

Tap chí Dược liệu, tập 9, số 3/2004 (trang 69-72)

TỔNG HỢP BA DẪN XUẤT NITƠ VÀ THỬ HOẠT TÍNH ĐỘC TẾ BÀO CỦA MỘT SỐ DẪN XUẤT CỦA 4',5,6-TRIHIDROXY-3,3',7-TRIMETHOXYFLAVON, PHÂN LẬP TỪ CÂY MILIUSA BALANSAE

Đỗ Thị Thu Hương, Nguyễn Quảng An, Trần Văn Sung - Viện Hóa học
 Lê Mai Hương - Viện Hóa học các hợp chất thiên nhiên
 (Nhận bài ngày 14 tháng 1 năm 2004)

Summary

Synthesis of Three Nitrogen Derivatives and Cytotoxicity of Some Derivatives of 4',5,6-trihydroxy-3,3',7-trimethoxyflavone Isolated from *Miliusa balansae*

Three nitrogen compounds have been successfully synthesized from 4',5,6-trihydroxy 3,3',7-methoxyflavone (chryso splenol C) isolated from *Miliusa balansae* Fin. & Gagnep. Together with other 10 derivatives of chryso splenol C prepared according to literature, these thirteen compounds have been tested for cytotoxic activity against Hep-G2 (Hepatoma-G2). Four of them showed moderate activity ($IC_{50} < 5 \mu g/ml$).

Key words: *Miliusa balansae*, Chryso splenol C, Derivatives, Synthesis, Cytotoxicity

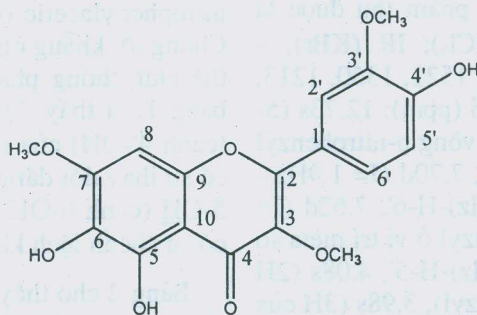
I. Đặt vấn đề

Trong quá trình nghiên cứu theo hướng chuyển hóa hợp chất có hoạt tính sinh học được phân lập từ thực vật, chúng tôi đã tiếp tục tổng hợp và thử hoạt tính độc tế bào đối với dòng tế bào Hep-G2 (tế bào ung thư gan người) của các dẫn xuất của 4',5,6-trihydroxy-3,3',7-trimethoxyflavon (chryso splenol C) được phân lập từ cây *Miliusa balansae* thuộc họ Na (Annonaceae) [1, 2,3].

II. Phần thực nghiệm

Thiết bị hoá chất: Các sản phẩm phản ứng được tinh chế bằng sắc ký cột silica gel (230-400 Mesh). Phổ hồng ngoại (FTIR) được đo trên máy NICOLET-IMPACT 410 dưới dạng viên nén KBr. Phổ cộng hưởng từ hạt nhân được đo trên máy Bruker AVANCE 500 MHz trong dung môi $CDCl_3$ ở Viện Hóa học.

Tổng hợp các dẫn xuất của 4',5,6-trihydroxy-3,3',7- trimethoxyflavon:



4',5,6-trihydroxy-3,3',7- trimethoxyflavon (chryso splenol C)

a. Tổng hợp 4',6-dimethylcarbamy-5-hydroxy-3,3',7-trimethoxyflavon (12): 36mg chryso splenol C được hoà tan trong 0.7 ml pyridin. Dung dịch được cho thêm 0.15mg dimethyl carbamy- clorur. Phản ứng khuấy ở nhiệt độ thường trong 24h. Sau

đó, dung dịch sản phẩm được hoà tan trong ethyl acetat (EA) và rửa bằng nước cất. Kết tinh sản phẩm trong EA-hexan, lọc hút và rửa bằng nước cất. $D_{nc} = 231-232^{\circ}C$ (trong $CHCl_3$); IR (KBr), ν (cm^{-1}): 3436, 2930, 1724, 1669, 1601, 1403, 1362,

1160, 1028, 832; $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3), δ (ppm): 12.60 (1H, s, 5-OH), 7.75 d ($J= 1.9\text{Hz}$)-H-2', 7.66 dd ($J= 8.4$ và 1.9Hz)- H-6', 7.23 d ($J= 8.4\text{Hz}$)-H-5', 6.53 (1H, s) 3.93 (3H, s), 3.92 (3H, s), 3.85 (3H, s), 3.18 (3H, s), 3.15 (3H, s), 3.04 (6H, s).

b. Tổng hợp 4',5,6-tri-o-nitrophenyl acetat-3,3',7-trimethoxyflavon (13): 18mg chryso splenol C được hoà tan trong 20ml THF (tetrahydrofuran). Dung dịch được cho thêm 72,4mg acid o-nitrobenzyl, 4,9mg DMAP (dimethyl amino pyridin) và 45.3mg DCC (1,3-diclohexylcarbodimid). Quá trình phản ứng được khuấy ở nhiệt độ thường trong 6h. Dung dịch sau phản ứng được hoà thêm EA và rửa nhiều lần bằng nước cất. Tinh chế sản phẩm qua cột silica gel với dung môi rửa giải là EA và hexan tỷ lệ: 15% - 50% EA/hexan, thu được sản phẩm 7mg. Đnc: 133-135°C (trong CHCl_3); IR (KBr), ν (cm^{-1}): 3412, 2941, 1760, 1708, 1607, 1523, 1348, 1260, 1140, 790, 711; $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3), δ (ppm): 7.47 - 8.19 (12H của ba vòng o-nitrobenzyl và 1H của H-2'), 7.37 dd ($J= 8.4$ và 0.8Hz)-H-6', 7.22 d ($J= 8.4\text{Hz}$)-H-5', 6.50 s H-8, 4.40 s (2H của nhóm CH_2 trong vòng o-nitrobenzyl), 4.35 (2H của nhóm CH_2 trong vòng o-nitrobenzyl), 4.07 s (2H của nhóm CH_2 trong vòng o-nitrobenzyl), 3.98 s (3H của nhóm OCH_3), 3.93 s (3H của nhóm OCH_3), 3.84 s (3H của nhóm OCH_3).

c. Tổng hợp 4',5-dihydroxy-6-p-nitrophenyl acetat-3,3',7-trimethoxyflavon (14): 18mg chryso splenol C được hoà tan trong 20ml THF. Dung dịch được cho thêm 54.3mg acid o-nitrobenzyl, 4.9mg DMAP và 45.3mg DCC. Quá trình phản ứng được khuấy ở nhiệt độ thường trong 23h. Dung dịch sau phản ứng được hoà thêm EA và rửa nhiều lần bằng nước cất. Tinh chế sản phẩm được tiến hành tiếp theo giống phản ứng b và sản phẩm thu được là 5mg. Đnc: 78-80°C (trong CHCl_3); IR (KBr), ν (cm^{-1}): 3430, 2925, 1755, 1604, 1521, 1350, 1213, 1127, 814; $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3), δ (ppm): 12.73s (5-OH), 8.24d ($J= 8.7\text{Hz}$) (2H của vòng p-nitrobenzyl ở vị trí orto so với nhóm NO_2), 7.70d ($J= 1.9\text{Hz}$)-H-2, 7.65dd ($J= 8.5\text{Hz}$ và 2.0Hz)-H-6', 7.62d ($J= 8.6\text{Hz}$) (2H của vòng p-nitrobenzyl ở vị trí meta so với nhóm NO_2), 7.04d ($J= 8.5\text{Hz}$)-H-5', 4.08s (2H của nhóm CH_2 vòng p-nitrobenzyl), 3.98s (3H của một nhóm OCH_3), 3.87s (3H của một nhóm OCH_3), 3.85s (3H của một nhóm OCH_3).

Thử hoạt tính độc tế bào Hep-G2: 10 dẫn xuất khác của chryso splenol C đã được tổng hợp theo tài liệu [3] cùng với 3 dẫn xuất chứa nitơ ở trên và

chryso splenol C đã được thử hoạt tính độc tế bào đối với dòng tế bào ung thư gan người (Hep-G2).

Các giá trị IC_{50} kháng tế bào Hep-G2 của các dẫn xuất được trình bày ở bảng 2. Quá trình thử hoạt tính được tiến hành theo tài liệu [4].

III. Thảo luận kết quả

Ở bảng 1, độ chuyển dịch hoá học của H-5' của chất 12 và 13 có sự thay đổi đáng kể (0.23ppm và 0.21ppm). Điều này được lý giải là nhóm OH bên cạnh ở vị trí C-4' đã bị thay thế bởi nhóm este của tác nhân acid tương ứng. Độ chuyển dịch hoá học của các dẫn xuất của H ở C-2 và C-6' không thay đổi nhiều (trừ H-6' của 13 là -0.29 ppm). Phổ $^1\text{H-NMR}$ và IR của các dẫn xuất có các tín hiệu phù hợp với cấu trúc của chúng.

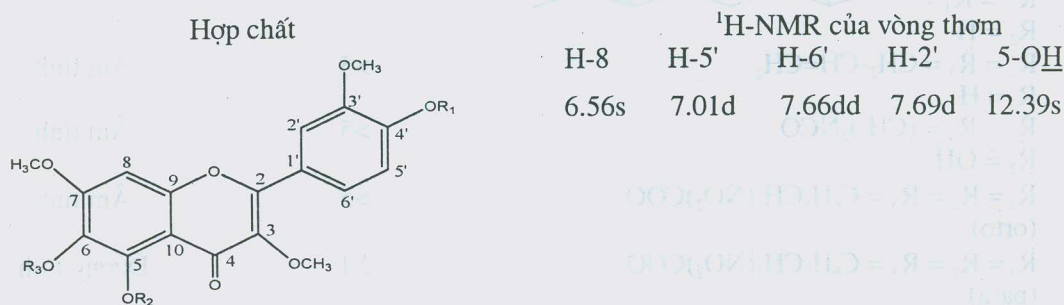
Trong phổ $^1\text{H-NMR}$ của sản phẩm 12 vẫn xuất hiện H của nhóm 5-OH ở vị trí 12.60 s, xuất hiện bốn nhóm CH_3 của nhóm $(\text{CH}_3)_2\text{NCO-}$ ở độ chuyển dịch hoá học là 3.18 (3H, s), 3.15 (3H, s), 3.04 (6H, s) khẳng định sự thế của hai nhóm dimethyl carbamyl vào 2 nhóm OH ở vị trí 4' và 6' của khung flavon.

Nhìn vào phổ $^1\text{H-NMR}$ của sản phẩm 13, ta thấy 3 nhóm OH của chryso splenol C đã bị thế để tạo ra dẫn xuất este hoá. Xuất hiện 12H của 3 vòng acid o-nitro phenylacetic ở vùng 7.47 đến 8.19 ppm. Đồng thời quan sát thấy cả 3 nhóm CH_2 nối với 3 vòng này ở 4.40, 4.35 và 4.07ppm.

Trong phổ $^1\text{H-NMR}$ của sản phẩm 14, chỉ thấy xuất hiện 4H của 1 vòng acid p-nitrophenylacetic : ở 8.24 ppm, d ($J= 8.7\text{Hz}$, 2H của vòng acid p-nitrophenylacetic ở vị trí orto so với nhóm NO_2) và 7.62 ppm, d ($J= 8.6\text{Hz}$, 2H của vòng acid p-nitrophenylacetic ở vị trí meta so với nhóm NO_2). Chúng tôi khẳng định nhóm OH ở vị trí C-6 bị thay thế chứ không phải ở vị trí C-4' vì khi nhìn vào bảng 1, ta thấy độ chuyển dịch hoá học của H-5' (cạnh 4'-OH) của chất đầu và sản phẩm 14 không có sự thay đổi đáng kể (0.03ppm), mặt khác H của 5-OH (cạnh 6-OH) giữa chất đầu và sản phẩm 14 có sự chênh lệch khá lớn (0.34ppm).

Bảng 2 cho thấy các chất 2, 3, 4, 6 và 14 có tác dụng dương tính đối với dòng tế bào ung thư gan người với IC_{50} ($\mu\text{g}/\text{ml}$) tương ứng là 1.9; 2.5; 4.1; 3.7 và 2.1ppm. Tuy nhiên, các dẫn xuất chuyển hoá có hoạt tính không mạnh bằng chryso splenol C ban đầu.

Bảng 1. Độ chuyển dịch hoá học của các H ở vòng thơm flavon của **12,13,14**



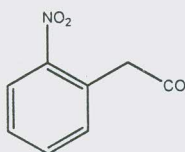
R₁ = R₂ = R₃ = H

12: R₁ = R₃ = (CH₃)₂NCO; R₂ = H

6.53s	7.23d	7.66dd	7.75d	12.60s
-------	-------	--------	-------	--------

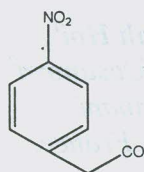
13: R₁ = R₂ = R₃ = C₆H₅(NO₂)CH₂COO
(orto)

6.50s	7.22d	7.37dd	-	-
-------	-------	--------	---	---



14: R₁ = R₂ = R₃ = C₆H₅(NO₂)CH₂COO
(para) =

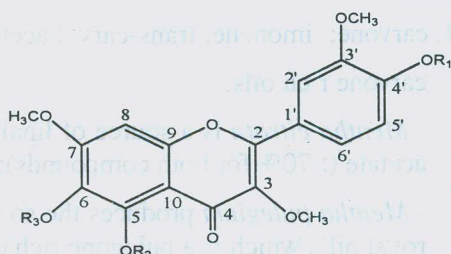
6.51s	7.04d	7.65dd	7.70d	12.73s
-------	-------	--------	-------	--------



R₁ = R₂ = H

Bảng 2. Hoạt tính kháng tế bào Hep- G2 của các dẫn xuất tổng hợp

STT	Hợp chất	IC ₅₀ (µg/ml)	Kết luận
1	Chrysofenol C	0,4	Dương tính



R₁ = R₂ = R₃ = H

2 R₁ = R₂ = R₃ = COCH₃ 1.9 Dương tính

3 R₁ = R₂ = R₃ = CO(CH₂)₂CH₃ 2.5 Dương tính

4 R₁ = R₂ = R₃ = CO(CH₂)₃CH₃ 4.1 Dương tính


5 R₁ = R₂ = R₃ = CO(CH₂)₄CH₃ >5 Âm tính

6 R₁ = R₂ = R₃ = COC₆H₅ 3.7 Dương tính

7 R₁ = R₂ = R₃ = C₆H₅OCO >5 Âm tính

8 R₁ = R₂ = R₃ = CH₃ >5 Âm tính

9 R₁ = R₂ = R₃ = CH₂C₆H₅ >5 Âm tính

10	$R_1 = R_3 =$  $R_2 = H$	>5	Âm tính
11	$R_1 = R_3 = CH_2-CH=CH_2$ $R_2 = H$	>5	Âm tính
12	$R_1 = R_3 = (CH_3)_2NCO$ $R_2 = OH$	>5	Âm tính
13	$R_1 = R_2 = R_3 = C_6H_5CH_2(NO_2)COO$ (orto)	>5	Âm tính
14	$R_1 = R_2 = R_3 = C_6H_5CH_2(NO_2)COO$ (para)	2.1	Dương tính

Tài liệu tham khảo

1). Do Thi Thu Huong, Christine Kamperdick, Tran Van Sung. *Journal of Natural Products* (in press); 2). Đỗ Thị Thu Hương, Trần Văn Sung, Nguyễn Hải Nam, Ahn Byung Zun. Tóm tắt công trình khoa học Viện Hóa học-2001, trang 239-243; 3). Đỗ Thị Thu Hương, Trần Văn Sung, Nguyễn Hải Nam, Ahn Byung Zun. *Tạp chí Hoá học* (đã nhận đăng); 4). Likhitwitayawuid K. et al., 1993, *J. Nat. Prod.*, **56**, 30.

Tạp chí Dược liệu, tập 9, số 3/2004 (trang 72-75)

CHEMICAL COMPOSITION OF “HUNG LANG” ESSENTIAL OIL CULTIVATED IN HANOI - VIETNAM

Nguyen Thi Phuong Thao¹, Tran Minh Hoi¹,
Alain Muselli², Ange Bighelli² and Joseph Casanova²

¹Institute of Ecology and Biological Resources (IEBR), Hanoi, Vietnam.

²Université de Corse, Equipe Chimie et Biomasse, 20000 Ajaccio, France.

(Nhận bài ngày 5 tháng 8 năm 2003)

Summary

“Hung Lang”, a form of *Mentha* usually cultivated in Lang area and other suburbs of Hanoi. It produced by hydrodistillation an essential oil which contained carvone (31.0%), limonene (29.5%) and trans-carvyl acetate (20.4%) as major components.

Key words: “Hung Lang” essential oil; ¹³C-NMR, carvone; limonene; trans-carvyl acetate.

Introduction

Mint oils are among the most important essential oils produced in the world and their value is estimated at a little bit less than 200 million USD per year. Several species are cultivated for essential oil production (1) as follows:

- *Mentha arvensis* var. *piperascens* produces “cornmint oil”, the most important source of (-) menthol (>70% of the whole oil).

-*Mentha piperita* var. *vulgaris* produces “peppermint oil” consisting of menthol, menthone and menthyl acetate as main components.

- *Mentha spicata* (native spearmint) and *Mentha cardiaca* (scotch spearmint) produces mostly

carvone rich oils.

- *Mentha citrata* is a source of linalool and linalyl acetate (>70% for both compounds);

- *Mentha pulegium* produces the so called “Penny-royal oil”, which is a pulegone rich oil (80%).

Besides the mint oils mentioned above, several essential oils produced by other *Mentha* species or subspecies have been investigated and exhibited different compositions. Some of them have been reviewed by Lawrence (2).

In Vietnam, the so called “Hung Lang” is a type of mint originating in Lang area in Hanoi and has been cultivated around the city since a long time. This is the most favorite spice among some

raw edible mints in Vietnam. It is a stoloniferous herb, with 20-60 cm long, square, light violet stems; leaves 3-4 pairs, ovate to sub-round, 2-5 x 1-3 cm in size, top acute to obtuse, basis rounded or cordate, margins serrulate, smooth on both surfaces; petiole 3-8 mm long; inflorescence apical, nearly spherical; corolla pink. Because of permanent cutting, "Hung Lang" is rarely found in full flowering stage.

