

**VIỆN HÀN LÂM KHOA HỌC VÀ CÔNG NGHỆ VIỆT NAM
VIỆN SINH THÁI VÀ TÀI NGUYÊN SINH VẬT**



VŨ ĐỨC THẮNG

**ĐIỀU TRA, THU THẬP MẪU CỬ BÌNH VÔI Ở MỘT SỐ TỈNH
VIỆT NAM VÀ XÂY DỰNG PHƯƠNG PHÁP ĐỊNH LƯỢNG
ROTUNDIN BẰNG SẮC KÝ LỚP MỎNG KẾT HỢP ĐO MẬT ĐỘ
QUANG (TLC-SCANNING)**

**NGÀNH : SINH HỌC THỰC NGHIỆM
MÃ NGÀNH : 60 42 01 14**

LUẬN VĂN THẠC SỸ SINH HỌC

**NGƯỜI HƯỚNG DẪN KHOA HỌC
TS. LÊ MINH HÀ**

Hà Nội, Tháng 12-2014

MỞ ĐẦU

Bình vôi là tên gọi của nhiều loài cây là dây leo có rễ củ thuộc chi *Stephania*, họ Tiết dê – Menispermaceae. Cây Bình vôi còn gọi là cây củ một, củ mỗi tròn, dây mỗi trơn, gà áp...[89].

Trên thế giới chi *Stephania* có khoảng trên 50 loài, ở Việt nam có khoảng 14 đến 16 loài. Các loài Bình vôi ở nước ta phân bố khá rộng trên cả 3 miền Bắc, Trung, Nam, thường gặp ở các vùng núi đá vôi: Tuyên Quang, Hoà Bình, Cao Bằng, Thanh Hoá, Lâm Đồng, Bà Rịa – Vũng Tàu...

Củ Bình vôi chứa chủ yếu các alkaloid với hàm lượng rất khác nhau trong từng loài, trong đó đặc biệt là hợp chất Rotundin (hay L-tetrahydropalmatin) chiếm hàm lượng lớn. Trong y học cổ truyền từ xa xưa củ Bình vôi đã được dùng dưới dạng sắc, ngâm rượu chữa mất ngủ, an thần, nhức đầu, sốt nóng, ho hen, ỉa, đau bụng, đau dạ dày, ho nhiều đờm, hen suyễn và khó thở. Hiện nay Rotundin được dùng chủ yếu để chữa bệnh mất ngủ và an thần. Rotundin nguồn gốc tự nhiên có những ưu điểm nổi bật như độc tính thấp, sự dung nạp thuốc tốt, mang lại giấc ngủ sinh lý. Sau khi ngủ không bị mệt mỏi và không gây nhức đầu như các loại thuốc tổng hợp từ hoá chất [5]. Các nghiên cứu gần đây nhất còn cho thấy Rotundin khi sử dụng với liều thấp còn có tác dụng làm giảm ảnh hưởng gây nghiện của cocain, gợi ý việc sử dụng Rotundin như một chất cai nghiện [29], [56], [57]. Bên cạnh đó, nhiều hoạt tính sinh học quý báu của Rotundin cũng đã được chứng minh bao gồm tác dụng an thần – giảm đau – gây ngủ, tác dụng hạ sốt, bảo vệ thần kinh, chống động kinh, hạ huyết áp, giãn cơ trơn [13].

Hiện nay việc tiêu thụ và sản xuất Rotundin từ nguyên liệu củ Bình vôi đang ngày càng được phát triển cả ở trên thế giới và Việt Nam. Việc bán tổng hợp Rotundin thành Rotundin sunfat để sản xuất thuốc tiêm cũng đã được Học viện Quân Y nghiên cứu thành công. Trên thị trường đã xuất hiện rất

nhiều sản phẩm thương mại có chứa Rotundin và Rotundin sunfat như sản phẩm viên Rotunda, Sen vòng, Roxen, Nightqueen... Tuy nhiên hiện nay nguồn dược liệu củ Bình vôi của Việt Nam trong tự nhiên đang ngày càng cạn kiệt do việc khai thác bừa bãi, không có qui hoạch. Vì vậy việc khảo sát để tìm kiếm loài Bình vôi có hàm lượng Rotundin cao, từ đó xây dựng phương án bảo tồn và nhân giống, trồng bình cây vôi là hoàn toàn cần thiết.

