

ẢNH HƯỞNG CỦA MÔI TRƯỜNG NUÔI CẤY LÊN SINH TRƯỞNG CỦA CALLUS CÂY GIÁO CỔ LAM (*Gynostemma pentaphyllum* (Thunb.) Makino) – MỘT CÂY DƯỢC LIỆU CÓ GIÁ TRỊ

Hoàng Tấn Quang^{1,*}, Phạm Thị Diễm Thi¹, Trần Thúy Lan¹, Phạm Mai Thu Thủy¹,
Vũ Đức Hoàng², Phan Thị Á Kim³

¹ Viện Công nghệ sinh học, Đại học Huế, Phú Thượng, Phú Vang, Thừa Thiên Huế, Việt Nam

² Trường đại học Sư phạm, Đại học Đà Nẵng, 459 Tôn Đức Thắng, Liên Chiểu, Đà Nẵng, Việt Nam

³ Sở Khoa học và Công nghệ tỉnh Quảng Nam, 54 Hùng Vương, Tam Kỳ, Quảng Nam, Việt Nam

* Tác giả liên hệ Hoàng Tấn Quang <htquang@hueuni.edu.vn>
(Ngày nhận bài: 01-06-2021; Ngày chấp nhận đăng: 03-07-2021)

Tóm tắt. Giáo cổ lam (*Gynostemma pentaphyllum* (Thunb.) Makino) là một cây thuốc dân gian thuộc họ Bầu bí. Cây phân bố rộng ở miền Nam Trung Quốc, Nhật Bản, Hàn Quốc và Việt Nam. Các thành phần có hoạt tính sinh học quan trọng của Giáo cổ lam là saponin glycoside (gypenoside) và các chất chống oxy hóa. Giáo cổ lam được sử dụng hỗ trợ chống ung thư, chống oxy hóa, giảm cholesterol, tăng cường miễn dịch và các tác dụng khác. Trong nghiên cứu này, callus sơ cấp của cây Giáo cổ lam được sử dụng làm nguyên liệu để đánh giá ảnh hưởng của môi trường nuôi cấy lên khả năng phát sinh và sinh trưởng của callus thứ cấp. Kết quả cho thấy, callus được nuôi cấy trên môi trường MS có bổ sung 2,0 mg/L kinetin và 0,5 mg/L indole-3-butyric acid sinh trưởng tốt nhất; tỷ lệ tạo callus thứ cấp cao (100%); callus đáp ứng được tiêu chuẩn để nuôi cấy huyền phù. Hàm lượng gypenoside và Rb1 trong callus là 36,298 và 0,009 mg/g chất khô; gypenoside thấp hơn trong lá (65,58%) và gần tương đương với mẫu thân (92,38%) của sản phẩm thu mua từ thị trường. Dung môi thích hợp để tách chiết gypenoside là methanol. Callus thu được sẽ được sử dụng làm nguyên liệu cho nuôi cấy tế bào huyền phù trong các nghiên cứu tiếp theo.

Từ khóa: callus, cây dược liệu, *Gynostemma pentaphyllum*, gypenoside, Rb1

Effects of culture medium on callus growth of *Gynostemma pentaphyllum* (Thunb.) Makino – a valuable medicinal plant

Hoang Tan Quang^{1,*}, Pham Thi Diem Thi¹, Tran Thuy Lan¹, Pham Mai Thu Thuy¹,
Vu Duc Hoang², Phan Thi A Kim³

¹Institute of Biotechnology, Hue University, Phu Thuong, Phu Vang, Thua Thien Hue, Vietnam

²University of Education, The University of Da Nang, 459 Ton Duc Thang St., Lien Chieu, Da Nang, Vietnam

³Department of Sciences and Technology, 54 Hung Vuong St., Tam Ky City, Quang Nam, Vietnam

* Correspondence to Hoang Tan Quang <htquang@hueuni.edu.vn>
(Received: 01 June 2021; Accepted: 03 July 2021)

Abstract. *Gynostemma pentaphyllum* (Thunb.) Makino (Jiaogulan) is a traditional medicinal herb belonging to the Cucurbitaceae family. *G. pentaphyllum* grows widely in Southern China, Japan, Korea, and Vietnam. The essential bioactive components of Jiaogulan are saponin glycosides (gypenosides) and antioxidants. Jiaogulan exhibits bioactive activities such as anticancer, antioxidant, cholesterol-reducing agent, immunopotential, and others. In this study, the primary callus of Jiaogulan was used as a material to evaluate the influence of the culture medium on the induction and growth of secondary calli. The results reveal that the callus cultured on the MS medium supplemented with 2.0 mg/L kinetin and 0.5 mg/L indole-3-butyric acid has the best growth ability, high rate of secondary callus induction (100%), and good callus quality for suspension culture. The concentration of gypenoside and Rb1 in callus is 36.298 and 0.009 mg/g dry weight. The gypenoside concentration of callus is lower than that of leaves (65.58%) and almost similar to that of stems (92.38%) from natural samples. The suitable solvent for the extraction of gypenoside is methanol. The obtained callus will be used as material for cell suspension culture in further studies.

Keywords: callus, *Gynostemma pentaphyllum*, gypenoside, medicinal herb, Rb1

1 Đặt vấn đề

Giảo cổ lam (*Gynostemma pentaphyllum* (Thunb.) Makino) là một loài dược liệu quý thuộc họ Bầu bí (Cucurbitaceae), phân bố rộng rãi tại Trung Quốc, Nhật Bản, Hàn Quốc và các quốc gia Đông Nam Á, trong đó có Việt Nam [1]. Giảo cổ lam có tác dụng hạ đường huyết, chống oxy hóa, bảo vệ tế bào gan, giảm cholesterol và triglyceride trong máu...; trong đó, saponin dạng dammarane-triterpene được cho là thành phần có vai trò chính [2].

Hiện nay, có hơn 180 loại saponin trong cây Giảo cổ lam, được gọi chung là gypenoside; trong đó, nhiều thành phần có cấu trúc giống với saponin của nhân sâm (*Panax ginseng*) [3]. Tám loại saponin của Giảo cổ lam có cấu trúc giống ginsenoside, loại protopanaxadiol trong nhân sâm, là Rb1 (Gypenoside III), Rc, Rb3 (Gypenoside IV), Rd (Gypenoside VIII), F2, Rg3, malonyl-Rb1 và malonyl-Rd [4].

