

NGHIÊN CỨU KHOA HỌC

Tap chí Dược liệu, tập 6, số 5/2001 (trang 129-131)

NGHIÊN CỨU XÁC ĐỊNH THỜI KỲ THU HOẠCH VÀ PHƯƠNG PHÁP SƠ CHẾ DƯỢC LIỆU CÂY LÃO QUAN THẢO

Nguyễn Bá Hoạt¹, Phạm Văn Ý¹, Nguyễn Thị Dung¹, Trần Văn Diên²,
Trần Danh Việt¹ - 1. Viện Dược liệu, 2. Viện KHKTNN Việt Nam
(Nhận bài ngày 12 tháng 9 năm 2001)

Summary

Determination of Time for Harvest and Method for Post-harvest Processing of *Geranium nepalense*

Productivity and quality of Geranium nepalense Kudo much depend on the developmental stages of the plant. Highest yield and soluble content of the product were obtained at the intensive blooming.

Of different post-harvest processing methods investigated, sun-drying or heating at 50°C proved most suitable ensuring the green color of the product and low expenses.

Key words: Geranium nepalense Kudo, Time for Harvest, Post-harvest Processing.

1 - Đặt vấn đề

Sau khi nghiên cứu đi thực thành công, cây lão quan thảo (*Geranium nepalense* Kudo) đã được đưa vào sản xuất ở nhiều vùng như Sa Pa, Bắc Hà (Lào Cai), Mộc Châu (Sơn La), Đông Văn, (Hà Giang), Mai Châu (Hoà Bình)...

Để đáp ứng nhu cầu sản xuất, đảm bảo chất lượng sản phẩm, chúng tôi đã tiến hành nghiên cứu ảnh hưởng của thời kỳ thu hoạch và phương pháp sơ chế đến năng suất và chất lượng dược liệu cây lão quan thảo. Bài báo này trình bày những kết quả đã thu được.

2 - Đối tượng và phương pháp nghiên cứu

2.1. Đối tượng nghiên cứu: Cây lão quan thảo được trồng thí nghiệm ở Trạm nghiên cứu cây thuốc Sa Pa.

2.2. Phương pháp nghiên cứu:

Xác định thời kỳ thu hoạch: Cây trồng được thu hoạch theo các giai đoạn: sinh trưởng mạnh (trước khi ra hoa), bắt đầu ra hoa, ra hoa rộ và hoa tàn.

Xác định phương pháp sơ chế: Chất lượng dược liệu lão quan thảo được xác định chủ yếu bằng màu xanh của dược liệu, vì vậy dược liệu đã được nghiên cứu sơ chế theo các phương pháp: phơi âm can, phơi nắng nhẹ, phơi nắng to và sấy trong tủ sấy TAMSON ở các nhiệt độ 40° C, 50° C, 60° C, 70° C, và 80° C.

Mỗi công thức được xác định độ ẩm định kỳ,

đến khi dược liệu đạt khoảng 11% thì ngừng phơi, sấy.

Kết quả thí nghiệm được xử lý theo phương pháp nghiên cứu thực vật của D. T. Klein và R. M. Klein. Hàm lượng chất tan trong cồn 70% của dược liệu được xác định theo ĐĐVN II, 2.

3. Kết quả nghiên cứu và thảo luận

3.1. Xác định thời kỳ thu hoạch dược liệu

Để xác định được thời kỳ thu hoạch tối ưu, chúng tôi đã tiến hành khảo sát sự tích lũy chất xanh và hàm lượng chất tan trong cồn của cây lão quan thảo ở các giai đoạn sinh trưởng khác nhau trồng ở Trạm nghiên cứu cây thuốc Sa Pa và thu được kết quả trong bảng 1.

Kết quả nghiên cứu ở bảng 1 cho thấy từ giai đoạn cây chưa ra hoa chuyển sang giai đoạn cây bắt đầu ra hoa là thời kỳ cây sinh trưởng mạnh cả về chiều cao và khối lượng cá thể. (Khối lượng cá thể tăng nhanh, từ 0.31 kg đến 0.45 kg, ≈ 45%). Sự sai khác lớn và rõ ràng giữa hai yếu tố đó đã góp phần cho việc tăng năng suất cây trồng sau này. Cũng trong thời kỳ đó, hàm lượng chất tan bắt đầu tăng từ 23 đến 28%. Từ giai đoạn bắt đầu ra hoa sang giai đoạn ra hoa rộ, khối lượng cá thể tăng chậm lại, từ 0.45 kg/cây đến 0.57 kg/cây (≈ 26%). Nhưng hàm lượng chất tan trong giai đoạn này lại tăng nhanh và đạt mức cao nhất (≈ 38%). Từ giai đoạn ra hoa rộ sang giai đoạn hoa tàn, khối lượng cá thể hầu như không tăng. Đồng thời, hàm

Bảng 1. Sự tích lũy chất xanh và hàm lượng chất tan trong cón 70% của cây lão quan thảo ở các giai đoạn sinh trưởng khác nhau

Giai đoạn sinh trưởng	Cao cây (cm)	Số nhánh (nhánh)	KL tươi (kg/ cây)	KL cây tăng so với khi chưa ra hoa (%)	Hàm lượng chất tan (%)
Chưa ra hoa	54,6 ± 4,5	17,5 ± 2,1 ¹	0,31 ± 0,05	-	23,44
Bắt đầu ra hoa	67,3 ± 4,5	18,1 ± 2,5	0,45 ± 0,05	45,1	28,09
Ra hoa rõ	83,7 ± 5,1	19,7 ± 2,5	0,57 ± 0,03	26,6	38,11
Hoa tàn	89,1 ± 5,3	19,2 ± 2,4	0,59 ± 0,04	3,5	26,20

lượng chất tan trong cây cũng giảm xuống còn 26%. Có thể lúc này cây đã ngừng sinh trưởng cả về chiều cao và sự tích lũy chất khô. Hơn nữa, ở giai đoạn cây tàn, lá xanh rụng nhiều, chỉ còn lại ở phần thân cây, nên hàm lượng chất tan trong dược liệu thấp. Như vậy, cây lão quan thảo ở giai đoạn quá non, hoặc quá già đều có hàm lượng chất tan thấp hơn giai đoạn cây ra hoa rõ.

Từ những kết quả trên, có thể thấy thời kỳ thu hoạch dược liệu tốt nhất vào giai đoạn cây ra hoa rõ. Tuy nhiên, trong sản xuất lớn, thời gian thu hoạch dược liệu có thể tiến hành sau khi cây bắt đầu ra hoa và kết thúc vào thời kỳ cây ra hoa rõ. Có như vậy mới đảm bảo được năng suất và chất lượng sản phẩm.

3.2. Xác định phương pháp sơ chế

Trong quá trình sản xuất dược liệu, sơ chế là một trong những khâu quan trọng trong việc duy trì và nâng cao chất lượng sản phẩm. Đối với cây lão quan thảo, theo yêu cầu của khách hàng, dược liệu phải giữ được màu xanh sau khi sơ chế. Nếu biến thành màu nâu hoặc màu đen thì sản phẩm không được chấp nhận. Để đáp ứng yêu cầu đó, chúng tôi đã tìm hiểu một loạt các biện pháp phơi, sấy khác nhau nhằm tìm ra phương pháp sơ chế tốt nhất.

Kết quả nghiên cứu được trình bày ở bảng 2.

Kết quả nghiên cứu ở bảng 2 cho thấy phơi nắng to hoặc sấy ở 50^o C cho kết quả tốt nhất, dược liệu đạt màu xanh theo yêu cầu của khách hàng. Phơi âm can mất nhiều thời gian làm cho dược liệu chuyển dần từ màu xanh sang màu nâu hoặc màu đen. Ngược lại, sấy ở nhiệt độ cao 70 - 80^o C, hơi nước bị cưỡng bức thoát khỏi dược liệu nhanh, nhưng bay hơi không kịp, ẩm độ cao đọng lại trong lò sấy, kết hợp với nhiệt độ cao làm cho dược

Bảng 2. Ảnh hưởng của phương pháp phơi sấy đến chất lượng dược liệu lão quan thảo

Phương pháp phơi, sấy	Độ ẩm dược liệu (%)	Màu xanh dược liệu
Phơi âm can	11,3 ± 0,15	-
Phơi nắng nhẹ	11,2 ± 0,12	+
Phơi nắng to	11,2 ± 0,11	+++
Sấy ở 40 ^o C	11,3 ± 0,17	++
Sấy ở 50 ^o C	11,2 ± 0,15	+++
Sấy ở 60 ^o C	11,2 ± 0,15	++
Sấy ở 70 ^o C	11,2 ± 0,12	-
Sấy ở 80 ^o C	11,1 ± 0,08	-

Ghi chú: (-) Không xanh, (+) Xanh ít, (++) Xanh trung bình, (+++) Xanh nhiều.

liệu bị chín tái khiến màu xanh biến mất, làm cho dược liệu có màu nâu đen.

Những kết quả trên cho thấy trong quá trình sản xuất lão quan thảo, nếu vùng nào nhiều nắng có thể phơi dược liệu trực tiếp dưới ánh sáng mặt trời vừa giữ được màu xanh của dược liệu vừa hạ dược giá thành sản phẩm trong quá trình chế biến. Nếu phải sấy thì không nên sấy ở nhiệt độ quá cao, nhất là khi khối lượng dược liệu trong lò lớn, thoát hơi nước không kịp sẽ làm cho dược liệu bị đen, không bảo đảm chất lượng sản phẩm.

4 - Kết luận

Từ những kết quả nghiên cứu trên đây, có thể rút ra một số kết luận như sau :

- Các giai đoạn sinh trưởng khác nhau của cây lão quan thảo cho năng suất chất xanh và chất lượng dược liệu khác nhau. Thời kỳ thu hoạch dược liệu tốt nhất là lúc cây ra hoa rõ.

- Các phương pháp sơ chế khác nhau ảnh hưởng rất

lớn đến màu sắc của dược liệu. Tốt nhất là phơi trực tiếp dưới nắng to hoặc sấy ở 50^o C.

Tài liệu tham khảo

- 1). D.T. Klein, R.M. Klein- Phương pháp nghiên cứu thực vật- Nhà xuất bản khoa học và kỹ thuật Hà nội- 1979;
- 2). Mai Lê Hoa- Nghiên cứu về thực vật, hoá học và tác dụng sinh học của một số loài thuộc chi *Geranium* L ở miền Bắc Việt nam - Tóm tắt luận án tiến sỹ dược học, 2001; 3). Phạm Văn Ý, Trần Văn Diễn, Bùi Thị Bằng, Nguyễn Văn Thuận, Nguyễn Bá Hoat, Đinh Văn My. *Tạp chí Dược liệu*, tập 1, số 3 + 4/ 1996; 4). Phạm Văn Ý, Bùi Thị Bằng, Lê Kim Loan, Lê Tùng Châu, Trần Văn Diễn. *Tạp chí Dược liệu*, tập 2, số 3/ 1997; Dược điển Việt Nam, II, 2.

Tạp chí Dược liệu, tập 6, số 5/2001 (trang 131-134)

GÓP PHẦN NGHIÊN CỨU THÀNH PHẦN HÓA HỌC CỦA TINH DẦU SAU SAU (*LIQUIDAMBAR FORMOSANA HANCE*) Ở VIỆT NAM

Trần Huy Thái, Trần Minh Hợi, Nguyễn Quang Hưng, Vũ Thị My

Viện Sinh thái và Tài nguyên Sinh vật

Laurent Severac - Công ty Aromasia

Nguyễn Xuân Phương - Trung tâm Giáo dục và Phát triển Sắc ký VN

(Nhận bài ngày 12 tháng 6 năm 2001)

Summary

Contribution to the Study on Chemical Composition of *Liquidambar formosana* Oil in Vietnam

Liquidambar formosana is a large, 20 - 40 m high tree. Leaves simple, alternate, trilobed, regularly serrulate at the margin. Flowers monosexual. It is widely distributed in many provinces of North Vietnam, mainly in Hoabinh, Hatay, Vinhphuc, Phutho and Caobang. Oil content in branches and leaves was 0.17%, on air-dry basis. Analyzed by GC/MS, the oil gave more than 100 constituents of which 84 were found at more than 0.1%. Major constituents were: α -pinen (18.7%), β -pinen (16.1%), *p*-cymen (8.8%), limonen (8.3%) and terpinen-4-ol (8.7%).

Key words: Liquidambar formosana Hance, Oil, Chemical Composition.

1. Đặt vấn đề

Cây sau sau (*Liquidambar formosana* Hance) thuộc họ Sau sau (Hamamelidaceae), là cây gỗ lớn, phân bố rộng, chiếm ưu thế ở rừng thứ sinh đặc biệt là vùng gò đồi trung du Việt Nam. Cây có nhiều công dụng như lá non làm rau thơm, gỗ cung cấp nguyên liệu làm giấy, vỏ thân có nhựa mũ được sử dụng làm thuốc. Một số nơi còn nuôi sâu cước trên lá sau sau để lấy dây cước có tính năng rất bền và được thị trường ưa chuộng [1-5]. Lá và nhựa sau sau có tinh dầu. Ở Việt Nam, những nghiên cứu về tinh dầu nhựa cây sau sau mới chỉ được đề cập đến trong công trình của Phạm Trương Thị Thọ; tác giả đã xác định trong tinh dầu có 17 hợp chất [6].

Việc tìm kiếm nguồn tinh dầu mới trên cơ sở nghiên cứu về đặc điểm sinh học và thành phần hóa học của tinh dầu sau sau nhằm đề xuất khả năng khai thác tự nhiên cũng như gây trồng phát triển cây này là hướng nghiên cứu đang được quan tâm ở Việt Nam. Trong bài báo này, chúng

tôi trình bày một số kết quả mới về thành phần hóa học của tinh dầu trong lá cây sau sau.

2. Đối tượng và phương pháp nghiên cứu

Nguyên liệu là lá cây sau sau thu được từ vùng Ngọc Thanh - Mê Linh - Vĩnh Phúc vào tháng 6 năm 2000.

Định lượng tinh dầu bằng phương pháp chưng cất kéo theo hơi nước có hồi lưu trong thiết bị Clevenger với thời gian là 4 giờ.

Phân tích định tính và định lượng một số thành phần hóa học của tinh dầu bằng phương pháp sắc ký phân giải cao (HRGC) và sắc ký khí - khối phổ (GC/MS); thứ tự rửa giải trên cột tách không phân cực HP - 1, các chất được so sánh với thư viện của máy, các chất chính còn được so sánh với chất chuẩn, cùng với các điều kiện chuẩn tại công ty Aromasia (Cộng hòa Pháp) và Trung tâm Giáo dục và Phát triển Sắc ký Việt Nam, với điều kiện chạy như sau:

+ Tinh dầu được làm khan bằng Na_2SO_4 , để trong tủ lạnh ở nhiệt độ $< 5^\circ\text{C}$, trước khi đem phân tích HRGC: sử dụng cả hai loại cột sắc ký không phân cực (HP-1) và phân cực Carbowax-20M với điều kiện 60°C (2 min) tăng nhiệt độ $4^\circ/\text{min}$ cho đến 220°C , giữ nhiệt độ này trong 20 min.

+ Thiết bị: GC model HP 5890 Series II Plus HP 6890 và GC/MS model HP 5890 Series II/ HP 5871 MSD. Khí mang N_2 và He [7].

3. Kết quả nghiên cứu và thảo luận

3.1. Đặc điểm sinh học

Sau sau là loại cây gỗ lớn cao từ 20 đến 40 m. Lá xẻ thùy chân vịt, lúc non có phủ một lớp lông hình sao, rụng vào mùa đông, lá kèm hình dải. Hoa

đơn tính cùng gốc, nở vào tháng 3 - 4. Quả vào tháng 9 - 10, hình cầu gồm nhiều quả nang với lá đài tồn tại. Hạt có cạnh. Cây phân bố khắp nơi, chiếm ưu thế ở rừng thứ sinh thuộc các tỉnh Vĩnh Phúc, Phú Thọ, Hòa Bình, Lạng Sơn...

3.2. Thành phần hóa học của tinh dầu

Hàm lượng tinh dầu từ cành mang lá của cây sau thu tại Mê Linh - Vĩnh Phúc đạt 0,17% theo nguyên liệu khô không khí.

Phân tích bằng sắc ký khí phân giải cao (HRGC) và sắc ký khí - khối phổ (GC/MS), chúng tôi đã xác định được trên 100 hợp chất trong tinh dầu, trong đó có 84 hợp chất có hàm lượng từ 0,1% trở lên.

Bảng 1. Thành phần hóa học của tinh dầu lá sau sau.