According to Dr Vu Xuan Phuong - a botanical expert, "Hung Lang" belongs to the *Mentha aquatica* L. species (3).

The present work aims at the characterization of its essential oil. To the best of our knowledge, the composition of this essential oil is reported for the first time.

Materials and methods

Plant and essential oil production:

Fresh plant material without flowers of "Hung Lang" was bought in Lang area in Hanoi. Essential oil was obtained by hydrodistillation with a Clevenger type apparatus (distillation time = 2 hours, yield: 0.07% w/w).

GC, GC/MS and ¹³C-NMR analysis

Samples of the oil were analyzed by GC, using a Perkin-Elmer Autosystem apparatus equipped with FID and fused capillary columns (50 m x 0.22 mm; film thickness 0.25 µm), BP-1 (polydimethyl siloxane) and BP-20 (polyethylene glycol). The oven temperature was programmed from 60°C to 220°C at 2°C/min and then held constant at 220°C for 20 min; injector temperature: 250°C; detector temperature: 250°C; carrier gas: helium (20 psi); mode split 1/60.

GC/MS was carried out with a Perkin Elmer Turbo mass detector, directly coupled to a Perkin Elmer Autosystem XL equipped with a fused-silica capillary column, BP-1 (polydimethylsiloxane, 50 m x 0.22 mm i.d., film thickness 0.25 µm). Ion source temperature: 150°C; energy ionization: 70 eV; electron ionization mass spectra were acquired over the mass range of 35-350 Da. Split: 1/80. Other GC conditions were the same as described under GC.

¹³C-NMR spectrum was recorded on a Bruker AC 200 Fourier Transform spectrometer operating at 50.323 MHz equipped with a 5mm probe, in deuterated chloroform, with all shifts referred to internal tetramethylsilane (TMS). The

spectra were recorded with the following parameters: pulse width (PW): 3.0 µs (flip angle 45°); acquisition time: 1.3 s for 32K data table with a spectral width (SW) of 12 500 Hz (250 ppm); CPD mode decoupling; digital resolution: 0.763 Hz/pt. The number of accumulated scans was 5000 for a sample of 70mg of essential oil in 0.5 ml CDCl₃. An exponential multiplication of the free induction decay with the line broadening of 1.0 Hz was applied before Fourier transformation.

Identification of components

Identification of the individual components was based i) on comparison of their GC retention indices (RI) on apolar and polar columns, determined relatively to the retention time of a series of *n*-alkanes with linear interpolation, with those of authentic compounds, ii) on computer matching with mass spectral libraries (4,5) and comparison with spectra of authentic samples or literature data (6,7); iii) on comparison of the chemical shifts of the carbons in the ¹³C-NMR spectrum of the mixture with those of the reference spectra compiled in our spectral library with the help of a laboratory produced software (8). This technique allows the identification of individual components to a content of 0.5-1% without any previous purification.

Results and Discussion

"Hung Lang" oil was rich in monoterpenes (table 1) characterized by the pre-eminence of carvone (31.4%), limonene (29.5%) and trans-carvyl acetate (20.4%). Among other menthane derivatives, cis-carveol (3.6%) and dihydrocarvyl acetate (3.4%) were present at appreciable contents while trans-carveol and dihydrocarveol accounted for 0.9 and 0.6%, respectively.

The oil also contained lavandulol and its acetate (0.7 and 0.8%, respectively) bearing an irregular monoterpene skeleton as well as 3-octanol and its acetate (0.4 and 0.5% respectively) which are acyclic, non terpenic compounds. Sesquiterpene hydrocarbons were represented by isolongifolene (0.7%), (*E*)-caryophyllene (1.1%) and germacrene D (0.3%) while two oxygenated sesquiterpenes, caryo-phyllene oxide (0.3%) and spathulenol (0.2%) were identified.

With respect to the literature data, the composition of "Hung Lang" essential oil differed from those of other *M. aquatica* oils. Indeed, most

of the reported compositions were dominated by menthofuran: 83-35% (9-16). In some other oils, menthofuran is present at appreciable contents accompanied with other main components such as cineole (14), elemol or viridiflorol (15). However, other monoterpenes were reported as major components of *M. aquatica* oils: menthol and neomenthol, menthyl and neomenthyl acetates, menthone (15, 17) and linalyl acetate (15). Finally, a few compositions were dominated by sesquiterpenes such as elemol, viridiflorol (15,17).

Conversely, the composition of the investigated sample of "Hung Lang" oil is rather close to that of *Mentha spicata* oil (native spearmint) whose main components are carvone and limonene (18,19). It should be noted, however, that the content of carvone in spearmint oil is usually higher (68-39%) than that of our sample while a

Few samples belonged to the carvone-limonene type.

An interesting point is the high content, in "Hung Lang" oil, of trans-carvyl acetate (20.4%). Such a high level has not been reported yet, although trans-carvyl acetate was reported as minor component of *M. spicata* oil: 5.9% in one sample from Italy (19) and 0.1% in an oil of Greek origin (20). It should be pointed out that cis- and trans-carvyl acetates have been identified in *M. spicata* var. *crispata* oil from Japan and the authors claimed that the former is responsible for the specific aroma of the Japanese oil (18).

Further work is needed to confirm the carvone/limonene/trans-carvyl acetate composition of the "Hung Lang" oil from Vietnam or to evidence an eventual chemical variability.

Table 1: Components of "Hung Lang" essential oil from Hanoi-Vietnam

Compounds	RIa	RIp	%	Identification mode
α -Pinene	930	1022	0.5	RI, MS, $^{13}\text{C-NMR}$
Sabinene	964	1119	0.3	RI, MS
β -Pinene	970	1108	0.6	RI, MS, $^{13}\text{C-NMR}$
3-Octanol	979	1387	0.4	RI, MS, $^{13}\text{C-NMR}$
Myrcene	980	1158	0.5	RI, MS, $^{13}\text{C-NMR}$
Limonene	1020	1199	29.5*	RI, MS, $^{13}\text{C-NMR}$
1,8-Cineole	1020	1208	0.1*	RI, MS
Linalool	1080	1538	0.2	RI, MS
trans-para-Mentha-2,8-dien-1-ol	1105	1623	0.1	RI, MS
3-Octyl acetate	1108		0.5	RI, MS
cis-Limonene oxide	1118	1455	0.1	RI, MS
trans-Limonene oxide	1122	1442	0.1	RI, MS
Lavandulol	1150	1672	0.7	RI, MS
Menthol	1158	1641	0.1	RI, MS
α -Terpineol	1170	1689	0.2	RI, MS
Dihydrocarveol	1177	1745	0.6	RI, $^{13}\text{C-NMR}$
trans-Carveol	1199	1830	0.9	RI, MS, $^{13}\text{C-NMR}$
cis-Carveol	1214	1862	3.6	RI, MS, $^{13}\text{C-NMR}$
Carvone	1220	1733	31.0	RI, MS, $^{13}\text{C-NMR}$
Lavandulil acetate	1272	1591	0.8	RI, MS, $^{13}\text{C-NMR}$
Dihydrocarvyl acetate	1311	1665	3.3	RI, $^{13}\text{C-NMR}$
trans-Carvyl acetate	1346	1767	20.4	RI, MS, $^{13}\text{C-NMR}$
Isolongifolene	1382	1513	0.7	RI, $^{13}\text{C-NMR}$
(E)- β -Caryophyllene	1415	1588	1.1	RI, MS

Germacrene D	1475	1697	0.3	RI, MS
Spathulenol	1562	2121	0.2	RI, MS
Caryophyllene oxide	1580	1982	0.3	RI, MS
Total			97.1	

RIa and RIp: Retherntion indices on apolar and polar columns, respectively. Order of elution and percentages are given on the apolar column, except those with an asterisk (polar column).

References

- 1). Bauer K., Garbe D., Surburg H., Common Fragrance and Flavor Materials, VCH, Weiheim, 1990; 2). Lawrence M.B., 1992-1994, pp 212,213, Allured Publishing Corporation, Carol Stream, 1995; 3). Vu Xuan Phuong, "Mentha aquatica L."- Hung Lang, Flora of Vietnam, vol. 2, Ho Bac ha - Lamiaceae Lindl., Science & Techniques Publishing House, Hanoi, 2000; 4). National Institute of Standards and Technology. PC Version 1.7 of The NIST/EPA/NIH Mass Spectral Library. Perkin Elmer Corporation, 1999; 5). McLafferty FW, Stauffer DB., Wiley Registry of Mass Spectral Data, 6th ed. Mass Spectrometry Library Search System Bench-Top/PBM, version 3.10d. Palisade: Newfield, 1994; 6). Adams R.P., Identification of Essential Oil Components by Gas Chromatography/Mass Spectroscopy. Allured Publishing Corporation: Carol Stream, Illinois, 1995; 7). Joulain D, Kùmig WA., The Atlas of Spectral Data of Sesquyterpene Hydrocarbons. E. B.-Verlag: Hamburg, 1998; 8). Tomi F., Bradesi P., Bighelli A., Casanova J., *J. Magn. Reson. Anal.*, 1995, **1**, 25-34; 9). Murray M.J., Lincoln D.E., *Euphytica*, 1972, **21**, 337-343; 10). Hefendehl F.W., Murray M.J., *Phytochemistry*, 1972, **11**, 189-195; 11). Malingrø T.M., Maarse H., *Phytochemistry*, 1974, **13**, 1531-1535; 12). Lincoln D.E., Murray M.J., Lawrence B.M., *Phytochemistry*, 1986, **25**, 1857-1863; 13). Sacco T., Maffei M., *Mentha aquatica* var. *hypeuria* Briq., A Selection Particularli Rich in Menthofuran, 10th International Congress of Essential Oils, Fragrances and Flavors, Washington, DC, USA, 16-20 November 1986, Proceedings, Lawrence B.M., Mookherjee B.D., Willis B.J., Editors, Elsevier Science Publishers, Amsterdam, 1988, 141-145; 14). Spinelli G., Bertoli A., Flamini G., Cioni P.L., Tomei P.E., *J. Essent. Oil Res.*, 1997, **9**, 455-457; 15). Baser K.H.C., Kÿrköyoglu M., Tarimcilar G., Kaynak G., *J. Essent. Oil Res.*, 1999, **11**, 579-588; 16). Roberts D., Plotto A., *Perfumer and Flavorist*, 2002, **27**, 24-29; 17). Miyazawa M., Watanabe H., Umemoto K., Kameoka H., *J. Agric. Food Chem.*, 1998, **46**, 3431-3434; 18). Lawrence M.B., "Spearmint oil" in Essential Oils, 1976-1978, p. 20, Allured Publishing Corporation, Wheaton, 1979; 19). Lawrence M.B., "Native Spearmint oil" in Essential Oils, 1992-1994, p. 76, Allured Publishing Corporation, Carol Stream, 1995; 20). Karousou R., *Phytochemistry*, 1998, **49**, 2273-2277.

Tap chí Dược liệu, tập 9, số 3/2004 (trang 75-78)

NGHIÊN CỨU THÀNH PHẦN HOÁ HỌC CỦA PHƯƠNG THUỐC NHỊ TRẦN THANG GIA GIẢM

Phạm Xuân Sinh*, Nguyễn Mạnh Tuyển*, Trần Thị Oanh**

*Trường Đại học Dược Hà Nội; **Bộ Y tế

(Nhận bài ngày 25 tháng 3 năm 2004)

Summary

Chemical Composition of Variable Nhị trần thang Remedy

The "Nhị trần thang", a traditional prescription, has been modified by both selecting herbal items from the basic composition and adding new ones available in Viet nam to fomulate new remedies. This report shows the result of the study on main chemical components (alkaloids, flavonoids, saponins, etc.) of the modified remedies.

Key words: Nhị trần thang, Chemical Composition.

1. Đặt vấn đề

Hen suyễn là một bệnh phổ biến ở Việt Nam và nhiều nước trên thế giới. Nó làm giảm khả năng

lao động và chất lượng cuộc sống. Hiện nay, có nhiều thuốc tân dược được dùng để phòng và điều trị hen suyễn. Song các thuốc này thường phải sử

dụng lâu dài và có nhiều tác dụng phụ [5]. Từ xa xưa, ông cha ta đã biết dùng thảo dược để dự phòng và cắt cơn hen. Ngoài các vị thuốc riêng lẻ, y học cổ truyền có nhiều phương thuốc điều trị hen suyễn rất tốt. Phương thuốc Nhị trần thang kinh điển (NTTKĐ) gồm 4 vị là bán hạ (*Radix Typhonii trilobati*), trần bì (*Pericarpium Citri reticulatae*), bạch linh (*Poria cocos*), cam thảo (*Radix Glycyrrhizae glabrae*), có công năng ôn hoá hàn đàm, được dùng trong trường hợp đờm thấp, ho nhiều đờm mà sinh nôn, tức ngực, hoa mắt, hồi hộp [2; 3; 6]. Phương thuốc NTKĐ đã được gia giảm thành nhiều phương khác nhau gọi là các phương thuốc nhị trần thang gia giảm (NTTGG) tương ứng với mục đích trị bệnh khác nhau. Tuy nhiên, các phương thuốc NTTGG trước đây đều lấy tác dụng giảm ho, long đờm là chính, chưa chú trọng đến tác dụng giãn phế quản. Trong khi giữa ho, hen, đờm có mối quan hệ mật thiết. Nhằm tăng tác dụng bình suyễn (giãn phế quản), chống ho, long đờm, chúng tôi đã tiến hành gia giảm phương

thuốc NTKĐ bằng một số vị sẵn có ở Việt Nam được sử dụng trong dân gian trị hen suyễn như cà độc dược (*Folium Daturae metel*), lá hen (*Folium Calotropis giganteae*), cóc mằn (*Herba Centipediae miniae*), tang bạch bì (*Cortex Mori radices*) [2; 3] để xây dựng một số phương thuốc mới và tiến hành định tính, định lượng một số thành phần hoá học chính trong các vị thuốc, phương thuốc đó.

2. Nguyên liệu và phương pháp nghiên cứu

2.1. Nguyên liệu:

- Các vị thuốc: Cà độc dược, lá hen, cóc mằn, tang bạch bì, trần bì, cam thảo, bán hạ được chế biến theo phương pháp cổ truyền [1; 2; 7].
- Phương thuốc NTKĐ và 2 phương thuốc được gia giảm là NTTGG_{CA} và NTTGG_{LH}.
- Các hoá chất đạt tiêu chuẩn do Phòng Giáo tài, Trường Đại học Dược Hà Nội cung cấp.

Công thức 1: NTKĐ	Công thức 2: NTTGG _{CA}	Công thức 3: NTTGG _{LH}
Phương thuốc NTT kinh điển	Phương thuốc NTT gia giảm CA	Phương thuốc NTT gia giảm LH
Bán hạ (BH)	Bán hạ	Bán hạ
Bạch linh	Cà độc dược (CA)	Lá hen (LH)
Trần bì (TB)	Trần bì	Trần bì
Cam thảo (CT)	Cóc mằn (CM)	Cóc mằn
	Cam thảo	Cam thảo
	Tang bạch bì (TBB)	Tang bạch bì

2.2. Phương pháp nghiên cứu:

- Sử dụng các phản ứng định tính trong ống nghiệm và sắc ký lớp mỏng (SKLM) để định tính một số thành phần hoá học như alcaloid, flavonoid, saponin, glycosid trong các phương thuốc NTTGG và trong từng vị thuốc theo các tài liệu kinh điển [4].

- Định lượng alcaloid, flavonoid, saponin, glycosid toàn phần có trong hai phương thuốc NTTGG và siro Typhocihen bằng phương pháp cân [2; 4].

3. Kết quả và bàn luận

3.1. Định tính trong ống nghiệm

Kết quả định tính các nhóm chất được ghi trong bảng 1.

Nhận xét: Với các thuốc thử, phản ứng đặc trưng của các thành phần hoá học chiết từ các vị thuốc, màu sắc được xếp theo thứ tự giảm dần từ đậm đến nhạt: Alcaloid: CA, LH, BH; flavonoid:

CT, TBB, TB; saponin: BH, CT, CM; glycosid: LH, CM. Các chất chiết từ các thang cho màu sắc rõ nhất trừ glycosid chiết từ thang NTTGG_{CA}. Phản ứng hoá học của các thành phần có trong phương thuốc là phản ứng tổng hợp các thành phần hoá học có trong các vị thuốc.

3.2. Định tính bằng sắc ký lớp mỏng

Tiến hành sắc ký lớp mỏng với bản mỏng silica gel trắng sẵn GF254 (Merck),

3.2.1. Định tính alcaloid

Triển khai SKLM bằng hệ dung môi n-butanol : acid acetic : nước (40: 8: 20) với alcaloid của lá CA, BH, bột (b) NTTGG_{CA} và nước sắc (s) NTTGG_{CA} và bằng hệ acetone : methanol : amoniac (45: 9: 1) với alcaloid của LH, BH, bột (b) NTTGG_{CA} và nước sắc (s) NTTGG_{CA}. Kết quả định tính alcaloid bằng sắc ký lớp mỏng được trình bày trong các bảng 2a và 2b.

Bảng 1:

Nhóm chất	Thuốc thử và phản ứng	Kết quả các phản ứng								
		CA	BH	LH	TBB	TB	CM	CT	NTTGG _{CA} (bột)	NTTGG _{LH} (bột)
Alcaloid	Mayer	+++	+	++					+++	+++
	Bouchardat	+++	+	++					+++	+++
	Dragendorff	+++	+	++					+++	+++
	Acid picric	+++	+	++					+++	+++
Flavonoid	NH ₃	-	-	-	++	++	-	+++	+++	+++
	Cyanidin	-	-	-	++	++	-	+++	+++	+++
	FeCl ₃	-	-	-	++	++	-	+++	+++	+++
	H ₂ SO ₄ đặc	-	-	-	++	++	-	+++	+++	+++
	NaOH 10%	-	-	-	++	++	-	+++	+++	+++
Saponin	Rosenthaler	-	+++	-	-	-	++	+++	+++	+++
	Lieberman-Burchard	-	+++	-	-	-	++	+++	+++	+++
	Salkowski	-	+++	-	-	-	++	++	+++	+++
	Vanilin 1%/Cồn -H ₂ SO ₄	-	+++	-	-	-	+++	+++	+++	+++
Glycosid	Lieberman		-	++			+		+	+++
	Baljet		-	++			+		+	+++
	Legal		-	++			+		+	+++
	Keller-Kiliani		-	++			+		+	+++

Bảng 2a.

