

NGHIÊN CỨU XÂY DỰNG TIÊU CHUẨN CƠ SỞ DƯỢC LIỆU TAM THẮT HOANG

Nguyễn Quang Vinh¹, Nguyễn Thị Phương², Bùi Tuấn Anh¹,
Trần Văn Tú¹, Vũ Thị Hải¹, Lê Huy Công¹

TÓM TẮT

Tiêu chuẩn cơ sở dược liệu Tam thất hoang được xây dựng bao gồm: Mô tả, vi phẫu, soi bột, độ ẩm, tro toàn phần, tạp chất khác, định tính và định lượng. Kết quả nghiên cứu cho thấy dược liệu Tam thất hoang thường nhiều đốt, cong ngoằn ngoèo, dài 3 - 10 cm, đường kính 0,3 - 1,0 cm; Mặt ngoài màu nâu hay màu vàng xám, có những vết nhăn dọc, mảnh, mùi thơm nhẹ đặc trưng, vị đắng, hơi ngọt. Vi phẫu thân thấy có lớp bản gồm từ 7 - 10 lớp tế bào hình chữ nhật, xếp chồng lên nhau, đều đặn; Mô mềm vỏ chứa nhiều hạt tinh bột, rải rác có những ống tiết chứa chất nhựa và tinh thể calci oxalat hình cầu gai; Libe - gỗ xếp thành từng bó hướng vào tâm; Mạch gỗ rất ít. Bột có màu nâu nhạt, vị thơm, vị hơi ngọt; Hạt tinh bột hình tròn, hình chuông hay hình nhiều cạnh. Hàm ẩm không quá 13 %, độ tro không quá 8 %, định tính dược liệu phải có acid oleanolic và hàm lượng AO không được thấp hơn 1%. Nghiên cứu này góp phần kiểm soát tốt chất lượng và nâng cao giá trị của dược liệu Tam thất hoang.

Từ khóa: Tam thất hoang, tiêu chuẩn cơ sở dược liệu, mô tả, vi phẫu

I. ĐẶT VẤN ĐỀ

Tam thất hoang (*Panax stipuleanatus* H. T. Tsai et K. M. Feng) là một trong 12 loài thuộc chi *Panax* - họ nhân sâm (Araliaceae) đã được các nhà khoa học trên thế giới nghiên cứu. Ở Việt Nam loài này chỉ xuất hiện ở huyện Sa Pa (núi Hàm Rồng - thị trấn Sa Pa và xã Tả Phìn) và huyện Bát Xát (xã Trung Lèng Hồ), tỉnh Lào Cai. Tam thất hoang là loại cây ưa bóng, ưa ẩm thích hợp với nền khí hậu quanh năm mát mẻ. Đây là nguồn gen quý, có giá trị, thuộc nhóm rất nguy cấp (CR) trong sách đỏ Việt Nam 2007 và nằm trong nhóm IIa của Nghị Định 32-CP.

Thành phần hóa học chính của Tam thất hoang là các saponin triterpen khung olean (Trần Công Luận và *ctv.*, 2009). Tam thất hoang đã được chứng minh có các tác dụng: Giúp lưu thông tuần hoàn máu, giảm lượng Cholesterol trong máu, hạ đường huyết, kích thích hệ miễn dịch, ức chế vi khuẩn và siêu vi khuẩn, chống viêm tấy giảm đau... (Nguyễn Thị Thu Hương và *ctv.*, 2009).

Nghiên cứu dược lý cho thấy căn chiết ethanol thân rễ và rễ củ của loài Tam thất hoang có khả năng giảm stress, saponin toàn phần có tác dụng chống oxy hóa. Ngoài ra các polyacetylen có tác dụng độc với một số dòng tế bào ung thư (Liang C, 2010, 2013).