Số TT	Hợp chất	Hàm lượng (%)	Số TT	Hợp chất	Hàm lượng (%)
1	2-methyl-3-buten-2-ol	vết	57	2-thiophenecarboxaldehyd	0,1
2	3-methyl butanal	vết	58	2-methyl-4-ethylenetetrahydropyridin	0,4
3	(Z)-hexenyl acetat	0,4	59	3-hexen-2-on, 3,4-dimethyl	0,5
4	(Z)-hexenol-2	vết	60	thymol	0,1
5	hexyl format	0,1	61	sabinol	0,4
6	α - pinen	18,7	62	2-acetyl cyclopentanon	1,9
7	camphen	vết	63	(S)-2-methylen-1-cyclohexanol	0,5
8	δ -3-careen	3,7	64	1-acetyl-2 (2-propanon)-cyclopentanon	0,1
9	β - pinen	16,1	65	geranyllinelol	0,2
10	α -terpinen	0,1	66	alcol benzylic	0,3
11	α -phellandren	1,6	67	dioctadecyl ester của acid phosphonic	0,2
12	myrcen	1,7	68	2,6,6-trimethyl-2-cyclohexen-1-ol	0,1
13	(Z)-3-hexenyl acetat	vết	69	(E)-3-isopropyl-6-oxo-2 heptenal	0,3
14	p-cymen	8,8	70	chứa kháng định	0,3
15	limonen	8,3	71	eicosan	0,2
16	(E)- β -ocimen	vết	72	methyl ester của succinylaceton	0,2
17	(Z)- β -ocimen	0,1	73	2,6 dimethyl-2,4-heptadien	vết
18	(Z)-linalol oxid	vết	74	3,3,6-trimethyl-1,4-heptadien-6-ol	0,1
19	terpinolen	0,2	75	2,4-methanoprolin ?	0,2
20	γ -terpinen	vết	76	6-methoxy-4-methyl-2H-pyran-2-on	0,2
21	epoxy- α -pinen	0,4	77	5-hydrox-3-cyclohexen-1-methanol	0,1
22	2-furanon 5-methyl	0,5	78	3-(2-thienyl)-2-pentanon ?	0,4
23	thujyl alcohol	vết	79	chứa kháng định	0,2
24	fenchyl-alcol	0,2	80	chứa kháng định	0,1
25	4-methylen-spiro (2,4) heptan	vết	81	methyl 2 (Z)-pentenyl ether	0,7
26	2-cyclohexan-1-ol	0,5	82	chứa kháng định	0,1

27	bicyclo (3.1.1) heptan-3-ol	0,6	83	4 hydroxy-3-methyl -2 cyclohexen-1-on	0,7
28	1-methoxy-1,3-cyclohexadien	0,2	84	6-methyl-2-heptanon	0,4
29	3,5,5-trimethyl cyclohexen	0,3	85	2-methyl-2-butenoic acid	0,2
30	exo-methyl-camphenilol	vết	86	4-methyl-5-vinylthiazol	0,1
31	pinocarvon	0,1	87	β -caryophyllen	0,7
32	M-cresol	0,2	88	chứa kháng định	vết
33	borneol	0,1	89	3,4 dimethyl-3-cyclohepten-1-on	0,3
34	4-isopropyl-2-cyclohexen-1-on	0,6	90	2,5-dimethyl-3-hexyn-2,5-diol	0,1
35	terpinen-4-ol	8,7	91	dihydrocarvon	vết
36	myrtenal	0,3	92	1,2,4-trihydroxy-p-menthan	0,6
37	α -terpineol	3,3	93	aromadendren	0,1
38	myrtenol	0,4	94	methyl bornyl ether	vết
39	4-methyl-bicyclo [3.1.0] hexan-3-ol	0,1	95	fenchon	0,1
40	(Z)-piperitol	0,1	96	γ -muurolen	vết
41	2-acetyl cyclopentanon	0,1	97	1-(1-ethoxyethenyl) cyclohexen	vết
42	ascaridol	0,3	98	5-(1-methylentyl)-3-nonen-2,8-dion	0,1
43	cuminic aldehyd	0,1	99	guajil acetat	0,2
44	2-furancarboxaldehyd	1,3	100	3,4-dimethyl-3-cyclohepten	vết
45	acid acetic	0,1	101	verdoracin	vết
46	1,3 dimethyl cyclopentanol	1,1	102	1-hydroxymethyladamentan	vết
47	1,2,3,4-tetramethyl cyclobuten	vết	103	chứa kháng định	vết
48	1-methyl, 2-cyclohexen-1-ol	0,2	104	1-methylen-2-vinyl-cyclopenten	vết
49	4-methoxy pyridin	0,4	105	(Z)-nerolidol	0,2
50	2-hydroxy-4,6-dimethyl pyrimidin	vết	106	caryophyllen oxid	1,1
51	2-acetylthiazol	0,2	107	spathulenol	0,7
52	3,3,5,5-tetramethyl cyclopenten	0,4	108	viridiflorol	0,2
53	cuminic alcohol	0,2	109	ambrinol	0,1
54	2-ethyl-5 methyl furan	0,4	110	2-phenylthio-bicyclo (2.2.1) heptan	vết
55	7-hydroxy, 3,7-dimethyl octanal	vết	111	cadinol	0,1
56	3-nonen-2-on	vết			

Bảng phân tích sắc ký khí - khối phổ, hơn 100 hợp chất trong tinh dầu đã được xác định, trong đó, những hợp chất có hàm lượng từ 0,1% trở lên là 84.

Các hợp chất thuộc nhóm monoterpenoid là thành phần chủ yếu của tinh dầu, chiếm khoảng 80% trọng lượng tinh dầu. Những hợp chất chủ yếu của nhóm này là α -pinen (18,7%); β -pinen (16,1%); p-cymen (8,8%); terpinen-4-ol (8,7%) và limonen (8,3%). Các hợp chất thuộc nhóm

sesquiterpenoid chỉ chiếm 15% trọng lượng của tinh dầu.

Phạm Trương Thị Thọ và cộng sự đã xác định được 17 hợp chất trong tinh dầu nhựa cây sau sau với thành phần chính là α -pinen (25,5%), β -pinen (16,8%), borneol (9,2%), limonen (8,4%) và α -terpineol (6,5%) [6].

Như vậy, về cơ bản những thành phần hoá học chính của tinh dầu trong lá và nhựa sau sau gần

giống nhau.

Kết luận

- Hàm lượng tinh dầu từ cành mang lá của cây sau sau đạt 0,17% theo nguyên liệu khô không khí.
- Thành phần hoá học của tinh dầu lá sau sau khá phức tạp, hơn 100 hợp chất trong đó 84 hợp chất có hàm lượng từ 0,1% trở lên đã được xác định. Các hợp chất theo nhóm monoterpenoid là thành phần

chủ yếu của tinh dầu chiếm khoảng 80%; các thành phần thuộc nhóm sesquiterpenoid chỉ chiếm khoảng 15% trọng lượng tinh dầu.

- Thành phần hóa học chính của tinh dầu sau sau gồm α -pinen (18,7%); β -pinen (16,1%); p-cymen (8,8%); limonen (8,3%) và terpinen-4-ol (8,7%).

Lời cảm ơn: Các tác giả cảm ơn PGS.TSKH Nguyễn Xuân Dũng đã tạo điều kiện cho việc thực nghiệm và góp ý bổ sung cho bài báo này.

Tài liệu tham khảo

- 1). Võ Văn Chí, Lê Khả Kế và nnk. Cây cỏ thường thấy ở Việt Nam. 1995. Nxb Khoa học - Kỹ thuật; 2). Võ Văn Chí. Từ điển cây thuốc Việt Nam. 1997. Nxb Y học; 3). Phạm Hoàng Hộ. Cây cỏ Việt Nam. Quyển 2 - Tập 2. 1991. Nxb Montréal; 4). Đỗ Tất Lợi. Tinh dầu Việt Nam. 1985. Nxb Y học TP. Hồ Chí Minh; 5). Lâm Quan Thanh. Cơ sở sản xuất tinh dầu ở địa phương. 1963. Nxb Công nghiệp; 6). Ch.P. Ivanop, L.K.Yankov and Pham Truong Thi Tho. On the composition of the essential oil from the besin of *Liquidambar formosana* Hance. Rivista Italiana essence profumi, pianta officiali nomi soporti cosmetica derosol Agosto 1969; 70. Nguyen Xuan Dung, Pham Van Khien, Tran Minh Hoi, Ninh Khac Ban, P. A. Leclercq, A. Musselli, A. Bighelli, J. Casanova. The composition of the seed oil of *Hibiscus abelmoschus* L. growing in Vietnam. 1999. J. Essential. Oil Res.(USA). P. 447-452

Tap chí Dược liệu, tập 6, số 5/2001 (trang 134-137)

COUMARINS FROM *CLAUSENA EXCAVATA*

Trịnh Thị Thủy, Trần Văn Sung - Institute of Chemistry, NCNSI, Vietnam
Guenter Adam - Leibniz-Institute of Plant Biochemistry, Halle (Saale), Germany
(Nhận bài ngày 7 tháng 11 năm 2000)

Summary

*The coumarins anisocoumarin-H, 7-[(E)-7'-hydroxy-3',7'-dimethylocta-2',5'-dienyloxy]-coumarin and 5-geranyloxy-7-hydroxycoumarin have been isolated from the leaves of *Clausena excavata*, in addition to fourteen new coumarins, three known limonoids and the carbazole alkaloid clauszoline-M. Their structures have been identified by MS, ¹H- ¹³C- and 2D-NMR investigations.*

Keywords: *Clausena excavata*, Rutaceae, anisocoumarin-H, 7-[(E)-7'-hydroxy-3',7'-dimethylocta-2',5'-dienyloxy]-coumarin, 5-geranyloxy-7-hydroxycoumarin.

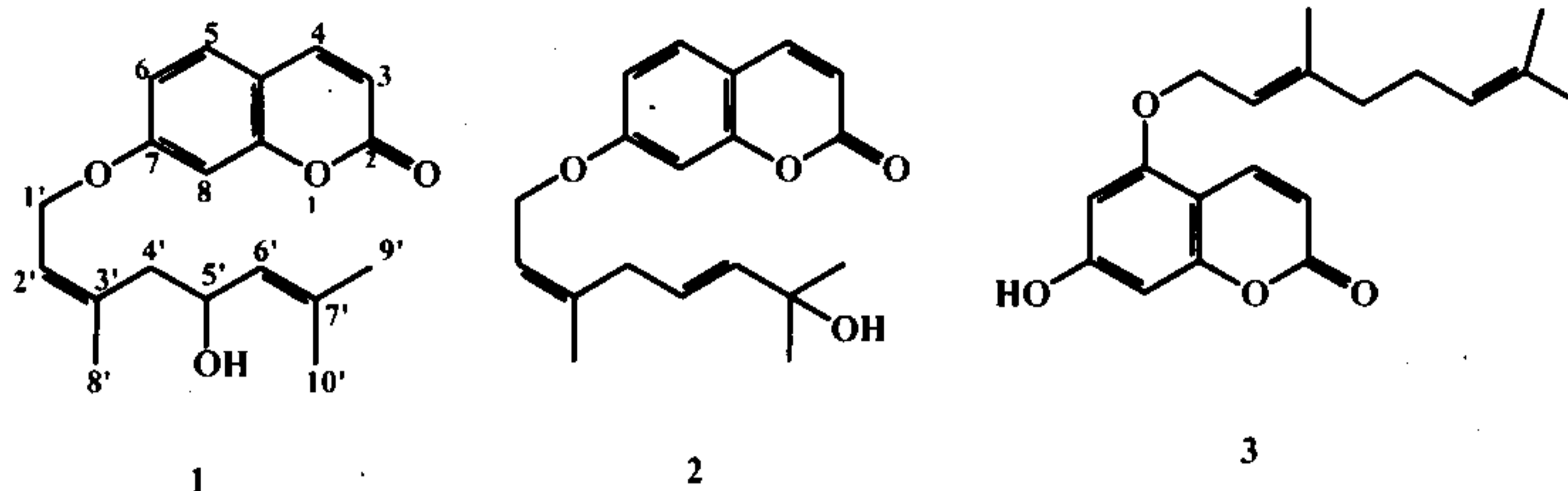
Introduction

Clausena excavata Burm. (Rutaceae) is a 1.5 m high shrub growing wild or cultivated in Southeast Asia [1]. The plant is used as a folk medicine for the treatment of paralysis, ulcerated nose, colic, stomach trouble, fever, headache, snake bite and abdominal pain. It is insecticidal, tonic and vermifuge [2]. The plant is known to be rich in carbazole alkaloids, coumarins [3] and limonoids [4]. Recently, we have studied the constituents of *Clausena excavata* collected in Vietnam and have found fourteen new coumarins (excavatin A-M) in addition to a known carbazole

alkaloid and three limonoids [5]. This paper describes the isolation and structural elucidation of further three coumarins: Anisocoumarin-H, 7-[(E)-7'-hydroxy-3',7'-dimethylocta-2',5'-dienyloxy]-coumarin and 5-geranyloxy-7-hydroxycoumarin from the leaves of *Clausena excavata* collected in Cuc Phuong National Park, Vietnam.

Results and discussion

The methanol extract of the leaves was extracted with n-hexane followed by EtOAc and n-BuOH. The residue of the EtOAc extract was fractionated by a combination of silica gel



column chromatography and preparative TLC to give coumarins along with alkaloids and limonoids as shown in the experimental.

Compounds **1-3** were found to be coumarins by their color reaction with alkaline hydroxyamine followed by FeCl_3 [6] as well as their UV and IR absorptions.

Anisocoumarin-H (**1**) was found to be a 7-substituted coumarin by the resonance signals at δ 6.25 (1H, d, $J=9.6$ Hz), 7.64 (1H, d, $J=9.6$ Hz) and δ 7.37 (d, $J=8.5$ Hz, H-5). The further splitting of the H-6 signal and the appearance of another doublet of those ($J=8.4$ and 2.4 Hz) at δ 6.84 indicated that C-8 was not substituted. Its mass spectrum underwent facile loss of $\text{C}_{10}\text{H}_{16}\text{O}$ to give the base peak at m/z 162. The $^1\text{H-NMR}$ spectrum of **1** showed a coumarin system with an

additional C_{10} moiety, which consisted of three vinyl methyl groups (δ_{H} 1.82; 1.71; 1.70; δ_{C} 18.2; 25.6 and 17.0), two methylenes (δ_{H} 4.63; 2.31 and δ_{C} 65.2; 47.7), two trisubstituted double bonds (δ_{H} 5.57; 5.18; δ_{C} 138.9; 135.5), three methines (δ_{C} 65.2; 121.7; 128.7) and a one-proton D_2O exchangeable broad singlet at δ_{H} 3.52 ppm (5'-OH). This C_{10} (5'-hydroxy-3',7'-dimethyl-octa-2',6'-dienyloxy) moiety linked at C-7 through an oxygen atom. The above spectroscopic data are best accommodated by structure **1** for anisocoumarin-H [7-(5'-hydroxy-3',7'-dimethyl-octa-2',6'-dienyloxy)-coumarin]. The proposed structure **1** was consistent with the $^{13}\text{C-NMR}$ spectrum (table 2), in which all the carbon atoms were assigned using DEPT technique. This compound was isolated for the first time from the leaf of *Clausena anisata* [7].

Table 1. $^1\text{H-NMR}$ data of coumarins **1-3** [CDCl_3 , δ values, $J(\text{Hz})$ in parentheses]

Position	1 ^a	2 ^a	3 ^b
3	6.25 d (9.6)	6.25 d (9.4)	6.13 d (9.6)
4	7.64 d (9.6)	7.64 d (9.4)	8.05 d (9.6)
5	7.37 d (8.5)	7.40 d (8.6)	
6	6.84 dd (8.5; 2.4)	6.85 dd (8.2; 2.4)	6.62 br s
8	6.81 d (2.4)	6.82 d (2.4)	6.32 br s
1'	4.63 d (6.4), 2H	4.60 d (6.6), 2H	4.59 d (6.4), 2H
2'	5.57 tq (6.3; 1.1)	5.49 tq (6.3; 1.3)	5.48 t (6.4)
4'	2.22 dd (13.7; 5.0) 2.31 dd (13.8; 5.0)	2.79 d (6.4)	2.08 m
5'	4.53 dd (8.3; 5.2)	5.62 dt (15.5; 6.4)	2.13 m
6'	5.18 dq (7.7; 1.4)	5.68 d (15.5)	5.09 t (6.2)
8'	1.82 s	1.33 s	1.61 s
9'	1.71 d (1.1)	1.33 s	1.81 s
10'	1.70 d (1.1)	1.75 d (1.3)	1.74 s
OH	3.52 br s		

^a 300 MHz; ^b 500 MHz

Compound **2** was characterized primarily by its $^1\text{H-NMR}$ spectrum. This revealed a pattern of aromatic protons typical of a coumarin nucleus substituted only at C-7, similar to compound **1**.

The remaining resonances indicated a geranyl-oxy side-chain. A deshielded oxy-methylene resonance coupled with a methine proton required the presence of an $\text{O-CH}_2\text{-CH=C(Me)-}$

Table 2. ^{13}C -NMR data of coumarins 1-3 (CDCl_3 , δ values)

Position	1 ^a	2 ^a	3 ^b
2	163,1	162,0	162,0
3	113,0	109,6	109,6
4	143,4	140,2	140,2
4a	112,5	103,9	103,9
5	128,7	156,8	156,8
6	113,2	96,4	96,4
7	161,3	161,5	161,5
8	101,5	95,7	95,7
8a	155,8	156,5	156,5
1'	65,2	65,7	65,7
2'	128,7	118,4	118,4
3'	138,9	142,1	142,1
4'	47,7	35,9	35,9
5'	66,4	26,2	26,2
6'	121,7	123,6	123,6
7'	135,5	132,0	132,0
8'	18,2	17,7	17,7
9'	25,6	25,6	25,6
10'	17,0	16,7	16,7

^a 75,5 MHz; ^b 125,5 MHz

R moiety. Other proton resonances suggested a $-\text{CH}_2\text{-CH}=\text{CH}-$ group, in which the olefinic protons were *trans*, and a $-\text{C}(\text{OH})\text{Me}_2$ terminal unit. The linkage between these three sub-units was established by a series of NOE experiments in which irradiation of the methyls of the isopropanol system caused enhancement of the *trans* olefinic protons and irradiation of the vinylic methyl led to a small enhancement of both methylene groups. Based on these spectral data, the structure of **2** was confirmed as 7-[(*E*)-7'-hydroxy-3',7'-dimethyl-octa-2',5'-dienyloxy]-coumarin. This coumarin was known for the first time from *Phebalium canaliculatum* cultivated in Australian National Park Botanic Gardens, Canberra [8].

