

NGHIÊN CỨU THÀNH PHẦN HOÁ HỌC VÀ HOẠT TÍNH KHÁNG NẤM CỦA CỎ CÂY ĐĂNG SÂM CODONOPSIS PILOSULA

Đến tòa soạn 18-11-2019

Hoàng Đức Nghĩa, Vũ Thị Thoa, Lê Đăng Quang

Trung tâm NCTK các hoạt chất sinh học, Viện Hóa Công nghiệp Việt Nam

Đỗ Thị Hoài Thu

Trung tâm Phát triển công nghệ cao, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam

Trung tâm NCTK các hoạt chất sinh học, Viện Hóa Công nghiệp Việt Nam

Trần Thanh Thân

Viện Công nghệ Môi Trường, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam

Bùi Thu Trang

Khoa Công nghệ Hóa, Trường Đại học Công nghiệp Hà Nội

Vũ Đình Hoàng

Viện Kỹ thuật Hóa học, Đại học Bách khoa Hà Nội

SUMMARY

STUDY ON CHEMICAL CONSTITUENTS AND ANTIFUNGAL ACTIVITY OF CODONOPSIS PILOSULA ROOTS

Codonopsis pilosula (Franch.) Nannf., a plant of the Campanulaceae family, is a well-known traditional medicinal material. Until now there are few of reports on the chemical composition and pharmacological activity of this plant. This paper reports on the process of extracting and determining the total saponin and polysaccharide contents of the roots of C. pilosula growing in Quang Nam province. Using chromatographic methods, we successfully isolated the principal lobetyolin. Its chemical structure was determined by mass fragmentation analysis of ESI-MS/MS data and comparison with those in the literatures. The total saponin content is more than 3% and polysaccharide is more than 9%. These contents were relatively high, proving that the chemical composition was related to the pharmacological effects of C. pilosula. Bioassay for antifungal activity of n-butanol extracts from C. pilosula was carried out by food-poisoned technique. These n-butanol extracts were consistently effective toward Sclerotium rolfsii and showed a weak inhibition against Fusarium oxysporum.

Keywords: *Codonopsis pilosula, saponin, polysaccharide, lobetyolin, Sclerotium rolfsii, Fusarium oxysporum.*

1. MỞ ĐẦU

Cây Đăng sâm, còn gọi là Đăng sâm, có tên khoa học là *Codonopsis pilosula* (Franch.) Nannf., thuộc họ Hoa Chuông (Campanulaceae), là một loại cây thuốc quý, sống lâu năm, thân mọc bò hay leo, có nguồn gốc từ khu vực Tây Bắc Trung Quốc. Hiện nay

tại Việt Nam, Đăng sâm mọc hoang dại hoặc được trồng nhiều ở các tỉnh Lạng Sơn, Cao Bằng, Lào Cai, Sơn La, Lâm Đồng... Trên thế giới đã có các nghiên cứu về thành phần hoá học của Đăng sâm, các nghiên cứu chỉ ra rằng trong cây có chứa các hợp chất polyacetylene, terpenoid, alkaloid, glycoside, flavonoid,

saponin và polysaccharide; trong đó, củ Đàng sâm chứa các thành phần chủ yếu gồm saponin và polysaccharide [3, 4, 5].

Đàng sâm được coi là "nhân sâm của người nghèo" vì có công dụng giống của nhân sâm nhưng lại rẻ tiền hơn. Cây Đàng sâm đã được sử dụng rộng rãi với nhiều mục đích khác nhau bởi các cộng đồng dân cư người dân tộc thiểu số ở vùng cao từ rất lâu đời. Theo dân gian, Đàng sâm là một vị thuốc bổ khí, có thể dùng thay thế nhân sâm trong các bệnh thiếu máu, vàng da, bệnh bạch huyết, viêm thượng thận, nước tiểu có albumin, chân phù đau [1]. Một số nghiên cứu tại Trung Quốc cho thấy chiết xuất của củ cây Đàng sâm có tác dụng chống viêm loét dạ dày, tăng cường khả năng miễn dịch, cải thiện trí nhớ, chữa ho, tiêu đờm, lợi tiểu tiện [2]. Saponin của Đàng sâm có tác dụng điều trị và ngăn ngừa các căn bệnh về tim mạch, chống đông máu, chống tiểu đường [1, 5]. Đặc biệt, polysaccharide trong Đàng sâm có tác dụng ức chế hoạt động của tế bào ung thư dạ dày, tế bào ung thư biểu mô tế bào gan, chống oxy hoá [4].

