

BỘ GIÁO DỤC VÀ ĐÀO TẠO

BỘ Y TẾ

TRƯỜNG ĐẠI HỌC DƯỢC HÀ NỘI



HỒ THỊ THANH HUYỀN

**NGHIÊN CỨU ĐẶC ĐIỂM THỰC VẬT,
THÀNH PHẦN HÓA HỌC VÀ MỘT SỐ
TÁC DỤNG SINH HỌC CỦA CÂY GẠO
(*Bombax malabaricum* DC., họ Gạo Bombacaceae)**

LUẬN ÁN TIẾN SĨ DƯỢC HỌC

HÀ NỘI, NĂM 2014

BỘ GIÁO DỤC VÀ ĐÀO TẠO

BỘ Y TẾ

TRƯỜNG ĐẠI HỌC DƯỢC HÀ NỘI

HỒ THỊ THANH HUYỀN

**NGHIÊN CỨU ĐẶC ĐIỂM THỰC VẬT,
THÀNH PHẦN HÓA HỌC VÀ MỘT SỐ
TÁC DỤNG SINH HỌC CỦA CÂY GẠO**
(*Bombax malabaricum* DC., họ Gạo Bombacaceae)

LUẬN ÁN TIẾN SĨ DƯỢC HỌC

CHUYÊN NGÀNH: Dược học cổ truyền

MÃ SỐ: 62.72.04.06

Người hướng dẫn khoa học: PGS.TS. Nguyễn Thái An
PGS.TS. Thái Nguyễn Hùng Thu

HÀ NỘI, NĂM 2014

LỜI CAM ĐOAN

Tôi xin cam đoan Luận án này là công trình nghiên cứu của riêng tôi dưới sự hướng dẫn của PGS. TS. Nguyễn Thái An và PGS. TS. Thái Nguyễn Hùng Thu.

Các kết quả trình bày trong luận án là trung thực và chưa từng được công bố trong bất kỳ công trình nào khác.

Tác giả luận án

Hồ Thị Thanh Huyền

LỜI CẢM ƠN

Trong quá trình thực hiện luận án, tôi đã nhận được sự ủng hộ và tạo điều kiện của Đảng ủy, Ban giám hiệu Trường Đại học Dược Hà Nội và Bộ môn Dược liệu nơi tôi học tập, nghiên cứu.

*Tôi xin bày tỏ lòng biết ơn sâu sắc tới **PGS.TS. Nguyễn Thái An** và **PGS.TS. Thái Nguyễn Hùng Thu**, là những người Thầy đã hướng dẫn và truyền đạt nhiều kinh nghiệm quý báu trong nghiên cứu khoa học cho tôi.*

Tôi xin chân thành cảm ơn GS.TS Phạm Thanh Kỳ, PGS. TS. Nguyễn Trọng Thông, PGS. TS Phan Văn Kiệm, PGS. TS Trần Huy Thái, PGS. TS Nguyễn Khắc Khôi, TS. Phạm Thị Vân Anh đã góp ý cho tôi trong quá trình nghiên cứu và hoàn thiện luận án.

Trong quá trình thực hiện luận án, tôi đã nhận được sự hợp tác nghiên cứu của các cơ quan: Viện Sinh thái và Tài nguyên sinh vật, Viện Hóa học các hợp chất thiên nhiên, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam, Bộ môn Dược lý trường Đại học Y Hà Nội, Trung tâm Kiểm nghiệm thuốc. Đồng thời, tôi cũng nhận được sự đóng góp quý báu của các Thầy Cô giáo, các nhà khoa học thuộc nhiều lĩnh vực.

Nhân dịp này tôi cũng xin trân trọng cảm ơn sự giúp đỡ nhiệt tình của các thầy cô, các anh chị em đồng nghiệp tại bộ môn Dược liệu, bộ môn Dược học cổ truyền và bộ môn Thực vật, các phòng ban trong trường đã luôn tạo điều kiện tốt nhất để tôi hoàn thành luận án. Cảm ơn các học trò đã luôn sát cánh cùng tôi trong suốt quá trình nghiên cứu vừa qua.

Lời sau cùng, xin được bày tỏ lòng biết ơn chân thành tới những người bạn, người thân trong gia đình và nhất là bố, mẹ, đã luôn kịp thời động viên và tạo mọi điều kiện thuận lợi nhất để tôi hoàn thành luận án. Xin cảm ơn người chồng thân yêu đã luôn giúp đỡ, chia sẻ với tôi trong những năm tháng qua.

Xin trân trọng cảm ơn tất cả sự giúp đỡ quý báu này.

Hồ Thị Thanh Huyền

MỤC LỤC

LỜI CAM ĐOAN	ii
LỜI CẢM ƠN	iii
DANH MỤC KÝ HIỆU, CHỮ VIẾT TẮT	vii
DANH MỤC BẢNG	x
DANH MỤC HÌNH VẼ	xii
ĐẶT VẤN ĐỀ	1
CHƯƠNG 1 TỔNG QUAN	3
1.1. ĐẶC ĐIỂM THỰC VẬT.....	3
1.1.1. Họ Gạo (<i>Bombacaceae</i> L.)	3
1.1.2. Chi <i>Bombax</i> L.	4
1.1.3. <i>Bombax malabaricum</i> DC. (<i>Bombax ceiba</i> L.)	8
1.2. THÀNH PHẦN HÓA HỌC CỦA MỘT SỐ LOÀI THUỘC CHI	
<i>Bombax</i> L.	13
1.2.1. Loài <i>Bombax anceps</i> Pierre.	13
1.2.2. Loài <i>Bombax costatum</i> Pellegr & Vuillet.....	16
1.2.3. Loài <i>Bombax malabaricum</i> DC.	16
1.3. TÁC DỤNG SINH HỌC VÀ CÔNG DỤNG.....	28
1.3.1. Độc tính.....	28
1.3.2. Tác dụng sinh học	29
1.3.3. Công dụng.....	35
CHƯƠNG 2 NGUYÊN VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU	40
2.1. NGUYÊN VẬT LIỆU NGHIÊN CỨU	40
2.1.1. Nguyên liệu nghiên cứu	40
2.1.2. Động vật thí nghiệm	41
2.1.3. Hóa chất và thiết bị	41
2.1.4. Địa điểm nghiên cứu	43
2.2. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU.....	43

2.2.1. Nghiên cứu về thực vật	43
2.2.2. Nghiên cứu thành phần hóa học	43
2.2.3. Phương pháp đánh giá độc tính cấp và tác dụng sinh học.....	44
2.2.4. Phương pháp xử lý số liệu	51
CHƯƠNG 3 KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU.....	53
3.1. NGHIÊN CỨU VỀ THỰC VẬT	53
3.1.1. Mô tả đặc điểm hình thái thực vật và giám định tên khoa học cây Gạo	53
3.1.2. Đặc điểm vi học và cấu tạo giải phẫu.....	55
3.2. NGHIÊN CỨU THÀNH PHẦN HÓA HỌC.....	58
3.2.1. Định tính các nhóm chất thường có trong dược liệu	58
3.2.2. Chiết xuất và phân lập các hợp chất từ lá và vỏ thân cây Gạo	60
3.2.3. Nhận dạng các hợp chất phân lập từ các bộ phận của cây Gạo.....	64
3.2.4. Xây dựng phương pháp xác định hàm lượng một số hợp chất có trong cây Gạo	94
3.3. ĐÁNH GIÁ ĐỘC TÍNH CẤP VÀ THỦ TÁC DỤNG SINH HỌC	104
3.3.1. Đánh giá độc tính cấp của cao nước vỏ thân, lá và hoa cây Gạo	104
3.3.2. Tác dụng giảm đau.....	107
3.3.3. Tác dụng chống viêm cấp	109
3.3.4. Tác dụng chống viêm mạn.....	112
3.3.5. Tác dụng cầm máu qua đánh giá thời gian chảy máu, đông máu.....	113
3.3.6. Tác dụng bảo vệ gan và chống oxy hóa.....	115
CHƯƠNG 4 BÀN LUẬN.....	121
4.1. VỀ THỰC VẬT	121
4.2. VỀ THÀNH PHẦN HÓA HỌC	123
4.2.1. Về kết quả định tính.....	124
4.2.2. Về kết quả phân lập các hợp chất	124
4.2.3. Về kết quả xác định hàm lượng một số hợp chất	129

4.3. VỀ ĐỘC TÍNH VÀ TÁC DỤNG SINH HỌC	132
4.3.1. Độc tính.....	133
4.3.3. Về tác dụng chống viêm	136
4.3.4. Về tác dụng cầm máu.....	140
4.3.5. Về tác dụng bảo vệ gan và chống oxy hóa	142
KẾT LUẬN VÀ KIẾN NGHỊ.....	146
CÁC CÔNG TRÌNH ĐÃ CÔNG BỐ LIÊN QUAN ĐẾN LUẬN ÁN TIẾN SĨ	
DƯỢC HỌC	
TÀI LIỆU THAM KHẢO	
DANH MỤC CÁC PHỤ LỤC CỦA LUẬN ÁN	

DANH MỤC KÝ HIỆU, CHỮ VIẾT TẮT

δ	Độ dịch chuyển hóa học
$^1\text{H-NMR}$	Proton nuclear magnetic resonance – Phổ cộng hưởng từ proton
$^{13}\text{C-NMR}$	Carbon (13) nuclear magnetic resonance – Phổ cộng hưởng từ hạt nhân ^{13}C
AGC	Apigenin 7-O- β -D-glucuronopyranosid
ALAT	Alanin aminotransfera
APG	Angiosperm Phylogeny Group
As	Ánh sáng
AST	Ánh sáng thường
ASAT	Aspartat aminotransfera
BBL	Cần toàn phần chiết xuất từ lá cây Gạo
BBL-H	Cần phân đoạn n-hexan chiết xuất từ lá cây Gạo
BBL-C	Cần phân đoạn cloroform chiết xuất từ lá cây Gạo
BBL-E	Cần phân đoạn ethyl acetat chiết xuất từ lá cây Gạo
BBL-W	Cần phân đoạn nước chiết xuất từ lá cây Gạo
BBV	Cần toàn phần chiết xuất từ vỏ thân cây Gạo
BBV-H	Cần phân đoạn n-hexan chiết xuất từ vỏ thân cây Gạo
BBV-C	Cần phân đoạn cloroform chiết xuất từ vỏ thân cây Gạo
BBV-E (VGE)	Cần phân đoạn ethyl acetat chiết xuất từ vỏ thân cây Gạo
BBV-W	Cần phân đoạn nước chiết xuất từ vỏ thân cây Gạo
B.	<i>Bombax</i>
BHA	Butyl hydroxylanisol
CTCP	Công ty cổ phần
CTHH	Công thức hóa học
CTPT	Công thức phân tử

CTSK	Chương trình sắc ký
d	Doublet – đỉnh đôi
dd	Doublet of doublet
dl	Dược liệu
DĐVN	Dược điển Việt Nam
DEPT	Distortionless Enhancement by Polarization Transfer
DMSO	Dimethyl sulfosid
DPPH	2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl
ESI-MS	Electron Spray Ionization Mass Spectrometry
EtOAc	Ethyl acetat
GSH	Glutathion
Glc	Glucose
HCKNST	Hồng cầu nhiễm kí sinh trùng
HG	Hoa cây Gạo
HMBC	Heteronuclear Multiple Bond Correlation
HSQC	Heteronuclear Single Quantum Coherence
IC ₅₀	Nồng độ ức chế 50% (Haft maximal inhibitory concentration)
IR	Phổ hồng ngoại (Infrared Spectroscopy)
LD ₅₀	Liều gây chết 50% (Lethal Dose, 50%)
LG	Lá cây Gạo
LOD:	Giới hạn phát hiện (Limit of Detection)
LOQ:	Giới hạn định lượng (Limit of Qualification)
m	Multiplet
<i>m/z</i>	Tỷ lệ số khối/điện tích ion
MDA	Malonyl dialdehyd
Mp	Điểm nóng chảy
MS	Mass spectrometry – Phổ khối

NAPQI	N-acetyl parabenzoquinon-imin
NMR	Nuclear Magnetic Resonance
p.	page
PAR	Paracetamol
PG	Prostaglandin
s	Singlet- đỉnh đơn
SKC	Sắc ký cột
SKC-RP	Sắc ký cột pha đảo
SKLM	Sắc ký lớp mỏng
s.c	Tiêm dưới da
t	Triplet- đỉnh ba
TLTK	Tài liệu tham khảo
TT	Thuốc thử
TW	Trung ương
UV254nm	Ultra violet– Ánh sáng tử ngoại (bước sóng 254nm)
UV365nm	Ultra violet - Ánh sáng tử ngoại (bước 365nm)
VG	Vỏ thân cây Gạo
WHO	World Health Organization -Tổ chức Y tế thế giới

DANH MỤC BẢNG

Trang

Bảng 1.1. CTHH các hợp chất phân lập từ loài <i>Bombax anceps</i> P.....	14
Bảng 1.2. CTHH của một số hợp chất có trong hoa của cây Gạo	19
Bảng 1.3. CTHH của một số hợp chất có trong rễ của cây Gạo	22
Bảng 1.4. Bảng tóm tắt thành phần hóa học của loài <i>Bombax malabaricum</i> DC.	25
Bảng 3.1. Kết quả định tính các nhóm chất hữu cơ trong lá, hoa và vỏ thân cây Gạo.....	59
Bảng 3.2. Kết quả xác định độ ẩm bột vỏ thân, lá, hoa cây Gạo	60
Bảng 3.3. Dữ liệu phổ NMR của BBV1	65
Bảng 3.4. Dữ liệu phổ NMR của BBV2	68
Bảng 3.5. Dữ liệu phổ NMR của BBV3	70
Bảng 3.6. Dữ liệu phổ NMR của BBV4	72
Bảng 3.7. Dữ liệu phổ NMR của BBV5	74
Bảng 3.8. Dữ liệu phổ NMR của BBV6	78
Bảng 3.9. Dữ liệu phổ NMR của BBV7	80
Bảng 3.10. Dữ liệu phổ NMR của BBV8	83
Bảng 3.11. Dữ liệu phổ NMR của BBL3.....	85
Bảng 3.12. Dữ liệu phổ NMR của BBL5.....	89
Bảng 3.13. Dữ liệu phổ NMR của BBL6.....	91
Bảng 3.14. Dữ liệu phổ NMR của BBL7.....	93
Bảng 3.15. Kết quả khảo sát khoảng nồng độ tuyến tính với các hợp chất.....	102
Bảng 3.16. Tổng hợp kết quả khảo sát độ đúng của các hợp chất.....	102
Bảng 3.17. Kết quả xác định hàm lượng một số hợp chất có trong mẫu vỏ thân cây Gạo.....	103
Bảng 3.18. Kết quả xác định hàm lượng một số hợp chất có trong mẫu lá Gạo	104
Bảng 3.19. Tỷ lệ chuột chết theo liều dùng thuốc trong 72 giờ sau uống cao nước toàn phần hoa cây gạo	106
Bảng 3.20. Tác dụng của cao nước và cồn phân đoạn ethyl acetat chiết xuất từ vỏ thân cây Gạo lên số cơn quặn đau của chuột nhắt trắng.....	107

Bảng 3.21. Tác dụng của cao nước và cồn phân đoạn ethyl acetat chiết xuất từ vỏ thân cây Gạo lên thời gian phản ứng với nhiệt của chuột	108
Bảng 3.22. Tác dụng của cao nước và cồn phân đoạn ethyl acetat chiết xuất từ vỏ thân cây Gạo trên mô hình gây phù chân chuột.....	109
Bảng 3.23. Tác dụng của cao nước và cồn phân đoạn ethyl acetat chiết xuất từ vỏ thân cây Gạo lên thể tích dịch rỉ viêm	110
Bảng 3.24. Tác dụng của cao nước và cồn phân đoạn ethyl acetat chiết xuất từ vỏ thân cây Gạo lên hàm lượng protein trong dịch rỉ viêm.....	111
Bảng 3.25. Tác dụng của cao nước và cồn phân đoạn ethyl acetat chiết xuất từ vỏ thân cây Gạo lên số lượng bạch cầu trong dịch rỉ viêm	111
Bảng 3.26. Tác dụng của cao nước và cồn phân đoạn ethyl acetat chiết xuất từ vỏ thân cây Gạo lên trọng lượng u hạt.....	112
Bảng 3.27. Tác dụng của VG lên thời gian chảy máu	113
Bảng 3.28. Tác dụng của VG lên thời gian đông máu.....	114
Bảng 3.29. Tác dụng của VG lên số lượng tiểu cầu trong máu ngoại vi.....	115
Bảng 3.30. Tác dụng của LG lên khối lượng gan chuột bị gây độc bằng PAR	116
Bảng 3.31. Tác dụng của LG lên hoạt độ ASAT trong huyết thanh chuột bị gây độc bằng PAR.....	116
Bảng 3.32. Tác dụng của LG lên hoạt độ ALAT trong huyết thanh chuột bị gây độc bằng PAR.....	117
Bảng 3.33. Tác dụng của LG lên hàm lượng MDA gan chuột nhắt bị gây độc bằng PAR.....	118
Bảng 3.34. Tác dụng của LG lên sự thay đổi đại thể gan chuột nhắt trắng trên mô hình gây độc gan bằng PAR	120
Bảng 3.35. Tác dụng của LG lên sự thay đổi vi thể gan chuột nhắt trắng trên mô hình gây độc gan bằng PAR	120
Bảng 4.1. Các chất phân lập được từ loài <i>Bombax malabaricum</i> DC.	124

DANH MỤC HÌNH VẼ

Trang

Hình 1.1. Hình ảnh hoa và lá của loài <i>Bombax insigne</i> Wall. [213].....	6
Hình 1.2. Hình ảnh loài <i>Bombax anceps</i> Pierre.	7
Hình 1.3. Hình ảnh loài <i>Bombax malabaricum</i> DC.	9
Hình 1.4. Đặc điểm hình thái của loài <i>Bombax malabaricum</i> DC. [108].....	11
Hình 1.5. Hình ảnh cây Gạo tại Đền Mỗ (Hải Phòng).....	12
Hình 2.1. Mẫu cao nước vỏ thân cây Gạo.....	40
Hình 2.2. Nguyên liệu các bộ phận cây Gạo.....	41
Hình 2.3. Quy trình nghiên cứu tác dụng bảo vệ gan và chống oxy hoá trên mô hình gây tổn thương gan bằng paracetamol	50
Hình 2.4. Phản ứng tạo phức trimethine	51
Hình 3.1. Cây Gạo	53
Hình 3.2. Đặc điểm hình thái <i>Bombax malabaricum</i> DC.	54
Hình 3.3. Đặc điểm hình thái hoa của <i>Bombax malabaricum</i> DC.....	54
Hình 3.4. Vi phẫu lá cây Gạo	55
Hình 3.5. Vi phẫu cành cây Gạo	56
Hình 3.6. Đặc điểm bột hoa cây Gạo	57
Hình 3.8. Đặc điểm bột vỏ thân cây Gạo	58
Hình 3.9. Sơ đồ phân lập các hợp chất từ vỏ thân cây Gạo	61
Hình 3.10. Sơ đồ phân lập các hợp chất từ lá cây Gạo	63
Hình 3.11. Ảnh chụp tinh thể BBV1 (dưới KHV vật kính 40).....	64
Hình 3.12. Cấu trúc hóa học của BBV1 (lupeol).	66
Hình 3.13. Ảnh chụp tinh thể BBV2 (dưới KHV vật kính 40).....	67
Hình 3.14. Cấu trúc hóa học của BBV2 (friedelin)	69
Hình 3.15. Ảnh chụp kết tinh của BBV3	69
Hình 3.16. Cấu trúc hóa học và một số tương tác HMBC của BBV3	71
Hình 3.17. Ảnh chụp tinh thể BBV4 (dưới KHV vật kính 10).....	72

Hình 3.18. Cấu trúc hóa học của BBV4.....	73
Hình 3.19. Cấu trúc hóa học và một số tương tác HMBC của BBV5	75
Hình 3.20. Một số mảnh phân tử chính trên phổ khối của BBV5	75
Hình 3.21. Ảnh chụp tinh thể BBV6 (dưới KHV vật kính 40).....	76
Hình 3.22. Cấu trúc hóa học của BBV6.....	77
Hình 3.23. Một số tương tác HMBC chính của hợp chất BBV6	79
Hình 3.24. Cấu trúc hóa học của BBV7 (stigmasterol).	81
Hình 3.25. Cấu trúc hóa học của BBV8.....	83
Hình 3.26. Ảnh chụp tinh thể BBL3 (dưới KHV vật kính 40)	84
Hình 3.27. Một số tương tác chính của hợp chất BBL3.	86
Hình 3.28. Cấu trúc hoá học của BBL3.	86
Hình 3.29. Ảnh chụp tinh thể BBL5 (dưới KHV vật kính 40)	87
Hình 3.30. Các tương tác HMBC chính của BBL5	88
Hình 3.31. Cấu trúc hóa học của BBL5	88
Hình 3.32. Ảnh chụp tinh thể BBL6 (dưới KHV vật kính 40)	90
Hình 3.33. Cấu trúc hóa học của BBL6	92
Hình 3.34. Ảnh chụp tinh thể BBL7 (dưới KHV vật kính 40)	92
Hình 3.35. Cấu trúc hóa học của BBL7	94
Hình 3.36. Sắc ký đồ của hỗn hợp 6 hợp chất phân lập từ vỏ thân cây Gạo	96
Hình 3.37. Sắc ký đồ của mẫu thử chuẩn bị từ vỏ thân cây Gạo.	96
Hình 3.38. Sắc ký đồ của hỗn hợp 7 hợp chất phân lập từ lá cây Gạo	97
Hình 3.39. Sắc ký đồ của mẫu thử chuẩn bị từ lá cây Gạo.	97
Hình 3.40. Sắc ký đồ của một số hợp chất phân lập được từ vỏ thân cây Gạo.	97
Hình 3.41. Sắc ký đồ của một số hợp chất phân lập được từ lá cây Gạo	98
Hình 3.42. So sánh phổ khối lượng tương ứng với pic một số hợp chất trên sắc ký đồ (trái) và khi đo để nhận dạng cấu trúc (phải) có trong vỏ thân cây Gạo	99

Hình 3.43. So sánh phổ khối lượng tương ứng với pic một số hợp chất trên sắc ký đồ (trái) và khi đo để nhận dạng cấu trúc (phải) có trong lá cây Gạo ...	100
Hình 3.44. Đồ thị biểu diễn tương quan tuyến tính giữa liều dùng cao nước toàn phần hoa cây Gạo và tỷ lệ chuột chết.....	106
Hình 3.45. Hình ảnh vi thể gan	119

ĐẶT VẤN ĐỀ

Cây Gạo trong dân gian còn thường được gọi với tên khác là Mộc miên, Cổ bối, Ban chi hoa, Anh hùng thụ... Cây Gạo là loài cây quen thuộc với người dân Việt Nam, nhất là ở những vùng nông thôn miền Bắc.

Cây Gạo cao tới 15m, vào mùa xuân, lá Gạo rụng hết, hoa bắt đầu nở đỏ tươi khiến cả cây bừng lên một sắc màu tươi thắm hết sức ấn tượng. Cây Gạo ngoài vẻ đẹp của nó, còn phải nói tới ứng dụng của các bộ phận của cây như hoa, vỏ thân và rễ đều có thể dùng làm thuốc chữa bệnh.

Tuy nhiên, những nghiên cứu về loài cây này còn rất ít, đặc biệt chưa tìm thấy nhiều những nghiên cứu về thành phần hóa học của cây Gạo ở Việt Nam. Do vậy việc tiến hành nghiên cứu cây Gạo *Bombax malabaricum* DC., họ Gạo Bombacaceae, mang tính thời sự và cần thiết ở Việt Nam.

Nhằm mục đích chứng minh kinh nghiệm sử dụng cây Gạo trong dân gian, hướng đến việc tìm kiếm các hợp chất có hoạt tính sinh học, xây dựng phương pháp phân tích các hợp chất có trong dược liệu với bước đầu thực hiện trên cây Gạo và góp phần nâng cao giá trị tiềm năng của cây Gạo trong kho tàng cây thuốc Việt Nam, luận án “**Nghiên cứu đặc điểm thực vật, thành phần hóa học và một số tác dụng sinh học của cây Gạo *Bombax malabaricum* DC., họ Gạo Bombacaceae**” được tiến hành với những mục tiêu sau:

1. Nghiên cứu đặc điểm thực vật loài *Bombax malabaricum* DC. thu hái tại Hà Nội.
2. Nghiên cứu thành phần hóa học mẫu nghiên cứu
3. Đánh giá độc tính cấp và thăm dò một số tác dụng sinh học của mẫu nghiên cứu.

Để đạt được mục tiêu đề ra, luận án được tiến hành với các nội dung sau:

❖ Về thực vật:

- Mô tả đặc điểm hình thái và giám định tên khoa học loài nghiên cứu thu hái tại Hương Sơn, Mỹ Đức, Hà Nội.
- Tiến hành giải phẫu, mô tả đặc điểm cấu tạo của lá, hoa, vỏ thân và đặc điểm vi học bột lá, hoa, vỏ thân mẫu nghiên cứu.

❖ Về hóa học:

- Định tính sự có mặt của các hợp chất thường gặp trong dược liệu ở hoa, lá và vỏ thân mẫu nghiên cứu.
- Chiết xuất, phân lập và nhận dạng một số hợp chất tinh khiết từ lá và vỏ thân mẫu nghiên cứu.
- Xây dựng phương pháp phân tích để có thể xác định hàm lượng một số hợp chất phân lập được.

❖ Về tác dụng sinh học:

- Đánh giá độc tính cấp của cao nước vỏ thân, lá và hoa mẫu nghiên cứu.
- Thử tác dụng giảm đau, chống viêm, cầm máu và tác dụng bảo vệ gan của cao nước các bộ phận của loài nghiên cứu và cồn phân đoạn ethyl acetat chiết xuất từ vỏ thân.

CHƯƠNG 1

TỔNG QUAN

1.1. ĐẶC ĐIỂM THỰC VẬT

1.1.1. Họ Gạo (*Bombacaceae* L.)

1.1.1.1. Vị trí, phân loại

❖ Về phân loại:

Họ Gạo là họ tương đối nhỏ trong hệ thực vật trái đất. Hệ thống phân loại của nhiều tác giả như Cronquist (1981-1988) [68], [69], Dahlgren (1981-1983) [70], APG I [38], APG II [39], APG III [40] ...và theo tài liệu phổ biến nhất hiện nay là “Hệ thống phân loại về ngành Ngọc lan (*Magnoliophyta*)” của A. Takhtajan (1997) [196], họ Gạo (*Bombacaceae*) thuộc bộ Bông (*Malvales*), liên bộ Bông (*Malvanae*), phân lớp Sổ (*Dilleniidae*), lớp Ngọc lan (*Magnoliopsida*), ngành Ngọc lan (*Magnoliophyta*).

❖ Về vị trí:

Theo Phạm Hoàng Hộ (1999) [17], Thorne (1992-2001) [197], họ Gạo cùng nằm trong bộ Bông (bộ Cẩm quỳ-Malvales) với các họ Bông (*Malvaceae*), họ Côm (*Elaeocarpaceae*), họ Đay (*Tiliaceae*), họ Trôm (*Sterculiaceae*)... [214], [215]...

Các tài liệu tham khảo đều nêu ra tổ hợp đặc điểm đặc trưng của họ Gạo là “Lá mọc đơn hay kép chân vịt, hoa to, đều, lưỡng tính, quả nang, vỏ quả trong có lông mềm trắng như bông” [17], [220]. Tóm tắt vị trí họ Gạo như sau:

Ngành Ngọc lan (*Magnoliophyta*)

Lớp Ngọc lan (*Magnoliopsida*)

Phân lớp Sổ (*Dilleniidae*)

Liên bộ Bông (*Malvanae*)

Bộ Bông (*Malvales*)

Họ Gạo (*Bombacaceae*)

Họ Gạo gồm 30 chi với 250 loài [108].

Ở Việt Nam, họ Gạo có 5-6 chi [6], [17] (*Ceiba*, *Bombax*, *Adansonia*, *Orchoma*, *Durio*, *Pachira*) đặc trưng bởi các đặc điểm sau:

1a – Lá kép chân vịt

2a – Nhị 5-15 *Ceiba*

2b – Nhị trên 40

4a – Quả nang mở; cuống cụm hoa dài hơn 10cm *Bombax*

4b – Quả nang không mở; cuống cụm hoa ngắn hơn 10cm *Adansonia*

1b – Lá đơn

2a – Gân chân vịt; nang không gai *Orchoma*

2b – Gân lông chim; nang có gai *Durio*

❖ *Phân bố:*

Họ Gạo (Bombacaceae) được phân bố chủ yếu ở vùng nhiệt đới và cận nhiệt đới trải dài từ châu Mỹ-La tinh đến châu Phi, châu Á, châu Úc. Phổ biến ở các nước Trung Quốc [220], Pakistan [209], Ai cập [108], Australia [86].

1.1.1.2. Đặc điểm thực vật

Cây gỗ lớn, cành thường nằm ngang [7], đôi khi cây gỗ lớn với bạnh gốc. Thân của nhiều loài có gai thô. Lá mọc cách đơn hay kép chân vịt, có cuống dài, mọc so le, có lá kèm sớm rụng, có lông hình sao và có vẩy phân nhánh [5]. Hoa lưỡng tính, lớn, màu đỏ, cam, trắng. Đài liền trong nụ, khi hoa nở rách thành 3-5 mảnh không đều, rời nhau hoặc dính ở gốc, xếp vặn, thường có đài phụ. Nhị nhiều, rời hay dính thành nhiều bó hay ống. Bao phấn một ô, mở dọc [8]. Hạt phân tròn, nhẵn. Bầu 5 ô, dính noãn trung trụ. Vòi nhụy đơn, nguyên hoặc chỉ hơi chia ra ở đỉnh. Quả nang mở vách, vỏ quả có lông như bông, nội nhũ nghèo hoặc không có nội nhũ [9].

1.1.2. Chi *Bombax* L.

1.1.2.1. Đặc điểm chung

Theo [108], [220], trên thế giới chi *Bombax* L. có 50-60 loài. Tuy nhiên,

hiện nay chỉ có 8 loài phổ biến được xác định tên khoa học.

- *Bombax albidum* Gagnep.
- *Bombax insigne* Wall.
- *Bombax anceps* Pierre.
- *Bombax thorelii* Gagnep.
- *Bombax malabaricum* DC. (tên đồng nghĩa: *Bombax ceiba* L.).
- *Bombax blancoanum* A.Robyns.
- *Bombax buonopozense* P.Beauv.
- *Bombax costatum* Pellegr. & Vuillet.

Theo [6], chi *Bombax* L. có 6 loài, trong đó có hai loài khác nhau *Bombax ceiba* L. và *Bombax malabaricum* DC. Tuy nhiên, hiện nay, các nhà thực vật học trên thế giới xếp hai loài này là một [108], [220]. Theo [8], [17], Việt Nam có 5 loài, trong đó có hai loài phổ biến nhất:

- *Bombax anceps* Pierre. (Gạo hoa trắng, Pơ lang),
- *Bombax malabaricum* DC. (*Bombax ceiba* L. – Gạo, Mộc miên...).

Các loài thuộc chi *Bombax* L. thường là cây gỗ lớn, có bạnh vè, có gai. Cây cao có thể tới 30-40m và đường kính thân có thể tới 3m, tán lá rộng, rụng lá vào mùa khô. Lá kép hình chân vịt với 3-9 lá chét, lá mọc cách có lá kèm và cuống lá. Hoa to, đều, lưỡng tính, đơn độc hay tập hợp thành xim ở nách hay ở ngọn. Tròng có 5 cánh thường có lông mềm, tiền khai hoa vặn. Ra hoa vào tháng 1 đến tháng 3. Đài có dạng đầu với 3 hay 5 thùy rách không đều nhau khi hoa nở, đôi khi có kèm theo một đài phụ. Nhị nhiều, bao phấn 1 ô, có khi 2 ô, hạt phấn tròn nhẵn, bầu thượng với 5 ô nhiều noãn. Quả nang, bên trong có nhiều lông dài [6], [17], [108].

1.1.2.2. Đặc điểm thực vật của một số loài thuộc chi *Bombax* L.

❖ *Bombax albidum* Gagnep.

Tên Việt Nam: Gòn ta trắng.

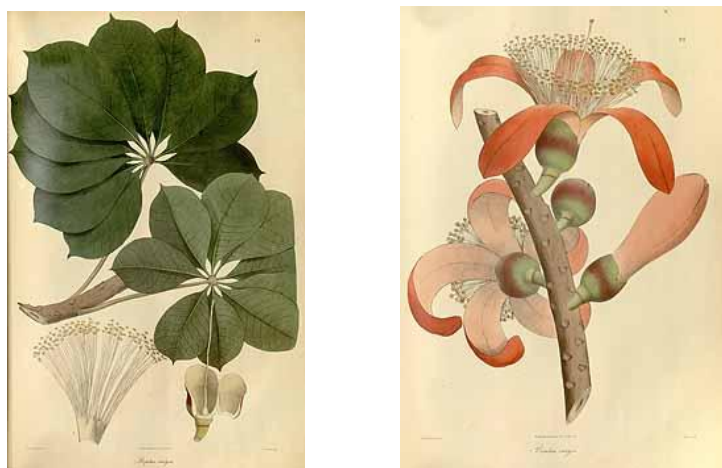
Phân bố ở Việt Nam: Đồng Nai.

Cây gỗ cao đến 30m, thân to 70-80 cm, cành ngang, vỏ cành xanh, không lông. Lá kép hình chân vịt với 5-8 lá chét có cuống lá, phiến lá có kích thước 10-12,5 x 5-6 cm. Gân phụ 10-20 cặp, lồi 2 mặt, không lông, cuống dài 20 cm. Hoa đơn độc ở đầu cành, to, trắng. Đài cao 6-8 cm, có 3-4 thùy. Tròng hoa dài 7-8 cm, có lông mịn, dày mặt ngoài. Nhị nhiều đến 400 thành một ống ngắn và 5 bó. Nang hình trụ to 9-10 x 3,5-4 cm, hạt nhiều, tròn [6], [17].

❖ *Bombax insigne* Wall.

Tên Việt Nam: Gạo đặc biệt, Pơ lang.

Phân bố ở Việt Nam: Lâm Đồng



Hình 1.1. Hình ảnh hoa và lá của loài *Bombax insigne* Wall. [213].

Cây cao 10-12m, thân có gai hình chùy, cành ngang. Lá có cuống dài 20 cm, lá kép có 5-7 lá chét hình bầu dục thon, nhọn 2 đầu, gân phụ 10-14 cặp, cuống phụ dài 1 cm. Hoa to, 2-3 hoa ở đầu cành, có mùi, đài cao 3-4 cm, tròng hoa tròn, 5 cánh, màu trắng hay đỏ, to 6-8 x 1 cm, dày. Nhị nhiều (đến 150), dính nhau ở đáy và thành 5 bó. Nang có cạnh, dày 20 cm rộng 2,5 cm [17].

❖ *Bombax thorelii* Gagnep.

Tên Việt Nam: Gạo Thorel, Gạo hoa hồng.

Phân bố ở Việt Nam: Lâm Đồng, Đồng Nai.

Cây gỗ lớn [6], thân có vỏ bóng, có gai hình chùy, cành ngang, lúc non không lông. Lá kép hình chân vịt có 5 lá chét, hình xoan bầu dục rộng, không lông, gân phụ 6-8 cặp, cuống phụ 2-3 mm, cuống chung dài 10-15 cm. Cây ra hoa lúc chưa có lá. Hoa to, màu hồng, đài không lông, hình chén cao 2 cm, cánh hoa 5 dài 7 cm, có lông nằm mặt ngoài. Nhị nhiều, dính nhau thành ống dài 1,5 cm và thành 5 bó, vòi nhụy chẻ 5 [17].

❖ *Bombax anceps* Pierre.

Tên Việt Nam: Gạo hai mặt, Pơ lang.

Phân bố ở Việt Nam: Gia Lai, Kontum, Đắc Lắc, Phú Yên, Khánh Hoà, Sông Bé, Lâm Đồng, Tây Ninh, Đồng Nai, Kiên Giang...[17].



a)



b)



c)

Hình 1.2. Hình ảnh loài *Bombax anceps* Pierre.

a,b : Các bộ phận của loài *Bombax anceps* Pierre.[151]

c : Hoa của loài *Bombax anceps* Pierre.[49].

Cây gỗ, rụng lá mùa khô, cao 15 - 20m, đường kính 20 - 35cm thân thẳng có gai, cành ngang mọc vòng, cành non không gai. Vỏ thân màu xám nhạt có nhiều gai và vết gai rụng, nhiều vết cành lõm và u lồi, thịt vỏ màu vàng trắng, xốp, lá kép chân vịt, tập trung ở đầu cành có cuống dài 4,4 - 10cm, nhẵn, có 4 - 7 lá hình bầu dục, hình trứng thuôn hoặc hình mác rộng, dài 8 - 16cm, rộng 4 - 7cm, đỉnh nhọn góc tròn, có 10 - 15 đôi gân bên màu trắng xanh [19].

Hoa cụm 2 - 4 bông, có các vết lá gần đầu cành, có gai. Hoa lớn màu trắng, cuống hoa mập, dài 1,5 - 1,8cm có lá bắc. Nụ hoa hình quả đào đỉnh nhọn dài 5 - 9cm. Cánh đài 5 hợp nhau phần lớn ở phía dưới thành hình chuông, phía trên là 5 thùy hình tam giác rộng. Khi hoa nở đài thường rách ở đỉnh, mặt ngoài nhẵn, màu xanh lục, mặt trong có lông. Cánh tràng 5, hình trứng ngược, dài 7cm, gốc thu hẹp dần cho tới họng, có lông mịn. Nhị 250 - 300 cái hợp lại thành 5 bó, các bó dính nhau phía dưới thành bẹ ngắn, chỉ nhị nhẵn, bầu hình nón dài 1,2 - 1,4cm, có lông, vòi nhẵn, dài vượt quá nhị, núm nhụy xẻ 5. Quả nang hình bầu dục dài 10cm, nhiều hạt, nhiều sợi bông ngắn màu trắng [17].

Cây thuộc loài ưa sáng, thường mọc trên nương rẫy ven đường, bìa rừng, quanh làng bản, ra hoa trước khi ra lá. Mùa hoa tháng 2 - 4. Mùa quả tháng 5 - 7.

1.1.3. *Bombax malabaricum* DC. (*Bombax ceiba* L.)

1.1.3.1. Đặc điểm thực vật loài *Bombax malabaricum* DC. (*Bombax ceiba* L.)

Tên Việt Nam: Gòn rừng, Mộc miên thụ, Mạy mìn, Mạy nghịu (Tày), cây Bông gạo, Anh hùng thụ, Hồng miên, Gòn, Cỏ bồi, Ban chi hoa...[5], [31].

Tên đồng nghĩa: *Bombax ceiba* L., *Gossampinus malabarica* (DC.) Merr., *Salmaalina malabarica* (DC.) Schott et Endl, *Bombax heptaphylla* Cav. [7], [31], [108].

Tên nước ngoài: Silk-cotton tree, Cotton wood tree (Anh), Arbre à coton, Arbre à bourre, Cotonier mapon (Pháp), Roca (Campuchia), Ngiou (Lào), Simul, Simbal (Ấn độ, Pakistan), Shalmali (tiếng Phạn) [6], [8], [108].

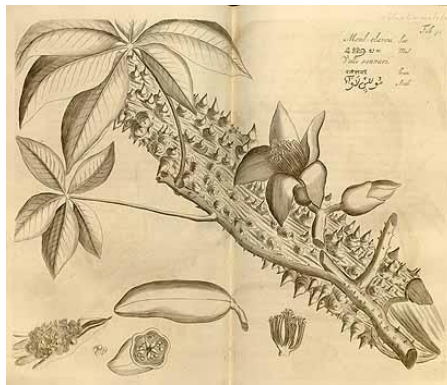
Cây gỗ to, cao tới 15m hay hơn (một số cây trong rừng có thể cao tới 30-40m, đường kính lên tới 3m) [8], [31]. Thân cây thẳng, sần sùi, màu xám, có bạnh vè to ở gốc, làm trụ cột cho các cành lá mọc ở trên, có gai sắc nhọn, hình nón để ngăn cản sự tấn công của động vật.



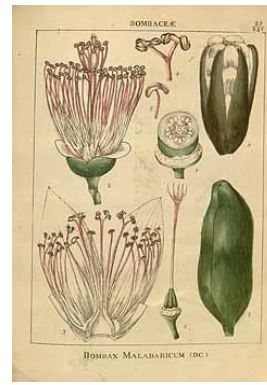
a)



b)



c)



d)

Hình 1.3. Hình ảnh loài *Bombax malabaricum* DC.

a,b: Hoa của loài *Bombax malabaricum* DC.[69], [165]

c,d: Các bộ phận của loài *Bombax malabaricum* DC.[161],[217]

Cành hình trụ, mọc ngang, không có gai, mọc ở phía trên. Lá mọc so le, kép chân vịt, gồm 5-7 lá chét [23], [31], hình mác hoặc hình trứng, gốc thuôn, đầu nhọn, dài 9-15cm, rộng 4-5cm, hai mặt nhẵn, mép nguyên, cuống chung dài hơn phiến lá, dài từ 20-25cm. Lá rụng hàng năm, và rụng vào mùa khô [17], [23], [31].

Cụm hoa mọc ở đầu cành thành chùm, 1-3 hoa mọc cùng một cuống. Hoa màu đỏ, thỉnh thoảng cũng xuất hiện những bông hoa màu cam, vàng, đường kính 7,5-11cm, dài 5-10cm. Hoa nhiều, nở trước khi cây ra lá từ tháng 1 đến tháng 3, cuống hoa ngắn, nhỏ, khỏe. Hoa to, đều, lưỡng tính. Đài dày, hình chuông, có 5 răng tù và ngắn màu nâu xám, bao bọc lấy nụ hoa, khi hoa nở thì

rách ra thành 3-5 mảnh không đều. Tròng 5 cánh nạc, rời nhau, mặt ngoài phủ lông nhung. Nhị rất nhiều hợp thành 5 bó hoặc 6 bó (không thành ống), ngắn hơn cánh hoa, bó nằm trong 2 cuống cánh khác nhau. Bầu thượng 5 ô, một vòi mang 5 đầu nhụy, bầu hình nón, có lông màu trắng nhạt [31].

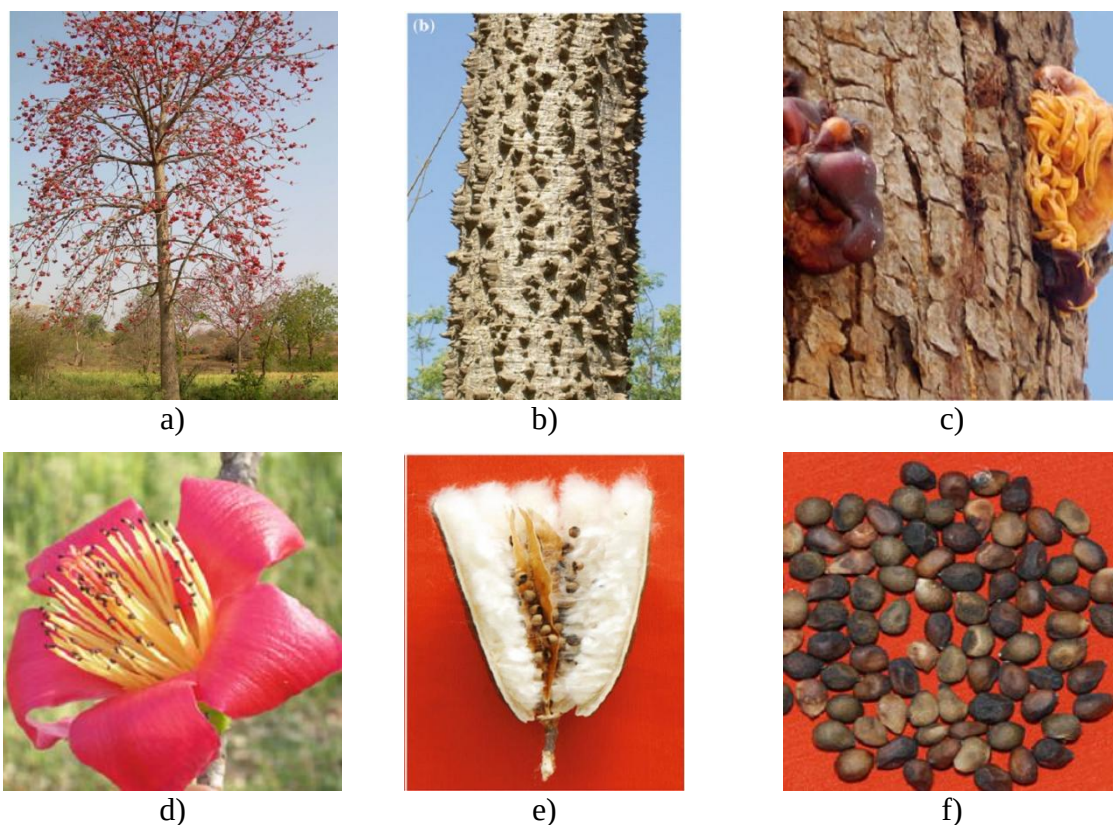
Quả nang 5 cạnh, hình thoi rộng, dài 8-15cm, khi chín nứt thành 5 mảnh, vỏ quả trong có nhiều lông trắng [32]. Mùa quả vào tháng 5 [14]. Hạt rất nhiều, hình trứng nhọn, màu đen hoặc xám, được bao bởi những sợi bông, phát tán cùng sợi bông [108].

1.1.3.2. Phân bố, sinh thái

❖ Trên thế giới

Cây Gạo là loài cây gỗ, có ở vùng nhiệt đới và cận nhiệt đới. Trên thế giới, cây Gạo phân bố chủ yếu ở châu Á, châu Phi, châu Úc. Có thể tìm thấy ở độ cao từ ngang mực nước biển cho tới mực nước biển tối đa 1.500m [108].

Tại Ấn Độ, cây Gạo phổ biến trong rừng cây khô, rừng cây rụng lá ẩm, sông ngòi, trong các thung lũng sâu, khu vực tiếp nhận từ 50-460mm lượng mưa hàng năm. Là loài có nguồn gốc từ Ấn Độ nhưng hiện nay được trồng rộng rãi ở nhiều nước trên thế giới như Malaysia, Indonesia, Thái Lan, Lào, Nam Trung Quốc, Hồng Kông, Đài Loan, Myanmar, Srilanka... Cây sống cả ở những vùng tương đối khắc nghiệt. Mùa đông cây Gạo có thể chịu được ở nhiệt độ 2-3°C hoặc thấp hơn, về mùa nóng cây sống được ở nhiệt độ cao có khi đến 49°C. Cây mọc được trên nhiều loại đất kể cả đất khô cằn, trơ sỏi đá, phát triển tốt nhất ở đất pha cát sâu, đặc biệt ở đất thoát nước tốt [43], [108], [157], [204].



Hình 1.4. Đặc điểm hình thái của loài *Bombax malabaricum* DC. [108]

a) Cây Gạo b) Thân cây c) Nhựa cây d) Hoa e) Quả f) Hạt

Ở Pakistan, cây Gạo được tìm thấy ở Hazara và những vùng khác ở các tỉnh biên giới phía Tây Bắc. Tại Trung Quốc, cây được trồng nhiều tại vườn hoa, dọc đường cao tốc và hoa cây Gạo là biểu tượng của hai thành phố Quảng Châu và Đài Loan [108], [125].

❖ Ở Việt Nam

Việt Nam là một nước nhiệt đới gió mùa nên cây Gạo phân bố rộng rãi ở nhiều nơi nhưng thường thấy ở các tỉnh miền Bắc nước ta, từ Quảng Bình trở ra. Cây thường mọc ở đất trống ven rừng, đồi, nhất là dọc theo bờ sông suối. Cây còn được trồng ở đầu làng, ven đường đi hoặc ở đình chùa lấy bóng mát [6], [31], [32]. Năm 2011, Hội bảo vệ thiên nhiên và môi trường đã công nhận cây Gạo tọa lạc tại Đền Mỗ (thôn Nghi Dương, xã Ngũ Phúc, huyện Kiến Thụy, Hải Phòng) là cây di sản Việt Nam (hình 1.5). Cây gạo có tuổi thọ 727 năm, hiện vẫn phát triển xanh tốt, ra hoa đỏ rực vào tháng 2 [108].

Gạo là cây ưa sáng, dễ trồng, có thể trồng bằng hạt hoặc bằng cành vào mùa xuân, thích nghi với điều kiện khắc nghiệt, là cây gỗ mọc nhanh, sau 2 năm trồng từ hạt đã có thể cao gần 2m, cây trồng bằng cành sau 5 năm có đường kính hơn 20cm. Gạo rụng lá vào mùa đông, ra hoa quả vào đầu mùa xuân, khi chưa có lá. Quả chứa nhiều hạt, cứ 100kg quả khô thu được khoảng 2kg hạt, 1kg hạt có từ 25.300-38.500 hạt [32]. Hạt có lông mềm, phát tán khắp nơi nhờ gió. Gỗ nhẹ, màu trắng, thường dùng để đóng thùng đựng hàng hóa [31], [32].



Hình 1.5. Hình ảnh cây Gạo tại Đền Mỗ (Hải Phòng)

1.1.3.3. Bộ phận dùng, thu hái và chế biến:

Toàn cây được sử dụng cho các mục đích khác nhau:

- Vỏ thân: thu hái quanh năm, tốt nhất vào mùa xuân [6], [32], hay hè - thu [8]. Vỏ thân mang về cạo bỏ vỏ thô bên ngoài, rửa sạch, thái nhỏ, phơi khô sắc uống, hoặc dùng tươi giã nát để đắp ngoài [15], [23].
- Rễ: thu hái vào mùa xuân hay mùa thu, rửa sạch, thái nhỏ, phơi khô.
- Hoa: hái vào mùa xuân, ép lấy nước (dùng tươi), hoặc phơi khô, tán thành bột để uống [8].
- Gôm, gỗ, nhựa, hạt, quả, bông: cũng được thu hái, chế biến phù hợp với mục đích sử dụng [8], [23].

1.2. THÀNH PHẦN HÓA HỌC CỦA MỘT SỐ LOÀI THUỘC CHI *Bombax* L.

Qua các tài liệu thu thập được cho thấy thành phần hóa học của chi *Bombax* L. gồm có các nhóm chất: alcaloid, triterpenoid, tanin, flavonoid, sitosterol... Trong phần này, chỉ trình bày tóm tắt những hợp chất đã được phân lập và xác định cấu trúc từ một số loài của chi *Bombax* L. trên thế giới và ở Việt Nam.

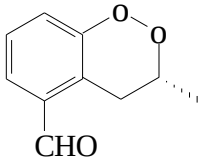
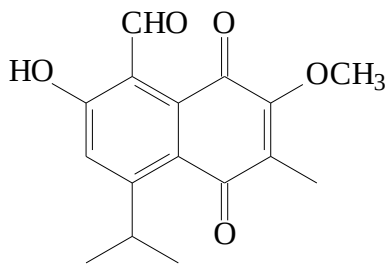
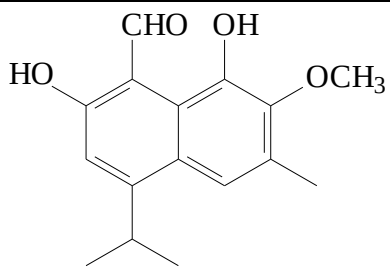
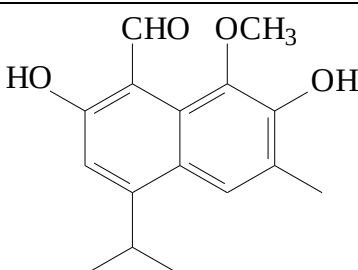
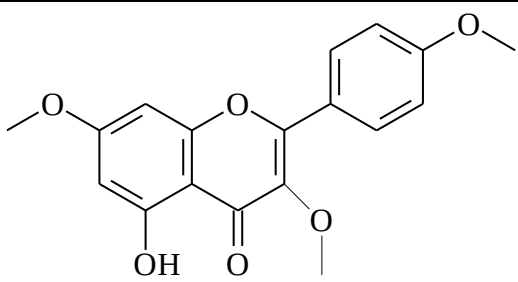
1.2.1. Loài *Bombax anceps* Pierre.

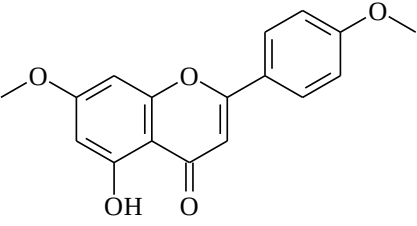
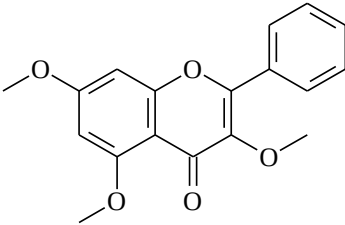
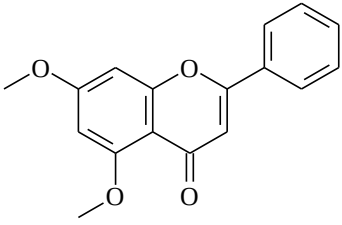
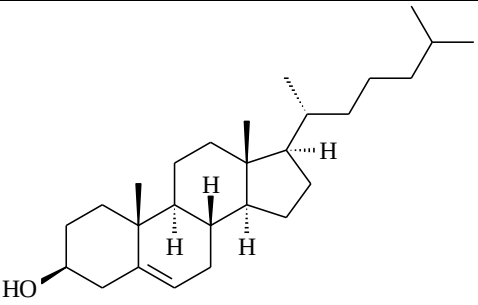
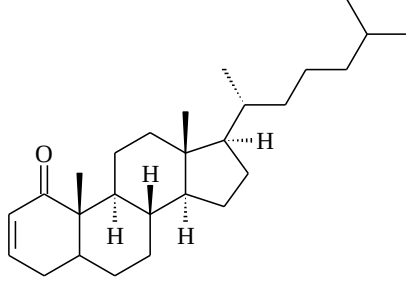
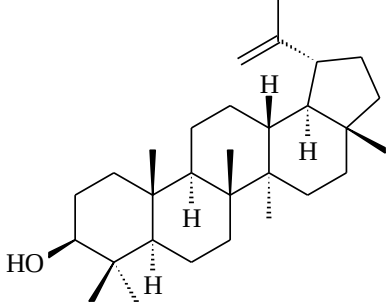
Năm 2010, từ rễ của loài *Bombax anceps* P. thu hái tại Thái Lan, Sichaem và cộng sự [185] đã phân lập, xác định được 11 hợp chất bao gồm:

- 8-formyl-7-hydroxy-5-isopropyl-2-methoxy- 3-methyl- 1,4-naphthoquinon (2)
- isohemigossypol-2-methyl ether (3)
- isohemigossypol-1-methyl ether (4)
- 5-hydroxy-3,7,4'-trimethoxyflavon (5)
- 5-hydroxy-7,4'-dimethoxyflavon (6)
- 3,5,7-trimethoxyflavon (7)
- 5,7-dimethoxyflavon (8)
- cholesterol (9)
- cholestenon (10)
- lupeol (11)

Bên cạnh đó, hợp chất (1) là một dihydrobenzodioxin lần đầu tiên được phân lập từ *Bombax anceps* P. được đặt tên là bombaxoin (bảng 1.1).

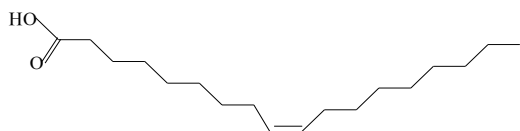
Bảng 1.1. CTHH các hợp chất phân lập từ loài *Bombax anceps* P.

TT	Tên hợp chất	Công thức hợp chất
1	<i>Bombaxoin</i>	
2	<i>8-formyl-7-hydroxy-5-isopropyl-2-methoxy-3-methyl-1,4-naphthoquinon</i>	
3	<i>Isohemigossypol-2-methyl ether</i>	
4	<i>Isohemigossypol-1-methyl ether</i>	
5	<i>5-hydroxy-3,7,4'-trimethoxyflavone</i>	

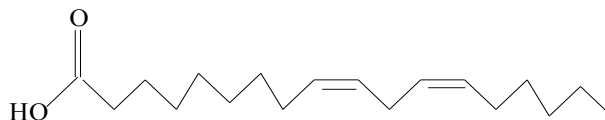
6	<i>5-hydroxy-7,4'-dimethoxyflavon</i>	
7	<i>3,5,7-trimethoxyflavon</i>	
8	<i>5,7-dimethoxyflavon</i>	
9	<i>Cholesterol</i>	
10	<i>Cholestenon</i>	
11	<i>Lupeol</i>	

1.2.2. Loài *Bombax costatum* Pellegr & Vuillet

Năm 1996, Ogbobe và cộng sự [147] đã phân lập được từ hạt của loài *B.costatum* Pellegr & Vuillet các acid béo: acid caproic, acid caprylic, acid palmitic, acid stearic, acid oleic, acid linoleic, acid arachidic, acid vernolic.



Acid oleic



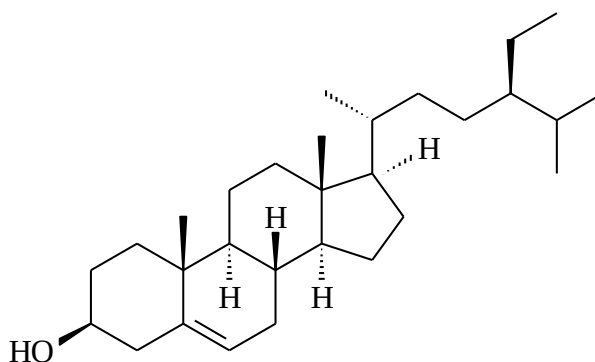
Acid linoleic

1.2.3. Loài *Bombax malabaricum* DC.

Năm 1935, Ghose lần đầu tiên nghiên cứu thành phần hóa học của loài *B.malabaricum* DC. (*B. ceiba* L.). Các hợp chất hóa học đã được phân lập từ bộ phận khác nhau của loài này và một số hợp chất tự nhiên lần đầu tiên được phân lập: bombamalosid, bombamalon, bombasin, bombalin...[82].

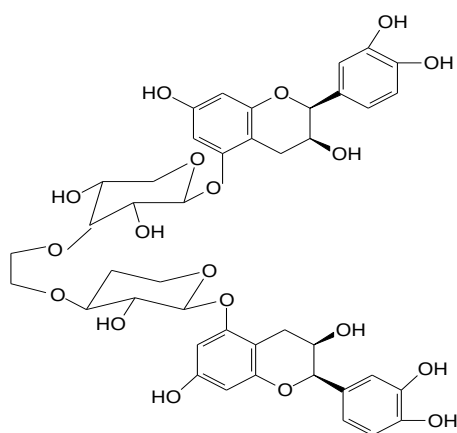
1.2.3.1. Vỏ thân

Vỏ thân chứa chất nhầy [23], tanin 3,01% [31]. Năm 2003, các nhà khoa học Hàn Quốc đã phân lập được lupeol từ phân đoạn dicloromethan [141], [225]. Năm 1980, β -sitosterol cũng được phân lập từ vỏ thân [62].

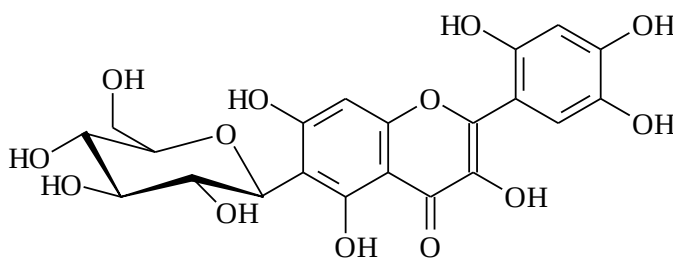


β -sitosterol

Ngoài ra, từ vỏ thân cây Gạo còn phân lập được shamimicin, shamimin [170].



Shamimicin



Shamimin

1.2.3.2. Hoa

Hoa Gạo chứa nhiều acid amin (arginin, lysin, alanin, acid glutamic, glycolic, leucin), đường (fructose, glucose, galactose, sucrose, lactose, arabinose) [138], pectin, tanin và các nguyên tố vi lượng [8].

Gopal và Gupta phân lập từ hoa gạo một số hợp chất như β -sitosterol, hentriacatan, hentriacontanol, kaempferol và quercetin [85]. Từ dịch chiết methanol của cánh hoa tươi, Niranjana và Gupta đã phân lập được 2 hợp chất là: pelargonidin 5- β -D-glucopyranosid và cyanidin 7-methyl ether-3- β -glucopyranosid [145].

Trong hoa Gạo có chứa 9 acid hữu cơ, 16 đường và 16 chất gồm 3,5,7-trihydroxy-4'-methoxyflavon; 3,5,7,4'-tetrahydroxy-3'-methoxyflavon; kaempferol, kaempferid-7 β -rutinosid, quercetin, quercetin-3 β -rutinosid, isorhamnetin-3 β -rutinosid, ceryl alcohol, β -amyrin, taraxerol, taraxeryl acetat, lupeol, lupeol acetat, 24 β -ethylcholest-5-en-3 β -O- α -L-arabinopyranosyl(1 $\rightarrow$ 6)- β -D-glucopyranosid; 4,5,7-trihydroxyflavon-3-O- β -D-glucopyranosyl(1 $\rightarrow$ 4)- α -L-rhamnopyranosid; 3,5-dihydroxy-4-methoxyflavon-7-O- α -L-rhamnopyranosyl(1 $\rightarrow$ 6)- β -D-glucopyranosid [164].

Theo [216], Wang và cộng sự có 5 chất từ hoa Gạo gồm acid hexadecanoic, acid tetradecanoic, 3-methyl-2(3H)-benzofuranon, α -cedrol, β -cedrol.

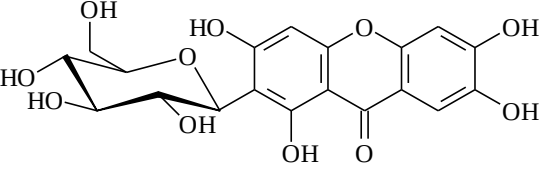
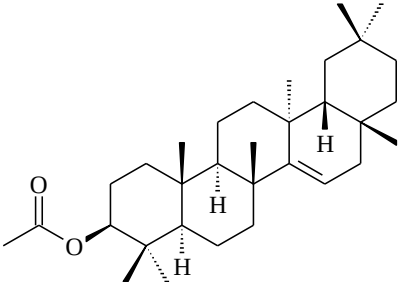
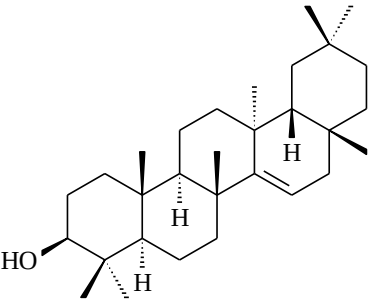
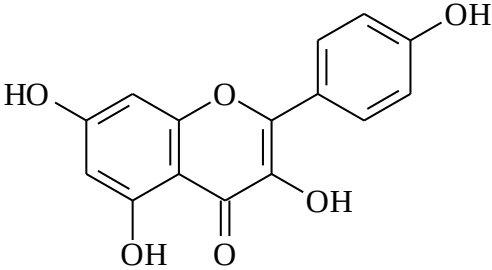
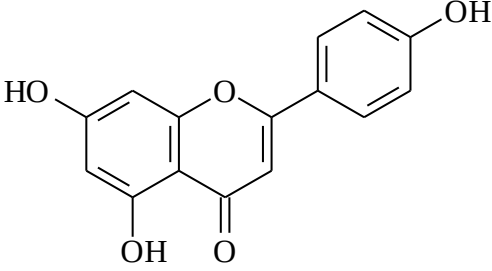
Năm 2008, Wu và cộng sự đã xác định được 6 chất trong hoa Gạo gồm bombasin, bombasin 4-O- β -glucosid, bombalin, dihydrodehydrodiconiferyl alcohol 4-O- β -D-glucopyranosid, acid trans-3-(p-coumaroyl) quinic, acid neochlorogenic [219].

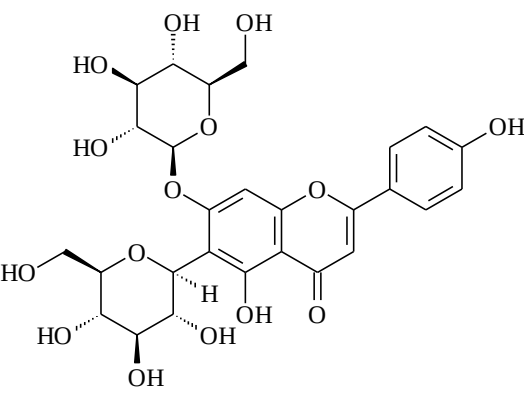
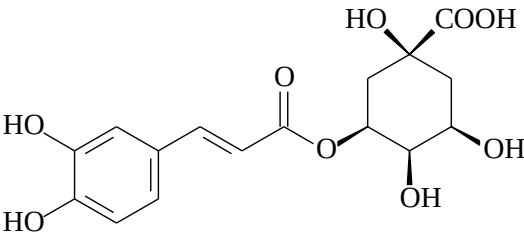
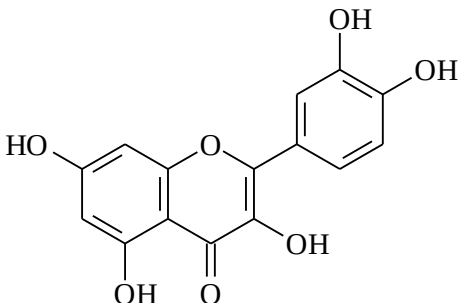
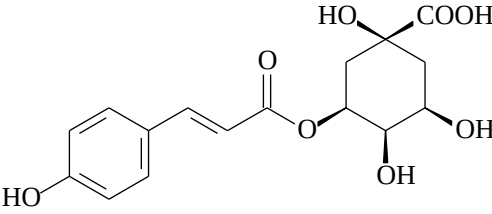
Theo [79], từ căn methanol, El-Hagrassi phân lập và xác định cấu trúc hóa học của 7 flavon: vicenin-2, apigenin, linarin, saponarin, cosmetin, isovitexin, xanthomicrol. Ngoài ra, từ căn n-hexan, nhóm tác giả còn phân lập được 14 hợp chất gồm cholesterol, campesterol, stigmasterol, α -amyrin và 10 hydrocarbon.

Năm 2011, Said A. tìm thấy 7 chất trong hoa Gạo gồm acid isovanilic, mangiferin, acid protocatechuic, rutin, quercetin 3-O- β -D-galacturonopyranosid, quercetin 3-O- β -D-glucopyranosid, apigenin-7-O- β -D-glucopyranosid [168].

Một số công thức hóa học các hợp chất có trong hoa của cây Gạo như lupeol, mangiferin, taraxeryl acetat ...được trình bày ở bảng 1.2.

Bảng 1.2. CTHH của một số hợp chất có trong hoa của cây Gạo

TT	Tên hợp chất	Công thức hợp chất	TLTK
1	Mangiferin		[168]
2	Taraxeryl acetat		[164]
3	Taraxerol		[164]
4	Kaempferol		[85]
5	Apigenin		[79]

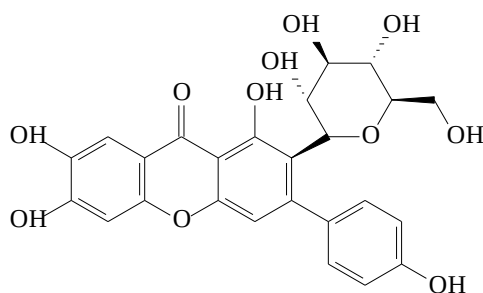
6	<i>Saponarin</i>		[79]
7	<i>Acid neoclorogenic</i>		[219]
8	<i>Quercetin</i>		[168]
9	<i>Acid trans-3-(p-coumaroyl) quinic</i>		[219]

1.2.3.3. Lá

Lá Gạo là nguồn nguyên liệu rất giàu xanthon, từ dịch chiết ethanol 70% của lá *B. malabaricum* DC., các nhà khoa học tại Trung tâm nghiên cứu quốc gia Dokki, Cairo, Ai Cập đã phân lập được mangiferin [138].

Từ dịch chiết ethanol của lá *Bombax malabaricum* DC., Faizi S. và cộng sự đã phân lập được shamimin [80].

Năm 2004, Versiani phân lập từ dịch chiết lá của loài *Bombax ceiba* thu hái tại Pakistan được 4 hợp chất xanthon glycosid: 2-C- β -d-glucopyranosyl-1,6,7-trihydroxy-3-O-(p-hydroxybenzoyl)-9H-xanthen-9-on; 4-C- β -d-glucopyranosyl-1,6,8-trihydroxy-3,7-di-O-(p-hydroxybenzoyl)-9H-xanthen-9-on; 4-C- β -d-glucopyranosyl-1,3,6, 8-tetrahydroxy-7-O-(p-hydroxybenzoyl)-9H-xanthen-9-on và mangiferin [209].



2-C- β -d-glucopyranosyl-1,6,7-trihydroxy-3-O-(p-hydroxybenzoyl)-9H-xanthen-9-one

1.2.3.4. Rễ

Theo [31], rễ Gạo chứa cephalin phosphatid và chất nhầy. Phần trắng của rễ chứa chất vô cơ 2,1%, protein 1,2%, chất béo 0,9%, tinh bột 71,2%, chất pectic 6%, cephalin 0,3%. Rễ của cây non chứa protein 1,2%, chất béo 0,9%, phosphatid (cephalin) 0,6%, semul đỏ 0,5%, tanin 0,4%, arabinose và galactose 8,2%, pectin 6,9% và tro 71,2% [8], [92].

Ghose và cộng sự nhận thấy rễ của cây non chứa nhiều đường hơn rễ của cây lâu năm, nhưng những thành phần khác như cellulose, dầu thì lại ít hơn [82].

Hàm lượng hợp chất phenol trong bột rễ khô chiếm 4,86% và tanin chiếm 1,72% [103].

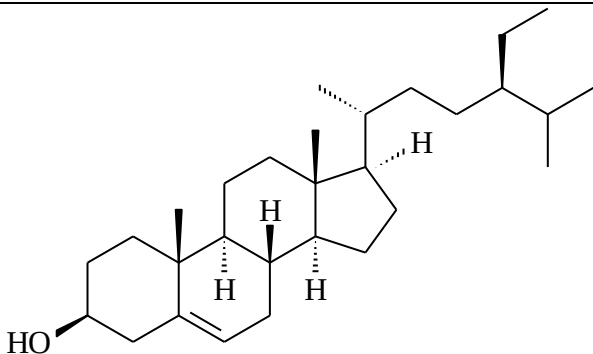
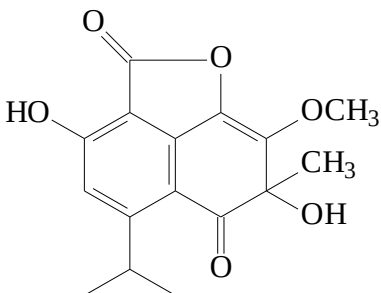
Trong vỏ rễ có chứa lupeol, naphthol (hemigossypol-6-methylether), naphthol ether (hemigossypol-1,6,7-trimethyl ether) và desmethyl naphthol hemigossypol, cadalane sesquiterpen lacton, 5-isopropyl-3-methyl-2,4,7-trimethoxy-8,1-naphthalen carbolacton và một naphthoquinon là 8-formyl-7-hydroxy-5-isopropyl-2-methoxy-3-methyl-1,4-naphthoquinon [159].

Năm 2007, Zhang và cộng sự [228] đã lần đầu tiên phân lập được các hợp chất sesquiterpen từ rễ loài *B. ceiba* đặt tên là bombamalon A, bombamalon B, bombamalon C, bombamalon D, bombamalosid.

Daucosterol, một β -sitosterol glycosid đã được Qi và cộng sự phân lập từ rễ của loài *B. ceiba* L. năm 1996 [154].

Một số công thức hóa học của các hợp chất có trong rễ cây Gạo được trình bày ở bảng 1.3.

Bảng 1.3. CTHH của một số hợp chất có trong rễ của cây Gạo

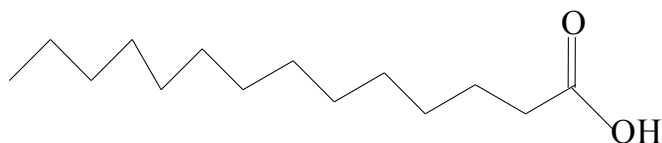
STT	Tên hợp chất	Công thức chất phân lập	TLTK
1	<i>Daucosterol</i>		[154]
2	<i>Bombamalon A</i>		[228]

STT	Tên hợp chất	Công thức chất phân lập	TLTK
3	<i>Bombamalon B</i>		[228]
4	<i>Bombamalon C</i>		[228]
5	<i>Bombamalon D</i>		[228]
6	<i>β-Sitosterol</i>		[62]

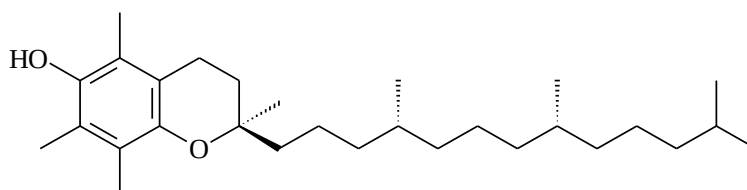
1.2.3.5. Hạt

Hạt có một lượng dầu khá lớn, lượng dầu béo khô là 22,3% với 0,5% stearin [8], [31]. Das và cộng sự thu được các thành phần polysaccharid có trong hạt như d-galactose, l-arabinose và l-rhamnose [73].

Dhar và Munijal xác định hạt có n-hexacosanol, tocoferol, carotenoid. Hạt chứa lượng lớn các acid béo (28,3% acid palmitic, 7,3% acid stearic, 49,9% acid oleic, 14,5% linoleic, 34% myristic, 7,2% palmitolic và 3,7% acid behenic [77].



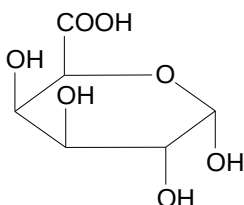
Acid myristic



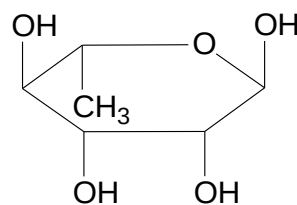
α - tocopherol

1.2.3.6. Gôm

Gôm lấy từ cây Gạo khi thủy phân hoàn toàn cho L-arabinose, D-galactose, acid D-galacturonic và rhamnose (vết) [31], [42], [56], [108]. Gôm được tìm thấy ở thân cây, chứa lượng lớn tanin, tanin catechol. Nhựa chứa acid catechutannic [23].



Acid galacturonic



Rhamnose

Như vậy, có hơn 100 hợp chất được phân lập từ các bộ phận khác nhau của loài *Bombax malabaricum* DC. (*Bombax ceiba*), bao gồm các flavonoid, sesquiterpen, steroid, naphtoquinon...

Thành phần hóa học của các bộ phận dùng khác nhau của loài *Bombax malabaricum* DC. được tóm tắt ở bảng 1.4.

Bảng 1.4. Bảng tóm tắt thành phần hóa học của loài Bombax malabaricum DC.

TT	Tên hợp chất	Bộ phận	TLTK
1	Shamimicin	Vỏ thân	[179]
2	Lupeol	Vỏ thân, thân, vỏ rễ	[180], [209]
3	β -Sitosterol	Vỏ thân, thân, rễ, vỏ rễ, hoa, hạt	[62], [85], [180]
4	Apigenin	Hoa	[79]
5	Cosmetin		
6	Isovitexin		
7	Linarin		
8	Saponarin		
9	Vicenin 2		
10	Xanthomicrol		
11	3,5-Dihydroxy-4'-methoxy-flavon-7-yl-O- α -l-rhamnopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 6)- β -d-glucopyranosid		[164]
12	Kaempferol		[85]
13	Quercetin		[114]
14	4',5,7-Trihydroxy-flavon-3-yl-O- β -d-glucopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 4)- α -l-rhamnopyranosid		
15	3',4',5'-Trihydroxy-6-methoxy flavone-3-O-glucopyranosid		[163]
16	Cyanidin-3,5-diglucosid		[177]
17	Cyanidin-7-methyl		[145]
18	ether-3- β -d-glucosid		[163]
19	Pelargonidin-5- β -d-glucosid		
20	Pelargonidin-3,5-diglucosid		[79]
21	α -Amyrin		
22	β - Amyrin		[164]
23	Lupeol acetat		
24	Taraxerol		[79]
25	Taraxeryl acetat		
26	Campesterol		[164]
27	Cholesterol		
28	24 β -Ethylcholest-5-en-3 β -yl-O- α -l-arabinosyl-(1 $\rightarrow$ 6)- β -d-glucopyranoside		[164]

TT	Tên hợp chất	Bộ phận	TLTK
29	(24-ethyl-5,22-cholestadien-3 β -ol) Stigmasterol	Hoa	[79]
30	Bombasin		[219]
31	Bombasin-4-O- β -glucosid		
32	Dihydro-dehydro-diconiferyl alcohol- 4-O- β -d-glucopyranosid		
33	n-Hentriacontan		[85]
34	α -Cedrol		[209]
35	β -Cedrol		[85]
36	Hentriacontanol		[219]
37	Neochlorogenic acid		
38	<i>trans</i> -3-(<i>p</i> -Coumaroyl)-quinic acid		
39	3-Methyl-2(3 <i>H</i>)-benzofuranon		[219]
40	Bombalin		[209]
41	Alanin		
42	Arginin		
43	Glutamic acid		
44	Glycocol		
45	Lysin		
46	Mangiferin	Hoa, lá	[108], [168], [209]
47	β -Sitosterol-3-O- β -d-glucopyranosid (daucosterol)	Hoa, rễ	[85], [154]
48	Shamimin	Lá	[80]
49	2-C- β -d-glucopyranosyl-1,6,7-trihydroxy-3-O-(<i>p</i> -hydroxybenzoyl)-9H-xanthen-9-on		[108], [209]
50	4-C- β -d-Glucopyranosyl-1,6,8-trihydroxy-3,7-di-O-(<i>p</i> -hydroxybenzoyl)-9H-xanthen-9-on		
51	4-C- β -d-Glucopyranosyl-1,3,6, 8-tetrahydroxy-7-O-(<i>p</i> -hydroxybenzoyl)-9H-xanthen-9-on		
52	5,7,3', 4'-Tetrahydroxy-6-methoxyflavan-3-O- β -d-glucopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 4)- α -d-xylopyranosid	Rễ	[62]
53	Hesperidin		[154]
54	Bombaxquinon B		[173], [228]
55	Bombamalon A		[228]
56	Bombamalon B		
57	Bombamalon C		
58	Bombamalon D		

TT	Tên hợp chất	Bộ phận	TLTK
59	Bombamalosid	Rễ	[228]
60	Isohemigossypol-2,7-dimethyl ether		
61	Lacinilen C		[276]
62	Hemigossylic acid lactone-2-hydroxy-7-methyl ether		[173]
63	6-Hydroxy-5-isopropyl-3-methyl-7-methoxy-8,1-naphthalene carbolacton		[193]
64	Isohemigossylic acid lactone-2-methyl ether		[153], [228]
65	5-Isopropyl-3-methyl-2,7-dimethoxy-8,1-naphthalene carbolacton		[173]
66	Oleanolic acid		[154]
67	Triacontanol		[62]
68	Isohemigossypolon	Rễ, vỏ rễ	[178], [179]
69	Isohemigossypol-2-methyl ether		[180]
70	Isohemigossypol-1,2-dimethyl ether		[228]
71	7-hydroxy-cadalen	Rễ, vỏ rễ, tâm gỗ	[173]
72	Hemigossypolon	Vỏ rễ	[178]
73	Hemigossypolon-6-methyl ether		[180]
74	Gossypol		[179]
75	Hemigossypol		[179]
76	Hemigossypol-6-methyl ether		[179]
77	Hemigossypol-1,6,7- trimethyl ether		[179]
78	Isohemigossypol-1-methyl ether		[159]
79	5-Isopropyl-3-methyl-2,4,7-trimethoxy-8,1-naphthalene carbolacton		
80	Gallic acid	Hạt	[77]
81	Ethyl gallat		
82	1-Galloyl- β -d-glucose		
83	Tannic acid		
84	Carotenoid		[77]
85	α^* -, β -, γ -, δ -Tocopherol		[77]
86	Hexacosanol		[209]
87	Myristic acid		[77]
88	Palmitic acid (hexadecanoic acid)		[209]
89	Palmitoleic acid		[55]
90	Heptadecanoic acid		[209]
91	Heptadecenoic acid		
92	Stearic acid		
93	Oleic acid		
94	Linoleic acid		

TT	Tên hợp chất	Bộ phận	TLTK
95	Behenic acid	Hạt	[209]
96	Vernolic acid		[55]
97	Octyl palmitat		[77]
98	Octadecyl palmitat		
99	7-hydroxy -5-isopropyl-2-methoxy-3-methyl-1,4-naphthoquinon	Tâm gỗ	[153]
100	11-nor-isohemigossypolon-2-methyl ether (7- hydroxy-5-isopropyl-2-methoxy-3-methyl-1,4-naphthoquinon		[194]
101	6-O-(β -d-galactopyranosyl-uronic acid)-d-galactose	Gôm	[56]

1.3. TÁC DỤNG SINH HỌC VÀ CÔNG DỤNG

Trên thế giới và tại Việt Nam, một số loài thuộc chi *Bombax* L. đã được sử dụng làm thuốc chữa bệnh, phổ biến ở dạng thuốc sắc, thuốc đắp [6], [108]. Theo các tài liệu thu thập được, các tác dụng sinh học và công dụng chữa bệnh của một số loài thuộc chi *Bombax* L. bao gồm: chống viêm, giảm đau, hạ sốt, chống oxy hóa, chống ung thư, tác dụng bảo vệ gan, hạ huyết áp, bảo vệ tim mạch, hạ đường huyết, kháng khuẩn và kháng nấm...[78], [98], [131], [150], [155], [195], [207], [208]...