Compound **3** was isolated in the form of a colorless powder. The molecular formula was determined as $\text{C}_{19}\text{H}_{22}\text{O}_4$ by HR-MS. The UV spectrum showed $\lambda_{\text{max}}^{\text{MeOH}}(\log \epsilon)$: 223 (3.96), 242 (3.74), 247 (3.76), 268 (2.32), 328 nm (3.96) which are similar to those of 5,7-dihydroxycoumarin. Their IR bands appeared at ν_{max}^* 3014 and 1718 cm^{-1} (a hydroxy group and an α,β -unsaturated lactone). The ^1H -NMR showed AB-type doublets at δ 6.13 (H-3) and 8.05 (H-4) (1H, $J=9.6$ Hz each), *meta*-couplets at δ 6.62 (H-6) and δ 6.32 (H-8) (1H, br s each). These results, coupled with the observation of

the H-4 signal at 8.05 and at lower field compared with that of coumarin lacking C-5 oxygen function, indicated the presence of a 5,7-oxygenated coumarin nucleus in the molecule. The remaining signals at δ 5.48 (1H, t, $J=6.4$ Hz), 5.09 (1H, t, $J=6.2$ Hz), 2.13 (4H, m), 1.82; 1.74; 1.61 (3H, s each), coupled with two characteristic ions at m/z 245 and 191 arising from loss of $[\text{C}_5\text{H}_9]$ from the molecular ion in EI-MS, as well as the appearance of NOE enhancement between the $\text{H}_2\text{-1}'$ (δ 4.59) and 3'-Me (δ 1.74) signals suggested that this coumarin contains a geranyloxy moiety $[-\text{OCH}_2\text{CH}=\text{C}(\text{CH}_3)\text{-CH}_2\text{CH}_2\text{CH}=\text{C}(\text{CH}_3)_2]$ at C-5. From these data and by comparison with reported data in the literature [9], the structure of 5-geranyloxy-7-hydroxycoumarin is represented by the formula **3**. This compound was isolated for the first time from the stem bark of *Clausena excavata* collected in Singapore [9].

Experimental

Leaves of *Clausena excavata* Burm. F. were collected in Cuc Phuong National Park, Ninh Binh, Vietnam in December 1995. The species was identified by Dr. Tran Dinh Dai, Hanoi. A voucher specimen [Nr. 750, 13/6/1996] was deposited in the Herbarium of the Institute of Ecology and Natural Resources, National Centre for Natural Science and Technology, Hanoi. The plant material was dried at 45°C, ground (850g) and extracted with MeOH/ H_2O (95:5) at room temperature. MeOH was removed by distillation in vacuo and the aq. soln was extracted with n-hexane followed by EtOAc and n-butanol. EtOAc was evapd in vacuo. The residue of the EtOAc extract (30g) was chromatographed over silica gel with CHCl_3 and increasing amounts of MeOH (5-15%) to give anisocoumarin-H (**1**), 7-[(*E*)-7'-hydroxy-3',7'-dimethylocta-2',5'-dienyloxy]-coumarin (**2**) and 5-geranyloxy-7-hydroxycoumarin (**3**) as well as other compounds [5].

Anisocoumarin-H (1): Yield 0,0051 %, $R_f=0,56$ [silica gel, n-hexane/ethylacetate (40:60)]. UV $\lambda_{\text{max}}^{\text{MeOH}}(\log \epsilon)$: 322 (4,28) và 210 (4,51). IR (KBr, cm^{-1}): 3275 (OH), 2929, 1729, 1613, 1557, 1125, 837 và 613 cm^{-1} . $[\alpha]_D^{26} -75^\circ$ (c 1; CHCl_3). EI-MS (70 eV) m/z (rel. int.): 246 $[\text{M}-\text{C}_4\text{H}_6\text{O}]^+$ (10), 162 $[\text{M}-\text{C}_{10}\text{H}_{16}\text{O}]^+$ (100), 134 (30) and 85 (50).

7-[(E)-7'-Hydroxy-3',7'-dimethyl-octa-2',5'-dienyloxy]-coumarin (2): Yield 0,0007%, Rf=0,24 [silica gel, CHCl₃/MeOH (95:5)]. UV $\lambda_{\max}^{\text{MeOH}}$ (log ϵ): 399 (2,26), 322 (4,09), 259 (3,37) và 216 (4,15). IR (KBr, cm⁻¹): 3031, 2924, 1728, 1613, 1557, 1458, 1428, 1404, 1273, 1235, 1125, 988, 976 và 837 cm⁻¹. $[\alpha]_{\text{D}}^{25} +2,7^{\circ}$ (c 0,25; MeOH). EI-MS (70 eV) *m/z* (rel. int.): 296 [M-H₂O]⁺ (5), 230 (10), 215 (14), 162 (100), 134 (85) và 93 (85).

5-Geranyloxy-7-hydroxycoumarin (3):

Yield 0.0016 %, Rf=0.27 [silica gel, CHCl₃/MeOH (95:5)]. UV $\lambda_{\max}^{\text{MeOH}}$ (log ϵ): 328 (3,96), 268 (3,23), 247 (3,76), 242 (3,74) và 223 (3,96). IR (KBr, cm⁻¹): 3014, 2929, 1718, 1457, 1158, 1088, 973 và 826 cm⁻¹. $[\alpha]_{\text{D}}^{29} -1,1^{\circ}$ (c 0,5; MeOH). EI-MS (70 eV) *m/z* (rel. int.): 314 [M]⁺ (4), 178 (100), 169 (92), 81 (40) và 69 (100).

Acknowledgements: We thank Dr. J. Schmidt, Halle, for MS, Dr. A. Porzel for NMR measurements as well as Dr. Tran Dinh Dai, Ha Noi, for identification of the plant material.

References

- 1). Đỗ Tất Lợi, *Những Cây thuốc và Vị thuốc Việt nam*, (Glossary of Vietnamese medicinal plant and drugs), Ha Noi Publishing house for Science and Technics (1991), p. 849; 2). Perry L. M., *Medicinal Plants of East and Southeast Asia: Attributed Properties and Uses*. The MIT Press, Cambridge (1980), p. 363; 3). Shiow-Chyn Huang, Pei-Lin Wu and Tian-Shung Wu, *Phytochemistry* (1997), **44** (1), 179-181.; 4). Tian-Shung Wu, Shiow-Chyn Huang and Jeng Shiow Lai, *Journal of the Chinese Chemical Society (Teipei)*, 1993, **40**, 319; 5). Trinh Thi Thuy, Helmut Ripperger, Andrea Porzel, Tran Van Sung and Guenter Adam, *Phytochemistry* (2000), **52**, 511-516; 7). F. Feigel, "Spot Tests in Organic Analysis", Elsevier, New York (1960), p. 250; 8). Bonaventure Tchaleu Ngadjui, Jonsón Foyere Ayafor, Beibam Lucas Sondengam and Joseph Donald Conolly, *Journal of Natural Products* (1989), Vol. **52**, No.2, 243-247; 9). Quarder M.A., El-Turbi J. A., Armstrong J. A., Gray A. I., Warterman G. P., *Phytochemistry* (1992), **31**, No. 9, 3083-3089; 10). Ito, C., Ohta H., Tan Hugh T-W. and Furukawa H., *Chemical and Pharmaceutical Bulletin* (1996), **44** (12), 2231-2235.

Tap chí Dược liệu, tập 6, số 5/2001 (trang 137-142)

TÁC DỤNG ỨC CHẾ TĂNG SINH TẾ BÀO UNG THƯ IN VITRO CỦA CÂY CÀ GAI LEO

Nguyễn Bích Thu¹, Nguyễn Thị Quỳnh²,

Do Young Yoon³, Phạm Kim Mãn¹, Đoàn Thị Nhu¹

1. Viện Dược liệu; 2. Khoa Sinh, trường Đại học Quốc gia Hà Nội; 3. Viện nghiên cứu sinh học và kỹ thuật sinh học Hàn Quốc (KRIBB).

(Nhận bài ngày 19 tháng 6 năm 2001)

Summary

Inhibitory Effect of *Solanum hainanense* on *in vitro* Proliferation of Some Cancer Cell Lines

Extracts from Solanum hainanense have been tested on in vitro proliferation of different cancer cell lines, using SRB, a colorimetric assay based on the protein binding property of the dye sulforhodamine B. Initial results showed that all the M1, M2 and M3 fractions inhibited the proliferation of SK-OV-3, Hela, Caski, C3, PC-3, A549 and PCL/PRF cells. The M3 fraction at high dose (100 µg/ml) also has cytotoxicity on SK-OV-3, C3, PC-3, A549 and PCL/PRF cancer cells.

Key words: *Solanum hainanense* Hance, Cancer Cell Lines, Anti-proliferation Effect

1. Mở đầu

Trong những năm gần đây, nhiều nhà khoa học trên thế giới và Việt Nam đã tập trung nghiên cứu sàng lọc nhằm phát hiện và đánh giá hiệu quả các

chất có hoạt tính phòng và kháng ung thư với một lượng kinh phí được đầu tư rất lớn. Chỉ tính riêng ở Mỹ, theo Michel Page (1997), hàng năm Viện nghiên cứu ung thư Quốc gia Hoa Kỳ đã giành hàng trăm triệu USD để tiến hành sàng lọc tới hơn

10.000 hợp chất mới, thử hiệu ứng của chúng trên hàng chục loại tế bào ung thư, ở nhiều liều lượng khác nhau [6]. Đầu tư lớn như vậy với mục đích tìm ra các chất đặc trưng có hiệu lực điều trị từng loại ung thư riêng biệt nhằm góp phần ngăn chặn tiến tới đẩy lùi căn bệnh quái ác này. Do đó, nhiều phương pháp nhằm làm đơn giản hoá công việc, đánh giá nhanh hiệu lực của các chế phẩm đã lần lượt được thực hiện [1], [2], [3], [4], [5]. Phương pháp sau đơn giản, nhanh, nhạy và tiết kiệm hơn phương pháp trước. SRB là một trong những phương pháp đó đã được áp dụng rộng rãi trong các phòng thí nghiệm thử sàng lọc thuốc ở Mỹ và nhiều nước khác trên thế giới từ những năm đầu 1990 [1], [5].

SRB viết tắt từ Sulforhodamine B là tinh thể màu tím thẫm, có màu ánh hồng khi tan trong dung môi acid yếu được dùng làm thuốc nhuộm tế bào. SRB bám vào các acid amin kiềm của protein trong tế bào. Lượng SRB tỷ lệ thuận với lượng protein có trong tế bào. Do đó, định lượng được SRB cho phép định lượng được tế bào cần nghiên cứu. Dựa trên nguyên tắc đó, SRB được sử dụng trong các phương pháp so màu để đánh giá sự tăng sinh, sinh trưởng của tế bào và độc tính của các chế phẩm. Đó là những chỉ tiêu quan trọng trong sàng lọc được phẩm nói chung và thuốc phòng, chống ung thư nói riêng.

Trong bài báo này, chúng tôi thông báo một số kết quả bước đầu về thử tác dụng của cây cà gai leo đến sự tăng sinh của một số dòng ung thư nuôi cấy *in vitro*.

2. Nguyên liệu, hoá chất và phương pháp nghiên cứu

2.1. Nguyên liệu và hoá chất

(1). *Phương pháp chuẩn bị mẫu*: Các mẫu thuốc thử M₁, M₂, M₃, M₄, M₅ và M₆ được chiết từ phần trên mặt đất của cây cà gai leo (*Solanum hainanense* Hance) thu hái vào tháng 5/1998 tại Sóc Sơn, Hà Nội.

Chuẩn bị dịch chiết toàn phần

Lấy 10 g bột dược liệu cà gai leo chiết nguội với cồn 40° (3 lần × 250ml cồn). Gộp dịch chiết, thu hồi cồn dưới áp suất giảm thu được cao khô cà gai leo (M₁).

Hoà tan nóng 10g cao khô M₁ trong cồn 80° (3 lần × 50 ml). Gộp dung dịch cồn và thu hồi dung môi dưới áp suất giảm thu được M₂. Tinh chế M₂ nhiều lần bằng phương pháp tủa với dung môi thu

được M₃.

Hoà cồn không tan trong cồn trong nước và đun nóng cho tan, lọc bỏ phần không tan trong nước. Thêm cồn 96° với tỉ lệ 1:1, khuấy đều, để lắng, lọc thu được bột khô M₄. Dung dịch cồn được thu hồi dưới áp suất giảm thu được M₅. Tinh chế M₄ thu được bột vô định hình M₆.

Các mẫu được làm khô và cân. Để đánh giá tác dụng ức chế tăng sinh tế bào ung thư, các mẫu được hoà trong dimethyl sulfoxid (DMSO) ở nồng độ 10 mg/ml. Các mẫu thuốc trên được thử ở 5 liều pha loãng cách nhau 3 lần bắt đầu từ liều cao nhất là 100µg/ml.

ADR- Adriacin Doxorubicin là một loại dược phẩm có tác dụng độc đối với tế bào ung thư, dùng làm đối chứng dương tính cũng được thử ở 5 liều, bắt đầu từ liều cao nhất là 3µg/ml.

(2) *Các dung dịch*: 0,4% SRB (hoà tan 400mg SRB trong 100ml dung dịch 1% acid acetic); 50% TCA; 1% acid acetic; 10mM tris-base [tris (hydroxymethyl) aminomethan]; môi trường nuôi cấy tế bào RPMI 1640 chứa 5 hoặc 10% huyết thanh bê (FBS). 0,05% trypsin-EDTA.

2.2. Các dòng tế bào ung thư và phương pháp nuôi cấy để thử thuốc

Các dòng tế bào ung thư được Phòng thí nghiệm Đánh giá Hiệu ứng Sinh học (Biopotency Evaluation Lab.), Viện KRIBB Hàn Quốc cung cấp gồm:

- Tế bào ung thư cổ tử cung: SK-OV-3, Hela, Caski và C3.
- Tế bào ung thư tuyến tiền liệt PC-3 .
- Tế bào ung thư phổi A549.
- Tế bào ung thư gan PCL/PRF (chứa gen virus viêm gan B- HBV).

HACAT - tế bào biểu mô sừng.

Các dòng tế bào này đều tạo thành một lớp bám vào đáy và thành chai khi nuôi cấy *in vitro*. Chuẩn bị huyền dịch tế bào gốc dùng trong nuôi cấy để thử thuốc bằng 0,05% trypsin-EDTA, môi trường nuôi cấy RPMI có chứa 5% FBS. Đếm số lượng tế bào bằng buồng đếm tế bào máu (hematocytometer). Sau đó, nạp đều vào các giếng của đĩa nuôi cấy vi lượng gồm 96 giếng. Mỗi giếng gồm 5.10⁴ tế bào (đối với các dòng PC-3, A549, và PLC/PRF) hoặc 10⁵ tế bào (đối với dòng SK-OV-3) trong 180µl môi trường RPMI 5% FBS.

2.3. Phương pháp SRB

*Phương pháp SRB đã được Skehan trình bày chi tiết [5]. Một cách tóm tắt, phương pháp này được tiến hành qua các bước sau:

- *Nạp tế bào* vào các giếng của đĩa nuôi cấy vi lượng (được bố trí như ở hình 1), sau đó ủ ở 37°C, 5% CO₂ trong 24 tiếng trước khi tiến hành thử thuốc.

- *Cố định đĩa Tz in situ* (Đĩa dùng làm đối chứng) ở thời điểm bắt đầu thử thuốc được gọi là đĩa Tz (thời gian zero). Giữ ở nhiệt độ phòng cho tới khi đem nhuộm với thuốc nhuộm SRB.

- *Ủ với các mẫu thuốc thử*: thêm vào mỗi giếng 20µl dịch thuốc đã pha có nồng độ đặc gấp 10 lần liều thử. Ủ khoảng 40 – 48 giờ.

		M _i						ADR					
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	M	V _H											
B	M	V _H											
C	M	V _H											
D	M	V _H											
E	MT	V _H											
F	MT	V _H											
G	MT	V _H											
H	MT	V _H											

Hình 1. Sơ đồ bố trí thí nghiệm trên đĩa nuôi cấy vi lượng 96-giếng.

Các ô có kí hiệu: M chỉ giếng được nạp môi trường nuôi cấy, MT - giếng nạp môi trường nuôi cấy và tế bào, V_H - giếng nạp môi trường nuôi cấy, tế bào và dung môi pha mẫu (những giếng này dùng làm đối chứng âm tính). Các ô trống trong các cột 3,4,5,6 và 7 chỉ các giếng thí nghiệm thử với mẫu M_i (i= 1, 2, 3,4, 5, 6) theo thứ tự liều giảm dần tương ứng 100, 30, 10, 3 và 1µg/ml. Các ô trống trong các cột 8, 9, 10,11 và 12 chỉ các giếng thí nghiệm thử với ADR theo thứ tự liều giảm dần 30, 10, 3, 1 và 0,3µg/ml làm đối chứng dương tính. Các hàng từ A đến H cho biết số lần thí nghiệm lặp lại (trong thí nghiệm của chúng tôi là 4 lần)

- *Nhuộm với SRB*: Protein tổng số của các tế bào được nhuộm bằng dung dịch 0,4% SRB ở nhiệt độ phòng. Lượng SRB dư thừa được rửa trôi.

$$A(\%) = \frac{T - T_z}{V_H - T_z} \times 100\%$$

- *Hoà tan thuốc nhuộm*: bằng dung dịch 10 mM tris-base.

trong đó:

- *Đo mật độ quang học*: bằng máy SpectraMax 250 ở bước sóng 540 nm.

T_z là giá trị trung bình của mật độ quang học ở các giếng của đĩa Tz.

**Tính toán số liệu và đánh giá kết quả*

V_H là giá trị trung bình của mật độ quang học ở các giếng chỉ chứa dung môi (đối chứng âm tính).

Dựa vào giá trị mật độ quang học đo được, tỷ số tăng sinh của tế bào (A%) được xác định theo công thức sau:

T là giá trị trung bình của mật độ quang học ở các giếng thử với thuốc.

Nếu:

1/ A= 50%, thuốc đã ức chế tế bào tăng sinh 50% (GI₅₀) hay tế bào tăng sinh 50% so với chứng.

2/ A= 10%, thuốc đã ức chế tế bào tăng sinh 90% (GI₉₀) hay tế bào tăng sinh chỉ đạt 10% so với chứng.

3/ A= 0% (khi T = Tz), thuốc đã ức chế toàn bộ quá trình tăng sinh của tế bào (TGI), vì lượng protein sau khi ủ với thuốc chỉ bằng lúc ban đầu.

4/ A < 0 (khi T < Tz), thuốc đã gây độc và làm chết tế bào. Liều thuốc mà tại đó giá trị A = - 50% được gọi là liều gây độc tế bào 50% và kí hiệu là IC₅₀ (Index Cytotoxicity).