Để góp phần vào việc nghiên cứu với mục đích trên, trong luận văn này chúng tôi tiến hành thực hiện đề tài **“Điều tra, thu thập mẫu củ Bình vôi ở một số tỉnh Việt Nam và xây dựng phương pháp định lượng Rotundin bằng sắc ký lớp mỏng kết hợp đo mật độ quang (TLC-Scanning)”** nhằm tìm kiếm, xác định được loài Bình vôi chứa hàm lượng hoạt chất Rotundin cao và đưa ra được phương pháp định lượng Rotundin từ củ Bình vôi tươi bằng TLC-Scanning giúp tiết kiệm được thời gian và chi phí so với định lượng từ củ khô bằng HPLC, phục vụ cho việc thu mua kịp thời nguồn dược liệu để sản xuất Rotundin ở qui mô lớn.

Nội dung nghiên cứu cụ thể như sau:

1. Điều tra nghiên cứu cụ thể như sau:úp tiết kiệm được thời gian và chi phí và xác định được thể như sau:úp tiết kiệm được t
2. Xây dựng xác định thể như sau:úp tiết kiệm được Rotundin trong các mẫu thể như sau:úp tiết kiệm được bằng phương pháp sắc ký lớp mỏng kết hợp đo mật độ quang TLC-Scanning.
3. Xây dựng phương pháp định lượng Rotundin trong củ bằng phương pháp sắc ký lớp mỏng kết hợp đo mật độ quang của Rotundin.

CHƯƠNG 1. TỔNG QUAN

1.1. Giới thiệu về chi Bình vôi

Chi Bình vôi hay chi Thiên kim đằng (danh pháp khoa học: *Stephania*, đồng nghĩa: *Perichasma*) là một chi thực vật có hoa trong họ Biển bức cát (Menispermaceae hay còn gọi là họ Tiết dê), có nguồn gốc ở miền đông và nam châu Á cũng như Australasia. Chúng là các loài cây thân thảo dạng dây leo, thường xanh, cao tới 4 m, với thân củ dạng gỗ phình to, trong dân gian gọi là củ. Các lá mọc thành vòng xoắn trên thân cây, hình khiên với cuống lá gắn gần trung tâm của lá. Hoa nhỏ, khác gốc, màu vàng cam tụ tập thành tán kép. Quả hình cầu dẹt, khi chín màu đỏ, chứa một hạt, hình móng ngựa, có gai [89].

Trên thế giới chi Bình vôi *Stephania* có khoảng 50 loài, phân bố ở vùng nhiệt đới, Á nhiệt đới ở các nước châu Á là chủ yếu như: Trung quốc (43 loài), Thái lan (18 loài), Indonesia (17 loài), Việt nam (14 - 16 loài), Malaysia (11 loài), Ấn độ (11 loài), Philippin (8 loài), Papua New Guinea (8 loài), Myanma (5 loài), Nhật bản (2 loài), Sri Lanka (2 loài), Lào (2 loài), Đông timor (1 loài), Quần đảo Solomon (1 loài), Banglades (1 loài), Nepal (1 loài); ngoài ra còn có ở châu Úc: Australia (7 loài), và châu Phi (12 loài) [8].

Ở nước ta, các loài trong chi Bình vôi có khoảng 14 đến 16 loài và chúng phân bố rất rộng, trên nhiều địa phương từ Bắc vào Nam. Song các khu vực có số loài phong phú, đa dạng và tập trung hơn cả là các tỉnh Cao Bằng, Lạng Sơn, Lào Cai, Yên Bái, Bắc Kạn, Tuyên Quang, Phú Thọ, Thái Nguyên, Quảng Ninh, Lai Châu, Sơn La, Hoà Bình, Hà Tây, Hà Nam, Ninh Bình, Thanh Hoá, Nghệ An, Hà Tĩnh. Một số ít loài (*S. venosa*, *S. cambodica* Gagnep, *S. pierrei*) chỉ gặp ở các tỉnh phía Nam: Đắc Lắc, Lâm Đồng, Bình Định, Phú Yên, Ninh Thuận, Khánh Hoà, Bà Rịa - Vũng Tàu và An Giang

[15]. Trước đây, tên Bình vôi chỉ dùng cho một loài là *Stephaniarotunda* Lour. (*Stephania glabra* (Roxb.) Miers.), cùng với những tên khác là Củ một, Củ gà ấp, Dây môi trơn, Cà tòm, Cây pằm (Tày), Co cây khấu (Thái), Tở lũng dòi (Dao), P'lồi (K'ho), Moon - seed (Anh).

Một số loài Bình vôi đã được phát hiện tại một số tỉnh ở Việt Nam được liệt kê trong bảng 1.1.

