

# Phân tích vi học và thành phần hoá học của lan một lá *Nervilia aragoana* Gaudich - họ lan Orchidaceae thu hái ở Kon Tum

Trần Thị Ngọc Mai<sup>1\*</sup>, Trần Công Luận<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Trường Đại học Công nghệ TP Hồ Chí Minh

<sup>2</sup>Trường Đại học Tây Đô

Ngày nhận bài 3/1/2018; ngày chuyển phân biện 11/1/2018; ngày nhận phân biện 21/2/2018; ngày chấp nhận đăng 27/2/2018

## **Tóm tắt:**

Cây lan một lá thu tại tỉnh Kon Tum có tên khoa học *Nervilia aragoana* Gaudich. Mẫu cây này được khảo sát vi phẫu lá, cuống lá và thân rễ để xác định cấu tạo của lớp tế bào biểu bì, đặc điểm bó libe-gỗ. Xác định đặc điểm của bột lá, bột thân rễ; soi bột để xác định cấu trúc của các mảnh mô, hình dạng, kích thước của hạt tinh bột và tinh thể canxi oxalat. Phân tích sơ bộ thành phần hoá học của mẫu bột lá và bột thân rễ theo phương pháp Ciuley cải tiến để định tính các thành phần hoá học có trong các phân đoạn chiết khác nhau, từ đó định hướng quá trình chiết tách và phân lập các hợp chất có hoạt tính sinh học.

**Từ khoá:** *Nervilia*, phân tích hoá thực vật, phân tích vi học.

**Chỉ số phân loại:** 3.4

## **Đặt vấn đề**

Lan một lá là cây ưa bóng và đặc biệt ưa ẩm. Cây thường mọc trong các hốc đá hoặc trên lớp đất có nhiều thảm mục dưới tán rừng kín, hoặc rừng cây lá rộng núi đá vôi. Độ cao phân bố của cây từ 600-1500 m. Hàng năm, từ thân ngầm mọc lên một lá vào cuối mùa xuân hoặc đầu mùa hè. Đến giữa mùa thu, phần trên mặt đất tàn lụi. Hoa thường xuất hiện trước khi cây ra lá. Trên mỗi cây thường có 1-5 quả. Mỗi quả có nhiều hạt nhỏ, tự mở thành 3 mảnh khi quả già để hạt rơi vãi ra xung quanh. Cây mọc từ hạt vào tháng 6 và tập trung thành những đám nhỏ. Mùa ra hoa vào tháng 9 đến tháng 12 [1].

Lan một lá là cây thuốc quý hiếm được đưa vào Sách Đỏ Việt Nam và Trung Quốc từ năm 1996 [2]. Theo Đỗ Huy Bích, lá hoặc toàn cây lan một lá được dùng làm thuốc giải độc, nhất là ngộ độc nấm, làm mát phổi, chữa ho lao, ho lâu năm, viêm phế quản. Nhai rễ củ tươi làm giảm khát, bồi dưỡng cơ thể. Ở Trung Quốc, cây này còn được dùng chữa viêm miệng, viêm họng cấp tính, rối loạn kinh nguyệt hoặc tổn thương do ngã, đau nhức, viêm mủ da, lở loét, mụn nhọt, tràng nhạc [1].

Ở phía Bắc nước ta, lan một lá phân bố chủ yếu ở các tỉnh miền núi. Ở phía Nam gặp ở Kon Tum, Lâm Đồng, Bình Dương, An Giang. Trong vài năm gần đây do lợi nhuận kinh tế cao, lan một lá bị khai thác quá mức để bán

qua biên giới, khiến tăng nguy cơ tuyệt chủng. Do đó, việc nghiên cứu định danh và phân tích sơ bộ thành phần hoá học của cây này là bước đầu định hướng cho các nghiên cứu xác định thành phần hoá học và tác dụng dược lý nhằm khẳng định giá trị thực của cây thuốc quý hiếm này để có biện pháp bảo tồn và phát triển nguồn dược liệu của quốc gia.

## **Đối tượng và phương pháp nghiên cứu**

### ***Đối tượng nghiên cứu***

Mẫu cây lan một lá được thu vào khoảng từ tháng 6 đến tháng 10 hàng năm, địa điểm thu mẫu tại Kon Tum. Dược liệu được làm sạch, phơi khô, xay mịn thành bột (bột lá và bột thân rễ).