Chú thích: (+) phản ứng dương tính, (-) phản ứng âm tính

n-Butanol : acid acetic : nước (40 : 8 : 20)											
Lá CA			BH			NTTGG _{CA} (b)			NTTGG _{CA} (s)		
Vết	Rf*	Màu	Vết	Rf*	Màu	Vết	Rf*	Màu	Vết	Rf*	Màu
a1	47.9	Đc				c1	47.9	Đc	d1	47.9	Đc
a2	53.4	Đc				c2	53.4	Đc	d2	53.4	Đc
a3	78.1	Vx				c3	78.1	Vx	d3	78.1	Vx
			b1	89	V	c4	89	V	d4	89	V
a4	97.3	Đc				c5	97.3	Đc	d5	97.3	Đc

Bảng 2b.

Aceton : methanol : ammoniac (45 : 9 : 1)											
LH			BH			NTTGG _{CA} (b)			NTTGG _{CA} (s)		
Vết	Rf*	Màu	Vết	Rf*	Màu	Vết	Rf*	Màu	Vết	Rf*	Màu
a1	40	Nâu				c1	40	Nâu	d1	40	Nâu
a2	66	V				c2	66	V	d2	66	V
a3	93	Đc				c3	93	Đc	d3	93	Đc
			b1	96	Vc	c4	96	Vc	d4	96	Vc

Trong đó: Đc - Đỏ cam, V - vàng, Vc - Vàng cam, Vx - Vàng xanh.

3.2.2. Định tính flavonoid

Triển khai SKLM bằng hệ dung môi: Cloroform : ethylacetat : acid formic (4:5:2), thuốc thử hiện màu: hơi amoniac đặc. Kết quả, trên sắc ký đồ dịch chiết flavonoid của TB có 5 vết, CT 3 vết, TBB bị 4 vết,

các thang NTTGG 12 vết.

3.2.3. Định tính saponin

Triển khai SKLM bằng hệ dung môi: Cyclohexan: ethylacetat (4:6), thuốc thử hiện màu:

Vanilin 1% trong cồn có H₂SO₄ đặc. Kết quả là trên sắc ký đồ dịch chiết saponin của BH, CT, CM mỗi vị có 3 vết, NTTGG 9 vết.

3.2.4. Định tính glycosid

Triển khai SKLM bằng hệ dung môi: Ethylacetat: methanol: nước (8:0,5:0,5), thuốc thử hiện màu: Dung dịch NaOH 1N (trong cồn 50⁰), thêm natrinotroprussiat để đạt nồng độ 1%. Kết quả là dịch chiết glycosid của NTTGG_{LH} có 4 vết tương ứng 4 vết của LH, NTTGG_{CA} có 1 vết tương ứng với 1 vết của CM.

Nhận xét: Các vết trên sắc ký đồ của các phương thuốc là tổng hợp các vết của các vị thuốc thành phần nhưng diện tích và màu sắc của các vết khác nhau. Có thể dựa vào SKLM để phát hiện sự có mặt của các vị thuốc trong phương thuốc.

3.3. Định lượng một số nhóm chất chính trong phương thuốc:

Bột dược liệu được xác định độ ẩm, cân chính xác một lượng nhất định, loại béo bằng ether dầu hoả trong bình Soxhlet. Làm bay hơi hết ether trong dược liệu. Chiết hồi lưu cách thuỷ bằng các dung môi thích hợp đến kiệt các hoạt chất (thử bằng các phản ứng đặc trưng) thu được dịch chiết.

- Đối với alcaloid: Trước khi chiết hồi lưu cách thuỷ phải thấm ẩm dược liệu bằng dung dịch amoniac 10%. Dung môi chiết là cloroform, dịch chiết cloroform được lãc nhiều lần với H₂SO₄ 0,25M. Gộp dịch chiết acid, kiềm hoá bằng dung dịch amoniac 10% đến pH=9,5. Lãc lại nhiều lần với cloroform. Gộp dịch cloroform, làm khan, lọc và bốc hơi thu cãn.

- Đối với flavonoid: Dung môi là cồn ethylic 70⁰, thu hồi dung môi, cô tới cãn rồi hoà vào nước cất, lãc nhiều lần với ethylacetat. Gộp dịch ethylacetat, làm khan, lọc và bốc hơi thu cãn.

- Đối với saponin: Dung môi chiết là cồn ethylic 80⁰, dịch chiết cồn được cô thành cãn. Hoà cãn vào nước cất, lãc nhiều lần với n-butanol. Gộp dịch n-butanol, làm khan, lọc, rồi bốc hơi thu cãn.

- Đối với glycosid: Dung môi chiết là cồn ethylic 96⁰: nước(50:50), để nguội dịch chiết, thêm chì acetat 30%, để lãng, lọc. Dịch lọc đem loại bỏ ion chì bằng dung dịch Na₂SO₄ 15%, lọc. Dịch lọc đem cô cách thuỷ còn 45-50 ml, lãc nhiều lần với cloroform rồi làm khan, lọc và bốc hơi thu cãn.

* Xử lý cãn: Cãn được sấy ở 80⁰ C đến khối lượng không đổi, đem cãn.

Bảng 3. Kết quả định lượng alcaloid, flavonoid, saponin, glycosid toàn phần

Nhóm chất	Hàm lượng (%) NTTGG _{CA} (bột)	Hàm lượng (%) NTTGG _{LH} (bột)
Alcaloid	0,1	0,05
Flavonoid	6,0	6,2
Saponin	6,7	5,0
Glycosid	0,004	0,014

4. Kết luận

Trong các phương thuốc NTTGG có các thành phần hoá học chính là alcaloid, flavonoid, saponin, glycosid với hàm lượng alcaloid 0,1% trong bột NTTGG_{CA} và 0,05% trong NTTGG_{LH}; flavonoid 6,0% trong NTTGG_{CA} và 6,2% trong NTTGG_{LH}; saponin 6,7% trong NTTGG_{CA} và 5,0% trong NTTGG_{LH}; glycosid 0,004% trong NTTGG_{CA} và 0,014% trong NTTGG_{LH}.

Các kết quả nghiên cứu cho thấy thành phần hoá học của toàn bộ phương thuốc không có gì thay đổi so với thành phần hoá học của các vị thuốc trong phương thuốc và là tổ hợp các thành phần hoá học của các vị thuốc trong phương thuốc. Những kết quả này là những số liệu tin cậy để nghiên cứu tiêu chuẩn hoá chế phẩm nghiên cứu sau này.

Tài liệu tham khảo

- 1). Bộ môn dược cổ truyền - Trường Đại học Dược Hà Nội (2002), *Dược học cổ truyền*, Nxb Y học; 2). Bộ Y tế (2002), *Dược điển Việt Nam III*, Nxb Y học; 3). Võ Văn Chí(1997), *Từ điển cây thuốc Việt Nam học*, NXB Y học; 4). Nguyễn Văn Đãn, Nguyễn Viết Tự (1985), *Phương pháp nghiên cứu hoá học cây thuốc*, Nxb Y học; 5). IRWIN J.Polk, *Cẩm nang về bệnh hen suyễn*, (MD. Lê Thân dịch - 1998), Nxb Y học; 6). Hoàng Duy Tân-Trần Văn Nhũ (1995), *Tuyển tập phương thang Đông Y*, Nxb Đông Nai; 7). Phạm Xuân Sinh(1999), *Phương pháp chế biến thuốc cổ truyền*, Nxb Y học.

ĐỊNH LƯỢNG ALCALOID TOÀN PHẦN TRONG LÁ SEN BẰNG PHƯƠNG PHÁP SO MÀU VÀ PHƯƠNG PHÁP QUANG PHỔ TỬ NGOẠI

Nguyễn Kim Cẩn, Nguyễn Văn Tài

Viện Dược liệu

(Nhận bài ngày 30 tháng 3 năm 2004)

Summary

Quantitative Determination of Total Alkaloids in Lotus Leaves by Colorimetry and UV Spectrophotometry

A new method for quantitative determination of total alkaloids, the active components in the leaf of Nelumbo nucifera Geartn has been established. Alkaloids were extracted and refined with chloroform in an alkaline medium and 3% phosphoric acid solution. They were combined with blue Bromothymol in a buffer solution (pH 7) and the complex was measured at $\lambda = 615 \pm 1$ nm on a spectrophotometer. For UV spectrophotometry, the solution of the total alkaloids was measured at $\lambda = 270$ nm.

Key words: Nelumbo nucifera, Leaf, Total Alkaloids, Colorimetry, UV Spectrophotometry.

Đặt vấn đề

Từ lâu, y học dân gian Việt Nam đã dùng các bộ phận của cây sen để làm thuốc như lá sen, hạt sen, tâm sen, ngó sen. Những bộ phận này đều chứa các alkaloid như nuciferin, roemerin, nornuciferin.

Có rất ít công trình nghiên cứu về phương pháp định lượng alkaloid sen. Cho đến nay ở Việt Nam, để định lượng alkaloid sen, người ta dùng phương pháp khối lượng và phương pháp chuẩn độ acid bazơ [4,5,6].

Trong thông báo này, chúng tôi giới thiệu về kết quả khảo sát phương pháp định lượng alkaloid toàn phần trong lá sen bằng phương pháp so màu nhờ thuốc thử xanh Bromothymol và phương pháp quang phổ tử ngoại.

Nguyên liệu, thiết bị, hoá chất

Nguyên liệu:

- Lá sen bánh tẻ thu vào tháng 8, phơi trong râm, sấy khô ở nhiệt độ 40 -50 °C, tán nhỏ, rây qua rây cỡ lỗ 1-2 mm rồi bảo quản trong lọ màu kín.

- Chất đối chiếu: Alkaloid toàn phần của lá sen được chiết theo phương pháp định lượng khối lượng rồi tinh chế bằng cách tủa trong hỗn hợp dung môi cloroform - ether dầu và làm khô trong chân không đến khối lượng không đổi.

- Pha dung dịch có nồng độ 0,2mg/ml alkaloid

toàn phần trong cloroform làm chuẩn đối chiếu cho phương pháp so màu.

- Pha dung dịch có nồng độ 0,01mg/ml alkaloid toàn phần trong cồn làm dung dịch chuẩn cho phương pháp tử ngoại (tương đương với dung dịch 0.001%).

Thiết bị:

- Cân hàm ẩm, máy lắc, máy quang phổ UV-VIS Cary 1E.

Thuốc thử:

- Dung dịch HCl 1N; dung dịch acid phosphoric 3%; dung dịch NaOH 0,05 N.

- Dung dịch thuốc thử xanh Bromothymol 0,31% trong môi trường kiềm nước.

- Dung dịch đệm phosphat có pH từ 6 đến 8,5.

Thực nghiệm và bàn luận

- Chọn dung môi chiết:

Chúng tôi tiến hành chiết alkaloid toàn phần trong lá sen với các dung môi khác nhau như ethanol 95%, methanol và cloroform. Kết quả khảo sát được nêu trong bảng 1.

Bảng 1 cho thấy chiết bằng cloroform có hàm lượng alkaloid toàn phần cao nhất, thời gian chiết nhanh nhất, dễ thao tác nhất không bị nhũ trong quá trình thực nghiệm. Chúng tôi chọn cloroform làm dung môi chiết.

Bảng 1: Dung môi chiết khác nhau

Lần thí nghiệm	Hàm lượng alkaloid toàn phần (%)			Đặc trưng toán học	
	Ethanol (95%)	Methanol	Chloroform		
1	0,86	1,13	1,57	X	0,86
2	0,80	1,25	1,48	S	0,00257
3	0,89	1,19	1,52	X	0,119
4	0,93	1,21	1,61	S	0,00212
5	0,83	1,16	1,54	X	0,154
				S	0,00243

- Chọn acid trong quá trình làm sạch alkaloid toàn phần: cả 2 phương pháp so màu và tử ngoại.

Chúng tôi đã sử dụng HCl 1N và acid phosphoric 3% trong quá trình chuyển từ dạng bazơ thành dạng muối tan trong nước để làm sạch alkaloid và thấy dùng acid phosphoric 3% thuận lợi hơn, góp phần hạn chế sự tạo nhũ, còn hàm lượng alkaloid toàn phần thì hầu như không đổi.

Cloroform và acid phosphoric 3% được chọn cho quy trình chiết xuất alkaloid toàn phần trong

- Định lượng alkaloid toàn phần lá sen bằng phương pháp so màu:

Ảnh hưởng của độ pH môi trường đến phản ứng tạo màu giữa alkaloid lá sen với thuốc thử xanh Bromothymol.

Chúng tôi đã tiến hành khảo sát ở độ pH của môi trường phản ứng từ 6 đến 8,5 và kết quả được nêu ở bảng 2

Bảng 2: Ảnh hưởng của pH môi trường

Độ pH	Mật độ quang A	Độ pH	Mật độ quang A
6,00	0,265	7,50	0,352
6,50	0,393	8,00	0,157
7,00	0,439	8,50	0,022

Giá trị pH 7 là thích hợp nhất cho phản ứng tạo phức màu giữa alkaloid toàn phần và thuốc thử xanh Bromothymol.

- Ảnh hưởng của thời gian đến độ bền màu:

Sự thay đổi của màu cứ 15 phút được theo dõi một lần cho đến 120 phút, thấy mật độ quang A của dung dịch hầu như không đổi. Do vậy, có thể

đo mẫu trong khoảng thời gian từ 30 đến 60 phút mà không ảnh hưởng đến kết quả.

- Ảnh hưởng của lượng thuốc thử đến phản ứng màu:

Thay đổi lượng thuốc thử trong phản ứng tạo phức từ 0,05ml đến 0,35ml thuốc thử xanh Bromothymol thu được kết quả ở bảng 3.

Bảng 3: Ảnh hưởng của lượng thuốc thử

Thể tích thuốc thử (ml)	Dung dịch đệm pH 7 (ml)	Mật độ quang A	Thể tích thuốc thử (ml)	Dung dịch đệm pH 7 (ml)	Mật độ quang A
0,05	9,95	0,282	0,25	9,75	0,465
0,10	9,90	0,429	0,30	9,70	0,471
0,15	9,85	0,392	0,35	9,65	0,456
0,20	9,80	0,439			

Dùng 0,3ml thuốc thử là tối ưu.

- Khoảng nồng độ tuân theo định luật Lambert-Beer:

Khi khảo sát lượng alkaloid toàn phần từ nồng

độ 0,05mg/ml đến hơn 0,2mg/ml thấy chỉ với hàm lượng alkaloid $\leq 0,2$ mg/ml mới tuân theo định luật Lambert- Beer.

Phương pháp định lượng alkaloid toàn phần

trong lá sen bằng phương pháp so màu:

Cân chính xác khoảng 1g bột lá sen (độ chính xác 0,01g), xác định độ ẩm song song. Chiết Soxhlet bằng cloroform ở môi trường kiềm đến hết alkaloid. Thu hồi cloroform đến khô. Hoà cân bằng acid phosphoric 3%. Lọc. Kiểm hoá dịch acid bằng amoniac 10% đến pH 10-11. Lắc dịch đã kiềm hoá với cloroform lần lượt theo thể tích: 20, 20, 15, 10 ml. Gộp dịch cloroform lại rồi rửa bằng nước. Làm khô cloroform bằng natri sunfat khan và chuyển vào bình định mức 100ml. Thêm cloroform đến vạch. Lấy chính xác 0,5 ml dung dịch alkaloid cho vào bình nón dung tích 100ml, thêm 0,3ml xanh Bromothymol, 9,7ml dung dịch đệm phosphat pH 7 và 15ml cloroform, lắc 30 phút. Chuyển toàn bộ dung dịch sang bình lắng gạn, gạn lấy lớp cloroform. Lắc dịch cloroform với 15ml dung dịch NaOH 0,05N. Đo mật độ quang của dung dịch nước được giá trị Ax (so với dung dịch mẫu trắng).

Lấy chính xác 0,5ml dung dịch alkaloid toàn phần chuẩn có nồng độ 0,2mg/ml rồi tiến hành phản ứng màu như với dung dịch phân tích. Đo mật độ quang được giá trị Ac. Hàm lượng alkaloid toàn phần trong mẫu tính theo công thức:

$$X (\%) = \frac{200.Ax}{Ac.a.(100 - b)}$$

a là trọng lượng dược liệu (g), b là độ ẩm dược liệu (%).

Định lượng alkaloid toàn phần lá sen bằng phương pháp tử ngoại

- Dung dịch alkaloid toàn phần chuẩn đối chiếu có nồng độ 0,001% trong ethanol 95%. (0,01mg/ml)

- Khảo sát phổ hấp thụ tử ngoại của alkaloid toàn phần lá sen thấy có 3 đỉnh hấp thụ ở 209nm, 227nm (vai) và 270 nm. Chúng tôi chọn cực đại

hấp thụ ở $\lambda_{max} = 270$ nm để đo trong phân tích. Đo mật độ quang của dung dịch chuẩn có nồng độ 0,001% ta được Ac.

- Dung dịch phân tích và tiến hành phân tích:

Tiến hành chiết alkaloid toàn phần trong lá sen như trong phương pháp so màu. Dịch alkaloid đã làm sạch thu hồi dung môi đến cân khô. Hoà cân trong ethanol được dung dịch A. Lấy 0,1ml dung dịch A pha loãng trong bình định mức 10ml được dung dịch B. Đo mật độ quang của dung dịch B ở bước sóng 270 nm được giá trị Ax. Hàm lượng alkaloid toàn phần trong mẫu tính theo công thức:

$$X (\%) = \frac{Ax.Cc.V}{Ac.p.V_1} \times 100$$

X là hàm lượng alkaloid toàn phần trong mẫu (%); Ax: Mật độ quang của dung dịch phân tích; Ac: Mật độ quang của dung dịch chuẩn đối chiếu; Cc: Nồng độ của dung dịch chuẩn đối chiếu (%); V: Thể tích ban đầu của dung dịch phân tích (ml); V1: Thể tích của dung dịch phân tích lấy để pha loãng; p: Lượng cân mẫu phân tích (g) theo dược liệu khô tuyệt đối.

