

KẾT QUẢ PHÂN TÍCH CHẤT LƯỢNG ĐẤT Ở MỘT SỐ VÙNG TRỒNG DƯỢC LIỆU

Ngô Quốc Luật¹, Nguyễn Công Vinh², Nguyễn Duy Thuận¹

¹ Viện Dược liệu, ² Viện Thổ nhưỡng Nông hóa

(Nhận bài ngày 15 tháng 4 năm 2003)

Summary

Soil Analysis in Some Medicinal Plant Growing Areas

In order to apply suitable fertilization and cultivation technologies for development of medicinal plants with higher quality and benefits, a soil analysis was carried out in medicinal plant growing areas in Lao Cai, Hanoi, Hai Duong, Thanh Hoa and Da Lat.

The results of the survey has shown that most of the soils are poor in total N, P and K, those taken from Hanoi and Thanh Hoa being the poorest. Conversely, soil samples taken from Sa Pa (Lao Cai) are rather rich in nitrogen. All the soils show light acidic reaction with pH ranging from 5.5 to 6.0.

A rate of 500-1000kg lime powder, 120-180kg N, 60-120kg P₂O₅ and 90-120kg K₂O per hectare is recommended for growers in most areas. A lower rate of nitrogen should be applied for soils in Sa Pa.

1. Đặt vấn đề

Phát triển trồng cây thuốc để tạo nguồn nguyên liệu làm thuốc ổn định là một trong những chiến lược quan trọng về phát triển y học dân tộc kết hợp với y học hiện đại của Đảng và Nhà nước ta hiện nay. Trồng cây thuốc ở Việt Nam đã có từ lâu đời, các loài cây thuốc bản địa, cũng như cây thuốc di thực vào nước ta khá phong phú về chủng loại và số lượng, đáp ứng một phần nhu cầu ngày càng cao trong việc bảo vệ sức khỏe cộng đồng.

Cũng như những cây trồng khác, cây thuốc phụ thuộc nhiều vào tính chất, điều kiện sinh thái nơi chúng sinh trưởng và phát triển. Trong đó, đất trồng là yếu tố có tác động mạnh mẽ vào năng suất và chất lượng của cây vì "đất nào, cây ấy".

Việc hiểu biết về tính chất của đất là một cơ sở khoa học đảm bảo cho quá trình thâm canh sản xuất cây thuốc. Hiện nay, ngoài nguồn dược liệu khai thác tự nhiên, cây thuốc còn được trồng trên các vùng sinh thái khác nhau để tạo nguồn nguyên liệu sản xuất. Yêu cầu đặt ra là phải nắm được đặc tính của đất trồng để làm cơ sở khoa học cho việc thâm canh cây thuốc, tạo ra sản phẩm có năng suất cao, chất lượng tốt. Đó là xuất phát điểm để chúng tôi triển khai nghiên cứu đề mục "Phân tích chất lượng đất ở một số vùng trồng cây thuốc", của đề tài nhánh KC.10.07.02, thuộc đề tài cấp nhà nước KC.10.07, trong Chương trình KC.10.

Để tiến hành nghiên cứu, chúng tôi đã điều tra, thu thập và lấy mẫu để phân tích một số chỉ tiêu chất lượng đất ở các vùng khác nhau như Hải Dương, Sa Pa, Thanh Hóa, Đà Lạt và Hà Nội.

2. Phương pháp nghiên cứu

Điều tra lấy mẫu đất

Mẫu đất được lấy ở các điểm nghiên cứu thuộc đề tài nghiên cứu KC.10.07.02, theo đường chéo góc; mỗi mẫu lấy ở 9 điểm trên 2 đường chéo, trộn đều lấy mẫu hỗn hợp. Ở mỗi điểm, đất được lấy ở 2 độ sâu 0-20 cm và 20-40 cm.

Phương pháp phân tích

Các chỉ tiêu được phân tích tại Phòng nghiên cứu sử dụng đất thuộc Viện Thổ nhưỡng Nông hóa, theo phương pháp sau:

pH _{KCl} (1:5)	đo trên máy pH meter
Độ chua thủy phân	chuẩn độ
Al ⁺⁺⁺ di động	chuẩn độ
C tổng số	Walkley Black
N tổng số	Kejldalh
P ₂ O ₅ tổng số	so màu
K ₂ O tổng số	Quang kế ngọn lửa
Lân dễ tiêu	Bray 2
Kali dễ tiêu	Quang kế ngọn lửa
Ca ⁺⁺ , Mg ⁺⁺ trao đổi (AAS)	Đo trên hấp phụ nguyên tử

Bảng 1: Các vùng lấy mẫu và đặc điểm loại đất

Vùng lấy mẫu đất	Loại cây thuốc	Mẫu đất		Đặc điểm loại đất
		Ký hiệu	Độ sâu(cm)	
Hải Dương	Ngưu tất	A1	00-20	Đất phù sa sông Hồng
		A2	20-40	
	Ích mẫu	B1	00-20	Đất phù sa sông Hồng
		B2	20-40	
Hà Nội	Cúc gai dài	HN1	00-20	Đất phù sa sông Hồng
		HN2	20-40	
	Lão quán thảo và ích mẫu	C2.1	00-20	Đất phù sa sông Hồng
		C2.2	20-40	
	Các loại cây khác	ĐT1	00-20	Đất phù sa sông Hồng
		ĐT2	20-40	
Sa Pa - Lào Cai	Áctisô	A1	00-20	Đất mùn alít núi cao
		A2	20-40	
	Lão quan thảo	L1	00-20	Đất feralít núi cao
		L2	20-40	
	Cúc gai dài	S1	00-20	Đất feralít núi cao
		S2	20-40	
Thanh Hóa	Ngưu tất	A1	00-20	Đất phù sa sông Mã
		A2	20-40	
	ích mẫu	B1	00-20	Đất phù sa sông Mã
		B2	20-40	
	Ngưu tất và ích mẫu (Hà Trung)	TH1(H.Tr)	00-20	Đất dốc tụ
		TH2(H.Tr)	20-40	
Đà Lạt - Lâm Đồng	Áctisô	A1	00-20	Đất feralit trên đá bazan
		A2	20-40	
	Áctisô	B1	00-20	Đất feralit trên đá bazan
		B2	20-40	

3. Kết quả và thảo luận

3.1. Độ chua của đất: Qua kết quả phân tích, chúng tôi thấy như sau (bảng 2):

Độ pH của đất thể hiện phản ứng của đất. Phản ứng này ảnh hưởng trực tiếp và gián tiếp đến sinh trưởng của cây. Đất quá chua hay quá kiềm đều tác hại đến hệ rễ, kìm hãm sức hấp thụ dinh dưỡng của cây. Kết quả phân tích được trình bày ở bảng 2. Phân cấp đánh giá pH đất cho thấy hầu hết đất trồng cây thuốc ở các điểm nghiên cứu đều có giá trị pH thuộc vào giới hạn chua đến chua nhiều. Trong các nhóm đất, đất ở Sa Pa chua nhất, pH đạt 3.95-4.15, tiếp đến là đất ở Hải Dương, 4.45 -5.10. Đất trồng HN1(cúc gai dài), HN2 (cúc gai dài), đất nghiên cứu cây thuốc ở Hà Nội C2 có phản ứng ít chua nhất, thuộc đất trung tính 6.2-6.55.

Độ chua thủy phân (CTP) và độ chua trao đổi thể hiện qua hàm lượng Al^{+++} trao đổi trong các

mẫu đất cũng thay đổi theo điều kiện của từng vùng. Trong số các mẫu phân tích, mẫu đất lấy ở Sa Pa có độ chua thủy phân và hàm lượng nhôm trao đổi cao hơn cả, tiếp đến là đất ở Thanh Hóa 1, 2 (Hà Trung). Các mẫu đất lấy ở Hà Nội 1 (cúc gai dài), Hà Nội 2 (cúc gai dài) và Hà Nội C2.1, C2.2, thuộc hệ thống sông Hồng có phản ứng đất trung tính, nên hàm lượng nhôm trao đổi và độ chua thủy phân thấp hơn so với các nhóm đất khác.

Xét về mức độ yêu cầu bón vôi cải tạo đất, các mẫu đất ở Hải Dương, Sa Pa, Hà Trung - Thanh Hoá cần bón nhiều nhất. Nếu đất có hàm lượng sét cao (đất thịt nặng) có thể bón 600kg đến 1,0-1,5 tấn vôi bột/ha/năm, trong vòng 2, 3 năm liền, sau đó nghỉ 1, 2 năm, không nên bón đều liên tục. Nếu đất có thành phần cơ giới nhẹ (cát) có thể bón 5-6 tạ/ha/năm. Tuy nhiên, có thể áp dụng kỹ thuật bón liên tục các năm để bổ sung dinh dưỡng calci, magiê cho cây hàng năm, nhưng lượng bón cần ít hơn trong từng năm.

Bảng 2. Kết quả phân tích độ chua của đất

TT	Ký hiệu mẫu	pH _{KCl} (1:5)	Độ chua, meq/100gdất	
			Độ chua thuỷ phân	Al ⁺⁺⁺ trao đổi
1	Hải Dương A1	4.56	0.162	0.333
2	Hải Dương A 2	4.45	0.162	0.166
3	Hải Dương B 1	4.75	0.121	0.166
4	Hải Dương B 2	5.10	0.121	0.250
5	Hà Nội 1 - Cúc gai dài	6.20	0.121	0.250
6	Hà Nội 2 - Cúc gai dài	6.35	0.121	0.166
7	Hà Nội C 2.1	6.50	0.262	0.250
8	Hà Nội C 2.2	6.55	0.323	0.333
9	Hà Nội ĐT1	5.60	0.330	0.834
10	Hà Nội ĐT2	5.75	0.166	0.712
11	Sa Pa A1	3.95	1.535	0.915
12	Sa Pa A 2	4.15	1.616	0.832
13	Sa Pa L1	5.10	0.323	0.166
14	Sa Pa L 2	5.05	0.121	0.208
15	Sa Pa S 1	5.35	0.121	0.166
16	Sa Pa S 2	5.50	0.121	0.250
17	Thanh Hoá A1	5.60	0.162	0.333
18	Thanh Hoá A 2	5.65	0.121	0.416
19	Thanh Hoá B 1	5.85	0.162	0.416
20	Thanh Hoá B 2	5.95	0.242	0.333
21	Thanh Hoá 1 (Hà Trung)	5.20	0.330	1.076
22	Thanh Hoá 2 (Hà Trung)	5.10	0.166	0.834
23	Đà Lạt A1	5.80	0.162	0.250
24	Đà Lạt A2	5.40	0.162	0.333
25	Đà Lạt B1	5.55	0.121	0.416
26	Đà Lạt B 2	5.60	0.162	0.250

3.2. Hàm lượng các chất tổng số**Bảng 3.** Hàm lượng của một số chất tổng số trong đất

TT	Ký hiệu mẫu	Hàm lượng tổng số (%)				Tỷ lệ C/N
		C	N	P ₂ O ₅	K ₂ O	
1	Hải Dương A1	1,34	0,14	0,13	0,57	9,57
2	Hải Dương A2	1,11	0,12	0,13	0,52	9,41
3	Hải Dương B1	1,22	0,13	0,19	0,67	9,10
4	Hải Dương B2	1,79	0,13	0,23	0,67	13,36
5	Hà Nội 1 - Cúc gai dài	1,66	0,12	0,13	0,74	13,50
6	Hà Nội 2 - Cúc gai dài	0,83	0,11	0,12	1,31	7,43
7	Hà Nội C 2.1	1,36	0,14	0,13	1,40	9,72
8	Hà Nội C 2.2	1,27	0,11	0,12	1,41	11,30
9	Hà Nội ĐT1	1,03	0,10	0,31	0,97	10,82
10	Hà Nội ĐT2	0,84	0,07	0,24	1,20	12,48
11	Sa Pa A1	6,78	0,30	0,23	0,74	22,45
12	Sa Pa A2	6,08	0,34	0,21	0,55	17,78
13	Sa Pa L1	6,4	0,24	0,28	0,37	26,56
14	Sa Pa L2	3,84	0,24	0,29	0,34	16,34
15	Sa Pa S1	3,71	0,25	0,32	0,24	15,08
16	Sa Pa S2	4,22	0,24	0,30	0,31	17,96
17	Thanh Hoá A1	1,24	0,11	0,03	0,05	11,10

18	Thanh Hoá A2	0,86	0,08	0,03	0,08	10,20
19	Thanh Hoá B1	1,46	0,14	0,12	0,47	10,40
20	Thanh Hoá B2	1,45	0,12	0,07	0,09	11,80
21	Thanh Hoá 1 (Hà Trung)	2,06	0,12	0,30	0,06	16,74
22	Thanh Hoá 2 (Hà Trung)	1,74	0,09	0,20	0,06	19,52
23	Đà Lạt A1	1,73	0,24	0,43	0,03	7,35
24	Đà Lạt A2	3,26	0,25	0,50	0,02	13,10
25	Đà Lạt B1	2,24	0,11	0,14	0,02	19,99
26	Đà Lạt B2	1,66	0,09	0,10	0,02	18,49

Các chất tổng số trong đất nói lên tiềm năng cung cấp dinh dưỡng cho cây trồng. Chúng phản ánh độ phì nhiêu tiềm tàng của đất. Một số yếu tố tổng số chính được phân tích và trình bày ở bảng 3.

Hàm lượng chất hữu cơ tổng số (C%) có các mẫu đất lấy ở Thanh Hoá, Hà Nội C2.1, C2.2 đạt mức nghèo. Trong đó, đất ở Thanh Hóa A1, Thanh Hóa A2, và đất ở Đà Lạt (mẫu B1 và B2) có hàm lượng chất hữu cơ thấp nhất. Hàm lượng carbon tổng số trong chất hữu cơ đất đạt giá trị 1.66-2.06%. Điều đáng ngạc nhiên là các mẫu đất lấy ở Sa Pa có hàm lượng carbon của chất hữu cơ rất cao. Đặc biệt, các mẫu Sa Pa A1, Sa Pa A2, Sa Pa L1, carbon tổng số lên hơn 6%, ngang với đất rừng nguyên thủy hay đất rừng ẩm nhiệt đới.

Đạm tổng số trong đất phần lớn thuộc đất trung bình đến hơi nghèo. Các mẫu phân tích đều có hàm lượng N tổng số đạt dưới 0,2%, trừ mẫu đất lấy ở Sa Pa A1, A2, hàm lượng N tổng số lên hơn 0,2-0,3 %.

Tỷ lệ C/N phản ánh khả năng phân giải, tích lũy chất hữu cơ của đất. Hầu hết các đất có tỷ lệ này giao động trong phạm vi 9-15. Phạm vi này cho thấy sự phân giải hữu cơ tương đương với quá trình tích lũy trong đất. Các mẫu lấy ở Sa Pa có tỷ lệ C/N khá cao. Giá trị này lên hơn 15-20, có mẫu lên đến 26 -56. Điều đó chứng tỏ đất ở đây có quá trình phân giải chất hữu cơ chậm hơn sự tích lũy, có thể do đất phân bố ở độ cao tương đối, có khí hậu lạnh ảnh hưởng đến quá trình tích lũy hữu cơ của đất. Trong điều kiện khí hậu lạnh kim hàm sự khoáng hóa, phân giải hữu cơ diễn ra chậm. Tuy nhiên, hữu cơ đất phát triển trong điều kiện khí hậu lạnh chủ yếu là hữu cơ thô, chất lượng mùn kém. Do đó, cần có những biện pháp canh tác thích hợp để tạo điều kiện ở xy hoá tăng quá trình khoáng hóa được tốt hơn và khai thác độ phì nhiêu tự nhiên vốn có của đất.

Lân tổng số có các mẫu Sa Pa A1, Sa Pa A2 có trị số đạt khá. Số còn lại ở mức nghèo. Điều này cũng có thể do lân là một trong những yếu tố hạn chế dinh dưỡng đối với cây trồng nói chung trên

các vùng sinh thái, đặc biệt đối với những đất trồng cây lấy rễ làm được liệu.

Kali tổng số đạt mức nghèo đến rất nghèo, trừ các mẫu Hà Nội DT1, Hà Nội DT2 và Hà Nội C₂, có hàm lượng khá hơn, nhưng cũng chỉ đạt mức trung bình. Vì vậy, trong các nguyên tố dinh dưỡng chính đã phân tích thì kali là yếu tố hạn chế lớn, tiếp đến là lân. Để đảm bảo chất lượng cây thuốc tốt hơn, cần có biện pháp cân đối dinh dưỡng trong quá trình đầu tư phân bón cho cây.

3.3. Các cation trao đổi và lân, kali dễ tiêu trong đất.

Khả năng trao đổi cation của đất được phản ánh gián tiếp qua kết quả phân tích 2 cation trao đổi chính trong đất là Ca⁺⁺ và Mg⁺⁺ (bảng 4).

Cation Ca⁺⁺ và Mg⁺⁺ trao đổi giao động trong phạm vi khá rộng, tùy thuộc vào các loại đất khác nhau. So sánh giữa các đất lấy ở các vùng khác nhau thấy có sự biến động lớn về các cation trao đổi. Đất trồng cây thuốc lấy ở Hải Dương có cation Ca⁺⁺ thay đổi từ 3,1 đến 4,2 meq/100g đất và cation Mg⁺⁺ đạt 2,3-3,1 meq/100g đất. Các mẫu HN1 (cúc gai dài), HN2 (cúc gai dài) và Hà Nội C1.1, Hà Nội C1.2 có hàm lượng khá cao các ion trao đổi này. Ion Ca⁺⁺ phân tích được hầu hết trên 5meq/100g đất, ion Mg⁺⁺ thay đổi trong phạm vi trên 6 meq/100g đất. Trong các vùng sinh thái khác nhau, đất lấy ở Đà Lạt có khả năng trao đổi các cation thấp nhất, tiếp đến là đất lấy ở Sa Pa, cao nhất là đất lấy ở Thanh Hóa và Hà Nội DT1, Hà Nội DT2.

Kết quả phân tích lân dễ tiêu theo phương pháp Bray 2 cho thấy hầu hết các đất có hàm lượng chất này ở mức giàu. Một số mẫu đạt trung bình được lấy ở Sa Pa và thấp như mẫu lấy ở Thanh Hóa. Các mẫu có hàm lượng lân dễ tiêu nghèo là Sa Pa A2, Đà Lạt B2.

