XÂY DỰNG TIÊU CHUẨN KIỂM NGHIỆM ĐẢNG SÂM (CODONOPSIS JAVANICA) 3 NĂM TUỔI TRỒNG LÀM NGUYÊN LIỆU TẠI LÂM ĐỒNG

Đỗ Văn Mãi, Đinh Thị Đào**, Nguyễn Thị Ngọc Đan**, Dương Thị Mộng Ngọc**, Trần Công Luận***

TÓM TẮT

Mục tiêu: *Xây dựng tiêu chuẩn kiểm nghiệm Đảng sâm 3 năm tuổi trồng làm nguyên liệu tại Lâm Đồng.*

Phương pháp nghiên cứu:

Khảo sát đặc điểm thực vật học: *Mô tả và chụp hình các đặc điểm hình thái và giải phẫu. Vi phẫu của rễ Đảng sâm được nhuộm bằng phẩm nhuộm son phèn và iod lục.*

Kiểm tra độ tinh khiết: *Độ ẩm, tro toàn phần, tro không tan trong HCl.*

Định tính: *Định tính các hợp chất saponin bằng phản ứng hoá học và lobetyolin bằng phương pháp sắc ký lớp mỏng.*

Định lượng: *Xác định hàm lượng chất chiết được bằng phương pháp chiết nóng với dung môi là nước và hàm lượng saponin toàn phần bằng phương pháp cân theo tiêu chuẩn DĐVN IV.*

Kết quả: *Đã đề nghị tiêu chuẩn kiểm nghiệm Đảng sâm 3 năm tuổi trồng làm nguyên liệu tại Lâm Đồng.*

Kết luận: *Phương pháp phân tích Đảng tin cậy, đơn giản nên có thể ứng dụng vào công tác kiểm tra đánh giá chất lượng nguyên liệu.*

Từ khóa: *Đảng sâm, Lâm Đồng, lobetyolin, saponin.*

ABSTRACT

STUDY ON THE STANDARDIZATION OF THE 3-YEAR-OLD CODONOPSIS JAVANICA ROOTS AS RAW MATERIAL IN LAM DONG

Do Van Mai, Dinh Thi Dao, Nguyen Thi Ngoc Dan, Duong Thi Mong Ngoc, Tran Cong Luan

* Y Hoc TP. Ho Chi Minh * Supplement of Vol. 19 - No 5 - 2015: 80 - 86

Objectives: *The aim of the study was to develop the specifications for analyzing Codonopsis javanica as raw material in Lam Dong.*

Research methods: Botanical characteristics: *Description and photograph of morphological and anatomical characteristics. The root of Codonopsis javanica was stained with carmine alum and iodine green dye.*

Test purity: *Humidity test, total ash, insoluble ash in acid.*

Qualitative: *Determination of saponins compounds by chemical reactions and lobetyolin by thin layer chromatography method.*

Quantification: *Extractable matter was determined by hot extraction with water and total saponins according to VN Pharmacopoeia IV.*

Results: *The specifications for analyzing Codonopsis javanica as raw material in Lam Dong were proposed.*

Conclusions: *The analytical method was proven to be reliable. This result is able to apply for quality control of material.*

Keywords: *Codonopsis javanica, Lam Dong, lobetyolin, saponins.*

---

* Trường Đại học Tây Đô ** TT Sâm và Dược liệu TPHCM

Tác giả liên lạc: PGS.TS.Trần Công Luận *ĐT*: 0903671323 *Email*: congluan53@gmail.com

ĐẶT VẤN ĐỀ

Nước ta có nguồn dược liệu phong phú, có kinh nghiệm sử dụng thuốc từ thiên nhiên lâu đời, có điều kiện môi trường phù hợp cho nuôi trồng phát triển nhiều loại dược liệu. Đây là điều kiện hết sức thuận lợi để phát triển lĩnh vực sản xuất các loại thuốc từ nguồn dược liệu thiên nhiên góp phần quan trọng cho sự nghiệp chăm sóc sức khỏe của nhân dân, ngoài ra còn là nguyên liệu đầu vào cho các ngành công nghiệp khác như mỹ phẩm, chế biến thực phẩm…