Bài báo này chúng tôi thông báo quá trình chiết xuất, xác định hàm lượng saponin và polysaccharide toàn phần từ củ Đàng sâm; khảo sát khả năng kháng sinh của cao chiết *n*-butanol đối với nấm *S. rofsii* và *F. oxysporum* nhằm định hướng cho các nghiên cứu sâu hơn tiếp theo. Bên cạnh đó, phân lập hợp chất lobetyolin bằng các phương pháp sắc kí, cấu trúc hoá học của lobetyolin được xác định bằng ESI-MS/MS ở hai chế độ positive mode và negative mode.

2. THỰC NGHIỆM

2.1. Mẫu thực vật

Củ của cây Đàng sâm *C. pilosula* được thu hoạch vào tháng 08/2018 ở huyện Tây Giang, tỉnh Quảng Nam và được giám định bởi ThS. Nghiêm Đức Trọng, Đại học Dược Hà Nội.



Hình 1: Mẫu củ Đàng sâm thu hái tại Quảng Nam

2.2. Phương pháp thực nghiệm

2.2.1. Phương pháp phân lập các hợp chất

a. *Sắc ký lớp mỏng (TLC)*: Sắc ký lớp mỏng được thực hiện trên bản mỏng TLC silica gel 60 F₂₅₄ 20×20 cm (Merk, 1.05554.0001). Được phát hiện bằng thuốc thử anisaldehyde/H₂SO₄.
b. *Sắc ký cột (CC)*: Sắc ký cột thường (CC) được tiến hành với chất hấp phụ là silica gel (Merk, 60 A) có cỡ hạt từ 40 ÷ 63µm; đường kính cột d = 4 cm; chiều cao 15 cm; lượng silica gel nhồi cột là 5 gam. Tiến hành phân lập cao chiết *n*-butanol trên cột sắc ký silica gel, dung môi rửa giải là hỗn hợp etyl axetat (E)/metanol (M): E/M = 98/2; E/M = 97/3; E/M = 96/4; E/M = 95/5; E/M = 90/10; E/M = 88/10; E/M = 85/10; E/M = 80/10 thu được 6 phân đoạn kí hiệu là PD1-6. Quá trình sắc ký cột được theo dõi bằng sắc ký lớp mỏng (TLC) với hệ dung môi triển khai là E/M/W = 8/1/0.5. Phân đoạn PD5 được tinh chế lại trên cột silica gel lần thứ 2, sử dụng dung môi rửa giải là hỗn hợp E/M = 90/10, kết tinh phân đoạn thu được tinh thể 1.

2.2.2. Xác định cấu trúc các hợp chất

Phổ khối (ESI-MS/MS) được đo trên máy ghi phổ khối VARIAN 920-MS, kết quả thu được từ các dữ liệu phổ khối ở 2 chế độ positive mode và negative mode sử dụng để đưa ra công thức phân tử; so sánh các peak ion của phân mảnh với các dữ liệu đã công bố trong tài liệu tham khảo, từ đó đưa ra các công thức của phân mảnh.

2.2.3. Xác định saponin và polysaccharide toàn phần

Rễ củ Đàng sâm sau khi thu hái được sơ chế làm sạch. Tiến hành sấy khô ở nhiệt độ 40-50°C. Nghiền nhỏ tạo các hạt kích thước 2-3

mm. Quy trình xác định hàm lượng saponin toàn phần trong Đảng sâm được thực hiện theo Dược Điển Việt Nam IV [1]. Ngâm chiết mẫu (46.79 g) với dung môi metanol 95% (100 ml) trong 24 giờ tại nhiệt độ phòng. Dịch chiết metanol được lọc tách khỏi phần bã. Phần bã này sau đó được đun hồi lưu 2 lần với metanol (100 ml) trong 2 giờ.