Kali dễ tiêu trong đất thay đổi khá rộng trên các vùng sinh thái khác nhau. Kết quả thu được giao động trong phạm vi 1,51 - 27,1 mgK₂O/100g đất. Các mẫu đất ở Thanh Hoá A1, A2 và B2 có hàm

Bảng 4. Các cation trao đổi và chất dễ tiêu

TT	Ký hiệu mẫu	meq/100gdất		mg/100gdất	
		Ca ⁺⁺	Mg ⁺⁺	P ₂ O ₅	K ₂ O
1	Hải Dương A1	3,88	2,72	16,74	4,52
2	Hải Dương A2	3,49	2,33	16,05	4,52
3	Hải Dương B1	4,27	3,10	21,74	7,53
4	Hải Dương B2	3,10	2,72	23,47	4,52
5	Hà Nội 1 - Silybum	6,60	3,49	12,16	7,53
6	Hà Nội 2 - Silybum	5,43	3,49	10,73	6,03
7	Hà Nội C 2.1	6,21	3,10	11,73	7,53
8	Hà Nội C 2.2	6,60	3,10	10,31	6,03
9	Hà Nội ĐT1	8,60	5,16	5,62	12,05
10	Hà Nội ĐT2	10,32	6,88	5,12	6,03
11	Sa Pa A1	2,33	1,94	6,00	27,11
12	Sa Pa A2	1,94	1,94	3,26	16,57
13	Sa Pa L1	2,72	2,33	5,53	15,06
14	Sa Pa L2	2,33	1,94	4,76	15,06
15	Sa Pa S 1	3,10	2,72	5,53	7,53
16	Sa Pa S 2	3,10	2,33	5,64	7,53
17	Thanh Hoá A1	1,55	1,16	8,19	1,51
18	Thanh Hoá A 2	1,94	1,16	8,48	3,01
19	Thanh Hoá B 1	5,04	2,72	18,27	12,05
20	Thanh Hoá B 2	3,10	2,33	22,96	4,52
21	Thanh Hoá 1 (Hà Trung)	10,32	8,60	12,84	7,53
22	Thanh Hoá 2 (Hà Trung)	8,60	6,88	8,84	6,03
23	Đà Lạt A1	2,72	3,10	27,49	12,05
24	Đà Lạt A2	2,33	1,16	27,75	6,03
25	Đà Lạt B 1	1,94	1,55	6,89	4,52
26	Đà Lạt B 2	1,55	1,16	9,89	4,52

lượng kali trao đổi thấp nhất.

Nhận xét chung và kiến nghị

Trên các vùng sinh thái khác nhau, các loại đất trồng cây thuốc có tính chất hoá học thay đổi khá rộng. Phản ứng của đất phần lớn là chua ít. Do đó, nhu cầu bón vôi ở đây không cao. Các đất có giá trị pH khoảng 5.6 đến trên 6 có thể không cần bón vôi, hoặc chỉ cần bón với lượng thấp khoảng 3-5 tạ/ha/vụ. Đất có pH thấp dưới 5 cần bón khoảng 500-1000kg/ha vôi bột.

Các chỉ tiêu đặc trưng cơ bản cho tiềm năng dinh dưỡng (N, P₂O₅ và K₂O) của đất đối với cây trồng phần lớn nghèo. Ngoại trừ các mẫu đất lấy ở

Sa Pa có hàm lượng đạm tổng số khá cao đến trung bình. Đất lấy ở Hà Nội và Thanh Hóa có hàm lượng thấp hơn cả. Đây là những điểm cần lưu ý đạm đối với các cây trồng, nhất là cây thu hoạch lá và thân làm dược liệu. Lượng đạm có thể bón thay đổi, tùy theo cây và mức độ đạm có trong đất ở mỗi vùng sinh thái. Đất ở Sa Pa có hàm lượng đạm tổng số khá cao, có thể đầu tư với lượng đạm nhỏ, tránh lãng phí trong lúc các yếu tố khác được đầu tư thấp. Trong đầu tư đạm cần chú ý ưu tiên cho cây lấy lá, thân. Hàm lượng lân và kali tổng số nghèo đến trung bình, lượng bón có thể thay đổi, tùy thuộc các loại đất ở các vùng trồng khác nhau. Đối với cây lấy củ, cần ưu tiên kali nhiều hơn các cây trồng khác.

Tài liệu tham khảo

1). Nguyễn Văn Bộ. *Hiệu lực phân kali bón cho cây ngũ cốc ăn hạt trên các loại đất có hàm lượng kali tổng số khác nhau*. Tuyển tập công trình NCKHKTNN, 1993, tr.108-114, NXBNN, 1993; 2). Hội khoa học đất. Đất Việt Nam, NXBNN, 2000; 3). Nguyễn Tử Siêm, Thái Phiên, 1998. *Cải thiện độ phì nhiêu thực tế đất chua vùng đồi núi*. Canh tác bền vững trên đất dốc ở Việt nam, NXBNN, 1998, 175-182.

**ĐỊNH LƯỢNG L-TETRAHYDROPALMATIN (ROTUNDIN) TRONG VIÊN HOÀN
ĐÔNG DƯỢC BALOK BẰNG PHƯƠNG PHÁP SẮC KÝ LỎNG HIỆU NĂNG CAO**

Phạm Thị Duyên, Trịnh Văn Lầu- Viện Kiểm nghiệm

Phạm Thanh Kỳ - Trường Đại học Dược Hà Nội

(Nhận bài ngày 10 tháng 1 năm 2003)

Summary

Quantitative Determination of L-tetrahydropalmatine (Rotundine) in Balok Pills by HPLC

After being completely extracted from powdered Balok pills with chloroform, L- tetrahydropalmatine was quantitatively determined by HPLC. The HPLC technique was carried out on an RP-18 (250x4.0 mm; 5 μ m) column with a UV detector at $\lambda=283$ nm and a mixture of 0.05 M potassium dihydrogen phosphate, acetonitrile and triethylamine (62.5 : 37.5 : 0.5, adjusted to pH= 4.0 with concentrated phosphoric acid) as a mobile phase. The experimental results proved that the proposed HPLC method was rapid, specific and precise.

Key words: Rotundine, Balok Pills, HPLC, Quantitative Determination

1. Đặt vấn đề

Viên hoàn *Balok* của Công ty TNHH Đông Nam Dược Bảo Long được sản xuất để hỗ trợ cai nghiện ma túy và phục hồi thể lực. Trong đó, có vị thuốc bình vôi với hoạt chất chính là Rotundin (rotundin), một alkaloid có tác dụng trấn kinh, an thần.

Để đảm bảo hiệu lực chữa bệnh của thuốc, vấn đề cần đặt ra trong công tác tiêu chuẩn hoá và quản lý chất lượng thuốc là định tính và xác định chính xác hàm lượng rotundin có trong chế phẩm này.

Một vài phương pháp định lượng rotundin đã và đang được dùng từ trước đến nay như phương pháp kết tủa với AgNO_3 [5], phương pháp acid – base [2], phương pháp đo quang [5]. Các phương pháp này phù hợp với việc định lượng rotundin đơn chất hoặc trong các chế phẩm chứa rotundin. Việc áp dụng các phương pháp này để định lượng rotundin trong bình vôi và trong các chế phẩm chứa bình vôi, sẽ không tránh khỏi sai số, do trong bình vôi có nhiều alkaloid khác với cấu trúc hoá học, tính chất quang học tương tự rotundin. Hơn nữa, trong thành phần của các chế phẩm còn có nhiều dược liệu khác và tá dược, nên cũng phần nào gây ảnh hưởng đến kết quả.

Trong bài viết này, chúng tôi muốn giới thiệu một quy trình chiết và định lượng rotundin trong viên hoàn *Balok* bằng phương pháp sắc ký lỏng hiệu năng cao (HPLC).

2. Phần thực nghiệm

2.1. Thuốc thử và thiết bị

2.1.1. Thuốc thử đã được chuẩn hoá theo ISO / IEC 17027 và GLP.

- Các hoá chất và dung môi đạt tiêu chuẩn dùng cho sắc ký lỏng hiệu năng cao.

- Chất chuẩn là rotundin do Viện Kiểm nghiệm điều chế.

- Chế phẩm *Balok* do Công ty TNHH Đông Nam Dược Bảo Long sản xuất có số lô: 03/ 03.

2.1.2. Thiết bị đã được hiệu chuẩn theo ISO / IEC 17025.

- Máy HP 1100 với detector UV nối với máy tính và máy in.

- Máy lắc siêu âm.

- Bộ Soxhlet 100 ml.

- Nồi cách thuỷ.

- Dụng cụ thuỷ tinh chính xác các loại.

2.2. Điều kiện sắc ký

- Cột: RP 18 (250 x 4.0 mm ; 5 μ m).

- Tốc độ dòng: 1 ml/ phút.

- Detector UV với bước sóng phát hiện 283 nm.

- Nhiệt độ phân tích: Nhiệt độ phòng.

- Thể tích tiêm: 20 μ l.

* *Pha động:* Hỗn hợp gồm dung dịch KH_2PO_4 0,05 M (62,5 ml), acetonitril (37,5 ml) và triethylamin (0,5 ml).

Dùng dung dịch acid phosphoric đặc để điều

chỉnh pH đến 4,0. Lọc qua màng lọc mịn cỡ 0,45 μm , lắc siêu âm trong 5 phút để loại bọt khí.

2.3. Chuẩn bị mẫu thử

* *Bột mịn Balok*: Lấy 2 vỉ *Balok* gồm 24 nang có chứa 72 viên hoàn nhỏ. Dem sấy các viên hoàn ở nhiệt độ 50°C trong 4h. Để nguội trong bình hút ẩm. Cân, rồi tính khối lượng trung bình của từng viên. Nghiền mịn viên đã sấy và rây qua cỡ rây 0,4 mm.

- Cân chính xác khoảng 1,00 g bột mịn *Balok* chuyển vào một túi giấy lọc. Làm ẩm khối bột mịn bằng 0,5 ml dung dịch ammoniac 6N (TT). Để yên trong 30 phút. Cho túi giấy lọc này vào trong dụng cụ chiết nóng Soxhlet cỡ 100ml. Dùng 30 ml cloroform (TT) để chiết alkaloid trong khoảng 4 giờ đến khi kiệt alkaloid.

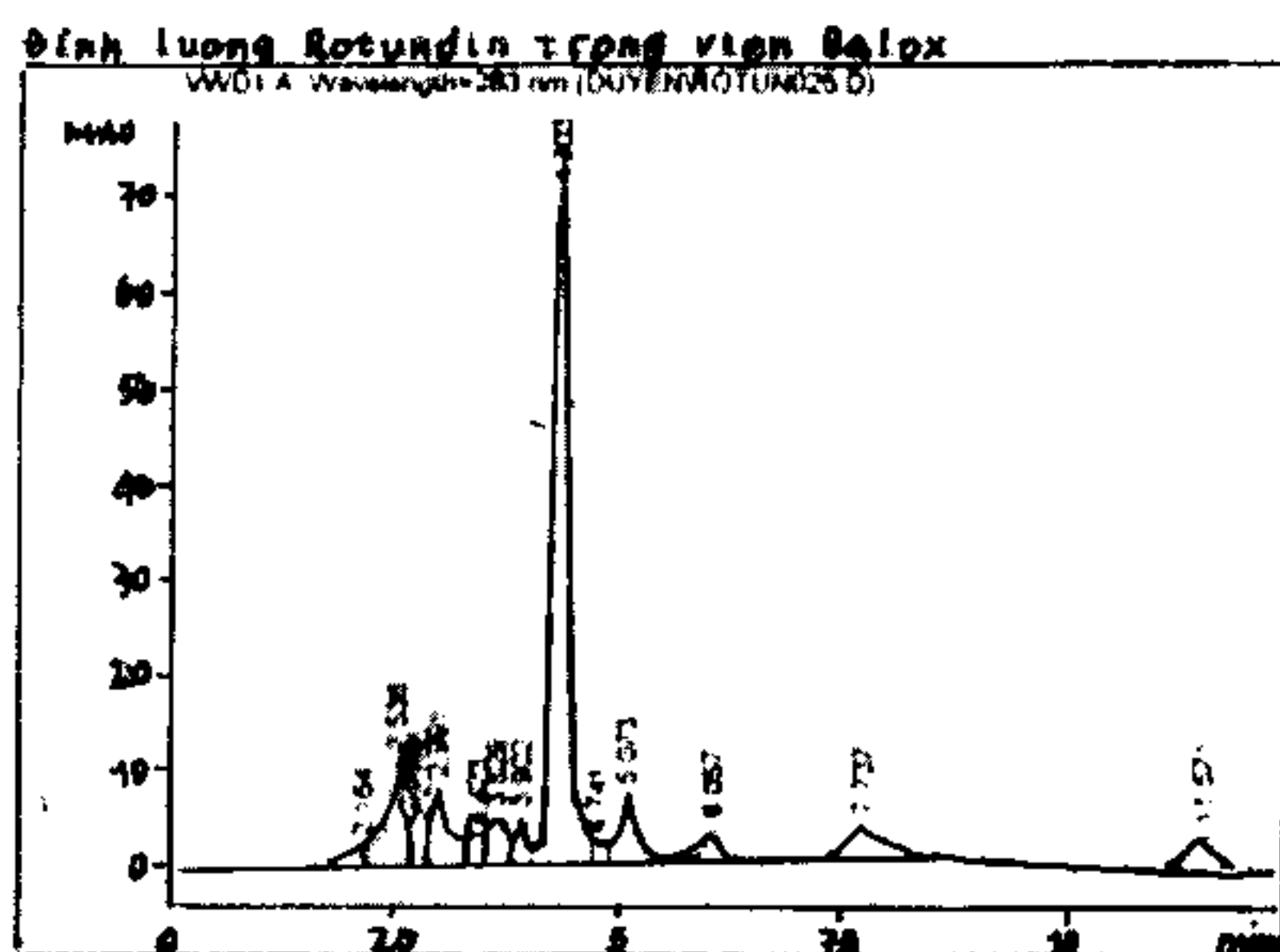
- Dịch chiết cloroform được cô cách thủy đến cạn. Hoà tan cân thu được trong dung dịch acid sulfuric 0,1 N (5 lần, mỗi lần khoảng 10 ml). Lọc dung dịch qua giấy lọc vào một bình gạn. Kiểm hoá dịch lọc bằng dung dịch ammoniac đặc đến pH 10. Chiết 4 lần, mỗi lần với 10 ml cloroform. Tập trung dịch chiết cloroform (TT), bốc hơi trên cách thủy tới khô.

- Hoà tan cân thu được trong pha động để được dung dịch có nồng độ rotundin tương đương với nồng độ của dung dịch rotundin chuẩn, lắc đều.

- Lọc sơ bộ qua giấy lọc thường, bỏ 10 ml dịch lọc đầu. Sau đó, dịch lọc được lọc qua giấy lọc mịn cỡ 0,45 μm , thu được dung dịch thử.

2.4. Chuẩn bị mẫu chuẩn

Pha một dung dịch chuẩn có chứa khoảng 0,04 mg rotundin khan trong 1 ml pha động.



Hình 1: Sắc ký đồ mẫu thử (dịch chiết của viên hoàn *Balok*)

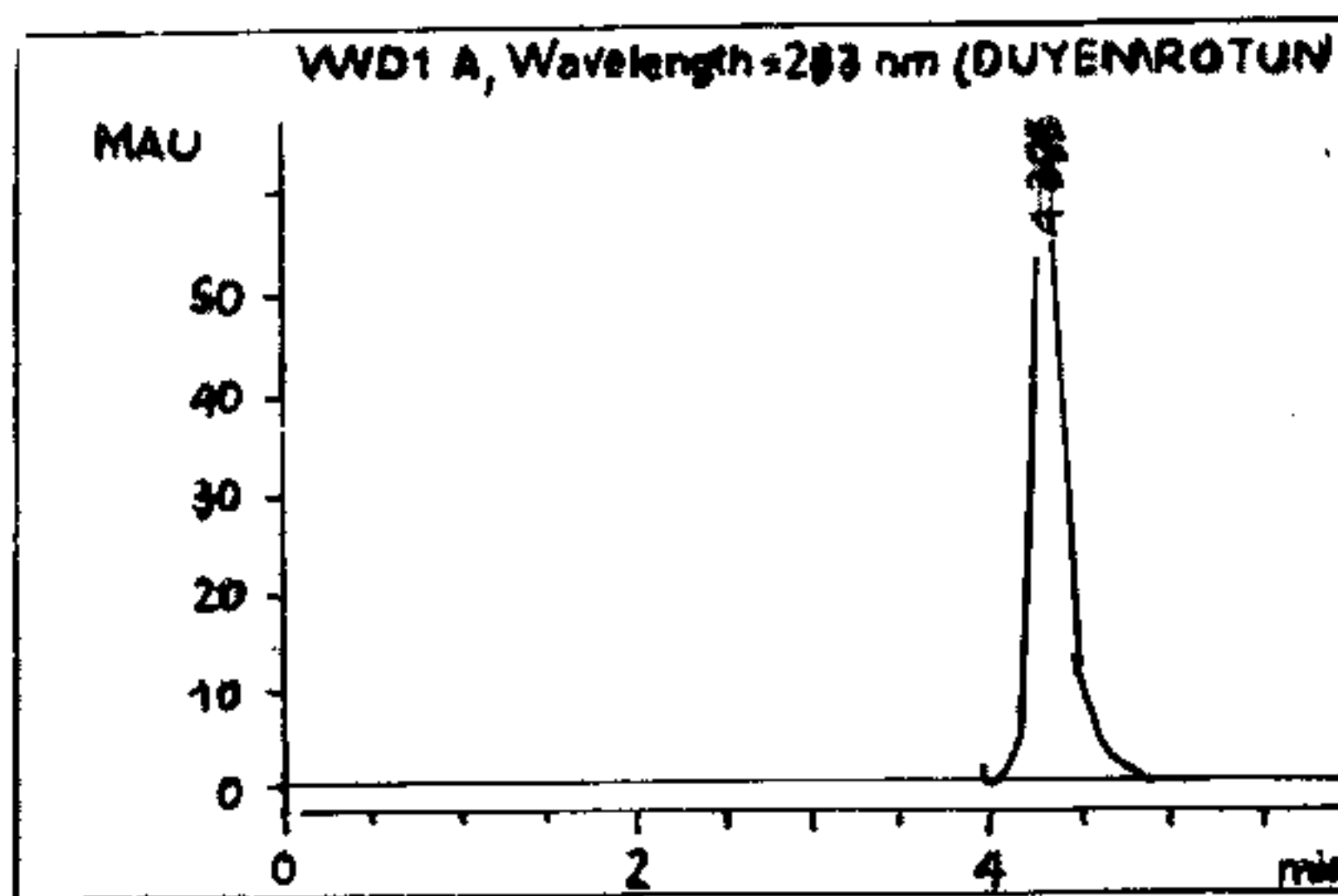
3. Kết quả và bàn luận

Để định lượng các hoạt chất trong chế phẩm đông dược, điều quan trọng là phải chiết kiệt được hoạt chất cần định lượng và làm sạch dịch chiết bằng phương pháp thích hợp. Trong viên hoàn *Balok*, ngoài củ bình vôi, còn có xuyên khung, đương quy, thực địa, bạch thược, lưỡng diện châm, nhân sâm, bạch linh, bạch truật, cam thảo, trầm hương, đông trùng hạ thảo, mộc nhĩ, hắc táo nhân, viên chí và tá dược. Do lượng chất cần phân tích tương đối nhỏ, nên để tách được rotundin ra khỏi hỗn hợp, cần phải có phương pháp chiết thích hợp. Qua tham khảo các tài liệu [1], [2], [4], [5], chúng tôi đã lựa chọn phương pháp chiết nóng trong dụng cụ Soxhlet với dung môi là cloroform, sau đó tinh chế sơ bộ như đã nêu trong mục 2.3. Phương pháp chiết này có khả năng chiết kiệt được alkaloid và cho dịch chiết tương đối sạch. Thực nghiệm cho thấy dùng phương pháp chiết nóng trong dụng cụ Soxhlet với 30 ml cloroform trong 4 giờ, đã chiết kiệt rotundin. Điều này được kiểm tra bằng phương pháp sắc ký lớp mỏng (TLC).