1.3.1. Độc tính

Năm 2009, Jain [102] đã sử dụng liều cao bột rễ vỏ thân *B. malabaricum* DC. với khối lượng 3g bột thử nghiệm trong 12 ngày, kết quả không thấy xuất hiện độc tính cấp trên chuột.

Trên mô hình gây độc tính cấp cho chuột nhắt trắng cả hai giống, Saleem và cộng sự [170] cho chuột uống dịch chiết methanol của lá loài *B. ceiba* L. trong 7 ngày với liều cao 1g/kg chuột. Nhận thấy, tại liều thử không có sự thay đổi hành vi cũng như các hoạt động, các chỉ số tim, gan và phổi của động vật thí nghiệm là bình thường.

Saleem (2003) tiếp tục nghiên cứu độc tính dịch chiết methanol của vỏ thân, ở cả hai liều 100mg/kg/ngày và liều cao 1000mg/kg/ngày trong 7 ngày.

Nhận thấy, liều thứ nhất làm giảm trọng lượng chuột 17%, trong đó 7% ở con cái. Nhưng tại liều thứ hai không có chuột nào sống sót (LD_{100}) [170]. Rehman và cộng sự đã đánh giá độc tính cấp của cao lỏng hoa Gạo qua đường uống và đường tiêm tĩnh mạch trên chuột nhắt và chuột cống trắng. Kết quả đã cho thấy mức độ và dấu hiệu độc phụ thuộc rất lớn vào liều dùng. LD_{50} của đường uống trên chuột cống là 6768,730mg/kg. Đường tiêm tĩnh mạch lần lượt là 889,496 và 467,84 mg ở chuột cống và chuột nhắt [162]. Gần đây nhất, năm 2011, Said [168] cho chuột nhắt trắng uống dịch chiết methanol của hoa loài *B. ceiba* L. liều 5g/kg thể trọng, độc tính thể hiện không rõ ràng và tất cả số chuột còn sống sau 24 giờ.

1.3.2. Tác dụng sinh học

1.3.2.1. Tác dụng chống viêm

Năm 1992, Lin Chung Chin và cộng sự đã tiến hành thử nghiệm tác dụng chống viêm cấp của dịch chiết nước rễ, thân, vỏ thân *B. malabaricum* DC. trên mô hình gây viêm bởi carragenin liều 2g/kg, kết quả cho thấy tác dụng chống viêm vượt trội so với indomethacin [126].

Năm 2009, Nima D. Namsa và cộng sự tiến hành sàng lọc 34 cây thuốc dân tộc, 13 cây được sử dụng chữa các bệnh viêm nhiễm trong đó có *B.ceiba* L. [144].

Jagtap và cộng sự dùng dịch chiết nước *B. malabaricum* DC. cho chuột cống được gây viêm ruột bằng indacetamid, indomethacin và chuột nhắt được gây viêm bằng acid acetic uống liều tối đa 270mg/kg và 500mg/kg, kết quả cho thấy có tác dụng giảm phù nề, giảm số lượng điểm loét và làm giảm TNF- α -1 cytokin gây ra các phản ứng viêm [97].

1.3.2.2. Tác dụng giảm đau

Tác dụng giảm đau của dịch chiết methanol lá (MBL) và mangiferin được đánh giá trên hai mô hình: mô hình gây quặn đau bằng acid acetic và mô hình

gây đau bằng mâm nóng để đánh giá tác dụng giảm đau ngoại vi và tác dụng giảm đau trung ương.

Trên mô hình gây quặn đau bằng acid acetic, lần lượt tiêm cho từng nhóm chuột nhất mangiferin chiết xuất từ MBL (0,422; 4,42; 44,2 mg/kg), aspirin trước khi tiêm acid acetic 0,9% (10 ml/kg). Kết quả cho thấy mangiferin ức chế biểu hiện quặn đau của chuột đến 38,89%, 46,65%, 59,29% so với nhóm chứng trong đó aspirin là 37,10%. Như vậy MBL và mangiferin đều làm giảm số cơn quặn đau của chuột, hiệu quả giảm đau phụ thuộc liều so với lô chứng [71].

Sử dụng naloxon (chất đối kháng thụ thể opioid không chọn lọc) để đánh giá cơ chế giảm đau, nhận thấy khi có mặt naloxon (liều 2mg/kg), tác dụng giảm đau của mangiferin giảm 38% nhưng hiệu quả giảm đau của MBL không thay đổi. Như vậy, MBL và mangiferin đều có tác dụng giảm đau nhưng tác dụng giảm đau của MBL hoàn toàn không phụ thuộc thụ thể opioid còn mangiferin thì theo cơ chế giảm đau giống morphin [71].

1.3.2.3. Tác dụng hạ sốt

Năm 2011, các nhà khoa học Ấn Độ thử tác dụng hạ sốt *in vivo* của dịch chiết methanol lá *B. malabaricum* DC. (MBL) trên mô hình gây sốt cho chuột Wistar bằng nấm men bánh mỳ với liều 200mg/kg và 400mg/kg. Lô thử được so sánh với lô sử dụng paracetamol liều 150mg/kg và lô chứng dùng Tween 80 1%. Nhiệt độ của chuột được đo ở trực tràng trong vòng 8h.

Kết quả cho thấy, MBL ở cả hai liều 200mg/kg và 400mg/kg đều làm giảm nhiệt độ cơ thể chuột có ý nghĩa thống kê ($p < 0,05$ và $p < 0,01$). Như vậy, có thể kết luận MBL có tác dụng hạ sốt. Tác dụng hạ sốt tuy chưa tốt bằng paracetamol nhưng thời gian tác dụng tối đa kéo dài hơn [78].

1.3.2.4. Tác dụng chống oxy hóa

Đã có nhiều đề tài nghiên cứu về tác dụng chống oxy hóa của *B. malabaricum* DC.:

Theo [107], *B. malabaricum* DC. được đánh giá tác dụng chống oxy hóa qua khả năng quét gốc DPPH, ngoài ra còn có khả năng ức chế sự peroxy lipid và peroxy nitrit, ức chế hoạt động của myeloperoxidase-1 enzym peroxidase [211].

Dịch chiết nước và cồn dịch chiết methanol của vỏ thân *B. malabaricum* DC. tại các nồng độ khác nhau từ 50 µg/ml đến 150 µg/ml cho thấy tác dụng chống oxy hóa mạnh thông qua khả năng quét gốc DPPH, ức chế peroxy hóa lipid qua nghiên cứu của Bhushan Gandhare và cộng sự [52].

Dịch chiết nước, cồn dịch chiết ethanol 50%, acetone 80% từ hoa của *B. malabaricum* DC. có khả năng chống oxy hóa vượt trội so với acid ascorbic hoặc acid gallic, tương đương vitamin E. Tổng số phenolic cao nhất tương đương 130,38 mg acid gallic, trong khi tổng số phenolic thấp nhất tương đương 57,09 gam acid gallic [226].

Cồn dịch chiết n-hexan và dịch chiết methanol từ hoa *B. malabaricum* DC. có tác dụng chống oxy hóa liều 0,5mg/ml, gần tương đương tert - butyl hydroquinon [79].

So sánh với BHA (Butylat hydroxylanisol), cồn phân đoạn butanol có tác dụng chống oxy hóa mạnh hơn BHA. EC₅₀ của phân đoạn butanol và BHA lần lượt là 5,31 µg/ml và 9,5 µg/ml [141].

Mangiferin thu được từ dịch chiết methanol lá *B. malabaricum* DC. có tác dụng chống oxy hóa tương đương rutin và tốt hơn acid ascorbic [71].

Thử nghiệm *invivo* cũng đã được tiến hành khi cho người tình nguyện uống 3g bột rễ *B. malabaricum* DC. đóng trong nang gelatin, đo khả năng chống oxy hóa toàn phần trong huyết thanh sau 4h thấy chỉ số chống oxy hóa tăng lên 44% [107].

1.3.2.5. Tác dụng bảo vệ gan

Thông thường, một dược liệu có tác dụng chống viêm và chống oxy hóa thì sẽ có tác dụng bảo vệ gan, *B. malabaricum* DC. không nằm ngoài quy luật đó.

Mô hình đánh giá tác dụng bảo vệ gan của các mẫu nghiên cứu thường sử dụng CCl_4 làm tác nhân gây độc. Kết quả cho thấy mangiferin và dịch chiết nước của rễ, thân, vỏ thân *B. malabaricum* DC. với liều 1g/kg làm hạ men gan về gần với giá trị men gan của nhóm chứng, với ALAT giảm 75% ($p < 0,005$), ASAT giảm 50% ($p < 0,01$), đồng thời các tổn thương mô học của gan cũng được giảm đáng kể, đặc biệt đối với tổn thương gan nhiễm mỡ và hoại tử tế bào gan [67], [71], [126].

Một nghiên cứu khác của Ravi V. và cộng sự năm 2010 trên mô hình gây viêm gan bằng isoniazid và rifampicin, với mẫu thử là căn dịch chiết methanol hoa *B. malabaricum* DC. tại các liều lần lượt là 150, 300, 450 mg/kg. Kết quả cho thấy ALAT, ASAT, ALP, bilirubin toàn phần đều giảm ($p < 0,01$), GSH và protein toàn phần tăng rõ rệt, tác dụng tương đương với chất chuẩn silymarin liều 2,5 mg/kg [158].

Said và cộng sự cũng tiến hành đánh giá tác dụng bảo vệ gan của hoa *B. malabaricum* DC. liều 250 mg/kg và 500 mg/kg nhưng sử dụng mô hình gây độc gan bằng paracetamol trên chuột nhắt trắng. Kết quả cho thấy men gan ALAT tương ứng giảm 26,4 và 27,8% còn ASAT giảm 13,7 và 17,0% [168].

1.3.2.5. Tác dụng hạ huyết áp

Saleem và cộng sự lần đầu tiên ghi nhận tác dụng hạ huyết áp 45-55% sau 60 phút của căn dịch chiết methanol từ lá loài *B. malabaricum* DC. liều 70mg/kg [170]. Đặc biệt, shamimin (flanovol-C-glycosid phân lập từ dịch chiết methanol của lá *B. malabaricum* DC.) có tác dụng hạ huyết áp đạt 81% ở liều 15mg/kg [80].

Lupeol liều 5mg/kg, 15 mg/kg và cồn dịch chiết methanol từ vỏ thân *B.malabaricum* DC. liều 10 mg/kg, 30mg/kg có tác dụng hạ huyết áp 44% đến 52% [170].

1.3.2.6. Tác dụng kháng khuẩn

Dịch chiết nước, cồn phân đoạn chiết bằng ethanol, cồn phân đoạn chiết bằng ether được hòa tan trong 2% tween 80 (10mg/ml) [116] và cồn phân đoạn buthanol của dịch chiết methanol từ vỏ thân liều 10mg/ml [141], shamimin [79], cồn dịch chiết methanol từ hoa [91], cồn dịch chiết methanol từ lá *B.malabaricum* DC. [94], [99], [96] có tác dụng ức chế các chủng vi khuẩn *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyogenes*, *Klebsiella pneumoniae*, *Escherchia coli*, *Klebsiella aerogenes*, *Neisseria gonorrhoea* và vi nấm *Candida albicans*.

Yuan và cộng sự nghiên cứu trên 50 cây thuốc có tác dụng kháng *Helicobacter pylori*, trong đó có dịch chiết ethanol của *B. malabaricum* DC., kết quả thu được MIC là 10,24 mg/ml, đường kính vùng ức chế 11-20mm [227]. Năm 1991, Mishra và cộng sự đã nghiên cứu tác dụng kháng nấm của dịch chiết nước lá *B. malabaricum* DC. Kết quả cho thấy dịch chiết nước gây ức chế 90,4% sợi nấm *Epidermophyton floccosum*, 80,4% chủng *Tricophyton mentagrophytes* và 75,25% chủng *Microsporum gypseum* [132].

Năm 1999, Faizi và Ali nghiên cứu tác dụng kháng khuẩn của shamimin, kết quả cho thấy tại nồng độ thử 100µg shamimin gây ức chế 3 chủng vi khuẩn Gram dương (*Listeria monocytogenes*, *Bacillus subtilis* và *Streptococcus pyogenes*) và 5 chủng vi khuẩn Gram âm (*Shigella sonnei*, *Salmonella typhi*, *Enterobacter cloacae*, *Pseudomonas aeruginosa* và *Shigella flexneri*) với đường kính vòng vô khuẩn trong khoảng 8-12 mm [80]. Dịch chiết methanol lá *B. malabaricum* DC. cũng đã được chứng minh khả năng kháng chủng *Salmonella typhi* MTCC 531 và B 330 với MIC 80-240 mg/ml. Trong khi dịch chiết nước không cho tác dụng này [91].

1.3.2.7. Tác dụng trên ký sinh trùng

Hossain và cộng sự đã tiến hành nghiên cứu tác dụng của dịch chiết methanol lá *B.malabaricum* DC. (MBL) với liều thử lần lượt là 10, 25, 50, 100mg/ml, so sánh với hoạt tính của albendazol liều 10 mg/ml trên ký sinh trùng sống là sán *Paramphistomum explanatum* [94]. Kết quả cho thấy tất cả sán đều chết ở liều thử MBL trong thời gian ngắn (<45 phút) và sự khác biệt có ý nghĩa thống kê ($p<0,001$) với chất so sánh. MBL liều 100 mg/ml cho hiệu quả tối đa. Sán bị tê liệt sau thời gian 18,50 phút và chết sau 22,17 phút [94].

1.3.2.8. Tác dụng trên vector truyền bệnh giun chỉ *Culex quinquefasciatus*

Hossain và cộng sự đã thực hiện nghiên cứu về tác dụng của cao lỏng và dịch chiết methanol lá *B. malabaricum* DC. trên bốn giai đoạn khác nhau trong vòng đời muỗi vằn *Culex quinquefasciatus* [95].

Kết quả cho thấy ở tất cả các nồng độ thử của cao lỏng lá (0,1%; 0,2%; 0,3%; 0,4%; 0,5%) đều gây tử vong với tỷ lệ cao khi sử dụng dịch chiết methanol liều 50 ppm ($p<0,05$). LD₅₀ xác định là 56,97 ppm và 48,85 ppm với nồng độ 0,4% và 0,5 % [95].

1.3.2.9. Tác dụng ức chế sự tạo mạch (antiangiogenic)

Cần phân đoạn butanol liều 100, 30, 10 µg/ml [141], dịch chiết methanol vỏ thân *B. malabaricum* DC. và lupeol ở liều 30, 50 µg/ml [225], có tác dụng ức chế mạnh sự hình thành các ống của tĩnh mạch cuống rốn người (HUEVC) từ 50% đến 98%.

Nghiên cứu khác cho thấy dịch chiết methanol vỏ thân và hoa của loài *B. malabaricum* DC. liều 30µg/ml và 100 µg/ml có tác dụng ức chế sự tạo mạch hiệu quả trong 58 cây thuốc sàng lọc ở Việt Nam với sự ức chế lên đến 89,3% và 87,5% [140].

1.3.2.10. Tác dụng chống ung thư

Lupeol chiết xuất từ *B. malabaricum* DC. được thử trên các dòng tế bào ung thư, tuy nhiên chưa thấy ảnh hưởng đến sự phát triển của dòng tế bào SK-mel-2, A549 và u sắc tố gây ung thư phổi.

Tuy nhiên, lupeol có tác dụng làm giảm đáng kể sự phát triển khối u ở chuột, đồng thời việc ăn các thức ăn chứa lupeol làm giảm khả năng mắc ung thư đại tràng, ung thư vú và ung thư tuyến tiền liệt [57], [219].

1.3.3. Công dụng

1.3.3.1. Tính vị, công năng

Hoa Gạo có vị ngọt, tính mát, có tác dụng thanh nhiệt, lợi thấp, tiêu viêm, thu liễm [8], [15], [31], [32]. Trị tiết tả, băng huyết [28].

Lá Gạo có vị ngọt, tính mát, có tác dụng thanh nhiệt, lợi thấp trị băng huyết [8].

Vỏ thân cây Gạo có vị cay, tính bình, có tác dụng khu phong trừ thấp, hoạt huyết, tiêu thũng, gây nôn [8], [19], [31], [28], [32].

Rễ Gạo có vị ngọt, tính mát, có tác dụng thanh nhiệt, lợi thấp, thu liễm, chỉ huyết, tán kết [32].

1.3.3.2. Công dụng

Nhiều bộ phận của cây Gạo được dùng làm thuốc theo y học cổ truyền [29], theo kinh nghiệm dân gian của các quốc gia trên thế giới và tại Việt Nam.

❖ Rễ và vỏ rễ

Tại Ấn Độ, dùng để trị tiêu chảy, kiết lý, bỏng [74]. Người dân thành phố Rajshahi dùng trong bệnh tiểu đường [104], [128], [156].

Ngoài ra, rễ có tác dụng bổ dương [50], [51], [175], bổ thận [46], [88], [127], bổ gan [101], bổ thần kinh [167].

Dùng cấp cứu trường hợp bọ cạp cắn, rắn cắn [148], [191], sốt, cảm lạnh [142].

Rễ Gạo dùng chữa đau thượng vị, viêm hạch bạch huyết dạng lao và làm thuốc lợi tiểu [8], [31], [32].

Rễ cũng được dùng để chữa sốt thương hàn, viêm amidan, liệt dương [19], bệnh lậu [190], bệnh giang mai [61]. Trẻ em bị tiểu đêm, đái dầm [83].

❖ *Thân cây và vỏ cây:*

Người dân quận Nalgonda (Ấn Độ) dùng vỏ thân chữa kiết lỵ do vi khuẩn, virus, rối loạn tiêu hóa [105], [160], [184], ợ nóng [191].

Vỏ thân cây có tác dụng bổ tim [148], chữa sỏi thận [117], [139], đau đầu [84], [120], nôn ra máu [121], chữa đau mắt [55], [99] và mụn trứng cá [176].

Dân gian dùng điều trị bệnh tiểu đường [47], [88]. Vỏ cây được đắp chữa sưng tấy, sai khớp [186] và cấp cứu trong trường hợp bị rắn cắn, bò cạp, rết và nhện đốt [45].

Vỏ cây làm thuốc chữa sốt [19]. Vỏ Gạo được dùng tươi chữa gãy xương, thấp khớp [8], [23], [28], [31], [32]. Vỏ Gạo giã nát cùng với bã chè tươi, lá cây Lai, lá cây Chẹo xào nóng, đắp chữa sai khớp. Đồng bào Thượng ở Tây nguyên dùng vỏ Gạo và vỏ cây Đa quả to, phơi khô, thái nhỏ, sắc uống chữa bệnh đậu mùa.

Nước sắc đặc của vỏ Gạo được ngâm chữa đau răng [28], [32], tiêu chảy kiết lỵ. Nhân dân cũng dùng vỏ Gạo để cầm máu trong các chứng băng huyết (phối hợp với rễ non và hạt cây tươi) [8], [14].

❖ *Gôm:*

Đặc biệt, gôm của loài *B. malabaricum* DC. điều trị hen suyễn [100], viêm phổi [108], phong thấp [63], [148] [149].

Ngoài ra, gôm được ghi nhận chữa bệnh ghẻ [45], tiêu chảy, kiết lỵ [191]. Trong dân gian, dùng điều trị sâu răng [65], đau nhức toàn thân [172].

Nhựa chích từ thân cây Gạo chữa ho ra máu, rong kinh với liều 1-3g/ngày [8], [14], [148], [199], trị thiếu máu [45], [88] và chảy máu [174].

Ở Ấn Độ, gồm Gạo là thuốc kích thích sinh dục và dùng hoa, quả cây Gạo để trị rắn cắn [32], [187]. Gôm hòa nước uống để cầm máu và chữa lậu [23], [58].

❖ *Lá:*

Lá thu hái chủ yếu từ tháng 8 đến tháng 10, được dùng làm thuốc giảm đau [172]. Người dân một số nước châu Á dùng lá trị thiếu máu hoặc cầm máu trong các trường hợp rong kinh, băng huyết [45], [88], [106].

Uống cao lỏng lá và đắp lá cây Gạo vào vết thương do rắn cắn [187].

❖ *Hoa:*

Hoa loài *B. malabaricum* DC. được dùng chữa thiếu máu [100], [120], bệnh trĩ [108], [120], nhọt và lở loét [130], [200], dị ứng [189].

Tại Ấn Độ, dùng cho nam giới sinh lý yếu [98], [118], trị lậu hay các trường hợp xuất tinh sớm [52], [179], [203]. Điều trị rối loạn kinh nguyệt, rong kinh ở phụ nữ [143], [192].

Trong dân gian, *B. malabaricum* DC. được phối hợp điều trị ung thư, chống viêm [52], [203], viêm ruột [44], [129], [199], rắn cắn [199], [201].

Hoa dùng làm thuốc lợi tiểu, nhuận tràng [179], lách to, chảy máu trong cơ thể [148], đau dạ dày và bệnh thủy đậu [201], đau mắt [99], [117].

Hoa Gạo chữa kiết lỵ, tiêu chảy với liều 20-30g, phơi khô, thái nhỏ, sắc với 200ml nước còn 50ml, chia 2 lần uống trong ngày. Cũng dùng như trà uống vào mùa hè, nước hoa Gạo được xem như một dung dịch bổ âm, dùng chữa suy nhược hoặc do các nguyên nhân khác (rong kinh, đa kinh, chảy máu dạ dày tá tràng, mất máu sau vết thương, sỏi thận mà tủy xương bình thường và do cả trường hợp suy tủy) [8], [28], [31]. Khoa Tiêu hóa và Huyết học, viện Quân Y 108 đã dùng nước sắc và cao lỏng 2:1 của hoa Gạo phơi khô cho uống mỗi ngày 100 ml để chữa cho bệnh nhân thiếu máu nhược sắc do rong kinh, đa kinh, chảy máu dạ dày, mất máu sau khi mổ đạt hiệu quả tốt 90%. Mỗi đợt điều trị là 30 ngày. Thuốc không gây tác dụng phụ, người bệnh ăn ngủ tốt, tăng cân. Hoa Gạo

mới hái rửa sạch, để ráo nước, giã thật nhuyễn ép lấy nước trộn với dầu gấc (lượng tương đương), đánh đều, bôi chữa bỏng [32].

❖ *Quả:*

Quả nang dùng để chữa vô sinh, đái tháo đường tại Ấn Độ. Dùng cấp cứu trường hợp rắn cắn [120], [199].

❖ *Hạt:*

Hạt hình trứng nhẵn, màu đen dùng chữa kiết lỵ và trong các trường hợp phá thai [119], [133], [176], [184].

Hạt sao vàng sắc lấy nước uống làm tăng thêm sữa [28].

Ngoài ra, hạt cây Gạo cho dầu có tác dụng chữa ngứa lở ngoài da [28], đồng thời có thể dùng để ăn hoặc dùng thay dầu hạt bông trong kỹ nghệ sản xuất xà phòng [32].

❖ *Sợi bông:*

Người dân Ấn Độ dùng sợi bông chữa bỏng và bệnh lòi dom [148], [175].

❖ *Gai:*

Tại Calcutta (Ấn Độ), gai được dùng điều trị viêm da đau đầu [45], [175].

Đĩa mật trong hoa dùng lợi tiểu và tẩy [8], [14].

1.3.3.3. Liều dùng:

- Theo [8], [31], [35]: Hoa: 10-20g/ngày, Vỏ: 15-30g/ngày, Rễ: 5-50g/ngày,
Quả: 1-3g/ngày, Gôm: 1-2g/ngày.

1.3.3.4. Một số bài thuốc

❖ *Theo [31],*

- *Chữa gãy xương:*

Vỏ Gạo	30g	Lá xoan non	10g
Củ nghệ	20g	Dây tơ hồng	20g
Củ dứa dại	10g	Ngải cứu	8g

Tất cả giã nát trộn với lòng trắng trứng gà, đắp bó tại chỗ.

- *Chữa sai khớp*: Vỏ Gạo giã nát cùng bã chè tươi, lá cây lai, lá cây chèo xào nóng đắp vào khớp bị sai.

- *Chữa viêm loét dạ dày mạn tính*:
Rễ/Vỏ Gạo 30g
Rễ cây Xuyên tiêu 30g

sắc nước uống.

❖ Theo *Từ điển cây thuốc Việt Nam* [8]:

- *Chữa đau thượng vị*:
Rễ/vỏ Gạo 30g
Rễ Hoàng lực 6g

đun sôi uống.

- *Sung tấy, đơn độc, quai bị viêm dạ dày*: vỏ Gạo tươi (bỏ lớp ngoài), thái miếng 30-40 g, sắc uống.

- *Trị ngã sai khớp hoặc gãy xương*: Vỏ trắng cây Gạo, giã nát hòa với lòng trắng trứng gà, đổ giấm vào nấu chín đắp vào chỗ xương gãy sau khi đã nắn sửa xương lại, khô lại thay đến khi hết đau và vết thương bằng phẳng thì thôi .

CHƯƠNG 2

NGUYÊN VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. NGUYÊN VẬT LIỆU NGHIÊN CỨU

2.1.1. Nguyên liệu nghiên cứu

- Nguyên liệu nghiên cứu là lá, vỏ thân của cây Gạo *Bombax malabaricum* DC. (BB) thu hái vào tháng 10/2010 tại xã Hương Sơn, huyện Mỹ Đức (Hà Nội), hoa và mẫu cành tươi mang hoa thu hái vào tháng 4/2011. Tiêu bản mẫu nghiên cứu được lưu giữ tại Phòng tiêu bản, Viện Sinh thái và Tài nguyên sinh vật (số hiệu mẫu của loài nghiên cứu là TN01). Giấy chứng nhận mẫu lưu tiêu bản ở Phụ lục 1.

- Lấy riêng lá, hoa và vỏ thân của cây Gạo *Bombax malabaricum* DC. rửa sạch, sấy khô ở 50°C rồi làm nhỏ, bỏ trong túi nilon kín, để nơi khô ráo, thoáng mát làm mẫu nghiên cứu đặc điểm vi học và hóa học.

- Chuẩn bị cao nước để thử tác dụng sinh học: sau khi rửa sạch, làm nhỏ, sấy khô ở 50°C, chiết riêng từng bộ phận của cây Gạo. 2kg dược liệu (lá, vỏ thân, hoa) đã xác định độ ẩm lần lượt cho vào bình sắc dược liệu, thêm nước cho ngập dược liệu khoảng 2cm. Đun sôi 1 giờ, lấy dịch chiết đem lọc. Chiết 3 lần, gộp các dịch lọc và đem cô đến còn thể tích 500ml, tương ứng với cao lỏng 4:1 (1ml cao nước tương ứng với 4g dược liệu khô). Sau khi chiết thu được 500ml cao lỏng lá (LG), 500ml cao lỏng vỏ thân cây Gạo (VG) và 500ml cao lỏng hoa (HG). Liều dùng trong các nghiên cứu được tính quy ra gam dược liệu khô cho 1kg cân nặng chuột.



Hình 2.1. Mẫu cao nước vỏ thân cây Gạo



Hình 2.2. Nguyên liệu các bộ phận cây Gao

2.1.2. Động vật thí nghiệm

- Chuột nhắt trắng, chủng Swiss, cả hai giống, khỏe mạnh, khối lượng 20 ± 2 g, của Viện Vệ sinh dịch tễ Trung ương cung cấp.

- Chuột cống trắng, cả hai giống, khỏe mạnh, khối lượng 120 ± 20 g, của Viện Vệ sinh dịch tễ Trung ương cung cấp.

Động vật được nuôi trong điều kiện phòng thí nghiệm với đầy đủ thức ăn và nước uống tại Bộ môn Dược lý - Trường Đại học Y Hà Nội từ trước khi nghiên cứu 5 ngày và trong suốt thời gian nghiên cứu.

2.1.3. Hóa chất và thiết bị

❖ Thuốc thử, dung môi, hóa chất

- Các thuốc thử, dung môi, hóa chất sử dụng trong nghiên cứu đạt tiêu chuẩn phân tích qui định trong Dược điển Việt Nam IV.

+ Bộ kit định lượng protein của hãng Hospitex Diagnostics (Italy)

+ Bộ kit định lượng ASAT của hãng DIALAB GmbH (Áo)

+ Bộ kit định lượng ALAT của hãng DIALAB GmbH (Áo)

+ Dung dịch xét nghiệm máu ABX Minidil LMG của hãng ABX - Diagnostics

- Mẫu chuẩn:

- + Aspirin gói 500mg (Aspegic) của công ty Sanofi-Synthelabo Việt Nam.
- + Codein phosphat hàm lượng 97,61%, lọ chất chuẩn do Trung tâm Kiểm nghiệm Hà Nội cung cấp.
- + Prednisolon dạng viên nén, hàm lượng 5mg của Công ty CPDP Nam Hà.
- + Silymarin (Silymax) dạng viên nén, hàm lượng 70mg của CT Mediplantex.
- + Paracetamol (Efferalgan) dạng viên sủi, hàm lượng 500mg của Pháp.
- + Carragenin (carrageenan sodium salt, a naturally occurring polysaccharide) của hãng BHD Chemicals Ltd. Poolo England, lọ 250 gam.

❖ **Phương tiện**

- Quan sát, phân tích hoa, tiêu bản thực vật và soi bột lá, hoa, vỏ thân, chụp ảnh trực tiếp trên kính hiển vi Leica Wetzlar GmbH, kính soi nổi Krussoptroni, máy ảnh kỹ thuật số Canon Power shot S40 tại Bộ môn Thực vật, Bộ môn Dược liệu (Trường Đại học Dược Hà Nội).
- Máy đo điểm chảy (Mp): Kofler micro-hotstage, Viện Hóa Học các Hợp chất thiên nhiên-Viện Hàn lâm Khoa Học và Công Nghệ Việt Nam.
- Máy khối phổ: Agilent 6310 Ion Trap và JEOL JMSHX-100 Mass spectrometer, Viện Hóa Học các Hợp chất thiên nhiên - Viện Hàn lâm Khoa Học và Công Nghệ Việt Nam.
- Máy đo phổ cộng hưởng từ hạt nhân: Bruker AM500 FT-NMR Spectrometer, Viện Hóa Học-Viện Hàn lâm Khoa Học và Công Nghệ Việt Nam.
- Máy sắc ký lỏng khối phổ Shimadzu LC/MS 8030 có kết nối thêm detector SPD-20A của Trung tâm Kiểm nghiệm Hà Nội.
- Máy đo độ phù chân chuột: Plethysmometer No.7250 (Ugo-Basile, Italy), Bộ môn Dược lý, Trường Đại học Y Hà Nội.
- Máy xét nghiệm sinh hóa: Screen- Master (Hospitex Diagnostic, Italy), Bộ môn Dược lý, Trường Đại học Y Hà Nội.

- Thiết bị hâm nóng của hãng Ugo-Basile, Italy, Bộ môn Dược lý, Trường Đại học Y Hà Nội.
- Máy đo quang ELISA, Bộ môn Dược lý, Trường Đại học Y Hà Nội.
- Máy huyết học Vet abcTM Animal Blood Counter, Bộ môn Dược lý, Trường Đại học Y Hà Nội.

2.1.4. Địa điểm nghiên cứu

❖ Nghiên cứu tại thực địa

- Xã Hương Sơn, huyện Mỹ Đức, Hà Nội.

❖ Nghiên cứu tại phòng thí nghiệm

- Nghiên cứu thực vật tại: Bộ môn Dược liệu và Bộ môn Thực vật – trường Đại học Dược Hà Nội, Phòng Thực vật – Viện Sinh thái và Tài nguyên sinh vật.
- Nghiên cứu hóa học tại: Bộ môn Dược liệu- Trường Đại học Dược Hà Nội, Trung tâm Kiểm nghiệm Hà Nội, Phòng Phổ khối và Phòng Cộng hưởng từ hạt nhân - Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam.
- Thử độc tính cấp và nghiên cứu tác dụng sinh học tại Bộ môn Dược lý - Trường Đại học Y Hà Nội.

2.2. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.2.1. Nghiên cứu về thực vật

- Quan sát và mô tả đặc điểm hình thái thực vật của cây tại thực địa.
- Giám định tên khoa học của cây trên cơ sở phân tích đặc điểm hình thái, đặc điểm bộ phận sinh sản, so sánh với tiêu bản lưu trữ và các tài liệu phân loại thực vật [8], [9], [183] cùng với các chuyên gia phân loại thực vật.
- Nghiên cứu đặc điểm vi học: cắt và làm tiêu bản vi phẫu, soi bột lá, hoa và vỏ thân loài nghiên cứu, quan sát các đặc điểm, mô tả và chụp ảnh tiêu bản [7].

2.2.2. Nghiên cứu thành phần hóa học

- Định tính các nhóm chất hữu cơ chính trong dịch chiết toàn phần bằng các phản ứng đặc trưng [22], [28].
- Chiết xuất bằng methanol và tách các thành phần bằng chiết lỏng lỏng với các

dung môi có độ phân cực tăng dần [11], [15], [28].

- Phân lập các hợp chất bằng phương pháp sắc ký cột với chất hấp phụ Silica gel (0,040-0,063mm, Merck) và chất hấp phụ pha đảo YMC (30-50 μ m, Fuji Silica Chemical Ltd.) [2], [10], [16].
- So sánh thành phần bằng SKLM với bản mỏng Silica gel GF254 (Merck) [15].
- Xác định độ tinh khiết của các hợp chất bằng SKLM, HPLC và hàm lượng được sơ bộ xác định bằng phương pháp HPLC [1], [59], [60], [64], [89], [123].
- Nhận dạng các hợp chất phân lập được dựa vào các dữ liệu phổ MS, NMR, độ chảy, dung môi đo phổ sẽ ghi cụ thể cho từng chất phân lập, so sánh dữ liệu phổ chất phân lập với dữ liệu phổ có trong thư viện phổ và tài liệu thu thập được [15], [22], [28], [110].

2.2.3. Phương pháp đánh giá độc tính cấp và tác dụng sinh học

2.2.3.1. Đánh giá độc tính cấp

Đánh giá độc tính cấp của cao lỏng các bộ phận của cây Gạo được thực hiện cụ thể như sau [12]: Chuột nhắt trắng thực nghiệm được nuôi ổn định trong điều kiện phòng thí nghiệm 5 ngày. Chuột đạt yêu cầu về cân nặng 20 ± 2 g sẽ được đưa vào thí nghiệm. Tiến hành thử nghiệm trên các lô chuột (mỗi lô 10 con) theo mức liều 0,25ml dịch chiết/ 10g chuột/ 1 lần. Khoảng cách giữa hai lần uống liên tiếp là 2 giờ. Chuột được để nhịn đói 15 giờ trước khi tiến hành thí nghiệm, cho uống nước theo nhu cầu. Theo dõi chuột liên tục trong vòng 6 giờ, tỉ lệ chết trong 72 giờ và các dấu hiệu khác trong vòng 7 ngày sau khi dùng chế phẩm thử.

Các chỉ tiêu theo dõi bao gồm:

- Tình trạng chung của chuột: hoạt động tự nhiên, tư thế, màu sắc (mũi, tai, đuôi), lông, phân, nước tiểu.
- Tỉ lệ chuột chết trong 72 giờ và các dấu hiệu khác trong vòng 7 ngày sau khi thử nghiệm.
- Xác định LD₅₀ (nếu có) theo phương pháp Litchfield – Wilcoxon.

2.2.3.2. *Đánh giá tác dụng giảm đau*

❖ *Đánh giá tác dụng giảm đau trên chuột nhắt trắng gây quặn đau bằng acid acetic (phương pháp Koster) [13], [33], [37], [90].*

Chuột nhắt trắng cả hai giống cân nặng $20 \pm 2\text{g}$, được chia ngẫu nhiên thành 6 lô, mỗi lô 10 con:

- Lô 1 (đối chứng): uống nước cất, 1 ml/100 g chuột.
- Lô 2 (chứng dương): uống aspirin liều 100 mg/kg chuột.
- Lô 3: uống cao nước VG liều 6g dược liệu/kg chuột.
- Lô 4: uống cao nước VG liều 12g dược liệu/kg chuột.
- Lô 5: uống cồn VGE liều 6g dược liệu/kg chuột.
- Lô 6: uống cồn VGE liều 12g dược liệu/kg chuột.

Trong đó VG là cao nước vỏ thân cây Gạo và VGE là cồn phân đoạn ethyl acetat chiết xuất từ vỏ thân cây Gạo. Các mẫu thử đều được pha trong nước cất để đảm bảo thể tích 1 lần cho uống đồng đều ở tất cả các lô là 0,2ml/10g chuột. Cho chuột uống thuốc thử 3 ngày liền. Ngày thứ 3, sau khi cho chuột uống thuốc 1 giờ, tiêm vào ổ bụng chuột dung dịch acid acetic 1%, 0,2 ml/con. Đếm số cơn quặn đau của chuột trong từng 5 phút cho đến hết phút thứ 30 sau khi tiêm acid acetic. Tỷ lệ % ức chế các cơn quặn đau của các lô uống mẫu thử so với lô chứng được tính theo công thức:

$$I\% = \frac{D_c - D_t}{D_c} \times 100\%$$

trong đó: D_c : Số cơn quặn đau trung bình ở lô chứng

D_t : Số cơn quặn đau trung bình ở lô dùng thuốc

$I\%$: Tỷ lệ ức chế các cơn quặn đau

❖ *Đánh giá tác dụng giảm đau trên chuột nhắt trắng gây đau bằng mâm nóng*

Thí nghiệm được tiến hành trên chuột nhắt trắng, cả 2 giống, cân nặng $20 \pm 2\text{g}$ [37], [90]. Trước khi tiến hành thí nghiệm, xác định thời gian đáp ứng đau của chuột để loại bỏ những chuột có phản ứng đau trước 8 giây hoặc sau 60

giây. Chuột nhắt trắng được chia ngẫu nhiên thành 6 lô, mỗi lô 10 con:

- Lô 1 (đối chứng): uống nước cất, 1 ml/100 g chuột.
- Lô 2 (chứng dương): Codein liều 10 mg/kg chuột.
- Lô 3: uống cao nước VG liều 6g dược liệu/kg chuột.
- Lô 4: uống cao nước VG liều 12g dược liệu/kg chuột.
- Lô 5: uống cồn VGE liều 6g dược liệu/kg chuột.
- Lô 6: uống cồn VGE liều 12g dược liệu/kg chuột.

Trong đó VG là cao nước vỏ thân cây Gạo và VGE là cồn phân đoạn ethyl acetat chiết xuất từ vỏ thân cây Gạo. Các mẫu thử đều được pha trong nước cất để đảm bảo thể tích 1 lần cho uống đồng đều ở tất cả các lô là 0,2ml/10g chuột. Cho chuột uống thuốc thử 3 ngày liên (như phần thí nghiệm trên). Đặt chuột lên mâm nóng, luôn duy trì ở nhiệt độ 56°C bằng hệ thống ổn nhiệt. Dùng đồng hồ bấm giây để tính thời gian từ lúc đặt chuột vào mâm nóng đến khi chuột liếm chân sau hoặc nhảy ra khỏi mâm nóng khi có phản xạ đau. So sánh thời gian phản ứng với nhiệt của lô chuột uống mẫu thử với lô chứng để đánh giá tác dụng của mẫu thử.

2.2.3.3. Đánh giá tác dụng chống viêm cấp

❖ *Đánh giá tác dụng chống viêm cấp trên mô hình phù chân chuột bằng carragenin*

Áp dụng mô hình gây phù chân chuột bằng carrageenin của Winter và cộng sự [37], [90], [218]. Chuột cống trắng cả 2 giống cân nặng 120 ± 20 g được chia ngẫu nhiên thành 6 lô, mỗi lô 10 con.

- Lô 1 (đối chứng): uống nước cất, 1 ml/100g chuột.
- Lô 2: uống aspirin liều 150 mg/kg chuột.
- Lô 3: uống cao nước VG liều 4g dược liệu/kg chuột.
- Lô 4: uống cao nước VG liều 8g dược liệu/kg chuột.
- Lô 5: uống cồn VGE liều 4g dược liệu/kg chuột.
- Lô 6: uống cồn VGE liều 8g dược liệu/kg chuột.

Trong đó VG là cao nước vỏ thân cây Gạo và VGE là cồn phân đoạn ethyl acetat chiết xuất từ vỏ thân cây Gạo. Các mẫu thử đều được pha trong nước cất để đảm bảo thể tích 1 lần cho uống đồng đều ở tất cả các lô là 0,2ml/10g chuột. Chuột được uống thuốc 4 ngày liên tục trước khi gây viêm. Ngày thứ 4, sau khi uống thuốc thử 1 giờ, gây viêm bằng cách tiêm carrageenin 1% (pha trong nước muối sinh lý) 0,1 ml/chuột vào gan bàn chân sau, bên phải của chuột.

Đo thể tích chân chuột (đến khớp cổ chân) bằng dụng cụ chuyên biệt vào các thời điểm: trước khi gây viêm (V_0); sau khi gây viêm 2 giờ (V_2), 4 giờ (V_4), 6 giờ (V_6) và 24 giờ (V_{24}). Mức độ tăng thể tích của từng chân chuột được tính theo công thức của Fontaine:

$$\Delta V\% = \frac{V_t - V_0}{V_0} \times 100\%$$

trong đó: V_0 : thể tích chân chuột trước khi gây viêm

V_t : thể tích chân chuột sau khi gây viêm

ΔV : độ tăng thể tích chân chuột

- Tác dụng chống viêm của thuốc được đánh giá bằng khả năng ức chế phản ứng phù ($I\%$):

$$I\% = \frac{\Delta \bar{V}_c\% - \Delta \bar{V}_t\%}{\Delta \bar{V}_t\%} \times 100$$

trong đó: $\Delta \bar{V}_c\%$: trung bình độ tăng thể tích chân chuột ở lô đối chứng

$\Delta \bar{V}_t\%$: trung bình độ tăng thể tích chân chuột ở lô uống thuốc

❖ *Đánh giá tác dụng chống viêm cấp trên chuột gây viêm màng bụng*

Áp dụng phương pháp của A. R. Weidhase & Rhirf Chelmann [37], [90]. Chuột công trắng cả 2 giống cân nặng 120 ± 20 g được chia ngẫu nhiên thành 6 lô, mỗi lô 10 con.

- Lô 1 (đối chứng): uống nước cất, 1ml/100g chuột.
- Lô 2 (chứng dương): uống aspirin liều 150mg/kg chuột .

- Lô 3: uống cao nước VG liều 4g được liệu/kg chuột .
- Lô 4: uống cao nước VG liều 8g được liệu/kg chuột.
- Lô 5: uống cồn VGE liều 4g được liệu/kg chuột.
- Lô 6: uống cồn VGE liều 8g được liệu/kg chuột.

Trong đó VG là cao nước vỏ thân cây Gạo và VGE là cồn phân đoạn ethyl acetat chiết xuất từ vỏ thân cây Gạo. Các mẫu thử đều được pha trong nước cất để đảm bảo thể tích 1 lần cho uống đồng đều ở tất cả các lô là 0,2ml/10g chuột. Các lô chuột được uống thuốc thử hoặc nước cất với thời gian như thí nghiệm trên. Gây viêm màng bụng bằng dung dịch gồm 0,05g carrageenin và 1,4ml formaldehyd pha trong 100ml nước muối sinh lý vừa đủ. Tiêm màng bụng dung dịch trên cho chuột với thể tích 2 ml cho mỗi chuột. Sau 24 giờ gây viêm, mổ ổ bụng chuột hút dịch rỉ viêm. Đo thể tích và đếm số lượng bạch cầu/ml dịch rỉ viêm, định lượng protein trong dịch rỉ viêm của chuột uống mẫu thử so với chuột lô chứng để đánh giá tác dụng của mẫu thử.

2.2.3.4. Đánh giá tác dụng chống viêm mạn

Chuột nhất trắng, cả 2 giống, cân nặng 20 ± 2 g được chia ngẫu nhiên thành 6 lô, mỗi lô 10 con [90].

- Lô 1 (đối chứng): uống nước cất, 1ml/100g chuột.
- Lô 2 (chứng dương): uống prednisolon liều 5mg/kg chuột.
- Lô 3: uống cao nước VG liều 6g được liệu/kg chuột.
- Lô 4: uống cao nước VG liều 12g được liệu/kg chuột.
- Lô 5: uống cồn VGE liều 6g được liệu/kg chuột.
- Lô 6: uống cồn VGE liều 12g được liệu/kg chuột.

Trong đó VG là cao nước vỏ thân cây Gạo và VGE là cồn phân đoạn ethyl acetat chiết xuất từ vỏ thân cây gạo. Các mẫu thử đều được pha trong nước cất để đảm bảo thể tích 1 lần cho uống đồng đều ở tất cả các lô là 0,2ml/10g chuột. Gây viêm mạn tính bằng cách cấy sợi amiant trọng lượng 6 mg tiết trùng (sấy 120°C trong 1 giờ) đã được tẩm carrageenin 1%, ở da gáy của mỗi chuột. Sau

khi cấy u hạt, các chuột được uống nước cất hoặc thuốc thử liên tục trong 7 ngày. Ngày thứ 8 tiến hành giết chuột bằng cloroform, bóc tách khối u hạt và cân tươi, sau đó sấy khô ở nhiệt độ 56°C đến khối lượng không đổi (khoảng 18 giờ). Cân trọng lượng u hạt sau khi đã được sấy khô [90]. Tỷ lệ % ức chế khối lượng u hạt được tính theo công thức:

$$I\% = \frac{T_c - T_t}{T_c} \times 100\%$$

trong đó: T_c : Khối lượng trung bình khối u hạt lô chứng trắng

T_t : Khối lượng trung bình khối u hạt lô thử

$I\%$: Tỷ lệ ức chế u hạt.

2.2.3.5. Đánh giá tác dụng cầm máu

Nguyên tắc: đánh giá thời gian đông máu, thời gian chảy máu đuôi chuột, đếm số lượng tiểu cầu trong máu ngoại vi [90].

Tiến hành: Chuột nhắt trắng, cả 2 giống, khối lượng 20 ± 2 g được chia ngẫu nhiên thành 3 lô, mỗi lô 10 con.

Lô 1 (đối chứng): uống nước cất, thể tích 0,2ml/10g chuột.

Lô 2: uống cao nước VG liều 6 g/kg chuột.

Lô 3: uống cao nước VG liều 12 g/kg chuột.

Trong đó VG là cao nước vỏ thân cây Gạo và các mẫu thử đều được pha trong nước cất để đảm bảo thể tích 1 lần cho uống đồng đều ở tất cả các lô là 0,2ml/10g chuột. Chuột được uống nước cất hoặc thuốc thử trong 7 ngày liên tục. Xét nghiệm được tiến hành tại 2 thời điểm trước và khi uống thuốc thử 7 ngày 1 giờ. Chuột được đánh giá thời gian đông máu tại nhiệt độ phòng (28°C) và trong bình ổn nhiệt nuôi cơ quan cô lập. Sau đó chuột được lấy máu để đếm số lượng bạch cầu và tiểu cầu.

2.2.3.6. Đánh giá tác dụng bảo vệ gan

Đánh giá tác dụng bảo vệ gan của mẫu nghiên cứu trên mô hình gây tổn thương gan thực nghiệm bằng paracetamol (PAR) [4], [26], [27], [34]. Chuột

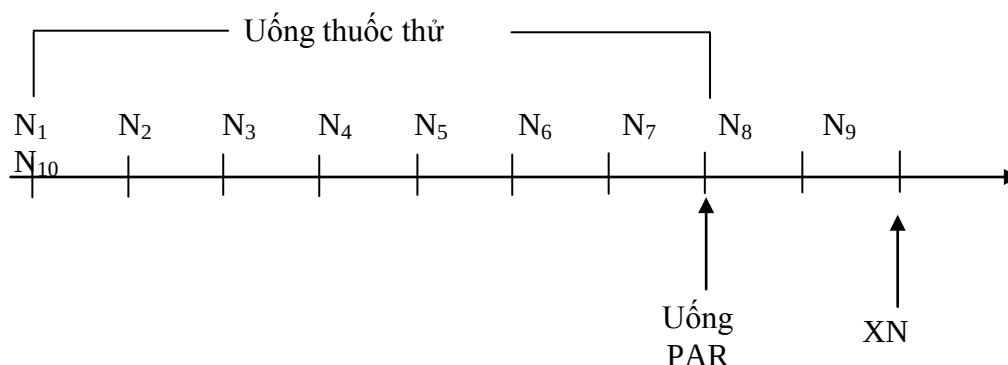
nhất trắng, cả 2 giống, cân nặng $20 \pm 2g$ được chia ngẫu nhiên thành 5 lô, mỗi lô 10 con.

- Lô 1 (đối chứng): uống nước cất, thể tích 0,2ml/10g chuột.
- Lô 2 (mô hình): uống nước cất + uống PAR 400mg/kg chuột
- Lô 3(chứng dương): silymarin liều 70mg/kg chuột + PAR 400mg/kg chuột.
- Lô 4: uống cao nước LG liều 6g dl/kg chuột + uống PAR 400mg/kg chuột.
- Lô 5: uống cao nước LG liều 12g dl/kg chuột + uống PAR 400mg/kg chuột.

Trong đó LG là cao nước lá cây Gạo và các mẫu thử đều được pha trong nước cất để đảm bảo thể tích 1 lần cho uống đồng đều ở tất cả các lô là 0,2ml/10g chuột. Các lô chuột được uống nước cất hoặc thuốc thử liên tục trong 7 ngày liên tục, ngày thứ 8 sau khi cho chuột nhịn đói 16 giờ, lô 2, 3, 4, 5 đồng loạt được uống paracetamol liều 400mg/kg. 48 giờ sau khi gây độc, giết chuột, lấy máu động mạch cảnh ở tất cả các lô chuột làm xét nghiệm ASAT, ALAT [3]. Lấy gan để cân trọng lượng, quan sát đại thể, làm xét nghiệm vi thể và định lượng MDA dịch đồng thể gan.

$$X = \frac{m_{gan}}{m_{chuot}}$$

trong đó: m_{gan} : khối lượng gan ; m_{chuot} : khối lượng chuột ngay trước khi mổ

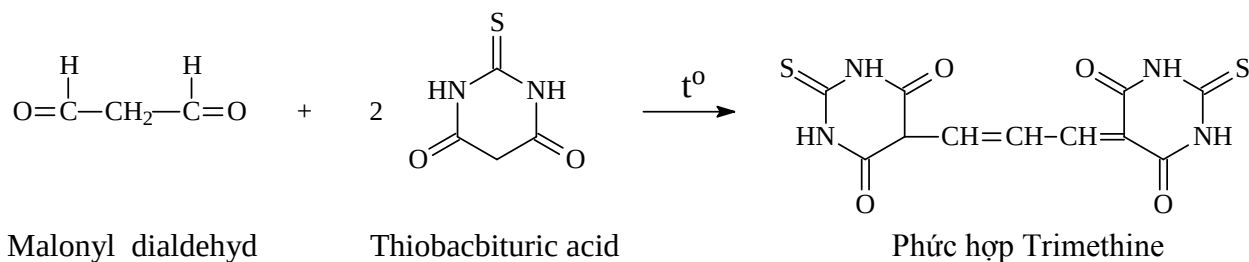


Hình 2.3. Quy trình nghiên cứu tác dụng bảo vệ gan và chống oxy hoá trên mô hình gây tổn thương gan bằng paracetamol

❖ *Phương pháp xác định MDA dịch đồng thể gan [4]:*

Nguyên lý của phương pháp:

MDA là một sản phẩm được tạo ra trong quá trình peroxyhoá lipid màng tế bào gan. MDA phản ứng với acid thiobarbituric để tạo phức trimethine có màu hồng và có đỉnh hấp thụ cực đại ở bước sóng 530-532nm.



Hình 2.4. Phản ứng tạo phức trimethine

Mật độ quang của dung dịch đo tỷ lệ thuận với nồng độ MDA. Hàm lượng MDA được tính theo hệ số chuyển đổi trên đường cong chuẩn sử dụng MDA tinh khiết trong khoảng nồng độ 2-40nmol.

Hệ số sau khi dựng đường cong chuẩn là 28,2.

Tiến hành: Cân 0,25g gan chuột nhắt trắng nghiền với 6 ml dung dịch KCl 0,12%.

- Bước 1: 1ml dung dịch nghiền từ phủ tạng thêm vào 0,25ml acid ascorbic và 0,25ml muối Mohr.
- Bước 2: ủ 37⁰C trong 30 phút lấy ra cho thêm vào 0,5ml dung dịch acid tricloacetic vào các ống, ly tâm 3000 vòng/phút trong 10 phút.
- Bước 3: lấy 1ml dịch nổi thêm vào 0,5ml acid thiobarbituric
- Bước 4: đun sôi cách thủy 20 phút sau đó để lạnh ở nhiệt độ phòng, dung dịch có màu hồng.
- Bước 5: đo quang ở máy ELISA bước sóng 532nm.

2.2.4. Phương pháp xử lý số liệu

Các số liệu thực nghiệm được xử lý thống kê theo phương pháp thống kê sinh học, sử dụng công cụ phân tích số liệu (Data analysis) của Microsoft Excel

[24]. Kết quả thí nghiệm được biểu thị bằng ($M \pm SD$) & ($M \pm SE$). Đánh giá, so sánh giá trị trung bình giữa các lô thí nghiệm bằng phương pháp thống kê sử dụng chuẩn t-Student. Sự khác biệt có ý nghĩa khi $p < 0,05$ với qui ước:

*: $p < 0,05$; **: $p < 0,01$; ***: $p < 0,001$

CHƯƠNG 3

KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU

3.1. NGHIÊN CỨU VỀ THỰC VẬT

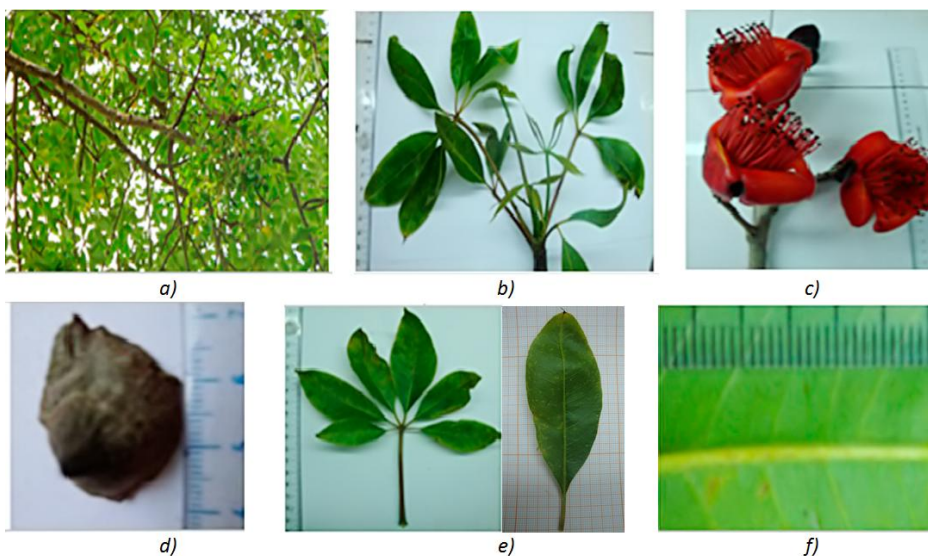
3.1.1. Mô tả đặc điểm hình thái thực vật và giám định tên khoa học cây Gạo

Cây gỗ, cao 12-15m. Thân có gai hình nón, thường có bệnh vè ở gốc. Lá kép chân vịt, mang 5 lá chét hay hơn, lá chét hình trứng hay hình bầu dục rộng, kích thước 6-7 x 3,5-4cm, đầu lá thường có mũi; mép lá hơi xoắn, cuống lá chét dài 1,5-2,5 cm; cuống chung dài 15-20cm. Hoa đơn độc ở nách lá, hoa to, đường kính 15-17cm. Đài hình chuông hay hình chén. 5 cánh hoa, màu hồng hay đỏ. Nhị nhiều, chỉ nhị dính thành 5 bó ở phía dưới; không dính thành cột. Bầu dưới gần hình tròn. Vòi nhụy dài hơn chỉ nhị 1-1,5cm, chia 5 thùy; đầu thùy dày lên dạng đầu. Bao phấn một ô, mở dọc, hạt phấn tròn. Quả nang mở vách, kích thước 10-15 x 4-6cm, nứt hay có 5 gờ thẳng, vỏ quả có lông như bông. Hạt dài đến 8mm, có lông dài như sợi bông, màu trắng.

Qua quan sát các đặc điểm của loài nghiên cứu và tham khảo các tài liệu về thực vật của Việt Nam [5], [6], [7], [8], thực vật chí Trung Quốc [220] và sự xác nhận của PGS. TS Trần Huy Thái (Viện Sinh thái và Tài nguyên sinh vật), cây Gạo được giám định tên khoa học là *Bombax malabaricum* DC., họ Gạo (Bombacaceae). Tên đồng nghĩa: *Bombax ceiba* L. Tên Việt Nam: Mộc miên, Gạo rừng, Gạo hoa đỏ, Gòn đỏ, Gạo đỏ.



Hình 3.1. Cây Gạo



Hình 3.2. Đặc điểm hình thái *Bombax malabaricum* DC.

a) Cành cây gạo

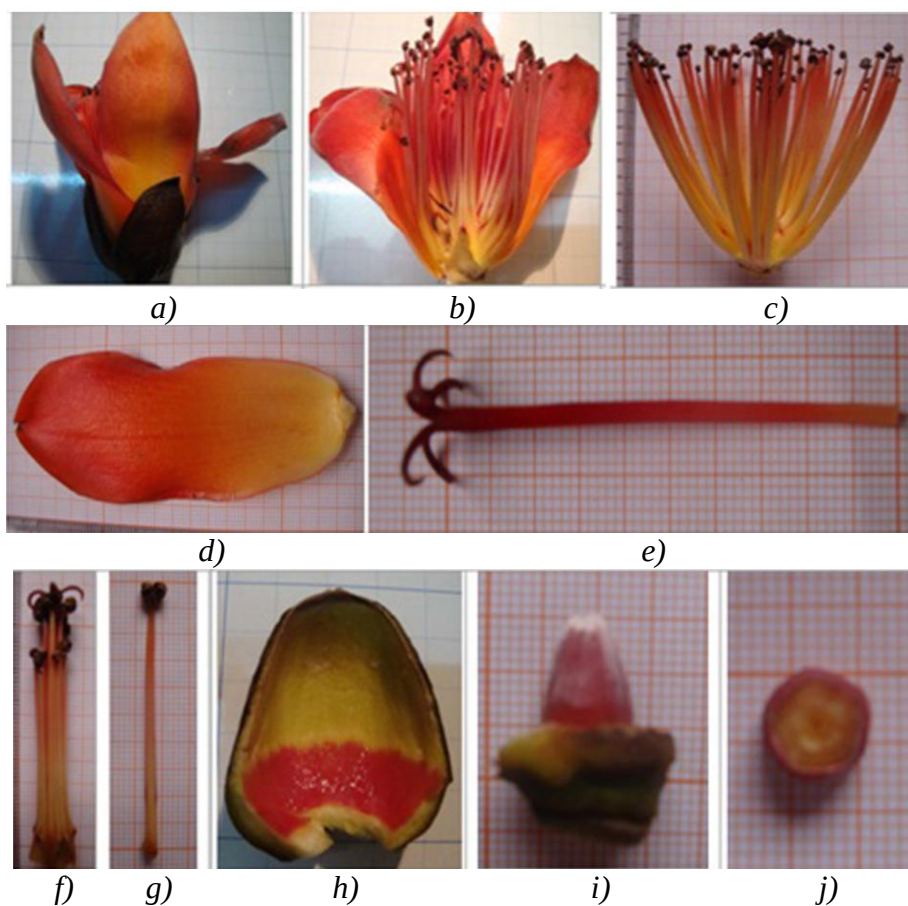
b) Lá cây gạo

c) Cành mang hoa

d) Gai hình nón

e) Lá kép

f) Gân lá



Hình 3.3. Đặc điểm hình thái hoa của *Bombax malabaricum* DC.

a) Hoa chụp nghiêng

b) Hoa bổ dọc

c) Bộ nhụy nhị hoa

d) Cánh hoa

e) Nhụy hoa

f+g) Một bó nhị hoa

h) Cánh đài hoa

i) Bầu hoa

j) Bầu hoa cắt ngang

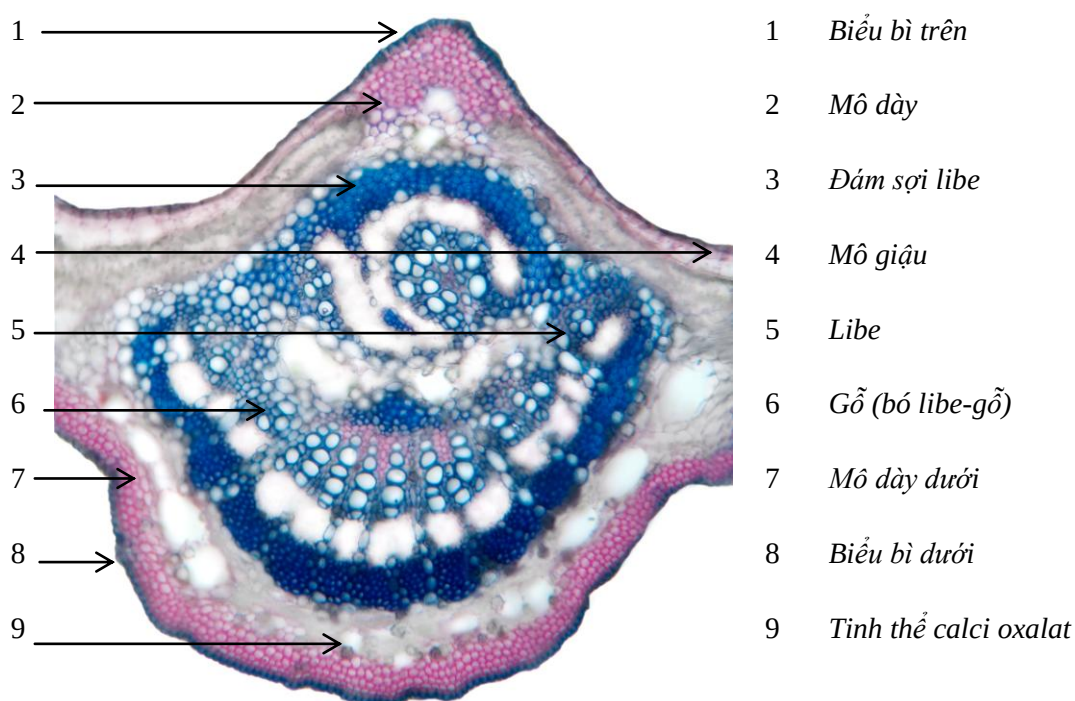
3.1.2. Đặc điểm vi học và cấu tạo giải phẫu

Loài *Bombax malabaricum* DC. được cắt vi phẫu lá, cành non, nhuộm kép lên tiêu bản quan sát dưới kính hiển vi và xác định đặc điểm, chụp ảnh.

3.1.2.1. Cấu tạo giải phẫu lá

Phần gân lá: hình dạng mặt trên và dưới đều lồi, mặt dưới lồi nhiều hơn. Biểu bì trên (1): một lớp tế bào hình tròn nhỏ, xếp sát nhau, phủ bên ngoài một lớp cu tin bất màu xanh. Mô dày trên (2) gồm 4-5 hàng tế bào hình tròn, bất màu hồng đậm. Mô mềm khuyết: 1-2 lớp tế bào hình tròn, bầu dục hay hơi đa giác thành mỏng. Các đám sợi libe (3) bao bọc bên ngoài vòng libe- gỗ khép thành vòng tròn kín, bề dày lớp gỗ gấp khoảng 3 lần so với bề dày lớp libe. Túi tiết nằm ở phiến lá. Bó libe gỗ hình cung, gồm cung libe (5) bao quanh cung gỗ (6) bất màu xanh ở giữa. Mô dày dưới (7) gồm 4-5 hàng tế bào mô dày tròn. Biểu bì dưới (8) là lớp tế bào hình tròn. Giữa gân lá, trong mô khuyết, mô dày có các tinh thể calci oxalat hình cầu gai (9) (Hình 3.4).

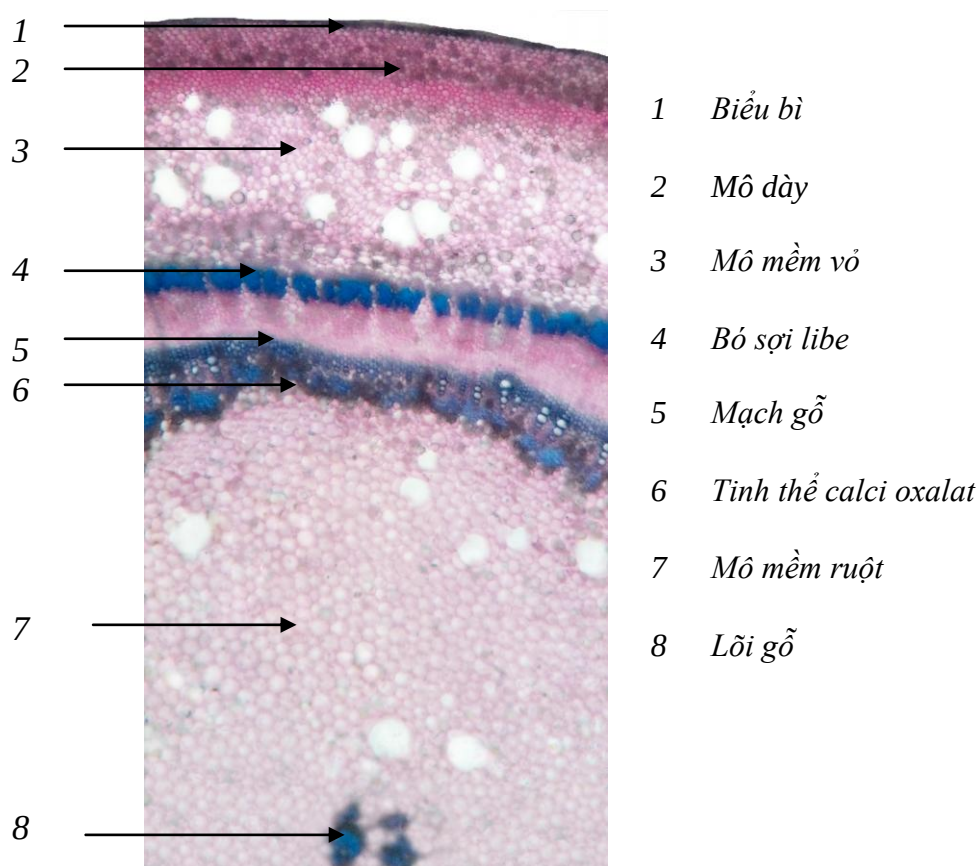
Phần phiến lá: Biểu bì giống phần gân lá, mô giậu gồm 2 hàng tế bào hình chữ nhật xếp vuông góc với hàng tế bào biểu bì (4).



Hình 3.4. Vi phẫu lá cây Gạo

3.1.2.2. Cấu tạo giải phẫu cành

Lát cắt hình tròn, ngoài cùng là lớp biểu bì (1). Mô dày tròn gồm 4-5 lớp tế bào, liên tục quanh thân (2). Mô mềm vỏ gồm các tế bào hình bầu dục nằm ngang xếp lộn xộn (3), các mạch dẫn hình tròn hay bầu dục có kích thước lớn nằm rải rác. Mô cứng bắt màu xanh đậm. Có các bó sợi libe (4) nằm ngoài bó libe-gỗ. Libe cấp hai cấu tạo bởi những tế bào nhỏ, xếp thành vòng tròn liên tục không đều, phía ngoài. Các mạch gỗ xếp thành hàng bên trong libe (5). Tinh thể calci oxalat (6) hình cầu gai nằm trong mô mềm vỏ, mô mềm ruột. Mô mềm ruột (7) cấu tạo bởi các tế bào hình trứng hoặc đa giác, có màng mỏng. Lõi gỗ bắt màu xanh (8) (Hình 3.5).

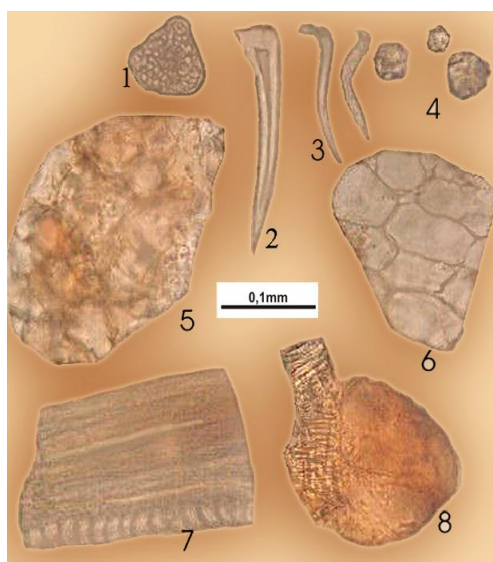


Hình 3.5. Vi phẫu cành cây Gạo

3.1.2.3. Đặc điểm bột dược liệu

❖ *Đặc điểm bột hoa:* Bột màu đỏ nâu, vị nhạt, không mùi (Hình 3.6)

Soi dưới kính hiển vi có các đặc điểm sau: Hạt phấn (1), lông che chở (2), tinh thể calci oxalat hình cầu gai (3), mảnh cánh hoa (5), (6), bó sợi mang mảnh mạch xoắn (7), mảnh cánh hoa mang mạch xoắn (8)



1- Hạt phấn

2.3- Lông che chở

4- Tinh thể calci oxalat hình cầu gai

5.6- Mảnh cánh hoa

7- Bó sợi mang mảnh mạch xoắn

8- Mảnh cánh hoa mang mạch xoắn

Hình 3.6. Đặc điểm bột hoa cây Gao

❖ *Đặc điểm bột lá:* Bột màu xanh sáng, vị nhạt, không mùi (Hình 3.7)

Soi dưới kính hiển vi có các đặc điểm sau: Lỗ khí và mảnh biểu bì mang lỗ khí (1), lông tiết (2), tinh thể calci oxalat hình cầu gai (3), mảnh mô giậu (4), túi tiết (5), bó sợi mang mạch xoắn (6), mảnh mạch xoắn (7), mảnh phiến lá (8)



1- Lỗ khí và mảnh biểu bì mang lỗ khí

2- Lông tiết

3- Tinh thể calci oxalat hình cầu gai

4- Mảnh mô giậu

5- Túi tiết

6- Bó sợi mang mạch xoắn

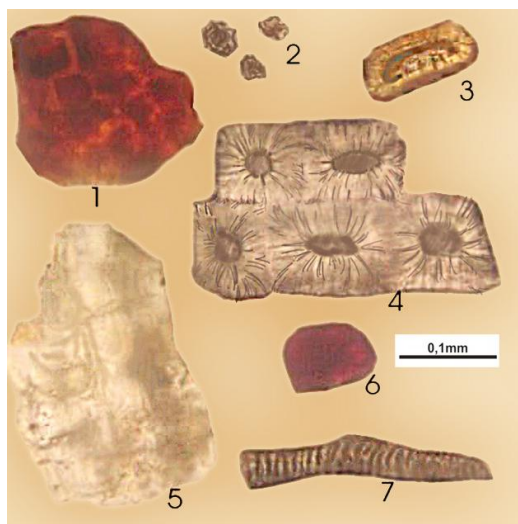
7- Mảnh mạch xoắn

8- Mảnh phiến lá

Hình 3.7. Đặc điểm bột lá cây Gao

❖ *Đặc điểm bột vỏ thân*: Bột màu vàng nâu, nhiều xơ (Hình 3.8).

Soi dưới kính hiển vi có các đặc điểm sau: Mảnh bản (1), tinh thể calci oxalat hình cầu gai (2), tế bào cứng (3), mảnh mô cứng (4), mảnh mô mềm (5), mảnh mang màu (6), mảnh mạch vạch (7).



- 1- Mảnh bản
- 2- Tinh thể calci oxalat hình cầu gai
- 3- Tế bào cứng
- 4- Mảnh mô cứng
- 5- Mảnh mô mềm
- 6- Mảnh mang màu
- 7- Mảnh mạch vạch

Hình 3.8. Đặc điểm bột vỏ thân cây Gao

3.2. NGHIÊN CỨU THÀNH PHẦN HÓA HỌC

3.2.1. Định tính các nhóm chất thường có trong dược liệu

Tiến hành định tính các nhóm chất thường gặp trong dược liệu bằng các phản ứng hóa học thường quy. Kết quả được thể hiện ở bảng 3.1.

Qua các phản ứng định tính ở trên, sơ bộ kết luận trong vỏ thân cây Gao có chứa glycosid tim, alkaloid, saponin, flavonoid, coumarin, tanin, acid hữu cơ, đường khử, sterol. Trong lá và hoa cây gạo có chứa glycosid tim, alkaloid, saponin, flavonoid, coumarin, tanin, acid hữu cơ, đường khử, sterol, acid amin và caroten.

*Bảng 3.1. Kết quả định tính các nhóm chất hữu cơ trong lá, hoa
và vỏ thân cây Gạo*

STT	Nhóm chất	Phản ứng định tính	Kết quả			Kết luận sơ bộ		
			Lá	Hoa	Vỏ thân	Lá	Hoa	Vỏ thân
1	Glycosid tim	- Pư Lieberman - Pư Baljet - Pư Legal - Pư Keller– Kiliani	++ ++ ++ ++	++ ++ ++ ++	+++ +++ ++ +++	Có	Có	Có
2	Saponin	- Quan sát hiện tượng tạo bọt	+	++	++	Có	Có	Có
3	Anthranoid	- Pư Borntraeger - Vi thăng hoa	- -	- -	- -	Không	Không	Không
4	Flavonoid	- Pư với dd kiềm loãng - Pư Cyanidin - Pư với dd FeCl ₃ - Pư diazio hóa	+++ +++ +++ +++	+++ +++ +++ ++	+++ +++ +++ ++	Có	Có	Có
5	Coumarin	- Pư mở, đóng vòng lacton - Pư diazo hóa	++ +++	+ ++	+ ++	Có	Có	Có
6	Alcaloid	- TT Mayer - TT Bouchardat - TT Dragendorff	+ ++ +	+ + +	+ + +	Có	Có	Có
7	Tanin	- Pư với chì acetat - Pư với dd FeCl ₃ - Pư với dd gelatin	+++ +++ +++	+++ +++ +++	+++ +++ +++	Có	Có	Có
8	Acid hữu cơ	Pư với Na ₂ CO ₃	+	+	+	Có	Có	Có
9	Đường khử	Pư với thuốc thử Fehling A Pư với thuốc thử Fehling B	+++ +++	+++ +++	+++ +++	Có	Có	Có
10	Acid amin	Pư với thuốc thử Ninhydrin	++	+	-	Có	Có	Không
11	Tinh bột	Pư với thuốc thử Lugol	-	-	-	Không	Không	Không
12	Acid béo	Tạo chất mờ trên giấy lọc	-	-	-	Không	Không	Không
13	Caroten	Pư với H ₂ SO ₄ đặc	++	++	-	Có	Có	Không
14	Sterol	Pư Lieberman	+++	+++	+++	Có	Có	Có

3.2.2. Chiết xuất và phân lập các hợp chất từ lá và vỏ thân cây Gạo

3.2.2.1. Độ ẩm của bột dược liệu

Tiến hành xác định độ ẩm của bột vỏ thân, lá và hoa Gạo, thu được kết quả như bảng 3.2.

