	Không quá 6 %
3	Chất chiết được trong dược liệu	Không dưới 16 %
4	Định tính (HPLC & SKLM)	SKĐ SKLM của dung dịch thử có các vết có màu sắc và Rf trùng với G-Rg1, G-Rb1, G-Rd, G-Re và N-R1 SKĐ HPLC của dung dịch thử có pic có thời gian lưu ứng với G-Rg1, G-Rb1, G-Rd, G-Re và N-R1
5	Định lượng (HPLC)	Dược liệu phải không chứa ít hơn 8,0% (mg/100 mg) G-Rg1, G-Rb1, G-Rd, G-Re và N-R1
6	Giới hạn kim loại nặng	Hàm lượng Pb < 5,0 mg/kg Hàm lượng As < 2,0 mg/kg Hàm lượng Cd < 1,0 mg/kg Hàm lượng Hg < 0,2 mg/kg

4. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU

4. Nghiên cứu chế biến Tam thất theo định hướng tác dụng ức chế tế bào ung thư

Hàm lượng ginsenoside ở các điều kiện chế biến khác nhau



4. Nghiên cứu chế biến Tam thất theo định hướng tác dụng ức chế tế bào ung thư

Hàm lượng Tam thất chế ở điều kiện khác nhau

	RAW	100_2	100_4	100_6	100_8	100_10	120_2	120_4	120_6	120_8	120_10
N-R1	1.35	1.17	0.98	0.91	0.34	0.26	0.75	0.23	-	-	-
G-Rg1	6.56	5.66	4.83	4.55	1.78	1.50	3.88	1.31	0.15	-	-
G-Re	0.65	0.73	0.56	0.52	0.20	0.15	0.34	0.11	-	-	-
G-Rb1	3.82	3.86	3.52	3.50	2.21	2.10	3.15	1.99	1.02	0.57	0.25
G-Rh1	-	0.07	0.16	0.24	0.56	0.63	0.47	0.83	0.93	0.95	0.94
G-Rd	0.70	0.69	0.63	0.64	0.47	0.47	0.62	0.48	0.32	0.23	0.15
R-G-Rg3	-	0.07	0.16	0.24	0.63	0.75	0.59	1.19	1.66	1.92	1.76
Tổng	13.07	12.25	10.85	10.60	6.18	5.87	9.22	6.13	4.07	3.67	3.1

- Các ginsenoside cấu trúc PPT gồm: G-Rg1, G-Re và N-R1 kém bền hơn so PPD (G-Rb1 và G-Rd).
- Do vậy, ở điều kiện chế biến 120 °C từ 6-10h, các thành phần NR1 và G-Re không còn phát hiện được, trong khi đó G-Rg1 đã giảm 97% so với mẫu chưa chế biến và chỉ còn 0.15% so với 6.56% ở mẫu chưa chế biến.
- G-Rh1 (PPT) (được biến đổi từ các G-Rg1, G-Re và N-R1) tăng dần từ 0.07 – 0.94%.
- PPD (G-Rd và G-Rb1) bền hơn và giảm chậm hơn so với PPT và vẫn được phát hiện ở điều kiện chế biến 120 °C, 10 giờ.
- Hàm lượng saponin tổng giảm mạnh ở điều kiện chế biến 120 °C.

4. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU

4. Nghiên cứu chế biến Tam thất theo định hướng tác dụng ức chế tế bào ung thư

Đánh giá hoạt tính độc tế bào của Tam thất chế ở điều kiện khác nhau

Khả năng ức chế sự tăng trưởng của tế bào **A549** của các cao chiết từ Tam thất chế biến (CB) ở nhiệt độ 100 °C và 120 °C

Mẫu thử	Tỷ lệ ức chế so với mẫu chứng âm (%)						IC ₅₀ (μM)	IC ₅₀ TB (μM)	
	5,0 μM	2,5 μM	1,0 μM	0,5 μM	0,25 μM	0,1 μM			
Doxorubicin	1	79,54	78,02	59,01	29,69	21,76	17,18	1,01	1,00 ± 0,01
	2	80,46	78,69	59,31	29,62	21,62	16,69	1,00	
	3	80,95	79,42	59,98	29,34	22,73	15,05	0,99	
Mẫu thử	Tỷ lệ ức chế so với mẫu chứng âm (%)						IC ₅₀ (mg/ml)	IC ₅₀ TB (mg/ml)	
	3,0 mg/ml	2,0 mg/ml	1,5 mg/ml	1,0 mg/ml	0,5 mg/ml	0,25 mg/ml			
CCB	1	16,02	9,45	7,32	2,13	-1,63	-4,81	> 3	IC ₅₀ > 3
	2	15,52	7,79	6,99	2,15	-0,47	-5,77	> 3	
	3	16,85	12,04	5,83	1,19	-2,07	-6,60	> 3	
CB100-2	1	13,43	8,49	7,32	3,72	-0,51	-4,17	> 3	IC ₅₀ > 3
	2	15,10	13,45	13,65	5,00	2,55	1,36	> 3	
	3	15,70	14,48	13,68	7,10	2,44	0,94	> 3	
CB100-4	1	10,99	7,51	3,44	3,48	-0,78	-1,22	> 3	IC ₅₀ > 3
	2	13,41	12,30	5,71	3,31	2,09	-1,81	> 3	
	3	10,63	15,03	7,90	1,42	-0,42	-2,67	> 3	
CB100-6	1	11,65	5,16	1,18	-0,45	-2,65	-5,36	> 3	IC ₅₀ > 3
	2	12,41	10,21	2,68	1,04	-0,65	-3,67	> 3	
	3	11,14	6,71	6,20	-0,31	-1,92	-5,81	> 3	
CB100-8	1	80,81	28,51	1,61	-2,37	-5,17	-9,04	2,51	2,53 ± 0,02
	2	83,02	14,30	1,58	0,90	-3,00	-11,67	2,56	
	3	83,64	13,56	5,68	3,42	-1,72	-11,02	2,54	
CB100-10	1	81,45	23,43	4,85	0,20	-1,46	-3,05	-3,05	2,50 ± 0,04
	2	84,16	32,40	4,32	3,78	-0,31	-3,08	-3,08	
	3	82,71	23,93	3,53	0,98	0,64	-2,89	-2,89	
Mẫu thử	Tỷ lệ ức chế so với mẫu chứng âm (%)						IC ₅₀ (mg/ml)	IC ₅₀ TB (mg/ml)	
	3,0 mg/ml	2,0 mg/ml	1,5 mg/ml	1,0 mg/ml	0,5 mg/ml	0,25 mg/ml			
CCB	1	16,02	9,45	7,32	2,13	-1,63	-4,81	> 3	IC ₅₀ > 3
	2	15,52	7,79	6,99	2,15	-0,47	-5,77	> 3	
	3	16,85	12,04	5,83	1,19	-2,07	-6,60	> 3	
CB120-2	1	40,94	-0,11	-1,04	-3,57	-17,81	-20,26	> 3	IC ₅₀ > 3
	2	44,42	5,39	2,47	-5,96	-13,12	-18,85	> 3	
	3	39,03	8,01	3,99	1,80	-10,12	-16,49	> 3	
CB120-4	1	79,98	38,10	6,82	-2,82	-3,09	-5,91	2,44	2,43 ± 0,01
	2	81,61	38,10	5,99	-5,25	-4,75	-8,50	2,43	
	3	82,94	38,05	7,15	-3,70	-4,83	-7,37	2,41	
CB120-6	1	83,00	78,95	32,95	2,38	-2,30	-9,62	1,77	1,75 ± 0,02
	2	84,36	81,36	33,08	2,72	-3,22	-9,96	1,74	
	3	86,44	83,31	29,62	2,36	-3,85	-14,28	1,74	
CB120-8	1	83,15	79,16	44,08	-3,21	-10,83	-20,98	1,67	1,60 ± 0,06
	2	84,71	82,03	49,75	0,86	-9,71	-19,75	1,56	
	3	86,94	84,04	45,98	0,45	-10,07	-21,54	1,58	
CB120-10	1	84,27	81,12	37,49	-2,04	-10,56	-21,54	1,70	1,68 ± 0,04
	2	85,92	82,91	32,74	2,49	-8,21	-16,01	1,71	
	3	87,54	84,53	40,20	-0,73	-10,14	-20,92	1,64	

4. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU

4. Nghiên cứu chế biến Tam thất theo định hướng tác dụng ức chế tế bào ung thư

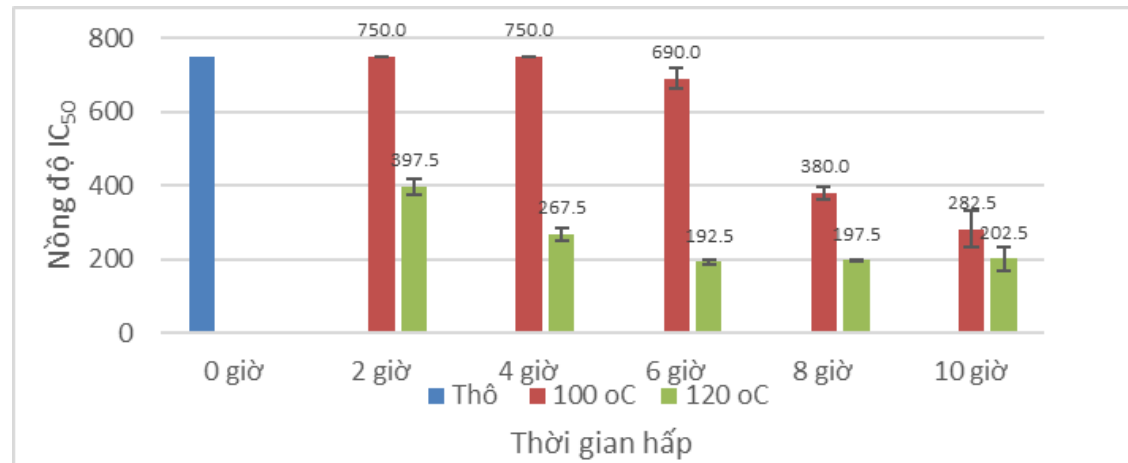
Đánh giá hoạt tính độc tế bào của Tam thất chế ở điều kiện khác nhau

