BỘ GIÁO DỤC VÀ ĐÀO TẠO

BỘ Y TẾ

VIỆN DƯỢC LIỆU

Nghiên cứu thuốc từ thảo dược

GIÁO TRÌNH SAU ĐẠI HỌC

NHÀ XUẤT BẢN KHOA HỌC VÀ KỸ THUẬT

Nghiên cứu thuốc từ thảo dược

(Giáo trình sau đại học)

TC410

61 – 615 . 9
KHKT – 05 150 – 345 – 05

BỘ GIÁO DỤC VÀ ĐÀO TẠO

BỘ Y TẾ

VIỆN DƯỢC LIỆU

NGHIÊN CỨU THUỐC TỪ THẢO DƯỢC

(GIÁO TRÌNH SAU ĐẠI HỌC)

NHÀ XUẤT BẢN KHOA HỌC VÀ KỸ THUẬT

HÀ NỘI - 2006

CHỦ BIÊN

PGS. TS. NGUYỄN THƯỢNG DONG

THAM GIA BIÊN SOẠN

PGS. TS. BÙI THỊ BẰNG
PGS. TS. NGUYỄN KIM CẨN
PGS. TS. NGUYỄN THƯỢNG DONG
GS. TS. PHẠM THANH KỲ
GS. VŨ NGỌC LỘ
TS. NGUYỄN TẬP
TS. PHẠM VĂN THANH
TS. NGUYỄN BÍCH THU
TS. NGUYỄN DUY THUẦN
TS. NGUYỄN VĂN THUẬN

BIÊN TẬP VÀ TRÌNH BÀY

DS. LÊ NGUYỆT NGA
CN. ĐẶNG QUANG CHUNG

LỜI NÓI ĐẦU

Đầu những năm 60 thế kỷ trước xu hướng chung của ngành dược thế giới đã đi sâu nghiên cứu thuốc từ cây cỏ. Ví dụ, nước Pháp có ngành tân dược rất phát triển, đạt nhiều thành công trong phòng và chữa bệnh cho con người, nhưng dùng tân dược cũng đã để lại trong người bệnh nhiều tác dụng không mong muốn. Từ năm 1986 Bộ Y tế Pháp đã chính thức công nhận thuốc từ thảo dược. Ngành dược ở Pháp và nhiều nước công nghiệp khác như Mỹ, Anh, Ý, Đức ... đã đầu tư lớn cho nghiên cứu, chế biến và sản xuất thuốc từ thảo dược rất hiện đại. Các nước có nền y học cổ truyền lâu đời như Trung Quốc, Ấn Độ, Triều Tiên, Nhật Bản, một số nước Đông Nam Á... đã có nhiều chính sách thúc đẩy ngành dược sản xuất thuốc từ cây cỏ. Các nhà thực vật học, hóa học, nông học, dược học, sinh học phối hợp cùng nghiên cứu chọn đất trồng tốt nhất, xác định bộ phận dùng trong cây, chiết tách các hợp chất, nghiên cứu dạng bào chế và thử dược lý, lâm sàng thành công rất nhiều loại thuốc từ thảo dược.

Ở Việt Nam trong vài thập kỷ qua công tác nghiên cứu nguồn tài nguyên cây thuốc rất được Nhà nước quan tâm chỉ đạo. Đã tiến hành điều tra cả nước, từ năm 1961 đến nay đã ghi nhận được 3948 loài cây thuốc, thuộc 307 họ thực vật và nấm. Các viện nghiên cứu, các xí nghiệp Nhà nước, liên doanh hoặc tư nhân sản xuất thuốc từ dược liệu ngày càng tăng về số lượng và chất lượng. Yêu cầu nguyên liệu cây thuốc rất lớn. Theo đánh giá của Viện Dược liệu năm 1988 cần 30.000 tấn cung cấp cho hệ thống y học cổ truyền và 20.000 tấn cho công nghiệp dược và xuất khẩu. Công tác trọng tâm trong chiến lược ngành dược nước ta giai đoạn 2001 - 2005 phải đảm bảo 40% và vào năm 2010 là 60% thuốc thiết yếu sản xuất từ nguyên liệu trong nước. Dược liệu vẫn được khẳng định là nền tảng chủ yếu trong nghiên cứu và sản xuất của ngành dược. Nhưng thực trạng hiện nay ra sao?

- Trong thập kỷ cuối cùng của thế kỷ XX dược liệu đã bị thuốc tây lấn át. Nguồn dược liệu thiên nhiên bị khai thác cạn kiệt. Riêng nguồn thiên nhiên cung cấp 20.000 tấn/năm của 200 loài có tính phổ biến và thương mại.

- Đông dược Trung Quốc tràn ngập, từ thuốc chín (thuốc Bắc) đến thành phẩm.

- Số lượng cây thuốc ở nước ta được đưa vào chiết xuất còn rất hạn chế. Trong tổng số 5659 mặt hàng trong nước từ 346 hoạt chất, thì 3392 số đăng ký thuốc nước ngoài có 890 hoạt chất.

- Tình trạng khai thác rừng làm nương rẫy, đô thị hóa, chặt phá rừng bừa bãi lấy gỗ, cháy rừng, lũ lụt ... cũng làm mất theo nhiều cây thuốc.

- Đội ngũ người làm công tác chuyên sâu về cây, con làm thuốc còn thiếu và yếu về chuyên môn. Việc áp dụng các tiến bộ kỹ thuật để nâng cao chất lượng cây trồng và năng suất, nâng cao hiệu suất chiết tách các hoạt chất trong cây thuốc còn ít.

- Các cơ quan quản lý Nhà nước từ trung ương đến địa phương không thể quản lý nổi công tác dược liệu nói chung và cây thuốc nói riêng.

Trước tình hình trên trong chỉ thị mới đây nhất của Nhà nước số 25/1999/CT-Ttg ngày 30 tháng 8 năm 1999 ở mục 9 ghi rõ: "... Bộ Nông nghiệp và Phát triển nông thôn phối hợp với Bộ Y tế và các địa phương nghiên cứu xây dựng đề án bảo vệ tái sinh và tổ chức nuôi

trồng dược liệu, đặc biệt là những cây quý hiếm...".

Viện Dược liệu - Bộ Y tế còn rất nhiều việc phải làm để thực hiện chỉ thị này. Quan trọng và trước tiên phải góp phần tích cực với các cơ sở đào tạo trong và ngoài ngành, với các địa phương tạo lập một đội ngũ cán bộ có kiến thức và kỹ năng làm công tác điều tra và bảo tồn nguồn tài nguyên cây thuốc thiên nhiên, bảo tồn nguồn gen di truyền để tạo nhiều giống mới chất lượng cao, nghiên cứu hóa thực vật, sàng lọc các hoạt chất để bào chế các dạng thuốc.

Sự cải thiện hệ thống giống cây trồng được Nhà nước ngày càng quan tâm đầu tư trong đó có cả giống cây dược liệu, cây thực phẩm - thuốc. Chất lượng thuốc chữa bệnh phụ thuộc nhiều vào giống cây trồng, vào điều kiện chăm bón, thu hái và bảo quản.

Từ năm 1979, Viện Dược liệu đã được Bộ Y tế, Bộ Giáo dục và Đào tạo giao chức năng đào tạo học vị tiến sĩ. Trước và sau năm 1979, ngoài việc đào tạo tiến sĩ và cao học viện cũng góp phần đáng kể cùng các địa phương làm công tác điều tra, sơ bộ xác định trữ lượng nguồn cây thuốc thiên nhiên; hướng dẫn địa phương cách trồng và bảo vệ tái sinh các loài cây thuốc quý hiếm, đồng thời đã tiếp nhận nhiều cán bộ tốt nghiệp đại học dược, sinh học, nông học, hóa học thực tập trong các labo, pilot và các trạm, các trung tâm nghiên cứu nuôi trồng và chế biến dược liệu thuộc Viện.

Đến nay, để hỗ trợ cho việc giảng dạy và thực lập, Viện thấy cần phải biên soạn bộ giáo trình sau đại học "Nghiên cứu thuốc từ thảo dược" nhằm đào tạo và nâng cao cho nghiên cứu sinh và thực tập sinh về hai mảng kiến thức:

1. Điều tra, bảo tồn và tạo nguồn nguyên liệu chất lượng cao làm thuốc phòng và chữa bệnh.

2. Các phương pháp nghiên cứu tác dụng dược lý của thuốc bào chế từ cây thuốc.

Nội dung tập giáo trình này gồm 5 phần sau:

Phần I. Điều tra và bảo tồn nguồn dược liệu thiên nhiên ở Việt Nam.

Phần II. Kỹ thuật trồng trọt, chăm bón, tạo giống và thu hoạch cây thuốc.

Phần III. Chiết xuất dược liệu.

Phần IV. Các nhóm hợp chất thiên nhiên chính trong dược liệu.

Phần V. Các phương pháp hóa lý ứng dụng trong phân tích, kiểm nghiệm dược liệu.

Bộ sách do các giáo sư, tiến sĩ chuyên sâu có nhiều chục năm kinh nghiệm giảng dạy, đi thực địa điều tra, nghiên cứu và trực tiếp làm những thí nghiệm biên soạn.

Hơn nữa, Viện được bổ sung nhiều trang thiết bị nghiên cứu và sản xuất thử (pilot) hiện đại, đã từng bước xây dựng bảo tàng tiêu bản cây, con làm thuốc, xây dựng các vườn, trại, trung tâm nghiên cứu cây thuốc ở các vùng khí hậu khác nhau trong nước. Đó là những thuận lợi giúp các nghiên cứu sinh và thực tập sinh học tập có kết quả.

Các tác giả chân thành cảm ơn Giáo sư, Tiến sĩ Trương Việt Dũng Vụ trưởng Vụ Khoa học và Đào tạo Bộ Y tế, Tiến sĩ Vụ trưởng Trần Thu Hà và Tiến sĩ Đỗ Văn Nhượng Vụ Đại học và Sau đại học Bộ Giáo dục và Đào tạo đã góp ý kiến nâng cao tính khoa học, cập nhật và thực tiễn cho tập giáo trình này. Tuy nhiên, việc biên soạn không tránh khỏi thiếu sót. Chúng tôi rất biết ơn khi nhận được những ý kiến bổ sung của các bạn đồng nghiệp đã, đang làm công tác giảng dạy, nghiên cứu và sản xuất thuốc từ thảo dược.

PGS. TS. Nguyễn Thượng Dong

MỤC LỤC

Phần I
ĐIỀU TRA CÂY THUỐC VÀ NGHIÊN CỨU BẢO TỒN

TS. Nguyễn Tập

Chương I
ĐIỀU TRA CÂY THUỐC 33

Mở đầu 33
I. Chuẩn bị 34
1.1. Khảo sát tiền trạm 34
1.2. Lực lượng điều tra 35
1.3. Dụng cụ, thiết bị phục vụ cho quá trình điều tra 35
1.4. Tập huấn 36
II. Điều tra thực địa 36
2.1. Điều tra phỏng vấn thu thập cây thuốc trong cộng đồng 36
2.1.1. Một số lưu ý khi phỏng vấn thu thập thông tin 37
2.1.2. Tạo mối quan hệ tốt với người dân địa phương 39
2.2. Điều tra theo tuyến trên thực địa 40
2.3. Điều tra bằng ô tiêu chuẩn 42
2.4. Điều tra tình hình khai thác sử dụng dược liệu 45
2.5. Thu thập mẫu, cây, hạt giống và một số tư liệu khác tại thực địa 47
2.5.1. Thu thập tiêu bản và mẫu dược liệu 47
2.5.2. Thu thập cây giống và hạt giống 49
2.5.3. Cách ghi êtikét (nhãn) và lý lịch tiêu bản 49
2.5.4. Chụp ảnh 51
III. Công việc sau điều tra 52
3.1. Xác định tên khoa học các cây thuốc 52
3.1.1. Khái niệm về các bậc phân loại thực vật và cách gọi tên cây 52
3.1.2. Xác định tên khoa học cây thuốc 53
3.2. Trồng cây thuốc ở vườn thu thập/ vườn mẫu và lưu giữ hạt 54
3.3. Phơi sấy khô, xử lý và bảo quản tiêu bản - mẫu vật 55
3.3.1. Tầm quan trọng của bộ tiêu bản 55

3.3.2. Phơi, sấy khô và xử lý bảo quản 55
3.3.3. Khâu tiêu bản và đóng gói mẫu dược liệu 56
3.3.4. Vào sổ, sắp xếp lưu trữ vào kho của bảo tàng 57
3.4. Xây dựng danh lục cây thuốc 58
3.5. Vẽ bản đồ 59
3.6. Báo cáo tổng kết 60

Chương II
BẢO TỒN CÂY THUỐC 61

Mở đầu 61
I. Tầm quan trọng của nguồn cây thuốc thiên nhiên và sự cần thiết bảo tồn cây thuốc hiện nay 62
1.1. Mối quan tâm của cộng đồng thế giới về bảo tồn cây thuốc 62
1.2. Khái quát về tiềm năng và hiện trạng nguồn tài nguyên cây thuốc Việt Nam 64
1.2.1. Vài nét về điều kiện tự nhiên và xã hội Việt Nam 64
1.2.2. Việt Nam có nguồn cây thuốc phong phú và đa dạng 66
1.2.2.1. Phong phú về thành phần loài 66
1.2.2.2. Khả năng khai thác sử dụng 67
1.2.2.3. Triển vọng 68
1.3. Nguồn tài nguyên cây thuốc Việt Nam đã bị giảm sút nghiêm trọng, một số loài đang đứng trước nguy cơ tuyệt chủng 69
1.3.1. Vùng phân bố tự nhiên của cây thuốc bị thu hẹp 69
1.3.2. Sự giảm sút nhanh chóng khả năng khai thác những loài cây thuốc có nhu cầu sử dụng cao 70
1.3.3. Những cây thuốc thuộc diện quí hiếm đang đứng trước nguy cơ bị tuyệt chủng cao 70
1.3.4. Tìm hiểu một số nguyên nhân chủ yếu 71
II. Bảo tồn cây thuốc 72
2.1. Điều tra thu thập 73
2.1.1. Điều tra thu thập một cách hệ thống kinh nghiệm sử dụng cây thuốc theo kinh nghiệm của cộng đồng các dân tộc 73
2.1.1.1. Mục đích 73
2.1.1.2. Nội dung và phương pháp điều tra thu thập 74

2.1.2. Đi sâu điều tra đánh giá về tiềm năng khai thác sử dụng 74
2.1.2.1. Mục đích 74
2.1.2.2. Vùng điều tra 74
2.1.2.3. Nội dung điều tra nghiên cứu 74
2.1.2.4. Phương pháp điều tra nghiên cứu 75
2.2. Xây dựng Danh lục Đỏ cây thuốc - Xác định loài ưu tiên bảo tồn 75
2.2.1. Khái niệm chung về bảo tồn đa dạng sinh học và vấn đề bảo tồn loài đối với cây thuốc 75
2.2.1.1. Bảo tồn hệ sinh thái 75
2.2.1.2. Bảo tồn loài 76
2.2.1.3. Bảo tồn trong loài 76
2.2.2. Quan điểm loài ưu tiên bảo tồn 76
2.2.3. Khung phân hạng của IUCN, 1994 78
2.2.3.1. Một số định nghĩa theo IUCN 78
2.2.3.2. Cấu trúc các thứ hạng trong khung phân hạng 79
2.2.4. Xây dựng Danh lục Đỏ cây thuốc 87
2.2.4.1. Xác lập danh sách các loài dự kiến 87
2.2.4.2. Thu thập hệ thống hoá các thông tin 88
2.2.4.3. Xây dựng Danh lục Đỏ cây thuốc 92
2.2.5. Xác định loài ưu tiên bảo tồn 93
2.3. Bảo tồn nguyên vị và bảo tồn chuyển vị 94
2.3.1. Bảo tồn nguyên vị 94
2.3.2. Bảo tồn chuyển vị 96
2.3.2.1. Trồng trong các vườn thực vật và vườn cây thuốc 96
2.3.2.2. Bảo quản hạt 97
2.3.2.3. Bảo tồn in vitro 98
2.4. Vai trò quản lý của nhà nước và sự tham gia của công đồng 99
2.4.1. Quản lý và bảo tồn cây thuốc bằng luật định 99
2.4.2. Luật pháp trong quản lý và bảo tồn cây thuốc ở Việt Nam 101
2.4.3. Nâng cao nhận thức của cộng đồng trong bảo tồn cây thuốc 102
2.5. Tư liệu hoá - Trao đổi thông tin và hợp tác 103
2.5.1. Xây dựng cơ sở dữ liệu bảo tồn cây thuốc 103
2.5.2. Trao đổi thông tin và hợp tác quốc tế 106

Phần II
KỸ THUẬT TRỒNG, THU HÁI VÀ SƠ BỘ CHẾ BIẾN CÂY THUỐC 111

TS. Nguyễn Văn Thuận

I. Điều kiện tự nhiên, các vùng sinh thái nông nghiệp và vấn đề sản xuất cây thuốc ở Việt Nam 111
1.1. Vùng Đông Bắc 111
1.2. Vùng Việt Bắc - Hoàng Liên Sơn 112
1.3. Vùng Tây Bắc 115
1.4. Vùng đồng bằng Bắc Bộ 116
1.5. Vùng Bắc Trung Bộ 117
1.6. Vùng duyên hải Nam Trung Bộ 118
1.7. Vùng Tây Nguyên 118
1.8. Vùng Đông Nam Bộ 119
1.9. Vùng đồng bằng sông Cửu Long 120
II. Kỹ thuật trồng và sơ chế cây thuốc 120
2.1. Chọn đất và kỹ thuật làm đất trồng cây thuốc 120
2.1.1. Đất trồng 120
2.1.2. Đất vườn ươm 121
2.2. Gieo, trồng và chăm bón cây thuốc 122
2.2.1. Chuẩn bị hạt giống 122
2.2.2. Tiêu chuẩn để xác định lượng hạt giống 122
2.2.3. Kỹ thuật trồng 125
2.3. Thu hái, sơ chế dược liệu 127
2.4. Kỹ thuật trồng một số cây thuốc phổ biến 128
2.4.1. Kỹ thuật trồng cây thanh cao hoa vàng 128
2.4.2. Kỹ thuật trồng cây ngưu tất 134
2.4.3. Kỹ thuật trồng cây sả chanh 137
2.4.4. Kỹ thuật trồng cây đương quy 143
III. Một số thông số di truyền và thông số thống kê cơ bản sử dụng trong chọn lọc cây trồng dựa trên các đặc điểm định lượng 147
3.1. Phản ứng chọn lọc 148
3.2. Phân sai chọn lọc 150
3.3. Cường độ chọn lọc 151
3.4. Hệ số di truyền của một đặc điểm 151

3.4.1. Hệ số di truyền theo nghĩa rộng 152
3.4.2. Hệ số di truyền theo nghĩa hẹp 153
3.5. Hệ số biến dị của một đặc điểm 156
3.6. Độ vượt thực tế của cây trội được chọn 156
3.7. Tương quan giữa các đặc điểm chọn lọc 157
3.8. Khả năng tổ hợp di truyền 159
3.8.1. Khả năng tổ hợp chung của các giống bố, mẹ 160
3.8.2. Khả năng tổ hợp riêng giữa các giống bố, mẹ 161
3.8.3. Cách tính toán khả năng tổ hợp chung và khả năng tổ hợp riêng (áp dụng ở cây tự thụ phấn) 162
3.8.3.1. Sơ đồ lai di-alen 162
3.8.3.1.1. Sơ đồ lai di-alen hoàn toàn 163
3.8.3.1.2. Sơ đồ lai di-alen thuận nghịch 164
3.8.3.1.3. Sơ đồ lai di-alen không dùng phép lai nghịch 165
3.8.3.1.4. Sơ đồ lai di-alen chỉ dùng các phép lai thuận 166
3.8.3.2. Sơ đồ lai M × N 167
3.9. Các hình thức chọn lọc ở các cá thể 170
3.9.1. Chọn lọc tandem 170
3.9.2. Chọn lọc đồng thời k đặc điểm ở cùng một thế hệ 171
3.9.2.1. Chọn lọc đồng thời k đặc điểm theo tiêu chuẩn độc lập về các đặc điểm 171
3.9.2.2. Chọn lọc theo chỉ số xếp loại của các giống 172
3.9.2.3. Chọn lọc theo tỷ số chọn lọc 172
3.9.2.4. Chọn lọc theo chỉ số chọn lọc 173
3.9.2.5. Chọn lọc theo chỉ số nhân 175
IV. Thu hoạch, chế biến, bảo quản và kiểm tra giống 175
4.1. Thu hoạch 175
4.2. Chế biến và bảo quản giống 176
4.3. Nội dung và phương pháp kiểm tra chất lượng giống và hạt giống 176
4.3.1. Nội dung 176
4.3.1.1. Kiểm tra ngoài đồng 177
4.3.1.2. Kiểm tra trong phòng thí nghiệm 177
4.3.2. Phương pháp lấy mẫu hạt giống kiểm tra 178
4.3.2.1. Nguyên tắc lấy mẫu 179
4.3.2.2. Các phương pháp lấy mẫu 179
4.3.2.3. Phương pháp chia mẫu 180

4.3.2.4. Mức độ lấy mẫu 181
4.3.2.5. Độ không đồng đều của lô hạt giống khi lấy mẫu 181
4.3.2.6. Các thủ tục sau khi lấy mẫu 183
4.3.3. Kiểm tra độ sạch của hạt giống 183
4.3.3.1. Phương pháp kiểm tra 183
4.3.3.2. Tính toán các kết quả phân tích để báo cáo 184
4.3.4. Kiểm tra độ nảy mầm và sức nảy mầm 185
4.3.4.1. Khái niệm và ý nghĩa 185
4.3.4.2. Quy định khi đánh giá các cây mầm 185
4.3.4.3. Phương pháp xác định độ nẩy mầm và sức nẩy mầm 186
4.3.4.3.1. Các phương pháp trên nền giấy thấm nước 186
4.3.4.3.2. Các phương pháp trên nền cát 187
4.3.4.4. Đánh giá các cây mầm và tính toán các kết quả 187
4.3.4.5. Các phương pháp phá ngủ sinh lý 188
4.3.5. Xác định độ ẩm hạt giống 189
4.3.5.1. Khái niệm 189
4.3.5.2. Phương pháp xác định độ ẩm hạt giống 190
4.3.6. Kiểm tra độ thuần 191
4.3.6.1. Phương pháp kiểm tra ở trong phòng 191
4.3.6.2. Phương pháp kiểm tra ngoài đồng ruộng 192
4.3.7. Kiểm tra sức sống hạt giống 194
4.3.7.1. Khái niệm 194
4.3.7.2. Phương pháp xác định sức sống hạt giống 194
4.3.7.2.1. Xác định trực tiếp 194
4.3.7.2.2. Kiểm nghiệm hoá sinh 195
4.3.8. Xác định khối lượng 1000 hạt 196

Phần III

CHIẾT XUẤT DƯỢC LIỆU 199

TS. Nguyễn Duy Thuần

I. Tầm quan trọng của chiết xuất dược liệu 199
II. Nguyên liệu chiết xuất dược liệu 200
2.1. Nguyên liệu 200
2.2. Các hợp chất tự nhiên trong dược liệu 200
2.2.1. Phân loại 200

2.2.1.1. Theo vai trò trong quá trình sinh trưởng của cây 200
2.2.1.2. Theo cấu trúc hoá học 201
2.2.2. Tính phân cực của các hợp chất tự nhiên 201
2.2.2.1. Chất tan trong nước và dung môi phân cực 202
2.2.2.2. Chất tan trong ether và dung môi không phân cực 202
III. Dung môi 202
3.1. Các tương tác của chất tan và dung môi 203
3.1.1. Độ bền (lực) phân tán 203
3.1.2. Các tương tác lưỡng cực 203
3.1.3. Tương tác bởi liên kết hydro. 203
3.2. Sự phân cực của một dung môi 204
3.2.1. Lực rửa giải ε_0 204
3.2.2. Độ phân cực của một dung môi 204
3.2.3. Tham số về độ hoà tan Hildebrand 205
IV. Một số quá trình xảy ra trong quá trình chiết xuất dược liệu 212
4.1. Quá trình khuếch tán 212
4.1.1. Khuếch tán phân tử 212
4.1.2. Khuếch tán đối lưu 213
4.2. Quá trình thẩm thấu 213
4.3. Quá trình thẩm tích 214
V. Những yếu tố ảnh hưởng đến quá trình chiết xuất dược liệu 214
5.1. Những yếu tố thuộc về nguyên liệu 214
5.1.1. Màng tế bào dược liệu 214
5.1.2. Màng nguyên sinh 215
5.1.3. Tạp chất thường có trong dược liệu 215
5.1.3.1. Dược liệu chứa pectin, gôm, chất nhày 215
5.1.3.2. Dược liệu chứa tinh bột 215
5.1.3.3. Dược liệu chứa nhiều chất béo, tinh dầu, nhựa 215
5.1.3.4. Dược liệu chứa enzym 216
5.2 Những yếu tố thuộc về dung môi 216
5.3. Những yếu tố thuộc về kỹ thuật 216
5.3.1. Nhiệt độ chiết xuất 216
5.3.2. Thời gian chiết xuất 216
5.3.3. Độ mịn của dược liệu 216
5.3.4. Khuấy trộn dược liệu và dung môi 216

5.3.5. Siêu âm 216
VI. Các phương pháp chiết xuất 216
6.1. Phân loại 219
6.1.1. Căn cứ vào nhiệt độ 219
6.1.2. Căn cứ vào chế độ làm việc 219
6.1.3. Căn cứ vào chuyển động tương hỗ giữa hai pha 219
6.1.4. Căn cứ vào áp suất làm việc 220
6.1.5. Căn cứ vào trạng thái làm việc của hai pha 220
6.1.6. Dựa vào những biện pháp kỹ thuật đặc biệt 220
6.2. Một số phương pháp chiết xuất 220
6.2.1. Phương pháp chiết xuất gián đoạn 220
6.2.1.1. Phương pháp ngâm 220
6.2.1.2. Phương pháp ngấm kiệt 220
6.2.2. Phương pháp chiết bán liên tục 221
6.2.3. Phương pháp chiết liên tục 221
6.2.3.1. Chiết trong phòng thí nghiệm 221
6.2.3.2. Chiết trong công nghiệp 221

Phần IV
CÁC NHÓM HỢP CHẤT THIÊN NHIÊN CHÍNH TRONG DƯỢC LIỆU 223

Chương I
TINH DẦU VÀ MỘT SỐ DƯỢC LIỆU CHỨA TINH DẦU 223
TS. Nguyễn Duy Thuần

I. Đại cương 223
1.1. Khái niệm và định nghĩa 223
1.2. Thành phần hoá học 225
1.2.1. Các hợp chất terpen mạch hở 226
1.2.2. Các hợp chất terpen mạch vòng 227
1.2.3. Hợp chất có nhân thơm 228
1.2.4. Hợp chất chứa S và N 228
1.2.5. Các thành phần khác 229

1.3. Phân bố trong thiên nhiên 229
1.4. Tính chất của tinh dầu 230
1.4.1. Tính chất vật lý 230
1.4.2. Tính chất hoá học 230
1.5. Chế tạo tinh dầu 233
1.5.1. Phương pháp cất kéo bằng hơi nước 233
1.5.2. Phương pháp chiết bằng dung môi 234
1.5.3. Phương pháp ướp 234
1.5.4. Phương pháp ép 234
1.5.5. Các phương pháp khác 235
1.6. Kiểm nghiệm 236
1.6.1. Lấy mẫu 236
1.6.2. Cảm quan 236
1.6.3. Xác định các hằng số vật lý 236
1.6.4. Các chỉ số hoá học 236
1.6.5. Tìm các tạp chất và chất giả mạo 236
1.6.5. Kiểm nghiệm tinh dầu bằng thuốc thử hoá học 238
1.6.7. Kiểm nghiệm tinh dầu bằng sắc ký 238
1.7. Định lượng tinh dầu trong dược liệu 239
1.8. Định lượng một số thành phần chính của tinh dầu 240
1.8.1. Tinh dầu chứa thành phần chính là ester và alcol 240
1.8.2. Các phenol 241
1.8.3. Aldehyd và ceton 241
1.8.4. Các ether 241
1.8.5. Các ester 242
1.8.6. Các thành phần khác 242
1.9. Tác dụng sinh học và ứng dụng của tinh dầu 242
1.9.1. Trong y dược 242
1.9.2. Trong các ngành kỹ nghệ khác 242
II. Một số dược liệu có chứa tinh dầu 243
2.1. Bạc hà 243
2.2. Hương nhu 246
2.3. Sả 247
2.4. Đại hồi 251
2.5. Quế 253

Chương II
POLYSACCHARID VÀ DƯỢC LIỆU CHỨA POLYSACCHARID 257

GS. Vũ Ngọc Lộ

I. Khái niệm 257
1.1. Sự hoá đông của polysaccharid 257
1.2. Phân lập polysaccharid 258
II. Phân loại polysaccharid 258
2.1. Polysaccharid của vi khuẩn và nấm 258
2.1.1. Dextran 258
2.1.2. Lentinan 261
2.2. Polysaccharid từ tảo 261
2.2.1. Acid alginic (algin) và alginat 262
2.2.1.1. Chế tạo acid alginic và alginat 262
2.2.1.2. Tính chất 262
2.2.1.3. Kiểm nghiệm 263
2.2.1.4. Ứng dụng của alginat 263
2.2. 2. Thạch (agar-agar, gélose) 263
2.2.2.1. Nguồn nguyên liệu 264
2.2.2.2. Chế biến thạch 264
2.2.2.3. Thành phần hóa học 264
2.2.2.4. Kiểm nghiệm 264
2.2.2.5. Độ tinh khiết 264
2.2.2.6. Công dụng 265
2.3. Polysaccharid từ thực vật bậc cao và động vật 265
2.3.1. Polysaccharid đồng thể 265
2.3.1.1. Fructan 265
2.3.1.1.1.Tính chất và thành phần hoá học 265
2.3.1.1.2. Công dụng 266
2.3.1.1.3. Chế phẩm 266
2.3.1.1.4. Dược liệu chứa inulin 266
2.3.1.2. Tinh bột 267
2.3.1.2.1. Tính chất và thành phần hoá học của nguyên liệu cho tinh bột 267
2.3.1.2.2. Kiểm tra chất lượng 269
2.3.1.2.3. Chế tạo tinh bột 269
2.3.1.2.4. Công dụng 270
2.3.1.2.5. Sự thuỷ phân của tinh bột 270

2.3.1.3. Cellulose 271
2.3.1.3.1. Cấu trúc 271
2.3.1.3.2. Tính chất 272
2.3.1.3.3. Ứng dụng 272
2.3.1.3.4. Các nguyên liệu cho cellulose 273
2.3.1.4. Chitin và chitosan 275
2.3.1.4.1. Cấu trúc và tính chất 275
2.3.1.4.2. Chiết xuất chitin 276
2.3.1.4.3. Chế tạo chitosan 277
2.3.1.4.4. Ứng dụng của chitin và chitosan 277
2.3.1.5. Chất xơ tiêu hoá 279
2.3.1.5.1. Định nghĩa 279
2.3.1.5.2. Thành phần chính 279
2.3.1.5.3. Nguồn gốc 280
2.3.1.5.4. Tác dụng sinh học 280
2.3.1.5.5. Kiểm nghiệm xác định các chất xơ dinh dưỡng 281
2.3.1.5.6. Sử dụng chất xơ 281
2.4. Polysaccharid dị thể 281
2.4.1. Gôm và chất nhày 281
2.4.1.1. Khái niệm 281
2.4.1.2. Phân loại gôm và các họ thực vật có chứa gôm 282
2.4.1.3. Các polysaccharid dị thể có manose hay gặp 283
2.4.1.4. Những dược liệu chứa chất nhầy 283
2.4.2. Pectin, polysaccharid pectic 284
2.4.2.1. Cấu trúc 284
2.4.2.2. Nguồn nguyên liệu 285
2.4.2.3. Chế tạo 285
2.4.2.4. Tính chất 286
2.4.2.5. Tác dụng dược lý và công dụng 286
III. Dược liệu chứa polysaccharid khác 287
3.1. Lô hội (*Aloe vera*) 287
3.2. Măng tây (*Asparagus officinalis*) 287
3.3. Hoàng kỳ (*Atragalus membranaceus* (Fish.) Bye var. *Mongholicus* (Bye) Hsiao, *A. membranaceus* (Fish.) Bye). 288
3.4. Đương quy Trung Quốc (*Angelica sinensis* (Oliv.) Diels.) 288
3.5. Đương quy Nhật Bản (*Angelica acutiloba* (Sieb.et Zucc.) Kit.) 288

Chương III
MỘT SỐ HỢP CHẤT PHENOL VÀ DƯỢC LIỆU CHỨA HỢP CHẤT PHENOL 290

TS. Nguyễn Văn Thanh, TS. Nguyễn Bích Thu

I. Phenol và các acid phenolic 291
1.1. Khái niệm chung 291
1.1.1. Các phenol đơn giản 291
1.1.2. Các acid phenolic 291
1.1.2.1. Dẫn xuất của acid benzoic 291
1.1.2.2. Các acid phenolic-dẫn xuất của acid cinnamic 291
1.1.3. Các phenol khác 291
1.2. Tính chất lý, hoá, chiết tách và xác định các acid phenolic 292
1.2.1. Tính chất 292
1.2.2. Phương pháp phân tích 293
1.2.2.1. Phương pháp sắc ký lớp mỏng (SKLM) 293
1.2.2.2. Sắc ký giấy (SKG) 294
1.2.2.3. Sắc ký khí (SKK) 294
1.2.2.4. Sắc ký lỏng cao áp (SKL) 295
1.3. Ứng dụng trong y học 295
II. Coumarin 295
2.1. Giới thiệu 295
2.2. Đặc điểm cấu trúc và phân loại 295
2.2.1. Đặc điểm cấu trúc 295
2.2.2. Phân loại coumarin 297
2.2.2.1. Coumarin đơn giản 297
2.2.2.2. Furanocoumarin 297
2.2.2.3. Pyranocoumarin 298
2.3. Tính chất, chiết xuất và phân tích coumarin 298
2.3.1. Lý tính 298
2.3.2. Hoá tính 298
2.3.3. Chiết xuất 298
2.3.4. Tính chất phổ 298
2.3.5. Các phương pháp phân tích coumarin 299
2.3.5.1. Các acid hydrocinnamic và hydroxycoumarin 299
2.3.5.2. Furanocoumarin 300

2.4. Các cây có chứa coumarin 300
2.5. Tác dụng dược lý của coumarin 301
2.5.1. Tác dụng chống viêm 301
2.5.2. Tác dụng kháng khuẩn và nấm 302
2.5.3. Tác dụng khác 302
2.5.4. Độc tính của coumarin 303
2.5.4.1. Độc tố aflatoxin 303
2.5.4.2. Độc tố ochratoxin 303
2.5.4.3. Những cây nước ngoài có chứa coumarin cấm hoặc thận trọng khi sử dụng 303
2.6. Ứng dụng của coumarin trong công nghiệp dược phẩm và hoá học 304
III. Tanin 304
3.1. Khái niệm chung 304
3.2. Cấu trúc hoá học của tanin và phân loại 305
3.2.1. Cấu trúc hoá học 305
3.2.2. Phân loại tanin 306
3.2.2.1. Tanin thuỷ phân được (HT) 306
3.2.2.2. Tanin ngưng tụ (proanthocyanidin-PA) 307
3.3. Tính chất, chiết xuất và phân tích tanin 308
3.3.1. Tính chất của tanin 308
3.3.1.1. Tính chất chung 308
3.3.1.2. Tính chất của tanin thuỷ phân được 308
3.3.1.3. Tính chất của tanin ngưng tụ (proanthocyanidin) 308
3.3.2. Chiết xuất 309
3.3.3. Phương pháp phân tích tanin 310
3.3.3.1. Định tính 310
3.3.3.2. Định lượng 310
3.4. Tác dụng của tanin 310
3.4.1. Tác dụng sinh học 310
3.4.2. Hoạt tính sinh học của tanin và các sản phẩm phân huỷ của tanin 312
3.4.3. Tương tác sinh dược học của tanin 312
3.5. Một số dược liệu chứa hàm lượng tanin cao 313
3.5.1. Cau 313
3.5.2. Long nha thảo 313
3.5.3. Chè 313

3.5.4. Sồi 313
3.5.5. Sồi trắng 313
IV. Lignan, neolignan và các hợp chất liên quan 313
4.1. Giới thiệu chung 313
4.2. Phân tích các lignan 315
4.3. Tác dụng sinh học của lignan 315

Chương IV

ALCALOID TRONG DƯỢC LIỆU 321

GS. TS. Phạm Thanh Kỳ

I. Đại cương 321
1.1. Khái niệm về alcaloid 321
1.2. Tính chất chung của alcaloid 322
1.2.1. Lý tính 322
1.2.2. Hoá tính 324
1.3. Định tính alcaloid trong dược liệu 326
1.3.1. Chiết xuất alcaloid trong dược liệu 326
1.3.2. Định tính alcaloid bằng phản ứng hóa học 326
1.3.2.1. Phản ứng tạo tủa 326
1.3.2.2. Phản ứng tạo màu 327
1.3.2.3. Phản ứng tạo tinh thể trên phiến kính 330
1.3.2.4. Vi thăng hoa 330
1.3.3. Định tính bằng sắc ký lớp mỏng 330
1.4. Định lượng alcaloid trong dược liệu 331
1.4.1. Phương pháp cân 332
1.4.2.Phương pháp acid-base (phương pháp trung hoà) 332
1.4.3. Phương pháp so màu 334
1.4.4. Phương pháp sắc ký lỏng hiệu năng cao (HPLC) 335
1.5. Sinh tổng hợp alcaloid 336
1.5.1. Những phản ứng chung trong quá trình tạo thành alcaloid 336
1.5.1.1. Sự tạo thành hợp chất amid 337
1.5.1.2. Sự tạo thành azomethin 337
1.5.1.3. Ngưng tụ Mannich 338
1.5.1.4. Sự ngưng tụ amin vào hệ thống quinoid 338
1.5.2. Một số ví dụ về sinh tổng hợp alcaloid 339

1.5.2.1 Sự đóng vòng của ornithin và lysin 339
1.5.2.2. Sinh tổng hợp nicotiana-alcaloid 340
1.5.2.3. Sinh tổng hợp tropan-alcaloid 342
1.5.2.4. Sinh tổng hợp colchicin 343
1.6. Cấu trúc và phân loại alcaloid 344
1.6.1. Alcaloid không có nitơ ở dị vòng 344
1.6.2. Alcaloid có nitơ ở dị vòng 346
1.6.2.1. Alcaloid có nhân pyrrol và pyrrolidin 346
1.6.2.2. Alcaloid có nhân pyrrolizidin 347
1.6.2.3. Alcaloid có nhân pyridin và piperidin 347
1.6.2.4. Alcaloid có nhân tropan 347
1.6.2.5. Alcaloid có nhân quinolin 348
1.6.2.6. Alcaloid có nhân isoquinolin 348
1.6.2.6.1. Cấu trúc benzylisoquinolin 349
1.6.2.6.2. Cấu trúc tetrahydroisoquinolin 349
1.6.2.6.3. Cấu trúc ptalidisoquinolin 349
1.6.2.6.4. Cấu trúc protoberberin 349
1.6.2.6.5. Cấu trúc protopin 350
1.6.2.6.6. Cấu trúc morphinan 350
1.6.2.6.7. Cấu trúc benzophenanthridin 350
1.6.2.6.8. Cấu trúc emetin 351
1.6.2.6.9. Cấu trúc apomorphin 351
1.6.2.7. Alcaloid có nhân imidazol 351
1.6.2.8. Alcaloid có nhân quinolizidin 352
1.6.2.9. Alcaloid có nhân indol 352
1.6.2.9.1. Cấu trúc indolalkylamin 352
1.6.2.9.2. Cấu trúc physostigmin 353
1.6.2.9.3. Cấu trúc ergolin 353
1.6.2.9.4. Cấu trúc harman 354
1.6.2.9.5. Cấu trúc yohimbin 354
1.6.2.9.6. Cấu trúc sarpagin 354
1.6.2.9.7. Cấu trúc ajmalin 355
1.6.2.9.8. Cấu trúc ellipticin 355
1.6.2.9.9. Cấu trúc vindolinin 355
1.6.2.9.10. Cấu trúc strychnin 355
1.6.2.9.11. Cấu trúc dime 356

1.6.2.9.12. Cấu trúc oxindol 357
1.6.2.10. Alcaloid có nhân quinazolin 358
1.6.2.11. Alcaloid có nhân acridon 359
1.6.2.12. Alcaloid có nhân purin 359
1.6.2.13. Alcaloid có nhân steroid 359
1.6.2.14. Alcaloid có cấu trúc terpenoid 360
II. Một số nhóm alcaloid quan trọng 366
2.1. Nhóm tropan-alcaloid 366
2.1.1. Cấu trúc khung cơ bản của nhóm tropan-alcaloid 368
2.1.1.1. Tropin 368
2.1.1.2. Atropin 369
2.1.1.3. Scopolamin 370
2.1.1.4. Cocain 371
2.1.2. Nguồn gốc 371
2.1.2.1. Hyoscyamin 371
2.1.2.2. Scopolamin 371
2.1.2.3. Cocain 372
2.1.3. Sinh tổng hợp tropan-alcaloid (xem phần đại cương) 372
2.1.4. Kiểm nghiệm 372
2.1.4.1. Định tính 372
2.1.4.2. Định lượng 372
2.1.5. Tác dụng, sử dụng và dạng dùng 373
2.2. Nhóm morphinan-alcaloid 375
2.2.1. Cấu trúc hoá học của nhóm morphinan 375
2.2.2. Một số alcaloid quan trọng 379
2.2.2.1. Morphin 379
2.2.2.1.1. Cấu trúc và tính chất hoá học 379
2.2.2.1.2. Định tính morphin bằng phản ứng hoá học 380
2.2.2.1.3. Định tính morphin bằng sắc ký lớp mỏng 380
2.2.2.1.4. Định lượng morphin 381
2.2.2.1.5. Sinh tổng hợp morphin 382
2.2.2.1.6. Tác dụng và sử dụng morphin 384
2.2.2.2. Codein 384
2.2.2.3. Thebain 385
2.3. Nhóm protoberberin-alcaloid 386
2.3.1. Cấu trúc hoá học của nhóm protoberberin 386

2.3.2. Một số alcaloid quan trọng ... 392
2.3.2.1. Berberin ... 392
2.3.2.1.1. Cấu trúc hoá học ... 392
2.3.2.1.2. Nguồn gốc ... 392
2.3.2.1.3. Tính chất ... 392
2.3.2.1.4. Định tính ... 392
2.3.2.1.5. Định lượng ... 393
2.3.2.1.6. Sinh tổng hợp berberin ... 394
2.3.2.1.7. Tác dụng và công dụng ... 395
2.3.2.2. Palmatin ... 396
2.3.2.2.1. Cấu trúc hoá học ... 396
2.3.2.2.2. Nguồn gốc ... 386
2.3.2.2.3. Tính chất ... 396
2.3.2.2.4. Định tính palmatin trong dược liệu ... 396
2.3.2.2.5. Định lượng ... 397
2.3.2.2.6. Tác dụng và công dụng ... 397
2.4. Nhóm cinchona-alcaloid ... 397
2.4.1. Cấu trúc hoá học của nhóm cinchona ... 397
2.4.2. Nguồn gốc ... 400
2.4.3. Sinh tổng hợp cinchona-alcaloid ... 401
2.4.4. Kiểm nghiệm ... 402
2.4.4.1. Định tính ... 402
2.4.4.2. Định lượng ... 402
2.4.5. Tác dụng và sử dụng ... 403

Chương V
GLYCOSID TIM VÀ DƯỢC LIỆU CHỨA GLYCOSID TIM 406
GS. Vũ Ngọc Lộ

I. Định nghĩa ... 406
II. Phân bố trong thiên nhiên ... 406
III. Cấu trúc của glycosid tim ... 407
3.1. Cấu trúc của phần đường ... 407
3.2. Cấu trúc hoá học của genin ... 407
IV. Liên quan giữa cấu trúc và hoạt tính sinh học ... 408
V. Sinh tổng hợp của glycosid tim ... 408

VI. Tính chất 409
6.1. Tính chất lý, hoá 409
6.2. Định tính 409
6.2.1. Phản ứng màu 410
6.2.2. Phản ứng với genin 410
6.2.3. Phản ứng với cardenolid 410
6.2.4. Phản ứng huỳnh quang 410
6.2.5. Sắc ký 411
6.2.6. Quang phổ 411
6.3. Định lượng 412
6.3.1. Định lượng bằng phương pháp lý - hoá 412
6.3.2. Định lượng bằng đo màu 412
6.3.3. Định lượng sau khi làm sắc ký lớp mỏng 412
6.3.4. Định lượng bằng phương pháp sắc ký lỏng cao áp 413
6.3.5. Định lượng bằng phương pháp sinh vật 413
VII. Tác dụng dược lý 413
7.1. Tác dụng trên tim 413
7.2. Tác dụng trên hệ thần kinh trung ương 414
7.3. Tác dụng trên hệ tiết niệu 414
VIII. Dược động học 414
IX. Sử dụng các dược liệu chứa glycosid tim 415
9.1. Độc tính 415
9.2. Dạng bào chế 415
9.3. Chỉ định 415
9.4. Những điều chú ý khi sử dụng 415
X. Các dược liệu chứa glycosid tim 416
10.1. Digital tía (dương địa hoàng hoa tím) 416
10.2. Digital lông 419
10.3. Các loài *Strophanthus* trên thế giới 422
10.3.1. *Strophanthus gratus* (Wall.et Hook.) Baillon 422
10.3.2. *Strophanthus* Kombe Oliver 423
10.4. Các loài *Strophanthus* ở Việt Nam 423
10.4.1. Sừng trâu 423
10.4.2. Sừng dê hoa vàng 424
10.4.3. Trúc đào 425
10.4.4. Thông thiên 426

10.4.5. Đay 428
10.4.5.1. Đay quả dài 428
10.4.5.2. Đay quả tròn 428
10.5. Một số dược liệu khác chứa glycosid tim 429
10.5.1. Cây sui 429
10.5.2. Bồng bồng 430
10.5.3. Mướp sát 431
10.5.4. *Acokanthera schimperi* (A.DC.) Schweinf. 431
10.5.5. *Apocynum cannabinum* L. 431
10.5.6. *Convallaria majalis* L. 431
10.5.7. *Adonis vernalis* L. 431
10.5.8. *Erysimum canescens* Roth. 431
10.5.9. *Periploca graeca* L. 432
10.5.10. *Helloborus caucasicum* A.Br. và *Helloborus purpurascens* V. et K. 432

Chương VI
ĐẠI CƯƠNG VỀ SAPONIN VÀ DƯỢC LIỆU CHỨA SAPONIN 434
PGS.TS. Nguyễn Thượng Dong

I. Saponin steroid 434
1.1. Phân loại 435
1.1.1. Saponin furostanol 436
1.1.2. Saponin spirostanol 436
1.1.3. Saponin aminofurostanol 437
1.1.4. Saponin sipirosolanon 437
1.1.5. Saponin solanidanol 437
1.2. Phân bố 438
1.3. Sinh tổng hợp saponin steroid trong cây thuốc 438
1.4. Phương pháp chiết xuất 439
1.5. Phương pháp phân tích 439
1.6. Tác dụng sinh học 440
II. Saponin triterpen 442
2.1. Cấu tạo hoá học và phân loại 442
2.2. Saponin triterpen tetracyclic 443
2.2.1. Nhóm damaran 443

2.2.2. Nhóm cycloartan 443
2.2.3. Nhóm lanostan 443
2.2.4. Nhóm cucurbitan 443
2.2.5. Nhóm β-onoserin 444
2.3. Saponin triterpen pentacyclic 444
2.3.1. Nhóm olean 445
2.3.2. Nhóm ursan 446
2.3.3. Nhóm lupan 447
2.3.4. Nhóm hopan 447
2.4. Tính chất 448
2.5. Phân bố 448
2.6. Sinh tổng hợp saponin triterpen trong cây thuốc 448
2.7. Phương pháp chiết xuất và phân tích 449
2.8. Tác dụng 450
III. Dược liệu chứa saponin 451
3.1. Dược liệu chứa saponin steroid 451
3.1.1. Sơn tỳ giải 451
3.1.2. Thiên môn 454
3.1.3. Cà gai leo 456
3.2. Dược liệu chứa saponin triterpen 459
3.2.1. Bồ kết 459
3.2.2. Cam thảo bắc 462
3.2.3. Mướp đắng 467
3.2.4. Sâm Việt Nam 472
3.2.5. Ngưu tất 485

Phần V

CÁC PHƯƠNG PHÁP HOÁ LÝ ỨNG DỤNG TRONG PHÂN TÍCH KIỂM NGHIỆM DƯỢC LIỆU 493

Chương I

CÁC PHƯƠNG PHÁP SẮC KÝ 493

PGS.TS. Bùi Thị Bằng

I. Phương pháp sắc ký lớp mỏng (SKLM) 493
1.1. Nguyên lý 494

1.2. Kỹ thuật sắc ký lớp mỏng 495
1.2.1. Pha tĩnh (các chất hấp phụ) 495
1.2.2. Pha động và thuốc thử hiện màu 499
1.3. Phương pháp tiến hành sắc ký lớp mỏng 510
1.3.1. Dụng cụ 510
1.3.2. Cách tiến hành 511
1.4. Ứng dụng sắc ký lớp mỏng trong xác định dấu vân tay hoá học của dược liệu và thuốc 512
1.4.1. *Astragalus* và *hedyarum* 513
1.4.2. Đương quy Trung Quốc 514
1.4.3. Thăng ma 516
1.4.4. *Crategus* sp. 517
1.4.5. Nấm Linh chi 518
1.4.6. Bạch quả 520
1.4.7. Ngũ vị tử 523
1.4.8. *Valeriana officinalis* 523
1.5. Ứng dụng sắc ký lớp mỏng trong định lượng hoạt chất của dược liệu và thuốc từ dược liệu 525
1.5.1. Bán định lượng hoạt chất bằng sắc ký lớp mỏng 525
1.5.2. Định lượng sau khi rửa vết kết hợp với quang phổ tử ngoại 526
1.5.3. Định lượng so màu bằng sắc ký lớp mỏng kết hợp với kỹ thuật quét phổ truyền hình 527
1.5.3.1. Các bước tiến hành định lượng hoạt chất bằng kỹ thuật quét phổ truyền hình 528
1.5.3.2. Định lượng một số nhóm chất 529
1.5.3.2.1. Định lượng acid caffeic 529
1.5.3.2.2. Định lượng terpenoid 530
1.5.3.2.3. Định lượng glycosid 532
II. Phương pháp sắc ký giấy (SKG) 536
2.1. Nguyên tắc 536
2.2. Phương pháp tiến hành 537
2.2.1. Chuẩn bị bình sắc ký 537
2.2.2. Chuẩn bị dung môi 538
2.2.2.1. Cách chọn dung môi 538
2.2.2.2. Phối hợp giữa nước và dung môi hữu cơ 538
2.2.2.3. Các hệ dung môi 539

2.2.3. Chuẩn bị giấy 540
2.2.4. Chấm sắc ký 541
2.2.5. Triển khai sắc ký 541
2.2.5.1. Phương pháp sắc ký đi lên 541
2.2.5.2. Phương pháp sắc ký đi xuống 542
2.2.5.3. Phương pháp sắc ký nằm ngang 542
2.2.5.4. Phương pháp sắc ký vòng 542
2.2.5.5. Phương pháp triển khai nhiều lần và cho dung môi chạy quá cỡ giấy 543
2.2.5.6. Phương pháp sắc ký hai chiều 544
2.3. Ứng dụng sắc ký giấy trong phân tích và kiểm nghiệm dược liệu 545
2.3.1. Phân tích acid hữu cơ 545
2.3.2. Phân tích acid amin 545
2.3.3. Phân tích coumarin 546
2.3.4. Phân tích đường (saccharid) 546
2.3.5. Phân tích flavonoid 546
2.3.6. Phân tích glycosid tim 547
2.3.7. Phân tích iridoid 552
2.3.8. Phân tích quinon và dẫn xuất 552
2.3.9. Phân tích saponin 553
2.3.10. Phân tích sterol 554
III. Phương pháp sắc ký khí (SKK) 555
3.1. Nguyên tắc 555
3.2. Thiết bị 555
3.2.1. Nguồn cung cấp khí 556
3.2.2. Bộ phận nạp mẫu (cổng bơm mẫu) 556
3.2.3. Cột sắc ký 557
3.2.4. Hệ thống phát hiện (detector) 558
3.2.4.1.Detector ion hoá ngọn lửa 558
3.2.4.2. Detector dẫn nhiệt 559
3.2.4.3. Detector cộng kết điện tử 560
3.2.4.4. Detector phát xạ nguyên tử 560
3.2.4.5. Detector quang hoá 562
3.2.4.6. Detector quang kế ngọn lửa 564
3.2.4.7. Detector nitrogen-phosphor 565
3.2.4.8. Detector quang ion hoá 565

3.2.4.9. Detector khối phổ 567
3.3. Các đại lượng đặc trưng của sắc ký khí 572
3.3.1. Số đĩa lý thuyết 572
3.3.2. Hệ số dung lượng 542
3.3.3. Hệ số phân giải 573
3.3.4. Hệ số đối xứng 573
3.4. Phương pháp tiến hành sắc ký khí 574
3.5. Thuốc thử dùng trong sắc ký khí 574
3.6. Chuẩn nội 575
3.7. Chuẩn hoá 575
3.8. Ứng dụng sắc ký khí trong kiểm nghiệm dược liệu 575
3.8.1. Xác định hàm lượng các thành phần chính của tinh dầu bằng sắc ký khí 575
3.8.2. Xác định hàm lượng nước trong dược liệu 575
3.8.3. Xác định hàm lượng ethanol 576
3.8.4. Xác định dư lượng thuốc bảo vệ thực vật cơ clo 577
3.8.5. Xác định dư lượng thuốc bảo vệ thực vật cơ phosphor 578
IV. Phương pháp sắc ký lỏng hiệu năng cao (SKL) 581
4.1. Nguyên tắc 581
4.2. Thiết bị 582
4.3. Các loại detector 582
4.3.1. Detector khúc xạ 583
4.3.2. Detector huỳnh quang 583
4.3.3. Detector tử ngoại khả kiến và detector chùm tia quang diod 584
4.3.4. Detector tán xạ ánh sáng bay hơi 584
4.4. Pha tĩnh (cột sắc ký) 598
4.5. Pha động 599
4.6. Các đại lượng đặc trưng của quá trình sắc ký 599
4.6.1. Số đĩa lý thuyết 599
4.6.2. Độ phân giải 600
4.6.3. Hệ số đối xứng 601
4.7. Phương pháp tiến hành 601
4.8. Ứng dụng trong kiểm nghiệm dược liệu 602
4.8.1. Xác định hàm lượng hoạt chất trong dược liệu 602
4.8.2. Nhận dạng và định lượng aflatoxin trong dược liệu 605

Chương II
CÁC PHƯƠNG PHÁP QUANG PHỔ 608

PGS.TS. Nguyễn Kim Cẩn

I. Các phương pháp quang phổ hấp thụ tử ngoại khả kiến 608
1.1. Những khái niệm cơ bản 608
1.1.1. Sóng và năng lượng 608
1.1.2. Mức năng lượng điện tử của hợp chất hữu cơ 609
1.1.3. Quy tắc chọn lọc 611
1.1.4. Những quy luật của sự hấp thụ ánh sáng 612
1.1.4.1. Định luật Lambert 612
1.1.4.2. Định luật Beer 613
1.1.5. Những phương pháp biểu hiện phổ hấp thụ 613
1.2. Thiết bị 615
1.3. Ứng dụng 619
1.3.1. Ứng dụng phổ hấp thụ trong phân tích định tính và nghiên cứu cấu trúc phân tử 619
1.3.1.1. Nhận biết sắc tố thực vật 621
1.3.1.2. Những sắc tố carotinoid 622
1.3.2. Ứng dụng trong phân tích định lượng 629
1.3.2.1. Định lượng một chất theo chất chuẩn đối chiếu 631
1.3.2.2. Định lượng một chất không có chất chuẩn đối chiếu 632
1.3.3. Ứng dụng trong phân tích hỗn hợp 632
1.3.3.1. Định lượng trực tiếp thành phần của hỗn hợp chất hấp thụ 632
1.3.3.2. Định lượng gián tiếp thành phần của hỗn hợp chất hấp thụ 633
1.4. Dung môi 633
1.4.1. Những dung môi được ứng dụng trong đo phổ hấp thụ 633
1.4.2. Ảnh hưởng của dung môi đến vị trí và cường độ của vân hấp thụ 635
1.4.3. Ảnh hưởng của nhiệt độ 635
II. Phương pháp quang phổ hồng ngoại 638
2.1. Vị trí của phổ hồng ngoại trong phổ quang học 638
2.2. Số vân trong phổ 640
2.3. Những tần số đặc trưng của nhóm 641

2.4. Những dữ liệu thực nghiệm theo phổ hồng ngoại hấp thụ của các hợp chất hữu cơ 646
2.4.1. Những hydrocarbon 647
2.4.1.1. Những hydrocarbon no 647
2.4.1.2. Những alkan vòng 651
2.4.1.3. Những alken 651
2.4.1.4. Những hydrocarbon có nối đôi liên hợp 653
2.4.1.5. Những alkyl 653
2.4.1.6. Những hợp chất thơm 654
2.4.2. Những hợp chất hữu cơ có các nhóm chức 656
2.4.2.1. Những hợp chất hữu cơ chứa oxy 656
2.4.2.1.1. Những hợp chất chứa nhóm –OH 656
2.4.2.1.2. Những ether 659
2.4.2.1.3. Những hợp chất hữu cơ chứa nhóm carbonyl (>C=O) 659
2.4.2.2. Những hợp chất hữu cơ của nitơ 666
2.4.2.2.1. Nhóm amin 666
2.4.2.2.2. Muối của amin 668
2.4.2.2.3. Nhóm azomethin 668
2.4.2.2.4. Nhóm nitril và isonitril 669
2.4.2.2.5. Nhóm azo 670
2.4.2.2.6. Nhóm diazo 670
2.4.2.2.7. Nhóm nitro 671
2.4.2.2.8. Nhóm nitroso 672
2.4.3. Những hợp chất hữu cơ chứa nguyên tử halogen 672
2.4.4. Những hợp chất hữu cơ chứa lưu huỳnh 673
2.4.4.1. Những mercaptan và thiophenol 673
2.4.4.2. Sulfoxyd 674
2.4.4.3. Sulfon (–SO_2) 674
2.5. Những yếu tố ảnh hưởng đến phổ hồng ngoại 674
2.5.1. Ảnh hưởng của lực liên kết và khối lượng 675
2.5.2. Ảnh hưởng của trạng thái tập hợp 675
2.5.3. Ảnh hưởng của dung môi 676
2.5.4. Liên kết cầu hydro 676
2.5.5. Hiệu ứng điện tử- Hiệu ứng cảm ứng và mesome 677
2.5.6. Ảnh hưởng sức căng của vòng 678

2.6. Những điều kiện đo phổ hấp thụ trong vùng hồng ngoại 678
2.6.1. Mẫu dạng khí 678
2.6.2. Mẫu dạng lỏng 678
2.6.3. Mẫu rắn 679
2.7. Thiết bị 679
2.7.1. Sơ đồ cấu tạo phổ kế hồng ngoại 679
2.7.1.1. Nguồn sáng 679
2.7.1.2. Bộ tách ánh sáng đơn sắc 680
2.7.1.3. Hệ thống nhận tín hiệu 681
2.7.2. Sơ đồ cấu tạo phổ kế hồng ngoại biến đổi Fourier (F.T.IR) 681
2.7.2.1. Nguồn sáng 681
2.7.2.2. Giao thoa kế 681
2.7.2.3. Detector 683
2.7.2.4. Máy tính 683
2.8. Ứng dụng phổ hồng ngoại 683
2.8.1. Phân tích chức của hợp chất 683
2.8.2. Định tính các hợp chất 684
2.8.3. Phân tích định lượng 684

PHẦN I

ĐIỀU TRA CÂY THUỐC VÀ NGHIÊN CỨU BẢO TỒN

TS. Nguyễn Tập

CHƯƠNG I
ĐIỀU TRA CÂY THUỐC

MỞ ĐẦU

Từ ngàn xưa, trong quá trình tìm kiếm thức ăn bằng hái lượm, loài người đã phát hiện ra thứ gì có độc thì tránh; thứ gì ăn được thì trở thành nguồn lương thực - thực phẩm; còn thứ gì ăn vào khỏi bệnh thì dần được tích luỹ thành kinh nghiệm dùng làm thuốc, truyền tụng từ đời này qua đời khác. Cùng với sự tiến hoá và phát triển của xã hội, kho tàng kiến thức về cây thuốc của nhân loại ngày nay đã trở nên vô cùng phong phú.

Theo tài liệu của Tổ chức Y tế Thế giới (WHO) năm 1985, trong số khoảng 250.000 loài thực vật bậc thấp cũng như bậc cao đã biết, khoảng 20.000 loài được sử dụng làm thuốc ở các mức độ khác nhau. Trong đó, Ấn Độ được biết có trên 6000 loài; Trung Quốc trên 5000 loài; riêng về thực vật có hoa ở một vài nước Đông Nam Á đã có tới 2000 loài là cây thuốc.

Nằm trong vành đai khí hậu nhiệt đới gió mùa nóng và ẩm; Việt Nam có nguồn tài nguyên thực vật phong phú và đa dạng, trong đó có nhiều loài được dùng làm thuốc. Hơn nữa, cộng đồng các dân tộc Việt Nam vốn cũng có nhiều kinh nghiệm độc đáo trong việc sử dụng các loại cây cỏ để làm thuốc.

Từ các tiềm năng sẵn có này, muốn đưa vào khai thác sử dụng bền vững, nhất thiết phải tiến hành điều tra, nghiên cứu một cách khoa học.

Điều tra cây thuốc là việc làm đầu tiên trong quá trình nghiên cứu về cây thuốc, trước khi đưa vào khai thác sử dụng hoặc phát triển.

Mục đích điều tra cây thuốc:

- Thu thập, xác định về loài cùng với những giá trị sử dụng của chúng trong cộng đồng; xây dựng Danh lục các loài cây thuốc hiện có ở khu vực đã điều tra.

- Nắm vững về mặt phân bố, sơ bộ về trữ lượng và một số đặc điểm sinh học khác của những cây thuốc quan trọng... kịp thời giới thiệu cho khai thác đưa vào sử dụng; giới thiệu cho nghiên cứu hoá học và dược học những loài cây thuốc mới; đề xuất các biện pháp khai thác hợp lý, bảo vệ và phát triển.

Để tiến hành một đợt điều tra (hay một dự án về điều tra) cây thuốc nói chung, đều phải qua các bước cụ thể như sau:

I. CHUẨN BỊ

1.1. Khảo sát tiền trạm

Bao gồm các việc:

1. Liên hệ với các cấp chính quyền địa phương nơi điều tra và các ngành có liên quan để báo cáo, lên kế hoạch phối hợp và hỗ trợ trong quá trình điều tra.

2. Tìm hiểu sơ bộ về mặt hành chính; các đặc điểm về địa hình, thảm thực vật; sự phân bố dân cư, phong tục tập quán - xã hội.

3. Thu thập các tài liệu đã tiến hành điều tra khảo sát trước đó về cây thuốc, tài nguyên rừng / tài nguyên sinh vật (nếu có).

4. Xác định các điểm tập kết, nguồn cung cấp hậu cần tại chỗ; dự kiến các tuyến điều tra và điểm điều tra.

Riêng về các tuyến điều tra và ô tiêu chuẩn cần được thiết kế sao cho đảm bảo tính chất điển hình; đồng thời lại có thể ghi nhận được một cách đầy đủ nhất về số lượng loài cây thuốc hiện có trong khu vực được điều tra.

3(T) - 387

1.2. Lực lượng điều tra

Tuỳ theo mục đích và phạm vi của vùng điều tra (rộng hay hẹp) mà tổ chức đoàn điều tra có nhiều hay ít người.

Nhìn chung, một đoàn điều tra về cây thuốc thường gồm các thành phần như sau:

1. Chuyên gia về điều tra cây thuốc: Là những người chuyên làm công tác điều tra cây thuốc, có vốn kiến thức và khả năng nhận biết được nhiều cây thuốc trên thực địa - những người này là lực lượng nòng cốt trong đoàn điều tra.

2. Những thầy lang (ông lang - bà mế) - những người có nhiều kinh nghiệm sử dụng cây thuốc trong cộng đồng. Bên cạnh đó là những người già, có thể họ không biết dùng nhiều cây thuốc, song lại có một hai bài thuốc, phương thuốc cổ truyền hết sức độc đáo.

Những người này là đối tượng để phỏng vấn, thu thập các cây thuốc và bài thuốc dân tộc.

3. Một số chuyên gia khác về lâm sản, thảm thực vật rừng, phân loại thực vật. Một số cán bộ làm công tác dược liệu ở công ty dược và hiệu thuốc ở địa phương.

4. Nhân viên kỹ thuật (làm tiêu bản, dụng cụ và thiết bị điều tra).

5. Người dẫn đường, leo trèo giỏi để lấy mẫu, mang vác mẫu và làm nhiệm vụ hậu cần.

1.3. Dụng cụ, thiết bị phục vụ cho quá trình điều tra

1. Bản đồ địa hình UTM - 1/50.000 hoặc lớn hơn và các loại bản đồ khác (nếu có).

2. Dụng cụ đo đạc và quang học: thước các loại; địa bàn; máy định vị vệ tinh (GPS); máy đo độ cao (Altimetre); máy đo chiều cao cây (Brumlei); máy đo độ dốc; kính lúp cầm tay và lúp 2 mắt để bàn; máy ảnh; camera...

3. Dụng cụ thu thập và làm tiêu bản: Dao; thuổng; kéo cắt cành (có loại nối dài để cắt cành cao); cặp mang; cặp ép; giấy báo cũ; nhãn; phiếu mô tả; túi ni lông và túi giấy chuyên dụng các loại; cồn và dung dịch bảo quản mẫu tạm thời...

4. Một số sách và tài liệu cẩm nang để tra cứu nhanh.

5. Các loại biểu mẫu điều tra in sẵn (nhiều); một số tài liệu để tra cứu.

6. Phương tiện vận chuyển và đi lại trong quá trình điều tra (xe ôtô - xăng dầu: hoặc các phương tiện khác).

7. Lương thực, thực phẩm, thuốc phòng bệnh và sơ cứu.

1.4. Tập huấn

1. Giới thiệu cụ thể về kế hoạch đợt điều tra cho các thành viên.

2. Hướng dẫn quy trình và phương pháp.

3. Có thể giới thiệu trước về một số cây thuốc quan trọng (là đối tượng tìm kiếm của đợt) có triển vọng phát hiện ở khu vực điều tra.

4. Phân chia thành các nhóm tổ chuyên môn - kỹ thuật.

II. ĐIỀU TRA THỰC ĐỊA

2.1. Điều tra phỏng vấn thu thập cây thuốc trong cộng đồng

Tùy theo nội dung và mục đích của đợt điều tra, mà người ta sử dụng các phương pháp phỏng vấn khác nhau, như: *phỏng vấn không cấu trúc, phỏng vấn bán cấu trúc hay phỏng vấn có cấu trúc*. Tuy nhiên, với mục đích điều tra thu thập cây thuốc và cách sử dụng cây thuốc trong cộng đồng, thường dùng phương pháp *phỏng vấn có cấu trúc, với bộ câu hỏi đã soạn thảo được ghi thành phiếu điều tra*. Phương pháp này còn gọi là *phương pháp điều tra mở*, nghĩa là *người điều tra không giới hạn đối tượng về một nhóm cây thuốc, chữa trị một nhóm bệnh nào đó*. Người được phỏng vấn thường là những "ông lang", "bà mế" (thường gọi là "Thầy lang") hay người biết cây thuốc, *tình nguyện cung cấp thông tin, giới thiệu một cách vô tư những cây thuốc đã biết cho người điều tra*.

Có hai cách cung cấp thông tin để cho người giới thiệu cây thuốc lựa chọn:

Cách thứ nhất: Đến tận nhà báo trước cho người cung cấp thông tin đi lấy trước những cây thuốc, sau đó giới thiệu lần lượt cho người điều tra ghi chép. Cách này thường được áp dụng với những người già yếu, không đi thực địa được, họ bảo người nhà của họ đi lấy. Cán bộ điều tra hướng dẫn tỷ mỷ cách lấy mẫu, sao cho có thể được sử dụng làm tiêu bản.

Cách thứ hai: Người giới thiệu cây thuốc cùng đi thực địa, đưa cán bộ điều tra đến nơi có cây thuốc để giới thiệu và thu thập tiêu bản.

Các thông tin cần phỏng vấn và thu thập được chuẩn bị trước trong phiếu điều tra cây thuốc và bài thuốc.

2.1.1. Một số lưu ý khi phỏng vấn để thu thập đủ thông tin cho phiếu điều tra

* Họ tên người cung cấp thông tin, bao nhiêu tuổi, thuộc Dân tộc nào.

* Nghề nghiệp chính và nơi ở hiện nay (ghi cụ thể ở bản / buôn, thôn, xã, huyện, tỉnh nào).

Hai mục thông tin này cần ghi đầy đủ để còn liên hệ lại khi cần thiết.

* Tên cây thuốc theo tiếng dân tộc ở địa phương, kèm theo dịch nghĩa. Tên gọi cây thuốc thường được đặt với một ý nghĩa nào đó, đôi khi gợi ý về công dụng của cây thuốc.

Ví dụ: Mạy tảng nam là tên gọi cây Ngũ gia bì gai (*Acanthopanax trifoliatus* (L.) Voss) của đồng bào Tày ở Cao Bằng, Lạng Sơn: "Mạy tảng" là tên các loại "Ngũ gia bì" nói chung; "Nam" có nghĩa là gai.

* Phần bộ phận dùng, công dụng được "để ngỏ" gồm nhiều dòng để ghi được đầy đủ nhất các thông tin về bộ phận dùng, cách chế biến/ bào chế, liều lượng dùng và công dụng chữa chứng bệnh gì / Có thể yêu cầu người cung cấp thông tin mô tả triệu chứng của bệnh để tránh nhầm lẫn với các bệnh khác.

Riêng ở phiếu điều tra bài thuốc, phần mô tả triệu chứng bệnh được để riêng thành một mục thông tin, ngay sau mục "Tên bài thuốc".

Trong phần này, đôi khi còn để ghi chép xuất xứ hay câu chuyện truyền thuyết về cây thuốc được giới thiệu.

Năm 2001, trong đợt điều tra phỏng vấn cây thuốc trong cộng đồng dân tộc H'Rê ở huyện Sơn Hà, tỉnh Quảng Ngãi, đoàn điều tra Viện Dược liệu được giới thiệu một cây thuốc có tên gọi là "Dây khỉ", thuộc chi *Abrus*, họ Đậu – *Fabaceae*; được sử dụng chữa vết thương, đau nhức xương khớp. Công dụng này có xuất xứ từ câu chuyện: Có người nhìn thấy những con khỉ bị thương (có thể do bị bắn) ăn phần thân leo của cây thuốc trên. Cứ thế, câu chuyện được truyền khẩu trong cộng đồng, từ cây thuốc (hay thức ăn) của khỉ chuyển thành cây thuốc chữa bệnh của người.

* Cách điều tra phỏng vấn bài thuốc cũng tương tự như điều tra cây thuốc là cứ để cho người được phỏng vấn chủ động giới thiệu từng cây thuốc – vị thuốc. Để khẳng định về chất lượng thông tin, điều tra viên có thể hỏi thêm: "Theo kinh nghiệm của Ông / Bà, từng ấy cây thuốc / vị thuốc trong bài thuốc này là đủ hay còn có thể thêm cây thuốc / vị thuốc nào nữa", "liều lượng của mỗi loại như thế này được chưa, xin Ông / Bà xem hộ lại cho" (ý muốn khẳng định lại về liều lượng của mỗi loại đã ghi được ở trong phiếu),...

BỘ Y TẾ - VIỆN DƯỢC LIỆU **Biểu số 1**

Phiếu số.....

PHIẾU ĐIỀU TRA CÂY THUỐC TRONG CỘNG ĐỒNG

(Dùng cho cán bộ điều tra)

- Họ tên người cống hiến cây thuốc:.....
- Nghề nghiệp: .....
- Nơi ở hiện nay: .....
- Tên cây thuốc: - Tên thường gọi:.....
  - Tên khác: .....
  .....
  - Tên khoa học: .....
  Synonym (nếu có).....
  ....
  - Họ thực vật: .....
- Bộ phận dùng, công dụng (bao gồm cách chế biến, cách sử dụng, liều dùng):

.....

.....

Ngày.....tháng.....năm.....

Người / nhóm điều tra phỏng vấn

(Ghi rõ họ tên và nơi làm việc)

VIỆN DƯỢC LIỆU - BỘ Y TẾ **Biểu số 2**

Phiếu số.....

PHIẾU ĐIỀU TRA BÀI THUỐC DÂN GIAN

(Dùng cho cán bộ điều tra)

- Tên bài thuốc:.....

.....

- Triệu chứng bệnh:..... ....
- Họ tên người cống hiến bài thuốc: .....Tuổi.....Dân tộc.....
- Nghề nghiệp: .....
- Nơi ở hiện nay:.....

TT	Tên cây thuốc/ tên các cây thuốc trong bài thuốc (tên địa phương, tên khoa học, họ thực vật)	Bộ phận dùng/ Lượng (gam)	Cách chế biến, bào chế - Công dụng	Ghi chú (những kiêng kỵ nếu có)
1	*2*	*3*	*4*	*5*

Ngày....tháng.....năm.....

Người /nhóm điều tra phỏng vấn

(ghi rõ họ, tên và nơi làm việc)

* Một bài thuốc có thể gồm một vài cây thuốc / vị thuốc khác nhau. Vì thế, các mục thông tin được ghi dưới dạng bảng gồm nhiều cột.

* Đồng thời với việc phỏng vấn, cần thu mẫu thực vật của các loài cây thuốc được giới thiệu làm tiêu bản. Trường hợp cây thuốc được giới thiệu không đúng mùa hoa, quả, vẫn phải lấy mẫu, hẹn thời gian sau trở lại hoặc bổ sung ở nơi khác.

2.1.2. Tạo mối quan hệ tốt với người dân địa phương

* Để làm tốt công tác phỏng vấn, đoàn điều tra nên bố trí ăn ở ngay tại cộng đồng. Tìm hiểu để nắm vững và tôn trọng các phong tục tập quán của nhân dân địa phương.

* Nguyên tắc chung là phải giải thích rõ ràng và cụ thể ngay từ đầu về mục đích và giới hạn những nội dung cần phỏng vấn. Điều tra viên phải có thái độ cầu thị và tôn trọng người đối thoại để tạo niềm tin.

* Đối với những người già, thầy lang không thạo tiếng Kinh, cách tốt nhất là thông qua một người trong cộng đồng, sử dụng ngôn ngữ của họ trong quá trình phỏng vấn.

* Như trên đã đề cập, để thu được những kết quả tin cậy, hãy để cho người được phỏng vấn chủ động giới thiệu từng cây thuốc, cùng với những kinh nghiệm và hiểu biết của họ. Các điều tra viên cần hết sức mềm dẻo khi đặt câu hỏi, nhằm thu thập đủ thông tin cho phiếu điều tra. Tránh dùng những từ chuyên môn sâu, hoặc đưa ra những câu hỏi "cắt ngang" thiếu tế nhị, đại loại như: "Cây này tên gì", "để chữa bệnh gì", "tại sao"...

Những câu hỏi không đúng lúc thường nhận được câu trả lời miễn cưỡng, với kết quả không mong đợi.

* Về vấn đề bí mật thông tin, sở hữu trí tuệ và chia sẻ lợi ích: Công ước Đa dạng sinh học (CBD) năm 1992 đã *thừa nhận nguồn tài nguyên sinh học là của mỗi quốc gia. Mỗi quốc gia có trách nhiệm bảo tồn và duy trì tri thức, sự sáng tạo và hoạt động ngành nghề của dân chúng, cũng như thừa nhận các quyền của cộng đồng.* Ở Việt Nam, hiện chưa có những quy định cụ thể về quyền sở hữu và chia sẻ lợi ích trong khai thác giá trị của đa dạng sinh học với cộng đồng. Tuy nhiên, đối chiếu với các điều khoản đang được nhiều nước áp dụng trong các "Hợp đồng viễn cảnh Đa dạng sinh học" – (Prospecting Bio-diversity Contracts)

trong nghiên cứu sàng lọc các hợp chất tự nhiên có quy định: Kết quả nghiên cứu sàng lọc dựa trên cơ sở thông tin do cộng đồng cung cấp, thì quốc gia sở hữu tài nguyên cũng như người cung cấp thông tin ban đầu cũng được chia sẻ một phần lợi ích, từ nguồn lợi nhuận do thương mại hóa mang lại.

Bởi vậy, trong quá trình điều tra phỏng vấn, điều tra viên trước hết phải tôn trọng và giữ bí mật cho bên cung cấp thông tin. Cam kết không công bố thông tin, không sử dụng thông tin đó với mục đích vụ lợi khi chưa có sự thỏa thuận.

2.2. Điều tra theo tuyến trên thực địa

Điều tra theo tuyến trên thực địa nghĩa là toàn bộ quá trình điều tra thu thập cây thuốc, được tiến hành theo một tuyến nhất định. Trong đó các tuyến điều tra, khảo sát phải được thiết kế sao cho có thể thu thập được đầy đủ nhất số loài cây thuốc hiện có ở khu vực cần điều tra. Vì vậy, *tuyến điều tra phải đi qua tất cả các kiểu địa hình, kiểu thảm thực vật khác nhau*. Trong đó, quan trọng nhất là tuyến điều tra đi từ vùng thấp ở chân núi, lên đến đỉnh núi cao nhất trong vùng. Ngoài ra, các tuyến điều tra dọc theo các khe suối trong rừng cũng được coi trọng, bởi môi trường ẩm ướt ở đây thường tập trung nhiều cây thuốc quí. Mọi cây thuốc sẽ được thu thập, thống kê dọc theo hai bên của tuyến đi, trong phạm vi quan sát có thể. Đôi khi cũng cần dừng lại để mở rộng tìm kiếm sang một bên nào đó. Đối với những tuyến đi dài, có thể còn phải cắm trại, ăn ngủ và làm việc vài ngày ngay ở trong rừng. Lưu ý rằng, ngoài các tuyến điều tra đại diện trong các quần xã rừng, còn có các tuyến điều tra quanh làng bản, trên đồng ruộng và nương rẫy để thu thập và thống kê những cây thuốc trồng và những loài cây trồng khác cũng được dùng làm thuốc.

Sử dụng bản đồ địa hình và GPS để xác định lộ trình và tính chiều dài của tuyến điều tra.

Thu thập và thống kê cây thuốc trên tuyến điều tra: Việc thu thập cây thuốc trên tuyến điều tra được dựa vào hai nguồn:

- Phỏng vấn *các ông lang / bà mế cùng đi*: Cách làm là cũng để cho họ hoàn toàn chủ động. Khi gặp những cây thuốc quen thuộc, họ sẽ yêu cầu dừng lại để giới thiệu, lấy mẫu. Mọi thông tin sẽ được ghi vào trong các phiếu *Điều tra cây thuốc* hay *Bài thuốc dân tộc* (nếu đã thu thập được đủ các cây thuốc trong 1 bài thuốc).

- Từ *các nhà Thực vật học và Dược học chuyên làm công tác điều tra cây thuốc và tài nguyên thực vật*: Thông thường những nhà chuyên môn này có vốn

kiến thức và nhận biết chung được nhiều cây thuốc, nên có thể trao đổi trở lại với những người cùng đi. Một vài câu hỏi có thể đặt ra, như: "Cây này ở địa phương gọi tên là gì", "Ông / Bà hay có ai dùng làm thuốc không", "Để chữa bệnh gì", "Ông / Bà còn thấy mọc ở đâu trong vùng này"... Thông qua các cuộc phỏng vấn trên thực địa, thông tin về cây thuốc dân tộc ở nơi điều tra cũng được thu thập.

Trong quá trình điều tra theo tuyến trên thực địa, một số cây thuốc được coi là quan trọng (như: là đối tượng giới thiệu cho khai thác thu mua, nghiên cứu bảo tồn hoặc là những cây thuốc mới được giới thiệu...) còn được ghi nhận vào một ***"Phiếu điều tra cây thuốc trên thực địa"*** khác. Trong đó chủ yếu về các thông tin: Địa điểm nơi phát hiện, đặc điểm môi trường tự nhiên nơi mọc và hiện trạng của cây. Cùng một loài cây thuốc sẽ ghi được nhiều "Phiếu điều tra cây thuốc trên thực địa" ở nhiều điểm phát hiện và phân bố khác nhau. Các thông tin thuộc loại này sẽ được đưa vào tư liệu hóa, xây dựng cơ sở dữ liệu nguồn tài nguyên cây thuốc Việt Nam và vẽ bản đồ phân bố cây thuốc.

BỘ Y TẾ - VIỆN DƯỢC LIỆU **Biểu số 3**

Số phiếu.....

PHIẾU ĐIỀU TRA CÂY THUỐC

(Cây thuốc có giá trị sử dụng phổ biến hoặc thuộc diện quí hiếm cần bảo vệ)

Tên cây thuốc: - *Việt Nam thông dụng:* .....

- *Địa phương:* .....
- *Khoa học:* .....
- *Họ thực vật:* .....

Sử dụng: *Công dụng / Bộ phận dùng / Liều lượng / Cách sử dụng*.....

.....

Địa điểm (thuộc): *Tên khu rừng*.....

Thôn (bản) ....., *xã*....., *huyện*.. ....., *tỉnh*.....

Đặc điểm nơi mọc: - *Toạ độ địa lý:* ....**N**..... .....**E**

- *Độ cao (Altimetre):* .....*m; Độ dốc:* .....; *Hướng phơi*.....
- *Đá mẹ / đất:* .....
- *Loại hình rừng:*..... *Độ che bóng (%)*.....

Đặc điểm hiện trạng: - *Dạng cây:* .... *Kích thước*..... .....

- *Lá / màu sắc / mùi, vị* ....
- *Hoa / màu sắc / mùi*.....*Quả / màu sắc / mùi vị*.....
- *Đặc điểm khác*..... ....
- *Hiện trạng:* ....

Ngày.....**tháng**.....**năm**..... **Tên người/ Đoàn điều tra**..... .....

Phương pháp điều tra cây thuốc theo tuyến trên thực địa là phương pháp được áp dụng nhiều nhất trong quá trình điều tra cây thuốc từ trước cho đến nay. Ưu điểm của phương pháp này (và cả phương pháp điều tra phỏng vấn cây thuốc và bài thuốc dân tộc) là tương đối đơn giản, dễ áp dụng. Kết quả của cả hai phương pháp trên là *xác định và lên được Danh lục các loài cây thuốc hiện có ở trong vùng*. Ngoài ra, khi tổng hợp các "Phiếu điều tra cây thuốc trên thực địa" còn cho ta thêm nhận xét *có tính tương đối về sự phong phú và phân bố của một số loài cây thuốc, thông qua phân tích tần suất và độ gặp*. Mặt khác, do các tuyến khảo sát được thiết kết đi qua mọi kiểu địa hình và thảm thực vật, kể cả trên đỉnh núi cao và nơi hiểm trở nhất, nên kết quả phát hiện và thống kê thành phần loài về cơ bản cũng được coi là tương đối đầy đủ (tại thời điểm điều tra). Tuy nhiên, *hạn chế* lớn nhất của phương pháp điều tra theo tuyến, thực chất vẫn *chỉ là phương pháp điều tra định tính. Kết quả thu được phụ thuộc không nhỏ vào số lượng tuyến và thời gian điều tra*. Ngoài ra việc bỏ sót loài (nhất là những loài quý hiếm) là không thể tránh khỏi, do đây không phải là đợt điều tra chuyên về công tác bảo tồn.

2.3. Điều tra bằng ô tiêu chuẩn

Phương pháp điều tra bằng ô tiêu chuẩn được sử dụng rộng rãi trong nghiên cứu đa dạng thực vật, địa thực vật, sinh thái thực vật và tài nguyên thực vật,... Phương pháp này cũng được áp dụng để điều tra thành phần các loài cây thuốc và trữ lượng dược liệu, trong các quần xã thực vật khác nhau.

Điều tra cây thuốc bằng ô tiêu chuẩn là phương pháp nhận dạng và thống kê tất cả những loài cây thuốc có trong một diện tích xác định trên thực địa. *Các ô tiêu chuẩn thường có dạng hình vuông, diện tích có thể là 10 × 10 m (hoặc lớn hơn), 5 × 5 m hay 3 × 3 m*... tùy theo loại hình thảm thực vật và đặc điểm của địa hình khu vực điều tra. *Vị trí các ô tiêu chuẩn được xác định một cách ngẫu nhiên, với cự ly khoảng cách nhất định trên các tuyến điều tra* (tương tự như cách điều tra theo tuyến đã nói ở trên). Số ô tiêu chuẩn được nghiên cứu càng nhiều, nghĩa là tỷ lệ giữa diện tích tất cả các ô tiêu chuẩn so với tổng diện tích khu vực điều tra càng lớn, độ tin cậy của kết quả điều tra càng cao. Tuy nhiên, do tính chất phức tạp của địa hình và thảm thực vật nhiệt đới ở Việt Nam mà có những cây thuốc (thậm chí là cây thuốc quý hiếm) hiện có trong vùng điều tra, nhưng không được thống kê, do không có mặt trong các ô tiêu chuẩn. Ví dụ những cây thuốc chỉ mọc bám ở vách đá, hay chỉ mọc ở trên đỉnh núi,... Trường hợp này, các điều tra viên phải căn cứ vào tình hình thực tế (ước tính phạm vi

phân bố của các loài cây thuốc này trong khu vực), để xác định thêm một số ô tiêu chuẩn nữa. Cách làm này được gọi là *xác định ô tiêu chuẩn theo phương pháp phân tầng – ngẫu nhiên*, để điều tra.

Việc xác định ranh giới ô tiêu chuẩn thường bằng cách căng dây. Sử dụng địa bàn để kiểm tra góc vuông giữa hai cạnh của ô tiêu chuẩn.

Các việc làm trong ô tiêu chuẩn gồm có:

- Phỏng vấn các thầy lang và các nhà chuyên môn để nhận dạng các loài cây thuốc trong ô.

- Sử dụng êtikét hoặc các dải màu khác nhau (bằng vải hay nhựa) buộc đánh dấu các loài cây thuốc (mỗi loài một màu khác nhau).

- Đếm, đo các loài cây thuốc và những loài cây khác, ghi chép vào phiếu điều tra. Nếu có loài cây thuốc mới (hoặc bổ sung công dụng) do Thầy lang giới thiệu, cần ghi thêm vào phiếu điều tra cây thuốc dân tộc.

BỘ Y TẾ - VIỆN DƯỢC LIỆU **Biểu số 4**

Ô số:.....

Phiếu điều tra cây thuốc trong ô tiêu chuẩn

Diện tích ô tiêu chuẩn (m^2):.....

Tọa độ địa lý của ô tiêu chuẩn:..... Tuyến điều tra / nơi điều tra.....

Độ cao.....

Hướng phơi:.....

Thổ nhưỡng / đất đai:..... Độ tàn che (%).....

Thuộc kiểu thảm thực vật:.....

TT	Tên cây thuốc và tên các loài thực vật khác	Công dụng / Bộ phận dùng	Số cá thể	Ghi chú
1	*2*	*3*	*4*	*5*

Ngày.....tháng.....năm.....

Tên người / đoàn điều tra

Cách ghi chép, thống kê:

- Cột 1 và 2: Ghi thứ tự từng loài cây thuốc và các loài cây khác (có thể theo vần ABC).

+ Thống kê hết cây thuốc, sau mới chuyển sang các loài thực vật khác; Ranh giới phân biệt bởi một đường kẻ ngang.

+ Tên cây thuốc và tên các loài thực vật khác ghi đủ: tên gọi thông dụng, tên theo tiếng địa phương, tên khoa học – Họ thực vật.

- Cột 3: Ghi những công dụng làm thuốc chủ yếu kèm theo bộ phận dùng (trong ngoặc đơn). Nếu là cây thuốc mới còn thêm một phiếu điều tra phỏng vấn đã nói ở trên.

- Cột 4: Đếm số lượng cá thể mỗi loài.

- Cột 5: Ghi chú tóm tắt số cá thể trưởng thành, số cây con tái sinh và hiện trạng của cây (có thể đo kích thước; hoa / quả).

- Trong 1 ô tiêu chuẩn có thể gồm nhiều tờ phiếu (nhưng vẫn mang cùng số hiệu của ô).

- Lấy mẫu làm tiêu bản (của tất cả các loài để xác định tên khoa học), chụp ảnh và vẽ sơ đồ phân bố của các loài (từng cá thể) trong ô tiêu chuẩn, trên giấy kẻ ly.

Tổng hợp, phân tích kết quả: Thống kê các loài cây thuốc trong ô tiêu chuẩn theo từng tuyến điều tra. Tổng hợp giữa các tuyến để biết tổng số loài cây thuốc đã gặp. áp dụng toán thống kê để xử lý số liệu, đánh giá tần suất và so sánh.

Áp dụng phương pháp *điều tra cây thuốc bằng ô tiêu chuẩn* trước hết cũng *để thống kê về thành phần loài, lên Danh lục cây thuốc* của khu vực điều tra. *Ưu điểm* lớn nhất của phương pháp này là ở chỗ, *đánh giá được độ phong phú, sự phân bố của từng loài cây thuốc trong quần xã, thông qua các dẫn liệu về độ gặp và tần suất*. Những dẫn liệu này còn được sử dụng trong nghiên cứu sinh thái, tình hình tái sinh của các loài cây thuốc trong quần thể tự nhiên.

Phương pháp điều tra bằng ô tiêu chuẩn cũng là phương pháp chủ yếu để áp *dụng trong điều tra trữ lượng dược liệu* (Phiếu điều tra có thêm cột khối lượng dược liệu).

Bên cạnh những ưu điểm trên, phương pháp điều tra cây thuốc bằng ô tiêu chuẩn cũng có những *hạn chế*, như: *Tiến hành rất khó khăn trong điều kiện của địa hình và thảm thực vật nhiệt đới quá phức tạp; Cần có nhiều thời gian và tốn kém kinh phí*. Mặt khác, phương pháp điều tra này cũng *dễ bỏ sót loài*, nếu trong quá trình điều tra không thiết lập đủ các ô tiêu chuẩn, đại diện cho tất cả các kiểu địa hình và kiểu thảm thực vật khác nhau.

2.4. Điều tra tình hình khai thác sử dụng dược liệu

Kết quả của một đợt điều tra nghiên cứu về cây thuốc, sẽ là chưa đầy đủ, nếu chưa tiến hành điều tra về tình hình khai thác, sử dụng cây thuốc ở địa phương.

Điều tra tình hình khai thác và sử dụng cây thuốc chính là phương pháp điều tra nhanh về thị trường dược liệu. Mục đích chủ yếu là nắm được những loài cây thuốc nào đang có nhu cầu sử dụng và khối lượng sử dụng của mỗi loại hàng năm là bao nhiêu (tấn). Căn cứ vào kết quả điều tra để giới thiệu cho khai thác. Phương pháp chung để tiến hành việc điều tra này *là phỏng vấn trực tiếp.*

Đối tượng phỏng vấn bao gồm: Những người thường xuyên đi khai thác cây thuốc; Người / cơ sở chuyên kinh doanh, buôn bán dược liệu (bao gồm cả những người bán cây thuốc / dược liệu ở chợ); Người / cơ sở sử dụng dược liệu để làm thuốc chữa bệnh hoặc sản xuất các loại thuốc có nguồn gốc từ dược liệu.

Cũng giống như phương pháp phỏng vấn để thu thập cây thuốc và bài thuốc dân tộc, trong phương pháp điều tra thị trường cũng *đòi hỏi các điều tra viên phải hết sức mềm dẻo; hiểu được tâm lý của các đối tượng được phỏng vấn*, họ không muốn bị làm phiền hoặc cản trở việc kinh doanh sản xuất của họ. Vì thế, *cách tốt nhất* đối với điều tra viên *là cần giải thích rõ mục đích phỏng vấn của mình*; qua giao tiếp, *tạo niềm tin để họ cung cấp đầy đủ và chính xác mọi loại thông tin* (nhất là những người / cơ sở kinh doanh và sản xuất dược liệu).

Cách phỏng vấn và thu thập thông tin: Tùy từng đối tượng được phỏng vấn để có các cách tiếp cận khác nhau. Đối với những người chuyên đi khai thác hay buôn bán (nhỏ) các loại cây thuốc ở chợ, điều tra viên có thể thống kê từng loại cây thuốc / dược liệu hiện có, sau đó hỏi về nguồn gốc, khối lượng bán ra hàng năm hoặc mỗi phiên chợ. Riêng đối với những người / cơ sở chuyên kinh doanh, sử dụng dược liệu để chữa bệnh theo y học cổ truyền hoặc sản xuất thuốc về dược liệu... *cách tốt nhất là thuyết phục họ cho thống kê tại kho hoặc cho mượn sổ theo dõi kinh doanh, sản xuất*. Sau khi đã nắm được danh sách từng mặt hàng mới tiến hành phỏng vấn về nguồn gốc đầu vào, đầu ra và khối lượng của từng loại dược liệu. Tất cả mọi thông tin kể trên được ghi vào phiếu điều tra.

<u>Lưu ý</u>:

- Về cơ bản đây là phiếu điều tra nhanh về các loại cây thuốc / dược liệu đang được khai thác sử dụng, nên tạm thời không đề cập tới giá cả, lỗ, lãi.

- Khối lượng mỗi loại cố gắng quy ra trung bình 1 năm (lấy số liệu 3 năm, kể cả ước tính của năm tiến hành điều tra).

- Cột 2 ghi lần lượt các loại cây thuốc / dược liệu xếp theo vần ABC.

- Cột 4, 5 được coi là đầu vào. Cột 6, 7, 8, 9 được coi là đầu ra.

Khối lượng (tấn) ghi ở cột 3 bằng tổng khối lượng (tấn) của các cột 4, 5, 6, 7, 8, 9 cộng lại. Tuy nhiên, sẽ có những loại dược liệu mà tổng khối lượng (tiêu thụ) gồm các cột 6, 7, 8, 9 có thể nhỏ hơn con số ở cột 3, do trong 3 năm gần đây chưa tiêu thụ hết (có thể bị tồn kho).

BỘ Y TẾ - VIỆN DƯỢC LIỆU

Biểu số 5
Phiếu số.....

PHIẾU ĐIỀU TRA TÌNH HÌNH KHAI THÁC, KINH DOANH, SỬ DỤNG DƯỢC LIỆU

(Tính trung bình 1 năm trong 3 năm gần đây)

- Tên cơ sở doanh nghiệp hoặc người đi khai thác, kinh doanh, sử dụng dược liệu.....
.....
- Địa chỉ (số nhà, phố, phường - xã, huyện, thị): .....
.....

TT	Tên các loại dược liệu	Khối lượng TB/năm (tấn)	Nguồn gốc (tấn)		Tiêu thụ (tấn)			
			Ở địa phương	Từ nơi khác	Bán ra thị trường	SD trực tiếp chữa bệnh trong YHCT	Đưa vào sản xuất dược phẩm	Xuất khẩu
1	*2*	*3*	*4*	*5*	*6*	*7*	*8*	*9*

Ngày.....tháng.....năm.....
Người điều tra - phỏng vấn

- Tùy từng đối tượng được phỏng vấn, mà các thông tin thu được cũng khác nhau.

Ví dụ: Với người chuyên đi khai thác dược liệu bán ra thị trường (chợ hoặc cho các doanh nghiệp), số liệu thống kê chỉ có ở các cột 1, 2, 3, 4, và 6. Trong khi đó khi điều tra phỏng vấn một Công ty Dược của Trung ương hay cấp tỉnh, số liệu thống kê sẽ thu được hầu như có ở tất cả các cột. Trong khi đó, đối với một

thầy thuốc y học cổ truyền hay một bệnh viện y học cổ truyền, sẽ có 2 số liệu đáng chú ý nhất là ở cột 7 và cột 8 (bào chế các dạng thuốc Đông dược).

Tổng hợp các phiếu điều tra nhanh về tình hình khai thác sử dụng, *trước hết là để nắm được thực tế về nhu cầu sử dụng, trên cơ sở kết quả điều tra, sẽ giới thiệu các loài cây thuốc cho khai thác thu mua. Mặt khác, qua các số liệu khai thác – thu mua dược liệu của những người chuyên đi khai thác hoặc thu mua* (Doanh nghiệp Dược), *cũng là cơ sở để đánh giá thêm về tiềm năng khai thác của một loài cây thuốc nào đó ở địa phương.*

2. 5. Thu thập mẫu, cây, hạt giống và một số tư liệu khác tại thực địa

2.5.1. Thu thập tiêu bản và mẫu dược liệu

* Thu thập tiêu bản [1]: Phần này chỉ đề cập các khâu thu thập và xử lý bảo quản tạm thời tại thực địa.

Đồng thời với việc phỏng vấn cây thuốc, bài thuốc Dân tộc trong quá trình điều tra cây thuốc trên thực địa, các điều tra viên phải tiến hành lấy tiêu bản ngay.

- ***Đối tượng*:** Tất cả các loài cây thuốc (kể cả nấm) mới được giới thiệu, mới phát hiện hoặc đã biết. Ngoài ra, đối với các loài thực vật cùng chi với những loài cây thuốc đã biết, còn nghi ngờ, hoặc những loài thực vật khác không làm thuốc nhưng có trong các ô tiêu chuẩn – cần xác định tên khoa học của loài đi kèm với cây thuốc.

- ***Số lượng mẫu cần lấy*:** Tiêu bản thực vật nói chung, cây làm thuốc nói riêng, được coi là đủ tiêu chuẩn cho phân loại – xác định tên khoa học, bao gồm đủ các cơ quan dinh dưỡng và sinh sản. Ví dụ một cành mang lá, trên đó có cơ quan sinh sản (hoa, quả - đối với thực vật có hoa ; bào tử - đối với Dương xỉ và thực vật bậc thấp). Đối với những loài cây có lá lớn (lá dạng cau dừa, tuế, chuối,...) ; hoa mọc ở thân hoặc cành già không mang lá,... có thể lấy mẫu là đại diện của từng bộ phận. Các loài thuộc họ Hòa thảo (*Poaceae*) hoặc cây thân cỏ,... mẫu tiêu bản cần nhổ cả khóm hay một phần của khóm hoặc cả cây. Mỗi loài hay cá thể của loài ở điểm phân bố cần lấy 3 - 5 mẫu để làm tiêu bản.

- ***Cách làm mẫu tiêu bản*:** Từng mẫu cần được tỉa bỏ bớt cành hoặc lá (nếu mẫu quá nhiều lá), song cần để lại các lá đại diện (có lá to, lá trung bình, lá nhỏ; có lá non, lá già) ; sửa cho mẫu có dáng tự nhiên ; lá và hoa không chồng lên

---

[1] Kỹ thuật xử lý bảo quản, xây dựng bộ tiêu bản cây thuốc và mẫu dược liệu được đề cập cụ thể ở phần sau

nhau; lật 1 – 2 lá ở mặt dưới lên trên... Đối với những mẫu thân cỏ, dài – có thể gập đi gập lại nhiều lần (phần ngọn hướng lên trên). Những mẫu có hoa và quả to, cần bổ đôi (Hoa: bổ dọc, quả: bổ dọc và bổ ngang). Tất cả các bộ phận của mẫu tiêu bản nằm gọn trong phạm vi của tờ báo Nhân Dân gập 4 và được ép lại bằng báo cũ đó. Khoảng 10 mẫu bó lại thành một bó, sau đó xếp từng bó vào túi nilon dày (2 lượt túi), bao ngoài là túi bao tải.

- ***Xử lý bảo quản tạm thời:*** Sử dụng dung dịch cồn loãng (cồn và nước sạch) 40% hoặc 50 – 60% tùy theo thời gian bảo quản tạm thời, đổ vào các bó tiêu bản trong túi nilon ; lượng dung dịch cần đủ dư thừa ngấm vào tất cả các mẫu, sau đó buộc chặt miệng túi ; thỉnh thoảng lật cả túi cho dung dịch bảo quản được ngấm đều khắp. Dùng bút dạ ghi ký hiệu từng bao mẫu (mặt ngoài bao tải).

* Bên cạnh các tiêu bản trên, đối với một số loài cây thuốc được coi là mới, cần thu thêm các cụm hoa, quả để riêng trong các lọ nhựa hoặc thủy tinh có nắp đậy kín để có thêm mẫu phân tích khi xác định tên khoa học.

Dung dịch ngâm mẫu gồm: Cồn: 50%; Glycerin: 5% ; acid acetic: 1%. Êtikét được ghi bằng loại mực không bị phai trong cồn, để luôn vào trong lọ mẫu. Số hiệu mẫu hoa / quả trùng với số hiệu tiêu bản trên.

* Thu thập mẫu dược liệu: Trong một bảo tàng cây thuốc thường có 2 loại mẫu, đó là loại mẫu – tiêu bản thực vật kể trên và mẫu dược liệu. Mẫu dược liệu là bộ mẫu bao gồm các bộ phận dùng làm thuốc, như: lá, hoa, quả, hạt, vỏ thân, vỏ rễ, gỗ thân/ cành, rễ, củ,... Những loại mẫu này thường được thu thập đồng thời với thu tiêu bản thực vật ngay trên thực địa. Cá biệt có trường hợp chúng được mua lại ở trên thị trường, nhưng phải biết chắc chắn đúng loài.

Mẫu dược liệu được coi là tiêu chuẩn, khi chúng được thu thập nguyên vẹn các bộ phận dùng, trên những cá thể điển hình và điều quan trọng nhất phải chính xác về loài. Mẫu được làm khô đến mức tối đa, song cũng có những mẫu được ngâm trong dung dịch bảo quản lâu dài về hình dạng, kích thước và màu sắc tự nhiên của nó. Mẫu khô cũng được tẩm và xử lý bằng chất bảo quản, chống mục nát bởi côn trùng và nấm mốc phá hủy.

* Đối với những loài cây thuốc được coi là mới hoặc đang là đối tượng nghiên cứu hóa học và dược học, cần phải lấy mẫu nguyên liệu. Mẫu để giới thiệu cho nghiên cứu hóa học và dược học có thể là bộ phận dùng (làm thuốc) hay bao gồm tất cả các bộ phận của cây. Mẫu nguyên liệu thường được làm khô ngay ở thực địa hoặc tìm cách gửi về cơ sở nghiên cứu bằng cách nhanh nhất.

Khối lượng nguyên liệu mỗi loại mẫu (bộ phận của cây) từ 200 – 500 gam

khô hoặc hơn. Cùng 1 loài, có thể cần lấy mẫu nguyên liệu ở những điểm phân bố địa lý khác nhau, hoặc cùng một điểm phân bố nhưng lấy ở các thời gian sinh trưởng khác nhau của cây.

Mẫu nguyên liệu cho nghiên cứu hóa học và dược học cũng cần có đủ êtikét và lý lịch mẫu, tương tự như lý lịch tiêu bản (sẽ đề cập ở phần sau).

2.5.2. Thu thập cây giống và hạt giống

Song song với việc lấy tiêu bản, mẫu dược liệu, cần thu thập một số cây con (cây mọc từ hạt hoặc cây chồi) và hạt giống (nếu có) của tất cả các loài cây thuốc (trừ một số loài hiếm chưa được phép thu thập). Cây con và hạt giống thu thập được mang về để trồng ở các vườn thu thập cây thuốc, hoặc đưa (hạt) vào bảo quản trong các ngân hàng hạt giống, với mục đích bảo tồn. Cây con và hạt giống cần được đóng gói cẩn thận, đảm bảo sống trong suốt quá trình điều tra hoặc tìm cách gửi về nơi gieo trồng càng sớm càng tốt.

Cây giống và hạt giống thu thập cũng phải có êtikét và lý lịch mẫu kèm theo (sẽ đề cập ở phần sau).

2.5.3. Cách ghi êtikét (nhãn) và lý lịch tiêu bản thu thập (phiếu tiêu bản)

Tất cả các loại tiêu bản, mẫu vật thực vật và cây thuốc chỉ được coi là có giá trị hoàn chỉnh khi có đầy đủ êtikét (nhãn) và lý lịch tiêu bản (phiếu tiêu bản). Êtikét và lý lịch tiêu bản phải được ghi và buộc (êtikét) ngay khi thu mẫu và ép mẫu tại thực địa. Từng mẫu phải có êtikét và lý lịch tiêu bản riêng để tránh nhầm lẫn.

* Cách đánh số: Số hiệu của tiêu bản và mẫu vật ghi trong êtikét và lý lịch tiêu bản được đánh số theo trình tự thời gian và theo cá thể thu thập. Nghĩa là các tiêu bản hoặc mẫu dược liệu, được thu trên cùng một cá thể loài, đều mang cùng một số hiệu. Các loài khác nhau, thậm chí là các cá thể khác nhau của cùng một loài, nhưng thu thập ở các địa điểm khác nhau (trong cùng 1 ngày) cũng mang các số hiệu khác nhau. Song, số thứ tự của một mẫu ghi trong êtikét và sổ lý lịch tiêu bản luôn là một số trùng nhau.

Đối với các nhà Thực vật học chuyên nghiệp ở phương Tây, mỗi người đều tiến hành đánh số thứ tự cho các mẫu thu thập, trong suốt quá trình làm việc của mình. Người ta khuyên không nên bắt đầu từ một dãy số mới cho mỗi dự án hoặc cho mỗi năm mà bạn thu thập (Gary J. Martin).

Tuy nhiên, các đợt điều tra dược liệu ở Việt Nam, có thành phần và số lượng cán bộ nghiên cứu tham gia thường xuyên thay đổi. Việc lấy mẫu dường như

cũng do nhiều người tham gia, nên số thu thập ở thực địa thường bắt đầu từ một dãy số mới. Chính vì thế, *tất cả các tiêu bản và mẫu vật dược liệu* (sau khi đã được xử lý và khâu) *khi nhập và bảo tàng chúng sẽ được tiếp tục đánh số mới theo thứ tự thời gian trong sổ nhập tiêu bản / mẫu vật* (sổ cái) *và trong cơ sở dữ liệu của bảo tàng*. Như vậy, một tiêu bản hay một mẫu vật dược liệu sẽ có hai số hiệu: một số hiệu thu thập ở thực địa và một số hiệu chính thức theo sổ tiêu bản và mẫu vật ở bảo tàng.

Cách làm này xem ra có vẻ phức tạp, song cho phép người quản lý thường xuyên có thể nắm vững được tổng số tiêu bản và mẫu vật hiện có trong bảo tàng là bao nhiêu. Vấn đề này là rất cần thiết cho công tác bảo quản định kỳ và quản lý bảo tàng. Mặt khác, số lượng tiêu bản cây thuốc và mẫu vật dược liệu ở Việt Nam thường ít hơn rất nhiều só với ở các bảo tàng Động – Thực vật nói chung, nên việc làm trên có thể được coi là khả thi.

* Nội dung các dẫn liệu ghi trong êtikét và phiếu thu thập tiêu bản:

Êtikét: - Số
- Ngày.....tháng.....năm.....(lấy mẫu)
- Tên cây thuốc / dược liệu
- Người lấy

Phiếu tiêu bản:

BỘ Y TẾ
VIỆN DƯỢC LIỆU Số.....

PHIẾU TIÊU BẢN

Ngày tháng năm 200...

Tên cây thuốc.....
Họ: .....
Dạng cây .....
Đặc điểm: Lá..... Hoa.....Quả .....
Nơi lấy: .....
Môi trường nơi mọc:.....
Tọa độ địa lý và độ cao:.....
Công dụng / Bộ phận dùng: .....
.....
.....
Mẫu khác kèm theo: - Mẫu dược liệu:.....
- Bộ phận khác: .....
Người lấy: .....

Phiếu tiêu bản hay còn gọi là lý lịch tiêu bản / mẫu vật được sử dụng để ghi chép cả những dẫn liệu cơ bản của loài cây thuốc, mà trong mẫu khô không thể nhận biết được, như: dạng cây (gỗ, bụi, thảo); chiều cao, đường kính của thân; màu sắc và mùi vị của hoa, quả,...

Ngoài ra, do hạn chế bởi kích thước của êtikét, phiếu tiêu bản còn để ghi các thông tin quan trọng khác của cây thuốc, như tên gọi theo tiếng địa phương; công dụng – bộ phận dùng; nơi lấy (thuộc địa phương nào); nơi mọc (habitat) và các dẫn liệu khác về tọa độ địa lý và sinh thái của cây.

Sử dụng các thông tin ghi nhận được trong phiếu tiêu bản, cùng với việc phân tích về hình thái sẽ giúp cho các nhà thực vật học dễ dàng hơn trong việc phân loại – xác định chính xác được tên của loài.

* Chất liệu giấy và bút ghi:

Êtikét được làm từ loại giấy dày, hoặc bìa mỏng, có độ bền cao với thời gian. Kích thước của êtikét thường: 3 × 7 cm, có đục 1 lỗ tròn để luồn dây buộc. Dây buộc là loại chỉ sợi to, dai và bền lâu với thời gian.

Phiếu tiêu bản được đóng dưới dạng cuốn sổ nhỏ, kích thước tương đương với khổ giấy A4 gập tư (10 × 14 cm) – dễ bỏ túi. Trong đó mỗi phiếu là một tờ. Chất liệu từ loại giấy tốt, không bị nhàu nát khi vô tình bị ướt.

Ghi êtikét và phiếu tiêu bản bằng bút chì loại tốt hoặc bút viết bằng "mực tàu". Chữ viết của 2 loại bút này không bị phai khi thấm nước và cồn. Chữ viết cần rõ ràng và dễ đọc.

2.5.4. Chụp ảnh

Hình ảnh của cây thuốc, các bộ phận làm thuốc,... cũng được coi là nguồn dẫn liệu cần thu thập.

Trong quá trình phỏng vấn và điều tra trên thực địa, tất cả các cây thuốc đều cần phải chụp một số kiểu ảnh như: Sinh cảnh – môi trường cây mọc; toàn cây hay một phần của quần thể; cành mang hoa / quả hoặc cả cây mang hoa / quả (cây thảo); ảnh chụp riêng cụm hoa, cụm quả hoặc một hoa hay một quả (đôi khi gồm cả quả bổ dọc và bổ ngang); ảnh bộ phận dùng (ở các góc nhìn khác nhau). Những ảnh có tính chất mô tả thường để một đoạn thước có vạch xăng ti mét và mi li mét để so sánh về kích thước của vật chụp.

Để có được những bức ảnh chất lượng cao, cần sử dụng loại máy ảnh tốt (với các loại ống kính khác nhau) hoặc máy ảnh kỹ thuật số. Bên cạnh nguồn tư liệu

ảnh, nếu có điều kiện nên dùng máy quay video – camera kỹ thuật số để ghi được toàn cảnh sống động của các cây thuốc trong quá trình điều tra.

III. CÔNG VIỆC TIẾP TỤC SAU ĐIỀU TRA

Ngay sau khi kết thúc điều tra ở thực địa, các điều tra viên cần tiếp tục thực hiện nốt những công việc tại cơ quan – Viện nghiên cứu, cụ thể như sau:

3.1. Xác định tên khoa học các cây thuốc

3.1.1. Vài khái niệm về các bậc phân loại thực vật và cách gọi tên cây

Căn cứ vào các đặc điểm hình thái (nhất là của bộ phận sinh sản) và mối quan hệ chủng loại phát sinh... các nhà thực vật học đã sắp xếp các nhóm thực vật theo một hệ thống thứ bậc phân loại khác nhau. Trong đó, đơn vị phân loại cơ sở nhất trong giới thực vật được gọi là **loài** (species). Trên đơn vị cơ sở này lần lượt là **Chi** (Genus); **Họ** (Familia); **Bộ** (Ordo); **Lớp** (Classis) và **Ngành** (Divisio). Ngoài ra, trong quá trình nghiên cứu phân loại loài, các nhà thực vật học còn nhận ra ngay trong loài cũng có những sự khác biệt nhỏ. Những sự khác biệt đó, tùy từng mức độ để tiếp tục chia ra những đơn vị phân loại nhỏ hơn, như: **Dưới loài** (Sub-species – viết tắt là **spp.**) ; **Thứ** (Varietas – viết tắt là **var.**) và **Dạng** (Forma – viết tắt là **f.**). Tên gọi các bậc phân loại (Taxon) này cũng được các nhà thực vật học thống nhất sử dụng bằng tiếng **La Tinh.**

Hiện đã có một số định nghĩa khác nhau về loài, trong đó có định nghĩa của Komarov (1949) được coi là tương đối hoàn chỉnh: "*Loài là tập hợp nhiều cá thể cùng xuất phát từ một tổ tiên chung, trải qua quá trình đấu tranh sinh tồn và chọn lọc tự nhiên mà cách ly với các sinh vật khác, đồng thời loài là một giai đoạn nhất định trong quá trình tiến hóa chung của sinh vật*". Về mặt di truyền trong định nghĩa về loài được ông giải thích: "*Các cá thể trong cùng một loài có thể giao phối tự nhiên với nhau sinh ra các cá thể con cái có khả năng sinh sản*".

Để thống nhất tên gọi một loài cây trong giới thực vật, từ năm 1753 Karl, Linné đã đề xuất dùng hai từ ghép của tên Chi (Viết hoa) và từ sau là một tính từ chỉ loài (không viết hoa). Tính từ này có thể dùng để chỉ tính chất, đặc điểm hình thái điển hình, công dụng, nơi mọc hoặc được lấy từ tên của người phát hiện và thu được mẫu đầu tiên... Sau tính từ chỉ loài là tên người (tác giả) công bố loài đó. Tên tác giả thường được viết tắt cả họ lẫn tên hoặc viết đầy đủ họ và viết tắt tên.

Như vậy, tên gọi đầy đủ cho một loài cây (còn gọi là tên khoa học – Scientific name, hay tên La Tinh – Latin name) theo danh pháp quốc tế, sẽ là một cụm từ kép.

Ví dụ: - Cây thảo quả là *Amomum aromaticum* Roxb.

Trong đó: *Amomum* là tên chi; *aromaticum* là loài với xuất xứ là có mùi thơm; Roxb. viết tắt tên của nhà thực vật Roxburgh.

- Cây Ngũ gia bì gai: *Acanthopanax trifoliatus* (L.) Merr.

Acanthopanax là tên chi; *trifoliatus* là tên loài có nghĩa là lá của nó gồm 3 lá chét; L. là viết tắt tên nhà thực vật học Thụy Điển Karl, Linné người đầu tiên xác định loài này, sau đó được Merriam, Clinton Hart (viết tắt là Merr.) xác định lại, vì thế tên của Karl, Linné được viết trước ở trong ngoặc đơn.

- Cây Sâm Ngọc Linh: *Panax vietnamensis* Ha et Grushv.

Panax là tên chi; *vietnamensis* với nghĩa là lấy tên nước Việt Nam để đặt cho tên loài này. Ha et Grushv. Là Hà Thị Dụng cùng với Grushvitzkii, Igor Vladimirovich nhà thực vật học người Nga cùng xác định.

Như vậy, từ cách gọi tên một loài cây theo cách truyền thống của một cộng đồng hay một quốc gia, nay được "chuyển ngữ" theo danh pháp quốc tế của khoa học phân loại thực vật (bằng tiếng La Tinh). Với thứ ngôn ngữ mới này, chúng ta có thể cùng nhận biết, so sánh và trao đổi giữa các nền văn hóa khác nhau (Eugene Hunn, 1992).

3.1.2. Xác định tên khoa học cây thuốc

Tất cả các tiêu bản cây thuốc thu thập được, bên cạnh tên gọi phổ thông và tên gọi theo mỗi địa phương, đều phải xác định tên khoa học của chúng.

Việc phân loại, xác định tên khoa học cây thuốc cũng như đối với tất cả các loài thực vật nói chung, được căn cứ vào các đặc điểm hình thái, đặc biệt là của hoa, quả hay bào tử. Những dẫn liệu này được các nhà chuyên sâu về phân loại thực vật đã hệ thống thành "khóa phân loại" kèm theo sự mô tả tất cả các bậc phân loại (taxon), nhất là đối với loài, trong các bộ "Thực vật chí" vùng hoặc quốc gia. Bên cạnh các bộ "Thực vật chí", các nhà khoa học Trung Quốc cũng đã từng xây dựng các bộ "Dược liệu chí" – tương tự như "Thực vật chí", nhưng chỉ đề cập đến những loài được sử dụng làm thuốc. Đây cũng là những tài liệu tham khảo tốt, để xác định tên khoa học các loài cây thuốc. Tuy nhiên, nhiều nhà thực vật đã làm việc nhiều năm, với vốn kiến thức tích lũy được đã giúp họ nhận dạng và xác định nhanh chóng tên khoa học của nhiều loài cây.

* Dụng cụ:

- Kính lúp 2 mắt soi nổi, với các bộ giác phóng đại khác nhau

- Panh sắt, kim nhọn, kim mũi mác

- Đĩa đồng hồ (đựng mẫu), giấy kẻ ly hoặc thước mỏng phân chia đến mi li mét để đo.

Xác định tên khoa học cây thuốc được chia thành 2 bước:

+ *Xác định sơ bộ*: Được tiến hành ngay tại thực địa, khi thu thập tiêu bản, mẫu vật; để ghi vào nhãn và Sổ thu thập tiêu bản. Đối với những loài biết chưa chắc chắn, còn nghi ngờ, ở giai đoạn này mới dừng ở mức sơ bộ xác định đến chi hoặc họ (cũng có trường hợp chưa đến họ).

+ *Xác định chính thức:* Tại phòng thí nghiệm - Nơi có đầy đủ các tài liệu (khoá phân loại ở các bộ Thực vật chí và Dược liệu chí), kính hiển vi ... tiến hành kiểm tra lại tên khoa học tất cả các loài (đã biết) hoặc xác định đầy đủ và chính xác hơn đối với những loài biết chưa chắc chắn hoặc chưa xác định được ở thực địa.

Đối với những mẫu khó, do hạn chế bởi tài liệu tra cứu hoặc về khả năng để xác định, cần gửi tới các chuyên gia sâu về phân loại thực vật ở các cơ quan khác trong nước hoặc ở nước ngoài.

(Tạm thời ở tài liệu này không trình bày cụ thể phương pháp hay từng bước đi trong việc xác định tên khoa học cây thuốc, cũng như mô tả xác định loài mới).

Chú ý: Việc xác định tên khoa học các loài cây thuốc đã thu thập được, phải hoàn thành trước khi tiến hành vào sổ tiêu bản chính thức, nhập dữ liệu vào máy tính để hệ thống hóa các loài, mới xây dựng được Danh lục cây thuốc ở vùng điều tra.

3.2. Trồng cây thuốc ở vườn thu thập / vườn mẫu và lưu giữ hạt

**** Trồng cây thuốc đã thu thập được***

- Tất cả những cây thuốc và hạt giống đã thu thập được trong quá trình điều tra, cần được gieo trồng ngay ở các vườn thu thập hoặc vườn mẫu. Tùy theo đặc điểm sinh thái của mỗi loài mà quyết định nơi trồng (vườn nào cho phù hợp).

- Cây thuốc đưa vào trồng cần có đầy đủ lý lịch thu thập; được nhập vào sổ theo dõi của vườn ; chăm sóc, theo dõi và ghi chép.

- Mục đích của việc trồng cây thuốc mới thu thập, trước hết nhằm làm phong phú thêm số loài cây thuốc của vườn. Các dẫn liệu theo dõi được về tình hình sinh trưởng phát triển là cơ sở quan trọng cho việc nghiên cứu sâu về mặt sinh

học của một loài thu thập mới; phục vụ cho yêu cầu bảo tồn, cung cấp giống và nguyên liệu ban đầu cho các khâu nghiên cứu tiếp theo.

**** Lưu giữ hạt:***

Đồng thời với việc trồng cây thuốc kể trên, những hạt giống thu thập được cần gửi ngay tới các trung tâm lưu giữ hạt với mục đích bảo tồn (Seed - Bank). Hạt giống được lưu giữ ở điều kiện nhiệt độ thấp, trong một thời gian nhất định vẫn đảm bảo được về năng lực nảy mầm. Tuỳ theo yêu cầu lưu giữ, người ta có thể chia ra: Kho lưu giữ ngắn hạn, trung hạn và dài hạn (ở các cấp nhiệt độ khác nhau).

3.3. Phơi sấy khô, xử lý và bảo quản tiêu bản – mẫu vật[2]

3.3.1. Tầm quan trọng của bộ tiêu bản

Bộ tiêu bản khô (Herbarium) hay còn gọi là Bộ mẫu thực vật là công cụ nghiên cứu chủ yếu của các nhà thực vật học trong nghiên cứu khu hệ thực vật, phân bố, sinh thái, bảo tồn, ... thực vật nói chung hoặc từng nhóm tài nguyên thực vật nói riêng, trong đó có cây thuốc.

Như vậy, nếu không có mẫu thì việc xác định tên khoa học các loài cây khó chính xác và qua thời gian không có gì để kiểm chứng, đối chiếu. Đây là một vấn đề đặc biệt quan trọng đối với cây thuốc, vì tiêu bản khô được coi như một vật chứng xác thực về loài cây thuốc nào đó, về nơi phân bố, cùng với những thông tin khác có liên quan. Hướng dẫn người ta tìm kiếm thêm ở những nơi khác hoặc trở lại thu thập cho các mục đích nghiên cứu tiếp theo.

3.3.2. Phơi, sấy khô và xử lý bảo quản

Các bao mẫu mang ở thực địa về cần được để trong kho hay phòng có điều hòa nhiệt độ. Sau đó lần lượt lấy ra từng tiêu bản, ép vào giữa 2 lượt giấy báo khô, chú ý sửa lại tư thế mẫu. Cứ 10 – 15 tiêu bản được buộc chặt trong cặp ép, đưa vào sấy ở nhiệt độ 50 – 60°C (hoặc phơi nắng) cho đến khô. Ở Vườn thực vật Mít Xu Ri (Hoa Kỳ) người ta còn dùng các miếng nhôm mỏng có các gờ lượn sóng nhỏ, kích thước 28,5 × 42 cm, kẹp thêm vào giữa các cặp ép có tiêu bản, để tạo điều kiện bốc hơi nhanh và tạo độ phẳng cho các tiêu bản.

Đối với các mẫu dược liệu (bộ phận dùng làm thuốc) cũng được đưa vào sấy khô. Để mẫu vật có được dáng hình như ý muốn, trong quá trình sấy phải thường xuyên chỉnh sửa, hoặc sử dụng các khung nẹp, để mẫu không bị cong queo.

---

[2] Ở đây tạm thời không đề cập kỹ thuật làm tiêu bản ngâm giữ màu

Trong quá trình ép sấy tiêu bản và mẫu, nếu phát hiện thấy bị thiếu hoặc êtikét bị hỏng, chữ viết mờ cần viết bổ sung ngay.

Tẩm dung dịch bảo quản: Sau khi tiêu bản và mẫu vật được sấy / phơi khô, để giữ gìn lâu dài, tránh sự phá hoại của nấm mốc và côn trùng nhỏ cần tiến hành tẩm độc bằng dung dịch bảo quản gồm: Cồn 96% và clorua thủy ngân ($HgCl_2$) – với nồng độ 30 gam trong 1 lít cồn.

Cách làm: Xếp lần lượt từ 5 – 10 tiêu bản khô (Tùy theo độ lớn của mẫu) vào khay men hay khay nhựa chuyên dụng ; đổ dung dịch bảo quản ngập chìm các mẫu, sau đó đậy kín, để 15 – 30 phút cho dung dịch bảo quản ngấm đều vào tất cả các bộ phận của mẫu. Sau đó dùng tay (có găng tay cao su) hoặc đũa thủy tinh lấy lần lượt từng mẫu, ép vào giữa 2 tờ báo, buộc ngoài bởi cặp ép (như cách làm để sấy mẫu kể trên), đưa vào tủ sấy ở nhiệt độ 50 – 60°C cho đến khô.

Chú ý clorua thủy ngân là hóa chất độc, bởi vậy khi làm mẫu, kỹ thuật viên phải có khẩu trang và găng tay. Nơi đặt tủ sấy cũng cần thoáng gió và tách biệt với phòng làm việc.

3.3.3. Khâu tiêu bản và đóng gói mẫu dược liệu

Mỗi tiêu bản sau khi được tẩm dung dịch bảo quản và sấy khô đều phải được khâu trên bìa cứng – giấy croquis, kích thước 28,5 × 42 cm. Chú ý, trong trường hợp có các bộ phận bị rời ra hoặc kèm theo (do bổ từ hoa, quả) đều phải được khâu hết vào tiêu bản. Chỉ khâu cần loại có chất lượng cao, để tồn tại được lâu dài.

Tiêu bản khâu xong phải viết nhãn ngay và dán vào góc dưới bên phải của tờ bìa. Nội dung nhãn tiêu bản của Viện Dược liệu như sau:

VIỆN DƯỢC LIỆU — CỘNG HÒA XÃ HỘI CHỦ NGHĨA VIỆT NAM

National Institute of Medicinal Materials — *The Republic Socialist of Vietnam*

Số (N°) .....

.....

.....

Nơi lấy.....

Nơi mọc.....

Công dụng.....

.....

Ngày (Date) — Người lấy (Legit) — Người giám định (Determinavit)

..... — ..... — .....

Chú ý:

- Số (N^o): Là số thứ tự của tiêu bản / mẫu vật được chính thức nhập vào Bảo tàng (Đánh số thứ tự theo thời gian).

- Tên gọi: Chỉ ghi tên khoa học, tên thông dụng và họ thực vật.

- Mọi thông tin khác được lấy từ dữ liệu của phiếu tiêu bản.

- Nhãn tiêu bản, êtikét, và phiếu thu thập tiêu bản ở thực địa được coi như hồ sơ / lý lịch của một tiêu bản - được xử lý và lưu trữ bởi một phần mềm riêng.

Đối với các mẫu vật khô là các bộ phận dùng của cây thuốc (mẫu dược liệu) sau khi tẩm dung dịch bảo quản (cồn 96% + $HgCl_2$: 3%) và sấy khô, được để trong các bô can thủy tinh nút mài, miệng rộng với các dung tích tùy theo độ lớn của mẫu vật. Nút mài thường bôi vadơlin để khi đậy được kín. Nhãn tiêu bản trên cũng được dùng làm nhãn cho mẫu dược liệu.

3.3.4. Vào sổ, sắp xếp lưu trữ vào kho của bảo tàng

**** Vào sổ, sắp xếp:***

Sau khi hoàn thành các công đoạn trên, tất cả các loại tiêu bản và mẫu vật đều phải được ghi vào các loại sổ sách sau:

- *Sổ nhập*: Ghi theo thứ tự tiêu bản và mẫu dược liệu (2 sổ riêng) được nhập vào bảo tàng theo thời gian. Mỗi số hiệu tiêu bản / mẫu vật thu thập (không kể loài) tương ứng với một số hiệu trong sổ nhập. Số hiệu của sổ nhập được coi là số của tiêu bản / mẫu vật ở bảo tàng. Căn cứ vào sổ nhập, có thể thường xuyên nắm được tổng số tiêu bản / mẫu vật hiện có trong bảo tàng.

- *Sổ tiêu bản /mẫu vật theo họ thực vật*: Sau khi vào sổ nhập tiêu bản / mẫu vật đó được ghi tiếp vào sổ tiêu bản / mẫu vật viết theo vần ABC tên khoa học của họ, chi và loài (mỗi Ngành hay nhóm thực vật có 1 sổ riêng). Bên cạnh số thứ tự của họ, chi, loài, trong sổ này còn có các thông tin về số thứ tự của tiêu bản hay mẫu dược liệu ở bảo tàng (sổ nhập); số thứ tự thu thập ở thực địa và ký hiệu nơi để tiêu bản / mẫu vật thuộc dãy và ô nào ở trong kho.

Sổ tiêu bản / mẫu vật theo họ thực vật là công cụ tra cứu nhanh nhất tiêu bản / mẫu vật của một loài nào đó khi cần nghiên cứu. Mặt khác, căn cứ vào cuốn sổ này để bố trí sơ đồ kệ, tủ đựng tiêu bản / mẫu vật trong kho lưu trữ.

Tất cả những công việc ghi chép trên trước kia phải ghi bằng tay vào sổ, nay sử dụng máy tính sẽ nhanh chóng và thuận tiện hơn nhiều. Tuy nhiên cách tốt nhất vẫn nên sử dụng cả cách làm truyền thống ở trên.

**** Kho tiêu bản / mẫu vật:***

Là những phòng rộng trong một khối nhà riêng, được xây dựng kiên cố và xung quanh thoáng đãng, nhiều ánh sáng, có điều hòa nhiệt độ, máy hút ẩm và các điều kiện phòng hộ khác (cháy nổ, lũ lụt).

Ở những nước tiên tiến, trước khi đưa tiêu bản và mẫu vật vào kho lưu trữ, người ta tiến hành xử lý một lần nữa, bằng phun / xông hóa chất; sau đó để trong phòng lạnh - 25°C (72 giờ) hoặc đưa vào lò vi sóng nhằm tận diệt hết nấm mốc, côn trùng.

Tiêu bản / mẫu vật được bảo quản trong điều kiện nhiệt độ 18 – 20°C, độ ẩm không khí dưới 50%. Ngoài ra có thể để thêm băng phiến.

Với tiêu chuẩn của kho và điều kiện bảo quản như trên, tiêu bản thực vật / cây thuốc có thể giữ được hàng trăm năm không bị hư hỏng. Tuy nhiên, trong qúa trình theo dõi và quản lý bảo tàng, cần định kỳ đưa tiêu bản / mẫu vật ra sấy lại hoặc xử lý xông hóa chất,...

3.4. Xây dựng danh lục cây thuốc

Xây dựng danh lục cây thuốc là việc làm tất yếu, bởi danh lục cây thuốc chính là kết quả điều tra thu thập, thống kê cây thuốc về số lượng loài ở khu vực điều tra.

Danh lục cây thuốc thường được xây dựng dưới các dạng bảng như sau:

*** Bảng 1 - *Xếp theo tên Việt Nam thông dụng, bao gồm các thông tin:***

- *Tên gọi*: Tên Việt Nam thông dụng; tên gọi theo tiếng địa phương đã sưu tầm được; Tên khoa học của loài; Synonym; họ thực vật.

- *Công dụng*: Ghi lần lượt các công dụng đã sưu tầm được; công dụng chủ yếu ghi trước, sau đến công dụng khác.-

- *Bộ phận dùng*: Ghi bộ phận dùng làm thuốc (Lá, cả cành lá; hoa; quả; hạt; vỏ thân - cành; vỏ rễ; thân; cả rễ; hay dùng toàn bộ cả cây...).

- *Cách dùng*: Ghi cách chế biến dùng làm thuốc (băm nhỏ phơi khô; sao vàng; sắc uống; ngâm rượu uống; tán bột uống...) và liều lượng.

Chú ý: + Ghi thêm: dùng độc vị hay phối hợp với một số cây thuốc khác.

+ Cây mọc tự nhiên hay trồng.

Bảng 1 là Danh lục quan trọng nhất, trong đó bao gồm các thông tin về một cây thuốc đã thu thập được ở vùng điều tra.

*** Bảng 2: *Xếp theo họ thực vật***

Từ bảng 1, các loài cây thuốc được xếp theo vần ABC tên la-tinh (chi sau đến loài), theo các họ thực vật (tên la-tinh). Các họ lại được sắp xếp theo vần ABC (tên La-tinh - Ví dụ: Acanthaceae → Araliaceae...). Đồng thời các họ này lại được xếp trong các ngành thực vật, lần lượt từ Tảo → nhóm Nấm → Địa y → Rêu → Lá thông → Tháp bút → Thạch tùng → Dương xỉ → Thông → Thực vật có hoa. Trong ngành Thực vật có hoa lại xếp các họ theo hai lớp: Hai lá mầm và Một lá mầm.

Để tiện cho việc tra cứu, sau tên mỗi loài cây thuốc cần ghi chú thêm số thứ tự của loài đó ở Bảng 1 (xếp theo tên Việt Nam thông dụng).

3.5. Vẽ bản đồ

Căn cứ vào các điểm đã phát hiện được cây thuốc trong quá trình điều tra trên thực địa (đã được xác định vị trí bằng GPS và đánh dấu vào bản đồ điều tra), tiến hành hiệu chỉnh lại, chuyển sang bản đồ có tỷ lệ nhỏ hơn làm tài liệu tổng hợp và báo cáo.

Tổng hợp các điểm phân bố (của một loài nào đó) trên bản đồ được gọi là Bản đồ phân bố điểm của loài đó ở khu vực điều tra. Thông thường Bản đồ phân bố điểm được xây dựng cho một số nhóm các cây thuốc, như:

- Những cây thuốc có khả năng khai thác thu mua.
- Những cây thuốc quý hiếm có nguy cơ bị tuyệt chủng, cần bảo vệ.
- Những cây thuốc mới phát hiện hay cây thuốc dân tộc độc đáo.

Bản đồ phân bố cây thuốc tốt nhất là được xây dựng trên nền của Bản đồ thảm thực vật hiện đại (mới nhất). Các loài cây thuốc trên bản đồ thường được thể hiện bằng các ký hiệu riêng (ví dụ: số thứ tự của loài đó trong bản chú giải, hoặc sử dụng các chữ cái đầu tiên của cây thuốc hay tên la-tinh của loài cây thuốc đó).

Bên cạnh bản đồ phân bố, người ta còn xây dựng cả bản đồ trữ lượng.

Hiện tại đã có một số chương trình, phần mềm chuyên biệt cho xây dựng bản đồ. Bởi vậy, trong quá trình điều tra thực địa và khi xây dựng bản đồ cây thuốc, cần có sự tham gia của các chuyên gia về địa lý thực vật.

Bản đồ cây thuốc là một trong những tài liệu quan trọng của kết quả đợt điều tra. Căn cứ vào các bản đồ cây thuốc người ta có thể bố trí các điểm khai thác thu mua thuận lợi nhất. Bản đồ cây thuốc còn được sử dụng như là một tài

liệu cơ sở để xây dựng - quy hoạch các vùng kinh tế nông - lâm nghiệp (chuyên về cây dược liệu) ở các địa phương.

3.6. Báo cáo tổng kết

Tất cả các tư liệu về điều tra khảo sát kể trên, được tổng hợp trong một báo cáo kết quả bao gồm các phần chính như sau:

- Khái quát về điều kiện tự nhiên xã hội vùng điều tra.

- Tóm tắt những kết quả điều tra nghiên cứu trước đó về tài nguyên cây thuốc; tình hình khai thác, sử dụng, quản lý - bảo vệ cây thuốc ở địa phương.

- Nêu cụ thể những nội dung và mục đích của đợt điều tra khảo sát này.

Phần kết qủa điều tra cần mô tả, phân tích và đánh giá về các vấn đề sau:

1. Kết quả điều tra thu thập về thành phần loài: căn cứ vào tập Danh lục đã tổng hợp được để đề cập: Số loài, thuộc số Chi, Họ, Ngành, Lớp; Số loài là cây trồng, cây mọc tự nhiên; Số loài cây thuốc mới sưu tầm được (mới so với những kết quả điều tra trước đó - nếu có, hoặc mới đối với hệ thực vật Việt Nam cũng như đối với Danh lục cây thuốc Việt Nam đã biết).

2. Kết quả sưu tầm cây thuốc và bài thuốc dân tộc; phân tích và bình luận.

3. Khái quát về tiềm năng và hiện trạng nguồn cây thuốc ở vùng điều tra: Sự phân bố của những loài quan trọng, nêu cụ thể từng loài; khả năng khai thác hiện tại (ước tính). Còn nguyên trạng hay đã và đang bị khai thác, sử dụng ; phân tích hiện trạng thông qua kết quả điều tra nhanh về thị trường dược liệu địa phương. Đối với những loài cây thuốc thuộc diện quý hiếm có nguy cơ bị tuyệt chủng cần phân tích về những nguyên nhân đe doạ hiện hữu.

Phần đề nghị thường nêu ý kiến đề xuất về các giải pháp: Khai thác hợp lý nguồn cây thuốc đã điều tra được kể trên, bao gồm: những loài có thể khai thác ngay và khai thác ở đâu; cách khai thác nhằm đảm bảo tái sinh tự nhiên; những loài quý hiếm hoặc bị giảm sút nghiêm trọng cần ngừng khai thác; bảo vệ chặt chẽ. Những loài cây thuốc mọc tự nhiên quý có thể đưa vào trồng thêm...

Phần kết luận: Khẳng định các kết quả đã điều tra khảo sát được và một số đề nghị đáng lưu ý khác.

CHƯƠNG II
BẢO TỒN CÂY THUỐC

MỞ ĐẦU

Dấu hiệu về giá trị kinh tế của giới thực vật là cung cấp các cây thuốc sử dụng ngày hôm nay và tiềm năng to lớn của nhiều loại thuốc mới trong tương lai. Tuy nhiên đã là báo động về hậu quả mất đi nhanh chóng nguồn cây thuốc ở nhiều quốc gia, do khai thác quá mức và môi trường sống của chúng bị hủy hoại (*Chiang Mai Declaration*, 1988).

Lo ngại trước tình hình vốn tài nguyên cây thuốc, cùng với những kinh nghiệm sử dụng cây thuốc của các cộng đồng đang bị mai một, nên ngay từ Hội nghị lần thứ 40 của Tổ chức Y tế thế giới (WHO), tháng 5 năm 1987 đã tái xác định những quan điểm chính được đưa ra ở Hội nghị Alma – Ata từ năm 1979, là *cần phải khởi xướng những chương trình nhằm nhận biết về giá trị, bào chế và trồng trọt, cùng với việc bảo tồn cây thuốc.*

Tháng 3 năm 1988, tại Chiang Mai – Thái Lan, một số Tổ chức quốc tế (WHO, IUCN, WWF) [3] đã phối hợp với Bộ Y tế – Chính phủ Hoàng gia Thái Lan tổ chức một Hội thảo Quốc tế đầu tiên chuyên về bảo tồn cây thuốc. Từ diễn đàn của Hội thảo này, một lần nữa các nhà khoa học đã khẳng định về tầm quan trọng và vai trò to lớn của cây thuốc trong sự nghiệp chăm sóc sức khỏe cộng đồng. Đồng thời, kêu gọi Liên Hợp quốc và các quốc gia thành viên cùng với các Tổ chức quốc tế khác cần có những hành động thiết thực để bảo tồn cây thuốc. Bảo tồn cây thuốc chính là bảo tồn giá trị của đa dạng sinh học (ĐDSH), trong các nền văn hóa của mỗi quốc gia.

---

[3] - WHO: World Health Organization – Tổ chức Y tế Thế giới.
- IUCN: The International Union for Conservation of Nature and Natural Resources – Hiệp hội (Tổ chức) Quốc tế Bảo tồn thiên nhiên và Tài nguyên thiên nhiên.
- WWF: The World Wild Fund for Nature = World Wild – life Fund – Quỹ Bảo tồn thiên nhiên Thế giới.

I. TẦM QUAN TRỌNG CỦA NGUỒN CÂY THUỐC THIÊN NHIÊN VÀ SỰ CẦN THIẾT BẢO TỒN CÂY THUỐC HIỆN NAY

1.1. Mối quan tâm của cộng đồng thế giới về bảo tồn cây thuốc

Trong tất cả các nền văn hóa của nhân loại từ thời thượng cổ đến nay, con người vẫn luôn coi trọng cây cỏ như là một nguồn thuốc chủ yếu để chữa bệnh và bảo vệ sức khỏe.

Theo thông tin của Tổ chức Y tế thế giới (WHO) đến năm 1985, trên thế giới đã có khoảng 20.000 loài thực vật bậc cao có mạch cũng như bậc thấp (trong tổng số khoảng 250.000 loài đã biết) được sử dụng trực tiếp làm thuốc, hay có nguồn gốc cung cấp các hoạt chất tự nhiên để làm thuốc (*N.R. Farnsworth and D.D. Soejarto, 1985*). Con số này còn được ước tính từ 30 – 70.000 loài (*NAPRALERT, 1990*). Trong đó, ở vùng nhiệt đới châu Á có khoảng 6.500 loài thực vật có hoa được dùng làm thuốc. Ở Ấn Độ 6.000 loài, ở Trung Quốc là 5.136 loài,... (*N.R. Farnsworth, 1985 ; S.K. Alok, 1991 ; P.G. Xiao, 1991*). Được biết ở các quốc gia đang phát triển có tới 80% dân số tỏ ra có tín nhiệm với việc chăm sóc sức khỏe bằng y học cổ truyền, mà trong đó cây cỏ là nguồn thuốc chủ yếu đã được sử dụng (*WHO, IUCN, WWF – 1993*). Trung Quốc là nước đông dân nhất thế giới, lại có nền y học dân tộc phát triển, nên trong số cây thuốc đã biết hiện nay có tới 80% số loài (vào khoảng 4.200 loài) là được sử dụng theo kinh nghiệm cổ truyền của các dân tộc (*P.G. Xiao, 1991*).

Bên cạnh các phương thức dùng cây thuốc theo cách cổ truyền như sắc thuốc, thuốc cao, thuốc ngâm rượu, thuốc bột, thuốc chườm - bó và xoa bóp,... từ nhiều năm nay, người ta còn chế tạo ra hàng trăm loại thuốc hiện đại, có hiệu lực chữa bệnh cao, mà nguồn gốc là các hợp chất tự nhiên được chiết xuất từ cây cỏ (*Anon, 1982*). Phương pháp nghiên cứu sàng lọc hóa học và dược lý để tạo thuốc mới ngày càng được quan tâm nhiều hơn không chỉ ở những quốc gia công nghiệp phát triển, mà còn ở cả các quốc gia đang phát triển. Hiện chưa có con số thống kê nào đề cập về tổng khối lượng nguyên liệu các loài thực vật mỗi năm, được dùng vào mục đích làm thuốc trên thế giới là bao nhiêu. Chỉ đoán rằng, đó sẽ là một khối lượng rất lớn. Ở Trung Quốc, số dược liệu (từ thực vật) sử dụng trong y học cổ truyền hàng năm từ 0,7 – 1,0 triệu tấn, với giá trị vào khoảng 1,4 tỷ USD. Còn các sản phẩm thuốc y học dân tộc trong thương mại quốc nội của đất nước này, năm 1986 đã đạt 571 triệu USD (*Li Chaojin, 1987 và P.G. Xiao, 1991*).

Theo số liệu của *Trung tâm Thương mại Quốc tế* cho biết, nhu cầu sử dụng

cây thuốc ở các nước công nghiệp phát triển, năm 1976 đã nhập khẩu 355 triệu USD, đến năm 1980 đã tăng lên 551 triệu USD (*O. Akerele, 1991*). Chỉ tính riêng 12 loại dược liệu có nhu cầu sử dụng cao ở Mỹ là bạch quả, *Hypericum perforatum*, sâm Triều Tiên, tỏi, Kawa, *Valeriana officinalis*,... năm 1998 đã đạt doanh số bán lẻ là 552 triệu USD (*OTC. Drug Review ingredient status, 1998*)...

Thừa nhận rằng, cây cỏ là nguồn cung cấp quan trọng các loại thuốc dùng trong y học cổ truyền, cũng như nhiều loại thuốc hiện đại có xuất xứ là các hợp chất tự nhiên.

Tuy nhiên, đã là báo động về sự thu hẹp đáng kể đa dạng sinh học (ĐDSH) do các hoạt động nhất định của con người (Công ước ĐDSH, 1992). Nhiều loài động – thực vật đã vĩnh viễn bị mất đi hoặc đang bị đe dọa gay gắt về khả năng sống sót của chúng. Tư liệu từ *Tổ chức về Bảo tồn thiên nhiên và Tài nguyên thiên nhiê*n (IUCN) cho biết, trong tổng số 43.000 loài thực vật mà cơ quan này có thông tin, hiện có tới 30.000 loài được coi là đang bị đe dọa tuyệt chủng ở các mức độ khác nhau (*World conservation monitoring centre – IUCN, 1992 và 1993*). Trong tổng số 30.000 loài này, đương nhiên có rất nhiều loài được dùng làm thuốc.

Ở Bangladesh có một số cây thuốc quý như *Tylophora indica* (dùng làm thuốc chữa hen), *Zannia indica* (thuốc tẩy xổ)... trước kia dễ tìm kiếm, nay đã trở nên hiếm hoi (*A.S. Islam, 1991*). Hoặc là loài ba gạc – *Rauvolfia serpentina* vốn mọc tự nhiên khá phổ biến ở Ấn Độ, Srilanca, Bangladesh, Thái Lan,... mỗi năm khai thác được khoảng 1.000 tấn nguyên liệu xuất sang thị trường Âu – Mỹ, làm thuốc chữa cao huyết áp (riêng Ấn Độ chiếm 40 – 50%). Song, do bị khai thác liên tục nhiều năm đã làm cho cây thuốc này mau cạn kiệt. Một số bang ở Ấn Độ đã chính thức tạm đình chỉ khai thác loài ba gạc kể trên (*O. Akerele, 1991; L. de Alwis, 1991 và A.S. Islam, 1991*). Một loài cây thuốc quí khác là *Coptis tecta* mọc nhiều ở vùng Đông – Bắc Ấn Độ, trước kia khai thác mỗi năm hàng chục tấn bán sang các nước vùng Đông Nam Á, nay đã trở nên rất hiếm, thậm chí đang đứng trước nguy cơ bị tuyệt chủng (*O. Kerele, 1991*).

Theo *He Shan An và Cheng Zhong Ming, 1985* ở Trung Quốc vốn có một số loài *Dioscorea* spp. trữ lượng khá lớn, trong thập kỷ 50, đã từng khai thác tới 30.000 tấn, hiện đã bị giảm sút nhiều, có loài thậm chí đã phải trồng. Một vài loài cây thuốc dân tộc quý như *Fritillaria cirrhosa* (làm thuốc ho) phân bố phổ biến ở vùng Tây – Bắc tỉnh Tứ Xuyên nay chỉ còn sót lại ở 1 – 2 điểm, với số lượng cá thể ít. Hoặc loài *Iphigenia indica* có tác dụng chữa ung thư, chỉ phân bố

rất hẹp ở vùng Lijang và Dali tỉnh Vân Nam, do bị tìm kiếm khai thác gay gắt, hiện có thể đã bị tuyệt chủng. Một số loài cây thuốc quý khác như *Paris polyphylla*, *Gastrodia elata*, *Nervilia fordii*,... cũng là những ví dụ điển hình về sự tồn tại mỏng manh của chúng ở Trung Quốc (*P.G. Xiao, 1991*).

Nguyên nhân gây nên sự suy thoái nghiêm trọng này trước hết là sự khai thác quá mức và do môi trường sống của chúng bị hủy diệt. Điểm đáng lưu ý ở đây là các vùng rừng nhiệt đới và á nhiệt đới, chứa đựng tới 3/5 mức độ đa dạng sinh học của thế giới, lại là nơi bị tàn phá nhiều nhất. Theo số liệu của *Tổ chức Nông lương* (FAO) của Liên Hợp Quốc, chỉ trong vòng 40 năm, (1940 – 1980), diện tích các loại hình rừng trên đã bị thu hẹp tới 44%. Tính ra mỗi năm có tới 75.000 hecta rừng đã bị phá hủy. Rừng bị mất đi có nghĩa là các cây thuốc ở đó cũng đã bị mất đi, đồng thời còn kéo theo nhiều hậu quả tai hại khác. Mặt khác, như chúng ta đã biết, diện tích rừng nhiệt đới trên trái đất chủ yếu tập trung ở các quốc gia đang phát triển. Ở nơi đó, vốn tri thức về *Ethnobotany, Ethnomedicin* trong cộng đồng các dân tộc rất phong phú, trong khi đó việc điều tra nghiên cứu về những kinh nghiệm này hiện còn rất ít ỏi (*K.S. Bawa and P. S. Ashton, 1991*).

Trước mắt, người ta nhận thấy rằng còn nhiều triệu chứng về thần kinh, cảm xúc; nhiều bệnh tật nan giải như ung thư, bệnh về di truyền, tế bào và AIDS,.. cần phải tiếp tục tìm kiếm các loại thuốc mới từ các loài cây cỏ và từ vốn kinh nghiệm của y học cổ truyền của các dân tộc. Vì thế, vấn đề bảo tồn ĐDSH và bảo tồn cây thuốc đang là mối quan tâm hàng đầu ở nhiều quốc gia (*A.B. Cunningham, 1991*).

1.2. Khái quát về tiềm năng và hiện trạng nguồn tài nguyên cây thuốc Việt Nam

1.2.1. Vài nét về điều kiện tự nhiên và xã hội nước Việt Nam

Nước Cộng hòa xã hội chủ nghĩa Việt Nam nằm dọc trên bán đảo Đông Dương, kéo dài theo hướng bắc nam với hơn 1600km trên đất liền, từ 8°30' ở mũi Cà Mau – tỉnh Cà Mau đến hang Lũng Cú – tỉnh Hà Giang. Phía bắc giáp nước Cộng hòa Nhân dân Trung Hoa, phía nam giáp Vịnh Thái Lan và nam Biển Đông, phía tây giáp Cộng hòa Dân chủ Nhân dân Lào và Vương quốc Cam Pu Chia, còn phía đông giáp Vịnh Bắc Bộ và Biển Đông. Tổng diện tích phần đất liền là 325.360 km^2, ngoài ra còn nhiều đảo và quần đảo lớn, như Cát Bà, Cồn Cỏ, Bạch Long Vĩ, Hòn Mê, Cù Lao Chàm, Hoàng Sa, Trường Sa, Côn Đảo, Phú Quốc, Thổ Chu,...

Nước Việt Nam có hình dạng hẹp về chiều ngang, nơi rộng nhất chỉ khoảng 600 km, nơi hẹp nhất là hơn 40 km. Trên đó, có tới 3/4 lãnh thổ là đồi núi, với nhiều dãy núi lớn và cao như Hoàng Liên Sơn có các đỉnh Fan Si Păng 3143 m (cao nhất Đông Dương), Ngũ Chỉ Sơn 3096 m, Phu Xi Lung 3075 m. Dãy Trường Sơn chạy dọc biên giới Việt Lào, về phía nam mở rộng ra thành các cao nguyên với một số đỉnh núi nhô cao như Ngọc Linh 2589 m, Chư Yang Sin 2405 m, Bi Đúp 2287 m. Xen kẽ với các vùng núi kể trên là một hệ thống các sông suối chằng chịt. Song đáng chú ý nhất là hai con sông lớn Hồng Hà và Cửu Long, đã tạo ra ở hai miền Bắc và Nam hai vùng đồng bằng châu thổ rộng lớn.

Sự chia cắt mạnh và phức tạp của bề mặt địa hình là nhân tố quan trọng tạo nên sự đa dạng cao trong bản đồ sinh khí hậu ở Việt Nam.

Nằm ở khu vực Đông Nam Á, Việt Nam có khí hậu nhiệt đới gió mùa nóng và ẩm. Trong đó, tính nhiệt đới gió mùa điển hình thấy rõ ở các vùng đất thấp phía nam và thiên dần sang khí hậu nhiệt đới gió mùa vùng núi hay gần như á nhiệt đới ở các vùng núi cao phía bắc.

Tất cả những nhân tố về địa lý, địa hình và khí hậu kể trên... đã góp phần tạo nên ở Việt Nam có nguồn tài nguyên động – thực vật phong phú và đa dạng. Theo ước tính có cơ sở của các nhà khoa học, về thực vật bậc cao có mạch có tới 12.000 loài. Bên cạnh đó còn có 800 loài Rêu, 600 loài Nấm và hơn 2000 loài Tảo (*Phan Kế Lộc, 1998; Nguyễn Nghĩa Thìn, 1997...*). Trong đó, có rất nhiều loài đã và đang có triển vọng được sử dụng làm thuốc (*Nguyễn Tập, 2002*).

Nghiên cứu về khu hệ thực vật ở Việt Nam, nhìn chung các tác giả đều dễ dàng đi đến thống nhất rằng, thảm thực vật rừng rậm nhiệt đới lá rộng thường xanh ẩm là kiểu thảm điển hình nhất ở nước ta. Tuy nhiên, khi đi vào chi tiết, có thể thấy ở các vùng núi cao có sự hỗn giao giữa cây lá rộng với cây lá kim. Rừng lá kim thuần loại không đáng kể. Ở các vùng thấp, khô hạn hơn có kiểu rừng thưa cây lá rộng rụng lá và nửa rụng lá, hoặc trảng cỏ và cây bụi thứ sinh... Trong các kiểu rừng này, chứa đựng nhiều loài thực vật với các nguồn gốc và xuất xứ khác nhau. Đáng tiếc rằng, nguồn tài nguyên này hiện không còn nguyên trạng nữa. Diện tích rừng thì ngày càng bị thu hẹp; toàn bộ vốn tài nguyên chứa đựng trong nó bị suy giảm; số loài bị đe dọa tuyệt chủng có chiều hướng gia tăng.

Việt Nam có 54 dân tộc, với tổng số dân hơn 76,7 triệu người (*Tổng cục Thống kê, 2000*). Trong đó, dân tộc Kinh chiếm tới 73%, tập trung chủ yếu ở các vùng đồng bằng, trung du và núi thấp. Các dân tộc ít người khác sống quần tụ

và rải rác khắp các vùng núi suốt từ Bắc chí Nam. Tuy nhiên, ở vùng núi phía Bắc tập trung chủ yếu các dân tộc Tày, Nùng, Thái, Mường, H'Mông... còn ở dọc theo dãy Trường Sơn và Tây Nguyên là cộng đồng các dân tộc Pa Cô, Vân Kiều, K'Dong, K'Ho, Sê Đăng, Ba Na, Ê Đê... Một số cộng đồng dân tộc trong số này vẫn còn tập quán du canh, phá rừng làm nương rẫy trồng lúa ngô. Hiện tại ở nước ta vẫn có tới 80% dân số sống ở vùng nông thôn và làng bản mà đời sống kinh tế của họ chủ yếu vẫn là nghề nông, nghề rừng, ngư nghiệp và một số nghề thủ công khác. Bên cạnh đó, cộng đồng các dân tộc sống trên đất nước Việt Nam vốn cũng có nhiều kinh nghiệm sử dụng các loài cây cỏ sẵn có để làm thuốc chữa bệnh. Vốn kinh nghiệm quí báu này đã góp phần tạo dựng nên nền y học cổ truyền dân tộc, với bề dày lịch sử mấy ngàn năm.

1.2.2. Việt Nam có nguồn cây thuốc phong phú và đa dạng

1.2.2.1. Phong phú về thành phần loài

Theo kết quả điều tra tương đối có hệ thống của Viện Dược liệu từ năm 1961 đến nay, đã xác định ở Việt Nam hiện đã biết 3.948 loài cây thuốc, thuộc 307 họ của 9 ngành và nhóm thực vật bậc cao cũng như bậc thấp (kể cả Nấm). Cụ thể ở bảng sau:

Bảng 1: Số loài cây thuốc đã biết ở Việt Nam

TT	Nhóm / ngành	Số họ	Số loài
1	Nhóm Tảo (Alge)	19	52
2	Nhóm Nấm (Fumgi)	12	22
3	Ngành Rêu (Bryophyta)	4	4
4	Ngành Lá thông (Psilophyta)	1	1
5	Ngành Thông đất (Lycopodiophyta)	2	25
6	Ngành Cỏ tháp bút (Equisetophyta)	1	3
7	Ngành Dương xỉ (Polypodiophyta)	26	128
8	Ngành Thông (Pinophyta) (Ngành Hạt trần – Gymnospermae)	11	38
9	Ngành Mộc lan (Magnoliophyta) (Ngành Hạt trần – Angiospermae)	231	3.675
Tổng số		**307**	**3.948**

Theo thống kê, trong "*Từ điển cây thuốc Việt Nam*" của Võ Văn Chi, 1997 một số loài thuộc thực vật bậc thấp và Nấm được sử dụng làm thuốc nhiều hơn so với nguồn dẫn liệu kể trên của Viện Dược liệu, như: thuộc nhóm Nấm: 30 loài thuộc 19 họ (VDL: 22 loài, 12 họ). Song riêng ở nhóm Tảo, Danh lục cây thuốc của Viện Dược liệu đề cập được 52 loài thuộc 19 họ (Võ Văn Chi, 1997: 19 loài, 15 họ). Mặc dù vậy, so với tổng số loài thực vật đã biết ở Việt Nam, bước đầu vẫn có thể rút ra một số nhận xét sau đây:

1. Nguồn cây thuốc ở Việt Nam đặc biệt phong phú và đa dạng về thành phần loài. Dường như tất cả các nhóm và ngành thực vật (kể cả Nấm) đều có các loài được sử dụng làm thuốc. Đặc biệt là trong nhóm thực vật bậc cao có mạch, so với 10.386 loài đã biết (*Phan Kế Lộc, 1998*), cây làm thuốc chiếm tới trên 37,26%.

2. So với một số nhóm cây có ích khác như: cây gỗ: 700 loài, cây chứa tinh dầu: 657 loài, song mây và tre nứa: trên 130 loài [4]... rõ ràng số loài cây được sử dụng làm thuốc lớn hơn rất nhiều.

3. Tuy nhiên, so với một số nhóm thực vật bậc thấp đã biết khác, như Tảo: khoảng hơn 2000 loài, Rêu 800 loài, Nấm 600 loài thì số loài được sử dụng làm thuốc ở Việt Nam còn quá ít – hay đúng hơn, chúng chưa được điều tra nghiên cứu cụ thể. Bởi thế, đây cũng có thể coi là nguồn dược liệu tiềm năng, cần có sự đầu tư nghiên cứu trong thời gian tới.

1.2.2.2. Khả năng khai thác sử dụng

Trong tổng số 3.948 loài cây thuốc đã biết ở Việt Nam hiện nay, phần lớn được sử dụng theo kinh nghiệm (truyền khẩu) trong nhân dân. Số loài được xác minh khoa học về giá trị, cơ chế chữa bệnh (kể cả từ nguồn tài liệu của nước ngoài) chỉ chiếm khoảng 20 – 30%. Chúng được sử dụng để điều trị từ các chứng bệnh thông thường mắc phải trong cuộc sống hàng ngày, như cảm sốt, cảm lạnh, cầm máu – làm liền vết thương, ăn uống khó tiêu, bong gân - sai khớp do ngã, bó – nắn gãy xương... cho đến cả một số bệnh nan y khó chữa như bệnh tim mạch, gan, thận, thần kinh, dị ứng,... Trong một số công bố gần đây về 920 loài cây thuốc, các tác giả của công trình này đã liệt kê ra được 64 loại bệnh chứng đã được điều trị bằng cây thuốc theo cách cổ truyền (*nhiều tác giả, 2004 ; Cây thuốc*

---

[4] - Vu Van Dung et al., 1996; Vietnam forest Tree; Agr. Pub. House
- Lã Đình Mỡi và một số người khác, 2001; Tài nguyên TV có tinh dầu ở VN; T.1; NXB. NN.
- Bộ NN&PTNT, Đại sứ quán Hà Lan, IUCN, Viện KHLN. VN, 2002; Tổng quan ngành Lâm sản ngoài gỗ của Việt Nam.

và Động vật làm thuốc ở Việt Nam; T.1 và 2). Một số loại bệnh nan giải về gan, thận, đau dạ dày, thấp khớp, bó gãy xương, chữa rắn cắn,... nhìn chung người dân tỏ ra có tín nhiệm hơn khi điều trị bằng cây thuốc theo kinh nghiệm của y học cổ truyền.

Mặt khác, tính phong phú về sử dụng cây thuốc trong Y học cổ truyền còn thể hiện ở kinh nghiệm của từng cá nhân hay của mỗi cộng đồng dân tộc. Trên một số cây thuốc, mỗi bộ phận hoặc sau khi đã chế biến, có thể sử dụng với những công dụng khác nhau.

Số liệu thống kê của ngành Y tế gần đây cho biết, mỗi năm ở Việt Nam tiêu thụ từ 30 – 50.000 tấn các loại dược liệu khác nhau. Trên 2/3 khối lượng này được khai thác từ nguồn cây thuốc mọc tự nhiên và trồng trọt trong nước. Riêng từ nguồn cây thuốc tự nhiên đã cung cấp tới trên 20.000 tấn mỗi năm. Tuy vậy, khối lượng dược liệu này trên thực tế mới chỉ bao gồm từ 200 loài được khai thác và đưa vào thương mại có tính phổ biến hiện nay. Bên cạnh đó còn nhiều loài cây thuốc khác vẫn được thu hái sử dụng tại chỗ trong cộng đồng, hiện chưa có những con số thống kê cụ thể.

Nghiên cứu về nhu cầu dược liệu ở Việt Nam hiện nay, tạm thời có thể chia ra một số đầu mối tiêu thụ như sau:

* Sử dụng làm thuốc trong y học cổ truyền, chủ yếu dưới dạng thuốc chén và thuốc thang; ước lượng từ 20 – 30.000 tấn / năm.

* Là nguyên liệu cho công nghiệp dược, bao gồm chiết xuất hợp chất tự nhiên để làm thuốc và sản xuất thuốc đông dược (sản xuất bằng máy ở các nhà máy dược phẩm và xí nghiệp), nhu cầu gần 20.000 tấn / năm.

* Dược liệu để xuất khẩu mỗi năm từ 5.000 đến gần 10.000 tấn, với giá trị khoảng 15 triệu đô la Mỹ.

Ngoài ra, trong những năm gần đây, Việt Nam còn xuất khẩu một số bán thành phẩm thuốc dưới dạng hoạt chất như berberin, palmatin, rotundin, rutin,... Một số doanh nghiệp đã xuất khẩu được thuốc hoạt chất như Artemisinin, Artesunat... và nhiều dạng thuốc đông dược khác. Hiện chưa có những con số thống kê đầy đủ về tổng giá trị thương mại quốc nội, cũng như xuất khẩu về dược liệu và thuốc từ dược liệu của Việt Nam.

1.2.2.3. Triển vọng

Trong cây cỏ có chứa nhiều hợp chất tự nhiên và trong số những hợp chất có hoạt tính sinh học cao đó, có nhiều chất được sử dụng làm thuốc. Các hợp chất

tự nhiên trong cây cỏ thường thấy ở các nhóm hoạt chất như: alcaloid, saponin, flavonoid, coumarin, polysaccharid, anthranoid... Hiện tại số loài thực vật ở nước ta được đưa vào chiết xuất hợp chất để làm thuốc còn rất hạn chế. Với nguồn tài nguyên thực vật (và cả động vật) phong phú, cùng với vốn kinh nghiệm *ethnobotanic và ethnomedicin* của cộng đồng các dân tộc Việt Nam, hy vọng, đó là một nguồn tiềm năng để nghiên cứu, tạo ra những loại thuốc mới có hiệu lực chữa bệnh cao.

1.3. Nguồn tài nguyên cây thuốc Việt Nam đã bị giảm sút nghiêm trọng, một số loài đang đứng trước nguy cơ bị tuyệt chủng

1.3.1. Vùng phân bố tự nhiên của cây thuốc bị thu hẹp

Theo thống kê của ngành Lâm nghiệp, diện tích rừng ở nước ta từ 14,3 triệu hecta vào năm 1943, đến năm 1993 chỉ còn 9,3 triệu hecta (*Bộ Lâm nghiệp, 1995*). Việt Nam là một trong một số quốc gia có tốc độ phá rừng cao nhất thế giới (*Mc Kinnon & Cox, 1991*), hiện tại diện tích rừng nguyên sinh cổ còn lại không tới 1% tổng diện tích lãnh thổ (*Averyanov, L. V. et al., 2004*). Rừng bị phá hủy, sẽ làm cho toàn bộ tài nguyên rừng ở đó bị mất đi, trong đó có nhiều cây thuốc và còn kéo theo nhiều hậu quả tai hại khác.

Trong quá trình điều tra dược liệu của Viện Dược liệu – Bộ Y tế, từ năm 1970 – 1990 đã phát hiện nhiều vùng rừng có cây thuốc phong phú nay đã hoàn toàn bị xóa sổ, thay vào đó là nương rẫy hoặc các công trình dân sự. Năm 1972 – 1973, vùng núi Hàm Rồng ở thị trấn Sa Pa – Lào Cai là một khu rừng rậm rạp, có nhiều cây thuốc, kể cả các loài quí hiếm như sâm vũ diệp (*Panax bipinnatifidus* Seem.), tam thất hoang (*P. stipuleanatus* H. T. Tsai et K. M. Feng), hoàng liên gai (*Berberis julinae* Schneid.)..., đến năm 1985, rừng ở đây đã hoàn toàn bị phá hủy, để trồng ngô và các loại cây trồng khác. Tình trạng này còn có thể thấy ở vùng rừng Dốc Cun – Hòa Bình, nay là nương chè và nhà ở. Hàng chục ngàn hecta rừng ở tiểu cao nguyên An Khê (thuộc 2 tỉnh Gia Lai và Bình Định), trước kia vốn là một trung tâm phân bố lớn nhất Việt Nam của cây vàng đắng (*Coscinium fenestratum* (Gaertn.) Colebr.) - nguyên liệu chiết berberin, hiện đã nằm dưới lòng hồ chứa nước của thủy điện Vĩnh Sơn. Năm 1983, trong khi tiến hành điều tra dược liệu huyện Trà My tỉnh Quảng Nam, chúng tôi đã có dịp kiểm chứng, tính trung bình 1 hộ dân người K'Ho có 6 – 8 nhân khẩu, mỗi năm đã phá gần 1,2 hecta rừng nguyên sinh để trồng lúa nương. Trong các khu rừng này có nhiều cây thuốc quí như vàng đắng, thiên niên kiện,

ngũ gia bì chân chim, hoàng đằng,... chưa kịp điều tra và khai thác... Bên cạnh nạn phá rừng và mất rừng (do cháy rừng và lũ lụt), việc khai thác rừng (lấy gỗ), trồng rừng mới thuần loại (bạch đàn, keo lá tràm, keo tai tượng, thông...) cũng làm mất đi nhiều loài cây thuốc vốn có trong các tầng cây bụi và thảm tươi ở đó.

Tóm lại, nạn phá rừng làm nương rẫy và mở mang các công trình lớn ở miền núi, đã trực tiếp làm thu hẹp thảm thực vật tự nhiên ở Việt Nam, trong đó có nhiều cây làm thuốc.

1.3.2. Sự giảm sút nhanh chóng khả năng khai thác những loài cây thuốc có nhu cầu sử dụng cao

Bên cạnh tác động của nạn phá rừng và mất rừng, việc khai thác liên tục nhiều năm, chưa chú ý bảo vệ tái sinh cũng làm cho nguồn cây thuốc ở Việt Nam mau cạn kiệt. Tình trạng này có thể thấy rất rõ đối với những cây thuốc có giá trị sử dụng và kinh tế cao, nhất là cây nguyên liệu cho công nghiệp dược.

Ví dụ: vàng đắng (*Coscinium fenestratum* (Gaertn.) Colebr.) là một loài dây leo gỗ lớn. Kết quả điều tra đến năm 1986 đã xác định cây phân bố chủ yếu ở các tỉnh phía Nam (từ vĩ độ 16°15' ở Phú Lộc – Thừa Thiên Huế trở vào), trên phạm vi thuộc 121 xã, 44 huyện, 14 tỉnh. Từ năm 1980 – 1990 tính trung bình khai thác từ 1000 – 2500 tấn / năm, ở các tỉnh Gia Lai - Kon Tum, Nghĩa Bình, Quảng Nam - Đà Nẵng, Đắk Lắk và Sông Bé (theo đơn vị hành chính lúc đó). Đến giai đoạn từ 1991 – 1995, mỗi năm chỉ còn dưới 200 tấn. Từ năm 1995 đến nay, về cơ bản không còn khai thác vàng đắng ở nước ta (*Nguyễn Tập và một số người khác 1986 và 1996*). Đặc biệt đáng lưu ý là một số cây thuốc có nhu cầu dường như không hạn chế, như ba kích (*Morinda officinalis* How); đảng sâm (*Campanumoea javanica* Blume) và các loài hoàng tinh thuộc chi *Disporopsis* và *Polygonatum*... Vốn phân bố khá phổ biến ở các tỉnh miền núi phía bắc, lượng khai thác những cây thuốc này hiện đã suy giảm nghiêm trọng, thậm chí đã trở nên hiếm đến mức đã được đưa vào Danh lục Đỏ cây thuốc Việt Nam (*Nguyễn Tập, 1985, 1990, 1997, 2001*) và Sách Đỏ Việt Nam – Phần thực vật, 1996.

1.3.3. Những cây thuốc thuộc diện quý hiếm đang đứng trước nguy cơ bị tuyệt chủng cao

* Đặc điểm chung: *Là những cây thuốc vốn hiếm gặp ở Việt Nam, với kích thước quần thể nhỏ thường xuyên bị khai thác do có giá trị sử dụng và kinh tế cao, hoặc hiện tại chưa bị sức ép bởi khai thác, nhưng do có số lượng cá thể không nhiều nên rất dễ bị rủi ro, bởi thiên tai (cháy rừng, lũ lụt, lở đất). Hoặc vô tình bị tàn phá do môi trường sống là ven rừng, gần đường đi và nương rẫy.*

Những đối tượng kể trên hiện đã trở nên cực hiếm và đang có nguy cơ bị tuyệt chủng cao. Điển hình là các loài sâm mọc tự nhiên: *Panax bipinnatifidus* Seem., *P. stipuleanatus* H. T. Tsai et K. M. Feng, *P. vietnamense* Ha et Grushv.; các loài hoàng liên: *Coptis chinensis* Franch., *C. quinquesecta* W. T. Wang, *Berberis julinae* Schneid., *B. wallichiana* DC, *Mahonia bealei* (Forst.) Carr., *Thalictrum foliolosum* DC., bách hợp (*Lilium brownii* var. *viridum*); biến hóa núi cao (*Asarum balansae* Franch.); thanh mộc hương (*Aristolochia tuberosa* C. F. Liang et S. M. Hwang ex Liang)...

1.3.4. Tìm hiểu một số nguyên nhân chủ yếu

** Rừng bị phá hủy làm mất môi trường sống, thu hẹp vùng phân bố tự nhiên của cây thuốc.*

- Phá rừng làm nương rẫy: Do tập quán du canh – du cư của một số cộng đồng dân tộc ít người sống ở vùng núi, như H'Mông, Dao, Hà Nhì... ở phía Bắc; Ba Na, Sê Đăng, Ê Đê, H'Rê... ở phía Nam, trước kia mỗi năm họ thường chặt, đốt hàng vạn hecta rừng, để lấy đất làm nương rẫy (trồng lúa nương, ngô, sắn...). Rừng bị chặt phá thường là rừng nguyên sinh hay còn tương đối nguyên sinh, độ dốc ít, đất màu mỡ. Ngoài ra, nhiều vùng rừng phục hồi sau nương rẫy cũng bị phá do thiếu đất trồng trọt. Hiện tượng này nếu cứ lặp lại nhiều lần sẽ dẫn tới tình trạng trở thành đồi trọc. Vì đất bị rửa trôi quá nhiều, rừng không thể phục hồi được nữa.

Bên cạnh nạn phá rừng để trồng cây lương thực, còn có hiện tượng phá rừng lấy đất trồng cây công nghiệp (cao su, cà phê, chè...).

Phá rừng để lấy đất trồng trọt ***là nguyên nhân nghiêm trọng nhất***, làm mất vĩnh viễn tài nguyên rừng, trong đó có cây thuốc; làm thu hẹp đáng kể vùng phân bố của cây thuốc tự nhiên.

- Rừng bị mất do làm hồ chứa nước cho nhà máy thủ điện, cho các công trình thủy lợi, mở mang mạng lưới giao thông hoặc tạo nên các khu tái định cư mới.

Các việc làm này thường được trù liệu với mục đích rõ ràng. Tuy nhiên nếu không nghiên cứu kỹ hoặc quản lý tốt, sẽ dẫn đến các hậu quả thứ cấp, như: thay đổi môi trường sinh thái cục bộ, hoặc cây thuốc ở đó sẽ bị khai thác triệt để hơn, do mạng lưới giao thông nay đã được cải thiện.

** Khai thác lâm sản, tu bổ rừng phục hồi, trồng rừng thuần loại* cũng vô tình loại bỏ các cây thuốc, hoặc làm biến đổi môi trường sinh thái vốn có của cây thuốc.

Thuộc nhóm nguyên nhân này, có thể bao gồm cả nạn cháy rừng tự nhiên và lũ lụt.

** Khai thác cây thuốc không chú ý bảo vệ tái sinh tự nhiên* (khai thác quá mức):

- Phát động khai thác ồ ạt, không có kế hoạch luân chuyển vùng khai thác.

- Khai thác có tính hủy diệt theo kiểu "chặt trắng" – cả cây lớn lẫn cây nhỏ; thu hái hoa, quả, lá... thường chặt đốn cả cây. Khai thác không tránh mùa hoa quả, không chừa cây gieo giống, không chừa lại phần gốc phù hợp đối với những cây thuốc có khả năng tái sinh chồi...

Cách khai thác trên được coi là phổ biến ở Việt Nam. ***Đây là nguyên nhân nghiêm trọng thứ 2*** dẫn đến tình trạng suy giảm nhanh chóng nguồn cây thuốc thiên nhiên ở nước ta. Hậu quả này đã làm cho những loài có giá trị kinh tế và sử dụng cao, bao gồm cả những loài hiếm đang đứng trước nguy cơ bị tuyệt chủng.

** Quản lý khai thác thu mua dược liệu không chặt chẽ*. Đặc biệt từ khi nền kinh tế nước ta chuyển sang cơ chế thị trường, từ khâu khai thác, vận chuyển đến kinh doanh dược liệu có nhiều thành phần kinh tế tham gia (chủ yếu là tư nhân), gây khó khăn cho công tác quản lý. Vì lợi nhuận, người ta bất chấp tất cả, khai thác cả những loài cây thuốc thuộc diện bị cấm và bảo tồn (có tên trong Nghị định số 18/NĐ-CP trước kia nay là Nghị định số 48/2002/NĐ-CP và trong Sách Đỏ Việt Nam – Phần thực vật (1996) và trong Danh lục Đỏ cây thuốc Việt Nam (2001)). Trong khi đó nhiều văn bản về quản lý tài nguyên hiện chưa đến được với người dân, thậm chí cả một số doanh nghiệp Dược.

Tóm lại, ***gây nên sự suy giảm nguồn cây thuốc thiên nhiên có nhiều nguyên nhân. Trong đó, nghiêm trọng nhất lại chính là do các hoạt động của con người. Bởi vậy, bảo tồn cây thuốc ở Việt Nam hiện nay, bên cạnh tăng cường công tác quản lý, nhất thiết phải có sự tham gia của cộng đồng***.

II. BẢO TỒN CÂY THUỐC

Tiếp theo Hội nghị Quốc tế Bảo tồn cây thuốc, tổ chức ở Thái Lan năm 1988, năm 1993 WHO, IUCN và WWF đã đưa ra một tài liệu "Hướng dẫn bảo tồn cây thuốc" (Guidelines on Conservation of Medicinal Plants). Đây không phải là loại tài liệu về phương pháp nghiên cứu, nhưng những người biên soạn đã có chủ ý đề cập từ khâu điều tra nghiên cứu cho đến tiến hành khai thác sử dụng, phát

triển trồng thêm và quản lý cây thuốc, đều là những hoạt động có liên quan và phục vụ cho mục đích bảo tồn. Tuy nhiên, để cho công tác bảo tồn cây thuốc có hiệu quả, cần phải căn cứ vào tình hình của mỗi quốc gia, để từ đó đưa ra các giải pháp và chương trình hành động phù hợp.

2.1. Điều tra thu thập

Lịch sử điều tra thu thập cây thuốc để sử dụng ở Việt Nam có lẽ được bắt đầu từ các thầy lang và một số nhà sư. Đến đầu thế kỷ 20, khi khoa học thực vật học của phương Tây du nhập vào nước ta, thì việc nghiên cứu cây thuốc đã được gắn liền với phân loại thực vật, xác định tên khoa học của chúng.

Điều tra cây thuốc gắn liền với phân loại thực vật cũng được các nhà thực vật học và dược học trong nước, tiến hành ngay trong kháng chiến chống Pháp. Từ ngày hòa bình lập lại ở miền Bắc (1954) và giải phóng miền Nam thống nhất đất nước (1975), công việc này mới thực sự được tiến hành một cách có hệ thống trên phạm vi toàn lãnh thổ phục vụ cho nhu cầu khai thác sử dụng ở các địa phương.

Tính đến cuối năm 2003 đã có trên một ngàn lượt xã - phường thuộc hầu hết các huyện – thị của tất cả các tỉnh – thành phố đã được tiến hành điều tra dược liệu. Kết quả đã phát hiện và thống kê được ở Việt Nam có 3.948 loài cây thuốc, hàng trăm loài trong số đó đã được đưa vào khai thác sử dụng trong nước và xuất khẩu...

Tuy nhiên, trước yêu cầu bảo tồn để khai thác bền vững nguồn tài nguyên cây thuốc thiên nhiên ở Việt Nam, công tác điều tra dược liệu (chủ yếu về cây thuốc) cần tập trung vào một số vấn đề chủ yếu sau:

2.1.1. Điều tra thu thập một cách có hệ thống kinh nghiệm sử dụng cây thuốc theo kinh nghiệm của cộng đồng các dân tộc

2.1.1.1. Mục đích

1- Bảo tồn vốn tri thức – kinh nghiệm sử dụng cây thuốc của cộng đồng.

2- Thu thập và phát hiện những cây thuốc mới, bổ sung cho kho tàng nguồn tài nguyên cây thuốc Việt Nam.

3- Nghiên cứu xác minh về mặt khoa học nhằm đưa ra sử dụng rộng rãi hơn, hoặc tạo ra các thuốc mới có hiệu lực chữa bệnh cao (từ những kinh nghiệm sử dụng cây thuốc trong cộng đồng).

2.1.1.2. Nội dung và phương pháp điều tra thu thập

Đã được đề cập cụ thể ở mục 2.1. của phần Điều tra cây thuốc, song ở đây cần lưu ý:

1- Đối tượng là những loài cây thuốc chưa biết, đồng thời chú ý thu thập để bổ sung thông tin cho tất cả những cây thuốc đã biết (3.948 loài).

2- Đồng thời với việc lấy tiêu bản để xác định tên khoa học và lưu trữ, đối với những cây thuốc mới, cây chưa xác định được tên khoa học nhất thiết phải thu thập cả cây giống về trồng, với mục đích bảo tồn chuyển vị (Ex situ Conservation), nhận biết để dễ dàng thu thập lại khi cần thiết.

Trong quá trình điều tra dược liệu ở Việt Nam, từ 1961 đến nay, vấn đề ghi chép, hệ thống hóa các thông tin về kinh nghiệm sử dụng cây thuốc của cộng đồng chưa được đầy đủ và có hệ thống. Bởi vậy, trong các đợt điều tra sắp tới, cần đặc biệt chú ý. Trong tài liệu "*Hướng dẫn bảo tồn cây thuốc*" của WHO, IUCN và WWF (1993), ***vấn đề điều tra thu thập cây thuốc và kinh nghiệm sử dụng của cộng đồng được nêu lên như là hoạt động quan trọng nhất, trong công tác bảo tồn***. Bởi vì bảo tồn cây thuốc còn bao hàm trong đó sự bảo tồn vốn tri thức về cây thuốc của các cộng đồng ở mỗi quốc gia. Đó là những kinh nghiệm có khi đã được sàng lọc, truyền tụng từ đời này qua đời khác. Nếu không được ghi chép lại, chúng có thể bị mai một cùng thời gian. Mặt khác, nếu cây thuốc không được bảo tồn, thì vốn tri thức về nó cũng không còn. Những kinh nghiệm sử dụng cây thuốc trong cộng đồng còn là chìa khóa để khám phá ra những loại dược phẩm mới cho tương lai.

2.1.2. Đi sâu điều tra đánh giá về tiềm năng khai thác sử dụng

2.1.2.1. Mục đích

Nắm được tiềm năng để có kế hoạch khai thác một cách hợp lý, chính là bảo tồn vốn tài nguyên cây thuốc thiên nhiên.

2.1.2.2. Vùng điều tra

- Tập trung vào những vùng rừng có nhiều cây thuốc mọc tập trung và những vùng xa xôi hẻo lánh chưa có điều kiện điều tra.

- Có thể là những vùng rừng núi đã từng điều tra, nhưng qua một thời gian dài khai thác hoặc bị tác động, đã làm cho nguồn cây thuốc ở đây thay đổi nhiều.

2.1.2.3. Nội dung điều tra nghiên cứu

- Phát hiện, thống kê thành phần loài cây thuốc.

- Xác định sơ bộ sự phân bố, khả năng khai thác (trữ lượng) những cây thuốc đang có nhu cầu sử dụng cao, giới thiệu cho khai thác.

- Căn cứ vào đặc điểm sinh học của các loài trên (mùa hoa quả, khả năng tái sinh tự nhiên,...) đề xuất kỹ thuật khai thác, đảm bảo tái sinh tự nhiên, bao gồm:

+ Tiêu chuẩn cây khai thác

+ Thời gian khai thác hợp lý

+ Kỹ thuật chặt, thu hái nguyên liệu

+ Kỹ thuật phơi, sấy (chế biến sơ bộ) và bảo quản

+ Tỷ lệ chừa cây gieo giống tự nhiên

+ Chu kỳ luân chuyển vùng khai thác

- Xác định những loài cây thuốc thuộc diện quý hiếm, cần bảo vệ. Bao gồm: tên các loài, điểm phân bố, tình hình hiện trạng. Trên cơ sở đó đề ra biện pháp bảo vệ phù hợp.

2.1.2.4. Phương pháp điều tra nghiên cứu

Bao gồm các phương pháp:

- Điều tra theo tuyến và ô tiêu chuẩn (ở mục 2.2. và 2.3. - phần điều tra cây thuốc).

- Điều tra trữ lượng cây thuốc.

- Điều tra tình hình khai thác sử dụng (ở mục 2.4. - phần điều tra cây thuốc).

Điều tra nắm vững tiềm năng để có kế hoạch khai thác một cách hợp lý, sẽ góp phần quan trọng trong việc bảo tồn nguồn tài nguyên cây thuốc thiên nhiên.

2.2. Xây dựng Danh lục Đỏ cây thuốc – Xác định loài ưu tiên bảo tồn

2.2.1. Khái niệm chung về bảo tồn đa dạng sinh học và vấn đề bảo tồn loài đối với cây thuốc

Đề cập tới bảo tồn đa dạng sinh học, các nhà khoa học thường phân chia ra các hình thức chủ yếu sau:

2.2.1.1. Bảo tồn hệ sinh thái

Mục đích là bảo tồn nguyên vẹn hệ sinh thái, cảnh quan cùng toàn bộ các quần thể – chủng quần sinh vật hiện có ở đó. Chúng được tồn tại, sinh trưởng

phát triển tự nhiên trong mối quan hệ hữu cơ với môi trường sống, cũng như giữa chúng với nhau. Hình thức bảo tồn này có thể thấy ở các Vườn Quốc gia và các Khu Bảo tồn thiên nhiên.

2.2.1.2. Bảo tồn loài

Mục đích là bảo tồn nguyên vẹn quần thể (đối với thực vật) hoặc chủng quần (đối với động vật), trong đó bao gồm tất cả các cá thể của một hay một số loài sinh vật nào đó. Bảo tồn loài được thực hiện dưới 2 hình thức ***Bảo tồn nguyên vị*** (*In situ Conservation*) và ***Bảo tồn chuyển vị*** (*Ex situ Conservation*) (được trình bày cụ thể ở phần sau).

2.2.1.3. Bảo tồn trong loài

Còn gọi là Bảo tồn đa dạng dưới loài hay là ***Bảo tồn đa dạng di truyền của loài***. Mục đích của Bảo tồn trong loài là bảo tồn các tính trạng/ các biến dị di truyền bền vững của loài. Đó là những khác biệt về mặt hình thái - độ lớn và màu sắc của một số bộ phận của cây, về tính chống chọi với điều kiện tự nhiên, sâu bệnh hoặc về hàm lượng hoạt chất tích lũy... giữa các cá thể khác nhau trong quần thể (hoặc chủng quần) loài. Bảo tồn tính đa dạng trong loài cũng đặc biệt được coi trọng đối với cây trồng, vật nuôi (trong đó có các loài làm thuốc). Bởi đó là nguồn vật liệu ban đầu cho công tác chọn, tạo giống mới.

Chú ý, ***trong bảo tồn cây thuốc còn bao gồm cả lĩnh vực phi vật thể, đó là bảo tồn vốn tri thức – kinh nghiệm sử dụng cây thuốc của cộng đồng***.

Tóm lại, bảo tồn đa dạng sinh học nói chung và bảo tồn cây thuốc nói riêng là một quá trình phức tạp, bao gồm nhiều vấn đề phải quan tâm. Tuy nhiên, trong bối cảnh ở Việt Nam hiện nay, bảo tồn cây thuốc tự nhiên, trước hết là ***bảo tồn loài,*** sau đó mới đến ***bảo tồn trong loài***. Trong đó, cấp bách nhất lại là việc xác định được những loài đang bị đe dọa, nếu không có các biện pháp bảo tồn kịp thời, chúng sẽ bị tuyệt chủng.

2.2.2. Quan điểm loài ưu tiên bảo tồn

Theo D. A. Falk và K. E. Holsinger, 1991: *Bất cứ loài nào có phạm vi, ranh giới phân bố hẹp hoặc với số lượng cá thể ít thì đều được xem như có bối cảnh rủi ro cao và cần phải được ưu tiên bảo tồn.*

Theo quan điểm của các nhà di truyền học lại nhấn mạnh: *Bất cứ taxon nào tiêu biểu cho một dòng tiến hóa duy nhất hoặc có mức độ khác biệt cao về mặt di truyền, đều là đối tượng cần ưu tiên bảo tồn.*

Năm 1991, A. B. Cunningham bổ sung thêm: *Còn nhiều loài khác hiện bị xâm hại do khai thác quá mức hoặc môi trường sống của chúng bị thu hẹp cũng là những đối tượng cần ưu tiên trong bảo tồn.*

Kế thừa các quan điểm trên, ngay từ năm 1996, trong quá trình nghiên cứu bảo tồn cây thuốc, Nguyễn Tập đã đưa ra quan điểm: ***Những loài cây thuốc vốn hiếm gặp hay đã và đang trở nên hiếm gặp bởi nhiều nguyên nhân khác nhau, hiện đang lâm vào tình trạng bị đe dọa tuyệt chủng (ở Việt Nam), đều là những đối tượng cần ưu tiên bảo tồn***. Có thể hiểu quan điểm này, bao gồm các nhóm đối tượng sau:

* Những loài cây thuốc vốn hiếm gặp, do phạm vi phân bố hạn chế, với kích thước quần thể nhỏ – số lượng cá thể ít. Thuộc nhóm này, có thể chia ra 2 nhóm nhỏ khác:

- Có giá trị sử dụng và kinh tế cao, nên bị lùng sục tìm kiếm khai thác gay gắt, đã trở nên cực hiếm, hiện có nguy cơ bị tuyệt chủng rất cao.

- Hiện tại chưa bị sức ép bởi các hoạt động khai thác sử dụng, nhưng do phân bố hạn chế, với kích thước quần thể nhỏ – số lượng cá thể ít nên cũng dễ bị rủi ro, bởi thiên tai (cháy rừng, lũ lụt) hoặc các hoạt động khác của con người (nạn phá rừng làm nương rẫy, làm hồ chứa nước, đường giao thông...) và động vật (làm thức ăn hay dẫm đạp...).

* Những cây thuốc là các loài đặc hữu hẹp, là đại diện duy nhất của chi hay họ thực vật trong hệ thực vật Việt Nam. Ngoài ra, thuộc nhóm này có thể kể thêm cả những loài mà sự hiện diện của chúng ở nước ta (thường ở gần vùng biên giới với số lượng cá thể ít) là điểm đầu hay cuối của khu phân bố của loài trên phạm vi toàn thế giới.

Đối tượng thuộc hai nhóm trên thường được gọi một cách vắn tắt là những ***cây thuốc quí hiếm***. Khái niệm quí hiếm ở đây chỉ có tính tương đối, bởi giá trị sử dụng, kinh tế mang lại hiện tại, đồng thời với tính quí hiếm về giá trị nguồn gen.

* Những loài cây thuốc vốn phân bố tương đối phổ biến (không hiếm), với kích thước quần thể và trữ lượng lớn, nhưng đã bị khai thác và tàn phá liên tục nhiều năm (khai thác quá mức) làm thu hẹp nhanh chóng về phân bố, không còn khả năng khai thác tự nhiên; thậm chí đã trở nên hiếm hoặc cực hiếm cũng là những đối tượng cần ưu tiên bảo tồn.

Trên đây có thể coi là những quan điểm để lựa chọn đối tượng bảo tồn. Song,

để có cơ sở khoa học chắc chắn hơn, chúng ta cần đánh giá cụ thể về tình trạng bị đe dọa đối với các loài cây thuốc, theo các tiêu chuẩn trong khung phân hạng của IUCN năm 1994.

2.2.3. Khung phân hạng của IUCN, 1994

Từ đầu những năm 70 của thế kỷ trước, IUCN đã đưa ra một khung phân hạng, bao gồm các tiêu chuẩn để đánh giá tình trạng bị đe dọa đối với các loài (hay bậc taxon) sinh vật. Ngay sau khi ra đời, khung phân hạng này đã được nhiều nhà khoa học sử dụng để xây dựng nên các Danh lục Đỏ hay Sách Đỏ, ở cấp quốc gia hay vùng, trong đó có Việt Nam. Danh lục Đỏ và Sách Đỏ đã được các nhà khoa học và nhà quản lý sử dụng như những công cụ trong công tác bảo tồn sinh vật.

Trải qua gần 30 năm tồn tại, các nhà bảo tồn nhận thấy cần phải sửa đổi lại khung phân hạng của của IUCN, trên cơ sở định lượng hóa các tiêu chuẩn, để cho việc đánh giá tình trạng bị đe doạ đối với các loài được chính xác và khách quan hơn. Đó chính là lý do để cho khung phân hạng mới của IUCN được công bố vào tháng 11 năm 1994.

Để hiểu và áp dụng được khung phân hạng của IUCN, 1994, trước hết cần nắm được định nghĩa về một số khái niệm sau:

2.2.3.1. Một số định nghĩa theo IUCN [5]

1. Quần thể (Population)

Tập hợp toàn bộ cá thể của một taxon (loài), chủ yếu là các cá thể trưởng thành.

2. Tiểu quần thể (Subpopulation)

Một bộ phận quần thể (nhóm cá thể) tồn tại trong một khu vực địa lý, ít giao tiếp về sinh sản (quần thể địa phương).

3. Suy giảm liên tục (Continuing decline)

Giảm sút số lượng nhận thấy gần đây và còn tiếp tục trong tương lai, nguyên nhân không rõ hoặc không kiểm soát được. Các biến động về số lượng tự nhiên không coi là suy giảm liên tục.

4. Chia cắt nghiêm trọng (Severely fragmented)

Các cá thể tồn tại ở các tiểu quần thể cách biệt, có nguy cơ tuyệt chủng, ít có khả năng hợp quần lại.

---

[5] Khung phân hạng của IUCN (1994) được dịch sang tiếng Việt bởi Đề án "Tu chỉnh Sách Đỏ Việt Nam" 2000 – 2003.

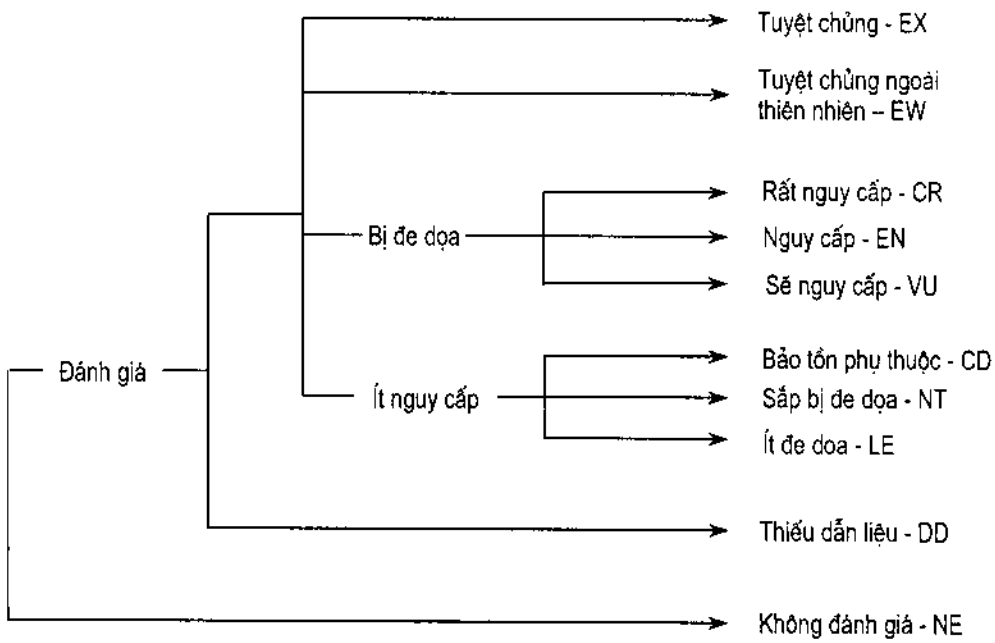
5. Khu phân bố (Extent of occurrence)

Diện tích xác định bởi một đường tưởng tượng ngắn nhất nối liền các điểm phân bố đã biết hoặc dự đoán của một taxon, từ những trường hợp ngẫu nhiên. Khu phân bố thường có dạng một hình đa giác với các góc trong nhỏ hơn 180^0 và chứa tất cả các điểm phân bố. Diện tích của khu phân bố được tính bằng km^2.

6. Nơi chiếm giữ / nơi sống (Area of occupancy)

Diện tích nằm trong khu phân bố của một taxon đã xác định như trên. Diện tích này nhỏ hơn khu phân bố vì các cá thể của taxon chỉ gặp thường xuyên ở một số điểm thích hợp trực tiếp liên quan tới đời sống của chúng, không phải ở tất cả các điểm phân bố. Diện tích nơi chiếm giữ / nơi sống đo bằng km^2. Tính diện tích *vùng phân bố* và *nơi sống* bằng cách dùng lưới ô vuông, trên tỷ lệ bản đồ thích hợp.

2.2.3.2. Cấu trúc các thứ hạng trong khung phân hạng



Các thứ hạng:

- EX (Extinct) - Đã hoàn toàn bị tuyệt chủng / tuyệt chủng.
- EW (Extinct in the wild) –Tuyệt chủng ngoài thiên nhiên.
- CR (Critically Endangered) – Cực kỳ nguy cấp/ Rất nguy cấp.
- EN (Endangered) - Đang bị nguy cấp / Nguy cấp.
- VU (Vulnerable) – Sẽ / Sắp bị nguy cấp.
- CD (Conservation dependent) – Bảo tồn phụ thuộc.

- NT (Near threatened) – Sắp bị đe dọa.
- LE (Least concern) – ít bị đe dọa.
- DD (Data deficient) – Thiếu dẫn liệu.
- NE (Non evaluable) – Không đánh giá.

Tuyệt chủng – Extinct (Ex)

Một taxon được coi là ***tuyệt chủng*** khi không còn gì nghi ngờ là cá thể cuối cùng của taxon đó đã chết.

Tuyệt chủng ngoài thiên nhiên – Extinct in the wild (EW)

Một taxon được coi là ***tuyệt chủng ngoài thiên nhiên*** khi chỉ còn sống trong trồng trọt, trong nuôi nhốt (in captivity), hoặc chỉ là một (hoặc nhiều) quần thể đã tự nhiên hóa trở lại rõ ràng ở ngoài vùng phân bố cũ. Một taxon được dự đoán (presumed) là tuyệt chủng ngoài thiên nhiên khi qua các cuộc khảo sát chi tiết ở nơi sống đã biết (hoặc có khả năng) của taxon đó vào các thời điểm thích hợp (theo ngày đêm, theo mùa, theo năm) trên khắp khu phân bố lịch sử của nó, không thể ghi nhận được sự hiện diện của một cá thể nào cả. Các cuộc khảo sát cần được thực hiện trong khoảng thời gian phù hợp với chu kỳ và dạng sống của taxon đó.

Rất nguy cấp – Critically Endangered (CR)

Một taxon được coi là ***rất nguy cấp*** khi đang đứng trước một nguy cơ cực kỳ lớn sẽ bị tuyệt chủng ngoài thiên nhiên trong thời gian trước mắt, được xác định bởi một tiêu chuẩn bất kỳ nào đó (A tới E) (ở phần sau).

Nguy cấp – Endangered (EN)

Một taxon được coi là ***nguy cấp*** khi không phải là rất nguy cấp, nhưng lại đang đứng trước một nguy cơ rất lớn sẽ bị tuyệt chủng ngoài thiên nhiên trong một tương lai gần, được xác định bởi một tiêu chuẩn bất kỳ nào đó (từ A đến E) (ở phần sau).

Sẽ nguy cấp – Vulnerable (VU)

Một taxon được coi là ***sẽ nguy cấp*** khi không phải là rất nguy cấp hoặc nguy cấp nhưng lại đang đứng trước một nguy cơ lớn sẽ bị tuyệt chủng ngoài thiên nhiên trong một tương lai tương đối gần, được xác định bởi một tiêu chuẩn bất kỳ nào đó (A – D) (ở phần sau).

Ít nguy cấp – Lower risk (LR)

Một taxon được coi là ***ít nguy cấp*** khi được đánh giá là không đáp ứng một

tiêu chuẩn nào của thứ hạng ***rất nguy cấp, nguy cấp*** hay ***sẽ nguy cấp***. Taxon được xếp vào thứ hạng này có thể được phân thành 3 thứ hạng phụ:

1. *Bảo tồn phụ thuộc – Conservation dependent (CD)*: Bao gồm các taxon hiện đang là đối tượng của một chương trình bảo tồn liên tục, riêng biệt cho taxon hoặc nơi ở của nó, mà khi chương trình này kết thúc sẽ đưa taxon lên một thứ hạng bị đe dọa cao hơn trong thời gian 5 năm.
2. *Sắp bị đe doạ - Near threatened (NT)*: Các taxon không được coi là bảo tồn phụ thuộc, nhưng lại rất gần với sẽ nguy cấp.
3. *ít lo ngại – Least concern (LE)*: Các taxon không được coi là bảo tồn phụ thuộc hoặc sắp bị đe dọa.

Thiếu dẫn liệu – Data deficient (DD)

Một taxon được coi là ***thiếu dẫn liệu*** khi không có đủ thông tin để có thể đánh giá trực tiếp hoặc gián tiếp về nguy cơ tuyệt chủng, căn cứ trên sự phân bố và tình trạng quần thể. Một taxon trong thứ hạng này có thể đã được nghiên cứu kỹ, đã được biết nhiều về sinh học, song vẫn thiếu dẫn liệu về sự phân bố và độ phong phú. Như vậy DD không phải là thứ hạng bị đe dọa, hoặc cũng không tương đương với thứ hạng ít nguy cấp. Việc xếp các taxon vào thứ hạng này cho thấy rằng cần có nhiều thông tin hơn nữa, và như vậy có nghĩa là thừa nhận khả năng các nghiên cứu trong tương lai sẽ chứng minh việc xếp các taxon này vào một thứ hạng bị đe dọa là thích hợp.

Không đánh giá - Not evaluable (NE)

Một taxon được coi là ***không đánh giá*** khi chưa được đánh giá đối chiếu với các tiêu chuẩn.

CÁC TIÊU CHUẨN CỤ THỂ CỦA CÁC THỨ HẠNG RẤT NGUY CẤP, NGUY CẤP VÀ SẼ NGUY CẤP

Rất nguy cấp (CR)

Một taxon được coi là rất nguy cấp khi đang đứng trước một nguy cơ sẽ bị tuyệt chủng ngoài thiên nhiên trong thời gian trước mắt được xác định bởi một trong các tiêu chuẩn sau đây (A tới E):

A. Sự suy giảm quần thể dưới bất kỳ dạng nào dưới đây:

1. Suy giảm ít nhất 80%, theo quan sát, ước tính, suy đoán hoặc phỏng đoán trong 10 năm cuối hoặc 3 thế hệ cuối (lấy khoảng thời gian nào gần nhất) dựa trên (và xác định được) một trong các điểm dưới đây:

(a) Quan sát trực tiếp.

(b) Chỉ số về độ phong phú thích hợp với taxon đó.

(c) Sự suy giảm nơi chiếm giữ / nơi sống, khu phân bố hoặc chất lượng nơi chiếm giữ / nơi sống.

(d) Mức độ khai thác hiện tại hoặc khả năng.

(e) Ảnh hưởng của các taxon di nhập, lai tạo, dịch bệnh, chất ô nhiễm, vật cạnh tranh, hoặc ký sinh.

2. Sự suy giảm ít nhất 80%, theo dự đoán, hoặc phỏng đoán, sẽ xảy ra trong 10 năm tới hoặc 3 thế hệ tới (lấy khoảng thời gian nào dài nhất), dựa trên (và xác định được) một trong các điểm (b), (c), (d) hoặc (e) ở trên.

B. Khu phân bố ước tính là dưới 100 km^2, hoặc nơi chiếm giữ / nơi sống ước tính dưới 10 km^2, ngoài những ước tính này còn phải chỉ ra được ít nhất 1 trong 2 điểm sau đây:

1. Bị chia cắt nghiêm trọng hoặc chỉ tồn tại ở một điểm.

2. Suy giảm liên tục, theo quan sát, suy đoán hoặc dự đoán, của một trong các yếu tố sau:

(a) Khu phân bố.

(b) Nơi chiếm giữ / nơi sống.

(c) Phạm vi hoặc chất lượng nơi sống.

(d) Số địa điểm hoặc số tiểu quần thể (Subpopulation).

(e) Số lượng cá thể trưởng thành.

C. Quần thể ước tính chỉ có dưới 250 cá thể trưởng thành và một trong các điểm sau đây:

1. Có nguy cơ giảm ít nhất 25% trong 3 năm cuối hoặc thế hệ cuối (lấy khoảng thời gian nào kéo dài nhất) hoặc:

2. Có sự suy giảm liên tục, theo quan sát, dự đoán, hoặc suy đoán về số lượng cá thể trưởng thành và cấu trúc quần thể thuộc một trong các dạng sau đây:

(a) Bị chia cắt nghiêm trọng (nghĩa là không có một tiểu quần thể nào ước tính trên 50 cá thể trưởng thành).

(b) Tất cả các cá thể chỉ ở trong một tiểu quần thể duy nhất.

D. Quần thể ước tính chỉ có dưới 50 cá thể trưởng thành.

E. Phân tích số lượng cho thấy xác suất bị tuyệt chủng ngoài thiên nhiên của taxon ít nhất là 50% trong vòng 10 năm tới hoặc trong 3 thế hệ tới (lấy khoảng thời gian nào dài nhất).

Nguy cấp (EN)

Một taxon được coi là nguy cấp khi không phải là rất nguy cấp, nhưng lại đứng trước một nguy cơ rất lớn sẽ bị tuyệt chủng ngoài thiên nhiên trong một tương lai gần, được xác định bởi một trong các tiêu chuẩn từ A tới E.

A. Sự suy giảm quần thể dưới bất kỳ dạng nào dưới đây:

1. Sự suy giảm ít nhất 50%, theo quan sát, ước tính, suy đoán hoặc phỏng đoán trong 10 năm cuối hoặc trong 3 thế hệ cuối (lấy khoảng thời gian nào dài nhất) dựa trên (và xác định được) một trong những điểm dưới đây:

(a) Quan sát trực tiếp

(b) Chỉ số về độ phong phú thích hợp với taxon đó.

(c) Sự suy giảm nơi chiếm giữ / nơi sống, khu phân bố hoặc chất lượng nơi chiếm giữ / nơi sống.

(d) Mức độ khai thác hiện tại hoặc khả năng.

(e) Ảnh hưởng của các taxon di nhập, lai tạo, dịch bệnh, chất ô nhiễm, vật cạnh tranh, hoặc ký sinh.

2. Sự suy giảm ít nhất 50%, hoặc phỏng đoán, sẽ xảy ra trong 10 năm tới hoặc 3 thế hệ tới (lấy khoảng thời gian nào dài nhất), dựa trên (và xác định được) một trong các điểm (b), (c) hoặc (d) trên đây.

B. Khu phân bố ước tính là dưới 5.000 km^2, hoặc nơi chiếm giữ / nơi sống dưới 500 km^2, ngoài những ước tính này còn phải chỉ ra được ít nhất 1 trong 2 điểm dưới đây:

1. Bị chia cắt nghiêm trọng hoặc chỉ tồn tại không quá 5 địa điểm.

2. Suy giảm liên tục, theo quan sát hoặc dự đoán, của một trong các yếu tố sau:

(a) Khu phân bố.

(b) Nơi chiếm giữ / phân bố.

(c) Phạm vi hoặc chất lượng nơi chiếm giữ / nơi sống.

(d) Số địa điểm hoặc số tiểu quần thể.

(e) Số lượng cá thể trưởng thành.

3. Dao động cực lớn về các yếu tố dưới đây:

(a) Khu phân bố

(b) Nơi chiếm giữ / nơi sống.

(c) Số địa điểm hoặc số tiểu quần thể.

(d) Số lượng cá thể trưởng thành.

C. Quần thể ước tính chỉ có dưới 2.500 cá thể trưởng thành và một trong các điểm sau đây:

1. Suy giảm liên tục ước tính ít nhất 20% trong 5 năm hoặc 2 thế hệ (lấy khoảng thời gian nào ít nhất) hoặc:

2. Sự suy giảm liên tục theo quan sát hoặc suy đoán về lượng cá thể trưởng thành và cấu trúc quần thể, dưới một trong các dạng sau:

(a) Bị chia cắt nghiêm trọng (nghĩa là không có một tiểu quần thể nào ước tính có trên 250 cá thể trưởng thành).

(b) Tất cả các cá thể chỉ ở trong một tiểu quần thể duy nhất.

D. Quần thể ước tính chỉ có dưới 250 cá thể trưởng thành.

E. Phân tích định lượng cho thấy xác suất bị tuyệt chủng ngoài thiên nhiên ít nhất là 20% trong 20 năm hoặc 5 thế hệ (lấy khoảng thời gian nào dài nhất).

Sẽ nguy cấp (VU)

Một taxon được coi là sẽ nguy cấp, khi không phải là rất nguy cấp hoặc nguy cấp, nhưng đang đứng trước một nguy cơ lớn sẽ bị tuyệt chủng ngoài thiên nhiên trong một tương lai tương đối gần, được xác định bởi một trong các tiêu chuẩn từ A tới E:

A. Sự suy giảm quần thể dưới bất kỳ dạng nào dưới đây:

1. Sự suy giảm ít nhất 20%, theo quan sát, ước tính, suy đoán hoặc phỏng đoán trong 10 năm hoặc trong 3 thế hệ cuối (lấy khoảng thời gian nào dài nhất) dựa trên (và xác định được) một trong những điểm dưới đây:

(a) Quan sát trực tiếp

(b) Chỉ số về độ phong phú thích hợp với taxon đó.

(c) Sự suy giảm nơi chiếm giữ / nơi sống, khu phân bố hoặc chất lượng nơi chiếm giữ / nơi sống.

(d) Mức độ khai thác hiện tại hoặc khả năng.

(e) Ảnh hưởng của các taxon di nhập, lai tạo, dịch bệnh, chất ô nhiễm, vật cạnh tranh, hoặc ký sinh.

2. Sự suy giảm ít nhất 20%, theo dự đoán, hoặc phỏng đoán, sẽ xảy ra trong 10 năm tới hoặc 3 thế hệ tới (lấy khoảng thời gian nào dài nhất), dựa trên (và xác định được) một trong các điểm (b), (c) hoặc (d) trên đây.

B. Khu phân bố ước tính dưới 20.000 km^2, hoặc nơi chiếm giữ / nơi sống dưới 2000 km^2, ngoài những ước tính này còn phải chỉ ra được ít nhất 1 trong 2 điểm dưới đây:

1. Bị chia cắt nghiêm trọng hoặc chỉ tồn tại không quá 5 địa điểm.

2. Suy giảm liên tục, theo quan sát, suy đoán hoặc dự đoán, của một trong các yếu tố sau:

(a) Khu phân bố.

(b) Nơi chiếm giữ / phân bố.

(c) Số địa điểm hoặc số tiểu quần thể.

(d) Số lượng cá thể trưởng thành.

C. Quần thể ước tính dưới 10.000 cá thể trưởng thành và một trong các điểm sau đây:

1. Suy giảm liên tục ước tính ít nhất 10% trong 10 năm cuối hoặc 3 thế hệ (lấy khoảng thời gian nào dài nhất) hoặc:

2. Một sự suy giảm liên tục theo quan sát hoặc suy đoán về lượng cá thể trưởng thành và cấu trúc quần thể, dưới một trong các dạng sau:

(a) Bị chia cắt nghiêm trọng (nghĩa là không có một tiểu quần thể nào có trên 1.000 cá thể trưởng thành).

(b) Tất cả các cá thể chỉ ở trong một tiểu quần thể duy nhất.

D. Quần thể rất nhỏ hoặc thu hẹp lại và có một trong những dạng dưới đây:

1. Quần thể ước tính chỉ dưới 1.000 cá thể trưởng thành.

2. Đặc trưng bởi sự thu hẹp nơi chiếm giữ (điển hình là dưới 100 km^2) hoặc số địa điểm (điển hình là dưới 5).

Như vậy taxon này sẽ thiên về chịu những tác động của hoạt động con người (hoặc các biến cố mà tác động được tăng cường bởi các hoạt động của con người); trong thời gian rất ngắn của một tương lai không thể lường trước được có thể sẽ trở thành "rất nguy cấp", hoặc ngay cả "tuyệt chủng" trong một thời gian ngắn.

E. Phân tích định lượng cho thấy xác suất bị tuyệt chủng ngoài thiên nhiên ít nhất là 10% trong 100 năm.

Một số điều lưu ý

1. Các tiêu chuẩn phân hạng của IUCN được áp dụng cho các taxon ở các bậc phân loại khác nhau: loài, phân loài, thứ, và ngay cả với các dạng chưa xác định rõ bậc phân loại.

2. Để phân hạng một taxon, chỉ cần đáp ứng một tiêu chuẩn nào đó, không nhất thiết phải thỏa mãn tất cả mọi tiêu chuẩn, điều này không thể có được. Tuy nhiên, do khi bước vào phân hạng ta chưa biết tiêu chuẩn nào đáp ứng được với đối tượng phân hạng, nên cứ thực hiện phân hạng với các tiêu chuẩn khác nhau (từ A tới E), kết quả sẽ chọn được tiêu chuẩn thích hợp nhất cho taxon đó.

3. Các tiêu chuẩn phân hạng IUCN về cơ bản mang tính chất định lượng. Tuy nhiên, việc không có đủ những dẫn liệu tin cậy cần thiết, có chất lượng về đối tượng phân hạng IUCN đề ra, vì các dẫn liệu dựa trên sự ước tính suy đoán, dự đoán đều có thể chấp nhận được. Dẫn liệu suy đoán, dự đoán dựa trên sự ngoại suy cho tương lai từ các mối đe dọa hiện nay, khả năng, hoặc dựa trên các nhân tố có liên quan tới độ phong phú, sự phân bố của đối tượng (điều kiện thức ăn, môi trường...), không nhất thiết phải là dẫn liệu trực tiếp quan sát.

4. Trong trường hợp không có đủ dẫn liệu để phân hạng một taxon, có thể chọn thứ hạng "Thiếu dẫn liệu – DD". Nhiều khi, trường hợp này xảy ra cả với các đối tượng đã được hiểu biết rõ về sinh học, song lại chưa đủ dẫn liệu để phân hạng. Tuy nhiên, một khi đã có căn cứ về sự đe dọa đối với một taxon, như nơi cư trú duy nhất bị phá hoại, thì tuy chưa biết rõ về sinh học của loài đó, vẫn nên cố gắng xếp taxon đó vào thứ hạng bị đe dọa.

5. Các tiêu chuẩn cho các thứ hạng bị đe dọa (CR, EN, VU...) được áp dụng không phụ thuộc vào các biện pháp bảo tồn hiện đang thực thi đối với một taxon. Nên sử dụng thứ hạng CD trong trường hợp các đối tượng đang được bảo tồn có triển vọng.

6. Khi xây dựng Danh lục Đỏ, có áp dụng các tiêu chuẩn IUCN cần ghi rõ các tiêu chuẩn (A – E), hoặc tiêu chuẩn phụ (a, b, c, d, e). Một Danh lục Đỏ bị coi là vô giá trị, nếu các taxon được phân hạng trong đó không được chỉ rõ ít nhất một tiêu chuẩn đã sử dụng.

7. Các tiêu chuẩn phân hạng IUCN đề xuất, nhìn chung, thích hợp cho việc áp dụng ở phạm vi thế giới (mondial) hơn là ở phạm vi khu vực hay quốc gia. Việc phân hạng các taxon, xác định các thứ hạng bị đe dọa cho một taxon ở phạm vi khu vực (regional) hoặc quốc gia (national) sẽ có giá trị hơn nhiều nếu có thêm 2 thông tin là thứ hạng của taxon đó ở phạm vi thế giới và tỷ lệ giữa quần thể ở khu vực, quốc gia đó hoặc bộ phận phân bố ở khu vực, quốc gia đó với phân bố thế giới của taxon đó. Vì vậy, phải chấp nhận sự khác biệt trong việc phân hạng cùng 1 taxon ở phạm vi thế giới và phạm vi khu vực, quốc gia.

Ví dụ: Một taxon được phân hạng ở thứ hạng VU ở phạm vi thế giới có khi lại chỉ ở thứ hạng LR ở một khu vực quốc gia nào đó, hoặc ngược lại.

8. Việc đánh giá lại tình trạng đe dọa, chuyển đổi thứ hạng cho các taxon phải được tiến hành qua từng giai đoạn khi có dẫn liệu mới.

2.2.4. Xây dựng Danh lục Đỏ cây thuốc

Theo IUCN, Sách Đỏ (Red Book) và Danh lục Đỏ (Red List) là công cụ cho các nhà quản lý và nhà khoa học sử dụng trong công tác bảo tồn. Vì vậy, trong quá trình bảo tồn cây thuốc, việc làm trước tiên là phải xác định được một Danh sách các loài ở một quốc gia hay một vùng lãnh thổ nào đó đang bị đe dọa, cần bảo tồn. Đó chính là việc xây dựng Danh lục Đỏ cây thuốc (Red List of Medicinal Plants in ...), mà trong đó các loài đều được đánh giá về tình trạng bị đe dọa, theo khung phân hạng của IUCN, 1994 đã đề cập ở phần trên.

Các bước tiến hành xây dựng Danh lục Đỏ cây thuốc bao gồm:

2.2.4.1. Xác lập danh sách các loài dự kiến

Căn cứ vào kết quả điều tra nghiên cứu của nhiều năm và từ một số nguồn tư liệu khác, lựa chọn một danh sách dự kiến, bao gồm các loài cây thuốc, được cho rằng chúng đang bị đe dọa (bởi nhiều nguyên nhân). Số lượng loài trong danh sách này nhìn chung là không hạn chế, song chắc chắn cũng không thể quá nhiều.

Để cho việc lựa chọn các loài tương đối chính xác, người (hoặc cơ quan) chủ trì nên tổ chức các cuộc hội thảo, tham khảo thêm ý kiến của các nhà khoa học, nhà quản lý cũng như các nhà doanh nghiệp... có liên quan đến tài nguyên cây thuốc. Đây cũng là hình thức thu thập thêm thông tin về các loài cây thuốc dự kiến sẽ đưa vào Danh lục Đỏ.

2.2.4.2. Thu thập, hệ thống hóa các thông tin

Dựa vào tiêu chuẩn trong các cấp phân hạng của IUCN, dễ dàng nhận thấy, thông tin (dẫn liệu) cần phải thu thập và hệ thống hóa bao gồm: tên gọi loài cây thuốc; bộ phận dùng; công dụng; phân bố; trữ lượng tự nhiên (nếu có); đặc điểm sinh học cơ bản (sinh thái, tái sinh tự nhiên); tình hình khai thác sử dụng, các nguyên nhân tác động khác ...

Các thông tin này được ghi theo từng loài, trong phiếu dữ liệu sau:

Ví dụ về phiếu dữ liệu của Viện Dược liệu:

PHIẾU DỮ LIỆU

CÂY THUỐC BỊ ĐE DỌA TUYỆT CHỦNG Ở VIỆT NAM

*** Tên cây thuốc:**

1. Tên khoa học (Tên chính thức, tên tác giả xác định, năm công bố).

a- Synonym (nếu có, ghi 1 – 3 tên, đầy đủ tên tác giả, năm công bố).

b- Họ thực vật.

2. Tên Việt Nam thông dụng (chỉ ghi 1 tên gọi).

Tên khác theo địa phương hay theo tiếng dân tộc (phiên âm).

3. Tên gọi theo tiếng nước ngoài (nếu có).

*** Đặc điểm nhận dạng chủ yếu:**

1. Dạng cây (dạng sống, kích thước).

2. Lá (cách mọc, màu sắc...).

3. Cụm hoa, hoa (màu sắc, hương vị).

4. Quả / hạt.

5. Ảnh các loại về loài này.

*** Đặc điểm sinh học khác:**

1. Sinh thái (đặc điểm sinh thái cơ bản, môi trường sống/ nơi mọc/ độ cao...).

2. Tái sinh tự nhiên (mùa hoa/ quả, khả năng nhân giống tự nhiên, khả năng tái sinh vô tính tự nhiên...).

3. Đặc điểm khác.

*** Bộ phận / công dụng làm thuốc:**

1. Bộ phận dùng, thành phần hóa học...

2. Công dụng làm thuốc (chú ý ghi đầy đủ kể cả các kinh nghiệm sử dụng của cộng đồng đã sưu tầm được).

NHỮNG DỮ LIỆU CHỦ YẾU ĐỂ PHÂN HẠNG

*** Phân bố:**

1. Trên thế giới (tối thiểu phải ghi được đến tên quốc gia).

2. Ở Việt Nam:

a. Ghi lần lượt các điểm phân bố (kèm theo tọa độ địa lý các điểm – nếu có) theo 2 mốc thời gian: - Trước năm 2000.

- Từ năm 2001 đến nay (từ sau năm 2000).

b. Ước tính diện tích (km^2), đo bằng giấy kẻ ly trên bản đồ; bao gồm 2 loại dữ liệu, chia theo các cấp, ở 2 khoảng thời gian.

** Diện tích khu / vùng phân bố (extent of occurrence) – km^2:*

- Trước năm 2000: < 100 / 101 – 5.000 / 5.001 – 20.000 / > 20.000.
- Sau năm 2000: < 100 / 101 – 5.000 / 5.001 – 20.000 / > 20.000.

** Diện tích nơi sống (Area of occupancy) – km^2:*

- Trước năm 2000: < 10 / 11 – 500 / 501 – 2.000 / > 2.000.
- Sau năm 2000: < 10 / 11 – 500 / 501 – 2.000 / > 2.000.

** Đặc điểm các khu phân bố:*

Liên tục / bị chia cắt.

** Tình trạng nơi sống:*

Có biến đổi (bị thu hẹp hay mở rộng), không biến đổi hay không rõ. Nếu có biến đổi thì ước tính trong 10 năm gần đây về mức độ bị thu hẹp:

- Đã biết (có số liệu): < 20%; > 20%; > 50%; > 80%.
- Dự đoán: < 20%; > 20%; > 50%; > 80%.

*** Tình trạng số lượng / kích thước quần thể:**

1. Ước tính số lượng cá thể trong toàn quần thể hay tiểu quần thể:

- < 50; < 250; < 2.500; > 2.500.
- Không rõ số lượng.

2. Xu thế biến đổi của quần thể:

- Hướng biến đổi: giảm, tăng, không đổi, không rõ.
- Tốc độ biến đổi theo hướng suy giảm đi do xác định được (hoặc ước tính) trong vòng 5 – 10 năm gần đây hoặc 3 thế hệ cuối:

- < 20%; > 20%; > 50%; > 80%.

- Tốc độ dự đoán trong vòng 5 – 10 năm tới hay trong 3 thế hệ tiếp theo: <20%; > 20%; > 50%; > 80%.

*** Phân tích các nguyên nhân gây nên tình trạng "bị đe dọa tuyệt chủng"**

1. Do con người:

a- Khai thác để sử dụng (làm thuốc hay cho mục đích khác): - Trong nước.

- Xuất khẩu.

b- Phương thức khai thác: Có tính hủy diệt/ không chú ý bảo vệ tái sinh.

c- Bị tàn phá do các hoạt động khác (phá rừng làm nương rẫy, làm hồ chứa nước, mở mang giao thông, khu dân cư; do khai thác rừng, tu bổ rừng; do môi trường bị ô nhiễm...).

2. Do thảm họa tự nhiên:

a- Cháy rừng.

b- Lũ lụt.

3. Do vô tình bị tàn phá (chăn thả gia súc, động vật hoang dã...).

*** Tình trạng quản lý taxon khi lập phiếu:**

1. Các văn bản quản lý, có tính pháp luật / hành chính.

2. Biện pháp kỹ thuật:

- Có nằm trong Vườn Quốc gia hay Khu Bảo tồn nào.

- Lập khu bảo vệ mới cho taxon.

- Biện pháp / hoạt động bảo tồn đối với taxon.

3. Đánh giá hiệu quả bảo tồn hiện tại (tốt, trung bình, xấu, không đánh giá được).

*** Đánh giá chất lượng dữ liệu:**

1. Nguồn dữ liệu: - Trực tiếp điều tra khảo sát.

- Từ các nguồn khác.

2. Đánh giá mức độ tin cậy của dữ liệu: tốt, trung bình, kém.

*** Phân hạng tình trạng bị đe dọa:**

1- Trong nước: - Theo khung phân hạng cũ của IUCN.

- Mức phân hạng của các văn bản khác.

2- Thế giới: - Theo IUCN cũ và sau 1994.

- CITES (Convention on the International Trade in Endangered species of wild Fauna and Flora).

3. Kết quả phân hạng hiện nay:

.....

..... Ngày..... tháng.....năm.....

Người lập phiếu phân hạng

Như vậy, căn cứ vào toàn bộ các thông tin thu thập được (có thể chưa toàn diện) chúng ta có thể đánh giá được tình trạng bị đe dọa (theo tiêu chuẩn phân hạng của IUCN, 1994) đối với từng loài cây thuốc trong Danh sách dự kiến (đã nói ở phần 2.4.1. (1) kể trên).

Ví dụ:

1. Hoàng liên (Coptis quiquesecta W. T. Wang, *1975) ;* Ranunculaceae:

* Phân bố: - Thế giới: Núi Kim Bình, tỉnh Vân Nam, Trung Quốc.

- Trong nước: Ngũ Chỉ Sơn / Hoàng Liên Sơn / Sa Pa, Lào Cai.

(ước tính tổng diện tích nơi sống ở Việt Nam: < 10 km^2).

* Tình trạng:

- Đã bị khai thác liên tục nhiều năm, hiện trở nên cực hiếm nhưng vẫn bị tìm kiếm.

- Ước tính quần thể bị suy giảm > 80%.

- Tái sinh kém, chưa có biện pháp bảo tồn hiệu quả.

* Kết quả phân hạng: CR. A1a, c, d. B1 + 2b, c.

2. Hoàng tinh vòng (Polygonatum kingianum Coll. ex Hemsl.*);* Convallariaceae:

* Phân bố: - Thế giới: Trung Quốc.

- Trong nước: Lai Châu, Hà Giang, Lào Cai, Sơn La

* Tình trạng:

- Đã bị khai thác liên tục nhiều năm, hiện đã trở nên rất hiếm và vẫn bị tìm kiếm khai thác.

- Ước tính quần thể phụ ở Việt Nam đã bị giảm ít nhất > 50%.

- Sinh trưởng phát triển chậm ; chưa có biện pháp bảo tồn hiệu quả.

* Kết quả phân hạng: EN. A1 a, c, d.

3. Tục đoạn (Dipsacus asper wall.) ; Dipsaceae.

* Phân bố: - Thế giới: Trung Quốc.

- Trong nước: Hà Giang, Lai Châu, Lào Cai.

* Tình trạng:

- Đã bị khai thác nhiều năm, hiện đã giảm sút rõ rệt, nhưng vẫn bị khai thác tiếp.

- Ước tính quần thể phụ ở Việt Nam trong vòng 10 năm trở lại đây đã bị giảm sút > 20% (hoặc nhiều hơn).

- Sinh trưởng phát triển nhanh. Trồng dễ dàng bằng hạt.

* Kết quả phân hạng: VU. A1 a, c, d.

2.2.4.3. Xây dựng Danh lục Đỏ cây thuốc

Căn cứ vào kết quả phân hạng các loài cây thuốc trong Danh sách dự kiến, để tổng hợp nên Danh lục Đỏ cây thuốc.

Danh lục Đỏ cây thuốc trước hết bao gồm các loài "đang bị đe dọa tuyệt chủng", nằm trong các cấp phân hạng CR, EN và VU. Sau đó đưa thêm cả những loài bị đe dọa ở mức thấp (ít bị nguy cấp), thuộc các cấp: CD, NT và LE.

Cấu trúc **Danh lục Đỏ cây thuốc** thường được đề cập vắn tắt các loại thông tin:

- Tên gọi (Tên khoa học, synonym (nếu có), họ thực vật, tên khác...).
- Công dụng (chủ yếu) / bộ phận dùng làm thuốc.
- Phân bố (ở trong nước).
- Tình trạng (mức độ bị khai thác, tàn phá bởi các nguyên nhân khác).
- Cấp phân hạng (theo IUCN, 1994).

Để tiện cho việc tra cứu và quản lý, các loài cây thuốc nên xếp lần lượt theo vần ABC trong từng nhóm phân hạng (CR, EN, VU, CD, NT và LE). Chúng cũng có thể được xếp lần lượt theo các taxon / ngành thực vật, họ, chi, loài (cách làm này thường thấy trong Danh lục Đỏ thực vật nói chung).

Ví dụ về Danh lục Đỏ cây thuốc Việt Nam, 2004.

Sau nhiều năm trực tiếp điều tra khảo sát, thu thập thông tin và tiến hành phân hạng (theo IUCN), đến năm 2004, Danh lục Đỏ cây thuốc Việt Nam, bao gồm 134 loài thuộc 79 chi, 55 họ, 5 ngành thực vật có mạch bậc cao, với 3 cấp được phân hạng là: CR: 18 loài; EN: 42 loài và VU: 74 loài. Cụ thể ở bảng sau:

Bảng 2: Số loài cây thuốc bị đe dọa tuyệt chủng trong Danh lục Đỏ cây thuốc Việt Nam

Diễn giải / Ngành thực vật	Cây thuốc được phân hạng theo IUCN, 1994					
	Thuộc các taxon			Thuộc cấp phân hạng		
	Số họ	Số chi	Số loài	CR	EN	VU
Ngành Lá thông (*Psilophyta*)	**1**	**1**	**1**	**1**	**0**	**0**
Ngành Thông đất (*Lycopodiophyta*)	**1**	**1**	**1**	**0**	**0**	**1**
Ngành Dương xỉ (*Polypodiophyta*)	**1**	**1**	**2**	**0**	**1**	**1**
Ngành Thông (*Pynophyta*)	**4**	**8**	**10**	**4**	**2**	**4**
Ngành Mộc lan (*Magnoliophyta*)	**48**	**68**	**120**	**13**	**39**	**68**
Lớp Mộc lan (Magnoliopsida)	*38*	*52*	*90*	*13*	*24*	*53*
Lớp Hành (Liliopsida)	*10*	*16*	*30*	*0*	*15*	*15*
Tổng số	**55**	**79**	**134**	**18**	**42**	**74**

2.2.5. Xác định loài ưu tiên bảo tồn

Căn cứ vào các cấp phân hạng về tình trạng bị đe dọa (theo IUCN, 1994) trong Danh lục Đỏ cây thuốc, về cơ bản có thể xác định được loài ưu tiên bảo tồn, theo các cấp độ CR → EN → VU.

Lấy ví dụ trong số 134 loài trong Danh lục Đỏ cây thuốc Việt Nam kể trên cho thấy:

Ưu tiên 1: là 18 loài ở cấp phân hạng CR: Hoàng liên (*Coptis quinquesecta*); hoàng liên bắc (*Coptis chinensis*); sâm vũ diệp (*Panax bipinnatifidus*); tam thất hoang (*P. stipuleanatus*); chu sa liên (*Aristolichia tuberosa*); thổ hoàng liên lùn (*Thalictrum ichangense*); cam thảo đá bia (*Telosma procumbens*); ba gạc hoa đỏ (*Rauvolfia serpentina*); biến hóa núi cao (*Asarum balansae*); kim ngân rừng (*Lonicera burnei*); kim ngân lá to (*L. hildebrandiana*)...

Những loài này đang trong tình trạng cực kỳ bị nguy cấp, do phạm vi phân bố rất hạn chế, đã và đang tiếp tục bị lùng sục tìm kiếm khai thác, hiện đã trở nên cực hiếm – hoặc nơi mọc của chúng gần đường đi, nương rẫy nên nguy cơ bị rủi ro là rất cao... Nếu không có sự can thiệp bảo tồn kịp thời, chúng sẽ bị tuyệt chủng trong tương lai rất gần.

Ưu tiên 2: 42 loài ở cấp phân hạng EN: Hoàng liên gai gồm 2 loài (*Berberis julianae; B. wallichiana*); hoàng tinh vòng (*Polygonatum kingianum*); bình vôi núi cao (*Stephania brachyandra*); thông thảo (*Tetrapanax papyriferus*); ngũ gia

bì hương (*Acanthopanax gracilistylus*); ngũ gia bì gai (*A. trifoliatus* var. *setosus*); sâm Ngọc Linh (*Panax vietnamensis*); quảng phòng kỷ (*Aristolochia westlandii*); hoàng liên ô rô (*Mahonia japonica*); mã hồ (*M. nepalensis*); bát giác liên (*Podophyllum tonkinense*); một lá (*Nervilia* spp.)...

Thuộc nhóm này cũng là những loài cây thuốc quí, thường bị tìm kiếm khai thác sử dụng, nhưng do phạm vi phân bố thường rộng hơn nhóm các cây thuốc trên (CR). Hoặc nếu có thuộc diện hiếm gặp thì mức độ bị khai thác cũng không gay gắt bằng nhóm trên.

Bởi vậy chúng cũng là những cây thuốc đang lâm vào tình trạng bị nguy cấp, nếu không có biện pháp bảo tồn cũng sẽ bị tuyệt chủng trong tương lai gần, hoặc sẽ lập tức chuyển thành diện cực kỳ bị nguy cấp (CR), thậm chí cũng có thể bị tuyệt chủng, nếu bị một tác động bất thường.

Ưu tiên 3: 74 loài ở cấp phân hạng VU: Đảng sâm (*Campanumoea javanica*); hà thủ ô đỏ (*Fallopia multiflora*); tục đoạn (*Dipsacus asper*); thổ nhân sâm (*Talinum repens*); tiền hồ (*Angelica decursiva*); các loài ba gạc khác (*Rauvolfia* spp.); bình vôi (*Stephania* spp.); một số loài thuộc chi bảy lá một hoa (*Paris* spp.)...

Tất cả những loài thuộc nhóm này cũng là những cây thuốc quí, nhưng có phạm vi phân bố tương đối rộng, do khai thác liên tục chúng đã trở nên hiếm dần. Một số loài khác, mặc dù phân bố không rộng, hiện chưa bị tác động bởi khai thác nhưng vẫn có thể bị rủi ro. Các loài cây thuốc trong nhóm VU cũng cần phải xúc tiến bảo tồn, nếu không sẽ dẫn đến các tình trạng bi đát (EN và CR), thậm chí cũng có thể bị tuyệt chủng khi gặp những tác động bất thường.

2.3. Bảo tồn nguyên vị và bảo tồn chuyển vị

2.3.1. Bảo tồn nguyên vị (In situ Conservation)

Là hình thức bảo tồn nguyên vẹn quần thể / tiểu quần thể của các loài động – thực vật hiện có, ngay trong toàn bộ hệ sinh thái tự nhiên vốn có của nó. Nói cách khác là toàn bộ hệ sinh thái ở một vùng nào đó được bảo vệ nghiêm ngặt, để cho tất cả các loài động – thực vật (trong đó có cây thuốc) sinh trưởng, phát triển (kể cả cạnh tranh) một cách tự nhiên và lâu dài.

Để thực hiện bảo tồn nguyên vị, người ta thường thiết lập các vùng gọi là "Khu Bảo tồn thiên nhiên" (Nature Reserves) và "Công viên Quốc gia" (Việt Nam dịch là Vườn Quốc gia) (National Parks). Diện tích của Khu Bảo tồn thiên nhiên (khu BTTN) hay Vườn Quốc gia (VQG) được xác định sao cho đủ đảm bảo

tính chất cách ly địa lý và giữ được hệ sinh thái tự nhiên ở đó. Ở Việt Nam, diện tích của mỗi khu như vậy thường từ 20.000 – 60.000ha. Trong mỗi loại hình bảo vệ này, các quốc gia đề ra một quy chế bảo vệ phù hợp nhằm quản lý tốt nhất toàn bộ giá trị nguồn gen ở VQG và khu BTTN.

Tính đến tháng 3 năm 2003, ở Việt Nam đã có 25 VQG và 59 khu BTTN được Chính phủ phê duyệt, với tổng diện tích 2.271.401 ha; hiện còn một số vùng rừng phong phú khác đã và đang được điều tra nghiên cứu để quy hoạch thêm.

