

ĐÁNH GIÁ TÍNH ỔN ĐỊNH VỀ ĐẶC ĐIỂM HÌNH THÁI VÀ HÀM LƯỢNG SAPONIN TOÀN PHẦN TRONG RỄ CÂY THUỐC NGƯU TẮT *IN VITRO*

Phó Thị Thủy Hằng*, Ngô Thị Thúy Ngân
 Trường Đại học Y Dược - ĐH Thái Nguyên

TÓM TẮT

Rễ là bộ phận chủ yếu dùng làm thuốc của cây Ngưu tất. Vì vậy, sau khi thu hoạch rễ, chúng tôi tiến hành đánh giá sự ổn định về đặc điểm hình thái và hàm lượng saponin toàn phần trong rễ cây Ngưu tất *in vitro* và cây trồng bằng hạt. Bằng các phương pháp như: phương pháp đánh giá tính ổn định về đặc điểm hình thái rễ, phương pháp định tính hợp chất saponin bằng các phản ứng màu: Liebermann-Burchard, phản ứng với dung dịch NaCl 1%, phương pháp tách chiết và định lượng hợp chất saponin. Chúng tôi đã thu được kết quả sau: không có sự khác biệt về đặc điểm hình thái rễ cây Ngưu tất *in vitro* và rễ cây trồng bằng hạt. Các phản ứng màu cho kết quả giống nhau và đương tính với hợp chất saponin. Hàm lượng saponin toàn phần trong rễ cây Ngưu tất *in vitro* không có sự khác biệt so với rễ cây trồng bằng hạt (khoảng 3,9% khối lượng khô).

Từ khóa: định lượng saponin, tách chiết saponin, *in vitro*, Ngưu tất

ĐẶT VẤN ĐỀ

Cây Ngưu tất đã được nhiều tác giả quan tâm nghiên cứu như Phan Hải Nam, Ngô Thị Xuyên, Đỗ Tất Lợi, Phạm Văn Sinh... Tuy nhiên các công trình này chủ yếu tập trung nghiên cứu về đặc điểm hình thái, giải phẫu, tác dụng dược lý mà chưa đề cập tới nhân giống cây thuốc này bằng kỹ thuật nuôi cấy *in vitro*. Năm 2011, chúng tôi đã tiến hành nuôi cấy *in vitro* thành công cây thuốc Ngưu tất và bước đầu đã đưa được cây ra môi trường tự nhiên. Năm 2015, chúng tôi tiếp tục đánh giá về hệ gen của cây *in vitro*, kết quả cho thấy hệ gen của cây ổn định, không xuất hiện những gen mới so với cây trồng bằng hạt. Kết quả trên cho thấy, môi trường nhân giống bước đầu phù hợp với cây Ngưu tất. Tuy nhiên, nhiều công trình nghiên cứu cho thấy trong quá trình nuôi cấy *in vitro* lâu dài, do ảnh hưởng của các chất kích thích sinh trưởng có thể gây ra sự biến đổi trong các quá trình sinh lý, sinh hóa dẫn đến sự biến đổi hàm lượng các chất quý trong cây. Saponin là một hợp chất quan trọng trong cây Ngưu tất, có tác dụng chính trong việc chữa bệnh của cây. Vì vậy, chúng tôi cần tiếp tục đánh giá sự ổn định của hợp chất saponin trong rễ cây Ngưu tất *in vitro*.

NỘI DUNG NGHIÊN CỨU

Đối tượng nghiên cứu

Rễ cây Ngưu tất *in vitro* và mẫu đối chứng là rễ cây Ngưu tất được trồng bằng hạt (trồng theo cách truyền thống).

Địa điểm nghiên cứu

Cây *in vitro* được trồng tại vườn ươm tại xóm Sơn Cầm, xã Sơn Cầm, Phú Lương, Thái Nguyên. Các thí nghiệm được tiến hành tại phòng Hóa hữu cơ thuộc khoa Hóa học - Trường Đại học Sư phạm Thái Nguyên

Phương pháp nghiên cứu

Phương pháp đánh giá tính ổn định về đặc điểm hình thái rễ cây Ngưu tất in vitro.

Theo dõi các chỉ tiêu như chiều dài rễ, đường kính rễ, số rễ cái/cây, số rễ con/cây, màu sắc rễ... Kết quả được so sánh với các chỉ tiêu tương ứng của đối chứng (ĐC) là rễ cây Ngưu tất được trồng bằng hạt ngoài tự nhiên.