Phổ hấp thụ của rotundin trong pha động mà chúng tôi đo được (hình 3) cho thấy rotundin có cực đại hấp thụ ở bước sóng 283 nm.

Việc lựa chọn pha động thích hợp được chúng tôi xây dựng dựa trên việc tham khảo tài liệu [3] kết hợp với hoá chất và dung môi sẵn có ở Viện. Qua khảo sát bằng thực nghiệm trên một số pha động, chúng tôi nhận thấy pha động và điều kiện sắc ký nêu ở mục 2.2 cho khả năng tách tốt rotundin trong viên hoàn *Balok* (hình 1).

Thời gian lưu của rotundin là 4,32 phút; hệ số dung lượng $K=1,02$; số đĩa lý thuyết $N=5390$; hệ số bất đối của pic $T=1,14$ (hình 2).



Hình 2: Sắc ký đồ mẫu chuẩn rotundin

3.1. Khảo sát độ ổn định của hệ thống sắc ký

Độ ổn định của hệ thống sắc ký được biểu thị bằng độ lệch chuẩn tương đối (RSD) của diện tích

pic và thời gian lưu qua 6 lần tiêm một mẫu chuẩn vào hệ thống sắc ký và tiến hành sắc ký với điều kiện đã chọn ở trên. Ghi diện tích pic và thời gian lưu thu được với dung dịch rotundin chuẩn.

Bảng 1: Khảo sát độ ổn định của hệ thống sắc ký

STT	Diện tích pic của rotundin	Số liệu thống kê
1	626,22	$\bar{S} = 624,05$ $n = 6$ $RSD = 0,28 \%$
2	622,47	
3	624,48	
4	625,84	
5	622,16	
6	623,15	

Kết quả trình bày ở bảng 1 cho thấy độ lệch chuẩn tương đối của diện tích pic là $0,28\% < 2\%$ và thời gian lưu là $0,11\% < 1\%$ qua 6 lần tiêm dung dịch chuẩn rotundin. Điều đó chứng tỏ hệ thống sắc ký được vận hành là phù hợp và đảm bảo sự ổn định của phép phân tích định lượng Rotundin.

3.2. Khảo sát khoảng tuyến tính

Khảo sát sự phụ thuộc giữa nồng độ rotundin

và diện tích pic được khảo sát từ các dung dịch chuẩn gốc. Tiến hành pha một dãy các dung dịch chuẩn có nồng độ từ 0,005 đến 0,125 mg/ml pha động.

Kết quả cho thấy trong khoảng nồng độ khảo sát có sự tương quan tuyến tính giữa nồng độ của rotundin và diện tích pic. Phương trình hồi quy và hệ số tương quan được ghi ở bảng 2.

Bảng 2: Liên quan giữa nồng độ rotundin và diện tích pic

Nồng độ mg/ml	0,005011	0,02505	0,0501	0,08016	0,1002	0,1253
Diện tích pic	100,73	484,86	941,66	1498,72	1880,42	2362,81
Phương trình hồi quy	$S = 18729,27 C + 7,18$					
Hệ số tương quan	$r = 0,99996$					

3.3. Khảo sát độ lặp lại của phương pháp:

Để khảo sát độ lặp lại của phương pháp, chúng tôi tiến hành chiết như đã mô tả trong mục 2.3, rồi định lượng rotundin theo chương trình sắc ký đã chọn. Chuẩn bị 5 mẫu thử từ bột mịn *Balok* và một mẫu chuẩn có chứa 0,0337 mg rotundin khan / ml pha động.

Độ lặp lại của phương pháp được đánh giá bằng độ lệch chuẩn tương đối của 5 phép thử song song. Kết quả được ghi ở bảng 3 cho thấy phương pháp đã dùng để định lượng rotundin trong viên hoàn *Balok* có độ lặp lại cao với độ lệch chuẩn tương đối nhỏ ($RSD = 0,98 \%$).

Bảng 3. Khảo sát độ lặp lại của phương pháp

STT	Lượng cân (Bột mịn <i>Balok</i>) (g)	Lượng rotundin khan (mg) có trong 1 g bột mịn	Các số liệu thống kê
1	1,0174	2,03	$C = 2,04$ $n = 5$ $RSD = 0,98 \%$
2	0,9785	2,01	
3	1,0068	2,06	
4	1,0009	2,05	
5	1,0053	2,06	

3.4. Khảo sát độ đúng của phương pháp.

Để khảo sát độ đúng của phương pháp, chúng tôi áp dụng phương pháp thêm. Dựa vào hàm lượng rotundin đã biết trong mẫu bột mịn *Balok* ở mục 3.3 và hàm lượng của chất chuẩn rotundin.

Các mẫu độ đúng được chuẩn bị như sau: cân chính xác khoảng 1,00 g bột mịn *Balok* cho vào một túi giấy lọc, thêm chính xác một lượng rotundin chuẩn, sao cho tổng lượng hoạt chất rotundin có trong mẫu thử đem tiêm nằm trong

khoảng nồng độ tuyến tính đã khảo sát. Tiến hành chiết tách như mục 2. 3.

Tiến hành sắc ký theo chương trình đã chọn trên 6 mẫu thử song song với một mẫu chuẩn rotundin. Tính hàm lượng rotundin có trong mẫu thử dựa vào mẫu chuẩn đã có. Lượng rotundin thu hồi được thể hiện trên bảng 4. Kết quả cho thấy khả năng tìm lại được trung bình của phương pháp xây dựng đối với rotundin trong viên hoàn *Balok* là 100,01 % với độ lệch chuẩn tương đối RSD = 2,0 %.

Bảng 4: Khảo sát độ đúng của phương pháp

STT	Lượng rotundin khan			Số liệu thống kê
	Lượng thêm vào (mg)	Lượng thu hồi		
		mg	%	
1	1,6595	1,6207	97,66	$\bar{C} = 100,01 \%$ $n = 6$ $RSD = 2,0 \%$
2	1,8017	1,8432	102,30	
3	1,8491	1,8353	99,25	
4	2,3233	2,3835	102,59	
5	2,5129	2,4815	98,75	
6	3,3664	3,3496	99,50	

5. Kết luận

Từ một chế phẩm hỗn hợp nhiều thành phần dược liệu, với thành phần hoá học phức tạp, sau khi chiết alkaloid bằng cloroform và tinh chế sơ bộ, tiến hành phân tích trên máy HPLC với chương trình sắc ký đã nêu. Các kết quả thực nghiệm cho

thấy phương pháp HPLC được đề xuất ở trên đạt độ đúng, độ ổn định và độ chính xác đáng tin cậy. Phương pháp này có thể được áp dụng để định tính và định lượng rotundin trong viên hoàn *Balok* cũng như trong các chế phẩm đông dược khác có chứa bình vôi.

Tài liệu tham khảo

[1] - Bộ môn Dược liệu, Trường Đại học Dược Hà Nội (1998), Bài giảng Dược liệu tập II, NXB Y học, Tr. 79-83; [2] - Bộ Y tế (2002), Dược điển Việt Nam III, NXB Y học, tr. 321-322; [3] - Nguyễn Đức Toàn, Nguyễn Tuấn Anh, Phạm Thị Giảng (2001) " Phát hiện sự có mặt của Rotundin trong hỗn hợp nhiều dược liệu bằng phương pháp sắc ký lớp mỏng (TLC) và phương pháp sắc ký lỏng hiệu năng cao (HPLC)", Thông báo kiểm nghiệm số 2, tr. 8-11; [4] - Pharmacopocia of the People's Republic of China (English Edition 1997), Vol. I, pp. 173-174; [5] - Pharmacopocia of the People's Republic of China (English Edition 1997), Vol.II, pp. 530-531.

Tạp chí Dược liệu, tập 8, số 3/2003 (trang 73-76)

A NEW CHEMOTYPE OF *BAECKEA FRUTESCENS* L. OIL FROM VIETNAM

Tran Minh Hoi¹, Tran Huy Thai¹, Dominique Lesueur², Ange Bighelli², Joseph Casanova².

¹) Institute of Ecology and Biological Resources, Vietnam; ²) Université de Corse, France.

(Nhận bài ngày 20 tháng 2 năm 2003)

Summary

Essential oil obtained from the aerial part of *Baeckea frutescens* harvested in Vinh Phuc Province of Vietnam was analyzed using GC/RI and ^{13}C -NMR spectroscopy. Nineteen components accounting for 94.8% of total oil were identified. The sample was characterized by the predominance of α -thujene (27.4%).

Key words: *Baeckea frutescens*, Essential Oil, Chemical Composition, α -thujene, GC-MS, ^{13}C -NMR.

Introduction

Baeckea frutescens L. (Myrtaceae) is a small aromatic shrub, widely distributed in Australia, South East Asia and China where it is used as an anti-febrile and anti-rheumatic medicinal plant.

Various components have been isolated from *B. frutescens* extracts such as sesquiterpenes (Tsui and Brown, 1996a), chromones (Tsui and Brown, 1996b; Satake *et al.*, 1999), phloroglucinols (Fujimoto *et al.*, 1996), flavanones (Makino and Fujimoto, 1999) and an endoperoxide (Tsui and Brown, 1996c), but few studies are available on chemical composition of its essential oil. A sample of leaf oil from China was characterized by α -pinene and *trans*-carveol as major components (Ji *et al.*, 1980). There are two studies concerning *B. frutescens* leaf oil from Vietnam. Phan Tong Son *et al.* (1998) identified β -pinene, γ -terpinene and p-cymene, Tran Huy Thai *et al.* (2001) found α -thujene (22.9-28.4%); linalool (11.5-12.0%) and terpinen-4-ol (7.7-8.4%) as major components of the leaves and branches of the sample from Vinh Phuc. More recently, our group, in collaboration with Hanoi Pharmacy University, has investigated four samples of the oil (Nguyen Thi Tam *et al.*, 2003), of which two were found rich in monoterpenes, dominated by β -pinene and p-cymene, respectively and the rest two contained tasmanone as major component.

This paper reports the chemical composition of a new sample of essential oil obtained from aerial part of *B. frutescens*, harvested in Vinh Phuc Province, Vietnam.

Materials and Methods

Plant material and oil isolation

Fresh leaves and stems of *B. frutescens* collected in Me Linh district, Vinh Phuc Province, in September 2002 were steam-distilled for 2 hours using a pilot plant apparatus, yielding 0.42% of essential oil on dry basis.

GC Analysis

GC analysis was carried out using a Perkin-Elmer Autosystem apparatus equipped with two Flame Ionization Detectors (FID), and fused

capillary columns (50 m x 0.22 mm *i.d.*, film thickness 0.25 μm), BP-1 (polydimethylsiloxane) and BP-20 (polyethyleneglycol). The oven temperature was programmed from 60°C to 220°C at 2°C/min and then held constantly for 20 min; both injector (injection mode: split 1/60) and detector temperatures were adjusted at 250°C and helium was used as the carrier gas.

Carbon-13 NMR analysis

Spectra were recorded on a Bruker AC 200 Fourier Transform spectrometer operating at 50.323 MHz, equipped with a 10 mm probe, in deuterated chloroform, with all shifts referred to internal tetramethylsilane (TMS). Other parameters were: pulse width (PW): 5.0 μs (flip angle 45°); acquisition time: 1.3 s for 32K data table with a spectral width (SW) of 12 500 Hz (250 ppm); CPD mode decoupling; digital resolution: 0.763 Hz/pt. The number of accumulated scans was 5000 for each sample (200 mg of the oil in 2 ml CDCl_3). An exponential multiplication of the free induction decay with the line broadening of 1.0 Hz was applied before Fourier transformation.

Identification of components

Identification of all the components, four excepted, was based i) on comparison of their GC retention indices (RI) on apolar and polar columns (determined relatively to the retention time of a series of n-alkanes with linear interpolation) with those of authentic compounds; ii) by carbon-13 NMR for major components. The latter is based on comparison of the chemical shifts in the mixture with those of the reference spectra compiled in our spectral library with the help of laboratory-produced software (Tomi *et al.*, 1995). Each compound is unambiguously identified taking into account the number of identified carbons, the number of overlapping signals, the difference of chemical shifts of each resonance in the mixture spectrum and in the reference.

Results and Discussion

The investigated *Baeckea frutescens* essential oil from Vinh Phuc was a monoterpene-rich oil (table 1). After flash chromatography and analysis of the two fractions by GC/RI and ^{13}C -NMR, 19

compounds accounting for about 95% of the oil were identified. Its composition is characterized by α -thujene (27.4), 1,8-cineole (13.6%), linalool (11.0%) and terpinen-4-ol (8.1%). Other monoterpenes present at appreciable contents are γ -terpinene (5.6%), p-cymene (5.4%), α -pinene (4.6%) and α -terpineol (3.1%). This oil contained

several sesquiterpenes such as β -caryophyllene (4.7%) and its epoxide (0.8%), α -humulene (4.1%) and its epoxide (0.6%). Conversely, neither tasmanone nor agglomerone, the unusual non-terpenic triketones, as well as α -, β -, and γ -eudesmols, present in some other samples, were not detected here.

Table 1. Chemical composition of the essential oil of *Baeckea frutescens* L. from Vinh Phuc

Compounds	IKa	IKp	%
α -thujene	925	1029	27.4
α -pinene	931	1029	4.6
sabinene	965	1120	0.4
α -pinene	970	1109	0.9
myrcene	980	1158	0.4
α -phellandrene	997	1163	0.4
α -terpinene	1009	1179	1.6
p-cymene	1009	1269	5.4
limonene	1021	1200	1.3
α -cineole	1021	1210	13.6
α -terpinene	1048	1243	5.6
terpinolene	1077	1279	0.8
linalool	1083	1540	11.0
terpinen-4-ol	1162	1596	8.1
α -terpineol	1171	1687	3.1
(E)- α -caryophyllene	1416	1591	4.7
α -humulene	1449	1661	4.1
caryophyllene oxide	1568	1982	0.8
humulene-6,7-epoxide	1593	2039	0.6
Total			94.8

The composition of the oil investigated in the present study differs from all the previously reported ones. It differs drastically from the oils of Quang Binh, which contained tasmanone [2-(2-methylpropanoxy)-4,6,6-trimethyl-5-methoxy-4-cyclohexen-1,3-dione] as major component (24.3 and 22.9%) as well as from the Chinese oil characterized by the occurrence of α -pinene and *trans*-carveol as major components, as observed on the chromatographic profile since the authors did not report the percentages of the components (Ji *et al.*, 1980). It also differs from other Vietnamese monoterpenic oils, such as the sample reported by Phan Tong Son *et al.* (1998) containing β -pinene (25.1%), γ -terpinene (12.3%) and p-cymene

(11.1%) as major components or the one from Hue, dominated by β -pinene (23.3%), 1,8-cineole (8.6%) and α -pinene (8.2%). In all these samples, the content of α -thujene is very low but reached 12.3% in a sample from Soc Son district, accompanied by p-cymene (22.2%), 1,8-cineole (10.9%) and terpinen-4-ol (7.9%).

This study confirms the chemical variability of the essential oil obtained from the aerial part of the Vietnamese *Baeckea frutescens*.

Acknowledgements: The authors are indebted to the "Collectivité Territoriale de Corse" and the French "Ministère des Affaires Etrangères" for financial support (Programme de coopération décentralisée Corse - Viêt-nam).

References

- 1). Bick IRC, Horn DHS. *Aust. J. Chem.* 1965; **18**: 1405-1410; 2). Brophy JJ, Goldsack RJ, Forster PI, Clarkson JR, Fookes CJR. *J. Essent. Oil Res.* 1996; **8**: 465-470; 3). Fujimoto Y, Usui S, Mitsuko M, Sumatra M. *Phytochem.* 1996; **41**: 923-925; 4). Ji XD, Zhao GL, Pu QL, Cai QL, Jiang DQ. *Acta Pharmaceutica Sinica* 1980; **15**: 766-768; 5). Joulain D, Künig WA. In *The Atlas of Spectral Data of Sesquiterpene Hydrocarbons*, Verlag EB: Hamburg, Germany, 1998; 6). Makino M, Fujimoto Y. *Phytochem.* 1999; **50**: 273-277; 7). McLafferty FW, Stauffer DB. *Wiley Registry of Mass Spectral Data*, 6th Ed., Mass spectrometry library search system benchtop/PBM, version 3.10d, Palisade Co, Newfield, 1994; 8). Nguyen Thi Tam, Duong Thi Thuan, Bighelli A., Castola V., Muselli A., Richomme P., Casanova J. *Flavour Fragr. J.*, in press; 9). NIST. National Institute of Standards and Technology library, The Perkin-Elmer Corp., 1997; 10). Phan Tong Son, Phan Minh Giang, Nguyen Bich Van. *Revue Pharmaceutique* 1998, **12**: 7; 11). Satake T, Kamiya K, Saiki Y, Hama T, Fujimoto Y, Endang H, Umar M. *Phytochem.* 1999; **50**: 303-306; 12). Tomi F, Bradesi P, Bighelli A, Casanova J. *J. Magn. Reson. Anal.* 1995; **1**: 25-34; 13). Tran Huy Thai *et al.* 2001, Selected Works on Ecological and Bio-resource Studies 1996-2000: 104-107; 14). Tsui WY, Brown GD. *J. Nat. Prod.* 1996 a; **59**: 1084-1086; 15). Tsui WY, Brown GD. *Phytochem.* 1996 b; **43**: 871-876; 16). Tsui WY, Brown GD. *Tetrahedron* 1996 c; **52**: 9735-9742.