### ***Phương pháp nghiên cứu***

Phân tích đặc điểm hình thái và định tên khoa học: Quan sát và mô tả đặc điểm hình thái thực vật về dạng sống, thân, lá, hoa, quả và hạt. Dụng cụ sử dụng gồm kính lúp soi nổi, máy ảnh kỹ thuật số, thước kẻ. Định tên khoa học của loài nghiên cứu dựa trên tài liệu tham khảo [3, 4], tại Bộ môn Tài nguyên - Dược liệu thuộc Trung tâm Sâm và Dược liệu TP Hồ Chí Minh.

Phân tích đặc điểm vi phẫu: Tiêu bản vi phẫu thân được cắt ngang ở đoạn lá và thân rễ. Sau đó, các mảnh cắt được nhuộm và làm tiêu bản vi phẫu. Quan sát, mô tả và chụp ảnh

\*Tác giả liên hệ: Email: ttngmai@gmail.com

# Microscopic examination and chemical composition analysis of one-leaf orchid *Nervilia aragoana* Gaudich - Orchidaceae family harvested at KonTum

Thi Ngoc Mai Tran<sup>1\*</sup>, Cong Luan Tran<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Ho Chi Minh city University of Technology

<sup>2</sup>Tay Do University

Received 3 January 2018; accepted 27 February 2018

**Abstract:**

One-leaf orchid in Kon Tum province is named *Nervilia aragoana* Gaudich. This plant was examined for microscopy of leaves, petioles and rhizomes to determine the structure of epidermal cell layers and the characteristics of xylem phloem. We also conducted characterization of leaf and rhizome powder, microscopic examination of the powder to determine the structure of the tissue fragment, the shape and size of starch granules and calcium oxalate crystals. Chemical composition analysis of the leaf and rhizome by the improved Ciuley method to identify and characterize the chemical constituents present in the various extracting fractions, thereby orienting the extraction and isolation processes with biological activity compounds.

**Keywords:** Chemical composition analysis, microscopic examination, *Nervilia*.

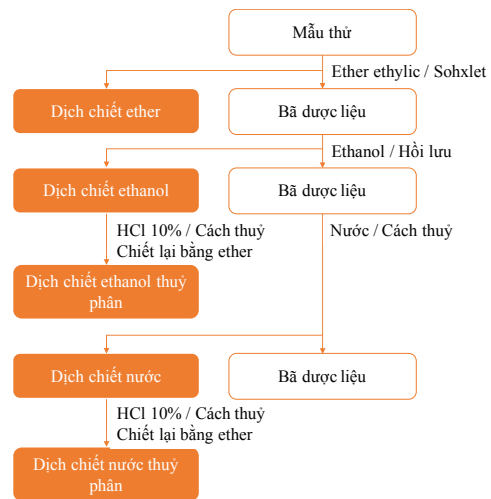
**Classification number:** 3.4

các đặc điểm vi phẫu qua kính hiển vi [5-7].

Phân tích đặc điểm vi học: Phần trên mặt đất và phần dưới mặt đất được sấy khô, nghiền mịn và làm tiêu bản bột. Quan sát, mô tả và chụp ảnh các đặc điểm qua kính hiển vi [5-7].

Phân tích sơ bộ thành phần hoá học theo quy trình phân tích Ciuley cải tiến [7].

**Chuẩn bị dịch chiết:** Mẫu bột lá và bột thân rễ được chiết theo quy trình ở hình 1 để thu các phân đoạn dịch chiết trong ether, trong ethanol, trong nước; dịch chiết ethanol và dịch chiết nước thủy phân trong HCl 10%.



Hình 1. Sơ đồ chiết mẫu để thu dịch chiết.

Phân tích các hợp chất có trong dịch chiết: Các phân đoạn của dịch chiết ether, ethanol, nước và các dịch thủy phân trong HCl 10% của bột lá và bột thân rễ được tiến hành phân tích định tính theo bảng 1.

Bảng 1. Phương pháp phân tích các nhóm hợp chất có trong dịch chiết.