Phần dịch sau hồi lưu gộp với dịch chiết ngâm, tiến hành cô quay loại dung môi, hiệu chỉnh thể tích đến 200 ml bằng nước cất. Sau đó chiết phân bố với hỗn hợp *n*-hexan (H) và etyl axetat (E) (H:E = 1:1) theo tỉ lệ 1:1, cho vào phễu chiết lắc đều. Sau một thời gian, hỗn hợp phân thành 2 lớp, lớp phía trên là phân lớp H/E, lớp phía dưới là phân lớp nước. Tách riêng 2 lớp, lấy phân lớp nước hiệu chỉnh thể tích bằng nước cất đến 200 ml, đem chiết 3 lần với dung môi *n*-butanol (tỉ lệ 1:1). Gộp 3 lần phân lớp *n*-butanol, tiến hành cô cạn loại dung môi thu được cao chiết *n*-butanol, phần cặn dạng bột trắng thu được là saponin toàn phần (3.39 gam).

Quy trình xác định hàm lượng polysaccharide toàn phần trong Đảng sâm được thực hiện theo patent US 3999343 [5]. Phần bã sau khi chiết với metanol được đem đun hồi lưu với nước cất trong 3 giờ, dịch thu được hiệu chỉnh đến thể tích 100 ml, sau đó thêm vào etanol 95% (tỉ lệ 1:2). Để lắng qua đêm xuất hiện kết tủa. Phần dịch lọc được kết tủa lần 2 sau đó gộp kết tủa, rửa kết tủa, đem sấy rồi cân đến khối lượng không đổi, thu được polysaccharide toàn phần (3 gam).

2.2.4. Kỹ thuật thử hoạt tính kháng sinh

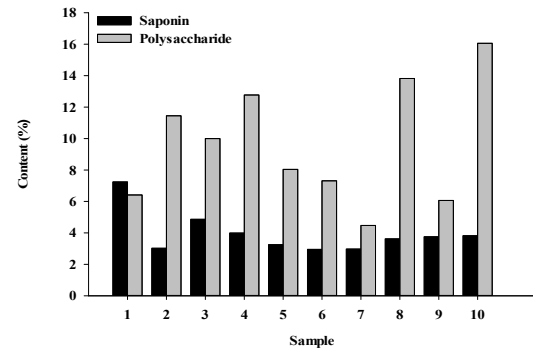
Sử dụng phương pháp food-poisoned technique để khảo sát hoạt tính kháng sinh của cao chiết *n*-butanol đối với nấm *S. rolfsii* và *F. oxysporum*, xác định bằng cách trộn chất hoặc cặn chiết vào môi trường PDA nóng chảy theo đúng nồng độ thử nghiệm. Đĩa petri sau khi được đưa nấm lên trên thạch đã được nuôi cấy ở nhiệt độ 20°C trong 1-3 ngày và đo đường kính tán nấm. Hiệu quả kháng nấm được tính theo công thức:

$$C_v (\%) = 100 \times \frac{D_c - D_0}{D_c - d}$$

Trong đó: D_c : đường kính tán nấm trên đĩa petri đối chứng; D_0 : đường kính khoan agar-nấm, mm; D_1 : đường kính tán nấm trên đĩa petri trộn chất phân tích, mm.

3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Saponin và polysaccharide toàn phần trong củ Đảng sâm thu hái ở tỉnh Quảng Nam



Hình 2: Hàm lượng saponin và polysaccharide toàn phần trong củ Đảng sâm

Tiến hành chiết phân đoạn bằng các dung môi phân cực khác nhau trên 10 mẫu khô củ Đảng sâm thu được kết quả hàm lượng saponin và polysaccharide toàn phần như hình 2.

Trên 10 mẫu khô Đảng sâm được khảo sát, đã thu được cao saponin và cao polysaccharide toàn phần với hàm lượng saponin trung bình đạt 3.73%, lượng polysaccharide trung bình đạt 9.52% tính trên khối lượng khô được liệu; hàm lượng này có sự thay đổi theo độ tuổi của cây. So sánh với mẫu *C. pilosula* thu hái tại Taiyuan Trung Quốc (saponin đạt 2.48% và polysaccharide đạt 18.25%) [10], hàm lượng saponin thu được ở Đảng sâm Việt Nam tương đối cao, trong khi đó, lượng polysaccharide toàn phần thấp hơn so với Đảng sâm Trung Quốc.