Bảng 3.2. Kết quả xác định độ ẩm bột vỏ thân, lá, hoa cây Gạo

Lần	Vỏ thân		Lá		Hoa	
	Khối lượng (g)	Độ ẩm (%)	Khối lượng (g)	Độ ẩm (%)	Khối lượng (g)	Độ ẩm (%)
1	2,5463	7,33	2,0054	4,28	2,0080	6,77
2	2,4698	7,81	2,1031	4,43	2,0155	6,84
3	2,5129	8,02	2,0062	4,46	2,0127	6,75
Trung bình	2,5096	7,72	2,0382	4,39	2,0121	6,79

3.2.2.2. Chiết xuất các hợp chất từ lá và vỏ thân cây Gạo

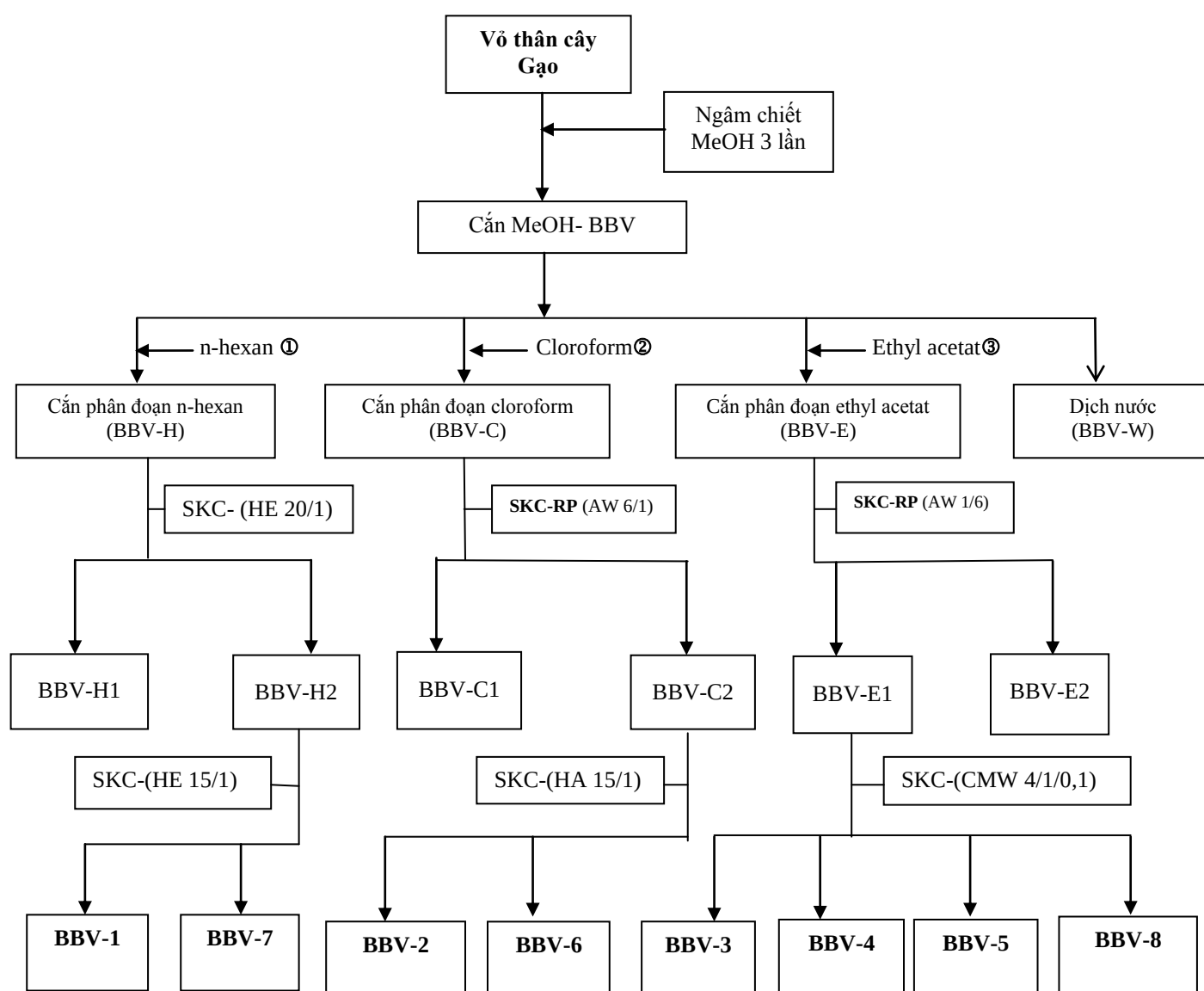
Bột lá (500g) và bột vỏ thân (1kg) cây Gạo được chiết bằng ngâm với methanol ở nhiệt độ phòng (25°C). Dịch chiết methanol được bay hơi dung môi dưới áp suất giảm thu được cặn toàn phần lần lượt ký hiệu là BBL (20g), BBV (51g). Cặn chiết methanol được hòa với nước nóng (60°C) rồi lắc thật kỹ, thêm vừa đủ đến khi tan hết, sau đó được chiết lần lượt với các dung môi có độ phân cực tăng dần: n-hexan, cloroform, ethyl acetat, thu được các phân đoạn dịch chiết. Các phân đoạn được cất thu hồi dung môi dưới áp suất giảm đến kiệt dung môi, thu các cặn n-hexan (ký hiệu là H), cặn cloroform (ký hiệu là C), cặn ethyl acetat (ký hiệu là E). Phần dịch nước còn lại cũng được cô dưới áp suất giảm, sấy khô đến cặn (ký hiệu là W). Cân các cặn để xác định tỷ lệ cặn.

3.2.2.3. Phân lập các hợp chất từ vỏ thân và lá cây Gạo

❖ Phân lập các hợp chất từ vỏ thân cây Gạo

Cặn các phân đoạn chiết xuất từ vỏ thân cây Gạo sau khi được chiết bằng các dung môi có độ phân cực tăng dần n-hexan, cloroform, ethyl acetat được ký hiệu lần lượt là BBV-H, BBV-C, BBV-E và cặn thu được từ dịch nước còn lại là BBV-W (hình 3.9).

Cần BBV-H được phân lập trên cột sắc ký với chất hấp phụ silica gel sử dụng hệ dung môi n-hexan: ethyl acetat (20/1) (HE 20/1). Hứng dịch rửa giải vào các ống và kiểm tra bằng SKLM, gộp các ống từ 2-16, thu được phân đoạn BBV-H1, gộp các ống từ 17-20, thu được phân đoạn BBV-H2, cất thu hồi dung môi đến khô. Tiến hành sắc ký cột cần phân đoạn BBV-H2 với chất hấp phụ silica gel, hệ dung môi n-hexan: ethyl acetat (15/1) (HE 15/1), kiểm tra các ống hứng dịch rửa giải bằng SKLM, gộp các ống có cùng thành phần thành các phân đoạn, bốc hơi dung môi các phân đoạn chỉ có 1 vết, kết tinh lại thu được 2 hợp chất **BBV-1** (20mg) và **BBV-7** (15mg).



Hình 3.9. Sơ đồ phân lập các hợp chất từ vỏ thân cây Gạo

Cẩn BBV-C được phân lập trên cột sắc ký pha đảo với chất hấp phụ YMC-RP-18, sử dụng hệ dung môi aceton: nước (6/1) (AW 6/1). Kiểm tra các ống hứng dịch rửa giải bằng SKLM, gộp các ống từ 2-10, thu được phân đoạn BBV-C1, gộp các ống từ 11-14, thu được phân đoạn BBV-C2, cất thu hồi dung môi đến khô. Tiến hành sắc ký cột với chất hấp phụ là silica gel cẩn phân đoạn BBV-C2, hệ dung môi n-hexan: aceton (15/1) (HA 15/1), kiểm tra các ống hứng dịch rửa giải bằng SKLM, gộp các ống có cùng thành phần thành các phân đoạn, bốc hơi dung môi những phân đoạn chỉ có 1 vết, kết tinh lại thu được 2 hợp chất **BBV-2** (15mg) và **BBV-6** (20mg).

Cẩn BBV-E được phân lập trên cột sắc ký pha đảo YMC-RP-18, với hệ dung môi aceton: nước (1/6) (AW 1/6). Kiểm tra các ống hứng dịch rửa giải bằng SKLM, gộp các ống từ 3-9, thu được phân đoạn BBV-E1, gộp các ống từ 11-25, thu được phân đoạn BBV-E2, cất thu hồi dung môi đến khô. Tiến hành sắc ký cột cẩn phân đoạn BBV-E1 với chất hấp phụ silica gel, hệ dung môi cloroform: methanol: nước (4/1/0,1) (CMW 4/1/0,1), kiểm tra các ống hứng dịch rửa giải bằng SKLM, gộp các ống có cùng thành phần thành các phân đoạn, bốc hơi dung môi những phân đoạn chỉ có 1 vết, thu được 1 hợp chất dạng dầu **BBV-8** (15mg), sau khi kết tinh lại thu được 3 hợp chất **BBV-3** (11mg), **BBV-4** (20mg), **BBV-5** (20mg).

❖ *Phân lập các hợp chất từ lá cây Gạo*

Cẩn các phân đoạn thu được từ dịch chiết methanol của lá cây Gạo sau khi được chiết bằng các dung môi có độ phân cực tăng dần n-hexan, cloroform, ethyl acetat được ký hiệu lần lượt là BBL-H, BBL-C, BBL-E và cẩn thu được từ dịch nước còn lại là BBL-W.

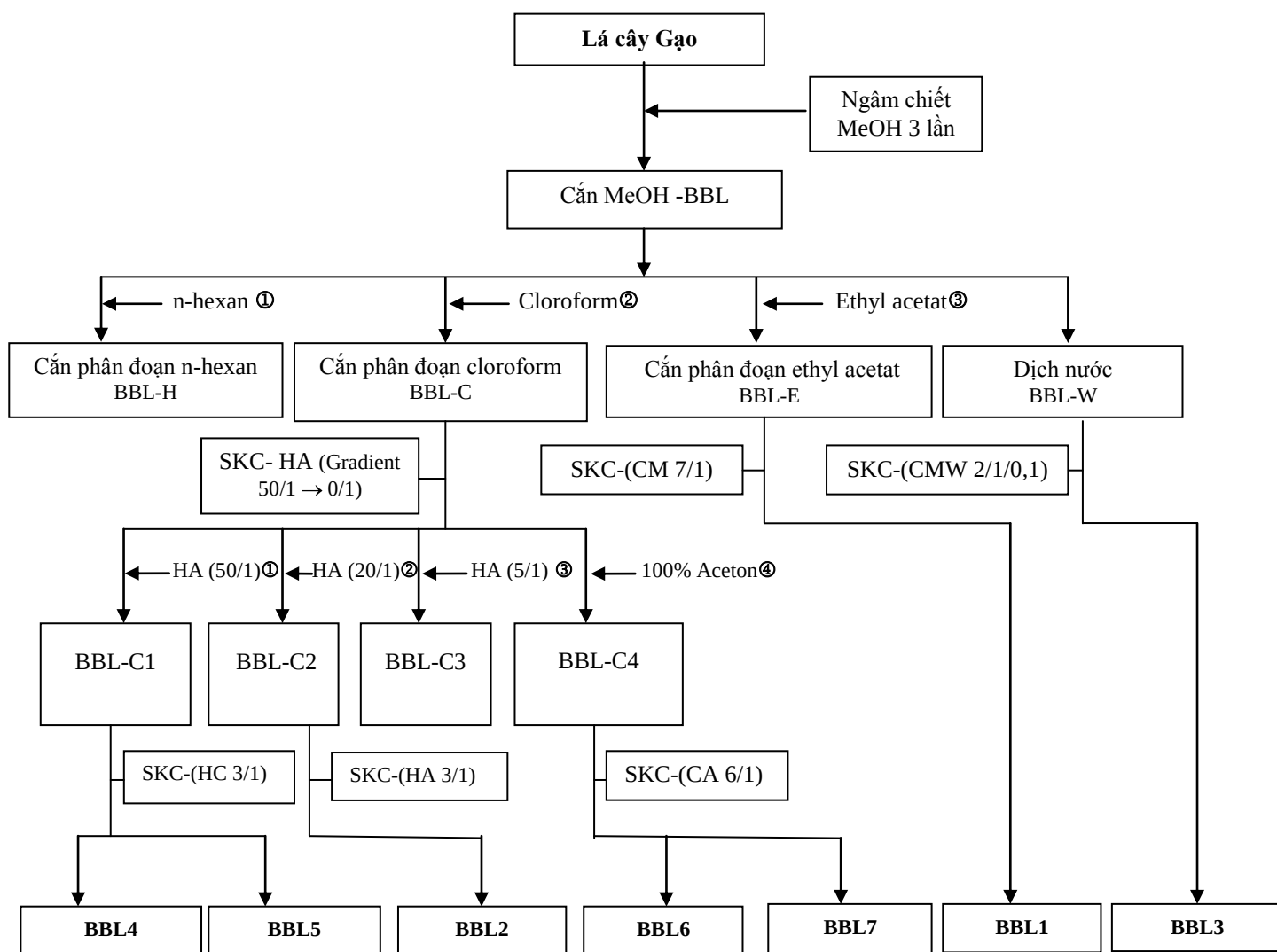
Quy trình chiết xuất và phân lập các chất từ lá cây Gạo được trình bày ở hình 3.10.

Cẩn BBL-C được phân lập trên sắc ký cột với chất hấp phụ là silica gel, dung môi sử dụng là n-hexan: aceton (HA) gradien nồng độ (HA 50/1), (HA 20/1), (HA 5/1), 100% aceton. Thu được các phân đoạn tương ứng là BBL-C1→BBL-C4, cất thu hồi dung môi các phân đoạn đến khô.

Tiến hành sắc ký cột cẩn phân đoạn BBL-C1 với chất hấp phụ là silica gel, hệ dung môi n-hexan: cloroform (3/1) (HC 3/1), kiểm tra các ống hứng dịch rửa

giải bằng SKLM, gộp các ống có cùng thành phần thành các phân đoạn, bốc hơi dung môi các phân đoạn chỉ có 1 vết, kết tinh lại thu được 2 hợp chất **BBL-4** (30mg) và **BBL-5** (20mg).

Tiến hành sắc ký cột căn phân đoạn BBL-C2 với chất hấp phụ silica gel, hệ dung môi n-hexan: aceton (3/1) (HA 3/1), kiểm tra các ống hứng dịch rửa giải bằng SKLM, gộp các ống có cùng thành phần thành các phân đoạn, bốc hơi dung môi phân đoạn chỉ có 1 vết, kết tinh lại thu được hợp chất **BBL-2** (5mg).



Hình 3.10. Sơ đồ phân lập các hợp chất từ lá cây Gạo

Tiến hành sắc ký cột căn phân đoạn BBL-C4 với chất hấp phụ là silica gel, hệ dung môi cloroform: aceton (6/1) (CA 6/1), kiểm tra các ống hứng dịch rửa

giải bằng SKLM, gộp các ống có cùng thành phần thành các phân đoạn, bốc hơi dung môi các phân đoạn chỉ có 1 vết, kết tinh lại thu được 2 hợp chất **BBL-6** (7mg) và **BBL-7** (8mg).

Cẩn BBL-E được phân lập trên cột silica gel với hệ dung môi cloroform: methanol (7/1) (CM 7/1). Kiểm tra các ống hứng dịch rửa giải bằng SKLM, gộp các ống có cùng thành phần thành các phân đoạn, bốc hơi dung môi phân đoạn chỉ có 1 vết, kết tinh lại thu được hợp chất **BBL-1** (6mg).

Cẩn BBL-W được phân lập trên cột silica gel với hệ dung môi cloroform: methanol: nước (2/1/0,1) (CMW 2/1/0,1). Kiểm tra các ống hứng dịch rửa giải bằng SKLM, gộp các ống có cùng thành phần thành các phân đoạn, bốc hơi dung môi phân đoạn chỉ có 1 vết, kết tinh lại thu được hợp chất **BBL-3** (30mg).

3.2.3. Nhận dạng các hợp chất phân lập từ các bộ phận của cây Gạo

3.2.3.1. Nhận dạng các hợp chất phân lập từ vỏ thân

❖ **BBV1**

Tính chất: **BBV1** là một chất kết tinh ở dạng tinh thể hình kim màu trắng (hình 3.11), nhiệt độ nóng chảy: 188-189°C. Tan trong ether, ethanol, methanol; không tan trong nước.



Hình 3.11. Ảnh chụp tinh thể **BBV1** (dưới KHV vật kính 40)

Phổ khối lượng ESI-MS xuất hiện pic ion phân tử tại m/z 427 $[M+H]^+$ cho phép xác định công thức phân tử là $C_{30}H_{50}O$ ($M=426$).

Phổ NMR chỉ ra rằng hợp chất này là hợp chất triterpenoid có khung lup-20(29)-en. Phổ 1H -NMR cho thấy tín hiệu của 7 nhóm methyl CH_3 cộng hưởng trong vùng trường mạnh, trong đó có 6 nhóm methyl bậc ba CH_3 tại các giá trị δ_H 0,97 (3H, s, H-23); 0,76 (3H, s, H-24); 0,84 (3H, s, H-25); 1,03 (3H, s, H-26); 0,94 (3H, s, H-27); 0,79 (3H, s, H-28) và một tín hiệu CH_3 tại 1,68 (3H, br s, H-

29) thuộc nhánh isopropenyl. Tín hiệu 2 proton thuộc nhánh isopropenyl tại δ_H 4,68 (1H, d, $J = 1,0$ Hz, H_a -30) và 4,56 (1H, d, $J = 1,0$ Hz, H_b -30). Ngoài ra, tín hiệu tại 3,38 (1H, dd, $J = 11,5; 5,0$ Hz, H-3) khẳng định sự có mặt của một nhóm oximethin (CH-O).

Bảng 3.3. Dữ liệu phổ NMR của **BBV1**

C	$^{\#}\delta_C[136]$	$\delta_C^{a,b}$	DEPT	$\delta_H^{a,c}$ mult.($J=$ Hz)
1	38,7	38,76	CH ₂	
2	27,5	27,46	CH ₂	
3	79,0	79,03	CH	3,19 dd (11,5; 5,0)
4	38,9	38,89	C	
5	55,3	55,36	CH	
6	18,3	18,35	CH ₂	
7	34,3	34,34	CH ₂	
8	40,9	40,88	C	
9	50,5	50,50	CH	
10	37,2	37,21	C	
11	21,0	20,97	CH ₂	
12	25,2	25,21	CH ₂	
13	38,1	38,11	CH	
14	*42,9	42,87	C	
15	27,5	27,49	CH ₂	
16	35,6	35,62	CH ₂	
17	*43,0	43,03	C	
18	**48,0	48,36	CH	
19	**48,3	48,01	CH	2,38 ddd (11,0;11,0;6,0)
20	150,9	150,97	C	
21	29,9	29,90	CH ₂	
22	40,0	40,03	CH ₂	
23	28,0	28,01	CH ₃	0,97 s
24	15,3	15,38	CH ₃	0,76 s
25	***16,1	16,13	CH ₃	0,83 s
26	***16,0	16,01	CH ₃	1,03 s
27	14,6	14,58	CH ₃	0,94 s
28	18,0	18,03	CH ₃	0,79 s
29	19,3	19,33	CH ₃	1,68 s
30	109,3	109,33	CH ₂	4,68 s/4,56 s

$^{\#}\delta_C$ (lupeol) được đo trong $CDCl_3$ ở 125MHz (^{13}C) [136] *, **, *** có thể bị trao đổi

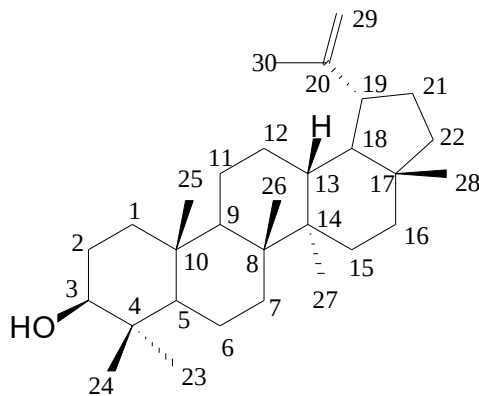
^a đo trong $CDCl_3$; ^b 125 MHz; ^c 500 MHz.

Phổ ^{13}C -NMR của **BBV1** bao gồm tín hiệu của 30 nguyên tử carbon. Phân tích các tín hiệu trên phổ DEPT xác nhận được gồm 7 carbon methyl (CH₃), 11

carbon methylen (CH_2), 6 carbon methin (CH) và 6 carbon bậc bốn (C). Nhánh isopropenyl được xác nhận bởi các tín hiệu của 1 carbon methylen tại δ 109,33 (C-29) cùng với tín hiệu của 1 carbon bậc bốn tại δ 150,97 (C-20) và 1 carbon methyl δ 19,33 (C-29). Ngoài ra, tín hiệu của 1 carbon oximethin tại δ 79,03 (C-3) cho phép xác nhận có 1 nhóm hydroxyl trong phân tử của hợp chất.

So sánh số liệu phổ NMR của hợp chất **BBV1** với số liệu của hợp chất triterpen khung lup-20(29)-en đã biết là lupeol (3β -hydroxylup-20(29)-ene) [136] nhận được sự phù hợp hoàn toàn ở tất cả các vị trí tương ứng (bảng 3.3). Nhận định này được khẳng định thêm khi xem xét đến hằng số tương tác J của proton H-3. Proton H-3 cộng hưởng tại δ 3,19 (dd, $J = 11,5; 5,0$ Hz), tín hiệu doublet này cho thấy hằng số tương tác J lớn vì vậy H-3 ở vị trí axial (a) hay alpha (α) dẫn tới OH tại C-3 là equatorial (e).

Từ các phân tích nêu trên hợp chất **BBV1** được xác định là 3β -hydroxylup-20(29)-ene hay lupeol (hình 3.12).



Hình 3.12. Cấu trúc hóa học của **BBV1** (lupeol).

❖ **BBV2**

Tính chất: Hợp chất BBV2 thu được dưới dạng chất kết tinh màu trắng, tinh thể hình lăng trụ (Hình 3.13). Tan trong cloroform, ethanol, methanol. Nhiệt độ nóng chảy: 263-263,5°C.



Hình 3.13. Ảnh chụp tinh thể **BBV2** (dưới KHV vật kính 40)

Phổ khối lượng ESI-MS xuất hiện pic ion phân tử tại m/z 427 $[M+H]^+$ cho phép xác định công thức phân tử là $C_{30}H_{50}O$ ($M=426$).

Phổ 1H -NMR xuất hiện tín hiệu của 8 nhóm methyl trong đó có 7 nhóm methyl bậc 3 tại δ 0,73; 0,87; 1,01; 1,05; 1,18; 0,95 và 1,00 ppm dưới dạng các singlet và một nhóm methyl bậc 2 tại δ 0,88 ppm dưới dạng một tín hiệu doublet ($J=7,0$ Hz). Nhìn chung, phổ 1H -NMR có dạng phổ của một hợp chất triterpen.

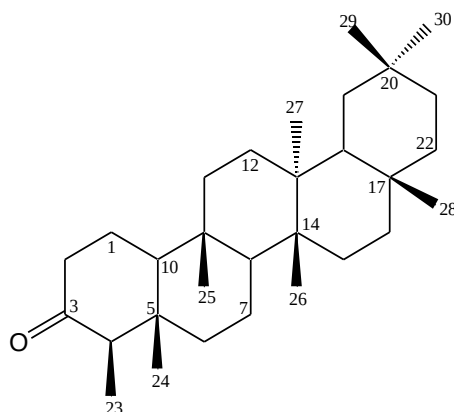
Phổ ^{13}C -NMR xuất hiện tín hiệu của 30 carbon, trong đó dựa vào kết quả của các phổ DEPT cho thấy hợp chất **BBV2** có 7 carbon bậc bốn tại δ 212,82 (C-3); 42,59 (C-5); 37,21 (C-9); 39,46 (C-13); 38,07 (C-14); 29,75 (C-17); 27,92 (C-20); 5 carbon methin tại δ 59,21 (C-4); 52,84 (C-8); 59,21 (C-10); 30,25 (C-12); 42,59 (C-18); 10 carbon methylen tại δ 22,03 (C-1); 41,88 (C-2); 41,27 (C-6); 18,00 (C-7); 35,78 (C-11); 32,56 (C-15); 36,37 (C-16); 35,10 (C-19); 32,18 (C-21); 39,00 (C-22); 8 carbon methyl tại δ 6,57 (C-23); 14,41 (C-24); 17,69 (C-25); 18,40 (C-26); 20,00 (C-27); 32,56 (C-28); 34,78 (C-29); 31,86 (C-30). Trong đó, tín hiệu của nhóm carbonyl ($C=O$) được xác định tại δ 212,82 (C-3), tín hiệu một nhóm methyl bậc 2 tại δ_C 6,57/ δ_H 0,88 (dd, $J=7,0$ Hz) đặc trưng cho nhóm methyl liên kết với carbon C-4 của khung friedelan.

Bảng 3.4. Dữ liệu phổ NMR của **BBV2**

C	[#] δ _C [93]	δ _C ^{a,b}	δ _H ^{a,c} mult, (J = Hz)
1	22,28	22,03	1,68 m/1,96 m
2	41,53	41,88	2,29 dd (7,5; 13,5); 2,39 ddd (1,0; 5,0; 13,5)
3	213,17	212,82	-
4	58,24	59,21	2,24 br d (7,0)
5	42,14	42,59	-
6	41,30	41,27	1,27 m/1,76 m
7	18,24	18,40	1,39 m/1,49 m
8	53,12	52,84	1,40 m
9	37,45	37,21	-
10	59,50	59,21	1,53 m
11	35,64	35,78	1,25 m/1,45 m
12	30,50	30,25	1,34 m
13	39,71	39,46	-
14	38,31	38,07	-
15	32,78	32,56	1,28 m/1,45 m
16	36,01	35,37	1,35 m/1,57 m
17	29,99	30,25	-
18	42,81	42,58	1,55 m
19	35,35	35,10	1,22 m/1,35 m
20	28,18	27,92	-
21	32,44	32,18	1,30 m/1,50 m
22	39,24	39,00	0,96 m/1,50 m
23	6,81	6,57	0,88 d (7,0)
24	14,65	14,41	0,72 s
25	17,94	17,99	0,87 s
26	18,65	18,40	1,01 s
27	20,25	20,00	1,05 s
28	31,77	32,18	1,18 s
29	35,01	35,10	0,95 s
30	32,09	31,86	1,00 s

^ađo trong CDCl₃, ^b125 MHz, ^c500 MHz, [#]δ_C của friedelan-3-one [93].

Từ các dữ kiện phổ nêu trên cho phép dự đoán hợp chất **BBV2** là friedelan-3-one. So sánh thêm các dữ kiện phổ của **BBV2** với hợp chất friedelan-3-one [93] đặc biệt là giá trị δ_C và hằng số tương tác J của các proton ta thấy hoàn toàn trùng khớp. Như vậy, hợp chất **BBV2** được khẳng định là friedelan-3-one với công thức phân tử là $C_{30}H_{50}O$ ($M=426$).



Hình 3.14. Cấu trúc hóa học của **BBV2** (friedelin)

❖ **BBV3**

Tính chất: Hợp chất **BBV3** thu được dưới dạng chất kết tinh màu vàng nhạt, tan trong ethylacetat, ethanol, methanol. Nhiệt độ nóng chảy: 217-218°C.



Hình 3.15. Ảnh chụp kết tinh của **BBV3**

Phổ khối lượng ESI-MS xuất hiện pic ion phân tử tại m/z 291 $[M+H]^+$ cho phép xác định công thức phân tử là $C_{15}H_{14}O_6$ ($M=290$).

Phổ ^{13}C -NMR của **BBV3** xuất hiện tín hiệu của 15 carbon của một hợp chất flavonoid. Tuy nhiên không có tín hiệu của nhóm carbonyl ở vùng trường

thấp, đồng thời lại xuất hiện tín hiệu CH₂ tại δ_C 29,2 và hai tín hiệu carbon nối với nguyên tử oxy tại δ_C 79,8 và δ_C 67,4.

Bảng 3.5. Dữ liệu phổ NMR của BBV3

C	$\delta_C^{[221]}$	$\delta_C^{a,b}$	DEPT	$\delta_H^{a,c}$ mult. ($J =$ Hz)	HMBC (H→C)
2	79,42	79,8	CH	4,83 (1H, d)	C-3, 4, 9, 1', 2' và 6'
3	66,96	67,4	CH	4,20 (1H, m)	C-10
4	28,98	29,2	CH ₂	2,88 (1H,dd, $J=12,0;2,5$ Hz) 2,74 (1H,dd, $J=12,0;4,5$ Hz)	C-2, 3, 5, 9, và 10
5	157,56	157,9	C		
6	95,72	96,4	CH	5,96 (1H, m)	C- 7, 8, và 10
7	157,09	157,5	C		
8	96,26	95,9	CH		
9	157,56	157,3	C		
10	99,79	100,0	C		
1'	132,23	132,2	C		
2'	115,47	115,3	CH	6,99 (1H, d, J 1,5 Hz)	C-2, 3', và 6'
3'	145,40	145,7	C		
4'	145,28	145,9	C		
5'	115,25	115,9	CH	6,77 (m)	C- 1' và 3'
6'	119,22	119,4	CH	6,82 (m)	C-2, 2',4', 5'

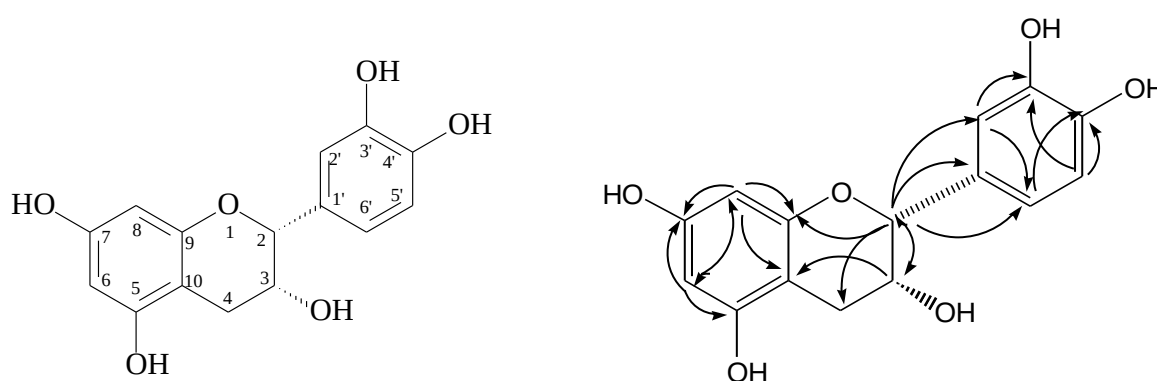
^ađo trong CD₃OD, ^b125 MHz, ^c500 MHz.

Dữ liệu phổ nêu trên cho thấy đây là một hợp chất flavan có nhóm hydroxy tại C-3 không có nhóm C=O tại C-4 . Điều này được làm sáng tỏ hơn bởi các tương tác spin-spin của các proton H-2/H-3 và H-3/H-4 trên phổ ¹H-NMR. Trên phổ ¹H-NMR proton H-2 xuất hiện là một doublet tại δ (ppm) 4,83 ($J=7,5$ Hz), proton H-3 xuất hiện là một multiplet tại δ 4,19 và hai proton H-4 xuất hiện dưới dạng hai tín hiệu doublet của một doublet tại δ 2,74 (dd, $J = 16,0; 2,0$ Hz) và 2,88 (dd, $J = 16,0; 4,5$ Hz) chứng tỏ nhóm OH tại C-3 và có cấu hình α -OH (trong trường hợp cấu hình 3- β -OH như hợp chất catechin [221])

thì hai tín hiệu proton H-4 có tương tác spin-spin với H-3 với các giá trị hằng số tương tác là $J=8,4$ Hz và $J = 5,5$ Hz). Ba tín hiệu tại δ (ppm) 6,99 (d, $J = 1,5$ Hz); 6,78 (d, $J = 8,5$ Hz) và 6,82 (dd, $J=8,0$; 1,5 Hz) chứng tỏ vòng B đã bị thế tại các vị trí 1',3',4'. Ngoài ra, tín hiệu doublet tại δ (ppm) 5,96 (2H, d, $J=1,5$ Hz) chứng tỏ hai prpton này nằm ở vị trí meta với nhau và phù hợp với H-6 và H-8 của vòng A.

Những dữ liệu phổ trên cùng với sự phân tích so sánh các giá trị hằng số tương tác J với các giá trị tương ứng của epicatechin [221] cho thấy hợp chất **BBV3** là 3,3',4',5,7-pentahydroxyflavan (epicatechin) với công thức phân tử là $C_{15}H_{14}O_6$. Kết quả này được khẳng định thêm bằng kết quả phổ khối lượng với sự xuất hiện các pic ion tại m/z 291 $[M+H]^+$ trên phổ ESI-MS.

Kết quả so sánh các dữ kiện phổ ^{13}C -NMR của **BBV3** với epicatechin [221] (Bảng 3.5) cũng hoàn toàn phù hợp. Phổ HMBC cũng được thực hiện và các tương tác HMBC nhận được hoàn toàn khẳng định cấu trúc của **BBV3** là epicatechin như mô tả trên hình 3.16. Đây là lần đầu tiên epicatechin được phân lập từ vỏ thân cây Gạo.



Hình 3.16. Cấu trúc hóa học và một số tương tác HMBC của **BBV3**

❖ BBV4

Tính chất: Hợp chất **BBV4** thu được dưới dạng tinh thể hình kim, màu vàng nhạt, tan trong methanol, ethanol. Nhiệt độ nóng chảy: 175 – 177°C.



Hình 3.17. Ảnh chụp tinh thể **BBV4**
(dưới KHV vật kính 10)

Phổ khối lượng ESI-MS xuất hiện pic ion phân tử tại m/z 289 $[M-H]^-$ kết hợp với phổ 1H -NMR và ^{13}C -NMR có thể dự đoán công thức phân tử là $C_{15}H_{14}O_6$ ($M=290$).

Bảng 3.6. Dữ liệu phổ NMR của **BBV4**

C	$\delta_C^{d,e}$ [66]	$\delta_C^{a,b}$	DEPT	$\delta_H^{a,c}$ mult. ($J=$ Hz)
2	81,0	82,88	CH	4,57 d (7,5)
3	66,4	68,83	CH	3,99 m
4	27,7	28,51	CH ₂	2,53 dd (16,0; 8,5); 2,88 dd (16,0; 5,5)
5	156,1	157,58	C	-
6	95,3	96,35	CH	5,87 d (2,5)
7	156,4	157,85	C	-
8	94,0	95,56	CH	5,94 d (2,5)
9	155,3	156,93	C	-
10	99,2	100,87	C	-
1'	130,7	132,28	C	-
2'	114,5	115,29	CH	6,86 d (1,5)
3'	144,8	146,26	C	-
4'	144,8	146,26	C	-
5'	115,1	116,11	CH	6,77 d (8,0)
6'	118,4	120,04	CH	6,74 dd (8,0; 1,5)

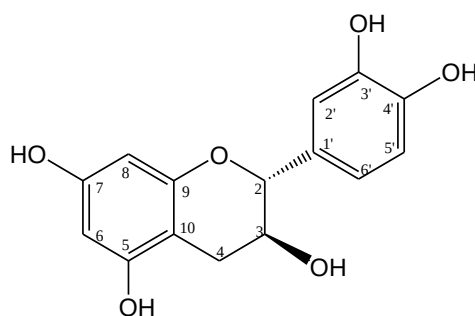
^a đo trong CD_3OD , ^b 125MHz, ^c 500MHz,

^d đo trong DMSO, ^e 150MHz.

Phổ 1H -NMR xuất hiện tín hiệu của hai proton ở vị trí *meta* với nhau tại δ 5,87 (1H, d, $J = 2,5$ Hz, H-6); 5,94 (1H, d, $J = 2,5$ Hz, H-8), đồng thời phổ 1H -NMR cũng xác định sự xuất hiện của một vòng thơm thế kiểu 1, 3, 4 bởi các tín

hiệu δ 6,86 (1H, d, $J = 1,5$ Hz, H-2'); 6,77 (1H, d, $J = 8,0$ Hz, H-5'); 6,74 (1H, dd, $J = 8,0; 1,5$ Hz, H-6'). Ngoài ra còn xuất hiện tín hiệu của một nhóm methin tại δ 4,57 (1H, d, $J = 7,5$ Hz, H-2), một proton nối với oxy tại δ 3,99 (1H, m, H-3) và hai proton của nhóm methylen tại δ 2,53 (1H, dd, $J = 16,0; 8,5$ Hz, H_a-4); 2,88 (1H, dd, $J = 16,0; 5,5$ Hz, H_b-4).

Phổ ^{13}C -NMR xuất hiện tín hiệu của 15 nguyên tử carbon trong đó tín hiệu của hai nhóm methin tại δ 82,88 và 68,83 là phù hợp với vị trí C-2 và C-3 của khung 3-hydroxyflavan. So sánh các dữ kiện phổ của hợp chất **BBV4** với các dữ kiện phổ của chất (+)-catechin [66] thấy có sự phù hợp hoàn toàn. Như vậy **BBV4** là (+)-catechin ($\text{C}_{15}\text{H}_{14}\text{O}_6$) có cấu trúc như hình 3.18.



Hình 3.18. Cấu trúc hóa học của **BBV4**.

❖ **BBV5**

Hợp chất **BBV5** là chất bột màu trắng, dạng vô định hình. Nhiệt độ nóng chảy: 203-205°C. Tan trong methanol, ethanol, ethyl acetat, không tan trong nước.

Trên phổ ^1H -NMR và ^{13}C -NMR của **BBV5** xuất hiện các tín hiệu đặc trưng cho sự có mặt của một phân tử đường tại δ_{H} 4,12 (1H, d, $J = 7,5$ Hz, proton anome) và δ_{C} 103,43 (carbon anome); một nhóm amid cũng được nhận diện tại δ_{H} 7,55 (1H, d, $J = 9,5$ Hz, NH) và δ_{C} 173,75 (-NH-C=O); các proton methylen của mạch dài tại δ_{H} 1,23 -1,28 (32H, br s) và δ_{C} 22,0 - 31,22 ppm, 2 nhóm methyl tại δ_{H} 0,84 (6H, t, $J = 7,0$ Hz) và δ_{C} 13,85 ($\times 2$) tín hiệu proton của

2 nhóm methyl này dạng triplet chứng tỏ nó liên kết trực tiếp với nhóm CH₂ hay nó chính là vị trí liên kết cuối cùng của 2 mạch dài. Ngoài ra, 2 proton olefin được xác định δ_H 5,30 (1H, dd, $J = 15,5; 6,5$ Hz) và 5,36 (1H, dd, $J = 15,5; 6,5$ Hz), δ_C 129,63 và 130,20 ppm nổi đôi được xác định là *trans* vì có hằng số $J = 15,5$ Hz; 3 nhóm methin gắn với nguyên tử oxy tại δ_H 3,83 (1H, m); 3,84 (1H, m) và 4,17 (1H, t, $J = 5,5$ Hz). Các dữ kiện phổ này gợi ý rằng hợp chất **BBV5** là một cerebroside [152]

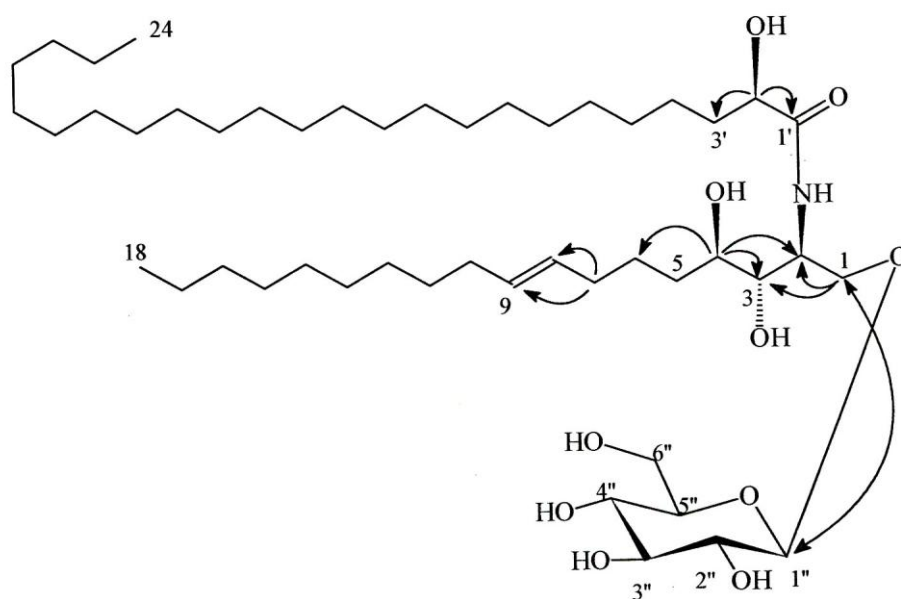
Bảng 3.7. Dữ liệu phổ NMR của **BBV5**

C	δ_C [152]	$\delta_C^{a,b}$	DEPT	$\delta_H^{a,c}$ ($J =$ Hz)	HMBC (H $\rightarrow$ C)
1	68,1	68,80	CH ₂	3,83 m / 3,64 m	2, 3, 1''
2	49,6	49,84	CH	4,09 m	
3	73,7	74,15	CH	4,17 t (5,5)	
4	70,8	70,52	CH	3,84 m	2, 3, 6
5	33,8	34,28	CH ₂	1,49 m / 1,60 m	3, 7
7 & 10	26,3; 26,4	26,6; 26,9	CH ₂	1,93 m	8, 9
8/9	128,9	129,63	CH	5,30 dd (6,5;15,5)	7, 10
9/8	129,2	130,20	CH	5,36 dd (6,5;15,5)	7, 1
NH	-	-		7,55 d (9,5)	
1'	174,0	173,75	C	-	
2'	70,9	70,89	CH	3,83 m	3'
3'	33,8	34,28	CH ₂	1,49 m / 1,60 m	2', 4'
1''	102,7	103,43	CH	4,12 (1H, d, $J=7,5$ Hz)	1
2''	72,6	73,39	CH	2,92 (1H, br t, $J= 8,0$ Hz)	1'', 3''
3''	75,9	76,45	CH	3,14 (1H, br dd, $J=9,0; 5,0$ Hz)	2'', 4''
4''	69,5	69,96	CH	3,04 (1H, m)	6''
5''	75,6	76,84	CH	3,08 (1H, br dd, $J=9,5; 4,5$ Hz)	
6''	61,0	61,01	CH ₂	3,67 (1H, m) / 3,43 (1H, m)	
CH ₃	13,2; 13,3	13,85 ($\times 2$)	CH ₃	0,85 t (6,5)	
(CH ₂) _n	21,7– 31,6	22,0–31,22	CH ₂	1,23 br s	8(9), 4

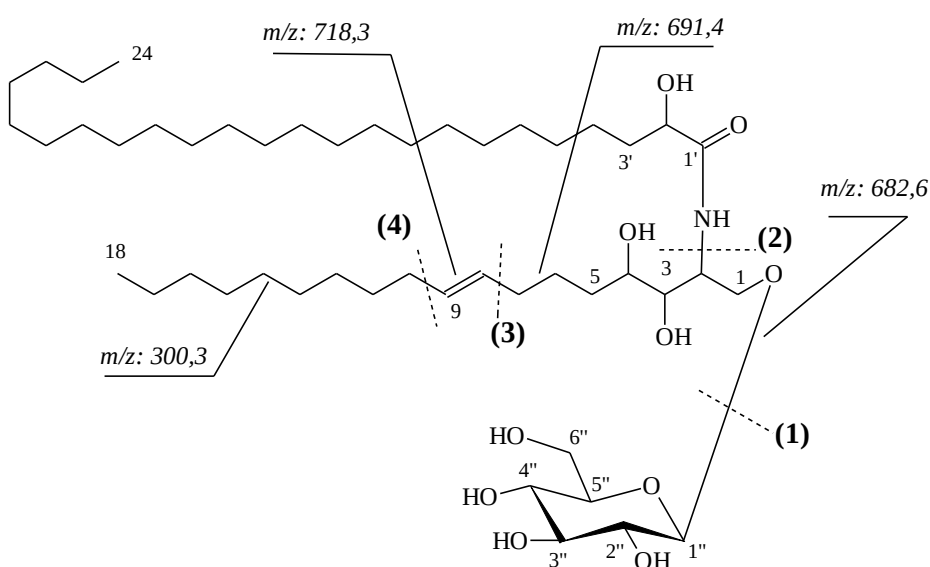
^a đo trong DMSO, ^b 125 MHz, ^c 500 MHz

Tất cả các vị trí của **BBV5** được gán theo các dữ liệu phổ NMR hai chiều là HSQC và HMBC (hình 3.19, bảng 3.7). Phân tích chi tiết các tương tác trên phổ HMBC của H-1 sang C-2 (δ 49,84)/C-3 (δ 74,15)/C-1'' (δ 103,43); H-4 sang

C-2 (δ 49,84)/C-3 (δ 74,15)/C-6 (δ 22,00); H-8 (9) sang C-7 (δ 26,6); C-10 (δ 26,9); H-2' sang C-3' (δ 34,28); H-3' sang C-2' (δ 70,89) và H-1'' sang C-1 (δ 68,80) đã khẳng định vị trí của các nhóm hydroxyl tại C-3, C-4 và C-2', đơn vị đường được xác định nối với C-1. Đơn vị đường được xác định là đường β -D-glucosyl thông qua nhận diện bộ số liệu ^1H -MNR và ^{13}C -NMR cũng như so sánh với tài liệu [152] (bảng 3.7).



Hình 3.19. Cấu trúc hóa học và một số tương tác HMBC của **BBV5**

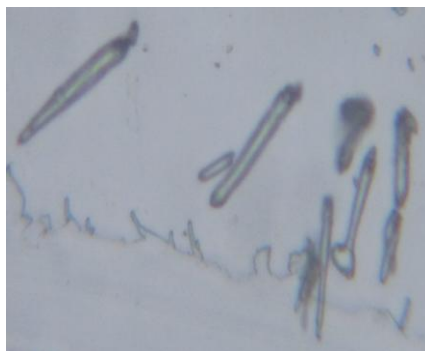


Hình 3.20. Một số mảnh phân tử chính trên phổ khối của **BBV5**

Để xác định chính xác độ dài mạch carbon và vị trí của nối đôi trong phân tử hợp chất **BBV5**, phổ khối lượng đã được đo. Trên phổ ESI-MS xuất hiện pic ion phân tử tại m/z 845,3 $[M+H]^+$ tương ứng với công thức phân tử $C_{48}H_{93}NO_{10}$ ($M=844$). Trên phổ khối lượng bắn mảnh xuất hiện pic ion mảnh tại m/z 682,6 $[m_1+H-C_6H_{11}O_5]^+$ tương ứng công thức $C_{42}H_{83}NO_5$; phân tử **BBV5** bị cắt mảnh ở vị trí 1 (hình 3.20); pic ion mảnh tại m/z 300,3 tương ứng với công thức $C_{18}H_{36}O_3$; phân tử **BBV5** bị cắt tại vị trí 1 và 2 chứng tỏ mạch chính của **BBV5** có 18C, mạch còn lại có 24C. Pic ion mảnh tại m/z 718,3 $[m_2+H-C_9H_{18}]^+$ tương ứng với công thức $C_{39}H_{75}NO_{10}$ phân tử **BBV5** bị cắt mảnh ở vị trí 3; pic ion mảnh m/z 691,4 $[m_3+H-C_{11}H_{20}]^+$ tương ứng với công thức $C_{37}H_{73}NO_{10}$ phân tử **BBV5** bị cắt mảnh ở vị trí 4. Từ vị trí cắt của 2 mảnh phân tử suy ra nối đôi được xác định ở vị trí C8/C9. Từ tất cả các phân tích nêu trên, cùng với số liệu phổ khối lượng ESI-MS cho phép khẳng định hợp chất **BBV5** là một cerebroside có công thức phân tử $C_{48}H_{93}NO_{10}$ có cấu trúc như hình 3.19 và có tên gọi là momor-cerebroside I [152].

❖ **BBV6**

Tính chất: Hợp chất **BBV6** thu được dưới dạng bột màu trắng. Soi dưới KHV, vật kính 40 có hình lăng trụ dài (Hình 3.21). Nhiệt độ nóng chảy: 283-284°C. Tan trong cloroform, ít tan trong methanol.

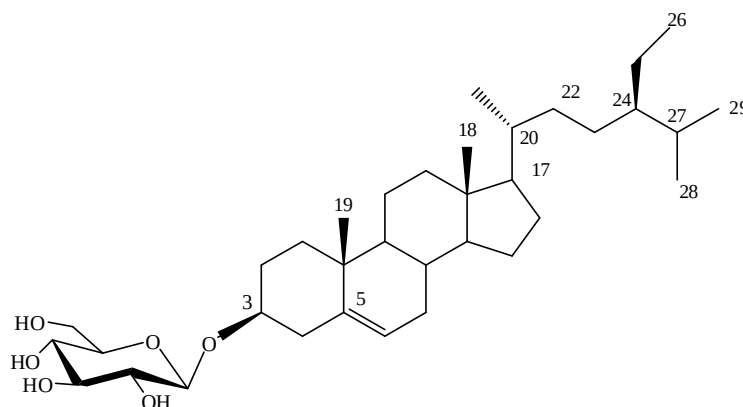


Hình 3.21. Ảnh chụp tinh thể **BBV6** (dưới KHV vật kính 40)

Phổ khối lượng ESI-MS cho pic ion mảnh tại m/z 397,3 $[m+H-C_6H_{12}O_6]^+$ và pic ion phân tử là 575,3 $[M-H]^-$ tương ứng với công thức phân tử $C_{35}H_{60}O_6$.

Phổ $^1\text{H-NMR}$ của **BBV6** cho thấy sự có mặt của một hợp chất có khung sterol đặc trưng bởi các tín hiệu của hai nhóm thế methyl bậc ba δ 0,68 (s, H-18); δ 0,96 (s, H-19), ba nhóm thế methyl bậc hai δ 0,91 (d, $J=6,5$ Hz, H-21); δ 0,83 (d, $J=7,3$ Hz, H-29), δ 0,81 (d, $J=6,8$ Hz, H-28) và một nhóm thế methyl bậc một δ 0,84 (t, $J=7,6$ Hz, H-26). Trên phổ cũng xác nhận sự có mặt của nhóm $\beta\text{-OH}$ tại C-3 δ 3,43 (m, H-3) và một nối đôi tại C-5/C-6 δ 5,32 (1H, br s, H-6). Sự xuất hiện một phân tử đường glucosyl cũng được xác định trên phổ $^1\text{H-NMR}$ bởi tín hiệu của proton amome tại δ 4,22 (d, $J = 8,0$ Hz, H-1').

Phổ $^{13}\text{C-NMR}$ của **BBV6** xuất hiện 35 tín hiệu carbon. Trong đó 29 tín hiệu được xác định là thuộc vào một khung sterol tại δ 36,79 (C-1); 29,22 (C-2); 76,94 (C-3); 38,29 (C-4); 140,42 (C-5); 121,11 (C-6); 31,33 (C-7); 31,38 (C-8); 49,58 (C-9); 36,16 (C-10); 20,55 (C-11); 39,33 (C-12); 41,81 (C-13); 56,14 (C-14); 23,80 (C-15); 27,73 (C-16); 55,42 (C-17); 11,61 (C-18); 18,90 (C-19); 35,43 (C-20); 18,56 (C-21); 33,33 (C-22); 25,47 (C-23); 45,13 (C-24); 28,70 (C-25); 19,63 (C-26); 22,59 (C-27); 19,03 (C-28); 11,73 (C-29). 6 tín hiệu còn lại là của một đường glucose với các tín hiệu đặc trưng của các carbon nối với nguyên tử oxy [4 x CH-O tại δ 73,42 (C-2'); 76,67 (C-3'); 70,08 (C-4'); 76,67 (C-5'); CH₂OH tại δ 61,07 (C-6')], carbon anomeric tại δ 100,8 (C-1').



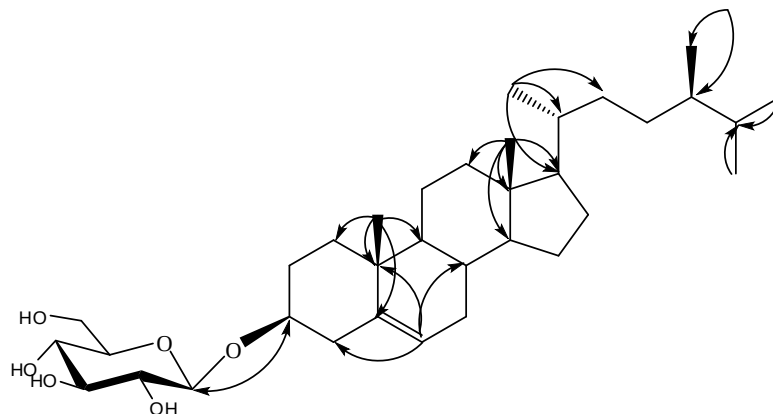
Hình 3.22. Cấu trúc hóa học của **BBV6**

Bảng 3.8. Dữ liệu phổ NMR của **BBV6**

C	δ_C [75]	$\delta_C^{a,b}$	DEPT	$\delta_H^{a,c}$ mult ($J=Hz$)	HMBC(H→C)
1	36,84	36,79	CH ₂	1,00 (m)	
2	29,27	29,22	CH ₂	1,30 (m)	
3	76,90	76,94	CH	3,43 (1H, m)	1'
4	38,30	38,29	CH ₂	2,35 (m)	
5	140,43	140,42	C		
6	121,21	121,11	CH	5,32 (1H, br s)	4, 8, 10
7	31,4	31,33	CH ₂	1,94 (m)	
8	31,4	31,38	CH	1,43 (m)	
9	49,60	49,58	CH	0,91 (m)	
10	36,21	36,16	C		
11	20,61	20,55	CH ₂	1,49 (m)	
12	40,20	39,33	CH ₂	0,97 (m)	
13	41,85	41,81	C		
14	56,18	56,14	CH	0,99 (m)	
15	23,87	23,80	CH ₂	1,55 (m)	
16	27,81	27,73	CH ₂	1,22 (m)	
17	55,43	55,42	CH	1,01 (m)	
18	11,67	11,61	CH ₃	0,68 (3H, s)	12, 13, 14, 17
19	18,93	18,90	CH ₃	0,96 (3H, s)	1, 5, 9, 10
20	35,50	35,43	CH	1,34 (m)	
21	18,62	18,56	CH ₃	0,91 (3H, d, 6,5)	17, 20, 22
22	33,34	33,33	CH ₂	1,01 (m)	
23	25,40	25,47	CH ₂	1,16 (m)	
24	45,13	45,13	CH	0,92 (m)	
25	28,68	28,70	CH ₂	1,49 (m)	
26	19,72	19,63	CH ₃	0,84 (3H, t, 7,6)	25
27	22,60	22,59	CH	1,26 (m)	
28	19,10	19,03	CH ₃	0,81 (3H, d, 6,8)	24, 27, 29
29	11,79	11,73	CH ₃	0,83 (3H, d, 7,3)	24, 27, 28
1'	100,79	100,79	CH	4,22 (1H, d, 8,0)	3
2'	75,45	73,42	CH	2,90 (m)	
3'	76,75	76,67	CH	3,12 (m)	
4'	70,05	70,08	CH	3,02 (m)	
5'	76,75	76,67	CH	3,07 (m)	
6'	61,06	61,07	CH ₂	3,40 (m) 3,64 (dd, 6,0; 10,0)	

δ_C [75] đo trong DMSO. ^a đo trong DMSO. ^b 125 MHz. ^c 500 MHz

Thông qua các tương tác trực tiếp H-C trên phổ HSQC, độ chuyển dịch hóa học của các carbon được gán với các proton tương ứng. Trên phổ HMBC, tín hiệu tương tác giữa proton anome δ 4,22 (1H, d, $J = 8,0$ Hz, H-1'') với carbon δ 76,94 (C-3) cho phép xác định vị trí liên kết của đơn vị đường. Tương tác giữa proton olefin δ 5,32 ppm với carbon δ 38,29 (C-4)/ 31,38 (C-8)/ 36,16 (C-10) cho thấy một nối đôi được xác định tại C5/C6. Các tương tác HMBC chi tiết khác được liệt kê trong bảng 3.8 và hình 3.23. Từ những dữ kiện phổ trên kết hợp với so sánh số liệu phổ ^{13}C -NMR của hợp chất daucosterol nêu trong tài liệu [75] ta thấy hoàn toàn phù hợp. Như vậy, **BBV6** được xác định là daucosterol, một hợp chất khá phổ biến trong các loài thực vật.



Hình 3.23. Một số tương tác HMBC chính của hợp chất **BBV6**

❖ **BBV7**

Hợp chất **BBV7** thu được dưới dạng tinh thể hình kim màu trắng có điểm nóng chảy $170\text{-}171^\circ\text{C}$.

Phổ khối lượng ESI-MS cho pic ion phân tử m/z 395,3 $[\text{M}+\text{H}-\text{H}_2\text{O}]^+$ tương ứng với công thức phân tử là $\text{C}_{29}\text{H}_{48}\text{O}$ ($M=412$).

Phổ ^1H -NMR cho thấy sự có mặt của hai nhóm thế methyl bậc ba δ 0,84 (s, H-18); δ 1,03 (s, H-19), ba nhóm thế methyl bậc hai δ 0,91 (d, $J = 6,5$ Hz, H-21); δ 0,81 (d, $J = 6,8$ Hz, H-28); δ 0,69 (d, $J = 9,5\text{Hz}$, H-29) và một nhóm thế methyl bậc một δ 0,84 (t, $J = 8,5\text{Hz}$, H-26). Trên phổ cũng xác nhận sự có mặt của nhóm $\beta\text{-OH}$ tại C-3 δ 3,53 (m, H-3) và hai cặp nối đôi tại C-5/C-6 δ 5,35

(1H, br d, $J=3,5$ Hz, H-6); C-22/C-23 δ 5,15 (1H, dd, $J=15,0$; 8,5 Hz, H-22); 5,02 (1H, dd, $J=15,05$; 8,5 Hz, H-23).

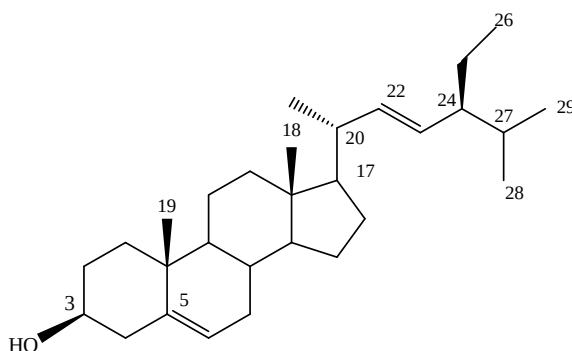
*Bảng 3.9. Dữ liệu phổ NMR của **BBV7***

C	[#] δ_C [72]	$\delta_C^{a,b}$	DEPT	$\delta_H^{a,c}$
1	37,21	37,26	CH ₂	
2	31,62	31,66	CH ₂	
3	71,81	71,82	CH	3,53 (1H, m)
4	42,29	42,30	CH ₂	
5	140,72	140,76	C	
6	121,71	121,73	CH	5,35 (1H, br d, 3,5)
7	31,87	31,90	CH ₂	
8	31,87	31,90	CH	
9	50,08	50,16	CH	
10	36,48	36,52	C	
11	21,07	21,09	CH ₂	
12	39,64	39,78	CH ₂	
13	42,29	42,30	C	
14	56,83	56,87	CH	
15	24,34	24,37	CH ₂	
16	28,92	28,93	CH ₂	
17	55,90	56,05	CH	
18	12,03	11,99	CH ₃	0,84 (3H, s)
19	19,38	19,41	CH ₃	1,03 (3H, s)
20	40,50	40,51	CH	
21	21,05	21,22	CH ₃	0,91 (3H, d, 6,5)
22	138,32	138,33	CH	5,15 (1H, dd, 8,5, 15,0)
23	129,22	129,27	CH	5,02 (1H, dd, 8,5, 15,0)
24	51,21	51,24	CH	
25	31,87	31,90	CH ₂	
26	21,20	21,22	CH ₃	0,84 (3H, t, 8,5)
27	25,40	25,42	CH	
28	18,95	19,04	CH ₃	0,81 (3H, d, 6,8)
29	12,25	12,26	CH ₃	0,69 (3H, d, 9,5)

[#] δ_C của stigmasterol đo trong CDCl₃ [72], ^a Đo trong CDCl₃, ^b 125 MHz, ^c 500 MHz

Phổ ^{13}C -NMR của **BBV7** xuất hiện 29 tín hiệu được xác định là thuộc vào một khung sterol. Căn cứ vào những tín hiệu trên các phổ DEPT ta thấy có 6 nhóm methyl tại δ 11,99 (C-18); 19,41 (C-19); 21,22 (C-21); 21,22 (C-26); 19,04 (C-28); 12,26 (C-29); 9 nhóm methylen tại δ 37,26 (C-1); 31,66 (C-2); 42,30 (C-4); 31,90 (C-7); 21,09 (C-11); 39,78 (C-12); 24,37 (C-15); 28,93 (C-16); 31,90 (C-25); 11 nhóm methin tại δ 71,82 (C-3); 121,73 (C-6); 31,90 (C-8); 50,16 (C-9); 56,87 (C-14); 56,05 (C-17); 40,51 (C-20); 138,33 (C-22); 129,27 (C-23); 51,24 (C-24); 25,42 (C-27) và 3 carbon bậc bốn tại δ 140,76 (C-5); 36,52 (C-10); 42,30 (C-13).

Dựa vào các số liệu phổ NMR và ESI-MS, **BBV7** được xác định là stigmasterol. Kết hợp so sánh phổ ^{13}C -NMR giữa **BBV7** và stigmasterol [72] thấy hoàn toàn phù hợp tại các vị trí tương ứng. Như vậy, **BBV7** được xác định là stigmasterol.



Hình 3.24. Cấu trúc hóa học của **BBV7** (stigmasterol).

❖ **BBV8**

Hợp chất **BBV8** nhận được dưới dạng chất dầu không màu.

Phổ khối lượng ESI-MS cho pic ion phân tử m/z 371 $[\text{M}+\text{H}]^+$ tương ứng với công thức phân tử là $\text{C}_{22}\text{H}_{42}\text{O}_4$ ($\text{M}=370$).

Phổ ^1H -NMR xuất hiện tín hiệu doublet tại δ_{H} 4,03 ($J=5,5$ Hz) đặc trưng cho 1 proton gắn vào carbon nối với nguyên tử oxy. Tín hiệu doublet này cho thấy bên cạnh nguyên tử C này là một nhóm CH. Ngoài ra, trên phổ còn xuất

hiện tín hiệu của hai nhóm methyl tại δ_H 0,93 (6H), một proton của nhóm methylen tại δ_H 1,60, còn lại là các tín hiệu của 6 nhóm CH_2 có độ dịch chuyển hóa học trong khoảng từ δ 1,31 đến 1,67

Phổ ^{13}C -NMR xuất hiện tín hiệu của 11 nguyên tử C trong đó tín hiệu tại δ_C 175,26 đặc trưng cho nhóm carboxylat, tín hiệu nhóm oxymethylen tại δ_C 67,72; tín hiệu 1 carbon CH tại δ_C 40,24; 2 nhóm methyl tại δ_C 44,38 và 11,38 và 6 tín hiệu CH_2 khác tại δ_C 34,78; 31,62; 30,11; 25,56; 24,03 và 24,94. Các tín hiệu này được xác định thông qua phổ DEPT 90 và DEPT 135.

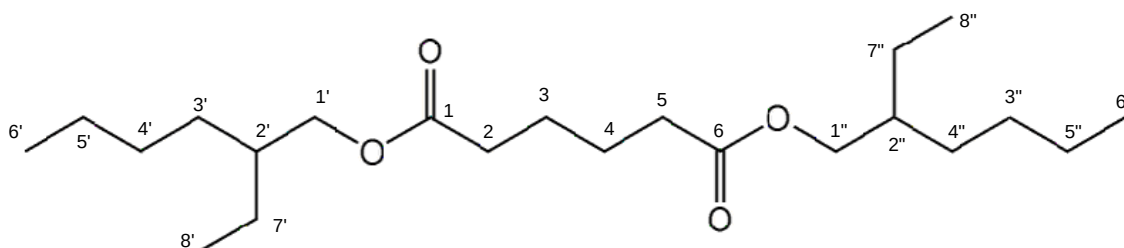
Phổ HSQC xác định các giá trị độ dịch chuyển hóa học của từng proton gắn với carbon tương ứng. Kết quả được chỉ ra trên bảng 3.10. Việc xác định cấu trúc của **BBV8** được bắt đầu từ nhóm carboxylat ($-COO^-$), trong đó liên kết ester phù hợp với giá trị δ_C 67,72 của nhóm CH_2-O . Đồng thời bên cạnh nhóm này là một nhóm CH do tạo thành tín hiệu doublet của nhóm CH_2-O , tức là có sự rẽ mạch nhánh tại vị trí $CH-2'$. Từ tương tác HMBC của CH_3-8' (δ_H 0,93) với carbon $HC-2'$ (δ_C 40,24) và với $C-7'$ (δ_C 24,94), khẳng định một nhánh nối vào nhóm CH này là $-C_2H_5$, nhánh còn lại được xác định bằng tương tác của $H-1'$ (δ_H 4,03) với $C-3'$ (δ_C 31,62) và tương tác của nhóm CH_3-6' (δ_H 0,93) với $C-5'$ và $C-4'$. Nhóm này được xác định là $-C_4H_9$. Còn lại hai nhóm CH_2 tại δ_C 34,78 và 25,56 trong đó tín hiệu cộng hưởng tại δ_C 34,78 đã dịch chuyển về phía trường thấp hơn do nằm sát với carbon $C=O$, tín hiệu tương tác của HMBC của $H-2$ (δ_H 2,36) với $C-3$ (δ_C 25,56) cũng được xác định. Như vậy công thức dự kiến là $C_{11}H_{21}O_2$. Theo công thức, với một số lẻ H (21 H) thì trong phân tử phải chứa một số lẻ nguyên tử N. Tuy nhiên, các dữ liệu phổ NMR nêu trên không thể hiện sự có mặt của nguyên tử N trong phân tử. Như vậy, khả năng tồn tại 1 phân tử có tính đối xứng với công thức đầy đủ là $C_{22}H_{42}O_4$. Dự đoán này dần dần được khẳng định bằng phổ khối lượng.

Bảng 3.10. Dữ liệu phổ NMR của **BBV8**

C	Chemadraw 5,0	$\delta_C^{a,b}$	DEPT	$\delta_H^{a,c}$	HMBC (H-C)
1 (6)	172,0	175,26	C		
2 (5)	33,3	34,78	CH ₂	2,36 (m)	1,3
3 (4)	24,8	25,56	CH ₂	1,67 (m)	1
1' (1'')	71,1	67,72	CH ₂	4,03 (t, J=5,5Hz)	1,2',3',7'
2' (2'')	37,3	40,24	CH ₂	1,60 (m)	1',8'
3' (3'')	30,6	31,62	CH ₂	1,32 (m)	
4' (4'')	30,0	30,11	CH ₂	1,33 (m)	6'
5' (5'')	23,4	24,03	CH ₂	1,34 (m)	
6' (6'')	15,0	14,38	CH ₃	0,93(t, J=6,5Hz)	4',5'
7' (7'')	24,0	24,94	CH ₂	1,40 (m)	1',8'
8' (8'')	11,5	11,38	CH ₃	0,93 (t, J=6,5Hz)	2',7'

^ađo trong CD₃OD, ^b125 MHz, ^c500 MHz.

Từ các kết quả phân tích phổ trên, **BBV8** được xác định là *Bis (2-ethyl hexyl) adipat* hay còn gọi là *diethylhexyl adipat*, còn được gọi là FlexolA26. Đây là lần đầu tiên hợp chất này được phát hiện từ vỏ cây Gạo.



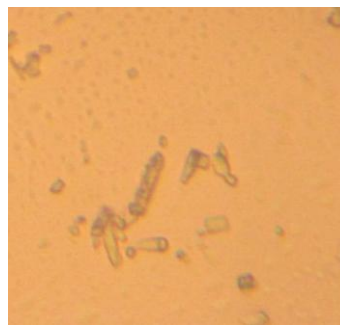
Hình 3.25. Cấu trúc hóa học của **BBV8**

3.2.3.2. Nhận dạng các hợp chất phân lập từ lá

Có 3 hợp chất phân lập được từ lá là **BBL1**, **BBL2** và **BBL4** được xác định lần lượt là daucosterol (**BBV6**), stigmasterol (**BBV7**) và lupeol (**BBV1**) đã phân lập được và nhận dạng ở vỏ thân. Sau đây là các chất còn lại (**BBL3**, **BBL5**, **BBL6** và **BBL7**):

❖ **BBL3**

Tính chất: Hợp chất **BBL3** phân lập được dưới dạng tinh thể màu vàng. Tan trong methanol, ethanol nóng; không tan trong n-hexan.



Hình 3.26. Ảnh chụp tinh thể **BBL3**
(dưới KHV vật kính 40)

Phổ khối lượng ESI-MS xuất hiện pic ion phân tử tại m/z 423 $[M+H]^+$ tương ứng với công thức phân tử là $C_{19}H_{18}O_{11}$ ($M = 422$).

Phổ NMR chỉ ra rằng hợp chất này có cấu trúc dạng xanthone C-glucoside. Phổ 1H -NMR cho thấy tín hiệu 3 nhóm methin (CH) của vòng benzen cộng hưởng trong vùng trường yếu δ_H 6,35 (s, H-8); 6,79 (s, H-11) và 7,33 (s, H-14). Tín hiệu proton tại δ_H 13,85 của nhóm hydroxyl đặc trưng đính vào C-5. Ngoài ra, tín hiệu của một proton anome của phân tử đường được xác định tại δ_H 4,58 (1H, dd, $J = 9,5$ Hz, H-1'), hằng số tương tác $J=9,5$ Hz gợi ý đây là một đường nối C-C.

Phổ ^{13}C -NMR của **BBL3** bao gồm tín hiệu của 19 nguyên tử carbon. Phân tích các tín hiệu trên phổ DEPT xác nhận được gồm 10 carbon bậc 4 (C), 1 carbon methylen (CH_2) và 8 carbon methin (CH). Trong đó có 3 carbon methin của vòng thơm; 10 carbon bậc 4 của khung xanthone. Nhánh đường được xác nhận bởi các tín hiệu của 1 carbon anome cùng với tín hiệu của 4 carbon methin và tín hiệu của 1 nhóm methylen đặc trưng cho phân tử đường glucose. Từ những dữ kiện phổ trên cho phép dự đoán hợp chất **BBL3** là mangiferin.

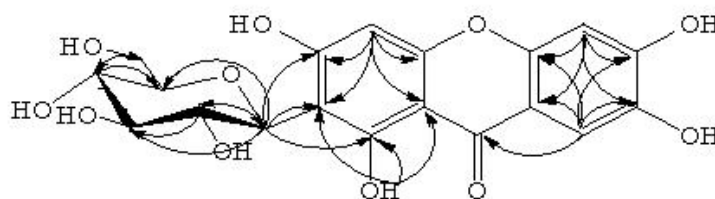
Bảng 3.11. Dữ liệu phổ NMR của **BBL3**.

C	* δ_C [223]	$\delta_C^{a,b}$	$\delta_H^{a,c}$ mult. (J = Hz)	HMBC (H→C)
2	150,9	151,15	-	
3	111,8	110,88	-	
4	179,2	178,86	-	
5	161,8	161,74	-	
6	107,7	107,33	-	
7	163,9	163,76	-	
8	93,4	93,25	6,35 s	6, 7, 9, 10
9	156,3	156,15	-	
10	101,4	101,21	-	
11	102,7	102,21	6,79 s	2, 3, 12, 13
12	154,1	155,46	-	
13	143,8	144,13	-	
14	108,2	107,49	7,33 s	2, 4, 12, 13
1'	73,2	73,11	4,58 d (9,5)	5, 6, 7, 2', 5'
2'	70,4	70,25	4,05 t (9,5)	1', 3'
3'	79,0	78,98	3,21 m	
4'	70,7	70,62	3,14 m	3', 5', 6'
5'	81,6	81,52	3,17 m	
6'	61,6	61,47	3,67 br d (11,0; 2,5) 3,41 dd (11,0; 6,0)	4'
5-OH			13,85 s	5, 6, 10

* δ_C (mangiferin) đo trong DMSO [223], ^a: đo trong DMSO; ^b: 125 MHz; ^c: 500 MHz

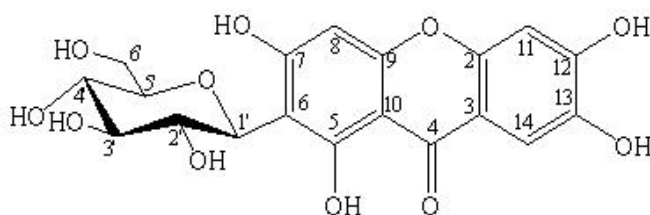
So sánh số liệu phổ NMR của hợp chất **BBL3** với số liệu của mangiferin [223] nhận được sự phù hợp hoàn toàn ở tất cả các vị trí tương ứng (xem bảng 3.11). Nhận định này được khẳng định thêm khi xem xét phổ HSQC, HMBC. Trên phổ HSQC, proton H-8 (C-8, δ_C 93,25) cộng hưởng tại δ_H 6,79 (1H, s), tín hiệu này dạng singlet cho thấy đây là vòng thơm thế 5 vị trí. Proton H-11 cộng

hưởng tại δ_H 6,35 (C-11, δ_C 102,21), dưới dạng tín hiệu singlet; proton H-14 cộng hưởng tại δ_H 7,33 (C-11, δ_C 102,21), cũng dưới dạng tín hiệu singlet. Mặt khác, tương tác HMBC của H-11 với C-2 (δ_C 151,15)/C-3 (δ_C 110,88)/C-12 (δ_C 155,46)/C-13 (δ_C 144,13) và tương tác HMBC của H-14 với C-2 (δ_C 151,15)/C-4 (δ_C 178,86)/C-12 (δ_C 155,46)/C-13 (δ_C 144,13) cho phép khẳng định đây là tín hiệu của 2 proton của vòng thơm thế 4 vị trí. Trừ đi 6 nguyên tử C của phân tử đường glucose còn lại 13 nguyên tử C của phần aglycon như vậy phần aglycon hoàn toàn phù hợp với khung xanthone. Vị trí đính đường glucose được xác định dựa vào tương tác HMBC giữa H-1' của đường với C-5 của phần aglycon (hình 3.27).



Hình 3.27. Một số tương tác chính của hợp chất **BBL3**.

Từ tất cả các phân tích nêu trên, hợp chất **BBL3** được xác định là mangiferin một hợp chất đã được phân lập từ cây Gạo [209].



Hình 3.28. Cấu trúc hoá học của **BBL3**.

❖ BBL5

Tính chất: Tinh thể hình lăng trụ dài, không màu. Nhiệt độ nóng chảy: 290 – 292°C



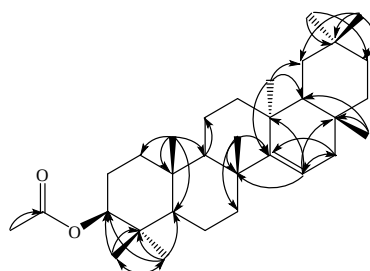
Hình 3.29. Ảnh chụp tinh thể **BBL5** (dưới KHV vật kính 40)

Phổ khối lượng ESI-MS xuất hiện pic ion phân tử m/z 469 $[M+H]^+$ tương ứng với công thức phân tử là $C_{32}H_{52}O_2$ ($M = 468$).

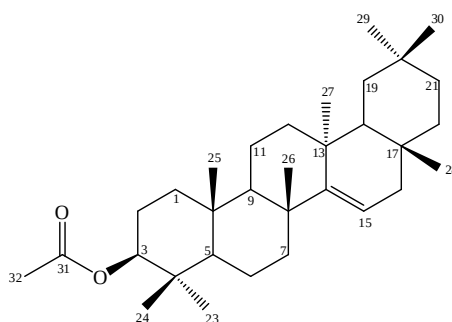
Phổ 1H -NMR của **BBL5** có dạng một hợp chất triterpen năm vòng với sự xuất hiện tín hiệu singlet của 9 nhóm methyl bậc ba tại δ_H 0,88 (3H); 0,86 (3H); 0,95 (3H); 0,82 (3H); 0,91 (6H); 0,96 (3H); 1,10 (3H) và 2,05 (3H). Trong đó có 1 nhóm methyl cộng hưởng ở vùng trường thấp (δ_H 2,05/ δ_C 21,09) và 1 tín hiệu δ_C 171,45 gợi ý **BBL5** có nhóm acetyl. Các nhóm methyl bậc ba còn lại dưới dạng singlet đặc trưng cho khung taraxeran. Ngoài ra, trên phổ còn xuất hiện tín hiệu 1 proton olefin tại δ_H 5,54 (dd, $J = 8,0; 3,0$ Hz) và do sự có mặt của nhóm acetyl nên proton H-3 có sự dịch chuyển về phía trường thấp δ_H 4,46 (dd, $J = 11,5; 5,0$ Hz).

Phổ ^{13}C -NMR xuất hiện tín hiệu của 32 nguyên tử carbon. Phổ DEPT cho thấy hợp chất này có 8 carbon bậc bốn (tại δ 38,83; 37,74; 35,62; 37,22; 37,40; 28,62; 157,83 và 171,45), có 5 carbon bậc ba (tại δ 81,24; 55,49; 48,59; 116,80 và 49,04), có 10 nhóm CH_2 (tại δ 37,53; 23,28; 18,52; 36,50; 17,35; 34,95; 37,22; 41,06; 33,52 và 32,93) và có 9 nhóm methyl (tại δ 16,37; 27,77; 15,30; 29,72; 25,74; 29,63; 33,13; 21,09 (x2)). Các tín hiệu cộng hưởng tại δ 171,45 (C) và 21,09 (CH_3) khẳng định sự có mặt 1 nhóm acetyl; các tín hiệu cộng hưởng tại δ 157,83 (C) và 116,80 (CH) khẳng định sự có mặt của 1 nối đôi bị thế ba lần tại C-14/C-15 của khung taraxeran.

Trên phổ ^{13}C -NMR của **BBL5** có sự xuất hiện tín hiệu nhóm oximethin tại δ 81,24 (CH) bị dịch chuyển mạnh về phía trường thấp do liên kết với nhóm acetyl. Bên cạnh đó, căn cứ vào những tương tác trên phổ HSQC và phổ HMBC nhóm acetyl được khẳng định nối với C-3 bởi các tương tác HMBC từ các proton H-3 (δ 4,46) với C-31 (δ 171,45) và tương tác HMBC của proton H-23 (δ 0,86) và H-24 (δ 0,88) với carbon oximethin C-3 (δ 81,24). Tương tác giữa proton H-27 (δ 1,01) với C-18 (δ 49,04) và C-19 (δ 41,06) cho phép khẳng định **BBL5** có nhóm CH_3 tại vị trí C-13 đặc trưng cho khung taraxeran. Vị trí của liên kết đôi tại C-14 (δ 157,83)/C-15 (δ 116,80) được khẳng định bởi sự xuất hiện các tương tác HMBC từ proton của nhóm methyl H-26 (δ 0,91) với carbon olefin C-14 (δ 157,83), từ proton olefin H-15 (δ 5,54) với carbon C-8 (δ 37,74); C-13 (δ 35,62); C-16 (δ 37,22); C-17 (δ 37,40).



Hình 3.30. Các tương tác HMBC chính của **BBL5**



Hình 3.31. Cấu trúc hóa học của **BBL5**

Ngoài ra, vị trí nối đôi tại C-14/C-15 và nhóm acetyl gắn với C-3 còn được khẳng định bởi sự phù hợp hoàn toàn về số liệu phổ NMR tại các vị trí tương ứng của hợp chất taraxeryl acetat so với các số liệu đã được công bố [198].

