

ĐỊNH TÍNH SAPONIN VÀ ALKALOIDE TỪ DỊCH CHIẾT NẤM LINH CHI

Đống Thị Anh Đào, Huỳnh Hoàng Anh Chi, Đào Đức Duy

Khoa Công nghệ Hóa học và Dầu khí, trường ĐH Bách Khoa, ĐHQG-HCM

(Bài nhận ngày 24 tháng 7 năm 2003)

TÓM TẮT: *Linh Chi là một loại nấm có giá trị dược biết đến từ ngàn xưa. Linh Chi được xem là có giá trị ngang bằng với Nhân Sâm vì khả năng chữa nhiều bệnh của nó bao gồm bệnh viêm gan siêu vi B, tiểu đường, cao huyết áp, ung thư, khối u, ...*

Linh Chi có những thành phần hoạt chất đặc biệt như: saponin triterpenoides, alkaloides, polysaccharides, aminoacids... Nhưng thành phần hoạt chất quan trọng nhất được chú tâm nghiên cứu là saponin triterpenoides, alkaloides. Vì thế, việc xác định hoạt tính của chúng là yếu tố quan trọng đầu tiên khi nghiên cứu về hợp chất này.

I. Tổng quan [3]

- Hơn 4000 năm trước đây (khoảng 2550-2140 trước công nguyên), giá trị dược liệu của Nấm Linh Chi đã được ghi chép trong các thư tịch cổ.
- Vào thời nhà Minh (khoảng năm 1590), nhà y dược nổi tiếng Trung Quốc Lý Thừa Trân phân ra thành “Lục Bảo Linh Chi” với các khái quát công dụng dược lý khác nhau, ứng theo từng màu của nấm. Có sáu màu sắc khác nhau: Hồng Chi, Hoàng Chi, Thanh Chi, Bạch Chi, Hắc Chi, Tử Chi.
- Từ đầu thế kỷ 17 (1621), giống Nấm Linh Chi đã được nuôi trồng phổ biến ở Trung Quốc chính bởi giá trị dược liệu cao của chúng.
- Năm 1978, tại phòng thí nghiệm thực vật bậc thấp, Khoa Sinh Trường Đại Học Tổng Hợp Hà Nội, lần đầu tiên đã nuôi trồng thành công loài *Ganoderma Cochlear*.
- Đến nay, việc nuôi trồng Linh Chi đã rất phổ biến. Các nước Hàn Quốc, Nhật, Thái Lan, Mã Lai, Mỹ, Việt Nam, ... đã nuôi trồng thành công trong phòng thí nghiệm và đem vào ứng dụng trong thực tế.
- Linh Chi nuôi trồng chủ yếu ở Việt Nam là Hồng Linh Chi tên khoa học là *Ganoderma Lucidum*.

Thành phần hoá học của Nấm Linh Chi:

Theo kết quả phân tích của viện nghiên cứu dược liệu Quảng Đông thì thành phần hoá học của Nấm Linh Chi như sau:

Nước 12 – 13%

Cellulose 54 – 56%

Lignin 13 – 14%

Hợp chất nitơ 1,6 - 2,1%

Chất béo 1,9–2%

Hợp chất phenol 0,08 – 0,1 % (có thể tới 0,4% ở trong cao)

Hợp chất Sterol toàn phần 0,11 – 0,16%

Saponin toàn phần 0,3 – 1.23%

Alkaloides 1,82–3,06%

Các nguyên tố khoáng: Ag, B, Ca, Fe, K, Na, Mg, Mn, Sn, Zn, Bi, Cu, Ge (Germanium) có hàm lượng cao và Cs (Cesium).

Một số nghiên cứu cho biết có acid amin, polysaccaride với lượng không lớn.