Do có vai trò tương tự nhân sâm, trong khi quá trình trồng dễ hơn và thời gian thu hoạch ngắn hơn so với nhân sâm, nên Giảo cổ lam được xem là nguồn dược liệu thay thế nhân sâm đầy triển vọng [5]. Tuy nhiên, nguồn Giảo cổ lam trong tự nhiên đã và đang bị khai thác quá mức dẫn đến khan hiếm. Theo sách đỏ Việt Nam năm 2007, Giảo cổ lam được xếp vào nhóm nguy cấp (EN A1a, c, d) [6].

Việc nghiên cứu để tạo ra nguồn nguyên liệu *in vitro* thay thế cây Giảo cổ lam tự nhiên là cần thiết. Nuôi cấy huyền phù tế bào được xem là giải pháp hiệu quả và đã được áp dụng thành công trên nhiều đối tượng khác nhau, nguyên liệu để nuôi cấy tế bào huyền phù chính là callus [7]. Nuôi cấy tế bào huyền phù có nhiều lợi thế hơn so với khai thác cây tự nhiên như sản xuất các hợp chất thứ cấp có hoạt tính sinh học cao, chủ động trong cung cấp nguyên liệu, không bị nhiễm bẩn bởi thuốc trừ sâu, thuốc diệt cỏ, cần ít diện tích sản xuất... [8]. Một số tác giả trên thế giới đã nghiên cứu nuôi cấy callus cây Giảo cổ lam như Jala và cs. [9] hay Ao và cs. [10]; tuy nhiên, các bước tiếp theo về nuôi cấy huyền phù tế bào cây này chưa được thực hiện. Ngoài ra, theo Zhang và cs., callus còn được sử dụng để làm nguyên liệu tạo protoplast, từ đó mới tái sinh cây từ protoplast [11].

Trong một nghiên cứu đã công bố trước đây, chúng tôi thu được callus từ lá và cuống lá; trong đó, callus hình thành từ lá có chất lượng tốt hơn. Tuy nhiên, callus sơ cấp này có tốc độ sinh trưởng chậm, rần và chưa đủ điều kiện để nuôi cấy huyền phù [6]. Vì vậy, nghiên cứu này được thực hiện nhằm tìm ra môi trường nuôi cấy thích hợp để callus sinh trưởng tốt nhất, đủ tiêu chuẩn làm nguyên liệu cho nuôi cấy huyền phù, đồng thời đánh giá mức độ tích lũy gypenoside trong dòng callus này.

2 Đối tượng và phương pháp

2.1 Đối tượng

Đối tượng nghiên cứu là callus cây Giảo cổ lam năm lá (*Gynostemma pentaphyllum* (Thunb) Makino) *in vitro* do Phòng thí nghiệm Công nghệ Gen, Viện Công nghệ sinh học, Đại học Huế cung cấp [6].

2.2 Phương pháp

Điều kiện nuôi cấy

Tất cả các thí nghiệm nuôi cấy được tiến hành trong phòng nuôi cấy mô tế bào thực vật, nhiệt độ phòng nuôi 25 ± 2 °C, thời gian chiếu sáng 12 giờ sáng/ngày, cường độ chiếu sáng 2.000 lux.

Môi trường nuôi cấy: Môi trường MS (Murashige và Skoog, 1962) [12] cơ bản chứa 3% đường sucrose, 0,8% agar, bổ sung các chất điều hòa sinh trưởng khác nhau tùy theo từng thí nghiệm, pH 5,8 và được hấp khử trùng ở 121 °C trong 15 phút. Môi trường được giữ trong túi nhựa PE.

Ảnh hưởng của chất điều hòa sinh trưởng đến khả năng tạo callus thứ cấp

Khối callus được cấy chuyển lên môi trường MS cơ bản có bổ sung kết hợp giữa cytokinin (Benzylaminopurine-BAP và Kinetin-KIN) và auxin (Naphthalene acetic acid- NAA và indole-3-butyrac acid-IBA) nhằm tìm ra dòng callus đủ điều kiện để nuôi cấy tế bào huyền phù. Nồng độ cytokinin thay đổi (0,5–3,0 mg/L) và nồng độ auxin được giữ nguyên (0,5 mg/L) tham khảo từ các nghiên cứu trên cây Giảo cổ lam được công bố trước đây [9, 13].

Các chỉ tiêu được ghi nhận sau 20 ngày nuôi cấy, bao gồm tỷ lệ phát sinh callus thứ cấp, mức độ phát sinh callus và đặc điểm của callus.

Tách chiết gypenoside

Để xác định hàm lượng gypenoside trong mẫu, chúng tôi sấy khô callus và tách chiết trong ba loại dung môi khác nhau. Mẫu lá và thân của cây giảo cổ lam mua trên thị trường được sử dụng làm mẫu đối chứng.

Callus thứ cấp, thân và lá cây Giảo cổ lam (0,5 g khô) được chiết trong 10 mL methanol 80% có sử dụng sóng siêu âm trong 1,5 giờ, hoặc chiết hai lần trong 10 mL ethanol 80% ở 25 °C trong 12 giờ, hoặc 10 mL nước cất ở 80 °C trong ba giờ. Sau đó, lọc dịch chiết và để bay hơi đến khô. Phần cặn được cân và tái hòa tan trong dung môi tương ứng đến nồng độ 5 mg/mL, lọc qua màng lọc 0,22 µm và bảo quản ở 4 °C cho các thí nghiệm tiếp theo [14, 15].

Xác định hàm lượng gypenoside

Hàm lượng gypenoside trong dịch chiết được xác định bằng phương pháp quang phổ [16, 17]. Phân tích sắc ký lỏng hiệu năng cao (HPLC) được sử dụng để định lượng Rb1 trong dịch chiết. HPLC được thực hiện trên hệ thống Alliance E2695 với cột C18 (4,6 × 250 × 5 mm). Pha động bao gồm nước và acetonitrile (34%) trong 20 phút, nhiệt độ chạy 30 °C, tốc độ dòng 0,8 mL/phút, thể tích chạy 20 µL. Tín hiệu được thu nhận bằng đầu dò ở bước sóng 203 nm [4]. Chất chuẩn được sử dụng trong phân tích HPLC là ginsenoside Rb1 (Y0001347, CRS, Pháp, độ tinh khiết 98%), hàm lượng Rb1 được xác định dựa trên diện tích của đỉnh (peak) có thời gian lưu tương đương với đỉnh chuẩn.