Do là cây thuốc quý, hiếm gặp trong tự nhiên, giá bán cao nên Tam thất hoang thường xuyên bị tìm kiếm khai thác dẫn đến suy giảm nghiêm trọng số lượng cá thể và quần thể, nhiều nơi trong rừng tự nhiên hầu như không còn nguồn gen quý này. Mặc dù là một dược liệu quý nhưng cho đến nay những công trình nghiên cứu trong nước về loài này còn ít. Để góp phần hoàn thiện các nghiên cứu về loài cây

này, nhóm nghiên cứu đã tiến hành khảo sát các chỉ tiêu để xây dựng tiêu chuẩn cơ sở cho dược liệu Tam thất hoang.

II. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Vật liệu nghiên cứu

Thân rễ và rễ củ Tam thất hoang thu hái tại Vườn Quốc gia Hoàng Liên.

2.2. Hóa chất - thuốc thử

Các dung môi, hóa chất sử dụng đều đạt tiêu chuẩn hóa chất tinh khiết phân tích (PA). Các dung môi dùng cho phân tích sắc ký (TLC, HPLC) đều được mua của hãng Merck (hoặc tương đương). Chất chuẩn acid oleanolic (AO) của hãng Sigma-Aldrich, độ tinh khiết đạt 98,0%.

2.3. Phương pháp nghiên cứu

Xây dựng tiêu chuẩn dược liệu Tam thất hoang dựa trên các chỉ tiêu chung được quy định tại dược điển Việt Nam gồm: Mô tả, soi bột, vi phẫu, độ ẩm dược liệu, tro toàn phần, định tính, định lượng... (Bộ Y tế, 2009).

- Mô tả: Mô tả bằng cảm quan, kiểm tra kích thước bằng cách đo.

- Vi phẫu, bột: Phương pháp hiển vi, thử theo Dược điển Việt Nam IV (ĐĐVN IV), phụ lục 12.18.

- Hàm ẩm: Phương pháp cân, thử theo ĐĐVN IV, Phụ lục 9.6

- Độ tro: Thử theo ĐĐVN IV, Phụ lục 9.8.

- Định tính: Acid oleanolic bằng phương pháp sắc ký lớp mỏng. Bản mỏng: *Silica gel 60F₂₅₄* (Merck); Dung môi khai triển: n-hexan/ethyl acetat (4/1).

¹ Vườn Quốc gia Hoàng Liên; ² Viện Dược liệu

+ Dung dịch thử: Cân khoảng 1,0 g rễ tam thất hoang đã xay nhỏ cho vào bình cầu dung tích 50 ml, có nút nhám, thêm 20 ml dung môi methanol chứa acid chlohydric 2% (TT), đun hồi lưu cách thủy ở nhiệt độ 70°C trong 1 giờ. Để nguội bình cầu về nhiệt độ phòng, lọc lấy dịch chiết. Cô dịch chiết đến cạn, hòa tan cân bằng 5 ml methanol (TT), lọc, thu được dung dịch thử.

+ Dung dịch đối chiếu 1: Dung dịch acid oleanolic 0,5 mg/ml trong methanol (TT).

+ Dung dịch đối chiếu 2: Lấy 1,0 g bột rễ tam thất hoang đối chiếu, tiến hành chiết như dung dịch thử.

+ Cách tiến hành: Chấm riêng biệt lên bản mỏng 10 µl mỗi dung dịch thử và các dung dịch đối chiếu. Sau khi khai triển, bản mỏng được để bay hết dung môi ở nhiệt độ phòng. Phun thuốc thử dung dịch acid sulfuric 10% trong ethanol, sấy bản mỏng ở 105°C đến khi xuất hiện rõ các vết.

- Định lượng: Định lượng acid oleanolic (AO) bằng phương pháp sắc ký lỏng cao áp hiệu năng cao (HPLC).

+ Hệ thống, thiết bị và điều kiện phân tích HPLC

Hệ thống HPLC (Shimadzu, Nhật Bản), gồm: bơm LC-20AD, bộ tiêm mẫu tự động SIL-20AHT, detector UV-VIS, phần mềm Labsolution để truy xuất hình ảnh và số liệu trên máy HPLC. Phần mềm Excel được sử dụng để tính toán kết quả.