Tạp chí Dược liệu, tập 8, số 3/2003 (trang 76-81)

NGHIÊN CỨU CHIẾT XUẤT VÀ TÁC DỤNG BẢO MÒN SỎI TIẾT NIỆU IN VITRO CỦA BÀI THUỐC "NGŨ LINH GIA VỊ"

Đỗ Trung Đàm, Nguyễn Thương Dong-Viện Dược liệu

Lê Chi Mai - Viện Y học Cổ truyền VN

(Nhận bài ngày 22 tháng 3 năm 2003)

Summary

Studies on Extraction and *In Vitro* Anti-urolithic Effect of the Prescription *Ngũ linh gia vị*

The method for extracting the dried extract from the remedy curing urinary stones "Ngũ linh gia vị" was studied. The standards of the extract were preliminarily established. In vitro studies of the anti-urolithic effect have shown that the extract proved to be 20 times as strong as the control.

Key words: Remedy "Ngũ linh gia vị", Dried Extract, Anti-urolithic Effect

I. Mở đầu

Sỏi đường tiết niệu là một bệnh khá phổ biến trên thế giới và cả ở Việt Nam. Bệnh hay tái phát do sự kết thạch của một số thành phần của nước tiểu trong những điều kiện lý hoá nhất định. Sỏi kích thích gây co thắt làm tắc đường tiết niệu, viêm nhiễm và đau, làm nguy hại đến sức khoẻ và tính mạng của người bệnh.

Khoa Nội - Viện Y học cổ truyền Việt Nam đã sử dụng bài thuốc "Ngũ linh gia vị" để điều trị sỏi tiết niệu và đã thu được kết quả khá tốt. Nhằm chế ra loại thuốc viên lưu hành trên thị trường, chúng tôi đã nghiên cứu chiết xuất bài thuốc thành dạng cao khô toàn phần và nghiên cứu tác dụng bảo mòn sỏi *in vitro* của dạng cao này.

II. Đối tượng và phương pháp nghiên cứu

1. Công thức bài thuốc nghiên cứu

Bài thuốc "Ngũ linh gia vị" gồm các vị thuốc sau: bạch truật (rhizoma *Atractylodis macrocephalae*) 12 g; bạch linh (Poria) 12 g; trư linh (Polyporus) 12 g; trạch tả (rhizoma *Alismatis*) 12g; kim tiền thảo (herba *Desmodii styracifolii*) 16 g; kê nội kim (endothelium *Corneum Gigeriae Galli*) 12 g; cốt xay (herba *Abutili indici*) 40 g; quế (cortex *Cinnamomi*) 4 g.

Tất cả các vị thuốc trên đây đều đạt tiêu chuẩn theo ĐDVN III.

2. Chiết xuất bột cao khô

Các vị bạch truật, bạch linh, trư linh, trạch tả và quế được chiết xuất bằng ethanol 80%; các vị còn lại chiết bằng cách sắc với nước. Cô riêng mỗi

dịch đến dạng cao đặc. Trộn đều cao đặc với bột mịn hoài sơn, rồi sấy ở áp lực giảm cho đến thể chất cao khô. Tán thành bột. Lý do thêm hoài sơn, xem phần "Bàn luận".

3. Xác định sơ bộ tiêu chuẩn cao khô "Ngũ linh gia vị":

- Xác định bằng cảm quan.
- Xác định mất khối lượng do làm khô theo phương pháp 1 ghi trong ĐĐVN III, trang PL-98.
- Xác định tro toàn phần theo phương pháp ghi trong ĐĐVN III trang PL-129.
- Định tính alcaloid trong kim tiền thảo và acid cinnamic trong quế bằng sắc ký lớp mỏng theo phương pháp ghi trong ĐĐVN III trang PL-86, dùng dịch chiết từ mẫu kim tiền thảo và acid cinnamic chuẩn để đánh giá.
- Xác định các chất chiết được bằng ethanol 80% theo ĐĐVN III, trang PL-142.

4. Dạng thuốc dùng trong nghiên cứu tác dụng làm mòn sỏi

Hoà cao khô với nước cất theo tỷ lệ 15,4%. Khuấy kỹ rồi lọc. Như vậy, 1 ml dịch cao ban đầu tương ứng với 2 g dược liệu khô, gọi là dung dịch thuốc T.

5. Phương pháp nghiên cứu

5.1. Pha dung dịch nước tiểu nhân tạo: Cân 14,625g NaCl và 6,8g KH_2PO_4 , hoà vào 1000 ml nước cất, được dung dịch pH 5,8 với thành phần các ion như sau: Na^+ 5,75 g/l; K^+ 1,95 g/l; Cl^- 8,875 g/l và PO_4^{3-} 4,75 g/l, tức là bao gồm những ion chính trong thành phần của nước tiểu, gọi là dung dịch A.

5.2. Xử lý viên sỏi: Các viên sỏi dùng trong thí nghiệm do Khoa ngoại tiết niệu - Viện Quân y 103 cung cấp (sau khi mổ lấy sỏi trên bệnh nhân bị sỏi tiết niệu).

Rửa các viên sỏi bằng dung dịch NaCl 0,9% cho thật sạch, tráng bằng nước cất, sau đó cho vào nắp hộp Petri và sấy ở 50-60° đến khối lượng không đổi. Cân từng viên sỏi, tính từ viên có khối lượng lớn nhất và đánh số thứ tự theo khối lượng giảm dần.

5.3. Tiến hành thí nghiệm

al. Ngày thứ nhất:

Lấy 3 cốc thủy tinh có dung tích 200 ml. Cho vào mỗi cốc 30 ml dung dịch A. Tiến hành 3 lô thí nghiệm:

- Lô 1: Lô đối chứng, dùng cốc 1, thêm 10 ml dung dịch NaCl 0,9%.

- Lô 2: Lô thuốc nồng độ thấp, dùng cốc 2, thêm 5 ml dung dịch thuốc T và 5 ml dung dịch NaCl 0,9%.

- Lô 3: Lô thuốc nồng độ cao, dùng cốc 3, thêm 10 ml dung dịch thuốc T.

Cho cả 3 cốc vào bình điều nhiệt ở nhiệt độ 37° C.

- Bỏ vào cốc 1 các viên sỏi số 1, 4, 7, 10 và 13.

- Bỏ vào cốc 2 các viên sỏi số 2, 5, 8, 11 và 14.

- Bỏ vào cốc 3 các viên sỏi số 3, 6, 9, 12, 15, 18 và 21.

Buổi sáng lắc 4 lần vào các thời điểm 8 giờ 30; 9 giờ 30, 10 giờ 30 và 11 giờ 30 phút. Buổi chiều lắc 3 lần vào các thời điểm 14 giờ, 15 giờ và 16 giờ. Mỗi lần lắc theo một trình tự nhất định bằng máy lắc trong 1 phút.

bl. Ngày thứ hai:

Gạn bỏ dung dịch đã ngâm của ngày hôm trước. Thêm các dung dịch mới vào các cốc 1, 2, và 3 giống như ngày thứ nhất, rồi cũng tiến hành như ngày thứ nhất.

cl. Ngày thứ ba:

Tiến hành như ngày thứ hai.

dl. Ngày thứ tư:

Buổi sáng tiến hành như sáng ngày thứ ba. Buổi chiều, rửa các viên sỏi bằng dung dịch NaCl 0,9%, rồi tráng bằng nước cất, sau đó, sấy ở 50-60°C đến khối lượng không đổi. Cân lại khối lượng các viên sỏi. Khối lượng mòn sỏi là hiệu số khối lượng sỏi cân được trước và sau thí nghiệm [2].

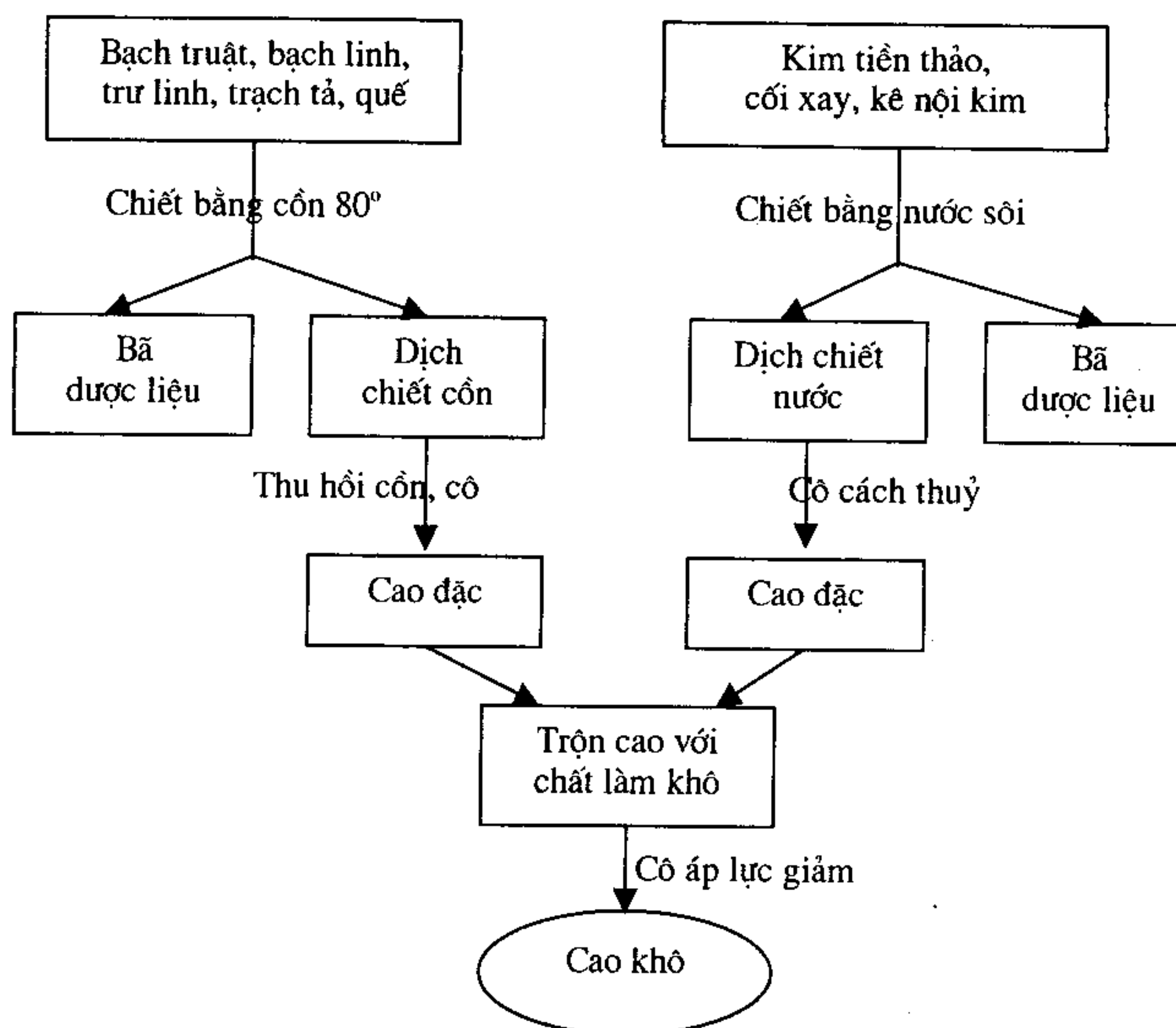
III. Kết quả

Để có thể chế ra dạng thuốc viên lưu hành trên thị trường, chúng tôi đã chế ra dạng bột cao khô và dùng chính dạng cao khô bán thành phẩm dự định sẽ làm viên để nghiên cứu tác dụng làm mòn sỏi.

A. Nghiên cứu chiết xuất bột cao khô "Ngũ linh gia vị"

1. Quy trình chiết xuất

Đối với các vị thuốc có nhiều tinh bột như bạch truật, bạch linh, trư linh và trạch tả, vị thuốc có nhiều tinh dầu là quế đã được chiết bằng cồn 80°, còn các vị thuốc khác như cối xay, kim tiền thảo và kê nội kim được chiết bằng nước sôi như kiểu sắc thuốc theo sơ đồ 1.



Sơ đồ 1: Quá trình chiết cao khô "Ngũ linh gia vị"

2. Hiệu suất cao khô.

Từ 12 kg dược liệu, sau khi chiết bằng qui trình trên, thu được 924g cao khô, tính ra hiệu suất cao khô so với dược liệu là 7,7% (1 khối lượng cao khô cần 13 khối lượng dược liệu khô)

3. Tiêu chuẩn cao khô thu được.

Đã thử 3 mẫu. Kết quả như sau:

- Tính chất: Bột đồng nhất, màu nâu đen, vị đắng, mùi thơm đặc trưng của dược liệu.

- Xác định mất khối lượng do làm khô: Không lần nào quá 5%. Như vậy có thể quy định tiêu chuẩn mất khối lượng do làm khô không quá 5%.

- Xác định tro toàn phần: Không lần nào quá 10%.

- Định tính: Thấy sự có mặt của alcaloid kim tiền thảo và acid cinnamic trong quế.

- Xác định các chất chiết được bằng ethanol trong cao khô: Tất cả các mẫu đều có hàm lượng chất chiết được cao hơn 65%. Trong số các chất không chiết được bằng ethanol, phần chủ yếu là do bột hoài sơn trộn vào với cao đặc để sấy khô.

B. Tác dụng làm mòn sỏi của cao khô

1. Tỷ lệ sỏi mòn ở lô đối chứng

Kết quả sỏi mòn ở lô đối chứng được trình bày ở bảng 1.

Bảng 1

Số TT	Khối lượng sỏi trước thí nghiệm (mg)	Khối lượng sỏi sau thí nghiệm (mg)	Khối lượng sỏi tan trong thí nghiệm (mg)	% sỏi tan so với ban đầu
1	6984	6952	32	0,46
2	5652	5618	34	0,60
3	1850	1836	14	0,76
4	1648	1628	20	1,21
5	630	620	10	1,59
Trung bình	3353		22,0 ± 4,8	0,92 ± 0,21

2. Tỷ lệ sỏi mòn ở lô thuốc nồng độ thấp

Kết quả nghiên cứu sỏi mòn ở lô thuốc nồng độ thấp được trình bày ở bảng 2:

Bảng 2

Số TT	Khối lượng sỏi trước thí nghiệm (mg)	Khối lượng sỏi sau thí nghiệm (mg)	Khối lượng sỏi tan trong thí nghiệm (mg)	% sỏi tan so với ban đầu
1	5786	5458	328	5,67
2	3683	2920	763	20,72
3	3432	3258	174	5,07
4	2390	1254	1136	47,53
5	465	392	73	15,70
Trung bình	3151		494,8 ± 198,9	18,94 ± 7,74

3. Tỷ lệ sỏi mòn ở lô thuốc nồng độ cao

Kết quả nghiên cứu sỏi mòn ở lô thuốc nồng độ cao được trình bày ở bảng 3:

Bảng 3

Số TT	Khối lượng sỏi trước thí nghiệm (mg)	Khối lượng sỏi sau thí nghiệm (mg)	Khối lượng sỏi tan trong thí nghiệm (mg)	% sỏi tan so với ban đầu
1	6934	6582	352	5,08
2	5690	4074	1616	28,40
3	3726	3490	236	6,33
4	2917	2358	559	19,16
5	1582	1342	240	15,17
6	1139	570	569	49,95
7	414	349	65	15,70
Trung bình	3200		519,6 ± 195,1	19,97 ± 5,81

4. Tác dụng làm mòn sỏi của thuốc tính theo khối lượng sỏi mòn

Kết quả nghiên cứu tác dụng làm mòn sỏi của thuốc tính theo khối lượng sỏi mòn được trình bày ở bảng 4:

Bảng 4

Số TT	Lô thí nghiệm	Số viên sỏi	Lượng sỏi mòn (mg)	Lô chứng	P
1	Lô đối chứng	5	22,0 ± 4,8	100	-
2	Thuốc nồng độ thấp	5	494,8 ± 198,9	2249	<0,05
3	Thuốc nồng độ cao	7	519,6 ± 195,1	2362	<0,05

5. Tác dụng làm sỏi mòn tính theo % khối lượng sỏi lúc ban đầu

Tác dụng làm sỏi mòn của thuốc tính theo % khối lượng sỏi lúc ban đầu được trình bày ở bảng 5:

Bảng 5

Số TT	Lô thí nghiệm	Số viên sỏi	% mòn sỏi so với ban đầu	Lô chứng	P
1	Lô đối chứng	5	0,92 ± 0,21	100	-
2	Thuốc nồng độ thấp	5	18,94 ± 7,74	2059	<0,05
3	Thuốc nồng độ cao	7	19,97 ± 5,81	2171	<0,01

IV. Bàn luận

1. Về bài thuốc nghiên cứu

Cơ sở của phương thuốc nghiên cứu là bài

thuốc cổ phương "Ngũ linh tán" trong "Thương hàn luận" có công thức gồm quế chi 4g, bạch truật 8g, phục linh 12g, trư linh 12g và trạch tả 12g.

Theo y học cổ truyền, bài thuốc trên có tác dụng thông dương, hoá khí, kiện tỳ và lợi thủy. Khi gia thêm vào 3 vị kim tiền thảo, kê nội kim, cốt xay, ta được bài thuốc nghiệm phương "Ngũ linh gia vị" dùng để điều trị bệnh sỏi đường tiết niệu.

Trên lâm sàng, Khoa Nội - Viện Y học cổ truyền Việt Nam đã sử dụng bài thuốc này để điều trị sỏi đường tiết niệu với kết quả khá tốt, vì riêng bài "Ngũ linh tán" chỉ có tác dụng chủ yếu là thông dương, hoá khí, lợi thủy, kiện tỳ. Các vị trư linh, bạch linh, trạch tả là lợi thủy, thẩm thấp; còn bạch truật kiện tỳ, vận hoá thấp, khiến thủy thấp không đình tụ được. Quế chi tán ôn, thông dương, giúp bàng quang khí hóa làm thủy phải hành và giúp cho các vị thuốc thẩm thấp, lợi thủy phát huy tác dụng. Vì thế, đây là phương thuốc chủ yếu lấy lợi tiểu để tiêu trừ thấp tà. Thêm kim tiền thảo lại có tác dụng lợi tiểu, thông lâm, thanh nhiệt, tiêu kết tụ [3].

