

12.18 ĐỊNH TÍNH DƯỢC LIỆU VÀ CÁC CHẾ PHẨM BẢNG KÍNH HIỂN VI

Định tính bằng kính hiển vi là phương pháp sử dụng kính hiển vi để nhận biết các đặc điểm của các mô, tế bào hoặc các chất chứa trong tế bào, ở các lát cắt, bột, các mô đã được làm rã ra, hoặc các tiêu bản bề mặt của dược liệu và các chế phẩm. Việc chọn mẫu đại diện để định tính và sự chuẩn bị tiêu bản phải phù hợp với những yêu cầu về định tính của mỗi loại mẫu cần kiểm tra. Các tiêu bản của các chế phẩm được chuẩn bị sau những xử lý thích hợp tùy theo các dạng chế phẩm khác nhau.

Tiêu bản dược liệu

Lát cắt ngang hoặc dọc

Chọn lấy một mẫu dược liệu thích hợp sao cho có đủ các đặc điểm thực vật như sau:

Thân và rễ nhỏ: Lấy một đoạn có đủ mặt cắt ngang.

Thân, rễ to và rễ củ: Lấy một phần có mặt cắt ngang hình quạt (có cấu tạo từ biểu bì đến tâm).

Vỏ thân: Lấy một phần cắt ngang hình chữ nhật (có cấu tạo từ bần đến tầng phát sinh libe-gỗ).

Lá: Lấy một đoạn gân giữa có dính mỗi bên một ít phiến lá.

Hoa: Bóc biểu bì hay cắt ngang từng bộ phận.

Quả và hạt nhỏ: Lấy nguyên cả quả và hạt.

Quả và hạt to: Lấy một phần, chọn vị trí cắt có đủ các đặc điểm.

Dùng lưỡi dao cạo, ống cắt vi phẫu cầm tay hay máy cắt vi phẫu cắt mẫu dược liệu thành từng lát mỏng 10 µm đến 20 µm. Cũng có thể kẹp mẫu trong parafin rắn, củ khoai lang, củ đậu v.v... để cắt. Trừ chỉ dẫn trong chuyên luận riêng, lát cắt có thể được soi ngay hoặc phải qua các bước xử lý sau đây trước khi đem soi kính:

Ngâm các lát cắt vào *dung dịch cloramin T 5 % (TT)* đến khi lát cắt trắng ra thì rửa sạch cloramin bằng nước.

Ngâm lát cắt vào *thuốc thử cloral hydrat (TT)* khoảng 10 min rồi rửa sạch bằng nước cất.

Ngâm lát cắt trong *dung dịch acid acetic 1 % (TT)* trong khoảng 2 min rồi rửa thật kỹ lại bằng nước cất.

Ngâm lát cắt trong *dung dịch lục iod (TT)* hoặc *xanh methylen (TT)* trong khoảng từ 1 s đến 5 s, rửa nhanh bằng *ethanol 60 % (TT)* rồi rửa lại bằng nước cất.

Ngâm lát cắt trong *dung dịch carmin 40 (TT)* tới khi thấy màu bắt rõ thì rửa bằng nước cất.

Tiêu bản bột

Lấy một lượng nhỏ bột (qua rây số 250), cho vào một giọt dung dịch soi (như nước, glycerin, cloral hydrat hay thuốc thử khác tùy thuộc vào mục đích soi) đã có sẵn trên lam kính, dùng kim mũi mác dàn đều cho bột thấm dung dịch, đặt lam kính, di nhẹ lam kính rồi quan sát dưới kính.

Tiêu bản bề mặt

Làm ẩm và làm mềm mẫu (nếu cần thiết), cắt lấy 2 mẫu nhỏ khoảng 4 mm² (một mẫu để soi và một mẫu để đối chiếu) hoặc tước lấy một đoạn biểu bì, đặt lên một lam kính, thêm thuốc thử thích hợp rồi soi kính.