3. Kết quả và thảo luận

3.1 Tác dụng của các mẫu chiết từ cà gai leo đến một số dòng tế bào ung thư:

Tỷ số tăng sinh của bốn dòng tế bào (PC-3, SK-OV-3, A549 và PLC/PRF) đã được thử với các mẫu M₁, M₂, M₃, M₄, M₅, M₆ chiết từ cây cà gai leo. Theo chỉ dẫn của A. Monks khi sàng lọc các chế phẩm tự nhiên, chúng tôi đã thử mỗi mẫu ở 5 liều khác nhau. Mật độ quang học đo được bằng máy SpectraMax 250 được sử dụng để tính tỷ số tăng sinh (A%). Kết quả được trình bày trong các bảng 1, 2, 3 và 4.

Bảng 1. Tỷ số tăng sinh của tế bào ung thư dòng PC-3 dưới tác dụng của các mẫu chiết từ cà gai leo

[M _i]μg/ml	M ₁	M ₂	M ₃	M ₄	M ₅	M ₆	ADR
1	102,4	102,5	99,3	104,8	113,5	94,1	99,2
3	100,2	105,0	101,1	100,0	104,1	97,6	81,1
10	101,2	102,8	102,8	101,4	108,1	102,2	44,1
30	96,5	95,5	86,5	102,0	106,7	99,8	27,2
100	75,8	90,1	-89,6	102,7	107,0	100,7	1,2

Bảng 2. Tỷ số tăng sinh của tế bào ung thư dòng SK-OV-3 dưới tác dụng của các mẫu chiết từ cà gai leo

[M _i]μg/ml	M ₁	M ₂	M ₃	M ₄	M ₅	M ₆	ADR
1	104,5	94,3	94,3	100,5	67,7	93,5	88,6
3	97,7	96,4	98,9	100,5	78,1	93,7	78,3
10	93,0	99,5	107,0	97,5	86,8	98,0	62,4
30	90,7	87,6	77,6	88,2	82,6	98,9	43,6
100	82,4	84,7	-75,2	88,7	84,7	99,7	34,5

Bảng 3. Tỷ số tăng sinh của tế bào ung thư dòng A549 dưới tác dụng của các mẫu chiết từ cà gai leo

[M _i]μg/ml	M ₁	M ₂	M ₃	M ₄	M ₅	M ₆	ADR
1	99,6	93,9	101,9	100,7	84,5	92,2	85,2
3	99,0	98,9	101,1	101,6	92,5	98,4	75,8
10	97,7	97,7	100,8	98,9	88,3	93,8	57,2
30	96,7	97,9	84,9	94,5	86,9	102,0	28,5
100	94,5	93,0	-78,3	99,1	85,5	99,6	23,0

Bảng 4. Tỷ số tăng sinh của tế bào ung thư dòng PLC/PRF dưới tác dụng của các mẫu chiết từ cà gai leo

[M _i] µg/ml	M ₁	M ₂	M ₃	M ₄	M ₅	M ₆	ADR
1	98,5	99,2	103,9	98,2	100,1	100,0	78,2
3	98,6	98,2	102,6	97,8	99,4	98,2	70,5
10	99,1	98,5	99,2	97,4	97,9	98,3	48,7
30	98,1	98,6	99,0	98,0	97,4	98,8	23,1
100	98,2	99,5	-11,2	98,3	97,2	96,7	23,1

Phân tích các số liệu trong bảng, chúng tôi nhận thấy tỷ số tăng sinh của cả bốn dòng tế bào ung thư dưới tác dụng của các mẫu M₄, M₅ và M₆ ở tất cả các nồng độ đối với cả bốn dòng tế bào thí nghiệm hầu như không sai khác so với đối chứng âm tính. Trong khi đó, ADR - một màn chắn dùng làm đối chứng dương tính, tỷ số này giảm rõ rệt khi tăng liều tác dụng.

Mẫu M₃ ở liều 100 µg/ml gây độc và làm chết 11,2, 75,2, 78,3 và 89,6 % tế bào ở các dòng tương ứng PLC/PRF, SK-OV-3, A549 và PC-3. Điều đó cho thấy hiệu ứng của M₃ ở cùng một liều (100 µg/ml) đối với các tế bào ung thư có nguồn gốc khác nhau đều khác nhau. Sở dĩ như vậy có thể do sự khác nhau về tính nhạy cảm của các dòng tế bào thí nghiệm đối với thuốc. Cũng với mẫu này, nhưng ở những liều nhỏ hơn 30 µg/ml, không thấy có ảnh hưởng tới tỷ số tăng sinh ở tất cả các dòng tế bào, giống như các mẫu M₄, M₅ và M₆.

Các mẫu M₁ và M₂ thể hiện chiều hướng giảm tỷ số tăng sinh khi tăng liều tác dụng, tuy điều này không rõ ràng trong thí nghiệm đối với tế bào dòng PLC/PRF.

3.2 Tác dụng của M₃ đến tỷ số tăng sinh của một số dòng tế bào

Chưa có cơ sở về cơ chế tác dụng của M₁, M₂ và M₃ đến tế bào ung thư như thế nào, nhưng có thể nhóm chất có ảnh hưởng tới tỷ số tăng sinh của một số dòng tế bào ung thư cùng nằm trong thành phần của ba mẫu trên. Điều này phù hợp với quy trình chiết các mẫu đã được tiến hành [7], vì M₃ được tinh chế từ M₂, còn M₂ lại được chiết xuất từ M₁ - là cao khô toàn phần của cà gai leo (Haina I).

Từ những kết quả ban đầu nêu trên, chúng tôi định hướng tiếp tục tinh chế cùng với việc xác định hoạt chất có tác dụng ức chế ung thư của các mẫu M₁, M₂ và đặc biệt là mẫu M₃ (Haina II). Đồng thời, thử tác dụng ức chế tăng sinh tế bào đối với các dòng tế bào ung thư cổ tử cung là Hela, Caski và C3 đi đôi với tế bào lành là tế bào biểu mô sừng (keratinocyte) dòng HACAT in vitro ở các liều trong khoảng 20-80µg/ml đối với mẫu M₃.

Kết quả cho thấy mẫu M₃ làm giảm tỷ số tăng sinh đối với cả ba dòng tế bào ung thư (bảng 5). Riêng đối với dòng C₃ ở liều 80µg/ml đã làm chết 16,3% so với đối chứng.

Bảng 5. Tác dụng của M₃ đến tỷ số tăng sinh của một số dòng tế bào

[M ₃] µg/ml	A(%)			
	HACAT	Hela	Caski	C ₃
20	96.8	96.4	100.8	96.5
40	85.0	91.1	96.3	83.4
60	86.9	84.6	88.5	70.8
80	98.1	82.5	58.2	-16.3

Còn đối với tế bào thường- HACAT, không thấy rõ tác dụng ức chế tăng sinh của M₃ tuân theo quy luật phụ thuộc nồng độ. Để giải thích điều này, có lẽ cần tiến hành thêm các thí nghiệm trên nhiều loại tế bào ung thư và tế bào lành khác.

Đồng thời, chúng tôi cũng đánh giá tác dụng ức chế tăng sinh tế bào đối với các dòng tế bào ung thư gan PLC/PRF, Hep 3B bằng phương pháp WST-1 (được thông báo ở số sau).

Tài liệu tham khảo

1). Carmichael J. et al.(1987). *J. Cancer Reseach* 47, 936-942; 2). Denizot F. and Lang R.; (1986). *Journal of Immunological Methods*, 89, 271-277; 3). Goodwin C.J., Holt S.J.; Downes S.; and Marshall N.J.(1995). *Journal of Immunological Methods* 179, 95-103; 4). Monks A. et.al. (1991). *Journal of the Cancer Institute*, 83(11), 757-766; 5). Skehan P. et.al.(1990). *Journal of the Cancer Institute*, 82(13), 1107-1112; 6). Teicher B. A.,(Editor).(1997). *Anticancer Drug Development Guide (Preclinical Screening, Clinical Trials and Approval)*. Dana_Faber Cancer Institute, Boston, MA. Humana Press Totowa, New Jersey.

Tap chí Dược liệu, tập 6, số 5/2001 (trang 142-147)

NGHIÊN CỨU TÁC DỤNG ĐIỀU TRỊ TẠI CHỖ VẾT THƯƠNG BỎNG VÀ VÙNG LẤY DA CỦA THUỐC SH-91 CHẾ TỪ CÂY BÒN BỌT VÀ CÂY HOA GIẾ

*Nhâm Văn Sinh, Nguyễn Liêm -Học viện Quân y
(Nhận bài ngày 21 tháng 4 năm 2000)*

Summary

*In situ Therapeutic Properties of SH-91 Ointment Prepared from *Glochidion eriocarpum* and *Desmos chinensis* on Burns and Peeled Areas*

*SH-91 ointment containing tannin and saponins was prepared from *Glochidion eriocarpum* and *Desmos chinensis*. The preparation exercised an antibacterial effect against a number of bacteria common on burns and had an LD₅₀ value of 22g/kg body weight by oral administration in mice. In a clinical trial with 219 patients, it proved effective in curing superficial burn lesions and healing peeled areas by local application.*

*Key words: *Glochidion eriocarpum* Champ., *Desmos chinensis* Lour., SH-91 Ointment, Antibacterial Effect, Burns, Peeled Areas.*

Đặt vấn đề

Cây bòn bọt (*Glochidion eriocarpum* Champ., - Euphorbiaceae) và cây hoa giế (*Desmos chinensis* Lour., - Annonaceae) mọc phổ biến ở vùng trung du và miền núi bắc Việt Nam. Nhân dân ở các địa phương thường dùng chúng để chữa các chứng bệnh như lở sơn do dị ứng, rần cấn, tiêu chảy, lỵ, và tiểu tiện khó. Đặc biệt ở Tuyên Quang, đồng bào dân tộc Dao có kinh nghiệm dùng nước sắc hỗn hợp của hai cây chữa bỏng và vết thương lở loét. Chúng tôi thừa kế bài thuốc này từ năm 1991, với ký hiệu là SH-91, nhằm nghiên cứu ứng dụng chữa vết thương bỏng với các mục đích sau:

- Tìm hiểu tính chất dược học cây thuốc (thực vật, tên khoa học, thành phần hoá học, dạng bào chế SH-91).

- Kiểm tra một số tính chất sinh học (liều độc cấp, tính kháng khuẩn, tác dụng điều trị bỏng thực nghiệm).

-Đánh giá tác dụng điều trị bỏng của thuốc SH-91 trên lâm sàng có so sánh với thuốc kem Silver

sulfadiazin và Maducin.

II. Nguyên vật liệu, đối tượng và phương pháp nghiên cứu

1. Nguyên vật liệu

Cây bòn bọt và cây hoa giế được thu hái ở núi Tam Đảo, Vĩnh Phúc.

Dung môi, hoá chất, thuốc thử, theo tiêu chuẩn ĐĐVN.

Động vật thí nghiệm: chuột nhắt trắng 18-20g, thỏ 10-12 tháng tuổi nặng 2,3-2,5 kg, khoẻ mạnh.

Thuốc so sánh đối chứng: Silver sulfadiazin 1% (Marion Mỹ sản xuất), Maducin (HVQY sản xuất) và vaselin được dùng.

2. Đối tượng nghiên cứu: 219 bệnh nhân bỏng được điều trị tại Viện Bỏng QG. gồm 147 nam, 72 nữ, tuổi trung bình 20,3 (1- 72 tuổi), có diện tích bỏng 5-30%, độ sâu II-III.

3. Phương pháp nghiên cứu

Xác định thực vật: tiêu bản của 2 cây được lưu

trữ tại Bộ môn Dược HVQY và được TS. Nguyễn Tiến Bản (Viện Tài nguyên-Sinh thái- Trung tâm khoa học tự nhiên xác định tên khoa học.

Kiểm tra sơ bộ thành phần hoá học: phương pháp ống nghiệm theo giáo khoa DL.

Bào chế: dạng cao SH-91 và dạng mỡ SH-91, theo phương pháp của ĐĐVN. tiến hành tại Bộ môn Dược- HVQY.

Xác định LD₅₀ theo đường uống, tính theo phương pháp Liwschitch, ở Bộ môn Dược lý HVQY.

Thử tác dụng kháng khuẩn: ở Bộ môn Vi sinh vật y học, HVQY.

Điều trị bỏng thực nghiệm: 10 thỏ được gây bỏng (theo mô hình Pocidalò J.J. và Hladovec J.) ở hai bên sống lưng, mỗi vết có đường kính 15 cm, độ sâu II-III, diện tích 10% cơ thể. Trên 10 thỏ thí nghiệm gồm 20 vết: 10 vết được điều trị bằng cao SH-91, ngày bôi 2 lần, 10 vết bằng Silver sulfadiazin 1% (SSD1%) làm đối chứng, ngày bôi 2 lần. Theo dõi 35 ngày về diễn biến tại chỗ vết bỏng: đại thể, vi thể, vi khuẩn, thực nghiệm được tiến hành tại Bộ môn Sinh lý bệnh HVQY.

Nghiên cứu điều trị lâm sàng: chia làm 4 nhóm:

Nhóm I: 47 bệnh nhân bỏng nông, độ II-III, điều trị bằng cao SH-91, đánh giá sự tạo màng trên vết bỏng.

Nhóm II: 33 bệnh nhân bỏng nông, độ II-III, mỗi bệnh nhân chia 2 vùng: vùng nghiên cứu (A), điều trị bằng mỡ SH-91, vùng so sánh (B) dùng mỡ Maducin.

Nhóm III: 61 bệnh nhân bỏng nông độ II-III, mỗi bệnh nhân chia 2 vùng: vùng nghiên cứu (A) điều trị bằng mỡ SH-91, vùng so sánh (B) dùng kem Silver sulfadiazin 1%.

Nhóm IV: 78 bệnh nhân có vùng lấy da để ghép, vùng A dùng mỡ SH-91 và vùng so sánh B dùng vaselin được dụng.

Các chỉ tiêu theo dõi lâm sàng: toàn thân, tại chỗ, phù viêm, sung huyết, xuất tiết, nhiễm khuẩn, số lần đắp thuốc, pH, số ngày khỏi, chất lượng sẹo... làm tại Viện Bỏng QG.

Các chỉ tiêu theo dõi cận lâm sàng: các xét nghiệm làm 2 lần: trước và sau điều trị 7 ngày:

Xét nghiệm vi khuẩn: ở Bộ môn Vi sinh y học, HVQY.

Xét nghiệm mô học: tế bào, mô học: ở Bộ môn Mô phôi, HVQY.

Xét nghiệm định lượng mucopolysaccarid (MPS).

Xét nghiệm siêu cấu trúc: ở labô siêu cấu trúc HVQY.

Xét nghiệm định lượng hydroxyprolin (HYP) ở mô bỏng, ở Bộ môn Sinh hoá, HVQY.

III. Kết quả nghiên cứu

3.1. Tính chất dược học của cây thuốc

1.1. Thực vật: Bòn bọt (*Glochidion eriocarpum* Champ.) là loại cây nhỏ, cành non có màu đỏ tím, rất nhiều lông ngắn, cành già màu xanh nhạt. Lá mọc so le, phiến lá hình trứng thuôn nhọn, dài 6-8 cm, rộng 2-3 cm, hai mặt lá đều có lông; cuống lá ngắn. Hoa rất nhỏ đơn tính màu trắng.

Hoa giẻ (*Desmos chinensis* Lour.) là loại dây leo. Lá hình trứng gốc tròn đầu thon, mặt trên xanh bóng nhẵn, mặt dưới có lông vàng. Hoa màu xanh vàng, có lá bắc nhỏ; dài 3, hình tam giác thuôn dài có lông; tràng 6 rất dài, gấp 6-7 lần lá đài, hơi dày có lông ở cả hai mặt.

1.2. Thành phần hoá học: Phản ứng trên ống nghiệm, thực hiện với các thuốc thử chuyên biệt, thấy có các nhóm hoạt chất sau:

Tanin, saponin và acid amin ở cây bòn bọt.

Tanin, flavonoid và đường khử ở cây hoa giẻ.

1.3. Dạng bào chế: Cao SH-91

Công thức: - Toàn cây bòn bọt và hoa giẻ (mỗi cây 5 kg) chặt nhỏ, phơi khô.

Cho dược liệu vào nồi nhôm, đổ ngập nước 1-2 cm, có vỉ nén nhẹ. Đun sôi trong 3 giờ, gạn lấy nước thứ nhất. Thêm nước sấm sấp dược liệu, đun sôi tiếp 2 giờ, gạn lấy nước thứ hai. Hợp hai nước lại, cô còn 1.000 ml cao. Đóng chai nút kín tiệt trùng 110°C/1 giờ. Cao có tỉ lệ 10/1 (10 kg dược liệu thu được 1 lít cao).

Cao SH-91 có tính chất lý hoá (theo tiêu chuẩn cơ sở) như sau:

Màu sắc: nâu nhạt. Mùi: thơm mùi dược liệu.

Độ tan: tan trong nước, cồn. Độ nhớt: 1,27 poise. Tỷ trọng: 1,034. pH=5. Cặn khô: 10%.

- Thuốc mỡ SH-91 gồm:

Cao SH-91 tỷ lệ 10% (10 g), lanolin (10 g), sáp ong (2 g), vaselin vd 100g.

Tính chất lý hoá (theo tiêu chuẩn cơ sở): Màu nâu sẫm, mùi thơm của cao, mịn không có gợn, nóng chảy ở 40-41°C, vô khuẩn. Thuốc mỡ SH-91 đạt các tiêu chuẩn theo DĐVN là mịn, đồng nhất, vô khuẩn.

2. Kiểm tra một số tính chất sinh học của cao SH-91

2.1. Độc tính cấp:

TT	Chủng vi khuẩn	Đường kính vô khuẩn (mm)	
		Cao SH-91	Nước cất
1	<i>Staphylococcus aureus</i>	22	0
2	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	21	0
3	<i>Escherichia coli</i>	15	0
4	<i>Proteus</i>	15	0
5	<i>Bacillus subtilis</i>	18	0

- Nồng độ diệt khuẩn tối thiểu của cao SH-91 (2 giờ sau tiếp xúc)

TT	Loài vi khuẩn	Nồng độ mg/ml
1	<i>Staphylococcus aureus</i> (chủng ATCC- 29213)	75
2	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (chủng 27833)	75
3	<i>Escherichia coli</i> (chủng ATCC 25922)	150
4	<i>Proteus</i> (chủng 103)	150
5	<i>Bacillus subtilis</i>	300

Như vậy, cao SH-91 (bồn bọt - hoa giẻ) có tác dụng kháng khuẩn trên một số chủng vi khuẩn thường gặp ở vết bỏng.