Nhóm hợp chất	Thuốc thử/Cách thực hiện	Phản ứng dương tính
Chất béo	Nhỏ dung dịch lên giấy	Vết trong mờ
Carotenoid	Carr-Price	Xanh chuyển sang đỏ
	H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	Xanh dương hay xanh lục ngả sang xanh dương
Tinh dầu	Bốc hơi tới cạn	Có mùi thơm
Triterpenoid tự do	Liebermann-Burchard	Đỏ nâu - tím, lớp trên có màu xanh lục
Alkaloid	Thuốc thử chung alkaloid	Kết tủa
Coumarin	Phát quang trong kiềm	Phát quang mạnh hơn
Antraglycosid	KOH 10%	Dung dịch kiềm có màu hồng tới đỏ
Flavonoid	Mg/HCl đậm đặc	Dung dịch có màu hồng tới đỏ
	Thuốc thử vòng lacton	Tím
Glycosid tim	Thuốc thử đường 2-desoxy	Đỏ đậm
	HCl	Đỏ
Anthocyanosid	KOH	Xanh
	HCl/Fe <sup>3+</sup>	Đỏ
Proanthocyanidin	FeCl <sub>3</sub>	Xanh rêu hay xanh đen (polyphenol)
	Dung dịch gelatin muối	Tủa bông trắng (tanin)
Tanin	Liebermann-Burchard	Đỏ nâu - tím, lớp trên có màu xanh lục
Triterpenoid thủy phân	Thuốc thử Liebermann	Có vòng tím nâu
Saponin	Lắc mạnh dung dịch nước	Sủi bọt
Acid hữu cơ	Bột Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	Sủi bọt
Chất khử	Thuốc thử Fehling	Tủa đỏ gạch
Polyuronic	Pha loãng với cồn 90%	Tủa bông trắng - vàng nâu

Đánh giá kết quả phân tích theo các mức sau: (-) không có, (±) nghi ngờ, (+) có ít, (++) có, (+++) có nhiều, (++++) có rất nhiều.

## Kết quả nghiên cứu

### Đặc điểm hình thái và định tên khoa học của lan một lá thu tại Kon Tum

Phân tích đặc điểm hình thái cho thấy: Lan một lá là cây thân thảo. Lá và hoa không đồng trường, lá màu xanh, đôi khi có chấm màu tím sẫm, không có lông, dài khoảng 12 cm, rộng khoảng 16 cm, hình tim rất rộng, mép hơi lượn sóng, thùy gốc ít nhiều phủ lên nhau. Cuống lá cao khoảng 10-15 cm, màu xanh, đôi khi có chấm màu tím. Củ chìm dưới mặt đất, đường kính khoảng 1-2 cm, có màu trắng. Củ đâm rễ tạo dải con phát triển thành cây mới.



Hình 2. Lan một lá *Nervilia aragoana* Gaudich.

Dựa vào quan sát đặc điểm hình thái (hình 2), tham khảo tài liệu trên trang theplantlist và eol [3, 4], và kết quả giám định của Bộ môn Tài nguyên - Dược liệu thuộc Trung tâm Sâm và Dược liệu TP Hồ Chí Minh, cây lan một lá thu tại tỉnh Kon Tum được định tên khoa học là *Nervilia aragoana* Gaudich, tên đồng nghĩa là *Nervilia concolor* (Blume) Schltr., tên tiếng Việt là Chân trâu xanh, Trăn châu xanh, Thanh thiên quỳ xanh, Lan cờ thuộc họ Lan - Orchidaceae. Phân hạng: VU.A1c,d.

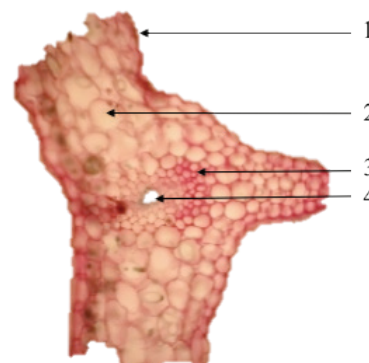
### Phân tích vi phẫu

Cấu tạo giải phẫu của các cơ quan thực vật là một đặc điểm quan trọng trong kiểm nghiệm dược liệu. Phân tích cấu tạo bên trong của cây giúp xác định các đặc điểm điển hình của đối tượng nghiên cứu, nói lên sự khác biệt của các cơ quan của các loại dược liệu khác nhau.

**Đặc điểm vi phẫu lá (hình 3):** Ngoài cùng là lớp biểu bì (1) có cấu tạo là một lớp tế bào xếp đều đặn, bên trong lớp biểu bì là mô mềm (2) gồm những tế bào to, hình lục giác, cạnh hơi tròn, kích thước không đồng đều, vách mỏng. Chính giữa gân lá là bó libe-gỗ (4) với phần libe nằm phía dưới, phần gỗ nằm phía trên gồm những tế bào có vách dày hoá gỗ. Bao quanh bó libe-gỗ là đám mô dày (3) có hình tròn, vách dày.