Đã từ lâu, Trung Quốc dùng kim tiền thảo để điều trị sỏi gan mật, viêm thận, sỏi thận và gân đây, còn phát hiện tác dụng điều trị sỏi bàng quang. Những công trình nghiên cứu gần đây đã chứng minh kim tiền thảo có tác dụng bài sỏi và chống viêm [4]. Kê nội kim có tác dụng tiêu thủy độc, lý tỳ vị, thường dùng phối hợp với kim tiền thảo để điều trị sỏi mật và sỏi bàng quang [5]. Cốt xay có tác dụng chữa bí tiểu tiện, thủy thũng, thanh thấp nhiệt, giải độc [6]. Sự kết hợp giữa các tác dụng bài sỏi, chống viêm với thông dương, hoá khí, lợi thủy sẽ làm cho việc điều trị sỏi đường tiết niệu của bài thuốc thu kết quả tốt hơn, đặc biệt với những sỏi nhỏ ở niệu quản và bàng quang.

2. Về cách chiết

Với các vị thuốc có chất bột như bạch truật, bạch linh, trư linh, trạch tả, đã dùng cách chiết bằng cồn 80% để hạn chế lượng cao ra quá nhiều do tinh bột gây ra. Quế cũng được chiết bằng cồn 80%. Các dược liệu khác được chiết bằng cách sắc với nước. Để có thể sấy tạo thành dạng bột khô, chúng tôi đã trộn cao đặc chiết được với bột mịn hoài sơn. Đúng ra là phải để lại một lượng bột mịn bạch linh để làm việc này, nhưng đây là đợt chiết bột thuốc để làm thí nghiệm thử tác dụng dược lý, nếu để lại một lượng bạch linh, thì khi hoà bột với nước rồi lọc để làm thí nghiệm, nó sẽ không tan và làm cho dịch cao không có đủ lượng bạch linh như trong công thức. Chúng tôi không dùng các loại tá dược trợ khác như $MgCO_3$, mà dùng bột mịn hoài sơn, vì hoài sơn không có ảnh hưởng đến tác dụng trị sỏi tiết niệu, mà tính chất

làm tá dược gần với bạch linh hơn, để sau này khi chế tạo ra dạng viên dùng cho người, sẽ dành lại một lượng bột mịn bạch linh thay cho hoài sơn.

3. Về tác dụng làm mòn sỏi của phương thuốc

Lượng sỏi mòn ở lô đối chứng rất ít, trung bình chỉ có 22 mg. Ở lô dùng thuốc nồng độ thấp, lượng sỏi mòn trung bình là 494,8 mg, gấp 22 lần so với lô đối chứng, với $P < 0,05$. Ở Lô dùng thuốc nồng độ cao, lượng sỏi mòn là 519,6 mg, lớn hơn ở lô dùng thuốc nồng độ thấp, nhưng không đáng kể; còn so với lô đối chứng, lượng sỏi mòn gấp 23,6 lần, với $P < 0,05$.

Nếu tính lượng sỏi mòn theo tỷ lệ % so với khối lượng sỏi lúc ban đầu, thì ở lô đối chứng, tỷ lệ sỏi mòn rất ít, chỉ 0,92%. Ở lô dùng thuốc nồng độ thấp, tỷ lệ sỏi mòn rất lớn 18,94%, gấp hơn 20 lần so với lô đối chứng, với $P < 0,05$. Còn ở lô dùng thuốc nồng độ cao, tỷ lệ sỏi mòn là 19,97%, gấp 21,7 lần so với lô đối chứng, với $P < 0,01$. Tuy nhiên, lô thuốc nồng độ cao có mức độ sỏi mòn lớn hơn lô thuốc nồng độ thấp không đáng kể.

4. Về tác dụng của một số vị thuốc

Trong bài thuốc chúng tôi nghiên cứu, kim tiền thảo là vị thuốc được dùng rộng rãi trong nhân dân để điều trị sỏi tiết niệu. Đã có những công trình nghiên cứu ngâm sỏi vào nước sắc kim tiền thảo, sau một tháng, vớt ra cân lại, thấy sỏi nhỏ đi [7]. Đặc biệt, các tác giả Nhật Bản đã tiến hành nghiên cứu ở chuột nhắt trắng [4] và thấy kim tiền thảo có tác dụng ức chế sự tạo thành sỏi calci oxalat, tăng thải trừ citrat và giảm bài xuất calci cũng như tăng khối lượng nước tiểu. Điều này rất có ích trong việc phòng chống sỏi oxalat trên lâm sàng. Do điều kiện thí nghiệm hạn chế, chúng tôi chưa có điều kiện nghiên cứu xem bài thuốc có tác dụng làm mòn sỏi mạnh đối với loại sỏi có thành phần hoá học nào. Ở Việt Nam, Trung Quốc và nhiều nước khác, các loại thuốc viên từ kim tiền thảo đã được sản xuất và lưu hành trên thị trường.

Kê nội kim thuộc nhóm thuốc tiêu đạo, được sử dụng chữa các bệnh sỏi thận và sỏi mật, vì theo y học cổ truyền, kê nội kim có tính chất tiêu kết tụ và đặc biệt có kết quả hơn khi phối hợp với các vị thuốc làm lợi tiểu như trạch tả, một vị thuốc cũng rất phổ biến trong điều trị sỏi ở Việt Nam, Nhật Bản và Indonesia.

V. Kết luận

Đã nghiên cứu phương pháp chiết xuất bột cao khô từ phương thuốc chữa sỏi tiết niệu "Ngũ linh

gia vị" và sơ bộ xác định tiêu chuẩn bột cao khô *vitro* cho thấy, cao thuốc làm mòn sỏi nhiều gấp chiết được. Nghiên cứu tác dụng làm mòn sỏi *in vitro* hơn 20 lần so với lô không có thuốc.

Tài liệu tham khảo

- 1). Dược điển Việt nam III (2002) NXB Y học Hà nội; 2). Đỗ Trung Đàm, Nguyễn Thị Dung, Nguyễn Văn Tường (1996), Tác dụng làm mòn sỏi mật *in vitro* của bài thuốc "Đờm đạo bài thạch thang", Tạp chí Y học cổ truyền dân tộc, 8, 5-7; 3). Viện nghiên cứu Trung y, Trung ương Hội Y Dược học Việt nam dịch (1995), Đông dược học thiết yếu, NXB Mũi Cà mau, 143-144, 474-475; 4). Hirayana H., Wang Z. et al. (1993), Effect of *Desmodium styracifolium* Triterpenoid on calcium oxalate renal stone, Yao Hsueh Pao, 3, 197-201; 5). Lilian Lai Bensky (1990) Chinese herbal medicine, Materia medica, 4, 415-418; 6). Lê Trần Đức (1997), Cây thuốc Việt nam, NXB Nông nghiệp Hà nội; 7). Dương Như Cẩm, Lê Thị Tín, Hồ Thị Thái (1978), Chữa sỏi tiết niệu bằng cây Kim tiền thảo, Y học thực hành, 4, 31-32.

Tạp chí Dược liệu, tập 8, số 3/2003 (trang 81-84)

TÁC DỤNG CỦA CHẾ PHẨM F1KN CHIẾT XUẤT TỪ HOA KIM NGÂN DẠI (*LONICERA DASYSTYLA*) LÊN ĐÁP ỨNG CHUYỂN DẠNG LYMPHO BÀO NGƯỜI

Vũ Tân Trào (1), Trần Văn Hiền (2)

(1) Viện Vệ sinh dịch tễ; (2) Viện Y học cổ truyền Việt Nam

(Nhận bài ngày 14 tháng 1 năm 2003)

Summary

Effect of F1KN Preparation Extracted from *Lonicera dasystyla* Flowers on Transformation of Human Lymphocytes

Lonicera dasystyla flowers are used in traditional medicine for anti-inflammation, anti-allergy and detoxication. In an effort to discover the bioactive component(s), F1KN was fractionated from total flavonoid extract by column chromatography with a mobile phase of benzene-ethyl acetate (9:1). At doses of 30 and 40 µg/ml in PBS, F1KN exhibited stimulatory effect on blast transformation of human T-lymphocytes as demonstrated by ³H-thymidine assay.

Key words: *Lonicera dasystyla* Flowers, Lymphocyte Transformation.

1. Đặt vấn đề

Hoa kim ngân là một vị thuốc được dùng khá phổ biến trong y học cổ truyền với các tác dụng chống viêm, chống dị ứng và giải độc [1]. Nhóm nghiên cứu Trần Văn Hiền và cộng sự đã chiết xuất một thành phần flavonoid có mã nghiên cứu là F1KN. Flavonoid toàn phần và F1KN có tác dụng lên hoạt tính một số enzym oxi hoá khử như catalase và polyphenoloxylase.

Nghiên cứu tác dụng của các dịch chiết thực vật lên các tế bào chịu trách nhiệm miễn dịch đang được nhiều nhà y sinh học quan tâm không những vì khả năng ứng dụng của các nghiên cứu cơ bản này mà nó còn giúp làm sáng tỏ phần nào nguyên lý chữa bệnh bằng y học cổ truyền là "Phù chính khu tà". Trong nghiên cứu này, chúng tôi khảo sát

khả năng kích thích không đặc hiệu của chế phẩm F1KN lên sự chuyển dạng của lympho bào máu ngoại vi người khoẻ mạnh. Đề tài nhằm tiếp tục xác định các tác dụng dược lý đáng quý của hoa kim ngân.

2. Nguyên liệu và phương pháp

2.1. Nguyên liệu thực vật:

Hoa kim ngân đại được thu hái ở ngoại thành Hà Nội, sấy khô ở nhiệt độ 50-60°C trong tủ sấy có quạt gió. Chiết flavonoid theo phương pháp thường quy [2] dùng các dung môi là cồn etylic 70°, ethyl acetat. Dịch chiết ethyl acetat được bay hơi bằng cách cất dưới áp lực giảm trong thiết bị cất quay Rotator. Dùng cột silica gel để tách phân đoạn các thành phần flavonoid. Chế phẩm F1KN thu được từ dung môi (pha động) là benzen-ethyl acetat (9:1).

Để tiến hành các nghiên cứu về miễn dịch, bột FIKN được hoà tan trong PBS (pH 7,2) và được điều chỉnh đến nồng độ 1mg/ml. Sau đó, dung dịch được vô trùng ở 120°C trong 30 phút và bảo quản ở 4°C.

2.2. Môi trường huyết thanh và thuốc thử.

a. Môi trường nuôi cấy:

Hỗn dịch lympho bào được chuẩn bị trong môi trường RPMI (Flow Laboratories) và được nuôi dưỡng trong môi trường này có chứa 10% huyết thanh AB.

b. Huyết thanh:

Thu mẫu máu bệnh nhân nhóm AB, để trong tủ điều nhiệt 37°C trong 40 phút để tách riêng huyết thanh.

c. Hoá chất:

- Ficoll – Hypaque: Chuẩn bị dung dịch Ficoll 400 (Pharmacia Fine Chemical, Thụy Điển) 9% và dung dịch Isopaque 34%. Hỗn hợp được chuẩn bị từ 12 phần Ficoll 9% và 5 phần Isopaque 34%. Tỷ trọng của hỗn hợp cần điều chỉnh chính xác để có $d=1,077 \text{ g/cm}^3$. Hỗn hợp này được dùng để tách hỗn hợp các tế bào đơn nhân, chủ yếu là các tế bào lympho từ máu toàn phần.

- Đệm photphat pH 7,2

- Phytohemagglutinin (PHA, hãng Sigma), được sử dụng ở nồng độ 10µg/ml. Pokeweed PWM, (hãng Sigma) được sử dụng ở nồng độ 25µg/ml.

2.3. Phương pháp tách tế bào đơn nhân máu ngoại vi và đánh giá ảnh hưởng của chế phẩm FIKN đến sự chuyển dạng lympho bào

a. Chuẩn bị tế bào đơn nhân máu ngoại vi.

Lấy máu tĩnh mạch của người tình nguyện bằng ống nghiệm chân không đã được heparin hoá. Pha loãng máu ba lần bằng dung dịch sinh lý PBS. Đặt máu đã pha loãng lên trên lớp Gradien tỷ trọng Ficoll-Hypaque ($d = 1,077$) và ly tâm ở 1700 vòng/phút, 20 phút, nhiệt độ phòng. Sau khi ly tâm, dùng pipet Pasteur hút lấy hỗn dịch các tế bào đơn nhân nằm trong vòng nhân trắng ở chỗ phân chia hỗn hợp Ficoll-Hypaque và máu pha loãng. Thêm 5ml PBS vào mỗi ống chứa tế bào, rửa tế bào hai lần bằng phương pháp ly tâm 1500 vòng/phút, 4°C trong 10 phút mỗi lần. Xác định số lượng tế bào lympho tách được bằng cách đếm các tế bào còn sống, dùng buồng đếm hồng cầu. Chuẩn bị hỗn

dịch tế bào lympho: Dùng môi trường RPMI-1640 chứa 10% FCS hoặc huyết thanh AB, điều chỉnh để có nồng độ hỗn dịch 10^6 tế bào/ml.

b. Đánh giá ảnh hưởng của chế phẩm đến sự phản ứng LTT chuyển dạng lympho bào:

Phương pháp dựa trên cơ sở là khi nuôi cấy *in vitro* lympho bào của người có mặt các chất phân bào mitogen như PHA hay PWM có thể gây nên sự chuyển dạng lympho bào sang dạng blast và phân chia tế bào. Để đánh giá tính chất phân bào của một chất trong phản ứng chuyển dạng lympho bào, chất nghiên cứu được dùng trong vai trò của mitogen. Lympho bào được phân lập từ máu ngoại vi của người tình nguyện theo phương pháp đã mô tả ở trên và được chuẩn bị ở nồng độ tế bào là 10^6 tế bào/ml.

Đưa vào các giếng của phiên đảo loại 96 giếng đáy tròn như sau:

Mẫu đối chứng 1: 100µl hỗn dịch lympho bào + 50 µl dung dịch PHA hoặc PWM 30µg/ml.

Các giếng thí nghiệm: 100µl hỗn dịch lympho bào + 50µl dung dịch FIKN với các nồng độ khác nhau.

Như vậy, nồng độ cuối cùng của PHA hay PWM trong hỗn hợp ủ là 10µg/ml, của FIKN là từ 10 đến 90µg/ml. Các mẫu thí nghiệm được tiến hành lặp lại ở 3 giếng một.

2.4. Các số liệu được xử lý thống kê và được thể hiện ở các giá trị $\bar{X} \pm SD$.

3. Kết quả

3.1. Ảnh hưởng của FIKN ở các nồng độ khác nhau đến phản ứng chuyển dạng lympho bào

Trong nghiên cứu này, dung dịch FIKN được pha loãng và đưa vào môi trường nuôi cấy tế bào lympho để có các nồng độ cuối cùng trong hỗn hợp phản ứng là 10, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 60, 70, 80, 90 µg/ml. Kết quả được trình bày ở bảng 1.

Giá trị tuyệt đối của hoạt tính phóng xạ xác định được trong các mẫu thay đổi tùy thuộc nhiều vào các cá nhân cho máu. Tuy nhiên, sau hàng loạt các thí nghiệm, chúng tôi thấy chỉ ở những nồng độ nhất định, chế phẩm FIKN mới gây tác dụng tốt với phản ứng chuyển dạng lympho bào T. và nồng độ tác dụng thường là 30 hoặc 40µg/ml. Chế phẩm FIKN ở các nồng độ lớn hơn nồng độ này không có tác dụng kích thích chuyển dạng.

Bảng 1. Ảnh hưởng của nồng độ FIKN đến phản ứng chuyển dạng lympho bào

Hỗn hợp nuôi cấy		Số xung/phút		
Tế bào	FIKN $\mu\text{g/ml}$	Mẫu 1	Mẫu 2	Mẫu 3
100000	-	210 $\pm$ 10	338 $\pm$ 94	242 $\pm$ 15
100000	10	120 $\pm$ 8	320 $\pm$ 86	
100000	20	240 $\pm$ 19	415 $\pm$ 92	
100000	25			163 $\pm$ 18
100000	30	1601 $\pm$ 489	1814 $\pm$ 52	291 $\pm$ 6
100000	35			235 $\pm$ 22
100000	40	526 $\pm$ 177	309 $\pm$ 57	1375 $\pm$ 150
100000	45	79 $\pm$ 8	97 $\pm$ 9	150 $\pm$ 32
100000	50	84 $\pm$ 13	88 $\pm$ 11	
100000	60	98 $\pm$ 37	78 $\pm$ 15	
100000	70	70 $\pm$ 8	82 $\pm$ 9	
100000	80	86 $\pm$ 11	80 $\pm$ 8	
100000	90			

3.2. Ảnh hưởng của FIKN 30 $\mu\text{g/ml}$ đến phản ứng chuyển dạng lympho bào:

Thí nghiệm được lập lại trên 10 mẫu máu ngoại vi người bình thường, dung dịch FIKN 30 $\mu\text{g/ml}$ được chọn để xác định ảnh hưởng của chế phẩm

đến phản ứng chuyển dạng lympho bào. PHA và PWM được dùng như các chất đối chứng dương. Việc đo số lượng thymidin kết hợp với DNA nhân tế bào được tiến hành ở các thời điểm khác nhau, kết quả ghi ở bảng 2.

Bảng 2. Ảnh hưởng của chế phẩm FIKN 30 $\mu\text{g/ml}$ lên mức độ đáp ứng chuyển dạng ở các khoảng thời gian nuôi cấy khác nhau

Thời gian nuôi cấy (giờ)	Số xung/phút			
	Control	FIKN	PHA	PWM
24	202 $\pm$ 15	305 $\pm$ 18		
48	217 $\pm$ 16	820 $\pm$ 22	4100 $\pm$ 324	3060 $\pm$ 243
72	230 $\pm$ 13	1605 $\pm$ 57	13369 $\pm$ 2450	3725 $\pm$ 315
96	193 $\pm$ 18	852 $\pm$ 32	5627 $\pm$ 351	8925 $\pm$ 238
120	195 $\pm$ 15	650 $\pm$ 45	4215 $\pm$ 245	10031 $\pm$ 628

Bảng 2 cho thấy chế phẩm FIKN có tác dụng mạnh nhất trên phản ứng LTT sau 72 giờ ủ tế bào với chế phẩm. Tác dụng kích thích chuyển dạng lympho bào của FIKN tương tự tác dụng của PHA, nghĩa là đạt giá trị cực đại ở thời điểm 72 giờ nuôi cấy, nhưng ở mức độ thấp hơn nhiều so với PHA. Dung dịch FIKN ở nồng độ 30 $\mu\text{g/ml}$ làm tăng khả năng chuyển dạng của lympho bào lên khoảng 7 lần so với mẫu đối chứng, 1600 so với 230 xung/phút. Trong khi đó, dung dịch PHA ở nồng độ 10 $\mu\text{g/ml}$ làm tăng hoạt tính phóng xạ đến trên 13.000 xung/phút.