Nghiên cứu chưa xác định được các loại saponin và polysaccharide cụ thể, tuy nhiên kết quả này đã chứng minh cây có chứa saponin và polysaccharide là thành phần hoá học có liên hệ với các tác dụng của Đảng sâm: bổ khí, tăng cường miễn dịch cơ thể, chống viêm loét dạ dày, chống đông máu, ngăn ngừa các căn bệnh về tim mạch, chống tiểu đường, chống oxy hoá [1, 4, 5]. Saponin và polysaccharide còn được tìm thấy với hàm lượng cao trong một số cây

thuộc chi *Panax* (*P. quinquefolium*, *P. notoginseng*...) [8].

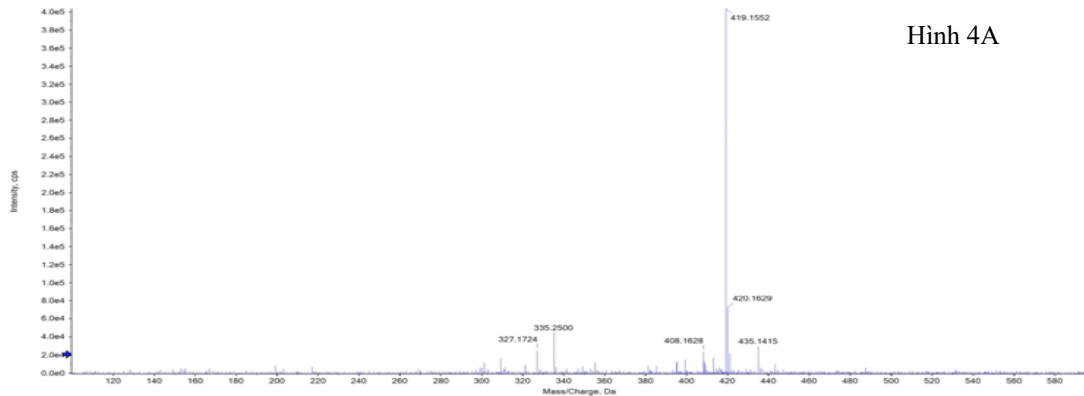
Saponin trong củ Đẳng sâm chủ yếu là saponin triterpenoid, nhóm dammaran tetracyclic (saponin triterpen 4 vòng), một ít là oleanane (saponin triterpen 5 vòng), chứa protopanaxadiol (ginsenosid Rb₁) và protopanaxatriol (ginsenosid Rg₁, ginsenosid Rc) [2, 4].

Polysaccharide có trong Đẳng sâm được cấu thành từ các monosaccharide liên kết với nhau bằng liên kết 1 → 3 hoặc 1 → 2, 3 glucosid; có khung (1 → 3)-β-D-galactopyranosyl, (1 → 2, 3)-α-D-galactopyranosyl và (1 → 3)-β-D-rhamnopyranosyl. Gần đây, Zhang YJ và cộng sự (2010) đã phân lập được một polysaccharide từ củ đẳng sâm *C. pilosula* có khối lượng phân tử 7.4×10⁴ Da được tạo thành từ các monomer galactose, arabinose, rhamnose qua các liên kết

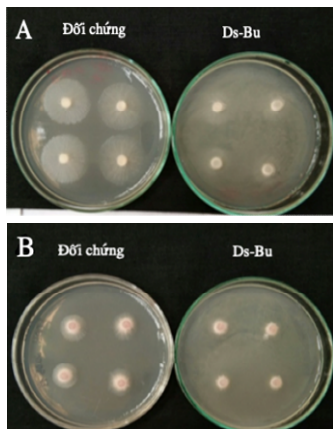
(1 → 3)-β-GalpNAc, (1 → 3)-α-Rhap và (1 → 2, 3)-β-Galp [9].