II. Phương pháp nghiên cứu

II.1. Hóa chất, thiết bị

A/ Hóa chất:

Saponin

- Định tính bằng phản ứng hóa học [1],[2]:
 - + Anhydrit acetic khan
 - + H₂SO₄ đậm đặc
- Định tính bằng sắc ký lớp mỏng [1],[2]:
 - + Hệ dung môi: CHCl₃:CH₃OH:H₂O (65:35:10)

Alkaloide

- Định tính bằng phản ứng hóa học [1],[2]:
 - + Thuốc thử Mayer
 - + Thuốc thử Dragendoff
- Định tính bằng sắc ký lớp mỏng [1],[2]:
 - + Hệ dung môi: Benzen:Aceton (1:1)

B/ Thiết bị:

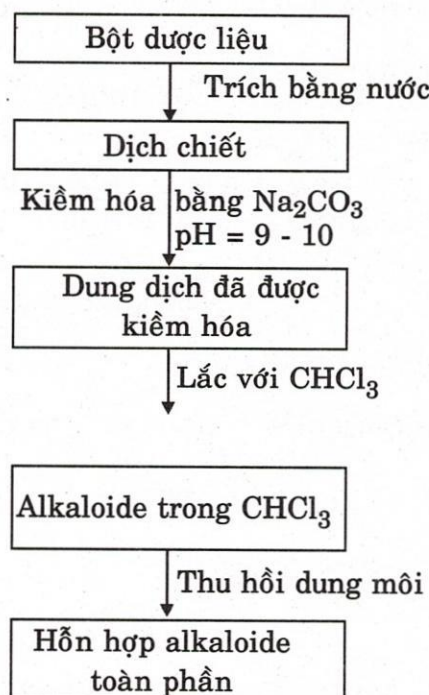
Bản mỏng 20 x 20 cm của Merck F₂₅₄

Bình chạy sắc ký

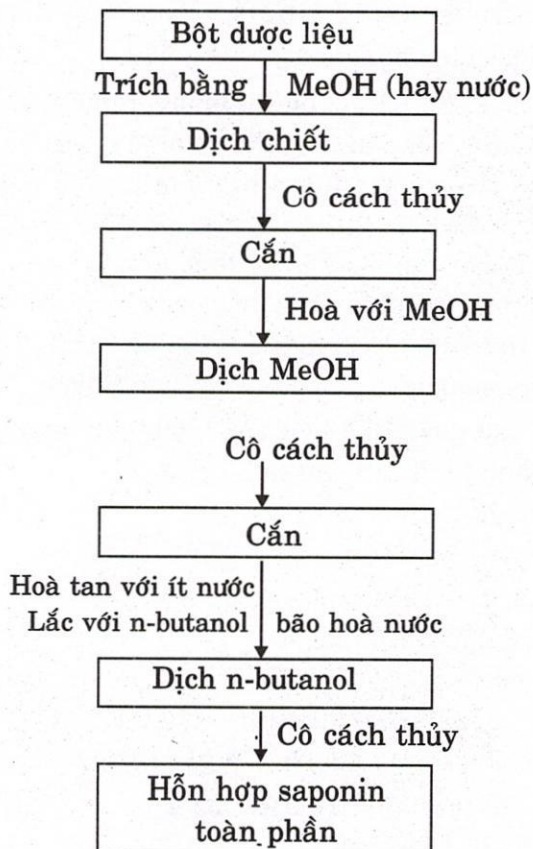
II.2. Phương pháp nghiên cứu

Để có thể định tính hoạt chất alkaloide và saponin bằng các phản ứng hóa học và sắc ký lớp mỏng thì ta phải chiết xuất riêng từng hoạt chất ở dạng thô.

Sơ đồ chiết alkaloide:



Sơ đồ chiết saponin



Sau khi chiết xuất, để định tính hoạt chất saponin và alkaloide bằng các phản ứng hóa học và sắc ký lớp mỏng, ta dựa theo tiêu chuẩn ban hành của Bộ Y Tế [4], như sau:

QUI CHẾ ĐÁNH GIÁ TÍNH AN TOÀN VÀ HIỆU LỰC THUỐC CỔ TRUYỀN
(Ban hành kèm theo quyết định số 371/BYT-QĐ ngày 12/3/1996 của Bộ Trưởng Bộ Y Tế)

Phụ lục 1: Các qui trình xác định đặc điểm chất lượng dược liệu và thuốc cổ truyền Việt Nam