Trong một thí nghiệm song song, đã nghiên cứu tác dụng của dịch chiết nước toàn phần hoa kim ngân lên đáp ứng chuyển dạng lympho bào, với nồng độ dịch chiết từ 100 $\mu\text{g/ml}$ đến 300 $\mu\text{g/ml}$,

không thấy có sự sai khác giữa số xung/phút của các mẫu có dịch thử với số xung/phút của mẫu đối chứng không chứa dịch chiết.

4. Thảo luận kết quả

Trong một số tài liệu trước đây, chúng tôi đã công bố về tác dụng hoạt hoá các tế bào lympho máu ngoại vi người bình thường làm bộc lộ các thụ thể tạo hoa hồng với hồng cầu cừu của dịch chiết FIKN [2]. Các nồng độ dịch chiết cho tác dụng rõ ràng nhất vào khoảng 2,5 đến 25 $\mu\text{g/ml}$. Các kết quả nhận được trong nghiên cứu này là dịch chiết FIKN ở một vài nồng độ thích hợp khoảng 30 $\mu\text{g/ml}$ còn có tác động đến trạng thái chức năng lympho qua thí nghiệm về mức độ chuyển dạng của tế bào lympho.

Đây là những kết quả đầu tiên về tác dụng của dịch chiết từ hoa kim ngân lên phản ứng tăng sinh của các tế bào có trách nhiệm miễn dịch (immunocompetent cells). Những kết quả nhận được đóng góp vào việc xác định hoạt tính sinh học có lợi của hoa kim ngân trong điều trị, vì ngoài tác dụng thanh nhiệt giải độc của kim ngân, hoa còn có thể tham gia vào cơ chế nâng cao sức đề kháng không đặc hiệu cho người bệnh trong quá trình điều trị.

Tài liệu tham khảo

1). Đỗ Tất Lợi. Cây thuốc và vị thuốc Việt Nam, NXB khoa học và kỹ thuật, 1977, 88-90; 2).Trần Văn Hiền, Phạm Mạnh Hùng, Ngô Văn Thông, Phí Thị Tuyết. ảnh hưởng của Bioflavonoid chiết xuất từ hoa *Lonicera dasystyla* R. đối với sự tạo hoa hồng E của lympho bào T máu ngoại vi người. Dược học 1989, N^o2, 17-19; 3). Jean Bruneton. Pharmacognosy. Lavoisier publishing. 1999, 318-321; 4). Giulia Di Carlo, Nicola Mascolo, Angelo A - Izzo. Flavonoids: old and new aspects of a class of natural therapeutic drugs. Life sciences 1999, V65, N4, 337-353; 5). Ramgolam V, Ang SG, Lai YH, Loh CS, Yap HK. Traditional Chinese medicines as immunosuppressive agents. Ann Acad Med Singapore 2000 Jan; 29 (1): 11 - 16.

Tạp chí Dược liệu, tập 8, số 3/2003 (trang 84-88)

NGHIÊN CỨU CHẾ BIẾN VỊ THUỐC MẪU ĐƠN BÌ

Phạm Xuân Sinh, Đào Thị Vui, Đào Đình Lực - Trường ĐH Dược Hà Nội
(Nhận bài ngày 14 tháng 3 năm 2003)

Summary

Studies on Processing of *Cortex Paeoniae Racidis*

Mau don bi (Cortex Paeoniae Racidis = CPR) has been used by oriental traditional medicine for a long time. It is usually processed by roasting to yellow (CPRy) or black colour (CPRb), soaking with alcohol then roasting dry again (CPRa). Although before and after processing CPR contains paeonol, tannin and flavonoids, the processing method may influence their contents. For paeonol, its content was altered significantly by various processing methods: CPRr (before process) = 1.36%, CPRy = 1.47%, CPRb 0.56% and CPRa=1.78%. Aqueous extracts of CPRy and CPRb reduced coagulating time of rabbit blood and bleeding time of albino mice, while those of CPR before and after processing diluted with distilled water by 100 times have antioxydant action on mouse liver cells.

Key words: Cortex Paeoniae Racidis, Processing, Paeonol Content.

I. Đặt vấn đề

Mẫu đơn bì (MĐB) là vỏ rễ của cây mẫu đơn (*Paeonia suffruticosa* Andr.) thuộc họ Mao lương (Ranunculaceae). Cây phân bố chủ yếu ở Trung Quốc. Đây là một vị thuốc được y học phương Đông, trong đó có Việt Nam sử dụng từ rất sớm. MĐB có trong thành phần của Lục vị, Bát vị và nhiều phương thuốc khác. Dược liệu bao giờ cũng phải được chế biến mới sử dụng. Có 7 phương pháp chế biến khác nhau với những công dụng khác nhau của từng phương pháp (1,5).

Hiện nay, MĐB được sử dụng nhiều ở các XNDF đặc biệt là XNDFTW 3 để sản xuất hoàn lục vị, hoàn bổ âm và các phòng chấn trị. Tuy vậy, cho đến nay MĐB vẫn được dùng theo kinh nghiệm là chủ yếu. Việc chế biến MĐB có ảnh

hưởng thế nào đến thành phần hoá học và tác dụng sinh học vẫn chưa có đủ cơ sở khoa học chứng minh. Do đó, để làm sáng tỏ vấn đề này, chúng tôi đã nghiên cứu sự thay đổi về thành phần hoá học chính và một số tác dụng sinh học của vị thuốc trước và sau khi chế biến bằng một số phương pháp y học cổ truyền.

II. Nguyên liệu và phương pháp nghiên cứu

2.1. Nguyên liệu.

- Dược liệu: Mẫu đơn bì do XNDFTW 3 cung cấp.
- Dung môi, hoá chất: Ether ethylic, Na₂CO₃, NaOH, H₂SO₄, Na₂SO₄ khan... đạt tiêu chuẩn kiểm nghiệm, do phòng Giáo tài Đại học Dược Hà Nội cung cấp.
- Súc vật thí nghiệm:

+ Chuột nhắt trắng Swiss thuần chủng có trọng lượng 20 ± 1 g khoẻ mạnh, do Viện Vệ sinh dịch tễ trung ương cung cấp.

+ Thỏ khoẻ mạnh có trọng lượng 1,8 - 2,4kg.

2.2. Phương pháp nghiên cứu.

2.2.1. Chế biến vị thuốc theo phương pháp YHCT.

- Mẫu đơn bì sao vàng (5)
- Mẫu đơn bì sao đen (5)
- Mẫu đơn bì chích rượu (5)

2.2.2. Nghiên cứu thành phần hoá học.

2.2.2.1. Chiết xuất.

Nguyên tắc: Trong MĐB có glycosid là paeonolid, khi tiếp xúc với một men có trong vị thuốc sẽ thủy phân cho một dẫn chất của phenol gọi là paeonol có công thức phân tử là $C_9H_{10}O_3$.

- Bột MĐB chiết bằng ether ethylic, loại tạp bằng dung dịch Na_2CO_3 10% lấy lớp ether. Lắc dịch ether với dung dịch NaOH 10% lấy lớp nước, thêm vào dịch nước dung dịch H_2SO_4 10% đến môi trường acid pH 1-2. Tách paeonol bằng cách lắc nhiều lần với ether, bốc hơi ether lấy cặn. Tinh chế bằng cồn vài lần, đem định tính và định lượng thành phần paeonol.

-Bột MĐB chiết nóng bằng nước, lọc lấy dịch trong đem định tính.

2.2.2.2. Định tính các nhóm chất trong MĐB.

+ Định tính bằng thuốc thử chung và thuốc thử đặc hiệu của từng nhóm chất theo phương pháp ghi trong tài liệu Dược liệu I, II - Đại học Dược Hà Nội.

+ Định tính paeonol bằng SKLM:

Dùng bản mỏng silica gel trắng sẵn, ký hiệu GF 254-Merk.

Hệ dung môi khai triển: Hệ 1: Ether dầu hoà: Ethyl acetat (9,5 : 0,5). Hệ 2: Acid acetic băng.

Thuốc hiện màu: $FeCl_3$ 5%/ acid acetic.

2.2.2.3. Định lượng thành phần paeonol.

Bằng phương pháp cân theo nguyên tắc như trên. Hàm lượng paeonol có trong MĐB được tính theo công thức:

$$X = \frac{m.100}{M - M.a}$$

X: Hàm lượng paeonol (%)

M: Lượng bột thô MĐB đem cân định lượng.

m: Lượng paeonol thu được sau khi sấy đến khối lượng không đổi.

a: Độ ẩm của dược liệu, xác định trên máy đo độ ẩm Presica - Thụy Sĩ.

2.2.3. Nghiên cứu tác dụng sinh học.

2.2.3.1. Nghiên cứu tác dụng của vị thuốc lên thời gian đông máu, chảy máu.

- Thử tác dụng của thuốc lên thời gian đông máu trên thỏ. Cách tính liều cho thỏ dựa trên nguyên tắc liều của thỏ gấp 10 lần liều người lớn. Do đó liều dùng cho thỏ là 2g MĐB/1kg trọng 24 giờ, dùng trong 3 ngày. Ở ngày thứ 3 sau khi uống thuốc 90 phút, lấy máu tĩnh mạch tai thỏ đo thời gian đông máu. Xử lý kết quả bằng sắc xuất thống kê theo phương pháp Test T (Student - Fisher) [4].

- Thử tác dụng của thuốc lên thời gian chảy máu trên chuột nhắt trắng. Liều của chuột là 0,125g MĐB/ 10g chuột trong 24 giờ (tương đương 12,5g MĐB/1kg chuột) dùng trong 3 ngày. Ở ngày thứ 3 sau khi cho chuột uống thuốc 90 phút, cắt đuôi chuột và xác định thời gian chảy máu. Xử lý kết quả bằng sắc xuất thống kê theo phương pháp Test T (Student - Fisher) [4].

2.2.3.2. Nghiên cứu tác dụng của vị thuốc lên quá trình POL in vitro.

- Nguyên tắc: Xác định hàm lượng MDA, một sản phẩm trung gian của quá trình POL. Sản phẩm MDA có thể phản ứng với acid thiobarbituric để tạo phức trimethin màu hồng có đỉnh hấp thụ cực đại ở bước sóng 530-532nm. Cường độ màu tỉ lệ thuận với hàm lượng MDA.

- Hàm lượng MDA là số mol MDA trong 1mg gan chuột nhắt trắng được xác định theo phương pháp của phòng Đông y thực nghiệm - Viện Y học cổ truyền Việt Nam.

III. Thực nghiệm, kết quả

3.1. Chế biến vị thuốc MĐB.

- Mẫu đơn bì chưa chế (MĐBS) được chế biến theo một số phương pháp sau:

+ Mẫu đơn bì sao vàng (MĐBV): dược liệu được sao trên chảo với nhiệt độ 140-150°C (có so sánh với mẫu sấy ở nhiệt độ 140°C trong tủ sấy điều chỉnh nhiệt độ), đến khi mặt ngoài có màu vàng sẫm, vị hơi đắng, mùi thơm đặc trưng. Lấy ra làm

sạch, để nguội, đóng túi PVC, bảo quản nơi khô mát.

Tiêu chuẩn: Độ hư hao <14%, kiểm tra thành phần hoá học phải có paeonol, tanin, đường tự do. Hàm lượng paeonol không ít hơn 1,1%.

+ Mẫu đơn bì sao đen (MĐBĐ): làm như trên với nhiệt độ 180-200°C (có so sánh với mẫu sấy ở nhiệt độ 200°C), đến khi mặt ngoài có màu đen, bên trong màu hơi vàng. Lấy ra làm sạch, để nguội, đóng túi PVC, bảo quản nơi khô mát.

Tiêu chuẩn: Độ hư hao <18%, kiểm tra thành phần hoá học phải có paeonol, tanin, đường tự do. Hàm lượng paeonol không ít hơn 0,4%.

+ Mẫu đơn bì chích rượu (MĐBR): dược liệu được tẩm rượu với tỷ lệ 1,5 lít rượu cho 10kg dược liệu. Sao ở nhiệt độ 60-70°C đến khô, để nguội, đóng túi PVC, bảo quản nơi khô mát.

Tiêu chuẩn: Độ hư hao <15%, kiểm tra thành phần hoá học phải có paeonol, tanin, đường tự do. Hàm lượng paeonol không ít hơn 1,2%.

3.2. Hoá học.

3.2.1. Định tính một số nhóm chất trong MĐB.

3.2.1.1. Định tính trong ống nghiệm.

Dịch chiết thu được ở trên đem làm phản ứng với một số thuốc thử chung và đặc hiệu; kết quả được ghi ở bảng 1:

Bảng 1: Kết quả định tính các thành phần hoá học trong MĐB sống và chế

TT	Hợp chất	Thuốc thử	Mẫu đơn bì				Ghi chú
			MĐB S	MĐB V	MĐB Đ	MĐB R	
1	Phenol (Paeonol)	Dd FeCl ₃ 5%/ cồn	++	++	++	++	Màu tím đen ánh xanh
2	Đường	TT Fehling TT AgNO ₃ /NH ₄ OH 5%	++ ++	++ ++	++ ++	++ ++	Tủa đỏ Cu ₂ O Tủa xám ở thành ống
3	Tanin	TT FeCl ₃ 5%	++ ++	++ ++	++ ++	++ ++	Màu xanh đen Tủa đục trắng
4	Flavonoid	- Phản ứng Cyanidin - Phản ứng với kiềm - Phản ứng diazo hoá	+++ +++ +++	++ ++ ++	++ ++ ++	+++ +++ +++	Dung dịch màu đỏ Tăng màu vàng màu đỏ

Nhận xét: Kết quả định tính cho thấy trong MĐB sống và chế đều có paeonol, tanin, đường và flavonoid.

3.2.1.2. Định tính paeonol bằng SKLM.

+ Sắc ký một chiều: Dịch chấm sắc ký được chuẩn bị như trên đem chất sắc ký bản mỏng silica gel trắng sẵn. Kết quả được ghi ở bảng 2.

+ Sắc ký hai chiều: Hệ dm 1: ether dầu hoả:

ethylacetat (9,5: 0,5). Hệ dm 2: acid acetic băng.

Kết quả thu được một vết màu xanh lá mạ dưới đèn tử ngoại $\lambda = 365\text{nm}$, hiện màu bằng dung dịch FeCl₃ 5% trong acid acetic cho màu nâu sẫm.

Nhận xét: Dịch chiết thu được sau chiết xuất và loại tạp, sơ bộ xác định chỉ có một chất. Mặt khác, theo một số tài liệu đã nghiên cứu trước đây [2,3], sơ bộ xác định chất đó là paeonol.

Bảng 2: Kết quả định tính bằng SKLM

Hệ dung môi	Số lượng vết	Màu dưới đèn tử ngoại ($\lambda = 365\text{nm}$)	Hiện màu bằng Dd FeCl ₃ / acid acetic	Rf
1	1	Xanh lá mạ	Nâu sẫm	0,56
2	1	Xanh lá mạ	Nâu sẫm	0,58

3.2.2. Định lượng paeonol. Định lượng bằng phương pháp cân. Kết quả được ghi ở bảng 3.

Bảng 3. Kết quả định lượng bằng phương pháp cân

TT	Mẫu thử	Hàm lượng paeonol (%)	Ghi chú
1	MĐBS	1,36	Các mẫu đều song song làm độ ẩm và tính theo hàm lượng khô tuyệt đối
2	MĐBV	1,47	
3	MĐBR	1,78	
4	MĐBD	0,56	

Nhận xét: Hàm lượng paeonol trong MĐB có sự thay đổi giữa các phương pháp chế biến, giữa dược liệu sống và chế. Trong đó, hàm lượng paeonol trong MĐBR cao nhất.

3.2.3. Tác dụng sinh học.

3.2.3.1. Tác dụng của thuốc lên thời gian đông máu của thỏ.

Sau khi uống thuốc ngày thứ 3 khoảng 90 phút, lấy máu tĩnh mạch tai thỏ, đo thời gian đông máu trên lam kính. Kết quả được ghi ở bảng 4.

Bảng 4: Tác động của thuốc lên thời gian đông máu của thỏ.

Lô	Thời gian đông máu của thỏ (phút)					Thời gian đông máu trung bình	P	% GTTP so với lô đối chứng
	1	2	3	4	5			
Trước uống thuốc	6,67	6,33	7,00	7,17	6,67	6,77± 0,15		100%
Sau uống MĐBD	5,90	5,28	6,33	5,22	5,58	5,66 ± 0,21	< 0,01	83,7%
Sau uống MĐBS	5,77	5,47	5,50	6,10	5,52	5,67 ± 0,12	< 0,01	83,8%

Nhận xét: MĐBD, MĐBS đều có tác dụng làm giảm thời gian đông máu của thỏ so với khi không dùng thuốc ở độ tin cậy 0,99. Điều này phù hợp với tác dụng cầm máu của MĐB sao đen hoặc sao cháy theo YHCT.

3.2.3.2. Tác dụng của thuốc lên thời gian chảy máu của chuột.

Chuột nhắt được chia thành 4 lô mỗi lô 10 con. Sau khi uống thuốc ngày thứ ba khoảng 60 phút, cắt bỏ một đoạn đuôi chuột dài khoảng 1cm kể từ chóp đuôi, ngâm vào một cốc nước 37°C. Đo thời gian từ lúc cắt đuôi đến khi cầm máu. Kết quả được ghi ở bảng 5.

Bảng 5: Tác động của thuốc lên thời gian chảy máu của chuột

Lô	Thời gian chảy máu của từng chuột (phút)										Thời gian chảy máu trung bình	P	%GTTB so với lô trắng
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10			
Trắng	5,71	6,03	4,81	6,67	4,98	6,97	6,20	4,83	7,67	5,25	5,91± 0,31		100
MĐBS	4,73	6,13	6,27	6,25	6,40	6,75	5,61	6,47	5,77	6,57	6,10± 0,19	>0,05	111,1
MĐBD	3,62	2,97	1,95	2,56	2,60	3,00	1,80	2,55	2,78	2,33	2,62± 0,17	<0,01	73,6
MĐBV	3,90	4,28	3,95	3,85	2,87	3,17	4,13	3,50	4,57	3,42	3,76 ± 0,17	<0,01	63,7
MĐBR	3,70	3,42	5,03	4,33	4,17	3,80	4,73	4,70	5,88	3,57	4,35 ± 0,24	<0,01	44,3

Nhận xét: Các dạng MĐBV, MĐBD và MĐBR có tác dụng cầm máu rõ rệt so với lô đối chứng (sự khác nhau này có ý nghĩa thống kê ở P<0,01), MĐBS làm tăng thời gian chảy máu của chuột so với lô không uống thuốc. Còn dạng MĐBD có tác dụng cầm máu mạnh nhất. Điều đó phù hợp với nguyên lý của YHCT và có thể khẳng định sự cần

thiết phải chế biến trong YHCT.