Xử lý số liệu

Các thí nghiệm được bố trí theo kiểu hoàn toàn ngẫu nhiên một nhân tố, ba lần lặp lại, cỡ mẫu ≥ 30 (đối với các thí nghiệm nuôi cấy) hoặc 3 (đối với các thí nghiệm xác định hàm lượng gypenoside). Kết quả thí nghiệm được tính trung bình và phân tích ANOVA với Duncan's test ($p < 0,05$) bằng phần mềm SPSS 17.0.

3 Kết quả và thảo luận

3.1 Ảnh hưởng của chất điều hòa sinh trưởng đến khả năng tạo callus thứ cấp

Ảnh hưởng của BAP kết hợp với NAA

Khi kết hợp BAP với NAA, sự phát sinh callus thứ cấp không tốt; tỷ lệ tạo callus thấp (cao nhất là 42,86%); callus sinh trưởng chậm, mỏng nước (Bảng 1 và Hình 1). Môi trường MS bổ sung 0,5-1,0 mg/L BAP và 0,5 mg/L NAA không có sự phát sinh callus thứ cấp sau 20 ngày nuôi cấy. Trên môi trường MS bổ sung 1,5–2,0 mg/L BAP và 0,5 mg/L NAA, callus bắt đầu xuất hiện, mềm và có màu vàng nhạt. Trên môi trường MS bổ sung 2,5 mg/L BAP và 0,5 mg/L NAA, callus bắt đầu có sự tăng sinh rõ rệt, hóa xốp và có màu vàng nhạt.

Theo Jala và cs., khi kết hợp giữa auxin (NAA) và cytokinin (BA), callus Giáo cổ lam sinh trưởng tốt nhất trên môi trường có lượng auxin và cytokinin bằng nhau hoặc auxin cao hơn [9]. Trong

nghiên cứu của chúng tôi, sự kết hợp này không thích hợp cho phát sinh callus, callus sinh trưởng yếu. Nguyên nhân có thể xuất phát từ các dòng callus được sử dụng khác nhau cho thí nghiệm, callus trong nghiên cứu của Jala và cs. sinh trưởng chậm (80 ngày) [9] trong khi callus trong nghiên cứu của chúng tôi sinh trưởng nhanh hơn (20 ngày để thu được khối callus có đường kính hơn 1 cm).

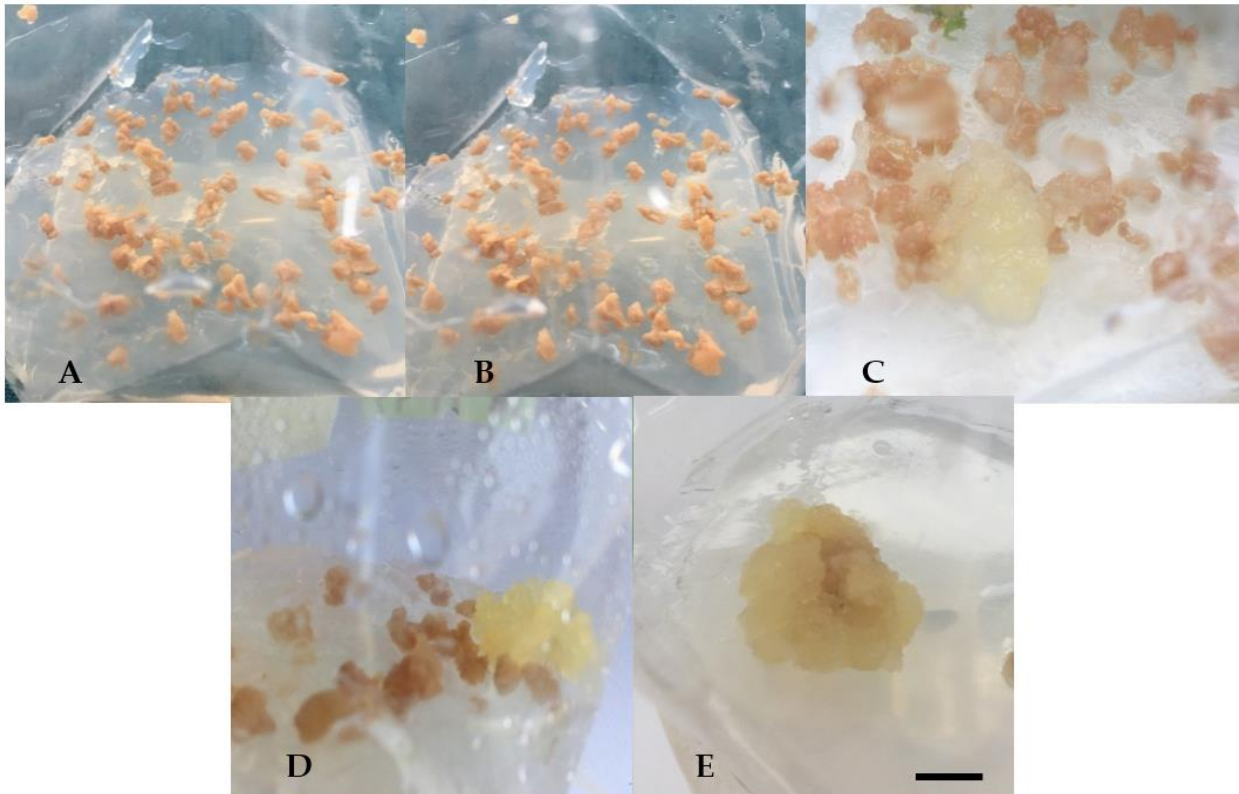
Ảnh hưởng của BAP kết hợp với IBA

Sự kết hợp giữa BAP và NAA cho kết quả tạo callus thứ cấp không tốt. Do đó, chúng tôi tiếp tục thăm dò sự kết hợp giữa BAP và IBA lên khả năng phát sinh callus thứ cấp. Kết quả trình bày ở Bảng 2 và Hình 2 cho thấy mặc dù tỷ lệ tạo callus cao hơn (23,81–61,90%), nhưng sự sinh trưởng của callus không thật sự tốt. Khi sử dụng 1,0 mg/L BAP kết hợp với 0,5 mg/L IBA, callus thứ cấp không xuất hiện. Callus thứ cấp bắt đầu xuất hiện khi tăng BAP lên 1,5 mg/L và đạt cao nhất khi sử dụng 2,5 mg/L BAP (61,90%).