Tiêu bản mô đã làm rã

Nếu mẫu thử là mô mềm hoặc chỉ có ít, lẻ tẻ các mô gỗ thì có thể dùng phương pháp kali hydroxyd. Nếu mẫu thử cứng, có nhiều mô gỗ hoặc các mô gỗ tụ lại thành bó lớn thì dùng phương pháp acid cromic-nitric hay phương pháp kali clorat. Mẫu thử cần được cắt thành các đoạn dài 5 mm, đường kính 2 mm hoặc những mẫu nhỏ dày khoảng 1 mm trước khi làm rã.

a. *Phương pháp kali hydroxyd*: Cho mẫu thử vào một ống nghiệm, thêm *dung dịch kali hydroxyd 5 % (TT)* vừa đủ, đun nóng nhẹ (hoặc ngâm nóng trong cách thủy) đến khi ép bằng đĩa thủy tinh thì mẫu bị vỡ ra. Gạn bỏ dung dịch kiềm, rửa sạch mẫu bằng nước rồi đặt mẫu lên lam kính. Dùng kim phẫu thuật xé mẫu ra rồi quan sát trong *glycerin (TT)*.

b. *Phương pháp acid cromic-nitric*: Cho mẫu thử vào một ống nghiệm, thêm vừa đủ *thuốc thử acid cromic-nitric (TT)*, ngâm đến khi ép bằng đĩa thủy tinh thì mẫu bị vỡ ra. Gạn bỏ dung dịch acid, rửa bằng nước rồi làm tiếp như phương pháp a.

c. *Phương pháp kali clorat*: Cho mẫu thử vào trong ống nghiệm, thêm *dung dịch acid nitric 50 % (TT)* và một ít bột kali clorat (TT), đun nóng đến khi giảm sùi bọt. Thêm một lượng nhỏ kali clorat đúng lúc để duy trì sùi bọt nhẹ cho đến khi mẫu bị vỡ ra khi ép bằng đĩa thủy tinh. Gạn bỏ dung dịch acid, rửa sạch mẫu bằng nước rồi làm tiếp như phương pháp a.

Tiêu bản phân hoa và bào tử

Nghiền phân hoa, bao phấn, hoa nhỏ hoặc túi bào tử (được làm mềm trong *acid acetic băng (TT)* bằng đĩa thủy tinh và lọc vào một ống ly tâm, ly tâm rồi bỏ phần nước. Thêm vào cân 1 ml đến 3 ml hỗn hợp mới pha của *anhydrid acetic - acid sulfuric (9 : 1)*, đun nóng 2 min đến 3 min trên cách thủy, ly tâm. Rửa cân bằng nước 2 lần, thêm 3 giọt đến 4 giọt *dung dịch glycerin 50 % (TT)* và *dung dịch phenol 1 % (TT)*, làm tiêu bản trong fuchsin - glycerin - gelatin và soi. Có thể dùng *cloral hydrat (TT)* thay cho fuchsin - glycerin - gelatin để soi.

Tiêu bản của chế phẩm đông dược bao gồm cả thuốc bột

Để định tính các chế phẩm đông dược bao gồm cả thuốc bột, chuẩn bị tiêu bản như đã mô tả ở mục "Tiêu bản bột" ở phần trên. Lượng mẫu lấy như dưới đây được nghiền thành bột và lấy một lượng bột thích hợp, thêm từng giọt thuốc thử theo yêu cầu, khuấy kỹ để làm tách rời các tế bào hay tổ chức bị dính.

Thuốc bột hoặc bột của viên nang: Lấy một lượng bột thích hợp, nghiền nhỏ.

Viên nén: Lấy 2 đến 3 viên.

Hoàn hồ-nước, hoàn hồ, hoàn mật ong (loại bỏ lớp vỏ bao): Lấy vài viên.

Thuốc ngâm: Lấy 1 đến 2 viên.