Thử nghiệm theo đường uống, kết quả thấy:

Cao SH-91 có LD₅₀ = 22 g cao/kg (20,3-23,7) thể trọng chuột nhất.

2.2. Tác dụng kháng khuẩn của cao SH-91, kết quả như sau:

- Hoạt tính ức chế vi khuẩn của cao SH-91:

2.3. Kết quả điều trị bỏng thực nghiệm:

So sánh diễn biến tại chỗ

	Cao SH-91 (vùng A)	Cream Silver sulfadiazin 1% (vùng B)
- Số vết bỏng	10	10
- Diện tích và độ sâu	10%, II-III	10%, II-III
- Diễn biến chung ở vết bỏng	Thuốc tạo màng mỏng, hoại tử khô, rụng từ rìa vào	Hoại tử ướt, có điểm loét, hoại tử rụng kiểu tan rữa.
- Phù nề tại chỗ tổn thương	Ít phù nề	Phù nề rõ
- Sinh thiết ngày thứ 3	Mô liên kết ít phù nề, xâm nhập tế bào viêm ít	Khoang gian bào giãn rộng, xâm nhập nhiều tế bào viêm
- Viêm mủ	20%	80%
- Mọc vi khuẩn	100%	100%
- Tự cấu giảm sau 17 ngày	$56,34.10^3 \rightarrow 5,2.10^3$	$48,69.10^3 \rightarrow 4,6.10^3$
- Thời gian rụng hoại tử	12-15 ngày sau bỏng	12-15 ngày sau bỏng
- Chỉ số phân chia tế bào:		
- Sau 5 ngày	$64,3 \pm 3,18$	$66,4 \pm 52,9$
- Sau 12 ngày	$29,5 \pm 3,4$	$31,6 \pm 4,29$
- Phát triển tổ chức hạt	Nền tổ chức sạch, mọc đều	Đều, bằng phẳng
- Thu hẹp diện bỏng:		
- Sau 15 ngày	$37,3 \pm 3,5$	$49,8 \pm 3,8$
- Sau 25 ngày	80% thành sẹo	80% thành sẹo
- Tính chất sẹo	Mềm, mịn, phẳng	Mềm, mịn, phẳng

Trên các vết bỏng thực nghiệm, cao SH-91 có tác dụng giảm viêm, giảm nhiễm khuẩn, sạch mủ, tổ chức hạt phát triển tốt và liền sẹo. So sánh với thuốc kem Silver sulfadiazin thấy cao SH-91 có kết quả tương đương.

2.4. Theo dõi tác dụng phụ của thuốc SH-91

Trên các tổn thương bỏng thực nghiệm, theo dõi 3 tuần sau khi bôi thuốc SH-91, trên da động vật không thấy mẩn đỏ và phản ứng viêm tiết dịch.

Theo dõi các chức năng tuần hoàn, tiêu hoá, hô hấp, thần kinh thấy cao SH-91 không làm rối loạn các chức năng ở động vật thực nghiệm.

3. Nghiên cứu lâm sàng đánh giá tác dụng điều trị bỏng của thuốc SH-91

3.1. Kết quả nghiên cứu nhóm I (47 bệnh nhân, diện tích bỏng 15,9%, độ sâu II-III).

Diễn biến tại chỗ sau bôi cao SH-91

Dấu hiệu lâm sàng	Diễn biến
- Cảm giác của bệnh nhân	- Khi bôi thuốc có cảm giác đau nhẹ, đau giảm dần và hết sau 4-5 phút, bệnh nhân dễ chịu.
- Phù, viêm, sung huyết	- Phù viêm sung huyết giảm dần và hết vào ngày thứ 3-4 với bỏng độ II, thứ 5-6 với bỏng độ III.
- pH	9,76 ± 0,3
- Đặc điểm màng thuốc	- Sau bôi cao SH-91 10-20 phút, vết bỏng se khô tạo thành màng thuốc che phủ
- Tỷ lệ % gặp viêm mủ ở quanh hoặc dưới màng	- Không
- Thời gian trung bình bắt đầu bong màng thuốc	- Bỏng độ II: 6,25 ± 0,76 ngày, độ III: 9,57 ± 1,05
- Thời gian bong hết (khỏi)	- Bỏng độ II: 9,25 ± 0,76 ngày, độ III: 16,42 ± 0,57
- Di ứng tại chỗ	- Không
- Nền vết bỏng khi khỏi	- Màu trắng hồng, nhẵn, mềm, đàn hồi.

Nhận xét trên 17 bệnh nhân (bỏng độ II-III) được điều trị bằng cao SH-91 thấy cao SH-91 tạo một màng che phủ tốt, màng se khô, không nhiễm khuẩn mủ. Màng thuốc tự bong khi vết bỏng lành, với độ II là 9,25 ngày, độ III là 16,42 ngày.

3.2. Kết quả nghiên cứu nhóm II và III

Tóm tắt và so sánh tác dụng điều trị tổn thương bỏng của thuốc mỡ SH-91, mỡ Maducin, kem Silver sulfadiazin (SSD)

	Nhóm II (33 bệnh nhân)		Nhóm III (61 bệnh nhân)	
	Mỡ SH-91	Mỡ Maducin	Mỡ SH-91	Kem SSD
Đau khi đắp thuốc	Đau thoáng qua	Thoảng qua	Thoảng qua	Không đau
Thời gian hết viêm nề, sung huyết, độ II	5 ngày	5	5	7
độ III	7 ngày	7	7	10
Số lần thay băng đắp thuốc: độ II	5,61 ± 0,82	5,38 ± 0,82	5,28 ± 0,7	10,15 ± 1,64
độ III	7,93 ± 1,13	7,86 ± 1,13	7,4 ± 1,05	13,86 ± 1,05
Số ngày khỏi: độ II	9,83 ± 2,2	9,61 ± 2,2	9,66 ± 1,17	12,05 ± 1,88
độ III	15,05 ± 3,11	14,93 ± 1,7	14,9 ± 1,05	16,77 ± 1,31
Sau 7 ngày điều trị:				
- pH	7,63 ± 0,42	7,75 ± 0,28	7,37 ± 0,33	7,85 ± 0,23
- Vi khuẩn (%)	32,53	33,33	32,74	36,72
-Pseudomonas aeruginosa	6,4%	6,06%	6,55%	12,06%
-Staphylococcus aureus	9,67%	9,09%	8,19%	8,62%

Mô học:				
- Tế bào viêm	3,37 ± 1,02	3,8 ± 1,36	4,6 ± 2,19	6,4 ± 2,43
- Macrophage	2,06 ± 0,55	2,78 ± 0,81	3,17 ± 0,46	2,07 ± 0,58
- Nguyên bào sợi-TB sợi	8,6 ± 2,03	3,62 ± 3,05	10,2 ± 1,94	8,1 ± 2,43
- Mạch máu	3,25 ± 1,02	3,12 ± 0,68	4,1 ± 1,21	3,02 ± 0,97
- Chỉ số phân bào	2,00 ± 0,25	2,2 ± 0,68	2,2 ± 0,49	1,8 ± 0,49
Hoá mô:				
- Hàm lượng hydroxy-prolin			703 ± 47,51	550,4 ± 44,47
- Mucopolysaccharid			105 ± 0,88	175 ± 0,94
Dị ứng	Không	Không	Không	Không
Nền da bong sau khi khỏi	Mềm, mịn, đàn hồi	Mềm, mịn, đàn hồi	Mềm, mịn, đàn hồi	Mềm, mịn, đàn hồi

- Nhận xét kết quả điều trị bong 33 bệnh nhân (độ II-III) bằng mỡ SH-91 so với thuốc Maducin trên các chỉ tiêu thấy tác dụng điều trị của 2 thuốc là tương đương nhau.

Trên 61 bệnh nhân bong (độ II-III) ở nhóm III điều trị bằng mỡ SH-91 so sánh với thuốc kem Silver sulfadiazin thấy thuốc mỡ SH-91 đạt các chỉ tiêu như số lần thay băng ít hơn, giảm nhiễm khuẩn nhanh hơn, ngày khỏi trung bình ngắn hơn.

Tuy nhiên các chỉ số khác về mô học, hoá mô là tương đương với Silver sulfadiazin.

3.3. Kết quả nghiên cứu nhóm IV

78 bệnh nhân có vùng lấy da mảnh mỏng và dày vừa (51 nam, 27 nữ), diện tích nghiên cứu trung bình 3,7% diện tích cơ thể

Kết quả so sánh diễn biến tại chỗ:

TT	Dấu hiệu lâm sàng	Mỡ SH-91 (vùng A); n=78	Vaselin dược dụng (vùng B); n=78
1	Chảy máu sau mổ	Chảy ít, máu thấm băng	Chảy nhiều, thấm ướt băng
2	Diễn biến thay băng lần đầu	Lớp gạc ngoài dễ bóc, ít đau khi bóc	Gạc ngoài bám chắc, khó bóc, đau nhiều khi bóc
3	Sau thay băng	Ít chảy máu, chỉ vài giọt lấm tẩm	Chảy máu nhiều hơn vùng A
4	Viêm tiết dịch	Không có viêm tiết dịch, lớp gạc trên bề mặt tổn thương nhẵn mỏng	Viêm tiết dịch kéo dài 4-5 ngày. Dịch rỉ viêm phủ kín lớp gạc thuốc
5	Thời gian vận động	Vận động sớm hơn bên B, cử động nhẹ nhàng vào ngày thứ 3	Vận động muộn hơn bên A, cử động nhẹ nhàng vào ngày thứ 5-6
6	Thời gian đau	Cường độ đau và thời gian đau ít hơn bên B, sau 3 ngày hết đau	Đau nhiều hơn bên A, đau kéo dài 5-6 ngày
7	Viêm mủ	Không	19/78 chiếm tỷ lệ 24,35%
8	Thời gian khỏi	9,47 ± 1,03 ngày	11,52 ± 2,28
9	Nền da phục hồi	Mềm, mịn, đàn hồi	Mềm, mịn, đàn hồi

Nhận xét trên 78 bệnh nhân có vùng lấy da được điều trị bằng mỡ SH-91 có so sánh với vaselin dược dụng thấy mỡ SH-91 có tác dụng cầm máu nhanh hơn, không viêm tiết dịch, ít đau hơn và thời gian khỏi là 9,47 ngày so với vaselin dược dụng là 11,52 ngày.

IV. Bàn luận

Hoa giẻ và bòn bọt là những cây thuốc theo kinh nghiệm dân gian, có nhiều loài, cần phải thu hái đúng, tránh nhầm lẫn.

Hoạt chất có tác dụng chữa bỏng của cao thuốc là tác dụng tổng hợp toàn phần có trong cao, nhưng qua nghiên cứu chúng tôi cho rằng 2 thành phần tanin và saponin có tác dụng chính. Tanin là chất làm săn se, cầm máu, ngừng xuất tiết, tạo màng che phủ và diệt khuẩn trên các vết thương bỏng nông. Saponin là chất làm giảm sức căng bề mặt chất lỏng, có khả năng làm tan sữa mủ, giả mạc, diệt khuẩn ở vết bỏng sâu, tạo điều kiện phát triển tổ chức hạt và biểu mô hoá.

Đã có nhiều cây thuốc được nghiên cứu chữa bỏng có hiệu quả, nhưng hỗn hợp cao thuốc từ hoa gié và bồn bọ, được chúng tôi nghiên cứu lần đầu tiên chữa bỏng trên thực nghiệm và lâm sàng. Kết quả này góp phần làm phong phú thêm nguồn cây thuốc chữa vết thương bỏng ở Việt Nam.

V. Kết luận

Đã xác định được tên khoa học của hai cây thuốc nghiên cứu, là *Glochidion eriocarpum* Champ., - Euphorbiaceae (bồn bọ) và *Desmos chinensis* Lour., Annonaceae (hoa gié).

Thành phần hoá học của bồn bọ là tanin,

saponin và acid amin; của hoa gié là tanin, flavonoid và đường khử.

Bào chế được dạng cao SH-91 (10/1) và dạng mỡ SH-91 10% từ hỗn hợp hai cây.

Thử tác dụng sinh học: cao SH-91 có LD₅₀=229 cao/kg thể trọng chuột nhắt, có tác dụng kháng khuẩn, tác dụng tốt trên điều trị bỏng thực nghiệm.

Trên lâm sàng, SH-91 có tác dụng tương đương với Maducin và Silver sulfadiazin 1% ở bệnh nhân bỏng độ II, III (141 bệnh nhân) và bệnh nhân có vùng lấy da để ghép (78 bệnh nhân).

Tài liệu tham khảo

1). Nguyễn Tiến Bàn: Các loài họ Na (Annonaceae), trong hệ thực vật VN. Tạp chí sinh học, tập 16 số 4/1994, tr.4-9; NXB KHCN. 2). Võ Văn Chí. Từ điển cây thuốc Việt Nam, Nxb. Y học, 1997; 1043-1045. 3). Phạm Hoàng Hộ. Cây cỏ VN. Nxb. KH&CN, quyển I, tập I, 1991; 312-318. 4). Nguyễn Thị Vân Khanh. Nghiên cứu thực vật, hoá học. 1 số tác dụng sinh học của cây hoa gié. Luận án cao học Dược- Hà Nội 1995. 5). Lê Thế Trung. Sử dụng tannin để chữa bỏng, tập san ĐHQY I/1977; 54-56.

Tạp chí Dược liệu, tập 6, số 1/2001 (trang 147-152)

SỰ KHÁNG THUỐC CỦA *E. COLI* ĐỐI VỚI CÁC PHYTONCID CỦA TỎI, HẸ VÀ MẬT ĐỘNG VẬT SO VỚI MỘT SỐ KHÁNG SINH

Bùi Thị Tho - Trường đại học Nông nghiệp I Hà Nội
(Nhận bài ngày 14 tháng 1 năm 2000)

Summary

Effect of Garlic, Chinese Chive Phytoncids and Animal Biles on Antibiotic-resistance of *E. coli*

*Culturing *E. coli* in media supplemented with phytoncids or animal biles at gradually increased concentrations showed that:*

+ *The duration for resistance induction against antibiotics was shorter than that against phytoncids from garlic and chinese chive.*

+ *Animal biles inhibited the drug resistance and accelerated the process resusceptibility of *E. coli* to antibiotics.*

+ *Antibiotic-resistant *E. coli* showed no cross-resistance against phytoncids.*

Key words: Phytoncids, Garlic, Chinese Chive, Animal biles, Resistance, Resusceptibility, *E. coli*.

I. Đặt vấn đề

Sau công trình nổi tiếng của Fleming phát hiện ra penicilin, hàng loạt các thuốc kháng sinh mới ra đời, mở ra một thời hoàng kim của y học và thú y. Đến nay, đã có 6000 chất kháng sinh khác nhau được tìm ra, trong đó chỉ có 2% số chất được sử dụng [Aspock [5]; Weinstein [11]] .

Chẳng bao lâu, người ta đã phát hiện được mặt trái của thuốc hoá học trị liệu, nhất là kháng sinh. Đó là sự kháng thuốc của các loại vi khuẩn gây bệnh. {Bachmann [6]; Brunton [7]}.

Sự kháng thuốc đang ngày một gia tăng, làm giảm hiệu quả điều trị, thậm chí nhiều liệu pháp kháng sinh đã bị vô hiệu hoá hoàn toàn. Do đó,

tính nguy kịch của nhiều loại bệnh tật đã và đang trở thành hiểm họa {Cohen [8]; Ibal [9]; Nakazawa [12] và Urbaskova [15]}.

Một số nghiên cứu mới đây của các nhà khoa học Anh Johnson A.P và cộng sự [10] đã tìm thấy 27% *E. coli* và *Klebsiella pneumonia* kháng lại gentamycin và apramycin gây bệnh ở người do *E. coli* gây bệnh ở gia súc truyền sang. Như vậy, vi khuẩn kháng thuốc từ gia súc có thể truyền sang cho người và ngược lại. Chúng có thể gây thành dịch lớn {Nicholas [13]; Cohen [8]}.

Đây lại là một thách thức lớn và mới đối với y học và thú y trong giai đoạn hiện tại cũng như tương lai.

Một khái niệm không thể bỏ qua được về sự ô nhiễm môi trường cần đặc biệt quan tâm là sự ô nhiễm các loại vi khuẩn kháng thuốc [3]. Nếu trong môi trường sống của cộng đồng đã bị ô nhiễm, nhất là là vi khuẩn kháng đa thuốc (multiresistance), thì đây sẽ là môi trường chứa nhiều thảm họa.

Hiện nay, nghiên cứu về khả năng loại trừ các plasmid kháng thuốc của vi khuẩn đang là vấn đề có nhiều triển vọng. Một mặt, nó giải quyết các yêu cầu của thực tiễn đòi hỏi, mặt khác cho phép xây dựng lý luận hoàn chỉnh hơn về tính kháng thuốc của vi khuẩn. Việc tìm ra các tác nhân để loại trừ các plasmid kháng thuốc, đặc biệt trong điều kiện sinh lý tế bào có ý nghĩa rất lớn. Ở nước ta, Nguyễn Văn Dịp 1993 [1] và 1997 [2], cũng đã làm thực nghiệm để loại trừ plasmid kháng thuốc của tụ cầu vàng.

Để kéo dài hiệu quả điều trị của thuốc hoá học trị liệu nói chung và kháng sinh nói riêng, hạn chế sự ô nhiễm môi trường bởi vi khuẩn kháng thuốc, chúng ta cần có nhiều giải pháp khoa học để ngăn ngừa, hạn chế sự hình thành tính kháng, đặc biệt sự lan truyền tính kháng đa thuốc của vi khuẩn.

II. Nguyên liệu và phương pháp

1. Nguyên liệu

Các thuốc kháng sinh đều đạt tiêu chuẩn DDVN 1994 do phòng quản lý xuất nhập khẩu thuốc thú y cung cấp.