Khả năng ức chế sự tăng trưởng của tế bào **MDA-MB 231** của các cao chiết từ Tam thất chế biến (CB) ở nhiệt độ 100 °C và 120 °C

Mẫu thử		Tỷ lệ ức chế so với mẫu chứng âm (%)						IC ₅₀ (μM)	IC ₅₀ TB (μM)
		5,0 μM	2,5 μM	1,0 μM	0,5 μM	0,25 μM	0,1 μM		
Doxorubicin	Lần 1	76,57	67,54	58,43	49,68	44,53	32,18	0,72	0,72 ± 0,02
	Lần 2	75,49	68,87	58,94	48,80	44,65	32,39	0,70	
	Lần 3	75,14	67,28	57,51	49,58	44,12	32,65	0,73	
Mẫu thử		Tỷ lệ ức chế so với mẫu chứng âm (%)						IC ₅₀ (mg/ml)	IC ₅₀ TB (μg/ml)
		3,0 mg/ml	2,0 mg/ml	1,5 mg/ml	1,0 mg/ml	0,5 mg/ml	0,25 mg/ml		
CCB	Mẫu 1	47,67	44,62	39,02	37,05	29,73	15,95	> 750	IC ₅₀ > 750
	Mẫu 2	48,06	46,81	45,06	40,21	31,75	16,72	> 750	
	Mẫu 3	48,14	43,29	36,47	34,66	23,21	11,95	> 750	
CB100-2	Mẫu 1	47,66	42,67	36,78	35,25	21,89	13,47	> 750	IC ₅₀ > 750
	Mẫu 2	44,22	42,86	33,26	28,57	19,77	6,79	> 750	
	Mẫu 3	46,78	39,42	36,34	32,61	16,58	8,42	> 750	
CB100-4	Mẫu 1	47,76	42,89	33,85	32,36	22,88	8,06	> 750	IC ₅₀ > 750
	Mẫu 2	36,35	28,40	22,41	20,26	8,72	1,29	> 750	
	Mẫu 3	44,95	35,06	29,12	31,07	26,62	6,30	> 750	
CB100-6	Mẫu 1	50,15	44,79	35,70	30,20	18,32	13,77	722,5	690 ± 0,11
	Mẫu 2	50,33	46,92	37,83	30,61	23,27	11,75	670,0	
	Mẫu 3	50,12	47,96	36,68	31,08	27,35	10,57	677,5	
CB100-8	Mẫu 1	96,96	72,73	42,17	35,33	24,20	18,20	377,5	380 ± 0,07
	Mẫu 2	96,94	68,99	42,82	32,37	18,12	16,11	397,5	
	Mẫu 3	96,62	74,83	39,05	40,65	29,28	14,41	362,5	
CB100-10	Mẫu 1	97,47	83,46	58,15	41,93	23,61	23,05	285	282,5 ± 0,19
	Mẫu 2	97,55	88,74	63,51	48,39	37,34	24,51	230	
	Mẫu 3	96,75	67,27	53,03	42,78	37,42	25,42	327,5	
Mẫu thử		Tỷ lệ ức chế so với mẫu chứng âm (%)						IC ₅₀ (mg/ml)	IC ₅₀ TB (μg/ml)
		3,0 mg/ml	2,0 mg/ml	1,5 mg/ml	1,0 mg/ml	0,5 mg/ml	0,25 mg/ml		
CCB	Mẫu 1	47,67	44,62	39,02	37,05	29,73	15,95	> 750	IC ₅₀ > 750
	Mẫu 2	48,06	46,81	45,06	40,21	31,75	16,72	> 750	
	Mẫu 3	48,14	43,29	36,47	34,66	23,21	11,95	> 750	
CB120-2	Mẫu 1	95,04	66,54	42,85	39,89	25,12	15,35	380	397,5 ± 0,08
	Mẫu 2	96,15	65,92	44,23	34,81	17,05	8,75	390	
	Mẫu 3	91,19	61,14	41,36	32,76	15,73	8,57	420	
CB120-4	Mẫu 1	97,44	94,16	58,21	36,91	23,43	17,64	277,5	267,5 ± 0,06
	Mẫu 2	96,72	92,68	61,42	47,08	28,82	16,04	250	
	Mẫu 3	97,39	92,51	56,70	41,12	22,07	14,05	277,5	
CB120-6	Mẫu 1	96,93	96,76	89,95	60,81	31,32	21,07	185	192,5 ± 0,03
	Mẫu 2	96,82	96,87	85,79	55,11	29,83	17,09	200	
	Mẫu 3	97,31	96,76	87,65	60,12	29,71	15,18	195	
CB120-8	Mẫu 1	97,24	96,95	93,57	51,14	31,05	11,57	199	197,5 ± 0,01
	Mẫu 2	97,05	96,76	93,22	53,43	30,41	12,62	198	
	Mẫu 3	96,86	96,38	90,92	55,05	32,43	14,57	196	
CB120-10	Mẫu 1	97,21	97,16	96,93	60,59	36,65	14,62	180	202,5 ± 0,13
	Mẫu 2	97,06	96,69	70,76	48,68	21,46	11,42	237,5	
	Mẫu 3	97,34	97,08	94,29	61,13	30,89	16,50	185	

4. Nghiên cứu chế biến Tam thất theo định hướng tác dụng ức chế tế bào ung thư

Đánh giá hoạt tính độc tế bào của Tam thất chế ở điều kiện khác nhau

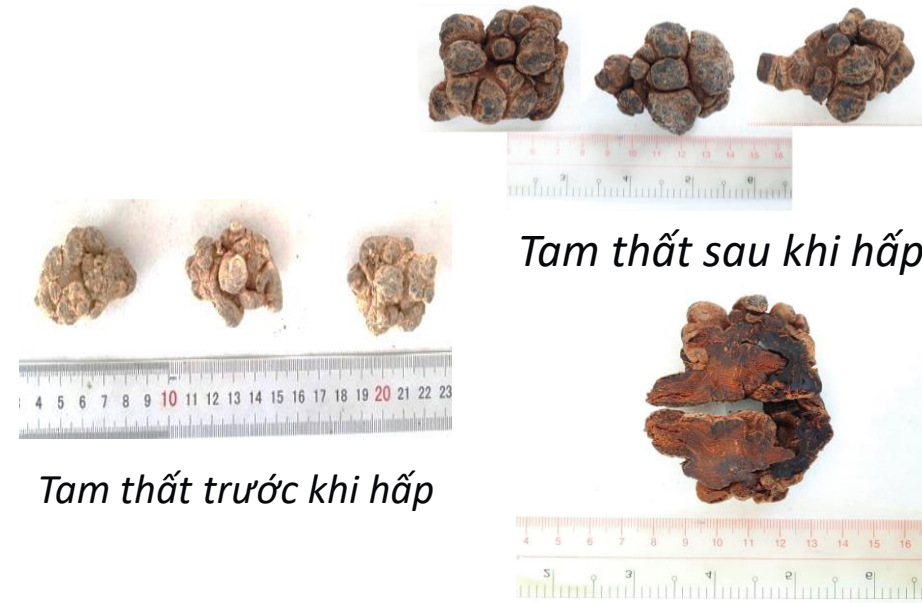
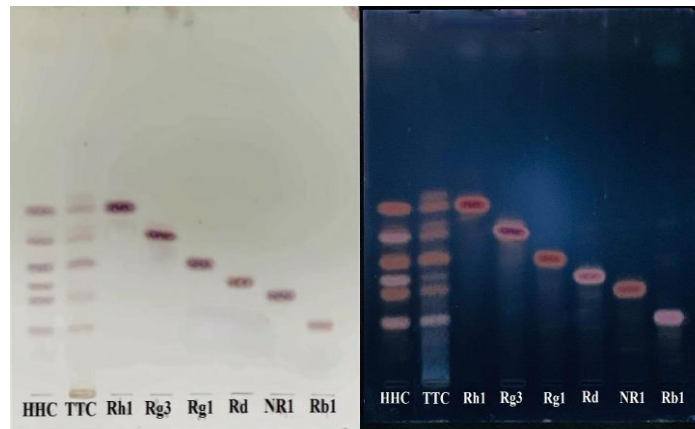
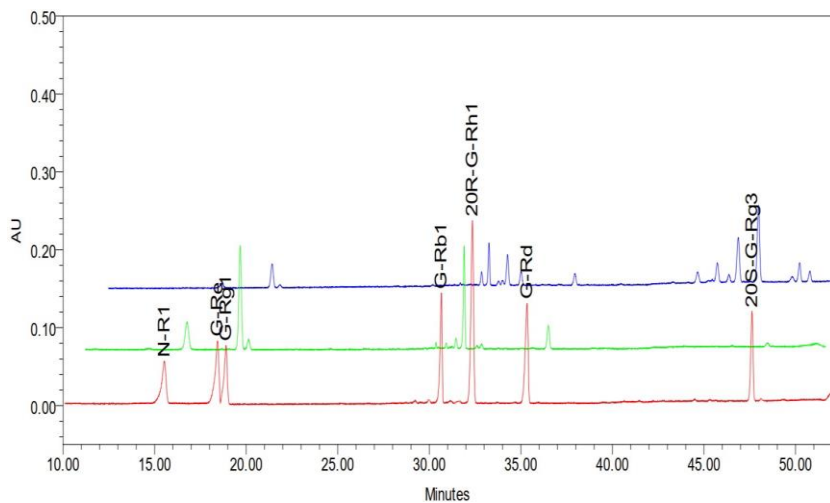


IC₅₀ của cao chiết Tam thất trên dòng tế bào MDA-MB 231 ở các điều kiện chế biến khác nhau.

4. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU

4. Nghiên cứu chế biến Tam thất theo định hướng tác dụng ức chế tế bào ung thư

Mẫu		Độ ẩm	Hàm lượng trung bình (%)							Tổng
			N-R1	G-Rg1	G-Re	G-Rd	G-Rb1	20(R)-G-Rh1	20(S)-G-Rg3	
Tam thất thô			1,86	4,39	0,59	1,03	4,70	-	-	12,57
TTC	Lô 1	8,28 ± 0,03		0,99		1,42	0,31	0,55	0,81	4,08
	Lô 2	7,35 ± 0,09		0,89		1,43	0,31	0,56	0,81	4,00
	Lô 3	7,84 ± 0,08		0,91		1,42	0,32	0,54	0,83	4,02



SKĐ HPLC & SKLM đại diện của mẫu TTC

Mặt cắt dược liệu tam thất chế

5. Tiêu chuẩn cho dược liệu Tam thất chế

Định nghĩa:

Tam thất chế (Processed radix *Panacis notoginseng*), là rễ củ của cây Tam thất [*Panax notoginseng* (Burk.) F.H.Chen], họ Nhân sâm (Araliaceae) được hấp hơi nước ở nhiệt độ cao, sau đó sấy khô.

Yêu cầu kỹ thuật

STT	Chỉ tiêu	Yêu cầu
1	Mô tả	Rễ củ có hình dạng thay đổi, hình trụ hay hình chùy, dài 1,5 - 4,0 cm, đường kính 1,2 - 2,0 cm. Mặt ngoài màu nâu đỏ, có những vết xém đen, trên mặt có những vết nhăn dọc rất nhỏ. Trên một đầu có những bấu nhỏ là vết tích của rễ con, phần dưới có khi phân nhánh. Trên đỉnh còn vết tích của thân cây. Thể chất mềm dẻo, dễ cắt. Mặt cắt ngang có lớp vỏ màu nâu, có những chấm nhỏ màu nâu (ống tiết), phần gỗ ở trong màu đỏ nâu, mạch gỗ xếp hình tia tỏa tròn. Mùi thơm nhẹ đặc biệt, vị đắng hơi ngọt.
2	Soi bột	Mảnh mạch vach, mạch mạng. Tinh thể canxi oxalat màu nâu đỏ. Những hạt tinh bột hình chuông, hình tròn hay hình khối, đường kính 3-13 μm , thường tụ thành đám, có khi đứng riêng rẽ.
3	Độ ẩm	Không quá 10 %
4	Tro toàn phần	Không quá 6 %
5	Chất chiết được trong dược liệu	Không dưới 16%

5. Tiêu chuẩn cho dược liệu Tam thất chế

STT	Chỉ tiêu	Yêu cầu	
6	Định tính	Trên sắc ký đồ của dung dịch thử phải có các vết có cùng màu sắc và Rf ginsenosid-Rg1, ginsenosid-Rb1, ginsenosid-Rd, ginsenosid-Rh1, ginsenosid-Rg3 và notoginsenosid-R1 trên sắc ký đồ của dung dịch chất đối chiếu.	
7	Định lượng	Dược liệu phải không chứa ít hơn 3,0% (mg/100 mg) tổng hàm lượng ginsenosid-Rg1, ginsenosid-Rb1, 20R-ginsenosid-Rh1, ginsenosid-Rd và 20S-ginsenosid-Rg3, tính theo dược liệu khô kiệt.	
8	Giới hạn kim loại nặng	Arsen	Không quá 2 mg/kg
		Cadimi	Không quá 1 mg/kg
		Chì	Không quá 5 mg/kg
		Thủy ngân	Không quá 0,2 mg/kg

6. Tối ưu hóa quy trình chiết xuất

Thí nghiệm	A	B	C	D	Thí nghiệm	A	B	C	D	Thí nghiệm	A	B	C	D
1	0	8	1	1	28	0	8	1	2	55	0	8	1	3
2	0	8	2	1	29	0	8	2	2	56	0	8	2	3
3	0	8	3	1	30	0	8	3	2	57	0	8	3	3
4	0	10	1	1	31	0	10	1	2	58	0	10	1	3
5	0	10	2	1	32	0	10	2	2	59	0	10	2	3
6	0	10	3	1	33	0	10	3	2	60	0	10	3	3
7	0	15	1	1	34	0	15	1	2	61	0	15	1	3
8	0	15	2	1	35	0	15	2	2	62	0	15	2	3
9	0	15	3	1	36	0	15	3	2	63	0	15	3	3
10	45	8	1	1	37	45	8	1	2	64	45	8	1	3
11	45	8	2	1	38	45	8	2	2	65	45	8	2	3
12	45	8	3	1	39	45	8	3	2	66	45	8	3	3
13	45	10	1	1	40	45	10	1	2	67	45	10	1	3
14	45	10	2	1	41	45	10	2	2	68	45	10	2	3
15	45	10	3	1	42	45	10	3	2	69	45	10	3	3
16	45	15	1	1	43	45	15	1	2	70	45	15	1	3
17	45	15	2	1	44	45	15	2	2	71	45	15	2	3
18	45	15	3	1	45	45	15	3	2	72	45	15	3	3
19	80	8	1	1	46	80	8	1	2	73	80	8	1	3
20	80	8	2	1	47	80	8	2	2	74	80	8	2	3
21	80	8	3	1	48	80	8	3	2	75	80	8	3	3
22	80	10	1	1	49	80	10	1	2	76	80	10	1	3
23	80	10	2	1	50	80	10	2	2	77	80	10	2	3
24	80	10	3	1	51	80	10	3	2	78	80	10	3	3
25	80	15	1	1	52	80	15	1	2	79	80	15	1	3
26	80	15	2	1	53	80	15	2	2	80	80	15	2	3
27	80	15	3	1	54	80	15	3	2	81	80	15	3	3

Kí hiệu	Biến phụ thuộc	Đơn vị
Y_1	Hiệu suất chiết cao	%
Y_2	Hàm lượng ginsenoside tổng của (G-Rg1 + G-Rb1 + G-Rh1 + G-Rd + G-Rg3)	%

Mã hóa	Biến độc lập	Đơn vị	Loại biến	Mức khảo sát
A	Dung môi chiết	% ethanol	Định lượng	
B	Tỉ lệ dược liệu : dung môi		Định lượng	1:8 – 1:10 – 1:15
C	Thời gian chiết	Giờ	Định lượng	1 – 2 – 3
D	Số lần chiết		Định lượng	1 – 2

(*) Chú thích: A: độ cồn (%); B: tỉ lệ dung môi/dược liệu (ml/g); C: thời gian chiết (giờ); D: số lần chiết (lần)

6. Tối ưu hóa quy trình chiết xuất

STT	A	B	C	Hàm lượng saponin thu được (mg) (TB, n=3)			
				Lần 1 (D=1)	Lần 2 (D=2)	Tổng 2 lần	Tổng 2 lần (%)
1	0	8	1	201,31	6,87	209,18	4,18
2	0	8	2	136,84	9,04	145,88	2,92
3	0	8	3	182,70	0,43	183,13	3,66
4	0	10	1	161,69	14,56	176,25	3,53
5	0	10	2	180,36	2,38	182,74	3,65
6	0	10	3	172,11	4,68	176,79	3,54
7	0	15	1	184,63	5,47	190,10	3,80
8	0	15	2	175,43	2,61	178,04	3,56
9	0	15	3	162,27	2,06	164,33	3,29
10	45	8	1	250,77	1,56	252,33	5,05
11	45	8	2	174,99	1,20	176,19	3,52
12	45	8	3	219,83	1,35	221,18	4,42
13	45	10	1	215,65	1,64	217,29	4,35
14	45	10	2	176,35	1,47	177,82	3,56
15	45	10	3	245,85	1,77	257,62	5,15
16	45	15	1	255,22	1,94	257,16	5,14
17	45	15	2	182,06	2,34	184,40	3,69
18	45	15	3	208,28	1,80	210,08	4,20
19	80	8	1	202,05	5,00	207,05	4,14
20	80	8	2	217,83	2,92	220,75	4,42
21	80	8	3	280,01	0,88	280,89	5,62
22	80	10	1	204,41	4,41	208,82	4,18
23	80	10	2	226,35	2,66	229,01	4,58
24	80	10	3	268,05	1,26	269,31	5,39
25	80	15	1	210,42	0,42	210,84	4,22
26	80	15	2	224,67	0,68	225,35	4,51
27	80	15	3	258,34	3,43	261,77	5,24