Bảng 1.1. Một số loài Bình vôi được phát hiện tại một số tỉnh ở Việt Nam

<i>STT</i>	<i>Tên loài</i>	<i>Địa điểm</i>	<i>Hàm lượng</i>	<i>Tài liệu</i>
1	<i>S. glabra</i> (Roxb.) Miers	Ninh Bình	0,59%	[21]
2	<i>S. viridiflavens</i> H. S. Lo et M. Yang	Sơn La	0,63%	[6]
3	<i>S. brachyandra</i> Diels	Sapa	3,7%	[11]
		Hoàng Liên Sơn (cũ)	3,55%	[2]
		Sapa	5,1%	[16]
		Sapa	3,69%	[8]
4	<i>S. kuinanensis</i> H. s. Lo et M. Yang	Lạng Sơn	3,06%	[21]
5	<i>S. sinica</i> Diels	Ninh Bình	1,4%	[16]
		Quảng Bình	2,43%	[8]
6	<i>S. sinica</i> Diels	Hà Nam Ninh (cũ)	1,31%	[2]
7	<i>S. dielsiana</i> Y. C. Wu.	Hà Nội	0,4%	[8]
8	<i>S. kwangsiensis</i> H. S. Lo	Quảng Ninh	1,8%	[16]

1.1.1. Đặc điểm thực vật chi Bình vôi

Các loài trong chi Bình vôi (*Stephania*) đều là dây leo, sống lâu năm hoặc hằng năm (Hình 1.1). Ở giai đoạn non thân thường nhẵn, màu xanh nhạt, xanh bóng hoặc xanh đậm. Trên thân già thường có những rãnh dọc,

những mụn cóc sần sùi, màu nâu xám, nâu đen hoặc màu nâu đất. Rễ dạng sợi hoặc phình to tạo thành rễ củ. Củ rất đa dạng về hình thái, kích thước và màu sắc. Củ thường có dạng hình cầu, hình trứng, hình trụ hoặc hình dạng bất định. Có loài rễ củ thường chỉ nặng 0,5-2(hoặc 3) kg, nhưng cũng có loài cho củ có thể nặng tới 50-70 kg. Tùy thuộc vào từng loài, tuổi cây và điều kiện môi trường sống mà hình thái, màu sắc vỏ củ cũng có nhiều thay đổi (nhẵn hoặc xù xì, màu nâu sáng nhạt, nâu đậm, xám tro, đen...). Thịt củ nạc hoặc có lẫn những vằn xơ, màu trắng ngà, vàng tươi, vàng nhạt hoặc đỏ nâu, đỏ tươi.

Lá mọc cách, cuống lá thường mảnh, dài 2 đến 5 hoặc 15 đến 20 cm và hai đầu phồng lên[15], có khi gấp khúc ở góc [21]. Cuống lá dính vào lá thường ở những vị trí cách xa mép dưới của gốc lá ở những khoảng cách nhất định, tùy thuộc vào từng loài (có thể từ 1/5 đến 1/3 chiều dài phiến lá). Phiến lá mỏng hoặc dày, nhẵn bóng hoặc rải rác có lông, hình khiên, hình tam giác rộng, hình trứng-tam giác, tam giác tròn hoặc gần tròn; mép lá nguyên hoặc chia thùy; gân lá dạng chân vịt, gồm 8-9 hoặc 10-12 gân chính cùng xuất phát từ đỉnh cuống lá. Chóp lá nhọn, thuôn nhọn, tù hoặc gần tròn; gốc lá gần tròn, phẳng hoặc gần hình tim. Màu sắc của phiến lá tùy thuộc vào từng loài (màu xanh nhạt, xanh vàng nhạt, xanh đậm, xanh nâu nhạt hoặc đốm tía).

Hoa đơn tính khác gốc. Cụm hoa đực, cái thường mọc từ kẽ lá. Cụm hoa có dạng tán đơn, tán kép, xim tán kép, hình đầu đến tán ngù [15], có cuống, đơn độc hay xếp theo kiểu chùm ít nhất ở các nhánh tán cấp 1 (2), các nhánh cuối cùng đôi khi không đều hoặc đôi khi các xim tụ hợp thành đầu hình đĩa [21]. Hoa đực thường có cấu tạo đối xứng tỏa tròn, dài 6-8, rời, xếp thành 2 vòng; 3-4 cánh hoa, dạng vỏ sò, màu vàng, đôi khi trắng xanh; nhị 2-6, thường 4, chỉ nhị dính nhau tạo thành ống hình trụ, đầu nhụy xoè thành đĩa

tròn. Hoa cái thường chỉ gồm 1 lá đài và 2 cánh hoa (rất ít khi có 3-4 lá đài và 3-4 cánh hoa), bầu hình trứng có 4 đến 6 hoặc 7 núm nhụy hình dùi.