Theo quy định của Việt Nam, VQG là nơi được hưởng quy chế bảo vệ nghiêm ngặt nhất. Nghĩa là cấm tuyệt đối mọi hoạt động thu hái, khai thác, săn bắt bất cứ loài sinh vật nào vốn có ở đó. Đồng thời cũng không được đưa bất cứ loài sinh vật nào từ nơi khác, vào trồng hay chăn thả ở VQG (kể cả ở vùng đệm). VQG là nơi phục vụ cho công tác nghiên cứu khoa học, học tập, tham quan – du lịch (hạn chế). Ngay cả việc lấy mẫu nghiên cứu cũng phải theo quy định, không làm ảnh hưởng tới tái sinh tự nhiên và phải có giấy phép của cơ quan Nhà nước có thẩm quyền.

Khu BTTN cũng là nơi được bảo vệ nghiêm ngặt. Tuy nhiên, đối với một số loài (ngoài danh sách bảo vệ) có thể được khai thác một cách hạn chế, mà không làm thay đổi sự cân bằng vốn có của hệ sinh thái.

Ở Việt Nam, hiện có một số loài cây thuốc thuộc diện cực kỳ quí hiếm, nhưng không nằm trong hệ thống các VQG và khu BTTN đã được phê duyệt. Như: các loài sâm vũ diệp (*Panax bipinnatifidus*), tam thất hoang (*P. stipuleanatus*), hoàng liên (*Coptis quinquesecta*), chu sa liên (*Aristolochia tuberosa*)... mới chỉ phát hiện thấy ở vùng Tây – Bắc của dãy Hoàng Liên Sơn (không nằm trong địa phận của VQG Hoàng Liên Sơn – Sa Pa). Loài hoàng liên bắc (*Coptis chinensis*) có hai điểm phân bố ở Việt Nam, thì một điểm ở núi Lô Thàng, huyện Quản Bạ, tỉnh Hà Giang không nằm trong diện các khu rừng đặc dụng được bảo vệ. Hoặc loài cam thảo đá bia (*Telosma procumbens*) mới chỉ tìm thấy ở một điểm duy nhất là núi Đá Bia thuộc huyện Tuy Hòa, tỉnh Phú Yên... Đối với những trường hợp này, cách tốt nhất là thiết lập ở đó "***Vùng bảo vệ nghiêm ngặt***" – (Stric reserves), với một diện tích phù hợp, nhằm bảo tồn loài và sinh cảnh. Tuy nhiên, đây là một việc làm khó khăn, trong điều kiện ở Việt Nam hiện nay.

Các nhà bảo tồn cũng cho rằng, bảo tồn nguyên vị là một việc làm phức tạp, khó khăn, nhất là trong việc xử lý mối quan hệ đã trở thành truyền thống của người dân địa phương với các sản phẩm từ rừng đã nuôi sống họ (về vấn đề này sẽ được đề cập riêng ở các phần sau). Song bảo tồn nguyên vị lại là hình thức

bảo tồn toàn diện nhất. Bởi mọi nguồn gen ở đó – kể cả cây thuốc được tồn tại vĩnh viễn, trong mối quan hệ tổng hòa của hệ sinh thái tự nhiên vốn có của chúng.

Việc bảo tồn cây thuốc ở các VQG và khu BTTN bao gồm các nội dung sau:

1. Điều tra, xây dựng Danh lục các loài cây thuốc hiện có.

2. Xác định địa điểm phân bố (điểm có cây mọc) và mức độ chiếm giữ của các loài cây thuốc so với các loài cây cỏ khác (nhất là các loài có tên trong Danh lục Đỏ cây thuốc) – Xây dựng bản đồ.

3. Có kế hoạch theo dõi thường xuyên đối với các loài cây thuốc có tên trong Danh lục Đỏ cây thuốc, nghiên cứu tình hình sinh trưởng phát triển, tái sinh tự nhiên của chúng.

4. Lựa chọn một số loài cây thuốc đang có nhu cầu sử dụng cao, nghiên cứu đưa vào phát triển trồng thêm (một cách hợp lý) tại vùng đệm, tạo thêm thu nhập cho người dân địa phương, ở xung quanh VQG và khu BTTN.

2.3.2. Bảo tồn chuyển vị (Ex situ Conservation)

Là hình thức bảo tồn bằng cách lưu giữ một số cá thể hay bộ phận sống của chúng bên ngoài nơi sống tự nhiên (hệ sinh thái), với các hình thức sau:

2.3.2.1. Trồng trong các vườn thực vật và vườn cây thuốc

Thu thập bớt một số cá thể hoặc hoặc hạt giống của các loài cây thuốc trong các VQG, khu BTTN hoặc ở những nơi khác, đem về trồng tại một số vườn thực vật hay vườn cây thuốc.

Tùy theo đặc điểm sinh thái của mỗi loài cây thuốc mà lựa chọn nên trồng chúng ở đâu, hay trồng như thế nào cho thích hợp. Ở những quốc gia không có hệ thống vườn thực vật và vườn cây thuốc theo các vùng sinh thái khác nhau, người ta phải chủ động tạo ra điều kiện về khí hậu, đất đai phù hợp – như làm nhà kính.

Các vườn thực vật cổ thành lập từ thế kỷ 16 ở châu Âu, ban đầu cũng là trồng cây thuốc cho sinh viên trường Y – Dược thực tập. Hiện nay trên thế giới đã có tới 5.000 vườn thực vật và vườn cây thuốc ở các quốc gia. Đáng chú ý nhất phải kể đến một số vườn cây thuốc ở Trung Quốc, như vườn cây thuốc Nam Ninh (tỉnh Quảng Tây), rộng 250 ha, đã thu thập và trồng được khoảng 2.500 loài cây thuốc ; vườn cây thuốc của Viện Phát triển cây thuốc ở Bắc Kinh, rộng hơn 70 ha

hiện có trên 1.000 loài cây thuốc. Ở Việt Nam, chỉ tính riêng hệ thống vườn cây thuốc Viện Dược liệu, tại Sa Pa, Tam Đảo, Hà Nội, Thanh Hóa đã có diện tích khoảng 10 ha, với tổng số khoảng 600 loài, trong đó có tới trên 70 loài có tên trong Danh lục Đỏ cây thuốc Việt Nam.

Bảo tồn cây thuốc dưới hình thức trồng ở vườn thu thập có các ưu điểm sau:

- Trên một diện tích hạn chế trồng được nhiều loài ; mỗi loài gồm một số cá thể đủ đảm bảo về độ an toàn dài lâu.

- Cây trồng ở vườn sẽ có điều kiện đi sâu nghiên cứu về mặt sinh học, khả năng nhân giống và kỹ thuật trồng.

- Là nơi cung cấp giống và mẫu vật nghiên cứu dược học ban đầu.

- Phục vụ cho yêu cầu giảng dạy, học tập về cây thuốc ; tham quan du lịch và quảng bá.

Những hạn chế của bảo tồn cây thuốc trồng ở vườn thu thập:

- Sự sinh trưởng, phát triển, kể cả sự tiến hóa của cây thuốc (về lâu dài) diễn ra trong môi trường không phải là tự nhiên và có thể dẫn đến xói mòn nguồn gen hoặc làm thay đổi về hàm lượng các hoạt chất sử dụng làm thuốc vốn có của nó.

- Tốn tiền bạc, công sức chăm sóc, duy trì.

Tuy nhiên, những hạn chế này người ta có thể tìm cách khắc phục được.

2.3.2.2. Bảo quản hạt (Seed Conservation)

Song song với hình thức trồng cây ở vườn thu thập, người ta còn thu thập bớt một số hạt giống của các loài cây thuốc trong tự nhiên, về lưu giữ trong các kho chứa được làm lạnh, gọi là "***Ngân hàng hạt***" (***Seed Banks***). Nguyên tắc chung của phương pháp này là giảm độ ẩm của hạt (đến mức tới hạn), sử dụng nhiệt độ thấp hạn chế sự hô hấp và quá trình đồng hóa của hạt. Tùy theo ngưỡng thấp của nhiệt độ kho chứa và đặc điểm sinh học của hạt mà chúng có thể duy trì được thời gian bảo quản dài hay ngắn. Thường có 3 loại kho lưu giữ: ngắn hạn, nhiệt độ 18 – 15°C (hoặc đến 10°C), thời gian lưu giữ hạt khoảng 5 năm; kho trung hạn, nhiệt độ 10°C (hoặc 15°C) - 5°C, thời gian lưu giữ hạt: 5 – 10 năm; kho dài hạn, nhiệt độ dưới 5°C (hoặc 10°C), thời gian lưu giữ hạt trên 10 năm. Tuy nhiên không phải tất cả các loại hạt đều có thể bảo tồn được dưới hình thức này. Các loại hạt có hàm lượng dầu béo cao thường rất khó bảo quản. Hơn nữa, hạt của các loài cây thuốc được lưu giữ, thường xuyên phải được theo

dõi, nghiên cứu về khả năng và tỷ lệ nảy mầm. Cần có chế độ thay đổi hạt lưu giữ đối với từng loài.

Ưu điểm của phương pháp lưu giữ hạt là ở chỗ, với một kho lưu giữ nhỏ nhưng có thể bảo tồn được hạt của nhiều loài. Thông qua việc lưu giữ có thể nghiên cứu và nắm vững được đặc điểm sinh học nảy mầm của các loài cây thuốc.

Hạn chế của phương pháp bảo tồn hạt là tốn kém về trang thiết bị.

2.3.2.3. Bảo tồn in vitro (In vitro Conservation)

Là hình thức bảo quản các bộ phận sống khác của cây thuốc, như: hạt phấn, phôi, đỉnh sinh trưởng hay mô sống của một bộ phận nào đó của cây trong những môi trường sinh lý và vi khí hậu đặc biệt. Đây là cách bảo tồn thường được các nhà Di truyền bảo quản "vật liệu" di truyền của sinh vật.

Với cách nuôi cấy đặc biệt, các bộ phận sống kể trên được lưu giữ lâu dài, thậm chí cả khi các cá thể cuối cùng của một loài nào đó đã bị mất ngoài tự nhiên hoặc trong vườn thực vật. Từ các bộ phận sống được lưu giữ, khi cần thiết người ta có thể tạo thành các cá thể, cây giống ban đầu để đưa vào gây trồng trong tự nhiên.

Phương pháp bảo tồn hiện đại này tuy tốn kém, đòi hỏi nhiều về trang thiết bị và điều kiện nuôi cấy, song lại tỏ ra có hiệu quả nhất trong việc có thể bảo tồn được nhiều bộ phận sống của nhiều loài cùng một lúc. Ngoài ra cũng từ các vật liệu được bảo tồn này, các nhà khoa học có thể còn tiến hành chọn tạo ra các loại giống cây trồng mới, trong khi đó toàn bộ vốn gen gốc của loài vẫn được bảo tồn nguyên vẹn.

Tóm lại, bảo tồn nguyên vị cũng như bảo tồn chuyển vị đều có những ưu điểm và hạn chế nhất định. Trong bảo tồn cây thuốc ở Việt Nam hiện nay cách tốt nhất là kết hợp song song cả hai hình thức bảo tồn trên.

Mục đích cuối cùng của mọi hình thức bảo tồn cũng là để sử dụng.

Những cây thuốc trong các vùng được bảo tồn nguyên vị (In situ), sau một thời gian nhất định chúng sẽ đạt tới trạng thái cân bằng như vốn có trong hệ sinh thái tự nhiên. Khi đó cho phép khai thác cho nhu cầu sử dụng. Hình thức quản lý và khai thác có kiểm soát như vậy thường thấy trong các "National Park" ở nhiều nước trên thế giới; Còn ở Việt Nam, đó là ở các "Khu Bảo tồn thiên nhiên". Đặc biệt đối với những loài cây có các bộ phận dùng làm thuốc như hoa (kim ngân), quả / hạt (sa nhân, mã tiền) hay cành lá, búp non (chè dây, chè

đắng)... sự khai thác hợp lý còn là tác nhân khiến chúng sinh trưởng, phát triển mạnh hơn. Tuy nhiên, đối với một số loài đặc biệt quí hiếm, việc thiết lập các khu bảo vệ nghiêm ngặt (như VQG ở Việt Nam) là nhằm bảo tồn lâu dài nguồn gen. Ngay cả việc lấy mẫu để nghiên cứu khoa học cũng cần tuân theo những quy chế chặt chẽ.

Song song với quá trình bảo tồn chuyển vị (Ex situ), có thể lựa chọn một số loài cây thuốc thuộc diện quí hiếm hoặc tái sinh tự nhiên không đáp ứng được nhu cầu khai thác sử dụng, để tiến hành nghiên cứu nhân trồng.

Quá trình nghiên cứu đưa một cây thuốc từ hoang dại vào trồng trọt bao gồm các bước chủ yếu sau:

- Thu thập nguồn giống ban đầu (hạt, hom giống...) từ cây mọc tự nhiên, từ cây đang bảo tồn chuyển vị ở vườn thu thập hoặc từ nguồn cây nuôi cấy mô - tế bào.

- Nghiên cứu nhân giống: tạo ra cây con / cây giống.

- Nghiên cứu đặc điểm sinh thái cây trồng: nhu cầu ánh sáng, nước, phân bón... liên quan đến kỹ thuật trồng và phòng trừ sâu bệnh.

- Xác định điều kiện trồng thích hợp: vùng trồng, khí hậu, đất đai.

- Thời vụ trồng và thu hoạch.

- Chế biến sau thu hoạch và bảo quản sản phẩm.

Theo quan điểm của các nhà bảo tồn, có hai hình thức trồng phù hợp với những quốc gia đang phát triển như Việt Nam là: Trồng tại vườn gia đình, đối với những cây thuốc phục vụ cho nhu cầu sử dụng tại chỗ và trồng đại trà trên diện tích lớn, đối với những cây thuốc có nhu cầu sử dụng lớn, cung cấp nguyên liệu cho công nghiệp dược và xuất khẩu.

2.4. Vai trò quản lý của nhà nước và sự tham gia của cộng đồng

2.4.1. Quản lý và bảo tồn cây thuốc bằng luật định

Ngay từ những năm đầu thế kỷ trước, một số quốc gia ở châu Âu, châu Mỹ và châu Đại Dương đã ban hành những bộ luật về quản lý tài nguyên sinh vật. Theo các điều khoản được nêu trong các luật định này, thì mọi nguồn nguyên liệu và sản phẩm từ sinh vật, khi được thương mại hóa, đều phải có xuất xứ. Về sau, cùng với sự gia tăng số loài bị đe dọa tuyệt chủng, các luật định ra đời là nhằm ngăn cấm hay kiểm soát cụ thể hơn các taxon hiếm và đang lâm vào tình

trạng bị nguy hiểm, trong đó có cây thuốc. Năm 1931, Italia ban hành luật riêng về khai thác và quản lý cây thuốc. Sau Italia là Ba Lan cũng có một luật định tương tự. Vài chục năm trở lại đây, Ấn Độ cũng quy định đình chỉ việc khai thác và xuất khẩu các loài cây thuốc như: *Rauvolfia serpentina, Atropa acuminata, Sausurea lappa...* Botswana cũng cấm khai thác loài *Harpagophytum procumbens*. Ở Zaire quy định việc khai thác và xuất khẩu các loài ba gạc (*Rauvolfia* spp.) phải có giấy phép của Chính phủ. Trung Quốc đã xây dựng Danh mục một số các loài cây thuốc bị cấm mọi hình thức xâm hại, ngoại trừ lấy mẫu cho nghiên cứu khoa học, như: *Panax ginseng, Coptis chinensis, Paris polyphylla, Gastrodia elata.*

MỘT SỐ VĂN BẢN QUỐC TẾ CÓ LIÊN QUAN ĐẾN QUẢN LÝ CÂY THUỐC

- Năm 1975, tại Washington có 103 quốc gia tham gia "Công ước về Thương mại quốc tế các loài Động – Thực vật hoang dã đang bị nguy hiểm" – The Convention on International Trade in Endangered Species of Wild Fauna and Flora", viết tắt là CITES (Việt Nam tham gia công ước này năm 1994). Kèm theo công ước là hai bản Danh sách các loài: Bị tuyệt đối cấm khai thác, buôn bán và được khai thác, buôn bán một cách hạn chế. Trong hai bản Danh sách này có nhiều loài được dùng làm thuốc.

- Năm 1992, công ước ĐDSH thông qua tại Rio de Janero (Brazil) có đề cập: Tài nguyên ĐDSH và tri thức về nó là có chủ quyền. Cần có sự phân phối công bằng và hợp lý lợi ích từ việc khai thác và sử dụng nguồn gen sinh vật.

- IUCN, 1998: Hướng dẫn xây dựng khung pháp lý để xác định quyền sử dụng nguồn gen.

- Hướng dẫn Bonne, 2001, về khai thác các nguồn gen và chia sẻ công bằng, bình đẳng các lợi ích từ việc sử dụng các nguồn tài nguyên gen.

- Hiệp định khung ASEAN về tiếp cận và chia sẻ công bằng hợp lý lợi ích từ việc sử dụng nguồn gen và tài nguyên sinh học (sẽ thông qua vào tháng 8 / 2004 tại Lào).

- Ngoài ra, trong lĩnh vực nghiên cứu sàng lọc các hợp chất tự nhiên để làm thuốc, cũng đã hình thành các dạng văn bản, mang tính thỏa thuận quốc tế, như "Bio-diversity Prospecting Contrac". Trong đó nhấn mạnh việc thu thập mẫu nghiên cứu phải có Danh sách loài định trước (tránh loài trong diện bảo tồn); thu thập phải đảm bảo tái sinh tự nhiên, đồng thời còn kèm theo vấn đề chia sẻ lợi ích với bên sở hữu tài nguyên.

Như vậy, căn cứ vào các văn bản và thỏa thuận Quốc tế kể trên, mỗi quốc gia hay vùng lãnh thổ nên xây dựng và cụ thể hóa thành các văn bản luật định riêng của mình. Theo ý kiến của các nhà bảo tồn, việc xây dựng các văn bản luật trong bảo tồn cây thuốc cần tập trung vào một số vấn đề sau:

- Danh sách các loài cây thuốc tạm thời cấm tuyệt đối việc khai thác và thương mại. Việc lấy mẫu phục vụ nghiên cứu khoa học cũng cần phải được phép của cơ quan quản lý và có quy định cụ thể riêng.

- Danh sách những loài được khai thác cũng cần có văn bản hướng dẫn về nơi khai thác, tiêu chuẩn cây được khai thác, thời gian – kỹ thuật khai thác đảm bảo tái sinh tự nhiên và kỹ thuật chế biến sơ bộ nguyên liệu.

- Đồng thời với Danh sách các loài cây thuốc kể trên là Danh sách các vùng hay khu vực đã được quy hoạch, với mục đích bảo tồn hay khai thác lâu dài nguồn cây thuốc thiên nhiên.

- Cuối cùng là quy định về xử phạt và xét thưởng.

Các văn bản luật hay quy định trên là cơ sở pháp lý quan trọng nhất, trong việc quản lý và bảo tồn cây thuốc ở mỗi quốc gia.

2.4.2. Luật pháp trong quản lý và bảo tồn cây thuốc ở Việt Nam

Hiện đã có một số văn bản Luật và Quy định có liên quan đến bảo vệ tài nguyên cây thuốc được ban hành.

- Chỉ thị 210/TTg-Vg (6 / 12 / 1966) của Thủ tướng Chính phủ, quy định: Cây con dược liệu là tài nguyên cao cấp; ngành Lâm nghiệp quản lý cây thuốc mọc tự nhiên ở rừng và quản lý việc khai thác, hướng dẫn bảo vệ tái sinh, bảo vệ vùng rừng tập trung nhiều cây thuốc, tránh khai hoang.

- Pháp lệnh bảo vệ rừng (1972).

- Nghị quyết số 200/CP (21 / 8 / 1978) về vấn đề phát triển dược liệu trong nước; điều tra dược liệu ở miền Nam; quy hoạch các vùng cây thuốc mọc tập trung và khai thác hợp lý.

- Luật Bảo vệ và phát triển rừng (1982).

- Nghị định số 18/HĐBT (17 / 1 / 1992), kèm theo hai Danh sách các loài động – thực vật bị cấm khai thác – thương mại và khai thác hạn chế. Đây là văn bản tiền thân để Việt Nam tham gia vào CITES (1994).

- Quy chế về quản lý và bảo tồn nguồn gen của Bộ Khoa học – Công nghệ và Môi trường (ban hành theo Nghị định số 2117 / 1997/NĐ-BKHCNMT): khẳng

định nguồn gen động – thực vật và vi sinh vật là tài nguyên quốc gia; quy định về những nhóm động – thực vật và vi sinh vật cần quan tâm bảo tồn, trong đó có cây làm thuốc.

- Nghị định số 48/2002/NĐ-CP (22 / 4 / 2002) kèm theo công văn số 3399/VPCP (21 / 6 / 2002) cụ thể hóa Danh sách những loài động – thực vật bị cấm tuyệt đối việc khai thác – thương mại và được phép khai thác hạn chế. Nghị định này thay thế cho Nghị định số 18/HĐBT (1992) kể trên.

Về cây thuốc và động vật làm thuốc trong Nghị định 48/2002/NĐ-CP được ghi cụ thể:

Cấm tuyệt đối khai thác: Cây thuốc: 12 loài và nhóm loài.

Động vật làm thuốc: 44 loài và nhóm loài.

Hạn chế khai thác: Cây thuốc: 20 loài và nhóm loài.

Động vật làm thuốc: 19 loài và nhóm loài.

Với hệ thống các văn bản luật định trên, về cơ bản là có đủ cơ sở pháp lý để tăng cường công tác quản lý và bảo tồn cây thuốc ở Việt Nam. Tuy nhiên, trước yêu cầu của tình hình thực tế hiện nay, các nhà lập pháp và quản lý cần phải xây dựng và ban bố thêm những văn bản cụ thể về quản lý tài nguyên cây thuốc thiên nhiên, nhất là trong lĩnh vực xuất nhập khẩu dược liệu và nghiên cứu sàng lọc các hợp chất tự nhiên để làm thuốc.

2.4.3. Nâng cao nhận thức của cộng đồng trong bảo tồn cây thuốc

Từ thời thượng cổ đến ngày nay, cộng đồng các dân tộc địa phương sinh sống ở đâu, ở đó tạo nên mối ràng buộc giữa con người với thế giới tự nhiên. Đất đai, cây cỏ,... đã nuôi sống họ, giúp họ tồn tại và phát triển. Chính vì thế, trong bảo tồn cây thuốc, vấn đề cốt yếu là giúp họ nâng cao nhận thức về ý nghĩa và tầm quan trọng của vấn để bảo tồn cây thuốc. Giúp họ trở thành nguồn nhân lực chủ yếu, tích cực tham gia vào công tác bảo tồn ở địa phương.

- Thông qua truyền thông, làm cho người dân địa phương hiểu bảo tồn cây thuốc là giữ gìn những loài cây cỏ vốn sẵn có và đã được cộng đồng sử dụng làm thuốc hay khai thác bán ra ngoài phạm vi của cộng đồng. Đó là nguồn lợi của chính cộng đồng. Cộng đồng cần phải bảo vệ chúng cho chính mình và cho cả con cháu mai sau.

- Tổ chức và hướng dẫn cộng đồng bảo tồn cây thuốc cụ thể phải làm những việc gì. Chú ý lắng nghe những ý kiến đề xuất của cộng đồng ; tạo mọi điều kiện để họ chủ động "làm" công việc bảo tồn và trồng thêm.

Khuyến khích việc xây dựng các "Hương ước" về bảo vệ cây thuốc phù hợp với pháp luật. Pháp luật bảo vệ các hương ước tiến bộ đó.

- Hướng dẫn người dân địa phương nhận biết những cây thuốc cần phải bảo vệ, cách khai thác cây thuốc sao cho đảm bảo tái sinh tự nhiên.

- Đi đôi với công tác bảo tồn cây thuốc là các chương trình phát triển kinh tế Nông – Lâm nghiệp – Xã hội, xóa đói giảm nghèo đối với những vùng sâu vùng xa.

Tóm lại, cộng đồng có vai trò quan trọng trong bảo tồn cây thuốc. Nhiệm vụ của các nhà khoa học và nhà quản lý là làm thế nào để giúp họ nâng cao nhận thức ; biến những công việc bảo tồn và trồng thêm cây thuốc trở thành nhu cầu vật chất. Vì bảo vệ cây thuốc, đi đôi với khai thác hợp lý và phát triển trồng thêm là nguồn thu nhập bền vững, góp phần cải thiện đời sống của chính cộng đồng.

2.5. Tư liệu hóa – trao đổi thông tin và hợp tác

2.5.1. Xây dựng cơ sở dữ liệu bảo tồn cây thuốc

Những kết quả điều tra phát hiện được hàng ngàn cây thuốc, cùng với những thông tin về chúng là kho tàng dữ liệu quan trọng về nguồn tài nguyên cây thuốc Việt Nam. Tuy nhiên, hạn chế trong chuyên đề này, tạm thời chỉ đề cập đến việc xây dựng cơ sở dữ liệu đối với những cây thuốc thuộc diện bị đe dọa tuyệt chủng ở Việt Nam, phục vụ cho công tác bảo tồn.

Các loại thông tin về mỗi loài trong cơ sở dữ liệu bao gồm:

1. Tên gọi:

1a. Tên khoa học hợp danh pháp, kèm theo năm công bố loài

1b. Tên đồng danh: bao gồm các synonym chủ yếu, kèm năm công bố.

1c. Họ thực vật

1d. Tên gọi theo tiếng Việt thông dụng (1 tên).

1e. Tên gọi khác – có tính địa phương, dân tộc.

1f. Tên nước ngoài (nếu có).

2. Đặc điểm nhận dạng chủ yếu:

2a. Dạng cây / dạng sống, kích thước chung.

2b. Lá: hình dạng, cách mọc (so le, đối, vòng), đặc điểm, kích thước.

2c. Cụm hoa / hoa: dạng cụm hoa / hoa, cách mọc, màu sắc, hương vị, cấu tạo hoa

2d. Quả: dạng quả, kích thước, màu sắc, mùi vị (khi xanh, chín).

2e. Hạt: số lượng hạt trong quả, dạng hạt, kích thước, màu sắc...

3. Ảnh:

3a. Ảnh toàn cây trong quần thụ và môi trường nơi mọc.

3b. Ảnh một cành mang lá, hoa / quả.

3c. Ảnh hoa / quả / hạt.

3d. Ảnh bộ phận dùng khi tươi và khô.

4. Bộ phận dùng, công dụng:

4a. Bộ phận dùng.

4b. Cách khai thác / thu hái và chế biến.

4c. Thành phần hóa học chủ yếu.

4d. Công dụng: ghi các công dụng làm thuốc đã thu thập được / liều lượng, kèm theo xuất xứ và các bài thuốc.

5. Đặc điểm sinh học chủ yếu:

5a. Phân bố:

- Trong nước: tên từng điểm phân bố đã phát hiện (tên vùng rừng/ núi, thuộc làng/ bản, thôn, xã, huyện, tỉnh), kèm theo: tọa độ địa lý, độ dốc, hướng phơi, độ cao (xác định bằng GPS).

- Thế giới: tên quốc gia hay vùng lãnh thổ.

5b. Đặc điểm sinh thái:

- Sự tương thích với ánh sáng.

- Sự tương thích với nước - độ ẩm / tính chịu hạn.

- Sự tương thích với khí hậu.

- Môi trường sống / nơi mọc, thổ nhưỡng - đất đai.

5c. Tái sinh tự nhiên:

- Mùa hoa, quả / tác nhân thụ phấn.

- Tái sinh bằng hạt / nhân tố tác động / lượng tái sinh.

- Tái sinh dinh dưỡng tự nhiên / nhân tố tác động.

- Khả năng nhân giống nhân tạo: bằng hạt / hom, thời gian nảy mầm, tỷ lệ nảy mầm... và các đặc điểm khác.

6. Các nguyên nhân tác động đến quần thể:

6a. Do con người:

- Khai thác sử dụng làm thuốc.

- Phương thức khai thác.

- Mức độ khai thác.

- Nhu cầu thị trường (trong nước và xuất khẩu).

- Khai thác sử dụng vào mục đích khác.

- Bị tàn phá do các hoạt động khác của con người (phá rừng làm nương rẫy, hồ chứa nước, mở đường...).

- Do môi trường bị ô nhiễm.

6b. Do động vật: làm thức ăn, bị giẫm đạp.

6c. Do thảm họa tự nhiên: cháy rừng, lũ lụt, giông bão, hạn hán,...

7. Tình hình quản lý, bảo vệ:

7a. Biện pháp hành chính / pháp luật (trong Danh sách các loài được quản lý).

7b. Biện pháp kỹ thuật:

- Nằm trong vùng được quy hoạch bảo vệ / bảo tồn In situ (Vườn Quốc gia, Khu Bảo tồn thiên nhiên).

- Thu thập trong các hình thức bảo tồn Ex situ.

8. Dẫn liệu theo dõi bảo tồn (ghi dẫn liệu theo dõi định kỳ).

8a. Tình hình sinh trưởng, phát triển trong các khu được bảo tồn In situ

8b. Tình hình sinh trưởng – phát triển và kết quả dưới những hình thức bảo tồn Ex situ.

- Trồng ở vườn: sinh trưởng – phát triển, ra hoa / quả; tỷ lệ nảy mầm của hạt /hom giống; thời gian nảy mầm (qua các lần thí nghiệm).

- Bảo quản hạt (Seed Conservation).

- Bảo quản mô sống (In vitro Conservation).

8c. Trao đổi hạt / cây giống với các quốc gia và vùng lãnh thổ khác trên thế giới.

9. Những nghiên cứu khác:

9a. Nghiên cứu nông học (nghiên cứu sâu về nhân giống, tạo giống mới, kỹ thuật trồng trọt, phòng trừ sâu bệnh, năng suất, vùng trồng và phát triển).

9b. Nghiên cứu sâu về thành phần hóa học, tác dụng dược lý, bào chế thuốc...

Tất cả các dẫn liệu trên được nạp vào máy tính theo một phần mềm chuyên dụng. Đó là cơ sở dữ liệu phục vụ cho công tác bảo tồn những loài cây thuốc thuộc diện quí hiếm, có nguy cơ bị tuyệt chủng ở Việt Nam. Cần thiết phải xây dựng một WEBSITE để trao đổi thông tin về những loài cần được bảo tồn kể trên.

2.5.2. Trao đổi thông tin và hợp tác quốc tế

Trao đổi thông tin và hợp tác quốc tế là một vấn đề được coi trọng trong bảo tồn cây thuốc.

1. Trao đổi thông tin về các nội dung:

- Danh sách và tên các loài cây thuốc đang được bảo tồn.
- Về phân bố và tình hình hiện trạng.
- Kết quả bảo tồn.
- Khả năng nhân trồng, kỹ thuật trồng, vùng trồng và phát triển.

2. Hợp tác quốc tế:

- Phối hợp xúc tiến bảo tồn (nhất là với các quốc gia có khu phân bố liền kề), trao đổi kinh nghiệm.
- Học tập phương pháp, đào tạo chuyên môn.
- Hỗ trợ kinh phí để xúc tiến các chương trình hành động (các Tổ chức Bảo tồn quốc tế và các quốc gia).
- Tham gia vào các Hiệp hội Bảo tồn quốc tế và khu vực.

3. Trao đổi hạt giống / cây giống với các nước khác.

Bên cạnh những hoạt động kể trên, sự phối hợp hành động giữa ngành Y tế với các ngành khác ; giữa Trung ương với địa phương là một nhân tố đặc biệt quan trọng trong công tác bảo tồn cây thuốc.

- Với ngành Lâm nghiệp: Quy hoạch, quản lý bảo vệ ; nghiên cứu phát triển trồng cây thuốc trên đất rừng.
- Với ngành Nông nghiệp: Kỹ thuật trồng trọt, nhân giống, vùng trồng...
- Với ngành Hải quan: Quản lý xuất nhập khẩu.
- Với ngành Sinh học: Nghiên cứu cơ bản về sinh học cây thuốc.

Bảo tồn và phát triển vốn tài nguyên cây thuốc là nhiệm vụ của toàn dân. Để làm tốt được việc này, chúng ta cần tổ chức được một mạng lưới rộng rãi, với những cán bộ kỹ thuật được đào tạo chuyên sâu về công tác bảo tồn.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1- *Olayiwola Akerele, Vernon Heywood & Hugh Synge* (1991); Conservation of Medicinal Plants; Cambridge University Press; 362p.

2- *Lohn H. Barton & Wolfgang C. Siebecl* (1994); Material Transfer Agreements in genetic Resources exchange – The case case the International Agricultural Research centres; Issues in Genetic Resources – IPGRI, N°1, May, 61p.

3- *Nguyễn Tiến Bân, Nguyễn Khắc Khôi, Nguyễn Tập và một số người khác* (1996); Sách Đỏ Việt Nam, Tập II – Thực vật; Nhà XB KH & KT, Hà Nội; 484 trang.

4- *Đỗ Huy Bích, Nguyễn Tập, Bùi Xuân Chương, Mai Nghị* (1978); Hướng dẫn Bảo vệ tái sinh và khai thác dược liệu; NXB Y học, Hà Nội; 207 trang.

5- *Lê Trần Chấn và một số người khác* (1999); Một số đặc điểm cơ bản hệ thực vật Việt Nam; NXB KH & KT, Hà Nội; 307 trang.

6- *Nguyễn Chiều* (1971); Tóm tắt nghiên cứu sinh thái cây thuốc ở thực địa; Thông báo dược liệu, số 9: 1 – 8.

7- *Donald A. Falk & Kent E. Holsinger* (1991); Genetic and Conservation of Rare Plants; Oxford University Press; 283p.

8- *Iaroxenko P. D.* (1969); Địa thực vật học (Geobotanic); NXB Tiến bộ – Moskva; 197 trang (tiếng Nga).

9- *Gary J. Martin. Thực vật Dân tộc học* – Bản dịch của Trần Văn Ơn, Phan Bích Nga và một số người khác, 2002; NXB Nông nghiệp, Hà Nội; 363 trang.

10- *Walter V. Reid, Sarah A. Laird et al.* (1993) ; Biodiversity Prospecting: Using genetic Resources for suitainable Development; World Resources Institute Publication, 341p.

11- *Nguyễn Tập* (1996); Nghiên cứu bảo tồn nhữmg loài cây thuốc quí hiếm có nguy cơ bị tuyệt chủng ở Việt Nam; Luận án PTS. Sinh học, Trường Đại học Khoa học Tự nhiên - ĐHQG Hà Nội.

12- *Nguyễn Tập* (1998); Tài nguyên cây thuốc và vấn đề bảo tồn; Chuyên đề giảng dạy - đào tạo Cao học và NCS Viện Dược liệu – Trường Đại học Dược Hà Nội; 38 trang.

13- *Nguyễn Tập* (2001); Điều tra cây thuốc và nghiên cứu bảo tồn; chuyên đề đào tạo trong dự án "Bảo tồn thực vật Việt Nam" – Hợp tác Viện Sinh thái & TNSV với Vườn thực vật Mit Xu Ri (Hoa Kỳ) 2001 – 2004; 32 trang.

14- *Nguyễn Tập* (2001); Áp dụng khung phân hạng mới của IUCN (1994) để đánh giá tình trạng bị đe dọa đối với cây thuốc; Tạp chí Dược liệu số 2 + 3 (6): 42 – 45; số 4 (6): 97 – 100.

15- *Nguyễn Tập* (2004); Xây dựng Danh lục Đỏ cây thuốc Việt Nam, phục vụ cho công tác bảo tồn; Tuyển tập công trình khoa học – Hội nghị khoa học toàn quốc: Những vấn đề nghiên cứu cơ bản trong khoa học sự sống; NXB KH & KT, Hà Nội; trang 222 – 226.

16- *Dương Hữu Thời* (1963); *Sinh thái thực vật*; Trường Đại học Tổng hợp Hà Nội; 258 trang.

17- *CITES* (1994); *Guide to Plants in Trade*; Published by Department of the Environment; 216p.

18- *Hội đồng Bộ trưởng* (1978); Nghị quyết số 200/HĐBT (21/8/1978) v/v phát triển dược liệu trong nước và điều tra dược liệu Miền Nam.

19- *Hội đồng Bộ trưởng* (1992); Nghị định số 18/HĐBT (17/1/1992) v/v quản lý các loài thực vật - động vật quí hiếm.

20- *Bộ Khoa học, Công nghệ và Môi trường* (1997); Nghị định số 2117/1997/ NĐ-B.KHCN và MT về Quy chế quản lý và bảo tồn nguồn gen Động –Thực vật và Vi sinh vật.

21- *Bộ Khoa học, Công nghệ và Môi trường* (2001); Hướng dẫn về công ước Đa dạng sinh học; IUCN – Việt Nam, BMZ & Cục Môi trường xuất bản; 253 trang.

22- *The IUCN council* (1994); IUCN Red List Categories; IUCN species Survival commission, 30th November; 21p.

23- *Bộ Nông nghiệp và Phát triển nông thôn, Bird life International in Indochina, Đại sứ quán Vương quốc Hà Lan & Ngân hàng thế giới* (2004); Thông tin về các khu bảo tồn hiện có và đề xuất ở Việt Nam; tái bản lần thứ 2, Tập I – Miền Bắc; Tập II – Miền Nam.

24- *State Programme KT.02* (1993); Guidance on the accession of Vietnam SR to CITES; Centre for Natural Resources and Environmental Studies University of Hanoi; 64p.

25- *Văn phòng Chính phủ* (1966); Chỉ thị số 210/TTg-Vg (6 /12/1966) v/v điều tra, phát triển dược liệu.

26- *Văn phòng Chính phủ* (2002); Nghị định số 11/2002/NĐ-CP (21/1/2002) v/v quản lý hoạt động xuất khẩu, nhập khẩu và quá cảnh các loài Động vật – Thực vật hoang dã.

27- *Văn phòng Chính phủ* (2002); Nghị định số 48/2002/NĐ-CP (22/4/2002) và công văn số 3399/VPCP (21/6/2002) kèm theo Danh sách các loài Động – Thực vật hoang dã cần quản lý ở Việt Nam.

28- *Viện Dược liệu* (1997); Phương pháp điều tra Dược liệu – Tài liệu tập huấn điều tra Dược liệu Miền Nam (1997 – 1985).

29- *WHO, IUCN & WWF* (1993); Guidelines on the Conservation of Medicinal Plants; The Trus tees, Royal Botanic Gardens, Kew; 50p.

30- *Bộ Y tế* (1973); Quy trình Điều tra Dược liệu – Bộ Y tế.

PHẦN II

KỸ THUẬT TRỒNG, THU HÁI VÀ SƠ BỘ CHẾ BIẾN CÂY THUỐC

TS. Nguyễn Văn Thuận

I. ĐIỀU KIỆN TỰ NHIÊN, CÁC VÙNG SINH THÁI NÔNG NGHIỆP VÀ VẤN ĐỀ SẢN XUẤT CÂY THUỐC Ở VIỆT NAM

Việt Nam có nền y học cổ truyền lâu đời - chịu ảnh hưởng sâu sắc của nền y học cổ truyền Trung Quốc. Việt Nam là nước nhiệt đới, gió mùa có nguồn tài nguyên thực vật phong phú, và đa dạng – tính đến nay đã phát hiện 3.948 loài thực vật có mạch là cây thuốc.

Ngay từ thời tiền sử người Việt cổ đã biết dùng cây cỏ để trị bệnh. Ngày nay, nền y học Việt Nam đã được Đảng và Nhà nước khẳng định "Đông tây y kết hợp" vì thế ngành trồng, sản xuất dược liệu không ngừng được đẩy mạnh và phát triển.

Việt Nam là một nước hẹp và dài chạy từ vĩ tuyến 8°30' đến vĩ tuyến 23°22' vĩ độ Bắc. Theo Giáo sư Trần An Phong miền sinh thái nông nghiệp của nước ta có thể chia làm 9 vùng (cũng có những quan niệm khác phân chia thành 7 vùng) gồm: Vùng Đông Bắc, vùng Việt Bắc – Hoàng Liên Sơn, vùng Tây Bắc, vùng đồng bằng Bắc Bộ và vùng Bắc Trung Bộ, vùng Duyên Hải nam Trung Bộ, vùng Tây Nguyên, vùng Đông Nam Bộ, vùng đồng bằng sông Cửu Long. Điều kiện tự nhiên của các vùng thích nghi với một số cây thuốc như sau:

1.1. Vùng Đông Bắc

Vùng sinh thái Đông Bắc bao gồm các tỉnh Quảng Ninh, Lạng Sơn, Cao Bằng, Bắc Giang... tổng diện tích tự nhiên 3,4 triệu ha; diện tích rừng 519.359 ha, đất trống đồi núi trọc 1,7 triệu ha. Địa hình vùng thấp dần từ tây bắc xuống

đông nam, độ cao trung bình 400 – 500 m. Đặc điểm nổi bật của vùng là sắp xếp các khối núi xen giữa các cánh đồng. Nhiệt độ cao nhất từ tháng 6 đến tháng 9 đạt trên 30°C (từ 30 – 35°C). Thấp nhất tháng 1 và tháng 2 dưới 20°C. Ẩm độ cao nhất vào tháng 3 và tháng 4 trên 90%, độ ẩm thấp nhất vào tháng 10 và tháng 11 chỉ đạt dưới 80%.

Do vị trí địa hình, vùng Đông Bắc chịu ảnh hưởng của gió mùa đông bắc mạnh nhất, mùa lạnh đến sớm hơn nơi khác. Nhiệt độ mùa đông thấp hơn các nơi khác 1 – 3°C. Thời gian có nhiệt độ thấp hơn 20°C ở độ cao 500 m là 165 ngày/năm. Biên độ nhiệt độ năm 13 – 14°C. Nhiệt độ trung bình năm của các vùng từ 21 – 23°C. Nhiệt độ tối cao tuyệt đối 36 – 40°C. Nhiệt độ tối thấp tuyệt đối – 3,4°C.

Lượng mưa trung bình năm 1.276,0 mm tại Móng Cái. Số ngày mưa trong năm là 120 – 160 ngày/năm. Mùa mưa trong năm bắt đầu từ tháng 5 đến tháng 9, trừ khu duyên hải có mưa dài hơn, từ tháng 4 đến tháng 10. Lượng bốc hơi nước từ 900 – 1.100 mm. Đất đai đủ ẩm từ tháng 7 – tháng 9.

Thổ nhưỡng: Đất phát triển trên vùng núi thấp, cao nguyên đá vôi và đồi núi thấp chủ yếu là nhóm đất đỏ vàng.

Các thung lũng bồi tụ dọc các sông và đồng bằng tích tụ ven biển chủ yếu là đất phù sa, sông suối đất dốc tụ thung lũng và ven biển có đất cát mặn.

Mùa hè nóng ẩm, mùa đông khắc nghiệt, khô hạn, sương muối, giá rét. Vùng ven biển hay chịu ảnh hưởng của bão nước dâng. Ô nhiễm môi trường do khai thác mỏ và các hoạt động kinh tế khác.

Do đặc điểm khí hậu, đất đai thổ nhưỡng như trên nên vùng Đông Bắc cũng phân bố rất nhiều loại cây thuốc hoang dại, điển hình như ba kích, hồi, quế, thanh cao, chóc máu...

1.2. Vùng Việt Bắc - Hoàng Liên Sơn

Đường ranh giới của vùng này với vùng Đông Bắc là giải Ngân Sơn, Cốc Xo đến khối Tam Đảo; với vùng Tây Bắc là dải Hoàng Liên Sơn. Diện tích toàn vùng 3,3 triệu ha, trong đó rừng tự nhiên 687.942 ha, đất trống đồi núi trọc 1,6 triệu ha.

Đặc điểm của vùng này là địa hình thấp từ biên giới Việt Trung về đồng bằng. Khu vực cao trên 1000 m bao gồm các đỉnh dãy Hoàng Liên Sơn, Bắc Hà, Si Ma Cai, Mường Khương, Núi Vòm, sông Chảy, cao nguyên đá vôi Quản Bạ, Đồng Văn, dãy Putaka, Phia Ya, Phiabioc, Trung lưu sông Gâm. Đá vôi phát

triển, bề mặt sơn nguyên nhấp nhô, dãy đồi sườn thoải. Khu Hoàng Liên Sơn núi cao đồ sộ, các đèo cao trên 2000 m và một số cao trên 3000 m. Vòm sông Chảy là khối granit và cổ với đỉnh Tây Côn Lĩnh (2.481 m) và Kiêu Liêu Ty (2.403 m).

Vùng đồi nằm ở hạ lưu các thung lũng lớn. Giữa các đồi có những cánh đồng rộng, có chỗ là đệ tam cũ, có chỗ là thung lũng bồi tụ.

Khu vực cao từ 300m trở xuống có địa hình đồi núi thấp thoải, các bán bình nguyên cổ phẳng, các thềm sông và bãi bồi đất phì nhiêu.

Sườn tây Hoàng Liên Sơn hẹp dốc đứng xuống sông Đà, sườn đông thấp dần theo nhiều bậc về phía sông Hồng với bề mặt 1300 m – 1700 m, 1700 – 1800 m phát triển quanh Sa Pa.

Khí hậu thuỷ văn: Điều kiện khí hậu thuỷ văn vùng Việt Bắc – Hoàng Liên Sơn có đặc điểm quanh năm duy trì độ ẩm cao, mưa nhiều với các tầm mưa lớn nhất nước ta. Nhiệt độ mùa đông ấm hơn vùng Đông Bắc từ 1 – 2°C. Ở các núi cao mùa đông lạnh có khả năng băng giá, sương muối, tuyết. Trong các tháng ít mưa thường đạt 30 – 40 mm đến 60 – 70 mm/tháng. Hiện tượng mưa phùn cuối mùa đông cũng phát triển mạnh. Số ngày mưa phùn lên đến 50 hoặc hơn. Ở Yên Bái có đến 70 ngày mưa phùn. Lượng mưa dao động mạnh qua nhiều năm. Năm mưa lớn nhất có thể đạt 3.000 mm, ở các nơi mưa lớn 1.500 mm/tháng. Những năm ít mưa không vượt quá 1.500 mm/năm và tháng mưa ít nhất chỉ đạt 100 – 200 mm.

Mùa sinh trưởng của cây thuận lợi từ tháng 8 đến tháng 12. Nhưng ở vùng sinh thái này về mùa đông nhiệt độ lại thấp nên các cây trồng lương thực, cây thực phẩm, cây ăn quả v.v... không phù hợp với điều kiện ở vùng này, nhưng một số cây thuốc có nguồn gốc ôn đới lại rất thích hợp như cây đương quy, bạch truật, lão quan thảo, chè xanh, đỗ trọng, hoàng bá, actisô, digitalis, các loại sâm, tam thất v.v...

Trong mùa đông thường có từ 70 – 100 ngày nhiệt độ xuống dưới 15°C và khoảng 50 ngày dưới 10°C. Ở vùng núi cao từ tháng 7 trở đi nhiệt độ trung bình tháng mới vượt 20°C. Ở vùng núi thấp, từ tháng 3 đến tháng 11 nhiệt độ trung bình đều trên 20°C. Ở vùng núi cao, nhiệt độ trung bình tháng cao nhất cũng ít khi vượt 28°C, song nhiệt độ tối thấp tuyệt đối có nơi xuống dưới 0°C. Ở vùng núi lượng nước bốc hơi thay đổi từ 900 – 1000 mm/năm. Nhiều nơi có 5 tháng liên tục mưa trên 200 mm/tháng. Ở khu vực núi thấp và đồi, mùa sinh trưởng cây trồng còn dưới 8 tháng. Lượng nước bốc hơi từ 1000 – 1100 mm/năm. Nhiệt độ trung bình năm 22 – 23°C. Nhiệt độ trung bình tháng 1 từ 15 – 16°C. Từ tháng 4 đến tháng 11 nhiệt độ trung bình tháng đều vượt 20°C.

Số giờ nắng thay đổi theo khu vực khá rõ, chỉ từ 1.400 – 1.600 giờ/năm. Các tháng ít nắng nhất là tháng 1, 2 và 3. Từ tháng 4 trở đi số giờ nắng tăng nhanh và đạt cực đại vào tháng 7. Cán cân bức xạ thường từ 58 – 68 kcal/cm^2/năm.

Đất: Phần lớn đất ở vùng này là đỏ vàng trên các loại đá sét và đá biến chất. Tầng đất mỏng, độ phì kém so với đất đỏ và đá bazan. Tuy nhiên, khi hình thành trên các loại đá biến chất nơi có địa hình đồi thoải, ít dốc, đất có độ xốp tăng lên, chất lượng cao hơn và hàm lượng kali tăng hơn. Điều đáng lo ngại là hơn 60% diện tích đất loại này đã bị mất lớp phủ bì thực vật nên bị xói mòn nghiêm trọng. Cũng phải kể đến nhóm đất mùn trên cao (trên 700 m) vì đây mới là địa bàn trồng cây thuốc, có tầng đất mỏng nhưng do khí hậu ẩm, mát mẻ đất tích luỹ được nhiều mùn độ phì thích hợp với một số cây đặc sản, cây thuốc như đào, mơ, mận, lê, tam thất, xuyên khung, ô đầu, đương quy, đỗ trọng.

Phân vùng một số khu vực theo địa mạo:

Núi cao (cao hơn 2000 m): Bao gồm phần còn lại của dãy Hoàng Liên Sơn, được cấu tạo chủ yếu từ các loại đá mác ma, trầm tích. Hình thái khối núi vẫn đặc trưng bởi quá trình chia cắt rất mạnh do quá trình xâm thực bào mòn. Các loại đất phát triển chủ yếu gồm đất mùn trên núi.

Núi trung bình (1.000 – 2000 m): Phân bố chủ yếu ở phía Tây Bắc tỉnh Hà Giang, gồm các khối núi nằm sát biên giới Việt – Trung, có độ cao khá lớn, đỉnh cao nhất 2.419 m. Hình thái các khối núi ở đây vẫn bị chia cắt khá mạnh, quá trình xâm thực, bào mòn ngày càng mạnh do tệ nạn phá rừng. Các loại đất chính gồm đất mùn vàng đỏ trên núi, đất đỏ vàng ở nơi có địa hình thấp.

Núi thấp - đồi (thấp hơn 1000 m): Đại bộ phận diện tích đất trong vùng là dạng địa hình đồi núi thấp, có mức độ chia cắt khác nhau, được cấu tạo từ các dạng đá trầm tích. Do đặc điểm cấu tạo địa chất nên mức độ bào mòn xâm thực diễn ra ở đây khác nhau. Phần phía nam là những dạng địa hình đồi xen kẽ, các địa hình thung lũng bằng rộng, có độ cao thấp vài chục mét. Đất phát triển trong vùng chủ yếu gồm các loại đất đỏ vàng có quá trình feralit mạnh, đất phù sa cổ ở các rìa thung lũng.

Cao nguyên và núi đá vôi với quá trình hoạt động castơ, tập trung chủ yếu ở Đồng Văn (1.600 m) Quản Bạ (1.100 – 1.200 m). Do quá trình hoạt động castơ đã chia cắt địa hình thành những khối đá vôi riêng biệt hoặc liền nhau, địa hình có dạng lởm chởm, sườn dựng đứng, nhiều nơi thấy địa hình castơ với thung lũng xâm thực. Đó là đặc điểm của những vùng đá vôi xen kẽ trầm tích lục nguyên. Đất phát triển ở vùng cao nguyên đá vôi gồm có đất đỏ vàng, đỏ nâu và đất đen.

Thung lũng và trũng giữa núi: Phân bố chủ yếu ở phía nam của vùng. Tuy diện tích nhỏ nhưng có ý nghĩa lớn trong công nghiệp. Đất phát triển trên các thung lũng chủ yếu là đất phù sa sông suối, thung lũng dốc tụ.

1.3. Vùng Tây Bắc

Diện tích 3,6 triệu ha, trong đó diện tích rừng tự nhiên 480.984 ha, đất trống đồi núi trọc 2,5 triệu ha. Địa hình phân bố theo hướng tây bắc - đông nam, giới hạn bởi dãy Hoàng Liên Sơn và dãy Pulasan – Puđenđinh, Pusamsao dọc theo biên giới Lào - Việt. Địa hình nói chung cao hơn 500m. Bao gồm các tỉnh Lai Châu, Sơn La và Hoà Bình.

Vùng núi và cao nguyên Tây Bắc, bởi đặc trưng của dãy núi cao và cao nguyên chia cắt bởi các thung lũng sông suối lớn chạy dài theo hướng Tây bắc - Đông nam, trùng với các yếu tố đứt gãy do quá trình thành tạo địa chất. Vùng có độ cao trung bình lớn từ 800 - 1.000 m. Có xu hướng nghiêng dần từ Tây bắc xuống đông nam.

Từ đông sang tây ta gặp dãy núi Hoàng Liên Sơn kéo dài từ Tà Lèng qua Fanxipăng xuống Puxaphình chia hai lưu vực sông Hồng và sông Đà. Đây là hệ thống núi cao nhất, đồ sộ nhất Đông Dương với nhiều đỉnh có độ cao xấp xỉ 3.000 m cao nhất là đỉnh Fanxipăng (3.143 m).

Dải thứ hai chạy từ Pu Huổi Khong qua Co Pi A ngăn cách khu vực sông Mã với sông Đà. Một trong những đặc điểm nổi bật của vùng Tây Bắc là sự có mặt của các cao nguyên đá vôi castơ nhiệt đới. Cao nguyên Tà Phìn – Xin Chảy ở độ cao 1.000 – 1.200 m cấu tạo bởi các đá vôi có tuổi $P_2 – M_2$, các cấu trúc địa chất phức tạp. Cao nguyên Sơn La – Mộc Châu ở độ cao thấp hơn 800 – 1.000 m, cấu tạo chủ yếu bởi các đá carbonat tuổi M_2 khá đặc trưng cho một vùng castơ già.

Đặc điểm trùng hợp là hệ thống thuỷ văn vùng Tây Bắc trùng mạng lưới phá huỷ kiến tạo theo hướng tây bắc - đông nam. Các sông chính là sông Đà, sông Mã với các phụ lưu của nó tạo nên mạng chia cắt địa hình có mật độ trung bình 1 km/km^2. Do cấu trúc địa hình như vậy nên vùng Tây Bắc bị che khuất cả hai luồng gió mùa chính. Luồng nào khi đến vùng này đều gây hiệu ứng phân làm biến tính. Mùa đông của vùng khô lạnh hơn, mùa hè gió tây khô héo. Ở các thung lũng khuất gió, mùa khô kéo dài, lượng mưa trên năm giảm. Mùa khô thường từ 4 – 5 tháng. Lượng mưa thường dưới 1500 mm, có nơi chỉ đạt 1100 mm. Mùa đông ở đây thường ấm hơn vùng Việt Bắc, khả năng sương muối băng giá có nhiều ở các đai cao. Thời tiết quang mây lặng gió trong suốt mùa đông kết hợp với địa hình đã tạo ra chênh lệch nhiệt độ ngày đêm trung bình từ 12 – 14°C.

Mùa hạ đến sớm hơn các vùng khác, từ tháng 3 đã có những nhiệt độ tối cao vượt quá 30°C, tháng 4 bắt đầu nắng thật sự, tháng có nhiệt độ trung bình cao nhất là tháng 6, cá biệt như Lai Châu tháng 8, Tuần Giáo tháng 7. Nhiệt độ cao tuyệt đối, quan trắc được ở Lai Châu 42,5°C (tháng 5/1982); Mường Tè 40,5°C (3/5/1980); Sông Mã 41,7°C (13/5/1966); Yên Châu 41,1°C (13/5/1966); Hoà Bình 41,2°C (16/5/1940). Nhiệt độ thấp tuyệt đối ở Lai Châu 3,4°C (2/1/1974); Mường Tè 3,9°C (3/1/1974); Yên Châu 1,5°C (2/1/1974); Hoà Bình 1,9°C (18/1/1961).

Mùa mưa của vùng bắt đầu và kết thúc sớm hơn các vùng khác thuộc Bắc Bộ một tháng. Tình hình mưa của các vùng phân hoá mạnh, phía bắc mưa lớn ở tâm Mường Tè 2.000 – 3.000 mm/năm trong khi ở phía nam lượng mưa chỉ từ 1.400 – 1.600 mm/năm, cá biệt tại Yên Châu mưa chỉ từ 1.108 mm/năm với số ngày mưa 11 ngày và không có ngày nào có lượng mưa trên 100 mm. Khí hậu Tây Bắc phân hóa theo các đai cao dưới 300 m; 300 – 700 m; 700 – 800 m trở lên.

Đất Tây Bắc có độ cao 300 – 700 m phổ biến là đất đỏ vàng trên núi, ở 700 – 900 m trở lên là đất mùn vàng đỏ trên núi và ở trên 2000 m là đất mùn trên núi cao, nói chung, đất chua, nghèo, rất dễ tiêu, tầng đất trung bình đến mỏng. Vùng cao nguyên đá vôi, vùng núi Điện Biên, vùng núi Pu Den Đinh có tầng tương đối dày.

Các hạn chế chính ở vùng này là thiếu nước trong mùa khô, gió tây khô nóng, tố lốc, mưa đá và động đất.

1.4. Vùng đồng bằng Bắc Bộ

Đồng bằng sông Hồng đặc trưng bởi bề mặt khá bằng phẳng và hơi nghiêng ra biển theo hướng tây bắc - đông nam. Ngoại trừ một số ngọn núi còn sót, vùng đồng bằng bồi tích chênh lệch độ cao từ 1 – 10 m. Vùng được bồi đắp sản phẩm phù sa của hai hệ thống sông Hồng và sông Thái Bình. Bề mặt địa hình do sản phẩm phù sa của hệ thống sông Hồng bằng phẳng và ít đồi núi sót hơn bề mặt địa hình do sản phẩm phù sa của hệ thống sông Thái Bình. Diện tích tự nhiên 1,25 triệu ha, trong đó đất nông nghiệp 820.000 ha (50%) đất lâm nghiệp 175.000 ha đất trống đồi núi trọc 70.000 ha.

Trọng lượng bức xạ dồi dào 105 – 120 kcal/cm^2/năm. Bức xạ quang hợp lớn 56 – 62 kcal/cm^2/năm. Số giờ nắng đạt từ 1.600 – 1.800 giờ/năm. Lượng mưa từ 1.600 – 2.200 mm/năm. Trong năm có từ 60 – 85 ngày nhiệt độ xuống dưới 15°C và khoảng dưới 38 ngày có gió tây nóng. Có khoảng 7 – 12 ngày lượng mưa lớn trên 50mm, biên độ nhiệt độ năm 12 – 13°C. Hàng năm thường có từ 10 tháng trở lên đủ ẩm và có từ 4 – 5 tháng liên tục lượng mưa vượt 2000 mm.

Đồng bằng Bắc Bộ được tạo và tưới tiêu bởi hệ thống sông Hồng và sông Thái Bình với lượng nước hàng năm trên 130 tỷ m^3 và lượng cát bùn trên 120 triệu m^3. Đồng bằng được bảo vệ bởi một hệ thống đê sông và đê biển chống được mực nước lũ trên 13 m tại Hà Nội. Tốc độ đồng bằng lấn ra biển có nơi đạt tới 100 m/năm.

Trên toàn đồng bằng trừ các đồi đá gốc còn sót đều là đất bồi tụ và có liên quan đến đặc tính phù sa sông Hồng và sông Thái Bình, chế độ bồi tích, chế độ thuỷ văn sông ngòi và các hoạt động nông nghiệp.

Đất phù sa ngoài đê được bồi hàng năm khoảng 130.000 ha mà 75% là đất phù sa sông Hồng có thành phần cơ giới nhẹ, phì nhiêu thích hợp với cây công nghiệp ngắn ngày và cây lương thực, cây thực phẩm. Vùng ven biển phần lớn chua mặn, ngoài đê biển là đất mặn sú vẹt ở Hải Phòng, Thái Bình. Rìa đồng bằng là một dải đất xám bạc màu, là đất phù sa cũ bị rửa trôi và đã được canh tác lâu đời. Đồng bằng Bắc Bộ là vùng sinh thái thích nghi với nhiều loại cây thuốc, nông dân ở vùng này lại có trình độ tiếp thu khoa học kỹ thuật cao nên sản lượng cây thuốc ở nước ta phần lớn được trồng và cung cấp ở vùng này. Một số xã ở khu vực đồng bằng sông Hồng cơ cấu cây trồng hầu như là cây thuốc, như xã Tân Quang (Mỹ Văn, Hưng Yên), xã Mễ Sở, Bình Minh, Tân Dân, Đông Kết v.v... (Châu Giang, Hưng Yên). Cây thuốc ở đây gần như được trồng quanh năm như cây bạc hà, húng quế, bạch truật, hoài sơn, đương quy, bán hạ, ngưu tất...

1.5. Vùng Bắc Trung Bộ

Là miền núi thấp, hẹp ngang, sườn dốc, cấu trúc kéo dài theo hướng tây bắc - đông nam. Độ cao trung bình toàn vùng khoảng 600 - 700 m.

Khí hậu thuỷ văn vùng Bắc Trung Bộ, mùa đông tương đối lạnh, nhiệt độ trung bình tháng từ tháng 12 đến tháng 2 thường từ 16 – 19°C, Tháng 7 thường có nhiệt độ trung bình 28 – 29°C. Tháng 1 nhiệt độ thường từ 16,5 – 17,5°C ở phía bắc và 17 – 20°C ở phía nam. Mưa nhiều nhưng phân bố không đều. Chịu ảnh hưởng trực tiếp của bão, gió tây khô nóng, gió mùa đông bắc. Số giờ nắng thực tế đạt 1500 – 1700 giờ/năm.

Đất phần lớn là đất đỏ vàng hình thành trên đá sét và đất biến chất phân bố ở trung du và miền núi Thanh Nghệ Tĩnh, tầng đất mỏng, độ phì kém, đất đỏ vàng hình thành trên đá bazan. Đồng bằng Thanh Nghệ Tĩnh có đất xám bạc màu xám, địa hình tương đối bằng phẳng hoặc dốc ít, thành phần cơ giới nhẹ, hàm lượng chất dinh dưỡng thấp có nhiều ở vùng Bình Trị Thiên – nhóm đất

phù sa bồi tụ đồng bằng nhỏ của hệ thống sông Mã, sông Cả có độ phì nhiêu trung bình đến khá. Các cây thuốc trồng ở vùng này thường là các cây đặc thù như các cây lấy tinh dầu sả, quế, tràm, tràm Úc, bạch đàn, tràm gió. Vùng núi cao trên 1.200m như Mường Loóng (Kỳ Sơn, Nghệ An) có thể trồng được cả một số cây có xuất xứ ôn đới như đương quy, bạch truật, bạch chỉ, đỗ trọng, anh túc v.v...

Các mặt hạn chế của khí hậu, đất đai thổ nhưỡng ở vùng này: Trong vụ đông xuân thường có 15 – 20 đợt gió mùa đông bắc; mùa hè gió tây khô nóng có ảnh hưởng tới sinh trưởng và phát triển của cây trồng.

Số ngày có gió tây khô nóng nhiều, lượng nước bốc hơi lớn gây hạn hán đầu vụ mùa, sâu bệnh phát triển. Sương muối và thời tiết nóng ẩm đã tạo điều kiện cho sâu bệnh hại cây trồng.

1.6. Vùng duyên hải Nam Trung Bộ

Từ nam đèo Hải Vân đến mũi Dinh, diện tích tự nhiên 4,5 triệu ha, đất nông nghiệp 590.000ha, đất lâm nghiệp 1,6 triệu ha.

Nhiệt độ trung bình năm từ 25°C trở lên. Không có mùa đông lạnh. Mùa mưa lệch về mùa đông từ tháng 9 đến tháng 12 hoặc tháng 1. Nhiệt độ trung bình tháng 1 không còn nơi nào dưới 20°C trừ vùng núi cao. Từ vùng Quy Nhơn trở vào thường từ 23°C trở lên. Biên độ nhiệt độ trong năm giảm rõ rệt, ở phía bắc của vùng khoảng 5°C, ở phía nam từ Nha Trang trở vào chỉ khoảng 3°C. Ở phía bắc, tây bắc của vùng, thảm thực vật chuyển tiếp của vùng sinh thái Bắc Trung Bộ, chúng thuộc kiểu rừng kín thường xanh, mưa ẩm, á nhiệt đới, nằm ở độ cao trên 1.000 m. Ở vùng vành đai thấp hơn 1.000 m mùa khô thường kéo dài từ 3 đến 6 tháng và có từ 2 – 4 tháng hạn. Ở phía Đông của vùng chạy dọc ven biển là vùng đất cát, đất phù sa. Thảm thực vật chủ yếu là do mục đích sử dụng của con người tạo nên. Một số cây dược liệu có thể phát triển tốt ở vùng này như dừa cạn, bụp dấm, mã đề, kim tiền thảo...

1.7. Vùng Tây Nguyên

Có diện tích tự nhiên 5,5 triệu ha, bao gồm các tỉnh Gia Lai, Kon Tum, Đắc Lắc và Lâm Đồng đất nông nghiệp hơn 300.000 ha, đất lâm nghiệp 3,1 triệu ha, đất chưa sử dụng 2 triệu ha, trong đó 2,6 triệu ha là đất trống đồi núi trọc, cây lùm bụi. Đây là vùng núi và cao nguyên có độ cao trung bình 500 – 800 m. Phía đông bắc khối núi Kon Tum với những đỉnh vượt 2000 m. Ở phần giữa là cao nguyên Lang Biang cao 1500 m, cao nguyên Di Linh 800 – 1000 m.

Nét nổi bật của địa hình Tây Nguyên là tính phân bậc rõ ràng, bậc cao nằm về phía đông, bậc thấp nhất về phía tây. Khí hậu vùng này thường có 4 tháng thiếu ẩm (từ tháng 12 đến tháng 3 năm sau), lượng mưa thời kỳ này quá nhỏ. Lượng mưa trong mùa mưa phong phú, nhiều nơi 5 tháng liên tục lượng mưa vượt 200 mm/tháng (tháng 5 – 9).

Nhiệt độ trung bình năm của vùng đạt từ 21 – 23°C. Tháng nóng nhất là tháng 3 và 4, tháng lạnh nhất là tháng 1. Nhiệt độ tối cao tuyệt đối biến đổi mạnh, biên độ nhiệt độ ngày đêm từ 8 – 10°C.

Vùng Tây Nguyên hầu hết là đất đỏ bazan có độ cao trung bình 500 – 600 m, xen kẽ là những đồi sa diệp thạch và granit, lác đác có cả đá vôi. Cao nguyên Đắc Lắc thấp hơn cao nguyên Gia Lai, cao trung bình 400 – 500m (Buôn Ma Thuột 461 m) hình dáng như một cái chảo úp khổng lồ, cao ở giữa và thoải về các phía. Ở phía nam của vùng các cao nguyên Di Linh, Bảo Lộc, loại đất chiếm diện tích là đất đỏ feralit nâu từ đá bazan dày 10 – 12 m, đất xám bạc màu, đất đỏ vàng trên đá trầm tích và đất phù sa sông suối.

Thảm thực vật nằm ở độ cao 1000 m, đặc trưng là thảm thực vật nằm trong các kiểu khí hậu vùng cao, với kiểu rừng kín lá rộng, lá kim mưa ẩm á nhiệt đới, kiểu rừng lá kim ẩm ôn đới núi trung bình và kiểu rừng thưa lá kim hơi khô kiểu á nhiệt đới. Hạn chế chính của vùng Tây Nguyên là thiếu nước trong mùa khô. Rất nhiều loại cây thuốc thích nghi với điều kiện sinh thái đa dạng phong phú của vùng núi Tây Nguyên, thậm chí cây sâm Ngọc Linh là một cây thuốc quý hàng đầu của Việt Nam cũng có nguồn gốc ở vùng này. Ngoài ra ở các vùng núi cao trên 1500 m các cây như ngũ vị tử, sơn tra, đương quy, bạch truật, đỗ trọng, huyền sâm, đẳng sâm cũng có thể trồng phát triển rất tốt. Ở các vùng thấp hơn Tây Nguyên là địa bàn có thể trồng các cây thuốc lấy tinh dầu như sả các loại, bạc hà, cà Úc, anh túc v.v...

1.8. Vùng Đông Nam Bộ

Diện tích tự nhiên khoảng 2,34 triệu ha, đất nông nghiệp 707.000 ha, đất lâm nghiệp 1,3 triệu ha, đất khác 123.000 ha, đất trống đồi núi trọc 229.000 ha, bãi bồi ven biển, đầm lầy 26.000 ha, đất hoang vùng đồng bằng 85.000 ha. Bao gồm lãnh thổ các tỉnh: Tây Ninh, Sông Bé, Đồng Nai, TP. Hồ Chí Minh, Bà Rịa – Vũng Tầu. Khu vực núi trung bình và núi cao đủ ẩm quanh năm, khu núi thấp và đồng bằng đủ ẩm 9 tháng, thường có từ 7 –8 tháng lượng mưa liên tục vượt 200 mm. Tháng 7, 8 có lượng mưa lớn nhất.

Nhiệt độ trung bình năm của vùng núi xấp xỉ 21°C. Hầu như quanh năm không có tháng nào có nhiệt độ trung bình dưới 19°C và vượt quá 23°C. Ở đồng bằng nhiệt độ trung bình năm đạt 25 – 26°C, tháng có nhiệt độ thấp nhất cũng trên 23°C. Vùng Đông Nam Bộ chủ yếu được tưới bởi sông Đồng Nai, sông Bé và sông Sài gòn.

Hai nhóm đất chính đại diện cho vùng này là đất xám chiếm 34,26% và đất đỏ vàng chiếm 44%.

1.9. Vùng đồng bằng Sông Cửu Long

Diện tích tự nhiên 3,97 triệu ha, đất nông nghiệp 2,6 triệu ha, đất lâm nghiệp 253.000 ha, đất khác 277.000 ha, đất chưa sử dụng 927.000 ha, bãi bồi ven sông, ven biển, đầm lầy 160.000 ha. Bao gồm các tỉnh Long An, Tiền Giang, Bến Tre, Đồng Tháp, Vĩnh Long, An Giang, Cần Thơ, Sóc Trăng, Minh Hải, Kiên Giang, Trà Vinh.

Nhiệt độ trung bình năm thường vượt 26°C, 27°C. Lượng mưa ở phía tây thường phong phú, có 8 tháng mưa, trung bình vượt 100 mm, trong đó liên tục 6 tháng vượt 200 mm/tháng. Nhiệt độ tối cao tuyệt đối đạt 40°C và tối thấp tuyệt đối 14,8°C.

Đồng bằng sông Cửu Long có các nhóm đất chính: Đất phù sa 1,18 triệu ha, loại đất này tốt nhất, chủ yếu phân bố ở vùng ven và giữa sông Tiền, sông Hậu. Đất mặn 744.000 ha, đất xám 134.656 ha, ngoài ra còn các loại đất đỏ vàng 2420 ha, các loại đất khác 190.257 ha.

Các cây tràm, tràm Úc, hoài sơn, bạch đàn... có thể trồng và phát triển rất tốt ở vùng sinh thái đặc biệt này.

II. KỸ THUẬT TRỒNG VÀ SƠ CHẾ CÂY THUỐC

2.1. Chọn đất, và kỹ thuật làm đất trồng cây thuốc

2.1.1. Đất trồng

Đất trồng cây thuốc phải tuỳ theo chủng loại, mùa vụ và thực tế quỹ đất của từng địa phương, từng cơ sở mà chọn, nhưng yêu cầu cơ bản của đất trồng cây thuốc là thoát nước, có mực nước ngầm thấp, gần hệ thống tưới tiêu, cây thuốc là loại cây trồng không thích hợp với úng ngập (trừ một số cây thuỷ sinh như trạch tả, dừa nước v.v...). Đặc điểm của phần lớn các loại cây thuốc là rễ ăn không quá sâu, rất cần nước trong quá trình sinh trưởng. Đối với các loại cây lấy củ, cây ngắn ngày nên chọn loại đất cát pha thịt nhẹ, các loại cây lấy củ, dài ngày nên

chọn loại đất thịt nhẹ có thành phần dinh dưỡng cao, có khả năng giữ nước, có tầng canh tác dày (40 – 50 cm) độ pH từ 5 – 7. Các loại cây lấy lá và sử dụng toàn thân cũng nên chọn đất giàu dinh dưỡng, tầng canh tác vừa phải, có khả năng tích luỹ nước cao, nhưng cũng có điều kiện tiêu úng khi cần thiết. Nhìn chung "cây nào thì đất ấy" cần chọn đất và thiết kế cánh đồng, ruộng trồng cây thuốc cho phù hợp với điều kiện thực tế của tập quán canh tác và điều kiện thích ứng của cây.

Đối với cây thuốc cần áp dụng một chế độ luân canh nghiêm ngặt, thường cây thuốc được gieo trồng vào vụ đông – xuân nên luân canh với cây lúa và một cây họ đậu khác là rất phù hợp. Cũng như đối với một số cây trồng khác kỹ thuật làm đất trồng cây thuốc cũng cần cầy sâu (10 – 15cm – các cây lấy lá và thân cành: 15 – 20 cm – các cây lấy củ và cây dài ngày), để ải, đập đất nhỏ. Chiều cao, rộng của luống cũng tuỳ từng loại cây thuốc cụ thể. Đối với đương quy (*Angelica acutiloba*) 25 – 30 cm, bạch chỉ (*Angelica dahurica*) 30 – 35 cm, ngưu tất (*Achyranthes bidentata*) 35 – 40 cm, nhưng nhìn chung các cây lấy củ lên luống càng cao càng tốt, thậm chí như ngưu tất có thể lên luống cao 50 cm và dùng chế độ dinh dưỡng (phân bón) để tạo chiều cao âm của luống (kỹ thuật bón phân chuồng), Luống rộng vừa phải, không nên quá rộng khó chăm bón và thu hoạch, thông thường luống rộng 70 – 80 cm.

Cây trồng miền núi nên đánh luống theo chiều đồng mức để tránh bị rửa trôi, nhưng đồng thời cũng phải quan tâm đến khả năng phá đứt luống lúc mưa quá lớn.

Cũng có nhiều loại cây thuốc thích nghi tốt với các loại đất có màu chỉ thị (tất nhiên còn phải phù hợp vào nhiều yếu tố khác) như cây bạch truật (*Atractylodes macrocephala*) trồng rất tốt ở loại đất màu vàng, cây đương quy - đất có màu hơi đen (giàu mùn), cây ngưu tất - đất có màu trắng (đất pha cát vừa), cây tam thất - đất có màu đỏ bazan v.v...

Chọn đất, chuẩn bị đất và làm đất đúng kỹ thuật là một khâu kỹ thuật quan trọng, quyết định đến năng suất, chất lượng và hiệu quả kinh tế của công tác trồng cây thuốc.

2.1.2. Đất vườn ươm

Phần lớn các cây thuốc đều phải gieo giống qua giai đoạn vườn ươm. Vườn ươm là nơi cây con sinh trưởng đầu tiên, đóng vai trò quyết định đối với chất lượng cây giống, do đó ảnh hưởng lớn đến năng suất và phẩm chất sản phẩm sau này.

Vườn ươm nên chọn nơi gần ruộng trồng, có thể ở một góc ruộng, gần nguồn nước tưới, cũng có thể là các nhà lưới, nhà màn điều khiển được nhiệt độ.

Đất vườn ươm nên chọn loại đất nhẹ, tầng canh tác có thể không sâu, nhưng chế độ tưới tiêu tốt. Đất vườn ươm cũng cần cày sâu, bừa kỹ, nhặt sạch cỏ dại, đặc biệt loại cỏ có bộ rễ ăn sâu như cỏ gấu, cỏ tranh. Sau khi phơi ải, có thể lên luống rộng từ 100 – 110 cm cao 20 – 25 cm, rãnh thoát nước lớn, vườn ươm nên chia ô nhỏ để tiện việc thoát nước và chăm bón sau này.

Diện tích vườn ươm chỉ cần 3 – 5% so với diện tích sản xuất đại trà.

Tuỳ từng loại cây, có thể gieo hạt trong khay hoặc gieo trong bầu là biện pháp khá phổ biến hiện nay; vừa tiết kiệm hạt giống, công chăm bón, nước tưới và đặc biệt không làm ảnh hưởng đến bộ rễ của cây, vì hình dáng bộ rễ quyết định đến chất lượng và giá trị thương phẩm của dược liệu sau này. Đất làm bầu cần chọn loại đất nhẹ, giàu dinh dưỡng, giàu mùn, ít cỏ dại, đã được để ải, trộn 2/3 đất với 1/3 phân chuồng hoai mục để đóng vào khuôn bầu.

2.2. Gieo, trồng và chăm bón cây thuốc

2.2.1. Chuẩn bị hạt giống

Hạt giống là vật tư kỹ thuật, là tư liệu sản xuất đặc biệt quan trọng của nghề trồng cây thuốc. Việc đầu tiên là phải có tiêu chuẩn xác định số lượng giống, đối với nhiều loại cây thuốc, bảo quản hạt giống yêu cầu những điều kiện hết sức chặt chẽ, vì hạt giống cây thuốc rất dễ mất sức nảy mầm. Các loại cây thuốc họ Hoa tán hạt giống chứa hàm lượng tinh dầu cao như đương quy, độc hoạt v.v... nếu ở điều kiện nhiệt độ cao hơn 30°C sau một tuần tỷ lệ nảy mầm của hạt có thể giảm từ 70 – 80% xuống còn 10 – 15% thậm chí chỉ còn 1 – 2%. Các cây thuốc họ Cúc có xuất xứ ôn đới như bạch truật, cúc gai dài v.v... nếu nhiệt độ không khí nơi bảo quản cao hơn 35°C sau 10 ngày tỷ lệ nảy mầm có thể bị giảm trên 50%.

2.2.2. Tiêu chuẩn để xác định lượng hạt giống

- Số lượng hạt/đơn vị khối lượng của hạt.
- Độ thuần của hạt giống (độ thuần di truyền + độ thuần cơ học).
- Tỷ lệ nảy mầm của hạt giống.
- Số lượng cây sẽ trồng/1 đơn vị diện tích.

Lượng hạt giống gieo cần thiết:

$$V = \frac{M + K}{S.A} \times 100$$

trong đó: V: lượng hạt giống cần thiết;

M: mật độ trồng;

K: hệ số dự phòng;

K = 0,1M đối với loại hạt giống gieo qua vườn ươm;

K = 0,5M đối với loại hạt gieo thẳng vào hốc;

K = 2M đối với loại hạt giống nhỏ gieo theo hàng (Phần lớn cây thuốc đều sử dụng hệ số này);

A: số lượng hạt /kg (suy ra từ khối lượng 1000 hạt);

S: giá trị sử dụng của hạt giống:

$$S(\%) = \frac{PC}{100}$$

P: tỷ lệ nảy mầm,

C: độ thuần của hạt giống.

Tuy nhiên khi xác định lượng hạt giống cần quan tâm đến các vấn đề sau:

- Giá trị thực của hạt giống.
- Thời gian gieo trồng.
- Điều kiện đất đai.
- Kích thước và sức sinh trưởng của loại cây đó.
- Dự đoán khả năng phá hoại của sâu bệnh.

Tiêu chuẩn một giống cây thuốc tốt như sau:

- Đặc trưng đầy đủ của giống, tỷ lệ nhiễm tạp thấp, hạt không bị sâu bệnh
- Tỷ lệ nảy mầm cao.

Tỷ lệ nảy mầm được tính theo công thức:

$$\text{Tỷ lệ nảy mầm (\%)} = \frac{\text{Tổng số hạt nảy mầm}}{\text{Tổng số hạt thử}} \times 100$$

Độ nảy mầm đối với mỗi cây thuốc yêu cầu khác nhau. Ví dụ: Đương quy tối thiểu 60%; bạch chỉ, bạch truật 70%.

Để thử tỷ lệ nảy mầm của hạt giống cây thuốc thông thường người ta chia làm 4 lô mẫu, nếu kết quả thử của các lô mẫu chênh lệch nhau 10% thì phải thử lại.

Dùng phương pháp thử Tetrazolium (phương pháp xác định tỷ lệ hạt sống có thể nảy mầm được). Hoá chất được dùng là 2,3,5 clorua tetrazolium, chất này

trong điều kiện bình thường không có màu nhưng khi bị tế bào sống khử thì cho màu đỏ. Phương pháp thử này được thao tác như sau:

Hạt được ngâm trong nước nóng qua đêm rồi bổ dọc hạt sao cho các nửa đều dính mầm, sau đó đặt từng nửa hạt vào đĩa Petry, rồi phủ một lớp dung dịch clorua tetrazolium trong 4 giờ, sau đó rửa lại hạt bằng nước máy, đếm các hạt bị nhuộm đỏ. Tỷ lệ hạt sống được tính theo công thức.

$$\text{Số lượng hạt sống (\%)} = \frac{\text{Số lượng 1/2 hạt được nhuộm đỏ}}{\text{Tổng số 1/2 hạt}} \times 100$$

Đây là phương pháp thử tỷ lệ hạt sống, hay nói cách khác là thử khả năng nảy mầm của giống cây thuốc nhanh, rẻ, tiết kiệm được thời gian, tiền bạc và công sức của người nông dân trồng cây thuốc. Nhưng phương pháp này chỉ thích hợp với loại cây thuốc có hạt giống to, vì thao tác bổ đôi hạt khá phức tạp, tỷ mỉ.

Độ ẩm hạt tối ưu được tính theo công thức:

$$\text{Độ ẩm hạt (\%)} = \frac{W_1}{W_2} \times 100$$

trong đó: W_1: khối lượng của mẫu hạt trước khi sấy hoặc phơi khô;

W_2: khối lượng hạt đã khô.

Độ ẩm của hạt giống: Độ ẩm của hạt giống cây thuốc, được hiểu theo hai thời điểm, là độ ẩm khi thu hái và độ ẩm sau khi chế biến và đưa vào bảo quản. Phần lớn các loại hạt giống cây thuốc đều có chứa một hàm lượng cao tinh dầu nên rất dễ hút ẩm trở lại và mất sức nảy mầm. Hạt giống cây thuốc khi thu hoạch đem phơi hoặc sấy rồi bảo quản (tốt nhất là phơi âm can – phơi ở những nơi dâm không chịu ánh sáng trực xạ và tránh nhiệt độ phơi quá cao; hoặc sấy ở nhiệt độ thấp (dưới 35°C) cho đến khi độ ẩm của hạt dưới 7%, hoặc ở điều kiện "siêu khô" – dưới 3,5% độ ẩm).

Hạt được bảo quản kín trong 2 lớp túi ni lông hoặc hộp chuyên dụng (chú ý nên để hạt nguội hẳn mới cho vào túi, hộp).

Bảo quản trong kho lạnh ngắn hạn (hạt gieo hàng năm) trung hạn (hạt dự trữ để bảo quản 2 – 3 năm) và dài hạn (hạt bảo quản lâu dài, bảo tồn nguồn gen).

Cần đóng gói hạt cho phù hợp với thời gian bảo quản (bảo quản lâu dài không nên đóng gói quá lớn, hạt nhỏ cũng chỉ nên đóng gói bảo quản nhỏ), với khả năng sử dụng và diện tích gieo trồng. Trong quá trình bảo quản hạt không nên tháo mở túi và nắp hộp bảo quản nhiều lần.

Không như các loại cây trồng nông, lâm nghiệp khác, hạt giống các loại cây thuốc đều phải bảo quản trong các kho lạnh chuyên dùng.

Xử lý hạt giống trước khi gieo: ở điều kiện nhiệt độ bình thường (khi gieo hạt đúng mùa vụ) phần lớn các loại hạt cây thuốc đều có thời gian cần thiết cho sự nảy mầm khá dài (ngưu tất 7 – 10 ngày, bạch chỉ 20 – 25 ngày, đương quy 25 – 30 ngày, thậm chí các loại sâm 4 – 5 tháng và nhiều loại còn dài hơn); vì vậy, nếu bình thường người nông dân gieo hạt ra đất và tưới nước đủ ẩm suốt thời gian hạt hình thành mầm sẽ mất rất nhiều công lao động, nước tưới, để khắc phục nhược điểm trên, ta có thể sử dụng 1 trong 2 cách sau:

- Ngâm ủ hạt vào cát ẩm: Đãi sạch hạt, ngâm hạt trong nước lã từ 10 – 24 giờ (tuỳ từng loại hạt) thau rửa nước chua và trộn với cát ẩm cứ một phần hạt trộn 2 - 3 phần cát, sau đó tãi đều xuống nền kho, phòng lát gạch hoặc nền xi măng, lấy bao tải ướt phủ lên hoặc phủ bằng rơm rạ cắt ngắn cho rễ rải đều. Hàng ngày cho tưới đủ ẩm, lớp cát trộn hạt dày mỏng tuỳ vào kích cỡ hạt nhưng thông thường dày từ 3 – 5 cm. Đảo cát và hạt hàng ngày trước lúc tưới nước, khi có dấu hiệu một số hạt đã nứt nanh thì đưa hạt ra gieo vào luống, tiếp tục tưới nước giữ ẩm cho đến khi hạt mọc đều.

- Sử lý bằng cơ học, hoá học và các tác nhân vật lý như xát mỏng bớt vỏ hạt, cắt bỏ mỏm hạt, dùng acid sulfuric (H_2SO_4) ở nồng độ phù hợp để bào mòn vỏ hạt hoặc một số kỹ thuật khác nhằm đẩy nhanh thời gian hạt hút đủ nước giúp cho quá trình nảy mầm của hạt được tiến hành nhanh hơn, rút ngắn thời gian. Ngoài ra một số hoá chất có khả năng giúp rút ngắn thời gian nảy mầm của hạt.

Gieo hạt: Hạt giống cây thuốc thường có giá trị kinh tế cao so với cây lương thực, thực phẩm khác. Hạt đương quy tiêu chuẩn thường có giá hơn 1.000.000 đ/kg, bạch chỉ 700.000 đ/kg, hạt nhân sâm Triều Tiên 2000 – 3000 USD/kg, vì thế ta nên tiết kiệm hạt giống khi gieo. Trước khi gieo phải xác định chính xác diện tích vườn ươm, số bầu gieo hạt hay diện tích các khay gieo hạt.

Chia hạt đều cho từng luống với diện tích tương ứng, tiếp tục chia thành 2 hoặc 3 phần tuỳ theo số lượng hạt nhiều hay ít, trộn đều một phần hạt với 3 phần cát hoặc đất bột và gieo hạt nhiều lần cho mỗi diện tích gieo để đảm bảo hạt được gieo đều.

Phần lớn các loại hạt cây thuốc sau khi gieo cần được phủ rơm rạ hoặc trấu, tưới nước để giữ ẩm cho đến khi hạt mọc đều.

2.2.3. Kỹ thuật trồng

Do hạt giống cây thuốc khá đắt, nên giá thành mỗi cây giống cũng cao, vì vậy cần lưu ý khi trồng cây.

Trồng cây gieo từ vườn ươm: Cần thiết phải bảo vệ toàn bộ rễ khi nhổ cây, tốt nhất dùng các nông cụ phù hợp như dầm, cọc đánh cây v.v... để phá kết cấu đất tại chỗ của loại cây chuẩn bị nhổ trồng, vẫn cần sự hỗ trợ của dầm hoặc cọc đào để gỡ từng cây. Nhất thiết phải trồng cho bộ rễ được thẳng đứng, vì thế lỗ bỏ cây phải được tạo ra bằng một dụng cụ thích hợp (trong nhiều trường hợp có thể dùng luôn dầm hoặc cọc đào cây) lấp khoả đất cẩn thận. Khi bỏ cây xuống hố nên dùng hai ngón tay nhấc nhẹ theo phương thẳng đứng cho rễ cây thẳng ra, đất bột được lấp vào gần rễ, nếu cây to, rễ quá dài khi lấp được một nửa hố trồng có thể tưới một lần nước cho nước ngấm vào đủ cả bộ rễ; rễ được tiếp xúc toàn bộ với đất. Nếu cây có nhiều lá, hoặc lá quá to thì nên cắt bớt lá hoặc cắt một phần của lá để tránh sự thoát hơi nước quá nhiều so với khả năng hút nước đang bị hạn chế của rễ cây ở thời kỳ mới trồng. Khi trồng xong nhất thiết phải tưới đủ ẩm, vào các ngày nắng nhiều cần thiết phải có vật che cho cây mới trồng, trong điều kiện có thể trồng cây vào buổi chiều. Cần thiết phải trồng cây khi cây con vườn ươm vừa đến tuổi trồng, không nên trồng sớm quá hoặc muộn quá ảnh hưởng đến tỷ lệ sống của cây và năng suất sản lượng sau này.

Đối với những cây gieo vào bầu trong quá trình trồng cấy sẽ ít những thao tác phức tạp hơn. Giỡ bầu nhẹ nhàng khỏi mặt đất, trường hợp có những rễ dài, mọc ra ngoài bầu ta nhẹ nhàng tháo gỡ để vẫn đảm bảo bộ rễ của cây được nguyên vẹn dùng dao sắc để cắt lớp ni lông hoặc xé bỏ khỏi bầu một cách an toàn cho cây và cho hình dạng bầu, tránh để phần đất của bầu bị vỡ vụn, nứt rạn. Khi đặt bầu cây xuống hố trồng ta dùng tay bê nhẹ bầu, tránh làm vỡ bầu.

Đối với cây thuốc lưu niên ta trồng như một số cây lâm nghiệp, công nghiệp, cây ăn quả khác. Phần lớn cây thuốc hiện nay đang được trồng trên diện tích lớn của nước ta đều xuất phát từ di thực nhập nội, hoặc từ nước ngoài vào như Trung Quốc, Triều Tiên, Nhật Bản, Ấn Độ, Liên Xô (trước đây) v.v..., hoặc từ hoang dại vào trồng trọt nên rất nhạy cảm với biện pháp kỹ thuật hết sức quan trọng đầu tiên là thời vụ gieo trồng. Các cây có nguồn gốc ôn đới gần như đều có thời vụ gieo trồng vào cuối mùa thu để thời gian sinh trưởng chính của cây đều vào mùa đông lạnh, các cây này thường kết thúc vòng sinh trưởng vào giữa hè hoặc ở vùng mát là đầu thu như đương quy, bạch chỉ, ngưu tất, trạch tả, cúc gai dài, huyền sâm, lão quan thảo v.v... Thời vụ là biện pháp kỹ thuật rất quan trọng đối với cây trồng đặc biệt là đối với cây thuốc, sớm hay muộn hơn 15 ngày về thời vụ ở cây thuốc có thể làm giảm năng suất đến 30- 40%. Mật độ khoảng cách trồng đối với cây thuốc cũng cần được hết sức lưu ý, ngoài ra yếu tố năng suất dược liệu (củ, rễ, hoa lá, cành hoặc toàn thân) ở cây thuốc chất lượng, các

hàm lượng hoạt chất có trong dược liệu có nghĩa là điều kiện để cây thuốc tích luỹ được nhiều hoạt chất cũng hết sức quan trọng. Khác với các cây trồng khác, có năng suất dược liệu, chất lượng đảm bảo nhưng hình dáng, màu sắc bề ngoài của dược liệu - sản phẩm của quá trình trồng cây thuốc cũng cần được chú ý. Củ nhân sâm có hình dáng 2 tay, 2 chân và "thân người" được người đời huyền bí nâng tầm quan trọng lên gấp bội so với củ nhân sâm có rễ củ phát triển, hình dáng bình thường. Củ đương quy, bạch chỉ, độc hoạt v.v... phải có dạng củ "cà rốt" mới được giá, ngưu tất phải có màu trắng ngà, củ dài thuôn đều mới được giá trị thương phẩm cao v.v... Tất cả các chỉ tiêu trên được quyết định bởi khoảng cách, mật độ trồng cây.

Chế độ phương pháp và chủng loại phân bón đối với cây thuốc cũng cần được quan tâm, cây thuốc phần lớn có động thái tích luỹ hoạt chất trong một thời gian dài, vì thế những loại phân bón có cơ chế tác động nhanh, phân hoá học, phân bón qua lá... đều không phù hợp nhiều đối với cây thuốc. Các loại cây thuốc đều có nhu cầu phân chuồng gấp 1,5 lần các loại cây trồng khác. Phương pháp và chế độ bón phân đối với cây thuốc cũng cần được lưu ý, tránh các chất tồn dư cao của các loại hoá chất trực tiếp như NO_3^- từ phân đạm hay một số kim loại nặng từ phân bón, nước tưới đối với dược liệu.

Thuốc bảo vệ thực vật sử dụng đối với cây thuốc cũng cần được quan tâm đúng mức, thời gian phun thuốc phải cách thời điểm thu hái dược liệu ở mức độ cho phép tuyệt đối an toàn. Nên dùng các loại thuốc bảo vệ thực vật có nguồn gốc sinh học, thảo mộc, các loại thuốc không bị cấm sử dụng.

Ưu tiên phát triển trồng cây thuốc sạch, an toàn hoặc theo chương trình G.A.P (Good Agricultural Practice), phòng trừ sâu bệnh theo I.P.M (các biện pháp phòng trừ tổng hợp).

Chăm bón đối với cây thuốc: Câu ca dao "công trồng là công bỏ, công làm cỏ là công ăn" đều đúng với tất cả các loại cây trồng, cây thuốc cũng rất cần được chăm bón chu đáo, theo một quy trình chặt chẽ. Đặc biệt là chế độ làm cỏ, xới xáo, bón phân, phòng trừ sâu bệnh và thu hái sơ chế biến.

2.3. Thu hái, sơ chế dược liệu

Khác với các cây trồng khác, ngoài sản lượng nông nghiệp, cây thuốc còn tích chứa những hoạt chất sinh học, hoá học chữa bệnh và bồi dưỡng sức khoẻ con người hết sức quý và đa dạng. Trong cây thanh cao thì hoạt chất artemisinin, trong cây sâm là các saponin, trong cây đương quy nhóm chất

steroid, trong cây bạc hà thì menthol, cây hương nhu là eugenol, cây Dioscorea là diosgenin, cây sả hoa hồng là geraniol v.v... vì thế thời điểm thu hái thích hợp đối với cây thuốc là hết sức quan trọng. Nên thu hoạch cây thuốc vào các ngày nắng, sau khi thu hoạch cần thiết phải sơ chế biến ngay, chú ý phải giữ nguyên hình dáng vốn có của dược liệu, tránh giập gãy, mốc mọt, đứt và biến dạng. Các cây lấy tinh dầu nên tập trung thu hái và chưng cất lấy tinh dầu dứt điểm trong một khoảng thời gian ngắn vì hàm lượng và chất lượng tinh dầu các loại có thời gian đạt đỉnh điểm ngắn chỉ trong vòng thời gian 5 – 10 ngày, sau đó hàm lượng và chất lượng các loại hoạt chất và tinh dầu trong cây thuốc sẽ bị giảm.

Hiện nay, hầu hết các cơ sở trồng cây thuốc đều thu hoạch dược liệu bằng phương pháp thủ công, các cây lấy thân, cành, lá, hoa v.v... (phần trên mặt đất) đều dùng liềm, dao cắt rửa sạch và đem phơi trên nong, nia, sân xi măng, sân lát gạch hoặc sấy ở các lò sấy từ thô sơ đến hiện đại.

Các cây lấy rễ, củ (phần dưới mặt đất) dùng cuốc, thuổng, mai... để đào (chú ý: không làm đứt rễ, củ) rửa sạch và đưa vào sơ chế, phơi khô, xông sinh, xông khói, hấp, đồ và phơi khô trước khi đưa tiếp đi chế biến.

Hầu hết các loại dược liệu sau khi thu hoạch đều phơi khô, nhưng đặc biệt cũng có những loại sơ chế biến rất cầu kỳ, nên tùy từng loại ta áp dụng các phương pháp chế biến cho phù hợp.

2.4. Kỹ thuật trồng một số cây thuốc phổ biến

2.4.1. Kỹ thuật trồng cây thanh cao hoa vàng

Tên khoa học: *Artemisia annua* L.

Họ thực vật: Asteraceae

Tên Việt Nam: Thanh cao, thanh cao hoa vàng, ngải hoa vàng, bù hao, hoàng hoa vàng v.v...

Nguồn gốc thực vật và sự phân bố

Thanh cao là cây bản địa của các vùng đông và bắc Mỹ, từ miền trung đến tận miền nam châu Âu và gần như toàn bộ lãnh thổ châu Á. Nhưng thanh cao mọc tập trung và nhiều nhất là ở Trung Quốc, Trung Á và Việt Nam.

Ở Việt Nam thanh cao mọc hoang dại ở các tỉnh Lạng Sơn, Cao Bằng, Bắc Giang, Quảng Ninh, Bắc Cạn, Thái Nguyên và Hải Dương. Hiện nay đang được trồng lớn ở một số tỉnh như Thanh Hoá, Ninh Bình, Hà Nội, Hưng Yên, Vĩnh Phúc, Hà Tây, Phú Thọ, Tuyên Quang v.v...

Đặc tính sinh vật học và sinh thái

Mô tả

Thanh cao là một loại cây thân thảo hoá gỗ cao từ 1m đến 3m, có khi hơn. Toàn thân có mùi thơm nhẹ, lá mọc cách, phiến lá phía dưới 3 lần xẻ thuỳ, phần trên 2 lần sẻ thuỳ lông chim và hợp thành những dải rất hẹp. Khi hoa nở, toàn cây được coi như một chuỳ kép gồm nhiều cành cấp 1, mỗi cành cấp 1 có nhiều cành cấp 2, cành cấp 2 lại có nhiều cành cấp 3. Cụm hoa hình đầu rất nhỏ, có đường kính từ 2mm đến 2,5 mm nằm trong một tổng bao gồm 6 đến 8 lá bắc hình bầu dục. Mỗi cụm hoa chứa 25 – 35 hoa, trong đó có 5 đến 8 hoa cái (không có nhị đực) xếp ở vòng ngoài và 20 – 25 hoa lưỡng tính ở giữa. Hoa rất nhỏ, dài từ 1 mm đến 1,2 mm có tràng hoa màu vàng nhạt. Hạt (quả bế) hình trứng, rất nhỏ, vỏ có rãnh dọc và chứa các tuyến tinh dầu. Thanh cao là cây thụ phấn chéo không hoàn toàn (không điển hình) và thụ phấn nhờ gió. Hạt thanh cao thường có tỷ lệ nảy mầm tương đối cao từ 85% đến 90%, ngoài các yếu tố cần thiết như độ ẩm và nhiệt độ hạt thanh cao mọc được còn nhờ cả vào sự có mặt của yếu tố ánh sáng.

Sinh trưởng và phát triển

Cây thanh cao là cây dược liệu dễ trồng, dễ sống, sinh trưởng nhanh, chóng thu hoạch. Thời gian sinh trưởng từ khi nảy mầm đến lúc ra hoa kết quả từ 8 – 10 tháng đối với các tỉnh phía Bắc, còn các tỉnh phía Nam thì ngắn hơn. Đối với cây trồng để thu hoạch dược liệu thì thời gian cần thiết cho một vụ trồng ngắn hơn chỉ 6 – 7 tháng (từ tháng giêng đến tháng 7).

Điều kiện sinh thái

Cây thanh cao có bộ rễ chùm ăn nông trên mặt đất (25 cm đến 40 cm), chịu hạn tốt, kém chịu úng, thích nghi với những vùng thuận mưa, nắng nhiều. Nhiệt độ thích hợp tốt nhất cho cây từ 26°C đến 28°C. Cây kém phát triển khi nhiệt độ dưới 10°C và trên 40°C. Lượng mưa thích hợp từ 1400 – 1600 mm/năm. Độ ẩm tốt nhất cho cây phát triển từ 80% đến 85% và ánh sáng đầy đủ.

Giá trị làm thuốc, giá trị kinh tế

Thanh cao là cây dược liệu quý. Ở Trung Quốc cây thanh cao được dùng trong Y học cổ truyền để điều trị bệnh sốt rét cách đây trên 2000 năm. Trong tập đơn thuốc chữa 52 loại bệnh từ đời Hán, cây đã được dùng để hạ nhanh các cơn sốt. Lý Thời Trân, đại danh y người Trung Hoa, đã ghi thanh cao trong "Bản Thảo Cương Mục" về giá trị và sử dụng cây thanh cao để làm thuốc chưa bệnh sốt rét.

Ở Việt Nam trong "Nam dược thần hiệu" danh y Tuệ Tĩnh (thế kỷ 15) đã ghi thanh cao chữa được nhiều chứng bệnh sốt rét. Hải Thượng Lãn Ông Lê Hữu Trác trong tập "Dược phẩm vãng yếu" cũng đã đề cập đến giá trị chữa bệnh sốt rét của cây thanh cao. Ngày nay thanh cao dùng làm nguyên liệu chiết xuất artemisinin làm thuốc chữa sốt rét. Bã lá sau khi chiết làm phân xanh bón ruộng rất tốt, vừa tăng độ mùn vừa diệt côn trùng sâu bọ hại hoa màu. Thân cây đã lấy hết lá dùng làm chất đốt. Nhựa bã sáp còn lại có thể dùng làm các chất sơn, chất dịch dùng diệt côn trùng, phun cho cây ăn quả. Hoạt chất artemisinin là mặt hàng đặc sản nhiệt đới xuất khẩu cho hiệu quả kinh tế cao.

Kỹ thuật trồng

Kỹ thuật trồng cây thanh cao thu hoạch hạt giống

Chọn địa điểm

Thanh cao là cây thụ phấn chéo không hoàn toàn, vì vậy, việc chọn địa điểm để sản xuất hạt giống thanh cao là hết sức quan trọng.

Thoạt đầu hạt giống thanh cao cần được sản xuất ở các trạm, trại, trung tâm nghiên cứu. Địa điểm sản xuất hạt giống thanh cao cần được cách ly với những khu vực nông dân có sản xuất giống, đặc biệt là gần vùng thanh cao mọc hoang dại. Khoảng cách ly tối thiểu là 500 m.

Chọn đất và chuẩn bị đất

Đất trồng sản xuất hạt giống cần phải tránh bị úng ngập, nhất là vào mùa mưa bão (từ tháng 5 đến tháng 7). Đất có độ phì trung bình, để khi hạn có thể tưới nước, độ pH từ 5,0 – 7,0.

Đất phải chuẩn bị rất kỹ, cầy sâu 10 cm – 15 cm để ải càng tốt, bừa nhỏ, nhặt sạch cỏ dại. Luống lên cao từ 15 cm – 20 cm, mặt luống rộng 70 cm – 80 cm để thuận tiện cho việc kiểm tra cỏ dại khi cây con còn nhỏ. Đáy luống 1,20 m – 1,40 m. Cần làm mặt luống phẳng, tránh hạt thanh cao chìm sâu trong đất, không có khả năng nảy mầm.

Làm đất vườn ươm: Đất được chuẩn bị rất kỹ, đập nhỏ, làm thật phẳng và chặt mặt luống, tránh hạt thanh cao lọt sâu không còn có khả năng mọc.

Gieo hạt giống

Hạt thanh cao rất nhỏ nên rất cẩn thận khi gieo. Lượng hạt giống để gieo cho 1 sào Bắc Bộ vườn ươm từ 150 gam đến 200 gam. Nếu hạt giống chuẩn, tỷ lệ nảy mầm bằng hoặc trên 80% thì một sào vườn ươm có thể đủ cây con trồng cho một hecta.

Khi gieo trộn hạt với cát, cứ 1 phần hạt trộn 4-5 phần cát, trộn đều, chia đều cho từng luống và gieo đi gieo lại mấy lần.

Sau khi gieo cần tưới đủ ẩm và luôn giữ đủ ẩm cho đất để hạt mọc đều và cây con phát triển tốt. Cần tưới nước bằng ô doa, loại có tia nước nhỏ và tưới thấp tay tránh hạt bị trôi dạt. Nếu tưới ngấm cũng cần chú ý hạt bị nước dâng nổi và trôi đi. Sau khi nước ngấm đủ mặt luống thì tháo nước dần, cho đến khi hết nước ở rãnh.

Bón phân

Thanh cao là cây phàm ăn, bộ rễ phát triển rộng nhưng nông, lượng phân bón dùng cho 1ha cần:

20 tấn phân chuồng + 140 kg N + 120 kg P_2O_5 + 80 kg K_2O

Chế độ bón phân: Toàn bộ phân chuồng, 2/3 phân lân, 1/4 phân đạm và 1/3 phân kali bón lót trước khi lên luống hoàn chỉnh. Lượng đạm còn lại chia bón 3-4 đợt, bón đạm đón nụ vào cuối tháng 9 và sau đó ngừng hẳn bón đạm. Số 2/3 phân kali còn lại bón vào nửa đầu tháng 9. 1/3 số phân lân còn lại bón vào nửa cuối tháng 8.

Mật độ trồng

Ruộng sản xuất giống thanh cao nên trồng ở khoảng cách 40 cm × 40 cm hoặc 40 cm × 50 cm. Nếu đất xấu khoảng cách trồng nhỏ hơn. Đất tốt khoảng cách trồng lớn hơn.

Thanh cao là cây thụ phấn chéo không hoàn toàn, thụ phấn nhờ gió nên ruộng sản xuất giống cần được bố trí thuận lợi cho việc thụ phấn của cây như thoáng gió, kích thước ruộng tương đối lớn, có hình vuông hoặc hình dáng tập trung.

Thời vụ gieo trồng

Hạt thanh cao được gieo trong khoảng thời gian từ 15/1 – 25/1 hàng năm. Sau khi hạt mọc từ 45 – 60 ngày, lúc cây có chiều cao từ 7 – 12 cm có thể đánh trồng.

Thời điểm và phương pháp thu hái

Nếu chọn phương pháp thu hái 1 lần, chặt cả cây thì thời điểm thu hái từ 10/11 – 25/11. Nếu chọn phương pháp thu nhiều lần theo từng cấp cành thì đợt 1 thu 1/3 số cành gốc vào ngày 10/11; lần thứ 2 thu 1/3 số cành ở giữa thân cây vào thời điểm 20/11 và lần cuối là số cành trên cùng và ngọn cây thu vào ngày 1/12 hàng năm.

Hạt thanh cao nhỏ, dễ rụng nên khi thu hái phải dùng kéo chuyên dụng hoặc liềm cắt cành cho vào thúng hoặc bạt, vải hoặc bao tải đem về ủ một đêm; sau đó phơi nắng, đập cho hạt rụng, loại bỏ lá, cành non và tạp chất khác.

Tiếp tục loại bỏ mày hạt, hạt lép và các tạp chất nhỏ khác bằng cách dùng sàng lắc tròn để mày hạt, cành hoa xoay vào giữa và dùng tay hớt bỏ đi. Sàng xoay và có thể kết hợp quạt nhẹ nhiều lần loại bỏ hết các tạp chất có màu vàng. Khi chỉ còn lại hạt, thấy có màu xám tàn thuốc lá là được. Năng suất của hạt giống TC_1 đạt từ 220 đến 250 kg/ha.

Phơi lại hạt cho khô đến lúc ẩm độ trong hạt chỉ còn 7 – 8%, để nguội, đóng gói 2 lớp, lớp trong là túi PE hàn kín. Đưa hạt vào bảo quản ở kho lạnh. Nếu để ở kho bình thường hạt thanh cao thường chỉ duy trì được tỷ lệ nảy mầm trên 50% sau một năm. Sang cuối năm thứ 2 bảo quản thì tỷ lệ hạt thanh cao nảy mầm chỉ còn 5-10%. Nếu bảo quản trong kho lạnh ($t = 15^oC$, ẩm độ 45 – 50%) có thể duy trì tỷ lệ nảy mầm của hạt thanh cao ở mức cao (trên 50%) trong giới hạn 3 năm.

Kỹ thuật trồng cây thanh cao thu hoạch dược liệu (lấy lá)

Chọn đất và chuẩn bị đất

Cây thanh cao có phạm vi thích ứng rộng đối với nhiều loại đất, đồng bằng, trung du và các đồi núi thấp. Đất có độ phì từ trung bình đến màu mỡ. Đất dễ tưới tiêu, đặc biệt dễ thoát nước. Độ pH trung bình từ 5,0 – 7,0.

Cày sâu từ 10 cm – 15 cm để ải, bừa nhỏ, lên luống cao 15 cm – 20 cm,mặt luống 70 cm – 80 cm,đáy luống 1,20 m – 1,40 m. Cần làm mặt luống cao ở giữa để dễ thoát nước.

Làm đất vườn ươm: Hạt thanh cao rất nhỏ, ngoài yếu tố nhiệt độ, độ ẩm, hạt thanh cao cần có tác động trực tiếp của ánh sáng mới nảy mầm, nên đất vườn ươm để gieo hạt phải được chiếu sáng tốt.

Đất để ải, bừa và đập nhỏ, mặt luống tuyệt đối phẳng dùng vồ hoặc đòn tre dập bằng mặt luống. Hạt gieo đều 150 gam – 200 gam hạt trên một sào Bắc Bộ (360 m^2) và đủ trồng 1 hecta ruộng sản xuất dược liệu.

Dùng đất bột hoặc cát trộn với hạt gieo nhiều lần để hạt được rải đều, không cần thiết phải lấp đất. Gieo xong tưới nước ngay, nên tưới bằng ô doa, tưới thấp tay để phòng trôi hạt. Luôn giữ đủ ẩm cho ruộng giống. Sau 6 – 8 ngày gieo hạt mọc.

Thời vụ gieo trồng

Thời vụ gieo hạt tốt nhất từ 15/1 đến 30/1. Sau khi mọc 45 ngày - 60 ngày có thể dánh cây con đi trồng.

Mật độ khoảng cách trồng

Tuỳ chân đất tốt xấu để lựa chọn khoảng cách trồng phù hợp, khoảng cách tốt nhất là 20 cm × 30 cm (mật độ 16,6 vạn cây/ha).

Chế độ phân bón

Lượng phân: 20 tấn phân chuồng + 140 kg N + 60 kg P_2O_5 + 30 kg K_2O

Cách bón:

Bón lót: Dùng 20 tấn phân chuồng + 30 kg P_2O_5 bón trước khi trồng cây (lên luống sơ bộ, bón phân đều xuống luống rồi lên luống hoàn chỉnh để lấp kín phân).

Bón thúc: Phân đạm: Chia đều, bón 4 lần:

- Lần 1: Sau khi trồng 1 tháng.
- Lần 2: Sau lần 1: 25 đến 30 ngày.
- Lần 3: Sau lần 2: 15 đến 20 ngày.
- Lần 4: Trước thu hoạch 3 tuần.

Phân lân: Bón nốt 30 kg P_2O_5 còn lại vào giữa hai lần bón đạm (lần 2 và 3)

Phân kali: Bón toàn bộ phân kali vào giữa 2 lần bón đạm (lần 3 và 4).

Chăm sóc, xới xáo và làm cỏ

Thời kỳ cây con, cây thanh cao phát triển chậm, thường bị cỏ dại lấn át nên chú ý làm cỏ và bắt sâu xám cắn hại.

Khi đã trồng ra ruộng sản xuất, gặp nắng ấm cây phát triển nhanh nên chỉ cần 2 lần làm cỏ và vun gốc. Sau đó cây khép tán không một loại cỏ dại nào có thể cạnh tranh được.

Cây trồng luân canh

Thanh cao là cây phàm ăn, sinh khối lớn nên trồng rất hại đất, vì thế phải áp dụng chế độ luân canh theo công thức:

- Cây họ đậu (đâu tương, đậu Côve) - thanh cao - lúa nước.
- Cây có củ (khoai tây,ngưu tất) - thanh cao - lúa nước.

Sâu bệnh và biện pháp phòng trừ

Thanh cao thường bị sâu xám cắn hại lúc cây ở vườn ươm hoặc cây còn nhỏ ở ruộng sản xuất. Có thể dùng tay bắt hoặc rắc Basudin từ 40 - 45 kg/ha.

Sâu xanh, rệp xanh, rệp đỏ và bọ xít cũng thường gây hại thanh cao, nên dùng các thuốc có gốc lân hữu cơ để phòng ngừa, như Methyl Paration, Foster...

Bệnh thối nâu dùng Zineb 80 nồng độ 1/500 để phòng trừ.

Thu hoạch, chế biến và bảo quản dược liệu

Thời điểm thu hoạch tốt nhất từ 15/7 đến 25/7 hàng năm.

Chặt cây từ sáng sớm, hoặc chiều tối hôm trước phơi trực tiếp tại ruộng, chiều tối hoặc sáng sớm ngày hôm sau mang cả cây về sân phơi. Khi lá đã khô giòn, dùng đòn đập cho lá khô rời khỏi cành, phơi đến khi ẩm độ xấp xỉ 12% thì dùng sàng, sảo tách lá ra khỏi các tạp chất khác như cọng, cành, đất cát v.v... Đóng bao dược liệu và cho vào kho bảo quản, thông thường mỗi bao đựng khoảng 15 – 20 kg dược liệu.

2.4.2. Kỹ thuật trồng cây ngưu tất

Tên khoa học: *Achyranthes bidentata* Blume.

Họ thực vật: Họ rau Dền - Amaranthaceae.

Tên Việt Nam: Ngưu tất

Chuẩn bị cho một vụ trồng

Chuẩn bị đất:

Đối với ngưu tất trồng lấy dược liệu, nên chọn đất phù sa ven sông, đất thịt nhẹ, đất có tầng canh tác dày, thoát nước tốt và nước tưới thuận lợi.

Chuẩn bị hạt giống:

Hạt giống cần phải được chuẩn bị tốt, trước khi vào vụ gieo trồng cần thử lại tỷ lệ mọc mầm để xác định lượng hạt gieo, thông thường loại hạt giống có tỷ lệ mọc mầm trên 80%, thì 1ha gieo trồng cần 8 – 9 kg hạt.

Chuẩn bị phân bón:

- Phân chuồng hoai mục : 500 kg/sào (360 m^2) – 14 tấn /ha
- Phân NPK (theo tỷ lệ: 5 - 10 - 3%) : 35 kg/sào – 1000 kg/ha
- Thuốc phòng trừ sâu bệnh : 20.000 đ/sào- 560.000 đ/ha

Các vật tư kỹ thuật khác:

- Rơm rạ che phủ 50 kg/sào – 1200 - 1500 kg/ha.
- Diêm sinh để sấy dược liệu 2,5 - 3 kg/sào – 75 - 80 kg/ha.

Kỹ thuật gieo trồng làm dược liệu

- Thời vụ trồng: Thời vụ gieo trồng tốt nhất từ 15/9 đến 15/10.

- Làm đất: cày 2 - 3 lần để đất có độ sâu 35cm, bừa kỹ làm nhỏ đất, nhặt sạch cỏ dại, cày chia luống rộng 1,4 m, lên luống sơ bộ, rải đều toàn bộ lượng phân chuồng lên mặt luống, sau đó lên luống tiếp, vét sạch rãnh để luống đạt độ cao 40 cm, san phẳng và đập nhỏ đất mặt luống.

- Gieo hạt: Rải đều hạt lên mặt luống với lượng 8 - 9 kg/ha, gieo xong phủ rơm rạ (hoặc trấu) và tưới ẩm hàng ngày bằng thùng tưới có doa. Nếu đủ ẩm chỉ sau 5-6 ngày là hạt mọc mầm, cần rỡ bỏ rơm rạ ngay để cây không bị yếu.

- Chăm sóc: Yêu cầu đất thường xuyên đủ ẩm, nếu gặp hạn lâu ngày có thể tưới ngấm ở những chân ruộng đất thịt nhẹ. Cách làm: tháo nước vào rãnh luống, ngập 2/3 chiều cao của luống, để nước ngấm lên trên mặt luống (sau 1 đêm), khi thấy đủ ẩm cần tháo kiệt nước ngay.

- Sau khi mọc 20 - 25 ngày cây có 2 đôi lá thật, cần tiến hành làm cỏ, tỉa cây, để khoảng cách giữa các cây 4 - 5cm, kết hợp với bón thúc phân NPK lượng phân 10 kg/sào, cách làm: rắc đều lượng phân trên luống, dùng cành cây khỏa nhẹ để phân rơi xuống gốc, sau đó tưới nước lã để phân không làm chết cây.

- Khi cây được 4 đôi lá cần làm cỏ và tỉa cây đợt 2, để khoảng cách giữa các cây từ 6-7cm. Bón thúc phân NPK với lượng 20 kg/sào.

- Khi cây được 6 đôi lá; làm cỏ, tỉa định cây để mật độ 8 - 10 cm; bón thúc số phân NPK còn lại (5 kg/sào).

- Khi cây ra hoa cần phát bỏ ngọn để tập trung dinh dưỡng vào củ.

Phòng trừ sâu bệnh

- Sâu, bệnh hại xuất hiện ở thời kỳ cây non và cây trưởng thành, phòng trừ như sau:

- Phòng trừ sâu: sâu xám cắn mầm non, bắt bằng tay vào sáng sớm. Sâu cuốn lá, sâu xanh, rệp hại lá cây trưởng thành dùng thuốc Sherpa 25% hoặc Tập kỳ với nồng độ 1 phần nghìn.

- Bệnh lở cổ rễ hại cây lúc mới trồng, phòng tránh bằng cách giữ độ ẩm vừa phải, ruộng luôn sạch cỏ dại, tỉa cây đúng lúc, không để cây mọc quá dày, không để đất và quần thể cây quá ẩm.

Thu hoạch, sơ chế và bảo quản dược liệu

Ngưu tất có thể thu hoạch khi đạt 135 - 140 ngày tuổi. Chọn ngày khô ráo, cắt bỏ thân cây trên mặt đất, dùng cuốc, thuổng để đào, tránh làm đứt rễ ảnh hưởng đến năng xuất và thương phẩm dược liệu. Sau khi thu hoạch, cắt bỏ gốc

cây, phơi qua nắng cho mềm, rửa thật sạch, xông sinh để chống mốc và phơi nắng đến khô là được. Cách xông diêm sinh như sau: Nếu không có lò sấy diêm sinh chuyên dùng có thể lấy lá cót ép hoặc 2 lần cót thường quây vòng tròn có đường kính khoảng 1m, dưới có hầm đốt diêm sinh. Dùng thùng ô doa tưới nước trên đống dược liệu cho đều, sau đó xếp dược liệu vào lò, dược liệu to ở phía dưới, nhỏ phía trên, đậy kín bằng nong nia, hoặc bao tải, hoặc nilong để khi xông sinh khói sinh không bay ra ngoài. Đốt diêm sinh trong hầm lò và bịt cửa lò lại để khói sinh bốc lên đều trong khối dược liệu. Sau khi xông sinh 18 - 20 tiếng, mang ra phơi nắng đến khô, thuỷ phần còn khoảng 12% là được (thông thường 100 kg dược liệu tươi cần 1 kg diêm sinh). Lưu ý khi xếp ngưu tất dùng 3-4 ống tre tròn dài bằng chiều cao lò cắm xuống đáy lò xếp dược liệu xung quanh cọc, sau đó rút lên để tạo lò thông khói từ đáy lò lên miệng lò.

Sau khi phơi khô phân loại củ to và nhỏ riêng, bó thành từng bó nhỏ. Bảo quản trong túi nilông ngoài bao tải, hoặc bảo quản trong chum, vại đậy kín. Thường xuyên kiểm tra để phát hiện côn trùng và nấm mốc gây hại.

Tiêu chuẩn, chất lượng dược liệu

- Củ ngưu tất đạt chất lượng thương phẩm phải có chiều dài 20 - 30 cm, đường kính 0,5 - 1 cm. Hơi mềm, đầu trên mang vết tích của cổ rễ, đầu dưới hơi thuôn nhỏ. Mặt ngoài màu vàng đất hay nâu nhạt. Mùi thơm nhẹ, vị hơi ngọt, hơi đắmg và the.

Hiệu quả kinh tế xã hội và khuyến nghị sản xuất

- Ngưu tất là cây dễ trồng, dễ để giống, có khả năng thâm canh cho năng suất cao (3 - 3,5 tấn/ha), thích nghi rộng với nhiều loại khí hậu, đất đai.

- Là cây vụ đông, ngắn ngày, thời gian sử dụng đất ngắn dược liệu hàng năm được sử dụng với khối lượng tương đối lớn (100 – 150 tấn/năm). Đầu tư chi phí cho sản xuất ít nên giá trị lợi nhuận của người nông dân trồng ngưu tất tương đối cao. Cần có biện pháp phát triển trồng và ổn định diện tích trồng ngưu tất cho từng năm.

Giá trị sử dụng làm thuốc, giá trị kinh tế

Ngưu tất có tác dụng chống viêm, hạ cholesterol máu, hạ áp, gây co bóp tử cung. hữa thấp khớp, đau bụng, bế kinh, huyết áp cao, đái buốt ra máu, đẻ khó hoặc nhau thai không ra, chấn thương tụ máu, viêm họng. Ngày dùng 6 - 12 g dưới dạng thuốc sắc.

2.4.3. Kỹ thuật trồng cây sả chanh

Ở nước ta, nhiều nơi gọi nhóm sả cho citral là sả chanh. Các loài tiêu biểu trồng ở nước ta có tên khoa học là: *Cymbopogon tortilis* và *Cymbopogon flexuosus*.

Thuộc họ Lúa: Poaceae (gramineae).

Nguồn gốc thực vật và sự phân bố

Các loài sả chanh thuộc chi *Cymbopogon* thường có mặt ở khắp vùng nhiệt đới và cận nhiệt đới. Riêng giống sả *C.tortilis* và *C. flexuosus* được trồng ở Ấn Độ, Guatemala, Honđuras, Haiti và một số nước khác. Sả chanh được trồng hầu hết ở khắp các tỉnh phía bắc nước ta, tập trung ở một số nông trường như Việt Trung (Quảng Bình), Thạch Ngọc (Nghệ Tĩnh), Cửu Long (Hà Sơn Bình), Bắc Sơn (Bắc Thái) v.v... Sau năm 1975 cây sả còn được đưa nghiên cứu và trồng trọt ở các tỉnh phía nam như miền Đông Nam Bộ, Tây Nguyên v.v...

Đặc tính sinh vật học và điều kiện sinh thái

Mô tả

Sả chanh là loại cỏ sống lâu năm, mọc thành bụi, cao từ 0,8 – 1,5 m. Thân rễ trắng hay hơi tím. Lá hẹp dài giống như lá lúa, mép hơi nhám. Cụm hoa gồm nhiều bông nhỏ không cuống. Toàn cây có mùi thơm đặc biệt mùi sả.

Sinh trưởng và phát triển

Ở nước ta cây sả sinh trưởng và phát triển mạnh vào cuối mùa xuân đến đầu mùa thu. Trong mùa đông cây phát triển rất kém.

Điều kiện sinh thái

Sả là cây chịu hạn nhưng chịu ngập úng kém. Nhiệt độ thích hợp đối với cây sả là 24 - 28°C. Cây sả phát triển kém khi nhiệt độ dưới 10°C. Trên 35°C sả cũng sinh trưởng kém. Lượng mưa thích hợp là 1500 - 2000 mm/năm.

Giá trị sử dụng làm thuốc, giá trị kinh tế

Tinh dầu sả dùng làm thuốc giúp tiêu hoá, đuổi muỗi, còn dùng trong công nghiệp chất thơm, làm nước hoa, xà phòng thơm... lá sả dùng pha nước uống cho mát và tiêu. Củ sả có tác dụng thông tiểu tiện ra mồ hôi chữa cảm sốt.

Sả chanh là cây cho năng suất chất xanh cao từ 25 - 30 tấn/ha/năm, với hàm lượng tinh dầu 0,7 - 0,8% lá tươi – sả là cây có giá trị kinh tế cao cả về giá trị sử dụng trong nước và sản xuất tinh dầu xuất khẩu.

Kỹ thuật trồng

Chuẩn bị trước khi trồng

Chuẩn bị đất

Đất thích hợp cho sinh trưởng và phát triển cây sả là các loại đất đỏ, đất phù sa cổ và một số đất xám khác. Sả sinh trưởng tốt trên các đất tơi xốp, có độ sâu trên 30 cm, thoát nước dễ dàng. Sả phát triển tốt trên đất bằng, có thể trồng trên đát dốc nhưng độ dốc không quá 15 độ. Độ chua thích hợp pH = 6 - 7

Chuẩn bị giống

Tép sả giống khi đem trồng phải được chọn lựa kỹ để bảo đảm độ nảy mầm, độ đồng đều và không mang nguồn sâu bệnh. Độ dài tép sả từ 30 đến 40 cm, bóc lớp lá khô, bó thành từng bó 50 tép, dùng lạt buộc ngang thân, không buộc ở ngọn để tránh dập gãy tép sả. Tép sả trước khi trồng cần được ủ cho nảy mầm. Để ủ, tép sả được đặt thành từng lớp mỏng (không đặt thành đống) trên đám đất ẩm, tưới nước đều đặn vào sáng sớm và chiều tối, chú ý che nắng cho các tép sả. Sau 3 - 6 ngày ở gốc bắt đầu ra rễ, khi rễ nhú dài bằng nửa hạt thóc là đem trồng, không nên để rễ quá dài.

Phân bón

Sả là cây sinh trưởng mạnh cần lượng phân bón lót khá lớn. Phân chuồng 20 - 25 tấn, phân supe lân 400 kg cho một ha.

Các vật tư khác

Nếu có điều kiện chuẩn bị bã sả, cây phân xanh hoang dại để ủ gốc cho sả sau khi trồng để giữ ẩm, tăng chất dinh dưỡng, duy trì và kích thích hoạt động của tập đoàn vi sinh vật có ích.

Giống và sản xuất giống

Các giống hiện trồng ở Việt Nam

Giống sả chanh được trồng từ lâu ở Việt Nam là *Cymbopogon citratus* (DC) stapf. Giống đã thu thập ở Hà Bắc, Bắc Thái, Vĩnh Phú, Nghệ Tĩnh, Thanh Hoá, Thành phố Hồ Chí Minh. Các giống sả chanh nhập nội từ Ấn Độ về như: *Cymbopogon flexuosus* Stapf. – ký hiệu OD19 được nhập năm1988. Ngoài ra còn tuyển chọn các dạng tương tự với một số đặc điểm hình thái và mục đích sử dụng khác nhau như giống *C.* f. stapf.- R.R.L.62 hay *C.* f. stapf. - OD19 - sesion-269. Giống sả chanh Ấn Độ *C. tortilis* (preal). *A. Camus*. Theo giáo sư C. K. Atal cho biết loài này có thể là *C. Pendulus*.

Kỹ thuật sản xuất giống

Hình thức sinh sản

Sả chanh sinh sản vô tính bằng cách tách các tép sả ở gốc cây trồng cũ đem trồng.

Chọn lọc duy trì

Sả dùng làm giống tốt nhất có độ tuổi từ 1,5 – 2 năm. Chọn tép sả to, đốt ngắn, tép cứng, không sâu bệnh.

Kỹ thuật sản xuất giống

Trong một số trường hợp người ta tiến hành giâm sả trước khi trồng. Thông thường khi các tép sả đem trồng ngay thì không cần giâm. Nhưng khi phải vận chuyển đi xa, có khi đến 7- 8 ngày sau khi tách tép sả mới trồng. Trường hợp này người ta giâm tép sả trước khi trồng.

- Đất để giâm tép sả cần được chuẩn bị kỹ, đất mịn, tơi, có đủ độ ẩm, cày sâu 20 cm, rạch hàng sâu 14 - 16 cm, hàng cách hàng 30 cm, các tép sả cách nhau 2 cm. Khi cần tủ gốc, che nắng, tưới nước vào buổi sáng và buổi chiều. Sau khi tép sả ra rễ đem đi trồng hoặc dùng để dặm ở những ruộng không đảm bảo mật độ.

- Tiêu chuẩn giống cho sản xuất: Cây giống tốt nhất có độ tuổi 1,5- 2 năm tép sả mập, bẹ dài, khoẻ. Độ dài tép sả 30 - 40 cm. Gốc thân 4-5 cm phiến lá trên 3 - 5 cm.

Kỹ thuật trồng thu dược liệu

Thời vụ trồng sả khác nhau ở các tỉnh phía Bắc và phía Nam. Ở các tỉnh phía Bắc có 2 thời vụ trồng: Vụ chính là vụ xuân và bổ sung là vụ thu.

Các tỉnh đồng bằng và trung du phía Bắc trồng sả trong tháng 2 và tháng 3. Các tỉnh vùng khu bốn có gió nóng trồng sả bắt đầu từ 30/1 đến 30/3. Các tỉnh Tây Bắc và vùng núi phía Bắc trồng từ 10/2 đến 20/4. Các tỉnh miền Nam trồng trước mùa mưa, tháng 6, 7.

- Làm đất lên luống:

Cày 2 lần sâu 20-25 cm, bừa 3 lượt cho tơi đất,nhặt sạch cỏ, làm phẳng mặt ruộng. Ở nơi đất dốc rạch hàng theo đường đồng mức. Cách 50 m bố trí 1 đường mương và bờ đất để cắt dòng chảy hạn chế xói mòn. Nơi đất bằng lên luống ruộng rộng 3 - 5 m, rạch hàng theo hướng đông - tây và bố trí hệ thống mương thoát nước chống úng.

- Trồng sả:

Trước lúc trồng nếu gốc quá dài chặt bớt để còn lại 4 - 8 cm. Sau đó chấm gốc sả vào hố phân rồi đem trồng. Ở các tỉnh phía Bắc trồng sả vào mùa xuân có nhiều mưa phùn, độ ẩm không khí cao, sả chóng bén rễ nên để gốc 4 - 5 cm là vừa. Nhưng ở các tỉnh phía Nam, trồng sả trong mùa mưa, cần để rễ cái dài 8 - 9 cm, khi mưa to đất không lấp nõn sả, không làm thối nõn làm cho tỷ lệ sống của sả bị giảm. Hố phân để chấm gốc đào ở nơi trồng. Phân chuồng hoai mục 60% khối lượng trộn với 40% khối lượng đất bột để tạo thành hồ sền sệt chấm gốc tép sả đã được ủ nảy mầm trước khi đem trồng. Mật độ trồng sả tuỳ thuộc vào độ màu mỡ của đất. Nơi đất tốt trồng thưa. Nơi đất xấu trồng dày hơn. Những nơi xen canh cây Họ Đậu có thể trồng thưa và khoảng cách giữa các hàng cây rộng hơn. Có thể áp dụng các mật độ sau:

- 80 – 85 cm × 50 – 55 cm – 1 ha có 24.000 – 25.000 bụi (2 tép/bụi)
- 90 – 100 cm × 60 – 70 cm – 1 ha có 20.000 – 22.000 bụi (2 tép/bụi)
- 120 – 60 cm – 1 ha có 14.000 bụi (2 tép/bụi)

Tép sả được đặt thẳng đứng (nơi ít gió) hoặc nghiêng 60^0 (nơi nhiều gió) mỗi gốc trồng 2 hoặc 3 tép sả. Sau khi đặt tép sả cần lấy đất mịn lấp kín đất kín phân, giậm chặt gốc không để đất lấp mất nõn. Yêu cầu của việc trồng sả là đặt sâu, lấp nông, giậm chặt. Sau khi trồng ủ gốc, tưới nước cho sả. Chăm sóc sả năm thứ nhất: Sau khi trồng 20 ngày cần kiểm tra mật độ, trồng dặm ngay những khóm chết, sót. Sau khi trồng 45 ngày tiến hành xới phá váng, diệt cỏ dại, cày bừa bón phân 2 lần: lần 1 sau khi thu hoạch lứa đầu, lần 2 bón vào tháng 9. Để bón phân tiến hành cày rạch 2 đường cách gốc sả 20 cm, cày chín đất, lật đều. Bón 300 kg amoni sulfat năm đầu, các năm sau bón 400 kg (amoni sulfat). Phân kali clorua bón 100 kg/năm cùng với phân đạm. Sau khi bón phân xong tiến hành bừa lấp phân.

Chăm sóc ở các năm tiếp theo: Cày bừa, bón phân qua đông vào tháng 11, 12 cách 3 đường ở giữa 2 hàng sả. Rải phân hữu cơ và lân xong bừa lấp kín phân. Cày bừa, bón phân vô cơ 4 lần vào các tháng 4, 6, 8, 10. Không nên bón thúc phân vô cơ vào các ngày nắng nóng hay mưa rào.

Sả là cây không chịu được úng, cho nên việc chống úng cho sả là một biện pháp thâm canh có hiệu quả cao. Sau các trận mưa lớn cần tiến hành tiêu nước cho sả kịp thời.

- Bón phân:

Phân chuồng bón lót 20 tấn, các năm về sau bón qua đông 10 tấn /ha. Phân lân năm thứ nhất bón 400 kg supe lân, lót toàn bộ. Những năm tiếp theo bón 300 kg supe lân, bón qua đông cùng với phân chuồng.

Phòng trừ sâu bệnh

Thực hiện tốt công tác vệ sinh đồng ruộng để phòng trừ sâu bệnh. Sau mỗi lần thu hoạch, dọn hết các lá sả và cây sả trên đồng ruộng, đem ra khỏi ruộng đốt hoặc vùi sâu xuống đất. Thường xuyên kiểm tra ruộng sả để phát hiện sâu bệnh kịp thời. Ở vùng trung du phía Bắc đáng chú ý có sâu đục thân và bệnh khô lá. Khi phát hiện sâu bệnh cần tiến hành phòng trừ kịp thời bằng các loại thuốc đặc trị trên thị trường.

Thu hoạch, chưng cất và bảo quản dược liệu

Thu hoạch cũng là một trong những biện pháp thâm canh tăng năng suất sả.

Lá sả là nơi tập trung tinh dầu, vì vậy khi thu hoạch cần chú ý kỹ thuật cắt lá. Lá sả cần được thu hoạch lúc trời nắng, lá khô, tiến hành thu hoạch trong khoảng thời gian từ 8 giờ sáng đến 16 giờ. Không nên thu hoạch khi lá sả bị ướt việc bảo quản sẽ khó khăn và hàm lượng tinh dầu bị ảnh hưởng. Có thể căn cứ vào một số yếu tố sau đây để xác định tthời gian thu hoạch sả: Lứa đầu cắt sau khi trồng 4 - 6 tháng, lứa tiếp theo tiến hành cắt sau lứa đầu 35 - 45 ngày. Thời gian cắt lứa đầu và các lứa sau phụ thuộc vào tốc độ sinh trưởng và phát triển của cây sả. Quá trình này chịu ảnh hưởng của đặc tính giống, độ màu mỡ của đất, kỹ thuật chăm sóc và điều kiện khí hậu thời tiết.

- Khi phần khô trên đầu ngọn lá có chiều dài 3 - 5 cm là thu hoạch tốt.

- Khi các tép sả có từ 6 lá trở lên là thu hoạch được.

- Khi lá sả uốn cong 45 độ so với mặt phẳng ngang.

Trong thực tế không nhất thiết phải đủ các yếu tố trên mới thu hoạch mà tuỳ theo tình hình cụ thể, có khi chỉ cần 2 - 3 yếu tố cũng đã thu hoạch tốt. Ở nước ta thường căn cứ vào thời gian trồng, hoặc thu hoạch đợt trước và độ khô ngọn lá. Thu hoạch đúng lúc vừa đảm bảo năng suất lá và tinh dầu cao, vừa tạo điều kiện để sả tiếp tục phát triển tốt sau khi cắt lá.

Cắt sả ở chiều cao 3-4 cm trên nhánh 3 là tốt nhất. Cắt thấp, lứa sả sau có lá xấu, vàng, năng suất thấp. Liềm cắt lá cần sắc bén, khi cắt nếu dụng cụ không sắc sả bị tua lá, ảnh hưởng đến sinh trưởng về sau. Trong một bụi sả các tép sả có thể phát triển không đều nhau, tép cao, tép thấp do đó nhánh 3 của các tép không cùng ở một mặt phẳng, như vậy lúc cắt tránh vơ cả bụi sả để cắt một lát theo mặt ngang, mà vừa lựa chiều nghiêng liềm cắt theo chóp mũ.

Sau khi thu hoạch lá sả mang về nơi tập trung chờ chưng cất tinh dầu cần được bảo quản tốt, nếu không năng suất và chất lượng tinh dầu sẽ giảm nhiều.

Có hai cách bảo quản: Bảo quản lá sả tươi và bảo quản lá sả đã bị héo. Đối với lá tươi, lá sả đem về phải rải mỏng, lớp lá không dày quá 30 cm. Cứ sau 3 giờ phải đảo một lần. Có thể buộc lại từng nắm nhỏ để dựng đứng hoặc buộc thành từng bó to và dựng lên. Cần bảo đảm sao cho lá sả không vàng úa. Có thể làm giàn che nhiều tầng để xếp lá sả tiết kiệm diện tích mặt bằng. Các tầng của giàn cách nhau 40 cm. Thời gian bảo quản lá sả tươi không nên quá 48 giờ.

Bảo quản lá sả héo là lúc lá sả đã được làm giảm hàm lượng nước đến 20% khối lượng, có thể làm héo ở trong nhà hoặc phơi nắng. Khi làm héo trong nhà cần có các phòng sạch và thoáng, nền nhà có thể bằng đất hoặc bằng gạch. Rải lá sả thành một lớp mỏng, chiều dày không quá 20 cm, cứ sau 3 giờ đảo một lần. Phơi nắng lá sả có thể tiến hành ngay tại ruộng. Sả cắt xong đem rải mỏng thành từng luống trên ruộng. Cũng có thể chuyên chở về phơi trên các bãi cỏ sân phơi. Nắng tốt thời gian phơi có thể chỉ cần 4 giờ. Sau khi héo, lá sả được đưa vào nhà cất giữ để chưng cất tinh dầu.

- Chưng cất tinh dầu: chưng cất tinh dầu là dùng hơi nước kéo tinh dầu ra khỏi lá. Hơi nước mang theo tinh dầu đi ra khỏi nồi nấu theo vòi dẫn rồi được ngưng tụ khi đi qua bộ phận làm lạnh, thu lại dưới dạng tinh dầu thô. Thời gian chưng cất một mẻ kéo dài 2,5 - 3 giờ kể từ lúc bắt đầu ra dầu. Lượng nước thu được có khối lượng tương đương với khối lượng lá sả, một kilôgam lá cần có một lít nước ngưng tụ. Tinh dầu thu được sau khi sơ chế còn có lẫn một phần nước và một số tạp chất có ảnh hưởng xấu đến chất lượng tinh dầu vì vậy cần được lắng đọng trước khi cất giữ. Tinh dầu sau khi lọc cho vào thùng để cất giữ. Thùng cần được rửa sạch và không lẫn tinh dầu khác. Có thể dùng xút để rửa thùng, sau đó rửa lại 2 - 3 lần bằng nước nóng, phơi nắng cho khô. Trước khi cho dầu vào thùng sạch rửa qua một lần tinh dầu cùng loại. Tinh dầu cũ để tráng thùng cho vào nồi để chưng cất lại. Cho tinh dầu vào thùng chứa không nên đổ đầy quá, cần để chừa một khoảng trống, phòng khi thay đổi áp suất trong thùng hoặc thay đổi khối lượng tinh dầu. Sau đậy nút chặt cho vào kho bảo quản.

Kho tàng cần xây cao ráo, sạch sẽ, thoáng, tránh gần nguồn lửa và hơi nóng.

Tiêu chuẩn, chất lượng dược liệu

Sả chanh có hàm lượng tinh dầu từ 0,5% - 0,65% trọng lượng tươi hay 1,21%-1,58% trọng lượng khô của lá sả. Thành phần tinh dầu gồm citral A- 8,74%, citral B- 56,13% - Citral tổng số là 64,87%.

Hiện nay trên thị trường yêu cầu phổ biến đối với tinh dầu sả chanh, hàm lượng citral đạt 70%. Tinh dầu ngoại hạng là loại chứa 80% - 85% citral.

Chỉ số hoá lý của tinh dầu sả chanh 70% - 80% citral như sau:

Tỷ trọng: d ở 25°C = 0,8760 – 0,8880

Quang cực: X = - 0,4° – 1,8°

Chiết quang: = 1,4830 – 1,4877

Tan trong 2 - 3 thể tích cồn.

Hiệu quả kinh tế xã hội và khuyến nghị sản xuất

Sả chanh là cây dễ trồng thích nghi với nhiều loại đất đai, khí hậu khác nhau. Có khả năng thâm canh cho năng suất tinh dầu cao. Có nhu cầu tiêu thụ trong nước và xuất khẩu lớn. Trên thế giới các nước tiêu thụ tinh dầu sả chanh có thể nhóm thành ba khu vực với mức tiêu thụ hàng năm như sau: Tây Âu: 130 - 160 tấn/năm, Bắc Mỹ: 100 - 140 tấn/năm, Liên Xô (trước đây): 100 - 110 tấn/năm ngoài ra, Nhật tiêu thụ 35 tấn/năm và các nước khác 50 tấn/năm. Với những ưu thế trên sả chanh cần được chú trọng trong việc nghiên cứu ứng dụng và đẩy mạnh sản xuất trên quy mô lớn trong phạm vi cả nước.

2.4.4. Kỹ thuật trồng cây đương quy

Tên khoa học : *Angelica acutiloba* (Sieb.et.Zucc) Kitagawa.

Họ thực vật : Apiaceae.

Tên Việt Nam: Đương quy.

Nguồn gốc thực vật

Cây đương quy được nhập nội từ Nhật Bản vào Việt Nam từ năm 1990. Cho đến nay chưa tìm thấy đương quy mọc tự nhiên trong hệ thực vật Việt Nam. Ở Nhật Bản, đương quy mọc hoang ở các vùng Miti, Ibuki và vùng ven sông Hida. Đương quy được trồng và sử dụng nhiều ở Trung Quốc với loài *Angelica sinensis*, ở Triều Tiên và Nhật Bản trồng và sử dụng loài *Angelica acutiloba*.

Đặc tính sinh vật học và điều kiện sinh thái

Mô tả

Cây có chiều cao từ 75 - 100 cm khi ra hoa. Lá có cuống dài, có bẹ lá phía gốc, cuống lá màu tím nhạt, lá xẻ lông chim 3 lần, mép lá có răng cưa, không có lông, hoa tự hình tán kép, cánh hoa màu trắng. Hoa của bông trung tâm nở trước, sau đó lần lượt đến hoa ở cành cấp 1, cấp 2, cấp 3. Thứ tự các cấp cành nở hoa cách nhau từ 4 - 6 ngày. Quả bế đôi, thuôn dài 4 -5 mm, hẹp dần về phía

gốc. Tâm bì có gân, có 4 - 5 ống dẫn ở phần lưng, 4 chiếc ở mặt bụng. Rễ cọc có rễ phụ, toàn thân có mùi thơm đặc biệt.

Sinh trưởng và phát triển

Có thể chia sự sinh trưởng và phát triển của cây đương quy ra làm 2 thời kỳ cơ bản là sinh trưởng sinh dưỡng và sinh trưởng sinh sản:

- Giai đoạn sinh trưởng sinh dưỡng kéo dài từ khi cây mọc mầm, phát triển thành cây, tăng lên về số lượng và thành phần tế bào. Bộ lá quanh cổ rễ phát triển tối đa, sự sinh trưởng sinh dưỡng càng mạnh thì sự tích luỹ chất khô vào củ càng nhiều, vì vậy việc kéo dài thời gian sinh trưởng sinh dưỡng có ý nghĩa lớn trong việc tăng năng suất dược liệu cây đương quy.

- Giai đoạn sinh trưởng sinh sản là quá trình tiếp theo của sinh trưởng sinh dưỡng, biểu hiện từ khi cây ra ngồng, lúc này bộ lá quanh cổ rễ ngừng phát triển, mà hình thành những lá nhỏ trên thân. Rễ củ không tăng lên về khối lượng mà lại tiêu hao dinh dưỡng để nuôi hoa, quả, làm cho rễ củ bị hoá xơ và rỗng, không sử dụng làm dược liệu được. Khi kết thúc giai đoạn sinh trưởng sinh sản, là cây đương quy kết thúc một vòng đời. Quá trình sinh trưởng sinh sản thường xảy ra 3 - 4 tháng cuối trong đời sống của cây đương quy.

Giá trị sử dụng và giá trị kinh tế

Giá trị sử dụng

Rễ củ cây đương quy là một vị thuốc quý, không thể thay thế trong nhiều bài thuốc y học cổ truyền. Nó được dùng làm thuốc bổ, thuốc chữa bệnh phụ nữ, thuốc trị các bệnh thiếu máu, đau đầu, suy tim, gầy yếu, mệt mỏi, viêm khớp, tê liệt. Về chất lượng dược liệu, hàm lượng chất tan trong cồn 50^{0} trên 35%, vượt tiêu chuẩn ghi trong dược điển Nhật Bản, hàm lượng đường đơn 10 - 14%, hàm lượng polysaccharid 10 - 13%. .

Giá trị kinh tế

Cây đương quy có khả năng cho năng suất dược liệu cao. Nếu được thâm canh tốt năng suất đương quy có thể đạt 2,5 - 3 tấn dược liệu khô/ha, với giá bán hiện nay khoảng 20.000 đ/kg, 1 ha đương quy có thể thu được 25 - 30 triệu đồng.

Kỹ thuật trồng

Chuẩn bị trước khi trồng

Chuẩn bị đất

Đất trồng đương quy nên chọn đất pha cát, giàu mùn, tưới và tiêu nước thuận tiện. Cây đương quy sinh trưởng tốt trên đất có độ pH từ 5,5 đến 6,5.

Chuẩn bị giống

Hạt giống đương quy rất dễ mất sức mọc mầm, thời gian mọc mầm kéo dài từ 13 - 15 ngày, vì vậy, cần thử tỷ lệ mọc mầm trước khi gieo trồng. Thông thường nếu hạt có tỷ lệ nảy mầm từ 65 - 70% thì lượng hạt cần thiết cho 1 ha gieo thẳng từ 5 - 5,5 kg, nếu gieo trong bầu cần 2- 2,5 kg.

Chuẩn bị phân bón

Cần chuẩn bị 25 - 30 tấn phân chuồng hoai mục, 500 - 550 kg phân đạm urê, 600 - 650 kg supe lân, 250 - 250 kg kali sulfat và khoảng 1000 kg tro bếp.

Chuẩn bị khác

- Rơm rạ che phủ cho 1 ha gieo thẳng 1000 - 1500 kg.

- Diêm sinh để sấy dược liệu 40 - 50 kg.

- Các loại thuốc sâu như Basudin, Monitor, thuốc trừ nhện. Tuỳ theo chủng loại sâu xuất hiện và mức độ gây hại của chúng mà xử lý.

Giống và kỹ thuật sản xuất hạt giống

Các giống hiện trồng ở Việt Nam

Hiện nay ở Việt Nam chỉ có 1 loài đương quy duy nhất được trồng để lấy dược liệu *Angelica acutiloba* Kitagawa.

Kỹ thuật sản xuất hạt giống

Hình thức sinh sản

Đương quy được gieo trồng bằng hạt để lấy rễ củ làm dược liệu. Tuy nhiên khi cây đã ra hoa quả thì rễ củ không còn khả năng sử dụng làm thuốc, vì vậy cần có biện pháp sản xuất giống đương quy tốt để có hệ số nhân giống cao, giảm giá thành sản phẩm.

Chọn lọc duy trì

Việc chọn lọc hạt giống tốt duy trì hàng năm đối với cây đương quy là rất cần thiết, giống đương quy nhập từ Triều Tiên trước đây chỉ sau hơn 10 năm sản xuất, do không chọn lọc nên dễ bị thoái hoá hoàn toàn. Chọn lọc duy trì cây đương quy: Chỉ thu hạt giống ở những cây sinh trưởng từ 2 năm trở lên, hạt thu hoạch ở cành cấp 1, đã chín sinh lý hoàn toàn. Cần chọn những cây khoẻ mạnh không bị sâu bệnh, nở hoa vào tháng 3-4, quả chín vào tháng 5 - 6 để làm giống. Không thu hoạch hạt của những cây chín vào tháng 10 hàng năm.

Kỹ thuật sản xuất hạt giống

Sản xuất hạt giống đương quy chỉ được tiến hành ở vùng cao Sapa, hoặc những vùng có khí hậu tương tự. Thời vụ gieo hạt tốt nhất là vào đầu tháng 10 năm trước và trồng cây con vào tháng 2 - 3 năm sau.

Giai đoạn vườn ươm

Đất vườn ươm chọn nơi bằng phẳng, ít sỏi đá, tưới và tiêu nước thuận tiện. Đất cần được làm nhỏ, lên luống cao khoảng 25 cm, rộng 90 cm. Bón lót phân chuồng mục với lượng 12 tấn + 250 kg phân lân + 100 kg phân kali/ha. Rắc đều phân trên mặt luống, xáo nhẹ để trộn đều phân vào đất, san phẳng mặt luống, sau đó gieo đều hạt trên mặt luống, mỗi ha có thể gieo 20 - 21 kg hạt giống. Gieo xong, phủ rơm rạ kín mặt luống, tưới nước đủ ẩm thường xuyên. Sau khi gieo khoảng 15 - 18 ngày hạt bắt đầu mọc mầm, rỡ bỏ rơm rạ, sau một tháng có thể làm cỏ và tỉa bớt những chỗ hạt mọc quá dày. Khi cây được 4 - 5 lá, tỉa để cách cây 4 - 5 cm, khi cây có 6 - 7 lá tỉa để cách cây 8 -10 cm. Sau mỗi lần làm cỏ hoặc tỉa cây cần tưới thúc nước phân chuồng loãng. Đến khoảng cuối tháng 2 hoặc đầu tháng 3 đánh cây ra ruộng trồng.

Giai đoạn trồng và chăm sóc cây giống

Đất trồng cây lấy hạt giống nên chọn đất mới khai phá, hoặc đất đã trồng các cây họ đậu, cây ngũ cốc. Nếu trồng lại đất đã trồng cây đương quy, thời gian luân canh ít nhất là 3 năm. Chọn đất có độ dốc nhỏ, thoát nước tốt và chủ động. Đất cần được cày sâu, bừa kỹ, nhặt sạch gốc cỏ dại. Luống cần được đánh cao 30 - 35 cm, mặt luống rộng khoảng 90 cm. Bổ hốc trồng với khoảng cách 50 × 50 cm bón lót toàn bộ phân chuồng với lượng 25 - 30 tấn/ha, tro đốt khoảng 2,5 tấn/ha và phân supe lân 750 kg/ha. Cần đảo đều phân trong đất và lấp đất kín phân, nên trồng cây vào buổi chiều. Trồng xong phải tưới ngay để cây mau hồi xanh. Yêu cầu ruộng đồng phải thường xuyên sạch cỏ dại, đất đủ ẩm. Sau khi trồng được 2 tháng (tháng 5, 6) cần bón thúc phân với lượng 150 kg ure/ha + 560 kg kali. Vào cuối tháng 8, đầu tháng 9 bón thúc phân lần 2 với lượng 200 kg ure + 100 kg kali, kết hợp với vun gốc, tỉa bỏ lá già dưới gốc. Sang tháng 2 năm sau bón thúc lần cuối với lượng 150 kg ure + 150 kg kali/ha. Kết hợp với vun gốc và tỉa bỏ những lá gốc.

Phòng trừ sâu bệnh

Đương quy là cây phàm ăn, sinh trưởng mạnh, ít bị sâu bệnh phá hại. Tuy nhiên cũng có một số loại sâu bệnh hại sau:

- Sâu xám thường gây hại trên vườn ươm vào giai đoạn mới trồng, có thể bắt bằng tay hoặc phun thuốc trừ sâu vào buổi tối, hoặc sáng sớm.

- Rệp hại lá, hoa, quả, có thể phun thuốc Monitor với nồng độ 0,2 - 0,3%.

- Vào mùa mưa cây thường bị bệnh thối củ do ngập úng, hoặc ẩm độ cao, cần thoát nước triệt để và loại bỏ những cây bị bệnh.

Thu hoạch và bảo quản hạt giống

- Khi cây nở hoa cần ngắt bỏ những cành hoa cấp 3 để tập trung dinh dưỡng vào nuôi hạt ở cành cấp 1, cấp 2.

- Khi quả chín vàng, khoảng 55 - 60 ngày sau khi nở hoa, cạo vỏ quả thấy vỏ lụa, hạt có màu nâu sẫm, cứng chắc thì bắt đầu thu hoạch hạt, ngắt từng bông đã chín phơi trên nia, mẹt, sau đó tuốt hạt, làm sạch tạp chất, loại bỏ những hạt lép, lửng, phơi lại hạt thật khô, ẩm độ của hạt < 3%, bảo quản hạt thật kín trong lọ nút mài và giữ trong kho lạnh. Không nên phơi hạt kéo dài, dễ mất sức mọc mầm.

III. MỘT SỐ THÔNG SỐ DI TRUYỀN VÀ THÔNG SỐ THỐNG KÊ CƠ BẢN SỬ DỤNG TRONG CHỌN LỌC NHÂN TẠO CÂY TRỒNG DỰA TRÊN CÁC ĐẶC ĐIỂM ĐỊNH LƯỢNG

Tính hiệu quả của sự chọn lọc phụ thuộc vào tần số xuất hiện gen trong quần thể. Tác động cơ bản của sự chọn lọc lên một quần thể sinh vật chính là làm thay đổi sự sắp xếp của các tần số gen trong quần thể đó. Ở các đặc điểm định lượng, sự biểu hiện của các tần số này thông qua tần số xuất hiện của kiểu hình thường bị che lấp một phần (hoặc hoàn toàn) bởi tác động của môi trường. Vì lý do đó, không thể thực hiện sự chọn lọc trên các cá thể riêng rẽ theo đặc điểm định lượng. Vì thế, người ta miêu tả các tác động của sự chọn lọc trên các đặc điểm định lượng bằng một cách khác. Đó là chọn lọc theo các kết quả tính toán dựa trên các tính chất có thể quan sát được ở một đặc điểm nào đó, như:

- Giá trị trung bình (media) của mẫu chọn lọc ($\overline{X}$) hay của quần thể (μ);

- Phương sai kiểu hình (variance) của mẫu chọn lọc (S^2) hay của quần thể (σ^2_p);

- Độ lệch chuẩn của phương sai kiểu hình (standard deviation of variation) của quần thể (σ_p),

- Sai số thí nghiệm (experimental error) hay phương sai do tác động của môi trường σ^2_E, v.v...

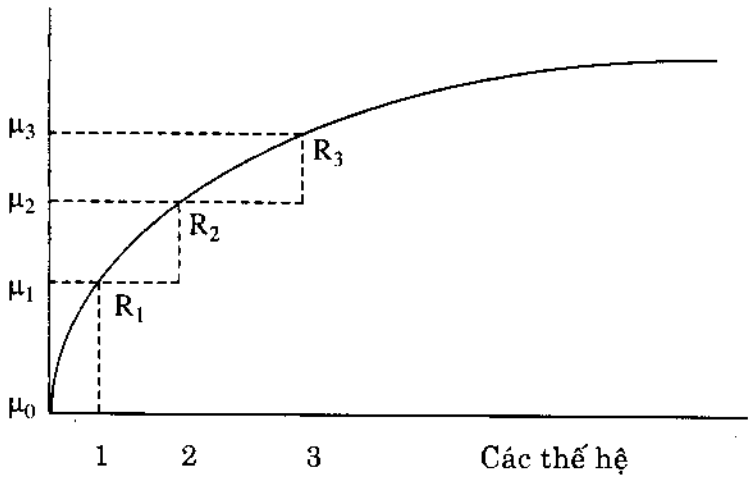
Từ các tính chất có thể quan sát được ở một quần thể như đã nêu trên, người ta có thể tính toán được các thông số di truyền và thông số thống kê để chọn lọc các cá thể mong muốn và đánh giá hiệu quả của sự chọn lọc đó.

Sau đây xin trình bày một số thông số di truyền và thống kê có thể dùng để chọn lọc, đó là:

- Phản ứng chọn lọc (R).
- Phân sai chọn lọc (S).
- Cường độ chọn lọc ($i = S/\sigma_p$).
- Hệ số di truyền của đặc điểm (h^2)
  + Hệ số di truyền theo nghĩa rộng (h^2_a).
  + Hệ số di truyền theo nghĩa hẹp (h^2_e).
- Hệ số biến dị của một đặc điểm (V%).
- Độ vượt thực tế của cây trội được chọn ra (Δ_{Xi}).
- Tương quan giữa các đặc điểm chọn lọc (r^2).
- Khả năng tổ hợp di truyền của các giống cây trồng:
  + Khả năng tổ hợp chung của các giống bố, mẹ (GCA).
  + Khả năng tổ hợp riêng giữa hai giống bố, mẹ (ECA).

3.1. Phản ứng chọn lọc (R: Response of selection)

Sự thay đổi tạo ra bởi sự chọn lọc mà chúng ta quan tâm là sự thay đổi giá trị trung bình quần thể của đặc điểm đang được dùng để chọn lọc. Điều đó được thể hiện qua hình 1.



Hình 1: Phản ứng đối với sự chọn lọc sau mỗi thế hệ được chọn lọc

Phân tích hình 1 ta thấy giá trị trung bình quần thể (μ_i) được chọn ra ở mỗi thế hệ 1, 2, 3 ngày càng tăng do kết quả của chọn lọc dương tính. Những giá trị trung bình được gia tăng đó của đặc điểm được chọn lọc chính là phản ứng được chọn lọc R. Trong một thí nghiệm chọn lọc thì phản ứng chọn lọc (R) được tính như hiệu giữa giá trị trung bình quần thể của đặc điểm sau khi chọn lọc (thế hệ sau) và giá trị trung bình quần thể cuả đặc điểm đó trước khi chọn lọc (thế hệ trước).

Phản ứng chọn lọc (R) của đặc điểm nào đó phụ thuộc vào hệ số di truyền của đặc điểm đó (h^2: heritability) và số lần chọn lọc được thực hiện. Ngoài ra, R được tính một cách phù hợp với phân sai chọn lọc (S: selection differential).

Độ lệch chuẩn cũng được sử dụng để chuẩn hoá phản ứng chọn lọc bằng cách chia R cho σ_P (tức là R/σ_P). Đây là số đo tổng quát hoá phản ứng chọn lọc và qua nó có thể so sánh các quần thể khác nhau. Phản ứng chọn lọc còn được gọi là "Ưu thế chọn lọc" (genetic advantage by selection).

Biên độ và thời gian kéo dài của phản ứng chọn lọc trong quá trình chọn lọc liên tiếp phụ thuộc vào các yếu tố sau:

- Phụ thuộc vào hệ số sinh sản của cây trồng:
  + Ở các loài tự thụ phấn: Biên độ biến dị nhỏ và phản ứng chọn lọc nhanh chóng giảm sau mỗi lần chọn lọc, do đó không kéo dài phản ứng chọn lọc.
  + Ở các loài thụ phấn chéo: Biên độ biến dị rộng và phản ứng chọn lọc không giảm một cách nhanh chóng sau mỗi lần chọn lọc, do đó phản ứng chọn lọc biểu hiện ở nhiều thế hệ chọn lọc liên tiếp.
- Phụ thuộc vào độ lớn, bản chất và tương tác giữa các biến dị di truyền (σ^2_A và σ^2_P) và biến dị không di truyền (σ^2_E).

Công thức tính phản ứng chọn lọc như sau:

Mối quan hệ giữa phản ứng chọn lọc (R), Phân sai chọn lọc (S), Cường độ chọn lọc (I) và hệ số di truyền (h^2) được thể hiện qua các công thức sau:

$$R = h^2.\ S = I.\sigma_P.\ h^2 = X_0 - X_P \qquad \textbf{(công thức 1)}$$

trong đó: h^2: hệ số di truyền của đặc điểm;

S: phân sai chọn lọc của đặc điểm;

I: cường độ chọn lọc được áp dụng;

σ_P: độ lệch chuẩn phương sai của đặc điểm;

X_0: giá trị trung bình của quần thể đời sau;

X_P: giá trị trung bình của quần thể ban đầu.

3.2. Phân sai chọn lọc (S: Selection Differential)

Phân sai chọn lọc (S) là hiệu giữa giá trị trung bình kiểu hình về đặc điểm của các cá thể được chọn lọc và giá trị trung bình của quần thể ban đầu, được tính theo công thức:

$$S = X_S - X_P \qquad \textbf{(công thức 2)}$$

trong đó: X_P: giá trị trung bình của đặc điểm của các cá thể ở quần thể ban đầu

X_S: giá trị trung bình của đặc điểm của các cá thể được chọn từ quần thể ban đầu đó.

Độ lớn của phân sai chọn lọc tỷ lệ nghịch với % của quần thể được chọn (tức là tỷ lệ thuận với cường độ chọn lọc I) và độ lệch chuẩn kiểu hình (σ_P) của đặc điểm được chọn. Ta có công thức khác để tính phân sai chọn lọc như sau:

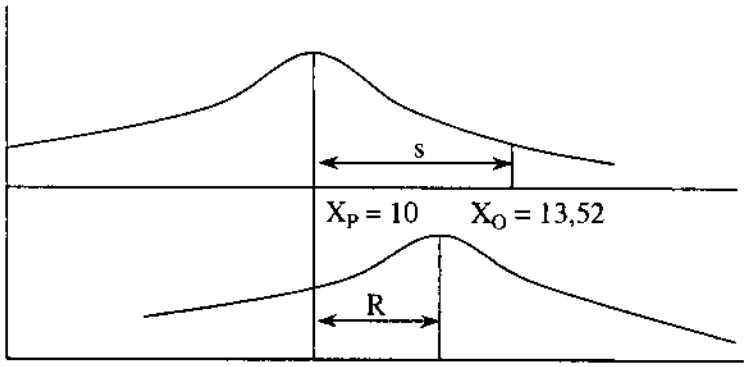
$$S = I.\sigma_P \qquad \textbf{(công thức 3)}$$

Hình 2 giải thích qua hình vẽ giá trị và cách tính phản ứng chọn lọc (R) và phân sai chọn lọc (S) trong một thế hệ. Dễ dàng thấy rằng:

$$R = X_O - X_P$$

Như đã chứng minh bằng lý thuyết, phản ứng chọn lọc bằng ước lượng được ở thế hệ thứ nhất của sự chọn lọc là phản ứng chọn lọc thực.

Quần thể ban đầu



Quần thể của các cá thể được chọn

Hình 2: Minh hoạ cách tính phản ứng chọn lọc (R) và phân sai chọn lọc (S)

Trong thí dụ ở hình 2:

X_P là giá trị trung bình kiểu hình của quần thể ban đầu chưa chọn lọc,

$X_P = 10$ và $\sigma_P = 2$.

$S = X_S - X_P = 13,52 - 10 = 3,52.$

$I = S/\sigma_P = 3,52/2 = 1,76.$

X_O là giá trị trung bình kiểu hình của các cá thể được chọn ra trong cùng thế hệ

$$X_O = 11,76 \text{ và } \sigma_P = 1,73.$$

Do đó:

$$R = X_O - X_P = 11,76 - 10,0 = 1,76.$$

Từ đây ta cũng có thể tính được hệ số di truyền thực hiện (H^2_r)

$$h^2_r = R/S = 1,76/3,52 = 0,5;$$

3.3. Cường độ chọn lọc ($I - S/\sigma_P$)

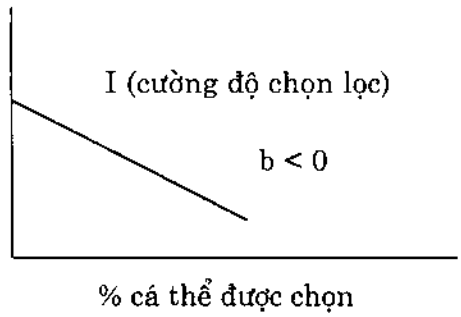
Độ lệch chuẩn kiểu hình (σ_P) của đặc điểm là thước đo tính biến dị kiểu hình của đặc điểm, đó là một tính chất của đặc điểm trong quần thể. Nó cung cấp cho ta các đơn vị tính toán để người ta có thể chuẩn hoá phân sai chọn lọc với công thức S/σ_P – phân số này được gọi là Cường độ chọn lọc (I).

$$I = S/\sigma_P \qquad \textbf{(công thức 4)}$$

$$I = R/(\sigma_P.h^2) \qquad \textbf{(công thức 5)}$$

Cường độ chọn lọc (*i*) tỷ lệ nghịch với % cá thể được chọn:

$$I = 1/(\% \text{ cá thể được chọn}) \qquad \textbf{(công thức 6)}$$



Hình 3: Mối quan hệ tỷ lệ nghịch giữa % cá thể được chọn và cường độ chọn lọc

3.4. Hệ số di truyền của một đặc điểm

Để miêu tả các biến dị kiểu hình (những sai khác) ở một đặc điểm giữa các cá thể và để tìm hiểu xem các biến dị kiểu hình đó là do cấu trúc di truyền (biến dị di truyền) hay do tác động của các yếu tố môi trường (biến dị do môi trường), người ta đưa ra các khái niệm về Hệ số di truyền (h^2).

3.4.1. Hệ số di truyền theo nghĩa rộng (h^2_a) (heritability in broad sence)

Hệ số di truyền là một thông số thống kê di truyền quan trọng đã được Knight (1948) định nghĩa như sau "*Hệ số di truyền là phần của phương sai quan sát được chịu trách nhiệm về các biến dị có thể di truyền được (Genetic variance)*". Hệ số di truyền này được coi là hệ số di truyền theo nghĩa rộng (h^2_a)"

$$h^2_a = \frac{\sigma^2_G}{\sigma^2_P} \qquad \textbf{(công thức 7)}$$

hay

$$h^2_a = \frac{\sigma^2_G}{\sigma^2_G + \sigma^2_E + \sigma^2_{GE}} \qquad \textbf{(công thức 8)}$$

trong đó: σ^2_P: phương sai kiểu hình của các đặc điểm chọn lọc;

σ^2_G: phương sai kiểu gen của đặc điểm chọn lọc;

σ^2_E: phương sai do tác động môi trường;

σ^2_{GE}: phương sai do tương tác kiểu gen – môi trường.

Để đánh giá hệ số di truyền theo nghĩa rộng trong khảo nghiệm dòng vô tính, người ta dùng công thức của Wright (được Vidakovic đưa ra năm 1969), như sau:

$$h^2_a = \frac{\sigma^2_C}{\frac{\sigma^2_c}{r} + \sigma^2_C} \qquad \textbf{(công thức 9)}$$

trong đó: σ^2_C: phương sai dòng vô tính;

σ^2_e: phương sai do hoàn cảnh (do tác động môi trường);

r: số lần lặp lại.

Theo Lê Đình Khả (1997), năm 1976 Burley và Wood đã dùng công thức tính hệ số di truyền theo nghĩa rộng nói trên để xác định sai khác giữa các loài/xuất xứ trong khảo nghiệm loài/xuất xứ và tác giả tạm gọi là hệ số sai khác giữa các loài/xuất xứ. Khi $h^2 = 1$ thì sai khác giữa các dòng vô tính là hoàn toàn do yếu tố di truyền.

Lê Đình Khả (1995) giới thiệu công thức của Einspahr - Van Buijtenen Joharsson để tính hệ số di truyền nghĩa rộng theo khảo nghiệm dòng vô tính, như sau:

$$h^2_a = \frac{\sigma^2_C}{\sigma^2_e + \sigma^2_C} \qquad \textbf{(công thức 10)}$$

Ngoài ra khả năng di truyền một đặc điểm của một cây trồng cho hậu thế thu được bằng nhân giống vô tính còn biểu hiện qua mối tương quan bố mẹ – hậu thế hoặc hệ số tương quan bố mẹ – dòng vô tính (r).

3.4.2. Hệ số di truyền theo nghĩa hẹp (h^2_e) (Heritability in narow sence)

Với một sơ đồ bố trí lai di truyền thích hợp, như dùng phép phân tích của Mather và Jink (1971) hay Stricberger (1976), trong cùng một thí nghiệm người ta trồng và phân tích kết quả của thế hệ bố, mẹ (P_1 và P_2); của thế hệ con lai F_1; của thế hệ phân ly F_2; của phép lai lại giữa F_1 với bố (B_1) và của phép lai lại giữa F_1 với mẹ (B_2), có thể tách được phương sai kiểu gen của đặc điểm chọn lọc (σ^2_G) thành phương sai do tác động của các gen thêm (σ^2_A), phương sai do tác động của tính trội (σ^2_D), phương sai do tác động át gen hay tương tác giữa các gen khác nhau (σ^2_I), Phương sai do môi trường (σ^2_E), phương sai do tương tác kiểu gen – môi trường (σ^2_{GE}) và phương sai tính trạng (σ^2_P).

Nghĩa là: $$\sigma^2_G = \sigma^2_A + \sigma^2_D + \sigma^2_I$$ **(công thức 11)**

Điều này cho phép ta tính hệ số di truyền theo nghĩa hẹp:

$$h^2_e = \sigma^2_A / \sigma^2_P$$ **(công thức 12)**

trong đó: σ^2_A: phương sai do các gen thêm quy định đặc điểm chọn lọc;

σ^2_P: phương sai kiểu hình của đặc điểm chọn lọc.

Ngoài ra, có thể tính hệ số di truyền theo nghĩa hẹp bằng hệ số hồi quy (b) thông qua phương trình hồi quy (equation of regression) thể hiện mối tương quan bố mẹ - hậu thế. Sau khi lai hai cá thể bố và mẹ ta được các cá thể đời con, đem trồng trong cùng thí nghiệm các cá thể của cả đời bố, mẹ và của đời con và tính hệ số hồi quy về một đặc điểm nào đó, có thể xảy ra 3 trường hợp như ở hình 4.

Khi các điểm toạ độ (x_i, y_i) càng phân tán và không tạo thành đường thẳng tuyến tính thì giá trị của b càng tiến đến 0.

Ta có phương trình hồi quy tuyến tính (từ đó có thể tính hệ số b) như sau:

$$Y_i = b\,X_i \pm C$$ **(công thức 13)**

Vidakovic (1969) đã đưa ra công thức tính toán hệ số di truyền thông qua hệ số hồi quy b trong tương quan bố mẹ – hậu thế, như sau:

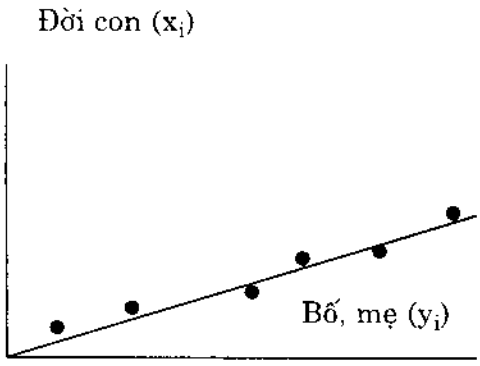
$$b = \frac{\sum fx_i y_i - \frac{\sum fx_i \sum fy_i}{N}}{\sum fx_i^2 - \frac{\sum fx_i \sum fy_i}{N}}$$ **(công thức 14)**

trong đó: X_i: biến số độc lập (đặc điểm i của các cá thể cây mẹ);

Y_i: biến số phụ thuộc (đặc điểm i của các cá thể hậu thế);

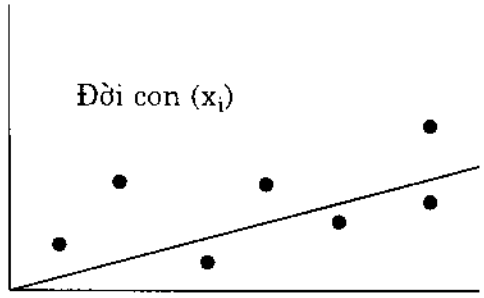
f: tần số xuất hiện cá thể mang đặc điểm i;

N: tổng số cá thể.



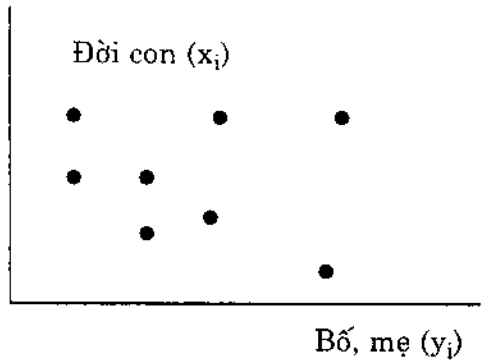
Trường hợp b > 0

– Khi hệ số hồi quy b >0,5:
+ Hệ số di truyền cao
+ Tác động môi trường nhỏ
+ Các cá thể đời con giống bố, mẹ



Trường hợp b < 0,5

– Khi hệ số hồi quy b < 0,5:
+ Hệ số di truyền thấp
+ Tác động môi trường đáng kể
+ Các cá thể đời con hơi khác bố, mẹ



Trường hợp b = 0

– Khi hệ số hồi quy b = 0
+ Hệ số di truyền bằng 0
+ Tác động hoàn toàn do môi trường
+ Các cá thể đời con hoàn toàn khác bố, mẹ

Hình 4: Tính hệ số di truyền bằng phương trình hồi quy tuyến tính

Đối với các loài sinh sản vô tính: Hệ số di truyền theo nghĩa hẹp trong khảo nghiệm dòng vô tính sẽ là:

$$h^2_e = 2b \qquad \textbf{(công thức 15)}$$

Như ta thấy hệ số hồi quy tuyến tính (b) tự nó đã cho ta ước lượng về hệ số di truyền theo nghĩa hẹp $h^2_e = \sigma^2_A / \sigma^2_P$.

Đối với các loài tự thụ phấn: Khi đem lai hai giống của cây tự thụ phấn người ta có thể xác định hệ số di truyền về một đặc điểm nào đó để làm cơ sở cho việc chọn lọc con lai mong muốn. Quan hệ giữa bố, mẹ và hậu thế được xác định ở thế hệ F_2 và F_3. Các số liệu của đời con F_3 được sử dụng để tính hệ số hồi quy với các giá trị trung bình của các cá thể mẹ nên hệ số di truyền cho ta thước đo trực tiếp về hệ số di truyền theo nghĩa hẹp. Để có ước lượng khá chính xác về hệ số di truyền thì điều kiện cần là quan hệ cùng máu không quá cao giữa các cá thể bố và mẹ khi đem lai với nhau:

$$h^2_e = b \qquad \textbf{(công thức 16)}$$

Đối với các loài thụ phấn chéo: ở các loài thụ phấn chéo, một cây làm mẹ được thụ phấn một cách ngẫu nhiên với phấn của một hay nhiều cây làm bố khác (mà có thể không xác định được) nên người ta tính hệ số hồi quy về một đặc điểm nào đó giữa các cá thể đời con và các cá thể làm mẹ. Do đó hệ số di truyền bằng hai lần hệ số hồi quy đời mẹ- đời con:

$$h^2_e = 2b \qquad \textbf{(công thức 17)}$$

Một cách khác để ước lượng hệ số di truyền theo nghĩa hẹp là ước lượng qua phản ứng di truyền R, hệ số di truyền này gọi là hệ số di truyền thực hiện (realized inheritability) và được tính như sau:

$$h^2_r = R/(i.\ \sigma_P) = R/S = (X_o - X_p)/(X_s - X_p) \qquad \textbf{(công thức 18)}$$

Ví dụ: Trong ví dụ ở hình 4.

X_p: giá trị trung bình của quần thể $X_p = 10$;

X_s: giá trị trung bình của các cá thể được chọn $X_s = 13,52$;

X_o: giá trị trung bình của hậu thế của các cá thể được chọn $X_o = 11,76$;

R: phản ứng chọn lọc $R = X_o - X_p = 11,76 - 10 = 1,76$;

S: phân sai chọn lọc $S = X_s - X_p = 13,52 - 10 = 3,52$.

Theo công thức (4) $R = h^2.S$ và công thức (17) ta có:

$$h^2_r = R/S = 1,76/3,52 = 0,5$$

Kết luận về hệ số di truyền:

Hệ số di truyền h^2 không chỉ là một thuộc tính của đặc điểm của cá thể mà còn là một thuộc tính của quần thể, cần phải chú ý khi phân tích quần thể. Khi tính toán hệ số di truyền cần chỉ rõ phương pháp sử dụng để tính toán và điều kiện lấy số liệu, tức là nó được ước lượng trên cơ sở một giống cây trồng, một khu đất hay một vài môi trường thí nghiệm. Vì hệ số di truyền là một thông số về một

quần thể nên cần phải nêu rõ về nguồn gốc của quần thể và các điều kiện môi trường để nghiên cứu chúng khi nói về tính đại diện của quần thể đó.

Ví dụ: ở cây Cúc hoa, Jong (1984) nghiên cứu 79 F_1 từ 15 cặp lai của *Chrysanthemum morifolium* cho thấy, hệ số di truyền 70% đối với ngày ra hoa/cây trong điều kiện nhiệt độ ban đêm ở 12°, 13°, 15°, 17°C và nhìn chung hậu thế có ngày ra hoa sớm hơn bố mẹ ở một trong những nhiệt độ trên đều có ngày ra hoa sớm ở tất cả các nhiệt độ đó. Nhìn chung số hoa/cây của F_1 lớn hơn số hoa/cây của bố mẹ. Novotna (1988) nghiên cứu hậu thế của dòng tự thụ phấn phát triển ở 10°C - 12°C/12°C - 14°C (đêm/ngày) ở mùa đông, hậu thế được tiếp tục cho tự thụ phấn và đánh giá đời con của chúng về khả năng chịu lạnh, tác giả đã thông báo có di truyền cao về khả năng chống chịu nhiệt độ thấp ở một vài trường hợp. Singh và các cộng sự (1987) đã tính được giá trị cao về hệ số di truyền theo nghĩa rộng đối với số hoa/cây, đường kính hoa, khối lượng 100 hoa và nồng độ của Pyrethrin ở một tập đoàn của *Chrysanthemum cinerariaefolium*.

3.5. Hệ số biến dị của một đặc điểm (V%)

Hệ số biến dị của một đặc điểm là chỉ tiêu nói lên mức độ biến dị ở một đặc điểm nào đó, có thể dùng để so sánh mức độ biến dị giữa các đặc điểm của một dòng, giữa các dòng của một giống, giữa các giống của một loài cây trồng.

$$V\% = \frac{X_S - X_{chung}}{X_{chung}} \times 100 \qquad \textbf{(công thức 19)}$$

Như đã nói ở trên, sự chọn lọc chỉ tác động vào các đặc điểm có biến dị di truyền lớn, nên để việc chọn lọc thực sự có hiệu quả và có ý nghĩa, người ta phải xác định trước hết hệ số biến dị về đặc điểm mong muốn và xác định hệ số di truyền nghiã rộng theo công thức có thể dùng để xác định hệ số sai khác giữa các loài, xuất xứ (như đã được trình bày ở công thức 12). Với hệ số biến dị có thể so sánh độ biến dị của hai hay nhiều đặc điểm của quần thể.

3.6. Độ vượt thực tế của cây trội được chọn (Δx_i)

Thông thường người ta chọn lọc để giữ lại các cây trội về đặc điểm mong muốn nào đó làm giống. Có thể tính độ vượt thực tế về đặc điểm nào đó của các cây trội theo công thức tương tự như công thức được sử dụng để tính cường độ chọn lọc:

$$(\Delta x_i) = \frac{X_{i\ cây\ trội} - X_{i\ chung}}{S_{pi}} \qquad \textbf{(công thức 20)}$$

trong đó: $X_{i\ cây\ trội} - X_{i\ chung}$ là hiệu giữa giá trị thực về đặc điểm i của cá thể trội và giá trị trung bình của quần thể so sánh về đặc điểm i (để có thể so sánh giữa các cá thể trội người ta chuẩn hoá độ vượt này bằng cách chia cho độ lệch chuẩn của các số liệu quan sát được trong quần thể so sánh).

S_{pi} là độ lệch chuẩn kiểu hình về đặc điểm i của quần thể so sánh.

3.7. Tương quan giữa các đặc điểm chọn lọc (Hệ số tương quan r^2)

Trên đây là sự chọn lọc áp dụng đối với một đặc điểm riêng rẽ. Bây giờ ta hãy xét đến ảnh hưởng của sự chọn lọc dương tính (hoặc âm tính) về một đặc điểm đến sự thể hiện của đặc điểm khác.

Nếu các đặc điểm độc lập với nhau thì không có vấn đề gì về nguyên lý chọn lọc. Nhưng nếu chúng lệ thuộc vào nhau, nghĩa là chúng biểu hiện ra tính trạng một cách tỷ lệ thuận với nhau (thường xảy ra với các đặc điểm thành phần của năng suất), thì việc nghiên cứu tính lệ thuộc này có tầm quan trọng lớn. Theo kết quả của các nghiên cứu này có thể đưa ra các chiến lược chọn lọc khác nhau, có thể chọn lọc gián tiếp đặc điểm A thông qua việc chọn lọc về đặc điểm B có tương quan tỷ lệ thuận với A. Ví dụ: Chọn giống chịu hạn một cách gián tiếp thông qua việc chọn các giống có bộ rễ phát triển mạnh, nếu ở giống đó bộ rễ dài tương quan tỷ lệ thuận với khả năng chịu hạn của nó. Người ta cũng thường chọn lọc về các đặc điểm thành phần của năng suất để cải tiến năng suất của cây trồng, vì thực ra không có kiểu gen riêng quyết định năng suất.

Các loại tương quan tính trạng và nguyên nhân của sự tương quan giữa các đặc điểm có thể là:

- Tương quan kiểu gen: Do hai đặc điểm có sự tương đồng về kiểu gen.

- Tương quan kiểu hình: Do tác động của kiểu gen và tác động của môi trường.

- Tương quan không di truyền: Do tác động của môi trường.

Với sự bố trí các sơ đồ lai di truyền (genetic designs) và sử dụng các phép phân tích đồng phương sai (covariance), thông qua các phương pháp tương tự như các phương pháp dùng để phân tích phương sai (variance), người ta có thể tách các mối tương quan kiểu gen (genotype correlation) ra khỏi các mối tương quan kiểu hình (phenotype correlation). Nguyên nhân của mối tương quan kiểu gen giữa các đặc điểm có thể là do sự liên kết gen (gene linkage) hoặc do tính đa hiệu của các gen (pleiotropy).

Sự tương quan giữa hai đặc điểm X và Y được tính bằng công thức:

$$r = \frac{COV(x, y)}{\sqrt{\delta x.\delta x}}$$ **(công thức 21)**

Ở các cây trồng nhân giống vô tính có sự liên quan chặt chẽ giữa các tương quan kiểu hình (r_p) và các tương quan kiểu gen (r_g) của một đặc điểm (Brown và các cộng sự, 1969). Nghĩa là với các cây nhân giống vô tính có thể sử dụng kết quả nghiên cứu về tương quan kiểu hình giữa các đặc điểm để chọn giống.

Theo Hogarth (1968) người ta sử dụng r_p để chọn giống cho nhân giống vô tính và r_g để chọn giống làm bố mẹ cho lai tạo giống. Không nên chỉ dựa vào kết quả nghiên cứu về tương quan kiểu hình r_p giữa các đặc điểm để chọn bố mẹ cho lai tạo giống, vì mối tương quan đó có thể không chỉ do kiểu gen mà còn do tác động của môi trường tạo nên.

Một số ví dụ về sử dụng tương quan giữa các đặc điểm trong chọn lọc giống cây cúc hoa:

Ở loài cúc hoa (*Chrysanthemum coronarium* L.) Yulian và các cộng sự (1995) nghiên cứu quan hệ giữa sự phân thuỳ ở lá và sự ra hoa của cây cúc ở miền nam Nhật Bản (Nara, Kagawa, Tokushima, Okayama và Fukuoka) đã kết luận rằng có thể phân loại giống dựa trên sự phân thuỳ của lá thành các loại như: xẻ lá chét lông chim nông (pinnatifid), xẻ lá chét lông chim sâu (pinnatiseet) thường là những giống ra hoa muộn.Tuy nhiên, trong thí nghiệm này cũng thấy rằng có giống xẻ lá thuỳ lông chim - pinnatilobed (giống 31) hoặc xẻ lá chét lông chim nông- pinnatifid (giống 13) là những giống ra hoa rất sớm.

Woodson và các cộng sự (1984) đã nghiên cứu quan hệ giữã hoạt tính của men khử nitrat(nitrat reductase), sự tích luỹ nitơ và sự phân bố nitơ ở giống cúc *Indianapolis* White (Trong thí nghiệm thuỷ canh trên nền cát trong nhà kính). Các tác giả đã kết luận hoạt tính của men NO^{3-} reductase cao nhất (3,4 mumoles NO_2 $gFW^{-1}h^{-1}$) có liên quan với sự sinh trưởng dinh dưỡng trong giai đoạn đầu ở giống cúc này, mặc dù hoạt động của NO^{3-} reductase được phát hiện trong suốt thời kỳ sinh trưởng của cây.

Kanchaleekorn - Chaiyasoonthron (1988) đã tính được hệ số tương quan rất thấp (0,18) giữa chiều cao trung bình của cây con và chiều cao cây trưởng thành ở giống "khao kaset" của Thái Lan. Pandita và Bhat (1986) đã chọn lọc ngẫu nhiên 100 cây cúc hoa *Chrysanthemum (Tanacetum cinerariaefolium)* ở Sanat Nagar và thấy có tương quan có ý nghĩa (P = 0,05) giữa nồng độ Pyrethrin ở hoa con (trong cụm hoa cúc) và chiều rộng của hoa con ở trung tâm cụm hoa (với hệ số tương quan r = 0,415). Cũng tìm thấy tương quan có ý nghĩa (P = 0,01) giữa

chiều rộng của hoa con ở trung tâm cụm hoa và chiều rộng của hoa con ở rìa cụm hoa cúc (với hệ số tương quan r = 0,509). Chất pyrethrin tìm thấy ở *Chrysanthemum balsamita* là một chất trừ sâu sinh học có tác dụng kháng rệp (aphid) *Metopophium dirhodum,* hoạt tính trừ sâu có thể do pyrethrin I được tìm thấy lần đầu tiên ở *Tanacetum balsamita.*

Bhat và Menary (1986) sử dụng thế hệ F_1 của các phép lai dialen (diallelic cross) và lai đa dòng (polycross) giữa 5 kiểu gen của *Chrysanthemum cinerariaefolium* và dùng phép phân tích path coefficient đã chỉ ra rằng năng suất hoa khô/cây có ảnh hưởng trực tiếp cao nhất đến năng suất tổng hợp pyrethrin. Các tác giả cũng quan sát thấy tương quan dương giữa số hoa/cây với năng suất hoa/cây và nồng độ pyrethrin cao.

Raja và các cộng sự (1989) thông báo là trong 20 giống được chọn lọc trong điều kiện đất giàu can xi có giống Red Gold, các dòng IIHR-Sel.7 và IIHR-Sel.8 biểu hiện khả năng chống chịu điều kiện đất thiếu sắt. Các giống chống chịu có chứa nồng độ cao về Mn. Singh và các cộng sự (1987) khi nghiên cứu *Chrysanthemum cinerariaefolium* đã chỉ ra tương quan có ý nghĩa giữa năng suất hoa (g/cây) và chiều cao cây, với đường kính hoa và với số hoa/cây; đường kính hoa có tương quan thuận với nồng độ pyrethrin. Bằng phân tích path coefficient đã chỉ ra đường kính thân cây, số hoa/cây, đường kính hoa và khối lượng 100 hoa có ảnh hưởng dương trực tiếp đến nồng độ của pyrethrin, trong khi năng suất hoa và chiều cao cây có ảnh hưởng âm trực tiếp đến nồng độ của pyrethrin.

Ở cây hoa hồng: Khi nghiên cứu ảnh hưởng của NaCl và $NaHCO_3$ trong môi trường nuôi cấy đến bộ lá và sự nảy mầm của hạt phấn trong môi trường in vitro ở giống hoa hồng lai *Rosemultiflora* (làm gốc ghép cho giống hoa hồng cắt cành), Weber và Reimann-Philipp (1989) đã quan sát thấy có sự tương quan dương giữa khả năng chống chịu mặn của hạt phấn và khả năng chống chịu mặn của cây mang hạt phấn đó. Như vậy có thể chọn giống chống chịu đất mặn thông qua việc chọn các giống có hạt phấn nảy mầm tốt trong môi trường nuôi cấy hạt phấn in vitro có độ mặn cao.

3.8. Khả năng tổ hợp di truyền (CA: Combining Ability)

Để thu được kết quả mong muốn trong một chương trình lai tạo giống cây trồng, người ta cần nghiên cứu khả năng tổ hợp di truyền giữa các cá thể dùng làm bố, mẹ để lai với nhau.

Các quan điểm đầu tiên về khả năng tổ hợp di truyền đã được đưa ra từ

những năm 1930 ở Hoa Kỳ. Ý tưởng cơ bản là: lần lượt thực hiện một cách hệ thống các phép lai thuận và lai nghịch giữa các cặp bố-mẹ, sau đó phân tích xem sự khác nhau giữa kết quả của các phép lai (kiểu hình ở đời con) là do tác động của các gen thêm (additive genes) hay do tương tác giữa các gen mà chủ yếu là ảnh hưởng của các gen trội (dominance genes).

Điều này được quan sát ở công thức tổng quát biểu diễn giá trị trung bình của đặc điểm được chọn ở đời con từ mỗi phép lai. Ví dụ lai cặp bố - mẹ (A × B), giá trị trung bình của đặc điểm X của các cá thể đời con (X_{AB}) là:

$$X_{AB} = X + GCA_A + GCA_B + ECA_{AB} \qquad \textbf{(công thức 22)}$$

trong đó: X: giá trị trung bình chung của các cá thể đời con;

GCA_A: khả năng tổ hợp chung của các cá thể giống A (quyết định bởi các gen thêm trong cấu trúc di truyền của giống A);

GCA_B: khả năng tổ hợp chung của các cá thể giống B (quyết định bởi các gen thêm trong cấu trúc di truyền của giống B);

ECA_{AB}: khả năng tổ hợp riêng giữa các cá thể của giống A và các cá thể của giống B, thể hiện tương tác giữa các gen của A và B ở đời con.

Khả năng tổ hợp di truyền của một giống cây trồng với giống cây trồng khác có thể được cho bởi:

- Số gen tác động dương tính (possitive genes).

- Các mối tương tác có thể được thiết lập giữa các gen của cả hai cây bố, mẹ.

Tuỳ thuộc vào hai yếu tố trên mà có giống cây trồng có khả năng tổ hợp chung. Có giống cây trồng chỉ có khả năng cho kết quả lai tốt đối với một số ít giống khác, khả năng đó gọi là khả năng tổ hợp riêng (khả năng này chỉ xét với một đặc điểm cụ thể nào đó).

3.8.1. Khả năng tổ hợp chung của các giống bố, mẹ (GCA: General Combining Ability)

Các cá thể có nhiều gen tác động dương tính thì có khả năng tổ hợp chung rất tốt, vì cá thể càng có nhiều gen thêm (addtive genes) và tác động của chúng càng lớn thì càng di truyền nhiều hơn sang các cá thể đời con. Điều này không lệ thuộc vào các cá thể được lai với một cá thể có khả năng tổ hợp chung tốt nào đó. Vì thế sau khi đã xác định được một số giống cây trồng có khả năng tổ hợp chung tốt thì người ta coi nó như các giống kiểm tra (tester varieties) để xác định khả năng kết hợp chung của các giống cần nghiên cứu. Có thể tính toán

được khả năng tổ hợp chung có thể tính toán thông qua biến dị di truyền do gen thêm (additive genetic variance).

Có thể xác định khả năng tổ hợp chung thông qua chọn lọc thường do lai thuận- nghịch và lai đa dòng (polycross).

Ví dụ: Ở cây hoa cúc, Jong (1984) nghiên cứu 79F_1 từ 15 cặp lai của *Chrysanthemum morifolium* cho thấy khả năng tổ hợp chung cao đối với đặc điểm " ngày ra hoa" trong điều kiện nhiệt độ ban đêm ở 12°, 13°, 15°, 17°C.

3.8.2. Khả năng tổ hợp riêng giữa hai giống bố, mẹ (ECA Especific Combining Ability)

Khi lai hai cây bố, mẹ với nhau ta thu được hạt lai và từ các hạt lai này cho ra các cá thể con lai (hậu thế). Sự thể hiện ra kiểu hình của một kiểu gen lai có thể chịu tác động của tương tác giữa các gen: Tác động trội (dominance: là tương tác giữa các alen của các gen khác nhau). Điều này gây ra sự sai khác trong sự biểu hiện kiểu hình và những sai khác này giúp ta xác định khả năng tổ hợp riêng của cặp bố - mẹ nào đó. Một cặp bố - mẹ nào đó mà khả năng tổ hợp riêng có giá trị dương và đủ lớn, có nghĩa là cặp lai đó sẽ đem cho kết quả tốt, thể hiện ưu thế lai cao (heterosis) và có thể dùng cặp bố - mẹ đó để sản xuất hạt giống lai thương mại. Các giống ngô lai Bioseed, lúa lai... là những ví dụ về hạt giống lai thương mại (commercial hybrids).

Nhìn chung:

- Nếu $\sigma^2_A > 2\ \sigma^2_D$ thì nên khai khai thác tổ hợp chung của giống.
- Nếu $\sigma^2_A < 2\ \sigma^2_D$ thì nên khai khai thác tổ hợp riêng của giống.

(Trong đó σ^2_A là phương sai do tác động của các gen thêm và σ^2_D là phương sai do tác động của các gen trội).

Có thể tính toán khả năng tổ hợp riêng thông qua các phép chọn lọc sau khi cho bố mẹ lai thuận- nghịch, lai một cặp bố, mẹ (biparental cross), các phép lai thường, các phép lai thương mại.

Ví dụ: Ở cây hoa cúc, Pandita và Bhat (1986) đã dùng phép lai phân tích lai dialen để nghiên cứu khả năng tổ hợp chung và khả năng tổ hợp riêng ở một số giống cúc của *Chrysanthemum cinerariaefolium* Vis. Tỷ lệ ECA/GCA cao đã chỉ ra rằng các tác động do tính trội của các gen trong biểu hiện của các tính trạng được nghiên cứu là chủ yếu. Ngoài ra, do sự sai khác giữa lai thuận và lai nghịch, các tác giả còn cho rằng trong biểu hiện của một số tính trạng còn có tác động của các yếu tố di truyền ngoài nhân, gọi là di truyền theo mẹ hay di truyền theo tế bào chết.

3.8.3. Minh hoạ cách tính toán khả năng tổ hợp chung và khả năng tổ hợp riêng qua ví dụ cụ thể (áp dụng ở cây tự thụ phấn)

Trong một công trình lai tạo giống cây trồng, việc trước tiên là phải chọn giống bố, mẹ thông qua việc xác định khả năng tổ hợp chung và riêng của các giống mà ta muốn chọn là bố, mẹ. Để làm được điều này người ta sử dụng một số sơ đồ lai thích hợp, thực hiện phép lai, lấy hạt lai và bố trí thí nghiệm để đo các đặc điểm cần chọn lọc ở đời con, tính toán và rút ra kết luận về khả năng tổ hợp của các cặp bố - mẹ.

Một số sơ đồ lai có thể dùng như: lai di-alen (diallelic cross); lai giữa hai giống bố, mẹ (biparental cross); lai đa dòng (polycross); lai theo sơ đồ North Caroline I và North Caroline II; lai một (hoặc 2) giống với nhiều giống (top-cross). Sau đây xin trình bày tóm tắt một số sơ đồ lai để tính toán GCA và ECA ở một tính trạng của các giống bố, mẹ.

3.8.3.1. Sơ đồ lai di-alen (diallen cross)

Hệ thống lai di-alen là một sơ đồ lai di truyền được phổ biến rất rộng rãi và là một trong những sơ đồ lai cho ta nhiều thông tin nhất về các giống cây trồng được nghiên cứu. Phép lai di-alen được Schmidt sử dụng lần đầu tiên vào năm 1919 để xác định các giá trị về phép lai giữa các giống bố, mẹ là giá trị mà ngày nay người ta gọi là giá trị gen thêm (additive value). Tuy nhiên, từ năm 1940 người ta bắt đầu phát triển model này theo quan niệm của trường phái Hoa Kỳ về phương sai di truyền do gen thêm (additive genetic variance) và phương sai di truyền do tính trội (variance of dominance). Từ đó xuất hiện các quan niệm khả năng tổ hợp chung và khả năng tổ hợp riêng, để giải thích các biến trạng di truyền do gen thêm và biến trạng do tính trội.

Các điều kiện để áp dụng model lai di-alen là:

– Những điều kiện trong các phép phân tích di truyền số lượng như:

+ Sự di truyền nhị bội bình thường (diploid inheritance).

+ Không có liên kết gen hay cân bằng liên kết (linkage or equilibrium of linkage).

+ Không có tác động át gen (epistasy).

+ Không có sự khác nhau giữa các đời con từ phép lai thuận và phép lai nghịch.

+ Không có tương tác môi trường giữa các giống bố, mẹ.

– Ngoài ra, để áp dụng model lai di-alen còn phải thêm các điều kiện sau:

+ Tính đồng hợp tử của các giống bố, mẹ (điều kiện này ràng buộc model này chỉ áp dụng cho các cây trồng tự thụ phấn).

+ Không có sự di truyền đa gen, tức là chỉ có sự di truyền liên quan đến hai alen ở mỗi locus của các loci liên quan đến tính trạng đang nghiên cứu. Điều kiện này đã cho tên gọi của sơ đồ lai này (sơ đồ lai di-alen).

Trong số các điều kiện này, trừ điều kiện phải có sự phân ly nhị bội của các nhiễm sắc thể của bố mẹ, các điều kiện khác rất khó hoặc không thể khống chế được trước khi thực hiện các phép lai. Tuy nhiên sử dụng sơ đồ bố trí thí nghiệm thích hợp có thể tách các tác động của tính át gen và của môi trường...

Trong một phép lai di-alen, model tuyến tính biểu thị giá trị quan sát được của một đặc điểm được cho bởi công thức sau:

$$Y_{ij\,k} = M + G_i + G_j + S_{i\,j} + E_{i\,jk} \qquad \textbf{(công thức 23)}$$

trong đó:

M: giá trị trung bình kiểu hình chung của tất cả các cá thể trong thí nghiệm;

G_i: tác động do gen thêm của giống i (khả năng tổ hợp chung của giống i);

G_j: tác động do gen thêm của giống j (khả năng tổ hợp chung của giống j);

$S_{i\,j}$: tác động do gen trội ở con lai của phép lai giữa giống i và giống j (khả năng kết hợp riêng giữa hai giống này với nhau);

$E_{i\,jk}$: sai số liên quan đến phép cân đo, đong đếm ở cá thể k trong số các cá thể của con lai từ phép lai i j.

(Ta thấy công thức này rất giống với công thức 22, nhưng có ước lượng sai số thí nghiệm nên chính xác hơn)

Đặc điểm của phép lai di-alen:

- Với số giống cây (lần lượt làm bố và làm mẹ) bằng n, số biến thể (variants) cần nghiên cứu trong thí nghiệm trên đồng ruộng để lấy số liệu sẽ phụ thuộc vào sơ đồ lai di alen mà nhà chọn giống lựa chọn.

- Tuỳ thuộc vào số biến thể này mà hiệu quả của sơ đồ lai, số thông tin nhận được, cách ghi chép số liệu và công thức tính toán khả năng tổ hợp chung và khả năng tổ hợp riêng của các giống bố mẹ sẽ khác nhau. Điều này được thể hiện ở 4 loại sơ đồ lai di-alen.

Có 4 loại sơ đồ lai di-alen như sau:

3.8.3.1.1. Sơ đồ lai di-alen hoàn toàn (có n giống tự thụ phấn được sử dụng làm bố, mẹ)

- Có n^2 biến thể (trong đó có n^2 - n phép lai và n giống bố, mẹ), trong đó:

+ Có các cá thể đời con của $(n^2 - n)/2$ cặp lai thuận (F_1).

+ Có các cá thể đời con của $(n^2 - n)/2$ cặp lai nghịch.

+ Có các cá thể của n giống bố, mẹ (tự thụ phấn).

- Đây là sơ đồ lai phức tạp và toàn diện nhất, nhưng nó sẽ cho ta nhiều thông tin nhất.

Bảng 1: Cách ghi các số liệu (n giống = n cột = hàng)

	A	B	C	D	T'(hàng)
A	a+a	a+b	a+c	a+d	T'_A
B	b+a	b+b	b+c	b+d	T'_B
C	c+a	c+b	c+c	c+d	T'_C
D	d+a	d+b	d+c	d+d	T'_D
T (cột)	T_A	T_B	T_C	T_D	T (tổng)

Ta có thể tính khả năng tổ hợp chung (GCA) của các giống trong thí nghiệm theo công thức chung:

$$GCA\ x_i = [(Tx_i + T'x_i)/2n] - [T\ (tổng)/n^2] \qquad \textbf{(công thức 24)}$$

+ GCA của giống A: $GCA_A = [(T_A + T'_A)/2n] - [T\ (tổng)/n^2]$

+ GCA của giống B: $GCA_B = [(T_B + T'_B)/2n] - [T\ (tổng)/n^2]$

+ GCA của giống C: $GCA_C = [(T_C + T'_C)/2n] - [T\ (tổng)/n^2]$

+ GCA của giống D: $GCA_D = [(T_D + T'_D)/2n] - [T\ (tổng)/n^2]$

(Giá trị T (tổng)/n^2 chính là giá trị X chung ở công thức 22 hay M của công thức 23)

3.8.3.1.2. Sơ đồ lai di-alen thuận - nghịch

- Có n giống tự thụ phấn được sử dụng làm bố, mẹ

- Số biến thể = $n^2 - n$, trong đó:

+ Có các cá thể đời con của $(n^2 - n)/2$ phép lai thuận (F_1).

+ Có các cá thể đời con của $(n^2 - n)/2$ phép lai nghịch.

+ Không có các cá thể của n giống bố, mẹ tự thụ phấn.

Đây là sơ đồ lai di-alen hoàn toàn, nhưng không có số liệu của các cá thể bố, mẹ tự thụ phấn.

Bảng 2: Cách ghi chép số liệu (n giống = n cột = n hàng)

	A	B	C	D	T' (hàng)
A		a + b	a + c	a + d	T'_A
B	b + a		b + c	b + d	T'_B
C	c + a	c + b		c + d	T'_C
D	d + a	d + b	d + c		T'_D
T (cột)	T_A	T_B	T_C	T_D	T (tổng)

Ta có thể tính khả năng tổ hợp chung (GCA) của các giống trong thí nghiệm theo công thức chung:

$$GCA\ x_i = [(Tx_i + T'x_i)/2(n-2)] - [\ 2T(tổng)/n(n-2)] \quad \text{(công thức 25)}$$

+ GCA của giống A: $GCA_A = [(T_A + T'_A)/\ 2(n-2)] - [\ 2T(tổng)/\ n(n-2)]$

+ GCA của giống B: $GCA_B = [(T_B + T'_B)/\ 2(n-2)] - [\ 2T(tổng)/\ n(n-2)]$

+ GCA của giống C: $GCA_C = [(T_C + T'_C)/\ 2(n-2)] - [\ 2T(tổng)/\ n(n-2)]$

+ GCA của giống D: $GCA_D = [(T_D + T'_D)/\ 2(n-2)] - [\ 2T(tổng)/\ n(n-2)]$

(Giá trị 2T (tổng)/ n(n – 2) chính là giá trị trung bình chung X ở công thức 22 hay M ở công thức 23)

3.8.3.1.3. Sơ đồ lai di-alen không dùng phép lai nghịch

– Có n giống tự thụ phấn được sử dụng làm bố, mẹ

– Có n + n(n – 1)/2 biến thể, trong đó:

+ Có các cá thể đời con của n(n – 1)/2 phép lai thuận (F_1).

+ Có các cá thể của n giống bố, mẹ tự thụ phấn.

+ Không có các cá thể đời con của n(n-1)/2 phép lai nghịch.

Đây là phép lai di-alen không hoàn toàn.

Bảng 3: Cách ghi các số liệu (n giống = n cột = n hàng)

	A	B	C	D	T' (hàng)
A	a + a	a + b	a + c	a + d	T'_A
B		b + b	b + c	b + d	T'_B
C			c+c	c + d	T'_C
D				d + d	T'_D
T (cột)	T_A	T_B	T_C	T_D	T (tổng)

Ta có thể tính khả năng tổ hợp chung (GCA) của các giống trong thí nghiệm theo công thức chung:

$$GCA\ x_i = [(Tx_i/(n + 2)] - [\ 2T(tổng)/n(n + 2)] \quad \textbf{(công thức 26)}$$

+ GCA của giống A: $GCA_A = [T_A/(n + 2)] - [\ 2T(tổng)/n(n + 2)]$

+ GCA của giống B: $GCA_B = [T_B/(n + 2)] - [\ 2T(tổng)/n(n + 2)]$

+ GCA của giống C: $GCA_C = [T_C/(n + 2)] - [\ 2T(tổng)/n(n + 2)]$

+ GCA của giống D: $GCA_D = [(T_D/(n + 2)] - [\ 2T(tổng)/n(n + 2)]$

(Giá trị 2T (tổng)/ n(n + 2) chính là giá trị trung bình chung X ở công thức 22 hay M ở công thức 23).

3.8.3.1.4. Sơ đồ lai di-alen chỉ dùng các phép lai thuận

- Có n giống tự thụ phấn được sử dụng làm bố, mẹ
- Có n(n – 1)/2 biến thể, trong đó:
  + Chỉ có các cá thể đời con của n(n – 1)/2 phép lai thuận (F_1)
  + Không có các cá thể của n giống bố, mẹ tự thụ phấn.
  + Không có các cá thể đời con của n(n – 1)/2 phép lai nghịch.

Đây là phép lai di-alen không hoàn toàn.

Bảng 4: Cách ghi các số liệu (n giống = n cột = n hàng)

	A	B	C	D	T' (hàng)
A		a + b	a + c	a + d	T'_A
B			b + c	b + d	T'_B
C				c + d	T'_C
D					T'_D
T (cột)	T_A	T_B	T_C	T_D	T (tổng)

Ta có thể tính khả năng tổ hợp chung (GCA) của các giống trong thí nghiệm theo công thức chung:

$$GCA\ x_i = [(Tx_i/(n - 2)] - [\ 2T(tổng)/n(n - 2)] \quad \textbf{(công thức 27)}$$

+ GCA của giống A: $GCA_A = [T_A/(n - 2)] - [\ 2T(tổng)/n(n - 2)]$

+ GCA của giống B: $GCA_B = [T_B/(n - 2)] - [\ 2T(tổng)/n(n - 2)]$

+ GCA của giống C: $GCA_C = [T_C/(n - 2)] - [\ 2T(tổng)/n(n-2)]$

+ GCA của giống D: $GCA_D = [(T_D/(n - 2)] - [\ 2T(tổng)/n(n - 2)]$

(Giá trị 2T (tổng)/ n(n – 2) chính là giá trị trung bình chung X ở công thức 22 hay M ở công thức 23).

3.8.3.2. Sơ đồ lai M × N (lai nhóm gồm M giống với nhóm gồm N giống)

- Số cây làm bố và số cây làm mẹ không bằng nhau: Lai thuận M giống cây với N giống cây cùng loài.

- Số phép lai = (M × N) = số biến thể trong thí nghiệm.

Ví dụ: Lai các giống A, B, C, D với các giống P, Q, R. Số phép lai = (4 × 3) = 12

- Cách ghi chép số liệu về một đặc điểm nào đó (ví dụ năng suất) ở các đời con được ghi ở bảng 5.

Bảng 5: Sơ đồ bố trí số liệu để tính toán khả năng tổ hợp chung trong phép lai M × N

Mẹ / Bố	A	B	C	D	Tổng của hàng
P	a + p	b + p	c + p	d + p	T_p
Q	a + q	b + q	c + q	d + q	T_q
R	a + r	b + r	c + r	d + r	T_R
Tổng của cột	T_A	T_B	T_C	T_D	T (tổng chung)

Khả năng tổ hợp chung của các giống A, B, C, D với các giống P, Q, R được tính theo các công thức chung như sau:

GCA(i) = (T(i)/m hàng) – [T(tổng)/m (hàng) × n (cột)] **(công thức 28a)**

GCA(j) = (T(j)/n hàng) – [T(tổng)/m (hàng) × n (cột)] **(công thức 28b)**

trong đó: i: giống i nằm trên các cột từ i = 1 đến n

j: giống j nằm trên các hàng từ j = 1 đến m

(Giá trị [T(tổng)/m (hàng) × n (cột)] chính là giá trị X ở công thức 22 hay m ở công thức 23).

Trong ví dụ ở bảng 5:

$GCA_A = T_A/M - T/(M \times N)$;

$GCA_B = T_B/M - T/(M \times N)$;

$GCA_C = T_C/M - T/(M \times N)$;

$GCA_D = T_D/M - T/(M \times N)$;

$GCA_P = T_P/M - T/(M \times N)$;

$GCA_Q = T_Q/M - T/(M \times N)$;

$GCA_R = T_R/M - T/(M \times N)$.

Hãy quan sát qua một vài ví dụ cụ thể:

Bảng 6: Ví dụ thực tế về cách điền và tính toán số liệu ở bảng 5

	A	B	C	D	E	T (hàng)	GCA
P	10,1	19,7	20,5	10,7	10,7	71,7	+0,5
Q	14,1	18,4	22,5	15,1	12,9	83,0	+2,41
R	8,3	13,8	14,4	10,3	11,4	58,2	–2,55
T (cột)	32,5	51,9	57,4	36,1	35,0	T = 212,9(Tổng)	
GCA	–3,36	+3,11	+4,94	–2,16	-2,52	X = 14,19(chung)	

Bảng 7: Phân tích phương sai (ANOVA)

Nguồn biến dị	Độ tự do (GL)	Tổng bình phương (S.C)	Bình phương trung bình (C.M)	F (Fischer)
Giống A – E	4	169,19	42,3	11,19**
Giống P – Q	2	61,68	30,84	
Sai số (số dư)	8	27,0	3,44	
Tổng	14	258,36	18,45	

F được tính như sau: F = [(42,3/3,44) × 4 + (30,84/3,44) × 2]/6 = 11,19

(**) có ý nghĩa ở 1%.

Phần mà tổng bình phương chung phân chia cho sự sai khác do các cá thể bố, mẹ gây ra là (169,19 + 61,18)/258,36 = 0,894, tương ứng với giá trị của tương quan (r^2) về đặc điểm năng suất đang xét giữa các cặp bố, mẹ.

Phân tích về ảnh hưởng của khả năng tổ hợp riêng của các cặp lai (ví dụ: R×C)

Hãy quan sát sự sai khác giữa năng suất quan sát được ở hậu thế và năng suất mong đợi ở hậu thế từ phép lai R × C:

- Năng suất quan sát được ở đời con lai $X_{R \times C}$ = 14,4 (theo bảng 6)

- Năng suất mong đợi ở đời con từ phép lai (R×C) được tính theo công thức sau:

$$X'_{RxC} = GCA_R + GCA_C + GCA_{chung} \quad \textbf{(công thức 29)}$$

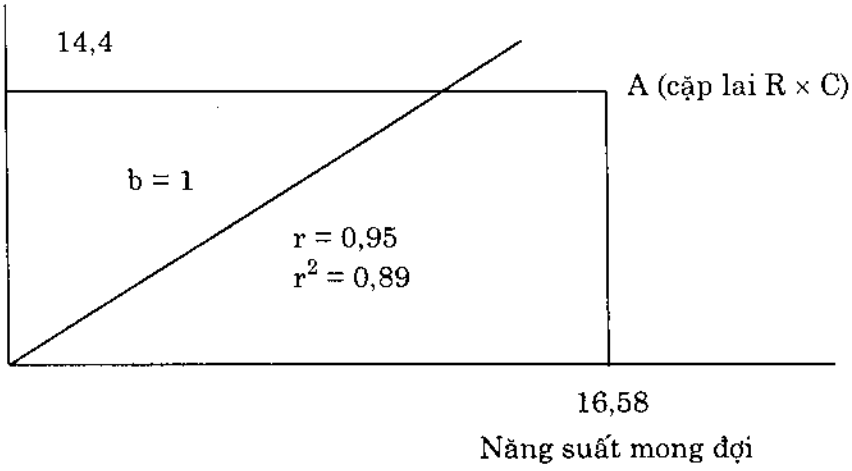
$$= -2,55 + 4,94 + 14,19$$

$$= 16,58$$

- Khả năng tổ hợp riêng của cặp bố – mẹ (R × C) là:

$ECA_{R\times C}$ = Năng suất quan sát được ở đời con – Năng suất mong đợi ở đời con

$= X'_{R\times C} - X_{R\times C} = 14,4 - 16,58 = -2,18.$



Hình 5: Quan hệ giữa năng suất quan sát được và năng suất mong đợi ở đời con của cặp R × C

Theo hình 5, hệ số b = 1 không mang một ý nghĩa sinh học nào, có thể quan sát thấy rằng các đặc điểm toạ độ nằm trên đường thẳng b = 1 cho ta giá trị quan sát được lớn hơn giá trị mong đợi tức là ECA sẽ mang giá trị dương (ECA > 0). Nếu các toạ độ nằm dưới đường thẳng b = 1 thì ECA sẽ mang giá trị âm (ECA < 0).

Trong hình 5: Toạ độ A biểu diễn sự giao nhau giữa giá trị quan sát được và giá trị mong đợi về đặc điểm đang xét ở đời con.

Như vậy, từ công thức 22:

$$X_{AB} = X + GCA_A + GCA_B + ECA_{AB} \qquad \textbf{(công thức 30)}$$

trong đó: X_{AB}: giá trị quan sát được của đặc điểm chọn lọc ở con lai A × B;

X: giá trị trung bình chung của các cá thể đời con;

GCA_A: Khả năng tổ hợp chung của các cá thể giống A (Quyết định bởi các gen thêm trong cấu trúc di truyền của giống A);

GCA_B: khả năng tổ hợp chung của các cá thể giống B (Quyết định bởi các gen thêm trong cấu trúc di truyền của giống B);

ECA_{AB}: khả năng tổ hợp riêng giữa các cá thể của giống A và các cá thể của giống B, thể hiện tương tác giữa các gen của A và B ở đời con.

Tổng ($X + GCA_A + GCA_B$) là giá trị mong đợi về đặc điểm đang chọn lọc.

Ta có thể suy ra cách tính nhanh giá trị khả năng tổ hợp riêng của một cặp bố mẹ theo một đặc điểm nào đó:

$$ECA_{AB} = X_{AB} - (X + GCA_A + GCA_B) \qquad \textbf{(công thức 31)}$$

ECA_{AB} = Giá trị quan sát được ở đời con – Giá trị mong đợi ở đời con.

3.9. Các hình thức chọn lọc ở các cá thể

Trong quá trình lai tạo và chọn giống, giá trị sử dụng của một cây trồng, một giống, một kiểu gen nào đó, hiểu theo nghĩa rộng, có thể được cho bởi một đặc điểm mong muốn nào đó. Nhưng trong thực tế, giá trị của một cây trồng thường được cho bởi một tập hợp các đặc điểm của nó. Vì thế ta hãy bàn về một số hình thức chọn lọc đồng thời một vài đặc điểm của giống. Có nhiều hình thức chọn lọc đồng thời nhiều đặc điểm, nhưng ở đây chỉ xin trình bày các phương pháp có thể cho kết quả chọn lọc cực đại theo đơn vị thời gian.

Có hai hình thức chọn lọc về nhiều đặc điểm:

– Chọn lọc tandem là sự chọn lọc đơn giản về k đặc điểm ở k thế hệ chọn lọc liên tiếp.

– Chọn lọc đồng thời k đặc điểm ở cùng một thế hệ chọn lọc:

a/ Chọn lọc theo tiêu chuẩn độc lập nhau giữa các đặc điểm.

b/ Chọn lọc theo chỉ số xếp loại của giống theo các đặc điểm.

c/ Chọn lọc theo tỷ số chọn lọc.

d/ Chọn lọc theo chỉ số chọn lọc.

e/ Chọn lọc theo chỉ số nhân.

Sau đây xin trình bày tóm tắt các phương pháp chọn lọc này:

3.9.1. Chọn lọc tandem (hay chọn lọc đơn giản về k đặc điểm ở k thế hệ liên tiếp)

Chọn lọc đơn giản (tandem) về k đặc điểm là sự chọn lọc lần lượt về k đặc điểm ở k thế hệ liên tục (k chu kỳ chọn lọc), ở mỗi chu kỳ chọn lọc chỉ thực hiện sự chọn lọc về một đặc điểm. Với sự chọn lọc tandem có thể đạt cường độ chọn lọc $I = S/\sigma_P$ cao nhất đối với một đặc điểm X_j nào đó. Khi có sự tương quan dương giữa một đặc điểm X_j và các đặc điểm khác, có thể mong đợi rằng các kiểu gen ưu việt về đặc điểm X_j sẽ biểu hiện đồng thời tính ưu việt về các đặc điểm khác (j = 1 đến k).

Nhược điểm của chọn lọc đơn giản là:

+ Với chu kỳ chọn lọc thứ nhất đã làm giảm hiệu quả của các chu kỳ chọn lọc sau. Vì ở chu kỳ chọn lọc thứ nhất về đặc điểm X_j nào đó người chọn lọc đã không chú ý đến những gen quyết định các tính trạng khác. Cứ như vậy, ở mỗi chu kỳ chọn lọc đơn người ta có thể loại đi các cá thể có đặc điểm mong muốn nào đó cần được giữ lại, nếu mục đích của chu kỳ chọn lọc đó là một đặc điểm mong muốn khác.

+ Kiểu chọn lọc tadem cần nhiều chu kỳ chọn lọc do đó rất mất thời gian và sự chọn lọc ở các chu kỳ chọn lọc sau càng phức tạp, vì phải duy trì mức độ chọn lọc cao như đối với đặc điểm đã chọn lọc ở chu kỳ trước.

+ Kết quả của sự chọn lọc tadem có thể rất thấp nếu các đặc điểm có tương quan âm chặt chẽ với nhau.

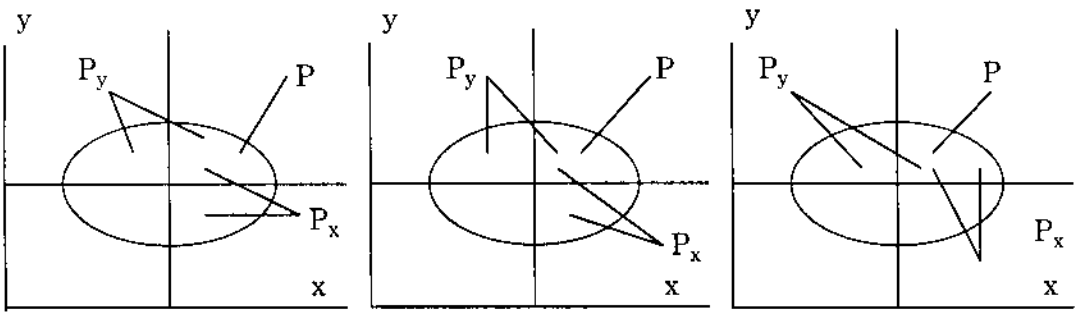
3.9.2. Chọn lọc đồng thời k đặc điểm ở cùng một thế hệ

Với sự chọn lọc về một đặc điểm của giống nào đó ta sẽ đạt được kết quả chọn lọc lớn nhất. Nhưng kết quả của sự chọn lọc đồng thời về k đặc điểm của giống đó sẽ chỉ bằng 1/k.

3.9.2.1. Chọn lọc đồng thời k đặc điểm theo tiêu chuẩn độc lập về các đặc điểm

Các tiêu chuẩn chọn lọc là các giá trị tối thiểu của các đặc điểm mà cá thể được chọn đồng thời phải có. Hình thức chọn lọc đồng thời với nhiều tiêu chuẩn chọn lọc là hình thức được sử dụng nhiều trong chọn giống.

Ví dụ: Chọn lọc đồng thời về 2 đặc điểm X và Y:



X và Y tương quan + X và Y tương quan − X và Y độc lập nhau

Hình 6: Tỷ lệ % cá thể của quần thể được chọn lọc đồng thời theo 2 đặc điểm:

P_x: phần quần thể được chọn theo đặc điểm X;

P_y: phần quần thể được chọn theo đặc điểm Y;

P : phần quần thể được chọn đồng thời theo cả 2 đặc điểm ($P = P_x.P_y$).

Với thí nghiệm chọn lọc đồng thời về k đặc điểm, kết quả chọn lọc sẽ là:

$$P = P_1.P_2.P_3.P_j... P_k = \prod_{j=1}^{k} p_j \quad (P_j < 1) \qquad \textbf{(công thức 32)}$$

Ưu điểm: Phương pháp này có ưu điểm hơn phương pháp chọn lọc tadem vì chọn lọc đồng thời nhiều đặc điểm của giống.

Nhược điểm: Kết quả chọn lọc theo phương pháp này thường thấp vì sự xác định các tiêu chuẩn chọn lọc thường không chú ý đến hệ số di truyền của các đặc điểm và các mối tương quan giữa các đặc điểm cũng không mang sự đánh giá kinh tế của chúng.

3.9.2.2. Chọn lọc theo chỉ số xếp loại của các giống

Đây là phương pháp của Mulamba và Mock (1978) dựa trên sự xếp loại các đặc điểm được chọn lọc theo chỉ số xếp loại đối với từng đặc điểm X_j. Chỉ số xếp loại của một giống i nào đó (I_i) là tổng các chỉ số xếp loại của các đặc điểm X_j đó. Các giống được chọn là các giống có chỉ số xếp loại I_i cao nhất.

Chỉ số xếp loại của giống i được tính như sau:

$$I_i = \sum_{j=1}^{k} \text{(Chỉ số xếp loại các đặc điểm } X_j) \qquad \textbf{(công thức 33)}$$

Trong bảng 8: Giống được chọn là giống số 3.

Bảng 8: Tính chỉ số xếp loại của các giống

Giống i	Chỉ số xếp loại của các đặc điểm X_j					Chỉ số xếp loại của giống i (I_i)
	Chỉ số xếp loại của x_1	Chỉ số xếp loại của x_2	Chỉ số xếp loại của x_3	Chỉ số xếp loại của x_j	Chỉ số xếp loại của k	
1	7	4	8			19
2	6	9	3			18
3	9	6	10			25
–						
i						
n						

3.9.2.3. Chọn lọc theo tỷ số chọn lọc

Tỷ số chọn lọc của các đặc điểm X_j ở giống i nào đó là tỷ số giữa giá trị của các đặc điểm X_j của tất cả các giống i (i = 1 đến n) trong một thí nghiệm chọn lọc.

Bảng 9: Tính tỷ số chọn lọc của các giống

Giống i	Chỉ số xếp loại của các đặc điểm X_j					Chỉ số xếp loại của giống i (I_i)
	Chỉ số xếp loại của x_1	Chỉ số xếp loại của x_2	Chỉ số xếp loại của x_3	Chỉ số xếp loại của x_j	Chỉ số xếp loại của k	
1	8	5	9			22
2	9	10	14			33
3	6	8	12			26
–						
i				I_{ij}		
n					I_{nk}	

Tỷ số chọn lọc của các đặc điểm X_j (tức là các I_{ij}) được tính như sau:

$$I_{ij} = X_j / (\sum_{j=1}^{n} X_{ij})n \qquad (j = 1 \text{ đến } k)$$

Tỷ số chọn lọc của giống i nào đó được tính như sau:

$$I_i = \sum_{j=1}^{k} (\text{Tỷ số chọn lọc của các đặc điểm } X_j) = \sum_{j=1}^{n} X_{ij} \quad \textbf{(công thức 34)}$$

Trong bảng 9, giống được chọn là giống số 2.

Ưu điểm của phương pháp này là có hiệu quả cao hơn phương pháp chọn lọc theo chỉ số xếp loại các giống. Theo giả thiết rằng giá trị trung bình sẽ thay đổi một cách tương đối tỷ lệ thuận với độ lệch chuẩn thì phương pháp này có thể đạt hiệu quả tương tự như hiệu quả của phương pháp chọn lọc theo chỉ số chọn lọc (Xin xem mục dưới đây).

Tương quan giữa phương pháp chọn lọc theo chỉ số xếp loại giống với phương pháp chọn lọc theo chỉ số chọn lọc là 0,905, trong khi tương quan giữa phương pháp chọn lọc theo tỷ số chọn lọc giống với phương pháp chọn lọc theo chỉ số chọn lọc là 0,968.

3.9.2.4. Chọn lọc theo chỉ số chọn lọc

Chỉ số chọn lọc của một giống i nào đó là tổng chỉ số chọn lọc của các đặc điểm X_j. Chỉ số chọn lọc của các đặc điểm X_j này là tích của các giá trị trung bình của đặc điểm X_j với một hệ số (C_j). Hệ số C_j là hệ số đánh giá giá trị của các đặc điểm đó.

Hệ số C_j đánh giá giá trị của các đặc điểm này có thể là:

- Hệ số di truyền của các đặc điểm đó (h^2)

- Tương quan giữa đặc điểm đó với năng suất của giống (r)

- Hệ số hồi quy đa biến giữa đặc điểm đó với các đặc điểm khác (b)

- Phương sai kiểu gen (σ^2_G) hoặc phương sai kiểu hình (σ^2_P) của đặc điểm đó.

- Giá trị kinh tế tương đối của mỗi đặc điểm (Giá thương mại của sản phẩm của giống mang đặc điểm đó)...

Như vậy, giá trị của mỗi đặc điểm X_j sẽ được nhân với hệ số C_j tương ứng của nó và giá trị tổng của các tích đó sẽ là Chỉ số chọn lọc của giống i (I_i)

$$I_i = C_1X_1 + C_2X_2 + C_jX_j + ... + C_kX_k = \sum_{j=1}^{k} C_jX_j \quad (i = 1 \text{ đến } n) \quad \textbf{(công thức 35)}$$

(Người ta sẽ chọn các giống có giá trị I_i cao nhất)

Với sự chọn lọc dựa trên hai đặc điểm, Henderson (1963) thay các giá trị X_j bằng các giá trị của phân sai chọn lọc và có công thức tính chỉ số chọn lọc của giống i (I_i) như sau:

$$I_i = C_1(X_1 - P_1) + C_2(X_2 - P_2) \quad (i = 1 \text{ đến } n) \qquad \textbf{(công thức 36)}$$

X_1, X_2: các giá trị trung bình của n cá thể được chọn về mỗi đặc điểm X_1 và X_2

P_1, P_2: các giá trị trung bình của các cặp bố, mẹ 1 và 2

$S_1 = X_1 - P_1$ và $S_2 = X_2 - P_2$ là các phân sai chọn lọc

Có thể tổng quát hoá công thức trên cho k đặc điểm, ta có chỉ số chọn lọc của một giống i nào đó như sau:

$$I_i = \sum_{j=1}^{k} C_j(X_j - P_j) \qquad \textbf{(công thức 37)}$$

X_j: các giá trị trung bình của n cá thể được chọn về mỗi đặc điểm j;

P_j: các giá trị trung bình về đặc điểm j của các cặp bố, mẹ;

C_j: các hệ số tương đương đánh giá giá trị của đặc điểm j.

Một ví dụ về C_j: Chỉ số chọn lọc của giống có thể là chỉ số về năng suất được cân đối bởi hệ số tương đương C_j, ví dụ như: tiêu chuẩn chất lượng và giá sản phẩm theo từng tiêu chuẩn chất lượng. Ví dụ: Trong nghiên cứu về chọn lọc giống hoa nào đó, có thể chọn lọc dựa trên giá thành của các loại hoa tuỳ thuộc vào chất lượng của hoa, theo công thức sau:

$$I_i = C_1X_1 + C_2X_2 + C_3X_3 \qquad \textbf{(công thức 38)}$$

trong đó: X_1: năng suất của loại hoa 1; C_1 = (Giá hoa loại 1)/(Giá hoa loại 3);

X_2: năng suất của loại hoa 2; C_2 = (Giá hoa loại 2)/(Giá hoa loại 3);

X_3: năng suất của loại hoa 3; C_3 = (Giá hoa loại 3)/(Giá hoa loại 3) = 1.

3.9.2.5. Chọn lọc theo chỉ số nhân

Chỉ số nhân chọn lọc của một giống i nào đó (I_i) là tích của các hiệu giữa giá trị kiểu hình của mỗi giống về đặc điểm X_j và các giá trị kiểu hình thấp nhất của đặc điểm X_j ở một giống i nào đó.

$$I_i = \prod_{j=1}^{k}(X_j - \text{Xmin của j}) \quad (i = 1 \text{ đến } n) \qquad \textbf{(công thức 39)}$$

trong đó: X_j: là giá trị trung bình kiểu hình của đặc điểm X_j;

X min của j: là giá trị thấp nhất của đặc điểm X_j ở giống i nào đó;

Π : là tích của các hiệu giữa X_j và X min của j.

IV. THU HOẠCH, CHẾ BIẾN, BẢO QUẢN VÀ KIỂM TRA GIỐNG

4.1. Thu hoạch

Để có chất lượng hạt giống cao phải thu hoạch vào đúng lúc hạt chín, nếu thu hoạch lúc chưa chín năng suất sẽ giảm, hạt lép nhiều, chất lượng giống không đảm bảo, nếu để chín quá hạt sẽ bị gãy, nứt hoặc nảy mầm dẫn tới giảm chất lượng giống. Sự chín của giống trên đồng ruộng gọi là chín hình thái. Những biểu hiện của chín hình thái ở mỗi giống hoàn toàn khác nhau, cùng một giống gieo ở các mùa vụ khác nhau chín hình thái cũng khác nhau, khi vừa chín hình thái nên thu hoạch giống ngay, ví dụ ở đương quy khi có 70 – 75% số hạt trên bông chuyển màu vàng chanh thì thu hoạch giống là tốt nhất, ở bạch chỉ khi chín thì vỏ áo của hạt vàng khô, ngưu tất chín thì lá vàng, vỏ quả vàng v.v...

Có nhiều giống khi chín hình thái xong thì các các quá trình diễn biến sinh lý hoá sinh trong hạt cũng hoàn thành, nếu cung cấp đủ nhiệt và ẩm thì có thể bắt đầu nảy mầm để bước sang chu kỳ mới. Có một số giống sau khi chín hình thái chưa có khả năng nảy mầm khi cung cấp đủ điều kiện cần thiết cho sự nảy mầm, mà cần một khoảng thời gian bảo quản nhất định mới có thể bắt đầu nảy mầm được. Thời gian tính từ lúc hạt (củ) giống chín hình thái đến khi chúng có thể nảy mầm được gọi là thời gian chín sinh lý, hay thời gian ngủ nghỉ. Các giống khác nhau có thời gian ngủ nghỉ khác nhau, bảo quản sau thời gian ngủ nghỉ hạt (hay củ) nảy mầm bình thường. Nếu muốn gieo giống trước khi giống qua thời gian ngủ nghỉ thì phải dùng biện pháp vật lý, hoá học phá vỡ đặc tính ngủ nghỉ. Đối với giống có thời gian ngủ nghỉ thì thu hoạch thuận lợi hơn những giống không có thời gian ngủ nghỉ ví dụ một số giống bạch truật do không có thời gian ngủ nghỉ nên có hiện tượng hạt nảy mầm trên hoa khi gặp mưa liên tục 2 – 3 ngày vào lúc hạt bạch truật chín. Điều đó đã ảnh hưởng đến năng suất và

phẩm chất đáng kể đặc biệt là làm giảm tỷ lệ nảy mầm, thậm chí mất sức nảy mầm nếu thu hoạch gặp thời tiết xấu.

4.2. Chế biến và bảo quản giống

Hạt (củ) giống thu về có hàm lượng nước cao, vì vậy nếu để thành đống lớn, nhiệt toả ra do hô hấp của hạt không thoát kịp sẽ gây nóng. Nhiệt độ cao lại kích thích sự phát triển của nấm mốc bên ngoài và kích thích các hoạt động sinh lý bên trong như: tăng cường độ hô hấp, kích thích hoạt động của các men phân giải đường, tinh bột. Mọi hoạt động trên đều gây hại cho phẩm chất gieo trồng của hạt giống như làm giảm sức nảy mầm, chuyển màu, gây mùi hôi thối v.v... Vì vậy các cơ sở sản xuất giống cây có hạt thường được trang bị máy sấy hạt để kịp thời hạ độ ẩm của hạt giống, khi không có máy sấy cần chủ động chọn ngày nắng ráo, bố trí nhân lực hợp lý để thu đến đâu tuốt đập phơi ngay đến đấy.

Các loại hạt giống cần phơi sấy đến độ ẩm bảo quản trong kho. Sự hạ độ ẩm cần được tiến hành từ từ, không nên hạ đột ngột sẽ ảnh hưởng đến sức sống. Thí dụ, ở lúa theo các nghiên cứu của Nhật Bản thì hạ nhiệt độ mỗi giờ từ 0,3 – 0,4% là phù hợp cho việc làm giống. Khi phơi trên sân nếu gặp nắng hè gay gắt không nên dàn mỏng mà nên phơi dày và đảo thường xuyên tránh gây nứt rạn hạt gạo ảnh hưởng đến quá trình nảy mầm. Đặc biệt đối với một số hạt chứa lượng tinh dầu cao như đương quy, bạch chỉ, bạc hà, sả... nếu phơi dưới nắng gay gắt, nhiệt độ lên cao sẽ gây chảy dầu làm mất sức sống, do vậy cần phơi dưới nắng dịu, hoặc hong dưới bóng dâm.

Sau khi khô, cần tiến hành làm sạch rơm rác, hạt cỏ dại, hạt lép lửng, tạp chất bằng thủ công hoặc máy sàng phân loại hạt. Lô hạt sạch được đóng bao, chú ý ghi thẻ đầy đủ bỏ vào bao và đeo bên ngoài, sau đó đưa vào kho (xây đúng quy cách) để bảo quản. Cần xử lý chống mối mọt trong kho bằng thuốc hoá học bằng xông hơi để tiêu diệt toàn bộ trứng và mọt trưởng thành. Những lô giống được xử lý thường có mùi và nhiễm độc, nếu sử dụng làm giống không hết mà cần chuyển làm lương thực hoặc dược liệu cần chú ý kiểm tra cẩn thận tránh gây độc hại cho người dùng.

4.3. Nội dung và phương pháp kiểm tra chất lượng giống và hạt giống

4.3.1. Nội dung

Bao gồm các kiểm tra ngoài đồng và trong phòng thí nghiệm.

4.3.1.1. Kiểm tra ngoài đồng

Nhiệm vụ chủ yếu của kiểm tra ngoài đồng là đánh giá độ thuần của giống căn cứ trên các đặc trưng, đặc tính của cây ở ngoài đồng. Qua kiểm tra ở ngoài đồng để phát hiện cỏ dại, sâu bệnh; phát hiện sự lẫn tạp của các giống khác trong quá trình gieo trồng và chế biến hạt giống.

- Kiểm tra ngoài đồng có thể xác định được tính xác thực của giống, tức là xem giống đó có phải đúng thực không hay là giống khác. Nguồn gốc của giống.

- Xác định độ đúng giống trên cơ sở xác định được tỷ lệ lẫn của các giống khác hoặc tỷ lệ lẫn của cỏ dại để có kế hoạch chọn lọc và xử lý thích đáng.