Điều kiện phân tích HPLC: cột pha đảo Ascentis C18 (250 mm x 4,6 mm; 5 µm), detector UV-VIS (bước sóng 205 nm); pha động là nước và acetonitril (tỷ lệ 20 – 80), chế độ rửa giải đẳng dòng; tốc độ rửa giải là 0,5 ml/phút; thể tích mẫu tiêm vào cột là 10 µl.

+ Chuẩn bị mẫu

Mẫu chuẩn AO: cân chính xác 5,0 mg chất chuẩn AO, hòa tan trong 5,00 ml methanol. Các dung dịch chuẩn AO có nồng độ nhỏ hơn được chuẩn bị bằng cách pha loãng dung dịch trên bằng methanol.

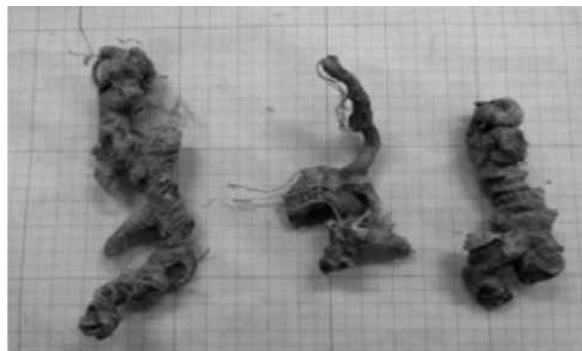
Mẫu thử: Cân chính xác khoảng 2,0 g mẫu thử (đã xay nhỏ và xác định độ ẩm) cho vào bình cầu 250 ml, thêm khoảng 100 ml methanol chứa acid chlohydric 2% , chiết hồi lưu cách thủy trong 2 giờ. Để nguội về nhiệt độ phòng. Lọc lấy dịch chiết, cô dịch chiết đến cạn. Hòa cân bằng 50 ml methanol, lọc vào bình định mức 50 ml, định mức vừa đủ bằng methanol. Lọc qua màng lọc cellulose acetat 0,45 µm trước khi tiêm vào cột.

III. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Mô tả dược liệu Tam thất hoang

Thân rễ thường nhiều đốt, cong ngoằn ngoèo, ít

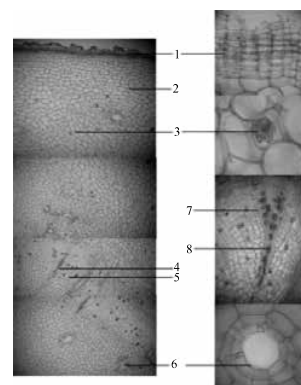
khi có hình trụ thẳng, dài 3 - 10 cm, đường kính 0,3 - 1,0 cm. Mặt ngoài màu nâu hay màu vàng xám, có những vết nhăn dọc, mảnh; những vết vân ngang nổi rõ chia thân rễ thành nhiều đốt, đặc biệt có nhiều sẹo do thân khí sinh hàng năm tàn lụi để lại. Thế chất cứng chắc, giòn, dễ bẻ, mặt bẻ lờm chờm, màu xám nhạt. Mùi thơm nhẹ đặc trưng, vị đắng, hơi ngọt (Hình 1).



Hình 1. Hình ảnh dược liệu Tam thất hoang

3.2. Vi phẫu dược liệu Tam thất hoang

Quan sát từ ngoài vào trong thấy có: Lớp vỏ gồm từ 7 - 10 lớp tế bào hình chữ nhật, xếp chồng lên nhau, đều đặn. Mô mềm vỏ gồm tế bào có kích thước và hình dạng khác nhau, chứa nhiều hạt tinh bột, rải rác có chứa những ống tiết chứa chất nhựa và tinh thể calci oxalat hình cầu gai. Libe - gỗ xếp thành từng bó hướng vào tâm, libe nằm ngoài, gỗ nằm trong, các bó libe-gỗ cách nhau bởi những tia ruột, gồm nhiều tế bào (bên trong có chứa tinh bột). Mạch gỗ rất ít (Hình 2).