Bảng 1. Ảnh hưởng của nồng độ BAP kết hợp với NAA đến khả năng phát sinh callus

BAP (mg/L)	NAA(mg/L)	Tỷ lệ phát sinh callus thứ cấp (%)	Mức độ phát sinh callus	Đặc điểm callus
0,5	0,5	0,00 ^c	-	Không phát sinh callus
1,0	0,5	0,00 ^c	-	Không phát sinh callus
1,5	0,5	9,52 ^b	+	Mềm, mỏng nước, kết thành từng khối nhỏ màu vàng nhạt
2,0	0,5	14,29 ^b	+	Mềm, mỏng nước, kết thành từng khối nhỏ màu vàng nhạt
2,5	0,5	42,86 ^a	++	Mềm, mỏng nước, kết thành từng khối nhỏ màu vàng nhạt

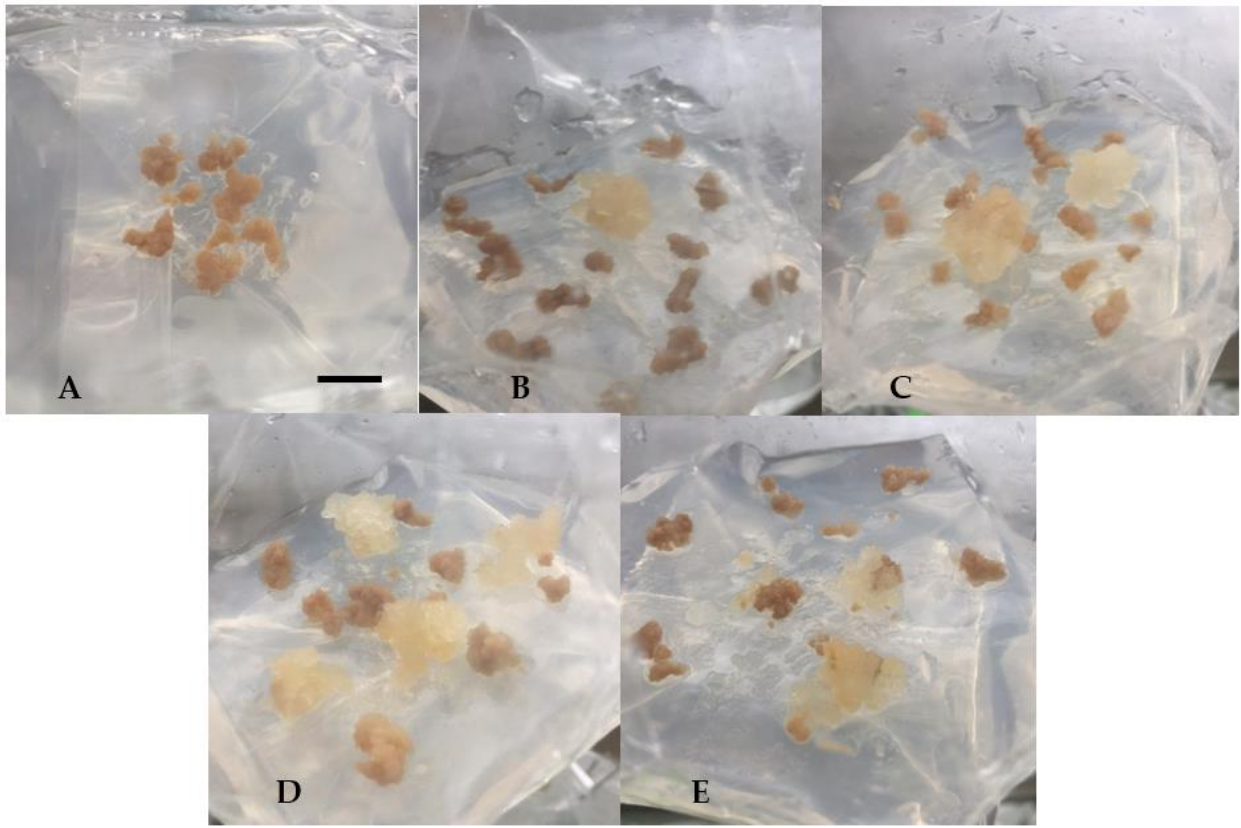
Ghi chú: Mức độ phát sinh: (++++) sinh trưởng mạnh; (+++) sinh trưởng khá; (++) sinh trưởng trung bình; (+) sinh trưởng kém; (-) không sinh trưởng. Chú thích này dùng chung cho các Bảng 1–3. Các chữ cái khác nhau trên cùng một cột chỉ sự sai khác có ý nghĩa thống kê của các trung bình mẫu với $p < 0,05$ (Duncan's test). Chú thích này dùng chung cho tất cả các bảng.