Tiêu chuẩn chất lượng

❖ *Tính xác thực của nguyên liệu (Authenticity)*

Nhận biết các hoạt chất và các chất đặc trưng bằng các phản ứng hóa học đặc trưng và bằng sắc ký lớp mỏng. Các kết quả phân tích trên phải được vẽ hoặc chụp ảnh màu. Nếu chưa biết rõ thành phần hoạt chất, thì có thể xác định nguyên liệu làm thuốc bằng một bản sắc ký lớp mỏng có nhiều chi tiết của một dịch chiết tiêu chuẩn. Bản sắc ký này được coi như dấu vân tay (finger print) của cây thuốc. Nêu rõ điều kiện chiết, điều kiện chạy sắc ký và phun thuốc thử.

(Trích Tạp chí dược học – số 5/1996)

Áp dụng tiêu chuẩn trên, thực hiện các phương pháp để định tính như sau:

• **Saponin**

Định tính bằng phản ứng hóa học [2]:

+ Phản ứng sơ bộ: Cho một ít cặn hòa tan vào nước, lắc mạnh ống nghiệm trong một phút. Để yên trong mười lăm phút, nếu có bọt bền thì xác định sơ bộ là saponin.

+ Phản ứng màu: Phản ứng Liebermann - Burchard

Cho vào cặn saponin toàn phần chiết từ nấm Linh Chi 1ml anhydrit acetic khuấy kỹ cho tan, thêm từ từ dọc theo thành ống nghiệm 0,3 -0,5 ml H₂SO₄ đậm đặc rồi quan sát, nếu vòng ngăn cách: Có màu hồng đến đỏ tím thì sơ bộ kết luận dược liệu có saponin triterpen.

Định tính bằng phương pháp sắc ký lớp mỏng

Sau khi phun thuốc thử acid H₂SO₄ 10% đem kiểm tra cho:

+ Phát quang dưới ánh sáng thường

+ Phát quang dưới ánh sáng tử ngoại

• **Alkaloide**

Định tính bằng phản ứng hóa học:

Phản ứng tủa: dịch chiết Linh Chi cho thử với:

Thuốc thử Mayer: cho tủa vô định hình màu trắng vàng.

Thuốc thử Dragendorff: cho tủa màu vàng cam đến đỏ.

Định tính bằng phương pháp sắc ký lớp mỏng

Phát quang dưới ánh sáng thường

Hơ iod.

III. Kết quả và bàn luận

Kết quả

• **Saponin**

* Định tính bằng phản ứng hóa học:

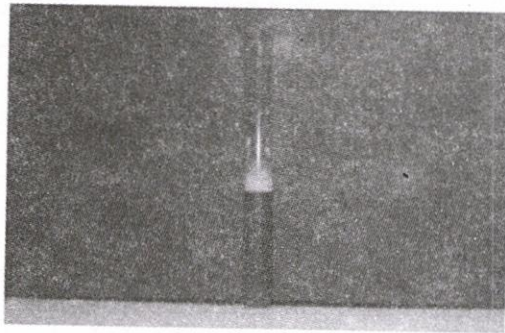
+ *Phản ứng sơ bộ:*

Sau khi lắc,

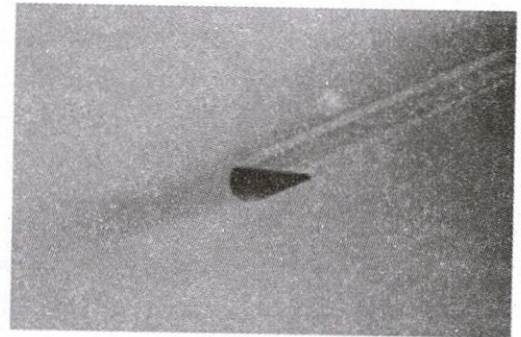
+ *Phản ứng màu:* Phản ứng Liebermann – Burchard

Quan sát thấy có vòng ngăn cách có

thấy có bột bền trong mười lăm phút,
xác định sơ bộ có saponin.



màu hồng đến đỏ tím. Sơ bộ kết luận
được liệu có saponin triterpen



* Định tính bằng phương pháp sắc ký lớp mỏng
+ Xét trên dịch chiết từ nấm Linh Chi:

- Dưới ánh sáng thường

Bảng mỏng sau khi hong khô cho phun thuốc thử H₂SO₄ 10% và đem vào tủ sấy sấy ở 110°C khoảng 10 phút, ta thấy xuất hiện hai vết màu hồng tím. Đo R_f ta có:

$$R_{f1} = 0,706 \quad R_{f2} = 0,625$$

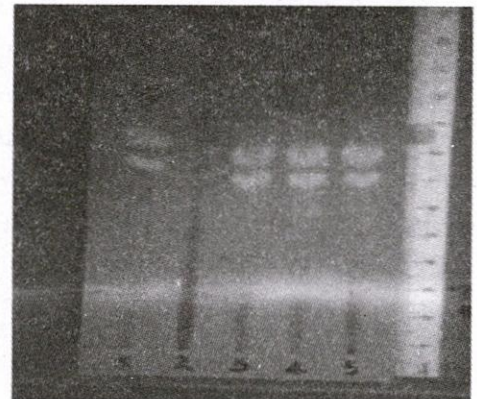
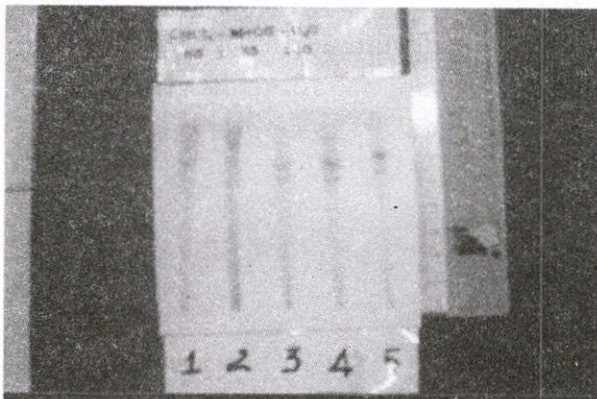
$$R = 0,625 \quad R_{f5} = 0,275$$

- Dưới đèn tử ngoại

Nếu sau khi phun thuốc thử H₂SO₄ 10% rồi soi dưới đèn tử ngoại UV thì ta sẽ thấy được 5 vết màu tím hồng, cam với các R_f tương ứng như sau:

$$R_{f1} = 0,706 \quad R_{f4} = 0,427$$

$$R_{f3} = 0,473$$



Hệ dung môi CHCl₃-CH₃OH -H₂O(65:35:10)

1- Dịch chiết bằng MeOH

2- Cồn 48⁰

3- Dịch chiết nước ở pH7

4- Dịch chiết nước ở pH4

5- Dịch chiết nước ở pH3

• **Alkaloide**

* Định tính bằng phản ứng hóa học: Phản ứng tủa
Thuốc thử Mayer: có cho tủa vô định hình màu trắng vàng.

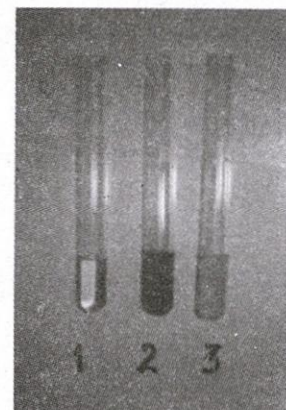
Thuốc thử Dragendorff: có cho tủa màu vàng cam.

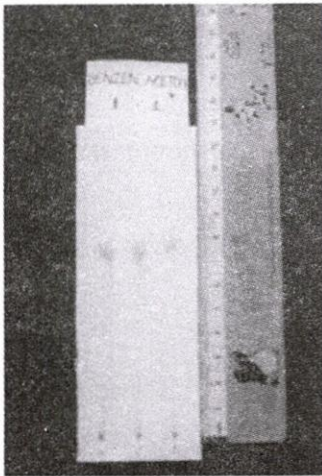
* Định tính bằng phương pháp sắc ký lớp mỏng