STT	A	B	C	Khối lượng cặn (g) (TB, n=3)				Hiệu suất chiết (%)	
				Lần 1 (TN1→27)	Lần 2 (TN28→54)	Lần 3 (TN55→81)	Tổng	1 lần	2 lần
1	0	8	1	2,3712	0,3928	0,1397	2,9037	51,55	60,09
2	0	8	2	2,4355	0,3387	0,1304	2,9046	52,95	60,31
3	0	8	3	2,6085	0,2419	0,1421	2,9925	56,71	61,97
4	0	10	1	2,2207	0,5896	0,1297	2,9400	48,28	61,09
5	0	10	2	2,4767	0,2693	0,1397	2,8857	53,84	59,70
6	0	10	3	2,5617	0,2387	0,1383	2,9387	55,69	60,88
7	0	15	1	2,3213	0,6275	0,2242	3,1730	50,46	64,10
8	0	15	2	2,5195	0,2959	0,1421	2,9575	54,77	61,20
9	0	15	3	2,5190	0,2853	0,1391	2,9434	54,76	60,96
10	45	8	1	1,9104	0,2595	0,0787	2,2486	41,53	47,17
11	45	8	2	1,8947	0,1947	0,0435	2,1329	41,19	45,42
12	45	8	3	1,9051	0,1752	0,0600	2,1403	41,42	45,22
13	45	10	1	1,9230	0,1833	0,0770	2,1833	41,80	45,79
14	45	10	2	1,9307	0,1900	0,0933	2,2140	41,97	46,10
15	45	10	3	1,8687	0,2333	0,0703	1,4903	40,62	45,70
16	45	15	1	2,1647	0,5702	0,1056	2,8405	47,06	59,45
17	45	15	2	1,8298	0,2698	0,0666	2,1662	39,78	45,64
18	45	15	3	1,9249	0,1572	0,0891	2,1712	41,85	45,26
19	80	8	1	1,2579	0,2573	0,0715	1,5867	27,35	32,94
20	80	8	2	1,3203	0,2035	0,0565	1,5803	28,70	33,13
21	80	8	3	1,4408	0,1344	0,0611	1,6363	31,32	34,24
22	80	10	1	1,0550	0,2537	0,0913	1,4000	22,93	29,45
23	80	10	2	1,3937	0,1913	0,0473	1,6323	30,30	34,46
24	80	10	3	1,4520	0,1990	0,0600	1,7110	31,57	35,89
25	80	15	1	1,3564	0,1954	0,0631	1,6149	29,49	33,73
26	80	15	2	1,4194	0,1772	0,0616	1,6582	30,86	34,71
27	80	15	3	1,5020	0,1181	0,0561	1,6762	32,65	35,22

(*) Chú thích: A: độ cồn (%); B: tỉ lệ dung môi/dược liệu (ml/g); C: thời gian chiết (giờ); D: số lần chiết (lần)

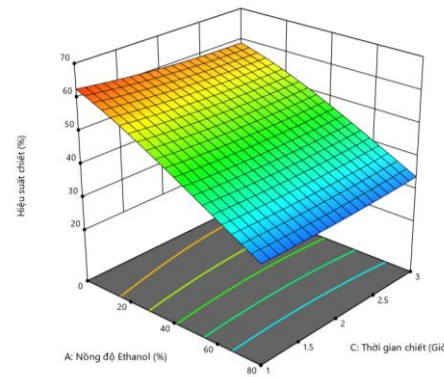
6. Tối ưu hóa quy trình chiết xuất

STT	A	B	C	Hiệu suất chiết của 2 lần (%)	Hiệu suất chiết ginsenosid của 2 lần (%)
1	0	8	1	60,09	4,18
2	0	8	2	60,31	2,92
3	0	8	3	61,97	3,66
4	0	10	1	61,09	3,53
5	0	10	2	59,70	3,65
6	0	10	3	60,88	3,54
7	0	15	1	64,10	3,80
8	0	15	2	61,20	3,56
9	0	15	3	60,96	3,29
10	45	8	1	47,17	5,05
11	45	8	2	45,42	3,52
12	45	8	3	45,22	4,42
13	45	10	1	45,79	4,35
14	45	10	2	46,10	3,56
15	45	10	3	45,70	5,15
16	45	15	1	59,45	5,14
17	45	15	2	45,64	3,69
18	45	15	3	45,26	4,20
19	80	8	1	32,94	4,14
20	80	8	2	33,13	4,42
21	80	8	3	34,24	5,62
22	80	10	1	29,45	4,18
23	80	10	2	34,46	4,58
24	80	10	3	35,89	5,39
25	80	15	1	33,73	4,22
26	80	15	2	34,71	4,51
27	80	15	3	35,22	5,24

suất chiết (%)
64.1

A
C

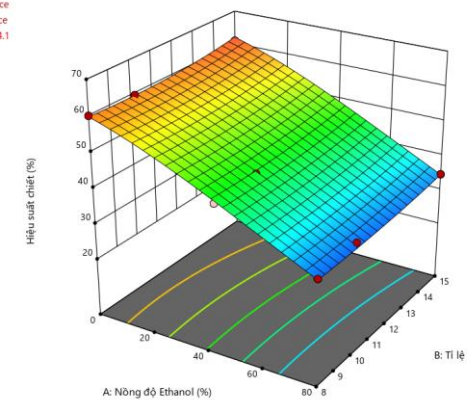
Actual Factor
11.5



Hiệu suất chiết (%)
Design Points:
● Above Surface
○ Below Surface
29.45 64.1

X1 = A
X2 = B
C = 2

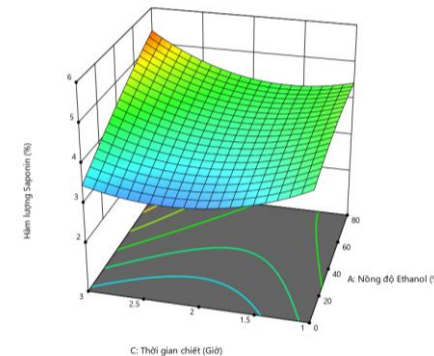
Actual Factor
C = 2



Đồ thị biểu diễn biến thiên hiệu suất chiết cao theo biến số quy trình chiết

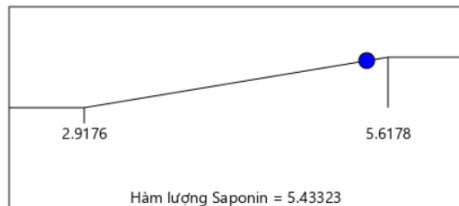
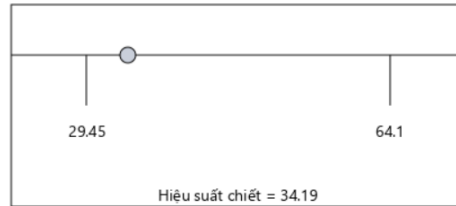
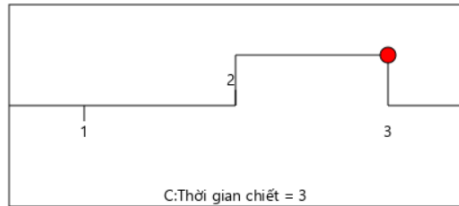
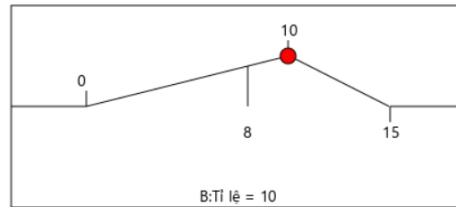
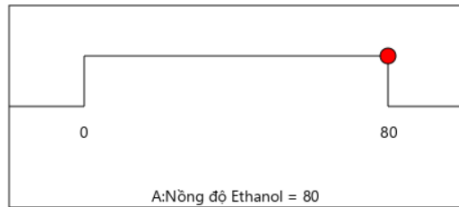
Hàm lượng Saponin (%)
2.9176 5.6178

X1 = A
X2 = C
Actual Factor
B = 11.5



Đồ thị biểu diễn biến thiên hàm lượng saponin toàn phần theo biến số quy trình chiết

6. Tối ưu hóa quy trình chiết xuất



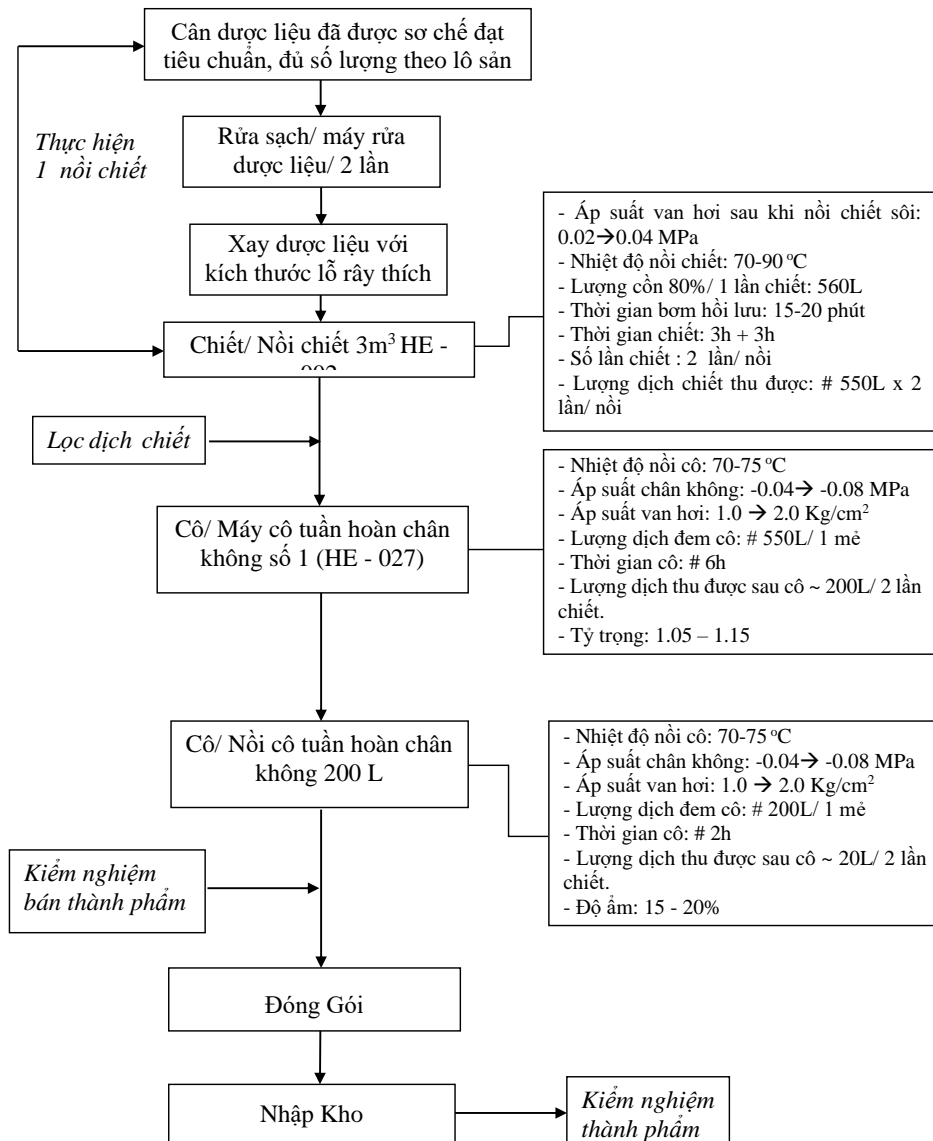
Desirability = 0.968
Solution 1 out of 30