Nhóm phương pháp nghiên cứu hợp chất saponin trong rễ cây Ngưu tất

Phương pháp định tính hợp chất saponin bằng các phản ứng màu

Sử dụng các phản ứng màu nhằm khẳng định sự có mặt của hợp chất saponin trong rễ cây Ngưu tất *in vitro* và rễ cây trồng bằng hạt ngoài tự nhiên.

* Tel: 0984 060452

Phản ứng Liebermann - Burchard: cho hỗn hợp gồm 1ml anhydrit axetic + 1ml CHCl_3 (Chlorofom) đã để lạnh ở 0°C vào ống nghiệm. Sau đó, thêm 1 giọt H_2SO_4 vào ống nghiệm. Bột Nguu tất được hoà tan trong CHCl_3 và cho vào hỗn hợp trên. Nếu xuất hiện các màu như xanh da trời, lục, hồng, cam, đỏ, và bền vững trong một thời gian là phản ứng dương tính. Chứng tỏ có saponin.

Phản ứng với dung dịch NaCl 1%: Hòa tan 0,5mg bột Nguu tất trong 3ml dung dịch NaCl 1%, sau đó đun sôi nhẹ, lọc, cho dịch lọc vào ống nghiệm, lắc đều. Nếu thấy xuất hiện nhiều bọt màu vàng bền vững chứng tỏ có saponin [1].

Phương pháp tách chiết và định lượng hợp chất saponin

Rễ Nguu tất sau khi thu hoạch được rửa sạch, sấy khô ở 80°C và nghiền thành bột mịn. Cân 20(g) bột Nguu tất cho vào túi giấy lọc rồi cho vào dụng cụ Soxhlet, thêm ether dầu hoả, đem chiết cách thủy trong 8 giờ để loại bỏ chất béo, chất màu. Sau đó lấy túi bột Nguu tất ra cho bay hơi hết dầu hoả, tiếp tục chiết saponin trong cồn 70° bằng dụng cụ Soxhlet, chiết đến khi dịch chiết cuối cùng không còn phản ứng của saponin. Dịch chiết cồn thu được đem cô cách thủy bằng máy cất thu hồi dung môi đến cạn. Hoà tan cạn trong 15 - 20ml nước cất nóng, sau đó để nguội. Lắc nhiều lần với n-butanol cho đến kiệt saponin. Cất thu hồi dung môi. Cặn chứa saponin toàn phần hoà vào một lượng nhỏ cồn 80° , sau đó thêm hỗn hợp aceton : ether (4:1) với thể tích gấp 2 - 3 lần thể tích hỗn hợp saponin trong cồn thấy xuất hiện tủa, lọc lấy tủa. Dịch lọc tiếp tục thêm hỗn hợp aceton : ether (4:1) để

tủa hết saponin. Tủa thu được đem sấy ở 80°C đến khối lượng không đổi, đem cân [2].

Hàm lượng saponin toàn phần trong rễ cây Nguu tất được tính như sau:

$$X = \frac{m}{b - p} * 100\%$$

Trong đó: X: hàm lượng saponin toàn phần (%)

m: khối lượng cần thu được (g)

b: khối lượng bột Nguu tất đem định lượng (g)

p: lượng nước (g) có trong b (g) bột Nguu tất đem định lượng

KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Kết quả đánh giá tính ổn định về đặc điểm hình thái rễ cây Nguu tất *in vitro*

Khi lá Nguu tất bắt đầu úa vàng thì tiến hành thu hoạch rễ, theo dõi một số chỉ tiêu hình thái nhằm so sánh rễ cây *in vitro* và rễ cây trồng bằng hạt (bảng 1). Chúng tôi sử dụng hàm t-Test Two Sample For Means với mức ý nghĩa 0,05 thuộc phần mềm Data analysis để xử lý số liệu thu được. Kết quả so sánh các giá trị trung bình đã xác định được sự khác nhau không có ý nghĩa ở mức $\alpha = 0,05$ (vì $T_{tn} < T_{\alpha}$) tức các giá trị trung bình không khác nhau với độ tin cậy 95% (bảng phụ 1). Như vậy, về mặt hình thái rễ cây *in vitro* không có sự khác biệt so với rễ cây trồng bằng hạt.

Kết quả nghiên cứu saponin toàn phần trong rễ cây Nguu tất *in vitro*

Trong các yếu tố cấu thành nên chất lượng sản phẩm cây Nguu tất thì hàm lượng saponin trong rễ là yếu tố quan trọng nhất, quyết định được tính và giá trị thương phẩm của cây Nguu tất.