Cao mật động vật: Lấy mật của trâu, bò, lợn khoẻ mạnh, lọc qua Sezka cách thuỷ đến cao đặc, sấy tiếp dưới 50°C thành cao khô.

Củ tỏi khô, bóc hết vỏ cứng. Hẹ dùng cả cây, nghiền thật mịn pha loãng trong nước cất 2 lần theo nồng độ yêu cầu.

2. Phương pháp

+ Phân lập giám định vi khuẩn theo sơ đồ của Nguyễn Phú Quý và Nguyễn Văn Quỳnh (Kỹ thuật xét nghiệm vi sinh vật học 1991).

+ Làm kháng sinh đồ trên thạch theo phương pháp của Kirby Bauer (1993).

+ Nuôi cấy vi khuẩn trong môi trường theo yêu cầu thí nghiệm. Đánh giá mức độ nhạy cảm và kháng thuốc của vi khuẩn thí nghiệm theo tiêu chuẩn 91127 của Tổ chức y tế thế giới [14].

Trước khi tiến hành các thí nghiệm, chúng tôi đã xác định được nồng độ tối thiểu tác dụng của *E. coli* với kháng sinh và các phytoncid. Để thấy rõ được vai trò của tỏi, hẹ và cao mật động vật trong việc hạn chế tính kháng thuốc của vi khuẩn, chúng tôi đã bố trí những thí nghiệm sau:

+ Tạo vi khuẩn kháng thuốc trong 2 loại môi trường (loại có nồng độ thuốc tăng dần và loại cũng có nồng độ thuốc tăng dần nhưng có bổ sung cao mật động vật)

+ Kiểm tra khả năng tạo kháng chéo của *E. coli* khi đã kháng thuốc và các phytoncid của tỏi, hẹ.

+ Làm tái mẫn cảm trở lại các chủng vi khuẩn đã kháng thuốc cũng trong 2 loại môi trường như trên.

III. Kết quả nghiên cứu và thảo luận

1. Tạo *E. coli* kháng thuốc

A. Thí nghiệm được tiến hành trên 9 chủng *E. coli* (trong đó có 2 chủng *E. coli* chuẩn do đại học Dược khoa và đại học Quốc gia cung cấp, 7 chủng còn lại phân lập từ các mẫu bệnh phẩm của động vật). Các chủng *E. coli* đem tạo kháng với 9 loại thuốc hoá học trị liệu và 2 loại phytoncid của tỏi và hẹ trong môi trường chỉ có nồng độ thuốc tăng dần. Kết quả tạo kháng được trình bày ở bảng 1.

Kết quả bảng 1 cho thấy từ những chủng *E. coli* ban đầu rất mẫn cảm với các thuốc tạo kháng, nhưng sau một thời gian cho tiếp xúc dần với thuốc ở nồng độ tăng dần, *E. coli* đã xuất hiện sự kháng lại với các thuốc hoá học trị liệu nhanh hơn rất nhiều so với các phytoncid của tỏi và hẹ. *E. coli* kháng các thuốc hoá học trị liệu mất khoảng từ 8,5 đến 17,0 ngày cấy truyền liên tục (trừ Noflocaxin ở đời thứ 30 vẫn chưa bị *E. coli* kháng lại), trong khi đó với phytoncid phải mất 23,7 - 58,7 ngày. Thời gian tạo kháng của *E. coli* với các thuốc hoá học trị liệu ngắn hơn so với các phytoncid. Cụ thể là với các thuốc hoá học trị liệu bình quân chung mất 13,7 lần truyền đời liên tục (ngoại trừ Noflocaxin -

Bảng 1. Kết quả tạo *E. coli* kháng thuốc trong môi trường không có cao mật động vật

Nhóm thuốc	Thuốc tạo kháng	$[N_{mic}] \mu\text{g/ml}$	Thời gian tạo kháng (ngày)	$[N_{kháng}] \mu\text{g/ml}$
Dược chất	Ch	4,0	8,5	8,0
	C	2,0	12,6	4,0
	F	2,0	16,0	4,0
	N	2,0	17,0	4,0
	G	1,0	15,0	2,0
	A	2,0	12,0	4,0
	No	0,25	không kháng ở ngày thứ 30	-
	Clor-extra	0,125	16,5	1,0
	Sp - SH	2,0	12,0	4,0
Phytoncid	tỏi	10^{-5} ml	58,7	3×10^{-5} ml
	hẹ	2×10^{-3} ml	23,8	4×10^{-3} ml

Ghi chú: * $[N_{mic}] \mu\text{g/ml}$: Nồng độ tối thiểu tác dụng, với tối pha loãng ở nồng độ 1/vạn; lấy 0,3 ml; hệ pha loãng 1%, lấy 0,4ml

* $[N_{kháng}] \mu\text{g/ml}$: Nồng độ kháng

* Thời gian tạo kháng: Số ngày tiếp truyền đời để vi khuẩn xuất hiện sự kháng thuốc

kháng sinh mới), còn với các phytoncid bình quân chung phải mất 41,25 lần truyền đời mới có được *E. coli* kháng lại chúng.

B. Tạo *E. coli* kháng thuốc trong môi trường có nồng độ thuốc tăng dần nhưng có bổ sung cao mật động vật. Kết quả được trình bày ở bảng 2.

Bảng 2 cho thấy so với thí nghiệm ở môi trường không bổ sung mật động vật, vi khuẩn *E. coli* hình thành tính kháng trong môi trường thêm

cao mật có chậm hơn. Cụ thể như sau: với các thuốc hoá học trị liệu thời gian bình quân để tạo các chủng *E. coli* kháng thuốc mất 17,8 lần truyền đời (chậm hơn so với không có mật 4,1 đời), với các phytoncid của tỏi, hẹ bình quân mất 47,5 lần truyền đời (chậm hơn so với không có mật 7,1 đời).

Các thí nghiệm trên còn cho thấy trong công tác điều trị, đối với cloramphenicol và tetracyclin khi dùng đơn phương, nồng độ MIC của thuốc

Bảng 2. Vai trò của cao mật động vật trong quá trình tạo *E. coli* kháng thuốc

Nhóm thuốc	Thuốc tạo kháng	$[N_{mic}] \mu\text{g/ml}$	Thời gian tạo kháng (ngày)		$[N_{kháng}] \mu\text{g/ml}$
			T	T + MDV	
Dược chất	Ch	4,0	8,5	13,5	8,0
	C	2,0	12,6	15,0	4,0
	F	2,0	16,0	20,0	4,0
	N	2,0	17,0	-	4,0
	G	1,0	15,0	20,0	2,0
	A	2,0	12,0	17,0	4,0
	No	0,25	không kháng ở ngày thứ 30	-	-
	Clor-extra	0,125	16,5	22,5	1,0
	Sp - SH	2,0	12,0	16,5	4,0
Phytoncid	tỏi	10^{-5} ml	58,7	63,3	3×10^{-5} ml
	hẹ	2×10^{-3} ml	23,8	31,7	4×10^{-3} ml

với vi khuẩn cao từ 2 đến 4 µg/ml, thời gian kháng thuốc lại nhanh. *E. coli* kháng lại 2 thuốc này trong cả 2 thí nghiệm bình quân chung mất 14,4 đời. Còn khi phối hợp chúng lại, thì MIC đã giảm đi rất nhiều chỉ còn 0,125 µg/ml (giảm 16 - 32 lần). Đặc biệt, thời gian vi khuẩn kháng thuốc chậm lại 7,1 đời (từ 12,4 đời tăng lên 19,5 đời cấy truyền).

2. Khả năng tạo kháng chéo của *E. coli* khi đã kháng thuốc.

Các chủng vi khuẩn đã được tạo kháng ở thí nghiệm trên đem kiểm tra khả năng kháng với các thuốc còn lại. Các thuốc kháng chéo là những thuốc mà các chủng *E. coli* này chưa hề được tiếp xúc trong quá trình sống. Kết quả thí nghiệm được trình bày ở bảng 3.

Bảng 3. Khả năng tạo kháng chéo của *E. coli*

KC \	K	C	Ch	F	N	Tỏi	Hệ
C		K	0	0	0	0	0
Ch		K/C	K	K/C	K/C	0	0
F		K/C	K/C	K	K/C	0	0
N		0	0	0	K	0	0
Tỏi		0	0	0	0	K	0
Hệ		0	0	0	0	0	K

Bảng 3 cho thấy chỉ các thuốc hoá học trị liệu *E. coli* mới có khả năng cho kháng chéo giữa chúng với nhau, còn các phytoncid của tỏi, hệ hoàn toàn không cho kháng chéo. Không có khả năng kháng chéo giữa các thuốc hoá học trị liệu với phytoncid hay ngược lại.

Với kết quả nghiên cứu trên, phân nào đã lý giải được hiện tượng dùng phytoncid muộn đời vẫn giữ được giá trị phòng trị bệnh của nó. Còn các thuốc hoá học trị liệu tuy mới chỉ xuất hiện ở nửa đầu của thế kỷ 20, nhưng lại xuất hiện mặt phụ có hại là tính kháng thuốc như đã gặp trong phòng trị bệnh và gây ô nhiễm môi trường.

3. Tác dụng của cao mật động vật trong quá trình tạo *E. coli* đa kháng và đơn kháng mãn cảm trở lại với thuốc.

Các chủng *E. coli* đơn kháng được tạo ra trong phòng thí nghiệm. Còn các chủng *E. coli* đa kháng được phân lập từ các mẫu bệnh phẩm của gia súc.

Các chủng vi khuẩn *E. coli* này cũng được nuôi cấy trong 2 loại môi trường là canh thang và canh thang có bổ sung cao mật động vật ở các nồng độ khác nhau. Kết quả được trình bày ở bảng 4.

A. Với các chủng *E. coli* đơn kháng.

Bảng 4. Quá trình tái mãn cảm các chủng *E. coli* đơn kháng

Tên thuốc kiểm tra tái mãn cảm	Thời gian nuôi cấy (ngày) cho VK mãn cảm trở lại	
	Canh thang	Canh thang + CMDV
Ch	31,0	16,0
C	41,7	34,0
F	30,7	21,7
N	36,7	-
Tỏi	33,0	26,0
B/Q	35,7	23,6

Bảng 4 cho thấy thời gian xuất hiện tái mãn cảm của vi khuẩn *E. coli* dài, ngắn khác nhau tùy theo loại thuốc. Chúng tôi thấy cao mật động vật

có khả năng làm cho *E. coli* mãn cảm trở lại với thuốc nhanh hơn. Nếu trong môi trường không có mật, bình quân chung hết 35,7 lần cấy truyền đời.

Còn trong môi trường có bổ sung cao mật động vật chỉ hết 23,6 đời.

B. Với các chủng *E. coli* đa kháng.

Năm 1998, trong quá trình kiểm tra tính kháng thuốc của *E. coli*, chúng tôi đã phân lập được 2 chủng *E. coli* đa kháng cùng một lúc với 11/12 loại thuốc đem thí nghiệm là Tylosin (Ty), Ampicilin (A), Clotetracyclin (Ch), Cloramphenicol (C), Streptomycin(S), Tiamulin (Ti), Lincomycin (Li),

Tiakaneolin (Tia), Spectam - SH (Sp), Clo - extra (Clor) và Phucin (Pu). Chúng tôi đã đem 2 chủng *E. coli* này nuôi cấy liên tục nhiều đời trên 2 loại môi trường canh thang và canh thang có bổ sung các nồng độ mật khác nhau. Mỗi ngày cấy chuyển vi khuẩn một lần, cứ sau 5 ngày lại kiểm tra kháng sinh đồ một lần để đánh giá mức độ mẫn cảm trở lại với thuốc. Kết quả thí nghiệm được trình bày ở bảng 5.

Bảng 5. Quá trình tái mẫn cảm của *E. coli* đa kháng phân lập từ bệnh phẩm

[N] mật	Số lần truyền đời để vi khuẩn tái mẫn cảm trở lại với thuốc				
	0	20µg/ml	120µg/ml	480µg/ml	1920µg/ml
Ty	k	k	k	k	k
A	k	k	k	k	k
Ch	k	k	k	k	k
St	k	k	k	k	k
Ti	k	35	35	35	35
C	k	k	k	k	k
Li	k	k	k	k	k
Tia	35	30	30	35	30
Sp	k	35	35	35	35
Pu	k	k	k	k	k
Clor	k	30	35	35	35
Số thuốc mẫn cảm trở lại	1/11	4/11	4/11	4/11	4/11

Bảng 5 cho thấy từ những chủng *E. coli* ban đầu đa kháng với 11 loại thuốc, nhưng sau nhiều đời sống trong môi trường không có thuốc, vi khuẩn cũng có khả năng tái mẫn cảm trở lại với thuốc mà nó đã nhận được tính kháng trong quá trình sống. Cụ thể, sau 35 đời cấy truyền liên tục trong môi trường không có cao mật động vật, *E. coli* đã tái mẫn cảm trở lại với 1/11 thuốc. Đó là tiakaneolin, các thuốc còn lại 10/11 không được tái mẫn cảm. Trong môi trường có bổ sung cao mật động vật ở 4 loại nồng độ đều có 4/11 thuốc được *E. coli* tái mẫn cảm trở lại ở đời cấy truyền thứ 30 - 35.

VI. Kết luận.

1. Phytoncid của tỏi, hệ trong tự nhiên không bị vi khuẩn kháng lại. Vi khuẩn kháng lại phytoncid nhân tạo trong phòng thí nghiệm rất chậm, nhưng lại tái mẫn cảm nhanh hơn so với các thuốc hoá học trị liệu khác.
2. Không có hiện tượng kháng chéo giữa các phytoncid và giữa phytoncid với thuốc hoá học trị liệu khác.
3. Cao mật động vật có tác dụng ức chế, ngăn chặn sự kháng thuốc của vi khuẩn *E. coli*.

Tài liệu tham khảo

- 1). Nguyễn Văn Dịp. Tạp chí Y học thực hành tháng 3-1993; 2). Nguyễn Văn Dịp, Trương Thị Xuyên. Tạp chí Y học thực hành tháng 2 - 1997; 3). Lê Đình Lương (sách dịch) Tính kháng thuốc loại episome của vi khuẩn. Tuyển tập vi sinh vật. Tập 2. NXB KHKT 1975; 4). Đinh Bích Thủy và cộng sự. Tạp chí KHKT. Thú y. Tập 2 số 3-1995; 5). Aspöck. C; Koller. W; Rotter. M. Resistance spectam of Staphylococcus at the Vienna general hospital from July to December 1991. Chizzali - Bonfadin - C. Hygiene - Institut. Universital Wien. 1994; 6). Bachmann. B.J. Linkage map of *E. coli* K -12. edition 7. Microbiol. Rev. 47. 1983. and edition 8. 54. 1990; 7). Brunton. J. The Shiga toxin family: molecular nature and role in disease 1990. Academic press. Inc. New Yooh; 8). Cohen. S.N. and Shapiro. J.A. Transposable genetic. Scientific American. 1980. 242; 9). Ibal. J; Raman. M; Karbir. M.S. J. Med. Sci. Bio. 1997. Dec.5 (6); 10). Johnson. A.P; Burm. L; Woodford. N; Threfall. E.S. 1994. J. Med.

Micro.40; 11). Luis Weinstein. The pharmacological basis of therapeutics. Chater. 60. 1993; 13). Nakazawa. M. Sugimoto. C. Microbiology. 1987. Voll No 4;14). Nicholas. F.N. Veterinary genetics. Clasedon press. Oxford. 1987; 15). Standarization of antibiotic susceptibility testing according international norms. Bio. Micro. WHO. 91127. 1995; 16). Urbaskova. P; Schindler. J. Bacterial resistance to antibiotic in the Czech Republic. The Working group for monitoring resistance in the Czech republic. Praha. 1994.

Tap chí Dược liệu, tập 6, số 5/2001 (trang 152-156)

NGHIÊN CỨU THUỐC PANACRIN ỨC CHẾ U DÙNG TRONG ĐIỀU TRỊ UNG THƯ

Phần II. Tác dụng ức chế u và hạn chế di căn của panacrin và một số chế phẩm từ dược liệu trên mô hình u đùi thực nghiệm, độc tính cấp và độc tính bán trường diễn của panacrin

Phạm Kim Mân, Lê Thu Thủy, Đỗ Trung Đàm, Nguyễn Kim Phương - Viện Dược liệu
Trần Văn Hanh, Nguyễn Minh Thông, Nguyễn Thị Đức - Viện Quân Y 103
(Nhận bài ngày 22 tháng 6 năm 2000)

Summary

Preparation of Anti-tumour Panacrin for Cancer Treatment

Study No. 2. Anti-tumour and Anti-metastasis Effects of Some Preparations from Medicinal Plants and Toxicity of Panacrin Drug

Extracts from *Carica papaya* L. (A), *Crinum latifolium* L. (B), *Panax pseudoginseng* (Burk) F.H. Chen (C), *Scutellaria rivularis* and *Hedyotis diffusa* Willd (D) and Panacrin, a preparation made from *Carica papaya*, *Crinum latifolium* and *Panax pseudoginseng*, were tested for anti-tumour and anti-metastasis effects.

The results showed that all the samples inhibited the development and metastasis of the tumours on thigh tumour model induced by Sarcoma TG.180 cells in mice. Panacrin has low toxicity.

Key words: *Carica papaya* L., *Crinum latifolium* L., *Panax pseudoginseng* (Burk) F.H. Chen, *Scutellaria rivularis*, *Hedyotis diffusa* Willd, Panacrin, Anti-tumour, Anti-metastasis, Toxicity.

1. Mục đích

Việc xác định tác dụng ức chế u và hạn chế di căn của một số chế phẩm từ dược liệu trong nước (đã có tài liệu nước ngoài và kinh nghiệm của nhân dân sử dụng trong điều trị u và ung thư) và chế phẩm Panacrin nhằm đưa ra ứng dụng một loại thuốc có tác dụng ức chế u, hạn chế di căn của tế bào ung thư..