Hình 1. Ảnh hưởng của nồng độ BAP kết hợp với NAA đến khả năng phát sinh callus: A. Môi trường có bổ sung 0,5 mg/L BAP và 0,5 mg/L NAA; B. 1,0 mg/L BAP và 0,5 mg/L NAA; C. 1,5 mg/L BAP và 0,5 mg/L NAA; D. 2,0 mg/L BAP và 0,5 mg/L NAA; E. 2,5 mg/L BAP và 0,5 mg/L NAA; bar = 1 cm

Bảng 2. Ảnh hưởng của nồng độ BAP kết hợp với IBA đến khả năng phát sinh callus

BAP (mg/L)	IBA (mg/L)	Tỷ lệ phát sinh callus (%)	Mức độ phát sinh callus	Đặc điểm callus
1,0	0,5	0,00 ^d	-	Không phát sinh callus
1,5	0,5	23,81 ^c	+	Mềm, mọng nước, kết thành từng khối nhỏ màu vàng nhạt
2,0	0,5	52,38 ^b	++	Mềm, mọng nước, kết thành từng khối nhỏ màu vàng nhạt
2,5	0,5	61,90 ^a	++	Mềm, mọng nước, kết thành từng khối nhỏ màu vàng nhạt
3,0	0,5	47,62 ^b	+	Mềm, mọng nước, kết thành từng khối nhỏ màu vàng nhạt



Hình 2. Ảnh hưởng của nồng độ KIN kết hợp với IBA đến khả năng phát sinh callus: A. Môi trường có bổ sung 1,0 mg/L BAP và 0,5 mg/L IBA; B. 1,5 mg/L BAP và 0,5 mg/L IBA; C. 2,0 mg/L BAP và 0,5 mg/L IBA; D. 2,5 mg/L BAP và 0,5 mg/L IBA; E. 3,0 mg/L BAP và 0,5 mg/L IBA; bar = 1 cm

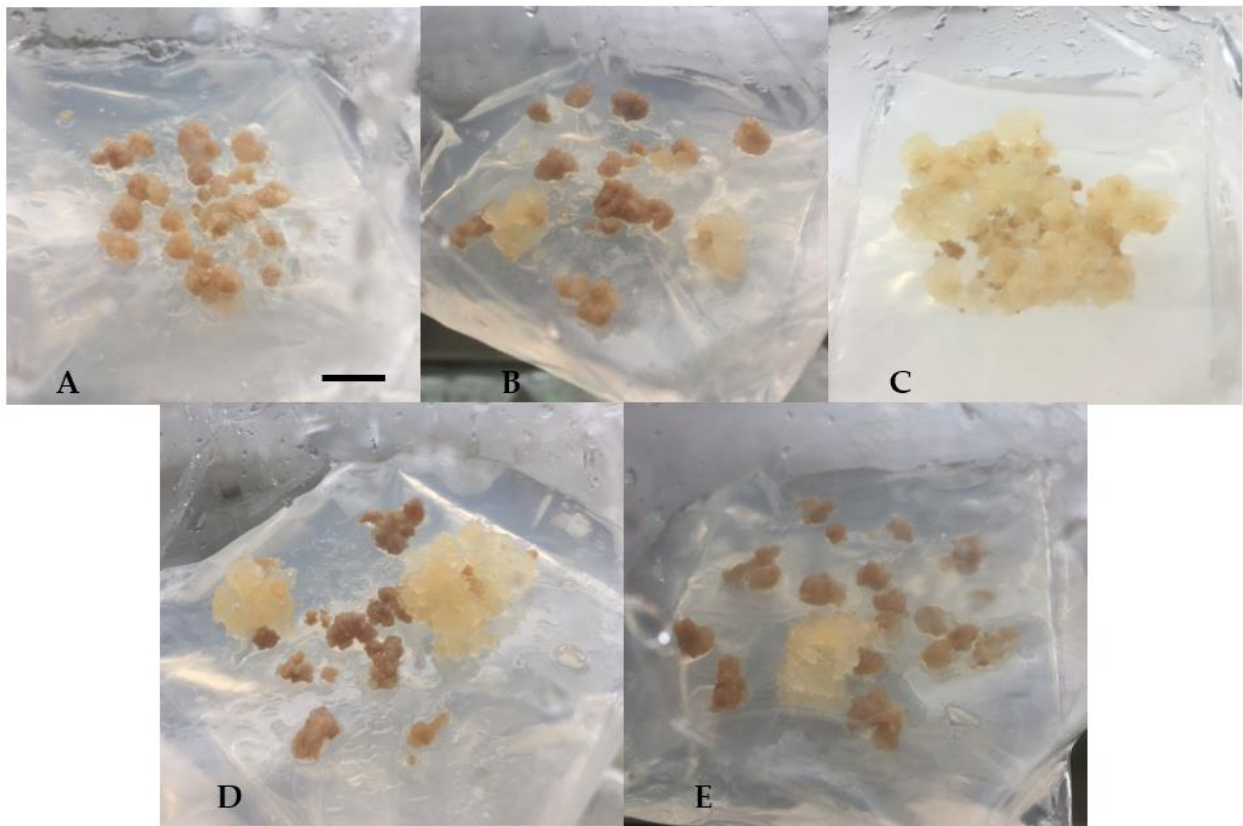
Ảnh hưởng của KIN kết hợp với IBA

Kết quả trình bày ở Bảng 1 và Bảng 2 cho thấy BAP không thật sự phù hợp cho phát sinh callus thứ cấp của cây Giảo cổ lam; vì vậy, chúng tôi thay thế BAP bằng KIN để kết hợp với IBA (tốt

hơn NAA). Kết quả ảnh hưởng của KIN kết hợp với IBA đến khả năng phát sinh callus thứ cấp sau 20 ngày nuôi cấy được trình bày ở Bảng 3 và Hình 3.

Bảng 3. Ảnh hưởng của nồng độ KIN kết hợp với IBA đến khả năng phát sinh callus

KIN (mg/L)	IBA (mg/L)	Tỷ lệ phát sinh callus (%)	Mức độ phát sinh callus	Đặc điểm callus
1,0	0,5	0,00 ^e	–	Không có sự phát sinh callus
1,5	0,5	57,14 ^c	++	Mềm, mọng nước, kết thành từng khối nhỏ màu vàng nhạt
2,0	0,5	100,00 ^a	++++	Mềm, mọng nước, kết thành từng khối nhỏ màu vàng nhạt
2,5	0,5	71,14 ^b	++	Mềm, mọng nước, kết thành từng khối nhỏ màu vàng nhạt
3,0	0,5	42,89 ^d	+	Mềm, mọng nước, kết thành từng khối nhỏ màu vàng nhạt