Mã	Tên biến	Ràng buộc	Mục tiêu
A	Độ cồn	Từ 0 - 80%	
B	Tỉ lệ dược liệu : dung môi	1:8 - 1:15	Tối thiểu
C	Thời gian chiết		
Y ₁	Hiệu suất chiết cao		
Y ₂	Hiệu suất chiết ginsenosid		Tối đa hóa

Thông số chiết xuất và dự đoán tính chất cao bán thành phẩm tạo thành

(*) *Chú thích: A: độ cồn (%); B: tỉ lệ dung môi/dược liệu (ml/g); C: thời gian chiết (giờ); D: số lần chiết (lần)*

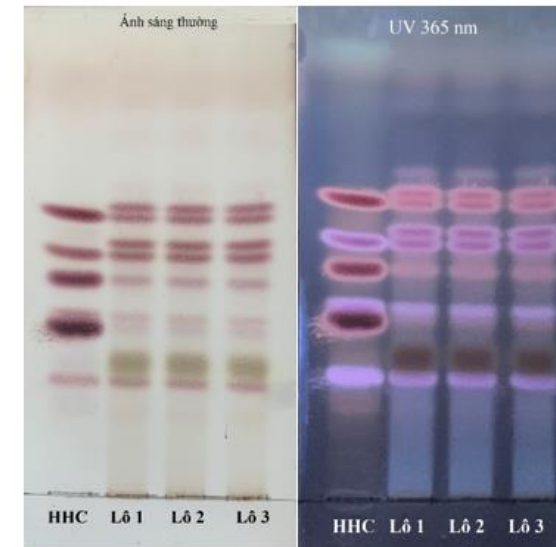
7. Điều chế cao Tam thất ở quy mô sản xuất tương ứng với quy mô 3 kg cao/lô



Độ ẩm của cao chiết Tam thất chế ở 3 lô

	Lô 1	Lô 2	Lô 3
Độ ẩm (%) ± SD	18,02 ± 0,004	18,09 ± 0,004	18,13 ± 0,003
Hàm lượng (mg/g)			

Định tính



SKĐ SKLM cao chiết Tam thất chế (3 lô) so sánh với chất chuẩn
 Ghi chú: Hệ dung môi khai triển $\text{CHCl}_3\text{-EA-MeOH-H}_2\text{O}$ (15:40:22:10).
 HHC: hỗn hợp chuẩn G-Rh1, G-Rg3, G-Rg1, G-Rd, N-R1, G-Rb1.

TÓM TẮT QUY TRÌNH BÀO CHẾ CAO ĐỊNH CHUẨN TAM THẮT CHẾ

I-YÊU CẦU KỸ THUẬT:

1.1. Định nghĩa cao định chuẩn Tam thất chế (*Standardized Extractum Processed Panacis notoginseng*)

Cao định chuẩn Tam thất chế được bào chế từ củ Tam thất chế (*Processed Radix Panacis notoginseng*) họ Nhân sâm (*Araliaceae*) theo phương pháp thích hợp để có hàm lượng ginsenoside ổn định.

1.3.1. Mô tả: Thễ chất mềm, đồng nhất, màu nâu sẫm, mùi thơm đặc trưng của dược liệu, vị đắng.

1.3.2. Độ ẩm: 15,0 % - 20,0 %

1.3.3. Tro toàn phần: Không quá 6,0 %

1.3.4. Định tính:

Sắc ký đồ sắc ký lớp mỏng của dung dịch thử phải có các vết có màu sắc và R_f trùng với các vết của sắc ký đồ của dung dịch chuẩn đối chiếu 20(*R*)-ginsenosid-Rh1, 20(*S*)-ginsenosid-Rg3, ginsenosid-Rg1, notoginsenosid-R1, ginsenosid-Rd và ginsenosid-Rb1 khi quan sát ở dưới ánh sáng thường và dưới ánh sáng tử ngoại (365 nm).

Sắc ký đồ sắc ký lỏng hiệu năng cao của dung dịch thử phải có các pic chính có thời gian lưu tương ứng với thời gian lưu của pic ginsenosid-Rg1, ginsenosid-Rb1, 20(*R*)-ginsenosid-Rh1, ginsenosid-Rd và 20(*S*)-ginsenosid-Rg3 trên sắc ký đồ của dung dịch chuẩn.

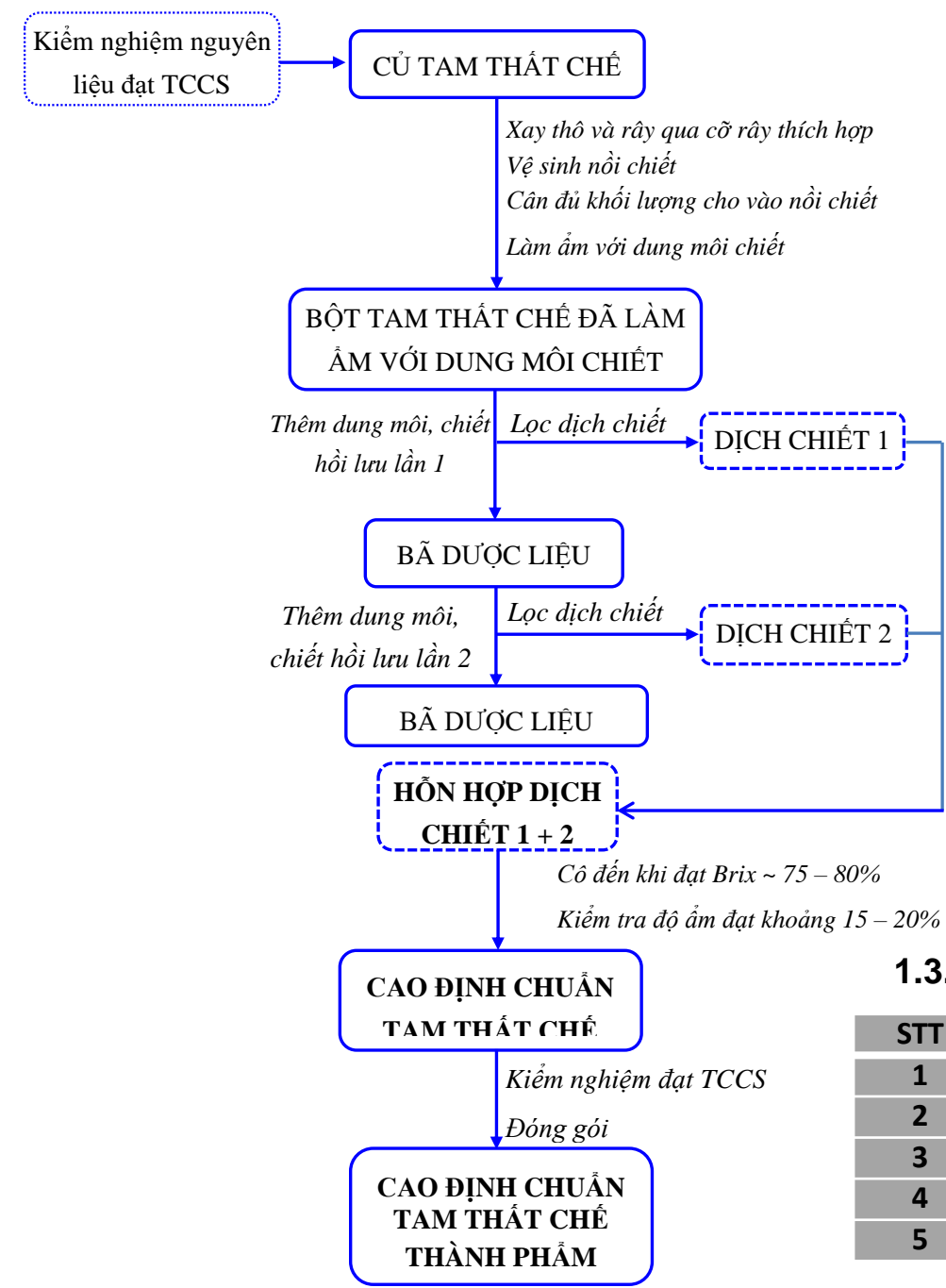
1.3.5. Định lượng: Không ít hơn **3%** tổng 20(*R*)-ginsenosid-Rh1 và 20(*S*)-ginsenosid-Rg3 và không ít hơn **12,0 %** tổng hàm lượng ginsenosid-Rg1, ginsenosid-Rb1, 20(*R*)-ginsenosid-Rh1, ginsenosid-Rd và 20(*S*)-ginsenosid-Rg3.