Quả hạch, dạng hình gần tròn, hình trứng, trứng bầu, 2 bên dẹt. Ở quả trưởng thành, cuống quả lệch về một phía gần với dấu vết còn lại của núm nhụy. Bầu 2 noãn, nhưng chỉ có 1 phát triển thành hạt, còn 1 thoái hóa. Ở quả chín, vỏ ngoài thường có màu vàng đậm hoặc đỏ tươi, nhẵn bóng. Hạt hình móng ngựa, hình trứng dẹt hoặc hơi tròn, 2 mặt bên lõm, ở giữa có lỗ thủng hoặc không, dọc theo gờ lưng bụng thường có 4 hàng vằn hoặc gai. Đặc điểm hình thái của hạt thường đặc trưng cho từng taxon; nên đây được coi là một trong những dấu hiệu đáng tin cậy để giám định tên khoa học đối với các loài chi Bình vôi [15]. Cây mầm có lá mầm ít nhiều bằng rễ mầm, bao quanh bởi nội nhũ [21].



Hình 1.1. Hình ảnh về cây Bình vôi

1.1.2. Sinh thái, sinh trưởng và phát triển của các loài Bình vôi

Các loài thuộc chi Bình vôi thường sinh trưởng trong các rừng nguyên sinh hay rừng thứ sinh. Chúng thường mọc trên đỉnh hay trên các sườn núi đá

vôi, núi đất xen lẫn đá, các dải đất ven đường, ven sông, đôi khi gặp ở ven bờ biển. Sóng thích hợp ở nhiệt độ trung bình năm 21-23⁰C, lượng mưa 2000-2500mm, ưa đất nhiều mùn, thoát nước, độ pH = 6,5-7. Một số loài có thể phân bố ở độ cao tới 2.000-2.800 m so với mực nước biển. Hầu hết các loài Bình vôi đều ưa sáng, ưa đất có độ ẩm vừa phải và đặc biệt ở giai đoạn ra hoa tạo quả.

Các loài Bình vôi hiện có ở Việt Nam có 2 thời vụ chồi chính trong năm. Vụ chồi đông xuân, bao gồm các chồi sớm xuất hiện (trên thân và trên đầu củ) ngay từ tháng 11- 12. Những chồi này ở trạng thái "chồi ngủ" cho đến mùa xuân (tháng 1 - 2) thì bắt đầu thời kỳ sinh trưởng mạnh. Chỉ trong vòng 1 - 2 tháng, chồi đã dài tới hơn 1m. Chồi đông xuân là lứa chồi quan trọng nhất của cây Bình vôi, vì trên loại chồi này cây sẽ ra lá, ra hoa, quả và mọc ra lứa chồi xuân hè (chồi cấp II). Số lá của chồi cấp II nhiều hơn gấp bội so với chồi đông xuân (tính trên cùng một đơn vị chiều dài của chồi). Lá trưởng thành ngay trong mùa hè và sẽ rụng hết khi mùa khô hanh (tháng 10). Sự rụng lá hàng năm cũng là tập tính quan trọng của cây Bình vôi. Sự tái sinh chồi mạnh mẽ của cây Bình vôi còn thể hiện ở khả năng mọc mầm trên các mảnh bở ra từ củ đem vùi xuống đất. Những mảnh ở đầu củ (khoảng 1/3 củ trở lên) mọc mầm tốt hơn những mảnh khác. Có thể áp dụng khả năng này để nhân giống cây Bình vôi. Trong tự nhiên, hoa Bình vôi được thụ phấn chéo chủ yếu nhờ côn trùng.

Hạt Bình vôi thường rất nhỏ, khối lượng trung bình của 1.000 hạt thường chỉ khoảng 10-29g. Hạt phát tán nhờ nước. Các cá thể Bình vôi trồng từ hạt thường sinh trưởng, phát triển khá nhanh. Chỉ sau 5-6 tháng tuổi, cây đã vươn dài tới 50-80(-100) cm, phân cành khỏe. Ở một số loài, cây có thể bắt đầu ra hoa và cho quả khi mới bước vào giai đoạn 6- 8 tháng tuổi. Trong quá trình

sinh trưởng, rễ chính thường lớn dần tạo thành củ (ở những loài có củ) hoặc phân nhánh nhiều tạo thành rễ dạng sợi (ở những loài chỉ có rễ dạng sợi) [15].