Hình 3. Ảnh hưởng của nồng độ KIN kết hợp với IBA đến khả năng phát sinh callus: A. Môi trường có bổ sung 1,0 mg/L KIN và 0,5 mg/L IBA; B. 1,5 mg/L KIN và 0,5 mg/L IBA; C. 2,0 mg/L KIN và 0,5 mg/L IBA; D. 2,5 mg/L KIN và 0,5 mg/L IBA; E. 3,0 mg/L KIN và 0,5 mg/L IBA; bar = 1 cm

Trên môi trường MS bổ sung 0,5–1,0 mg/L KIN và 0,5 mg/L IBA không có sự phát sinh callus thứ cấp sau 20 ngày nuôi cấy; callus sơ cấp dần hóa nâu và chết. Trên môi trường MS bổ sung 1,5 mg/L KIN và 0,5 mg/L IBA, callus bắt đầu tăng sinh, mềm và có màu vàng nhạt. Trên môi trường MS bổ sung 2,0 mg/L KIN và 0,5 mg/L IBA, callus tăng sinh mạnh, có dạng xốp, mềm, mọng nước, kết thành từng khối nhỏ màu vàng nhạt (Hình 3). Trên môi trường MS bổ sung 2,5 mg/L KIN và 0,5 mg/L IBA, callus có dấu hiệu giảm sinh trưởng, callus mềm có màu vàng nhạt và một số vùng hóa nâu.

Kết quả trên cho thấy, callus Giảo cổ lam nuôi cấy trên môi trường MS có bổ sung 2,0 mg/L KIN và 0,5 mg/L IBA cho khả năng sinh trưởng tốt nhất, tỷ lệ tạo callus thứ cấp cao (100%). Đây là dòng callus tốt nhất, có thể sử dụng để nuôi cấy tế

bào huyền phù.

3.2 Sự tích lũy gypenoside trong callus

Callus thu được từ môi trường nuôi cấy tối ưu được tách chiết theo ba quy trình với ba dung môi khác nhau, sau đó phân tích sự có mặt của gypenoside bằng phương pháp HPLC. Trong ba dung môi sử dụng để tách chiết, nước là dung môi cho nhiều đỉnh tách biệt nhất (16 đỉnh), tiếp đến là methanol (15 đỉnh) và ít nhất là ethanol (10 đỉnh). Đây là các đỉnh được hệ thống nhận diện tự động với diện tích từ 3500 AU×s trở lên (Hình 4).

Kết quả phân tích cho thấy trong mẫu callus có một đỉnh trùng thời gian lưu với đỉnh chuẩn Rb1 (5,238 phút, Hình 4 và 5), xuất hiện trong dịch chiết methanol và nước. Như vậy, Rb1 nói riêng và gypenoside nói chung đã có mặt trong callus Giảo

cổ lam và dòng callus này có thể được sử dụng cho các nghiên cứu nuôi cấy tiếp theo. Từ kết quả này có thể nhận thấy ethanol không phải là dung môi tốt để tách chiết gypenoside từ cây Giảo cổ lam. Sắc đồ HPLC cũng cho thấy đỉnh với diện tích lớn nhất ứng với thời gian lưu khoảng 2,5 phút xuất hiện trong tất cả mẫu và dung môi nghiên cứu; đây có thể là thành phần gypenoside chính của cây giảo cổ lam.

Kết quả phân tích ở Bảng 4 và Hình 4–5 cho thấy có sự khác nhau giữa hàm lượng gypenoside tổng số và Rb1 tích lũy ở mẫu callus thân và lá khi chiết trong các dung môi khác nhau. Trong ba dung môi sử dụng, methanol cho hàm lượng gypenoside cao nhất (36,298 mg/g chất khô, tương đương khoảng 3,36% chất khô). Hàm lượng gypenoside khi tách chiết bằng ethanol và nước khá tương đương nhau (32–33 mg/g khô), thấp hơn so với khi chiết bằng methanol.

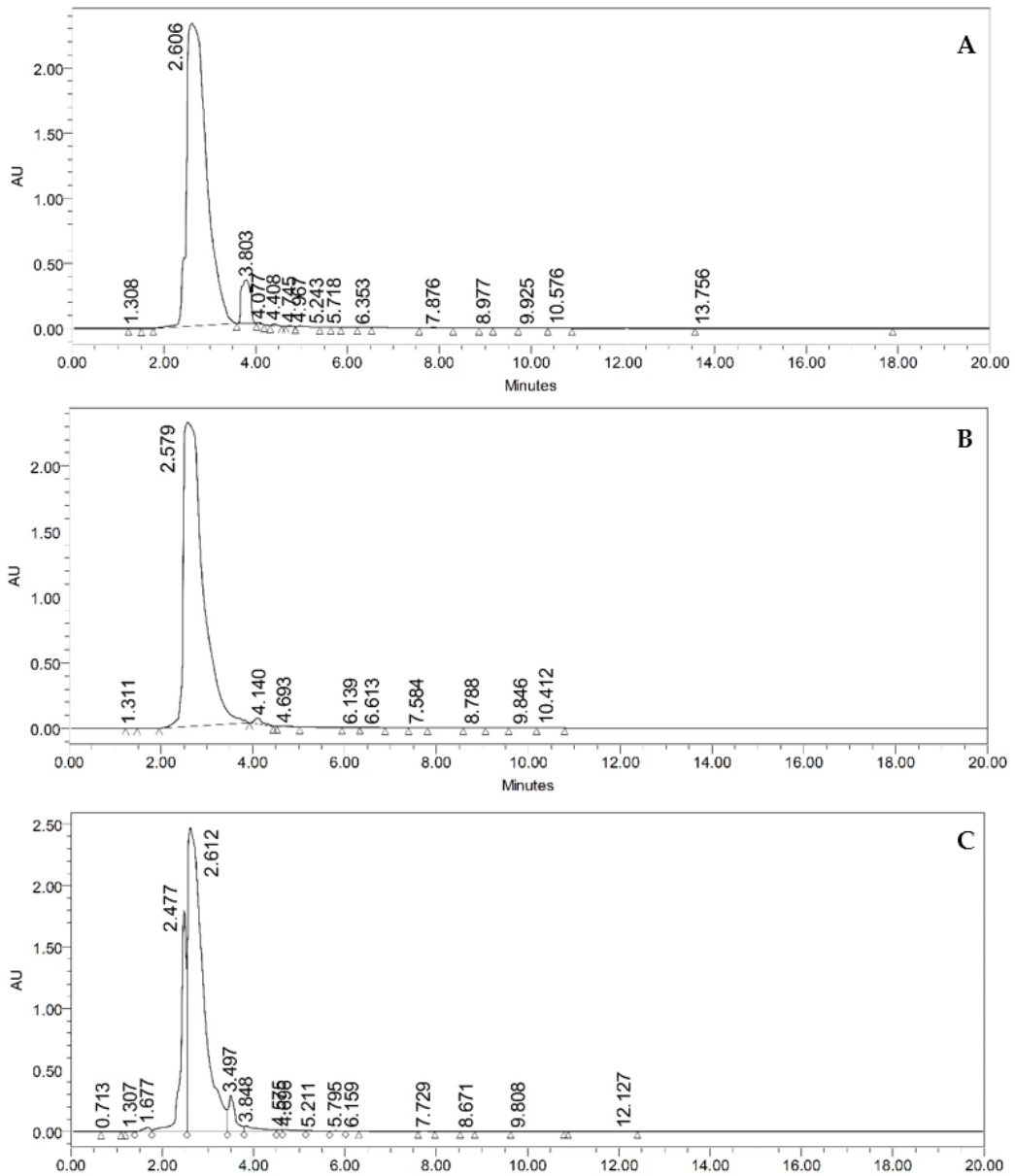
Tuy nhiên, kết quả phân tích cũng cho thấy hàm lượng gypenoside trong callus thấp hơn trong lá (chỉ bằng 65,58%) và gần tương đương mẫu thân (bằng 92,38%) của sản phẩm thu mua từ thị trường (cây tự nhiên) khi tách chiết bằng methanol (Bảng 4). So với hàm lượng gypenoside, hàm lượng Rb1 trong callus còn thấp hơn trong mẫu tự nhiên rất nhiều lần.