1.3.7. Độ nhiễm khuẩn:

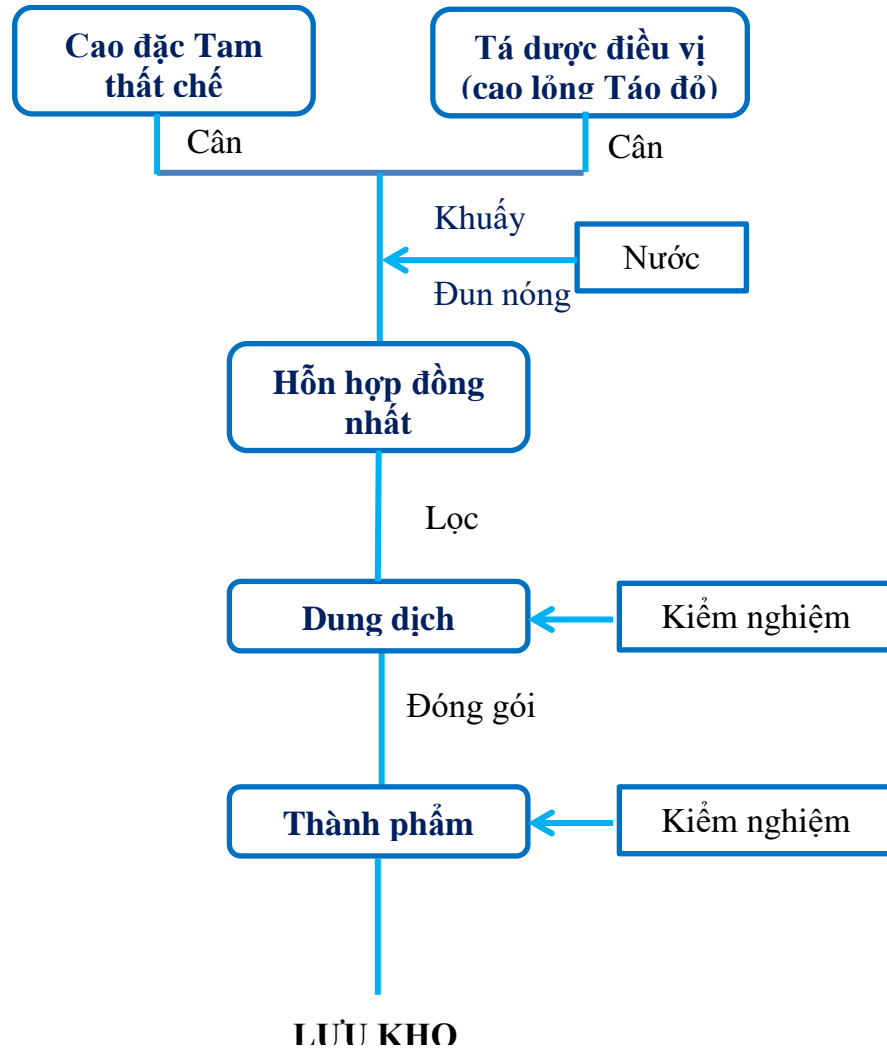
STT	Tên chỉ tiêu	Mức tối đa	Đv tính
1	Tổng số Vi khuẩn hiếu khí	10 ²	CFU/g
2	Tổng số Nấm men, nấm mốc	10	CFU/g
3	Coliforms	10	CFU/g
4	Staphylococcus aureus	Không được có	trong 1 g
5	Clostridium perfringens	10	CFU/g

1.3.6. Giới hạn kim loại nặng:

Chì (Pb)	Không quá 5,0 mg/kg
Asen (As)	Không quá 2,0 mg/kg
Cadimi (Cd)	Không quá 1,0 mg/kg
Thủy ngân (Hg)	Không quá 0,2 mg/kg



9. Nghiên cứu bào chế và tiêu chuẩn hóa sản phẩm chứa cao Tam thất ở quy mô phòng thí nghiệm và qui mô pilot.



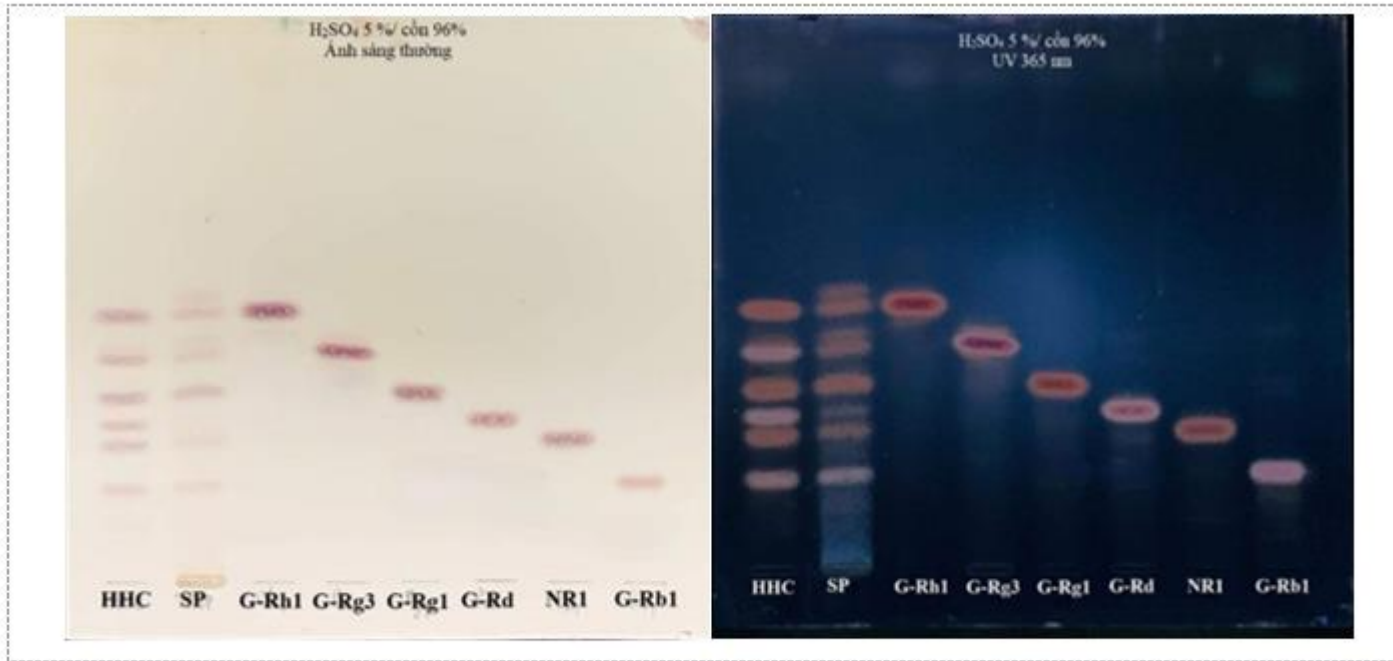
10. Xây dựng quy trình kiểm nghiệm sản phẩm cao lỏng Tam thất

Kết quả xác định cân sau khi bay hơi và tỉ trọng của cao lỏng Tam thất chế

	Lô 1	Lô 2	Lô 3	TB
Hàm lượng cặn (%)	13,3	13,2	13,5	13,3
Tỉ trọng (%)	1,03	1,05	1,05	1,04

Kết quả định lượng các saponin trong cao lỏng Tam thất chế.

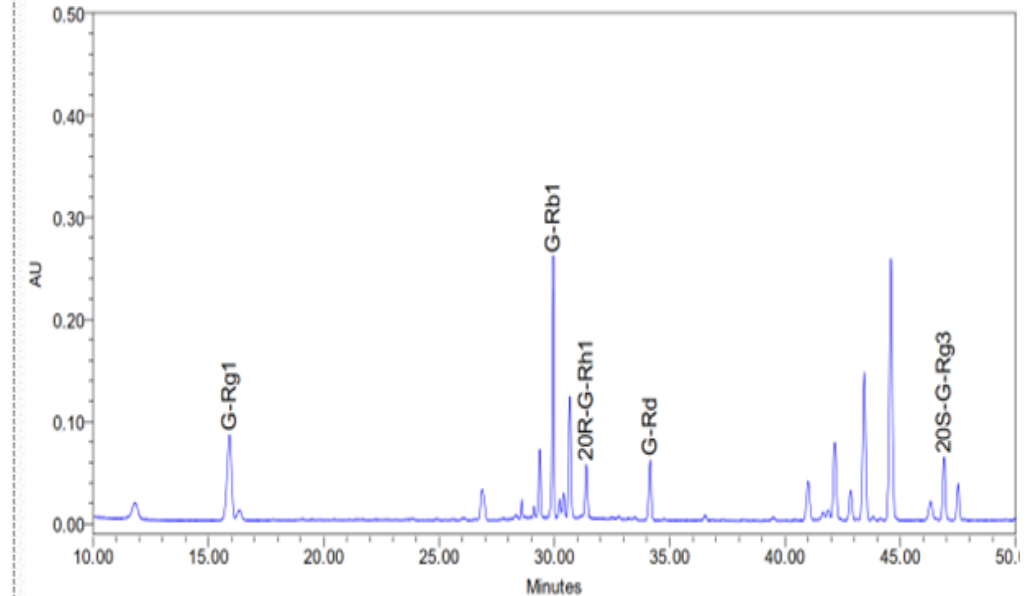
Mẫu	Hàm lượng (mg/ml)					Tổng mg/ml	Tổng mg/15 mL
	G-Rg1	G-Rb1	20R-G-Rh1	G-Rd	20S-G-Rg3		
1	1,495	2,455	0,329	0,792	0,832	5,888 ± 0,028	88,32
2	1,472	2,427	0,321	0,795	0,840		
3	1,491	2,442	0,322	0,804	0,846		



Sắc ký đồ sắc ký lớp mỏng cao thành phẩm Tam thất chế so với các chất chuẩn

*Ghi chú: Điều kiện sắc ký: Pha động EA-CHCl₃-MeOH-H₂O (15:40:22:10)

HHC: hỗn hợp các chuẩn G-Rh1, G-Rg3, G-Rg1, G-Rd, NR1 và G-Rb;



Sắc ký đồ định lượng saponin trong cao lỏng Tam thất chế.