Bảng 1. Một số chỉ tiêu theo dõi rễ cây *in vitro* và rễ cây trồng bằng hạt

Chỉ tiêu theo dõi	Cây trồng bằng hạt	Cây <i>in vitro</i>
Chiều dài rễ (cm)	16,02±0,06	15,83±0,08
Đường kính rễ(mm)	7,15±0,07	7,21±0,06
Số rễ cái/cây	2,23±0,12	2,26±0,14
Số rễ con/cây	5,32±0,09	5,21±0,05
Màu sắc rễ	nâu nhạt	nâu nhạt

Vì vậy, để đánh giá mức độ ổn định của cây *in vitro* và cây trồng bằng hạt, chúng tôi tiến hành định lượng hợp chất saponin và thực hiện các phản ứng màu định tính.

Kết quả định tính hợp chất saponin bằng các phản ứng màu

Kết quả thực hiện phản ứng Liebermann -Burchard cho thấy cả hai ống nghiệm đều cho màu cam đỏ và bền vững trong một thời gian dài.

Tiến hành phản ứng màu và mức độ tạo bọt của hai ống nghiệm là giống nhau (bọt màu vàng bền vững dâng lên 2,5 cm trong ống nghiệm). Như vậy, với kết quả phản ứng định tính bột Ngu ru tất với dung dịch NaCl 1% cho thấy sự biểu hiện hai phản ứng màu định tính đã khẳng định trong rễ cây Ngu ru tất *in vitro* và rễ cây Ngu ru tất trồng bằng hạt đều có chứa hợp chất saponin.



Phản ứng Liebermann-Burchard



Phản ứng với NaCl 1%

Hình 1. Hình ảnh định tính hợp chất saponin

Kết quả định lượng hợp chất saponin

Chúng tôi tiến hành tách chiết và định lượng hợp chất saponin toàn phần trong rễ cây Ngu ru tất *in vitro* và cây trồng bằng hạt. Sử dụng hàm t-Test Two Sample For Means với mức ý nghĩa 0,05 thuộc phần mềm Data analysis để xử lý số liệu thu được. Kết quả phân tích cho thấy tất cả các giá trị $T_{tn} < T_{\alpha}$. Như vậy, các giá trị trung bình không khác nhau ở mức ý nghĩa $\alpha = 0,05$ tức các giá trị trung bình không khác nhau với độ tin cậy 95% (bảng phụ 2). Kết quả trình bày ở bảng 2

Bảng 2. Hàm lượng hợp chất saponin trong rễ cây *in vitro* và rễ cây trồng bằng hạt

	m (g)	p(g)	b(g)	X (%)	X (%)
Cây tự nhiên	20,011	0,782	0,000	3,908	3,908±0,021
	20,013	0,811	0,000	4,052	
	20,006	0,753	0,000	3,764	
	20,009	0,814	0,000	4,068	
Cây <i>in vitro</i>	20,012	0,761	0,000	3,803	3,909±0,019
	20,014	0,772	0,000	3,857	

So sánh hàm lượng hợp chất saponin trong rễ cây Ngu ru tất *in vitro* và cây Ngu ru tất trồng bằng hạt chúng tôi nhận thấy, hàm lượng saponin trong rễ cây *in vitro* không có sự khác biệt so với trong rễ cây trồng bằng hạt. Hàm lượng saponin khoảng 3,9% khối lượng khô. Như vậy, trong quá trình nuôi cấy *in vitro* không làm thay đổi hàm lượng saponin trong rễ cây Ngu ru tất so với cây trồng bằng hạt. Tuy nhiên, kết quả theo dõi các chỉ tiêu của chúng tôi đều nhỏ hơn so với kết quả của một số tác giả khác (hàm lượng saponin khoảng 4% khối lượng khô). Điều này có thể do thời điểm chúng tôi thu hoạch rễ cây sớm hơn 1 tháng so với mùa thu hoạch của rễ cây Ngu ru tất.



Loại lipid bằng dung cụ Soxhlet



Chiết saponin bằng dung cụ Soxhlet



Cô can dịch chiết bằng máy cắt quay



Tách chiết saponin bằng phương pháp phân tích

Hình 2. Hình ảnh một số giai đoạn tách chiết và định lượng hợp chất saponin

KẾT LUẬN VÀ ĐỀ NGHỊ

Kết luận

1. Không có sự khác biệt về đặc điểm hình thái rễ cây Ngưu tất *in vitro* và rễ cây Ngưu tất trồng bằng hạt (cách trồng truyền thống).
2. Các phản ứng màu đã khẳng định trong rễ cây Ngưu tất *in vitro* và rễ cây Ngưu tất được trồng bằng hạt đều chứa hợp chất saponin.
3. Hàm lượng saponin trong rễ cây Ngưu tất *in vitro* không có sự khác biệt so với rễ cây trồng bằng hạt (khoảng 3,9% khối lượng khô). Như vậy, trong quá trình nuôi cấy *in vitro* không làm thay đổi hàm lượng saponin trong rễ cây Ngưu tất so với cây trồng bằng hạt.