Đảng sâm là một trong những dược liệu quý hiếm giúp tăng cường thể lực, chống nhược sức, suy nhược cơ thể, kích thích các hoạt động não bộ, suy nhược tinh thần, chống ôxy hóa, chống lão hóa, phòng chống các loại ung thư, tăng sức đề kháng[4] và được đưa vào sách đỏ Việt Nam năm 2007. Vì thế nhằm phát triển nguồn dược liệu quý và thực hiện chủ trương của nhà nước về hình thành vùng trồng dược liệu, đồng thời góp phần đánh giá nguồn nguyên liệu Đảng sâm Việt Nam, trong nghiên cứu này, chúng tôi tiến hành xây dựng tiêu chuẩn kiểm nghiệm Đảng sâm (*Codonopsis javanica)* 3 năm tuổi trồng làm nguyên liệu tại Lâm Đồng.

Áp dụng các phương pháp lý hóa để khảo sát độ ẩm, định tính các nhóm hoạt chất chủ yếu và bằng pháp sắc ký lớp mỏng đã xác định sự hiện diện của lobetyolin trong Đảng sâm (*Codonopsis javanica)* 3 năm tuổi trồng tại Lâm Đồng. Từ đó, góp phần tiêu chuẩn hóa và kiểm nghiệm chất lượng Đảng sâm (*Codonopsis javanica*) 3 năm tuổi trồng làm nguyên liệu tại Lâm Đồng.

ĐỐI TƯỢNG - PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

Đối tượng nghiên cứu

Rễ Đảng sâm 3 năm tuổi trồng tại Công ty TNHH Cao Lâm, Đà Lạt, Lâm Đồng.

Lobetyolin được phân lập từ Rễ Đảng sâm 3 năm tuổi tại Trung tâm Sâm và dược liệu Tp.HCM.

Phương tiện

Hóa chất: Methanol (TQ); anhydric acetic (Merck); diethyl ether (TQ), cloroform (TQ); n-butanol (TQ), acid acetic (TQ)

Dụng cụ: Máy siêu âm (εlma, LC60H); tủ sấy; bể cách thủy; bình sắc ký; cân có độ chính xác 0,1 mg (Mettler Tolerdo, AB204).

Phương pháp nghiên cứu

Khảo sát đặc điểm thực vật học:

Mô tả cấu tạo giải phẫu và bột dược liệu qua kính hiển vi sau khi đã cắt ngang và nhuộm kép với carmin và lục iod hoặc đã xay dược liệu thành bột theo các phương pháp thường quy[2,1].

Phương pháp khảo sát độ ẩm, tro toàn phần, tro không tan trong acid[2]

Khảo sát độ ẩm (mất khối lượng do sấy khô) theo DĐVN IV, phụ lục 9.6, 1g, sấy ở 70°C đến khối lượng không đổi. Lặp lại thí nghiệm 3 lần.

Khảo sát tro toàn phần theo DĐVN IV, phụ lục 9.8. Lặp lại thí nghiệm 3 lần.

Khảo sát tro không tan trong acid theo DĐVN IV, phụ lục 9.7. Lặp lại thí nghiệm 3 lần.

Định tính bằng phương pháp hóa học[2,1]

Lấy 5 g bột dược liệu (rây qua rây số 355), thêm 20 ml ethanol 70% (TT), đun cách thuỷ trong 15 phút. Lọc lấy dịch trong để làm các phản ứng sau:

Cho 5 ml dịch chiết vào ống nghiệm, cô cạn, thêm 5 ml nước cất, bịt miệng ống, lắc 15 giây. Cột bọt bền ít nhất trong vòng 10 phút

Lấy 1 ml dịch chiết vào ống nghiệm sạch, cô cạn, hoà tan cắn bằng 1 ml cloroform (TT). Thêm 1 ml anhydric acetic băng (TT), thêm từ từ theo thành ống 1 ml acid sulfuric (TT). Xuất hiện vòng tím đậm giữa 2 lớp dung dịch thử.

Định tính bằng phương pháp sắc ký lớp mỏng[3]

Điều kiện sắc ký: Bản mỏng nhôm Silicagel $60F_{254}$ (dày 0,25 mm, 20 x 20 cm) Merck, Germany

Bản mỏng: *Silica gel G.*

Dung môi khai triển: n - butanol - acid acetic - nước (7: 1: 0,5).