11. Đánh giá độ ổn định của cao định chuẩn 0, 3, 6 tháng ở điều kiện 30, 40 ± 2 °C và 75 ± 5%

Tần suất	Hàm lượng (mg/g)					Tổng
	G-Rg1	G-Rb1	20R-G-Rh1	G-Rd	20S-G-Rg3	
0 tháng	4,758 ± 0,12	7,313 ± 0,177	0,973 ± 0,037	2,384 ± 0,045	2,526 ± 0,170	17,954 ± 0,527
3 tháng	4,541 ± 0,066	7,192 ± 0,115	0,976 ± 0,013	2,411 ± 0,023	2,650 ± 0,111	17,770 ± 0,112
6 tháng	4,276 ± 0,070	7,320 ± 0,377	1,210 ± 0,052	2,468 ± 0,215	2,921 ± 0,109	18,194 ± 0,792

Tần suất	Hàm lượng (mg/g)					Tổng
	G-Rg1	G-Rb1	20R-G-Rh1	G-Rd	20S-G-Rg3	
0 tháng	4,758 ± 0,12	7,313 ± 0,177	0,973 ± 0,037	2,384 ± 0,045	2,526 ± 0,170	17,954 ± 0,527
1 tháng	4,470 ± 0,103	6,990 ± 0,138	0,964 ± 0,047	2,273 ± 0,006	2,542 ± 0,105	17,239 ± 0,384
3 tháng	4,145 ± 0,136	6,581 ± 0,101	0,912 ± 0,047	2,144 ± 0,083	2,482 ± 0,052	16,264 ± 0,407
6 tháng	4,345 ± 0,053	6,439 ± 0,051	1,237 ± 0,034	2,639 ± 0,061	2,906 ± 0,081	17,566 ± 0,078

Hàm lượng saponin tổng trong mẫu cao định chuẩn thay đổi không đáng kể, có sự giảm nhẹ hàm lượng G-Rg1, G-Rb1 và sự tăng hàm lượng 20R-G-Rh1 và 20S-G-Rg3. Tuy nhiên, hàm lượng saponin tổng sau 6 tháng vẫn đạt yêu cầu về chỉ tiêu định lượng theo TCCS (không ít hơn 10% tổng hàm lượng G-Rg1, G-Rb1, 20R-G-Rh1, G-Rd và 20S-G-Rg3).

Ước tính tuổi thọ của cao đặc Tam thất chế

$$t_{90}(t_2) = K t_{90}(t_1) = 2^{(40-30)/10} \times 13 = 26 \text{ tháng}$$

Do vậy, thời gian bảo quản cao định chuẩn/ cao đặc Tam thất chế là 24 tháng ở 30 °C.

11. Đánh giá độ ổn định của sản phẩm cao lỏng 0, 3, 6 tháng ở điều kiện 30, 40 ± 2 °C và 75 ± 5%

Tần suất (tháng)	Hàm lượng (mg/ml) ± SD					Tổng/ ml	Tổng/ 15 ml
	G-Rg1	G-Rb1	20R-G-Rh1	G-Rd	20S-G-Rg3		
0 tháng	1,486 ± 0,012	2,441 ± 0,014	0,324 ± 0,005	0,797 ± 0,006	0,839 ± 0,007	5,888 ± 0,028	88,32
3 tháng	1,459 ± 0,043	2,437 ± 0,012	0,348 ± 0,011	0,851 ± 0,024	0,851 ± 0,030	5,985 ± 0,187	89,775
6 tháng	0,665 ± 0,006	2,336 ± 0,006	0,404 ± 0,014	0,873 ± 0,015	0,893 ± 0,019	5,171 ± 0,026	77,565

Hàm lượng saponin trong cao lỏng ở điều kiện lão hóa trong 1, 3, 6 tháng.

Tần suất (tháng)	Hàm lượng (mg/ml) ± SD					Tổng / ml	Tổng/ 15 ml
	G-Rg1	G-Rb1	20R-G-Rh1	G-Rd	20S-G-Rg3		
0 tháng	1,486 ± 0,012	2,441 ± 0,014	0,324 ± 0,005	0,797 ± 0,006	0,839 ± 0,007	5,888 ± 0,028	88,32
1 tháng	1,070 ± 0,014	2,469 ± 0,032	0,457 ± 0,006	0,837 ± 0,012	0,938 ± 0,017	5,771 ± 0,078	86,565
3 tháng	0,358 ± 0,014	2,202 ± 0,042	0,587 ± 0,008	0,776 ± 0,023	1,093 ± 0,019	5,015 ± 0,077	75,225
6 tháng	0,085 ± 0,019	1,765 ± 0,022	0,645 ± 0,007	0,759 ± 0,028	1,307 ± 0,013	4,561 ± 0,037	68,415

Hàm lượng saponin tổng giảm nhẹ trong khoảng thời gian giữa 3 tháng và 6 tháng, chủ yếu do sự giảm hàm lượng G-Rg1, G-Rb1 và sự tăng hàm lượng ginsenosid-Rh1. Tuy nhiên, hàm lượng saponin tổng sau 6 tháng vẫn đạt yêu cầu về chỉ tiêu định lượng theo TCCS (không ít hơn 50 mg tổng hàm lượng G-Rg1, G-Rb1, 20R-G-Rh1, G-Rd và 20S-G-Rg3 tính trên 15 ml chế phẩm).

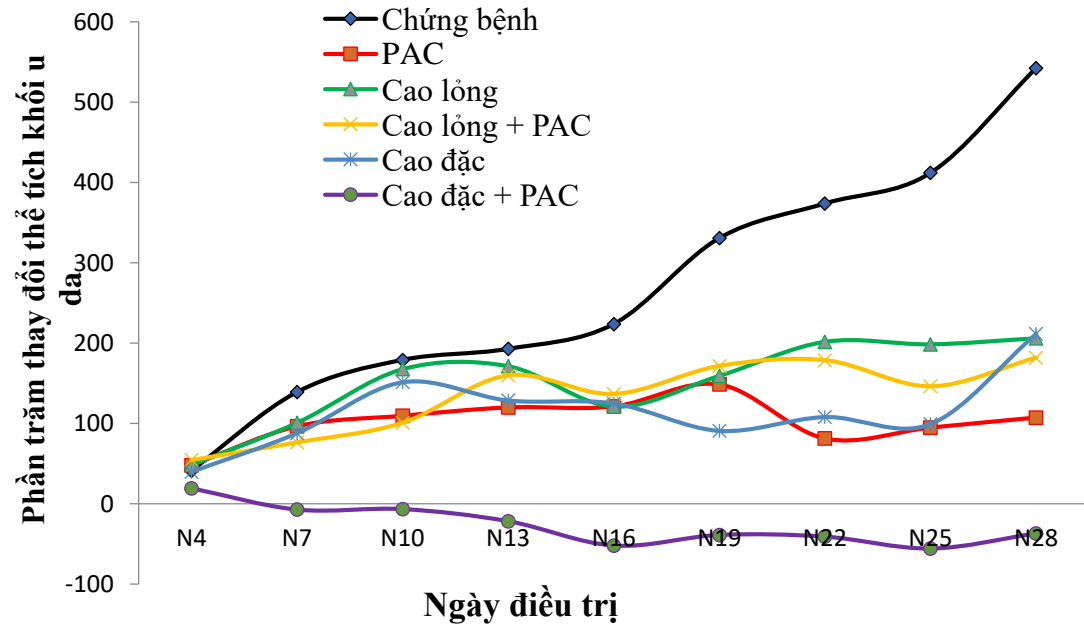
12. Thử nghiệm độc tính

Thử nghiệm	Kết quả	
	Cao đặc	Cao lỏng
Độc tính cấp đường uống	Không biểu hiện độc tính ở liều 55 g/kg (~1,1 g cao/ml)	Không biểu hiện độc tính ở liều 200 ml/kg (D_{max})
Độc tính bán trường diễn	Liều 450 mg/kg và 900 mg/kg không ảnh hưởng đến thể trọng, chức năng tạo máu, chức năng gan, thận của chuột thử nghiệm. Liều cao trong thời gian dài có thể ảnh hưởng cấu trúc vi thể thận.	Liều 10 ml và 20 ml/kg làm giảm mức độ tăng cân, không ảnh hưởng đến chức năng tạo máu, chức năng gan, thận. Liều cao trong thời gian dài có thể ảnh hưởng cấu trúc vi thể thận.

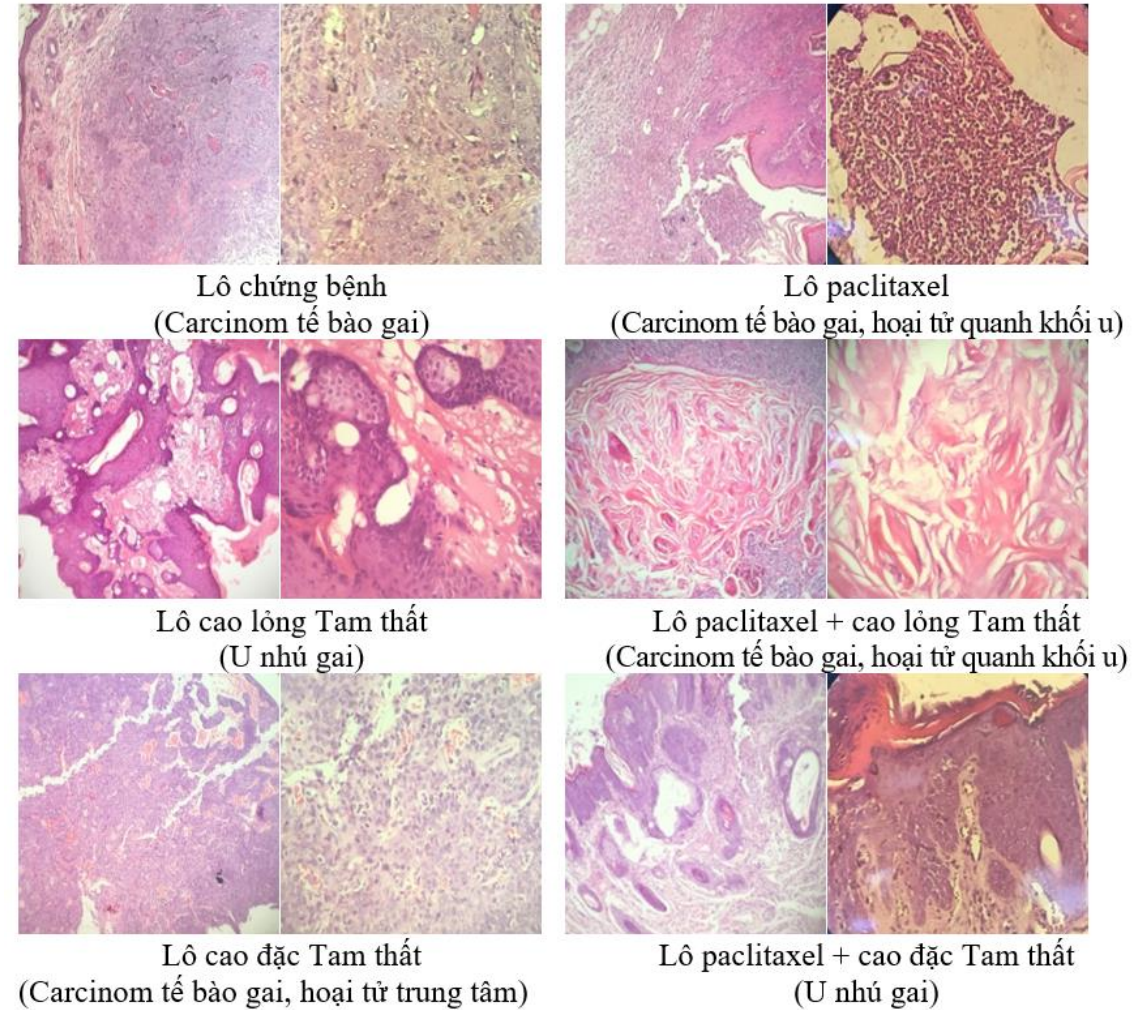
12. Thử nghiệm dược lý: kháng khối u và chống huyết khối