Nếu pha thể tích ban đầu của dung dịch phân tích và dung dịch chất chuẩn như nhau, đồng thời lấy cùng một thể tích để pha loãng trong một thể tích cũng giống nhau để đo thì công thức tính rút gọn như sau:

$$X (\%) = \frac{Ax}{Ac.p}$$

Kết quả định lượng alkaloid toàn phần trong lá sen theo 2 phương pháp so màu và tử ngoại được ghi ở bảng 4. Những kết quả này được so sánh với phương pháp khối lượng.

Bảng 4. Kết quả định lượng alkaloid toàn phần lá sen bằng những phương pháp khác nhau (%)

Lần thí nghiệm	Phương pháp so màu	Phương pháp tử ngoại	Phương pháp khối lượng
1	1,53	1,54	1,57
2	1,48	1,47	1,48
3	1,48	1,46	1,52
4	1,47	1,47	1,61
5	1,45	1,45	1,54
Đặc trưng toán học	$\bar{X} = 1,48$ $S^2 = 0,00087$	$\bar{X} = 1,48$ $S^2 = 0,00055$	$\bar{X} = 1,54$ $S^2 = 0,0024$

Kết luận

- Đã xây dựng phương pháp định lượng alcaloid toàn phần trong lá sen bằng phương pháp so màu nhờ xanh Bromothymol và phương pháp quang phổ tử ngoại.

- Đã so sánh kết quả phân tích bằng phương pháp so màu và phương pháp tử ngoại với nhau,

đồng thời so sánh với phương pháp khối lượng. Phương pháp khối lượng cho kết quả cao hơn (1,54%), hai phương pháp so màu và tử ngoại cho kết quả tương đương (1,48 %). Phương pháp khối lượng cho kết quả cao hơn có thể còn lẫn tạp nhưng không đáng kể.

- Từ đặc trưng toán học, ta thấy các phương pháp có độ chính xác ở mức 95%.

Tài liệu tham khảo

1). Phan Quốc Kinh, Phạm Gia Khôi, Phạm Thị Ngọc Trâm, " *Dược học* ", 1973, N 1, 13-16; 2). Nguyễn Thượng Đông, Đỗ Trung Đàm, " *Tạp chí Dược học* ", 1995, N 7+8, 46-47; 3). Tomita Macao. Bằng phát minh Nhật. 30A31, N 17984, Đăng ký 9.07.60, Công bố 13.11.62; 4). Đặng Hồng Vân, Phan Quốc Kinh, " *Dược học* ", 1974, N 1, 12-13; 5). Nguyễn Thị Nhung, Phan Thanh Kỳ. " *Thông báo kiểm nghiệm* ", 1998, N 4, 21-23; 6). Nguyễn Kim Cẩn, Đinh Thị Thuyết, " *Tạp chí Dược liệu* ", 2001, N 2+3, 45-48.

Tạp chí Dược liệu, tập 9, số 3/2004 (trang 82-84)

THẨM DÒ TÁC DỤNG CỦA BÀI THUỐC "NHỊ NHẬN HOÀ VI" CHỮA VIÊM LOÉT DẠ DÀY - TÁ TRÀNG (Thông báo số 1)

Phùng Hoà Bình - Đại học Dược Hà Nội
Lê Minh Phương - Viện Dược Liệu
(Nhận bài ngày 22 tháng 2 năm 2004)

Summary

Preliminary Studies on the Effects of the *Nhi nhan hoa vi* Prescription for Gastroduodenitis

Nhi nhan hoa vi is a traditional prescription for gastric inflammation and ulcer. Pharmacological experiments have shown that its extract does not change the amounts of gastric juice and total acids, but decreases 83,5 - 92,9% of injury and 50 - 72,7 % of ulcer in rat stomach and increases the gall amount by 88,7 %.

Key words: *Nhi nhan hoa vi*, Anti-Gastric Ulcer

1. Đặt vấn đề

Y học hiện đại đã xác định nguyên nhân gây loét dạ dày - tá tràng là sự mất cân bằng giữa các yếu tố gây loét như tăng tiết dịch vị, tăng tiết acid dịch vị, tăng tiết pepsin, nhiễm khuẩn *Helicobacter pylori* với các yếu tố bảo vệ như giảm chất nhầy, giảm NaHCO₃, thiếu máu cục bộ, hẹp môn vị (1, 2).

Dựa theo cơ chế bệnh sinh của y học hiện đại, kết hợp với lý luận bệnh sinh của y học cổ truyền (3) chúng tôi đã xây dựng một công thức thuốc để điều trị bệnh viêm loét dạ dày - tá tràng. Thực tế sử dụng dạng thuốc sắc trên một số bệnh nhân thấy có kết quả lâm sàng rõ rệt như giảm cơn đau nhanh

giảm hoặc hết cảm giác nóng rát vùng dạ dày, giảm nôn, giảm hoặc hết đầy chướng bụng, kích thích tiêu hoá và an thần tốt hơn.

Việc nghiên cứu thực nghiệm bài thuốc để xác định tác dụng đã góp phần định hướng nghiên cứu tiếp sau.

2. Phương pháp nghiên cứu

2.1. *Xây dựng công thức bài thuốc:* Phối hợp một số vị thuốc có tác dụng chính như lợi mật, an thần, giảm co thắt cơ trơn, kháng khuẩn, chống viêm (tương ứng với phương pháp điều trị viêm loét dạ dày- tá tràng thể can khí phạm vị, hoả uất, khí trệ của y học cổ truyền).

Bài thuốc được đặt tên là "nhị nhân hoà vị", gồm nhân trần 16 g, mạch môn 8 g, mộc hương 8 g, hoàng liên 4 g, táo nhân 10 g, hương phụ 10 g, trư ma căn 10 g và cam thảo 4 g.

2.2. Nghiên cứu tác dụng dược lý

a/. Thử tác dụng chống loét dạ dày theo mô hình Shay (6).

Súc vật thí nghiệm là chuột cống trắng thuộc 2 giống, trọng lượng 140 - 260 g. Tiến hành song song lô đối chứng với lô thử thuốc. Lô thử thuốc: cho chuột uống thuốc 5 ngày, để đói 24 giờ, thắt môn vị, giết chuột, thu lấy dịch vị. Định lượng acid dịch vị bằng phương pháp trung hoà.

Đánh giá tác dụng theo các chỉ tiêu sau:

- Thể tích dịch vị: số ml dịch vị/100 g thể trọng chuột.

- Độ acid dịch vị: số ml NaOH 0,1 N trung hoà lượng HCl tự do hoặc HCl toàn phần trong 10 ml dịch vị.

- Mức độ tổn thương dạ dày: tính theo thang điểm của Robert và Nezamit (6).

- Tỷ lệ loét dạ dày (%) là số chuột bị loét so với tổng số chuột trong lô thí nghiệm.

Xử lý kết quả thực nghiệm theo phương pháp thống kê t-test Student (5). So sánh sự thay đổi các chỉ tiêu quan sát giữa lô thử thuốc với lô đối chứng theo công thức sau:

$$X(\%) = \frac{X_c - X_t}{X_c} \times 100$$

Trong đó: X là tỷ lệ (%) sự thay đổi giữa lô thử thuốc với lô đối chứng; X_c là giá trị trung bình các thông số ở lô đối chứng; X_t là giá trị trung bình các thông số ở lô thử thuốc.

b/. Thử tác dụng lợi mật

- Súc vật thí nghiệm là chuột nhắt trắng thuộc 2 giống, trọng lượng 20- 24 g / con.

- Thí nghiệm theo phương pháp Rudi (7): cho chuột uống thuốc 2 ngày, thắt ống mật chủ, thu lấy dịch mật. Cân khối lượng mật, so sánh với lô đối chứng. Độ lợi mật L (%) được tính theo công thức:

$$L(\%) = \frac{M_t - M_c}{M_c} \times 100$$

Trong đó: L (%) là độ lợi mật; M_t là khối lượng mật trung bình của lô thử thuốc; M_c là khối lượng mật trung bình của lô đối chứng.

c/. Thử độc tính cấp (4)

Súc vật thí nghiệm là chuột nhắt trắng thuộc 2 giống, trọng lượng 18 - 22 g / con. Cho chuột uống thuốc ở liều tối đa cho phép. Theo dõi 72 giờ, nếu không có chuột chết thì được coi là thuốc không gây độc cấp ở liều thử.

3. Kết quả thí nghiệm

3.1. Kết quả thử tác dụng chống loét dạ dày

Thuốc thử là cao lỏng 2 : 1 (1ml cao lỏng tương đương 2 g dược liệu). Tiến hành thử với 2 lô: lô thử I (liều 15 g DL / Kg TT chuột) và lô thử II (liều 30 g DL / Kg TT chuột). Chuột thử: n = 10 con / 1 lô thử. Kết quả thí nghiệm được ghi ở bảng 1, 2.

3.2. Kết quả thử tác dụng lợi mật

Số chuột thử n = 20/ lô. Liều thử 16 g DL / kg TT chuột, chế dưới dạng cao lỏng 1 : 1 (1ml cao tương ứng 1 g dược liệu). Kết quả thí nghiệm được ghi ở bảng 3.

Bảng 1. Các chỉ tiêu quan sát khi thử tác dụng chống loét dạ dày của lô thử thuốc I.

Chỉ tiêu theo dõi	Lô thử I	Lô đối chứng	Giá trị P	So sánh lô thử I với lô đối chứng
Thể tích dịch vị (ml)	8,1 ± 1,9	9,9 ± 1,8	> 0,05	giảm 18,2 (%)
Độ acid tự do	4,1 ± 1,1	5,6 ± 0,9	< 0,05	giảm 26,8 (%)
Độ acid toàn phần	7,5 ± 1,0	9,0 ± 1,7	> 0,05	giảm 16,7 (%)
Mức độ tổn thương (điểm)	1,4 ± 2,2	8,5 ± 5,4	< 0,01	giảm 83,5 (%)
Tỷ lệ loét	27,3 %	100 %		ức chế loét 72,7 (%)

Bảng 2. Các chỉ tiêu quan sát khi thử tác dụng chống loét dạ dày của lô thử thuốc II.

Chỉ tiêu theo dõi	Lô thử II	Lô đối chứng	Giá trị P	So sánh lô thử II với lô đối chứng
Thể tích dịch vị (ml)	10,6 ± 3,3	9,9 ± 1,8	> 0,05	tăng 7 (%)
Độ acid tự do	5,4 ± 1,2	5,6 ± 0,9	> 0,05	giảm 3 (%)
Độ acid toàn phần	7,8 ± 1,6	9,0 ± 1,7	> 0,05	giảm 13,3 (%)
Mức độ tổn thương (điểm)	0,6 ± 0,6	8,5 ± 5,4	< 0,01	giảm 92,9(%)
Tỷ lệ loét	50 %	100 %		ức chế loét 50 (%)

Bảng 3. Tác dụng lợi mật của dịch chiết "nhị nhân hoà vị" trên chuột nhắt trắng.

Thông số	Lô đối chứng	Lô thử thuốc
Khối lượng mật trung bình	15,1 ± 2,4	28,5 ± 6,0
Tác dụng lợi mật (%)	100	188,7

3.3.Thử độc tính cấp

Dịch chiết được cô đến đậm đặc, cho chuột uống ở 2 liều, kết quả được ghi ở bảng 4.

Bảng 4. Kết quả thử độc tính cấp của dịch sắc thuốc " nhị nhân hoà vị" trên chuột nhắt

Lô thí nghiệm	Liều thử (g DL/ Kg TT)	Số chuột thử	Số chuột chết
Lô I	280	06	0
Lô II	320	10	0

4. Bàn luận và kết luận

"Nhị nhân hoà vị" là phương thuốc mới, được xây dựng theo cơ chế của y học hiện đại kết hợp với lý luận y học cổ truyền. Việc chọn lựa vị thuốc dựa trên kết quả nghiên cứu về dược lý và hoá sinh. Thực tế điều trị bệnh nhân viêm loét dạ dày - tá tràng có tác dụng khả quan. Kết quả thí nghiệm cho thấy:

- Thể tích dịch vị ở cả 2 lô thử khác với lô đối chứng không có ý nghĩa thống kê ($P > 0,05$).

- Độ acid tự do, độ acid toàn phần có chiều hướng giảm, nhưng sự khác nhau không có ý nghĩa thống kê ($P > 0,05$).

- Mức độ tổn thương và tỷ lệ loét giảm rõ rệt: so với lô đối chứng thì lô thử I làm giảm mức độ tổn

thương 83,5 %, giảm tỷ lệ loét 72,7 %; Lô thử II làm giảm mức độ tổn thương 92,9 %, giảm tỷ lệ loét 50 %.

Lượng dịch vị, độ acid giảm không đáng kể, có nghĩa là chức năng tiêu hoá của dạ dày không bị giảm khi sử dụng thuốc. Mức độ tổn thương trên dạ dày giảm rõ rệt. Điều đó cho phép chúng tôi nghĩ đến cơ chế tác dụng của thuốc là tăng cường yếu tố bảo vệ. Phải chăng sự tăng tiết dịch mật liên quan đến sự tăng sinh NaHCO_3 là một yếu tố quan trọng chống lại tác động của dịch acid.

Thuốc không gây độc tính cấp ở liều thử cao gấp trăm lần liều điều trị, phù hợp về mặt lý thuyết, các vị thuốc đều không độc. Việc sử dụng trên lâm sàng là an toàn.

Tài liệu tham khảo

- 1). Bộ môn sinh lý học, trường đại học Y Hà Nội (1998). Sinh lý học tập I. NXB Y học 1998, trang 324, 359; 2). Bộ môn Dược lâm sàng, trường đại học Dược Hà Nội (1998). Dược lâm sàng. NXB Y học 1998, trang 313; 3). Bộ môn y học cổ truyền dân tộc, trường Đại học Y Hà Nội (1994). Y học cổ truyền. NXB Y học 1994, trang 150-6, 254; 4). Đỗ Trung Đàm (1996). Phương pháp xác định độc tính cấp của thuốc. NXB Y học 1996, trang 11-9; 5). Nguyễn Tiến Khanh. (1995). Thống kê ứng dụng trong công tác dược. Trường ĐH Dược Hà Nội, trang 17-23; 6). Robert A. Tuner Screening methods in pharmacology. Academic press. New York and London 1965, p. 221-2; 7). Pyguu P.B. Pap u mok 1977, 4 cta 14-

NGHIÊN CỨU TÁC DỤNG BẢO VỆ GAN CỦA ĐÌNH LĂNG DỰA TRÊN CƠ CHẾ TÁC DỤNG CHỐNG OXY HOÁ

Nguyễn Thị Thu Hương, Nguyễn Thị Anh Như - Trung tâm Sâm & Dược liệu Tp. HCM
(Nhận bài ngày 23 tháng 2 năm 2004)

Summary

Studies on Hepatoprotective Activity of *Polyscias fruticosa* Based on Antioxidant Mechanism

The previous study indicated that *Polyscias fruticosa* showed an antioxidant activity on lipid peroxidation in mouse brain by use of auto-oxidation and free radical generating system: Fenton's reagent (iron ferrous + hydrogen peroxide). In this study, we investigated the hepatoprotective activity of the root and leaf extracts of the plant using a carbon tetrachloride-induced acute hepatotoxicity model. The results revealed that carbon tetrachloride (0.5 g/kg, intraperitoneal injection) induced an increase in malonyl dialdehyde (MDA) content, a product of lipid peroxidation in brain and liver. Oral administration of the root or leaf extract (100 mg/kg) for 7 days decreased the carbon tetrachloride-induced increase in MDA content. The effect of *Polyscias fruticosa* is the same as those of vitamin E (1 g/kg), a typical antioxidant, and Omitan, a commercial hepatoprotective drug with the active component biphenyl dimethyl dicarboxylate (25mg/kg). These findings suggested that the hepatoprotective activity of *Polyscias fruticosa* is based on the antioxidant mechanism.

Key words: *Polyscias fruticosa*, Hepatotoxicity, Lipid Peroxidation, Antioxidant

I. Đặt vấn đề

Bình thường cơ thể con người luôn tồn tại cân bằng giữa các dạng oxy hoạt động với các chất chống oxy hóa. Nhưng do ảnh hưởng của nhiều tác nhân độc hại từ môi trường sống, cân bằng có thể dịch chuyển theo hướng làm tăng sự tạo thành các gốc tự do của oxy và giảm các chất chống oxy hóa. Trạng thái rối loạn cân bằng này được gọi là stress oxy hóa (oxidative stress). Hậu quả của sự gia tăng quá mức các gốc tự do thường dẫn đến việc phát sinh bệnh tật như các quá trình viêm, bệnh tim mạch, ung thư, bệnh suy thoái thần kinh do tuổi già và sự lão hóa sớm do stress.

Đình lăng (*Polyscias fruticosa* (L.) Harms) thuộc họ Nhân sâm (Araliaceae) là một dược liệu được sử dụng khá phổ biến trong y học dân gian và được nghiên cứu từ những năm 80 về cấu trúc hóa học, các tác dụng dược lí như tác dụng tăng lực, chống trầm cảm, phục hồi thời gian ngủ bị rút ngắn bởi stress, tác động chống xơ vữa động mạch... [1,2]. Để nâng cao giá trị sử dụng của cây thuốc này, chúng tôi xin giới thiệu một số kết quả nghiên cứu về tác dụng bảo vệ gan của cao rễ, cao lá và cao phối hợp rễ và lá đình lăng dựa trên cơ chế tác

động chống oxy hóa (antioxidant).