Dung dịch thử: Lấy 5 g bột dược liệu, chiết siêu âm với methanol (20 ml x 2 lần) trong 30 phút, lọc. Tập trung dịch lọc, cô dịch lọc còn 2 ml để chấm sắc ký lớp mỏng.

Dung dịch chuẩn: Hòa tan lobetyolin trong methanol để được dung dịch có chứa 1 mg/ml.

Cách tiến hành: Chấm riêng biệt lên bản mỏng 20 µl mỗi dung dịch trên. Sau khi triển khai sắc ký, để khô bản mỏng ở nhiệt độ phòng. Quan sát dưới ánh sáng tử ngoại ở bước sóng 254 nm, trên sắc ký đồ của dung dịch thử phải có vết cùng tắt quang và cùng giá trị R_f với vết lobetyolin trên sắc ký đồ của dung dịch đối chiếu. Phun dung dịch acid sulfuric 10 % trong ethanol. Sấy bản mỏng ở 105 °C trong 5 phút, trên sắc ký đồ của dung dịch thử phải có vết cùng màu có cùng giá trị R_f với vết lobetyolin chuẩn trên sắc ký đồ của dung dịch đối chiếu.

Chất chiết được trong dược liệu theo DĐVN IV, phương pháp chiết nóng, dùng nước làm dung môi.

Định lượng[2]

Cân chính xác khoảng 5 g bột dược liệu (đã qua rây số 355), thêm 50 ml *ether dầu hỏa (30 °C đến 60 °C) (TT)*, chiết bằng bình Soxhlet đến khi hết chất béo (khoảng 6 giờ), lấy bã bay hết hơi ether. Chiết tiếp như trên bằng 50 ml *cloroform (TT)* trong 3 giờ, lấy bã bay hết hơi cloroform. Chiết tiếp như trên bằng 50 ml *methanol (TT)* trong 6 giờ. Lấy dịch chiết methanol cất thu hồi dung môi dưới áp suất giảm được cắn, thêm 30 ml *nước cất* để hòa tan cắn. Lắc dung dịch này với *n-butanol bão hòa nước* cho đến khi lớp n-butanol không còn có màu. Gộp dịch n-butanol, rửa 3 lần bằng *nước cất*. Lấy dịch butanol cất thu hồi n-butanol được cắn. Hòa tan cắn bằng 2 ml *ethanol 80 % (TT)* rồi chuyển vào một cốc đã được xác định khối lượng trước. Bốc hơi trên cách thủy được cắn. Sấy khô cắn ở 105°C, trong 3 giờ. Cân cắn.

Tính hàm lượng saponin toàn phần (X %) theo công thức sau:

$$X\ \% = \frac{a \times 100}{m \times (100 - d)} \times 100$$

Trong đó:

a là khối lượng cắn saponin thu được (g);

d là độ ẩm của dược liệu (%);

m là khối lượng dược liệu đã dùng (g).

Hàm lượng saponin toàn phần không nhỏ hơn 3,0 % tính theo dược liệu khô kiệt.