- Khi kiểm tra ngoài ruộng cần phải quan sát tìm hiểu điều kiện tự nhiên, đất đai, các biện pháp kỹ thuật đã áp dụng; tình hình sinh trưởng của giống trên đồng ruộng. Giống sẽ thu hoạch được lấy từ cây một năm tuổi, hay hai năm tuổi.

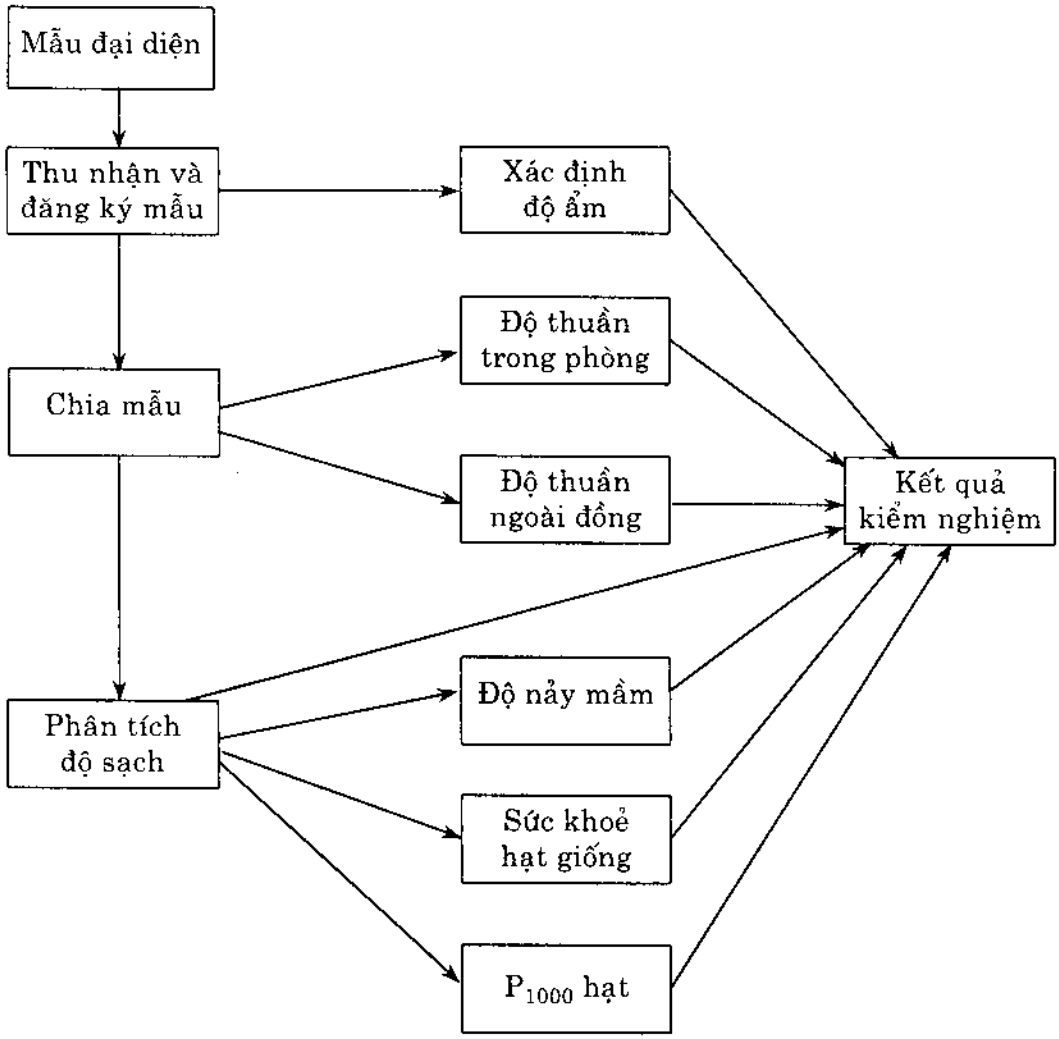
- Kiểm tra ngoài đồng có vai trò bổ sung cho các kiểm nghiệm ở trong phòng để có kết luận chính xác về giống cần kiểm tra.

4.3.1.2. Kiểm tra trong phòng thí nghiệm

Để kiểm tra hạt giống một cách chặt chẽ, sau khi kiểm tra giống ở ngoài đồng cần phải kiểm tra ở trong phòng, vì có một số chỉ tiêu không thể kiểm nghiệm được ở ngoài ruộng, mặt khác trong quá trình thu hoạch, chế biến hạt giống, vận chuyển, bảo quản giống vẫn có thể lẫn tạp.

Kiểm tra trong phòng tập trung vào các nội dung chủ yếu sau: độ sạch, độ thuần của hạt giống, độ nảy mầm, độ ẩm, sức khoẻ hạt giống, khối lượng 1000 hạt.

Mẫu đại diện cho các cơ sở cần kiểm nghiệm gửi đến trạm kiểm nghiệm. Phòng kiểm nghiệm của trạm có trách nhiệm thu thập mẫu, đăng ký và vào sổ gốc có đánh số thứ tự, số kiểm nghiệm, tên địa phương của người xin kiểm nghiệm, loại cây thuốc, số lô hạt giống, ngày nhận mẫu. Sau khi đăng ký vào sổ mẫu được chia ra làm nhiều phần lần lượt đi vào các bộ phận kiểm nghiệm ở phòng thí nghiệm như: Kiểm tra để xác định độ ẩm, độ thuần (xác định số lượng hạt lẫn tạp khác giống, khác dạng). Một phần mẫu được giữ lại để kiểm tra ngoài đồng bằng con đường gieo trồng. Kiểm nghiệm độ nảy mầm, sức khoẻ hạt giống, P_{1000} hạt. Sau khi hoàn thành các kiểm nghiệm tất cả số liệu được tính toán và lập biên bản báo cáo kết quả.



Hình 7: Sơ đồ biểu diễn trình tự phân tích mẫu kiểm nghiệm

4.3.2. Phương pháp lấy mẫu hạt giống kiểm tra

Phương pháp kiểm tra có thể bằng những quan sát đo đếm trực tiếp, thông qua các phương pháp vật lý, hoá học, sinh vật hoặc cảm quan để đánh giá.

Tuy nhiên khi tiến hành kiểm nghiệm trong phòng và ngoài đồng đều phải tuân theo các nguyên tắc và thủ tục tiến hành chung cho các loại kiểm nghiệm như: Yêu cầu sự đồng đều của lô hạt giống, lấy mẫu và các thủ tục lấy mẫu, các quy định khi quan sát về các cây mẫu, hạt v.v... cũng như khi tính toán các kết quả kiểm nghiệm.

Trước khi lấy mẫu hạt giống để kiểm nghiệm, chúng ta cần hiểu một số thuật ngữ thường dùng trong lấy mẫu.

- *Lô hạt giống:* Là toàn bộ hạt giống của một giống cây trồng nào đó mà người ta đã biết nguồn gốc lịch sử và được xác nhận một số thông tin nhất định.

Yêu cầu của lô hạt giống trước khi tiến hành lấy mẫu là phải đồng đều, lô phải có đánh số và được ghi nhãn. Khối lượng của lô lớn nhỏ tuỳ thuộc vào từng loại hạt giống như một số loại cây trồng: Ngô, lúa mì, lúa nước không được vượt quá 20.000 kg. Các loại hạt: Cao lương, kê và một số loại hạt tương đương tối đa là 10.000 kg, còn cây thuốc khối lượng nhỏ hơn nhiều.

- *Mẫu gốc:* Bao gồm nhiều mẫu nhỏ của phần hạt giống đã lấy mẫu từ các vị trí khác nhau của lô hạt giống.

- *Mẫu hỗn hợp:* Tất cả các mẫu gốc lấy từ các thành phần khác nhau của lô hạt giống, được trộn đều lại tạo thành mẫu hỗn hợp.

- *Mẫu đại diện:* Là một phần của mẫu hỗn hợp để gửi đến phòng kiểm nghiệm hạt giống. Mẫu đó đôi khi có thể giống mẫu hỗn hợp, đó là trường hợp mẫu hỗn hợp không quá nhiều mà vừa đủ để làm thành mẫu đại diện. Khi mẫu hỗn hợp nhiều quá có thể giảm bớt đi một nửa theo cách chia ngẫu nhiên.

4.3.2.1. Nguyên tắc lấy mẫu

Nguyên tắc cơ bản của việc lấy mẫu là phải lấy được nhiều phần nhỏ hạt giống (gọi là mẫu gốc) ở các vị trí khác nhau trong lô, có tính chất đại diện. Những phần nhỏ này được trộn đều cùng với nhau tạo thành mẫu hỗn hợp. Mẫu hỗn hợp chính là sự thu nhỏ của lô hạt giống, và có thể sử dụng để đại diện cho lô hạt giống. Từ mẫu hỗn hợp sẽ chia nhỏ ra thành mẫu đại diện, để gửi đến các phòng kiểm nghiệm phục vụ cho kiểm tra chất lượng hạt giống.

Lô hạt giống thường chứa một lượng hạt giống tương đối lớn, chúng ta không thể thực hiện kiểm tra toàn bộ hạt giống có trong lô đó. Các kiểm nghiệm để xác minh chất lượng của một lô hạt giống được tiến hành trên mẫu đã lấy từ lô hạt giống đó. Vì vậy khi lấy mẫu cần phải chú ý đến tính chất đại diện gần như tuyệt đối cho cả lô. Lô hạt giống đó được sử dụng hay bị loại bỏ là tuỳ thuộc hoàn toàn vào các kết quả phân tích từ mẫu lấy đã được công nhận. Điều đó rất quan trọng cần đảm bảo những mẫu lấy phải được chính xác.

4.3.2.2. Các phương pháp lấy mẫu

Mẫu có thể lấy trong giai đoạn chế biến gia công, bán hạt giống hoặc trước khi vào vụ gieo trồng. Lấy mẫu sau khi hạt giống đã được làm sạch, phân hạng v.v...

Trong quá trình vận chuyển từ nơi này đến nơi khác để phục vụ cho quá trình gieo trồng, hạt giống thường đựng trong trong bao chất đống trên sàn ô tô

hay có thể đổ đống trên sàn kho. Các mẫu lấy để kiểm nghiệm có thể lấy ở hầu hết các chỗ của tất cả các phần trong lô hạt giống. Hạt giống lấy mẫu phải được chứa đựng trong cùng một loại bao bì như nhau.

Khối lượng tối đa của lô hạt giống là 1 tấn, khối lượng mẫu lấy đại diện chỉ có 1 kg. Tỷ lệ khối lượng tối đa của mẫu đại diện đối với tỷ lệ hạt giống trong lô chỉ là 1/1000, vì thế mẫu đã lấy phải đại diện được cho lô hạt giống. Sử dụng các phương pháp lấy mẫu đúng sẽ giúp cho kiểm nghiệm đạt kết quả tốt. người ta có thể sử dụng các phương pháp sau đây:

- Lấy mẫu bằng tay:

Phương pháp này có thể hoàn toàn chủ động để lấy được một cách cẩn thận, nhưng do tay của người quá ngắn chỉ có thể lấy được từ nửa bao trở lên và xuyên qua theo độ sâu của bao khoảng 40 cm. Để khắc phục điều này có thể đổ bao ra sàn để lấy mẫu. Phương pháp được tiến hành như sau:

Bàn tay xoè ra với các ngón tay duỗi thẳng và đẩy vào trong hạt giống, sau đó nắm lấy hạt và lấy ra ngoài. Các ngón tay sẽ nắm chắc như vậy để không một hạt giống nào ở trong mẫu được rơi ra ngoài.

- Lấy mẫu bằng dụng cụ cầm tay:

Dùng các loại xiên lấy mẫu. Các loại xiên này có thể có độ dài từ 50 – 100 cm, có đường kính từ 1,8 – 2,5 cm. Xiên có thể làm bằng sắt hoặc tôn, xiên có cấu tạo giống như chiếc xilanh, nhọn một đầu còn một đầu có tay cầm, gồm hai ống tròn, ống tròn bọc ngoài có từ 3 - 6 lỗ, lỗ rộng tối thiểu 20 mm. Khi lấy mẫu, dùng xiên xiên vào trong bao hạt giống. Dùng tay quay ống tròn bên trong và các lỗ được mở ra, hạt giống rơi vào đầy các lỗ, từ từ kéo xiên ra ngoài và đổ hạt giống vào các khay đựng hạt. Các bao giống đã lấy mẫu bằng xiên phải dán kín lại nếu là bao bằng các chất dẻo, hoặc khâu lại nếu là bao gai hoặc dứa.

Trước khi lấy mẫu phải vệ sinh sạch sẽ các xiên lấy mẫu.

Ngoài các phương pháp trên, ở một số nước có nền nông nghiệp tiên tiến, người ta có thể lấy mẫu tự động, kết hợp trong quá trình chế biến khi đóng bao bằng máy.

4.3.2.3. Phương pháp chia mẫu

Các mẫu gốc lấy được sau khi đã được trộn đều có thể chia theo các phương pháp sau đây:

- Hạt giống được dàn đều ra trên một mặt phẳng tạo thành một hình vuông hoặc gần vuông. Độ dày của lớp hạt cỡ nhỏ không được lớn hơn 1,5cm; độ dày

của lớp hạt cỡ to không được lớn hơn 5 cm. Dùng thước dẹt chia mẫu ra theo hai đường chéo của hình vuông, sau đó lấy ra hai phần đối đỉnh hoặc tuỳ theo yêu cầu mẫu lấy về khối lượng. Tiếp tục trộn đều chia lặp lại như trên cho đến khi đạt được khối lượng mẫu cần phân tích.

- Dùng dụng cụ chia: Dụng cụ được cấu tạo giống như một hộp hình phễu có ngăn đều hai phần. Khi chia mẫu chỉ việc đổ hạt giống lên đến đỉnh của vách ngăn, hạt giống sẽ chia đều về hai phía, lấy 1/2 và tiếp tục chia lại cho đến khi đạt được lượng mẫu cần lấy.

- Phương pháp thìa: Hạt giống sau khi trộn đều, được trải ra trên một khay rộng. Dùng thìa xúc hạt giống ở các vị trí khác nhau ở trong khay.

4.3.2.4. Mức độ lấy mẫu

Mức độ lấy mẫu sẽ căn cứ vào nhu cầu đòi hỏi khi kiểm nghiệm cho từng loại, tối thiểu như sau:

+ Trường hợp lô hạt giống đựng ở trong bao:

< 5 bao: Mỗi bao lấy một mẫu và thường số mẫu lấy ít nhất là 5.

6 – 30 bao: Ba bao lấy một mẫu và không được lấy dưới 5 mẫu.

> 31 bao: Cứ 5 bao lấy một mẫu và không được lấy dưới 10 mẫu.

+ Trường hợp hạt giống đổ ở trong kho:

Số lượng mẫu lấy sẽ tuỳ thuộc vào số lượng hạt giống:

Dưới 50 kg: Lấy 3 mẫu gốc.

500 kg: Lấy 5 mẫu gốc

501 – 3000 kg: Cứ 300 kg lấy một mẫu gốc. Số lượng mẫu lấy không được dưới 10 mẫu.

4.3.2.5. Độ không đồng đều của lô hạt giống khi lấy mẫu

Trước khi lấy mẫu, lô hạt giống cần phải được trộn đều, để ít có sự sai khác trong lô. Nếu như lô hạt giống có sự sai khác nhiều, việc kiểm nghiệm có thể dừng lại để trộn lại mẫu. Tuy vậy thực tế vẫn có sự sai khác, không đồng đều giữa các bao của lô hạt giống hoặc giữa các mẫu gốc. Do đó người ta phải tính đến độ không đồng đều của các bao đựng trong lô hạt giống. Độ không đồng đều được ký hiệu là H (Heterogeneity).

$$H = \frac{V}{W} - 1$$

trong đó: V: biến động thực tế tìm thấy của các mẫu trong những chỉ tiêu chất lượng đã được kiểm nghiệm;

W: biến động lý thuyết của các mẫu trong những chỉ tiêu chất lượng đã được kiểm nghiệm:

$$W = \frac{N\Sigma X^2 - (\Sigma X)^2}{N(N-1)}$$

N: số mẫu lấy trong lô;

X: kết quả được tính bằng phần trăm của các chỉ tiêu chất lượng trong một mẫu;

$$W = \frac{\overline{X}(100 - \overline{X})}{n}$$

ở đây: $\overline{X}$: giá trị trung bình của tất cả các mẫu trong lô đã được xác định:

$$\overline{X} = \frac{\Sigma X}{n}$$

n: số hạt giống đã được xác định trong mỗi mẫu (1000 hạt hoặc 2000 hạt cho kiểm nghiệm độ thuần, 100 hạt cho kiểm nghiệm độ nảy mầm).

Độ không đồng đều có ý nghĩa được quy ước theo bảng sau:

Nếu giá trị X vượt quá giới hạn cho phép, độ không đồng đều H không cần phải tính toán nữa, mà kết quả kiểm nghiệm được chấp nhận để báo cáo.

Ví dụ:

Độ sạch > 99,8%
Độ nảy mầm > 99%
Số hạt lẫn < 2% khối

Trong trường hợp này chỉ có thể 1 – 2 bao có chất lượng kém còn đa số các bao khác có chất lượng hạt giống rất cao.

Số bao	H	Số bao	H
6	2,02	19	0,93
7	1,80	20	0,90
8	1,64	21	0,88
9	1,51	22	0,85
10	1,41	23	0,83
11	1,32	24	0,81
12	1,25	25	0,79
13	1,18	26	0,77
14	1,13	27	0,76
15	1,08	28	0,74
16	1,04	29	0,72
17	1,00	30	0,71
18	0,97	31	0,70

4.3.2.6. Các thủ tục sau khi lấy mẫu

Mẫu sau khi lấy phải được đựng trong bao có niêm phong kín và ghi đầy đủ nhãn. Các mẫu cần phải được gửi ngay đến cơ quan kiểm nghiệm. Riêng mẫu dùng để kiểm tra độ ẩm và độ nảy mầm không được đựng trong bao dễ hút nước.

Các mẫu phải thật sự là mẫu của lô hạt giống đã lấy. Mỗi mẫu phải có nhãn riêng và đã được niêm phong, nếu có điều kiện kẹp chì là tốt nhất.

Biên bản kèm theo mẫu cùng với một số thông tin cần thiết như sau:

Tên người gửi:
Địa chỉ:
Loài:
Giống:
Nguồn gốc và loại lô hạt giống:
Chất lượng hạt giống:
Số bao:
Yêu cầu kiểm nghiệm loại:
Dấu kiểm tra:
Chứng nhận độ ẩm:
Độ thuần:
Độ nảy mầm:
Nơi và ngày lấy mẫu:
Đã lấy mẫu bằng:
Người lấy mẫu:

4.3.3. Kiểm tra độ sạch của hạt giống

Độ sạch hay còn gọi là độ tinh khiết của hạt giống. Mục đích của phân tích độ sạch là xác định phần trăm các thành phần có trong mẫu so với lượng mẫu đã kiểm nghiệm và suy ra độ lẫn tạp của lô hạt giống.

Trên cơ sở xác định được độ sạch, có thể biết được giá trị gieo trồng của giống.

$$\text{Giá trị gieo trồng của giống} = \frac{\text{Độ sạch} \times \text{độ nảy mầm}}{100}$$

4.3.3.1. Phương pháp kiểm tra

Khối lượng mẫu để kiểm tra độ sạch tuỳ thuộc vào các loại cây trồng khác nhau. Thông thường đối với một số loại cây trồng như sau:

Loại hạt	Khối lượng mẫu kiểm nghiệm độ sạch (g)
Đương quy	200
Bạch chỉ	300
Ngưu tất	100
Bạch truật	500
Cúc gai dài	400
Sả hoa hồng	100

Mẫu phân tích độ sạch được trải ra trên mặt bàn phẳng có đầy đủ ánh sáng. Dựa vào sự phân tích bằng mắt để nhận biết các hạt. Công việc tiến hành làm bằng tay là chủ yếu. Mẫu được tách ra làm 3 phần như sau:

- Hạt sạch: Bao gồm tất cả các hạt giống nguyên vẹn (không bị sứt mẻ) của các mẫu đại diện đã lấy để kiểm nghiệm. Thậm chí kể cả các hạt nhỏ, nhăn nheo, chưa chín, bệnh, các hạt hỏng và nếu trên 1/2 khối lượng hạt gốc nguyên vẹn đều được tính là hạt sạch.

- Các hạt khác: Có thể bao gồm các hạt khác giống, khác loài, cỏ dại. Mỗi hạt cần phải phân biệt đúng, chính xác.

- Các tạp chất chết: Các loại tạp chất tìm thấy trong mẫu phân tích như; sỏi, đất, đá, rơm, rác; ngoài ra các hạt vỡ dưới 1/2 khối lượng hạt gốc nguyên vẹn cũng được xếp vào các tạp chất chết.

4.3.3.2. Tính toán các kết quả phân tích

X: khối lượng hạt sạch

Y: khối lượng tạp chất chết

Z: khối lượng hạt khác

$\sum$ khối lượng mẫu = X + Y + Z

$$\text{Phần trăm (\%) hạt sạch} = \frac{X}{X+Y+Z} \times 100$$

$$\text{Phần trăm (\%) tạp chất chết} = \frac{Y}{X+Y+Z} \times 100$$

$$\text{Phần trăm (\%) các hạt khác} = \frac{Z}{X+Y+Z} \times 100$$

Các kết quả kiểm nghiệm được báo cáo bằng phần trăm (%) khối lượng của mỗi phần so với khối lượng mẫu đã lấy.

4.3.4. Kiểm tra độ nảy mầm và sức nảy mầm

4.3.4.1. Khái niệm và ý nghĩa

Kết quả của sản xuất dược liệu bị ảnh hưởng rất nhiều bởi chất lượng hạt giống không tốt. Kiểm tra độ nảy mầm và sức nảy mầm trước khi gieo trồng để tránh được sự thất thu do không biết trước khả năng nảy mầm của giống tránh được lãng phí hạt giống trên đơn vị diện tích. Vì vậy một trong những chỉ tiêu quan trọng đánh giá chất lượng hạt giống là độ nảy mầm và sức nảy mầm của hạt giống.

- Độ nảy mầm của hạt giống là khả năng hạt mọc mầm tối đa ở trong điều kiện gieo trồng thích hợp và trong một thời gian nhất định. Được biểu thị bằng phần trăm(%) số cây mầm bình thường so với tổng số hạt gieo. Độ nảy mầm biểu thị khả năng nảy mầm cao nhất của hạt giống. Độ nảy mầm ảnh hưởng trực tiếp đến mật độ trồng và tổng số cây trên một đơn vị diện tích, cùng với chỉ tiêu độ sạch cho biết giá trị gieo trồng của giống.

- Sức nảy mầm của hạt giống là khả năng hạt mọc mầm đồng đều trong một thời gian nhất định và được biểu thị bằng phần trăm(%) số hạt mọc mầm so với tổng số hạt gieo.

Trong cùng một thời gian và điều kiện gieo trồng như nhau, giống nào có sức nảy mầm cao chứng tỏ giống đó có chất lượng cao. Các giống có độ thuần cao cũng thường có sức nảy mầm cao. Chỉ tiêu này biểu thị mức độ đồng đều của hạt giống, giúp cho cây sinh trưởng đồng đều trong các giai đoạn về sau.

4.3.4.2. Quy định khi đánh giá các cây mầm

+ *Các cây mầm bình thường:* Phải có đầy đủ lá mầm, lá đầu tiên và hệ thống rễ khỏe mạnh, chiều dài rễ >1/2 chiều dài lá mầm. Các cây mầm này có khả năng tiếp tục phát triển để thành các cây bình thường khi mọc trong các điều kiện thuận lợi: Đất đai, nước, nhiệt độ và ánh sáng thuận lợi, ở lúa nước, lúa mì, cao lương rễ thứ cấp phát triển cân đối, không bị sứt mẻ, mảnh mai, yếu hoặc thiếu hụt. Đôi khi có trường hợp rễ sơ cấp bị hỏng và mọc thêm rễ thứ cấp nhưng vẫn có đủ chiều dài và có sức sống đảm bảo cây mầm phát triển cân đối, các cấu trúc bình thường thì vẫn được tính là cây mầm bình thường.

+ *Các cây mầm không bình thường:* Các cây mầm này được xác định như sau: các mầm hạt không đủ khả năng để tiếp tục phát triển cho ra các cây bình thường trong các điều kiện thuận lợi. Các cây mầm có những sai sót nghiệm trọng, khi thử trên nền nhân tạo như: không có lá mầm, không có rễ hoặc chiều dài rễ thứ cấp < 1/2 chiều dài của lá mầm. Các lá mầm bị biến dạng như: chẻ ra, ngắn hoặc khuyết, phình ra. Các rễ thứ cấp ngắn yếu và mảnh.

+ *Các hạt ngủ không nảy mầm:* Các hạt không nảy mầm không nhất thiết là chết mà có thể là các hạt ngủ. Loại hạt này vẫn hút nước và giữ nguyên ở cuối thời kỳ kiểm nghiệm. Nếu > 5% sau khi kiểm nghiệm sẽ làm lại để phá vỡ tính ngủ rồi mới thử độ nảy mầm và sức nảy mầm.

+ *Các hạt chết:* Là các hạt ở cuối thời kỳ kiểm nghiệm không cho ra cây mầm. Những hạt này không phải là hạt ngủ, chúng thường mềm nhũn và bị nhiễm các loại nấm mốc.

4.3.4.3. Phương pháp xác định độ nảy mầm và sức nảy mầm

Các mẫu kiểm nghiệm độ nảy mầm và sức nảy mầm cần phải lấy từ phần hạt sạch của mẫu để kiểm nghiệm độ sạch.

Số lượng: 100 hạt với 4 lần nhắc lại, hoặc 50 hạt với 8 lần nhắc lại. Hạt giống có thể được đếm bằng tay hoặc đếm bằng máy đếm hạt.

Các phương pháp thường dùng trên các nền sau đây:

4.3.4.3.1. Các phương pháp trên nền giấy thấm nước

- Trên giấy (viết tắt TP – top of paper) dùng kéo cắt giấy thấm theo kích thước khay men, hộp nhựa, hộp petri. Sau khi đã thấm ướt giấy thấm sẽ lót vào các hộp đựng trên 3 – 4 lớp. Hạt giống được đặt lên trên giấy, sau đó đặt vào trong phòng thử độ nảy mầm có điều chỉnh nhiệt độ và độ ẩm. Đến thời gian quy định lấy ra quan sát các cây mầm và tính toán kết quả.

- Giấy gấp nếp (viết tắt PP – pleated paper): dùng 2 –3 lớp giấy thấm nước đã được gấp nếp, thường là 50 nếp gấp, hạt giống được đặt dọc theo nếp gấp. Sau đó đặt giấy xếp đã đầy hạt giống vào trong các hộp giấy hoặc nhựa đặt trực tiếp vào trong phòng thử độ nảy mầm.

- Giữa giấy (viết tắt BP – between paper): dùng 3 –4 lớp giấy thấm nước. Hạt giống sau khi đếm được đặt lên trên giấy thấm. Sau đó phủ lên trên mặt 3 – 4 lớp giấy thấm nước, gấp một cạnh lề bên trái hoặc phải, sau đó cuộn tròn lại để giữ hạt giống ở bên trong suốt thời kỳ kiểm nghiệm. Các cuộn giấy này có thể đặt trong tủ định ôn hay phòng thử độ nảy mầm.

Giấy dùng làm nền khi kiểm nghiệm độ nảy mầm và sức nảy mầm phải là giấy dai, khi ngấm nước không được rách, mủn, đủ độ dày, cứng vừa phải, để không cho rễ mọc xuyên qua. Ngoài ra giấy dùng để thử độ nảy mầm là giấy không chứa các chất độc, không thích hợp cho các loại vi khuẩn và nấm phát triển. Thích hợp nhất là loại giấy lọc, có khả năng thấm nước tốt và dai bền khi ướt.

4.3.4.3.2. Các phương pháp trên nền cát

Yêu cầu cát không được to quá, cũng không được mịn quá, vì sẽ ảnh hưởng đến khả năng giữ nước hoặc nhỏ quá sẽ xếp sít chặt lại, làm ảnh hưởng đến mầm hạt. Độ nhỏ của hạt cát vào khoảng 0,8 mm là vừa. Độ ẩm của cát thường dùng 60 – 70%. Cát có thể sử dụng lại sau mỗi lần, nhưng phải khử trùng sau khi kiểm nghiệm. Khi dùng cát làm nền có thể có các cách sau:

+ Trên mặt cát (viết tắt TS- top of sand): Cát ẩm trải phẳng trong các khay tôn (sắt, nhựa, nhôm) dày 2 – 3 cm. Hạt giống đặt lên trên mặt cát thành từng hàng cách nhau từ 0,1 – 1,5 cm. Lấy ngón tay khẽ ấn nhẹ cho hạt giống ngập xuống cát 1/3 hạt.

+ Giữa cát (viết tắt S – insand): Phương pháp tiến hành giống như trên, nhưng sau khi đặt hạt thì phủ một lớp cát ẩm lên trên có độ dày 10 – 20 mm.

* Sử dụng đất: Có thể dùng đất tơi, ẩm, mịn để thay cát, mọi thủ tục tiến hành giống như với cát. Nói chung yêu cầu của đất (cát) phải là không độc và xử lý diệt trùng trước khi gieo hạt để tránh các loại ký sinh gây thối hạt làm ảnh hưởng đến kết quả kiểm nghiệm.

* Yêu cầu về nước cho kiểm nghiệm phải là nước sạch có thể uống được, không gây độc.

* Nhiệt độ trong thời gian kiểm nghiệm: Tuỳ loại cây trồng mà có yêu cầu cho phù hợp, nhưng đa số thích hợp từ 20 – 30°C. Tốt nhất là duy trì được nhiệt độ không đổi trong suốt thời gian kiểm nghiệm.

Khoảng thời gian kiểm nghiệm cho từng loại hạt giống của các cây trồng là có khác nhau, kể từ lúc gieo cho đến khi đánh giá:

Ngô	Sau 7 ngày	Đương quy	Sau 20 ngày
Lúa mì	8 ngày	Bạch chỉ	20 ngày
Lúa nước	14 ngày	Ngưu tất	8 ngày
Thanh cao	10 ngày	Mã đề	5 ngày
Sả hoa hồng	12 ngày	Bạch truật	10 ngày

Trong một số trường hợp có thể kết thúc kiểm nghiệm sớm hơn hoặc kéo dài hơn.

4.3.4.4. Đánh giá các cây mầm và tính toán các kết quả

Ở cuối thời kỳ kiểm nghiệm các hạt nảy mầm và không nảy mầm được đánh giá và phân loại: các cây mầm bình thường và không bình thường, các hạt chết hay là không nảy mầm. Tất cả được quan sát và đánh giá tính toán phần trăm (%) số hạt mầm bình thường tính cho mỗi lần nhắc lại sau đó lấy số trung bình của tất cả các lần nhắc lại.

Khi tính toán giữa các lần nhắc lại không được chênh lệch quá nhiều. Sự chênh lệch giữa các lần nhắc lại có kết quả cao nhất và thấp nhất không được vượt quá giới hạn cho phép sẽ được chấp nhận.

Ví dụ 1: Kiểm nghiệm lần thứ 1 90%
Kiểm nghiệm lần thứ 2 86%
Kiểm nghiệm lần thứ 3 88%

Độ tin cậy là 5. Nhưng trong ví dụ 1, khác nhau giữa hai lần nhắc lại là 4, do đó cả hai lần kiểm nghiệm là đúng. Số trung bình của hai lần về độ nảy mầm là 88% sẽ được ghi trong báo cáo kết quả kiểm nghiệm.

Ví dụ 2: Kiểm nghiệm lần thứ 1 90%
Kiểm nghiệm lần thứ 2 84%

Sự khác nhau giữa hai lần là 6, vì vậy > 5 phải làm lại kiểm nghiệm.

Ngoài ra các trường hợp sau đây cũng phải kiểm nghiệm lại:

- Hạt giống đang còn trong giai đoạn ngủ
- Hạt giống bị bệnh
- Các kết quả thất thường.

4.3.4.5. Các phương pháp phá ngủ sinh lý (dormancy)

Hiện tượng hạt giống không nảy mầm được mặc dù được cung cấp đầy đủ các điều kiện cần thiết cho sự nảy mầm như: nước, oxy và nhiệt độ.

Nguyên nhân của sự ngủ nghỉ:

- Có thể do cấu trúc của vỏ quả dày, nước không thấm qua vỏ để vào phôi cung cấp nước cho quá trình nảy mầm.

- Do trong hạt có chứa một số chất ức chế sự nảy mầm: Hạt giống sau một thời gian bảo quản trong kho, các loại chất ức chế này sẽ tự phân huỷ, hoặc người ta dùng một số loại hoá chất để phá ngủ như: KNO_3 (nitrat kali); HNO_3 (acid nitric); H_2SO_4 (acid sulfuric) nồng độ 0,2%; gibberalin (GA_3) nồng độ 0,05%.

Ví dụ: Để phá ngủ của lúa nước người ta ngâm hạt giống trong dung dịch HNO_3 nồng độ 0,2% trong 24 giờ.

Đối với lúa mì, lúa mạch và cao lương có thể phá ngủ bằng cách xử lý lạnh ở nhiệt độ 5 đến 10°C, thời gian 3 ngày, sau đó cho nảy mầm trên cát hoặc giấy lọc. Đối với lão quan thảo có thể phá ngủ bằng H_2SO_4 nồng độ 0,1% trong 24 giờ.

Không phải tất cả các loại cây trồng đều có được tính ngủ này, có một số giống không cần phải phá ngủ. Vì vậy trước khi kiểm nghiệm độ nảy mầm và

sức nảy mầm nên có thông tin trước. Chỉ phải phá ngủ với các giống cần thiết, sau khi phá ngủ rồi, các thủ tục tiến hành để kiểm tra độ nảy mầm và sức nảy mầm được tiến hành bình thường.

Bảng 10: Một số yêu cầu về thử độ nảy mầm và sức nảy mầm của một số loại cây trồng

Cây trồng	Nền	Nhiệt độ (°C)	Đếm lần đầu (ngày)	Đếm lần cuối (ngày)	Điều kiện phá ngủ
Lúa nước	TP, BP, S	20	4	10	H_2O (50°C), HNO_3
Lúa mì	TP, BP, S	30	4	89	H_2O (30 - 50°C), GA_3
Lạc	BP, S	20	5	10	Bóc vỏ
Đậu xanh	TP	20	4	10	KNO_3
Thuốc lá	TP, BP, S	30	7	16	KNO_3
Dưa hấu, dưa bở	TP	20	4	8	KNO_3
Cải xanh, cải củ		30	5	7	KNO_3
Đương quy	BP, S	20	15	25	GA_3
Lão quan thảo	BP, S	25	12	20	H_2SO_4
Thanh cao	BP, S	20	4	8	
Bạch chỉ	BP	20	10	25	
Mã đề	TP, BP, S	20-30	5	10	
Bạch truật	TP, S	15-20	7	10	

4.3.5. Xác định độ ẩm hạt giống

4.3.5.1. Khái niệm

Độ ẩm hạt giống là trọng lượng của mẫu hạt giống bị mất đi khi sấy khô, được biểu thị bằng phần trăm (%) so với trọng lượng mẫu ban đầu.

Hạt giống với mục đích để gieo trồng trong sản xuất, nhân ra các thế hệ tiếp theo, sau khi thu hoạch thường được bảo quản trong kho từ một vài tháng đến một vài năm. Tình trạng hạt giống trong thời gian ở trong kho phụ thuộc nhiều vào các điều kiện bảo quản như: ẩm độ không khí, nhiệt độ và độ ẩm của hạt giống. Yếu tố thuỷ phần hạt giống có ảnh hưởng trực tiếp. Các tác giả Delouche (1968) và Harrington, Douglas (1970) đã cho thấy mối quan hệ giữa độ ẩm hạt giống và tình trạng hạt giống như bảng 11.

Bảng 11: Mối liên hệ giữa độ ẩm hạt giống và tình trạng hạt giống

Độ ẩm hạt giống (%)	Tình trạng hạt giống
0 – 4	- Sự khử ẩm quá cao có thể gây hại cho một số loại hạt giống. Có thể gây ra ngủ lần hai.
4 – 8	- Bảo quản kín an toàn
8 – 10	- Côn trùng còn hoạt động ở mức độ thấp. Hạt dễ bị tổn thương cơ giới (vỡ, nứt)
10 – 12	- Bảo quản kín không an toàn
12 – 14	- Sâu mọt, nấm mốc phát triển được trên hạt và trong hạt
14 –18	- Đề kháng tác hại cơ giới khá (nên thu hoạch tuốt đập trong thời gian này). Tốc độ hô hấp còn cao, hạt tự bốc nóng nếu ủ đống. Dễ bị côn trùng, nấm mốc tấn công gây hư hại.
18 – 40	- Hạt chín sinh lý, tốc độ hô hấp cao- thu hoạch có đổ đống sẽ bị bốc nóng và hư hỏng nhanh. Côn trùng và nấm mốc rất dễ tấn công gây hư hại nặng.
40– 60	- Hạt hút ẩm mạnh và dễ nảy mầm.

Độ ẩm của hạt giống càng cao, cường độ hô hấp mạnh, nấm và côn trùng hoạt động mạnh. Hoạt động của côn trùng, nấm và hô hấp của hạt sinh ra nhiệt lượng, nhiệt độ hạt sẽ tự tăng dần (chưa kể đến bảo quản trong điều kiện nóng ẩm), dẫn đến hiện tượng bốc nóng, hạt giống sẽ bị hư hỏng rất nhanh.

Theo Harrington và Douglas (1970), tuổi thọ của các hạt ngũ cốc có liên quan nhiều đến việc bảo quản trong điều kiện độ ẩm khác nhau.

Hạt đương quy, Bạch chỉ ở nhiệt độ trên 25°C và ẩm độ không khí trên 85% sau 7 ÷ 10 ngày có thể mất sức nảy mầm hoà toàn.

4.3.5.2. Phương pháp xác định độ ẩm hạt giống

+ *Dùng đồng hồ đo độ ẩm:* Bằng phương pháp này có thể xác định trực tiếp hàm lượng nước trong hạt giống của các mẫu đem phân tích. Kích cỡ mẫu đã được xác định trên từng kiểu máy và các giống khác nhau, trọng lượng mẫu để xác định thường từ 10 – 25g.

+ *Phương pháp sấy khô ổn định ở nhiệt độ cao:* Mẫu hạt giống trước khi sấy được nghiền thành bột, sau đó được đặt vào trong lò sấy hoặc tủ sấy điện ổn định ở nhiệt độ 130 – 135°C trong thời gian 2 giờ (đối với ngô – 4 h), lấy ra để nguội trong bình hút ẩm rồi cân nhanh, sự khác nhau về trọng lượng trước và

sau khi sấy khô được coi là phần trăm (%) độ ẩm so với trọng lượng mẫu hạt giống ban đầu.

- Kết quả được tính toán theo mẫu dưới đây:

Số mẫu kiểm nghiệm	Số hộp đựng	Khối lượng hộp đựng chưa có mẫu(g)	Khối lượng mẫu + K.L hộp đựng khi chưa sấy (g)	Khối lượng mẫu trước khi sấy (g)	Khối lượng mẫu + K.L hộp sau khi sấy (g)	Khối lượng đã mất (g)	Độ ẩm (%)
XX	YY	M_1	M_2	$M_2 - M_1$	M_3	$M_2 - M_3$	$\frac{M_2 - M_3}{M_2 - M_1} \times 100$

So sánh các kết quả của hai lần kiểm nghiệm, nếu sự khác nhau giữa hai lần kiểm nghiệm > 0,2% cần phải làm lại.

4.3.6. Kiểm tra độ thuần

Độ thuần của giống (hay còn gọi là độ đúng giống) là phần trăm (%) số cây hoặc số hạt của cây trồng đúng giống trong tổng số cây hoặc số hạt cùng loài ở mẫu lấy.

Khi một giống mới ra đời, số lượng hạt giống tác giả ban đầu (Breeder's Seed) còn rất ít, muốn có đủ lượng hạt giống để cung cấp cho sản xuất phải qua rất nhiều lần nhân. Trong thời gian này cần phải kiểm tra đầy đủ để giữ được độ thuần cho giống.

Trong quá trình tái sản xuất, các đặc điểm đã biết của một giống như về hình thái, sinh lý, sinh hoá và các đặc điểm khác không được thay đổi ở các thế hệ tiếp theo đối với các cây trồng có phương thức sinh sản vô tính hay hữu tính.

Sử dụng giống có độ thuần cao sẽ đem lại lợi ích về năng suất, phẩm chất, khả năng phòng trừ sâu bệnh và cỏ dại, thuận lợi khi thu hoạch v.v...

Độ thuần của giống là một trong những chỉ tiêu quan trọng nhất của công tác kiểm tra chất lượng hạt giống. Để đánh giá được độ thuần của giống phải tiến hành kiểm tra ở trong phòng, ngoài đồng, nhà kính và nhà lưới.

4.3.6.1. Phương pháp kiểm tra ở trong phòng

+ Kiểm tra hạt khô: Lấy 400 hạt từ mẫu đại diện một cách ngẫu nhiên. Hạt giống được trải ra trên mặt bàn có đầy đủ ánh sáng (ánh sáng ban ngày tốt hơn

cả), dùng kính lúp cầm tay có độ phóng đại từ 10 – 20 lần kiểm tra kích thước, hình dạng, màu sắc của vỏ hạt, râu dài hay ngắn, lông trên vỏ v.v...

Chú ý: Trong quá trình thu hoạch và chế biến hạt giống một số đặc điểm bị thay đổi như râu bị rụng bớt đi hoặc vỏ của hạt có một số bị biến dạng. Do đó khi cần kiểm tra chính xác có thể lấy mẫu từ diện tích ngoài ruộng để kiểm tra.

+ *Kiểm tra cây mầm:* Các giống khác nhau khi cho mọc mầm có thể cho ra các cây mầm khác nhau về màu sắc thân mầm, màu sắc lá bao, hình dạng mầm và màu sắc lá mầm, sự phân bố lông trên thân mầm. Ví dụ: lá bao có màu đỏ, tía, hồng, màu xanh của các giống khác nhau.

+ *Các kiểm nghiệm hoá học:* Các hạt giống khác nhau có phản ứng màu khác nhau với dung dịch phenol. Lấy 100 hạt giống đặt vào giấy lọc có tẩm dung dịch phenol 1% đặt trong hộp petri trong 4 giờ sau đó xem phản ứng màu. Có thể phân ra làm các mức độ: không có phản ứng màu, màu sáng, trung bình, đậm và rất đậm. Đem so sánh với mẫu xác thực của giống.

4.3.6.2. Phương pháp kiểm tra độ thuần ngoài đồng

Các kiểm nghiệm ở trong phòng chưa thể đánh giá được một cách chính xác độ thuần của giống, mà phải kết hợp với sự quan sát đánh giá độ thuần ở ngoài đồng. Có những giống mang những đặc điểm về hạt giống nhau, nhưng khi gieo trồng ở ngoài ruộng lại có các đặc điểm khác nhau, vì thế mục đích kiểm tra ngoài đồng là để xác nhận xem cây trồng mọc lên có đúng với hạt giống đã đưa hay không. Đồng thời cung cấp thêm các thông tin kinh tế như sau:

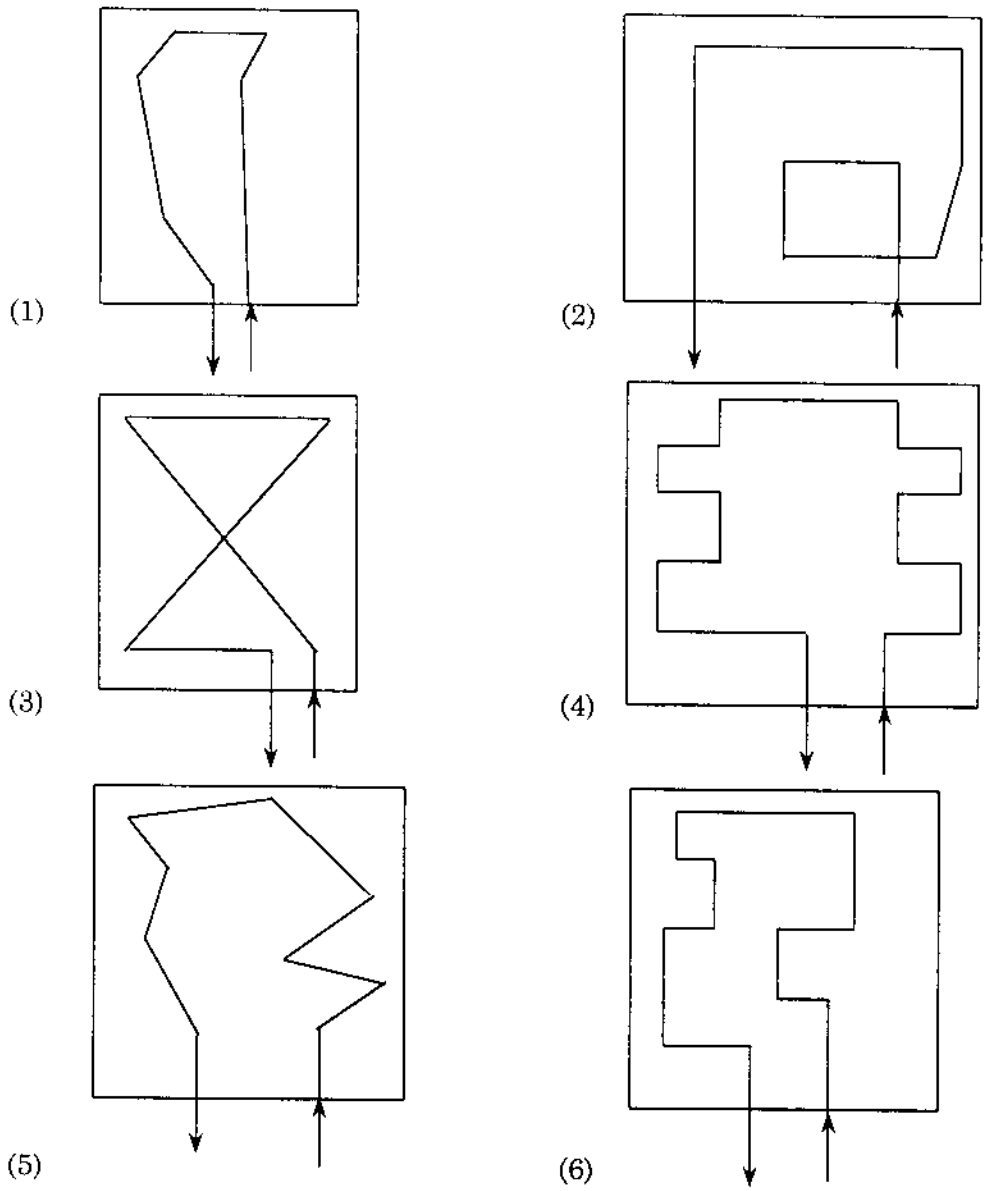
- Nguồn gốc hạt giống và sự nhận biết giống.
- Lịch sử trồng trọt của khu ruộng gieo trồng giống đó.
- Các biện pháp kỹ thuật và canh tác đã áp dụng.
- Hiện tại tình hình sinh trưởng của giống trên đồng ruộng.
- Khoảng cách ly.
- Số lượng phần trăm các cây khác loài, khác giống, khác dạng.
- Mức độ cỏ dại.
- Tình hình phát sinh bệnh hại trong quá trình trồng trọt.

Tất cả các tiêu chuẩn phải do cơ quan có thẩm quyền kiểm tra quyết định, ở nước ta phòng kiểm nghiệm quốc gia thuộc Trung tâm khảo nghiệm giống cây trồng Trung ương chịu trách nhiệm.

Kiểm tra giống ngoài đồng để xác định độ thuần của giống lần lượt theo các khâu như sau:

Lấy mẫu

Khi định điểm lấy mẫu cũng như cây lấy mẫu phải đồng đều, không chọn chỗ cây xấu quá hoặc tốt quá, loại bỏ các chỗ ruộng bị hỏng bởi lý do khách quan như mất trộm, trâu bò, chuột phá hại v.v...



Hình 8: Sơ đồ lấy mẫu và kiểm tra giống ngoài đồng

Ghi chú: (1)- Quan sát 60% ruộng; (2) và (3)- Quan sát 60-70%; (4) và (5)- Quan sát 75%; (6) - Quan sát 85%.

Các phần diện tích này được loại bỏ trước khi định kiểm lấy mẫu. Tuy nhiên diện tích ruộng chọn để kiểm tra không nên < 5% diện tích thu kiểm tra. Khi lấy mẫu có thể lấy chéo góc, lấy theo hàng. Số mẫu lấy và diện tích mỗi mẫu tuỳ thuộc loại cây trồng, diện tích mà có khác nhau. Diện tích lấy mẫu có thể $1m^2$, $2\ m^2$, $5\ m^2$, $10\ m^2$ hoặc $20\ m^2$. Ví dụ đối với ngô số cây lấy mẫu cần là 100 cây, đối với lúa mì 2000 cây, lúa nước 100 – 200 khóm như vậy cần xác định số cây trung bình/$1m^2$ và tính xem phải lấy trên 5 điểm hay 10 điểm, đồng thời diện tích mẫu là bao nhiêu cho đủ số lượng cây mẫu cần lấy. Việc định số lượng điểm để lấy mẫu: cứ 2 ha đầu tiên được lấy ra 5 điểm, sau đó cứ thêm ra 2, 3 hoặc chưa đến, lại lấy ra 1 điểm để lấy mẫu.

Khi lấy mẫu người thanh tra phải đi bộ trên ruộng và di chuyển chéo qua các hàng, định trước các điểm lấy mẫu và số cây mẫu cho đủ theo quy định đối với từng loại cây trồng. Hình 2 là một số sơ đồ mẫu để lấy mẫu và kiểm tra giống ngoài đồng.

4.3.7. Kiểm tra sức sống hạt giống

4.3.7.1. Khái niệm

Sức sống của hạt giống là khả năng sống của hạt giống nói chung, không kể hạt đã qua giai đoạn ngủ hay chưa, được biểu thị bằng phần trăm (%) số hạt sống so với tổng số hạt kiểm tra.

Khi gieo trồng các hạt giống của lô hạt có sức sống cao sẽ có tỷ lệ nảy mầm cao và độ đồng đều tốt hơn lô hạt có sức sống thấp.

- Hạt giống sau thu hoạch có khả năng nảy mầm ngay là hạt giống không qua giai đoạn ngủ. Nếu hạt giống phải cất giữ một thời gian mới có khả năng nảy mầm là hạt giống phải qua giai đoạn ngủ. Thời gian ngủ dài hay ngắn là tuỳ thuộc vào các giống khác nhau. Có loại hạt giống không cần ngủ, vì vậy sau khi thu hoạch phơi khô là có thể gieo lại ngay được.

4.3.7.2. Phương pháp xác định sức sống hạt giống

4.3.7.2.1. Xác định trực tiếp

Xác định bằng cách thử độ nảy mầm của các loại hạt giống. Đối với các loại hạt phải qua giai đoạn ngủ, trước khi thử độ nảy mầm phải phá ngủ bằng các phương pháp như đã giới thiệu ở trên.

Khi đánh giá tỷ lệ nảy mầm phân ra làm các loại sau:

+ Các cây mầm có sức sống biểu hiện mầm khoẻ: phát triển cân đối rễ và phần mầm, thân có màu xanh, có đầy đủ rễ sơ cấp và thứ cấp.

+ Các cây mầm không có sức sống: Cây mầm nhỏ yếu, ngắn hơn 1/2 chiều dài cây mầm lớn nhất trong kiểm nghiệm, không có rễ sơ cấp, chỉ có một vài rễ

thứ cấp.

4.3.7.2.2. Kiểm nghiệm hoá sinh

+ Kiểm nghiệm tetrazolium: Lankon (1950) – Người đầu tiên đã đưa ra thử nghiệm sức sống hạt giống bằng tetrazolium, dựa trên cơ sở thay đổi màu của các mô tế bào. sau này được Lindenbei và Bulat (1955) phát triển, tiếp theo là Ader (1965); Steiner cùng Werth (1974), Moore (1962, 1963) mô tả kỹ hơn.

Cơ sở của phương pháp: Các tế bào phôi sống sẽ bị nhuộm màu đỏ của tetrazolium. Các tế bào phôi đã mất sức sống hoặc chết khong bị nhuộm màu đỏ. Đối với hạt ngũ cốc thông thường có một lớp vỏ alơron có vai trò quan trọng trong quá trình trao đổi chất khi phân giải phần bột dự trữ trong nội nhũ và mầm hạt bắt đầu mọc ra các tế bào phôi sống có khả năng nhuộm màu đỏ bởi tetrazolium. Nếu như lớp vỏ anơron này bị hỏng thì các loại ký sinh gây hại, nấm mốc dễ tấn công đến phần nội nhũ và tấn công tiếp vào phôi làm hạt mất sức sống.

Phương pháp: Lấy 100 hạt giống (như để thử độ nảy mầm) ngâm vào nước lã từ 16 – 20 giờ, đối với các loại có vỏ có thể bóc vỏ bỏ đi. Sau đó cắt hạt theo chiều dọc để có cả phôi và nội nhũ. Đặt các nửa hạt vào cốc có chứa dung dịch tetrazolium 1% từ 2 – 4 ngày trong điều kiện nhiệt độ 30°C. Lấy ra quan sát các tế bào sống có nhuộm màu đỏ. Đánh giá sức sống được quan sát trên toàn bộ bề mặt của hạt giống, có thể phân loại vào 3 nhóm theo diện tích của bề mặt đã nhuộm màu:

1 - 100 – 75% tổng diện tích bề mặt lớp nội nhũ nhuộm màu.

2 - 75 – 25% tổng diện tích bề mặt lớp nội nhũ nhuộm màu.

3 - 25% tổng diện tích bề mặt lớp nội nhũ nhuộm màu.

Các hạt giống ở nhóm 1 với hơn 75% diện tích bề mặt lớp nội nhũ đã nhuộm màu là có sức sống và có khả năng mọc, chống đỡ được với các điều kiện đất đai không thuận lợi. Các hạt giống ở nhóm 2 và 3 sức sống yếu và rất yếu.

+ Kiểm nghiệm sức sống hạt giống bằng Indigo – carmin hoặc acid fruch.

Cơ sở của phương pháp: Các tế bào phôi sống không nhuộm màu xanh của Indigo carmin và màu đỏ của acid fruch nên vẫn giữ được màu trắng của phôi, các tế bào phôi chết sẽ nhuộm màu. Phương pháp này cũng có thể xác định sức sống của các hạt ngũ cốc.

Phương pháp xác định: Giống như phương pháp trên, nhưng thời gian ngâm trong dung dịch Indigo - carmin hoặc acid fruch ngắn hơn chỉ trong 10 - 15 phút sau đó vớt ra rửa sạch nước lã rồi đặt lên bàn quan sát.

Sức sống của hạt giống được quan sát bằng cách đếm, rồi tính % số hạt có phôi không nhuộm màu so với tổng số hạt xử lý.

Phương pháp hoá sinh có thể đánh giá sức sống hạt giống bằng cách xác định nhanh chóng, tiện lợi, cho biết khả năng sống của hạt giống.

Ngoài các phương pháp trên người ta còn một số phương pháp khác như:

- Cho chiếu tia X lên hạt giống, nếu hạt còn sức sống nó sẽ ánh lên trên màn huỳnh quang.

Phương pháp gieo hạt ở điều kiện nhiệt độ thấp rồi đánh giá sức sống qua cây mầm.

4.3.8. Xác định khối lượng 1000 hạt

Các giống cây trồng khác nhau có khối lượng 1000 hạt khác nhau. Đây cũng là một trong các đặc điểm để phân biệt các giống với nhau. Khối lượng 1000 hạt cũng phần nào thể hiện chất lượng hạt giống. Trong cùng một giống lô hạt nào có khối lượng 1000 hạt lớn có nghĩa là hạt đó mẩy chắc, chứa đầy đủ các chất dinh dưỡng hơn, khi gieo hạt sẽ có sức sống cao hơn. Khi xác định lượng hạt giống gieo trên một đơn vị diện tích, không những dựa trên tỷ lệ nảy mầm mà còn căn cứ vào khối lượng 1000 hạt.

Phương pháp xác định:

Hạt giống lấy từ mẫu hạt sạch, đếm số hạt một cách ngẫu nhiên bằng tay, bàn đếm hạt hoặc máy đếm, sau khi đếm xong đem cân và tính toán, đơn vị tính bằng gam.

Phương pháp tiến hành đơn giản, nhưng để đảm bảo độ chính xác, người ta phải tính độ chênh lệch cho phép giữa các mẫu.

$$\text{Hệ số biến động CV (\%)} = \frac{S}{X} \times 100$$

X - giá trị trung bình của 100 hạt giống

S - độ lệch chuẩn

$$S = \frac{n(\sum X^2) - (\sum X)^2}{n(n-1)}$$

n - số lần nhắc lại

X - khối lượng của mỗi lần nhắc lại

Nếu hệ số biến động này không vượt quá 6 đối với các hạt có vỏ trấu, hoặc 4 cho các loại hạt khác thì các kết quả được xác định và tính toán.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. *Comstock R. E., Robinson H. T.* (1952); Genetic Parameters, their estimation and significance. Proc. sixth inter. Grasslands congress, pp. 284-291.
2. *Allard R. W.* (1960); Principle of plant breeding, Jhon Wiley & Sons, Inc. New York.
3. *Gilbert, N. E.* (1973); Biometrical interpretation claden don. Press, Oxford.
4. *Mather K. Jinks J. L.* (1977); Introduction of biometrical genetic. Champman and Hall, London .
5. *Singh B. D.* (1987); Plant breeding and genetics klyani publish house, New. Delhi.
6. *Anderson. E.* (1957); A. semigraphical method for the analysis of complex problem. Proc. Nat. Acad. Sci. 3: Wash 43 : 923-927.
7. *Burton G. W.* (1952); Quantitative inheritance in grasses. Proc. 6th grass cong. 1: 277- 281.
8. *Sahoo S.; P. K. Dutta* (1982); Selection of high yielding palmorosa genotypes for the growth of palmarosa oil industries in the rural sector indian perfumer vol. 26 Noe. 2-4/1982, 41-45.
9. National bureau of plant genetic resources minimal descriptors of agri-horticultural crops part IV Medicinal and Aromatic plants - Pusa Campus New Delhi 110012, India.
10. *Arwooth Nalampan* (1978); Mungbean production in Thailand pp. 9-14.
11. *AVRDC* (1990); *Vegetable production training manual*. p. 447.
12. *Kolloo G.* (Editor), (1993); Genetic improvement of vegetable, Pergamon press.
13. (1992); Crop production technology Kyungpook national university, Rep. of Korea.
14. *AVRDC* (1993); Germplasm collection, evaluation, documentation and conserva. AVRDC publication.
15. (1978); Kỹ thuật trồng cây thuốc. NXB Vệ sinh Nhân dân, Bắc Kinh, Trung Quốc.

16. *Đỗ Tất Lợi* (2003); Những cây thuốc và vị thuốc Việt Nam. Nhà xuất bản Y học.

17. *Luyện Hữu Chỉ, Nguyễn Văn Hoan và CS.* (1997); Giống cây trồng. Nhà xuất bản Nông nghiệp.

18. *Trần Đình Long và CS.* (1997); Chọn giống cây trồng. Nhà xuất bản Nông nghiệp.

19. *Mai Thị Phương Anh* (1996); Rau và trồng rau. Viện Khoa học Kỹ thuật Nông nghiệp Việt Nam. Nhà xuất bản Nông nghiệp - Hà Nội.

20. *Nguyễn Xuân Linh* (1998); Hoa và kỹ thuật trồng hoa. Nhà xuất bản Nông nghiệp.

21. *Ngô Hữu Tình* (1997); Cây ngô. Nhà xuất bản Nông nghiệp.

22. *Bùi Huy Đáp* (1999); Một số vấn đề về cây lúa. Nhà xuất bản Nông nghiệp.

PHẦN III
CHIẾT XUẤT DƯỢC LIỆU

TS. Nguyễn Duy Thuần

I. TẦM QUAN TRỌNG CỦA CHIẾT XUẤT DƯỢC LIỆU

Chiết xuất dược liệu có vai trò rất quan trọng trước hết là để lấy được các chất có trong dược liệu dưới dạng cần thiết (dung dịch, bột...) toàn phần hoặc tinh khiết hơn cho mục đích nghiên cứu hoặc điều trị.

Trong nghiên cứu hóa học các hợp chất tự nhiên thì việc nghiên cứu chiết xuất kết hợp với các kỹ thuật khác để thu được các chất tinh khiết làm thuốc hoặc cung cấp nguyên liệu cho quá trình bán tổng hợp thuốc mới nhằm tăng tác dụng điều trị của thuốc, giảm bớt những tác dụng không mong muốn của thuốc hay để tạo ra những tác dụng mới. Ví dụ, từ lá cây thanh cao hoa vàng người ta chiết xuất và phân lập được artemisinin, sau đó lại bán tổng hợp ra artesunat, arteether.... Các dẫn chất này cũng được dùng để điều trị sốt rét nhưng có hiệu quả cao hơn. Từ vỏ cây canhkina đã phân lập được quinin, sau đó lại bán tổng hợp ra quinidin có tác dụng diệt ký sinh trùng sốt rét kém hơn, nhưng lại có tác dụng chữa rối loạn nhịp tim. Diosgenin (chiết và phân lập từ nhiều loài thuộc chi *Dioscorea*) được dùng làm nguyên liệu để bán tổng hợp ra nhiều loại thuốc steroid quan trọng.

Đối với ngành Dược Việt Nam, chiết xuất dược liệu có tầm quan trọng đặc biệt. Thuốc thang (thuốc đông y), thuốc nam vẫn được dùng rộng rãi từ trước đến nay, trong nhiều năm nữa chúng vẫn chiếm một tỷ lệ cao trong tổng số thuốc dùng trong phòng và chữa bệnh đặc biệt là ở các vùng nông thôn, miền núi. Trong việc thực hiện hiện đại hóa thuốc y học cổ truyền hiện nay thì chiết xuất dược liệu không những đáp ứng cho việc chiết xuất những thành phần tinh khiết để bào chế ra những dạng thuốc tiện dùng và có hiệu quả hơn, mà còn góp phần tiêu chuẩn hóa thuốc y học cổ truyền. Mặt khác phát triển công nghiệp

chiết xuất dược liệu sẽ là điều kiện bảo đảm cho việc sản xuất dược liệu ở quy mô lớn, đây là lợi thế của ngành dược nước ta với khí hậu nhiệt đới, độ ẩm cao, có diện tính rừng, đồi núi rộng và đặc biệt có hệ thực vật, nói chung và cây thuốc nói riêng, rất phong phú, đa dạng.

II. NGUYÊN LIỆU CHIẾT XUẤT - DƯỢC LIỆU

2.1. Nguyên liệu

Dược liệu dùng để chiết xuất có thể là một phần hay toàn bộ động vật, thực vật, khoáng vật hoặc vi sinh vật. Nguyên liệu dùng để chiết bao gồm các bộ phận hoặc toàn thể một dược liệu hoặc nhiều dược liệu, có thành phần phức tạp đôi khi không rõ ràng và kém ổn định, hàm lượng hoạt chất lại thay đổi, vì phụ thuộc vào rất nhiều yếu tố: giống, loài, khí hậu và những yếu tố về địa lý, điều kiện nuôi trồng, chế độ canh tác (đối với dược liệu là thực vật), bộ phận dùng, giai đoạn sinh trưởng, cách bảo quản....

Đối với nguyên liệu là thực vật, bộ phận dùng để chiết có thể là hoa, quả, hạt, thân, lá, nhựa, phần trên mặt đất, rễ, củ... hoặc toàn cây.

Tùy theo bản chất của các chất có trong dược liệu mà người ta quy định chiết từ dược liệu tươi hay khô. Đối với các trường hợp đặc biệt người ta còn phải xử lý nguyên liệu trước khi đem chiết xuất.

Để nghiên cứu thành phần hoá học một cây thuốc, nên dùng dược liệu tươi. Nếu phải xử lý thì thường ổn định bằng cách nhúng vào cồn hoặc nước sôi trong vài phút ngay sau khi thu hái, sau đó phơi khô tự nhiên trong râm hoặc bằng quạt, tránh nhiệt độ cao. Nếu dược liệu thu hái ở nơi xa, có thể giữ mẫu được vài ngày bằng cách bọc vào túi nhựa có chứa hơi cồn. Cần phải xử lý sơ bộ, loại bỏ phần bị sâu bệnh, nấm ký sinh (đã có trường hợp kết luận sai lầm về thành phần hoá học), các tạp cơ học, hoặc các thảo mộc khác lẫn vào.

Trong tài liệu này, dược liệu được hiểu là nguyên liệu có nguồn gốc thực vật là chủ yếu. Các trường hợp có nguồn gốc khác sẽ được nói cụ thể khi đề cập tới.

2.2. Các hợp chất tự nhiên trong dược liệu

2.2.1. Phân loại

2.2.1.1. Theo vai trò trong quá trình sinh trưởng của cây

– Chất trao đổi bậc 1 (primary metabolite): các chất tham gia vào quá trình sinh trưởng của cây (carbon hydrat, acid amin, lipid...)

– Chất trao đổi bậc 2 (secondary metabolite): không phải là những chất nuôi sống và cần thiết cho sự phát triển của cây, vai trò của chúng còn chưa biết hết..., chúng là đối tượng nghiên cứu của hoá học các hợp chất tự nhiên, đặc biệt trong y học, nông nghiệp.

2.2.1.2. Theo cấu trúc mặt hoá học

Các hợp chất tự nhiên được xếp theo các nhóm chức cơ bản:

- Carbonhydrat (monosaccharid, oligosaccharid, polygosaccharid)
- Lipid và acid béo
- Acid amin (protein, phiprotein)
- Base amin (alcaloid, amin)
- Acid hữu cơ
- Terpenoid (mono-, sesqui-, di-, triterpen, carotenoid, steroid...)
- Các hợp chất phenol (flavonoid, tanin, lignin, quinon...)
- Glycosid...

2.2.2. Tính phân cực của các hợp chất tự nhiên

Trong cây, các hợp chất tồn tại dưới dạng hoà tan trong nước (dịch tế bào: các chất phân cực như các carbon hydrat phân tử bé, một số polysaccharid như pectin, gôm, các glycosid như saponin, flavonoid, iridoid.. muối alcaloid của các acid hữu cơ, acid amin, muối amin, cac phenol hoà tan dưới dạng glycosid hoặc dạng phức hợp khác.), dầu béo hoặc tinh dầu, các chất không phân cực như các hydro carbon, monoterpen, sterol, carotenoid và các dẫn xuất phenyl propanoid.

Dầu và tinh dầu chứa trong các bộ phận riêng biệt như hạt (dầu béo), các tổ chức tiết (tinh dầu).

Về mặt phân cực: phụ thuộc vào trọng lượng phân tử (mạch carbon) và vào các nhóm chức, thông thường mạch carbon càng dài thì tính phân cực càng giảm. Các nhóm chức có nguyên tử mang điện âm, có thể hình thành liên kết hydro là nhóm chức phân cực. Nói chung phân tử càng có nhiều nhóm phân cực thì tính phân cực càng mạnh, nhưng nếu mạch carbon càng dài thì tính phân cực càng giảm.

Một lưu ý quan trọng là các enzym vốn có mặt trong cây, cần phải khống chế nó để tránh sự thuỷ phân của các glycosid (và sẽ làm thay đổi tính phân cực, do đó làm thay đổi độ hoà tan của hợp chất đối với dung môi).

Nói chung, không có một quy trình chung cho việc chiết xuất các chất, vì việc chiết xuất các chất phụ thuộc vào rất nhiều yếu tố, nhưng có một số nguyên tắc cơ bản sau:

2.2.2.1. Chất tan trong nước và dung môi phân cực

- Các chất điện ly.
- Các chất phân cực: chứa các nhóm hoặc nguyên tử mang điện âm, có thể hình thành liên kết hydro với phân tử nước (–OH, –CO, –NO, $–NH_2$...) và các halogen.
- Càng có nhiều nhóm phân cực, thì phân tử càng dễ hoà tan trong nước, nhưng nếu mạch hydrocarbon của phân tử càng dài, thì độ hoà tan càng giảm (trong thực nghiệm, thường mạch này không quá 5 hoặc 6 carbon. Một nhóm phân cực có 3 - 4 carbon trong mạch thì tan được trong nước.

2.2.2.2. Chất tan trong ether và dung môi không phân cực

Nói chung các chất không phân cực đều tan trong ether và các dung môi không phân cực.

Các chất mà phân tử chỉ có 1 nhóm phân cực yếu cũng có thể tan trong ether.

Dung môi là yếu tố rất quan trọng trong chiết xuất. Để có cơ sở trong việc chọn dung môi hợp lý và hiệu quả cho việc chiết xuất, chúng ta cần nghiên cứu một số cơ sở lý thuyết về dung môi.

III. DUNG MÔI

Việc lựa chọn một dung môi hay hỗn hợp dung môi dùng trong chiết xuất là rất quan trọng và tuỳ theo bản chất của mỗi loại dược liệu. Cơ sở chọn một dung môi để chiết xuất là tính phân cực của hợp chất chứa trong dược liệu và tính chất của dung môi.

Các dung môi đưa ra trong khuôn khổ của tài liệu này là những dung môi cho phép đáp ứng được những đòi hỏi của việc chiết tách, sắc ký và phân tích định lượng.

Đó là những chất lỏng thuộc loại dung môi phân tử, có nghĩa là những dung dịch điện môi gần như không dẫn điện. Khả năng dẫn điện yếu của chúng được thể hiện bằng sự tự ion hoá rất yếu của các phân tử.

Chỉ những dung môi dưới dạng phân tử hữu cơ là được dùng cho những quá

trình chiết tách hoặc sắc ký (trừ nước).

Dung môi đóng vai trò chủ yếu đến các tương tác của các chất tan trong dung dịch.

3.1. Các tương tác của chất tan và dung môi

Tính phân cực của một dung môi là kết quả của sự kết hợp của ba loại tương tác chính giữa các phân tử .

3.1.1. Độ bền (lực) phân tán: (còn gọi là lực Van der Waals)

Độ bền này được sinh ra từ sự chuyển động của các electron trong các phân tử có trong dung dịch. Khi mà cấu hình của electron trở lên không đối xứng, thì nó sẽ sinh ra momen lưỡng cực ngang bằng với phân tử của chất tan, làm xuất hiện sự phân cực ở phân tử của dung môi và gây ra sức hút tĩnh điện giữa chất tan và dung môi. Độ bền này càng lớn thì các electron càng có thể phân cực hơn trong chất tan và trong dung môi. Chúng có năng lượng yếu được sắp xếp từ 1 đến 10 kcal/mol.

3.1.2. Các tương tác lưỡng cực

Chỉ gặp khi dung môi và chất tan thường xuyên có momen lưỡng cực. Đây là những tương tác có khả năng chọn lọc.

Tuy nhiên, trong trường hợp tương tác lưỡng cực cảm ứng, thì một trong hai yếu tố chủ chốt là chất tan hoặc dung môi phải thường xuyên lưỡng cực, còn chất kia có lưỡng cực cảm ứng (trường hợp phân tử có thể phân cực). Các tương tác này càng mạnh thì các phân tử càng có momen lưỡng cực cao (ví dụ: nitril - sulfoxyd - nitro hoá).

3.1.3. Tương tác bởi liên kết hydro

Các tương tác này được diễn ra giữa một phần tử nhận proton và một phần tử cho proton. Đặc tính của chất nhận tăng lên cùng với đặc tính bazơ của phân tử, đặc tính của chất cho tăng lên với sự tham gia của H^+ của các acid.

Các chất cho mạnh bao gồm:
- Cồn
- Acid carboxylic
- Các phenol
- $CHCl_3$

Các chất nhận mạnh bao gồm: - Các amin bậc I và bậc II

- Các sulfoxyd

Những dung môi có khả năng cho mạnh làm hoà tan những chất nhận mạnh một cách thuận lợi và ngược lại.

Ngoài ra cần chú ý đến tương tác của các ion và tương tác điện môi.

Những tương tác tĩnh điện càng yếu thì tính ổn định về điện môi ε của dung môi càng cao.

Những dung môi có hằng số điện môi ε lớn có thể hoà tan những chất có khả năng ion hóa.

3.2. Sự phân cực của một dung môi

Sự phân cực của một dung môi là kết quả tổng hợp của những tương tác khác nhau trên.

Nó được biểu thị:

- Bởi lực rửa giải ε_o của dung môi.
- Bởi độ phân cực P' tuỳ theo Rohrschneider (đã được tính toán bởi Snyder).
- Bởi tham số của độ hoà tan Hildebrand ∂.

3.2.1. Lực rửa giải ε_o(bảng 3)

ε_o là năng lượng tự do hấp thụ từ những phân tử có trong dung môi được tính bằng đơn vị của bề mặt dung môi hấp thụ.

$$\varepsilon_o = \frac{\Delta G_S^o}{2,3RT.As}$$

trong đó: ΔG_S^o - năng lượng hấp thụ của các phân tử chất tan;

As - bề mặt bị chiếm trên chất ngoại hấp thụ bởi một phân tử dung môi;

R - hằng số khí tiêu chuẩn;

T - nhiệt độ được tính theo ^oK.

(ε_o được đo dựa trên oxyd silic hoặc nhôm).

Năng lượng hấp thụ được đo so với pentan một cách khách quan và quy định năng lượng bằng không trên silic.

3.2.2. Độ phân cực của một dung môi (bảng 2)

Tham số P' được xác định bởi SNYDER, bao gồm:

- Khả năng nhận proton.

- Khả năng cho proton.
- Sự tương tác lưỡng cực.
- Sự tương tác với toluen.
- Sự tương tác với methylethylceton.

3.2.3. Tham số về độ hoà tan Hildebrand ∂ (bảng 1)

Tham số ∂ này được định nghĩa là: $\partial = \sqrt{Es/Vs}$

trong đó: Vs - thể tích phân tử gam của dung môi;

Es - năng lượng phân tử được biểu diễn kết hợp thông qua toàn bộ những tương tác.

Năng lượng phân tử kết hợp là tổng của các năng lượng thành phần của những tương tác:

- Sự phân tán: ∂d
- Lưỡng cực : ∂n
- Liên kết H : ∂H

$$\partial o = \sqrt{\partial d^2 + \partial n^2 + \partial H^2}$$

Một số ví dụ về các dung môi thường được sử dụng:

Nhóm I: Các dung môi phân cực lưỡng cực (dung môi cho proton, nhất là liên kết H và một số trường hợp có tương tác lưỡng cực), đó là: H_2O - ROH- φOH - φCOOH - NH_3.

Nhóm II: Các dung môi phân cực không lưỡng cực (các tương tác lưỡng cực).

a/ Dung môi của các chất tan phân cực: các nguyên tử khác loại có nối đôi - ceton - DMSO- DMF.

b/ Dung môi của các chất tan không phân cực: $CHCl_3$ - ether ethylic

Nhóm III: Những dung môi không phân cực, không lưỡng cực (các tương tác kiểu Van der Waals), đó là những dung môi của các chất tan không phân cực, như là các hydrocarbon và các dẫn chất halogen của chúng (CCl_4 – benzen...).

Chúng ta lưu ý rằng các dung môi nhóm (1) và (2a) có thể trộn lẫn được với nhau, nhóm (2a) và (3) có thể trộn lẫn được với nhau.

Người ta có thay đổi bản chất và cường độ của các tương tác giữa chất tan - dung môi để lựa chọn cho thích hợp. Ví dụ: việc thay thế methanol trong một

giai đoạn tách rửa (dung môi phân cực) bằng ethanol sẽ không làm thay đổi đáng kể, vì cả hai dung môi chủ yếu đều nhận proton, trong khi cho thêm clorua metylen (tương tác lưỡng cực mạnh) hoặc có thêm cloroform (chất cho proton) sẽ gây ra những thay đổi quan trọng trong việc lựa chọn. Người ta cũng nhận thấy lợi ích của việc sắp xếp các dung môi tuỳ vào khả năng cho proton của các loại tương tác khác nhau.

Nhiều hệ thống phân loại đã được xem xét, được biết đến nhiều nhất là:

- Hệ thống phân loại SNYDER

- Thuyết Solvat hóa

1) Hệ thống phân loại dựa vào hình tam giác có khả năng chọn lọc của SYNDER (SST).

Hệ thống phân loại này được dựa trên sự phân bổ những tác động qua lại về cực của mỗi dung môi tuỳ theo lực thành phần.

Acid : Xd là chất cho proton.

Base : Xe là chất nhận proton.

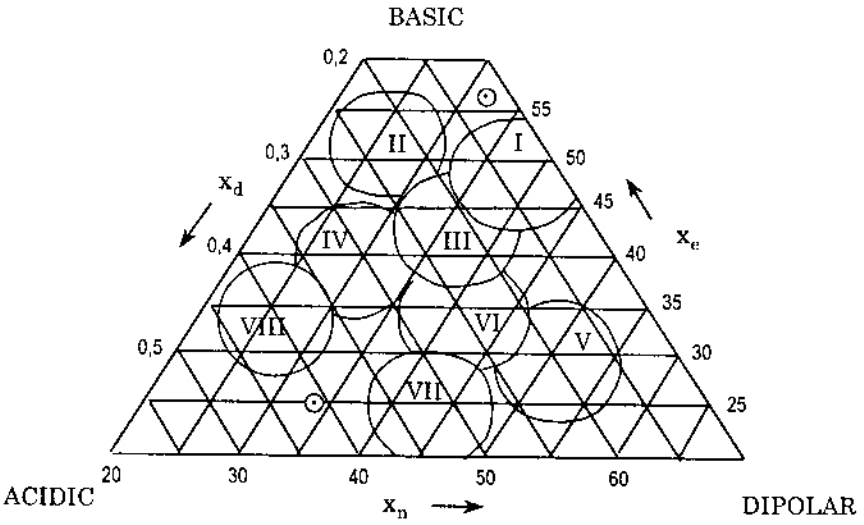
Lưỡng cực: Xn là các tương tác lưỡng cực.

Các lực thành phần X này đã được tính toán bởi SYNDER như sự tương tác với dung môi X_d của diocxan Xe, ethanol, X_n và nitrometan với tổng: Xd + Xe + Xn = 1.

Việc biểu thị ba lực thành phần này dựa trên ba mặt của một tam giác, được gọi là tam giác chọn lọc SYNDER. Những dung môi khác nhau được phân thành 8 vùng (8 nhóm có khả năng chọn lọc):

- Nhóm I : Ether - các amin
- Nhóm II : Các alcol mạch thẳng - ethanol – methanol
- Nhóm III : Tetrahydrofuran- methoxyethanol – dimethylsulfoxic
- Nhóm IV : Acid acetic
- Nhóm : Clorua methylen (CH_2Cl_2)
- Nhóm VI : Dioxan - acetonitril - acetat ethyl
- Nhóm VII : Các hydrocarbon thơm, các ether thơm, dẫn chất nitro hoá.
- Nhóm VIII: Cloroform - nước

TAM GIÁC CHỌN LỌC CỦA SNYDER



Bảng 1: Tham số độ hòa tan

Tên chất	Lượng phân tử gam	1	2	3	4	5	1'	2'	3'	4'	5'
	(cm^3)	δ	δ_0	δ_d	δ_n	δ_h	δ	δ_0	δ_d	δ_n	δ_h
Alcan											
n-Butan	101,4	6,8	6,9	6,9	0,0	0,0	13,9	14,1	14,1	0,0	0,0
n-Pentan	116,2	7,0	7,1	7,1	0,0	0,0	14,3	14,5	14,5	0,0	0,0
n-Hexan	131,6	7,3	7,3	7,3	0,0	0,0	14,9	14,9	14,9	0,0	0,0
n-Heptan	147,4	7,4	7,5	7,5	0,0	0,0	15,1	15,3	15,3	0,0	0,0
n-Octan	163,5	7,6	7,6	7,6	0,0	0,0	15,5	15,5	15,5	0,0	0,0
Cyclohexan	108,7	8,2	8,2	8,2	0,0	0,1	16,8	16,8	16,8	0,0	2,2
Hydrocarbon thơm											
Benzen	89,4	9,2	9,1	9,0	0,0	1,0	18,8	18,6	18,4	0,0	2,0
Toluen	106,8	8,9	8,9	8,8	0,7	1,0	18,2	18,2	18,0	1,4	2,0
Naphtalen	111,5	9,9	9,9	9,4	1,0	2,9	20,3	20,3	19,2	2,0	5,9
o-Xylen	121,2	8,8	8,8	8,7	0,5	15	18,0	18,0	17,8	1,0	3,1
Ethylbenzen	123,1	8,8	8,7	8,7	0,3	0,7	18,0	17,8	17,8	0,6	1,4
Hydrocarbon-halogenic											
Clorid methyl	55,4	9,7	8,3	7,5	3,0	1,6	19,8	17,0	15,3	6,1	3,9
Clorodifluorometan	72,9	8,3	7,3	6,0	3,1	2,8	17,0	14,9	12,3	6,3	5,7
Cloroform	80,7	9,3	9,3	8,7	1,5	2,8	19,0	19,0	17,8	3,1	5,7
Diclorodifluorometan	92,3	5,1	6,1	6,0	1,0	0,0	11,3	12,5	12,3	2,0	0,0

Bảng 1 (tiếp theo)

Tên chất	Lượng phân tử gam	1	2	3	4	5	1'	2'	3'	4'	5'
	(cm^3)	δ	δ_0	δ_d	δ_n	δ_h	δ	δ_0	δ_d	δ_n	δ_h
Tetraclorid carbon	97,1	8,6	8,7	8,7	0,0	0,3	17,6	17,8	17,8	0,0	0,6
Clorobenzen	102,1	9,5	9,6	9,3	2,1	1,0	19,4	19,6	19,0	4,3	2,0
Bromobenzen	105,3	9,9	10,6	10,0	2,7	2,0	20,3	21,7	20,5	5,5	4,1
Diclorobenzen	112,8	10,0	10,0	9,4	3,1	1,6	20,5	20,5	19,2	6,3	3,3
Ceton											
Aceton	74	9,9	9,8	7,6	5,1	3,4	20,3	20,0	15,5	10,4	7,0
Cyclohexanon	104,0	9,9	9,6	8,7	3,1	2,5	20,3	19,6	17,8	6,3	5,1
Diethylceton	106,4	8,8	8,9	7,7	3,7	3,0	18,4	18,9	16,4	7,1	6,1
Acid clorid và anhydrid											
Acetyl clorid	71,0	9,5	9,5	7,7	5,2	1,9	19,4	19,4	15,8	10,6	3,9
Anhydrid succinic	66,8	15,4	15,4	9,1	9,4	8,1	31,5	31,5	18,6	19,2	16,6
Anhydrid acetic	94,5	10,3	10,9	7,8	5,7	5,0	21,1	22,3	16,0	11,7	10,2
Alcol											
Methanol	40,7	14,5	14,5	7,4	6,0	10,9	29,7	29,6	15,1	12,3	22,3
Ethanol	58,5	12,7	13,0	7,7	4,3	9,5	26,0	26,5	15,8	8,8	19,4
Alcol allylic	68,4	11,8	12,6	7,9	5,3	8,2	24,1	25,7	16,2	10,8	16,8
Propanol-1	75,2	11,9	12,0	7,8	3,3	8,5	24,3	24,5	16,0	6,8	17,4
Propanol-2	76,8	11,5	11,5	7,7	3,0	8,0	23,5	23,5	15,8	6,1	16,4
Alcol furfurylic	86,5	12,5	11,9	8,5	3,7	7,4	25,6	24,3	17,4	7,6	15,1
Butanol -1	91,5	11,4	11,3	7,8	2,8	7,7	23,3	23,1	16,0	5,7	15,8
Butanol -2	92,0	10,8	10,8	7,7	2,8	7,1	22,1	22,2	15,8	5,7	14,5
Alcol benzylic	103,6	12,1	11,6	9,0	3,1	6,7	24,8	23,8	17,4	6,3	13,7
Cyclohexanol	106,0	11,4	11,0	8,5	2,0	6,6	23,3	22,4	15,8	4,1	13,5
Ethyl-2 butanol-1	123,2	10,5	10,4	7,7	2,1	6,6	21,5	21,2	18,4	4,3	13,5
Ethyl lactat	115,0	10,0	10,6	7,8	3,7	6,1	20,5	21,6	16,0	8,2	10,8
n-butyl lactat	149,1	9,4	9,7	7,7	3,2	5,0	19,2	19,9	15,8	7,6	12,5
Ethylen glycol (ether monomethylic)	79,1	11,4	12,1	7,9	4,5	8,0	23,3	24,8	16,2	6,5	10,2
Ethylen glycol (ether monoethylic)	97,8	10,5	11,5	7,9	4,5	7,0	21,5	23,5	16,2	9,2	16,4
Diethylen glycol (ether monomethylic)	130,9	8,5	10,9	7,9	4,5	6,0	17,4	22,3	16,2	9,2	14,3
Ethylen glycol (ether monomethylic)	131,6	9,5	10,2	7,8	2,5	6,0	19,4	20,8	16,0	9,2	12,3
Ethyl-2 hexanol -1	157,0	9,5	9,9	7,8	1,6	5,8	19,4	20,2	16,0	5,1	12,3
Octanol-1	157,7	10,3	10,3	8,3	1,6	5,8	21,1	21,0	17,0	3,3	11,9

Bảng 1 (tiếp theo)

Tên chất	Lượng phân tử gam	1	2	3	4	5	1'	2'	3'	4'	5'
	(cm^3)	δ	δ_0	δ_d	δ_n	δ_h	δ	δ_0	δ_d	δ_n	δ_h
Diethylen glycol (ether monobutylic)	170,6	12,1	10,0	7,8	3,4	5,2	24,8	20,4	16,0	7,0	10,6
Acid carboxylic											
Acid formic	37,8	12,1	12,2	7,0	5,8	8,1	24,8	24,9	14,3	11,9	16,6
Acid acetic	57,1	10,1	10,5	7,1	3,9	6,6	20,7	21,4	14,5	8,0	13,5
Acid n-butyric	110,0	10,5	9,2	7,3	2,0	5,2	21,5	8,8c	4,9c	4,1	10,6
Phenol											
m-Cresol	104,7	10,2	11,1	8,8	2,5	6,3	20,9	22,7	18,0	5,1	12,9
Methyl salicylat	129,0	10,6	10,6	7,8	3,9	6,0	21,7	21,7	16,0	8,0	12,3
Polyalcol											
Ethylen glycol	55,8	14,6	16,1	8,3	5,4	12,7	29,9	32,9	17,0	11,0	26,0
Glycerol	73,3	16,5	17,7	8,5	5,9	14,3	33,8	36,1	17,4	12,1	29,3
Propylen glycol	73,6	12,6	14,8	8,2	4,6	11,4	25,8	30,2	16,8	9,4	23,3
Butandiol-1,3	89,9	11,6	14,1	8,1	4,9	10,5	23,7	28,9	16,6	10,0	21,5
Diethylen glycol	95,3	12,1	14,6	7,9	7,2	10,0	24,8	29,9	16,2	14,7	20,5
Triethylen glycol	114,0	10,7	13,5	7,8	6,1	9,1	21,9	27,5	16,0	12,5	18,6
Nước	18,0	23,4	23,4	7,6	7,8	20,7	47,9	47,8	15,5	16,0	42,3

Đơn vị thường sử dụng được gọi là "Hildebrand": 1 $cal^{1/2}cm^{-3/2} = (4,18)^{1/2}$ $(MPa)^{1/2}$.

δ Tham số của độ hoà tan hoàn toàn (thu được từ các phương pháp nhiệt đông).

δ_o Tham số của độ hoà tan hoàn toàn tính toán từ các tham số hoà tan thành phần: $\delta_o = (\delta_d^2 + \delta_n^2 + \delta_h^2)^{1/2}$.

δ_d Tham số hoà tan một phần tương ứng với các tương tác của sự phân tán.

δ_n Tham số hoà tan một phần tương ứng với các tương tác lưỡng cực.

δ_h Tham số hoà tan một phần tương ứng với các tương tác bởi liên kết hydro.

Bảng 2: Tính chất của các dung môi

Độ phân cực P' của dung môi phụ thuộc các lực tương tác khác nhau: x_e: khả năng nhận proton; x_d: khả năng cho proton; x_n: lực tương tác lưỡng cực; x_i, x_m: lực tương tác của dung môi với toluen và methylethylceton.

Thứ tự	Dung môi	1 P'	Nhóm được chọn	3 x_e	4 x_d	5 x_n	6 x_i	7 x_m
1	Ether ethylic	2,8	I	0,53	0,13	0,34	0,09	0,15
2	Ether isopropylic	2,4	I	0,48	0,14	0,38	0,07	0,20
3	Benzen	2,7	VII	0,23	0,32	0,45	0,16	0,29
4	Cloroform	4,1	VIII	0,25	0,41	0,33	0,15	0,39
5	Clorobenzen	2,7	VII	0,23	0,33	0,44	0,17	0,34
6	Ethyl acetat	4,4	VI	0,34	0,23	0,43	0,13	-
7	Pyridin	5,3	III	0,41	0,22	0,36	0,13	0,24
8	Dioxan	4,8	VI	0,36	0,24	0,40	0,14	0,24
9	*n*-Butanol	3,9	II	0,59	0,19	0,25	0,07	0,24
10	*n*-Propanol	4,0	II	0,54	0,19	0,27	0,06	0,24
11	Aceton	5,1	VI	0,35	0,23	0,42	0,12	0,28
12	Ether benzylic	4,1	VII	0,30	0,28	0,42	0,17	0,28
13	Ethanol	4,3	II	0,52	0,19	0,29	0,8	0,25
14	Nitrobenzen	4,4	VII	0,26	0,30	0,44	0,17	0,30
15	m-Crésol	7,4	VIII	0,38	0,37	0,25	0,08	0,36
16	N,N- Dimethylacetamid	6,5	III	0,41	0,20	0,39	0,13	0,23
17	Acid acetic	6,0	IV	0,39	0,31	0,30	0,08	0,27
18	Nitroethan	5,2	VII	0,28	0,29	0,43	0,16	0,31
19	Methanol	5,1	II	0,48	0,22	0,31	0,06	0,28
20	Alcol benzylic	5,7	IV	0,40	0,30	0,30	0,11	0,26
21	Dimethylformamid	6,4	III	0,39	0,21	0,40	0,14	0,24
22	Tricresyl phosphat	4,6	VI	0,36	0,23	0,41	0,15	0,27
23	Methoxyethanol	5,5	III	0,38	0,24	0,38	0,11	0,25
24	Nonylphenol oxyethylat	-	III	0,38	0,22	0,40	0,13	0,23
25	N-methyl-2-pyrrolidon	6,7	III	0,40	0,21	0,39	0,15	0,23
26	Acetonitril	5,8	VI	0,31	0,27	0,42	0,13	0,29
27	Anilin	6,3	VI	0,32	0,32	0,36	0,13	0,31
28	Methylformamid	6,0	III	0,41	0,23	0,36	0,11	0,25
29	Cyanomorpholin	5,5	VI	0,35	0,25	0,40	0,16	0,27
30	Butyrolacton	6,5	VI	0,28	0,26	0,40	0,16	0,28
31	Nitromethan	6,0	VII	0,33	0,31	0,40	0,14	0,31
32	Dodecafluoroheptanol	8,8	VIII	0,36	0,40	0,27	0,07	0,37
33	Formylmorpholin	6,4	VI	0,31	0,24	0,39	0,15	0,25
34	Carbonat propylen	6,1	VIb	0,39	0,27	0,42	0,15	0,28
35	Dimethylsulfoxyd	7,2	III	0,34	0,23	0,39	0,14	0,24

36	Tetrafluoropropanol	8,6	VIII	0,33	0,36	0,30	0,08	0,37
37	Dioxyd tetrahydrothiophen	6,9	VI	0,32	0,28	0,39	0,16	0,27
38	Tris-cyanoethoxypropan	6,6	VI	0,31	0,27	0,41	0,16	0,28
39	Oxydipropionitril	6,8	VI	0,44	0,29	0,40	0,17	0,29
40	Diethylenglycol	5,2	III	0,42	0,23	0,33	0,09	0,23
41	Triethylenglycol	5,6	III	0,43	0,24	0,34	0,12	0,24
42	Ethylenglycol	6,9	IV	0,36	0,29	0,28	0,13	0,29
43	Formamid	9,6	IV	0,33	0,33	0,30	0,20	0,34
44	Nước	10,2	VIII	0,37	0,37	0,25	0,07	0,33

Bảng 3: Lực tách (năng lượng hấp thụ) của các dung môi (ε_o)

Các dung môi	ε_0 Silice	ε_0 Oxit nhôm
FC 78	–	–0,25
FC 75	–	–0,25
FC 43	–	–0,25
FC 113	0,02	–
Isooctan	–	0,01
n-Heptan	0	0,01
n-Hexan	0	0,01
n-Pentan	0	0,01
Cyclohexan	–	0,04
Cyclopentan	–	0,05
Tetraclorid carbon	0,11	0,17
Ether isopropylic	–	0,25
Cloro-1,2 butan	–	0,26
Ether isopropylic	0,32	0,28
Bromoetan	–	0,34
Cloroform	0,26	0,36
Dicloro-1,2 etan	0,34	0,44
Methyltertiobutyl ether	0,47	–
Tetrahydrofuran	0,53	0,51
n-Octanol	–	0,50
Triethylamin	–	0,36
Methylethylceton	–	0,51
Acetonitril	0,52	0,55
Dioxan	0,51	0,61
tert-Butanol	–	0,70
n-Butanol	–	0,82
Dimethylsulfoxyd	–	0,75
Isopropanol	0,60	0,82
Ethanol	–	0,88
Methanol	0,70	0,95
Nước	0,70	0,95
Acid acetic	0,70	0,95

IV. MỘT SỐ QUÁ TRÌNH XẢY RA TRONG QUÁ TRÌNH CHIẾT XUẤT DƯỢC LIỆU

Trong quá trình chiết xuất, dược liệu và dung môi tiếp xúc với nhau, dung môi thấm vào dược liệu, các chất trong tế bào dược liệu hòa tan vào dung môi rồi khuếch tán ra ngoài tế bào. Sau khi loại bỏ dược liệu (bã) ta thu được dung dịch (dung môi chứa các chất từ dược liệu đem chiết). Như vậy trong quá trình chiết xuất dược liệu sẽ xảy ra một số quá trình: khuếch tán, thẩm thấu, thẩm tích...

4.1. Quá trình khuếch tán

Quá trình di chuyển vật chất từ pha này sang pha khác khi hai pha tiếp xúc trực tiếp với nhau gọi là quá trình khuếch tán.

Trong quá trình chiết xuất dược liệu, dược liệu là pha rắn, dung môi là pha lỏng. Ở đây xảy ra hai loại khuếch tán.

4.1.1. Khuếch tán phân tử

Khi dung môi và dược liệu tiếp xúc nhau, do sự cản trở của pha này với pha kia mà trên bề mặt tiếp xúc hình thành lớp màng. Trong lớp màng luôn luôn có chế độ chuyển động dòng, quá trình di chuyển vật chất cơ bản là nhờ sự tiếp xúc giữa các phân tử và sự tác dụng tương hỗ giữa chúng, do đó quá trình khuếch tán qua màng được gọi là quá trình khuếch tán phân tử. Động lực của quá trình khuếch tán này là gradien nồng độ theo hướng x, tức là sự biến đổi nồng độ trên một đơn vị đường đi. Vận tốc khuếch tán là lượng vật chất đi qua một đơn vị bề mặt trong một đơn vị thời gian. Theo định luật Fick, vận tốc khuếch tán tỷ lệ với gradien nồng độ.

Ta có: $$\frac{dG}{Fd\tau} = -D\frac{dC}{dX}$$

trong đó: $\frac{dG}{Fd\tau}$ là vận tốc khuếch tán;

D là hệ số tỷ lệ;

dấu (–) có nghĩa là nồng độ giảm theo hướng khuếch tán;

$\frac{dC}{dx}$ là gradien nồng độ.

Giải phương trình trên, ta tính được lượng chất khuếch tán:

$$G = - D.F.\tau.\frac{dC}{dx}$$

trong đó: G - lượng chất khuếch tán (kg);

F - bề mặt khuếch tán, vuông góc với hướng khuếch tán (m^2);

τ - thời gian khuếch tán (h);

C- nồng độ chất tan (kg/m^3);

x- chiều dài quãng đường khuếch tán (m).

Hệ số khuếch tán phân tử là lượng chất đi qua một đơn vị bề mặt, trong một đơn vị thời gian, khi nồng độ chất giảm đi trên một đơn vị chiều dài theo hướng khuếch tán. Hệ số khuếch tán của một chất đặc trưng cho tính chất khuếch tán của chất đó trong một môi trường nào đấy.

Công thức tính hệ số khuếch tán phân tử theo Einstein:

$$D = \frac{RT}{N}\frac{1}{6r\pi\eta}$$

ở đây: R - hằng số khí;
T - nhiệt độ tuyệt đối;
N- hằng số Avogadro;
η - độ nhớt của chất lỏng;
r - bán kính của phân tử khuếch tán.

- Ứng dụng.

+ Trong quá trình chiết xuất dược liệu, đặc trưng của quá trình khuếch tán qua màng tế bào chính là khuếch tán phân tử.

+ Dựa vào biểu thức của định luật Fick, ta thấy rằng những yếu tố có ảnh hưởng đến quá trình chiết xuất là: độ mịn của dược liệu, thời gian chiết xuất, nhiệt độ chiết xuất, dung môi chiết, khuấy trộn trong quá trình chiết xuất, kích thước của phân tử khuếch tán.

4.1.2. Khuếch tán đối lưu

Trong chiết xuất dược liệu, quá trình khuếch tán của chất tan trong dung môi được đặc trưng chủ yếu bằng khuếch tán đối lưu.

Khuếch tán trong môi trường lỏng chuyển động được mô tả bằng phương trình vi phân của khuếch tán đối lưu:

$$\frac{dC}{dt} + vx\frac{dC}{dx} + vy\frac{dC}{dy} + vz\frac{dC}{dz} = D\left(\frac{d^2C}{dx^2} + \frac{d^2C}{dy^2} + \frac{d^2C}{dz^2}\right)$$

Phương trình này rất phức tạp, tùy từng trường hợp mà người ta giải phương trình để áp dụng.

4.2. Quá trình thẩm thấu

Là quá trình khuếch tán giữa hai pha lỏng qua một màng có tính bán thấm, có nghĩa là màng đó chỉ cho dung môi đi qua mà không cho chất tan đi qua. Màng này gọi là màng bán thấm, do áp lực thẩm thấu của các phân tử chất tan, dung môi sẽ được thấm từ pha lỏng có nồng độ chất tan thấp hơn sang pha lỏng có nồng độ cao hơn cho đến khi áp lực thủy tĩnh cân bằng với áp lực thẩm thấu.

Trong tế bào dược liệu chất nguyên sinh có tính chất bán thấm, vì vậy khi

dược liệu còn tươi, do tác dụng của chất nguyên sinh mà chỉ có dung môi được thấm vào tế bào làm cho dược liệu bị trương nở, còn chất tan trong tế bào không khuếch tán ra ngoài được, vì vậy người ta phải tìm cách phá hủy chất nguyên sinh bằng nhiệt hoặc cồn để thực hiện quá trình chiết xuất.

4.3. Quá trình thẩm tích

Là quá trình khuếch tán giữa hai pha lỏng qua một màng có tính chất thẩm tích, có nghĩa là màng đó không chỉ cho dung môi đi qua mà còn cho cả chất tan đi qua, nhưng chỉ cho qua những chất có phân tử nhỏ.

Màng của các tế bào dược liệu có tính chất của một màng thẩm tích, do đó khi chiết xuất nếu màng tế bào còn nguyên vẹn thì chỉ có chất tan là phân tử nhỏ và ion (phần lớn là hoạt chất) khuếch tán qua được màng tế bào, còn các chất có phân tử lớn (keo, tạp chất...) thì không qua được màng tế bào nên không bị chiết vào dịch chiết. Như vậy, có thể coi màng tế bào như một màng lọc có tính chọn lọc. Đây chính là ưu điểm của màng tế bào đối với quá trình chiết xuất, do vậy trong chiết xuất, không nên xay dược liệu quá mịn, vì khi đó màng tế bào bị phá vỡ, tính chọn lọc của màng không còn và dịch chiết sẽ có nhiều tạp, gây khó khăn cho quá trình tinh chế.

V. NHỮNG YẾU TỐ ẢNH HƯỞNG ĐẾN QUÁ TRÌNH CHIẾT XUẤT DƯỢC LIỆU

5.1. Những yếu tố thuộc về nguyên liệu

5.1.1. Màng tế bào dược liệu

Màng tế bào dược liệu có ảnh hưởng nhiều đến quá trình khuếch tán. Đó là nơi xảy ra quá trình trao đổi chất có tính chất chọn lọc. Trong quá trình chiết xuất lại xảy ra các hiện tượng khuếch tán, thẩm thấu, thẩm tích,.... Màng tế bào có cấu tạo không ổn định, nó có thể bị thay đổi tính chất vật lý và thành phần hóa học để đáp ứng với những chức năng đặc biệt mà nó đảm nhiệm (hóa gỗ, hóa khoáng, phủ sáp...). Sự thay đổi này có thể xảy ra từng phần hoặc toàn phần ở màng tế bào và thường thay đổi nhiều khi đã già hóa.

- Đối với thực vật còn non hay các bộ phận mỏng, mềm như dạng cây thảo nhỏ, hoa, lá..., thành phần của màng tế bào chủ yếu là cellulose, chúng không tan trong nước và các dung môi hữu cơ khác, bền với nhiệt độ, có tính mềm dẻo và đàn hồi. Đối với dược liệu loại này, dung môi dễ dàng thấm vào dược liệu, do đó không cần xay mịn, vì như vậy dịch chiết sẽ có nhiều tạp chất.

- Đối với dược liệu đã già, rắn chắc như hạt, gỗ, vỏ, rễ: màng tế bào có thể hóa bần, hóa cutin, phủ thêm sáp, hóa gỗ, hóa khoáng hoặc phủ khoáng hoặc bị

dầy lên làm dung môi khó thấm vào trong tế bào. Màng tế bào cũng có thể bị phủ thêm chất nhầy, chất này có thể bị trương nở, trở nên nhớt khi gặp nước làm bít kín các ống mao quản trên màng tế bào, cản trở sự thấm của dung môi và quá trình khuếch tán. Đối với các dược liệu này cần phải xay nhỏ dược liệu để tạo điều kiện cho dung môi thấm vào dược liệu.

5.1.2. Màng nguyên sinh

Chất nguyên sinh có thành phần hóa học rất phức tạp và không ổn định, chúng có tính nhớt, đàn hồi, không tan trong nước, không bền với nhiệt độ. Về mặt cấu tạo có thể coi chất nguyên sinh là một môi trường dị thể phức tạp, một hệ keo nhiều pha, tạo thành từ những hợp chất cao phân tử phân tán trong môi trường nước.

Chất nguyên sinh có tính chất bán thấm, có nghĩa là chỉ cho dung môi đi qua. Do đó để chiết được các chất tan trong tế bào, người ta phải tìm cách phá hủy chất nguyên sinh bằng cách làm đông vón chúng bằng nhiệt (sấy, phơi) hoặc bằng cồn (hơi cồn hoặc cồn nóng).

5.1.3. Tạp chất thường có trong dược liệu

Đó là các sản phẩm của quá trình trao đổi chất, là chất dự trữ hoặc chất thải của dược liệu trong quá trình sống. Các chất này thường gây cản trở, nhưng đôi khi có tác dụng có lợi cho quá trình chiết xuất.

5.1.3.1. Dược liệu chứa pectin, gôm, chất nhầy

Đối với những dược liệu chứa nhiều pectin, gôm, chất nhầy: những chất này tan được trong nước và bị trương nở tạo ra dung dịch keo, làm tăng độ nhớt, gây cản trở cho quá trình chiết xuất. Có thể loại chúng bằng cách cho kết tủa trong cồn cao độ.

5.1.3.2. Dược liệu chứa tinh bột

Đối với dược liệu chứa nhiều tinh bột: tinh bột không tan trong nước lạnh, nhưng ở nhiệt độ cao nó bị hồ hóa, làm tăng độ nhớt của dung dịch, gây cản trở cho quá trình chiết xuất. Đối với dược liệu loại này, không nên xay quá mịn để tránh giải phóng ra nhiều tinh bột và không nên chiết ở nhiệt độ cao để tránh tinh bột bị hồ hóa.

5.1.3.3. Dược liệu chứa nhiều chất béo, tinh dầu, nhựa

Đối với những dược liệu chứa nhiều chất béo, tinh dầu, nhựa: chúng là những chất không tan trong nước và thường tan trong các dung môi không phân cực. Nếu dùng dung môi chiết là nước, các chất này sẽ cản trở quá trình thấm của dung môi vào dược liệu, gây cản trở cho quá trình chiết xuất, do đó cần loại

chúng bằng các dung môi thích hợp trước khi chiết. Nếu dùng dung môi không phân cực để chiết, dịch chiết sẽ lẫn nhiều tạp và phải loại đi bằng các cách khác nhau trong quá trình tinh chế tiếp theo.

5.1.3.4. Dược liệu chứa enzym

Đối với dược liệu chứa enzym: enzym có bản chất là protein, ở nhiệt độ 60^0 - 70^0C, chúng bị mất hoạt tính, còn ở nhiệt độ thấp chúng chỉ ngừng hoạt động và nếu nâng lên nhiệt độ thích hợp thì chúng hoạt động trở lại. Enzym có thể gây cản trở, nhưng có khi lại tạo điều kiện thuận lợi cho quá trình chiết xuất. Ví dụ: Glycosid trong cây bao gồm phần đường và phần không đường (aglycol). Dưới tác dụng của enzym sẵn có trong dược liệu, gặp điều kiện thuận lợi (ấm, ẩm), glycosid sẽ bị thủy phân, mạch đường sẽ bị cắt một phần hoặc toàn phần, làm thay đổi độ phân cực của glycosid, làm chúng ít tan trong nước hơn. Có trường hợp người ta cần glycosid thứ cấp hoặc chỉ cần phần không đường, lúc đó lại cần tạo điều kiện cho enzym hoạt động bằng cách vò nát, cắt nhỏ dược liệu, ủ ở nhiệt độ thích hợp (như trường hợp chiết mangiferin từ lá xoài...).

Trong trường hợp cần chiết glycosid sơ cấp người ta phải diệt enzym ngay sau khi thu dược liệu để tránh cho glycosid bị thủy phân.

Có ba phương pháp để diệt enzym:

+ Phương pháp nhiệt ướt: Nhúng dược liệu vào nước hoặc cồn sôi.

+ Phương pháp nhiệt ẩm: Cho dược liệu qua hơi ẩm nóng (hơi nước, cồn).

+ Phương pháp nhiệt khô: Cho dược liệu qua luồng không khí nóng.

5.2. Những yếu tố thuộc về dung môi

Như đã trình bày ở phần "dung môi", dung môi là yếu tố cực kỳ quan trọng trong chiết xuất. Trong đó các vấn đề cần nghiên cứu kỹ là: độ phân cực, độ nhớt và sức căng bề mặt của dung môi.

5.3. Những yếu tố thuộc về kỹ thuật

Đó là những yếu tố có thể thay đổi được bằng các biện pháp kỹ thuật khác nhau nhằm tạo ra các điều kiện thuận lợi cho quá trình chiết xuất.

5.3.1. Nhiệt độ chiết xuất

Theo công thức tính hệ số khuếch tán của Einstein, khi nhiệt độ tăng thì hệ số khuếch tán cũng tăng, do đó theo định luật Fick, lượng chất khuếch tán cũng tăng lên. Hơn nữa khi nhiệt độ tăng thì độ nhớt của dung môi giảm, do đó sẽ tạo điều kiện thuận lợi cho quá trình chiết xuất. Tuy nhiên khi nhiệt độ tăng sẽ có một số bất lợi sau:

- Nhiệt độ tăng cao có thể phá hủy một số chất như: vitamin, glycosid, alcaloid,...

- Nhiệt độ tăng cũng làm các chất tạp tăng độ tan và như vậy dịch chiết sẽ kéo theo nhiều tạp chất hơn. Nhất là đối với gôm và chất nhầy sẽ bị trương nở, tinh bột bị hồ hóa và như vậy cản trở quá trình chiết xuất và khó khăn cho quá trình tinh chế.

- Khi nhiệt độ tăng cũng làm sự hao hụt dung môi tăng theo, đặc biệt đối với các dung môi có nhiệt độ sôi thấp.

- Đối với một số chất đặc biệt tỏa nhiệt trong quá trình hòa tan thì khi nhiệt độ tăng, độ tan của chúng lại giảm.

Do vậy, tùy từng trường hợp cụ thể mà chúng ta cần lựa chọn nhiệt độ chiết xuất sao cho thích hợp.

5.3.2. Thời gian chiết xuất

Trong quá trình chiết xuất lúc đầu các chất có phân tử lượng thấp tan trước (thường là hoạt chất), sau mới đến các chất có phân tử lượng cao (thường là tạp như nhựa, keo...). Vì vậy, việc lựa chọn thời gian thích hợp để chiết cũng là yếu tố quan trọng.

5.3.3. Độ mịn của dược liệu

Về nguyên tắc khi kích thước dược liệu càng nhỏ thì bề mặt tiếp xúc của dược liệu với dung môi tăng, do đó lượng chất khuếch tán vào dung môi tăng và thời gian chiết xuất sẽ nhanh hơn.

Tuy nhiên, trong thực tế nếu xay dược liệu quá mịn sẽ gây ra một số bất lợi cho quá trình chiết xuất:

- Khi ngâm dược liệu vào dung môi, bột dược liệu bị dính bết vào nhau, tạo thành dạng bột nhão, vón cục, do vậy quá trình chiết xuất bị chậm lại, mặt khác khi rút dịch chiết sẽ khó khăn, thậm chí không chảy được (hiện tượng tắc thiết bị).

- Khi bột dược liệu quá mịn, nhiều tế bào dược liệu bị phá hủy, dịch chiết sẽ lẫn nhiều tạp, gây khó khăn cho quá trình tinh chế và bảo quản.

5.3.4. Khuấy trộn dược liệu và dung môi

Trong quá trình chiết xuất, chất tan khuếch tán từ dược liệu vào dung môi, nồng độ chất tan trong dung môi tăng dần và chênh lệch nồng độ chất tan trong và ngoài tế bào giảm dần, tốc độ quá trình khuếch tán cũng giảm dần, đến lúc

nào đó sẽ xảy ra cân bằng động giữa hai pha. Khuấy trộn dược liệu và dung môi sẽ tạo ra chênh lệch nồng độ ở màng tế bào, và như vậy, làm tăng cường tốc độ khuếch tán. Việc chọn thể loại cấu tạo của cánh khuấy, tốc độ khuấy đối với từng trường hợp cụ thể cũng là vấn đề lưu ý: dược liệu là hoa, lá mỏng manh thì không cần khuấy mạnh vì như vậy sẽ kéo theo nhiều tạp chất...

5.3.5. Siêu âm

Siêu âm có tác dụng:

- Làm tăng diện tích tiếp xúc giữa hai pha bằng cách phân tán chúng thành những hạt nhỏ.

- Phá vỡ một phần màng tế bào.

- Tăng cường sự xáo trộn của hỗn hợp.

- Có tác dụng làm nóng tại chỗ.

Kết quả là năng lượng của siêu âm có tác dụng làm tăng mạnh tính thẩm thấu và khuếch tán, làm tăng cường quá trình chiết xuất. Tuy nhiên phương pháp này mới chỉ dùng trong nghiên cứu, trong các phòng thí nghiệm mà chưa áp dụng trong chiết xuất công nghiệp.

Ngoài các yếu tố trên còn nhiều yếu tố khác có ảnh hưởng đến quá trình chiết xuất như: áp suất, pH môi trường, chấn động cơ học, dòng điện cao áp...

VI. CÁC PHƯƠNG PHÁP CHIẾT XUẤT

Chúng ta cần biết rằng, không có một phương pháp chiết xuất chung cho tất cả các dược liệu. Để chọn một phương pháp chiết xuất riêng cần thiết phải biết được thành phần các chất định chiết, từ đó nghiên cứu lựa chọn dung môi và chọn dụng cụ, thiết bị cho thích hợp.

Khi chưa biết rõ thành phần các chất có trong dược liệu, người ta dùng phương pháp cổ điển để nghiên cứu chiết xuất sơ bộ:

+ Chiết nóng bằng dung môi trong dụng cụ soxhlet hoặc đun cách thủy hồi lưu.

+ Dùng một dãy dung môi, bắt đầu từ không phân cực đến phân cực mạnh để chiết phân đoạn các hợp chất ra khỏi dược liệu, ví dụ: ether dầu-ether-cloroform-cồn và cuối cùng là nước.

+ Dựa vào tính phân cực của dung môi và của các nhóm hợp chất ta có thể dự đoán sự có mặt của các chất trong mỗi phân đoạn dịch chiết:

- Trong phân đoạn chiết ether và ether dầu sẽ có các hydrocarbon béo hoặc thơm, các thành phần của tinh dầu (cac monoterpen), các chất không phân cực như chất béo, caroten, các sterol, chất mầu, clorophyl,...
- Trong dịch chiết cloroform có sesquiterpen, diterpen, coumarin, quinon, các aglycon do glycosid thủy phân tạo ra, một số alcaloid base yếu,...
- Trong dịch chiết cồn có mặt glycosid, alcaloid, flavonoid, các hợp chất phenol khác, nhựa, acid hữu cơ và tanin.
- Trong dịch chiết nước có các glycosid, tanin, các đường, các hợp chất carbon hydrat phân tử vừa như pectin, chất nhầy, các protein và các muối vô cơ.

+ Ethanol 80% và methanol là dung môi vạn năng, dịch chiết của chúng sau khi bay hơi sẽ được cao toàn phần chứa hầu hết các hợp chất có trong dược liệu.

Trong phòng thí nghiệm với một lượng dược liệu nhỏ người ta thường dùng phương pháp chiết xuất bằng dụng cụ soxhlet, ưu điểm của phương pháp này là với một lượng nhỏ dung môi có thể chiết kiệt hết các chất trong dược liệu. Có thể dùng phương pháp chiết hồi lưu trên bình cầu...

6.1. Phân loại

Có nhiều cách phân loại phương pháp chiết xuất dựa vào các yếu tố khác nhau.

6.1.1. Căn cứ vào nhiệt độ

- Chiết nóng.
- Chiết nguội.

6.1.2. Căn cứ vào chế độ làm việc

- Phương pháp chiết gián đoạn.
- Phương pháp chiết bán liên tục.
- Phương pháp chiết liên tục.

6.1.3. Căn cứ vào chuyển động tương hỗ giữa hai pha

- Phương pháp chiết ngược dòng.
- Phương pháp chiết xuôi dòng.
- Phương pháp chiết chéo dòng.

6.1.4. Căn cứ vào áp suất làm việc

- Phương pháp chiết ở áp suất thường (áp suất khí quyển).
- Phương pháp chiết dưới áp suất giảm (áp suất chân không).
- Phương pháp chiết ở áp suất cao (chế độ làm việc có áp lực).

6.1.5. Căn cứ vào trạng thái làm việc của hai pha

- Phương pháp ngâm.
- Phương pháp ngấm kiệt.

6.1.6. Dựa vào những biện pháp kỹ thuật đặc biệt

- Phương pháp dùng siêu âm.
- Phương pháp khí hóa lỏng.
- Phương pháp tạo dòng xoáy.
- Phương pháp mạch nhịp...

6.2. Một số phương pháp chiết xuất

6.2.1. Phương pháp chiết xuất gián đoạn

6.2.1.1. Phương pháp ngâm

Là phương pháp đơn giản nhất đã có từ cổ xưa.

Cách tiến hành: Cho dược liệu đã được xử lý vào dụng cụ chiết (bình chiết, thùng gỗ hoặc kim loại...), đổ dung môi cho ngập dược liệu, sau một thời gian nhất định rút lấy dịch chiết (lọc hoặc gạn). Để tăng cường hiệu quả chiết xuất, người ta có thể khuấy.

Có nhiều cách ngâm: ngâm tĩnh hoặc ngâm động, ngâm nóng hay lạnh, ngâm một lần hoặc nhiều lần.

Ưu điểm: Là phương pháp đơn giản, rẻ tiền, dễ thực hiện, đặc biệt là những nơi chưa có điều kiện đầu tư thiết bị.

Nhược điểm: Thao tác thủ công, năng suất thấp và khó lấy hết hoạt chất. Nếu chiết nhiều lần thì tốn dung môi và thời gian chiết...

6.2.1.2. Phương pháp ngấm kiệt (ngâm nhỏ giọt)

Cách tiến hành: Sau khi chuẩn bị, người ta ngâm dược liệu vào dung môi trong bình ngấm kiệt. Sau khoảng thời gian xác định (tùy từng dược liệu), rút nhỏ giọt dịch chiết ở phía dưới, đồng thời bổ sung thêm từ từ dung môi mới ở phía trên sao cho lớp dung môi luôn ngập dược liệu khoảng 3 - 4 cm, cho đến khi

hết hoạt chất trong dược liệu. Phương pháp này có ưu điểm là dược liệu được chiết kiệt, nhưng vẫn có nhược điểm là lao động thủ công, năng suất thấp và tốn dung môi.

6.2.2. Phương pháp chiết bán liên tục

(*Còn gọi là phương pháp chiết xuất nhiều bậc, phương pháp chiết ngược dòng tương đối hay phương pháp chiết ngược dòng gián đoạn*).

Phương pháp này có sử dụng một hệ thống thiết bị gồm nhiều bình chiết khác nhau, có thể mắc thành một dãy từ 4 - 16 bình chiết nối tiếp nhau. Quá trình chiết suất được coi như ngược chiều tương đối vì thực tế dược liệu không chuyển động.

Tiến hành: Lúc đầu, dược liệu và dung môi được nạp vào tất cả các bình và ngâm trong một thời gian nhất định (tùy thuộc vào dược liệu và dung môi). Sau đó dịch chiết được chuyển tuần tự từ bình này sang bình khác. Hệ thống tổ hợp kín các bình chiết này cho phép đóng ngắt một cách chủ động để thay và nạp dược liệu mới, rồi lắp bình này vào cuối của hệ thống, như vậy, dịch chiết đậm đặc nhất (đã đi qua tất cả các bình) được dẫn qua nó (theo nguyên tắc: dịch chiết 1 của bình đầu để riêng, dịch chiết 2 làm dung môi cho bình 2 và dịch chiết này lại là dịch đầu của bình 2, và tiếp tục sang các bình 3, 4,...). Số bình càng nhiều thì quá trình chiết xảy ra càng gần với quá trình liên tục.

Như vậy ở đây quá trình chiết xuất xảy ra theo nguyên tắc: "dung môi mới tiếp xúc với dược liệu cũ và dược liệu mới tiếp xúc với dung môi cũ". Phương pháp này có ưu điểm là dược liệu được chiết kiệt và thu được dịch chiết đậm đặc, tuy nhiên hệ thống thiết bị cồng kềnh, vận hành phức tạp, thủ công và không tự động hóa quá trình được.

2.2.3. Phương pháp chiết liên tục

Phương pháp này được thực hiện trong những thiết bị làm việc liên tục:

6.2.3.1. Chiết trong phòng thí nghiệm

Trong phòng thí nghiệm và dùng dung môi bay hơi để chiết, người ta chiết liên tục trên dụng cụ soxhlet.

6.2.3.2. Chiết trong công nghiệp

Trong công nghiệp, người ta dùng các hệ thống thiết bị khác nhau. Dược liệu và dung môi liên tục được đưa vào thiết bị và chuyển động ngược chiều nhau trong thiết bị. Dược liệu di chuyển được trong thiết bị là nhờ những cơ cấu vận

chuyển chuyên dùng khác nhau. Dịch chiết trước khi ra khỏi thiết bị được tiếp xúc với dược liệu mới đậm đặc hơn, bã dược liệu trước khi ra khỏi thiết bị được tiếp xúc với dung môi mới nên được chiết kiệt.

So với phương pháp chiết gián đoạn thì phương pháp chiết liên tục có những ưu điểm sau:

+ Năng suất làm việc cao, tiết kiệm thời gian chiết.

+ Tự động hóa và cơ giới hóa được trong quá trình chiết xuất.

+ Kinh tế, vì tiết kiệm được dung môi, lại chiết kiệt được dược liệu.

Tuy nhiên, thiết bị có cấu tạo phức tạp, đắt tiền. Vận hành phức tạp và đòi hỏi đội ngũ công nhân phải được đào tạo.

Để các thiết bị chiết xuất làm việc có hiệu quả, đáp ứng được yêu cầu của những quá trình công nghệ cao hiện nay, cần phải bảo đảm quá trình chiết xuất xảy ra ở điều kiện gần như ngược dòng mà trở lực thủy lực lại phải nhỏ, cũng như tỷ lệ lượng pha lỏng so với pha rắn phải nhỏ (nghĩa là dùng ít dung môi). Tổng trở lực khuếch tán trong và ngoài cũng phải nhỏ...

Nguyên liệu để chiết xuất cũng rất phong phú về hình dạng, cấu trúc, tính chất vật lý (khối lượng riêng, độ xốp, độ đàn hồi, trở lực khuếch tán,...) nên quá trình chiết xuất xảy ra cũng khác nhau, do đó thiết bị chiết xuất cũng rất đa dạng về cấu tạo.

Có rất nhiều kiểu, loại thiết bị chiết xuất. Thông thường, người ta đặt tên cho thiết bị theo cấu tạo hoặc theo chế độ làm việc của thiết bị. Ví dụ: Thiết bị kiểu tháp, thiết bị kiểu quay, thiết bị kiểu tầng sôi, thiết bị có tưới dung môi, thiết bị nghiêng có bộ phận vận chuyển bằng vít tải,...

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. *Nguyễn Văn Đàn, Nguyễn Viết Tựu* (1985); Phương pháp nghiên cứu hóa học cây thuốc, NXB Y học, TP. Hồ Chí Minh, Tr. 8 - 18.

2. *Martine Beljean* (1999); Generalites sur les solvants, Universite de Caen.

3. *Nguyễn Khắc Quỳnh Cử, Nguyễn Tuấn Dũng* (1998); Chiết xuất dược liệu, Bộ môn Dược liệu, Trường Đại học Y - Dược, TP. Hồ Chí Minh.

4. *Từ Minh Koóng và cộng sự* (2001); Kỹ thuật sản xuất dược phẩm, T. I, Bộ môn Công nghiệp Dược, Trường Đại học Dược Hà Nội, tr. 70 - 100.

PHẦN IV

CÁC NHÓM HỢP CHẤT THIÊN NHIÊN CHÍNH TRONG DƯỢC LIỆU

CHƯƠNG I

TINH DẦU VÀ MỘT SỐ DƯỢC LIỆU CHỨA TINH DẦU

TS. Nguyễn Duy Thuần

I. ĐẠI CƯƠNG

1.1. Khái niệm và định nghĩa

Theo Dược điển Pháp xuất bản lần thứ 8 (1965), tinh dầu (tinh dầu = dầu bay hơi = dầu) là: "Các sản phẩm nhìn chung có thành phần khá phức tạp, bao gồm các chất dễ bay hơi có chứa trong thực vật, và có khả năng thay đổi nhiều hay ít trong suốt quá trình chế biến. Để tách các chất dễ bay hơi này, có một số quy trình khác nhau. Trong đó, có lẽ chỉ có hai quy trình dùng để điều chế các loại tinh dầu chính thức: cất kéo bằng hơi nước đối với các thực vật hoặc các bộ phận nhất định nào đó của thực vật có chứa tinh dầu và ép". Dược điển cũng chỉ rõ rằng quy trình thứ hai được khuyến nghị dùng cho việc lấy tinh dầu từ quả các cây thuộc chi *Citrus*. Từ lần xuất bản thứ 9 (1972), Dược điển Pháp chỉ sử dụng thuật ngữ tinh dầu (tiếng Pháp là *huile essentielle*).

Gần đây hơn (tháng 10 năm 1987), Tiêu chuẩn Pháp (NF) T 75-006 đưa ra định nghĩa sau về tinh dầu: "Sản phẩm thu được từ nguyên liệu có nguồn gốc thực vật, bằng cách cất kéo bằng hơi nước hoặc bằng các phương pháp cơ học đối với vỏ trái cây thuộc chi *Citrus*. Tinh dầu được tách ra khỏi nước bằng các

phương pháp vật lý".

Định nghĩa này mang tính hạn chế về quy trình: nó loại trừ các sản phẩm thu được bằng cách chiết xuất với dung môi cũng như các sản phẩm thu được từ một phương pháp khác như phương pháp khí điều áp, phương pháp tách hương liệu của hoa, và các phương pháp khác (*Tuy nhiên, chú ý rằng các sản phẩm chiết xuất từ nước hoa quả trong suốt quá trình cô đặc của chúng hay trong quá trình xử lý ở nhiệt độ cao (tiệt trùng nhanh theo phương pháp Paxtơ) cũng được gọi là tinh dầu. Chính xác hơn, chúng còn được gọi là tinh dầu trái cây hay dầu nước hoa quả*). Các phương pháp này đã cung cấp một lượng lớn cho các thị trường dược phẩm, mỹ phẩm, nước hoa cũng như nhiều lĩnh vực khác của công nghệ thực phẩm. Vì vậy, trước tiên chúng tôi thấy cần thiết phải định nghĩa và hiểu các thuật ngữ thông dụng nhất trong lĩnh vực này.

- *Concrete*: chiết xuất hương thơm đặc trưng, từ thực vật tươi (mới thu hái), bằng cách chiết xuất với một dung môi không chứa nước.

- *Pomade*: chất béo thơm được lấy từ các loại hoa có thể bằng phương pháp "tách hương liệu của hoa bằng phương pháp lạnh" (chẳng hạn, sự khuếch tán của các phần tử có hương thơm của hoa vào chất béo), hay bằng phương pháp "tách hương liệu của hoa bằng phương pháp nóng" (chẳng hạn, ngâm hoa vào chất béo nóng chảy).

- *Resinoid*: chiết xuất hương thơm đặc trưng, thu được từ một nguyên liệu có nguồn gốc thiên nhiên, bằng cách chiết xuất với một dung môi không có nước. Ở đây, nguyên liệu có nguồn gốc thiên nhiên có nghĩa là: "thuộc thực vật, động vật hay các vi sinh vật, bao gồm cả các sản phẩm lấy được từ các nguyên liệu bằng con đường enzym".

- *Absolute*: sản phẩm hương thơm đặc trưng, lấy từ *concrete*, *promade*, hay từ *resinoid* bằng phương pháp chiết với ethanol ở nhiệt độ thường. Dung dịch ethanol thu được sẽ được làm lạnh và lọc để tách bỏ các chất sáp; sau đó, ethanol được loại bỏ bằng cách cất chân không. (*Trong thực tế hiện nay, thuật ngữ dầu (hay tinh dầu) cũng chỉ rõ rằng, các sản phẩm có mùi thơm không có ở thực vật, song do kết quả của sự thoái hoá enzym của một cơ chất sau khi các mô bị biến đổi. Đặc biệt là trường hợp đối với các cây mù tạc và các isothiocyanat sản sinh trong quá trình thuỷ phân glucosinolat, hay đối với các sản phẩm từ tỏi và các sản phẩm dễ bay hơi có chứa lưu huỳnh xuất phát từ việc phân hủy alliin. Trường hợp của các irise cũng rất đáng quan tâm. Các thân rễ của các cây thuộc họ Iridaceae (I. florentina* L., *I. pallida Lamp, I. germanica* L.*) thực tế chúng không có hương thơm khi thu hoạch. Chỉ sau một thời gian dài bảo quản các*

thân rễ đã bóc vỏ và phơi khô (hai hoặc ba năm) sẽ cho mùi thơm và màu tím đặc trưng. Đó là do các irone (cis và trans-α, β và cis-γ) phát sinh từ quá trình ôxy hoá các triterpen vòng có tên là iridal (iripallidal, iriflorentinal và các loại khác, ở trạng thái tự do hay ester hoá bởi các acid béo).

Các loại tinh dầu phải trải qua một quá trình xử lý tiếp theo để loại trừ một phần hay toàn bộ một số thành phần. Kết quả là thu được tinh dầu "*terpeneless*", hay "*sesquiterpeneless*".

Mặc dù có một số lượng đáng kể các loại tinh dầu được sử dụng nhờ các công dụng của chúng trong y học, rất nhiều tinh dầu – do các đặc tính có khả năng cảm nhận của chúng - được dùng trong chế phẩm thực phẩm. Đây là các loại gia vị.

- *Spices (gia vị)*: các sản phẩm từ cây cỏ tự nhiên hay các hỗn hợp của chúng, không có sự can thiệp của các yếu tố bên ngoài, được dùng để mang lại hương vị và hương thơm, và để làm gia vị cho thực phẩm; thuật ngữ này áp dụng cho cả các sản phẩm thô và dạng bột (Tiêu chuẩn Pháp V 00-0001, tháng 11 năm 1975). Trong thực tế cũng như ở Pháp, thuật ngữ "gia vị" bao gồm các loại gia vị và các loại cỏ cây truyền thống. (*Các cuốn từ điển thông thường của Mỹ phân biệt một gia vị với đồ gia vị bằng cách chỉ rõ nguồn gốc của chúng. Theo the Webster' s New World Dictionaries viết bằng tiếng Mỹ, xuất bản lần thứ hai., một loại gia vị là một "chất có nguồn gốc thực vật được dùng để cho vào thức ăn", trong khi đó, một đồ gia vị là "một thứ để cho vào tạo hương vị cho món ăn". Cuốn từ điển này cũng chỉ ra rằng các khái niệm về cây cỏ và hương thơm cũng rộng hơn: một thảo mộc là (ngoài khía cạnh thực vật) bất kỳ loại thực vật nào được dùng làm thuốc, gia vị hoặc hương thơm (điều này cho phép sử dụng vào mục đích khác ngoài việc dùng để làm gia vị); một chất thơm là một loại thực vật, chất hoá học... mà chúng có hương thơm, vị ngọt và cay hay hăng). Khái niệm thuật ngữ "dược thảo" khi sử dụng trong công nghệ thực phẩm cũng rất rộng: "thực vật hay một bộ phận của nó có chứa các chất mang mùi vị và hương thơm", hơn thế nữa "có trong thảo dược là các loại gia vị và các cây cỏ gia vị có mùi thơm).*

Cuối cùng, chú ý rằng khái niệm về hương thơm mang nghĩa khác hơn và rộng hơn so với khái niệm tinh dầu, vì vậy nó được áp dụng cho bất kỳ chất nào có mùi thơm có nguồn gốc tự nhiên hay được tổng hợp bằng quy trình lý hoá hay enzym (ví dụ: cà phê rang, thịt nướng, cá, pho mát...).

1.2. Thành phần hóa học

Tinh dầu bao gồm nhiều thành phần không đồng nhất, trong đó có các hydrocarbon terpenic mạch hở, vòng, các dẫn chất có oxy (alcol, aldehyd, ester,

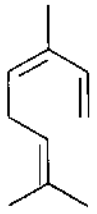
ether, các chất nhân thơm, các acid hữu cơ có phân tử lượng thấp (acid valerianic), một số dẫn chất của coumarin...

1.2.1. Các hợp chất terpen mạch hở

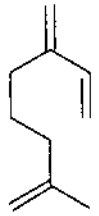
• Monoterpen

- hydrocarbon

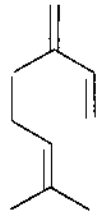
α-ocimen



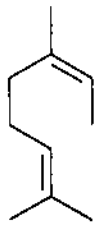
β-ocimen



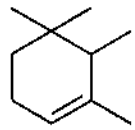
α-myrcen



β-myrcen

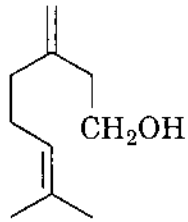


Dihydromyrcen

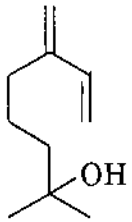


Cyclodihydromyrcen

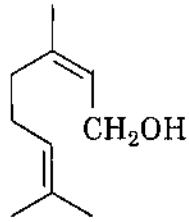
- Các alcol



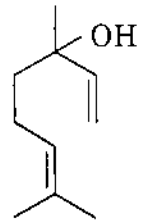
Myrcen-8-ol



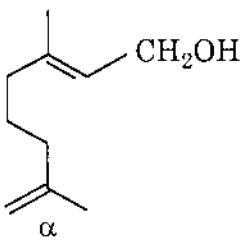
Myrcen-2-ol

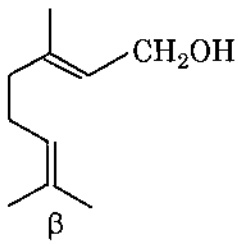


Nerol

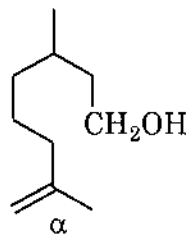


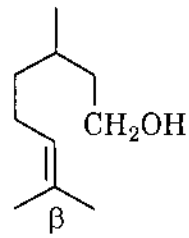
Linalol





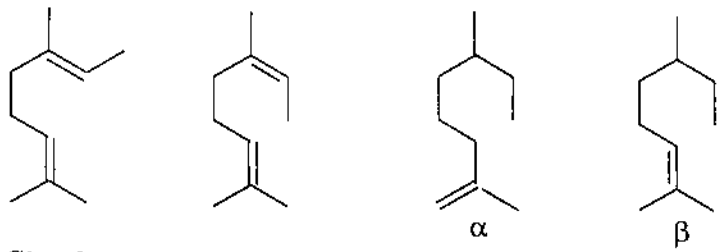
Geraniol





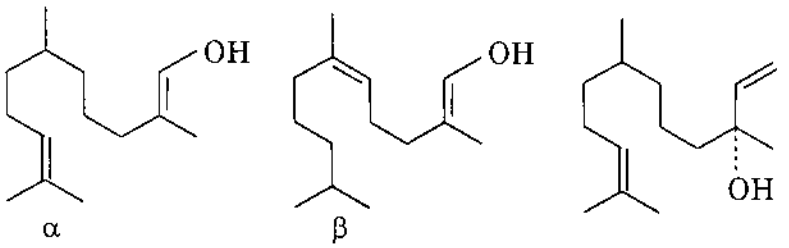
Citronellol

- Các dẫn chất aldehyd



Citral a Citral b α Citronellal β

- Các sesquiterpen

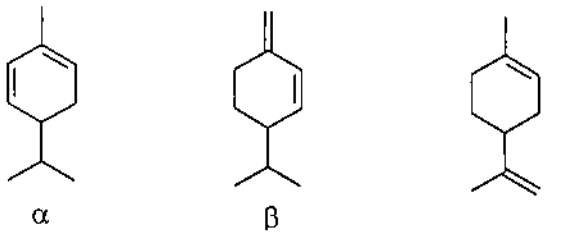


α β

Farnesol Nerolidol

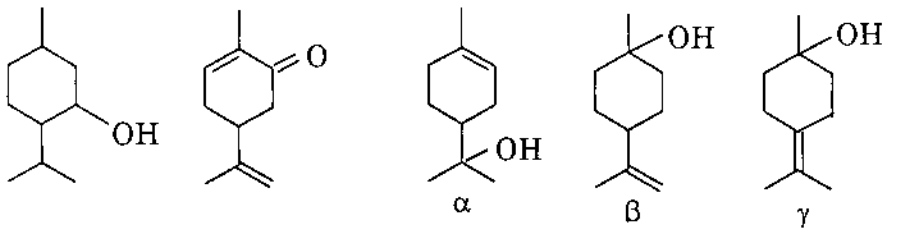
cadinen Chamazulen

1.2.2. Các hợp chất terpen mạch vòng

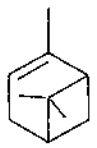


α β

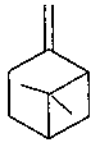
Phelandren Limonen



Menthol Carvon α Terpineol β γ

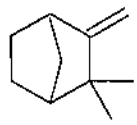


α

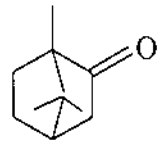


β

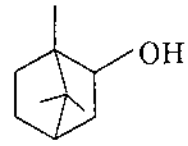
Pinen



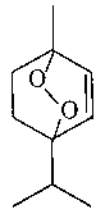
Camphen



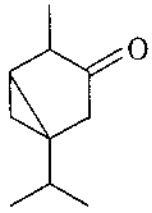
Camphor



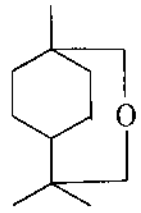
Borneol



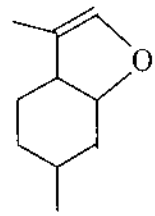
Ascaridol



Thujon

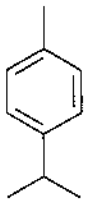


Cineol

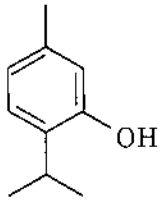


Mentofuran

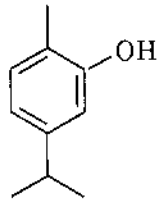
1.2.3. Hợp chất có nhân thơm



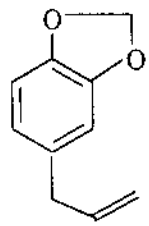
p-Cimen



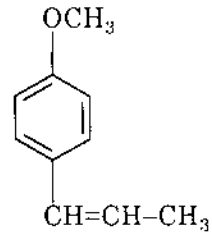
Thymol



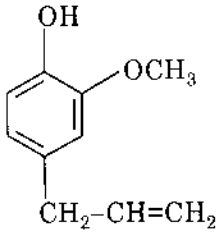
Carvacrol



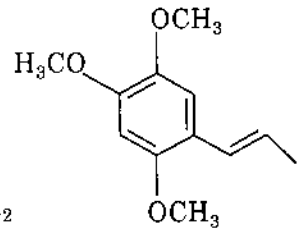
Safrol



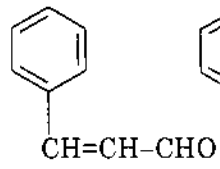
Anethol



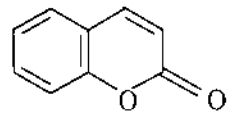
Eugenol



Asaron

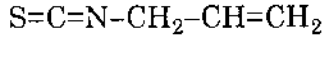


Aldehyd cinamic

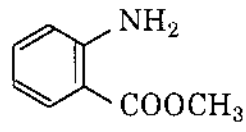


Coumarin

1.2.4. Hợp chất chứa S và N



Alylisothyoxyanat



Methylantranilat

1.2.5. Các thành phần khác

Các acid hữu cơ có phân tử lượng thấp: acid acetic, acid butyric, acid valerianic... (thường ở dạng ester).

Ngoài ra người ta còn xếp các thành phần tinh dầu theo kiểu khác, ví dụ theo bản chất hóa học (các hydrocarbon, aldehyd, ceton, alcol, phenol, acid, oxyd acid (ester nội, lacton), oxyd, peoxyd...

1.3. Phân bố trong thiên nhiên

Chủ yếu có trong thực vật: Khoảng 85/225 họ, chiếm gần 30%, đặc biệt là thực vật bậc cao loại có hoa

- Ngành hạt trần: họ Thông
- Ngành hạt kín: họ Lúa
- Lớp cây 2 lá mầm: Long não, Hoa môi, Cam, Sim, Ngọc lan, Hoa tán, Mõm sói...

Hiếm thấy ở thực vật bậc thấp (đã phát hiện tinh dầu từ một loài địa y *Evernia prunastri*)

Một số ít ở động vật: Xạ hương, cà cuống

• Trong cây tinh dầu được phân bố hầu như ở tất cả các bộ phận: lá (bạc hà...), hoa (hoa hồng...), quả (hồi...), hạt (thảo quả, sa nhân, hạnh nhân...); Nhiều tinh dầu hầu như phân bố trong toàn cây như các cây trong họ Hoa môi, Long não...

• Việc tổng hợp và tích luỹ các tinh dầu nhìn chung được biết đến với sự xuất hiện của các cấu trúc mô học chuyên hoá, thường phân bố trên hay gần với bề mặt của cây hay bộ phận của cây: các tế bào tinh dầu của họ *Zingiberaceae*, lông tiết của họ *Lamiaceae*, túi tiết của họ *Myrtaceae* hay *Rutaceae*, và các ống tiết của họ *Apiaceae* hay *Asteraceae*.

• Trong cây, tinh dầu được chứa ở các tổ chức khác nhau:
  - Trong biểu bì tiết: Họ Hoa hồng, Nhài, hoa Đại.
  - Tế bào tiết: Họ Gừng, Long não, Mộc lan.
  - Lông tiết: Các cây trong họ Hoa môi
  - Túi tiết: Họ Sim, Bạch đàn, Tràm, Đinh hương, Cam.
  - Ống tiết: Họ Hoa tán.

• Hàm lượng tinh dầu trong cây thường dao động, không ổn định từ 0,03% (Hoa hồng) - 23% (Đinh hương); trung bình 0,1 – 1%.

• Tỷ lệ tinh dầu trong cây phụ thuộc rất nhiều yếu tố: Bộ phận chứa tinh dầu, kỹ thuật canh tác, thời tiết, thời kỳ sinh trưởng (thời kỳ thu hái)... Ví dụ: vào mùa hè bạc hà chứa nhiều menthol tự do, còn mùa đông lại chứa nhiều dạng kết hợp.

1.4. Tính chất của tinh dầu

1.4.1. Tính chất vật lý

- Đa số tinh dầu ở thể lỏng ở nhiệt độ thường, một số thành phần ở thể rắn: menthol, borneol, camphor...

- Dễ bay hơi ở nhiệt độ thường.

- Tỷ trọng: đa số nhỏ hơn 1. Một số tinh dầu có tỷ trọng lớn hơn 1: Quế, đinh hương, hương nhu. Tỷ lệ thành phần chính (aldehyd cinnamic, eugenol) quyết định tỷ trọng của tinh dầu, nếu hàm lượng các thành phần chính thấp, những tinh dầu này có thể trở thành nhẹ hơn nước.

- Ít tan trong nước, tan trong cồn với tỷ lệ nhất định, tan trong dung môi hữu cơ.

- Tinh dầu mới điều chế thường là không màu hoặc vàng nhạt, khi để lâu sẽ chuyển thành màu vàng và thẫm dần.

- Một số tinh dầu có màu đặc trưng : Tinh dầu thạch xương bồ, tinh dầu quế có màu đỏ thẫm, tinh dầu của một số cây trong chi *Artemisia* (có azulen) có màu xanh.

- Có mùi và vị đặc trưng.

- Điểm sôi của tinh dầu phụ thuộc vào thành phần cấu tạo, thường cao và không ổn định: từ 170° - 350°C (có thể dùng phương pháp cất phân đoạn để tách riêng từng thành phần của tinh dầu) ví dụ: monoterpen sôi dưới 200°C, sesquiterpen 250 - 280°C, polyterpen trên 300°C.

- Chỉ số khúc xạ: 1,450 - 1,560, tinh dầu có thành phần gồm nhiều dây nối đôi hoặc nhân thơm có chỉ số khúc xạ cao.

- Năng suất quay cực thường cao, tả tuyền hoặc hữu tuyền.

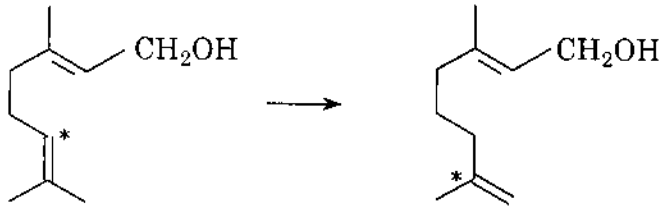
- Ở nhiệt độ thường, thường lỏng, cá biệt một số tinh dầu có thể kết tinh được thành phần của chúng (camphor, anethol, borneol...).

1.4.2. Tính chất hóa học

Về tổng quát tính chất hóa học của một tinh dầu bao gồm tính chất đặc trưng của các thành phần cấu tạo nên tinh dầu.

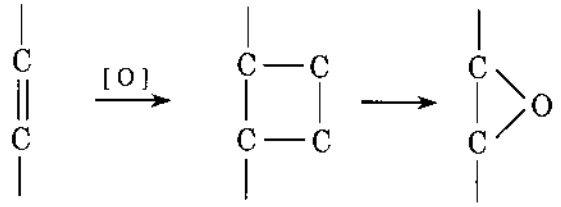
a- Tính chất của dây nối đôi.

• Chuyển vị dây nối đôi:



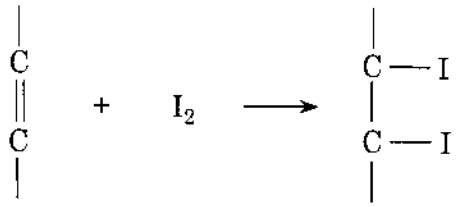
Geraniol

• Oxy hóa dây nối đôi thành peroxyd và oxyd nội



Quá trình này xảy ra đồng thời với quá trình trùng hiệp hóa tinh dầu để tạo thành nhựa.

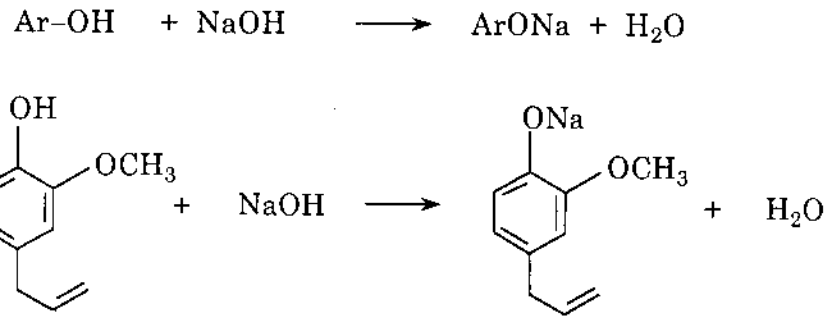
• Halogen hóa dây nối đôi:



b- Phản ứng của tinh dầu có thành phần mà trong phân tử có nhóm –OH alcol và -OH phenol

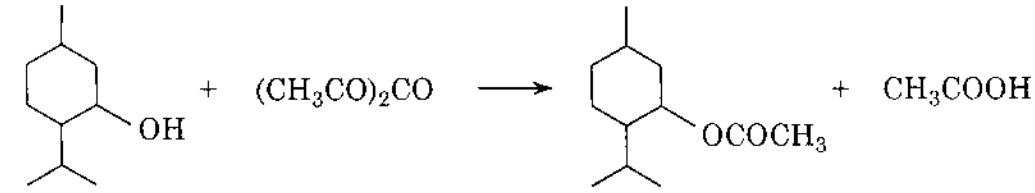
- Tạo ether oxyd (R_1–O–R_2).

- Phản ứng với NaOH(tạo muối alcolat hoặc phenolat).



eugenol eugenat

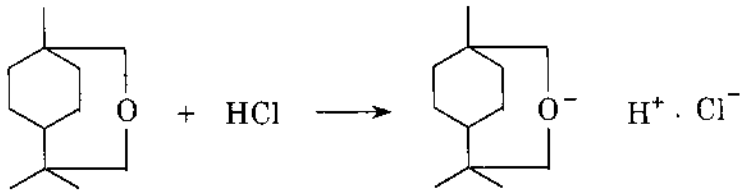
- Acetyl hóa:



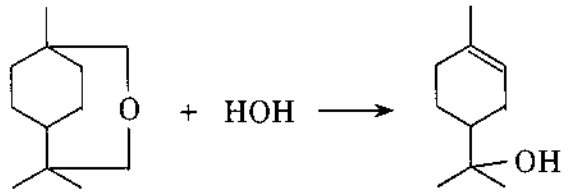
Menthol

Phản ứng này rất hay được dùng trong kiểm nghiệm tinh dầu.

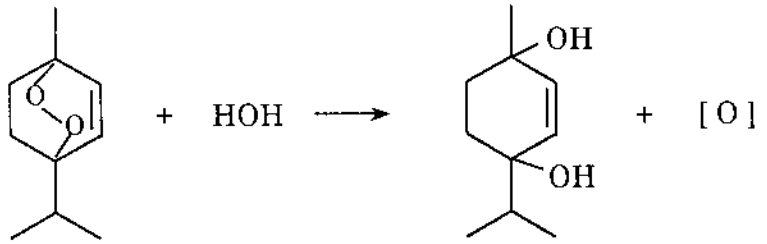
- Các ether oxyd nội dễ dàng tạo muối oxoni và hydrat hóa:



Cineol

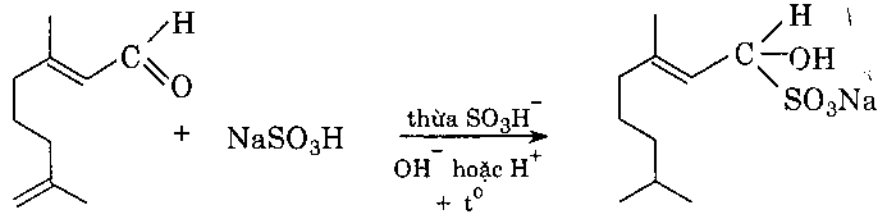


Cineol Terpineol



c- Các phản ứng đặc trưng cho tinh dầu mà trong thành phần có các nhóm –CHO, –C=O.

• Phản ứng cộng hợp với natribisulfit cho những hợp chất kết tinh:



α-citral

• Phản ứng ngưng tụ với các hợp chất carbilamin [H_2N–B–] cho sản phẩm kết tinh có điểm chảy xác định:

$$R–CH=O + H2N–B– \longrightarrow R–CH=N–B–$$

- Ngưng tụ với hydroxylamin tạo oxim:

$$R–CH=O + H_2N–OH \longrightarrow R–CH=N–OH + H_2O$$

Các sản phẩm này kết tinh và thường được dùng để tách các thành phần có nhóm – CHO ra khỏi tinh dầu.

- Ngưng tụ với phenylhydrazin ($H_2N–NH–C_6H_5$) để tạo phenylhydrazon (Sản phẩm kết tinh có màu, có điểm chảy xác định) ví dụ: 1 giọt tinh dầu quế + 1 giọt hydrazin sulfat cho tinh thể màu vàng.

- Ngưng tụ với semicarbazit ($H_2N–NH–CO–NH_2$) và thiosemicarbazit ($H_2N–NH–CS–NH_2$) cho các carbazon, là các sản phẩm kết tinh.

Ngoài ra cần biết thêm một số tính chất khác của andehyt và ceton như oxy hóa, trùng hiệp hóa, cộng hợp cơ kim, hydro hóa, tạo acetal và bán acetal...

1.5. Chế tạo tinh dầu

Có 4 phương pháp thường dùng để chế tạo tinh dầu: ướp, chiết bằng dung môi, ép và phương pháp cất kéo bằng hơi nước.

1.5.1. Phương pháp cất kéo bằng hơi nước

• Nguyên tắc: Cất 2 chất lỏng bay hơi được, không trộn lẫn vào nhau (nước và tinh dầu). Khi áp suất hơi bão hòa bằng áp suất khí quyển, hỗn hợp nước và tinh dầu bắt đầu sôi và hơi nước kéo theo hơi tinh dầu.

Hơi nước có thể đưa từ bên ngoài, do các nồi hơi cung cấp hoặc tạo ra trong nồi cất.

• Thiết bị cất tinh dầu:

- Nồi cất: Hình trụ làm bằng thép không gỉ, tôn mạ kẽm hay đồng; tỷ lệ giữa đường kính (D) và chiều cao của nồi (H) thường là 1/1,2 đến 1/1,5).

- Bộ phận ngưng tụ: Có nhiệm vụ hóa lỏng hơi nước và hơi tinh từ nồi cất chuyển sang, gồm 2 bộ phận: ống dẫn hơi (vòi voi) và bộ phận làm lạnh. Việc làm lạnh theo nguyên tắc ngược dòng (ống dẫn hơi thường là xoắn ruột gà, chùm hoặc kết hợp).

- Bộ phận phân lập: Hứng nước và tinh dầu và tách riêng chúng, có nhiều kiểu bình nhưng đều có cùng một nguyên tắc: kiểu bình florentin.

1.5.2. Phương pháp chiết bằng dung môi

Phương pháp này thường được dùng để chiết tinh dầu của hoa hoặc chiết xuất một thành phần nhất định nào đấy. Dung môi thường dùng là ether dầu hỏa, xăng công nghiệp.... Sau khi chiết, cất dưới áp lực giảm để thu hồi dung môi, sản phẩm thu được là tinh dầu có lẫn sáp và một số tạp chất khác. Dùng alcol để chiết tinh dầu và loại alcol bằng cách cất dưới áp lực giảm.

Người ta cũng có thể dùng dung môi không bay hơi như dầu béo, dầu parafin (thường để chiết các loại hoa). Theo phương pháp này, người ta ngâm dược liệu trong dung môi đã được làm nóng ở 60°-70°C trong 12-48 giờ tùy theo từng loại hoa. Làm nhiều lần cho đến khi dung môi bão hòa tinh dầu (khoảng 10-15 lần). Dùng alcol để tách tinh dầu ra khỏi dung môi và cất thu hồi alcol dưới áp lực giảm sẽ thu được tinh dầu.

1.5.3. Phương pháp ướp

Thường dùng khuôn gỗ có kích thước 58 × 80 × 5 cm, ở giữa đặt tấm thủy tinh được phết mỡ lợn cả 2 mặt, mỗi lớp dày khoảng 3mm. đặt lên trên bề mặt chất béo một lớp lụa mỏng và rải trên đó 50 - 80g hoa tươi đã làm sạch. 35 - 40 khuôn gỗ như vậy được xếp chồng lên nhau rồi để trong phòng kín. Sau 24 - 72 giờ tùy theo từng loại hoa, người ta thay lớp hoa mới cho đến khi lớp chất béo bão hòa tinh dầu. Dùng alcol để chiết tinh dầu từ chất béo, sau đó tách tinh dầu ra khỏi alcol như phương pháp trên.

1.5.4. Phương pháp ép

Phương pháp này chỉ dùng để điều chế tinh dầu của các loài thuộc chi *Citrus* vì một số lý do sau:

- Tinh dầu vỏ cam, chanh chủ yếu dùng trong kỹ nghệ sản xuất đồ uống, vì vậy cần có mùi vị giống như tự nhiên mà nếu áp dụng các phương pháp khác thì không đạt được yêu cầu này.

- Tinh dầu trong túi tiết nằm ngay ở lớp vỏ ngoài của vỏ cam, chanh. Chỉ cần tác động một lực cơ học là tinh dầu có thể giải phóng ra, vì vậy rất phù hợp với phương pháp ép.

- Các túi tiết tinh dầu trong vỏ các loài thuộc chi *Citrus* được bao bọc bởi các màng pectin, càng gia nhiệt, màng này càng đông cứng lại nên rất khó dùng phương pháp cất.

Dịch thu được sau khi ép có chứa nhiều pectin, do đó phải xử lý bằng cách lọc, ly tâm. Tinh dầu thu được phải bảo quản ở nhiệt độ thấp.

1.5.5. Các phương pháp khác

Ngoài các phương pháp truyền thống kể trên, ngày nay ở các nước phát triển còn dùng một số phương pháp khác hiện đại, tiết kiệm năng lượng và thu được tinh dầu có chất lượng cao, chúng tôi xin giới thiệu hai phương pháp mới: Phương pháp chiết bằng sóng cực ngắn (vi ba) và phương pháp chiết bằng khí hóa lỏng.

• Phương pháp chưng cất bằng hơi nước trong chân không với tác động của sóng cực ngắn. Theo phương pháp này, dược liệu tươi được đặt trong một thiết bị chân không và được đốt nóng một cách chọn lọc bằng sóng cực ngắn. Tinh dầu tách ra khỏi dược liệu cùng với nước của chính dược liệu đó (không thêm nước từ bên ngoài như phương pháp khác). Quá trình này xảy ra rất nhanh và tốn rất ít năng lượng. Tinh dầu thu được cũng tương tự như phương pháp cất truyền thống.

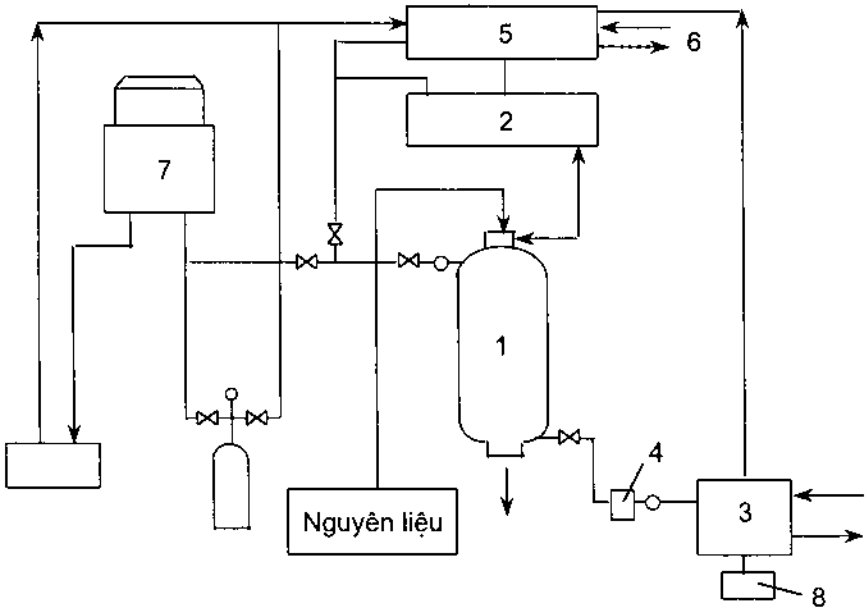
• Phương pháp chiết bằng khí hóa lỏng (khí ở trạng thái siêu tới hạn).

Theo lý thuyết, trong phương pháp này người ta có thể dùng một số khí. Hiện nay thường được dùng hơn cả là khí carbon dioxyd.

Ưu điểm của việc dùng khí CO_2 là cho hiệu suất cao, thời gian chiết nhanh, không có nguy cơ cháy nổ, không gây ô nhiễm môi trường, sản phẩm tinh dầu tinh khiết và giữ được hương vị tự nhiên.

Toàn bộ hệ thống chiết hoạt động theo nguyên tắc tuần hoàn, khép kín: CO_2 lỏng được bơm cao áp đưa tới cột trao đổi nhiệt với áp lực theo yêu cầu của công nghệ chiết xuất. Khi đạt nhiệt độ theo yêu cầu nó được đưa tới cột chiết chứa nguyên liệu, tại đây quá trình chiết xảy ra rất nhanh. CO_2 lỏng mang theo tinh dầu được tách ra ở cột phân ly dưới tác dụng của sự thay đổi nhiệt và áp suất. CO_2 lại trở về cột trao đổi nhiệt hóa lỏng rồi được được chuyển về bình chứa ban đầu để sử dụng tuần hoàn (xem sơ đồ).

Phương pháp này được sử dụng nhiều để chiết tinh dầu của hoa dùng cho kỹ nghệ hương liệu và dược phẩm.



Sơ đồ dây chuyền chiết xuất dược liệu bằng CO_2 lỏng:

1. nồi phản ứng; 2. bình trữ CO_2 lỏng; 3. thiết bị làm bay hơi; 4. lọc dịch chiết; 5. bộ phận làm lạnh; 6. máy nén; 7. thiết bị điều áp; 8. bình đựng sản phẩm chiết ra.

1.6. Kiểm nghiệm

1.6.1. Lấy mẫu

- Đảm bảo mẫu có đầy đủ tính chất đại biểu, phẩm chất của lô tinh dầu cần kiểm nghiệm.

- Số lượng:

Dưới 10 thùng – lấy từng thùng một.

50 thùng – lấy 20%.

Từ 51 – 100 thùng – lấy thêm 15%.

Từ 101 – 500 thùng – lấy thêm 10%.

Mỗi thùng lấy ra 500 ml.

Trước khi lấy mẫu phải lắc thùng, dùng ống thủy tinh hút tinh dầu cho vào chậu thủy tinh, khuấy đều khi đủ mẫu – lấy ra 500 ml, đổ đầy vào 2 bình đem đi kiểm nghiệm.

1.6.2. Cảm quan

Dựa vào màu sắc, mùi vị... để sơ bộ đánh giá chất lượng tinh dầu.

Áp dụng cho cả dược liệu chứa tinh dầu, trong phương pháp này người ta dùng cả phản ứng vi hóa trên tiêu bản.

Ví dụ: Tiêu bản tươi mới cắt + thuốc thử Xuđăng III cho màu đỏ tươi.

+ acid osmic xuất hiện tủa đen.

1.6.3. Xác định các hằng số vật lý

- Độ hòa tan trong cồn:

Các tinh dầu thường hòa tan với một tỷ lệ nhất định trong ethanol.

Ví dụ: Tinh dầu chanh hòa tan trong 1 thể tích cồn 95%.

Tinh dầu bạch đàn hòa tan trong 5 thể tích cồn 70%.

Tinh dầu đinh hương hòa tan trong 2 thể tích cồn 70%.

Tinh dầu hồi hòa tan trong 1 thể tích cồn 70%.

- Đo tỷ trọng.

- Đo $[\alpha]_D$ (đặc trưng cho độ hoạt quang của carbon trong tinh dầu, $[\alpha]_D$ quan hệ mật thiết với thành phần của tinh dầu...

Ví dụ: $[\alpha]^{20}_D$ của tinh dầu bạc hà là –18 đến –32°

- Chỉ số khúc xạ n_D.

N_D^{20} của tinh dầu bạc hà = 1,458 – 1,471.

- Đo độ đông:

- Tinh dầu hồi ở 15°C nếu kết tinh , suy ra tinh dầu có 85 – 95% anethol.

1.6.4. Các chỉ số hóa học

- Chỉ số acid.
- Chỉ số ester.
- Chỉ số xà phòng.
- Chỉ số acetyl.

Các chỉ số hóa học góp phần đánh giá chất lượng, thành phần chính của tinh dầu.

Ví dụ: Tinh dầu bạc hà có chỉ số acetyl cao thì hàm lượng menthol cao.

1.6.5. Tìm các tạp chất và chất giả mạo

- Nước: Dùng $CuSO_4$, $CaCl_2$ khan.
- Chất tan trong nước. Ví dụ cồn: Giảm thể tích khi pha loãng với nước. Dầu hỏa:

- Bốc hơi, thêm vào cắn $KHSO_3$ sẽ có mùi dầu.
- Xác định chỉ số xà phòng của cắn.

•Dầu khoáng (dầu parafin)

- Nhiệt độ cất phân đoạn cao.
- Không tan trong cồn hoặc làm giảm độ tan trong cồn và giảm chỉ số khúc xạ của tinh dầu.
- Không phân hủy khi cho tiếp xúc với H_2SO_4.

•Chất béo:

- Giỏ một giọt tinh dầu lên giấy lọc, hơ nóng. Nếu có lẫn chất béo, trên giấy lọc còn lại vết.
- Hòa tan trong cồn cao độ, dầu mỡ nổi lên.
- Cất kéo bằng hơi nước.

•Ngoài ra còn chú ý việc trộn lẫn tinh dầu rẻ tiền vào tinh dầu đắt tiền; tìm kim loại nặng...

1.6.6. Kiểm nghiệm tinh dầu bằng thuốc thử hóa học

Dựa vào các phản ứng đặc trưng của các nhóm chức có trong thành phần của tinh dầu ví dụ: Phenol, alcol tạo dẫn chất 3,5-dinitrobenzoat; phenol tạo màu với Fe^{+++} ; aldehyd, ceton tạo semicarbazon và phenylhydrazon (là các tinh thể, có màu đặc trưng).

- Tinh dầu đinh hương trong cồn + vài giọt $FeCl_3$ cho màu xanh ngọc bích.
- Tinh dầu giun thêm phenolphtalein đun sôi để nguội sẽ đặc lại và có màu hổ phách.

1.6.7. Kiểm nghiệm tinh dầu bằng sắc ký

•Sắc ký lớp mỏng: Chất hấp phụ thường là silicagel; dung môi ít phân cực (tùy loại); hiện màu bằng hơi iod hoặc phun dung dịch vanilin trong acid sulfuric đậm đặc ở 105°C vài phút.

- Các phenol có màu vàng đến đỏ.
- Các aldehyd có màu vàng đến nâu.
- Có thể dùng thuốc thử riêng cho từng nhóm chức.
- Các thành phần của tinh dầu cho R_f tương đối ổn định đối với từng hệ dung môi.

Phương pháp này dễ làm, cho kết quả nhanh và còn dùng để tách các đơn chất.

•Sắc ký khí: Nguyên tắc của phương pháp sắc ký khí là dựa trên sự phân chia của các thành phần trong tinh dầu giữa 2 pha không trộn lẫn vào nhau. Pha cố định là chất lỏng được tẩm trên bề mặt của chất mang (cột nhồi) hoặc được tráng thành một lớp phim mỏng trên thành cột tách (cột mao quản). Pha di động là một khí: H_2, He, Ar, N_2...

- Dựa vào giá trị thời gian lưu Rt, so sánh với thời gian lưu của chất chuẩn. Thời gian lưu của một cấu tử là thời gian chất đó được lưu lại trong cột tách, được tính từ khi bơm mẫu vào máy đến khi xuất hiện pic ở detecteur, thời gian lưu được tính bằng phút. Phương pháp này có thể gây nhầm lẫn, vì có nhiều thành phần khác nhau có cùng một thời gian lưu như nhau. Vì vậy phải tiến hành trên nhiều cột tách có tính chất khác nhau (phân cực và không phân cực).

- Phương pháp phân tích cộng: Trộn chất cần so sánh vào tinh dầu, tiến hành chạy sắc ký. So sánh 2 bản sắc ký đồ (SKĐ), đỉnh của chất dự kiến sẽ được tăng thêm so với bản sắc ký nguyên mẫu.

- Phương pháp phân tích trừ: Loại chất cần định tính ra khỏi mẫu bằng phương pháp hóa học, chạy sắc ký 2 mẫu. So sánh 2 bản sắc ký đồ, ở bản SKĐ đã loại, đỉnh đó sẽ bị mất đi hoặc còn lại rất nhỏ. Phương pháp này thường dùng để định tính các thành phần phenol, aldehyd hoặc ceton.

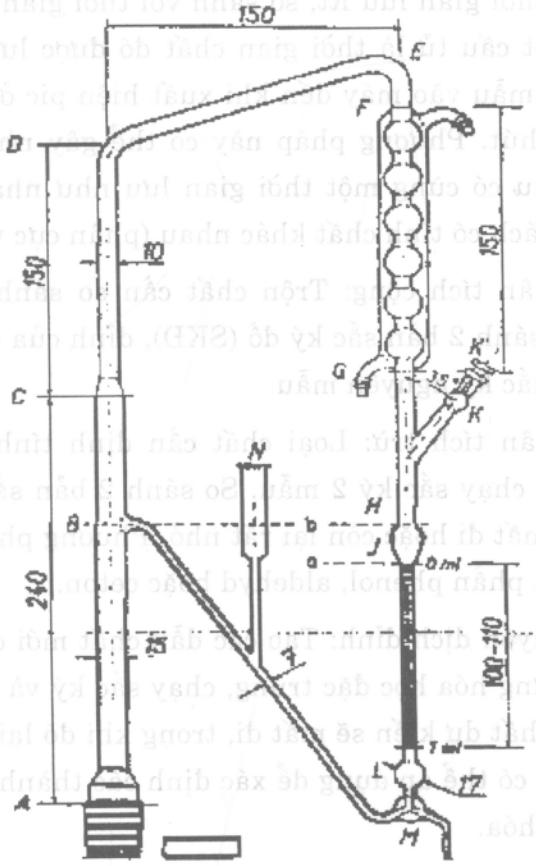
- Phương pháp chuyển dịch đỉnh: Tạo các dẫn chất mới cho các chất dự kiến định tính bằng phản ứng hóa học đặc trưng, chạy sắc ký và so sánh. Bản sắc ký đồ của mẫu đã xử lý, chất dự kiến sẽ mất đi, trong khi đó lại xuất hiện một đỉnh mới. Phương pháp này có thể áp dụng để xác định các thành phần alcol, so sánh với sản phẩm đã ester hóa.

- Kết hợp sắc ký khí với các phương pháp phân tích phổ khác: Sắc ký khí và phổ khối (MS), Sắc ký khí và phổ cộng hưởng từ hạt nhân (NMR). Phương pháp kết hợp này còn dùng để định lượng các thành phần trong tinh dầu.

1.7. Định lượng tinh dầu trong dược liệu (xem hình dưới đây)

Tinh dầu trong dược liệu được định lượng bằng cách cất kéo hơi nước trong dụng cụ cất như hình vẽ. Dịch cất được hứng vào một ống chia độ được phân độ tới 1/20 ml và pha nước được chảy tự động trở lại bình cất. Thể tích tinh dầu cất

được có thể đọc trực tiếp ở phần chia độ của ống này hoặc có thể dùng xylen hòa tan tinh dầu để đưa tinh dầu nổi lên phần chia độ của dụng cụ (đối với tinh dầu có tỷ trọng lớn hơn 1) rồi đọc thể tích tổng cộng của xylen và tinh dầu. Hàm lượng tinh dầu được biểu thị bằng phần trăm (tt/kl). (Đọc thêm PL-143, Dược điển Việt Nam III, 2002).



Dụng cụ định lượng tinh dầu trong dược liệu
theo Dược điển Viện Nam III (đơn vị đo: mm)

1.8. Định lượng một số thành phần chính của tinh dầu

1.8.1. Tinh dầu chứa thành phần chính là ester và alcol

- Nguyên tắc: Xà phòng hóa các ester bằng KOH thừa rồi chuẩn độ lượng KOH thừa.

- Nếu là alcol, trước đó phải ester hóa bằng anhydrid acetic sau đó làm như trên. Từ đương lượng KOH đã dùng, suy ra đương lượng gam ester, rồi suy ra lượng tinh dầu.

- Để định lượng cả dạng tự do và dạng kết hợp trong tinh dầu cần ester hóa trước, sau đó xà phòng toàn bộ rồi tính ra lượng alcol toàn phần.

- Một vài chú ý:

Với alcol bậc 1 và bậc 2 qúa trình acetyl hóa xảy ra với sự có mặt của acetat natri khan trong khoảng 2 giờ.

Với alcol bậc 2 khó hơn.

Với alcol bậc 3 phải dùng acetyl clorid. Thường dùng thêm anhydrid phtalic để tránh sự đóng vòng của một vài dẫn chất, ví dụ: citral

Người ta còn dùng phương pháp so màu: Trước hết oxy hóa alcol trong tinh dầu thành aldehyd hoặc ceton rồi cho phản ứng với 2,4-dinitrophenylhydrazin để tạo sản phẩm có màu rồi đem đo quang.

1.8.2. Các phenol

- Phương pháp dùng bình cassia: Bình cassia là một bình bằng thủy tinh dung tích 100 ml, có cổ dài trên đó được chia vạch chính xác đến 0,01 ml.

Phenol tan trong dung dịch kiềm, lợi dụng tính chất này để định lượng chúng (chú ý: Trong tinh dầu, ngoài phenol tự do còn có một lượng đã bị este hóa, khi định lượng cần đun cách thủy để xà phòng hóa chúng). Phương pháp này nhanh nhưng cho sai số cao (vì các alcol khác hoặc acid cũng tan trong kiềm).

- Với các dẫn chất có nhóm -OH ở vị trí octo hoặc para như thymol hoặc carvacrol, có thể dùng thuốc thử diazo rồi so màu.

1.8.3. Aldehyd và ceton

- Phương pháp dùng natri bisulfit hoặc natri sulfit ($NaHSO_3$, $NaSO_3$) tạo tinh thể (cân hoặc dùng bình cassia).

- Phương pháp dùng phenylhydrazin hoặc hydroxylamin tạo sản phẩm kết tinh có màu (cân hoặc dùng bình cassia).

1.8.4. Các ether

- Phương pháp đo độ đông đặc, ví dụ: Để định lượng cineol trong tinh dầu, người ta cho tinh dầu kết hợp với *o*-cresol để thu được sản phẩm kết tinh, sản phẩm này có nhiệt độ đông đặc phụ thuộc vào hàm lượng cineol trong tinh dầu.

- Dùng bình cassia với dung dịch resorcin thừa.

- Cất phân đoạn.

1.8.5. Các ester

- Đo độ đông.
- Phương pháp xà phòng hóa.
- Cất phân đoạn.

1.8.6. Các thành phần khác

Tùy từng trường hợp cụ thể, người ta có thể dùng một số phương pháp riêng, ví dụ: để định lượng ascaridol trong tinh dầu giun, ta có thể dùng phương pháp đo iod.

Ngày nay người ta thường dùng sắc ký khí để định lượng tinh dầu hoặc các thành phần trong tinh dầu.

1.9. Tác dụng sinh học và ứng dụng của tinh dầu

1.9.1. Trong y dược

Phạm vi sử dụng tinh dầu rất rộng

- Tác dụng lên thần kinh trung ương (tinh dầu long não, camphor).
- Tim mạch (citral, tinh dầu thạch xương bồ...).
- Hô hấp (tinh dầu tràm, bạch đàn, đại bi...).
- Tác dụng lên thần kinh cảm giác (tinh dầu bạc hà, menthol...).
- Kháng khuẩn, diệt và xua đuổi côn trùng và ký sinh trùng, kháng nấm. (thymol, tinh dầu sả, tinh dầu giun, tinh dầu bạch đàn...).

Tinh dầu dễ bay hơi, tan trong mỡ cho nên tác dụng nhanh chóng qua niêm mạc hoặc đường hô hấp.

- Giảm dau, gây tê; dùng ngoài (nha khoa, xoa bóp), hay dùng trong (dạ dày ruột (hương nhu, hồi...).
- Gây tiết dịch, long đờm và kích thích tiêu hóa (tràm, sa nhân, hồi, thảo quả...).

Các dược liệu chứa tinh dầu được dùng nhiều trong y học cổ truyền; chúng thường có vị cay, tính ấm hoặc nhiệt, có tác dụng phát tán, giải biểu, giảm đau, hành khí, hành huyết, khai khiếu và hầu như gặp ở tất cả các nhóm thuốc sử dụng trong y học cổ truyền.

1.9.2. Trong các ngành kỹ nghệ khác

- Thực phẩm: Gia vị, chất thơm cho đồ hộp, pha chế rượu mùi, đồ uống.
- Hương liệu: Trong kỹ nghệ thuốc lá, chè, nước hoa, xà phòng...
- Pha chế rượu mùi...

II. MỘT SỐ DƯỢC LIỆU CÓ CHỨA TINH DẦU

2.1. Bạc hà

Bạc hà Á

Tên khoa học: *Mentha arvensis* L.

Họ Hoa môi – Lamiaceae

Tên nước ngoài: Field mint, japanese peppermint (Anh).

Menthe des champs (Pháp).

Đặc điểm thực vật và phân bố

Cây thảo sống lâu năm, cao khoảng 0,20 – 0,70 m. Thân mềm, hình vuông. Lá mọc đối, chéo chữ thập, hình bầu dục hoặc hình trứng, cuống ngắn, mép lá có khía răng cưa. Cụm hoa mọc vòng xung quanh kẽ lá. Hoa nhỏ, đài hình chuông, tràng hình ống.

Bạc hà Á ở Việt Nam có hai nguồn gốc

1. Bạc hà bản địa: Mọc hoang ở các tỉnh Sơn La, Lào Cai, Lai Châu. Cây có thể cao đến 1,50 m. Thân màu xanh, xanh lục hoặc tím. Loại này đưa về đồng bằng trồng cho năng suất cây xanh cao, nhưng hiệu suất tinh dầu và hàm lượng methol trong tinh dầu thấp nên không có giá trị kinh tế.

2. Bạc hà di thực: Có nhiều chủng loại:

- Bạc hà 974
- Bạc hà 976
- Bạc hà Đài Loan.
- Một số giống đang nghiên cứu TN – 8 và TN – 26.

Giống bạc hà 974 được trồng nhiều ở các tỉnh đồng bằng Bắc Bộ và các tỉnh phía nam. Những năm cuối thập kỷ 70 của thế kỷ XX, bạc hà được phát triển nhiều nhất. Trên thế giới, bạc hà Á được trồng nhiều ở Nhật Bản, Brazil và Trung Quốc.

Trồng trọt và thu hoạch

Bạc hà là cây dễ trồng. Cây sinh trưởng tốt ở nhiệt độ 20 - 25°C trên đất tơi xốp, giữ được ẩm, màu mỡ. Bạc hà thường được nhân giống bằng thân ngầm hoặc bằng thân cành. Vào mùa đông, phần thân lá bị lụi đi, người ta giữ nguyên ruộng bạc hà, thỉnh thoảng có thể tưới ẩm nếu thời tiết khô hạn, đến mùa xuân thì đào chọn lấy thân mầm khỏe để làm giống. Mỗi hecta cần khoảng 600 - 700

kg mầm giống. Ngoài ra có thể tách lấy thân cành sao cho có một ít rễ ở phần gốc để trồng. Cần tưới giữ ẩm ngay sau khi trồng và trong suốt thời gian sinh trưởng. Cần tránh bị ngập úng và làm sạch cỏ thường xuyên.

Sau khi trồng 2 - 3 tháng có thể thu hoạch. Mỗi năm có thể thu hoạch 2 - 3 lứa. Khi cây ra hoa khoảng 70% là đúng lúc thu hoạch.

Bộ phận dùng

- Thân, cành có mang lá và hoa (Herba Menthae).

- Tinh dầu bạc hà (Oleum Menthae) cất từ lá và bộ phận trên mặt đất đã được tinh chế.

- Menthol tinh thể.

Thành phần hoá học

1. Tinh dầu: là chất lỏng không màu hoặc màu vàng nhạt, mùi thơm đặc biệt, vị cay mát. d^{20}: 0,890 – 0,992, α_D^{20}: - 20 đến - 40°, n_D^{20}: 1,455 – 1,465.

Hàm lượng là 0,5 % trên dược liệu khô tuyệt đối (theo yêu cầu của DĐVN II, tập 3).

2. Flavonoid.

Thành phần hoá học chính của tinh dầu là l – menthol, thường trên 70%. Ngoài ra còn có menthol ester, menthon, các hợp chất hydrocarbon monterpenic. DĐVN quy định hàm lượng menthol toàn phần là 60%, trong đó menthol ester không được quá 9%.

Công dụng

Bạc hà Á (*Mentha arvensis*) được ghi trong DĐVN và được dùng chủ yếu trong y học cổ truyền. Bạc hà được xếp vào nhóm tân lương giải biểu có tác dụng phát tán phong nhiệt, chữa cảm nóng không ra mồ hôi. Ngoài ra còn dùng để chữa các triệu chứng tiêu hoá kém, thường phối hợp với nhiều vị thuốc khác dưới dạng thuốc sắc.

Nói chung ở các nước khác trên thế giới, bạc hà Á được trồng chủ yếu để cất lấy tinh dầu.

Do hàm lượng menthol trong tinh dầu cao (trên 75%), bạc hà Á được coi là nguồn nguyên liệu thiên nhiên để chiết xuất menthol.

Tinh dầu bạc hà

- Dùng chiết xuất menthol.

- Tinh dầu bạc đã lấy menthol được dùng làm nước thơm súc miệng, kem đánh răng và các dược phẩm (dầu, cao xoa bóp...).

Menthol có tác dụng kháng khuẩn, chống co thắt, giảm đau, kích thích tiêu hoá, chữa hôi mồm. Menthol được dùng trong nhiều ngành kỹ thuật như kỹ nghệ dược phẩm, công nghệ thực phẩm, bánh kẹo, pha chế rượu mùi v.v..

Bạc hà Âu

Tên khoa học *Mentha piperita* L.

Họ Hoa môi – Lamiaceae.

Bạc hà Âu được trồng chủ yếu ở các nước châu Âu. Giống được ưa chuộng là bạc hà Mitcham (Anh), Milly và Maine et Loire (Pháp). Ở Việt Nam có di thực nhưng chưa được phát triển.

Về đặc điểm thực vật: khác với bạc hà Á là hoa mọc thành nhiều vòng thành bông ở ngọn cành.

Thành phần hoá học

- Tinh dầu: 1 - 3% (tính trên dược liệu khô tuyệt đối).

- Flavonoid

Thành phần hoá học chính của tinh dầu:

+ 40 - 60% menthol toàn phần.

+ 8 - 10% menthol.

+ Lượng nhỏ menthofuran (1 - 2%).

Công dụng

Bạc hà Âu được ghi trong nhiều Dược điển các nước thuộc châu Âu. Dược liệu là cành mang hoa còn tươi hoặc lá khô, có tác dụng kích thích tiêu hoá, chống co thắt, tác dụng này là do tinh dầu. Flavonoid có tác dụng lợi mật. Dạng dùng: thuốc hãm 5%, thuốc sắc hoặc nước cất bạc hà.

Tinh dầu bạc hà Âu có mùi thơm dịu, rất được ưa chuộng. Một số tác giả cho rằng là do bạc hà Âu có chứa menthofuran. Tinh dầu được dùng như một chất thơm trong kỹ nghệ dược phẩm, kỹ nghệ sản xuất rượu và bánh kẹo. Tinh dầu không dùng để chiết xuất menthol.

2.2. Hương nhu

Hương nhu trắng

Tên khoa học: *Ocimum gratissimum* L.

Họ Hoa môi – Lamiaceae.

Tên nước ngoài: Lemon basil, shrubby basil (Anh).

Basilic blanc, basilic du Ceylon (Pháp).

Đặc điểm thực vật và phân bố

Cây thảo sống lâu năm, phân cành nhiều thành bụi, cao 1 – 1,5 m. Thân vuông hóa gỗ ở gốc, lá mọc đối chéo chữ thập, lá hình trứng thuôn, mép khía răng thô, có lông ở cả hai mặt. Hoa mọc tập trung ở ngọn cành thành xim đơn. Quả bế.

Cây mọc hoang và được trồng ở nhiều nơi trong cả nước. Ngoài ra cây hương nhu còn được trồng ở nhiều nơi trên thế giới: Liên bang Nga, Ấn Độ, Sri Lanka.

Trồng trọt và thu hái

Trồng bằng hạt. Ở các tỉnh phía Bắc gieo hạt vào tháng 11 – 12 trong vườn ươm, vào giữa tháng 2, khi cây con cao 20 - 30 cm thì bứng cây non đi trồng. Thu hoạch khi cây đã ra hoa. 1 - 2 năm đầu cần phát gốc vào mùa xuân, chừa lại 20 - 30 cm cho chồi non mọc. Các năm sau kết hợp thu hái với tỉa bớt cành già để cành non phát triển. Ở các tỉnh phía Nam có thể gieo trồng muộn hơn.

Bộ phận dùng

- Cành mang lá và hoa.
- Tinh dầu – Oleum Ocimi gratissimi.

Thành phần hoá học

- Dược liệu chứa 0,78 – 1,38% tinh dầu (hoa 2,27% lá 1,38%, toàn cây 1,14%) tính trên trọng lượng khô tuyệt đối. DĐVN II, tập 3, quy định dược liệu phải chứa ít nhất 1% tinh dầu.

Tinh dầu hương nhu trắng là chất lỏng màu vàng đến nâu vàng, d^{20}: 0,980 – 1,010, n_D^{20}: 1,510 – 1,528, α_D^{20}: 20°2 đến – 15°6.

Thành phần chính của tinh dầu là eugenol (60 – 70%) có nơi đạt trên 70%. DĐVN quy định hàm lượng eugenol không dưới 60%.

Công dụng

Hương nhu trắng chủ yếu được dùng làm nguyên liệu cất tinh dầu giàu eugenol ở Việt Nam. Eugenol dùng trong nha khoa, làm dầu cao xoa bóp và là nguyên liệu để tổng hợp vanilin.

Trong Y học cổ truyền, cành mang lá và hoa của hương nhu trắng được dùng như hương nhu tía để chữa cảm cúm, đau bụng, đi ngoài dưới dạng thuốc sắc

hoặc hãm (6 - 12 g/ngày), hoặc dưới dạng thuốc xông để chữa sốt, đau đầu do cảm nắng.

Ngoài hương nhu trắng, cây hương nhu tía cũng được trồng khắp nơi với diện tích nhỏ để làm thuốc.

Hương nhu tía

Tên khoa học: *Ocimum sanctum* L.

Họ Hoa môi - Lamiaceae.

Đặc điểm thực vật và phân bố

Cây nhỏ, sống hàng năm hay sống dai, cao gần 1 m. Thân, cành màu đỏ tía, có lông. Lá mọc đối, màu nâu đỏ, có cuống khá dài, mép khía răng cưa, hai mặt đều có lông. Hoa màu tím hay trắng, mọc thành xim co ở đầu cành. Quả bế. Toàn thân có mùi thơm dễ chịu. Cây được trồng phổ biến khắp nơi dễ làm thuốc.

Trồng trọt và thu hái

Trồng bằng hạt, gieo vào tháng 1. Cây con được chăm sóc đến tháng 2 thì đem ra trồng. Thu hái lúc cây đã ra hoa (tháng 5 cây ra hoa kéo dài đến tháng 10). Phơi hoặc sấy khô

Bộ phận dụng

Cành mang lá, hoa

Thành phần hóa học

Phần trên mặt đất có chứa tinh dầu.

Hàm lượng tinh dầu khi cây bắt đầu có hoa đến lúc ra hoa là 1,08 – 1,62%. DĐVN quy định hàm lượng tinh dầu không dưới 0,5%.

Thành phần hoá học chính của tinh dầu là eugenol. Phân tích 1 mẫu tinh dầu hương nhu tía trồng ở Hà Nội, thu hoạch vào tháng 5 có các thành phần sau: Eugenol 49 – 50%, ngoài ra có chứa các hợp chất sesquiterpen: elemen 21%, caryophylen 22,2%, α-humulen 1,3%, caryophylen oxyd 0,8% và elemol 0,6%.

Công dụng

Chữa cảm sốt, đau bụng đi ngoài, nôn mửa, cước khí, thuỷ thũng. Dạng dùng: Thuốc sắc hoặc thuốc xông.

Nước sắc dùng súc miệng chữa hôi miệng.

2.3. Sả

Tên khoa học: *Cymbopogon* spp.

Họ Lúa – Poaceae

Tên nước ngoài: citronella grass, citron-grass (Anh).

citronelle, verveine des Indes occidentales (Pháp).

Đặc điểm thực vật và phân bố

Chi *Cymbopogon* có chừng 120 loài trong đó có khoảng 50 loài có chứa tinh dầu, phân bố chủ yếu ở vùng nhiệt đới và cận nhiệt đới thuộc các nước châu Á và châu Phi. Về giá trị kinh tế của tinh dầu phải kể đến ba nhóm chính sau đây:

1. Sả Citronella, cho tinh dầu citronelle (Oleum Citronellae, Citronella oil), đại diện nhóm này là hai loài:

- *Cymbopogon winterianus* Jawitt - Sả Java

- *Cymbopogon nardus* Rendle - Sả Srilanca.

2. Sả Palmarosa, cho tinh dầu palmarosa (Oleum Palmarosae-Palmaroseoil): đại diện cho nhóm này là loài *Cymbopogon martinii* Stapf. var. Motia. Loại sả này cho tinh dầu có mùi thơm như hoa hồng nên còn được gọi là sả hoa hồng.

3. Sả Lemongrass, cho tinh dầu Lemongrass (Oleum Cymbopogonis citrati – Lemongrass oil): Đại diện cho nhóm này là các loài:

- *C. citratus* Stapf.

- *C. fleuxuosus* Stapf.

- *C. pendulus* (Nees ex Steud). Wats.

Sả là loài cỏ sống lâu năm mọc thành bụi, cao đến 2m, rễ chùm ăn rộng cho nên kém chịu hạn và úng. Thân có đốt ngắn được bao bọc kín bởi các bẹ lá, tạo thành các tép sả. Lá hẹp như lá lúa, hai mặt và mép lá rất ráp. Độ dài của lá tuỳ theo từng loài, có thể từ 0,2 - 1,2 m. Cụm hoa chuỳ, có 2 loại hoa trên cùng một cây: Hoa lưỡng tính hình mác nhọn và hoa đực có cuống hình ellip hoặc hình mác.

Sả được trồng để sản xuất tinh dầu. Mười nước sau đây xuất khẩu nhiều nhất trên thế giới: Trung Quốc, Hundurat, Guatemala, Ghinê, Malaysia, Sri Lanka, Chilê, Cônggô, Philippin, Indonesia. Sản lượng tinh dầu sả trên thế giới mỗi năm khoảng trên 6000 tấn, trong đó riêng sả Java đã chiếm 4000 - 5000 tấn.

Ở Việt Nam trước năm 1963 phần lớn các giống sả được trồng là do người Pháp di thực từ trước Cách mạng Tháng Tám, gồm có 8 loài, trong đó có 2 loài

thuộc Sả Lemongrass là *C. citratus* và *C. flexuosus* và 6 loài Sả Citronelle trong đó có 1 loài là *C. nardus* và được trồng ở các tỉnh Tuyên Quang, Thái Nguyên.

Sau năm 1963 đã di thực một số giống sả mới: Sả Java (*C.winterianus*) còn gọi là xả xoè, được trồng chủ yếu ở 2 huyện Hàm Yên và Chiêm Hoá (Tuyên Quang). Sau năm 1975 sả được trồng trên diện tích lớn ở một số tỉnh phía nam. Nhưng nhìn chung sản lượng tinh dầu sả của Việt Nam còn rất thấp, năm 1977 là năm sản xuất nhiều tinh dầu sả nhất (90 tấn). Hiện nay có nhập thêm một số giống sả mới (*C. martinii* var. Motia) và đang trồng ở quy mô thí nghiệm.

Trồng trọt và thu hoạch

Trồng bằng tép sả; 1 gốc sả trong suốt thời gian sinh trưởng có thể cho 3-5 ngàn tép sả. Riêng sả Palmarosa được trồng bằng hạt. Trồng sả vào mùa xuân. ở các tỉnh phía nam trồng vào đầu mùa mưa. Nếu ở vùng có khả năng tưới tiêu tốt, trồng vào cuối mùa mưa (tháng 9 - 10). 5 - 6 tháng sau khi trồng có thể thu hoạch. Nếu chăm sóc tốt cứ sau 40 ngày thu hoạch 1 lần. Nên cắt tỉa thường kỳ vì lá non chứa nhiều tinh dầu hơn lá già. Trong điều kiện chăm sóc tốt có thể thu hoạch 5 - 6 năm. Năng suất cao nhất vào các năm thứ 2, 3 và thứ 4. Sau đó phải trồng lại, nếu không, sả sẽ cho năng suất và chất lượng tinh dầu kém. Sả Java (*C. winterianus*) có giá trị kinh tế nhất vì các lý do sau:

+ Hiệu suất tinh dầu cao: Năm thứ 1: 100 kg/ha, năm thứ 2 trở đi 150 kg/ha. Nếu chăm sóc tốt có thể đạt 200 - 250 kg/ha. Trong khi đó sả Palmarosa chỉ đạt tối đa 70 kg/ha.

+ Chất lượng tinh dầu tốt, thường đạt và vượt chỉ tiêu thương phẩm quốc tế.

+ Tinh dầu được tiêu thụ nhiều trên thị trường quốc tế do giá trị sử dụng cao.

Sản lượng sản xuất hàng năm củatinh dầu sả Java là 700 tấn.

Bộ phận dùng

- Phần trên mặt đất, chủ yếu là lá để cất tinh dầu.
- Tinh dầu
- Rễ sả

Thành phần hoá học

1. Hàm lượng tinh dầu:

Sả là cây công nghiệp nên đa số tài liệu đưa ra hiệu suất tinh dầu tính trên lá tươi.

- Sả Citronella: 1 - 1,2% (Sả Java),0,37 - 0,40% (sả Sri Lanka)

- Sả Palmarosa: 0,16% (toàn cây) 0,52 (ngọn mang hoa)

Sả Palmarosa trồng thí nghiệm ở Hà Nội (tính trên trọng lượng khô tuyệt đối): 0,77 - 1,43% (toàn cây), 2,8% (ngọn mang hoa).

- Sả Lemongrass: 0,46 - 0,55% (C. *citratus*) 0,52 - 0,77% (C. *flexosus*).

2. Thành phần hoá học của tinh dầu:

- Tinh dầu sả Citronella Java (Oleum Citronellae - Citronella oil (Java).

Là chất lỏng màu vàng nhạt, mùi thơm của sả với các hằng số: d^{15}: 0,887 - 0,895, α_D^{15}: $-0,35^\circ$ đến $-5,6^\circ$; thành phần chính là citronelal (25 - 54%), geranilol (26 - 45%), các alcol khác như citronelol và ester của chúng. Hàm lượng geraniol toàn phần là 85 - 96%.

Tiêu chuẩn thương phẩm quốc tế quy định những chỉ tiêu sau đây với tinh dầu sả Citronelle:

Tiêu chuẩn	Geraniol toàn phần	Citronelal
Đạt	Không dưới 85%	Không dưới 35%
Loại tốt nhất	Không dưới 85%	50 - 60%
Loại kém	80 - 85%	10 - 20%

- Tinh dầu sả Citronella Sri Lanka

Thành phần hoá học tinh dầu tương tự như tinh dầu Citronella Java, nhưng hàm lượng citronelal thấp hơn (7 - 15%), geraniol (26 - 39%), geraniol toàn phần quy định không dưới 57%.

- Tinh dầu sả Palmarosa:

Tinh dầu là chất lỏng màu vàng nhạt, mùi thơm của hoa hồng với các hằng số: d^{20}: 0,887 - 0,900, nD^{20}: 1,4763, αD^{20}: $+54^\circ$ đến 30°. Thành phần chính của tinh dầu là geraniol (75 - 95%).

Sả Palmarosa trồng ở Hà Nội cho tinh dầu với hàm lượng geraniol là 77,7 - 86,9%, geraniol ester là 11,0 - 19,8%.

- Tinh dầu sả Lemon grass:

Là chất lỏng màu vàng nhạt, mùi thơm của sả, với các hằng số: d^{20}: 0,8986, n_D^{20}: 1,4910, α_D^{20}: -60°. Thành phần chính của tinh dầu là citral (bao gồm citral a và citral b) 65 - 86%.

Sả *C. citratus* trồng ở Trảng Bom (Việt Nam) có hàm lượng citral trong tinh dầu là 80%.

Một điểm đặc trưng cho tất cả các loài sả là trong tinh dầu có chứa methylheptenon với hàm lượng 1 - 2% làm cho tinh dầu sả có mùi rất đặc trưng của sả.

Kiểm nghiệm tinh dầu: Định lượng citronelal, citral, geraniol. Xem phần "Đại cương" của chương tinh dầu.

Công dụng

Tinh dầu sả Java (*C. witerianus*) tiêu thụ nhiều nhất trên thị trường thế giới. Các nước tiêu thụ nhiều nhất là Mỹ, Anh, Pháp, Đức, Nhật Bản. Tinh dầu này dùng chủ yếu trong kỹ nghệ hương liệu: pha chế nước hoa, kỹ nghệ xà phòng v.v... Chất có giá trị ở đây là citronelal, được chuyển thành các sản phẩm khác, đặc biệt là hydroxycitronelal, là chất điều hương quan trọng, làm cho nước hoa có mùi hoa tự nhiên.

Tinh dầu sả Sri Lanka cũng được sử dụng trong kỹ nghệ nước hoa và xà phòng nhưng kém giá trị hơn tinh dầu sả Java. Dùng để chiết xuất geraniol.

Tinh dầu sả Palmarosa dùng trong kỹ nghệ nước hoa và xà phòng, do giàu geraniol, có mùi thơm của hoa hồng. Ngoài ra còn là chất thơm trong kỹ nghệ sản xuất thuốc lá.

Tinh dầu sả Lemongrass dùng chủ yếu để chiết xuất citral, là nguyên liệu để tổng hợp vitamin A, một lượng nhỏ dùng trong kỹ nghệ xà phòng, nước hoa, chất thơm cho thực phẩm.

Sả (toàn cây) được dùng chữa cảm sốt, đau bụng, đi ngoài, đầy hơi, chướng bụng, nôn mửa, trẻ em bị kinh phong, ho, viêm phổi. Ngày dùng 8-12g dưới dạng thuốc xông hay hãm uống. Có thể dùng riêng hoặc phối hợp với các vị thuốc khác. Tinh dầu dùng đuổi muỗi và côn trùng, khử mùi hôi, xoa ngoài phòng và chống cúm và phòng bệnh truyền nhiễm.

Ghi chú: Nhân dân Việt Nam vẫn trồng một loài sả có tên khoa học chưa xác định. Tép sả phát triển (thường gọi là củ sả) được dùng làm gia vị. Lá được dùng làm thuốc xông chữa cảm cúm, củ sả còn có tác dụng thông tiểu.

2.4. Đại hồi

Tên khoa học: *Illicium verum* Hook. f.

Họ Hồi – Illiciaceae.

Tên nước ngoài: True star-anise, chinese anise (Anh).

Anis étoilé, badianier de Chine (Pháp).

Đặc điểm thực vật và phân bố

Cây cao 6 – 10 m. Cành mọc thẳng tạo cho cây dạng thon gọn và tán lá hẹp. Lá mọc so le nhưng thường mọc sít tạo thành các vòng giả, từ 4 – 6 lá. Lá thon dài hoặc hình bầu dục mép nguyên có lượn sóng hoặc không. Lá rất dễ rụng khỏi cành nếu cắt cành rời khỏi cây. Hoa có thể có nhiều màu: Trắng, trắng hồng, hồng, tím hồng. Noãn đa số là 8 có khi 9 – 10.

Quả tươi có màu xanh, khi khô màu nâu thẫm, cấu tạo từ 8 đại đều và rời nhau, có khi 9 - 12 nhưng hiếm. Các đại hình thoi xếp tỏa tròn thành hình sao.

Hồi được coi là một đặc sản của tỉnh Lạng Sơn, được trồng ở hầu hết các huyện trong tỉnh, trừ Hữu Lũng và Nam Chi Lăng. Ngoài ra còn được trồng ở Cao Bằng, Quảng Ninh, Bắc Thái (vùng giáp với Lạng Sơn). Năm 1999, toàn Lạng Sơn trồng 17000 ha hồi, thu hoạch 15000 tấn quả tươi.

Hồi còn được trồng ở Trung Quốc (Quảng Tây, Nam Ninh).

Trồng trọt và thu hái

Trồng bằng hạt. Chọn quả to đều cánh từ 8 – 10 cánh (đại) của những cây ở độ tuổi trưởng thành (30 – 40 tuổi), không bị sâu bệnh, thường xuyên sai quả và được chăm sóc tốt. Phơi nắng nhẹ, quả sẽ nứt, hạt rơi ra. Bảo quản hạt trong cát trong 3 tháng khi hạt nứt nanh 7 – 10% thì gieo. Thường gieo trước Tết Nguyên Đán 2 tuần. Khi cây ra lá đều thì cấy vào bầu. Cây con 20 – 25 tháng tuổi thì đem trồng.

Cây ra hoa vào lúc 5 tuổi. Những năm đầu tiên sản lượng thường thấp. Cây trưởng thành, 1 năm có thể cho từ 20 – 40 kg quả. Có thể khai thác đến khi cây 100 tuổi hoặc hơn nữa.

Hồi được khai thác vào 2 vụ. Vụ chính vào tháng 8 – 9 (hồi mùa), vụ phụ từ tháng 11 – tháng 12 năm sau (vụ chiêm). Thường cây sai quả vào vụ mùa thì sẽ ít quả vào vụ chiêm và ngược lại.

Bộ phận dụng

- Quả - Fructus Anisi stellati.

- Tinh dầu – Oleum Anisi stellati.

Tinh dầu được cất từ quả tươi vừa mới thu hái với hiệu suất 3 – 3,5%. Tinh dầu hồi Lạng Sơn được ưa chuộng trên thị trường quốc tế. Hiện nay khu vực Bắc Việt Nam (Lạng Sơn, Cao Bằng) và Nam Trung Quốc (Quảng Tây, Nam Ninh) là nơi cung cấp tinh dầu hồi chủ yếu cho thế giới.

Thành phần hoá học

- Quả có chứa tinh dầu 8 – 9%. Quả mới thu hoạch có thể chứa 10 – 15%. DĐVN III quy định hàm lượng tinh dầu không dưới 4%.

Tinh dầu quả hồi là chất lỏng không màu hay màu vàng nhạt, mùi đặc biệt, vị ngọt, kết tinh khi để lạnh. d^{20}: 0,978 – 0,990, n_D^{20}: 1,552 – 1,560, α_D^{20}: –20 đến +1°.

Thành phần chủ yếu của tinh dầu là *trans*-anethol (85 – 90%). Tinh dầu quả hồi Lạng Sơn luôn đạt hàm lượng anethol trên 90%.

- Lá có chứa tinh dầu 0,56 – 1,73%.

Tinh dầu lá có chứa lượng anethol xấp xỉ tinh dầu quả 85 – 90%.

- Hạt chứa chất béo.

Kiểm nghiệm

Định lượng anethol bằng phương pháp đo độ đông đặc. Nhiệt độ đông đặc không dưới +15°, tương đương với hàm lượng anethol từ 85 – 95% (xem DĐVN III).

Công dụng

- Quả hồi có tác dụng giúp tiêu hoá, lợi sữa, giảm đau, giảm co bóp nhu động ruột, dùng để chữa ỉa chảy, nôn mửa, ăn không tiêu, bụng đầy.

Tính vị trong đông y: Vị cay, ôn, tác dụng vào kinh can, thận, tỳ, vị, có tác dụng ôn trung khứ hàn, khai vị, kiện tỳ. Dạng dùng: bột (1 - 4 g), rượu thuốc.

Dùng ngoài hồi có tác dụng chữa đau nhức, thấp khớp, bong gân.

- Tinh dầu hồi có tác dụng tương tự như dược liệu, thường được phối hợp trong nhiều thuốc khác. Ngoài ra tinh dầu còn được chế rượu mùi, dùng tổng hợp các hormon.

2.5. Quế

Tên khoa học: *Cinnamomum* sp.

Họ Long não – Lauraceae.

Trên thị trường quốc tế lưu hành 2 loại quế chính:

1. *Cinnamomum cassia* Nees et Bl. với tên trên thị trường là cassia. Quế Trung Quốc, quế Việt Nam thuộc loại này.

2. *Cinnamomum zeylanicum* Gare et Bl. với tên trên thị trường là cinnamon – quế Sri Lanka (hay quế Ceylan).

Ngoài ra còn có các loài: *Cinnamomum burmani* (C. Nees et T. Nees) C Nees et Bl và *Cinnamomum loureirii* C. Nees phân bố chủ yếu ở các nước Đông Nam Á.

2.5.1. Quế Việt Nam

Tên khoa học: *Cinnamomum cassia* Nees et Bl.

Họ Long não – Lauraceae.

Đặc điểm thực vật và phân bố

Cây gỗ, cao 10 – 20 m, vỏ thân nhẵn. Lá mọc so le có cuống ngắn, dài nhọn hoặc hơi tù, có 3 gân hình cung. Hoa trắng, mọc thành chùm xim ở kẽ lá hay đầu cành. Quả hạch hình trứng, khi chín có màu tím nhẵn bóng. Toàn cây có mùi thơm của quế. Được trồng nhiều ở các tỉnh phía nam Trung Quốc và ở Việt Nam.

Theo những nghiên cứu mới nhất, loài *C. cassia* là loài quế nguyên sản của Việt Nam được trồng phổ biến từ các tỉnh phía bắc đến các tỉnh phía nam của miền Trung, Các địa phương trồng quế với diện tích lớn là: Yên Bái, Quảng Nam, Quảng Ngãi, Thanh Hoá, Nghệ An, Quảng Ninh. Loài quế Việt Nam cũng được trồng ở các tỉnh miền nam Trung Quốc và cho chất lượng tốt hơn quế địa phương.

Trồng trọt và khai thác

Trồng bằng hạt. Gieo hạt trong vườn ươm, khi cây cao khoảng 0,6 – 0,7 m thì bứng đem trồng. Sau 10 năm có thể thu hoạch vỏ. Thu hoạch vào 2 vụ tháng 4 – 5 và 9 – 10 là khi cây có nhiều nhựa, dễ bóc.

Bộ phận dùng

- Vỏ quế – Cortex Cinnamomi: Vỏ quế cuộn tròn thành hình ống, dài 25 – 40 cm, đường kính 1,5 – 5 cm, hoặc là những mảnh vỏ uốn cong rộng 3 – 5 cm dày 1 – 5 mm, mặt ngoài màu nâu xám, mặt trong nâu đỏ đến nâu xẫm. Dễ bẻ gẫy, mặt bẻ màu nâu đỏ ít có sợi. Sau khi đã ngâm nước, mặt cắt ngang thấy rõ một vòng mô cứng màu trắng ngà. Mùi thơm, vị cay ngọt.

- Cành nhỏ: Quế chi.

- Tinh dầu quế – Oleum Cinnamomi Cassiae.

Tinh dầu quế được cất từ phần dư phẩm khi chế biến dược liệu quế (5 – 10%) từ cành con và lá.

Thành phần hoá học

Vỏ quế

- Tinh dầu 1 – 3%. DĐVN II, tập 3 quy định không dưới 1%.

- Các hợp chất diterpenoid (cinnacassiol), phenylglycosid, chất nhày, chất nhựa, các hợp chất flavonoid, tanin và coumarin.

Tinh dầu quế là chất lỏng không màu đến màu vàng nâu, mùi thơm, vị ngọt sau nóng cay, d^{20}: 1,040 – 1,072, n_D^{20}: 1,590 – 1,610, α_D^{20}: -1° đến +1°. Thành phần chính của tinh dầu vỏ quế là aldehyd cinnamic (70 – 95%). DĐVN II, tập 3 quy định hàm lượng aldehyd cinnamic không dưới 80%. Ngoài ra còn có cinnamylacetat – chất làm giảm giá trị tinh dầu quế, cinamylalcol và coumarin.

Lá

- Tinh dầu: 0,14 – 1,04%. Phân tích tinh dầu lá quế Yên Bái bằng phương pháp phổ cộng hưởng từ hạt nhân carbon – 13 xác định được 5 thành phần: benzaldehyd, bezylacetat, aldehyd cinnamic, cinnamylacetat và coumarin. Hàm lượng aldehyd cinnamic dao động 12 tháng trong năm từ 34,65 – 95,55%. Thấp nhất vào tháng 6 và các tháng sau đó (tháng 7,8,9: 57,74%, 69,16%, 82,43%). Ngược lại hàm lượng cinamylacetat cao nhất vào tháng 6 (57,933%) và giữ ở hàm lượng đáng kể trong suốt các tháng mùa hè. Từ tháng 10 cho đến giữa tháng 5 hàm lượng aldehyd cinnamic trong lá luôn luôn đạt trên 80%. Vì vậy nếu khai thác tinh dầu vỏ kết hợp với lá nên khai thác trước tháng 5 và sau tháng 9.

Tác dụng dược lý và công dụng

- Quế là vị dược liệu quý dùng cả trong Tây y và Đông y. Quế có tác dụng kích thích tiêu hoá, trợ hô hấp và tuần hoàn, tăng sự bài tiết, co mạch, tăng nhu động ruột và co bóp tử cung. Theo những nghiên cứu mới, quế còn có tác dụng chống khối u, chống xơ vữa động mạch vành, chống oxy hoá. Trong Tây y dùng dưới dạng cồn thuốc, rượu thuốc, rượu mùi.

- Quế còn sử dụng rất nhiều để làm gia vị. Một mặt do mùi vị quế kích thích ăn ngon, kích thích tiêu hóa, mặt khác còn do quế có tác dụng ức chế sự phát triển của nấm, bảo vệ thức ăn khỏi thiu thối. Ở nồng độ 1% bột quế có tác dụng ức chế sự phát triển của *Aspergilus flavus* và nồng độ 0,25 – 0,5% ức chế sự tạo thành độc tố aflatoxin.

Đông y xếp quế vào vị thuốc bổ. Tính vị: Ngọt cay, đại nhiệt. Tác dụng vào cả 5 kinh: Tâm, phế, thận, can, tỳ. Có tác dụng bổ mệnh môn hoả, thông huyết mạch trừ hàn tích. Dùng để hồi dương cứu nghịch, mệnh môn hoả suy, tạng phủ lạnh, tiêu hoá kém, đau và đầy bụng.

Trong Đông y còn dùng quế chi để chữa cảm lạnh không ra mồ hôi, tê thấp, chân tay đau buốt.

Tinh dầu quế có tác dụng sát khuẩn, kích thích tiêu hoá, kích thích hệ thống thần kinh làm dễ thở và tuần hoàn lưu thông, kích thích nhu động ruột, được dùng phối hợp với các vị thuốc khác dưới dạng rượu thuốc, cồn ngọt và dạng dầu cao xoa.

2.5.2. Quế Sri Lanka

Tên khoa học *Cinnamomum zeylanicum* Gare et Bl.

Họ Long não – Lauraceae.

Nguồn gốc Sri Lanka và Nam Ấn Độ, được trồng nhiều ở một số nước nhiệt đới: Quần đảo Seychelle, Madagasca, Malaysia. Nơi sản xuất nhiều nhất là Sri Lanka.

Những điểm khác quế Việt Nam:

- Về dược liệu: Khác với quế Việt Nam loại quế này thường được cạo hết lớp bần và cuộn thành từng ống với độ dày vào khoảng 0,2 – 0,8 mm, mùi rất thơm.

- Về thành phần hoá học: Vỏ có chứa 0,5 – 1% tinh dầu.

Hàm lượng aldehyd cinnamic trong tinh dầu thấp hơn quế Việt Nam: khoảng 70%, ngoài ra còn có eugenol 4 – 10%.

Lá chứa 0,75% tinh dầu. Thành phần chính của tinh dầu lá quế là eugenol 70 – 90%. Lá quế Sri Lanka có thể coi là nguồn nguyên liệu cung cấp eugenol.

- Về sử dụng: Vỏ quế Sri Lanka rất được ưa chuộng trên thị trường quốc tế, chủ yếu để dùng làm gia vị. Tinh dầu vỏ được cất từ dư phẩm khi chế biến vỏ quế.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. *Phạm Thanh Kỳ và cộng sự*, (1998), Bài giảng dược liệu, Tập II, Trường Đại học Dược Hà Nội, 151-169.

2. *Bruneton, J.* (1995). Pharmacognogy Phytochemistry Medicinal Plants.

3. *Delaveau, P.* (1987). Les epice-Histoire, description et usage des differents epices, aromates et condimént, Albin Michel, Paris.

4. *Mengal, P., Behn, D., Gil, M.B. and Monpon, B.* (1993). Extraction d'huile essentielle par micro-ondes, Parfums, Cosmetiques, Arômes, 114, 66-67.

5. *Peyron, L. and Richard, H.* (1992). L'extraction des epices et herbes aromatiques et les differents types d'extraits, in "Epices et aromates", (Richard, H., ed), p. 113-137.

CHƯƠNG II
POLYSACCHARID VÀ DƯỢC LIỆU CHỨA POLYSACCHARID

GS. Vũ Ngọc Lộ

I. KHÁI NIỆM

Polysaccharid (hoặc polyosid hoặc glycan) là các polymer có phân tử lượng lớn do sự ngưng tụ một số lượng lớn các phân tử ose (trên 10 ose liên kết).

Các polysaccharid gồm các polysaccharid đồng thể được cấu tạo do sự ngưng tụ nhiều phân tử cùng kiểu ose và polysaccharid dị thể do sự ngưng tụ các phân tử thuộc nhiều kiểu ose khác nhau. Thông thường người ta gặp các polymer dị thể trong đó có các hexose, pentose, anhydrohexose, ose ether, ose ester. Một polysaccharid (đồng thể hoặc dị thể) có thể là mạch thẳng hoặc mạch nhánh.

Theo kinh điển, người ta phân biệt:

1- Polysaccharid với các dãy có chu kỳ: Các ose được phân bố trên một chuỗi gồm nhiều ose giống nhau (amylose, cellulose...). Cấu dạng của các chất trong nhóm này do cấu hình của dây nối osid chủ yếu là :

- Dây nối β (1 → 4), cấu dạng là một chuỗi kéo dài (cellulose).
- Dây nối α (1 → 4), cấu dạng hình xoắn ốc (amylose).
- Trong một số trường hợp, cấu dạng lỏng lẻo (dây nối 1 → 6).

2- Polysaccharid có dãy không liên tục. Các vùng có chu kỳ đều đặn xen kẽ với vùng không đều. Nhiều khả năng tương tác giữa polymer và polymer tạo ra gel.

3- Các polysaccharid hoàn toàn dị thể.

1.1. Sự hoá đông của polysaccharid

Nhiều polysaccharid có khả năng đông đặc lại để tạo ra gel, nghĩa là các màng lưới các phân tử lớn 3 chiều trong đó có pha lỏng giữa các mắt lưới. Các chuỗi hoặc các đoạn của mắt lưới kết nối với nhau càng nhiều, độ rắn của gel càng cao.

Các polymer đồng thể có những chuỗi đều tạo ra các vùng nối tiếp rộng rãi. Ở đây sẽ tạo ra tủa.

Các polymer dị thể không có các chuỗi đều thì được khuếch tán trong dung môi. Ở đây sẽ tạo ra các dung dịch nhớt.

Các polymer có các chuỗi đều gián đoạn có thể tạo ra các vùng nối tiếp cho các cấu trúc hình xoắn ốc.

1.2. Phân lập polysaccharid

Việc phân lập các polysaccharid đòi hỏi phải sử dụng các dung môi nước, có khi phải thêm các acid kim loại (như chiết xuất pectin hoặc một số muối như carbonat trong sản xuất algin). Người ta dùng các dung môi lưỡng tính. Để loại trừ các muối và các phân tử có trọng lượng phân tử thấp, người ta phải sử dụng phương pháp thẩm tích, các nhựa trao đổi ion, lọc phân tử trên gel (loại bỏ các oligosaccharid và sắc tố bằng ethanol hoặc aceton).

Việc phân đoạn các polysaccharid rất tinh tế. Phải sử dụng phương pháp kết tủa (dung môi không hòa tan, thêm muối, thay đổi pH). Cần khai thác các kỹ thuật sắc ký. Các polysaccharid có những cấu trúc đặc biệt: tạo ra các dẫn chất. Sau khi tinh chế, cần phải xác định bằng phương pháp vật lý và hóa học.

II. PHÂN LOẠI POLYSACCHARID

Có nhiều cách phân loại polysaccharid. Mỗi cách phân loại đều có những ưu điểm, nhược điểm nhất định.

Trong chương này, chúng tôi phân chia các polysaccharid thành nhiều nhóm:

- Polysaccharid từ các vi sinh vật và nấm.
- Polysaccharid từ tảo.
- Polysaccharid từ thực vật bậc cao và động vật.

2.1. Polysaccharid của vi khuẩn và nấm

2.1.1. Dextran

Dextran là các polymer của glucose, các glucan do các gốc của D-glucopyranosyl kết hợp với nhau bằng liên kết 1 → 6. Dextran gồm các phân tử ít nhiều phân nhánh và có phân tử lượng lớn $(40 - 50).10^6$. Dextran được tạo ra do một enzym ngoài tế bào thuộc nhiều chủng loại vi khuẩn của các chi

Leuconostoc, *Lactobacillus* và *Streptococcus*. Chính enzym được gọi là dextransucrase đã tạo ra sự polymer hóa các gốc của α-glucopyranosyl từ saccharose.

Mỗi polymer đặc trưng cho chủng tạo thành dextran, có thể có liên kết 1 → 2, 1 → 3 hoặc 1 → 6. Thực tế liên kết 1 → 6 là hay gặp nhất. Tỷ lệ phân nhánh là 5 – 33%. Trong đa số các trường hợp, mạch ngang là ngắn (1 đến 2 phân tử glucose) và nối với mạch chính bằng liên kết 1 → 3 hoặc 1 → 2.

Dextran thương phẩm chứa khoảng 95% các liên kết αD (1 → 6) và 5% các liên kết αD (1 → 3) nằm ở các nhánh ngang là do các chủng đã được chọn lọc của loài *Leuconostoc mesenteroides* nuôi cấy ở môi trường đường mía. Khi nuôi cấy xong, polymer tạo thành được kết tủa bằng ethanol. Do phân tử lượng của sinh khối cao, tiến hành thủy phân từng phần để thu được sinh khối có phân tử lượng theo yêu cầu. Việc khử sự polymer hóa từng phần được tiến hành ở môi trường acid do sử dụng các enzym từ nấm hoặc siêu âm. Sau khi loại bỏ các ion, làm tủa bằng aceton và kết tinh lại, người ta thu được dextran dược dụng. Độ nhớt và độ thẩm thấu tương tự như của huyết tương.

Dextran là thuốc không độc, tác dụng kéo dài, hoàn toàn được thải trừ khỏi cơ thể, là thuốc thay thế huyết thanh dùng trong các trường hợp bị sốc, mất máu, chảy máu, chấn thương, mất nước, bỏng. Hiếm trường hợp phản ứng quá mẫn xảy ra. Lúc đầu, tiêm truyền chậm 20 ml/kg/ngày. Để đề phòng sốt phản vệ do dùng dextran có phân tử lượng lớn, ban đầu tiêm tĩnh mạch dextran có phân tử lượng thấp.

Trên thị trường có ba dạng dextran:

- Dextran có phân tử lượng khoảng 1.000 .
- Dextran có phân tử lượng khoảng 40.000 .
- Dextran có phân tử lượng khoảng 70.999 – 150.000.

Các loại dextran thường được dùng là:

- Dextran I khối lượng phân tử khoảng 1000, dùng dưới dạng dung dịch tiêm tĩnh mạch: 3g dextran I và 0,12g natri clorid / 20ml; pH 4 – 6. Dextran là một dextran đơn phân tử có tác dụng kháng thể, dùng để phòng ngừa phản vệ do dextran cao phân tử.

- Dextran 40 là dung dịch dextran có khối lượng phân tử khoảng 40.000. Dextran 40 là loại thuốc thay thế huyết tương.

- Dextran 70 là dung dịch keo ưu trương, chứa 6% dextran trọng lượng phân tử cao, trung bình 70.000. Liên kết polymer chủ yếu là liên kết 1, 6 – glucosid. Dextran 70 là dịch truyền thay thế huyết tương.

- Dextran 75 với khối lượng phân tử trung bình 75.000. Chỉ định và dạng thuốc giống như Dextran 70.

- Dextran 110 với trọng lượng phân tử trung bình 110.000. Chỉ định và dạng thuốc như Dextran 70.

(Dược thư quốc gia Việt Nam lần xuất bản thứ 1, 2002, 359 – 364; Từ điển bách khoa Dược học, 1999, 180 – 181).

Từ dextran có trọng lượng phân tử 10.000, có thể chế dextran sulfat có tác dụng chống đông máu.

Dextran sulfat dùng dưới dạng thuốc mỡ để chữa chứng huyết khối, giãn tĩnh mạch, phù nề.

Dextran sắt là dung dịch keo có thể tiêm được, chứa phức hợp sắt hydroxyd với dextran đã thủy phân một phần, tương ứng với 50mg sắt / 1ml. Dextran sắt được chỉ định trong trường hợp thiếu máu, trong trường hợp người bệnh không dung nạp được các chế phẩm sắt uống hoặc có hội chứng hấp thu qua đường ruột không tốt hoặc đã dùng thuốc uống mà không có kết quả. Tiêm bắp sâu theo liều 1,5mg / kg.

Tại Việt Nam, Đặng Hanh Khôi, Đinh Ngọc Lâm và cộng sự (cs.) đã sản xuất thành công dextran được tạo ra do tác dụng của vi khuẩn *Leuconostoc mesenteroides* với đường mía. Thuốc được dùng với kết quả tốt cho 250 bệnh nhân trừ một trường hợp bị phản ứng. Từ dextran, Đặng Hanh Khôi và cs. đã chế tạo được Dextranfer (Những sáng kiến cải tiến của ngành Y tế, Nhà xuất bản Y học - 1962 và Y học Việt Nam – 1 / 1965, 9-16).

Dextran còn dùng làm thuốc nhỏ mắt để cải thiện thị lực khi đeo kính áp tròng. Dextran sulfat phối hợp với các thuốc chống viêm trong trường hợp bị chấn thương.

Dextran có ứng dụng làm chất mang trong sắc ký lớp mỏng.

Thuốc được dùng thử nghiệm trên súc vật và người. Nguyễn Hữu Mô và cs. (1962) đã dùng dextran điều trị choáng thương nặng trên chó với thời gian từ 1 giờ đến 1 giờ 30 phút. Tỷ lệ thoát choáng là 95 %. Dextran làm tăng huyết áp rõ rệt. Huyết áp tăng nhanh trung bình 15-20 phút và duy trì ở mức độ xấp xỉ trung bình. Sau khi truyền dextran, nhịp tim có thể bị rối loạn nhẹ, song chỉ là tạm thời. Truyền dextran vào tĩnh mạch theo phương pháp nhỏ giọt nhanh (180-200 giọt/phút) đã nâng cao huyết áp nhanh hơn nhỏ giọt chậm. (20 - 60 giọt/phút) trung bình 10 phút, không thấy xảy ra biến cố. Sau khi tiêm truyền dextran, máu chảy tăng rất ít so với dextran nước ngoài và có tính chất tạm thời. Dextran

có xu hướng tăng tính đông máu, do đó tăng cường tính thích ứng phòng ngự của cơ thể trong choáng, xuất huyết, phẫu thuật lớn.

Thuốc đã được dùng với kết quả tốt cho 250 bệnh nhân trừ 1 trường hợp bị phản ứng. Từ dextran, Đặng Hanh Khôi và cs. đã chế tạo được dextranfer.

(Những sáng kiến cải tiến của ngành Y tế, Nhà xuất bản Y học, 1962 và Y học Việt Nam, 1/1965, 9-16; Dược học, 1962,6,11-15).

2.1.2. Lentinan

Lentinan là polymer phân lập được từ nấm hương (*Lentinus edodes* (Berh.) Sing). Về cấu trúc, đó là một glucan với mạch chính có dây nối β- (1 → 3) và với nhóm thế là glucose nối với nhau bằng dây nối 1 → 6, có khối lượng phân tử xấp xỉ 500.000. Tính chất chống u của lentinan đã được chứng minh qua nhiều mô hình thực nghiệm không phải do các tính chất kìm hãm tế bào mà là do hoạt tính kích thích miễn dịch. Chất này kích thích tăng sinh các tế bào lympho nhờ sự có mặt của interleucin -2, kích thích hoạt tính của các đại thực bào và sản sinh interleucin – 1. Theo nhiều tác giả Nhật Bản, những nghiên cứu thực nghiệm trên người, tác dụng chống u của lentinan phối hợp với một thuốc trị u khác tỏ ra mạnh hơn nếu chỉ dùng thuốc trị u dùng đơn lẻ (ung thư dạ dày).

Một số nấm lớn khác thuộc nhóm nấm Đảm (*Basidiomycetes*) chứa các polysaccharid có tính chất tương tự như lentinan. Thông thường đó là glucan (1 → 3) mạch thẳng hoặc ít nhiều có phân nhánh (schizophyllan), đôi khi kết nối với một protein (krestin – là phân đoạn có hoạt tính sinh học phân lập từ nấm đảm *Coriolus versicolor*.

2.2. Polysaccharid từ tảo

Nhiều tảo chứa các polysaccharid có khả năng tạo ra gel do thích nghi với môi trường nước biển, tạo ra độ mềm dẻo nhiều hơn độ cứng rắn.

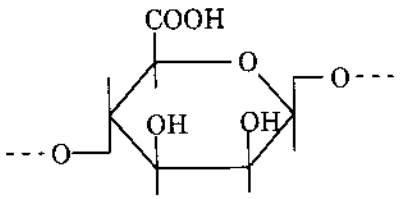
Các tảo hiện đang được sử dụng chứa các polysaccharid đặc trưng : acid alginic và fucan (các tảo nâu), galactan có nhóm sulfat (carraghenan và thạch) của tảo đỏ và polysaccharid phức tạp, thông thường có nhóm sulfat của tảo lục. Ngoài ra, còn có các polysaccharid dự trữ : tinh bột có trong tảo xanh, laminaran (β- (1 → 3) glucan) có trong tảo đỏ, nhiều đường đơn (*D*-manitol, *D*-sorbitol) có trong tảo nâu (Phaeophyceae).

Tảo là nguồn cung cấp nguyên liệu cho lương thực, nông nghiệp. Tảo chứa ít lipid, nhiều nguyên tố vi lượng, nhiều vitamin.

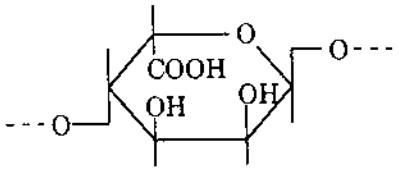
2.2.1. Acid alginic (algin) và alginat

Acid alginic là hỗn hợp các acid polyuronic bao gồm các gốc của các acid *D*-manuronic và acid *L*-gulucoronic chiết xuất từ các tảo nâu (Phaeophyceae). Acid alginic ở dạng kết tinh, sợi, bột vô định hình.

Hai acid này khác nhau ở vị trí nhóm carboxyl so với vòng pyran.



Acid *D*-manuronic



Acid *D*-gulucoronic

Tỉ lệ giữa 2 acid này cao hay thấp lệ thuộc vào nguồn gốc thực vật của nguyên liệu.

Acid alginic không tan trong nước mà trương nở ra, hơi tan hoặc không tan trong alcol, không tan trong các dung môi hữu cơ, tan trong dung dịch hydroxyd kiềm tạo thành các dung dịch nhớt.

Theo Dược điển Pháp X, acid alginic chứa từ 19 đến 25% các gốc carboxyl tính theo dược liệu khô.

2.2.1.1. Chế tạo acid alginic và alginat

Dựa vào tính chất có nhiều anion và không hòa tan trong nước, người ta tạo ra các muối hòa tan của natri, kali hoặc amoni và không hòa tan của calci.

Người ta lấy các tản, cắt nhỏ hoặc nghiền nát, rửa bằng nước ngọt đã được acid hóa nhằm loại bỏ các muối kim loại và các đường hòa tan. Sau đó, ngâm vào nước kiềm nóng (50°, natri carbonat) để hòa tan acid alginic. Sau khi lọc và loại bã, thêm vào dịch lọc dung dịch Ca clorid, được tủa Ca alginat, đem khử màu và khử mùi, tinh chế bằng hòa tan trở lại và kết tủa dưới dạng acid alginic.

Người ta có thể tạo ra acid alginic bằng cách acid hóa dung dịch kiềm.

Theo hai kiểu chế tạo nói trên, người ta thu được nhiều loại muối khác nhau: muối natri, kali, amoni, calci và propylen glycol.

2.2.1.2. Tính chất

Các alginat có cation hóa trị 1 và magnesi alginat hòa tan trong nước tạo ra các dung dịch keo nhớt ở các nồng độ thấp. Nếu bổ sung dần dần các cation có hóa trị 2, người ta được gel không chuyển hóa thuận nghịch do nhiệt.

2.2.1.3. Kiểm nghiệm

Sự nhận dạng acid alginic bằng khả năng tạo ra dung dịch natri alginat nhớt (thêm magnesi clorid) hoặc gel (thêm calci clorid).

Có thể tạo ra phản ứng màu sau khi xử lý bằng α-hydroxynaphtalen trong môi trường acid hydrocloric ở nhiệt độ nóng.

Để kiểm nghiệm, người ta còn định lượng clorid (< 1 phần trăm), các kim loại nặng của cặn do sự nung với sự có mặt của magnesi oxyd và định lượng carboxyl bằng phương pháp acid hóa.

2.2.1.4. Ứng dụng của alginat

- Trong ngành Y – Dược:

Theo nguyên tắc chung, alginat và acid alginic được dùng phối hợp với natri bicarbonat và nhôm hydroxyd, uống vào sau bữa ăn. Tính chất acid của dịch dạ dày giải phóng acid alginic tạo thành gel nhớt và nhiều bọt, hình thành hàng rào nổi lên trên ở dạ dày, làm cho dịch dạ dày không trào ra. Các polysaccharid này có mặt trong nhiều chế phẩm thuốc dùng để điều trị triệu chứng các rối loạn do tính chất acid gây bệnh: sự trào ra ở dạ dày – thực quản, thoát vị hoành, chứng ợ nóng, viêm thực quản.

Muối natri của acid β-poly-*D*-manuronic được kiến nghị làm chất bổ trợ cho điều trị bệnh béo phì.

Calci alginat dùng làm bông cầm máu. Tiếp xúc với máu và các dịch tiết, alginat tạo thành gel dạng sợi làm cho cầm máu nhanh. Miếng bông alginat được dùng phổ biến làm thuốc cầm máu bên ngoài, chảy máu cam, chảy máu răng.

Trong kỹ thuật bào chế, alginat dùng để chế thuốc dạng đậm đặc, chất ổn định nhũ tương, nhũ dịch, chất chống làm rã viên nén. Alginat tham gia vào chế phẩm thuốc có tác dụng kéo dài, thuốc tan trong ruột. Ngành mỹ phẩm có dùng alginat.

- Trong ngành thực phẩm, acid alginic và alginat được dùng nhiều: Na, K, NH_4, Ca, propylen glycol alginat làm chất bổ sung cho thực phẩm, chất tạo thạch, tạo nhũ dịch, chất làm đậm đặc thuốc, chất lưu giữ nước.

- Ngành dệt tiêu thụ rất nhiều alginat.

2.2.2. Thạch (agar –agar, gélose)

Thạch được chiết xuất từ nhiều loại tảo bằng cách xử lý bằng nước sôi. Lọc nóng, cô đặc và làm khô.

2.2.2.1. Nguồn nguyên liệu

Thạch là do nhiều loại tảo thuộc nhiều chi cung cấp: *Gelidium, Euchema, Gracilaria,...*

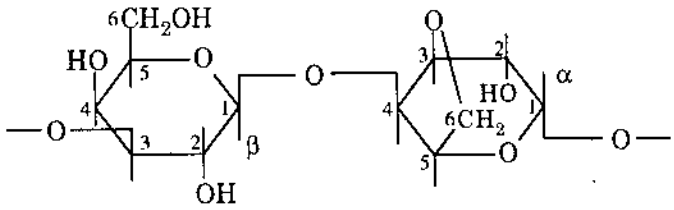
Tại Việt Nam, nguồn cung cấp chính là Rau câu chỉ vàng (*Gracilaria verrucosa* (Huds) Papeng).

2.2.2.2. Chế biến thạch

Để chế biến thạch, đầu tiên là chế biến sơ bộ bao gồm những công việc: loại tạp chất (cây que, đất cát), phơi khô. Những công việc tiếp theo là chiết xuất bằng nước sôi, lọc, đôi khi phải tẩy màu bằng than, lọc, làm khô.

2.2.2.3. Thành phần hóa học

Thạch gồm 20% nước, 4 - 5% chất vô cơ, lipid (vết), 4 - 5% hợp chất nitơ, polysaccharid gồm agarose và agaropectin. Agarose là polysaccharid gồm nhiều đơn vị agarobiose. Agarobiose là disaccharid của β-*D*-galactose và 3,6-anhydro-α-*L*-galactose (qua thủy phân acid)



Agarobiose (*D*-galactapyranosyl) 1-4 (3-6-anhydro *L*-galactose)

Nếu thủy phân bằng enzym, người ta được neo-agarobiose (cấu trúc hơi khác).

Agaropectin chứa galactose, anhydrogalactose và các gốc của acid uronic và ester sulfuric.

2.2.2.4. Kiểm nghiệm

Thạch trương nở nhẹ ở nước lạnh và nở nhiều ở nước nóng. Với tỉ lệ 1,5g / 100ml nước, thạch nếu để nguội sẽ cho chất lượng hoá thạch với trạng thái đặc.

Nếu đem tán nhỏ, thạch cho màu lơ đen sau chuyển sang màu tím với iod.

Tro của thạch còn có dấu vết của tảo silic.

2.2.2.5. Độ tinh khiết

- Gelatin: Nếu thêm 1 ml dung tịch tanin 2% vào 10 ml dung dịch 0,2% thạch đun nóng thì không được tạo tủa.

- Hàm lượng nước: > 20%.

- Hàm lượng tro: > 4%.

2.2.2.6. Công dụng

Thạch dùng làm thuốc bao dạ dày, ruột và thuốc nhuận tràng nhẹ (4 – 16g / ngày). Thạch dùng làm môi trường nuôi cấy vi trùng, làm khuôn răng. Thạch còn ứng dụng trong công nghiệp thực phẩm (bánh, kẹo), mỹ phẩm, ảnh.

2.3. Polysaccharid từ thực vật bậc cao và động vật

2.3.1. Polysaccharid đồng thể

2.3.1.1. Fructan

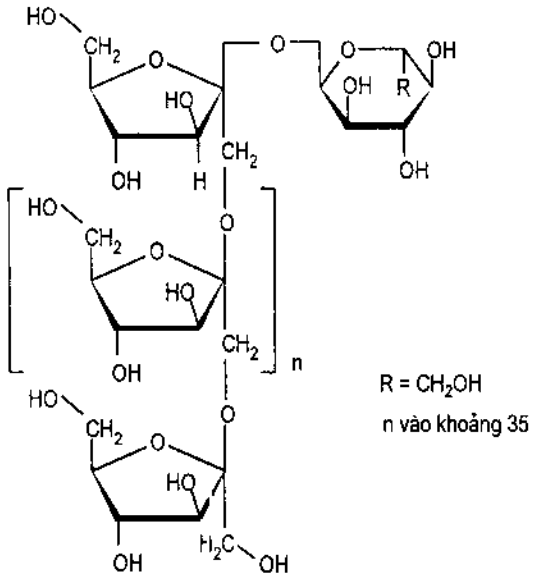
2.3.1.1.1. Tính chất và thành phần hoá học

Fructan là các polymer của fructose nối với nhau bởi liên kết β (2 → 1) vào phân tử glucose tận cùng. Fructan được coi là các đồng đẳng bậc cao của saccharose.

Fructan thường gặp ở cây cỏ, tập trung ở vào khoảng một chục họ: Inulin của các họ Cúc (Asteraceae), họ Vòi voi (Boraginaceae), họ Hoa chuông (Campanulaceae); phlein và fructan có mạch nhánh ở các cây một lá mầm, đặc biệt ở các họ Lúa (Poaceae) và họ Loa kèn trắng (Liliaceae).