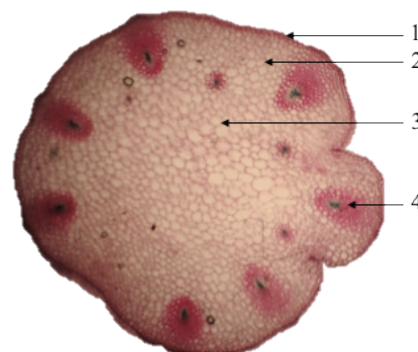
**Đặc điểm vi phẫu cuống lá (hình 4):** Biểu bì (1) gồm lớp tế bào ngoài cùng xếp đều đặn. Mô mềm vỏ (2) nằm ngay dưới lớp biểu bì gồm các tế bào hình lục giác có cạnh trong

đôi tròn, sắp xếp đều đặn. Bên trong là đám mô mềm tủy (3) gồm các tế bào tương đối tròn, kích thước lớn hơn các tế bào mô mềm vỏ. Các bó libe-gỗ (4) xếp thành vòng tròn gần mép ngoài cuống lá, mỗi bó có phần gỗ nằm phía trong, phần libe nằm phía ngoài.



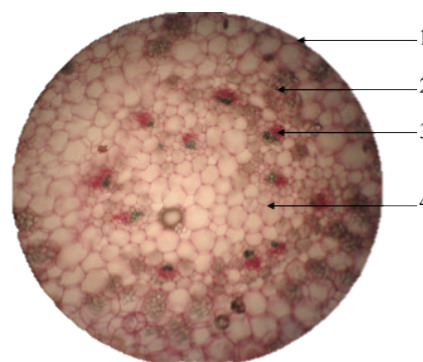
Hình 3. Vi phẫu lá.

1. Biểu bì, 2. Mô mềm, 3. Đám mô dày bao quanh bó libe-gỗ, 4. Bó libe-gỗ.



Hình 4. Vi phẫu cuống lá.

1. Biểu bì, 2. Mô mềm vỏ, 3. Mô mềm tủy, 4. Bó libe-gỗ.



Hình 5. Vi phẫu thân rễ.

1. Biểu bì, 2. Các tế bào mô mềm chứa tinh bột, 3. Bó libe-gỗ, 4. Mô mềm tủy.

**Đặc điểm vi phẫu thân rễ (dạng củ) (hình 5):** Ngoài cùng là biểu bì (1) gồm một lớp tế bào xếp đều đặn. Bên trong là các tế bào mô mềm vỏ (2) có hình lục giác, kích thước không đồng đều, vách mỏng, có chứa nhiều hạt tinh bột hình xoắn hay gần tròn tập trung thành từng đám bên trong. Các bó libe-gỗ (3) xếp thành vòng, mỗi bó có phần gỗ hướng vào trong, phần libe hướng ra ngoài. Mô mềm tủy (4) có hình dạng và kích thước giống với mô mềm vỏ.

**Phân tích vi học**

Mỗi loại dược liệu đều có những đặc điểm mô học đặc trưng, chúng được thể hiện một phần qua đặc điểm bột dược liệu. Khảo sát bột dược liệu bằng kính hiển vi nhằm mục đích tìm ra những đặc điểm vi học đặc trưng của bột dược liệu, giúp cho việc định danh, xác định độ tinh khiết của dược liệu, phân biệt với dược liệu dễ nhầm lẫn và phát hiện sự giả mạo nếu có.

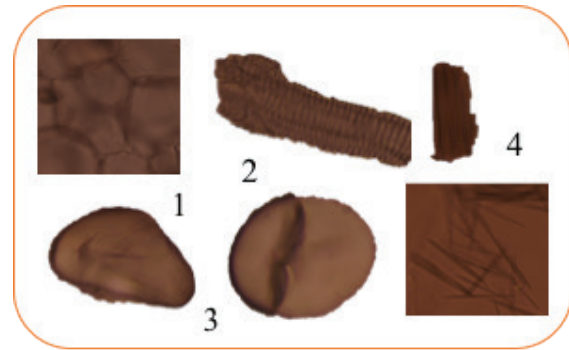
**Đặc điểm của bột lá (hình 6):** Bột lá có màu lục, không mùi, vị hơi đắng. Soi dưới kính hiển vi cho thấy: Mảnh mô mềm (1) gồm các tế bào hình lục giác vách mỏng. Các mảnh mạch (2) gồm mạch vạch và mạch xoắn. Sợi (3) dài, vách mỏng, khoang rộng. Tinh thể canxi oxalat (4) hình kim xếp thành từng búi, dài khoảng 65 µm.