3.2. Hoạt tính kháng sinh của cao chiết *n*-butanol

Khảo sát hoạt tính kháng sinh của cao chiết *n*-butanol trên nấm *S. rolfssii* và *F. oxysporum* tại nồng độ 1 mg/ml, đo đường kính tán nấm và tính toán hiệu quả ức chế. Tại thời điểm 1 ngày sau nuôi cấy, cao chiết *n*-butanol ức chế 35–56% sự phát triển của tán nấm *S. rolfssii*. Trên đĩa petri quan sát được (hình 3A) tán nấm *S. rolfssii* phát triển rất nhỏ cho thấy cao này có hiệu quả ức chế đáng kể; sau 2 ngày nuôi cấy, ức chế 13–49% nấm *S. rolfssii*. Đối với nấm *F. oxysporum*, hoạt tính của cao chiết *n*-butanol thể hiện yếu; hiệu quả ức chế 18–37% đối với mycelia của *F. oxysporum* sau 1 ngày (hình 3B) và 6–24% sau 3 ngày nuôi cấy.



Hình 4A

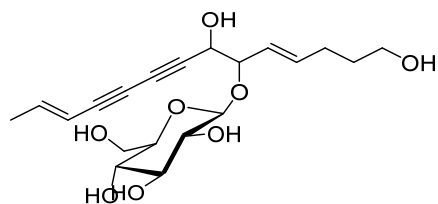


Hình 3: Cao chiết *n*-butanol ức chế mycelia của nấm.

A: nấm *S. rolfssii*; B: nấm *F. oxysporum*

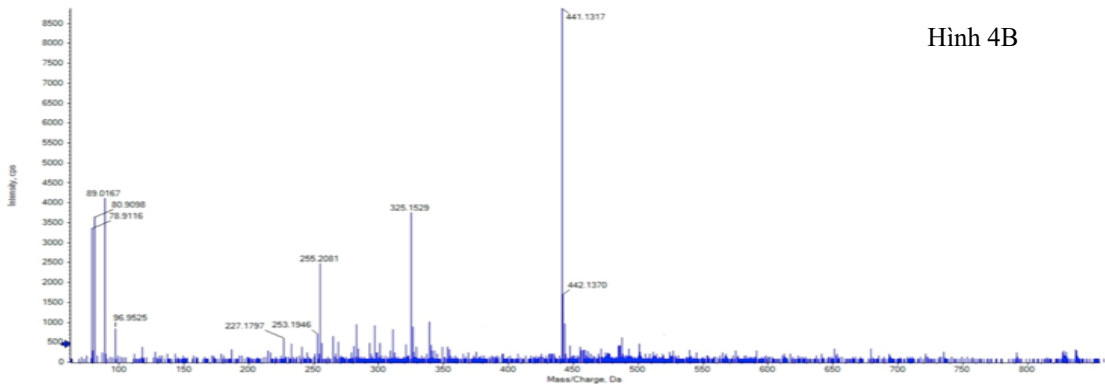
3.3. Phân lập và xác định cấu trúc hợp chất 1 có trong củ Đẳng sâm

Bằng phương pháp sắc ký cột silica gel thông thường thu được một hợp chất rắn dạng bột trắng từ phân đoạn PD5 của củ Đẳng sâm. Hợp chất phân lập (1) được xác định cấu trúc bằng phổ khối ESI-MS/MS kết hợp với so sánh các tài liệu đã công bố.