Inulin (Dahlin, alantin)

Inulin là chất dự trữ trong cây cỏ. Inulin là bột vô định hình, màu trắng, không mùi. Khối lượng phân tử vào khoảng 5000. Inulin dễ hút ẩm, dễ tan trong nước nóng, hơi tan trong nước lạnh và các dung môi hữu cơ. Nếu thủy phân acid, cho *D*-fructose và *D*-glucose. Số lượng gốc fructose trong inulin là vào khoảng 35.



Inulin

Dung dịch inulin 10% có pH 4,5 đến 7.

Nếu ở dạng thuốc tiêm, inulin có thể kết tủa qua qúa trình bảo quản. Các tủa này có thể tan đi nếu đun nóng không quá 15 phút. Dung dịch tiêm có thể để nguội ở nhiệt độ phòng trước khi tiêm.

Inulin có thể tiêm theo đường tĩnh mạch mà không bị chuyển hóa. Nếu dùng ở dạng uống, inulin đi thẳng đến ruột kết mà không bị giáng hóa.

Inulin còn được dùng để làm thuốc thăm dò chức năng thận.

Inulin dùng để chế thuốc chẩn đoán đo tốc độ lọc qua tiểu cầu. Một số chế phẩm có inulin:

- Thuốc tiêm inulin (BP 1998).

- Thuốc tiêm trong dung dịch NaCl (USP 23).

2.3.1.1.2. Công dụng

Inulin dùng để chế thuốc chẩn đoán đo tốc độ lọc qua tiểu cầu.

2.3.1.1.3. Chế phẩm

- Thuốc tiêm inulin (Dược điển Anh 1998).

- Thuốc tiêm trong dung dịch NaCl (Dược điển Mỹ 23).

2.3.1.1.4. Dược liệu chứa inulin

1) Ngưu bàng (*Arctium lappa* L.)

Ngưu bàng thuộc nhóm phát tán phong nhiệt. Rễ có thể chứa 50% inulin.

2) Cây *Cichorium intybus* L.

Rễ chứa nhiều inulin (50 – 60%). Rễ có vị đắng do có các sesquiterpen lacton.

Rễ được dùng làm thuốc thông mật và lợi mật, thuốc giúp cho các chức năng thải trừ qua thận và hệ tiêu hóa, thuốc bổ trợ trong chế độ ăn giảm béo, thuốc điều trị triệu chứng các rối loạn tiêu hóa (đầy bụng, khó tiêu).

3) Bồ công anh thấp (*Taraxacum officinale* Weber)

Rễ chứa nhiều fructose và inulin. Hàm lượng fructose cao nhất vào mùa xuân và hàm lượng inulin đạt 40% vào mùa thu. Có tài liệu ghi rễ chứa vào khoảng 25% inulin. Toàn cây có vị đắng do có sesquiterpen lacton (germacranolid và eudesmanolid). Bồ công anh thấp còn có các alcol triterpenic 5 vòng (taraxasterol, pseudotaraxasterol và các dẫn chất có nhóm OH) và các sterol.

Lá và rễ bồ công anh được dùng làm thuốc thông mật, lợi mật và thuốc thải trừ nước qua thận.

4) Rễ cây thổ mộc hương (*Inula helenium* L.) chứa 14% inulin (có tài liệu ghi là 40%) (D. A. Muraviôva, 1978) .

5) Rễ cây mộc hương (*Saussurea lappa* Clarke) chứa 18% inulin, mộc hương thuộc nhóm "Hành khí giải uất".

6) Rễ cây thược dược (*Dahlia variabilis* Desf.) là nguyên liệu cho inulin.

7) Rễ cây hướng dương củ (*Helianthus tuberosus* L.) cũng là nguyên liệu cho inulin.

2.3.1.2. Tinh bột

2.3.1.2.1. Tính chất và thành phần hoá học của nguyên liệu cho tinh bột

Tinh bột là chất dự trữ chủ yếu của cây cỏ. Tinh bột là nguồn cung cấp năng lượng cần thiết cho người và nhiều động vật. Năm 1987, sản xuất thế giới là 22,5 triệu tấn, ứng dụng trong nhiều ngành. Ngành dược và hóa học chỉ khai thác 63.000 tấn. Tinh bột có trong tất cả các bộ phận của cây cỏ, thường tập trung ở:

- Hạt ngũ cốc (lúa, ngô, sắn,...), các cây họ Đậu (đỗ tương, đỗ xanh,...).
- Quả (mít, chuối,...).
- Bộ phận dưới mặt đất (khoai tây, sắn, dong riềng,...).
- Thân cây (báng – *Arenga pinnata* Merr.).

Tinh bột có trong các bộ phận của cây (rễ, thân rễ, quả, hạt, thân) với hàm lượng từ 2 – 70%. Lá chứa ít tinh bột (1 – 2%).

Hàm lượng tinh bột trong nguyên liệu như sau:

Gạo	75%
Ngô	60 – 69%
Khoai lang	17 – 19%
Khoai tây	17 – 18%
Sắn	30 – 32%
Sắn dây	20%.

Trong quá trình sinh trưởng, dưới tác động của enzym tinh bột được chuyển hóa thành đường đơn hòa tan và được di chuyển tới nhiều bộ phận khác nhau của cây.

Tinh bột là bột trắng (trừ bột ngô có màu vàng nhạt), rất mịn, không tan trong nước.

Tinh bột có nhiều hình dạng khác nhau: hình cầu, hình trứng, hình nhiều góc,...

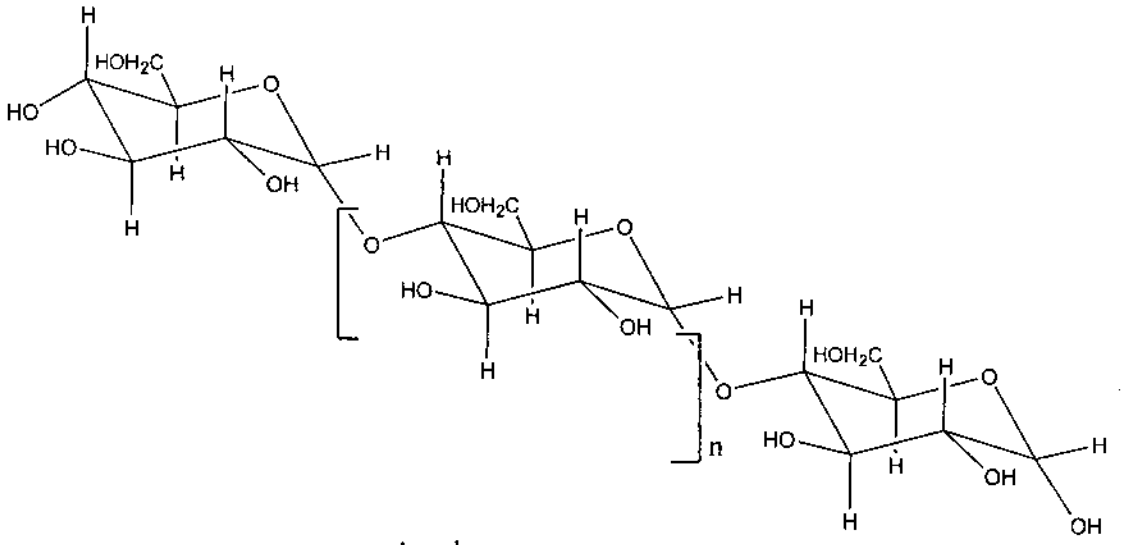
Kích thước có thể khác nhau từ 2 – 45 μm, có nhiều lớp đồng tâm (ngô) hoặc lệch tâm (khoai tây) xung quanh một điểm gọi là rốn hạt, soi dưới kính hiển vi phân cực, hạt tinh bột có hình chữ thập đen.

Trong nước lạnh, hình dạng tinh bột không thay đổi. Khi nhiệt độ được nâng lên thì tinh bột thay đổi trạng thái qua nhiều giai đoạn: Giai đoạn đầu ngậm

một ít nước. Nếu làm mất nước, tinh bột trở lại trạng thái ban đầu. Nâng nhiệt độ tới 60 – 85° thì hạt tinh bột nở ra nhanh chóng, tinh bột ngậm nhiều nước, hạt tinh bột không trở lại trạng thái ban đầu. Nếu nâng nhiệt độ cao hơn nữa, thì sẽ thành hồ tinh bột.

Tinh bột là polymer gần như đồng thể gồm *D*-glucose 98, 99%, lipid 0,1 – 0,7% (tùy theo nguồn gốc), protein 0,05 – 0,5%, kim loại (hàm lượng trong tro là 0,05 – 0,3%). Phân đoạn glucid gồm 2 polymer: amylose (mạch thẳng) và amylopectin (có mạch nhánh). Hàm lượng amylose và amylopectin có khác nhau tùy theo nguồn gốc thực vật: amylose: 16 – 17% với gạo, khoai tây; 23 – 24% với lúa mạch (*Hordeum vulgare*); 25 – 28% với mì; 35% với đậu và trong trường hợp đặc biệt 65 – 70% với ngô.

Amylose gồm hàng nghìn đơn vị α-*D*-glucose nối với nhau bằng dây nối (1 → 4).



Amylose

Amylopectin gồm 5.000 – 50.000 đơn vị glucose và phân nhánh nhiều. Các đơn vị α-*D*-glucose được nói với nhau theo dây nối (1 → 4) và chỗ phân nhánh theo dây nối (1 → 6). Trọng lượng phân tử lớn, có thể lên tới 10^7 đến 10^8.

Amylopectin ít tan trong nước hơn amylose do có trọng lượng phân tử cao.

Thành phần hóa học của nguyên liệu cho tinh bột

Thành phần chính là tinh bột. Lipid (triglycerid, lecithin, sterid) có với hàm lượng 2 – 5%. Hàm lượng protein là 8% (gạo) đến 13% (lúa mì). Hàm lượng một số acid amin là thấp. Hiện nay, chúng ta có tạo được một số chủng loại lúa giàu protein. Hàm lượng các nguyên tố kim loại thấp, nhất là ở ngô. Phospho và sắt có trong gạo và lúa mì. Về giá trị sinh học tăng dần, người ta có lúa mì, lúa

mạch, *Avena sativa*, gạo. Tất cả ngũ cốc đều thiếu vitamin A. Qua quá trình chế biến, người ta dễ loại bỏ các vitamin nhóm B.

2.3.1.2.2. Kiểm tra chất lượng

Việc kiểm tra chất lượng tinh bột được thực hiện bằng các phản ứng định tính (xác định các đặc điểm vi học, sự tạo thành hồ, phản ứng tạo màu với iod). Sự có mặt các tạp chất lạ, kim loại nặng, arsenic, giới hạn acid, mất khối lượng do làm khô (Dược điển Việt Nam II, tập 3, 1994).

2.3.1.2.3. Chế tạo tinh bột

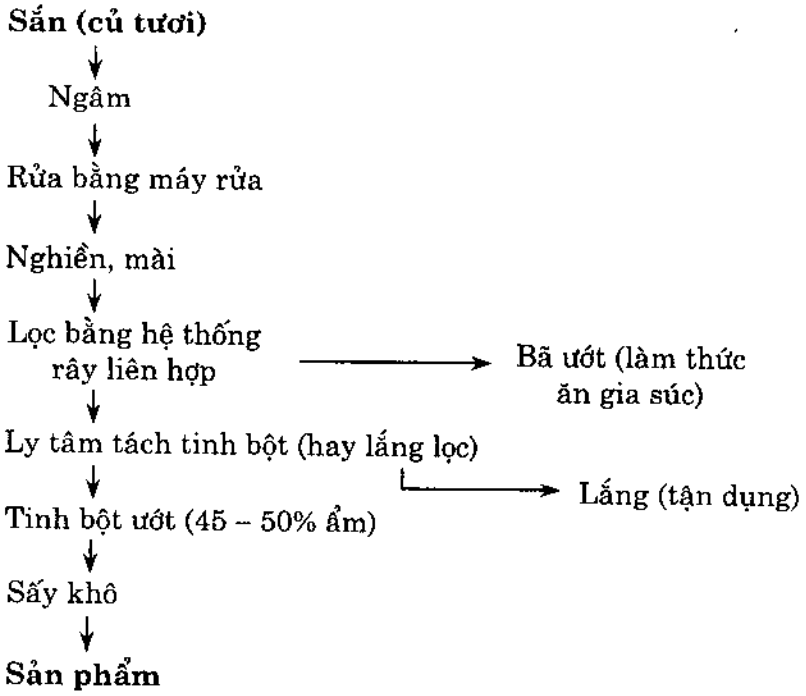
Cần phân biệt bột và tinh bột. Bột gồm tinh bột và nhiều thành phần khác : protein, lipid, muối khoáng,... Tinh bột gồm polysaccharid (amylose + amylopectin). Việc chế tạo tinh bột gồm các giai đoạn : nghiền nhỏ nguyên liệu, nhào nguyên liệu đã được chia nhỏ với nước, lên men, rửa nước, phơi khô.

Phương pháp sản xuất tinh bột sắn. Có thể dùng nguyên liệu là củ sắn tươi hoặc sắn lát khô.

Sơ đồ quy trình sản xuất nhỏ (trình độ cơ giới hóa thấp).

Sắn (củ tươi) → Rửa (máy) → Mài xát → Rây loại bã → Lắng tinh bột → Phơi hoặc sấy → Tinh bột khô

Sơ đồ sản xuất ở quy mô cơ giới hoá



2.3.1.2.4. Công dụng

- Tinh bột là nguồn lương thực chính của con người.

- Trong ngành Dược, tinh bột làm tá dược thuốc viên, chế glycerin tinh bột, bột nhão.

Tinh bột là nguyên liệu để chế glucose (glucose dược dụng, glucose công nghiệp, glucose thực phẩm), dextrin, cồn, acid citric, acid glutamic.

Tinh bột có nhiều ứng dụng trong ngành khác : làm giấy (lĩnh vực này dùng gần một nửa khối lượng tinh bột không dùng làm lương thực), hồ vải, xử lý quặng,...

Tại Việt Nam, tinh bột sắn được dùng nhiều tại các xí nghiệp dược phẩm làm tá dược thuốc viên. Qua kiểm tra 10 mẫu tinh bột lấy ở một số xí nghiệp dược phẩm ở Hà Nội và ở miền Trung, Phan Tuý nhận thấy cả 10 mẫu này không đạt tiêu chí về hàm lượng sắt và lưu huỳnh IV oxyd so với Dược điển Mỹ XXIV. Tác giả này có đề xuất phương pháp tinh chế tinh bột sắn có dùng phụ gia loại sắt. Tác giả ứng dụng với quy mô thí nghiệm 5 tạ/ mẻ tại Xí nghiệp Dược phẩm Trung ương 5 (Đà Nẵng) và Công ty trách nhiệm hữu hạn Vân Anh (Hà Tây), tinh bột sắn tinh chế đều đạt theo yêu cầu của Dược điển Mỹ XXIV. Tác giả còn xây dựng quy trình chế tạo tinh bột biến tính làm tá dược dính. Các thông số kỹ thuật thu được từ thuỷ phân tinh bột sắn tương đương các thông số kỹ thuật của Lycatab-DSH nhập từ Pháp.

(Dược học 2003, 43 (3), 20-32, Dược học 2003, 43 (8), 20-22)

2.3.1.2.5. Sự thủy phân của tinh bột

Ở nhiệt độ thường, tinh bột không hòa tan trong nước, rượu, eter, carbon disulfid, cloroform và benzen. Tinh bột hút nước và trương nở. Khi đun nóng lên nhiệt độ nhất định, hạt tinh bột sẽ bị phá vỡ, thành dạng hồ. Nhiệt độ này là nhiệt độ hồ hóa. Nhiệt độ hồ hóa của khoai tây là 55 - 65°C, bột mì 60 – 80°C, ngô 75 - 75°C.

Tinh bột biến đổi tính chất (biến tính) do tác động của acid, kiềm, muối,... và bị thủy phân do tác động của acid, enzym và tạo ra các sản phẩm tùy theo mức độ thủy phân (xem bảng ở trang sau).

Các enzym thủy phân tinh bột chính là α-amylase và β-amylase. α - amylase có nhiều trong hạt ngũ cốc. α-Amylase cắt dây nối (1 → 4) của amylose và cho sản phẩm cuối cùng là maltose (90%). α-Amylase còn cắt được dextrin do enzym β để lại để tạo ra dextrin phân tử bé hơn. Như vậy, α-amylase tác động đến tinh bột để cho maltose và dextrin phân tử bé hơn.

Các sản phẩm thủy phân	Trọng lượng phân tử	Hiện màu với iod
Amylodextrin	10.000	Xanh – tím
Erythrodextrin	6.000	Đỏ nâu
Achrodextrin	3.200	Không đổi màu
Tetrasaccharid	660	-
Trisaccharid	504	-
Maltose	342	-
Glucose	180	-

β-Amylase có trong khoai lang, đậu tương,... β-amylase cắt những dây nối (1 → 4) của amylose để cho maltose (100%). Với amylopectin, β-amylase cắt được dây nối (1 → 4), khi gặp mạch nhánh thì dừng lại.

Như vậy, sản phẩm thu được là maltose 50 – 60% và dextrin.

Quá trình dextrin hóa và đường hóa được ứng dụng trong kỹ nghệ sản xuất hồ, rượu.

Một số enzym khác (γ-amylase hay glucoamylase, dextrinase...) có tác dụng thủy phân tinh bột và thành phần chuyển hóa của tinh bột.

2.3.1.3. Cellulose

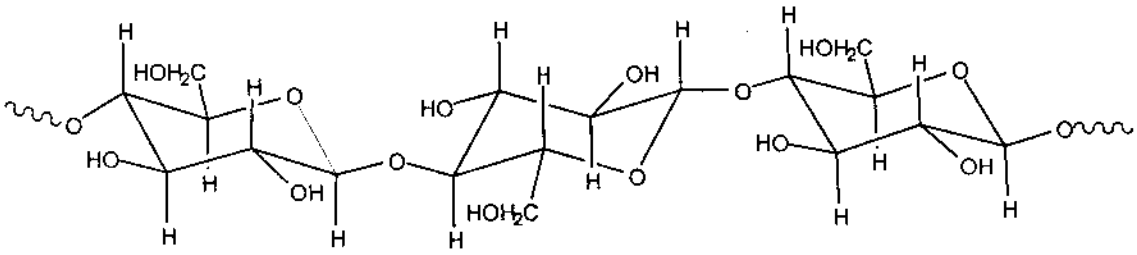
Cellulose là polymer sinh học rất phổ biến. Cellulose ít gặp ở sinh vật nhân sơ, có ở tản thực vật (thallophyta) có diệp lục hoặc không có diệp lục, ở thực vật thân rễ (cormophyta) trong các vách tế bào.

Cellulose có đa phần ở các cây có sợi (cây lanh, cây gai, đay,...), ở các lông bao quanh hạt (bông). Có loài vi khuẩn (*Acetobacter xylinum*) là nguồn cung cấp cellulose. Trên thực tế, gỗ là nguồn chính cung cấp cellulose (40 – 50%). Cellulose đang được khai thác là do sự loại lignin từ gỗ trong môi trường acid hoặc kiềm (trong công nghiệp giấy), từ các lông ngắn của bông (công nghiệp hóa học). Có thể khai thác các sản phẩm giáng hóa của rơm. Còn những phương pháp khác cho phép thu hồi cellulose và nhiều thành phần khác của gỗ.

2.3.1.3.1. Cấu trúc

Cellulose là một polymer mạch thẳng cấu tạo bởi nhiều đơn vị *D*-glucose liên kết với nhau bằng β (1 → 4). Các phân tử *D*-glucopyranose được biểu diễn dưới dạng ghế.

Cellulose có phân tử lượng là 250.000 – 1.000.000 và có thể nhiều hơn.



Cellulose

2.3.1.3.2. Tính chất

Cellulose là polymer có nhiều nhóm OH nên dễ dàng bị ester hóa và ether hóa. Sự ester hóa tạo ra nhiều chế phẩm (cellulose nitrat, acetat) và nhiều công dụng khác (chế tạo chất nổ, chất dẻo, phim, giấy đầu lọc thuốc lá, màng thẩm tích, vi nang, vi hạt làm cho tác dụng kéo dài).

Sự ether hóa tao ra các polymer tan trong nước với nhiều ứng dụng. Sự hòa tan trong nước của các dẫn chất cellulose phụ thuộc với mức độ tạo ra các nhóm thế. Đa phần tan trong nước tạo thành các dung dịch nhớt, do đó có nhiều ứng dụng trong ngành dược, mỹ phẩm (làm chất ổn định, chất kết dính, chất làm trơn).

Cellulose hòa tan trong dung dịch amoniac của đồng hydroxyd (thuốc thử Schweitzer) và trong dung dịch Ca sulfocyanid đậm đặc khi đun nóng,...

Cellulose không phải là chất dễ tan trong cơ thể, mà chỉ được tiêu hóa ở ruột các động vật nhai lại do enzym cellulase có ở các vi khuẩn sống ở dạ dày các loài này.

2.3.1.3.3. Ứng dụng

Cellulose là nguyên liệu chế tạo nhiều dẫn chất bán tổng hợp dùng trong y dược và nhiều ngành khác. Các dạng dùng là cellulose vi tinh thể và bột cellulose. Oxycellulose là thuốc cầm máu tại chỗ.

Cellulose tetranitrat (collodion) làm màng bọc cho những vết thương nhỏ hoặc để cầm máu.

Carboxymethylcellulose (carmelose) dùng làm tá dược viên nén, làm chất nhũ dịch. Carboxymethylcellulose còn có ứng dụng trong nhiều ngành khác: mực in, dệt, chất ổn định thực phẩm.

Carboxymethylcellulose được dùng dưới nhiều dạng: calcium carboxymethyl-cellulose, natri carboxymethylcellulose.

Ethylcellulose là tá dược dính viên nén, chất bao viên, bao hạt và vi nang.

Hydroxyethylcellulose làm chất tăng độ đậm đặc của thuốc, chất ổn định thuốc, chất bao viên, chất bôi trơn thuốc tra mắt, thuốc chữa khô miệng.

Methylcellulose làm thuốc nhuận tràng (loại có độ nhớt trung bình và cao) dùng với liều 6g / ngày (chia làm nhiều lần), làm thuốc nhỏ mắt dưới dạng dung dịch 1%, làm chất nhũ dịch và chất ổn định trong công nghiệp thực phẩm.

Đáng lưu ý là methylcellulose tương kỵ với một số hợp chất (clorocresol, hydroxybenzoat).

Hydroxyethylmethylcellulose làm tá dược trong chế phẩm thuốc.

Cellulose acetat phtalat (celacephat) là cellulose trong đó vài nhóm OH đã được acetyl hóa (21,5 đến 26%) và nhóm OH được ester hóa bởi hydrophtalosyl-hydro (30 đến 36%). Cellulose acetat phtalat không chịu tác động trong môi trường acid của dạ dày mà chỉ bị mềm đi và nở ra trong chất lỏng ở ruột. Cellulose acetat phtalat được dùng để chế viên bao, nang tan ở ruột. Cellulose acetat phtalat dễ bị thấm với vài chất có thể ion hóa amoni hydroclorid và kali iodid.

Hydroxypropylcellulose

Chất này 1 phần có nhóm thế 2 – hydroxypropyl ether của cellulose. Dùng làm phim bao viên nén, tá dược viên nén, làm vi nang. Còn làm chất nhũ hóa và chất ổn định trong công nghiệp thực phẩm.

Hydroxypropylmethylcellulose phtalat (Hypromelose) có các tính chất tương tự như methylcellulose. Dùng để chế viên nén bao phim làm chất dính, làm kéo dài tác dụng thuốc, làm chất nhũ dịch, làm ổn định các gel tác dụng tại chỗ và thuốc mỡ.

Methylhydroxypropylcellulose phtalat làm chất bao viên nén và hạt trong các chế phẩm hạt giải phóng dần hoạt chất, che lấp vị khó chịu của thuốc. Trong công nghiệp thực phẩm, đó là chất nhũ dịch và ổn định thuốc.

Methylhydroxypropylcellulose ứng dụng rộng rãi để chế các thuốc đau mắt dung dịch. Chất này được ưa chuộng hơn là methylcellulose do làm cho chế phẩm được trong suốt hơn và thường có ít sợi hơn. Chất này kéo dài tác dụng chế phẩm thuốc đau mắt.

2.3.1.3.4. Các nguyên liệu cho cellulose

1- Bông: Có nhiều loài:

- Bông luồi (*Gossypium herbaceum* L.)
- Bông cỏ (*) (*Gossypium arboreum* L.)

- Bông hải đảo (*Gossypium barbadense* L.)

Bộ phận dùng:

Bông bao quanh hạt.

Hạt chứa 15% dầu béo, khô dầu, gossypol.

Sợi bông chứa 95 ± 4% cellulose, protein 1,6 ± 0,3%, sáp 0,9 ± 0,3%, pectin.

Có hai loại bông:

- Bông xơ là bông tự nhiên không hút nước do có tầng cutin bằng sáp, dùng làm êm khi băng bó.

- Bông hút.

Công dụng:

1. Bông hút là nguyên liệu để chế nhiều dẫn chất bán tổng hợp: methylcellulose, carboxymethylcellulose, ethyl cellulose, oxycellulose. Ba chất đầu dùng làm chất kết dính, chất nhũ hóa.

Hạt chứa 15% dầu béo.

Dầu bông chưa acid oleic 40 – 50%, acid linoleic 25 – 30% và các acid béo no 20 – 30%, dùng trong thực phẩm và trong công nghệ xà phòng.

Khô dầu chứa nhiều protein 50% trong đó có đủ acid amin cần thiết được làm thức ăn cho gia súc.

Gossipol có độc tính với tế bào, có tác dụng làm giảm tinh trùng, giảm testosteron, ức chế khối u.

2- Cây gòn (*Ceiba pentandra* Gaertn.) cho sợi bông ở vỏ quả trong, dùng làm bông nệm, mền chăn, dụng cụ cứu nạn (phao) hoặc pha với lông để dệt vải.

3- Cây gạo (*Gossampinus malabarica* Merr. = *Bombax malabaricum* DC.). Sợi quả gạo làm bông nệm, gối.

Năm 2002, Nguyễn Hải Nam và cs. chứng minh dịch chiết cây gòn trong methanol có hoạt tính chống tạo mạch tốt ở liều 100 pg/ml, có tính kháng khuẩn và chống oxy hóa (Tạp chí Dược liệu 2002, tập 7, số 6, 186 – 189).

4- Cây lanh (*Linum usitatissimum* L.). Cây nhập nội. Lấy sợi, đun ngâm lên men, rồi nghiền, tẩy trắng. Sau khi chế biến, sợi dùng để dệt vải và chế tạo chỉ khâu tiệt trùng.

Hạt lanh cho chất nhày và dầu béo.

5- Gai cho sợi : Gai có nhiều thứ, có thứ dùng để sản xuất giấy đặc biệt (giấy thuốc lá), panô nội thất, rơm rải chuồng ngựa. Có thứ cho chất gây nghiện.

6- Gai (*Boehmeria nivea* (L.) Gaudich.) cho sợi dùng để dệt vải (lưới đánh cá, dây cua – roa, vải lốp xe đạp, ôtô). Rễ chữa bệnh ứ huyết, làm an thai, đau bụng khi có thai.

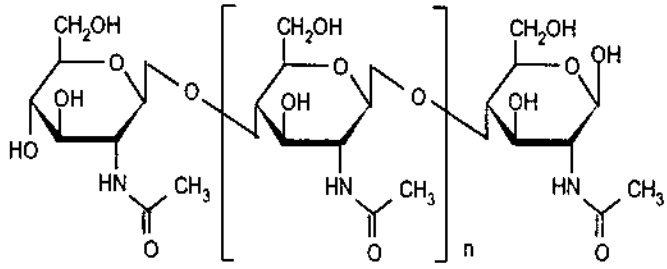
7- Đay quả tròn (*Corchorus capsularis* L.), đay quả dài (*Corchorus olitorius* L.). Vỏ thân cho sợi để dệt.

8- Sợi dứa dại (*Agave*) cho sợi làm dây thừng chịu mặn, buộc tầu, thuyền.

2.3.1.4. Chitin và chitosan

2.3.1.4.1. Cấu trúc và tính chất

Chitin là polysaccharid được coi là dẫn chất của cellulose trong đó nhóm hydroxy ở vị trí C_2 được thay thế bằng nhóm acetylamino ($-HNCOCH_3$). Đó là poly (N-acetyl-2-amino-2-desoxy-β-*D*-glucopyranose). Các hợp chất này nối với nhau bằng các liên kết β-(1→ 4)-glucosid.



Chitin

Với ký hiệu ghi phần đầu của mũi tên chỉ nhóm $-CH_2OH$ và đuôi mũi tên chỉ nhóm – $NHCOCH_3$, chitin có thể có 3 dạng cấu hình.

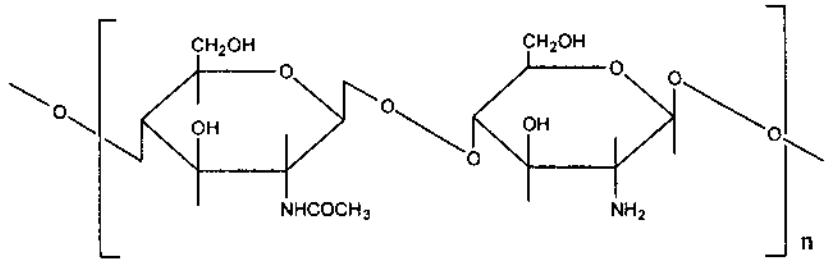
α-chitin β-chitin γ-chitin

α-Chitin có trong hầu hết trong vỏ động vật giáp xác như tôm, cua, xác ve. β- và γ-chitin có trong một số ít động vật như mực ống, mực nang.

Lưu Văn Chính (2001) đã chứng minh chitin lấy từ vỏ tôm thu thập ở Việt Nam có cấu hình α.

Chitosan là chitin đã được desacetyl hoá. Chitosan có nhiều công dụng trong y tế và các ngành khác.

Trong thực tế, việc desacetyl hóa thường xảy ra không hoàn toàn, nên trong phân tử chitosan vẫn còn chứa nhóm acetamid, do đó chitosan có nhiều mức độ desacetyl hóa khác nhau. Trên thị trường nhiều chitosan có độ desacetyl hóa 80 – 85%. Vì vậy, một số tác giả biểu diễn công thức của chitosan như sau:



Chitosan

Chitin có trong nấm, nấm men, các động vật không xương sống ở biển và các động vật chân đốt.

Nguyên liệu có nhiều chitin là vỏ tôm. Vỏ tôm chiếm 40 – 50% trọng lượng tôm. Mỗi năm, thế giới đánh bắt 6 triệu tấn giáp xác. Hàng năm Việt Nam có 30.000 tấn vỏ tôm phế thải từ các nhà máy tôm đông lạnh.

Chitin ở thể rắn vô định hình, không tan trong nước, acid loãng, kiềm loãng và đặc, alcol và các dung môi hữu cơ khác, tan trong HCl, H_2SO_4 đặc, H_3PO_4 78 – 97%, acid acetic khan. Có những chênh lệch về độ tan, trọng lượng phân tử, chỉ số acetyl, độ quay cực là tùy theo nguồn gốc và phương pháp chế biến.

Trọng lượng phân tử của chitin thường lớn hơn 1.000.000, của chế phẩm chitosan là 10.000 – 12.000.

2.3.1.4.2. Chiết xuất chitin

Theo Lưu Văn Chính (2001), cách tiến hành như sau:

Lấy 100 g vỏ tôm đã sấy khô, nghiền nhỏ, vừa khuấy vừa thêm từ từ vào dung dịch HCl 10% (lấy dư). Để yên 24 h, sau đó rửa nhiều lần bằng nước trung tính đã loại bỏ hết nước khoáng. Ngâm tiếp vỏ tôm sau khi đã loại hết nước khoáng trong lượng dư dung dịch NaOH 10% qua đêm cho đến khi vỏ tôm trở nên trong. Lúc này toàn bộ protein đều bị phân hủy. Lọc, rửa nhiều lần bằng nước trung tính, sấy khô ở 50^0 trong 2 giờ. Thu được chitin thô màu trắng ngà, phớt hồng.

Loại bỏ chất màu trong chitin bằng cách nhúng ngập chitin trong dung dịch H_2O_2 1% qua đêm cho đến khi toàn bộ màu phớt hồng biến mất. Lọc, rửa nhiều

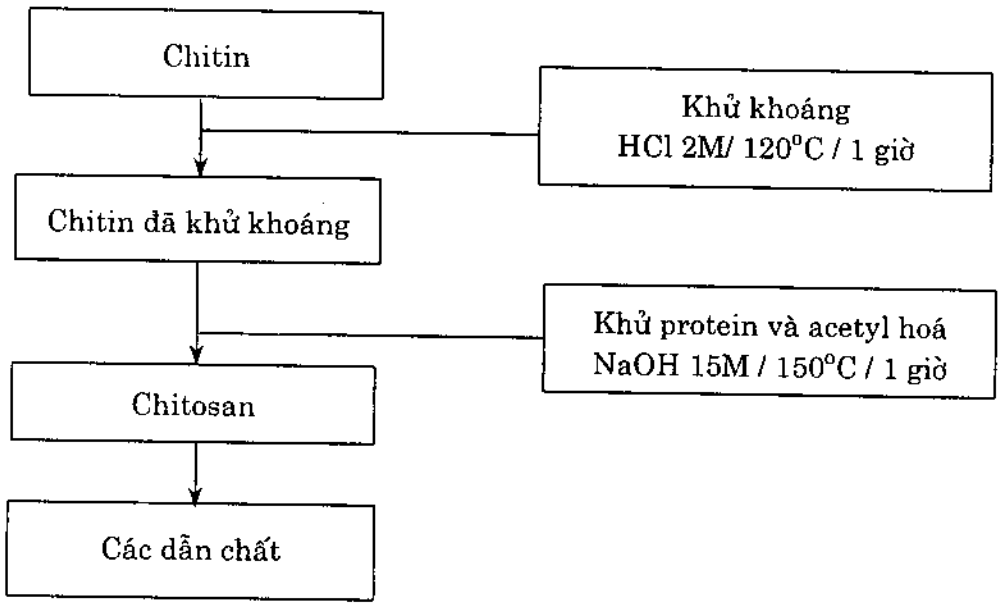
lần bằng nước, sau đó bằng alcol và aceton. Sấy khô đến khi trọng lượng không đổi. Thu được chitin sạch, màu trắng ngà.

2.3.1.4.3. Chế tạo chitosan

Cũng theo Lưu Văn Chính (2001) cách tiến hành như sau :

Cho 10 g chitin sạch vào bình cầu 500ml. Đổ vào bình cầu 100ml dung dịch NaOH 70%. Đun nóng hỗn hợp nói trên ở 145° trong khoảng 1giờ cho đến khi tan hoàn toàn trong dung dịch. Để nguội, lọc, rửa nhiều lần bằng nước đến trung tính. Thu được chitosan có màu trắng hoe phớt vàng. Tẩy sản phẩm thu được bằng dung dịch H_2O_2 1,5% trong 3 giờ. Rửa, lọc nhiều lần bằng nước nhiều lần, sấy dưới áp lực giảm đến trọng lượng không đổi. Sản phẩm thu được không tan trong nước, nhưng lại tan trong dung dịch CH_3COOH.

Có thể tạo chitosan trực tiếp từ vỏ tôm (không qua giai đoạn điều chế chitin (Nguyễn Hữu Đức, 1999) như sau:



2.3.1.4.4. Ứng dụng của chitin và chitosan

Chitin

Chitin dùng để chế chitin acetat và chitin sulfat. Chitin acetat tan trong acid acetic, dung dịch resorcin 50%, trong acid hydrocloric.

Chitin sulfat có tính chất chống đông.

Chitin *n*-butyrat được dùng để chế tạo thủy tinh thể.

Chitin dùng để chế tạo glucosamin (1-amino-2-deoxy-β-*D*-glucopyranose). Glucosamin sulfat và hydroclorid dùng để điều trị các rối loạn về thấp khớp bao gồm viêm sưng khớp.

Chitosan

Chitosan là nguyên liệu phong phú, không độc, có thể sinh thủy phân, có tính kháng khuẩn, kháng nấm, dễ tạo ra nhiều dẫn chất.

Ứng dụng trong y dược:

+ Làm thuốc chữa bỏng: theo Vũ Trọng Tiến (2001), kem chitosan 2% dùng cho 62 bệnh nhân bỏng biểu bì và bỏng trung bình (nông) làm kích thích tái tạo mô và biểu mô, làm chóng liền vết thương bỏng. Số ngày điều trị khỏi trung bình là 9,1 ngày đối với biểu bì và 14 ngày đối với bỏng nông.

Với vết thương bỏng nông, sâu, thuốc này làm sạch vết thương, ức chế một số vi khuẩn trong đó có *Staphylococcus aureus* và *Pseudomonas aeruginosa,* kích thích tái tạo ô hạt, tạo điều kiện tiến hành ghép da sớm ở ngày 14,5 với vùng bỏng sâu đã được cắt hoại tử và ngày 18,5 đối với vùng bỏng sâu để tự rụng hoại tử.

Cũng theo tác giả này, màng chitosan điều trị vùng lấy da tự do, mảng mỏng làm giảm chảy máu, ức chế vi khuẩn và kích thích biểu mô nhanh. Sau 7 ngày đắp màng chitosan, vùng lấy da tự do đã biểu mô hóa đủ các lớp mầm đến lớp sừng.

+ Làm thuốc trị viêm loét dạ dày, tá tràng.

+ Làm thuốc giảm mỡ trong cơ thể. Chitosan kết hợp với mỡ thành một khối mà cơ thể không hấp thu được, do đó mà được thải ra ngoài. Uống 2 – 4 nang (loại 250mg) cùng với nước 15 – 30 phút trước 2 bữa ăn chính (Hoàng Tích Huyền, 2003)

+ Làm thuốc cầm máu. Các bông gạc làm từ chitosan dùng trong ngoại khoa và bảo vệ vết thương.

+ Làm giảm cholesterol. Tác dụng này đã được chứng minh qua thử nghiệm trên chuột. Theo Lưu Văn Chính (2001), N,N,N-trimethylchitosan thử nghiệm trên chuột nhất hạ cholesterol mạnh hơn chất chuẩn cholestyramin.

+ Kết tụ tế bào u in vitro, tạo ra khối u đặc và ức chế sự phát triển tế bào.

+ Từ chitosan Nguyễn Hữu Đức (1999) đã chế tạo được chitosan acetat phtalat làm phim tan ở ruột giống như Eudragit L/S, CAP đã được công nhận.

+ Chitosan là nguyên liệu chế tạo da nhân tạo.

+ Làm tá dược thuốc viên, tá dược rã, tá dược làm cốm và thuốc viên với tác dụng kéo dài.

- Ứng dụng trong các ngành khác :

+ Xử lý nước thải: Việc xử lý nước thải là dựa vào tính tạo phức với các kim loại như Cu, Pb, Hg, Cr.

Để xử lý nước thải, có thể dùng màng lọc từ chitosan. Màng N-acylchitosan có tính bán thấm tốt.

+ Chitosan có ứng dụng trong công nghiệp giấy và sợi. Chitosan làm tăng sức cản gẫy và tính bền nếp gấp của giấy, cải thiện tính bền của sợi.

+ Trong nông nghiệp, chitosan phủ lên hạt cây lương thực, thực phẩm kích thích hạt chóng nảy mầm, làm tăng sức đề kháng của cây. Phun dung dịch loãng chitosan lên lá cây đậu tây (*Phaseolus vulgaris*) làm giảm đáng kể những tổn thương do virus.

+ Chitosan làm cho tóc bền vững, bóng mượt, làm cho mỹ phẩm bền màu.

Viện Dinh dưỡng đã chứng minh nếu sử dụng 2,5 g PDP (chitosan) trên 1 kg thịt thì giò được bảo quản tốt tương tự như được sử dụng hàn the ở nhiệt độ 27°C và nếu ở nhiệt độ 8^0C thì có thể bảo quản được 26 ngày. Các giò làm thí nghiệm dùng PDP làm phụ gia đều rất ngon, bề mặt hồng mịn, thơm và dai giòn.

2.3.1.5. Chất xơ tiêu hoá

2.3.1.5.1. Định nghĩa

Xác định thế nào là chất xơ tiêu hoá không phải công việc đơn giản. Lúc đầu, người ta coi chất xơ thực phẩm là các chất từ thực vật không chịu sự tác động tiêu hoá do các enzym của hệ tiêu hoá ở con người. Điều này có nghĩa là chất xơ bao gồm các phân tử lớn của các thành tế bào thực vật và một số polysaccharid có trong tế bào. Như vậy phải nói đến các tiêu chí hoá học, phải coi các chất xơ thực phẩm còn bao gồm lignin và polysaccharid thực vật nữa.

2.3.1.5.2. Thành phần chính

Chất xơ gồm:

a- Polysaccharid. Có nhiều nhóm:

+ Cellulose là yếu tố cấu trúc cơ bản. Cellulose không tan trong nước.

+ Pectin là các polygalacturonan có nhiều trong các quả, trong các loài cây hai lá mầm, dễ tan trong nước.

+ Hemicellulose là các polymer hỗn hợp các ose trung tính và acid, homo- hoặc heteropolysaccharid.

b- Lignin là chất heteropolymer bao gồm nhiều đơn vị phenylpropan.

c- Các chất khác: glycoprotein (có ít).

2.3.1.5.3. Nguồn gốc

Rau quả là nguồn cung cấp nhiều chất xơ thực phẩm: cà rốt, củ cải, táo, cám mì, cám gạo...

Cám mì chứa các muối vô cơ (K, P dưới dạng phytat, Mg) và chất xơ 45%. Ngoài ra còn có protein 17%, tinh bột 15 - 20% và đường 7 - 8%.

2.3.1.5.4. Tác dụng sinh học

Đáng lưu ý là các chất xơ có thành phần không ổn định, nên tác dụng sinh học cũng không ổn định. Thật khó mà xác định được mối tương quan chính xác giữa các thành phần hoá học và tác dụng của chất xơ. Tác dụng sinh lý lệ thuộc vào bản chất của chất xơ, kích thước hạt, độ xốp, độ tan. Hàm lượng chất tan hay không tan trong nước góp phần đánh giá tác dụng sinh học của chất xơ. Tác động của một chất polymer đối với các phân tử khác có trong hệ tiêu hoá là do cấu tạo chất xơ.

Có hai tác dụng của các chất xơ: tác dụng lưu giữ ở ruột và tác dụng chuyển hoá.

Tác dụng lưu giữ ở ruột: chất xơ làm cho khối lượng phân tử tăng lên. Sau khi ăn cám mì, khối lượng phân tăng lên 127%. Một tác dụng khác là đối với thời gian lưu giữ ở ruột. Người ta chuẩn hoá thời gian trong vòng 48 giờ: rút ngắn thời gian lưu giữ nếu dài quá và kéo dài thời gian nếu ngắn quá. Một yếu tố khác có tham gia vào tác động này: độ tan của chất xơ (cám, mì, cellulose).

Các khảo sát theo phương pháp dịch tễ học cũng như theo phương pháp thực nghiệm tại các cộng đồng dân cư ở các vùng kinh tế cho thấy những người ăn theo chế độ ăn ít chất xơ dễ bị táo bón. Các công trình này làm sáng tỏ thêm vai trò của các chất xơ đối với các cơn đau của bệnh túi thừa và gợi ý có mối liên quan giữa tần suất ung thư trực tràng – phủ tạng và chế độ ăn giàu protein và mỡ động vật và nghèo chất polysaccharid thực vật.

Tác dụng chuyển hoá:

Nhiều công trình nói đến các mối phản ứng qua lại giữa các chất xơ và các muối vô cơ, giữa các chất xơ và cholesterol máu, giữa các chất xơ và đường huyết. Nói chung, nhiều chuyên gia dinh dưỡng cho rằng chế độ ăn giàu chất xơ sẽ tạo ra thiếu hụt các chất vô cơ.

Sự tiêu thụ thường xuyên các chất xơ hoà tan (pectin) và không hoà tan (cám) đều làm hạ cholesterol máu và LDL. Ngược lại nếu ăn các sợi không hoà tan thì hàm lượng triglycerid trong máu giảm đi. Qua điều tra dịch tễ học, người ta nhận thấy tỷ lệ tử vong với những người ăn thường xuyên chế độ ăn nhiều xơ thấp hơn so với những người không theo chế độ ăn ít xơ.

Nhiều cuộc khảo sát dịch tễ học khác đã chứng minh việc bổ sung các chất xơ vào chế độ ăn (đặc biệt là các chất xơ hoà tan) làm cho đường huyết giảm đi và được duy trì thêm một thời gian, đồng thời còn có khả năng trì hoãn được việc điều trị bằng insulin.

Chất xơ tiêu hoá hấp thu được các độc tố, ức chế được sự hình thành các chất độc, sự phát triển một số vi khuẩn, phòng được bệnh tiểu đường. (J. Bruneton, 1993; Bùi Nguyên, 2004).

2.3.1.5.5. Kiểm nghiệm: xác định các chất xơ dinh dưỡng

Có nhiều phương pháp xác định hàm lượng chất xơ trong dược liệu: phương pháp cân- hoá học có sử dụng các chất tẩy rửa acid và trung tính, tạo ra chất bã là chất xơ và phương pháp cân - enzym. Phương pháp chính thức (đối với cám) là xác định tổng các khối lượng các chất xơ tan và không tan.

2.3.1.5.6. Sử dụng chất xơ

Dạng dùng: Bột mì nghèo chất xơ. Dạng dùng trong khoa dinh dưỡng là các chế phẩm bích quy có bổ sung các chất xơ. Có thể khai thác nhiều dạng bào chế: cốm, viên nén,...

Chỉ định: Cần tiến hành chuẩn hoá sự quá giang ở ruột: các chất xơ ngũ cốc có khả năng hấp thu nước lớn và ít bị lên men tỏ ra thích hợp hơn so với các chất xơ hoà tan. Các chất này là nguyên nhân gây đầy hơi: 10 - 20g/ngày, mỗi ngày 2 - 3 lần, kèm theo bổ sung nước. Đối với trẻ em, cần có sự hướng dẫn của thầy thuốc.

Chất xơ được sử dụng trong chế độ giảm béo: các chất xơ không cung cấp năng lượng, nhưng tạo cảm giác no. Chế độ ăn uống đối với bệnh nhân tiểu đường cần đến các chất xơ.

Ở các nước công nghiệp, nhu cầu chất xơ hàng ngày là 20 - 25g và có thể là 35 g (J. Bruneton, 1993).

2.4. Polysaccharid dị thể

2.4.1. Gôm và chất nhày

2.4.1.1. Khái niệm

Gôm và chất nhày là chất có phân tử lớn, có nhiều ose, hoà tan ít nhiều

trong nước để tạo ra những keo hoặc gel (chất đông). Người ta có khuynh hướng gọi là keo thảo mộc, thậm chí polysaccharid thảo mộc.

Gôm là các sản phẩm do cây tiết ra, sau đó người ta phân biệt các thành phần cấu tạo: polysaccharid dị thể trung tính (manan và dẫn chất), polysaccharid dị thể acid và galacturonan (pectin).

Vài chỉ tiêu đánh giá có tiến bộ hơn giúp cho phân biệt gôm và chất nhày. Gôm là các phân tử phức tạp, dị thể và phân nhánh có chứa các acid uronic. Gôm chảy ra ngoài cây do chấn thương. Gôm có thể do sự chuyển hóa của polysaccharid và cũng có thể của tinh bột. Gôm tiết ra và khô đặc, không tan trong dung môi hữu cơ, như vậy là khác với chất nhựa có nguồn gốc terpen.

Chất nhày là các thành phần của tế bào được tạo ra trong các tế bào hay ống tiết, hay gặp ở vỏ hạt. Chất nhày thường gặp ở họ Bông (Malvaceae) (chất nhày acid) và họ Đậu (Fabaceae) (chất nhày trung tính). Do giữ nước, chất nhày rất cần cho sự nảy mầm.

2.4.1.2. Phân loại gôm và các họ thực vật có chứa gôm

Gôm được phân chia thành bốn nhóm:

1. Nhóm A: Nhóm này gồm các chất kiểu galactan có nhóm thế là các đơn vị 1-arabinose và oligosid phân nhánh có đường khác (1-rhamnose, *D*-xylose), acid *D*-glucuronic. Polysaccharid thường gắn với một protein.

2. Nhóm B: Gồm các chuỗi của các acid galacturonic nối với nhau theo các dây nối (1 → 4) có các nhóm thế là các mạch ngắn gồm *L*-arabinose và các acid *D*-glucuronic và *D*-galacturonic. Mạch chính có thể bị ngắt đoạn bởi *L*-rhamnose đôi khi bởi một đường.

Có trường hợp, cả 2 kiểu phân tử (A và B) cùng tồn tại song song.

3. Nhóm C: Gồm các xylan nối với nhau bởi 1 → 4 – β và các nhóm thế là các đường khác nhau (*L*-arabinosse, *L*-galactose, acid *D*-glucoronic).

4. Nhóm D: Mạch chính có sự xen kẽ (1 → 4 – 1 → 2) của acid *D*-glucuronic và *D*-manose. Các OH ở C_3 của manose được thay thế bằng các chuỗi của nhóm A. Gôm của cây *Anogeissus latifolia* là một thí dụ của kiểu cấu trúc này.

Gôm thường gặp trong các họ Trinh nữ (Mimosaceae), Bàng (Combretaceae), Cam (Rutaceae).

Gôm thường tan trong nước tạo thành các dung dịch nhớt. Một số gôm khác hoàn toàn không tan, chỉ tạo thành keo. Các dung dịch gôm băng (1% hoặc ít hơn) thường bị kết tủa do ethanol. Gôm có hoạt tính quang học và được nhận

dạng bằng góc quay cực. Để nhận dạng đường, thường dùng phân tích đường qua thủy phân và sắc ký lớp mỏng.

Polysaccharid dẫn chất của manose. Chất nhày trung tính. Ở đây, manose là đường hay gặp. Hiếm thấy có manan. Manan là mạch thẳng gồm nhiều đơn vị *D*-manose nối với nhau bằng (1 → 4), không tan trong nước.

2.4.1.3. Các polysaccharid dị thể có manose hay gặp

1. Glucomanan. Trong polymer này, 20 – 50% các *D*-manose được thay thế bằng *D*-glucose. Các dây nối giữa các ose là (1 → 4) –β. Có thể nhiều đơn vị *D*-manose nối liền nhau, còn các glucose đứng tách biệt.

Glucomanan hay gặp ở họ Loa kèn trắng (Liliaceae), họ Lan (Orchidaceae).

2. Galactomanan. Trong các phân tử này, nhóm hydroxymethyl ở 6 của một vài gốc *D*-manose của mạch polymanose được thay thế bằng gốc *D*-galactosyl có liên kết theo α. Các chất này dễ tan trong nước, trừ những chất có những nhóm thế.

Galactomanan có trong hạt các loài thuộc họ Na (Annonaceae), Bìm bìm (Convolvulaceae), Cau (Arecaceae).

3. Galactoglucomanan. Mạch trung tâm. Mạch chính gồm các gốc của glucomanan và nhiều đơn vị của manose được thay thế bằng *D*-galactosyl.

Polysaccharid dị thể acid: Chất nhày acid. Trong lĩnh vực này, việc phân loại theo hóa học có khó khăn. Ở đây, chúng tôi phân loại theo nguồn gốc thực vật và theo các chất có cấu trúc tương tự.

2.4.1.4. Những dược liệu chứa chất nhày

1. Các cây trong họ Mã đề (Plantaginaceae) có chất nhày:

- Mã đề (*Plantago major*).

Bộ phận dùng : Lá và hạt

Thành phần hóa học chính là chất nhày. Chất nhày có trong lá với hàm lượng 20% và hạt có thể tới 40%. Chất nhày trong hạt chứa *D*-xylose, *L*-arabinose, acid *D*-galacturonic, *L*-rhamnose và *D*-galactose theo tỷ lệ tương ứng 15 : 3 : 4 : 2 : 0,4. Ngoài ra, còn có planteose là oligosaccharid gồm galactose, glucose, fructose theo tỷ lệ tương ứng 1 : 1 : 1. Chỉ số nở của hạt là 5.

Mã đề còn chứa 2 iridoid là aucubosid và catalpol, nhiều hợp chất flavonoid gồm luteolin-7-glucuronid, homoplantaginin, nepitin, apigenin, quercetin, scutelarein, baicalein, hispidulin, luteolin-7-glucosid, 7-O-α-*L*-rhamnopyranosyl-5,6,4'-trihydroxy-6-methoxyflavon, 7-O-β-*D*-glucopyranosyl-5,6,3',4'-tetrahydroxyflavon.

Hạt chữa tiểu tiện khó khăn, đi tiểu đau buốt, nước tiểu đỏ đục, nóng, lượng ít, đi tiểu ra máu, trị ho.

Lá làm thuốc lợi tiểu, trị mụn nhọt, chống loét dạ dày, tá tràng, chữa bỏng.

- Mã đề (*Plantago asiatica*).

Hạt chứa chất nhày. Chỉ số nở 4.

Lá, toàn cây lợi tiểu, trị ho, viêm phổi.

2. *Althaea officinalis* L., họ Bông (Malvaceae).

Các bộ phận của cây đều chứa chất nhày, trong đó có *D*-galactose, *L*-rhamnose và các acid *D*-glucuronic và *D*-galacturonic. Cấu trúc cùng họ hàng với polysaccharid pectic: chuỗi monogalacturonic, nhánh của các acid uronic và galactose.

3. Lanh (*Linum usitatissimum* L.).

Hạt chứa 10% chất nhày là arabinoxylan rất phân nhánh, được cấu tạo bởi các acid *D*-galacturonic, *D*-galactose, *L*-rhamnose, *D*-xylose và *L*-arabinose.

2.4.2. Pectin, polysaccharid pectic

Những chất pectic là những polymer gồm các gốc của các acid α-galacturonic liên kết với nhau bằng 1 → 4, kết hợp với các araban và galactan. Đó là các glycanogalacturonan trong đó bản chất các đường liên kết với galacturonan thay đổi tùy theo nguồn gốc thực vật, sự sinh trưởng của cây...

Về mặt thương mại, có các acid pectic trong đó các nhóm chức carboxyl không (hoặt rất ít) bị methyl hóa. Muối của chúng gọi là pectat. Từ "acid pectinic" (còn gọi là pectin) (muối là pectinat) dành cho các dẫn chất đã có phần được methyl hóa. Trên thực tế, người ta phân loại pectin tùy theo mức độ methyl hóa, ester hóa. Chỉ số methyl hóa của các acid pectic nếu dưới 5 đến 50 là pectin ít được methyl hóa, còn nếu trên 5 là đã được methyl hóa ở mức độ cao.

2.4.2.1. Cấu trúc

Hiện nay, người ta đã biết đến các homogalacturonan (có trong cụm hoa đầu của cây hướng dương) và rhamnogalacturonan. Các chất nói đầu ít gặp. Đó là một chuỗi của các acid α-*D*-galacturonic nối với nhau theo 1 → 4 và có nhiều nhóm methyl. Còn các rhamnogalacturonan thì có mạch chính nối với các rhamnose, nhưng lại bị đứt quãng.

→ 4) - α - *D*- Gal*p* A – (1 → 2) – β - Rha*p* – (1 → 4).

2.4.2.2. Nguồn nguyên liệu

Hai nguồn nguyên liệu chính là:

– Quả một số loài trong chi Citrus: chanh, cam, bưởi. Trong trường hợp này, pectin là dư phẩm của công nghệ chế tạo dịch quả. Hàm lượng pectin trong vỏ quả chanh là 2 - 4% (vỏ tươi).

– Quả của vài loại trong họ Hoa hồng (Rosaceae): Táo tây. Hàm lượng pectin trong bã táo ép là 10 - 20%.

Các nguồn khác cho pectin là cà rốt, củ cải đường, hoa hướng dương, khoai tây, cà chua.

Pectin được chia thành 2 nhóm:

– Pectin hoà tan có trong dịch tế bào thực vật gồm acid pectic, muối pectat, acid pectinic và muối pectinat.

– Protopectin là pectin không hoà tan. Protopectin làm cho quả chanh có độ cứng nhất định. Khi quả chín, protopectin chuyển thành pectin.

2.4.2.3. Chế tạo

Trong công nghệ, việc chiết xuất pectin được đi từ bã quả chanh (30 – 35% pectin trong bã chanh) và táo (15 – 20% pectin từ bã táo) nghĩa là từ bã sau khi chế dịch quả. Các chất thu được có độ methyl hóa cao (70 – 75%). Nếu xét cần thiết thì loại một phần các ester. Sau khi đun sôi, hòa tan nóng các dung dịch acid. Lấy dịch chiết đem lọc hay ly tâm. Có trường hợp phải loại bỏ tinh bột bằng amylase. Sau đó phải tủa bằng isopropanol.

Trần Lâm Huyến (1960) chế pectin từ cùi bưởi (bỏ lớp vỏ màu xanh, vàng, đỏ) như sau: Cùi bưởi thái nhỏ, ngâm với nước nóng (1 kg cùi tươi / 3 lít nước, 1 kg cùi khô / 7 – 8 lít nước), đun cách thủy 2 giờ, vừa đun, vừa khuấy. Vắt lấy nước, rồi đổ nước vắt vào cồn 90° có 1% HCl. Số lượng cồn bằng số nước vắt. Vừa đổ vừa khuấy nhẹ. Pectin tủa thành một khối đông như thạch. Dung dịch còn lại là cồn chừng 45°, có thể cất thu hồi.

Pectin còn hơi vàng, cần tinh chế. Hòa tan pectin trong nước nóng ở 90°. Nếu dùng 1 kg cùi bưởi thì cần 2 lít nước. Lọc qua vải. Cho nước lọc chảy vào 2 lít cồn 96°. Khuấy nhẹ. Để pectin thu được trên vải lọc. Rửa bằng nước cất cho hết phản ứng acid. Sấy pectin thu được ở 45°. Hiệu suất: 13,766% (cùi tươi).

Theo Trần Trung Nam và cs. (1962), 1000 g hạt bưởi khô chứa 200 g pectin. Pectin đã được ứng dụng trong nha khoa Bệnh viện Hà Giang. Qua 100 ca nhổ

răng, dùng vô trùng tẩm dung dịch pectin 5% ấn vào lỗ chân răng sau khi nhổ răng và lau sạch máu thì máu cầm lại và không chảy nữa.

2.4.2.4. Tính chất

Pectin ở dạng vô định hình màu xám trắng, tan trong nước, formamid, glycerin nóng. Nếu mức độ methyl ester tăng, độ hòa tan sẽ tăng lên. Nếu trọng lượng phân tử tăng lên, độ hòa tan sẽ giảm. Pectin không tan trong ethanol, isopropanol, aceton. Pectin kết tủa bởi các muối có nhiều hóa trị (đồng sulfat, chì nitrat). Tính chất này được ứng dụng để sản xuất pectin.

Khối lượng phân tử thay đổi từ 160.000 đến 400.000.

Dung dịch pectin rất nhớt. Trong những điều kiện đặc biệt, dung dịch pectin được tạo ra do đun nóng, sẽ bị hóa đông nếu để nguội.

Với pectin có độ methyl hóa cao thì sự hóa đông sẽ chậm lại ở môi trường acid với sự có mặt của saccarose.

Định tính

- Pectin có thể tạo thành acid pectin hydroxylcornic (chất thử + hydroxylamin + Na hydroxylamin). Thêm sắt (III) clorid, được tủa màu đỏ.

- Dựa vào sự có mặt của acid galacturonic. Hòa tan một ít pectin vào 3 – 4ml nước. Thêm vài giọt chì acetat kiềm 10%, đun cách thủy. Lúc đầu tạo tủa trắng, sau dần xuất hiện màu cam hơi đỏ.

2.4.2.5. Tác dụng dược lý và công dụng

Pectin chưa thể hiện được tính chất dễ tiêu hoá ở người và động vật. Tuy nhiên, qua đường tiêu hoá, nhiều pectin mới được giáng hoá nhờ các vi khuẩn ở ruột. Chính các chất đã được giáng hoá mới được tiêu hoá.

Nhiều công trình chứng minh pectin có trọng lượng phân tử lớn và có nhiều nhóm methoxy (là các hoạt chất mạnh nhất có tác dụng chống làm tăng cholesterol trên động vật (chuột cống, gà, chó...) và người. Protopectin và pectin có ít nhóm methoxy không có tác dụng.

Pectin từ bã táo nghiền có tác dụng kháng khuẩn với các vi khuẩnGam âm và các vi khuẩn Gam dương không sinh bào tử bao gồm *Salmonella typhi* và *Escherichia coli* ở nhóm thứ nhất và *Staphylococous aureus* ở nhóm thứ hai. Pectin ít hoặc không có hoạt tính với nấm, nấm men và vi khuẩn sinh bào tử.

Pectin còn làm tăng sự thải trừ kim loại nặng trên động vật thí nghiệm và sự hấp thụ các chất mỡ có trọng lượng phân tử thấp ở chuột cống.

Trong ngành dược, pectin được sử dụng làm thuốc:

– Có tính chất bảo vệ trong các chứng bệnh ở đường ruột - dạ dày, viêm dạ dày, ỉa chảy. Khả năng bảo vệ của pectin ở niêm mạc tiêu hoá là do tính chất hấp thụ toxin và hoạt tính kháng khuẩn.

– Có tính chất cầm máu: uống 50 ml dung dịch pectin 1 - 2%/ngày.

– Có tác dụng chậm: penicilin tác dụng chậm, insulin tác dụng chậm.

– Có tính chất tạo nhũ dịch hoặc chất làm đông trong một số chế phẩm thuốc.

Pectin còn được dùng trong công nghiệp thực phẩm và công nghiệp khác (mực in, keo).

III. DƯỢC LIỆU CHỨA POLYSACCHARID KHÁC

3.1. Lô hội (*Aloe vera*)

Thành phần của nhựa lô hội đến nay chưa được sáng tỏ nhiều. Có tài liệu cho biết nhựa lô hội chứa hơn 1 kiểu polysaccharid. Có tài liệu nói tối thiểu 4 kiểu glucomanan mạch thẳng đã được acetyl hóa với dây nối glycosid (1 → 4). Một tài liệu khác cho biết có galactan acid, manan, glucomanan, araban và glucogalactomanan.

Lô hội còn có anthraglycosid 10 – 20% trong đó có 30% barbaloin và các chất khác: aloesin, aloeson (aglycon của aloesin), một số anthraquinon tự do (aloe – emodin...).

Lô hội, aloin đều có tác dụng tẩy.

Aloe – emodin và dịch chiết cồn lô hội có tác dụng chống ung thư. Aloe – emodin và dịch chiết methanol lô hội có tính kháng virus.

Chất lectin từ lô hội có hoạt tính ngưng kết mạnh hồng cầu và kích thích phân bào.

3.2. Măng tây (*Asparagus officinalis*)

Rễ chứa inulin và 8 fructo – oligosaccharid.

Hạt chứa nhiều polysaccharid tan trong NaOH với các phân tử mạch thẳng gồm β - gluco và β- manose với dây nối 1 → 4, liên kết với α - galactose đứng ở vị trí tận cùng, với glucose - manose theo tỷ lệ 1 : 1.

Măng tây dùng làm thuốc trị bệnh ngoài da và làm thực phẩm.

3.3. Hoàng kỳ (*Astragalus membranaceus* (Fish.) Bye var. *mongholicus* (Bye) Hsiao, *A. membranaceus* (Fish.) Bye).

Rễ là vị thuốc nhóm bổ khí chữa cơ thể suy nhược. Ngoài ra, còn có tác dụng ích huyết trị huyết hư, thiếu máu.

Thành phần chủ yếu là polysaccharid và saponin.

Polysaccharid gồm các astragalan I, II, III. Astragalan I được cấu tạo bởi *D*-glucose, *D*-galactose và *L*-arabinose. Các astragalin II và III gồm các đường glucose.

Saponin gồm 9 astragalosid và isoastragalosid.

3.4. Đương quy Trung Quốc (*Angelica sinensis* (Oliv.) Diels.).

Đương quy là vị thuốc bổ, hoạt huyết, chỉ huyết. Đương quy gồm 6 nhóm hoạt chất trong đó có polysaccharid. Polysaccharid chứa chất AS1 có tác dụng bảo vệ phóng xạ. Nếu đem thuỷ phân, chất này cho *L*-arabinose, *D*-galactose, *D*- glucose, *L*-rhamnose.

Polysaccharid có tác dụng bảo vệ phóng xạ, có tác dụng tạo huyết kể cả trên chuột bị chiếu xạ (Lê Kim Loan, 2001).

Tinh dầu 0,2 – 0,4% chứa nhiều chất trong đó thành phần chính là ligustilid.

3.5. Đương quy Nhật Bản (*Angelica acutiloba* (Sieb. et Zucc.) Kit.) : là loài cây mới di thực.

Bộ phận dùng: Rễ.

Đương quy Nhật Bản chứa nhiều nhóm hóa học đáng chú ý là tinh dầu 0,26% trong đó có ligustilid và polysaccharid. Polysaccharid gồm cả polysaccharid đồng thể (glucan với nhiều đơn vị glucose) và polysaccharid dị thể trong đó có nhiều arabino- galactan (urabinose, galactose, rhamnose, acid galacturonic,...): arabino – galactan AG IIb – 1, AG IIb – 2, AR - 2IIa, AR – 2IIb, AR – 2IIc, AR – 2IId.

Đương quy Nhật Bản với hoạt chất là adenosin có tác dụng ức chế ngưng tập tiểu cầu, làm giảm độ nhớt của máu.

Các polysaccharid AG IIb – 1, AR - 2IIa có tác dụng kháng bổ thể, ức chế khối u, ức chế mạnh các dạng u báng, u xơ và u rắn.

LD_{50} trên chuột nhắt của rễ là 154 g/ kg và hạt là 106 g/ kg thể trọng.

Các tác dụng sinh học của đương quy Nhật Bản tương tự đương quy Trung Quốc (Lê Kim Loan, 2002).

TÀI LIỆU THAM KHẢO CHÍNH

1. *J. Bruneton* (1993) ; Pharmacognosie. Phytochimic. Plantes médicinales ($2^{ème}$ed). Londres. Paris – New York.
2. *Lưu Văn Chính* (2001); Luận án Tiến sỹ Hóa học. Viện Hóa học các hợp chất thiên nhiên.
3. *Nguyễn Hữu Đức* (1999); Luận án Tiến sĩ Dược học. Trường Đại học Y Dược Tp. Hồ Chí Minh.
4. *Lê Kim Loan* (2001); Luận án Tiến sĩ Dược học. Viện Dược liệu.
5. *A. Y. Leung et Steven Foster* (1996) ; Encyclopedie of common natural ingredients used in food, drugs and cosmetics (2^{nd} ed.).
6. *Martindale* (1999); The complete drug reference 32^{nd} ed.
7. (1983); The Merck Index 10^{th}ed.
8. *R. R. Paris et H. Moyse* (1965); Précis de Matière médicale. Tome I. Masson.
9. *M. Paris et M. Hurabielle* (1981); Abrégé de Matière médicale. Tome I. Masson.
10. *M. Paris et M. Hurabielle* (1986); Abrégé de Matière médicale. Tome II. Masson.
11. *Vũ Trọng Tiến* (2001); Luận án Tiến sỹ Dược học. Trường Đại học Y Dược Tp. Hồ Chí Minh.
12. The World Health Organization (1999); Monographs on selected medicinal plants, Geneva.
13. *Ngô Văn Thu* (1998); Bài giảng dược liệu. Tập 1. Trường Đại học Y Dược Tp. Hồ Chí Minh.

CHƯƠNG III

MỘT SỐ HỢP CHẤT PHENOL VÀ DƯỢC LIỆU CHỨA HỢP CHẤT PHENOL

TS. Phạm Văn Thanh, TS. Nguyễn Bích Thu

Gần đây, các hợp chất phenol được các nhà khoa học đặc biệt quan tâm, vì chúng có khả năng ức chế chất sinh ung thư và chất gây đột biến. Ngoài ra, tác dụng chống oxy hóa và giảm đau của polyphenol đóng góp vào tác dụng điều trị dự phòng hoặc bảo vệ cơ thể.

Khái niệm hợp chất phenol gồm rất nhiều các hợp chất có ít nhất một vòng thơm và một hay nhiều nhóm thế hydroxyl tự do hoặc kết hợp với nhóm chức khác, như ether, ester hoặc glycosid. Các hợp chất phenol tan trong nước, vì phần lớn đều ở dạng kết hợp với đường như một glycosid và thường ở trong không bào.

Trong hàng nghìn các hợp chất phenol đã được biết cấu trúc, flavonoid là nhóm hợp chất lớn nhất nhưng là các phenol đơn vòng đơn giản, phenyl-propanoid và tất cả các quinon phenolic tồn tại tương đối nhiều. Nhiều nhóm polymer quan trọng trong cây, như lignin, melanin và tanin là các hợp chất polyphenol.

Chuyên đề này chỉ tập trung giới thiệu:

- Phenol và các acid phenolic.
- Coumarin.
- Tanin.
- Lignan, neoligan và các hợp chất liên quan.

I. PHENOL VÀ CÁC ACID PHENOLIC

1.1. Khái niệm chung

Phenol là các dẫn xuất benzen đơn giản nhất, ít tồn tại ở dạng tự do trong cây.

Khái niệm acid phenolic áp dụng cho tất cả các hợp chất hữu cơ có tối thiểu một nhóm carboxy và một nhóm hydroxyl phenolic. Tuy nhiên, gần đây các nhà khoa học thường giới hạn acid phenolic là các dẫn xuất của các acid benzoic (C6 - C1) và acid cinnamic (C6 - C3).

Các phenol tự do và các acid phenolic thường cùng tồn tại trong cây, ở dạng kết hợp như một glycosid đơn giản có mặt trong phân đoạn tan trong cồn. Phổ biến nhất là các acid *p*-hydroxybenzoic, acid procatechuic, acid vanilic, acid syringic... Ngược lại với các acid trên, các phenol tự do trong cây thường tương đối hiếm. Hydroquinon phổ biến nhất, ngoài ra, còn gặp các catechol, orcinol, pyrogalol...

1.1.1. Các phenol đơn giản

Các phenol đơn giản tồn tại nhiều trong cây, hydroquinon chỉ được tìm thấy trong vài họ thực vật (bao gồm họ Ericaceae và Rosaceae), chủ yếu dưới dạng glycosid diphenol (arcubin) hay ether monomethyl.

1.1.2. Các acid phenolic: Acid phenolic bao gồm 2 nhóm:

1.1.2.1. Dẫn xuất của acid benzoic

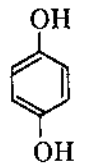
Các acid phenolic C6 - C1 là các dẫn xuất hydroxyl của acid benzoic tồn tại phổ biến ở trạng thái tự do, cũng như ở dạng kết hợp ester (như acid salicylic) hay glycosid; acid procatechic, acid gallic ở dạng tự do và dạng ester có trong thành phần cấu tạo của tanin và một số catechin. Các aldehyd tương ứng với các acid này, như vanilin, anisaldehyd, salicylaldehyd... cũng tồn tại tương đối phổ biến trong cây.

1.1.2.2. Các acid phenolic - dẫn xuất của acid cinnamic

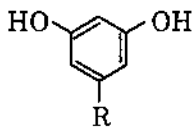
Hầu hết các acid phenolic C6 - C3, như acid *p*-coumaric, acid caffeic, ferulic, sinapic... rất phổ biến trong thiên nhiên, một số acid khác, như acid *o*-coumaric, *o*-ferulic ít gặp hơn.

1.1.3. Các phenol khác: như alcol phenol

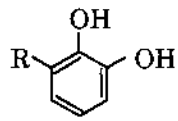
Aldehyd phenol (vanilin)



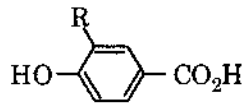
Hydroquinon



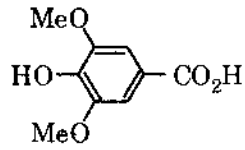
R = H, resorcinol
R = Me, orcinol
R = OH, phloroglucinol



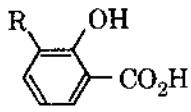
R = H, catechol
R = OH, pyrogallol



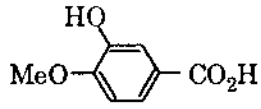
R = H, acid *p*-hydroxybenzoic
R = OH, acid protocatechuic
R = OMe, acid vanillic



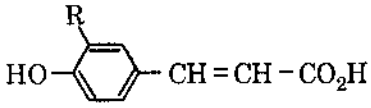
Acid syringic



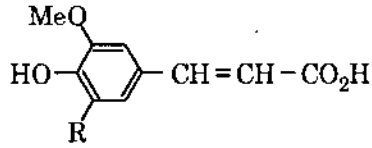
R = H, acid salicylic
R = OH, acid *o*-protocatechuic



Acid isovanilic



R = H, acid *p*-coumarin
R = OH, acid caffeic



R = H, acid ferulic
R = OMe, acid sinapic

Hình 1: Cấu trúc của phenol và các acid phenolic

1.2. Tính chất lý, hoá, chiết tách và xác định các acid phenolic

1.2.1. *Tính* chất

Nói chung, các phenol tan trong dung môi hữu cơ phân cực, trong dung dịch natri hydroxyd và muối carbonat; có thể chiết bằng dung môi hữu cơ trong môi trường acid nhẹ. Các glycosid tan trong nước. Tất cả các hợp chất phenol thường không bền, dễ bị oxy hóa, đặc biệt trong mội trường kiềm. Các dẫn xuất của acid cinnamic dễ bị đồng phân hóa trong dung dịch nước dưới tác động của tia tử ngoại. Các ester cinnamic của các hydroxyacid (thí dụ acid caffeoylquinic) bị đồng phân hóa trong điều kiện acid hoặc kiềm tạo hỗn hợp đồng phân mặt phẳng (acid clorogenic).

Acid phenolic được giải phóng khi thủy phân acid dịch chiết cây và có thể chiết được bằng ether.

1.2.2. Phương pháp phân tích

Thường dùng phương pháp sắc ký lớp mỏng (SKLM), hoặc sắc ký khí (SKK), sắc ký lỏng cao áp (SKLCA) để phân tích các hợp chất phenol đơn giản trong cây.

Phương pháp thích hợp nhất để phân tích các hợp chất phenol và acid phenolic là phương pháp SKLCA pha ngược (C18) với pha động là hỗn hợp nước, cồn, acetonitril, hoặc cả hai và acid để hạn chế sự ion hóa.

Các hợp chất này thường được chiết từ nguyên liệu tươi bằng cồn hoặc hỗn hợp cồn - nước để loại bớt các chất béo và tránh ester hóa các acid phenolic.

1.2.2.1. Phương pháp sắc ký lớp mỏng

Phương pháp tốt nhất để tách và xác định các hợp chất phenolic là phương pháp SKLM. Ba chất hấp phụ được dùng để phân tích các dẫn xuất phenolic trong cây bằng phương pháp SKLM là cellulose, silica gel và polyamid. Nói chung, silica gel là chất hấp phụ tốt nhất để tách các hợp chất phenolic kém phân cực; đối với các hợp chất chứa nhóm phenol tự do thì polyamid là tách tốt nhất; chất hấp phụ cellulose thường được dùng để tách các hỗn hợp có nhiều đơn vị glycosid. Dung môi khai triển thường chứa acid (acid acetic, acid formic).

Thuốc thử hiện màu đặc trưng của các phenol, như sắt clorua, vanilin và acid hydrocloric, 2,6-dicloroquinon clorimid trong môi trường kiềm; ngoài ra còn dùng các thuốc thử đặc hiệu khác, như 2,4-dinitrophenylhydrazin đối với các aldehyd. Các hợp chất phenol hấp thụ tử ngoại có màu sẫm trên bản mỏng silica gel chứa chỉ thị màu huỳnh quang ở bước sóng 254 nm.

Giá trị Rf của các hợp chất phenol và các acid phenolic trong 4 dung môi khai triển khác nhau được trình bày ở bảng 1 .

Bảng 1: Đặc trưng SKLM và tính chất phổ của các hợp chất phenol và acid phenolic

Tên	Rf SKLM (×100) trong dung môi				Màu sắc	EtOH λ_{max}	EtOH-NaOH λ_{max}
	1	2	3	4			
Phenol đơn giản					Vanilin - HCl		
Orcinol	19	62	46	67	Xanh hồng	276, 282	294
4-Methylresorcinol	25	63	59	65	Đỏ gạch	282	291
2-Methylresorcinol	40	64	58	73	Xanh hồng	275, 280	288
Resorcinol	17	59	48	74	Đỏ	276, 283	293
Catechol	35	66	58	72	Không màu	279	phân hủy

Bảng 1 (tiếp theo)

Tên	Rf SKLM (×100) trong dung môi				Màu sắc	EtOH λ_{max}	EtOH-NaOH λ_{max}
	1	2	3	4			
Hydroquinon	18	58	34	69	"	295	phân hủy
Pyrogalol	8 1	15	19	72	"	266	phân hủy
Phloroglucinol	5	47	9	62	"	269, 273	350
Acid phenolic					Folin		
A. gallic	5	40	5	40	Xanh da trời	272	phân hủy
A. protocatechuic	19	44	19	52	"	260, 295	240, 283
A. gentisic	33	44	41	61	Xanh da trời sau khi hơ amoniac	237, 335	308
A. *p*-hydroxybenzoic	55	80	60	62	"	265	278
A. syringic	79	58	74	52	"	271	298
A. vanilic	82	73	70	57	"	260, 290	285, 297
A. salicylic	91	82	86	66	"	235, 305	225, 297

Ghi chú: - Dung môi 1 và 2 trên silica gel: Acid formic - cloroform (1-9) và ethyl acetat (EtOAc) - benzen (9 - 11).

- Dung môi 3 và 4 trên cellulose MN300: Benzen- methanol (MeOH) - acid formic (45 - 8 - 4) và dung dịch acid formic 6%.

Các phenol cũng được xác định bằng cách so sánh phổ tử ngoại trong cồn và trong dung dịch kiềm

1.2.2.2. Sắc ký giấy (SKG)

Các phenol cũng được phát hiện bằng phương pháp SKG nhưng với các dung môi khai triển SKG tốt nhất cho phenol (butanol- acid acetic - nước) thì các phenol đơn giản thường khó phân tích.

Bốn acid hydrocinnamic hay gặp nhất, thường tồn tại đồng thời trong cây, là acid ferulic, acid sinapic, acid caffeic và acid *p*-coumaric. Tách chúng đơn giản và thường dùng sắc ký giấy vì chúng phát quang ở ánh sáng tử ngoại (màu khác nhau: xanh da trời và xanh lá cây).

1.2.2.3. Sắc ký khí (SKK)

Sắc ký khí không được áp dụng nhiều để tách các phenol vì phải tạo dẫn xuất bay hơi thích hợp của các phenol (trimethylsilyl ether hoặc acetat). Có thể phân tích trực tiếp các phenol đơn giản và các acid phenol carboxylic bằng phương pháp SKK hoặc sau khi chuyển thành dẫn xuất methyl hóa. Tuy nhiên,

đây là kỹ thuật tốt để tách các hỗn hợp phenol đơn giản trong cây. Thí dụ, có thể tách 38 phenol khác nhau, như *p*-cresol, catechol hay 4-methyl-2,6-dimethoxyphenol trong lá thuốc lá.

1.2.2.4. Sắc ký lỏng cao áp (SKLCA)

Phương pháp SKLCA pha ngược, dùng cột μ Bondapak C18 và Spherisorb C18 với pha động tương ứng là các hỗn hợp methanol- nước - acid acetic (6-12-1) và *n*-butanol - nước - acid acetic (14-342-1) tách tốt hỗn hợp các acid phenolic và aldehyd phenolic. SKLCA cũng là một phương pháp tốt để tách các acylphloroglucinol có trong các loài thuộc chi dương xỉ *(Dryopteris)* dùng cột pha ngược là μ Bondapak C18 với pha động là hỗn hợp dung môi tetrahydrofuran - acid phosphoric - nước (635-1-350).

1.3. Ứng dụng trong y học

Các hợp chất phenol, như arbutin được dùng để sát trùng đường niệu, các hợp chất salycylat có tác dụng chống viêm, các ester của acid cinnamic trong actisô (như cynarin, các acid phenolic) có tác dụng bảo vệ gan.

Các ester của phenylpropanoid glycosid đã được chứng minh có nhiều tác dụng quan trọng, như ức chế men CAMP phosphodiesterase (forsythiasid, plantamajosid), ức chế men aldose reductase (verbacosid). Verbacosid, forsythiasid ức chế men 5-LO (5-lipoxygenase) trong bạch cầu hạt ở người và ở màng bụng chuột.

Nhiều hợp chất phenol có tác dụng kháng khuẩn và kháng nấm.

II. COUMARIN

2.1. Giới thiệu

Coumarin là hợp chất hữu cơ có trong nhiều loài cây. Dị vòng chứa oxy của coumarin tạo nên mùi thơm được mô tả như mùi thơm của vanilin hay của cỏ mới khô. Coumarin được phát hiện từ những năm 1820; coumarin được tổng hợp trong phòng thí nghiệm từ năm 1868 để dùng làm nước hoa, hoặc hương liệu, hoặc để bán tổng hợp các chất hóa học khác, đặc biệt là chất chống đông và chất diệt loài gậm nhấm.

2.2. Đặc điểm cấu trúc và phân loại

2.2.1.Đặc điểm cấu trúc

Coumarin là những dẫn chất α-pyron có cấu trúc C6 - C3. Benzo α-pyron là

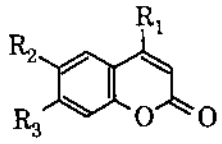
một coumarin đơn giản nhất tồn tại trong hạt cây họ Đậu. Cho đến nay, người ta đã biết đến gần 1000 coumarin khác nhau.

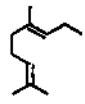
Hầu như trong các nguyên tử coumarin đều có nguyên tử oxy nối vào C7 nên có thể coi các coumarin đều là dẫn xuất của umbelliferon. Coumarin thuộc nhóm các hợp chất phenol nhưng phần lớn các nhóm OH phenol được ether hóa bằng nhóm CH_3 hay bằng một mạch terpenoid từ một đến 3 đơn vị isoprenoid.

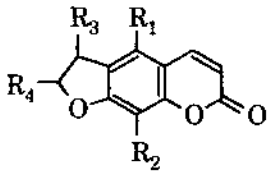
Về hóa học, coumarin có thể tồn tại dưới dạng tự do hay dạng kết hợp với đường glucose tạo thành coumarin glycosid. Mạch đường thường đơn giản, hay gặp là glucosa, đôi khi là glucosa-glucosa, hoặc glucosa-xylosa.

Giống như các phenylpropanoid khác, coumarin sinh ra do chuyển hóa qua các acid cinnamic, acid *p*-coumaric. Đặc trưng của quá trình là hydroxyl hóa ở vị trí 2', sau đến đồng phân hóa nối đôi, rồi đến lacton hóa. Trong các trường hợp này, coumarin chỉ sinh ra sau khi mô bị tổn thương và thủy phân men. Sự tạo thành di- và tri- hydroxycoumarin và ether của chúng liên quan tới hydroxyl hóa của umbelliferon hơn là lacton hóa của các acid cinnamic tương ứng. Prenyl hóa của vòng benzen bởi dimethyl allyl pyrophosphat ở vị trí 6 của 7-hydroxycoumarin cho furano và pyranocoumarin mạch thẳng, ở vị trí 8 nó có khả năng tạo những chất đồng đẳng.

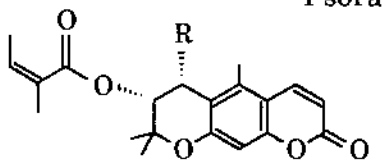
Sự tạo thành furanocoumarin bao gồm 2 bước: oxy hóa lập thể chọn lọc ở vị trí 4' và loại hydroxyisopropyl ở vị trí 5 do ngưng tụ aldol. Thế ở vị trí 5 hay 8 hoặc cả hai vị trí của furanocoumarin xảy ra sau và được xúc tác bởi men oxydase và men *o*-methyltransferase.

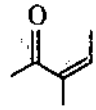


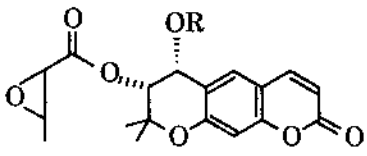
	R_1	R_2	R_3
Coumarin	H	H	H
Herniarin	H	H	OCH_3
Methyl-umbelliferon	CH_3	H	OH
Scopoletin	H	OCH_3	OH
Umbelliferon	H	H	OH
Ostruthin	H		OH

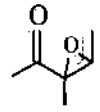


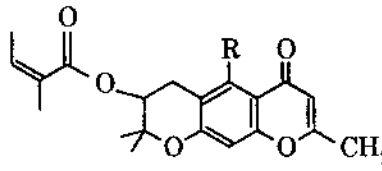
	R_1	R_2	R_3	R_4
Bergapten	OCH_3	H	H	H
Isopimpinellin	OCH_3	OCH_3	H	H
Peucedanin	H	H	OCH_3	$CH(CH_3)_2$
Xanthotoxin	H	OCH_3	H	H
Psoralen	H	H	H	H

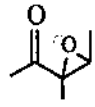


Xanthalin R: 

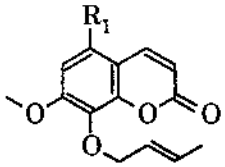


Peuarenarin R: 

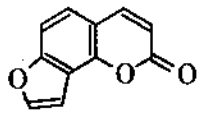


Peuarenin R: 

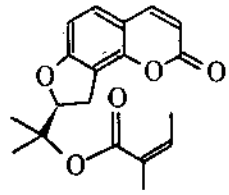
	R
Ledebouviellol	OH
2-Methylchromon	OCH_3



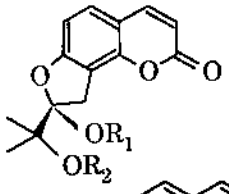
Osthol



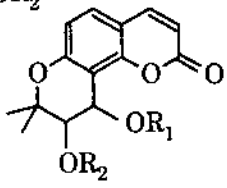
Angelicin



Columbianadin



	R_1	R_2
Apterin	H	β-glucosyl
Athamantin	iso-valeryl	iso-valeryl



	R_1	R_2
Anomalin	valeryl	valeryl

Hình 2: Cấu trúc hóa học của một số coumarin

2.2.2. Phân loại coumarin

Có thể phân coumarin thành các nhóm:

2.2.2.1. Coumarin đơn giản, bao gồm oxycoumarin và alkyl-oxycoumarin.

2.2.2.2. Furanocoumarin, bao gồm 6,7-furanocoumarin (còn gọi là psoralen);

dihydro 6,7-furanocoumarin; 7,8-furanocoumarin (còn gọi là angelicin) và dihydro 7,8-furanocoumarin.

2.2.2.3. Pyranocoumarin bao gồm 6,7-pyranocoumarin (còn gọi là xanthiletin); dihydro 6,7-pyranocoumarin; 7,8-pyranocoumarin; dihydro 7,8-pyranocoumarin và 5,6-pyranocoumarin (ít gặp trong cây).

- Ngoài ra, còn một số nhóm khác, như: 3-phenylcoumarin và 4-phenylcoumarin...

2.3. Tính chất, chiết xuất và phân tích coumarin

2.3.1. Tính chất vật lý

Coumarin là những chất kết tinh không màu, hoặc có màu vàng nhạt, vị đắng, một số lớn dễ thăng hoa có mùi thơm. Có thể dùng phản ứng thăng hoa của coumarin để định tính coumarin. Ở dạng glycosid dễ tan trong nước và dạng aglycon dễ tan trong dung môi hữu cơ kém phân cực. Các dẫn chất coumarin có huỳnh quang dưới ánh sáng tử ngoại. Cường độ huỳnh quang phụ thuộc nhóm oxy trong phân tử coumarin và pH của dung dịch. Nhóm OH ở C7 có khả năng tạo huỳnh quang mạnh nhất.

2.3.2. Tính chất hoá học

Coumarin có vòng lacton (ester nội) nên bị mở vòng tạo muối dễ tan trong nước khi bị tác dụng bởi kiềm, nếu acid hóa sẽ đóng vòng trở lại. Dưới tác dụng của kiềm, các dẫn chất acylcoumarin còn bị cắt nhóm acyl. Các dẫn chất coumarin có nhóm OH phenol tự do sẽ cho màu xanh với thuốc thử sắt III clorid. Ngoài ra, coumarin có thể tạo phản ứng ghép đôi với muối diazo.

2.3.3. Chiết xuất

Coumarin ở trạng thái tự do tan trong cồn và các dung môi hữu cơ như ether và các dung môi clo hóa và có thể chiết chúng bằng các dung môi này. Dạng glycosid tan tốt hơn hoặc ít tan trong nước. Để tinh chế coumarin, có thể dựa vào tính chất đóng mở vòng lacton. Trong một vài trường hợp có thể dựa vào tính chất thăng hoa. Tuy nhiên, ứng dụng của hai tính chất này trong chiết xuất coumarin bị giới hạn do có nguy cơ thay đổi cấu trúc. Người ta hay sử dụng kỹ thuật phân đoạn trên gel đối với coumarin (dạng aglycon và dạng glycosid). Bán điều chế coumarin bằng phương pháp SKLCA thường và pha ngược ngày càng được sử dụng rộng rãi.

2.3.4. Tính chất phổ

Coumarin có đặc tính phổ UV bị ảnh hưởng bởi bản chất và vị trí của nhóm

thế hoặc kiềm (KOH, $NaOCH_3$). Dưới ánh sáng tử ngoại, các vết coumarin trên SKLM có màu và cường độ màu tăng lên khi hơ hơi amoniac, từ màu xanh da trời đến màu vàng và màu tía.

Coumarin thường được định lượng bằng phương pháp quang phổ huỳnh quang (sau khi cạo vết lớp mỏng và rửa giải) hoặc đơn giản nhất là dùng phương pháp SKLCA.

2.3.5. Các phương pháp phân tích coumarin

2.3.5.1. Các acid hydrocinnamic và hydroxycoumarin

Coumarin thường được phát hiện cùng với hydrocinnamic như một "hợp chất phenol đơn giản", sau khi thủy phân dịch chiết bằng acid hay kiềm. Thường chiết xuất coumarin bằng các dung môi như ether hay ethyl acetat. Những hợp chất này dễ được phát hiện vì chúng phát quang ở tia tử ngoại, cường độ phát quang thường tăng lên khi xử lý với hơi amoniac. Sự đổi màu của chúng ở SKG rõ ràng hơn trong SKLM.

Bảng 2 : Màu trên sắc ký giấy và dữ liệu phổ của hydroxycoumarin

TT	Coumarin	BAW	Nước	Acid formic 10%	Phát quang ở anh sáng tử ngoại	EtOH λ_{max}
Aglycon						
	Coumarin	92	67	76	Không	212, 274, 282, (+)312
	Umbeliferon	89	57	60	Xanh da trời sáng	210, 240, (+)325
	Aesculetin	79	28	45	Xanh da trời	230, 260, 303, 351
	Scopoletin	83	29	51	Xanh tím	229, 253, 300, 346
	Daphnetin	81	61	54	Vàng nhạt	215, 263, 328
Glycosid	**BAW**	**Nước**	**BN**			
	Aesculin	53	56	13	Xanh sáng	224, 252, 293, 338
	Cichorin	53	61	10	Hồng nhạt	228, 255, 290, 345
	Scopolin	53	64	44	Tím hoa cà	227, 250, 288, 339

Ghi chú:

(+): Phát hiện bằng cách phun với dung dịch NAOH 5%; Cường độ phát quang màu xanh lá mạ tăng lên khi đặt giấy dưới ánh sáng tử ngoại 5 - 10 phút.

BAW: *n*-BuOH - HOAc - H_2O

BN: *n*-BuOH - 2M NH_4OH

Có thể dễ dàng phân biệt acid cinnamic với coumarin do cường độ phát quang yếu hơn và thực tế thường cho 2 vết khi sắc ký trong dung môi nước do tạo thành đồng phân. Việc xác định các coumarin có thể được khẳng định dựa vào tính chất phổ. Thí dụ acid caffeic thường có dải hấp thụ ở bước sóng 243 và 326 nm với vai xác định ở bước sóng khoảng 300 nm. Các hydroxycoumarin hấp thụ ở bước sóng dài hơn các acid cinnamic; thí dụ aesculetin có các băng hấp thụ ở 230, 260, 303 và 351 nm. Đo chuyển dịch bathochromic của phổ với sự có mặt của kiềm có thể phân biệt sự khác nhau giữa acid cinnamic và các coumarin.

2.3.5.2. Furanocoumarin

Ngược lại với các hydroxycoumarin đơn giản, furanocoumarin thường tan trong các dung môi kém phân cực và dễ dàng chiết xuất bằng ether hoặc ether dầu. Chúng thường tồn tại dưới dạng glycosid và được giải phóng ra khi thủy phân acid. SKLM trên silica gel được dùng phổ biến để phân tích. Dung môi thích hợp bao gồm cloroform, cloroform chứa 1 - 5% ethanol, ether - benzen (1 : 1), ether - benzen - 10 % acid acetic (1 : 1 : 1), thời gian khai triển thay đổi từ 1 - 2 giờ.

Furanocoumarin được phát hiện do có màu xanh da trời, tím, nâu, xanh lá cây hay màu vàng ở ánh sáng tử ngoại. Cường độ màu tăng lên khi phun bản mỏng với 10% KOH trong methanol, hoặc 20% antimon clorid trong cloroform. Có thể xác định furanocoumarin dựa vào phổ tử ngoại. Không giống với hydroxycoumarin, furanocoumarin không dịch chuyển phổ bathochromic trong dung dịch kiềm.

2.4. Các cây có chứa coumarin

Coumarin thường tồn tại trong thiên nhiên dưới dạng dẫn xuất của benzopyren. Coumarin được tìm thấy ở trong hơn 27 họ thực vật. Nó tồn tại phổ biến trong nhiều loài cây, như *Dipteryx odorata* (đậu Tonka), cây oải hương, cỏ ngọt ba lá, cam thảo, quế, và trong các loài rau quả như dâu tây, quả mơ, quả anh đào...

Coumarin phổ biến trong nhiều họ cây hai lá mầm, như họ Hoa tán, Cúc, Cà phê, Cam, Hoa hồng... và trong một số cây họ Cà (như Scopoletin). Nhiều cây một lá mầm cũng chứa hàm lượng lớn coumarin, như các loài Lan (họ Gramiaceae)...

Hydroxycoumarin có trong nhiều họ cây khác nhau, phổ biến nhất là umbeliferon (7-hydroxy), aesculetin (6,7-hydroxy) hay scopoletin (6 methoxy-7-hydroxycoumarin). Ngoài ra, đôi khi cũng gặp daphnetin (7,8-hydroxy) trong cây *Daphne mezereum* (thụy hương) và fraxetin(6-methoxy-hydroxy) trong cây *Fraxinus* sp.(tân bì và cây bạch tiễn).

Mặc dầu coumarin được tổng hợp chủ yếu ở lá, nhất là lá non và lá đang phát triển, nhưng nó vẫn tồn tại với hàm lượng tương đối cao trong quả, rồi đến rễ và thân. Hơn nữa, sự thay đổi mùa và điều kiện môi trường cũng có thể ảnh hưởng tới sự tồn tại của coumarin trong cây; cũng có những ngoại lệ tùy vào từng loài và hợp chất cụ thể, thí dụ furanocoumarin ở *Pastinaca satica* được tạo thành trong quả, furanocoumarin trong *Angelica changelica* được tạo thành ở lá, nhưng osthol lại được tạo thành ở rễ.

Các coumarin có tác dụng sinh học trong cây thường liên quan tới khả năng đóng vai trò một phytoalexin của chúng, tức là chúng được tạo thành khi cây bị tổn thương, do cây bị bệnh hoặc do khô héo; chúng tích tụ ở bề mặt của lá, quả và hạt, và ức chế sự phát triển và sự hình thành bào tử của các loài nấm trên cây; coumarin cũng hoạt động trong quá trình chuyển hóa của cây, đóng vai trò điều hòa sự phát triển của cây. Đặc biệt, furanocoumarin ức chế sự phát triển của đầu rễ, làm chậm sự nảy mầm.

2.5. Tác dụng dược lý của coumarin

Coumarin có nhiều tác dụng dược lý quan trọng bao gồm chống đông máu, kích thích tố, làm nhạy cảm với da, diệt vi trùng, thuốc giãn mạch, diệt côn trùng, trừ giun sán, giảm đau và hạ nhiệt. Sản phẩm lên men của coumarin là dicoumarol là chất chống đông máu mạnh. Dicoumarol, như wafarin, là thuốc chống đông máu rất thông dụng. Tuy nhiên, coumarin tự nhiên không có tác dụng trong hệ thống tiêu hóa dạ dày - ruột ở người, những chất này ở đường uống không có tác dụng chống đông máu. Vì vậy, những cây thuốc chứa coumarin thường chủ yếu được sử dụng để chống phù và tăng cường hệ vận mạch, chứ không phải là thuốc chống đông máu. Coumarin còn có tác dụng làm bền và bảo vệ thành mạch, ví dụ aesculetin, bergapten và fraxin.

Coumarin glycosid có tác dụng chống nấm, và tác dụng chống ung thư.

2.5.1. Tác dụng chống viêm

Umbelliferon đã được chứng minh có tác dụng giống nhóm NSAID (thuốc chống viêm không phải steroid) trên mô hình chống viêm cấp gây bởi carragenin và tác dụng này kéo dài tới 3 giờ là thời gian tác dụng tối đa của carragenin. Coumarin cũng có tác dụng trên mô hình chống viêm trên chân chuột gây bởi dextran. Osthol, chiết xuất từ các loài *Angelica* như độc hoạt *(A. pubescens), A. archangelica* và thương truật *(Atractylodes lancea)* có tác dụng ức chế chọn lọc 5-LO (5-lipoxygenase) *in vitro* nên được coi là có tính chất đối kháng với canxi.

Columbianadin, columbianetin acetat, umbeliferon được chiết từ độc hoạt có tác dụng chống viêm với liều 10 mg/kg thể trọng chuột.

Coumarin và các sản phẩm chuyển hóa của chúng có khả năng kích thích đại thực bào nên có thể dùng làm thuốc điều trị vết bỏng và các dạng vết thương do nhiệt.

2.5.2. Tác dụng kháng khuẩn và nấm

Nhiều dẫn chất của coumarin có tác dụng kháng khuẩn, cả các chủng vi khuẩn gram âm và gram dương và nấm. Chất novobiocin trong nấm *Streptomyces niveus* là một kháng sinh có phổ kháng khuẩn rộng. Nhóm thế OH ở vị trí 6 trong phân tử coumarin có vai trò quan trọng trong tác dụng kháng nấm trong khi nhóm OH tự do ở vị trí 7 lại có vai trò quan trọng trong tác dụng kháng khuẩn của coumarin.

2.5.3. Tác dụng khác

Các coumarin phân lập từ cây mù u *(Callophylum lanigerum),* costatolid từ nhựa mủ của *Calopyllum teysmanii* có tác dụng ức chế gyrase DNA, do đó ức chế hoạt tính của virus HIV. Gần đây, năm 2000, các nhà khoa học đã chứng minh được coumarin phân lập từ cây *Zanthoxylum schinifolium* có hoạt tính chống virus viêm gan B (HBV).

Tác dụng chống sốt rét của daphnetin chiết xuất từ chi *Daphne* (Yang et al., 1992) cũng như dentatin và clausarin chiết xuất lừ loài *Harmandiana* (Yenjai et al., 2000) đã được chứng minh.

Xanthotoxin được chiết xuất từ *Ammi majus* điều trị bệnh bạch biến từ hơn 50 năm nay. Điều trị bức xạ tia cực tím sau khi đã uống hoặc bôi các psoralen (như xanthotoxin) hiện được dùng khá phổ biến, thuận lợi và có hiệu quả trong điều trị bệnh vẩy nến, có thể giảm tác dụng phụ bằng cách thay xanthotoxin bằng bergapten.

Trimethoxypsoralen (TMP) và dẫn xuất có tác dụng ức chế tăng sinh tế bào lympho mạnh hơn xanthotoxin (Berger et Coven, 1999).

Woo và cs. (1983) đã nghiên cứu tác dụng của coumarin trong *Angelica koreanan* trên men chuyển hóa thuốc và thấy imperatorin, isoimperatorin làm chậm chuyển hóa thuốc *in vitro* và *in vivo.* Praeruptorin A, xanthotoxin, psoralen và bergapten được chiết xuất từ dịch chiết cloroform của rễ *Peucedanum japonicum* ức chế men MAO (não chuột). Daphnetin ức chế men proteinkinase ở tế bào ung thư gan Hep G2.

Coumarin và dẫn xuất gây nên sự thay đổi đáng kể trong điều hòa đáp ứng miễn dịch. Coumarin đóng vai trò gián tiếp qua sự điều biến của hệ miễn dịch chủ, do đó kích thích hoạt tính miễn dịch dẫn tới bảo vệ chống lại sự tái phát của khối u, hoặc giảm kích thước các khối u nhỏ. Nó có tác dụng trực tiếp ức chế phát triển đối với dòng tế bào u ác tính *in vitro,* thí dụ dịch chiết rễ *Angelica japonica* (chứa scopoletin, japoangelon, xanthotoxin, bergapten) có tác dụng lên sự phát triển dòng tế bào ung thư dạ dày MK-1, dịch chiết methanol của *Tordylium* (chứa umbeliferon, isoimperatorin và dẫn xuất angelicin) ức chế dòng tế bào ung thư KB (ung thư mũi hầu) và NSCLS-N6 (dòng tế bào ung thư biểu mô cuống phổi).

2.5.4. Độc tính của coumarin

Độc tính của coumarin có phần nào chưa được nghiên cứu kỹ. Cơ quan quản lý Thuốc và thực phẩm Mỹ và Viện nghiên cứu ung thư quốc gia đã chỉ định phải nghiên cứu độc tính và tác dụng sinh ung thư của coumarin. Các báo cáo cho thấy tác dụng độc với một số cơ quan nhất định chỉ xảy ra ở một số loài và dòng, sự chuyển hóa coumarin khác nhau về định tính và định lượng giữa người, và trong loài gặm nhấm. Tình trạng sinh khối u ung thư đã được phát hiện sau khi dùng quá liều các hợp chất này trong thời gian dài.

Theo La ke (1999), coumarin không phải là tác nhân gây độc gen.

2.5.4.1. Độc tố aflatoxin

Aflatoxin là một độc tố nấm có khung cơ bản difuranocoumarin, là sản phẩm chuyển hóa thứ cấp của các loài nấm *Aspergillus flavus* và *A. parasiticus.* Aflatoxin có khả năng gây ung thư ở mức độ tế bào, có thể gây quái thai và gây đột biến trên chuột. Nghiên cứu mới đây ở Mỹ cho thấy aflatoxin là một trong những chất có khả năng gây đột biến và ung thư mạnh nhất.

2.5.4.2. Độc tố ochratoxin

Các ochratoxin đều có khung isocoumarin. Hợp chất đầu tiên được phát hiện là ochratoxin A, phân lập từ *A. ochraceus.* Ngoài ra, ochratoxin còn được tìm thấy trong chi *Aspergillus, Penicillium...* Ochratoxin có thể gây thương tổn cấp tính cũng như mạn tính cho thận. Ngoài ra, còn có tác dụng độc đối với hệ miễn dịch và tác dụng gây quái thai. Ochratoxin cũng được xếp vào danh mục các chất gây ung thư mạnh.

2.5.4.3. Những cây nước ngoài có chứa coumarin cấm hoặc thận trọng khi sử dụng

- *Dipteryx odorata* (Đậu Tonka)
- *Pilosella officinarum* (Mouse-ear Hawkweed).

2.6. Ứng dụng của coumarin trong công nghiệp dược phẩm và hoá học

Hoạt tính sinh học của psoralen và các dẫn chất dicoumarol đã được biết đến và nhiều loại hợp chất này đã được sử dụng trong điều trị bệnh vẩy nến và chống đông máu.

Bergapten được coi là một thuốc điều trị bệnh vảy nến, vì tác dụng lâm sàng của nó có thể so sánh được với tác dụng của xanthotoxin.

Warfarin điều chế từ coumarin được dùng làm thuốc chống đông máu kháng viatmin K. Warfarin natri dễ tan trong nước, có thể dùng dạng tiêm (bột đông khô) hay uống dạng viên nén. Warfarin có tác dụng ngăn ngừa tổng hợp prothrombin, làm tăng tác dụng của hóa học trị liệu, được dùng kết hợp với hóa học trị liệu để điều trị bệnh ung thư phổi. Warfarin uống được hấp thu nhanh.

Tất cả các thuốc chống đông máu nhóm coumarin liên kết mạnh với protein huyết tương 98 - 99%).

Coumarin và dẫn xuất do tính chất phát quang cũng được ứng dụng nhiều trong các phương pháp phân tích, như đánh giá hoạt tính enzym, đánh dấu các protein, phân tích ion...

Coumarin được sử dụng nhiều trong công nghiệp, chủ yếu làm hương liệu, chất định hương của nước hoa (thí dụ 3,4-dihydrocoumarin), làm tăng hàm lượng các tinh dầu, như cây oải hương, định hương trong thuốc lá, mạ điện; 6-methyl coumarin được dùng chủ yếu làm chất tăng mùi...

III. TANIN

3.1. Khái niệm chung

Tanin là các hợp chất polyphenol có trong thực vật có vai trò trong nhiều mặt của cuộc sống hàng ngày. Từ "tanin" có từ rất lâu và phản ánh kỹ thuật truyền thống là "thuộc da", tức là dùng các dịch chiết của các bộ phận nhiều loại cây khác nhau làm cho da động vật không thối và bền.

Tanin là những hợp chất cấu tạo dựa trên acid tanic và acid galic, rất phổ biến trong gỗ, vỏ cây và cây trồng lấy lá, tan tốt trong nước nhưng phản ứng với protein, điều đó là nguyên nhân gây ra tính làm se của nhiều loại cây và được dùng để thuộc da. Vỏ cây *Acacia* được dùng như một nguồn của tanin, trong vỏ rễ của nhiều loài cây có chứa một lượng lớn tanin.

Có ba nhóm chất chuyển hóa thứ cấp trong cây là các hợp chất có chứa nitơ, terpenoid và các hợp chất phenolic. Tanin thuộc nhóm hợp chất phenolic.

Tanin tồn tại cả trong cây hạt trần và hạt kín. Trong cây hạt kín thì tanin gặp phổ biến trong cây hai lá mầm hơn là trong cây một lá mầm.

Các họ cây hai lá mầm hay gặp có tanin là: cây keo *(Acacia* sp.*)*, cỏ ba lá *(Lotus* sp.*)*, cây hồng đậu *(Onobrychis* sp.*)*, cây bàng (*Terminalia catappa* L.), cây sim *(Rhodomyrtus tomentosa* Wight.). Ngoài ra, tanin còn có trong các loài: sồi *(Quercus* sp.*)*, thích *(Acer* sp.*)*, cây bulô *(Betula* sp.*)*, liễu *(Salix caprea)*, thông *(Pinus* sp.*)*, *Sorghum* sp.

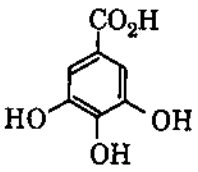
Tanin chủ yếu có trong không bào và chất sáp bề mặt của cây. Chúng không làm ảnh hưởng đến chuyển hóa của cây. Chỉ sau khi màng tế bào bị vỡ và chết, chúng mới hoạt động và có tác dụng chuyển hóa.

Các bộ phận của cây có chứa tanin: vỏ thân, gỗ, quả, lá, rễ, mụn cây.

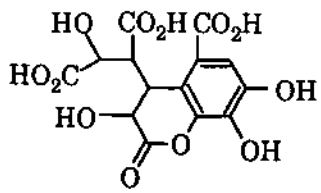
3.2. Cấu trúc hoá học của tanin và phân loại

3.2.1. Cấu trúc hóa học

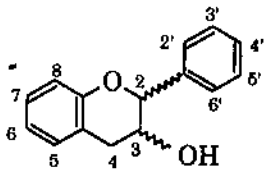
Tanin là các hợp chất phenolic có khả năng tủa với protein. Chúng gồm nhóm oligomer và polymer.



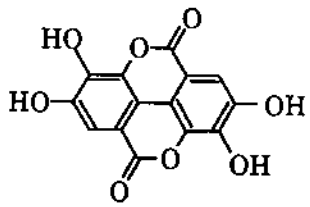
Acid galic



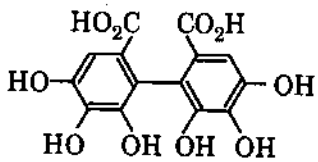
Acid chebulic



Favan-3-ol



Acid elagic



Acid (*s*)-hexahydroxydiphenic

Hình 3: Cấu trúc hóa học một số tanin

Có một số nhầm lẫn về thuật ngữ dùng để xác định hay phân loại tanin. Trên thực tế:

- Không phải chỉ có tanin kết hợp và tủa với protein (một số phenolic khác như pyrogallol và resorcinol cũng có tính chất này).

- Không phải tất cả các polyphenol tủa với protein hay tạo phức với polysaccharid.

Một trong các khái niệm chính xác nhất về tanin được đưa ra bởi Horvath (1981): ***"Tanin là hợp chất phenolic có trọng lượng phân tử cao, có chứa các nhóm hydroxyl và các nhóm chức khác (như carboxyl), có khả năng tạo phức với protein và các phân tử lớn khác trong điều kiện môi trường đặc biệt"***. Khái niệm tanin không bao gồm những chất phenol đơn giản hay gặp cùng với tanin, như acid gallic, các catechin, acid clorogenic...Chúng được coi là các pseudotanin.

3.2.2. Phân loại tanin

Tanin thường được chia thành hai nhóm chính:

- Tanin thủy phân được (HT)

-Tanin ngưng tụ, hay xác định chính xác hơn là các proanthocyanidin (PA).

3.2.2.1. Tanin thủy phân được (HT)

Tanin thủy phân được là các ester của đường (hoặc polyol) với nhiều phân tử acid phenolic. Phân tử đường thường là glucose. Acid phenolic có thể là acid gallic (galotaunin) hay acid hexahydroxydiphenic (HHDP) và dẫn xuất oxy hóa của nó là acid dehydroxyhexahydroxydiphenic (DHHDP), acid chebulic (elagitannin). HT thường có hàm lượng thấp trong cây. Khi thủy phân, chúng tạo thành acid gallic, epigallic và đường.

Một số tác giả chia tanin thủy phân được thành hai nhóm:

+ **Taragallotanin** (nhân là acid gallic và acid quinic).

+ **Caffetanin** (acid caffeic và acid quinic).

Galotanin:

- Nhóm phenolic bị ester hóa với nhân đôi khi bị thế bởi các dimer hoặc các oligomer bậc cao hơn của acid gallic (mỗi đơn monomer được gọi là galloyl).

- Mỗi phân tử HT thường gồm nhân của *D*-glucose và từ 6 tới 9 nhóm galloyl.

- Trong tự nhiên, có nhiều các ester của mono và di-galloyl của glucose

(trọng lượng phân tử khoảng 900). Chúng không được coi là tanin vì tối thiểu có 3 nhóm hydroxyl của glucose phải bị ester hóa thể hiện khả năng liên kết mạnh thì mới được xếp là tanin.

- Nguồn galotanin dồi dào nhất là acid tanic thu được từ ngũ bội tử là bướu cây muối *(Rhus semialata).* Nó có nhân là năm nhóm galloyl-*D*-glucose và 5 đơn vị galloyl liên kết với 1 nhân galloyl. Hàm lượng tanin thay đổi từ 50 - 70%.

- Galitanin có trong rễ cây đại hoàng *(Rheum* sp.*)*, lá cây thường xanh dây leo *(Arctostaphylos uva- ursi),* bướu cây sồi *(Quercus infectoria)*...

Elagitanin:

- Các nhóm phenolic có chứa acid hexahydroxyphenic tự loại nước tạo dạng lacton của acid ellagic.

- Trọng lượng phân tử từ 2000 - 5000.

Elagitanin có trong lá nhiều loài bạch đàn *(Eucalyptus* sp.*)*, vỏ quả và vỏ cây lựu *(Punica granatum),* vỏ cây sồi trắng *(Quercus albus)*...

3.2.2.2. Tanin ngưng tụ (Proanthocyanidin - PA)

PA, còn được gọi là tanin pyrocatechic, tồn tại trong cây phổ biến hơn HT. Chúng là các oligomer hay polymer của các đơn vị flavonoid (flavan 3-ol) nối với các dây nối C–C không bị cắt khi thủy phân, như catechin, epicatechin hoặc các chất tương tự.

- Khái niệm "proanthocyanidin" là do phản ứng xúc tác acid oxy hóa tạo anthocyanidin màu đỏ khi đun nóng PA trong dung dịch cồn acid. Các anthocyanidin phổ biến nhất là cyanidin (flavan-3-ol, từ procyanidin) và delphinidin (từ prodelphinidin).

- PA có thể chứa từ 2 tới 50 hoặc nhiều hơn các đơn vị flavonoid. Các PA polymer có cấu trúc phức hợp vì các đơn vị flavonoid có thể khác nhau một số nhóm thế và vì bề mặt thay đổi của các liên kết giữa các flavan.

Tanin ngưng tụ được xếp vào nhóm flavonoid theo nghĩa rộng. Sinh nguyên giống như của flavonoid.

Catechin có thể tồn tại ở dạng monomer nhưng không có tính chất thuộc da. Đó không phải là tanin.

Proanthocyanidin không bao giờ tồn tại ở dạng monomer. Dạng ngưng tụ ít nhất là dạng flavan. Sự liên kết được thực hiện giữa các carbon 4 và 8, và 4 và 6.

Proanthocyanidin là oligomer flavonol tương ứng với sự liên kết 2 -10 đơn vị flavan.

Bảng 3: Phân loại tanin

TT	Tên hợp chất	Cấu trúc	Trọng lượng phân tử	Tủa với protein
1	Tanin ngưng tụ Proanthocianidin (flavolan)	Oligomer của catechin và flavan 3,4-diol	1000 - 3000	++++
2	Tanin thuỷ phân được Galotanin Elagitanin	Ester của acid galic và glucosa Ester của acid hexahydroxydiphenic và glucosa	1000 - 1500 2000 - 5000	+++++ +++++
3	Prototanin Tiền tanin	Catechin (và galocatechin) flavan 3,4-diol	200 - 600	±

3.3. Tính chất, chiết xuất và phân tích

3.3.1. *Tính chất của tanin*

3.3.1.1. Tính chất chung

- Tanin là các hợp chất oligomeric với nhiều đơn vị cấu trúc và nhiều nhóm phenolic tự do. Trọng lượng phân tử từ 500 tới hơn 20.000.

- Tanin tan trong nước tạo dung dịch keo, nhưng độ hoà tan của chúng thay đổi phụ thuộc vào mức độ polymer hóa. Chúng tan trong cồn và aceton. Độ ổn định ở dung dịch nước thay đổi theo cấu trúc và thường là vừa phải. Thí dụ, trong quá trình chiết với nước nóng, geraniin phân hủy ở 30 phút tạo acid gallic, elgallic và corilagin (1-galoyl-3,5-HHDP-glucose). Dạng dimeric và oligomeric của galoyl và ester HHDP của glucose cũng tương đối không bền.

- Giống như các phenol, tanin phản ứng với sắt clorid. Chúng cũng tủa với muối kim loại nặng và gelatin và dựa vào tính chất này để tách tanin.

Có thể phân biệt tanin thủy phân và tanin ngưng tụ dựa vào tính chất của chúng trong môi trường acid ở nhiệt độ cao.

- Tanin có thể tạo phức với: protein, tinh bột, cellulose, muối khoáng.

3.3.1.2. Tính chất của tanin thủy phân được

Bị thủy phân trong môi trường acid nhẹ, kiềm nhẹ, nước nóng hay enzym (tananse) tạo thành carbohydrat và acid phenolic.

3.3.1.3. Tính chất của tanin ngưng tụ (Proanthocyanidin)

Tanin pyrocatechic khó tan trong nước hơn tanin pyrogallic. Nó còn được gọi

là phlobatanin do dễ tạo thành chất đỏ tanin hay phlobaphen dưới tác dụng của acid hoặc enzym. Phlobaphen là đặc trưng của một số dược liệu như canh ki na, vỏ quế...

- Khi cất khô, tanin pyrocatechic cho pyrocatechin là chủ yếu; cho tủa màu xanh đậm với muối sắt ba, và tủa bông với nước brom.

- Các sắc tố anthocyanidin có màu thay đổi từ màu hồng, đỏ tươi, đỏ, màu hoa cà, tím, và màu xanh da trời trong hoa, lá, quả, nước quả và rượu vang. Chúng cũng tạo nên vị se của quả và rượu vang.

- Mối liên kết giữa C–C trong PA không bị phá vỡ khi thủy phân acid, vì vậy tanin ngưng tụ không thủy phân trong điều kiện acid nhẹ, kiềm nhẹ, enzym hay nước nóng.

- Phụ thuộc vào cấu trúc hóa học và bậc polymer hóa, PA có thể tan hay không tan trong dung môi hữu cơ - nước. Hỗn hợp các oligomer có tính chất chống oxy hóa mạnh được gọi là các proanthocyanidin oligomer, và có trong dịch chiết hạt nho, vỏ cây thông biển có tên thương mại là pycnogenol.

Tanin ngưng tụ có nhiều trong các chi *Acacia, Camellia, Cinchona, Colophospermum, Rheum...*

Cũng có một số tanin đặc biệt. Nó còn được gọi là những gallo và elagiflavotanin, là sự kết hợp giữa tanin ngưng tụ và tanin thủy phân được. Thí dụ tanin trong cây *Hamamelis virginiana.*

3.3.2. Chiết xuất

Tanin thường được chiết với hỗn hợp nước hay aceton (thích hợp nhất là 70% aceton - 30% nước vì aceton hạn chế tanin tủa với protein. Thường tránh dùng methanol do gây ra methanol hóa galoyl. Hiệu suất tối đa thu được khi chiết tanin trong dược liệu tươi, hoặc được liệu bảo quản lạnh, hay làm khô ở áp suất thấp vì khi dược liệu khô, một phần tanin kết hợp không thuận nghịch với các polymer khác. Sau khi cất loại aceton, loại các sắc tố và lipid khỏi dung dịch nước bằng cách chiết dung môi (như dicloromethan). Sau đó, dung dịch nước được chiết bằng ethyl acetat để tách các proanthocyanidin dimeric và hầu hết các galotanin. Các proanthocyanidin polymeric và các galotanin có trọng lượng phân tử cao còn lại trong pha nước. Sử dụng các phương pháp sắc ký thích hợp để thu được các hợp chất tinh khiết. Kỹ thuật hay được sử dụng nhất ở đây là kỹ thuật lọc gel, sau đó dùng phương pháp sắc ký lỏng cao áp pha ngược.

Khi **tinh chế tanin** cần loại các hợp chất phenolic có trọng lượng phân tử thấp và các sắc tố trong dịch chiết thô; cũng có thể tinh chế nhiều loại tanin dựa vào sự hấp phụ trên Sephadex LH-20.

3.3.3. Phương pháp phân tích tanin

3.3.3.1. Định tính

Với muối sắt, galotanin và elagitanin cho màu xanh đen và tạo tủa, tanin ngưng tụ cho màu hồng với kali iodua (trong khi đó acid galic tự do cho màu da cam với thuốc thử này). Elagitanin cho màu hồng, rồi chuyển sang màu tía và sau là màu xanh da trời với hỗn hợp thuốc thử acid nitric và acid acetic. Tanin ngưng tụ cho màu đỏ với vanilin và acid hydrocloric...

3.3.3.2. Định lượng

Có thể định lượng tanin theo các phương pháp sau:

- Phương pháp so màu: Phương pháp Folin-dennis và Folin-ciocalteau (phản ứng khử acid phosphomolypdic của các phenol trong dung dịch kiềm). Phương pháp Vanilin - acid clohydric (đặc trưng đối với tanin ngưng tụ); phương pháp Rhodanin (đặc trưng đối với các tanin thủy phân được loại gallotanin); phương pháp Wilson và Hagerman (đặc trưng đối với tanin thủy phân được loại ellagitanin).

- Phương pháp trọng lượng: **đo trọng lượng với ytebi** (Yb): Dựa vào khả năng tạo tủa chọn lọc của Yb với polyphenol trong dịch chiết. Phương pháp định lượng này không cần chất chuẩn.

Ngoài ra, còn có thể định lượng tanin bằng phương pháp bột da, tủa với đồng acetat, protein hoặc tủa với PVP, phương pháp oxy hóa, hoặc phương pháp khuếch tán ánh sáng của gốc tự do...

3.4. Tác dụng của tanin

3.4.1. Tác dụng sinh học

Khả năng tạo tủa với protein đóng góp vào tác dụng chữa tiêu chảy, cũng như tác dụng chống chảy máu của các thuốc có hàm lượng tanin cao. Tanin có thể kết tủa với kim loại nặng và alcaloid nên thường được dùng để chữa ngộ độc kim loại và alcaloid.

Tác dụng ức chế sinh ung thư của tanin chủ yếu do khả năng kết hợp của tanin với các chất gây ung thư. Cơ chế ức chế phần nào phụ thuộc vào loại chất sinh ung thư.

Tanin ở nồng độ cao ức chế hoạt động của các enzym, nhưng ở nồng độ thấp chúng thường kích thích hoạt tính các enzym.

Tanin tham gia vào quá trình trao đổi chất và các quá trình oxy hóa khử trong cây. Tanin có tác dụng kháng khuẩn nên có tác dụng bảo vệ cây.

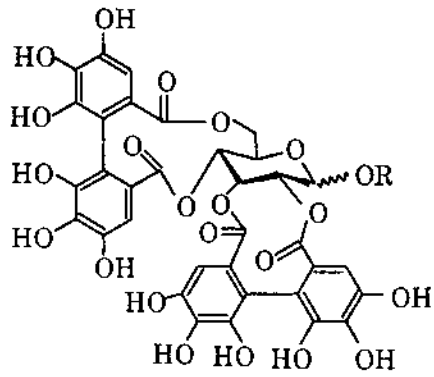
Các hợp chất tanin có tác dụng giảm đau tại chỗ do làm giảm tác dụng ở đầu dây thần kinh trung ương (ức chế và diệt vi khuẩn); cầm máu do tác dụng làm se hệ mao mạch; có tác dụng chữa trĩ, viêm miệng và họng.

Tanin được uống để trị đi ngoài nhưng phải thải trừ ngay khỏi đường tiêu hóa bằng cách dùng thuốc nhuận tràng.

Nước ép quả hồng có chứa nhiều tanin ngưng tụ được dùng ở Nhật để điều trị cao huyết áp và ngăn ngừa chứng đột quỵ. Quả hồng ngay cả khi chín cũng có tác dụng làm săn se do chứa nhiều tanin ngưng tụ. Uống dịch chiết tanin thô quả hồng làm ức chế đáng kể các cơn đột quỵ bất ngờ.

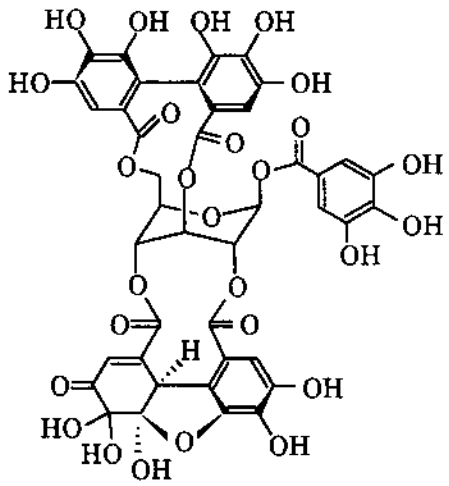
Tanin thủy phân được, galotanin và một tanin ngưng tụ chiết xuất từ vỏ cây tống quán sủi đỏ ức chế 1,2-dimethylhydrazin gây khối u ở ruột kết.

Casuarinin, tanin thủy phân được chiết xuất từ vỏ cây *Terminalia arjuna* Linn, có tác dụng ức chế virus *Herpes* typ 2 (HSV-2) *in vitro*.



Casuarictin (R = β-glucose)

Geraniin, một tanin thuỷ phân được có trong thành phần cây chó đẻ răng cưa (*Phylanthus amarus* Chum. et Thonn.) được dùng để điều trị viêm gan virus do ức chế tín hiệu điều khiển protein kinase, hay ức chế tương tác giữa HBV enhacer I và các yếu tố dịch mã tế bào.



Geraniin

Thành phần polyphenol có tác dụng chống oxy hóa chính trong chè xanh, (-)-epigalocatechin galat có tác dụng ức chế nhiều loại tế bào khác nhau liên quan tới quá trình sinh ung thư.

Đối với động vật nhai lại, tanin có một số tác dụng nhất định, như ức chế hấp thu thức ăn của động vật. Tác dụng này thay đổi phụ thuộc vào hàm lượng và loại tanin hấp thu, khả năng của động vật và cơ chế thải độc.

3.4.2. Hoạt tính sinh học của tanin và các sản phẩm phân hủy của tanin

Tanin, đặc biệt là tanin thủy phân được có hoạt tính sinh học thấp theo đường uống do có khả năng tạo phức với protein nên có độ tan thấp trong chất béo.

Tanin thủy phân được tồn tại hầu như trong ruột ở độ pH trung tính và kiềm hơn là pH acid, mức độ thủy phân phụ thuộc gần như hoàn toàn vào hệ vi sinh vật trong ruột. Acid gallic và epigallic có tác dụng độc với gan. Dùng tanin với liều cao trong một thời gian dài, có thể gây tổn thương cho gan.

3.4.3. Tương tác sinh dược học của tanin

Tanin đóng vai trò đặc biệt trong nén ép bề mặt màng nhầy sau khi vào cơ thể, vì vậy dùng nó để trị bệnh tiêu chảy. Tanin có tác dụng chống chảy máu, giảm đau và làm giảm độ acid trong dạ dày. Khả năng tạo tủa của tanin với alcaloid, protein và các phân tử lớn khác có thể coi như tương tác sinh dược học làm giảm khả năng sinh học của các chất liên quan. Một số tác giả đã chứng minh tác dụng chống oxy hóa của chè xanh và chè đen bị mất hoàn toàn khi thêm sữa vào chè. ***Tuyệt đối tránh đồ uống có hàm lượng tanin cao trong khi dùng các thuốc chữa bệnh là alcaloid.*** Không nên kê đơn các vị thuốc có

hàm lượng tanin cao cùng với vị thuốc có hàm lượng alcaloid cao, đặc biệt là ở dạng cao lỏng hỗn hợp.

Có ít nghiên cứu về sinh dược học của các sản phẩm phân hủy phenolic của tanin và tác dụng của chúng trên sự hấp thu thuốc.

Mối liên quan giữa cấu trúc và tác dụng sinh học: sự khác nhau về cấu trúc hóa học của tanin dẫn tới khác nhau về tác dụng sinh học. Phản ứng của tanin thủy phân và tanin ngưng tụ với protein phụ thuộc vào cấu trúc không gian của phân tử và khả năng phản ứng của các nhóm phenolic.

Các protein khác nhau có ái lực khác nhan đối với tanin và nó phản ánh chức năng sinh học của chúng. Trọng lượng phân tử của tanin tăng thì khả năng liên kết với các phân tử protein giảm. Tác dụng làm se của chúng trở nên kém do chúng liên kết chặt vào các thành tế bào.

3.5. Một số dược liệu chứa hàm lượng tanin cao

***3.5.1. Cau** (Areca catechu)*

220 - 500.000 ppm. Hạt cau non tỉ lệ tanin 70% nhưng khi chín còn 15 - 20%.

***3.5.2. Long nha thảo** (Agnmonia eupatona):* 50.000- 80.000 ppm. .

***3.5.3. Chè** (Camelia sinensis* O. Ktze): 20% tanin có tác dụng làm săn da, sát khuẩn mạnh.

Tanin trong chè là hỗn hợp của các catechin và dẫn xuất có tác dụng như một vitamin P.

Lá chè: 90.000 - 130.000 ppm.

***3.5.4. Sồi** (Quercus infectoria):* 400.000 - 700.000 ppm.

***3.5.5. Sồi trắng** (Quercus alba):* 78.500 - 200.000 ppm.

IV. LIGNAN, NEOLIGNAN VÀ CÁC HỢP CHẤT LIÊN QUAN

4.1. Giới thiệu chung

Các phytoestrogen chính trong thiên nhiên bao gồm các isoflavon, coumestan và lignan.

Có 4 nhóm hợp chất được tạo thành do sự ngưng tụ của các đơn vị phenylpropan là lignan, neolignan, "oligomer", norlignan. Có thể xếp cả các lignan lai hóa vào nhóm này.

Lignan là các hợp chất diphenolic $(C6 - C3)_2$, tạo dây nối đuôi - đuôi của 2 đơn vị acid cinnamic. Lignan được tạo thành do trùng hợp hóa 2 acid cinnamic.

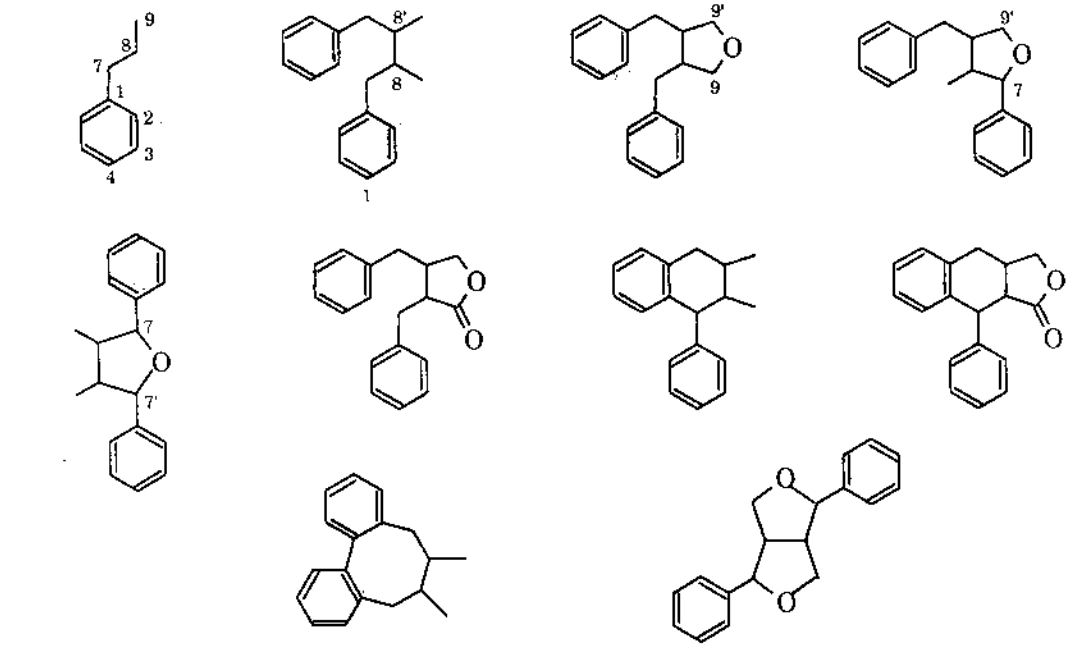
Khái niệm lignan thường để chỉ các hợp chất có khung là kết quả của liên kết giữa β carbon của mạch nhánh với 2 đơn vị dẫn xuất của 1-phenylpropan (dây nối 8 - 8').

Neolignan cũng là sản phẩm ngưng tụ của các đơn vị phenylpropanoid, nhưng dây nối thực tế thay đổi chỉ với 1 β carbon (thí dụ 8-3'; 3-3'; 8-O- 4').

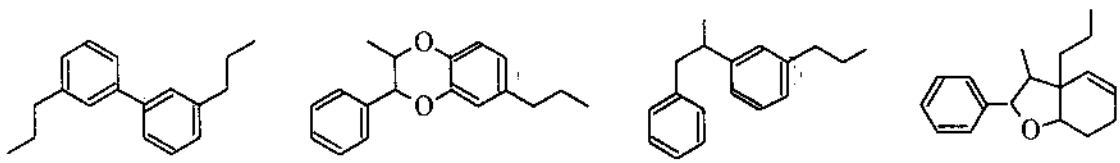
Khái niệm oligome chỉ các lignan và neolignan là kết quả ngưng tụ của từ 2 tới 5 đơn vị phenylpropanoid (thí dụ sesqui và dilignan của hạt ngưu bàng, acid lithospermic).

Norlignan có khung C17 và là lignan đặc trưng của các cây hạt trần.

Nhóm cuối cùng bao gồm "lignoid" cũng còn gọi lignan lai hóa, như flavonolignan của cúc gai (*Silybum marianum Gaertn*) hay của *Hydnocarpus* sp., coumarolignan của nhiều cây họ Simaroubaceae và xantholignan như kielcorin.



Hình 4: Các loại lignan chính



Hình 5: Cấu trúc của neolignan

Có hàng trăm loại lignan, phân bố rộng rãi trong khoảng 70 họ. Chúng khác nhau ở bậc oxy hóa, tạo vòng hoặc dẫn xuất. Trong các cây hạt trần, lignan tập trung chủ yếu ở gỗ, trong khi đó ở các cây hạt kín chúng được phát hiện ở tất cả các bộ phận của cây.

Neolignan ít gặp hơn, thường tồn tại dưới dạng các phenol propenyl- và allyl.

4.2. Phân tích các lignan

Lignan chứa cấu trúc thế ở vị trí 2,3 của di-1,4-benzylbutan. Đó là các lignan polymer có mạch dài. Vì vậy, tách các hợp chất này trong cây yêu cầu xử lý hóa học để tạo chúng ở dạng aglycon hay glycosid.

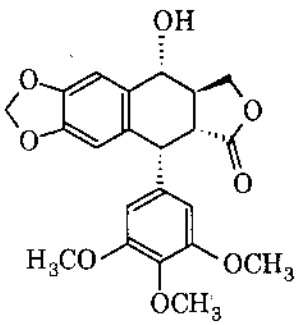
Hỗn hợp các lignan đơn giản thường được tách bằng SKG với hệ dung môi *n*-butanol- acid acetic - nước và dung dịch 15% acid acetic. Hỗn hợp các lignan phức tạp hơn có thể được tách trên SKG đã tẩm dung dịch acid molybdic loãng, dung môi khai triển butanol- acid acetic- dung dịch acid molybdic trong nước. Cũng có thể tách hỗn hợp này bằng phương pháp SKLM trên silica gel dùng dung môi khai triển như ethyl acetat - methanol (19-1) hay benzen - ethanol (99-1).

Không có thuốc thử đặc hiệu cho lignan. Điều này giúp phân biệt lignan với các hợp chất phenol khác. Lignan có màu tối trên giấy khi soi đèn tử ngoại hay có thể phun thuốc thử 10% antimon clorid trong cloroform. Trên bản mỏng sắc ký, có thể phát hiện chúng bằng cách phun H_2SO_4 đặc. Cũng có thể phát hiện lignan bằng phương pháp quang phổ.

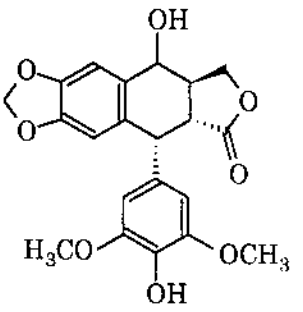
Chúng hấp thụ ở bước sóng 280 - 284 nm, băng hấp thụ này có thể chuyển dịch tới bước sóng 298 nm với sự có mặt của kiềm.

4.3. Tác dụng sinh học của lignan

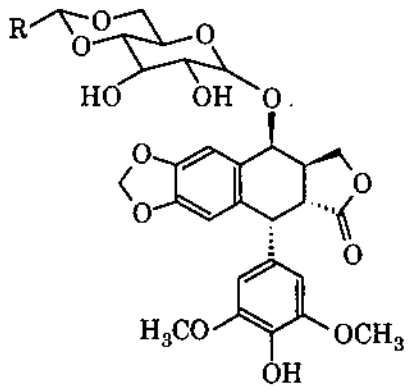
Lignan và các cây có chứa lignan đã được sử dụng lâu đời trong y học cổ truyền. Mặc dầu nhiều lignan, nhưng hầu như các arylnaphthalen và dibenzocyclo octan có tác dụng độc và tính chất chống phân bào, chỉ có các dẫn xuất bán tổng hợp của podophylotoxin mới được dùng trong lâm sàng.



Podophylotoxin



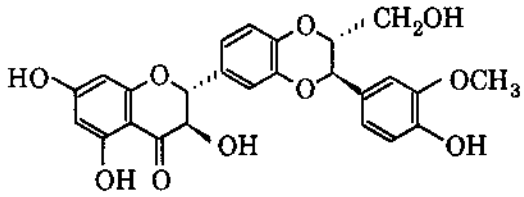
α-Pelatin



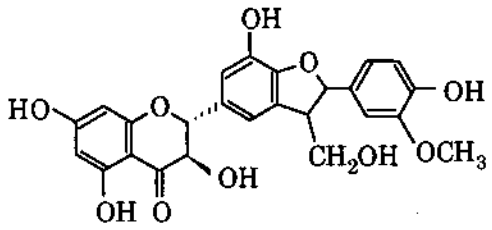
R = CH_3, Etoposid

R = thienyl, Teniposid

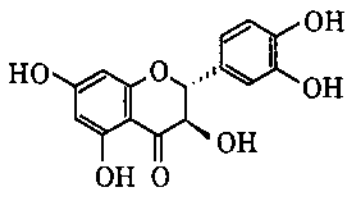
Các lignan trong cây có tác dụng bảo vệ gan, thí dụ flavonolignan là silymarin bao gồm silybin, silychristin, silidianin có trong quả cây cúc gai - *Silybum marianum* Gaertn.



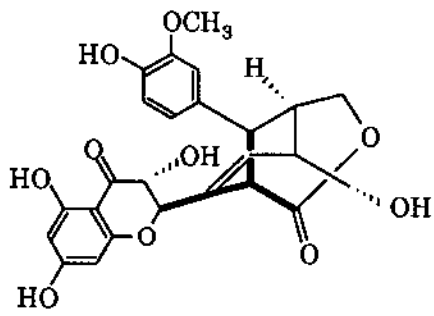
Silybin



Silychristin



Taxifolin



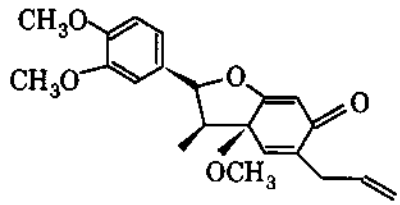
Silydianin

Nghiên cứu tác dụng bảo vệ gan của hơn 30 lignan, như schizandrin, iso schizandrin và các gomisin A, B, C, D, F và G tìm thấy trong quả cây ngũ vị tử *(Schizandra chinensis* (Turcz.) Baill., họ Ngũ vị - Schizandraceae) cho thấy chúng có tác dụng bảo vệ gan rất tốt, tăng tổng hợp protein gan được dùng để điều trị viêm gan mạn có men gan tăng, điều trị tổn thương gan...

Lignan acid nordihydroguaaretic - NDGA (trong cây *Larrea mexicana)* là một trong những hợp chất thiên nhiên có tác dụng chống oxy hóa mạnh, ức chế men 5- LO, ức chế tế bào ung thư được dùng làm thuốc chống oxy hóa, chống ung thư và chống viêm.

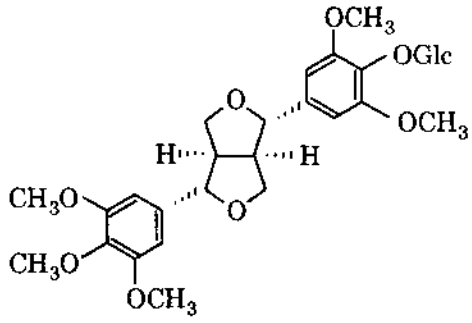
Lignan và neolignan có tác dụng ức chế men, đặc biệt là men C-AMP phosphodiesterase và các men của quá trình hô hấp. Tác dụng hạ huyết áp của bis-β-*D*-glucosid của (+)-pinoresinol, tác dụng chống côn trùng của các furanocoumarin (pyrethrin) trong dầu vừng.

Trong nhóm neolignan thì kadsurenon được phân lập từ thân cây *Piper futokadsura* có tác dụng chống dị ứng và viêm khớp, ức chế yếu tố hoạt hoá tiểu cầu. Một số neolignan khác, cũng như furanofuranoid lignan (thí dụ: magnolol, aschantin) cũng được chứng minh có tác dụng tương tự.



Kadsurenon

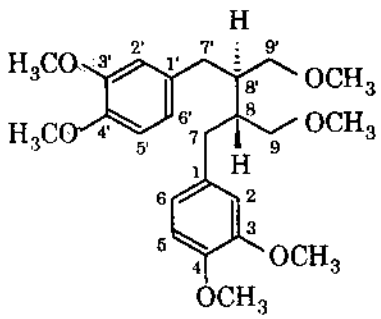
Một số lignan là dẫn xuất của cyclolignan naphthalen - hay tetrahydro-naphthalen có tác dụng chống virus. Gần đây, các nhà khoa học Nhật Bản đã từngthấy di-O-β-*D*-glucosid của (+)-syringaresinol có trong rễ loài Ngũ gia bì nhân sâm Siberi có tác dụng sinh thích nghi "adaptogen" (kháng stress).



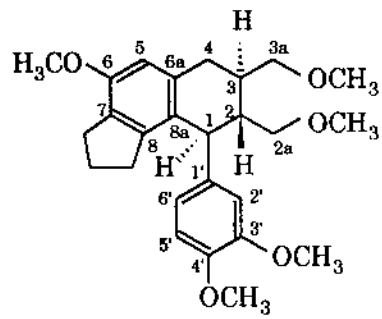
(+)-Syringaresinol di-O-β-*D*-glucosid

Về mặt hóa học, các estrogen trong cơ thể (estradiol, estron và estriol) có cấu trúc steroid. Nhiều hạt của cây (như hạt lựu, chà là) thực tế có chứa một lượng nhỏ estron, nhưng nhiều phytoestrogen không phải là các steroid; chúng có thể là các isoflavon, lignan và coumestan, gọi chung là các hợp chất phytoestrogen phenolic. Chúng không được xác định là các steroid nhưng có tác động tới các thụ thể steroid chuyển hóa hormon trong tế bào.

Nhiều loài trong chi *Phyllanthus* được dùng trong y học cổ truyền ở nhiều nước trên thế giới. Chó đẻ răng cưa *(Phyllanthus amarus* Chum et Thonn) là một cây thuốc được dùng để chữa vàng da và một số bệnh gan khác. Phần trên mặt đất được dùng làm thuốc có chứa diarylbutan (Phylanthin 0,7%) có hàm lượng lignan cao. Từ dịch chiết chó đẻ răng cưa, các nhà khoa học Thái Lan đã chiết được 2 dẫn xuất của lignan là phylanthin và hydrophylanthin với nồng độ tương ứng là 2,1 μg/ml có hoạt tính đối với dòng tế bào ung thư KB-V1 đã kháng vinblastin).

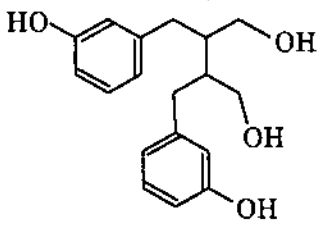


Phylanthin

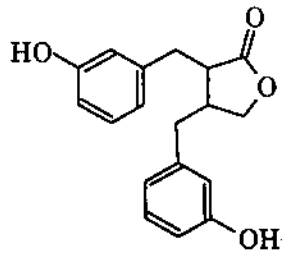


Hypophylanthin

Lignan dibenzocyclo-octadien có trong vỏ rễ *Steganotaenia araliaceae* được chiết từ phân đoạn tan trong ethyl acetat có tác dụng chống phân bào (tế bào ASK).



Enterodiol



Enterolacton

Ngoài hạt lanh, một số quả, hạt, các loại rau cũng chứa lignan.

Bảng 4: Hàm lượng lignan trong một số loại quả và hạt (mg/100g khô)

Tên	Hàm lượng *Matairesinol*	Tên	Hàm lượng *Seccoisolariciresinol*
Hạt lanh	1,087	Hạt lanh	369,9
Hạt vừng	0,608	Bí ngô	3,870
Chè	0,090 - 0,305	Chè	1,050 - 2,887
Cám lúa mạch đen	0,167	Quả dâu tây	1,205
Cám yến mạch	0,155	Hạt vừng	0,090
Bông cải xanh	0,023	Hạt hướng dương	0,610
Hạt cây anh túc	0,012	Bông cải xanh	0,414
Quả dâu tây	0,005	Tỏi	0,380
		Cà rốt	0,370
		Lạc	0,298 - 0,333
		Đỗ tương	0,013 - 0,273
		Đào lộn hột	0,257

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. *Bộ Y tế và Bộ Giáo dục và Đào tạo* (1998); Bài giảng dược liệu, tập II, Hà Nội.
2. *Bộ Y tế* (2002); Dược thư Quốc gia Việt Nam.
3. *Atta-ur - Rahman. M. Iqabal Choudhary* (1998); New trend in natural product chemistry, OPA Amsterdam.
4. *Egon Stahl* (1973); Thin - layer Chromatography, Springer - Verlag Berlin - Heidelberg - New York.
5. *Fereidoon Shahidi - Chi-tang Ho* (2000); Phytochemicals and Phytopharmaceuticals, AOCS Press.
6. *James E. Robbers, VarroE. Tyler* (1999); The Therapeutic Use of Phytomedicinals, The Haworth Herbal Press.
7. *J. B. Harbome* (1984); Phytochemical methods, 2nd edition.

CHƯƠNG IV
ALCALOID TRONG DƯỢC LIỆU

GS. TS. Phạm Thanh Kỳ

I. ĐẠI CƯƠNG

1.1. Khái niệm về alcaloid

Đã từ lâu các nhà khoa học tìm thấy trong cây các hợp chất hữu cơ, những hợp chất này thường là những chất trung tính hoặc acid. Đến năm 1806 một dược sĩ là Friedrich Wilhelm Serturner phân lập được một chất từ nhựa thuốc phiện có tính kiềm và gây ngủ mạnh đã đặt tên là morphin. Năm 1810 Gomes chiết được chất kết tinh từ vỏ canhkina đặt tên là "Cinchonino". Sau này P. J. Pelletier và J. B. Caventon xác định Cinchonino là hỗn hợp hai chất quinin và cinchonin. Năm 1818 Pelletier và Caventon lại phân lập được hai chất có tính kiềm từ một loài Strychnos đặt tên là strychnin và brucin. Như vậy từ cây cỏ các nhà khoa học đã phân lập được một số chất có tính kiềm. Đến năm 1819 một dược sĩ là Wilhelm Meissner đề nghị xếp các chất có tính kiềm lấy từ thực vật ra thành một nhóm riêng, ông đề nghị gọi tên là alcaloid, và đưa ra định nghĩa: alcaloid là những hợp chất hữu cơ có chứa nitơ, có phản ứng kiềm và lấy từ thực vật.

Sau này các nhà khoa học đã chiết được nhiều hợp chất có tính kiềm từ thực vật [Piperin (1819), Cafein (1819), Colchicin (1820), Coniin (1826), Codein (1832), Narcein (1832), Papaverin (1848)...] đồng thời cũng tìm thấy trong động vật như Samandarin, samanin lấy từ tuyến da của loài *Salamandra maculosa* và *S. altra*; Bufotenin, bufotenidin, serotonin là những chất độc lấy từ loài cóc Bufo. Batrachotoxin có trong tuyến da loài ếch độc vùng Trung Mỹ (*Phyllobates aurotaenia*).

Ngoài tính kiềm, alcaloid còn có một số đặc tính khác như thường có hoạt tính sinh học mạnh và phản ứng với một số thuốc thử được gọi là thuốc thử chung của alcaloid. Sau này Polonopski đã đưa ra định nghĩa: *"Alcaloid là những hợp chất hữu cơ, có chứa nitơ, đa số có nhân dị vòng, có phản ứng kiềm,*

744 - 247

thường gặp trong thực vật và đôi khi trong động vật, thường có hoạt tính sinh học mạnh và cho phản ứng hoá học với một số thuốc thử gọi là thuốc thử chung của alcaloid".

• ***Danh pháp***

Các alcaloid trong dược liệu thường có cấu tạo phức tạp nên người ta không gọi tên theo danh pháp hoá học mà thường gọi chúng theo một tên riêng. Tên của các alcaloid luôn có đuôi **in** và xuất phát từ:

– Tên chi hoặc tên loài của cây + **in**

Ví dụ:	Papaverin xuất phát từ		Papaver somniferin
	Strychnin	từ	Strychnos nux-vomica
	Ephedrin	từ	Ephedra sinica
	Palmatin	từ	Jatrorrhiza palmata
	Cocain	từ	Erythroxylum coca

- Đôi khi dựa vào tác dụng của alcaloid đó

Ví dụ: Emetin do từ emetos có nghĩa là gây nôn, morphin do từ morpheus là gây ngủ.

- Có thể xuất phát từ tên người

Ví dụ: Pelletierin do tên Pelletier. Nicotin do tên Nicot.

Những alcaloid trong cùng một cây nhưng tìm ra sau hoặc có cấu trúc tương tự thường được gọi tên bằng cách thêm tiếp đầu ngữ hoặc biến đổi vĩ ngữ của alcaloid chính (biến đổi in → idin, amin, alin, imin...).

Alcaloid có tiếp đầu ngữ Nor diễn tả 1 chất đã mất 1 nhóm methyl. Ví dụ: Ephedrin ($C_{10}H_{15}ON$) → nor-ephedrin ($C_9H_{13}ON$): các đồng phân thường có tiếp đầu ngữ: Pseudo, iso, epi, neo, allo, ...

Có thể biến đổi vần của alcaloid chính. Ví dụ: Narcotin → cotarnin, tarconin.

1.2. Tính chất chung của alcaloid

1.2.1. Lý tính

- Thể chất: Phần lớn alcaloid trong công thức cấu tạo có oxy thường ở thể rắn ở nhiệt độ thường.

Ví dụ: Morphin ($C_{17}H_{19}NO_3$), codein ($C_{18}H_{21}NO_3$), strychnin ($C_{21}H_{22}N_2O_2$), quinin ($C_{20}H_{24}N_2O_2$), reserpin ($C_{33}H_{40}O_9N_2$)...

21(T) - 387

Những alcaloid trong công thức cấu tạo không có oxy thường ở thể lỏng. Ví dụ: Coniin ($C_8H_{17}N$), nicotin ($C_{10}H_{14}N_2$), spartein ($C_{15}H_{26}N_2$).

Tuy nhiên trong thiên nhiên cũng có một số alcaloid trong công thức cấu tạo có oxy vẫn ở thể lỏng như arecolin ($C_8H_{13}NO_2$), pilocarpidin ($C_{10}H_{14}N_2O_2$) và một vài chất không có oxy vẫn ở thể rắn như sempervirin ($C_{19}H_{16}N_2$), conessin ($C_{24}H_{40}N_2$).

Các alcaloid ở thể rắn thường kết tinh được và có điểm chảy rõ ràng, nhưng cũng có một số alcaloid không có điểm chảy vì bị phân huỷ ở nhiệt độ trước khi chảy.

Những alcaloid ở thể lỏng bay hơi được và thường vững bền, không bị phân huỷ ở nhiệt độ sôi nên cất kéo được bằng hơi nước để lấy ra khỏi dược liệu.

- Mùi vị: Đa số alcaloid không có mùi, có vị đắng và một số ít có vị cay như capsaicin, piperin, chavicin...

- Màu sắc: Hầu hết các alcaloid đều không màu, trừ một vài alcaloid có màu vàng như berberin, palmatin, chelidonin.

- Độ tan: Nói chung các alcaloid ở dạng base thường không tan trong nước mà thường tan tốt trong dung môi hữu cơ như ether, cloroform, benzen, metanol..., trái lại, các alcaloid ở dạng muối thường dễ tan trong nước và hầu như không tan trong các dung môi hữu cơ ít phân cực.

Có một số trường hợp ngoại lệ, alcaloid dạng base lại tan tốt trong nước như coniin, nicotin, spartein, colchicin, cafein (cafein tan 1/80 trong nước lạnh và 1/2 trong nước sôi), alcaloid dạng muối lại ít tan trong nước như becberin nitrat... Một số alcaloid có chức phenol như morphin, cephelin tan trong dung dịch kiềm.

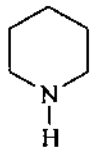
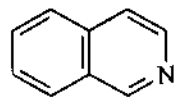
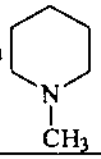
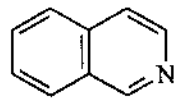
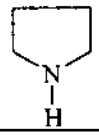
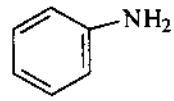
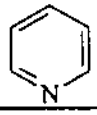
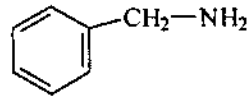
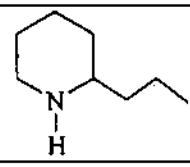
Dựa vào độ tan khác nhau của alcaloid dạng base và dạng muối người ta sử dụng dung môi thích hợp để chiết xuất, phân lập và tinh chế alcaloid.

- Năng suất quay cực: Phần lớn alcaloid có khả năng quay cực vì trong cấu trúc có carbon không đối xứng, đa số tả tuyền, một số nhỏ hữu tuyền như cinchonin, quinidin, aconitin, pilocarpin..., một số không có tác dụng với ánh sáng phân cực (vì không có carbon không đối xứng trong cấu trúc) như piperin, papaverin, narcein..., một số alcaloid là hỗn hợp đồng phân tả và hữu tuyến (racemic) như atropin, atropamin...

Năng suất quay cực là hằng số giúp ta kiểm tra độ tinh khiết của alcaloid. Alcaloid dạng tả tuyền (*l*) bao giờ cũng có tác dụng sinh học mạnh hơn dạng hữu tuyền (dạng *d*) hoặc dạng raxemic.

1.2.2. Hoá tính

- Alcaloid nói chung có tính kiềm yếu là do trong phân tử có nitơ. Người ta có thể tính được độ kiềm của các chất.

	Độ kiềm pK_B		Độ kiềm pK_B
Piperidin 	2,8	Quinolin 	9,2
N-metyl-piperidin 	3,9	Isoquinolin 	9,5
Pyrrolidin 	2,9	Anilin 	9,4
Pyridin 	8,8	Benzylamin 	4,6
Codein	6,1	Coniin 	3,1
Narcotin	7,8	Papaverin	8,1

- Strychnin: $N_2 \rightarrow pK_B$: 6,0 (N_1 gần C = 0 nên không có tính kiềm).

Người ta xếp:

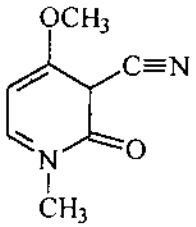
+ Alcaloid có độ kiềm mạnh thì giá trị $pK_B < 3$

+ Alcaloid có độ kiềm trung bình thì pK_B: 3 - 7 (Alcaloid trong họ Cà, alcaloid trong thuốc phiện...)

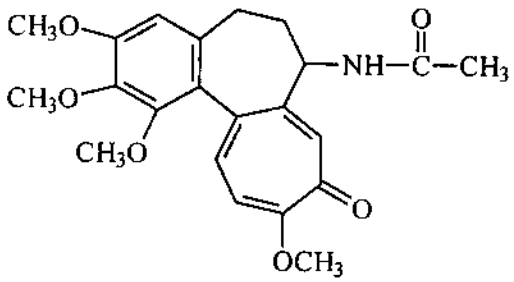
+ Alcaloid có độ kiềm yếu thì pK_B: 7 - 10 (Alcaloid trong vỏ canhkina)

+ Alcaloid có độ kiềm rất yếu thì pK_B: 10 - 12 (Alcaloid có nhân purin)

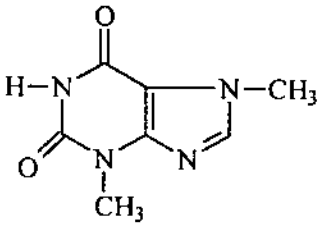
Ngoại lệ: Có alcaloid không còn tính kiềm như: Ricinin, colchicin, theobromin.



Ricinin

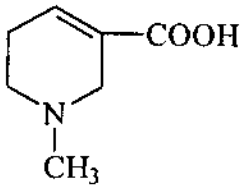


Colchicin

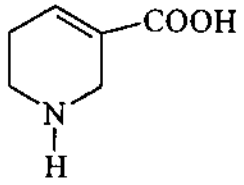


Theobromin

có chất có phản ứng acid yếu:



Arecaidin



Guvacin

- Tác dụng với acid, alcaloid tạo ra các muối tương ứng.

- Alcaloid kết hợp với kim loại nặng (Hg, Bi, Pb...) tạo ra muối phức.

- Các alcaloid có phản ứng với một số thuốc thử gọi là thuốc thử chung của alcaloid. Những phản ứng chung này được chia làm hai loại.

* Phản ứng tạo tủa: Có hai nhóm thuốc thử tạo tủa với alcaloid.

• Nhóm thứ nhất: gồm có:

- Thuốc thử Mayer [K_2HgI_4 - Kalitetraiodomercurat]
- Thuốc thử Bouchardat (=T.T. Wagner) (I_2/KI)
- Thuốc thử Dragendorff ($KBiI_4$ - Kalitetraiodobismutat)
- Muối Reinecke [NH_4<$Cr(SCN)_4(NH_3)_2$>.H_2O] - amoni tetrasulfocyanua diamin cromat III.]
- Thuốc thử Scheibler [$H_3P(W_3O_{10})_4$]
- Thuốc thử Godeffroy [$H_3Si(W_3O_{10})_4$]
- Thuốc thử Sonnenschein [$H_3P(Mo_3O_{10})_4$]

• Nhóm thứ hai: Tạo tủa dạng tinh thể với alcaloid:

- Dung dịch vàng clorid
- Dung dịch platin clorid
- Acid picrolonic
- Acid styphnic
- Dung dịch acid picric

* Phản ứng tạo màu: Sử dụng các thuốc thử:

- Acid H_2SO_4 đậm đặc (d = 1,84)
- Acid nitric đậm đặc (d = 1,4)
- Thuốc thử Fröhde (acid sulfomolypdic)
- Thuốc thử Marquis (Sulfofocmol)
- Thuốc thử Mandelin (acid sulfovanadic)
- Thuốc thử Erdmann (acid sulfonitric)
- Thuốc thử Merke (acid sulfoselenic)
- Thuốc thử Wasicky (p.dimethylaminobenzaldehyd hoà trong H_2SO_4).

1.3. Định tính alcaloid trong dược liệu

Muốn định tính alcaloid trong dược liệu phải thực hiện các bước sau:

1.3.1. Chiết xuất alcaloid trong dược liệu

Có thể sử dụng một trong ba phương pháp để chiết xuất lấy alcaloid ra khỏi dược liệu và loại bớt những tạp chất:

- Chiết xuất alcaloid bằng dung môi hữu cơ ở môi trường kiềm.
- Chiết xuất alcaloid bằng nước acid loãng hoặc cồn đã acid hoá.
- Chiết xuất alcaloid bằng cồn trung tính.

1.3.2. Định tính alcaloid bằng phản ứng hoá học

1.3.2.1. Phản ứng tạo tủa

Để xác định xem trong dược liệu có alcaloid hay không thì trước tiên phải thực hiện phản ứng với thuốc thử (TT) tạo tủa.

- Thường dùng ba thuốc thử: T. T. Mayer, T. T. Bouchardat, T. T. Dragendorff.

- Phản ứng phải thực hiện trong môi trường acid.

1.3.2.2. Phản ứng tạo màu

Sau khi kết luận trong dược liệu có alcaloid, muốn xác định xem alcaloid trong đó là alcaloid gì hoặc có cấu trúc khung gì người ta phải thực hiện phản ứng tạo màu hoặc phản ứng màu đặc hiệu.

- Phản ứng với T.T. tạo màu:

Ví dụ:

+ Dịch chiết hạt mã tiền + HNO_3 đậm đặc → xuất hiện màu đỏ máu (có Brucin).

+ Dịch chiết lá cà độc dược + T.T. Mandelin → xuất hiện màu đỏ (có scopolamin).

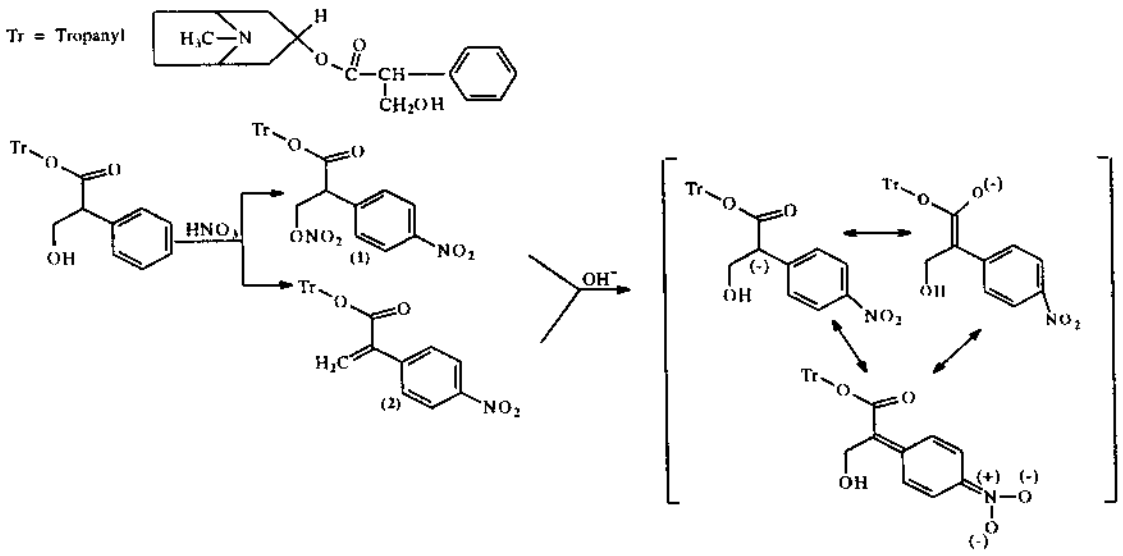
+ Dịch chiết lá Hyoscyamus + T.T. Wasicky → đun nóng xuất hiện màu đỏ tím (có hyoscyamin).

- Phản ứng tạo màu đặc hiệu:

+ Phản ứng Vitali: Năm 1880 Vitali lần đầu tiên thực hiện dịch chiết có khung tropan (lá Belladon). Sau khi chiết được alcaloid dạng base đem nitro hoá bởi acid nitric bốc khói, cô khô rồi cho KOH/cồn sẽ xuất hiện màu tím đỏ, màu chỉ bền trong vài phút rồi mất dần. Phản ứng màu này đặc trưng cho những dẫn chất ester của acid tropic.

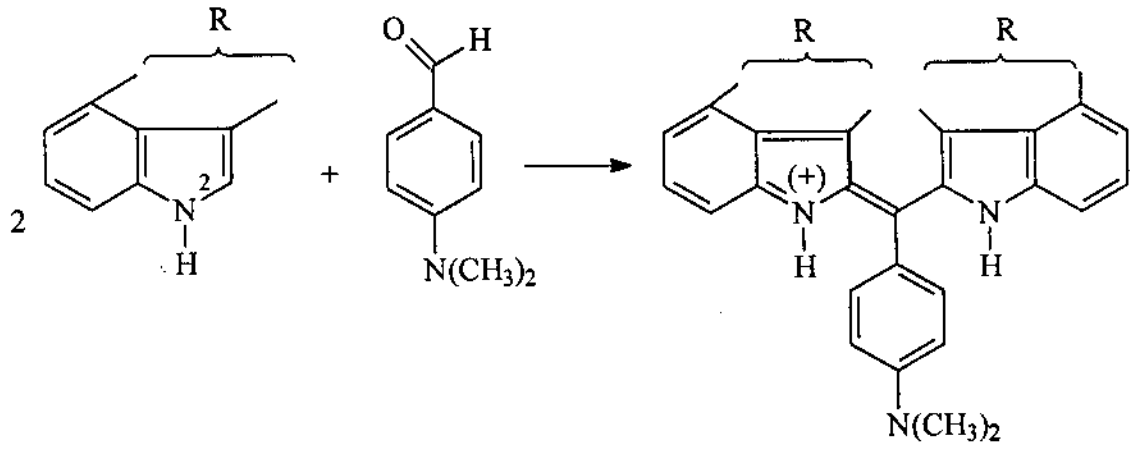
Sau này có một vài alcaloid khác như strychnin, apomorphin và veratrin cũng cho màu tương tự nhưng màu này sẽ mất đi nhanh khi cho thêm aceton, còn các alcaloid có khung tropan thì màu lại đậm lên khi cho thêm aceton, do đó khi làm phản ứng Vitali được bổ sung cho thêm 1 - 2 ml aceton trước hoặc sau khi cho KOH/cồn.

Phản ứng Vitali đến năm 1965 - 1966 Schwenker đã giải thích cơ chế: Khi tác dụng với acid nitric đậm đặc vòng thơm của acid tropic gắn 1 nhóm NO_2 vào vị trí 4 tạo ra hợp chất. 4-nitroatropin (1) và 4-nitroapoatropin (2). Cả 2 hợp chất nitro này đều cho màu tím đặc trưng khi tác dụng với kiềm mạnh và chúng tạo ra những anion mesomeri bền vững.



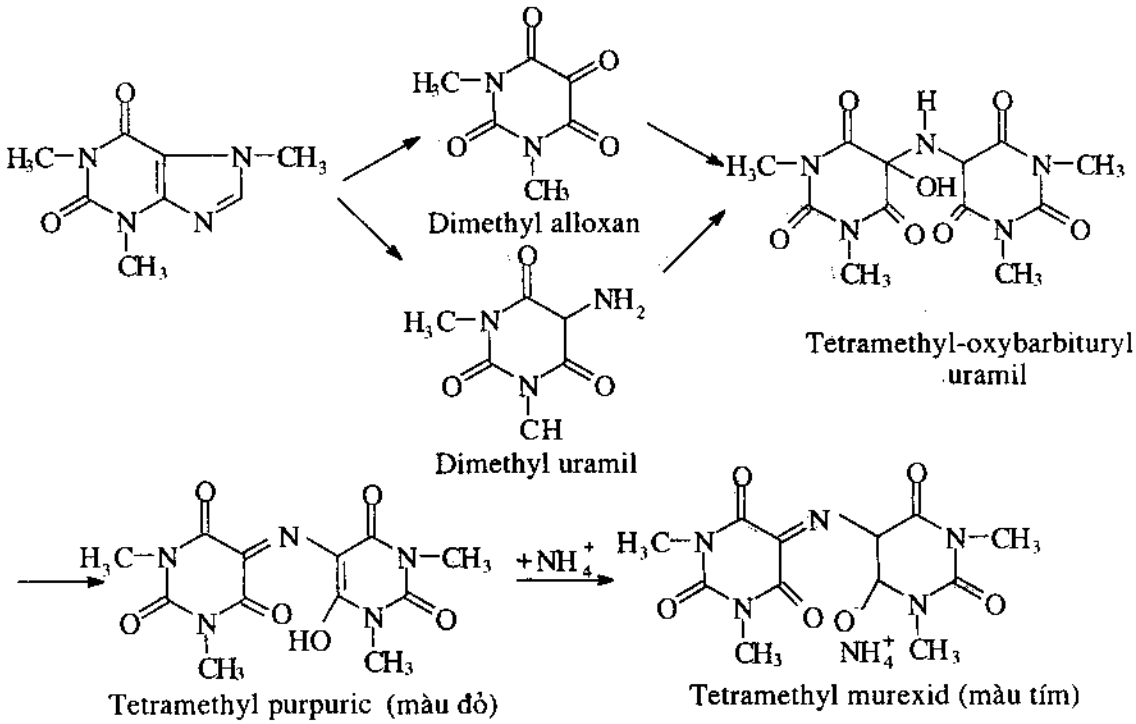
+ Phản ứng Van-Urk:

Năm 1929 lần đầu tiên Van-Urk diễn tả phản ứng màu đặc hiệu của alcaloid cựa khoả mạch với thuốc thử *p*-dinitrobenzaldehyd hoà tan trong H_2SO_4 có chứa một ít muối sắt III cho màu xanh đậm. Nhưng cơ chế phản ứng chưa rõ, sau này Voigt cũng như Dibbern và Rochelmayer (1963) rồi đến Brieskorn đã giải thích phản ứng xảy ra do sự ngưng tụ 2 phân tử dẫn chất indol với 1 phân tử *p*-dimethylaminobenzaldehyd. Phản ứng này cũng lên màu với các alcaloid có nhân indol khác nhưng ở vị trí 2 phải không có nhóm thế.



+ Phản ứng Murexid:

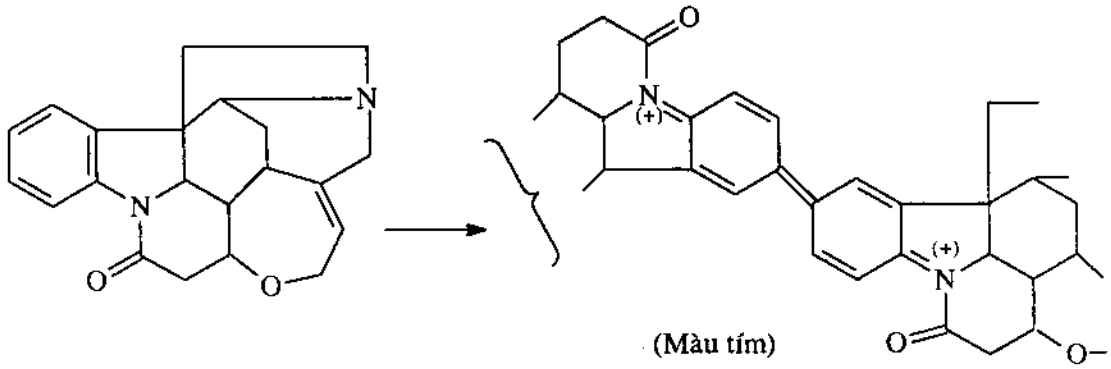
Các alcaloid có nhân purin (cafein, theobromin, theophyllin) đun nóng với H_2O_2 có vài giọt HCl tới khô sẽ có cặn màu vàng, cho thêm amoniac vào cắn sẽ xuất hiện màu tím đỏ do tạo ra muối amonium của acid purpuric.



+ Phản ứng OTTO.

Phản ứng OTTO xác định sự có mặt của strychnin trong dịch chiết hạt mã tiền.

Dịch chiết alcaloid dạng base cho bốc hơi dung môi tới khô, hoà tan cắn bằng một ít H_2SO_4 đặc, cho vài tinh thể kali bicromat vào sẽ xuất hiện màu tím sau chuyển sang màu vang đỏ.



1.3.2.3. Phản ứng tạo tinh thể trên phiến kính

Một số alcaloid dễ dàng tạo muối dạng tinh thể có thể làm phản ứng trên phiến kính rồi quan sát tinh thể dưới kinh hiển vi.

Ví dụ: Hoàng liên, hoàng đằng, vàng đắng.

Cho 1 - 2 giọt dịch chiết (hoặc ít bột dược liệu) lên phiến kính rồi nhỏ vào đó 1 – 2 giọt HCl đặc (hoặc HNO_3 30%), sau 10 phút đối với dịch chiết (sau 30 phút đối với bột dược liệu) đem soi dưới kính hiển vi sẽ quan sát thấy những tinh thể hình kim màu vàng của muối berberin hoặc palmatin.

1.3.2.4. Vi thăng hoa

Có một số alcaloid thăng hoa được. Ví dụ cafein trong chè, cà phê, ephedrin trong ma hoàng, có thể tiến hành vi thăng hoa rồi quan sát tinh thể dưới kính hiển vi hoặc làm phản ứng định tính sau khi thăng hoa.

1.3.3. Định tính bằng sắc ký lớp mỏng

- Chất hấp phụ: Silicagel G (MERCK) có thể dùng bản mỏng đã tráng sẵn hoặc tự tráng: lấy 2,0 g bột silicagel G (MERCK) cho vào cối sứ thêm 15 ml nước cất vào nghiền đều rồi tráng nhanh lên tấm kính có kích thước 5 × 15cm đã rửa sạch sấy khô. Để ở nhiệt độ phòng cho khô rồi hoạt hoá ở 100 - 105°C trong 1 giờ, để nguội và bảo quản trong bình hút ẩm.

- Chuẩn bị dịch chấm sắc ký: lấy 1 - 2 g bột dược liệu chiết lấy alcaloid base bằng dung môi hữu cơ ở môi trường kiềm, bốc hơi dung môi tới khô, hoà tan cắn với 1 ml metanol pA để chấm sắc ký.

- Hệ dung môi khai triển: Tuỳ theo cấu trúc alcaloid trong dược liệu mà lựa chọn các hệ dung môi khai triển thích hợp.

+ Alcaloid trong củ bình vôi: $CHCl_3$: MeOH [9 : 1] hoặc: toluen : aceton : Et-OH : amoniac [45 : 45 : 7 : 3].

+ Alcaloid trong lá sen: $CHCl_3$: MeOH : NH_4OH [50 : 9 : 1].

+ Alcaloid trong lá vông: $CHCl_3$: aceton : NH_4OH [50 : 9 : 1].

+ Alcaloid trong dạ cẩm: *n*-BuOH : CH_3COOH : H_2O [5 : 1 : 4].

+ Alcaloid trong bách bộ: $CHCl_3$: MeOH : NH_4OH [50 : 9 : 1].

+ Alcaloid trong ba gạc: $CHCl_3$: MeOH : NH_4OH [50 : 9 : 0,5].

+ Alcaloid trong hạt mã tiền: $CHCl_3$: MeOH : NH_4OH [50 : 9 : 1] hoặc: toluen : aceton : Et-OH : NH_4OH [5 : 4 : 0,6 : 0,4].

+ Alcaloid trong vàng đắng: *n*-BuOH : CH_3COOH : H_2O [7 : 1 : 2].

+ Alcaloid trong nhựa thuốc phiện: $CHCl_3$: aceton : MeOH : NH_4OH [20 : 20 : 3 :1] hoặc: $CHCl_3$: MeOH : NH_4OH [50 : 9 :1] hoặc xylol : methylethylceton : methanol : diethylamin [40 : 60 : 6 : 2].

+ Alcaloid trong hoàng đằng: *n*-BuOH : CH_3COOH : H_2O [7 : 1 : 2].

+ Alcaloid trong chè, cà phê: EtOAc : $CHCl_3$: CH_3COOH [30 : 50 : 10].

+ Alcaloid trong vỏ canhkina: $CHCl_3$: MeOH : NH_4OH [50 : 9 : 1].

- Thuốc thử phun hiện màu: Đa số dùng thuốc thử Dragendorff pha theo Munier. Một số alcaloid có thể dùng thuốc thử hiện màu riêng. Ví dụ như:

+ Phát hiện cafein có thể phun dung dịch I_2 rồi phun dung dịch H_2SO_4 3N, cafein sẽ tạo với I_2 trong môi trường acid màu đỏ nâu của cafein - periodid.

+ Alcaloid trong rễ ba gạc có thể phun hỗn hợp acid percloric và $FeCl_3$ sẽ xuất hiện màu xanh hoặc phun HNO_3 bốc khối sẽ phát hiện ajmalicin có màu tím.

+ Alcaloid trong vỏ canhkina: Phun acid formic sau đó soi dưới đèn UV sẽ có huỳnh quang xanh đậm.

+ Alcaloid trong cựa khoả mạch có thể phun thuốc thử Van-Urk sẽ xuất hiện màu xanh lam.

1.4. Định lượng alcaloid trong dược liệu

Có thể định lượng toàn bộ alcaloid hoặc chỉ định lượng một alcaloid là hoạt chất trong dược liệu, có nhiều phương pháp định lượng, nói chung các phương pháp đều có hai giai đoạn chính.

- Chiết xuất lấy riêng các alcaloid ra khỏi dược liệu, có thể sử dụng một trong ba phương pháp chiết xuất alcaloid nhưng việc chiết xuất phải có tính chất định lượng nghĩa là lượng dược liệu đem chiết phải cân chính xác, có trừ độ ẩm dược liệu và ở từng giai đoạn chiết phải hoàn toàn xong.

- Tiến hành định lượng: Tuỳ theo tính chất và điều kiện mà lựa chọn phương pháp định lượng cho thích hợp.

Sau đây giới thiệu một số phương pháp hay dùng:

1.4.1. Phương pháp cân

- Phương pháp cân chỉ sử dụng khi:

+ Alcaloid có tính base rất yếu, những alcaloid này không chuẩn độ được bằng phương pháp acid-base vì hằng số điện ly quá bé sẽ không có bước nhảy trên đường cong chuẩn độ nên không quan sát được sự chuyển màu rõ rệt của chỉ thị. Ví dụ: Colchicin trong hạt tỏi độc, alcaloid có nhân purin như cafein, theobromin...

+ Những alcaloid đang nghiên cứu chưa xác định rõ cấu trúc hoá học.

+ Cần định lượng hỗn hợp nhiều alcaloid mà trong đó các alcaloid có phân tử lượng rất khác nhau.

- Quá trình tiến hành:

+ Chiết xuất lấy alcaloid, loại tối đa các tạp chất, cất thu hồi dung môi, bốc hơi tới khô.

+ Sấy cặn ở nhiệt độ thích hợp tới khối lượng không đổi rồi đem cân.

+ Tính kết quả ra hàm lượng % alcaloid trong dược liệu khô tuyệt đối.

1.4.2. Phương pháp acid - base (phương pháp trung hoà)

- Định lượng alcaloid bằng phương pháp trung hoà khi:

+ Alcaloid trong dược liệu phải chiết ra được ở dạng base.

+ Alcaloid phải có độ kiềm rõ rệt.

+ Phải biết khối lượng phân tử của alcaloid cần định lượng để tính đương lượng với acid chuẩn độ.

- Dịch chiết alcaloid trước khi định lượng phải:

+ Không lẫn chất kiềm như amoniac, các amin sẽ gây sai số thừa.

+ Không lẫn chất màu, chất béo làm cho khi chuẩn độ khó quan sát vùng chuyển màu của chỉ thị.

+ Dung dịch alcaloid base phải trong, vì có vẩn đục hay có chút ít nhũ dịch sẽ gây ra hiện tượng hấp phụ các chất kiềm làm cho kết quả định lượng sai số thừa.

- Khắc phục các hiện tượng trên bằng cách:

+ Đối với amoniac và các amin người ta lợi dụng tính dễ bay hơi của nó. Sau khi bốc hết hơi dung môi hữu cơ thường cho cặn alcaloid base vào sấy ở 100°C

trong vòng 30 - 60 ph.

+ Đối với chất béo, nếu dược liệu là quả, hạt chứa nhiều chất béo người ta thường chiết với ether dầu hoả để loại chất béo trước khi chiết alcaloid; Nếu có ít chất béo lẫn vào dung dịch alcaloid khi định lượng thì khắc phục bằng cách cho 1 - 2 ml ether dầu hoả vào lắc để chất béo hoà tan trong ether dầu hoả nổi lên trên sẽ không ảnh hưởng tới việc quan sát vùng chuyển màu của chỉ thị.

+ Chất màu thường được loại đi bằng cách chuyển alcaloid từ dạng base sang dạng muối và ngược lại. Khi thật cần thiết mới dùng chất hấp phụ màu (than hoạt).

- Sau khi có dịch chiết alcaloid base trong dung môi hữu cơ có thể tiến hành định lượng gián tiếp bằng cách đem lắc với một lượng chính xác dung dịch acid chuẩn độ dư sau gạn lấy riêng lớp acid và định lượng acid thừa bằng kiềm tương ứng, hoặc cho bốc hơi dung môi hữu cơ, cặn alcaloid base còn lại được hoà tan với một lượng chính xác dung dịch acid chuẩn độ dư rồi định lượng acid thừa bằng kiềm tương ứng. Hoặc cặn alcaloid base có thể hoà tan với 1 - 2 ml dung môi hữu cơ thích hợp, sau cho thêm nước cất đun sôi để nguội, đặt dung dịch này lên nồi cách thuỷ khuấy cho bay hết hơi dung môi hữu cơ rồi định lượng trực tiếp bằng dung dịch acid chuẩn độ.

- Acid chuẩn độ thường dùng là: HCl, H_2SO_4 có nồng độ 0,01 - 0,1 N hoặc 0,01 - 0,1 M.

- Chỉ thị màu thường dùng là đỏ methyl, vì theo lý thuyết cũng như thực tế pH của hầu hết các muối alcaloid đều có vùng chuyển màu của chỉ thị này (pH 4,2 - 6,3). Có một vài alcaloid có điểm tương đương trên đường cong chuẩn độ ở khoảng pH4 như hydrastin, narcotin, isopelletierin, methylisopelletierrin... thì dùng methyl vàng cam làm chỉ thị màu. Có một số trường hợp người ta dùng hỗn hợp chỉ thị để quan sát vùng chuyển màu được rõ hơn. Ví dụ: Định lượng alcaloid trong vỏ canhkina hay trong ô đầu người ta dùng chỉ thị màu là 8 giọt đỏ methyl + 1 giọt xanh methylen.

- Tính kết quả: Khi định lượng nhiều alcaloid trong dược liệu người ta thường tính kết quả theo 1 alcaloid chính trong đó. Ví dụ định lượng alcaloid toàn phần trong lá Benladon thì tính theo hyoscyamin, định lượng alcaloid trong ma hoàng thì tính theo ephedrin...

Định lượng alcaloid trong môi trường khan:

Những alcaloid có tính base rất yếu nếu chuẩn độ theo phương pháp acid-base trong môi trường dung dịch nước sẽ không chính xác nên người ta thường hoà tan alcaloid vào trong dung môi không phải là nước, thường dùng acid acetic khan (gọi là môi trường khan) để định lượng. Thường dùng acid percloric 0,1 N để định lượng và chỉ thị màu là tím tinh thể.

Quá trình xảy ra:

$$\text{Alcaloid} + CH_3COOH \rightleftharpoons \text{Alcaloid}.H^+ + (CH_3COO)^-$$

$$HClO_4 + CH_3COOH \rightleftharpoons (CH_3COOH_2)^+ + ClO_4^-$$

$$\text{Alcaloid}.H^+ + (CH_3COO)^- + (CH_3COOH_2)^+ + ClO_4^- \rightleftharpoons \text{Alcaloid}.H^+ + ClO_4^- + {}_2CH_3COOH$$

Căn cứ vào lượng acid percloric tiêu thụ tính ra hàm lượng alcaloid trong dược liệu.

1.4.3. Phương pháp so màu

Hầu hết alcaloid không có màu do đó để định lượng được bằng phương pháp so màu thì phải tạo ra dung dịch có màu theo các nguyên tắc sau:

- Dựa vào phản ứng tạo màu của alcaloid với thuốc thử thích hợp.

Ví dụ: Alcaloid trọng cựa khoả mạch tạo màu xanh lơ với *p*-dimethyl-amino-benzaldehyd ở môi trường H_2SO_4 đặc.

- Tạo ra tủa có màu với alcaloid, sau đó lấy riêng tủa hoà tan trong dung môi thích hợp tạo ra dung dịch có màu. Ví dụ: Alcaloid trong vỏ canhkina phản ứng với thuốc thử Reinecke tạo ra tủa Reineckat alcaloid có màu, lấy riêng tủa hoà tan trong aceton tạo ra dung dịch có màu để định lượng.

- Thực hiện phản ứng biến đổi alcaloid thành dẫn chất có màu. Ví dụ: Biến đổi morphin thành 2-nitrosomorphin có màu đỏ đậm trong môi trường kiềm.

- Thực hiện phản ứng giáng phân, cắt alcaloid thành những phần nhỏ, lấy riêng phần cần thiết ra rồi cho tác dụng với thuốc thử thích hợp tạo ra dung dịch có màu để định lượng. Ví dụ: Physostigmin tác dụng với kiềm tạo thành eserolin, carbonat kiềm và methylamin. Lấy riêng methylamin ra bằng cách cất kéo hơi nước, sau đó cho phản ứng với thuốc thử ninhydrin tạo ra dung dịch có màu. Định lượng phần methylamin rồi suy ra hàm lượng physostigmin.

Định lượng alcaloid bằng phương pháp so màu phải tuân theo định luật Lambert-Beer do đó phải tìm được điều kiện thích hợp trong giới hạn cường độ màu tỷ lệ thuận với nồng độ alcaloid.

1.4.4. Phương pháp sắc ký lỏng hiệu năng cao (HPLC)

Phương pháp HPLC có độ chính xác và độ nhạy cao, có tính đặc hiệu, thực hiện tương đối nhanh và thuận tiện, có thể áp dụng để định lượng alcaloid trong dược liệu ở những cơ sở có trang bị máy HPLC.

Để tiến hành định lượng alcaloid bằng phương pháp HPLC cần phải:

- Có alcaloid tinh khiết làm chuẩn.

- Xây dựng phương pháp chiết kiệt alcaloid trong dược liệu đáp ứng yêu cầu định lượng.

- Xây dựng được chương trình sắc ký trên máy HPLC (pha tĩnh, pha động, detector, tốc độ dòng, thể tích tiêm, nhiệt độ phân tích).

Ví dụ: Định lượng *l*-tetrahydropalmatin trong củ bình vôi.

- Chiết xuất alcaloid: Cân chính xác khoảng 0,4 g bột dược liệu thẩm ẩm bằng 0,5 ml dung dịch amoniac 6N (TT), cho vào túi giấy lọc để yên trong 30 ph, rồi cho vào bình soxhlet chiết với 30 ml cloroform trong 4 giờ cho kiệt alcaloid. Lấy dịch cloroform cho bốc hơi cách thuỷ đến khô, hoà tan cặn trong dung dịch H_2SO_4 0,1 N (5 lần mỗi lần 10 ml). Lọc qua giấy lọc vào 1 bình gạn, kiềm hoá dịch lọc bằng dung dịch amoniac đặc đến pH 10. Chiết 4 lần, mỗi lần với 10 ml cloroform. Gộp dịch chiết cloroform cho bốc hơi cách thuỷ tới khô. Hoà tan cắn bằng pha động và chuyển vào bình định mức 50,0 ml thêm pha đông đến vạch, lắc đều. Lọc sơ bộ qua giấy lọc thường, bỏ 10ml dịch lọc đầu. Dịch lọc sau được lọc qua giấy lọc mịn cỡ 0,45 μm thu được dung dịch thử.

- Pha dung dịch chuẩn: Cân chính xác 0,05 mg *l*-tetrahydropalmatin khan hoà tan trong 1 ml pha động.

- Chương trình sắc ký đã xây dựng:

+ Pha tĩnh: Cột RP18: chiều dài 25 cm, đường kính trong 4 mm, chất nhồi cột là octadecylsilyl silicagel dùng cho sắc ký có cỡ hạt 5 μm (250 × 4 mm; 5 μm).

+ Pha động: Hỗn hợp dd KH_2PO_4 0,05 M : 62,5 ml

Acetonitril : 37,5 ml

Triethylamin : 0,5 ml

điều chỉnh pH pha động đến 4,0 bằng dung dịch acid phosphoric đặc. Lọc qua màng lọc 0,45 µm, lắc siêu âm để loại hết bọt khí.

+ Detector UV với bước sóng phát hiện 283 nm

+ Tốc độ dòng: 1 ml/phút

+ Thể tích tiêm: 20 µl

+ Nhiệt độ phân tích: Nhiệt độ phòng (27 ± 3°C)

Tiêm lần lượt 20 µl mỗi dd thử và dd chuẩn vào hệ thống HPLC.

- Tính kết quả: Hàm lượng *l*-tetrahydropalmatin dựa trên diện tích pic l-tetrahydropalmatin thu được từ sắc ký đồ của dung dịch thử và dd chuẩn và hàm lượng của chất chuẩn *l*-tetrahydropalmatin. Công thức tính:

$$X\% = \frac{S_T \times m_c \times C_c \times 100}{S_C \times m_T \times (1 - b)}$$

trong đó: S_T: diện tích pic *l*-tetrahydropalmatin thu được trên sắc ký đồ của dung dịch thử;

S_C: diện tích pic *l*-tetrahydropalmatin thu được trên sắc ký đồ của dung dịch chuẩn;

m_c: lượng cân mẫu chuẩn (mg);

m_T: lượng cân mẫu thử (mg);

C_c: hàm lượng *l*-tetrahydropalmatin chuẩn (%);

b: độ ẩm dược liệu (g/1g bột mịn dược liệu).

1.5. Sinh tổng hợp alcaloid

Sinh tổng hợp alcaloid đã được Vinterstein và Trier chứng minh từ năm 1931 cho rằng alcaloid là dẫn chất cuả các acid amin. Sau này người ta sử dụng acid amin có gắn đồng vị phóng xạ (^{14}C, ^{15}N) đã chứng minh hầu hết các khung cơ bản của alcaloid đều do các acid amin kết hợp với một số gốc như acetat, hemi hoặc monotecpin tạo ra.

1.5.1. Những phản ứng chung trong quá trình tạo thành alcaloid

Sinh tổng hợp "alcaloid thật" đòi hỏi có sự tạo ra dây nối C–N ở dị vòng, trong đó N ở acid amin mạch thẳng được coi là tiền chất do đó phải thực hiện một số phản ứng.

1.5.1.1. Sự tạo thành hợp chất amid

Sự tạo thành hợp chất amid thường do phản ứng của nhóm carbonyl hoạt động với nhóm amino. Để hoạt hoá acid thường dùng ATP (Adenosin triphosphat) để chuyển ra dẫn chất AMP (Adenosin monophosphat). Sau đó biến đổi tiếp tạo thành CoA-ester.

Ví dụ: $CH_3–COOH + ATP \rightarrow CH_3CO \sim AMP + PP$

(Acetyl - AMP)

$CH_3CO \sim AMP + CoA \rightarrow CH_3–CO \sim CoA + AMP$

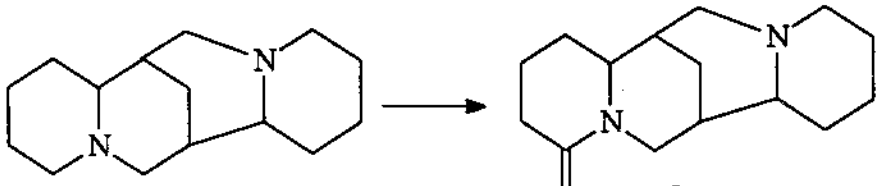
(Acetyl - CoA)

Những nhóm carboxyl hoạt động phản ứng với amin bậc 1 hoặc bậc 2 tạo ra 1 amid và giải phóng nhóm hoạt động.

$$R–CO–X + H_2N–R_1 \rightarrow R–CO–NH–R_1 + HX$$

(acid hoạt động)

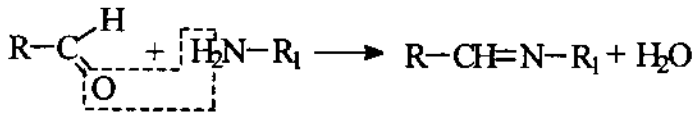
Trong một số ít trường hợp nhóm amid trong phân tử alcaloid không qua phản ứng của acid với amin sinh ra mà chúng được tạo ra do gắn thêm nhóm oxy. Ví dụ như Spartein chuyển thành Lupanin



Spartein Lupanin

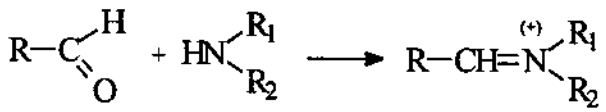
1.5.1.2. Sự tạo thành azomethin

Azomethin thường tạo ra từ những hợp chất amino với aldehyd.



Amin bậc 1 Azomethin

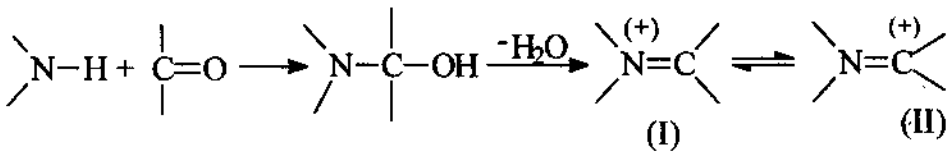
Nếu amin bậc 2 tham gia phản ứng sẽ tạo ra những hợp chất có N bậc 4.



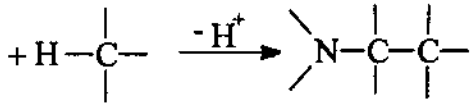
Diazomethin

1.5.1.3. Ngưng tụ Mannich

Phản ứng ngưng tụ của 1 chất có nhóm carbonyl (aldehyd hoặc ceton nhưng hầu hết là aldehyd) với 1 amin trong môi trường acid là ngưng tụ Mannich.

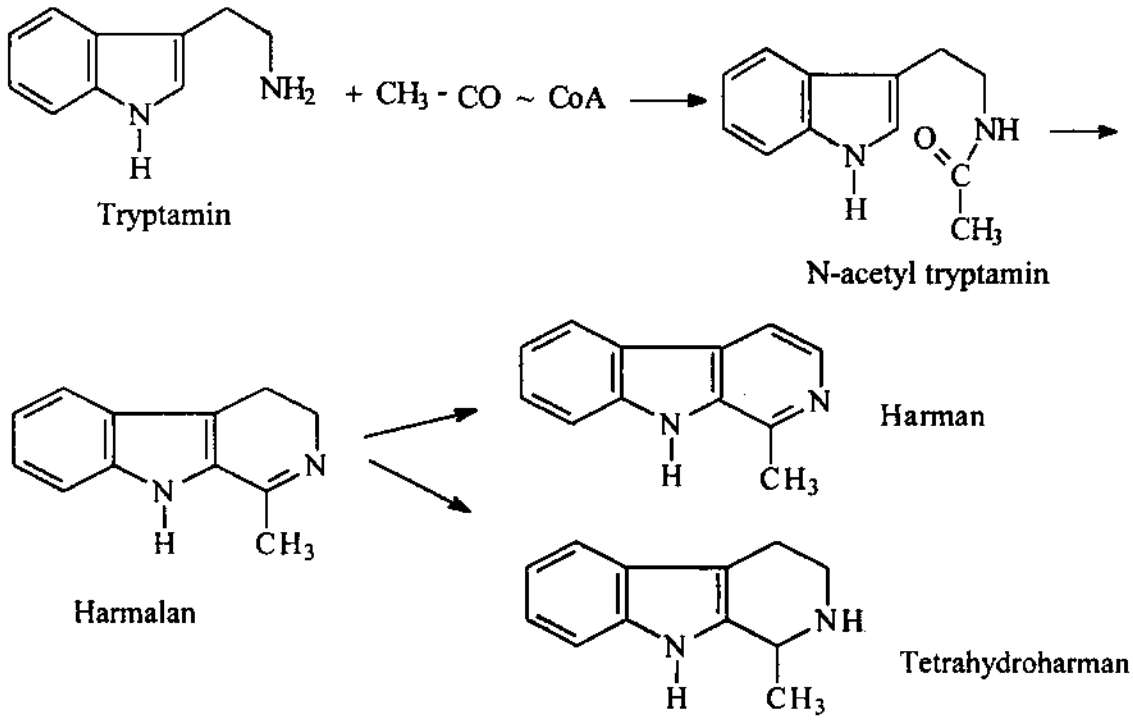


(I) (II)



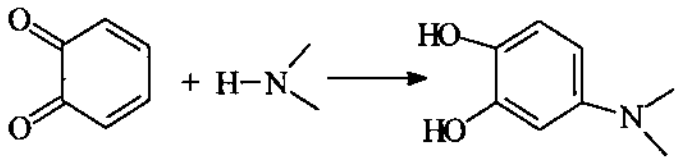
Sản phẩm ngưng tụ

Ngưng tụ Mannich thực sự có ý nghĩa trong sinh tổng hợp alcaloid. Ví dụ: Sự tạo thành alcaloid harman từ tryptamin.

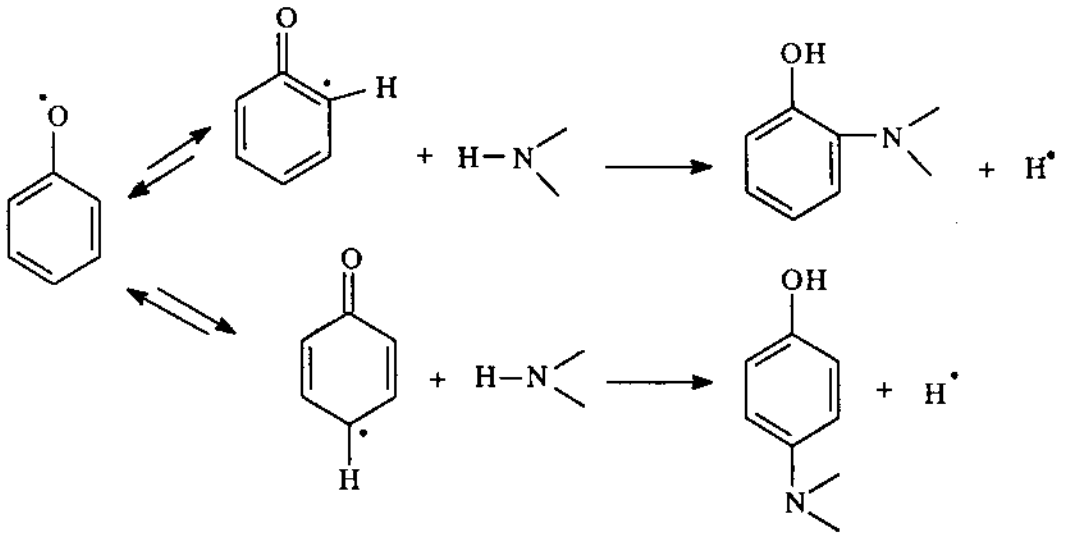


1.5.1.4. Sự ngưng tụ amin vào hệ thống quinoid

Sự ngưng tụ các amin vào hệ thống quinoid thường xảy ra ở vị trí *orto* và *para* tạo ra hợp chất có C–N.



Ngoài ra các amin có thể gắn vào gốc của phenol ở vị trí *octo* hoặc *para* tạo ra hợp chất có nhóm OH-phenolic.



1.5.2. Một số ví dụ về sinh tổng hợp alcaloid

1.5.2.1. Sự đóng vòng của ornithin và lysin

Ornithin và lysin là 2 acid amin làm tiền chất sinh tổng hợp hệ vòng của nitơ. Trong đó ornithin tạo thành vòng 5 cạnh, lysin tạo ra vòng 6 cạnh. Vòng 5 cạnh trong alcaloid phần lớn là hệ vòng pyrrolidin, còn vòng 6 cạnh phần lớn là hệ thống vòng piperidin.

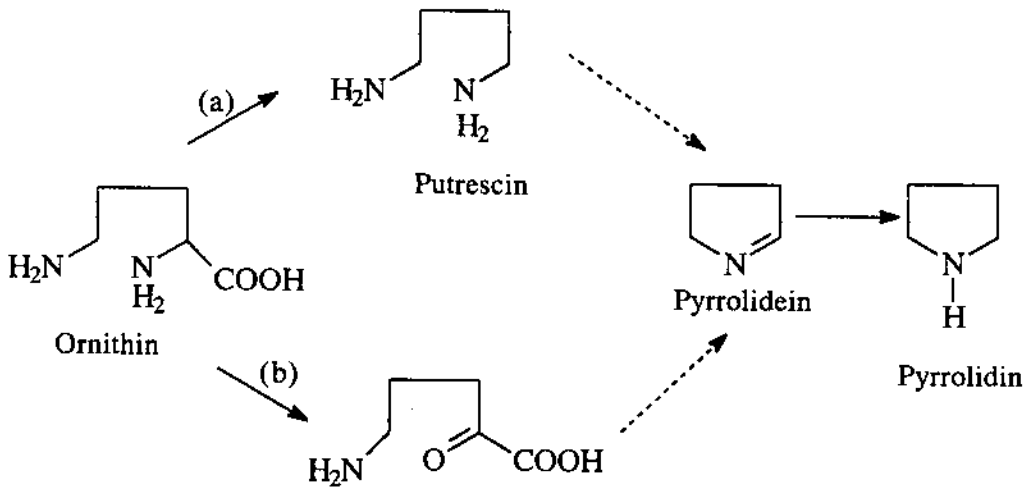
Hai acid amin này có hai con đường tạo ra hệ thống vòng:

+ Theo con đường (a) các chất sinh ra qua việc mất nhóm carbonyl của acid amin.

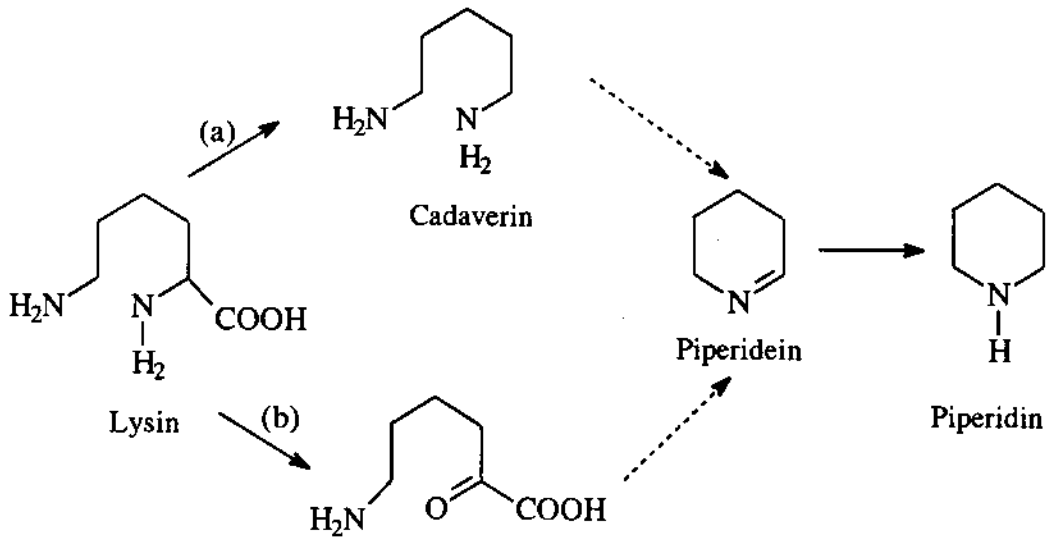
ornithin → putrescin

lysin → cadaverin

+ Theo đường (b), trước tiên mất nhóm NH_2 thay bằng oxy, sau đó hai con đường diễn ra như nhau. Trước kia người ta nhận thấy chỉ có con đường (a) thực hiện trong tự nhiên, bây giờ người ta cho rằng cả hai con đường đều đạt được.



Khả năng đóng vòng của ornithin



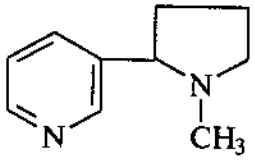
Khả năng đóng vòng của lysin

1.5.2.2. Sinh tổng hợp nicotiana-alcaloid

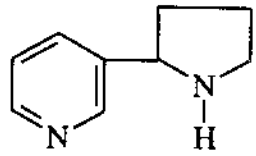
Alcaloid quan trọng của nhóm này là nicotin, nor-nicotin, anabasin.

Nicotin, nor-nicotin là alcaloid chính của *Nicotiana tabacum*, Anabasin là alcaloid chính của *Nicotiana glauca*.

- Nicotin và nor-nicotin gồm hai vòng pyridin + pyrrolidin.

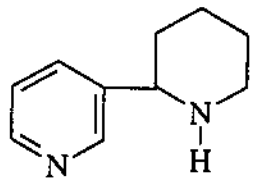


Nicotin



Nor-nicotin

- Anabasin có hai vòng: pyridin + piperidin



Anabasin

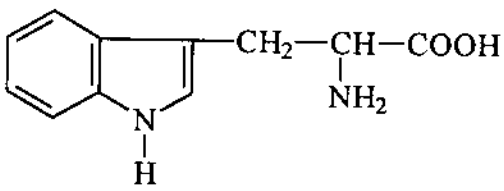
Vòng pyridin sinh ra từ acid nicotinic.

- Trước hết nói đến sinh tổng hợp **acid nicotinic**. Tiền chất của acid nicotinic là acid quinolic, chúng được tạo ra theo hai con đường khác nhau.

+ Ở động vật và nấm acid quinolic được tạo ra từ tryptophan.

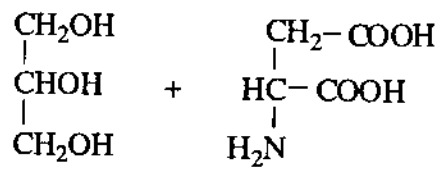
+ Ở vi sinh vật và thực vật acid quinolic tạo ra từ dẫn chất glycerin và acid asparatic. Sau đó acid quinolic mất đi một nhóm carbonyl tạo ra acid nicotinic mononucleotid, rồi tiếp tục biến đổi hoặc trực tiếp thành acid nicotinic hoặc theo con đường qua NAD → amidnicotinic → a.nicotinic.

<u>Động vật, nấm</u>

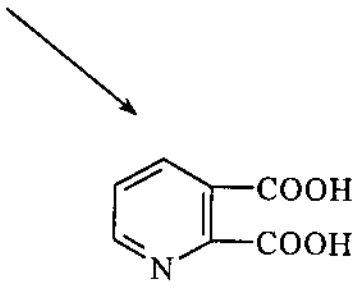


Tryptophan

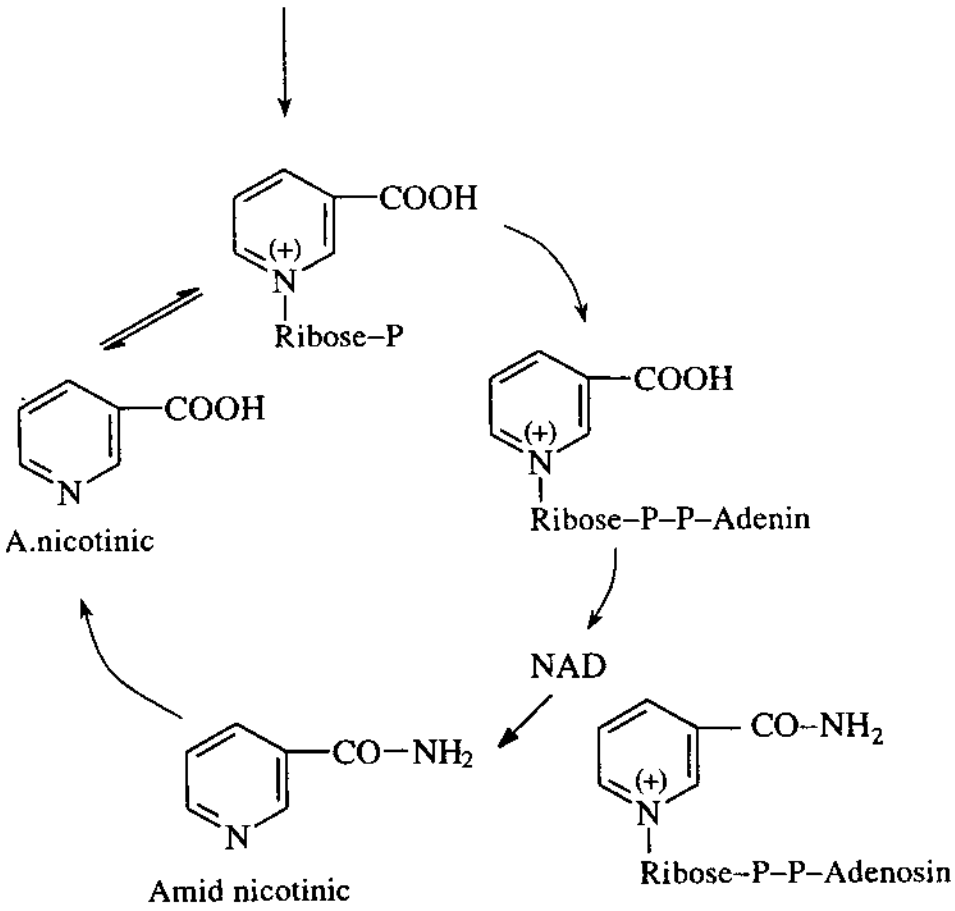
<u>Thực vật, vi sinh vật</u>



Glycerin + A.asparatic

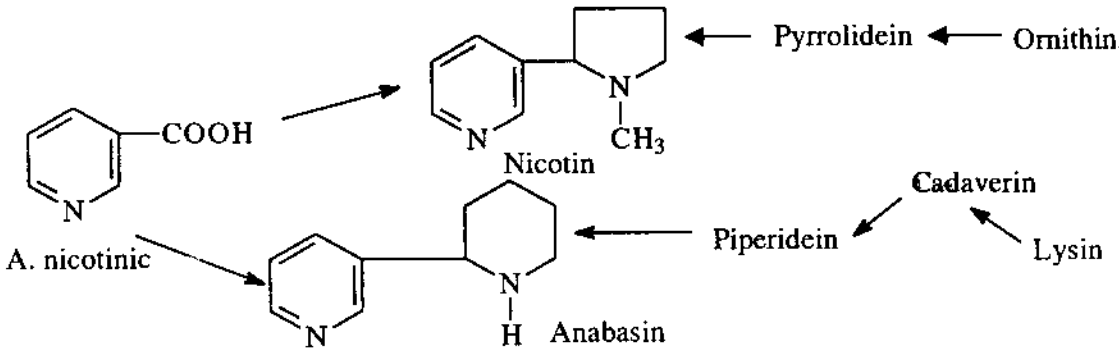


A. quinolic

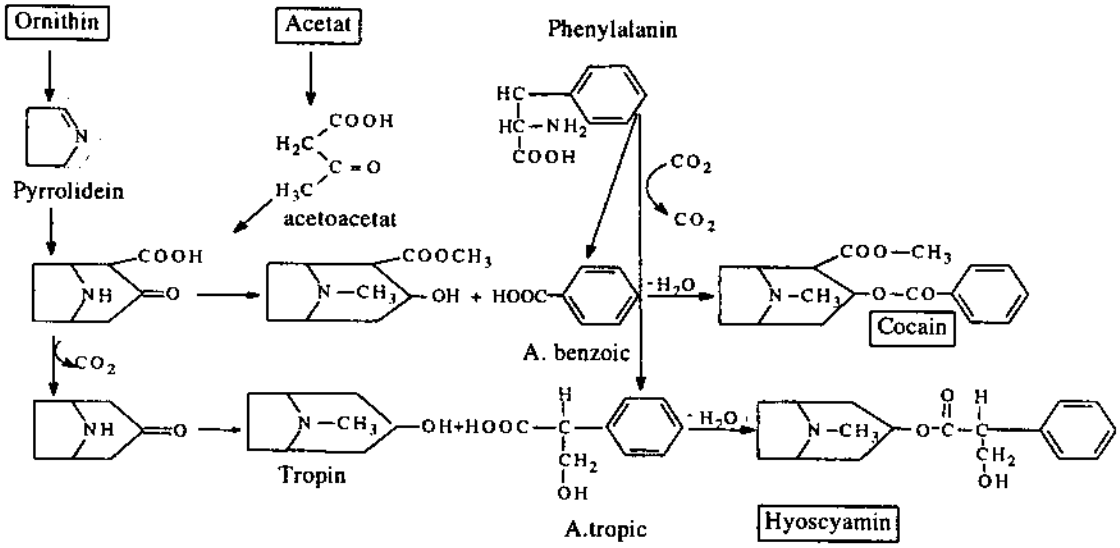


- Sinh tổng hợp vòng pyrrolidin từ ornithin

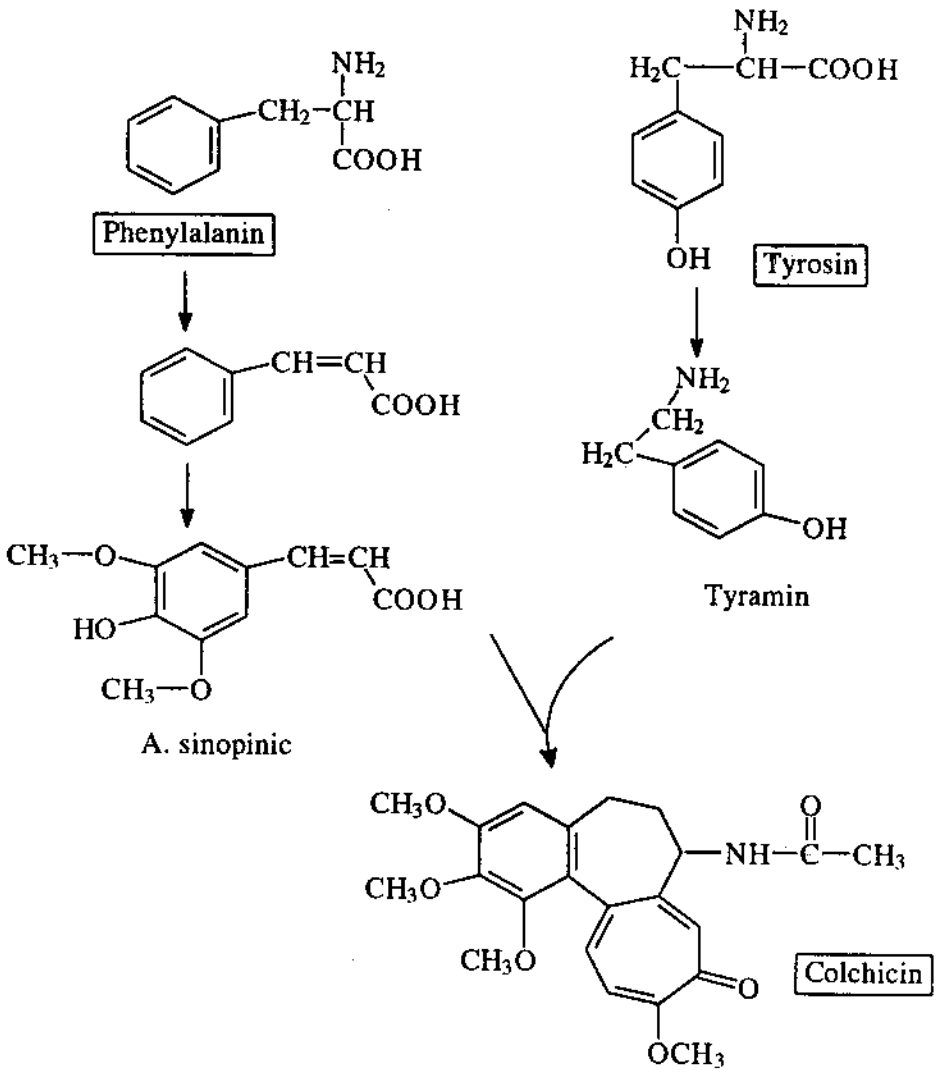
piperidin từ lysin



1.5.2.3. Sinh tổng hợp tropan-alcaloid



1.5.2.4. Sinh tổng hợp colchicin



1.6. Cấu trúc và phân loại alcaloid

Đến nay đã biết trên 16.000 alcaloid thiên nhiên với trên 300 dạng cấu trúc khác nhau. Việc phân loại chủ yếu dựa vào cấu trúc nhân cơ bản hoặc dựa vào nguồn gốc tạo ra alcaloid.

**** Phân loại theo cấu trúc:***

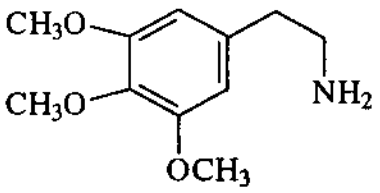
Đa số các tác giả phân loại alcaloid theo cấu trúc hoá học.

1.6.1. Alcaloid không có nitơ ở dị vòng

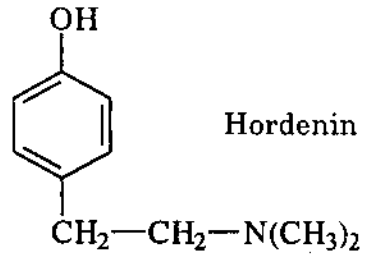
Những alcaloid xếp vào nhóm này đều có nitơ nằm ở mạch thẳng, nhóm này còn gọi là "Proto alcaloid"

Ví dụ: - Hordenin trong mầm mạch nha (*Hordeum vulgare* – Poaceae)

- Mescalin (*Lophophora williamsii* – Cactaceae)

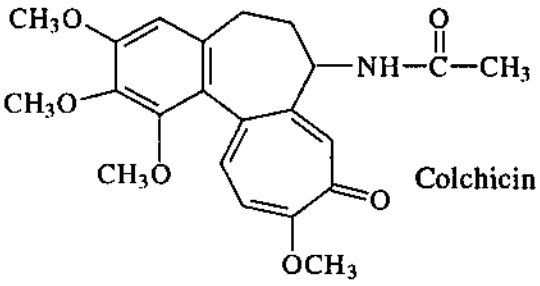


Mescalin

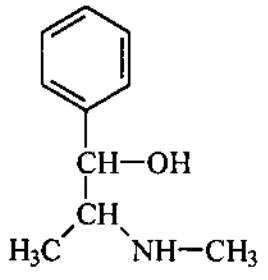


Hordenin

- Ephedrin (*Ephedra* spp. - Ephedraceae)
- Colchicin (*Colchicum* spp. - Liliaceae)

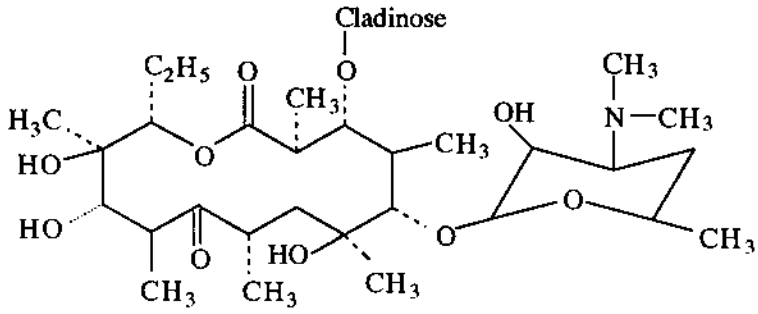


Colchicin

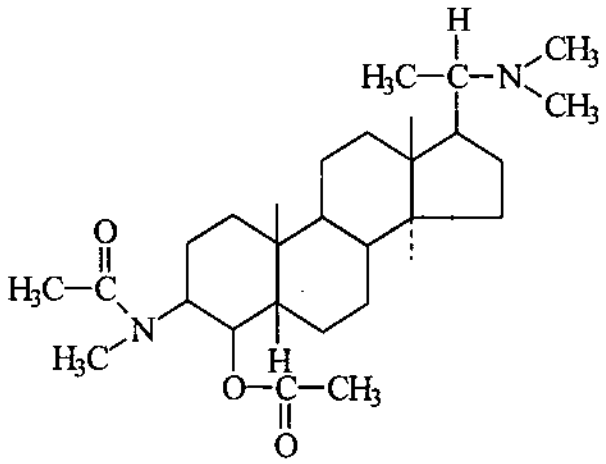


Ephedrin

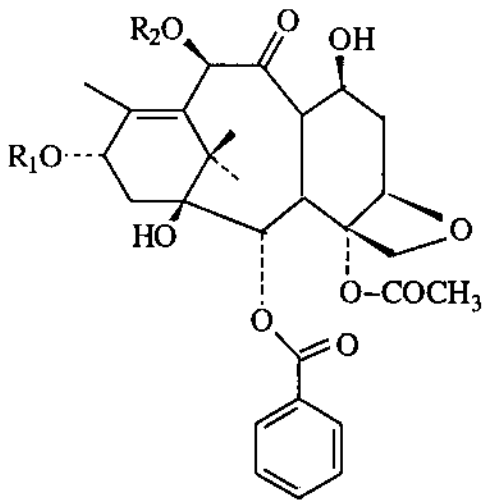
- Erythromycin (*Streptomyces erythreus* – Bacteriophyta)

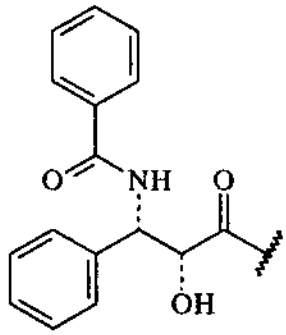
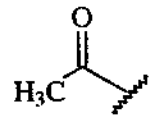
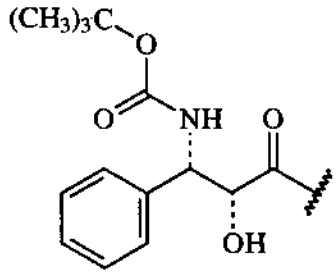


- Pachysandrin (*Pachysandra terminalis* – Buxaceae)



- Taxol (*Taxus brevifolia* – Taxaceae)



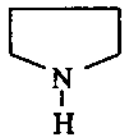
	R_1	R_2
Taxol		
Taxotere		H
10-Deacetylbaccatin III	H	H

1.6.2. Alcaloid có nitơ ở dị vòng

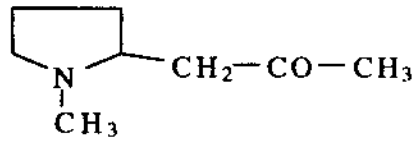
1.6.2.1. Alcaloid có nhân pyrrol và pyrrolidin

Ví dụ: - Hygrin trong lá Coca (*Erythroxylum coca* – Erythroxylaceae)

Pyrrol

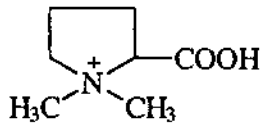


Pyrrolidin



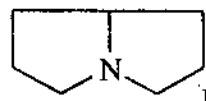
Hygrin

- Stachydrin (*Stachys tuberifera* – Labiatae)

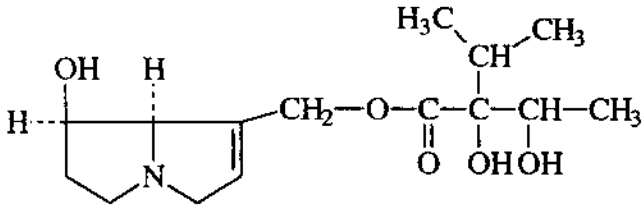


1.6.2.2. Alcaloid có nhân pyrrolizidin

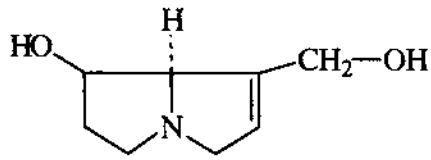
Ví dụ: Indicin, Indicin-N-oxyd có trong cây vòi voi (*Heliotropium indicum*), Retronecin trong *Senecio retrorsus*; Senecionin trong *Senecio vulgaris*...



Pyrrolizidin



Indicin



Retronecin

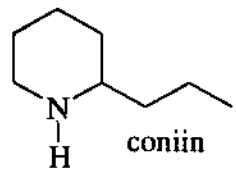
1.6.2.3. Alcaloid có nhân pyridin và piperidin

Ví dụ: Coniin trong *Conium maculatum*

Arecolin trong *Areca catechu*

Lobelin trong *Lobelia inflata*

Nicotin trong *Nicotiana tabacum*

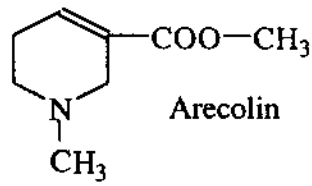


coniin

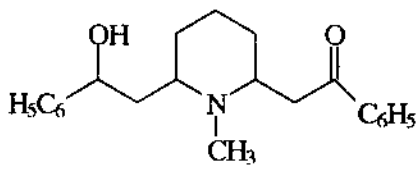
Anabasin trong *Nicotiana glauca*

Piperin trong *Piper nigrum*

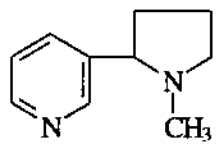
Ricinin trong *Ricinus communis*



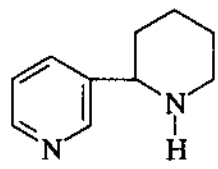
Arecolin



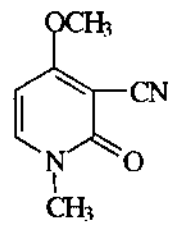
Lobelin



Nicotin



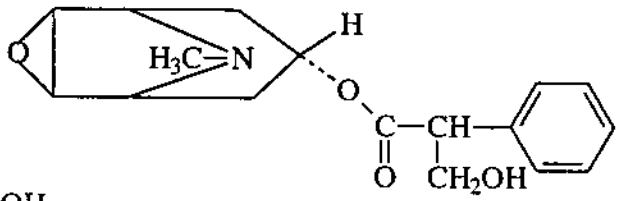
Anabasin



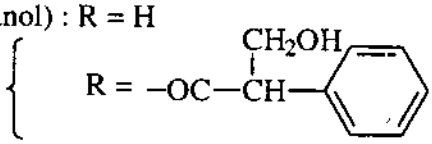
Ricinin

1.6.2.4. Alcaloid có nhân tropan

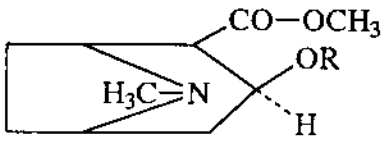
Ví dụ: Hyoscyamin, atropin, tropin, scopolamin... có trong các cây ở chi *Atropa*, *Datura*, *Hyoscyamus*, *Duboisia*, *Mandragora* và *Scopolia* (Solanaceae), cocain trong lá coca.



Tropin (=Tropanol) : R = H
Atropin
Hyoscyamin



Scopolamin (=Hyoscin)

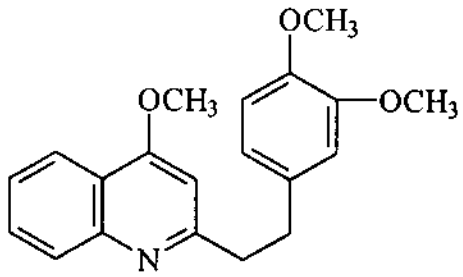


Cocain : R = —OC—C_6H_5

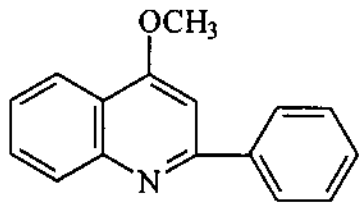
Cinnamoyl cocain: R = —OC—CH=CH—C_6H_5

1.6.2.5. Alcaloid có nhân quinolin

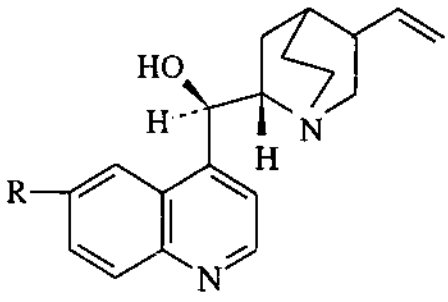
- Quinin, quinidin, cinchonin, cinchonidin... trong vỏ các loài canhkina (*Cinchona* spp. - Rubiaceae), *Remijia* spp. (Rubiaceae), Cusparin trong vỏ cây Cusparia; Graveolin, Graveolinin trong *Ruta graveolens*.



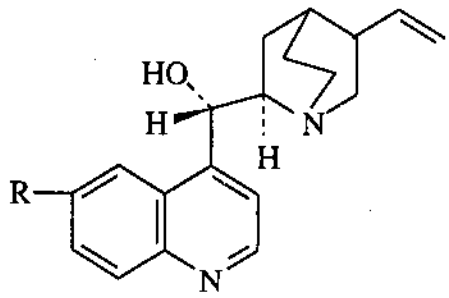
Cusparin



Graveolin



Cinchonidin : R = – H
Quinin : R = – OCH_3



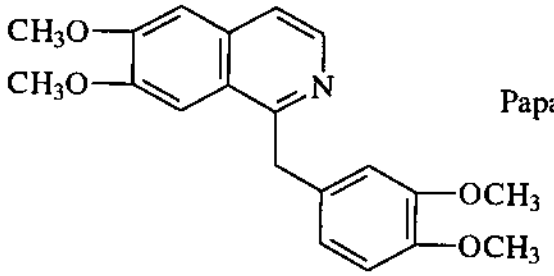
Cinchonin R = H
Quinidin R = – OCH_3

1.6.2.6. Alcaloid có nhân isoquinolin

- Nhóm này có nhiều alcaloid được sử dụng trong điều trị. Có thể chia ra 9 phân nhóm.

1.6.2.6.1. Cấu trúc benzylisoquinolin

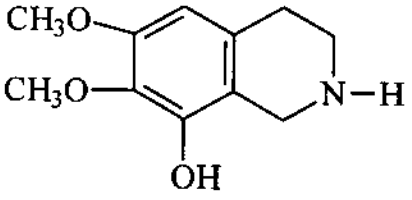
Ví dụ: Papaverin trong nhựa thuốc phiện.



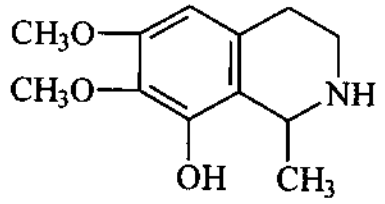
Papaverin

1.6.2.6.2. Cấu trúc tetrahydroisoquinolin

Ví dụ: Anhalidin, anhalonidin... trong *Anhalonium lewinii*.



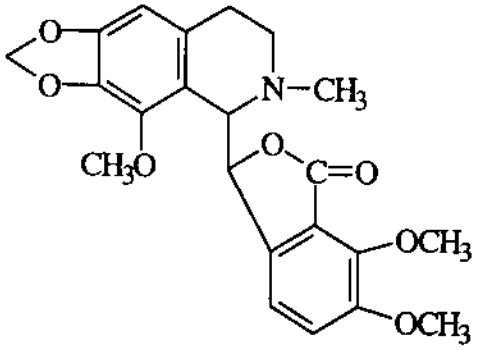
Anhalidin



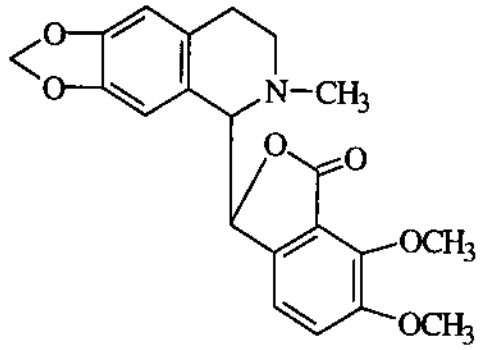
Anhalonidin

1.6.2.6.3. Cấu trúc ptalidisoquinolin

Ví dụ: Noscapin trong nhựa thuốc phiện, hydrastin trong *Hydratis canadensis*.



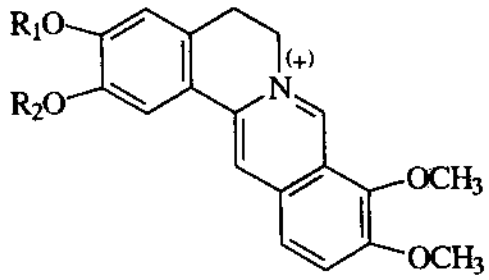
Noscapin



Hydrastin

1.6.2.6.4. Cấu trúc protoberberin

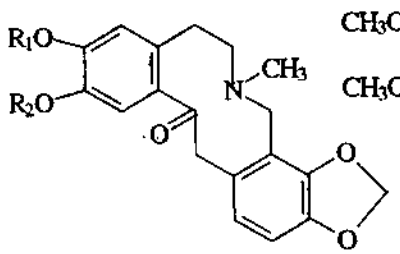
Ví dụ: Berberin trong hoàng liên, hoàng bá, vàng đắng, palmatin, jatrorrhizin trong *Jatrorrhiza palmata*, *Fibraurea recisa*, *F. tinctoria*.



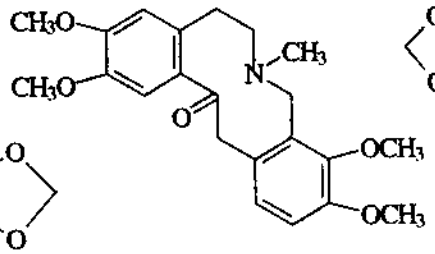
Palmatin: $R_1 = R_2 = CH_3$
Jatrorrhizin: $R_1 = H, R_2 = CH_3$
Berberin: $R_1 + R_2 = -CH_2-$

1.6.2.6.5. Cấu trúc protopin

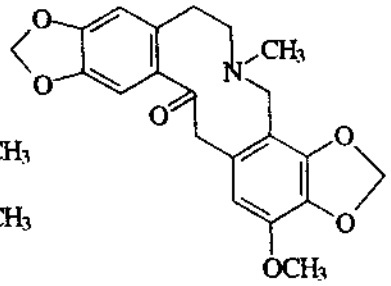
Ví dụ: Protopin, cryptopin trong thuốc phiện (*Papaver somniferum*) muramin trong *Papaver nudicaul* var. *amurense*; coulteropin trong *Romneya coulteri*.



Protopin: $R_1 + R_2 = -CH_2-$
Cryptopin: $R_1 = R_2 = -CH_3$



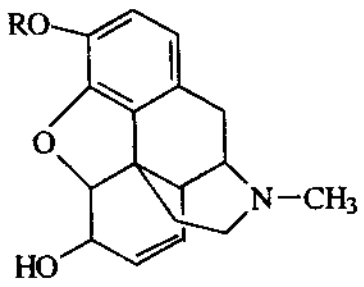
Muramin



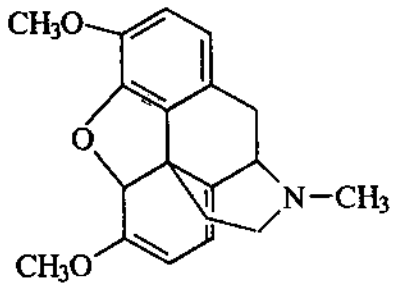
Coulteropin

1.6.2.6.6. Cấu trúc morphinan

Ví dụ: Morphin, codein, thebain trong thuốc phiện



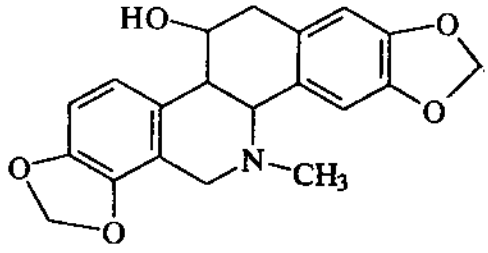
Morphin: R = –H
Codein: R = $-CH_3$



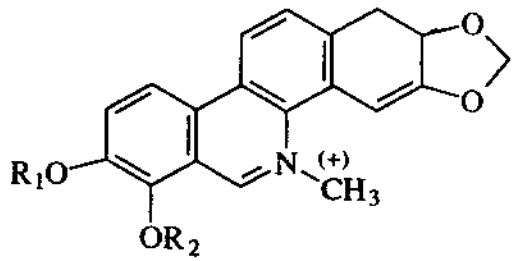
Thebain

1.6.2.6.7. Cấu trúc benzophenanthridin

Ví dụ: Chelidonin, chelerythrin, sanguinarin trong *Chilidonium majus* – Papaveraceae.