Bảng 3.12. Dữ liệu phổ NMR của BBL5

C	[#] δ _C [198]	δ _C ^{a,b}	DEPT	δ _H ^{a,c} mult.(J = Hz)	HMBC (H→C)
1	37,73	37,53	CH ₂	1,39 m/ 1,93 dd (15,0; 3,0)	
2	28,86	23,28	CH ₂	1,65 m	
3	80,98	81,24	CH	4,46 dd (11,5; 5,0)	1, 2, 4, 23, 24, 31
4	39,01	38,83	C	-	
5	55,63	55,49	CH	1,32 m	
6	18,76	18,52	CH ₂	1,44 m/1,46 m	
7	35,15	36,50	CH ₂	1,29 m/1,63 m	
8	37,92	37,74	C	-	
9	48,56	48,59	CH	1,42 m	11
10	37,81	37,22	C	-	
11	17,39	17,35	CH ₂	1,42 m/1,46 m	
12	36,51	34,95	CH ₂	1,05 m/1,42 m	
13	37,54	35,62	C	-	
14	157,76	157,83	C	-	
15	116,56	116,80	CH	5,54 dd (8,0; 3,0)	8, 13, 16, 17
16	37,40	37,22	CH ₂	1,65 m/2,02 m	14, 15
17	37,62	37,40	C	-	
18	49,68	49,04	CH	1,03 m	
19	41,17	41,06	CH ₂	2,02 m/2,05 m	
20	28,64	28,62	C	-	
21	34,95	33,52	CH ₂	1,32 m/1,42 m	
22	33,55	32,93	CH ₂	1,33 m/1,43 m	
23	27,75	27,77	CH ₃	0,86 s	3, 4, 5, 24
24	15,33	16,37	CH ₃	0,88 s	3, 4, 5, 23
25	15,33	15,30	CH ₃	0,95 s	1, 5, 9, 10
26	29,63	29,63	CH ₃	0,91 s	8, 9, 14
27	25,76	25,74	CH ₃	1,10 s	13,14,18, 19
28	29,73	29,72	CH ₃	0,82 s	17, 18
29	33,13	33,13	CH ₃	0,96 s	20, 21
30	21,15	21,09	CH ₃	0,91 s	19, 20, 21
C=O	170,82	171,45	C	-	-
COCH ₃	21,36	21,09	CH ₃	2,05 s	31

[#]δ_C đo trong CDCl₃ 125 MHz [198], ^a: đo trong CDCl₃; ^b: 125 MHz; ^c: 500 MHz.

❖ **BBL6**

Tính chất: là tinh thể hình kim, không màu, tan trong methanol, ethanol, cloroform, ethyl acetat. Nhiệt độ nóng chảy: 281 - 282°C.



Hình 3.32. Ảnh chụp tinh thể **BBL6** (dưới KHV vật kính 40)

Phổ khối lượng ESI-MS xuất hiện pic ion phân tử m/z 427 $[M+H]^+$ tương ứng với công thức phân tử $C_{30}H_{50}O$ ($M = 426$).

Phổ 1H -NMR của **BBL6** khá giống so với hợp chất **BBL5** đều có dạng một hợp chất triterpen 5 vòng. Trong đó, sự xuất hiện tín hiệu singlet của 8 nhóm methyl bậc ba tại δ_H 0,80 (3H); 0,82 (3H); 0,91 (6H); 0,93 (3H); 0,95 (3H); 0,98 (3H) và 1,09 (3H) gợi ý **BBL6** có dạng khung taraxeran. Ngoài ra, trên phổ còn xuất hiện tín hiệu một proton olefin tại δ_H 5,54 (dd, $J = 8,5; 3,5$ Hz) và xuất hiện thêm một proton oximethin tại δ_H 3,21 (dd, $J = 11,0; 4,5$ Hz).

Phổ ^{13}C -NMR xuất hiện tín hiệu của 30 nguyên tử carbon. Phổ DEPT cho thấy hợp chất này có 7 carbon bậc bốn (tại δ 39,00; 38,78; 38,02; 37,59; 35,80; 28,81 và 158,11), có 5 carbon bậc ba (tại δ 79,08; 55,56; 48,78; 116,89 và 49,30), có 10 nhóm CH_2 (tại δ 37,76; 27,17; 18,82; 35,14; 17,51; 36,70; 37,73; 41,35; 33,72 và 33,12) và có 8 nhóm methyl (tại δ 15,46; 28,01; 15,44; 30,92; 25,91; 29,93; 33,36 và 21,33). Các tín hiệu cộng hưởng tại δ 158,11 (C) và 116,89 (CH) khẳng định sự có mặt của 1 nối đôi bị thế ba lần.

Ngoài ra trên phổ ^{13}C -NMR của **BBL6** có sự xuất hiện tín hiệu nhóm oximethin tại δ 79,08 (CH) và không xuất hiện tín hiệu của nhóm acetyl (δ 171,64) như trên phổ của **BBL5** cho phép ta dự đoán có nhóm hydroxy ở C-3. Các hằng số tương tác của H-3 ($J = 11,0$ Hz và $J = 4,5$ Hz) cho thấy H-3 có cấu hình α .

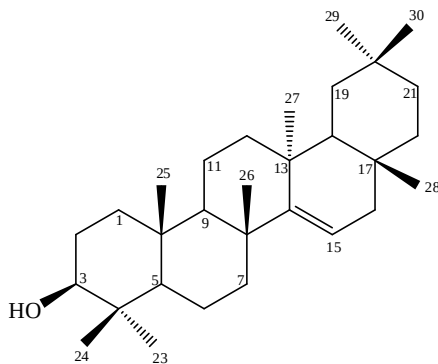
Bảng 3.13. Dữ liệu phổ NMR của **BBL6**

C	[#] δ _C [198]	δ _C ^{a,b}	δ _H ^{a,c} mult. (J = Hz)	HMBC (H→C)
1	38,56	37,76	1,39 m/ 1,93 dd (15,0; 3,0)	
2	26,60	27,17	1,65 m	
3	78,65	79,08	3,21 dd (11,5; 4,5)	
4	38,83	39,00	-	
5	55, 39	55,56	1,32 m	
6	18,68	18,82	1,44 m/ 1,46 m	
7	35,63	35,14	1,29 m/ 1,63 m	
8	38,55	38,78	-	
9	48,56	48,78	1,42 m	11
10	37,81	38,02	-	
11	17,39	17,51	1,42 m/ 1,46 m	
12	36,51	36,70	1,05 m/ 1,42 m	
13	37,54	37,59	-	
14	157,76	158,11	-	
15	116,56	116,89	5,54 dd (8,5; 3,5)	8, 13, 16, 17
16	37,40	37,73	1,65 m/ 2,02 m	14, 15
17	37,62	35,80	-	
18	49,68	49,30	1,03 m	
19	41,17	41,35	2,02 m/ 2,05 m	
20	28,64	28,81	-	
21	34,95	33,72	1,32 m/ 1,42 m	
22	33,55	33,12	1,33 m/ 1,43 m	
23	27,75	28,01	0,93 s	3, 4, 5, 24
24	15,33	15,46	0,80 s	3, 4, 5, 23
25	15,33	15,44	0,95 s	1, 5, 9, 10
26	29,63	30,92	0,93 s	8, 9, 14
27	25,76	25,91	1,09 s	13,14,18, 19
28	29,73	29,93	0,82 s	17, 18
29	33,13	33,36	0,98 s	20, 21
30	21,15	21,33	0,91 s	19, 20, 21

[#]: δ_C (taraxerol) đo trong CDCl₃ 125 MHz [198], ^a: đo trong CDCl₃; ^b: 125 MHz; ^c: 500 MHz;

Căn cứ vào những tương tác trên phổ HSQC và phổ HMBC nhóm oximethin được khẳng định tại C-3 bởi các tương tác HMBC từ các proton methyl H-23 (δ 0,91) và H-24 (δ 0,80) với carbon oximethin C-3 (δ 79,08). Vị trí của liên kết đôi tại C-14 (δ 158,11)/C-15 (δ 116,89) được khẳng định bởi sự xuất hiện các tương tác HMBC từ proton của nhóm methyl H-26 (δ 0,93) với carbon olefin C-14 (δ 158,11), từ proton olefin H-15 (δ 5,54) với carbon C-8 (δ

38,78); C-13 (δ 37,59); C-16 (δ 37,73); C-17 (δ 35,80). Ngoài ra, vị trí nối đôi tại C-14/C-15 và nhóm oximethin tại C-3 còn được khẳng định bởi sự phù hợp hoàn toàn về số liệu phổ NMR tại các vị trí tương ứng của hợp chất taraxerol so với các số liệu đã được công bố [198].



Hình 3.33. Cấu trúc hóa học của **BBL6**

❖ **BBL7**

Tính chất: Tinh thể hình kim, không màu, tan trong methanol, ethanol. Nhiệt độ nóng chảy 138 - 140°C.



Hình 3.34. Ảnh chụp tinh thể **BBL7** (dưới KHV vật kính 40)

Phổ khối lượng ESI-MS xuất hiện pic ion phân tử m/z 412,9 $[M-H_2O+H]^+$ tương ứng với công thức phân tử của **BBL7** là $C_{29}H_{50}O_2$ ($M = 430$).

Phổ 1H -NMR cho thấy sự có mặt của 2 nhóm thế methyl bậc ba δ 0,69 (s, H-18), δ 1,00 (s, H-19), 3 nhóm thế methylen bậc hai δ 0,93 (d, 6,6; H-21), δ 0,83 (d, 7,3; H-26), δ 0,84 (t, 7,5; H-29) và 1 nhóm thế methin bậc một δ 0,81 (d, 6,8; H-27)

Trên phổ NMR cũng xác nhận sự có mặt của 2 nhóm hydroxy β -OH tại H

-3 (δ 3,59, m)/C-3 (δ 71,40) và α -OH tại H -7 (δ 3,86, br s)/C-7 (δ 65,38), một nối đôi tại C-5 (δ 146,27)/C-6 (δ 123,91) và δ 5,61 (1H dd 5,0; 1,5 Hz; H-6).

Bảng 3.14. Dữ liệu phổ NMR của **BBL7**

C	[#] δ_C [87]	$\delta_C^{a,b}$	DEPT	$\delta_H^{a,c}$
1	37,01	37,05	CH ₂	
2	31,37	31,42	CH ₂	
3	71,35	71,40	CH	3,59 m
4	42,01	42,05	CH ₂	
5	146,26	146,27	C	
6	123,86	123,91	CH	5,61 dd (5,0; 1,5)
7	65,37	65,38	CH	3,86 br s
8	37,52	37,57	CH	
9	42,25	42,31	CH	
10	37,40	37,43	C	
11	20,71	20,74	CH ₂	
12	39,16	39,22	CH ₂	
13	42,14	42,18	C	
14	49,42	49,46	CH	
15	24,32	24,33	CH ₂	
16	28,28	28,30	CH ₂	
17	55,66	55,77	CH	
18	11,65	11,65	CH ₃	0,69 s
19	18,26	18,26	CH ₃	1,00 s
20	36,23	36,13	CH	
21	18,86	18,83	CH ₃	0,93 d (6,6)
22	33,89	33,97	CH ₂	
23	26,17	26,01	CH ₂	
24	46,04	45,89	CH	
25	28,91	29,20	CH ₂	
26	19,58	19,81	CH ₃	0,83 d (7,3)
27	19,01	19,06	CH	0,81 d (6,8)
28	23,01	23,11	CH ₃	
29	12,33	12,01	CH ₃	0,84 t (7,5)

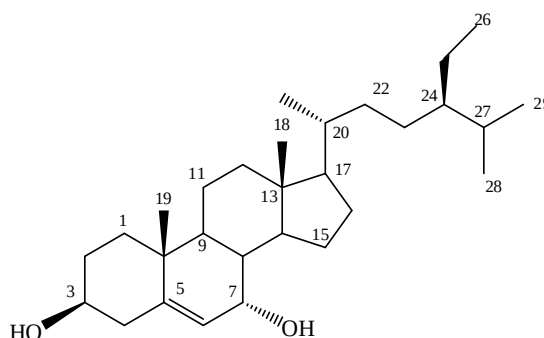
[#] δ_C của 7 α -hydroxysitosterol đo trong CDCl₃ [87]

^a đo trong CDCl₃, ^b 125MHz, ^c 500 MHz.

Phổ ¹³C-NMR của **BBL7** xuất hiện tín hiệu của 29 carbon đặc trưng cho các hợp chất thuộc vào một khung sterol. Các tín hiệu trên phổ DEPT cho thấy hợp chất này có 6 nhóm methyl tại δ 11,65 (C-18); 18,26 (C-19); 18,83 (C-21); 19,81 (C-26); 23,11 (C-28); 12,01 (C-29); có 10 nhóm methylen tại δ 37,05 (C-1); 31,42 (C-2); 42,05 (C-4); 20,74 (C-11); 39,22 (C-12); 24,33 (C-15); 28,30 (C-16); 33,97 (C-22); 26,01 (C-23); 29,20 (C-25); có 10 nhóm methin tại δ

71,40 (C-3); 123,91 (C-6); 65,38 (C-7); 37,57 (C-8); 42,31 (C-9); 49,46 (C-14); 55,77 (C-17); 36,13 (C-20); 45,89 (C-24); 19,06 (C-27) và có 3 carbon bậc 4 tại δ 146,27 (C-5); 37,43 (C-10); 42,18 (C-13).

Dựa vào những dữ kiện phổ trên kết hợp so sánh với dữ kiện phổ ^{13}C -NMR của hợp chất 7α -hydroxy sitosterol [87] xác định được **BBL7** là 7α -hydroxy sitosterol có cấu trúc như ở hình 3.35.



Hình 3.35. Cấu trúc hóa học của **BBL7**

3.2.4. Xây dựng phương pháp xác định hàm lượng một số hợp chất có trong cây Gạo

Để có thể xác định được hàm lượng một số hợp chất phân lập được từ các bộ phận khác nhau của cây Gạo cần có một phương pháp phân tích thích hợp. Nghiên cứu được bắt đầu với các hợp chất dạng kết tinh. Phương pháp được chọn lựa để tiến hành nghiên cứu là HPLC. Tiến hành khảo sát điều kiện sắc ký với cột hiện có là Cột Zorbax C18 (250mm×4,6 mm; 5 μm) kết hợp cột bảo vệ Phenomenex C18 (ODS, Octadecyl; cartridge 15x30mm ID). Quá trình khảo sát được tiến hành ở nhiệt độ phòng là 25°C.

3.2.4.1. Chuẩn bị mẫu thử

❖ Cẩn toàn phần thu được từ vỏ thân cây Gạo

Cân 500,08g vỏ thân cây Gạo (độ ẩm 7,72%) đã được làm nhỏ, ngâm lạnh 3 lần với methanol trong 24 giờ, 48 giờ và 72 giờ. Thu hồi dịch chiết, lọc, gộp dịch lọc được cất thu hồi dung môi dưới áp suất giảm thu được cẩn. Cẩn được cô đến khối lượng không đổi, thu được 25,12g cẩn toàn phần, đem bảo quản ở 4°C.

❖ *Cần toàn phần thu được từ lá cây Gạo*

Cân 510,36 g dược liệu lá cây Gạo (độ ẩm 4,39%) đã được làm nhỏ, ngâm lạnh 3 lần với methanol trong 24 giờ, 48 giờ và 72 giờ. Thu hồi dịch chiết, lọc, gộp dịch lọc được cất thu hồi dung môi dưới áp suất giảm thu được cần. Cần được cô đến khối lượng không đổi, thu được 21,12g cần toàn phần, đem bảo quản ở 4°C.

❖ *Pha dung dịch thử*: cân chính xác khoảng 0,5000g cần tương ứng hòa tan trong methanol và định mức thành 25mL dung dịch, lọc qua bông thủy tinh, sau đó qua màng lọc 0,45µm, lấy dịch trong để tiêm sắc ký.

3.2.4.2. Khảo sát điều kiện sắc ký với các dịch chiết methanol từ cây Gạo

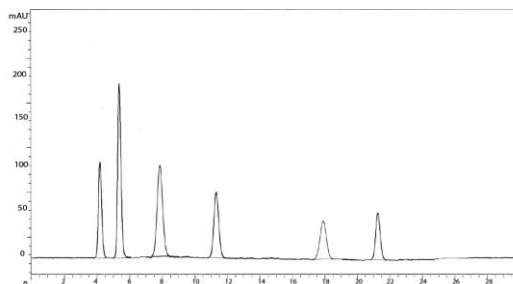
Cân chính xác từng chất phân lập được và hòa tan thành các dung dịch trong methanol lọc qua màng lọc trước khi tiêm vào hệ thống sắc ký. Xử lý tương tự với các cần dịch chiết methanol để có các mẫu thử.

Sau khi thử nghiệm với một số chương trình dung môi khác nhau, tốc độ dòng và thể tích tiêm mẫu khác nhau, đã chọn lựa được một chương trình tương đối phù hợp đủ để tách các chất nghiên cứu cũng như các pic khác trong mẫu nghiên cứu được chuẩn bị từ vỏ thân và lá cây Gạo. Thời gian phân tích không quá kéo dài, mỗi một lần tiêm mẫu là 30 phút. Điều kiện sắc ký xác định được với điều kiện cột sẵn có ở trên như sau:

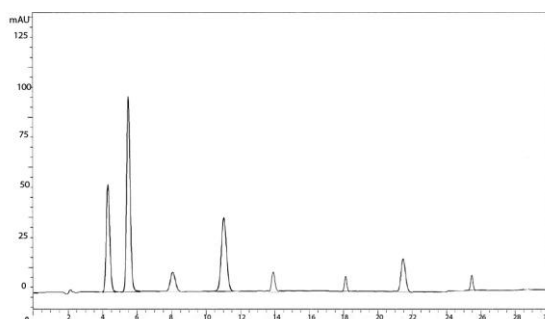
❖ *Với dịch chiết vỏ thân cây Gạo*:

Sử dụng chế độ gradient dung môi với kênh A là acid formic 0,1% trong acetonitril và kênh B là acid formic 0,1% trong methanol (B). Tỷ lệ kênh A-B ban đầu là (30:70), thay đổi tuyến tính đạt đến A-B (40:60) ở phút thứ 6, rồi thay đổi tuyến tính đạt đến A-B (50:50) ở phút thứ 23. Thay đổi tuyến tính về lại A-B (40:60) ở phút thứ 27 và cuối cùng pha động được thay đổi tuyến tính về tỷ lệ A-B (30:70) ban đầu ở phút thứ 30. Tốc độ dòng là 0,7 ml/phút và thể tích tiêm mẫu là 10µl. Bước sóng của detector được chọn là 280nm là để dung hòa tương đối khả năng hấp thụ của các chất.

Chương trình sắc ký với điều kiện sắc ký như trên được gọi là CTSK1. Với CTSK1, các chất nghiên cứu được tách hoàn toàn, pic cân đối, thời gian lưu hợp lý. Các sắc ký đồ thu được như ở hình 3.36 và hình 3.37.



Hình 3.36. Sắc ký đồ của hỗn hợp 6 hợp chất phân lập từ vỏ thân cây Gạo



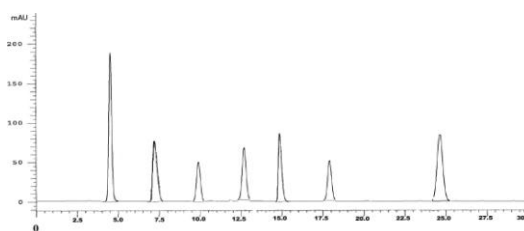
Hình 3.37. Sắc ký đồ của mẫu thử chuẩn bị từ vỏ thân cây Gạo.

Tiến hành sắc ký với từng hợp chất nghiên cứu và so sánh với sắc ký đồ thu được của hỗn hợp 6 hợp chất là epicatechin, catechin, daucosterol, lupeol, stigmasterol và friedelin để xác định được thời gian lưu của các chất. Thời gian lưu của các chất lần lượt là 4,38; 5,41; 7,88; 11,36; 17,94 và 21,35 phút.

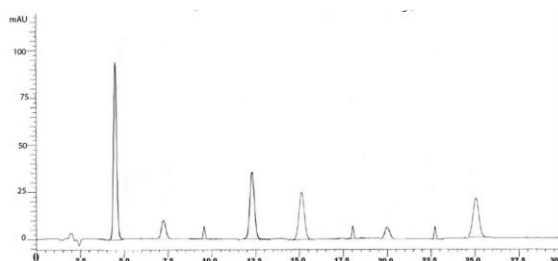
❖ Với dịch chiết lá cây Gạo:

Sử dụng chế độ gradient dung môi với kênh A là acid formic 0,1% trong acetonitril và kênh B là acid formic 0,1% trong methanol. Tỷ lệ kênh A-B ban đầu là (30:70), thay đổi tuyến tính đạt đến A-B (35:65) ở phút thứ 10, rồi thay đổi tuyến tính đạt tới A-B (40:60) ở phút thứ 15, tiếp tục thay đổi tuyến tính tới A-B (45:55) ở phút thứ 25, thay đổi tuyến tính trở về pha động A-B (40:60) ở phút thứ 27 và thay đổi tuyến tính về lại tỷ lệ A-B (30:70) ban đầu ở phút thứ 30. Tốc độ dòng là 1,0ml/phút, thể tích tiêm mẫu là 10 μ l và bước sóng của detector được chọn là 280nm. Chương trình sắc ký với điều kiện sắc ký như trên

được gọi là CTSK2. Với CTSK2, 7 hợp chất mangiferin, daucosterol, 7α -hydroxysitosterol, lupeol, taraxeryl acetat, stigmasterol và taraxerol được tách hoàn toàn, pic cân đối, thời gian lưu trung bình của các chất lần lượt là 4,42; 7,12; 9,51; 12,14; 15,17; 18,03 và 25,05 phút. Các sắc ký đồ thu được như ở hình 3.38 và hình 3.39.



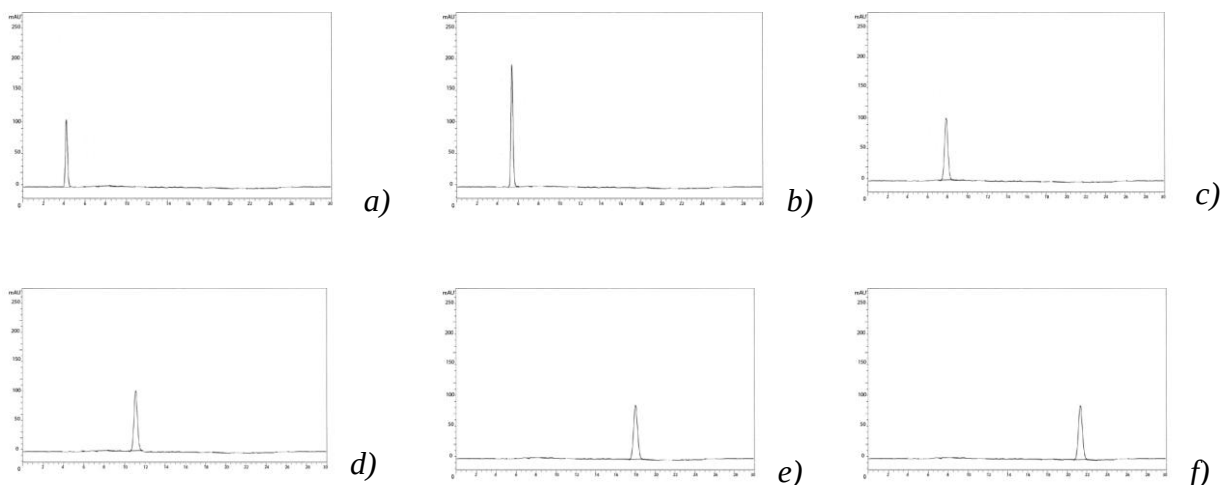
Hình 3.38. Sắc ký đồ của hỗn hợp 7 hợp chất phân lập từ lá cây Gạo



Hình 3.39. Sắc ký đồ của mẫu thử chuẩn bị từ lá cây Gạo.

3.2.4.3. Xác định độ tinh khiết của một số hợp chất phân lập được

Tiến hành sắc ký theo CTSK1 với từng hợp chất phân lập được từ vỏ thân cây Gạo thu được các sắc ký đồ như ở hình 3.40



Hình 3.40. Sắc ký đồ của một số hợp chất phân lập được từ vỏ thân cây Gạo.

a) epicatechin

b) catechin

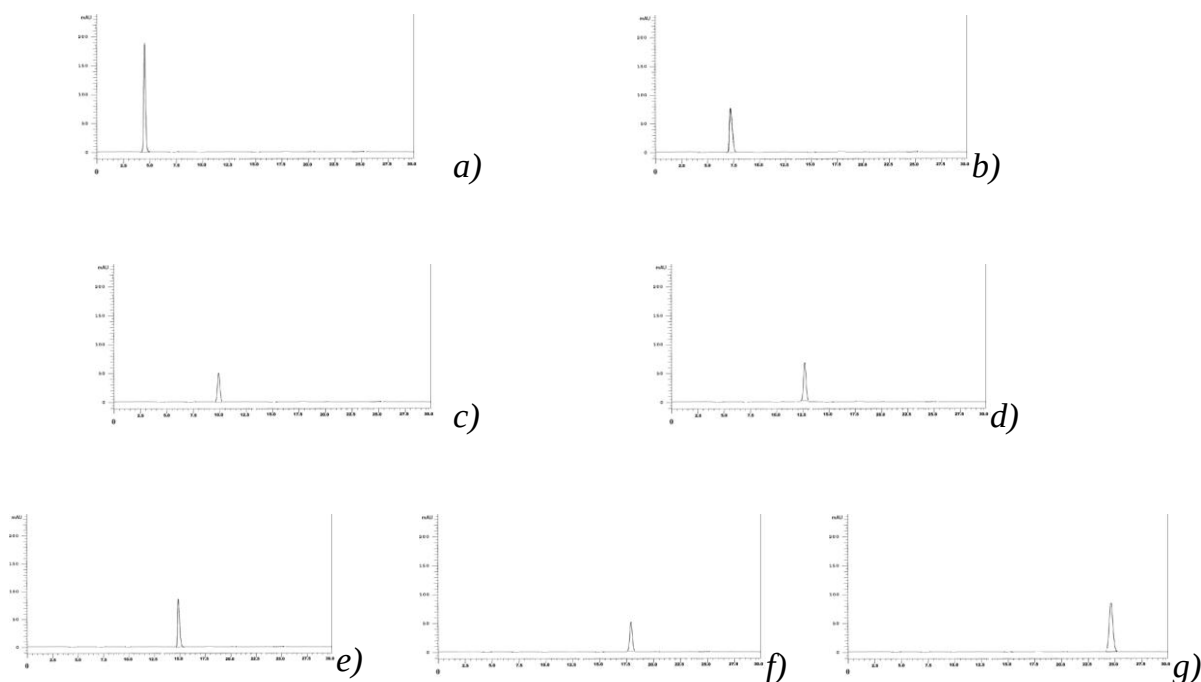
c) daucosterol

d) lupeol

e) stigmasterol

f) friedelin

Tiến hành sắc ký theo CTSK2 với từng hợp chất phân lập được từ lá cây Gạo thu được các sắc ký đồ như ở hình 3.41.



Hình 3.41. Sắc ký đồ của một số hợp chất phân lập được từ lá cây Gạo

a) mangiferin

b) daucosterol

c) 7 α -hydroxysitosterol

d) lupeol

e) taraxeryl acetat

f) stigmasterol

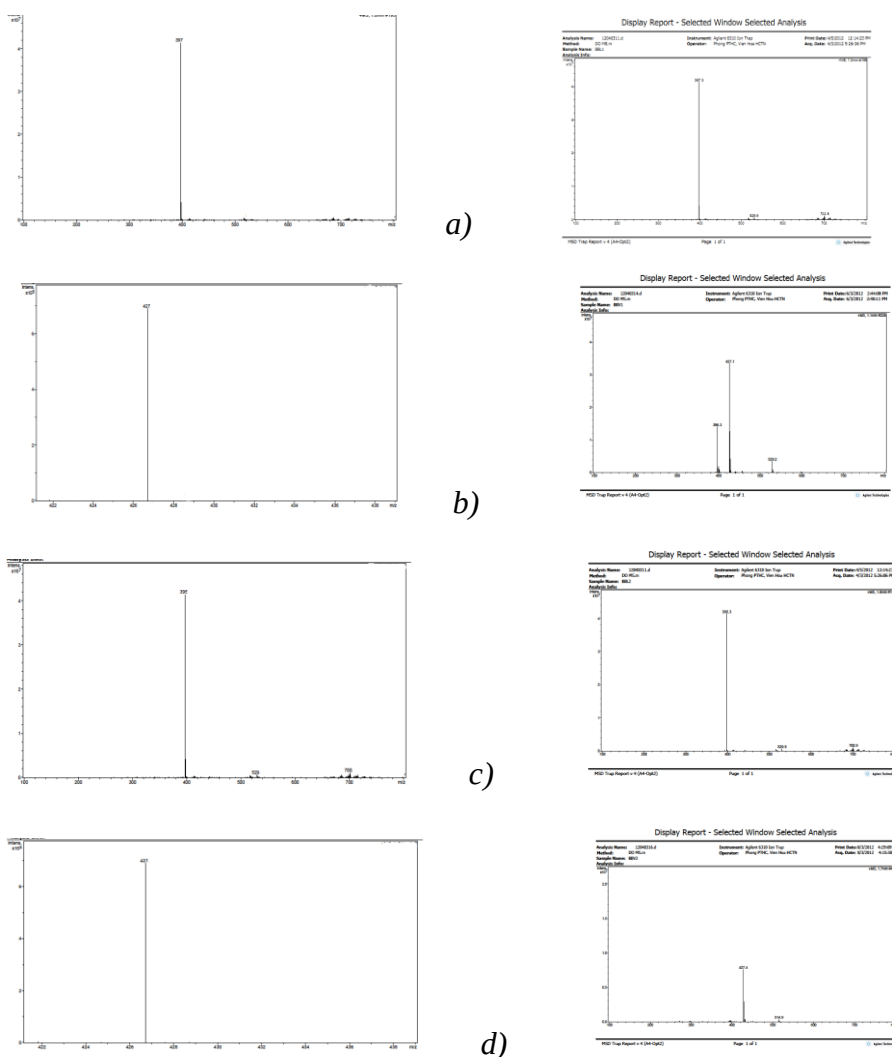
g) taraxerol

Các sắc ký đồ ở các hình 3.40 và hình 3.41 cho thấy cả 10 hợp chất đều không xuất hiện pic tạp chất (trong thời gian sắc ký là 30 phút). Đặc biệt với 3 chất daucosterol, lupeol và stigmasterol với 2 điều kiện sắc ký khác nhau cũng chỉ xuất hiện duy nhất một pic trên sắc ký đồ với thời gian lưu có thay đổi chút ít. Điều đó một lần nữa khẳng định các hợp chất phân lập được có độ tinh khiết cao nên có thể sử dụng các hợp chất này làm nguyên liệu để thiết lập chất đối chiếu. Tuy nhiên do lượng các hợp chất phân lập được còn ít và chưa đủ thời gian cho phép thiết lập chất chuẩn, vì vậy tạm dùng chúng như chất đối chiếu để khảo sát phương pháp định lượng chúng trong vỏ thân và lá cây Gạo.

3.2.4.4. Định tính các hợp chất trên sắc ký đồ của các dịch chiết toàn phần

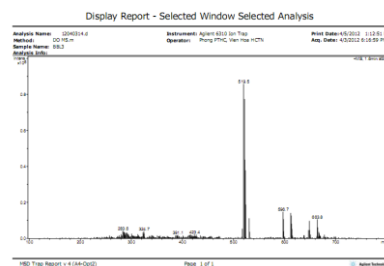
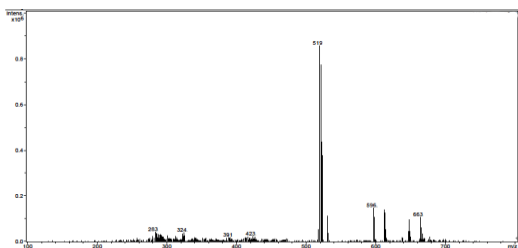
Định tính bằng so sánh phổ khối lượng của các pic cùng thời gian lưu của mẫu thử và hỗn hợp chất đối chiếu. Phổ khối lượng nhận dạng các pic được đo ở

chế độ: ESI+ với tốc độ khí phun là 3 l/phút, tốc độ khí làm khô là 15l/phút, nhiệt độ mao quản là 250°C, nhiệt độ của heat block là 400°C, vùng quét m/z là 100-1000. Thế phá mảnh +4,5kV. Để khẳng định thêm, các phổ khối lượng thu được từ các pic tương ứng với các hợp chất trên sắc ký đồ mẫu thử được so sánh với phổ khối lượng đã được dùng để phân tích cấu trúc. Kết quả được thể hiện ở hình 3.42 (một số hợp chất có trong dịch chiết vỏ thân cây Gạo) và hình 3.43 (một số hợp chất có trong dịch chiết lá cây Gạo).

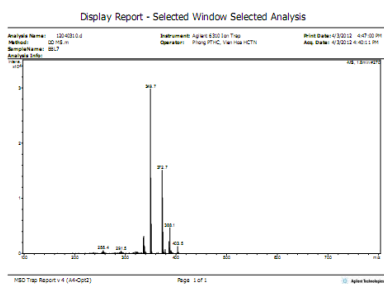
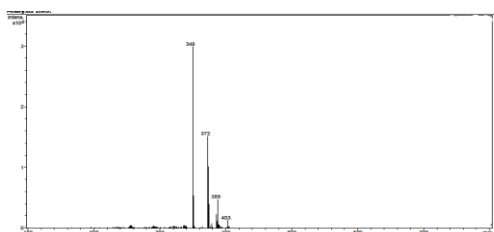


Hình 3.42. So sánh phổ khối lượng tương ứng với pic một số hợp chất trên sắc ký đồ (trái) và khi đo để nhận dạng cấu trúc (phải) có trong vỏ thân cây Gạo

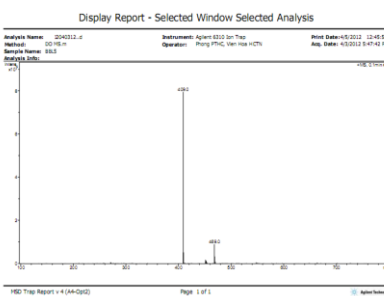
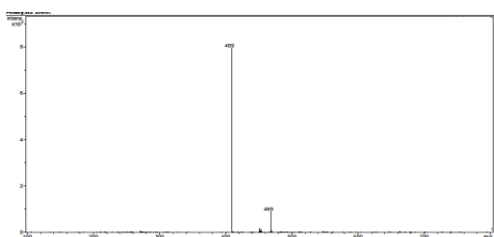
a) daucosterol b) lupeol c) stigmasterol d) friedelin



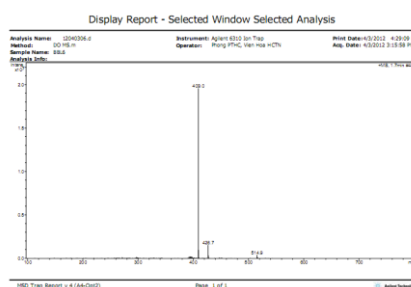
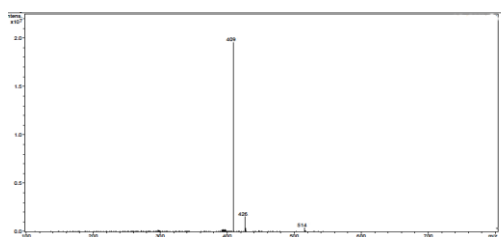
a)



b)



c)



d)

Hình 3.43. So sánh phổ khối lượng tương ứng với pic một số hợp chất trên sắc ký đồ (trái) và khi đo để nhận dạng cấu trúc (phải) có trong lá cây Gạo
a) mangiferin b) 7 α -hydroxysitosterol c) taraxeryl acetat d) taraxerol

Kết quả hoàn toàn phù hợp giữa phổ khối lượng của các pic ứng với từng chất trên sắc ký đồ mẫu thử là dịch chiết toàn phần chuẩn bị từ vỏ thân hay lá cây Gạo với phổ khối lượng từng chất phân lập được. Ngoài các pic của 6 hợp chất nghiên cứu, trên sắc ký đồ của mẫu thử chuẩn bị từ vỏ thân cây Gạo còn xuất hiện thêm 2 pic khác ở khoảng 14,0 phút và 25,4 phút (Hình 3.37). Tương tự trên sắc ký đồ của mẫu thử chuẩn bị từ lá cây Gạo, ngoài các pic của 7 hợp chất nghiên cứu, còn xuất hiện thêm 2 pic khác ở khoảng 20,0 phút và 22,8 phút (hình 3.39).

3.2.4.5. Thẩm định phương pháp và áp dụng để xác định hàm lượng các chất

❖ Thẩm định phương pháp

Phương pháp xây dựng được kiểm tra về sự phù hợp của hệ thống sắc ký. Tiến hành tiêm lặp lại 6 lần dung dịch chuẩn, ghi lại các giá trị về thời gian lưu, diện tích pic. Độ lặp lại của hệ thống được biểu thị bằng Độ lệch chuẩn tương đối RSD của thời gian lưu trong khoảng 0,11-0,16% với cả CTSK1 và CTSK2. Độ lệch chuẩn tương đối RSD của diện tích pic trong khoảng 0,27-0,49% (với CTSK1) và 0,11-0,21% (với CTSK2).

Tính đặc hiệu được kiểm tra bằng cách tiêm lần lượt dung môi pha mẫu, dung dịch thử và dung dịch đối chiếu vào hệ thống sắc ký, kết quả cho thấy dung dịch chuẩn và dung dịch thử tương ứng cho pic có thời gian lưu tương ứng, còn dung môi pha mẫu không cho pic ở các thời gian lưu tương ứng.

Kết quả khảo sát khoảng nồng độ tuyến tính cho thấy có sự tương quan tuyến tính chặt chẽ giữa nồng độ chất phân tích và diện tích pic đáp ứng trong khoảng nồng độ khảo sát của các hợp chất nghiên cứu với hệ số tương quan r đạt được trong khoảng 0,9995-1,0000 (Bảng 3.15). Kết quả này được sử dụng làm cơ sở để lựa chọn nồng độ định lượng của các hợp chất nghiên cứu tương ứng.

Bảng 3.15. Kết quả khảo sát khoảng nồng độ tuyến tính với các hợp chất

Hợp chất	Phương trình hồi quy	Khoảng nồng độ (µg/ml)	r	CTSK
Epicatechin	S=1604,63.C - 34,73	4,6 - 45,9	1,0000	1
Catechin	S = 4321,06.C-884,04	3,8 - 45,6	0,9999	1
Daucosterol	S=2093,72.C- 232,08	1,7 - 34,0	0,9999	1 và 2
Lupeol	S = 2188,58.C – 909,39	4,5 - 53,8	0,9997	1
	S=2129,05.C-31,34	4,5 - 44,8	1,0000	2
Stigmasterol	S = 1456,33.C- 3,36	2,4 - 24,0	1,0000	1
	S = 959,80.C+17,58	3,6 - 36,4	1,0000	2
Friedelin	S = 1367,76.C-260,66	5,3 - 42,7	0,9999	1
Mangiferin	S = 4347,28.C -1456,28	4,0 - 48,2	0,9997	2
7α-hydroxysitosterol	S=836,28.C-25,24	1,7 - 34,4	1,0000	2
Taraxeryl acetat	S=1286,10.C+853,84	6,4 - 50,9	0,9995	2
Taraxerol	S=1602,88.C-27,29	5,5 - 55,2	1,0000	2

Thêm một lượng chính xác dung dịch chuẩn vào dung dịch thử, sao cho tổng nồng độ sau khi thêm vẫn nằm trong khoảng tuyến tính của phương pháp. Tiến hành phân tích kết quả sắc ký để khảo sát độ đúng. Kết quả được tổng hợp trong bảng 3.16.

Bảng 3.16. Tổng hợp kết quả khảo sát độ đúng của các hợp chất

CTSK	Hợp chất	Nồng độ thêm vào mẫu (µg/ml)	Tỷ lệ thu hồi (%)	
			Trung bình	min-max
CTSK1	Epicatechin	7,34	99,20	97,44 - 99,84
	Catechin	3,04	99,21	96,58 - 101,26
	Lupeol	7,17	100,88	99,82 - 101,74
	Friedelin	4,27	99,77	95,33 - 102,68
	Stigmasterol	1,92	100,61	99,07 - 102,43
	Daucosterol	1,36	101,42	99,97 - 102,19
CTSK2	Mangiferin	6,43	100,69	98,34-102,04
	Daucosterol	2,72	101,42	100,58-102,19
	7α-hydroxy sitosterol	2,75	100,75	100,02-101,76
	Lupeol	7,17	100,22	99,54-101,48
	Taraxeryl acetat	5,09	100,25	98,85-102,61
	Stigmasterol	1,92	101,22	100,28-102,27
	Taraxerol	4,42	100,10	99,00-101,84

Kết quả khảo sát cho thấy phương pháp phân tích đã lựa chọn cho tỷ lệ thu hồi cao, có độ đúng tốt. Kết quả khảo sát cho thấy phương pháp HPLC xây dựng có độ nhạy cao, giới hạn định lượng LOQ thấp hơn nồng độ định lượng nhiều lần của từng hợp chất (nằm trong khoảng 0,8-4,07 μ g/ml).

Những kết quả thẩm định về tính đặc hiệu, khoảng nồng độ tuyến tính, độ đúng, độ lặp lại của các phương pháp định lượng các thành phần trong vỏ thân hoặc lá cây Gạo chứng tỏ rằng có thể sử dụng các phương pháp này để sơ bộ xác định hàm lượng của từng thành phần trong vỏ thân hoặc lá cây Gạo.

❖ *Xác định hàm lượng một số hợp chất có trong vỏ thân cây Gạo*

Tiến hành cân chính xác khoảng 500,0mg cân hòa tan và định mức thành 25ml, lọc qua bông và qua màng lọc. Tiến hành sắc ký song song mẫu thử với mẫu hỗn hợp các chất đối chiếu. Tính kết quả theo phương pháp chuẩn hóa 1 điểm.

Lượng cân cân cho các lần định lượng lần lượt là: 502,2mg; 503,2mg và 503,4mg. Tính toán lượng từng chất có mẫu thử qui về tương đương với 500mg cân. Tính giá trị trung bình của 3 lần thử. Từ lượng dược liệu và hàm ẩm của nó đem chiết và tổng lượng cân thu được tính ra hàm lượng từng chất có trong 100g dược liệu khô. Kết quả định lượng sơ bộ một số chất thu được có trong 100g vỏ thân cây Gạo được trình bày ở bảng 3.17.

Bảng 3.17. Kết quả xác định hàm lượng một số hợp chất có trong mẫu vỏ thân cây Gạo

Hợp chất	Khối lượng hợp chất (mg)							Hàm lượng (mg/100 g dl)
	Có trong cân đem định lượng			Tương đương trong 0,5g cân				
	Lần 1	Lần 2	Lần 3	Lần 1	Lần 2	Lần 3	Tr.bình	
Epicatechin	1,225	1,226	1,205	1,219	1,218	1,197	1,211	12,3
Catechin	0,662	0,667	0,668	0,659	0,663	0,664	0,662	6,7
Daucosterol	0,178	0,181	0,180	0,177	0,179	0,179	0,178	1,8
Lupeol	0,936	0,935	0,939	0,932	0,929	0,933	0,931	9,5
Stigmasterol	0,186	0,190	0,193	0,185	0,189	0,192	0,189	1,9
Friedelin	0,752	0,751	0,746	0,749	0,746	0,741	0,746	7,6

❖ *Xác định hàm lượng một số hợp chất có trong lá cây Gạo*

Tiến hành tương tự như với vỏ thân. Lượng cân cân cho các lần định lượng lần lượt là: 506,4mg; 503,2mg và 502,2mg. Tiến hành song song mẫu thử với mẫu hỗn hợp các chất đối chiếu. Tính toán lượng từng chất có mẫu thử tương đương với 500mg cân. Tính giá trị trung bình của 3 lần thử. Kết quả thu được như ở bảng 3.18.

Bảng 3.18. Kết quả xác định hàm lượng một số hợp chất có trong mẫu lá cây Gạo

Hợp chất	Khối lượng hợp chất (mg)							Hàm lượng (mg/100 g dl)
	Có trong cân đem định lượng			Tương đương trong 0,5 g cân				
	Lần 1	Lần 2	Lần 3	Lần 1	Lần 2	Lần 3	Tr.bình	
Mangiferin	0,953	0,949	0,944	0,941	0,943	0,939	0,941	8,1
Daucosterol	0,132	0,132	0,131	0,130	0,131	0,131	0,131	1,1
7 α -hydroxy sitosterol	0,108	0,108	0,111	0,106	0,107	0,111	0,108	0,9
Lupeol	0,650	0,667	0,661	0,642	0,662	0,658	0,654	5,7
Taraxeryl acetat	0,473	0,474	0,477	0,467	0,471	0,475	0,471	4,1
Stigmasterol	0,103	0,106	0,104	0,102	0,105	0,103	0,103	0,9
Taraxerol	0,598	0,595	0,599	0,591	0,592	0,596	0,593	5,1

3.3. ĐÁNH GIÁ ĐỘC TÍNH CẤP VÀ THỬ TÁC DỤNG SINH HỌC

3.3.1. Đánh giá độc tính cấp của cao nước vỏ thân, lá và hoa cây Gạo

3.3.1.1 Đánh giá độc tính cấp của cao nước vỏ thân cây Gạo

Sau khi uống cao nước toàn phần vỏ thân cây Gạo ở tất cả các liều, chuột không có hiện tượng gì đặc biệt: ăn uống, vận động bình thường, chuột không bị khó thở, đi ngoài phân khô.

Liều tối đa có thể cho uống là 0,25 ml cao nước toàn phần vỏ thân/10g thể trọng, 3 lần trong 24 giờ, mỗi lần cách nhau ít nhất 2 giờ. Như vậy chuột đã uống 75 ml cao nước vỏ thân cây Gạo/kg thể trọng chuột, tương đương 300g dược liệu khô/kg. Đây cũng là thể tích tối đa có thể cho uống trên chuột nhắt trắng và đậm độ cao đặc nhất có thể cho được chuột nhắt trắng uống bằng kim đầu tù chuyên dụng. Quan sát thấy không xuất hiện chuột chết trong vòng 72 giờ sau khi uống thuốc thử.

Vì vậy không vẽ được đồ thị hồi qui tuyến tính giữa liều lượng thuốc và tỷ lệ chuột chết ở các liều dùng khác nhau, nên không xác định được LD₅₀ của cao lỏng toàn phần vỏ thân cây Gạo theo đường uống trên chuột nhắt trắng bằng phương pháp Litchfield – Wilcoxon.

3.3.1.2. Đánh giá độc tính cấp của cao nước lá cây Gạo

Sau khi uống cao nước lá cây Gạo ở tất cả các liều, chuột không có hiện tượng gì đặc biệt: ăn uống, vận động bình thường, chuột không bị khó thở. Tuy nhiên các chuột bị tiêu chảy ở các liều từ trên 240g - 300g dược liệu/kg thể trọng chuột. Liều tối đa có thể cho uống là 0,25 ml cao nước toàn phần lá/10g thể trọng, 3 lần trong 24 giờ, tương ứng với 75 ml cao nước/kg thể trọng chuột, tương đương 300g dược liệu khô/kg. Đây cũng là thể tích tối đa có thể cho uống trên chuột nhắt trắng và đậm độ cao đặc nhất có thể cho được chuột nhắt trắng uống bằng kim đầu tù chuyên dụng. Quan sát thấy không xuất hiện chuột chết trong vòng 72 giờ sau khi uống thuốc thử.

Vì vậy không vẽ được đồ thị hồi qui tuyến tính giữa liều lượng thuốc và tỷ lệ chuột chết ở các liều dùng khác nhau, nên không xác định được LD₅₀ của cao nước toàn phần lá cây Gạo theo đường uống trên chuột nhắt trắng bằng phương pháp Litchfield – Wilcoxon.

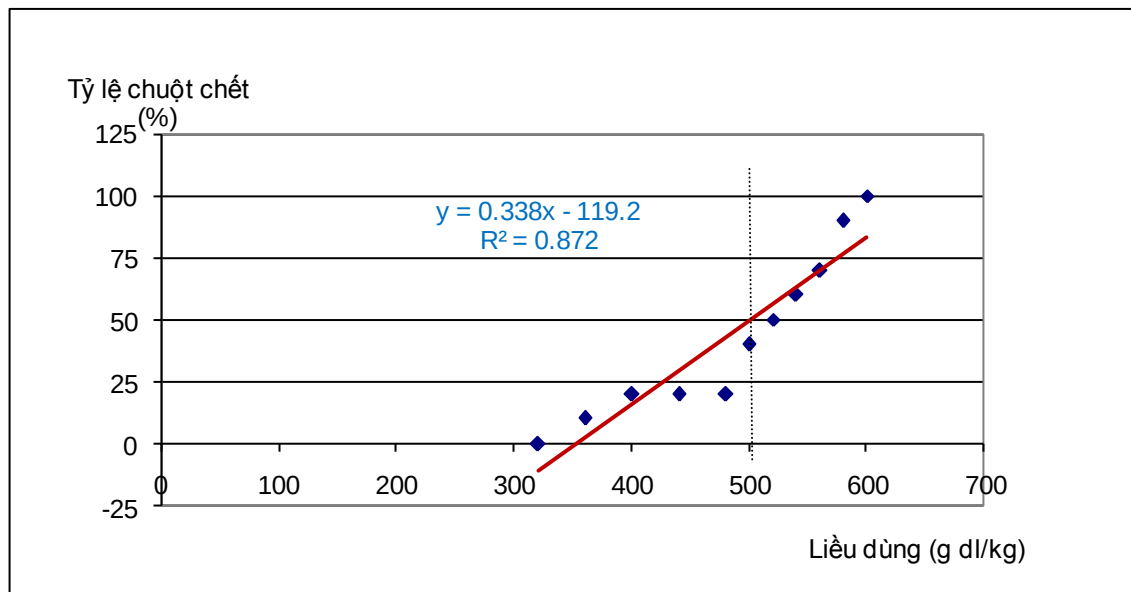
3.3.1.3. Đánh giá độc tính cấp của cao nước hoa cây Gạo

Sau khi uống cao nước toàn phần hoa Gạo ở các liều thấp dưới 220g dược liệu/kg chuột, không có hiện tượng gì đặc biệt: ăn uống, vận động bình thường, chuột không bị khó thở, không bị tiêu chảy. Các liều cao, chuột có hiện tượng khó thở sau uống thuốc thử 1 giờ, khó thở và co giật chủ yếu xảy ra trong 24 giờ đầu sau uống thuốc thử, xuất hiện chuột chết. Tỷ lệ chuột chết trong vòng 72 giờ được ghi lại trong bảng 3.19.

Bảng 3.19. Tỷ lệ chuột chết theo liều dùng thuốc trong 72 giờ sau uống cao nước toàn phần hoa cây Gạo

STT	Thể tích uống (ml/kg)	Liều dùng (g dược liệu/kg)	Tỷ lệ chuột chết (%)
1	40	320	0
2	45	360	10
3	50	400	20
4	55	440	20
5	60	480	20
6	62,5	500	40
7	65	520	50
8	67,5	540	60
9	70	560	70
10	72,5	580	90
11	75	600	100

Từ kết quả bảng 3.19 vẽ được đồ thị tương quan tuyến tính sau:



Hình 3.44. Đồ thị biểu diễn tương quan tuyến tính giữa liều dùng cao nước toàn phần hoa cây Gạo và tỷ lệ chuột chết

Từ đồ thị trên tính được phương trình tương quan tuyến tính giữa liều dùng và tỷ lệ chuột chết: $y = 0,3381x - 119,29$

Vậy $LD_{50} = 500,71 \pm 28,28$ (g dược liệu/kg)

3.3.2. Tác dụng giảm đau

Tác dụng giảm đau được thử với cao nước chiết xuất từ vỏ thân cây Gạo (VG) và cồn phân đoạn ethyl acetat chiết xuất từ vỏ thân cây Gạo (VGE) trên chuột nhắt trắng gây quặn đau bằng acid acetic (phương pháp Koster) và bằng phương pháp mâm nóng.

3.3.2.1. Thử tác dụng giảm đau của VG và VGE trên chuột nhắt trắng gây quặn đau bằng acid acetic

Kết quả thí nghiệm về tác dụng của cao nước vỏ thân cây Gạo (VG) và cồn phân đoạn ethyl acetat chiết xuất từ vỏ thân cây Gạo (VGE) lên số cơn quặn đau của chuột nhắt trắng được trình bày ở bảng 3.20.

Bảng 3.20. Tác dụng của cao nước và cồn phân đoạn ethyl acetat chiết xuất từ vỏ thân cây Gạo lên số cơn quặn đau của chuột nhắt trắng

T T	Lô	Số cơn quặn đau của chuột					
		0-5 phút	5-10 phút	10-15 phút	15-20phút	20-25phút	25-30phút
1	Chứng sinh học	5,80±1,48	19,60±3,66	14,00±2,87	10,00±2,49	7,50±2,46	4,60±1,07
2	Aspirin 100mg/kg p ₂₋₁	1,80±0,79 ***	6,30±1,64 ***	5,70 ± 1,89 ***	3,70±1,16 ***	2,90±1,52 ***	1,40±0,52 ***
3	VG 6g/kg p ₃₋₁ p ₃₋₂	3,60±1,51 ** **	13,60±2,95 ** ***	10,20±2,74 ** ***	7,80±1,32 * ***	4,70±1,64 ** *	2,60±0,84 *** **
4	VG 12g/kg p ₄₋₁ p ₄₋₂ p ₄₋₃	1,60±0,84 *** (o) **	6,70±1,49 *** (o) ***	4,80 ± 1,62 *** (o) ***	2,70±0,67 *** (o) ***	2,10±0,88 *** (o) ***	1,10±0,87 *** (o) ***
5	VGE 6g/kg p ₅₋₁ p ₅₋₂	2,80±0,92 *** *	12,80± 1,32 *** ***	9,90 ± 1,73 ** ***	7,90 ± 1,45 * ***	5,30±1,64 * **	2,40±1,07 *** *
6	VGE 12g/kg p ₆₋₁ p ₆₋₂ p ₆₋₅	1,60±0,97 *** (o) *	6,90 ± 0,99 *** (o) ***	6,00 ± 1,15 *** (o) ***	4,70 ± 1,70 *** (o) ***	3,20±1,14 *** (o) **	1,40±0,70 *** (o) *

Ghi chú: (o): $p > 0,05$ *: $p < 0,05$ **: $p < 0,01$ ***: $p < 0,001$

Kết quả ở bảng 3.20 cho thấy: aspirin liều 100mg/kg/ngày có tác dụng làm giảm số cơn quặn đau một cách rõ rệt trên chuột bị gây quặn đau bằng acid acetic ở tất cả các thời điểm nghiên cứu ($p < 0,001$).

Cao lỏng VG với liều 6g/kg/ngày có số cơn quặn đau ở tất cả các thời điểm nghiên cứu giảm có ý nghĩa thống kê so với lô chứng ($p < 0,05$), với liều 12g/kg/ngày số cơn quặn đau ở tất cả các thời điểm nghiên cứu giảm rõ rệt so với lô chứng ($p < 0,001$) và có tác dụng giảm đau tương đương với aspirin liều 100mg/kg/ngày ($p > 0,05$).

Lô uống VG 6g/kg/ngày có số cơn quặn đau ở tất cả các thời điểm nghiên cứu giảm rõ rệt so với lô uống aspirin liều 100mg/kg/ngày ($p < 0,01$).

Lô uống VGE liều 6g được liều/kg/ngày có số cơn quặn đau ở tất cả các thời điểm nghiên cứu giảm có ý nghĩa thống kê so với lô chứng ($p < 0,05$).

Liều 12g được liều/kg/ngày: Các chuột ở lô uống VGE có số cơn quặn đau ở tất cả các thời điểm nghiên cứu giảm rõ rệt so với lô chứng ($p < 0,001$) và tác dụng giảm đau tương đương với aspirin liều 100mg/kg/ngày ($p > 0,05$).

Lô chuột uống VGE 12g được liều/kg/ngày có số cơn quặn đau ở tất cả các thời điểm nghiên cứu giảm có ý nghĩa thống kê so với chuột ở lô uống VGE 6g được liều/kg/ngày ($p < 0,05$).

3.3.2.2. Thử theo phương pháp gây đau bằng mâm nóng

Kết quả thí nghiệm về tác dụng của cao nước vỏ thân cây Gạo (VG) và cồn phân đoạn ethyl acetat chiết xuất từ vỏ thân cây Gạo (VGE) lên thời gian phản ứng với nhiệt của chuột nhắt trắng được trình bày ở bảng 3.21.

Bảng 3.21. Tác dụng của cao nước và cồn phân đoạn ethyl acetat chiết xuất từ vỏ thân cây Gạo lên thời gian phản ứng với nhiệt của chuột

T T	Lô chuột nghiên cứu	Thời gian phản ứng với nhiệt độ (giây)			
		T ₀	T ₁	P trước-sau	P so với chứng
1	Chứng sinh học	17,81 ± 2,14	17,70 ± 3,69	> 0,05	
2	Codein 10 mg/kg	18,02 ± 3,69	24,84 ± 5,87	< 0,01	< 0,01
3	VG 6g/kg	17,94 ± 1,04	17,79 ± 1,84	> 0,05	> 0,05
4	VG 12g/kg	17,83 ± 2,74	18,05 ± 2,71	> 0,05	> 0,05
5	VGE 6g/kg	17,64 ± 2,21	18,06 ± 1,73	> 0,05	> 0,05
6	VGE 12g/kg	17,80 ± 2,68	17,74 ± 2,30	> 0,05	> 0,05

Kết quả bảng 3.21 cho thấy:

- Codein 10mg/kg/ngày có tác dụng kéo dài thời gian phản ứng với nhiệt

độ của chuột so với trước khi uống thuốc và so với chuột ở lô chứng ($p < 0,01$).

- VG và VGE với liều 6g/kg/ngày và liều 12g/kg/ngày không làm thay đổi có ý nghĩa thống kê thời gian phản ứng với nhiệt độ của chuột so với trước khi uống thuốc và so với chuột ở lô chứng ($p > 0,05$).

3.3.3. Tác dụng chống viêm cấp

Tác dụng chống viêm cấp của cao nước vỏ thân cây Gạo (VG) và cồn phân đoạn ethyl acetat chiết xuất từ vỏ thân cây Gạo (VGE) được tiến hành thử trên 2 mô hình: gây phù chân chuột bằng carragenin và gây tràn dịch màng bụng.

3.3.3.1. Tác dụng chống viêm cấp của VG và VGE trên mô hình gây phù chân chuột bằng carragenin

Kết quả thử tác dụng chống viêm cấp của VG và VGE trên mô hình gây phù chân chuột bằng carragenin thu được như ở bảng 3.22.

Bảng 3.22. Tác dụng của cao nước và cồn phân đoạn ethyl acetat chiết xuất từ vỏ thân cây Gạo trên mô hình gây phù chân chuột

Lô chuột nghiên cứu	Sau 2 giờ (V_2)		Sau 4 giờ (V_4)		Sau 6 giờ (V_6)		Sau 24 giờ (V_{24})	
	Độ phù (%)	giảm phù so với chứng (%)	Độ phù (%)	giảm phù so với chứng (%)	Độ phù (%)	giảm phù so với chứng (%)	Độ phù (%)	giảm phù so với chứng (%)
Lô 1: Chứng sinh học	60,62±15,15		66,33± 14,32		44,85± 9,61		31,44± 6,22	
Lô 2: Aspirin (150 mg/kg) p_{2-1}	25,06± 10,87 ***	58,66	35,41± 13,66 ***	46,60	31,05± 11,72 **	30,77	29,82± 9,56 (o)	5,20
Lô 3: VG (4g/kg) p_{3-1}	58,33± 15,66 (o)	3,78	56,37± 10,81 (o)	15,02	42,64± 10,30 (o)	4,93	35,00± 10,46 (o)	-11,30
Lô 4: VG (8g/kg) p_{4-1}	57,85± 15,72 (o)	4,57	55,87± 13,91 (o)	15,77	44,95± 14,93 (o)	-0,22	35,61± 10,00 (o)	-13,27
Lô 5: VGE 4g/kg p_{5-1}	39,06± 19,18 *	35,57	44,05± 15,87 **	33,59	40,63± 15,25 (o)	9,43	30,56± 11,41 (o)	2,80
Lô 6: VGE 8g/kg p_{6-1}	38,83± 9,07 *	35,90	46,60± 11,09 **	29,74	38,55± 12,41 (o)	14,05	30,39± 11,16 (o)	3,34

Ghi chú: (o): $p > 0,05$ *: $p < 0,05$ **: $p < 0,01$ ***: $p < 0,001$

Bảng 3.22 cho thấy: Cao nước toàn phần vỏ thân cây Gạo (VG) ở cả 2 liều 4 g/kg và 8 g/kg không có tác dụng chống viêm cấp tại tất cả các thời điểm nghiên cứu. Tuy nhiên ở các thời điểm sau gây viêm 2 giờ và 4 giờ, cao nước toàn phần vỏ thân cây Gạo có xu hướng làm giảm phù chân chuột nhưng sự khác biệt chưa có ý nghĩa thống kê ($p>0,05$).

- Cồn phân đoạn ethylacetat chiết xuất từ vỏ thân cây gạo (VGE) có tác dụng làm giảm phù chân chuột ở tất cả các thời điểm nghiên cứu nhưng chỉ tại các thời điểm đầu của quá trình nghiên cứu (2 giờ và 4 giờ sau gây viêm chân chuột), tác dụng làm giảm phù chân chuột rõ rệt ($p<0,05$ hoặc $p<0,01$). Không có sự khác biệt giữa liều cao (8g/kg) và liều thấp (4 g/kg).

3.3.3.2. Thử trên mô hình gây tràn dịch màng bụng

Kết quả thí nghiệm về tác dụng ức chế viêm trên mô hình gây tràn dịch màng bụng ở chuột cống trắng của cao nước vỏ thân cây Gạo (VG) và cồn phân đoạn ethyl acetat chiết xuất từ vỏ thân cây Gạo (VGE) lên thể tích dịch rỉ viêm, lượng bạch cầu trong dịch rỉ viêm được trình bày ở bảng 3.23, 3.24 và 3.25.

Bảng 3.23. Tác dụng của cao nước và cồn phân đoạn ethyl acetat chiết xuất từ vỏ thân cây Gạo lên thể tích dịch rỉ viêm

Lô chuột nghiên cứu	Lượng dịch rỉ viêm ($\bar{X} \pm SD$, ml)	p so lô 1	p so lô 2
Lô 1: Chứng sinh học	$3,98 \pm 1,56$		
Lô 2: Aspirin 150 mg/kg	$2,06 \pm 0,74$	<0,01	
Lô 3: VG 4g dl/kg	$4,54 \pm 1,73$	>0,05	<0,05
Lô 4: VG 8g dl/kg	$3,60 \pm 1,07$	>0,05	<0,05
Lô 5: VGE 4g dl/kg	$3,48 \pm 1,53$	>0,05	>0,05
Lô 6: VGE 8g dl/kg	$2,68 \pm 0,40$	>0,05	>0,05

Kết quả bảng 3.23 cho thấy: Aspirin liều 150 mg/kg/ngày có tác dụng làm giảm rõ rệt thể tích dịch rỉ viêm so với lô chứng ($p<0,01$).

- Cao nước vỏ thân cây Gạo và cồn phân đoạn ethyl acetat chiết xuất từ vỏ thân cây Gạo (VGE) liều cao 8g được liệu/kg thể trọng chuột cống trắng đều có xu hướng làm giảm thể tích dịch rỉ viêm với lô chứng nhưng chỉ có chế phẩm

cần phân đoạn ethyl acetat chiết xuất từ vỏ thân cây gạo (VGE) làm giảm rõ rệt ($p < 0,05$). Liều 4g dược liệu/kg thể trọng chuột cống trắng, cao nước vỏ thân cây Gạo và cần phân đoạn ethyl acetat chiết xuất từ vỏ thân cây Gạo (VGE) không có tác dụng đến thể tích dịch rỉ viêm.

Bảng 3.24. Tác dụng của cao nước và cần phân đoạn ethyl acetat chiết xuất từ vỏ thân cây Gạo lên hàm lượng protein trong dịch rỉ viêm

Lô chuột nghiên cứu	Hàm lượng protein ($\bar{X} \pm SD$, mg/dl)	p so lô 1	p so lô 2
Lô 1: Chứng sinh học	4,98 $\pm$ 0,18		
Lô 2: Aspirin 150 mg/kg	5,10 $\pm$ 0,13	>0,05	
Lô 3: VG 4g/kg	5,07 $\pm$ 0,30	>0,05	>0,05
Lô 4: VG 8g/kg	5,01 $\pm$ 0,17	>0,05	>0,05
Lô 5: VGE 4g/kg	4,94 $\pm$ 0,19	>0,05	>0,05
Lô 6: VGE 8g/kg	5,20 $\pm$ 0,17	>0,05	>0,05

Kết quả bảng 3.24 cho thấy: Ở mức liều 6g dược liệu/kg/ngày và 12g dược liệu/ kg/ ngày: cao nước vỏ thân cây Gạo và cần phân đoạn ethyl acetat chiết xuất từ vỏ thân cây Gạo (VGE) không có tác dụng đến hàm lượng protein trong dịch rỉ viêm so với lô chứng ($p > 0,05$).

Bảng 3.25. Tác dụng của cao nước và cần phân đoạn ethyl acetat chiết xuất từ vỏ thân cây Gạo lên số lượng bạch cầu trong dịch rỉ viêm

Lô chuột nghiên cứu	Số lượng bạch cầu ($\bar{X} \pm SD$, g/l)	p so lô 1	p so lô 2
Lô 1: Chứng sinh học	6,86 $\pm$ 3,45		
Lô 2: Aspirin 150 mg/kg	4,83 $\pm$ 2,17	<0,05	
Lô 3: VG 4g/kg	6,26 $\pm$ 2,27	>0,05	>0,05
Lô 4: VG 8g/kg	5,91 $\pm$ 1,23	>0,05	>0,05
Lô 5: VGE 4g/kg	6,20 $\pm$ 3,40	>0,05	>0,05
Lô 6: VGE 8g/kg	6,04 $\pm$ 2,25	>0,05	>0,05

Kết quả bảng 3.25 cho thấy:

- Aspirin liều 150 mg/kg/ngày có tác dụng làm rõ rệt số lượng bạch cầu trong dịch rỉ viêm so với lô chứng ($p < 0,05$).

- Cao nước vỏ thân cây Gạo và căn phân đoạn ethyl acetat chiết xuất từ vỏ thân cây Gạo (VGE) ở cả 2 liều 6g/kg và 12g dược liệu/kg thể trọng chuột cống trắng đều có xu hướng làm giảm số lượng bạch cầu trong dịch rỉ viêm so với lô chứng nhưng sự khác biệt chưa có ý nghĩa thống kê ($p>0,05$).

3.3.4. Tác dụng chống viêm mạn

Kết quả thí nghiệm về tác dụng ức chế viêm mạn của cao nước vỏ thân cây Gạo và căn phân đoạn ethyl acetat chiết xuất từ vỏ thân cây Gạo (VGE) được trình bày ở bảng 3.26.

Bảng 3.26. Tác dụng của cao nước và căn phân đoạn ethyl acetat chiết xuất từ vỏ thân cây Gạo lên trọng lượng u hạt

Lô chuột nghiên cứu	Trọng lượng u hạt ($\bar{X} \pm SD$, mg)	p so với lô 1	p so với lô 2
Lô 1: Chứng sinh học	35,90 $\pm$ 17,26		
Lô 2: Prednisolon 5 mg/kg	15,10 $\pm$ 3,81	<0,01	
Lô 3: VG 6g/kg	30,11 $\pm$ 18,75	>0,05	<0,05
Lô 4: VG 12g/kg	18,45 $\pm$ 8,88	<0,05	>0,05
Lô 5: VGE 6g/kg	24,73 $\pm$ 5,68	>0,05	>0,05
Lô 6: VGE 12g/kg	15,56 $\pm$ 4,85	<0,01	>0,05

Kết quả bảng 3.26 cho thấy:

- Prednisolon liều 5 mg/kg/ngày có tác dụng làm giảm rõ rệt trọng lượng khối u hạt so với lô chứng ($p<0,01$).

- Cao nước và căn phân đoạn ethyl acetat chiết xuất từ vỏ thân cây Gạo liều cao 12g dược liệu/kg thể trọng chuột đều làm giảm trọng lượng khối u hạt so với lô chứng, như vậy ở liều này cao nước và căn phân đoạn ethyl acetat chiết xuất từ vỏ thân cây Gạo đều có tác dụng chống viêm mạn tính ($p<0,05$), tác dụng này tương đương với prednisolon liều 5mg/kg ($p>0,05$).

- Liều 6g dược liệu/kg/ngày: cao nước và căn phân đoạn ethyl acetat chiết xuất từ vỏ thân cây Gạo không làm giảm trọng lượng khối u hạt.

3.3.5. Tác dụng cầm máu qua đánh giá thời gian chảy máu, đông máu

Tác dụng cầm máu được thử nghiệm với cao nước vỏ thân cây Gạo (VG).

Chuột nhắt trắng được chia ngẫu nhiên thành 5 lô, mỗi lô 10 con. Chuột được uống nước cất hoặc thuốc thử trong 7 ngày liên tục. Xét nghiệm được tiến hành tại 2 thời điểm trước và sau khi uống thuốc 7 ngày 1 giờ.

3.3.5.1. Nghiên cứu tác dụng của VG lên thời gian chảy máu

Chuột được đánh giá thời gian đông máu tại nhiệt độ phòng 28°C và trong bình ổn nhiệt nuôi cơ quan cô lập (37°C). Sát khuẩn vùng đuôi chuột, để khô. Dùng kéo sắc cắt gọn một phần đuôi chuột dài 2mm. Rồi nhúng ngay đuôi chuột vào bình nước giữ ở 37°C, bắt đầu bấm đồng hồ ngay (chú ý: không bóp, nặn, ấn vào đuôi chuột). Theo dõi cho đến khi máu không chảy nữa thì bấm đồng hồ dừng lại, ta được thời gian chảy máu của chuột tương ứng.

Từ thời gian chảy máu của từng chuột trong các lô xác định được tại thời điểm trước khi uống thuốc và sau khi uống thuốc, tính thời gian chảy máu trung bình ở từng lô và so sánh các giá trị trung bình thu được trước và sau khi uống thuốc thử nghiệm. Kết quả thu được như ở bảng 3.27.

Bảng 3.27. Tác dụng của VG lên thời gian chảy máu

Lô	Thời gian chảy máu trung bình (giây)		P trước -sau
	Trước uống thuốc	Sau uống thuốc	
Lô 1: nước cất	50,70 ± 18,49	54,80 ± 25,60	>0,05
Lô 2: VG 6g dl/kg	50,70 ± 9,90	49,70 ± 12,90	>0,05
Lô 3: VG 12g dl/kg	53,40 ± 18,29	37,70 ± 7,26	<0,05

Kết quả ở bảng 3.27 cho thấy:

- VG liều thấp 6g dl/kg sau uống 7 ngày đều không làm thay đổi thời gian chảy máu ở chuột nhắt so với trước khi uống thuốc và so với lô chứng ($p>0,05$).
- Riêng VG liều cao (12g dược liệu/kg) có tác dụng làm giảm thời gian chảy máu có ý nghĩa thống kê so với chứng và so với trước uống thuốc ($p<0,05$).

3.3.5.2. Nghiên cứu tác dụng của VG lên thời gian đông máu

Chuột được đánh giá thời gian đông máu tại nhiệt độ phòng 28°C.

Sát khuẩn vùng đuôi chuột, để khô. Dùng kéo sắc cắt gọn một phần đuôi chuột dài 2mm. Vuốt theo chiều dài đuôi chuột, cho máu chảy ra hai phiến kính, mỗi phiến kính một giọt (chú ý: đường kính các giọt đều nhau). Bấm đồng hồ ngay khi máu chảy ra. Đặt hai phiến kính vào hộp petri.

Sau 2 phút, bắt đầu nghiêng nhẹ phiến kính thứ nhất một góc 45° xem giọt máu đã đông chưa, sau đó cứ 30 giây nghiêng một lần cho đến khi máu đông (giọt máu không thay đổi hình dạng khi nghiêng phiến kính).

Tiếp tục xem phiến kính thứ hai cho tới khi máu đông. Bấm đồng hồ dừng lại. Thời gian đông máu tính cho tới khi máu đông ở phiến kính thứ hai.

Từ thời gian đông máu của từng chuột trong các lô xác định được tại thời điểm trước khi uống thuốc và sau khi uống thuốc, tính thời gian đông máu trung bình ở từng lô và so sánh các giá trị trung bình thu được trước và sau khi uống thuốc thử nghiệm. Kết quả thu được như ở bảng 3.28.

Bảng 3.28 Tác dụng của VG lên thời gian đông máu

Lô	Thời gian đông máu trung bình (giây)		P trước –sau
	Trước uống thuốc	Sau uống thuốc	
Lô 1: nước cất	225,80 ± 68,82	207,60 ± 17,76	>0,05
Lô 2: VG 6g dl/kg	286,80 ± 62,30	250,20 ± 68,53	>0,05
Lô 3: VG 12g dl/kg	254,50 ± 67,85	208,00 ± 38,24	>0,05

Kết quả ở bảng 3.28 cho thấy:

Ở tất cả các lô thử với cả 2 liều của VG, thời gian đông máu trung bình có thay đổi chút ít trước và sau khi thử thuốc nhưng sự sai khác là không có ý nghĩa thống kê.

3.3.5.3. Nghiên cứu tác dụng của VG lên số lượng tiểu cầu trong máu ngoại vi

Sau khi kết thúc việc đo thời gian đông máu, chảy máu, tiến hành giết chuột, lấy 1ml máu động mạch cảnh ở tất cả các lô chuột cho vào ống chống đông citrat, lắc đều, nhẹ nhàng không gây vỡ hồng cầu. Cho máu đã chống đông vào máy huyết học tự động 18 thông số dành cho động vật Vet abcTM Animal Blood Counter.

Từ số lượng tiểu cầu trong máu ngoại vi của từng chuột trong các lô xác định được, tính số lượng tiểu cầu trung bình ở từng lô và so sánh các giá trị trung bình thu được giữa các lô. Kết quả thu được như ở bảng 3.29.

Bảng 3.29. Tác dụng của VG lên số lượng tiểu cầu trong máu ngoại vi

Lô	Số lượng tiểu cầu (G/l)	p so với chứng
Lô 1: nước cất	483,80 ± 159,62	
Lô 2: VG liều 6g dl/kg	446,70 ± 103,45	>0,05
Lô 3: VG liều 12g dl/kg	465,40 ± 143,65	>0,05

Kết quả ở bảng 3.29 cho thấy:

VG ở cả 2 liều thử nghiệm sau 7 ngày uống đều không ảnh hưởng đến số lượng tiểu cầu máu ngoại vi của chuột nhất so với lô chứng ($p>0,05$).

3.3.6. Tác dụng bảo vệ gan và chống oxy hóa

Tác dụng bảo vệ gan và chống oxy hóa được thử với cao nước của lá cây Gạo (LG)

3.3.6.1. Tác dụng của LG lên khối lượng gan chuột nhắt trắng

Từ khối lượng gan xác định được của từng chuột trong các lô, tính khối lượng gan trung bình từng lô và so sánh các giá trị trung bình thu được như ở bảng 3.30.

Bảng 3.30. Tác dụng của LG lên khối lượng gan chuột bị gây độc bằng PAR

i	Lô chuột	Khối lượng gan trung bình (g)	p _{2-i}	p _{3-i}
1	Chứng sinh học	1,3073 ± 0,1967		
2	Mô hình (p ₂₋₁ =0,0020)	1,6870 ± 0,2552		
3	Silymarin 70mg/kg	1,6513 ± 0,1604	0,7272	
4	LG 6g dl/kg	1,2203 ± 0,1453	1×10 ⁻⁴	1×10 ⁻⁵
5	LG 12g dl/kg	1,2997 ± 0,1104	1×10 ⁻⁴	2×10 ⁻⁵

Kết quả ở bảng 3.30 cho thấy:

- Khối lượng gan chuột ở lô mô hình (lô 2) tăng rõ rệt so với lô chứng sinh học (p<0,01).

- Ở các lô uống thuốc (cả lô thử thuốc và thuốc chứng dương) khối lượng gan đều giảm so với lô mô hình. Tuy nhiên sự khác biệt chỉ có ý nghĩa thống kê ở các lô chuột uống LG ở cả 2 liều 6g dl/kg và 12g dl/kg (p<0,001).

3.3.6.2. Tác dụng của LG lên hoạt độ ASAT và ALAT

Từ kết quả hoạt độ ASAT của từng chuột trong các lô xác định được, tính hoạt độ ASAT trung bình từng lô và so sánh các giá trị trung bình thu được.

Bảng 3.31. Tác dụng của LG lên hoạt độ ASAT trong huyết thanh chuột bị gây độc bằng PAR

i	Lô chuột	Hoạt độ AST trung bình (UI/l)	Tỷ lệ giảm so với lô 2 (%)	p _{2-i}	p _{3-i}
1	Chứng sinh học	138,5± 37,6			
2	Mô hình (p ₁₋₂ =0,0015)	338,1± 130,0			
3	Silymarin 70mg/kg	206,6± 50,7	39	0,0121	
4	LG 6g dl/kg	113,2± 21,3	67	8×10 ⁻⁴	4×10 ⁻⁴
5	LG 12g dl/kg	103,6± 17,3	69	6×10 ⁻⁴	2×10 ⁻⁴

Kết quả ở bảng 3.31 cho thấy:

- Hoạt độ ASAT ở lô mô hình (lô 2) gây độc bằng paracetamol tăng cao rõ rệt so với lô chứng sinh học ($p < 0,002$).

- Hoạt độ ASAT ở lô chuột uống LG ở cả 2 liều 6g dl/kg và 12g dl/kg trong 8 ngày trước khi gây độc gan đã giảm rõ rệt so với lô 2 ($p < 0,001$). Mặt khác, LG ở 2 liều trên cũng có tác dụng tốt hơn so với silymarin liều 70mg/kg ($p < 0,001$).

Từ kết quả hoạt độ ALAT của từng chuột trong các lô xác định được, tính hoạt độ ALAT trung bình từng lô và so sánh các giá trị trung bình thu được như ở bảng 3.32.

Bảng 3.32. Tác dụng của LG lên hoạt độ ALAT trong huyết thanh chuột bị gây độc bằng PAR

i	Lô	Hoạt độ ALT trung bình (UI/l)	Tỷ lệ giảm so với lô 2(%)	P _{2-i}	P _{3-i}
1	Chứng sinh học	74,0 ± 16,7			
2	Mô hình ($p_{1-2} = 0,0019$)	291,4 ± 144,6			
3	Silymarin 70mg/kg	178,9 ± 35,6	52	0,0498	
4	LG 6g dl/kg	99,8 ± 17,7	66	0,0040	1×10^{-5}
5	LG 12g dl/kg	88,8 ± 14,9	70	0,0029	3×10^{-5}

Kết quả ở bảng 3.32 cho thấy:

- Hoạt độ ALAT ở lô mô hình (lô 2) gây độc bằng PAR tăng cao rõ rệt so với lô chứng sinh học ($p < 0,002$).

- Hoạt độ ALAT ở các lô chuột uống LG ở cả 2 liều 6g dl/kg và 12g dl/kg đã giảm rõ rệt so với lô 2 ($p < 0,01$). Kết quả cũng cho thấy LG có tác dụng tốt hơn rất nhiều so với silymarin liều 70mg/kg ($p < 0,0001$).