II. Nguyên liệu và phương pháp

1). Nguyên liệu

Các chế phẩm: A: Dịch chiết từ lá đu đủ, B: Dịch chiết từ lá trinh nữ hoàng cung, C: Dịch chiết từ bột tam thất, D: Dịch chiết từ một bài thuốc Trung Quốc, P: Sản phẩm Panacrin được bào chế từ tam thất, đu đủ và trinh nữ hoàng cung.

2). Phương pháp nghiên cứu

a). Gây mô hình ung thư đùi thực nghiệm bằng cách tiêm 5×10^7 tế bào ung thư Sarcoma 180 vào đùi chuột nhắt trắng thuần chủng BAL b/c 8 tuần tuổi thấy 100% khối u phát triển. Tác dụng của thuốc được đánh giá thông qua:

- Khối lượng u (đùng thuốc kẹp để đo kích thước đùi chuột, rộng, dài, chu vi) ở những thời điểm 4, 7, 10, 14 ngày sau khi tiêm tế bào ung thư. Từ các số đo trên, tính ra thể tích tương đối của khối u theo công thức:

$$V = \frac{\pi}{6} D^3 \quad (\text{Theo Nowak và cs. 1978})$$

- Tính trọng lượng u đùi: Giết chuột ở ngày thứ 14, lấy trọng lượng đùi mang u trừ trọng lượng đùi bên đối diện.

- Tính tỷ lệ % hạn chế phát triển khối u:

$$\text{Growth Delay (GD)} = \frac{V_1 - V_c}{V_c} \quad (\text{Nowak 1978})$$

V_1 : Khối lượng u của nhóm dùng thuốc. V_c : Khối lượng u của nhóm đối chứng (không dùng thuốc).

b). Xác định độc tính cấp

Phương pháp: Theo Tổ chức y tế thế giới và sách "Phương pháp xác định độc tính cấp của thuốc".

- Động vật thí nghiệm: Chuột nhắt trắng 19-23 g.
- Dạng dùng: Dịch Panacrin cô cách thủy đến đậm độ thích hợp, rồi cho chuột uống.
- Đường dùng: Lấy thuốc vào bơm tiêm rồi đưa thuốc trực tiếp vào dạ dày qua một kim cong đầu tù.

- Thời gian theo dõi: 3 ngày kể từ khi cho chuột uống thuốc.

- Xác định độc tính cấp theo cách tính của Litchfield - Wilcoxon.: $\Sigma TSX_2 = 0,114$

c). Xác định độc tính bán trường diễn

Thí nghiệm được thử trên thỏ gồm hai lô là lô đối chứng và lô thử thuốc. Các thỏ ở lô thử thuốc được uống Panacrin dưới dạng cao cồn với liều 4,5 ml cao/1 kg thỏ/1 ngày và liên tục 30 ngày. Trước khi cho thỏ uống, phải bốc hơi cồn. Các thỏ đối chứng được uống nước cất với cùng thể tích và thời gian tương đương với thỏ thử thuốc. Cho thỏ uống thuốc và nước qua ống thông vào dạ dày.

Trong quá trình thí nghiệm, theo dõi tình trạng chung của thỏ, cân nặng, chức phận tạo máu, chức năng gan và thận trong thời gian 30 ngày trước, 30 ngày trong và 30 ngày sau khi cho uống thuốc. Trong mỗi tháng lấy máu thỏ 2 lần vào các tuần thứ hai và thứ tư. Các mẫu máu này được làm các xét nghiệm hoá sinh và huyết học để theo dõi ảnh hưởng của thuốc. Làm xét nghiệm bệnh lý giải phẫu đại thể và vi thể gan, thận của thỏ sau 1 tháng kết thúc việc cho thỏ uống thuốc.

Chức phận tạo máu được đánh giá qua xét nghiệm: đếm số lượng bạch cầu, hồng cầu và định lượng huyết sắc tố bằng phương pháp Crosby dưới dạng phức chất hemoglobincyanid (cyanmet-hemoglobin).

Chức năng gan được đánh giá qua các xét nghiệm:

- Định lượng protein toàn phần trong huyết thanh bằng phương pháp Biurê.

- Định lượng hoạt độ các men transaminaza GOT và GPT trong huyết thanh theo phương pháp của Reitman-Frankel sửa đổi bởi Sevela - dùng các cơ chất là L-aspartat và L-alanin.

Chức năng thận được đánh giá qua các xét nghiệm:

- Định lượng men trong huyết thanh theo phương pháp dùng men ureaza của Rappoport.

- Định lượng creatinin trong huyết thanh bằng phản ứng Jaffe.

Các enzym và các chất chuyển hoá nêu trên được định lượng bằng thuốc thử được cung cấp bởi các hãng Human (Đức) và Menarini (Ý) dưới dạng các bộ thuốc thử (kit) và được đo trên máy quang kế bán tự động Scout theo chỉ dẫn của nhà sản xuất.

Các kết quả thí nghiệm được phân tích thống kê bằng nghiệm pháp t của Student.

III. Kết quả nghiên cứu

1. Tác dụng hạn chế sự phát triển ung thư

Mẫu A làm giảm thể tích u đùi chuột ở 10 ngày và 14 ngày.

Mẫu C làm giảm thể tích u đùi chuột ở 4, 7, 10 ngày.

Mẫu D làm giảm thể tích u đùi chuột ở 4, 7, 10 ngày.

Mẫu P làm giảm thể tích u đùi chuột ở 4, 7 ngày.

Căn cứ theo thang đánh giá của V.V. Sokolov và cộng sự thì các mẫu A, C, D, P có tác dụng hạn chế một phần sự phát triển của khối u ở giai đoạn sớm.

2. Tác dụng hạn chế di căn của tế bào ung thư

Theo dõi di căn của tế bào ung thư lên gan, phổi, lách (xem bảng ở trang sau).

Các mẫu thuốc đều có tác dụng hạn chế sự di căn của tế bào ung thư từ u đùi lên gan, phổi, lách. Quan sát đại thể các lô thí nghiệm số chuột uống thuốc có di căn chi bằng 1/3 đến 1/6 so với lô đối chứng.

Lô	Đợt 1	Đợt 2	Đợt 3	Đợt 4
Đối chứng	Gan 6/6 chuột có di căn 20 nốt. Phổi 6/6 chuột có di căn, 23 nốt. Lách to	Gan 6/6 chuột có di căn, 20 nốt. Phổi 6/6 chuột có di căn, 20 nốt. Lách to và rất to	Gan 5/10 chuột, 10 nốt. Phổi 4/10 chuột, 7 nốt. Lách to	Gan 6/9 chuột có di căn, 13 nốt. Phổi 4/9 chuột, 12 nốt. Lách to
Thuốc A	Gan 3/6 chuột, 10 nốt. Phổi 3/6 chuột, 12 nốt. Lách to.	Gan 5/6 chuột, 15 nốt. Phổi 5/6 chuột, 15 nốt. Lách to.	Gan không có di căn. Phổi 1/10 chuột, 2 nốt. Lách 3 chuột, lách to	
Thuốc B		Gan 3/6 chuột có di căn, 6 nốt. Phổi 3/6 chuột, 8 nốt. Lách to	Gan không có di căn. Phổi 1/10 chuột, 2 nốt. Lách hơi to.	
Thuốc C	Gan 1/6 chuột, 4 nốt. Phổi 3/6 chuột, 8 nốt. Lách bình thường.	Gan 1/6 chuột xơ. Phổi 1/6 chuột, 3 nốt. Lách 3 chuột, hơi to.	Gan không có di căn. Phổi 1/10 chuột, 2 nốt. Lách hơi to.	
Thuốc D	Gan 1/6 chuột, 2 nốt. Phổi 3/6 chuột, 6 nốt. Lách hơi to.	Gan 2/6 chuột, xơ. Phổi không có di căn. Lách 3 chuột, hơi to.	Gan không có di căn. Phổi 1/10 chuột, 2 nốt. Lách hơi to.	
Thuốc P			Gan không có di căn. Phổi 1/10 chuột, 2 nốt. Lách hơi to.	Gan 3/9 chuột, 5 nốt. Phổi 1/9 chuột, 2 nốt. Lách 3 chuột, lách to

3). Độc tính cấp của Panacrin

Stt	Liều (ml/kg)	Số chuột thử	Số chuột chết	Tỷ lệ % chuột chết (a)	Tỷ lệ % chuột chết mong đợi (b)	Hiệu 2 tỷ lệ chết (a-b)	Tham số cho X ²
1	40	12	0	(0) 0,80	2,2	1,4	0,009
2	50	12	1	8,3	9,6	1,3	0,002
3	62,5	12	3	25	22	3	0,006
4	80	12	5	41,7	48	6,3	0,017
5	100	12	9	75	72	3	0,005
6	200	12	12	(100) 95,7	86,2	9,5	0,075

Kết quả xác định độc tính cấp được trình bày trong bảng theo cách tính của Litchfield Willcoxon thì $LD_{50} = 82 (70,7 \rightarrow 95,1)$ ml/kg với $P = 0,05$.

Kết luận: Liều chết 50% ở chuột nhắt trắng dùng đường uống là 82 ml/kg với giới hạn tin cậy $(70,7 \rightarrow 95,1)$ ml/kg ở ngưỡng xác suất $P = 0,05$.

4). Độc tính bán trường diễn của Panacrin

Các kết quả theo dõi được trình bày trong bảng ở trang 155 cho thấy khi cho thử uống liều 4 ml/1 kg thử/ngày và uống kéo dài 30 ngày dưới dạng cao cồn không có biểu hiện nhiễm độc về mặt

sinh hoá, huyết học và giải phẫu. (Liều thử trên gấp 5 lần liều dùng bình thường của Panacrin trong điều trị)

IV. Kết luận

- Các mẫu đem thử A, B, C, D, P đều có tác dụng ức chế sự phát triển khối u ở giai đoạn sớm trên mô hình u đùi do chuột BAL b/c được tiêm Sarcoma TG. 180.

- Các mẫu thử đều có tác dụng làm giảm sự di căn của tế bào ung thư.

- Panacrin ít độc, có giới hạn an toàn rộng.

Tài liệu tham khảo

1). Bruce et al. Molecular Biology of the Cell. Garland Pub., Inc., New York-London, 1966; 2). Cancer Research. 25(3), 329, 1965; 3). K. Nowak et al. Brit. of Cancer. 37, 576-580, 1978; 4). Actualité Pharmaceutique, 11-1997; 5). Đỗ Trung Đàm. Phương pháp xác định độc tính cấp của thuốc. NXB Y học, Hà Nội, 1976; 6). W.H.O. Research Guideline for Evaluating the Safety and Efficacy of Herbal Medicines. Manila, Philippines, 1993.

Kết quả thử độc tính bán trường diễn của Panacrin

	Lô thỏ đối chứng. n=6			Lô thỏ uống thuốc. n=5		
	Trước khi uống	Trong khi uống	Sau khi uống	Trước khi uống	Trong khi uống	Sau khi uống
Cân nặng (kg)	1.98 ± 0.13	1.91 ± 0.09 t=0.78	2.02 ± 0.03 t=0.51	1.94 ± 0.07	2.03 ± 0.08 t=0.82	2.09 ± 0.09 t=1.34
Bạch cầu (1000/mm ³)	7.78 ± 0.76	8.13 ± 0.39 t=0.71	7.35 ± 0.27 t=0.93	6.86 ± 1.22	7.11 ± 0.81 t=0.19	7.21 ± 0.40 t=0.27
Hồng cầu (triệu/mm ³)	4.21 ± 0.07	4.28 ± 0.11 t=1.0	4.23 ± 0.14 t=0.22	4.18 ± 0.19	4.21 ± 0.18 t=0.16	4.22 ± 0.09 t=0.19
Hemoglobin (g/l)	95.75 ± 1.64	94.70 ± 1.44 t=0.83	93.02 ± 3.81 t=1.14	94.53 ± 2.52	94.68 ± 6.66 t=0.02	95.53 ± 1.72 t=0.33
Protein toàn phần (g/dl)	6.14 ± 0.12	5.96 ± 0.27 t=1.06	6.24 ± 0.12 t=1.00	6.31 ± 0.26	6.10 ± 0.31 t=0.51	6.44 ± 0.15 t=0.42
Ure (μmol/ml)	19.97 ± 0.75	20.86 ± 1.22 t=1.44	22.32 ± 1.02 t=1.97	20.93 ± 3.24	17.66 ± 0.79 t=1.01	21.50 ± 1.34 t=0.16
Creatinin (mg/dl)	2.66 ± 0.28	2.46 ± 0.13 t=1.11	2.51 ± 0.10 t=0.88	2.57 ± 0.08	2.47 ± 0.19 t=0.48	2.61 ± 0.07 t=0.38
GOT (UI/l)	68.75 ± 4.62	70.95 ± 6.68 t=0.46	67.18 ± 7.26 t=0.18	81.30 ± 6.09	75.37 ± 25.98 t=0.22	82.41 ± 6.85 t=0.12
GPT (UI/l)	153.60 ± 15.45	145.51 ± 18.18 t=0.59	160.62 ± 20.37 t=0.55	173.41 ± 11.24	161.95 ± 35.56 t=0.31	171.74 ± 8.10 t=0.19

PHÂN ĐỘNG VẬT LÀM THUỐC

Hỏi: Nghe nói phân động vật cũng được dùng làm thuốc chữa bệnh. Xin cho biết có đúng như vậy không?

Đặng Hữu Chức (Hà Bắc)

Đáp: Phân động vật chỉ được dùng làm thuốc trong y học cổ truyền và kinh nghiệm dân gian; và cũng chỉ có một số phân của những động vật gần gũi với con người mới được sử dụng:

Phân tằm được dùng trong y học cổ truyền với tên thuốc là tằm sa hay tằm mễ. Phân tằm được thu hoạch vào mùa xuân-hạ (tháng 2-6), loại bỏ các tạp chất như cuống và gân lá dâu, rơm rác..., rồi phơi khô giòn là được. Dược liệu có hình thoi, dài 2-3 mm, màu nâu đen, mặt ngoài hơi nhăn nheo, chất cứng, mùi hơi hôi. Khi dùng, đem phân tằm sao qua chõ có mùi thơm. Trong phân tằm, có chất hữu cơ, nitơ, các vitamin A, B, các kích thích tố thực vật.

Phân tằm có vị ngọt, cay, hơi đắng, tính ôn, không độc, có tác dụng trừ phong thấp, nhức mỏi, ứ huyết, chân tay tê bại (lấy phân tằm sao nóng, đựng đầy vào hai túi nhỏ dùng thay đổi để chườm và day vào chỗ tê đau); chữa bệnh đái đường, băng huyết (mỗi ngày uống 6-12g, có khi đến 40g phân tằm sao vàng, tán nhỏ; có thể chiêu thuốc với rượu hoặc sắc với nước rồi chia làm nhiều lần uống trong ngày) Để chữa đau thắt vùng thượng vị đột ngột, Tuệ Tĩnh (Nam dược thần hiệu) đã lấy phân tằm cho vào nước, khuấy mạnh cho tã ra, để lắng, rồi lọc uống. Người có máu nóng không được dùng phân tằm.

Theo tài liệu nước ngoài, ở Trung Quốc, người ta đã chế được chất điệp lục từ phân tằm. So với phương pháp chế điệp lục cổ điển của thế giới là dùng lá thông và các loài cây cỏ khác, phương pháp mới này đỡ tốn kém hơn nhiều, lại có năng suất cao, cứ 20 kg phân tằm có thể tạo ra 1 kg chất điệp lục. Từ chất điệp lục này, lại chế ra nhiều loại thuốc chữa bệnh viêm gan, ung thư do thiếu bạch cầu.

Phân chim: Phân chim sẽ có 5,66% nitơ toàn phần, 0,22% amoniac, 33,7% tro, được dùng làm thuốc từ lâu đời trong y học cổ truyền, với tên gọi là ma tước phấn, bạch đình hương. Dược liệu có vị đắng, tính ôn, hơi có độc, có tác dụng tiêu tích,

làm sáng mắt, chống viêm. Chữa bụng đầy trướng, kết hòn, ngực sườn đau: phân chim phơi khô (21 hạt) tán bột, hoà với một ít rượu mà uống hoặc trộn phân chim với một ít can khương, tán bột, luyện với mật làm viên uống với nước ấm.

Chữa cổ họng sưng đau: phân chim (7 hạt) tán bột, trộn với đường kính làm thành 2 viên, rồi ngâm nuốt nước dần dần (Nam dược thần hiệu). Dùng ngoài, phân chim sẽ nghiền với nước, bôi chữa mụn nhọt, đầu đinh.

Phân chim yến (30g) phơi khô, sao vàng, tán bột; tỏi (3 củ) giã nát. Trộn đều hai thứ, thêm hồ làm viên bằng hạt ngô. Mỗi lần uống 3 viên với nước ấm. Chữa ngộ độc.

Phân chim bồ câu (20g), sao vàng, tán nhỏ, cho vào ít rượu, khuấy đều. Đợi lắng trong thì bỏ cặn, gạn uống để chữa đau bụng thuộc âm chứng, sắc mặt xanh nhợt (Nam dược thần hiệu).

Phân dơi (dạ minh sa). Từ tháng 4 đến tháng 11, người ta tìm đến các hang đá có dơi ở, dùng cào và xẻng xúc phân đựng vào bao tải. Nhân dân vùng rừng U Minh thuộc tỉnh Minh Hải lại dụ dơi đến ở để lấy phân. Đem phân về, loại bỏ tạp chất, phơi khô. Khi dùng làm thuốc, phải chế biến theo cách sau: Cho phân dơi vào nước sạch, khuấy đều và nhẹ, gạn bỏ chất bẩn nổi lên trên và một phần nước. Thêm nước, lại khuấy gạn, làm như vậy 3 lần. Lần cuối cùng gạn bỏ hết nước, lấy cặn đem phơi, rồi sao cho thơm.