Chelidonin

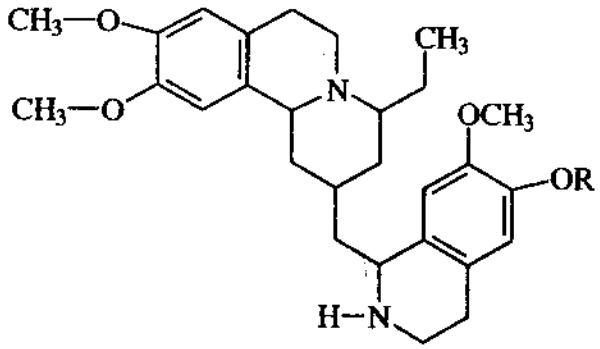


Chelerythrin: $R_1 = R_2 = -CH_3$

Sanguinarin: $R_1 + R_2 = -CH_2-$

1.6.2.6.8. Cấu trúc emetin

Ví dụ: Emetin, cephelin trong Ipeca.

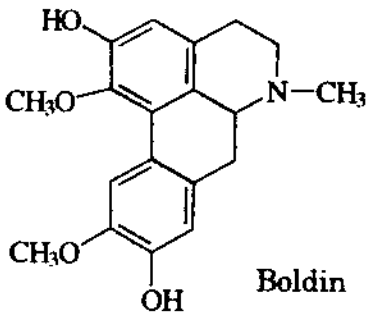


Emetin: $R = -CH_3$

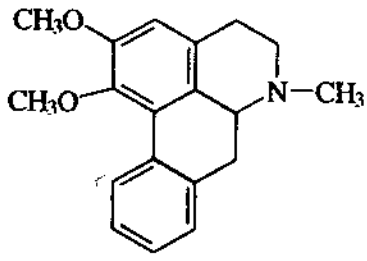
Cephelin: $R = -H$

1.6.2.6.9. Cấu trúc apomorphin

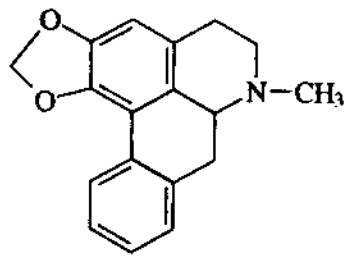
Ví dụ: Boldin trong lá *Peumus boldus*. Roemerin trong Bình vôi (*Stephania spp.*). Nuciferin trong lá sen.



Boldin



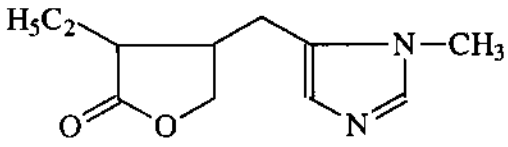
Nuciferin



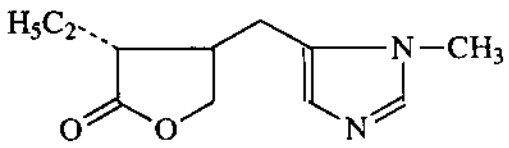
Roemerin

1.6.2.7. Alcaloid có nhân imidazol

Ví dụ: Pilocarpin, isopilocarpin trong lá một số loài *Pilocarpus*.



Pilocarpin



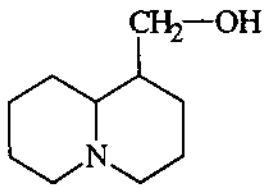
Isopilocarpin

1.6.2.8. Alcaloid có nhân quinolizidin

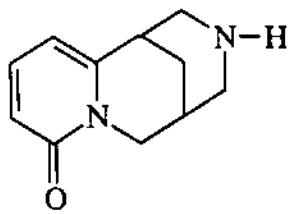
Ví dụ: Lupinin trong *Lupinus luteus*

Cytisin trong *Cytisus laburnum*

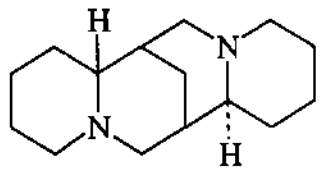
Spartein trong *Sarothamnus scoparius*



Lupinin



Cystisin



Spartein

1.6.2.9. Alcaloid có nhân indol

Đây là nhóm rất quan trọng vì có nhiều alcaloid trong nhóm này được sử dụng trong điều trị. Có thể chia ra 12 phân nhóm.

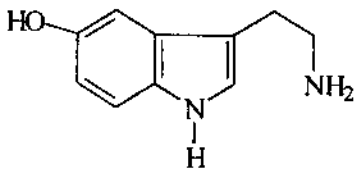
1.6.2.9.1. Cấu trúc indolalkylamin

Ví dụ: Serotonin có trong các mô động vật và có trong cây *Gossypium hirsutum*, *Paneolus foenescii*, *P. campanulatus*.

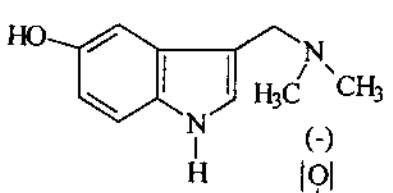
Bufotenin trong các loài cóc Bufo, trong *Pitadenia macrocarpa*

Lespedamin trong *Lespedeza bicolor* var. *japonica*.

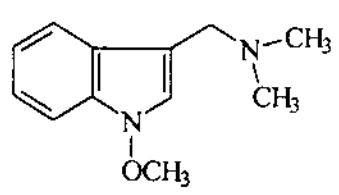
Psilocybin có trong nấm *Psilocybe aztecorum*.



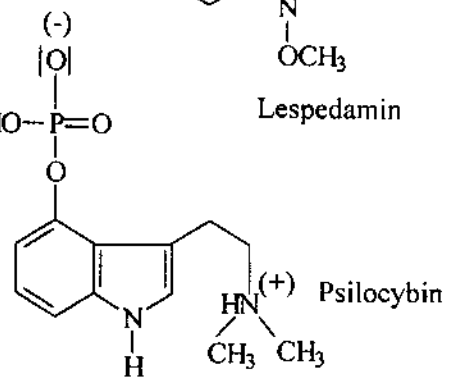
Serotonin



Bufotenin



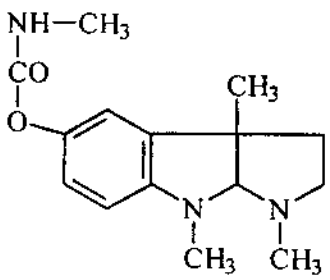
Lespedamin



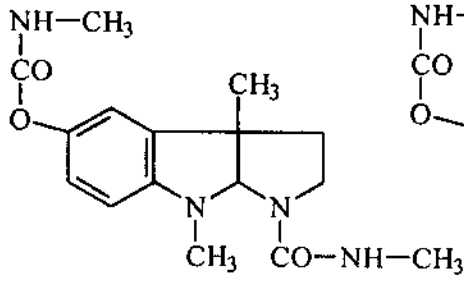
Psilocybin

1.6.2.9.2. Cấu trúc physostigmin

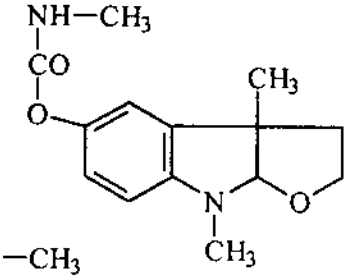
Ví dụ: Physostigmin, Physovenin, Eseramin trong *Physostigma venenosum*



Physostigmin



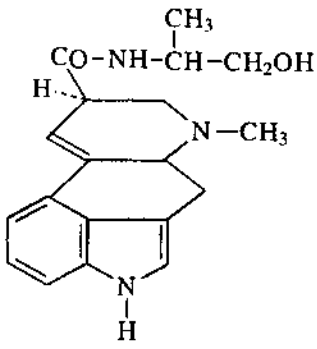
Eseramin



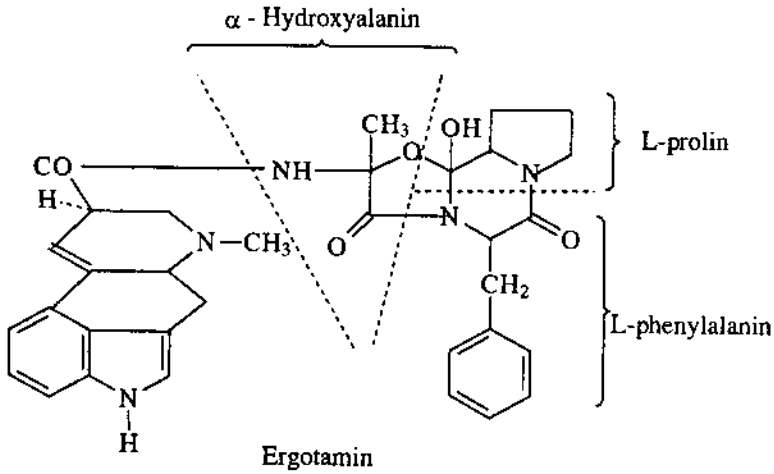
Physovenin

1.6.2.9.3. Cấu trúc ergolin

Ví dụ: Ergobasin, Ergotamin,... trong cựa khoả mạch



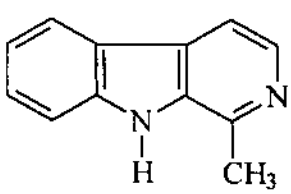
Ergobasin (=Ergometrin)

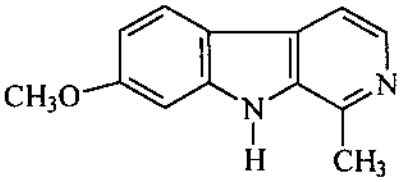


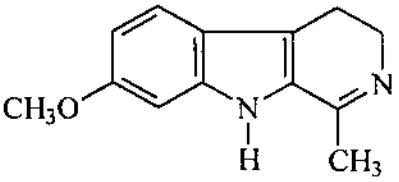
Ergotamin

1.6.2.9.4. Cấu trúc harman

Ví dụ: Harman, Harmin, Harmalin trong *Passiflora incarnata*.

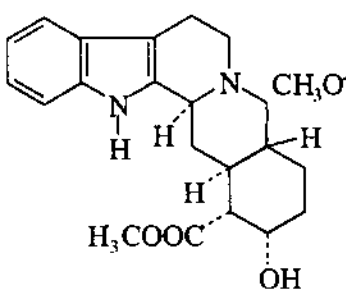

Harman

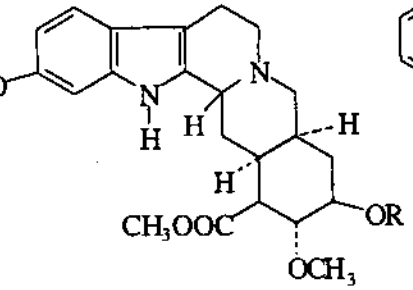

Harmin

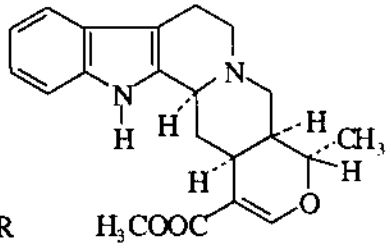

Harmalin

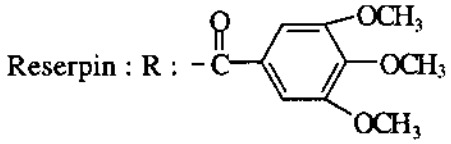
1.6.2.9.5. Cấu trúc yohimbin

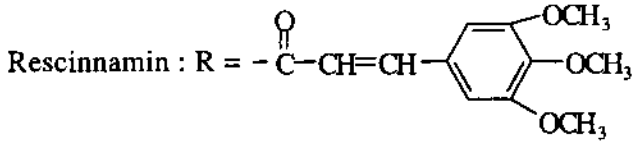
Ví dụ: Yohimbin, Reserpin, Ressinnamin, Ajmalicin trong một số loài Ba gạc (*Rauwolfia* spp.)


Yohimbin




Ajmalici

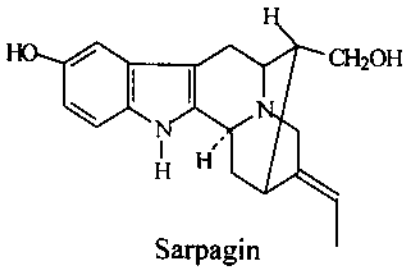

Reserpin : R :

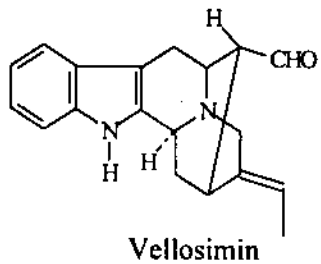

Rescinnamin : R =

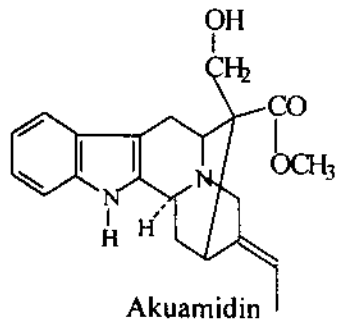
1.6.2.9.6. Cấu trúc sarpagin

Ví dụ: - Sarpagin trong một số loài Ba gạc

- Vellosimin trong *Vinca difformis*
- Akuamidin trong *Picralima nitida*


Sarpagin

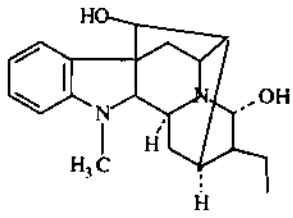

Vellosimin

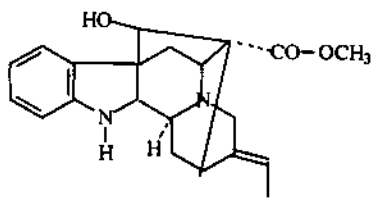

Akuamidin

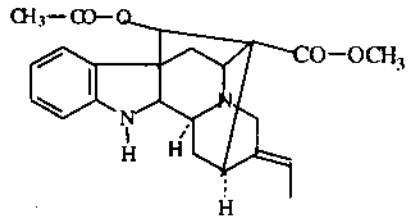
1.6.2.9.7. Cấu trúc ajmalin

Ví dụ: - Ajmalin trong Ba gạc (*Rauwolfia* spp.)

- Vincarin, vincamedin trong một số loài *Vinca*

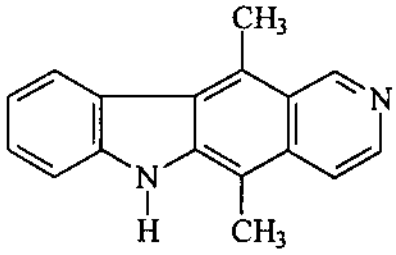

Ajmali

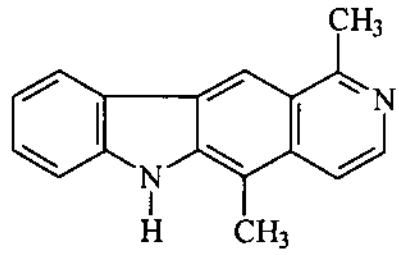

Vincari


Vincamedi

1.6.2.9.8. Cấu trúc ellipticin

Ví dụ: Ellipticin có trong cây *Ochrosia elliptica*. Olivacin có trong cây *Aspidosperma olivaceum*.

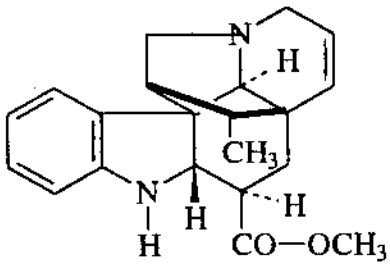

Ellipticin


Olivacin

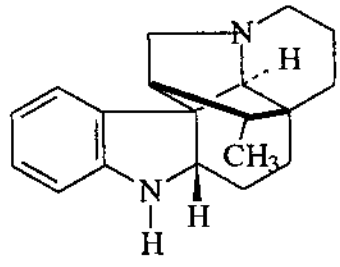
1.6.2.9.9. Cấu trúc vindolinin

Ví dụ: - Vindolinin trong Dừa cạn (*Catharanthus roseus*)

- Tuboxenin trong *Pleiocarpa tubiciana*



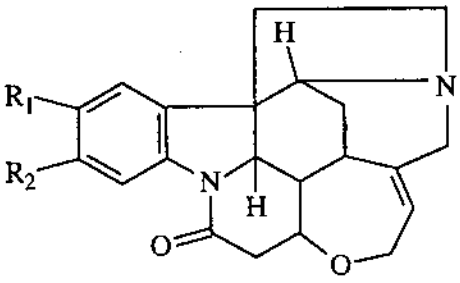
Vindolinin

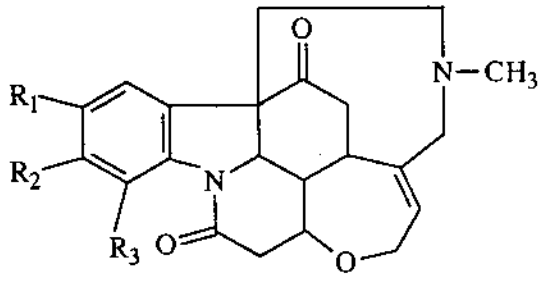


Tuboxenin

1.6.2.9.10. Cấu trúc strychnin

Ví dụ: Strychnin, Brucin, α-colubrin, β-colubrin, novacin, vomicin trong Mã tiền (*Strychnos* spp.)





Strychnin: $R_1 = R_2 = H$

Brucin: $R_1 = R_2 = -OCH_3$

α-Colubrin: $R_1 = H$; $R_2 = OCH_3$

β-Colubrin: $R_1 = -OCH_3$; $R_2 = H$

Novacin: $R_1 = R_2 = -OCH_3$; $R_3 = H$

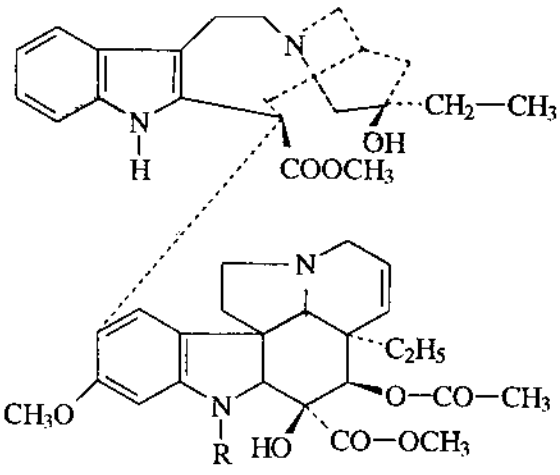
Vomicin: $R_1 = R_2 = H$; $R_3 = -OH$

1.6.2.9.11. Cấu trúc dime

Nhóm này là những alcaloid có cấu trúc 2 vòng indol, hoặc 2 vòng indolin hoặc 1 vòng indol và 1 vòng indolin gắn với nhau qua liên kết C–C hoặc C–N.

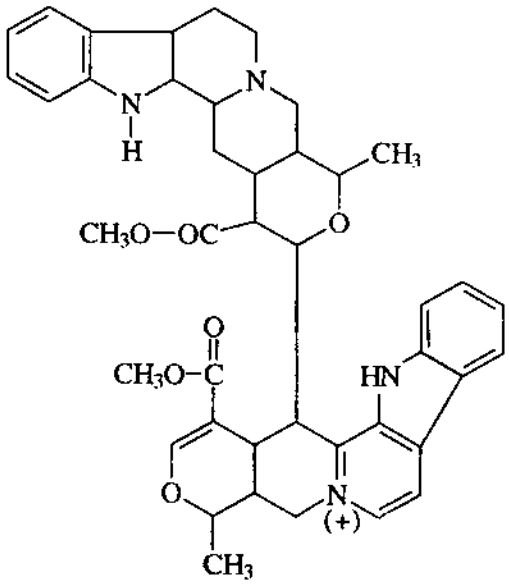
Ví dụ: - Vinblastin, Vincristin trong lá cây Dừa cạn (*Catharanthus roseus*)

- Serpentinin trong rễ Ba gạc Ấn Độ (*Rauwolfia serpentina*)
- Folicanthin trong lá cây *Calycanthus floridus*
- C - toxiferin trong *Strychnos froesii*.

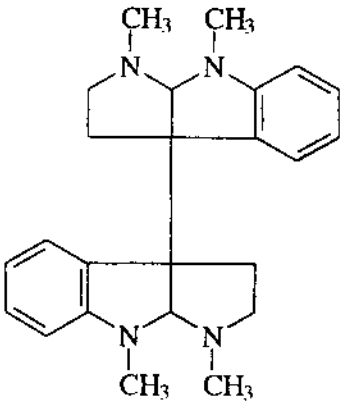


Vinblastin : R = CH_3

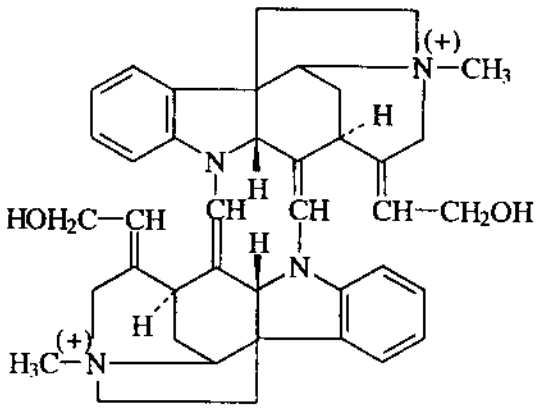
Vincristin : R = CHO



Serpentinin



Folicanthin

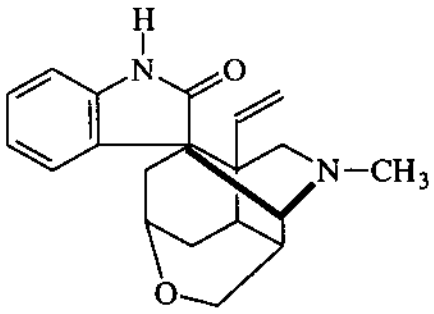


C-Toxiferin

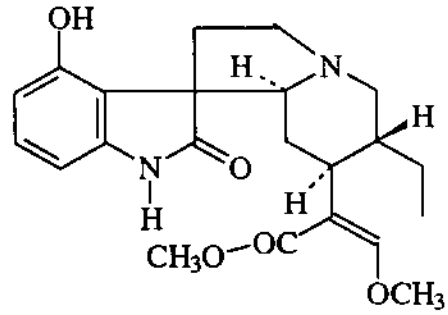
1.6.2.9.12. Cấu trúc oxindol

Ví dụ: - Gelsemin trong *Gelsemium sempervirens*

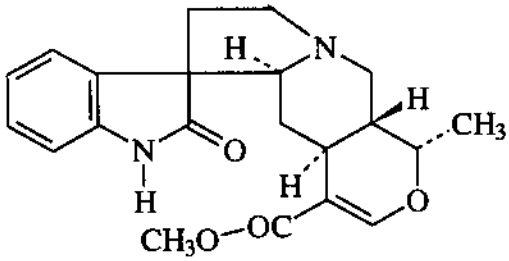
- Rotundifolin trong cây *Mitragyna rotundifolia*
- Mitraphyllin, Rhyncophyllin trong một số loài *Uncaria*



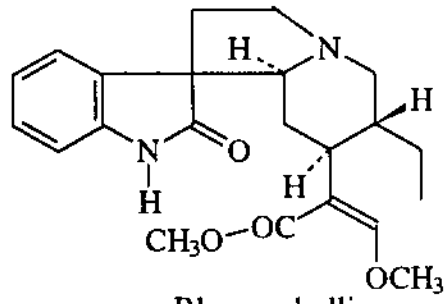
Gelsemin



Rotundifolin



Mitraphyllin



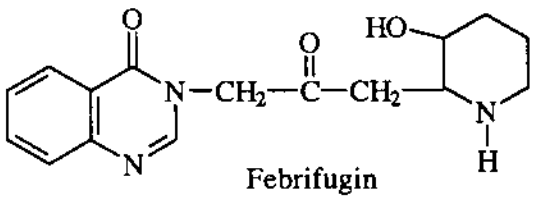
Rhyncophyllin

1.6.2.10. Alcaloid có nhân quinazolin

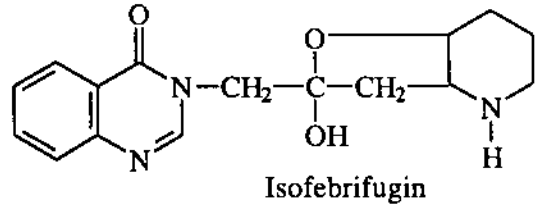
Ví dụ: α - Dichroin (= isofebrifugin), β- Dichroin (=febrifugin) trong cây Thường sơn (*Dichroa febrifuga*)

- Glycorin, Glycosminin trong *Glycosmis arborea*.

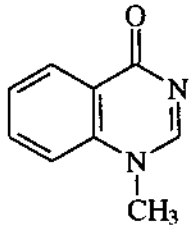
- Sessiflorin trong cây *Anisotes sessiliflorus*.



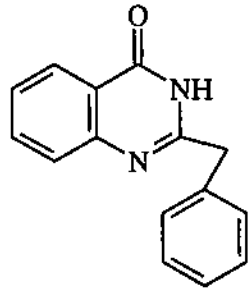
Febrifugin



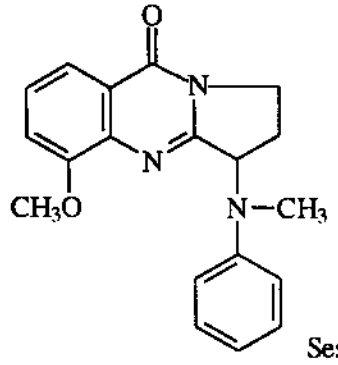
Isofebrifugin



Glycorin



Glycosminin



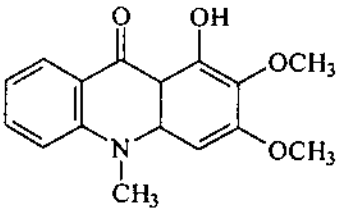
Sessiflorin

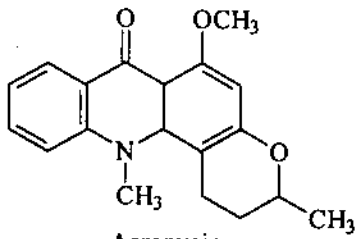
1.6.2.11. Alcaloid có nhân acridon

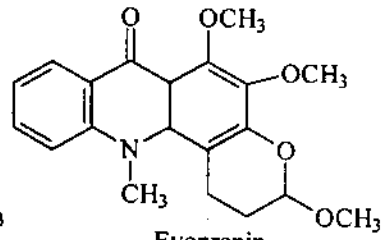
Ví dụ: - Acronycin trong cây *Acronychia baueri*

- Arborinin trong cây *Glascosmis arborea*

- Evoprenin trong cây *Evodia alata*

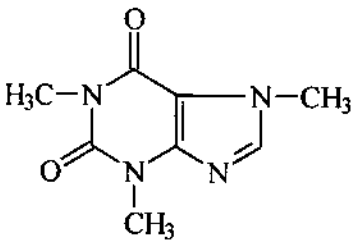

Arborinin

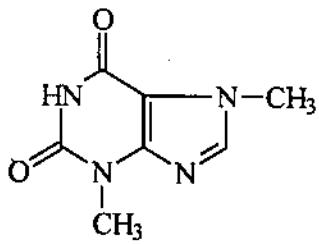

Acronycin

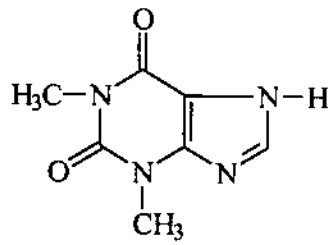

Evoprenin

1.6.2.12. Alcaloid có nhân purin

Ví dụ: Theophyllin, theobromin, cafein trong chè (*Camellia sinensis*), cà phê (*Coffea arabica*)


Cafein


Theobromin


Theophyllin

1.6.2.13. Alcaloid có nhân steroid

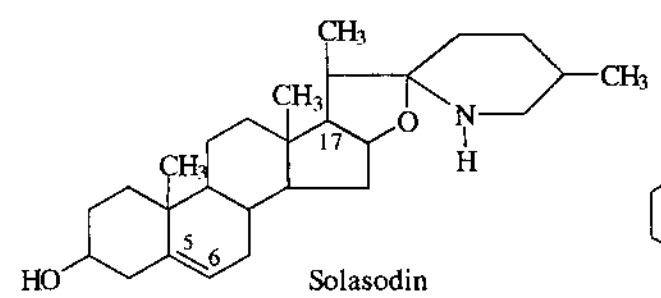
Các alcaloid có nhân steroid thường có 1 hoặc 2 nitơ trong mạch nhánh đã đóng vòng ở vị trí C-17 hoặc ở vị trí C-3. Chúng là dẫn chất của dãy cholestan (khung có 27C) hoặc là dẫn chất của dãy pregnan (khung có 21C ít khi có 22,23C). Đã biết trên 200 alcaloid có cấu trúc steroid, chúng thường tập trung ở họ Cà (Solanaceae), họ Hành (Liliaceae) họ Trúc đào (Apocynaceae), họ Hoàng dương (Buxaceae).

Ví dụ: - Solasodin, solanidin ở một số loài Solanum

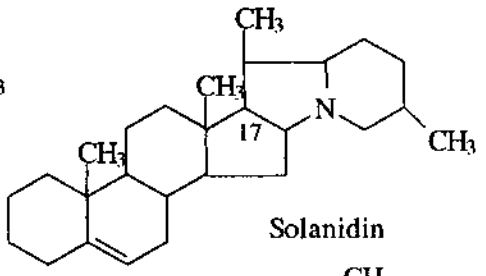
- Funtumin, Funtumidin ở trong *Funtumia latifolia*

- Conessin có trong *Holarrhena antidysenterica*.

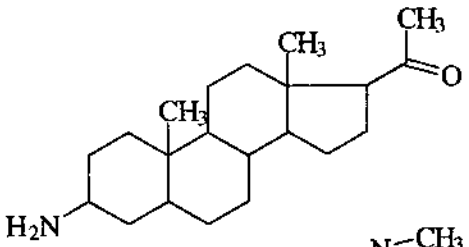
- Buxaltin trong *Buxus sempervirens*



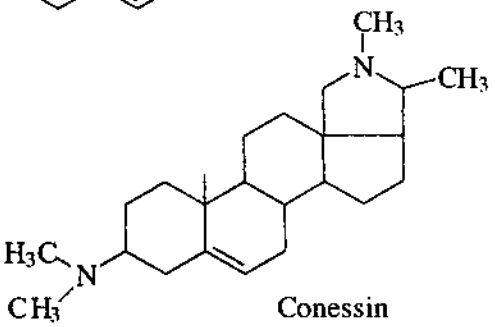
Solasodin



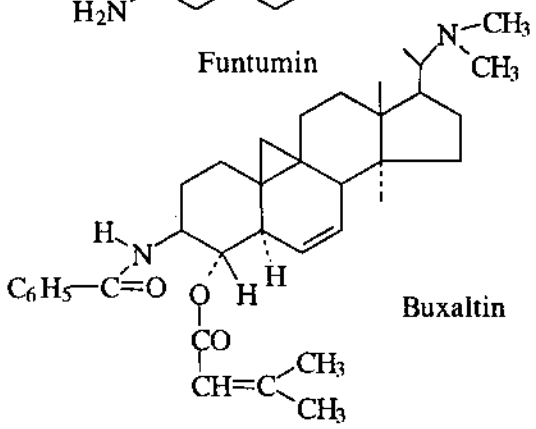
Solanidin



Funtumin



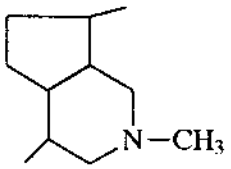
Conessin



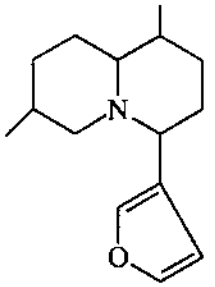
Buxaltin

1.6.2.14. Alcaloid có cấu trúc terpenoid

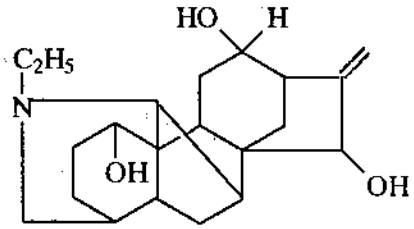
Cho tới nay mới thấy rất ít alcaloid có cấu trúc monoterpen (ví dụ: skythanthin ở *Skythanthus acutus*) và sesquiterpen (ví dụ: desoxynupharidin ở *Nuphar japonicum*). Cấu trúc diterpen có nhiều hơn thường tập trung ở chi *Aconitum* và *Delphinium* (ví dụ: Napellin, aconitin, hypaconitin trong một số loài *Aconitum*; delphinin, codelphin, ajaconin... có trong một số loài *Delphinium*).



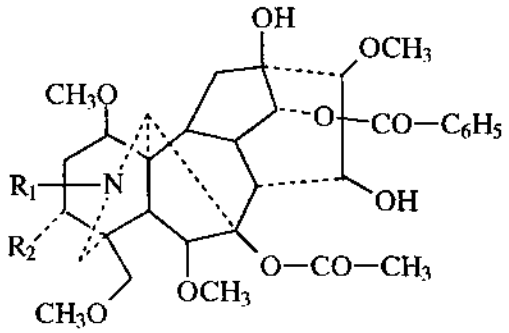
Skythanthin



Desoxynupharidin



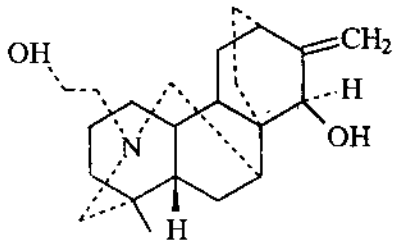
Napellin



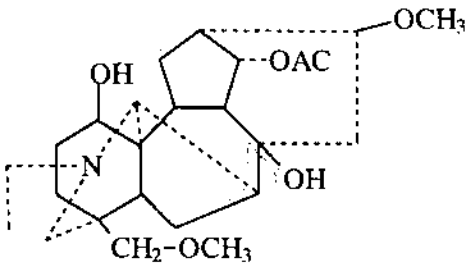
Aconitin: $R_1 = C_2H_5$; R_2 = OH

Mesaconitin: $R_1 = CH_3$; R_2 = OH

Hypaconitin : $R_1 = CH_3$; R_2 = H



Ajaconin

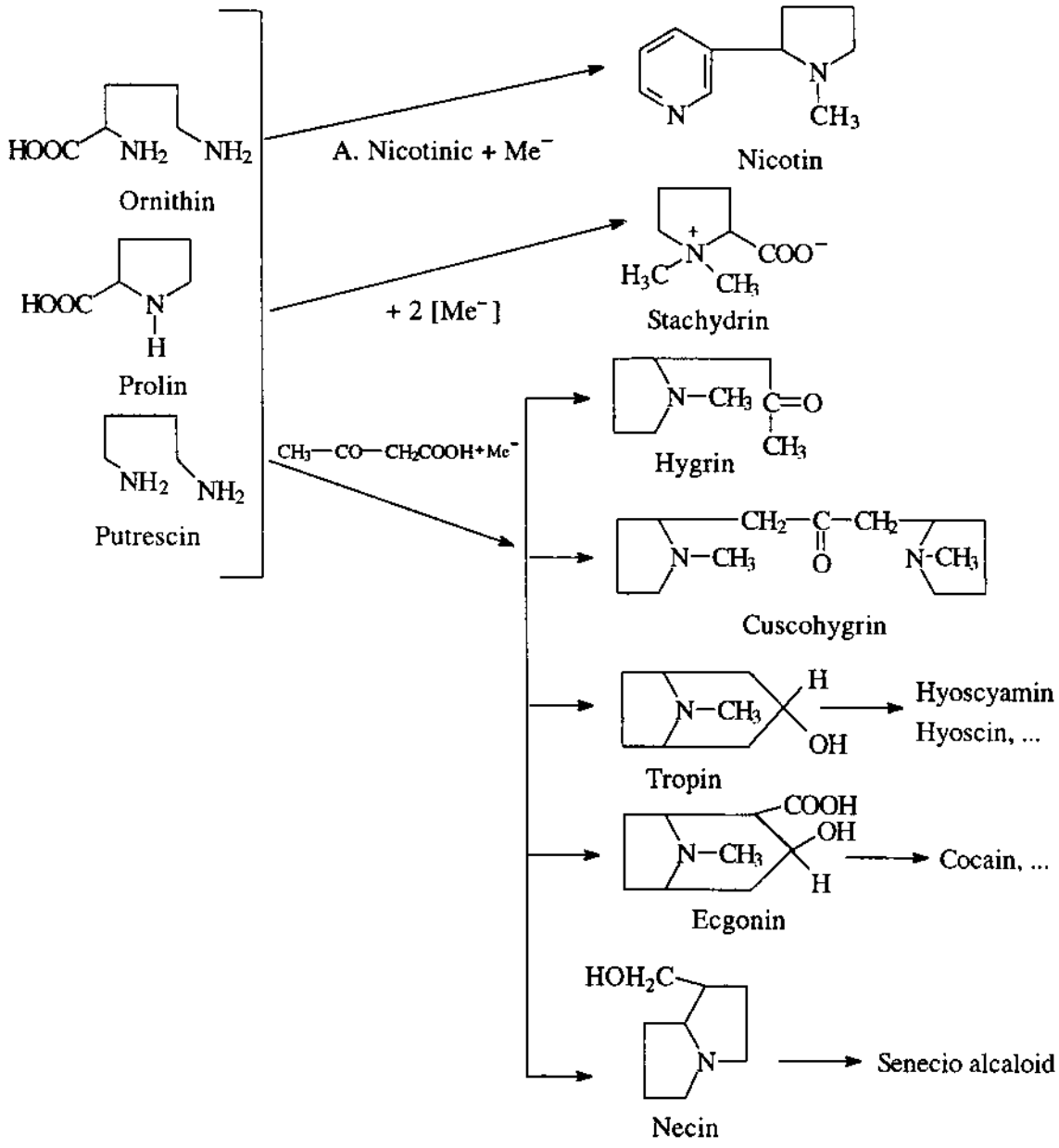


Condelphin

**** Phân loại alcaloid theo sự phát sinh sinh vật (Biogenese)***

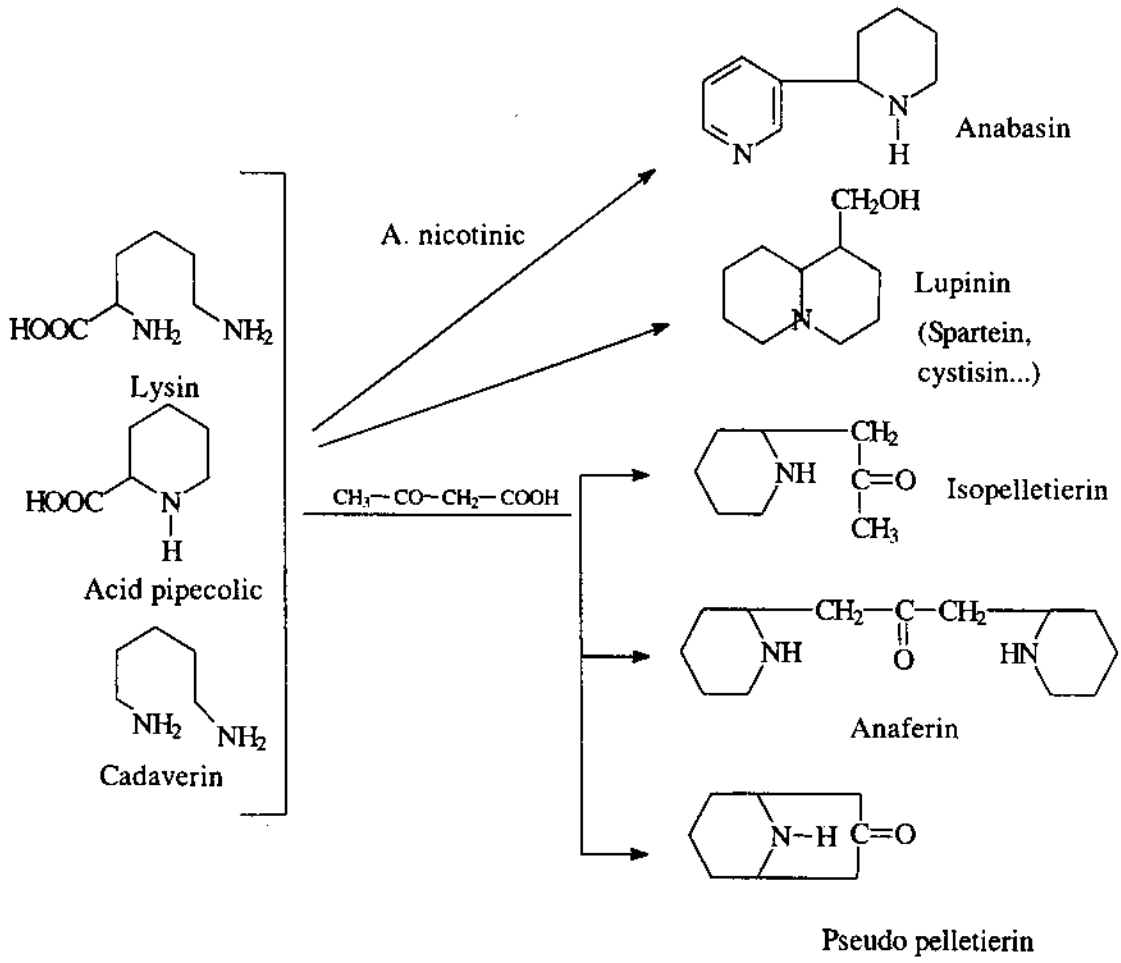
Những alcaloid là dẫn xuất của ornithin

Từ acid amin là ornithin, tạo ra sản phẩm mất nhóm carboxyl là putrescin cùng với prolin tạo ra các alcaloid có khung tropan, ecgonin, nicotin, necin và stachydrin.

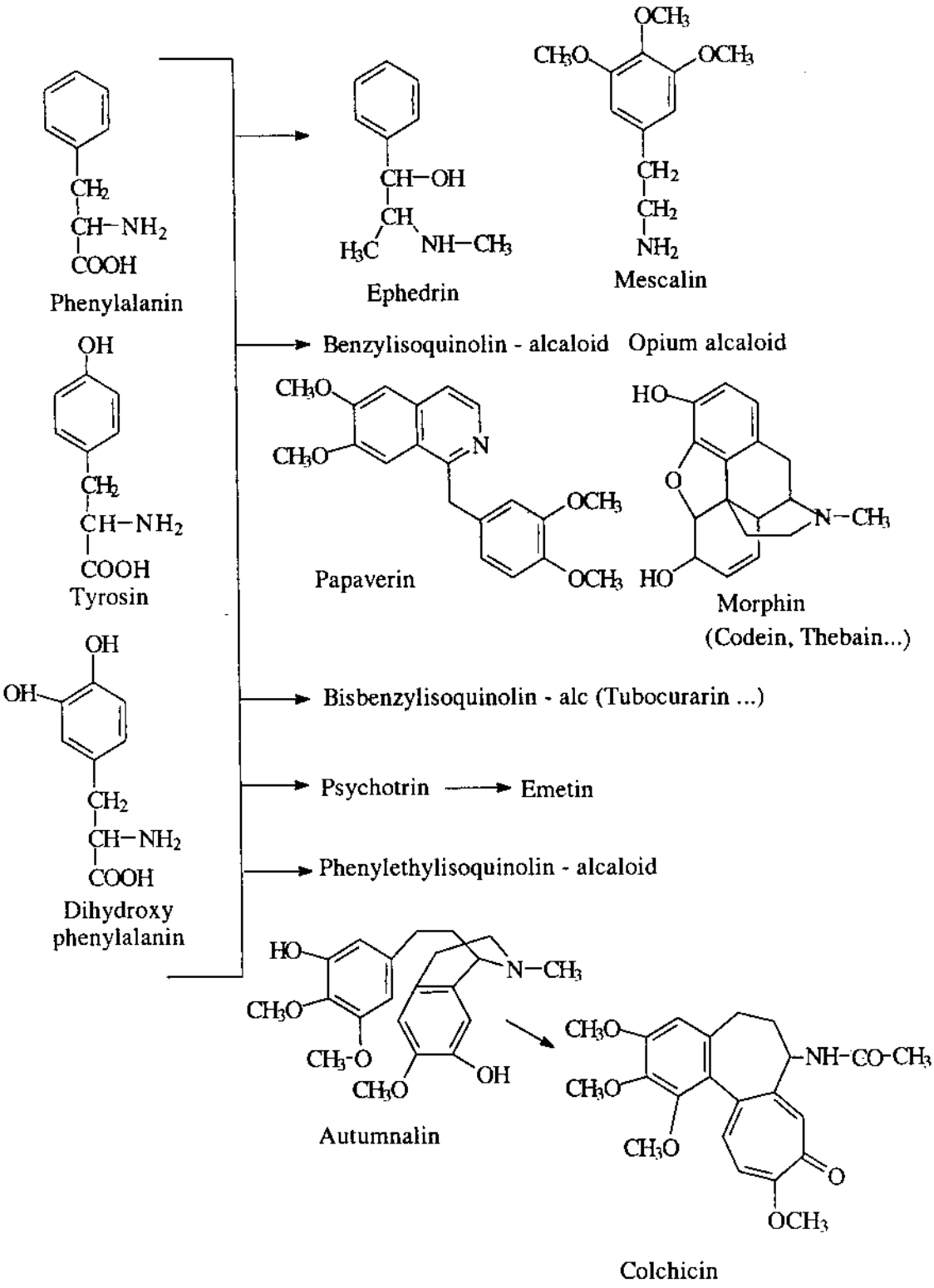


Những alcaloid là dẫn xuất của lysin

Từ acid amin là lysin, tạo ra sản phẩm mất nhóm carboxyl là cadaverin cùng với acid pipecolic tạo ra các alcaloid có khung piperidin, quinolizidin.

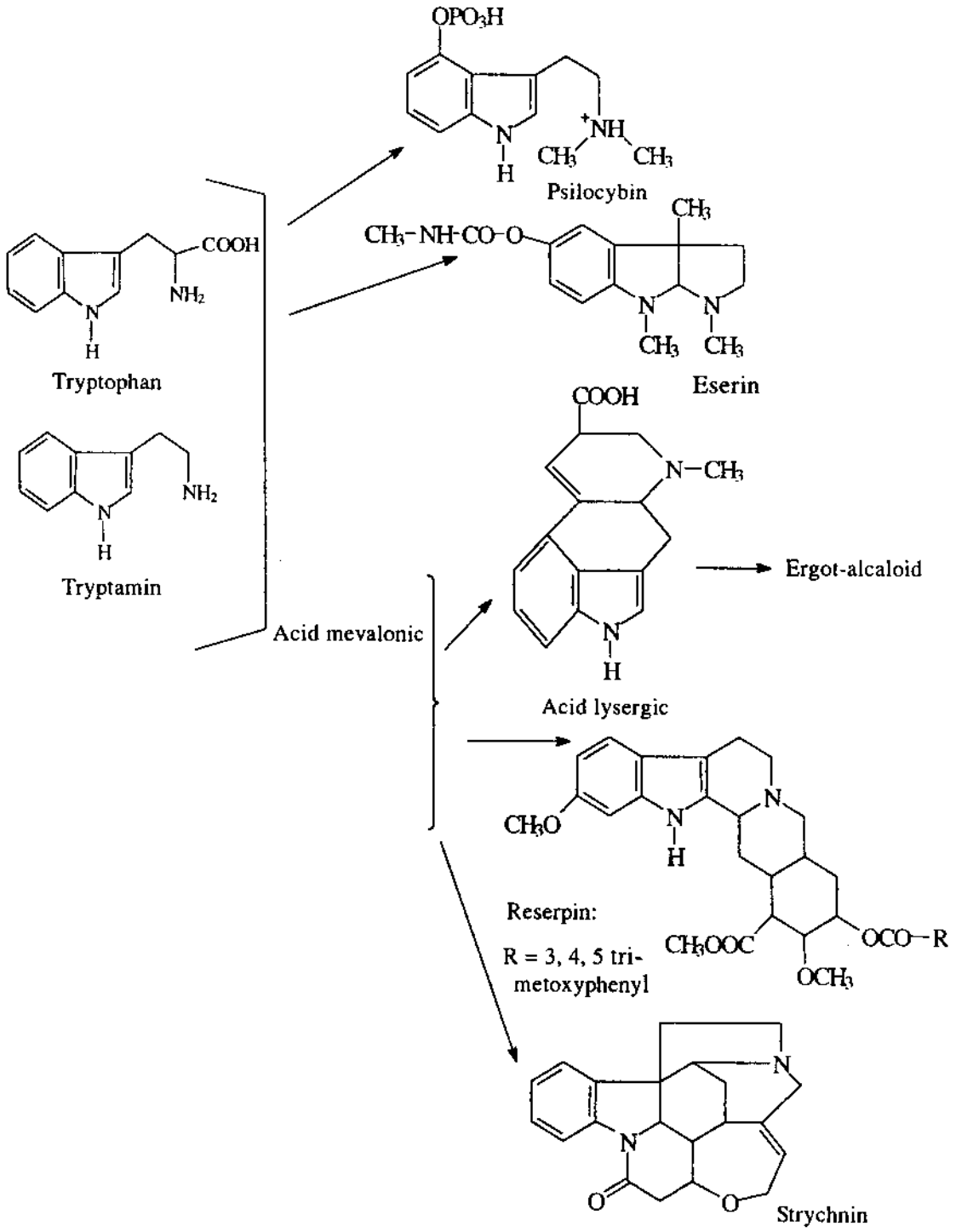

HOOC NH2 NH2
Lysin
HOOC N H
Acid pipecolic
NH2 NH2
Cadaverin
A. nicotinic
CH3–CO–CH2–COOH
N N H
Anabasin
CH2OH
N
Lupinin
(Spartein,
cystisin...)
NH CH2 C=O CH3
Isopelletierin
NH CH2–C–CH2 O HN
Anaferin
N–H C=O
Pseudo pelletierin

Những alcaloid là dẫn xuất của phenylalanin, tyrosin và dihydroxy - phenylalanin



Những alcaloid là dẫn xuất của tryptophan

Acid amin tryptophan và sản phẩm mất nhóm carboxyl là tryptamin là tiền chất của các alcaloid có nhân indol.



II. MỘT SỐ NHÓM ALCALOID QUAN TRỌNG

2.1. Nhóm tropan - alcaloid

Các alcaloid có nhân tropan không phải là những alcaloid đầu tiên phát hiện ra trong thiên nhiên nhưng các alcaloid này sớm thu hút sự chú ý vì tác dụng dược lý và được sử dụng làm thuốc. Các alcaloid có nhân tropan thường gặp trong các chi *Atropa, Datura, Duboisia, Hyoscyamus, Mandragora, Scopolia và Sonadra* (Solanaceae), chi *Convolvulus* (Convolvulaceae) *và chi Erythroxylum* (Erythroxylaceae).

Đại diện alcaloid của nhóm này được trình bày ở bảng 1.

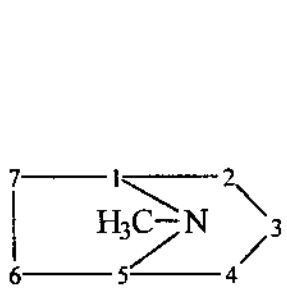
Bảng 1.

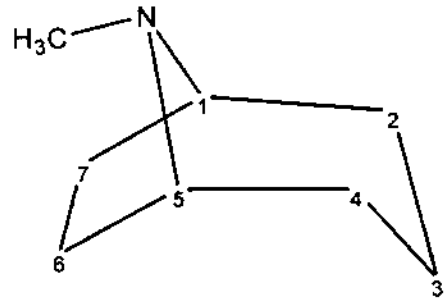
Alcaloid	Aminoalcol	Acid thành phần/cấu trúc	Trong loài cây
Hyoscyamin ($C_{17}H_{23}NO_3$)	Tropin	(-) acid tropic	*Atropa belladonna*
Atropin ($C_{17}H_{23}NO_3$) (± Hyoscyamin)	Tropin	(±) acid tropic	*Atropa belladonna*
Atropamin ($C_{17}H_{21}NO_2$)	Tropin	acid tropic	*Atropa belladonna*
Belladonnin ($C_{34}H_{42}N_2O_4$)	Tropin	α -isatropic	*Atropa belladonna*
(-) Scopolamin ($C_{17}H_{21}NO_4$)	Scopin	(-) a. tropic	*Hyoscyamus niger* *Datura metel* *Scopolia carniolica*
Poroidin ($C_{12}H_{21}NO_2$)	Nortropin	a. isovalerianic	*Duboisia myoporoides*
Norhyoscyamin ($C_{16}H_{21}NO_3$)	Nortropin	(-) a. tropic	*Duboisia myoporoides*
Butropin ($C_{12}H_{21}NO_2$)	Tropin	a. isobutleric	*Duboisia buchhardtii*
Tigloyltropein ($C_{13}H_{21}NO_2$)	Tropin	a. tiglinic	*Datura ferrox*

Bảng 1. (tiếp theo)

Alcaloid	Aminoalcol	Acid thành phần/cấu trúc	Trong loài cây
Tigloidin ($C_{13}H_{21}NO_2$)	Pseudotropin ($C_8H_{15}NO$)	a. tiglinic	*Datura innoxia*
Tropacocain ($C_{15}H_{19}NO_2$)	Pseudotropin ($C_8H_{15}NO$)	a. benzoic	*Erythroxylum coca*
Norscopolamin (Norhyoscin) ($C_{16}H_{19}NO_4$)	Norscopin	(±) a. tropic	*Datura metel*
Benzoylecgonin ($C_{16}H_{19}NO_4$)	(-) Ecgonin	a. benzoic	*Erythroxylum coca*
(-) Cocain ($C_{17}H_{21}NO_4$)	(-) Ecgonin-methyleste	a. benzoic	*Erythroxylum coca*
Cinnamoylcocain ($C_{19}H_{23}NO_4$)	(-) Ecgonin-methyleste	a. cinnamic	*Erythroxylum coca*
α -Truxillin ($C_{38}H_{46}N_2O_8$)	(-) Ecgonin-methyleste	α. truxillic	*Erythroxylum coca*
β -Truxillin	(-) Ecgonin-methyleste	β. truxillic	*Erythroxylum coca*
Convolamin ($C_{17}H_{23}NO_4$)	Tropin	a. veratrumic	*Convolvulus pseudocantabrica*
Convolvin ($C_{16}H_{21}NO_4$)	Nortropin	a. veratrumic	*Convolvulus pseudocantabrica*
Meteloidin ($C_{13}H_{21}NO_4$)	Teloidin	acid tiglinic	*Datura meteloides*
Tigloylmeteloidin ($C_{18}H_{27}NO_5$)	Teloidin	2.mol.tiglinic	*Datura ferrox*
3-α- Acetoxytropan ($C_{10}H_{17}NO_2$)	Tropin	acid acetic	*Datura sanguinea*
Phyllalbin ($C_{16}H_{21}NO_3$)	Tropanol	a. vanilic	*Phyllanthus discoides*
Brugin ($C_{12}H_{19}NO_2S_2$)	Tropin	1-2-Dithiolan-3-carboxylic	*Bruguiera sexangula*

2.1.1. Cấu trúc khung cơ bản của nhóm tropan-alcaloid





Khung tropan: N-methyl-pyrrolidin + piperidin

- Alcaloid phát hiện đầu tiên của nhóm này là atropin do Mein 1833 chiết được từ rễ cây Belladon.

- Năm 1860 Niemann phân lập được cocain từ lá coca.

- Năm 1888 E. Schmidt phát hiện ra scopolamin từ rễ cây *Scopolia carniolica.*

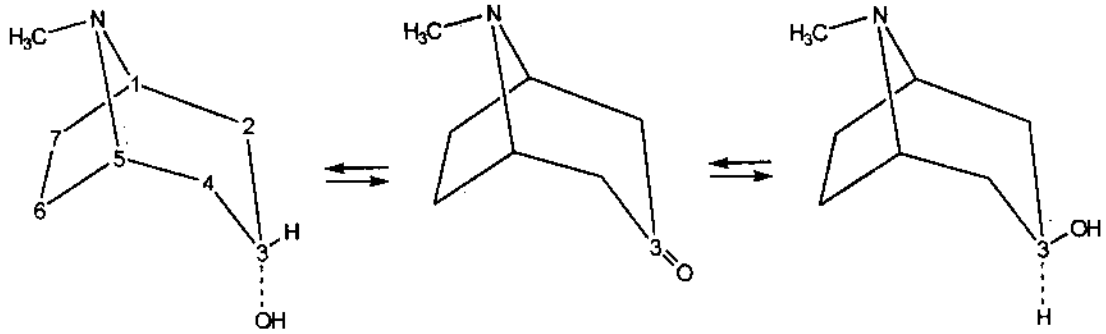
Đến nay người ta đã biết trên 50 alcaloid thiên nhiên kiểu cấu trúc này. Trong điều trị thường sử dụng atropin, hyoscyamin và scopolamin, ngoài ra còn dùng các sản phẩm tổng hợp có cấu trúc hoá học tương tự.

2.1.1.1. Tropin

Cấu trúc khung cơ bản của nhóm tropan - alcaloid đã được Willstater (1901 - 1903) giải thích.

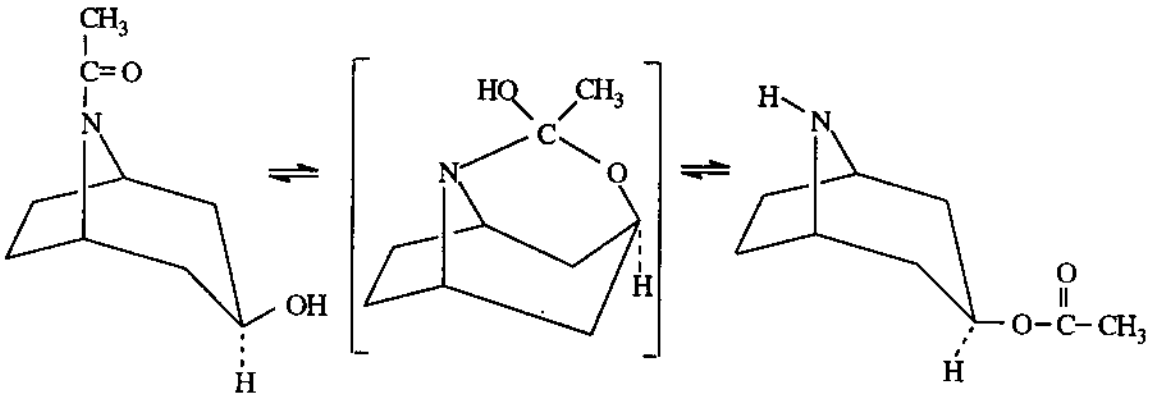
- Tropin (3 α-tropanol) phân biệt với pseudotropin (3 β-tropanol) qua vị trí của nhóm OH ở C_3. Hyoscyamin, atropin có cấu trúc α-tropanol, còn cocain tương ứng với cấu trúc pseudotropin.

- Tropin là đồng phân không bền vững và dễ biến đổi thành pseudotropin bền vững hơn qua đun nóng với natriumamylat. Trong cấu trúc tropin, nhóm OH nằm trong không gian xa N hơn trong cấu trúc của pseudotropin.



Tropin (F : 63°) 3-Tropanon Pseudotropin (F : 109°)

- Năm 1952 Fodor đã chứng minh có thể biến đổi Nor-pseudotropin thành dẫn chất acyl qua gắn với N hoặc O. Do đó có thể viết cấu trúc không gian như sau:

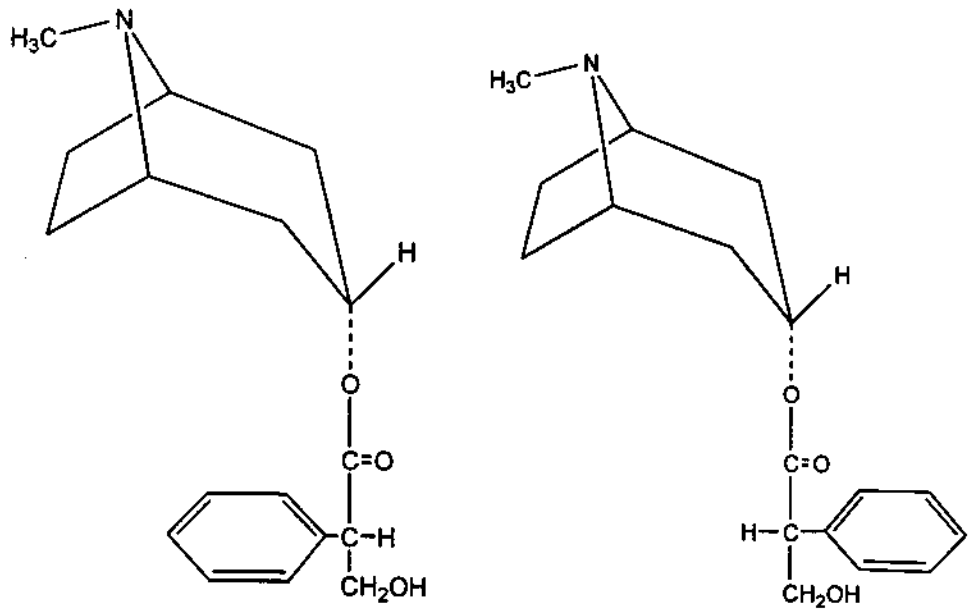


N-acetyl-norpseudotropin

O-acetyl-norpseudotropin

2.1.1.2. Atropin

- Nếu cho tropin là chất không quang hoạt tác dụng với *dl*-acid tropic thì sẽ nhận được atropin. Chất không quang hoạt này có thể tách ra *l* và *d* hyoscyamin.



l- Hyoscyamin

(F: 108°, $[\alpha]_D$: -21°)

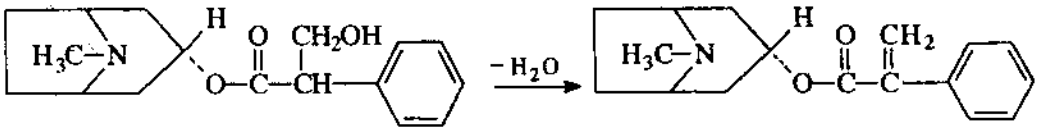
d- Hyoscyamin

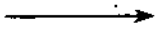
(F: 108°, $[\alpha]_D$: + 21°/Et-OH)

Atropin (F: 115°, không quang hoạt)

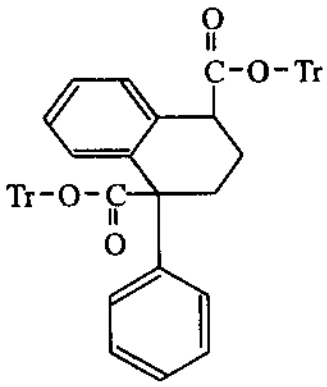
Trong cây tồn tại phổ biến ở dạng *l*-Hyoscyamin. Quá trình chế biến tạo ra dạng Racemic (Atropin).

• Atropin $\xrightarrow{-H_2O}$ Apoatropin (= Atropamin).





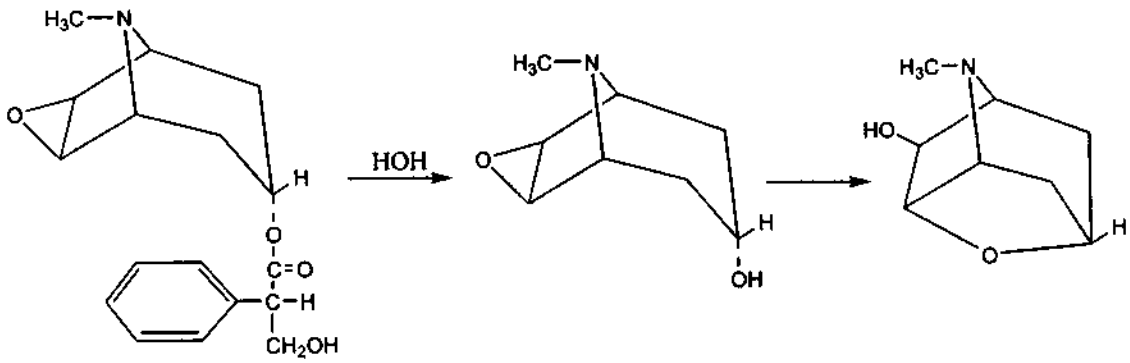
• 2 Mol Apoatropin ⟶ Belladonnin



Tr = Tropyl

2.1.1.3. Scopolamin (= hyoscin)

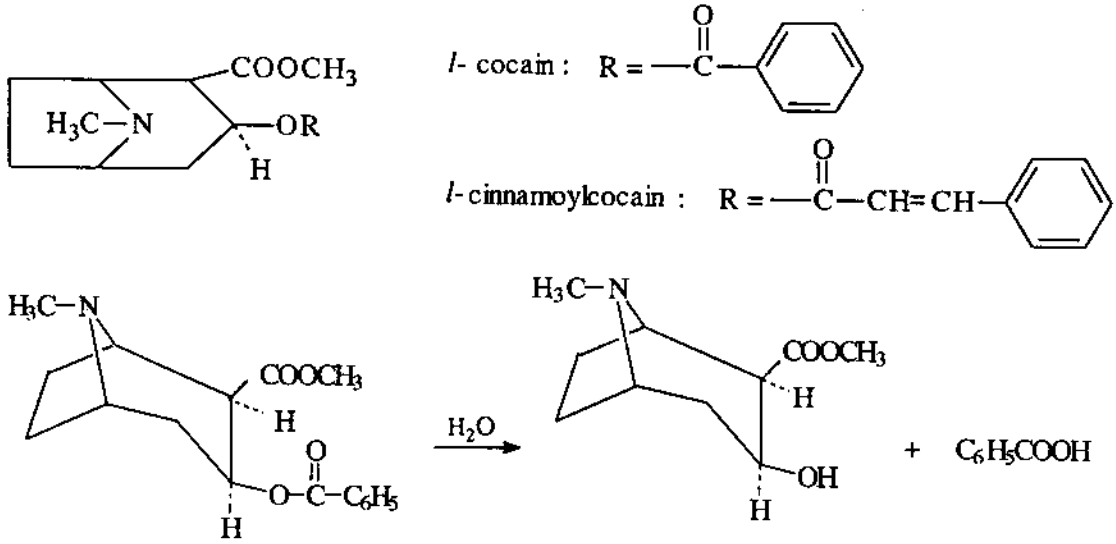
Scopolamin là ester của *l* acid tropic với scopin. Scopin phân biệt với tropin bởi nhóm epoxi ở vị trí 6, 7. Thuỷ phân scopolamin sẽ nhận được không chỉ scopin, mà còn scopolin.



l-Scopolamin	Scopin (F: 76°)	Scopolin (F: 108°)
(F: 59°)	+ Acid tropic	+ Acid tropic

Racemic hoá *l*-Scopolamin sẽ tạo ra atroscin (F: 56°) nhưng atroscin không được dùng trong điều trị như atropin.

2.1.1.4. Cocain (Methyl benzoyl ecgonin)



Thuỷ phân cocain ⟶ Ecgonin + a. benzoic

2.1.2. Nguồn gốc

2.1.2.1. Hyoscyamin

+ Có trong cây *Atropa belladonna* trồng nhiều ở châu Âu và Hoa Kỳ. (Trong lá có 0,3 - 1,2% alcaloid toàn phần, trong đó 3/4 là *l*-hyoscyamin).

+ Trong cây *Hyoscyamus niger*, được trồng ở Anh, Trung Âu và Hoa Kỳ. Dược liệu dùng là lá, yêu cầu phải chứa không nhỏ hơn 0,05% alcaloid toàn phần tính theo hyoscyamin.

+ Trong cây *Hyoscyamus muticus* trồng ở Ai Cập, alcaloid toàn phần trong lá: 0,5 - 1,4%, trong đó hyoscyamin là alcaloid chính.

+ Rễ cây *Scopolia carniolia* trồng nhiều ở tây nam châu Âu, có 1,0% alcaloid toàn phần, alcaloid chính là *l*-hyoscyamin, sau đó đến *l*-scopolamin.

+ *Datura stramonium* trồng nhiều ở vùng Ban Căng và Nga. Hàm hượng alcaloid toàn phần: 0,25 - 0,60% trong lá. Alcaloid chính là *l*-hyoscyamin, sau đó là *l*-scopolamin.

2.1.2.2. Scopolamin

L-scopolamin có trong một số loài *Datura* như *Datura stramonium, Datura metel*... và một số loài *Duboisia* như *Duboisia myoporoides* trồng nhiều ở Úc,

hàm lượng alcaloid toàn phần trong lá: 5%, trong đó alcaloid chính là *l*-scopolamin.

2.1.2.3. Cocain

Cocain có trong lá *Erythroxylum coca* có nguồn gốc Nam Mỹ, được trồng nhiều ở một số nước Nam Mỹ như Bolêvia, Peru, Colombia... và trên đảo Java của Indonesia. Hàm lượng cocain thay đổi tuỳ theo nơi trồng và sự thu hái. Lá coca được trồng ở Nam Mỹ có 0,5 - 1,0% alcaloid toàn phần, trong đó *l*-cocain là alcaloid chính. Còn thu hái lá non ở Java, hàm lượng alcaloid toàn phần đạt tới 2,5%, nhưng alcaloid chính là cinnamoyl-cocain, còn *l*-cocain chỉ chiếm 25% lượng alcaloid toàn phần.

2.1.3. Sinh tổng hợp tropan - alcaloid

(Xem ở phần đại cương)

2.1.4. Kiểm nghiệm

2.1.4.1. Định tính

- Phản ứng Vitali: Xác định sự có mặt của alcaloid khung tropan (xem phần đại cương).

- Phản ứng xác định hyoscyamin: Dịch chiết dược liệu + vài giọt T.T. Wasicky → đun nóng sẽ xuất hiện màu đỏ tím.

- Phản ứng xác định scopolamin: Dịch chiết dược liệu + vài giọt T.T. Mandelin → xuất hiện màu đỏ.

- Định tính bằng sắc ký lớp mỏng:

+ Chất hấp phụ: dùng bản mỏng silicagel GF_{254} đã tráng sẵn của hãng MERCK.

+ Dung môi khai triển:

Aceton : H_2O : amoniac đặc [90 : 7 : 3].

Hoặc ethyl acetat : MeOH : amoniac đặc [17 : 2 : 1].

+ Phun hiện màu bằng T.T. Dragendorff.

2.1.4.2. Định lượng

- Phương pháp acid - base: Cân chính xác khoảng 10g bột dược liệu, thấm ẩm với amoniac rồi chiết bằng ether. Chuyển alcaloid sang dạng muối bằng cách lắc với HCl 1%, kiềm hoá dịch chiết bằng NH_4OH tới pH 9,5 - 10, rồi lắc với $CHCl_3$. Dịch chiết $CHCl_3$ được lọc qua Na_2SO_4 khan rồi cất thu hồi cloroform.

Cắn được sấy khô ở 100 - 105°C trong 60 phút, để nguội, hoà tan cắn trong 4 ml $CHCl_3$. Thêm 15 ml H_2SO_4 0,02 N, đun nóng trên nồi cách thuỷ cho bay hết hơi $CHCl_3$, pha loãng với nước đun sôi để nguội (20 ml). Sau đó định lượng acid thừa bằng dung dịch NaOH 0,02N. Chỉ thị màu là đỏ methyl.

- Định lượng bằng phương pháp so màu: Có thể định lượng bằng phương pháp so màu theo nguyên tắc tạo tủa với muối Reinecke, lấy riêng tủa Reineckat alcaloid hoà tan trong aceton rồi đo ở bước sóng 525 nm.

2.1.5. Tác dụng, sử dụng và dạng dùng

- Tropanalcaloid có tác dụng ngăn chặn phản ứng tiết cholin qua choán chỗ cạnh tranh acethylcholin ở Receptor. Chúng thuộc nhóm thuốc làm liệt đối giao cảm.

- Hyoscyamin có ảnh hưởng đặc biệt đến hoạt động của các tuyến và cơ trơn. Nó kìm hãm các tuyến tiết mồ hôi, nước bọt, dịch vị. Nó làm giảm trương lực cơ và co bóp của dạ dày, ruột, mật, bàng quang và khí quản, nó làm giãn cơ.

- Atropin có tác dụng bằng khoảng một nửa hyoscyamin. Nó làm giãn đồng tử, có tác dụng chống nôn, giải độc các dẫn chất của acid phosphoric.

- Apoatropin không có tác dụng làm giãn đồng tử và không sử dụng trong điều trị. Vì nó độc hơn atropin nên nhiều Dược điển quy định không được lẫn tạp chất apoatropin.

- Belladonnin có tác dụng giảm đau yếu và có tác dụng giảm chứng chuột rút. Thường dùng phối hợp với atropin điều trị bệnh Parkinson.

- Scopolamin có tất cả các tác dụng của atropin. Tác dụng ngoại biên kém hơn atropin, nhưng tác dụng ức chế thần kinh trung ương rõ rệt hơn. Scopolamin được dùng làm thuốc an thần trong trường hợp bị kích thích, bị hồi hộp, xúc cảm.

Sử dụng và dạng dùng:

- Belladon: Ngày nay người ta thường sử dụng dạng dịch chiết cồn cao và alcaloid tinh khiết. Chúng được dùng làm thuốc chống co thắt trong các cơn đau dạ dày, ruột, mật, hen phế quản.

Chế phẩm:

+ Bellafolin là alcaloid toàn phần của belladon có dạng viên nén 0,25 mg, dạng dung dịch (10 giọt ứng với 0,50 ml và chứa 0,25 mg) dùng điều trị cơn co thắt đường tiêu hoá, đau dạ dày, nôn hoặc buồn nôn, đau bụng, tiết nhiều nước bọt. Người lớn uống ngày 3 lần, mỗi lần 1 - 2 viên hoặc 10 - 20 giọt.

+ Belladenal: Phối hợp alcaloid toàn phần của belladon với acid barbituric. Mỗi viên belladenal có 0,25 mg bellafolin + 50 mg phenobarbital. Dùng để chữa bệnh tâm thần, động kinh, hen, đau thắt ngực, đau ruột, nôn mửa khi có thai, say sóng. Người lớn dùng mỗi ngày 2 - 4 viên.

+ Bellaginum: Mỗi viên nén có chứa 15 mg cao belladon + 0,25 g analgin và 0,1 g natri hydrocarbonat dùng để chữa đau dạ dày do thừa acid dịch vị, chống co thắt đường tiêu hoá. Người lớn dùng mỗi lần 1 viên × 2 - 3 lần/ngày.

+ Bellergal: Viên bọc đường có 0,1 mg bellafolin + 0,3 mg ergotamin tartat + 20 mg phenobarbital dùng cho người thần kinh căng thẳng lo âu, rối loạn thần kinh thực vật, ưu năng tuyến giáp, nôn nao khi đi tàu xe.

+ Bellergamin: Viên bọc đường có 0,1 mg alcaloid toàn phần của rễ Belladon + 0,3 mg alcaloid toàn phần của nấm cựa gà + 20 mg phenobarbital. Được sử dụng giống như bellergal.

+ Belletoval: Dạng viên nén có 0,25 mg hyoscyamin sulfat + 50 mg butobarbital. Dùng điều trị các cơn co thắt nội tạng, thừa acid dịch vị, bệnh parkinson, chứng đau nửa đầu, chóng mặt buồn nôn. Người lớn ngày dùng 1 - 3 lần × 1 viên.

+ Belloide: Viên bọc đường có 0,1 mg hyoscyamin sulfat + 0,3 mg alcaloid toàn phần của nấm cựa gà + 30 mg butobarbital. Được sử dụng như bellergamin.

Chú ý: Các thuốc chứa alcaloid trong belladon đều có chống chỉ định đối với glocom. Bellergamin, Belletoval, Belloide còn chống chỉ định đối với người phì đại tuyến tiền liệt kèm ứ nước tiểu, phụ nữ có thai hoặc nuôi con bú, người bị suy gan, thận nặng, người bị bệnh tim mạch nặng.

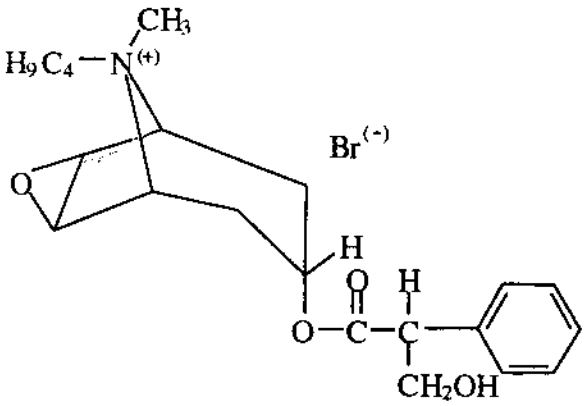
- Hyoscyamus: Dược liệu được chế biến và sử dụng tương tự belladon.

+ Hyoscyamin (Hyoscyamin hydrobromid hoặc hyoscyamin sulfat): Dạng viên nén 0,15 và 0,374 mg, uống giọt 0,125 mg/ml, ống tiêm 0,5 mg/ml. Thuốc có tác dụng liệt đối giao cảm và chống co thắt cơ trơn, dùng cho người bị rối loạn đường niệu dưới kèm triệu chứng tăng nhu động ruột. Người lớn ngày dùng 2 - 4 lần, mỗi lần 1 viên.

+ Ngoài ra còn có dầu Hyoscyamus (hyoscyamus oil): Dùng xoa bóp ngoài chữa đau do thấp khớp.

- Lá một số loài *Duboisia* và rễ một số loài *Scopolia* được dùng để chiết xuất lấy *l*-Scopolamin, *l*-Hyoscyamin.

Chế phẩm: Scopolamin-N-butylbromid (= Buscopan) dạng viên bọc đường 10 mg, ống tiêm 1 ml/20 mg, thuốc đạn 10mg cho người lớn và 7,5 mg cho trẻ em, lọ 10 ml thuốc giọt (dd 1%). Thuốc có tác dụng chống co thắt cơ trơn dùng cho người có cơn co thắt đường tiêu hoá, viêm dạ dày - tá tràng, táo bón do co thắt, viêm đại tràng. Đau do sỏi mật, sỏi thận, đau khi thăm khám ở niệu đạo, đau khi thấy kinh. Người lớn dùng uống 1 - 2 viên × 2 - 3 lần trong ngày hoặc nạp 1 - 3 viên thuốc đạn. Đau cấp tính có thể dùng thuốc tiêm tĩnh mạch, tiêm bắp hoặc dưới da mỗi lần 1 ống × 2 - 3 lần/ ngày. Trẻ em tuỳ theo tuổi, dùng từ 1/4 đến 1/3 liều người lớn (không dùng cho trẻ em dưới 24 tháng và người bị glôcôm).



- Cocain: Liều nhỏ gây tăng tiết nước bọt, tăng hoạt động của cơ và gây trạng thái khoan khoái, tác dụng gây sảng khoái của cocain là do ức chế enzym monoamin-oxydase và kích thích nor-adrenalin và serotonin trong não. Cocain gây nghiện, liều cao gây chết do liệt hô hấp.

Cocain gây tê bề mặt và co mạch máu nên được dùng gây tê niêm mạc mắt, tai, mũi, họng, răng; nhỏ mũi chữa chảy máu cam, đôi khi dùng chữa cơn đau thực quản (không dùng cho trẻ em dưới 10 tuổi và người già).

Chế phẩm: Dạng bột hoặc ống tiêm 1ml dung dịch 2%. Gây tê niêm mạc mắt dùng dung dịch 2 - 5%, niêm mạc miệng, mũi, họng dung dịch 2 - 10%, niêm mạc niệu đạo dung dịch 3 - 5%.

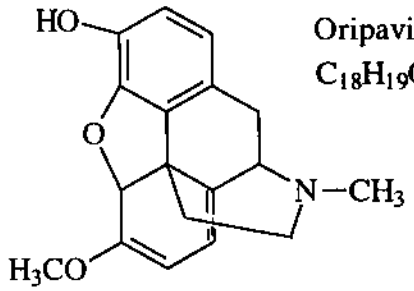
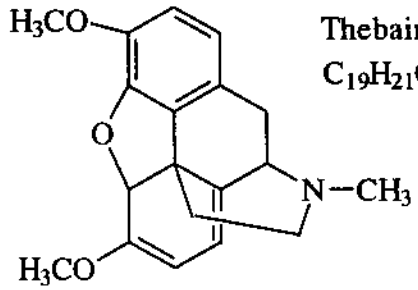
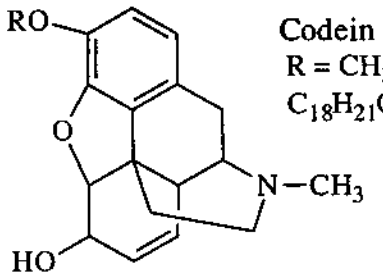
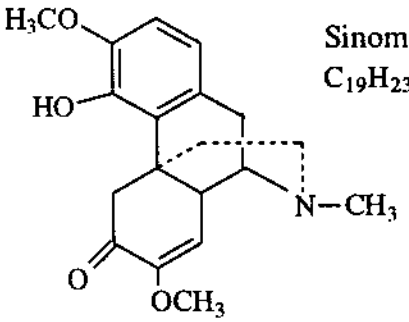
2.2. Nhóm morphinan - alcaloid

2.2.1. Cấu trúc hoá học của nhóm morphinan

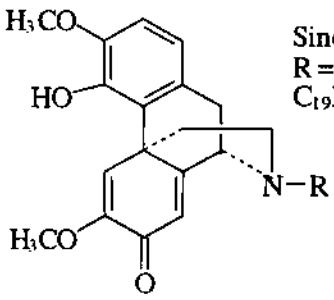
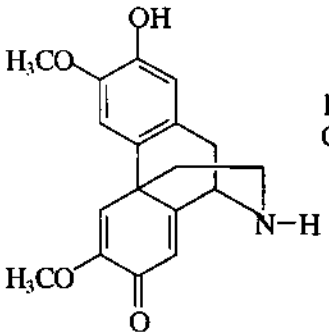
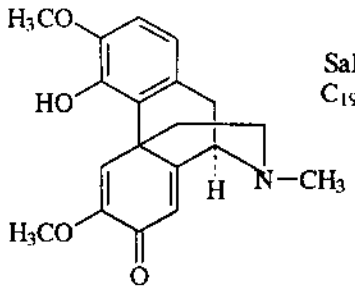
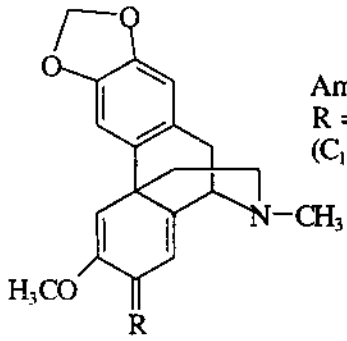
Alcaloid thuộc nhóm morphinan, ngày nay không phải là một nhóm nhỏ mà có nhiều alcaloid mới tìm ra trong những năm gần đây được bổ sung vào nhóm này. Những alcaloid khung morphinan không những có trong chi *Papaver*, mà còn có ở trong một số chi khác như *Menispermum, Sinomenium, Stephania, Croton.*

Những alcaloid đại diện cho các kiểu cấu trúc của nhóm này được trình bày ở bảng 2.

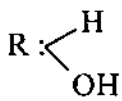
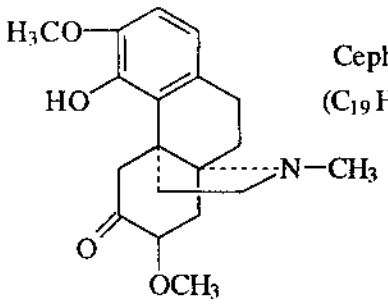
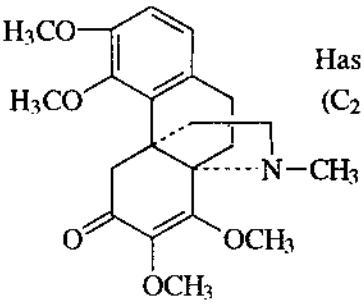
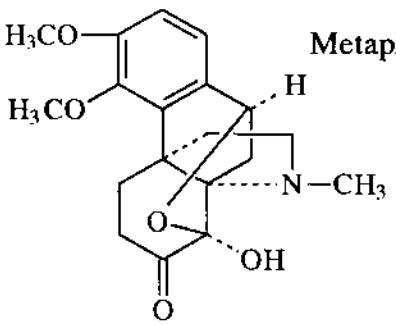
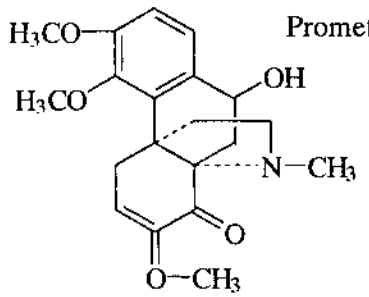
Bảng 2.

Cấu trúc	F	$[\alpha]_D$	Có ở loài
 Oripavin $C_{18}H_{19}O_3N$	200 - 201°	-212° (C)	*Papaver orientale*
 Thebain $C_{19}H_{21}O_3N$	193°	-219°(A)	*Papaver somniferum*
 Codein R = CH_3 $C_{18}H_{21}O_3N$	156-157°	-137°(A) -111°(C)	*Papaver somniferum*
Morphin: R = –H ($C_{17}H_{19}O_3N$)	253 - 254°	-131°(M)	*Papaver somniferum*
 Sinomenin $C_{19}H_{23}NO_4$	161°	-71°(A)	*Sinomenium acutum*

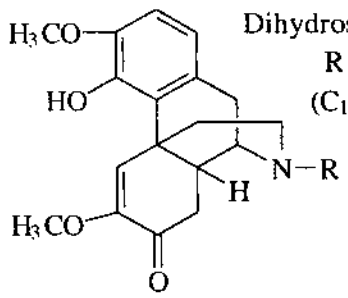
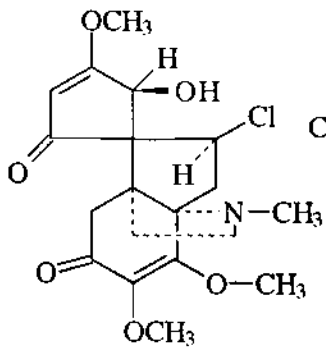
Bảng 2. (tiếp theo)

Cấu trúc	F	$[\alpha]_D$	Có ở loài
 Sinoacutin R = CH_3 $C_{19}H_{21}NO_4$	198°	-81,6°(C) -116°(E)	*Sinomenium acutum*
Nor - Sionacutin R = H ($C_{18}H_{19}NO_4$)	113 - 115°	-107°(E)	*Papaver bracteatum* *Croton balsamifera*
 Flavinin $C_{18}H_{19}NO_4$	130 - 132°	-6°(E)	*Croton flavens*
 Salutaridin $C_{19}H_{21}NO_4$	196 - 198°	+108°(E)	*Croton salutaris* *Papaver orientale* *Papaver somniferum*
 Amurin R = O ($C_{19}H_{19}NO_4$)	213 - 215°	+10°(C)	*Papaver amurense*

Bảng 2. (tiếp theo)

Cấu trúc	F	$[\alpha]_D$	Có ở loài
Nudaurin  $(C_{19}H_{21}NO_4)$	201 - 202°	-52°(C)	*Papaver nudicaule*
 Cepharamin $(C_{19}H_{23}NO_4)$	186°	-284°(C)	*Stephania cepharantha*
 Hasabanonin $(C_{21}H_{27}NO_5)$	116 - 117°	-219°(A)	*Stephania japonica*
 Metaphanin	232°		*Stephania japonica*
 Prometaphanin			*Stephania japonica*

Bảng 2. (tiếp theo)

Cấu trúc	F	$[\alpha]_D$	Có ở loài
 Dihydrosalutaridin R = CH_3 ($C_{19}H_{23}NO_4$)	198 - 203°	-76°(M)	*Croton linearis* *Croton discolor*
Dihydro-norsalutaridin R = H ($C_{18}H_{21}NO_4$)	208 - 212°	-69°(M)	*Croton linearis* *Croton discolor*
 Acutumin $C_{19}H_{24}NO_6Cl$	239 - 242°	-212°(Py)	*Menispermum dauricum* *Sinomenium acutum*

2.2.2. Một số alcaloid quan trọng

2.2.2.1. Morphin: [Morphinan-3,6-diol-7,8 didehydro-4,5-epoxy-17 methyl (5α, 6α)].

2.2.2.1.1. Cấu trúc và tính chất hoá học

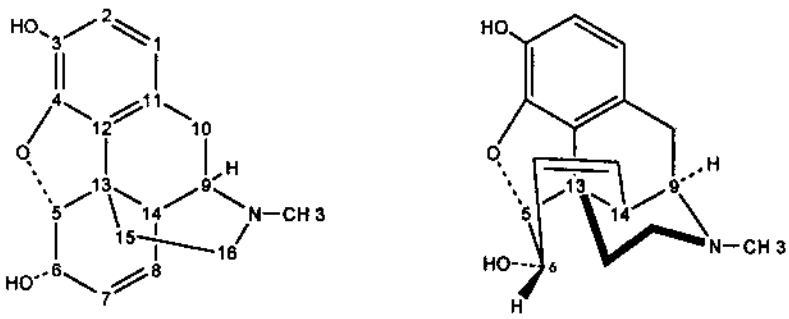
- Morphin do Sertuner phân lập từ nhựa thuốc phiện năm 1806.

- Năm 1925, Robinson đưa ra công thức khai triển.

- Năm 1927, Schoff đã chứng minh công thức khai triển của Robinson đưa ra là đúng.

- Năm 1952, Gates và Tschudi đã tổng hợp toàn phần được morphin.

Morphin có 5 carbon bất đối, đánh số theo Cahn-Ingold:



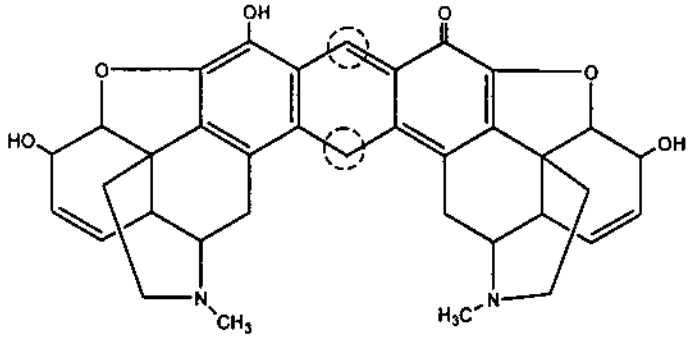
Morphin: 5R. 6S 9R 13S 14R

Morphin có OH- phenol nên chúng tạo ra muối phenolat khi tác dụng với kiềm nhưng không tạo muối với amoniac, OH-phenol của morphin có độ acid pK_A = 9,9; mặt khác morphin là một alcaloid có độ kiềm pK_B = 6,1 sẽ tạo ra muối khi tác dụng với acid, do đó nó có tính lưỡng tính, điểm đẳng điện nằm ở pH 9,1. Dựa trên tính chất đặc biệt này để chiết xuất và phân lập morphin.

- Morphin có trong nhựa thuốc phiện 3 - 23%, trong quả khô chưa trích nhựa 0,10 - 0,20%. Có thể bán tổng hợp morphin từ thebain.

2.2.2.1.2. Định tính morphin bằng phản ứng hóa học

Lấy khoảng 0,10g thuốc phiện + 5 ml cloroform và vài giọt amoniac đặc, lắc khoảng 10 phút. Lấy dịch chiết cloroform cho lên mặt kính đồng hồ, để bốc hơi tự nhiên, trên mặt kính đồng hồ xuất hiện vòng tinh thể màu xám tro, thêm 2 giọt T.T.Marquis sẽ xuất hiện màu đỏ sẫm (màu đỏ sẫm tạo ra là sản phẩm dime của 2 phân tử morphin).



2.2.2.1.3. Định tính morphin bằng sắc ký lớp mỏng

+ Chất hấp phụ là silicagel GF_{254} đã tráng sẵn.

+ Hệ dung môi khai triển:

$CHCl_3$: MeOH: NH_4OH [50 : 9 : 1] hoặc benzen: metanol [8 : 2].

+ Pha 1 mg morphin base trong 1 ml MeOH làm dung dịch đối chiếu.

Chấm 20 µl dịch chiết alcaloid từ nhựa thuốc phiện hoặc từ quả khô và 20àl dung dịch morphin lên bản mỏng silicagel GF_{254}. Sau khi khai triển bằng hệ dung môi trên, để bốc hơi hết dung môi rồi phun hiện màu bằng T.T.Dragendorff pha theo Munier. Trong dịch chiết phải có vết cùng Rf và màu với vết morphin đối chiếu.

2.2.2.1.4. Định lượng morphin

+ Định lượng morphin trong nhựa thuốc phiện:

Được tiến hành theo nguyên tắc: cho nhựa thuốc phiện trộn với nước vôi, morphin trong nhựa được chuyển thành morphinat calci tan trong nước, lắc với dung môi hữu cơ ít phân cực ($CHCl_3$) để lấy các alcaloid khác ở dạng base ra khỏi nước vôi. Sau đó cho vào nước vôi một lượng dư amoni clorid, Amoni clorid tác dụng với nước vôi tạo ra amoniac, amoniac mới sinh chuyển morphinat calci thành morphin base. Lấy riêng tủa morphin base, rửa loại hết clorid rồi hoà tan morphin trong MeOH nóng. Chuẩn độ morphin base bằng HCl 0,10N, dùng chỉ thị màu là đỏ methyl (Xem Dược điển Việt Nam II).

+ Định lượng morphin trong quả khô chưa trích nhựa:

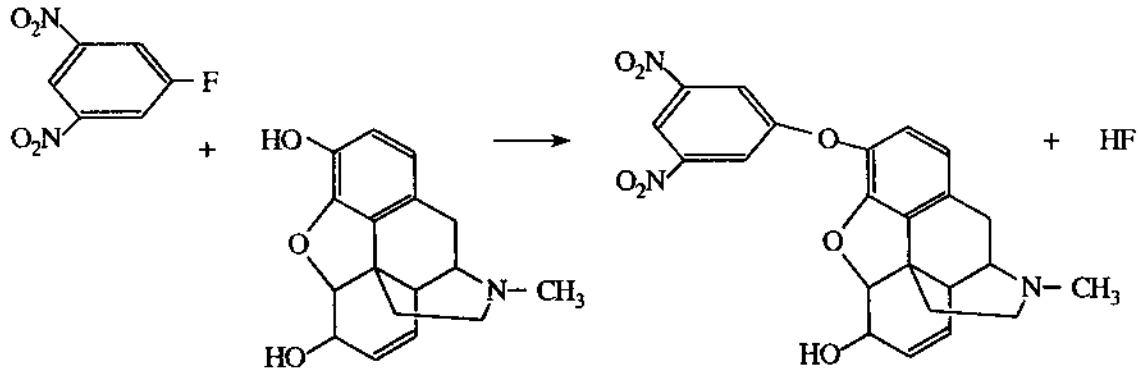
Chiết bột quả khô bằng *n*-propanol ở môi trường HCl 0,1N trong soxhlet 3 - 4 giờ cho kiệt alcaloid. Bốc hơi dung môi *n*-propanol, cặn khô chứa morphin và các alcaloid phụ ở dạng muối hydroclorid, hoà tan nóng trong HCl 1N, để nguội, lọc, lắc dịch lọc với $CHCl_3$ nhiều lần để loại tạp. Sau khi cho bay hết hơi dung môi $CHCl_3$ trong dịch chiết acid, lấy một thể tích nhất định đem cô cách thuỷ đến khô. Hoà tan cắn khô trong NaOH để chuyển morphin thành morphinat Na tan trong nước. Lắc nhiều lần để lấy hết alcaloid phụ. Trung tính dịch chiết morphin bằng HCl 1N cho tới pH 7 rồi lắc với hỗn hợp dung môi $CHCl_3$: isopropanol [3: 1], sau đó kiềm hoá bằng dung dịch $NaHCO_3$ 4% tới pH 9 và lắc tiếp với hỗn hợp dung môi $CHCl_3$: isopropanol [3: 1]. Gộp dịch chiết lại và lọc qua Na_2SO_4 khan. Cất thu hồi dung môi. Cặn morphin base còn lại hoà tan trong HCl 0,1N dư, chuẩn độ acid thừa bằng NaOH 0,1N, chỉ thị màu là đỏ methyl.

1 ml HCl 0,1N tương ứng với 28,53 mg morphin base khan.

Ngoài ra có thể định lượng morphin trong nhựa hoặc trong quả khô bằng các phương pháp khác:

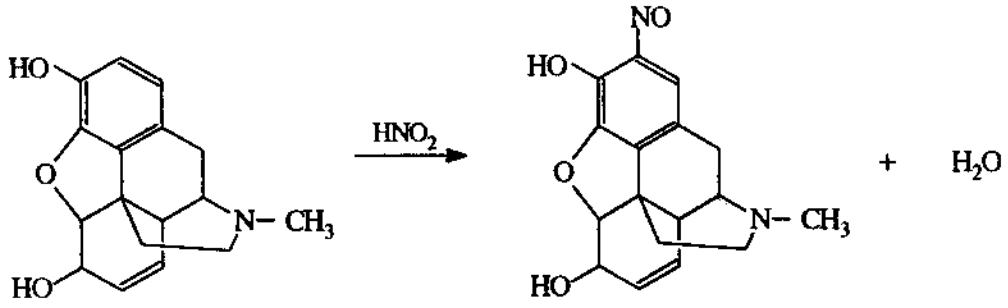
+ Phương pháp cân (theo Pfeifer):

Cho morphin tác dụng với dinitrofluobenzen sẽ tạo ra tủa morphin dinitrophenylether, lấy riêng tủa, sấy khô tủa rồi cân.



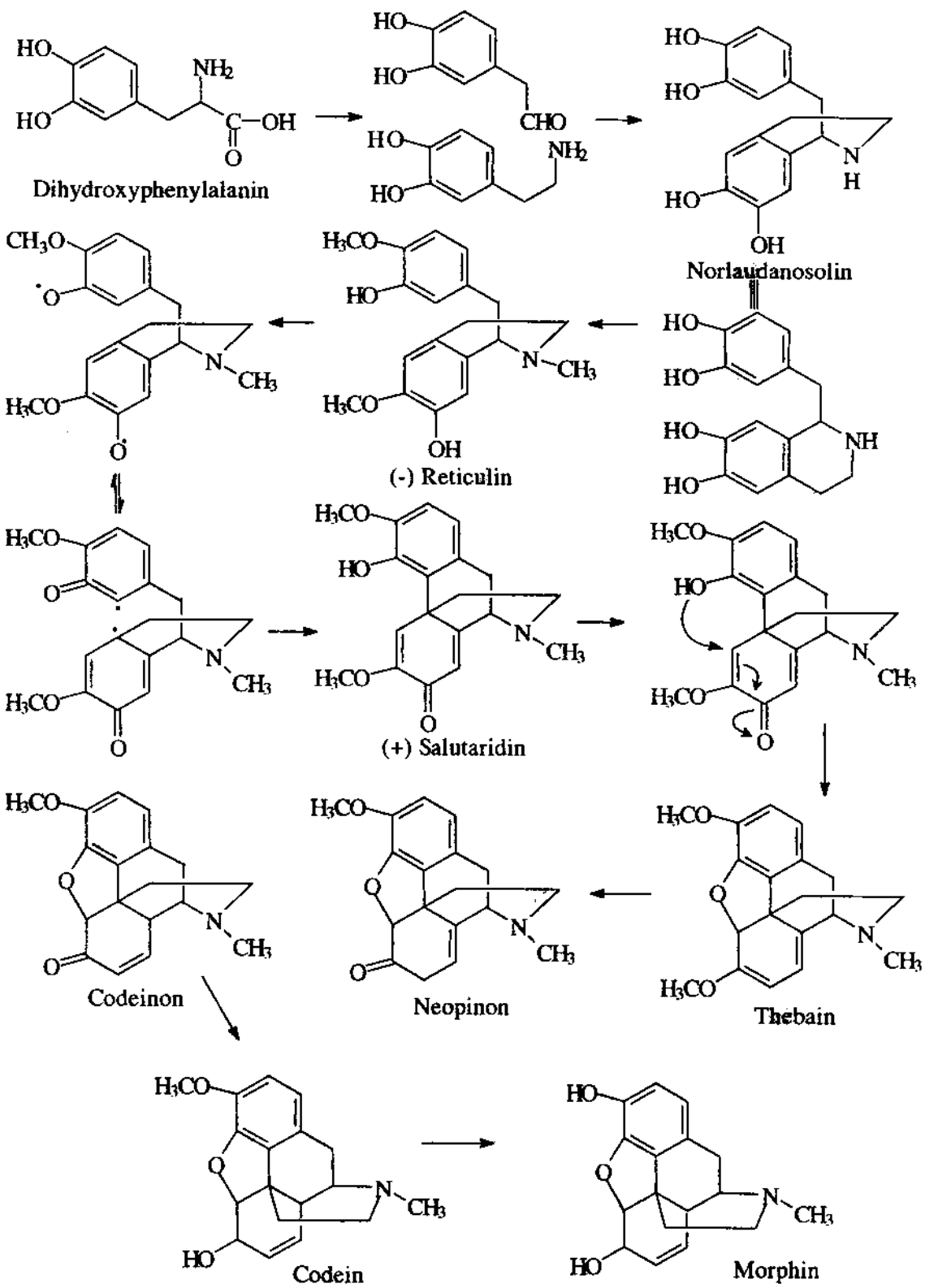
+ Phương pháp so màu (theo Kleischmidt và Mothes):

Chuyển morphin thành 2-nitrosomorphin sẽ cho màu đỏ đậm trong môi trường kiềm.



2-Nitroso-morphin

2.2.2.1.5. Sinh tổng hợp morphin



Sinh tổng hợp morphin, codein

2.2.2.1.6. Tác dụng và sử dụng của morphin

Liều nhỏ morphin lúc đầu có tác dụng kích thích thần kinh trung ương gây cảm giác dễ chịu, thoải mái, sau mất cảm giác đau. Liều cao gây ngủ. Morphin có tác dụng lên trung tâm hô hấp và hành tuỷ làm cho nhịp thở thoạt đầu nhanh, nông; sau chậm lại. Khi bị ngộ độc có thể chết do ngừng thở. Morphin có tác dụng làm giảm kích thích ho.

Morphin vào cơ thể đạt hàm lượng tối đa trong huyết tương sau 2 - 4 giờ. Liên kết 30% với protein - huyết tương. Các tổ chức mô mềm của thận, phổi, gan, lách có hàm lượng morphin cao. Thuốc chuyển hoá trong thận thành dẫn xuất liên hợp glucuronic (Morphin-3-O-glucuronid). Morphin thải trừ chủ yếu qua nước tiểu, qua phân chỉ có dưới 10%.

Morphin được dùng làm thuốc giảm đau, gây ngủ, nhất là đau do ung thư, cơn đau do sỏi mật, sỏi thận, nhồi máu cơ tim, chuẩn bị gây mê. Chữa mất ngủ do đau đớn, đau dây thần kinh.

Người lớn tiêm dưới da mỗi lần 1 ống 1ml/0,01mg (dạng hydroclorid). Liều tối đa cho người lớn 1 lần: 0,02 g và 0,05 g/24 giờ. Trẻ em 3 - 15 tuổi ngày tiêm 1/5 đến 1 ống.

Dạng viên nén bọc 10mg (giải phóng chậm và kéo dài), người lớn uống 2 lần, mỗi lần 1 viên/ 10 mg. Ngoài ra còn có dạng viên 30 - 60 và 100 mg.

Chú ý: Không dùng cho người đau bụng cấp chưa rõ nguyên nhân, người suy gan nặng, chấn thương sọ não và tăng áp nội sọ, trạng thái kinh giật, trẻ em dưới 3 tuổi. Thuốc gây nghiện.

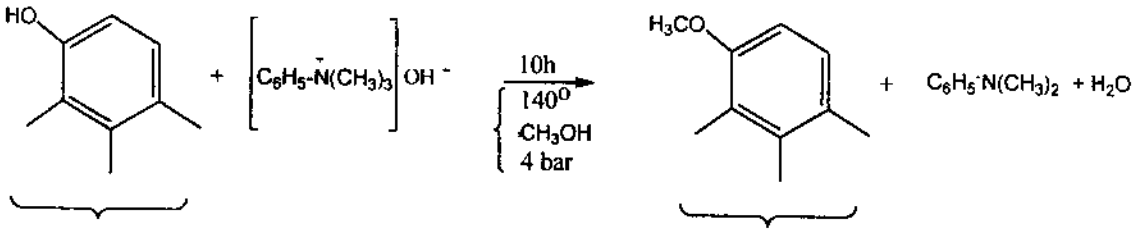
2.2.2.2. *Codein* (Morphin-3 methylether) (Morphinan-6-ol,7,8 didehydro-4,5-epoxy-3 methoxy 17 methyl (5α, 6α)

- Codein do Robiquet phân lập từ thuốc phiện năm 1832.

- Codein có trong nhựa thuốc phiện: 0,3 - 3% và trong quả khô chưa trích nhựa.

- Do nhu cầu codein lớn, lượng codein chiết xuất từ thuốc phiện không đủ cung cấp, do đó người ta đã bán tổng hợp codein từ morphin.

Phản ứng methyl hoá morphin qua chất xúc tác là phenyl - trimethyl - amonium-hydroxyd (Rodionoff.) được thực hiện:



Morphin Codein

- Codein ít độc hơn morphin, tác dụng gây ngủ và giảm đau kém hơn morphin, nhưng có tác dụng ức chế mạnh trung tâm ho nên được dùng chủ yếu làm thuốc chữa ho.

- Dạng dùng: Codein hydroclorid, codein phosphat, codein sulfat; dạng bột hay viên 0,015g, siro codein: 0,2% codein base.

- Liều dùng: Người lớn uống 0,015 - 0,02g/ lần × 3 - 4 lần/ ngày. Trẻ em trên 2 tuổi uống 0,005 g cho mỗi tuổi, chia từng liều nhỏ uống trong 24 giờ (dùng siro codein). Trẻ em dưới 2 tuổi không được dùng.

Ngoài ra, người ta còn phối hợp codein với menthol, thymol làm thuốc trị ho. Biệt dược quitopan (Pháp) viên ngậm 8,25mg codein phosphat kèm menthol, thymol,... dùng trị ho không có đờm; người lớn ngày ngậm 2 - 4 lần, mỗi lần 1 viên. Người già dùng nửa liều trên. Chú ý không dùng viên ngậm Quitopan cho người hen, người bị suy hô hấp và trẻ em dưới 15 tuổi không được dùng.

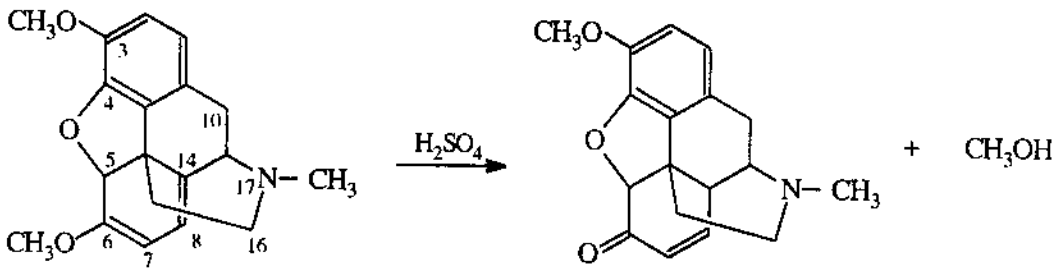
2.2.2.3. Thebain (6,7,8,14-tetradehydro-4,5 epoxy-3,6-dimethoxy-17 methyl morphinan).

- Thebain do Pelletier phát hiện năm 1835.

- Thebain có trong thuốc phiện với hàm lượng 0,3 - 1,5% tuỳ nguồn gốc.

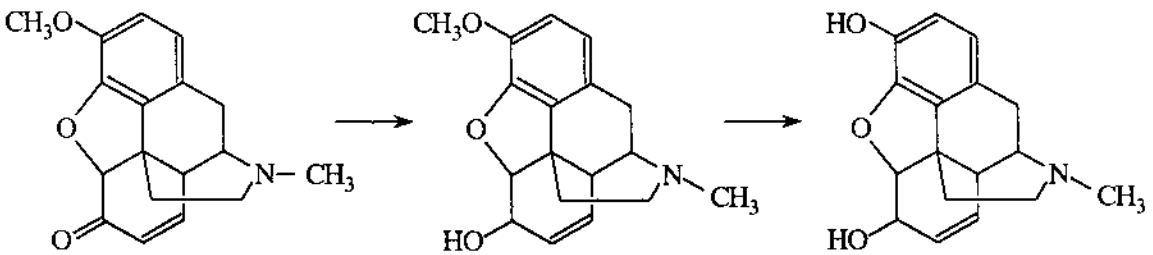
- Thebain không có ý nghĩa trong điều trị, nó không có tác dụng gây mê mà lại kích thích gây co rút cơ tương tự như strychnin.

- Thebain tác dụng với H_2SO_4 loãng sinh ra codeinon và methanol.



Thebain Codeinon

Từ codeinon có thể điều chế ra codein và morphin.

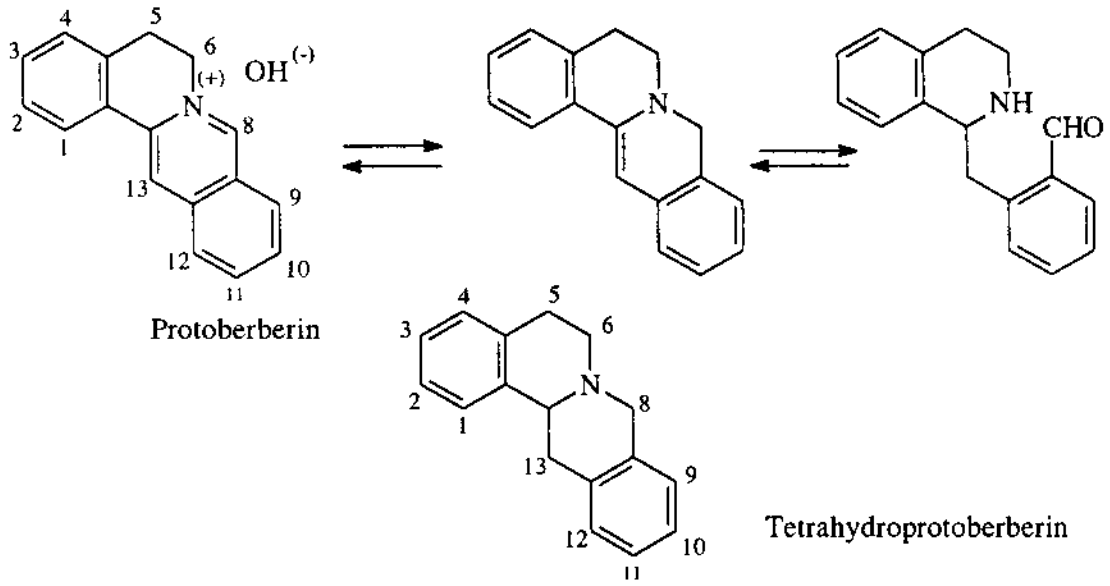


Codeinon Codein Morphin

2.3. Nhóm protoberberin - alcaloid

2.3.1. Cấu trúc hoá học của nhóm protoberberin

Protoberberin hoặc berbin-alcaloid có khung dibenzo [a, g]-quinolizinin, ở vị trí 2, 3, 9 và 10 hoặc 2, 3, 10 và 11 có nhóm thế chứa oxy và ở đại diện cấu trúc kiểu corydalin còn có 1 nhóm methyl ở vị trí C-13. Alcaloid nhóm này có 2 mức oxy hoá: N bậc 4 ở protoberberin và N bậc 3 ở tetrahydroprotoberberin (tetrahydroanhydroprotoberberin, Berbin).

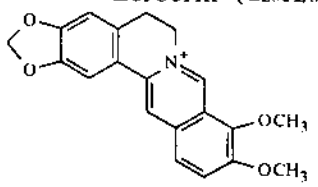
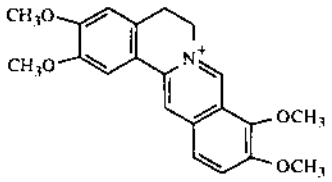
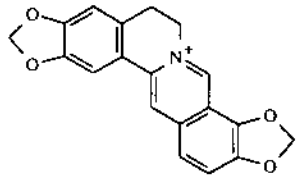
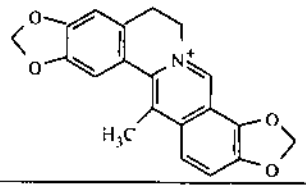
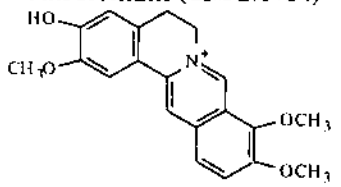
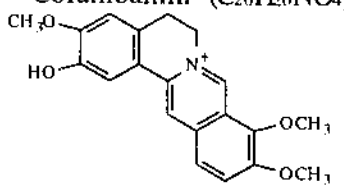


Protoberberin Tetrahydroprotoberberin

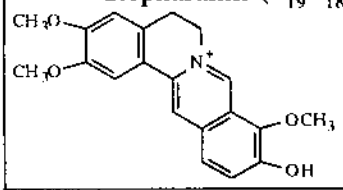
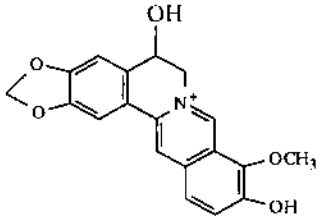
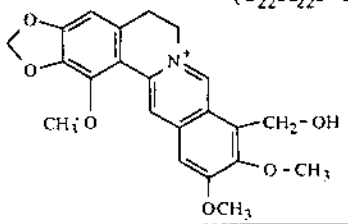
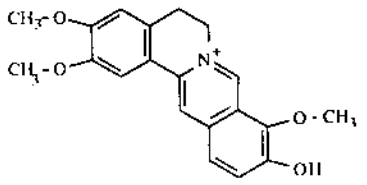
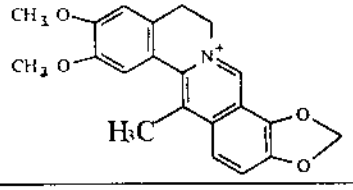
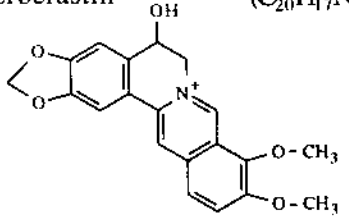
Alcaloid có cấu trúc protoberberin đã phân lập được ở nhiều cây trong các họ: Annonaceae, Berberidaceae, Convolvulaceae, Menispermaceae, Papaveraceae, Ranunculaceae và Rutaceae.

Những alcaloid đại diện cho các kiểu cấu trúc được trình bày ở bảng 3.

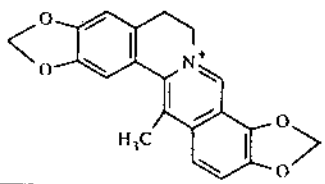
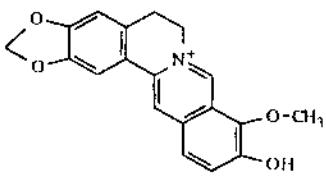
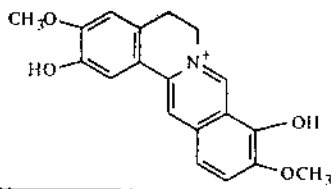
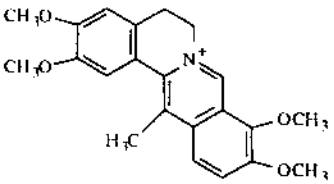
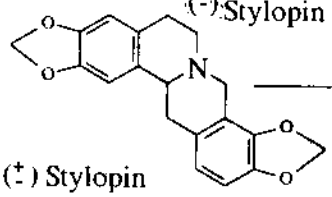
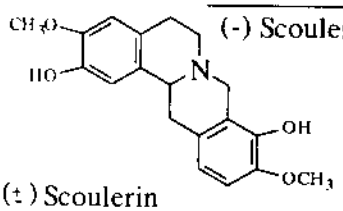
Bảng 3.

Alcaloid	F	$[\alpha]_D$	Có trong
1	2	3	4
Berberin $(C_{20}H_{18}NO_4)^{(+)}$ 	144° 205° (Hydr.)	0°	- *Berberis* - *Cpotis* spp. - *Phellodendron amurense* - *Cosinium fenestrodum*
Palmatin $(C_{21}H_{22}NO_4)^{(+)}$ 	205° (clorid)	0°	*Jatrorrhiza* *Fibraurea tinctoria* *Fibraurea recisa*
Coptisin $(C_{19}H_{14}NO_4)^{(+)}$ 	280° (Jodid)	0°	*Coptis japonica*
Worenin $(C_{20}H_{16}NO_4)^{(+)}$ 	295° (clorid)	0°	*Coptis japonica*
Jatrorrhizin $(C_{20}H_{20}NO_4)^{(+)}$ 	206° (clorid)	0°	*Jatrorrhiza*
Columbamin $(C_{20}H_{20}NO_4)^{(+)}$ 		0°	*Jatrorrhiza*

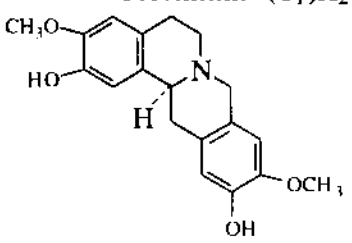
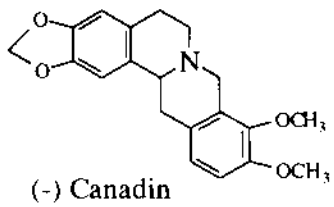
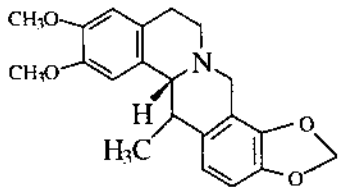
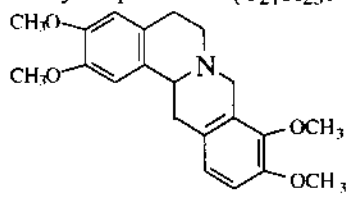
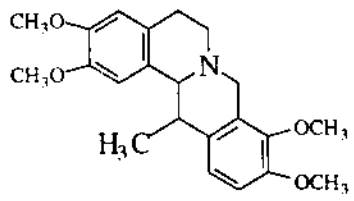
Bảng 3. (tiếp theo)

1	2	3	4
Stepharanin $(C_{19}H_{18}NO_4)^{(+)}$ 	274-5° (HCl)	-	*Stephania glabra*
Thalidastin $(C_{19}H_{16}NO_5)^{(+)}$ 	230° (clorid)	+138° (M)	*Thalictrum fendlerii*
Alborin $(C_{22}H_{22}NO_6)^{(+)}$ 	238°	0°	*Papaver alboroseum*
Dehydrocorydalmi $(C_{20}H_{20}NO_4)^{(+)}$ 	228°		*Corydalis* ssp. *Stephania glabra*
Dehydrothalictrifolin $(C_{21}H_{20}NO_4)^{(+)}$ 	271° (clorid)	0°	*Corydalis thalictrifolia*
Berberastin $(C_{20}H_{17}NO_5)^{(+)}$ 	132-7°	+ 107° (E)	*Hydrastis canadensis* *Coptis orientalis* *Berberis laurina*

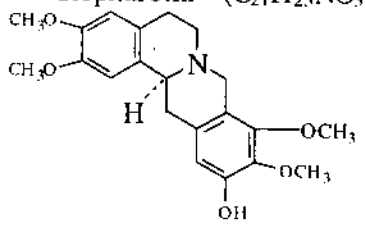
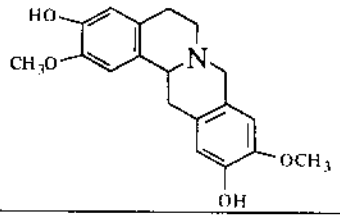
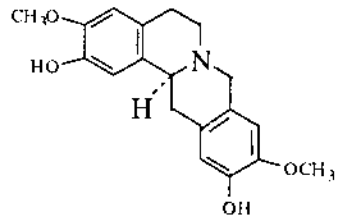
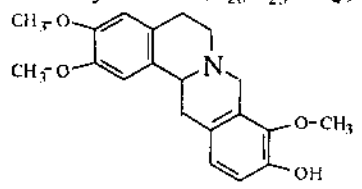
Bảng 3. (tiếp theo)

1	2	3	4
Corysamin $(C_{20}H_{18}NO_4)^{(+)}$ 	189-90° (Picrat)		*Corydalis incisa*
Thalifendin $(C_{19}H_{16}NO_4)^{(+)}$ 		0°	*Corydalis thalictrifolia*
Cyclanolin $(C_{20}H_{24}NO_4)^{(+)}$ 	214-5° (Clorid)	-116° (M)	*Cyclea insularis*
Dehydrocorydalin $(C_{22}H_{24}NO_4)^{(+)}$ 	163° 237° (Nitrat)	0°	*Corydalis ambigua*
$(C_{19}H_{17}NO_4)$ (+) Stylopin / (-) Stylopin  (±) Stylopin	203°	+310° (C)	*Corydalis cava* / *Stylophorum diphyllum*
	221°	0°	*Corydalis ambigua*
(+) Scoulerin $(C_{19}H_{21}NO_4)$ / (-) Scoulerin  (±) Scoulerin	195°		*Corydalis cava* / *Corydalis scouleri*
			Corydalis scouleri *C. aurea*

Bảng 3. (tiếp theo)

1	2	3	4
Coreximin ($C_{19}H_{21}NO_4$) 	262°	(-)	*Dicentra eximia*
(+) Canadin ($C_{20}H_{21}NO_4$)  (-) Canadin	133°	±298 (C)	*Corydalis cava* *Hydrastin canadensis*
Thalictrifolin ($C_{21}H_{23}NO_4$) 	155°	+218° (M)	*Corydalis thalictrifolia*
(+)Tetrahydropalmatin ($C_{21}H_{25}NO_4$)  (-) Tetrahydropalmatin	142°	±292° (A) 232°(HCl) 113°(Picr.)	*Corydalis cava* - *Corydalis cava* - Một số loài *Stephania* (*S.glabra, S.kuinanensis, S. brachyandra* ...)
(±) Tetrahydropalmatin	148°	0°	*Corydalis aurea*
Corydalin ($C_{22}H_{27}NO_4$) 	136°	+300°(C)	*Corydalis tuberosa*

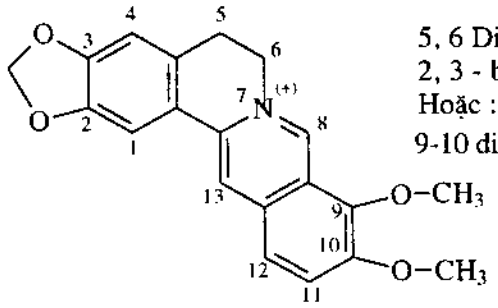
Bảng 3. (tiếp theo)

1	2	3	4
Stepharotin ($C_{21}H_{25}NO_5$) 	227 - 9° (HBr)		*Stephania* sp. *Corydalis ambigua*
Coramin ($C_{19}H_{21}NO_4$) 	247 - 52°		*Corydalis pseuds adunca*
(±) Coreximin ($C_{19}H_{21}NO_4$) 	237°	-	*Phellodendron amurense*
Corydalmin ($C_{20}H_{23}NO_4$) 	238°	+ 337°	*Corydalis* spp.

2.3.2. Một số alcaloid quan trọng

2.3.2.1.Berberin

2.3.2.1.1- Cấu trúc hoá học



5, 6 Dihydro - 9, 10 - dimethoxy benzo [g], 2, 3 - benzodioxolo - quinolizinium.
Hoặc : 7, 8, 13, 13a tetradehydro 9-10 dimethoxy-2,3(methylene-dioxy)berbinium

2.3.2.1.2. Nguồn gốc: Berberin là alcaloid có trong các dược liệu

+ Vàng đắng (*Coscinium fenestratum* Colebr. = *C.usitatum* Pierre) ở thân và rễ: 1,5 - 3%.

+ Rễ hoàng liên (*Coptis* spp.): 3 - 5%.

+ Rễ và thân rễ thổ hoàng liên (*Thalictrum foliolosum* DC.): 0,35%

+ Thân và rễ hoàng liên gai (*Berberis wallichiana* DC.) khoảng 3 - 4%.

+ Vỏ hoàng bá (*Phellodendron amurense* Rupr., *P. chinense* Schneider.): 1,5-3%.

2.3.2.1.3. Tính chất

+ Berberin ở dạng muối clorid dihydrat ($C_{20}H_{18}NO_4Cl.2H_2O$) tinh thể hình kim màu vàng, ít tan trong nước lạnh, tan tốt trong nước nóng, hầu như không tan trong ether, cloroform.

+ Berberin sulfat trihydrat $(C_{20}H_{18}NO_4)_2.SO_4.3H_2O$ tinh thể hình kim màu vàng, tan trong nước (khoảng 30 phần), tan trong cồn.

2.3.2.1.4. Định tính

- Định tính bằng phản ứng hoá học:

+ Lấy 0,10 g bột dược liệu ngâm với 5ml nước trong 2 giờ, lấy 2ml dịch nước ngấm, thêm 1 giọt H_2SO_4 đậm đặc rồi thêm dần dần dung dịch bão hoà clo trong nước. Giữa 2 lớp chất lỏng sẽ có màu đỏ thẫm (dd berberin với nồng độ 1/250.000 vẫn còn xuất hiện phản ứng này.)

+ Lấy 0,20g bột dược liệu, thêm 2ml acid acetic, đun sôi nhẹ, lọc. Cho vào dịch lọc 2 - 3 giọt dung dịch iod sẽ xuất hiện tủa màu vàng (Berberin iodid).

- Phản ứng trên kính: Nhỏ 1 - 2 giọt dịch chiết dược liệu bằng cồn lên phiến kính, nhỏ thêm 1 giọt acid HNO_3 30% (hoặc HCl đặc) để yên 5 - 10 phút rồi đem

soi dưới kính hiển vi sẽ quan sát thấy tinh thể hình kim màu vàng. Đun nóng tiêu bản, tinh thể mất đi và có màu hồng.

- Định tính bằng SKLM: Chấm khoảng 10 - 20 µl dịch chiết dược liệu bằng cồn và 20 µl dung dịch berberin clorid đối chứng (0,5mg berberin clorid hoà tan trong 1ml MeOH) lên bản mỏng silicagel GF_{254} (MERCK) đã tráng sẵn, khai triển bằng hệ dung môi: *n*Bu-OH: CH_3COOH: H_2O [7 : 1 : 2]. Sau khi làm khô tấm sắc ký dem soi dưới đèn tử ngoại và phun hiện màu bằng T.T. Dragendorff. Dịch chiết phải có vết có Rf và cùng màu với vết berberin đối chứng.

2.3.2.1.5. Định lượng

- Phương pháp cân: Cân chính xác khoảng 5 g bột dược liệu đã sấy khô ở 80°C đến khối lượng không đổi. Cho vào bình Zaichenko và chiết kiệt hoạt chất bằng 50 ml ethanol 90°, cất trên nồi cách thuỷ để loại hết cồn. Thêm 30 ml nước và 2 - 3g MgO, tiếp tục đun trên cách thuỷ ở 60 - 70°C trong 15 phút, thỉnh thoảng lắc bình. Lọc, rửa cắn bằng 30 - 40 ml nước nóng, rửa làm nhiều lần, đến khi nước rửa không có màu nữa. Gộp nước rửa với dịch lọc, thêm 5ml dung dịch KI 50% để kết tủa berberin iodid. Lọc, rửa tủa bằng dung dịch KI 2% dùng nước kéo tủa vào một bình chịu nhiệt 250 ml có nút mài, lượng nước dùng không được quá 50 ml. Đun trên nồi cách thuỷ, lắc bình cho berberin iodid phân tán đều trong nước, khi nhiệt độ trong bình lên 70°C, thêm 50 ml aceton (lượng aceton có thể giảm đi tuỳ theo lượng berberin). Đậy nút bình, tiếp tục đun để hoà tan berberin iodid. Sau khi thêm thật nhanh 3 ml dung dịch amoniac, lắc bình cho đến khi kết tủa. Để ở chỗ mát một đêm. Lọc lấy tủa phức berberin-aceton vào một chén nung đã cân bì trước. Hứng dịch lọc vào một bình khác, đo thể tích dịch lọc. Rửa tủa bằng ether ethylic, sấy khô ở 105°C trong 3 giờ, cân.

1 g tủa tương ứng với 898,2 mg berberin

1 ml dịch lọc tương ứng với 0,0272 mg berberin

- Phương pháp HPLC.

Cân chính xác khoảng 0,07 g bột dược liệu đã nghiền mịn và rây qua rây 0,25 mm vào một bình nón có nút mài 100 ml. Chiết 3 lần, mỗi lần dùng 25 ml hỗn hợp dung môi MeOH: HCl [100 : 1] bằng cách đun hồi lưu cách thuỷ 30 phút. Gộp các dịch chiết, làm bay hơi trên cách thuỷ tới khô . Cắn được chiết tiếp bằng nước nóng 5 lần, mỗi lần 15 ml. Lọc và gộp các dịch chiết, làm bay hơi trên cách thuỷ tới khô. Cắn được hoà tan và chuyển vào bình định mức 50ml bằng MeOH, thêm MeOH đến vạch, lắc đều, lọc qua giấy lọc cỡ 0,45 µm, thu được dung dịch thử.

Dung dịch chuẩn: Pha khoảng 0,060 mg berberin clorid trong 1 ml MeOH.

Chương trình sắc ký:

+ Cột Lichrosorb RP8 (10 µm; 250 × 4 mm)

+ Detector UV, bước sóng phát hiện 345 nm

+ Pha động: Hoà tan 3,4 g kali dihydro-phosphat, 1,7 g Na laurylsulphat trong 1000 ml hỗn hợp dung môi nước - acetonitril (1 : 1)

+ Tốc độ dòng: 0,7 ml/phút

+ Thể tích tiêm: 20 µl

+ Nhiệt độ phân tích: Nhiệt độ phòng (27±3°C)

Công thức tính hàm lượng berberin trong dược liệu:

$$X\% = \frac{S_T \times m_c \times C_c \times 100}{S_C \times m_T \times (1-b)}$$

trong đó: S_T, S_C là diện tích pic của mẫu thử và mẫu chuẩn;

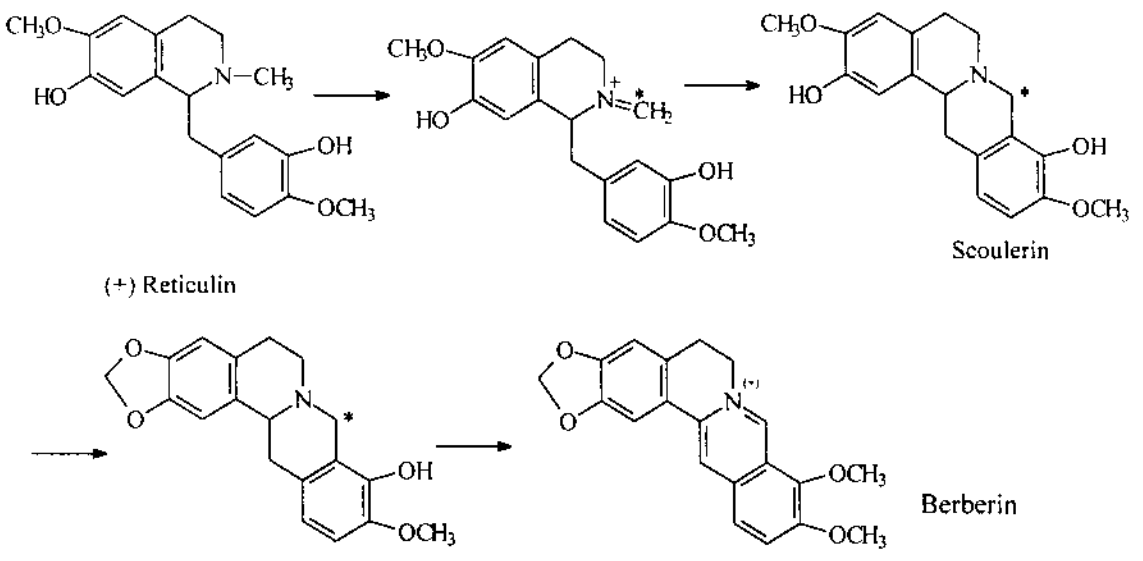
m_c là lượng cân mẫu chuẩn (mg);

C_c là hàm lượng mẫu chuẩn (%);

m_T là lượng cân mẫu thử (mg);

b là độ ẩm dược liệu (g/1g dược liệu).

2.3.2.1.6. Sinh tổng hợp berberin



2.3.2.1.7. Tác dụng và công dụng

- Dung dịch berberin clorid, dùng phương pháp pha loãng trong ống nghiệm, nồng độ 1/32.000 có tác dụng ức chế *Streptococcus hemolyticus*, *Vitrio cholerae*, nồng độ 1/16.000 ức chế *Staphylococcus aureus*, nồng độ 1/8.000 ức chế *Streptococcus virideus*, *Shigella dysenteriae*, *Bacillus subtilis*, nồng độ 1/4.000 ức chế *Bacillus pneumoniae*, *Bacillus proteus*, nồng độ 1/1000 ức chế *Bacillus typhi*, *Bacillus coli*.

- Berberin với liều thấp làm tim hưng phấn, làm giãn động mạch, hạ huyết áp, đối với tử cung, khí quản, dạ dày và ruột có tác dụng hưng phấn, tăng tiết mật, hạ sốt.

- Uống berberin sulfat hấp thu chậm, sau 8 giờ mới đạt nồng độ cao nhất trong máu; Sau khi hấp thu phân bố nhanh vào tim, gan, thận, nồng độ trong máu khó duy trì. Tiêm vào tĩnh mạch thỏ 20 mg/kg thể trọng không có phản ứng xấu và không có biểu hiện bệnh lý. Uống liều lớn có thể làm giảm huyết áp và gây hiện tượng ức chế hô hấp cấp tính. Liều LD_{50} đối với chuột nhắt trắng là 24,3 mg/kg thể trọng.

- Khử hoá berberin tạo ra tetrahydro-berberin (canadin) có tác dụng an thần và mềm cơ, hạ huyết áp nhẹ.

Berberin được dùng điều trị hội chứng lị do trực khuẩn, viêm ruột, ỉa chảy. Còn dùng làm thuốc thông mật, viêm ống mật và trong một số bệnh nhiễm khuẩn do tụ cầu và liên cầu khuẩn.

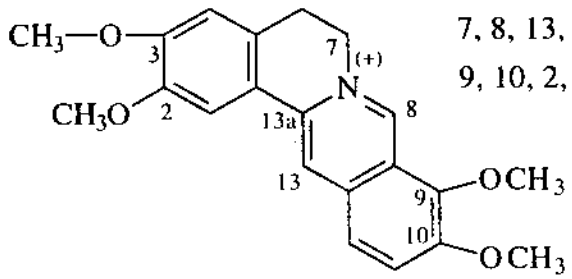
Dạng dùng: Viên nén, viên bao hoặc viên nang 10 - 50 và 100 mg.

Người lớn: Ngày 2 lần × 2 - 4 viên 50 mg hoặc 1 - 2 viên 100 mg. Trẻ em: ngày 2 lần, trẻ dưới 24 tháng dùng 1 - 2 viên 10 mg/lần, trẻ 5 - 7 tuổi: 4 - 5 viên 10 mg/lần. Trẻ em 8 - 15 tuổi: 2 - 3 viên 50 mg/lần.

Chú ý: Phụ nữ có thai không nên dùng (dễ gây co bóp dạ con).

2.3.2.2. Palmatin

2.3.2.2.1. Cấu trúc hoá học



7, 8, 13, 13a tetradehydro
9, 10, 2, 3, tetramethoxy-berbinium

2.3.2.2.2. Nguồn gốc

Palmatin là alcaloid có trong:

- Thân và rễ cây Hoàng đằng (*Fibraurea tinctoria*, F. *recisa* – Menispermaceae): 1 – 2%.

- Rễ và thân rễ hoàng liên (*Coptis* spp. – Ranunculaceae)

- Thân và rễ vàng đắng (*Coscinium fenestratum* - Menispermaceae)

- Vỏ hoàng bá (*Phellodendron amurense*, P.chinense – Rutaceae)

2.3.2.2.3. Tính chất

Palmatin thường ở dạng muối clorid ($C_{21}H_{22}O_4NCl,3H_2O$) có tinh thể hình kim, màu vàng tươi, vị đắng, tan trong nước.

2.3.2.2.4. Định tính palmatin trong dược liệu

- Ngâm 0,10 g bột dược liệu với 3ml nước, lọc. Lấy 2 ml dịch lọc thêm 1ml H_2SO_4 đậm đặc, rồi thêm từng giọt nước clo, giữa 2 lớp dung dịch sẽ có 1 vòng màu đỏ nâu.

- Lấy 0,20 g bột dược liệu ngâm trong 2 ml cồn Et-OH 90°; đặt 2 giọt dịch chiết cồn lên phiến kính, nhỏ 1 giọt HNO_3 30%. Sau khoảng 10ph đem soi dưới kính hiển vi sẽ thấy những tinh thể hình kim to màu vàng.

- Định tính bằng SKLM: Chấm lên bản mỏng silicagel GF_{254} (MERCK) đã tráng sẵn 20 µl dịch chiết cồn và 20 µl dung dịch palmatin clorid chuẩn (hoà tan 0,001 g palmatin clorid trong 1ml ethanol 90°). Khai triển tấm sắc ký bằng hệ dung môi: *n*-butanol: acid acetic : nước [7 : 1 : 2]. Sau khi làm khô bản sắc ký,

phun hiện màu bằng T.T Dragendorff. Trong dịch thử phải có 1 vết cùng màu đỏ cam và cùng Rf với vết palmatin clorid chuẩn.

2.3.2.2.5. Định lượng

Có thể định lượng palmatin trong dược liệu bằng phương pháp cân (xem DĐ Việt Nam III) hoặc bằng phương pháp HPLC.

2.3.2.2.6. Tác dụng và công dụng

Palmatin clorid có tác dụng ức chế tụ cầu khuẩn (*Staphylococcus*) và liên cầu khuẩn (*Streptococcus*), còn đối với các loại vi khuẩn khác thì không thấy tác dụng rõ rệt.

Được dùng để chữa ỉa chảy, lỵ, phòng và chữa một số bệnh về mắt như viêm kết mạc, viêm bờ mi, mắt hột. Hiện nay ít dùng.

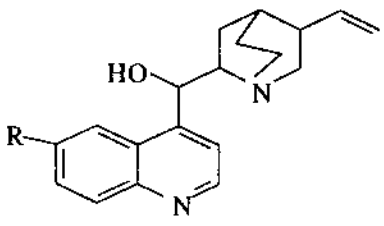
Liều dùng: Người lớn uống 5 – 10 viên/ngày (0,02 g/viên) trẻ em dưới 3 tuổi: 2 – 8 viên/ngày (viên 5 mg) chia làm 2 – 3 lần.

Ngoài ra có thể dùng palmatin điều chế (*dl*)-tetrahydropalmatin có tác dụng an thần.

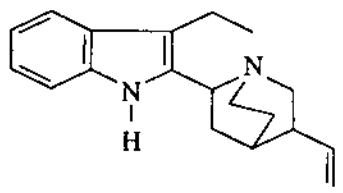
2.4. Nhóm cinchona - alcaloid

2.4.1. Cấu trúc hoá học của nhóm cinchona

Alcaloid nhóm cinchona là những alcaloid trong chi *Cinchona* và chi *Remija*. Chúng có cấu trúc kiểu Cinchonin và Cinchonamin.



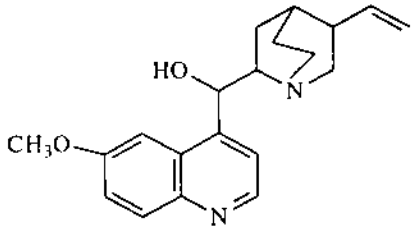
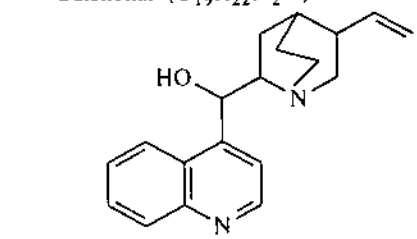
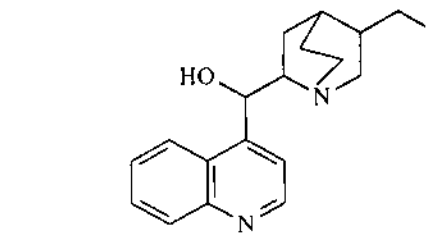
Kiểu Cinchonin



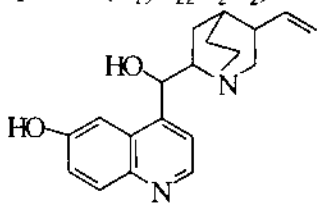
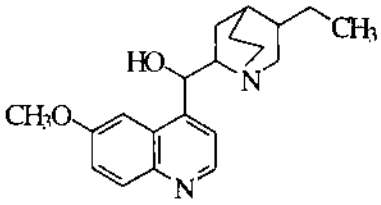
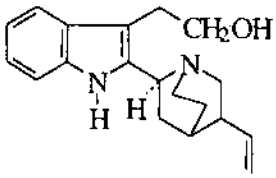
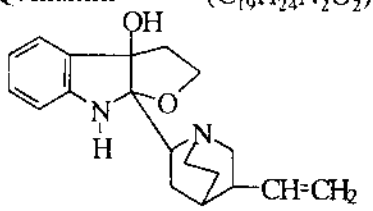
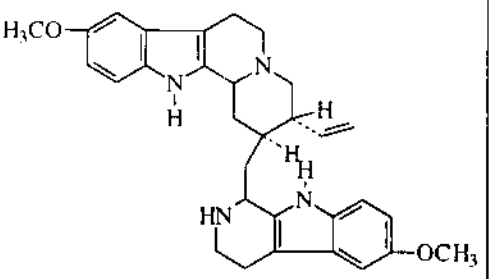
Kiểu Cinchonamin

Một số alcaloid đặc trưng cho các kiểu cấu trúc trên được trình bày ở bảng 4.

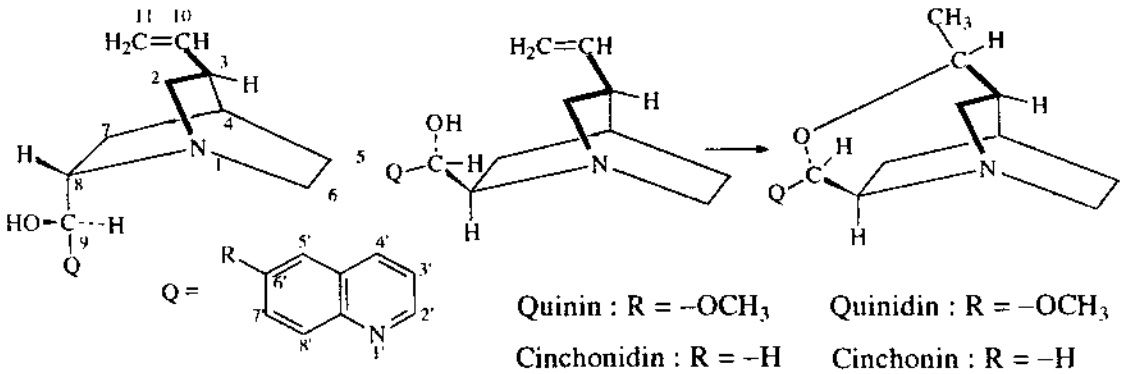
Bảng 4.

Alcaloid	F	$[\alpha]_D$	Có trong cây
1	2	3	4
Quinin ($C_{20}H_{24}N_2O_2$)  Quinidin ($C_{20}H_{24}N_2O_2$)	177°	-117° (C)	Một số loài Canhkina (*Cinchona* spp.)
	173°	+255° (A)	- *Cinchona* spp. - *Remija pedunculata*
Cinchonin ($C_{19}H_{22}N_2O$)  Cinchonidin ($C_{19}H_{22}N_2O$)	264°	+224° (A)	Một số loài Canhkina (*Cinchona* spp.)
	205°	- 110° (A)	
Hydrocinchonin ($C_{19}H_{24}N_2O$)  Hydrocinchonidin ($C_{19}H_{24}N_2O$)	268°	+204° (A)	Các loài Canh Kina (*Cinchona* spp.)
	232°	-96°	

Bảng 4. (tiếp theo)

1	2	3	4
Cuprein ($C_{19}H_{22}N_2O_2$) 	198°	-175° (A)	- *Remijia pedunculata* - Một số loài Canhkina
Hydroquinin ($C_{20}H_{26}N_2O_2$) 	173°	-142° (A)	*Cinchona* spp.
Hydroquinidin ($C_{20}H_{26}N_2O_2$)	169°	+237° (A)	
Succirubin ($C_{19}H_{24}N_2O_2$)	80-81°	+1,6° (A)	*Cinchona succirubra*
Methylsuccirubin ($C_{20}H_{26}N_2O_3$)	171-72°	-87° (A)	*Cinchona succirubra*
Cinchonamin ($C_{19}H_{24}N_2O_2$) 	186°	+123° (A)	- *Remijia purdieana* - *Cinchona* spp.
Quinamin ($C_{19}H_{24}N_2O_2$) 	185-6°	+104° (A)	*Cinchona succirubra*
Cinchophyllin ($C_{31}H_{35}N_4O_2$) 	230°	+23° (C)	*Cinchona* spp.

Cấu hình không gian một số alcaloid:



Trong cấu trúc gồm hai hệ thống vòng quinidin và quinuclidin nối với mạch nhánh vinyl ở vị trí 3 của nhân quinuclidin. Trong phân tử có 4 cacbon bất đối ở vị trí C_3, C_4, C_8, C_9, theo lý thuyết sẽ có 16 đồng phân không gian. Tuy vậy trong thiên nhiên còn có những chất có cấu trúc khác nhau ở C_8 và C_9.

Ở vị trí C_3 và C_4 của nhân quinuclidin không có sự phân biệt giữa quinin và quinidin, cinchonidin và cinchonin. Quinin và quinidin cũng như cinchonidin và cinchonin có cấu trúc ở C_8 và C_9 ngược nhau.

Ở quinidin và cinchonin có khả năng tạo ra ete của nhóm hydroxyl (OH) ở C_9 với C_{10} của nhóm vinyl, còn ở quinin và cinchonidin thì không có khả năng này.

Có những alcaloid phụ gọi là "Epi" được phân biệt với alcaloid chính (Normalbasen) qua cấu hình ở C-9. Ví dụ: Quinin và epiquinidin có OH-alcol ở C_9 ở vị trí β so với nhân quinuclidin còn epiquinin và quinidin thì OH ở vị trí α.

2.4.2. Nguồn gốc

Vỏ canhkina được phát hiện lần đầu tiên vào khoảng giữa thế kỷ XVII (1630) được dùng để chữa sốt. Alcaloid đầu tiên là cinchonin trong vỏ canhkina do Gomes phân lập vào năm 1810, đến năm 1819 Pelletier và Caventou phát hiện ra quinin, đến nay đã biết khoảng trên 30 alcaloid trong các loài *Cinchona*.

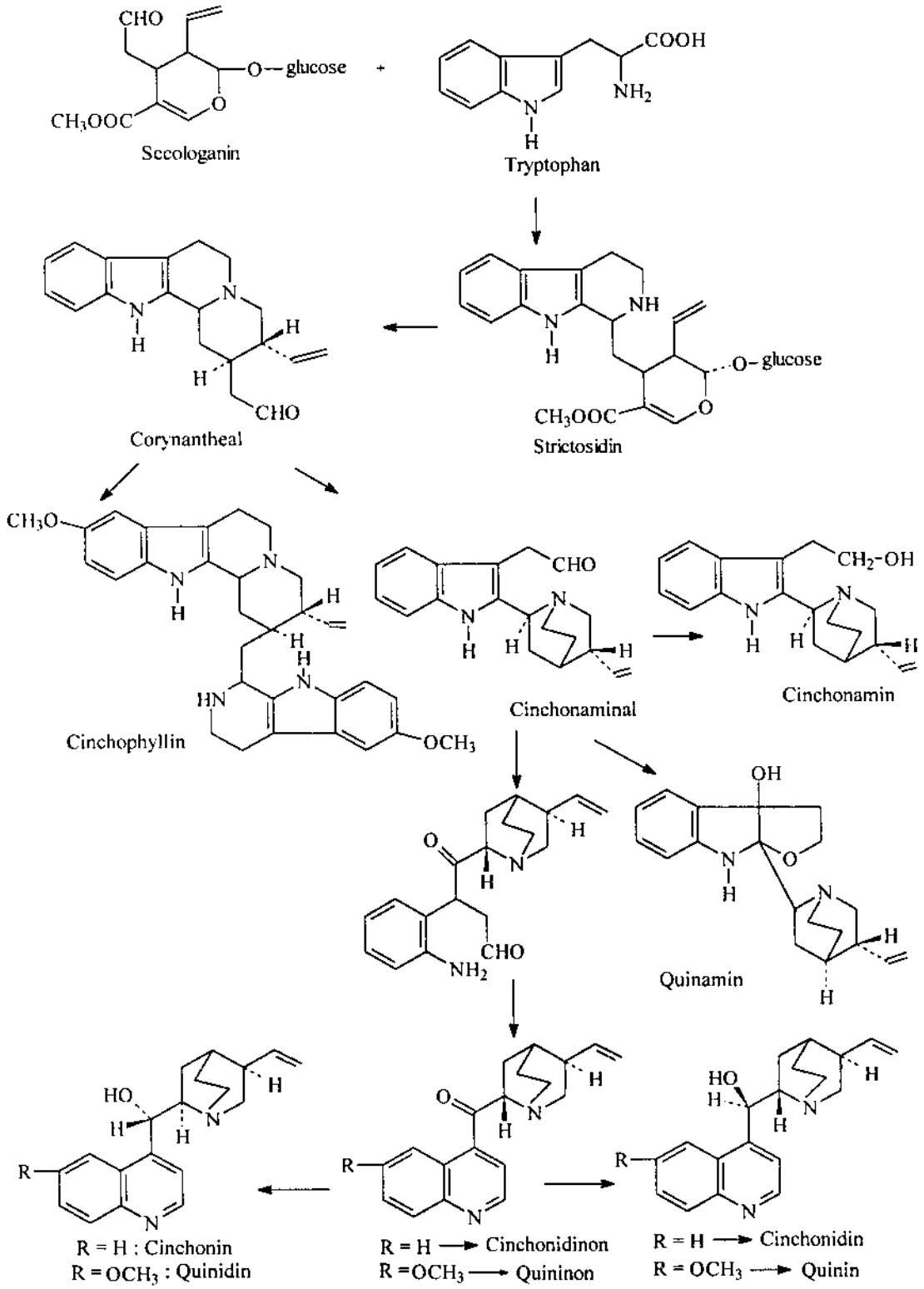
- Quinin có trong các loài canhkina (3 - 7%) (*Cinchona succirubra* Pavon, *C. calisaya* Weddell, *C. officinalis* L., *C. ledgeriana* Moens ...)

Năm 1944 Woodward và Doering đã tổng hợp được quinin nhưng phương pháp tổng hợp không kinh tế nên người ta vẫn phải trồng canhkina để chiết xuất lấy quinin.

- Quinidin có trong một số loài canhkina (0,1 - 0,3%) và một số loài *Remija* đặc biệt có nhiều trong loài *Remija pedunculata*.

- Cinchonin và cinchonidin có trong các loài *Cinchona* (0,2 - 0,4%) và một số loài *Remija*.

2.4.3. Sinh tổng hợp cinchona – alcaloid



2.4.4. Kiểm nghiệm

2.4.4.1. Định tính

- Xác định sự có mặt alcaloid trong dược liệu: dùng phản ứng với T.T chung tạo tủa.

- Xác định quinin, quinidin:

+ Quan sát huỳnh quang: Chiết alcaloid trong dược liệu ra dạng muối của acid có oxy quan sát sẽ thấy huỳnh quang xanh. Huỳnh quang này sẽ mất đi khi thêm nước clo, nước brom hoặc halogen acid (HCl, HBr...)

+ Phản ứng Thalleoquinin: Dung dịch muối của quinin và quinidin trong nước có huỳnh quang cho thêm nước clo hay nước brom cho đến hết huỳnh quang, rồi thêm amoniac thừa sẽ có màu xanh lục hay kết tủa xanh lục.

+ Phản ứng Erythroquinin: Dung dịch muối quinin sau khi cho nước clo hoặc nước brom đến hết huỳnh quang cho thêm amoniac và một ít kali feroxyanua sẽ xuất hiện màu đỏ. Cho thêm cloroform vào lắc màu đỏ sẽ chuyển sang lớp cloroform.

- Định tính alcaloid trong dược liệu bằng SKLM.

+ Dùng chất hấp phụ là silicagel GF_{254} (MERCK) đã tráng sẵn.

+ Hệ dung môi khai triển:

$CHCl_3$: MeOH: NH_4OH [50: 9:1]

+ Chấm 20µl dịch chiết alcaloid và 20µl dung dịch đối chứng (quinin, quinidin ...) lên cùng bản mỏng sau khi khai triển bằng hệ dung môi trên, để bay hết hơi dung môi, phun hiện màu bằng T.T. Dragendorff. Quan sát số lượng vết hiện màu với thuốc thử và phải có vết có cùng màu sắc và Rf với chất chuẩn đối chiếu.

2.4.4.2. Định lượng

- Định lượng alcaloid toàn phần trong vỏ canhkina bằng phương pháp acid-base (xem Dược điển Việt Nam). Dược điển Việt Nam quy định vỏ canhkina phải có ít nhất 6% alcaloid toàn phần. Dược điển châu Âu quy định phải có 6,5% alcaloid toàn phần.

Ngoài ra có thể định lượng bằng phương pháp đo quang theo các tác giả:

- Bandelin đã tạo tủa màu alcaloid với thuốc thử Reinecke, lấy riêng tủa đem hoà tan trong aceton rồi đo ở 525 nm.

26(T) - 387

- Sanchez đã định lượng quinin và quinidin bằng cách làm mất nhóm methyl của $-OCH_3$ bằng H_2SO_4, phenol sinh ra tạo màu đỏ với thuốc thử diazo. Đo cường độ màu, tính ra hàm lượng quinin và quinidin trong dược liệu.

- Monnet đã định lượng quinin bằng phương pháp so màu dựa vào phản ứng erythroquinin.

2.4.5. Tác dụng và sử dụng

- Quinin là alcaloid quan trọng nhất trong vỏ cây canhkina dùng điều trị bệnh sốt rét. Quinin diệt ký sinh trùng sốt rét chủ yếu diệt thể vô tính của các loài *Plasmodium*, diệt giao tử (gamete) của *Plasmodium vivax*, *P. malaria* và *P. ovale* nhưng không có tác dụng đối với giao tử của *P. falciparum* và thể ngoại hồng cầu của các loài *Plasmodium* nên không dùng quinin để phòng bệnh. Quinin còn có tác dụng ức chế trung tâm sinh nhiệt nên có tác dụng hạ sốt, liều nhỏ có tác dụng kích thích nhẹ thần kinh trung ương, liều lớn gây ức chế trung tâm hô hấp và có thể gây liệt hô hấp. Quinin gây tê cục bộ và tác nhân làm xơ cứng dùng điều trị chứng giãn tĩnh mạch (trĩ ...). Ngoài ra, quinin còn có tác dụng ức chế hoạt động của tim và kích thích tăng cường co bóp tử cung đặc biệt đối với tử cung có thai, với liều cao gây sẩy thai.

- Quinidin cũng có tác dụng diệt kí sinh trùng sốt rét và hạ nhiệt nhưng kém hơn quinin, có tác dụng chủ yếu là làm giảm kích thích cơ tim nên được dùng chữa bệnh tim loạn nhịp.

- Cinchonin và cinchonidin cũng có tác dụng diệt kí sinh trùng sốt rét nhưng yếu hơn quinin nhiều nên không dùng trong điều trị.

Sử dụng:

- Vỏ canhkina được dùng làm thuốc hạ sốt (viên seda, angekitamol...) hoặc thuốc bổ (rượu canhkina).

- Vỏ canhkina dùng làm nguyên liệu chiết xuất quinin, quinidin.

- Quinin dùng điều trị sốt rét, đặc biệt đối với sốt rét nặng và sốt rét ác tính do *P. falciparum* kháng cloroquin hoặc do các chủng đa kháng gây ra. Quinin cũng có thể bị kháng đặc biệt đối với *P. falciparum*. Trong điều trị phải dùng phối hợp với một thuốc diệt thể phân liệt ở máu có tác dụng chậm hơn như sulfadoxin hoặc tetracyclin. Cơ chế tác dụng của quinin trên ký sinh trùng sốt rét là ngăn cản tổng hợp acid nucleic hoặc giảm chức năng của thể tiểu giao tử.

Dạng dùng:

+ Viên nén: 300 mg (quinin dihydroclorid hoặc quinin hydroclorid)

+ Viên nén bao: 125 mg, 200 mg, 250 mg, 300 mg (dưới dạng quinin sulfat)

+ Ống tiêm dạng quinin dihydroclorid 300 mg/1ml 600 mg/2 ml. ống tiêm quinoserum 100 mg/10 ml (quinin dihydroclorid trong dung dịch muối đẳng trương).

Liều dùng: Theo phác đồ điều trị số 1993/QLSK ngày 6/4/1992 của Bộ Y tế. Điều trị đặc hiệu cho người bị sốt rét, sốt rét có biến chứng: Quinin dihydroclorid liều người lớn 20 - 30 mg/kg thể trọng trong 24 giờ.

Truyền nhỏ giọt tĩnh mạch: 6 giờ đầu quinin dihydroclorid 0,5 g pha trong 250ml dung dịch đẳng trương glucose hoặc NaCl với tốc độ 30 giọt/phút. Thời gian 1 lần truyền 4 - 8 giờ, cho đủ liều 24 giờ. Truyền 2 - 3 ngày, nếu bệnh nhân chuyển biến tốt khỏi hôn mê thì chuyển sang thuốc uống cho đủ 5 - 7 ngày. ở những nơi không có điều kiện truyền tĩnh mạch thì tiêm tĩnh mạch và xử trí như sau: 6 giờ đầu tiêm quinoserum 0,20 - 0,25 g (4 - 5 ống 0,05 g) hoặc quinin dihydroclorid 0,25 g pha với 20 ml dung dịch glucose 10% tiêm thật chậm vào tĩnh mạch. Sau đó tiêm bắp một ống quinin dihydroclorid 0,25g. Sau 8 giờ tiêm nhắc lại 1 lần cho đủ liều 24 giờ. Những ngày sau nếu bệnh nhân chuyển biến tốt thì chuyển sang uống cho đủ liều 5 - 7 ngày.

Chống chỉ định: Mẫn cảm với quinin, hemoglobin - niệu chưa rõ nguyên nhân. Rối loạn dẫn truyền trong thất.

Chú ý: Có thể chóng mặt, ù tai, nôn mửa, dị ứng phát ban. Thuốc chuyển vào sữa mẹ rất ít nên có thể dùng cho phụ nữ nuôi con bú.

- Quinidin là thuốc chống loạn nhịp dùng để phòng cơn mạch kích phát. Điều trị duy trì các chứng loạn nhịp hoàn toàn và cuồng động nhĩ đã giảm đi sau khi làm sốc điện. Trị các ngoại tâm thu.

Dạng dùng: Viên nang 275 mg tương ứng với 165 mg quinidin base (quinidin arabogalactansulfat). Viên nén "Durule" giải phóng hoạt chất chậm 250mg tương ứng với 200 mg quinidin monosulfat - (quinidin bisulfat) viên nén 100mg (quinidin - 5 - ethyl - 5 phenyl barbiturat), viên nén 175 mg tương ứng với 166mg quinidin base, viên nén 0,20 g quinidin sulfat.

Chống chỉ định: Tuyệt đối không được dùng cho người mẫn cảm với quinidin, bloc nhĩ - thất ở mức thấp, suy nhịp xoang. Xoắn đỉnh QT dài ở điện tâm đồ.

Chú ý: Tác dụng phụ thường gặp: nôn, ỉa chảy.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. *Werner Döpke* (1979); Ergebnisse der Alkaloid - Chimie. Akademie - Verlag. Beclin.

2. *Trease and Evans* (2000); Pharmacognosy. (Fourteenth Edition) WB Saunders Company Ltd. London. Philadelphia. Toronto. Sydney. Tokyo.

3. *MTP International Review of Science* (1998); Alkaloids. (Edited by K. Wiesner, F. R. S. University of New Brunswick).

4. *K. Mothes und H. R. Schütte* (1969); Biosynthese der Alkaloide. VEB. Deutsche Verlag der Wissenschaften - Berlin.

5. *H. Wagner* (1992); Pharmazeutische Biologie. Gustav Fischer Verlag - Stuttgat - New York.

CHƯƠNG V
GLYCOSID TIM VÀ DƯỢC LIỆU CHỨA GLYCOSID TIM

GS. Vũ Ngọc Lộ

Các glycosid tim gồm nhiều hợp chất thiên nhiên có nhiều đặc trưng về cấu trúc hóa học cũng như về tác dụng dược lý. Cho tới nay các glycosid tim vẫn còn chiếm một vị trí quan trọng trong các thuốc trị các chứng thiểu năng tim.

Từ lâu, người ta đã biết đến hoạt tính cường tim của nhiều cây cỏ: *Convallaria mayalis* từ thế kỷ thứ 16, *Digital* từ cuối thế kỷ 18, *Strophanthus* đầu thế kỷ 20.

I. ĐỊNH NGHĨA

Glycosid tim là những glycosid steroid có tác dụng đặc biệt lên tim, với liều điều trị có tác dụng cường tim, làm chậm và điều hòa nhịp tim, với quá liều điều trị thì gây nhiều hiện tượng phụ: gây nôn, làm chảy nước bọt, làm giảm sức co bóp của tim, làm ngừng tim...

II. PHÂN BỐ TRONG THIÊN NHIÊN

Các glycosid tim được phân bố trong khoảng một chục họ thực vật: Asclepiadaceae (*Asclepias, Calotropis, Carissa, Cryptostegia, Gomphocarpus (= Pachycarpa), Menabes, Periploca, Xysmalobium*...); Apocynaceae (*Acokanthera, Adenium, Apocynum, Cerbera, Nerium, Strophanthus, Thevetia*...); Brassicaceae (*Cheiranthus, Erysimum*); Celastraceae (*Euonymus*), Fabaceae (*Coronilla*), Liliaceae (*Bowela, Convallaria, Urginea*); Moraceae (*Antiaris, Antiaropsis, Castilla*); Ranunculaceae (*Adonis, Helleborus*); Scrophulariaceae (*Digitalis*); Tiliaceae (*Corchorus*).

Glycosid tim có trong nhiều bộ phận của cây: lá, hoa, vỏ thân, rễ, thân rễ, thân hành.

Hàm lượng glycosid tim trong cây thường thấp, dưới 1%.

Trong một số trường hợp đặc biệt, động vật cũng có (nhựa cóc có bufadienolid, cardenolid có ở sâu bọ cánh mềm). Vài sâu bọ cánh mềm tổng hợp được genin của glycosid tim từ phytosterol.

III. CẤU TRÚC CỦA GLYCOSID TIM

3.1. Cấu trúc của phần đường

Ngoài một số đường thông thường (*D*-glucose, *L*-rhamnose...), người ta còn gặp đường 2,6-desoxy (*D*-digitoxose), *L*-oleandrose, *D*-diginose...

Ngoài các đường đặc biệt nói trên, người ta còn gặp các đường 6-desoxy-hexose (*L*-rhamnose, *D*-fucose...), đường 6-deoxy-3-methylhexose (thevetose = đường 6-deoxy-3-methyl-*L*-glucose), digitalose (6-desoxy-3-methyl- *D*-galactose).

Trong cấu trúc của đường có thể một nhóm OH bị acetyl hóa.

3.2. Cấu trúc hóa học của genin

Cấu trúc gồm một genin steroid theo kiểu cardenolid (ở C_{23}) hoặc bufadienolid (ở C_{24}) và một phần đường (đường thường hay gặp thuộc nhóm oligosid).

Tất cả các genin đều có nhân 4 vòng chung cho các hợp chất steroid. Các vòng A, B, C, D được sắp xếp theo kiểu *cis-trans-cis* (digitoxigenin). Đặc biệt có trường hợp là *trans-trans-cis* (uzarigenin).

Trong vài trường hợp ở các vị trí 4, 5 có dây nối đôi. Thông thường có 2 nhóm OH: một nhóm (bậc 2) ở 3 hướng β, trừ một số chất và một (bậc 3) ở 14 (có chất không có OH như neriantin), hướng β.

Nhóm OH còn có mặt ở một số vị trí khác: 1 (ouabain), 5 (ouabain), 11 (ouabain), 12 (digoxin), 16 (gitoxin).

Nhóm OH có thể bị acyl hóa (oleandrigenin).

Hai nhóm OH ở gần nhau có thể tạo nhóm chức epoxy (adynerin).

Nhóm OH có thể bị ester hóa bởi acid formic (gitaloxin) hoặc acid acetic (oleandrin).

Sự oxy hóa được thể hiện bằng sự có mặt của một ceton ở C_{12} (sinogenin), một epoxyd ở 11, 12 (cerbetogenin) hoặc ở 7, 8 (sarverogenin).

Có thể gốc methyl bị oxy hóa ở C_{10} thành hydroxymethyl (ouabain) hoặc thành aldehyd (K strophantin).

Đặc biệt, vòng C có thể mang dây nối đôi ở 11, 12.

Thông thường phần đường nối với genin ở C_3, trừ một trường hợp ở họ Thiên lý (Asclepiadaceae) ở C_3 và C_2 hình thành cấu trúc đặc biệt 4 vòng.

Phần đường có thể gồm một đường (ouabain), thông thường 2 – 4 đường. Nếu là nhiều đường trong đó có glucose thì glucose sẽ đứng ở vị trí cuối cùng.

Glycosid cấp 1 có những điểm khác với glycosid cấp 2. Glycosid cấp 1 có trong cây tươi, qua quá trình chế biến, glucose dễ biến mất, glycosid cấp 1 sẽ chuyển thành cấp 2.

IV. LIÊN QUAN GIỮA CẤU TRÚC VÀ HOẠT TÍNH SINH HỌC

Hoạt tính cường tim có liên quan chặt chẽ đến phần genin. Phần đường không có tác dụng cường tim, nếu đường gắn liền với genin thì tác dụng cường tim tăng lên, mặt khác tính phân cực của glycosid cũng thay đổi.

Các yếu tố về cấu trúc cũng có liên quan đến tác dụng sinh học:

- Vòng lacton ở 17 nối với nhân sterol theo hướng β. Nếu vòng lacton bị thay đổi: bão hòa nối đôi, mở vòng, thay thế vòng lacton bằng lactam thì tác dụng giảm đi hoặc mất đi.

- Nối vòng. Hoạt tính sinh học đạt đối đa nếu vòng A / B là *cis*, B / C: *trans*, C / D: *cis*.

Nếu các A / B là *trans*, thì hoạt tính giảm mạnh (uzarigenin). Hoạt tính này vẫn còn giữ được, nếu vòng A có phần không no (*Urginea maritima*).

- Nhóm OH ở C_3 thường hướng β. Nếu ở hướng α, thì tác dụng giảm đi nhiều.

Sự có mặt của nhóm OH ở C_{14} là rất cần. Nếu mất nhóm này, thì tác dụng giảm đi nhiều.

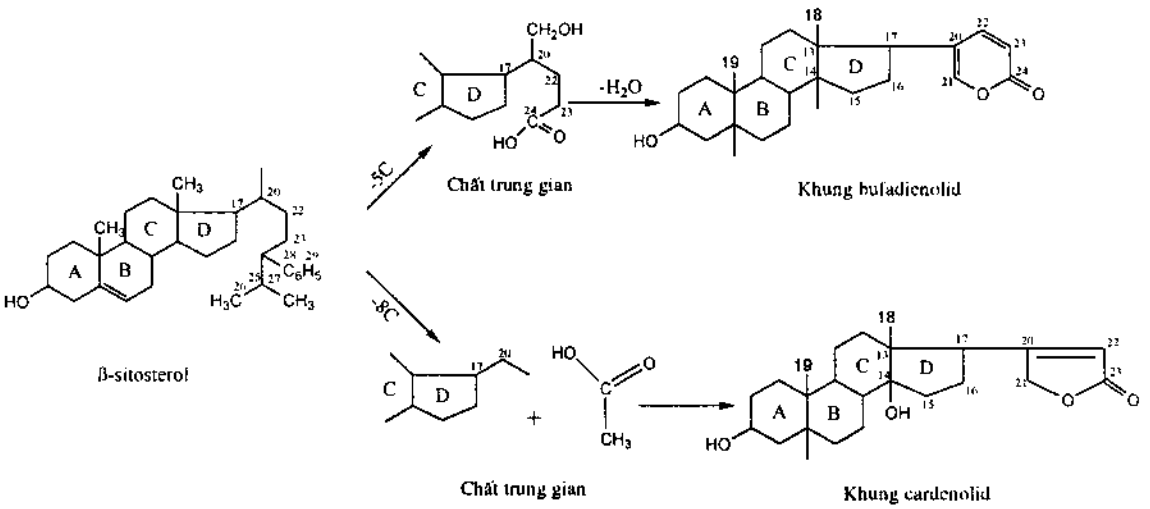
- Với bufadienolid, phần genin tác dụng mạnh hơn glycosid tương ứng.

- Với cardenolid, phần genin tác dụng kém hơn glycosid tương ứng.

V. SINH TỔNG HỢP CỦA GLYCOSID TIM

Các hợp chất sterol và triterpen đều bắt nguồn từ một nguồn gốc sinh nguyên là squalen. Bản thân squalen đi từ nguồn gốc acid acetic.

Từ squalen trong cây cỏ, các phytosterol được hình thành, cả 2 kiểu glycosid tim (cardenolid glycosid và bufadienolid glycosid) đều được tạo ra do β-sitosterol là chất có phổ biến trong cây cỏ.



VI. TÍNH CHẤT

6.1. Tính chất lý, hoá

Glycosid tim là những chất kết tinh, không màu, vị đắng, có năng suất quay cực, ít nhiều tan trong nước (độ tan phụ thuộc số lượng ose và số nhóm OH đính vào phần genin), tan trong cồn, thông thường khó tan trong cloroform (nhất là digitalin), không tan trong benzen và ether dầu hỏa.

Glycosid tim không bền vững. Trong môi trường kiềm, vòng lacton sẽ bị mở và epimer hóa ở 17 (17 β → 17 α).

Glycosid tim dễ bị thủy phân bởi enzym. Loài *Strophanthus kombe* chứa glycosid tim là hỗn hợp K- strophanthosid, bao gồm các K – strophantosid γ, β, α. K- strophanthosid là chất cấp 1, các K- strophantosid β và α được tạo ra do thủy phân từ từ bằng enzym.

6.2. Định tính

Các glycosid tim thường có hàm lượng thấp, nên không thể định tính trực tiếp trên dược liệu. Cần phải tạo ra cao đậm đặc có độ tinh khiết nhất định. Như vậy không thể dùng phương pháp thông thường. Thường phải chiết từ dược liệu đã tán nhỏ bằng ethanol 50% và dùng dịch chì acetat. Sau khi đun sôi, rồi để nguội và loại bã, chiết glycosid tim bằng cloroform. Lấy dịch chiết cloroform để định tính hoặc làm sắc ký lớp mỏng.

6.2.1. Phản ứng màu

Phản ứng đường. Cần làm các phản ứng đặc trưng cho đường 2 – 6 desoxy (phản ứng Pesez). Thêm xanthydrol vào dung dịch heterosid trong acid acetic đặc, đun cách thủy, xuất hiện màu đỏ.

Có thể dùng phương pháp Keller - Kiliani. Thêm acid sulfuric đặc có chứa muối Fe^{3+} (vết) vào dung dịch heterosid trong acid acetic đặc có chứa muối Fe (III). Như vậy sẽ xuất hiện vòng nâu đỏ và dung dịch acetic sẽ chuyển màu lơ ve.

Điều đáng lưu ý là ouabain (trong đó đường không phải là đường 2 – 6 desoxy mà là rhamnose) không cho phản ứng này. Ngược lại, glycosid không phải là glycosid tim, nhưng nếu có đường 2 – 6 desoxy thì cũng cho phản ứng này, ví dụ như diginosid (có đường là *D*- diginose), digifolein.

6.2.2. Phản ứng với genin

Các phản ứng này được thực hiện sau khi thủy phân các glycosid và chiết xuất genin bằng ether hay cloroform.

- Phản ứng chung với nhân sterol: Phản ứng Liebermann – Burchard: dịch chiết cloroform tạo ra với anhydrid acetic và acid sulfuric đặc màu tím, sau lơ, cuối cùng xanh ve ở pha cloroform.

6.2.3. Phản ứng với cardenolid

Các phản ứng đặc hiệu của các cardenolid là sự có mặt của γ-lacton, α, β-lacton không no: phản ứng Kedde và phản ứng Baljet. Điểm chung của các phản ứng này là dùng một dẫn xuất nhân thơm có nitơ. Trong môi trường kiềm (Na hydroxyd), chất này tạo ra với lacton một dẫn chất có màu. Phản ứng Kedde dùng acid 3, 5-dinitrobenzoic: màu sắc thu được là màu đỏ tía khá bền vững. Phản ứng Baljet dùng acid picric và cho màu cam bền vững. Các phản ứng này cho kết quả âm tính với saponin hoặc thể hiện kém nhạy cảm với bufadienolid. Các digitanol heterosid (diginosid, digifolein) cho phản ứng dương tính yếu.

Với phản ứng Raymond-Marthoud, việc cho thêm *m*-dinitrobenzen và NaOH tạo ra màu tím bền vững.

6.2.4. Phản ứng huỳnh quang

Trong môi trường acid, các glycosid tim cho các dẫn chất mất nước có huỳnh quang: tạo ra các dẫn chất 14 (15) - dehydro và trong trường hợp của các genin có nhóm thế ở 16, dẫn chất 14 (15) - 16 (17) - didehydro. Trong trường hợp nói

sau, phản ứng huỳnh quang đậm hơn. ở đây trienon được hình thành có 3 dây nối đôi liên hợp. Các phản ứng này rất cần cho việc thực hiện các sắc ký lớp mỏng.

Trên thực tế, người ta dùng phản ứng Jensen: phun dung dịch acid tricloacetic trong ethanol. Song song người ta dùng chất oxy hóa (cloramin) và được các huỳnh quang có màu sắc khác nhau, như vậy việc đánh giá kết quả dễ dàng hơn. Người ta còn có thể dùng acid phosphoric, dùng riêng biệt hoặc phối hợp với acid sulfuric và Fe (III) clorid. Sau khi hơ nóng, người ta thu được màu đỏ (phản ứng Tattje). Phản ứng tỏ ra nhạy cảm với glycosid mà genin có nhóm thế ở 16 hơn là với digitoxin hoặc digoxin.

Các digitanol glycosid (diginosid, digifolein...) không tạo ra phản ứng huỳnh quang.

Với thuốc thử Svendsen – Jensen, dung dịch tricloracetic 25% trong cồn 95° hoặc cloform tác động đến các cardenolid có OH ở C_{16} tạo ra huỳnh quang xanh.

6.2.5. Sắc ký

Có thể dùng sắc ký giấy hoặc sắc ký lớp mỏng.

Với sắc ký giấy, tướng cố định thường dùng là formaldehyd hoặc nước. Có thể dùng một số hệ dung môi: cloroform - tetrahydrofuranformamid (50 : 50 : 6,5), benzen - ethyl acetat - formamid (30 : 69 : 1), *n*-butanol bão hòa nước, toluen - butanol bão hòa nước.

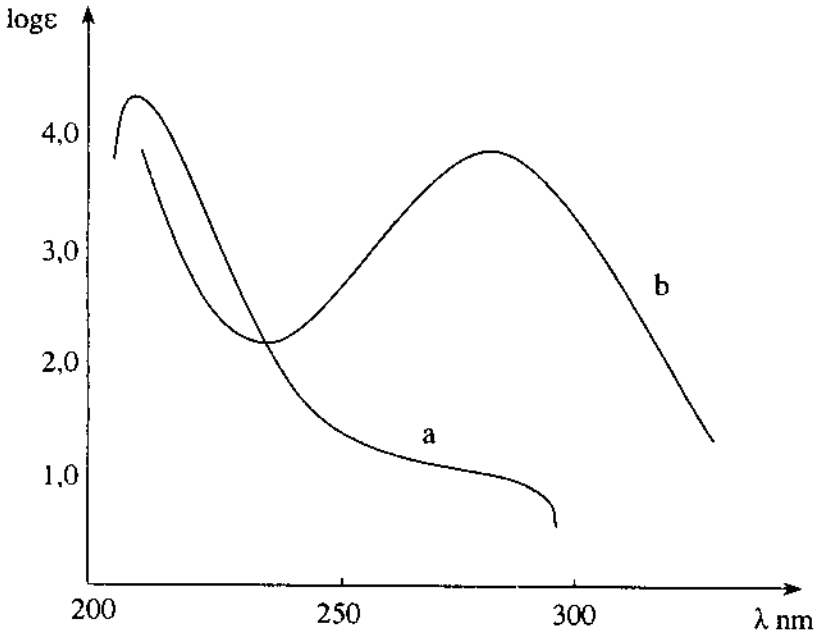
Với sắc ký lớp mỏng silicagel G, có thể dùng một số hệ dung môi: ethyl acetat-methanol - nước (80 : 5 : 5), cloroform - pyridin (60 : 60), cloroform - methanol (92 : 8), butanol - acid acetic - nước (100 : 4 : 24), (100 : 10 : 30), ethyl acetat - pyridin - nước (5 : 1 : 4), diclomethan - methanol - formamid (80 : 19 : 1).

Để thể hiện màu với các cardenolid có thể dùng thuốc thử Baljet, thuốc thử Kedde, thuốc thử Svendsen - Jensen..., với các hợp chất có đường 2 - desoxy, có thể dùng thuốc thử xanthydrol.

6.2.6. Quang phổ

Trong vùng tử ngoại, nhóm cardenolid có đỉnh hấp thụ cực đại 215 – 218 nm và logε khoảng 4,1; nếu trong phân tử có thêm nhóm carbonyl (ví dụ strophanthidin) thì có đỉnh hoặc vai ở 272 – 305 nm, còn các dẫn chất bufadienolid thì có đỉnh hấp thụ cực đại ở khoảng 300 nm logε khoảng 3,7.

Trong vùng hồng ngoại, nhóm bufadienolid do có vòng coumalin (=pyran-2-on) có các đỉnh hấp thụ ở 1730 cm^{-1} và 2 đỉnh ở 1640 và 1540 cm^{-1}.



a. Phổ tử ngoại của cardenolid

b. Phổ của bufadienolid

6.3. Định lượng

6.3.1. Định lượng bằng phương pháp lý - hóa

Định lượng các glycosid tim là công việc tinh tế do sự phức tạp của các thành phần hóa học của dược liệu và do hàm lượng glycosid tim thấp. Thường dùng các phương pháp lý – hóa. Các phương pháp này dễ làm, nhanh chóng và ít tốn kém.

6.3.2. Định lượng bằng đo màu

Thông thường được tiến hành sau khi thủy phân acid và chiết xuất genin. Phản ứng màu hay dùng là phản ứng Kedde. Nhược điểm của phương pháp là chỉ xác định được hàm lượng của glycosid tim toàn phần mà không cho biết được chính xác hàm lượng glycosid chính cần biết để phục vụ cho công tác điều trị.

6.3.3. Định lượng sau khi làm sắc ký lớp mỏng

Sau khi làm sắc ký lớp mỏng, có thể định lượng những glycosid tim chính cần khảo sát bằng mật độ quang học các vết sắc ký hoặc bằng so màu sau khi ngâm tách.

Dược điển Pháp X (1986 - 1996) và Dược điển Anh 1998, tập I yêu cầu lá Digital (*Digitalis purpurea* L.) sấy khô phải chứa 0,3% glycosid tim (tính theo digitoxin) so với dược liệu khô.

6.3.4. Định lượng bằng phương pháp sắc ký lỏng cao áp

Những năm gần đây, người ta dùng phương pháp sắc ký lỏng cao áp. Phương pháp này cho biết hàm lượng glycosid tim toàn phần và tỉ lệ của các glycosid khác trong dược liệu.

6.3.5. Định lượng bằng phương pháp sinh vật

Một số Dược điển có nói đến phương pháp sinh vật. Dược điển Việt Nam I, 1971; Dược điển Liên Xô, 1968 có nói đến các đơn vị ếch và đơn vị mèo. Dược điển Liên Xô X còn nói đến đơn vị bồ câu (liều tối thiểu gây chết tính theo 1kg thể trọng).

Đơn vị ếch là liều tối thiểu của dược liệu hay glycosid tim làm cho đa số ếch trong một lô ếch thí nghiệm bị tim ngừng đập. Thí nghiệm được tiến hành trong những điều kiện quy định.

Đơn vị mèo là liều tối thiểu của dược liệu hay glycosid tim làm cho tim mèo ngừng đập tính theo 1 kg thể trọng. Thí nghiệm được tiến hành trong những điều kiện quy định.

Theo Dược điển Mỹ XXVI (2003), hoạt lực của lá Digital (*Digitalis purpurea* L.) phải đạt yêu cầu là 100 mg lá phải tương đương với không dưới 1 đơn vị lá Digital theo quy định của Dược điển Mỹ. Thí nghiệm được tiến hành trên bồ câu.

VII. TÁC DỤNG DƯỢC LÝ

7.1. Tác dụng trên tim

Các glycosid tim thể hiện hoạt tính trên tim với nhiều mức độ khác nhau: cường độ và tốc độ co bóp, tần số, dẫn truyền. Những kết quả này được thể hiện qua những thay đổi của điện tim đồ được quan sát trong quá trình điều trị.

- Tăng sự co bóp: các glycosid tim làm tăng lực và tốc độ co bóp của cơ tim. Với bệnh nhân thiểu năng tim, hiệu quả tăng co cơ được thể hiện bằng sự tăng cung lượng tim, tăng hoạt động cơ tim mà không làm tăng tiêu thụ oxy, làm chậm tần số và gián tiếp làm giảm những chịu đựng động mạch. Các glycosid tác động ở màng vừa ức chế Na - K ATpase, điều này dẫn đến làm tăng nồng độ Ca đã ion hóa trong tế bào.

- Với người thiểu năng tim: các glycosid tim làm giảm tần số (hiệu quả làm giảm nhịp) do sự thay đổi hoạt động điều hòa thần kinh thực vật (hiệu quả gián tiếp giống thần kinh phế vị).

- Tác động ở mức dẫn truyền: tác dụng giảm dẫn truyền cơ (nguồn gốc tiết cholin) được thể hiện bằng sự làm chậm tốc độ dẫn truyền đến tiếp nối nhĩ thất, sự kéo dài thời gian trơ của nút nhĩ - thất (do đó có ứng dụng trong các rối loạn nhịp trên thất. Không có tác dụng đối với dẫn truyền trong tim).

Với bệnh nhân thiểu năng tim, sự co bóp bị giảm, cung lượng tim giảm (giảm phân số phóng), tồn dư hậu tâm thu và sự tiêu thụ oxy đều tăng, tần số tăng, sự giảm co bóp dẫn đến hoạt tính phản xạ co mạch giao cảm. Cung lượng thận giảm đi, xuất hiện sự lưu giữ nước - natri và phù nề. Các thuốc cường tim vừa làm tăng cung lượng cơ tim, làm suy giảm hoạt tính phản xạ co cơ giao cảm; sự kháng lại việc phóng thất giảm, sự hồi lưu tĩnh mạch được cải thiện, tần số có khuynh hướng chậm lại.

7.2. Tác dụng trên hệ thần kinh trung ương

Người ta nhận thấy các trung tâm gây nôn và trung tâm thị lực bị kích thích. Các hiện tượng không mong muốn này thể hiện nếu dùng thuốc quá liều.

7.3. Tác dụng trên hệ tiết niệu

Các glycosid tim có tác dụng gián tiếp lợi tiểu do tăng lưu lượng máu, do đó làm tăng sự lọc ở cầu thận và bài tiết nước tiểu.

VIII. DƯỢC ĐỘNG HỌC

Dược động học của glycosid tim phụ thuộc vào độ phân cực của các phân tử, đặc biệt vào mức độ hydroxyl hóa của genin. Digitoxin có ít các nhóm OH, nên có tính ái dầu. Bằng đường uống, digitoxin được tiêu tan nhanh chóng và hoàn toàn. Digitoxin được gắn chặt chẽ vào các protein của huyết tương và sự thải trừ qua đường mật và thận bị chậm trễ (thời gian nửa cuộc sống là hơn 6 ngày). Trái lại, digoxin ít ái dầu hơn lại khó tiêu tan ở ruột (80%), ít gắn với protein huyết tương, khuếch tán nhanh chóng vào các mô. Digoxin ít bị chuyển hóa và chủ yếu được loại trừ khỏi cơ thể một cách khá nhanh chóng qua đường tiết niệu (thời gian nửa cuộc sống là 36 giờ). Hợp chất rất dễ phân cực như uabain phải được dùng bằng đường tĩnh mạch (sự hấp thu qua đường tiêu hóa là rất kém) và việc bài tiết qua thận lại nhanh chóng.

IX. SỬ DỤNG CÁC DƯỢC LIỆU CHỨA GLYCOSID TIM

Ngày nay, người ta ít sử dụng các dược liệu chứa glycosid tim dưới dạng dược liệu hoặc dạng bào chế của dược liệu do tác dụng không ổn định mà chỉ dùng các hoạt chất của các dược liệu đó.

Tại nhiều nước, người ta sử dụng nhiều glycosid tim chiết xuất từ lá Digital (*Digitalis purpurea* L., *D. lanata*). Hoạt chất ouabain lấy từ *Strophanthus* đã trở thành mặt hàng lưu thông trên thị trường thuốc.

9.1. Độc tính

Đáng lưu ý là với glycosid tim liều điều trị và liều độc lại rất gần nhau. Nhiều yếu tố có làm tăng mức độ tác dụng của thuốc như thiếu máu cục bộ cơ tim, giảm kali – máu và tăng calci – máu.

Ngộ độc gây ra các rối loạn nhịp tim với ngoại tâm thu tâm thất, gây chết người do tim ngừng hoạt động.

Tuy nhiên, ngay với liều điều trị, cũng có thể xảy ra các phản ứng không mong muốn như không dung nạp tiêu hóa (nôn mửa, ỉa chảy).

9.2. Dạng bào chế

Đa phần các dược liệu dùng để chiết xuất các glycosid tim: digitoxin (Digital tía và Digital lông), digoxin (Digital lông), scillaren (*Urginea scilla*), ouabain (*Strophanthus gratus*).

9.3. Chỉ định

Các glycosid tim được chỉ định trong các trường hợp thiểu năng tim và rối loạn nhịp (chứng tim đập nhanh, loạn nhịp tâm thất, rung tim tâm nhĩ).

Việc lựa chọn thuốc tùy thuộc vào mức độ cấp thiết của việc điều trị. Liều lượng dùng không theo nguyên tắc chung mà theo từng cá nhân. Việc điều trị gồm hai giai đoạn:

- Điều trị tấn công với liều 0,5 mg dùng theo đường uống hay tiêm tĩnh mạch.

- Điều trị duy trì với liều hàng ngày vào khoảng 0,1mg và phải tính toán một cách chính xác tùy theo sự bài tiết qua đường tiết niệu và trạng thái bệnh nhân.

9.4. Những điều chú ý khi sử dụng

Các glycosid tim là các vị thuốc độc, nên phải thận trọng khi sử dụng, tùy theo:

- Trạng thái bệnh nhân, như digitalin không dùng với bệnh nhân thiểu năng

gan, digoxin không dùng với bệnh nhân thiểu năng thận.

- Tác dụng của thuốc dùng phối hợp như các thuốc chống loạn nhịp, các thuốc phong bế β làm giảm hoạt lực của các glycosid tim.

- Sự cân bằng các ion (K^+, Na^+, Mg^{2+}).

Việc sử dụng dòi hỏi phải có sự theo dõi lâm sàng và sinh học trên bệnh nhân.

X. CÁC DƯỢC LIỆU CHỨA GLYCOSID TIM

10.1. Digital tía (= Dương địa hoàng hoa tím) (*Digitalis purpurea* L.)

Mô tả:

Digital tía là cây cỏ, sống 2 năm, mọc phổ biến ở Tây Âu trên đất silic.

Ở năm sinh trưởng đầu tiên, cây mọc ra ở gốc các lá hình trái xoan, thuôn, xếp thành hoa thị, trong suốt cả mùa đông. Sang năm thứ hai, cây mọc ra thân mang hoa cao 1 – 1,50m, mang lá mọc cách. Cụm hoa mọc ở ngọn, gồm chùm hoa mọc thõng xuống. Hoa mẫu 5, tràng hình ống (có hình dạng ngón tay của tất tay) màu đỏ ở mặt ngoài, mặt trong nhạt hơn, họng có lông và có những điểm đỏ sẫm, xung quanh có viền trắng. Quả nang, mở bằng cắt vách, chứa nhiều hạt nhỏ.

Nguồn gốc:

Dược liệu thuộc hai nguồn gốc:

- Hoang dại: Pháp (Vosges, Forêt –noire).

- Trồng trọt (Hà Lan, Hoa Kỳ...): Cây được tuyển chọn và cải hoán nhằm tạo ra các chủng giầu các glycosid nhóm A. Công việc phơi sấy rất tinh tế, được thực hiện dưới 50°C.

Bộ phận dùng:

Lá được sấy khô. Bảng A.

Thành phần hóa học:

Lá chứa:

- Nước: 5%. Hàm lượng không được cao do hoạt chất dễ bị phân hủy.

- Hoạt chất là các glycosid tim kiểu cardienolid với hàm lượng 0,1 – 0,4% so với dược liệu khô. Có hai nhóm:

Nhóm A trong đó genin là digitoxigenin (có OH ở 3 và 14). Glycosid cấp 1 là purpureaglycosid A gồm 4 ose (1 glucose + 3 digitoxose) liên kết với nhau và đính vào digitoxigenin ở 3. Bằng thủy phân do enzym (mất 1 glucose), sẽ được 1

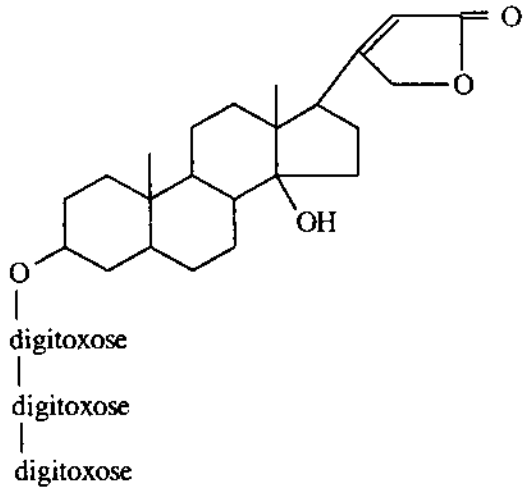
glycosid cấp 2 là digitoxosid hay digitoxin hay digitalin. Chất này chiếm 50% trong số các glycosid tim của lá digital tía. Digital tía là nguyên liệu chính để sản xuất digitalin.

Nhóm B gồm hai phân nhóm chính:

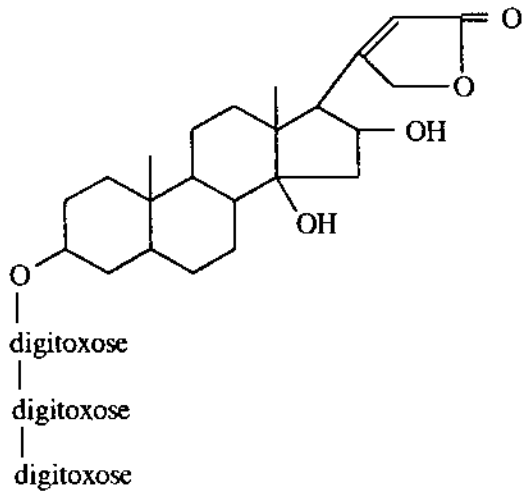
- Phân nhóm gitoxigenin (có OH ở 3 và 14, 16) gồm glycosid cấp 1 hay purpureaglycosid B (gồm 3 digitoxose + gitoxigenin) và sản phẩm do thủy phân bởi enzym (gitoxin). Gitoxin là glycosid tim yếu.

- Phân nhóm 16 - formyl gitoxigenin hay gitaloxigenin (có OH tự do ở 3, 14) và OH đã được ester hóa bằng acid formic ở 16).

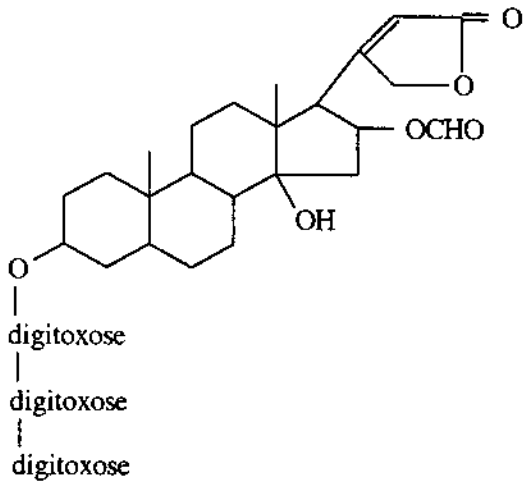
Gitaloxin (gitaloxigenin +3 digitoxose) độc hơn digitoxin và là chất không ổn định.



Digitoxin



Gitoxin



Gilatoxin

- Các thành phần khác bao gồm các hợp chất flavonoid trong đó có luteolin, các saponin sterolic (digitonosid hay digitonin), các digitanol - glycosid hay digienol - glycosid có nhân sterol, không có vòng lacton và không có tác dụng sinh lý.

Công dụng:

Digital tía có thể dùng dưới dạng bào chế của dược liệu (bột digital, cồn thuốc digital) hoặc nguyên liệu để chiết xuất glycosid tim (digitoxin (bảng A), dung dịch uống) hay viên nén, gitaloxin dùng dưới dạng viên.

Tại Việt Nam, từ lá digital tía di thực, Nguyễn Văn Đàn và cộng sự (cs.) đã chiết xuất được digitoxin (hiệu suất 0,00345%), gitoxin (hiệu suất 0,0124%) và hỗn hợp glycosid tim (đặt tên là ditozit (hiệu suất 0,03%)). Digitoxin và gitoxin được nhận dạng bằng điểm chảy so với tài liệu, sắc ký lớp mỏng, các phổ tử ngoại, hồng ngoại so với mẫu chuẩn (Viện Dược liệu. Công trình nghiên cứu khoa học, 1972 – 1986).

Phạm Duy Mai và cs. đã chứng minh ditozit thí nghiệm trên mèo có những tác dụng điển hình đối với hoạt động tim như một số glycosid tim khác, ditozit có hoạt tính sinh vật tương đối cao, bằng 75% hoạt tính sinh vật của digitoxin, ditozit được hấp thu hoàn toàn qua đường tiêu hóa, ditozit có độ tích lũy thấp hơn digitoxin.

Điều trị ditozit trên 35 bệnh nhân, Trần Đỗ Trinh có những nhận xét:

- 2 bệnh nhân phải ngừng thuốc do biến chứng nhồi máu phổi.
- 22 bệnh nhân đạt hiệu quả cao, hết hoàn toàn các triệu chứng suy tim.
- 6 bệnh nhân đạt hiệu quả vừa, giảm hẳn các triệu chứng suy tim.

- 5 bệnh nhân hiệu quả ít, chỉ đỡ chút ít, các triệu chứng cơ năng và thực thể như đỡ ho, đỡ khó thở, nhưng gan còn to nhiều hoặc to như lúc vào viện.

- Không có trường hợp nào bệnh nhân nặng thêm (Viện Dược liệu. Công trình nghiên cứu khoa học, 1972 – 1986).

10.2. Digital lông (*Digitalis lanata* Ehrh.)

Mô tả

Digital là cây cỏ sống dai ưa đất vôi, có nguồn gốc từ Trung Âu. Thân mọc thẳng đứng, gốc màu tím. Lá dạng ngọn giáo, xanh ve sẫm, nhẵn. Cụm hoa chùm nhẵn tận cùng, dài, gồm nhiều hoa hình ống, lá đài nhiều lông, tràng trắng xám, có gân nâu. Quả: nang mở chứa nhiều hạt nhỏ.

Nguồn gốc:

Cây trồng. Nơi sản xuất chính là Tây Âu, Trung Âu và Hoa Kỳ.

Bộ phận dùng:

Lá đã được sấy khô. Bảng A.

Thành phần hóa học:

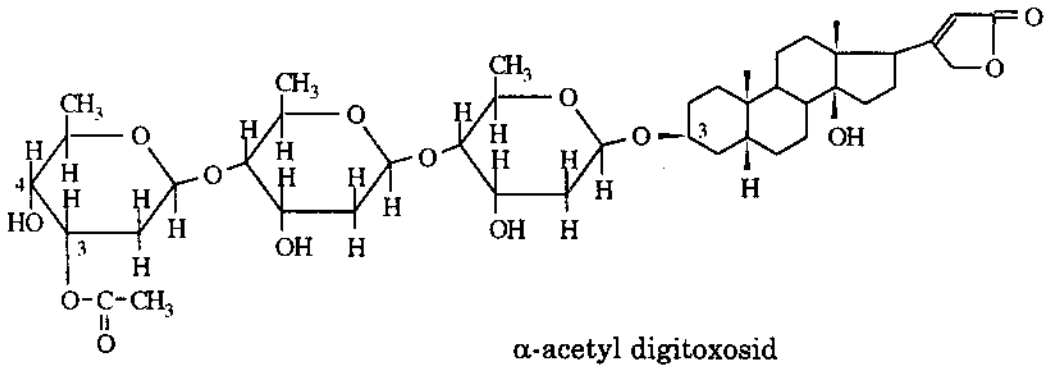
Lá chứa các hoạt chất là các glycosid tim kiểu cardenolid với hàm lượng 0,5 - 1% so với dược liệu đã sấy khô. Có nhiều nhóm:

Nhóm A có genin là digitoxigenin.

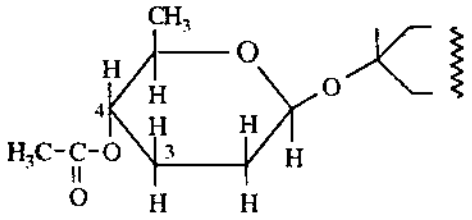
Glycosid cấp 1 là lanataglycosid A hay lanatosid A.

Lanataglycosid A khác với purpureaglycosid A do sự có mặt của nhóm acetyl đính vào digitoxose đứng xa với genin. Tuỳ theo vị trí nhóm acetyl ở 3 hoặc 4 của digitoxose người ta có 2 đồng phân α và β. Các dẫn chất acetyl β có tác dụng sinh lý mạnh nhất.

Dưới tác dụng của β-glucosidase, không còn glucose ở vị trí tận cùng và có sự hình thành acetyldigitoxosid hoặc acetyldigitoxin.



α-acetyl digitoxosid



β-acetyl digitoxosid

Dưới tác dụng của esterase, nhóm acetyl sẽ mất đi và người ta được purpurea glycosid A. Tác dụng liên hiệp của hai enzym sẽ tạo ra digitoxosid.

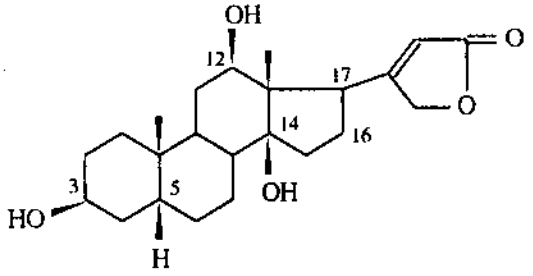
Nhóm B chia làm hai phân nhóm:

Phân nhóm gitoxigenin gồm lanataglycosid B hoặc lanatosid B (glycosid cấp 1), desacetyllanatosid B (purpureaglycosid B), acetylgitoxosid và gitoxosid.

Phân nhóm 16 – formyl gitoxigenin gồm lanataglycosid E hay lanatosid E và acetylgitalosid.

Nhóm này ít quan trọng về tác dụng sinh lý.

Nhóm C là nhóm quan trọng. Nhóm này chiếm 30 – 40% các glycosid toàn phần. Genin hay digoxigenin chứa 3 OH theo hướng 3 β, 12 β, và 14 β. Glycosid cấp 1 tương ứng với lanataglycosid C (lanatosid C) kèm theo acetyldigoxosid và digoxosid.



Digoxigenin

Nhóm D trong đó genin mang 4 gốc OH ở 3 β, 12 β, 14 β, 16 β là diginagenin. Nhóm này gồm lanataglycosid D hay lanatosid D và các glycosid cấp 2. Nhóm này ít quan trọng.

	Nhóm A	Nhóm B (a)	Nhóm B (b) (= nhóm E theo vài tác giả)	Nhóm C	Nhóm D
Genin / Ose	Digitoxigenin OH ở 3, 14	Gitoxigenin OH ở 3, 14, 16	16 formyl-gitoxigenin	Digoxigenin OH ở 3, 12, 14	Diginatigenin OH ở 3, 14, 16
Glucose – acetyl – digitoxose – digitoxose	Lanatosid A	Lanatosid B	Lanatosid E (= 16-formyl lanatosid B)	Lanatosid C	Lanatosid D
Glucose – digitoxose-digitoxose-digitoxose	Desacetyl lanatosid A (= purpurea glycosid A)	Desacetyl-lanatosid B (= purpurea-glycosid B)		Desacetyl lanatosid C	Desacetyl lanatosid D
Acetyl-digitoxose – digitoxose-digitoxose	Acetyl - digitoxosid	Acetyl - gitoxosid	Acetyl - gitaloxosid	Acetyl - digitoxosid	Acetyl – diginatosid
Digitoxose-digitoxose-digitoxose	Digitoxosid	Gitoxosid		Digoxosid	Diginatosid

Tác dụng sinh học

Digital lông có độ độc gấp 3 – 4 lần so với digital tía. Digital lông có tác dụng co sợi cơ rõ nét hơn. Tác dụng này do các glycosid nhóm C. Digoxin có tác dụng dược động học khác với digitoxin: ít tan trong dầu, hấp thu qua đường tiêu hóa yếu, bám dính với albumin của huyết tương giảm đi, thải trừ nhanh, chủ yếu qua thận. Như vậy tác dụng nhanh, nhưng ngắn.

Công dụng

Digital lông là nguyên liệu để chiết xuất glycosid tim và là nguồn nguyên liệu chính để chiết xuất glycosid tim của các loài digital. Từ đây, người ta không những chiết xuất các glycosid nhóm C mà còn cả các glycosid nhóm A.

Các chế phẩm được sử dụng:

- Digoxin (bảng A) (0,10 – 0,20 mg/ 24 giờ).
- Lanatosid C (1 – 4 mg / 24 giờ).
- Desacetyllanatosid C (0,75 – 1,5 mg / 24 giờ).
- Acetyl digitoxin (0,2 mg / 24 giờ).

Các liều nói trên tương ứng với các liều trung bình duy trì. Cần theo dõi điều trị chặt chẽ.

10.3. Các loài Strophanthus trên thế giới

S. gratus (Wall. et Hook.) Baillon và *S. kombe* Oliver, họ Trúc đào (Apocynaceae).

Các loài *Strophanthus* có nguồn gốc từ châu Phi. Đó là những cây nhỏ hoặc dây leo, lá mọc đối, dạng ngọn giáo. Hoa mẫu 5, tràng màu trắng đến hồng, xẻ thành 5 thùy, đỉnh của mỗi thùy kéo dài thành dải hẹp và xoắn (*S. kombe*). Quả: 2 đại chứa nhiều hạt có cán mang mào lông.

Bộ phận dùng

Hạt (bảng A).

Hạt hình trứng, dẹt, dài 10 – 20 mm. Trên thị trường, hạt không còn mồng. Hạt có thể nhẵn, màu tím (*S. gratus*) hoặc có lông tơ, màu xanh ve xám (*S. kombe*).

Nguồn gốc

Hoang dại, thu hái ở Đông Phi (*S. gratus*) hoặc Tây Phi (*S. kombe*).

Thành phần hóa học

Dược liệu chứa 20 – 30% lipid.

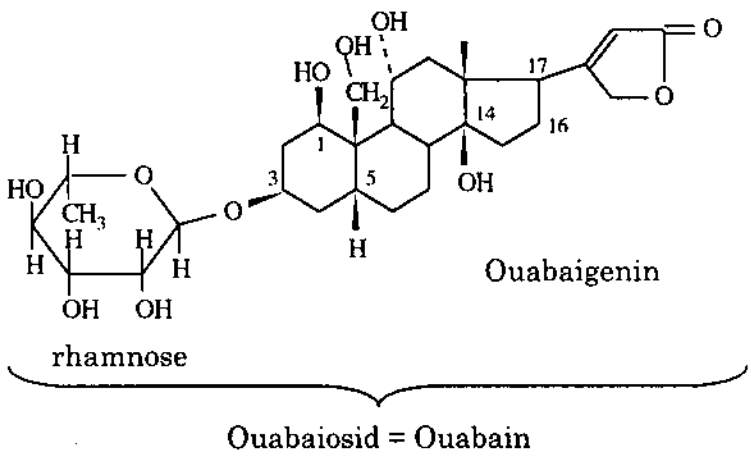
Hoạt chất là các glycosid tim kiểu cardenolid với hàm lượng cao.

Thành phần hóa học thay đổi tùy theo hai loài.

10.3.1. Strophanthus gratus (Wall. et Hook.) Baillon

Strophanthus gratus chứa 3 – 7% glycosid tim với thành phần chủ yếu là ouabain hay ouabaiosid (G-strophantin).

Ouabain gồm có 1 genin là ouabaigenin với nhiều nhóm OH và một đường là *L*-rhamnose. Ouabain dễ tan trong nước.



10.3.2. Strophanthus kombe Oliver

Strophanthus kombe chứa 5 – 10% glycosid tim là hỗn hợp nhiều K-strophanthosid (K-strophantin). Đó là các K- strophanthosid γ, β, α: K-strophanthosid γ là glycosid cấp 1. Còn các K-strophanthosid β và γ được tạo ra do sự thủy phân bởi enzym tiến hành dần dần. Bằng thủy phân acid, người ta thu được 1 genin là cymarigenin hay strophanthidin, chất này có ít nhóm OH hơn ouabaigenin và có 1 nhóm chứa aldehyd ở 10.

Tác dụng sinh học

Trước kia, các loài *Strophanthus* là các chất độc tẩm tên độc, có độc tính với tim.

Với liều nhỏ, các hoạt chất có tác dụng cường tim, tác dụng điều nhịp không rõ, co cơ mạnh.

- Ouabain không hấp thụ qua đường tiêu hóa, có tính phân cực mạnh, không bị chuyển hóa mà bị thải trừ nguyên vẹn qua đường tiết niệu. Ouabain không gắn vào protein của huyết tương. Như vậy tác dụng nhanh, thời gian lại ngắn. Đó là thuốc cấp cứu tiêm tĩnh mạch.

- K- strophanthosid có tác dụng tương tự như ouabain, nhưng hoạt tính yếu hơn và thời gian lại kéo dài hơn.

Công dụng

Các loài *Strophantus* có công dụng hạn chế trong điều trị. Ouabain (bảng A) dùng làm thuốc cường tim trong cấp cứu, tiêm tĩnh mạch.

Các K-strophanthin lấy từ *S. kombe* ít được sử dụng.

10.4. Các loài Strophanthus ở Việt Nam

10.4.1. Sừng trâu

(*Strophanthus caudatus* Kuntze var. *α-macrocephalus* Franch.)

Đoàn Thị Nhu và cs. đã chiết xuất được glycosid tim toàn phần từ hạt cây sừng trâu dưới dạng bột vô định hình và chứng minh cao nước hạt cây sừng trâu có tác dụng rõ rệt đối với tim động vật máu lạnh cũng như máu nóng, làm tăng sức co bóp của tim, tăng trương lực cơ tim, làm chậm nhịp tim, ảnh hưởng đến nhịp tim ở mức độ vừa phải, ít ảnh hưởng đến huyết áp khi tiêm tĩnh mạch, chỉ làm tăng huyết áp rõ rệt với liều độc gần liều chết (tác dụng xuất hiện nhanh), làm tim ngừng đập ở trạng thái co thắt với liều độc đối với động vật máu nóng cũng như máu lạnh, với tim cô lập cũng như nguyên vẹn, làm tăng trương lực cơ

nhẵn ruột (Viện Dược liệu. Kỷ yếu công trình nghiên cứu dược liệu, 1961 – 1971).

10.4.2. Sừng dê hoa vàng

(*S. divaricatus* (Lour.) Hook. et Arn.)

Sừng dê hoa vàng chứa 9-10% glycosid tim bao gồm divaricosid, divostrosid, sinosid, sinostrosid, caudosid, caudostrosid, sarmutosid. Divaricosid có với hàm lượng cao nhất và hoạt tính mạnh nhất trên tim.

Các glycosid nói trên được hấp thụ chậm ở ruột và không được hoàn toàn. Chúng không được dùng qua đường uống cũng như tiêm dưới da, tiêm bắp. Chúng được loại trừ khỏi cơ thể bệnh nhân sau 5 ngày. Các hiện tượng phụ là nôn mửa, táo bón, đôi khi là loạn nhịp.

Có thể dùng thay thế thuốc strophantin K. Chống chỉ định trong các trường hợp viêm màng ngoài tim, viêm màng trong tim cấp, bán cấp, truy tim do nhiễm trùng cấp.

Chế phẩm dùng là divasid bao gồm các glycosid tim toàn phần của hạt sừng dê hoa vàng, tiêm tĩnh mạch, mỗi ống 0,25 mg/ml pha loãng với glucose (Kee Chang Huang 1999)

Tại Việt Nam từ hạt cây sừng dê hoa vàng mọc hoang dại ở Hà Tĩnh, Trịnh Gia Ân và cs. (1967) đã chiết xuất được một hợp chất (hiệu suất 1%), khảo sát góc quay cực, quang phổ tử ngoại, quang phổ hồng ngoại chất này, khảo sát phần genin, phần đường thấy phù hợp với divaricosid theo tài liệu. Từ năm 1963, Viện Dược liệu chiết xuất từ hạt sừng dê hoa vàng hỗn hợp 3 glycosid tim và gọi là *D*- strophantin. Thí nghiệm trên mèo, Đoàn Thị Nhu và cs. chứng minh hoạt tính của *D*- strophantin bằng 59% ouabain, có tích lũy ở mức độ trung bình, có tác dụng tăng co bóp tâm thu, tăng trương lực cơ tim, liều vừa phải làm giảm nhịp tim và liều cao gây tăng nhịp tim và gây ngừng tim ở tâm thu qua thí nghiệm trên tim ếch cô lập và tim thỏ cô lập (Tạp chí Y học Việt Nam, 1967, số 34 và 1967, số 3-4).

Thí nghiệm *D*- strophantin trên lâm sàng với 20 bệnh nhân, tiêm tĩnh mạch từ 2 ml (1 ống) đến 4 ml (2 ống) tùy theo thể trọng bệnh nhân đối với thuốc, tiêm 2 lần/ngày, tiêm chậm từ khoảng 30 giây đến 1 phút, Đỗ Đình Địch nhận xét như sau:

1. *D*-strophantin là thuốc an toàn, không gây hiện tượng phụ
2. *D*-strophantin có đầy đủ tính chất của thuốc trợ tim nhóm ouabain.
3. *D*-strophantin tác dụng rất nhanh, tác dụng sau 5 phút, nên chỉ định

trong các trường hợp cấp cứu.

4. *D*-strophantin làm chậm mạch nhiều và có hiện tượng tích lũy, nên gần với chế phẩm cedilanid (lanatosid C) hơn là ouabain.

5. Liều *D*-strophantin có tác dụng dùng trong 1 ngày là 2 – 4ml (1/4 mg đến 1/2mg tiêm làm 1 lần). Nếu cần, có thể dùng liều cao hơn bằng cách tiêm thêm một liều thứ 2, nếu sau 6 giờ kết quả chưa thấy rõ rệt trên mạch và bài niệu.

6. Thời gian dùng *D*-strophantin không thể quy định trước là bao nhiêu ngày mà chỉ giới hạn bởi kết quả hoặc bởi nhiễm độc.

10.4.3. Trúc đào

Nerium oleander L.

Tên khác: *Nerium indicum* Miller

Họ Trúc đào (Apocynaceae)

Trúc đào là cây cảnh sống trên nhiều nơi. Tại châu Âu, trúc đào mọc phổ biến ở vùng Địa Trung Hải. Hoa màu hồng, có khi trắng.

Loài *N. odorum* có tràng kép, màu hồng.

Bộ phận dùng

Lá thu hái vào tháng 4 hay tháng 10 – 11. Lá thu hái về, đem sấy khô ở nhiệt độ dưới 50°C.

Thành phần hóa học

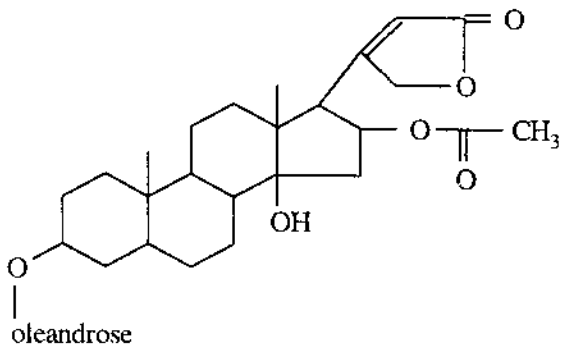
Lá chứa 0,5% glycosid tim với hoạt chất chính là neriolin (hay oleandrin, oleandrosid, folinerin) với hàm lượng 0,08 – 0,15%. Neriolin gồm genin là oleandrigenin (acetoxy – 16 β - gitoxigenin) và đường là oleandrose. Theo Dược điển X Liên Xô trước đây, 1 g neriolin chứa 34.000 – 40.000 đơn vị ếch hoặc 3.600 đơn vị mèo. Neriolin đã được ghi vào Dược điển Việt Nam I.

Năm 1960, Bộ môn Dược liệu Trường Đại học Y Dược Hà Nội đã chiết xuất neriolin. Năm 1962, Vũ Đình Hải và cs. ứng dụng neriolin này điều trị cho 77 bệnh nhân suy tim ở Bệnh viện Việt – Tiệp và có một số kết luận:

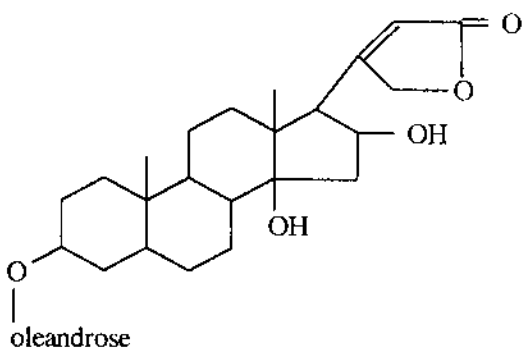
1. Neriolin có tác dụng rõ rệt đối với triệu chứng khó thở.

2. Tác dụng trợ tim đến rất nhanh thường sau 2 – 3 giờ. Neriolin không tích lũy, dễ sử dụng. Điều trị phải liên tục và đủ liều.

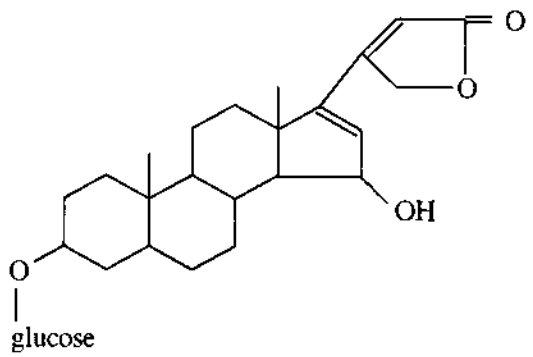
3. Neriolin thích hợp với điều trị lâu dài và ngoại trú ở các phòng khám tim cho các bệnh nhân bị di chứng của thấp khớp cấp mất bù là loại bệnh tim phổ biến ở Việt Nam.



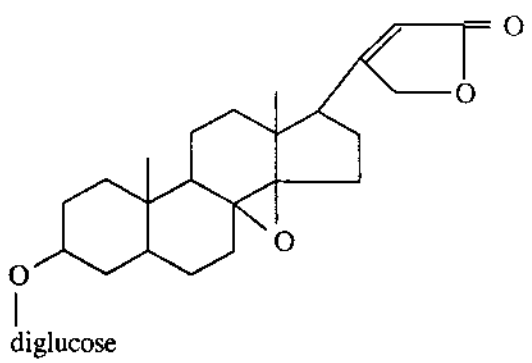
Oleandrin



Desacetyl oleandrin



Neriantin



Adynerin

Thuốc được dùng dưới hai dạng: Dung dịch neriolin trong cồn 95° 0,022%, viên nén neriolin 0,0001 g.

Ngoài ra, lá trúc đào còn chứa desacetyloleandrin (hoạt tính sinh vật 6000 đơn vị ếch), neriantin (không có OH ở C_{14}, hoạt tính thấp), adynerin (không có OH ở C_{14}) không có tác dụng trên tim.

10.4.4. Thông thiên

Thevetia peruviana (Pers.) K. Schum.

Tên khác: *Thevetia neriifolia* Juss.

Họ Trúc đào (Apocynaceae)

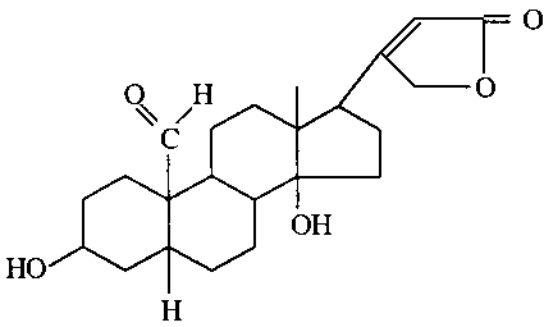
Thông thiên là cây nhỡ có nguồn gốc từ các vùng nhiệt đới, lá gần giống lá trúc đào (neriifolia). Hoa màu vàng, quả hạch có 4 hạt dẹt màu trắng, thường bị lép còn 3 hoặc 2 hạt. Toàn cây có nhựa mủ.

Nguồn gốc

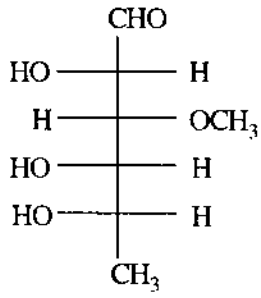
Cây nhập nội được trồng làm cảnh ở nhiều nơi.

Bộ phận dùng

Hạt chứa thevetin là hỗn hợp của thevetin A (= canogenin + *L*-thevetose + *D*-glucose + *D*-glucose) và thevetin B (= digitoxigenin + *L*-thevetose + *D*-glucose + *D*-glucose) với tỷ lệ thevetin A 38%, thevetin B 61%).



Canogenin



L-thevetose

Hiệu suất chiết xuất: 0,5 – 2,5%.

Chỉ có thevetin B có tác dụng cường tim.

Ngoài ra, còn có nhiều glycosid tim khác: neriifolin (= digitoxigenin + *L*-thevetose) 6 – 8%, peruvosid (= canogenin + *L*-thevetose), thevefolin (có thể là uzarigenin + *L*-thevetose); perusetin (acid canogenic + *L*-thevetose)...

Lá cũng có glycosid tim (thevetin B), nhưng với hàm lượng thấp.

Một số tác giả đã nghiên cứu cây thông thiên mọc ở Việt Nam. Đỗ Tất Lợi và cộng sự (1958) đã chiết được từ hạt thông thiên thevetin với hiệu suất 0,5-2,5 % và dầu béo với hiệu suất 40-50% (Những cây thuốc và vị thuốc Việt Nam, 1976).

Những năm sau, Trịnh Gia Ân và cộng sự (1986) đã chiết suất được từ hạt thông thiên hỗn hợp glycosid tim đặt tên là thevozid, từ đó đã phân lập và xác định được 2 chất là neriifolin và cerberin bằng điểm chảy, sắc ký lớp mỏng, các phổ tử ngoại và hồng ngoại. Phạm Duy Mai và cộng sự (1986) đã chứng minh thetozit có tác dụng điển hình của glycosid tim với hoạt tính sinh vật cao tương đương với *D*-strophantin và bằng 68% với *G*-strophantin. Thuốc có độ thải trừ nhanh hơn *G*-strophantin, ít có khả năng gây ngộ độc do tích luỹ khi dùng dài ngày. Thuốc có thể dùng bằng đường uống (Viện Dược liệu. Công trình nghiên cứu khoa học, 1972-1986).

Tác dụng dược lý và công dụng

Thevetin có tác dụng như các chế phẩm của lá Digital. Thuốc có tác dụng nhanh, không tích lũy trong cơ thể, kích thích cơ trơn của bàng quang và ruột, thông tiểu, liều cao gây đi lỏng.

Hoạt tính của thevetin (thevetin A + thevetin B) bằng 1/8 của strophantin G.

Thevetin A và thevetin B cùng với các glycosid khác trong hạt thông thiên có tác dụng an thần và có thể kéo dài giấc ngủ do các barbiturat tạo ra. Tác dụng an thần là do peruvosid B. (Kee Chang Huang 1999).

Có thể dùng dưới hai dạng: Uống và tiêm. Với dung dịch thevetin 1/ 1000, uống 1mg chia làm 3 lần. Dùng quá liều, có thể gây nôn mửa, ỉa chảy.

Với thuốc tiêm, đóng ống thuốc tiêm 2ml, dung dịch 1/1000, tiêm tĩnh mạch.

10.4.5. Đay

Hai loài cho sợi là đay quả dài – *Corchorus olitorius* L. và đay quả tròn – *C.capsularis* L., họ Đay – Tiliaceae.

Năm 1954, G. V. Lazurepski chứng minh hạt đay quả dài chứa olitorisid và corchorosid. Sau này, cả 2 chất này được chứng minh có trong 2 loài đay quả dài và đay quả tròn.

10.4.5.1. Đay quả dài

Đay quả dài: Quả hình trụ, có 10 vạch rõ, nhẵn, thuôn ở đỉnh, mở làm 5 mảnh, mỗi mảnh có 2 đường dọc rõ. Hạt hình quả lê.

10.4.5.2. Đay quả tròn

Đay quả tròn: Quả hình cầu có 10 cạnh khá rõ, có mào ngắn ở đỉnh, mở làm 5 mảnh, mỗi mảnh có 2 dãy hạt. Hạt có cạnh, dẹt.

Nguồn gốc

Đay là cây nhiệt đới. Đay quả dài được trồng ở Ấn Độ, Mã Lai... ở Việt Nam, đay được trồng nhiều ở Hà Nội (quận Long Biên), Hưng Yên, Bắc Ninh, Bắc Giang.

Bộ phận dùng

Hạt.

Thành phần hóa học

Hạt đay quả dài chứa 2,487 – 2,520‰ glycosid toàn phần ; 0,85‰ olitorisid, 1,75‰ corchorosid. Hạt đay quả tròn chứa 1,561 – 1,620‰ glycosid tim.

Hạt đay già tốt hơn hạt non. Hàm lượng glycosid tim trong hạt già 2,57 – 2,62‰ và hạt non 2,35‰.

Để chiết xuất glycosid tim, đầu tiên phải ổn định dược liệu (ngâm hạt trong cồn 70^0 trong 3 giờ). Hàm lượng glycosid / hạt đay đã được ổn định 2,62% và không ổn định 2,35‰.

Olitorisid = strophantidin + boivinose + glucose

Corchorisid + strophantidin + boivinose

Ngoài ra, hạt còn có nhiều glycosid tim khác.

Tác dụng dược lý và công dụng

Olitorisid và corchorosid có tác dụng gần giống strophantidin, không tích lũy. Liều dùng 0,5 – 1ml /ngày, 1 gam olitorisid chứa 60.000 đơn vị ếch. Corchorosid có hoạt tính sinh vật tương tự. Đóng trong ống tiêm 1ml dung dịch 0,04% ngày, tiêm tĩnh mạch 15 ngày liền.

Về tác dụng cường tim, tăng tốc độ co bóp tim, corchorosid có đôi chút kém olitorisid, nhưng lại dễ chịu hơn đối với bệnh nhân.

Bảng A

Từ glycosid toàn phần từ hạt đay, có thể lấy strophantidin, từ đó tạo ra acetylstrophantidin là chất có tác dụng tương tự như digital. Thuốc tiêm tĩnh mạch (tiêm chậm), dùng để điều trị rối loạn nhịp nhĩ và các trường hợp suy tim. Acetylstrophantidin có hoạt tính bằng 1/2 ouabain và đã được đưa vào sử dụng.

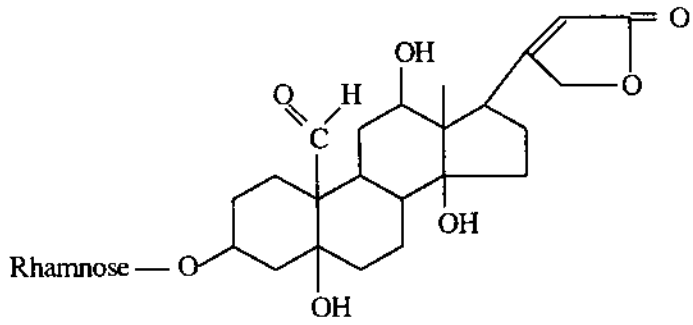
Năm 1977, Bộ môn Hóa dược Trường Đại học Dược Hà Nội đã bán tổng hợp được acetylstrophantidin từ glycosid tim từ hạt đay quả dài. Theo Dương Hữu Lợi (1983), acetylstrophantidin này có tác dụng làm chậm nhịp tim rõ rệt, với liều thấp kéo dài thời khoảng PQ, với liều cao dần có làm cho tim nhiễm độc, thải trừ nhanh, không tích lũy trong 24 giờ với liều tiêm bằng 50% đơn vị mèo. Dung dịch acetylstrophantidin đóng trong ống tiêm bảo quản trong tủ lạnh vẫn giữ được hoạt tính. Acetylstrophantidin do Bộ môn Dược liệu Trường Đại học Y Dược Thành phố Hồ Chí Minh sản xuất đã được dùng tại Bệnh viện Chợ Rẫy Tp. Hồ Chí Minh (1993).

10.5. Một số dược liệu khác chứa glycosid tim

10.5.1. Cây sui (*Antiaris toxicaria* Lesch.)

Hoạt chất từ nhựa mủ vỏ cây sui là các glycosid tim α, β, γ-antiarin có tác dụng trên tim như digital. Với liều cao, nhựa mủ làm ngừng tim và gây ra các

hiện tượng phụ như nôn mửa, co giật. Nhựa mủ tiêm tĩnh mạch với liều 0,3 mg gây chết thỏ trong 12 phút, còn với liều 1 mg gây chết chó trong 3 - 9 phút.



α-antiarin: R = 6-deoxyglucose

β-antiarin: R = rhamnose

Vỏ rễ chứa prenylauron (antiaron A và B), prenylchalcon (antiaron C, D và E) và prenylflavanon (antiaron F, G, H và I). Cao nước ethanol vỏ thân có độc tính với tế bào CA-9KB.

Nhựa mủ phối hợp với nhựa mủ cây giá (*Excoecaria agallocha* L.) dùng để tẩm tên độc ở người dân vùng Đông Nam Á.

Hạt, lá và vỏ thân dùng làm thuốc hạ sốt, hạt dùng chữa lỵ. Vỏ thân cho sợi may quần áo, túi sách, giấy. Vỏ làm chất nhuộm. Gỗ dùng trong xây dựng (Prosea 12 (1), 1999).

10.5.2. Bồng bồng (*Calotropis gigantea* (L.) Dryand ex. Ait.)

Tất cả các bộ phận của cây đều có glycosid tim, do đó có độc. Nhựa mủ chứa các cardenolid calotropin, calotoxin và usharin và có enzym thủy phân đạm calotropain. Vỏ rễ chứa các glycosid calotraposid A và B và các resinol β - calotropeol và giganteol. Thân có giganteol, α- và β-calotropeol. Hoa có β-calotropeol. Lá chứa các cardenolid calotropin và gigantin. Rễ chứa calotropin , frugosid và 4'-O-β-*D*-gluco pyranosyl frugosid. Calotropin có tác dụng kích thích tim và có độ độc bằng 15 – 20 lần so với strychnin. Calotroposid, calotoxosid và usharin có hoạt tính của glycosid tim bằng (theo thứ tự) 83%, 76% và 58% của ouabain. Liều chết của calotropin là 0,12mg / kg.

Nhựa mủ cây bồng bồng quý (*C. procera* (Aiton) Aiton f.) chứa các cardenolid calotropin, calotroposid, calactin, calotoxin, uscharin, uscharidin, voruscharin và procerosid. Ngoài ra, còn có calotropain là enzym thuỷ phân protid.

10.5.3. Mướp sát (*Cerbera odollam* Gaertn.)

Họ Trúc đào – Apocynaceae.

Hạt chứa glycosid tim là cerberin, neriifolin, thevelin B và 2'-O-acetyl-thevelin B. Vỏ thân và rễ chứa gentiobiosyl –thevetosid và glucosylthevetosid cùng một số glycosid tim khác.

10.5.4. Acokanthera schimperi (A. DC.) Schweinf.,

A. ouabai. Họ Trúc đào – Apocynaceae

Rễ và hạt chứa ouabain là glycosid tim lần đầu tiên được chiết xuất từ cây cỏ.

***10.5.5. Apocynum cannabinum* L.,**

Họ Trúc đào – Apocynaceae

Phần dưới mặt đất chứa 0,8% glycosid toàn phần trong đó có 0,28% cymarin và 0,33% K- strophantin β.

***10.5.6. Convallaria majalis* L.,**

Họ Loa kèn trắng – Liliaceae

Phần trên mặt đất chứa 0,1 đến 0,3% cardenolid chủ yếu là convallatoxin (convallatoxosid) có tác dụng cường tim nhanh, nhưng chóng hết và tác dụng lợi tiểu. Dược liệu được ghi vào Dược điển Pháp IX, Dược điển X Liên Xô trước đây.

***10.5.7. Adonis vernalis* L.,**

Họ Hoàng liên – Ranunculaceae

Phần trên mặt đất chứa adenitoxin, chất này khi thủy phân cho adonitoxigenin và *L*- rhamnose. Ngoài ra, còn có cymarin. Adonis vernalis được ghi vào Dược điển X Liên Xô trước đây.

10.5.8. Erysimum canescens Roth.,

Họ Cải – Brassicaceae (Cruciferae)

Phần trên mặt đất chứa glycosid tim; hoa và hạt: 6%, lá 1 – 1,5%, thân 0,5 – 0,7%. Erysimin đã được phân lập từ phần trên mặt đất. Chất này nếu thủy phân sẽ cho strophantidin, digitoxose. Erysimosid nếu thủy phân sẽ cho strophantidin, digitoxose và glucose.

Erysimin được ghi vào Dược điển X Liên Xô trước đây.

10.5.9. Periploca graeca L.,

Họ Thiên lý – Asclepiadaceae

Vỏ thân chứa glycosid tim trong đó có periplocin (= periplogenin + cymarose + glucose). Nếu đem thủy phân bằng enzym, sẽ được periplocymarin gồm genin là periplogenin và cymarose.

10.5.10. Helloborus caucasicum A. Br. *và Helloborus purpurascens* V. et K.,

Họ Hoàng liên – Ranunculaceae

Thân rễ và rễ cả hai loài đều chứa glycosid tim nhóm bufadienolid trong đó genin là hellebrigenin. Một trong hai chất này được gọi là korelborin-K (có trong H. caucasicum), chất thứ hai là hellebrin hay korelborin-P. Chất nói đầu là monosid và chất thứ hai là biosid.

TÀI LIỆU THAM KHẢO CHÍNH

1. British Pharmacopoeia, (1998).
2. *J. Bruneton* (1993). Pharmacognosie. Phytochimie. Plantes médicinales. Tec. Doc. Paris.
3. Dược điển Việt Nam I, (1971).
4. *E. Heftman*. Biokhimia steroidob (1970). Mir. Moskva (bản dịch ra tiếng Nga, (1972).
5. *A. Y. Leung et Steven Foster* (1996); Encyclopedie of common natural ingredients used in food, drugs and cosmetics. – 2nd ed. A. Wiley – Interscience Publication – USA.
6. *Dương Hữu Lợi* (1983); Luận án Tiến sĩ Y học (Trường Đại học Y Hà Nội).
7. *Bùi Hữu Nghĩa* (1993); Luận án Tiến sĩ Dược học (Viện Dược liệu).
8. *M. Paris, M. Hurabielle* (1986); Abrégé de Matière médicale (Pharmacognosie). Masson. Tome 2.
9. Pharmacopée française X.
10. Prosea 12 (1), (1999).
11. Prosea 2, (2001).
12. *Ngô Văn Thu* (1998); Bài giảng Dược liệu. Tập 1. Trường Đại học Y Dược Tp Hồ Chí Minh.
13. US. Pharmacopoeia XXVI (2003).
14. Ghơxudarsvennưie Pharmacopoeia CCCP. X.