KẾT QUẢ

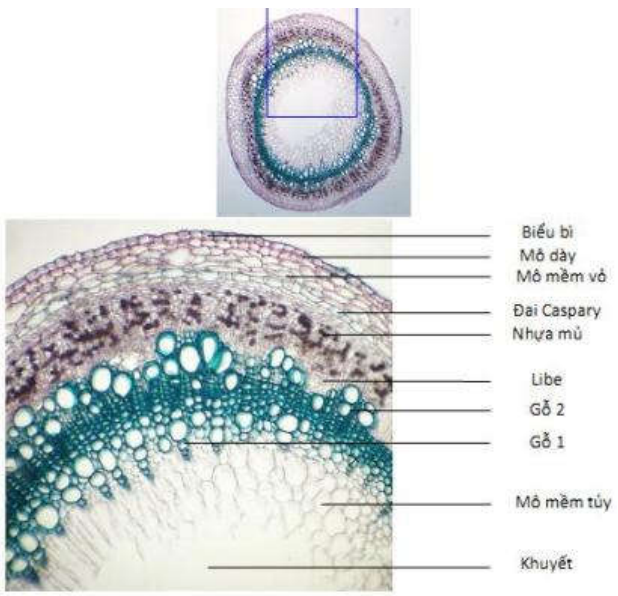
Khảo sát đặc điểm thực vật học

Mô tả

Rễ hình trụ, mọc thẳng trong đất, phía dưới có khi phân nhánh. Đầu trên phát triển to, có nhiều sẹo của thân cũ. Rễ nạc, màu trắng ngà, giữa có lõi gỗ, có nhựa mủ màu trắng như sữa, trên có những rãnh dọc và ngang, chia rễ thành những đường lồi lõm, dễ bẻ, vết bẻ không phẳng, không mịn, màu vàng nâu nhạt, mùi thơm, vị ngọt nhẹ. Đường kính 2,5 – 2,8 cm, chiều dài 13,4 -14 cm và khối lượng 25, 1 – 25, 9 g.

Đặc điểm vi phẫu

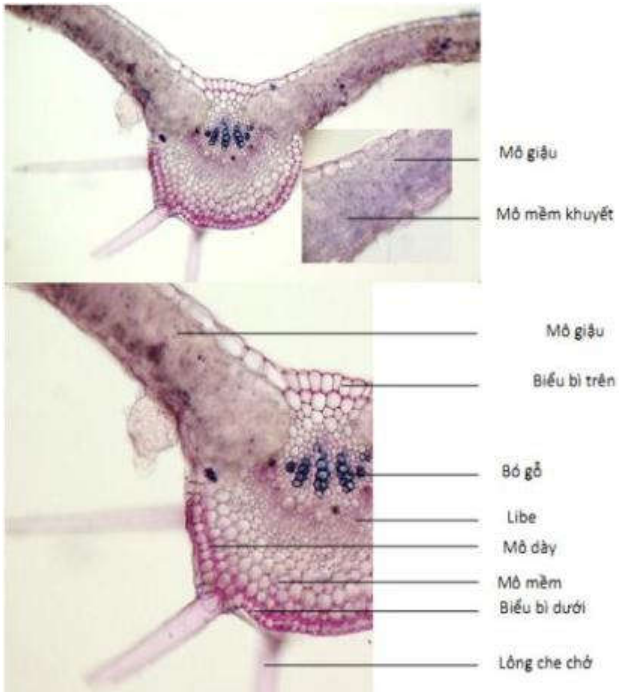
Thân



Hình 1. *Vi phẫu thân Đảng sâm Việt Nam 3 tuổi*

Thân có tiết diện hình bầu dục. Cấu tạo vi phẫu thân từ ngoài vào trong ta thấy lớp biểu bì nằm ngoài cùng gồm một lớp tế bào hình chữ nhật có lớp cutin. Kế đến gồm 2-3 lớp mô dày phiến, mô mềm vỏ gồm 1-2 lớp có vách mỏng nhăn nheo, đai Caspary. Có nhiều nhựa mủ. Libe 1 và libe 2 sắp xếp không rõ ràng. Gỗ 2 phát triển đẩy libe ra ngoài và đẩy gỗ 1 vào trong. Gỗ 1 phân hóa li tâm. Mô mềm tủy có nhiều hình dạng không đều. Ở giữa thân có một khuyết rộng.

Lá



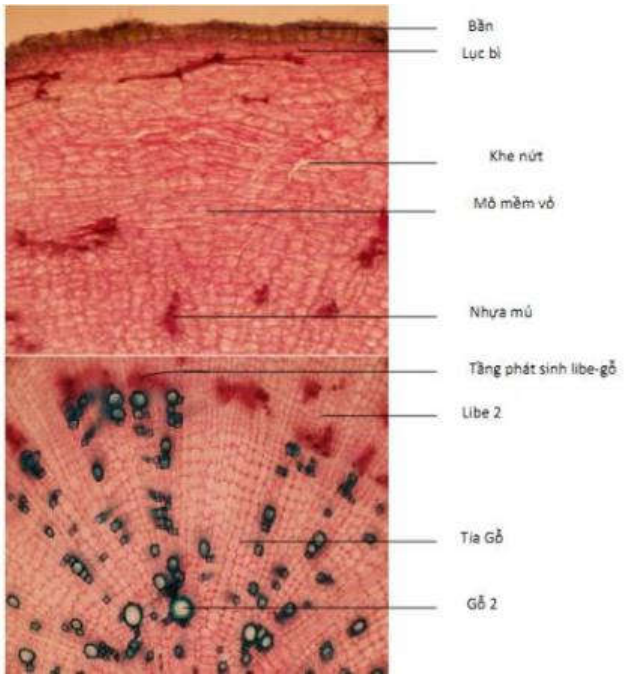
Hình 2. *Vi phẫu lá Đảng sâm Việt Nam 3 tuổi*