II. Nguyên liệu và phương pháp nghiên cứu

1. Nguyên liệu nghiên cứu:

Rễ và lá đình lăng được chiết xuất bằng phương pháp ngâm kiệt qua 2 phân đoạn cồn 96° và cồn 45°. Trộn hỗn hợp 2 dịch chiết và cô cách thủy thành dạng cao toàn phần (cao lá và cao rễ). Hàm lượng saponin toàn phần trong cao lá là 1,4% và trong cao rễ là 0,7% (tính theo chuẩn acid oleanolic). Ngoài ra, rễ và lá đình lăng được trộn theo một tỷ lệ nhất định và chiết xuất theo quy trình tương tự thành dạng cao phối hợp lá và rễ lại có hàm lượng saponin toàn phần là 1,0 %.

2. Súc vật nghiên cứu:

Chuột nhắt trắng đực (chủng ddY, trọng lượng trung bình $20 \pm 2g$) được cung cấp bởi Viện Pasteur TP.HCM và được để ổn định ít nhất một tuần trước khi thử nghiệm.

3. Hoá chất – Thuốc thử:

- Đệm phosphat (pH 7,2).
- Dung dịch sinh lí NaCl 0.9%.

- Kali clorur (KCl) (Merk, Germany).
- Acid thiobarbituric (TBA) (Merk, Germany).
- Acid tricloacetic (TCA) (China).
- Malonyl dialdehyd (MDA) (Merk, Germany).
- Đệm Tris HCl (Merk, Germany).
- Dầu ô liu (Italia).
- Tetrachlorur carbon (CCl₄) (China).
- Vitamin E (±) - α - tocopherol (Sigma, USA).
- Omitan - biệt dược có hoạt chất biphenyl dimethyl dicarboxylat, 25 mg (Asia Pharmaceutical, Korea).

4. Phương pháp nghiên cứu:

4.1. Xác định hàm lượng malonyl dialdehyd (MDA) [3,4]

4.1.1- Xác định hàm lượng MDA trong não:

Tách não chuột và nghiền đồng thể trong dung dịch đệm phosphat theo tỉ lệ 1:10 ở nhiệt độ 0-5°C. Lấy 1 ml dịch đồng thể + 1 ml đệm phosphat và ủ ở 37°C trong 15 phút. Sau đó, thêm vào 1 ml acid tricloacetic 10%, li tâm lấy dịch trong cho phản ứng với 1 ml acid thiobarbituric 0,8% ở 100 °C trong 15 phút và đo màu ở λ = 532 nm.

4.1.2- Xác định hàm lượng MDA trong gan:

Tách gan chuột và nghiền đồng thể trong dung dịch KCl 1.15% theo tỉ lệ 1:10 ở nhiệt độ 0-5°C. Lấy 2 ml dịch đồng thể + 1 ml đệm Tris 25 mM và ủ ở 37°C trong 15 phút. Sau đó, thêm vào 1 ml acid tricloacetic 10%, ly tâm lấy dịch trong cho phản ứng với 1 ml acid thiobarbituric 0,8% ở 100 °C trong 15 phút và đo màu ở λ = 532 nm.

4.1.3- Tính toán kết quả:

- Hàm lượng MDA trong các mẫu thử (nM/ml) được tính theo công thức:

$$C_{\text{thử}} = (\text{OD}_{\text{thử}} / \text{OD}_{\text{chuẩn}}) \times C_{\text{chuẩn}}$$

Trong đó: OD: mật độ quang

C: hàm lượng MDA (nM/ml)

- Hoạt tính chống oxy hóa (HTCO) được tính theo công thức:

$$\text{HTCO} (\%) = [(C_{\text{MDA chuẩn}} - C_{\text{MDA thử}}) / C_{\text{MDA chuẩn}}] \times 100$$

4.2. Mô hình gây viêm gan cấp bằng tetrachlorur carbon [5]

Súc vật thử nghiệm được chia làm 2 nhóm:

✓ Nhóm bình thường (không tiêm CCl₄), ký hiệu là CCl₄ -

- *Lô đối chứng*: Chuột được cho uống nước cất hằng ngày trong 6 ngày, sau đó tiêm phúc mô dung dịch dầu ô liu. Sau khi tiêm 24h, tiến hành mổ chuột tách lấy gan, não để định lượng MDA.

- *Lô thử*: Chuột được cho uống các cao thử nghiệm hằng ngày với liều 100 mg/kg trong 6 ngày, sau đó tiêm phúc mô dung dịch dầu ô liu. Sau khi tiêm 24h tiến hành mổ chuột tách lấy gan, não để định lượng MDA.

- *Lô đối chiếu*: Chuột được cho uống Omitan hằng ngày với liều 1viên/kg (tương đương với 25 mg hoạt chất biphenyl dimethyl dicarboxylat) hoặc vitamin E (1 g/kg) trong 6 ngày, sau đó tiêm phúc mô dung dịch dầu ô liu. Sau khi tiêm 24h, tiến hành mổ chuột tách lấy gan, não để định lượng MDA.

✓ Nhóm bệnh lý (tiêm CCl₄), ký hiệu là CCl₄ +

- *Lô đối chứng*: Chuột được cho uống hằng ngày nước cất trong 6 ngày, sau đó tiêm phúc mô dung dịch CCl₄ 5% pha trong dầu ô liu (0.5 g/kg thể trọng). Sau khi tiêm 24h, tiến hành mổ chuột tách lấy gan, não để định lượng MDA.

- *Lô thử*: Chuột được cho uống các cao thử nghiệm hằng ngày với liều 100 mg/kg trong 6 ngày, sau đó tiêm phúc mô CCl₄ (0.5 g/kg). Sau khi tiêm 24h, tiến hành mổ chuột tách lấy gan, não để định lượng MDA.

- *Lô đối chiếu*: Chuột được cho uống Omitan hằng ngày với liều 1viên/kg hoặc Vitamin E (1g/kg) trong 6 ngày, sau đó tiêm phúc mô CCl₄ (0.5 g/kg). Sau khi tiêm 24h, tiến hành mổ chuột tách lấy gan, não để định lượng MDA.

5. Đánh giá kết quả:

Các số liệu được biểu thị bằng trị số trung bình: M ± SEM và xử lí thống kê dựa vào phép kiểm One-way ANOVA. Tác dụng của các

nguyên liệu thử đạt ý nghĩa thống kê với độ tin cậy 95% khi $P < 0.05$ so với lô đối chứng tương ứng (phần mềm kiểm định Sigma Stat).

III. Kết quả và bàn luận

1. Tác dụng của dinh dưỡng trên hàm lượng MDA trong não

Kết quả ở bảng 1 cho thấy:

- Có sự tăng đạt ý nghĩa thống kê hàm lượng MDA trong não (tăng 22-33%) ở lô đối chứng bệnh lý so với lô đối chứng bình thường. Điều

này cho thấy CCl_4 có thể tác động như một stress oxy hóa lên não thể hiện qua việc làm tăng quá trình peroxy hóa lipid màng tế bào não.

- Cao rễ, cao phối hợp rễ-lá và cao lá dinh dưỡng ở liều 100 mg/kg đã duy trì ở mức bình thường hàm lượng MDA trong não các chuột bị gây viêm gan bằng CCl_4 . Tác dụng của các cao dinh dưỡng tương tự với vitamin E, một chất chống oxy hóa điển hình và Omitan, một biệt dược được sử dụng để bảo vệ gan trong các bệnh lý viêm gan cấp hay mãn tính.

Bảng 1: Kết quả tác dụng của dinh dưỡng trên hàm lượng MDA trong não

	Lô (n = 8)	Liều uống (mg/kg)	Hàm lượng MDA (nM/ml)	HTCO (%)
CCl_4 -	Đối chứng	0	26.01 ± 0.62	-
	Cao lá	100	26.06 ± 0.43	-
	Cao phối hợp	100	26.09 ± 0.39	-
	Cao rễ	100	27.66 ± 1.12	-
CCl_4 +	Đối chứng	0	31.81 ± 0.56#	-
	Cao lá	100	25.06 ± 0.34*	21.22
	Cao phối hợp	100	25.57 ± 0.32*	19.62
	Cao rễ	100	26.84 ± 0.23*	15.62
CCl_4 -	Đối chứng	0	27.03 ± 0.55	-
	Vitamin E	1 g/kg	25.99 ± 1.0529	3.85
	OMITAN	25 mg/kg	26.05 ± 1.32	3.63
CCl_4 +	Đối chứng	0	36.00 ± 0.50#	-
	Vitamin E	1 g/kg	26.36 ± 0.99*	26.78
	OMITAN	25 mg/kg	24.53 ± 1.18*	31.86

* $P < 0,05$: So sánh giữa các lô thử với lô đối chứng tương ứng. # $P < 0,05$: So sánh giữa lô đối chứng bệnh lý với lô đối chứng bình thường.

2. Tác dụng của dinh dưỡng trên hàm lượng MDA trong gan

Bảng 2: Kết quả tác dụng của dinh dưỡng trên hàm lượng MDA trong gan

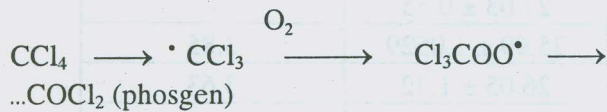
	LÔ (n = 8)	Liều uống (mg/kg)	Hàm lượng MDA (nM/ml)	HTCO (%)
CCl_4 -	Đối chứng	0	11.09 ± 0.27	-
	Cao lá	100	10.96 ± 0.30	1.17
	Cao phối hợp	100	10.69 ± 0.17	3.61
	Cao rễ	100	11.37 ± 0.44	-
CCl_4 +	Đối chứng	0	19.50 ± 0.50#	-
	Cao lá	100	13.19 ± 0.41*	32.36
	Cao phối hợp	100	14.83 ± 0.21*	23.95

	Cao rễ	100	15.21 ± 0.50*	22.0
CCl ₄ -	Đối chứng	0	9.81 ± 0.25	-
	Vitamin E	1 g/kg	8.69 ± 0.62	11.42
	OMITAN	25 mg/kg	10.21 ± 0.18	-
CCl ₄ +	Đối chứng	0	18.44 ± 0.37#	-
	Vitamin E	1 g/kg	14.33 ± 0.96*	22.29
	OMITAN	25 mg/kg	11.42 ± 0.77*	38.07

* P < 0,05: So sánh giữa các lô thử với lô đối chứng tương ứng. # P < 0,05: So sánh giữa lô đối chứng bệnh lý với lô đối chứng bình thường.

Kết quả ở bảng 2 cho thấy:

- Có sự tăng đạt ý nghĩa thống kê hàm lượng MDA trong gan ở lô đối chứng gây viêm gan so với lô đối chứng bình thường (tăng 76-88%). So sánh mức độ tăng MDA trong não và trong gan ở lô đối chứng gây viêm gan bằng CCl₄ cho thấy CCl₄ tác động như một stress oxy hóa lên tế bào gan nhiều hơn tế bào não và có thể được lí giải do CCl₄ khi vào cơ thể sẽ được chuyển hóa chủ yếu bởi hệ thống cytochrom P-450 trong ty thể gan để tạo thành gốc tự do trichloromethyl, các dạng oxy hoạt động và cuối cùng là phosgen như sau:



Chính các dạng gốc tự do trung gian này đã làm tăng quá trình peroxy hóa lipid màng tế bào gây ra tổn thương phá vỡ màng tế bào, gây viêm và mạnh hơn sẽ gây hoại tử (necrosis) hoặc làm chết tế bào (apoptosis) [6]. Bên cạnh đó, CCl₄ còn làm giảm hàm lượng và hoạt tính của các chất chống oxy hóa nội sinh như glutathion trong ty thể gan đưa đến tế bào gan nhạy cảm hơn với stress oxy hóa [7].

- Cao rễ, cao phối hợp rễ-lá và cao lá đỉnh lăng ở liều 100 mg/kg đã duy trì ở mức bình thường

hàm lượng MDA trong gan các chuột bị gây viêm gan bằng CCl₄. Tác dụng của đỉnh lăng tương tự với các thuốc đối chiếu vitamin E và Omitan.

- Công trình nghiên cứu trước đây về tác dụng chống oxy hóa *in vitro* của đỉnh lăng cho thấy hoạt tính chống oxy hóa của cây có thể được xếp theo thứ tự như sau: cao rễ < cao phối hợp < cao lá [8]. Kết quả trong đề tài này cũng cho thấy cao lá đỉnh lăng làm giảm sự tăng MDA trong não và gan chuột bị gây viêm gan bằng CCl₄ với hoạt tính chống oxy hóa mạnh hơn cao phối hợp và cao rễ. Nhận định này tương quan với hàm lượng saponin toàn phần (tính theo chuẩn acid oleanolic) trong các mẫu nguyên liệu. Các nghiên cứu trước đây đã xác định tác dụng chống oxy hóa và bảo vệ gan của các saponin có cấu trúc acid oleanolic [9] và cho thấy hàm lượng acid oleanolic cao hơn trong lá đỉnh lăng có thể quyết định tác dụng chống oxy hóa và bảo vệ gan của lá mạnh hơn rễ.

IV. Kết luận

Đỉnh lăng có tác dụng bảo vệ gan trong mô hình gây viêm gan cấp bằng tetraclorur carbon. Tác dụng chống oxy hóa thể hiện qua việc ức chế quá trình peroxy hóa lipid màng tế bào có thể là một trong những cơ chế tác động bảo vệ gan của đỉnh lăng.

Tài liệu tham khảo

- 1). Nguyễn Thị Thu Hương, Lương Kim Bích. *Tạp chí Dược liệu*, tập 6, số 2 + 3/2001, 84- 86; 2). Nguyễn Thới Nhâm & cộng sự, Tóm tắt kết quả nghiên cứu về Đỉnh lăng từ 1986-1990, 1990; 3). Nguyễn thị Thu Hương, Kinzo Matsumoto, Ryoji Kasai, Kazuo Yamasaki and Hiroshi Watanabe. *Biol. Pharm. Bull.*, 1998, 21, 978-981; 4). Kaori Yobimoto, Kinzo Matsumoto, Nguyen Thi Thu Huong, Ryoji Kasai, Kazuo Yamasaki and Hiroshi Watanabe. *Pharmacol. Biochem. Behav.*, 2000, 66, 661-665; 5). Trần Lê Dung, Trần Công Khánh, Nguyễn thị Minh Thu, Trần Văn Hiền. *Tạp chí Dược học*, số 9/1999, 15-16; 6). Meinrad B, Lutz WDW,

Eberhard B, Andreas S. Z. *Naturforsch*, 2001, 56, 649-659; 7). Kim HJ, Chun YJ, Park JD, Kim SI, Roh JK, Jeong TC. *Planta Medica*, 1997, 63, 415-418; 8). Nguyễn thị Thu Hương & Hoàng thị Mận. *Tạp chí Dược liệu*, tập 8, số 5/2003, 142-146; 9). Nguyễn thị Xuân Hoa, Phạm văn Thanh, Phạm Kim Mãn, Nguyễn thị Minh Khai. *Tạp chí Dược liệu*, tập 8, số 5/2003, 146-149.

Tạp chí Dược liệu, tập 9, số 3/2004 (trang 89-93)

TÍNH ĐA HÌNH CỦA PHÂN TỬ RIBONUCLEASE TỪ NỌC RẮN HỔ MANG ĐEN - II. CÁC DẠNG SẮC KÝ

Nguyễn Văn Thiết⁽¹⁾, Ngô Thị Hải Yến⁽²⁾
⁽¹⁾ Viện Công nghệ sinh học, ⁽²⁾ Viện Hoá học
(Nhận bài ngày 24 tháng 9 năm 2003)

Summary

Polymorphism of Black Snake Venom RNase. II- Chromatographical Forms

Existence of the ribonuclease (RNase) from Viet Nam black cobra venom in multiple molecular forms was confirmed by ion-exchange chromatography: the enzyme was eluted from a CM-cellulose column with two separate peaks. At present, the nature of these RNase chromatographic forms is unknown, but it is probably that they possess quaternary structure.

Key words: Cobra venom, RNase, ion-exchange chromatography, multiple molecular forms.

1. Mở đầu

Trong các nghiên cứu trước đây [8, 9] bằng phương pháp sắc ký sàng lọc, chúng tôi đã xác định được trọng lượng phân tử (M_r) của ribonuclease (RNase) nọc rắn hổ mang đen Việt Nam cao hơn nhiều so với M_r của các enzym khác trong siêu họ RNase A [14]. Kết quả này cho phép giả định rằng RNase có thể có cấu trúc bậc IV - một trong những dấu hiệu quan trọng để một RNase có hoạt tính gây độc tế bào (hoạt tính cytotoxin hay chống ung thư) [2, 3, 6]. Giả định này được củng cố thêm bởi các kết quả nghiên cứu động học bão hoà RNase bởi cơ chất: đường cong P - [S] của enzym này có dạng sigma [11, 13] - dạng động học đặc trưng cho các enzym allosteric với cấu trúc bậc IV xác định hoặc các enzym allosteric có khả năng tự liên hợp - phân ly (tức là các enzym tồn tại ở dạng một hệ thống gồm nhiều oligomer với số tiểu đơn vị khác nhau và có khả năng biến đổi qua lại) [4]. Mặt khác, các kết quả nghiên cứu động học mối phụ thuộc hoạt tính đặc trưng của RNase nọc rắn vào nồng độ của chính enzym đã phát hiện tồn ở ít nhất hai dạng động học của enzym này khác biệt nhau rất nhiều về hoạt tính đặc trưng [12].

Tuy nhiên, các kết quả động học vẫn chỉ là chứng minh gián tiếp tồn ở nhiều dạng phân tử của RNase. Bài báo này trình bày các kết quả chứng minh trực tiếp tồn ở nhiều dạng phân tử khác nhau của RNase nọc rắn hổ mang đen nhận được bằng phương pháp sắc ký trao đổi ion trên cột với CM-cellulose.

2. Vật liệu và phương pháp nghiên cứu

Nọc rắn hổ mang đen đông khô - nguồn RNase, mua ở làng nghề nuôi rắn xã Vĩnh Sơn huyện Vĩnh Tường tỉnh Vĩnh Phúc. Chế phẩm ARN tổng số dùng làm cơ chất cho RNase và nhựa cationit CM-cellulose mua của hãng Sigma. Tất cả các hoá chất cần thiết khác đều có độ sạch phân tích cao.