3.3.6.3. Tác dụng của LG lên sự thay đổi hàm lượng MDA trong dịch đồng thể gan chuột nhắt trắng

Từ kết quả hàm lượng MDA của từng chuột trong các lô xác định được, tính hàm lượng MDA trung bình từng lô và so sánh các giá trị trung bình thu được như ở bảng 3.33

Bảng 3.33. Tác dụng của LG lên hàm lượng MDA gan chuột nhắt bị gây độc bằng PAR

i	Lô chuột	Hàm lượng MDA trung bình (nmol/g gan)	P_{2-i}	P_{3-i}
1	Chứng sinh học	0,187±0,033		
2	Mô hình	0,214±0,067		
3	Silymarin 70mg/kg	0,149±0,046	0,0276	
4	LG 6g dl/kg	0,155±0,041	0,0327	0,7397
5	LG 12g dl/kg	0,145±0,031	0,0164	0,8494

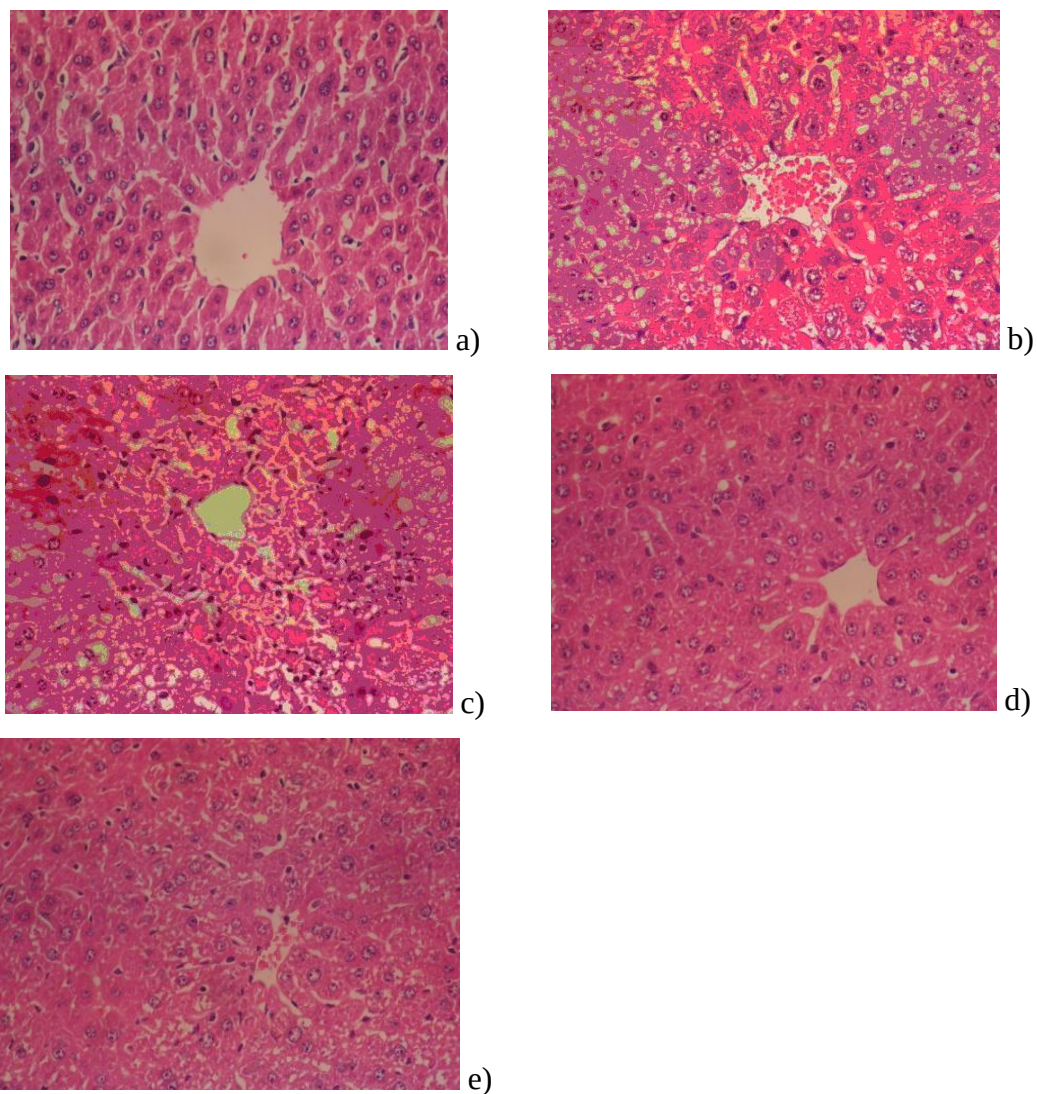
Kết quả ở bảng 3.33 cho thấy:

- Hàm lượng MDA ở lô mô hình (lô 2) gây độc bằng paracetamol tăng cao so với lô chứng sinh học.

- Hàm lượng MDA ở các lô chuột uống LG ở cả 2 liều, trong 8 ngày trước khi gây độc đã giảm rõ rệt so với lô 2 ($p < 0,05$). Chứng tỏ LG có tác dụng chống oxy hóa khá tốt.

3.3.6.4. Tác dụng của LG lên sự thay đổi mô bệnh học gan chuột nhắt trắng

Quan sát trực tiếp và dưới kính hiển vi điện tử (với HE x 400), hình ảnh gan đại diện cho các lô thu được như ở hình 3.45. Các đặc điểm đại thể và vi thể được tổng hợp trong bảng 3.34 và 3.35.



Hình 3.45. Hình ảnh vi thể gan

a) Lô 1 (Chứng sinh học): bình thường

b) Lô 2 (Mô hình): thoái hóa nặng

c) Lô 3 (dùng silymarin 70mg/kg: thoái hóa nặng

d) Lô 4 (dùng LG 6g dl/kg): bình thường

e) Lô 5 (dùng LG 12g dl/kg): thoái hóa nhẹ

Bảng 3.34. Tác dụng của LG lên sự thay đổi đại thể gan chuột nhắt trắng trên mô hình gây độc gan bằng PAR

Lô	Đại thể
Chứng sinh học	Gan màu đỏ, mặt nhẵn, mật độ mềm, không phù nề, không sung huyết.
Mô hình	Gan nhạt màu, phù nề, sung huyết, bề mặt không nhẵn, có chỗ bị hoại tử và bạc màu.
Silymarin 70mg/kg	Gan màu đỏ, sung huyết nhẹ và vừa, có nhiều điểm tổn thương, bạc màu nhẹ.
LG 6g dl/kg	Gan màu đỏ, xung huyết nhẹ, hầu như không thấy tổn thương.
LG 12g dl/kg	Gan màu đỏ, xung huyết, không có bạc màu, hầu như không quan sát thấy tổn thương.

Bảng 3.35. Tác dụng của LG lên sự thay đổi vi thể gan chuột nhắt trắng trên mô hình gây độc gan bằng PAR

Lô	Vi thể	Hình ảnh
Chứng sinh học	2/3 các mẫu bệnh phẩm có cấu trúc gan bình thường, 1/3 có thoái hóa gan rất nhẹ.	Hình 3.45a
Mô hình	Tất cả các mẫu bệnh phẩm gan thoái hóa rất nặng, nhiều vùng hoại tử, nhân đông.	Hình 3.45b
Silymarin 70mg/kg	Tất cả các mẫu bệnh phẩm gan thoái hóa nặng, nhiều vùng bị hoại tử, viêm và nhân đông.	Hình 3.45c
LG 6g dl/kg	2/3 mẫu bệnh phẩm có tế bào gan và các cấu trúc bình thường. 1/3 số mẫu bệnh phẩm thoái hóa và hoại tử mức độ nhẹ và vừa.	Hình 3.45d
LG 12g dl/kg	Tất cả các mẫu bệnh phẩm có gan thoái hóa rất nhẹ và nhẹ, không có tổn thương hoại tử và xuất huyết.	Hình 3.45e

CHƯƠNG 4

BÀN LUẬN

Loài *Bombax malabaricum* DC. (*Bombax ceiba* L.) có tên Việt Nam là cây Gạo (Mộc miên, Gòn rừng, Cổ bối...) là một loài rất quen thuộc và gần gũi với người dân ở nhiều quốc gia như Trung Quốc, Ấn Độ, Pakisxtan, Ai Cập, Australia, Thái Lan, Srilanka, Nepal, Việt nam [76], [124], [134]. Theo kinh nghiệm dân gian, nhiều bộ phận khác nhau của loài này được dùng để phòng và chữa bệnh. Tại Ấn Độ, rễ, vỏ thân của loài *Bombax malabaricum* DC. được dùng để trị tiêu chảy, kiết lỵ, bỏng, bệnh tiểu đường. Hoa và quả còn được sử dụng để trị rắn cắn. Theo tác giả Võ Văn Chi (1997) và Đỗ Tất Lợi (2003), vỏ thân cây Gạo thường được dùng bó gãy xương, sao vàng sắc đặc uống làm thuốc cầm máu; hoa Gạo sao vàng sắc uống chữa tiêu chảy, kiết lỵ (dùng 20-30g). Cho đến nay ở Việt Nam mới chỉ có các tài liệu về công dụng của cây Gạo trong dân gian. Do đó, cây Gạo là dược liệu cần được nghiên cứu sâu và đầy đủ hơn, nhất là về thành phần hóa học và tác dụng sinh học. Đây là đề tài luận án tiến sĩ đầu tiên nghiên cứu về cây Gạo ở Việt Nam.

4.1. VỀ THỰC VẬT

Hiện tại có nhiều hệ thống thực vật trên thế giới, có thể kể đến như Cronquist (1981-1988) [68], [69], Dahlgren (1981-1983) [70], Thorne (1992-2001) [197], A. Takhtajan (1997) [196], APG I (1998) [38], APG II (2003) [39], APG III (2009) [40].....

Qua các hệ thống trên cho thấy hai hệ thống hiện đại do hai nhà hệ thống học nổi tiếng đại diện cho châu Mỹ là Cronquist và đại diện cho châu Âu là Takhtajan đều cho rằng họ Gạo (*Bombacaceae*) là họ nhỏ trong hệ thống thực vật, họ Gạo nằm trong bộ Bông (*Malvales*), liên bộ Bông (*Malvanae*), phân lớp Sô (*Dilleniidae*), lớp Ngọc lan (*Magnoliopsida*).

Trên thế giới, họ Gạo (*Bombacaceae*) gồm 30 chi với 250 loài [108]. Ở Việt Nam chỉ có từ 5 đến 6 loài thuộc chi *Bombax* L. họ Gạo (*Bombacaceae*), do đó vấn đề đầu tiên là giám định tên khoa học của đối tượng nghiên cứu không

gặp nhiều khó khăn. Sau nhiều lần đi lấy mẫu tại các thời điểm khác nhau trong năm, đã lấy được mẫu cành cây có hoa vào tháng 4. Các đặc điểm hình thái của cây đã được phân tích, so sánh với các đặc điểm mô tả trong các tài liệu về phân loại thực vật. Kết quả cho thấy cây nghiên cứu có đầy đủ các đặc điểm của họ Gạo (Bombacaceae), các đặc điểm của chi *Bombax* L. và các đặc điểm của loài *Bombax malabaricum* DC. (*Bombax ceiba* L.). Tuy nhiên, theo Nguyễn Tiến Bân [5], [6], *Bombax malabarricum* DC. và *Bombax ceiba* L. là hai loài khác nhau. Nhưng hiện nay, Võ Văn Chi [8], Phạm Hoàng Hộ [17] và các nhà thực vật học trên thế giới xếp hai loài là một [196].

Mẫu nghiên cứu đã được Trần Huy Thái, Bùi Hồng Quang và Đỗ Thị Xuyên giám định và xác nhận tên khoa học là ***Bombax malabaricum* DC. (*Bombax ceiba* L.)**, họ Gạo (Bombacaceae). Việc định tên khoa học giúp cho các công bố về thành phần hóa học và tác dụng sinh học rõ nguồn gốc.

Tên khoa học của cây Gạo là *Bombax malabaricum* DC. còn có tên đồng danh: *Bombax ceiba* L., *Gossampinus malabarica* (DC.) Merr., *Salmalia malabarica* (DC.) Schott et Endl, *Bombax heptaphylla* Cav. [7], [8], [108].

Trên thế giới, cây Gạo có các tên gọi sau: Silk-cotton tree, Cotton wood tree (Anh), Arbre à coton, Arbre à bourre, Cotonier mapon (Pháp), Roca (Campuchia), Ngiou (Lào), Simul, Simbal (Ấn độ, Pakistan), Shalmali (tiếng Phạn) [6], [98], [108].

Ngoài ra tên Việt Nam cũng có một số tên gọi khác như: Mộc miên, Gòn rừng, Mộc miên thụ, Mạy mìn, Mạy nghịu (Tày), cây Bông gạo, Anh hùng thụ, Hồng miên, Gòn, Cỏ bói, Ban chi hoa...[5], [31].

Trong quá trình tìm hiểu, theo dõi sự sinh trưởng và phát triển của cây thấy cây Gạo là cây sống nhiều năm, dễ trồng trọt và nhân giống. Người dân Việt Nam trồng cây Gạo tại các khu vực đình, đền, chùa, đầu làng bản. Đặc biệt tại Sơn La có rất nhiều cây Gạo, người dân thu gom bông hoa Gạo để làm đệm. Hiện nay, người dân Phú Thọ trồng thành từng vườn cây Gạo với mục đích lấy tầm gửi cây Gạo và lấy gỗ. Chính vì thế nguồn dược liệu từ cây Gạo rất có tiềm năng với thời điểm thu hái các bộ phận của cây khác nhau. Lá cây Gạo thu hái từ

tháng 8 đến tháng 10, hoa vào tháng 3-4.

Kết quả nghiên cứu đặc điểm thực vật cho thấy cây Gạo dễ nhận biết bởi đặc trưng hoa to, màu đỏ bên cạnh hình ảnh gai hình nón trên thân. Luận án cũng đã nghiên cứu cấu tạo giải phẫu hoa, đặc điểm vi phẫu lá và cành, đặc điểm bột thân, lá và hoa. Việc xác định các đặc điểm vi phẫu lá và cành, đặc điểm bột thân, lá và hoa đã góp phần nhận biết và tiêu chuẩn hóa dược liệu.

Là loài cây quen thuộc, phổ biến, cây Gạo đã được ứng dụng trong điều trị một số loại bệnh theo kinh nghiệm dân gian tại nhiều quốc gia. Tại Trung Quốc, Ấn Độ...cây Gạo đã được đưa vào Thực vật chí [183], [220]. Tuy nhiên, tại Việt Nam, cây Gạo mặc dù đã có mặt trong một số chế phẩm (như trà uống thanh nhiệt, hay cao thuốc điều trị các bệnh về máu...) song trong bộ Thực vật chí Việt Nam mới nhất (2000-2007) chưa thấy đề cập đến họ Gạo (Bombacaceae) và cây Gạo. Vì vậy, các kết quả nghiên cứu trên đây bước đầu góp phần xây dựng tiêu chuẩn dược liệu cho loài *Bombax malabaricum* DC.

4.2. VỀ THÀNH PHẦN HÓA HỌC

Bombax L. là một chi được biết đến nhiều nhất trong họ Bombacaceae, tuy nhiên đến nay mới có rất ít loài trong chi này được nghiên cứu về thành phần hóa học. Flavonoid, phenolic, terpenoid, sterol là các nhóm hợp chất tự nhiên có trong các loài thuộc chi *Bombax* L. Theo các tài liệu thu thập được cho đến nay có khoảng trên 100 hợp chất đã được phân lập và xác định cấu trúc hóa học (không kể các thành phần khác như tinh dầu, acid amin, đường) tập trung ở các loài *Bombax malabaricum* DC., *Bombax anceps* P., *Bombax costatum* P. V. Trong đó, loài *Bombax malabaricum* DC. phân lập được nhiều hợp chất nhất bao gồm 16 hợp chất từ rễ, 8 hợp chất từ vỏ rễ, 3 hợp chất vỏ thân, 3 hợp chất từ lõi thân, 2 hợp chất từ lá, 78 hợp chất từ hoa, 19 hợp chất từ hạt và 11 hợp chất từ gôm [108], [114].

Theo kinh nghiệm dân gian, bộ phận dùng của cây Gạo chủ yếu là vỏ thân, lá và hoa. Đây là nghiên cứu đầu tiên về loài này ở Việt Nam, tuy nhiên các nhà khoa học trên thế giới đã có nhiều nghiên cứu về thành phần hóa học của hoa loài này và đã xác định được gần 80 hợp chất chiếm khoảng $\frac{3}{4}$ các hợp

chất phân lập được. Do thời gian nghiên cứu hạn hẹp, vì vậy vỏ thân và lá được tập trung đưa vào nghiên cứu để có sự so sánh về thành phần hóa học.

4.2.1. Về kết quả định tính

Kết quả định tính các nhóm chất trong vỏ thân, lá và hoa của loài *Bombax malabaricum* DC. cho thấy thành phần hóa học của vỏ thân, hoa và lá bao gồm các nhóm hợp chất glycosid tim, alkaloid, saponin, flavonoid, coumarin, tanin, acid hữu cơ, đường khử, sterol, acid amin và caroten. Riêng caroten và acid amin không có trong vỏ thân. Các nhóm hợp chất trên đều phù hợp với các nhóm hợp chất đã phân lập được từ các loài thuộc chi *Bombax* L. đã được trình bày trong phần tổng quan.

4.2.2. Về kết quả phân lập các hợp chất

Bảng 4.1. Các chất phân lập được từ loài Bombax malabaricum DC.

Số TT	Hợp chất	Danh pháp	Bộ phận
1	BBV1-BBL4	Lupeol	Vỏ thân - Lá
2	BBV2	Friedelin	Vỏ thân
3	BBV3	Epicatechin	Vỏ thân
4	BBV4	Catechin	Vỏ thân
5	BBV5	Momor cerebrosid I	Vỏ thân
6	BBV6-BBL1	Daucosterol	Vỏ thân - Lá
7	BBV7-BBL2	Stigmasterol	Vỏ thân - Lá
8	BBV8	Diethylhexyl adipat	Vỏ thân
9	BBL3	Mangiferin	Lá
10	BBL5	Taraxeryl acetat	Lá
11	BBL6	Taraxerol	Lá
12	BBL7	7 α -hydroxysitosterol	Lá

Trong nghiên cứu này, 8 hợp chất phân lập được từ vỏ thân loài *Bombax malabaricum* DC. và 7 hợp chất được phân lập từ lá, trong đó có 3 hợp chất phân lập được cả trong vỏ thân và lá (bảng 4.1).

❖ **Lupeol:** Hợp chất đã được phân lập từ nhiều bộ phận khác nhau của loài *Bombax malabaricum* DC.: vỏ thân, hoa, vỏ rễ theo các quy trình khác nhau [41], [166]. Trong nghiên cứu này, lupeol còn phân lập được từ bộ phận là lá.

Lupeol có trong nhiều loài thực vật, nó được tìm thấy trong bắp cải, hạt tiêu, dưa chuột, cà chua, trong trái cây (như: ôliu, xoài, dâu tây, nho đỏ), trong cây thuốc (như: nhân sâm, chó đẻ răng cưa, phèn đen...), phân bố rộng rãi trong các họ thực vật (như: Asteraceae, Apocynaceae, Rutaceae, Euphorbiaceae...).

- Lupeol có nhiều tác dụng dược lý: chống viêm, chống oxy hóa, hạ huyết áp, chống sốt rét, bảo vệ gan và đặc biệt kìm hãm sự phát triển tế bào ung thư [135]. Lupeol làm giảm kích thước khối u một cách nhanh chóng và hiệu quả hơn cả những thuốc đang sử dụng điều trị ung thư như cisplatin. Nhận thấy vai trò quan trọng của lupeol [225], một số nhà khoa học đang đầu tư phân lập nó từ các nguồn dược liệu khác nhau như: chiết tách lupeol từ lá me rừng [16], phân lập các triterpen alcol từ loài *Xerospermum lavesvigatum*. Trong nghiên cứu này, xác định được hàm lượng khá cao lupeol phân lập từ loài *Bombax malabaricum* DC. (5,7mg/100g dược liệu), vì vậy là cơ sở cho các nhà khoa học khai thác nguồn dược liệu này tại Việt Nam.

❖ **Friedelin:** Đây là chất lần đầu tiên phân lập được từ vỏ thân cây Gạo nói riêng và từ chi *Bombax* L. nói chung. Cùng trong họ Gạo (Bombacaceae), hợp chất này được phân lập từ loài *Chorisia crispiflora* [114].

- Friedelin cũng là một triterpen có công thức phân tử giống lupeol, được phân lập từ một số loài thuộc các họ khác nhau: *Eugenia chlorantha* Duthie họ Myrtaceae, *Azima tetracantha* (Lam) họ Salvadoraceae [36], [37]. Năm 1995, A. Hisham và cộng sự phân lập được 2 triterpen từ phân đoạn n-hexan của vỏ thân cây *Salacia beddomei* (Gamble) là lupeol và friedelin [92]. Friedelin có nhiều tác dụng dược lý: chống viêm, giảm đau, hạ sốt, chống lại bệnh bạch cầu lymphoblastic T. Friedelin có tác dụng làm giảm co thắt cơ trơn khí quản thử nghiệm trên chuột lang [36].

❖ **Epicatechin:** Đây là lần đầu tiên hợp chất này được phân lập từ chi *Bombax* L. Epicatechin cũng đã được phân lập từ quả của loài *Adansonia digitata* và lá của loài *Ochroma pyramidae* cùng họ Gạo (Bombacaceae) [182], [202]. Hợp chất này có nhiều trong lá của cây trà, coca và nho. Tác dụng của

epicatechin theo các tài liệu tham khảo thường nói tới là tác dụng chống oxy hóa, chống kết tập tiểu cầu, bảo vệ tim mạch.

❖ **Catechin.** Catechin và epicatechin là 2 đồng phân của nhau, thuộc nhóm flavan-3-ol. Đây cũng là lần đầu tiên hợp chất này được phân lập từ loài *Bombax malabaricum* DC. nói riêng và chi *Bombax* L nói chung. Trước đó, hợp chất này đã được phân lập từ 2 loài thuộc họ Gạo, đó là loài *Ceiba pentandra* [146] và loài *Ochroma pyramidae* [202].

❖ **Momor cerebroside I.** Lần đầu tiên phân lập được hợp chất này từ họ Gạo (Bombacaceae). Các nhà khoa học trên thế giới đã tiến hành phân lập được Momor cerebroside I từ nhiều loài khác nhau: *Incarvillea arguta* (Curcubitaceae), *Cucumis sativus* L (Bignoniaceae)... [112], [113], [224].

❖ **Daucosterol, Stigmasterol và 7 α -hydroxy sitosterol:** là các hợp chất có hệ thống vòng cyclopentan perhydrophenanthren, dẫn chất của β -sitosterol thuộc nhóm sterol có nguồn gốc từ thực vật bậc cao gọi chung là phytosterol. Nhóm sterol đã được phân lập từ các bộ phận khác nhau của loài *Bombax malabaricum* DC. Trong đó β -sitosterol có mặt ở hầu hết các bộ phận của cây Gạo như: rễ, vỏ thân, hoa và hạt [108]. Daucosterol và Stigmasterol đã được phân lập từ hoa của loài *Bombax malabaricum* DC. [79], [85]. Trong nghiên cứu này, daucosterol và stigmasterol được phân lập từ lá và vỏ thân. Bên cạnh đó, 7 α -hydroxy sitosterol lần đầu tiên được phân lập từ họ Gạo (Bombacaceae).

Theo Berges RR [48], β -sitosterol có khả năng cải thiện đáng kể triệu chứng và các thông số dòng chảy nước tiểu cho thấy hiệu quả trong điều trị tăng sản tuyến tiền liệt lành tính. β -sitosterol gây ức chế hấp thu cholesterol ở ruột, làm giảm nồng độ cholesterol trong máu, do đó được sử dụng trong trường hợp cholesterol máu cao [137]. Hiện nay có rất nhiều chế phẩm có chứa thành phần β -sitosterol ở dạng thực phẩm chức năng hoặc thuốc dùng để phòng các bệnh tim mạch và huyết áp. Ngoài ra, daucosterol có tác dụng điều hòa miễn dịch, ức chế sự phát triển của nấm men *invitro*, đặc biệt có tác dụng trên nấm *Candida albicans* [115]. Những tác dụng này hoàn toàn phù hợp với kinh nghiệm sử dụng

vỏ thân cây gạo chống viêm, kháng nấm trong dân gian. Phù hợp với kết quả thử tác dụng chống viêm trong nghiên cứu. Daucosterol cũng có mặt trong nhiều cây thuốc quý như: nhân sâm, kê huyết đằng, đỗ trọng, chó đẻ răng cưa... Các nhà khoa học trên thế giới đã tiến hành phân lập daucosterol từ nhiều loài khác nhau. Năm 2012, Jie - wen Guo và cộng sự đã phân lập được 5 hợp chất có tác dụng được lý, trong đó có daucosterol từ hạt giống cây *Litchi chinensis* [111] Stigmasterol không chỉ được phân lập từ loài *Bombax malabaricum* DC., mà stigmasterol còn là một phytosterol đã được phân lập từ nhiều loài khác nhau như: *Rubus suavissimus* (Rosoideae) [210], *Achyranthes aspera* L. (Amaranthaceae) [21], *Strobilanthes callosus* [188],...

❖ **DEHA (Diethylhexyl adipat).** Đây là lần đầu hợp chất này được phân lập từ loài cũng như từ họ Bombacaceae. Tuy nhiên, có ý kiến cho rằng BBV8 có thể là chất ngoại lai, lẫn từ ngoài vào. Thực tế, cả 2 qui trình chiết xuất, phân lập các hợp chất từ vỏ thân và lá đều được tiến hành tương tự và trong cùng điều kiện do vậy nếu bị lẫn từ ngoài vào thì BBV8 phải xuất hiện trong cả vỏ thân và lá. Rất tiếc đây là một chất dầu nên chưa nghiên cứu phân tích cùng với các chất khác và công thức của BBV8 cho thấy khả năng hấp thụ UV-VIS yếu nên không xuất hiện hoặc là 1 trong 2 pic nhỏ còn lại của SKĐ vỏ thân bị bỏ qua do không cùng T_R của dung dịch hỗn hợp đôi chiều chỉ có 6 hợp chất. Để khẳng định sự có mặt của BBV8 trong vỏ thân cây Gạo cần có những nghiên cứu tiếp theo bằng các phương pháp thích hợp như trước hết xác định phổ MS của 2 pic còn lại trên SKĐ vỏ thân hay tiếp tục dùng BBV8 như một "vân tay" để tiếp tục nghiên cứu. Nếu BBV8 thật sự có mặt trong vỏ thân cây Gạo thì đây là lần đầu tiên nó được phân lập từ cây này. Nếu BBV8 là chất ngoại lai thì chỉ có thể là sự kết hợp từ yếu tố ngoại lai với một số acid hữu cơ có trong dược liệu hình thành trong quá trình chiết xuất sẽ có kết luận bổ sung cảnh báo. Tuy nhiên, khả năng có mặt BBV8 trong cây Gạo là rất cao vì vỏ thân của loài *Bombax malabaricum* DC. được biết là có chứa nhiều nhựa mủ [108] và phản ứng ester hóa xảy ra trong quá trình chiết xuất không có xúc tác cũng rất khó xảy ra.

❖ **Mangiferin:** một xanthon glycosid được biết đến là thành phần hoạt chất chính trong lá xoài *Mangifera indica* L., thuộc họ Đào lộn hột (Anacardiaceae). Hợp chất này đã được các nhà khoa học phân lập từ các bộ phận khác nhau của loài *Bombax malabaricum* DC. Theo [181], phân lập từ lá của loài này là từ năm 2003 và theo [71] là năm 2005. Mangiferin được phân lập từ hoa loài *B. malabaricum* năm 2011 [168]. Tác dụng sinh học của mangiferin cũng đã được rất nhiều các nghiên cứu khác nhau chứng minh. Dar A [71] cũng đã thử tác dụng chống oxy hoá, tác dụng giảm đau, tác dụng bảo vệ gan của mangiferin và dịch chiết methanol của lá loài *Bombax malabaricum* DC. Trong nghiên cứu này, tác dụng chống oxy hóa và bảo vệ gan đã được chứng minh thực sự hiệu quả với bộ phận là lá cây gạo thu hái tại Việt Nam, việc xác định thành phần mangiferin trong lá góp phần chứng minh tác dụng dược lý và kinh nghiệm sử dụng các bộ phận cây gạo làm thuốc bổ gan, bảo vệ gan trong dân gian.

❖ **Taraxeryl acetat:** Có trong hoa của loài *Bombax malabaricum* DC. phân lập năm 1974, trong nghiên cứu này taraxeryl acetat được phân lập từ lá. Hợp chất cũng được tìm thấy trong các loài thực vật bậc cao khác như *Codonopsis pilosula* họ Campanulaceae [198], *Seriphidium santolium* Poljak [222]... Taraxeryl acetat được nghiên cứu về tác dụng kháng virus, kết quả cho thấy chất này có tác dụng kháng virus *Herpes simplex* type II [122].

❖ **Taraxerol:** Tương tự taraxeryl acetat, hợp chất này cũng đã được phân lập từ hoa năm 1974 và lần đầu tiên được phân lập từ lá của loài *Bombax malabaricum* DC. Taraxerol có trong các loài: *Myrica rubra*, *Codonopsis pilosula*. Theo [122], taraxerol có tác dụng chống viêm tương đương với indomethacin, có hoạt tính kháng *K. pneumoniae*. Tác dụng này hoàn toàn phù hợp với kinh nghiệm dân gian sử dụng lá Gạo trong điều trị thấp khớp, viêm da.

Trong số các hợp chất phân lập được:

- Lần đầu tiên 2 hợp chất được phân lập từ họ Gạo (Bombacaceae) bao gồm: momor cerebroside I và 7 α -hydroxysitosterol. 3 hợp chất lần đầu tiên được phân lập từ chi *Bombax* L. gồm: friedelin, epicatechin, catechin.

4.2.3. Về kết quả xác định hàm lượng một số hợp chất

4.2.3.1. Về phương pháp xử lý mẫu từ dược liệu dùng để phân tích

Để định lượng các chất trong cây Gạo đạt kết quả tốt, trước hết cần phải chiết kiệt hoạt chất và làm sạch dịch chiết. Phương pháp ngâm lạnh với methanol được lựa chọn, đây cũng là phương pháp tách các hợp chất từ dược liệu trước khi tiến hành chiết lỏng lỏng bằng các dung môi có độ phân cực khác nhau. Do vậy các hợp chất phân lập được đều sẽ có mặt trong dịch chiết methanol. Mặt khác phương pháp ngâm lạnh với methanol cho phép loại bỏ phần lớn các chất cản trở như chất nhầy.

Với cách ngâm lạnh 3 lần với thời gian 24 h, 48 h và 72 h đã đủ cho phép lấy khá kiệt hoạt chất. Vì bã dược liệu sau khi ngâm lạnh 3 lần được ngâm tiếp với methanol thêm 1 lần nữa. dịch chiết thu được được loại bớt dung môi và kiểm tra bằng HPLC và sắc ký lớp mỏng đều không thấy xuất hiện các pic hoặc vết của các hợp chất tương ứng.

4.2.3.2. Về việc tạm dùng các hợp chất phân lập được làm chất đối chiếu để xây dựng phương pháp

Do không có khả năng có được đủ các chất chuẩn cần thiết nên phải sử dụng các chất phân lập được như là các chất đối chiếu để xây dựng phương pháp. Các hợp chất phân lập đã được kiểm tra độ tinh khiết bằng sắc ký lớp mỏng với ít nhất 3 hệ dung môi khai triển khác nhau trước khi tiến hành đo các phổ để xác định cấu trúc. Độ tinh khiết của các hợp chất này được kiểm tra thêm bằng cách xác định tổng tạp theo phương pháp chuẩn hóa diện tích. Với nồng độ dung dịch kiểm tra có nồng độ đủ lớn và thời gian sắc ký là 30 phút các hợp chất phân lập được từ vỏ thân và lá cây Gạo đều chỉ cho 1 pic duy nhất trên sắc ký đồ và không cho thêm pic lạ nào khác. Đặc biệt có 3 hợp chất có mặt cả trong vỏ thân và lá cây Gạo là lupeol, daucosterol và stigmasterol với 2 chương trình dung môi khác nhau cũng cho sắc ký đồ chỉ có duy nhất 1 pic ở thời gian lưu có thay đổi chút ít. Chứng tỏ các hợp chất phân lập được khá tinh khiết.

Tuy nhiên để thiết lập chất đối chiếu với các chất này cần có lượng chất phân lập đủ lớn để xác định độ ẩm, hàm lượng thực tế và kiểm tra độ ổn định

theo thời gian. Thực tế lượng các chất phân lập được còn quá ít và thời gian không cho phép có thể thực hiện các công việc trên. Do vậy trước mắt bỏ qua hàm ẩm, hàm lượng tạp (nếu còn có), tạm coi hàm lượng của các hợp chất trên là 100% để nghiên cứu xây dựng phương pháp phân tích. Nếu hàm lượng thật của các chất đối chiếu thấp hơn (do còn độ ẩm và độ tinh khiết không thật sự đạt 100%) thì nồng độ các dung dịch đối chiếu cũng sẽ giảm theo một tỷ lệ tương ứng. Đồng thời giới hạn phát hiện và định lượng có thể còn đạt được giá trị thấp hơn.

4.2.3.3. Về ứng dụng phổ MS trong việc nâng cao độ tin cậy của việc định tính

Thông thường trong sắc ký lỏng việc định tính các pic được dựa vào thời gian lưu và kết hợp thêm một số thông tin khác như phổ hấp thụ UV-VIS tương ứng với các pic. Tuy nhiên với một hỗn hợp phức tạp có nguồn gốc dược liệu chứa các hợp chất khá đa dạng cần tăng cường tính nhận dạng các pic. Với thiết bị LC-MS có thể nhận dạng các pic trên sắc ký đồ bằng kết hợp thời gian lưu và phổ MS của các pic sẽ cho phép định tính một cách chính xác hơn nhiều so với việc kết hợp với phổ UV-VIS.

Tuy nhiên thiết bị LC-MS chưa phải là phổ biến nên việc áp dụng rộng rãi gặp khó khăn. Do vậy trong nghiên cứu của chúng tôi LC-MS được dùng để khẳng định việc tách các hợp chất nghiên cứu trên sắc ký đồ là triệt để và giúp có được đầy đủ thông tin hơn để định tính theo kiểu kết hợp nhiều "vân tay". Tuy nhiên vẫn cần có một phương pháp đơn giản hơn để có thể ứng dụng rộng rãi trong kiểm nghiệm với dược liệu.

4.2.3.4. Về khảo sát điều kiện sắc ký và yêu cầu thiết bị HPLC

Tiến hành khảo sát các điều kiện sắc ký để chọn được điều kiện sao cho chất phân tích được tách hoàn toàn, pic cân đối, thời gian phân tích không quá dài.

Mặc dù sử dụng LC-MS để khảo sát và xây dựng phương pháp nhưng với mong muốn phương pháp được áp dụng rộng rãi hơn nên chỉ dùng detector UV-VIS làm bộ phận phát hiện khi định lượng. MS được dùng để khẳng định thêm

các pic được xác định tại các thời gian lưu tương ứng không bị chồng lấn với các chất khác. Phổ khối lượng thu được từ các pic có thời gian lưu tương ứng còn được so sánh với phổ khối lượng đo được khi xác định cấu trúc để thêm tính khẳng định.

Để có thể phân tích đồng thời nhiều hợp chất, chương trình dung môi được triển khai. Nhưng nếu thiết bị không có điều kiện gradient dung môi thì có thể tham khảo chương trình dung môi trên để chọn thành phần pha động phù hợp để phân tích riêng từng chất hoặc một số chất với điều kiện chúng được tách riêng khi chạy sắc ký với điều kiện đẳng dòng.

4.2.3.5. Khả năng áp dụng phương pháp phân tích các hợp chất

Sau khi xây dựng, quy trình phân tích đã được thẩm định theo quy định chung. Các kết quả thẩm định cho thấy phương pháp đã đáp ứng các yêu cầu cần có như: sự phù hợp của hệ thống, độ lặp lại, khoảng nồng độ tuyến tính, LOD và LOQ, độ đúng.

Phương pháp phân tích các hợp chất trong vỏ thân và lá cây Gạo bằng phương pháp HPLC xây dựng được là đáng tin cậy. Đồng thời phương pháp có ưu điểm là đơn giản, dễ thực hiện, có thể tiết kiệm được thời gian và chi phí kiểm nghiệm. Hiện nay đa số các Trung tâm kiểm nghiệm dược phẩm, mỹ phẩm đến các cơ sở sản xuất thuốc đều được trang bị máy HPLC. Vì vậy, kết quả nghiên cứu của đề tài có thể triển khai và ứng dụng vào thực tế.

4.3.2.5. Về kết quả định lượng một số hợp chất trong vỏ thân và lá cây Gạo

Vì các chất phân lập được tạm dùng là chất đối chiếu chưa biết hàm ẩm và hàm lượng thực sự nên nồng độ các dung dịch đối chiếu chỉ là tương đối. Tuy nhiên với độ tinh khiết kiểm tra được và mẫu đã được làm khô kỹ trước khi đo phổ để xác định cấu trúc nên hàm lượng cũng gần 100% nên sai số nồng độ thực sẽ không quá xa nồng độ biểu kiến dùng tính toán. Bên cạnh đó mới chỉ tiến hành với 1 mẫu được liệu qua một lần chiết cần toàn phần, do vậy các kết quả thu được chưa thể đại diện cho hàm lượng các chất trong dược liệu nhưng vẫn là một giá trị có thể dùng để ước lượng hàm lượng các hợp chất trong các bộ phận của cây Gạo.

Từ mẫu vỏ thân cây Gạo dùng nghiên cứu luận án đã sơ bộ xác định được hàm lượng có trong 100 g vỏ thân cây Gạo khô của 6 chất nghiên cứu như sau: epicatechin là 12,3mg; catechin là 6,7mg; daucosterol là 1,8mg; lupeol là 9,5mg; stigmasterol là 1,9mg và friedelin là 7,6mg.

Từ mẫu lá cây Gạo dùng nghiên cứu luận án đã xác định được hàm lượng có trong 100 g lá Gạo khô của 7 chất nghiên cứu như sau: mangiferin là 8,1 mg, daucosterol là 1,1mg, 7 α -hydroxysitosterol là 0,9mg, lupeol là 5,7mg, taraxeryl acetat là 4,1mg, stigmasterol là 0,9mg và taraxerol là 5,1mg.

Như vậy, với việc tiến hành phân tích đồng thời các hợp chất phân lập được trong lá hoặc vỏ thân cây Gạo cho phương hướng sử dụng phương pháp “đa vận tay” để định tính và có thể xác định hàm lượng các chất nếu có chất đối chiếu phù hợp.

4.3. VỀ ĐỘC TÍNH VÀ TÁC DỤNG SINH HỌC

Theo kinh nghiệm dân gian, các bộ phận vỏ thân, gôm, hạt, quả của cây Gạo được sử dụng để chữa các bệnh có triệu chứng viêm và đau như thấp khớp, nhức mỏi chân tay, vết thương bầm tím, sưng tấy, suy thận. Lá và hoa được dùng phổ biến để chữa các bệnh về gan, thận, đường tiêu hóa, mất máu, suy nhược cơ thể.

Trên thế giới, loài *Bombax malabaricum* DC. đang ngày càng thu hút được sự quan tâm của các nhà khoa học với nhiều tác dụng chữa bệnh quan trọng và các tác dụng sinh học đã được công bố, như tác dụng bảo vệ gan, tác dụng chống viêm, giảm đau, hạ sốt, hạ huyết áp, tác dụng hạ đường huyết, ức chế sự tạo mạch, tác dụng chống oxy hóa và chống ung thư [134], [205], [206].

Tuy nhiên, các nghiên cứu về tác dụng sinh học của loài này cũng chưa được đầy đủ và hoàn chỉnh, đặc biệt có rất ít nghiên cứu về loài *Bombax malabaricum* DC. thu hái tại Việt Nam. Vì vậy, để làm sáng tỏ việc sử dụng cây thuốc này, đề tài đã tập trung vào nghiên cứu độc tính các bộ phận vỏ thân, lá, hoa để xác định tính an toàn, nghiên cứu tác dụng giảm đau, chống viêm cấp và mạn tính trên vỏ thân, tác dụng bảo vệ gan của lá và tác dụng cầm máu của vỏ thân cây Gạo.

4.3.1. Độc tính

4.3.1.1. Về đánh giá độc tính của vỏ thân

Với liều uống cao nước vỏ thân cây Gạo tăng dần từ 100g/kg đến 300g/kg thể trọng (gấp 50 lần liều dùng thông thường), đây là thể tích tối đa, chuột có khả năng dung nạp được. Theo dõi chuột ở các lô sau khi được uống thuốc, nhận thấy: Chuột ở tất cả các lô không có biểu hiện của các triệu chứng ngộ độc, các chuột vẫn ăn uống, hoạt động bình thường, phân và nước tiểu của chuột không có gì bất thường, sau 72h không có chuột chết, do đó chưa xác định được LD₅₀.

Tuy nhiên, theo nghiên cứu của Saleem và cộng sự (2003), dịch chiết methanol của vỏ thân loài *Bombax malabaricum* DC. liều cao 1000mg/kg/ngày trong 7 ngày không có chuột nào sống sót và xác định được LD₁₀₀ [170]. Như vậy, khả năng trong thành phần của vỏ thân cây Gạo có chất gây độc, vì vậy để đánh giá được độ an toàn của dược liệu là vỏ thân cây Gạo, cần thiết đánh giá độc tính bán trường diễn cũng như độc tính của vỏ thân chiết xuất qua các dung môi khác nhau trong các nghiên cứu tiếp theo.

4.3.1.2. Về đánh giá độc tính của lá

Kết quả đánh giá độc tính cấp trên chuột nhắt trắng với liều uống cao nước lá cây Gạo liều 100g – 300g/kg thể trọng. Chuột vận động, ăn uống bình thường, không bị khó thở, tuy nhiên các chuột bị tiêu chảy ở các liều từ 240g – 300g dược liệu/kg thể trọng. Quan sát không thấy xuất hiện chuột chết trong vòng 72h sau khi uống thuốc thử, không xác định được LD₅₀. Điều này hoàn toàn phù hợp với nghiên cứu của Saleem và cộng sự (1999), với liều 1g/kg dịch chiết methanol của lá không có chuột nào bị chết, không có sự thay đổi các chức năng tim, gan, thận của chuột [170]. Điều đó chứng tỏ rằng lá cây Gạo dưới dạng dịch nước, theo đường uống ít có độc tính và có độ an toàn rộng.

4.3.1.3. Về đánh giá độc tính của hoa

Với liều cao nước hoa cây Gạo dưới 220g/kg chuột, không có hiện tượng gì đặc biệt: chuột ăn uống, vận động bình thường. Khi tăng liều, chuột có hiện tượng khó thở sau 1 giờ, co giật ở liều cao, xuất hiện chuột chết. Xác định được LD₅₀ = 500,71 g/kg (gấp 75 lần liều thông thường) đối với hoa cây Gạo. Như

vậy, hoa cây Gạo có dấu hiệu gây độc, kết quả đã cho thấy mức độ độc phụ thuộc rất lớn vào liều dùng, phù hợp với nghiên cứu về hoa của Rehman và cộng sự (2006), đã xác định được LD₅₀ đường uống trên chuột cống là 6768,730mg/kg [162]. Việc đánh giá được độc tính của hoa cây Gạo giúp cho nâng cao tính an toàn khi sử dụng dược liệu, đây là nguyên liệu sản xuất nước giải khát phổ biến tại Việt Nam và Trung Quốc hiện nay. Cần phải có những nghiên cứu sâu và rộng thêm về các thành phần trong hoa và xác định độc tính bán trường diễn.

4.3.2. Về tác dụng giảm đau

4.3.2.1. Lựa chọn mô hình thực nghiệm

Theo tổ chức y tế thế giới (WHO), đau là một cảm giác khó chịu và một kinh nghiệm xúc cảm gây ra tổn thương bởi các tế bào thực thể hoặc tiềm tàng để bảo vệ cơ thể. Đau là một triệu chứng biểu hiện qua cảm giác của một bệnh nào đó. Cảm giác đau xuất hiện tại một vị trí nào đó khi bị tổn thương, tạo nên một đáp ứng nhằm loại trừ tác nhân gây đau. Tác nhân gây đau rất đa dạng, bao gồm: tác nhân cơ học, hóa học, vật lý. Nhằm ngăn chặn phản ứng đau xảy ra ở các tổ chức của cơ thể, có thể sử dụng: thuốc giảm đau trung ương (loại morphin); thuốc giảm đau ngoại vi (asprin, paracetamol...)

Aspirin là thuốc giảm đau thuộc nhóm thuốc chống viêm phi steroid (NSAID), ở mức liều thấp có tác dụng lên các cơn đau nhẹ và vừa như đau cơ, đau bụng kinh, đau do viêm xương khớp. Vị trí tác dụng là các receptor cảm giác ngoại vi. Aspirin có tác dụng lên các cơn đau nông nhẹ và vừa, khu trú hoặc lan tỏa như đau đầu, đau cơ, đau răng, đau khớp. Đặc biệt có tác dụng tốt với đau do viêm. Tác dụng giảm đau của aspiin do làm ức chế tổng hợp PGE₂ nên giảm tính cảm thụ các ngọn dây cảm giác với các chất gây đau của phản ứng viêm như bradykinin, histamin, serotonin...

Codein là thuốc giảm đau gây nghiện thuộc nhóm opiat, có tác dụng lên các cơn đau cấp dữ dội như đau do chấn thương, do ung thư, đau sau phẫu thuật. Codein có tác dụng chọn lọc và trực tiếp lên tế bào thần kinh trung ương, nhất là vỏ não với nhiều trung khu bị ức chế: trung khu đau, trung khu hô hấp, trung khu ho. Codein ức chế cảm giác đau một cách đặc hiệu và chọn lọc thông qua

hoạt hóa (được gọi là đồng vận) các thụ thể chất gây nghiện đặc biệt là thụ thể μ có ở tủy sống và các trung tâm thần kinh trên tủy khác. Bởi vậy codein và các opiat khác được gọi là thuốc giảm đau trung ương. Sử dụng codein dạng bột đường uống là phù hợp với đường dùng của thuốc nghiên cứu.

Luận án đã sử dụng *phương pháp mâm nóng* với tác nhân là nhiệt độ để gây đau, đánh giá tác dụng giảm đau của các thuốc có cơ chế tác dụng trung ương (codein). Với nguyên tắc: đo thời gian phản ứng với nhiệt độ ở chuột nhắt trắng để đánh giá gián tiếp ngưỡng đau, thuốc giảm đau sẽ kéo dài thời gian phản ứng với nhiệt độ và ngược lại. Phương pháp mâm nóng chỉ nhạy cảm với các thuốc tác dụng lên phần trên của hành tủy, gây ra một phản ứng kích thích hệ thống giảm đau, thể hiện trong phương pháp này là phản ứng vận động làm cho chuột nhắt chân sau và đưa lên liếm hoặc chuột nhảy lên.

Phương pháp Koster, đánh giá tác dụng giảm đau của các thuốc theo cơ chế tác dụng ngoại vi như nhóm hạ sốt – giảm đau – chống viêm không steroid (aspirin). Trên mô hình gây đau bằng acid acetic gây nên những cơn đau quặn bụng, biểu hiện sự kích thích tại chỗ của tác nhân hóa học. Gây đau bằng tác nhân hóa học là thí nghiệm này, pha đáp ứng đầu tiên là do sự kích thích trực tiếp lên sợi cảm giác và pha đáp ứng muộn hơn là thứ phát do sự xuất hiện đáp ứng các chất trung gian hóa học gây đau được giải phóng ra do phản ứng viêm. Thuốc tác động lên trung ương (codein) có khả năng ức chế cả hai pha, còn thuốc tác động lên ngoại biên (aspirin) chỉ ức chế lên pha sau.

4.3.2.2. Lựa chọn đường dùng và liều dùng thuốc

Vỏ thân cây Gạo được người dân địa phương sử dụng cho bệnh nhân thấp khớp dưới dạng nước sắc với mức liều thường dùng là 15-30 gam dược liệu khô/ngày cho người lớn (dùng 15-30g vỏ thân sắc, lấy nước uống) tương đương 0,3-0,6 g/kg thể trọng/ngày (tính trung bình người lớn nặng 50kg) [14]. Mẫu thử trong nghiên cứu được bào chế dưới dạng cao nước (4:1) và cần phân đoạn ethyl acetat chiết xuất từ vỏ thân cây Gạo. Tiến hành ngoại suy liều có hiệu quả tương đương giữa người và động vật thí nghiệm để tính liều dùng ở chuột nhắt trắng là 3,6-7,2 g/kg (theo hệ số 12). Trong nghiên cứu đánh giá tác dụng giảm đau này,

chúng tôi tiến hành thử trên 2 mức liều là 6g được liệu/kg chuột và 12g được liệu/kg chuột.

4.3.2.3. Tác dụng của vỏ thân (VG) và căn phân đoạn ethyl acetat chiết xuất từ vỏ thân cây Gạo (VGE) đối với chuột bị gây đau bởi nhiệt độ hoặc acid acetic

Kết quả nghiên cứu trên mô hình mâm nóng cho thấy, cao nước vỏ thân và căn phân đoạn ethyl acetat chiết xuất từ vỏ thân cây Gạo liều 6g được liệu/kg chuột và liều 12g được liệu/kg chuột không có tác dụng giảm đau theo cơ chế trung ương. Trên mô hình gây quặn đau bằng acid acetic, cao nước vỏ thân (VG) và căn phân đoạn ethyl acetat chiết xuất từ vỏ thân cây Gạo (VGE) liều 6g được liệu/kg chuột và liều 12g được liệu/kg chuột thể hiện tác dụng giảm đau theo cơ chế ngoại vi. Ở cả hai mức liều, VG và VGE có số lượng cơn quặn đau đều giảm có ý nghĩa thống kê so với lô đối chứng ($p < 0,01$), tuy nhiên ở mức liều 12g/kg thì tác dụng giảm đau có xu hướng xuất hiện sớm và kéo dài hơn mức liều 6g/kg và tương đương với tác dụng của aspirin liều 100mg/kg.

Theo Đỗ Tất Lợi (2004) và Võ Văn Chi (1997), sử dụng vỏ thân cây Gạo trị thấp khớp, gãy xương, đau thượng vị, sung tẩy, đau răng [15], [8]. Như vậy, kết quả thực nghiệm đã chứng minh cao nước vỏ thân cây Gạo có tác dụng giảm đau tốt, phù hợp với kinh nghiệm dân gian sử dụng cây Gạo để trị đau nhức xương khớp, đau răng, là những loại đau ngoại vi do kích thích ngọn dây thần kinh nhận và dẫn truyền cảm giác đau ở ngoại biên. Bên cạnh đó, tác dụng giảm đau được thể hiện trong căn phân đoạn ethyl acetat chiết xuất từ vỏ thân cây Gạo, điều đó chứng minh các thành phần có tác dụng giảm đau nằm trong phân đoạn ethyl acetat, từ đó có định hướng chiết tách, phân lập các hợp chất có tác dụng giảm đau từ phân đoạn này trong các nghiên cứu tiếp theo.

4.3.3. Về tác dụng chống viêm

4.3.3.1. Lựa chọn mô hình thực nghiệm

Viêm là một đáp ứng bảo vệ cơ thể của hệ thống miễn dịch trước sự tấn công của các yếu tố bên ngoài (vi khuẩn, yếu tố cơ học, vật lý, hóa học, sinh học và do đáp ứng miễn dịch) hoặc do các tác nhân bên trong (hoại tử do thiếu máu

cục bộ, viêm tắc động mạch, xuất huyết, bệnh tự miễn hay do sản phẩm chuyển hóa như acid uric tăng gây viêm khớp trong bệnh Gout, urê huyết tăng gây viêm màng phổi, màng tim...), biểu hiện chủ yếu tại chỗ. Đây là một đáp ứng miễn dịch tự nhiên (đáp ứng miễn dịch không đặc hiệu). Quá trình viêm thường kèm theo các triệu chứng sưng, nóng, đỏ và đau, do các mạch máu ở gần nơi tổn thương giãn nở, đưa nhiều máu đến nơi tổn thương. Các bạch cầu cũng theo mạch máu xâm nhập vào mô, tiết các chất trung gian hóa học như prostaglandin, leucotrien. Viêm cấp là quá trình diễn ra trong những giờ đầu khi kháng nguyên xâm nhập vào cơ thể, khi viêm không lành sẽ có thể trở thành viêm mạn tính.

Aspirin có tác dụng lên hầu hết các loại viêm không kể nguyên nhân. Chỉ ở liều cao mới có tác dụng chống viêm. Thuốc có tác dụng lên thời kỳ đầu của quá trình viêm. Aspirin chỉ có tác dụng lên bạch cầu trung tính và chỉ ở giai đoạn ức chế cyclo-oxygenase (COX), từ đó ức chế tổng hợp prostaglandin (PG). Thuốc còn đối kháng với hệ enzym phân hủy protein, ngăn cản quá trình đổi protein, làm bền vững màng lysosom (màng lysosom là màng sinh chất được cấu tạo từ protein và lipid) do đó hạn chế giải phóng các enzym của lysosom trong quá trình thực bào nên có tác dụng chống viêm. Ngoài ra thuốc còn ức chế cơ chất của enzym; ức chế sự di chuyển của bạch cầu tới ổ viêm; ức chế phản ứng kháng nguyên-kháng thể; ức chế các chất trung gian hóa học của quá trình viêm như bradykinin, histamin, serotonin.

Presnisolon là một glucocorticoid có tác dụng rõ rệt chống viêm. Chúng viêm, bất kỳ thuộc căn bệnh nào đều đặc trưng bởi bạch cầu thoát mạch và xâm nhiễm vào mô bị viêm. Glucocorticoid ức chế các hiện tượng này. Đối với bạch cầu trung tính, các glucocorticoid làm giảm chức năng, giảm biệt hóa, giảm di chuyển, giảm bám dính vào tế bào nội mô, giảm hóa ứng động, giảm sản xuất ra các superoxide. Ngoài tác dụng trên chức năng của bạch cầu, glucocorticoid còn làm giảm tổng hợp PG do ức chế phospholipase A2 và làm giảm sự xuất hiện cyclooxygenase ở những tế bào viêm, do đó làm giảm lượng enzym sản sinh PG.

Carrageenin được sử dụng để gây phù có bản chất là polysaccharid gần giống với cấu trúc vỏ vi khuẩn, là kháng nguyên không phụ thuộc tuyến ức. các

mô hình gây viêm bằng carrageenin sẽ khởi động quá trình viêm cấp, bản chất của quá trình này là sự đáp ứng miễn dịch không đặc hiệu. Quá trình viêm cấp do kháng nguyên là các polysaccharid có sự tham gia của đáp ứng miễn dịch dịch thể do các lympho bào B đảm nhận. Các kháng nguyên không phụ thuộc tuyến ức như polysaccharid khi vào cơ thể sẽ được các lympho bào B nhận diện và tự sản xuất kháng thể đặc hiệu mà không cần sự trợ giúp của các lympho bào T. Biểu hiện của quá trình viêm này là giãn mạch tại chỗ làm vùng viêm đỏ, làm tăng cường tuần hoàn đến chỗ viêm tạo thuận lợi cho bạch cầu xuyên mạch, tăng thoát dịch từ lòng mạch vào tổ chức kẽ, tăng tiết các chất trung gian hóa học như prostaglandin, histamin, leucotrien, biểu hiện quan sát thấy chủ yếu là triệu chứng phù.

Amiant là dị vật, là một yếu tố gây viêm mạn. Khi đưa amiant vào cơ thể, cơ thể sẽ phản ứng bằng cách tập trung nhiều loại tế bào tạo ra mô bào lưới và nguyên bào sợi bao quanh vật lạ, tạo thành một khối u gọi là u hạt thực nghiệm tương tự với tiến triển của viêm mạn tính. Mô hình gây viêm bằng amiant sẽ khởi động các quá trình viêm mạn, bản chất của quá trình này cũng là sự đáp ứng miễn dịch không đặc hiệu. Quá trình viêm mạn gây ra do amiant có sự tham gia của quá trình đáp ứng miễn dịch qua trung gian tế bào do các lympho T phụ trách.

Luận án đã thử tác dụng chống viêm trên 2 mô hình: *mô hình gây phù chân chuột bằng carrageenin*: dùng carrageenin 1%, tiêm vào bàn chân sau, bên phải của chuột để gây phù nhằm đánh giá tác dụng chống viêm cấp của thuốc. Thuốc đối chứng dương được lựa chọn trong nghiên cứu này là aspirin. Với nguyên tắc: đo thể tích chân chuột để đánh giá mức độ gây viêm; tác dụng chống viêm của thuốc sẽ được đánh giá bằng khả năng ức chế phù bàn chân chuột. *Mô hình gây tràn dịch màng bụng*: Tác nhân gây viêm cấp cũng được dùng là carrageenin để tiêm vào màng bụng chuột. Viêm màng bụng có sự thoát dịch, sự di chuyển của bạch cầu và các chỉ số hóa sinh khác liên quan tới phản ứng viêm có thể được đo dễ dàng trong dịch rỉ viêm. Trên mô hình này, đánh giá tác dụng chống viêm cấp của thuốc được đánh giá theo nguyên tắc: đo thể tích

dịch rỉ viêm, đếm số lượng bạch cầu trong 1ml dịch rỉ viêm và định lượng protein có trong dịch rỉ viêm; tác dụng chống viêm của thuốc sẽ được đánh giá bằng khả năng làm giảm các thông số này.

Tác dụng chống viêm mạn được tiến hành thử trên mô hình gây u hạt bằng amiant. Tác nhân gây viêm là sợi amiant được cấy vào da gáy của chuột, tạo thành các khối u hạt. Trên mô hình này, prednisolon được chọn làm thuốc đối chứng dương do có tác dụng ức chế đáp ứng miễn dịch qua trung gian tế bào do các lympho bào T đảm nhận. Tác dụng chống viêm của thuốc được đánh giá theo nguyên tắc: Thuốc chống viêm mạn sẽ ức chế sự tạo thành u hạt, việc đánh giá này thông qua việc xác định sự thay đổi trọng lượng u hạt tươi và u hạt sau khi sấy khô giữa các lô chuột dùng thuốc các liều khác nhau.

4.3.3.2. Lựa chọn đường dùng và liều dùng thuốc

Vỏ thân cây Gạo được người dân địa phương sử dụng cho bệnh nhân thấp khớp, viêm dạ dày dưới dạng nước sắc với mức liều thường dùng là 15-30 gam được liệu khô/ ngày cho người lớn (dùng 15-30g vỏ thân sắc, lấy nước uống) tương đương 0,3-0,6 g/kg thể trọng/ngày (tính trung bình người lớn nặng 50kg) [14]. Mẫu thử trong nghiên cứu được bào chế dưới dạng cao nước (4:1) và cồn phân đoạn ethyl acetat chiết xuất từ vỏ thân cây Gạo. Tiến hành ngoại suy liều có hiệu quả tương đương giữa người và động vật thí nghiệm để tính liều dùng ở chuột cống trắng là 2,4-4,8 g/kg (theo hệ số 8) và ở chuột nhắt trắng là 3,6-7,2 g/kg (theo hệ số 12). Trong nghiên cứu đánh giá tác dụng chống viêm cấp trên chuột cống với 2 mức liều là 4g được liệu/kg chuột và 8g được liệu/kg chuột; tác dụng chống viêm mạn trên chuột nhắt trắng với 2 mức liều là 6g được liệu/kg chuột và 12g được liệu/kg chuột, nhằm đánh giá tác dụng của các mẫu có phụ thuộc vào liều dùng hay không.

4.3.3.3. Tác dụng chống viêm của vỏ thân (VG) và cồn phân đoạn ethyl acetat chiết xuất từ vỏ thân cây Gạo (VGE) đối với chuột bị gây đau bởi nhiệt độ hoặc acid acetic.

Tác dụng chống viêm cấp: Trên mô hình gây phù chân chuột bằng carragenin, cao nước VG ở hai liều 4g được liệu/kg chuột và 8g được liệu/kg

chuột không có tác dụng chống viêm. Tuy nhiên, VGE liều 4g được liệu/kg chuột và 8g được liệu/kg có tác dụng làm giảm thể tích chân chuột một cách có ý nghĩa thống kê so với lô gây viêm thực nghiệm và không được điều trị (lô chứng). Như vậy, cần phân đoạn ethyl acetat chiết xuất từ vỏ thân cây Gạo có tác dụng chống viêm trên động vật thí nghiệm, tác dụng chống viêm của VGE xuất hiện sớm, rõ rệt sau 2 giờ và 4 giờ và không có sự khác biệt giữa hai liều 4g được liệu/kg chuột và 8g được liệu/kg chuột. *Trên mô hình gây tràn dịch màng bụng*, VGE liều 8g được liệu/kg chuột làm giảm thể tích dịch rỉ viêm. Tuy nhiên, VG và VGE ở hai liều 4g được liệu/kg chuột và 8g được liệu/kg chuột không làm thay đổi hàm lượng protein trong dịch rỉ viêm và số lượng bạch cầu trong dịch rỉ viêm.

Trên mô hình gây viêm mạn tính, cao nước VG và cần VGE liều 12g được liệu/kg chuột có tác dụng chống viêm mạn (làm giảm trọng lượng khối u hạt). Tác dụng chống viêm tương đương với tác dụng của prednisolon liều 5mg/kg chuột ($p>0,05$).

Như vậy cao nước vỏ thân và cần phân đoạn ethyl acetat chiết xuất từ vỏ thân cây Gạo có tác dụng chống viêm cấp và viêm mạn tính trên các mô hình đã thử với mức liều theo kinh nghiệm dân gian đã dùng. Nghiên cứu tác dụng chống viêm của các tác giả trên thế giới cũng cho thấy tác dụng chống viêm của loài *Bombax malabaricum* DC. Vỏ thân, thân, rễ với liều 10mg/kg có tác dụng chống viêm vượt trội so với indomethacin [126]. Dịch chiết nước của gôm với liều 270mg được liệu/kg chuột có tác dụng giảm phù nề, giảm số lượng vết loét [97]. Các kết quả chống viêm của cây Gạo trong khuôn khổ luận án đã góp phần minh chứng và lý giải cho các kinh nghiệm điều trị bệnh như trong tài liệu của một số tác giả Đỗ Tất Lợi (2003) và Võ Văn Chi (1997), vỏ thân cây Gạo có tác dụng trị thấp khớp.

4.3.4. Về tác dụng cầm máu

4.3.4.1. Lựa chọn mô hình thực nghiệm

Cầm máu là một quá trình diễn ra nhằm hạn chế hoặc ngăn cản máu chảy ra khỏi mạch khi thành mạch bị tổn thương. Quá trình cầm máu được thực hiện

qua năm giai đoạn: co mạch, hình thành nút tiểu cầu, đông máu, co cục máu đông và tan cục máu đông. Trong đó giai đoạn đông máu diễn ra phức tạp và kéo dài nhất [18].

Đông máu là quá trình máu chuyển từ thể lỏng sang thể đặc nhờ chuyển fibrinogen hòa tan trong huyết tương thành fibrin không hòa tan dưới xúc tác của thrombin. Thrombin được hình thành từ prothrombin nhờ xúc tác của prothrombinase được sinh ra theo hai con đường: con đường ngoại sinh và con đường nội sinh [30].

Một số xét nghiệm liên quan đến quá trình đông máu thường dùng:

- *Thời gian chảy máu*: là thời gian tính từ khi bắt đầu rạch vào da và máu chảy ra cho đến khi hết chảy máu. Bình thường là từ 2-4 phút. Thời gian chảy máu hay còn gọi là thời gian hình thành nút tiểu cầu, phản ánh chức phận cầm máu của tiểu cầu và mạch máu [30].
- *Thời gian đông máu*: là thời gian tính từ lúc máu lấy ra khỏi cơ thể (không có chống đông) cho đến khi máu đông hoàn toàn, bình thường từ 8-12 phút [30].

4.3.4.2. Lựa chọn đường dùng và liều dùng thuốc

Vỏ thân cây Gạo được người dân địa phương sử dụng cho bệnh nhân cầm máu trong các chứng băng huyết dưới dạng nước sắc với mức liều thường dùng là 15-30 gam dược liệu khô/ ngày cho người lớn (dùng 15-30g vỏ thân sắc, lấy nước uống) tương đương 0,3-0,6 g/kg thể trọng/ngày (tính trung bình người lớn nặng 50kg) [14]. Mẫu thử trong nghiên cứu được bào chế dưới dạng cao nước (4:1), tiến hành ngoại suy liều có hiệu quả tương đương giữa người và động vật thí nghiệm để tính liều dùng ở chuột nhắt trắng là 3,6-7,2 g/kg (theo hệ số 12). Trong nghiên cứu đánh giá tác dụng giảm đau này, chúng tôi tiến hành thử trên 2 mức liều là 6g dược liệu/kg chuột và 12g dược liệu/kg chuột.

4.3.4.3. Tác dụng cầm máu của vỏ thân (VG) qua đánh giá thời gian chảy máu, thời gian đông máu và số lượng tiểu cầu trong máu ngoại vi.

Cao nước vỏ thân cây Gạo ở liều 6g dược liệu/kg chuột không làm thay đổi thời gian chảy máu, thời gian đông máu và số lượng tiểu cầu trong máu ngoại vi so với lô không được điều trị (lô đối chứng âm).

Trên mô hình nghiên cứu thời gian chảy máu, cao nước VG ở liều 12g được liều/kg chuột có tác dụng làm giảm thời gian chảy máu có ý nghĩa thống kê so với lô không được điều trị (lô chứng) và so với trước uống thuốc ($p < 0,05$).

Kết quả nghiên cứu cho thấy chỉ có cao lỏng VG liều cao 12g/kg thể hiện tác dụng cầm máu thông qua làm giảm thời gian chảy máu mà không ảnh hưởng đến thời gian đông máu và số lượng tiểu cầu, có thể cho thấy cơ chế cầm máu của VG liên quan đến chức phận cầm máu của mạch máu nhiều hơn là tiểu cầu và các yếu tố đông máu, cơ chế này có thể liên quan đến các thành phần sterol theo cơ chế hormon đã được chứng minh là có trong các bộ phận của cây Gạo. Cơ chế này là hoàn toàn phù hợp với các kinh nghiệm dân gian sử dụng vỏ thân cây Gạo để trị cầm máu trong rong kinh, đa kinh, băng huyết, trĩ... [8], [23].

4.3.5. Về tác dụng bảo vệ gan và chống oxy hóa

4.3.5.1. Lựa chọn mô hình thực nghiệm

Để gây tổn thương gan trên thực nghiệm, có thể dùng nhiều chất hóa học khác nhau như paracetamol, carbontetraclohid, D-galactosamin, ethanol, thiocetamid... Mỗi một mô hình gây tổn thương gan đều có cơ chế riêng. Trong nghiên cứu này, với mục đích đánh giá tác dụng chống oxy hóa, chúng tôi đã chọn paracetamol (PAR) làm tác nhân gây tổn thương gan. PAR là thuốc hạ sốt, giảm đau được sử dụng rộng rãi để điều trị triệu chứng trong nhiều bệnh và được dùng khá phổ biến. PAR sau khi vào cơ thể, 93% được đào thải qua nước tiểu dưới dạng liên hợp, 2% ở dạng không đổi, phần còn lại được chuyển hóa qua CYP_{2E1} trong hệ thống enzym Cyt-P₄₅₀ ở gan để tạo thành N-acetyl parabenzoquinon-imin (NAPQI) – một gốc tự do gây peroxy hóa lipid và sinh ra MDA dẫn đến tổn thương các tế bào gan. Với liều điều trị thông thường, PAR ít gây độc với gan vì lượng NAPQI sinh ra sẽ được trung hòa ngay bởi GSH, một chất chống oxy hóa có sẵn trong tế bào gan. Nhưng với liều cao, lượng NAPQI sinh ra nhiều, lượng GSH trong gan không đủ để trung hòa, khi ấy tế bào gan sẽ

bị tổn thương. PAR gây tổn thương gan ngoài cơ chế sinh ra các gốc tự do như CCl_4 , còn làm cạn kiệt hệ thống chống oxy hóa của cơ thể (các chất thiol...).

Trong lâm sàng, khi tế bào gan bị tổn thương sẽ dẫn đến rối loạn cấu trúc và chức năng gan. Các tế bào gan thực hiện các chức năng gan nhờ vào một hệ thống enzym. Khi tế bào gan bị tổn thương, các enzym này sẽ được giải phóng vào máu và nồng độ enzym sẽ tăng cao trong máu. Khi tổn thương gan, dẫn đến sự thay đổi của ít nhất 20 enzym trong huyết thanh, trong đó sự thay đổi của 2 enzym là ASAT (aspartat aminotransferase) và ALAT (alanin aminotransferase) có giá trị chẩn đoán hơn cả. Hoạt độ ASAT và ALAT tăng cao và tăng sớm trong viêm gan do virus hoặc nhiễm độc. Các enzym này xuất hiện trong máu sớm trước khi có triệu chứng lâm sàng và hết muộn sau khi triệu chứng đã hết. ALAT chỉ có trong bào tương tế bào gan còn ASAT chủ yếu nằm trong các ti thể và một số cơ quan khác như tim, phổi. Vì vậy, khi tổn thương ở mức độ tế bào (chưa làm ảnh hưởng tới màng ti thể) thì chủ yếu là ALAT và một phần nhỏ ASAT được giải phóng vào máu. Do vậy, để đánh giá mức độ tổn thương gan ở giai đoạn đầu thì việc đánh giá hoạt độ ALAT là chính xác và đặc hiệu hơn.

Mức độ tổn thương gan do PAR gây ra tùy thuộc vào liều lượng và đường dùng. Khi dùng liều PAR càng cao thì mức độ tổn thương gan càng nặng, có thể dẫn tới tử vong. Hiện nay, trên thị trường PAR được dùng chủ yếu theo đường uống. Luận án đã tiến hành thăm dò liều gây độc PAR trên chuột nhắt trắng theo đường uống với mức liều 500mg/kg, xuất hiện tỷ lệ 20% chuột chết. Do đó trong mô hình nghiên cứu này, lựa chọn gây độc trên chuột nhắt trắng bằng PAR theo đường uống với mức liều 400mg/kg để quan sát được tổn thương gan ở mức độ vừa phải, chuột không chết sau khi gây độc.

Silymarin được lựa chọn là thuốc đối chứng dương. Silymarin được dùng trong nhiều nghiên cứu, là một thuốc có nguồn gốc từ thực vật và đã được chứng minh có tác dụng bảo vệ và phục hồi tổn thương gan theo cơ chế: tăng tạo các cyt- P450 trong lưới nội bào (có vai trò quan trọng trong cơ chế khử độc gan); có tác dụng ổn định tế bào, ngăn cản quá trình xâm nhập của các chất độc vào

bên trong tế bào gan, giúp cho tế bào không bị các chất độc xâm nhập và hủy hoại, do đó nó làm bền vững màng tế bào, duy trì được cấu trúc, chức năng của tế bào; có tác dụng ức chế sự biến đổi của gan thành các tổ chức xơ, giảm sự hình thành và lắng đọng của các sợi collagen dẫn đến xơ gan; có tác dụng bảo vệ tế bào gan, tăng cường chức năng gan và kích thích sự phát triển của các tế bào gan đã bị hủy hoại cũng như có tác dụng chống peroxyd hóa lipid, chống viêm, từ đó cải thiện các dấu hiệu cũng như triệu chứng bệnh gan, làm giảm nồng độ các enzym trong máu.

4.3.5.2. Lựa chọn đường dùng và liều dùng thuốc

Lá cây Gạo được người dân địa phương sử dụng cho bệnh nhân viêm gan dưới dạng nước sắc với mức liều thường dùng là 15-30 gam dược liệu khô/ ngày cho người lớn (dùng 15-30g vỏ thân sắc, lấy nước uống) tương đương 0,3-0,6 g/kg thể trọng/ngày (tính trung bình người lớn nặng 50kg) [14]. Mẫu thử trong nghiên cứu được bào chế dưới dạng cao nước (4:1), tiến hành ngoại suy liều có hiệu quả tương đương giữa người và động vật thí nghiệm để tính liều dùng ở chuột nhắt trắng là 3,6-7,2 g/kg (theo hệ số 12). Trong nghiên cứu đánh giá tác dụng giảm đau này, chúng tôi tiến hành thử trên 2 mức liều là 6g dược liệu/kg chuột và 12g dược liệu/kg chuột.

4.3.5.3. Tác dụng của cao nước lá cây Gạo (LG) đối với gan chuột bị gây độc bởi paracetamol

Chuột uống cao nước lá *Bombax malabaricum* DC. 8 ngày trước khi gây độc bằng paracetamol (PAR), kết quả cho thấy LG ở cả 2 liều 6g/kg và 12g/kg có tác dụng làm giảm rõ rệt hàm lượng ASAT, ALAT ($p < 0,001$) trong huyết thanh và MDA trong dịch đồng thể gan ($p < 0,05$); mức độ làm hạn chế sự tăng hoạt độ ASAT và ALAT ở cả hai mức liều đều mạnh hơn so với silymarin liều 70mg/kg ($p < 0,01$). Và LG với liều 12g/kg có tác dụng tốt hơn liều 6g/kg, tuy nhiên sự khác biệt là không lớn. LG liều 12g/kg và 6g/kg tương ứng làm giảm 69% và 67% hàm lượng ASAT, 70% và 66% hàm lượng ALAT, 32% và 27% hàm lượng MDA. Trên hình ảnh mô bệnh học, trong các lô uống silymarin và lô uống cao nước lá *Bombax malabaricum* DC., về mặt đại thể gan chuột biểu hiện

tổn thương gan giảm so với lô chứng bệnh lý (ít xung huyết hơn, hầu như không có tổn thương); về mặt vi thể gan chuột biểu hiện tổn thương mẫu bệnh phẩm giảm đáng kể so với lô chứng bệnh lý (chỉ có 1/3 mẫu bệnh phẩm có thoái hóa và hoại tử ở mức độ nhẹ và vừa). Tuy nhiên, xét ảnh hưởng của LG lên sự thay đổi mô bệnh học gan chuột thì LG liều 6g/kg lại có tác dụng phục hồi tế bào gan tốt hơn liều 12g/kg, về đại thể, gan ít xung huyết hơn, về vi thể, số mẫu bệnh phẩm gan thoái hóa ít hơn.

Thông thường, khi tăng liều, tác dụng của thuốc sẽ tăng lên và khi quá liều tác dụng của thuốc không tăng mà tăng độc tính. Có thể thấy, khi tăng liều từ 6g/kg lên 12g/kg, tác dụng không tăng nhưng đã thấy xuất hiện tác dụng gây độc. Điều này cũng đã phù hợp với một số kết quả nghiên cứu của các tác giả trên thế giới về tác dụng của các bộ phận cây Gạo khi thay đổi liều dùng. Theo Sampath và cộng sự đã tiến hành nghiên cứu tác dụng chống oxy hóa của cây Gạo bằng phương pháp ổn định màng tế bào hồng cầu cừu gây ra bởi giải pháp nhược trương [171]. Tính phần trăm (%) ức chế lipid peroxidation. Kết quả cho thấy phân đoạn ethyl acetat có thể hiện khả năng chống oxy hóa ở liều thấp, càng ở liều cao, phần trăm (%) ức chế càng thấp và phần trăm (%) giải phóng càng cao gây phá hủy tế bào [5]. Mặt khác, kết quả nghiên cứu hóa thực vật cho thấy trong lá cây Gạo có chứa saponin có đặc tính làm tăng tính thấm thành mạch, do đó ở liều 12g dược liệu/kg chuột, sự tăng tính thấm thành mạch đã bắt đầu gây sự giải phóng các chất độc cho tế bào gan, gây xung huyết và thoái hóa nhẹ.

Như vậy, cao nước lá cây Gạo được dùng để bảo vệ gan trước hoặc sau khi bị tổn thương. Tác dụng bảo vệ gan có thể được giải thích là do có các chất polyphenol chiết xuất, phân lập được từ lá (mangiferin) có tác dụng chống oxy hóa, có tác dụng giảm NAPQI, làm giảm nguy cơ gây độc tế bào gan và có khả năng ức chế CYP_{2E1} trong hệ thống Cyt-P₄₅₀ ở gan dẫn đến giảm nồng độ NAPQI trong huyết thanh, làm giảm tổn thương gan. Nghiên cứu này đã phần nào chứng minh được kinh nghiệm sử dụng lá cây Gạo làm thuốc bảo vệ gan, bổ gan trong dân gian.

KẾT LUẬN VÀ KIẾN NGHỊ

KẾT LUẬN

1. Về đặc điểm thực vật của loài *Bombax malabaricum* DC.

- Đã mô tả chi tiết đặc điểm thực vật của loài nghiên cứu và xác định tên khoa học của cây Gạo thu hái tại Hương Sơn, Mỹ Đức, Hà Nội để nghiên cứu là *Bombax malabaricum* DC., họ Gạo (Bombacaceae).

- Đã xác định đặc điểm vi phẫu lá, thân và đặc điểm bột lá, hoa và vỏ thân của loài nghiên cứu, góp phần tiêu chuẩn hóa dược liệu.

2. Về thành phần hóa học của loài *Bombax malabaricum* DC.

- Đã xác định các nhóm chất có trong vỏ thân loài *Bombax malabaricum* DC. gồm: glycosid tim, alkaloid, saponin, flavonoid, coumarin, tanin, acid hữu cơ, đường khử, sterol. Trong lá và hoa gồm có: glycosid tim, alkaloid, saponin, flavonoid, coumarin, tanin, acid hữu cơ, đường khử, sterol, acid amin và caroten.

- Từ vỏ thân loài *Bombax malabaricum* DC. đã phân lập được 8 hợp chất là lupeol, friedelin, catechin, epicatechin, momorcerebrosid 1, daucosterol, stigmasterol và diethylhexyl adipat. Phân lập được 7 hợp chất từ lá là: daucosterol, stigmasterol, mangiferin, lupeol, taraxeryl acetat, taraxerol và 7α -hydroxysitosterol.

- Trong số các hợp chất phân lập được có 2 hợp chất lần đầu tiên phân lập được từ họ Gạo (Bombacaceae): momor cerebroside I, 7α -hydroxysitosterol và 3 hợp chất lần đầu tiên được phân lập từ chi *Bombax* L.: friedelin, epicatechin, catechin. 3 hợp chất cùng phân lập được từ vỏ thân và lá gồm: lupeol, daucosterol và stigmasterol.

- Đã xây dựng được phương pháp cho phép định lượng đồng thời một số hợp chất dạng tinh thể đã phân lập được từ các bộ phận của cây Gạo bằng sắc ký lỏng hiệu năng cao với cột pha đảo Zorbax C18, bước sóng phát hiện 280nm, sử dụng chế độ gradient dung môi acetonitril và methanol.

- Phương pháp xây dựng đều đạt các yêu cầu của thẩm định nên có thể áp dụng vào định lượng chất có trong vỏ thân và lá cây Gạo. Đây là một trong những nghiên cứu tiên phong trong hiện đại hóa việc tiêu chuẩn hóa dược liệu.

- Đã sơ bộ xác định giá trị hàm lượng của 6 hợp chất trong 100g một mẫu vỏ thân khô của cây Gạo là: epicatechin là 12,3mg; catechin là 6,7mg; daucosterol là 1,8mg; lupeol là 9,5mg; stigmasterol là 1,9mg và friedelin là 7,6mg và hàm lượng của 7 hợp chất trong 100g một mẫu lá Gạo khô là: mangiferin là 8,1mg, daucosterol là 1,1mg, 7 α -hydroxysitosterol là 0,9mg, lupeol là 5,7mg, taraxeryl acetat là 4,1mg, stigmasterol là 0,9mg và taraxerol là 5,1mg.