Cấu tạo của gân chính: Gân lá một mặt lồi, lồi ở dưới. Ngoài cùng là lớp biểu bì trên và biểu bì dưới cấu tạo bởi 1 lớp tế bào hình chữ nhật đứng. Biểu bì dưới có những lông che chở rất to. Dưới biểu bì có 1-2 lớp mô dày góc làm nhiệm vụ nâng đỡ. Mô mềm gồm những tế bào hình đa giác, kích thước không đều. Bó libe gỗ xếp gần như hình lưỡi liềm. Bó gỗ nằm sát kề nhau, được phân cách bởi những tế bào mô mềm. Libe nằm dưới gỗ tạo thành hình vòng cung.

Cấu tạo của phiến lá: Phía ngoài cùng là biểu bì trên và biểu bì dưới. Biểu bì trên cấu tạo bởi những tế bào hình chữ nhật to nằm. Biểu bì dưới cấu tạo bởi những tế bào nhỏ hơn, có nhiều lông nhám. Dưới lớp biểu bì trên có một lớp mô giậu chứa nhiều lục lạp, dưới mô giậu là mô mềm khuyết.

Rễ

Vi phẫu cắt ngang rễ hình hơi tròn, từ ngoài vào trong gồm có: Bần gồm nhiều lớp tế bào có vách dày màu nâu hình chữ nhật tẩm suberin. Lục bì gồm 1-3 lớp tế bào màng mỏng cấu tạo bởi cellulose. Mô mềm vỏ phát triển gồm những tế bào vách mỏng hình đa giác, xếp lộn xộn. Thỉnh thoảng có những khe nứt. Ống nhựa mủ có tiết diện khá nhỏ, nằm rải rác ở vùng libe và cả vùng mô mềm vỏ. Tế bào libe nhỏ xếp xít nhau. Libe 2 vừa đồng tâm và xuyên tâm. Tầng phát sinh libe gỗ không liên tục. Gỗ 2 khá tập trung ở miền tủy và các bó gỗ xếp rải rác nằm riêng lẻ ở vùng tủy to nhỏ không đều. Vùng mô mềm vỏ hẹp, có nhiều khe nứt thể hiện rõ ở vùng mô mềm vỏ, tầng phát sinh libe-gỗ phát triển đặc biệt là gỗ 2 nên libe 1 và gỗ 1 không còn. Tia tủy xuất hiện và loe rộng hơn chia vùng libe gỗ thành những chùy hẹp. Mạch gỗ xếp thành hàng tạo thành hệ thống hình nan quạt tỏa ra từ tâm.



Hình 3. *Vi phẫu rễ Đảng sâm Việt Nam 3 tuổi*

Soi bột

- Bột rễ Đảng sâm Việt Nam có màu vàng nâu, mùi thơm, vị ngọt nhẹ.

- Quan sát dưới kính hiển vi thấy: Mảnh bần gồm các tế bào hình đa giác vách dày, mảnh mô mềm gồm các hình đa giác vách mỏng, khối inulin hình quạt, mảnh mạch mạng, tinh thể calci oxalat, khối nhựa màu, hạt tinh bột đơn lẻ có rốn phân nhánh, mảnh mạch điểm và tế bào mô cứng riêng lẻ màu vàng nhạt thành dày.

Hình 4. *Các cấu tử có trong bột rễ cây Đảng sâm Việt Nam*

- *Nhận xét:* Bột rễ Đảng sâm Việt Nam trồng và hoang dại có những cấu tử tương tự nhau và có khá đầy đủ các cấu tử theo DĐVN IV chuyên luận Đảng sâm Việt Nam[2]. Tuy nhiên một số cấu tử trong DĐVN IV chưa đề cập đến như mảnh bần, mạch mạng, khối nhựa màu và tế bào mô cứng.