**Hình 6. Vi học bột lá.**

1. Mảnh mô mềm, 2. Các mảnh mạch, 3. Sợi, 4. Tinh thể canxi oxalat.

**Đặc điểm của bột thân rễ (dạng củ) (hình 7):** Bột thân rễ có màu trắng xám, mùi thơm, vị ngọt nhẹ. Soi dưới kính hiển vi cho thấy: Mảnh mô mềm (1) với các tế bào mô mềm hình lục giác, vách mỏng, kích thước không đồng đều. Mảnh mạch (2) gồm mạch vạch và mạch xoắn. Hạt tinh bột (3) hình xoắn có chiều dài khoảng 60-75 µm, rộng 40-50 µm, hình gần tròn đường kính 25-65 µm. Tinh thể canxi oxalat (4) hình kim xếp thành từng búi hay nằm rải rác, dài khoảng 65 µm.



**Hình 7. Vi học bột thân rễ.**

1. Mảnh mô mềm, 2. Mảnh mạch, 3. Hạt tinh bột, 4. Tinh thể canxi oxalat

**Phân tích sơ bộ thành phần hoá học**

Quá trình phân tích định tính thành phần hoá học của lan một lá được thực hiện theo sơ đồ hình 1 và bảng 1 thu được kết quả được trình bày trong bảng 2.

**Bảng 2. Kết quả phân tích sơ bộ thành phần hoá học *Nervilia aragoana* Gaudich.**

Nhóm hợp chất	Dịch chiết bột lá trong dung môi					Dịch chiết bột thân rễ trong dung môi					Kết luận	
	(1)	(2)	(3)	(4)	(5)	(1)	(2)	(3)	(4)	(5)	Lá	Thân rễ
Chất béo	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Carotenoid	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
Tinh dầu	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Triterpenoid tự do	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+
Alkaloid	-	±	-	±	-	-	-	-	-	-	±	-
Coumarin	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-
Antraglycosid	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Flavonoid	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Glycosid tim	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+
Anthocyanosid	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Proanthocyanidin	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
Tanin	-	±	-	-	-	-	-	-	-	-	±	-
Khung Triterpenoid	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+
Saponin	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
Acid hữu cơ	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Chất khử	+	+	-	-	-	+	-	-	-	-	+	+
Polyuronic	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+

Ghi chú: (1) ether, (2) ethanol, (3) thủy phân dịch chiết ethanol trong HCl 10%, (4) nước, (5) thủy phân dịch chiết nước trong HCl 10%, (-) không có, (±) nghi ngờ, (+) có.

Mẫu bột lá cây *Nervilia aragoana* Gaudich trong dịch chiết ether có carotenoid, bột thân rễ có triterpenoid tự do. Dịch chiết ethanol bột lá có coumarin, anthraquinon, saponin và chất khử; nghi ngờ có alkaloid và tanin; bột thân rễ có khung triterpenoid và chất khử. Dịch chiết nước mẫu bột lá có saponin và chất khử, nghi ngờ có alkaloid; bột thân rễ có glycosid tim và polyuronic.

### Kết luận

Cây lan một lá thu tại tỉnh Kon Tum có tên khoa học *Nervilia aragoana* Gaudich có đặc điểm vi phẫu và mô học đặc trưng của lá và thân củ. Phân tích thành phần hoá học của bột lá có các hợp chất carotenoid, coumarin, proanthocyanidin, saponin, và chất khử, nghi ngờ có alkaloid và tanin; bột thân rễ có triterpenoid tự do, glycosid tim, khung triterpenoid, chất khử và polyuronic.

### TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] Đỗ Huy Bích và cs (2003), *Cây thuốc và động vật làm thuốc ở Việt Nam, tập 1*, NXB Khoa học và kỹ thuật, Hà Nội.
- [2] Nguyễn Tập (2004), *Danh lục đỏ cây thuốc Việt Nam*, Viện Dược liệu, Hà Nội.
- [3] <http://www.theplantlist.org/tp11.1/record/kew-135256>
- [4] <http://www.eol.org/pages/1137657/overview>
- [5] Lê Đình Bích, Trần Văn Ôn (2007), *Thực vật học*, NXB Y học, Hà Nội.
- [6] Nguyễn Viết Thân (2003), *Kiểm nghiệm dược liệu bằng phương pháp hiển vi*, NXB. Khoa học và kỹ thuật, Hà Nội.
- [7] Trần Hùng và cs (2013), *Phương pháp nghiên cứu dược liệu*, NXB Đại học Y dược, TP Hồ Chí Minh.