3. Về tác dụng sinh học của loài *Bombax malabaricum* DC.

- Ở các mức liều thử 100 – 300g dược liệu/kg cân nặng chuột nhắt trắng, với cao nước vỏ thân và lá Gạo không gây chết chuột ở tất cả các lô thử nghiệm.

- Ở mức liều dưới 220g dược liệu/kg cân nặng chuột nhắt trắng, với cao nước hoa Gạo không thấy chuột chết. Từ liều trên 220g/kg, bắt đầu xuất hiện chuột chết. Xác định được LD₅₀ đối với hoa Gạo là 500,71 g/kg.

- Cao nước vỏ thân và căn phân đoạn ethyl acetat chiết xuất từ vỏ thân cây Gạo với các liều 6g và 12g dược liệu/kg chuột nhắt trắng thể hiện tác dụng giảm đau ngoại vi, không có tác dụng giảm đau trung ương.

- Căn phân đoạn ethyl acetat chiết xuất từ vỏ thân cây Gạo liều 8g dược liệu/kg cân nặng chuột cống trắng có tác dụng chống viêm cấp.

- Cao nước vỏ thân và căn phân đoạn ethyl acetat chiết xuất từ vỏ thân cây Gạo với liều 12g dược liệu/kg chuột nhắt trắng có tác dụng chống viêm mạn tính.

- Cao nước vỏ thân cây Gạo với liều 12g dược liệu/kg chuột nhắt trắng có tác dụng cầm máu.

- Cao nước lá cây Gạo ở cả hai liều 6g và 12g dược liệu/kg chuột nhắt trắng có tác dụng bảo vệ gan thông qua tác dụng làm giảm hoạt độ ASAT, ALAT; hạn

chế được gây tổn thương cả cấu trúc đại thể và vi thể gan do paracetamol gây ra với liều 400mg/kg cân nặng chuột nhất trắng.

- Cao nước lá cây Gạo ở cả hai liều 6g và 12g được liều/kg chuột nhất trắng có tác dụng làm giảm trọng lượng gan và tác dụng chống oxy hóa thông qua làm giảm nồng độ MDA của dịch đồng thể gan ($p < 0,05$).

KIẾN NGHỊ

- Tiếp tục triển khai nghiên cứu, phân lập các hợp chất từ hoa và rễ của loài *B. malabaricum* DC.

- Tiếp tục nghiên cứu hợp chất BBV8 phân lập từ vỏ thân cây Gạo bằng các phương pháp thích hợp để khẳng định sự có mặt của BBV8 trong cây.

- Dựa trên kết quả đã nghiên cứu về thành phần hóa học, cần tiếp tục nghiên cứu loài này về khả năng chống oxy hóa từ các chất phân lập được, khả năng chống ung thư và là cơ sở cho việc tìm ra thuốc điều trị ung thư trong tương lai.

- Do thời gian có hạn, chúng tôi mới chỉ phân tích trên 1 mẫu vỏ thân cây Gạo và 1 mẫu lá cây Gạo nên chưa có tính đại diện cao. Do đó cần mở rộng nghiên cứu, xác định hàm lượng hoạt chất trong vỏ thân và lá cây Gạo khác tại các vùng khác nhau và các mùa khác nhau ở Việt Nam để có số liệu chính xác về hàm lượng các hợp chất có trong các bộ phận của cây Gạo.

CÁC CÔNG TRÌNH ĐÃ CÔNG BỐ LIÊN QUAN ĐẾN LUẬN ÁN TIỀN SĨ ĐƯỢC HỌC

1. Hồ Thị Thanh Huyền, Thái Nguyễn Hùng Thu, Nguyễn Thái An, Phan Văn Kiệm (2011), “Phân lập và nhận dạng epicatechin từ vỏ thân cây Gạo (*Bombax malabaricum* DC.)”, *Tạp chí Dược học*, 6(422), tr. 19-20.
2. Hồ Thị Thanh Huyền, Nguyễn Thái An, Thái Nguyễn Hùng Thu, Phạm Thị Vân Anh, Nguyễn Trọng Thông (2011), “Nghiên cứu tác dụng bảo vệ gan và chống oxy hóa của cao lỏng cây Gạo (*Bombax malabaricum* D. C)”, *Tạp chí Dược học*, 11(427), tr. 23-26.
3. Hồ Thị Thanh Huyền, Thái Nguyễn Hùng Thu, Nguyễn Thái An, Nguyễn Trọng Thông, Phạm Thị Vân Anh (2011), “Study on biological activity of *Bombax malabaricum* DC., Bombacaceae”, Proceeding Pharma Indochina VII, 10/2011, The 7th Indochina Conference on Pharmaceutical Science, Bangkok Thai Lan, p. 36-39.
4. Hồ Thị Thanh Huyền, Thái Nguyễn Hùng Thu, Nguyễn Thái An (2011), “Some results of plan microscopic studies and chemical composition of *Bombax malabaricum* DC., Bombacaceae”, Proceeding Pharma Indochina VII, 10/2011, The 7th Indochina Conference on Pharmaceutical Science, Bangkok Thai Lan, p. 270-274.
5. Hồ Thị Thanh Huyền, Thái Nguyễn Hùng Thu, Nguyễn Thái An (2012), “Phân lập catechin và momor-cerebroside I từ vỏ thân cây Gạo (*Bombax malabaricum* DC.)”, *Tạp chí Dược học*, 12(440), tr. 49-52.
6. Hồ Thị Thanh Huyền, Thái Nguyễn Hùng Thu, Nguyễn Thái An (2013), “Phân lập lupeol và stigmasterol từ vỏ thân cây Gạo (*Bombax malabaricum* DC.)”, *Tạp chí Dược học*, 3(443), tr. 14-17.

7. Hồ Thị Thanh Huyền, Thái Nguyễn Hùng Thu, Nguyễn Thái An (2013), “Kết quả phân lập và nhận dạng taraxeryl acetat, taraxerol và 7 α -hydroxy sitosterol từ lá cây Gạo (*Bombax malabaricum* DC.)”, *Tạp chí Dược học*, 4(444), tr. 28-33.
8. Hồ Thị Thanh Huyền, Nguyễn Thái An, Thái Nguyễn Hùng Thu (2013), “Đặc điểm hình thái và cấu tạo giải phẫu các bộ phận của cây Gạo thu hái tại Hà Nội”, *Tạp chí Dược liệu*, 2(18), tr. 108-112.
9. Phạm Lê Minh, Hồ Thị Thanh Huyền, Nguyễn Thái An, Thái Nguyễn Hùng Thu (2013), “Nghiên cứu xây dựng phương pháp xác định hàm lượng một số hợp chất có trong vỏ thân cây gạo (*Bombax malabaricum* DC.)”, *Tạp chí Dược học*, 07(447), tr. 48-52.
10. Phạm Lê Minh, Hồ Thị Thanh Huyền, Nguyễn Thái An, Thái Nguyễn Hùng Thu (2013), “Nghiên cứu xây dựng phương pháp xác định hàm lượng một số hợp chất có trong lá cây gạo (*Bombax malabaricum* DC.)”, *Tạp chí Dược học*, 12(452), tr. 10-14.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

TIẾNG VIỆT

1. Trần Tử An (2007), *Hóa phân tích, tập 1-2*, NXB Y học, Hà Nội, tr. 35-52.
2. Trần Tử An (2007), *Kiểm nghiệm dược phẩm*, NXB Y học, Hà Nội, tr. 123-166.
3. Nguyễn Đạt Anh và cs (2012), *Các xét nghiệm thường quy*, NXB Y học, Hà Nội.
4. Phạm Vân Anh, Nguyễn Trọng Thông, Phan Thiệu Ngọc và cs (2007), “Nghiên cứu tác dụng chống oxy hóa của cao quả nhàu trên hai mô hình gây tổn thương gan chuột nhắt trắng bằng carbon tetrachlorua và paracetamol”, *Tạp chí Dược học*, 4, tr. 22-25.
5. Nguyễn Tiến Bân (1997), *Cẩm nang tra cứu và nhận biết các họ thực vật hạt kín ở Việt Nam*, NXB Nông nghiệp, tr. 30.
6. Nguyễn Tiến Bân (2003), *Danh lục các loài thực vật Việt Nam*, NXB Nông nghiệp, tập 2, tr. 554-556.
7. Lê Đình Bích, Trần Văn Ôn (2007), *Thực vật học*, NXB Y học, tr.256-259.
8. Võ Văn Chi (1997), *Từ điển cây thuốc Việt Nam*, NXB Y học, tr.508-509.
9. Võ Văn Chi (1999), *Cây cỏ có ích ở Việt Nam*, NXB Giáo dục, tập 1, tr. 635.
10. Nguyễn Thượng Dong (2006), *Nghiên cứu thuốc từ thảo dược*, NXB Khoa học và kỹ thuật.
11. Nguyễn Thượng Dong (2008), *Kỹ thuật chiết xuất dược liệu*, NXB Khoa học và kỹ thuật.
12. Đỗ Trung Đàm (1996), *Phương pháp xác định độc tính cấp của thuốc*, NXB Y học, Hà Nội.

13. Đỗ Trung Đàm (2001), “Phương pháp ngoại suy liều có hiệu quả tương đương giữa người và động vật thí nghiệm”, *Tạp chí Dược học*, 2, tr. 7-9.
14. Nguyễn Văn Đàn (2005), *Cây hoa chữa bệnh*, NXB Y học, tr. 37-40.
15. Nguyễn Văn Đàn, Nguyễn Viết Tựu (1985), *Phương pháp nghiên cứu hóa học cây thuốc*, NXB Y học Hà Nội.
16. Phạm Hữu Hiền, Lê Thị Anh Đào (2004), "Chiết tách lupeol từ lá me rừng", *Tạp chí hóa học và ứng dụng*, số 10, 20-22.
17. Phạm Hoàng Hộ (1999), *Cây cỏ Việt Nam* (quyển 1), NXB Trẻ, tr.514.
18. Văn Đình Hoa và cs (2011), *Sinh lý bệnh và miễn dịch*, NXB Y học, Hà Nội.
19. Trần Hợp, Nguyễn Bội Quỳnh (1993), *Cây gỗ kinh tế ở Việt nam*, NXB Nông nghiệp, tr. 78.
20. Hoàng Thị Kim Huyền (2006), *Dược lâm sàng*, NXB Y học, Hà Nội, tr. 49-50.
21. Tôn Nữ Liên Hương (2011), “Nghiên cứu thành phần hóa học của cây cỏ xước (*Achyranthes aspera* L.) ở Trà Vinh”, *Tạp chí khoa học*, Trường Đại học Cần Thơ, tr. 56-61.
22. Phạm Thanh Kỳ (2007), *Dược liệu học, tập 2*, NXB Y học, Hà Nội.
23. Đỗ Tất Lợi (2004), *Những cây thuốc và vị thuốc Việt Nam*, NXB Y học, Hà Nội, tr. 545-546.
24. Chu Văn Mẫn (2009), *Giáo trình thống kê sinh học*, NXB Khoa học và Kỹ thuật Hà Nội.
25. Đào Văn Phan (2000), “Silymarin (Legalon)-Đặc điểm dược lý và các ứng dụng trong lâm sàng”, *Hội thảo khoa học Legalon và ứng dụng*, Hà nội 11/2000, tr. 12-15.
26. Đào Văn Phan, Nguyễn Trọng Thông, Nguyễn Trần Giáng Hương (2012), *Dược lý học lâm sàng*, NXB Y học, Hà Nội.
27. Phan Thị Phi Phi (2007), *Một số vấn đề y sinh học cập nhật cho bác sỹ*, NXB Y học.

28. Ngô Văn Thu, Trần Hùng (2011), *Dược liệu học, tập 1*, NXB Y học, Hà Nội.
29. Nguyễn Bá Tĩnh (2007), *Tuệ Tĩnh toàn tập*, NXB Y học, tr.30.
30. Mai Tất Tố (2009), *Dược lý học tập 1*, NXB Y học.
31. Viện Dược liệu (2004), *Cây thuốc và động vật làm thuốc ở Việt Nam*, tập 1, NXB Khoa học và kỹ thuật, tr. 852-853.
32. Viện Dược liệu (2009), *Cây thuốc Nghệ An*, NXB Sở Thông tin và truyền thông Nghệ An, tr. 354-355.
33. Viện Dược liệu (2006), *Phương pháp nghiên cứu tác dụng dược lý của thuốc từ thảo dược*, NXB Khoa học và kỹ thuật.

TIẾNG ANH

34. A.A. Oyagbemi and A.A. Odetalo (2010), "Hepatoprotective Effects of Ethanolic Extract of *Cnidioscolus aconitifolius* on Paracetamol Induced Hepatic Damage in Rats", *Pakistan Journal of Biological Sciences*, 13, p. 164-169.
35. Agnivesha-Charak-Dridhabala (2002), *Charak Samhita Sidhithana*, p. 967.
36. Agung Endro Nugroho et al (2011), "Effects of Friedelin from *Eugenia chlorantha* Duthie on Physiological Receptors-operated Guinea-Pig Trachea Contraction", *Journal of Pharmaceutical Research & Clinical Practice*, 1(2), p.71-78.
37. Antonisamy P et al (2011), "Anti-inflammatory, analgesic and antipyretic effects of friedelin isolated from *Azima tetracantha* Lam. in mouse and rat models", *J Pharm Pharmacol*, 63(8), p. 1070-1077.
38. Angiosperm Phylogeny Group-APG I. (1998), "An ordinal classification for the families of flowering plants", *Annals of the Missouri Botanical Garden*, 85, p. 531-543.

39. Angiosperm Phylogeny Group-APG II. (2003), "An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants", *Botanical Journal of the Linnean Society*, 141, p. 399-436.
40. Angiosperm Phylogeny Group-APG III. (2009), "An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants", *Botanical Journal of the Linnean Society*, 161, p. 105-121.
41. Aratanechemuge Y, Hibasami H, Sanpin K, Katsuzaki H, Imai K, Komiya T (2004), "Induction of apoptosis by lupeol isolated from mokumen (*Gossampinus malabarica* L. Merr) in human promyelotic leukemia HL-60 cells", *Oncol Rep*, 11(2), p. 289–292.
42. Audu-Peter JD, Vandi JK, Wuniah (2009), "Evaluation of some physicochemical properties of *Bombax gum*", *J Pharm Bioresources*, 6(2), p. 38–42.
43. Bachulkar M (2010), "Note on a tree of *Bombax ceiba* L. with red and yellow flowers", *Phytotaxonomy*, 10, p. 143–146.
44. Badhe PD, Pandey VK (1990), "A study of medicinal and economic plants of *Amravati division, Amravati circle, Maharashtra*", *Bull Med Ethnobot Res*, 11, p. 1–3.
45. Bakshi DN, Sensarma P, Pal DC (1999), "A lexicon of medicinal plants in India", *Naya Prakash*, Calcutta, p. 360–365.
46. Baruah P, Sarma GC (1984), "Studies on the medicinal uses of plants by the Boro tribals of Assam.II", *J Econ Tax Bot*, 11, p. 71–76.
47. Behera SK, Panda A, Bhera SK, Misra MK (2006), "Medicinal plants used by the Kandhas of Kandhamal district of Orissa", *Indian J Trad Knowl*, 5(4), p. 519–528.
48. Berges RR. et al (1995), "Randomised, placebo-controlled, double-blind clinical trial of beta-sitosterol in patients with benign prostatic hyperplasia", *The Lancet*, 345 (8964), p.1529-1532.

49. BGO Plant Database, *The Botanical Garden Organization*, Ministry of Environment and Natural Resources, Thailand.
50. Bhargava C, Thakur M, Yadav SK (2011), "Effect of *Bombax ceiba* L. on spermatogenesis, sexual behaviour and erectile function in male rats", *Andrologia*, 44, p. 474-478.
51. Bhuyan DK (1994), "Herbal drugs used by the tribal people of Lohit district of Arunachal Pradesh for abortion and easy delivery-A report", *Adv Plant Sci*, 7, p. 197–202.
52. Bhushan Gandhare, Nikhil Soni Hemant J. Dhongade, (2010), "Invitro antioxidant activity of *Bombax ceiba*", *IJBR*, 1(2), p. 31-36.
53. Blanco (1875), M., *Flora de Filipinas*, p.226.
54. Bohannon MB, Kleiman R. (1978), "Cyclopropene fatty acids of selected seed oils from Bombacaceae, Malvaceae, and Sterculiaceae", *Lipids*, 13, p. 270–273.
55. Borthakur SK, Sarma VK (1996), "Ethno-veterinary medicine with special reference to cattle prevalent among the Nepalis of Assam, India", *Ethnobiology in human welfare*, Deep Publications, New Delhi.
56. Bose S, Dutta AS (1963), "Structure of *Salmaalial malabarica* gum", *J Indian Chem Soc*, 40, p. 257–262.
57. Buckingham.J (1992), *Dictionary of Natutal Products*, London, Champan and Hall Scientific, p. 3698.
58. Caius F (2003), "The medicinal and poisonous plants of India", *Scientific Publishers*.
59. Campaner dos Santos, L. and Vilegas, W. (2001), "Preparative separation of the naphthopyranone glycosides by high-speed counter-current chromatography", *Journal of Chromatography A*, 915(1-2), p. 259-263.
60. Cannell (1998), *How to approach the isolation of a natural product*, Natural Products Isolation, Humana Press, New Jersey, p. 1–51.
61. Chandra K (1995), "An ethnobotanical study on some medicinal plants of district Palamau (Bihar)", *Sachitra Ayurved*, 48, p. 311–314.

62. Chauhan JS, Sultan M, Srivastav SK (1980), "Constituents from *Salmalia malabaricum*", *Can J Chem*, 58, p. 328–330.
63. Chelvan PT (1998), "Traditional phytotherapy among the migrant Tamilian settlers in South Gujarat", *Biojournal*, 10, p. 9–14.
64. Chen, X., Yi, C., Yang, X. and Wang, X. (2004), "Liquid chromatography of active principles in *Sophora flavescens* root", *Journal of Chromatography*, 812(1-2), p. 149-163.
65. Chetty KM, Rao KN (1989), "Ethnobotany of Sarakallu and adjacent areas of Chittoor district, Andhra Pradesh", *Vegetos*, 2, p. 51–58.
66. Chien-Chang Shen, Yuan-Shiun Chang and Li-Kang Ho (1993), "Nuclear magnetic resonance studies of 5,7-dihydroxyflavonoids", *Phytochemistry*, 34 (3), p. 843-845.
67. Chiu HF, Lin CC, Yen MH, Wu PS, Yang CY (1992), "The effects of *Bombax malabarica* and *Scutellaria rivularis*", *Am J Chinese Med*, 20(3–4), p. 257–264.
68. Cronquist (1981), *An Integrated System of Flowering Plants*, Columbia University Press, New York, USA.
69. Cronquist (1988), *The Evolution and Classification of Flowering Plants*, New York Botanical Garden.
70. Dahlgren, R.M.T (1983), "General aspects of angiosperm evolution and macrosystematics", *Nordic Journal of Botany*, 3, p. 119-149.
71. Dar A, Faizi S, Naqvi S, Roome T, Zikr-ur-Rehman S, Ali M, Firdous S, Moin ST (2005), "Analgesic and antioxidant activity of mangiferin and its derivatives: the structure activity relationship", *Biol Pharm Bull*, 28(4), p. 596–600.
72. Darong K., Juraithip W., Wanchai D. (2009), "Biosynthesis of β -sitosterol and stigmasterol proceeds exclusively via the mevalonate pathway in cell suspension culture of *Croton stellatopilosus*", *Tetrahedron Letters*, 49, p. 4067-4072.
73. Das S, Ghosal PK, Ray B. (1990), "Structural studies of a polysaccharide

from the seeds of *Salmaaliala malabarica*”, *Carbohydr Res*, 207, p. 336–340.

74. David R. Lide (2007), *CRC Handbook of Chemistry and Physics*, CRC Press, Taylor & Francis, Boca Raton.
75. De-Hong Y., Yong-Ming B., Chao-Liang W., and Li-Jia A (2005), “Studies of chemical constituents and their antioxidant activities from *Astragalus mongholicus Bunge*”, *Biochemical and Environmental Sciences*, 18, p. 297-301.
76. Debarupa D. Chakraborty, Prithviraj Chakraborty (2010), “Phyto-pharmacology of *Bombax ceiba* Linn: A Review”, *Journal of Pharmacy Research*, 3(12), p. 2821.
77. Dhar DN, Munjal RC (1976), “Chemical examination of the seeds of *Bombax malabaricum*”, *Planta Med*, 29, p. 148–150.
78. Emdad Hossain, Subhash C Mandal and JK Gupta (2011), “Phytochemical screening and in-vivo antipyretic activity of the methanol leaf-extract of *Bombax malabaricum* DC. (Bombacaceae)”, *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*, 10(1), p. 55-56.
79. El-Hagrassi AM, Ali MM, Osman AF, Shaaban M (2011), “Phytochemical investigation and biological studies of *Bombax malabaricum* flowers”, *Nat Prod Res*, 25(2), p. 141–151.
80. Faizi S, Ali M (1999), “Shamimin: a new flavonol C-glycoside from leaves of *Bombax ceiba*”. *Planta Med*, 65(4), p. 383–385.
81. GB Jadhav et al (2009), “Analgesic effect of silymarin in experimental induced pain in animal models”, *Journal of Pharmacy Research* 2009, 2(8), p. 1276-1278.
82. Ghose TP (1935), “*Bombax malabaricum*”, *Indian Forester*, 61, p. 93–103.
83. Ghosh S, Sensarma P (1997), “Ethnomedicine to modern medicine: An observational study in some villages of West Bengal”, *Ethnobotany*, 9, p. 80–84.

84. Girach RD (1995), "Ethnomedicinal uses of plants among the tribals of Singhbhum district, Bihar, India", *Ethnobotany*, 7, p. 103–107.
85. Gopal H, Gupta RK (1972), "Chemical constituents of *Salmalia malabarica* Schott & Endl.Flowers", *J Pharma Sci*, 61, p. 807–808.
86. Griffiths AD, Phillips A, Godjuwa C (2003), "Harvest of *Bombax ceiba* for the aboriginal arts industry, Central Arnhem Land, Australia", *Biol Cons*, 113(2), p. 295–305.
87. Guerriero A. et al (1993), "Pteridines, sterols, and indole derivatives from the lithistid sponge *Corallistes undulatus* of the coral sea", *Journal of Natural Products*, 56 (11), p. 1962 – 1970.
88. Guiley R (2006), "The encyclopedia of magic and alchemy", *Infobase Publishing*, New York.
89. Han, Q. B., Song, J. Z., Qiao, C. F., Wong, L. and Xu, H. X. (2006), "Preparative separation of gambogic acid and its C-2 epimer using recycling high-speed counter-current chromatography", *Journal of Chromatography*, 1127(1-2), p. 298-301.
90. Hans Gerhard Vogel (2008), *Drug discovery and evaluation: pharmacological assays*, Springer Verlag Berlin, p. 1009-1010, 1013, 1028, 1103-1105, 2023-2028.
91. Hassan Ali, Nafisa, (2003), "An investigation of antimicrobial compounds for immunomodulating and anti-adhesion properties", *Pakistan Research Repository*, p. 121.
92. Hibasami H, Saitoh K, Katsuzaki H, Imai K, Aratanechemuge Y, Komiya T (2004), "2-O-methylisohemigossylic acid lactone, a sesquiterpene, isolated from roots of mokumen (*Gossampinus malabarica*) induces cell death and morphological change indicative of apoptotic chromatin condensation in human promyelotic leukemia HL-60 cells", *Int J Mol Med*, 14(6), p.1029–1033.
93. Hisham A. et al (1995), "Salacianone and salacianol, Two triterpenes from *Salacia beddomei*", *Phytochemistry*, 40(4), 1227-1231.

94. Hossain E, Chandra G, Nandy AP, Mandal SC, Gupta JK (2011), "Anthelmintic effect of a methanol extract of *Bombax malabaricum* leaves on *Paramphistomum explanatum*", *Parasitol Res*, 110(3), p. 1097-1102.
95. Hossain E, Rawani A, Chandra G, Mandal SC, Gupta JK (2011), "Larvicidal activity of *Dregea volubilis* and *Bombax malabaricum* leaf extracts against the filarial vector *Culex quinque-fasciatus*", *Asian Pac J Trop Med*, 4(6), p. 436–441.
96. Islam MK, Chowdhury JA, Eti IZ (2011), "Biological activity study on a Malvaceae plant: *Bombax ceiba*", *J Sci Res*, 3(2), p. 445–450.
97. Jagtap AG, Niphadkar PV, Phadke AS (2011), "Protective effect of aqueous extract of *Bombax malabaricum* DC. on experimental models of inflammatory bowel disease in rats and mice", *Indian J Exp Biol*, 49(5), p. 343–351.
98. Jain A, Katewa SS, Chaudhary BL, Galav P (2004), "Folk herbal medicines used in birth control and sexual diseases by tribals of Southern Rajasthan, India", *J Ethnopharmacol*, 90, p. 171–177.
99. Jain DL, Baheti AM, Jain SR, Khandelwal KR (2010), "Use of medicinal plants among tribes of Satpuda region of Dhule and Jalgaon districts of Maharashtra—an ethnobotanical survey", *Indian J Trad Knowl*, 9(1), p. 152–157.
100. Jain SK (1991), *Dictionary of Indian folk medicine and ethnobotany*. Deep Publications, New Delhi.
101. Jain SP (1989), "Tribal remedies from Saranda forest, Bihar, India –I", *Int J Crude Drug Res*, 27, p. 29–32.
102. Jain V (2011), "Journey of Semal research and conservation", *Bomrim*, 3(1), p. 2–3.
103. Jain V, Katewa SS, Verma SK (2011), "In vitro antimicrobial activity of roots of *Bombax ceiba*—An ethnomedicinal plant", *Proceedings of*

international conference on folk and herbal medicine, Scientific Publishers.

104. Jain V, Verma SK (2008), "Conservation of silk cotton tree", *Prout*, 19(8), p. 22–23.
105. Jain V, Verma SK, Katewa SS (2007), "A dogmatic tradition posing threat to *Bombax ceiba*—the Indian Red Kapok tree", *Medicinal Plant Conserv*, 13, p. 12–15.
106. Jain V, Verma SK, Katewa SS (2009), "Myths, traditions and fate of multipurpose *Bombax ceiba* L.—an appraisal", *Indian J Trad Knowl*, 8(4), p. 638–644.
107. Jain V, Verma SK, Katewa SS, Anandjiwala S, Singh B (2011), "Free radical scavenging property of *Bombax ceiba* root", *Res J Med Plant*, 5(4), p. 462–470.
108. Jain V, Verma SK, (2012), *Pharmacology of Bombax ceiba Linn.*, Springer Briefs in Pharmacology and Toxicology.
109. Jeong Suk et al (2009), "Suppressive Action of *Astragali Radix* (AR) Ethanol Extract and Isolated Astragaloside I on HCl/ethanol-Induced gastric lesions", *Biomolecules & Therapeutics*, 17(1), p. 62-69.
110. James Keeler (2002), *Understanding NMR spectroscopy*, University of Cambridge.
111. Jie-wen Guo et al (2012), "Five chemical constituents of the ethyl acetat fraction from ethanol extract of semen Litchi", *Journal of Medicinal Plants Research*, 6(1), p.168-170.
112. Jing Tang et al (2010), "Antimicrobial activity of sphingolipids isolated from the stems of Cucumber (*Cucumis sativus* L.), *Molecules* 15, p. 9288-9295.
113. Jiyoung Ryu, Ju Sun Kim et al. (2003), "Cerebrosides from *Longan arillus*", *Arch. Pharm. Res.*, 26(2), p. 138-142.
114. John Refaat (2013), "Bombacaceae: A phytochemical review", *Pharmaceutical Biology*, 51(1), p. 100-130.

115. Jue-Hee Lee et al (2007), "Immunoregulatory activity by Daucosterol, a beta-sitosterol glycoside, induces protective Th1 immune response against disseminated candidiasis in mice", *Vaccin*, 25(19), p. 3834-3840.
116. K. Anandarajagopal, J. Anbu Jeba Sunilson, (2011), "Bombax ceiba Linn. bark extracts shows anti-microbial activity", *International Journal of Pharmaceutical Research*, 3(1), p. 24-26.
117. Katewa SS, Jain A (2006), *Traditional folk herbal medicines*, Apex Publishing House.
118. Khan MA, Singh VK (1996), "A folklore survey of some plants of Bhopal district forests, Madhya Pradesh, India, described as antidiabetics", *Fitoterapia*, 67, p. 416–421.
119. Khan VA, Khan AA (2005), "Herbal folklores for male sexual disorders and debilities in Western Uttarpradesh", *Indian J Trad Knowl*, 4(3), p. 317–324.
120. Kong FY, Ng DK, Chan CH et al (2006), "Parental use of the term "Hot Qi" to describe symptoms in their children in Hong Kong: a cross sectional survey "Hot Qi" in children". *J Ethnobiol Ethnomedicine*, 5, p. 2–8.
121. Kulip J (2003), "An ethnobotanical survey of medicinal and other useful plants of Muruts in Sabah Malaysia", *Telopea*, 10(1), p. 81–98.
122. Kuljanabhadgavad T. et al (2009), "Chemical structure and antiviral activity of aerial part from *Lagdera pterodonta*", *J Health Res*, 23(4), p.175-177.
123. Kumar, N., Savitri, and Maheshinie, R. (2005), "Separation of catechin constituents from five tea cultivars using high-speed counter-current chromatography", *Journal of Chromatography*, 1083(1-2), p. 223-228.
124. Kunwar RP, Uprety Y, Burlakoti C, Chowdhary CL, Bussmann RW (2009), "Indigenous use and ethnopharmacology of medicinal plants in far-west Nepal", *Ethnobotany Res Appl*, 7, p. 5–28.

125. Lie-Fen Shyur, Jieh-Hen Tsung, Je-Hsin Chen, Chih-Yang Chiu, and Chiu-Ping Lo (2005), "Antioxidant properties of extracts from medicinal plants popularly used in Taiwan", *International Journal of Applied Science and Engineering*, 3(3), 195-202.
126. Lin CC, Chen SY, Lin JM, Chiu HF (1992), "The pharmacological and pathological studies on Taiwan folk medicine (VIII): The anti-inflammatory and liver protective effects of "Mu-mien", *Am J Chin Med*, 20(2), p. 135–146.
127. Mahato RB, Chaudhary RP (2005), "Ethnomedicinal plants of Palpa district, Nepal", *Ethnobotany*, 17, p. 152–163.
128. Maheshwari JK (2000), *Ethnobotany and medicinal plants of Indian subcontinent*, Deep Publications, New Delhi.
129. Maheshwari JK, Kalakoti BS, Lal B (1986), "Ethnomedicine of Bhil tribe of Jhabua district, Madhya Pradesh", *Anc Sci Life*, 5, p. 255–261.
130. Manishi P, Srinivasa BH, Shivanna MB (2005), "Medicinal plant wealth of local communities in some villages in Shimoga district of Karnataka", *J Ethnopharmacol*, 98, p. 307–312.
131. Mehra PN, Karnik CR (1968), "Pharmacognostic studies on *Bombax ceiba* Linn", *Indian J Pharmacol*, 30, p. 284.
132. Mishra DN, Dixit V, Mishra AK (1991), "Mycotoxic evaluation of some higher plants against ringworm causing fungi", *Indian Drugs*, 28, p. 300–303.
133. Misra MB, Mishra SS, Mishra RK (1968), "Pharmacology of *Bombax malabaricum* DC.", *Indian J Pharmacy*, 30, p. 165.
134. Mitul Patel, Murugananthan, Shivalinge Gowda K,P (2012), "In Vivo Animal Models in Preclinical Evaluation of Anti-Inflammatory Activity- A Review", *International Journal of Pharmaceutical Research & Allied Sciences*, 1(2), p. 1-5.
135. Mohammad Saleem, (2009), "Lupeol, A novel anti-inflammatory and anti-cancer dietary triterpene", *Cancer Lett*, 285(2), p. 109-115.

136. Mochammad Sholichin et al (1980), "¹³C Nuclear magnetic resonance of Lupane-type triterpenes, Lupeol, Betulin and Betulinic acid", *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, 28(3), p. 1006-1008.
137. Moreau R.A. (2002), "Phytosterols, phytostanols, and their conjugates in foods: structural diversity, quantitative analysis, and health-promoting uses", *Prog Lipid Res*, 41(6), p. 457-500.
138. Muhanammad Aliversiani (2004), *Studies in the chemical constituents of Bombax ceiba and Cuscuta reflexa*, Chemistry International Center for Chemical Sciences University of Karachi.
139. Nadankunjidan S, Abirami S (2005), "Comparative study of traditional medical knowledge of Pondicherry and Karaikal regions in union territory of Pondicherry", *Ethnobotany*, 17, p. 112–117.
140. Nam NH, Kim HM, Bae KH, Ahn BZ (2003), "Inhibitory effects of Vietnamese medicinal plants on tube-like formation of human umbilical venous cells", *Phytother Res*, 17(2), p. 107–111.
141. Nguyen-Hai Nam, Nguyen Tien Vung and Tran Cong Khanh, (2003), "*Ceiba pentandra* – a medicinal plant with potential use as antitumor remedy", *J. Materia Medica*, 7(6), p. 186-189.
142. Namhata D, Mukarjee A (1989), "Some common practices of herbal medicines in Bankura district, West Bengal", *Indian J Forestry*, 12, p. 318–321.
143. Negi KS, Tiwari JK, Gaur KD, Pant KC (1993), "Notes on ethnobotany of five districts of Garhwal Himalayas, India", *Ethnobotany*, 5, p. 73–81.
144. Nima D. Namsa et al (2009), "An ethnobotanical study of traditional anti-inflammatory plants used by the lohit community of Arunachal Pradesh, India", *Journal of Ethnopharmacology*, 125(2), p. 234-245.
145. Niranjana GS, Gupta PC (1973), "Anthocyanins from flowers of *Bombax malabaricum*", *Planta Med*, 24(2), p. 196–199.

146. Noreen Y, el-Seedi H, Perera P, Bohlin L. (1998), Two new isoflavones from *Ceiba pentandra* and their effect on cyclooxygenase-catalyzed prostaglandin biosynthesis, *J Nat Prod*, 61, p. 8–12.
147. Ogbobe O et al (1996), “Physicochemical properties of seed and fatty acid composition of *Bombax costatum* seed oil”, *Riv Ital Sostanze Grasse*, 73, p. 271-272.
148. Oudhia, P. (2003), *Interaction with the Herb Collectors of Gandai Region*, Chhatisgarh, MP, India.
149. Pandey BN, Das PKL, Jha AK, Ojha AK, Mishra SK, Yadav S (1998), “Ethnobotanical profile of South Bihar with special reference to East Singhbhum (Jamshedpur)”, *Acta Ecol*, 20, p. 31–38.
150. Patel SS, Verma NK, Rathore B, Nayak G, Singhai AK, Singh P (2011), “Cardioprotective effect of *Bombax ceiba* flowers against acute adriamycin-induced myocardial infarction in rats”, *Rev Bras Farmacogn*, 21, p. 704-709.
151. Pierre (1839), *Flore forestiere de la Cochinchine*, 2, p. 174-175.
152. Pittaya Tuntiwachwuttikul, Yupa Pootaeng - On, Photchana Phansa and Walter Charles Taylor (2004), “Cerebrosides and a Monoacylmonogalac- tosylglycerol from *Clinacanthus nutans*”, *Chem. Pharm. Bull.*, 52 (1), p. 27-32.
153. Puckhaber LS, Stipanovic RD (2001), “Revised structure for a Sesquiterpene lactone from *Bombax malabaricum*”, *J Nat Prod*, 64(2), p. 260–261.
154. Qi Y, Guo S, Xia Z, Xie D (1996), “Chemical constituents of *Gossampinus malabarica* (L.) Merr. (II)”, *Zhongguo Zhong Yao Za Zhi*, 21(4), p. 234–235, 256.
155. Qi YP, Zhu H, Guo SM, Jue HQ, Lin S (2008), “Study on antitumor activity of extract from roots of *Gossampinus malabarica*”, *Zhong Yao Cai*, 31(2), p. 266–268.

156. Rahman AHMM, Anisuzzaman M, Haider SA, Ahmed F, Islam AKM, Naderuzzaman ATM (2008), "Study of medicinal plants in the graveyards of Rajshahi city", *Res J Agric Biol Sci*, 4(1), p. 70–74.
157. Raju AJS, Rao SP, Rangaiah K (2005), "Pollination by bats and birds in the obligate outcrosser *Bombax ceiba* L. (Bombacaceae), a tropical dry season flowering tree species in the Eastern Ghats forests of India", *Ornithological Sci*, 4, p. 81–87.
158. Ravi V, Patel SS, Verma NK, Dutta D, Saleem TSM (2010), "Hepatoprotective activity of *Bombax ceiba* Linn against Isoniazid and Rifampicin-induced toxicity in experimental rats", *Int J Appl Res Nat Prod*, 3(3), p. 19–26.
159. Reddy MVB, Reddy MK, Duvvuru G, Murthy MM, Caux C, Bodo B (2003), "A new Sesquiterpene lactone from *Bombax malabaricum*", *Chem Pharm Bull*, 51(4), p. 458–459.
160. Reddy S, Vatsavaya SR (2000), "Folklore biomedicine for common veterinary diseases in Nalgonda district, Andhra Pradesh, India", *Ethnobotany*, 12, p. 113–117.
161. Rheede tot Drakestein, Hendrik van (1682), *Hortus Indicus Malabaricus*, 3, p. 52.
162. Rehman Z, Rehman A, Ahmad S (2006), "Acute toxicity studies of *Bombax ceiba* flowers in mice and rats", *Pak J Sci Ind Res*, 49(6), p. 410–413.
163. Rizk AM, Al-Nowaihi AS. (1989). *The Phytochemistry of the Horticultural Plants of Qatar*, Oxford, p. 29.
164. Rizvi SAI, Saxena OC (1974), "New glycosides, terpenoids, colouring matters, sugars and fatty compounds from the flowers of *Salmalia malabarica*", *Arzneim-Forsch*, 24(3), p. 285–287.
165. Roxburgh, W. (1819), *Plants of the coast of Coromandel*, 3, p. 247.

166. Sadia, Zikr-UR-Rehman (2009), *Isolation of Bioactive Chemical constituents from Bombax ceiba and Aegle marmelos*, University of Karachi, Karachi, Pakistan.
167. Saghir IA, Awan AA, Majid S, Khan MA, Qureshi SJ, Bano S (2001), "Ethnobotanical studies of Chikar and its allied areas of district Muzaffarabad", *J Biol Sci*, 1(12), p. 1165–1170.
168. Said A, Aboutable EA, Nofal SM, Tokuda H, Raslan M (2011), "Phytoconstituents and bioactivity evaluation of *Bombax ceiba* L. flowers", *J Trad Med*, 28, p. 55–62.
169. Saleem R, Ahmad M, Hussain SA, Qazi AM, Ahmad SI, Qazi MH, Ali M, Faizi S, Akhtar S, Hussain SN (1999), "Hypotensive, hypoglycaemic and toxicological studies on the Flavonol C- glucoside Shamimin from *Bombax ceiba*", *Planta Med*, 65, p. 331–334.
170. Saleem R, Ahmad SI, Ahmad M, Faizi Z, Rehman S, Ali M, Faizi S (2003), "Hypotensive activity and toxicology of constituents from *Bombax ceiba* stem bark", *Biol Pharm Bull*, 26(1), p. 41–46.
171. Sampath kunar (2011), "Evaluation of RBC membrane stabilization and antioxidant activity of *Bombax ceiba* in an in vitro method", *International Journal of Pharma and Bio Sciences*, 2(1), p. 220-226.
172. Samuel AJSJ, Kalusalingam A, Chellappan DK, Gopinath R, Radhamani S, Husain HA, Muruganandham V, Promwichit P (2010), "Ethnomedical survey of plants used by the Orang Asli in Kampung Bawong, Perak, West Malaysia", *J Ethnobiol Ethnomedicine*, 6, p. 5–10.
173. Sankaram AVB, Reddy NS, Shoolery JN (1981), "New sesquiterpenoids of *Bombax malabaricum*", *Phytochemistry*, 20, p. 1877–1881.
174. Sardeshmukh R, Nadkarni K (1993), "Raktarsha and mocharasa yoga-a study", *Deerghayu Int*, 11(2), p. 14.
175. Sarkar PR (1986), *Yaogic treatment and Natural remedies*, 2nd edn. AMPS Publication, Calcutta.

176. Saxena AP, Vyas KM (1981), "Ethnobotanical records on infectious disease from tribals of Banda district (UP)", *J Econ Tax Bot*, 2, p. 191–195.
177. Scogin R. (1986). "Reproductive phytochemistry of Bombacaceae: Floral anthocyanins and nectar constituents", *Aliso*. 11, p. 377–385.
178. Seshadri V, Batta AK, Rangaswami S (1971), "Phenolic components of *Bombax malabaricum* (Root-Bark)", *Curr Sci*, 23, p. 630.
179. Seshadri V, Bhatta AK, Rangaswami S. (1973), "Phenolic compounds of *Bombax malabaricum*, *Indian J Chem*, 11, p. 825–827.
180. Seshadri V, Bhatta AK, Rangaswami S. (1976), "A new crystalline lactone from *Bombax malabaricum*", *Indian J Chem B*, 14, p. 616–617.
181. Shahat AA, Hassan RA, Nazif NM, Van Miert S, Pieters L, Hammuda FM, Vlietinck AJ (2003), "Isolation of mangiferin from *Bombax malabaricum* and structure revision of shamimin", *Planta Med*, 69(11), p. 1068–1070.
182. Shahat AA. (2006), "Procyanidins from *Adansonia digitata*", *Pharm Biol*, 44, p. 445–450.
183. Shetty BV, Singh V (1988), *Flora of India (Series 2)*, Flora of Rajasthan, 1, BSI publications, Calcutta.
184. Shome U, Rawat AKS, Mehrotra S (1996), "Time tested household herbal remedies", *Ethnobiol Human Welf*, New Delhi.
185. Sichaem J et al (2010), "Chemical constituents from the roots of *Bombax anceps*", *J Chil Chem Soc*, 55(3), p. 325-327.
186. SikarwarRLS (1996), *Ethno-veterinary herbalmedicines inMorena district of M.P. India*, *Ethnobiol HumanWelf*, New Delhi.
187. Silja VP, Varma KS, Mohanan KV (2008), "Ethnomedicinal plant knowledge of the Mullu kuruma tribe of Wayanad district Kerala", *Indian J Trad Knowl*, 7(4), p. 604–612.

188. Singh B. et al (2002), "Anti-inflammatory and antimicrobial activities of triterpenoids from *Strobilanthes callosus* nees", *Phytomedicine* , 9(4), p. 355-359.
189. Singh BP, Verma J, Shridhara S, Rai D, Gaur SN, Arora N (2001), "Allergens of *Salmalia malabarica* (Eng. Silk Cotton) tree pollen and seed fibres", *Indian J Allergy Appl Immunol*, 15(1), p. 45–48.
190. Singh KK, Kalakoti BS, Prakash A (1994), "Traditional phytotherapy in the health care of Gond tribals of Sonbhadra district, UttarPradesh, India", *J Bombay Nat Hist Soc*, 91, p. 386–390.
191. Singh V, Pandey RP (1998), "Ethnobotany of Rajasthan", *Scientific Publishers*, Jodhpur, p. 357-358.
192. Sinha M, Shakuntala, Megha (2008), "Clinical evaluation of *Shalmali* (*Salmalia malabarica*) in menorrhagia", *J Res Educ Indian Med*, 14 (3), p. 47–54.
193. Sood RP, Suri KA, Suri OP, Dhar KL, Atal CK (1982), "Sesquiterpene lactone from *Salmalia malabarica*", *Phytochemistry*, 21(8), p. 2125–2126.
194. Sreeramulu K, Rao KV, Venkatarao C, Gunasekar D (2001), "A new naphthoquinone from *Bombax malabaricum*", *J Asian Nat Prod Res*, 3, p. 261–265
195. Surveswaran S, Cai YZ, Corke H, Sun M (2007), "Systematic evaluation of natural phenolic antioxidants from 133 Indian medicinal plants", *Food Chem*, 102, p. 938–953.
196. Takhtajan, A.L. (1997), *Diversity and Classification of Flowering Plants*, Columbia University Press, New York, USA.
197. Thorne, R.F. (1992), *Classification and geography of flowering plants*, Botanical Review, 58, p. 225-348.
198. Trinh Thi Thuy et al (2008), "Triterpenes from the roots of *Codonopsis pilosula*", *Journal of Chemistry*, 46 (4), p. 515-520.

199. Tiwari KC, Majumdar R (1996), “Medicinal plant from upper Assam borders having specific folk uses”, *Sachitra Ayurveda*, 49, p. 207–215.
200. Tiwari KC, Majumdar R, Bhattacharjee S (1982), “Folklore information from Assam for family planning and birth control”, *Int J Crude Drug Res*, 20(3), p. 133–137.
201. Varghese E (1996), “Applied ethnobotany—a case study among the Kharias of Central India”, *Deep Publications*, New Delhi.
202. Vazquez E, Martinez EM, Cogordan JA, Delgado G. (2001), Triterpenes, phenols, and other constituents from the leaves of *Ochroma pyramidale* (Balsa Wood, Bombacaceae), Preferred conformations of 8-C- β -d-glucopyranosyl-apigenin (vitexin), *Rev Soc Quím Méx*, 45, p. 254–258.
203. Vedavathy S, Rao KN, Rajaiah M, Nagaraju N (1991), “Folklore information from Rayalaseema region, Andhra Pradesh for family planning and birth control”. *Int J Pharmacognosy*, 29, p. 113–116.
204. Verma SK, Jain V (2008a), “Silk cotton tree in flames and fumes of tradition”. *Prout*, 19(1), p. 18–19.
205. Verma SK, Jain V, Katewa SS (2006), “Fibrinolysis enhancement by *Bombax ceiba*—a new property of an old plant”, *South Asian J Prev Cardiol*, 10(4), p. 212–219.
206. Verma SK, Jain V, Katewa SS (2006), “Urgent need for conservation of silk cotton tree (*Bombax ceiba*)—a plant of ethno medicinal importance”, *Bull Biol Sci*, 4(1), p. 81–84.
207. Verma SK, Jain V, Katewa SS (2008), “Potential antihyperglycemic activity of *Bombax ceiba* in type 2 diabetes”, *Int J Pharmacol Biol Sci*, 2(1), p. 79–86.
208. Verma SK, Jain V, Katewa SS (2011), “Anabolic effect of *Bombax ceiba* root in idiopathic involuntary weight loss—a case study”, *J Herb Med Toxicol*, 5(1), p. 1–5.

209. Versiani MA. (2004), *Studies in the Chemical Constituents of Bombax ceiba and Cuscuta reflexa*, Research Institute of Chemistry, Karachi University, Pakistan.
210. Venkata Sai et al (2012), "Isolation of Stigmasterol and β -sitosterol from dicloromethane extract of *Rubus suavissimus*", *International Current Pharmaceutical Journal*, p. 239-242.
211. Vieira TO, Said A, Aboutabl E, Azzam M, Creczynski-Pasa TB (2009), "Antioxidant activity of methanolic extract of *Bombax ceiba*", *Redox Rep*, 14(1), p. 41–46.
212. Vijendra Verma et al. (2011), "*Bombax ceiba* Linn: Pharmacognostical, phytochemistry, ethnobotany and pharmacology studies", *International Pharmaceutica Scientia*, 1(1), p. 62-68.
213. Wallich, N., (1830), *Plantae Asiaticae Rariores*, 1, p. 79-80.
214. Wafaa Kamal Taia (2009), "General View of Malvaceae Juss. S.L. and Taxonomic Revision of Genus *Abutilon* Mill. in Saudi Arabia", *Sci.*, 21(2), pp: 349-363.
215. Wafaa M. Said et al. (2013), "Comparative study of three species of Malvatheca (*Bombacoideae* and *Malvoideae* (*Malvaceae sensu lato*) using Morphological, Anatomical and RAPD-PCR analyses", *Advances in Environmental Biology*, 7(2), p. 415-426.
216. Wang H, Zeng Z, Zeng H-P (2003), "Study on chemical constituents of petroleum ether fraction of alcohol extract from the flower of *Bombax malabaricum*", *Chem Ind Forest Products*.
217. Wight, R. (1840), *Illustrations of Indian botany*, 1, p. 29.
218. Winter C.A. (1962), "Carrageenin-induced edema in hind paw of the rat as an assay for anti-inflammatory drugs", *Proc.Soc.Exp. Bio. Med.*, p.531-544.
219. Wu J, Zhang XH, Zhang SW, Xuan LJ (2008), "Three novel compounds from the flowers of *Bombax malabaricum*", *Helvetica Chimica Acta*, 91(1), p. 136–143.

220. Wu Zhengyi, Peter H, Hong Deyuan (2007), *Flora of China*, 12, p. 300-301.
221. Y. Cai. F. J. Evans, M. F. Roberts, J. D. Phillipson, M. H. Zenk, and Y. Y. Gleba (1991), "Polyphenolic compounds from *Croton lechreli*", *Phytochemistry*, 30(6), p. 2033-2040.
222. Yan-Ru Deng (2004), "Chemical components of *Seriphidium santolium* poljak", *Journal of the Chinese Chemical Society*, 51(3), p. 629-636.
223. Yasufumi Shimizu et al. (1995), *Chemical and chemotaxonomical studies of Ferns*. LXXXVII. Constituents of *Trichomanes reniforme*, *Chem. Pharm. Bull.*, 43(3), p. 461-465.
224. Yinggang Luo et al (2004), "Novels ceramides and a new glucoceramide from roots of *Incarvillea arguta*", *Lipids*, 9, p. 907-913.
225. You YJ, Nam NH, Kim HM, Bae KH, Ahn BZ (2003), "Antiangiogenic activity of lupeol from *Bombax ceiba*", *Phytother Res*, 17(4), p. 341–344.
226. Yu YG, He QT, Yuan K, Xiao XL, Li XF, Liu DM, Wu H (2011), "In vitro antioxidant activity of *Bombax malabaricum* flower extracts", *Pharm Biol*, 49(6), p. 569–576.
227. Yuan CW, Tung LH, (2005), "Screening of anti-Helicobacter pylori herbs deriving from Taiwanese folk medicinal plants", *FEMS Immunology and Medical Microbiology*, 43, p. 295-300.
228. Zhang X, Zhu H, Zhang S, Yu Q, Xuan L (2007), "Sesquiterpenoids from *Bombax malabaricum*", *J Nat Prod*, 70, p. 1526–1528.

DANH MỤC CÁC PHỤ LỤC CỦA LUẬN ÁN

PHỤ LỤC 1: KẾT QUẢ GIÁM ĐỊNH TÊN KHOA HỌC	iii
PHỤ LỤC 2: PHỔ CỦA CHẤT BBV1-BBL4	vii
▪ MS, $^1\text{H-NMR}$, $^{13}\text{C-NMR}$, DEPT	
PHỤ LỤC 3: PHỔ CỦA CHẤT BBV2	xiii
▪ MS, $^1\text{H-NMR}$, $^{13}\text{C-NMR}$, DEPT	
PHỤ LỤC 4: PHỔ CỦA CHẤT BBV3	xix
▪ MS, $^1\text{H-NMR}$, $^{13}\text{C-NMR}$, DEPT, HMBC, HSQC	
PHỤ LỤC 5: PHỔ CỦA CHẤT BBV4	xxx
▪ MS, $^1\text{H-NMR}$, $^{13}\text{C-NMR}$, DEPT	
PHỤ LỤC 6: PHỔ CỦA CHẤT BBV5	xxxvi
▪ MS, $^1\text{H-NMR}$, $^{13}\text{C-NMR}$, DEPT, HMBC, HSQC	
PHỤ LỤC 7: PHỔ CỦA CHẤT BBV6-BBL1	li
▪ MS, $^1\text{H-NMR}$, $^{13}\text{C-NMR}$, DEPT, HMBC, HSQC	
PHỤ LỤC 8: PHỔ CỦA CHẤT BBV7-BBL2	lxiv
▪ MS, $^1\text{H-NMR}$, $^{13}\text{C-NMR}$, DEPT	
PHỤ LỤC 9: PHỔ CỦA CHẤT BBV8	lxxi
▪ MS, $^1\text{H-NMR}$, $^{13}\text{C-NMR}$, DEPT, HMBC, HSQC	
PHỤ LỤC 10: PHỔ CỦA CHẤT BBL3	lxxxiv
▪ MS, $^1\text{H-NMR}$, $^{13}\text{C-NMR}$, DEPT, HMBC, HSQC	
PHỤ LỤC 11: PHỔ CỦA CHẤT BBL5	xcvii
▪ MS, $^1\text{H-NMR}$, $^{13}\text{C-NMR}$, DEPT, HMBC, HSQC	

PHỤ LỤC 12: PHỔ CỦA CHẤT BBL6	CX
▪ MS, ¹ H-NMR, ¹³ C-NMR, DEPT, HMBC, HSQC	
PHỤ LỤC 13: PHỔ CỦA CHẤT BBL7	CXXVI
▪ MS, ¹ H-NMR, ¹³ C-NMR, DEPT	
PHỤ LỤC 14: SẮC KÝ ĐỒ CỦA DỊCH CHIẾT TOÀN PHẦN VỎ THÂN CÂY GẠO	CXXXIII
PHỤ LỤC 15: SẮC KÝ ĐỒ CỦA DỊCH CHIẾT TOÀN PHẦN LÁ CÂY GẠO	CXXXV
PHỤ LỤC 16: KẾT QUẢ KHẢO SÁT ĐỘ ĐÚNG CỦA CÁC HỢP CHẤT CÓ TRONG VỎ THÂN CÂY GẠO	CXXXVII
PHỤ LỤC 17: KẾT QUẢ KHẢO SÁT ĐỘ ĐÚNG CỦA CÁC HỢP CHẤT CÓ TRONG LÁ CÂY GẠO	CXL
PHỤ LỤC 18: MỘT SỐ HÌNH ẢNH KIỂM TRA ĐỘ TINH KHIẾT CỦA CÁC CHẤT PHÂN LẬP BẰNG SKLM VÀ HPLC	CXLIII

PHỤ LỤC 1

VIỆN SINH THÁI VÀ TÀI
NGUYÊN SINH VẬT

CỘNG HÒA XÃ HỘI CHỦ NGHĨA VIỆT NAM
ĐỘC LẬP - TỰ DO - HẠNH PHÚC

PHÒNG THỰC VẬT

KẾT QUẢ GIÁM ĐỊNH TÊN KHOA HỌC

Kính gửi: Nghiên cứu sinh **Hồ Thị Thanh Huyền**, Bộ môn Dược liệu- Đại học Dược Hà Nội.

Chúng tôi nhận được đề nghị giám định tên khoa học cho mẫu tiêu bản của Nghiên cứu sinh **Hồ Thị Thanh Huyền**, Bộ môn Dược liệu- Đại học Dược Hà Nội vào ngày 20 tháng 4 năm 2011.

Thành viên tham gia giám định: **CN Bùi Hồng Quang**
TS. Trần Huy Thái

Các thông tin từ mẫu vật: Mẫu vật ở dạng tiêu bản tươi, có đủ tiêu chuẩn để định loại bao gồm cơ quan sinh sản (hoa). Và cơ quan sinh dưỡng (cành non, lá) và các thông tin ghi chép tại thực địa. Nơi thu hái: Hương Sơn- Mỹ Đức- Hà Nội, ngày tháng thu hái: 16-4-2011.

Kết quả giám định tên khoa học: Mẫu tiêu bản (TN01) của Nghiên cứu sinh **Hồ Thị Thanh Huyền**, Bộ môn Dược liệu- Đại học Dược Hà Nội, gửi giám định có tên khoa học là: *Bombax malabaricum* DC. – Gạo thuộc họ Gạo - *Bombacaceae* Kunth.

Chúng tôi gửi tới Nghiên cứu sinh **Hồ Thị Thanh Huyền**, Bộ môn Dược liệu- Đại học Dược Hà Nội kết quả giám định trên.

Hà Nội, ngày 26 tháng 4 năm 2011

Xác nhận của Viện sinh thái
và tài nguyên sinh vật
PHÓ VIỆN TRƯỞNG



Trần Huy Thái

Người giám định

TS. Trần Huy Thái

**KẾT QUẢ GIÁM ĐỊNH TÊN KHOA HỌC VÀ BIÊN SOẠN TƯ LIỆU
LOÀI THỰC VẬT**

Mẫu thực vật được giám định tên khoa học có số hiệu sau: Hồ Thị Thanh Huyền TN01, ngày thu 16.04.2011 (HN), thu tại Hà Nội (Hương Sơn: Mỹ Đức). Tên khoa học là *Bombax ceiba* L. (còn có tên đồng nghĩa là *Bombax malabaricum* DC.), tên Việt Nam là Gạo (Gạo rừng, Gạo hoa đỏ, Gòn đỏ, Gạo đỏ, Mộc miên), thuộc họ Gạo (Bombacaceae).

Phần danh pháp, mô tả đặc điểm hình thái và một số tư liệu như dưới đây:

***BOMBAX CEIBA* L. – Gạo**

L. 1753. Sp. Pl. 1: 511; C. Phengklai, 1997. Thail. Bull. 25: 96, f. 10; Phamh. 1999. Illustr. Fl. Vietn. 1: 514. f. 2067.

– *Bombax malabaricum* DC. 1824. Prodr. 1: 479.

Tên khác: Gạo rừng, Gạo hoa đỏ, Gòn đỏ, Gạo đỏ, Mộc miên.

Mô tả: Cây gỗ, cao 12-15(25) m. Thân có gai hình nón, thường có bạnh vè ở gốc. Lá kép chân vịt, mang 5 lá chét hay hơn, lá chét hình trứng hay bầu dục rộng, kích thước 6-7 x 3,5-4 cm, đầu lá thường có mũi; mép lá hơi xoắn; cuống lá chét dài 1,5-2,5 cm; cuống chung dài 15-20 cm. Hoa đơn độc ở nách lá, đường kính đến 15-17 cm. Đài hình chuông hay chén. Cánh hoa 5, màu hồng hay đỏ. Nhị nhiều, chỉ nhị dính thành 5 bó ở phía dưới, không dính thành cột. Vòi nhụy dài hơn chỉ nhị 1-1,5 cm, chia 5 thùy; đầu nhụy dày lên dạng đầu. Quả nang, kích thước 10-15(16) x 4-6(8) cm, nhẵn hay có 5 gờ thẳng. Hạt dài đến 8 mm, có lông dài như sợi bông, màu trắng.

Phân bố: Được trồng ở hầu hết các tỉnh thành ở Việt Nam. Còn có ở Pakistan đến Ấn Độ, Trung Quốc, đảo Đài Loan, Myanma, Đông Dương, Thái Lan, Malaixia, Indônêxia (Java), Philippin, Niu Ghinê, Ôxtrâyliya, vùng nhiệt đới châu Mỹ,...



Sinh học và sinh thái: Cây ra hoa tháng 1-3, thường nở hoa trước khi cây ra lá, có quả chín vào mùa hè. Cây rụng lá vào mùa khô. Cây ưa khí hậu nhiệt đới, hơi khô, ưa sáng. Thường ở độ cao 0-800m.

Mẫu nghiên cứu: Hà Nội (Hương Sơn: Mỹ Đức), Hồ Thị Thanh Huyền TN01, ngày 16/04/2011 (HN).

Giá trị sử dụng: Cây được trồng lấy sợi, lấy gỗ đóng đồ thông thường hay cho bóng mát. Còn được dùng làm thuốc (theo Võ Văn Chi, 2012).

Tài liệu tham khảo:

1. Võ Văn Chi, 2012. Từ điển cây thuốc Việt Nam, 1: 1006. Nxb. Y học.
2. Phạm Hoàng Hộ, 1999. Cây cỏ Việt Nam, 1: 514. Nxb. Trẻ, Tp. Hồ Chí Minh.
3. Phengklai C. 1997. Thai forest Bulletin, 25: 81-101.

Xác nhận

Hà Nội, ngày 22 tháng 10 năm 2012

Viện Sinh thái & Tài nguyên sinh vật

Người giám định mẫu và biên soạn



PHÓ VIỆN TRƯỞNG

Trần Huy Châu

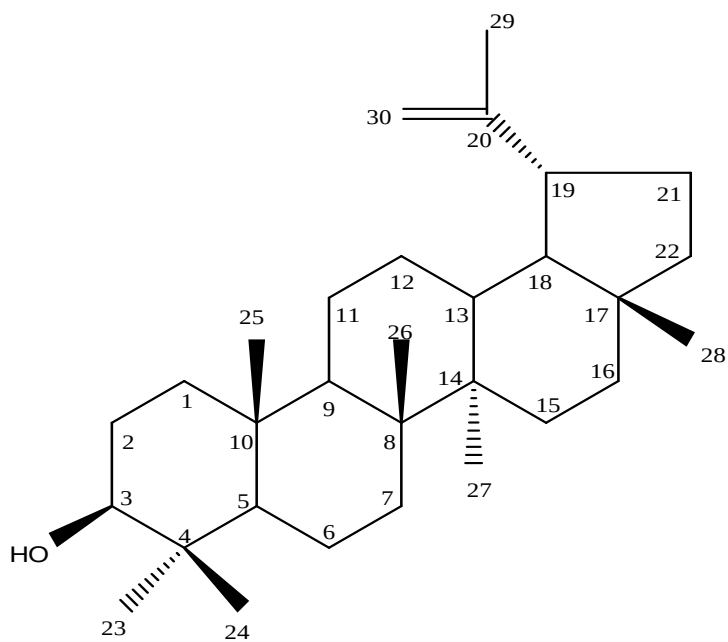
TS. Đỗ Thị Xuyên



PHỤ LỤC 2

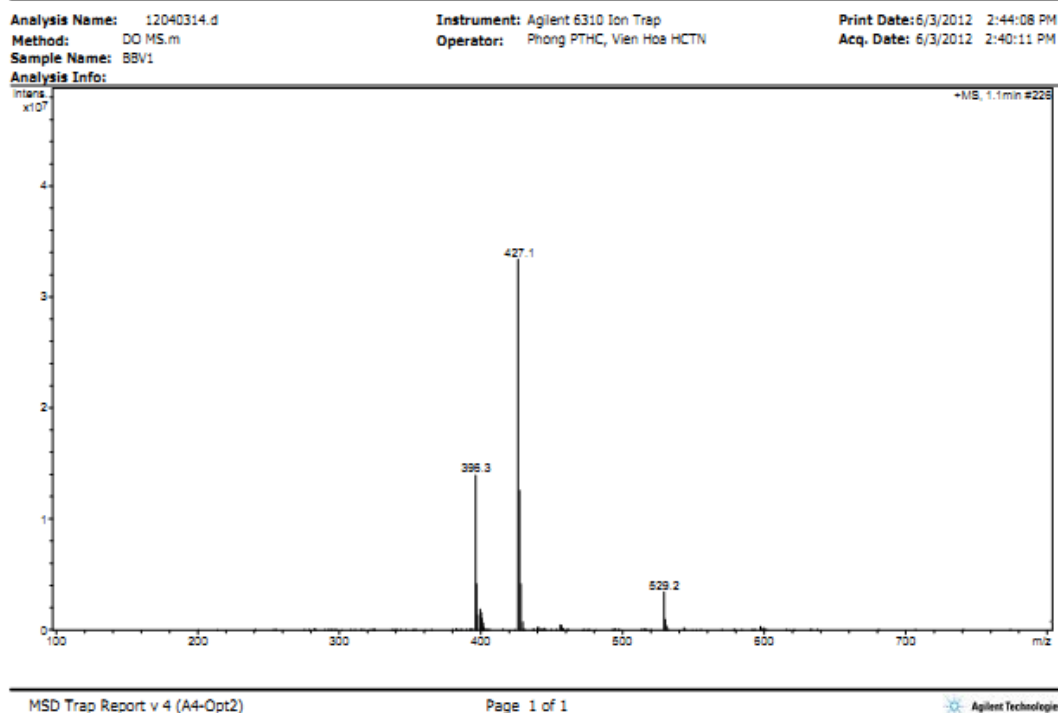
PHỤ LỤC 2: PHỔ CỦA CHẤT BBV1-BBL4

- MS
- ^1H -NMR
- ^{13}C -NMR
- DEPT

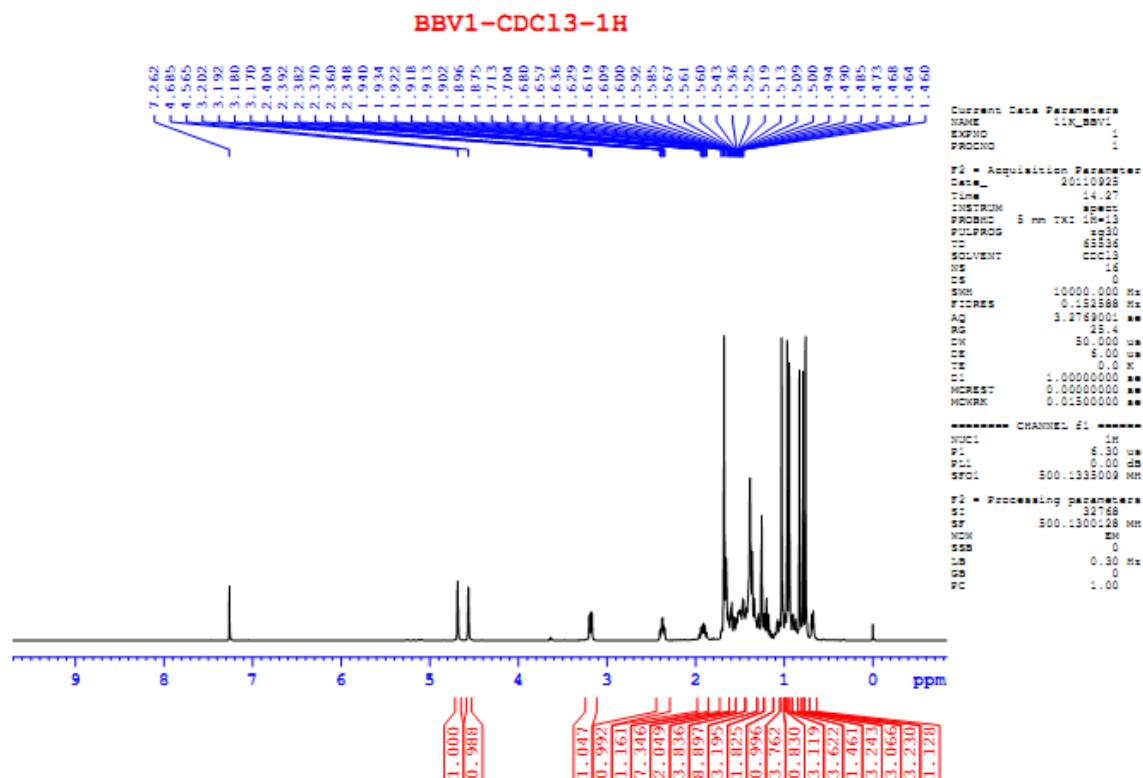


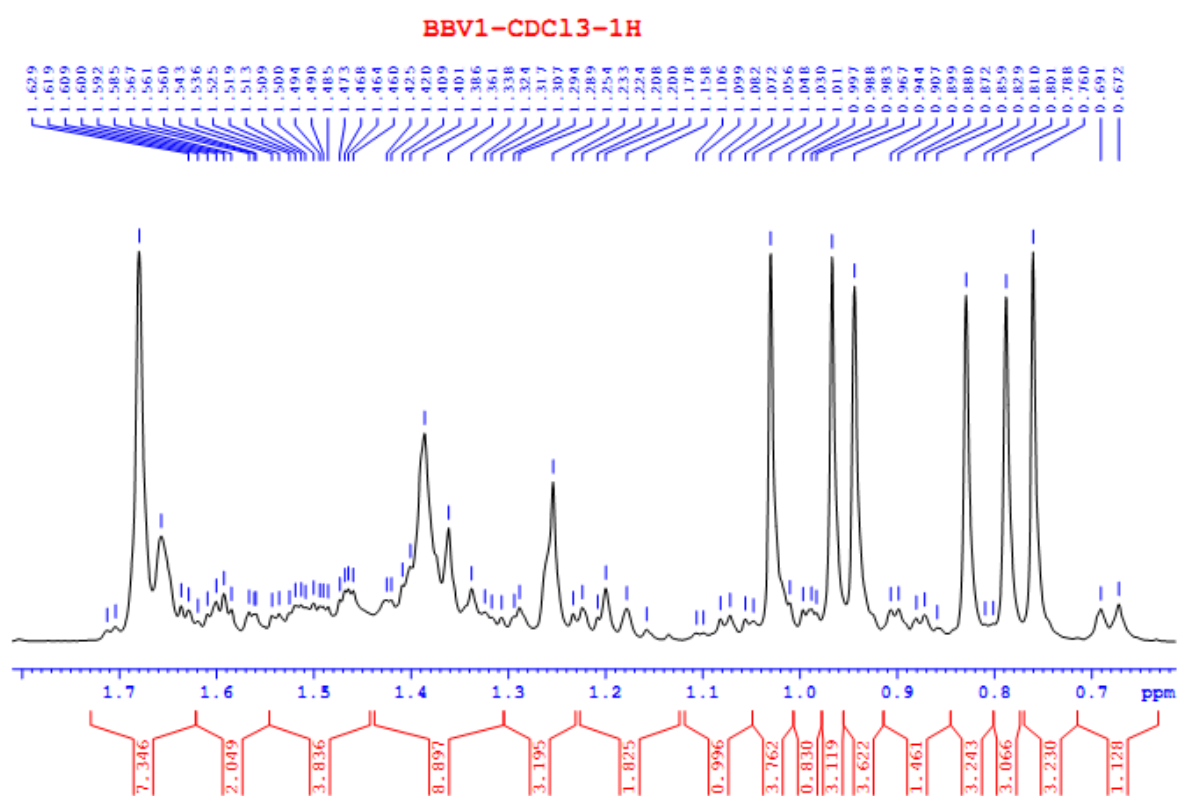
Phổ ESI-MS

Display Report - Selected Window Selected Analysis

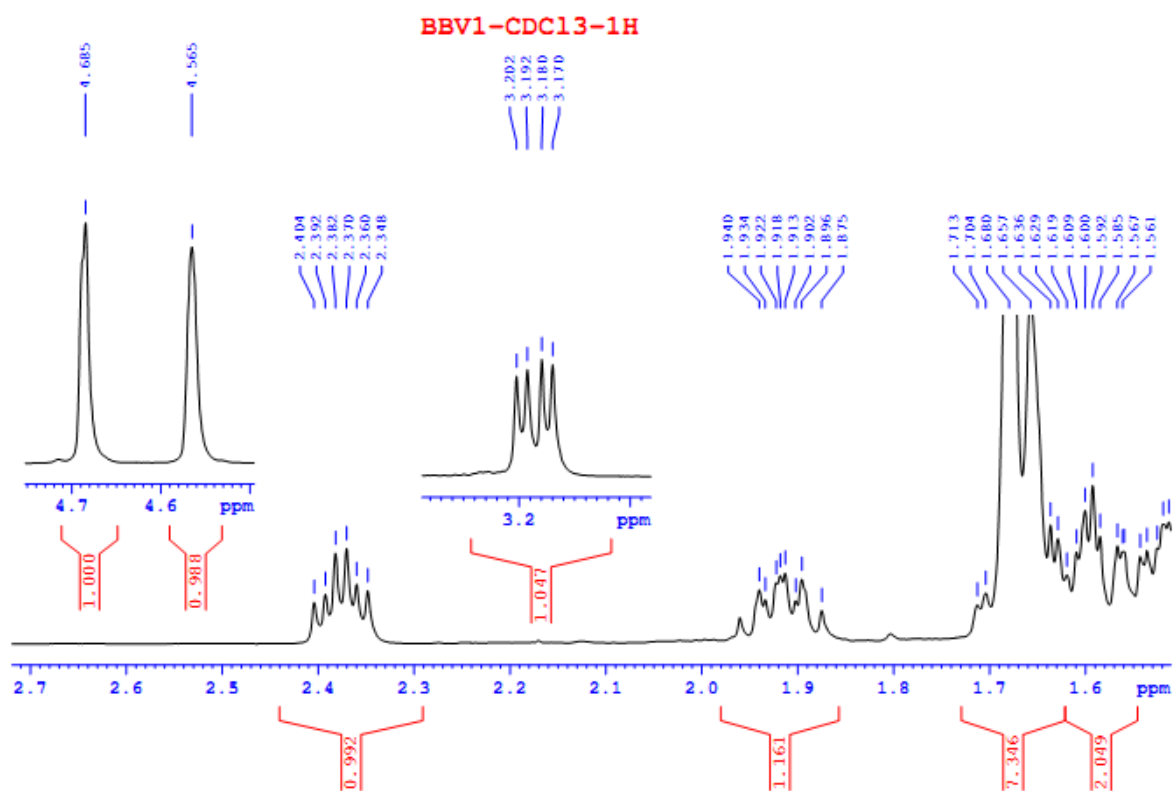


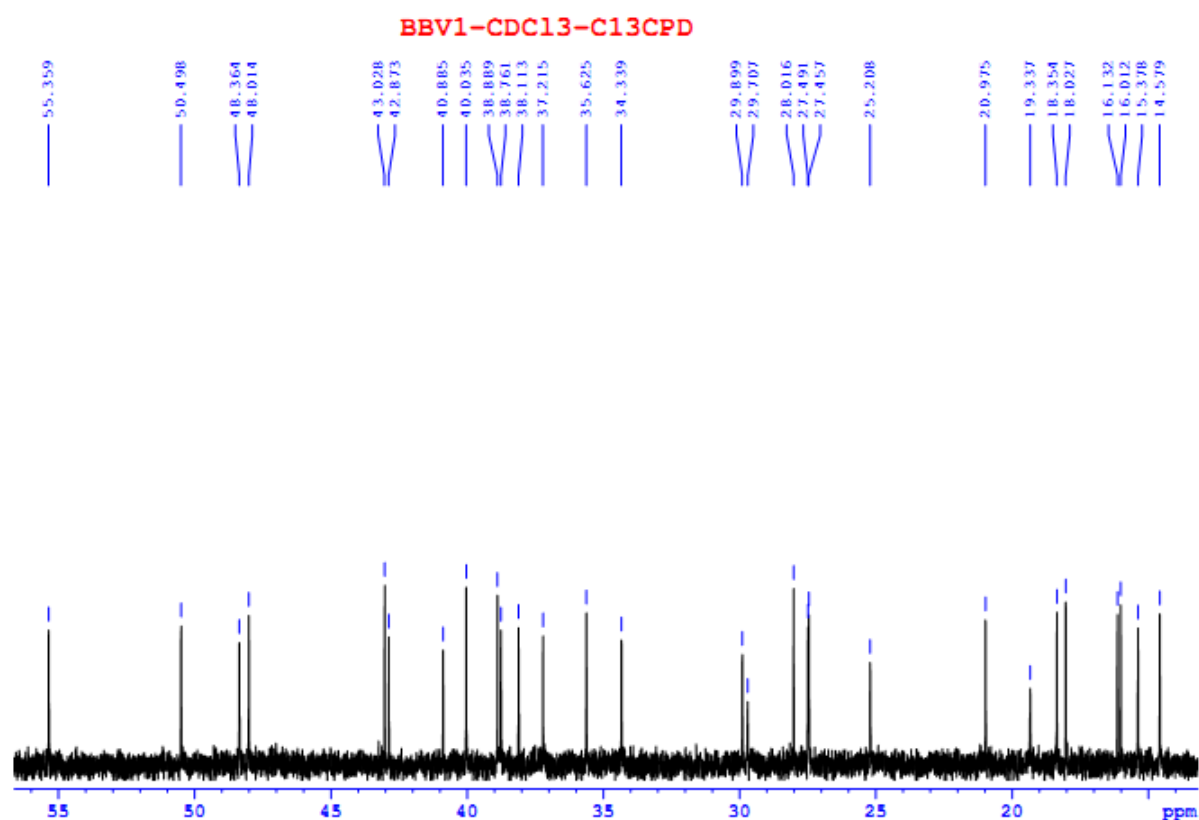
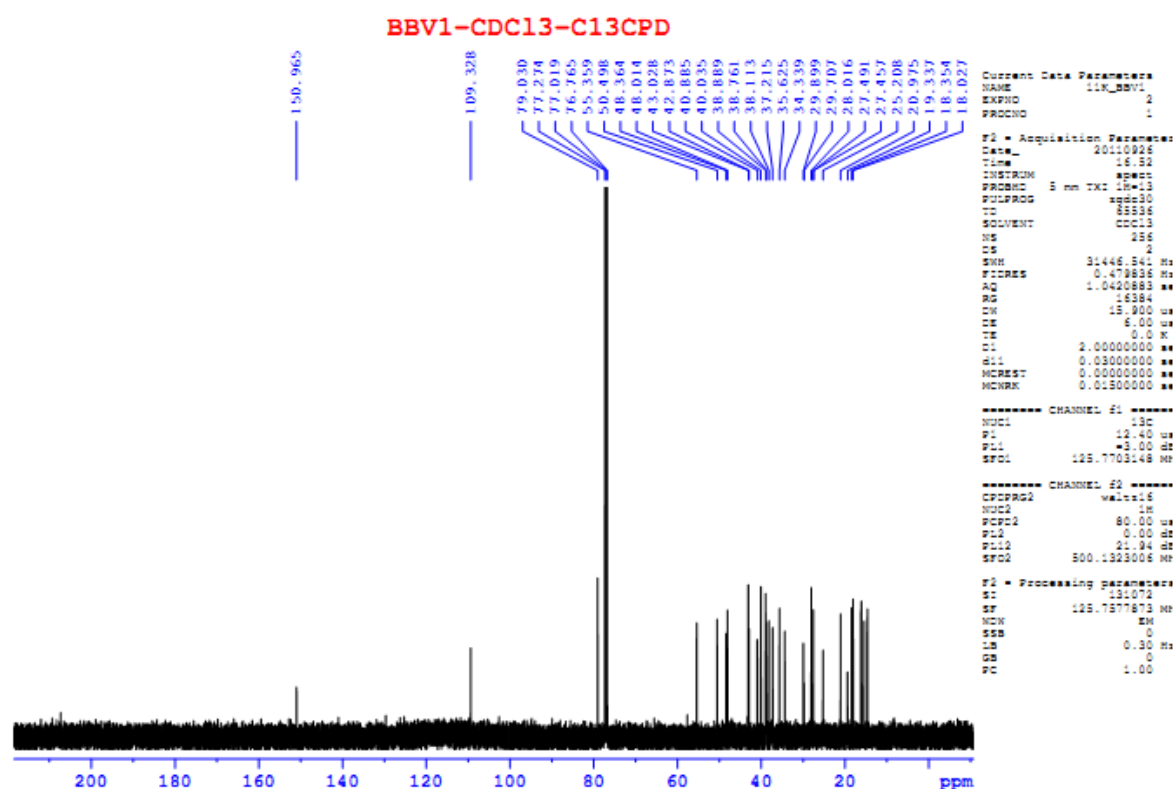
Phổ ^1H -NMR