Phân tách RNase bằng phương pháp sắc ký trao đổi ion trên cột (10 x 1,6 cm) với CM-cellulose được tiến hành như sau: Trong mỗi lần sắc ký cột với nhựa trao đổi ion được cân bằng với đệm citrat 10 mM có giá trị pH tương ứng khác nhau là 5,8, 5,6, 5,5, 5,2, 4,8 và 4,4; sau đó cho lên cột một lượng chế phẩm nọc rắn đông khô (chế phẩm Eo được chuẩn bị từ 100 mg nọc rắn), tiếp theo enzym (protein) được thôi khỏi cột bằng 120 ml gradient 0-1 M NaCl (bình chứa: 60 ml NaCl 1 M

trong đệm citrat 10 mM, bình khuấy: 60 ml đệm citrate 10 mM), thu mỗi phân đoạn 3 ml. Sau khi kết thúc sắc ký, tiến hành xác định protein và hoạt tính RNase trong mỗi phân đoạn thu được.

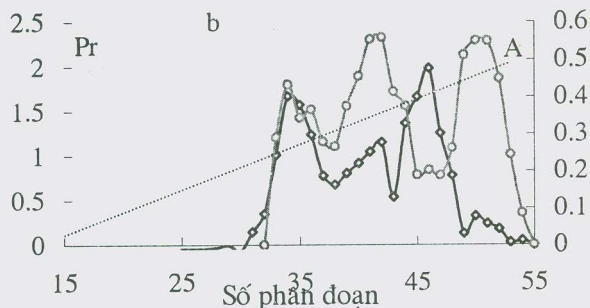
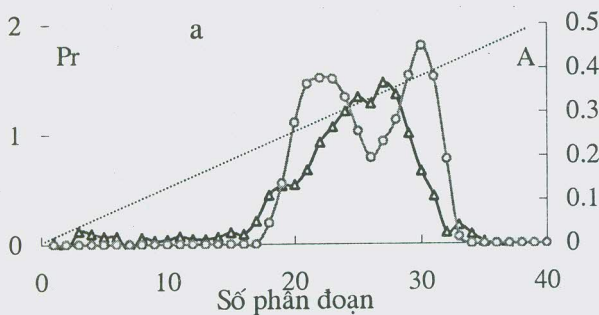
Hoạt tính RNase được xác định theo phương pháp như chúng tôi đã mô tả trước đây [7], sự thay đổi giá trị OD₂₆₀ của dịch phản ứng do thủy phân ARN được đo trực tiếp trên máy GeneQuant DNA/RNA calculator của hãng Pharmacia và UV-visible spectrophotometer UV-1601 của hãng Shimadzu.

3. Kết quả và thảo luận

Các dạng phân tử của RNase nọc rắn nhận được bằng sắc ký trên CM-cellulose

Như đã đề cập ở trên, các nghiên cứu động học đã chỉ ra tồn ở 2 dạng phân tử khác nhau của

RNase trong chế phẩm E₀, nhưng khi phân tách enzym này từ nọc rắn hổ mang đông khô bằng phương pháp sàng lọc phân tử trên cột với Sephadex G-75, chúng tôi chỉ nhận được một đỉnh RNase duy nhất sắc gọn và đối xứng, tương ứng với khối lượng phân tử khoảng trên 40 kDa [8, 9]. Điều này có nghĩa là các dạng RNase phát hiện được bằng phương pháp động học có kích thước như nhau hoặc khác biệt nhau không nhiều về khối lượng phân tử, cho nên chúng không thể phân tách được bằng phương pháp sắc ký sàng lọc phân tử. Tuy vậy, khi phân tách RNase trong nọc rắn hổ mang đông khô trên cột với CM-cellulose chúng tôi nhận được 2-3 đỉnh RNase phân biệt phản hấp phụ khỏi cột ở các nồng độ muối khác nhau. Do CM-cellulose chỉ bền trong vùng pH 4-6, nên sắc ký đã được tiến hành trong đệm citrat 10 mM với các giá trị pH khác nhau trong vùng pH từ 4,4 đến 5,8. Hình 1 là kết quả sắc ký chế phẩm E₀ ở pH = 5,5.



Hình 1. Sắc ký đồ hai lần sắc ký chế phẩm nọc rắn hổ mang đông khô ở pH = 5,5
-Δ- protein (Pr), -O- hoạt tính RNase (A), đường chéo là gradient nồng độ NaCl (0-1M),
được tính theo giá trị trục tung bên phải nhân với 2

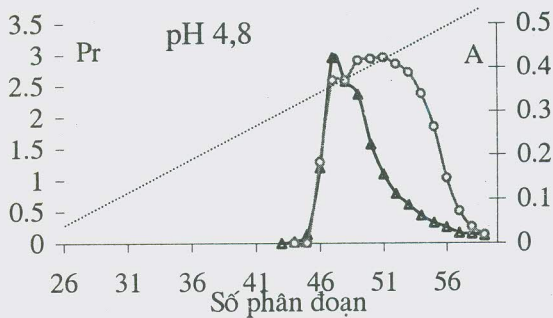
Chúng tôi đã tiến hành 5 lần sắc ký chế phẩm E₀ ở pH = 5,5, trong đó 3 lần nhận được 2 đỉnh RNase phản hấp phụ ở các nồng độ muối tương ứng là khoảng 0,5 và 0,8 M (xem hình 1 a), 2 lần nhận được 3 đỉnh RNase phản hấp phụ ở các nồng độ muối tương ứng là khoảng 0,5; 0,7 và 0,9 M NaCl (xem hình 1 b).

Tiếp theo, chúng tôi đã tiến hành sắc ký chế phẩm E₀ ở các giá trị pH 5,8, 5,6, 5,2, 4,8 và 4,4. Tổng kết kết quả của 11 lần sắc ký ở các giá trị pH khác nhau trong vùng pH = 5,5 - 4,4 (5 lần ở pH 5,5; 2 lần ở pH 4,8 và 1 lần ở mỗi giá trị pH 5,8, 5,6, 5,2 và 4,4) cho thấy những nét chung sau về bức tranh sắc ký đồ nhận được:

- Khi sắc ký chế phẩm E₀ được tiến hành ở các giá trị pH > 5 (ở các giá trị pH là 5,2, 5,5, 5,6 và 5,8)

thì luôn luôn nhận được 2 đỉnh RNase tách biệt rõ rệt, phản hấp phụ khỏi CM-cellulose ở các nồng độ NaCl tương ứng là khoảng 0,6 và 0,8 M. Sắc ký đồ nhận được ở các giá trị pH này đều có dạng giống như sắc ký đồ của sắc ký ở pH = 5,5 trên hình 1 a, ngoại trừ 2 lần sắc ký chế phẩm E₀ ở pH = 5,5 lại nhận được 3 đỉnh RNase phản hấp phụ khỏi CM-cellulose ở các nồng độ NaCl tương ứng là 0,5, 0,7 và 0,9 M như đã nêu ở trên (xem hình 1 b).

- Khi sắc ký được tiến hành ở các giá trị pH < 5 (ở các giá trị pH 4,4 và 4,8) RNase phản hấp phụ khỏi cột trong một vùng nồng độ NaCl khoảng từ 0,6 đến 0,9 M và trên sắc ký đồ chỉ có một đỉnh RNase rất rộng. Sắc ký đồ của một trong các lần sắc ký ở pH < 5 được biểu diễn trên hình 2.



Hình 2. Sắc ký đồ nhận được khi sắc ký chế phẩm nọc rắn đông khô được tiến hành ở các giá trị pH = 4,8

Các ký hiệu như trên hình 1

Từ các kết quả trên, chúng ta thấy RNase trong nọc rắn đông khô (chế phẩm E₀) có nhiều dạng phân tử khác biệt nhau về điện tích bề mặt (điện tích tổng số) và giá trị điện tích tổng số của chúng bị biến đổi cùng với sự thay đổi pH. Ở các giá trị pH > 5,0, các dạng RNase khác biệt nhau rất nhiều về điện tích bề mặt, cho nên chúng được phân tách ra khỏi nhau rất tốt bằng sắc ký trên CM-cellulose. Nhưng ở các giá trị pH < 5,0, các dạng RNase này không khác biệt nhau hoặc khác biệt không nhiều về điện tích bề mặt, cho nên chúng phản hấp phụ khỏi cột CM-cellulose ở dạng một đỉnh RNase rộng. Cho đến nay, chúng tôi vẫn chưa rõ nguyên nhân vì sao trong 2 lần sắc ký ở pH = 5,5 lại nhận được 3 đỉnh RNase khác nhau, mặc dù trong 3 lần sắc ký khác ở pH này và tất cả các lần sắc ký khác ở các giá trị pH > 5,0 chỉ nhận được 2 đỉnh RNase.

Như vậy, bằng phương pháp sắc ký trao đổi ion trên CM-cellulose từ nọc rắn hổ mang đen, có thể nhận được 2 hoặc 3 đỉnh (dạng) RNase phân biệt khác biệt nhau về điện tích bề mặt. Kết quả sắc ký trao đổi ion dường như khẳng định kết luận về tồn ở ít nhất 2 dạng phân tử khác nhau của RNase trong nọc rắn hổ mang đen nhận được bằng nghiên cứu động học của mỗi phụ thuộc A₀ - [E] là đúng [12]. Tuy nhiên vẫn còn chưa rõ liệu các dạng này có phải là monomer hay dimer như đã giả định đối với các dạng động học hay không. Do chưa rõ bản chất của các dạng RNase nọc rắn hổ mang nhận được bằng phương pháp sắc ký trao đổi ion nên chúng tôi tạm gọi chúng là các dạng sắc. Hơn nữa, việc nhận được 2 (thậm chí 3) đỉnh RNase (dạng sắc ký) phân biệt ở các giá trị pH > 5 và chỉ có 1 đỉnh RNase rộng ở các giá trị pH < 5 là dễ hiểu (xem ở trên), thì vẫn chưa rõ vì sao trong 3 lần sắc ký ở pH = 5,5 nhận được 2 đỉnh RNase mà trong 2 lần sắc ký khác cũng ở pH = 5,5 lại nhận được 3 đỉnh RNase.

Khả năng tồn ở nhiều dạng phân tử khác nhau của RNase trong nọc rắn đã được đề cập đến trong các công trình nghiên cứu về RNase nọc rắn của

các tác giả Liên Xô cũ và Ấn Độ. Theo các tác giả Babkina & Vasilenko khi sắc ký nọc rắn từ các loài hổ mang *Naja oxiana*, rắn lục *Vipera lebetina* và một loài rắn khác là *Echis corinatus* đã nhận được nhiều đỉnh RNase [1], còn Mahalakshmi và cộng sự lại chỉ ra khả năng liên hợp - phân ly thuận nghịch phụ thuộc vào sự có mặt của NaCl của RNase từ nọc rắn hổ mang *Naja naja* của Ấn Độ, hơn nữa dạng monomer có hoạt tính cao hơn dạng có M_r cao hơn [5], điều mà chúng tôi cũng đã Đối chứng minh được đối với RNase trong nọc rắn hổ mang đen Việt Nam bằng phương pháp động học [12].

Một số tính chất của các dạng sắc ký của RNase nọc rắn

Theo kết quả sắc ký sàng lọc phân tử trên Sephadex G-75, RNase nọc rắn hổ mang đen ra khỏi cột ở dạng một đỉnh enzym duy nhất nhọn, sắc và đối xứng. Điều này có nghĩa là cả các dạng động học (phát hiện được bằng phương pháp nghiên cứu động học mỗi phụ thuộc A₀ - [E]) và các dạng sắc ký (phát hiện được bằng phương pháp sắc ký trao đổi ion trên CM-cellulose) của RNase nọc rắn hổ mang đen đều có M_r như nhau hoặc gần nhau. Để tìm hiểu rõ thêm về bản chất của các dạng sắc ký nhận được trên đây của RNase nọc rắn hổ mang đen, chúng tôi đã tiến hành nghiên cứu một số tính chất của chúng (xác định pH_{opt}, động học bão hòa enzym bởi cơ chất). Xác định giá trị pH_{opt} của hai đỉnh RNase nhận được trong các lần sắc ký ở các giá trị pH > 5 cho kết quả như sau:

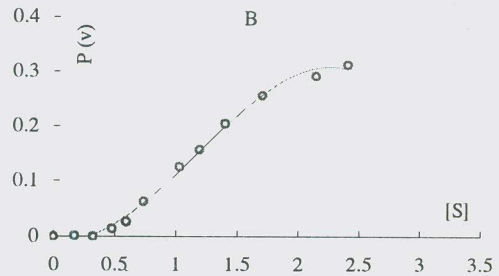
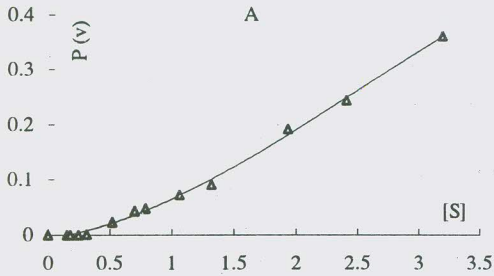
Dạng sắc ký thứ nhất (tương ứng với đỉnh 1):
pH_{opt} = 2,50 ± 0,32;

Dạng sắc ký thứ hai (tương ứng với đỉnh 2):
pH_{opt} = 2,43 ± 0,37.

Như vậy, pH_{opt} của 2 dạng sắc ký của RNase nọc rắn hổ mang đen là gần như nhau và khác biệt không nhiều so với pH_{opt} của enzym này trong nọc

rắn đông khô ($2,53 \pm 0,30$) [10].

Kết quả nghiên cứu động học cho thấy ái lực



Hình 3. Đường cong bão hoà enzym bởi cơ chất của 2 dạng sắc ký (đỉnh) của RNase nọc rắn hổ mang đen nhận được trong sắc ký ở pH = 5,8. A - đỉnh RNase thứ nhất, B - đỉnh RNase thứ hai.

Hoạt tính RNase được xác định trong đệm Gli 10 mM, pH 2,4 theo biến đổi OD₂₆₀ của hỗn hợp phản ứng sau 30 s kể từ khi bắt đầu phản ứng (bảng cho enzym vào). Nồng độ cơ chất và lượng sản phẩm tạo thành tính theo đơn vị OD₂₆₀.

Từ đồ thị biểu diễn mối phụ thuộc giữa sản phẩm tạo thành và nồng độ ban đầu của cơ chất của 2 đỉnh RNase trên hình 3, ta thấy cả 2 dạng đều có đường cong P – [S] hình chữ S, nhưng dạng sắc ký 2 (tương ứng với đỉnh RNase thứ hai) có ái lực với cơ chất cao hơn nhiều so với dạng thứ nhất: trong vùng nồng độ cơ chất khảo sát dạng sắc ký 2 dường như đã đạt bão hoà, trong khi đó đối với dạng sắc ký 1, lượng sản phẩm tạo thành (P) gần như vẫn tỷ lệ tuyến tính với nồng độ cơ chất ([S]) và chưa có dấu hiệu đạt bão hoà ở nồng độ cơ chất cao hơn nhiều so với nồng độ cơ chất đã bão hoà đối với dạng sắc ký 2.

Từ các kết quả sắc ký nọc rắn đông khô trên CM-cellulose trình bày ở trên, có thể kết luận rằng RNase trong nọc rắn hổ mang đen Việt Nam có từ 2 đến 3 dạng phân tử khác biệt nhau nhiều về điện tích bề mặt, cho nên chúng dễ dàng được phân tách ra khỏi nhau bằng phương pháp sắc ký trao đổi ion ở pH > 5. Tuy nhiên, ở pH < 5 các dạng RNase này khác biệt nhau không nhiều về điện tích bề mặt, nên chúng được thối ra khỏi cột ở dạng một đỉnh

của hai dạng sắc ký chính của RNase trong nọc rắn đông khô với cơ chất khác nhau rõ rệt (hình 3).

enzym chung và rộng. Sự tồn ở các dạng phân tử khác nhau của RNase trong nọc rắn hổ mang đen cũng được chứng minh gián tiếp bằng phương pháp nghiên cứu động học của mối phụ thuộc hoạt tính đặc trưng của RNase vào nồng độ của chính enzym. Tuy nhiên cho đến nay, vẫn chưa thể kết luận rõ ràng về bản chất của các dạng RNase này, chúng là các isozym, các oligomer hay các cấu hình khác nhau? Mặc dù vậy, có một điều rõ ràng là RNase nọc rắn hổ mang đen có cấu trúc bậc IV, vì đường cong bão hoà cơ chất của enzym này cả trong nọc rắn thô và trong các chế phẩm enzym có độ sạch cao đều có dạng hình chữ S là dạng đặc trưng cho các enzym allosteric với một cấu trúc bậc IV xác định hoặc của các enzym allosteric có khả năng liên hợp - phân ly (tồn ở ở dạng một hệ thống cân bằng gồm nhiều oligomer với số tiểu đơn vị khác nhau). Trong thời gian tới, chúng tôi sẽ sử dụng các phương pháp điện di có nhuộm RNase trong các điều kiện nativ và thoái hoá để nghiên cứu cấu trúc bậc IV của RNase nọc rắn hổ mang đen.