3.2.3.3. Tác dụng của MĐB lên quá trình peroxy hoá (Pol):

Dịch nước sắc 1:1, pha loãng 100 lần, thử tác dụng ức chế quá trình Pol. Kết quả được ghi ở bảng 6.

Bảng 6: Ảnh hưởng của MĐB sống và chế đến phản ứng Peroxy hoá lipid dịch đồng thể tế bào gan chuột nhắt trắng.

Mẫu	Lượng mẫu đưa vào phản ứng (ml)	Nồng độ cuối của mẫu (mg/ml)	E	MDA	% so với đối chứng	Độ ức chế (%)
MĐBS	0,0	0,00	0,760	21,66	100	0
	0,1	0,35	0,379	10,55	49,87	51,29
	0,2	0,70	0,255	7,15	33,54	66,99
	0,3	1,05	0,204	5,75	26,83	73,45
	0,4	1,40	0,129	3,60	16,62	83,38
	0,5	1,75	0,121	3,45	15,23	84,07
MĐBV	0,0	0,00	0,819	23,34	100	0
	0,1	0,35	0,355	9,95	42,63	57,37
	0,2	0,70	0,219	6,15	26,35	73,28
	0,3	1,05	0,172	4,80	20,75	79,43
	0,4	1,40	0,149	4,15	17,78	82,22
	0,5	1,75	0,133	3,75	16,06	83,93
MĐBD	0,0	0,00	0,702	20,01	100	0
	0,1	0,35	0,289	8,10	40,5	59,50
	0,2	0,70	0,181	5,05	25,24	74,46
	0,3	1,05	0,160	4,50	22,49	77,51
	0,4	1,40	0,157	4,40	21,99	78,01
	0,5	1,75	0,142	4,00	20,00	80,00
MĐBR	0,0	0,00	0,346	9,7	100	0
	0,1	0,35	0,158	4,4	45,41	54,59
	0,2	0,70	0,129	3,6	37,13	62,87
	0,3	1,05	0,126	3,5	36,15	63,85
	0,4	1,40	0,117	3,3	34,08	63,92
	0,5	1,75	0,115	3,2	32,94	67,06

Nhận xét: MĐB sống và chế đều có tác dụng, ức chế quá trình Pol, ngay từ nồng độ 35mg/ml, tác dụng tăng theo nồng độ trong đó dạng MĐBV có độ ức chế cao nhất 83,93% ở nồng độ 1,75 mg/ml.

IV. Kết luận

- Về chế biến: Đã tiến hành chế biến MĐB, 3 trong số 7 phương pháp của YHCT đạt tiêu chuẩn.
- Về hoá học: Sơ bộ xác định trong vị thuốc MĐB trước và sau chế biến đều có paeonol, tanin, đường tự do.

Đã tách chiết được một chất, xác định là paeonol và tiến hành định lượng thành phần này.

- Về tác dụng sinh học: Đã tiến hành thử tác dụng của thuốc lên quá trình đông máu và chảy máu trên thỏ và chuột nhắt trắng, thấy rằng dạng MĐBD có tác dụng cầm máu rõ rệt nhất.
- Các dạng chế biến của MĐB đều có tác dụng ức chế quá trình Pol màng tế bào gan chuột nhắt hay quá trình OXH, trong đó MĐBV có tác dụng mạnh nhất.

Tài liệu tham khảo

- 1). Bộ môn Dược học cổ truyền, Đại học Dược Hà Nội - Dược học cổ truyền, NXB Y học 2002; 2). Đỗ Tất Lợi - Những cây thuốc và vị thuốc Việt Nam, NXB Y học, 1999; 3). Học viện Dược Nam Kinh - Trung thảo Dược học, NXB Vệ sinh Giang Tô 1977; 4). Lê Khánh Trai, Hoàng Hữu Như - Một số ứng dụng xác suất thống kê trong y sinh học, NXB Khoa học kỹ thuật, 1979; 5). Phạm Xuân Sinh - Phương pháp chế biến thuốc cổ truyền, NXB Y học, 1999.

GÓP PHẦN HOÀN THIÊN PHƯƠNG THUỐC “BỘT TAM HOÀNG” SỬ DỤNG CHO BỆNH NHÂN TRỊ Ở BỆNH VIỆN Y HỌC CỔ TRUYỀN CAO BẰNG

Đào Thị Thanh Hiền, Phạm Xuân Sinh, Hoàng Thị Kim Dung, Trần Duy Đông
(Nhận bài ngày 26 tháng 2 năm 2003)

Summary

Towards Improvement of *Bột tam hoàng* for Use in the Treatment of Hemorrhoid at Cao Bang Traditional Medical Hospital

“Bột tam hoàng” (Tam hoang powder) consisting of rhizoma Coptidis, cortex Oroxyli, radix and caulis Fibraureae and CuSO₄ has been using for hemorrhoid by Cao bang traditional medical hospital with good results. This study has revealed that the preparation contains alkaloids, flavonoids, amino acids, tannin, sterols and reduced sugars. It exhibited good antibiotic activities against 5 Gr(-) and 5 Gr(+) microbia and showed beneficial healing effect on over 85% of 500 hemorrhoid patients.

Due to the reaction between CuSO₄ and flavonoids, it is recommended not to mix the copper salt with the powder before use.

Key words: Tam hoang Powder, Chemical Compotion, Antibiotic, Hemorrhoid

Đặt vấn đề

Hiện nay, số lượng bệnh nhân trĩ đến điều trị ở các bệnh viện y học cổ truyền rất lớn. Sau khi thất trị, bệnh nhân rất cần một loại thuốc dùng ngoài với các tác dụng kháng khuẩn, chống viêm để giảm thiểu khả năng nhiễm trùng và mau lành vết thất. Trên cơ sở đó, Bệnh viện y học cổ truyền Cao Bằng đã đề xuất phương thuốc “Bột tam hoàng” để sử dụng cho bệnh nhân sau thất trị.

Bài thuốc gồm các vị thuốc:

Hoàng liên (Rhizoma Coptidis - HL)

Hoàng bá nam (Cortex Oroxyli - HBN)

Hoàng đằng (Radix et Caulis Fibraureae – HĐ)

Đồng sulfat dược dụng (CuSO₄.5H₂O)

Để nâng cao hiệu quả điều trị của phương thuốc, chúng tôi đã tiến hành một số nghiên cứu sau:

1. Hoàn thiện quy trình chế biến và bào chế.
2. Tiến hành định tính, định lượng sơ bộ.
3. Nghiên cứu tác dụng kháng khuẩn.

Nguyên liệu và phương pháp nghiên cứu

1. Nguyên liệu:

+ Chế phẩm “Bột tam hoàng” của Bệnh viện y học cổ truyền Cao Bằng.

+ Thân rễ hoàng liên thu hái ở Sa Pa (Lào Cai) và

mua ở phố Lãn Ông, Hà Nội.

+ Thân rễ hoàng đằng mua ở phố Lãn Ông, Hà Nội.

+ Vỏ thân hoàng bá nam thu hái ở vườn thực vật, Trường đại học dược, Hà Nội.

+ Đồng sulfat dược dụng.

2. Phương pháp nghiên cứu:

+ Định tính trong ống nghiệm, SKLM để xác định các nhóm chất chính.

+ Định lượng alcaloid và flavonoid toàn phần.

+ Thử tác dụng kháng khuẩn bằng phương pháp khoan giấy.

Kết quả:

+ Thành phần hoá học trong “Bột tam hoàng” có các nhóm chất chính là alcaloid, flavonoid, acid amin, đường khử, tanin, sterol.

+ Định tính alcaloid toàn phần trong “Bột tam hoàng” bằng SKLM với chất chuẩn palmatin và berberrin

Khai triển trên 2 hệ dung môi:

Hệ 1: n-Butanol : A. acetic : Nước (7:1:2)

Hệ 2: Toluene : Aceton : Ethyl acetat : A. formic (5:2:2:1)

Thuốc thử hiện màu Dragendorff.

Bảng 1: Kết quả SKLM của alcaloid toàn phần “Bột tam hoàng”

Mẫu dược liệu	Số vết	Rf.100 và màu sắc các vết				
		Hệ 1	Hệ 2	Màu sắc	Palmatin	Berberin
Bột tam hoàng	1	39	27	Vàng cam	+	+
	2	44	29	Vàng cam		
	3	50	38	Vàng cam		
	4	57	53	Vàng cam		
	5	75	65	Vàng cam		
	6	89	77	Vàng cam		

Qua bảng trên, ta thấy trong “Bột tam hoàng” có 6 alcaloid, berberin và palmatin.

+ Định lượng alcaloid toàn phần và flavonoid toàn phần

Bảng 2: Hàm lượng alcaloid toàn phần

	“Bột tam hoàng”/HCl 10%	“Bột tam hoàng”/H ₂ O 80°C
Alcaloid (%)	2,59	1,75

Bảng 3: Hàm lượng flavonoid toàn phần

	“Bột tam hoàng” /ethanol 70°C	HBN chế biến ngay sau thu hái	HBN chế biến sau thu hái 2 tháng	HBN có trộn CuSO ₄ (1:10)
Flavonoid (%)	0,53	3,11	2,54	1,98

+ Cao lỏng “Bột tam hoàng” (1:1) và (2:1) có tác dụng khá trên 10 chủng vi khuẩn thử gồm 5 chủng gr(-) và 5 chủng gr(+).

Bảng 4: Kết quả thử tính kháng khuẩn

STT	Kết quả Vi khuẩn	Đường kính vòng vô khuẩn (mm)			
		Penicillin(1UI)	Gentamicin(1UI)	Cao lỏng (1:1)	Cao lỏng (2:1)
1	<i>Bacillus subtilis</i>	15,27		8,10	10,30
2	<i>Bacillus cereus</i>	20,70		13,90	15,96
3	<i>Sarcina lutea</i>	18,40		8,10	12,20
4	<i>Staphylococcus aureus</i>	17,86		14,40	19,40
5	<i>Bacillus pumilus</i>	16,90		15,30	20,90
6	<i>Shigella flexneri</i>		24,52	10,40	16,40
7	<i>Salmonella typhi</i>		16,53	8,92	12,12
8	<i>Escherichia coli</i>		15,50	11,20	16,80
9	<i>Proteus mirabilis</i>		19,27	9,80	15,70
10	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>		23,89	10,80	16,90

+ Sơ bộ đưa ra phương pháp kiểm nghiệm và tiêu chuẩn hoá “Bột tam hoàng”.

+ Thử nghiệm lâm sàng ở Bệnh viện y học cổ truyền Cao Bằng trên 500 bệnh nhân sau thất trí cho thấy: >85% vết thất khô se, không nhiễm trùng và mau liền.

Nhận xét và kết luận

+ Kết quả thu được ở bảng 2 cho thấy hàm lượng alcaloid khi chiết bằng HCl 10% là 2,59%, còn khi chiết bằng nước ở nhiệt độ 80°C tương tự như khi sắc theo YHCT là 1,75%, đạt khoảng 65%.

+ Kết quả thu được ở bảng 3 cho thấy:

- Hoàng bá nam cần được chế biến ngay sau khi thu hái. Nếu để lâu, hàm lượng flavonoid giảm rõ rệt. Đồng thời, khi kiểm nghiệm thuốc, cần phải xác định hàm lượng flavonoid toàn phần.

- Không nên trộn chung đồng sulfat vào gói “Bột tam hoàng” vì sẽ xảy ra phản ứng tạo phức giữa đồng sulfat và flavonoid làm giảm hàm lượng flavonoid và tác dụng của “Bột tam hoàng”. Vì vậy, đồng sulfat nên đóng gói riêng.

+ Chúng tôi đề nghị dạng đóng gói của chế phẩm “Bột tam hoàng” như sau:

Gói 1: Hoàng liên 5g, hoàng bá nam 5g, hoàng đằng 5g.

Gói 2: Đồng sulfat được dụng ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) 0,5g.

Cách dùng: Hoà gói 1 vào 1000 ml nước nóng 80°C , ngâm 10 phút. Sau đó, hoà gói 2 vào 500 ml nước ấm rồi tiếp tục ngâm 5 phút.

Tài liệu tham khảo

1). Phạm Thị Phương Anh, 2001, Nghiên cứu ảnh hưởng của phương pháp chế biến vị thuốc Hoàng liên đến thành phần hoá học và tác dụng sinh học – Luận văn thạc sĩ dược học; 2). Trần Duy Đông, 2002, góp phần tiêu chuẩn hoá chế phẩm “Bột tam hoàng” của bệnh viện Y học cổ truyền Cao bằng, Khoá luận tốt nghiệp; 3). Đỗ Tất Lợi, 1999, Những cây thuốc và vị thuốc Việt Nam; 4). Viện dược liệu Bộ Y tế Việt nam, 1985, Kỹ yếu các công trình nghiên cứu dược liệu; 5). Kee Chang Huang, The pharmacology of Chinese Herb CRC Press; 6). Pharmacopoeia of The people's republic of the China 1997.

Tạp chí Dược liệu, tập 8, số 3/2003 (trang 91-94)

NGHIÊN CỨU TÁC DỤNG BẢO VỆ GAN CỦA DƯỢC LIỆU SÀI ĐẤT

Nguyễn Thị Xuân Hoa, Phạm Văn Thanh, Phạm Kim Mãn

Viện Dược liệu

(Nhận bài ngày 19 tháng 5 năm 2003)

Summary

Evaluation of Hepatoprotective Effect of *Wedelia calendulacea* Lees

Wedelia calendulacea Lees. is used in traditional medicine as an antibacterial, demulcent, antifebrile drug. It is indicated in the treatment of phlegmon, boils, impetigo, mastitis, abscesses, systatic cold and eruptive fever.

Information on hepatoprotective properties of the plant is available abroad but not in Vietnam. This paper reports the results of pharmacological studies of the total extract from the aerial part of *Wedelia calendulacea* Less. collected in Vietnam.

- The oxidative activity was $81,1\% \pm 5,7$, $P < 0,001$ (*in vitro*)
- The decrease of the concentration of MDA in mouse liver was 25,1%, $P < 0,001$ (*in vivo*)
- The decrease of the serum glutamate pyruvic transaminase (SGPT) level was 34,1%, $P < 0,05$
- The decrease of the concentration of bilirubin in mouse serum was 10,4%, $P > 0,5$
- The increase of the bile flow in mice was 88,8%, $P < 0,001$
- *W. calendulacea* has a definit hepatoprotective effect against liver injuries caused by carbon tetrachloride.

These results show that *Wedelia calendulacea* Lees. has a good hepatoprotective effect and deserves further studies to be used for preparing drugs for treatment of liver diseases.

1. Đặt vấn đề

Sài đất là một cây thuốc sẵn có trong nước, được dùng từ lâu làm thuốc chữa bệnh viêm nhiễm có hiệu quả. Một số tài liệu trên thế giới có đề cập đến tác dụng bảo vệ gan của sài đất [1], [3], [4]. Ở Việt Nam, chưa có công trình khoa học nào nghiên cứu về tác dụng này. Do đó, chúng tôi muốn chứng minh tác dụng bảo vệ gan của sài đất Việt Nam và hy vọng mở rộng phạm vi ứng dụng của cây trong việc phòng và chữa bệnh về gan.

2. Nguyên liệu và phương pháp nghiên cứu

2.1. Nguyên liệu: Dịch chiết 1/1 từ phần trên mặt đất của cây sài đất.

2.2. Phương pháp nghiên cứu:

2.2.1. Xác định hoạt tính chống oxy hoá (HTCO) *in vitro* (theo phương pháp Blagadarov và cs.) [5].

* Nguyên tắc: Tiến hành peroxyd hoá chất lipid sẽ tạo ra một sản phẩm trung gian là malonyl dialdehyd (MDA). Xác định MDA bằng cách cho phản ứng với acid thiobarbituric tạo phức trimethin có màu hồng và đo màu ở $\lambda_{\text{Max}} = 530 - 532 \text{ nm}$.

* Tiến hành: Tạo lượng MDA từ peroxyd hoá lipid: ủ hỗn hợp 2 ml tween 80, 0,2 ml dung dịch $\text{FeSO}_4 \cdot 10^{-3} \text{ M}$; 0,2 ml dung dịch ascorbic 10^{-2} M và 0,2 ml dung dịch thử ở 40°C trong 48 giờ. Định lượng MDA bằng cách tạo phức màu: Lấy 2 ml dung dịch ủ trên thêm 1 ml dung dịch acid tricloacetic 30%, lắc kỹ, ly tâm lấy dịch trong. Lấy 2 ml dịch này thêm 2 ml acid thiobarbituric 0,25%. Đo màu ở $\lambda = 530 - 532 \text{ nm}$.

* Tính toán:

$$\% \text{HTCO} = \frac{D_{tr} - D_{th}}{D_{tr}}$$

Trong đó: D_{tr} : Mật độ quang của mẫu trắng.

D_{th} : Mật độ quang của mẫu thử.

Số liệu được xử lý theo phương pháp thống kê.

2.2.2. Xác định hoạt tính chống oxy hoá *in vivo* thông qua hàm lượng MDA ở gan (theo phương pháp Stroeve E.A và Makarova V.G (1989)) [2].

* Nguyên tắc: Dựa vào sản phẩm của quá trình peroxyd hoá lipid có khả năng phản ứng với acid thiobarbituric tạo phức màu hồng.

* Tiến hành: Chuột có trọng lượng 20-22g, chia thành các lô như sau:

- Lô đối chứng gây bệnh: Gây viêm gan bằng dung dịch CCl_4 10% pha trong dầu olive. Tiêm phúc mạc 3 lần, tiêm lần trước cách lần sau 2 ngày với liều tiêm 0,2 ml cho 20 gam trọng lượng chuột.

- Lô gây bệnh và thử thuốc: Gây bệnh như ở lô trên và song song cho uống thuốc với liều 10 g được liều cho 1 kg trọng lượng chuột, uống 8 ngày liên kể từ hôm bắt đầu gây bệnh.