Phô ^{13}C -NMR

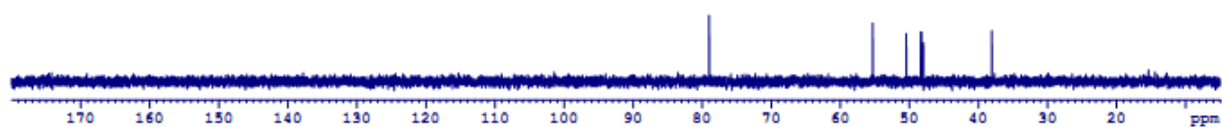




Phổ DEPT

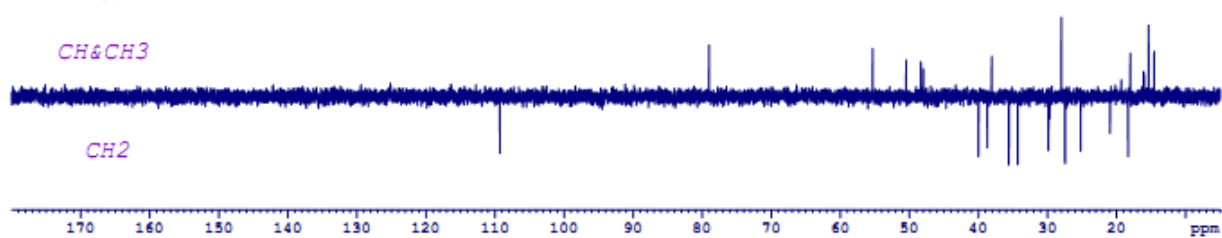
BBV1-CDC13-C13CPD &DEPT

DEPT90

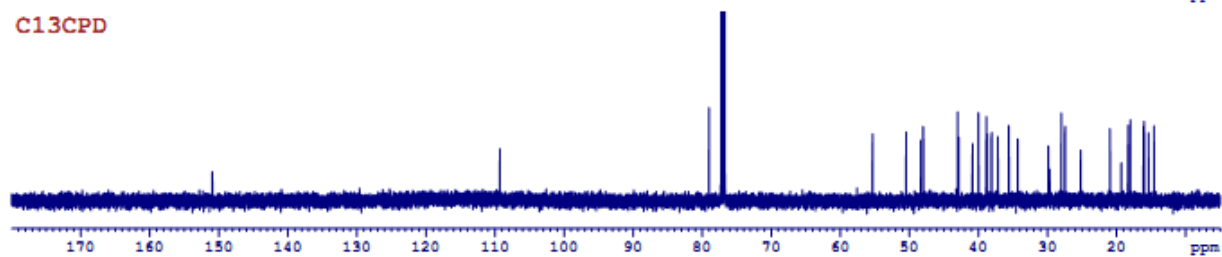


DEPT135

CH&CH3

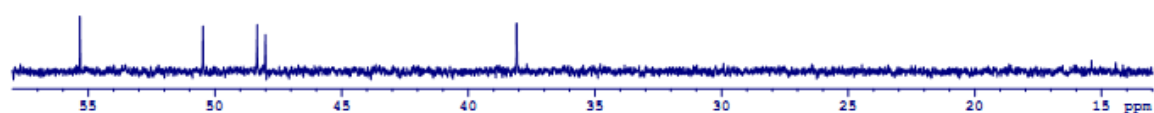


C13CPD



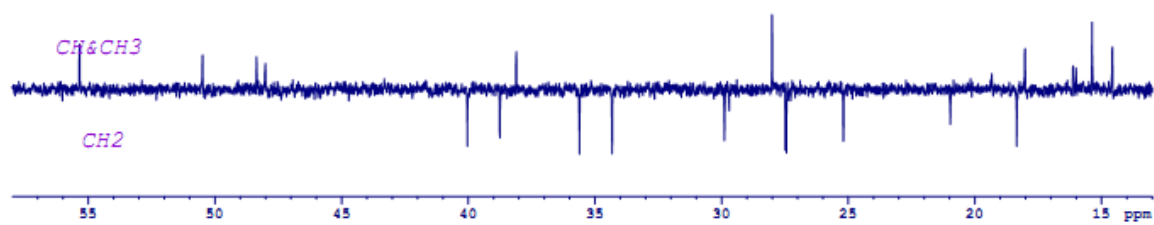
BBV1-CDC13-C13CPD &DEPT

DEPT90

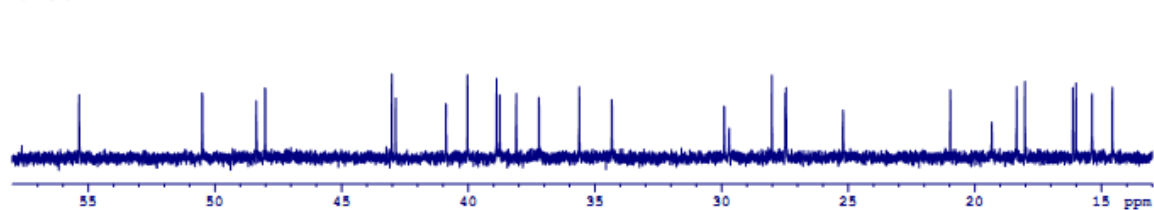


DEPT135

CH&CH3



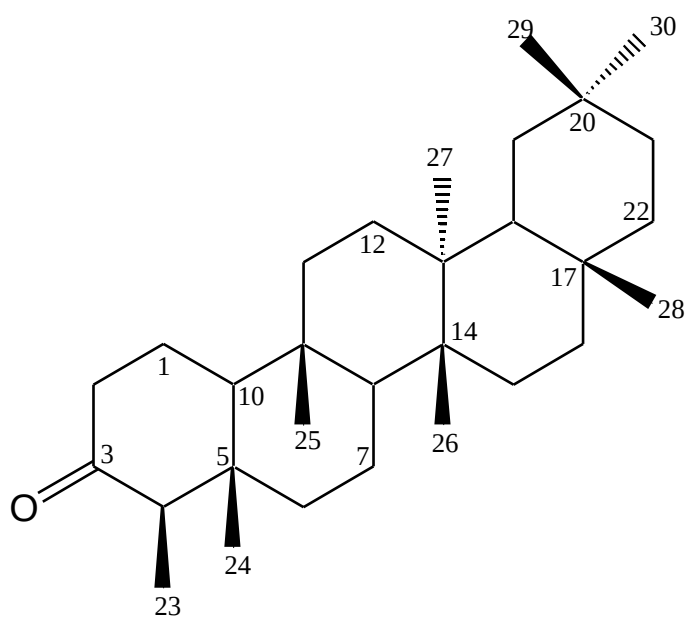
C13CPD



PHỤ LỤC 3

PHỤ LỤC 3: PHỔ CỦA CHẤT BBV2

- MS
- ^1H -NMR
- ^{13}C -NMR
- DEPT

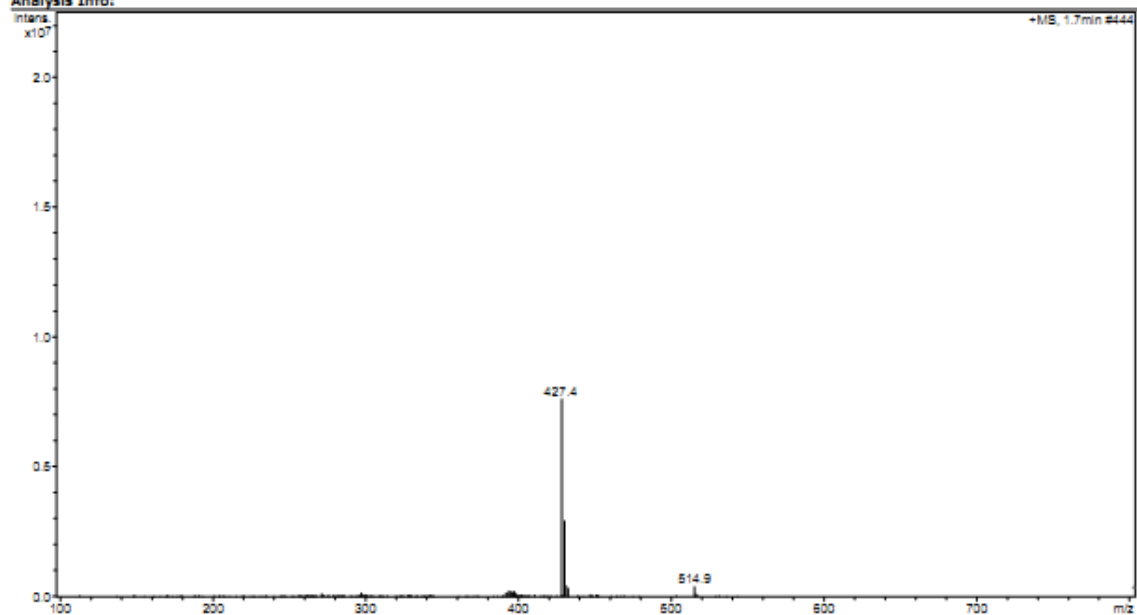


Phổ ESI-MS

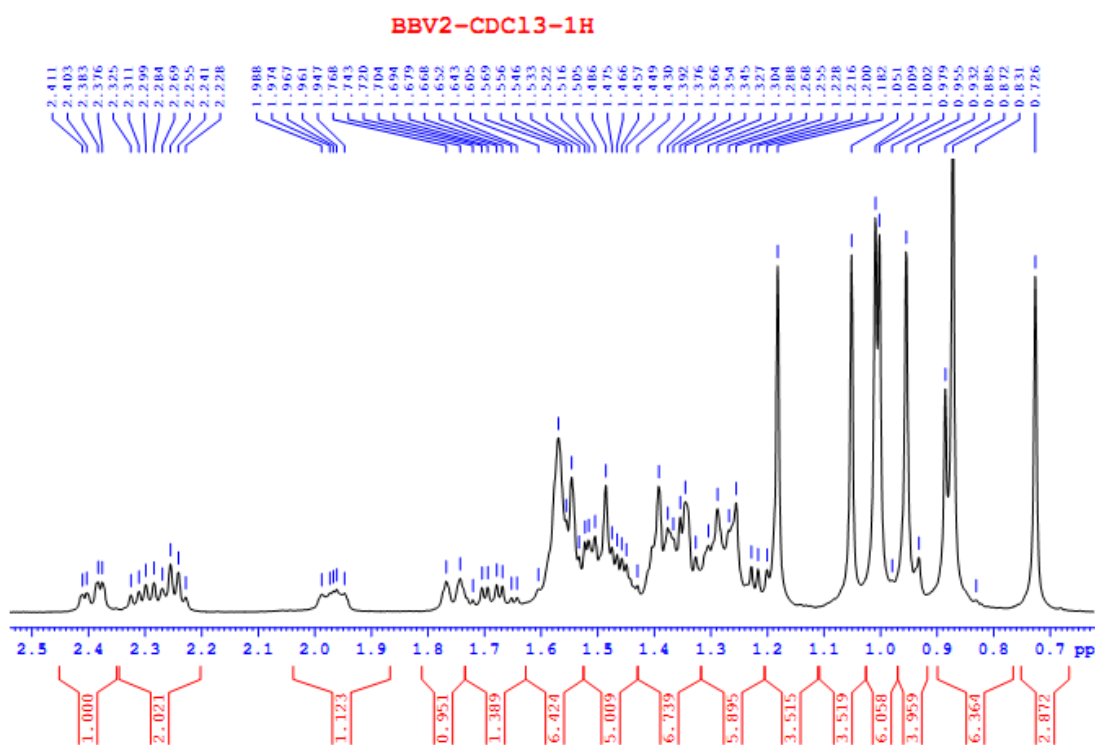
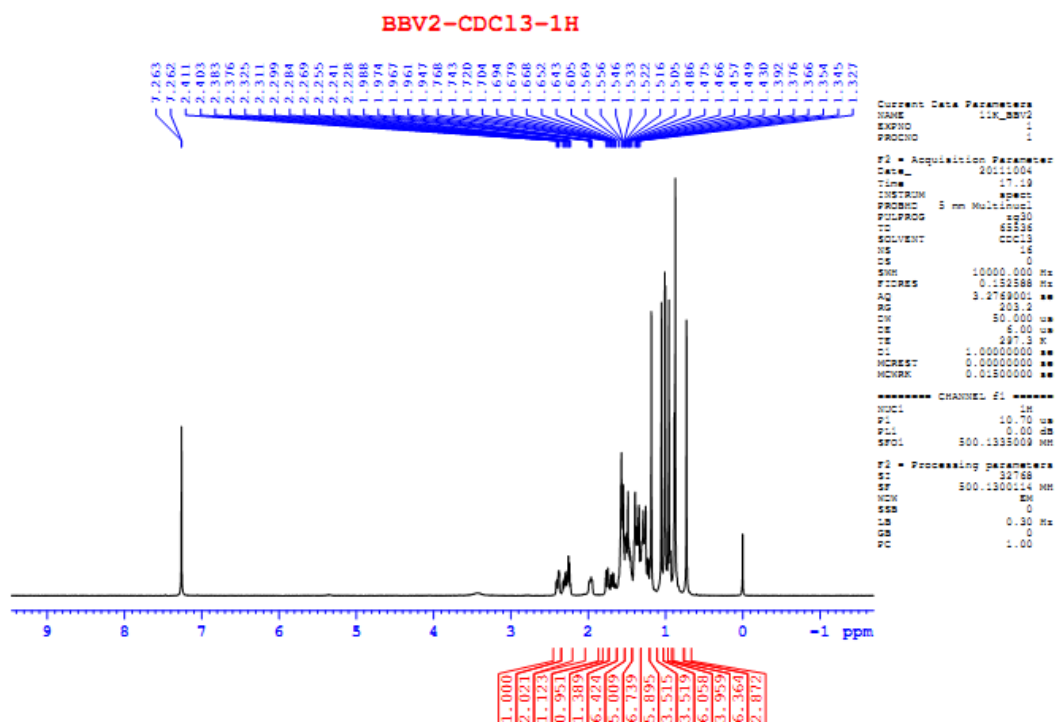
Display Report - Selected Window Selected Analysis

Analysis Name: 12040316.d **Instrument:** Agilent 6310 Ion Trap **Print Date:** 8/3/2012 4:29:09 PM
Method: DO MS.m **Operator:** Phòng PTHC, Viện Hoá HCTN **Acq. Date:** 8/3/2012 4:15:58 PM
Sample Name: BBV2

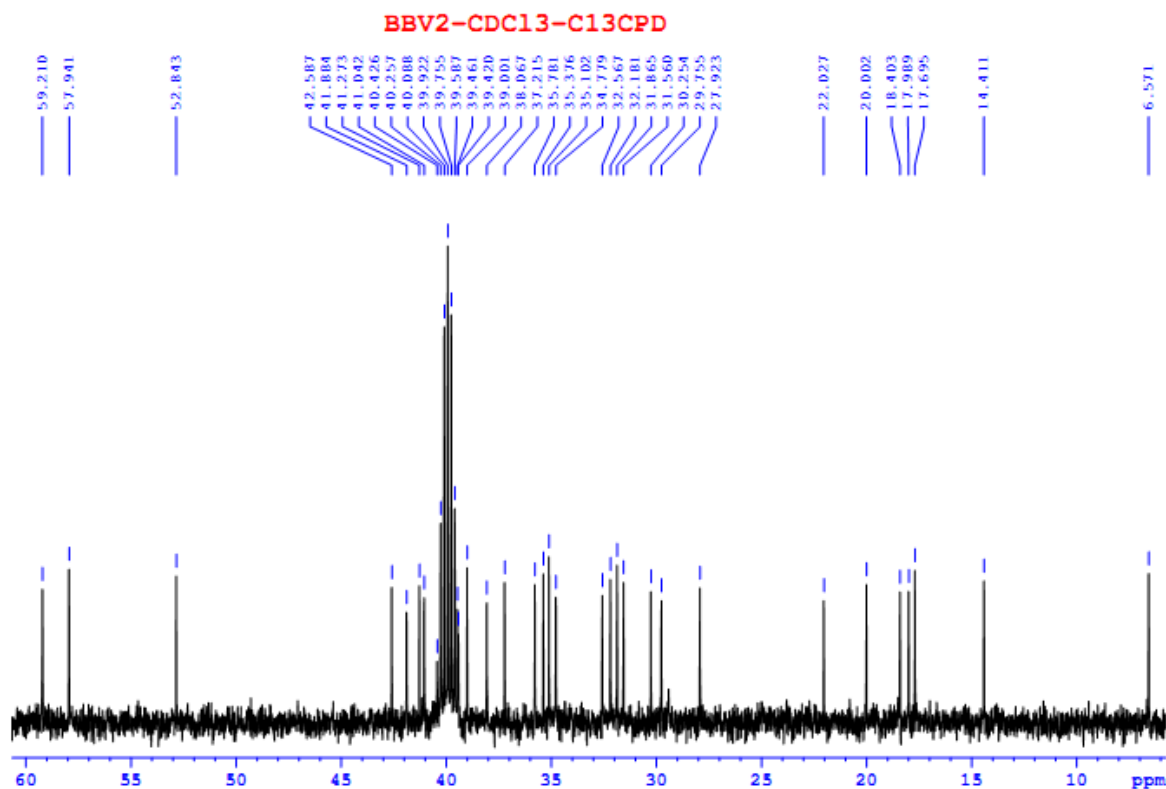
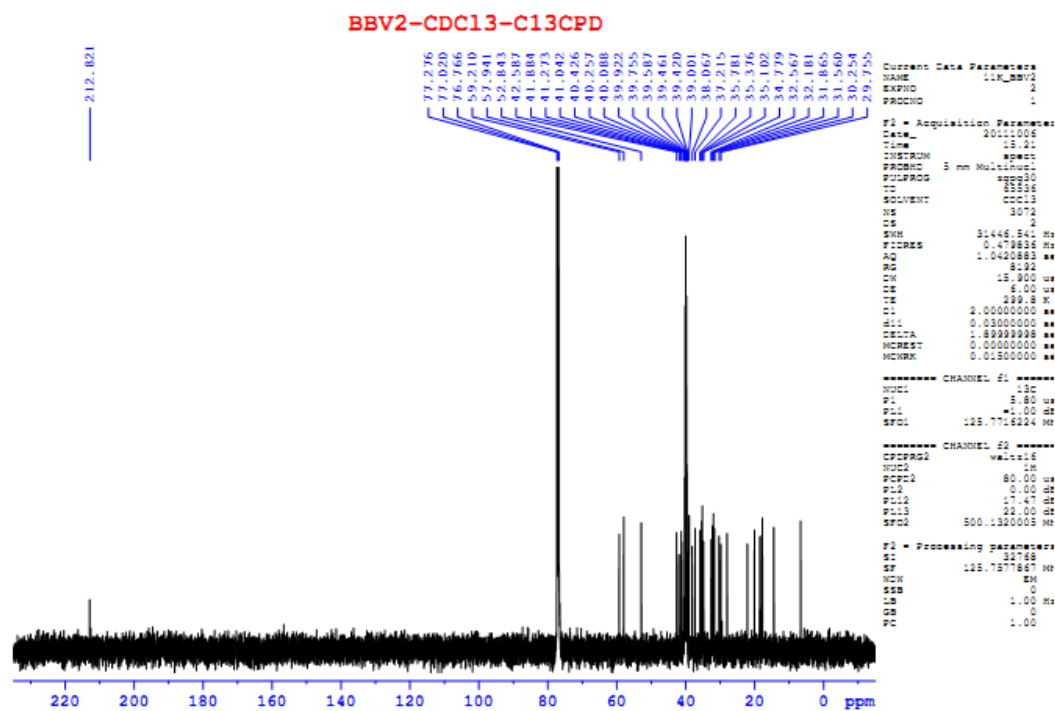
Analysis Info:



Phổ ^1H -NMR



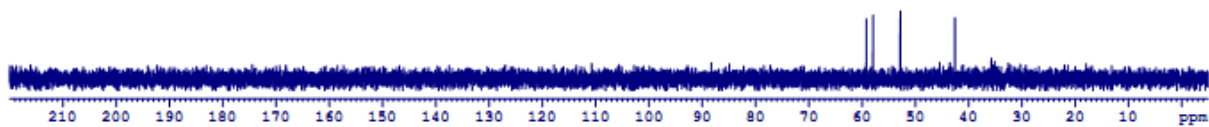
Phô ^{13}C -NMR



Phổ DEPT

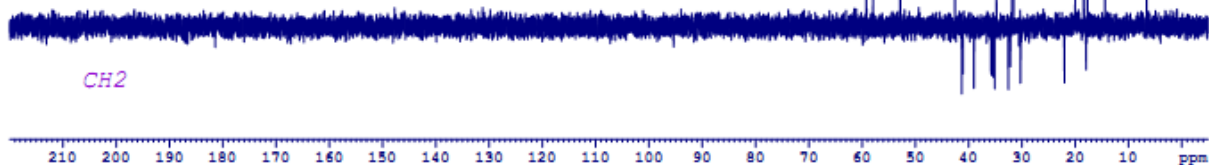
BBV2-CDC13-C13CPD &DEPT

DEPT90

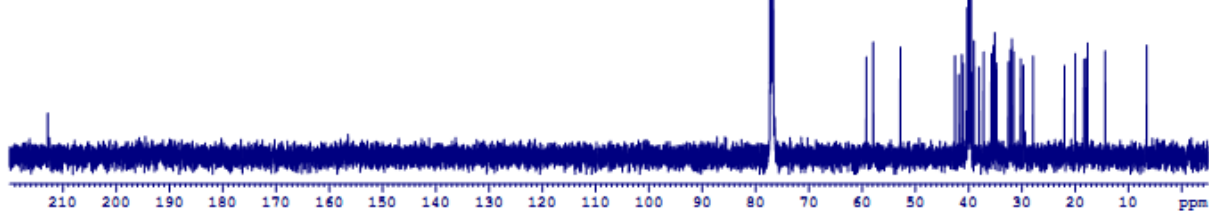


DEPT135

CH&CH3

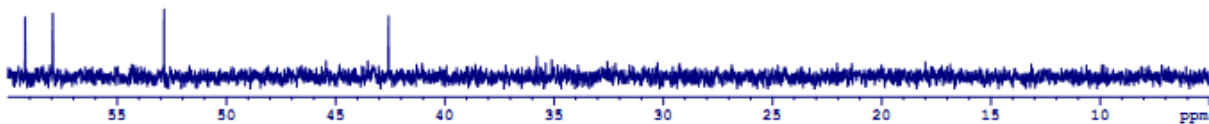


C13CPD



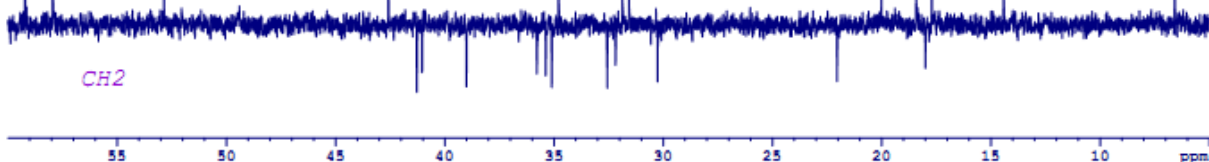
BBV2-CDC13-C13CPD &DEPT

DEPT90

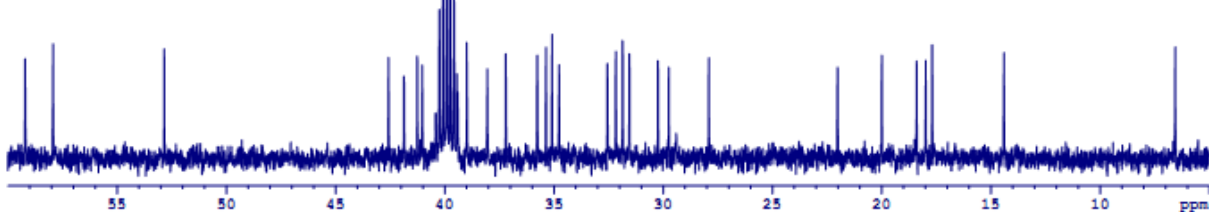


DEPT135

CH&CH3



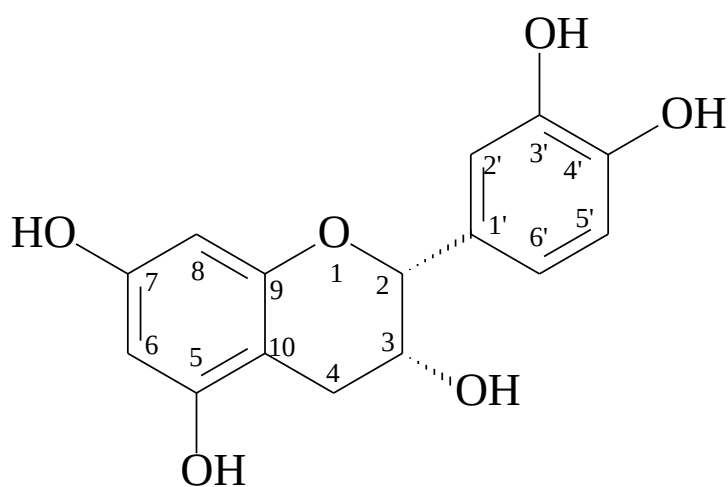
C13CPD



PHỤ LỤC 4

PHỤ LỤC 4: PHỔ CỦA CHẤT BBV3 (EL1)

- MS
- ^1H -NMR
- ^{13}C -NMR
- DEPT
- HMBC
- HSQC

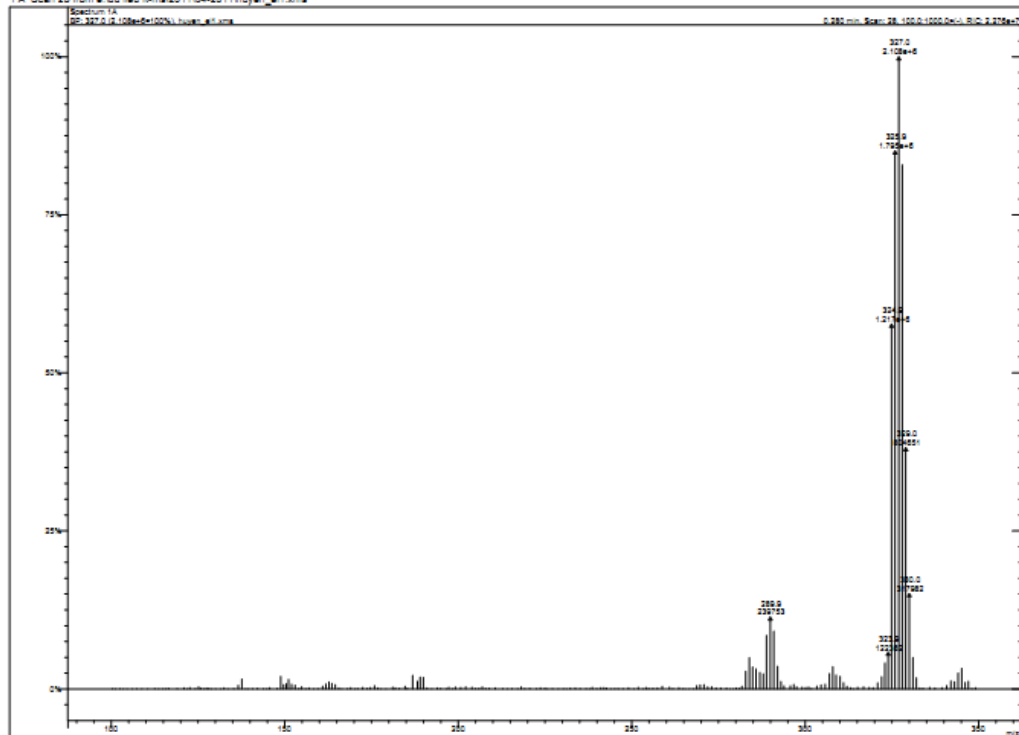


Phổ ESI-MS

Print Date: 13 Apr 2011 15:12:27

Spectrum 1A Plot - 4/13/2011 3:11 PM

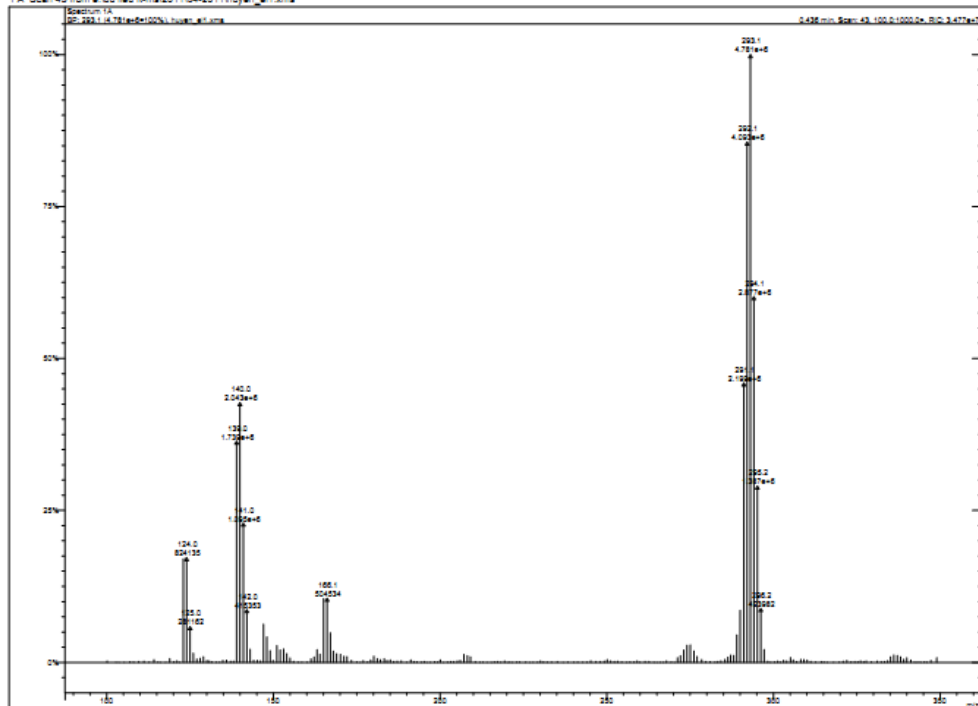
1 A Scan 28 from e:\du lieu 8-m\2011\04-2011\truyen_gif.xms



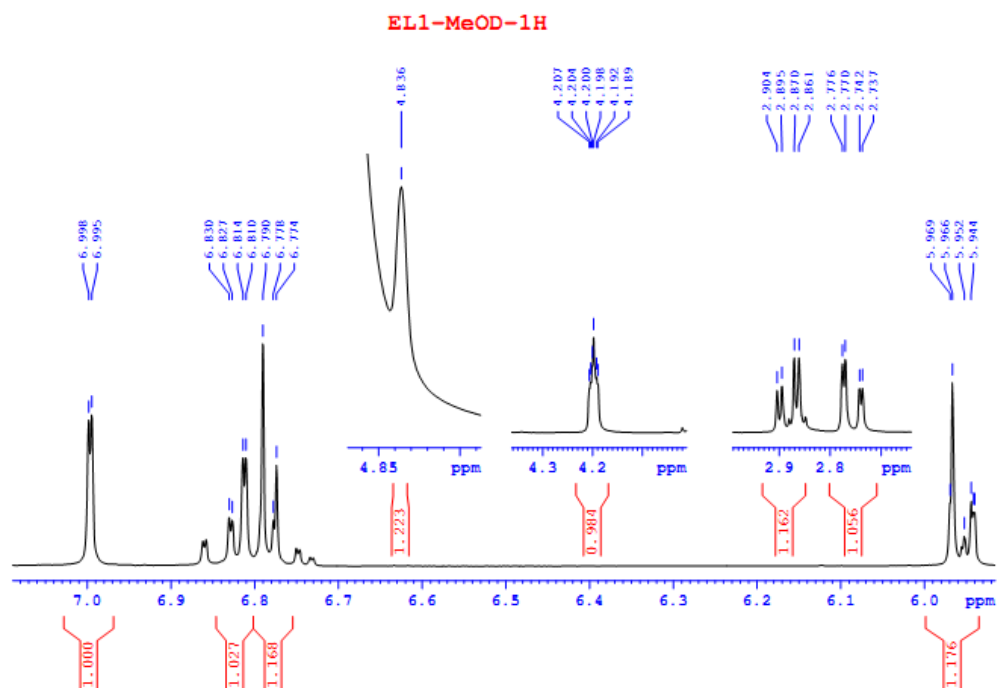
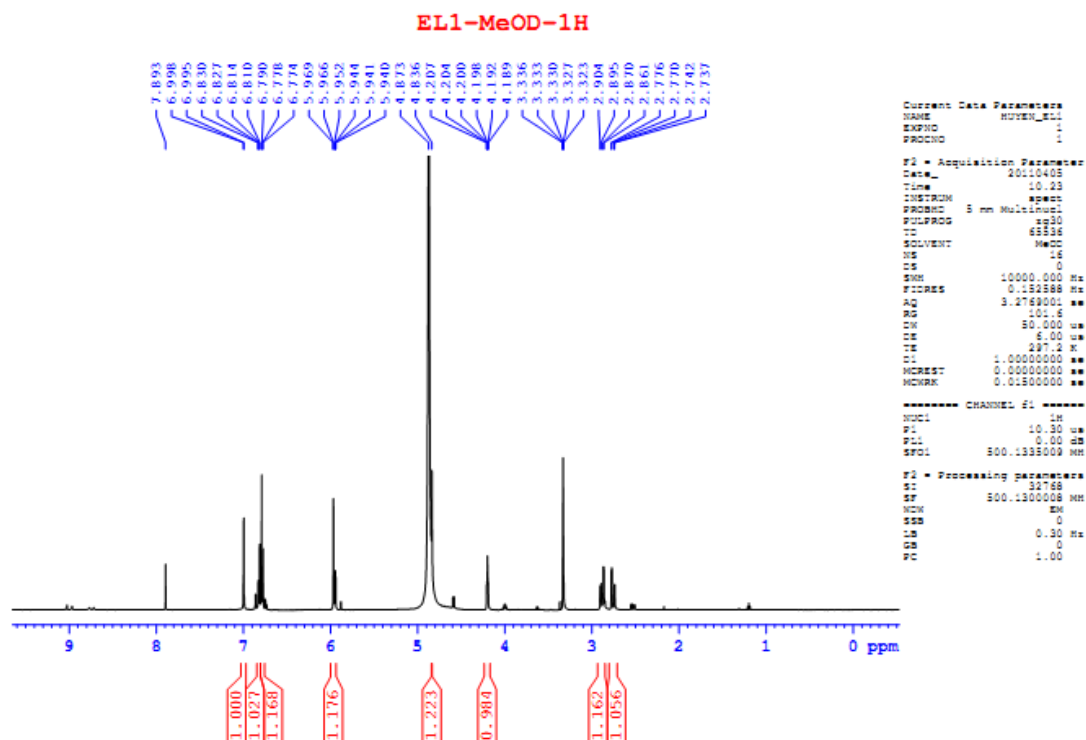
Print Date: 13 Apr 2011 15:09:48

Spectrum 1A Plot - 4/13/2011 3:09 PM

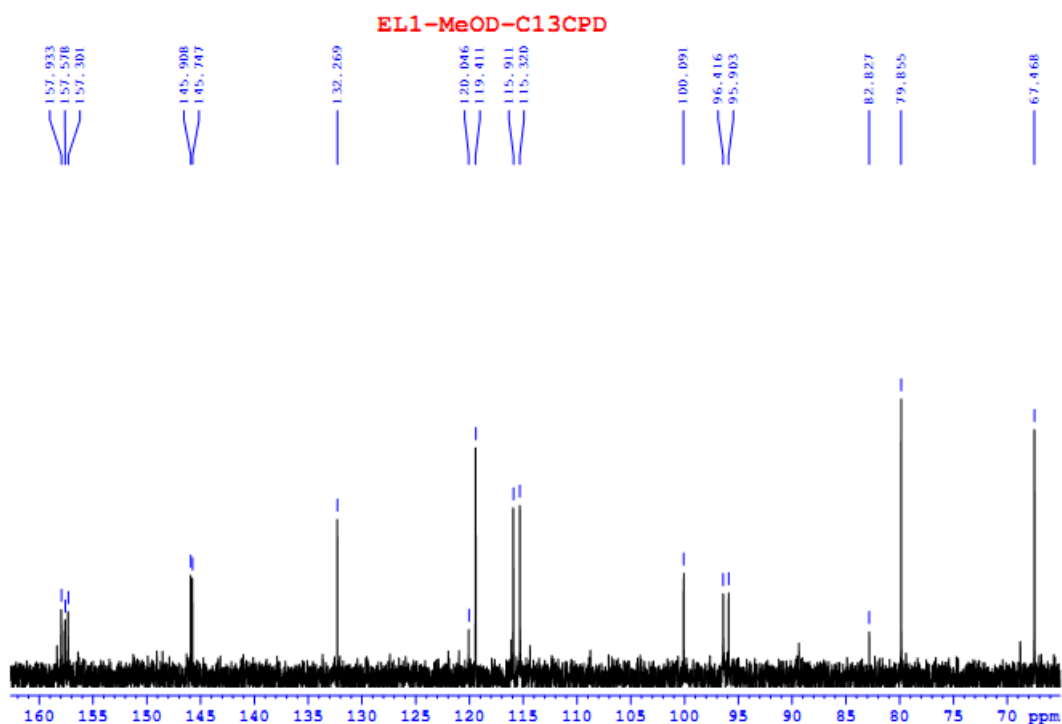
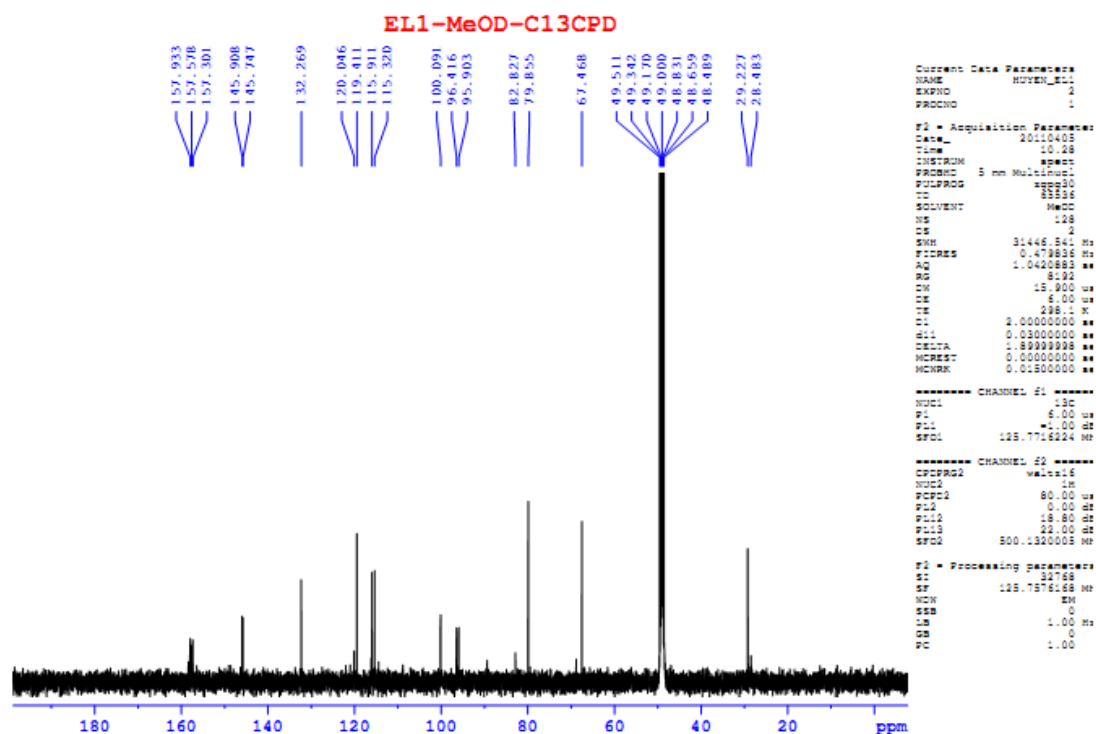
1 A Scan 43 from e:\du lieu 8-m\2011\04-2011\truyen_gif.xms



Phổ ^1H -NMR



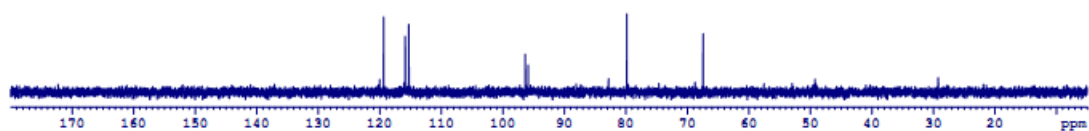
Ph² ¹³C-NMR



Phổ DEPT

EL1-MeOD-C13CPD&DEPT

DEPT90



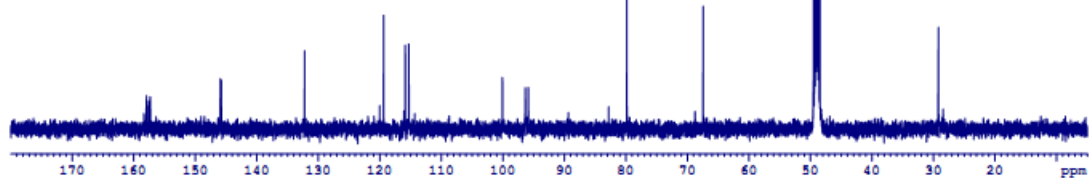
DEPT135

CH&CH3

CH2

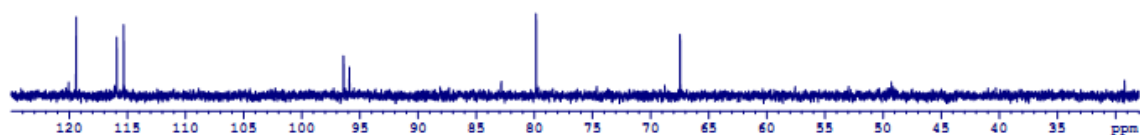


C13CPD



EL1-MeOD-C13CPD&DEPT

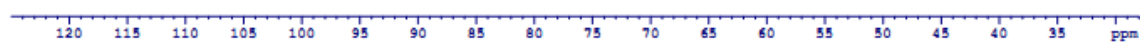
DEPT90



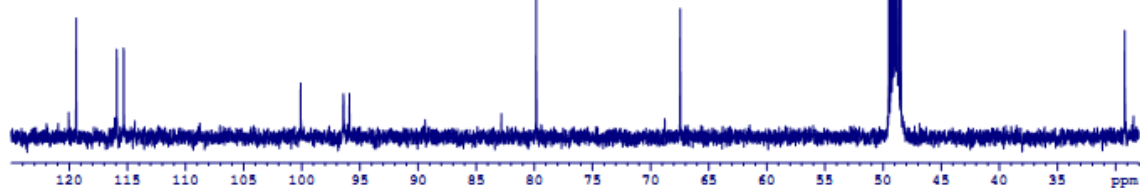
DEPT135

CH&CH3

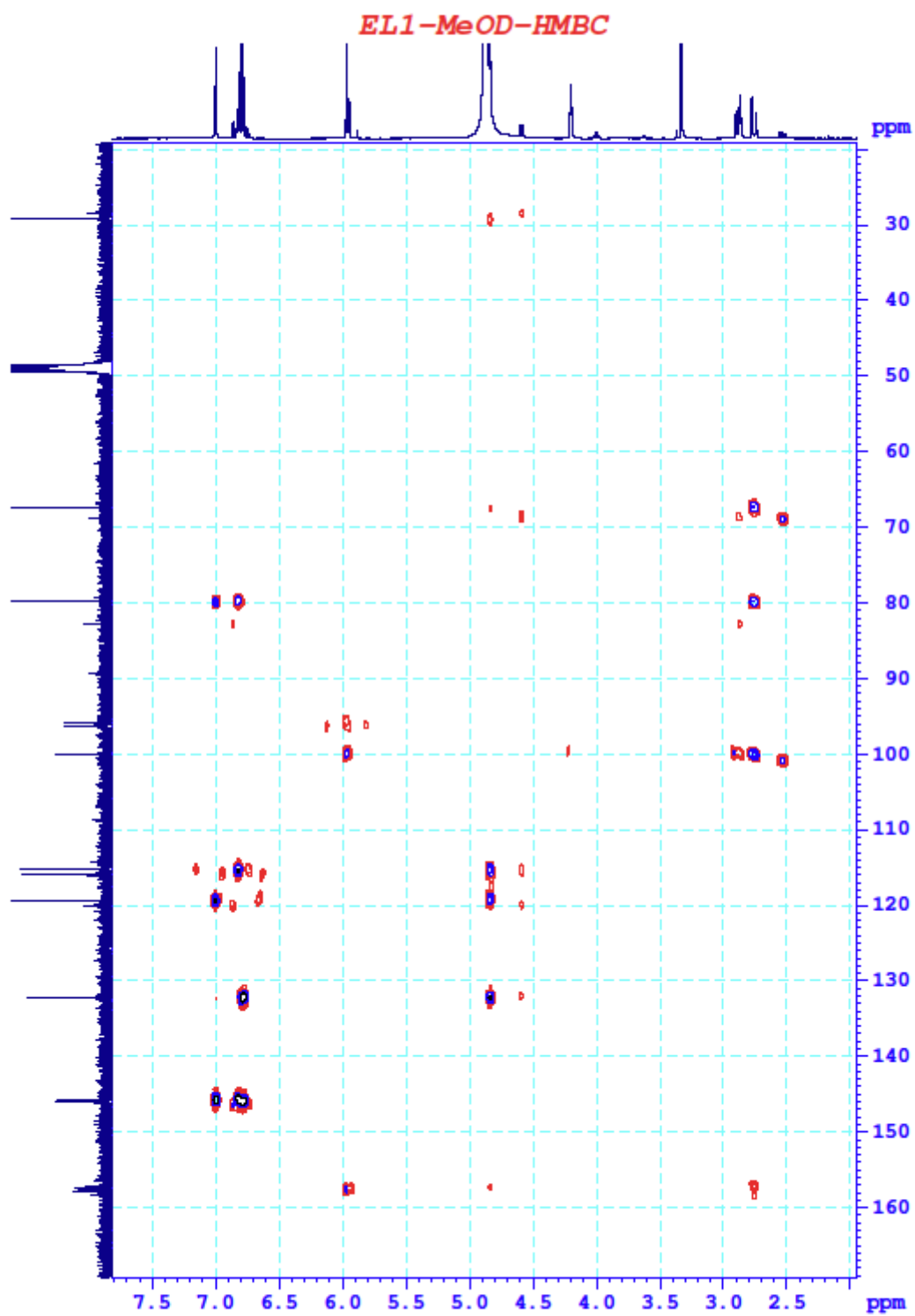
CH2



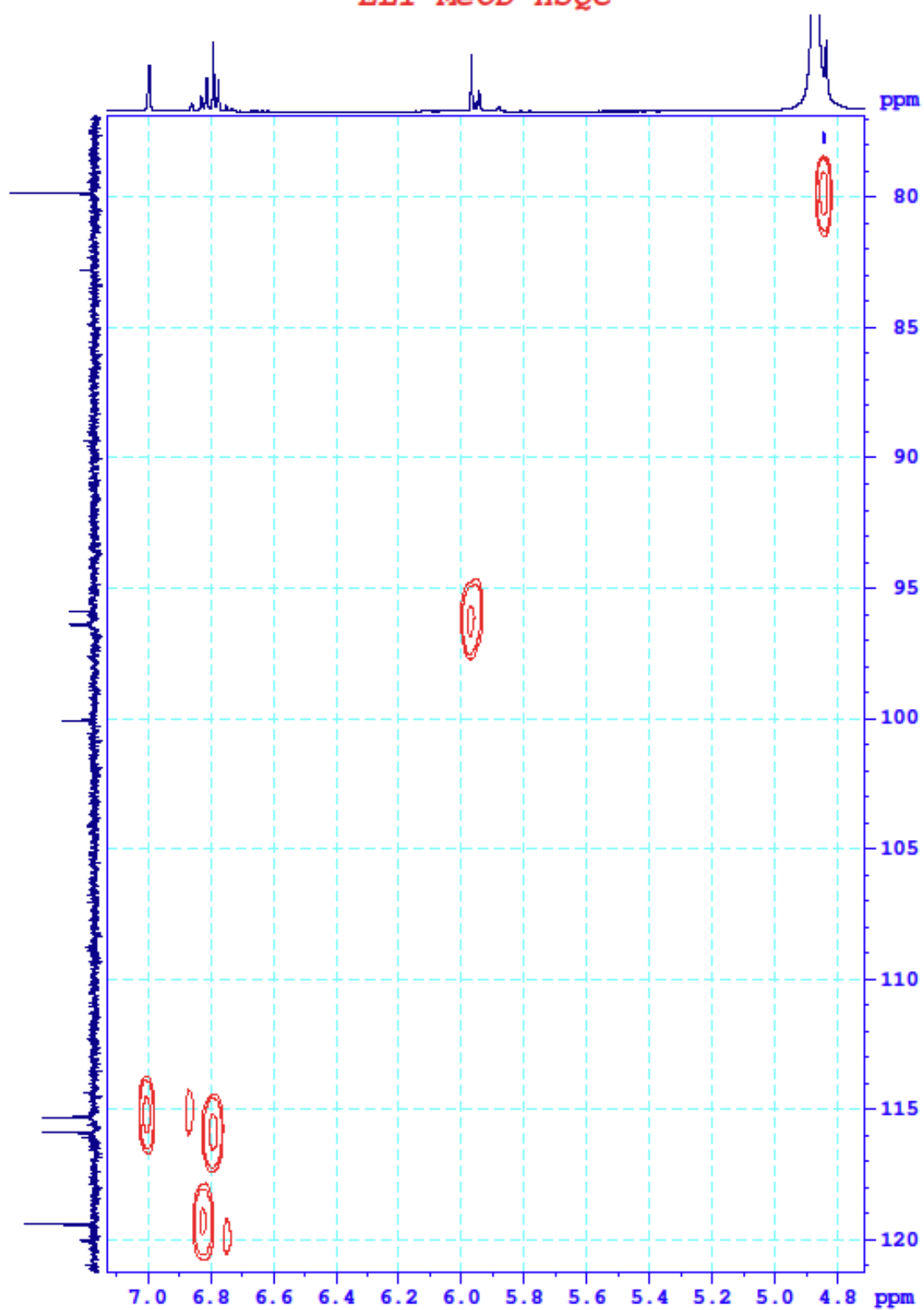
C13CPD

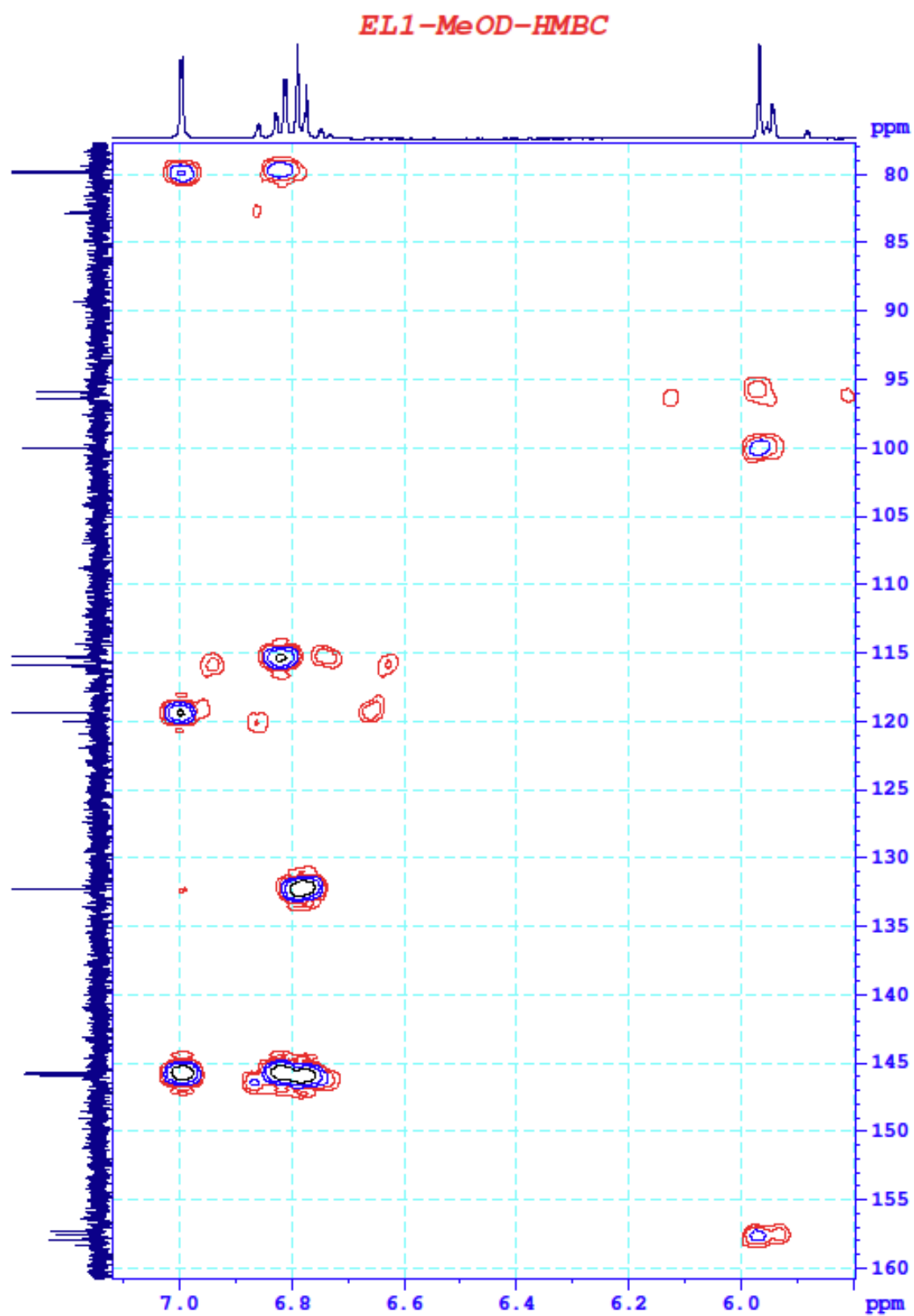


Phổ HMBC

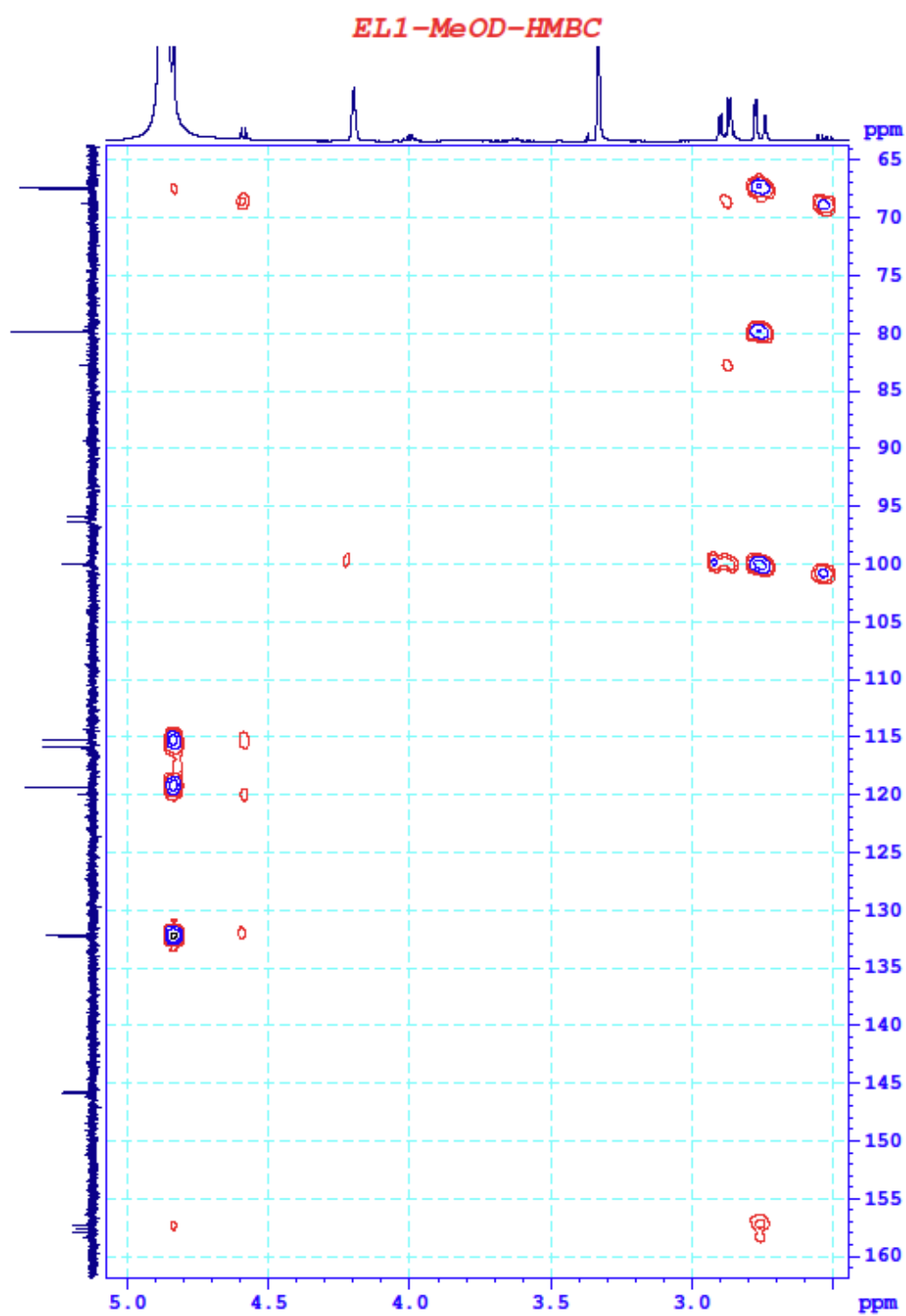


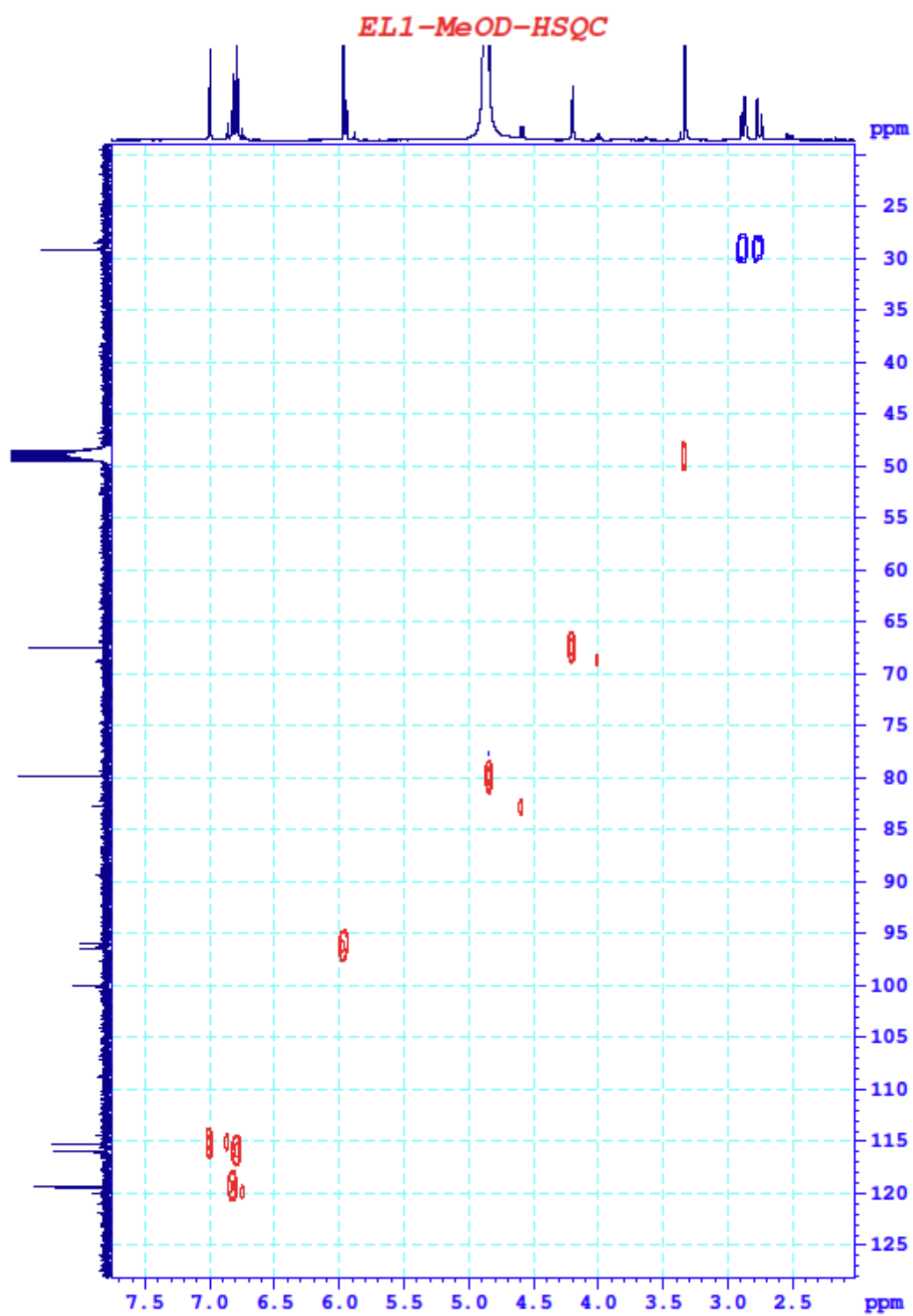
EL1-MeOD-HSQC





Phổ HSQC

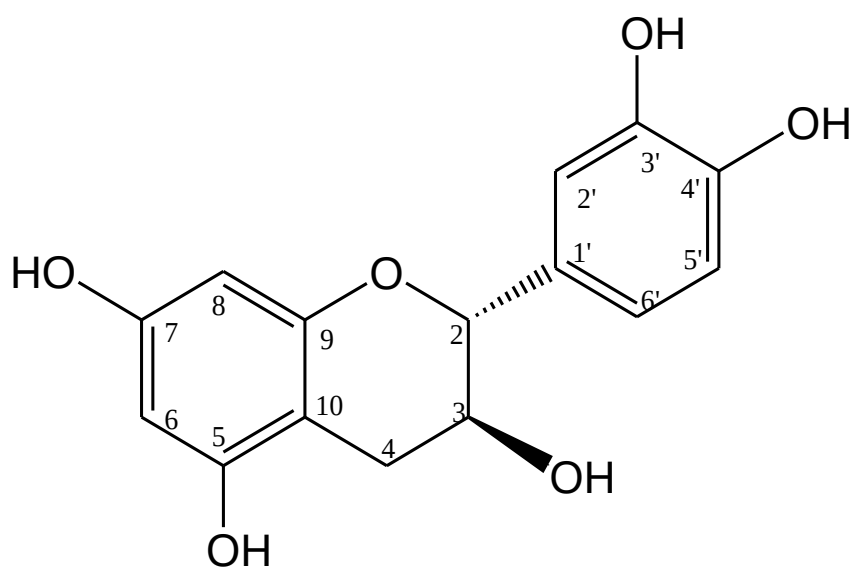




PHỤ LỤC 5

PHỤ LỤC 5: PHỔ CỦA CHẤT BBV4

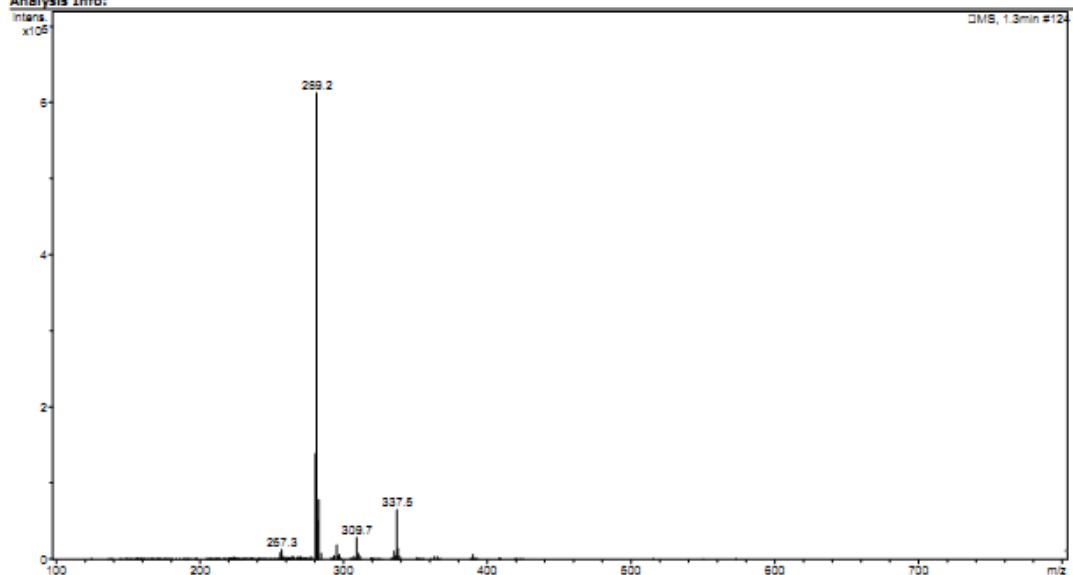
- MS
- ^1H -NMR
- ^{13}C -NMR
- DEPT



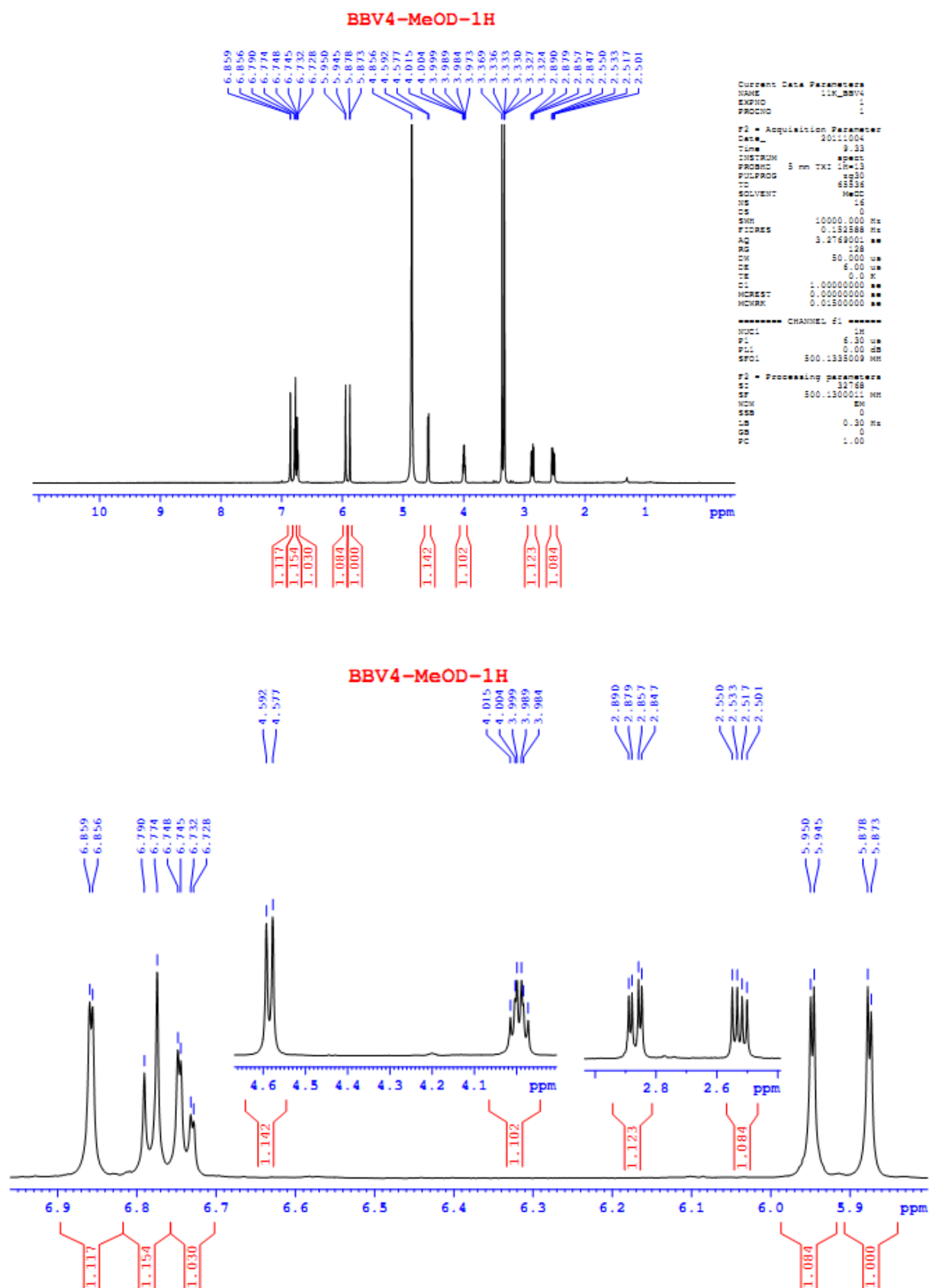
Phổ ESI-MS

Display Report - Selected Window Selected Analysis

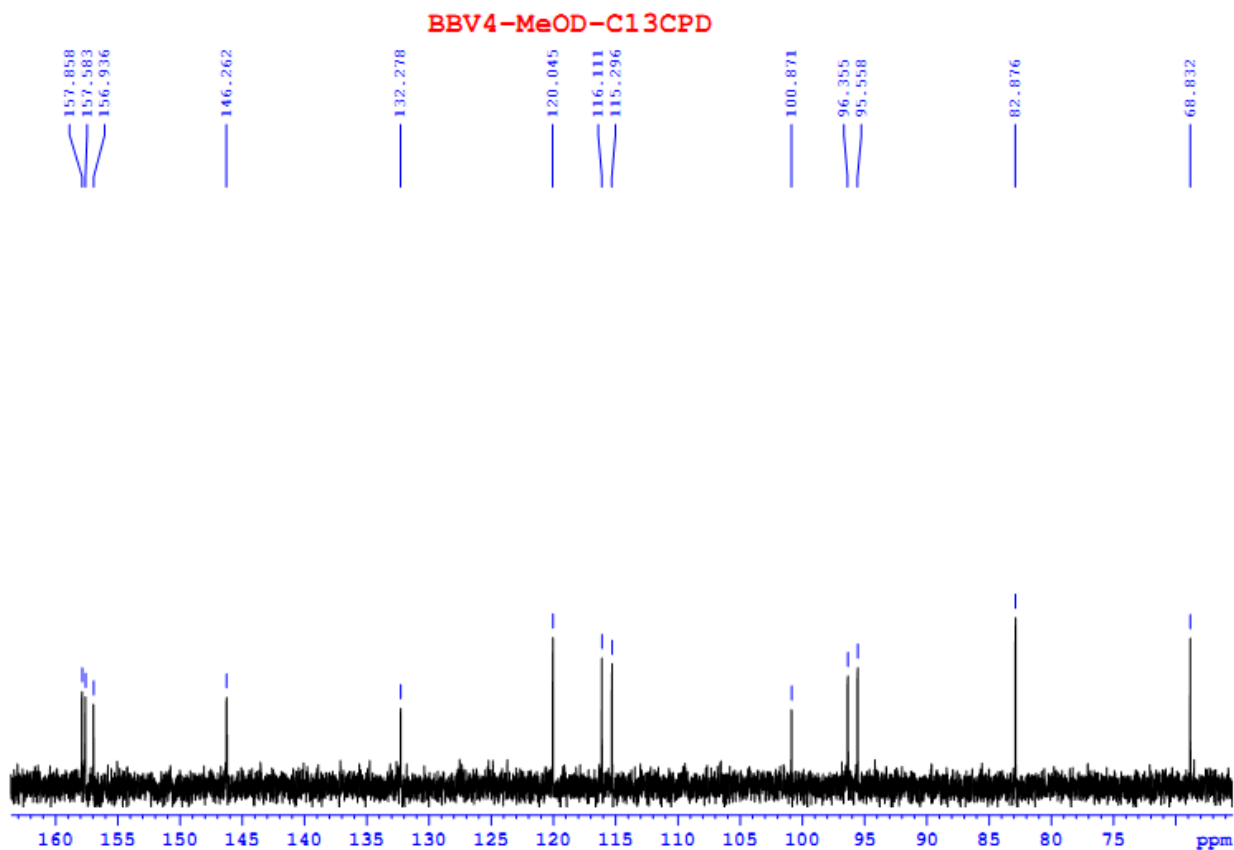
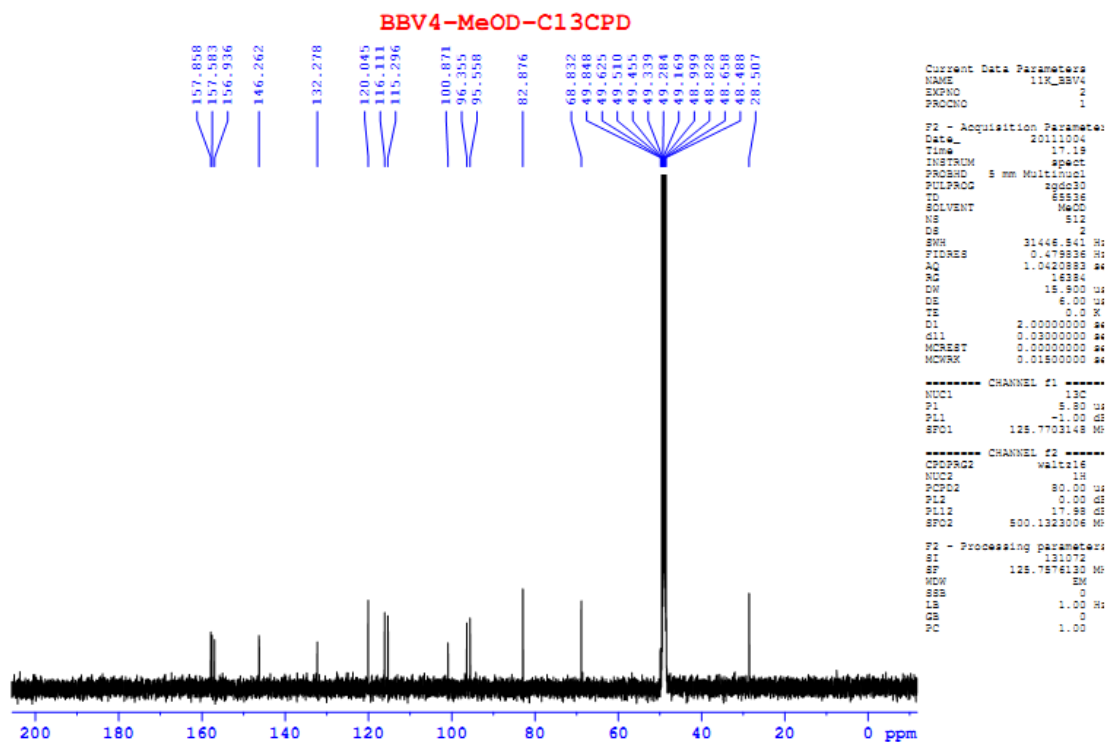
Analysis Name: 12040308.d Instrument: Agilent 6310 Ion Trap Print Date: 4/5/2012 12:06:20 PM
Method: DO MS.m Operator: Phong PTHC, Vien Hoa HCTN Acq. Date: 28/4/2012 3:54:40 PM
Sample Name: BBV4
Analysis Info:



Phổ ^1H -NMR



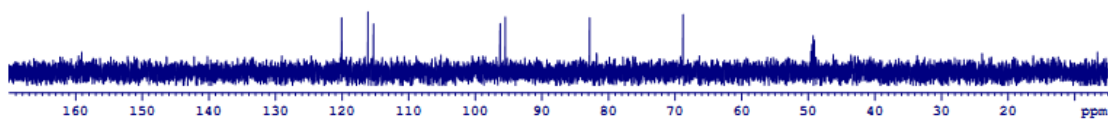
Phô ^{13}C -NMR



Phổ DEPT

BBV4-MeOD-C13CPD&DEPT

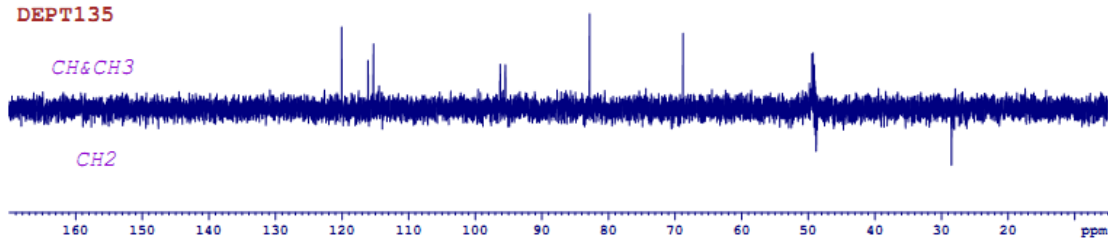
DEPT90



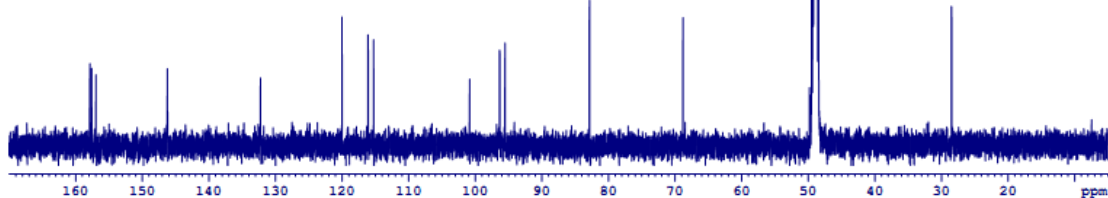
DEPT135

CH&CH3

CH2

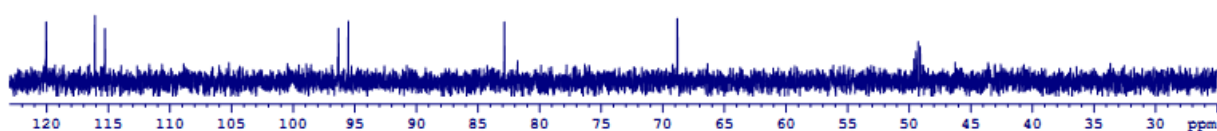


C13CPD



BBV4-MeOD-C13CPD&DEPT

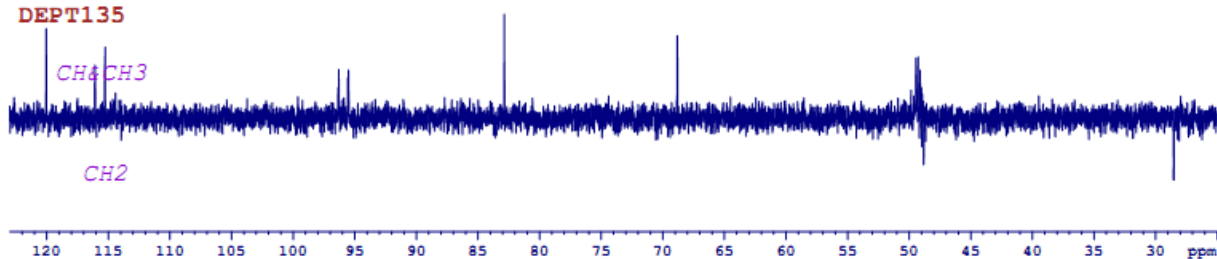
DEPT90



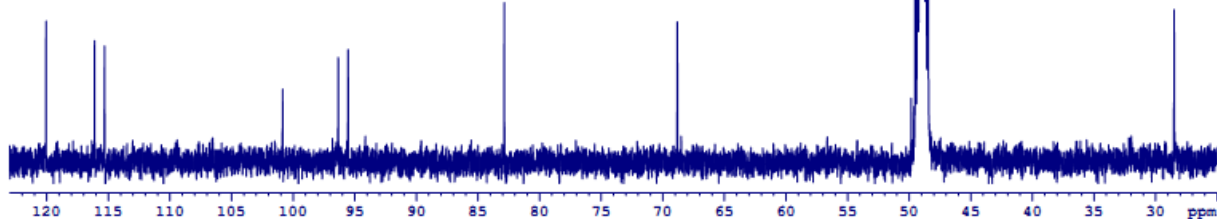
DEPT135

CH&CH3

CH2



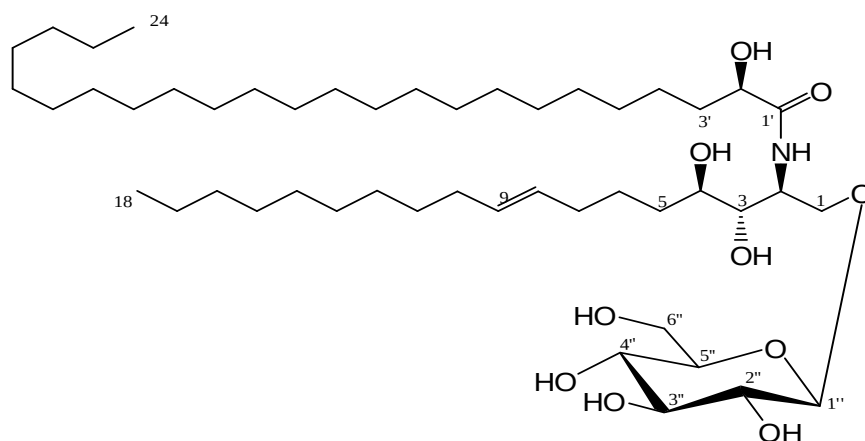
C13CPD



PHỤ LỤC 6

PHỤ LỤC 6: PHỔ CỦA CHẤT BBV5

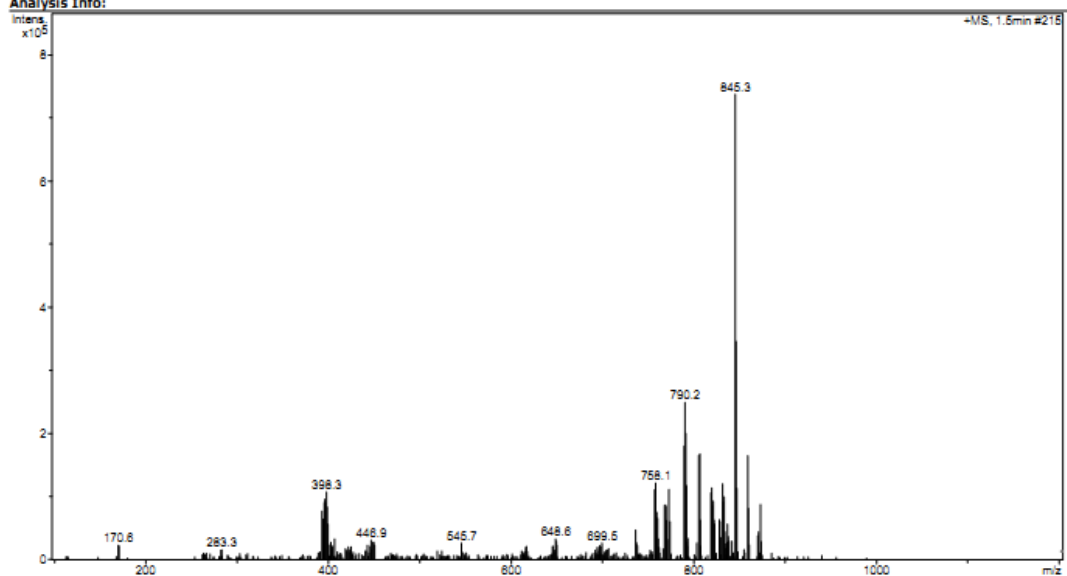
- MS
- ^1H -NMR
- ^{13}C -NMR
- DEPT
- HMBC
- HSQC