Đề nghị

Tiếp tục đánh giá sự ổn định về thành phần hóa học, đặc biệt thành phần saponin trong rễ cây Ngưu tất *in vitro*.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Nguyễn Thái An (2008) "Nghiên cứu thành phần saponin và tinh dầu của các vị thuốc trong phương tiêu giao tán" *Tạp chí Dược học*, số 389, tr.27-30.
2. Mai Đăng Đầu (2005), "Nghiên cứu, thiết kế, chế tạo hệ thống thiết bị chiết xuất dược liệu và hoàn thiện quy trình công nghệ chiết xuất saponin từ Ngưu tất". *Tạp chí Công nghệ Sinh học*, số 35, tr.25-31.

3. <http://www.vienduoclieu.org.vn/nghiencuukhoahoc-1986-2001.htm>.

4. <http://www.yhocotruyen.hunedsoft.com>

5. <http://caythuocvn.com/Dlieuhoc/Duoclieu/Nguut.at.htm#Thanhphanhoahoc>.

Bảng phụ 1. Bảng xử lý số liệu kích thước rễ cây *in vitro* và cây trồng bằng hạt (sử dụng hàm t-Test: Paired Two Sample for Means)

In vitro		Tự nhiên			
15,83	16,35	15,23	15,24	14,12	15,36
15,81	16,92	15,97	15,93	15,56	16,46
14,92	15,36	14,23	14,14	15,81	16,01
14,68	18,01	14,02	14,98	14,96	16,02
16,32	17,43	14,26	16,23	15,83	16,63
15,94	14,83	14,68	16,02	15,64	15,05
16,02	14,64	12,54	16,38	16,03	14,69
15,56	15,63	14,36	15,25	16,12	16,26
15,81	15,84	13,98	15,23	17,02	17,98
13,96	15,83	15,36	15,02	15,95	18,63

t-Test: Paired Two Sample for Means		
	In vitro	Tự nhiên
Mean	15,833	16,024
Variance	0,07597	0,05991
Observations	30	30
Pearson Correlation	0,127878	
Hypothesized Mean Difference	0	
df	29	
t Stat	-1,32044	
P(T<=t) one-tail	0,098508	
t Critical one-tail	1,699127	
P(T<=t) two-tail	0,197016	
t Critical two-tail	2,045231	

Bảng phụ 2. Xử lý số liệu phân tích hàm lượng saponin (sử dụng hàm t-Test: Paired Two Sample for Means)

Hàm lượng saponin		t-Test: Paired Two Sample for Means	
cây tự nhiên	cây <i>in vitro</i>	tn	iv
4,052	3,803	Mean	3,907667
3,907	3,857	Variance	0,020736
3,764	4,068	Observations	3
		Pearson Correlation	-0,94487
		Hypothesized Mean Difference	0
		df	2
		t Stat	-0,01031
		P(T<=t) one-tail	0,496356
		t Critical one-tail	2,919987
		P(T<=t) two-tail	0,992713
		t Critical two-tail	4,302656

SUMMARY

AN EVALUATION OF THE STABILITY OF MORPHOLOGICAL CHARACTERISTICS AND THE TOTAL AMOUNT OF SAPONOSIDS IN ACHYRANTHES BIDENTATA IN VITRO ROOTS

Phó Thị Thủy Hằng*, Ngô Thị Thủy Ngân
College of Medicine and Pharmacy - TNU

The root of *achyranthes bidentata* is often used as a medicine. So, after harvesting the roots, we evaluated the stability of morphological characteristics and the total amount of saponosid in the roots of in-vitro type and seed-planted type. By several methods such as studying the morphological characteristics of the root, qualifying saponosid compounds though the reaction with colors: Liebermann - Burchard, qualifying saponosid compounds though the reaction with 1% NaCl solution, extracting and quantifying saponosid substance. Finally, we got the following results: there is no difference in the morphological characteristics of two types (in-vitro and seed-planted). These reactions resulted in the same color. The total amount of saponosid in the root of *achyranthes bidentata* in vitro is not different from that of seed-planted (approximately 3.9% weight).

Key words: *saponosid extract, medicinal plant achyranthes bidentata, in vitro planting, quantifying saponosid*