Với hoàn mật ong có thể cắt thành lát mỏng và lấy một lượng mẫu thích hợp hoặc lấy một lượng cân nhỏ sau khi loại bỏ mật ong và nước để làm tiêu bản.

Đo tế bào và các thành phần của tế bào

Để đo kích thước tế bào và các thành phần của tế bào dưới kính hiển vi, có thể dùng trắc vi thị kính. Trước hết, lắp trắc vi thị kính vào thị kính, sau đó định cỡ bằng bàn soi trắc vi kế. Để định cỡ, xoay thị kính và di chuyển bàn soi để cho các vạch trên 2 thang chia độ song song với những vạch "0" bên trái của chúng trùng nhau, sau đó tìm những vạch khác ở bên phải. Giá trị (μm) của một vạch trắc vi thị kính có thể được tính toán trên cơ sở những vạch chia của 2 thang chia độ giữa những dòng trùng nhau. Để đo mẫu, đem nhân số vạch đo được của trắc vi thị kính với giá trị (μm) của mỗi vạch. Nói chung, phép đo được thực hiện dưới một vật kính có độ phóng đại lớn, tuy nhiên, để đo những kích thước lớn hơn của sợi, lông v.v... thì nên dùng vật kính có độ phóng đại nhỏ. Ghi lại các giá trị cực đại và cực tiểu (μm). Cho phép có một vài giá trị cao hơn hay thấp hơn chút ít so với yêu cầu quy định trong chuyên luận được điển.

Phát hiện màng tế bào

Màng tế bào hóa gỗ: Thêm 1 giọt đến 2 giọt thuốc thử phloroglucinol (TT), để yên một lúc, thêm 1 giọt acid hydrochloric (TT), vùng hóa gỗ xuất hiện màu đỏ tía.

Màng tế bào hóa bản hay hóa cutin: Thêm thuốc thử Sudan III (TT), để yên một lúc hay làm ấm nhẹ, xuất hiện màu đỏ cam hay màu đỏ.

Màng cellulose: Thêm thuốc thử kẽm clorid-iod, hoặc lúc đầu thêm dung dịch iod 1 % (TT) để làm ấm, để yên 1 min rồi thêm dung dịch acid sulfuric [33 ml acid sulfuric (TT) pha với nước cất vừa đủ 50 ml], sẽ xuất hiện màu xanh lam hay xanh tím.

Màng tế bào silic: Không có sự thay đổi gì khi thêm acid sulfuric (TT).

Phát hiện các thành phần của tế bào

Tinh bột: Thêm dung dịch iod (TT), sẽ xuất hiện màu xanh lam hay xanh tím.

Đặt mẫu trong dung dịch glycerin-acid acetic, quan sát dưới kính hiển vi phân cực thấy hiện tượng phân cực chéo của các hạt tinh bột, hiện tượng này mất đi ở những hạt tinh bột bị hóa hồ.

Hạt aleuron: Thêm dung dịch iod (TT), sẽ xuất hiện màu nâu hay màu vàng nâu.

Thêm dung dịch thủy ngân (II) nitrat (TT), xuất hiện màu đỏ gạch. Nếu dược liệu có dầu béo, phải loại dầu béo bằng ether (TT) hay ether dầu hòa (TT) trước khi thử.

Dầu béo, tinh dầu hay nhựa:

Thêm dung dịch Sudan III (TT), sẽ xuất hiện màu đỏ da cam, màu đỏ hoặc đỏ tía.

Trong ethanol 90 % (TT), dầu béo không hòa tan (trừ dầu thầu dầu và dầu bông), trong khi đó tinh dầu thì hòa tan được.

Inulin: Thêm dung dịch 1-naphthol 10 % trong ethanol (TT), sau đó thêm acid sulfuric (TT), các tinh thể inulin chuyển sang màu đỏ tía và hòa tan nhanh.