28/11 - 387

CHƯƠNG VI
ĐẠI CƯƠNG VỀ SAPONIN VÀ DƯỢC LIỆU CHỨA SAPONIN

PGS.TS. Nguyễn Thượng Dong

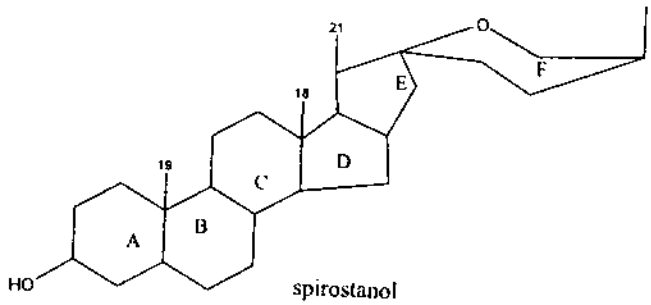
Saponin là nhóm glycosid khi gặp nước tạo thành bọt như xà phòng, có khả năng làm giảm sức căng bề mặt, có tính chất nhũ hoá, có khả năng làm vỡ hồng cầu và độc với một số sinh vật máu lạnh, đặc biệt đối với cá. Tính phá huyết của saponin là dựa trên khả năng liên kết của saponin với cholesterol trong màng bọc của hồng cầu, từ đó hồng cầu tự phá huỷ và các hemoglobin chuyển vào huyết thanh và làm cho huyết thanh có màu. Saponin làm kích ứng niêm mạc gây hắt hơi, đỏ mắt, có tính kháng khuẩn, có tác dụng long đờm, lợi tiểu.

Phân tử của saponin gồm phần aglycon, thường gọi là sapogenin và phần đường. Phần đường có thể là một vài phân tử đường hoặc nhiều hơn. Dựa vào một số tính chất đặc biệt như đã nêu ở trên, đặc biệt là cấu trúc glycosid, nên nhiều tác giả đã xếp cả nhóm glycoancaloid vào nhóm saponin. Saponin là các hợp chất kết tinh hoặc dạng bột vô định hình, tan trong methanol, cồn loãng. Một số saponin có khả năng tan trong nước kiềm nhẹ. Saponin không tan trong ether, clorofoc, aceton và các dung môi hữu cơ khác. Dung dịch nước của saponin thường ở dạng keo, khó thẩm tích. Tính chất này của saponin đã được khai thác trong công đoạn tinh chế khi phân lập chúng.

Phụ thuộc vào cấu trúc hoá học của phần sapogenin mà saponin được chia thành hai nhóm chính: saponin steroid và saponin triterpen.

I. SAPONIN STEROID

Sapogenin của nhóm này cấu trúc bởi khung steroid đặc trưng. Khi dehydro hoá các sapogenin steroid bằng selen thu được hydrocarbon của các dien (methyle-cyclopentanoperhydrophenantren). Các sapogenin steroid có 27 carbon. Ngoài khung steroid đặc trưng (bao gồm 4 vòng A,B,C,D) các sapogenin steroid còn có 2 dị vòng E và F. Các vòng E và F có chung một nguyên tử C_{22} với vòng Spirocetal.

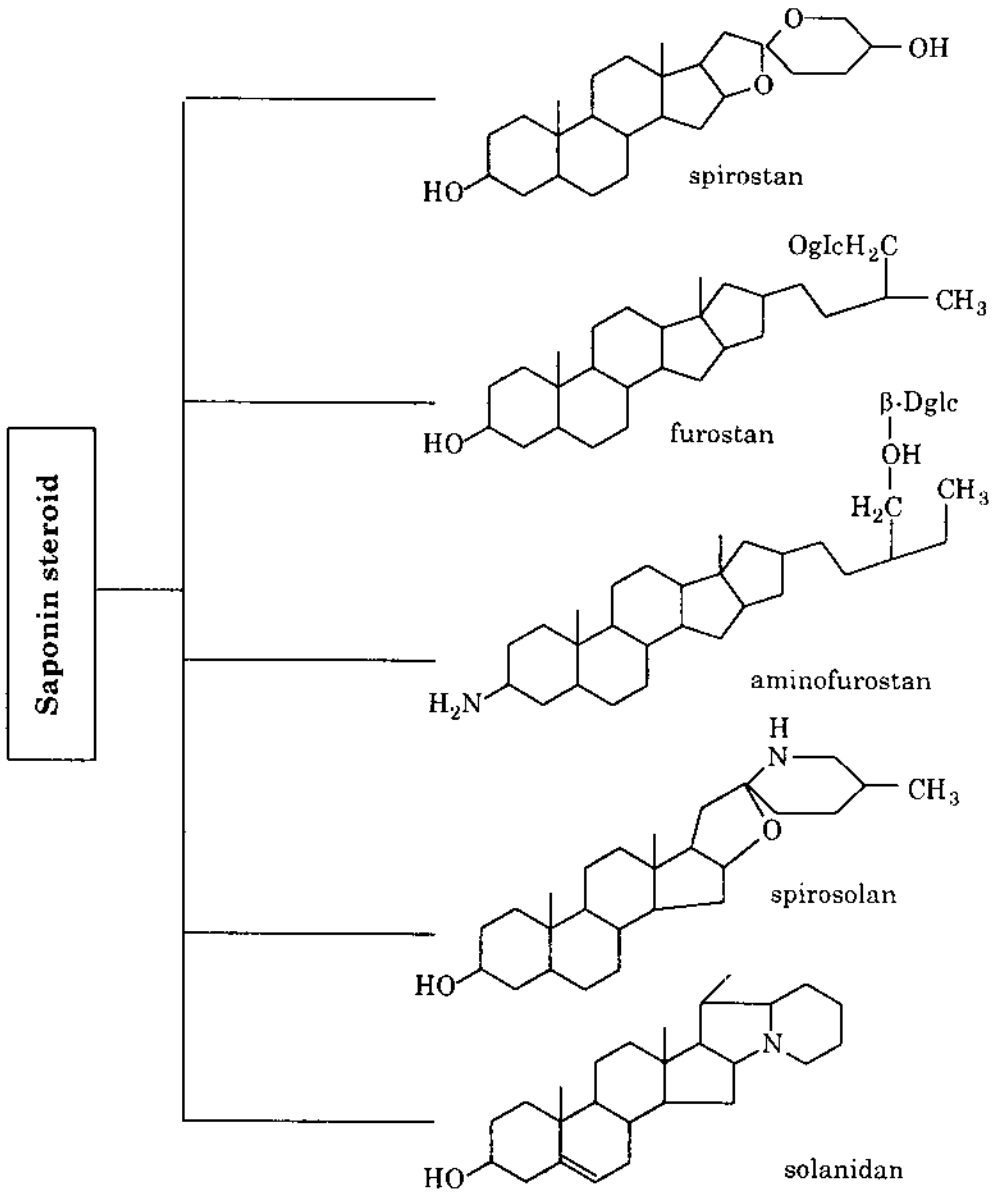


spirostanol

Phần đường thông thường gắn với vòng A tại nhóm OH ở vị trí C_1, C_2, và C_3.

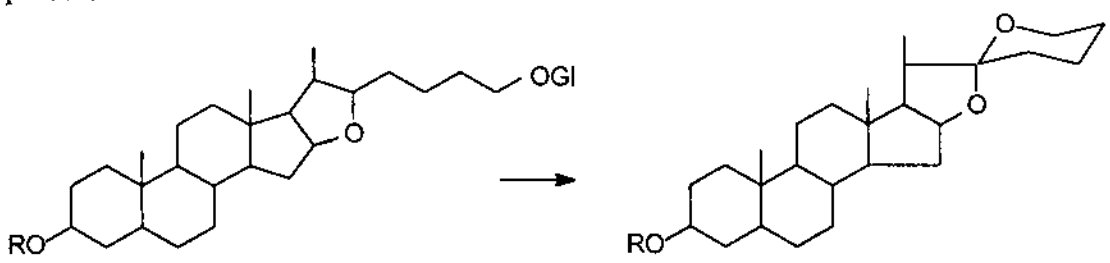
1.1. Phân loại

Saponin steroid được chia thành 5 nhóm: saponin furostanol, spirostanol, aminofurostanol, spirosolanol, solanidanol.



1.1.1. Saponin furostanol

Saponin furostanol có vòng F mở và nhóm OH ở vị trí C_{26} thường gắn với glucosa. Phần đường thường gắn với nhóm OH ở vị trí C_3. Vì phần đường được gắn ở cả 2 vị trí, nên nhóm này còn được gọi là bidesmosid. Khi thủy phân bằng enzym cắt bớt phân tử glucosa ở C_{26}, vòng F đóng lại và ta thu được saponin spirostanol



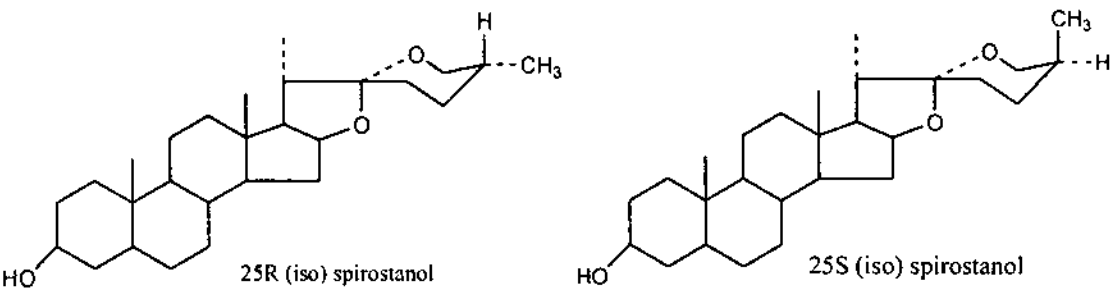
saponin furostanol saponin spirostanol

Saponin thuộc nhóm furostanol không tạo phức với cholesterol, do vậy không có đặc tính phá huyết. Chúng cũng không có tính chất kháng khuẩn như saponin spirostanol. Điều đó lại càng củng cố cho giả thuyết là các nhân tố kháng khuẩn trong thảo mộc tồn tại ở dạng không hoạt động, như là một dạng tiền chất, tồn tại trong tế bào thực vật song song với các enzym phân hủy chúng. Khi cây cỏ bị sây sát, các enzym mới thủy phân chúng thành các chất có tính năng kháng khuẩn.

1.1.2. Saponin spirostanol

Saponin spirostanol thường là đồng nhất. Sự khác biệt trong nhóm này phụ thuộc vào cấu trúc của sapogenin và chủ yếu do vị trí của nhóm OH và CO ở nhiều vị trí khác nhau. Nối đôi thường xuất hiện ở vị trí C_5, nhưng thỉnh thoảng cũng thấy ở C_9 và C_{25}.

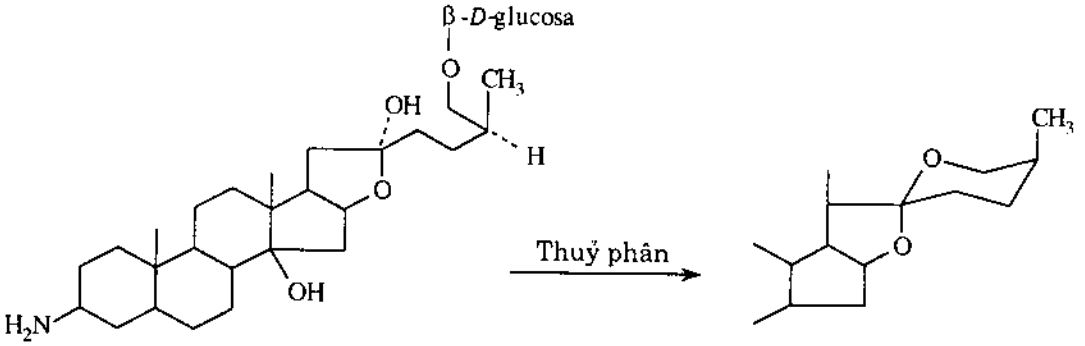
Saponin spirostanol thường tồn tại ở 2 dạng đồng phân C_{25R} (*iso*) và C_{25S} (*neo*). Dạng C_{25R} (*iso*) thường bền hơn C_{25S} (*neo*).



25R (iso) spirostanol 25S (iso) spirostanol

1.1.3. Saponin aminofurostanol

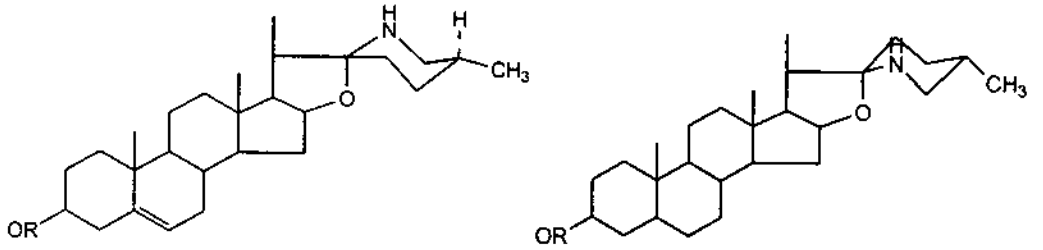
Saponin aminofurostanol điển hình là jurubin, một saponin phân lập được từ cây solanum paniculatum. Ở dãy vòng F mở như trường hợp saponin furostanol, nhưng ở vị trí C_3 lại dính nhóm NH_2



Jurubin Jurubidin

1.1.4. Saponin spirosolanol

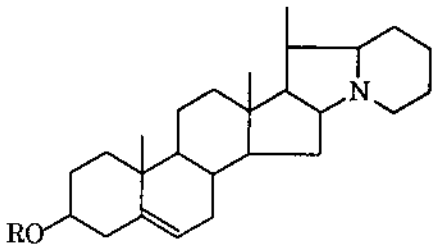
Saponin spirosolanol chỉ khác nhóm spirostanol ở nguyên tử oxy ở vòng F được thay thế bằng NH. Khác với nhóm saponin spirostanol là có dạng isomer ở C_{22} như solasonin phân lập được từ cây cà Úc (*Solanum laciniatum*) có cấu trúc (25R) 22α, còn tomatin có trong cà chua thì lại có cấu trúc (25S) 22β.



Solasonin Tomatin

1.1.5. Saponin solanidanol

Saponin solanidanol mà điển hình là solanin phân lập được từ mầm khoai tây, hai vòng E và F có chung một nguyên tử carbon và nitơ.



Solanin

Các saponin thuộc các nhóm aminofurostan, spirosolan và solanidan đều chứa N, nên vừa mang tính ancaloid vừa mang tính glucoid, nên được gọi là glucoancaloid.

Một số saponin steroid thường gặp

Sapogenin	Cấu hình nhóm CH_3 ở vị trí C_{25}	Vị trí các nhóm				
		OH			CO	Δ
Diosgenin	R*(iso)*			3β		Δ5
Yamogenin	S*(neo)*			3β		Δ5
Smilagenin	R*(iso)*			3β		
Sarsasapogenin	S*(neo)*			3β		
			1β	3β		Δ5
Ruscogenin	R*(iso)*		2α	3β		Δ5
Jucagenin	R*(iso)*		2α	3β		Δ5
Liligenin	S*(neo)*		3β	17α		Δ5
Penogenin	R*(iso)*			3β		
Hecogenin	R*(iso)*	2α	3β	15 β	C_{12}	
Digitogenin	R*(iso)*					

1.2. Phân bố

Saponin steroid thường gặp trong các loài thực vật một lá mầm như các họ Liliaceae (*Smilax*) Dioscoreaceae (*Dioscorea*) Agavaceae (*Agave, Juca*) Amaryllidaceae. Ngoài ra cũng thấy ở các loài hai lá mầm như họ Scrophulariaceae (*Digitalis*), Fabaceae (*Trigonella*) Zygophyllaceae (*Tribulus*). Các bộ phận của cây chứa hàm lượng cao saponin steroid là hạt, rễ, củ rễ, thấp nhất là trong lá. Trong một số loài chỉ chứa saponin furostanol (*Allium*) ở số loài khác lại chứa chủ yếu là saponin spirostanol (*Digitalis*)

1.3. Sinh tổng hợp saponin steroid trong cây thuốc

Nguồn quan trọng nhất để tổng hợp các saponin steroid là các sterol, chủ yếu là cholesterol và sitosterol. Bằng các phương pháp khác nhau người ta đã

chứng minh rằng, tiền chất để sinh tổng hợp các sapogenin steroid là cholesterol. Bằng các cholestorol đánh dấu và chứng minh con đường sinh tổng hợp của các sapogenin steroid trong *Dioscorea tokoro*.

Ngoài ra, năm 1943 Marker và cộng sự đã đưa ra một giả thuyết là sự tạo thành của saponin steroid là từ saponin furostanol. Giả thiết này càng được khẳng định khi cholestorol đánh dấu được phát hiện trong protodioscin, một loại saponin furostanol trong cây *Dioscorea floribunda*. Điều này đã được một số nhà khoa học Nhật Bản chứng minh đối với loài Dioscorea tokoro, furostanol và spirostanol saponin có thể chuyển qua, lại bởi một số enzym đặc trưng.

1.4. Phương pháp chiết xuất

Chiết xuất saponin steroid tinh khiết rất khó khăn vì tính chất hoá lý phức tạp của chúng. Thông thường được tiến hành như sau: Dược liệu được loại chất béo bằng ether dầu hoả hoặc ether, sau đó chiết với methanol hoặc ethanol ở các nồng độ khác nhau, cô thu hồi dung môi và saponin được lắc với butanol và kết tủa với ether hoặc aceton, hỗn hợp saponin toàn phần thu được chạy qua cột hoặc sắc ký lớp mỏng chế luyện cho đến khi thu được saponin tinh khiết.

1.5. Phương pháp phân tích

Phân tích và định tính saponin steroid dựa trên các tính chất đặc trưng của saponin như tạo bọt, phá huyết và phản ứng tạo màu với nhiều loại thuốc thử khác nhau như: acid sulfuric đậm đặc, dung dịch vanilin trong acid sulfuric, antimon clorid hoặc *p*-dimetylaminobenzaldehyd. Dựa trên các phản ứng màu đã nêu trên, nhiều tác giả đã xây dựng thành các phương pháp định tính và định lượng saponin steroid.

Để phân biệt sapogenin spirostanol với nhóm furostanol người ta thường sử dụng thuốc thử Ehrlich, theo đó nhóm glycosid furostanol bao gồm cả pseudosapogenin cho phản ứng màu với thuốc thử Ehrlich, nhưng spirostanol và phytosterol thì không.

Bằng phổ hồng ngoại ngoài khả năng định tính và định lượng saponin steroid còn xác định được các dạng đồng phân iso và neo của sapogenin. Phương pháp này dựa trên nguyên tắc sau: Tất cả các saponin steroid đều có 4 vùng hấp thu đặc trưng trong khoảng từ 1000 đến 800 cm^{-1} . Các vùng đặc trưng đó là:

980, 920, 900 và 865 cm^{-1} . Sapogenin steroid nhóm *iso* có vạch phổ hồng ngoại ở vùng 900 cm^{-1} cao hơn so với vùng hấp thụ ở 920 cm^{-1}. Ngược lại nhóm neo có vạch phổ ở vùng 920 cm^{-1} cao hơn ở vùng 900 cm^{-1}

Ngoài ra còn sử dụng phương pháp sắc ký giấy, sắc ký lỏng hiệu năng cao để định tính và định lượng saponin steroid

1.6. Tác dụng sinh học

Thông thường các saponin steroid được sử dụng như các hợp chất có tác dụng sinh học trong các trường hợp sau:

- Tác dụng kháng khuẩn: nhà nghiên cứu nổi tiếng trong lĩnh vực saponin steroid R.Tschesche đã gọi nhóm chất này là kháng sinh từ các loài thực vật bậc cao.

Kháng virus là đặc tính của một số saponin nhóm steroid trên các virus ở bệnh cúm và herpec.

- Tác dụng hạ cholestorol: Dựa trên tính chất của saponin steroid liên kết tạo phức với cholesterol và làm cân bằng lượng cholesterol trong máu.

- Tác dụng chống viêm thể hiện rõ nhất trong các trường hợp viêm thành mạch.

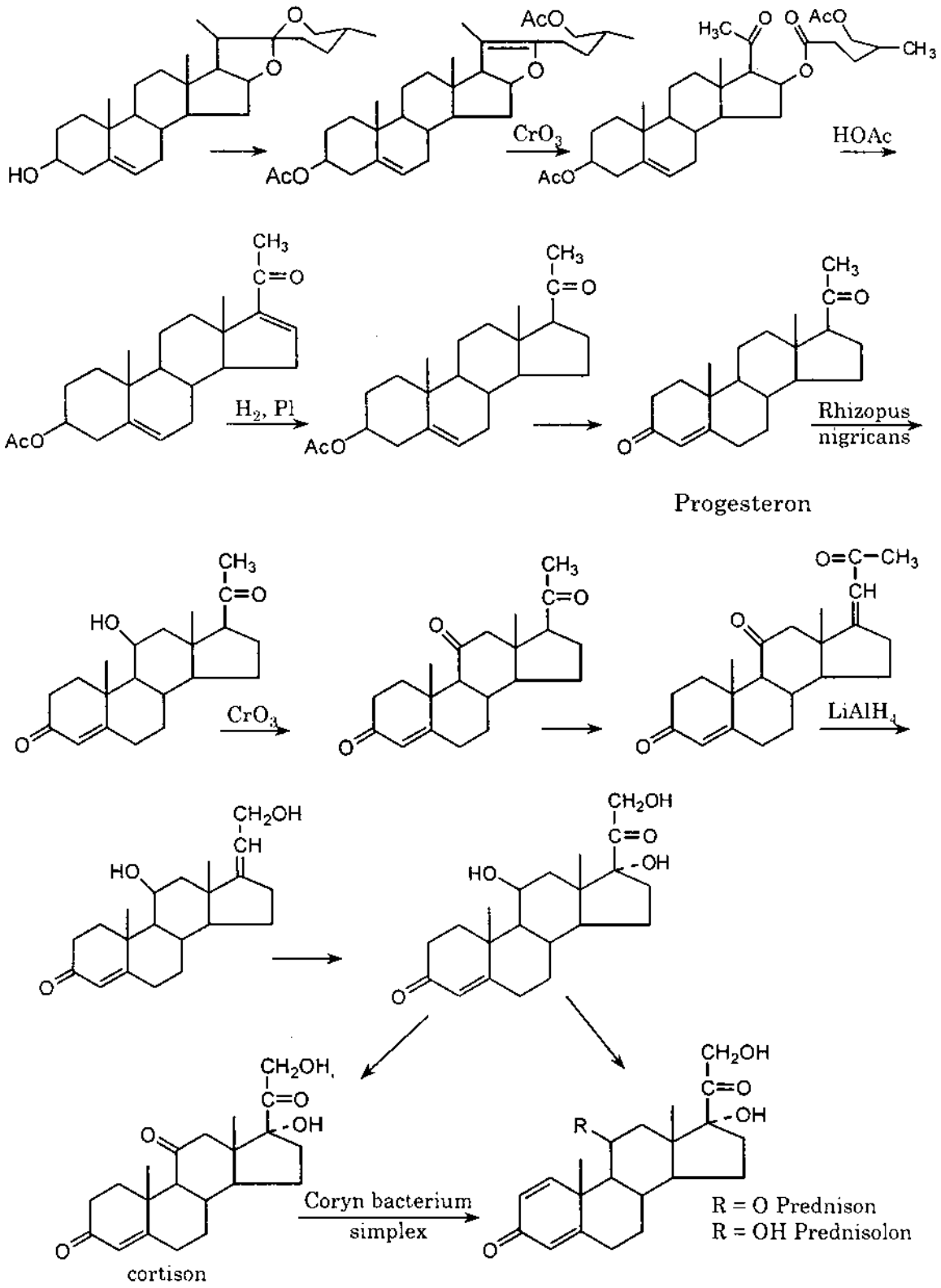
- Tác dụng ức chế khối u, kìm hãm sự phát triển của tế bào khối u. Các saponin steroid có số phân tử đường lớn tác dụng này càng mạnh.

Ngoài ra còn có tác dụng kích dục, kháng nấm, long đờm, chữa ho, lợi tiểu, bổ dưỡng.

Cần thận trọng khi đưa saponin steroid trực tiếp vào hệ tuần hoàn, ngoài tính chất phá huyết gây độc, saponin steroid còn làm phân liệt hệ thần kinh trung ương, giảm thân nhiệt và giảm huyết áp.

Saponin steroid được cơ cấu vào thành phần của hàng loạt loại thuốc sử dụng trong phòng bệnh và chữa bệnh xơ vữa động mạch như saponin thuộc chi Dioscorea, chi Ruscus và chi Tribulus.

Ứng dụng rộng rãi nhất của sapogenin steroid là sử dụng chúng như nguồn nguyên liệu cơ bản để bán tổng hợp thành các hormon sinh dục và corticosteroid. Sử dụng phổ biến nhất là diosgenin. (Xem sơ đồ điều chế cortison và prednisolon từ diosgenin).

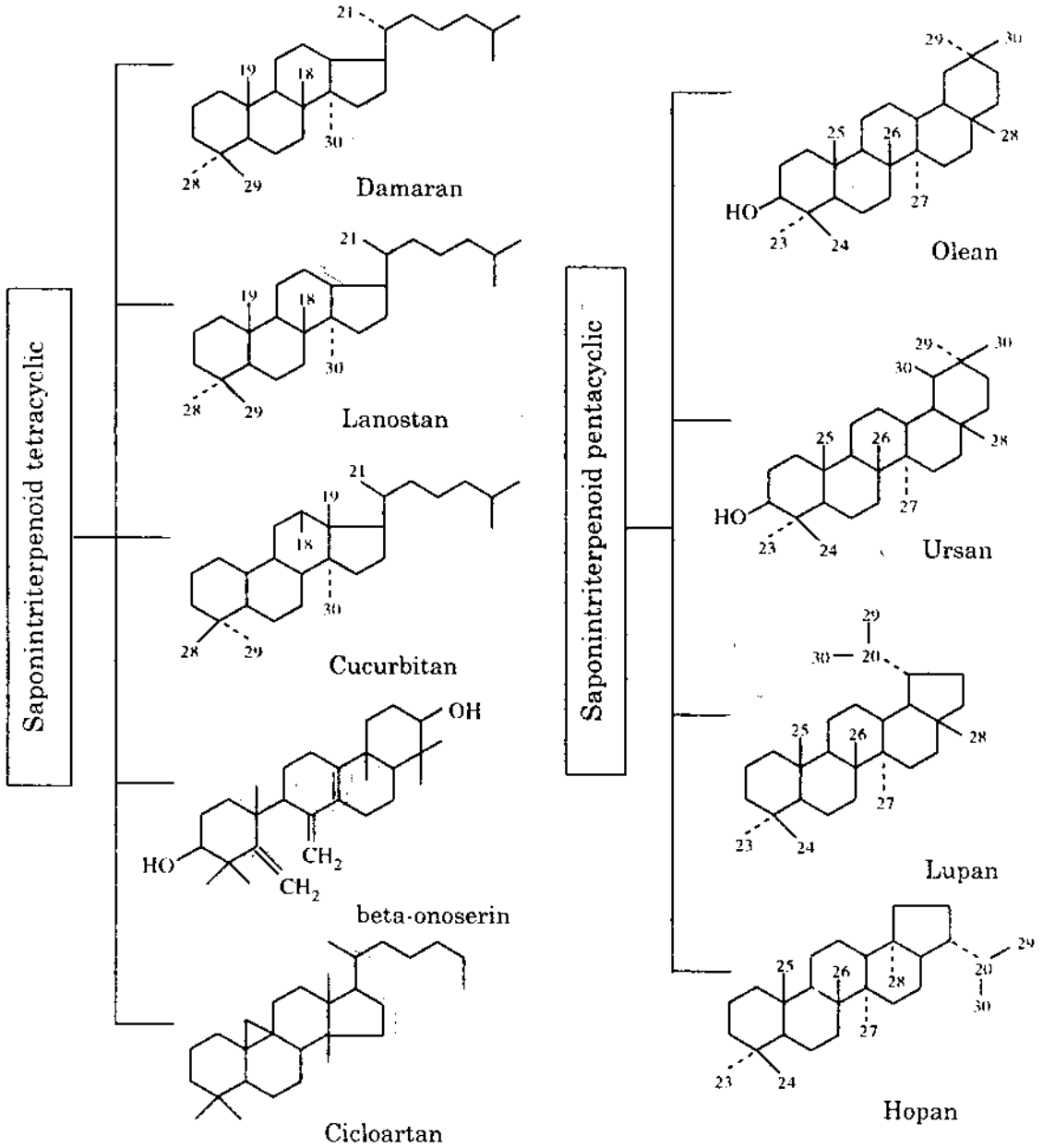


Sơ đồ điều chế cortison và prednisolon từ diosgenin.

II. SAPONIN TRITERPEN

2.1. Cấu tạo hoá học và phân loại

Sapogenin của saponin triterpen là các triterpenoid, các phân tử của chúng có 30 nguyên tử carbon. Chúng rất khác nhau về cấu trúc hoá học, phân loại saponin nhóm này chủ yếu dựa vào số lượng vòng hydrocarbon, chính vì vậy chúng được chia làm hai nhóm lớn là saponin triterpenoid pentacyclic và saponin triterpenoid tetracylic. Nhóm pentacyclic lại được chia thành 4 nhóm nhỏ và nhóm tetracylic được chia thành 5 nhóm (xem sơ đồ phân loại sau).



2.2. Nhóm saponin triterpen tetracyclic

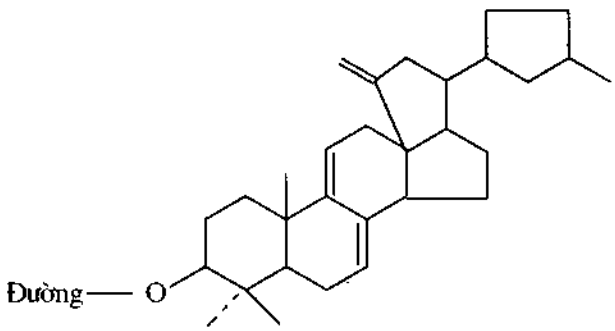
2.2.1. Nhóm damaran chứa khung cyclopentanoperhydrophenantren nhưng chúng rất khác nhau về các nhóm chức. Các saponin điển hình của nhóm này là saponin phân lập được trong nhân sâm (Panax Ginseng). Các saponin gần giống với nhóm damaran còn tìm thấy trong nhiều loài thuộc họ cucurbitaceae như cucurbitacin.

2.2.2. Nhóm cycloartan có cấu trúc 9,19 cyclolanostan, chứa khung steroid và mạch nhánh ở C_{17} và vòng cyclopropanon tạo thành bởi liên kết giữa C_9 và C_{19}.

Các dẫn chất của cycloartan lần đầu tiên phân lập được từ một số loài thuộc họ Moraceae. Ngày nay đã biết hơn 160 chất thuộc nhóm này, phân lập được từ nhiều họ thực vật khác nhau.

Các cycloartan còn tìm thấy trong các loài thuộc chi Astragalus (Fabaceae), chúng là những chất có tác dụng hạ cholesterol, hạ huyết áp, cường tim và lợi tiểu.

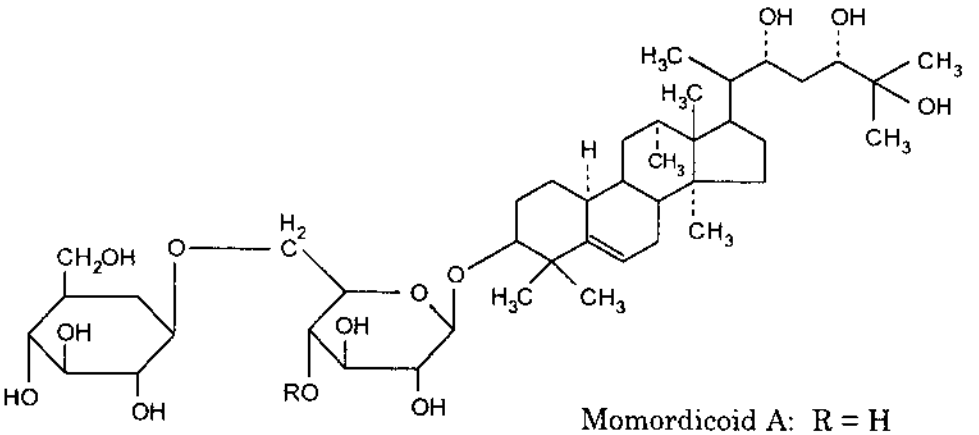
2.2.3. Nhóm lanostan mà đại diện là holothurin A, phân lập được từ một loài hải sâm *Holothuria spp.*



Holothurin A

2.2.4. Nhóm cucurbitan thường gặp trong họ Cucurbitaceae.

Đại diện của nhóm này là các glucosid có khung cucurbitan đã được các nhà khoa học Tây Ban Nha, Nhật Bản và Ấn Độ phân lập được từ quả cây mướp đắng.

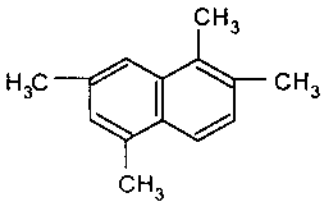


Momordicoid A: R = H
Momordicoid A: R = glucosa

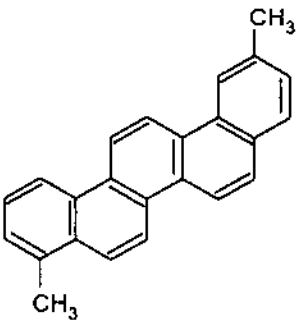
2.2.5. Nhóm β-onoserin là các dẫn chất trung gian đóng vai trò quan trọng trong quá trình sinh tổng hợp các steroid và triterpenoid, phân lập được rất sớm, từ cây *Ononis spinosa* năm 1885, nhưng mãi sau này mới được xác định cấu trúc.

2.3. Nhóm saponin triterpen pentacyclic

Các saponin thuộc nhóm này khi dehydrogen hoá sapogenin của chúng bằng selen tạo thành 1,2,7-trimethylnaptalin (sapotalin) và dimethylpixen là một pentacyclic

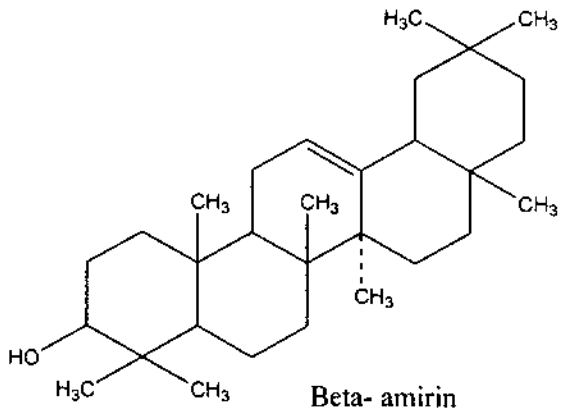


Sapotalin



Dimethylpixen

Cấu tạo của các hợp chất thuộc nhóm này gồm 5 vòng hydrocarbon với 21 hoặc 22 nguyên tử carbon và 8 hoặc 9 nguyên tử carbon của các nhóm CH_3. Saponin triterpen pentacyclic lại được chia ra thành 4 nhóm là olean, ursan, lupan và hopan.



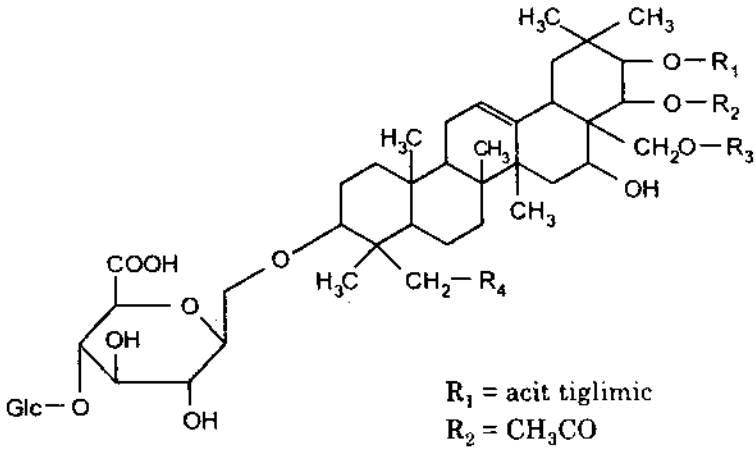
Beta- amirin

Một số saponin triterpen pentacyclic nhóm β-amirin

Saponin	Sapogenin	Đường	Dược liệu
Acid primulic A	Primulagenin A	Glc, Gal, Rham, Gluc	Rad. Primulae
Glycyrizin	Acid glycyrizinic	2gluc	Rad.Glycyrrhizae
Saponarosid	Gypsogenin	Xyl	Rad.Saponaria rubrae
α-Hederin	Hederagenin	Rham, Ara	Fol Hederae
Eleuterosid	Acid oleanolic	Glc, Rham, Ara	Rad.Eleutherococci

2.3.1. Nhóm olean đặc trưng với sự có mặt của 2 nhóm CH_3 ở vị trí C_{20}. Nhóm này là quan trọng nhất và bao gồm hầu hết các saponin triterpen pentacyclic, phổ biến nhất là β- amirin.

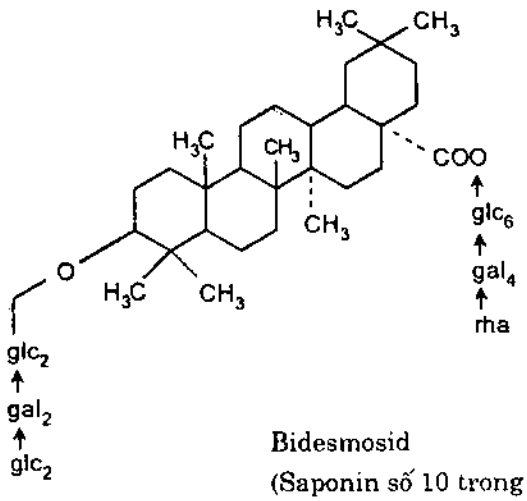
Nhóm này còn bao gồm cả các saponin có phần tử acid hữu cơ gắn theo dạng cấu trúc ester với nhóm OH.



Beta-escin

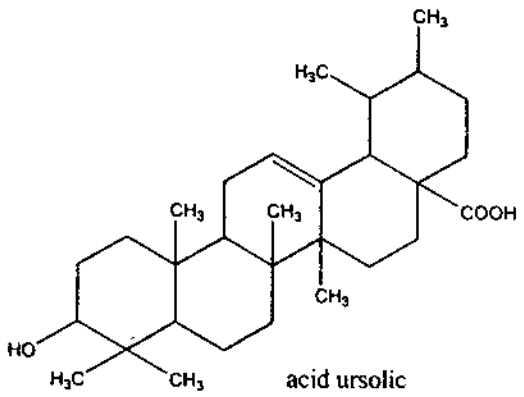
R_1 = acit tiglimic
$R_2 = CH_3CO$
R_3 = H
R_4 = OH

Mạch đường có thể gắn với sapogenin ở một vài vị trí khác nhau, cho nên các saponin này còn được phân biệt là monodesmosid, bidesmosid và tridesmosid. Phổ biến nhất trong thực vật là các bidesmosid của các olean. Các phần tử đường thường gắn ở C_3, C_{22} , C_{28} , C_{29}.



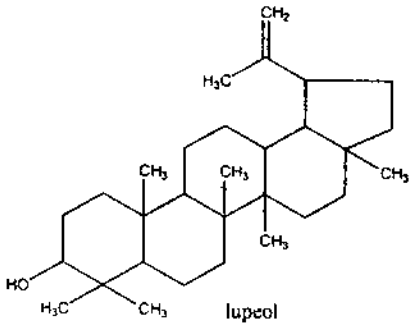
Bidesmosid
(Saponin số 10 trong vỏ thân ngũ gia bì chân chim)

2.3.2. Nhóm ursan khác với nhóm olean ở chỗ sự có mặt của các nhóm CH_3 ở vị trí C_{19} và C_{20}. Nhóm này thường là các dẫn chất của α-amirin như acid ursolic là sapogenin của một saponin phân lập được từ cây *Sanguisorba officinalis*(Rosaceae). Nhóm này rất ít gặp trong thiên nhiên.

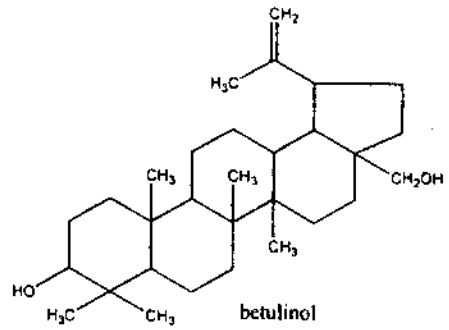


acid ursolic

2.3.3. Nhóm lupan có vòng E gồm 5 nguyên tử carbon. Các dẫn chất thuộc nhóm này là các lupeol và betulinol

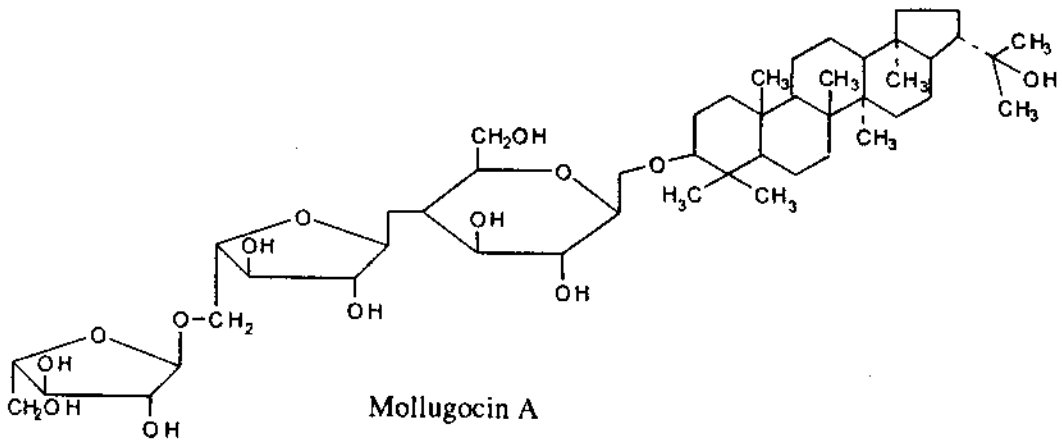


lupeol



betulinol

2.3.4. Nhóm hopan có các vòng A,B,C,D giống như các nhóm trên, chỉ khác là vòng E có 5 nguyên tử carbon và nguyên tử C_{22} ở mạch nhánh, nhóm CH_3 đính ở C_{18} thay vì ở C_{17}. Saponin đầu tiên phân lập được là từ cây *Mollugo hirta* L.



Mollugocin A

2.4. Tính chất

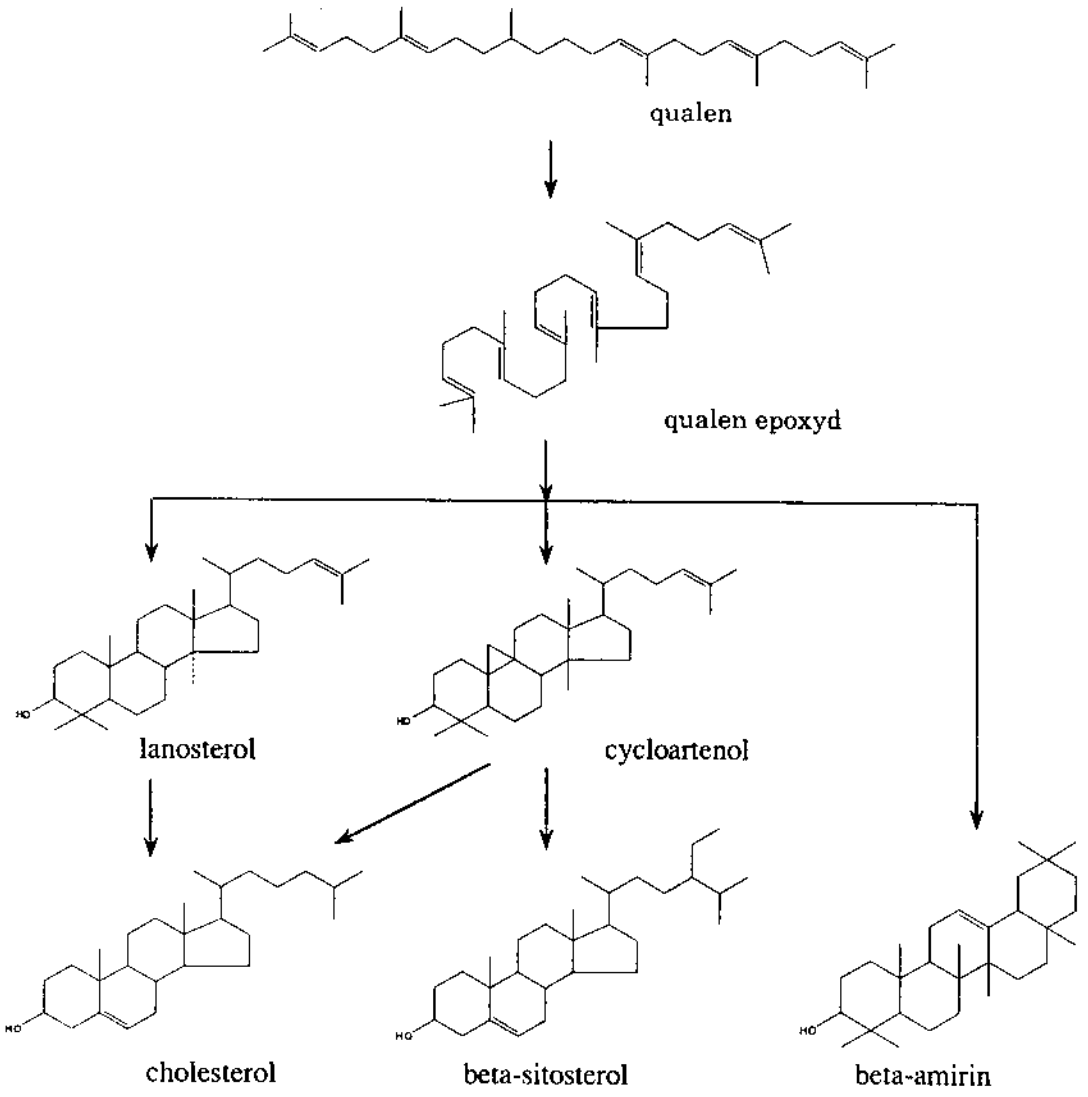
Saponin triterpen thường là các hợp chất vô định hình rất ít gặp ở dạng kết tinh. Mạch đường càng lớn bao nhiêu thì khả năng hoà tan của chúng trong nước và các dung môi phân cực càng tăng. Chúng là những hợp chất trung tính hoặc hơi acid. Tính acid là do nhóm carboxyl ở phần genin. Các saponin triterpen có khả năng tạo thành các muối không tan với các kim loại hoá trị một cũng như có khả năng tạo thành các phức với các lipid, sterol và tanin. Đặc tính điển hình là tính phá huyết, giảm sức căng bề mặt của nước và tạo bọt.

2.5. Phân bố

So với saponin steroid thì saponin triterpen chủ yếu gặp trong các loài hai lá mầm. Đã phát hiện khoảng 70 họ thực vật có chứa nhóm chất này. Đa số trong số họ thực vật trên có đặc tính hemotaxonomic. Thường hay gặp trong các họ thực vật sau: Caryophyllaceae, Chenopodiaceae, Polygalaceae, Primulaceae, Araliaceae, Fabaceae, Asteraceae, Equysetaceae. Hàm lượng saponin trong thân củ bao giờ cũng cao hơn phần trên mặt đất, chúng thường tồn tại ở dạng hoà tan trong dịch tế bào thực vật.

2.6. Sinh tổng hợp saponin triterpen trong cây thuốc

Các saponin triterpen pentacyclic hay tetracyclic được sinh tổng hợp trong cây trên nguyên tắc đóng vòng của qualen (xem sơ đồ). Cũng có quan điểm cho rằng onoserin và cycloartan có vai trò quan trọng trong sự tạo thành của các steroid và triterpenoid trong cây.



2.7. Phương pháp chiết xuất và phân tích

Chiết xuất saponin triterpen cũng tương tự như saponin steroid. Định tính chúng thường bằng các phản ứng tạo màu.Dược điển nhiều nước đã dựa vào khả năng tạo bọt và chỉ số phá huyết để xây dựng các phương pháp định tính và định lượng.

Chỉ số tạo bọt là cấp độ pha loãng của dịch chiết nước của 1 g dược liệu mà ở đó còn có khả năng tạo được bọt bền vững.

Chỉ số phá huyết cho ta thấy khả năng pha loãng lớn nhất của dịch chiết của 1 g dược liệu mà vẫn còn khả năng phá huyết của một lượng hồng cầu nhất

định. Ví dụ chỉ số phá huyết của một dược liệu là 1:5000, có nghĩa là giới hạn có khả năng pha loãng cuối cùng, nếu tiếp tục pha loãng tiếp thì khả năng phá huyết sẽ mất.

Saponin triterpen khi gặp acid sulfuric đậm đặc, antimon triclorid cho phản ứng tạo màu. Đặc tính này có thể sử dụng để phân tích hoặc định lượng saponin triterpen bằng các phương pháp sắc ký lớp mỏng hoặc đo quang. Đặc biệt có thể khai thác tính đặc trưng của phổ hồng ngoại của các chất này. Thường chúng cho 3 vạch hấp thụ đặc trưng ở 980, 920 và 900 cm^{-1} giống với saponin streroid, chỉ có vạch hấp thụ ở 865 cm^{-1} là không xuất hiện. Để xác định cấu trúc và phân tích các saponin triterpen pentacyclic và tetracyclic phổ biến sử dụng khối phổ, cộng hưởng từ hạt nhân proton và cộng hưởng từ hạt nhân C_{13} và sắc ký lỏng hiệu năng cao.

2.8. Tác dụng

Tác dụng cơ bản nhất của saponin triterpen là long đờm (expectorans). Khả năng này do tính chất của các saponin gây kích ứng các đầu dây thần kinh và tạo ra các phản xạ làm long đờm trong các màng của phế nang. Nếu dùng với liều cao hơn chúng lại có thể gây nôn. Điều quan trọng là phải xác định được một liều tác dụng phù hợp có khả năng kéo dài giai đoạn long đờm mà không gây nôn.

Các saponin triterpen có khả năng kích thích các tuyến nước bọt và tương tự với cả màng ruột và dạ dày, làm tăng khả năng hấp thụ chất. Điều đó chứng minh rằng quan điểm trước đây xếp saponin như là những tạp chất là không đúng, vì vậy chúng không cần bị loại bỏ trong quá trình bào chế.

Hàng loạt những nghiên cứu về tác dụng ức chế tế bào ung thư của saponin triterpen là dựa trên tính chất độc của chúng đối với tế bào ung thư, như cyclamin phân lập từ cây *cyclamen europaeum* và saponin P và Q phân lập được từ cây *Acer negundo*. Nhưng vì tính chất độc của chúng đối với tế bào rất cao, nên chưa được ứng dụng trong thực tế.

Saponin có khung damaran đã được chứng minh là có tác dụng chống viêm, antipiretic và tác dụng adaptogen.

Saponin triterpen đã được ứng dụng rộng rãi trong công nghệ thực phẩm, công nghệ sản xuất sơn, chất tẩy rửa, trong khai thác khoáng quặng và trong cứu hoả, do tính chất tạo bọt, tạo nhũ của chúng.

III. DƯỢC LIỆU CHỨA SAPONIN

3.1. Dược liệu chứa saponin steroid

3.1.1. Sơn tỳ giải

Rhizoma Dioscoreae

Cây sơn tỳ giải: *Dioscorea tokoro* Makino

Tên khác: Tỳ giải

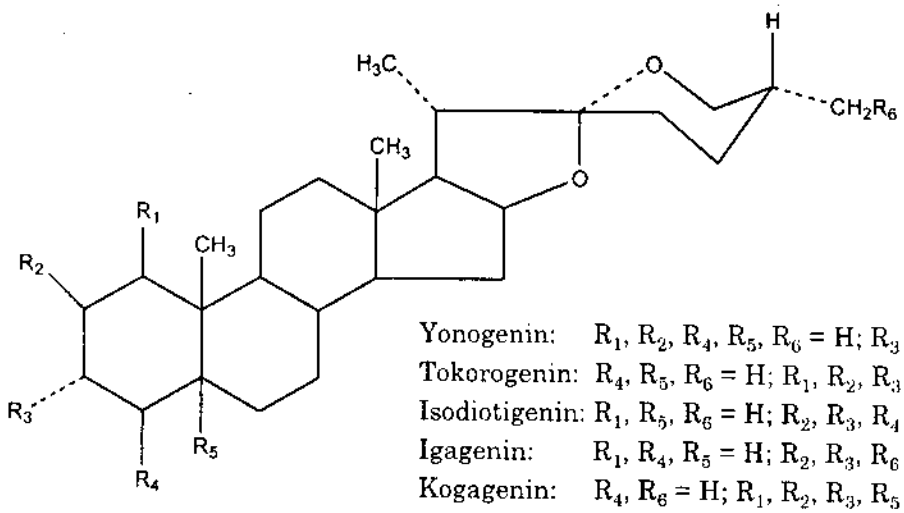
Họ: Củ nâu (Dioseoreaceae)

Mô tả

Cây leo bằng thân quấn, rễ củ sống dai dưới đất, phình thành củ to, lá mọc so le, hình tim, có 7-11 gân hình chân vịt, cuống lá dài, hoa đơn tính, khác gốc, đều và nhỏ, màu xanh nhạt, mọc thẳng bông, quả nang có cánh, tỳ giải mọc nhiều ở các tỉnh của Trung Quốc giáp danh với nước ta, Trung Quốc còn khai thác một số cây khác thuộc chi *Discorea* để làm vị thuốc tỳ giải. Ở nước ta cũng có vị thuốc mang tên tỳ giải nhưng chưa xác định được tên khoa học chắc chắn.

Thành phần hóa học

Từ năm 1936 Tsukano và Ueno (Nhật Bản) đã phân lập được phần sapogenin là diosgenin, igagenin, kogagenin, yonogenin, tokorogenin, isodiotigenin. Nhưng mãi đến 1963 các nhà khoa học Nhật Bản khác là Kawasaki akahori và Nagai mới phân lập được các saponin là yononin, tokoronin, prosaponin B, compoundikyttioscin và protodioscin.



Yonogenin: $R_1, R_2, R_4, R_5, R_6 = H; R_3 = OH$

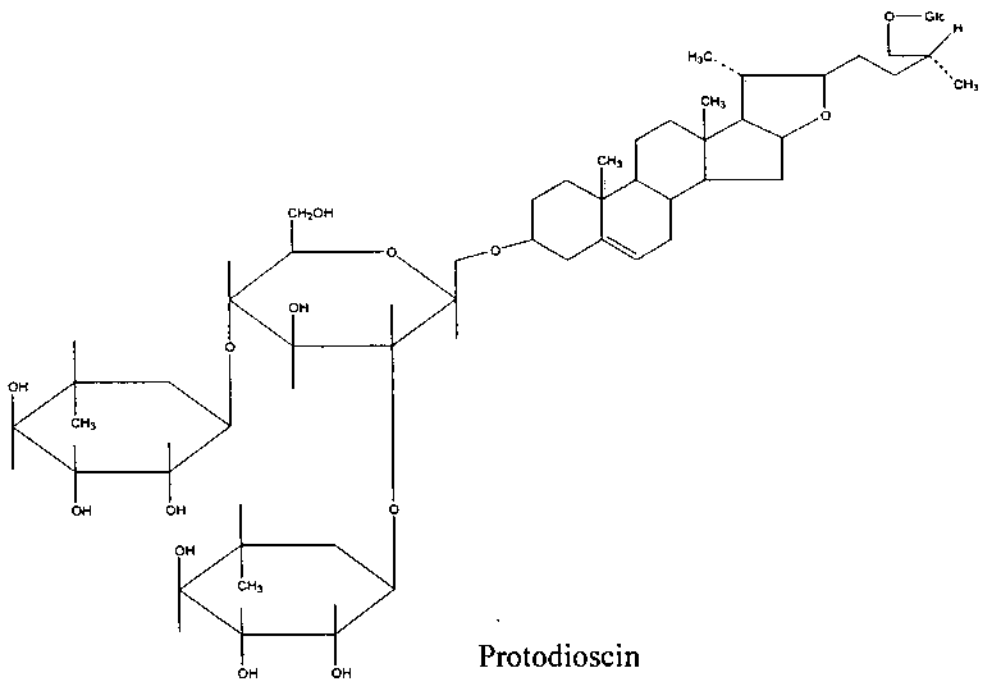
Tokorogenin: $R_4, R_5, R_6 = H; R_1, R_2, R_3 = OH$

Isodiotigenin: $R_1, R_5, R_6 = H; R_2, R_3, R_4 = OH$

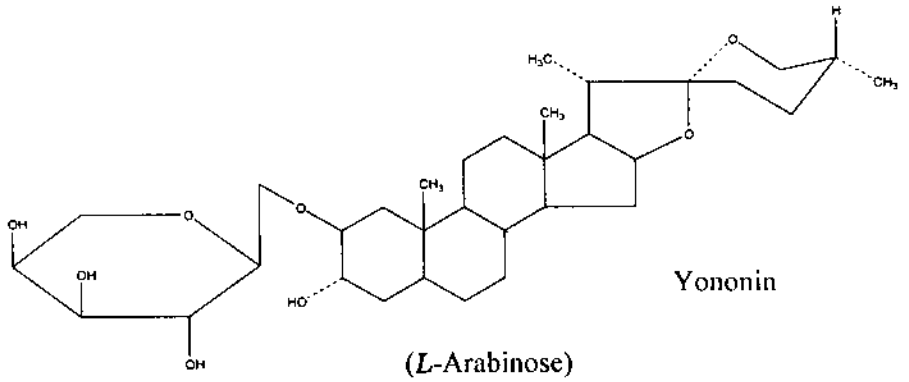
Igagenin: $R_1, R_4, R_5 = H; R_2, R_3, R_6 = OH$

Kogagenin: $R_4, R_6 = H; R_1, R_2, R_3, R_5 = OH$

Tokorogenin là genin đầu tiên được phát hiện có cấu hình 3α hydroxy ở vị trí C_3 và có công thức 25D- 1β,2β,3α trihydroxy-5β- spitrostan.

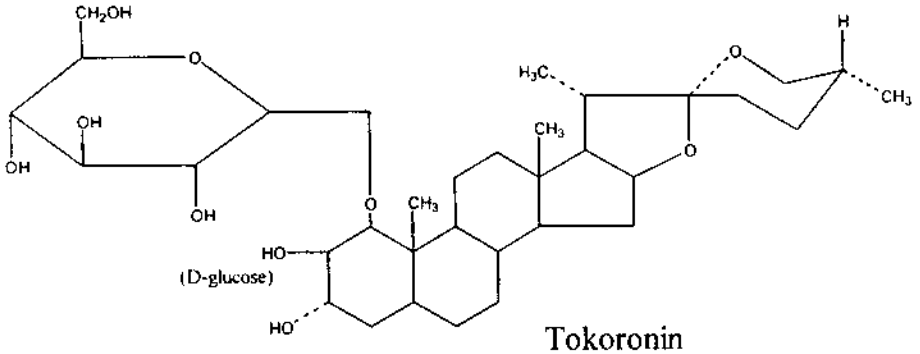


Protodioscin



Yononin

(*L*-Arabinose)



(D-glucose)

Tokoronin

Trong những năm 80 của thế kỷ XX, với mục đích tìm nguồn nguyên liệu có hàm lượng diosgenin cao, Viện Dược liệu đã nhập 3 loài khác thuộc chi *Dioscorea*, đó là *D. composita*, *D. deltoidea* và *D. floribunda*. Trong đó loài *D. deltoidea* có ưu điểm chỉ chứa 1 genin là diosgenin.

Chi *Dioscorea* có khoảng 600 loài, trong đó loài *D. composita* Hemsl. Được phát triển lớn ở Mexico chứa tới 15% diosgenin. Đã phân lập được trên 20 sapogenin từ khoảng 70 loài thực vật thuộc 2 chi *Dioscorea và Tamus*.

Họ Dioscoreaceae có rất nhiều chi, trong đó quan hệ gần gũi nhất với chi *Dioscorea* là các chi *Higinbothamia, Borderea Epipetrum, Rajana, Tamus*...

Đại bộ phận các sapogenin steroid tồn tại trong thực vật dưới dạng glucosid. Lúc đầu các sapogenin steroid được ứng dụng để tổng hợp thành các hormon steroid. Ở quy mô sản xuất công nghiệp, giai đoạn thủy phân và chiết xuất các hợp chất này được tiến hành bằng một trong hai cách sau: Cách một, hỗn hợp saponin toàn phần được chiết xuất bằng cồn ethanol hoặc methanol, đem thủy phân với acid, hoặc dược liệu khô được thủy phân trước rồi sau đó chiết sapogenin với xăng công nghiệp, benzen hoặc các dung môi không phân cực.

Khoảng 50 năm trước đây Marker giả thuyết rằng sapogenin steroid có thể là một trong các tiền chất tạo ra từ các glycosid của nhóm Furostanol sau phản ứng thủy phân. Từ giả thuyết đó mà họ đã dự đoán rằng các glycosid furostanol được tổng hợp trong thực vật như các dạng tiền chất của saponin spirostanol.

Marker cũng dự đoán rằng trong một số loài thuộc chi *Agave*, hàm lượng của sapogenin tăng dần theo tuổi của cây và cao nhất là vào thời gian ra hoa kết quả.

Một số các chất khác như β- sitosterol, stigmasterol, diterpen cũng tìm thấy trong nhiều loài thuộc chi dioscorea.

Từ lá của loài *D. deltoidea*, Pasesnichenko đã phân lập được các saponin spirostanol như deltofolin, dioscin và deltonin. Trong đó deltofolin là một saponin mới, sau đó ít lâu Rajavaman (Ấn Độ) đã phân lập được từ thân rễ một triglycosid của diosgenin. Nhưng trước đó Chakravarti đã phân lập được các sapogenin epismilagenin và smilagenon. Đến năn 1985, Đống Viết Thắng cũng phân lập được từ loài *D. deltoidea* nhập nội vào Việt Nam, hai saponin A và B-saponin A có điểm chảy 316- 318° C, α_D (1-Py)- 77° phổ hồng ngoại có các Pik đặc trưng ở 3500, 2940,1450,1060,980 và 860 cm^{-1}. Đem so sánh saponin A với Deltonin thấy trùng nhau. Khi thủy phân saponin A thì được diosgenin và phần đường bao gồm *D*-glucosa và *L*-rhamnosa.

Saponin B có giá trị R_f trùng với dioscin (mẫu phân lập từ *D. caucasica* của Liên Xô trước đây)

Điểm chảy của saponin B là 292 - 294°C, phổ hồng ngoại của dioscin và saponin B hoàn toàn giống nhau. Khi thủy phân saponin B, các tác giả thu được diosgenin và phần đường là *D*-glucosa và *L*-rhamnosa.

Liên Xô trước đây khai thác loài *Dioscorea nipponica* làm nguyên liệu sản xuất ra một loại thuốc có tác dụng hạ cholesterol và chống xơ vữa động mạch với tên là diosponin. Loài này chứa dioscin và protodioscin, trong đó protodioscin thuộc nhóm furostanol được đánh giá là chất có tác dụng tốt hơn, vì dễ tan trong nước nên dễ hấp thu hơn.

Tác dụng dược lý

Trong Y học cổ truyền sơn tỳ giải được sử dụng làm thuốc lợi tiểu, chữa viêm bàng quang mãn tính, viêm niệu đạo và thấp khớp. Một số loài khác đã được chứng minh là có tác dụng chống viêm, hạ cholesterol máu và chống xơ vữa động mạch, làm mềm thành mạch.

Công dụng

Chi Dioscorea được sử dụng làm nguyên liệu để chiết xuất diosgenin làm thuốc bán tổng hợp thành các corticoid. Hàng năm thế giới cần gần 1000 tấn diosgenin. Nước sản xuất lớn nhất là: Mexico, Ấn Độ, Trung Quốc.

Viện Dược liệu sau khi nhập nội 3 loài thuộc chi *Dioscorea* đã trồng đại trà tại Sa Pa, Hải Dương, Hoà Bình và chuyển giao công nghệ cho Xí nghiệp Hoá dược chiết xuất diosgenin ở quy mô công nghiệp.

3.1.2. Thiên môn

Radix Asparagi cochinchinensis

Cây thiên môn: *Asparagus cochinchinensis* (Lour.)

Tên khác: Thiên môn đông, thiên đông, dây tóc tiên, mè măn

Họ: Thiên môn (Asparagaceae)

Mô tả

Thiên môn là loại dây leo, sống lâu năm. Thân mang nhiều cành 3 ngạnh, đầu nhọn, biến dạng trông như lá, còn lá thì nhỏ trông như vẩy. Hoa nhỏ màu trắng, mọc vào mùa hè, quả mọng, khi chín có màu đỏ.

Bộ phận dùng

Rễ củ thu vào mùa thu đông, ở những cây 2 năm tuổi. Sau khi rửa sạch, cắt

bỏ đầu và rễ con, đem đồ qua hơi nước. Lúc còn nóng bóc bỏ vỏ rồi phơi hoặc sấy cho khô. Vị thuốc có vị ngọt hơi đắng.

Thành phần hóa học

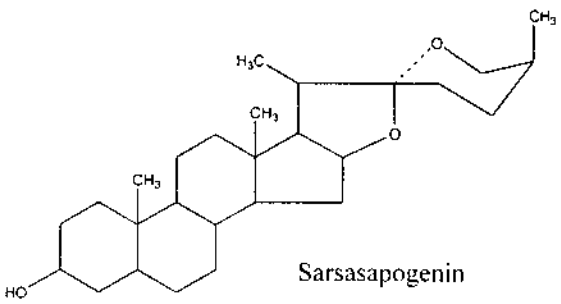
Từ rễ củ thiên môn các tác giả đã phân lập được 2 chất: saponin steroid, đặt tên là saponin E và saponin G. Saponin E có điểm chảy 225 - 227°C giá trị Rf = 0,41 và saponin G có điểm chảy 250 - 254°C giá trị Rf = 0,24 (trong hệ dung môi: cloroform - methanol - nước 59,4 : 36 : 4,6).

Saponin E khi thủy phân cho một genin là sarsasapogenin, điểm chảy 198-200°C, còn phần đường gồm d-glucosa, d-xylosa và l-Rhamnosa (2 : 2 : 1).

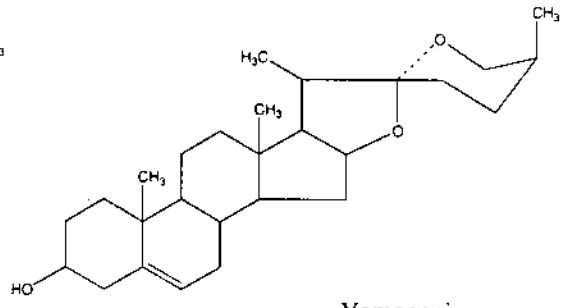
Các sapogenin khác đã phân lập được là yamogenin, penogenin và neohecogenin nhưng với hàm lượng rất ít, ngoài ra cũng đã chứng minh trong củ rễ chứa một steroid khác là 25β- spirostan- 3,5 dien, β-sitosterol, stigmasterol.

Phần trên mặt đất còn chứa flavonoid như rutin,glycosid của kaempferol.

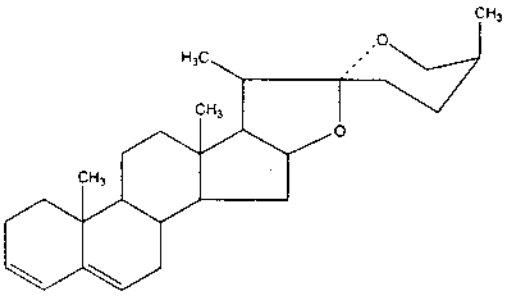
Các amino acid và carbon hydrat thuộc nhóm oligosaccharid cũng đã được phát hiện.



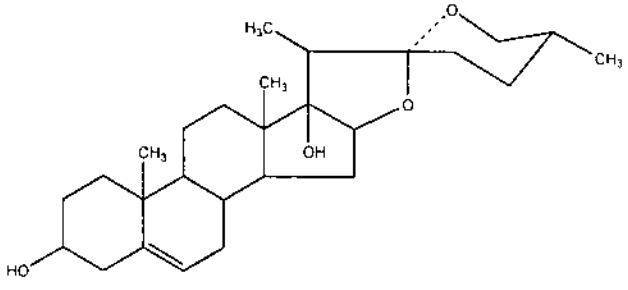
Sarsasapogenin



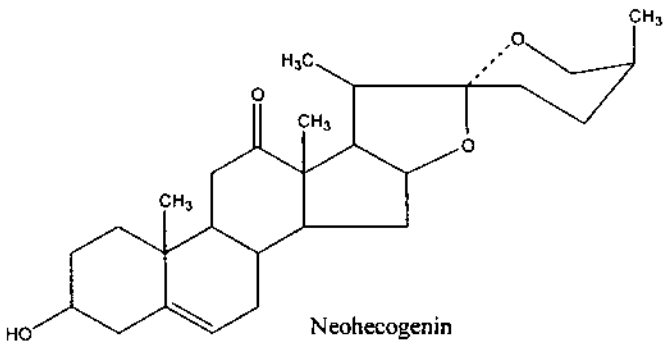
Yamogenin



25beta-spirostan 3,5dien



Penogenin



Neohecogenin

Tác dụng dược lý

Các công trình nghiên cứu đã chứng minh cao khô thiên môn có tác dụng chống viêm, lợi tiểu, đã được sử dụng để chữa viêm bàng quang, khó tiểu tiện, sỏi thận và sỏi bàng quang. Ngoài ra thiên môn còn có tác dụng kháng khuẩn, hạ huyết áp, làm chậm nhịp tim, tăng chức năng gan. Theo kinh nghiệm dân gian thiên môn còn được sử dụng chữa bệnh ho, viêm phổi, hoá đờm và kích thích quá trình tạo hồng cầu.

Công dụng

Dùng làm thuốc chữa ho, lợi tiểu, chữa sốt và thuốc bổ. Liều dùng: 10-15g mỗi ngày, dưới dạng thuốc sắc hoặc nấu thành cao. Theo tài liệu cổ thiên môn có vị ngọt hơi đắng, tính đại hàn, vào hai kinh phế và thận. Có tác dụng dưỡng âm, nhuận táo, thanh nhiệt. Dùng chữa phế ung hư lao, thổ huyết, ho ra máu, tiêu khát, nhiệt bệnh tân dịch hao tổn. Những người tì vị hư hàn, tiết tả không được dùng.

3.1.3.Cà gai leo

Herba Solani hainanense

Cây cà gai leo: *Solanum hainanense* Hance (*Solanum procumbens* Lour)

Tên khác: Chẽ nam (Tày), Cà gai dây(Bana), Gai cườm.

Họ: Cà (Solanaceae)

Mô tả

Cây nhỏ, có cành vươn dài tới 1 - 1,5 m, mọc leo hay bò lan, thân già và gốc hoá gỗ, có gai sắc nhọn, phần ngọn phủ lông hình sao, lá mọc so le hình bầu dục hay thuôn, đầu tù, phiến lá có thùy nông không đều, gân chính có gai ở cả hai mặt. Cụm hoa xim ở kẽ lá thường gồm 2 - 5 hoa, tràng gồm 4 cánh hoa màu tím nhạt, hình ô van thuôn dài. Nhị 4, màu vàng. Bầu nhẵn, có cuống dài, đường

kính quả 0,5 - 0,7cm, khi chín có màu đỏ, khi non có màu xanh lục. Hạt nhiều hình thân hơi dẹt, màu vàng.

Mùa hoa quả: từ tháng 4 - 8 có khi đến tháng 9. Tránh nhầm lẫn với loài *S.thorelli* Bonati và *S.trilobatum* L.

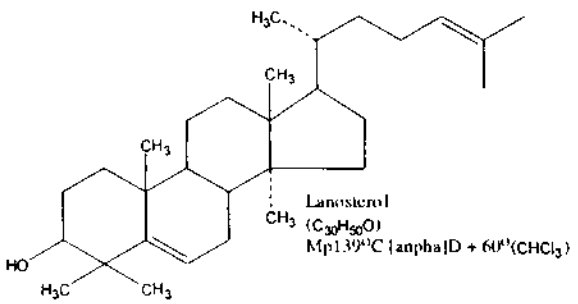
Bộ phận dùng

Lá, thân, rễ, qủa cà gai leo đều chứa glucoalcaloid với hàm lượng tương ứng 0,36; 0,08;0,20 và 0,45%. Nhóm hoạt chất này đã được chứng minh là hoạt chất chính trong thuốc Haina do Viện Dược liệu nghiên cứu và sản xuất để điều trị viêm gan và ức chế xơ gan. Mùa thu hái: tháng 6 - 7.

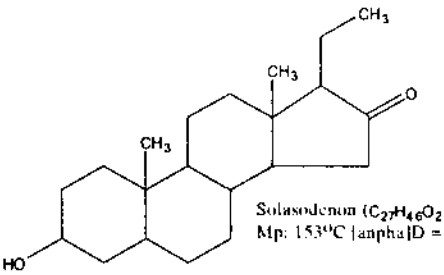
Thành phần hoá học

Trong cà gai leo đã được Nguyễn Bích Thu (Viện Dược liệu) chứng minh có glucoancaloid, saponin steroid, phytosterol, flavonoid, coumarin, acid hữu cơ, acid amin, carotenoid, chất béo và đường khử tự do.

Hoàng Thanh Hương đã chứng minh trong rễ và lá chứa β-sitosteol, cholesterol, lanosterol, dihydro-lanosterol, solasodenon, solasodin và neoclorogenin.

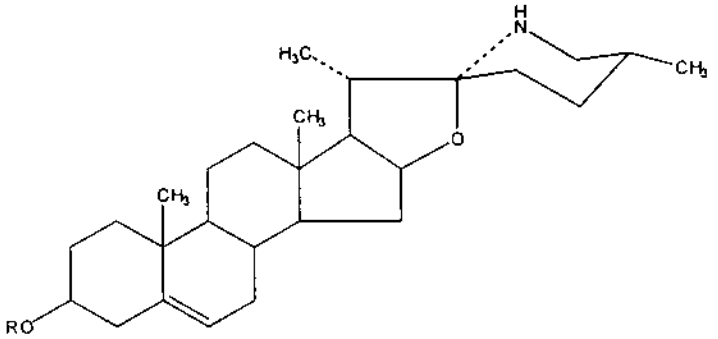


Lanosterol
($C_{30}H_{50}O$)
Mp139°C [anpha]D + 60°(CHCl3)

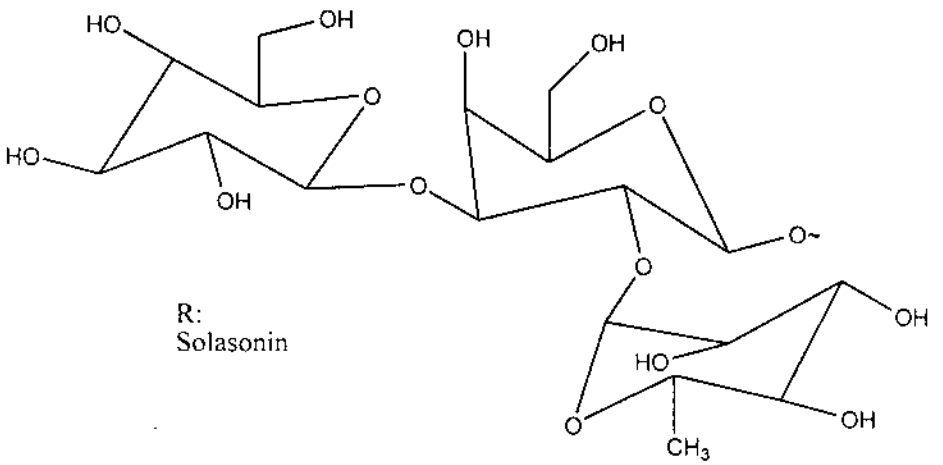


Solasodenon ($C_{27}H_{46}O_2$)
Mp: 153°C [anpha]D = 28,8° (EtOH)

Nguyễn Bích Thu (Viện Dược liệu) đã phân lập và xác định cấu trúc của solasonin, acid caffeic



R = H: Solasodin



Solasodin-3-(O-[anpha-*L*-Rhamnopyranosyl-(1→2)-O-[beta-*D*-glucopyrannosyl-(1→3)-beta-galactopyranosid)

Tác dụng dược lý

Các kết quả nghiên cứu của Viện Dược liệu cho thấy cà gai leo có tác dụng chống viêm trên mô hình gây phù bằng Kaolin chân chuột cống trắng, ức chế giai đoạn mãn tính trên mô hình gây u hạt thực nghiệm bằng amian. Với kết quả trên Đoàn Thị Nhu đã xây dựng công thức chế phẩm thuốc ngậm APD (sau này đặt tên là Dentonin) để điều trị viêm quanh răng và Solamin B để điều trị thấp khớp gồm cà gai leo và một số dược liệu khác.

Nguyễn Thị Minh Khai khi nghiên cứu ảnh hưởng của cà gai leo trên chuyển hoá colagen, nhận thấy cà gai leo có tác dụng ức chế sinh tổng hợp colagen, ở một số mô liên kết của chuột nhắt. Trên mô hình gây xơ thực nghiệm, cà gai leo làm giảm colagen cả về số lượng và chất lượng. Về mặt hình thái mô học, mức độ xơ gan giảm rõ rệt so với nhóm chuột gây xơ không điều trị bằng cà gai leo. Tác dụng chống viêm xơ còn được nghiên cứu trên colagenase tinh khiết và thấy rằng cà gai leo có tác dụng ức chế colagenase.

Tác dụng bảo vệ gan của cà gai leo còn được Nguyễn Phúc Thái nghiên cứu và nhận thấy cà gai leo có tác dụng làm giảm sự thay đổi của enzym gan ALT, AST và nồng độ glucose, MetHb, –SH, trọng lượng của gan và của chuột cũng như các tổn thương tế bào gan do trinitrotoluen gây ra.

Các tác giả còn nghiên cứu tác dụng chống oxy hoá *in vivo* của hai chế phẩm Haina I và Haina II do Viện Dược liệu sản xuất và tác dụng chống oxy hoá *in vitro* của dạng chiết toàn phần và glucoalcaloid điều chế từ cà gai leo và nhận thấy cà gai leo và các chế phẩm có tác dụng chống oxy hoá bảo vệ gan, ngăn ngừa xơ gan, có thể làm giảm tổn thương bởi quá trình oxy hoá gây ra ở gan.

Những kết quả thu được góp phần giải thích cơ chế tác dụng chống viêm bảo vệ gan của chế phẩm Haina.

Tác dụng trên hệ miễn dịch

Các kết quả thử nghiệm trên tế bào lympho T cho thấy các chế phẩm từ cà gai leo không có tác dụng độc với tế bào lympho T. Tuy nhiên khi thí nghiệm đồng thời tế bào lympho T và I L- 1 thì thấy các chế phẩm chiết từ cà gai leo, ngay cả với nồng độ 20g/ml vẫn có tác dụng kích thích tăng sinh của lympho T.

Kết quả thử nghiệm trên một số dòng ung thư của 4 phân đoạn chiết từ cà gai leo, đoạn *n*-hexan và butanol có độ độc với các dòng tế bào ung thư mạnh hơn cả. Sterol và glycoalcaloid là hai thành phần chính trong các phân đoạn này. Vì vậy, từ cao toàn phần Haina I đã chế tạo 5 mẫu ký hiệu từ M1 đến M5 và thử tác dụng của chúng trên chỉ số tăng sinh của một số dòng tế bào ung thư gan(Hep 3B, PIC/PRF), ung thư cổ tử cung... Kết quả cho thấy mẫu M3(Haina II), tuỳ thuộc vào nồng độ có tác dụng ức chế tăng sinh một số dòng tế bào ung thư, riêng với dòng tế bào lành HACAT thì M3 không có tác dụng.

Công dụng

Cà gai leo là nguyên liệu quan trọng và chủ yếu để sản xuất các mặt hàng Dentonin(chữa sâu quanh răng) Haina I và Haina II do Viện Dược liệu nghiên cứu và sản xuất.

Rễ cà gai leo được nhân dân dùng làm thuốc chữa phong thấp, đau nhức răng, sâu răng, chảy máu chân răng theo kinh nghiệm dân gian, nếu sát rễ cà gai leo vào răng trong khi uống rượu thì tránh được say rượu. Còn nếu bị say thì uống nước sắc cà gai leo. Liều dùng 16-12g ngày dưới dạng nước sắc.

3.2. Dược liệu chứa saponin triterpen

3.2.1. Bồ kết

Fructus Geditschiae

Bộ phận dùng là quả của cây bồ kết *Gleditschiafera (Lour)* Merr

Tên khác: Chùm kết, tạo giác, phác kết (Tày), co kết (Thái)

Tên nước ngoài: Locust fevsier de chine (*Pháp*)

Họ: Đậu(Fabaceae)

Mô tả

Cây gỗ to, cao 5 - 7 m, thân thẳng, vỏ nhẵn và gai to, cứng, phân nhánh, dài 10 - 25 cm. Cành mảnh, hình trụ, lúc đầu có lông, sau nhẵn và có màu xám

nhạt. Lá kép mọc so le. Cụm hoa mọc thành chùm ở ngoài kẽ lá dài 10 - 15 cm, hoa màu trắng, tụ họp 2 - 7 cái trên những cành ngắn. Quả đậu mỏng, dài 10 - 12 cm, rộng 1,5 - 2 cm, thẳng hoặc hơi cong, dày lên ở chỗ có hạt. Khi còn tươi mặt ngoài có một lớp phấn màu lam, chứa 10-12 hạt, bao bọc một lớp cốm màu vàng. Khi chín quả có màu vàng nâu, để lâu chuyển thành màu đen.

Mùa hoa: Tháng 5 - 7; mùa quả: tháng 8 - 10.

Bộ phận dùng

Quả chín(tạo giác) thu hoạch vào tháng 10 - 11, loại bỏ tạp chất, rửa sạch, phơi khô, khi dùng giã nát.

Gai(tạo giác thích) ở thân và cành, đã phơi khô hay sấy khô. Gai nguyên vẹn thường phân nhánh, sắp xếp thành hình xoắn ốc. Các gai trên thường nhỏ, dài 1 - 2 cm, các gai dưới to dần, có thể dài 10 - 15 cm, mặt ngoài nhẵn, nâu sẫm hay nâu xám, chất cứng rắn khó bẻ.

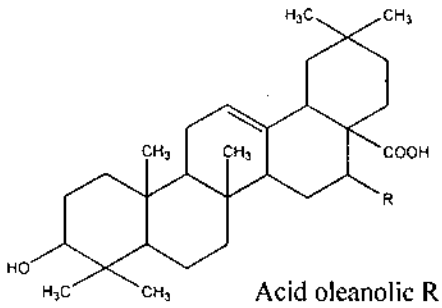
Hạt bồ kết(tạo giác tử) lấy từ quả chín đã phơi hay sấy khô.

Thành phần hoá học

Quả bồ kết chứa saponin, trong đó có một sapogenin là acid albigenic (điểm chảy 246,8°C, α_D - 30°(ethanol)

Theo tài liệu khác, quả chứa 10% saponin, trong đó 2 sapogenin được xác định là acid oleanolic và acid echynocystic.

Theo Ngô Bích Hải (1972) quả chứa nhiều saponin triterpen, trong đó một chất được xác định là astragalosid. Phần aglycon của chất này là 3,16- dioxy- 28-carboxyolean-12-en. Phần đường gắn vào OH ở vị trí C_3 bao gồm *D*-xylose, *L*-arabinose và *D*-xylose theo tỷ lệ 2 : 1 : 1. Phần đường gắn vào gốc acyl là *D*-xylose và *D*-galactose theo tỷ lệ 2 : 2.



Acid oleanolic R = H
Acid echynocystic R = OH

Ngoài ra còn chứa 5 hợp chất flavonoid trong đó có saponaretin, vitexin, homoorientin, orientin và luteolin.

Tác dụng dược lý

a. Quả bồ kết

- Tác dụng kháng khuẩn: Trên ống nghiệm đã chứng minh quả bồ kết có tác dụng ức chế các chủng vi khuẩn như trùng cầu khuẩn, trực khuẩn lỵ shigella, trực khuẩn thương hàn, phó thương hàn, trực khuẩn mủ xanh và phẩy khuẩn tả.

- Dịch chiết bằng ether dầu hoả với phương pháp khuếch tán thuốc trong môi trường nuôi cấy ở nồng độ 0,343 g/ml có tác dụng ức chế tụ cầu khuẩn B. Dịch chiết bằng cloroform với nồng độ 0,55 g/ml ức chế liên cầu khuẩn. Hỗn hợp flavonoid và chất saponaretin chiết từ quả có tác dụng kháng virus, hỗn hợp saponin có tác dụng chống trùng roi âm đạo. Dịch chiết nước từ quả bồ kết trên ống nghiệm có tác dụng ức chế một số nấm gây bệnh ngoài da.

Ngoài tác dụng kháng khuẩn, nước sắc quả bồ kết trên mèo thí nghiệm với liều 1 g/kg cho thẳng vào dạ dày có tác dụng tăng cường sự phân tiết của niêm mạc đường hô hấp và long đờm. Nước sắc 0,25% có tác dụng kích thích co bóp tử cung cô lập của chuột cống trắng.

- Độc tính: Saponin triterpen từ quả bồ kết thường khó hấp thu ở ruột và dạ dày, nhưng có tác dụng kích thích cục bộ niêm mạc dạ dày, gây chảy nước miếng, nước mũi, nôn mửa, đi ngoài, dùng với liều cao làm tổn thương niêm mạc đường tiêu hoá và lúc đó sẽ bị hấp thu qua đường ruột gây ngộ độc toàn thân với triệu chứng đau đầu, chóng mặt, rét run, nghiêm trọng có thể gây hôn mê, co giật, hô hấp khó khăn, cuối cùng gây tử vong do liệt hô hấp. Chất gleditsapogenin chiết từ quả bồ kết có chỉ số phá huyết đối với hồng cầu sơn dương là 1 : 7500, đối với thỏ tiêm tĩnh mạch với liều 40 - 47 mg/kg gây tử vong.

b. Gai bồ kết

Nước sắc gai bồ kết bằng phương pháp khuếch tán thuốc trong môi trường nuôi cấy có tác dụng ức chế tụ khuẩn vàng, dịch chiết nước dùng với liều 60g/kg cho vào dạ dày có tác dụng ức chế tế bào sarcom trên chuột nhắt trắng.

Công dụng

Ở Việt Nam nhân dân dùng quả bồ kết ngâm hoặc nấu nước gội đầu, làm sạch gầu, trơn tóc và dùng giặt quần áo len, dạ có màu không bị hoen ố và không phai màu.

Trong y học cổ truyền dùng làm thuốc chữa ho, tiêu đờm, chữa sâu răng, chữa chốc đầu, quai bị.

Trong y học hiện đại, một số bệnh viện đã dùng bồ kết để chữa bí trung tiện sau khi mổ, tắc ruột.

Cách dùng: Lấy quả bồ kết nướng vàng, bỏ hạt, tán thành bột mịn. Chấm bột đó vào đầu canule, đưa sâu vào hậu môn 3 - 4 cm, làm như vậy 3 - 4 lần, sau 3 - 5 phút bệnh nhân đánh trung tiện và thông đại tiện.

Quả bồ kết còn dùng trong các trường hợp trúng phong, hôn mê bất tỉnh, cấm khẩu, hen xuyễn, mụn nhọt, viêm tuyến vú, đau nhức răng.

Hạt bồ kết chữa đại tiện táo kết, lỵ mạn tính, ỉa mót rặn, lao hạch, ung độc. Liều dùng: 4,5 - 9 g/ngày, sắc uống hoặc dùng dạng hoàn tán.

Gai bồ kết chữa mụn nhọt, tuyến vú sưng đau.

Kiêng kỵ: Phụ nữ có thai không được dùng bồ kết.

3.2.2. Cam thảo bắc

Radix Glycyrrhizae

Cây cam thảo bắc: *Glycyrrhiza uralensis* Fisch.

Tên khác: Diêm cam thảo, sinh cam thảo, phấn cam thảo

Tên nước ngoài: Liquorice, Sweet wood (Anh), Bois doux, bois sucre, racine douce, reglisse (Pháp)

Họ: Đậu (Fabaceae)

Mô tả

Cây thảo, sống lâu năm, cao 0,3 - 1 m. Rễ dài có màu vàng nhạt. Thân có lông mềm, ngắn. Lá kép lông chim lẻ, mọc so le, lá chét hình trứng, mép nguyên. Cụm hoa mọc ở kẽ lá thành bông, hoa màu tím nhạt, tràng hoa hình cánh bướm. Quả đậu, cong hình lưỡi liềm, dài 3 - 4 cm, rộng 6 - 8 mm màu nâu đen, có lông dầy chứa 2-8 hạt nhỏ, dẹt, màu nâu bóng.

Mùa hoa: tháng 6 - 7 Mùa quả: tháng 8 - 9

Loài cam thảo Âu (*Glycyrrhiza glabra* L.) cũng được dùng với công dụng tương tự. Khác với cam thảo bắc ở chỗ lá chét thuôn dài, hoa màu lơ nhạt, quả rất dẹt, thẳng hoặc hơi cong, dài 2 - 3 cm, rộng 3 - 4 mm nhẵn bóng hoặc có lông ngắn, số hạt ít hơn.

Từ nhiều năm nay đã phát hiện cây thổ cam thảo ở Cao Bằng, với rễ màu vàng đất, vị ngọt nhạt hơn và cây cam thảo đá bia ở Phú Yên (*Telosma procumbens* Merr.) để dùng thay cam thảo bắc. Còn cây cam thảo sóng cắn

(*Albizzia myriophylla* Benth.) ở các tỉnh miền Đông Nam bộ mà vỏ rễ và vỏ thân cũng có vị ngọt, hơi lợm giọng, lại chứa chất độc. Chú ý tránh nhầm lẫn.

Bộ phận dùng

Rễ cam thảo bắc phơi khô hoặc sấy khô. Dược điển Việt Nam I, tập 2 công nhận hai loài *Glycyrrhiza uralensis* và *G.glabra*. Dược điển Trung Quốc 1997 (bản tiếng Anh) công nhận 3 loài *G. uralensis*, *G.inflata* và *G.glabra*.

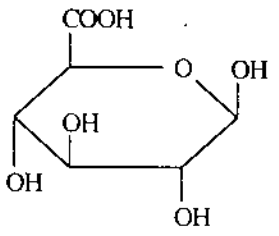
Có 2 dạng dùng: Cam thảo sống

Cam thảo chích

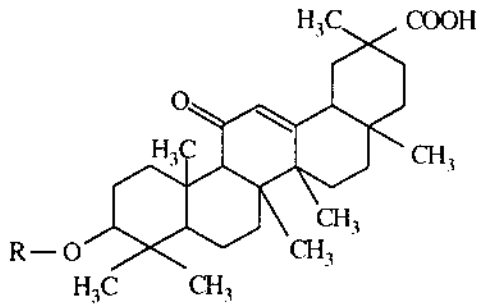
Sau khi sấy khô, đem tẩm mật (cứ 1 kg cam thảo phiến, dùng 200 g mật, thêm 200 g nước sôi) rồi sao vàng.

Thành phần hoá học

G. glabra L. trong rễ chứa saponin triterpen, chủ yếu là glycyrrhizin (8-24%) là muối của acid glycyrrhizic và là chất có vị ngọt (khoảng 50 lần ngọt hơn đường). Acid glycyrrhizic khi thủy phân tạo thành 2 phân tử acid glycuronic và sapogenin là acid glycyrrhizetic



Acid glycuronic



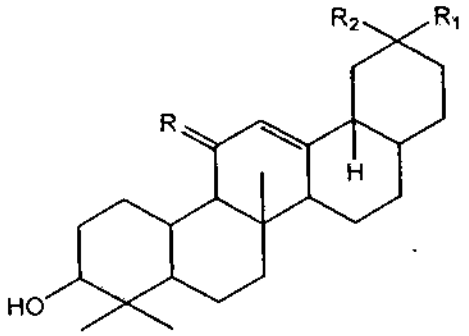
Acid glycyrrhizic R = Glr-Glr

Acid glycyrrhetic R = H

Glycyrrhizin không có tác dụng phá huyết nhưng muối natri của acid glycyrrhetic lại có chỉ số phá huyết là 1 : 5000.

Glycyrrhizin là bột tinh thể trắng, ít tan trong nước lạnh, tan trong nước nóng, nếu để nguội sẽ tạo thành gel, tan trong cồn loãng, không tan trong ether cloroform. Ở trong cây glycyrrhizin tồn tại dưới dạng muối Ca và Mg.

Ngoài ra còn tìm thấy acid liquyritic và acid 11-desoxyglycyrrhetic.



Acid desoxyglycyrrhetic I

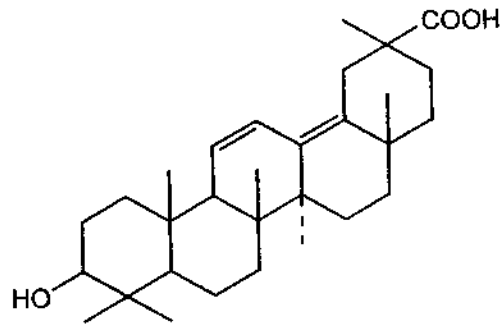
$R = H_2$ $R_1 = COOH$

$R_2 = CH_3$

Acid liquyritic $R = O$

$R_1 = CH_3$

$R_2 = COOH$



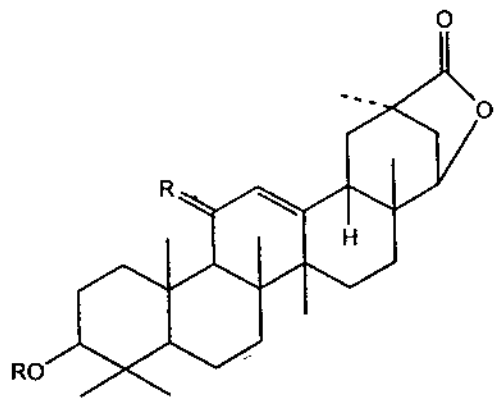
Acid desoxyglycyrrhetic II

Glycyrrhetol

$R = O$ $R_1 = CH_2OH$

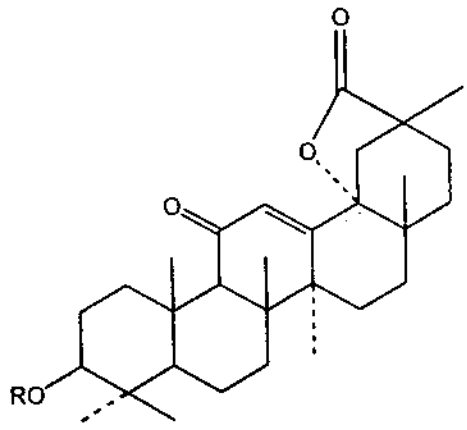
$R_2 = CH_3$

Trên thị trường, glycyrrhizin thương phẩm là ammoniglycyrrhizat. Đó là những vảy đen, bóng, tan trong nước, vị ngọt. Các chất khác là acid 18α hydroxyglycyrrhetic, glycyrrhetol, glabrolid, desoxyglabrolid, isoglabrolid.

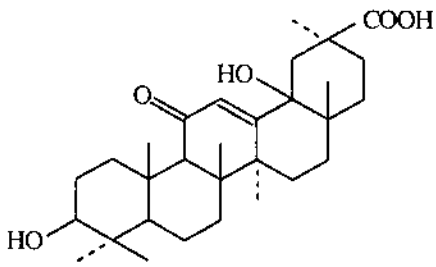


Glabrolid $R = O$

Desoxyglabrolid $R = H_2$



Isoglabrolid



Acid 18α-hydroxyglycyrrhetic

Trong vỏ rễ còn chứa 3-4% flavonoid, coumarin-umbelliferon, herniarin, licoumarin, tinh bột (20%) đường sacharosa và 4-6% pecictin.

Các hợp chất oestrogen có nhân sterol với hàm lượng thấp. Phân đoạn không xà phòng hoá của dịch chiết cồn có tác dụng oestrongen. Dịch chiết ether dầu hoả có chứa chất có tác dụng gây động dục ở chuột cái đã thiến, tác dụng như là với foliculin. Ngoài ra còn có sitosterol và stigmasterol.

***Glycyrrhita uralensis* Fisch.**

Rễ chứa carbonhydrat 4,7- 10,97%, tinh bột 4,17 - 5,92% glycyrrhigin 5,49 - 10,04%, acid 24-hydroxyglycyrrhetic, acid 3(3-hydroxyolean-11,13 (18) dien-30-oic 3β-hydroxyolean-9(11),12(13) dien-30 oic, flavonid có khoảng 20 chất trong đó những chất chính là liquyritin, liquyritigenin, isoliquyritin, isoliquyritigenin, neoliquyritin, deliquyritigenin-7-β-*D*-glucopyranosid, neo- isoliquyritin.

Tác dụng dược lý

Đã có các công trình nghiên cứu về tác dụng dược lý của vỏ rễ cam thảo như tác dụng gây trấn tĩnh, ức chế thần kinh trung ương, giảm vận động tự nhiên hạ thể nhiệt, giảm hô hấp, tác dụng giảm đau, giải co thắt cơ trơn, chữa viêm loét đường tiêu hoá, ức chế tác dụng gây tăng tiết dịch vị của histamin. Tác dụng bảo vệ gan, trong viêm gan mãn tính và tăng bài tiết mật, chống viêm gan và chống dị ứng. Tác dụng oestrogen.

Đã chứng minh natri glycyrrhizat có hiệu lực chống lại tác dụng của các chất gây độc trên tim, đồng thời kích thích co bóp tim giống adrenalin. Natri và kali glycyrrhizat có tác dụng giải độc mạnh đối với độc tố của bạch hầu, chất độc của cá, lợn, nọc rắn, đồng thời có tác dụng bảo vệ chống choáng. Glycyrrhizin có khả năng giải độc tố uốn ván, cocain và cloral hydrat.

Cam thảo còn chữa bệnh Addison vì trong cam thảo có acid glycyrrhetic, cấu tạo gần như cortison, nên có tác dụng trên sự chuyển hoá các chất điện giải, giữ natri và clorid trong cơ thể, giúp sự bài tiết kali.

Ngoài ra cam thảo bắc còn có tác dụng lợi tiểu, chữa táo bón, chữa một số bệnh ngoài da. Dùng thời gian kéo dài có thể gây phù.

Cam thảo bắc có khả năng giải mẫn cảm trong thí nghiệm nuôi cấy tế bào lympho. Phối hợp liều nhỏ cimetidin và cam thảo bắc đã loại bỏ glycyrrhigin, thí nghiệm trên tổn thương niêm mạc dạ dày, đã làm giảm độc tính của cimetidin và có tác dụng tốt điều trị loét dạ dày, tá tràng. Acid glycyrrhizic có tác dụng ức chế sự phát triển của nhiều vi khuẩn trong nuôi cấy và làm mất hoạt tính của vi khuẩn herpes đơn thuần một cách không hồi phục. Khi nghiên cứu so sánh tác dụng chống viêm của các đồng phân lập thể của acid glycyrhetiric người ta thấy đồng phân alpha có tác dụng mạnh hơn đồng phân beta. Người ta cũng nghiên cứu mối quan hệ giữa cấu trúc hoá học và hoạt tính chống độc đối với gan của glycyrrhizin và những chất tương tự.

Công dụng

Cam thảo sống dùng chữa cảm, ho mất tiếng, viêm họng, mụn nhọt, đau dạ dày, ỉa chảy, ngộ độc. Cam thảo chích có tác dụng bổ, chữa tỳ vị hư nhược, ỉa lỏng, thân thể mệt mỏi, kém ăn. Ngày uống 4 - 20 g dưới dạng bột thuốc hãm, nước sắc và cao mềm.

Ngày nay cam thảo thường được sử dụng với hai tác dụng chính:

- Chữa bệnh loét dạ dày và ruột, tác dụng giảm loét, giảm co thắt cơ trơn, giảm tiết acid hydrocloric. Ngày uống 3 - 5 g, uống liền 7 - 14 ngày, sau đó nghỉ vài ngày để tránh phù nề.

- Chữa bệnh Addison, mỗi ngày uống 10 - 30 ml cao lỏng cam thảo bắc, uống liền một tháng hay hơn. Hiện tượng phù nề do thuốc sẽ mất đi sau khi ngừng.

Cam thảo bắc dùng phối hợp với cortison có thể làm giảm tác dụng của cortison. Gần đây có tác giả cho rằng glycyrrhizin không phải là hoạt chất, nên chế cam thảo đã loại bỏ chất này.

Rễ cam thảo bắc còn có tác dụng nhuận tràng nhẹ được dùng chữa các chứng bệnh xuất tiết và các chứng kích thích niêm mạc các cơ quan đường tiết niệu. Trong y học dân gian Ấn Độ, cam thảo bắc còn được dùng nhai với lá trầu không, nhào với bơ sữa trâu hoặc mật ong để đắp ngoài chữa vết chém, vết thương.

3.2.3. Mướp đắng

Fructus flos et radix Momordicae charantiae

Cây mướp đắng: *Momordica charantia* L.

Tên khác: Khổ qua, ổ qua, mướp mủ, chua hao (Mường Thanh Hoá), má hói khóm (Tày Cao Bằng, Lạng Sơn)

Họ: Bầu bí (Cucurbitaceae)

Mô tả:

Dây leo bằng tua cuốn, sống một năm, thân thường có cạnh, non có lông, nhất là ngọn, sau nhẵn. Lá mọc so le, có cuống dài 3 - 5 cm, có lông. Phiến lá hình gần tròn, thường xẻ 5 - 7 thùy, gốc lá hình tim, mép khía răng. Hoa đực và hoa cái mọc riêng rẽ ở kẽ lá, màu vàng. Quả hình trụ, hình con thoi hoặc hình cầu nhọn ở hai đầu. Kích thước quả thay đổi tuỳ theo từng giống, có thể từ 3 -6 cm về đường kính. 4 - 22 cm về chiều dài, vỏ có nhiều gai nhọn hay gai tù. Màu sắc của quả khi chưa chín cũng thay đổi theo từng giống, từ màu xanh lá cây đến xanh nhạt hoặc trắng xanh... khi chín chuyển sang màu vàng da cam có phớt hồng, thường nứt thành 3 mảnh dọc lộ ra áo hạt màu đỏ.Hạt nhiều hình răng ngựa, hay hơi giống hình con rùa, dẹt, thắt lại đột ngột ở 2 đầu. Mùa hoa quả phụ thuộc vào thời vụ gieo trồng ở các nơi khác nhau và có thể kéo dài tới 2 tháng. Phạm Văn Thanh (Viện Dược liệu) chia thành 3 giống chính (cultivar) giống quả to, dài thẳng, màu xanh nhạt, hay trắng xanh, gai tù, vị đắng ít; giống thứ hai: quả dài hơi cong, màu xanh xẫm gai nhọn, vị đắng nhiều, thịt quả dày; giống thứ ba: quả tròn nhỏ, nhọn đột ngột ở hai đầu, xanh nhạt, gai tù, vị đắng ít.

Bộ phận dùng: quả, hoa, rễ

Phổ biến nhất là dùng quả. Chọn quả vàng lục dùng tươi hoặc phơi sấy khô. Nếu cần hạt thì lấy ở những quả chín phơi khô. Rễ thường dùng tươi.

Thành phần hoá học

+ Các hợp chất có khung cucurbitan, phần chính là 1 khung 4 vòng và một mạch nhánh như: các glycosid:

Momordicosid A, B, C, D, E, F_1, F_2, I, G, K, L

Charantin (hỗn hợp của 2 chất)

Cucurbitan triterpenoid I,II,III

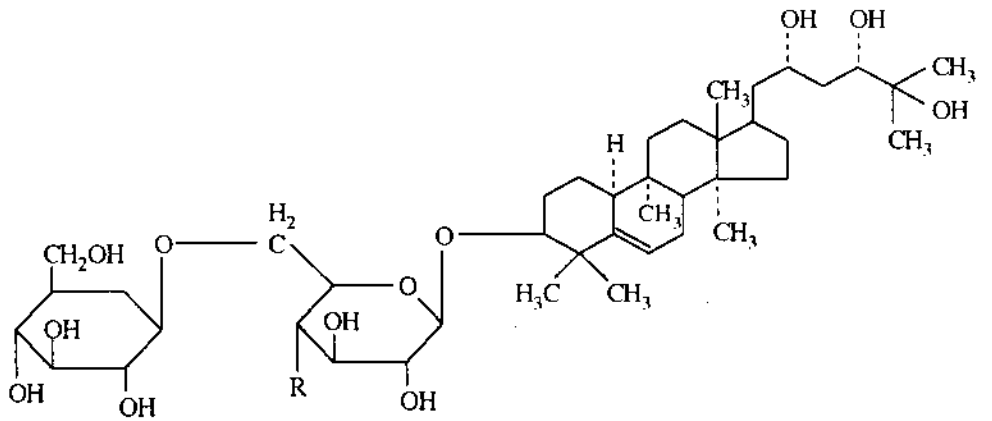
Momorcharasid I,II,III

Momordicin I,II,III

Nuomiosid A (Calceolariosid E)

+ Các polypeptid- lectin: Nhiều protein đã xác định được chuỗi acid amin tận cùng và xác định được trọng lượng phân tử như MAP-30, MCI, MCTI I,II,III, α, β momorcharin, momorcharin I,II.

+ Các nhóm hợp chất khác như chất dẫn dụ côn trùng, chất màu lycopen, β-caroten, các acid amin, các vitamin, acid béo...

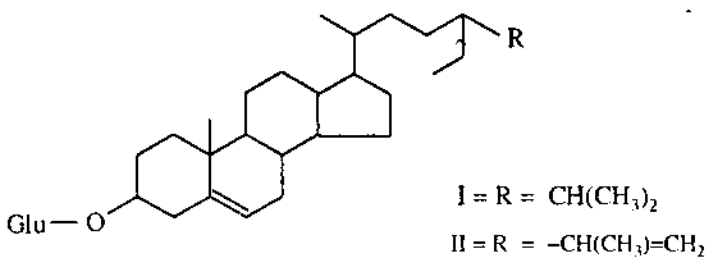


I: momordicosid A (3-O-β-gentiobiosid)

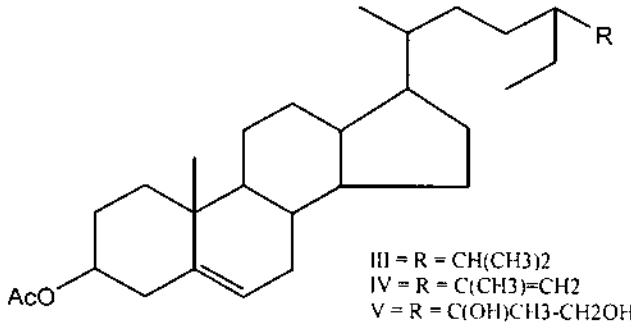
$C_{42}H_{72}O_{15}$ M=817,022 Mp 181-187° $[\alpha]^{20}_D$ +1,05°

II: Momordicosid B (3-O-β-*D*-xylopyranosyl (1→4) (β-*D*-glucopyranosyl (1-6) J-β-*D*-glucopyranosid của cucurbit 5 ene-3β, 22(*S*), 23(*R*), 24(*R*), 25 pentaol

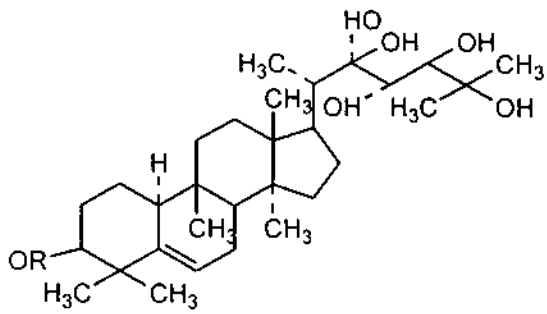
$C_{47}H_{80}O_{19}$ M = 949,138 Mp 238 - 42° $[\alpha]^{20}_D$ = 615°



Chất 5,25 stigmastadien-3β-ol-(3 *D*-glucosid (II) là một trong thành phần chủ yếu của hỗn hợp glucosid được gọi là charantin, đó là chất (II) và chất β-sitosterol 3β-*D* glucosid, đã được Wolfgalg Suerow phân lập vào năm 1965. Tác giả còn phân lập được 4 chất không thuộc nhóm glucosid.

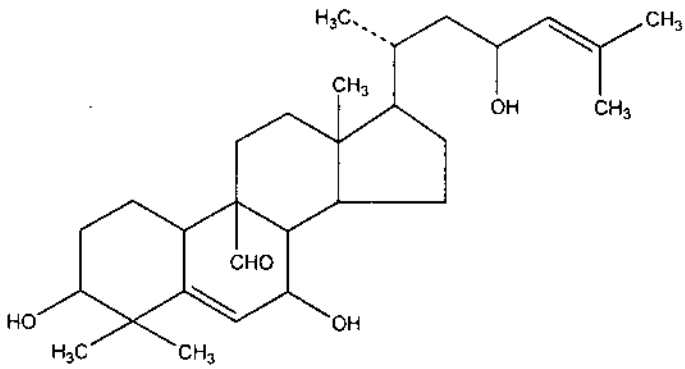


III = R = CH(CH3)2
IV = R = C(CH3)=CH2
V = R = C(OH)CH3-CH2OH
VI = R = CO-CH3



I R = β-*D*-galactopyranosyl-
(1-6) β-*D*-galactopyranosyl
II R = β-*D*-glucopyranosyl

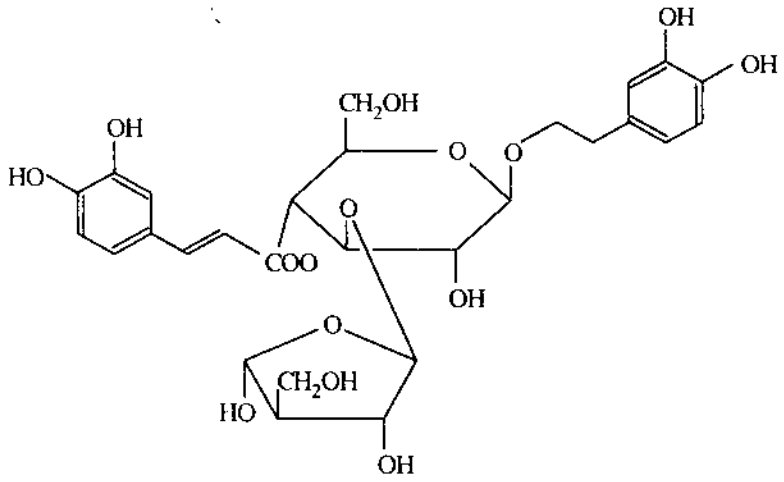
I = momorcharasid A
II = momorcharasid B



Momordicin I: 3β,7β, 23ξ trihydroxy cucurbita 5,24 dien-19al

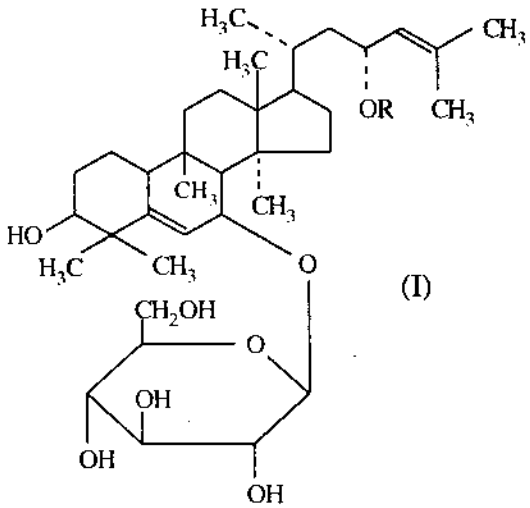
Momordicin II: 23-O-β glucopyranosid của momordicinI

Momordicin III: 23-O-β glucopyranosid của 3β,7β, 23ξ trihydroxy-24-oxo-cucurbita-5,25 dien-19al

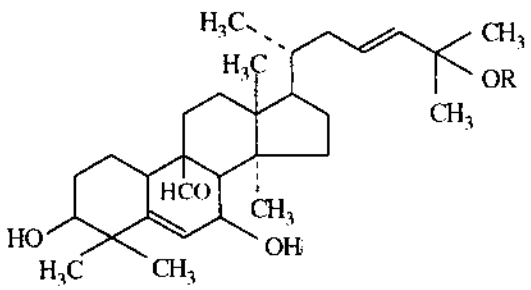


Nuomiosid A
(calceolariosid E)
$C_{28}H_{34}O_{15}$ M = 610,568 $[\alpha]_D$ –52,3°

Năm 1990 các tác giả Nigeria đã phân lập được 3 chất thuộc nhóm cucurbitan triterpenoid (I,II,III)



(I)



(I) $C_{36}H_{60}O_8$ M = 620,865
{anpha}D = 89,0°

(II) : R = H
(III) : R= CH_3

Tác dụng dược lý

Dịch ép, dịch chiết với ethanol và dịch chiết nước, được thử tác dụng hạ đường huyết bằng đường uống, đường tiêm trên thỏ, chuột cống trắng ở tình trạng bình thường và động vật đái tháo đường gây bởi aloxan, streptozotocin và liệu pháp dung nạp glucose. Theo dõi tác dụng trực tiếp của thuốc trên đường máu, hay theo dõi tác dụng gián tiếp trên biến chứng của bệnh đái tháo đường như làm chậm thời gian đục thể thủy tinh ở mắt. Các thí nghiệm đều cho thấy mướp đắng có tác dụng hạ đường huyết một cách có ý nghĩa.

Nhiều thành phần trong quả, hạt, lá, thân được coi là có hoạt tính gây hạ đường máu như: protein có tác dụng kiểu insulin, hỗn hợp của β-sitosterol, 3β *D*-glucosid và 5,25-stigmastadien 3β ol- β *D*-glucosid (charantin), vicin, pyrimidin, nucleosid.

Cơ chế tác dụng chống đái tháo đường của mướp đắng được giải thích theo ba cách: mướp đắng có tác dụng tương tự insulin, hoặc kích thích tế bào beta của đảo tụy tăng tiết insulin, hai là mướp đắng có tác dụng ngoài tụy, như ức chế hoạt động của các men tổng hợp glucose như glucose-6 phosphatase và fructose-1-6-bisphosphatase hay tăng cường oxy hoá glucose bằng cách hoạt hoá men glucose-6-phosphat dehydrogennase hay tăng hấp thu glucose vào các mô. Ba là mướp đắng có tác dụng thu nhặt loại trừ các gốc superoxyd và hydroxyl những gốc này có liên quan đến đái tháo đường.

Một số nghiên cứu về mướp đắng trên tế bào ung thư như chống gây đột biến tế bào, ức chế sự hình thành khối u và chống bệnh bạch cầu ở chuột.

Gần đây một số tác giả còn thử tác dụng của protein MAP- 30 và thấy có khả năng ức chế HIV. α-Momorcharin là thành phần duy nhất của momorcharin có tác dụng ức chế sự nhân đôi của HIV trong tế bào lympho nhiễm virus.

Đã có một số công trình nghiên cứu trong và ngoài nước về mướp đắng trên bệnh nhân đái tháo đường và thấy có tác dụng tốt.

Công dụng

Quả được sử dụng chữa ho dai dẳng, ngứa họng, chữa viêm nhiệt đau đầu, trừ rôm sẩy trẻ em, chữa đái rắt, đái buốt, đái đường. Quả còn được dùng trong dân gian chữa trĩ, bệnh gout, bệnh gan, thấp khớp. Viện Dược liệu đã sản xuất thành thuốc với tên là Morantin chữa bệnh đái tháo đường.

Lá nấu nước uống chữa ho, có thể giã nhỏ thêm ít muối chữa viêm họng. Lá mướp đắng với rau củ khởi và hoa thiên lý nấu canh ăn chữa mệt mỏi, lao lực, sốt nhẹ, háo khát.

Gốc và thân trong y học cổ truyền gọi là ty qua hay thiên la chữa viêm xoang, chảy nước mũi có mùi hôi.

Hạt thì chữa rắn cắn, chữa ho. Bài thuốc chữa rắn cắn của lương y Lê Ngọc Dị, Huyện Chợ Gạo, Tiền Giang gồm: hạt mướp đắng 4 g, mã tiền sống 2 g, long não 4 g, hạt nén 4 g. Tán nhỏ nhồi với sáp ong. Rễ dùng chữa trĩ và làm săn da.

3.2.4. Sâm Việt Nam

Radix Ginseng

Cây sâm Việt Nam: *Panax vietnammensis* Ha et Gruvsh.

Tên khác: Sâm khu V, Sâm Ngọc Linh, Củ ngãi rợm, Cây thuốc giấu

Họ: Nhân sâm (Araliaceae)

Mô tả

Cây thảo sống nhiều năm, cao 40 - 60 cm có khi tới 1m. Thân rễ nạc , đường kính 1 - 3,5 cm, có thể dài tới 1 m. Đốt trên cùng của thân rễ có từ 1 - 4 thân, thân nhẵn, rỗng, có 3 mặt hơi tròn, có những rãnh nhỏ theo chiều dọc. Lá mọc vòng, thường có 4 (ít khi 3, 5, 6) lá kép chân vịt có 5 (ít khi có 6, 7) lá chét. Lá chét trên cùng hình trứng ngược hoặc mũi mác, đầu lá thường nhọn đột ngột. Cụm hoa dài 25 cm gấp 1,5 - 2 lần chiều dài của cuống lá, thường mang một tán đơn, đôi khi có thêm 1 - 4 tán phụ. Cuống hoa dài 1,5 - 2 cm, có nhiều lông. Hoa màu vàng lục nhạt, đường kính hoa nở 3 - 4 cm. Đài 5 răng hình tam giác dài 1 - 1,5 cm. Tràng có 5 cánh hoa hình trứng dài 2 mm, bao phấn hình trái xoan dài 1 mm. Quả khi chín màu đỏ, thường có 1 chấm đen ở đỉnh quả, quả có 1 hạt hình thận, quả có 2 hạt hình cầu hơi dẹt dài 7 - 10mm. Hạt lớn dài 8 mm, vỏ hạt cấu tạo bởi nhiều vết xốp lồi lõm.

Ra hoa vào tháng 4 - 6, quả có vào tháng 7 - 9.

Bộ phận dùng

Thân rễ và rễ của sâm Việt Nam đào rửa sạch, phơi hoặc sấy khô dùng như nhân sâm. Lá sâm phơi khô sắc nước uống bổ, mát.

Thành phần hoá học

Các tác giả Nguyễn Thới Nhâm và Trần Công Luận đã chứng minh trong rễ củ cây sâm Việt Nam có 49 saponin, trong đó 25 chất đã được phát hiện trong các loài panax khác như: ginsenosid Rb_1 (2%), ginsenosid Rg_1 (1,4%), ginsenosid Rd (0,8%)... Đặc biệt các tác giả đã phát hiện thấy trong sâm Việt Nam có 24 chất saponin damaran mới và đặt tên là vinaginsenosid 1-14 và vinaginsenosida-j với một lượng lớn saponin damaran kiểu ocotilol (5,58% so với nguyên liệu và chiếm 50% trong saponin toàn phần).

Các hợp chất tiêu biểu của sâm Việt Nam là majonosid-R_2 gấp 42 lần hàm lượng của chất này trong sâm Nhật Bản (*panax Japonicus* var. *major*). Đã phân lập và xác định câu trúc của 7 hợp chất polyacetylen từ sâm Việt Nam trong đó 2 chất chủ yếu là panaxynol (0,0084%) và heptadeca-1,8 (E) dien- 4,6 dien-3,10 diol (0,0028%). Hai hợp chất này cũng có trong sâm Triều Tiên và đã chứng minh có tác dụng độc với tế bào và kháng ung thư.

Các tác giả cũng đã xác định được 17 acid béo với hàm lượng là 0,53% trong sâm Việt Nam, trong đó có 5 chất quan trọng nhất là acid palmatic, stearic, oleic, linoleic và linolinic. Đặc biệt acid linoleic và linolenic là những chất có tác dụng chống lão hoá tế bào (antioxydant). Ngoài ra cũng xác định được 18 acid amin và 20 nguyên tố vi lượng, các hợp chất sterol, glucid, tinh dầu và vitamin C

Như vậy về thành phần nhóm chất saponin triterpen có hàm lượng cao nhất (12 - 15%) và có số lượng các saponin (49) nhiều hơn so với các loài *panax* khác đã được nghiên cứu trên thế giới như nhân sâm Triều Tiên (26 saponin).

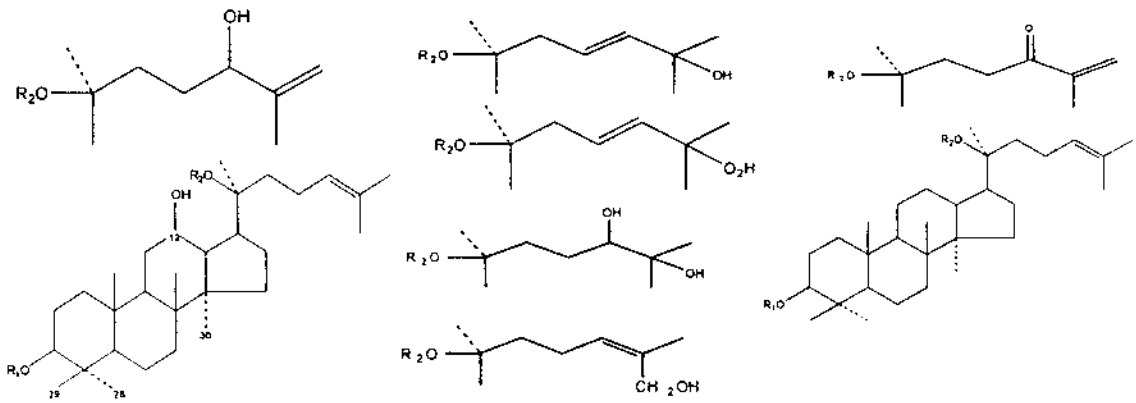
Saponin triterpen damaran hiện diện chủ yếu trong sâm Việt Nam đã xác định giá trị của nó cao như sâm Triều Tiên, sâm Nhật Bản, sâm Mỹ và tam thất. Trong đó saponin kiểu ocotilol với hàm lượng khá cao là một điểm khác biệt khá lý thú so với các loài sâm khác đặc biệt là hợp chất majonosid- R_2.

1. Phần dưới mặt đất (thân rễ và rễ củ)

1.1. Hợp chất saponin

49 hợp chất saponin bao gồm 25 saponin đã biết và 24 saponin có cấu trúc mới được đặt tên là vina-ginsennosid - R1- R24.

Các saponin dẫn chất của 20 (S)- Protopanaxadiol



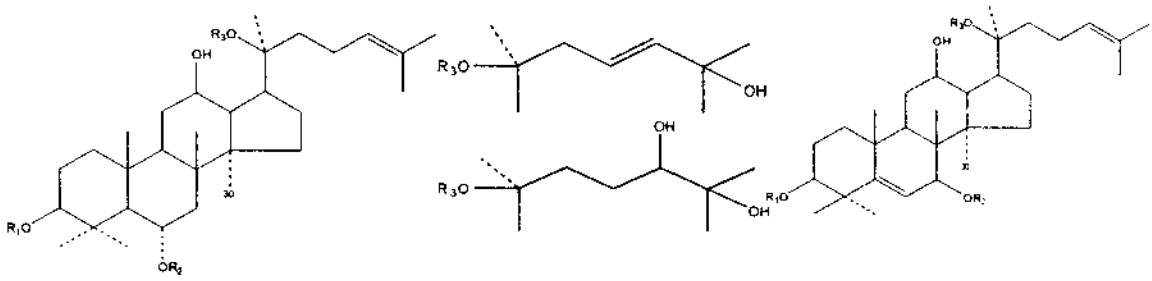
$R_1 = R_2 = H$: 20 (*S*) - protopanaxadiol (A)

20 (*S*)- Protopanaxadiol

Tên	Kiểu	R_1	R_2	Hiệu suất (%)
G-Rb_1*	(A)	- Glc^2- Glc	- Glc^2- Glc	2,0
G-Rb_2	(A)	- Glc^2- Glc	- Glc^6- Ara (P)	0,012
G-Rb_3 *	(A)	- Glc^2- Glc	- Glc^6- Xyl	0,11
G-R_0	(A)	- Glc^2- Glc	- Glc^6- Ara (f)	0,013
G-Rd*	(A)	- Glc^2- Glc	- Glc	0,87
PG-Rc_1	(A)	- Glc^2- Glc^6- Ac	- Glc	0,001
GY- IX	(A)	- Glc	- Glc^6- Xyl	0,002
GY- XYII	(A)	- Glc	- Glc^6- Glc	0,036
Q-R_1	(A)	- Glc^2- Glc^6- Ac	- Glc^6- Glc	0,012
N-Fa	(A)	- Glc^2- Glc^2- Xyl	- Glc^6- Glc	0,072
M-F_1	(B)	- Glc^2- Glc	- Glc	0,001
VG- R3	(H)	- Glc^2- Glc	- Glc	0,009
VG- R7	(A)	- Glc^2- Glc^2- Xyl	- Glc	0,01
VG- R8	(C)	- Glc^2- Glc	- Glc	0,004
VG- R9	(B)	- Glc^2- Glc	- Glc	0,004
VG- R13	(E)	- Glc^2- Glc	- Glc	0,002
VG- R24	(A)	- Glc^2- Glc	- Glc	0,001
VG- R23	(A)	- Glc^2- Glc	- Ara	0,001
VG- R22	(A)	- Glc^2- Glc	- Xyl	0,001
VG- R16	(D)	- Glc^2- Glc	- Glc	0,003
VG- R21	(G)	- Glc^2- Glc	- Glc	0,001
VG- R20	(F)	- Glc^2- Glc	- Glc	0,003

Ghi chú: G = ginsenosid: PG = pseudo - ginsenosid; GI = gipenosid; Q = quynque- noisid; N = noto ginsenosid; M = majonosid; VG = vina- ginsenosid; *: các saponin chính

Các saponin dẫn chất của 20 (*S*)- Protopanaxatriol



$R_1 = R_2 = R_3 = H$: 20 (*S*) – protopanaxatriol (1)

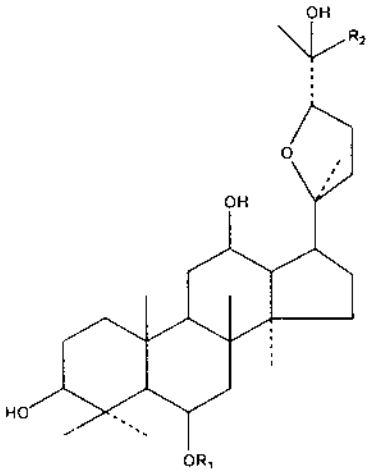
20 (S)- Protopanaxadiol

Tên	Kiểu	R_1	R_2	R_3	Hiệu suất (%)
G-Re*	(I)	-H	-Glc^2- Rha	- Glc	0,17
20-glc-G-Rf	(I)	-H	-Glc^2- Glc	- Glc	0,01
G-Rg_1*	(I)	-H	-Glc	- Glc	1,37
G-Rh_1	(I) 20(R),20(S)	-H	- Glc	- H	0,008
PG-RS_1	(I)	-H	- Glc^2-Rha (6 — Ac)	- Glc	0,013
N-R_1*	(I)	-H	- Glc^2- Xyl	- Glc	0,36
N-R_6	(I)	-H	- Glc	-Glc^6- αGlc	0,01
VG-R4	(I)	-Glc^2-Glc	-H	-Glc	0,004
VG-R12	(K)	-H	-Glc	-H	0,005
VG-R15	(J)	-H	-Glc	-Glc	0,003
VG-R17	(K)	-H	-Glc	-Glc	0,002
VG-R18	(K)	-H	-Glc	-Glc	0,002
VG-R19	(L)	-Glc^2-Glc	-H	-Glc	0,006

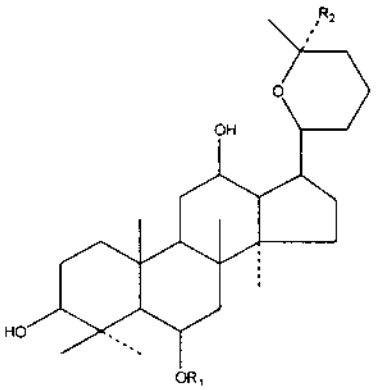
Ghi chú: *: các saponin chủ yếu trong thành phần saponin dẫn chất protopanaxatriol

Glc: β-*D*-glucopyranosyl; α-Glc: α-glucopyranosyl; GlcA: β-*D*-glucoronopyranosyl; Rha: α-*L*-rhamnopyranosyl; Xyl: β-*D*-xylopyranosyl; Ara: α-arabinopyranosyl; Ara(F): α-*L*-arabinofupyranosyl; Ara(p) : α-arabinopyranosyl; Ac:acetyl

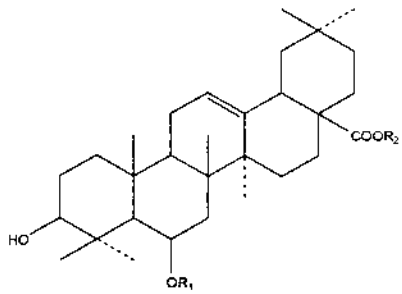
Các saponin có cấu trúc ocotillol và dẫn chất của acid oleanolic



R_1 = H, R_2 = CH_3
20 (*S*)-protopanaxatriol oxyd II (M)



R_1 = H, R_2 = CH_3
20(*S*) 25-epoxydammaran 3beta, 6 anpha, 24(R)-tetrol (N)



R_1 = R_2 = H: acid oleanolic (O)

Ocotillol

Tên	Kiểu	R_1	R_2	Hiệu suất (%)
PG-RT_4	(M)	-Glc	$-CH_3$	0,065
24 (*S*)-PG-F_{11}	(M)	-Glc^2-Rha	$-CH_3$	0,005
M-R_1*	(M)	-Glc^2-Glc	$-CH_3$	0,14
M-R_2*	(M)	-Glc^2- Xyl	$-CH_3$	5,29
VG-R1	(M)	-Glc^2-Rha 6 \ Ac	$-CH_3$	0,033
VG-R2	(M)	-Glc^2- Xyl 6 \ Ac	$-CH_3$	0,014
VG-R5	(M)	-Glc^2-Xyl^4-αGlc	$-CH_3$	0,008
VG-R6	(M)	-Glc^2-Xyl 6 \ αGlc	$-CH_3$	0,006
VG-R14	(M)	-Glc^2-Xyl	$-CH_2OH$	0,02
VG-R10	(N)	-Glc	$-CH_3$	0,007
VG-R11	(N)	-Glc^2-Xyl	$-CH_3$	0,03

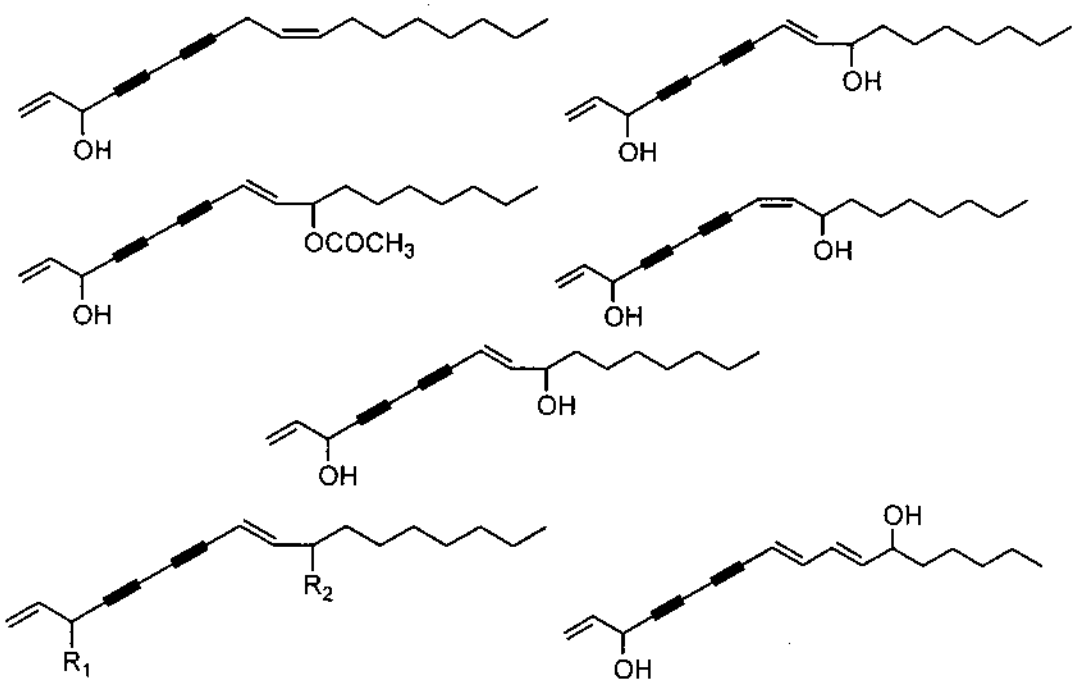
Acid oleanolic

Tên	Kiểu	R_1	R_2	Hiệu suất (%)
G-R_0	(O)	-Glc^2-Glc	-Glc	0,038
H-Ma3	(O)	-Glc^2-Glc 3 \ Ara(p)	-Glc	0,05

Ghi chú: *: các saponin chính,H = hemslosid

1.2. Hợp chất polyacetylen

7 hợp chất polyacetylen được phân lập ở phân đoạn II phân cực. 5 hợp chất đã được xác định cấu trúc với panaxynol và heptadeca- 1,8 (*E*)-dien-4, 6-diyn-3,10-diol là 2 polyacetylen chính và 2 hợp chất mới là 10-acetoxy- heptadeca- 8 (*E*)-en-4,6-diyn-3-olvà heptadeca-1,8 (*E*),10 (*E*)- trien- 4,6-diyn- 3,10-diol.



R_1 = OH hoặc Oac; R_2 = Oac hoặc OH

Ghi chú: Pv1= panaxynol , Pv2=10-acetoxy-heptadeca-8 (*E*)-en-4,6-diyn-3-ol,Pv3 = stereoisomer của Pv5, Pv4 = dẫn xuất của Pv5, Pv5 = heptadeca-1,8(*E*)-dien- 4,6-diyn-3,10-diol, Pv6 = heptadeca-1,8(*Z*)-dien-4,6-diyn-3,10diol, Pv7 = heptadeca-1,8(*E*), 10 (*E*)-trien-4,6-diyn-3,12-diol.

1.3. Thành phần acid béo

Stt	Số carbon của hợp chất	(%)	Tên của acid béo
1	8C	vết	
2	10C	vết	
3	11C	vết	
4	12C	0,22	
5	13C	0,31	
6	14C	1,33	
7	15C	0,40	
8	$15C^{1=}$	0,31	
9	16C	29,62	a. palmitic
10	$16C^{1=}$	vết	
11	17C	1,13	
12	$17C^{1=}$	vết	
13	18C	4,48	a. stearic
14	$18C^{1=}$	13,26	a. oleic
15	$18C^{2=}$	40,04	a. linoleic
16	$18C^{3=}$	2,61	a. linolenic
17	20C	1,51	

02 Hàm lượng dầu béo: 0,55%

1.4. Thành phần acid amin

Stt	Acid amin	Acid amin tự do (%)	Acid amin thủy giải (%)
1	Hyprophan	10,20	
2	Lysin	17,90	5,29
3	Histidin	1,02	2,59
4	Arginin	46,66	12,90
5	Acid apartic	7,60	10,38
6	Threonin	1,20	5,19
7	Serin	5,12	5,19
8	Acid glutanic	2,05	6,49
9	Prolin	3,07	15,58
10	Glycin	4,10	5,19
11	Alanin		5,19
12	Cystin	1,53	vết
13	Valin	0,51	1,29
14	Methionin	0,51	vết
15	Isoleusin	1,02	2,59
16	Leucin	1,02	5,19
17	Tyrosin	0,51	6,49
18	Phenylanin	0,51	6,49

1.5. Thành phần các nguyên tố vi lượng

Stt	Nguyên tố vi lượng	Hàm lượng (ppn)	Stt	Nguyên tố vi lượng	Hàm lượng (ppn)
1	K	9349,19	11	Br	17,27
2	Ca	2844,74	12	Ni	10,61
3	Mg	1950,19	13	Cu	6,23
4	Fe	491,21	14	Cr	4,10
5	Sr	169,87	15	Y	1,51
6	Ti	120,65	16	I	0,24
7	B	140,00	17	Co	0,15
8	Rb	91,62	18	As	0,10
9	Mn	68,10	19	Se	0,05
10	Zn	26,11	20	Hg	0,04

1.6. Hợp chất sterol: β-sitosterol và daucosterin (β-sitosteryl-3-O-β-*D*-glucopyranosid)

1.7. Hợp chất glucid: (Định lượng theo phương pháp Bertran)

- Đường tự do: 6,19%
- Đường toàn phần: 26,77%

1.8. Các thành phần khác: (Trong thân rễ và rễ củ tươi)

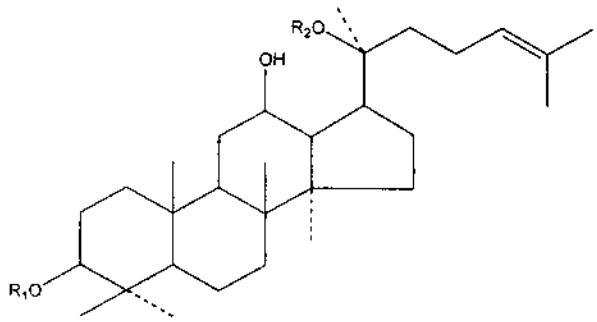
- Tinh dầu: 0,05-0,10%
- Sinh tố C: 0,059%

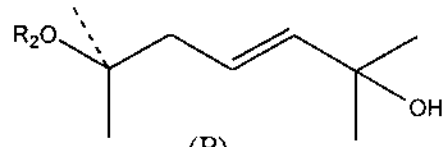
2. Phần trên mặt đất (lá SVN)

2.1. Hợp chất saponin

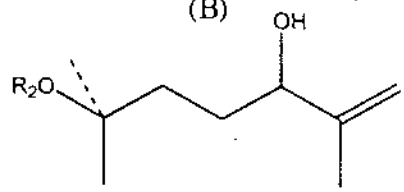
19 saponin damaran đã được phân lập từ phần trên mặt đất của sâm Việt Nam (SVN) bao gồm 11 saponin đã biết và 8 saponin có cấu trúc mới được đặt tên là Vinaginsenosid- L1- L8.

Các saponin dẫn chất của 20(S)-protopanaxadiol ở phần trên mặt đất của sâm Việt Nam.





(B)



(C)

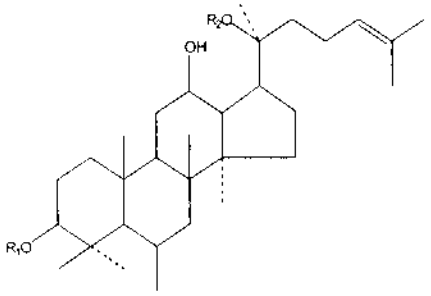
$R_1 = R_2 = H$: 20 (*S*) – protopanaxadiol (A)

20 (S)- protopanaxadiol

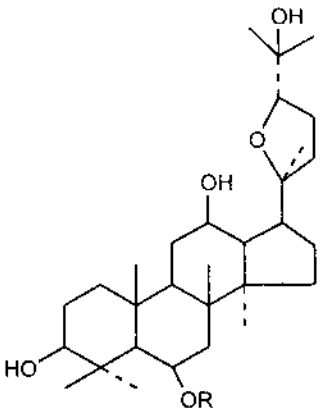
Stt	Tên	Kiểu	R_1	R_2	Công thức nguyên	Trọng lượng phân tử	Hiệu suất (%)
1	G-F_2	(A)	-Glc	-Glc	$C_{42}H_{72}O_{13}$	784	0,036
2	G-Fd	(A)	-Glc^2-Glc	-Glc	$C_{48}H_{82}O_{18}$	946	0,005
3	N-Fe*	(A)	-Glc	-Glc^6-Ara(f)	$C_{47}H_{80}O_{17}$	916	0,134
4	GY-IX	(A)	-Glc	-Glc^6-Xyl	$C_{47}H_{80}O_{17}$	916	0,088
5	G-Rb_3*	(A)	-Glc^2-Glc	-Glc^6-Xyl	$C_{53}H_{90}O_{22}$	1078	0,163
6	VG-L1	(A)	-Glc^2- Glc^2-Xyl	-H	$C_{47}H_{80}O_{17}$	916	0,001
7	VG-L2	(A)	-Glc^2- Glc^2-Xyl	-Glc^6-Ara(f)	$C_{58}H_{98}O_{26}$	1210	0,110
8	N-Fe*	(A)	-Glc^2- Glc^2-Xyl	-Glc^6-Xyl	$C_{58}H_{98}O_{26}$	1210	0,341
9	VG-L3	(B)	-Glc^2-Glc	-Glc^6-Xyl	$C_{53}H_{90}O_{23}$	1094	0,002
10	VG-L4	(B)	-Glc^2- Glc^2-Xyl	-Glc^6-Xyl	$C_{58}H_{98}O_{27}$	1226	0,001
11	VG-L5	(C)24(R)	-Glc	-Glc^6-Ara(f)	$C_{47}H_{80}O_{18}$	932	0,003
12	VG-L6	(C)24(R)	-Glc	-Glc^6-Xyl	$C_{47}H_{80}O_{18}$	932	0,002
13	VG-L7	(C)24(R)	-Glc^2-Glc	-Glc^6-Xyl	$C_{53}H_{90}O_{23}$	1094	0,001

Ghi chú: (*) các saponin chính yếu trong thành phần saponin dẫn chất của protopanaxadiol

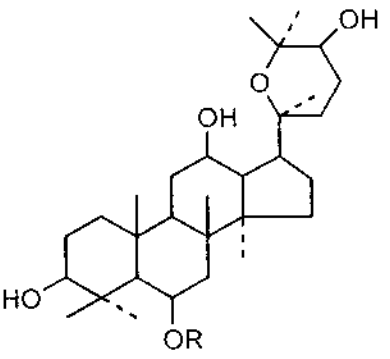
Các saponin dẫn chất của 20(*S*)- protopanaxadiol và saponin có cấu trúc ocotillol ở phần trên mặt đất của sâm Việt Nam



$R_1 = R_2 = R_3 = H$:
20 (S)-protopanaxatriol (*D*)



R = H:
20 (*S*)-protopanaxatriol oxide II (*E*)



R = H: 25-epoxydammarano 3 beta, 6 anpha, 12 beta, 24 (*R*) – tetrol (*F*)

Tên	Kiểu	R_1	R_2	R_3	Công thức nguyên	Trọng lượng phân tử	Hiệu suất (%)
PG-RS_1	*(D)*	-H	-Glc^2-Rha 6 \ Ac	-Glc	$C_{50}H_{84}O_9$	988	0,013
G-Re	*(D)*	-H	-Glc^2-Rha	-Glc	$C_{48}H_{82}O_{18}$	946	0,011
G-Rg_1	*(D)*	-H	-Glc	-Glc	$C_{42}H_{72}O_{14}$	800	0,001

Ocotillol

Tên	Kiểu	R	Công thức nguyên	Trọng lượng phân tử	Hiệu suất (%)
VG-L8	(*F*)	-Glc^2-Rha	$C_{42}H_{72}O_{14}$	800	0,001
24(*S*)-PG-F_{11}	(*E*)	-Glc^2-Rha	$C_{42}H_{72}O_{14}$	800	0,006
VG-R1*	(*E*)	-Glc^2-Rha \ Ac	$C_{44}H_{74}O_{15}$	842	0,155

Ghi chú: (*) saponin chính

2.2. Thành phần các nguyên tố vi lượng

Stt	Nguyên tố vi lượng	Hàm lượng (ppm)
1	Pb	5,38
2	Cu	18
3	Zn	18
4	Sn	10,75

3. Định lượng hợp chất saponin

3.1. Thân rễ và rễ củ hoang dại. 16,79% (phương pháp TLC-densitometre, tính theo M.R2)

3.2. Phần dưới mặt đất của sâm trồng bán hoang dại. (Trà Linh - Quảng Nam)

Hàm lượng một số saponin chính trong SVN (đã trừ độ ẩm)

Nguyên liệu	Hàm lượng saponin chính				
	G-Rb_1	G-Rd	G-Rg_1	M-R2	Tổng cộng
Đầu mầm	0,943	0,898	1,359	2,859	6,059
Sâm 2 tuổi	0,797	0,426	1,235	1,868	4,326
Sâm 3 tuổi	0,846	0,678	1,419	2,409	5,352
Rễ củ 4 tuổi	0,818	0,396	1,696	3,141	6,051
Rễ củ 5 tuổi	1,721	0,518	2,219	3,816	8,674
Rễ củ 6 tuổi	1,824	0,632	2,852	4,166	9,474
Thân rễ 4 tuổi	1,518	1,778	2,432	2,946	8,674
Thân rễ 5 tuổi	1,565	0,981	1,652	4,276	8,494
Thân rễ 6 tuổi	2,716	0,840	3,648	5,342	12,546

- Hàm lượng các saponin chính tổng cộng trong SVN tăng theo tuổi.
- Hàm lượng các saponin chính tổng cộng trong thân rễ cao hơn trong rễ củ cùng năm tuổi.

3.3. Phần trên mặt đất của sâm trồng bán hoang dại: (Trà Linh - Quảng Nam)

Hàm lượng saponin toàn phần tính theo chuẩn Notogisenosid- Fc trên dược liệu khô kiệt: 7,03% (theo phương pháp đo quang).

Tác dụng dược lý

Ba tác dụng dược lý quan trọng của các loài thuộc chi *Panax* như sau:

+ Tác dụng bồi bổ cơ thể- gia tăng chuyển hoá

+ Tác dụng tăng lực- chống nhược sức

+ Tác dụng sinh thích nghi (Adaptogen)- tăng sức đề kháng.

Nghiên cứu về tác dụng dược lý của sâm Việt Nam đã trở thành đối tượng chính. Các công trình nghiên cứu đã chứng minh sâm Việt Nam có tác dụng tăng lực, tăng cường các hoạt động của não bộ, tăng khả năng sinh dục, có tác dụng sinh thích nghi, có tác dụng chống phóng xạ, kháng viêm, giảm đau. Đồng thời có tác dụng hiệp lực với thuốc hạ đường huyết, hạ cholesterol. Tác dụng kháng khuẩn, đặc biệt trên các chủng *streptococous* gây viêm họng. Tác dụng bảo vệ gan và gia tăng hàm lượng cytochrom P450 trong vi thể gan. Các tác dụng trên đã được kiểm chứng trên lâm sàng.

Gần đây Nguyễn Thu Hương kết hợp với Viện Nghiên cứu Phương đông- Đại học Y - Dược Toyama và Hiroshima Nhật Bản đã chứng minh: Sâm Việt Nam có tác dụng phục hồi các rối loạn bệnh lý gây bởi stress tâm lý như mất cảm giác đau, giảm thời gian ngủ, viêm loét dạ dày, suy giảm miễn dịch, trong khi đó sâm Triều Tiên khi đối chiếu không có các tác dụng này. Majonosid R_2 đã được xác định là hợp chất quyết định tác dụng antistress của sâm Việt Nam. Kososhima và cs. (1998) đã chứng minh Majonosid- R_2 có tác dụng kích hoạt tác dụng chống ung thư *in vitro* và *in vivo*. Gần đây tác dụng kích thích miễn dịch không đặc hiệu và antioxydant *in vitro* của saponin toàn phần chiết từ sâm Việt Nam đã được công bố.

Công dụng

Thân rễ và rễ củ sâm được sử dụng như nhân sâm. Hiện nay Việt Nam đã sản xuất các chế phẩm như Linh sâm Việt Nam, Vinaginseng pastilles, vinapanax viên và sâm quy dưỡng lực.

3.2.5. Ngưu tất

Radix Achyranthes bidentae

Cây Ngưu tất: *Achyranthes bidentata* Blume

Họ: Rau dền (Amaranthaceae)

Mô tả

Cây thảo, thân mảnh hơi vuông , cao khoảng 1 m, lá mọc đối, thuôn nhỏ dần ở phần gốc đầu lá nhọn, phiến lá nhẵn. Hoa hợp thành bông ở ngọn cành hay nách lá. Đài 5 cánh gần bằng nhau, nhị 5, bầu hình trứng. Hoa mọc hướng lên, nhưng khi thành quả sẽ quặp xuống. Quả nang, lá bắc còn lại và nhọn thành gai, cho nên vướng phải có thể mắc vào quần áo. Ra hoa vào tháng 7, có quả vào tháng 12.

Bộ phận dùng và chế biến

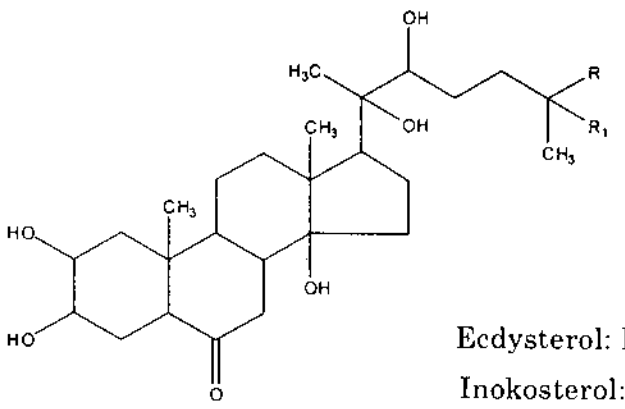
Thu hoạch rễ khi cây bắt đầu úa vàng, rửa sạch, xông sinh rồi phơi hoặc sấy.

Theo kinh nghiệm của Trung Quốc được bào chế như sau: Ngưu tất chọn bỏ tạp chất, rửa sạch, làm mềm, bỏ rễ con bên ngoài, cắt thành đoạn phơi khô. Đôi khi chế thành tửu Ngưu tất bằng cách lấy ngưu tất đã cắt đoạn, dùng rượu ngon phun như bụi nước, trộn đều, sau khi khô, lấy ra để nguội (cứ 100kg ngưu tất dùng 10kg rượu ngon).

Thành phần hoá học

Trong rễ , lá và hạt đều chứa saponin triterpen sau khi thủy phân saponin thu được phần genin là acid oleanolic và đường.

Đã phân lập được ecdysteron và inokosterol từ rễ ngưu tất. Các chất này có tác dụng thúc kén nhả tơ vì vậy được ứng dụng rộng rãi trong công nghệ tơ tằm



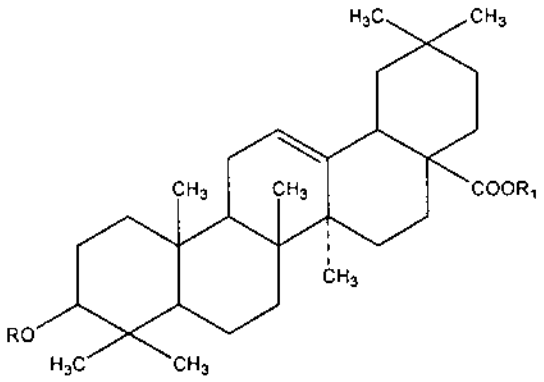
Ecdysterol: R = CH_3, R_1 = OH

Inokosterol: R = CH_2OH, R_1 = H

Với mục đích nghiên cứu tạo ra thuốc hạ cholesterol máu từ rễ ngưu tất (sau này có tên là Bidentin). Đoàn Thị Nhu và Phạm Kim Mãn (Viện Dược liệu) đã tách từ dạng chiết toàn phần thành ba bộ phận: sterol, saponin, đường tự do và các tạp chất, thử tác dụng hạ cholesterol máu theo mô hình tiêm Tween 80. Kết quả cho thấy phần saponin không có tác dụng hạ cholesterol máu, nhưng khi bổ sung thêm một lượng nhỏ chất dẫn, chúng lại thể hiện rất tốt tác dụng hạ cholesterol. Chính nhờ kết quả này mà Viện Dược liệu đã sản xuất thành công thuốc Bidentin chữa cholesterol máu và hạ huyết áp. Sau này từ hỗn hợp saponin này Phạm Kim Mãn đã phân lập được 1 saponin triterpen. Saponin đó có phần genin là acid oleanolic và phần đường gồm glucosa, galactosa và rhanosa, nhưng chưa xác định được cấu trúc.

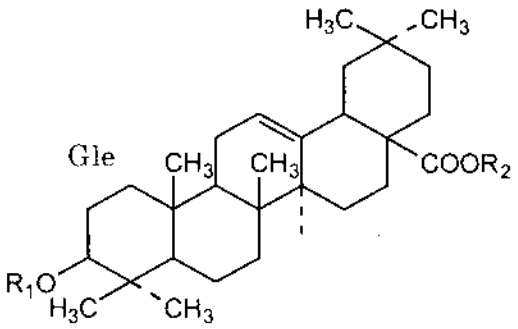
Năm 1995, Nguyễn Duy Thuần kết hợp với Stephan Nikolov (Viện Hàn lâm y học Bungari) đã phân lập từ phần trên mặt đất của cây ngưu tất một chất saponin có phần genin là acid oleanolic, nhưng phần đường lại bao gồm *D*-xylosa và *D*- glucosa và giả định saponin này là β- *D*- xylopyranosyl- β- *D*- glucopyranosid của acid oleanolic. Ngoài ra còn phân lập được acid caffeic và rutin cũng từ phần trên mặt đất của cây ngưu tất.

Ở Việt Nam còn có cây cỏ xước mọc hoang có tên khoa học là *Achyranthes Aspera* L. Cây này khác với cây ngưu tất là lá có khía răng cưa, lá to hơn và bông dài hơn. Trong cỏ xước cũng chứa saponin triterpenoid. Từ hạt cỏ xước các tác giả đã phân lập được 4 chất saponin

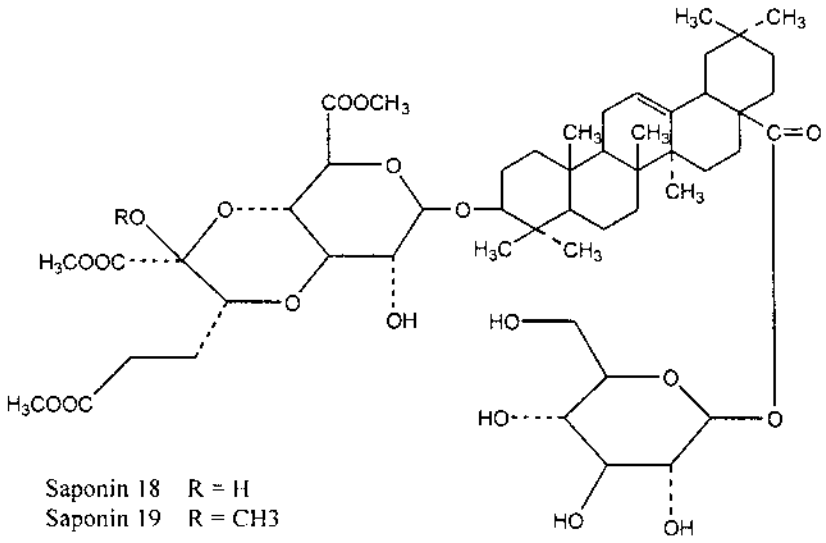


	R	R_1
Achyranthes saponin A	-glcA^4-glc^4-rha	H
Achyranthes saponin B	-glcA^4-glc^4-rha	gal
Achyranthes saponin C	-glcA^4 –rha	glcA
Achyranthes saponin D	-glcA^4-glc^4-rha	glcA

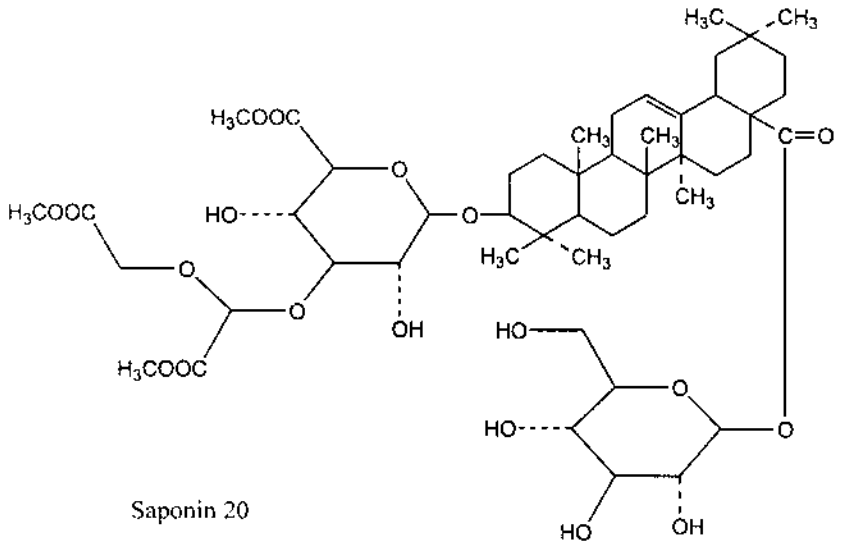
Đến năm 1998 Võ Duy Huấn (Viện Dược liệu) và KaguoYamasaki đã phân lập được 10 saponin của acid oleanolic. Các chất này cũng được xác định cấu trúc bằng khối phổ, cộng hưởng từ hạt nhân và cộng hưởng từ C13, và đặt tên là saponin 12→21



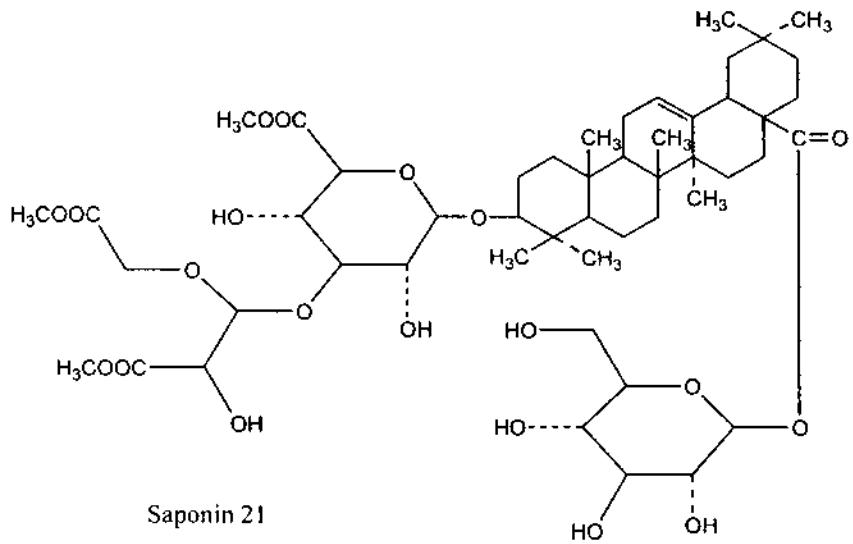
	R_1	R_2
Saponin12	Glc Ame Me	Me
Saponin13	H	
Saponin14	GlcA	Glc
Saponin15	GlcA Me	Glc
Saponin16	$GlcA^2$ Glc	Glc
Saponin17	$GlcA\ Me^2$ Glc	Glc



Saponin 18 R = H
Saponin 19 R = CH3



Saponin 20



Saponin 21

Saponin 12 là 28-desglucosyl prosapogenin của chikusetsusaponin IV dimetyl ester $[\alpha]^{20}_D$ +18,4° (pyridin, e ,09).FAB-MS (negative)m/z 659 [M-H]$^-$ $C_{38}H_{60}O_9$, 645 [M-Me]$^-$ 1H NMR (C_5 D_5 IV): δ 0,80; 0,83; 0,91; 0,92; 0,97; 1,23; 1,28(each 3H,s,MeX7), 3,07, (1H,dd-like, H-18), 3,35 (1H,dd,s=4,3,11,8 Hz, H3).5,35(1H,S,H-12),3,69; 3,72 (each 3H, s,-OCH_3 x 2), 4,99(1H,d,s=7,6Hz,Glc AH-1).

Saponin13 là prosapogenin của chikusetsusaponin IV a: $[\alpha]^{20}_D$ + 41,4 (Me OH; C1,33). FAB- Ms (negative)m/z : 617 (M-H)C_{36} H_{58} O_8, 455 [M- Glc]$^-$ .1H NMR(C_5 D_5 IV) δ 0,82; 0,87, 0,88,1,09, 1,10, 1,16, 1,19, (each 3H,S, -Mex7)3,20,(1H,dd,like,H18),3,40(1H,ddlike,H3),5,42(1H,brs,H12),6,25(1H,d,j=8, 1 Hz,Glc H-1).

Saponin14 là chikusetsusaponin IV a mp.213-215°C $[\alpha]^{20}_D$ + 7,9 (Me OH: C1,39). FAB- Ms (negative)m/z : 793 (M-H)$^-$ C_{42} H_{66} O_{14}, 631 [M- Glc]$^-$ 455[M-GlcA-Glc]$^-$ 1H NMR(C_5 D_5 N):δ 0,80, 0,85, 0,88, 0,96, 1,06, 1,24, 1,28 (each 3HS, Mex7)3,16(1H,dd- like, H-18), 3,35 (1H,dd- like, H-3), 5,38 (1H, brs H-12)5,01(1H,d,J=7,8Hz,GlcA H-1), 6,30, (1H,d,J=7,8Hz, Glc H-1).

Saponin 16 là chikusetsusaponin V: $[\alpha]^{20}_D$ + 2,6° (Me OH; C1,17). FAB- Ms (negative)m/z : 955 (M-H)$^-$ C_{48} H_{76} O_{19}, 793 [M- Glc]$^-$ 631 [M-2Glc]$^-$ 455[M-GlcA-2Glc]$^-$ 1H NMR (C_5 D_5 N): δ 0,80, 0,85, 0,88, 1,05, 1,06, 1,23, 1,24, (each 3H,s, -Mex7)3,15(1H,dd- like, H-18), 3,24 (1H,dd- J=4,4, 11,7Hz, H-3) 5,38 (1H, s, H-12) 4,96 (1H,d,J=7,3 Hz,GlcA H-1), 5,37 (1H,d,J=7,6Hz, Glc H-1), 6,27(1H,d,J=8,1Hz, Glc H-1)

Saponin 15 là chikusetsusaponin IV a methyl ester $[\alpha]^{20}_D$ + 7,8° (Me OH; C1,15). FAB- Ms (negative)m/z : 807 (M-H)$^-$ C_{43} H_{68} O_{14}, 793 [M- Me]$^-$ 645 [M-Glc]$^-$ 455[M-GlcAMe -Glc]$^-$ 1H NMR (C_5 D_5 N): δ 0,83, 0,88, 0,90, 0,95, 1,06, 1,25, 1,27, (each 3H,s, -Mex7) 3,17(1H,dd- J=3,8, 11,5Hz, H-18), 3,34 (1H,dd- J=4,2, 11,7Hz, H-3) 5,40 (1H, brs, H-12) 3,71(3H,s,- OMe), 4,94 (1H,d,J=7,8Hz, GlcA H-1), 6,25(1H,d,J=8,1Hz, Glc H-1)

Saponin17 là chikusetsusaponin V a methyl ester $[\alpha]^{20}_D$ + 3,0° (Me OH; C1,67). FAB- Ms (negative)m/z : 969 (M-H)$^-$ C_{49} H_{78} O_{19}, 807 [M- Glc]$^-$ 645 [M-2Glc]$^-$ 455[M-GlcAMe -2Glc]$^-$ 1H NMR (C_5 D_5 N): δ 0,83, 0,88, 0,90, 1,06, 1,23, 1,25, (each 3H,s, -Mex7) 3,16(1H,dd- like,H-18), 3,24 (1H,dd- J=4,1 , 11,7Hz, H-3) 5,40 (1H, brs, H-12) 3,70 (3H,s,- OMe), 4,92 (1H,d,J=7,1Hz, GlcA H-1), 5,34 (1H,d,J=7,6Hz, Glc H-1) 6,26 (1H,d,J=8,0Hz, Glc H-1)

Saponin18 là Achyranthosid B methyl ester $[\alpha]^{20}_D$ + 51,0° (Me OH; C1,47). FAB- Ms (positive)m/z : 1.019 $(M+Na)^+$ FAB-Ms (negative) m/z: 995 (M-H)$^-$ C_{50} H_{76} O_{20}, 833 [M- Glc]$^-$ 1H NMR (C_5 D_5 N): δ 0,78, 0,86, 0,88, 0,89, 1,05, 1,22, 1,24 (each 3H,s, -Mex7) 3,16(1H,dd- J=4.0, 13,5 Hz H-18), 3,27 (1H,dd- J=4,4, 11,7Hz, H-3) 5,39 (1H, brs, H-12) 3,51, 3,57, 3,72 (each 3H,s,- OMex7), 4,94 (1H,d,J=7,6Hz, GlcA H-1), 6,28 (1H,d,J=8,0Hz, Glc H-1).

Saponin19 là Achyranthosid A methyl ester $[\alpha]^{20}_D$ + 575° (Me OH; C1,20). FAB-Ms (negative) m/z: 1009 (M-H)$^-$ C_{51} H_{78} O_{20}, 1H NMR (C_5 D_5 N): δ 0,79, 0,87, 0,88, 0,89, 1,06, 1,21, 1,24 (each 3H,s, -Mex7) 3,17(1H,dd- like, H-18), 3,28 (1H,dd- like, H-3) 5,39 (1H, brs, H-12) 3,46, 3,50, 3,69, 3,82 (each 3H,s,-OMex4), 4,94 (1H,d,J=7,5Hz, GlcA H-1), 6,30 (1H,d,J=8,0Hz, Glc H-1).

Saponin 20 $[\alpha]^{20}_D$ + 6,5 (Me OH; C.39). FAB- Ms (positive)m/z : 991 $(M+Na)^+$ FAB-Ms (negative) m/z: 967 (M-H)$^-$ C_{49} H_{76} O_{19}, 953 [M- Me]$^-$ 791 [M-Glc- Me]$^-$ 1H NMR (C_5 D_5 N): δ 0,78, 0,86, 0,87, 0,89, 1,06, 1,21, 1,24 (each 3H,s, -Mex7) 3,17(1H,dd- like, H-18), 3,28 (1H,dd- like, H-3) 5,39 (1H, brs, H-12) 3,53, 3,55, 3,68 (each 3H,s,- OMex3), 4,85 (1H,d,J=7,8Hz, GlcA H-1), 6,29 (1H,d,J=8,0Hz, Glc H-1).

Saponin 21 là Achyranthosid C methyl ester $[\alpha]^{20}_D$ + 8,4° (Me OH; C1,67). FAB- Ms (positive)m/z : 1.021 $(M+Na)^+$ FAB-Ms (negative) m/z: 997 (M-H)$^-$ C_{50} H_{78} O_{20}, 1H NMR (C_5 D_5 N): δ 0,79, 0,86, 0,88, 0,89, 1,05, 1,21, 1,24 (each 3H,s, -Mex7) 3,16 (1H,dd- J=3,6, 13,7 Hz H-18), 3,28 (1H,dd- J=4,3, 11,6 Hz, H-3) 5,39 (1H, brs, H-12) 3,48, 3,66, 3,68 (each 3H,s,- OMex3), 4,88 (1H,d,J=7,8Hz, GlcA H-1), 6,29 (1H,d,J=7,8Hz, Glc H-1).

Dược lý

Cả ngưu tất và cỏ xước đã được Đoàn Thị Nhu nghiên cứu tác dụng chống viêm , chống phù nề theo mô hình gây phù Kaolin và viêm Amiang và sau này đã nghiên cứu tác dụng hạ cholesterol theo mô hình tiêm Tween 80.

Theo nghiên cứu của các tác giả Ấn Độ saponin ngưu tất còn có tác dụng co bóp tử cung thỏ, chuột, mèo và chó cả ở thời kỳ mang thai và tử cung cô lập. Có tác dụng tăng cường co bóp đối với ruột thỏ cô lập.

Ngoài ra còn chứng minh có tác dụng hạ áp, giảm đau, lợi tiểu, làm giảm tỉ lệ β/α lipoprotein và cholesterol máu. Trong Đông y thường dùng phối hợp với một số thuốc khác chữa mất kinh, đẻ khó.

Công dụng

Theo kinh nghiệm y học cổ truyền thì dùng sống làm tan máu ứ, tiêu nhọt sưng, trị các bệnh đái ra máu, kinh bế, khó đẻ, rau thai không ra, sau đẻ máu ứ bụng đau, hầu tắc, nhọt sưng, bị đánh đập, vấp ngã tổn thương. Dùng chín thì bổ gan thận, mạnh gân cốt, trị sưng đầu gối, xương đau, tứ chi co quắp liệt tê.

Theo Trung Dược đại từ điển, thì ngưu tất được sử dụng với mục đích bổ gan thận, mạnh chân gối, tan máu xấu, dùng trị khớp đau nhức, phụ nữ kinh nguyệt không đều. Can chữa máu, thận chữa linh, bổ mạnh gan thận thì máu đủ mà linh đầy, mọi chứng tự khỏi. Huyết hành thì nguyệt thủy tự thông, huyết khô tự tan.

Thuốc Bidentin hạ cholesterol máu và hạ huyết áp đã được nhiều giáo sư, bác sĩ nghiên cứu và thử nghiệm trên lâm sàng và được đánh giá là có tác dụng tốt.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. *Actarhive, Ch.* (1979); Pharmacognosia. NXB Y học Sofia.
2. *Nicolov, St.* (1988); Pharmacognosia. NXB Y học Sofia.
3. *Panova D.* (1980); Bioactivity compounds from medicinal plants. NXB Y học Sofia.
4. *Maksiutina, H.* (1985); Drugs from medicinal plants. NXB Y học Kiev.
5. *Muravieva, D.* (1978); Pharmacognosia. NXB Y học.
6. *Muravieva, D.* (1983); Medicinal plants. NXB Y học.
7. *Ovcharov, P.* (1987); Pharmacology. NXB Y học Sofia.
8. *Xocolov D.* (1987); Resorses of medicinal plants. NXB Khoa học Moscova.
9. *Petrov, V.* (1982); Fitoterapia. NXB Y học Moscova.
10. *Turova, A.* (1984); Medicinal plants in SSSV. NXB Y học Moscova.
11. *Britton, G.* (1983); The Biochemistry of natural pigments, Cambridge. Cambridge university press.
12. *Deutschmann, F.* (1981); Pharmazeutische Biologie. Stuttgrat, Gustav Fischer Verlag.
13. *Gildemeister, E.* (1961); Die ätherischen Oele, T_1 - VII, Berlin Acad. Verlag.
14. *Goodwin, T.* (1983); Introduction to plant biochemistry, 2nd ed. Oxford - New York, Pergamon Press.
15. *Hegnauer, R.* (1972); Chemotaxonomie der pflanzen, Band I - VI, Basel und Stuttgrat Birkhauser Verlag.
16. *Hillier, K.* (1977); Die pharmazie 32, 365, 37; 1982, 619, 42 1987, 577.
17. *Hoppe, H. A.* (1975 - 1977); Drogenkunde, Bd1 und 2, 8 Aufl. Berlin - New York, Walter de Gruyter.
18. *Karrer, W.* (1958); Konstitution und Vorkommen der organischen pflanzenstoffe. Basel und Stuttgart, Birkhauser Verlag.
19. *Karrer, W. C. H. Eugster* (1967); Ergänzungsband zu konstitution und Vorkommen der organischen pflanzenstoffe, Basel und Stuttgart. Birkhauser Verlag.

20. *Kohhmünzer, S.* (1980); Farmakognozia, Warszawa.

21. Merck index (1983); 10th ed. Rahway, New Tersey, USA, Merk and Co.

22. *Paris, M., M. Hurabielle* (1981); Abrégé de Matière medicale (pharmacognosie) Tom I, Paris - New York - Barcelone, Masson.

23. *Ross, M. S. F. R. Brain* (1977); An instroduction to phytopharmacy Tunbridge, Wells, pitman medical.

24. *Shibata, S.* (1977); Saponins with Biological and pharmacological activity, in new Natural products and plant drugs proceeding in Life sciences, Berlin - Heidenberg - New York. Springer Verlag.

25. *Stahl, E. W. Schild* (1981); Pharmazeutische Biologie 4, Drogenanalyse II inhaltostoffe und isolierungen Stuttgrat, Gustav Fischer Vergla.

26. *Steineegger, E., R. Hänsel* (1972); Lehrbnch der pharmacognosie, 3. Aufl, Berlin - Heidelberg - New York Springer Verlag.

27. *Tetenyi, P.* (1970); Infraspecific chemical Taxa of medicinal plants, Budapest, Akademiai, Kiado.

28. *Teuscher, E.* (1979); Pharmakognosie, Berlin.

29. *Trease, G. E., W. C. Evans* (1985); Pharmacognosy, 12th ed. London, Brilliere Tindall.

30. *Tschesche, R., G. Wulff* (1973); Chimie und Biologie der saponine in fortschritte der chimie organischer naturstoffe Vol. 30. Wien - New York, Springer Verlag.

31. *Teyler, V. E., L. R. Brady, J. E. Robbers* (1976); Pharmacognosy 7nd ed. Philadelphia.

32. *Verzärne, P. G.* (1982) Farmakognozia Budapest, Medicina Kynyykiado.

33. *Wagner, H. (1985)*; Pharmazeutische Biologie, 2. Drogen und ihre inhaltsstoffe, 3. Aufl. Stuttgrat, Gustav Fischer Verlag.

34. *Weiss, R. F.* (1974); Lehrbuck der phytotherapie. 3. aufl. Stuttgart, Hippokrates Verlag.

35. *Willis, J. C. A* (1966); Dictionary of the flowering plants and ferns, 7th ed. Cambridge, Cambridge university press.

PHẦN V

CÁC PHƯƠNG PHÁP HOÁ LÝ ỨNG DỤNG TRONG PHÂN TÍCH VÀ KIỂM NGHIỆM DƯỢC LIỆU

CHƯƠNG I
CÁC PHƯƠNG PHÁP SẮC KÝ

PGS. TS. Bùi Thị Bằng

I. PHƯƠNG PHÁP SẮC KÝ LỚP MỎNG

Sắc ký là từ dùng chỉ các kỹ thuật tách các chất từ hỗn hợp bằng cách dùng pha động (chất lỏng hoặc khí) để di chuyển các chất theo một chiều nhất định trên một pha tĩnh (chất rắn hoặc chất lỏng phủ trên chất rắn). Các chất được đẩy đi với tốc độ khác nhau vì chúng có phân tử lượng khác nhau nên phản ứng khác nhau với cả 2 pha: pha tĩnh và pha động.

Một số kỹ thuật sắc ký thường dùng trong phân tích:

- Sắc ký lớp mỏng (SKLM).
- Sắc ký lỏng hiệu năng cao (SKLHNC).
- Sắc ký khí (SKK).
- Sắc ký giấy (SKG).

Các kỹ thuật sắc ký trên có liên quan chặt chẽ với nhau trong phân tích và kiểm nghiệm dược liệu, bán thành phẩm và thuốc từ dược liệu. Trong đó SKLM là kỹ thuật được sử dụng nhiều nhất vì những ưu điểm và tiện lợi của nó.

1.1. Nguyên lý

SKLM là một kỹ thuật tách các chất được tiến hành khi cho pha động di chuyển qua pha tĩnh, trên đó ta đặt hỗn hợp các chất cần tách.

Pha tĩnh là chất hấp phụ được chọn phù hợp theo từng yêu cầu phân tích, được trải thành lớp mỏng đồng nhất và được cố định trên các phiến kính, phiến kim loại hoặc phiến nhựa.

Pha động là hệ dung môi đơn hoặc đa thành phần được trộn với nhau theo tỷ lệ thích hợp cho các yêu cầu phân tích.

Trong quá trình di chuyển qua lớp hấp phụ, các thành phần trong hỗn hợp mẫu được di chuyển trên lớp mỏng theo hướng pha động, với những tốc độ khác nhau. Trong quá trình di chuyển, các thành phần được giữ lại ở những khoảng cách khác nhau tuỳ theo đặc điểm của chúng. Kết quả ta thu được một sắc ký đồ trên lớp mỏng. Cơ chế của sự phân tách trên lớp mỏng có thể là cơ chế hấp phụ, phân bố, trao đổi ion, sàng lọc phân tử hay sự phối hợp đồng thời của nhiều cơ chế tuỳ thuộc vào tính chất của chất làm pha tĩnh và dung môi làm pha động.

Ta có thể coi những cơ chế cơ bản là sự phân tách giữa hai biến tướng lỏng và sự liên hệ thuận nghịch của các hợp chất đó với bề mặt của chất hấp phụ. Trong kỹ thuật SKLM chủ yếu là những lực vật lý trên bề mặt nên gọi là sắc ký hấp phụ hay sắc ký của Tswett – tác giả đã tìm ra nó. Thực chất SKLM là sắc ký cột hở có tính chất riêng biệt dùng để tách những lượng nhỏ hỗn hợp các chất . SKLM có thể vừa là sắc ký hấp phụ vừa là sắc ký phân bố. Hấp phụ khi lớp mỏng là silicagel hoặc nhôm oxyd được rải và sấy để hoạt hoá. Khi ta cho một biến tướng lỏng đứng im trong vi quản của lớp silicagel - đó là điều kiện của sắc ký phân bố.

Đại lượng đặc trưng cho mức độ di chuyển của các chất phân tách là hệ số di chuyển R_f được tính bằng tỷ lệ giữa khoảng cách di chuyển của chất thử và khoảng cách di chuyển của dung môi:

$$\mathbf{R_f = a : b}$$

trong đó: **a** - khoảng cách từ điểm xuất phát đến tâm của vết mẫu thử, cm;

b - khoảng cách từ điểm xuất phát đến mức dung môi đo trên cùng đường đi của vết, cm.

R_f chỉ có giá trị từ 0 đến 1.

Giá trị R_f của các chất phân tách trên lớp mỏng bị ảnh hưởng của một số yếu tố nên có nhiều thay đổi giữa các lần thực hiện. Vì vậy nên triển khai song song với chất chuẩn hoặc chất đối chiếu. Khi ấy ta có hệ số dịch chuyển tương

đối R_f. Hệ số dịch chuyển tương đối R_f được xác định bằng tỷ số giữa khoảng cách di chuyển của vết chất phân tách và khoảng cách dịch chuyển của vết chất chuẩn đối chiếu trong cùng điều kiện và trên cùng bản mỏng với chất phân tách:

$$R_f = a : c$$

trong đó: a - khoảng cách từ điểm xuất phát đến tâm của vết mẫu thử, cm.

c - khoảng cách từ điểm xuất phát đến tâm của vết chất chuẩn cm.

Giá trị R_f có thể lớn hơn hoặc nhỏ hơn 1.

**** Ưu điểm của SKLM***

- Đơn giản và rẻ tiền.
- Dễ lắp đặt và áp dụng, kể cả những phòng thí nghiệm nhỏ.
- Lượng mẫu cần rất nhỏ.
- Thời gian tiến hành ngắn. Cho kết quả nhanh.
- Các vết chất tách nhỏ và gọn nên sự phân tách được rõ rệt hơn.
- Dùng được các thuốc thử mạnh do lớp mỏng là lớp hữu cơ.

**** Ứng dụng của SKLM***

- Định tính, thử tinh khiết và đôi khi để bán định lượng hoặc định lượng hoạt chất thuốc.
- Kiểm tra độ tinh khiết của các chất tổng hợp hoặc chiết tách từ hỗn hợp các hợp chất thiên nhiên.
- Theo dõi qúa trình của phản ứng hóa học.
- Phân tích sơ bộ thành phần hóa học của cây cỏ, dược liệu, thuốc...
- Điều chế các chất tinh khiết.
- Nhận dạng dược liệu và vị thuốc trong bài thuốc bằng kỹ thuật dấu vân tay SKLM (DVT-SKLM).

1.2. Kỹ thuật sắc ký lớp mỏng

1.2.1. Pha tĩnh (Các chất hấp phụ)

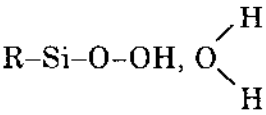
* ***Silicagel:*** Silicagel là chất hấp phụ hay được dùng nhất trong SKLM. Như đã biết các chất hấp phụ có những "trung tâm hoạt năng" hợp thành bởi những cạnh, những góc, những lỗ xốp hay điểm khuyết ở bề mặt. Ở những nơi đó những ion dễ lộ ra ngoài. Một mặt nữa silicagel điều chế từ tủa keo acid silicic ngưng tụ ($SiO_2.H_2O$). Keo này chứa những phần tử nước trong các khe của mạng

tinh thể. Khi tủa keo này được sấy ở 120°C để hoạt hoá, một phần những phân tử nước bốc hơi bị loại ra khỏi mạng tinh thể. Trong lúc đó, khung cấu trúc của mạng tinh thể vẫn giữ nguyên, nước bốc hơi tạo thành những lỗ hổng, nó có tác dụng hút rất mạnh các phân tử nước hay các phân tử của các chất phân cực khác vào trong khung cấu trúc của nó, hay hút mạnh các hơi khác [2].

Theo Kơ Lanh, silicagel hấp phụ do các nhóm sau:

R–Si–OH : Nhóm silanol

R–Si–O–Si–R : Nhóm siloxan



: Nhóm silanol ở dưới thể hydrat

Ba nhóm này chi phối sự hấp phụ trên bề mặt làm một lực trung bình và sự thay đổi tỷ lệ các nhóm làm thay đổi cấu trúc và thể của chất hấp phụ.

Từ một phản ứng ngưng tụ do tác dụng của ba trong bốn nhóm hydroxyl của mỗi phân tử acid cilicic, ta có một acid cilicic ngưng tụ thành phần như sau: $(H_2Si_2O_5)\infty$.

Silicagel có khả năng hấp phụ tuỳ theo cỡ hạt, trạng thái và hoạt năng của nó. Các loại silicagel dùng trong sắc ký gồm có:

- Silicagel bột mịn dùng trong sắc ký phân bố, cỡ hạt 60 – 325 mesh, hoạt năng III - IV.

- Silicagel hoạt năng cao để phân tách các chất dầu và sáp. Loại này có hoạt năng cao, có thể sấy ở 250°C trước khi dùng. Cỡ hạt: 60 - 200 mesh. Hoạt năng giữa I và II.

- Silicagel chuyên dùng cho sắc ký cột: cỡ hạt: 0,2 – 0,5 mm. Hoạt năng IV, có tác dụng phân tách tốt.

- Silicagel có chứa canxi sulfat dùng cho SKLM theo Stahl. Loại này là bột mịn. Khi dùng nhào với nước để tráng lên kính. Cỡ hạt trung bình: 2 – 5 µm.

Ngoài silicagel, còn có các chất hấp phụ khác nhưng ít dùng hơn so với silicagel, đó là: nhôm oxyd, kieselgua, phosphat magnesi bậc 2, magnesi silicat (tri), canxi hydroxyd, canxi phosphat, canxi sulfat, silicagel + nhôm oxyd, $Fe(OH)_3$, than, bột cellulose, polyamid, polyacrylnitrit, trao đổi ion, sephadex, DEAE sephadex (bảng 1).

Bảng 1: Các chất hấp phụ dùng trong SKLM

Chất hấp phụ	Độ acid - kiềm	Hoạt năng	Tác dụng	Ứng dụng
Silicagel	Acid	Có hoạt năng	Hấp phụ và phân chia	Cho tất cả các trường hợp
Nhôm oxyd	Kiềm	Có hoạt năng	Hấp phụ và phân chia	Base và steroid
Kieselgua	Trung tính	Không hoạt năng	Phân chia	Đường, thuốc, triglycerid, chất béo bậc cao
Phosphat magnesi bậc 2		Hoạt năng yếu	Hấp phụ	Carotenoid, tocopherol
Magnes silicat (tri)		Hoạt năng yếu	Hấp phụ	Tocopherol
Canxi hydroxyd	Kiềm	Hoạt năng yếu	Hấp phụ	Tocopherol
Canxi phosphat	Kiềm yếu	Hoạt năng yếu	Hấp phụ	Tocopherol
Canxi sulfat		Hoạt năng yếu	Hấp phụ	Tocopherol, acid béo, triglycerid
Silicagel + nhôm oxyd	Acid + base	Có hoạt năng	Phân chia	Chất màu, acid barbituric
$Fe(OH)_3$		Có hoạt năng	Hấp phụ	Chất phân cực
Than		Có hoạt năng	Hấp phụ	Chất không phân cực
Cellulose	Trung tính	Không hoạt năng	Phân chia	Chất màu, acid nucleic
Polyamid	Trung tính	Không hoạt năng	Trao đổi	Flavon
Polyacrylnitrit	Trung tính	Không hoạt năng	Trao đổi	Anthocyan
Trao đổi ion	Acid + base	Không hoạt năng	Phân chia và trao đổi	Acid nucleic

•Cách chọn những chất hấp phụ

Trong sắc ký, chúng ta thường gặp phải một hệ có tối thiểu ba thành phần: chất hấp phụ, dung môi và chất để phân tích sắc ký. Tiến hành sắc ký phụ thuộc vào dung môi và chất hấp phụ. Ta gọi là "môi trường hấp phụ". Ta có thể chọn trước được chất hấp phụ nào và dung môi nào thích hợp cho một chất để phân tích. Đối với lượng chất hấp phụ có ít, ta dùng phần lớn nhiều hệ dung môi thích hợp. Nói chung đối với một chất để phân tích, một chất hấp phụ có hoạt năng thường dùng với một dung môi khai triển có lực tương ứng. Theo quan niệm đó ta đã sắp xếp những chất hấp phụ cũng như những dung môi khai triển theo hoạt năng tăng dần. Ta có thể điều chỉnh hoạt năng chất hấp phụ theo như ý muốn [4, 5].

Trong sắc ký hấp phụ, ta dùng các oxyd, các oxyd ngậm nước hay các muối. Những chất bị hấp phụ là những hợp chất phân cực. Nó được giữ ở bề mặt chất hấp phụ bởi những lực tĩnh điện có liên quan đến sự gắn chặt của mạng tinh thể. Những " tâm hoạt năng" hấp phụ trước hết gồm những cạnh, những điểm gẫy, những góc và những điểm khuyết ở bề mặt, ở những nơi này những ion để lộ ra nhiều hay ít. Ta thấy bậc thang các hoạt năng hấp phụ đi song song với bậc thang các độ rắn. Bảng 3 xây dựng theo thực nghiệm những chất hấp phụ có hoạt năng khác nhau.

Những lực tĩnh điện bề mặt đẩy những momen lưỡng cực vào những hợp chất không phân cực hay làm tăng mhững momen lưỡng cực của những chất phân cực. Do đó những lưỡng cực ion hóa hay những lưỡng cực tham gia vào giữa hai lưỡng cực có ở khởi thủy của sự liên hệ giữa chất bị hấp phụ trên bề mặt của chất hấp phụ. Sự phân cực có thể, trong những trường hợp giới hạn, dẫn đến sự ion hóa của phân tử hấp phụ.

Những cầu hydro cũng tham gia vào sự liên hệ giữa chất hấp phụ và chất bị hấp phụ. Những phân tử hợp thành những cầu nối hydro nội bị hấp phụ rất ít bởi silicagel hay nhôm oxyd ngậm nước mà những đồng phân của nó không có những tính chất đó [8]. Ta cũng thấy những tác dụng xúc tác của những chất hấp phụ [7] do kết quả của những lực bề mặt.

Những chất hấp phụ ghi ở bảng 2 giữ nước và những rượu bậc thấp với một lực đặc biệt, do đó ta dùng các chất này để rửa những chất bị hấp phụ mạnh.

Bảng 2: Chất hấp phụ được sắp xếp theo thứ tự của những lực tăng dần

Theo Strain	Theo Hesse
Saccharose, tinh bột	Canxi oxyd
Inulin	Canxi fluorua
Magnesi citrat	Nhôm (Merck)
Talcum	Crom trioxyd
Natri carbonat	Nhôm kiềm
Kali carbonat	Tranconit
Canxi carbonat	Than hoạt nguồn gốc động vật
Canxi phosphat	
Magnesi carbonat	
Magnesi (Merck)	
Acid silicic hoạt hoá	
Magnesi silicat hoạt hoá	
Nhôm hoạt hoá	
Than xương và magnesi hoạt hoá	

Hoạt năng của những chất hấp phụ thông dụng rất thay đổi. Ta có thể thay đổi trong một mức rất rộng tính chất của một chất hấp phụ. Đặc biệt tỷ lệ nước có tầm quan trọng quyết định vì những phần tử nước rất dễ bị hấp phụ sẽ phong bế các điểm hoạt năng trên bề mặt.

1.2.2. Pha động và thuốc thử hiện màu

Để tách các chất trên lớp mỏng ta dùng các hệ dung môi triển khai SKLM (gọi là pha động). Thành phần của các hệ dung môi phụ thuộc vào bản chất (hoá - lý) của các chất cần tách. Tốc độ di chuyển của một chất trên một chất hấp phụ đã cho phụ thuộc vào dung môi. Một số tác giả đã xây dựng các bảng sắp xếp các dung môi theo độ phân cực tăng dần hoặc theo độ phân cực giảm dần (bảng 3, 4, 5). Dựa vào các bảng này chúng ta có hướng để chọn các dung môi thích hợp cho tách các chất theo yêu cầu.

Bảng 3: Bảng sắp xếp các dung môi theo lực phản hấp phụ tăng dần

	Theo Trappe [15]	Theo Strian [17]
Lực phản hấp phụ tăng dần ↑	Ether dầu hoả Cyclohexan Tetraclorua carbon Tricloethylen Toluen Benzen Methylen clorid Cloroform Ether ethylic Ethyl acetat Pyridin Aceton n-propanol Ethanol Methanol Nước	Ether dầu hoả (độ sôi 30 - 50°C) Ether dầu hoả (độ sôi 50 - 70°C) Ether dầu hoả (độ sôi 70 - 100°C) Tetraclorua carbon Cyclohexan Carbon sulfua Ether ethylic tuyệt đối Aceton Benzen Toluen Ester acid hữu cơ Acid hỗn hợp với những bazơ, với nước, với những rượu hay với pyridin

Bảng 4: Bảng sắp xếp các dung môi theo Hecker với lực phản hấp phụ giảm dần [9]

Lực phản hấp phụ giảm dần ↓	1- Dung dịch muối đệm 2- Acid vô cơ 3- Nước 4- Acid lactic 5- Formamid 6- Morpholin 7- Acid formic 8- Nitromethan 9- Acetonitril 10- Acid acetic và đồng đẳng 11- Methanol 12- Monomethylglycol ether 13- Ethanol và đồng đẳng 14- Phenol 15- Anilin 16- Aceton 17- Dioxan 18- Tetrahydrofuran	19- Pyridin và đồng đẳng 20- Ethyl acetat và đồng đẳng 21- Methylen clorua 22- Tetraclorua etan 23- Cloroform 24- Dicloetan 25- Tricloetan 26- Benzen 27- Toluen 28- Tetraclorua carbon 29- Sulfua carbon 30- Cyclopentan 31- Cyclohexan 32- Trimethylpentan 33- Heptan 34- Hexan 35- Dầu parafin

Có khi người ta dùng những hỗn hợp dung môi có độ phân cực khác nhau để tách các chất phân tích tốt hơn một dung môi đơn thuần. Về những hỗn hợp dung môi này cũng sắp xếp theo dãy chất phản hấp phụ. Như tác dụng phản hấp phụ tăng dần theo thứ tự sau [10]: ether dầu hoả, hỗn hợp ether dầu hỏa với benzen ở tỷ lệ tăng dần(10, 20, 50%), benzen, hỗn hợp benzen với những lượng tăng dần ethanol (2, 5, 10, 20%). Một dãy khác đặc hiệu hơn được ghi ở bảng 5 [3].

Bảng 5: Dãy phản hấp phụ của các hệ có một hay hai dung môi

(Các số ghi những thể tích. Lực phản hấp thụ tăng dần cột bên phải tiếp theo cột bên trái.)

Lực phản hấp phụ tăng dần ↑	Lực phản hấp phụ tăng dần ↑
Benzen	Cyclohexan/Ethyl acetat (2:8)
Benzen /Cloroform (1:1)	Butylacetat
Cloroform	Cloroform/Methanol (95:5)
Cyclohexan/Ethyl acetat (8:2)	Cloroform/Aceton (7:3)
Cloroform/Aceton (95:5)	Benzen/Ethyl acetat (3:7)
Benzen/Aceton (9:1)	Butyl aceta/Methanol (99:1)
Benzen/Ethyl acetat (8:2)	Benzen /Ether (1:9)
Cloroform/Ether (9:1)	Ether / Methanol (99:1)
Benzen/Methanol (95:5)	Ether
Benzen/Ether (6:4)	Ether/Dimethylformamid
Cyclohexan/Ethyl acetat (1:1)	Ethyl acetat
Cloroform/Ether (8:2)	Ethyl acetat/Methanol (99:1)
Benzen/Aceton (8:2)	Benzen/Aceton (1:1)
Cloroform/Methanol (99:1)	Cloroform/Methanol (9:1)
Cloroform/Aceton (85:15)	Dioxan
Benzen/Ether (4:6)	Aceton
Benzen/Ethyl acetat (1:1)	Methanol
Cloroform/Ether (6:4)	Dioxan/Nước (9:1)

** Trạng thái sắc ký và cấu trúc hóa học.*

Khi những chất phân tích hòa tan trong một dung môi hữu cơ có một ái lực giảm đối với những hợp chất hấp phụ hút nước thông dụng, ta lấy một chất hấp phụ hút "mạnh" và những dung môi "yếu" nghĩa là các chất có ở đầu bảng dãy các chất phản hấp phụ. Trái lại ta có thể dùng những chất hấp phụ "yếu" và dung môi "mạnh", khi ái lực hấp phụ của những hợp chất phân tích cao. Do đó ta thấy cần hiểu những đặc điểm cấu tạo có ảnh hưởng tới lực của một mối liên hệ hấp phụ. Những quy luật thực dụng được tóm lại ở đây.

1/ Những cacbuahydro bão hòa không bị hấp phụ. Các nối kép thêm vào làm tăng ái lực hấp phụ và cái này càng rõ khi số lượng nối kép nhiều. Do đó độ phân cực của các phân tử và lực của mối liên hệ bề mặt của những chất hấp phụ hút nước sẽ tăng.

2/ Nói chung, khi ta cho những nhóm chức vào một cacbuahydro, ái lực hấp phụ sẽ tăng dần, thực nghiệm đã cho ta xây dựng phân hạng các nhóm chức theo độ hấp phụ giảm dần như sau:

$-COOH$, $-CONH_2$, $-OH$, $-NHCOCH_3$, $-NH_2$, $-OCOCH_3$, $-COCH_3$, $-N(CH_3)_2$, NO_2, $-OCH_3$, $-H$, $-Cl$ (đối với các cacbuahydro nhân thơm).

$-COOH$, $-OH$, $-NH_2$, $=C=O$, $-O-R$ (alkyl), $-CH_2$ (đối với cacbuahydro mạch thẳng).

Những hợp chất carbonyl bị hấp phụ yếu hơn là những hợp chất hydroxyl và amin tương ứng. Những C- metyl không có ảnh hưởng mấy. Đối với những steroid việc sắp xếp các nhóm như sau:

Đối với những dẫn xuất 17β-thay thế của 3β-axetoxy-androsten-5, cường độ hấp phụ giảm dần theo thứ tự:

$$OH > =O > OCOCH_3 > COCH_3 > CN > OCOC_6H_5 > COOCH_3$$

Đối với những dẫn xuất 3β thay thế của cholesten-5 ta có cường độ hấp phụ giảm dần theo thứ tự:

$$N(CH_3)_2 > OH > OCOCH_3 > OCH_3 > Cl > H$$

Ta thấy một dung môi khai triển càng mạnh khi ái lực của nó đối với chất hấp phụ càng lớn, ta cũng thấy những tác dụng đó của những chất thay thế trong dãy các dung môi khai triển theo một thứ tự tương ứng.

Nếu có nhiều chất thay thế trong cùng một phân tử, những ảnh hưởng thứ tự đối với ái lực hấp phụ chỉ thêm vào một cách ước lượng.

Ta còn cần chú ý đến những tác dụng lập thể, ví dụ vị trí của những nhóm chức trong những hệ vòng nhân thơm như ở bảng 6.

Bảng 6: Giá trị R_f của các lập thể

Hợp chất	Dung môi	R_f
o- nitrophenol	benzen+ 5% ethanol	0,34
m-nitrophenol		0,24
p- nitrophenol		0,13
o- nitranilin	benzen+ 2% ethanol	0,53
m- nitranilin		0,38
p- nitranilin		0,24

Bảng 7 là một số hệ dung môi triển khai SKLM các hợp chất thiên nhiên thường gặp trong thành phần dược liệu và thuốc từ dược liệu.

Thuốc thử hiện màu – là một chất hoặc hỗn hợp của một số chất cho màu với các vết chất cần tách trên lớp mỏng. Ngoài thuốc thử hiện màu, các chất cần tách có thể được phát hiện bằng cách quan sát sắc phổ ở ánh sáng tự nhiên (nếu vết chất có màu sắc đặc trưng), hoặc dưới ánh sáng đèn tử ngoại (λ_{max} = 254 và 366 nm - nếu vết chất có huỳnh quang đặc trưng).

Bảng 7: Một số hệ dung môi triển khai SKLM và thuốc thử hiện màu thường dùng trong phân tích thành phần hoá học dược liệu và thuốc từ dược liệu [2, 13, 18, 19 ...]

Nhóm chất	Pha tĩnh	Pha động	Thuốc thử hiện màu
Alcaloid	Silicagel G	- Cloroform – aceton – diethylamin (5 : 4 : 1) - Cloroform – diethylamin (9 : 1) - Cyclohexan – diethylamin – cloroform (5 : 4 : 1) - Cyclohexan – diethylamin (9 : 1) - Benzen – ethyl acetat - diethylamin (7 : 2 : 1) - Cloroform – methanol (9 : 1 phụ thuộc - Cloroform – ethyl acetat - methanol (2 : 2 : 1). - Cloroform – aceton – methanol – amoniac 25% (20 : 20 : 3 : 1).	Thuốc thử (TT): -Dragendorff - Iodoplatinat - Hơi iod

Bảng 7. (tiếp theo)

Nhóm chất	Pha tĩnh	Pha động	Thuốc thử hiện màu
		- Cloroform – methanol – amoniac 25% (50 : 9 : 1) - *n*-Butanol – nước (bão hoà). - Methanol – amoniac (95 : 5) - Benzen – aceton – ethanol – amoniac 25% (4 : 6 : 1 : 0,3)	
	Silicagel kiềm	- Methanol - Cloroform – ethylacetat - methanol (2 : 2 : 1).	Thuốc thử: - Dragendorff - Iodoplatinat - Hơi iod
	Nhôm oxyd G	- Cloroform - Cyclohexan – Cloroform (3 : 7) + 0,05% diethylamin (3 giọt cho 100 ml)	Thuốc thử: - Dragendorff - Iodoplatinat - Hơi iod
Acid amin	Silicagel	- Ethanol 96% - nước (63 : 37, theo trọng lượng) - *n*-propanol – nước (64 : 36, theo trọng lượng) - Phenol – nước (75 : 25, theo trọng lượng) - *n*-propanol - 34% amoniac (67 : 33, theo trọng lượng) - Ethanol 96% - amoniac (77:23, theo trọng lượng)	Thuốc thử : - Isatin. - Folin - Ehrlich - Sakaguchi - Nessler
Acid amin		- *n*-butanol – aceton - acid acetic băng – nước (35 : 35 : 10 : 20) - *n*-butanol - acid acetic băng – nước (50 : 10 : 40) lấy pha trên	Ninhydrin
Acid hữu cơ			
Acid béo bậc thấp	Silicagel	- Methyl acetat – 2,5% amoniac (95 : 5). Triển khai 2 lần	Dung dịch methyl đỏ trong ethanol

Bảng 7. (tiếp theo)

Nhóm chất	Pha tĩnh	Pha động	Thuốc thử hiện màu
Acid oxy-, di, tri-carboxylic	Silicagel	- *n*-propanol -25% amoniac (7 : 3) - Ethanol - cloroform - 28% amoniac - nước (70 : 40 : 20 : 2)	Dung dịch 0,1% 2,6-diclophenolindo phenol/ethanol 95%
Acid oxy-, di-, tri-carboxylic	Cellulose	- Ethyl acetat - acid muravic - nước (3 : 1 : 1) - *n*-butanol - acid muravic - nước (30 : 5 : 10) - *n*-propanol – amoniac đặc (6 : 4).	Dung dịch 0,1% 2,6-diclophenolindo phenol/ethanol 95%
Acid phenolcarbo xylic	Silicagel G	- *n*-butanol - Ethanol - nước (20 : 1 : 2)	Dung dịch *p*-nitroanilin diazo hoá
Acid phenolcarbo xylic	Cellulose	- Benzol - acid acetic - nước (70:29:1) - *n*-butanol - Tret-butanol - amoniac - nước (4 : 2 : 2 : 1) - Propanol - amoniac - nước (8 : 1 : 1).	Dung dịch *p*-nitroanilin diazo hoá
Antra - glycossid	Silicagel G	- Ethylacetat – methanol – nước (100:17:13)	Dung dịch KOH 2N /ethanol
Antracen và dẫn xuất	Silicagel G	- Benzen – etyl acetat – acid formic (75 : 25 : 1) - Benzen – cloruacarbon (50:50) - Benzen – methanol (8:2) - Cloroform – ethanol – nước (60 : 30 : 30) - Ethyl acetat – methanol – nước (100 : 16,5 : 13,3) Toluen – aceton – nước (4 : 1 : 0,5)	Dung dịch KOH 2N /ethanol hoặc bicarbonat natri
Carotenoid	Silicagel G + canxi hydroxyd	- Ether dầu (90 - 110°C) – ben zen (9 : 1); (5 : 5); (1 : 9)	Carotenoid có màu ở ánh sáng thường

Bảng 7. (tiếp theo)

Nhóm chất	Pha tĩnh	Pha động	Thuốc thử hiện màu
Carotenoid (1)	- Oxyd nhôm hoạt tính II	- Ether dầu (60 - 80°C) - ether – acid acetic (85 : 15 : 1)	
Chất béo			
Triglycerid, acid béo tự do	-Silicagel	Ether dầu – acid acetic – ether (80 : 2 : 20); (90 : 1 : 10); (70 : 3 : 30)	- Hơi iot + Rodamin B
Phospho-lipid	Silicagel G	- Cloroform – methanol – nước (65 : 35 : 4); (80 : 20 : 1)	- Hơi iot + Rodamin B
Chất màu	Silicagel G	- Ethyl acetat – acid acetic – acid formic – nước (10 : 1 : 1 : 2) - *n*-Butanol – ethanol – amoniac – nước (7 : 2 : 2 : 2) - *n*-Butanol – acid acetic – nước (4 : 1 : 2)	- Hỗn hợp acid boric 10% và acid oxalic 10% (2 : 1). - Dung dịch KOH 10%/ethanol. - Dung dịch $FeCl_3$ 5%.
Coumarin và dẫn xuất	Silicagel G	- Benzen - ethyl acetat (8 : 3); (10 : 1); (9 : 1) - Benzen - aceton (10 : 1) - Toluen - ethyl acetat - acid formic (5:4:1)	- KOH 0,5N - 2N/ethanol - acid sulfanilic diazo hoá - *p*-nitro-anilin diazo hoá - Acid hydroxamic clorid sắt III - Iod-iodua 0,5%
Đường	Kieselgua	- Ethyl acetat - iso-propanol - nước (65 : 23,5 : 11,5)	- Phtalat anilin - Phtalat anisidin

Bảng 7. (tiếp theo)

Nhóm chất	Pha tĩnh	Pha động	Thuốc thử hiện màu
	Silicagel G	- Benzen - acid acetic băng - methanol (2 : 2 : 6) - Methylethylaceton - acid acetic băng - methanol (2 : 2 : 6)	- Amilin - Nitrat bạc Naphtoreso-xinol
	Alusin hoạt hoá	- *n*-propanol - ethyl acetat - nước - amoniac 25% (5 : 1 : 3 : 1) - *n*-propanol - ethyl acetat - nước - amoniac 25% (6 : 1 : 3 : 1)	Aldehyd anisic - acid sulfuric - Oxalat anilin
	Alusin không hoạt hoá	- *n*-propanol - ethyl acetat - nước - amoniac 25% (6 : 1 : 3 : 1) - *n*-Butanol - acid acetic băng - nước (6 : 3 : 1)	
Flavonoid			
Flav. genin	Silicagel G	- Toluen - ethyl acetat - acid formic (5 : 4 : 1) - Cloroform – ethyl acetat (6:4) - Benzen – pyridin – acid formic (72 : 18 : 10); (36 : 9 : 5) - Cloroform - methanol - acid acetic (7 : 1 : 1) - Cloroform – ethanol (3 : 1) - Cloroform – 11% acid acetic (9 : 1)	- Sắt III clorid - Nhôm clorid - TT Benedic - Acid boric 10% - acid oxalic 10% -Benzidin tetraazo hoá
	Polyamid	- Methanol – nước (8 : 1) (4 : 1) - Ethanol – nước (3 : 2); (4 : 1) - Benzen – methylethyl ceton – methanol (14 : 1 : 1)	- Magnesi – acid hydrocloric - Fast blue salt B
Flavonoid glycosid	Silicagel G	- Ethyl acetat - acid formic - nước (8:1:1) - Ethyl acetat - acid formic – acid acetic băng - nước (100 : 11 : 11 : 27): lấy pha trên - Ethyl acetat - acid formic – acid acetic băng - methylethyl ceton - nước (50 : 7 : 30 : 10)	

Bảng 7. (tiếp theo)

Nhóm chất	Pha tĩnh	Pha động	Thuốc thử hiện màu
		- Methanol – acid acetic – nước (18 : 1 : 1) Butanol - ethyl acetat - dimethylformamid – nước (10 : 6 : 3 : 2)	
	Polyamid	Ethanol - methylethyl ceton - nước - acetylaceton (3 : 3 : 13 : 1)	
Flavonoid glycosid	Cellulose	- *n*-Butanol - acid acetic băng - nước (40 : 10 : 50): lấy pha trên - Ethyl acetat – cloroform – acid formic (3 : 3 : 1) - Acid hydroclrid – acid acetic – nước (3 : 1 : 20) - Ethyl acetat – acid acetic – nước (10 : 2 : 3) - Iopropanol – amoniac (1 : 1)	
Glycosid tim	Silicagel G	- Ethyl acetat – pyridin – nước (50 : 5 : 45); (5 : 1:4): lấy pha trên - Clorua methylen – mathanol – formamid (80 : 19 : 1) - Ethyl acetat – methanol – nước (100 : 13,5 : 10); (81 : 11 : 8); (80 : 5 : 5) - Cloroform – pyridin (6 : 1) - Ethyl acetat – ethanol - methanol – nước (81 : 4 : 11 : 8) - Cloroform – methanol (9 : 1) - Cyclohexan – aceton – acid acetic (49 : 49 : 2) - Cloroform – methanol – nước (65 : 35 : 10) - Methylethyl ceton – toluen – nước – methanol – acid acetic băng (40 : 5 : 3 : 2,5 : 1)	***- Trên vòng lacton A***: + Baljet + Kedde ***- Trên vòng cardenolid:*** + Raymond + Legal ***- Trên đường deoxy***: + Keller + Kiliani + Pesez + Tollens + Langejan - Trên nhân sterol: + Lieberman + Car-Prica + Kaiser

Bảng 7. (tiếp theo)

Nhóm chất	Pha tĩnh	Pha động	Thuốc thử hiện màu
Saponin			
Saponin triterpen	Silicagel G	- Cloroform – methanol – nước (64 : 50 : 10); (70 : 30 : 4) - Butanol – acid acetic băng – nước (5 : 4 :1): lấy pha trên - Cloroform – methanol (95 : 5); (10 : 1) - Propanol – ethylacetat – nước (4 : 3 : 3) - *n*-Butanol - ethanol – amoniac 25% (7 : 2 : 5) - *n*-Butanol - ethanol – nước (7 : 2 : 5) - *n*-Butanol - acid acetic – nước (4 : 1 : 1) (4 : 1 : 5); (4 : 1 : 1); (6 : 1 : 3)	- Acid sulfuric - Lieberman-Buxa - Antimon III clorid bão hoà/cloroform - Vanilin-acid phosphoric - Vanilin/ethanol - vanilin/acid sulfuric
Saponin steroid	Silicagel G	- Ethylacetat – pyridin – nước (5 : 1 : 5); (3 : 1 : 3) - Cloroform – methanol – nước (65 : 30 : 10)	- Acid sulfuric/methanol (1:1) - Lơ tetrazoli
Sterol	Silicagel G	- Benzen – ethyl acetat (3 : 1); (4 : 1) - Cyclohexan – ethyl acetat (3 : 2) - Diclomethan – aceton (7 : 3); (9 : 1) - Cloroform – methanol – nước (188 : 12 : 1); (65 : 30 : 10) - Diclomethan – ether (9 : 1); (97 : 3) - Hexan – ether (99 : 1)	- Acid sulfuric 50% - Antimon (III) clorid - Anis aldehyd – acid sulfuric - Vanilin-acid phosphoric - Acid percloric - Acid clorosulfonic - Morin - Triphenyl tetrazoli

Bảng 7. (tiếp theo)

Nhóm chất	Pha tĩnh	Pha động	Thuốc thử hiện màu
Tinh dầu	Silicagel G	- Benzen - Benzen - ethyl acetat (95 : 5) - Benzen – methanol (95 : 5) - Ether dầu – ether – ethyl acetat (80 : 15 : 5) - Toluen – ethyl acetat (95 : 5) - Cloroform	- Vanilin / acid sulfuric - 4-minoanti-pyrin + ferricyanua + amoniac 25% - 2,4-dinitrophenyl hydrazin / acid sulfuric

1.3. Phương pháp tiến hành sắc ký lớp mỏng

1.3.1. Dụng cụ

Để thực hiện kỹ thuật SKLM trong phân tích cần những dụng cụ sau:

- Đèn tử ngoại, phát các bức xạ có bước sóng ngắn 254 nm và bước sóng dài 365 nm.

- Bình triển khai SKLM bằng thuỷ tinh trong suốt, kích thước phù hợp với các phiến kính cần dùng và có nắp đậy kín: 10 × 20 cm
20 × 20 cm
10 × 10 cm

- Ống mao quản để chấm sắc ký: 1 , 2, 5, 10, 20 µl.

- Lớp mỏng tráng sẵn trên phiến kính, kim loại hoặc nhựa.

- Bàn tráng lớp mỏng (nếu không có lớp mỏng tráng sẵn).

- Tủ sấy điều nhiệt để hoạt hoá và sấy bản mỏng và sắc ký đồ, hoặc để sấy nóng một số phản ứng phát hiện.

- Tủ hút hơi độc.

- Máy sấy dùng để sấy khô sắc ký đồ và cho phép chấm nhanh nhiều lần những dung dịch của chất cần phân tích.

- Tủ lạnh để bảo quản những thuốc thử dễ hỏng.

- Hộp bút chì màu để vẽ sắc ký đồ.

- Máy ảnh để chụp sắc ký đồ (nếu có điều kiện).

- Ống phun thuốc thử hiện màu.

1.3.2. Cách tiến hành

- *Chuẩn bị lớp mỏng:* Đặt các phiến kính đã rửa sạch, sấy khô (có kích thước cần thiết) lên bàn tráng kính. Điều chỉnh độ dày của lớp hấp phụ bằng các thong số trên thiết bị trải.

Chất hấp phụ được chọn lọc sao cho phù hợp với yêu cầu phân tích, như: silicagel G, kieselguhr, cellulose, nhôm oxyd. Trộn silicagel G với nước cất (tỷ lệ 1 : 2 kl/V), nhào kỹ trong cối trong 30 – 40 giây. Dịch treo được rót ngay vào thiết bị trải đã được điều chỉnh độ dày ~ 0,25 mm. Tiến hành trải dịch treo trên các phiến kính. Để nguyên các phiến kính tại chỗ khoảng 10 phút tới khi mặt trên hết bóng, hoặc để khô tự nhiên qua đêm ở nhiệt độ phòng.

- Hoạt hoá: Cho các bản mỏng đã khô mặt vào trong tủ sấy và sấy ở 105 – 110°C trong 30 phút. Để nguội rồi bảo quản trong bình hút ẩm. Khi dùng, nếu cần thì hoạt hoá lại bằng cách sấy ở 105 – 110°C trong 1 giờ.

- *Chuẩn bị bình triển khai:* Các bình triển khai thường là bình thuỷ tinh, hình hộp hay hình trụ, có nắp đậy kín, kích thước thay đổi tuỳ theo yêu cầu của các bản mỏng sử dụng. Bão hoà hơi dung môi vào khí quyển trong bình bằng cách lót giấy lọc xung quanh thành trong của bình, rồi rót một lượng vừa đủ dung môi vào bình. Lắc rồi để giấy lọc thấm đều dung môi. Lượng dung môi sử dụng sao cho sau khi thấm đều giấy lọc còn lại một lớp dày khoảng 5 mm đến 10 mm ở đáy bình. Đậy nắp bình và để yên 1 giờ ở nhiệt độ phòng. Muốn thu được kết quả lặp lại tốt chỉ nên dùng các loại dung môi tinh khiết, loại dùng cho sắc ký. Những dung môi dễ biến đổi về hoá học, hoặc có các thành phần dễ bay hơi chỉ nên pha trước khi dùng.

- *Chấm mẫu phân tích lên bản mỏng:* Lượng chất hoặc hỗn hợp chất chấm lên bản mỏng có ý nghĩa quan trọng đối với hiệu quả tách sắc ký, đặc biệt ảnh hưởng rất lớn đến trị số R_f. Lượng chất quá lớn làm cho các vết sắc ký lớn và kéo dài. Khi đó vết của các chất có gía trị R_f gần nhau sẽ bị chồng lấp. Lượng chất nhỏ quá có thể sẽ không phát hiện được do độ nhạy của thuốc thử không đủ (thông thường độ nhạy của các thuốc thử trên 0,005 µg) Lượng mẫu thông thường cần đưa lên bản mỏng từ 0,1 đến 50 µg ở dạng dung dịch trong các dung môi thích hợp (ether, cloroform, methanol, ethanol, nước...). Thể tích dung dịch đưa lên bản mỏng từ 0,001 ml đến 0,005 ml nếu chấm điểm và từ 0,1 đến 0,2 ml nếu chấm vạch như trong sắc ký điều chế. Đối với sắc ký điều chế lượng chấm có thể lên đến 10 – 50 mg. Đối với các dung dịch loãng thì có thể chấm nhiều lần trên cùng một điểm và sấy khô sau mỗi lần chấm.

Đường xuất phát phải cách mép dưới của bản mỏng 1,5 – 2 cm và cách bề mặt dung môi từ 0,8 đến 1 cm. Các vết chấm phải nhỏ, có đường kính 2 – 6 mm và cách nhau 15 mm. Các vết ở bìa phải cách bờ bên của bản mỏng ít nhất 1 cm để tránh hiệu ứng bờ. Khi làm SKLM bán định lượng, độ chính xác của kết quả phân tích phụ thuộc rất nhiều vào độ chính xác của lượng chất chấm lên bản mỏng. Do đó phải dùng mao quản định mức chính xác.

- *Triển khai sắc ký:* Đặt bản mỏng gần như thẳng đứng với bình triển khai. Các vết chấm phải ở trên bề mặt của lớp dung môi triển khai. Đậy kín bình và để yên ở nhiệt độ không đổi. Khi dung môi đã triển khai trên bản mỏng được một đoạn tuỳ theo yêu cầu phân tích, lấy bản mỏng ra khỏi bình, đánh dấu mức dung môi. Làm bay hơi dung môi trong tủ hút, rồi hiện vết bằng các thuốc thử tương ứng. Các vết xuất hiện tuỳ theo từng trường hợp: ngay sau khi phun thuốc thử hoặc sau khi sấy nóng bản mỏng trong 5 – 10 phút. Quan sát các vết xuất hiện ở ánh thường hoặc các vết có huỳnh quang dưới đèn tử ngoại ở bước sóng 254 nm hoặc 365 nm. Tính gía trị R_f hoặc R_x đối chiếu với các chất chuẩn.

1.4. Ứng dụng sắc ký lớp mỏng trong xác định dấu vân tay hoá học của dược liệu và thuốc

Như đã biết bằng phương pháp SKLM chúng ta có thể nhanh chóng xác định sơ bộ sự có mặt của hầu hết các nhóm chất có trong dược liệu và thuốc từ dược liệu: alcaloid, acid hữu cơ, acid amin, antraglycosid, carotenoid, chất béo, chất màu, coumarin, đường, flavonoid, glycosid tim, saponin, sterol, tanin, tinh dầu v.v... Một, hai hoặc ba trong số các nhóm chất này là các thành phần đặc trưng của một hoặc một số dược liệu. Vì vậy, chúng có thể trở thành "dấu vân tay" để nhận dạng dược liệu hoặc thuốc bào chế từ các dược liệu đó. Thực tế SKLM là phương pháp đã được áp dụng từ lâu và khá thông dụng trong định tính các dược liệu song song với phương pháp hiển vi - nhận dạng dược liệu bằng các đặc điểm vi phẫu và cấu tạo bột dược liệu (tạm gọi là dấu vân tay - hiển vi). Nhưng chỉ trong những năm gần đây kỹ thuật dấu vân tay - SKLM mới được đưa vào Dược điển và các tiêu chuẩn cơ sở để kiểm nghiệm dược liệu và thuốc từ dược liệu. Kỹ thuật dấu vân tay (DVT) - SKLM đặc biệt có hiệu quả trong việc phát hiện các dược liệu giả mạo do cố ý hoặc do nhầm lẫn. Do có nhiều ưu điểm, phương pháp này đã nhanh chóng trở thành phương pháp được sử dụng nhiều nhất trong các chuyên luận dược liệu của các Dược điển - là quy định bắt buộc trong kiểm nghiệm rất nhiều dược liệu và thuốc từ dược liệu. Tuy nhiên mức độ áp dụng còn khác nhau nhiều giữa các nước, giữa các Dược điển. Trong Dược

điển Trung Quốc 2000 hầu hết các chuyên luận dược liệu quy định sử dụng kỹ thuật SKLM để nhận dạng dược liệu [14].

Trong Dược điển Việt Nam III có 75 chuyên luận dược liệu quy định dùng phương pháp SKLM để định tính dược liệu [1].

Kỹ thuật DVT-SKLM yêu cầu nhiều thiết bị SKLM hiện đại, bao gồm máy chấm lớp mỏng tự động, lớp mỏng dùng cho SKLM hiệu năng cao có tẩm chất huỳnh quang, máy ảnh màu kỹ thuật số, hệ thống quét phổ truyền hình, các dung môi có độ tinh khiết cao, các chất chuẩn đối chiếu....Đối với các dược liệu và thuốc có thành phần hoạt chất phức tạp phải tiến hành SKLM của 2 – 3 nhóm chất, phát hiện bằng nhiều thuốc thử khác nhau và nhiều phương pháp khác nhau: dưới đèn tử ngoại với các bước sóng 254 nm và 365 nm, ở ánh sáng thường v.v...

Việc nghiên cứu xác định DVT-SKLM của một dược liệu và các chế phẩm hoặc thuốc từ dược liệu được tiến hành rất công phu. Điểm quan trọng là tìm được sự giống nhau và khác nhau giữa thành phần hoá học của dược liệu cần nhận dạng so với các dược liệu giả mạo, dược liệu nhầm lẫn hoặc dùng thay thế. Các dược liệu dùng thay thế, nhầm lẫn hoặc giả mạo thường có các thành phần hoá học tương tự nhau. Vì vậy phải khảo sát rất kỹ mới có thể tìm ra được sự khác biệt giữa dược liệu chính thống và dược liệu giả mạo. Chính sự khác biệt này được ghi lại trên sắc ký đồ như là DVT của dược liệu đó dùng để nhận dạng dược liệu trong nguyên liệu thô, trong các bán thành phẩm (cao, dịch chiết) và trong thuốc [11, 14...].

Hãng Camag đã phối hợp với một số viện nghiên cứu và các chuyên gia Dược điển Thuỵ Sĩ nghiên cứu xác định DVT của một số dược liệu dễ bị giả mạo, nhầm lẫn và thay thế. Dưới đây là phương pháp thực hiện kỹ thuật DVT-SKLM của một số dược liệu [http://www.camag.com].

1.4.1. Astragalus và hedysarum

•Xác định DVT-SKLM của Astragalus và Hedysarum

- *Mẫu thử:* 5 g bột dược liệu chiết trong 10 phút với 100 ml methanol - nước (57 : 43). Dịch chiết được lọc và thu hồi dung môi trong chân không ở 45°C. Loại lipid: cắn được chiết với 5 ml ethyl acetat (EtOAc) và 5 ml nước. Bỏ lớp EtOAc. Lớp dưới chiết tiếp 2 lần với 5 ml EtOAc. Dịch EtOAc loại bỏ. Dịch nước được chiết tiếp 3 lần với 5 ml butanol (BuOH). Rửa dịch BuOH 3 lần với 2 ml nước. Dịch nước loại bỏ. Bốc hơi BuOH và hoà cắn trong 1 ml methanol.

- *Mẫu chuẩn:* 1 mg astragalosid IV hoà trong 1 ml methanol.

- *Thuốc thử hiện màu:* Thuốc thử (TT) acid sulfuric: Cho cẩn thận 20 ml acid sulfuric vào 180 ml methanol làm lạnh bằng đá.

- *Điều kiện sắc ký:*

+ Pha tĩnh: Bản mỏng SKLM hiệu năng cao silicagel 60 F254 (Merck), 10 × 10 hoặc 20 × 10 cm.

+ Pha động: Cloroform - methanol - nước (18 : 8 : 1).

+ Chấm mẫu: Chấm 5 µl mẫu thử và 5 µl mẫu chuẩn trên 2 băng dài 8 mm, cách cạnh dưới của bản mỏng 8 mm, cách cạnh bên 2 mm.

+ Triển khai: Bão hoà bình triển khai 10 × 10 hoặc 20 × 10 trong 20 phút (giấy lọc) bằng 5 hoặc 10 ml dung môi pha động. Khoảng cách triển khai là 60 mm kể từ đáy bản mỏng. Lấy bản mỏng ra và làm khô bằng máy sấy tóc trong 5 phút (dùng luồng khí lạnh).

- *Phát hiện*: a) UV 254 nm

b) UV 366 nm

c) TT acid sulfuric: Ngâm bản mỏng vào TT trong 1 giây, sau đó sấy nóng ở 100°C trong 5 phút. Quan sát ở ánh sáng thường.

- *Dược liệu so sánh:*

+ *Astragalus* và *Hedysarum* là 2 dược liệu dễ nhầm lẫn.

+ Rễ Astragalus 2, 4, và 6 năm có chất lượng khác nhau.

+ Thân ngầm của Astagalus chất lượng kém rễ Astaragalus.

1.4.2. Đương quy Trung Quốc

• ***Xác định DVT-SKLM của Angelica sinensis (Đương quy Trung Quốc)***

- *Mẫu thử:* 1 g bột dược liệu chiết với 4 ml heptan bằng siêu âm trong 5 phút. Lọc dịch chiết qua màng 0,22 µm.

- *Mẫu chuẩn:* 1 mg của các chất sau: linoleic acid, Z-ligustilid và stigmasterol hoà trong 10 ml methanol.

- *Thuốc thử hiện màu:* thuốc thử acid sulfuric: Cho cẩn thận 20 ml acid sulfuric vào 180 ml methanol làm lạnh bằng đá.

- *Điều kiện sắc ký:*

+ Pha tĩnh: Bản mỏng SKLM hiệu năng cao silicagel 60 F254 (Merck), 10 × 10 hoặc 20 × 10 cm.

+ Pha động: Toluen - ethyl acetat - acid formic (90 : 10 : 1).

+ Chấm mẫu: Chấm 10 µl mẫu thử và 5 µl mẫu chuẩn trên 2 băng dài 8 mm, cách cạnh dưới của bản mỏng 8 mm, cách cạnh bên 2 mm.

+ Triển khai: Bão hoà bình triển khai 10 × 10 hoặc 20 × 10 trong 20 phút (giấy lọc) bằng 5 hoặc 10 ml dung môi pha động. Khoảng cách triển khai là 60 mm kể từ đáy bản mỏng. Lấy bản mỏng ra và làm khô bằng máy sấy tóc trong 5 phút (dùng luồng khí lạnh).

- *Phát hiện*: a) UV 254 nm

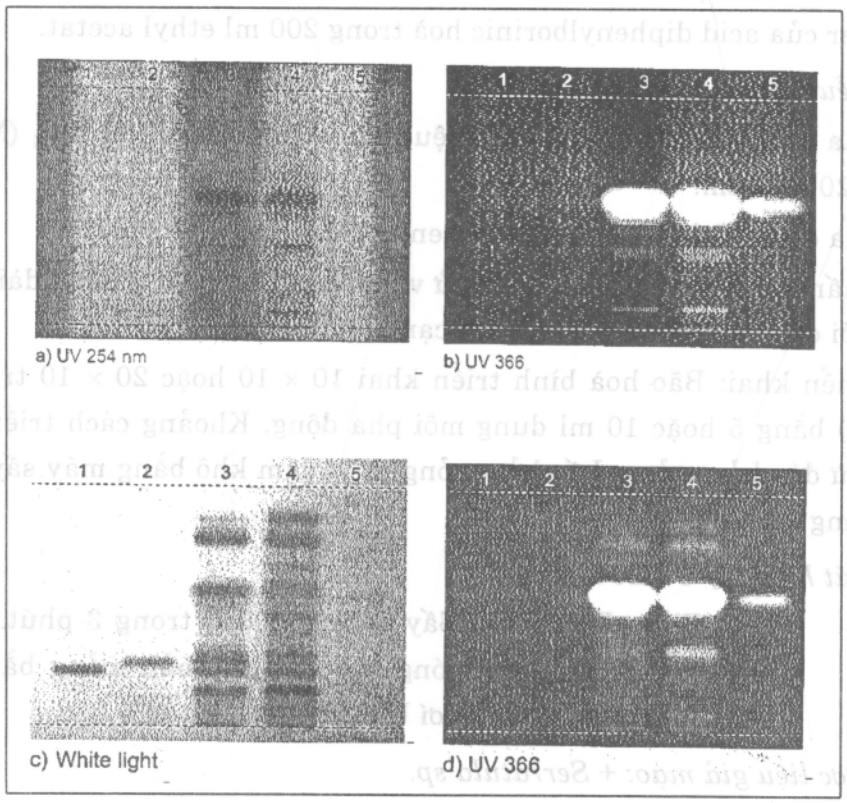
b) UV 366 nm

c) Thuốc thử acid sulfuric: Ngâm bản mỏng vào thuốc thử trong 1 giây, sau đó sấy nóng ở 100°C trong 5 phút. Quan sát ở ánh sáng thường.

d) Quan sát bản mỏng sau khi ngâm trong thuốc thử ở UV 366 nm.

- *Kết quả:* Hình 1.

- *Dược liệu giả mạo:* Rễ cây *Levisticum officinale*.



Hình 1: SKLM hiệu năng cao đương quy (*Angelica sinensis*) và dược liệu giả mạo (*Levisticum officinale*) [http://www.camag.com]

1. Stigmasterol
2. Linoleic acid
3. *Angelica sinensis*
4. *Levisticum officinale*
5. Z - ligustilid

1.4.3. Thăng ma

• ***Xác định DVT-SKLM của Cimicifuga racemosa (Thăng ma)***

**** Các acid hữu cơ trong Cimicifuga:***

- *Mẫu thử:* 0,5 g bột dược liệu chiết với 5 ml methanol - nước (1 : 1) bằng siêu âm trong 10 phút. Lọc dịch chiết qua giấy lọc. Rửa giấy lọc 4 lần × 1 ml methanol - nước (1 : 1). Cho dịch lọc và dịch rửa vào bình định mức 10 ml, thêm methanol - nước (1 : 1) đến vạch chuẩn. Lấy 1 ml dịch chiết cho vào bình đựng mẫu nhỏ dùng làm mẫu thử.

Khi phân tích cao thuốc và thuốc lấy khối lượng tương đương 0,5 g bột dược liệu.

- *Mẫu chuẩn:* 1 mg acid caffeic và 1 mg acid isoferulic hoà trong 10 ml methanol, mỗi loại.

- *Thuốc thử hiện màu:* Thuốc thử sản phẩm thiên nhiên (SPTN): 1 g amino-ethylester của acid diphenylborinic hoà trong 200 ml ethyl acetat.

- *Điều kiện sắc ký:*

+ Pha tĩnh: Bản mỏng SKLM hiệu năng cao silicagel 60 F_{254} (Merck), 10 × 10 hoặc 20 × 10 cm.

+ Pha động: Ethyl formiate - toluen - acid formic (30 : 50 : 20).

+ Chấm mẫu: Chấm 2 µl mẫu thử và mẫu chuẩn trên 2 băng dài 8 mm, cách cạnh dưới của bản mỏng 8 mm, cách cạnh bên 2 mm.

+ Triển khai: Bão hoà bình triển khai 10 × 10 hoặc 20 × 10 trong 20 phút (giấy lọc) bằng 5 hoặc 10 ml dung môi pha động. Khoảng cách triển khai là 70 mm kể từ đáy bản mỏng. Lấy bản mỏng ra và làm khô bằng máy sấy tóc trong 5 phút (dùng luồng khí nóng).

- *Phát hiện*: a) UV 254 nm

b) Phun TT SPTN: Sấy nóng ở 100°C trong 3 phút. Nhúng bản mỏng còn đang nóng vào TT. Sấy bản mỏng bằng dòng khí lạnh. Quan sát dưới UV 366 nm.

- *Dược liệu giả mạo:* + *Serratula sp.*

+ *Cimicifuga dahurica*

**** Glycosid triterpen trong Cimicifuga:***

- *Mẫu thử:* 0,5 g bột dược liệu chiết với 5 ml methanol bằng siêu âm trong 10 phút. Lọc dịch chiết qua giấy lọc. Rửa giấy lọc 4 lần × 1 ml methanol. Cho dịch lọc và dịch rửa vào bình định mức 10 ml, thêm methanol đến vạch chuẩn. Lấy 1

ml dịch chiết cho vào bình đựng mẫu nhỏ dùng làm mẫu thử.

Khi phân tích cao và sản phẩm thuốc lấy khối lượng tương đương 0,5 g bột dược liệu.

- *Mẫu chuẩn:* 2,5 mg actein hoà trong 10 ml ethanol – nước (6: 4).

2 mg deoxyactein hoà trong 10 ml methanol.

- *Thuốc thử hiện màu:* Anisaldehyd – acid sulfuric: Cho cẩn thận 10 ml acid sulfuric vào hỗn hợp làm lạnh bằng đá gồm 170 ml methanol và 20 ml acid acetic. Thêm vào đó 1 ml anisaldehyd.

Chú ý: thuốc thử không có màu và phải bảo quản trong tủ lạnh. Nếu thuốc thử có màu thì phải bỏ, không dùng được.

- *Điều kiện sắc ký:*

+ Pha tĩnh: Bản mỏng SKLM hiệu năng cao silicagel 60 F_{254} (Merck), 10 × 10 hoặc 20 × 10 cm.

+ Pha động: Ethyl formiat - toluen - acid formic (30 : 50 : 20).

+ Chấm mẫu: Chấm 2 µl mẫu thử và mẫu chuẩn trên 2 băng dài 8 mm, cách cạnh dưới của bản mỏng 8 mm, cách cạnh bên 2 mm.

+ Triển khai: Bão hoà bình triển khai 10 × 10 hoặc 20 × 10 trong 20 phút (giấy lọc) bằng 5 hoặc 10 ml dung môi pha động. Khoảng cách triển khai là 70 mm kể từ đáy bản mỏng. Lấy bản mỏng ra và làm khô bằng máy sấy tóc trong 5 phút (dùng luồng khí nóng).

- *Phát hiện:* Lớp mỏng được nhúng trong thuốc thử Anisaldehyd- acid sulfuric trong 1 giây, sau đó sấy ở nhiệt độ 100°C trong 2 – 5 phút. Quan sát ở ánh sáng thường.

- *Dược liệu giả mạo:* + *Serratula* sp.

+ *Cimicifuga dahurica*

1.4.4. Crataegus sp.

- ***Xác định DVT-SKLM của Crataegus sp.***

- *Mẫu thử*: Cho vào ống nghiệm 1 g bột dược liệu, đun nóng với 10 ml methanol trong 5 phút trên bếp cách thuỷ ở 65°C. Sau khi làm lạnh ở nhiệt độ phòng, lọc và hoà loãng dịch chiết đến 10 ml bằng methanol – dùng làm mẫu thử.

- *Mẫu chuẩn:* 1 mg acid caffeic, 2 mg acid clorogenic, 5 mg hyperosid, 5 mg rutin, 5 mg vitexin và 5 mg vitexin-2-O rhamnosid: mỗi loại hoà trong 20 ml methanol.

- *Thuốc thử hiện màu:*Thuốc thử sản phẩm thiên nhiên (SPTN): 1 g aminoethylester của acid diphenylborinic hoà trong 200 ml ethyl acetat.

- *Điều kiện sắc ký:*

+ Pha tĩnh: Bản mỏng SKLM hiệu năng cao silicagel 60 F_{254} (Merck), 10x10 hoặc 20x10 cm.

+ Pha động: Ethyl acetat - methanol – nước - acid formic (50 : 2 : 3 : 6).

+ Chấm mẫu: Chấm 2 µl mẫu thử và các mẫu chuẩn trên 2 băng dài 8 mm, cách cạnh dưới của bản mỏng 8 mm, cách cạnh bên 2 mm.

+ Triển khai: Bão hoà bình triển khai 10 × 10 hoặc 20 × 10 trong 20 phút (giấy lọc) bằng 5 hoặc 10 ml dung môi pha động. Khoảng cách triển khai là 70 mm kể từ đáy bản mỏng. Lấy bản mỏng ra và làm khô bằng máy sấy tóc trong 5 phút (dùng luồng khí nóng).