Tài liệu tham khảo

- 1). Babkina G.T., Vasilenko S.K. (1964). *Biokhimiya*, v. 29, No. 2, pp. 268-272; 2). Donato A.D., Cafaro V., D'Alessio G. (1994). *JBC*, v.269, No26, pp.17394-17396; 3). Kim J.S., Sousek J., Matousek J., Raines R.T. (1995). *JBC*, v.270, No 18, pp.10525-10530; 4). Kurganov B.I. Allosteric enzymes, Moscow 1978; 5). Mahalakshmi Y. V., Jagannadham M. V., Pandit M. W. *Life*, 2000, v. 49, p. 309-316; 6). Piccoli R., Di Gaetano S., De Lorenzo C., Grauso M., Monaco C., Spalletti-Cernia D., Laccetti P., Cinatl J., Matousek J., D'Alessio G., 1999: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, v. 96 (14), p. 7768-7773.17; 7). Nguyễn Văn Thiết (2002). *T/c Sinh học*, tập 24, số 3 tháng 9 năm 2002, tr.59-64; 8). Nguyễn Văn Thiết, Nguyễn Hoàng Tĩnh (2002). Nghiên cứu một số tính chất của ribonuclease từ nọc rắn hổ mang đen (*Naja naja*). Tuyển tập Báo cáo khoa học của Hội nghị Khoa học Hội Hoá sinh Y Dược Hà Nội và các tỉnh phía bắc. Đồ Sơn - Hải Phòng, 2-3/8/2002, tr.82-92; 9). Nguyễn Văn Thiết (2002). *T/c Dược liệu*, tập 7, số 6, tr. 181-185; 10). Nguyễn Văn Thiết, Ngô thị Hải Yến (2003). Một số tính chất đặc trưng của ribonuclease từ nọc rắn hổ mang đen Việt Nam (*Naja naja*). Báo cáo Hội nghị khoa học toàn quốc

Tap chí Dược liệu, tập 9, số 3/2004 (trang 93-95)

NGHIÊN CỨU TÁC DỤNG BỔ DƯỠNG THEO KIỂU TESTOSTERON CỦA CT₁

Nguyễn Thị Vân Thái

Bệnh viện Y học cổ truyền T.W

(Nhận bài ngày 26 tháng 11 năm 2003)

Summary

Testosterone-like Yang Tonic Effect of *Poliarchis dives* (CT₁)

Effect of Poliarchis dives (CT₁) was investigated on changes of the weight of spermatic bags in male Swiss mice. The result showed that CT₁ increased the weight of seminal vesicles with prostate significantly (by 83,33%). This suggests the product can improve spermatogenesis.

Key word: Poliarchis dives, Yang-tonic, Spermatic Bag

I. Đặt vấn đề

Hiện nay, tỷ lệ bệnh nhân mắc hội chứng suy giảm sinh dục ngày một tăng. Đã có một số công trình nghiên cứu về tác dụng bổ dưỡng của thuốc y học cổ truyền [3, 5, 8, 9]. CT₁ là một loại thuốc-thực phẩm giàu chất bổ dưỡng có nguồn gốc từ côn trùng được xây dựng dựa trên kinh nghiệm dân gian [1, 2, 4, 7]. Để góp phần đánh giá tác dụng bổ dưỡng theo kiểu testosterone và tính an toàn của chế phẩm, chúng tôi tiến hành nghiên cứu sự thay đổi trọng lượng túi tinh, một số chỉ tiêu sinh hoá, huyết học trước và sau sử dụng CT₁.

II. Đối tượng và phương pháp nghiên cứu

1. Chế phẩm CT₁ là dịch nghiền của trứng kiến (*Poliarchis dives*) trong nước theo tỷ lệ 1:1.

2. Đối tượng thí nghiệm:

Nghiên cứu được tiến hành trên 75 chuột nhắt trắng đực và 15 thỏ, được chia thành các lô như sau:

- Thỏ khoẻ mạnh, phát triển sinh lý bình thường, có thể trọng trung bình 2,0± 0,2 kg. Thỏ được uống chế phẩm CT₁ 5ml/thỏ/ngày, uống liên tục trong 6 tuần.

- Chuột nhắt trắng đực 4 tuần tuổi (n=75), có trọng lượng 16±1 g, phát triển sinh lý bình thường. Số chuột này được chia ngẫu nhiên thành các lô thí nghiệm: Lô 1 đối chứng dùng 20 con, lô 2 thử

thuốc CT₁ với 30 con và lô 3 với 25 chuột cho uống testosterone làm chuẩn đối chiếu.

Chuột và thỏ được nuôi dưỡng trong điều kiện phòng thí nghiệm với đầy đủ thức ăn, nước uống và chiếu sáng 12^h/ngày.

2.2. Phương pháp nghiên cứu

- Nghiên cứu tác dụng bổ dưỡng của chế phẩm CT₁ theo kiểu testosterone [9]: Sau phẫu thuật cắt bỏ tinh hoàn và thắt động mạch tinh hoàn, chuột được nghỉ 5 ngày, sau đó được chia ngẫu nhiên thành 3 lô thí nghiệm:

+ Lô đối chứng: cho chuột uống 0.5ml nước/con/ngày x 10 ngày liên tục.

+ Lô thử thuốc nghiên cứu: Chuột được uống CT₁ với liều 25g/kg/ngày trong 10 ngày

+ Lô chuẩn: cho uống testosterone (200mg/kg) cùng thể tích và thời gian như lô đối chứng và lô thử thuốc.

- Chỉ tiêu nghiên cứu:

+ Trọng lượng túi tinh và tuyến tiền liệt.

+ Các chỉ tiêu sinh hoá, huyết học trước và sau sử dụng chế phẩm CT₁.

- Các số liệu được xử lý theo phương pháp thống kê y sinh học. Thí nghiệm được tiến hành ở phòng Đông y thực nghiệm, BV Y học cổ truyền trung ương.

III. Kết quả nghiên cứu

3.1. Nghiên cứu tác dụng bổ dưỡng theo kiểu testosterone của CT₁ trên chuột nhắt trắng đực

Kết quả xác định trọng lượng túi tinh và tuyến tiền liệt (mg) của chuột nhắt trắng đực thí nghiệm được trình bày ở bảng 1.

Bảng 1. Trọng lượng túi tinh và tuyến tiền liệt của chuột nhắt trắng đực thí nghiệm

Lô thí nghiệm	N	Trọng lượng túi tinh + tuyến tiền liệt (mg)	%
Lô nước	20	19,2 ± 4,29	100
Lô chuẩn (200mg/kg)	25	89,2 ± 15,32	464,58 **
Lô CT ₁ (25g/kg)	30	35,2 ± 6,98	183,33 *

Ghi chú * P<0,05, ** P<0,001

Kết quả thí nghiệm cho thấy so với lô đối chứng uống nước, CT₁ ở liều 25g/kg gây tăng 183.33% trọng lượng túi tinh và tuyến tiền liệt trên chuột nhắt trắng đã loại bỏ tinh hoàn (P<0.05). Trọng lượng túi tinh và tuyến tiền liệt của lô uống testosterone chuẩn (200 mg/kg) tăng gấp 4,65 lần so với lô đối chứng (P<0.001). Kết quả xác định thành phần hormone sinh dục trong cơ thể kiến cho thấy testosterone chiếm 0,280ng/g và progesteron 0,195ng/kg; ngược lại, trong cơ thể mỗi chứa 0,237ng/g progesteron, 0,163ng/g testosterone [6]. Như vậy, chế phẩm CT₁ ở liều 25 g/kg thể hiện rõ tác dụng tăng cường sinh tinh theo kiểu testosterone. Kết quả nghiên cứu này đã góp phần chứng minh cơ sở khoa học của kinh

thí nghiệm dân gian là sử dụng côn trùng như một món ăn giàu chất bổ dưỡng và vị thuốc bổ dưỡng, cải lão hoàn đồng [1, 2, 4, 7].

3.2. Kết quả nghiên cứu ảnh hưởng của chế phẩm CT₁ đến các chỉ tiêu sinh hoá, huyết học trên thỏ

Chúng tôi tiến hành lấy máu và xác định các chỉ tiêu sinh hoá, huyết học trên thỏ trước và sau khi sử dụng liên tục chế phẩm CT₁ 3 tuần và sau 6 tuần.

3.2.1. Các chỉ tiêu huyết học trước, trong và sau khi sử dụng CT₁

Kết quả nghiên cứu ảnh hưởng của CT₁ đến các chỉ tiêu huyết học trên thỏ được trình bày ở bảng 2.

Bảng 2. Các chỉ tiêu huyết học trước, trong và sau khi sử dụng CT₁

Chỉ tiêu xét nghiệm	Trước thí nghiệm	Sau 3 tuần	Sau 6 tuần
Hồng cầu (x10 ⁶ /mm ³)	5,04 ± 0,50	5,30 ± 0,60	5,30 ± 1,60
Bạch cầu (x10 ³ /mm ³)	7,50 ± 1,40	6,22 ± 1,20	6,90 ± 1,20
Huyết sắc tố (g/dl)	11,20 ± 1,00	11,00 ± 1,40	11,62 ± 1,20
BC limpho (%)	58,50 ± 8,30	59,70 ± 12,60	57,00 ± 14,40
BC trung tính (%)	31,20 ± 7,70	32,20 ± 10,00	29,90 ± 13,00
Tế bào khác (%)	10,32 ± 2,20	10,00 ± 4,40	12,48 ± 3,00

Kết quả theo dõi các chỉ tiêu huyết học trước, trong và sau khi sử dụng CT₁ cho thấy các chỉ tiêu huyết học sau 3 và 6 tuần sử dụng CT₁ không thay đổi trừ hồng cầu, so với trước thí nghiệm tăng từ 5,04 đến 5,30 triệu (xem bảng 2). Như vậy, xu thế gây tăng hồng cầu sau khi sử dụng CT₁ phù hợp với kết quả xác định hàm lượng các nguyên tố vi lượng trong cơ thể mỗi (sắt: 1490,80 mg/kg; kẽm: 190,60 mg/kg) và trong cơ thể kiến (sắt: 1052,64 mg/kg; kẽm: 235,72 mg/kg) [6].

3.2.2. Các chỉ tiêu sinh hoá trước và sau khi sử dụng CT₁

Thí nghiệm được tiến hành trên thỏ khoẻ mạnh. Kết quả xét nghiệm các chỉ tiêu sinh hoá trước và sau khi sử dụng chế phẩm 3 và 6 tuần được trình bày ở bảng 3 cho thấy rõ sự giao động của một số globulin xảy ra sau 3 tuần sử dụng thuốc thử. Sau 6 tuần sử dụng thuốc, các chỉ tiêu này trở về xấp xỉ mức bình thường trước khi thử thuốc. Điều này cho phép nhận định về xu hướng thích nghi của cơ thể với sự tiếp nhận chế phẩm CT₁. Như vậy, không thấy sự thay đổi về sinh hoá và huyết học (trừ số lượng hồng cầu) sau 6 tuần sử dụng chế phẩm CT₁ ở liều 25g/kg.

Bảng 3. Các chỉ tiêu sinh hoá trước và sau sử dụng chế phẩm CT₁

Chỉ tiêu xét nghiệm	Trước thí nghiệm	Sau 3 tuần uống CT ₁	Sau 6 tuần uống CT ₁
GOT (u/l)	38,60 ± 22,00	38,00 ± 5,70	40,40 ± 2,60
GPT (u/l)	78,80 ± 16,00	80,00 ± 13,00	79,20 ± 12,70
Creatinin (mmol/l)	88,82 ± 7,20	84,25 ± 10,80	88,10 ± 10,00
Ure (mmol/l)	2,90 ± 1,50	2,90 ± 0,30	2,30 ± 0,53
Albumin (%)	60,90 ± 4,20	69,00 ± 1,50	64,60 ± 4,20
α.Globulin	22,20 ± 1,20	18,80 ± 3,80	22,20 ± 2,60
β.Globulin	12,70 ± 3,90	9,00 ± 1,00	11,66 ± 3,20
γ.Globulin	12,42 ± 3,60	9,80 ± 1,40	10,60 ± 2,00
A/G	1,28 ± 0,36	2,05 ± 0,20	1,59 ± 0,30

Kết quả thực nghiệm trên đây cho thấy rõ tác dụng bổ dưỡng theo kiểu testosterone của CT₁ trên chuột nhắt trắng đực tiền liệt (tăng trọng lượng túi tinh + tuyến tiền liệt). Có thể nói kết quả thí nghiệm của chúng tôi phù hợp với kết quả nghiên cứu gây phì đại tuyến tiền liệt bằng testosterone không thành công trên chuột nhắt trắng [10]. Kết quả nghiên cứu đã khẳng định tuyến tiền liệt của chuột nhắt quá nhỏ, khó có thể bóc tách để xác định trọng lượng, do vậy sự tăng trọng lượng túi tinh + tuyến tiền liệt là kết quả tăng sinh lượng

tinh trùng sau sử dụng CT₁.

Kết luận

1. Trên chuột nhắt trắng đực bị loại bỏ tinh hoàn, ở liều 25 g/kg CT₁ gây tăng 183,33% trọng lượng túi tinh-tuyến tiền liệt với P<0.05 so với lô đối chứng uống nước.
2. Chế phẩm CT₁ ở liều 25g/kg an toàn sau 6 tuần sử dụng. Trên thử thí nghiệm, chế phẩm CT₁ không gây biến động các chỉ tiêu sinh hoá, huyết học.

Tài liệu tham khảo

- 1). Võ Văn Chi, 1998. Từ điển động vật và khoáng vật làm thuốc ở Việt Nam, Nhà xuất bản y học, 1998; 2). Đỗ Hiệp, 1987. Thức ăn đen. NXB Thanh Niên, 1987; 3). Bành Văn Khừu, Đặng Quốc Khánh (2002). Những học thuyết cơ bản của y học cổ truyền. NXB y học, 2002; 4). Đỗ Tất Lợi, 2000. Những cây thuốc và vị thuốc Việt Nam. Nhà xuất bản Y học, 2000; 5). Nguyễn Khắc Liêu, Nguyễn Thị Tân Sinh và cộng sự (1983) Tác dụng của Ba kích đối với hoạt động tinh dục của nam giới. *Tạp chí sản phụ khoa* số 1-1983. Tổng hội y học Việt Nam, 1983; 6). Nguyễn Thị Vân Thái, 2003. Hàm lượng aminoacids, hormon sinh dục và nguyên tố vi lượng trong kiến và mối. Những vấn đề nghiên cứu cơ bản trong khoa học sự sống, NXB Khoa học và kỹ thuật, Hà Nội, 2003, tr. 509-511; 7). Nguyễn Bá Tĩnh (1991). Tuệ Tĩnh toàn tập- Y hải câu nguyên. Hội y học cổ truyền thành phố Hồ Chí Minh, 1991; 8). Phạm Văn Trinh (2002). Nghiên cứu dịch tế học liệt dương và độc tính trên thực nghiệm bài thuốc y học cổ truyền điều trị liệt dương. Đề tài cấp bộ y tế đã nghiệm thu năm 2002; 9). Nguyễn Văn Thịnh (2000). Nghiên cứu tác dụng của viên Tribelus trong điều trị cường dương. Luận án thạc sĩ y khoa, Đại học y Hà Nội; 10). Đỗ Trung Đàm, Nguyễn Bá Hoạt, Lê Minh Phương, Nguyễn Kim Phương, Đỗ Thị Phương. *Tạp chí Dược liệu*, tập 8, số 6/2003, trang 173-176.

Tạp chí Dược liệu, tập 9, số 3/2004 (trang 95-98)

TÁC DỤNG BẢO VỆ GAN CỦA RỄ CÂY NHÓ ĐÔNG TRÊN TỔN THƯƠNG GAN THỰC NGHIỆM

Phạm Minh Hưng¹, Nguyễn Duy Thuận², Đỗ Trung Đàm², Nguyễn Kim Phương²

1. Viện Thông tin thư viện y học trung ương; 2. Viện Dược liệu

(Nhận bài ngày 23 tháng 3 năm 2004)

Summary

Hepatoprotective Effect of Roots of *Morinda longissima* Y.Z.Ruan Rubiaceae

Our studies on the bioactivities of extracts from the roots of Morinda longissima Y.Z. Ruan Rubiaceae (ML) demonstrated that ML had a hepatoprotective effect against carbon tetrachloride induced hepatic injuries in mice. Aqueous and methanol extracts of the roots at a dose of 10g/kg/day reduced the serum ALT and bilirubine levels and hepatic malonyl dialdehyde (MDA) content in mice intoxicated by intraperitoneal injection of a high CCl₄ dose (10 ml of a 10% CCl₄ solution/kg divided into 3 times every other day) in comparison with those of the pathologic control (P<0.001). The hepatoprotective effect is also observed in the macro- and microscopic histological images of the liver.

Key words: *Morinda longissima*; ALT, Bilirubin, MDA, Hepatoprotective Effect

I. Đặt vấn đề

Nhỏ đông (*Morinda longissima* Y.Z. Ruan - Rubiaceae) là một cây thuốc dân gian quý, đã được đồng bào dân tộc Thái tỉnh Sơn La dùng từ lâu để chữa các bệnh về gan, phù thũng và viêm đại tràng. Cây đã được Bệnh viện y học cổ truyền tỉnh Sơn La áp dụng điều trị từ những năm 1990.

Để có cơ sở khoa học cho việc sử dụng nhỏ đông làm thuốc chữa bệnh gan, chúng tôi đã nghiên cứu tác dụng bảo vệ gan của rễ cây thuốc này trên mô hình gây tổn thương gan thực nghiệm trên chuột nhắt trắng bằng carbon tetrachlorid (CCl₄).

II. Đối tượng và phương pháp nghiên cứu

2.1. Đối tượng: Cao chiết nước rễ cây nhỏ đông và cao khô chiết bằng methanol (cao chiết methanol) rễ cây nhỏ đông, thu hái ở xã Chiềng An, thị xã Sơn La, tỉnh Sơn La.

2.2. Động vật thí nghiệm:

Chuột nhắt trắng giống Swiss, trọng lượng 20 – 22g, mua của Viện Vệ sinh Dịch tễ trung ương.

2.3. Phương pháp nghiên cứu:

2.3.1. Xác định ALT, bilirubin huyết thanh và quan sát hình ảnh mô học gan.

Chuột nhắt trắng được chia thành 4 lô như sau:

Lô 1: Đối chứng sinh lý – Tiêm màng bụng dầu ô liu, 3 liều, cách ngày, với thể tích tương đương với lô 2.

Lô 2: Đối chứng bệnh lý – Tiêm màng bụng dung dịch CCl₄ trong dầu ô liu, 3 liều, cách ngày, tổng liều 10 ml dung dịch CCl₄ 10%/kg.

Lô 3: Thử 1 – Tiêm màng bụng dung dịch CCl₄ trong dầu ô liu với liều như ở lô 2 và cho uống dịch chiết nước rễ cây nhỏ đông, với liều 10g/ kg/ ngày, liên tục 8 ngày liền.