- Lô đối chứng sinh lý: Tiêm dầu olive với số lần và thể tích tương đương 2 lô trên.

Lô đối chứng gây bệnh và đối chứng sinh lý: cho uống nước cất với cùng số lần và thể tích tương đương ở lô thử thuốc.

Sau 8 ngày giết chuột, lấy gan rửa sạch bằng nước muối sinh lý. Cân chính xác 100 mg gan. Sau đó, thêm 5 ml dung dịch đệm tris pH=7,4, nghiền kỹ. Hút 2 ml dịch sau khi nghiền, thêm vào đó 0,2 ml dung dịch $\text{FeSO}_4 \cdot 10^{-3} \text{ M}$, 0,2 ml dung dịch acid ascorbic 10^{-2} M . Ủ hỗn hợp trên ở 37°C trong 15 phút. Sau đó thêm vào 1 ml acid tricloacetic 30%, lắc kỹ, ly tâm ở 4200 vòng/phút. Lấy 2 ml dịch trong sau ly tâm, thêm vào đó 0,2 ml dung dịch HCl 0,5N và 2 ml dung dịch acid thiobarbituric 0,25%. Lắc kỹ, đun ở nhiệt độ 100°C trong 15 phút. Để nguội đến nhiệt độ phòng, đo mật độ quang ở bước sóng $\lambda=532 \text{ nm}$.

2.2.3. Xác định hoạt độ các men GPT (theo kỹ thuật của Reiman, Frankel)

* Nguyên tắc: Cơ chất 2-oxoglutarat và L-alanin phản ứng với nhau được xúc tác bởi GPT trong huyết thanh. Sản phẩm cuối cùng của phản ứng là NAD^+ , đo mật độ quang NAD^+ ở bước sóng $\lambda=365 \text{ nm}$ biết được hàm lượng GPT trong huyết thanh.

Quá trình phản ứng xảy ra như sau:

2-oxoglutarat + L-alanin $\xrightleftharpoons{\text{GPT}}$ L-glutamat + pyruvat.

Pyruvat + $\text{NADH} + \text{H}^+$ $\xrightleftharpoons{\text{LDH}}$ Lactat + NAD^+

* Tiến hành: Dùng thí nghiệm 2.2.2, trước khi lấy gan, lấy máu chuột, ly tâm ở 4200 vòng/phút trong 15 phút, lấy huyết thanh định lượng GPT.

2.2.4. Xác định bilirubin

* Nguyên tắc: Liên kết albumin bilirubin được giải phóng bằng một chất phân giải. Cho bilirubin phản ứng với dicloroanilin để tạo màu đỏ. Sau đó đo mật độ quang ở $\lambda=546 \text{ nm}$. Từ đó tính ra hàm lượng bilirubin.

* Tiến hành: Cũng như trong thí nghiệm 2.2.3., lấy một phần huyết thanh định lượng bilirubin.

2.2.5. *Xác định hình ảnh tổ chức học giải phẫu bệnh lý gan:*

Quan sát đại thể và vi thể của tổ chức gan.

2.2.6. *Xác định tác dụng lợi mật ở chuột nhắt (theo phương pháp Rudi)*

* Tiến hành: Dùng chuột nhắt trắng khỏe mạnh, không phân biệt đực cái, trọng lượng 30-32 g là loại chuột nhắt đạt tiêu chuẩn thí nghiệm do Trung tâm vaccin của Viện Vệ sinh dịch tễ cung cấp.

Cho chuột uống thuốc trước 3 ngày, ngày thứ 4: cho uống thuốc, sau 30 phút, mổ bụng, thắt ống mật chủ, khâu vết mổ lại, sau 30 phút, giết chuột,

bóc tách mật. Mật bóc tách được thấm vào giấy lọc rồi cân tươi ngay được m_1 (mg). Rạch túi mật, cho mật chảy ra hết rồi thấm vào giấy lọc, cân lại được m_2 (mg). Lượng mật của mỗi con là : $m = m_1 - m_2$ (mg). Lượng mật tăng (L%) tính theo công thức:

$$L\% = \frac{m_1 - m_c}{m_c} \times 100$$

3. Kết quả nghiên cứu

3.1. Hoạt tính chống oxy hóa (HTCO) in vitro

Từ dịch chiết cồn 1/1 pha loãng thành các nồng độ khác nhau, cho tham gia vào peroxyd hóa, đo lượng MDA và tính %HTCO. Kết quả được ghi ở bảng 1 và bảng 2.

Bảng 1: Hoạt tính chống oxy hoá ở các nồng độ khác nhau

Số mẫu	Hoạt tính chống oxy hoá (%) ở các nồng độ pha loãng							
	1/4	1/8	1/16	1/32	1/64	1/128	1/192	1/256
3	64	76,9	82,5	82,8	83,7	74,9	45,2	32

Bảng 2: Hoạt tính chống oxy hoá in vitro (với n = 7) xác định từ nồng độ có hoạt tính tối ưu

Mẫu	Nồng độ	Số mẫu	% HTCO	P
Cao toàn phần	1/64	7	83,1 ± 5,7	< 0,001

3.2. Xác định hoạt tính chống oxy hoá in vivo bằng việc xác định hàm lượng MDA ở gan

Kết quả nghiên cứu của dịch chiết sải đất trên hoạt tính chống oxy hoá in vitro được ghi ở bảng 3.

Bảng 3: Sự thay đổi hàm lượng MDA của gan chuột

STT	Lô thí nghiệm	Số chuột	D _{MDA}	Giảm so với gây bệnh (%)
1	Đối chứng SL	10	0,343 ± 0,008	
2	Đối chứng BL	9	0,514 ± 0,020	
3	Uống cao toàn phần	12	0,385 ± 0,010	25,1%; t= 6,8; P < 0,001

3.3. Xác định hoạt độ các men GPT

Kết quả nghiên cứu của dịch chiết sải đất trên hoạt tính của GPT được ghi ở bảng 4.

Bảng 4: Hàm lượng GPT trong huyết thanh của chuột thực nghiệm

STT	Lô thí nghiệm	Số chuột	GPT (U/ L)	Giảm so với gây bệnh (%)
1	Đối chứng SL	10	35,44 ± 1,62	
2	Đối chứng BL	8	140,13 ± 16,64	
3	Uống cao toàn phần	11	92,32 ± 15,21	34,1; t = 2,1; P < 0,05

3.4. Xác định bilirubin

Kết quả nghiên cứu trên bilirubin được ghi ở bảng 5.

Bảng 5: Sự thay đổi hàm lượng bilirubin trong huyết thanh chuột

STT	Lô thí nghiệm	Số chuột	Bilirubin ($\mu\text{mol/l}$)	Giảm so với gây bệnh (%)
1	Chứng SL	10	$1,94 \pm 0,14$	
2	Chứng BL	10	$2,98 \pm 0,28$	
3	Uống cao toàn phần	11	$2,67 \pm 0,40$	10,4; T = 0,6; P > 0,5

3.5. Xác định hình ảnh tổ chức học giải phẫu bệnh lý gan:

Chuột có trọng lượng 20-22g, được nuôi trong cùng điều kiện. Gây viêm hoại tử gan bằng

cách tiêm CCl_4 10% trong dầu thực vật. Đồng thời, cho chuột uống thuốc cần thử. Sau 8 ngày, giết chuột lấy gan, cắt và nhuộm vi phẫu gan để quan sát dưới kính hiển vi. Kết quả được ghi ở bảng 6.

Bảng 6: Kết quả xét nghiệm vi thể gan chuột thực nghiệm

Chuột sinh lý	Chuột bệnh lý (Tiêm CCl_4)	Chuột bệnh lý uống cao toàn phần
- Tế bào gan không thoái hóa, không có ổ hoại tử, khoảng cửa không có xâm nhập viêm. Các tĩnh mạch cửa và tĩnh mạch trung tâm tiểu thùy không có xung huyết. Gan bình thường. KL: Khoảng cửa không viêm, không xung huyết.	- Các tĩnh mạch trung tâm tiểu thùy và tĩnh mạch cửa giãn rộng, đặc biệt là tĩnh mạch khoảng cửa. Khoảng cửa có xâm nhập viêm rõ. Trong nhu mô gan có các ổ hoại tử, thoái hóa hốc của tế bào gan và xâm nhập tế bào viêm. KL: Dẫn tĩnh mạch; hoại tử + tế bào viêm.	- Tĩnh mạch cửa giãn nhẹ, tĩnh mạch trung tâm tiểu thùy không giãn, khoảng cửa xâm nhập viêm nhẹ. Tế bào gan có một số nơi thoái hóa nhỏ và xâm nhập viêm. KL: 1 ổ thoái hóa tế bào + viêm.

3.6. Xác định tác dụng lợi mật ở chuột nhắt

Kết quả thử tác dụng lợi mật của dịch chiết sài đất được ghi ở bảng 7.

Bảng 7: Kết quả thử tác dụng lợi mật

STT	Lô thí nghiệm	Số chuột	Lượng mật (mg)	% tăng so với lô đối chứng sinh lý
1	Chứng SL	10	$15,2 \pm 1,9$	
2	Uống cao toàn phần	11	$28,7 \pm 3,6$	88,8; t = 3,2; P < 0,001

4. Kết luận và bàn luận

- Năm 1989, Sharma AK và cs. đã đưa ra kết luận là dịch chiết cồn của toàn bộ cây sài đất thể hiện hiệu lực bảo vệ cao chống lại sự phá hại gan trên mô hình gây viêm gan bằng tetrachlorur carbon *in vivo* và làm tăng lưu lượng mật ở chuột cống [1].

- Năm 1994, Lin SC và cs. đã nghiên cứu hiệu lực bảo vệ gan của sài đất trên ba mô hình gây độc cho gan là tetrachlorur carbon, acetaminophen trên chuột nhắt và D(+)-galactosamin trên chuột cống

và đã kết luận sài đất làm giảm men transaminaza, tiến triển tốt về mặt tổ chức học [4].

Những kết quả mà chúng tôi nghiên cứu phù hợp với các tác giả trên. Sài đất có tác dụng làm giảm hàm lượng MDA (25,1%), men GPT (34,1%), và cải thiện về mặt tổ chức học trên mô hình gây bệnh bằng tetrachlorur carbon. Cũng trên mô hình đó, hàm lượng bilirubin trong huyết thanh giảm (10,4%). Ngoài ra, cao toàn phần của sài đất còn có tác dụng lợi mật rõ rệt (88,8%) và hoạt tính chống oxy hóa mạnh (83,1%).

(Xem tiếp trang 96)

THÀNH PHẦN HOÁ HỌC CỦA TINH DẦU CÂY MÀNG TANG MỘC HOANG Ở VÙNG NÚI BẠCH MÃ

Nguyễn Thị Tâm¹⁾, Trần Duy Minh²⁾, Trần Quang Thuý³⁾

¹⁾Trường đại học Dược Hà Nội, ²⁾Công ty dược trung ương Huế, ³⁾Viện Dinh dưỡng Hà Nội

Summary

Chemical Composition of *Litsea cubeba* Oil Growing Wild in Bach Ma Mountains

Fruits and laeves of Litsea cubeba (Lour.) Pers. (Lauraceae) wild growing in Bach Ma were collected for oil preparation. Oil analysis were carried out by a combination of capillary GC and MS. The major components were neral and geranial (85,60%) in the fruit oil, cis-ocimene (42,84%) and cineol (10,54%) in the leaf oil.

Key words: *Litsea cubeba* (Lour.) Pers., Lauraceae, Fruit and Leaf Oils, Neral, Geranial, cis-Ocimen

Mở đầu

Tiếp theo các công trình nghiên cứu về thành phần hoá học của tinh dầu cây màng tang mộc hoang ở một số tỉnh phía Bắc¹⁾ và Ba Vì²⁾, chúng tôi tiếp tục khảo sát có tính chất ngẫu nhiên một mẫu quả và lá cây màng tang (*Litsea cubeba* (Lour.) Pers.) mọc ở chân núi Bạch Mã thuộc tỉnh Thừa Thiên - Huế. Cây cao khoảng 5m, lá mọc so le, thuôn dài, , mặt trên xanh sẫm, mặt dưới nhạt. Quả nhỏ như quả hồ tiêu, khi còn tươi màu xanh, lúc khô có màu đen.

Lá và quả được cắt lấy tinh dầu. Tinh dầu được phân tích bằng phương pháp sắc ký khí kết hợp với khối phổ.

Nguyên liệu và phương pháp nghiên cứu

Nguyên liệu: Quả và lá cây màng tang thu hái vào tháng 8/2001.

Phương pháp nghiên cứu:

- Xác định hàm lượng tinh dầu bằng phương pháp cất kéo hơi nước với dụng cụ "Định lượng tinh dầu cải tiến" của Bộ môn dược liệu - Trường đại học Dược Hà Nội. Hàm lượng tinh dầu được tính trên trọng lượng khô tuyệt đối của dược liệu.
- Xác định thành phần tinh dầu bằng phương pháp sắc ký khí kết hợp khối phổ (GC/MS). Điều kiện tiến hành: Máy SKK GC-17A, cột capillar SPB5, Detector GCMS-QP 5050A, khí mang He, nhiệt độ 60-200 °C (tốc độ tăng nhiệt độ 4°C/min.), nhiệt độ buồng tiêm 250°C, nhiệt độ detector 280°C.

Kết quả và thảo luận

Bằng phương pháp sắc ký khí kết hợp với khối phổ, đã xác định được 27 thành phần trong tinh dầu lá và 16 thành phần trong tinh dầu quả. Thành phần chính của tinh dầu quả là citral (85,60%), gồm neral (38,77%) và geranial (46,83%). Các hợp chất hydrocarbon monoterpenic tồn tại ở hàm lượng rất thấp, chỉ duy nhất có l-limonen (2,14%). Các thành phần chứa oxy khác cũng như các hợp chất sesquiterpen chỉ chiếm trên dưới 1%.

Thành phần chính của tinh dầu lá là cis-ocimen (42,84%) và cineol (10,54%); ngoài ra, còn có linalol (2,07%), terpinen-4-ol (3,65%) và α -terpineol (3,65%). Các hợp chất hydrocarbon monoterpenic chiếm 74,56%.

Như vậy, với hàm lượng tinh dầu ở quả là 8,75% và hàm lượng citral trong tinh dầu là 85,60%, cây màng tang Bạch Mã là nguồn nguyên liệu cho tinh dầu giàu citral rất đáng được quan tâm nghiên cứu. Tinh dầu lá có thành phần chính là cis-ocimen và các hydrocarbon monoterpenic khác, không có giá trị kinh tế; nhưng về nghiên cứu cơ bản, cây màng tang đã đóng góp thêm một typ hoá học mới bên cạnh các typ giàu linalol, cineol và sabinen mà Nguyễn Thị Tâm và cs. đã công bố trong một bài báo trước đây. Hơn nữa, màng tang là cây rất đa dạng về mặt sinh học, trong cùng một vùng đã thể hiện nhiều chủng hoá học khác nhau như ở Ba Vì²⁾. Vì vậy, có thể ở Bạch Mã cũng tồn tại những chủng hoá học khác mà lá cho tinh dầu có giá trị kinh tế cao.

Kết quả phân tích định tính và định lượng tinh dầu lá và quả màng tang Bạch Mã

SIT	Thành phần	Tinh dầu quả	Tinh dầu lá
1	α -Thujen	-	1,27
2	α -Pinen	-	8,63
3	camphen	-	0,10
4	cis-Ocimen	-	42,68
5	β -Pinen	-	8,90
6	Methylheptenon	0,50	-
7	Myrcen	-	3,44
8	α -Phellandren	-	0,09
9	δ -4-Caren	-	0,60
10	α -Terpinen	-	0,67
11	p-Cymen	-	0,21
12	β -Phellandren	-	6,21
13	l-Limonen	2,14	-
14	l,8-Cineol	0,37	10,54
15	Alloocimen	-	0,68
16	γ -Terpinen	-	1,28
17	Sabinenhydrat (cis)	-	2,11
18	Linalol oxid	0,28	-
19	α -Terpinolen	-	0,32
20	Linalol	2,33	2,07
21	Sabinenhydrat (trans)	-	0,19
22	Thujol	-	0,09
23	1,6-heptadien-3,5-dimethyl	0,29	-
24	Citronelal	1,05	0,39
25	Limonen oxid	1,26	-
26	Terpinen-4-ol	-	3,65
27	Dipenten oxid	2,28	-
28	α -Terpineol	0,64	3,65
29	2,3-epoxygeranial	0,99	-
30	Neral	38,77	0,16
31	Geranial	46,83	0,19
32	β -Caryophyllen	-	1,75
33	α -Humulen	-	0,15
34	Germacren D	-	0,02
35	Caryophyllen oxid	0,85	-
36	Hexadecen	0,69	-
37	Eicosan	0,50	-
	Hàm lượng tinh dầu	8,75	2,81

Tài liệu tham khảo

- 1). Nguyễn Thị Tâm, Vũ Văn Anh, A. Muselli, A. Bighelli, J-M. Bessiere, J. Casanova. *Tạp chí Dược liệu*, Tập 7, số 5 năm 2002, tr. 141-144; 2). Nguyễn Thị Tâm, Vũ Văn Anh, Trần Quang Thuỷ. *Tạp chí Dược liệu*, Tập 8, số 2 năm 2003, tr. 35-40.

(Tiếp theo trang 94)

Tài liệu tham khảo

- 1). Sharma AK, Anand KK, Pushpangadan P, Chandon BK, Chopra CL, et al. (1989), "Hepatoprotective effects of *Wedelia calendulacea*", *J. Ethnopharmacol*, 25, pp. 93-102; 2). Stroeve E. A., Makarova V. G. (1989), *Determination of lipid peroxydation rate in tissue homogenates. Laboratory manual in biochemistry*. Moscow, pp. 243-256; 3). Emmanuel S., Amalraj T. & Ignacimuthu S. (2001), "Hepatoprotective effect of coumestans isolated from the leaves of *Wedelia calendulacea* Less. in paracetamol induced liver damage". (information in internet, [http://www. Gcom.net.au/steve](http://www.Gcom.net.au/steve)); 4). Lin SC, Lin CC, Lin YH, Shynn SJ. (1994), "Hepatoprotective effects of Taiwan folk medicine: *Wedelia chinensis* on three hepatotoxin-induced hepatotoxicity", *Am Journal Chin Med* -, 22 (2), pp. 155-68; 5). Благодоров С.Г. и авторы (1987), *Метод определения антиоксидантной активности*, Хим-фарм. Журнал, № 3.