- *Phát hiện*: a) UV 254 nm

b) Phun TT SPTN: Sấy nóng ở 100°C trong 3 phút. Sử dụng bình nhúng thuốc thử Camag. Nhúng bản mỏng còn đang nóng vào TT (tốc độ 1, thời gian: 0). Sấy bản mỏng bằng dòng khí lạnh. Quan sát dưới UV 366 nm.

- *Dược liệu dùng thay thế:* Một số loài *Crataegus.*

1.4.5. Nấm Linh chi

• ***Xác định DVT-SKLM của Ganoderma lucidum** (Nấm Linh chi)*

- *Mẫu thử:* 250 mg bột dược liệu chiết với 5 ml methanol bằng bếp siêu âm trong 3 phút. Lọc dịch chiết. Bốc hơi dịch lọc đến khô, hoà cắn trong 3 ml methanol.

- *Thuốc thử hiện màu:* Thuốc thử acid sulfuric: Cho cẩn thận 20 ml acid sulfuric vào 180 ml methanol làm lạnh bằng đá.

- *Điều kiện sắc ký:*

+ Pha tĩnh: Bản mỏng SKLM hiệu năng cao silicagel 60 F254 (Merck), 10 × 10 hoặc 20 × 10 cm.

+ Pha động: Dicloromethan – methanol (9 : 1).

+ Chấm mẫu: Chấm 5 µl mẫu thử trên băng dài 6 mm, cách cạnh dưới của bản mỏng 8 mm, cách cạnh bên 2 mm.

+ Triển khai: Bão hoà bình triển khai 10 × 10 hoặc 20 × 10 trong 20 phút (giấy lọc) bằng 5 hoặc 10 ml dung môi pha động. Khoảng cách triển khai là 70

mm kể từ đáy bản mỏng. Lấy bản mỏng ra và làm khô bằng máy sấy tóc trong 5 phút (dùng luồng khí nóng).

- *Phát hiện*: a) UV 254 nm

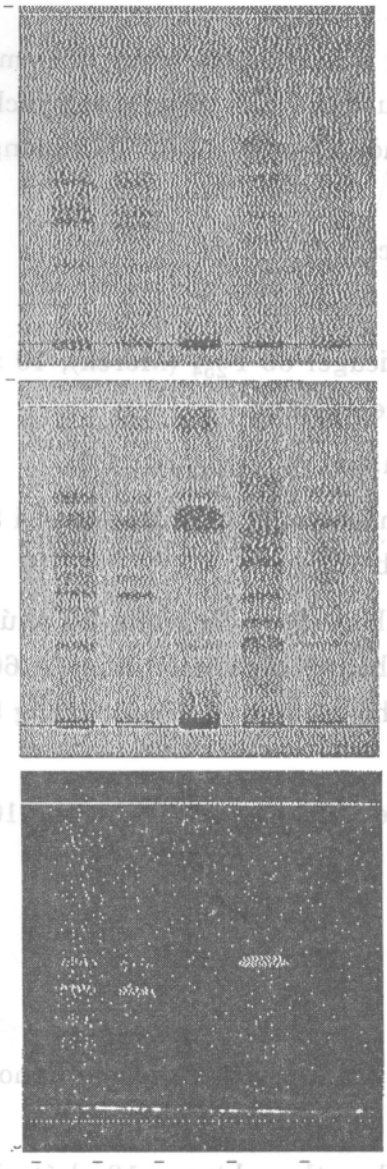
b) UV 366 nm

c) Thuốc thử acid sulfuric: Ngâm bản mỏng vào TT trong 1 giây, sau đó sấy nóng ở 100°C trong 5 phút. Quan sát ở ánh sáng thường.

d) Quan sát bản mỏng sau khi ngâm trong TT ở UV 366 nm.

- *Kết quả:* Hình 2.

- *Mẫu so sánh:* quả thể *Ganoderma applanatum (nấm cổ linh chi).*



Hình 2: SKLM hiệu năng cao nấm linh chi (*Ganoderma lucidum*) và dược liệu so sánh nấm cổ linh chi (*G. applanatum*) [http://www.camag.com]

1. *Ganoderma lucidum* (thể quả)
2. *Ganoderma lucidum* (thể quả)
3. *Ganoderma lucidum* (thể sợi)
4. *G. applanatum* (thể quả)
5. *Ganoderma lucidum* (thể quả)

1.4.6. Bạch quả

• ***Xác định DVT-SKLM của Ginkgo biloba** (Bạch quả)*

**** Các Ginkgolid trong bạch quả:***

- *Mẫu thử:* 1 g bột thuốc hoặc bột lá chiết hồi lưu với 10 ml methanol trong 10 phút. Sau khi làm lạnh, lọc lấy dịch chiết.

0,1 mg cao khô được chiết bằng siêu âm với 10 ml methanol trong 10 phút và lọc.

- *Mẫu chuẩn:*1 mg Ginkgolid A, Ginkgolid B, Ginkgolid C và bilabolid hoà tan riêng biệt trong 1 ml methanol.

- *Xử lý bản mỏng bằng acetat natri*: Hoà 8 g acetat natri trong 200 ml ethanol - nước (6 : 4). Ngâm bản mỏng SKLM hiệu năng cao trong dung dịch trong 2 giây, sau đó làm khô bản mỏng ở nhiệt độ phòng trong tủ hút. Bản mỏng được hoạt hoá trong 30 phút ở 90°C.

- *Thuốc thử hiện màu:* Thuốc thử anhydrid acetic.

- *Điều kiện sắc ký:*

+ Pha tĩnh: Bản mỏng SKLM hiệu năng cao silicagel 60 F_{254} (Merck), 10 × 10 hoặc 20 × 10 cm đã được ngâm trong dung dịch acetat natri.

+ Pha động: Toluen - ethyl acetat - aceton - methanol (20 : 10 : 10 : 1,2).

+ Chấm mẫu: Chấm 5 µl mẫu thử và 3 µl các mẫu chuẩn trên 2 băng dài 8 mm, cách cạnh dưới của bản mỏng 8 mm, cách cạnh bên 2 mm.

+ Triển khai: Bão hoà bình triển khai 10 × 10 hoặc 20 × 10 trong 20 phút (giấy lọc) bằng 5 hoặc 10 ml dung môi pha động. Khoảng cách triển khai là 60 mm kể từ đáy bản mỏng. Lấy bản mỏng ra và làm khô bằng máy sấy tóc trong 5 phút (dùng luồng khí lạnh).

- *Phát hiện*: Phun bản mỏng với TT anhydrid acetic và sấy ở 180°C trong 10 phút.

a) UV 254 nm

b) UV 366 nm.

**** Flavonoid trong bạch quả:***

- *Mẫu thử:* 1 g bột thuốc hoặc bột lá được chiết hồi lưu với 10 ml methanol trong 10 phút. Sau khi làm lạnh, lọc lấy dịch chiết.

0,1 mg cao khô được chiết bằng siêu âm với 10 ml methanol trong 10 phút và lọc.

- *Mẫu chuẩn:* Hoà 0,3 mg rutin trong 2 ml methanol

- *Thuốc thử hiện màu:*

+ Thuốc thử sản phẩm thiên nhiên (SPTN): 1 g aminoethylester của acid diphenylborinic hoà trong 200 ml ethyl acetat.

+ TT macrogol: Hoà 10 g polyethylen glycol 400 trong 200 ml dicloromethan.

- *Điều kiện sắc ký:*

+ Pha tĩnh: Bản mỏng SKLM hiệu năng cao silicagel 60 F_{254} (Merck), 10 × 10 hoặc 20 × 10 cm.

+ Pha động: Cyclohexan – ethylacetat (1 : 1).

+ Chấm mẫu: Chấm 5 µl mẫu thử và 5 µl mẫu chuẩn trên 2 băng dài 8 mm, cách cạnh dưới của bản mỏng 8 mm, cách cạnh bên 2 mm.

+ Triển khai: Bão hoà bình triển khai 10 × 10 hoặc 20 × 10 trong 20 phút (giấy lọc) bằng 5 hoặc 10 ml dung môi pha động. Khoảng cách triển khai là 60 mm kể từ đáy bản mỏng. Lấy bản mỏng ra và làm khô bằng máy sấy tóc trong 5 phút (dùng luồng khí lạnh).

- *Phát hiện:* a) UV 254 nm

b) UV 366 nm

c) TT SPTN - Macrogol: Sấy bản mỏng ở 100°C trong 3 phút, ngâm bản mỏng còn nóng trong TT SPTN, sấy khô bản mỏng bằng luồng khí lạnh. Sau đó ngâm bản mỏng trong TT Macrogol. Quan sát dưới UV 366 nm

- *Kết quả:* Hình 3

- *Mẫu so sánh:* - Lá bạch quả; viên nang bạch quả của Mỹ; bột cao lá bạch quả của Italia, Trung Quốc, Pháp; viên bột cao lá bạch quả của Thuỵ Sĩ, của Mỹ; Thuốc nước bạch quả của Mỹ, của Thuỵ Sĩ....

**** Ginkgolic acid trong bạch quả:***

- *Mẫu thử:* 1 g bột thuốc hoặc bột lá được chiết hồi lưu với 10 ml methanol trong 10 phút. Sau khi làm lạnh lọc dịch chiết.

0,1 mg cắn khô được chiết bằng siêu âm với 10 ml methanol trong 10 phút và lọc.

- *Mẫu chuẩn:* 1 mg ginkgolic acid hoà trong 10 ml methanol.

- *Điều kiện sắc ký:*

+ Pha tĩnh: Bản mỏng SKLM hiệu năng cao silicagel 60 F_{254} (Merck), 10 ×

10 hoặc 20 × 10 cm.

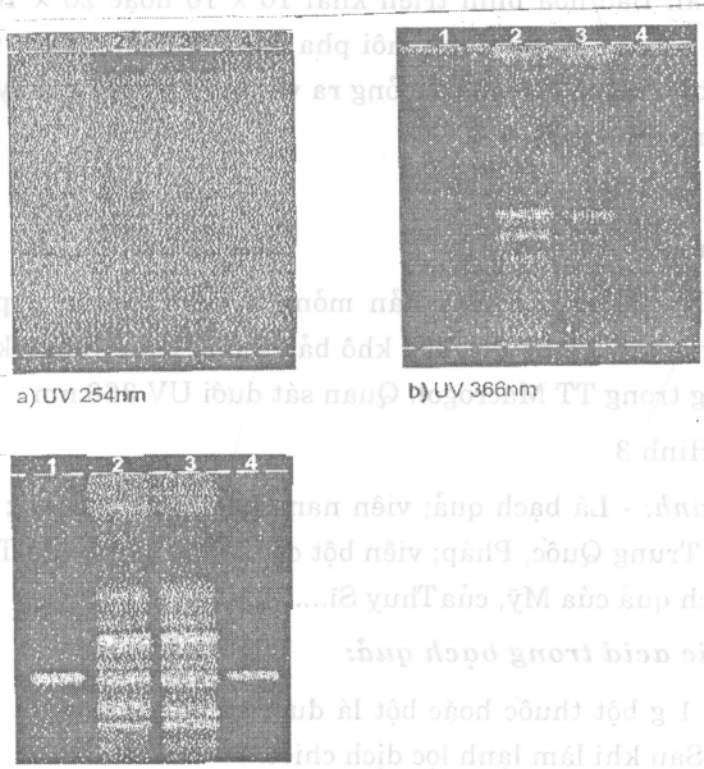
+ Pha động: Toluen – ethylacetat – acid acetic (8 : 2 : 0,2).

+ Chấm mẫu: Chấm 5 µl mẫu thử và 10 µl mẫu chuẩn trên 2 băng dài 8 mm, cách cạnh dưới của bản mỏng 8 mm, cách cạnh bên 2 mm.

+ Triển khai: Bão hoà bình triển khai 10 × 10 hoặc 20 × 10 trong 20 phút (giấy lọc) bằng 5 hoặc 10 ml dung môi pha động. Khoảng cách triển khai là 60 mm kể từ đáy bản mỏng. Lấy bản mỏng ra và làm khô bằng máy sấy tóc trong 5 phút (dùng luồng khí lạnh).

- *Phát hiện:* a) UV 366 nm

- *Mẫu so sánh:* - Lá bạch quả; viên nang bạch quả của Mỹ; bột cao lá bạch quả của Italia, Trung Quốc, Pháp; viên bột cao lá bạch quả của Thuỵ Sĩ, của Mỹ; Thuốc nước bạch quả của Mỹ, của Thuỵ Sĩ...



Hình 3: SKLM hiệu năng cao lá bạch quả (*Ginkgo biloba*) [http://www.camag.com]

1: Rutin; 2, 3: Lá khô *Ginkgo biloba*; 4: Rutin

1.4.7. Ngũ vị tử

• ***Xác định DVT-SKLM của Schisandra chinensis** (Ngũ vị tử)*

- *Mẫu thử:* 5 g thuốc nghiền thô chiết bằng soxhlet với 150 ml methanol trong 2 giờ. Thu hồi dung môi còn ~ 8 ml và chỉnh thể tích đến 10 ml bằng methanol.

- *Mẫu chuẩn:* Gomisin A, gomisin N, schisandrin, deoxyschisandrin, gamma schisandrin hoặc wuweizisu C : mỗi loại hoà trong 1 ml methanol.

- *Thuốc thử hiện màu:* Thuốc thử acid sulfuric: Cho cẩn thận 20 ml acid sulfuric vào 180 ml methanol làm lạnh bằng đá.

- *Điều kiện sắc ký:*

+ Pha tĩnh: Bản mỏng SKLM hiệu năng cao silicagel 60 F_{254} (Merck), 10 × 10 hoặc 20 × 10 cm.

+ Pha động: Toluen - ethylacetat - acid acetic (70 : 33 : 3).

+ Chấm mẫu: Chấm 3 µl mẫu thử và 1 µl của mỗi mẫu chuẩn trên 2 băng dài 8 mm, cách cạnh dưới của bản mỏng 8 mm, cách cạnh bên 2 mm.

+ Triển khai: Bão hoà bình triển khai 10 × 10 hoặc 20 × 10 trong 20 phút (giấy lọc) bằng 5 hoặc 10 ml dung môi pha động. Khoảng cách triển khai là 60 mm kể từ đáy bản mỏng. Lấy bản mỏng ra và làm khô bằng máy sấy tóc trong 5 phút (dùng luồng khí nóng).

- *Phát hiện:*

a) UV 254 nm

b) UV 366 nm

c) Thuốc thử acid sulfuric: Ngâm bản mỏng trong thuốc thử trong 1 giây, sau đó sấy nóng ở 100°C trong 5 phút. Quan sát ở ánh sáng thường.

- *Mẫu so sánh : Schisandra sphenanthera*

1.4.8. Valeriana officinalis

•***Xác định DVT-SKLM của Valeriana officinalis***

- *Mẫu thử:* Lắc 0,2 g bột dược liệu vừa mới nghiền với 5 ml dicloromethan trong 1 phút. Sau khi để yên trong 5 phút, lọc dịch chiết. Rửa giấy lọc bằng 2 ml

dicloromethan. Bốc hơi dung môi đến khô. Hoà cắn trong 0,2 ml dicloromethan.

- *Mẫu chuẩn:* 1 mg acid valerenic hoà trong 0,5 ml dicloromethan.

- *Thuốc thử hiện màu:* Thuốc thử acid hydroclorid – acid acetic: 20 ml acid acetic trộn với 80 ml HCl.

Thuốc thử anisaldehyd – acid sulfuric: Cho cẩn thận 10 ml acid sulfuric vào hỗn hợp đã làm lạnh gồm 170 ml methanol và 20 ml acid acetic. Cho thêm vào đó 1 ml anisaldehyd.

Chú ý: Thuốc thử không có màu và phải bảo quản trong tủ lạnh. Nếu thuốc thử có màu thì phải bỏ, không dùng được.

- *Điều kiện sắc ký:*

+ Pha tĩnh: Bản mỏng SKLM hiệu năng cao silicagel 60 F_{254} (Merck), 10 × 10 hoặc 20 × 10 cm.

+ Pha động: Hexan – ethylacetat – acid acetic (65 : 35 : 0,5).

+ Chấm mẫu: Chấm 3 µl mẫu thử và mẫu chuẩn trên 2 băng dài 10 mm, cách cạnh dưới của bản mỏng 8 mm, cách cạnh bên 2 mm.

+ Triển khai: Bão hoà bình triển khai 10 × 10 hoặc 20 × 10 trong 20 phút (giấy lọc) bằng 5 hoặc 10 ml dung môi pha động. Khoảng cách triển khai là 60 mm kể từ đáy bản mỏng. Lấy bản mỏng ra và làm khô bằng máy sấy tóc trong 5 phút (dùng luồng khí lạnh).

- *Phát hiện:*

a) UV 254 nm

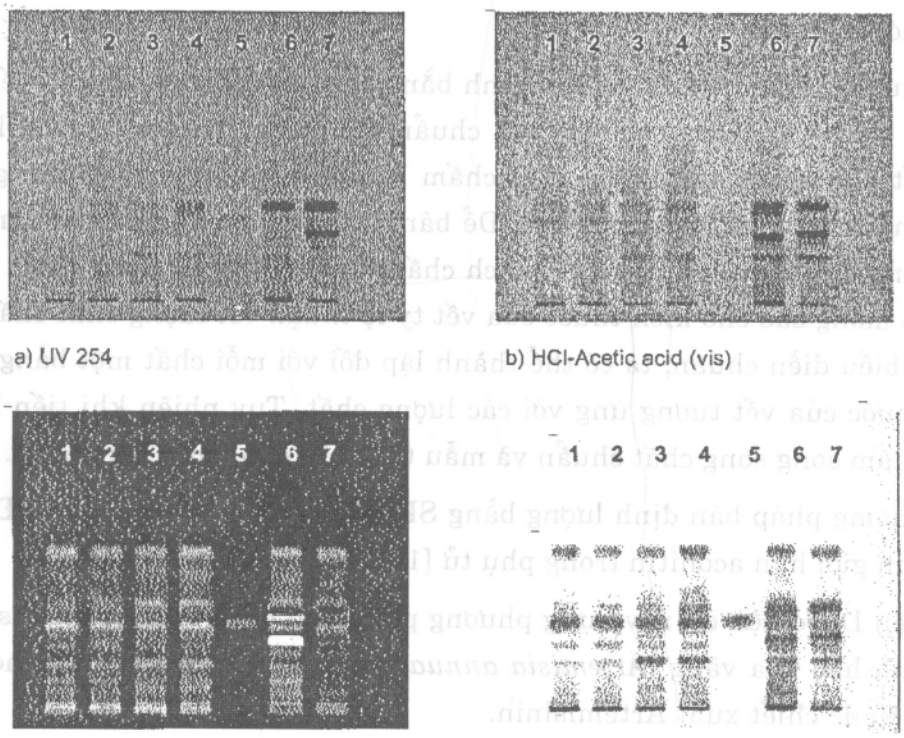
b) Thuốc thử acid hydroclorid – acid acetic: Phun TT lên bản mỏng, làm khô bằng khí lạnh, sấy bản mỏng ở 110°C trong 5 phút. Quan sát ở ánh sáng thường.

c) UV 366 nm sau khi phun TT acid hydroclorid – acid acetic.

d) Phun TT lên bản mỏng, làm khô bằng khí lạnh, sấy bản mỏng ở 110°C trong 5 phút. Quan sát ở ánh sáng thường.

- *Kết quả:* Hình 4.

- *Mẫu so sánh*: *Valeriana officinalis nguồn gốc khác nhau, Valeriana sitchensis; Valeriana wallichii.*



Hình 4 : SKLM hiệu năng cao *Valeriana officinalis*
[http://www.camag.com]

1. *Valeriana officinalis* (mẫu dược liệu chuẩn);
2. *Valeriana officinalis* (nguồn gốc Thái Bình Dương);
3. *Valeriana officinalis* (Hà Lan);
4. Rễ Valeriana (PHH8);
5. Valerenic acid;
6. *Valeriana stichensis.*
7. *Valeriana walichii* (Valeriana Ấn Độ)

1.5. Ứng dụng sắc ký lớp mỏng trong định lượng hoạt chất của dược liệu và thuốc từ dược liệu

1.5.1. Bán định lượng hoạt chất bằng sắc ký lớp mỏng

Kỹ thuật SKLM được ứng dụng nhiều trong bán định lượng hoạt chất của dược liệu, bán thành phẩm và thuốc bởi những ưu điểm của nó: - Cho kết quả nhanh, đáp ứng yêu cầu kiểm tra nhanh chất lượng dược liệu phục vụ mua, bán, thu hái, sơ chế dược liệu.

- Đơn giản, có thể thực hiện được ở những địa điểm không được trang bị các máy móc hiện đại.

Phương pháp này được tiến hành bằng cách đo bề mặt của các vết của mẫu thử so với bề mặt của các vết chất chuẩn đối chiếu. Trên lớp mỏng kích thước của vết phụ thuộc vào lượng chất chấm ban đầu: có sự tỷ lệ thuận giữa lượng chất chấm với kích thước của vết. Để bán định lượng bằng SKLM cần khảo sát tìm nồng độ thích hợp của dung dịch chất chuẩn và lượng chất thích hợp chấm lên lớp mỏng sao cho kích thước của vết tỷ lệ thuận với lượng chất chấm. Nếu có đường biểu diễn chuẩn, ta có thể thành lập đối với mỗi chất một bảng về những kích thước của vết tương ứng với các lượng chất. Tuy nhiên khi tiến hành luôn phải chấm song song chất chuẩn và mẫu thử trên cùng một bản mỏng.

Phương pháp bán định lượng bằng SKLM được quy định trong DĐVN III để xác định giới hạn aconitin trong phụ tử [1].

Viện Dược liệu đã xây dựng phương pháp bán định lượng Artemisinin trong lá thanh hao hoa vàng (*Artemisia annua* L.) bằng SKLM phục vụ cho thu mua dược liệu để chiết xuất Artemisinin.

1.5.2. Định lượng sau khi rửa vết kết hợp với quang phổ tử ngoại

Định lượng hoạt chất bằng SKLM kết hợp với phương pháp quang phổ tử ngoại là kỹ thuật sử dụng khá phổ biến trong kiểm tra chất lượng, xây dựng tiêu chuẩn dược liệu và thuốc từ dược liệu. Khác với bán định lượng bằng so sánh kích thước của vết, phương pháp này cho kết quả tương đối chính xác nhưng đòi hỏi thời gian tiến hành dài hơn, chi phí đắt hơn và cần có máy quang phổ tử ngoại – khả kiến. Ở đây, SKLM được sử dụng để loại tạp chất trong hỗn hợp dịch chiết trước khi định lượng.

Sau khi triển khai SKLM các vết chất được cạo và rửa giải bằng dung môi thích hợp. Đối với những chất có màu hoặc phát quang ở ánh sáng tử ngoại, hoặc hấp thụ ánh sáng ở vùng tử ngoại, khả kiến thì ta chỉ việc cạo vết, rửa giải và đem so màu ở quang sắc kế hoặc đo mật độ quang bằng máy quang phổ tử ngoại khả kiến. Thí dụ: *L*-tetrahydropalmatin trong dược liệu bình vôi được định lượng bằng SKLM kết hợp với quang phổ tử ngoại ở bước sóng 282 nm.

Đối với những chất không có màu hoặc không phát quang ta cần hiện màu bằng các thuốc thử thích hợp và đem rửa vết, sau đó so màu. Thí dụ: các amino acid, ta hiện màu bằng thuốc thử Ninhydrin, sau đó cạo vết, rửa và cho vào dung dịch cadimi acetat, đem so màu ở quang sắc kế.

Có những chất cần tạo phức với một thuốc hiện màu để tăng cường độ màu như các flavononoid thường được tạo màu với nhôm clorid rồi so màu với rutin chuẩn.

Để định lượng Ajmalicin trong ba gạc, alcaloid được tạo phức với thuốc thử xanh bromothymol có màu vàng, cực đại hấp thụ ở bước sóng 597 nm [1] .

Có những chất không có màu, cũng không hấp thụ ánh sáng ở vùng tử ngoại – khả kiến thì có thể tạo dẫn xuất có đỉnh hấp thụ cực đại, sau đó tiến hành định lượng theo dẫn xuất. Từ đó tính ra hàm lượng chất cần định lượng. Thí dụ: Artemisinin được tạo dẫn xuất với dụng dịch NaOH loãng, có đỉnh hấp thụ ở bước sóng 292 nm.

Cũng như bán định lượng, phương pháp định lượng bằng SKLM kết hợp với quang phổ tử ngoại – khả kiến đòi hỏi phải khảo sát vùng tuyến tính giữa nồng độ và mật độ quang của chất cần định lượng.

1.5.3. Định lượng so màu bằng sắc ký lớp mỏng kết hợp với kỹ thuật quét phổ truyền hình

Định lượng bằng phương pháp so màu được dựa trên sự so sánh mật độ quang của vết chất cần định lượng với vết chất chuẩn đã biết hàm lượng. Sau khi hiện màu bằng các thuốc thử thích hợp ta cho sắc phổ qua mật độ quang kế, đo hoặc vẽ đường biểu diễn mật độ quang của các vết. Phương pháp so màu đòi hỏi phải xây dựng đường cong chuẩn trước. Trước đây việc đo mật độ quang được tiến hành trên máy Densitometer. Việc ghi phổ và tính kết quả được tiến hành bằng tay, kết quả phụ thuộc nhiều vào kỹ thuật chấm kính, triển khai dung môi, bảo quản bản mỏng ....

Từ những năm 80 một số hãng (hãng Camag, hãng Shimadzu ...) đã bắt đầu sản xuất máy quét phổ SKLM tự động và xây dựng phần mềm lưu trữ, đánh giá sắc phổ bằng công nghệ truyền hình. Cùng với việc đưa công nghệ truyền hình và tự động hoá vào các thiết bị dùng trong SKLM họ đã làm thay đổi vị trí của kỹ thuật SKLM trong phân tích định tính và đặc biệt là định lượng hoạt chất. Thiết bị quét phổ SKLM tự động CAMAG TLC Scanner-3 với phần mềm win CATS của hãng CAMAG – là hệ thống lưu trữ, đánh giá sắc phổ SKLM hiện đại nhất. Nhờ công nghệ truyền hình mà các sắc phổ được chụp ảnh, lưu trữ dưới dạng các tệp dữ liệu (files) và chúng ta có thể quan sát những hình ảnh như thật bất kỳ lúc nào. Các hình ảnh sắc phổ SKLM có thể lưu giữ và sử dụng lâu dài trong định tính và định lượng. Thay cho việc phải cạo các vết và rửa giải bằng

dung môi thích hợp, chúng ta có thể định lượng trực tiếp các chất trên sắc phổ. Nhờ những tiến bộ kỹ thuật này, kỹ thuật SKLM được ứng dụng rộng rãi trong định lượng hoạt chất của dược liệu, bán thành phẩm và thuốc từ dược liệu. Kỹ thuật quét phổ SKLM truyền hình được đưa vào nhiều chuyên luận dược liệu và thuốc đông dược của Dược điểnTrung Quốc 2000 cũng như các tiêu chuẩn cơ sở dược liệu và thuốc (định lượng: indirubin trong Folium Isatidis; acid oleanolic trong Fructus Ligustri Lucidi và Herba Visci; acid ursolic trong Herba Verbenae; andrographolid trong Herba Andrographis, rebmanniosid A trong địa hoàng ...) [12, 14].

Hệ thống quét phổ truyền hình bao gồm các thiết bị sau:

- Máy quét phổ có khả năng quét sắc phổ của SKLM, SKLM hiệu năng cao và điện di. Có thể thực hiện 2 chế độ: phản xạ và truyền qua, bằng hấp thụ hoặc huỳnh quang. Giới hạn quét từ 190 đến 800 nm. Quét phổ 3 chiều, có khả năng quét đồng thời nhiều bước sóng (tới 31 bước sóng). Tự động chuyển từ đèn D_2 sang đèn tungsten. Máy quét được nối với máy tính. Tất cả thao tác kỹ thuật trong quá trình thực hiện: chấm mẫu, đặt chương trình quét phổ, chụp ảnh sắc phổ ... được điều khiển thông qua các phần mềm cài đặt trong máy tính.

- Máy tính có cài đặt các phần mềm: lưu trữ và truyền hình sắc phổ, định tính, định lượng hoạt chất trên sắc phổ, xây dựng đường chuẩn, tính kết quả định lượng bằng chiều cao pic hoặc diện tích pic.

- Buồng tử ngoại có đèn UV với các bước sóng 254 nm và 365 nm. Phía trên gắn với máy màu ảnh kỹ thuật số với độ phân giải và độ nhạy cao.

- Máy in màu.

- Máy chấm mẫu tự động. Lượng chất chấm lên lớp mỏng được thực hiện tự động theo chương trình.

- Máy triển khai dung môi tự động.

- Máy tráng lớp mỏng tự động.

- Hộp đựng thuốc thử hiện màu để ngâm bản mỏng.

- Máy sấy bản mỏng sau khi ngâm thuốc thử.

....

1.5.3.1. Các bước tiến hành định lượng hoạt chất bằng kỹ thuật quét phổ truyền hình

Định lượng hoạt chất bằng kỹ thuật quét phổ truyền hình được tiến hành qua các bước sau:

- Chuẩn bị mẫu thử.

- Chuẩn bị mẫu chuẩn.

- Tiến hành SKLM.

- Quét sắc phổ bằng máy quét phổ SKLM.

- Chụp ảnh sắc phổ và lưu giữ sắc phổ dưới dạng các tệp (file).

- Xây dựng đường chuẩn

- Đánh giá sắc phổ, xác định hàm lượng các chất bằng so sánh chiều cao hoặc diện tích của các pic tương ứng.

1.5.3.2. Định lượng một số nhóm chất

• ***Phương pháp định lượng một số nhóm chất bằng kỹ thuật quét phổ SKLM truyền hình:***

1.5.3.2.1. Định lượng acid caffeic

- *Mẫu thử:* Ngâm 5 g bột cao 1 đêm với 50 ml ethanol 16%, ép, lọc, đưa thể tích dịch chiết đến 50 ml. Chấm 1 - 10 µl dịch chiết trên bản mỏng.

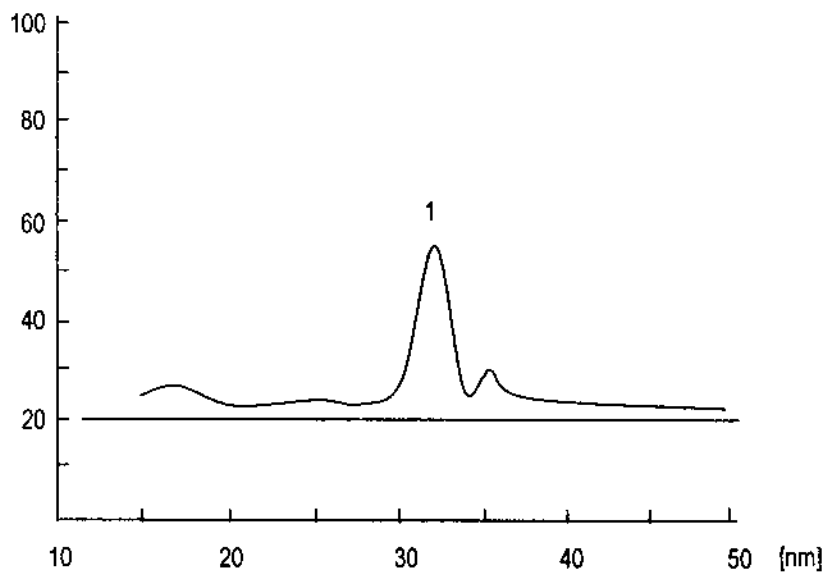
- *Mẫu chuẩn:* Hoà 50 mg acid caffeic trong methanol, đưa thể tích đến 100 ml. Hoà loãng dung dịhc chuẩn tỷ lệ: 1 : 10. Chấm 2, 3, 4, và 5 µl trên bản mỏng.

- *Bản mỏng*: Bản mỏng dùng cho SKLM silicagel Merck 60 F_{254} 20 × 10 hoặc 20 × 20 cm.

- *Chấm mẫu:* Mẫu được chấm bằng máy chấm mẫu tự động Camag Linimat IV, chấm băng dài 6 mm, khoảng cách giữa các băng 4 mm (được 18 băng trên 1 bản mỏng), cách cạnh dưới của bản mỏng 10 mm.

- *Triển khai sắc ký:* Triển khai trong bình dùng cho SKLM với hệ dung môi: toluen - ethyl acetat - acid formic 85% (10 : 5 : 5) lấy pha trên. Khoảng cách di chuyển của dung môi là 70 mm.

- *Đánh giá bằng densitometer:* Quét phổ huỳnh quang của vết acid caffeic bằng máy quét phổ SKLM Camag có phần mềm winCATS. Giải phổ quét từ 366 nm đến > 400 nm với đèn thuỷ ngân. Đánh giá bằng gía trị tích phân của pic mẫu thử so với tích phân của pic mẫu chuẩn (hình 5).



Hình 5: Phổ densitomet của acid caffeic chiết xuất từ cao dandelion (do Viện nghiên cứu Thuốc thú y - Berlin - Đức nghiên cứu và công bố năm 1996)
[http://www.camag.ch]

1.5.3.2.2. Định lượng terpenoid

- Mẫu thử:

+ Carvon trong dịch chiết *Nigella sativa* L.: Lấy 20 ml dịch chiết *Nigella sativa*, lắc hai lần, mỗi lần với 5 ml diethyl ether. Nếu cần thiết có thể cho thêm natri chlorid cho dễ phân lớp. Thêm diethyl ether đến 10 ml. Chấm 2 µl trên bản mỏng.

+ Thujon trong dịch chiết *Salvia fruticosa* L: Lấy 20 ml dịch chiết *Salvia fruticosa* L., lắc hai lần, mỗi lần với 10 ml hexan. Thu hồi dung môi dưới áp suất giảm ở nhiệt độ phòng đến còn 0,5 ml. Chấm 2 µl trên bản mỏng.

+ Asaron / isoasaron trong dịch chiết *Acorus calamus*: Lấy 10 ml dịch chiết *Acorus calamus* L., lắc hai lần, mỗi lần với 15 ml dicloromethan. Thu hồi dung môi dưới áp suất giảm ở nhiệt độ phòng đến còn 2 ml. Chuyển dịch chiết và tráng bình bằng dicloromethan vào bình định mức 5 ml. Thêm dicloromethan đến vạch. Chấm 2 µl trên bản mỏng.

- Mẫu chuẩn:

+ Carvon: Hoà 65 mg trong diethyl ether, đưa thể tích đến 100 ml. Hoà loãng dung dịch chuẩn tỷ lệ: 1 : 5. Chấm 4, 6, 8, và 10 µl trên bản mỏng.

34(T) - 387

+ Thujon: Hoà 10 mg trong toluen, đưa thể tích đến 10 ml. Chấm 2, 4, 6, và 8 µl trên bản mỏng.

+ Asaron / isoasaron: Hoà 70 mg trong diclorometha n, đưa thể tích đến 100 ml. Hoà loãng dung dịch chuẩn tỷ lệ: 1 : 10. Chấm 2, 3, 4, và 5 µl trên bản mỏng.

- *Bản mỏng*: Bản mỏng silicagel Merck 60 F_{254} dùng cho SKLM hiệu năng cao, kích thước 20 × 10 hoặc 20 × 20 cm được rửa bằng methanol trước khi dùng.

- *Chấm mẫu:* Mẫu được chấm bằng máy chấm mẫu tự động Camag Linomat IV, chấm băng dài 6 mm, khoảng cách giữa các băng 4 mm (được 18 băng trên 1 bản mỏng), cách cạnh dưới của bản mỏng 10 mm.

- *Triển khai sắc ký:* Triển khai trong bình dùng cho SKLM nằm ngang với các hệ dung môi:

+ Carvon: Cloroform - aceton (100 : 2).

+ *Thujon:* Diclorometha n - ethyl acetat - aceton (95 : 3 : 2). khoảng cách di chuyển của dung môi là 70 mm.

+ Asaron / isoasaron : Cloroform - hexan (7 : 3).

- *Thuốc thử hiện màu:* Ngâm bản mỏng trong bình ngâm thuốc thử:

+ Carvon: Ngâm trong TT anisaldehyd - sulfuric (1 ml anisaldehyd, 2 ml acid sulfuric, 100 ml acid acetic), sau đó để bản mỏng trên bếp sấy nóng Camag SKLM trong 5 - 10 phút ở 85°C. Vết của carvon hiện màu đỏ.

+ *Thujon:* Ngâm trong TT anisaldehyd - sulfuric, sau đó để bản mỏng trên bếp sấy nóng Camag SKLM trong 5 - 10 phút ở 110°C. Vết của carvon hiện màu xanh tím.

+ Asaron / isoasaron: không cần thuốc thử.

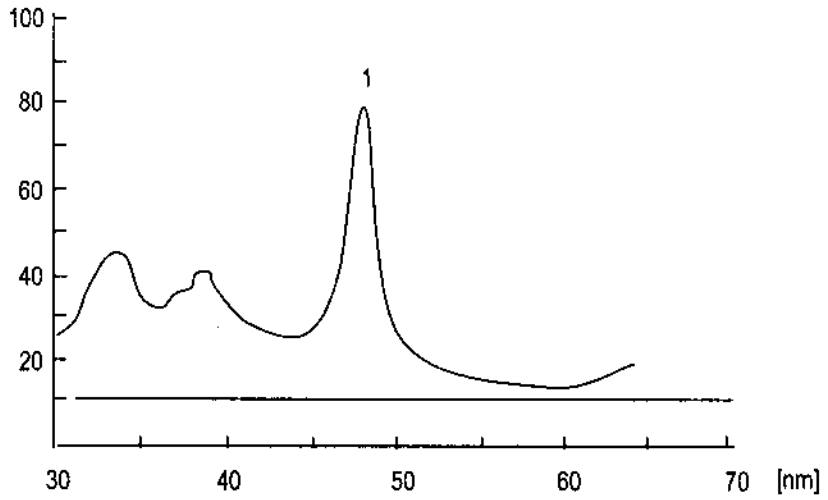
- *Đánh giá bằng densitometer:* Quét phổ hấp thụ bằng máy quét phổ SKLM Camag có phần mềm winCATS. Giải phổ quét với đèn deuterium:

Carvon: 410 nm

Thujon: 600 nm

Asaron / isoasaron: 300 nm

Đánh giá bằng so sánh diện tích pic của mẫu thử với diện tích pic của mẫu chuẩn (hình 6).



Hình 6 : Phổ densitomet của thujon từ *Salvia fruticosa* (do Viện nghiên cứu Thuốc thú y - Berlin - Đức nghiên cứu và công bố năm 1996) [http://www.camag.ch].

1.5.3.2.3. Định lượng glycosid

- *Mẫu thử:*

+ *Arbutin*: hoà loãng 0,5 ml dịch chiết lá cây *Arctostaphylos uva - ursi* bằng ethanol đến 2 ml. Chấm 5 µl trên bản mỏng.

+ *Aloin*: Lấy 5 ml thuốc nước Aloe, hoà loãng gấp hai lần, lắc 2 lần, mỗi lần với 10 ml diethyl ether. Bốc hơi dung môi trong máy cô quay ở 30°C. Dùng 5 ml methanol hoà cắn hoặc lấy 0,5 ml của dịch hoà loãng gấp 2 lần ở trên. Chấm 1 - 2 µl trên bản mỏng.

+ *Syringin*: Chấm 10 ml dịch chiết Ghi trắng (*Viscum album*) trên bản mỏng.

- *Mẫu chuẩn:*

+ *Arbutin*: Hoà 25 mg trong methanol, đưa thể tích đến 10 ml. Chấm 1, 2, 3 và 4 µl trên bản mỏng.

+ *Aloin*: Hoà 50 mg trong methanol, đưa thể tích đến 100 ml, hoà loãng 1 : 20. Chấm 1, 2, 3 và 4 µl trên bản mỏng.

+ *Syringin:* Hoà 2,5 mg trong butanol : acetonitril (1 : 1), đưa thể tích đến 5 ml, hoà loãng 1 : 4. Chấm 2, 4, 6 và 8 µl trên bản mỏng.

- *Bản mỏng*: Bản mỏng silicagel Merck 60 F_{254} dùng cho SKLM hiệu năng cao, kích thước 20 × 10 hoặc 20 × 20.

- *Chấm mẫu:* Mẫu được chấm bằng máy chấm mẫu tự động Camag Linomat IV, chấm băng dài 6 mm, khoảng cách giữa các băng 4 mm (được 18 băng trên 1 bản mỏng), cách cạnh dưới của bản mỏng 10 mm.

- *Triển khai sắc ký:* Triển khai trong bình dùng cho SKLM nằm ngang 20 × 10 với các hệ dung môi: + *Arbutin*: Ethyl acetat - methanol - nước (100 : 17 : 14). Khoảng cách di chuyển dung môi 70 cm.

+ *Aloin: E*thyl acetat - acid formic - nước (17 : 2 : 3). Khoảng cách di chuyển của dung môi là 50 mm.

+ *Syringin*: Cloroform - methanol - nước (65 : 25 : 2). Khoảng cách di chuyển của dung môi là 50 mm.

- *Thuốc thử hiện màu:* Ngâm bản mỏng trong bình ngâm thuốc thử:

+ *Arbutin*: Ngâm bản mỏng 4 giây trong thuốc thử molybdatophosphoric acid (2 g molybdatophosphoric acid pha trong 200 ml ethanol), sau đó để bản mỏng trên bếp sấy nóng Camag SKLM trong 5 - 10 phút ở 110°C. Vết của arbutin hiện màu xanh da trời.

+ *Syringin:* Ngâm trong thuốc thử anisaldehyd - sulfuric (1 ml anisaldehyd, 2 ml acid sulfuric, 100 ml acid acetic), sau đó để bản mỏng trên bếp sấy nóng Camag SKLM trong 5 - 10 phút ở 110°C. Vết của Syringin hiện màu xanh da trời.

+ *Aloin*: không cần thuốc thử.

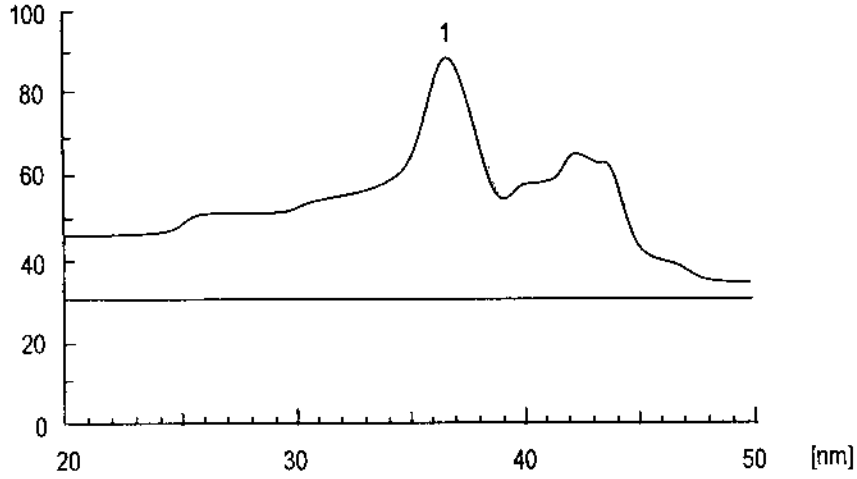
- *Đánh giá bằng densitometer:* Quét phổ hấp thụ bằng máy quét phổ SKLM Camag có phần mềm winCATS. Giải phổ quét với đèn deuterium:

Arbutin: 600 nm

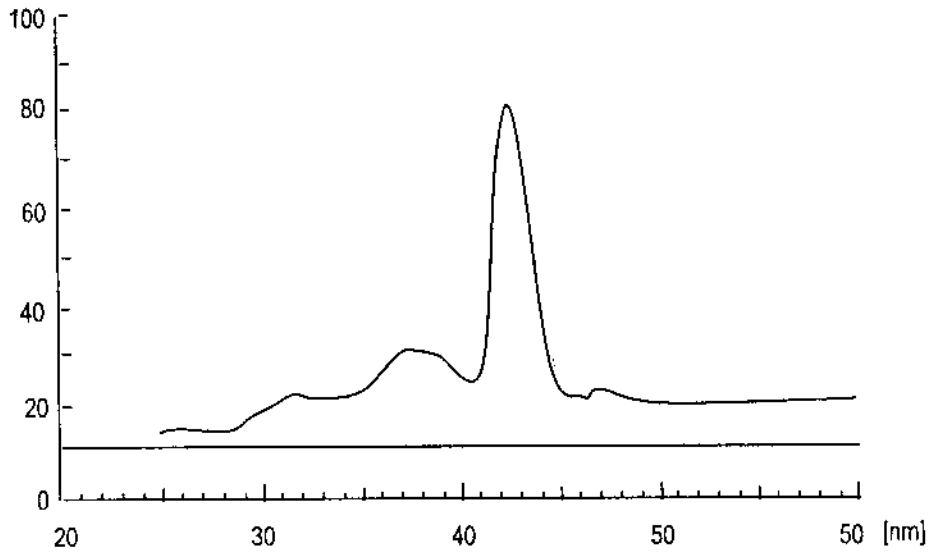
Aloin: 350 nm

Syringin: 600 nm

Đánh giá bằng cách so sánh diện tích pic của mẫu thử với diện tích pic của mẫu chuẩn (hình 7, 8).



Hình 7: Phổ densitomet của arbutin từ cây *Arctostaphylos uva - ursi* (do Viện nghiên cứu Thuốc thú y - Berlin - Đức nghiên cứu và công bố năm 1996) [http://www.camag.ch].



Hình 8 : Phổ densitomet của aloin trong thuốc nước Aloe (do Viện nghiên cứu Thuốc thú y - Berlin - Đức nghiên cứu và công bố năm 1996) [http://www.camag.ch].

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Dược điển Việt Nam xuất bản lần thứ ba, (2002).
2. *Nguyễn Văn Bàn* (1996); Phân tích sàng lọc hoá thực vật, Tập I, II.
3. Thông báo đặc biệt của Dr. R. Nerher vaf E. Von. Arx, Bale. Theo (2).
4. *Brockmann H. va H. Schodder* (1941); Ber. Dtsch. Chem. Ges.,. vol. 74: 73.
5. *Brockmann H, Angew* (1947); Chem., vol. 59, 199.
6. Camag: Planar chromatography (2000).
7. *Cassidy H. G.* (1957); Fundamentals of chromatography Technique of Organic Chemistry, Interscience publ. Inc. New York: 242 - 243. vol. 10.
8. *H. Hoyer* (1953); Chem. Ber., vol. 86: 1016.
9. Hecker E. Verteilungsverfahren im laboratorium. Monographie Z - Angew. Chem., Verlag Chemie, Weinheim / Bergsh..
10. *Hermanek S., V. Schwarz, Z. Cekan* (1961); Pharmazie, 1961: vol 16: 566.
11. *Lalla J. K. et al.* (2002); Standardization of Homeopathic mother tincture of Andrographic paniculata Nees. Indian Drugs, 39 (2): 96 - 100.
12. *Lin C., et al.* (2002); Determination of rebmannioside A in Rebmannia glutinosa Libosch by thin-layer chromatography. J. Chinese trad. & Herb. drugs, 33 (8): 706 - 707.
13. *Merck E. , A.G. Darmstadt* (1961); Anfazbereagentie fur Dunnschicht - und Papier chromatographie.
14. Pharmacopoeia of the Peoples's Republic of China (2000); English Edition, Vol. I. Chemical Industry Press.
15. *Stahl E.* (1961); Chemiker - Ztg, vol. 85: 371.
16. *Trappe W.* (1940); Biochem. Z. , vol. 305: 150., vol. 306: 316.
17. *Strain H.* (1942); Chromatographic Adsorption Analysis, Intercience Publ. Inc, New York.
18. *Wagner H., S. Bladt* (1996); Plant Drug Analysis - A Chromatography Atlas. Springer.

II. PHƯƠNG PHÁP SẮC KÝ GIẤY

2.1. Nguyên tắc

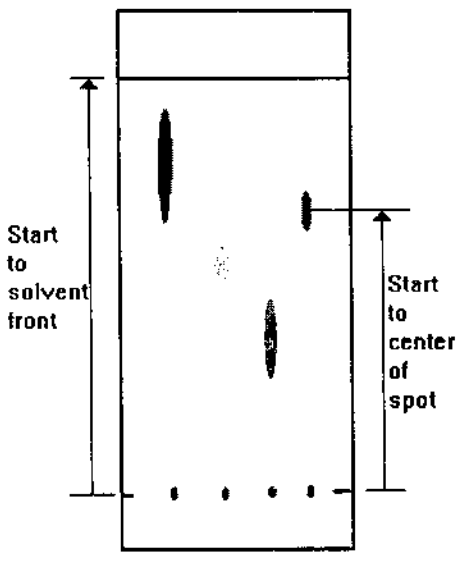
Phương pháp sắc ký giấy (SKG) là một phương pháp kiểm nghiệm độ tinh khiết và nhận dạng các chất. SKG là một kỹ thuật thích hợp trong phân tích bởi vì tiến hành tương đối nhanh và yêu cầu lượng mẫu nhỏ. SKG được áp dụng trong kiểm nghiệm chất lượng dược liệu để định tính, thử tinh khiết, bán định lượng và định lượng.

Sự tách của các chất bằng phương pháp SKG dựa chủ yếu trên sự khác nhau về hệ số phân bố của chúng giữa hai pha lỏng: Một pha tĩnh và một pha động. Pha tĩnh ở đây là nước có sẵn trong sợi cellulose của giấy, hoặc thành phần thân nước từ hỗn hợp dung môi của pha động được hút chọn lọc vào giấy. Pha động là một hệ dung môi thích hợp cho sự phân tách khi chuyển động trên pha tĩnh sẽ mang theo các thành phần của mẫu phân tích. Sự tách của các thành phần trên pha tĩnh phụ thuộc lực hấp thụ của chúng vào pha tĩnh và vào độ hoà tan của chúng vào pha động.

Mức độ di chuyển của một chất được đặc trưng bởi hệ số di chuyển (R_f) và tính bằng tỷ lệ giữa khoảng cách di chuyển của chất đó và khoảng cách di chuyển của dung môi (hình 9): $R_f = a/b$,

trong đó: a là khoảng cách di chuyển của chất phân tích;

b là khoảng cách di chuyển của dung môi.



Hình 9: Giá trị R_f của chất phân tích

[http://www.santafe.cc.fl.us/chemscape/catofp/chromato/paper/paper.htm]

Ghi chú:

- Start to solvent front: Từ khởi điểm đến giới tuyến của dung môi.
- Start to center of spot: Từ khởi điểm đến tâm của vết.

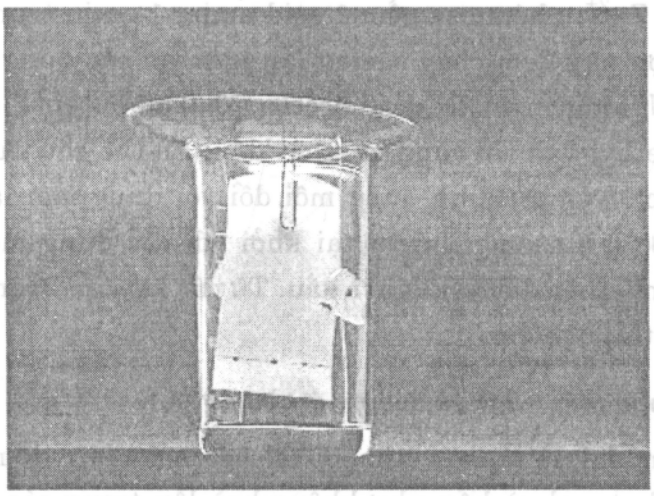
Giá trị R_f bao giờ cũng nhỏ hơn 1 và phụ thuộc vào các yếu tố: nhiệt độ, dung môi, loại giấy sắc ký sử dụng. Giá trị R_f được sử dụng như một chỉ tiêu bổ sung để nhận dạng các chất chưa biết. Tuy nhiên, hiệu quả nhất trong việc nhận dạng vẫn là chấm đồng thời với chất chuẩn để đối chiếu. Hơn thế nữa độ tinh khiết của một chất có thể đánh giá ngay trên sắc ký đồ. Một chất không tinh khiết thường cho hai hoặc nhiều vết, trong khi đó một chất tinh khiết chỉ cho một vết.

Trong trường hợp sắc ký liên tục không còn xác định được giới tuyến của dung môi, người ta dùng hệ số di chuyển (R_r). R_r là tỷ số giữa khoảng cách di chuyển của chất phân tích và khoảng cách di chuyển của chất dùng làm chuẩn so sánh. Gía trị R_r có thể nhỏ hơn hay lớn hơn 1.

2.2. Phương pháp tiến hành

2.2.1. Chuẩn bị bình sắc ký

Bình sắc ký là những bình thuỷ tinh hình trụ hoặc hình hộp dẹt, có kích thước thích hợp, có nắp đậy kín. Nắp có lỗ ở giữa để lắp bình gạn có khoá đựng dung môi. Trong bình có các giá đựng máng đựng dung môi và treo giấy sắc ký được thiết kế thích hợp cho kiểu sắc ký đi lên hoặc đi xuống (hình 10).



Hình 10: Triển khai sắc ký giấy

[http://www.santafe.cc.fl.us/chemscape/catofp/chromato/paper/paper.htm]

2.2.2. Chuẩn bị dung môi

Trong SKG việc chọn dung môi thích hợp là yếu tố chính quyết định kết quả thí nghiệm. Thành phần và tỷ lệ các dung môi trong hệ dung môi triển khai được nghiên cứu lựa chọn thích hợp cho từng đối tượng phân tích hoặc được quy định trong các chuyên luận. Việc trộn các thành phần được tiến hành trong bình gạn, sau khi lắc đều, để yên. Nếu có tách lớp thì gạn lấy pha thân nước, thường là lớp dưới, làm dung môi pha tĩnh để bão hoà giấy sắc ký sau khi đã chấm chất phân tích, còn lớp trên làm dung môi pha động. Nếu dung môi không tách lớp thì dùng chính dung môi đó để bão hoà giấy sắc ký.

2.2.2.1. Cách chọn dung môi

Nói chung những chất phân cực được tách bởi các dung môi phân cực trên giấy celluloza không tẩm hoặc được tẩm một chất lỏng phân cực. Còn chất kỵ nước được tách bằng các hệ dung môi ngược pha. Khi thiết lập một hệ dung môi thường dựa trên độ phân cực của chất phân tích và của các dung môi. Tính phân cực của dung môi đối với một chất thay đổi, trước hết với nồng độ của những thành phần có tính phân cực cao và quyết định mức độ di chuyển của chất đó. pH của dung môi có ảnh hưởng đối với mức độ di chuyển của những chất ion hoá.

Phương pháp đơn giản để xác lập một hệ dung môi trong sắc ký do Smith và Feinberg (1965) mô tả như sau: Một số hợp chất dùng làm đại diện, thí dụ: 4 cation của nhóm Zn^{2+}, nhóm oza gồm 1 acid amin, 1 amin trung tính và 1 amin base. Các hỗn hợp này đem chạy sắc ký lần lượt với các dung môi nguyên chất như: H_2O, HCl_2N, ammoniac 2N, acid acetic, ethanol, butanol, aceton, cloroform, benzen, ether diethyl và cuối cùng là ether dầu. Có thể thu được kết quả là tất các chất đều di chuyển tới đỉnh dung môi đối với dung môi là nước, acid hoặc ammoniac. Ngược lại, các chất nằm tại khởi với các dung môi là hữu cơ như cloroform, benzen, ether diethyl, ether dầu. Từ các kết quả trên ta có thể lập các hệ dung môi cho thử nghiệm.

2.2.2.2. Phối hợp giữa nước và dung môi hữu cơ

Như đã biết nước hoà lẫn với ethanol và aceton ở mọi tỷ lệ nhưng chỉ hoà lẫn một phần trong butanol và hầu như không hoà lẫn trong các dung môi hữu cơ khác, cho nên cần lập thêm một số hệ dung môi giữa nước và ethanol và butanol bão hoà nước để chạy thử.

Khi chạy với dung môi trung tính các vết thường bị kéo dài cho nên người ta thường thêm vào đó một lượng nhỏ acid hydrocloric hoặc amoniac hoặc acid acetic.

Có thể xác lập hệ dung môi dựa trên kết quả khi tiến hành phân tách một hỗn hợp gồm nhiều chất với các hệ dung môi mà tỷ lệ các thành phần được thay đổi từ thấp đến cao.

Một cách đơn giản khác: lấy cặp dung môi nước - benzen làm cơ sở. Ta biết rằng nước - benzen không hoà lẫn vào nhau, nhưng nếu thêm vào đó một dung môi thứ ba, như acid acetic băng, chất này hoà lẫn được cả nước và cả benzen. Bằng cách tăng dần nồng độ acid acetic, cuối cùng ta được một hệ dung môi thích hợp.

Trong mọi trường hợp chạy thử ta có thể dùng các dải giấy hẹp 2 - 3 cm và chạy trong các ống nghiệm hoặc ống đong nhỏ, với chiều triển khai ~ 10 cm cũng đủ để biết được chất thử đó di chuyển như thế nào trong hệ dung môi đang thử nghiệm.

2.2.2.3. Các hệ dung môi: Có ba hệ dung môi

- Hệ dung môi pha cố định là nước:

Người ta cho giấy bão hoà nước bằng cách nhúng hẳn giấy vào nước rồi treo cho chảy hết nước thừa hoặc treo giấy vào khí quyển bão hoà nước một thời gian lâu.

Đối với các dung dịch muối đệm, người ta cho giấy ngâm vào dung dịch này rồi lấy ra làm khô tự nhiên hoặc thông gió, sau đó mới cho vào khí quyển hơi nước để bão hoà nước.

Các chất phân cực trong môi trường ưa nước đều có thể tách được trên loại giấy này khi chạy với các hệ dung môi như: isopropanol - amoniac - nước (9 : 1 : 2 v/v), butanol - acid acetic - nước (4 : 1 : 5, v/v, lớp butanol) hoặc phenol bão hoà nước. Trong trường hợp dùng dung môi 2 pha thì bình triển khai cũng được bão hoà với cả 2 pha đó.

- Hệ dung môi pha cố định là dung môi hữu cơ phân cực (ưa nước):

Đối với các chất lỏng hữu cơ bay hơi (như methanol) người ta làm bão hoà giấy bằng cách treo giấy trong bình đã bão hoà khí chất lỏng đó rồi khai triển với một hệ dung môi hữu cơ không hoà lẫn.

Hệ thống tiêu biểu cho loại này là hệ Zaffaroni với giấy tẩm formamid, hoặc propylen - glycol và chạy với benzen; cloroform; cyclohexan hoặc một hỗn hợp của cả 3 chất ấy. Hệ thống này được dùng để tách có kết quả các chất phân cực ưa nước như các steroid.

- Hệ dung môi pha cố định là dung môi không phân cực - kỵ nước (pha ngược):

Các hệ thống pha ngược được dùng để tách các chất kỵ nước. Giấy được nhúng qua một dung dịch không phân cực như dầu hoả, dầu parafin, dầu silicon... đã hoà tan sẵn trong ether dầu hoặc benzen. Lấy ra treo để bay hơi hết dung môi thừa, sau đó chấm chất thử và khai triển với một hệ dung môi phân cực hơn, không hoà lẫn như hỗn hợp iso-propanol - nước (7 : 3); dimethyl-formamid - nước - methanol (10 : 1 : 10, v/v) hoặc nước - acid acetic. Pha di động này thường được bão hoà với pha cố định trước khi triển khai.

2.2.3. Chuẩn bị giấy

Giấy sắc ký là loại giấy đặc biệt dùng riêng cho sắc ký, có bề dày thích hợp. Tuỳ theo kích thước của bình và số lượng các vết cần chấm mà cắt những khổ giấy hình chữ nhật thích hợp, chiều dài dọc theo thớ giấy (thông thường ở ngoài bó giấy có dấu hiệu mũi tên để chỉ chiều giấy cần triển khai). Chiều rộng phải nhỏ hơn chiều dài của máng dung môi nhưng không được nhỏ hơn 2,5 cm. Chiều dài phải tính sao cho khi treo giấy vào bình không được để đầu dưới chạm vào máng dung môi trong khi bão hoà dung môi. Trường hợp bình sắc ký có hình chuông úp thì giấy phải cuộn tròn và cố định bằng móc thuỷ tinh hoặc khâu bằng chỉ. Đường kính của cuộn giấy phải nhỏ hơn đường kính của đĩa để giấy (đĩa này sau khi đã bão hoà sẽ rót dung môi vào) để tránh giấy chạm vào thành đĩa.

Trong hầu hết các trường hợp, dùng giấy Whatman số 1 và số 3 (hoặc loại giấy khác tương đương như giấy FN) đều có thể thích hợp (bảng 8, 9).

Bảng 8: Giấy sắc ký Whatman

Loại giấy	Trọng lượng (g/m^2)	Độ dày (mm)	Thời gian hút nước (phút) (1)	Thời gian dung môi di chuyển (giờ) (2)			Độ mịn mặt giấy
				A	B	C	
1	87	0,16	9	6	15	17	mịn
2	97	0,18	12,5	-	-	-	mịn
3	185	0,38	9	5,5	13,5	16,5	thô
3MM	185	0,33	9	5	12,5	15	mịn
4	92	0,20	5	3	7	8	mịn
17C	440	0,80	3	-	-	-	mịn
20	93	0,16	25	-	-	-	mịn
SIET	190	0,55	2,5	-	-	-	mịn

Ghi chú: (1): Chiều dài nước di chuyển từ dưới lên là 7,5 cm.

(2): Thời gian dung môi chạy từ trên xuống với chiều dài 40 cm.

A: Metyl etyl keton (Merck) - acid propionic - nước (6 : 2 : 2 v/v)

B: Butanol - acid acetic - nước (4 : 1 : 5 v/v...)

C: Phenol bão hoà nước

Bảng 9: Giấy sắc ký FN

Loại	Trọng lượng (g/m^2)	Độ dày (mm)	Mức độ hút nước (mm/30 phút) (1)	Đặc tính	Loại giấy Whatman tương đương
FN 1	85 - 90	0,18 - 0,20	140 - 160	Nhanh	4
FN2	120 - 125	0,20 - 0,23	140 - 160	Nhanh	-
FN3	85 - 90	0,18 - 0,20	90 - 100	Trung bình	1
FN4	120 - 125	0,20 - 0,23	90 - 100	Trung bình	-
FN5	85 - 90	0,17 - 0,19	60 - 70	Chậm	20
FN6	120 - 125	0,20 - 0,23	60 - 70	Chậm	-
FN7	145 - 150	0,28 - 0,30	140 - 160	Nhanh	3
FN8	270 - 280	0,51 - 0,55	170 - 190	Nhanh, dùng với số lớn nhất	-

(1): Độ hút cao của một giải giấy rộng 15 mm trong nước cất ở 20^0C

2.2.4. Chấm sắc ký

Kẻ một đường chì mảnh song song với mép giấy (đường vạch để chấm sắc ký) theo chiều rộng và cách mép giấy 3 cm đối với sắc ký đi lên để sao cho các vết chấm không bị ngập trong dung môi, 6 cm đối với sắc ký đi xuống để vạch chấm không trùng với đũa thuỷ tinh đỡ giấy mà thấp hơn 2 cm khi đặt giấy treo vào máng ở phần trên của bình.

Dùng micropipet chia độ tới 0,001 - 0,002 ml hoặc mao quản có dung tích xác định (2 µl ; 5 µl ; 10 µl) để chấm các dung dịch chất cần sắc ký thành vết có đường kính không quá 8 mm. Muốn giữ đường kính của vết chấm nhỏ, phải chấm nhanh nhiều lần, đợi giọt trước khô mới chấm tiếp.

Lượng chấm và nồng độ dung dịch chất thử được quy định trong chuyên luận. Thông thường mẫu phân tích được hoà tan trong một dung môi thích hợp với nồng độ 1% (0,01 g mẫu / 1 g dung môi). Lượng chấm phải ít hơn 1 ml. Khi chấm nhiều vết trên một dải giấy thì vết nọ chấm cách vết kia ít nhất là 30 mm.

2.2.5. Triển khai sắc ký

2.2.5.1. Phương pháp sắc ký đi lên

Rót dung môi để được một lớp dung môi cao 2,5 cm. Trong trường hợp pha tĩnh được chỉ định (là phần tách lớp phía dưới khi trộn hỗn hợp dung môi) thì rót

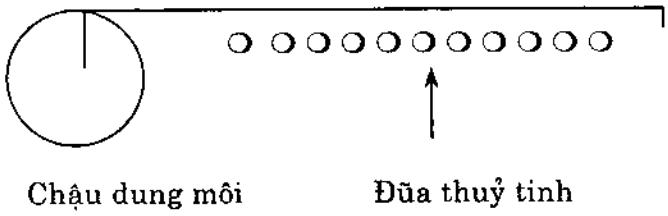
pha tĩnh vào khe giữa máng dung môi và thành bình sắc ký. Đậy kín nắp bình, để yên trong 24 giờ ở nhiệt độ 20 - 25°C và duy trì ở nhiệt độ này trong qúa trình tiếp theo. Sau đó treo giấy đã chuẩn bị vào bình, đậy nắp để yên 1 giờ 30 phút. Tiếp theo dùng tay vặn ở ngoài bình để hạ tờ giấy sắc ký vào máng dung môi sao cho vạch chấm không ngập vào dung môi. Triển khai sắc ký đến một khoảng cách quy định. Lấy giấy ra, đánh dấu ngay giới tuyến dung môi và để khô ngoài không khí hoặc bằng một luồng khí nóng của máy quạt sấy. Phải chú ý tránh ánh sáng trong suốt quá trình triển khai. Làm hiện vết bằng cách phun thuốc thử màu thích hợp, hoặc soi dưới đèn tử ngoại. Tính gía trị R_f và đánh giá kết quả.

2.2.5.2. Phương pháp sắc ký đi xuống

Cũng tiến hành tương tự như sắc ký đi lên, chỉ khác các điểm sau đây: Rót dung môi làm pha tĩnh vào đáy bình, tạo một lớp cao khoảng 2 cm; đặt giấy vào máng dung môi pha động ở phần trên bình, dùng một đũa thuỷ tinh để chèn giấy, gác đầu giấy treo qua đũa thuỷ tinh để không cho giấy chạm vào mép máng và chạm vào thành bình (hình 10). Thường sắc ký đi xuống được áp dụng cho các hỗn hợp khó tách và phải chạy sắc ký liên tục nên phải tính kết quả theo R_r.

2.2.5.3. Phương pháp sắc ký nằm ngang

Giấy cắt hình vuông hoặc hình chữ nhật được đặt nằm ngang trên các đũa thuỷ tinh. Đầu giấy chấm chất thử nhúng vào chậu dung môi (hình 11).

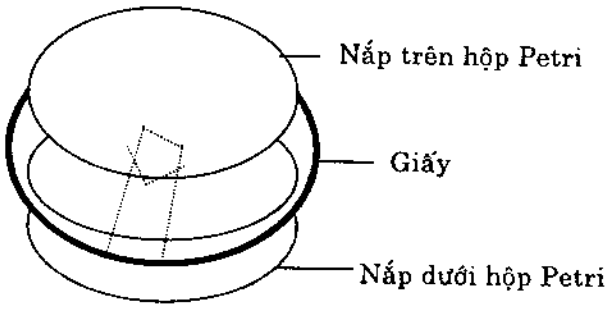


Hình 11: Sắc ký nằm ngang.

2.2.5.4. Phương pháp sắc ký vòng

Phương pháp sắc ký vòng là phương pháp sắc ký trong các chất khai triển hình thành những vòng tròn hoặc cung đồng tâm thay vì các vết hình tròn hoặc bầu dục.

Dụng cụ thường dùng là 2 nắp đĩa Petri và khoanh giấy hình tròn lớn hơn đĩa một ít được đặt vào giữa 2 đĩa. Nắp đĩa ở dưới đựng dung môi (hình 12).



Hình 12: Sắc ký vòng

Trước khi đặt giấy vào đĩa, dùng lưỡi dao lam rạch 2 đường thẳng cách nhau ~2 mm kể từ tâm tờ giấy ra đến mép giấy, tạo thành một giải giấy còn dính ở giữa. Giải giấy này được bẻ thẳng góc với mặt giấy và nhúng vào đĩa dung môi.

Chú ý rằng dung môi di chuyển nhanh hay chậm tuỳ thuộc vào kích thước của giải giấy to hay bé. Chất thử được chấm ở giữa giấy và khô trước khi triển khai.

Cách này có thể triển khai đồng thời 6 đến 8 chấm cách đều nhau trên cùng một tờ giấy. Các vết chấm có thể chấm thành những vệt hình cung và như vậy các vết triển khai sẽ là những vòng cung chạy từ tâm ra mép giấy.

2.2.5.5. Phương pháp triển khai nhiều lần và cho dung môi chạy quá cỡ giấy

Kỹ thuật triển khai nhiều lần được áp dụng cho các trường hợp triển khai một lần các vết không tách được.

Nguyên lý của phương pháp là kéo dài quãng đường dung môi khai triển gấp nhiều lần, trong khi vẫn giữ nguyên chiều dài của giấy. Giấy sau khi chạy một lần với dung môi được làm khô rồi lại chạy tiếp với cùng loại dung môi. Quá trình lặp lại có thể hai hoặc nhiều lần tuỳ theo kết quả thu được.

Một phương pháp tương tự cũng cho kết quả tốt là kỹ thuật chạy quá giấy. Thay vì dừng lại khi dung môi chạy gần hết chiều dài tờ giấy người ta tiếp tục cho dung môi chạy vượt quá giấy một thời gian nữa. Trong trường hợp này người ta cắt mép giấy thành hình răng cưa để dung môi chảy đều đặn và dễ dàng xuống đáy bình trong trường hợp chạy theo chiều trên xuống, hoặc đặt mép trên của giấy vào một rãnh thoát dung môi trong trường hợp chạy chiều dưới lên.

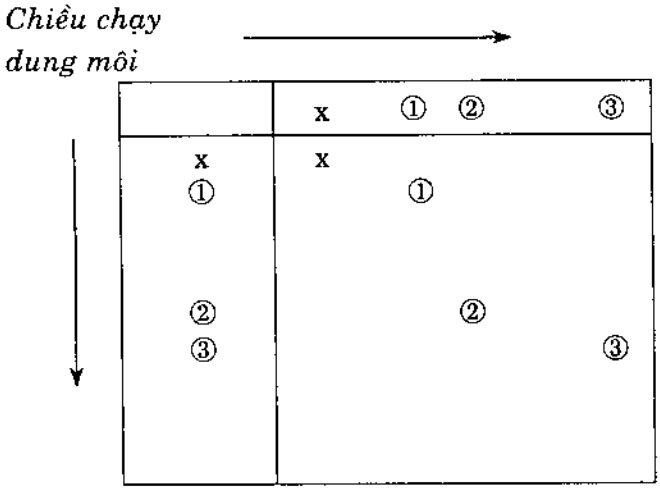
Để đề phòng hiện tượng các chất thử chạy vượt ra khỏi giấy mà không biết, người ta dùng một chất màu kiểm tra. Chất này đã được chạy thử để biết trước

R_f của nó đối với hệ dung môi đang dùng. R_f của chất màu phải cao hơn R_f của chất thử.

2.2.5.6. Phương pháp sắc ký hai chiều

Phương pháp sắc ký hai chiều được dùng với các trường hợp phân tích các hỗn hợp có thành phần phức tạp, khó tách.

Nguyên lý của kỹ thuật là dùng 2 hệ dung môi khác nhau (thí dụ: 1 hệ acid, 1 hệ base) và tách theo 2 chiều dọc và ngang (hình 13).



Hình 13: Sắc ký đồ chạy 2 chiều tách một hỗn hợp 3 chất

Sau khi triển khai với dung môi 1, giấy phải bốc hơi hết dung môi và làm khô hoàn toàn trước khi triển khai với hệ dung môi 2. Nếu dung môi 1 có dùng phenol thì nên cắt bỏ phần đỉnh dung môi trên giấy vì ở đó tập trung các tạp chất của giấy có thể làm ảnh hưởng đến lần triển khai sau. Trong sắc ký hai chiều việc lựa chọn cặp dung môi rất quan trọng. Chỉ với 3 hệ dung môi ghép lại thành 3 cặp và trên 3 sắc đồ khác nhau, người ta đã tách thành công tất cả các acid amin trong dịch đạm thuỷ phân như sau:

Sắc phổ	Dung môi 1	Dung môi 2
I	a	b
II	a	c
III	b	c

(a): Nước bão hoà phenol

(b): α- picolin - nước - amoniac (70 : 28 : 2 v/v)

(c): Iso - propanol - acid acetic - nước (7 : 2 : 1, v/v)

2.3. Ứng dụng sắc ký giấy trong phân tích và kiểm nghiệm dược liệu

Cũng như SKLM, phương pháp SKG được ứng dụng trong phân tích định tính và định lượng thành phần hóa học của dược liệu. Phương pháp SKG thích hợp cho phân tích một số nhóm chất sau:

2.3.1. Phân tích acid hữu cơ

Khi tách hỗn hợp các acid trên SKG bằng hệ dung môi không điều chỉnh pH, các vết tách không hoàn toàn. Hình của vết là kết quả của sự thay đổi hệ số phân bố của các acid khi hỗn hợp acid di chuyển trên giấy.

Sự nhoè vết, một phần bị gây ra bởi sự hấp thụ của các acid trên giấy sắc ký trong các hệ dung môi trung tính. Khắc phục hiện tượng này có thể bằng cách thay đổi các acid trước khi sắc ký (thí dụ chuyển chúng sang dạng dẫn xuất hydroxamat hoặc bằng cách điều chỉnh pH của các dung môi).

Để các vết acid tách rõ ràng, riêng biệt người ta dùng các hệ dung môi có độ acid cao hoặc có chứa amoniac đặc. Vết của các acid không bay hơi được phát hiện sau khi phun dung dịch của các thuốc thử tương ứng.

Định lượng các acid hữu cơ bằng SKG: Để định lượng người ta dùng các dịch chiết từ dược liệu đã được tinh chế sơ bộ. Sau khi triển khai, hàm lượng của các acid được xác định bằng các phương pháp khác nhau:

- Đo diện tích của vết.

- Đo độ đậm của màu hoặc cường độ phát quang dưới đèn tử ngoại bằng densitomet.

- So màu sau khi phản hấp phụ bằng các dung môi thích hợp.

2.3.2. Phân tích acid amin

Acid amin trong dược liệu được chia làm 2 nhóm: acid amin protein và acid amin không protein. Tuy vậy, phương pháp chiết xuất và phân tích chúng về cơ bản là giống nhau.

Nhóm acid amin protein gồm 20 chất là sản phẩm thuỷ phân của protein thực vật. Các acid amin cũng gặp ở dạng tự do, trong đó có một số acid amin gặp với hàm lượng lớn.

Chiết xuất acid amin tự do từ dược liệu: Nghiền dược liệu với nước nóng. Sau đó cho ethanol 75% vào ngâm trong 12 giờ. ép, lọc hoặc ly tâm. Bốc hơi dung môi. Dung dịch cô đặc dùng để phân tích bằng SKG với các hệ dung môi và thuốc

thử như bảng 10.

2.3.3. Phân tích coumarin

Coumarin là nhóm hợp chất tự nhiên - là dẫn xuất lacton của acid ortho-hydroxycinamic. Hầu hết coumarin đã biết (~ 600 chất) tồn tại trong cây chủ yếu dưới dạng tự do. Đặc tính lý hoá của coumarin là tính phát quang mạnh và rất nhạy với ánh sáng. Về hoá học coumarin là chất phân cực yếu nên đa số tan trong ether dầu và ether ethylic.

Do có mặt nhóm lacton, một số coumarin có thêm nhóm OH phenol nên chúng tan được trong kiềm nóng. Vì vậy có thể chiết chúng bằng dung dịch kiềm loãng nóng. Acid hoá dịch chiết kiềm sẽ thu được coumarin. Tuy nhiên, có một số trường hợp phản ứng với kiềm không thuận nghịch, nên khi acid hoá không thu được coumarin nguyên dạng ban đầu. Vì vậy, chiết coumarin bằng dung môi như ether dầu, ether ethylic, ethanol được nhiều tác giả cho là thích hợp hơn vì bảo tồn được cấu trúc hoá học tự nhiên của chúng.

Các dịch chiết được bốc hơi dung môi và tiến hành phân tích coumarin bằng phương pháp SKG như bảng 10.

2.3.4. Phân tích đường (saccharid)

Đường trong dược liệu được chia làm 3 nhóm lớn dựa vào số đơn vị oza cấu tạo nên phân tử của chúng:

- Monosaccharid (đường đơn): gồm 1 phân tử oza như glucose, fructose.

- Oligosaccharid: gồm từ 2 đến 10 phân tử oza kết hợp lại, như sucrose.

- Polysaccharid: gồm trên 10 đơn vị oza tạo thành 1 chuỗi thẳng có hoặc không có nhánh.

Đường mono được chiết từ dược liệu bằng cách nghiền nhỏ dược liệu với nước (làm tươi là tốt nhất). Lọc. Bốc hơi đến dịch đặc trên bếp cách thuỷ. Dịch cô đặc được dùng để chấm sắc ký.

Đường oligo và đường polysaccharid (đa đường) được thuỷ phân đến đường mono và tiến hành như với đường mono.

Phân tích đường bằng sắc ký giấy thường được tiến hành với giấy Whatman số 1 hoặc loại tương đương với các hệ dung môi và thuốc thử ở bảng 10.

2.3.5. Phân tích flavonoid

Flavonoid là các chất màu thực vật, có cấu trúc cơ bản C_6 - C_3 - C_6, trong đó

mỗi C_6 là một vòng benzen gắn với C_3. Cấu trúc có thể là vòng kín hoặc mở. Tại các vòng có gắn một hoặc nhiều nhóm hydroxy tự do hoặc đã thay thế một phần. Vì vậy flavonoid về bản chất là các polyphenol có tính acid. Các polyphenol có thể phản ứng lẫn nhau giữa các nhóm hydroxy để tạo thành các phân tử phức tạp hơn hoặc có thể liên kết với các hợp chất khác trong cây, như các oza (dạng glycosid), hoặc protein.

Chiết xuất từ dược liệu: Độ hoà tan của flavonoid phụ thuộc vào vị trí và số nhóm hydroxy và các nhóm thế khác của chúng. Số nhóm và vị trí của chúng rất khác nhau giữa các flavonoid. Vì vậy, không thể ấn định một phương pháp chiết xuất chung cho tất cả các flavonoid. Tuy nhiên có thể có một số nguyên tắc sau:

- *Flavonoid - glycosid-* là các flavon và flavonol có nhiều nhóm OH, các biflavon - là các chất phân cực mạnh: Để chiết chúng, thông dụng nhất là dùng các dung môi phân cực như ethanol, methanol. Tuỳ theo số lượng đường có trong phân tử flavonoid mà dùng các dung môi với các độ pha loãng khác nhau (ethanol, methanol 70 , 80, 90%) hoặc bằng nước nóng. Chiết nóng sẽ rút ngắn thời gian và đạt hiệu suất cao.

- *Aglycon hoặc các flavon, flavonol* có nhiều nhóm methoxy, ít nhóm hydroxy - là những chất có độ phân cực yếu. Để chiết chúng thường dùng các dung môi phân cực yếu như benzen, cloroform, ethyl acetat. Một số có thể tan trong ether dầu.

Các dịch chiết được bốc hơi dung môi và dùng để phân tích bằng phương pháp SKG như bảng 10.

2.3.6. Phân tích glycosid tim

Glycosid tim là một nhóm glycosid có cấu trúc steroid, có tác dụng đặc hiệu đối với bệnh tim. Trong cây chúng tồn tại dưới dạng glycosid hoà tan trong các dịch tế bào. Dưới tác dụng của các men hoặc các acid loãng, các glycosid tim thuỷ phân thành các genin và các oza. Là glycosid nên rất dễ tan trong nước và ethanol loãng, rất ít tan trong các dung môi không phân cực như ether dầu, ether diethyl, benzen. Trong dung dịch nước các glycosid này làm giảm sức căng bề mặt của dung dịch và tạo nhiều bọt khi lắc mạnh.

Genin của glycosid tim có cấu trúc steroid 5 vòng: A, B, C, D và F. Vòng F là một vòng lacton γ hoặc δ gắn vào C_{17}. Dựa vào vòng lacton chúng được chia làm hai nhóm lớn:

- Cacdenolid (I): genin có vòng γ lacton α, β không no (còn gọi là butenolid).

- Bufadienoid (II): genin có vòng δ lacton không no với 2 dây nối đôi (còn gọi là pentenolid).

Cấu trúc của các genin có thể khác nhau ở 3 điểm:

- Cấu hình tại C_3, C_5 hoặc C_{17} (α hoặc β). Có thể thêm nhóm chức oxy, chủ yếu là OH tại C_1, C_2, C_5 , C_{11}, C_{12}, C_{15}, C_{16} và C_{19}.

- Có thể có thêm dây nối đôi trong khung, thường là ở vòng B.

- Phần đường của glycosid tim khá phức tạp. Có 3 loại oza:

+ Oza thông thường (glucose, rhamnose ..).

+ Oza 2- deoxy: Là đường không có O ở C_2. Loại này khá phổ biến trong glycosid tim.

+ Oza đặc biệt.

Chiết xuất: Phương pháp chiết xuất dựa vào nguyên tắc chung của chiết xuất glycosid nhưng điểm mấu chốt trong kỹ thuật là việc khống chế hoặc sử dụng men thuỷ phân với mức độ cần thiết, thích hợp để thu được sản phẩm tự nhiên hoặc sản phẩm theo ý muốn. Dung môi thích hợp để chiết chúng là ethanol 50 - 90%. Để loại tạp có thể dùng dung dịch chì acetat và cho chảy qua cột hấp phụ. Để tách các phân đoạn khác nhau có thể lợi dụng độ phân cực khác nhau để tách bằng hỗn hợp $CHCl_3$ - ethanol với tỷ lệ khác nhau (3 : 1; 2,5 : 1; 2 : 1).

Bảng 10: Một số hệ dung môi dùng trong phân tích các nhóm chất thường gặp trong dược liệu bằng phương pháp SKG

STT	Nhóm chất	Hệ dung môi	Thuốc thử hiện màu
1	**Acid amin**	Sắc ký hai chiều: - Chiều 1: BuOH - AcOH - H_2O (4 : 1 : 1) - Chiều 2: Phenol - H_2O (3 : 1)	1.Dung dịch (D. d.) ninhydrin 0,1% trong aceton + hơ nóng 10 phút. 2. 10 ml d. d. acetat - cadimi 1% trong nước + 2 ml 3. AcOH + 100 ml aceton + 0,1 g ninhydrin.
2	**Coumarin và dẫn xuất**	- AcOH - H_2O (98 : 2) - Dimethyl formamid - EtOH (4 : 6)	1.Quan sát dưới đèn tử ngoại. 2.D.d. IK + I_2 3. D.d. KOH / ethanol + UV 4. Thuốc thử Ehrlich 5. Thuốc thử Emerson.

Bảng 10. (tiếp theo)

STT	Nhóm chất	Hệ dung môi	Thuốc thử hiện màu
3	**Đường (Saccharid)**		
	Mono-saccharid	- BuOH - AcOH - H_2O (4 : 1 : 5: lớp trên) - BuOH - EtOH - H_2O (4 : 1 : 2,2) - *n*-BuOH - Benzen - pyridin - H_2O (5 : 1 : 3 : 3) - Phenol bão hoà nước	1.Resorcinol - H_2SO_4 2. Anilin phtalat
	Oligo - saccharid	- BuOH - AcOH - H_2O (4 : 1 : 5, lớp trên) - BuOH - EtOH - H_2O (4 : 1 : 2,2) - *n*-BuOH - Benzen - pyridin - H_2O (5 : 1 : 3 : 3) - Phenol bão hoà nước * Triển khai rất lâu: 48 - 96 giờ	1.Resorcinol - H_2SO_4 2. Anilin phtalat
	Poly - saccharid	Thuỷ phân đến monoscacharid và tiến hành phân tích như trên	1. Resorcinol - H_2SO_4 2. Anilin phtalat
4	**Flavonoid**		
	Antocyanin	- CH_3COOH - HCl - H_2O (5 : 1 : 5)	1.Acid oxalic 10% trong aceton - nước (1 : 1). 2. Na_2CO_3 5% / nước. UV 3. Dung dịch (d.d.) NaOH trong MeOH (1%). 4. Sắt (III) clorid/ MeOH. 5. Sắt (III) clorid + Fericyanua K (1:1) dung dịch nước. 6. Antimon clorid 10% trong $CHCl_3$, UV 7. D. D. chì acetat kiềm 25% trong nước, UV. 8. Nhôm clorua 2% trong MeOH, UV.

Bảng 10. (tiếp theo)

STT	Nhóm chất	Hệ dung môi	Thuốc thử hiện màu
	Biflavonoid	- CH_3COOH - H_2O (3 : 2), (1 : 5) - iso-BuOH - H_2O (3 : 2), (1 : 1), (3 : 8) - EtOAc bão hoà nước - $CHCl_3$ bão hoà nước * Sắc ký hai chiều: - Chiều 1: n- BuOH - CH_3COOH băng - H_2O (3 : 1: 1) - Chiều 2: CH_3COOH 15% (v/v) trong nước	1. Ceric sulfat trong H_2SO_4, 2. Na_2CO_3 5% / nước. UV 3. Dung dịch (d.d.) NaOH trong MeOH (1%). 4. Acid oxalic 10% trong aceton - nước (1 : 1).
	Flavonon	- $CHCl_3$ - MeOH - H_2O (8 : 2 : 1) - EtOAc bão hoà nước - BuOH - CH_3COOH - H_2O (4 : 1 : 5) - EtOAc - acid formic - H_2O (10 : 2 : 3)	1. Acid oxalic 10% trong aceton - nước (1 : 1).
	Flavonol	- EtOAc bão hoà nước - BuOH - CH_3COOH - H_2O (4 : 1 : 5) - $CHCl_3$ - MeOH - H_2O (8 : 2 : 1)	1. Acid oxalic 10% trong aceton - nước (1 : 1).
	Flavon	- EtOAc bão hoà nước - EtOAc - acid formic - H_2O (10 : 2 : 3), (25 : 1 : 5), (3 : 3 : 1) - $CHCl_3$ - CH_3COOH - H_2O (13 : 6 : 2)	1. Acid oxalic 10% trong aceton - nước (1 : 1).
	Flavon methoxyl hoá	- *n*-BuOH bão hoà nước - Benzen - nitromethan - H_2O (3 : 2 : 5)	1. Acid oxalic 10% trong aceton - nước (1 : 1).
	Isoflavon	- Propanol - CH_3COOH - H_2O (1 : 1 : 7) - BuOH - CH_3COOH - H_2O (4 : 1 : 5), (4 : 1 : 1), (5 : 1 : 4) - EtOAc bão hoà nước	1. H_2SO_4 đặc 2. Acid oxalic 10% trong aceton - nước (1 : 1).
	Leikoantocy anidin	- 30% CH_3COOH - H_2O - pentanol (4 : 5 : 1)	1. Na_2CO_3 5% / nước, UV

Bảng 10. (tiếp theo)

STT	Nhóm chất	Hệ dung môi	Thuốc thử hiện màu
	o-glycosid flavon và flavonol	- Ethanol - CH_3COOH - H_2O (40 : 13 : 30) - BuOH - CH_3COOH - H_2O (4 : 1 : 5), (4 : 1 : 1), (5 : 1 : 4), (5 : 2 : 6), (6 : 2 : 1) - EtOAc bão hoà nước - EtOAc - acid formic - H_2O (13 : 6 : 2)	1. D. d. bạc nitrat - amoniac. 2. D. d. NaOH trong MeOH (1%). 3. Sắt (III) clorid / MeOH
5	**Glyco - sid tim**	- *n*-BuOH bão hoà nước - EtOH - pyridin - H_2O (5 : 1 : 4)	1.Dinitrobenzen 10% / ethanol, sau đó phun tiếp dung dịch NaOH 10% trong MeOH - H_2O. 2.D. d. acid tricloracetic 25% / CHCl3, hơ nóng 110°C, quan sát dưới UV. 3.D. d. anisaldehyd / CH_3COOH - H_2SO_4, hơ nóng 110°C.
6	**Iridoid**	- BuOH - AcOH - H_2O (4 : 1 : 1) - Isoprapanol bão hoà nước	1.D. d. anisaldehyd / H_2SO_4 2.D. d. $SbCl_3$ / $CHCl_3$. 3.Thuốc thử Trim Hill.
7	**Quinon và dẫn xuất**	- *n*-BuOH - CH_3COOH - H_2O (4 : 1 : 5), (2 : 1 : 1), (3 : 1 : 1) - Cyclohexan - benzen - MeOH (35: 25: 10) - H_2O - aceton - benzen (2 : 1 : 4, lấy pha nước) - EtOAc - acid formic - H_2O (10 : 2 : 3), (15 : 3 : 2) - MeOH - EtOAc - acid formic (50 : 5 : 5) - Dimethylformamid - H_2O (90 : 3) - Ether dầu bão hoà MeOH 97%.	1.Quan sát dưới ánh sáng tử ngoại. 2.D.d. 0,5% acetat Mg / MeOH, hơ nóng ở 90°C trong 5 phút. 3. D. d. KOH. 4. D.d. Na_2CO_3 5. Bạc nitrat / d. d. amoniac

Bảng 10. (tiếp theo)

STT	Nhóm chất	Hệ dung môi	Thuốc thử hiện màu
8	Saponin	- *n*-BuOH bão hoà nước - *n*-BuOH - CH_3COOH - H_2O (4 : 1 : 15) - *n*-BuOH - EtOH - H_2O (1 : 1 : 1) - *n*-BuOH - EtOAc - H_2O (4 : 1 : 5 - lấy pha trên)	- Dung dịch acid tricloracetic , hơ nóng. - Dung dịch vanilin / HCl - Dung dịch periodat
9	Sterol	- Benzen - $CHCl_3$ - $CHCl_3$ - tetrahydrofuran	- Dung dịch $SbCl_2$ 10 - 20% / $CHCl_3$. - Dung dịch iot / ether dầu

2.3.7. Phân tích iridoid

Iridoid là các chất tự nhiên có cấu trúc monoterpen (C_5) với một vòng cyclopentan và 1 vòng δ-lacton (hoặc dẫn xuất) thường không no. Trong cây iridoid tồn tại chủ yếu dưới dạng glycosid trong đó nhóm keton của vòng lacton biến thành dây nối acetal gắn qua OH của oza (chủ yếu là glucose). Ngoài nhóm chức lacton, iridoid thường có thêm các nhóm COOH, CH_2OH, $COOCH_3$ ở C_4 và C_8. Sự chuyển thành màu đen của một số dược liệu trong quá trình chế biến thường có liên quan đến sự có mặt của hợp chất iridoid.

Chiết xuất: Có thể chiết xuất iridoid bằng ethanol, methanol hoặc nước nóng. Dược liệu tươi xay với một ít nước và chiết nóng bằng nước hoặc bằng ethanol, methanol. Dược liệu khô tán bột và chiết hồi lưu với ethanol, methanol. Dịch chiết được bốc hơi dung môi. Cắn thu được hoà vào nước, để lắng, lọc bỏ cắn. Dịch lọc lắc vài lần với benzen hoặc ethyl acetat. Cô đặc dịch lọc, hoà lại trong ethanol làm dịch chấm SKG và tiến hành như bảng 10.

2.3.8. Phân tích quinon và dẫn xuất

Quinon là những diketon không no, khi bị khử chúng biến thành polyphenol. Polyphenol lại dễ dàng bị oxy hoá để trở lại quinon. Chúng là những chất có màu (vàng, cam, đỏ, tím) góp phần tạo màu sắc của cây cỏ và động vật.

Dựa vào sản phẩm khử hoá của quinon có thể chia chúng thành các nhóm:

- Benzoquinon.
- Naphtaquinon.

- Antraquinon.

- Phenantraquinon.

Chiết xuất: Benzoquinon và naphtaquinon là các chất không phân cực nên rất tan trong dầu béo, trong các dung môi không phân cực như ether dầu, benzen. Một số chất có thể cất kéo bằng hơi nước. Các antraquinon có thể chiết bằng các dung môi phân cực như ethanol, methanol. Bốc hơi các dung môi, được mẫu để phân tích bằng SKG.

Tách các quinon và dẫn xuất bằng phương pháp SKG không chỉ phụ thuộc vào mức độ hydroxy hoá của nhân mà còn phụ thuộc vào vị trí của nó. Ảnh hưởng nhiều nhất lên sự di chuyển của chất là nhóm hydroxyl ở vị trí C_2. Một số hệ dung môi thường dùng trong tách các quinon và dẫn xuất được trình bầy trong bảng 10.

2.3.9. Phân tích saponin

Saponin là một nhóm chất có đặc tính chung là khi hoà vào nước có tác dụng giảm sức căng bề mặt của dung dịch , tác dụng phá huyết và tạo nhiều bọt.

Dựa vào cấu trúc hoá học, các saponin được chia làm hai nhóm: saponin steroid và saponin triterpen.

+ *Saponin triterpen* có cấu trúc rất đa dạng, dựa vào cấu trúc của genin, saponin triperpen có thể chia thành 4 nhóm:

- Dẫn xuất β-amyrin.

- Dẫn xuất α-amyrin.

- Dẫn xuất lupeol.

- Triterpen 4 vòng.

Phần đường đại đa số các oza gắn qua nhóm OH ở C_3 của genin. Một số ít saponin còn có dây đường ở OH ở C_{16} hoặc qua COOH ở C_{28}.

+ *Saponin steroid* có đặc điểm chung về cấu trúc là hệ thống vòng spiroketal (vòng E và F nối nhau qua C_{22}). Chúng chỉ khac nhau ở 3 điểm:

- Ở C_5 (A/B) hydro có thể là cấu hình α hoặc β hoặc dây nối đôi $\Delta_{5,6}$.

- Tuỳ theo cấu hình của R1 và R2 (thường là H và CH_3) mà chúng có thể là đồng phân iso (25 - R) hoặc neo (25 - S).

- Về nhóm thế: tất cả sapogenin đều có OH ở C_3, một số ít có thêm OH ở C_2 hoặc C_6 (hoặc cả 2). Một số sapogenin có thêm C=O tại C_{12}.

Chiết xuất: Saponin là các chất phân cực mạnh nên tan nhiều trong nước lạnh hoặc nóng, hoặc các alcol bậc thấp (methanol, ethanol). Rất ít tan trong dung môi hữu cơ như ether, aceton, benzen. Dược liệu chứa nhiều chất béo có thể sơ bộ loại chất béo bằng ether dầu hoặc benzen sau đó chiết với ethanol, methanol hoặc nước. Bốc hơi dung môi. Hoà cắn trong nước. Lắc lần lượt với ether dầu, ethyl acetat, *n*-butanol bão hoà nước. Dịch butanol được bốc hơi dung môi. Hoà cắn trong methanol (hoặc ethanol), thêm một lượng gấp 2 - 3 lần ether diethyl (hoặc 3 - 4 lần hỗn hợp ether diethyl - aceton 1 : 4). Saponin kết tủa. Lọc lấy tủa. Hoà tủa trong methanol (hoặc ethanol) làm dịch chấm SKG.

Các sapogenin là các chất phân cực yếu nên ít tan trong nước, tan nhiều trong dung môi hữu cơ như hexan, heptan, ether dầu, benzen, aceton ...

Tuỳ theo yêu cầu phân tích saponin hay sapogenin mà chọn dung môi chiết thích hợp.

2.3.10. Phân tích sterol

Sterol là những alcol thể rắn có cấu trúc 27 - 29 nguyên tử C có khung cơ bản cyclopentanoperhydro phenanthren và một chuỗi ngang với các nhóm metyl hoặc etyl đặc biệt là ở C_{24}. Một số sterol có nhóm methyl ở C_4 hoặc C_{14}. Các chất này được gọi là methylsterol. Tất cả các sterol đều có OH ở C_3. Sterol có dây nối đôi gọi là stenol. Các sterol không có dây nối đôi gọi là stanol.

Chiết xuất: Đặc tính của các sterol là không phân cực, rất ít tan trong nước, tan trong dầu béo, caroten, lexithin. Rất tan trong các dung môi không phân cực như ether dầu, benzen, hexan, chloroform, nên các chất này được dùng làm dung môi chiết sterol. Ngoài ra còn có thể chiết bằng ethanol nếu chúng ở dạng glycosid. Các sterol chiết xuất được thường ở dưới dạng hỗn hợp của các este sterol kết hợp với lipid, caroten, lexithin. Vì vậy cần qua giai đoạn xà phòng hoá để tách các chất này ra khỏi sterol. Sau khi xà phòng hoá chiết sterol bằng dung môi hữu cơ (*n*-hexan, ether dầu, ether diethyl). Tinh chế bằng kết tinh phân đoạn trong methanol, hỗn hợp *n*-hexan - methanol, hoặc *n*-hexan. Tinh thể thu được có thể dưới dạng hình kim, hình vẩy, bột vô định hình tuỳ theo dung môi đã dùng để kết tinh. Hoà tinh thể sterol trong methanol, ethanol để chấm sắc ký.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Dược điển Việt Nam in lần thứ 3, (2003); Hà Nội.
2. *Nguyễn Văn Đàn, Nguyễn Viết Tựu* (1985): Phương pháp nghiên cứu hoá học cây thuốc. NXB Y học, TP. HCM.

3. *Maciutinaia N. P.* (1985): Nguyên liệu thuốc thảo mộc, Kiev.

4. *Pharmacopoeia* of the People's Republic of China. (English Edition 2000), vol. I. Chemical Industry Press.

5. Trang web:
[http://www.santafe.cc.fl.us/chemscape/catofp/chromato/paper/paper.htm]

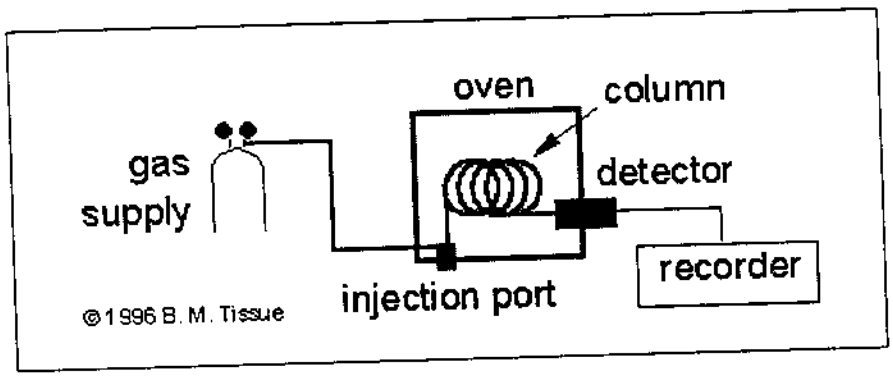
III. PHƯƠNG PHÁP SẮC KÝ KHÍ

3.1. Nguyên tắc

Phương pháp sắc ký khí (SKK) là một phương pháp tách trong đó pha động là chất khí (khí mang) và pha tĩnh chứa trong cột là một chất rắn, hoặc một chất lỏng phủ trên một chất mang tính trơ dạng rắn, hoặc một film lỏng phủ đều trên thành phía trong của cột. Phương pháp SKK dựa trên cơ chế hấp phụ và / hoặc phân bố.

3.2. Thiết bị (hình 14)

Thiết bị gồm: - Nguồn cung cấp khí.
- Bộ phận nạp mẫu (cổng bơm mẫu).
- Cột sắc ký.
- Hệ thống phát hiện (detector).
- Máy ghi sắc phổ và lưu trữ kết quả phân tích.



Hình 14: Sơ đồ cấu tạo máy SKK

[Brain M.Tissue, 17/9/2003: www.chem.vt.edu/chem-ed/sep/gc/gc.html]

Ghi chú: - Gas supply: Nguồn cung cấp khí.
- Injection port: Bộ phận nạp mẫu (cổng bơm mẫu).
- Oven: Lò.
- Column: Cột sắc ký.
- Detector: Hệ thống phát hiện.
- Recorder: Máy ghi sắc phổ.

3.2.1. Nguồn cung cấp khí: Là các bình khí heli, argon hoặc nitơ.

3.2.2. Bộ phận nạp mẫu (cổng bơm mẫu)

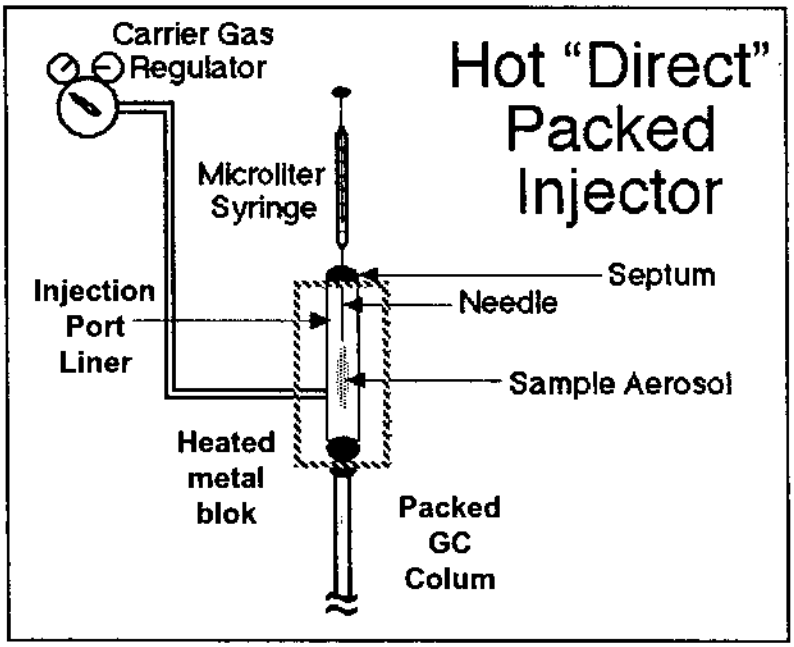
Có các loại cổng bơm mẫu khác nhau:

- Cổng bơm mẫu trực tiếp: Đưa tất cả mẫu bơm vào cột nhồi (hình 15).

- Cổng bơm mẫu chia dòng: Chất bơm vào phải hoá hơi ở cổng bơm mẫu. Một phần nhỏ của mẫu đi vào cột mao quản (hình 16).

- Cổng bơm mẫu không chia dòng: 100% lượng mẫu bơm đi vào cột (hình 16).

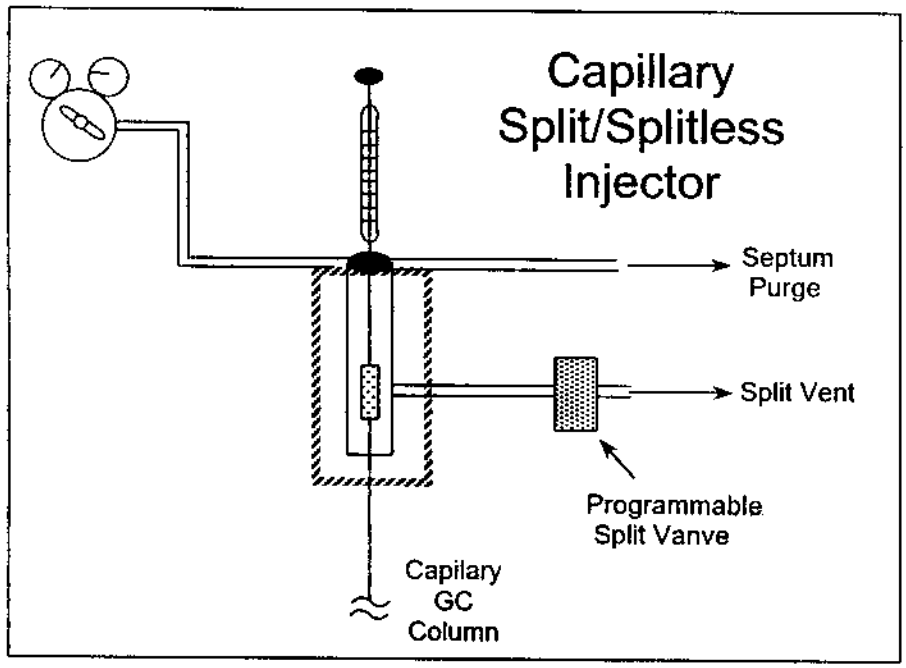
- Cổng bơm mẫu "bay hơi theo chương trình nhiệt độ": Khi bơm mẫu vào, dung môi bay hơi, còn chất đi vào cột tách.



Hình 15: Cổng bơm mẫu trực tiếp vào cột nhồi

[Thomas G. Chasteen: Sam Houston State University, Huntsville, Texas 77341, 17/9/2003: www. chem.vt.edu/chem-ed/html]

Ghi chú: - Carrier gas regulator: Điều chỉnh khí mang. - Needle: Kim.
- Microliter syringe: Bơm tiêm vi lượng. - Sample aerosol: Mẫu hoá hơi.
- Septum: Nắp. - Packed GC column: Cột nhồi.



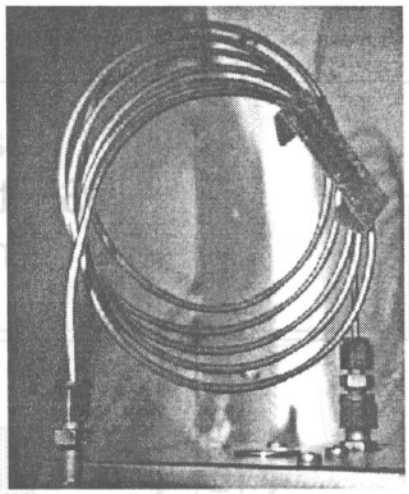
Hình 16: Sơ đồ cổng bơm chia và không chia dòng

[Thomas G. Chasteen: Sam Houston State University, Huntsville, Texas 77341, 17/9/2003: www. chem.vt.edu/chem-ed/html]

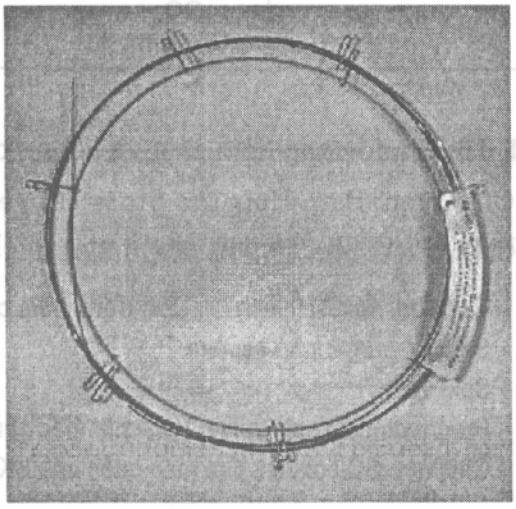
Ghi chú: - Capillary split/splitless injector: Cổng bơm chia/không chia.
- Septum purge: nắp septum.
- Split vent.
- Programmable split valve: Van chia theo chương trình.
- Capillery GC column: Cột mao quản của SKK.

3.2.3. Cột sắc ký

Cột thường làm bằng thuỷ tinh hoặc bằng thép không gỉ chứa pha tĩnh. Có hai loại cột: Cột nhồi (hình 17) và cột mao quản (hình 18). Cột nhồi thường dài từ 1 – 5 m, đường kính trong 5 mm. Cột nhồi được nhồi đầy pha tĩnh hoặc được phủ bên trong bằng pha tĩnh. Cột mao quản dài từ 10 đến 100 m, đường kính trong 250 µm. Pha tĩnh được phủ trên bề mặt phía trong của cột. Cột mao quản có khả năng tách cao hơn cột nhồi nhưng các pic lại dễ bị roãng khi bơm quá nhiều mẫu.



Hình 17: Cột nhồi [Brain M. Tissue, 17/9/2003: www.chem.vt.edu/chem-ed/sep/gc/graphics/packed.jpg]



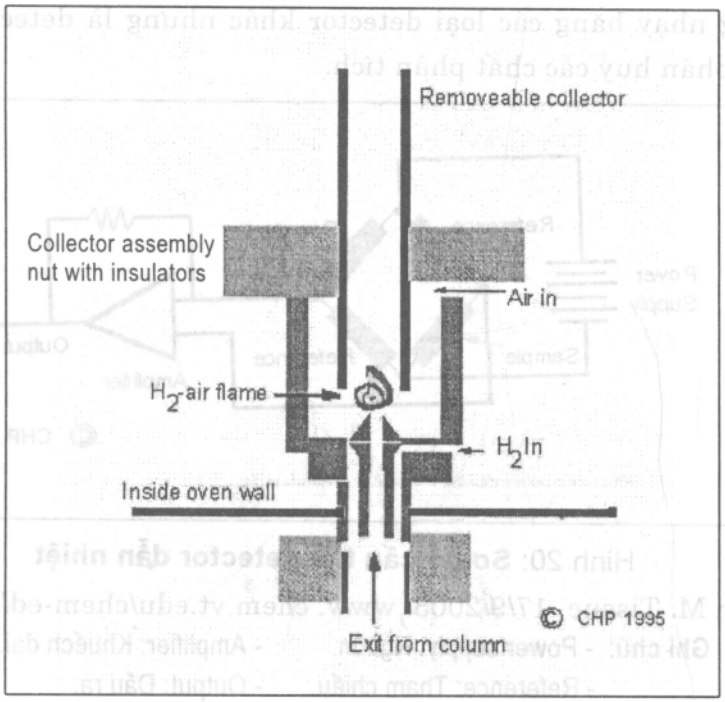
Hình 18: Cột mao quản [Brain M. Tissue, 17/9/2003: www.chem.vt.edu/chem-ed/sep/gc/graphics/capillar.jpg]

3.2.4. Hệ thống phát hiện (detector)

Trong phương pháp SKK các thành phần được tách trên cột, được phát hiện ngay sau khi chúng ra khỏi cột bằng các detector thích hợp. Do sự đa dạng của yêu cầu phân tích mà có nhiều loại detector khác nhau.

3.2.4.1. Detector ion hoá ngọn lửa (Flame – ionization detector: FID)

FID bao gồm ngọn lửa khí hydro và đĩa thu (hình 19).



Hình 19: Sơ đồ detector ion hoá ngọn lửa

[Brain M. Tissue, 17/9/2003: www.chem.vt.edu/chem-ed/html]

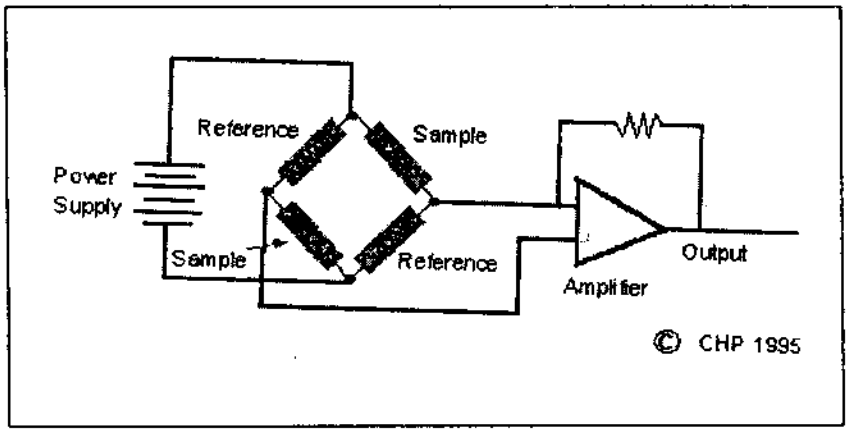
Ghi chú: - Removeable collector: đĩa thu mẫu đầu ra
- Collector assembly nut with insulators: Nắp đậy của đĩa thu có cách điện.
- Air in: Không khí vào.
- H_2-air flame: Ngọn lửa hydro - không khí.
- H_2 in: Hydro vào.
- Inside oven wall: Thành trong của lò.
- Exit from column: Đi vào từ cột của SKK.

Detector ion hoá ngọn lửa là detector rất nhạy với khoảng động học tuyến tính lớn, hạn chế duy nhất của loại detector này là phân huỷ các chất sau khi phân tích. Các chất sau khi tách trên cột, đi qua ngọn lửa, các phân tử bị phá vỡ, tạo thành các ion. Các ion được tập hợp trên điện cực và tạo ra tín hiệu điện. FID được sử dụng nhiều nhất và dùng để tách hầu hết các hợp chất hữu cơ.

3.2.4.2. Detector dẫn nhiệt (Thermal conductivity detector - TCD)

Cấu tạo của TCD gồm một sợi dây đốt nóng bằng điện (còn gọi là dây dẫn nhiệt). Nhiệt độ của dây dẫn nhiệt phụ thuộc vào độ dẫn nhiệt của dòng khí luân chuyển quanh nó. Thay đổi sự dẫn nhiệt, như khi phân tử hữu cơ tác động vào khí mang gây tăng nhiệt độ ở dây dẫn - được phát hiện như sự thay đổi điện trở (hình 20).

TCD không nhạy bằng các loại detector khác nhưng là detector không đặc hiệu và không phân huỷ các chất phân tích.



Hình 20: **Sơ đồ cấu tạo detector dẫn nhiệt**

[Brain M. Tissue, 17/9/2003: www. chem.vt.edu/chem-ed/tcd.html]

Ghi chú: - Power supply: Nguồn. - Amplifier: Khuếch đại.
- Reference: Tham chiếu. - Output: Đầu ra.
- Sample: Mẫu.

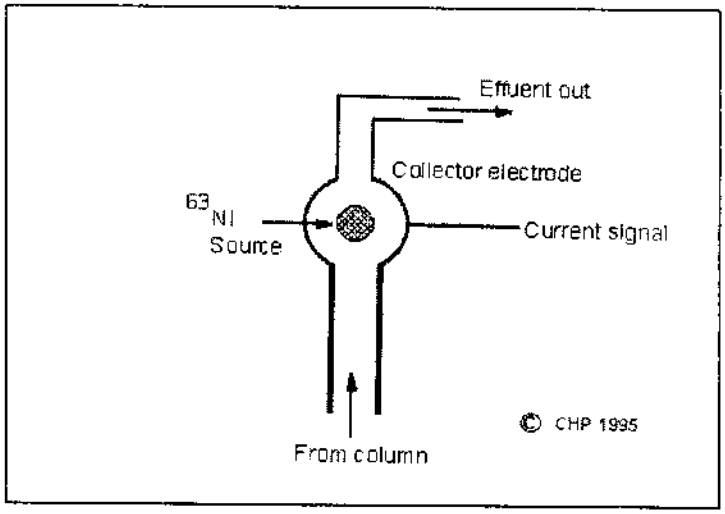
Có 2 cặp TCD dùng trong SKK. Một cặp được lắp ở đầu ra của cột để phát hiện các thành phần ngay sau khi chúng ra khỏi cột. Một cặp khác được lắp ở trước buồng tiêm mẫu hoặc cột tách. Điện trở của 2 mạch của các cặp detector được tập hợp ở mạch điện cầu. Cầu điện khuếch đại sự thay đổi điện trở khi đi qua chất phân tích dẫn nhiệt và không khuếch đại thay đổi điện trở do cả 2 cặp detector tạo ra do sự dao động của tốc độ dòng.

3.2.4.3. Detector cộng kết điện tử (Electron capture detector: ECD)

Cấu tạo của ECD được trình bày ở hình 21.

3.2.4.4. Detector phát xạ nguyên tử (Atomic emission detector: AED)

SKK với cột mao quản là kỹ thuật hiện đại có độ phân giải cao nhất trong việc tách các thành phần hoá hơi và bền với nhiệt. Nhu cầu về hệ thống phát hiện các thành phần có độ nhạy và chọn lọc cao cũng ngày càng tăng. Mặt khác nhờ sự phát triển của công nghệ mới mà ngày càng có nhiều các hợp chất phức tạp được tách bằng SKK, sắc phổ cũng càng ngày càng phức tạp hơn. Vì vậy hệ thống phát hiện (các detector) được sử dụng như một phương tiện phát hiện các thành phần cũng ngày càng trở nên thông dụng. Thêm vào đó, mỗi loại detector có những đặc điểm riêng (sự chọn lọc, độ nhạy, khoảng tuyến tính, độ ổn định và giá thành...) giúp chúng ta lựa chọn loại detector cần thiết cho sử dụng.



Hình 21: Sơ đồ cấu tạo detector cộng kết điện tử

[Brain M. Tissue, 17/9/2003:

www. chem.vt.edu/chem-ed/sep/gc/detector/ecd..html]

Ghi chú: - Ni Source: Nguồn Ni. - Collector electrode: Điện cực thu.

- From column: Từ cột SKK. - Effuent out: Đầu ra của chất tách.

- Current signal: Tín hiệu dòng điện.

Điểm mạnh của detector phát xạ nguyên tử là khả năng xác định đồng thời sự phát sóng của nhiều nguyên tố trong dòng hơi đi ra từ cột mao quản của SKK. Sau khi ra khỏi cột, hơi đi vào tế bào quang điện vi sóng – ở đây các thành phần bị phân huỷ và các nguyên tử của chúng bị kích thích bởi năng lượng của tế bào quang điện. Ánh sáng phát ra bởi các phần tử bị kích thích, được tách ra thành các tia riêng biệt đi qua chuỗi quang diod đến máy tính. Máy tính chọn ra các tia riêng biệt và ghi sắc đồ dưới dạng các pic – mỗi pic chỉ tương ứng với một cấu tử cụ thể của các chất bay hơi đi ra từ cột SKK.

Detector phát xạ nguyên tử bao gồm các bộ phận sau (hình 22):

- Một khớp giao diện nối cột mao quản của SKK với tế bào quang điện phát sóng cực ngắn.

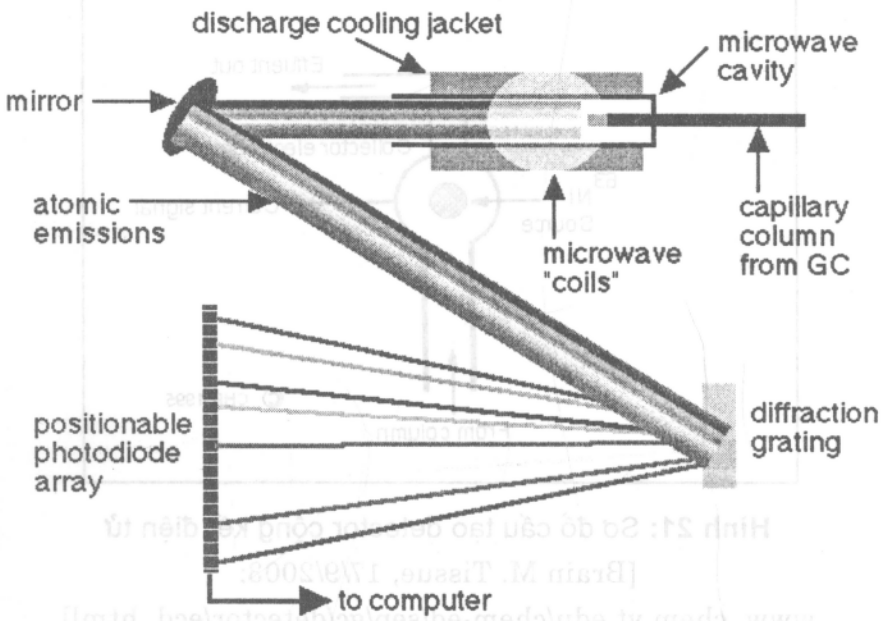
- Buồng phát sóng cực ngắn.

- Hệ thống làm lạnh cho buồng phát sóng cực ngắn.

- Bộ phận giảm nhiễu và các lăng kính liên quan đến hội tụ và phân tán các tia phát xạ nguyên tử.

- Khớp nối giao diện hiệu chỉnh chuỗi quang diod nối với máy tính.

- Hệ thống làm lạnh tế bào sóng cực ngắn vì năng lượng tập trung vào tế bào và chuyển thành nhiệt làm nóng tế bào.



Hình 22: Sơ đồ cấu tạo detector phát xạ nguyên tử [Thomas G. Chasteen, Sam Houston State University, Huntsville, Texas 77341, 17/9/2003: www. chem.vt.edu/chem-ed/sep/gc/detector/aed.html]

Ghi chú:
- Discharge cooling jacket: Bao làm lạnh.
- Microwave cavity: Khe vi sóng.
- Mirror: Gương.
- Atomic emissions: Phát xạ nguyên tử.
- Microwave "coils": Vòng tròn vi sóng.
- Capillary column from GC: Cột mao quản từ SKK.
- Positionable photodiode array: Chuỗi ánh sáng diod.
- Diffraction grating: Giảm nhiễu xạ.
- To computer: Đến máy tính.

3.2.4.5. Detector quang hoá (Chemiluminescence detector)

Phổ quang hoá, giống như phổ nguyên tử (AES), sử dụng các thông số định lượng của sự phát quang từ các cấu tử hoá học bị kích thích để xác định nồng độ chất phân tích. Khác với AES, phổ quang hoá là sự truyền quang từ các phân tử có năng lượng thay cho các nguyên tử kích thích đơn giản. Giải ánh sáng xác định bằng kỹ thuật quang hoá bắt nguồn từ phân tử toả sáng và vì vậy mà rộng hơn và phức tạp hơn phổ nguyên tử. Hơn thế nữa, phổ quang hoá có thể tiến hành ở cả pha lỏng và phá khí, trong khi đó phổ nguyên tử chỉ thực hiện được ở pha khí.

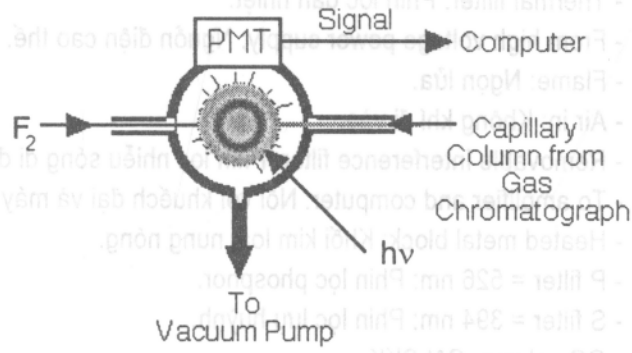
Detector quang hoá được nối với máy SK lỏng hoặc SKK và đóng vai trò

quan trọng trong các phòng thí nghiệm phân tích. Trong phổ quang hoá, năng lượng cần thiết để kích thích chất phân tích cao hơn các trạng thái điện tử quay vòng quanh và dao động và không xuất phát từ nguồn sáng bên ngoài như laser hoặc đèn. Vấn đề phân tán nguồn kích thích hoàn toàn tránh được. Năng lượng được tạo ra bằng phản ứng hoá học giữa chất phân tích và thuốc thử:

$$CH_3–S–CH_3 \ + \ F_2 \longrightarrow \text{sản phẩm} \ + \ h\nu \ (\text{ánh sáng})$$

Quang hoá ở pha khí, sự phát ánh sáng được tạo ra bởi phản ứng giữa chất phân tích (dimethyl sulfid) và khí ôxy hoá mạnh (fluorin hoặc ozon). Phản ứng xảy ra vào khoảng thời gian mà sản phẩm của ánh sáng tạo ra ngay lập tức. Vì vậy hệ thống phân tích trộn chất phân tích với thuốc thử ngay trong bình thể tích nhỏ, trực tiếp ở phía trước của khuếch đại ánh sáng. Khi chất phân tích đi ra từ cột sắc ký khí, đuôi cột gắn trực tiếp vào bình phản ứng. Vì vậy năng lượng của phản ứng được giải phóng ra bao nhiêu thì được dùng bấy nhiêu để kích thích phân tử chất phân tích. Sự mất năng lượng thông qua sự va chạm của pha khí là không mong muốn. Vì vậy áp suất khí ở bình phản ứng phải được duy trì thấp (~1 tora) bằng bơm chân không để hạn chế tối đa tác dụng bất hoạt của sự va chạm. Sơ đồ cấu tạo của detector quang hoá được trình bày ở hình 22.

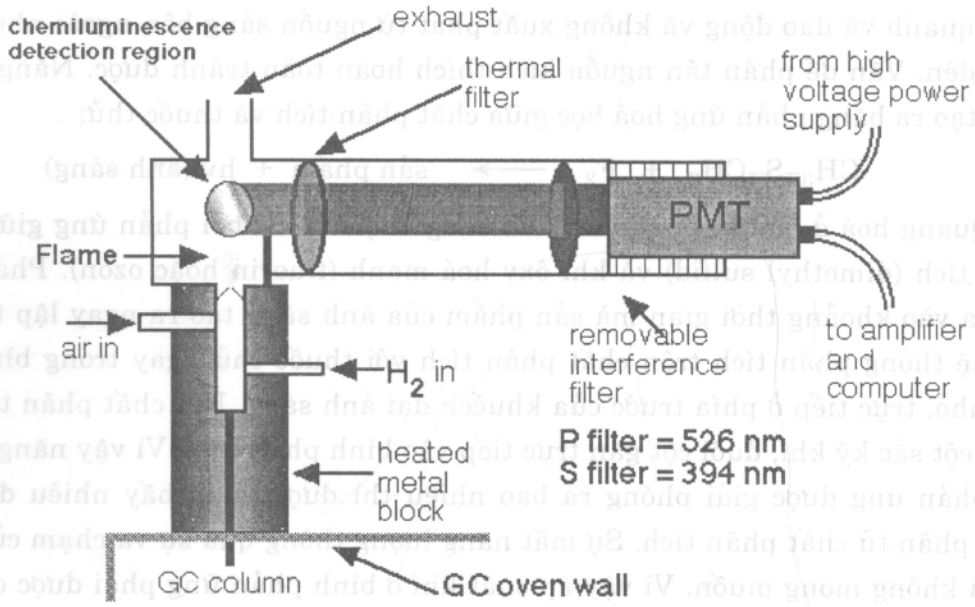
Đối với người phân tích hoá học, sự mơ hồ về sản phẩm thực sự của phản ứng là không quan trọng. Điều quan tâm hơn cả là độ nhạy của máy (giới hạn phát hiện của chất phân tích), độ chọn lọc, đáp ứng phân tích khi có các thành phần gây nhiễu và đáp ứng khoảng tuyến tính.



Hình 23: Sơ đồ cấu tạo detector quang hoá [Thomas G. Chasteen - 17/9/2003: Sam Houston State University, Huntsville, Texas 77341. theo www. chem.vt.edu/chem-ed/spec/molec/chemilum.html]

Ghi chú: - Signal: Tín hiệu.
- Computer: Máy tính.
- Capillary column from Gas Chromatograph: Cột mao quản đi từ SKK.
- To vacuum pump: Nối với bơm chân không.

3.2.4.6. Detector quang kế ngọn lửa (Flame – photometric detector: FPD)



Hình 24: Sơ đồ detector quang kế ngọn lửa [Thomas G. Chasteen - 17/9/2003: Sam Houston State University, Huntsville, Texas 77341. theo www. chem.vt.edu/chem-ed/spec/gc/detector/fpd.html]

Ghi chú: - Chemiluminescence detection region: Vùng phát hiện quang hoá.
- Exhaust: Ống xả.
- Thermal fillter: Phin lọc dẫn nhiệt.
- From high voltage power supply: Nguồn điện cao thế.
- Flame: Ngọn lửa.
- Air in: Không khí đi vào.
- Removable interference filter: Phin lọc nhiễu sóng di động được .
- To amplifier and computer: Nối với khuếch đại và máy tính.
- Heated metal block: Khối kim loại nung nóng.
- P filter = 526 nm: Phin lọc phosphor.
- S filter = 394 nm: Phin lọc lưu huỳnh.
- GC column: Cột SKK.
- GC oven wall: Thành lò SKK.

Detector quang kế ngọn lửa được sử dụng để xác định các chất có chứa lưu huỳnh và phosphor. Detector này sử dụng các phản ứng quang hoá của lưu huỳnh và phosphor trong ngọn lửa hydro / không khí như một nguồn thông tin tương đối đặc biệt của các hợp chất có chứa nguyên tử lưu huỳnh và nguyên tử phosphor. Lamda cực đại dẫn truyền của các hạt lưu huỳnh được kích thích (S_2)

vào khoảng 394 nm. Lamda cực đại cặp đôi (duplet) của các hạt phosphor bị kích thích (HPO) : 510 - 526 nm. Để có thể phát hiện một cách chọn lọc hoặc lưu huỳnh hoặc phosphor khi các thành phần này đi ra từ cột SKK, người ta sử dụng một kính lọc nhiễu sóng. Kính này được đặt giữa vùng bức xạ khả kiến và tử ngoại phát xạ bởi ngọn lửa. Khi không có tổng lượng lớn bức xạ hồng ngoại, phát xạ bởi ngọn lửa cháy, phản ứng đốt nóng đến PMT và làm tăng tín hiệu nền của PMT.

PMT được cách nhiệt với buồng cháy bằng tấm kim loại dẫn nhiệt kém, tiếp xúc với buồng PMT, kính lọc v.v...

Các chi tiết của detector quang kế ngọn lửa được sắp xếp như sau: Buồng đốt lửa có ống xả; kính lọc nhiệt cố định (có 2 kính lọc trong một số kiểu dáng thương mại); kính lọc phốt pho hoặc lưu huỳnh di chuyển được và PMT (hình 24).

3.2.4.7. Detector nitrogen - phosphor (Nitrogen - phosphorus detector: NPD)

Cấu tạo của detector nitrogen - phosphor tương tự như detector ion hoá ngọn lửa (xem hình 19). Sự khác nhau chính là ngọn lửa hydro / không khí của detector ion hoá ngọn lửa được thay bằng hạt rubidisilicat đốt nóng trong detector nitrogen - phosphor. Các chất từ cột SKK đi ra qua hạt muối rubidi nóng phát ra các ion của các thành phần có chứa nitrogen và phosphor đi qua nó. Các ion được tập trung ở bình thu ở phía trên hạt nung nóng, tạo ra dòng điện tương tự như detector ion hoá ngọn lửa.

3.2.4.8. Detector quang ion hoá (Photoionization detector: PID)

Detector quang ion hoá được ứng dụng để xác định các hydrocabua thơm hoặc các hợp chất có nguyên tử dị vòng. Detector quang ion hoá sử dụng ánh sáng tử ngoại để ion hoá các chất bị kích thích đi ra từ cột SKK. Các ion tạo ra được tập hợp ở điện cực. Vì vậy dòng điện phát sinh là thước đo nồng độ chất phân tích.

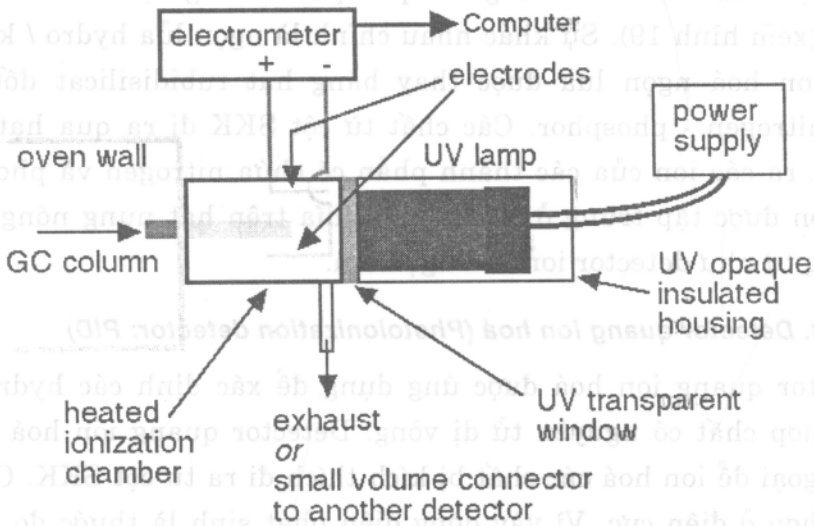
Phản ứng quang ion hoá xảy ra như sau:

$$R + h\nu \longrightarrow R^+ + e^-$$

Nếu năng lượng của một photon đi vào đủ cao, thì sự quang kích thích có thể xảy ra, 1 điện tử hoàn toàn tách ra khỏi phân tử quỹ đạo - là sự ion hoá. Nếu sự ion hoá của một chất xảy ra, thì dòng điện sinh ra tập trung ở điện cực của bình phản ứng của detector quang ion hoá, tỷ lệ thuận với chính chất đi vào bình phản ứng. Chỉ có các hydrocabua thơm và các chất chứa các nguyên tử dị vòng (tương tự như sulfua hữu cơ và phosphor hữu cơ) mới được xác định bằng detector quang ion hóa, bởi vì chỉ có các chất này mới có khả năng ion hoá trong phạm vi nguồn ánh sáng của các đèn tử ngoại đang có bán trên thị trường. Năng

lượng của các đèn tử ngoại từ 8,3 đến 11,7 ev, có nghĩa là lamda max trong khoảng từ 150 nm đến 106 nm. Hầu hết các detector quang ion hoá bán trên thị trường chỉ có 1 đèn tử ngoại. Các đèn tử ngoại được thay đổi phụ thuộc vào yêu cầu phân tích.

**** Phát hiện chọn lọc bằng detector quang ion hoá:*** Thí dụ về sự phát hiện chọn lọc benzen trong sự có mặt của isopropanol. Điểm sôi của benzen 80,1°C, khả năng ion hoá = 9,24 ev - ứng với đèn tử ngoại có năng lượng = 9,5 ev ở trong detector quang ion hoá bởi vì năng lượng này cao hơn khả năng ion hoá của benzen (9,24 ev). Isopropanol có điểm sôi tương tự như benzen (82,5°C) và 2 chất này sẽ ra khỏi cột SKK gần như cùng một thời gian. Mặc dù vậy, isopropanol có khả năng ion hoá cao hơn năng lượng của đèn tử ngoại (10, 15 ev) nên không nhìn thấy hoặc cảm ứng rất yếu ở detector quang ion hoá và vì thế chỉ phát hiện được một chất là benzen.



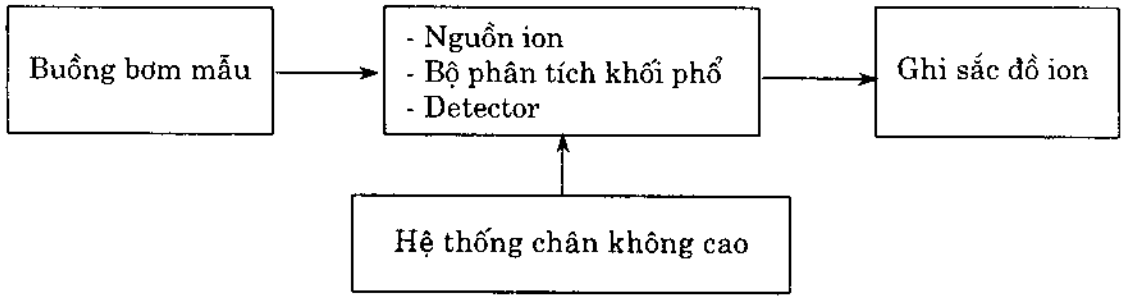
Hình 25: Sơ đồ cấu tạo detector quang ion hoá [Thomas G. Chasteen - 17/9/2003: Sam Houston State University, Huntsville, Texas 77341. theo www. chem.vt.edu/chem-ed/spec/gc/detector/pid.html]

Ghi chú: - Electrometer: Tĩnh điện kế.
- Computer: Máy tính.
- Electrodes: Điện cực.
- Oven wall: Thành lò.
- UV lamp: Đèn tử ngoại.
- Power supply: Nguồn điện.
- GC column: Cột SKK.
- UV opaque insulated housing: Buồng tử ngoại mờ cách điện.
- Heated ionization chamber: Buồng ion hoá đốt nóng.
- Exhaust or small volume connector to another detector: Ống xả hoặc ống nối thể tích nhỏ với detector khác.

Cấu tạo của detector quang ion hoá được trình bày ở hình 25: Detector quang ion hoá là detector SKK không phân huỷ vì chỉ có một phần rất nhỏ của chất phân tích bị ion hoá ở buồng của detector. Vì thế có thể nối ống xả từ detector quang ion hóa với một detector khác (như detector ion hoá ngọn lửa hoặc detector cộng kết điện tử) để có kết quả phân tích đồng thời bằng 2 detector. Nhiệm vụ chính ở đây là thiết kế buồng ion hoá và ống nối với detector thứ 2 có thể tích nhỏ nhất (đường kính trong nhỏ) để các pic khi tách bằng cột SKK không bị mở rộng trước khi phát hiện.

3.2.4.9. Detector khối phổ (Mass Spectrometric detector: MSD)

Detector khối phổ được nối với SKK để xác định trọng lượng phân tử và cấu trúc hoá học của chất tách được bằng SKK. Cấu tạo của khối phổ gồm:



Vì khối phổ tạo và vận hành trong pha khí ion nên phải hoạt động trong hệ thống chân không cao. Khối phổ chỉ dùng để phân tích các chất ion hoá được. Để tách các phân tử khối phổ sử dụng sự khác nhau về tỷ số khối lượng và điện tử (m/e) của các nguyên tử hoặc phân tử bị ion hoá để tách chúng rời nhau. Vì vậy khối phổ thích hợp để xác định số lượng nguyên tử hoặc số lượng phân tử đồng thời xác định cấu trúc hoá học của nguyên tử.

**** Các bước hoạt động chính của khối phổ:***

- Tạo pha khí ion.
- Tách các ion dựa trên tỷ số khối lượng và điện tử (m/e).
- Đo số lượng ion của các tỷ số.

Cường độ tách ion được mô tả bằng độ phân giải:

$$R = m / \Delta m ,$$

trong đó: m - khối lượng ion;

Δm - sự khác nhau về khối lượng ion giữa hai pic tách được trên phổ khối.

* ***Thí dụ:*** một phổ khối với độ phân giải = 1.000 có thể tách 1 ion có m/e = 100.0 với 1 ion có m/e = 100.1

* Các bộ phân tích khác nhau dùng trong khối phổ:

+ Khối phổ chuyển khối - Fourier;
+ Khối phổ bẫy ion;
+ Khối phổ cung từ;
+ Khối phổ tứ cực;
+ Khối phổ thời gian bay.

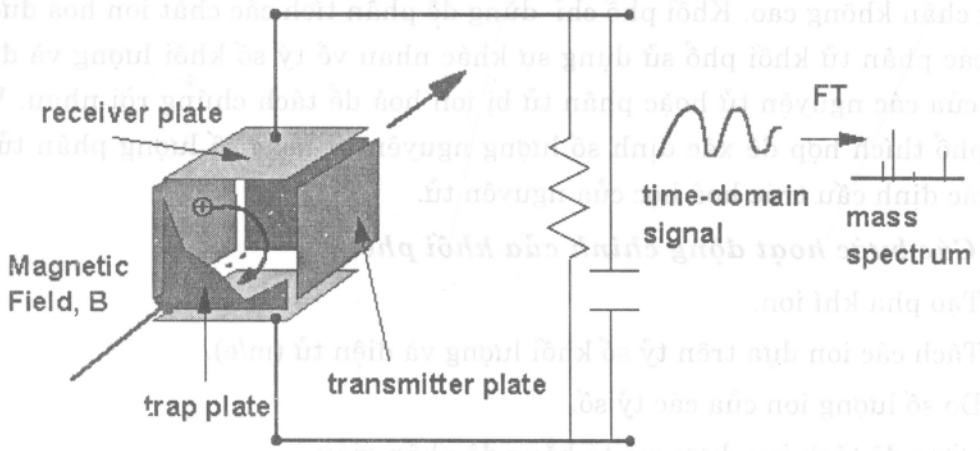
a) Bộ phân tích khối phổ chuyển hoá – Fourier (Fourier-transform mass spectrometry: FT-MS)

Khối phổ chuyển hoá - Fourier có ưu việt về cộng hưởng ion – ciclotron trong chọn lọc và phát hiện các ion. Ion trong từ trường sẽ chuyển động theo đường cung tròn:

$$r = mv / eB$$

Tần số: $f = eB / \pi m.$

Các ion, chuyển động với tần số cyclotrion của chúng, có thể hấp thụ năng lượng RF ở cùng tần số. Xung điện kích thích các ion trong từ trường. Các ion tái phát xạ, các tia xạ được thu tại tấm thu. Sự phân huỷ tạo ra tín hiệu không phân huỷ. Tín hiệu có thể chuyển dạng tạo ra các tần số phát xạ và vì vậy khối lượng của các ion được trình chiếu.



Hình 26: Sơ đồ cấu tạo bộ phân tích khối phổ chuyển khối Fourier [Brian M. Tissue, 17/9/2003: www.chem.vt.edu/chem-ed/ms/ftms.html]

Ghi chú: - Receiver plate: Tấm thu. - Transmitter plate: Tấm truyền
- Magnetic field, B: Từ trường B. - Time-domain signal: Tín hiệu thời gian.
- Trap plate: Tấm bẫy. - Mass spectrum: Phổ khối.

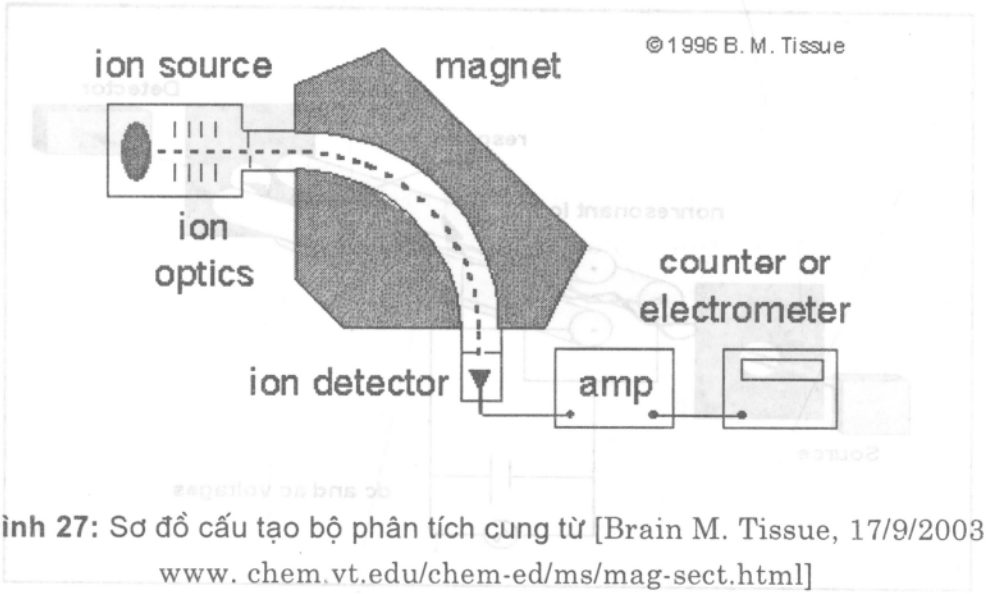
Khối phổ chuyển hoá có độ phân giải rất cao: 10^6 - đây là tiến bộ chính so với các dạng khối phổ khác.

Sơ đồ cấu tạo bộ phân tích khối phổ chuyển hoá - Fourier được trình bày ở hình 25.

b) Bộ phân tích khối phổ bẫy ion (Ion – trap mass spectrometry):

Bộ phân tích khối phổ bẫy ion dùng 3 điện cực để bẫy ion trong một thể tích nhỏ. Ưu điểm của bộ phân tích bẫy ion gồm kích thước nhỏ và khả năng bẫy và tập trung ion làm tăng tỷ số tín hiệu / độ nhiễu của phép đo. Bẫy ion thích hợp để phân tích các chất tương đối tinh khiết. Có thể thực hiện khối phổ nhiều lần.

c) Bộ phân tích khối phổ cung từ (magnetic-sector mass spectrometry): Là bộ phân tích đắt tiền nhưng khả năng tách cao, thường dùng phân tích dioscin, dopping, thích hợp cho phân tích các chất đồng phân. Kích thước rất to.



Hình 27: Sơ đồ cấu tạo bộ phân tích cung từ [Brain M. Tissue, 17/9/2003: www. chem.vt.edu/chem-ed/ms/mag-sect.html]

Ghi chú: - Ion source: Nguồn ion.
- Magnet: Từ.
- Ion optics: Thấu kính ion.
- Ion detector: Phát hiện ion.
- Counter or electrometer: Tĩnh điện kế.

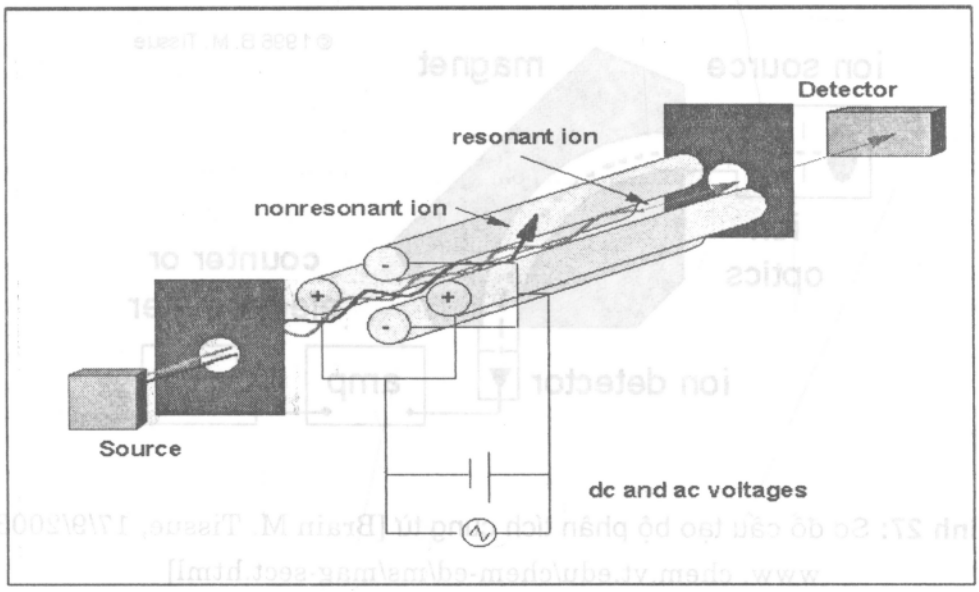
d) Bộ phân tích khối tứ cực (Quadrupole Mass Spectrometry):

Bộ lọc khối tứ cực bao gồm 4 thỏi kim loại song song với nhau như hình 15. Hai thỏi kim loại đối nhau có điện thế sử dụng = U + Vcos (wt) và hai thỏi khác có điện thế sử dụng = – (U + Vcos (wt)), trong đó U là dc điện thế và Vcos(wt) là ac điện thế. Điện thế sử dụng tác động đến đường đi của các ion giữa 4 thỏi kim loại. Với một điện thế dc và ac đã cho, chỉ có những ion của một tỷ lệ khối lượng /

điện tử nhất định đi qua được bộ lọc tứ cực, còn tất cả các ion khác bị bật ra ngoài đường đi của chúng. Phổ khối thu được bằng cách ghi lại sự di chuyển của các ion qua bộ lọc tứ cực như là sự dao động của điện thế trên các thỏi kim loại. Có hai phương pháp: w – thay đổi, U không thay đổi và V cố định hoặc U thay đổi, V cố định và w – là hằng số.

Cấu tạo của bộ tứ cực bao gồm (hình 28):

- Nguồn ion
- Thấu kính ion để tăng tốc và hướng các ion đi qua khe hở vào bộ lọc tứ cực.
- Bộ lọc tứ cực có thiết bị kiểm tra điện thế.
- Khe vào.
- Phát hiện ion.
- Phát hiện điện tử.
- Hệ thống chân không cao



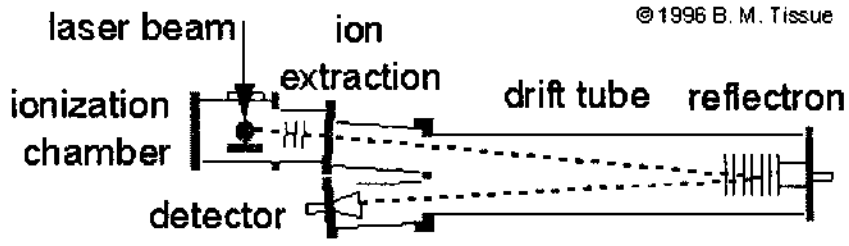
Hình 28: Sơ đồ cấu tạo bộ phân tích khối phổ khối tứ cực [Brain M. Tissue, 17/9/2003: www. chem.vt.edu/chem-ed/ms/quadrupo.html]

Ghi chú: - Source: Nguồn.
- Nonresonant ion: Ion không cộng hưởng.
- Detector: Detector (phát hiện).
- Resonant ion: Ion cộng hưởng.
- dc and ac voltages: Điện thế dc và ac

Ưu điểm của bộ phân tích tứ cực: Đơn giản, rẻ tiền nhưng chỉ thực hiện được khối phổ một lần. Bộ phân tích tứ cực thích hợp cho phân tích các thành phần trong hỗn hợp các chất chưa tinh khiết.

e) Bộ phân tích khối phổ thời gian bay (Time-of-Flight Mass Spectrometry (TOF-MS)

Bộ phân tích khối phổ thời gian bay sử dụng sự khác nhau về thời gian di chuyển qua vùng đàn hồi để tách các ion có khối lượng khác nhau. Nó hoạt động theo kiểu xung điện vì vậy ion phải được tạo ra dưới dạng xung điện.



Hình 29: Sơ đồ cấu tạo bộ phân tích khối phổ thời gian bay

[Brain M. Tissue, 17/9/2003: www. chem.vt.edu/chem-ed/ms/tof.html]

Ghi chú: - Laser beam: Tia laser.
- Ionization chamber: Buồng ion hoá.
- Ion extraction: Tách ion.
- Detector: Detector.
- Drift tube: Ống thu.
- Reflectron: Phản xạ.

Cấu tạo bộ phân tích khối phổ thời gian bay trình bày ở hình 16 cho thấy các ion được tách ra từ mẫu rắn bằng xung laser. Vật phản xạ là hàng loạt các vòng tròn hoạt động như một cái gương. Gương này bổ chính cho sự phân bố năng lượng động học của các ion ngay khi chúng vào vùng đàn hồi và cải thiện độ phân giải của máy. Đầu ra của detector – ion được nối với máy ghi dao động như chức năng của thời gian để vẽ phổ khối lượng.

f) Phương pháp ion hoá trong khối phổ

• Phương pháp ion hoá hoá học (Chemical ionization: CI): Ion hoá học sử dụng thuốc thử ion để phản ứng với phân tử phân tích, tạo ra các ion bằng một proton hoặc sự di chuyển lai hoá.

• Phương pháp ion hoá va chạm điện tử (Electron impact: EI): Phương pháp ion hoá va chạm điện tử sử dụng một chùm tia điện tử, thường được tạo ra từ sợi giây tóc tungsten, để ion hoá pha khí nguyên tử hoặc phân tử. Một điện tử từ chùm tia va chạm vào một điện tử từ nguyên tử của chất phân tích hoặc một phân tử tạo ra các ion.

3.3. Các đại lượng đặc trưng của sắc ký khí

3.3.1. Số đĩa lý thuyết

Số đĩa lý thuyết (n) được xác định trên một đơn vị độ dài của cột (tính bằng mét) hoặc số đĩa lý thuyết trên toàn cột.

Số đĩa lý thuyết (n) trên một mét của cột được tính toán từ số liệu thu được trong điều kiện đẳng nhiệt bằng biểu thức:

$$n = \frac{5,54 \times t_r^2}{L \times W_h^2}$$

trong đó:

t_r - khoảng cách dọc theo đường nền của sắc ký đồ tính từ lúc bắt đầu tiêm mẫu đến chân đường vuông góc hạ từ cực đại của pic cần quan tâm;

L - chiều dài cột, tính bằng mét;

W_h - độ rộng của pic cần quan tâm ở nửa chiều cao pic, đơn vị giống t_r.

Số đĩa lý thuyết trên một cột (gọi tắt là đĩa lý thuyết) được tính toán từ số liệu thu được trong điều kiện đẳng nhiệt bằng biểu thức:

$$n = \frac{5,54 \times t_r^2}{W_h^2}$$

3.3.2. Hệ số dung lượng

Khi hệ số dung lượng k' (cũng có thể hiểu là tỷ số phân bố khối lượng Dm) được xác định bằng biểu thức:

$$Dm = k' = K = \frac{Vs}{Vm} = \frac{Qs}{Qm}$$

trong đó: K - hằng số phân bố;

Vs - thể tích pha tĩnh;

Vm - thể tích pha động;

Qs - lượng chất trong pha tĩnh;

Qm - lượng chất trong pha động.

Hệ số dung lượng (tỷ số phân bố khối lượng) của một chất thành phần được xác định từ sắc đồ theo công thức:

$$k' = \frac{t_r - t_o}{t_o}$$

trong đó:

t_g - khoảng cách dọc theo đường nền từ lúc bắt đầu tiêm mẫu đến chân đường vuông góc hạ từ cực đại của pic cần quan tâm;

t_o - khoảng cách dọc theo đường nền từ lúc bắt đầu tiêm mẫu đến chân đường vuông góc hạ từ cực đại của thành phần không lưu giữ trên cột;

Các giá trị của t_g và t_o phải được biểu thị cùng một đơn vị.

3.3.3. Hệ số phân giải

Độ phân giải hay hệ số phân giải (R_s) giữa các pic định lượng trên sắc ký đồ phải lớn hơn 1,0. Hệ số này được tính bằng biểu thức:

$$R_s = \frac{1,18 \times (t_{rb} - t_{Ra})}{W_{ha} + W_{hb}}$$

trong đó:

- t_{rb} và t_{Ra} - các khoảng cách dọc theo đường nền tính từ lúc bắt đầu tiêm mẫu đến chân đường vuông góc hạ từ cực đại của pic liền kề nhau (a và b);
- W_{ha} và W_{hb} - độ rộng pic tương ứng đo ở một nửa chiều cao của pic.

Các giá trị t_{rb}, t_{Ra}, W_{ha} và W_{hb} phải được biểu thị theo cùng một đơn vị.

3.3.4. Hệ số đối xứng

Hệ số đối xứng của một pic được tính bằng biểu thức:

$$\frac{Wx}{2A}$$

trong đó:

- Wx - độ rộng đáy pic đo ở 1/20 chiều cao pic;
- A - khoảng cách từ đường vuông góc hạ từ cực đại của pic đến mép đường cong phía trước, ở tại 1/20 chiều cao pic.

Trong một số trường hợp cần tiến hành với chất chuẩn đối chiếu để xác định tỷ số giữa tín hiệu và nhiễu. Tỷ số này được tính theo công thức:

$$\frac{2H}{hn}$$

trong đó:

- H - chiều cao của pic của thành phần cần quan tâm trong sắc đồ thu được từ dung dịch đối chiếu quy định (pic C);
- hn - giá trị tuyệt đối của chiều cao nhiễu lớn nhất lệch khỏi đường nền trong khoảng sắc đồ thu được sau khi tiêm một dung dịch mẫu trắng. Khoảng sắc đồ cần quan sát có độ dài bằng 20 lần độ rộng đáy ở chiều cao của pic C và điểm giữa của nó là vị trí tương đương với vị trí của pic C (vị trí của pic thành phần cần quan tâm).

3.4. Phương pháp tiến hành sắc ký khí

Ổn định cột, buồng tiêm và detector ở nhiệt độ quy định.

Chuẩn bị các dung dịch mẫu thử và mẫu chuẩn theo quy định của chuyên luận trong Dược điển Việt Nam hiện hành hoặc các chuyên luận riêng. Dùng dung dịch chuẩn để xác định các điều kiện đo phù hợp đặt trên thiết bị và thể tích dung dịch mẫu tiêm cần dùng để tạo ra một đáp ứng phù hợp. Tiến hành các lần tiêm lặp lại để kiểm tra độ lặp lại của đáp ứng và kiểm tra số đĩa lý thuyết, nếu có yêu cầu.

Tiêm các dung dịch thử và ghi lại sắc đồ thu được. Tiến hành tiêm lại nhiều lần để kiểm tra độ lặp lại của đáp ứng. Xác định diện tích của các thành phần cần quan tâm. Cũng có thể xác định chiều cao của pic tương ứng với các thành phần của chất cần quan tâm khi hệ số đối xứng từ 0,80 đến 1,20. Từ những giá trị thu được tính ra hàm lượng của một thành phần hay nhiều thành phần có trong mẫu đem thử.

Khi dùng một chất làm chuẩn nội, pic của chất này không được che phủ pic của mẫu thử. Nếu có pic bị ảnh hưởng cần phải có sự bổ chính thích hợp. Trong những áp dụng có yêu cầu chương trình nhiệt độ, phải tính kết quả theo diện tích pic.

Trừ những chỉ dẫn khác quy định trong chuyên luận riêng, dùng nitrogen làm khí mang và detector ion hoá ngọn lửa. Thỉnh thoảng tiến hành thí nghiệm kiểm tra với chất đối chiếu và kỹ thuật tiêm trực tiếp vào cột (on – column), trong đó mẫu được tiêm trực tiếp vào chất nhồi cột, không sử dụng bộ chia dòng. Khi mẫu thử là nguyên liệu không bay hơi được tiêm vào cột, nên dùng tiền cột phù hợp, loại có thể thay đổi được.

Chương trình sắc ký riêng biệt có thể đòi hỏi những thay đổi về điều kiện chạy sắc ký đã ghi trong chuyên luận riêng. Trong những trường hợp như vậy cần đưa ra những thay đổi để có những kết quả sử dụng và tính toán được. Nếu cần thiết, chỉnh tốc độ dòng khí mang để thu được một sắc đồ đẹp hoặc để thay đổi thời gian lưu của pic quan tâm.

3.5. Thuốc thử dùng trong sắc ký khí

Các thuốc thử và các dung môi sử dụng trong việc chuẩn bị các dung dịch khảo sát cần có chất lượng phù hợp với quá trình phân tích trên SKK. Có rất nhiều chất hoá học được dùng làm pha tĩnh như các polyethylen glycol, các ester và các amid trọng lượng phân tử cao, các hydrocarbon, các silicon dạng gôm hay dạng lỏng (polysiloxan đã được thay bằng nhóm methyl, phenyl, nitril, vinyl

hoặc fluoroalkyl, hoặc hỗn hợp của chúng) và các vi hạt rỗng cấu tạo đa nhân thơm liên kết chéo. Pha tĩnh phù hợp khi nồng độ của nó, bản chất và bậc của chất mang rắn theo quy định của chuyên luận riêng.

3.6. Chuẩn nội

Các thuốc thử được dùng làm chuẩn nội không được chứa bất kỳ tạp chất nào gây ra các pic có ảnh hưởng tới việc xác định các thành phần của mẫu thử đã mô tả trong chuyên luận riêng.

3.7. Chuẩn hoá

Trong một số trường hợp cần tiến hành trên mẫu chuẩn để chuẩn hoá việc đánh giá một hoặc nhiều thành phần hoặc các chất liên quan. Trong những trường hợp này, diện tích toàn bộ của một pic hay các pic của các thành phần hoặc các chất có liên kết được biểu thị dưới dạng tỷ lệ phần trăm so với tổng diện tích của tất cả các pic thu được từ mẫu đem thử. Trong quá trình xác định cần sử dụng bộ khuếch đại để mở rộng thang đo và bộ tính tích phân tự động.

3.8. Ứng dụng sắc ký khí trong kiểm nghiệm dược liệu

3.8.1. Xác định hàm lượng các thành phần chính của tinh dầu bằng sắc ký khí

Để xác định các thành phần chính của tinh dầu, sử dụng detector ion hóa ngọn lửa, khí mang là nitrogen, cột mao quản hoặc cột nhồi. Tiến hành định lượng như mục 3.4. (Phương pháp tiến hành SKK).

3.8.2. Xác định hàm lượng nước trong dược liệu [Dược điển Trung Quốc 2000]

**** Điều kiện SKK:***

- Detector: Detector dẫn nhiệt.
- Cột: đường kính trong 0,18 - 0,25 mm, pha tĩnh: polymer ethylvinylbenzen liên kết divinylbenzen.
- Nhiệt độ cột: 140 - 150°C.
- Số đĩa lý thuyết cột tính cho pic nước: không dưới 3.000.
- Số đĩa lý thuyết cột tính cho pic ethanol: không dưới 200.
- Độ phân giải của pic nước và pic ethanol: không lớn hơn 2.
- Tiêm năm lần mẫu ethanol tuyệt đối.
- RSD của diện tích pic nước: không lớn hơn 2,0%.

**** Chuẩn bị dung dịch chuẩn:***

Cân chính xác 0,2 g nước tinh khiết vào bình định mức dung tích 25 ml, thêm ethanol tuyệt đối đến 25 ml, lắc kỹ.

**** Chuẩn bị dung dịch thử:***

Cân chính xác mẫu thử chứa 0,2 g nước vào bình nón, thêm cẩn thận 50 ml ethanol tuyệt đối, lắc kỹ. Siêu âm trong 20 phút và để yên trong 12 giờ. Sau đó lại siêu âm trong 20 phút. Phần dịch nổi được dùng làm dung dịch thử.

**** Cách tiến hành:***

Lấy chính xác 5 µl ethanol tuyệt đối, dung dịch chuẩn và dung dịch thử. Tiêm mẫu vào cột, xác định và tính hàm lượng.

Chú ý: (1) Ethanol tuyệt đối chứa 0,3% nước. Vì vậy khi chuẩn bị mẫu chuẩn và mẫu thử phải dùng ethanol cùng lô sản xuất.

(2) Hàm lượng nước được xác định bằng phương pháp chuẩn ngoại. Vì ethanol được dùng làm dung môi nên khi tính kết quả phải trừ đi hàm lượng nước trong ethanol như sau:

Diện tích của pic nước trong mẫu chuẩn = tổng diện tích của pic nước trong mẫu chuẩn – K × diện tích của pic nước trong mẫu chuẩn.

Diện tích pic nước trong mẫu thử = tổng diện tích của pic nước trong mẫu thử – k × diện tích pic nước trong mẫu thử.

$$K = \frac{\text{Diện tích pic nước trong ethanol tuyệt đối}}{\text{Diện tích ethanol trong ethanol tuyệt đối}}$$

3.8.3. Xác định hàm lượng ethanol [Dược điển Trung Quốc 2000]

**** Điều kiện SKK:***

- Detector: Detector ion hoá ngọn lửa.
- Cột: đường kính trong 0,18 - 0,25 mm, pha tĩnh: polymer ethylvinylbenzen liên kết divinylbenzen.
- Nhiệt độ cột: 120 – 150°C.
- Số đĩa lý thuyết cột tính cho pic *n*-propanol: không dưới 700.
- Độ phân giải của pic ethanol và pic propanol: không ít hơn 2.

**** Ổn định máy SKK:*** Lấy chính xác 4, 5, 6 ml ethanol đã loại nước, thêm 5 ml *n*-propanol (là chuẩn nội) và thêm nước đến 100 ml, lắc đều (tiếp tục hoà loãng nêu cần thiết). Tiến hành sắc ký để đạt được các điều kiện sắc ký như trên.

**** Chuẩn bị mẫu chuẩn:*** Lấy chính xác 5 ml mỗi loại ethanol đã loại nước

và *n*-propanol, chỉnh nhiệt độ về 20°C. Thêm nước đến 100 ml và lắc đều.

**** Chuẩn bị mẫu thử:*** Lấy chính xác một lượng dung dịch mẫu thử (~ 5 ml ethanol) và 5 ml *n*-propanol. Thêm nước đến 100 ml và lắc đều. Mẫu thử và mẫu chuẩn tiếp tục hoà loãng nếu cần.

**** Tiến hành sắc ký:*** Tiêm 3 mẫu chuẩn, tiếp sau là tiêm 3 mẫu thử. Tính gía trị trung bình của hệ số hiệu chỉnh thu được từ 3 lần tiêm mẫu thử.

**** Chú ý:*** (1) Phải chắc chắn rằng không có pic của tạp chất trùng với pic nội chuẩn xuất hiện trên sắc ký đồ của mẫu thử khi không có nội chuẩn.

(2) Sự dao động tương đối của gía trị mỗi lần đo của yếu tố hiệu chỉnh và hàm lượng ethanol không được lớn hơn 1,5% của giá trị trung bình tương ứng. Nếu không phải làm lại.

3.8.4. Xác định dư lượng thuốc bảo vệ thực vật cơ clo [Dược điển Trung Quốc 2000]

**** Điều kiện SKK:***

- Detector: Detector cộng kết điện tử.

- Cột mao quản thạch anh: đường kính trong 0,25 μm; dài 30 m;

Pha tĩnh: 5% diphenyl 95% dimethylpolysiloxan (SE-54) hoặc14% cyano-propylphenyl-86% dimethylpolysiloxan (DB-1701).

- Nhiệt độ cổng tiêm: 230°C.

- Nhiệt độ detector: 300°C.

- Nhiệt độ lò: từ 100°C tăng dần đến 220°C với tốc độ tăng 10 độ trong 1 phút. Sau đó tăng đến 250°C với tốc độ tăng 8 độ/phút.

- Cổng bơm không chia.

- Số đĩa lý thuyết cột tính cho pic α-BHC: không dưới 10^6.

- Độ phân giải giữa các pic: không quá 1,5.

**** Chuẩn bị mẫu chuẩn bảo quản:***

Cân chính xác một lượng các thuốc bảo vệ thực vật (TBVTV) sau:

- Hexaclorocyclohexan [BHC (α-BHC , β-BHC, γ-BHC, δ-BHC)].

- Chlorophenothan [DDT (*pp*'-D DE, *pp*'-DD, *op*'-DDT, *pp*'-DDT)] chuẩn.

- Pentacloride nitrobenzen (PCNB) chuẩn.

Hoà các mẫu TBVTV trên trong ether dầu (60 - 90°C). Thu được dung dịch chứa 4 - 5 μg/ml.

**** Chuẩn bị hỗn hợp các dung dịch chuẩn bảo quản:***

Hút chính xác 0,5 ml mỗi loại dung dịch chuẩn bảo quản trên vào bình định mức 10 ml. Hoà loãng bằng ether dầu (60 - 90^{0}C) đến vạch và lắc đều.

**** Chuẩn bị hỗn hợp các dung dịch chuẩn:***

Hút chính xác các hỗn hợp dung dịch chuẩn bảo quản, hoà loãng bằng ether dầu (60 - 90°C) để được một loạt dung dịch chứa: 0 µg, 1 µg, 5 µg, 10 µg, 50 µg, 100 µg, 500 µg /lit.

**** Chuẩn bị mẫu thử từ dược liệu:***

Cân chính xác 2 gam dược liệu, đã được làm khô ở 60°C trong 4 giờ và nghiền kỹ, cho vào bình tam giác dung tích 100 ml có giá đỡ. Ngâm dược liệu trong 20 ml nước 1 đêm. Thêm cẩn thận 40 ml aceton, cân, siêu âm trong 30 phút, làm lạnh. Thêm aceton đến trọng lượng ban đầu. Thêm 6 g natri clorid và 30 ml (đo chính xác) methylen clorid, để tách lớp. Chuyển nhanh lớp hữu cơ vào bình nón dung tích 100 ml có chứa natri sulfat khan. Để yên 4 giờ.

Hút chính xác 35 ml, bốc hơi dung môi trong chân không đến gần khô ở 40°C. Thêm một lượng ether dầu (60 - 90°C) vào cắn. Nhắc lại bốc hơi dung môi như trên đến kiệt aceton và methylen clorid.

Hoà cắn trong ether dầu (60 - 90°C) và chuyển vào ống ly tâm. Hoà loãng bằng ether dầu (60 - 90°C) đến 5 ml. Cho cẩn thận 1 ml H_2SO_4, lắc trong 1 phút, ly tâm (3.000 vòng/phút) trong 10 phút.

Hút chính xác 2 ml dịch nổi vào bình làm đậm đặc có chia độ. Làm đậm đặc trong chân không ở dưới 40°C (hoặc bằng nitrogen) đến một lượng và hoà loãng đến 1 ml.

**** Chuẩn bị mẫu thuốc đông dược và các chế phẩm từ dược liệu:***

Cân chính xác một lượng (tương đương 2 gam dược liệu) nghiền đến bột mịn (cắt nhỏ nếu là hoàn hoặc hút trực tiếp nếu là thuốc lỏng). Tiến hành như mục chuẩn bị dung dịch thử từ dược liệu.

**** Tiến hành sắc ký:***

Bơm cẩn thận 1 µl mỗi loại dung dịch thử và hỗn hợp dung dịch chuẩn, tương đương nồng độ, vào cột (3 lần nhắc lại). Xác định giá trị trung bình và tính hàm lượng thuốc BVTV tồn dư bằng phương pháp chuẩn ngoại.

3.8.5. Xác định dư lượng thuốc bảo vệ thực vật cơ phosphor [5, 6]

**** Điều kiện SKK:***

- Detector: Detector ion hoá ngọn lửa phosphor (P-FID).
- Cột thuỷ tinh: đường kính trong 2 µm; dài 1,2 m;

- Khí mang: Khí nitrogen với tốc độ dòng là 30 ml/phút.
- Nhiệt độ cổng tiêm: 230°C.
- Nhiệt độ detector: 300°C.
- Cổng bơm không chia.

**** Chuẩn bị dung dịch chuẩn (S_2) của các TBVT:***

Cân chính xác 0,040 g mỗi loại: desmetrin, prometrin và simazin, hoà trong aceton được 100 ml. Lấy chính xác 5 ml mỗi loại vào bình định mức dung tích 100 ml và thêm aceton đến vạch chuẩn, được dung dịch chuẩn S_2.

**** Chuẩn bị mẫu thử từ dược liệu:***

Cân 10 g bột dược liệu vào bình nón dung tích 500 ml, thêm vào đó 125 ml cloroform. Lắc trong 60 phút và lọc dưới áp suất giảm qua giấy lọc vào bình cầu đáy tròn. Rửa bã dược liệu 3 × 25 ml cloroform.

Tập hợp dịch chiết và bốc hơi dung môi trong chân không và trên bếp cách thuỷ ở 40°C. Chuyển dịch chiết vào cột sắc ký để tinh chế, rửa bình cầu bằng 5 ml cloroform × 2 lần.

**** Tinh chế dịch chiết từ dược liệu bằng sắc ký cột:***

Chuẩn bị cột sắc ký: Dùng cột thuỷ tinh đường kính trong 20 - 22 mm có màng lọc thuỷ tinh G4 và có khoá. Rót cloroform vào đầy cột, sau đó rót nhôm ô xyd để tạo thành một lớp dầy 100 mm.

- Tinh chế bước 1: Sau khi rót dịch chiết dược liệu và dịch rửa bình cầu vào cột, tiến hành rửa cột bằng cloroform, với tốc độ rửa 1 - 2 giọt/giây, thu được 150 ml cloroform. Thu dịch cloroform vào bình cầu đáy tròn. Quá trình tinh chế bước một kết thúc khi không còn giọt dung môi nào chảy ra từ cột. Bốc hơi dung môi trong chân không và trên bếp cách thuỷ ở 40°C.

- Tinh chế bước 2: Thêm 10 ml ether dầu vào cắn và chuyển hỗn hợp vào cột sắc ký chứa nhôm oxyd dày 50 mm trong ether dầu. Rửa cột bằng 90 ml ether dầu, dùng dịch này để tráng bình cầu, với tốc độ rửa 1 - 2 giọt / giây. Bỏ dịch rửa giải.

Hoà cặn còn lại trong bình cầu bằng 10 ml hỗn hợp gồm 60 thể tích chloroform và 40 thể tích ether dầu. Chuyển dung dịch vào cột. Rửa bình cầu 2 lần × 10 ml hỗn hợp dung môi trên và chuyển dịch rửa vào cột. Rửa cột bằng 120 ml hỗn hợp dung môi trên vào bình cầu đáy tròn. Quá trình tinh chế bước hai kết thúc khi không còn giọt dung môi nào chảy ra từ cột.

Bốc hơi dung môi trong chân không và trên bếp cách thuỷ ở 40°C.

Chuẩn bị dung dịch thử từ dược liệu cho SKK bằng cách hoà cắn trên trong aceton thu được thể tích 10 ml. dung dịch này dùng tiêm vào SKK nếu không đòi

hỏi tinh chế đặc biệt.

**** Tinh chế đặc biệt dịch chiết dược liệu cho SKK:***

Bốc hơi dung môi của dịch rửa giải trong chân không và trên bếp cách thuỷ ở 40°C. Cho vào cắn thu được 10 ml ether dầu và 10 ml dimethyl sulfoxid. Lắc hỗn hợp và chuyển vào bình lắng gạn. Gạn lấy lớp dimethyl sulfoxid và chiết 2 lần × 10 ml ether dầu. Bỏ dịch ether dầu. Thêm 100 ml nước vào lớp dimethyl sulfoxid và chiết 3 × 20 ml cloroform. Tập hợp dịch chiết cloroform và rửa 2 lần × 20 ml nước. Bốc hơi dung môi trong chân không và trên bếp cách thuỷ ở 40°C. Chuyển cắn vào bình lắng gạn bằng hỗn hợp gồm 10 ml ether dầu và 10 ml HCl (1 mol/l). Chiết với 10 ml, sau đó 5 ml HCl (1 mol/l). Bỏ lớp ether dầu. Chỉnh pH của dung dịch đến giá trị giữa 7 và 8 bằng dung dịch NaOH (1 mol/l). Chiết dung dịch 3 lần × 20 ml cloroform. Làm khô dịch cloroform bằng Na_2SO_4 khan. Lọc vào bình cầu đáy tròn, rửa bình lắng gạn 3 lần × 10 ml cloroform. Bốc hơi dung môi trong chân không và trên bếp cách thuỷ ở 40°C.

Hoà cắn trong aceton đến thể tích 10 ml. Dung dịch này dùng cho phân tích bằng SKK.

Quy trình tinh chế trên áp dụng cho các dược liệu có tên trong bảng sau:

No	Tên dược liệu	No	Tên dược liệu
1	Flores Calendulae	10	Fructus Foeniculi
2	Flores Chamomolae	11	Herba Milefolii
3	Folia Melissae	12	Herba Plantagilis anceolatae
4	Folia Menthae piperatae	13	Radix Althaeae
5	Folia Salviae	14	Radix Angelicae
6	Folia Thymi	15	Radix Levistici
7	Fructus Carvi	16	Radix Petroselini
8	Fructus Coriandri	17	Radix Valerianae
9	Fructus Cynobasti		

Ghi chú: Các dược liệu số 1 - 2: yêu cầu quy trình tinh chế đặc biệt.

- Các dược liệu 3 - 17: tinh chế bình thường như các bước 1 và 2.

**** Tiến hành sắc ký khí:***

- Lấy 1 ml dung dịch chuẩn S_2 hoà loãng đến 10 ml bằng aceton và tiêm dung dịch này vào máy. Trên sắc ký đồ các pic lần lượt tương ứng với: Prometryn, Simazin, Desmetryn.

- Tiêm các dung dịch mẫu thử tinh chế hoặc tinh chế đặc biệt vào máy. Hàm lượng các TBVTV trong dược liệu được xác định bằng phương pháp chuẩn ngoại.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. *Brain M. Tissue*. Trang Web về sắc ký khí: http://www.chem.vt.edu/chem-ed.html. cập nhật đến ngày 17 tháng 9 năm 2003.
2. Dược điển Việt Nam (2003) in lần thứ 3, Hà Nội.
3. *Thomas G. Chasteen*. Trang Web về sắc ký khí: http://www.chem.vt.edu/chem.ed.html cập nhật đến ngày 17 tháng 9 năm 2003.
4. Pharmacopoeia of the People's Republic of China. (English Edition 2000), vol. I. Chemical Industry Press.
5. *World Health Organization* (1998): Quality control methods for medicinal plant materials. Geneva,.
6. *The World Health Organization* (1998); The International Pharmacopoeia, third edition. 1979 (223 pages). Vol. I: General methods of analysis..

IV. PHƯƠNG PHÁP SẮC KÝ LỎNG HIỆU NĂNG CAO

4.1. Nguyên tắc

Sắc ký lỏng (SKL) hiệu năng cao là phương pháp tách trong đó pha động là một chất lỏng, còn pha tĩnh - chứa trong cột - là một chất rắn đã phân chia dưới dạng tiểu phân, hoặc là một chất lỏng phủ trên một chất mang rắn, hay một chất mang rắn đã được biến đổi bằng liên kết hoá học với các nhóm hữu cơ. Quá trình SKL dựa trên cơ chế hấp phụ, phân bố, trao đổi ion hay loại trừ theo kích cỡ.

SKL hiệu năng cao là 1 dạng của SKL để tách các thành phần tan được trong dung môi.

SKL là kỹ thuật sắc ký dùng để tách các ion hoặc các phân tử hoà tan trong dung môi. Nếu dung dịch mẫu tiếp xúc với một pha rắn hoặc lỏng thứ hai, thì các chất tan khác nhau sẽ tương tác với pha khác với các mức độ khác nhau nhờ sự khác nhau về sự hấp phụ, trao đổi ion, phân bố hoặc kích thước của chúng. Các sự khác nhau này làm cho các thành phần của hỗn hợp được tách ra khi chúng đi qua cột với thời gian khác nhau. Nói cách khác, các chất hoà tan trong dung môi lưu lại trong cột với thời gian khác nhau - gọi là thời gian lưu.

SKL đơn giản gồm có 1 cột có đáy xốp chứa một pha tĩnh cân bằng với một dung môi. Các pha tĩnh điển hình và tương tác với các chất phân tích là các chất rắn (hấp phụ), các ion trên nhựa (trao đổi ion), chất lỏng tráng trên giá thể rắn

trơ (phân bố). Hỗn hợp các chất phân tích được đổ vào cột, mở khoá cho dung môi chảy. Các thành phần của hỗn hợp đi qua cột với tốc độ khác nhau nhờ đặc điểm phân bố khác nhau giữa pha tĩnh và pha động. Các thành phần tách ra được rửa giải cùng dung môi và chảy ra từ cột như một hàm số của thời gian. SKL được dùng ở quy mô điều chế để tinh chế hoặc tách một số thành phần từ hỗn hợp các chất.

Việc tách các thành phần của dung dịch để phát hiện hoặc định lượng người ta sử dụng kỹ thuật thích hợp hơn đó là SKL hiệu năng cao. Trong SKL hiệu năng cao người ta dùng bơm để đẩy dung môi đi nhanh hơn và cho độ phân giải cao hơn với thời gian phân tích nhanh hơn. Dung môi dùng trong SKL hiệu năng cao phải được loại khí trước khi sử dụng để tránh tạo bọt khí. Bơm cung cấp chân không cao, ổn định, không rung và có thể đặt chương trình thay đổi tỷ lệ dung môi khác nhau trong quá trình tách. SKL hiệu năng cao là một tiến bộ kỹ thuật trong lĩnh vực phân tích định tính và định lượng các thành phần cũng như điều chế và tinh chế các chất tinh khiết từ hỗn hợp.

4.2. Thiết bị

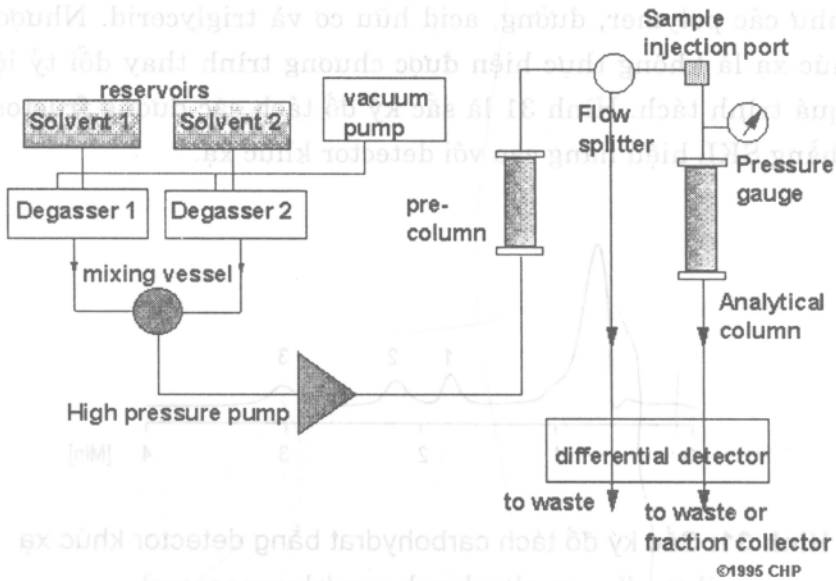
Thiết bị SKL hiệu năng cao gồm:

- Hệ thống bơm.
- Bộ phận tiêm mẫu (bơm tiêm hoặc van tiêm).
- Cột sắc ký.
- Detector.
- Máy ghi.

Sơ đồ cấu tạo SKL hiệu năng cao được trình bày ở hình 30.

4.3. Các loại detector

Trong nhiều năm, SKL hiệu năng cao đã và đang là một phương pháp được lựa chọn để tách và định lượng các thành phần phân cực và không bay hơi. Mặc dù thời gian lưu trong cột là một đại lượng chính được dùng để nhận dạng các chất phân tích nhưng sự phức tạp của thành phần các mẫu phân tích đòi hỏi sự khẳng định việc nhận dạng các chất thông qua các pic tương ứng bằng các thông tin định tính. Vì vậy, cần có các loại detector "đặc hiệu" ứng với các đặc điểm hóa lý đặc trưng của các thành phần, giúp cho việc nhận dạng các pic chính xác hơn. Việc phát hiện các chất được dựa trên đặc điểm hóa lý của chúng và ứng với mỗi đặc điểm là một loại detector.



Hình 30: Sơ đồ cấu tạo SKL hiệu năng cao

[Brain M. Tissue. 17/9/2003:
http://www.chem.vt.edu/chem-ed/sep/lc/hplc.html]

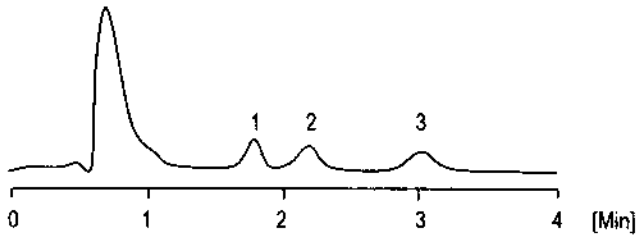
Ghi chú: - Reservoirs: Các bình chứa dung môi.
- Solvent 1: Dung môi 1.
- Solvent 2: Dung môi 2.
- Vacuum pump: Bơm chân không.
- Degasser 1: Loại khí 1.
- Degasser 2: Loại khí 2.
- Mixing vessel: Bình trộn.
- High pressure pump: Bơm áp suất cao.
- Precolumn: Tiền cột.
- Sample injection port: Cổng tiêm mẫu.
- Flow splitter: Chia dòng.
- Pressure gauge: Áp kế.
- Analytical column: Cột phân tích.
- Differential detector: Phát hiện
- To waste: Thải.
- To waste or fraction collector: Thải hoặc đến bình thu các phân đoạn.

Sự di chuyển của các chất phân tích theo dòng dung môi chảy trong cột được phát hiện như một sự thay đổi của các đặc điểm hóa lý của chúng: Sự thay đổi chỉ số khúc xạ (detector khúc xạ), sự hấp thụ trong vùng tử ngoại - khả kiến ở một bước sóng đã đặt (detector UV - VIS), sự huỳnh quang sau khi được kích thích ở một bước sóng thích hợp (detector huỳnh quang), một đáp ứng điện hoá (detector điện hoá), hoặc một tín hiệu điện của ánh sáng tán xạ khi các hạt sương mù của chất phân tích đi qua (detector tán xạ ánh sáng bay hơi).

4.3.1. Detector khúc xạ (Refractive Index Detector)

Detector khúc xạ là detetor có độ ổn định và độ nhạy cao được nối với SKL để phát hiện các thành phần không hấp thụ hoặc hấp thụ yếu ở vùng tử ngoại -

khả kiến, như các polymer, đường, acid hữu cơ và triglycerid. Nhược điểm của detector khúc xạ là không thực hiện được chương trình thay đổi tỷ lệ các dung môi trong quá trình tách. Hình 31 là sắc ký đồ tách các đường fructose, glucose và sucrose bằng SKL hiệu năng cao với detector khúc xạ.



Hình 31: Sắc ký đồ tách carbohydrat bằng detector khúc xạ
[http://www.altechweb.com/chromaccess].
Pic 1: Fructose (10 µl -166ppm).
Pic 2: Glucose (10 µl -166ppm).
Pic 3: Sucrose (10 µl -166ppm).

- Cột: Prevail carbohydrate ES, 5 µ, 53 × 7 mm.
- Pha động: 75 : 25 (acetonitril: nước).
- Tốc độ dòng: 2,0 ml/phút.
- Phát hiện: Detector khúc xạ.

4.3.2. Detector huỳnh quang (Fluorescence detector)

Detector huỳnh quang là detector để phát hiện các chất có khả năng phát quang sau khi được kích thích ở một bước sóng nhất định. Khoảng quét từ 200 nm đến 650 nm, có thể mở rộng đến 800 nm, quét với tốc độ cao ở hai bước sóng kích thích và phát xạ. Các detector huỳnh quang đời mới có thể đặt chương trình thời gian cho các lamda max kích thích và phát xạ, tối ưu hoá độ chọn lọc và độ nhạy. Có bộ dò điện tử, có thể phát xạ: huỳnh quang, phosphor và quang hóa học.

4.3.3. Detector tử ngoại khả kiến (UV-VIS detector) và detector chùm tia quang diod (Detector photodiod array)

Detector tử ngoại - khả kiến và detector chùm tia quang diod được kết nối với SKL hiệu năng cao để phát hiện các chất có đỉnh hấp thụ cực đại trong vùng tử ngoại - khả kiến. Có 2 loại detector UV-VIS: Loại một chùm tia và loại 2 chùm tia.

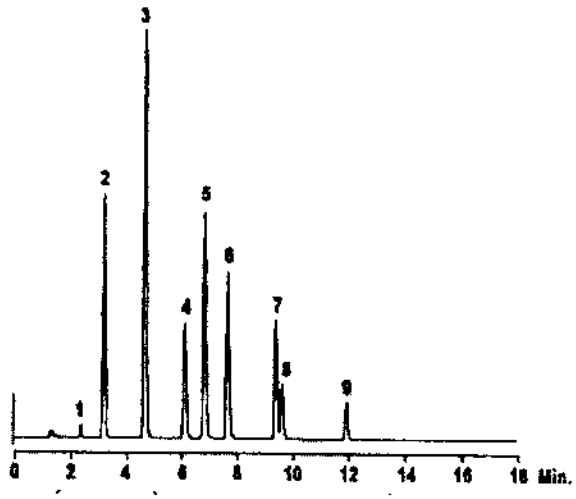
Khoảng bước sóng quét: - Đèn deuterium quét từ 190 - 365 nm.

- Đèn tungsten quét: 366 - 800 nm.

Có thể đặt chế độ quét đồng thời nhiều bước sóng.

Detector tử ngoại - khả kiến và detector chùm tia quang diod là các detector được sử dụng nhiều nhất trong phân tích phát hiện và điều chế các hợp chất thiên nhiên thuộc nhiều nhóm chất khác nhau:

- Acid béo (hình 32).
- Acid nhân thơm (hình 33).
- Flavonoid (hình 34).
- Protein (hình 35).
- Thuốc diệt cỏ (hình 36).
- Thuốc bảo vệ thực vật cơ phosphor (hình 37).
- Các độc tố aflatoxin (hình 38).



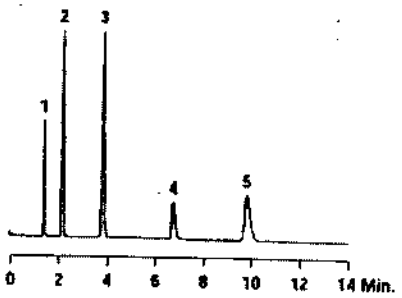
Hình 32: Sắc ký đồ tách acid béo bằng detector UV-VIS [http://www.altechweb.com/chromaccess]:

1. Caprylic acid (1,9 mg/ml).
2. Capric acid (1,8 mg/ml);
3. Lauric acid (1,9 mg/ml);
4. Linolenic acid (0,7 mg/ml);
5. Myristic acid (1,4 mg/ml);
6. Linoleic acid (0,6 mg/ml);
7. Palmitic acid (1,0 mg/ml);
8. Oleic acid (0,8 mg/ml);
9. Stearic acid (0,4 mg/ml);

- Cột: Altima HP C_{18} Hiload, 5 µ, 150 × 4,6 mm.
- Pha động: A: 0,1% TFA /H_2O; B: 0,1% TFA / acetonitril.

(thời gian, % B), (0, 80), (10, 100), (20, 100).

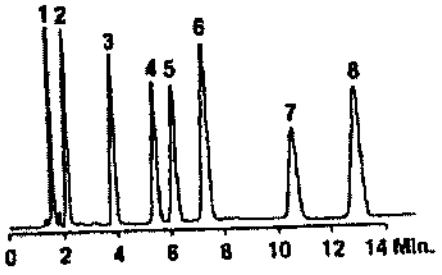
- Tốc độ dòng: 1,0 ml/phút. - Phát hiện: ở bước sóng 220 nm.



Hình 33: Sắc ký đồ tách acid nhân thơm bằng detector UV-VIS [http://www.altechweb.com/chromaccess]:

1. 3-Amino-4-hydroxybenzoic acid;
2. 4-Hydroxybenzoic acid;
3. Benzoic acid;
4. 4-Phenylbutyric acid;
5. 5-Phenylbutyric acid;

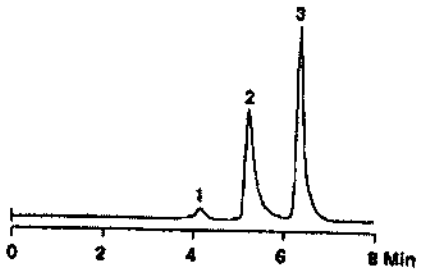
- Cột: Prevail organic acid, 5 µ, 150 × 4,6 mm.
- Pha động: (60: 40) 25 mM KH_2PO_4, pH 2,5: acetonitril.
- Tốc độ dòng: 1,0 ml/phút.
- Phát hiện: ở bước sóng 254 nm.



Hình 34: Sắc ký đồ tách flavonoid bằng detector UV-VIS [http://www.altechweb.com/chromaccess]:

1. Troxerutin (0,2 mg/ml);
2. Rutin (0,2 mg/ml);
3. Fisetin (0,2 mg/ml);
4. Morin (0,2 mg/ml);
5. Luteolin (0,2 mg/ml);
6. Quercetin (0,2 mg/ml);
7. Kaempferol (0,2 mg/ml);
8. Chrysin (0,2 mg/ml);

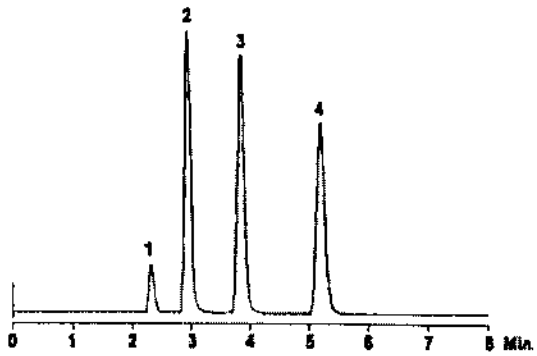
- Cột: Inertsil ODS-3, 5 µ, 150 × 4,6 mm.
- Pha động: (30: 20: 50) Methanol: Tetrahydrofuran: 0,2M NaH_2PO_4, pH 3.
- Tốc độ dòng: 1,0 ml/phút.
- Phát hiện: ở bước sóng 254 nm.



Hình 35: Sắc ký đồ tách protein bằng detector UV-VIS [http://www.altechweb.com/chromaccess]:

1. Thyroglobulin. 2. Beta-Lactoglobulin A. 3. GLY-TYR.

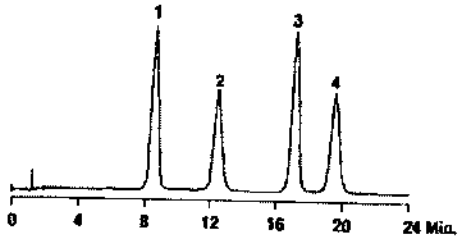
- Cột: Macrosphere GPC 300A, 250 × 4,6 mm.
- Pha động: 25 mM K_2HPO_4 , pH 7,0.
- Tốc độ dòng: 0,5 ml/phút.
- Phát hiện: ở bước sóng 220 nm.



Hình 36: Sắc ký đồ tách thuốc bảo vệ thực vật (TBVTV) bằng detector UV-VIS [http://www.altechweb.com/chromaccess].

1. Fenuron (62,5 µg/ml). 3. Diuron (62,5 µg/ml).
2. Monuron (62,5 µg/ml). 4. Linuron (62,5 µg/ml).

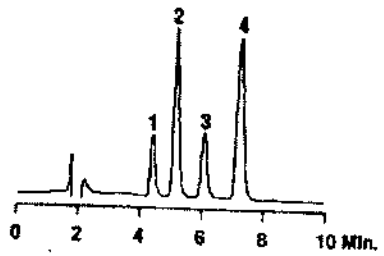
- Cột: Altima HP CN, 5 µ, 150 × 4,6 mm.
- Pha động: (60 : 40) nước: acetonitril.
- Tốc độ dòng: 1,0 ml/phút.
- Phát hiện: ở bước sóng 254 nm.



Hình 37: Sắc ký đồ tách thuốc BVTV cơ phosphor bằng detector UV-VIS [http://www.altechweb.com/chromaccess]:

1. Methyl parathion. 2. Diclorvos. 3. Ethoprophos. 4. Azinphos.

- Cột: Altima HP EPS C_{18} , 5 µ, 150 × 4,6 mm.
- Pha động: (60: 40) methanol: nước.
- Tốc độ dòng: 1,0 ml/phút.
- Phát hiện: ở bước sóng 214 nm.



Hình 38: Sắc ký đồ tách aflatoxin bằng detector UV-VIS [http://www.altechweb.com/chromaccess]:

1. Aflatoxin G2 (0,06 µg/ml). 3. Aflatoxin B2 (0,06 µg/ml).
2. Aflatoxin G1 (0,20 µg/ml). 4. Aflatoxin B1 (0,20 µg/ml).

- Cột:I nertsil ODS-3V, 5 µ, 150 × 4,6 mm.
- Pha động: (50: 50) methanol: nước.
- Tốc độ dòng: 1,0 ml/phút.
- Phát hiện: ở bước sóng 365 nm.

4.3.4. Detector tán xạ ánh sáng bay hơi (Evaporative light scattering detector)

Detector tán xạ ánh sáng bay hơi là loại detector mới đa chức năng và ứng dụng trong phân tích phát hiện và điều chế bất kỳ một thành phần không bay hơi nào. Hoạt động của detector tán xạ ánh sáng bay hơi gồm 3 bước:

+ ***Tạo sương mù:*** Mẫu được bơm vào dòng dung môi của pha động. Dung môi cùng chất phân tích chảy ra từ cột tách được đi qua một ống nhỏ hình kim của thiết bị tạo sương mù. Tại đây chất phân tích và dung môi pha động được trộn với khí nitrogen, khuếch tán và tạo thành những giọt rất nhỏ như sương mù. Kích thước và sự đồng nhất của các hạt sương mù rất quan trọng, xác định độ nhạy và độ lặp lại của phương pháp.

+ ***Bay hơi:*** Các hạt sương mù đi qua một vùng nóng - gọi là ống đàn hồi - ở đây dung môi của pha động bay hơi, để lại một lớp sương mù mỏng của các hạt mẫu phân tích khô trong hơi dung môi. Nhiệt độ của ống đàn hồi được đặt trước, phụ thuộc vào thành phần dung môi, tốc độ dòng và độ bay hơi của mẫu phân tích. Khi phân tích các mẫu bán bay hơi thì đặt nhiệt độ thấp. Có thể phân tích ở nhiệt độ phòng để các chất bán bay hơi không bị bay hơi.

+ ***Phát hiện:*** Các hạt mẫu đi vào tế bào quang điện. Tại đây các hạt mẫu đi qua chùm tia laser. Ánh sáng bị tán xạ bởi các hạt của mẫu, sinh ra một tín hiệu điện, nhờ đó các thành phần được phát hiện.

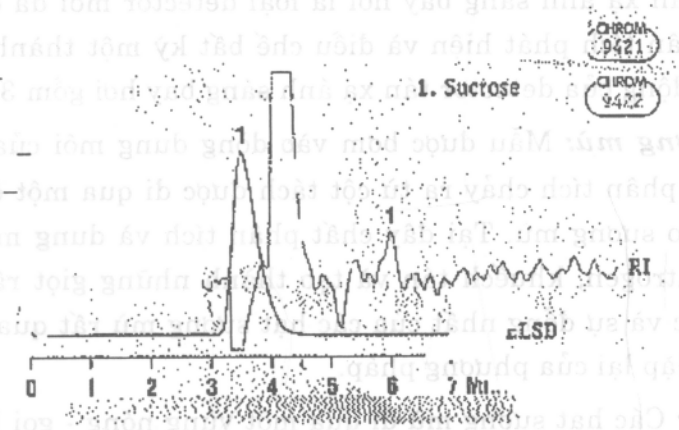
Những nguyên tắc mô tả ở trên hàm ý rằng 100% số giọt sương mù đi qua ống đàn hồi và đạt đến tế bào quang điện. Trong một số trường hợp có thể tách một số giọt sương để sự bay hơi của pha động tốt hơn hoặc vận hành ở nhiệt độ thấp hơn của ống dàn hồi. Tuy nhiên không một sơ đồ vận hành nào là tối ưu cho tất cả các ứng dụng. Việc chọn phương pháp cho kết quả tốt được dựa vào tốc độ dòng của pha động, độ bay hơi của chất phân tích và của pha động.

Detector tán xạ ánh sáng bay hơi là detector nhạy và vạn năng được kết nối với SKL hiệu năng cao để phát hiện bất kỳ một thành phần nào ít bay hơi hơn dung môi pha động, ở mức nanogram. Đáp ứng của detector tỷ lệ thuận với nồng độ của chất phân tích, hơn là đặc điểm quang học của mẫu. Pha động bay hơi trước khi phát hiện, vì thế loại trừ được dung môi, giữ được đường nền ổn định trong quá trình thay đổi tỷ lệ dung môi của pha động.

**** So sánh với các loại detector khác (detector khúc xạ, UV-VIS, huỳnh quang...):***

+ Detector tán xạ ánh sáng bay hơi có khả năng tách tốt hơn nên được áp dụng để điều chế hoặc bán điều chế các chất từ hỗn hợp.

+ Cải thiện độ ổn định của đường nền và độ nhạy phát hiện so với detector khúc xạ (hình 39).

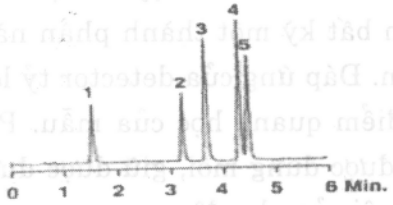


Hình 39: So sánh đường nền và độ nhạy của detector khúc xạ với detector tán xạ ánh sáng bay hơi [www.alltechWEB.com]:

- Cột: Prevail carbohydrate ES, 5 µ, 53 × 7 mm Rocket.
- Pha động: acetonitril : nước (75 : 25) .
- Tốc độ dòng: 2,5 ml/phút.
- Phát hiện: RI - detector khúc xạ.

  ELSD - detector tán xạ ánh sáng bay hơi.

+ Thực hiện phân tích tốc độ cao bằng cách thay đổi rất nhanh tỷ lệ các dung môi của pha động (hình 40).



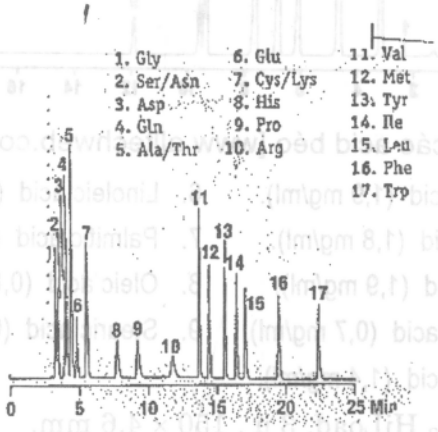
Hình 40: Phân tích tốc độ cao bằng thay đổi cực nhanh tỷ lệ các dung môi [www.alltechWEB.com].

- Cột: Altima HP C_{18}, 3 µm, 53 × 7 mm Rocket.
- Pha động: A: 0,1% TFA /H_2O; B: 0,1% TFA / acetonitril.
  (thời gian, % B), (0, 10), (6, 90).
- Tốc độ dòng: 2,5 ml/phút.
- Phát hiện: Detector tán xạ ánh sáng bay hơi.

+ Thay thế hiệu quả các detector hiện có của SKL:

- Thay thế detector UV-VIS: Nhược điểm của detector UV-VIS là không nhạy với các thành phần không có màu. Detector tán xạ ánh sáng bay hơi đáp ứng với tất cả các chất dù nó bay hơi chậm hơn dung môi pha động bao lâu cũng được. Tính chất vạn năng của detector tán xạ ánh sáng bay hơi cho phép xác định khối lượng của mẫu chính xác hơn detector UV-VIS.

- Đơn giản hoá phương pháp phát hiện bằng cách loại trừ tạo dẫn xuất trước hoặc sau cột (hình 41).



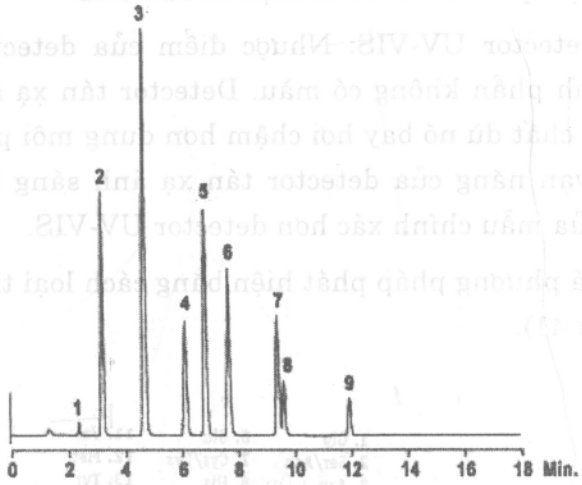
Hình 41: Detector tán xạ ánh sáng bay hơi loại trừ tạo dẫn xuất của các acid amin [www.alltechWEB.com].

- Cột: Prevail C18. 5 µm, 250 × 4,6 mm.
- Pha động: A: 5 mM heptafluorobutryic acid pH 1,0 w/0,7% TFA.
  B: acetonitril
- Thay đổi tỷ lệ dung môi: (thời gian, % B) (0,0), (6,0), (8, 15), (25, 35)
- Tốc độ dòng: 1,0 ml / min
- Phát hiện: Detector tán xạ ánh sáng bay hơi.

- Lựa chọn dung môi để tách tốt hơn là sử dụng tính chất quang phổ của chúng. Nhiều thành phần hấp thụ tốt nhất ở bước sóng thấp. Các dung môi có UV-cutoff cao không thể sử dụng để phân tích mẫu bằng detector UV-VIS. Các

dung môi này được sử dụng với detector tán xạ ánh sáng bay hơi để tách tốt hơn hoặc giảm 50% thời gian phân tích.

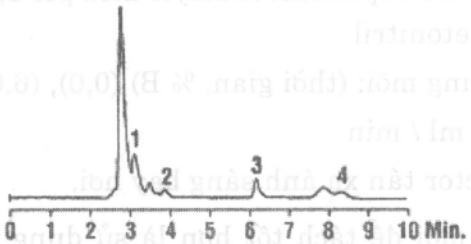
+ Ứng dụng detector tán xạ ánh sáng bay hơi để phân tích phát hiện và điều chế rất nhiều các hợp chất thiên nhiên: acid béo (hình 42); acid hữu cơ (hình 43); glycosid (hình 44, 45); đường (hình 46); triterpen lacton (hình 47); phospholipid (hình 48); alcaloid reserpin (hình 49).



Hình 42: Tách các acid béo [www.alltechweb.com.chromccess]:

1. Caprylic acid (1,9 mg/ml).
2. Capric acid (1,8 mg/ml).
3. Lauric acid (1,9 mg/ml).
4. Linolenic acid (0,7 mg/ml).
5. Myristic acid (1,4 mg/ml).
6. Linoleic acid (0,6 mg/ml).
7. Palmitic acid (1,0 mg/ml).
8. Oleic acid (0,8 mg/ml).
9. Stearic acid (0,4 mg/ml).

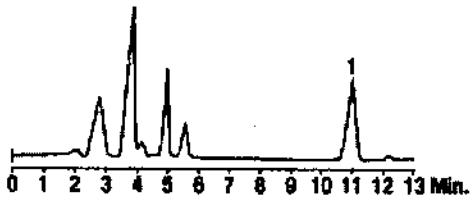
- Cột: Alltima HP C_{18} HiLoad, 3 µ , 150 × 4,6 mm.
- Pha động: A: 0,1% TFA / nước; B: 0,1% TFA / acetonitril.
- Thay đổi: (thời gian, % B), (0,80), (10, 100), (20, 100).
- Tốc độ dòng: 1,0 ml / phút.
- Phát hiện: Detector tán xạ ánh sáng bay hơi.



Hình 43: Tách các acid hữu cơ [www.alltechweb.com.chromccess]:

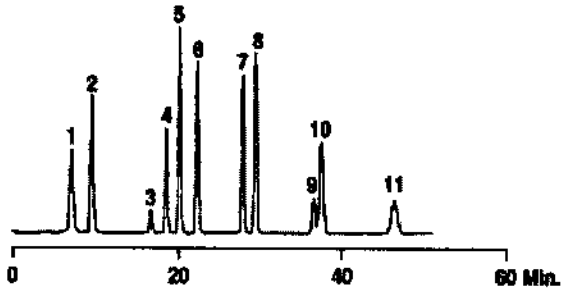
1. Tartaric acid. 2. Malic acid. 3. Citric acid. 4. Succinic acid.

- Cột: Prevail C_{18}, 5 µ , 250 × 4,6 mm.
- Pha động: 25 mM amminia acetat, pH 2,6 w/ formic acid.
- Tốc độ dòng: 1 ml / phút.
- Phát hiện: Detector tán xạ ánh sáng bay hơi.



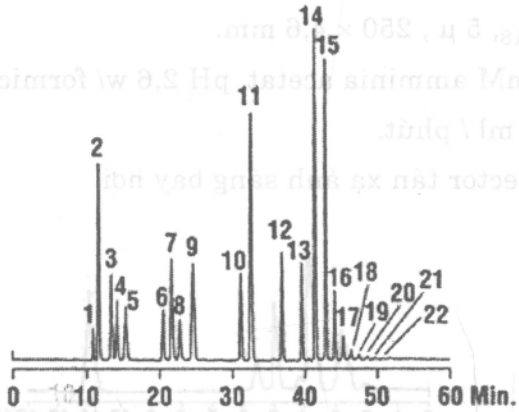
Hình 44: Tách astragalosid IV [www.alltechweb.com.chromccess]:
1. Astragalosid IV.

- Cột: Hypersil BDS C_{18}, 5 µ , 250 × 4,6 mm.
- Pha động: acetonitril / nước (36: 64).
- Tốc độ dòng: 0,8 ml / phút.
- Phát hiện: Detector tán xạ ánh sáng bay hơi.



Hình 45: Tách các Ginenosid trong nhân sâm Triều Tiên [www.alltechweb.com.chromccess]:

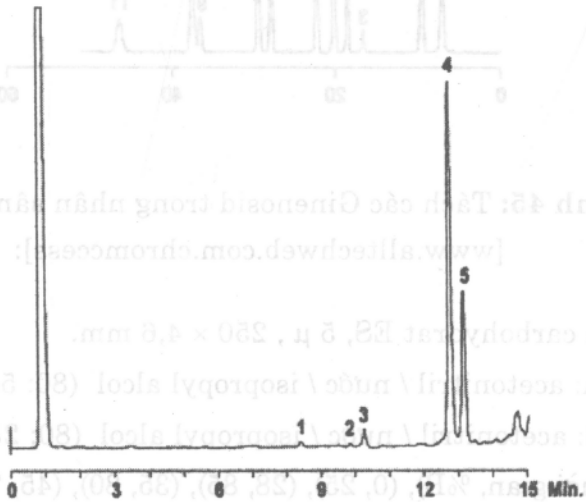
- Cột: Prevail carbohydrat ES, 5 µ , 250 × 4,6 mm.
- Pha động: A: acetonitril / nước / isopropyl alcol (80: 5: 15).
  B: acetonitril / nước / isopropyl alcol (80: 25: 15).
- Thay đổi: (thời gian, %B), (0, 25), (28, 85), (35, 80), (45, 75), (50,90), (51, 100), (57, 25).
- Tốc độ dòng: 0,8 ml / phút.
- Phát hiện: Detector tán xạ ánh sáng bay hơi.



Hình 46: Tách đường [www.alltechweb.com.chromccess].

1. *iso*-Erythritol.
2. Fructose.
3. Sorbitol.
4. Mannitol.
5. Glucose (DP1).
6. Inositol.
7. Sucrose.
8. Maltitol.
9. Maltose (DP2).
10. Raffinose.
11. Maltotriose (DP3).
12. Maltotetraose (DP4).
13. Maltopentaose (DP5).
14. Maltohexaose (DP6).
15. Maltoheptaose (DP7).
16. Maltooctaose (DP8).
17. Maltononaose (DP9).
18. Maltodecaose (DP10).
19. Maltoundecaose (DP11).
20. Maltododecaose (DP12).
21. Maltotridecaose (DP13).
22. Maltotetradecaose (DP14).

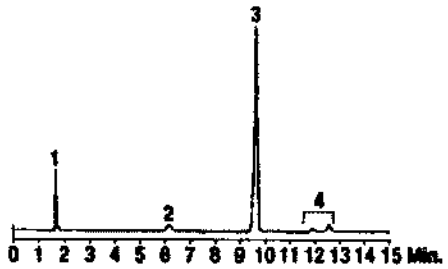
- Cột: Prevail carbohydrat ES, 5 µ , 250 × 4,6 mm.
- Pha động: A: acetoitril ; B: 0,04% ammoni hydroxyd / nước.
- Thay đổi: (thời gian, %B) (0, 17) (25, 27)), (40, 45), (60, 55).
- Tốc độ dòng: 1 ml/phút.
- Phát hiện: Detector tán xạ ánh sáng bay hơi.



Hình 47: Tách triterpen lacton từ viên thuốc Ginkgo Biloba [www.alltechweb.com.chromccess].

1. Bilobalid (44,4µg/ viên).
2. Ginkgolid J (15,9 µg/ viên).
3. Ginkgolid C (149,1 µg/ viên).
4. Ginkgolid A (1480,5 µg/ viên).
5. Ginkgolid B (798,1 µg/ viên).

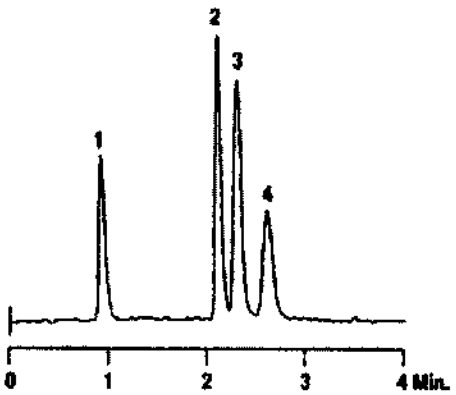
- Cột: Alltima C_{18} HiLoad, 3µ , 100 x 4,6 mm.
- Pha động: A: Nước, 0,1% TFA ; B: MeOH, 0,1% TFA.
- Thay đổi: (thời gian, % B), (0, 10), (15, 55).
- Tốc độ dòng: 1,3 ml / phút.
- Phát hiện: Detector tán xạ ánh sáng bay hơi.



Hình 48: Tách phospholipid trong 1% nhũ dịch itraconazol [www.alltechweb.com.chromccess]:

1. Itraconazol.
2. Phosphatidylethanolamin (PE).
3. Phosphatidylcholin (PC).
4. Lyso-Phosphatidylcholin (Lyso-PC).

- Cột: Hyperisil Silica, 3µ , 150 × 4,6 mm.
- Pha động: A: Nước; B: Isoprapanol; C: Hexan .
- Thay đổi: (thời gian, % B, %C), (0, 58, 40), (7, 50, 40), (14, 58, 40), (16, 58, 40).
- Tốc độ dòng: 1,0 ml / phút.
- Phát hiện: Detector tán xạ ánh sáng bay hơi.



Hình 49: Tách alcaloid reserpin [www.alltechweb.com.chromccess]:

1. Aspartam (50 ng/ µl).
2. Hydrocortison (50 ng/µl).
3. Reserpin (50 ng/µl).
4. Terfenadin (50 ng/µl).

- Cột: Zorbax StableBond C_{18}, 3,5 µ , 50 × 4,6 mm.

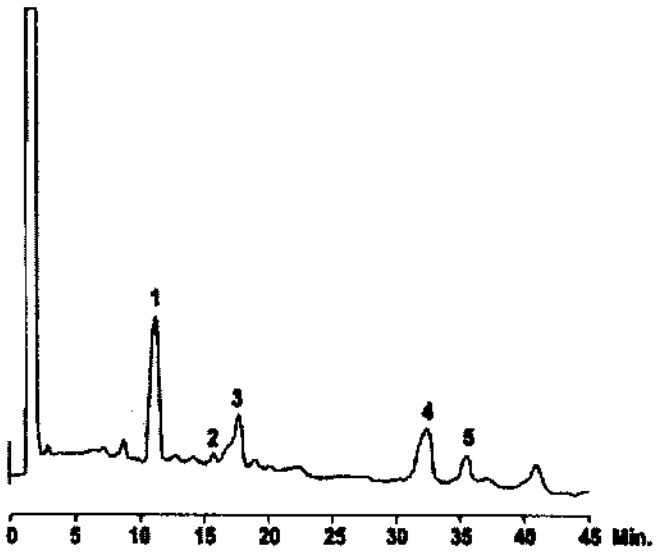
- Pha động: A: 0,025% acid formic trong nước; B: 0,025% acid formic trong acetonitril.

- Thay đổi: (thời gian, % B), (0, 0,25), (1, 70), (5,1, 25).

- Tốc độ dòng: 1,0 ml / phút.

- Phát hiện: Detector tán xạ ánh sáng bay hơi.

Detector tán xạ ánh sáng bay hơi được ứng dụng nhiều trong bán điều chế, điều chế hoặc tinh chế các chất tinh khiết từ hỗn hợp các chất thiên nhiên chiết xuất từ dược liệu: Bán điều chế các thành phần từ dịch chiết bạch quả (hình 50), bán điều chế dịch chiết chuẩn bạch quả (hình 51), điều chế catechin từ chè xanh (hình 52).



Hình 50: Bán điều chế các thành phần từ dịch chiết bạch quả [www.alltechweb.com.chromccess]:

1. Bilobalid. 2. Ginkgolid J. 3. Ginkgolid C. 4. Ginkgolid A. 5. Ginkgolid B.

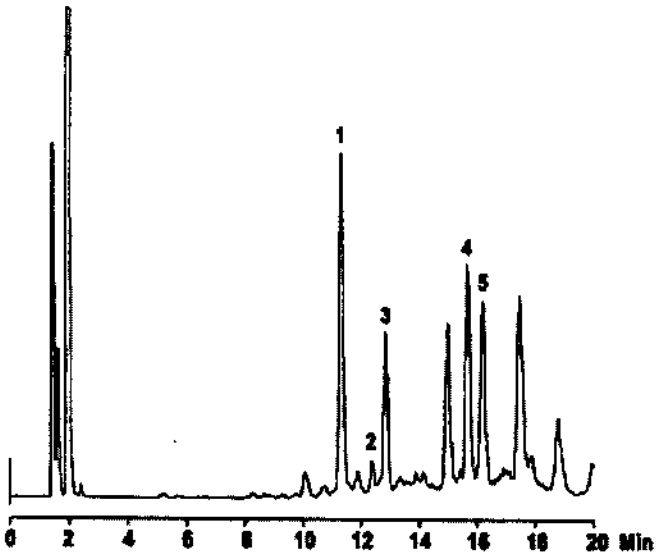
- Cột: Alltima C_{18}, 5 µ , 150 × 10 mm.

- Pha động: A: nước, 0,1% TFA; B: MeOH, 0,1% TFA .

- Thay đổi: (thời gian, % B), (0, 22), (45, 32).

- Tốc độ dòng: 5,0 ml/phút.

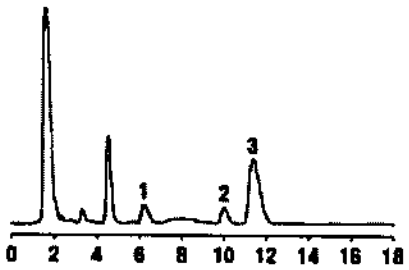
- Phát hiện: Detector tán xạ ánh sáng bay hơi.



Hình 51: Bán điều chế dịch chiết chuẩn bạch quả [www.alltechweb.com.chromccess]:

1. Bilobalid. 2. Ginkgolid J. 3. Ginkgolid C. 4. Ginkgolid A. 5. Ginkgolid B.

- Cột: Alltima C_{18}, 5 µ , 150 x 10 mm
- Pha động: A: nước, 0,1% TFA; B: MeOH, 0,1% TFA
- Thay đổi: (thời gian, % B), (0, 10), (15, 50), (20, 50)
- Tốc độ dòng: 5,0 ml / phút
- Phát hiện: Detector tán xạ ánh sáng bay hơi



Hình 52: Điều chế catechin từ chè xanh [www.alltechweb.com.chromccess]:

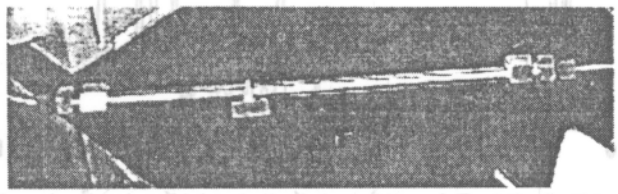
1. Caffein. 2. Epicatechin. 3. Epigallocatechin gallat.

- Cột: Alltima C_{18}, 5 µ , 150 × 10 mm.
- Pha động: A: nước, 0,1% TFA; B: MeOH, 0,1% TFA .
- Thay đổi: (thời gian, % B), (0, 10), (15, 50), (20, 50).

- Tốc độ dòng: 5,0 ml / phút.
- Phát hiện: Detector tán xạ ánh sáng bay hơi.

4.4. Pha tĩnh (cột sắc ký)

SKL quy ước dùng các cột sắc ký bằng chất dẻo hoặc bằng thuỷ tinh, dài từ vài cm đến vài mét. Chiều dài cột phổ biến nhất từ 10 đến 100 cm. Với kích thước dài hơn thường là cột dùng cho mục đích điều chế.



Hình ảnh cột SKL hiệu năng cao

[Brain M. Tissue: www.chem.vt.edu/chem-ed/sep/lc].

Cột dùng trong SKL hiệu năng cao là các ống thép không gỉ, loại điển hình dài từ 10 đến 13 cm, đường kính trong 3 - 5 mm. Cột phân tích thường ngắn và có bảo vệ cột dài từ 3 - 10 cm, lắp ở phía trước cột để giữ lại tạp chất và kéo dài thời gian sử dụng cột phân tích.

* ***Pha tĩnh*** dùng trong sắc ký phân bố: Pha tĩnh được kết nối với các tiểu phân (hạt) trơ, đường kính 3 - 5 μm, dùng trong cột phân tích. Các kích thước lớn hơn dùng trong cột điều chế. Các chất phân tích tách được khi chúng đi qua cột, nhờ sự khác nhau về đặc điểm phân bố giữa hai pha: pha tĩnh và pha động.

* ***Pha đảo*** trong sắc ký phân bố sử dụng pha tĩnh tương đối không phân cực và pha động phân cực như methanol, acetonitril, nước hoặc hỗn hợp các dung môi này. Pha tĩnh thường dùng nhất là các mạch *n*-octyldecyl (C18) và *n*-decyl (C8) và các nhóm phenyl. Sắc ký pha đảo là dạng chung nhất của SKL, trước hết vì phạm vi áp dụng cho các chất phân tích rất rộng, chúng có thể hoà tan trong pha động.

* ***Pha thường*** trong sắc ký phân bố sử dụng pha tĩnh phân cực và các dung môi hữu cơ không phân cực, như *n*-hexan, methylen clorid hoặc cloroform làm pha động. Pha tĩnh là các siloxan liên kết với các nhóm chức phân cực. Các nhóm chức phân cực thông dụng nhất để làm tăng độ phân cực là:

- Cyano: $-C_2H_4CN$
- Diol: $-C_3H_6\,OCH_2\,CHOH\,CH_2OH$

- Amino: $-C_3H_6NH_2$
- Dimethylamino: $-C_3H_6N(CH_3)_2$

4.5. Pha động

Pha động dùng trong SKL hiệu năng cao được nạp vào cột, dưới một áp lực của bơm chân không, từ một bình chứa và chảy qua cột với một tốc độ không đổi, sau đó qua detector. Nhiệt độ của cột sắc ký được giữ hằng định. Thành phần và tốc độ pha động được quy định trong từng chuyên luận riêng hoặc được nghiên cứu thiết lập cho các đối tượng cần phân tích và phụ thuộc vào một số yếu tố. Nếu pha tĩnh sử dụng là pha thường (phân cực) thì pha động là các dung môi không phân cực. Ngược lại, nếu pha tĩnh là pha đảo (không phân cực) thì pha động là các dung môi phân cực. Tỷ lệ các dung môi phân cực và không phân cực được thay đổi tuỳ theo đối tượng và yêu cầu phân tích. Thành phần pha động có thể hằng định trong suốt quá trình sắc ký (rửa giải đẳng dòng) hoặc thay đổi theo một chương trình định trước (rửa giải gradient).

Pha động là hỗn hợp dung môi được đuổi khí bằng bơm chân không hoặc bằng một thiết bị đuổi khí khác phù hợp (bếp siêu âm) nhưng không ảnh hưởng đến thành phần của pha động. Trong qúa trình định lượng, khi trong chuyên luận không quy định dùng chuẩn nội, nên sử dụng bộ phận tiêm mẫu có thể tích cố định.

4.6. Các đại lượng đặc trưng của quá trình sắc ký

4.6.1. *Số đĩa lý thuyết*

Khi trong chuyên luận quy định hiệu lực cột, ta phải xác định số đĩa lý thuyết (n) trên một đơn vị độ dài của cột (tính bằng mét) hoặc số đĩa lý thuyết trên toàn cột.

Số đĩa lý thuyết trên một mét của cột được tính toán từ số liệu thu được trong điều kiện đẳng nhiệt bằng biểu thức:

$$n = \frac{5{,}54 \times t_R^{\,2}}{L \times W_h^{\,2}}$$

trong đó:

t_R - khoảng cách dọc theo đường nền của sắc ký đồ tính từ lúc bắt đầu tiêm mẫu đến chân đường vuông góc hạ từ cực đại của pic cần quan tâm;

L - độ dài cột, m;

W_h - độ rộng đáy của pic cần quan tâm ở nửa chiều cao pic, đơn vị giống t_R.

Số đĩa lý thuyết trên toàn cột (gọi tắt là "đĩa lý thuyết") được tính toán từ số liệu thu được trong điều kiện đẳng nhiệt bằng biểu thức:

$$n = \frac{5,54 \times t_R^2}{W_h^2}$$

Hệ số dung lượng k' (cũng có thể hiểu là tỷ số phân bố khối lượng Dm) được quy định trong chuyên luận, ta xác định bằng biểu thức:

$$Dm = k' = K = \frac{Vs}{V_m} = \frac{Qs}{Q_m}$$

trong đó: K - hằng số phân bố;

Vs - thể tích pha tĩnh;

V_m - thể tích pha động;

Q_m - lượng chất trong pha động;

Qs - lượng chất trong pha tĩnh.

Hệ số dung lượng (tỷ số phân bố khối lượng) của một chất thành phần được xác định từ sắc đồ theo công thức:

$$K' = \frac{t_R - t_0}{t_0}$$

trong đó:

t_R - khoảng cách dọc theo đường nền từ lúc bắt đầu tiêm mẫu đến chân đường vuông góc hạ từ cực đại của pic cần quan tâm;

T_0 - khoảng cách dọc theo đường nền từ lúc bắt đầu tiêm mẫu đến chân đường vuông góc hạ từ cực đại của thành phần không lưu giữ trên cột.

Các giá trị t_R và t_0 phải được biểu thị cùng một đơn vị.

4.6.2. Độ phân giải

Trừ khi có các chỉ dẫn khác trong chuyên luận riêng, độ phân giải hay (R_s) giữa các pic định lượng trên sắc ký đồ phải lớn hơn 1,0. Hệ số này được tính bằng biểu thức:

$$R_s = \frac{1,18 \times (t_{Rb} - t_{Ra})}{W_{ha} + W_{hb}}$$

trong đó:

t_{Rb} và t_{Ra} - các khoảng cách dọc theo đường nền tính từ lúc bắt đầu tiêm mẫu đến chân đường vuông góc hạ từ cực đại của hai pic liền kề nhau (a và b);

W_{ha} và W_{hb} - độ rộng pic tương ứng đo ở một nửa chiều cao của các pic.

Các giá trị t_{Rb}, t_{Ra}, W_{ha}, W_{hb} phải tính theo cùng một đơn vị.

4.6.3. Hệ số đối xứng

Hệ số đối xứng của một pic được tính bằng biểu thức:

$$\frac{Wx}{2A}$$

trong đó:

Wx - độ rộng pic đo ở 1/20 chiều cao pic;

A - khoảng cách từ đường vuông góc hạ từ cực đại của pic đến mép đường cong phía trước, ở tại 1/20 chiều cao pic.

Trong một số trường hợp cần tiến hành với chất chuẩn đối chiếu để xác định tỷ số giữa tín hiệu và nhiễu. Tỷ số này được tính theo công thức:

$$\frac{2H}{h_n}$$

trong đó:

H - chiều cao pic của thành phần cần quan tâm trong sắc đồ thu được từ dung dịch đối chiếu quy định (pic C);

h_n - giá trị tuyệt đối của chiều cao nhiễu lớn nhất lệch khỏi đường nền trong khoảng sắc đồ thu được sau khi tiêm một dung dịch mẫu trắng. Khoảng sắc đồ cần quan sát có độ dài bằng 20 lần độ rộng đáy ở 1/2 chiều cao của pic C (vị trí của pic thành phần cần quan tâm).

4.7. Phương pháp tiến hành

Cân bằng cột bằng pha động theo quy định.

Chuẩn bị các dung dịch theo quy định của chuyên luận hoặc theo quy trình. Các dung dịch phải được loại các tiểu phân rắn. Dùng các dung dịch chuẩn đối chiếu để xác định các điều kiện đo phù hợp đặt trên thiết bị và lượng dung dịch mẫu tiêm cần dùng để tạo ra được một đáp ứng đầy đủ. Tiến hành các lần tiêm lặp lại của đáp ứng và kiểm tra số đĩa lý thuyết nếu cần thiết. Tiêm các dung dịch và ghi lại các sắc đồ thu được. Tiến hành tiêm lại nhiều lần để kiểm tra độ lặp lại của đáp ứng. Xác định diện tích các pic của các thành phần của các chất cần quan tâm. Cũng có thể xác định chiều cao của pic tương ứng với các thánh phần của chất cần quan tâm khi hệ số đối xứng ở trong khoảng từ 0,8 đến 1,20. Trong một số trường hợp ngoại lệ, khi tính theo chiều cao pic thì sẽ không cần lưu ý tới hệ số đối xứng. Trong những trường hợp mà quá trình rửa giải tiến hành theo chương trình dung môi thì phải tính kết quả theo diện tích pic. Khi dùng một chất làm chuẩn nội, pic của chất này không được che phủ pic của mẫu thử. Từ những giá trị thu được, tính ra hàm lượng của một thành phần hay

những thành phần có trong mẫu thử. Phần trăm của một hoặc các thành phần của mẫu thử được tính bằng cách xác định diện tích của một pic hay các pic biểu thị dưới dạng phần trăm so với tổng diện tích của tất cả các pic, trừ pic của dung môi hoặc các thuốc thử thêm vào. Trong quá trình xác định cần sử dụng bộ khuếch đại để mở rộng thang đo và bộ tích phân tự động.

4.8. Ứng dụng trong kiểm nghiệm dược liệu

4.8.1. Xác định hàm lượng hoạt chất trong dược liệu

SKL hiệu năng cao, cùng với hệ thống detector đặc hiệu cho phát hiện các chất dựa trên đặc điểm hoá lý của chúng, được sử dụng như một phương pháp sắc ký hiện đại nhất và chính xác nhất trong kiểm nghiệm chất lượng dược liệu (xác định hàm lượng hoạt chất) hiện nay. Vì vậy trong các chuyên luận về dược liệu, về thuốc đông dược của Dược điển cũng như trong các Tiêu chuẩn cơ sở SKL hiệu năng cao ngày càng được ứng dụng nhiều trong xác định hàm lượng hoạt chất.

SKL hiệu năng cao được áp dụng để xác định hàm lượng hoạt chất trong dược liệu của 38 chuyên luận dược liệu trong Dược điển Trung Quốc 2000 (bảng 11)

Bảng 11: Kiểm nghiệm chất lượng dược liệu bằng phương pháp sắc ký lỏng hiệu năng cao

[Dược điển TQ 2000: detector UV, pha tĩnh: octadecylsilan liên kết silicagel]

Số TT	Tên hoạt chất	Chuyên luận dược liệu	Pha động	Bước sóng phát hiện (nm)	Hàm lượng (% so với dược liệu khô)
1	2	3	4	5	6
1	Adenosin	Cordiceps	[68,5ml NaH_2PO_4 (0,01mol/l) + 31,5 ml Na_2HPO_4 (0,01mol/l)] : MeOH (17 : 3)	260	≥ 0,01
2	Acteosid	Herba Cistanches	Acetonitril - MeOH - 1% CH_3COOH (10 : 15 : 75)	334	≥ 0,08
3	Acid caffeic	Herba Taraxaci	MeOH: NaH_2PO_4 (1,56g/l) (23 : 77)	323	≥ 0,02
4	Baicalin	Radix Scutellariae	MeOH - H_2O - H_3PO_4(47 : 53 : 0,2)	280	≥ 9,0

Bảng 11. (tiếp theo)

1	2	3	4	5	6
5	Cinobufagin + resibufogenin	Venenum Bufonis	0,5% potassium dihydrogen phosphat - acetonitril (50 : 50), pH = 3,2	296	≥ 6,0
6	Cimicifugosid + 5-O-methylvis-amminol	Radix Saposhnikodiae	MeOH - H_2O (4 : 6)	254	≥ 0,24
7	Clorogenic acid	- Flos Chrysanthemi; -Chrysanthe-mum Morifolium	NaH_2PO_4 (0,1mol/l) : MeOH (70 : 30)	328	≥ 0,20
8	Costunolid	Radix Aucklandiae	MeOH - H_2O (13 : 7)		≥ 0,60
9	Dracorhodin	Sanguis Draxonis	acetonitril 0,05 mol/lit sodium dihydrogen phosphat - (50 : 50)	440	≥ 1,0
10	Emodin + Chrysophanol	Radix et Rhizoma Rhei	MeOH - 0,1% H_3PO_4 (85 : 15)	254	≥ 0,50
11	Ferulic acid	Rhizoma Ligustici	MeOH - H_2O (40 : 60); pH = 3,5	320	≥ 0,05
12	Flavonol glycosid (quercetin + kaempferol + isorhamnetin)	Folium Ginkgo	MeOH - 0,4% H_3PO_4 (50 : 50)	360	≥ 0,40
13	Forsythin	Fructius Forsythiae	Acetonitrin - H_2O (25 : 75)	277	≥ 0,15
14	Gastrodin	Rhizoma Gastrodiae	MeOH - dung dịch đệm phosphat	270	≥ 0,10
15	Gentiopierin	Radix Gentianae	MeOH - H_2O (3 : 7)	270	≥ 1,0
16	Gentiopicrosid	Radix Gentianae Macrophyllae	MeOH - H_2O (1 : 4)	254	≥ 2,0
17	Gensenosid Rg1 + Re	Radix Ginseng	acetonitril - 0,05% H_3PO_4 (99 : 400)	203	≥ 0,25

Bảng 11. (tiếp theo)

1	2	3	4	5	6
18	Gensenosid Rg1 + Re	Radix Red Ginseng	acetonitril - 0,05% H_3PO_4 (99 : 400)	203	≥ 0,20
19	Gensenosid Rb1	Radix Panacis Quinquefolii	acetonitril - H_2O (30 : 70)	203	≥ 1,0
20	Glycyrrhic acid	Radix Glycyrrhizae	MeOH 0,2 mol/ lit ammonium acetat - CH_3COOH glacial (67 : 33 : 1)	250	≥ 2,0
21	Hesperidin	Ecocarpium Citri Rubrum	MeOH - H_2O (40 : 60)	284	≥ 1,70
22	Hesperidin	Pericarpium Citri Reticulatae	MeOH - CH_3COOH - H_2O (35: 4: 61)	283	≥ 3,50
23	Hesperidin	Pericarpium Citri Reticulatae Viride	MeOH - CH_3COOH - H_2O (35 : 4: 61)	284	≥ 5,0
24	Indigo	Folium Polygoni Tinctorii	MeOH - H_2O (40: 60)	604	≥ 0,50
25	Isofraxidin	Herba Sarcandrae	acetonitril - 0,1% H_3PO_4 (20 : 80)	344	≥ 0,02
26	Linderalacton	Radix Linderae	acetonitril - H_2O (56 : 44)	235	≥ 0,03
27	Magnolol + honokiol	Flos Magnoliae Officinalis	MeOH - acetonitril - H_2O (50 : 20 : 30)	294	≥ 0,20
28	4-Methoxyl salicylic aldehyd	Cortex Periplocae	MeOH - H_2O - CH_3COOH (70 : 30 : 2)	278	≥ 0,20
29	Naringin	Rhizoma Drynariae	MeOH - CH_3COOH - H_2O (35 : 4 : 65)	283	≥ 0,5
30	Naringin	Ecocarpium Citri Grandis	MeOH - CH_3COOH - H_2O (35 : 4 : 61)	283	≥ 1,5
31	Paeoniflorin	Radix Paeoniae Rubra	MeOH 0,05 mol/lit sodium dihydrogen 230 phosphat - (40 : 65)	230	≥ 1,5

Bảng 11. (tiếp theo)

1	2	3	4	5	6
32	Piperin	Fructus Piperis	MeOH - H_2O (77 : 23)	343	≥ 3.0
33	Puerarin	Radix puerariae	MeOH - H_2O (25 : 75)	250	≥ 2,4
34	Sinomenin	Caulis Sinomenii	MeOH - ethylendiamin (100 : 0,125	262	≥ 0,5
35	Strichnin	Semen Strychni	*n*-hexan -methylen cloride - MeOH - Nh4OH (42,5 : 42,5 : 5: 25)	254	1,20 -2,20
36	Tanshinon IIA	Radix Salviae Miltiorrhizae	MeOH - H_2O (25 : 75)	270	≥ 0,2
37	2,3,5,4'-tetrahydroxystiben-2-O-β-D-glucosid ($C_{20}H_{22}O_9$)	Radix Polygoni Multiflori	acetonitril - H_2O (25 : 75)	320	
38	Tubeimosid A	Rhizoma Bolbostematis	60% MeOH	214	≥ 1,0

4.8.2. Nhận dạng và định lượng aflatoxin trong dược liệu

Aflatoxin là các chất độc gây ung thư, do nấm *Aspergillus flavus* sinh ra khi phát triển trên dược liệu. Các aflatoxin được chia làm 2 nhóm chính: nhóm B (huỳnh quang xanh da trời = blue fluorescence) và nhóm G (huỳnh quang xanh lá cây = green fluorescence). Có 4 loại aflatoxin: B_1, B_2, G_1, G_2, trong đó aflatoxin B_1 là độc nhất - thường có mặt như một thành phần chính, gây ung thư mạnh. Để đảm bảo an toàn cho người sử dụng dược liệu, cần xác định sự có mặt và hàm lượng của các aflatoxin trong dược liệu. Cho đến nay phương pháp được sử dụng nhiều nhất để định tính và định lượng aflatoxin trong thực phẩm và rau, quả, ngũ cốc là phương pháp SKL hiệu năng cao.