1.1.3. Kỹ thuật nhân giống và gây trồng

Có thể nhân giống Bình vôi bằng cả phương pháp vô tính hoặc hữu tính.

Với các loài Bình vôi không có củ (chỉ có rễ dạng sợi) thì có thể nhân giống rất dễ dàng bằng các đoạn hom dây lấy từ thân hoặc cành. Còn với các loài Bình vôi có củ thường chỉ có thể nhân giống sinh dưỡng bằng các mảnh củ ở phía gần gốc. Tuy nhiên, hệ số nhân giống vô tính thường thấp, chỉ gắp có 2-4 lần và tốc độ tăng trưởng cũng rất chậm.

Nhân giống Bình vôi từ hạt là biện pháp có hiệu quả cao. Hạt Bình vôi sau khi thu hoạch nếu gieo ngay hoặc ủ trong cát ẩm thì tỉ lệ nảy mầm sẽ cao. Sau khi gieo khoảng 40-65 ngày thì hạt bắt đầu nảy mầm. Hạt tươi được gieo ngay sau khi thu hái, ở điều kiện thuận lợi có tỷ lệ nảy mầm khá cao (thường từ 75-85%). Nếu để lâu 2-3 tháng mới gieo thì tỷ lệ nảy mầm chỉ đạt khoảng 30% tối đa 40-45%.

Trồng 2-3 năm có thể thu hoạch dược liệu. Thời gian càng lâu năng suất càng cao. Trồng bằng hạt có năng suất cao hơn trồng từ mầm củ [15].

1.1.4. Năng suất và thu hái củ Bình vôi

Đến nay, ở nước ta việc khai thác củ và cả lá vẫn chủ yếu dựa vào nguồn Bình vôi mọc sẵn trong tự nhiên. Lượng củ Bình vôi bị khai thác để sử dụng trong nước cũng như bán qua biên giới trong thời gian qua khá lớn. Những năm trước đây, sản lượng khai thác thường đạt tới 500-700 tấn/năm. Hiện nguồn nguyên liệu trong tự nhiên đã trở nên rất khan hiếm. Bình vôi trồng từ hạt trong năm đầu tiên năng suất củ tươi có thể đạt 1-2 tấn/ha, đến năm thứ 2 và 3 có thể đạt 2,5-3(-5) tấn/ha [15].

1.2. Các nghiên cứu về thành phần hóa học củ Bình vôi

Những cây thuộc chi *Stephania* (họ Menispermaceae) phân bố rộng và được sử dụng từ lâu trong y học cổ truyền để chữa nhiều bệnh khác nhau. Hơn 150 hợp chất alkaloid cùng với flavonoids, lignans, steroids, terpenoids và coumarins đã được phân lập và xác định cấu trúc trong chi này và nhiều hợp chất đã được đánh giá có hoạt tính sinh học cao.

1.2.1. Các nghiên cứu về thành phần hóa học củ Bình vôi trên thế giới

Số lượng các hợp chất đã phân lập từ các loài trong chi *Stephania* trên thế giới có thể xếp vào 9 nhóm hợp chất được liệt kê trong bảng 1.2. [8].

Bảng 1.2. Các nhóm alkaloid trong chi *Stephania*

STT	Nhóm chất	Số lượng alkaloid
1	Benzylisoquinolin	Gồm 6 chất được phân lập từ 6 loài khác nhau
2	Bisbenzylisoquinolin	Gồm 47 chất được phân lập từ 14 loài
3	Aporphin	Gồm 75 chất được phân lập từ 33 loài
4	Proaporphin	Gồm 8 chất được phân lập từ 9 loài
5	Protoberberin	Gồm 24 chất được phân lập từ 22 loài, trong đó có L-tetrahydropalmatin
6	Morphinan	Gồm 21 chất được phân lập từ 22 loài
7	Hasubanan	Gồm 49 chất được phân lập từ 11 loài
8	Eribidin	Gồm 1 chất là Protostephanin
9	Stephaoxocan	Gồm 2 chất được phân lập từ loài <i>S. cepharantha</i>

1.2.2. Các nghiên cứu về thành phần hóa học củ Bình vôi ở Việt Nam

Một số hợp chất đã được phân lập từ một số loài Bình vôi ở Việt Nam được liệt kê trong bảng 1.3.