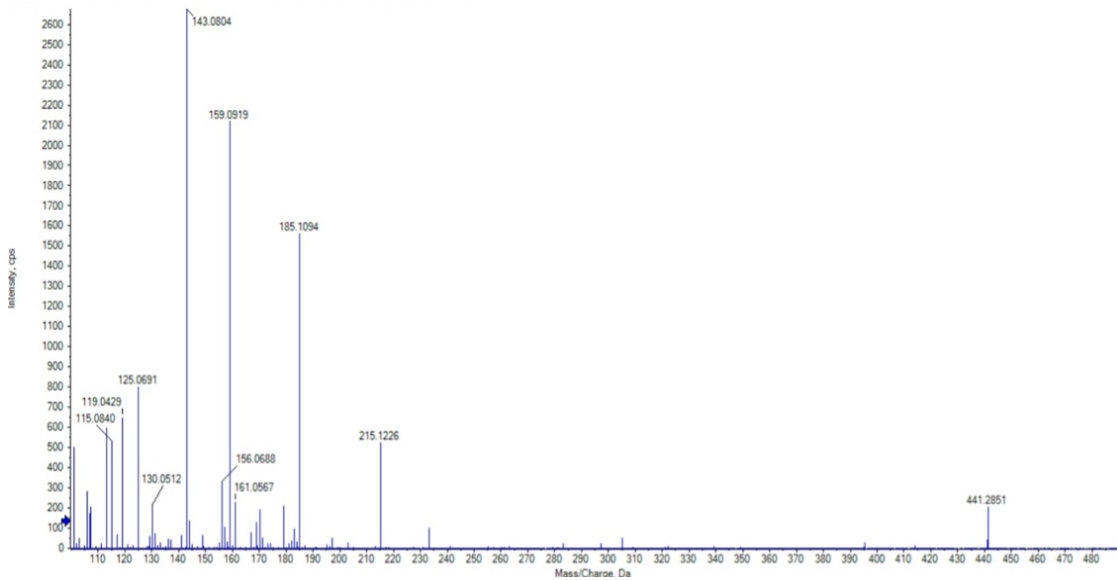


1

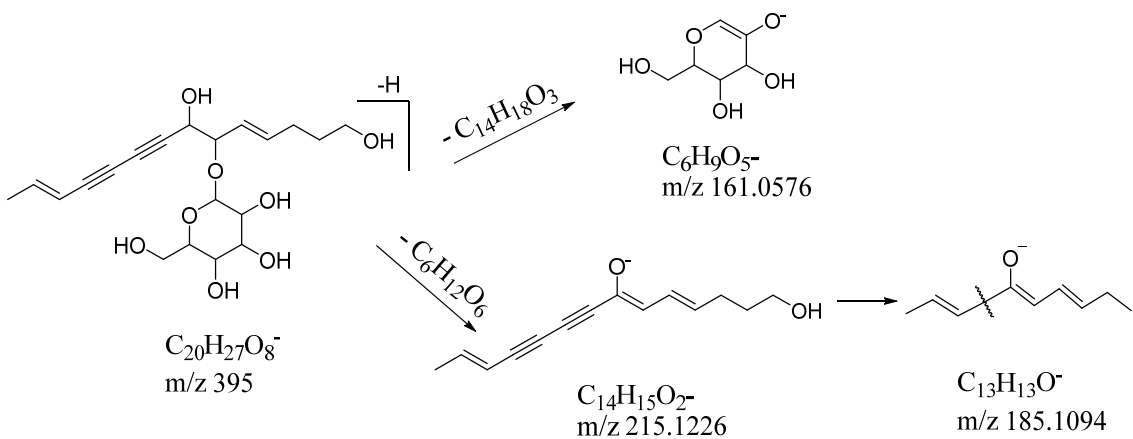
Hình 4B



Hình 4: Phổ ESI-MS (A: positive mode) và (B: negative mode) của hợp chất 1



Hình 5: Phổ ESI-MS/MS (negative mode) của các phân mảnh của hợp chất 1



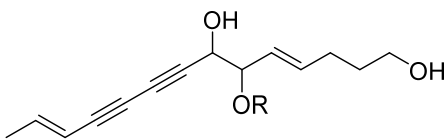
Trên phổ ESI-MS của hợp chất 1 ở hai chế độ positive mode và negative mode đều thu được các peak ion giả phân tử tương ứng như kết

quả ở hình 4 và 5. Hình ảnh phổ ESI-MS positive mode (hình 4A) xuất hiện peak ion giả phân tử $[\text{M}+\text{Na}]^+$ ở m/z 419.1552. Theo công

bộ của các tác giả Min Xie và cộng sự [2], phổ khối phân giải cao HR-ESI-MS của lobetyolin xuất hiện peak $[M+Na]^+$ ở m/z 419.1702 (tương ứng với công thức phân tử $C_{20}H_{28}NaO_8$, theo tính toán lý thuyết m/z 419.1676).