Cách tiến hành:

* ***Chuẩn bị mẫu:*** - Nghiền mẫu.

- ***Chiết xuất:*** Trộn 20 g mẫu với 20 g celit 545 trong bình nón dung tích 500 ml. Thêm 200 ml cloroform và 0 ml nước, trộn trong 30 phút. Lọc dịch qua giấy

lọc vào ống đong chia độ dung tích 250 ml. Dịch lọc bốc hơi đến khô trong bình cầu đáy tròn.

- Chuẩn bị cột sắc ký: cho 5 g sodium sulfat vào một cột sắc ký (3 × 20 cm) và cho thêm chloroform đến 1/2 cột. Rót nhũ dịch của 10 g silicagel 60 trong cloroform và cột và để yên trong 30 phút. Phủ cẩn thận silicagel bằng sodium sulfat và một ít bông. Cho cloroform chảy đến khi lớp bông khô.

- Tinh chế dịch chiết thô: Dịch chiết thô được làm đậm đặc trong 5 ml cloroform và chuyển vào cột bằng pipette pasteur. Tráng bình cầu bằng 2 ml cloroform × 3 lần. Cho dịch tráng vào cột. Cho cloroform chảy đến khi lớp bông khô.

Rửa cột bằng 100 ml hexan, sau đó - 100 ml diethyl ether trong 20 phút mỗi lần. Bỏ dịch rửa. Aflatoxin được rửa bằng hỗn hợp 145 ml cloroform và 5 ml methanol. Thu dịch rửa vào bình cầu 250 ml và bốc hơi hơi dung môi đến gần khô. chuyển dịch còn lại vào bình định mức 1 ml và thêm cloroform đến vạch chuẩn.

- Nhận dạng aflatoxin bằng SKL hiệu năng cao:

Pha dung dịch aflatoxin chuẩn trong bình định mức dung tích 1 ml chứa:

- aflatoxin B_1 1 µg/ml
- aflatoxin B_2 1 µg/ml
- aflatoxin G_1 1 µg/ml
- aflatoxin G_1 1 µg/ml

Điều kiện SKL hiệu năng cao:

- Cột pha thường: SI-60, 5 µm; 25 × 0,4 cm (e.g. Merck Li Chrospher)
- Pha động: Cloroform 99,3% /methanol 0,7% isocratic

Tốc độ dòng: 1 ml / phút

- Phát hiện: UV 364 nm

Hoặc

- Cột pha đảo: RP 18, 5 µm; 25 × 0,4 cm (e.g. Merck Li Chrosorb)
- Pha động: Nước / methanol / acetonitril. Thay đổi tỷ lệ dung môi trong quá trình sắc ký: từ 80/10/10 đến 20/40/40 trong 15 phút.
- Phát hiện: Detector UV 364 nm

Hoặc Detector huỳnh quang: bước sóng kích thích 352/365 nm, bước sóng phát xạ 442/440 nm.

Dẫn xuất hoá bằng acid trifluoracetic hoặc bromin để tăng giới hạn phát hiện.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. *Brain M. Tissue*. Trang Web về sắc ký lỏng: http://www.chem.vt.edu/chem-ed.html. cập nhật đến ngày 17 tháng 9 năm 2003.
2. Dược điển Việt Nam in lần thứ 3, Hà Nội 2003.
3. Pharmacopoeia of the People's Republic of China. (English Edition 2000), vol. I. Chemical Industry Press.
4. Trang Web của công ty Shimadzu: http://www.shimadzu.com.
5. Trang Web của công ty Perkin Elmer: http://www.perkinelmer.com.
6. Trang Web của công ty Alltech: http://www.alltechweb.com.
7. SUPELCO: vol. 16, No 2, International.
8. AOAC Official Method 990.33: Aflatoxin in corn and peanut Butter. Liquid Chromatographic method. First Action 1990; Final Action 1994.

CHƯƠNG II

CÁC PHƯƠNG PHÁP QUANG PHỔ

PGS. TS. Nguyễn Kim Cẩn

I. CÁC PHƯƠNG PHÁP QUANG PHỔ HẤP THỤ TỬ NGOẠI-KHẢ KIẾN

1.1. Những khái niệm cơ bản

1.1.1. Sóng và năng lượng

Trong những phương pháp vật lý được ứng dụng để nghiên cứu cấu trúc của phân tử chất hữu cơ thì sự tác dụng tương hỗ của chất với bức xạ điện tử trong một vùng rộng của tần số là hay nhất (bắt đầu từ sóng radio và kết thúc bằng tia γ), tức là bao gồm tất cả những phổ điện tử.

Trong trường hợp này xảy ra sự thay đổi năng lượng của phân tử, sự thay đổi này được xác định bằng tương quan Bohr:

$$\Delta E = E_C - E_d = h\nu$$

trong đó: ΔE - sự thay đổi năng lượng của hệ;

E_C và E_d - năng lượng của hệ ở trạng thái cuối và đầu;

h - hằng số Planck;

ν - tần số bức xạ.

Nếu năng lượng của trạng thái cuối cao hơn năng lượng ở trạng thái ban đầu ($E_C > E_d$) nghĩa là ΔE dương thì phù hợp với sự hấp thụ bức xạ và ngược lại ΔE âm nghĩa là $E_C < E_d$ thì trường hợp này xảy ra bức xạ năng lượng.

Trong trường hợp đầu (ΔE dương) chúng ta có ngành phổ hấp thụ và trong trường hợp thứ 2 (ΔE âm) chúng ta có ngành phổ phát xạ.

Bức xạ điện tử có thể đặc trưng bằng những thông số "*sóng*" hoặc thông số "*năng lượng*". Thông số "*sóng*" có thể biểu diễn bằng độ dài sóng λ (Å, nm, mμ, μ, cm, m) hay là tần số của dao động $\bar{\nu}$ s^{-1}:

$$\bar{\nu} = \frac{C}{\lambda}$$

ở đây C - tốc độ ánh sáng.

Thường người ta dùng "*số sóng*" (cũng được gọi là tần số) được đo bằng đơn vị cm^{-1}:

$$\nu = \frac{1}{\lambda}$$

Năng lượng của sự chuyển giữa 2 mức năng lượng được đo bằng electrovon (eV) hay bằng calo (cal).

Sự liên hệ giữa thông số *năng lượng* và thông số *sóng* được biểu diễn bằng mối tương quan sau:

$$\lambda_{nm} = \frac{107}{\nu}\ cm^{-1} = \frac{28591.2}{E}\ kcal/mol = \frac{1239.81}{E}\ eV$$

$$\nu cm^{-1} = 0{,}349758.10^{3}\ kcal/mol = 8{,}06575.10^{3}E.eV = \frac{107}{\lambda}\ nm$$

$$E_{kcal/mol} = 23{,}0609.E\ eV = 2{,}85912.10^{-3}.\ \nu\ cm^{-1} = \frac{107}{\lambda}\ nm$$

$$E_{eV} = 0{,}123981.10^{-3}\ \nu\ cm^{-1} = 4{,}33634.10^{-2}E\ kcal/mol = \frac{1239{,}81}{\lambda}\ nm$$

Thí dụ: độ dài sóng λ = 400 nm tương ứng với ν = 25000 cm^{-1}, năng lượng E_{eV} = 3,1 eV/phân tử hay $E_{kcal/mol}$ = 71,5 kcal/mol.

Bức xạ tử ngoại khả kiến nằm ở vùng có độ dài sóng 10^{-6} - 10^{-4} cm. Ứng năng lượng bậc 10 eV tương ứng với sự thay đổi năng lượng của những điện tử hoá trị (những điện tử bên ngoài - vùng phổ điện tử).

Phổ điện tử xuất hiện trong sự tương tác của bức xạ điện từ với chất. Năng lượng bị hấp thụ không liên tục mà bằng những lượng tử riêng biệt. Sự hấp thụ của bức xạ năng lượng như vậy sẽ xảy ra trong trường hợp nếu lượng tử của bức xạ phù hợp với hiệu giữa 2 mức năng lượng của chất được chiếu sáng, đồng thời tuân theo "*quy tắc chọn lọc*".

Ở đây, chúng ta sẽ nghiên cứu sự hấp thụ của hợp chất hữu cơ ở vùng tử ngoại và khả kiến của phổ. Để ngắn gọn chúng ta gọi sự hấp thụ như thế là hấp thụ ánh sáng, mặc dù bức xạ tử ngoại không thể quan sát được bằng mắt.

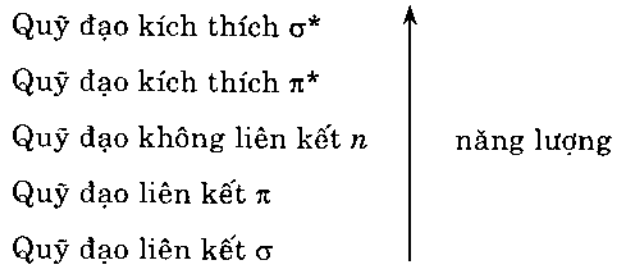
Trong quá trình của sự hấp thụ ánh sáng bởi chất những điện tử chuyển từ mức năng lượng này đến mức năng lượng khác, còn phân tử chuyển từ trạng thái cơ bản của mình đến trạng thái kích thích.

1.1.2. Mức năng lượng điện tử của hợp chất hữu cơ

Mức năng lượng điện tử trong các phân tử của hợp chất hữu cơ giải thích tốt nhất dựa vào lý thuyết của quỹ đạo phân tử. Những điện tử này có năng lượng

39(1) - 387

khác nhau. Khi so sánh những thế của sự ion hoá phân tử của những lớp khác nhau và khi tổng kết một vài giả thiết có thể xếp những điện tử của những quỹ đạo phân tử khác nhau thành dãy theo mức năng lượng của chúng như sau: $\sigma < \pi < n < \pi^* < \sigma^*$ và có thể biểu diễn theo sơ đồ:



Những điện tử liên kết của phân tử bão hoà chiếm quỹ đạo σ; những điện tử liên kết của những liên kết đôi và ba chiếm quỹ đạo π, còn những điện tử không liên kết của những nguyên tử khác loại, thí dụ nitơ và oxy chiếm quỹ đạo *n*.

Từ sơ đồ này, năng lượng của quỹ đạo liên kết π cao hơn năng lượng của quỹ đạo σ. Ngược lại đối với quỹ đạo kích thích thì năng lượng của quỹ đạo σ* lớn hơn năng lượng của quỹ đạo π*. Bởi vậy, trong tất cả các hợp chất có thể xảy ra những chuyển dịch điện tử của một vài kiểu với năng lượng khác nhau quan trọng hơn cả từ chúng

$n \rightarrow \pi^*$ (trong những hợp chất carbonyl).

$\pi \rightarrow \pi^*$ (trong những alken, alkin, hợp chất carbonyl và hợp chất nitơ).

$\sigma \rightarrow \pi^*$ (trong những hợp chất carbonyl).

$\sigma \rightarrow \sigma^*$ (trong những alkan).

Những chuyển dịch của điện tử từ quỹ đạo liên kết σ đến quỹ đạo kích thích σ* đòi hỏi năng lượng lớn, vì thế các vân hấp thụ tương ứng nằm ở vùng tử ngoại chân không (< 170 nm). Sự kích thích của những điện tử π đòi hỏi năng lượng nhỏ và sự hấp thụ phù hợp với sự chuyển $\pi \rightarrow \pi^*$ nằm ở vùng sóng dài hơn của phổ. Những điện tử của mức *n* có thể chuyển dịch đến những quỹ đạo kích thích π* và σ*. Cường độ của những vân ứng với sự chuyển dịch điện tử từ $n \rightarrow \pi^*$ như một quy luật nhỏ hơn một cách đáng kể cường độ của những vân ứng với những chuyển dịch khác.

Trong những hợp chất hữu cơ không chứa những điện tử *n* và π, sẽ chỉ có sự chuyển điện tử duy nhất $\sigma \rightarrow \sigma^*$. Sự xuất hiện sự chuyển $n \rightarrow \sigma^*$nằm ở vùng sóng dài hơn sự chuyển $\sigma \rightarrow \sigma^*$ gây nên bởi những điện tử không phân chia có trong những hợp chất bão hoà nguyên tử. Những chuyển dịch $n \rightarrow \pi^*$ được quan sát trong những hợp chất có dị tố liên kết với nguyên tử khác bằng liên kết bội.

Trong những hệ không liên hợp đơn giản những chuyển dịch này là sóng dài hơn cả. Trong sự liên hợp quỹ đạo π liên kết cao có thể có năng lượng lớn hơn quỹ đạo *n* chưa liên kết và lúc đó vân của bước nhảy $\pi \rightarrow \pi^*$ sẽ là vân sóng dài nhất.

Mức năng lượng điện tử trong những phân tử thơm phức tạp hơn.

Trong phân tử nhiều nguyên tử chứa những điện tử ở các trạng thái khác nhau, dưới tác dụng của bức xạ có thể xảy ra bước nhảy đa dạng từ trạng thái cơ bản đến những trạng thái kích thích khác nhau. Theo những tần số hấp thụ trong các phổ điện tử người ta chỉ có thể đánh giá được những năng lượng tương đối của hai mức. Rõ ràng là để chuyển điện tử từ mức năng lượng đầy cao ở trạng thái cơ bản đến mức năng lượng tự do thấp ở trạng thái kích thích cần năng lượng nhỏ hơn để chuyển từ mức năng lượng đầy thấp hơn. Năng lượng này tương ứng sự kích thích của điện tử từ quỹ đạo đầy cao đến quỹ đạo không đầy thấp.

Ở đây được hiểu là điện tử chuyển từ mức năng lượng này đến mức năng lượng khác trong giới hạn của một phân tử. Nhưng không hoàn toàn nhất thiết như vậy. Trong một vài hệ nói riêng như phức phân tử có thể xảy ra sự chuyển điện tử từ quỹ đạo của một phân tử này đến quỹ đạo của phân tử khác. Thường trong quá trình như thế gọi là sự chuyển giữa những phân tử của điện tích.

1.1.3. Quy tắc chọn lọc

Hoàn toàn không phải tất cả các bước nhảy đều có thể quan sát được mà bị giới hạn, nghĩa là có quy tắc chọn lọc trong hệ thực tại.

Thứ nhất, trong sự hấp thụ lượng tử ánh sáng có thể chỉ một điện tử bị kích thích. Quy tắc thứ hai liên quan đến số lượng tử spin không thay đổi trong sự chuyển điện tử. Đa số những phân tử hữu cơ ổn định thì những điện tử thường cặp đôi và mỗi một quỹ đạo có một cặp điện tử với spin ngược hướng nhau. Khi kích thích một từ cặp điện tử chuyển đến quỹ đạo có năng lượng cao hơn nhưng bảo tồn về hướng spin, nghĩa là ngược hướng của spin cặp trước. Những hệ chỉ chứa những điện tử cặp đôi gọi là trạng thái tổ hợp, còn những hệ chứa hai điện tử không cặp đôi là trạng thái kép 3. Sự chuyển dịch giữa những trạng thái tổ hợp là được phép, ngược lại những chuyển dịch giữa trạng thái tổ hợp và trạng thái kép 3 bị cấm. Các chuyển dịch giữa những trạng thái kép 3 khác cho phép bởi quy tắc chọn lọc nhưng vì độ dịch chuyển của trạng thái kép 3 như là một quy luật rất thấp, những dịch chuyển như thế thường không quan sát được. Những quy tắc khác của chọn lọc liên quan tới tính đối xứng của phân tử nói

chung hoặc là sự đối xứng của trạng thái cơ bản hay trạng thái kích thích.

Do đó, những bước nhảy bị cấm bởi quy tắc chọn lọc không xuất hiện trong phổ. Nhưng cần phải coi sự nghiên cứu lý thuyết là gần đúng và trong một vài trường hợp quan sát được cả những bước nhảy bị cấm, nhưng có cường độ nhỏ hơn trong trường hợp của những bước nhảy được phép của quy tắc chọn lọc. Với quan điểm hoá học của quy tắc chọn lọc trong sự gần đúng sơ bộ, có nghĩa là bước nhảy điện tử cần kèm theo sự pha trộn xác định hoặc kéo theo sự di chuyển điện tích thường gọi là momen bước nhảy.

1.1.4. Những quy luật của sự hấp thụ ánh sáng

Đối với phổ quang học có những quy luật chung của sự hấp thụ bức xạ. Trước khi nghiên cứu những phương pháp hiện đại của sự đo phổ hấp thụ và những phương pháp thể hiện chúng cần phải nắm vững hai định luật cơ bản của sự hấp thụ ánh sáng.

1.1.4.1. Định luật Lambert

Định luật này được Bouguer thiết lập năm 1729: Lượng tương đối của ánh sáng bị hấp thụ đi qua môi trường không phụ thuộc vào cường độ bức xạ tới (tia tới) mà phụ thuộc vào độ dày của lớp chất.

Định luật này biểu diễn sự phụ thuộc giữa khả năng hấp thụ và độ dày của lớp chất. Nói cách khác, dòng tia song song của ánh sáng đơn sắc đi qua môi trường hấp thụ đồng nhất bị yếu đi theo quy luật hàm số mũ. Một cách toán học biểu diễn như sau:

$$I = I_o e^{-kl}$$

ở đây: I_o- cường độ bức xạ đơn sắc chiếu vào (bức xạ tới - tia tới);

I- cường độ bức xạ đơn sắc đã qua;

l- độ dày lớp hấp thụ;

k- hệ số hấp thụ đặc trưng riêng của chất đối với mỗi độ dài sóng.

Thường người ta dùng dạng logarit để ghi định luật này:

$$A = \lg\left(\frac{I_o}{I}\right) = k_1 l \qquad k_1 = 0{,}4343k$$

k là hằng số, nghĩa là khả năng hấp thụ chất A (mật độ quang) tỷ lệ với độ dày lớp hấp thụ l. Nồng độ chất hấp thụ không tham gia vào hằng số k.

Định luật Lambert - Bouguer phù hợp với tất cả các chất.

Trong những hệ không liên hợp đơn giản những chuyển dịch này là sóng dài hơn cả. Trong sự liên hợp quỹ đạo π liên kết cao có thể có năng lượng lớn hơn quỹ đạo *n* chưa liên kết và lúc đó vân của bước nhảy $\pi \rightarrow \pi^*$ sẽ là vân sóng dài nhất.

Mức năng lượng điện tử trong những phân tử thơm phức tạp hơn.

Trong phân tử nhiều nguyên tử chứa những điện tử ở các trạng thái khác nhau, dưới tác dụng của bức xạ có thể xảy ra bước nhảy đa dạng từ trạng thái cơ bản đến những trạng thái kích thích khác nhau. Theo những tần số hấp thụ trong các phổ điện tử người ta chỉ có thể đánh giá được những năng lượng tương đối của hai mức. Rõ ràng là để chuyển điện tử từ mức năng lượng đầy cao ở trạng thái cơ bản đến mức năng lượng tự do thấp ở trạng thái kích thích cần năng lượng nhỏ hơn để chuyển từ mức năng lượng đầy thấp hơn. Năng lượng này tương ứng sự kích thích của điện tử từ quỹ đạo đầy cao đến quỹ đạo không đầy thấp.

Ở đây được hiểu là điện tử chuyển từ mức năng lượng này đến mức năng lượng khác trong giới hạn của một phân tử. Nhưng không hoàn toàn nhất thiết như vậy. Trong một vài hệ nói riêng như phức phân tử có thể xảy ra sự chuyển điện tử từ quỹ đạo của một phân tử này đến quỹ đạo của phân tử khác. Thường trong quá trình như thế gọi là sự chuyển giữa những phân tử của điện tích.

1.1.3. Quy tắc chọn lọc

Hoàn toàn không phải tất cả các bước nhảy đều có thể quan sát được mà bị giới hạn, nghĩa là có quy tắc chọn lọc trong hệ thực tại.

Thứ nhất, trong sự hấp thụ lượng tử ánh sáng có thể chỉ một điện tử bị kích thích. Quy tắc thứ hai liên quan đến số lượng tử spin không thay đổi trong sự chuyển điện tử. Đa số những phân tử hữu cơ ổn định thì những điện tử thường cặp đôi và mỗi một quỹ đạo có một cặp điện tử với spin ngược hướng nhau. Khi kích thích một từ cặp điện tử chuyển đến quỹ đạo có năng lượng cao hơn nhưng bảo tồn về hướng spin, nghĩa là ngược hướng của spin cặp trước. Những hệ chỉ chứa những điện tử cặp đôi gọi là trạng thái tổ hợp, còn những hệ chứa hai điện tử không cặp đôi là trạng thái kép 3. Sự chuyển dịch giữa những trạng thái tổ hợp là được phép, ngược lại những chuyển dịch giữa trạng thái tổ hợp và trạng thái kép 3 bị cấm. Các chuyển dịch giữa những trạng thái kép 3 khác cho phép bởi quy tắc chọn lọc nhưng vì độ dịch chuyển của trạng thái kép 3 như là một quy luật rất thấp, những dịch chuyển như thế thường không quan sát được. Những quy tắc khác của chọn lọc liên quan tới tính đối xứng của phân tử nói

1.1.4.2. Định luật Beer

Định luật này được Beer xây dựng vào năm 1862 biểu diễn mối liên hệ giữa khả năng hấp thụ và nồng độ của chất hấp thụ trong dung dịch.

Dòng tia song song của bức xạ đơn sắc khi đi qua dung dịch của chất hấp thụ có nồng độ C bị yếu đi theo quy luật:

$I = I_o e^{-kCl}$ hoặc ở dạng logarit ta có $A = \lg\frac{I_o}{I} = k_2 Cl$

$k_2 = 0,4343k$.

k và k_2 là hệ số hấp thụ đặc trưng cho chất.

Định luật Beer có thể phát biểu: Sự hấp thụ của ánh sáng tỷ lệ với số phân tử của chất mà ánh sáng đi qua nó. Như vậy nếu chất hấp thụ hòa tan hoàn toàn trong dung môi trong suốt, sự hấp thụ của dung dịch sẽ tỷ lệ với nồng độ phân tử của nó.

Khác với định luật Lambert - Bouguer, định luật Beer không phải định luật vạn năng. Sự sai lệch từ định luật Beer liên quan tới sự tác động tương hỗ giữa những phân tử trong dung dịch. Trước khi ứng dụng định luật Beer cần thiết phải kiểm tra sự tuân thủ định luật của dung dịch chất nghiên cứu.

1.1.5. Những phương pháp biểu hiện phổ hấp thụ

Những dữ liệu phổ được ghi như là sự phụ thuộc của hệ số hấp thụ vào độ dài của sóng nghĩa là được biểu diễn nhờ hai đại lượng biến thiên: yếu tố cường độ và yếu tố độ dài sóng. Sự chọn lựa những biểu thức thích hợp nhất đối với hai yếu tố này phụ thuộc vào điều kiện làm việc, vào lĩnh vực nghiên cứu cũng như vào sự ứng dụng tiếp theo của những đại lượng nhận được.

Thông số độ dài sóng có thể biểu diễn theo tất cả các vùng phổ quang học bằng cm^{-1} hay phụ thuộc vào vùng nghiên cứu: Å = 10^{-8} cm (anstrom), nm (nanomet), mμ (milimicron) đối với vùng khả kiến và vùng tử ngoại, micron (μ) đối với vùng hồng ngoại. Tần số biểu thị bằng s^{-1} (giây^{-1}) hiếm khi được sử dụng.

Yếu tố cường độ có thể biểu diễn như sau:

$\frac{I}{I_o}$: sự đâm thâu, phần bức xạ đi qua.

$\frac{I}{I_o} \cdot 100$: độ đâm thâu (%).

$\frac{I_o - I}{I_o}$: sự hấp thụ, phần bức xạ đã hấp thụ.

$\frac{I_o - I}{I_o} \cdot 100$: độ hấp thụ (%).

$A = \lg\left(\frac{I_o}{I}\right)$: mật độ quang.

Trong những phương pháp kể trên của sự biểu diễn yếu tố cường độ, độ dày của lớp và nồng độ có thể dùng đơn vị bất kỳ: thí dụ độ dày có thể dùng mm hay cm; nồng độ có thể là % trọng lượng và % thể tích thí dụ: g/l, mg/l, g/ml, mg/ml, M/l (mol/lit)...

Nếu nồng độ của chất được biểu diễn bằng mol/lit (M/l) và độ dày của lớp bằng cm thì yếu tố cường độ được gọi bằng hệ số hấp thụ phân tử ε hoặc là hệ số tắt phân tử. Định luật Beer được ghi dưới dạng:

$$A = \varepsilon Cl \quad \text{hoặc} \quad \varepsilon = \frac{A}{Cl}$$

Hợp nhất hai định luật Lambert - Bouguer có biểu thức:

$$A = \lg\left(\frac{I_o}{I}\right) = \varepsilon Cl$$

Đại lượng A (1%, 1 cm): là mật độ quang của dung dịch chất tan có nồng độ 1% (kl/tt) hay 10 g/l = $\frac{10}{M}$ mol/lit trong một cốc có độ dày 1 cm ở độ dài sóng xác định, ký hiệu là $A_{1\,cm}^{1\%}$ (hệ số hấp thụ).

$$A_{1\,cm}^{1\%} = \frac{10\varepsilon}{M}$$

Do đó

$$\varepsilon = A_{1\,cm}^{1\%} \cdot \frac{M}{10}$$

Thực tế, người ta sử dụng những nồng độ, độ dày lớp hấp thụ sao cho ở độ dài sóng cho phép nhận được giá trị tối ưu của mật độ quang đối với thiết bị sử dụng, sau đấy tính lại kết quả nhận được thành giá trị $A_{1\,cm}^{1\%}$. Bằng thực nghiệm ta có thể xác định hệ số tắt phân tử ε của bất kỳ chất nào.

Ứng dụng của định luật Beer

Phải nhớ rằng theo định luật Beer nếu thay đổi nồng độ của dung dịch và độ dày của lớp hấp thụ thì tích số của những đại lượng này là không đổi. Cường độ hấp thụ của dung dịch cũng không đổi.

Thí dụ: lớp của dung dịch 1% dày 10 cm hấp thụ chính xác lượng ánh sáng như là lớp dung dịch 10% dày 1 cm. Khác với định luật Lambert cho đến nay nó tuân thủ một cách nghiêm ngặt trong tất cả các trờng hợp đã bức xạ. Định luật Beer có nhiều ngoại lệ, nhưng những sai lệch thường được giải thích bằng sự

thay đổi thành phần, sự biến thiên gây nên bởi nồng độ. Nhiều acid, base và muối trong dung dịch không tuân theo định luật Beer chỉ vì khi tăng mức độ pha loãng chúng bị ion hoá hoàn toàn hơn, mà sự hấp thụ ánh sáng bởi các ion như một quy luật khác với sự hấp thụ của những phân tử không bị ion hoá.

Thí dụ: Phổ của acid nitric đậm đặc tương ứng với sự hấp thụ của phân tử HNO_3, ngược lại phổ của dung dịch pha loãng xuất hiện vân đặc trưng của sự hấp thụ ion nitrat.

Khi ứng dụng phổ hấp thụ nhất thiết phải coi trọng kiểm tra tính đúng đắn của định luật Beer đối với mỗi chất. Đối với phần lớn các chất hữu cơ không ion hoá, định luật Beer thực hiện ít nhất cũng gần đúng. Nhưng trước khi ứng dụng phương pháp quang phổ với một chất nào đó cần phải kiểm tra xem ở dung môi nào, nồng độ nào thì tuân theo định luật Beer rồi mới tiến hành nghiên cứu. Sự sai lệch đáng kể khỏi định luật Beer có thể gây nên bởi ánh sáng khuếch tán đi qua máy đơn sắc và cũng gây nên bởi sự phát huỳnh quang của dung dịch.

Những sai lệch tương tự được quan sát đối với dung dịch naphtalin và antraxen. Nếu dung dịch hoặc dung môi hấp thụ rất mạnh bức xạ không đơn sắc có thể tạo nên một bộ phận đáng kể từ dòng ánh sáng chung đi vào detectơ. Những khó khăn như thế tồn tại thật sự đặc biệt ở vùng tử ngoại xa của phổ gần vân hấp thụ của oxy khí quyển. Bởi vậy cần phải hoặc làm chân không máy hoặc đuổi hết khí làm trong suốt ở vùng này, thí dụ dùng khí nitơ.

1.2. Thiết bị

Khi ánh sáng hoặc bức xạ của một vùng bất kỳ nào khác của phổ điện tử tới môi trường trong suốt nó có thể tương tác với môi trường:

- Phản xạ trên bề mặt.
- Bị khuếch tán trong môi trường.
- Bị hấp thụ.

Khi không có sự tương tác bức xạ được truyền qua.

Thường cả 4 quá trình này có thể quan sát một cách đồng thời. Bức xạ bị hấp thụ là đối tượng nghiên cứu của phổ hấp thụ. Nhờ những thành tựu trong lĩnh vực chế tạo công cụ người ta đã sản xuất một cách công nghiệp hàng loạt máy quang phổ dùng trong phân tích định tính cũng như định lượng. Những máy này giúp chúng ta dễ dàng thực hiện các phép đo tương ứng để đánh giá định lượng cường độ màu hoặc sự hấp thụ ánh sáng.

Những thiết bị phổ thông cũng cho phép chúng ta đo được hệ số đâm thâu, mật độ quang của chất trong suốt, vẽ những đường cong hấp thụ cũng như đo được một loạt những đặc trưng quang học khác.

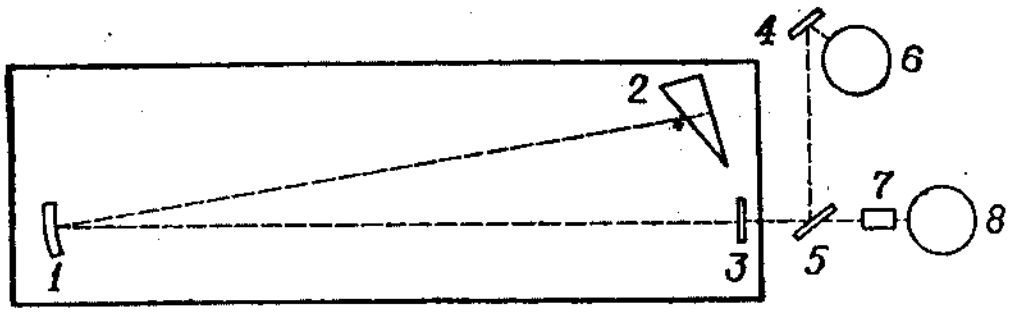
Tùy theo yêu cầu mục đích của phòng thí nghiệm mà người ta trang bị những máy có đặc trưng phù hợp hoặc chỉ hoạt động ở vùng khả kiến hoặc ở vùng tử ngoại hay hoạt động ở cả 2 vùng khả kiến và tử ngoại.

Phụ thuộc vào kinh phí mà trang bị máy phổ thông hay hiện đại đa chức năng.

Máy phổ thông hay hiện đại - hoàn toàn tự động được ghép nối và điều khiển bằng vi tính đều hoạt động dựa trên nguyên lý của sự so sánh hai chùm tia sáng nhờ màng chắn liên hệ với trục đo.

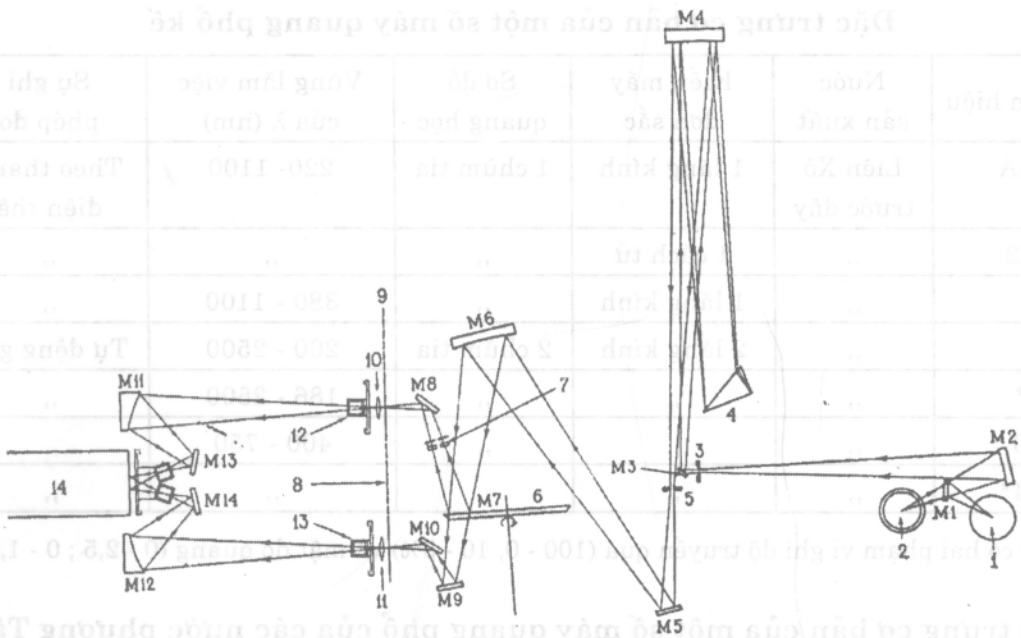
Sơ đồ quang học của tất cả các máy quang phổ khả kiến tử ngoại đều thiết kế theo nguyên lý một chùm tia hay hai chùm tia. Với những máy cấu tạo theo nguyên lý hai chùm tia khi thực hiện phép đo thuận tiện hơn.

Dưới đây chúng tôi xin giới thiệu những đặc trưng cơ bản của một số máy đã được sử dụng rộng rãi ở các nước và ở nước ta có sơ đồ quang học một chùm tia (hình 1), hai chùm tia (hình 2).



Hình 1. Sơ đồ quang học của máy quang phổ Beckman DU cấu tạo theo nguyên lý một chùm tia:

1. gương nhôm hình cầu;
2. lăng kính thạch anh xoay 30 độ;
3. khe ánh sáng đơn sắc;
4. gương tụ sáng;
5. gương phẳng đặt nghiêng;
6. nguồn sáng;
7. cuvet;
8. tế bào quang điện.



Hình 2. Sơ đồ quang học của máy quang phổ Unicam SP-800 cấu tạo theo nguyên lý hai chùm tia:

1. đèn đốt nóng; 2. đèn Đơteri; 3. khe vào; 4. lăng kính từ thạch anh nóng chảy; 5. khe ra; 6. bộ điều biến; 7. lọc ánh sáng cân bằng tia; 8. bộ suy giảm; 9. tới bút của máy tự ghi; 10 - 11. thấu kính; 12. cuvet so sánh; 13. cuvet để mẫu; 14. bộ nhân quang; M_1 - M_{14}: gương (M_1: gương với sự truyền hình soắn; M_6: gương hình xuyến)

Đặc trưng cơ bản của máy so màu

Nhãn hiệu	Nước sản xuất	Vùng phổ hay phạm vi làm việc của λ (nm)	Số lượng kính lọc*	Thiết bị thu năng lượng ánh sáng
FEK-M	Liên Xô trước đây	Khả kiến	4	2 tế bào quang điện Selen
FEK-N-57	,,	Khả kiến & tử ngoại gần	9	2 tế bào quang điện Sb - Cs
FEK-56	,,	315 - 630	9	2 tế bào quang điện F_4(Sb - Cs)
FEK-50	,,	360 - 1000	9	Tế bào quang điện Sb - Cs (SXV - 4) cho vùng phổ 360 - 660 nm và tế bào O - Cs (XV - 4) cho vùng phổ 600 - 1000 nm.
LMF-64M	,,	360 - 980	5	,,
FM-58I	,,	400 - 700	10	2 tế bào quang điện O - Cs
Specol	CHDC Đức	330 - 850	10	,,

*Số thứ tự kính lọc: 1 2 3 4 5 6 7 8

λ hiệu dụng cho ánh sáng truyền qua (nm): 726 665 619 574 533 496 465 432

Đặc trưng cơ bản của một số máy quang phổ kế

Nhãn hiệu	Nước sản xuất	Kiểu máy đơn sắc	Sơ đồ quang học	Vùng làm việc của λ (nm)	Sự ghi phép đo
SF- 4A	Liên Xô trước đây	1 lăng kính	1 chùm tia	220- 1100	Theo thang điện thế
SFD-2	,,	1 cách tử	,,	,,	,,
SF-5	,,	1 lăng kính	,,	380 - 1100	,,
SF-8	,,	2 lăng kính	2 chùm tia	200 - 2500	Tự động ghi
SF-9*	,,	,,	,,	186 - 2500	,,
SF-10	,,	,,	,,	400 - 750	,,
SF-14*	,,	,,	,,	,,	,,

* Máy có hai phạm vi ghi độ truyền qua (100 - 0, 10 - 0%) và mật độ quang (0 - 2,5 ; 0 - 1,0).

Đặc trưng cơ bản của một số máy quang phổ của các nước phương Tây

Nhãn hiệu	Nước sản xuất	Kiểu máy đơn sắc	Sơ đồ quang học	Vùng làm việc của λ (nm)	Sự ghi phép đo
Beckman DU-2	Mỹ	1 lăng kính	1 chùm tia	190 - 1000	Theo thang điện thế
Beckman DB	,,	,,	2 chùm tia	205 - 770	Tự ghi
Beckman DB-G	,,	,,	,,	190 - 700	Theo thang điện thế
Beckman DK-2A	,,	,,	,,	185 - 3500	Tự động ghi
Beckman FarUVDK	,,	2 lăng kính	,,	160 - 3500	,,
Cary-11	,,	,,	,,	200 - 800	,,
Cary-14	,,	,,	,,	186 - 2600	,,
Cary-15	,,	,,	,,	185 - 800	,,
Cary-1	Mỹ - Úc	2 cách tử	,,	190 - 900	,,
Cary-3	,,	,,	,,	,,	,,
Cary-4	,,	,,	,,	175 - 900	,,
Cary-5	,,	,,	,,	175 - 3300	,,
Unicam SP-500	Anh	1 lăng kính	1 chùm tia	186 - 1000	Theo thang điện thế
Unicam SP-700	,,	,,	2 chùm tia	186 - 3600	Tự động ghi
Unicam SP-800	,,	,,	,,	190 - 850	,,
Unicam MK-9	,,	,,	1 chùm tia	185 - 1000	Theo thang điện thế

(tiếp theo)

Nhãn hiệu	Nước sản xuất	Kiểu máy đơn sắc	Sơ đồ quang học	Vùng làm việc của λ (nm)	Sự ghi phép đo
Ultraskan	,,	,,	2 chùm tia	200 - 750	Tự ghi
VSU-2P	Đức	,,	1 chùm tia	200 - 1000	Theo thang điện thế
VSU-2G	,,	Cách tử	,,	320 - 1100	,,
Shimadzu UV-1240	Nhật	,,	2 chùm tia	190 - 800	Tự ghi
Shimadzu UV-1601	,,	,,	,,	,,	,,

Nhật Bản còn sản xuất một loạt máy có nhãn hiệu Shimadzu UV-1601 PC; UV-1650 PC; UV-1700; UV-2450 PC; UV- 2550 và UV-3150.

1.3. Ứng dụng

1.3.1. Ứng dụng phổ hấp thụ trong phân tích định tính và nghiên cứu cấu trúc phân tử

Trong một trăm năm qua, người ta đã liên hệ màu của các chất với cấu trúc của chúng. Khi cho rằng màu của hợp chất được gây nên bằng sự có mặt của các nhóm không bão hoà, năm 1876, Vittơ đã đưa ra thuật ngữ "sinh màu". Ngày nay thuật ngữ này vẫn được giữ sau nhóm không bão hoà. Những nhóm này hấp thụ ở vùng 180 - 800 nm.

Những phổ hấp thụ điện tử trong khoảng từ 200 - 800 nm được ứng dụng một cách rộng rãi để phát hiện và xác định cấu trúc của những hợp chất hữu cơ, bởi vì sự đo trong những vùng thấp hơn 190 nm (52600 cm^{-1}) đòi hỏi máy móc phức tạp.

Khi nghiên cứu những phổ hấp thụ của những lớp hợp chất hữu cơ khác nhau trong vùng 200 - 800 nm (50000 - 12500 cm^{-1}) những hydrocarbua bão hoà của dãy thẳng và vòng (parafin và cycloparafin) chứa những liên kết đơn giản chỉ có thể có bước nhảy $\sigma \rightarrow \sigma^*$. Những vân tương ứng với bước nhảy này nằm trong vùng tử ngoại chân không. Thí dụ CH_4 có vân hấp thụ ở 125 nm (80000 cm^{-1}), C_2H_6 ở 135 nm (74000 cm^{-1}).

Trong phổ của những phân tử bão hoà chứa dị tố có đôi điện tử tự do không liên kết, vân hấp thụ ở độ dài sóng dài hơn liên hệ với bước nhảy $n \rightarrow \sigma^*$. Bên cạnh sự hấp thụ này có thể vẫn xuất hiện những vân hấp thụ do bước nhảy $\sigma \rightarrow \sigma^*$. Thường có hai vị trí cực đại hấp thụ. Thí dụ CH_3OH có 2 vân ở 150 nm (66600 cm^{-1}) và 183 nm (54600 cm^{-1}).

Rõ ràng là những hydrocarbua no, vòng cũng như dẫn xuất chứa dị tố không hấp thụ ở vùng này.

Trong vùng từ 200 - 250 nm (50000 - 40000 cm^{-1}) có sự hấp thụ của mono olefin, mono acetylen, một vài alkyl clorua, những acid carbonic không liên hợp và những dẫn xuất của chúng.

Những phổ điện tử được ứng dụng trong sự nghiên cứu các hợp chất hữu cơ chứa hệ thống liên kết bội liên hợp, những hợp chất không liên hợp chứa những nguyên tử dị tố phải có bước nhảy $n \rightarrow \pi^*$ cho những vân hấp thụ trong vùng cao hơn 200 nm (< 50000 cm^{-1}) và một vài dẫn xuất halogen.

Trong sự nghiên cứu phổ hấp thụ của những hợp chất hữu cơ dựa vào những đại lượng của hệ số tắt phân tử ε_{max} và vị trí cực đại hấp thụ (λ_{max}).

Những vân hấp thụ cường độ thấp ($lg\varepsilon \leq 2$) được gây nên bởi những nhóm như tiocarbonyl, carbonyl trong những aldehyd và ceton, nitro và nitrozo.

Những vân hấp thụ trong vùng từ 250 - 300 nm (40000 - 33550 cm^{-1}) với $lg\varepsilon$ = 2 - 3 có thể thuộc về những hợp chất benzen đơn giản. Những vân này thường có cấu trúc dao động.

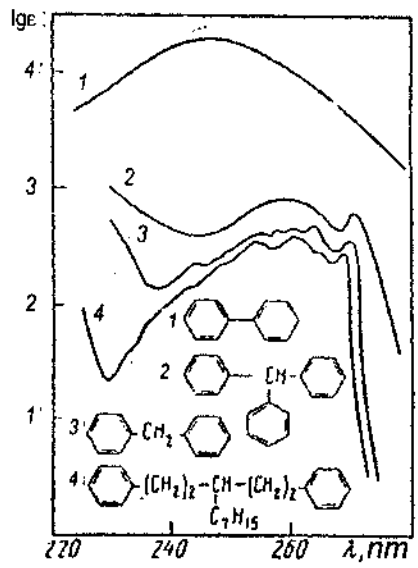
Những vân hấp thu mạnh với λ_{max} lớn hơn 200 nm (< 50000 cm^{-1}) và $lg\varepsilon \geq 4$ đặc trưng cho những hợp chất có liên kết liên hợp. Vị trí của những vân hấp thụ phụ thuộc vào cấu trúc phân tử và trước hết vào vị trí tương hỗ của những nhóm mang màu.

Nếu những nhóm mang màu được liên hợp một cách trực tiếp thì trong phổ quan sát được sự thay đổi mạnh, so với phổ của những hợp chất chứa những nhóm mang màu riêng lẻ.

Sự phân chia những nhóm mang màu bằng một nhóm methylen làm giảm một cách thật sự sự tương tác giữa chúng nhưng sự thay đổi trong phổ không lớn. Điều đó chỉ đúng trong những trường hợp khi mà trong phân tử không xảy ra sự chuyển hoá nội phân tử (thí dụ: hiện tượng hỗ biến ceton-enol).

Nếu hai nhóm mang màu được chia bởi hai nhóm methylen hoặc nhiều hơn thì phổ sẽ trùng với những phổ của những hợp chất chứa những nhóm mang màu riêng lẻ.

Sự thay đổi của dạng đường cong hấp thụ phụ thuộc vào sự sắp xếp tương hỗ của những nhóm mang màu được chỉ ra ở hình 3.

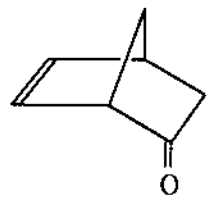


Hình 3. Ảnh hưởng của vị trí tương hỗ của những nhóm mang màu đến phổ hấp thụ:

1. diphenyl;
2. triphenyl methan;
3. diphenyl methan;
4. 1,5- diphenyl 3-heptyl pentan.

Trong một vài trường hợp ở những hợp chất chứa những nhóm mang màu được tách bằng một vài nhóm bão hoà quan sát được sự thay đổi trong phổ. Điều đó có thể giải thích bằng sự sắp xếp gần nhau của những nhóm mang màu trong không gian. Nhờ vậy mà xảy ra sự tương tác của những đám mây điện tử π của chúng.

Sự tương tác nội phân tử kiểu này gặp ở những hợp chất carbonyl. Thí dụ đối với ceton vân hấp thụ của nhóm carbonyl bị dịch chuyển đến 305 nm (32800 cm^{-1}) và cường độ tăng. Điều này được giải thích bằng sự gần về mặt không gian của liên kết đôi và nhóm carbonyl.



Dưới đây là một số ví dụ của sự ứng dụng phổ điện tử để nhận biết chất.

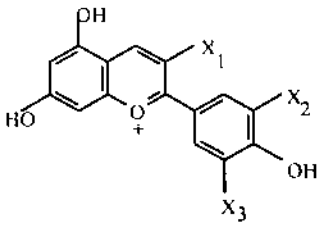
1.3.1.1. Nhận biết sắc tố thực vật

Những hợp chất màu có nguồn gốc thực vật có cực đại hấp thụ ở vùng 500 - 550 nm (20000 - 18000 cm^{-1}). Trong phổ hấp thụ xuất hiện những vân ở vùng này chứng minh về sự có mặt của những anthocyanin [1 - 4], mà anthocyanin thì liên quan tới tất cả các lớp chất đã nghiên cứu của sắc tố thực vật [5].

Những anthocyanin là những thành phần cơ bản của chất làm tăng thêm màu cho cánh hoa và quả (đặc biệt là các màu đỏ, xanh, tím). Những chất này là những glycosid của những anthocyanidin màu, chính vì vậy chúng hoà tan được trong nước. Những kiểu cơ bản của những anthocyanidin ban đầu có cực đại hấp thụ được nêu trong bảng 1. Những cực đại hấp thụ này được phân biệt bằng số nhóm hydroxyl.

Hệ số tắt phân tử đối với những hợp chất này thường có độ lớn 25000, nhưng có thể thay đổi phụ thuộc vào pH.

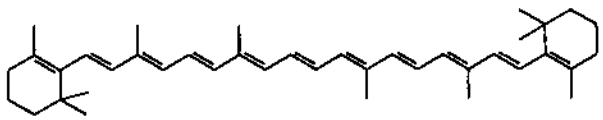
Bảng 1: Cấu tạo và cực đại hấp thụ của anthocyanidin [6]

Những anthocyanidin	Nhóm thế	Kiểu	λ^a_{max} (nm)	ν_{max} (cm^{-1})
	$X_1 = X_2 = X_3 = H$	apigenidin	475	21000
	$X_1 = OH, X_2 = X_3 = H$	pelargonidin	520	19200
	$X_1 = X_2 = OH, X_3 = H$	cyanidin	535	18700
	$X_1 = X_2 = X_3 = OH$	delfinidin	546	18300
	a: Dung dịch trong CH_3OH chứa 0,1% HCl			

1.3.1.2. Những sắc tố carotinoid

Những sắc tố carotinoid hoà tan được trong mỡ thường có màu từ vàng đến đỏ. Chúng có mặt một lượng nhỏ trong mô động vật và thực vật, thường có trong những thuốc nhuộm khác.

Sự hấp thụ của những carotinoid gây nên bởi mạch dài của liên kết ethylen liên hợp. β-Carotin là đại diện điển hình của lớp này. Chúng không ít hơn 11 liên kết.



trans-β-carotin

Màu của những sắc tố này gắn với sự có mặt những vân hấp thụ mạnh ở vùng 400 - 500 nm (25000 - 20000 cm^{-1}). Phổ thường có 3 cực đại. Vị trí của các cực đại được xác định chính xác và được sử dụng để nhận biết những sắc tố tinh khiết riêng biệt, hoặc ít ra cũng nhận biết hệ mang màu của chúng (bảng 2).

Bảng 2: Những vân hấp thụ của carotin trong dung môi hexan

Hợp chất	ν_{max} (cm^{-1})	λ_{max} (nm)	ε_{max}	ν_{max} (cm^{-1})	λ_{max} (nm)	ε_{max}	ν_{max} (cm^{-1})	λ_{max} (nm)	ε_{max}	Tài liệu
α-carotin	23700	422	102000	22500	444	150000	21100	473	135000	7 - 8
β-carotin	23500	425		22100	453	158000	20700	482	141000	9
γ-carotin	22900	437	110000	21600	462	166000	20200	494	146000	7 - 8

Như một quy luật chỉ với những lượng rất nhỏ của sắc tố cũng có thể đủ để xác định một chất bằng phương pháp phổ quang kế (thường chỉ cần 3 mg sắc tố là đủ). Chính vì vậy phương pháp được ứng dụng rất rộng rãi.

Những phổ hấp thụ của carotinoid cho thông tin đơn thuần về nhóm mang màu có mặt trong phân tử, bởi vậy chúng được nghiên cứu khá chi tiết.

Những dữ liệu điển hình về những vân hấp thụ của một số sắc tố tự nhiên được ghi trong bảng 3.

Bảng 3. Những vân hấp thụ của một vài carotinoid tự nhiên trong CS_2 [10]

Hợp chất	Công thức	Vị trí cực đại hấp thụ		Tài liệu
		ν_{max} (cm^{-1})	λ_{max} (nm)	
Torularodin	$C_{37}H_{18}O_2$	17200 18500 19900	582 564 502	11
Rodoviolasxin	$C_{42}H_{60}O_2$	17400 18700 20200	574 534 496	11
Rodocsantin	$C_{40}H_{54}O_2$	17700 19000 20400	564 525 491	11
Licopin	$C_{40}H_{56}$	18200 19700 21000	548 507 477	11
Licophil	$C_{40}H_{56}O_2$	18200 19700 21000	548 507 473	11
Capsorubin	$C_{40}H_{50}O_4$	18500 19900 21400	542 503 468	11
γ-carotin	$C_{40}H_{56}$	18700 20200 21600	534 496 463	11
β-carotin	$C_{40}H_{56}$	19200 20600 22200	520 485 450	11
α-carotin	$C_{40}H_{56}$	19600 21000	509 477	11
Luitherin	$C_{40}H_{56}O_2$	19700 21000 22500	508 476 445	11
Citrocsantin	$C_{40}H_{56}O$	20400 21800	490 459	11
Phlavocsantin	$C_{40}H_{56}O_2$	20900 22300 23800	478 449 420	11

- Clorophyll

Clorophyll là một từ những sắc tố thực vật cho màu xanh của cây. Clorophyll thuộc lớp porphyrin phức tạp hoặc sắc tố pyrol [12], trong đó có sắc tố máu và vitamin B_{12} là họ hàng.

Do nghiên cứu tổng hợp rộng rãi điều chế vitamin B_{12}, người ta chú ý tới phổ hấp thụ của những sắc tố vòng lớn giúp nhận rõ cấu trúc của chúng.

Trong những phổ của clorophyll những vân hấp thụ cơ bản tìm thấy ở vùng 430 - 450 nm (23000 - 22000 cm^{-1}) và 650 - 700 nm (15500 - 14000 cm^{-1}).

Những porphyrin trung tính phân tử của chúng vắng mặt ion phức kim loại phù hợp có 4 vân hấp thụ trong vùng khả kiến của phổ. Đối với hợp chất này, người ta phân biệt 3 kiểu phổ:

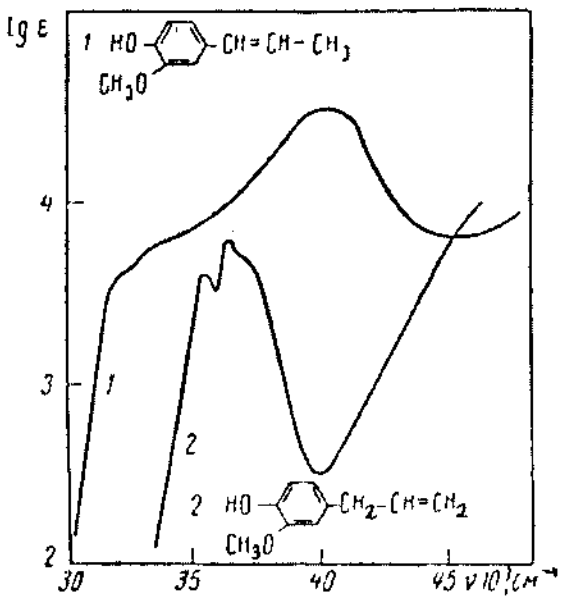
• Kiểu *etioporphyrin*: cường độ của 4 vân đã nêu tăng theo mức độ tăng của tần số.

• Kiểu *rodoporphyrin*: vân thứ 3 (tính từ vân độ dài sóng lớn nhất) có cường độ cao nhất.

• Phổ của những *phillоporphyrin*: cường độ của 4 vân lần lượt luân phiên (vân 1 và 3 cường độ giảm hơn vân 2 và 4).

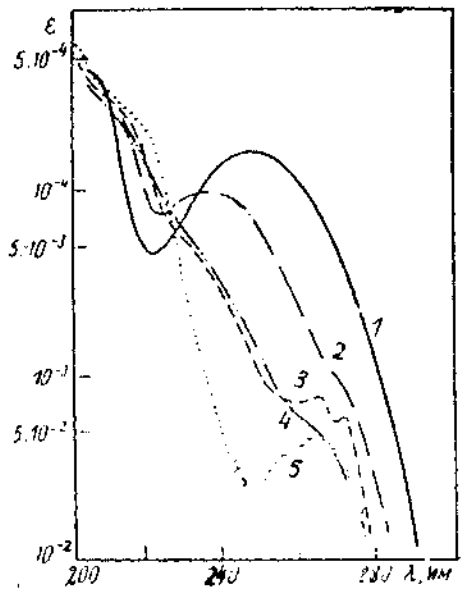
Chúng ta đã xem xét một số ví dụ để nhận biết những sắc tố thực vật, dưới đây là một số ví dụ của sự ứng dụng phổ điện tử để xác định cấu trúc của hợp chất.

① Theo phổ tử ngoại những hợp chất chứa những liên kết liên hợp và không liên hợp dược phân biệt một cách dễ dàng (hình 4).



Hình 4: Ảnh hưởng của sự liên hợp đến phổ hấp thụ:

1. isoebgenol trong hexan.
2. ebgenol trong hexan.



Hình 5: Ảnh hưởng của yếu tố không gian đến phổ:

1. diphenol.
2. 2-methyldiphenyl.
3. 2,6-dimethyldiphenyl.
4. 2,2'-dimethyldiphenyl.
5. 2,2',6,6'-tetramethyldiphenyl.

Tất cả trong dung môi cyclohexan.

② Theo giá trị của vân cực đại xác định cấu trúc của hệ liên hợp trong những carbuahydro không no và những hợp chất carbonyl. Có thể tính toán độ dài sóng hấp thụ cực đại của polien không chứa vòng 1,3-cyclohexadien dựa vào λ_{max} của butadien làm chuẩn rồi thêm số gia tương ứng của những nhóm thế ở những liên kết đôi theo biểu thức:

$$\lambda_{max} = 217 + 5A + 30B + 5C$$

A: số nhóm thế alkyl (có thể có liên kết bội nhưng không liên hợp);

B: số những liên kết bội liên hợp;

C: số những liên kết bội ngoài vòng.

Đối với những dien vòng:

$$\lambda_{max} = 256 + 5A + 30B + 5C$$

Trong trường hợp những hydrocarbua steroid không bão hoà thì giá trị ban đầu của độ dài sóng được xác định bằng sự sắp xếp tương hỗ của những liên kết đôi. Nếu những liên kết đôi ở trong một vòng thì đại lượng này bằng 253nm, nếu chúng ở các vòng khác nhau thì là 214 nm.

Bảng 4 nêu những ví dụ của sự ứng dụng quy luật này tính giá trị của độ dài sóng hấp thụ cực đại của những hợp chất không no.

Có một quy luật tương tự để tính độ dài sóng cực đại hấp thụ của những ceton không no. Những số gia phụ thuộc vào đặc trưng của nhóm thế cũng như vào vị trí của nó trong hệ liên hợp.

Cấu trúc của aldehyd và ceton có thể được xác định theo vị trí của độ dài sóng cực đại của vân hấp thụ của 2,4-dinitrophenylhydrazon của chúng.

$$\lambda_{max} = 330 + 7A + 17 + 9B$$

ở đây: 330- λ_{max} của 2,4-dinitrophenylhydrazon của formaldehyd;

7- số gia đối với nhóm thế alkyl đã đưa vào nhóm C=O hoặc cuối mạch liên hợp;

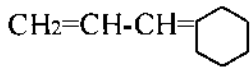
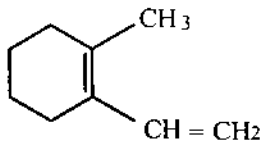
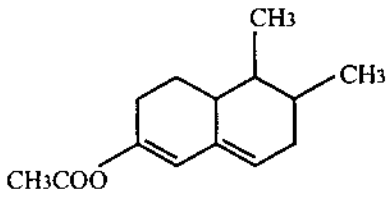
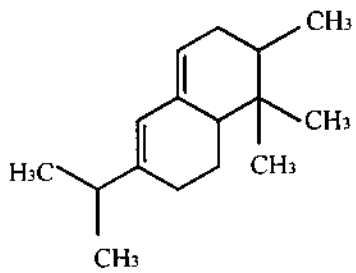
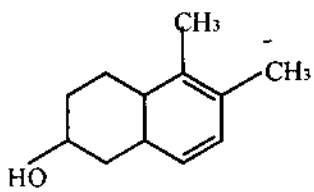
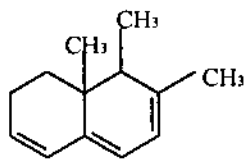
A- số nhóm thế alkyl;

17- số gia của liên kết đôi liên hợp đầu tiên;

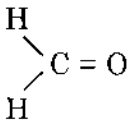
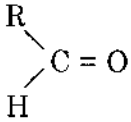
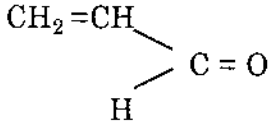
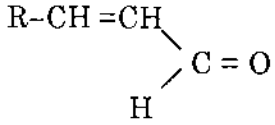
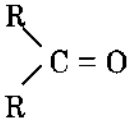
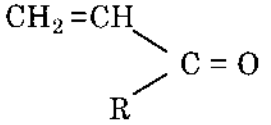
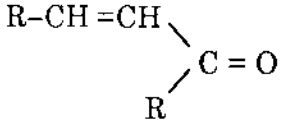
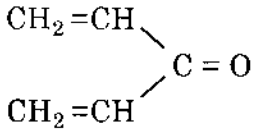
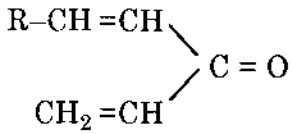
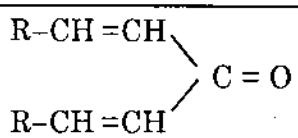
9- số gia của liên kết đôi tiếp theo;

B- số gia của liên kết đôi liên hợp C = C + 1.

Bảng 4: Giá trị cực đại hấp thụ của những hợp chất không no

Hợp chất	λ_{max} (nm)	
	Tính toán	Tìm được
CH_2=C-(CH_3)-C-(CH_3)=CH_2	217 + 5 × 2 = 227	226
($C_2H_5OCH_2CH$=CH)$_2$	217 + 5 × 2 = 227	228
	217 + 5 × 1 + 5 × 2 = 232	236
	217 + 5 × 2 + 5 × 1 = 232	233
	214 + 5 × 4 + 5 = 239	240
	214 + 5 × 4 + 5 = 239	238
	253 + 5 × 4 = 273	275
	253 + 5 × 5 + 30 + 5 = 313	316

Bảng 5: Giá trị cực đại hấp thụ của 2,4-dinitrophenylhydrazon của các hợp chất carbonyl (aldehyd và ceton) theo tính toán và thực nghiệm

Hợp chất carbonyl	λ_{max} 2,4-dinitrophenylhydrazon (nm)	
	Thực nghiệm	Tính toán
	330	
	336 - 337	337 = 330 + 7 × 1
	347	347 = 330 + 7 × 1 + 9 × 1 +1
	354 - 357	354 = 330 + 7 × 1 +17
	343 - 345	344 = 330 + 7 × 2
	352	354 = 330 + 7 × 2 + 9 × 1 + 1
	362 - 364	361 = 330 + 7 × 2 +17
	357	356 = 330 + 7 × 2
	361	363 = 330 + 7 × 2 + 17
	370	370 = 330 + 7 × 2 + 17 + 9

③ Sự phá vỡ hệ liên hợp liên quan tới những yếu tố lập thể (không gian) dẫn đến sự thay đổi phổ hấp thụ. Những hợp chất diphenyl là bằng chứng của điều đó. Sự đưa một nhóm thế lớn vào vị trí ortho phá vỡ tính đồng phẳng của phân tử, do đó những phổ hấp thụ trở nên giống các phổ của benzen đã thế tương ứng. (hình 5).

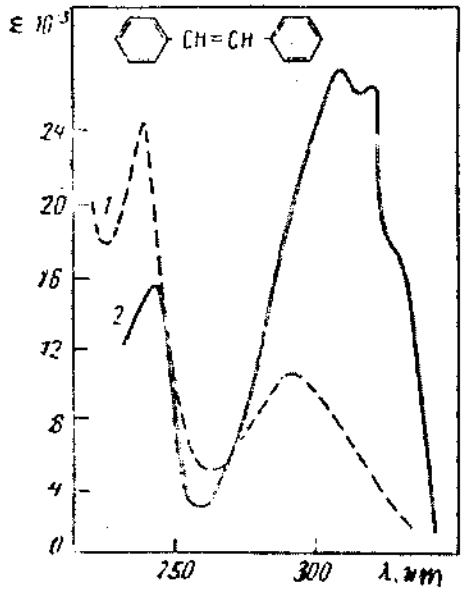
Hiện tượng tương tự quan sát được trong trường hợp của những anilin đã thế ở vị trí ortho, trong đó những nhóm thế phá huỷ sự tương tác của những điện tử n của nitơ với những điện tử π của vòng benzen (bảng 6).

Bảng 6: Hệ số hấp thụ phân tử của những dimethylanilin đã thế

Nhóm thế	ε_{max} (1)	Nhóm thế	ε_{max}
H	14000	2-clor	7500
4-methyl	15000	2-brom	6000
2-methyl	6000	4-nitro	18000
2,6-dimethyl	2500	4-nitro 3-methyl	16500
2-tretbutyl	1000	4-nitro3,5-dimethyl	6500
2-flo	12000		

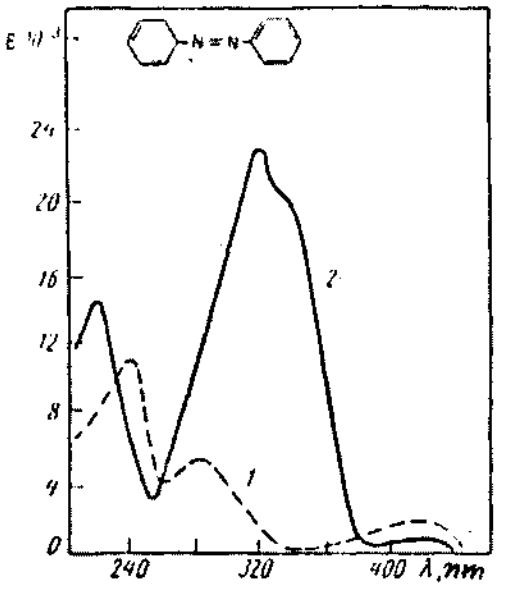
(1): Sự thay đổi cực đại hấp thụ không đáng kể.

④ Phổ tử ngoại được ứng dụng để phân biệt những đồng phân *cis* khỏi đồng phân *trans* trong trường hợp nếu chúng chứa hệ những liên kết bội liên hợp, và như một quy luật cường độ của vân sóng dài của sự hấp thụ do bước nhảy $\pi \rightarrow \pi^*$ của những đồng phân *trans* luôn cao hơn đồng phân *cis*.



Hình 6: Những phổ hấp thụ trong C_2H_5OH:

1. *cis*-stiben; 2. *trans*-stiben



Hình 7: Những phổ hấp thụ trong C_2H_5OH:

1. *cis*-azobenzen; 2. *trans*-azobenzen

Trên hình 6 và 7 đưa ra những phổ của đồng phân *cis* và *trans* của stiben và azobenzen.

Đối với những hợp chất có mạch polyen dài, sự thay đổi cấu hình được phản ánh trên phổ hấp thụ mặc dù chỉ một liên kết bội.

Thí dụ: trans-Licopin toàn phần có những vân hấp thụ ở λ_{max} = 504 nm (ε = 170000), và 470 nm (ε = 186000), còn trong phổ của neolicopin A có những vân ở λ_{max} = 500 nm (ε = 100000) và 470 nm (ε = 122000).

trans-Licopin

Neolicopin A

Khi sử dụng thực nghiệm những phổ hấp thụ để nghiên cứu cấu trúc của những hợp chất hữu cơ cần phải so sánh những phổ của đối tượng nghiên cứu với những phổ của các chất có cấu trúc đã biết rõ.

Do trong phổ tử ngoại hệ của liên kết bội liên hợp được xuất hiện là chính, cho nên phổ của những chất có hệ của liên kết bội như thế có thể sử dụng làm phổ hợp chất chuẩn.

Cần phải biết rằng khi so sánh sự hấp thụ của hợp chất chuẩn và hợp chất nghiên cứu sử dụng giá trị λ_{max} và cường độ của chúng chưa đủ mà phải tiến hành so sánh toàn bộ đường cong hấp thụ và chỉ khi có sự tương tự của tất cả phổ mới là cơ sở để nhận biết tính đồng nhất cấu trúc của hệ liên hợp.

1.3.2. Ứng dụng phổ hấp thụ trong phân tích định lượng

Ngày nay phân tích định lượng các hợp chất là một quan điểm phổ biến và quan trọng nhất của sự ứng dụng phổ hấp thụ. Những hợp chất có sự hấp thụ chọn lọc ở một vùng phổ phù hợp trong vùng 200 - 800 nm (50000 - 12500 cm^{-1}) đều có thể áp dụng phổ hấp thụ điện tử để xác định nồng độ bất kỳ trong môi trường trong suốt dựa vào định luật Lambert-Beer.

Theo định luật Lambert-Beer thì cường độ của dung dịch chất hấp thụ tỷ lệ với nồng độ chất và độ dày lớp hấp thụ.

Khi ghi quang điện các phổ thì độ chính xác của sự xác định có thể đạt được ± 0,2%.

Phương pháp phổ quang kế đặc biệt hữu hiệu khi xác định lượng nhỏ của chất, tất nhiên chất phân tích cần phải có sự hấp thụ chọn lọc đạt cường độ cao. Trong nhiều trường hợp chất được phân tích rất ít, những phương pháp khác nói chung hoặc không áp dụng được, hoặc đòi hỏi sự thực hiện tốn kém, mất thời gian và có thể dẫn đến thao tác không chính xác.

Để định lượng chất hấp thụ có thể sử dụng bất kỳ thiết bị phù hợp dựa trên sự đo cường độ chất hấp thụ nhưng cần thực hiện 2 điều kiện.

Một là: cần phải kiểm tra trong khoảng nồng độ làm việc của chất có tuân theo định luật Lambert-Beer hay không, nghĩa là cường độ hấp thụ (mật độ quang A) ở độ dài sóng bất kỳ tỷ lệ với nồng độ của dung dịch chất cũng như tỷ lệ với độ dày của lớp hấp thụ.

Hai là: cần phải xác định phổ hấp thụ của hợp chất tinh khiết, đặc biệt là xác định hệ số tắt phân tử ứng với cực đại hấp thụ (λ_{max}). Nếu đại lượng này đã biết có thể xác định một cách trực tiếp nồng độ của chất. Điều kiện thứ 2 yêu cầu nhất thiết phải có chất chuẩn tinh khiết làm chất đối chiếu so sánh.

Về nguyên tắc có thể xác định nồng độ của chất hấp thụ ở độ dài sóng bất kỳ miễn là ở đó chất tinh khiết cho sự hấp thụ rõ với cường độ rõ nhưng độ chính xác cao nhất của phép đo thường đạt được ở vân λ_{max} rộng. Nói cách khác sự thay đổi cường độ khi thay đổi không đáng kể của độ dài sóng phải nhỏ thì sai số mới không lớn.

Cấu tạo của thiết bị cũng ảnh hưởng đến độ chính xác của phép đo phổ quang kế. Phải nhớ rằng độ chính xác của phép đo phổ quang kế không giống nhau trong tất cả các vùng của mật độ quang mà thang chia độ mật độ quang được quy định theo từng vùng. Đối với mỗi máy cần kiểm tra độ chính xác của sự đo trong các khu vực khác nhau của thang chia độ để làm rõ vùng thích hợp nhất của mật độ quang.

Cần phải kiểm tra định kỳ thiết bị, thậm chí máy ở tình trạng vận hành thường xuyên. Sự kiểm tra như thế cho phép làm rõ một cách kịp thời những sai số của sự đo, điều đó hết sức quan trọng trong phân tích định lượng.

Những chất chuẩn được ứng dụng để kiểm tra và hiệu chuẩn máy được nêu trong bảng 7.

Bảng 7: Những vân hấp thụ của một vài chất chuẩn (a: cực điểm).

Hợp chất	Trọng lượng phân tử	ν_{max} (cm^{-1})	λ_{max} (nm)	$A^{1\%}_{1cm}$	ε	Dung môi
Bicromat kali ($K_2Cr_2O_7$)	294,2	42550[a]	235	124,9	3676	H_2SO_4 0,005 M
		38910	257	145,2	4272	
		31950[a]	313	48,8	1436	
		28570	350	107,1	3151	
Cromat kali (K_2CrO_4)	194,2	36350	275	189,3	3675	KOH 0,05 M
		31920[a]	313[a]	10,86	211	
		26660	375	247,9	4815	
Nitrat kali (KNO_3)	101,1	32210	310	0,6987	7,064	H_2O
Pecrorat astrafloxin	456,7	42360[a]	236	64,62	2951	H_2O
		36030	277	248,50	11350	
		26480[a]	377	1,036	47,32	
		19600	510	1907	87100	
		19320[a]	517	1780	81280	
		18515	540	3164	144500	

1.3.2.1. Định lượng một chất theo chất chuẩn đối chiếu

Dựa vào định luật Lambert-Beer ta có: $A = \varepsilon Cl$ và dùng cuvet có độ dày $l = 1$ cm thì $A = \varepsilon C$.

Gọi A_x - mật độ quang của dung dịch phân tích;

$X = C_x$ - hàm lượng (%) của chất phân tích cần tìm;

A_c - mật độ quang của dung dịch chuẩn;

C_c - nồng độ của dung dịch chuẩn (%);

V - thể tích ban đầu của dung dịch phân tích (ml);

V_1 - thể tích của dung dịch phân tích lấy để pha loãng khi đo (ml);

p - lượng cân chất phân tích (g) theo khô tuyệt đối.

Ta có biểu thức:

$$X = \frac{A_x.C_c.V.100}{A_c.p.V_1}\ \%$$

Nếu ta pha thể tích ban đầu của dung dịch chuẩn và dung dịch phân tích như nhau, đồng thời cũng lấy một thể tích như nhau đem pha loãng trong một thể tích giống nhau để đo ta có công thức rút gọn:

$$X = \frac{A}{A_c.p}$$

1.3.2.2. Định lượng một chất không có chất chuẩn đối chiếu

Định lượng một chất không có chất chuẩn đối chiếu nhưng lại biết $A_{1cm}^{1\%}$ hoặc ε (hệ số tắt phân tử của chất tinh khiết) thì việc tính toán có thể áp dụng như sau [13]:

a- Đối với trường hợp biết $A_{1cm}^{1\%}$ của chất, biểu thức tính toán sẽ là:

$$X = \frac{A_x.V.V_2.100}{A_{1cm}^{1\%}.p.V_1}$$

A_x - mật độ quang của dung dịch phân tích;
V - thể tích ban đầu của dung dịch phân tích;
V_1 - thể tích dung dịch ban đầu lấy để pha loãng (ml);
V_2 - thể tích dung dịch đã pha loãng (ml);
p - lượng cân mẫu (g) tính theo khô tuyệt đối;
$A_{1cm}^{1\%}$ - giá trị mật độ quang của dung dịch 1% trong cuvet 1 cm (độ hấp thụ riêng).

b- Đối với trường hợp biết giá trị hệ số tắt phân tử ε ta có công thức tính:

$$X = \frac{A_x.V.V_2.M}{p.V_1.\varepsilon}$$

A_x - mật độ quang của dung dịch phân tích;
V - thể tích ban đầu của dung dịch phân tích (ml);
V_1 - thể tích dung dịch ban đầu lấy để pha loãng (ml);
V_2 - thể tích dung dịch đã pha loãng (ml);
p - lượng cân mẫu (g) tính theo khô tuyệt đối;
ε - hệ số tắt phân tử;
M - trọng lượng phân tử (g).

1.3.3. Ứng dụng phổ hấp thụ trong phân tích hỗn hợp

1.3.3.1. Định lượng trực tiếp thành phần của hỗn hợp chất hấp thụ

Định lượng trực tiếp thành phần của hỗn hợp chất hấp thụ bằng phương pháp quang phổ dựa trên tính chất đã biết: Sự hấp thụ toàn phần của một hỗn hợp bất kỳ là tổng sự hấp thụ của các hợp phần riêng biệt. Trong trường hợp đơn giản hỗn hợp có 2 hợp phần tồn tại hai phương pháp cơ bản tìm giá trị A_a và A_b.

Một là: nếu sau khi xác định sự hấp thụ của hỗn hợp A_h có thể loại hoặc hợp phần a hay hợp phần b, nghĩa là loại được sự hấp thụ của một hợp phần thì hiệu

giá trị đầu và cuối của mật độ quang sẽ xác định mật độ quang gây nên bởi hợp phần đã bị loại. Phương pháp này gọi là phương pháp hiệu.

Hai là: cường độ hấp thụ có thể đo ở 2 giá trị thích hợp của độ dài sóng và giải hệ phương trình chung nhận được. Cũng có thể lập hệ phương trình dựa vào sự hấp thụ ở một độ dài sóng khi sử dụng đồng thời giá trị phân tích này hay giá trị khác của hàm lượng cả hai hợp phần.

Trong trường hợp chung người ta tiến hành như sau:

Ký hiệu $A_a^{\lambda_1}$ và $A_b^{\lambda_1}$ - mật độ quang của chất a và b ở bước sóng λ_1;

$A_a^{\lambda_2}$ và $A_b^{\lambda_2}$ - mật độ quang của chất a và b ở bước sóng λ_2;

$A_c^{\lambda_1}$ và $A_c^{\lambda_2}$ - mật độ quang khảo sát được của hỗn hợp ở λ_1 và λ_2;

x - nồng độ chất a (g/l);

y - nồng độ chất b (g/l).

Ta có

$$A_c^{\lambda_1} = x.A_a^{\lambda_1} + y.A_b^{\lambda_1}$$

$$A_c^{\lambda_2} = x.A_a^{\lambda_2} + y.A_b^{\lambda_2}$$

Thay 6 giá trị đã biết A vào phương trình trên xác định được x và y.

Phương pháp này gọi là phương pháp Phirordt được ứng dụng để phân tích hỗn hợp của sulfanylamid và sulfathiazol [14]; hay phân tích hỗn hợp clorophyl a và clorophyl b chiết từ cây cối [15]...

1.3.3.2. Định lượng gián tiếp thành phần của hỗn hợp chất hấp thụ

Nguyên tắc của phương pháp này là trước khi ứng dụng phổ hấp thụ tách các hợp phần khỏi nhau bằng phương pháp khác nhau. Phổ biến là dùng phương pháp sắc ký lớp mỏng để tách.

Sự kết hợp hai phương pháp này được ứng dụng rất rộng rãi để định lượng chất trong hỗn hợp.

1.4. Dung môi

1.4.1. Những dung môi được ứng dụng trong đo phổ hấp thụ

Chất lỏng hữu cơ được ứng dụng với tư cách là dung môi quang phổ cần phải trơ đối với những chất được nghiên cứu và trong suốt trong vùng của độ dài sóng nghiên cứu. Chất lỏng trơ không màu bất kỳ thực tế có thể là dung môi dùng ở vùng khả kiến. Những hydrocarbua no, H_2O, rượu béo, những dẫn xuất halogen, ester, acid hữu cơ... là những chất thoả mãn điều kiện trong suốt (không có hấp thụ) trong vùng nghiên cứu và trơ (không phản ứng với chất hoà tan) đối với chất nghiên cứu.

Những dung môi hữu cơ trong suốt thường bị bẩn bởi những tạp chất hấp thụ và cần phải làm sạch một cách cẩn thận. Thường người ta sản xuất dung môi chuyên dùng cho quang phổ. Dưới đây trong bảng là giới hạn cho qua của một số dung môi khác nhau.

Dung môi	ν	λ	Dung môi	ν	λ
	cm^{-1}	nm		cm^{-1}	nm
Acetonitril	52600	190	1,1,2-Trifloetan	43300	231
Pentan	52600	190	Tetrahydrofuran	42600	235
Hexan	51300	195	$CHCl_3$	40800	245
Heptan	50800	197	CH_3COOH	39800	251
Isooctan	50800	197	Ethyl acetat	39400	254
Cyclohexan	50500	198	Dimethylsulfoxid	37700	265
Cyclopentan	50500	198	CCl_4	37600	266
H_2O	50000	200	Dimethylformamid	37000	270
CH_3OH	49500	202	Benzen	36000	278
Isopropanol	49300	203	Toluen	35100	285
C_2H_5OH	48800	205	Tetracloethylen	34500	290
Ether diethylic	47600	210	Aceton		300
Dioxan	47400	211	Pyridin	32800	305
Hỗn hợp 3 dm (b)	47200	212	CS_2	26300	380
Diclomethan CH_2Cl_2)	43500	230	Nitromethan	26300	380

a: điểm mà ở đó mật độ quang đối với lớp 1cm xấp xỉ 1 (~10% cho qua).
b: hỗn hợp ether ethylic : 2-methylbutan: C_2H_5OH (5 : 5 : 2 v/v).

Cần phải thận trọng với những số liệu đã nêu trong bảng. Vấn đề là ở chỗ gần giới hạn ứng dụng của dung môi sự truyền qua của chúng có thể còn thấp hơn nữa trong kết quả đo do ảnh hưởng của oxy hoà tan trong dung môi...

Dung môi được chia làm 2 nhóm: không phân cực và phân cực. Nhóm không phân cực gồm những hydrocarbua; nhóm phân cực gồm rượu, nước, trung gian là ether, dioxan.

Phải lưu ý là dung môi ảnh hưởng đến phổ hấp thụ của những chất được hoà tan. Những thay đổi quan sát được dựa vào đặc tính của chất cũng như vào tính chất của dung môi.

Nếu hợp chất không phân cực được hoà tan trong dung môi cũng không phân cực thì phổ của nó trong trường hợp này gần với phổ của tướng hơi. Trong

những dung môi phân cực phổ của những hợp chất không phân cực bị thay đổi chút ít do kết quả của sự tương tác lưỡng cực (lưỡng cực cảm ứng). Những thay đổi lớn nhất trong phổ xảy ra trong sự hoà tan chất phân cực trong dung môi phân cực do sự tương tác mạnh lưỡng cực-lưỡng cực; rất có thể tạo thành phức chất. Trong những dung môi proton ngoài tương tác lưỡng cực-lưỡng cực, liên kết hydro có thể được hình thành dẫn đến sự thay đổi mạnh hơn của phổ.

1.4.2. Ảnh hưởng của dung môi đến vị trí và cường độ của vân hấp thụ

Những vân hấp thụ phù hợp với bước nhảy $\pi \rightarrow \pi^*$ trong sự tăng độ phân cực của dung môi thường bị dịch chuyển về phía sóng dài, cường độ tăng và mất cấu trúc dao động. Những vân của bước nhảy $n \rightarrow \pi^*$ như là một quy luật bị dịch chuyển về phía sóng ngắn và cũng làm mất cấu trúc dao động của chúng.

1.4.3. Ảnh hưởng của nhiệt độ

Nhiệt độ có thể phá vỡ cân bằng mà phổ biến là hình dạng phân tử (hoặc là trạng thái năng lượng). Sự hấp thụ của những phân tử khác với sự hấp thụ của những dạng khác trong hỗn hợp cân bằng. Thay đổi hấp thụ liên quan tới sự thay đổi cấu trúc. Bản chất của sự việc không khác với sự thay đổi trong thời gian phản ứng hoá học.

Hai là: hiệu ứng nhiệt độ thuần tuý là hiệu ứng vật lý: khi hạ nhiệt độ thế năng của phân tử giảm và phần lớn sự hấp thụ sẽ liên quan tới trạng thái năng lượng với mức năng lượng thấp. Kết quả những vân hấp thụ thông thường bị giảm còn vân cấu trúc mảnh trở nên rõ ràng hơn. Chính hiệu ứng thứ 2 này thú vị đối với chúng ta. Sự tồn tại của nó được xác định một cách thực nghiệm và được sử dụng trong nhiều công trình. Ngoài điều đó những vân có cấu trúc mảnh ở nhiệt độ thấp và trải rộng ở nhiệt độ cao. Cường độ hấp thụ ở cực đại giảm một cách tuyến tính với sự tăng nhiệt độ. Điều đó liên quan đến phổ của những dung dịch cũng như phổ của tướng khí.

Sự giãn rộng vân khi tăng nhiệt độ dẫn đến sự xuất hiện hấp thụ ở độ dài sóng lớn; rõ nhất nếu hợp chất hấp thụ ở vùng khả kiến, vì trong trường hợp này màu của chất được tăng lên. Hiệu ứng như thế thuận nghịch và có tên là hiệu ứng nhiệt. Trong những trường hợp ít gặp hơn sự làm nóng những chất không màu dẫn tới sự xuất hiện màu. Thí dụ: 9-phenyl 10-alkylantraxen vân hấp thụ ở ngay ranh giới của vùng khả kiến của phổ, khi làm nóng vân lọt vào vùng khả kiến và làm tăng dung dịch màu vàng.

Trong các phép đo bình thường phổ của những hợp chất hữu cơ ở nhiệt độ

phòng hiệu ứng nhiệt không lớn và có thể bỏ qua. Trong những nghiên cứu phân tích ảnh hưởng của nhiệt độ cần phải xem xét đặc biệt trong các trường hợp khi đòi hỏi độ chính xác cao của phép đo. Thí dụ trong phương pháp của phép quang phổ vi phân sự phụ thuộc nhiệt độ của mật độ quang có thể khác nhau ở độ dài sóng khác nhau. Trong những phép đo như vậy để đạt được độ chính xác cao đôi khi phải có điều nhiệt cuvet đo trong giới hạn ±1°C.

Như những tư liệu nêu trong bảng dưới đây đại lượng của hiệu ứng nhiệt thay đổi chút ít phụ thuộc vào dung môi do tương tác của dung môi với chất hoà tan. Rõ ràng là ảnh hưởng của nhiệt độ có thể khác nhau đối với hệ mang màu khác nhau. Các chất có sự hấp thụ giống nhau ở nhiệt độ phòng, có thể ở nhiệt độ rất thấp cho sự hấp thụ khác nhau. Điều đó cho phép phân biệt chúng.

Trong tài liệu đã mô tả cấu tạo của cuvet để đo ở nhiệt độ thấp. Ngày nay đối với đa số thiết bị quang phổ kế những cuvet như thế được sản xuất một cách công nghiệp.

Hệ số nhiệt độ của sự hấp thụ một số hợp chất hữu cơ

Hợp chất	Methanol				Isooctan			
	ν_{max} (cm^{-1})	λ_{max} (nm)	Hệ số a (10^{-3})	Sự giảm A (%/1°C)	ν_{max} (cm^{-1})	λ_{max} (nm)	Hệ số a (10^{-3})	Sự giảm A (% trên 1°C)
Benzen	39400	254	6,2	0,50	39200	255	6,2	0,48
Toluen	37200	269	8,6	0,74	37200	269	8,5	0,71
o-Cxylon	36900	271	7,3	0,61	36900	271	7,3	0,59
p-Cxylon	36400	275	6,7	0,55	36400	275	6,9	0,55
Acid benzoic	35700	280	2,1	0,09	35700	283	1,8	0,04
Benzaldehyd					34700	288	2,0	0,06
Nitrobenzen	38600	259	1,7	0,05				
Anilin	35200	284	2,0	0,08				
Aceton	36500	274	0,4	0,00	37000	270	0,9	0,00
Ether acetoacetic	41000	244	6,1	0,49	41150	243	1,4	0,00
Penta 2,4-dion	36600	273	6,8	0,56	36900	271	3,0	0,16
Hexa 2,5-dion	37000	270	0,7	0,00	36750	272	0,8	0,00
p-Xynon	41300	242	2,0	0,08	41650	240	2,3	0,09
Hexadien 2,4-al	36900	271	1,9	0,07	38300	261	1,6	0,02
Pentadien 1,3	44800	223	1,4	0,02	44600	224	2,0	0,06
Cyclopentadien	41300	242	1,8	0,06	41500	241	1,7	0,03
Pyridin	38900	257	2,7	0,15	39100	256	1,4	0,00

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. *Stuckey*. (1952); "J. Pharm. Pharmacol.", 4. 345.

2. *Wimer, Theivagt, Papendick*. (1965); "Analyt. Chem.", 37, 185 R.

3. *Brownell, et al*. (1963); "Analyt. Chem." 35, 143 R.

4. *Sunshine, Gerber*. (1963); Spectrophotometric analysis of Drugs, c.c Thomas, Springfield, Illinois.

5. *Maffelt et al*. (1956); "Amer. Ind. Hyg. Quarterly". 17, 186.

6. *Elkins, et al*. (1962); "Analyt. Chem.", 34, 1797.

7. *Klevens, Platt*. (1962); "J. Chem. Phys." 17, 470.

8. *Friedel, Orchin*. (1951); Ultraviolet Spectra of Aromatic compound, John Wiley, New york.

9. *Doran, Gillam*.(1928); "J. Soc. Chem. Ind." 47, 259 T.

10. *Gillam, Heibron*. (1936); "Biochem. J." 30, 1253.

11. *Stern. E. S, Timmons C. T*. (1970); Electronic absorption Spectroscopy in organic chemistry LTD London.

12. *Siegel, Blake*. (1962); "Analyt. Chem." 34, 397.

13. *Nguyễn Kim Cẩn, Đào Xuân Thạnh*. (1999.); "Tạp chí Dược liệu" T4, N4, Tr.110.

14. *Englis, Skoog*. (1943); "Analyt. Chem." 15, 748.

15. *Zscheile*. (1934); "J. Phys.", 38, 95.

16. *Nguyễn Đình Triệu* (2000); Các phương pháp phân tích vật lý và hoá lý. Nhà xuất bản Khoa học và Kỹ thuật Hà Nội.

17. Dược điển Việt Nam III, 2003.

II. PHƯƠNG PHÁP PHỔ HỒNG NGOẠI

2.1. Vị trí của phổ hồng ngoại trong phổ quang học

Phổ hồng ngoại (bức xạ hồng ngoại) tương ứng bậc năng lượng 10^{-1} eV (ứng độ dài sóng 10^{-4} - 10^{-2} cm). Năng lượng của vùng này ứng với năng lượng của bước nhảy giữa mức dao động của nguyên tử trong phân tử (phổ dao động).

Vùng hồng ngoại của phổ được chia thành 3 vùng là hồng ngoại gần, hồng ngoại cơ bản và hồng ngoại xa. Ứng với mỗi vùng người ta sử dụng những vật liệu quang và nguồn bức xạ khác nhau phù hợp.

Vùng hồng ngoại gần (0,8 - 2 μm).

Thuỷ tinh và thạch anh là vật liệu quang học. Đèn đốt nóng và những nguồn nhiệt là nguồn bức xạ. Những điện tử quang học, cặp nhiệt điện và vi nhiệt kế điện trở là những thiết bị thu bức xạ.

Vùng hồng ngoại cơ bản (2 μm - 40 μm).

Những tinh thể muối được dùng làm vật liệu quang học: LiF (→ 6 μm), CaF_2 (→ 9 μm), NaCl (→ 15 μm), KBr (→ 27 μm), CsI (→ 40 μm). Nguồn bức xạ là thanh silic, máy thu bức xạ là những cặp nhiệt điện, vi nhiệt kế điện trở.

Vùng này có ý nghĩa thực tiễn lớn trong sự nghiên cứu các hợp chất hữu cơ.

Vùng hồng ngoại xa (40 μm - 200 μm).

Vùng này được nghiên cứu nhờ cách tử nhiễu xạ. Đối với sự nghiên cứu cấu trúc của những hợp chất hữu cơ gần đây mới tìm thấy sự ứng dụng của nó.

Cách tử nhiễu xạ có thể dùng cho tất cả các vùng phổ quang học, song đối với những vùng khác nhau người ta dùng cách tử với những lượng khác nhau của đường vân gạch trên 1 cm. Ngày nay với thiết bị hiện đại người ta dùng hệ giao thoa Michelson.

Phân tử có những mức năng lượng lượng tử và năng lượng của phân tử. Năng lượng (E) của phân tử gồm năng lượng của trạng thái quay (E_q), dao động (E_{dd}) và điện tử ($E_{đt}$).

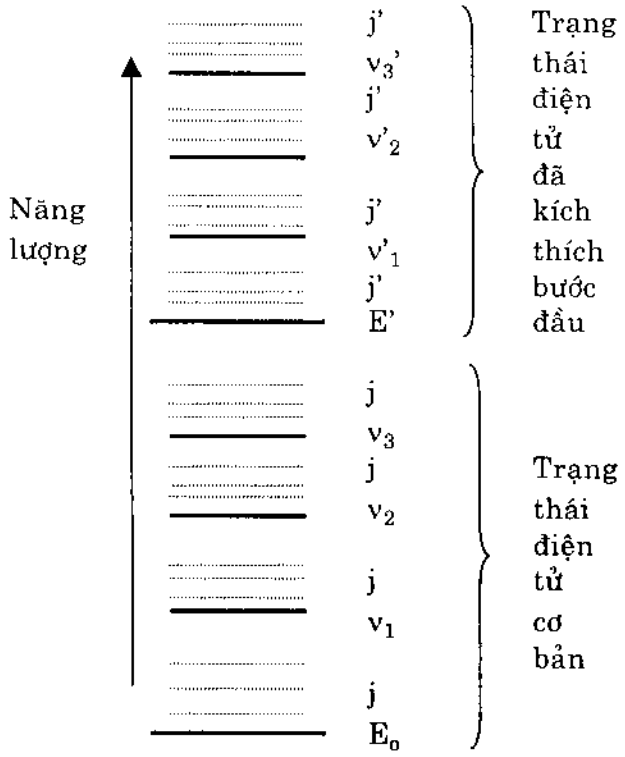
$$E = E_{đt} + E_{dd} + E_q$$

Sự hấp thụ bức xạ gây nên sự thay đổi năng lượng của những trạng thái này. Những phổ quay, phổ dao động và phổ điện tử xuất hiện trong kết quả của sự thay đổi năng lượng này.

Hình 1 chỉ sơ đồ của những mức năng lượng của phân tử hai nguyên tử. E_o và E' là những mức năng lượng điện tử tương ứng với trạng thái điện tử cơ bản

và trạng thái điện tử đã bị kích thích bước đầu.

Mỗi mức điện tử có một tổ hợp của mức dao động (v) và mức quay (j).



Hình 1: Sơ đồ mức năng lượng của phân tử 2 nguyên tử:

E - mức điện tử. v - mức dao động. j - mức quay.

Năng lượng của sự chuyển bậc 10^{-2} - 10^{-3} kcal/mol tương ứng với phổ quay và chúng được tìm thấy trong vùng sóng cực ngắn và hồng ngoại xa.

Những phổ dao động liên hệ với sự thay đổi năng lượng dao động và đối với đa số phân tử xuất hiện trong vùng hồng ngoại gần và trung bình (1 - 40 μm)

Năng lượng phù hợp bước nhảy bậc 1 - 10 kcal/mol. Những mức dao động giữa những mức này xảy ra sự chuyển tiếp thuộc về trạng thái điện tử cơ bản.

Vùng phổ điện tử 2 - 50 μm (5000 - 200 cm^{-1}) liên quan với sự dao động của nguyên tử trong phân tử. Có 2 phương pháp thực nghiệm nghiên cứu vùng này là phương pháp phổ hồng ngoại (IR) và phương pháp phổ khuếch tán tổ hợp (CD). Bản chất vật lý của hai phổ này khác nhau. Phổ hồng ngoại hấp thụ được gây nên bởi sự chuyển giữa hai mức dao động của phân tử ở trạng thái điện tử cơ bản. Những phổ khuếch tán tổ hợp liên hệ với độ phân cực của phân tử.

Ở đây chúng ta chỉ nghiên cứu mối liên hệ của phổ dao động (phổ hồng ngoại IR) với cấu trúc của hợp chất.

2.2. Số vân trong phổ

Phân tử không thẳng chứa N nguyên tử có 3N-6 dao động cơ bản. Phân tử thẳng có 3N-5 dao động. Do tính không điều hoà của dao động, ngoài những vân chính trong phổ thường có vân yếu gây nên bởi tần số thành phần và những họa âm. Những họa âm phù hợp tần số, tần số cơ bản nào đấy bội, còn những tần số thành phần là tổng hay hiệu của hai tần số cơ bản khác nhau. Đôi khi những vân mạnh xuất hiện trong các phổ do cộng hưởng giàn. Cộng hưởng giàn tồn tại trong trường hợp khi họa âm của tần số X và tần số cơ bản Y có những giá trị gần nhau. Ở những phân tử đối xứng trong các phổ có thể biểu diễn chỉ một phần của tất cả 3N-6 dao động.

Những dao động kéo theo sự thay đổi momen lưỡng cực của phân tử được biểu hiện trong các phổ hồng ngoại. Những dao động trong đó xảy ra sự thay đổi độ (tính) phân cực của phân tử biểu hiện trong những phổ khuếch tán tổ hợp. Do đó có quy luật cấm tình thế: trong trường hợp của những phân tử đối xứng tâm những dao động bất đối xứng một cách tương đối của tâm đối xứng hoạt động trong phổ hồng ngoại. Những dao động đối xứng một cách tương đối của tâm đối xứng hoạt động trong phổ khuếch tán tổ hợp. Phổ hồng ngoại và phổ khuếch tán tổ hợp khác nhau, bổ sung nhau. Theo mức độ giảm (sự) tính đối xứng những khác biệt mạnh trong các phổ hồng ngoại và phổ khuếch tán tổ hợp giảm, nhưng trong những phân tử không đối xứng những cường độ tương đối của nhiều vân của những phổ này vẫn giữ nguyên sự khác biệt.

Đối với những phân tử đối xứng cao có trục đối xứng không thấp hơn bậc ba, những dao động khác nhau có thể có những tần số như nhau. Do đó trong phổ của những hợp chất như thế xuất hiện một vài vân đồng thời một vân được thực hiện như được gọi sự suy biến. Hai lần những dao động suy biến gặp trong trường hợp nếu phân tử có trục đối xứng bậc ba và cao hơn. Ba lần những dao động suy biến thường gặp ở những phân tử có hơn một trục đối xứng bậc ba. Nhưng cần phải biết rằng có thể có sự trùng lặp ngẫu nhiên của tần số.

Benzen có 12 nguyên tử, có $3 \times 12 - 6 = 30$ dao động. Từ 30 dao động chỉ có 19 dao động được biểu hiện trong những phổ dao động: 7 dao động xảy ra với sự thay đổi momen lưỡng cực, bởi vậy hoạt động trong phổ hồng ngoại; 12 dao động được thực hiện với sự thay đổi độ phân cực hoạt động trong phổ khuếch tán tổ hợp. Do sự suy biến số vân trong phổ quan sát được ít hơn, chính thế trong phổ

IR có 4 vân và phổ khuếch tán tổ hợp có 7 vân.

Số dao động cơ bản của phân tử có thể tính khi biết số nguyên tử trong phân tử. Sự hiểu biết về sự đối xứng của phân tử cho phép xác định hoạt độ của những dao động riêng biệt trong phổ. Trong tài liệu có những bảng cho phép xác định hoạt độ của những dao động theo sự đối xứng đã biết của phân tử.

Những ký hiệu sau được dùng để đặc trưng kiểu đối xứng của dao động về nguyên tố đối xứng của phân tử:

Chữ A, B, E, F với chỉ số bổ sung dưới dạng chữ số 1, 2;

Chữ G, U với chỉ số bổ sung cũng như thế dưới dạng 1 vạch hoặc 2 vạch.

Ở đây A - sự dao động đối xứng, không suy biến một cách tương đối của trục đối xứng bậc n;

B - sự dao động bất đối xứng, không suy biến một cách tương đối của trục đối xứng bậc n;

E - dao động suy biến 2 lần;

F - dao động suy biến 3 lần.

Những dao động đối xứng và bất đối xứng so với mặt phẳng đối xứng σ_v chứa trục đối xứng được ký hiệu bằng chỉ số 1 và 2 mang ký hiệu A và B.

Tính đối xứng của dao động tương đối của mặt phẳng σ_h vuông góc với trục đối xứng ký hiệu 1 vạch; tính bất đối xứng của dao động tương đối của mặt phẳng σ_h vuông góc với trục đối xứng ký hiệu 2 vạch.

G - những dao động đối xứng một cách tương đối của trung tâm đối xứng;

U - những dao động bất đối xứng tương đối của trung tâm đối xứng.

Thí dụ: ký hiệu A_{1G} tượng trưng cho dao động không suy biến, đối xứng một cách tương đối của trục, của mặt phẳng và của tâm đối xứng.

2.3. Những tần số đặc trưng của nhóm

Những nghiên cứu thực nghiệm của đa số những phân tử có cùng một nhóm hóa học đã chỉ rằng nó không phụ thuộc vào sự thay đổi của phần còn lại của phân tử. Những nhóm giống nhau này hấp thụ ở giới hạn hẹp của tần số. Những tần số như vậy có tên gọi là tần số đặc trưng hay tần số nhóm. Thí dụ: những dao động của các nhóm CH, CH_2, CH_3, O-H, N-H, NH_2, C=C, $\begin{matrix} X \\ Y \end{matrix}\!\!>\!C=O$, NO_2...

Sự có mặt của những tần số nhóm dao động trong đó có sự tham gia lớn nhất của một vài nhóm nguyên tử, còn phần còn lại của phân tử tham gia không đáng kể; mặc dù biết rằng trong mỗi dao động làm thay đổi độ dài tất cả liên kết và thay đổi độ lớn của góc liên kết.

Trong phân tử hai nguyên tử tần số dao động ν phụ thuộc vào hai thông số: khối lượng của nguyên tử và hệ số lực liên quan đến độ đàn hồi của liên kết. Theo định luật Guc:

$$\nu = \frac{1}{2\pi} \cdot \sqrt{\frac{k}{\mu}}$$ ở đây k: hệ số lực;

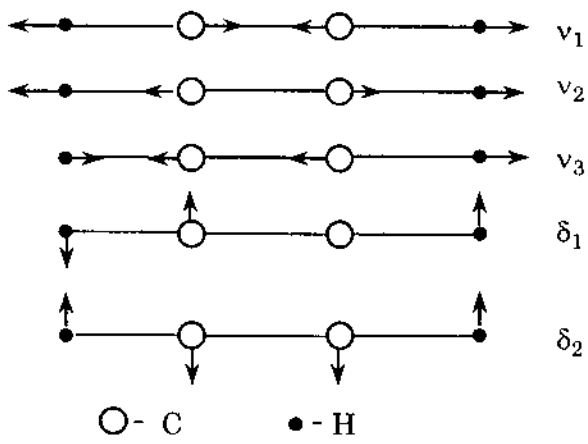
$$\mu = \frac{m_1 m_2}{m_1 + m_2}$$: khối lượng rút gọn.

Trong phân tử nhiều nguyên tử vấn đề phức tạp hơn nhiều; nhưng sự phụ thuộc này giúp chúng ta không phải là ít để đánh giá sâu sắc những vùng trong đó xuất hiện những dao động riêng biệt và tính đặc trưng của chúng. Dao động sẽ càng đặc trưng hơn khi những thông số của nhóm những nguyên tử dao động (k và μ) càng lớn hơn khác những thông số của phần còn lại của phân tử. Những dao động của nhóm chứa nguyên tử nhẹ như hyđro (CH_3, CH_2, CH, NH_2, NH, OH...) sẽ đặc trưng. Những nhóm chứa liên kết bội >C=C< , >C=N, –C≡C–, >C=O... có những vân hấp thụ đặc trưng liên hệ với những dao động trong đó về cơ bản xảy ra sự căng của liên kết tương ứng.

Nếu những nguyên tử gần nhau về khối lượng và được kết hợp bởi những liên kết có hệ số lực gần nhau thì không có khả năng tách những dao động với liên kết riêng biệt. Những vân hấp thụ phù hợp với những dao động của số lớn của góc và liên kết. Bởi vậy sự thay đổi bất kỳ, sự thay đổi không lớn của hình học phân tử dẫn đến sự chuyển dịch của vân hấp thụ.

Trong một loạt trường hợp có thể tách những dao động như thế, trong đó những độ dài của liên kết hoặc những góc giữa các liên kết bị thay đổi là chính. Theo điều này dao động thứ nhất gây nên bởi hóa trị, còn dao động thứ hai là biến dạng. Nhưng luôn phải nhớ rằng trong mỗi một dao động đều có sự tham gia nhiều hay ít của liên kết láng giềng và những góc kề bên nghĩa là không tồn tại số dao động hóa trị và số dao động biến dạng như đã nói (trừ phân tử thẳng).

Những dao động của phân tử 4 nguyên tử thẳng của acetylen là ví dụ đơn giản nhất. Phân tử acetylen có 7 dao động cơ bản (3 × 4 – 5 = 7). Sự chuyển dịch của những nguyên tử trong những dao động khác nhau nhận được dựa vào sự tính toán những dao động nêu trong hình 2.



Hình 2: Dao động của acetylen

Những dao động δ_1 và δ_2: hai lần suy biến (những dao động trong mặt phẳng nằm ngang và những dao động tương ứng trong mặt phẳng vuông góc có tần số như nhau).

Từ hình vẽ thấy rằng có 2 dao động ν_1 và ν_3 trong hướng của trục phân tử, trong đó những độ dài của liên kết C–H bị thay đổi về cơ bản. Tất nhiên trong những dao động này chính những nguyên tử carbon bị chuyển dịch, nhưng khối lượng của chúng thực tế lớn hơn còn biên độ của sự dịch chuyển nhỏ đến mức có thể bỏ qua. Do dao động này ν_1 và ν_3 có thể coi là dao động hóa trị đối xứng (ν_s) và dao động hóa trị bất đối xứng (ν_{as}) của C–H. Dao động ν_2 xảy ra cũng dọc trục của phân tử, đồng thời những liên kết C–H chuyển dịch dường như nghiêm ngặt và tần số của dao động được xác định chủ yếu bằng hệ số lực của liên kết C≡C. Dao động này có thể đưa đến dao động hóa trị của liên kết C≡C ($\nu_{C\equiv C}$).

Ngoài những dao động hóa trị trong phân tử của acetylen có những dao động biến dạng δ_1 và δ_2. Trong những phân tử thẳng những dao động hóa trị và biến dạng thuộc về kiểu khác nhau của sự đối xứng, bởi vậy sự phân tách chúng thành những dao động hóa trị và biến dạng được thực hiện nghiêm ngặt.

Trong phổ dao động của acetylen tìm được những tần số cơ bản sau: 3374 cm^{-1}; 1974 cm^{-1}; 3287 cm^{-1}; 612 cm^{-1}; 729 cm^{-1}. Những tần số 3374 cm^{-1} và 3287 cm^{-1} thuộc về những dao động hóa trị C–H (dao động hóa trị đối xứng và bất đối xứng). Tần số 1974 cm^{-1} là dao động hóa trị của liên kết C≡C còn những tần số 612 cm^{-1} và 729 cm^{-1} phản ánh những dao động biến dạng đối xứng và bất đối xứng của liên kết C–H.

Từ những dao động kể trên chỉ có những dao động với tần số ν_3 và δ_2 hoạt

động trong phổ hồng ngoại (IR). Những dao động bất đối xứng xảy ra với sự thay đổi momen lưỡng cực có tần số 3287 cm^{-1} và 729 cm^{-1}.

Trong phổ khuếch tán tổ hợp (CD), vùng hồng ngoại xa chỉ xuất hiện 2 vân tổ hợp mạnh: 1974 cm^{-1} và 3374 cm^{-1} thuộc về dao động hóa trị đối xứng của liên kết C≡C và C–H.

Như vậy những dao động của phân tử acetylen được phân chia rõ ràng thành những dao động hóa trị và dao động biến dạng. Mỗi một dao động hóa trị hoặc đặc trưng cho liên kết C–H hoặc cho liên kết C≡C.

Nhưng nếu như một từ những nguyên tử hydro trong phân tử này thay thế bằng một nhóm methyl (methyl acetylen) thì sự phân chia nghiêm ngặt như thế của dao động biến mất.

Cũng như trong dao động của liên kết C≡C của methyl acetylen ($\nu_{C\equiv C}$ = 2142 cm^{-1}) đã chỉ ra phép tính dao động có sự tham gia thật sự của liên kết đơn C–C (và sự tham gia không lớn của góc HCC). Cũng trong lúc đó những dao động biến dạng đối xứng của nhóm methyl tham gia không lớn gây nên sự căng liên kết C≡C.

Mức độ tham gia của những góc và liên kết phân tử trong dao động nhận được từ sự tính toán đặc trưng dạng của dao động này. Sự hiểu biết dạng của những dao động tương ứng cho phép đánh giá tính đặc trưng của chúng và hiểu sự thay đổi của tần số dao động có liên quan trong bước nhảy phân tử với hiệu ứng điện tử (bằng sự thay đổi mật độ điện tử của liên kết này dưới ảnh hưởng của chất thế) hoặc với hiệu ứng động hình học (bằng sự thay đổi dạng dao động). Như sự thay đổi tần số của dao động hóa trị C≡C trên 170 cm^{-1} trong sự chuyển từ acetylen tới methyl acetylen là hậu quả của sự thay đổi dạng của dao động này.

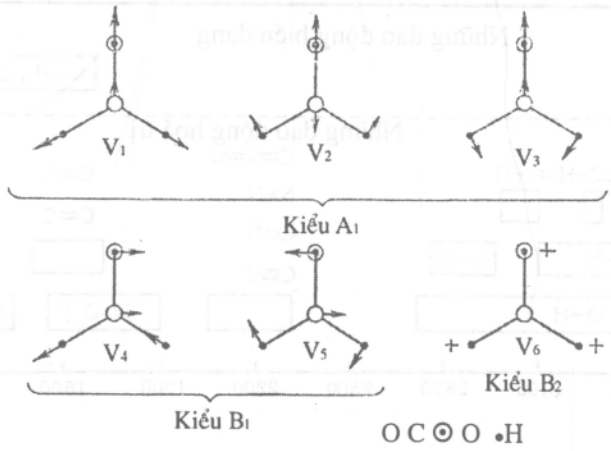
Một ví dụ khác chúng ta hãy xem xét những dao động của một phân tử có 4 nguyên tử khác - formaldehyd (HCHO). Formaldehyd có 6 dao động cơ bản (3 × 4 – 6 = 6). Sáu dao động này được chia thành 3 kiểu dao động: A_1, B_1 và B_2. Kiểu A_1 có 3 dao động hoàn toàn đối xứng. Kiểu B_1 có 2 dao động và một kiểu B_2.

Hình 3- sự chuyển dịch của những nguyên tử nhận được trong phép tính các dao động được ký hiệu bằng những mũi tên.

Sự tính toán đã chỉ ra rằng những dạng của dao động trong phân tử này không đơn giản như trong phân tử acetylen. Như trong dao động hóa trị đối xứng của liên kết C–H (ν_1) có sự tham gia (thực tế rất nhỏ) của góc HCO và HCC. Dao động ν_2 luôn gọi là dao động hóa trị của liên kết C=O, thật ra sự tham

gia của các góc trong dao động này so với sự tham gia của liên kết C=O có dạng rất phức tạp.

Nếu thế những nguyên tử hydro của phân tử này bằng những nhóm methyl (acetaldehyd, aceton) thì dạng của dao động với tần số ở vùng 1700 - 1750 cm^{-1} bị thay đổi, trong dao động $\nu_{C=O}$ ngoài liên kết C=O và những góc sẽ có sự tham gia của những liên kết C–C. Điều đó có nghĩa là sự chuyển dịch tần số trong sự thế thuộc về nhóm C=O có thể đã gây nên không chỉ bằng sự thay đổi tính chất điện tử của liên kết C=O dưới ảnh hưởng của chất thế mà còn bằng sự thay đổi của dạng dao động do sự thay đổi khối lượng và hình học của phân tử.



Hình 3: Những dao động của formaldehyd

Từ những thí dụ đã nêu thấy rõ là ngay cả những phân tử đơn giản như acetylen và formaldehyd những dao động cũng đủ phức tạp. Mối liên hệ nghiêm ngặt của những vân hấp thụ cơ bản trong phổ dao động của hợp chất hữu cơ với dao động của những loại nhóm riêng biệt chỉ có thể thực hiện được nhờ tính toán lý thuyết. Nhưng sự tính toán như thế phức tạp và cho đến nay chỉ thực hiện đối với những hợp chất tương đối dơn giản. Với những phân tử hữu cơ phức tạp người ta tiến hành tính gần đúng và kiểm tra kết quả nhận được trong phép tính của những phân tử đơn giản. Chúng cho phép xác định dạng của dao động, tính đặc trưng của tần số, ảnh hưởng đến đặc tính của dao động, những thông số như hệ số lực, khối lượng và hình học của phân tử.

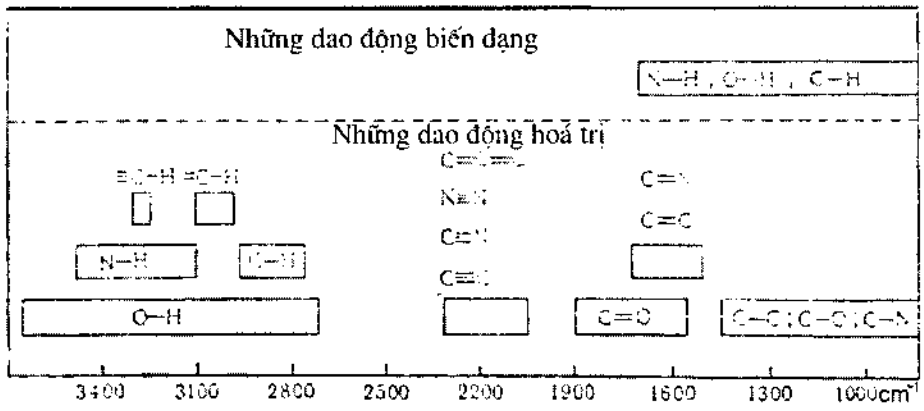
Những tư liệu thực nghiệm về tần số đặc trưng đã tích lũy cho phép tiến hành phân tích cấu trúc khi sử dụng những số liệu thực nghiệm cơ bản.

2.4. Những dữ liệu thực nghiệm theo phổ hồng ngoại hấp thụ của các hợp chất hữu cơ

Những vùng hấp thụ đã tìm được đối với một số nhóm của hợp chất hữu cơ được nêu ở bảng 1.

Trong vùng của những tần số cao nhất (3600 - 2800 cm^{-1}) tìm được những vân tương ứng với những dao động của nhóm chứa nguyên tử nhẹ - hydro, nghĩa là các nhóm C–H, N–H, O–H. Những dao động này là dao động hóa trị.

Bảng 1



Sự tăng khối lượng của nguyên tử khi bảo tồn bậc của liên kết làm dịch chuyển vân hấp thụ đến vùng sóng dài (về phía những tần số nhỏ), thí dụ những dao động của liên kết C–Cl trong những hợp chất béo được phân bố ở vùng 700 - 600 cm^{-1}. Những vân hấp thụ của khung phân tử hữu cơ chứa liên kết C–C, C–O, C–N ở vùng 1500 - 700 cm^{-1}, nhưng như đã chỉ ra đối với chúng không có những dao động thuộc về những liên kết riêng biệt. Đặc trưng của phổ trong giới hạn này của tần số thực tế bị thay đổi ngay cả khi có sự thay đổi nhỏ trong cấu trúc của hợp chất. Điều đó được ứng dụng với mục đích định tính, bởi vậy mỗi một hợp chất có một tập hợp những vân hấp thụ chỉ thuộc về nó. Vùng này được gọi là vùng vân tay (finger prints).

Sự tăng độ bội của liên kết (trong sự bảo tồn khối lượng) gây nên sự tăng tần số. Những dao động nhóm của hợp chất với liên kết đôi (C=C, C=O, C=N) nằm ở vùng 1800 - 1500 cm^{-1}. Thường những dao động này không hẳn là dao động hóa trị thuần túy, bởi vì trong chúng có sự tham gia đáng kể của những góc kề và liên kết bên cạnh. Vùng này rất có giá trị trong sự nghiên cứu những tương tác nội phân tử.

Những vân hấp thụ của những liên kết 3 (C≡C, C≡N) cần tìm ở vùng 2000 - 2300 cm^{-1}, bởi vì hệ số lực của liên kết ba lớn hơn hệ số lực của liên kết đơn và liên kết đôi.

Những dao động được xác định bằng sự thay đổi của các góc gặp ở vùng tần số nhỏ hơn đáng kể những dao động liên quan tới sự làm căng liên kết tương ứng.

Tương lai những thuật ngữ những dao động hóa trị và dao động biến dạng sẽ được sử dụng mặc dù cần phải đưa ra câu trả lời đầy đủ về điều là đối với những phân tử không thẳng những dao động biến dạng và dao động hóa trị nghiêm chỉnh không tồn tại. Sự phân chia như thế được thực hiện chỉ đối với những phân tử thẳng (thí dụ acetylen).

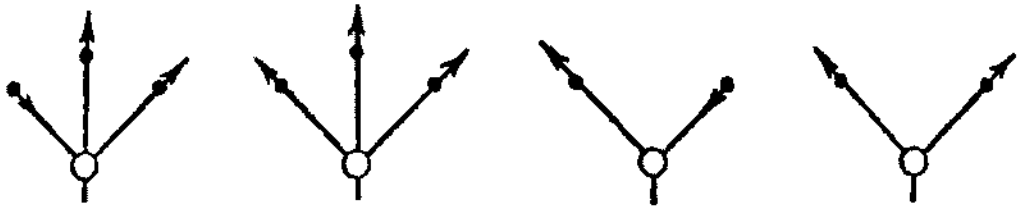
2.4.1. Những hydrocarbon

2.4.1.1. Những hydrocarbon no

Phổ hồng ngoại của những hydrocarbon được đặc trưng bằng những vân hấp thụ gây nên bởi các liên kết C–C và C–H.

Những vân đặc trưng liên hệ với tần số đặc trưng của C–H (methyl, methylen...) tìm được trong 3 vùng 3000 - 2800 cm^{-1}, 1400 - 1300 cm^{-1} và gần 700 cm^{-1}.

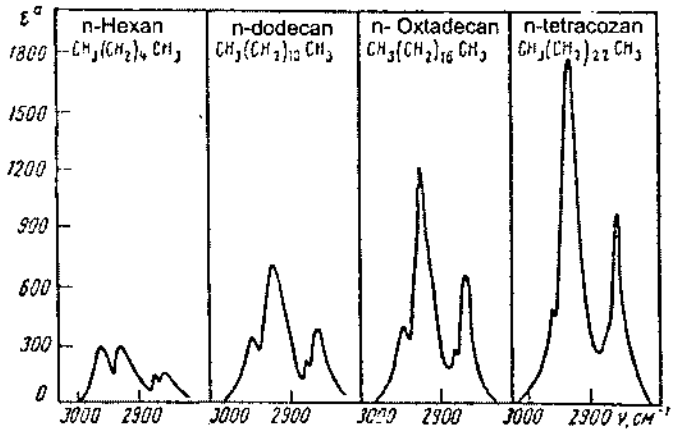
Sự hấp thụ trong vùng 3000 - 2800 cm^{-1} gây nên bằng dao động hóa trị C–H. Nó xuất hiện ở dạng vân phức tạp trong đó những pic ở 2962 và 2872 cm^{-1} thuộc về những dao động của nhóm methyl (dao động bất đối xứng ν_{as} và đối xứng ν_s). Còn những vân 2926 cm^{-1} và 2853 cm^{-1} thuộc về những dao động hóa trị của nhóm methylen (ν_{as} và ν_s) (hình 4).



ν_{as} = 2962 cm^{-1} ν_{as} = 2872 cm^{-1} ν_{as} = 2926 cm^{-1} ν_{as} = 2853 cm^{-1}

Hình 4. Những dao động hoá trị của C–H của nhóm methyl và methylen

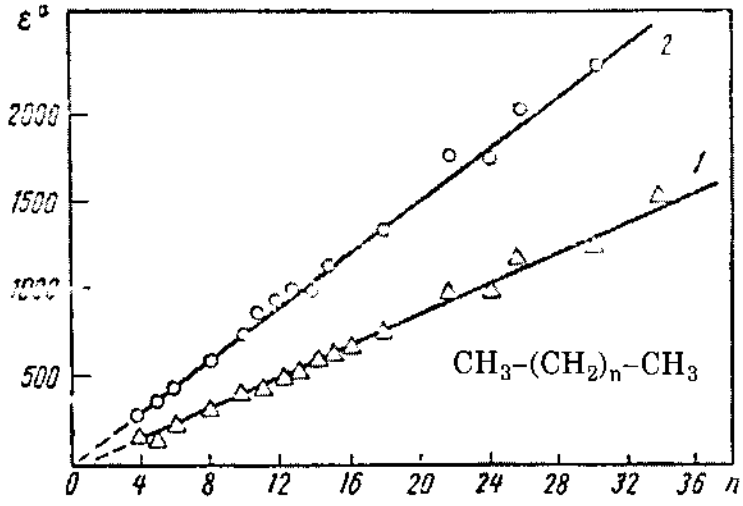
Vị trí của những vân hấp thụ này được bảo toàn tốt ở tất cả các kiểu hydrocarbon béo. Cường độ của vân phụ thuộc vào số nhóm methyl và methylen trong phân tử (hình 5).



Hình 5: Sự hấp thụ của những hydrocarbon bình thường trong vùng 3000 - 2800 cm^{-1}

Từ hình 5, cường độ hấp thụ của nhóm methylen lớn hơn đáng kể với sự tăng số nhóm, trong khi đó cường độ vân hấp thụ nhóm methyl ít thay đổi (sự thay đổi cường độ không lớn là do có sự che phủ của vân nhóm CH_2 và CH_3). Cường độ vân hấp thụ của nhóm CH_2 và CH_3 có sự phụ thuộc tuyến tính vào số lượng của chúng (hình 6). Do đó có thể dùng để xác định định lượng nhóm CH_3 và CH_2 trong những hydrocarbon riêng biệt hoặc trong hỗn hợp của chúng. Đây là phương pháp phân tích nhóm của xăng và những hỗn hợp phức tạp khác của những hydrocarbon. (đối với những hydrocarbon chứa không quá 14 - 16 nguyên tử carbon).

Hình 6: Sự phụ thuộc cường độ hấp thụ của nhóm CH_2 vào số nhóm:
1. ν_s (2853cm^{-1})
2. ν_{as} (2926cm^{-1})

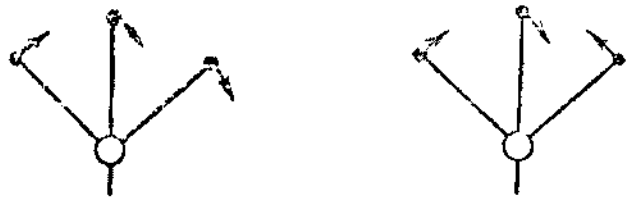


Nhóm methylen (=CH) có vân hấp thụ yếu (ν_{CH} gần 2890 cm^{-1}) vì bị che phủ bởi vân hấp thụ mạnh của nhóm CH_2 và CH_3 và thực tế không dùng để phát hiện.

Sự hấp thụ trong vùng 1400 - 1300 cm^{-1} và gần 700 cm^{-1} gây nên bởi những dao động biến dạng.

Nhóm methyl (CH_3) có những dao động biến dạng đối xứng và bất đối xứng (hình 7).

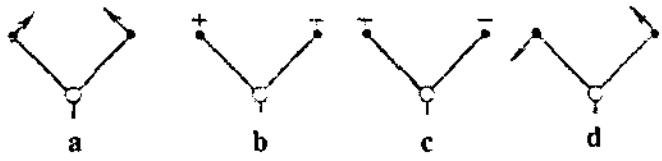
Hình 7: Những dao động biến dạng của nhóm CH_3



δ_{as} = 1460 cm^{-1} δ_s = 1380 cm^{-1}

Vân ở 1460 cm^{-1} phù hợp với dao động biến dạng bất đối xứng của nhóm CH_3 (δ_{as}). Dao động đối xứng δ_s xuất hiện ở 1380 cm^{-1}. Sự tách vân này thành vân đôi có thể là dấu hiệu của nhóm hemdimethyl. Có 4 kiểu dao động biến dạng đặc trưng cho nhóm CH_2: dao động cắt kéo (bending), quạt (wagging), xoắn (twisting) và dao động con lắc (rocking) (hình 8).

Hình 8: Những dao động biến dạng của nhóm CH_2:
a. Dao động cắt kéo.
b. Dao động hình quạt.
c. Dao động xoắn.
d. Dao động con lắc.



Vân hấp thụ phù hợp với dao động cắt kéo của nhóm methylen nằm ở 1467 cm^{-1}. Những vân 1467 cm^{-1} của nhóm methylen và 1460 cm^{-1} của nhóm methyl bị chồng lên nhau trong những phổ của những hydrocarbon phân nhánh khó phân biệt được.

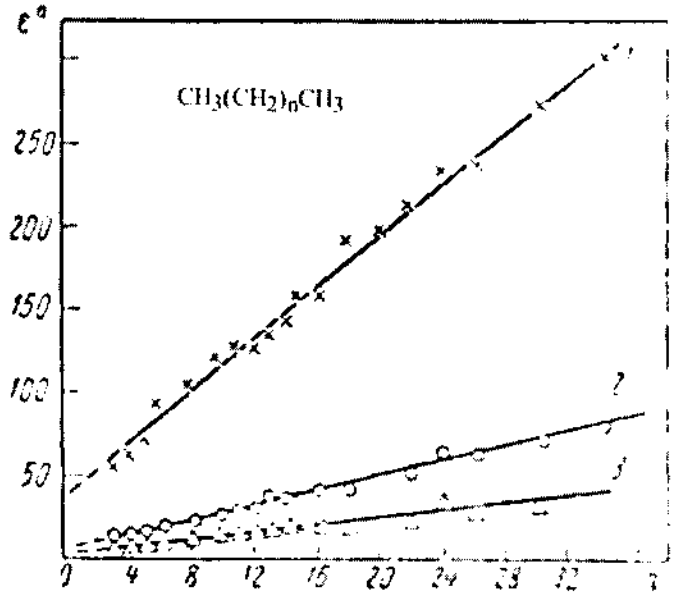
Trong những hydrocarbon thường với số vân $n > 5$ vân, vân phù hợp với dao động cắt kéo hẹp và mạnh còn vân của nhóm methyl ở 1460 cm^{-1} trong trường hợp này xuất hiện ở dạng hình vai.

Những dao động con lắc của nhóm methylen ở vùng 790 - 720 cm^{-1}. Vị trí của chúng được xác định bằng độ dài của mạch carbon. Như với C_2H_5 tần số của

dao động con lắc ở 790 - 770 cm^{-1}; với C_3H_7 nó có giá trị ở 743 - 734 cm^{-1}. Với n = 4 vân phù hợp ở 725 - 720 cm^{-1} (đối với mẫu rắn thường ở dạng vân kép). Những dao động con lắc của nhóm CH_2 có thể được ứng dụng để phát hiện những mạch polymethylen.

Những vân phổ tương ứng với những dao động xoắn và hình quạt của nhóm CH_2 và những dao động biến dạng của nhóm methylen (=CH) được phân bố ở vùng 1300 cm^{-1}. Chúng ít được ứng dụng với mục đích phát hiện do không đặc trưng và cường độ nhỏ.

Những dao động biến dạng khác của nhóm ($-CH_2$) là đặc trưng có cường độ vân hấp thụ tăng tuyến tính khi tăng số nhóm ($-CH_2$) (hình 9).



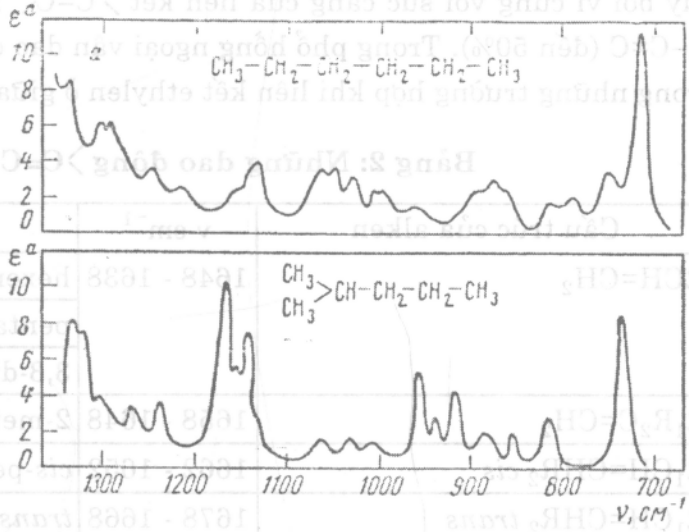
Hình 9: Sự phụ thuộc của cường độ hấp thụ của nhóm $-CH_2$ (dao động biến dạng) vào số nhóm $-CH_2$:

1. Dao động cắt kéo (1467 cm^{-1});
2. Dao động con lắc (720 cm^{-1});
3. Dao động hình quạt (1305 cm^{-1}).

Tính chất này của những dao động biến dạng được dùng để phân tích nhóm của hydrocarbon.

Những vân hấp thụ tương ứng với dao động khung có cường độ tương đối nhỏ xuất hiện ở hai vùng 1100 - 700 cm^{-1} và thấp hơn 500 cm^{-1}. Vùng thứ nhất liên hệ với dao động hóa trị của khung carbon. Vùng thứ hai ứng với dao động biến dạng. Như đã thấy vị trí của vân hấp thụ tương ứng với dao động này rất không ổn định vì vậy chúng không được ứng dụng để phân tích chức. Vùng này của phổ hồng ngoại tìm được sự ứng dụng rộng rãi để phát hiện những hợp chất riêng biệt (vùng dấu vân tay).

Theo phổ hồng ngoại trong vùng dao động của khung carbon có thể phát hiện được cả những đồng phân hydrocarbon, mà sự xác định những đồng phân này bằng những con đường khác rất khó.



Hình 10: Phổ hồng ngoại của 2 đồng phân hexan.

Nghiên cứu thực nghiệm số lớn những hydrocarbon chỉ ra rằng khi có mặt nhóm isopropyl trong phân tử làm phổ xuất hiện những vân ở 1170 cm^{-1} và 1145 cm^{-1}. Sự có mặt nhóm butyl bậc 3 trong phổ sẽ xuất hiện những vân ở 1255 và 1210 cm^{-1}. Khi có mặt của nguyên tử carbon bậc 4 người ta quan sát được những vân hấp thụ ở 1215 và 1195 cm^{-1}. Trong nghiên cứu cấu trúc những số liệu này có thể được dẫn ra như một chứng cứ về sự có mặt của các nhóm kể trên nhưng không thể như là một bằng chứng.

Những dao động biến dạng của khung carbon tìm thấy ở vùng thấp hơn 500 cm^{-1} thực tế không được nghiên cứu trong phổ hồng ngoại.

2.4.1.2. Những alkan vòng

Sự khép kín mạch polymethylen hình thành vòng không căng cơ bản không ảnh hưởng dao động hóa trị của nhóm methylen.

Tần số này lớn lên với sự tăng sức căng của vòng. Thí dụ ở vòng propan những vân của dao động hóa trị của nhóm $-CH_2$ tìm thấy ở gần 3040 cm^{-1}.

Sự đóng kín mạch methylen thành vòng không căng dẫn đến sự chuyển dịch không lớn của dao động cắt kéo của nhóm $-CH_2$ từ 1462 đến 1452 cm^{-1}.

2.4.1.3. Những alken

Sự đưa những liên kết bội vào phân tử của hợp chất hữu cơ dẫn tới sự xuất hiện vân hấp thụ đặc trưng cho liên kết này và làm thay đổi vị trí vân hấp thụ của nhóm một cách trực tiếp liên quan tới nó.

Trong những olefin đơn vân hấp thụ ở vùng 1680 - 1640 cm^{-1} ứng với những dao động hóa trị của $>C=C<$. Dao động này không hẳn là dao động hóa trị thuần

túy bởi vì cùng với sức căng của liên kết >C=C< xảy ra sự thay đổi góc hóa trị H–C=C (đến 50%). Trong phổ hồng ngoại vân dao động hóa trị C=C yếu, đặc biệt trong những trường hợp khi liên kết ethylen ở giữa phân tử (bảng 2).

Bảng 2: Những dao động >C=C< của alken

Cấu trúc của alken	ν cm^{-1}	Thí dụ	ν cm^{-1}	ε
$RCH=CH_2$	1648 - 1638	hexen-1	1642	42
		pentadexen-1	1642	40
		3,3-dimethyl buten-1	1645	46
$R_1R_2C=CH_2$	1658 - 1648	2-methylpenten-1	1653	33
$R_1CH=CHR_2$ *cis*	1662 - 1652	*cis*-penten-2	1658	10
$R_1CH=CHR_2$ *trans*	1678 - 1668	*trans*-penten-2	1670	2
$R_1R_2C=CHR_3$ và $R_1R_2C=CR_3R_4$	1675 - 1665			

Trong những hợp chất etylen đối tâm, dao động này không hoạt động trong phổ hồng ngoại vì bị cấm do đối xứng. Như đối với etylen và những đồng đẳng đối xứng của nó dao động hóa trị $\nu_{C=C}$ không xuất hiện trong phổ hồng ngoại. Vị trí của vân dao động hóa trị C=C bên trong của khoảng 1680 - 1640 cm^{-1} phụ thuộc vào mức độ thế ở liên kết C=C và hình học của phân tử (bảng 2).

Từ bảng 2, rõ ràng là sự tăng số chất thế làm tăng tần số $\nu_{C=C}$; đối với đồng phân *trans* tần số $\nu_{C=C}$ như một quy luật cao hơn, còn cường độ nhỏ hơn đối với đồng phân *cis*.

Vị trí vân hấp thụ của liên kết C=C trong những alken vòng phụ thuộc vào liên kết ở vòng thu hay phát. Đối với liên kết C=C ở vòng thu tần số $\nu_{C=C}$ lớn lên theo mức độ tăng của góc trong vòng còn với liên kết C=C ở vòng phát thì tần số $\nu_{C=C}$ lớn lên theo độ căng của vòng.

Tần số của dao động hóa trị =C–H tìm được ở 3010 - 3095 cm^{-1}, giá trị của $\nu_{=C-H}$ còn được xác định bằng mức độ của sự thế:

Với =CHR dao động đặc trưng có tần số ν ở 3040 - 3010 cm^{-1}.

Nhóm $=CH_2$ dao động xuất hiện ở khoảng 3095 - 3075 cm^{-1}.

Những vân dao động biến dạng mặt phẳng của liên kết C–H ở liên kết đôi có cường độ nhỏ được phân bố trong vùng của dao động biến dạng của nhóm methyl, methylen. Đối với mục đích phân tích cấu trúc những vân này thường không được ứng dụng. Ngược lại những vân dao động biến dạng không mặt

phẳng H–C=C–H trong phổ của alken rất đặc trưng. Chúng phân bố ở vùng 1000 - 800 cm^{-1} và đủ lớn về cường độ hấp thụ ở 970 - 965 cm^{-1} đặc trưng với đồng phân *trans*.

Theo sự hấp thụ ở vùng 1000 - 800 cm^{-1} có thể xác định những nhóm methylen ($R_2C=CH_2$) và vinyl ($R–CH=CH_2$) ở cuối phân tử với mức độ chính xác cao.

Sự đưa liên kết bội vào không ảnh hưởng đến dao động của phần còn lại của phân tử alken.

2.4.1.4. Những hydrocarbon có nối đôi liên hợp

Sự liên hợp của liên kết đôi C=C dẫn đến sự xuất hiện hai vân hấp thụ trong vùng 1650 - 1600 cm^{-1}. Sự tách được giải thích bằng sự tác dụng tương hỗ cơ học và bằng sự thay đổi dạng của dao động bình thường. Cường độ của vân tăng lên so với cường độ hấp thụ của hợp chất không liên hợp tương ứng. Ở những polyen trong vùng này xuất hiện một vài vạch đôi khi hợp lại thành một vân rộng và khi tăng số liên kết liên hợp vân hấp thụ dịch về phía tần số nhỏ.

Trong sự liên hợp của liên kết đôi ở vòng thơm sự dịch chuyển vân hấp thụ C=C thường nhỏ hơn trong sự liên hợp của những liên kết béo. Cường độ của vân $\nu_{C=C}$ tăng cùng với sự tăng của độ vân hấp thụ của dao động khung của vòng thơm trong vùng 1600 - 1500 cm^{-1}.

Đặc biệt sự tương tác mạnh của dao động xảy ra trong trường hợp của những liên kết $>C=C=C<$: tất cả 3 nguyên tử carbon của nhóm allenic tham gia vào dao động cho 2 vân hấp thụ: mạnh ở gần 1950 cm^{-1} (ν_{as}) và yếu ở gần 1050 cm^{-1} (ν_s).

2.4.1.5. Những alkyl

Những phân tử hydrocarbon chứa liên kết 3 trong phổ dao động của chúng xuất hiện sự hấp thụ đặc trưng ở vùng 2300 - 2100 cm^{-1}. Vân dao động hóa trị của C≡C yếu. Trong acetylen và những đồng đẳng đối xứng của nó các vân bị cấm theo đối xứng. Đúng thế, trong những hợp chất olefinic cường độ mạnh nhất của vân khi liên kết C≡C ở mép của phân tử và bị giảm nhanh chóng khi chuyển nó vào giữa phân tử. Vân $\nu_{C\equiv C}$ của những dẫn xuất monoalkyl nằm trong vùng 2140 - 2100 cm^{-1}, còn dẫn xuất dialkyl ở giữa 2260 - 2190 cm^{-1}.

Đối với nhóm acetylen ngoài cùng có vân hấp thụ hẹp $\nu_{\equiv C-H}$ ở vùng 3300 cm^{-1}.

2.4.1.6. Những hợp chất thơm

Sự có mặt của hợp chất thơm có thể được phát hiện theo 3 vùng hấp thụ:

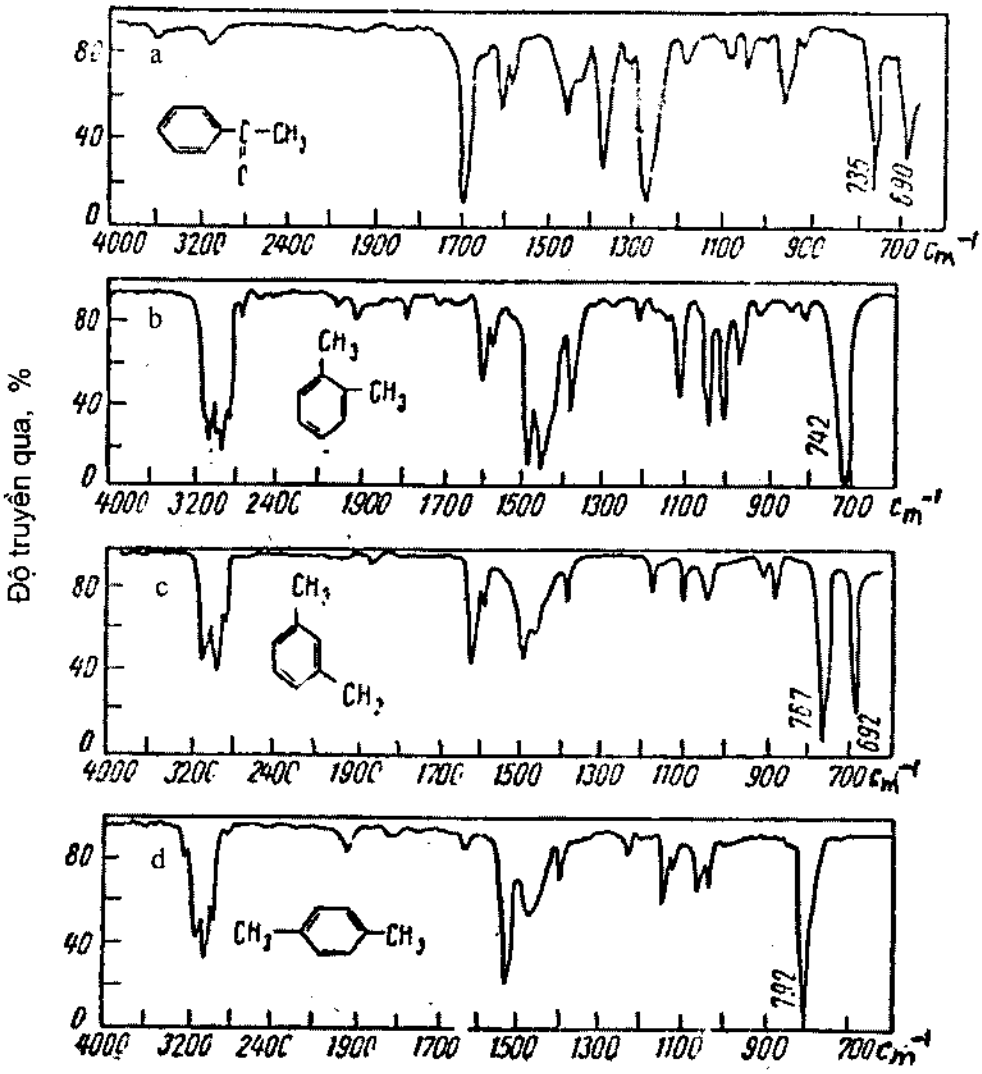
- Dao động hóa trị C–H (ν_{CH} ~ 3000 cm^{-1}).
- Dao động khung của liên kết C–C thơm (1600 - 1500 cm^{-1}).
- Dao động biến dạng C–H cường độ thấp ở 900 cm^{-1}.

Trong vùng 3000 cm^{-1} xuất hiện vân của dao động hóa trị của liên kết C–H có cường độ trung bình. Thường chúng là một nhóm vân. Khi ngoài vòng thơm còn mạch béo, vân hấp thụ của liên kết C–H thơm xuất hiện như cái vai trong chất béo cơ bản ν_{C-H}.

Sự hấp thụ ở vùng 1600 - 1500 cm^{-1} trong phổ của hợp chất thơm có thể xuất hiện ở dạng 3 vân: 1600, 1580, 1500, 1450 cm^{-1}. Cường độ của những vân này thay đổi trong một giới hạn rất rộng. Như một qui luật vân ở 1500 cm^{-1} đậm hơn vân ở 1600 cm^{-1}. Vân hấp thụ ở 1580 cm^{-1} chỉ xuất hiện trong trường hợp nếu vòng benzen liên hợp với những nhóm không bão hòa. Sự liên hợp làm tăng cường độ của tất cả 3 vân và ít ảnh hưởng đến vị trí của vân. Vân 1450 cm^{-1} không phải lúc nào cũng xuất hiện.

Sự hấp thụ mạnh trong phổ của những hydrocarbon benzen thấp hơn 900 cm^{-1}, ứng với những dao động biến dạng của những liên kết C–H của vòng thơm. Đối với benzen vân ứng với dao động này ở 671 cm^{-1}. Đối với những benzen đã thế, tần số của dao động biến dạng C–H phụ thuộc vào số và vị trí nhóm thế. Theo lượng và vị trí của vân trong vùng này của phổ xác định được kiểu của sự thế vòng benzen.

Hình 11 là những phổ của acetophenol và 3 đồng phân cinol ở vùng 900 - 700 cm^{-1}. Những phổ này là một minh chứng tốt nhất cho sự ứng dụng phổ hồng ngoại để xác định kiểu của sự thế.

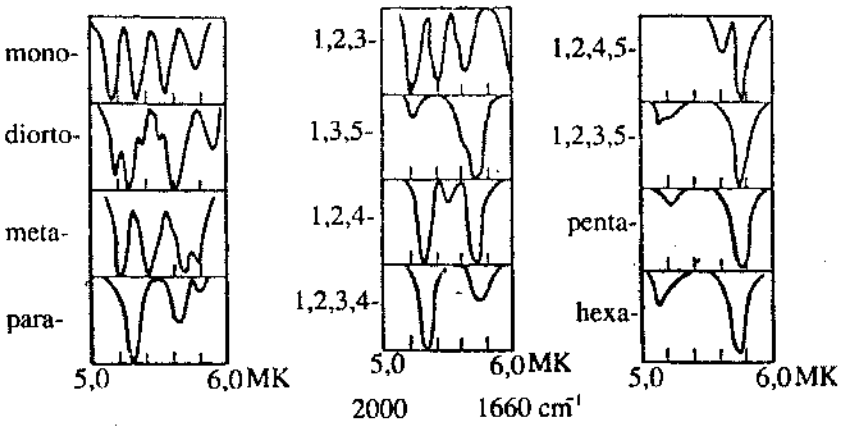


Hình 11: Những phổ hồng ngoại:

a. acetophenol; b. *o*-cinol; c. *m*-cinol; d. *p*-cinol.

Theo sự hấp thụ trong vùng 2000 - 1600 cm^{-1} có thể xác định kiểu của sự thế của những hợp chất benzen. Những vân này cường độ nhỏ ($\varepsilon \approx 5$) có thể ghi được trong phổ với nồng độ của mẫu lớn hơn bình thường 10 lần.

Hình 12 là phổ của những benzen đã thế ở vị trí khác nhau trong vùng 2000 - 1660 cm^{-1}.



Hình 12: Sự hấp thụ của benzen đã thế trong vùng 2000 - 1660 cm^{-1}.

2.4.2. Những hợp chất hữu cơ có các nhóm chức

Sự đưa các nhóm chức vào dẫn đến sự thay đổi thật sự phổ hồng ngoại của những hydrocarbon tương ứng. Chẳng hạn đối với hydrocarbon tổ hợp vân ở vùng 1350 - 700 cm^{-1} là đặc trưng riêng của mỗi chất. Ngoài điều đó trong phổ xuất hiện những vân riêng biệt đối với mỗi một nhóm chức. Khi nghiên cứu phổ của những lớp khác nhau của hợp chất hữu cơ phải chú ý đến những vân riêng biệt của mỗi nhóm chức.

2.4.2.1. Những hợp chất hữu cơ chứa oxy

2.4.2.1.1. Những hợp chất chứa nhóm –OH

Sự có mặt của nhóm –OH trong phân tử hợp chất hữu cơ dẫn tới sự thay đổi phổ và làm xuất hiện những vân hấp thụ mới liên hệ với những dao động của liên kết O–H và C–O. Vân hấp thụ đặc trưng nhất được xuất hiện trong các vùng 3600 - 3000 cm^{-1} (ứng dao động hóa trị của nhóm O–H) và 1400 - 1000 cm^{-1} (ứng với dao động của nhóm C–O–H).

Vùng 3600 - 3000 cm^{-1}:

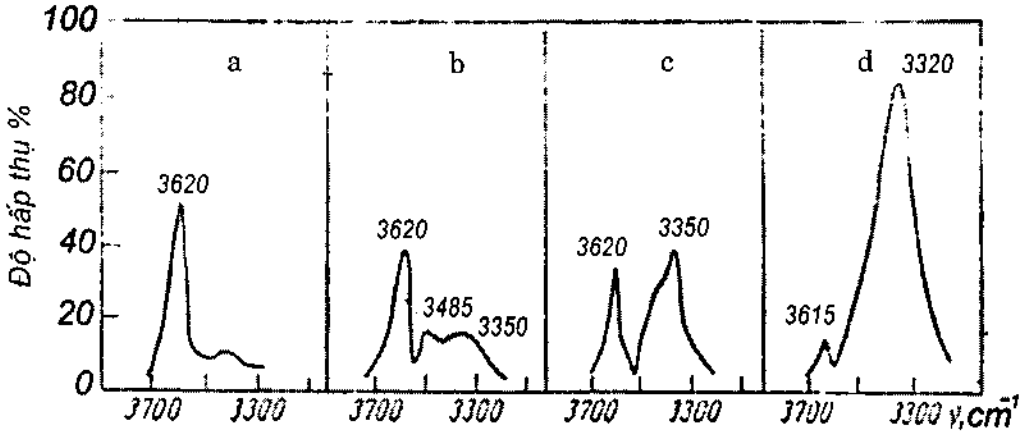
Trong vùng này xuất hiện những dao động hóa trị O–H là dao động đặc trưng bởi vì nguyên tử nhẹ hydrogen tham gia. Những vân hấp thụ ứng với những dao động này quan sát được ở một giới hạn rộng của tần số 3600 - 2500 cm^{-1}.

Hydro của nhóm hydroxyl có thể hình thành liên kết hydrogen với oxy của nhóm –OH của phân tử khác cũng như với nhóm chức khác cho điện tử. Sự hình thành của liên kết hydro ảnh hưởng đến vị trí và dạng của vân dao động hóa trị O–H.

Nhóm hydroxyl tự do không liên hợp của những rượu và phenol có vân hấp thụ hẹp ở vùng 3670 - 3580 cm^{-1}.Vân này thường quan sát được trong dung dịch loãng của hợp chất chứa hydroxyl ở dung môi trơ. Sự phát hiện vân của nhóm OH tự do không khó bởi vì những dao động cơ bản khác không cho vân hấp thụ ở vùng này, còn cường độ của những "họa âm" thấp hơn nhiều.

Sự tham gia của nhóm hydroxyl (–OH) tạo ra liên kết hydro giữa các phân tử làm xuất hiện sự chuyển dịch các vân hấp thụ về phía tần số nhỏ và làm tăng đáng kể cường độ của nó.

Sự hình thành những liên kết hydro giữa những phân tử rượu dẫn đến sự xuất hiện những dime (nhị trùng) và sự liên hợp nhiều phân tử. Trong phổ những vân hấp thụ rõ đặc trưng cho dime ở vùng 3550 - 3450 cm^{-1}, còn trong phổ của sự liên hợp nhiều phân tử quan sát được vân rộng ở vùng 3400 - 3200 cm^{-1}. Sự thay đổi đặc trưng của rượu ở vùng 3600 - 3200 cm^{-1} khi thay đổi nồng độ của hợp chất chứa hydroxyl trong dung môi trơ là dấu hiệu điển hình của liên kết cầu hydro giữa phân tử (hình 13):



Hình 13: Những phổ hồng ngoại của hợp chất chứa hydroxyl:

a. dung dịch rượu 0,01 M trong CCl_4; b. dung dịch rượu 0,1 M trong CCl_4;

c. dung dịch rượu 0,2 M trong CCl_4; d. dung dịch rượu 1 M trong CCl_4 .

- Ở nồng độ nhỏ (loãng) của chất trong phổ có vân hẹp ứng với nhóm hydroxyl tự do (hình 13 a).

- Tăng nồng độ dẫn đến sự xuất hiện dime (nhị trùng) và sự liên hợp của nhiều phân tử cho nên trong phổ xuất hiện sự hấp thụ ở vùng độ dài sóng dài hơn cùng với vân của nhóm hydroxyl tự do (hình 13 b).

- Tiếp tục tăng nồng độ làm giảm cường độ của vân ứng với nhóm hydroxyl tự do và tăng cường độ của vân hấp thụ vùng sóng dài hơn (hình 13 c, d).

Sự hình thành liên kết hydro giữa các phân tử với các hợp chất phân cực như ether, ceton, amin... kéo theo sự chuyển vân ν_{OH} ở vùng 3550 - 3450 cm^{-1}. Đồng thời quan sát được sự chuyển dịch không lớn của vân hấp thụ của nhóm cho điện tử từ 10 - 20 cm^{-1}.

Trong trường hợp khi nhóm hydroxyl và nguyên tử cho điện tử ở trong cùng một phân tử mà khoảng cách giữa chúng tương ứng với độ dài của liên kết hydro thì xuất hiện liên kết hydro nội phân tử. Trong trường hợp này vòng được hình thành có thể hoặc chứa liên kết bội, (thí dụ trong trường hợp 1,2-diol) hoặc có liên kết liên hợp (liên kết hydro như thế được gọi là liên kết kiểu vòng càng cua-chelat). Vân hấp thụ hẹp ở vùng 3590 - 3420 cm^{-1} phù hợp với liên kết hydro kiểu thứ nhất. Liên kết hydro kiểu càng cua-chelat làm xuất hiện vân hấp thụ ở dạng vân "rửa xói" rất rộng ở vùng 3200 - 2500 cm^{-1}, do đó đôi khi khó phát hiện nó.

Khác với liên kết hydro giữa các phân tử , đặc trưng hấp thụ của những hợp chất có liên kết hydro nội phân tử trong dung môi trơ không phụ thuộc vào nồng độ.

Bởi vậy những phổ hồng ngoại ở vùng 3600 - 3000 cm^{-1} cho khả năng nghiên cứu những liên kết hydro trong các hợp chất hữu cơ. Nghiên cứu sự phụ thuộc của vị trí và cường độ vân hấp thụ ở vùng này vào nồng độ của hợp chất chứa nhóm hydroxyl cho phép xác định đặc điểm của liên kết hydro.

Vùng 1400 - 1000 cm^{-1}

Vùng 1400 - 1000 cm^{-1} là vùng dao động khung của phân tử. Sự có mặt của liên kết phân cực C–O làm xuất hiện vân hấp thụ mạnh ở khoảng 1200 - 1000 cm^{-1} do sự tham gia của nhóm này trong những dao động khung.

Ngoài ra ở vùng 1400 - 1250 cm^{-1} xuất hiện những vân hấp thụ mạnh liên quan tới những dao động biến dạng mặt phẳng của nhóm OH.

Theo một số tài liệu công bố dựa vào vị trí các vân hấp thụ ở vùng 1400 - 1000 cm^{-1} có thể phân biệt được những phenol, rượu bậc 1, 2 và 3. Nhưng đối với mục đích phân tích cấu trúc những tư liệu này cần phải sử dụng rất thận trọng.

Bởi vậy nhóm hydroxyl được đặc trưng bằng những vân hấp thụ của những dao động hoá trị của nhóm OH và bằng những vân mạnh ở vùng 1400 - 1000 cm^{-1}.

2.4.2.1.2. Những ether

Những ether được đặc trưng bằng nhóm C–O–C; những dao động của nhóm này không được đặc trưng như đã trình bày một cách rõ ràng ở phần trên. Nhưng ở vùng 1200 - 1000 cm^{-1} xuất hiện vân mạnh của ether liên quan tới sự tham gia vào dao động của liên kết phân cực C–O. Vị trí của vân này không cố định mà phụ thuộc vào cấu trúc của ether:

- Trong những ether béo vân này nằm ở vùng 1150 - 1060 cm^{-1}.

- Ở những ether thơm và không no quan sát được trong khoảng 1270 - 1200 cm^{-1}.

Sự liên kết của oxy ảnh hưởng đến vị trí của vân hấp thụ của nhóm methyl và methylen kết hợp trực tiếp với nguyên tử oxy. Như vân dao động hoá trị đối xứng của nhóm methyl của những alkan nằm ở 2885 - 2860 cm^{-1}còn nhóm CH_3O- của những ether béo ($ROCH_3$) bị chuyển đến 2830 - 2815 cm^{-1}. Trong những ether thơm ($ArOCH_3$) những vân hấp thụ của nhóm CH_3 quan sát được ở 2850 cm^{-1}. Những dao động hoá trị của liên kết C–H ở vòng epoxyd xuất hiện ở 3050 - 2990 cm^{-1}; những dao động của liên kết C–H trong những ether $\alpha_1\beta$-không bão hoà nằm ở vùng 3150 - 3050 cm^{-1}.

2.4.2.1.3. Những hợp chất hữu cơ chứa nhóm carbonyl (>C=O)

Trong phần này chúng ta sẽ nghiên cứu phổ hồng ngoại của những hợp chất chứa nhóm chức >C=O, nghĩa là phổ của những aldehyd, ceton, acid và những dẫn xuất của chúng. Trong số những dẫn xuất của acid, những amid sẽ được nghiên cứu riêng do tính riêng biệt của cấu trúc của nhóm amid và do đặc trưng phức tạp của dao động của nó.

Những phổ của tất cả các kiểu của những hợp chất carbonyl được đặc trưng bằng vân hấp thụ mạnh (ε = 300 - 2000) ở vùng 1900 - 1580 cm^{-1} gây nên bởi những dao động đặc trưng có sự tham gia của nhóm C=O. Sự hấp thụ này được nghiên cứu hoàn hảo và chỉ ra rằng trước tiên cấu trúc của phân tử (hình học của phân tử, khối lượng của nguyên tử liên kết với nhóm carbonyl, những hiệu ứng cảm ứng và hiệu ứng mesome, những yếu tố lập thể) ảnh hưởng đến vị trí và cường độ hấp thụ của vân C=O. Ngoài ra, trạng thái tập hợp của chất và dung môi (sự hình thành liên kết cầu hydro hoặc sự tương tác điện tích) ảnh hưởng đến tần số dao động của liên kết C=O. Những chuyển vị xảy ra trong trường hợp này thường nhỏ hơn những chuyển vị gây nên do ảnh hưởng của yếu tố cấu tạo.

Sự phụ thuộc như thế của vị trí vân hấp thụ của nhóm carbonyl vào tương tác nội phân tử và giữa các phân tử; tính biệt lập của những vân này và cường

độ cao có ý nghĩa đặc biệt của vùng hấp thụ này trong nghiên cứu những phổ hoá học. Tính nhạy cảm cao của sự hấp thụ nhóm carbonyl tới sự thay đổi của môi trường lân cận gắn với điều là dao động đặc trưng của nhóm carbonyl xảy ra không chỉ do sự căng của liên kết C=O. Dao động nhóm này có sự tham gia đáng kể của những góc và liên kết liền kề.

Đối với những lớp riêng của những hợp chất carbonyl, các tần số hấp thụ ν_{CO} ở phạm vi hẹp, do đó theo vị trí của vân hấp thụ ν_{CO} có thể kết luận kiểu của hợp chất carbonyl.

Hợp chất hữu cơ chứa nhóm carbonyl đơn giản nhất là aldehyd formic có dao động ứng với nhóm C=O xuất hiện ở 1745 cm^{-1}.

Những aldehyd béo có sự hấp thụ của nhóm carbonyl ở 1740 - 1720 cm^{-1}. Khi nghiên cứu chất ở tướng khí giá trị của tần số này tăng lên. Thí dụ: ν_{CO} của axetaldehyd dạng hơi bằng 1752 cm^{-1}, còn của aldehyd propionic là 1757 cm^{-1}.

Những ceton bão hoà mạch hở tần số nhóm của nhóm carbonyl nằm trong giới hạn 1725 - 1705 cm^{-1}. Như là aldehyd, ν_{CO} ở dạng hơi tăng lên khoảng 20 cm^{-1}. Thí dụ aceton ở dạng hơi ν_{CO} = 1742 cm^{-1} còn trong dung dịch là 1728 - 1718 cm^{-1} phụ thuộc vào dung môi.

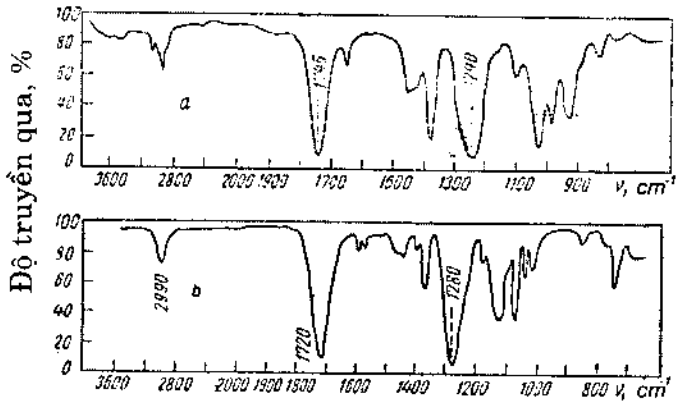
Những acid carbonic ở nguyên tử carbon của nhóm carbonyl kết hợp với nhóm hydroxyl (–OH), tần số dao động ν_{CO} tăng lên. Chỉ có thể quan sát được vân tương ứng ở trạng thái hơi hoặc trong dung dịch loãng với dung môi không phân cực, bởi vì bình thường các acid là chất nhị trùng (dime). Thí dụ: acid acetic (CH_3COOH), vân ν_{CO} đơn phân tử ở 1790 cm^{-1}. Bình thường sự hấp thụ quan sát được của CH_3COOH lỏng ở 1720 - 1700 cm^{-1} là dao động của nhóm carbonyl của chất nhị trùng (dime). Ở trạng thái rắn khi sự kết hợp mạnh hơn nữa vân hấp thụ của nhóm carbonyl bị chuyển vị đến 30 cm^{-1} về phía sóng dài.

Sự hấp thụ ν_{CO} của những acid carbonic ở trạng thái lỏng và rắn hầu như nằm ở chính vùng phổ của ceton và aldehyd. Những acid có thể được nhận biết theo cường độ lớn của vân C=O ($\varepsilon \sim 1500$ còn ở ceton vân này chỉ có ε = 300 - 600) và theo sự hấp thụ ở vùng khác của phổ. Những acid carbonic có sự hấp thụ đặc trưng gây nên do dao động hoá trị của nhóm hydroxyl. Ở dạng đơn phân tử dao động xuất hiện ở 3550 cm^{-1}. Dạng nhị trùng (dime) do liên kết cầu hydro mạnh giữa các phân tử, nhóm của những vân che phủ được quan sát ở vùng 3000 - 2500 cm^{-1}.

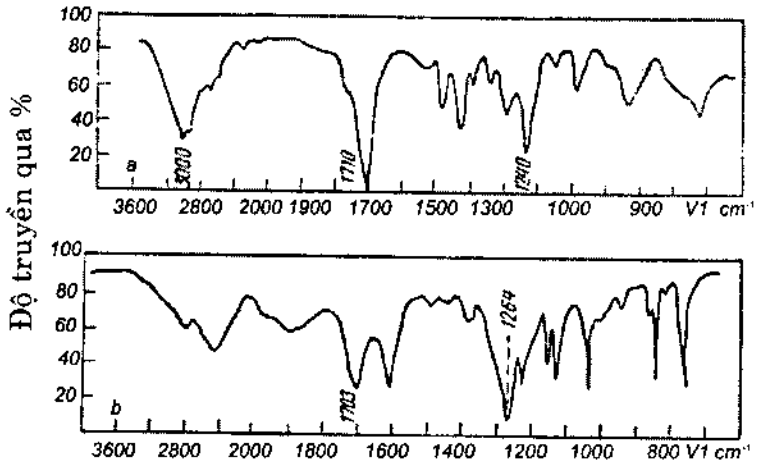
Sự hấp thụ mạnh ở vùng 1420 - 1200 cm^{-1} gây nên bởi những dao động biến dạng của nhóm hydroxyl (OH) và những dao động hoá trị C–O cũng xuất hiện ở các acid carbonic. Vị trí của những vân này bị thay đổi phụ thuộc các chất khác nhau

nhưng có thể được xác định theo cường độ cao của sự hấp thụ. Thí dụ: trên hình 14 đưa ra phổ của C_2H_5COOH (a) và của 2-methyl piridin-5-acid carbonic (b).

Đối với những ester sự hấp thụ của nhóm carbonyl tìm thấy ở vùng 1750 - 1735 cm^{-1}. Giá trị ν_{CO} này cao hơn giá trị ν_{CO} tìm được của những acid carbonic liên hợp tương ứng nhưng thấp hơn ν_{CO} của acid đơn phân tử.



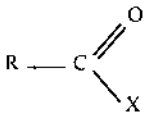
Hình 14: Những phổ hồng ngoại:
a. C_2H_5COOH (1% trong CCl_4, l = 0,5 mm);
b. 2-metylpiridin-5-acid carbonic trong bản KBr.



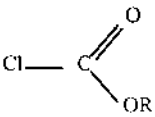
Hình 15: Những phổ hồng ngoại:
a. allylacetat (màng lỏng);
b. diethyl phtalat màng lỏng).

Cũng như là đối với acid trong phổ của ether ở vùng 1300 - 1050 cm^{-1} xuất hiện một hoặc một vài vân mạnh gây nên bởi dao động có sự tham gia của liên kết ether C–O–C (như được gọi là vân ether). Sự hấp thụ này được nhận biết theo cường độ cao và như quy luật "vân ether" mạnh hơn vân carbonyl, nó rộng hơn và đôi khi bị tách ra (hình 15).

Trong những halogenaldehyd của acid và những clorcarbonat quan sát được giá trị rất cao của tần số phù hợp dao động của nhóm carbonyl (1815 - 1770 cm^{-1} đối với những halogenaldehyd acid và 1790 - 1770 cm^{-1} clorcarbonat).



ν_{CO} = 1815 - 1770 cm^{-1}



ν_{CO} = 1790 - 1770 cm^{-1}

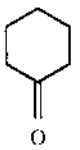
Những muối của acid carbonic có cấu trúc ion đặc trưng bằng sự có mặt của hai vân mạnh ở 1680 - 1610 cm^{-1} và 1400 - 1300 cm^{-1} ứng với dao động bất đối xứng của hai liên kết ngang nhau C=O.

Tần số dao động của nhóm carbonyl kiểu này của hợp chất thực tế không phụ thuộc vào cấu tạo của gốc alkyl. Những chất thế trong gốc hydrocarbon cũng không ảnh hưởng quan trọng đến tần số ν_{CO}, nếu chúng không ở vị trí α so với nhóm carbonyl.

Nhóm carbonyl thay đổi tần số dao động của liên kết C–H của gốc. Như tần số của dao động biến dạng CH của nhóm methyl trong ceton bị dịch chuyển đến 1360 - 1355 cm^{-1}, trong các ester methylic của acid carbonic tần số này ở 1440 - 1435 cm^{-1} (δ_{as}) và 1365 - 1356 cm^{-1} (δ_s); những dao động biến dạng của nhóm methylen $-CH_2-CO-$ cũng bị chuyển dịch đến 1440 - 1400 cm^{-1}.

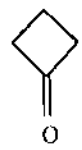
Nếu liên kết bội không liên hợp với nhóm carbonyl thì không có sự ảnh hưởng lẫn nhau nhưng phải nhớ rằng vân carbonyl mạnh che dấu vân yếu hơn của liên kết đôi.

Trong những vòng không căng tần số của nhóm carbonyl bảo toàn giá trị đặc trưng đối với những hợp chất bão hoà tương ứng mạch hở. Sự căng của vòng gây nên sự chuyển vân hấp thụ ν_{CO} về phía tần số lớn. Thí dụ đối với những ceton:



ν_{CO} = 1720 - 1700 cm^{-1}

ν_{CO} = 1750 - 1740 cm^{-1}



ν_{CO} ~ 1775 cm^{-1}

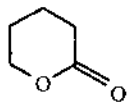
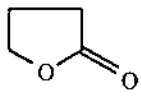
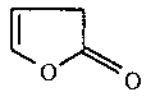
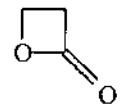
Hình ảnh tương tự quan sát được trong các ester:

- δ-lacton phạm vi của những tần số dao động C=O ở giữa 1750 và 1735 cm^{-1}.

- γ-lacton trong khoảng 1780 - 1760 cm^{-1}.

- γ-lacton không bão hoà β,γ chứa vòng 5 cạnh căng hơn có liên kết đôi, tần số của nhóm carbonyl có giá trị 1800 cm^{-1}.

- Những β-lacton có vòng 4 cạnh bị căng mạnh giá trị của tần số ở 1880 cm^{-1}.

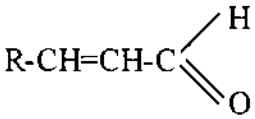





ν_{CO} = 1750 - 1735 cm^{-1} ν_{CO} = 1780 - 1760 cm^{-1} ν_{CO} = 1800 cm^{-1} ν_{CO} = 1880 cm^{-1}

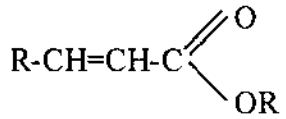
Đưa halogen vào gốc alkyl ở nguyên tử carbon α làm tăng tần số dao động của nhóm carbonyl:

RCHXCOR	RCHXCOOH	RCHXCOOR
ν_{CO} = 1745 - 1725 cm^{-1}	ν_{CO} = 1740 - 1720 cm^{-1}	ν_{CO} = 1770 - 1745 cm^{-1}

Sự liên hợp của nhóm carbonyl với liên kết bội làm giảm tần số dao động ν_{CO} đối với tất cả các kiểu của hợp chất carbonyl từ 20 - 30 cm^{-1}. Như aldehyd α, β-không bão hoà ν_{CO} ở khoảng 1705 - 1680 cm^{-1}, ceton α,β không bão hoà nằm trong phạm vi 1685 - 1665 cm^{-1}. Đối với ester của acid α,β-không bão hoà ở khoảng 1730 - 1717 cm^{-1}; còn γ-lacton không bão hoà α,β nằm giữa 1760 - 1740 cm^{-1}.



RCH=CHCOR

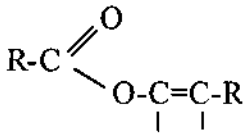


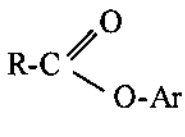
ν_{CO} = 1705 - 1680 cm^{-1} ν_{CO} = 1685 - 1665 cm^{-1} ν_{CO} = 1730 - 1717 cm^{-1}

Chính vòng benzen có ảnh hưởng tương tự.

Sự tăng số mắt xích CH=CH trong mạch liên hợp hầu như không ảnh hưởng đến vị trí vân hấp thụ của nhóm carbonyl.

Phải nhớ rằng đối với các ester của acid carbonic khi đưa liên kết bội vào nhóm ester làm tăng tần số dao động ν_{CO} và đối với những ester vinylic và phenylic của acid carbonic ν_{CO} ở vùng 1770 - 1745 cm^{-1}.





ν_{CO} = 1770 - 1745 cm^{-1}

Dưới ảnh hưởng của nhóm carbonyl vị trí và cường độ của vân hấp thụ của liên kết đôi bị thay đổi:

Tần số bị giảm (1640 - 1600 cm^{-1}), cường độ lớn lên và trở thành bằng với

cường độ vân hấp thụ ν_{CO}. Mặc dù sự tương tác qua lại của dao động C=C và C=O tồn tại thật sự, giá trị của dao động như trong phổ vẫn phân biệt được vân của dao động C=O cũng như C=C. Tần số cao hơn là của liên kết C=O, còn tần số thấp hơn thuộc về liên kết C=C.

Những thay đổi xảy ra ở vùng hấp thụ của nhóm C=O khi đưa vào phân tử nhóm carbonyl thứ hai phụ thuộc vào vị trí tương hỗ của chúng. Khi nghiên cứu những phổ dao động đã chứng minh giữa các nhóm carbonyl cạnh nhau tồn tại sự tương tác rất yếu cho nên sự thay đổi tần số dao động không vượt quá từ 5 - 15 cm^{-1}.

Trong các hợp chất γ và δ-dicarbonyl không xảy ra sự thay đổi vị trí vân hấp thụ nhóm C=O.

Trong trường hợp các hợp chất chứa nhóm C=O ở vị trí β phổ hồng ngoại được xác định bằng chính sự chuyển hoá cấu trúc làm mất hợp chất này. Như đã biết những β-diceton và những aldehyd có thể tồn tại ở dạng enol với sự hình thành liên kết hydro nội phân tử mạnh. Ở vòng chelat (vòng càng cua) sự tương tác của những dao động rất mạnh, đến nỗi không có khả năng tách biệt những tần số của nhóm carbonyl và liên kết đôi. Vùng 1650 - 1500 cm^{-1} quan sát được hình ảnh phức tạp của phổ với một số vân hoặc một vân rất rộng và mạnh. Trong vùng 3200 - 2700 cm^{-1} có vân "rửa xói" rộng của dao động hoá trị của nhóm OH.

Hình ảnh tương tự tìm thấy ở hợp chất *o*-oxycarbonyl dãy thơm. Những hợp chất chứa vòng chelat (vòng càng cua) dễ dàng tạo thành hợp chất nội phức với ion kim loại. Phổ của những hợp chất này ở vùng 1560 - 1500 cm^{-1} thường có hai vân hấp thụ thuộc về những dao động của tất cả hệ vòng càng cua.

Trong những acid β-dicarbonic quan sát được hai vân hấp thụ của nhóm C=O. Như malonic acid có hai vân hấp thụ ở 1740 và 1710 cm^{-1}.

Hai vân hấp thụ ν_{CO} xuất hiện như ở những anhydrid acid. Thí dụ như anhydrid acetic có những vân hấp thụ ở 1824 và 1748 cm^{-1}. Hai vân trong vùng hấp thụ carbonyl được đặc trưng như peroxyd acid. Sự khác nhau về tần số của những vân này không vượt quá 30 cm^{-1}.

Những anhydrid và những peroxyd acid được đặc trưng bằng giá trị rất cao của tần số vân hấp thụ:

Những anhydrid: 1850 - 1800 cm^{-1} và 1790 - 1740 cm^{-1}; $\Delta\nu$ = 60 cm^{-1}.

Những peroxyd: 1805 - 1780 cm^{-1} và 1785 - 1755 cm^{-1}; $\Delta\nu$ = 25 cm^{-1}.

Như đã nêu ở những ví dụ trên của các hợp chất khác nhau, vân của dao động hóa trị của nhóm carbonyl rất nhạy cảm đối với sự thay đổi trạng thái vật lý của hợp chất. Thường giá trị lớn nhất của tần số ν_{CO} quan sát được đối với hợp chất ở trạng thái hơi, sau đó đến các dung dịch của hợp chất carbonyl trong dung môi ít phân cực hoặc không phân cực (CS_2, CCl_4) và sau cùng là giá trị nhỏ hơn nữa của tần số ν_{CO} quan sát được ở trạng thái rắn khi tương tác giữa các phân tử xuất hiện mạnh hơn cả. Nếu nhóm carbonyl tham gia vào sự hình thành liên kết cầu hydro giữa các phân tử thì tần số ν_{CO} giảm từ 15 - 45 cm^{-1}.

Những amid của acid

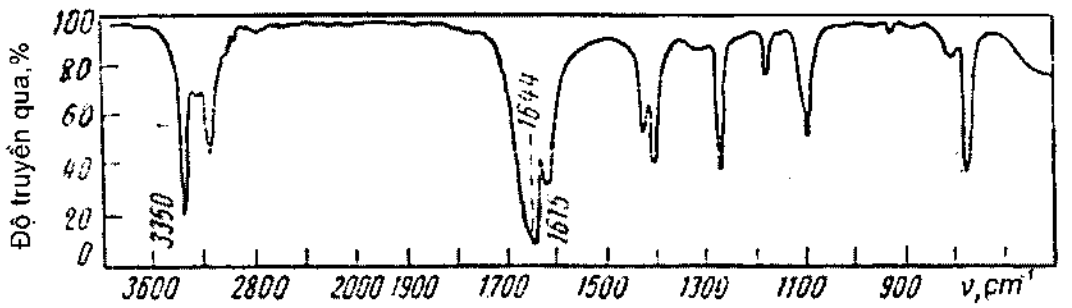
Phổ hồng ngoại của các amid là đối tượng của đa số những công trình nghiên cứu bởi vì nhóm amid là thành phần của nhiều hợp chất tự nhiên.

Có mặt sự hấp thụ ở vùng dao động hoá trị của N–H là đặc trưng của amid bậc 1 và 2. Trong những dung dịch loãng những amid bậc 1 có hai vân của nhóm amin tự do gần 3500 - 3400 cm^{-1}. Khi liên hợp xuất hiện hai hoặc một vài vân ở vùng 3360 - 3180 cm^{-1}.

Những amid bậc 2 có một vân hấp thụ của nhóm N–H tự do ở 3440 - 3420 cm^{-1} đối với hợp chất *cis* và 3460 - 3440 cm^{-1} đối với hợp chất *trans*.

Trong những phân tử đã liên hợp của những amid bậc 2 có hai vân: Vân 3100 - 3070 cm^{-1} có mặt ở cả đồng phân *cis* và *trans*, vân kia đặc trưng cho mỗi đồng phân: đồng phân *cis* ở 3180 - 3140, còn đồng phân trans ở 3330 - 3270 cm^{-1}.

Ở vùng hấp thụ carbonyl những amid có hai vân: như vân đã được gọi là "amid I" và "amid II" (hình 16). Vân thứ nhất ở trong khoảng 1690 - 1630 cm^{-1} trong phổ của những dung dịch loãng amid 1, 2 và 3. Những amid bậc 1 và 2 có thể liên hợp, do đó ở trạng thái rắn vân amid 1 bị chuyển dịch 30 - 40 cm^{-1} về phía tần số thấp.



Hình 16: Phổ hồng ngoại của cloracetamid trong bản KBr
1644 cm^{-1} - vân "amid I"; 1615 - vân "amid II".

Vân này được gây nên bởi dao động phức tạp của nhóm carbonyl trong đó có sự tham gia đáng kể của liên kết C–N, những góc C–C–O và C–N–R.

Vân "amid II" xuất hiện trong những amid bậc 1 và bậc 2 có lẽ thuộc về dao động biến dạng N-H. Nó ở vùng 1620 - 1590 cm^{-1} đối với amid bậc 1 và ở 1550 - 1510 cm^{-1} đối với amid bậc 2 (dung dịch loãng). Khi liên hợp tần số của vân "amid II" tăng 20 - 40 cm^{-1}.

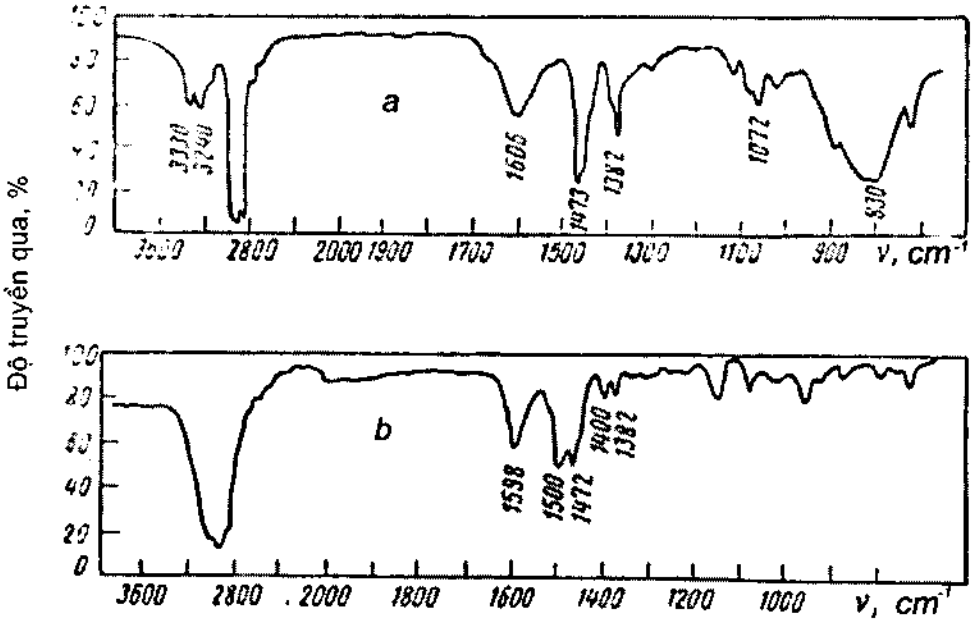
Từ những tư liệu đã trình bày rõ ràng là trong trường hợp của những amid vị trí của vân hấp thụ phụ thuộc vào sự liên hợp bởi vậy khi xử lý chúng cần phải chú ý đặc biệt tới trạng thái tập hợp của chất nghiên cứu.

2.4.2.2. Những hợp chất hữu cơ của nitơ

Trong phần này nghiên cứu những tần số đặc trưng của những nhóm chức chứa nguyên tử nitơ, chính là những tần số nhóm của nhóm amin, nitril, nitro và nitrozo, azomethyl, azo và diazo.

2.4.2.2.1. Nhóm amin

Sự xuất hiện những vân hấp thụ riêng biệt trong phổ hồng ngoại của những amin gắn với những dao động của liên kết N–H và C–N. Những dao động này xuất hiện ở vùng 3500 - 3300 cm^{-1}; 1650 - 1500 cm^{-1}; 1360 - 1000 cm^{-1} (hình 17).



Hình 17: Những phổ hồng ngoại:

a. *n*-hexylamin (màng lỏng);

b. clohydrat của hexylamin (bản KBr).

- *Vùng 3500 - 3300 cm^{-1}*

Sự hấp thụ trong vùng này là của dao động hoá trị liên kết N–H. Amin bậc 3 không có vân này.

Amin bậc 1 trong dung dịch loãng của dung môi trơ có hai vân hấp thụ: Vân tần số cao hơn (~3500 cm^{-1}) ứng với dao động hoá trị bất đối xứng, vân thứ hai (~3400 cm^{-1}) là dao động hoá trị đối xứng của nhóm NH_2. Sự phân bố tương hỗ của những vân này có thể xác định được tới độ chính xác đến 5 cm^{-1} theo phương trình thực nghiệm:

$$\nu_s NH_2 = 345{,}53 + 0{,}875\nu_{as} NH_2$$

Những amin bậc 2 ở vùng 3500 - 3300 cm^{-1} chỉ có một vân dao động hoá trị N–H.

Giống như nhóm hydroxyl, nhóm amin có khuynh hướng liên hợp dẫn tới sự hình thành liên kết cầu hydro giữa các phân tử hoặc nội phân tử. Trong trường hợp này những vân hấp thụ ứng với dao động hoá trị N–H bị chuyển dịch về phía tần số thấp. Những dịch chuyển này nhỏ hơn trong trường hợp của nhóm hydroxyl.

Trong phổ của những amin do sự liên hợp không hoàn toàn có thể quan sát đồng thời những vân của nhóm amin đã liên hợp với những vân của nhóm amin tự do. Yếu tố này được giải thích là số vân hấp thụ ở vùng 3500 - 3300 cm^{-1} có thể hơn hai trong phổ của amin bậc 1 và lớn hơn 1 trong phổ của amin bậc 2.

Sự có mặt của nhóm hydroxyl gây khó khăn cho sự nhận biết vân hấp thụ của nhóm amin.

- *Vùng 1650 - 1500 cm^{-1} và 960 - 650 cm^{-1}*

Sự hấp thụ trong những vùng này được xác định bằng những dao động biến dạng của nhóm amin. Những amin bậc 1 có vân đủ mạnh của dao động biến dạng phẳng bất đối xứng của nhóm amin trong khoảng 1650 - 1580 cm^{-1}. Trong những amin thơm bậc 1 vân này thường hợp nhất với sự hấp thụ của vòng thơm.

Vân dao động biến dạng của nhóm NH của những amin bậc 2 nằm ở vùng 1600 - 1500 cm^{-1} thường yếu và khó xác định. Trong những amin thơm vân này bị che do dao động khung của vòng.

Ở vùng 900 - 650 cm^{-1} những amin bậc 1 có vân rộng của dao động biến dạng của nhóm NH_2.

Sự hình thành liên kết hydro làm tăng tần số của vân dao động biến dạng N–H.

- *Vùng 1360 - 1000 cm^{-1}*

Những vân hấp thụ gây nên do sự tham gia của liên kết C–N vào dao động khung của phân tử xuất hiện ở tất cả các kiểu của amin trong vùng này.

Những amin béo có vân cường độ trung bình trong phạm vi 1230 - 1020 cm^{-1}. Những amin bậc 3 trong vùng này của phổ có 2 vân hấp thụ. Vân ứng với những amin thơm nằm ở 1360 - 1250 cm^{-1}.

2.4.2.2.2. Muối của amin

Sự hình thành muối làm thay đổi những vân hấp thụ của nhóm amin. Những dao động hoá trị của nhóm $-\overset{+}{N}H_3$ xuất hiện ở dạng vân mạnh rộng trong vùng ~3000 cm^{-1}. Thường vân này bị che phủ bởi vân dao động hoá trị C–H. Những muối của amin bậc 2 có vân hấp thụ tương ứng (rộng và mạnh) ở khoảng 2700 - 2250 cm^{-1}.

Đôi khi nhóm $\overset{+}{N}H_2$ xuất hiện ở dạng vân hẹp chính ở vùng này của phổ. Chính những muối của amin bậc 3 $\equiv\overset{+}{N}H$ có những vân tương tự.

Những vân dao động biến dạng của nhóm amin trong các muối bị dịch chuyển về phía tần số thấp so với những vân tương ứng của amin tự do. Như muối của amin bậc 1 có hai vân mạnh của dao động biến dạng ở 1600 - 1575 và 1300 cm^{-1}. Muối của các amin bậc 2 có một vân cường độ trung bình ở 1600 - 1575 cm^{-1}. Vân δ^{+}_{NH} của muối amin bậc 3 yếu và không có ý nghĩa thực tiễn. Những muối amin bậc 4 không có vân hấp thụ đặc trưng.

Nhóm amin ảnh hưởng đến những dao động biến dạng của gốc hydrocarbon. Thí dụ như cường độ của vân dao động hoá trị đối xứng của nhóm methyl trong $N\text{-}CH_3$ bị giảm mạnh (ε = 15 - 21 trong khi đó ở hydrocarbon ε = 30). Những dao động biến dạng của nhóm methylen kết hợp với nguyên tử nitơ nhận điện tử $\equiv\overset{+}{N}-$ ở vùng 1440 - 1400 cm^{-1} nghĩa là bị giảm thực sự. Sự xuất hiện những vân hấp thụ mới trong vùng 1450 - 1400 cm^{-1} khi chuyển từ amin đến muối của nó có thể là bằng chứng về sự có mặt của nhóm $-CH_2-N\lessdot$

Ảnh hưởng mạnh của nhóm amin đến đặc trưng của dao động nhóm carbonyl trong các amid đã thông báo ở trên.

2.4.2.2.3. Nhóm azomethin

Phần này không nghiên cứu những phổ hồng ngoại của hợp chất có chứa nhóm C=N trong vòng thơm. Trong hệ vòng như thế liên kết C=N liên hợp với liên kết C=C và không có dao động thuộc về mỗi nhóm riêng biệt.

Những vân hấp thụ C=N của hệ kiểu R–CH=N–R' (ở đây R' là alkyl, Ar, OH) ở phạm vi 1690 - 1615 cm^{-1} và phụ thuộc vào đặc trưng của những nhóm đã kết hợp.

Đối với những hợp chất azomethin béo không liên hợp tần số những vân hấp thụ nhóm –C=N nằm ở vùng 1690 - 1640 cm^{-1}. Với những oxim vân này ở 1680 - 1660 cm^{-1} (thí dụ: acetoxim hấp thụ ở 1675 cm^{-1}).

Trạng thái tập hợp ảnh hưởng thật sự đến vân hấp thụ của nhóm –C=N–: những mẫu rắn có những vân hấp thụ bị giảm đến 20 - 30 cm^{-1}. Sự liên hợp với gốc thơm làm giảm tần số dao động của liên kết C=N đến 1657 - 1641 cm^{-1} trong trường hợp Ar–CH=N–Alkyl và đến 1630 - 1615 cm^{-1} trong trường hợp Ar–CH=N–Ar.

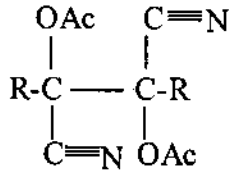
Trong những hệ đã nêu có thể nhận biết vân hấp thụ thuộc về dao động của nhóm –HC=N– nhờ cường độ cao của nó mặc dù phải hiểu là cường độ của vân hấp thụ C=N thay đổi mạnh phụ thuộc vào đặc điểm của nhóm đã kết hợp (như trong oxim của cyclohexanon $\varepsilon = 20$; trong Ar–CH=N–Ar $\varepsilon = 180$).

2.4.2.2.4. Nhóm nitril và isonitril

Những nitril có vân hấp thụ đặc trưng ở 2260 - 2215 cm^{-1} do dao động của nhóm nitril. Liên kết C–C tham gia đáng kể trong những dao động này (đến 50%). Những tần số của dao động nhóm C≡N ở những mono và dinitril bão hoà nằm giữa 2260 - 2240 cm^{-1}. Sự liên hợp với liên kết đôi và vòng thơm làm giảm tần số ν_{CN} đến 20 - 30 cm^{-1}.

Vị trí vân nhóm nitril thay đổi trong phạm vi nhỏ của tần số khi thay đổi cấu trúc gốc phân tử gắn với nhóm nitril. Ngược lại cường độ của nó bị thay đổi trong giới hạn rộng. Vân hấp thụ C≡N ở những nitril béo có cường độ nhỏ, sự liên hợp làm tăng cường độ của nó.

Phân tử có thêm nhóm chức chứa oxy dẫn tới giảm đáng kể cường độ vân $\nu_{C\equiv N}$; thí dụ trong cyanhydrin của aceton cường độ hấp thụ nhóm C≡N giảm hơn giá trị thông thường, còn trong hợp chất:



vân hấp thụ hoàn toàn không thấy được. Nó cũng không quan sát được trong

những clohydrat của α-aminonitril mặc dù chính trong α-aminonitril nó được phân biệt rõ ràng.

Như vậy sự vắng mặt vân hấp thụ mạnh $\nu_{C\equiv N}$ không thể là bằng chứng dứt khoát của sự vắng mặt nhóm nitril trong hợp chất.

Nhóm isonitril có vân hấp thụ mạnh ở 2185 - 2120 cm^{-1}.

2.4.2.2.5. Nhóm azo

Không phải lúc nào cũng thấy được vân hấp thụ gây nên bởi dao động của nhóm azo trong phổ hồng ngoại bởi vì vân này có cường độ yếu; Trong trường hợp của những phân tử đối xứng qua tâm như: azomethan, *trans*-azobenzen sự xuất hiện của vân $\nu_{N=N}$ trong phổ hồng ngoại là bị cấm do đối xứng và chỉ quan sát được trong phổ khuếch tán tổ hợp.

Sự nghiên cứu những phổ hồng ngoại của một loạt những chất azo thơm với nhóm azo có chứa nguyên tử ^{15}N cho phép xác định rằng vân $\nu_{N=N}$ của đồng phân *cis*-azobenzen nằm ở 1511 cm^{-1}, còn ở đồng phân *trans*-azobenzen đã thế bất đối xứng ở vùng 1418 - 1410 cm^{-1}. Nhận biết vân của nhóm azo của hợp chất azo thơm trong phổ rất khó bởi vì nó nằm ở đúng vùng ở đó có sự hấp thụ của vòng thơm.

2.4.2.2.6. Nhóm diazo

Nhóm diazo CN_2 có trong những hợp chất diazo béo, trong muối của diazoni thơm và trong những diazit (diazophenol-$OC_6H_4N_2$ và trong imidoquinoldiazit, thí dụ như $ArSO_2N–C_6H_4N_2$).

Phổ của tất cả những hợp chất diazo có sự hấp thụ rất đặc trưng ở vùng của liên kết 3 liên hệ với nhóm CN_2, vị trí của vân hấp thụ này phụ thuộc vào cấu trúc của hợp chất diazo (2300 - 2000 cm^{-1}).

Diazomethan có vân hẹp ở 2105 cm^{-1}; trong những diazoalkan sự hấp thụ gây nên bởi nhóm CN_2 nằm ở phạm vi 2049 - 2012 cm^{-1}; trong những hợp chất diazocarbonyl sự hấp thụ dịch chuyển đến 2188 - 2110 cm^{-1}. Tần số nhóm CN_2 của những muối diazoni thơm ở vùng từ 2330 đến 2160 cm^{-1}.

Trong phổ của những dung dịch vị trí νCN_2 của muối diazoni được xác định bằng chất thế trong vòng benzen: chất thế nhận điện tử làm tăng tần số dao động của nhóm CN_2, ngược lại, chất thế cho điện tử làm giảm tần số dao động của nhóm CN_2 (bảng 3). Đối với những muối diazoni rắn νCN_2 phụ thuộc chính vào anion.

Bảng 3: Tần số và cường độ tích phân của vân νCN_2 của muối diazo trong dung dịch CH_3OH.

Cation diazo	ν_{CN_2}, cm^{-1}	A_{CN_2}.10-4;M-1.cm^{-2}.l
p-$O_2NC_6H_4N_2^+$	2309	0,71
$C_6H_5N_2^+$	2290	1,27
p-$CH_3OC_6H_4N_2^+$	2251	3,85
p-$(CH_3)_2NC_6H_4N_2^+$	2160	13,50

Cường độ vân hấp thụ của nhóm CN_2 của những muối diazoni, thay đổi trong phạm vi rộng phụ thuộc vào chất thế và lớn lên theo mức độ tăng của lực cho điện tử của chất thế (bảng 3).

2.4.2.2.7. Nhóm nitro

Nhóm nitro NO_2 là thành phần của hợp chất nitro, nitrat cộng hoá trị và những nitramin. Những hợp chất của mỗi lớp trong 3 lớp này cho 2 vân hấp thụ cực mạnh ở 1650 - 1500 cm^{-1} và 1390 - 1250 cm^{-1} ứng với dao động hoá trị bất đối xứng và đối xứng của nhóm NO_2. Nitromethan hấp thụ ở 1580 và 1375 cm^{-1}.

Những khoảng tần số của những dẫn xuất alkyl đơn giản là 1567 - 1550 cm^{-1} (những dao động bất đối xứng) và 1379 - 1368 cm^{-1} (dao động đối xứng). Đối với những hợp chất nitro bậc 3 quan sát được sự giảm rõ rệt của cả 2 tần số dao động đến 1545 - 1530 và 1358 - 1342 cm^{-1}.

Sự liên hợp của nhóm nitro với liên kết đôi dẫn tới sự làm giảm cả 2 tần số hấp thụ.

Khi thế bằng nguyên tử halogen vào vị trí α tần số của dao động bất đối xứng tăng đáng kể, còn tần số của dao động đối xứng bị giảm, như clopicrin hấp thụ ở 1625 và 1311 cm^{-1}.

Sự tích luỹ những nhóm nitro trong hợp chất được phản ánh bằng kiểu khác nhau trong phổ phụ thuộc vị trí tương đối của chúng trong phân tử. Với những nitroalkan, những nhóm nitro ở những nguyên tử carbon khác nhau có sự thay đổi vân hấp thụ ứng với những dao động đối xứng và bất đối xứng nhưng không quan sát được. Đối với hem-dinitro và trinitroalkan xảy ra sự chuyển dịch vân hấp thụ của những dao động hoá trị đối xứng cũng như bất đối xứng của nhóm NO_2; hơn nữa hiệu riêng biệt về tần số $\Delta\nu = \nu_{as}-\nu_s$ đặc trưng cho mỗi kiểu của hợp chất: với hợp chất mononitro $\Delta\nu$ = 182 cm^{-1}, hợp chất hem-dinitro $\Delta\nu$ = 248 cm^{-1} và hợp chất hem-trinitroalkan $\Delta\nu$ = 298 cm^{-1}.

Trong những hợp chất nitro thơm những tần số của dao động hoá trị bất đối xứng phân bố tương ứng ở 1548 - 1520 cm^{-1} và 1360 - 1344 cm^{-1}. Đôi khi những vân của nhóm nitro xuất hiện ở dạng kép đôi (doublet); điều này liên quan tới hiệu ứng không gian hoặc sự hình thành liên kết cầu hydro với nhóm nitro.

Nhóm nitro ảnh hưởng đến dao động của những nguyên tử bên cạnh. Theo sự xuất hiện của vân dao động biến dạng của nhóm CH_2 ở 1349 cm^{-1} có thể nhận biết là hợp chất nitro bậc một.

Bình thường vân hấp thụ ứng với dao động bất đối xứng mạnh hơn rõ rệt vân ứng với dao động đối xứng.

Trong phổ của những muối kiềm của hợp chất nitro không quan sát được sự hấp thụ ở vùng 1500 - 1300 cm^{-1}.

Đối với những nitramin các vân của dao động hoá trị bất đối xứng tương ứng ở 1587 - 1530 cm^{-1} và 1292 - 1200 cm^{-1}.

2.4.2.2.8. Nhóm nitroso

Những dao động hoá trị của nhóm nitroso quan sát được ở vùng 1680 - 1430 cm^{-1}.

Những hợp chất O-nitroso (nitrit) có 2 vân hấp thụ ở 1681 - 1653 cm^{-1} và 1625 - 1613 cm^{-1} ứng dạng *trans* và *cis* của nitrit.

Những hợp chất C-nitroso hấp thụ ở vùng 1550 - 1500 cm^{-1}; hợp chất N-nitroso có vân hấp thụ liên quan dao động của nhóm nitroso ở 1500 - 1430 cm^{-1}.

2.4.3. Những hợp chất hữu cơ chứa nguyên tử halogen

Trong những dẫn xuất halogen xuất hiện những vân hấp thụ ứng với các dao động có sự tham gia của liên kết C–X.

Với dẫn xuất flo không tách được dao động ứng liên kết C–F do sự tương tác mạnh của chúng với những dao động khác. Dao động có sự tham gia của liên kết C–F có dạng rất phức tạp và nằm trong khoảng rộng của tần số: từ 1400 đến 1000 cm^{-1}. Sự có mặt của những nguyên tử F gây nên cường độ hấp thụ cao ở vùng này và có thể dùng để nhận biết những dẫn xuất F.

Sự thế bằng nguyên tử F dẫn đến sự chuyển dịch đáng kể về phía tần số lớn của vân dao động nhóm C–H, C–C, C–O...

Trong trường hợp của những dẫn xuất clo không phải lúc nào cũng tách được dao động đặc trưng của liên kết C–Cl mặc dù hiệu ứng tương tác nhỏ hơn và vùng tần số hẹp hơn (750 - 700 cm^{-1}) của dao động có sự tham gia của liên

kết C–Cl. Sự có mặt của một số nguyên tử clo ở một nguyên tử carbon dẫn đến sự tăng tần số nhóm của dao động C–Cl. Thí dụ CCl_4 hấp thụ ở 797 cm^{-1}.

Trong phổ của những dẫn xuất clo lỏng và dung dịch của chúng ngoài vận hấp thụ ở vùng 750 - 700 cm^{-1} còn một vân nữa ở 690 - 650 cm^{-1}. Điều đó được giải thích bởi sự có mặt của những đồng phân xoay: *trans-* và *gos-* đối với những halogenalkyl đơn giản còn trong trường hợp của những hợp chất vòng là đồng phân trục và xích đạo. Thí dụ như trong những alkyl clorid lỏng ngoài vân dạng *trans* ở 750 - 700 cm^{-1}, quan sát được vân dạng *gos* ở ~650 cm^{-1}, ở clocyclohexan vân C–Cl ở 742 cm^{-1} đối với đồng phân xích đạo và ở 688 cm^{-1} đối với đồng phân trục.

Ở những dẫn xuất di- và polyhalogen số những đồng phân có thể tăng phù hợp với hình ảnh phức tạp có được trong phổ ở vùng hấp thụ của dao động nhóm C–Cl.

Vân hấp thụ của những dẫn xuất brom đơn giản ở 600 - 500 cm^{-1} có độ lớn cố định tương đối. Trong những phổ của alkyl bromid lỏng cũng quan sát được hai vân: dạng *gos-* của alkyl bromid hấp thụ ở 560 cm^{-1}. Đối với những bromid vòng vân ở 750 - 700 cm^{-1} đặc trưng cho sự thế xích đạo còn ở 690 - 590 cm^{-1} là thế trục.

Phổ của những phân tử chứa iod đơn giản có vân C–I của dạng *trans-* ở gần 600 cm^{-1}. Vân của dạng *gos-* ở những dẫn xuất iod lỏng gần 500 cm^{-1}.

2.4.4. Những hợp chất hữu cơ chứa lưu huỳnh

Nhờ phổ hồng ngoại có thể nghiên cứu những hợp chất hữu cơ chứa nhóm S–H, S=O và SO_2.

Những vân hấp thụ liên hệ với những dao động của nhóm C–S và S–S có cường độ nhỏ, còn vị trí của chúng phụ thuộc vào cấu trúc của phần còn lại của phân tử không có giá trị thực tiễn để nhận biết.

2.4.4.1. Những mercaptan và thiophenol

Những mercaptan và thiophenol có vân đặc trưng do dao động của liên kết S–H. Vân S–H ở vùng tần số 2600 - 2550 cm^{-1} chỉ có một vài chất hấp thụ.

Trong phổ của những mercaptan đơn giản có vân hấp thụ tương đối yếu nhưng rõ ở 2600 - 2550 cm^{-1}.

Những acid thioacetic và dithioacetic hấp thụ ở 2550 - 2481 cm^{-1} chứng tỏ vắng mặt sự liên hợp rõ ràng của phân tử. Nhóm S–H không có khả năng hình

thành liên kết hydro mạnh, bởi vậy những vân hấp thụ S–H ít bị thay đổi khi thay đổi nồng độ của dung dịch.

2.4.4.2. Sulfoxyd

Những sulfoxyd có sự hấp thụ đặc trưng cường độ cao do những dao động của liên kết S=O ở vùng 1060 - 1040 cm^{-1}. Đối với mẫu rắn tần số ν_{SO} hạ từ 10 - 20 cm^{-1}. Sự liên hợp không ảnh hưởng đến tần số ν_{SO}. Tần số ν_{SO} tăng trong trường hợp của những halogenthionin và của sulfid cộng hoá trị. Đối với những acid sulfonic (R–SOOH) ν_{SO} ở gần 1090 cm^{-1} ở ester tương ứng nó tăng hơn một chút (1130 - 1126 cm^{-1}), còn trong những dialkylsulfid nó ở gần 1200 cm^{-1}.

2.4.4.3. Sulfon (-SO_2)

Những sulfon có sự hấp thụ rất đặc trưng ở vùng 1160 - 1120 cm^{-1} và 1350 - 1300 cm^{-1} do dao động đối xứng và bất đối xứng của nhóm SO_2. Những vân này rất mạnh, dễ nhận biết. Phổ của những chất rắn bị tách thành nhóm vân mạnh có tần số gần nhau. Thường các chất rắn hấp thụ ở tần số thấp hơn chất trong dung dịch CCl_4 từ 10 - 20 cm^{-1}. Vân tần số thấp bị chuyển dịch do sự thay đổi trạng thái liên hợp hoặc hình thành liên kết cầu hydro giảm hơn vân tần số cao.

Trong những sulfoclorid, sulfonat cộng hoá trị và sulfat xảy ra sự tăng tần số của dao động hoá trị nhóm SO_2. Như methansulfoclorid có những vân ở 1370 cm^{-1} và 1175 cm^{-1}, còn *p*-toluolsulfoclorid ở 1166 và 1366 cm^{-1}. Những sulfoxyd cộng hoá trị hấp thụ ở khoảng 1420 - 1330 cm^{-1} và 1200 - 1145 cm^{-1}, còn sulfat cộng hoá trị ở vùng 1440 - 1350 cm^{-1} và 1230 - 1150 cm^{-1}.

Trong trường hợp của những amid của acid sulfonic không xảy ra sự thay đổi dù rất nhỏ trong phổ dao động như ở những amid của acid carbonic, chỉ có một vài amid vân SO_2 tách khỏi giới hạn của khoảng đã nêu của tần số đặc trưng và trong trường hợp này có giá trị cao hơn.

Trong phổ của chính những acid sulfonic và muối của chúng tần số dao động hoá trị đối xứng và bất đối xứng của nhóm SO_2 giảm mạnh và vùng hấp thụ của chúng ở khoảng 1260 - 1150 cm^{-1} đối với dao động bất đối xứng và 1080 - 1010 cm^{-1} đối với dao động đối xứng. Hiệu những tần số giữa muối và chính acid rất nhỏ.

2.5. Những yếu tố ảnh hưởng đến phổ hồng ngoại

Nghiên cứu những dữ liệu thực nghiệm theo phổ hồng ngoại hấp thụ chúng ta đã xác định được tần số đặc trưng của một số nhóm chức (bảng 1).

Trong bảng chỉ ra tổng quát vị trí hấp thụ đặc trưng của những nhóm chất thường gặp. Sự thay đổi vị trí các tần số đặc trưng của các nhóm chức phụ thuộc trước hết vào lực liên kết, khối lượng nguyên tố và nhiều yếu tố khác nhau, chúng ta lần lượt tổng kết.

2.5.1. Ảnh hưởng của lực liên kết và khối lượng

Xét phương trình của định luật Guc:

$$\nu = \frac{1}{2\pi c}\cdot\sqrt{\frac{k}{\mu}}$$

trong đó: k: hệ số lực;

μ: khối lượng rút gọn.

Từ phương trình này rõ ràng là tần số đặc trưng ν phụ thuộc vào hằng số lực k của các liên kết giữa các nguyên tử và phụ thuộc vào khối lượng của các nguyên tố.

Người ta tính rằng khi tần số lực của hai nhóm khác nhau 25% thì tần số đặc trưng của chúng khác nhau rất rõ. Các liên kết của carbon trong các hợp chất nối đơn, nối đôi và nối ba sẽ cho các tần số đặc trưng khác nhau vì tỷ lệ hằng số lực của C–C : C=C : C≡C là 1 : 2 : 3. Ngoài ra khi thay đổi các nguyên tố của nhóm cũng sẽ dẫn đến sự thay đổi tần số đặc trưng chẳng hạn các nhóm chứa nối đôi C=O, C=S, C=N- đều có tần số đặc trưng khác nhau do khối lượng của các nguyên tố khác nhau gây ra. Nhóm O-H dao động hấp thụ ở 3600 cm^{-1} nhưng nhóm O–D dao động lại hấp thụ ở 2650 cm^{-1} bởi khối lượng D lớn gấp đôi khối lượng của H.

Khi nghiên cứu phổ hồng ngoại hấp thụ cần lưu ý tới những ảnh hưởng này.

2.5.2. Ảnh hưởng của trạng thái tập hợp

Cùng một chất nhưng ở trạng thái tập hợp khác nhau cho tần số đặc trưng của nhóm chức khác nhau. Ở trạng thái khí cho phổ lý tưởng nhất của hợp chất bởi vì thực tế không có sự tương tác giữa các phân tử do các phân tử ở cách xa nhau. Ở trạng thái lỏng các phân tử ở xung quanh những phân tử khác gần hơn dưới ảnh hưởng của sự kết hợp giữa các phân tử làm thay đổi tần số dao động. Phổ của chất ở trạng thái rắn bị thay đổi nhiều hơn không chỉ do sự tăng cường của tác dụng tương hỗ giữa các phân tử sát nhau mà còn do ảnh hưởng riêng của mạng lưới tinh thể.

Như là một quy luật trong tinh thể thường chỉ tồn tại một loại đồng phân

nhưng chất trong trạng thái khí và lỏng có thể có đồng phân cho nên trong phổ có thể xuất hiện vân phụ. Thí dụ, trong phổ của cloraceton lỏng xuất hiện hai vân phụ của nhóm carbonyl ở 1725 cm^{-1} và 1745 cm^{-1}; ở trạng thái hơi chỉ có một vân ở 1742 cm^{-1} còn trong trạng thái rắn vân bị dịch chuyển đến 1718 cm^{-1} do sự liên hợp của lưỡng cực.

2.5.3. Ảnh hưởng của dung môi

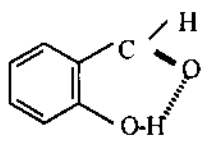
Trong dung dịch tần số đặc trưng của các nhóm có sự thay đổi phụ thuộc vào dung môi hoà tan chất. Ảnh hưởng của dung môi đến vị trí vân hấp thụ không lớn. Khi ghi phổ chất trong dung môi không phân cực thì tần số đặc trưng có giá trị thường cao hơn ở trong dung môi phân cực. Đối với các nhóm phân cực như C=O, C=N– thì ảnh hưởng dung môi thể hiện rõ do có sự tương tác mạnh của chúng với dung môi phân cực. Thí dụ như ở aceton.

Dung môi	$\nu_{C=O}$ (aceton), cm^{-1}	Dung môi	$\nu_{C=O}$ (aceton), cm^{-1}
Cyclohexan	1728	Nitromethan	1718
Carbontetraclorua	1724	Cloroform	1717
Dioxan	1720	Bromoform	1712

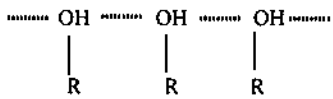
Trong trường hợp hình thành liên kết hydro thì ảnh hưởng của dung môi xảy ra rất rõ làm thay đổi thật sự những tần số dao động của nhóm tham gia vào sự hình thành nó.

2.5.4. Liên kết cầu hydro

Các liên kết cầu hydro có ảnh hưởng lớn đến tần số đặc trưng như đã thấy khi khảo sát phổ của các chất chứa các nhóm OH và NH... có khả năng tạo cầu hydro do đó tần số của nó luôn thay đổi khi ghi phổ trong những dung môi khác nhau hoặc ở những nồng độ khác nhau. Ở trong dung dịch nhóm OH có thể tạo cầu hydro nội phân tử (như aldehyd salixilic)



hay ngoại phân tử (ancol)



Dao động hoá trị của nhóm OH tự do (không liên hợp) là 3590 - 3650 cm^{-1}, trái lại dao động hoá trị của nhóm OH liên hợp (tạo cầu hydro) là 3350 cm^{-1}. Từ sự sai lệch tần số đặc trưng này, người ta có thể tính được năng lượng liên kết của cầu hydro.

Các liên kết cầu hydro nội phân và ngoại phân có thể phân biệt dễ dàng bằng phổ hồng ngoại. Đối với các liên kết cầu hydro nội phân tử khi pha loãng dung dịch tần số đặc trưng của nó không thay đổi nhưng ngược lại đối với cầu liên kết hydro ngoại phân tử thì thay đổi rất mạnh.

Liên kết cầu hydro không những có ảnh hưởng đến tần số đặc trưng của nhóm OH mà còn ảnh hưởng đến cả tần số đặc trưng của nhóm C=O (carbonyl).

2.5.5. Hiệu ứng điện tử - Hiệu ứng cảm ứng và mesome

Diankylsulfoxyd có dao động hoá trị của nhóm S=O ở gần 1050 cm^{-1} còn diankylsulfid ở gần 1200 cm^{-1}. Sự khác nhau này là do sự thay đổi phân bố điện tích trong nhóm ảnh hưởng đến hằng số lực liên kết hay nói cách khác do hiệu ứng cảm ứng gây nên. Cả hai chất trên đều có thể viết dưới dạng cộng hưởng:

$$(-CH_2-CH_2)_2S=O \rightleftharpoons (-CH_2-CH_2)_2\overset{+}{S}-\overset{-}{O}$$

(I) (II)

Diankylsulfoxyd

$$(-CH_2-CH_2-O)_2S=O \rightleftharpoons (-CH_2-CH_2-O)_2\overset{+}{S}-\overset{-}{O}$$

(III) (IV)

Diankylsulfid

Ở diankylsulfoxyd, do ái lực điện tử mạnh của nguyên tử oxy nên kéo điện tử của liên kết đôi S=O về phía nó dẫn đến sự hình thành công thức cộng hưởng II một cách thuận lợi, còn ở diankylsulfid thì các nguyên tử oxy ở nối đôi S=O và nối đơn –O-S- đều kéo điện tử về phía mình do đó khả năng tồn tại công thức cộng hưởng IV là kém ưu thế mà chủ yếu tồn tại ở dạng III.

Do đó liên kết đôi S=O ở hai hợp chất trên sẽ có hằng số lực khác nhau và dẫn đến tần số đặc trưng khác nhau.

Tần số đặc trưng của nhóm C=O trong các hợp chất andehyd, ceton, acid, ester, cloracid, amid...khác nhau không những do hiệu ứng liên hợp mà còn do hiệu ứng cảm ứng gây nên.

2.5.6. Ảnh hưởng sức căng của vòng

Trong các vòng 3, 4, 5 bão hoà góc liên kết C–C–C không bằng góc tứ diện của trạng thái lai tạo sp^3 là 109°18' mà nhỏ hơn. Do vậy gây ra sức căng của liên kết (sức căng Bayer). Sức căng này ảnh hưởng đến lực liên kết giữa các nguyên tử trong vòng và dẫn đến làm thay đổi đặc trưng của các dao động.

Dựa vào phương trình Herzberg có thể tính gần đúng tần số đặc trưng của các dao động ở những giá trị khác nhau của góc liên kết.

Những giá trị thực nghiệm trong bảng chỉ ra sự thay đổi tần số đặc trưng của các liên kết do ảnh hưởng sức căng liên kết C–H, C=C và C=O.

Chất	$\nu_{C=C}$ cm^{-1}	Chất	$\nu_{C=O}$ cm^{-1}	Chất	ν_{C-H} cm^{-1}
Cyclohexen	1646	Cyclohexanon	1718	Cyclopentan	2950
Cyclopenten	1611	Cyclopentanon	1742	Cyclobutan	3000
Cyclobuten	1566	Cyclobutanon	1784	Cyclopropan	3040

2.6. Những điều kiện đo phổ hấp thụ trong vùng hồng ngoại

Người ta đo phổ hồng ngoại của các chất ở trạng thái nguyên chất cũng như trạng thái dung dịch của chúng. Mẫu ghi phổ có thể là mẫu khí, lỏng hoặc rắn.

2.6.1. Mẫu dạng khí

Đối với mẫu khí tinh khiết hay hỗn hợp khí người ta cần sử dụng loại cuvet riêng có chiều dài khoảng 10 cm. Nồng độ các phân tử khí rất loãng so với các chất thể lỏng do đó cần thiết phải để ánh sáng đi qua mẫu với một chiều dài khá lớn có thể đến hàng mét. Do chiều dài cuvet thực tế chỉ 10cm cho nên người ta phải đặt một hệ thống gương phản chiếu ánh sáng trong cuvet để tăng độ dài đường đi của ánh sáng qua mẫu làm tăng độ hấp thụ ánh sáng của các phân tử khí.

2.6.2. Mẫu dạng lỏng

Các chất lỏng hữu cơ được nạp dễ dàng vào các cuvet riêng làm bằng tinh thể KBr với chiều dày lớp mỏng mẫu đo từ 0,01 - 0,05 mm người ta gọi là mẫu phim mỏng.

Các chất lỏng hoặc chất rắn có thể chuẩn bị dưới dạng dung dịch có nồng độ và bề dày lớp chất thích hợp.

Phải luôn nhớ rằng các dung môi hữu cơ cũng hấp thụ ánh sáng cho nên dung môi cần phải trơ và không cho vân hấp thụ riêng ở vùng nghiên cứu. Những dung môi thường dùng tốt nhất đo phổ hồng ngoại là CS_2, CCl_4 và $CHCl_3$.

Điểm đặc biệt cần chú ý là mẫu lỏng đo và dung môi sử dụng cần khan tuyệt đối nếu không sẽ phá hỏng các tấm cửa sổ của cuvet là những tinh thể muối KBr hay NaCl. Người ta cần phải làm khô dung môi bằng một bộ máy chưng cất dung môi đặc biệt hoặc chạy sắc ký cột.

2.6.3. Mẫu rắn

Các mẫu rắn có thể ghi phổ hồng ngoại ở dạng rắn bằng cách nghiền một lượng nhỏ chế phẩm (5 - 10 mg) với vazelin hoặc dầu paraphin (Nujol) thành bột nhão rồi ép bột nhão giữa 2 tấm cửa sổ của cuvet. Nhưng phải nhớ rằng chính dầu vazelin hay dầu paraphin có vân hấp thụ mạnh ở vùng của những dao động biến dạng và dao động hoá trị của C–H.

Với mẫu rắn thường người ta dùng phương pháp ép KBr (đĩa nén) chỉ cần lượng rất nhỏ của chế phẩm (1 - 2 mg) trộn với 0,3 - 0,4 g bột mịn KBr hay KCl đã sấy khô cho vào cối rồi ép thành một màng mỏng trong suốt có chiều dày khoảng 0,1 mm trong điều kiện chân không và áp lực lớn. Đặt màng mỏng vào cuvet để ghi phổ.

Giới hạn tồn tại trong sự đo phổ hồng ngoại chính là nguyên liệu làm cuvet. Thường những cuvet được chế tạo từ những tinh thể NaCl, KBr, LiF, CaF_2...; những chất này không cho phép làm việc với chất lẫn H_2O, các acid và kiềm. Với những trường hợp đặc biệt người ta chế tạo từ Ge, Si, polyetylen và những nguyên liệu khác.

2.7. Thiết bị

2.7.1. Sơ đồ cấu tạo phổ kế hồng ngoại

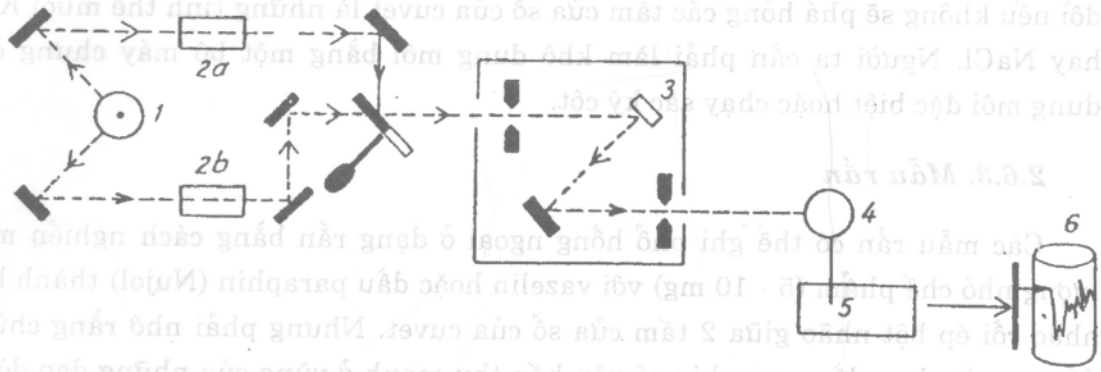
Phổ kế hồng ngoại thông dụng hiện nay là loại máy tự ghi, bộ phận chính của máy gồm: nguồn sáng, bộ tách ánh sáng đơn sắc (lăng kính hay cách tử).

Nhận tín hiệu, khuếch đại tín hiệu và tự ghi (hình 18).

2.7.1.1. Nguồn sáng

Trong phổ hồng ngoại nguồn sáng thường dùng là đèn Nernst và đèn Globar. Đèn Nernst là một ống dài 2 - 5 cm, đường kính 1 - 3 mm chứa oxyd kim loại đất hiếm (khoảng 85% ZrO_2 và 15% Y_2O_5) ở 800°C có khả năng phát sáng

và đốt nóng tối đa tới 1900°C. Đèn Globar là một ống dài 40 - 60 mm, có đường kính 4 - 6 mm làm từ silic carbit, nhiệt độ nóng tối đa 1300°C. Cả hai đèn đều phát tia hồng ngoại. Hiện nay còn dùng đèn nicrom, được chế tạo bằng cách cuốn một sợi hợp kim niken-crom quanh một ống sứ dài 50 - 60 mm có đường kính khoảng 4 - 5 mm, đốt nóng ở 700 - 800°C.



Hình 18: Sơ đồ chung của phổ kế hồng ngoại:

1. nguồn sáng;
2. a/ cuvét đo mẫu ; b/ cuvét so sánh;
3. bộ tách ánh sáng đơn sắc (cách tử);
4. nhận tín hiệu;
5. khuếch đại tín hiệu;
6. tự ghi.

2.7.1.2. Bộ tách ánh sáng đơn sắc

Ánh sáng từ nguồn sáng đi ra là một chùm sáng đa sắc phải phân tích thành ánh sáng đơn sắc. Hệ thống tách ánh sáng đơn sắc gồm lăng kính hoặc cách tử, khe vào và khe ra.

Để chế tạo lăng kính cho tia hồng ngoại phải dùng tinh thể muối LiF, CaF_2, NaCl, KBr... vì mỗi loại chỉ cho ánh sáng với một khoảng bước sóng nhất định đi qua như :

Vật liệu lăng kính	Chiều dài sóng λ
LiF	2 - 6 μm
CaF_2	1 - 8 μm
NaCl	2,5 - 15 μm
KBr	12,5 - 25 μm
CsI	25 - 50 μm

Các tinh thể muối này đều dễ chảy khi ẩm do đó phải bảo quản nó trong không khí khô .

Cách tử là những tấm thuỷ tinh trên đó vạch những đường song song với nhau, đối vơi tia hồng ngoại người ta dùng các cách tử có số vạch từ 20 - 300 vạch/mm. Để tách ánh sáng đơn sắc , người ta dùng các hệ thống gương và lăng kính có cấu tạo khác nhau hoặc hệ thống gương và cách tử. Hệ thống tách ánh sáng dùng cách tử được dùng khá phổ biến.

2.7.1.3. Hệ thống nhận tín hiệu

Tia sáng sau khi qua mẫu đo, bị hấp thụ một phần, phần còn lại được truyền sang bộ phận tín hiệu. Ở đây nhờ bộ phận detector đã biến tín hiệu ánh sáng thành tín hiệu điện. Dòng điện này có cường độ rất nhỏ, đồng thời luôn luôn thay đổi, phụ thuộc vào cường độ tia sáng bị hấp thụ nhiều hay ít mà dòng điện có cường độ mạnh hay yếu. Nhờ bộ khuếch đại tiếp theo mà dòng điện được mạnh lên nhiều lần để truyền tín hiệu sang bộ phận tự ghi, vẽ lên bản phổ hoặc đưa vào máy tính xử lý số liệu rồi in ra phổ.

2.7.2. Sơ đồ cấu tạo phổ kế hồng ngoại biến đổi Fourier (FT-IR)

Trong những năm gần đây người ta đã chế tạo được các máy quang phổ có độ nhạy cao dựa trên phương pháp biến đổi Fourier.

Phổ kế hồng ngoại biến đổi Fourier (FT - IR) gồm các bộ phận chính sau:

- Nguồn sáng , giao thoa kế, detector và máy tính (hình 19).

2.7.2.1. Nguồn sáng

Nguồn sáng cho phổ kế FT - IR cũng giống như phổ kế hồng ngoại thông dụng. Người ta sử dụng các nguồn phát xạ hồng ngoại liên tục như đèn Nernst (phát bức xạ 5000 - 3000 cm), đèn Globar (phát bức xạ 5000 - 100 cm) và đèn nicrom.

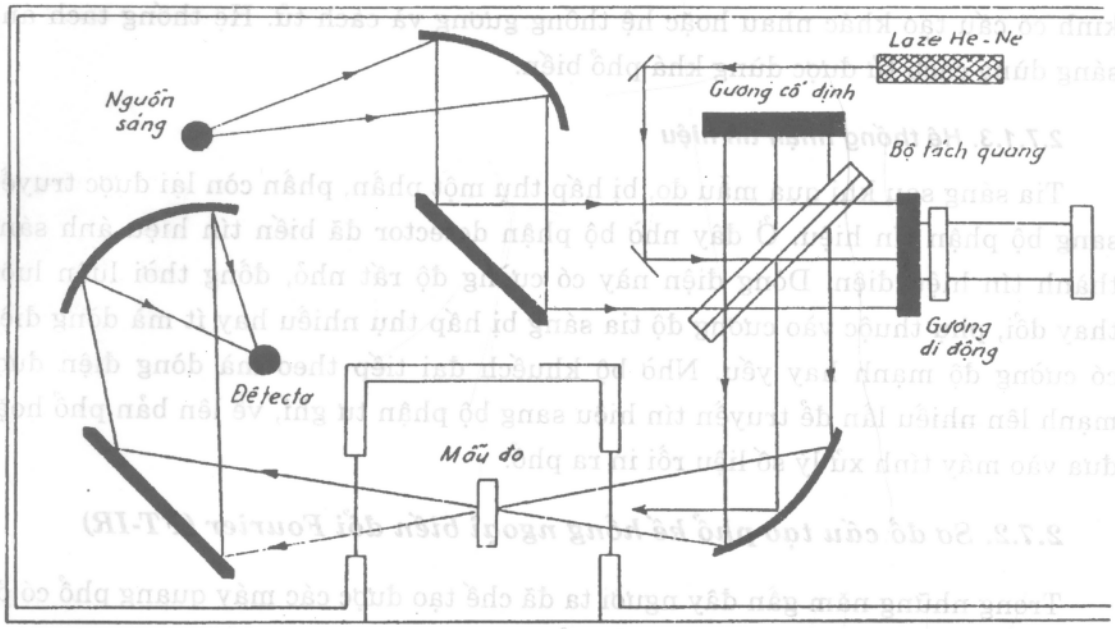
2.7.2.2. Giao thoa kế

Ngày nay những máy phổ kế hồng ngoại biến đổi Fourier thường dùng giao thoa kế Michelson.

Cấu tạo của giao thoa kế Michelson gồm bộ tách quang, hai gương phẳng đặt vuông góc với nhau nhưng 1 gương cố định, gương kia di chuyển tịnh tiến trên một đường thẳng nằm ngang.

Giao thoa kế Michelson là thiết bị tách chùm bức xạ thành 2 thành phần có

cường độ bằng nhau, rồi sau đó kết hợp trở lại thành bức xạ có cường độ thay đổi theo thời gian. Sự thay đổi cường độ bức xạ này là do quãng đường đi của 2 bức xạ được tách ra không giống nhau. Giá trị cường độ (I) là hàm của hiệu số 2 quãng đường đi trên phụ thuộc vào thời gian (t), ta có hàm I(t)



Hình 19: Nguồn sáng, giao thoa kế, detector và máy tính.

Chùm bức xạ từ nguồn sáng đi vào bộ tách quang của giao thoa kế bị tách thành 2 chùm vuông góc, một chùm đi đến gương cố định, chùm kia đi đến gương di động. Khi gặp gương chúng phản xạ trở lại qua bộ tách. Đến đây mỗi chùm lại chia đôi, một nửa đi về nguồn, nửa kia đi qua mẫu đo đến detector. Như vậy chùm bức xạ đến mẫu đo gồm 2 bức xạ nhập lại có thời gian trễ khác nhau nên cường độ bức xạ thay đổi theo thời gian phụ thuộc vào quãng đường đi thay đổi của bức xạ đến gương di động.

Bộ tách quang được chế tạo bằng một số vật liệu khác nhau tuỳ thuộc vào vùng hồng ngoại gần, trung bình hay xa. Mỗi loại vật liệu được sử dụng cho một giới hạn bước sóng của bức xạ hồng ngoại. Thí dụ vật liệu là Si thạch anh hay Si/CaF_2 có vùng bức xạ hồng ngoại 20000 - 2000 cm^{-1}, ứng với vùng hồng ngoại gần. Với vùng hồng ngoại trung bình dùng các vật liệu là Si/CaF_2, Ge/CsI, NaCl, hay KBr (vùng bức xạ trong khoảng 5000 - 300 cm^{-1}).

Đối với vùng hồng ngoại xa dùng vật liệu là Mylar 3,5 μm (700 - 100 cm^{-1}), Mylar 6 μm (500 - 100 cm^{-1})...

2.7.2.3. Detector

Thời gian để ghi một mẫu đối với phổ IR thông dụng hết khoảng 5 - 10 phút, trong khi đó đối với máy FT - IR thì chỉ cần thời gian 30 giây đến 1 phút vì thế phải có một loạt detector tương thích. Sau đây là các loại detector và vùng phổ hồng ngoại tương ứng :

Diod Si	20000 - 8000 cm^{-1}
PbS (N_2)	10000 - 4000 cm^{-1}
DLATG (Deuterium L alanine Triglycine Sulfate)	8000 - 300 cm^{-1}
DTGS/KBr (Deuterium Triglycine Sulfate)	5000 - 400 cm^{-1}
DTGS/CsI (Deuterium Triglycine Sulfate)	6400 - 200 cm^{-1}
DTGS/PE "	700 - 50 cm^{-1}
MCT (N_2) (Mercure cadmium Tellure)	5000 - 500 cm^{-1}

...

Nguyên tắc cơ bản của detector là khi một photon đập vào bề mặt của một chất rắn sẽ làm bật ra các electron, rồi đến lượt các electron này chuyển động đập vào chất rắn lại làm bật ra các electron với số lượng lớn hơn nhiều lần. Chất rắn là chất bán dẫn, mỗi chất tương ứng với một vùng bức xạ hồng ngoại khác nhau như đã mô tả.

2.7.2.4. Máy tính

Nguyên tắc hoạt động của máy tính như sau :

Theo sơ đồ cấu tạo của phổ kế, nguồn sáng phát ra chùm bức xạ, bức xạ qua giao thoa kế Michelson rồi đi qua mẫu đo đến bộ detector. Tín hiệu quang biến đổi thành tín hiệu điện, qua bộ khuếch đại rồi vào bộ máy tính lắp ghép với máy phổ. Việc vận hành máy và đo phổ được thực hiện hoàn toàn qua chương trình máy tính. Hiện nay máy tính chủ yếu dùng loại PC có cấu hình tối thiểu 33 - 100 MHz, 8 Mb RAM, đĩa cứng từ 120 MB trở lên. Phần mềm đa dạng phụ thuộc vào yêu cầu sử dụng của mỗi phòng thí nghiệm đặc biệt lưu ý các thư viện phổ bán kèm theo máy.

2.8. Ứng dụng phổ hồng ngoại

2.8.1. Phân tích chức của hợp chất

Những tư liệu thực nghiệm đã trình bày cho phép ta tiến hành một cách tin tưởng sự phân tích chức của các hợp chất hữu cơ.

Những vân hấp thụ ở vùng cao hơn 3100 cm^{-1} chứng minh sự có mặt của những nhóm =C–H; –OH; –NH.

Theo sự hấp thụ ở vùng 3100 - 2800 cm^{-1} có thể xác định tất cả những dao động hoá trị có thể xảy ra của C–H và kiểm tra kết luận theo sự hấp thụ đặc trưng của những dao động biến dạng trong khoảng 1400 - 1300 cm^{-1} và 900 - 700 cm^{-1}.

Sự xuất hiện những vân hấp thụ giữa 2300 - 1900 cm^{-1} nói về sự có mặt của liên kết ba hoặc liên kết cảm ứng.

Những liên kết đôi của các kiểu khác nhau được xác định theo sự hấp thụ ở vùng 1900 - 1600 cm^{-1}. Những vạch mạnh nhất ở vùng này thuộc về nhóm carbonyl (C=O).

2.8.2. Định tính các hợp chất

Phổ đầy đủ của hợp chất hữu cơ từ 4000 đến 400 cm^{-1} cho ta khả năng xác định tính đồng nhất của chất về cơ bản nhờ tính riêng biệt của sự xuất hiện những dao động của các liên kết C–C ở vùng vân tay (finger prints). Các chất là đồng nhất nếu những phổ hồng ngoại của chúng được đo trong những điều kiện như nhau trùng nhau.

- Định tính bằng chất đối chiếu hoá học.

Chuẩn bị mẫu thử và mẫu chất đối chiếu trong cùng điều kiện ghi toàn phổ trong điều kiện đo như nhau. Mẫu thử đồng nhất mẫu chất đối chiếu khi hai phổ trùng khít nhau về vị trí và cường độ vân hấp thụ.

- Định tính bằng phổ đối chiếu của thư viện phổ theo máy hoặc phổ đối chiếu của các dược điển.

Ở đây khi so sánh hai phổ với nhau cần lưu ý đến sự khác nhau có thể có về độ phân giải của nguồn giữa máy dùng ghi phổ đối chiếu và máy dùng ghi phổ chất khảo sát.

2.8.3. Phân tích định lượng

Phân tích định lượng bằng phổ hồng ngoại ít thuận tiện hơn phương pháp phổ tử ngoại khả kiến vì độ nhạy kém hơn cũng như những khó khăn gặp phải khi chuẩn bị mẫu đo và tính toán kết quả. Phương pháp định lượng chỉ tiến hành đo ở dạng dung dịch còn dạng mẫu rắn không đạt được kết quả chính xác.

Cơ sở lý thuyết của phương pháp định lượng bằng phổ hồng ngoại vẫn dựa trên định luật Lambert-Beer:

$$\lg\left(\frac{I_0}{I}\right)_\lambda = \varepsilon^\lambda cd = A^\lambda$$

trong đó A^λ- mật độ quang ở λ nhất định;

ε^λ- hệ số hấp thụ;

c- nồng độ;

d- chiều dày lớp dung dịch (chiều dày cuvet).

Trong một vùng sóng nhất định thì độ hấp thụ hay mật độ quang đều tỷ lệ tuyến tính với nồng độ dung dịch. Ở phương trình trên, đối với một chất, đo ở một bước sóng nhất định trong cùng một loại cuvet thì mật độ quang chỉ tỷ lệ với nồng độ dung dịch. Tuy vậy độ chính xác của phương trình trên chỉ giới hạn ở một nồng độ nhỏ do ảnh hưởng của sự phản xạ và tán xạ của ánh sáng trong dung dịch. Ngoài ra sai số của phương pháp thường gặp là do hai cuvet đựng mẫu và đựng dung môi không hoàn toàn giống nhau để độ truyền qua của bức xạ là đồng nhất vì trong quá trình sử dụng cửa sổ cuvet chế tạo bằng tinh thể muối (KBr, NaCl, LiF) rất dễ bị mờ do ảnh hưởng của độ ẩm môi trường hay dung môi, không gian gây ra. Thậm chí có khi còn bị các vệt xước làm tán xạ mạnh ánh sáng.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. *Babuskin. A. A , et al.* (1962); Methods Spectral analysis. MGU Press.

2 . *Bellami L.* (1963); Infra-red Spectra of complex molecules, Moscou.

3. *Gribov L. A.* (1965); Theory and calculation of oscillatory Spectra of polyatomic molecule, LGU Press.

4. *Mai-ans L. S.* (1960); Theory and calculation of oscillation of molecule. Academic SSSR, Press. M.

5. *Nacanisi K.* (1965); Infra-red Spectra and structure of organic compuond "MIR ", M.

6. *Hershenson H.* (1959); Infra-red absorption Spectra, Acad. Press, N-Y, London.

7. Dược điển Việt Nam - III, 2003.

8. *Nguyễn Đình Triệu* (2000); Các phương pháp phân tích vật lý và hoá lý, Nhà xuất bản Khoa học và Kỹ thuật Hà Nội.

BỘ GIÁO DỤC VÀ ĐÀO TẠO BỘ Y TẾ
VIỆN DƯỢC LIỆU

NGHIÊN CỨU THUỐC TỪ THẢO DƯỢC

(Giáo trình sau đại học)

CHỦ BIÊN: PGS. TS. NGUYỄN THƯỢNG DONG

Chịu trách nhiệm xuất bản: PGS. TS. TÔ ĐĂNG HẢI
Biên tập và sửa bài: ThS. NGUYỄN HUY TIẾN
CN. ĐẶNG QUANG CHUNG
Trình bày bìa: HƯƠNG LAN

NHÀ XUẤT BẢN KHOA HỌC VÀ KỸ THUẬT
70 Trần Hưng Đạo - Hà Nội

In 300 cuốn, khổ 19 x 27 cm, tại Công ty In Khoa học Kỹ thuật
101A Nguyễn Khuyến - Đống Đa - Hà Nội.
Số in : 387 - Giấy phép xuất bản số : 150 - 345 CXB cấp ngày 4/2/2005.
In xong và nộp lưu chiểu tháng 12 năm 2005.

205385

8 935048 953853

Giá: 195.000đ