Trong các nghiên cứu đã công bố trước đây, hàm lượng gypenoside trong mẫu Giảo cổ lam dao động từ 15 đến 60 mg/g khô, tương đương với số liệu trong nghiên cứu của chúng tôi. Ví dụ, trong rễ tơ có 38 mg gypenoside/g khô, trong rễ cây trưởng thành là 15 mg/g, trong lá là 42 mg/g và trong các sản phẩm thương mại tại Trung Quốc dao động từ 53 đến 66 mg/g khô [16]. Tại Việt Nam, hàm lượng saponin toàn phần trong cây Giảo cổ lam năm lá thu hái tại Thái Nguyên là 46,9 mg/g khô (4,69%) [17]. Đối với Rb1, trong callus, Rb1 chỉ chiếm 0,025% gypenoside, thấp hơn trong thân (0,216%) và thấp hơn các nghiên cứu khác như cây Giảo cổ lam thu ở Shaanxi (Trung Quốc) là 1,625% [18].

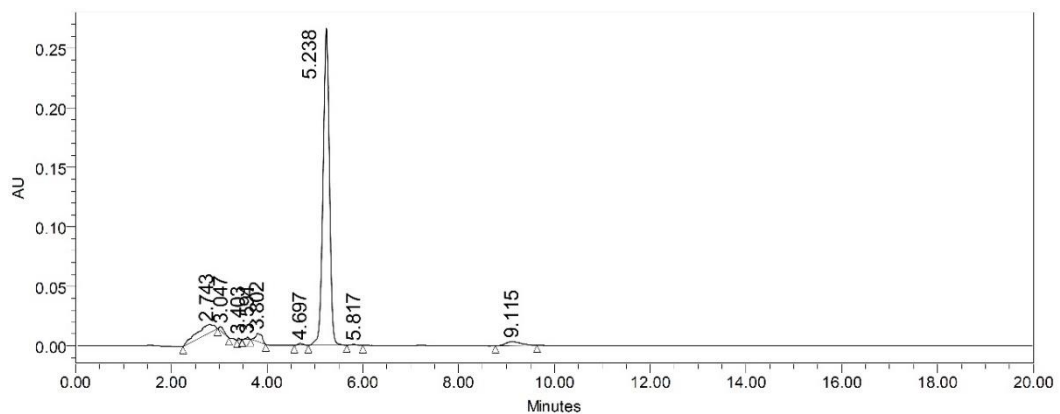
Các tài liệu đã công bố cho thấy bước sóng khi phân tích hàm lượng các loại saponin bằng HPLC là từ 200 đến 210 nm, trong đó bước sóng 203 nm chiếm nhiều nhất. Ví dụ, bước sóng 203 nm đã được sử dụng để định lượng ursolic và oleanolic acid [19], ginsenosides Rb1, Rc, Rb2, Rb3, và notoginsenosides Fc, Fe, Fd [20], saikosaponin [21], Rb1, Rb3 và Rd [18]. Các nghiên cứu đánh giá gypenoside trong cây Giảo cổ lam cũng đều được thực hiện ở bước sóng 203 nm [4, 14]. Vì vậy, sử dụng bước sóng này có thể phản ánh được thành phần gypenoside trong mẫu Giảo cổ lam.

Bảng 4. Ảnh hưởng dung môi lên hàm lượng gypenoside trong dịch tách chiết

Mẫu	Dung môi	Gypenoside (mg/g khô)	Rb1 (mg/g khô)
Callus	Methanol	36,298 ^b	0,009 ^c
	Ethanol	33,211 ^b	–
	Nước	32,205 ^b	0,012 ^c
Lá	Methanol	55,351 ^a	0,065 ^b
Thân	Methanol	39,293 ^b	0,085 ^a



Hình 4. Phổ HPLC mẫu callus thứ cấp với các dung môi tách chiết khác nhau: A. Methanol; B. Ethanol; C. Nước cất



Hình 5. Phổ HPLC chuẩn ginsenoside Rb1 (0,5 mg/mL)

4 Kết luận

Kết quả nghiên cứu cho thấy, callus Giảo cổ lam được nuôi cấy trên môi trường MS có bổ sung 2,0 mg/L KIN và 0,5 mg/L IBA sinh trưởng tốt nhất, cho tỷ lệ tạo callus thứ cấp cao (100%) và callus đáp ứng được tiêu chuẩn để nuôi cấy huyền phù. Hàm lượng gypenoside và Rb1 trong callus là 36,298 mg và 0,009 mg/g chất khô; gypenoside thấp hơn trong lá (tương đương 65,58%) và gần tương đương mẫu thân (bằng 92,38%) của sản phẩm thu mua từ thị trường. Dung môi thích hợp để tách chiết gypenoside từ cây Giảo cổ lam là methanol.