Lô 4: Thử 2 – Tiêm màng bụng dung dịch CCl₄ trong dầu ô liu với liều như ở lô 2 và cho uống

dịch nước pha từ cao khô rễ cây nhỏ đông chiết bằng methanol, với liều 0,67g cao khô/kg/ngày (tương đương 10 g dược liệu khô/kg/ngày), liên tục 8 ngày liền.

Chuột ở lô 1 và 2 uống nước với thể tích tương đương dịch chiết nước rễ cây nhỏ đông. Sau 8 ngày, giết toàn bộ chuột và xác định các thông số sau:

- Xác định hoạt độ enzym ALT huyết thanh theo [3, 7].

- Xác định hàm lượng bilirubin theo [5, 6].

- Xét nghiệm mô bệnh học gan đại thể và vi thể.

2.3.2. Xác định hoạt tính chống oxy hoá của gan theo [1, 4].

Trong thí nghiệm này, cách bố trí thí nghiệm cũng như trên nhưng chỉ có một lô thử dùng dịch nước pha từ cao khô rễ cây nhỏ đông chiết bằng methanol và số chuột dùng nhiều hơn.

2.3.3. Xử lý kết quả nghiên cứu.

- Các trị trung bình được biểu thị theo $M \pm SD$.

Các kết quả nghiên cứu được xử lý thống kê theo test " t " của Student [2].

III. Kết quả nghiên cứu

3.1. Ảnh hưởng của dịch chiết rễ cây nhỏ đông lên hoạt độ enzym ALT:

Kết quả được trình bày ở bảng 1 cho thấy CCl₄ đã làm tăng hoạt độ enzym ALT lên 1,67 lần so với lô đối chứng sinh lý (P< 0,001). Cao chiết nước và cao chiết methanol đã làm giảm hoạt độ enzym ALT đã bị tăng do CCl₄ về gần với lô đối chứng sinh lý, mức giảm này có ý nghĩa thống kê khi so sánh các trị số này giữa các lô thử và lô đối chứng bệnh lý (P < 0,005 và P < 0.001).

3.2. Ảnh hưởng của cao chiết rễ cây nhỏ đông lên hàm lượng bilirubin huyết thanh:

Kết quả được trình bày ở bảng 2.

Bảng 1: Hoạt độ enzym ALT ở các lô chuột thí nghiệm.

STT	Lô	n	ALT (U/ L)	% so với đối chứng sinh lý	% so với đối chứng bệnh lý	P
1	Đối chứng sinh lý	9	43,27 ± 1,98	100		
2	Đối chứng bệnh lý	8	72,13 ± 4,27	166,70	100	P 2,1 < 0,001
3	Cao chiết nước	8	56,41 ± 2,93	130,36	78,21	P 3,2 < 0,005
4	Cao chiết methanol	8	55,95 ± 1,52	129,30	77,57	P 4,2 < 0,001

Bảng 2: Hàm lượng bilirubin huyết thanh ở các lô chuột thí nghiệm.

STT	Lô	n	Bilirubin (µmol/ L)	% so với đối chứng sinh lý	% so với đối chứng bệnh lý	P
1	Đối chứng sinh lý	8	1, 108 ± 0,067	100		
2	Đối chứng bệnh lý	7	1,953 ± 0,105	176,26	100	P 2,1 < 0,001
3	Cao chiết nước	7	1,407 ± 0,050	126,99	72,04	P 3,2 < 0,001
4	Cao chiết methanol	7	1,176 ± 0,079	106,14	60,21	P 4,2 < 0,001

Bảng 2 cho thấy hàm lượng bilirubin ở lô đối chứng bệnh lý tăng 1.76 lần so với lô đối chứng sinh lý, sự khác biệt này có ý nghĩa thống kê (P<0,001). Cao chiết nước và cao chiết methanol đã làm giảm hàm lượng bilirubin tương ứng là 27,96 % và 39,79 % so với lô đối chứng bệnh lý và đưa hàm lượng bilirubin về gần với lô đối chứng sinh lý. Mức giảm này có ý nghĩa thống kê

(P<0,001) khi so sánh các giá trị này giữa các lô thử và lô đối chứng bệnh lý. Hàm lượng bilirubin ở lô dùng cao chiết methanol đã giảm về gần trị của lô đối chứng sinh lý.

3.3. *Đánh giá hoạt tính chống oxy hoá (HTCO) của cao chiết methanol rễ cây nhó đông:*

Kết quả được trình bày ở bảng 3.

Bảng 3: Ảnh hưởng của cao chiết methanol lên hàm lượng MDA ở gan chuột

STT	Lô	n	MDA (Biểu thị bằng mật độ quang)	% so với đối chứng sinh lý	% so với đối chứng bệnh lý	P
1	Đối chứng sinh lý	15	0.295 ± 0,015	100		
2	Đối chứng bệnh lý	19	0.490 ± 0,016	166,1	100	P 2,1 < 0,001
3	Cao chiết methanol	12	0.363 ± 0,024	123,05	74,08	P 3,2 < 0,001

Bảng 3 cho thấy ở lô đối chứng bệnh lý, CCl₄ làm tăng hàm lượng MDA lên 1,66 lần so với lô đối chứng sinh lý trong khi đó cao chiết methanol đã làm giảm 25,92% hàm lượng MDA so với lô đối chứng bệnh lý. Sự khác nhau này có ý nghĩa thống kê (P<0,001), chứng tỏ các chất có trong rễ cây nhó đông có tác dụng chống oxy hoá tốt.

3.4. *Hình ảnh mô học gan đại thể và vi thể:*

Kết quả quan sát hình ảnh mô học đại thể và vi thể gan ở các lô chuột thí nghiệm cho thấy:

3.4.1. *Lô đối chứng sinh lý:*

Cấu trúc gan hoàn toàn bình thường, mô gan nguyên vẹn, khoảng cửa rõ, ranh giới giữa các bè gan rõ rệt, không thấy tổn thương.

3.4.2. *Lô đối chứng bệnh lý:*

Các mẫu đều cho thấy gan bị tổn thương rất nặng, cấu trúc bè gan bị phá vỡ hoàn toàn, tế bào gan nhiều chỗ bị thoái hoá, mất nhân, ranh giới giữa các bè gan bị tổn thương nhiều.

3.4.3. *Lô thử cao chiết nước và cao chiết methanol:*

Gan vẫn bị tổn thương nhưng nhẹ hơn ở lô đối chứng bệnh lý; xen kẽ giữa những bè gan bị thoái hoá còn có những vùng tế bào gan vẫn còn giữ được cấu trúc bình thường, ranh giới giữa các bè gan bị tổn thương ít hơn so với lô đối chứng bệnh lý; một số mẫu gan hầu như vẫn còn giữ được cấu trúc bình thường, không bị tổn thương, khoảng cửa rõ, tế bào gan bình thường.

IV. Kết luận

CCl_4 là chất gây tổn thương gan kinh điển, do khi vào trong cơ thể nó bị biến đổi thành các gốc tự do. Các gốc này thúc đẩy quá trình peroxy hoá lipid (POL) tạo ra các sản phẩm gây độc cho gan biểu hiện ở sự tăng hoạt độ ALT, hàm lượng bilirubin và MDA lên tương ứng là 1,67 lần, 1,76 lần và 1,66 lần so với các trị số này ở lô đối chứng sinh lý.

Trên mô hình gây tổn thương gan thực nghiệm bằng CCl_4 , cao chiết nước và cao chiết methanol rễ cây nhó đông đã có tác dụng bảo vệ gan khá rõ thể hiện ở các chỉ số sinh học sau:

4.1. Cao chiết nước và cao chiết methanol đã làm giảm 21.79% và 22.43% hoạt độ enzym ALT ở các lô thử 1 và thử 2 so với lô đối chứng bệnh lý. Sự khác nhau về các giá trị này có ý nghĩa thống kê ($P < 0.005$ và $P < 0,001$).

4.2. Cao chiết nước và cao chiết methanol cũng đã làm giảm hàm lượng bilirubin 27.96% và 39.79% so với lô chứng bệnh lý. Sự khác nhau về các giá trị này có ý nghĩa thống kê ($P < 0.001$).

4.3. Cao chiết methanol có tác dụng chống oxy hoá tốt, HTCO của cao chiết methanol là 25.92%, có tác dụng ức chế rõ quá trình POL, ngăn cản tác dụng gây độc của CCl_4 .

4.4. Trên hình ảnh cấu trúc đại thể và vi thể gan, hình ảnh tổn thương nặng được quan sát thấy ở lô đối chứng bệnh lý đối với tế bào gan, màng tế bào và màng nhân. Nhưng ở lô chuột được dùng cao chiết rễ cây nhó đông, những hình ảnh này đã được cải thiện, tổn thương nhẹ và có dấu hiệu hồi phục rõ.

Những kết quả trên cho thấy rễ cây nhó đông có tác dụng bảo vệ gan tốt, cần được tiếp tục nghiên cứu để áp dụng vào điều trị.

Tài liệu tham khảo

- 1). Đàm Trung Bảo (1985), *Tạp chí dược học*, số tháng 1, trang 21 – 28; 2). Đỗ Trung Đàm (2003), Sử dụng Microsoft Excel trong thống kê sinh học, NXB Y học, Hà Nội; 3). Vũ Đình Vinh (1997) Hướng dẫn sử dụng các xét nghiệm sinh hoá, NXB Y học, Hà Nội; 4). Nguyễn Quang Thường (1995), *Tạp chí dược học*, số tháng 3, trang 23 – 26; 5). Ngô Văn Trại, Phạm Minh Hưng, Nguyễn Duy Thuần (2004), *Tạp chí Dược liệu*, tập 9, số tháng 1/2004, trang 1-2; 6). Turner R.A. (1965), Screening methods in pharmacology. Test for hepatotoxicity, p.299 – 300, Academic Press- New York and London.; 7). Frank Tietze (1964), Analytical biochemistry, p. 502 – 522; 8). Bergmeyer, H.U., Horder, M., et Rej, J., *J. Clin. Chem. Clin. Biochem.* 24 (1986) 497.

ĐÍNH CHÍNH

Ảnh 1, bìa 4, số 2, tập 9 năm 2004 in là:

Cây rau máu – *Gymnema latifolia* Wall. ex Wight

Họ Asteraceae.

Xin sửa lại là:

Cây rau máu – *Gymnema latifolia* Wall. ex Wight

Họ Asclepidaceae.

Toà soạn chân thành xin lỗi bạn đọc.

CÂY THUỐC VÀ ĐỘNG VẬT LÀM THUỐC Ở VIỆT NAM

Sách do tập thể tác giả gồm các nhà khoa học về y dược, hoá học, sinh học...có thâm niên nhiều năm nghiên cứu và tích lũy kinh nghiệm biên soạn trong 5 năm liên tục.

Nội dung giới thiệu 920 cây và 80 con được lựa chọn từ hơn 3800 loài thực vật và 400 động vật làm thuốc đã biết.

Bộ sách mang sắc thái tài nguyên, chứa đựng những thông tin toàn diện, đầy đủ nhất về dược liệu được cập nhật đến năm 2002 từ nhiều nguồn trong nước và trên thế giới.

Mỗi cây, con làm thuốc là một chuyên luận sâu, có đủ các phần danh pháp, phân loại, phân bố, sinh thái, trồng trọt, bộ phận dùng, chế biến, thành phần hoá học, dược lý thực nghiệm, dược lý lâm sàng, tính vị, công năng, công dụng và các bài thuốc.

Có gần 10.000 bài thuốc ứng dụng để điều trị hầu hết các bệnh mà con người thường gặp, được chọn lọc qua kinh nghiệm sử dụng cây thuốc, động vật làm thuốc trong nền y học cổ truyền của Việt Nam, các nước Đông Nam Á, Trung Quốc, Ấn Độ, châu Mỹ La tinh và nhiều nước khác.

Tranh vẽ cây và động vật làm thuốc được thể hiện rất công phu, có tính khoa học và nghệ thuật cao, kể cả những cây dễ nhầm lẫn, để độc giả nhận dạng dễ dàng và chính xác.

Ngoài danh pháp khoa học và tên thông dụng, còn kèm theo tên gọi của các dân tộc sống ở miền núi của ba miền đất nước và tên gọi theo tiếng nước ngoài (Anh, Pháp). Những cây thuốc và động vật làm thuốc quý hiếm, có nguy cơ tuyệt chủng cũng được các tác giả đặc biệt lưu ý để bảo vệ và lưu giữ nguồn gen.

"**Cây thuốc và động vật làm thuốc ở Việt Nam**" là một bộ sách quý và cần thiết cho nhiều đối tượng với các trình độ khác nhau như các cán bộ nghiên cứu và giảng dạy chuyên ngành cây thuốc, các thầy thuốc y học hiện đại và y học cổ truyền, các nhà khoa học làm công tác hoạch định chính sách bảo vệ nguồn tài nguyên dược liệu, các nhà doanh nghiệp khai thác và bảo tồn nguồn cây, con làm thuốc phong phú của nước nhà, đáp ứng nhu cầu nghiên cứu sản xuất thuốc trong nước và xuất khẩu dược liệu hợp lý, có hiệu quả. Nội dung nhiều chuyên luận trong bộ sách là những gợi ý cho các sinh viên, đặc biệt sinh viên y dược học cổ truyền làm luận văn tốt nghiệp đại học và cao học.

Đối với cộng đồng, bộ sách "**Cây thuốc và động vật làm thuốc ở Việt Nam**" là cẩm nang trong mỗi gia đình, giúp những người làm nghề chữa bệnh cứu người tìm kiếm tài liệu để hiểu rõ cách phòng và chữa bệnh thông thường bằng cây thuốc và động vật làm thuốc.

Sách do Nhà Xuất bản Khoa học và Kỹ thuật Hà Nội ấn hành. Bìa, sơ mi và ruột sách được in trên giấy tốt nhập nội, trình bày đẹp. Sách có cấu trúc khoa học, dễ tra cứu như một cuốn từ điển, khổ sách 20,5 cm x 29,5 cm, in làm 2 tập, mỗi tập gồm 460 cây thuốc và 40 động vật làm thuốc.

Sách đang có bán ở Nhà sách 70 Trần Hưng Đạo, Hà Nội và các nhà sách khác trong cả nước. Tập I: 1138 trang, giá 260.000 đồng; tập II: 1256 trang, giá 280.000 đồng.

THÔNG BÁO – TRAO ĐỔI

Theo quyết định số 20/2003/QĐ-HĐGSNN ngày 24/2/2003 của Hội đồng chức danh giáo sư Nhà nước do GS.TSKH. Phạm Minh Hạc, Chủ tịch Hội đồng ký, điểm công trình của bài đăng trong các tạp chí áp dụng cho ngành dược như sau:

TT	Tên tạp chí	Cơ quan xuất bản	Điểm CT
1	Tạp chí Dược học	Bộ Y tế	Từ 0 đến 1
2	Tạp chí Dược liệu	Viện Dược liệu	Từ 0 đến 1
3	Tạp chí Sinh học	Trung tâm KHTN & CNQG	Từ 0 đến 1
4	Tạp chí HH và C. nghệ hoá chất	Hội hoá học Việt Nam	Từ 0 đến 1
5	Tạp chí Y học VN	Tổng hội Y Dược học VN	Từ 0 đến 1
6	Tạp chí Y học thực hành	Tổng hội Y Dược học VN	Từ 0 đến 1
7	Revue Pharmaceutique	Tổng hội Y Dược học VN	Từ 0 đến 1
8	Tạp chí Nghiên cứu Y học	ĐH Y khoa Hà Nội	Từ 0 đến 1
9	Tạp chí NC Y Dược học Quân sự	Học viện Quân Y	Từ 0 đến 1
10	Tạp chí Y học Tp. HCM	ĐH Y Dược Tp. Hồ Chí Minh	Từ 0 đến 1
11	Tạp chí KH	ĐH Quốc gia HN	Từ 0 đến 0,5
12	Tạp chí Y học quân sự	Cục Quân Y	Từ 0 đến 0,5
13	Tạp chí KNKT Nông nghiệp	ĐH Nông nghiệp I HN	Từ 0 đến 0,5
14	Tạp chí Ngoại khoa	Hội Ngoại khoa Việt Nam	Từ 0 đến 0,5
15	Tạp chí Nội khoa	Hội Nội khoa Việt Nam	Từ 0 đến 0,5
16	Tạp chí Nhi khoa	Hội Nhi khoa Việt Nam	Từ 0 đến 0,5
17	Tạp chí Sản phụ khoa	Hội Sản phụ khoa Việt Nam	Từ 0 đến 0,5
18	Tạp chí Đông Y	Hội Đông Y Việt Nam	Từ 0 đến 0,5
19	Tạp chí Kiểm nghiệm (chỉ tính các bài là kết quả nghiên cứu)	Viện Kiểm nghiệm, Bộ Y tế	Từ 0 đến 0,5
20	TC NC Y Dược học Cổ truyền VN	Viện Y học Cổ truyền VN	Từ 0 đến 0,5
21	Tạp chí Phòng chống Sốt rét và các bệnh Ký sinh trùng	Viện Sốt rét, Ký sinh trùng & Côn trùng	Từ 0 đến 0,5
22	Tạp chí Y Sinh hoá	Hội Sinh hoá	Từ 0 đến 0,5
23	TC Y học Lâm sàng các bệnh n.đới	Hội Hen miễn dịch lâm sàng	Từ 0 đến 0,5
24	Công trình NCKH Đại học Dược	Trường ĐH Dược Hà Nội	Từ 0 đến 0,5
25	Tạp chí Khoa học	Trường ĐH Huế	Từ 0 đến 0,5
26	Tạp chí KH & CN	ĐH Thái Nguyên	Từ 0 đến 0,5
27	Tạp chí KH	Trường ĐH Cần Thơ	Từ 0 đến 0,5
28	Báo cáo KH ở Hội nghị KH Quốc gia và Quốc tế đăng toàn văn trong kỷ yếu (Proceedings) hội nghị		Từ 0 đến 1
29	- Các tạp chí KH chuyên ngành nước ngoài có uy tín (in bằng 1 trong 5 thứ tiếng: Anh, Nga, Pháp, Đức, Trung Quốc) - Các tạp chí KH chuyên ngành nước ngoài khác		Từ 0 đến 1 Từ 0 đến 0,5