1. Mẫu nước giải khát Linh Chi ban đầu

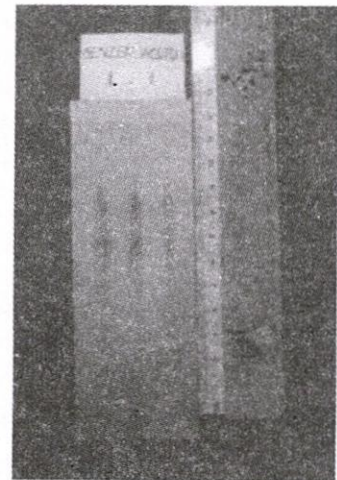
2. Mẫu nước giải khát Linh Chi khi có thuốc thử Dragendorff

3. Mẫu nước giải khát Linh Chi khi có thuốc thử Mayer





Hệ dung môi Benzen- Aceton (1:1)
 1-Dịch chiết bằng chloroform đã
 kiềm hóa
 2- (1) + (3)
 3-Dịch chiết bằng nước đã kiềm hóa



- Dưới ánh sáng thường

Bảng mỏng sau khi chấm sắc ký:

- Soi dưới ánh sáng thường thấy xuất hiện một vết màu vàng:

$$R_f = 0,6$$

- Sau khi hơi iod

- Hơi iod rắn thấy xuất hiện ba vết khác nhau màu vàng:

$$R_{f1} = 0,67; R_{f2} = 0,6; R_{f3} = 0,542$$

Bàn luận:

- Saponin: Theo mặt cảm quan nhận xét, với một lượng dung dịch đem chấm sắc ký như nhau (10 μ l) thì khi chiết bằng nước thì vết sắc ký rõ ràng hơn so với chiết bằng cồn. Như vậy có thể nhận xét sơ bộ là nước có thể chiết tốt hơn cồn.
- Alkaloide thường tồn tại trong dược liệu dưới dạng muối, do đó trước khi chiết người ta dùng kiềm để kiềm hóa dược liệu, chuyển tất cả alkaloide dạng muối sang dạng baz, sau đó dùng dung môi hữu cơ để chiết alkaloide baz ra khỏi dược liệu.

IV. Kết luận

- Trên sắc ký đồ, các vết thu được từ dịch chiết có giá trị R_f và màu sắc tương đồng với giá trị R_f và màu sắc của các vết thu được từ nguyên liệu.
- Bước đầu định tính bằng các phản ứng hóa học đặc trưng và phương pháp sắc ký lớp mỏng ta đã chứng minh được trong dịch chiết từ nấm Linh Chi có sự hiện diện của hợp chất saponin và alkaloide.

IDENTIFYING SAPONIN AND AKALOID IN THE EXTRACT OF THE GARNODERMA LUCIDUM

Dong Thi Anh Dao, Huynh Hoang Anh Chi, Dao Duc Duy

Falcuty of Chemical Technology & Petroleum, University of Techology - VNU-HCM

ABSTRACT: *Lingzhi, a valuable fungus, has been known thousands years ago. Lingzhi is regarded as valuable as ginseng because of its ability in the treatment of many kinds of diseases including Hepatitis B, Diabetes, Hypertension, cancers, tumours...*

Some special components have been found in it, such as: saponin triterpenoides, alkaloids, polysaccharides, aminoacids... But the most important components people have paid attention to in studying are saponin triterpenoides and alkaloids. Therefore, the identification of its exclusivism is the first most important factor when we begin studying them.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] Nguyễn Khắc Quỳnh Cứ, *Bài giảng chiết xuất dược liệu (Tài liệu giảng dạy sinh viên Dược 5)* - Trường Y Dược Tp. HCM, Bộ môn Dược liệu.
- [2] Nguyễn Văn Đàm, Nguyễn Viết Tự, *Phương pháp nghiên cứu hóa học cây thuốc*, Nhà xuất bản Y Học 1985.
- [3] Lê Xuân Thám, *Nấm Linh Chi, cây thuốc quý [5,11]* - Nhà xuất bản Khoa Học và Kỹ thuật.
- [4] *Tạp chí Dược học*, số 5/1996 - Quy chế đánh giá tính an toàn và hiệu lực thuốc cổ truyền.