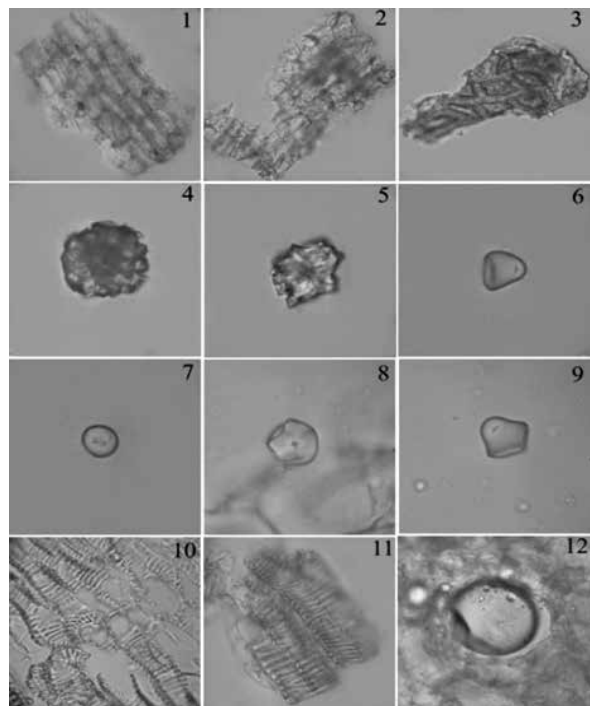


Hình 2. Vi phẫu cắt ngang rễ Tam thất hoang
1. Vỏ, 2. Mô mềm, 3. Tinh thể calci oxalat, 4. Bó libe-gỗ, 5. Tia ruột, 6. Ống tiết, 7. Libe, 8. Gỗ

3.3. Đặc điểm bột dược liệu Tam thất hoang

Bột có màu nâu nhạt, vị thơm, vị hơi ngọt. Quan sát dưới kính hiển vi thấy có: mảnh bản là những tế bào hình chữ nhật hay nhiều cạnh, thành dày.

Mảnh mô mềm gồm tế bào hình nhiều cạnh, hoặc tròn, thành mỏng, có chứa hạt tinh bột và nhiều tinh thể calci oxalat hình cầu gai. Đôi khi thấy ống tiết trong có chất tiết màu vàng nâu. Hạt tinh bột hình tròn, hình chuông hay hình nhiều cạnh. Mạch mạng, mạch vạch, mô dày (Hình 3).



Hình 3. Bột dược liệu Tam thất hoang

1- *Mảnh bản*; 2- *Mảnh mô mềm*; 3- *Mô dày*;
4,5- *Tinh thể calci oxalat*; 6,7,8,9- *Hạt tinh bột*;
10- *Mảnh mạch mạng*; 11- *Mạch vạch*; 12- *Ống tiết*

3.4. Kết quả kiểm tra hàm ẩm và độ tro của các mẫu dược liệu Tam thất hoang

Từ kết quả bảng 1 cho thấy hàm ẩm và độ tro của các mẫu Tam thất hoang lần lượt là $10,1 \pm 0,9$; $11,0 \pm 0,8$; $12,4 \pm 1,0$; $6,06 \pm 0,15$; $5,56 \pm 0,40$; $4,98 \pm 0,17$.

Tiêu chuẩn Tam thất hoang để xuất hàm ẩm không quá 13,0 % và độ tro không quá 8%.

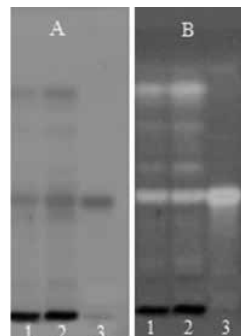
Tiêu chuẩn cơ sở Tam thất hoang qui định tạp chất không quá 1 %.