Tinh thể calci oxalat:

Không hòa tan trong dung dịch acid acetic loãng (TT), tan trong dung dịch acid hydrochloric loãng (TT), không sủi bọt.

Hòa tan chậm trong dung dịch acid sulfuric 50 % (TT), nhưng sau khi để yên một lúc thì tách ra những tinh thể calci sulfat.

Calci carbonat: Hòa tan trong dung dịch acid hydrochloric loãng (TT) và có sủi bọt.

Silic: Không hòa tan trong acid sulfuric (TT).

Các thuốc thử dùng cho phân tích vi thể

Dung dịch sắt (III) clorid: Hòa tan 1 g sắt (III) clorid (TT) trong nước và thêm nước vừa đủ 100 ml.

Thuốc thử cloral hydrat: Hòa tan 50 g cloral hydrat (TT) trong 15 ml nước và 10 ml glycerin (TT).

Dung dịch glycerin - acid acetic: Hòa lẫn các thể tích bằng nhau của glycerin (TT), acid acetic băng (TT) và nước.

Dung dịch Sudan III: Hòa tan 0,01 g Sudan III (TT) trong 5 ml ethanol 90 % (TT), thêm 5 ml glycerin (TT), lắc kỹ. Bảo quản trong lọ thủy tinh màu nâu và sử dụng trong thời gian 2 tháng.

Dung dịch đỏ rutheni: Cho một lượng vừa đủ đỏ rutheni (TT) vào 1 ml đến 2 ml dung dịch natri acetat 10 % (TT) để tạo thành màu đỏ vang. Dung dịch chỉ pha khi dùng.

Dung dịch phloroglucinol: Hòa tan 1 g phloroglucinol (TT) trong 100 ml ethanol 90 % (TT), lọc. Bảo quản trong lọ thủy tinh màu nâu, tránh ánh nắng.

Thuốc thử acid cromic - nitric:

Hòa tan 10 ml acid nitric (TT) trong 100 ml nước.

Hòa tan 10 g acid cromic (TT) trong 100 ml nước. Trộn lẫn các thể tích bằng nhau của 2 dung dịch trên trước khi dùng.

Fuchsin-glycerin-gelatin: Lấy 1,0 g gelatin (TT), thêm 6 ml nước, ngâm. Thêm 7 ml glycerin (TT), đun nóng và khuấy nhẹ để được hỗn hợp đồng nhất. Lọc qua gạc vào một hộp lồng, thêm một lượng vừa đủ fuchsin base [lấy 0,1 g fuchsin base (TT), thêm 600 ml ethanol (TT) và 80 ml dầu long não để hòa tan], trộn đều và để cho rắn lại.

Dung dịch 1 - naphthol: Lấy 10,5 ml dung dịch 1 - naphthol 15 % trong ethanol (TT), thêm chậm 6,5 ml acid sulfuric (TT), trộn đều, thêm 40,5 ml ethanol (TT) và 4 ml nước. Trộn đều.

Dung dịch thủy ngân (II) nitrat: Lấy 4,5 g thủy ngân (TT), thêm 3 ml acid nitric bốc khói (TT), trộn đều. Bảo quản trong lọ thủy tinh màu nâu, tránh ánh sáng.

Dung dịch kẽm clorid - iod: Lấy 8 g kali iodid (TT), thêm 8,5 ml nước để hòa tan. Sau đó thêm 2,5 g kẽm clorid khan (TT), hòa tan rồi thêm iod (TT) cho đến bão hòa. Bảo quản trong lọ thủy tinh màu nâu có nút mài.

Dung dịch lục iod: Hòa tan 0,3 g lục iod (TT) trong 100 ml nước, thêm 10 ml ethanol 90 % (TT), trộn đều.

Dung dịch carmin 40: Hòa tan 1 g carmin 40 (TT), 5 g kali sulfat (TT) và 0,5 g phenol (TT) trong 100 ml nước.