Thử nghiệm	Kết quả	
	Cao đặc	Cao lỏng
Tác dụng kháng khối u trên mô hình chuột gây u bằng DMBA	Cao chiết Tam thất không ảnh hưởng tỉ lệ sống/chết của chuột gây u bằng DMBA, làm giảm trọng lượng cơ thể chuột, giảm sự tăng kích thước khối u da, tăng hoại tử tế bào ung thư phổi khi phối hợp với paclitaxel	
Tác dụng kháng huyết khối trên mô hình hình gây huyết khối ở đuôi chuột bằng κ-carrageenan	Thể hiện ở liều 450 mg/kg	Thể hiện ở liều 10 ml/kg

12. Thử nghiệm dược lý: kháng khối u



Phần trăm thay đổi thể tích khối u da

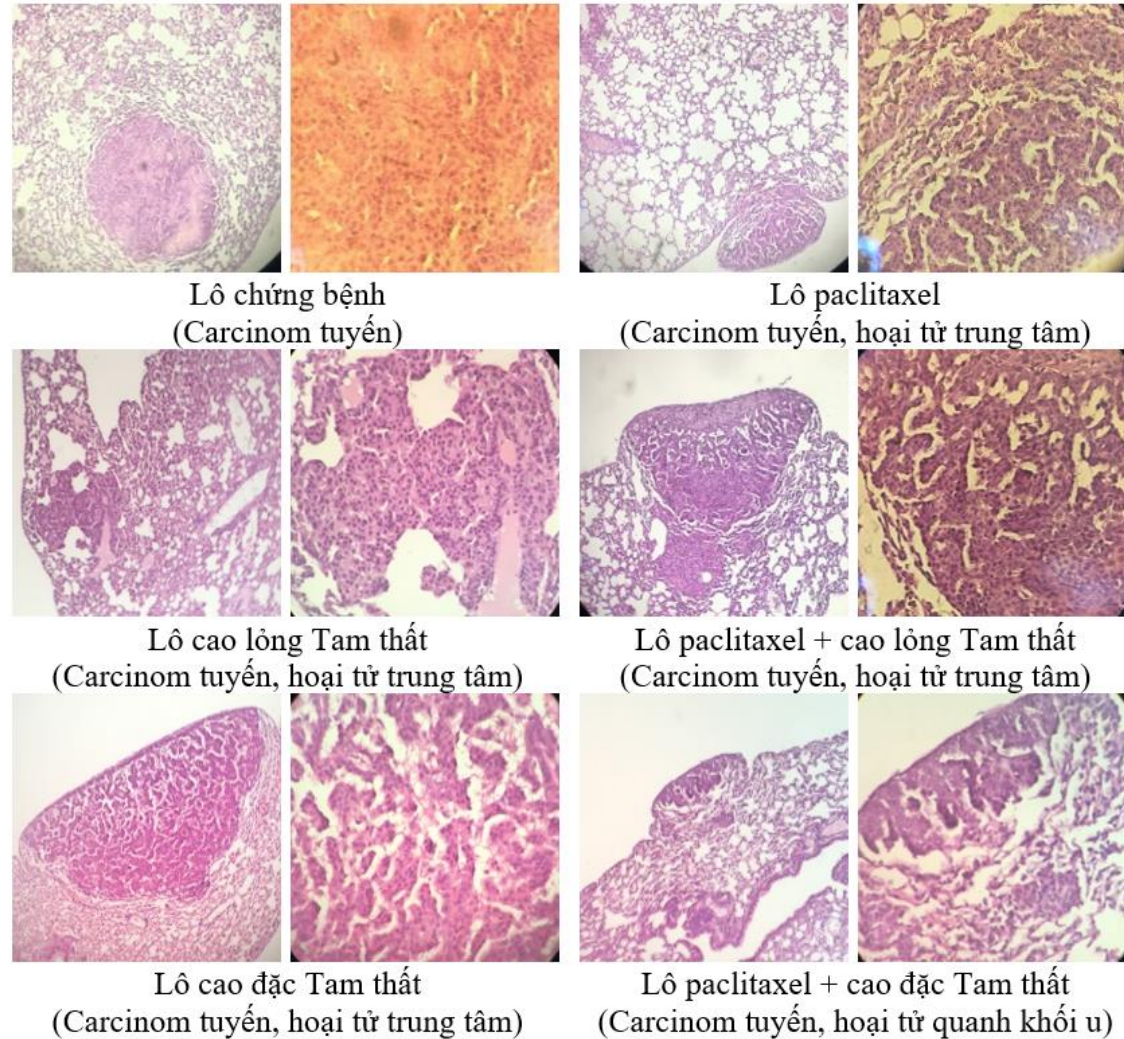


Vi thể tế bào khối u da

12. Thử nghiệm dược lý: kháng khối u

25% mẫu phổi ở lô chứng bệnh xuất hiện tình trạng carcinom kèm theo hoại tử tế bào ung thư, tỷ lệ này tăng lên đối với các lô điều trị với paclitaxel ± cao Tam thất.

Như vậy, cao chiết Tam thất thể hiện tác động làm hoại tử tế bào ung thư của các khối u phổi, trong đó cao đặc thể hiện tác động hoại tử tế bào ung thư phổi tốt hơn cao lỏng và tác động này tăng lên khi phối hợp giữa cao đặc Tam thất với paclitaxel.



Vi thể tế bào phổi

12. Thử nghiệm dược lý: chống huyết khối

Lô (n = 8)	Chiều dài đuôi (cm)	Chiều dài huyết khối (cm)			Phần trăm huyết khối (%)		
		24 giờ	48 giờ	72 giờ	24 giờ	48 giờ	72 giờ
Chứng bệnh	7,99 ± 0,19	5,08 ± 0,38	3,74 ± 0,43	1,73 ± 0,63	63,62 ± 4,67	46,70 ± 4,95	22,32 ± 8,36
Aspirin 20 mg/kg	8,40 ± 0,16	4,06 ± 0,18*	2,85 ± 0,33*	2,65 ± 0,60	48,38 ± 2,02*	33,71 ± 3,67*	31,03 ± 6,86
Cao đặc Tam thất 450 mg/kg	8,04 ± 0,07	5,01 ± 0,29 [#]	1,63 ± 0,53*	0,90 ± 0,25	62,58 ± 4,10 ^{##}	20,57 ± 6,89*	11,28 ± 3,15
Cao lỏng Tam thất 10 ml/kg	8,30 ± 0,09	4,78 ± 0,30	2,71 ± 0,35	1,08 ± 0,51	57,74 ± 4,05	32,79 ± 4,32*	12,63 ± 6,01

Kết quả thu được gợi ý cao đặc Tam thất liều 450 mg/kg và cao lỏng Tam thất liều 10 ml/kg thể hiện khả năng chống huyết khối trên mô hình gây huyết khối ở đuôi chuột bằng k-carrageenan, tác động này thể hiện chậm hơn so với đối chứng aspirin 20 mg/kg.

KẾT LUẬN

- ✓ Đã khảo sát nguyên liệu Tam thất đầu vào đạt tiêu chuẩn nghiên cứu
- ✓ Đã xây dựng được quy trình bào chế Tam thất theo hoạt tính ức chế tb ung thư và hàm lượng hoạt chất
- ✓ Đã tối ưu hóa quy trình chiết cao định chuẩn và bào chế cao lỏng Tam thất chế ở qui mô pilot
- ✓ Đã xây dựng tiêu chuẩn cơ sở cho dược liệu TT, TTC, cao định chuẩn, thành phẩm cao lỏng
- ✓ Đã đánh giá độ ổn thị 1, 3, 6 tháng ở điều kiện bảo quản thường và lão hóa cấp tốc
- ✓ Đã đánh giá hoạt tính ức chế tế bào ung thư, đã đánh giá tác động kháng khối u và chống huyết khối *in vivo*

KIẾN NGHỊ

- ✓ Tiếp tục hoàn thiện quy trình sản xuất sản phẩm ở quy mô sản xuất
- ✓ Thử nghiệm lâm sàng cho sản phẩm



TRÂN TRỌNG CẢM ƠN!