Độ ẩm, tro toàn phần, tro không tan trong HCl

Bảng 1. *Độ ẩm, độ đồng đều khối lượng của chế phẩm*

Chỉ tiêu	Số lần lặp lại thí nghiệm	Trung bình	Yêu cầu DĐVN IV
Độ ẩm (%)	3	6,24 ± 0,26	≤ 15
Tro toàn phần (%)	3	3,44 ± 0,15	≤ 6
Tro không tan trong HCl (%)	3	0,05 ± 0,01	≤ 2,5

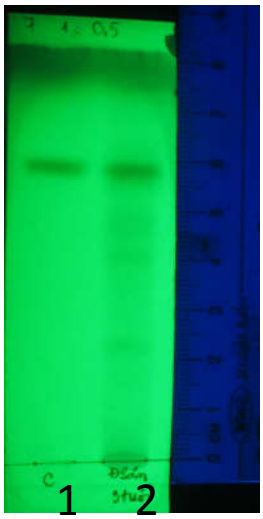
Định tính bằng phản ứng hóa học

Bảng 2. *Định tính bằng phản ứng hóa học*

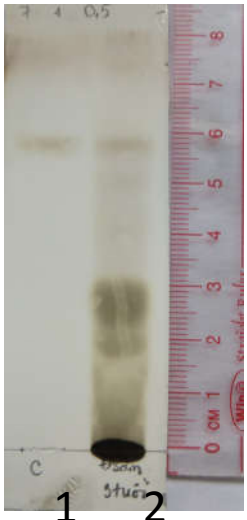
STT	Yêu cầu	Kết quả
1	Cột bọt bền ít nhất trong vòng 10 phút.	+
2	Xuất hiện vòng tím đậm giữa 2 lớp dung dịch thử.	+

Định tính bằng sắc ký lớp mỏng

n - butanol - acid acetic - nước (7: 1: 0,5)



Lobetyolin
Quan sát dưới ánh sáng tử ngoại ở bước sóng 254 nm



2. Dịch chiết Đảng sâm
Phun dung dịch acid sulfuric 10 % trong ethanol (TT). Sấy bản mỏng ở 105 °C trong 5 phút

Kết luận: Qua kỹ thuật phân tích bằng sắc ký lớp mỏng đã chứng minh trong Đảng sâm có sự hiện diện của lobetyolin.

Định lượng

Bảng 3. *Hàm lượng các chất trong bột rễ Đảng sâm Việt Nam*

Chỉ tiêu	Số lần lặp lại thí nghiệm	Trung bình	Yêu cầu DĐVN IV
Hàm lượng chất chiết được (%)	3	66,14± 1,73	≥ 2,5
Hàm lượng saponin toàn phần (%)	3	8,93 ± 0,69	≥ 3

Nhận xét: Hàm lượng chất chiết được theo DĐVN IV là không ít hơn 2,5 %. Trong khi đó Đảng sâm Bắc (*Codonopsis pisula*) thì DĐVN IV quy định là không được dưới 55,0% và dược liệu chuẩn của Hồng Kông quy định là không ít hơn 41,0% theo phương pháp chiết nguội dùng nước làm dung môi[3]. Vì vậy cần xem lại quy định của DĐVN IV về phần này.