Bảng 1. Hàm ẩm và độ tro của các mẫu dược liệu Tam thất hoang

TT	Mẫu đánh giá	Hàm ẩm (%)	Độ tro
1	Mẫu 1	$10,1 \pm 0,9$	$6,06 \pm 0,15$
2	Mẫu 2	$11,0 \pm 0,8$	$5,56 \pm 0,40$
3	Mẫu 3	$12,4 \pm 1,0$	$4,98 \pm 0,17$
Trung bình		11,16 %	5,53 %

3.5. Định tính acid oleanolic bằng phương pháp sắc ký lớp mỏng

Tiến hành định tính acid oleanolic bằng phương pháp sắc ký lớp mỏng. Kết quả được trình bày tại hình 4.



Hình 4. Sắc ký đồ TLC định tính Tam thất hoang
1, 2: *Mẫu tam thất hoang*;
3: *Chất đối chiếu acid oleanolic*

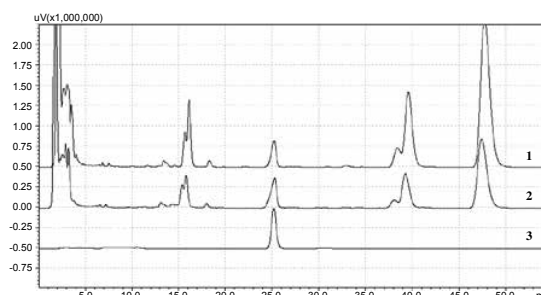
Kết quả cho thấy sắc ký đồ TLC mẫu thử cho các vết tách rõ ràng, trong đó có 01 vết Rf khoảng 0,5 có cùng màu hồng và cùng Rf với vết của mẫu đối chiếu AO, chứng tỏ lựa chọn định tính AO là thích hợp.

3.6. Hàm lượng AO trong các mẫu dược liệu Tam thất hoang

Kết quả định lượng AO cho thấy, trên sắc đồ HPLC của các mẫu thử đều có pic cùng thời gian lưu với pic của AO và hàm lượng AO tổng số của các mẫu tam thất đều trên 1 %, trung bình khoảng 1,3 %, vì vậy tiêu chuẩn Tam thất hoang để xuất hàm lượng acid olealic không được thấp hơn 1 %.

Bảng 2. Kết quả hàm lượng AO trong các mẫu Tam thất hoang

TT	Mẫu đánh giá	Hàm lượng % AO
1	Mẫu 1	$1,54 \pm 0,09$
2	Mẫu 2	$1,12 \pm 0,08$
3	Mẫu 3	$1,32 \pm 0,08$



Hình 5. Sắc ký đồ HPLC định lượng acid oleanolic trong Tam thất hoang
1, 2, 3: *Dược liệu Tam thất hoang*;
4: *Mẫu chuẩn acid oleanolic*

IV. KẾT LUẬN

Nghiên cứu đã xây dựng được các tiêu chí trong tiêu chuẩn của dược liệu Tam thất hoang gồm các chỉ tiêu: mô tả, hàm ẩm, độ tro, định tính, định lượng. Kết quả nghiên cứu cũng đã bước đầu đề xuất được giới hạn cần đạt trong tiêu chuẩn dược liệu Tam thất hoang: hàm ẩm không quá 13%, độ tro không quá 8%, định tính dược liệu phải có acid oleanolic và hàm lượng AO không được thấp hơn 1%. Chỉ tiêu mô tả, vi phẫu, bột phải giống như mô tả. Việc tiêu chuẩn hóa dược liệu Tam thất hoang sẽ giúp kiểm soát tốt hơn chất lượng của dược liệu này trên thị trường cũng như trong trồng trọt, thu hái, góp phần nâng cao giá trị của dược liệu này.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

BỘ Y TẾ, 2009. *Dược điển Việt Nam IV*. Nhà xuất bản Y học, tr 348-349.

Nguyễn Thị Thu Hương, Trần Công Luận, Nguyễn Tập, 2009. Nghiên cứu một số tác dụng dược lý của Tam thất hoang *Panax stipuleanatus* Tsai et Feng, họ Araliaceae. *Tạp chí Dược liệu*, 14(2): 99-103.