Thông tin tài trợ

Công trình được Bộ Giáo dục và Đào tạo, Việt Nam, tài trợ qua đề tài mã số B2019-DHH-562-09.

Tài liệu tham khảo

1. Cui WY, Jin Y, Liu H, Zu ML, Zhai XF, Yang C, et al. Dammarane-type saponins from *Gynostemma pentaphyllum* and their cytotoxicities. *Natural Product Research*. 2020;1-9.
2. Lâm BD, Tinh NT, Duy NV, Bảo NV, Hiền LV, Bình NX. Nghiên cứu khả năng nhân giống cây Giảo cổ lam (*Gynostemma pentaphyllum* Thunb) bằng phương pháp *in vitro*. *Tạp chí Nông nghiệp và Phát triển Nông thôn*. 2015;15:249-56.
3. Chen PY, Chang CC, Huang HC, Zhang LJ, Liaw CC, Lin YC, et al. New Dammarane-type Saponins from *Gynostemma pentaphyllum*. *Molecules*. 2019;24(7).
4. Liu F, Ren D, Guo DA, Pan Y, Zhang H, Hu P. Method Development for Gypenosides Fingerprint by High Performance Liquid Chromatography with Diode-Array Detection and the Addition of Internal Standard. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*. 2008;56(3):389-93.
5. Liang T, Zou L, Sun S, Kuang X, Wei J, Wang L, et al. Hybrid sequencing of the *Gynostemma pentaphyllum* transcriptome provides new insights into gypenoside biosynthesis. *BMC Genomics*. 2019;20(1):632.
6. Quảng HT, Như LPQ, Trí NM, Nhân LTT, Cường LN, Hải TTH, et al. Nhân giống cây Giảo cổ lam (*Gynostemma pentaphyllum* (Thunb.) Makino) bằng nuôi cấy callus. *Tạp chí Khoa học, Đại học Huế: Khoa học tự nhiên*. 2019;128(1E):59-68.
7. Yue W, Ming QL, Lin B, Rahman K, Cheng Z, Han T, et al. Medicinal plant cell suspension cultures: Pharmaceutical applications and high-yielding strategies for the desired secondary metabolites. *Critical reviews in biotechnology*. 2014;36:1-18.
8. Lộc NH. Nuôi cấy mô và tế bào thực vật-Các khái niệm và ứng dụng. Huế: NXB Đại học Huế; 2011.
9. Jala A, Patchpoonporn W. Effect of BA NAA and 2,4D on Micropropagation of Tiaoogulan (*Gynostemma pentaphyllum* Makino). *International Transaction Journal of Engineering, Management, & Applied Sciences & Technologies*. 2012;3(4):363-70.
10. Ao Z, Qin Z. Effect of some stress factors on gypenosides accumulation in callus of *Gynostemma pentaphyllum*. *Chinese Journal of Applied & Environmental Biology*. 1998 4(2):10-4.
11. Zhang H, Wu Q, Liu D. Protoplast culture and plant regeneration from the suspension cells of *Gynostemma pentaphyllum* (Thumb) Mak. *Chinese Journal of Biotechnology*. 1995;11(3):207-11.
12. Murashige T, Skoog F. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiol Plant*. 1962;15(3):473-97.
13. Hằng NTT, Vân LA, Khiêm ĐV, Cường HV, Hoàng NTP, Huyền PX. Nghiên cứu nhân giống *in vitro* và sự sinh trưởng phát triển cây giảo cổ lam (*Gynostemma pubescens*) trong nhà kính. *Tạp chí khoa học Đại học Đà Lạt*. 2018;8(3):99-112.
14. Wu Q, Jang M, Piao XL. Determination by UPLC-MS of four dammarane-type saponins from heat-processed *Gynostemma pentaphyllum*. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*. 2014;78(2):311-6.
15. Zhao TT, Shin KS, Choi HS, Lee MK. Ameliorating effects of gypenosides on chronic stress-induced anxiety disorders in mice. *BMC Complement Altern Med*. 2015;15:323.
16. Chang CK, Chang KS, Lin YC, Liu SY, Chen CY. Hairy root cultures of *Gynostemma pentaphyllum* (Thunb.) Makino: a promising approach for the production of gypenosides as an alternative of ginseng saponins. *Biotechnology Letters*. 2005;27(16):1165-1169.
17. Luyến BT, Nhung PTT, Quỳnh NT, Thư ND, Cải NT. Định lượng saponin toàn phần trong dược liệu

- giáo cổ lam (*Gynostemma pentaphyllum*) 5 lá và 7 lá thu hái tại Thái Nguyên bằng phương pháp đo quang. Tạp chí Khoa học và Công nghệ Đại học Thái Nguyên. 2019;207(14):187-94.
18. Shi MR, Li H, Bai G, Xiao YP. Quantification of five saponins in *Gynostemma pentaphyllum* (Thunb.) Makino by HPLC. Journal of Science and Technology of Food Industry (China). 2015;36(2):49-56.
 19. Gnoatto SCB, Schenkel EP, Bassani VL. HPLC method to assay total saponins in *Ilex paraguariensis* aqueous extract. Journal of the Brazilian Chemical Society. 2005;16:723-5.
 20. Liu F, Ma N, He C, Hu Y, Li P, Chen M, et al. Qualitative and quantitative analysis of the saponins in *Panax notoginseng* leaves using ultra-performance liquid chromatography coupled with time-of-flight tandem mass spectrometry and high performance liquid chromatography coupled with UV detector. Journal of Ginseng Research. 2018;42(2):149-57.
 21. Park IS, Kang E, Kim N. High-Performance Liquid Chromatographic Analysis of Saponin Compounds in *Bupleurum falcatum*. Journal of chromatographic science. 2000;38:229-33.