TIÊU CHUẨN KIỂM NGHIỆM ĐỀ NGHỊ ĐẢNG SÂM 3 NĂM TUỔI

	Các tiêu chí	Yêu cầu
1	Mô tả	Rễ nạc hình trụ có khi phân nhánh, đường kính 0,5-2 cm, dài 6-15 cm. Đầu trên phát triển to, có nhiều sẹo của thân. Mặt ngoài màu vàng nâu nhạt, trên có những rãnh dọc và ngang, chia rễ thành những đường lồi lõm, thể chất chắc, dễ bẻ, vết bẻ không phẳng, không mịn. Mùi thơm, vị ngọt nhẹ.
2	Vi phẫu	Lớp bần gồm 4 - 5 hàng tế bào hình chữ nhật xếp đều đặn thành hàng đồng tâm và dãy xuyên tâm, có nhiều chỗ bị nứt rách. Mô mềm vỏ cấu tạo bởi tế bào nhiều cạnh, hơi dài dẹt. Tế bào libe nhỏ xếp xít nhau. Mạch gỗ xếp thành hàng tạo thành hệ thống hình nan quạt toả ra từ tâm. Tia ruột có tế bào thành mỏng.
3	Soi bột	Màu vàng nâu, mùi thơm, vị ngọt nhẹ. Mảnh mô mềm, khối inulin có nhiều hình dạng, hạt tinh bột đơn lẻ có rốn phân nhánh, mảnh mạch điểm, tinh thể calci oxalat hình khối.
4	Mất khối lượng do sấy khô	Không quá 15%
5	Tro toàn phần	Không quá 6%
6	Tro không tan trong acid	Không quá 2%
7	Định tính Phương pháp hóa học	Lấy 5 g bột dược liệu (rây qua rây số 355), thêm 20 ml *ethanol 70% (TT)*, đun cách thuỷ trong 15 phút. Lọc lấy dịch trong để làm các phản ứng sau: Cho 5 ml dịch chiết vào ống nghiệm, cô cạn, them 5 ml nước cất, bịt miệng ống, lắc 15 giây. Cột bọt bền ít nhất trong vòng 10 phút.

	Các tiêu chí	Yêu cầu
	Sắc ký lớp mỏng	Lấy 1 ml dịch chiết vào ống nghiệm sạch, cô cạn, hoà tan cắn bằng 1 ml *cloroform (TT)*. Thêm 1 ml *anhydric acetic băng (TT)*, thêm từ từ theo thành ống 1 ml *acid sulfuric (TT)*. Xuất hiện vòng tím đậm giữa 2 lớp dung dịch thử. *Bản mỏng*: *Silica gel G.* *Dung môi khai triển: n - butanol - acid acetic - nước* (7: 1: 0,5). *Dung dịch thử*: Lấy 5 g bột dược liệu, chiết siêu âm với methanol (20 ml x 2 lần) trong 30 phút, lọc. Tập trung dịch lọc, cô dịch lọc còn 2ml để chấm sắc ký lớp mỏng. *Dung dịch chuẩn*: Hòa tan lobetyolin trong *methanol (TT)* để được dung dịch có chứa 1 mg/ml. *Dung dịch thử:* *Cách tiến hành*: Chấm riêng biệt lên bản mỏng 20 µl mỗi dung dịch trên. Sau khi triển khai sắc ký, để khô bản mỏng ở nhiệt độ phòng. Quan sát dưới ánh sáng tử ngoại ở bước sóng 254 nm, trên sắc ký đồ của dung dịch thử phải có vết cùng tắt quang và cùng giá trị R_f với vết lobetyolin trên sắc ký đồ của dung dịch đối chiếu. Phun *dung dịch acid sulfuric 10 % trong ethanol (TT)*. Sấy bản mỏng ở 105 ^oC trong 5 phút, trên sắc ký đồ của dung dịch thử phải có vết cùng màu có cùng giá trị R_f với vết lobetyolin chuẩn trên sắc ký đồ của dung dịch đối chiếu.
9	Chất chiết được trong dược liệu	Không ít hơn 55%
10	Hàm lượng saponin toàn phần	Không nhỏ hơn 3,0 %.

Lời cám ơn: *Tập thể thực hiện chân thành cám ơn sự tài trợ của Sở KHCN tỉnh Lâm Đồng cho đề tài này.*

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Bộ môn dược liệu Trường Đại học Y dược TP. HCM (2006*). Giáo trình "Phương pháp nghiên cứu dược liệu*.
2. Bộ Y tế (2009). *Dược điển Việt Nam IV*. Nhà xuất bản, tr. 752-754.
3. Deparment of Health, Hong Kong special administrative region, The people's republic of China (2013), Hong Kong chinese materia medica standards, 2, pp. 138.
4. Viện dược liệu (2003*). Cây thuốc và động vật làm thuốc, tập 1*". Nhà xuất bản Khoa học kỹ thuật, tr.739-743.

Ngày nhận bài báo: *27/02/2015*
Ngày phản biện nhận xét bài báo: *15/05/2015*
Ngày bài báo được đăng: *08/09/2015*