Trên phổ ESI-MS chế độ negative mode của chất **1** (hình 4B) cho peak ion giả phân tử $[M-H + H_2CO_2]^-$ ở m/z 441.1317. Trên hình ảnh phổ ESI-MS/MS phân tích peak m/z 441.1317 xuất hiện các phân mảnh có số khối m/z 161.0567, m/z 215.1226 và m/z 185.1094. Sự phân mảnh được biểu diễn qua sơ đồ (hình 5). So sánh dữ liệu các phân mảnh trên ESI-MS/MS với tài liệu tham khảo [2, 7], cấu trúc hợp chất **1** được kết luận là lobetyolin.

Các tài liệu nghiên cứu đã công bố trước đây cho thấy trong củ Đàng sâm *C. pilosula* chứa hợp chất lobetyolin, là chất chỉ thị dùng để định tính Đàng sâm [2, 3, 4, 6]. Lobetyolin thuộc nhóm hợp chất polyene, được phân lập từ các cây khác thuộc chi *Codonopsis* như *C. tubulosa*, *C. lanceolata*, *C. tangshen*, *C. lanceolata* và *C. nervosa* [6]. Theo nghiên cứu của Jing và cộng sự (2014), lobetyolin có hàm lượng 0.034 – 0.720 mg/g trong *C. pilosula*, 0.032 – 0.292 mg/g ở *C. pilosula* var. *modesta* và 0.008 – 1.302 mg/g ở *C. tangshen* [3]. Hợp chất này còn được phân lập từ các cây thuộc chi *Lobelia*, *Platycodon*, *Campanumoea* [6]. Một số polyene khác cũng được tìm thấy trong Đàng sâm *C. pilosula* như lobetyolinin (0.043 – 0.058 mg/g), lobetyol (0.023 – 0.029 mg/g) [2, 3, 10].



lobetyolin: R = β -Glc

lobetyolinin: R = β -Glc (6 \rightarrow 1)- β -Glc

lobetyol: R=H

Lobetyolin có đặc tính chống viêm loét dạ dày gây ra bởi etanol, có khả năng chống ung thư, chống virus, kháng viêm, bảo vệ niêm mạc dạ dày và chống oxy hoá [6]. Lobetyolin thu nhận

từ Đàng sâm có thể được ứng dụng để sản xuất các sản phẩm y dược phẩm.

4. KẾT LUẬN

Hàm lượng saponin và polysaccharide toàn phần từ củ cây Đàng sâm trồng ở tỉnh Quảng Nam đã được định lượng. Căn cứ vào lượng saponin và polysaccharide thu được, có thể khẳng định Đàng sâm Việt Nam có giá trị dược liệu khá tốt so với các loại sâm cùng loại của một số nước trên thế giới. Qua khảo sát, khẳng định cao chiết *n*-butanol từ Đàng sâm có hiệu quả ức chế đối với nấm *S. rolfsii* – nấm gây bệnh héo rũ gốc và rễ cây. Hợp chất lobetyolin đã được phân lập và xác định cấu trúc bằng phổ khối ESI-MS/MS, có hoạt tính chống viêm loét dạ dày, chống virus, chống oxy hoá, chống ung thư. Kết quả thu được trong nghiên cứu này góp phần xây dựng cơ sở dữ liệu đầy đủ hơn về thành phần hoá học của cây Đàng sâm, có thể tạo cơ sở cho những nghiên cứu khoa học tiếp theo về loài cây này.

LỜI CẢM ƠN

Các tác giả cảm ơn ông Trần Văn Thuyên, Nghiêm Đức Trọng đã hỗ trợ trong quá trình nghiên cứu và nhận dạng mẫu thực vật.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Dược Điển Việt Nam IV (2009); NXB Y học, Hà Nội, 753 – 755.
2. Min X., Jingkun L., Zhiquiang Y., Xiuzhuang L., Xiaoyan Y., Hui J., Anxiang S., Bo Q. (2018) *Bio-guided isolation of plant growth regulator from allelopathic plant – Codonopsis pilosula: phyto – selective activities and mechanisms*, RSC Adv, 8, 13649 – 13655.

(Tiếp theo Tr. 76)