Trần Công Luận, Lưu Thảo Nguyên, Nguyễn Tập, 2009. Nghiên cứu thành phần hóa học của hai loài Sâm vũ diệp và Tam thất hoang. *Tạp chí Dược liệu*, 14(1): 17-23.

Liang C, 2010. Oleanane-type triterpenoids from *Panax stipuleanatus* and their anticancer activities. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 20: 7110-7115.

Liang C, 2013. Oleanane-triterpenoids from *Panax stipuleanatus* inhibit NF-kB. *Journal of Ginseng Research*, 37(1): 74-79.

Establishment of baseline standards for medicinal herb (*Panax stipuleanatus*)

Nguyen Quang Vinh, Nguyen Thi Phuong,
Bui Tuan Anh, Tran Van Tu, Vu Thi Hai, Le Huy Cong

Abstract

The baseline standards for medicinal herb (*Panax stipuleanatus*) were established based on: Morphological characterization, microsurgery, powder, moisture, total ash, impurities. The research results showed that *Panax stipuleanatus* was curvy, scattered into several installments, each 3-10 cm long, 0.3-1.0 cm diameter. The outer surface was brown or yellowish-gray, with slim lines, fragments, slight odor, bitter taste, and slightly sweet taste. Vascular surgery consisted of 7 to 10 layers in rectangular shapes, stacked over equally. Soft shell contained many starch granules, occasionally appeared tubes containing the resin and crystalline calcium oxalate which is spherical hemisphere. Libe - the wood packs in a bunch directed to the core; Very few wood circuit. Powder was light brown, tasting slight sweet. Grain starch was round or multi-edged. Moisture content is not more than 13%, ash content is not more than 8%, qualitative pharmaceutical materials must contain oleanolic acid and AO content is not less than 1%. This research contributes to good quality control and enhances the value of *Panax stipuleanatus*.

Key words: *Panax stipuleanatus*, medicinal baseline standards, characterization, microsurgery

Ngày nhận bài: 18/6/2017

Ngày phản biện: 29/6/2017

Người phản biện: PGS. TS Nguyễn Thị Bích Thu

Ngày duyệt đăng: 27/7/2017

NGHIÊN CỨU XÂY DỰNG TIÊU CHUẨN CƠ SỞ DƯỢC LIỆU HOÀNG LIÊN Ô RÔ

Nguyễn Quang Vinh¹, Nguyễn Thị Phương², Bùi Tuấn Anh¹,
Trần Văn Tú¹, Vũ Thị Hải¹, Lê Huy Công¹

TÓM TẮT

Tiêu chuẩn cơ sở cho dược liệu Hoàng liên ô rô được xây dựng gồm: Mô tả, vi phẫu, soi bột, độ ẩm, tro toàn phần. Kết quả nghiên cứu cho thấy dược liệu Hoàng liên ô rô, thân hình trụ, màu vàng nhạt đường kính khoảng 0,5-2 cm, vỏ thân bề mặt sần sùi. Vi phẫu thân thấy có lớp bản gồm 1 - 2 lớp tế bào thành dày hình thoi, hình đa giác, xếp đều nhau, chứa nhiều đám sợi và đám tế bào mô cứng; Vùng libe dày; Tia ruột xuyên từ libe vào đến hết mạch gỗ, trên tia ruột vùng libe chứa các tinh thể canxi oxalat hình thoi, hình lăng trụ. Mô mềm ruột chiếm phần lớn thiết diện của thân, gồm những tế bào hình đa giác thành dày đã hóa cellulose một phần. Hàm ẩm không quá 12 %, độ tro không quá 8 %, định tính dược liệu phải có berberin chlorid và hàm lượng berberin chlorid không được thấp hơn 0,5%. Nghiên cứu này góp phần kiểm soát tốt chất lượng và nâng cao giá trị của dược liệu Hoàng liên ô rô.

Từ khóa: Hoàng liên ô rô, tiêu chuẩn cơ sở dược liệu, mô tả, vi phẫu

¹ Vườn Quốc gia Hoàng Liên, ² Viện Dược liệu