Theo các sách cổ, dạ minh sa có vị cay, mặn, mùi hôi, tính hàn, không độc, có tác dụng hoạt huyết, minh mục, trừ cam tích, kinh phong, được dùng trong những trường hợp sau:

- *Chữa đau mắt có màng mỏng:* Dạ minh sa (3-6 g) sao vàng, cho vào gan lợn nấu với nước cho chín dừ, ăn cả cái lẫn nước. Hoặc dạ minh sa sao với gạo nếp (40 g) và lá trác bá (40 g) cho khô, tán nhỏ, rây bột mịn, hoà với nước mật bò làm viên bằng hạt ngô. Mỗi lần uống 20 viên với nước sắc lá tre trước khi đi ngủ (Nam dược thần hiệu).

- *Chữa quáng gà*: Dạ minh sa sao vàng, nghiền nát, hoà với mật lợn, làm viên bằng hạt đỗ xanh. Ngày uống 4-6 viên với nước cơm hay nước cháo. Hoặc dạ minh sa (5g, gói vào miếng vải) phối hợp với cốc tinh thảo (6g), thảo quyết minh (10g), mật mông hoa (6g), cam thảo (3g), sắc với 400ml nước còn 100ml, uống làm 3 lần trong ngày. (Phương thuốc kinh nghiệm của Trung Quốc).

- *Chữa trẻ em da xanh, gầy gò, bụng to, mắt nhiều dử, phân có mùi khắm* (cam tích): Dạ minh sa (20g), mai mực (16g), thanh đại (12g), hạt gấc (12g), sử quân tử (8g), nga truật (8g), cốc tinh thảo (8g).

Dạ minh sa (chế biến như trên); mai mực ngâm nước rửa sạch, nướng qua, bỏ vỏ cứng; hạt gấc đập bỏ vỏ, lấy nhân, sao cháy; nga truật thái mỏng, sao vàng; sử quân tử bóc vỏ, lấy nhân, cắt hai đầu và bóc màng lụa, sao vàng; cốc tinh thảo sao vàng. Tất cả tán bột, rây mịn, luyện với mật hoặc đường làm viên bằng hạt đỗ xanh, sấy khô. Trẻ em: 1-3 tuổi, mỗi lần uống 15-20 viên; 4-7 tuổi, 20-30 viên; 8-12 tuổi trở lên, 30-40 viên. Ngày hai lần, uống với nước nóng hoặc nước cơm. Kiên ky: trường hợp cơ thể suy nhược, hư hàn, ăn không tiêu, tiêu chảy, không nên dùng. (Kinh nghiệm của tinh hội y học dân tộc Thanh Hoá).

Phân quy: Con quy chính là con mọt gạo hay mọt ngô, thường gặp trong các kho ngũ cốc. Nhiều gia đình đã nuôi quy để lấy phân làm thuốc. Nuôi quy trong lọ rộng miệng, thức ăn là bông gạo hay bông ngô. Phân quy thu được đem rây qua một loại rây nhỏ để loại tạp chất như vụn bông, rác, con sâu quy..., rồi sao cho khô và có mùi thơm. Dược liệu là những hạt rất nhỏ, màu nâu xám nhạt, không mùi, vị nhạt. Phân quy chứa nhiều acid amin như lysin, arginin, histidin, valin, leucin, methionin, phenylalanin... là một vị thuốc bổ dân gian được dùng cho trẻ em chữa chứng cam tích như ăn không tiêu, gầy yếu, xanh xao, nôn trớ, đau mắt nhiều dử. Liều dùng hàng ngày là 2-4 g dưới dạng thuốc bột. Dùng riêng hoặc phối hợp với các vị thuốc khác như bạch chỉ, sử quân tử, ý dĩ, hoài sơn...

Phân ngựa, tên thuốc trong y học cổ truyền là mã phần, có tác dụng cầm máu, giảm đau, làm se.

Tuệ Tĩnh (Nam dược thân hiệu) đã dùng phân ngựa đốt cháy thành than, tán nhỏ, hoà với rượu cho uống với liều 4 g, chữa phạm phòng do ốm thương hàn mới khỏi. Phân ngựa phối hợp với đậu đỏ (hai thứ lượng bằng nhau) đốt, tán bột, uống 4-8 g trong ngày với rượu, chữa thổ huyết. Hoặc phân ngựa với rau sam phơi khô, đốt thành tro, rắc chữa đau ngứa sinh lở loét. Theo lương y Vũ Văn Kính (TP. Hồ Chí Minh) phân ngựa (40 g) phơi khô, sao đen, tán nhỏ; đất lòng bẹp (hoàng thổ 40 g) sao qua, tán nhỏ. Trộn đều hai bột. Mỗi lần uống 20 g với ít rượu hâm nóng, chữa đau bụng dữ dội, đau thắt lưng chết.

Ngoài ra, theo các sách cổ, **phân dê** (10 viên) nấu với rượu, uống chữa nôn ra nước chua; sắc với nước tiểu trẻ em (đồng tiền, 200 ml) còn 100 ml, để lắng, gạn nước trong, uống làm 3 lần, chữa chứng ăn vào mửa ra (y học cổ truyền gọi là phiến vị); nếu phơi khô, đốt lấy khói xông lại chữa mụn rò có mủ, lâu không liền miệng. **Phân chuột** (14 hạt) phối hợp với rêu hẹ (1 nắm) sao cháy, sắc với 2 bát nước, còn nửa bát, bỏ bã, lại đun cho trào lên, rồi uống lúc nóng cho ra mồ hôi, chữa phạm phòng; nếu phối hợp với bồ hóng (lượng bằng nhau) cho vào nồi, đốt xông khói chữa lòi dom. **Phân giun** (1 thàng) sao cho hết khói, đang còn nóng đổ vào bát nước, khuấy đều, để lắng, gạn uống, chữa kiết lỵ. **Chất trắng trong phân gà** sao vàng hoặc đốt cháy, tán nhỏ, hoà với nước, khuấy đều, để lắng, rồi gạn lấy nước trong, uống chữa ngộ độc nấm, trúng phong, cấm khẩu; nếu dùng rắc lại chữa nhọt mọc trong tai. **Phân gà đen** trộn với nước, đắp chữa rét cần. **Phân ngỗng** chữa sâu độc cần, rắn cần. **Phân sâu dậu** (miền nam gọi là bù xè) sao vàng, tán bột mịn, ngày uống hai lần, mỗi lần 4 g với rượu chữa hậu sản ra máu, băng huyết. Nếu trộn phân sâu với nước làm thành viên bằng hạt nhân, uống mỗi lần 1-2 viên với nước cơm lại chữa hậu sản đi lỵ ngày nhiều lần (Con sâu dậu, còn gọi là nhậy dậu, là ấu trùng của một loại xén tóc, sống trong thân cây dậu).

Đó Huy Bích

TÁC DỤNG CHỐNG LÀM TỔ (CỦA TRÚNG) CỦA ALCALOID RỄ CÂY NGUYỆT QUÍ.

Fitoterapia, 1988, số 3, t.168

Từ rễ cây nguyệt quý (*Murraya paniculata* (L.) Jack) họ Rutaceae, một alkaloid đã được chiết tách là yuehchukene (I) (phiên âm theo âm Hán- Việt là nguyệt quý kiềm tức là alkaloid của nguyệt quý).

Cho chuột cống trắng cái trưởng thành ghép với chuột đực. Sau khi chuột giao phối được 2 ngày, cho chuột uống chất I với liều 3 mg/kg và tách khỏi chuột đực. Kết quả chuột cái không có thai là do thuốc có tác dụng chống làm tổ trong dạ con của chuột.

Chú thích: Cây nguyệt quý có tài liệu gọi là nguyệt quối, hoặc nguyệt quất.

TÁC DỤNG TRÊN TẾ BÀO UNG THƯ CỦA QUYÊN BÁ

Lee I.R., Song J.Y., Lee Y.S.

Korean J. of Pharmacognosy, vol. 23(3), p. 132-136, 1992.

Toàn cây quyên bá (*Selaginella tamariscina* (Beauv.) Spring), họ Selaginellaceae được chiết bằng methanol rồi cô thành cao đặc methanol. Cao này được chiết bằng cloroform, acetat ethyl hoặc n-butanol sẽ cho các chất đem thử trên tế bào ung thư dòng P388 và MKN 45 *in vitro*. Sau đó, xác định số tế bào chết bằng phương pháp nhuộm màu với tetrazolium, những tế bào chết sẽ bắt màu. Kết quả cho thấy cả ba chất chiết đều làm tăng số tế bào chết, giảm số tế bào sống so với lô đối chứng.

Từ phân đoạn chiết bằng acetat ethyl, đã tách được chất amentoflavon. Chất này có tác dụng làm giảm tế bào sống của tế bào P388 phụ thuộc vào liều dùng, nhưng không ức chế rõ trên tế bào MKN45.

HOẠT CHẤT CHỮA CAO HUYẾT ÁP CỦA SELAGINELLA DOEDERLEINII

Boughandjioua N., Chao L.R.

Planta Medica, 1990, vol 50(6), p.526.

Loài quyên bá *Selaginella doederleinii* Hieron., họ Selaginellaceae đã được dùng trong y học cổ truyền Trung Quốc làm thuốc tim mạch. Từ cây này, người ta đã chiết được chất hordenin- α -L-rhamnopyranosid và (E)-hordenin-[6-O-cinnamoyl- β -D-glucopyranosyl]-(1 \rightarrow 3)- α -L-rhamno-pyranosid.

Thử trên chuột cống trắng, hai chất này đều có tác dụng chống cao huyết áp.

ĐTD

CÁC CARDENOLID TỪ LÁ TRÚC ĐÀO

Phytochemistry 1990, 50 (2), 435-438.

Từ lá tươi cây trúc đào (*Nerium oleander*) được thu thập ở vùng Karachi, các tác giả đã phân lập được một chất cardenolid mới là neridiginosid và 3 chất quen biết là nerizosid, neritalosid và odorosid- II.

Cấu trúc của neridiginosid được xác định là 3 β - O- (D- diginosyl)- 5 β - 14 β - dihydroxy-card- 20(22) enolic bằng phổ NMR (COSY- 45, NOESY, J- resolved, HMQC và HMBC). Các chất quen biết được nhận dạng bằng các phổ đã được ghi trong các tài liệu.

Bốn chất nói trên đều có tác dụng ức chế hệ thần kinh trung ương với liều 25 mg/kg.

5- HYDROXYLAPACHOL: MỘT TÁC NHÂN ĐỘC ĐỐI VỚI TẾ BÀO LẤY TỪ CÂY TẾCH

Rafiullah M. Khan và cs

Phytochemistry 1999, 50 (3), 439-440.

Các tác giả trước đây cho biết cây tếch (*Tectona grandis*) chứa 1-hydroxy- 2-methylantraquinon, tectoquinon, pachybasin, dehydrotectol, tectol, lapachol, dehydro- α -lapachon, 2-methylquinizarin, deoxylapachol, β - sitosterol, obtusifolin, squalen và acid betulinic.

Trong công trình này, từ lõi gỗ cây tếch, các tác giả đã phân lập được 5 chất và nhận dạng là 5-hydroxylapachol, lapachol, dehydro- α -lapachon, methylquinizarin và squalen. Chất mới là 5-hydroxylapachol. Các chất 5-hydroxylapachol và lapachol đều có tác dụng độc với tôm *Artemia salina* với liều LC₅₀ 5 ppm.

HAI β - CARBOLIN ALCALOID TỪ CÂY DẠ CẨM

Nguyễn Minh Phương và cs.

Planta Med. 1999, 65(9), 761-762

Từ cây dạ cẩm (*Hedyotis capitellata* var. *mollis*) được thu thập ở vườn Quốc gia Tam Đảo (Vĩnh Phúc), các tác giả đã chiết tách được 2 chất và nhận dạng là hedyocapitellin và hedyocapitin bằng các phổ ¹H- và ¹³C-NMR, MS, IR, UV.

MỘT FLAVONOL GLYCOSID TỪ CÂY DỪA CẠN

Gilles Brun và cs.

Phytochemistry 1999, 50 (1), 167-169.

Từ thân cây dừa cạn (*Catharanthus roseus*) được thu thập ở vùng tây nam nước Pháp, 2 chất đã được chiết xuất và nhận dạng là mauritianin = kaempferol-3-O-(2,6-di-O- α -L-rhamnopyranosyl- β -galactopyranosid) và quercetin-3-O-(2,6-di-O- α -L-rhamnopyranosyl- β -O-galactopyranosid).

NORLIGNAN CÓ HOẠT TÍNH ỨC CHẾ HYALURONIDASE TỪ TRI MẪU

Sei- Joon Jeong và cs.

Planta Med. 1999, 65(4), 367-368

Các tác giả đã phân lập từ cao tri mẫu (*Anemarrhena asphodeloides*) 2 nor- lignan có hoạt tính ức chế hyaluronidase là cis-hinokiresinol và 1,3-di-p.hydroxyphenyl-4-penten-1-on và nor-lignan 4'-methyl-cis- hinokiresinol không có tác dụng.

Chất 1,3-di-p.hydroxyphenyl-4-penten-1-on là chất mới.

PHÂN LẬP VÀ PHÂN TÍCH HOÁ HỌC MỘT ACID BÉO CÓ TÁC DỤNG LÀM GIẢM HOẠT TÍNH LYMPHÔ BÀO CỦA CÂY THUỐC BÔNG

A.P. Alineida và cs.

Planta Med. 2000, 66(2), 134-137.

Trước đây, các tác giả đã chứng minh là cao lá cây thuốc bông (*Kalanchoe pinnata*) có tác dụng ức chế sự sinh sôi nảy nở nhanh lymphô bào *in vitro* và có hoạt tính giảm miễn dịch *in vivo*.

Trong công trình này, chúng tôi xác định những chất có tác dụng làm giảm miễn dịch. Từ dịch chiết ethanol, chúng tôi tinh chế một phân đoạn (KP12 SA) có tác dụng ức chế sự sinh sôi nảy nở tế bào lympho ở chuột mạnh hơn 20 lần so với dịch chiết thô. Bằng các phương pháp ¹H- ¹³C- NMR, IR và GC-

MS, các tác giả đã chứng minh KP12SA gồm acid palmitic 89,3%, acid stearic 10,7% và vết của các acid arachidic và behenic. Qua các kết quả nghiên cứu, các acid béo có trong cây thuốc bông có thể có tác dụng làm suy giảm miễn dịch *in vivo*.

CÁC SPIROSTANOL SAPONIN TỪ TỎI TÂY

Alfonso Carotenuto và cs.
Phytochemistry 1999, 51 (8), 1077-1082

Các tác giả đã phân lập được 4 spirostanol saponin từ tỏi tây (*Allium porrum L.*), trong đó 2 chất mới được nhận dạng là (25R)-5 α -spirostan-3 β , 6 β -diol 3-O-[O- β -D-glucopyranosyl-(1 \rightarrow 2)-O-[β -D-xylopyranosyl-(1 \rightarrow 3)]-O- β -D-glucopyranosyl-(1 \rightarrow 4)- β -D-galactopyranosid và (25R)-5 α -spirostan-3 β , 6 β -diol 3-O-[O- β -D-glucopyranosyl-(1 \rightarrow 3)-O- β -O-glucopyranosyl-(1 \rightarrow 2)-O-[β -D-xylopyranosyl-(1 \rightarrow 3)]-O- β -D-glucopyranosyl-(1 \rightarrow 4)- β -D-galactopyranosid.

Cả 4 chất nói trên đều được thử tác dụng kháng nấm *Fusarium culmorum*.

MỘT CHẤT KHÁNG NẤM TỪ RỄ CÂY HÀNH TA

Nyunt Phay và cs.
Phytochemistry 1999, 52 (2), 271-274.

Các tác giả đã phân lập từ rễ cây hành ta (*Allium fistulosum L.*) một chất kháng nấm mới là fistulosin, nhận dạng bằng các phổ khối, phổ ¹H- NMR, ¹³C- H- NMR là octadecyl- 3- hydroxyindol.

Thử nghiệm trên nhiều loài nấm và vi khuẩn, chất fistulosin có hoạt tính mạnh với nấm *Fusarium oxysporum* ở nồng độ 1,62-6,5 pg/ml.

Fistulosin ức chế tổng hợp protein, ức chế nhẹ tổng hợp DNA, không ức chế tổng hợp RNA.

COUMARIN TRONG QUẢ CỦA CÂY XÀ XÀNG (*CNIDIUM MONNIERI*)

Jin - Na Cai và cs
J. Nat. Prod. 2000, 63, 485- 488

Hai bicoumarin mới: cnidimonal⁽¹⁾ và cnidimarin⁽²⁾ và 2 dẫn chất coumarin mới: 5-formylxanthotoxol⁽³⁾ và 2'- deoxymerazin hydrat⁽⁴⁾ được phân lập từ quả của cây xà xàng (*Cnidium monnieri*) cùng với 15 chất đã biết. Trong số 15 chất đã biết, các chất 5- hydroxyxanthotoxol, murrayacarpin, 7- methoxy- 8- formylcoumarin và meranzin hydrat được phân lập lần đầu tiên từ xà xàng từ. Các chất 1- 4 được nhận dạng bằng các phương pháp quang phổ.

CÁC QUADRANOSID I- V TỪ HẠT CÂY TRÂM BẦU (*COMBRECUM QUADRANGULARE*)

I. Ketut Adnyana và cs.
J. Nat. Prod. 2000, 63, 496- 500

Năm glycosid triterpen mới gồm các quadranosid I (2 α , 3 β , 6 β - trihydroxylup- 20(29)- en- 28- oic acid β - glucopyranosyl ester), II (2 α , 3 β , 6 β , 23- tetrahydroxylup- 20 (29)- en- 28- oic acid β - glucopyranosyl ester), III (2 α , 3 β , 23, 29- tetrahydroxyolean- 12- en- 28 oic acid β - glucopyranosyl ester), IV (2 α , 3 β , 23- trihydroxyurs-12- en- 28- oic acid β - glucopyranosyl ester) và V (2 α , 3 β , 6 β , 23- tetrahydroxyurs- 12, 18- dien- 28- oic acid β - glucopyranosyl ester) được phân lập từ dịch chiết methanol của hạt trám bầu cùng với 13 chất quen biết. Các chất I, II V có tác dụng bảo vệ gan đối kháng với D-galactosamin gây chết tế bào do yếu tố gây hoại tử α trong tế bào gan chuột nhắt trắng nuôi cấy.

N.V.