Phổ ESI-MS

Display Report - Selected Window Selected Analysis

Analysis Name: 12040502.d Instrument: Agilent 6310 Ion Trap Print Date: 4/5/2012 1:14:36 PM
Method: DO MS.m Operator: Phong PTHC, Vien Hoa HCTN Acq. Date: 4/5/2012 12:54:59 PM
Sample Name: BBV5
Analysis Info:



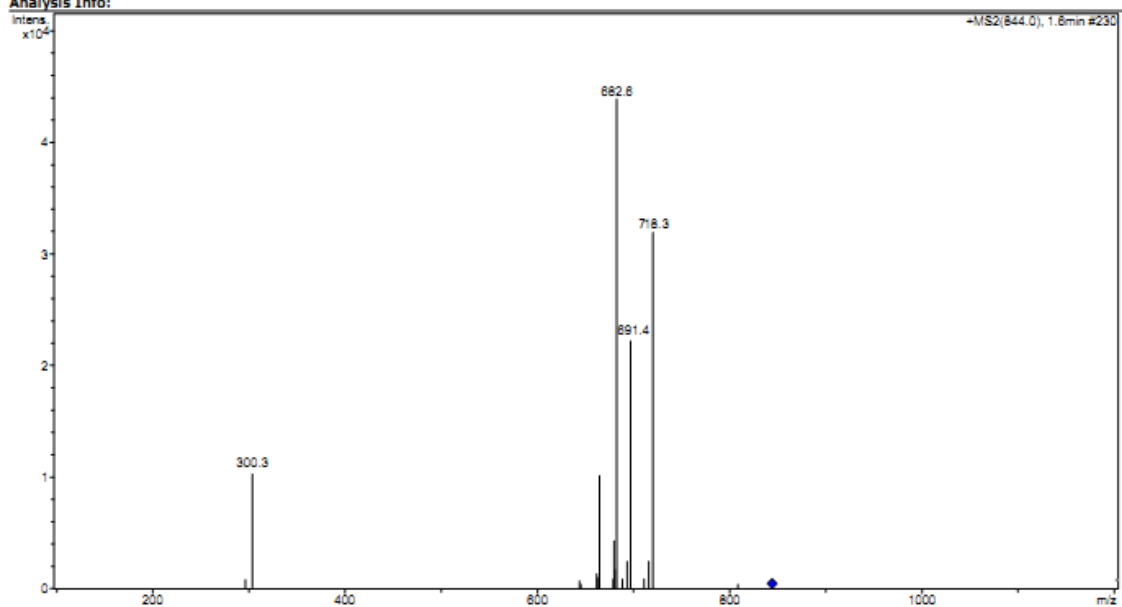
MSD Trap Report v 4 (A4-Opt2)

Page 1 of 1

Agilent Technologies

Display Report - Selected Window Selected Analysis

Analysis Name: 12040502.d Instrument: Agilent 6310 Ion Trap Print Date: 4/5/2012 1:26:33 PM
Method: DO MS.m Operator: Phong PTHC, Vien Hoa HCTN Acq. Date: 4/5/2012 12:54:59 PM
Sample Name: BBV5
Analysis Info:

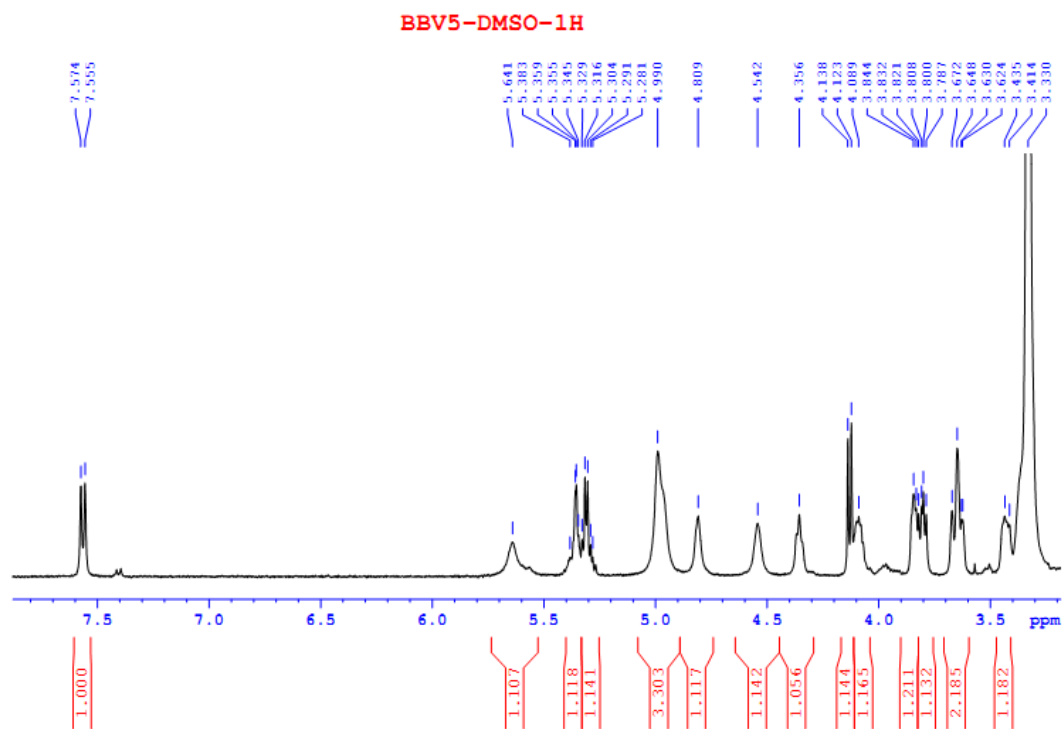
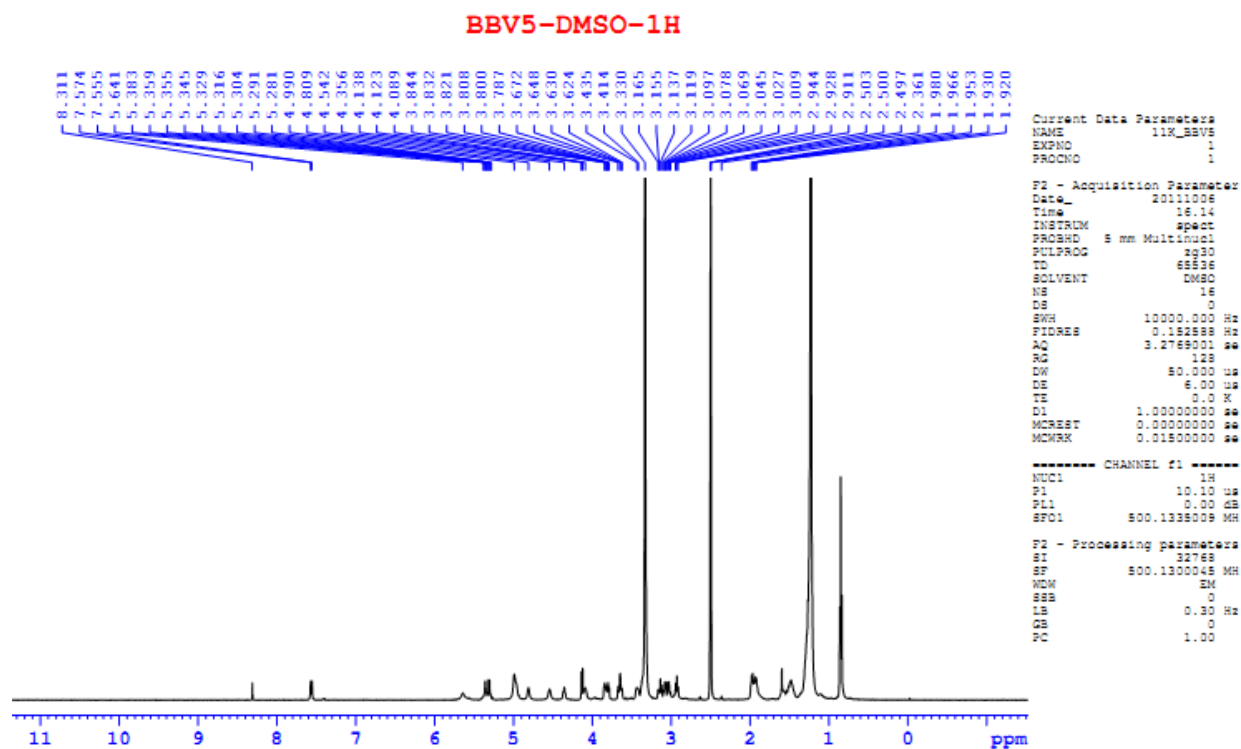


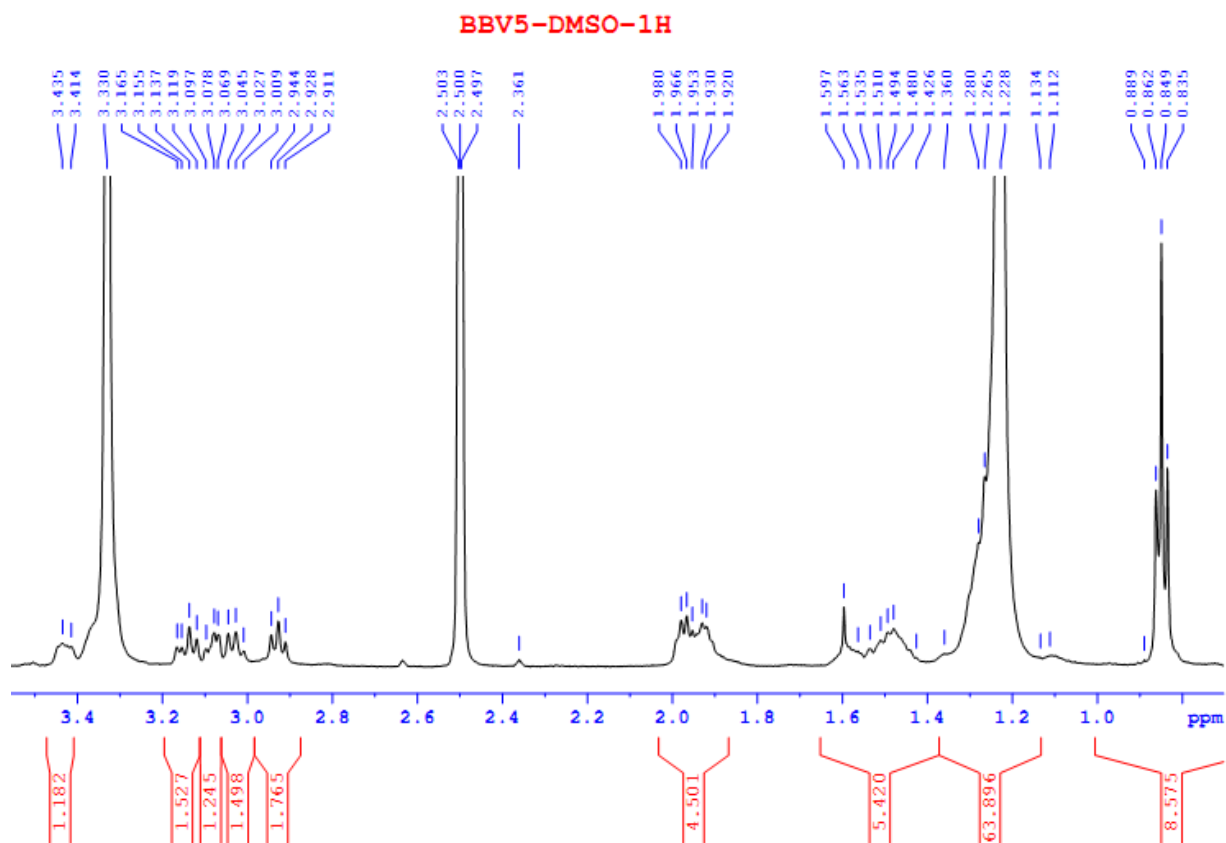
MSD Trap Report v 4 (A4-Opt2)

Page 1 of 1

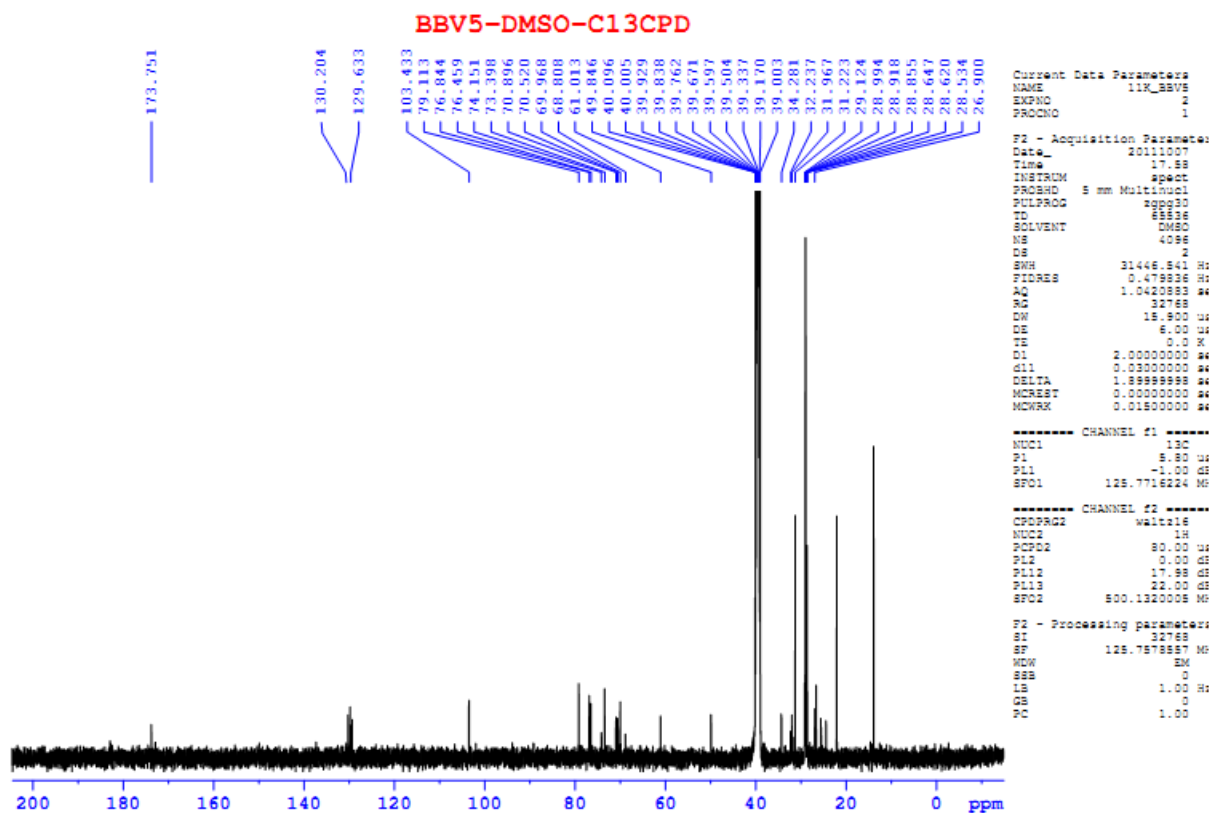
Agilent Technologies

Phở ¹H-NMR

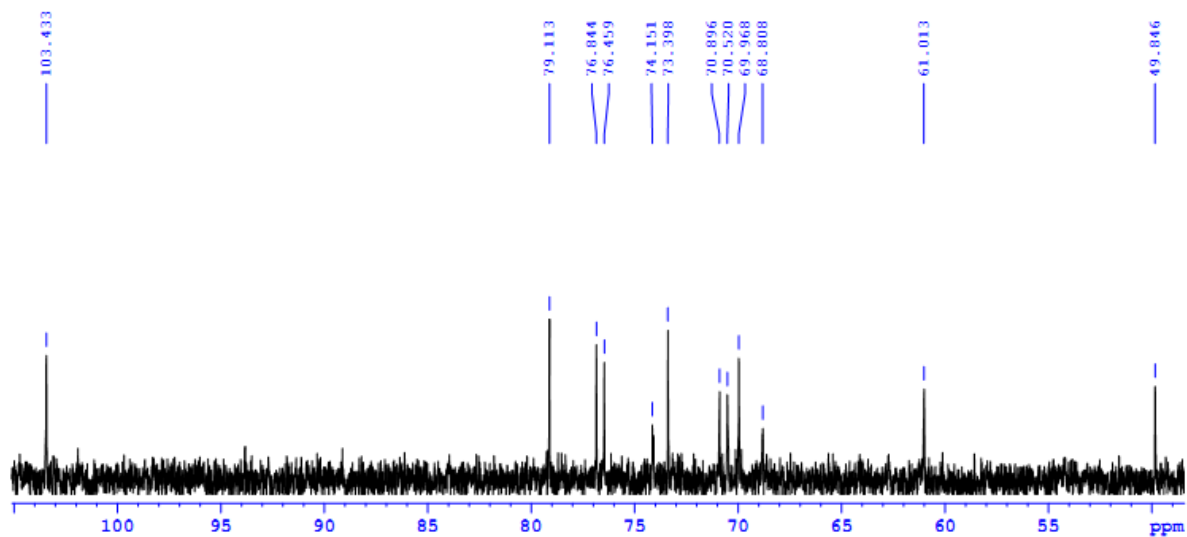




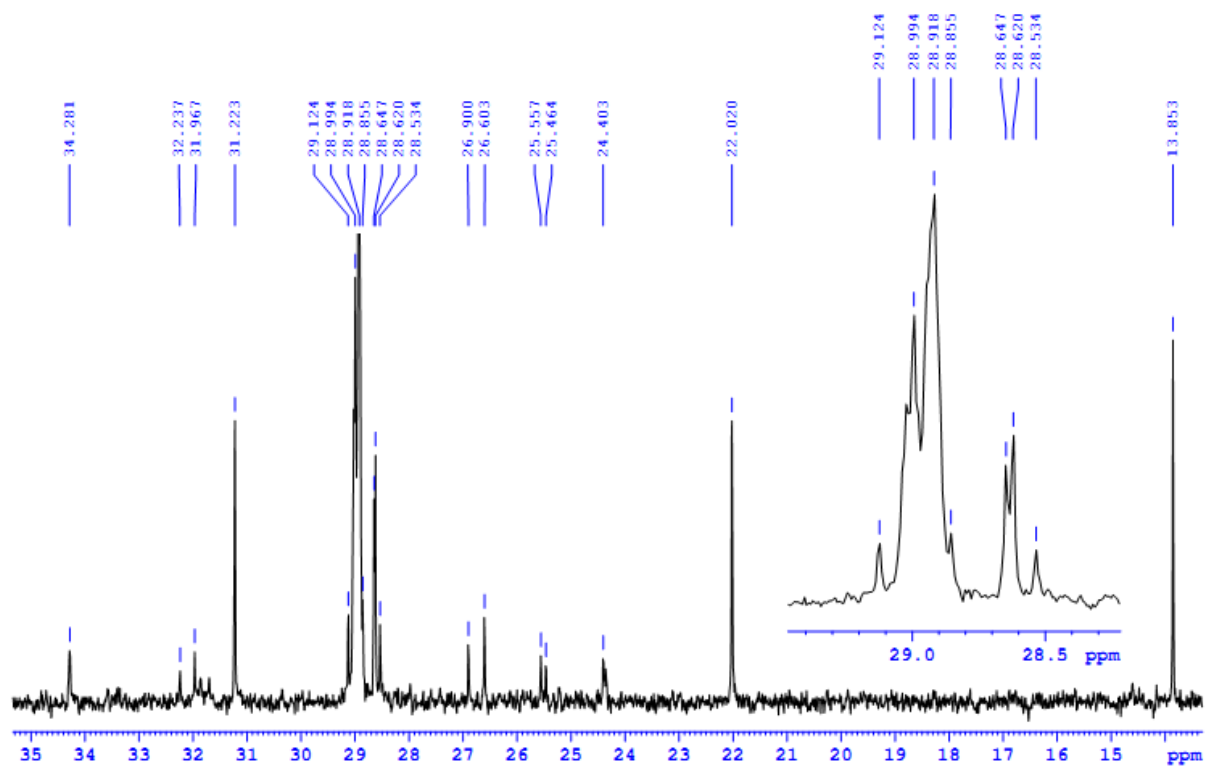
Pho ^{13}C -NMR



BBV5-DMSO-C13CPD



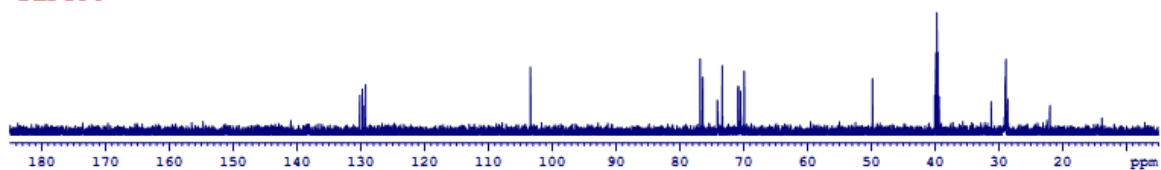
BBV5-DMSO-C13CPD



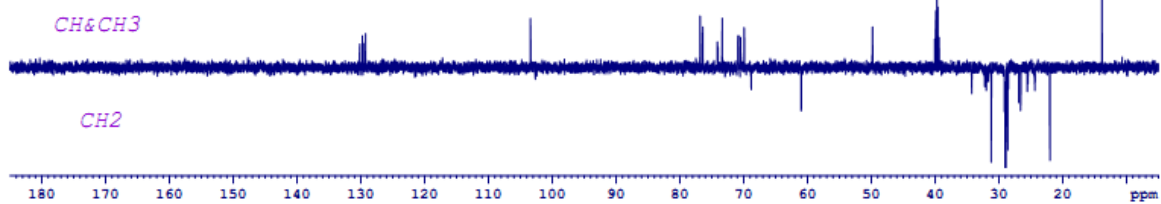
Phổ DEPT

BBV5-DMSO-C13CPD &DEPT

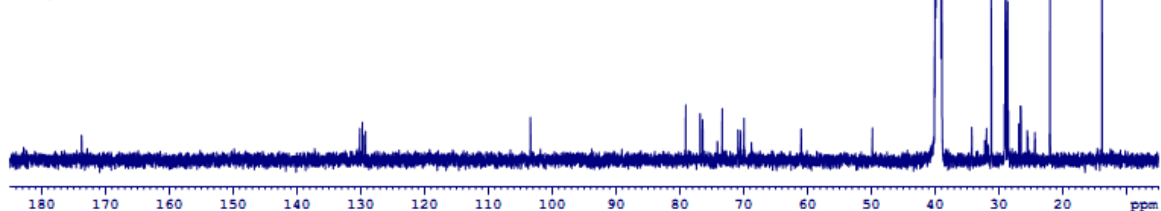
DEPT90



DEPT135

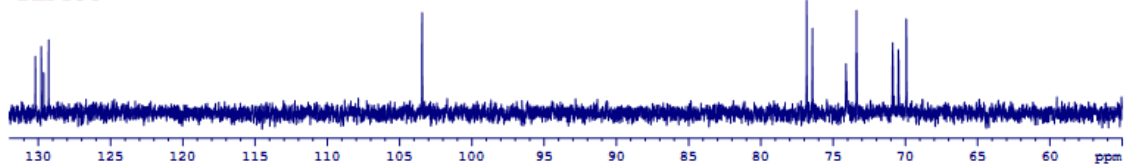


C13CPD

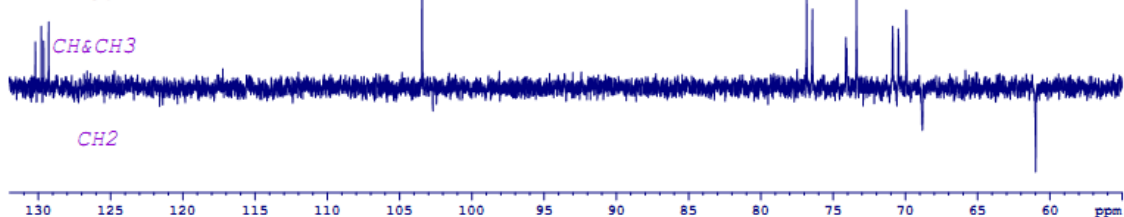


BBV5-DMSO-C13CPD &DEPT

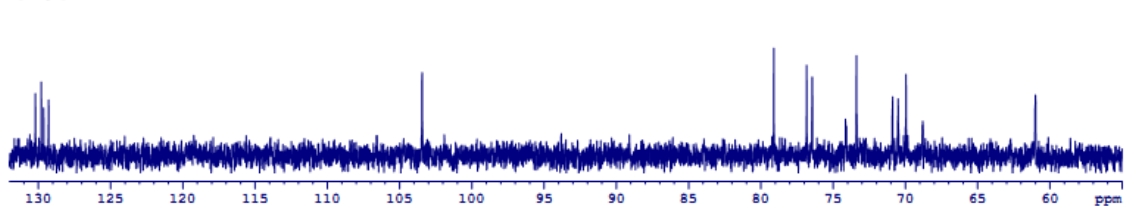
DEPT90



DEPT135

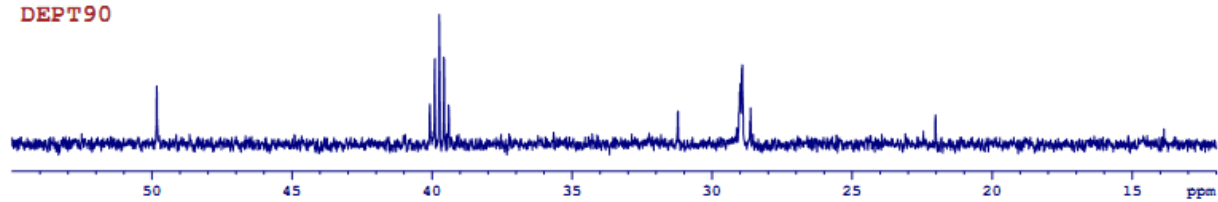


C13CPD

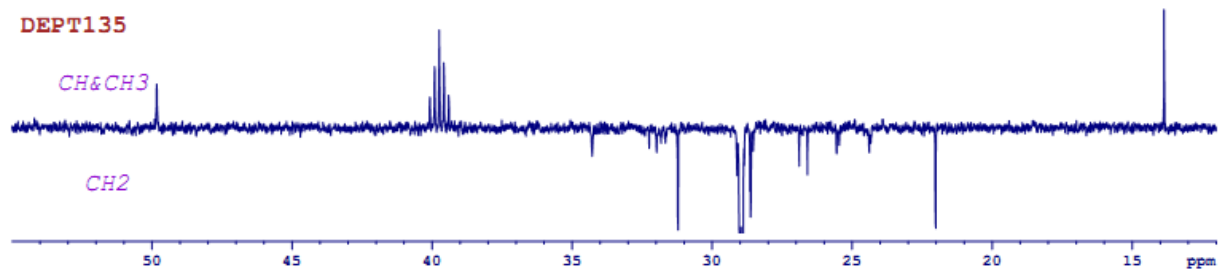


BBV5-DMSO-C13CPD &DEPT

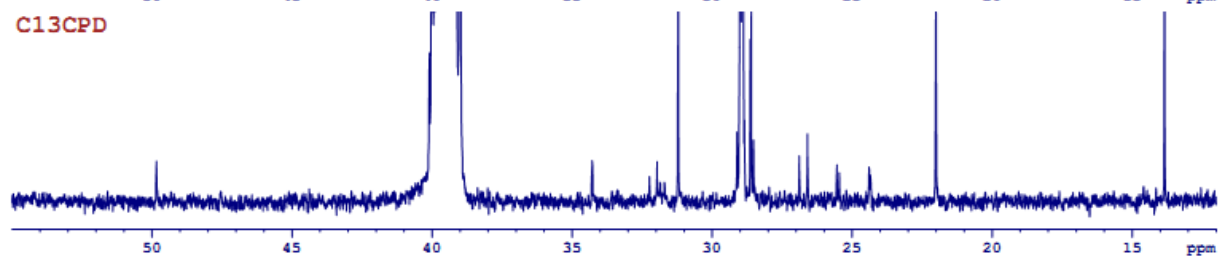
DEPT90



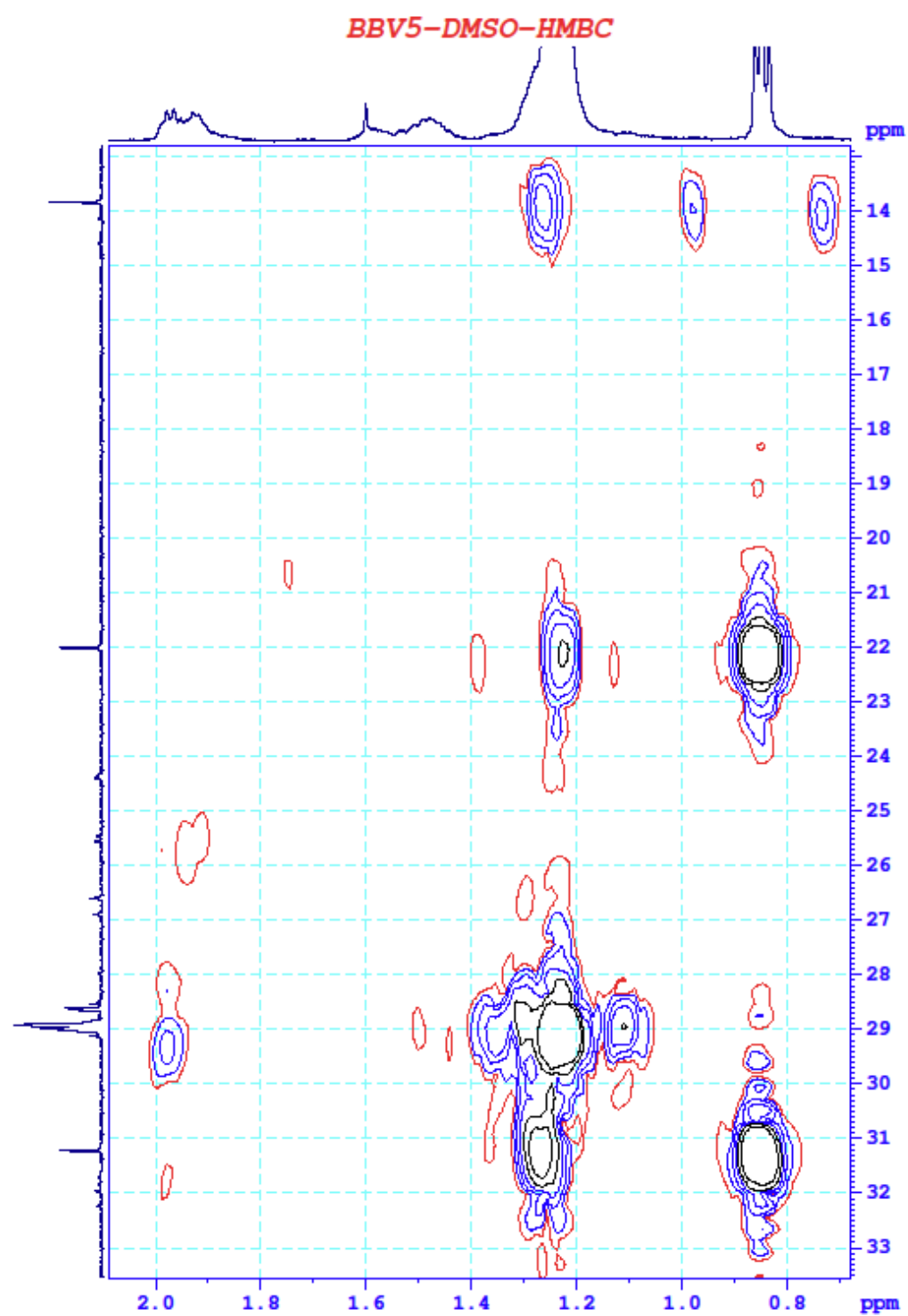
DEPT135

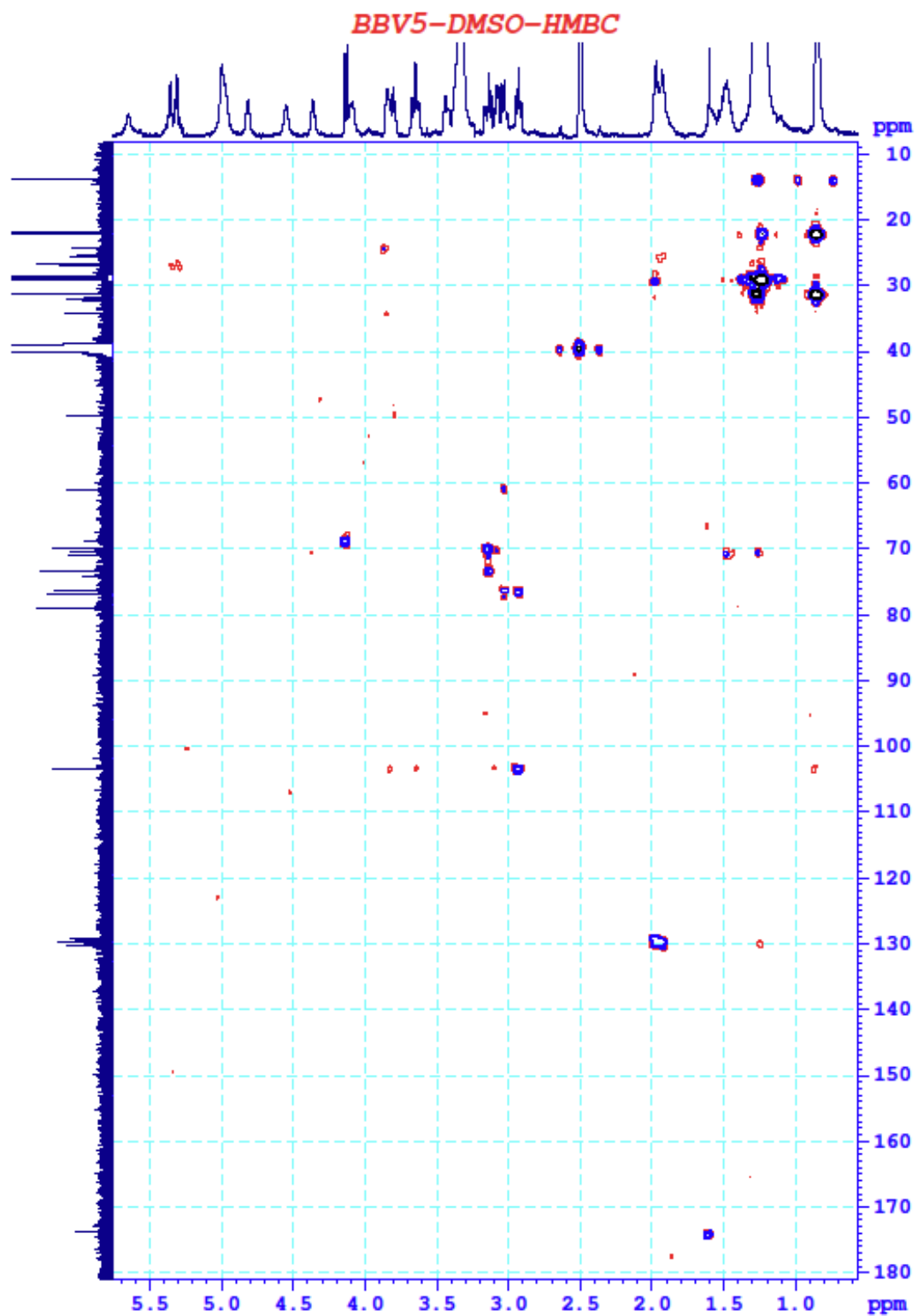


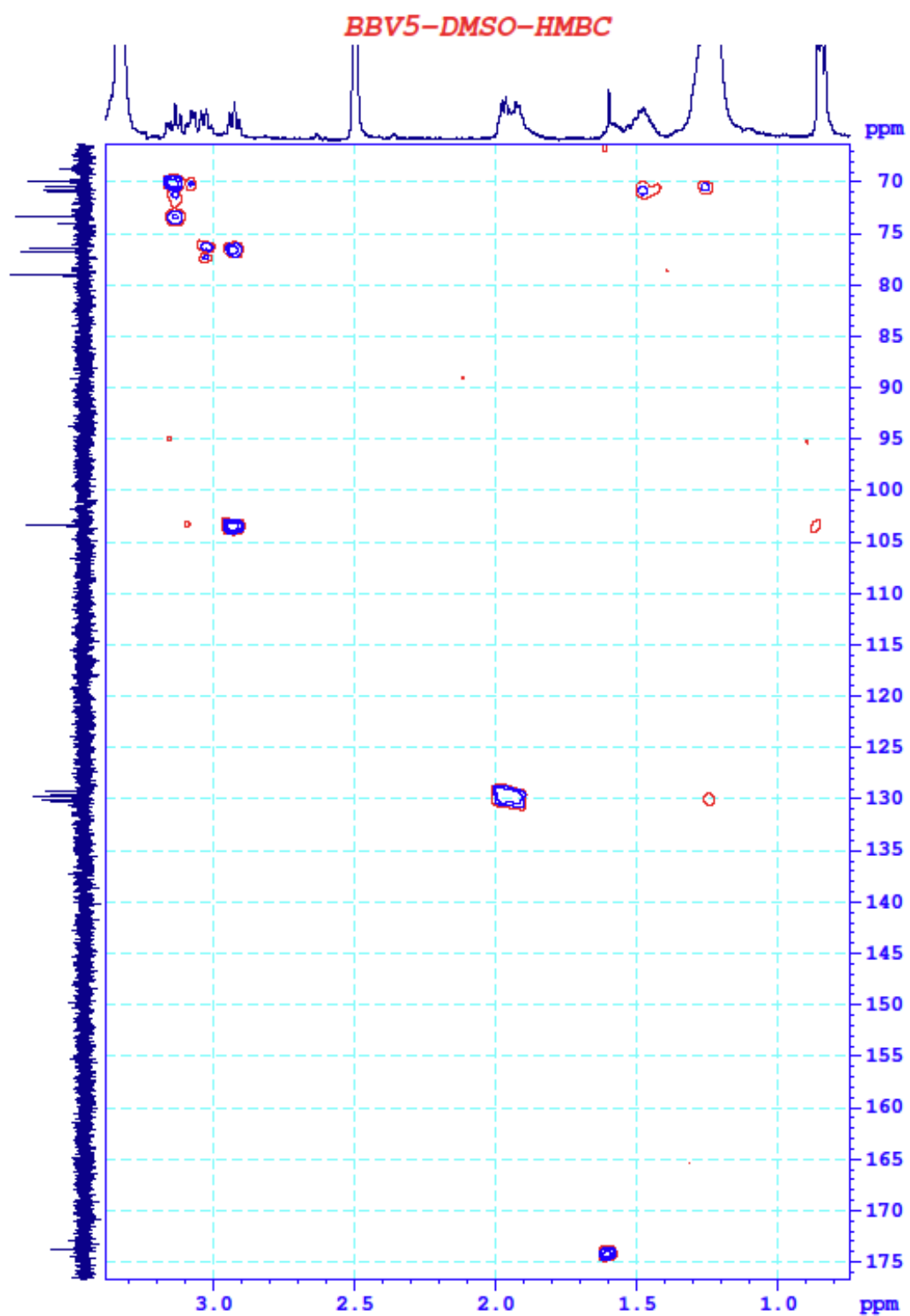
C13CPD

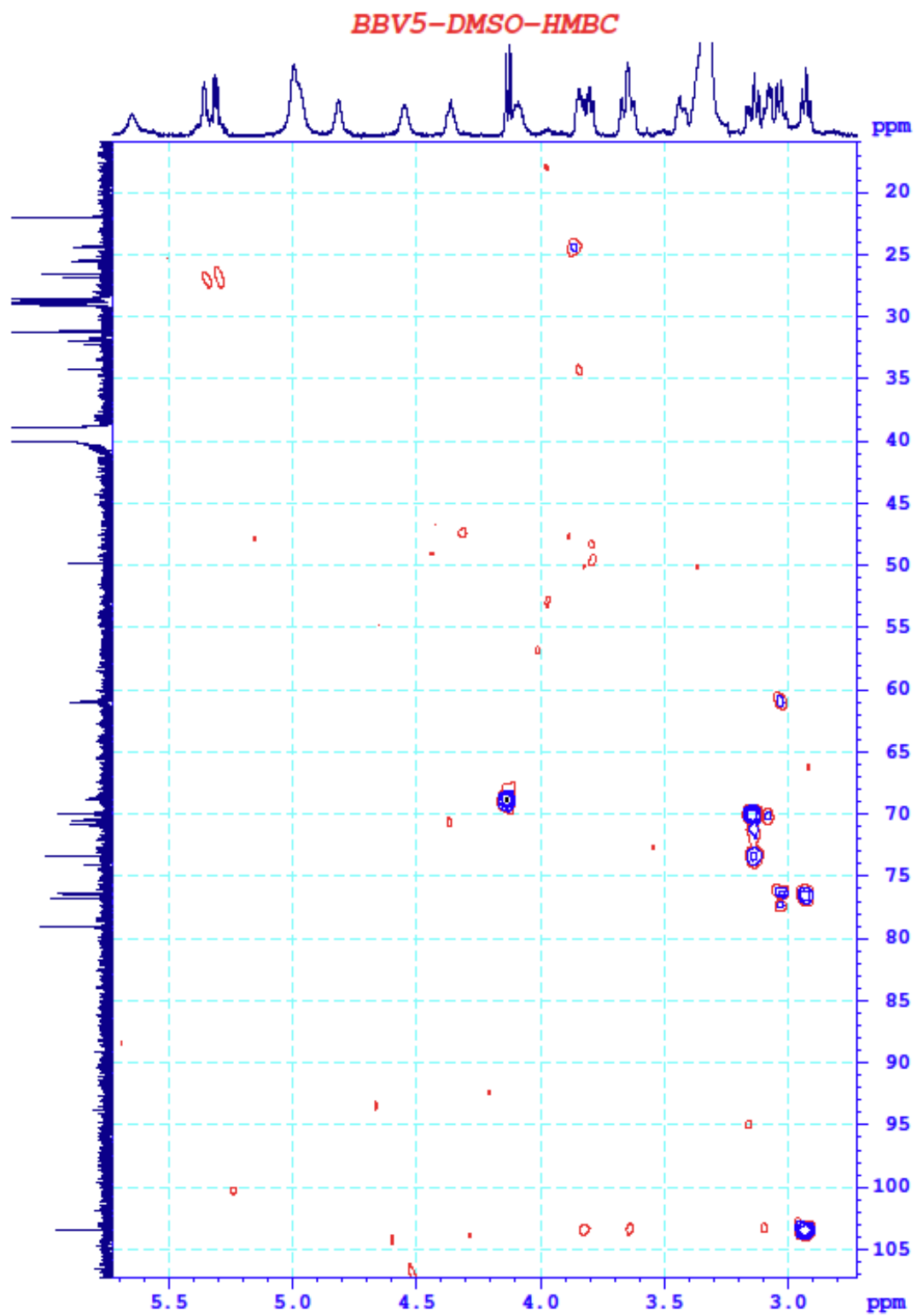


Phổ HMBC

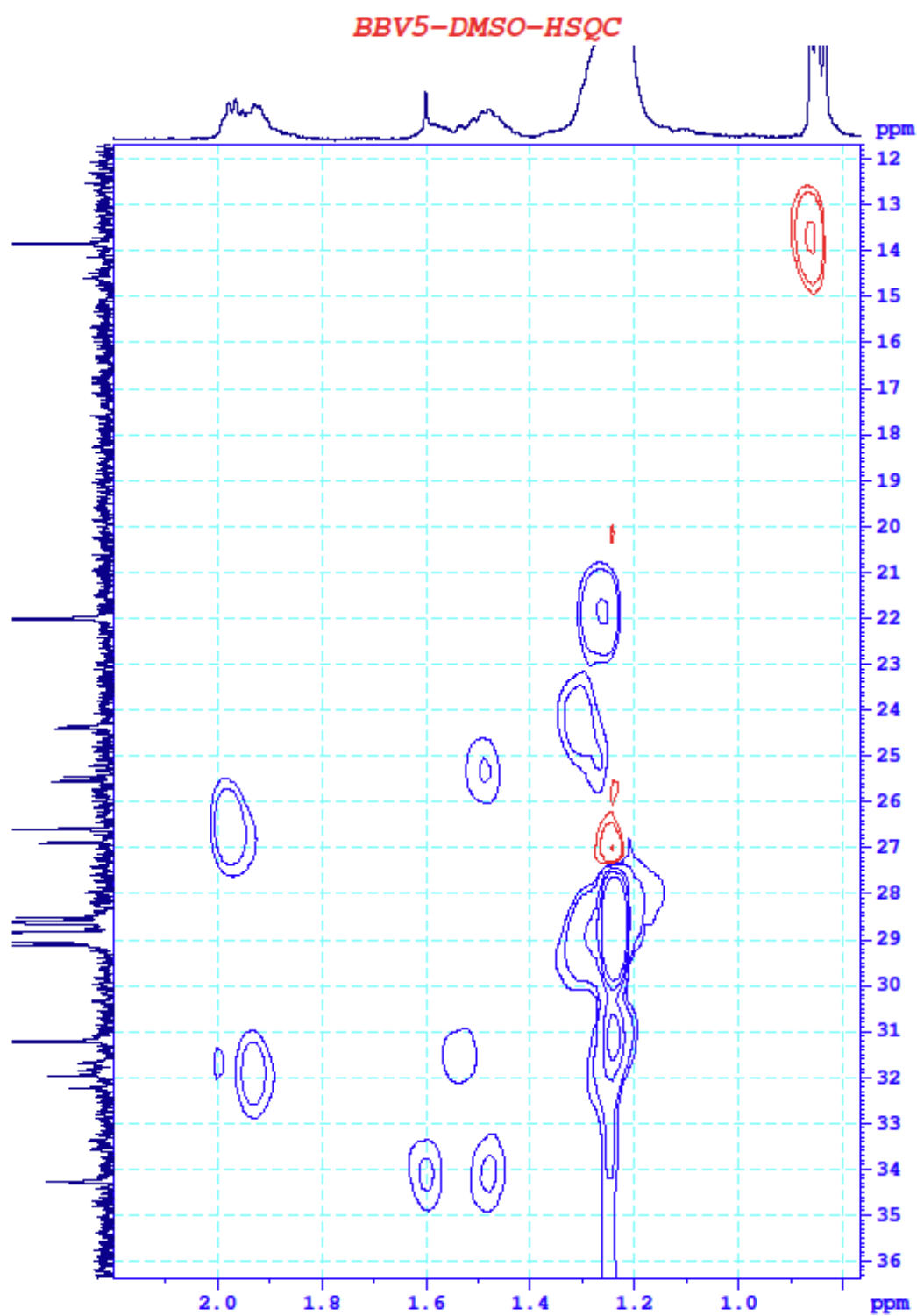


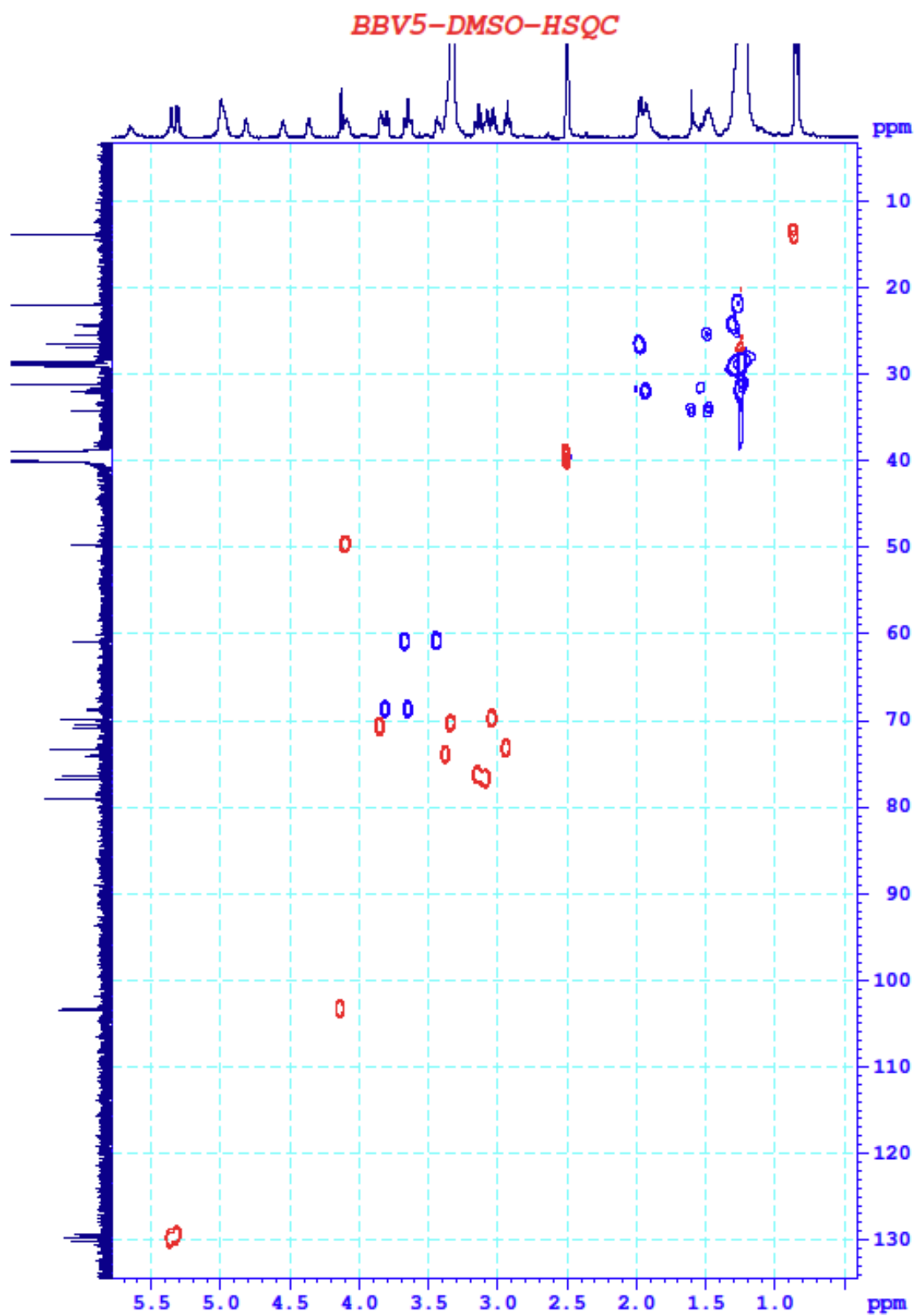


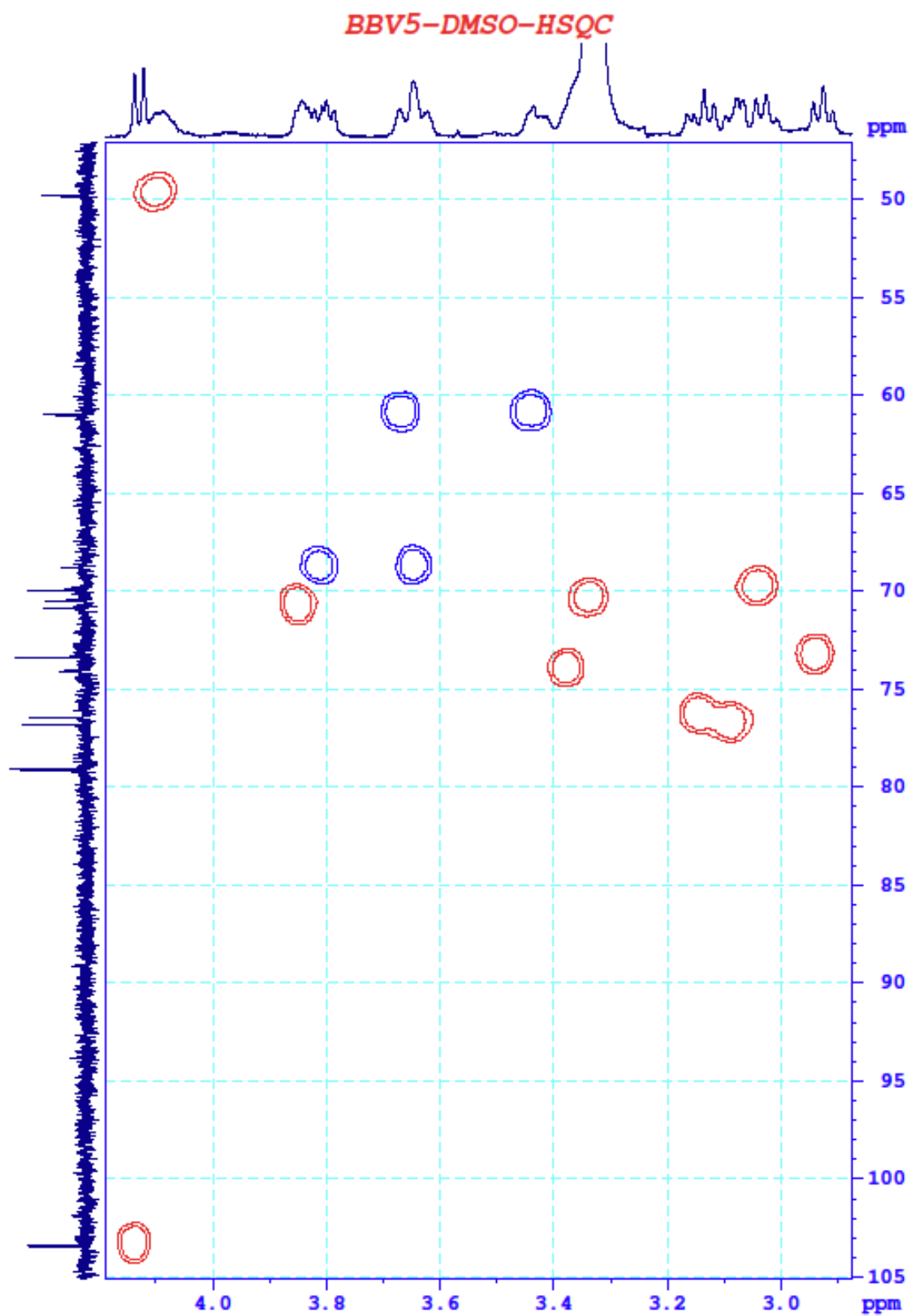




Phổ HSQC



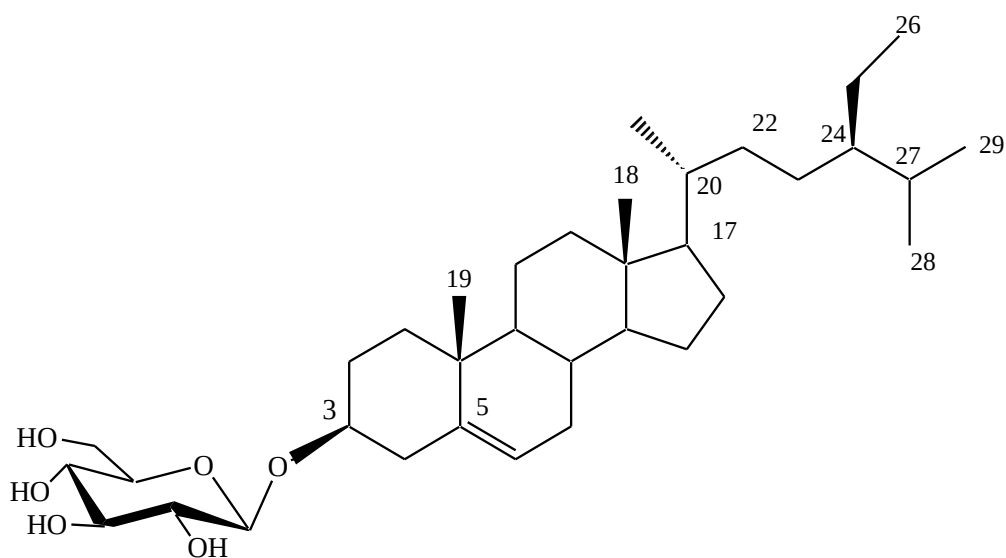




PHỤ LỤC 7

PHỤ LỤC 7: PHỔ CỦA CHẤT BBV6-BBL1

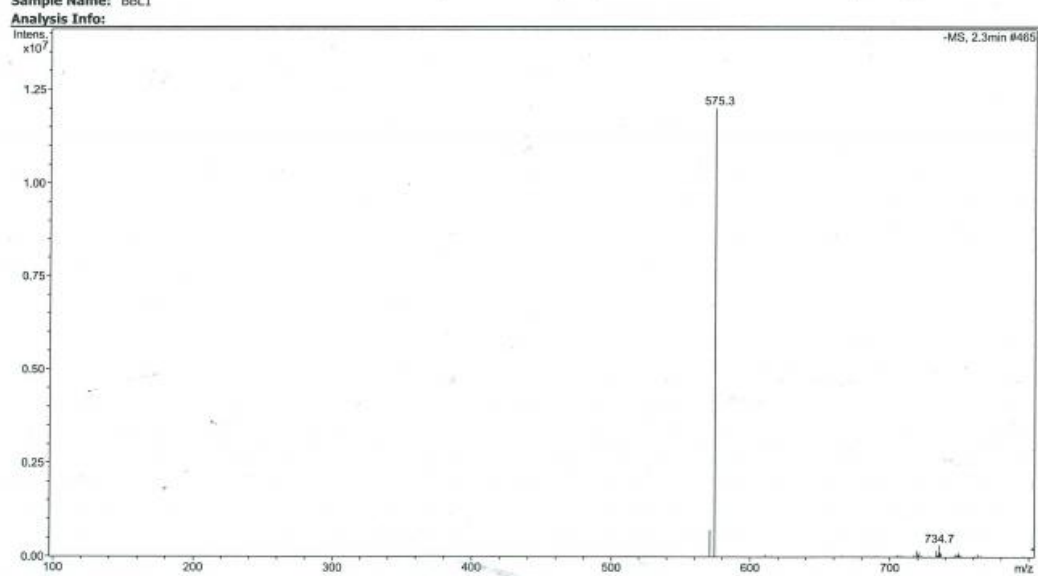
- MS
- ^1H -NMR
- ^{13}C -NMR
- DEPT
- HMBC
- HSQC



Phổ ESI-MS

Display Report - Selected Window Selected Analysis

Analysis Name: 12040311.d Instrument: Agilent 6310 Ion Trap Print Date: 4/5/2012 12:14:53 PM
Method: DO MS.m Operator: Phong PTHC, Vien Hoa HCTN Acq. Date: 4/3/2012 5:26:06 PM
Sample Name: BBL1



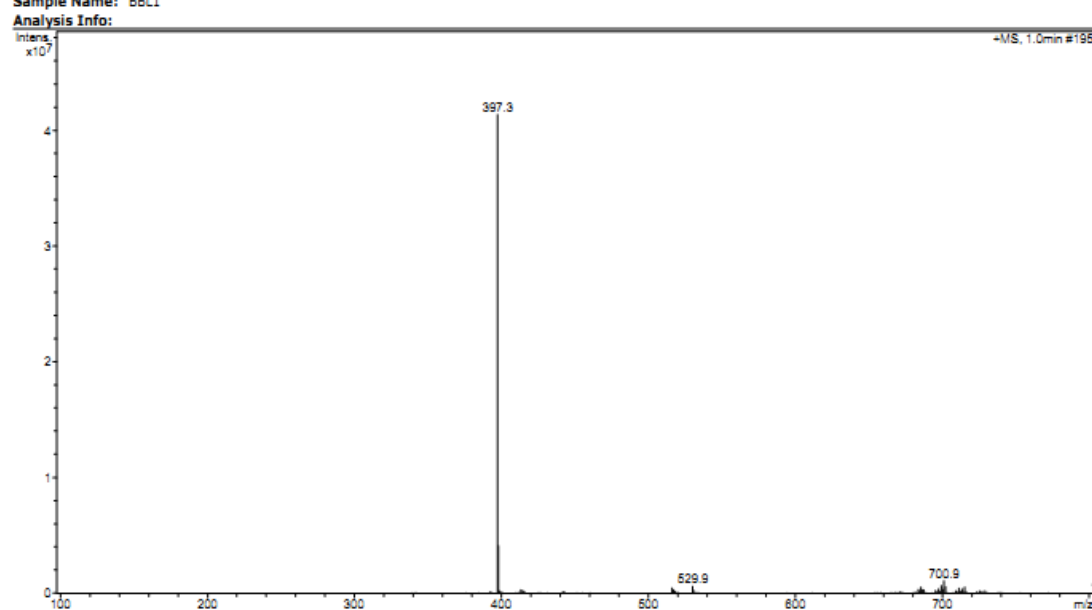
MSD Trap Report v 4 (A4-Opt2)

Page 1 of 1

Agilent Technologies

Display Report - Selected Window Selected Analysis

Analysis Name: 12040311.d Instrument: Agilent 6310 Ion Trap Print Date: 4/5/2012 12:14:23 PM
Method: DO MS.m Operator: Phong PTHC, Vien Hoa HCTN Acq. Date: 4/3/2012 5:26:06 PM
Sample Name: BBL1

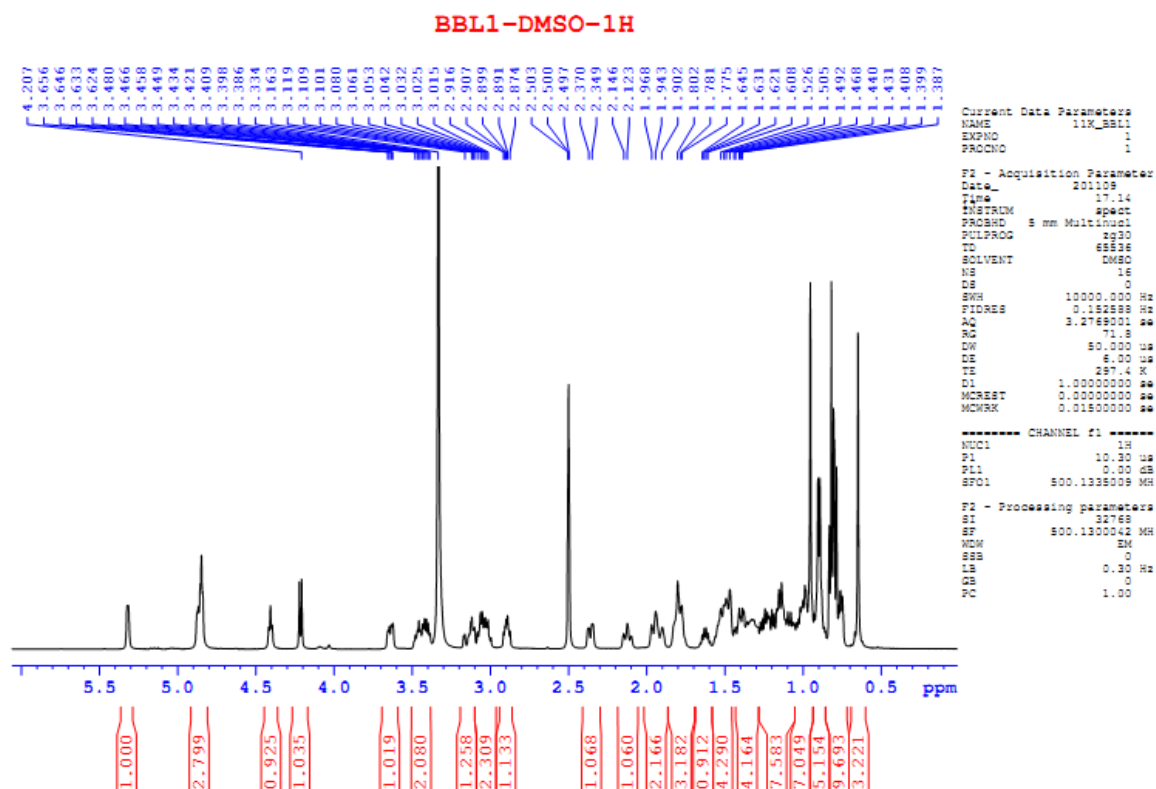


MSD Trap Report v 4 (A4-Opt2)

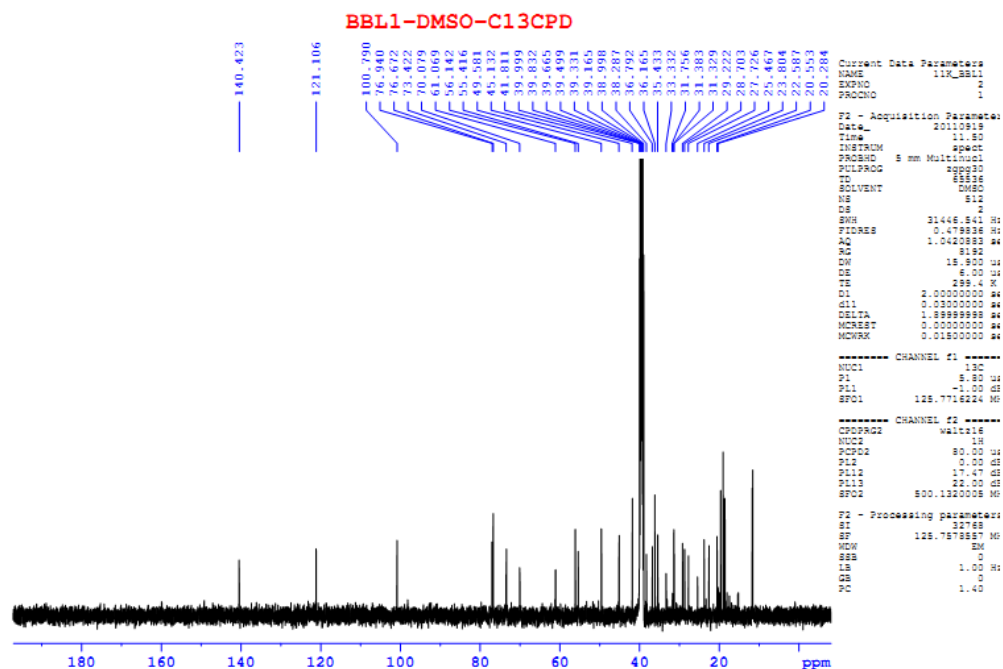
Page 1 of 1

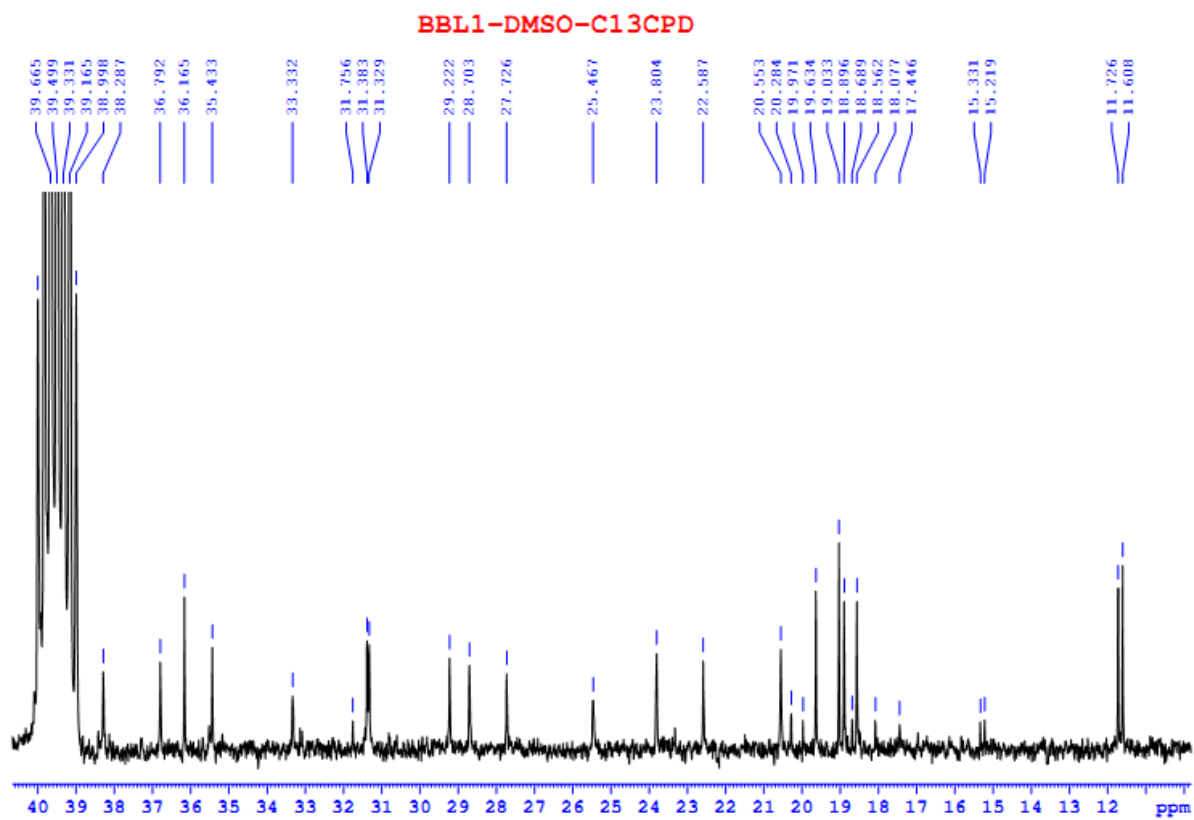
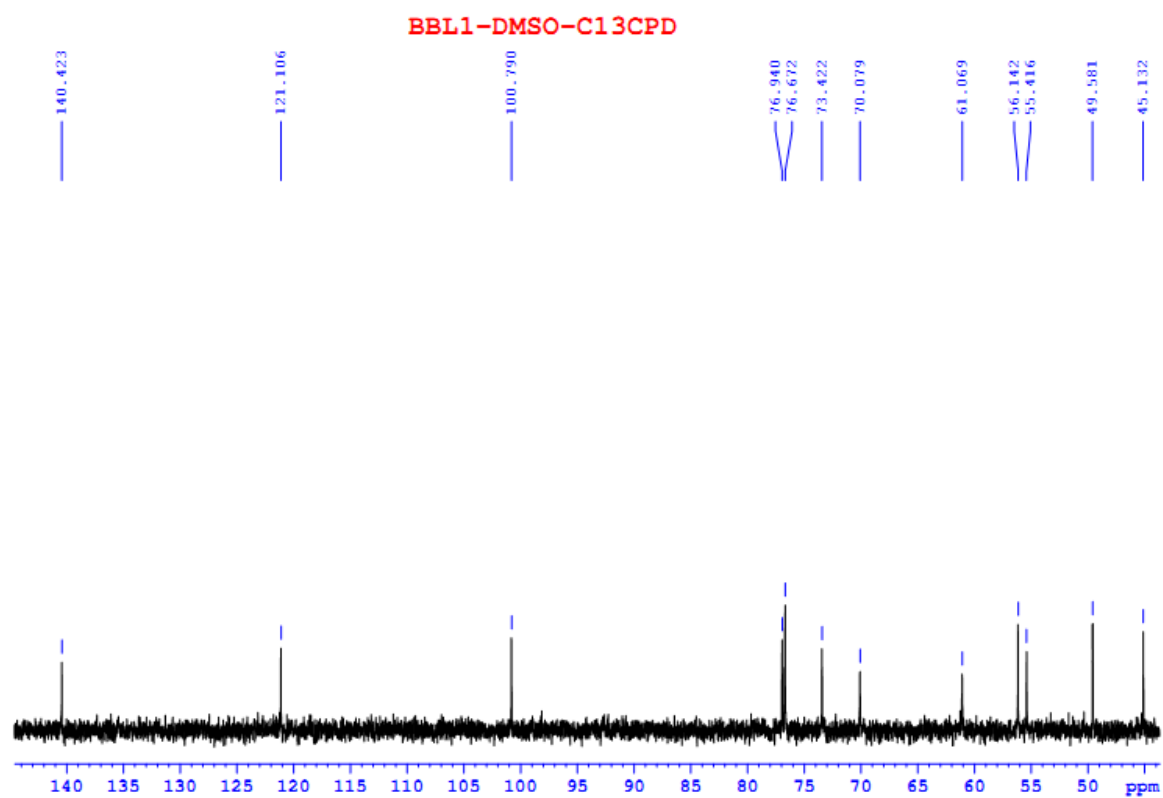
Agilent Technologies

Phổ ^1H -NMR



Phổ ^{13}C -NMR

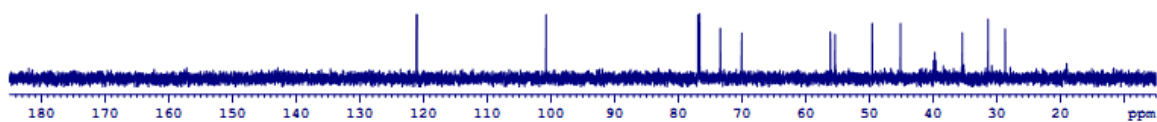




Phổ DEPT

BBL1-DMSO-C13CPD&DEPT

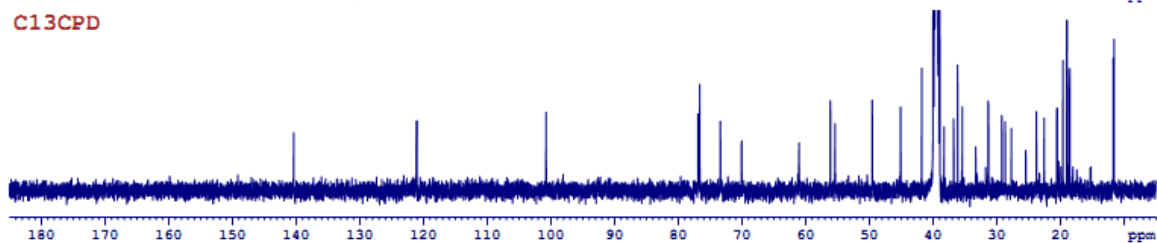
DEPT90



DEPT135

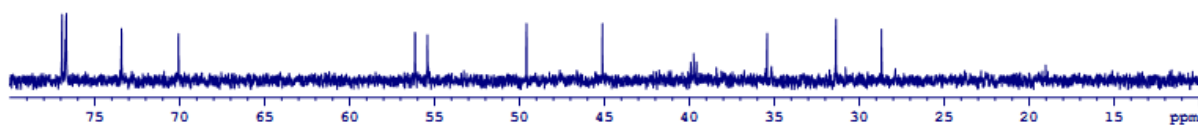
CH&CH3

CH2



BBL1-DMSO-C13CPD&DEPT

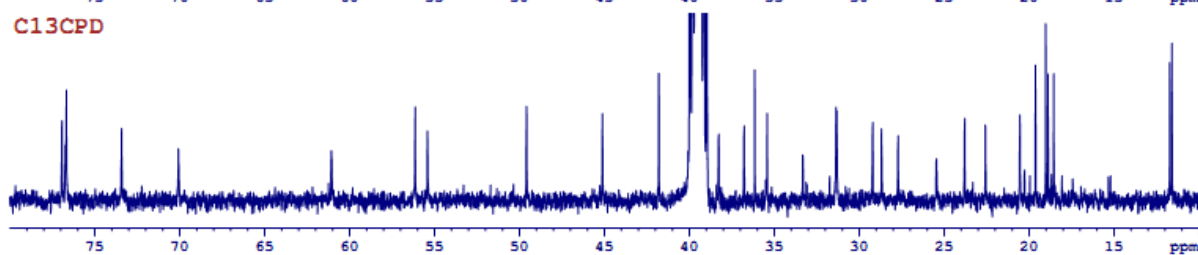
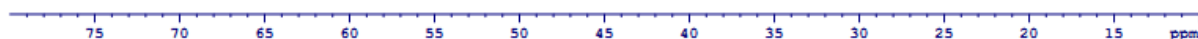
DEPT90



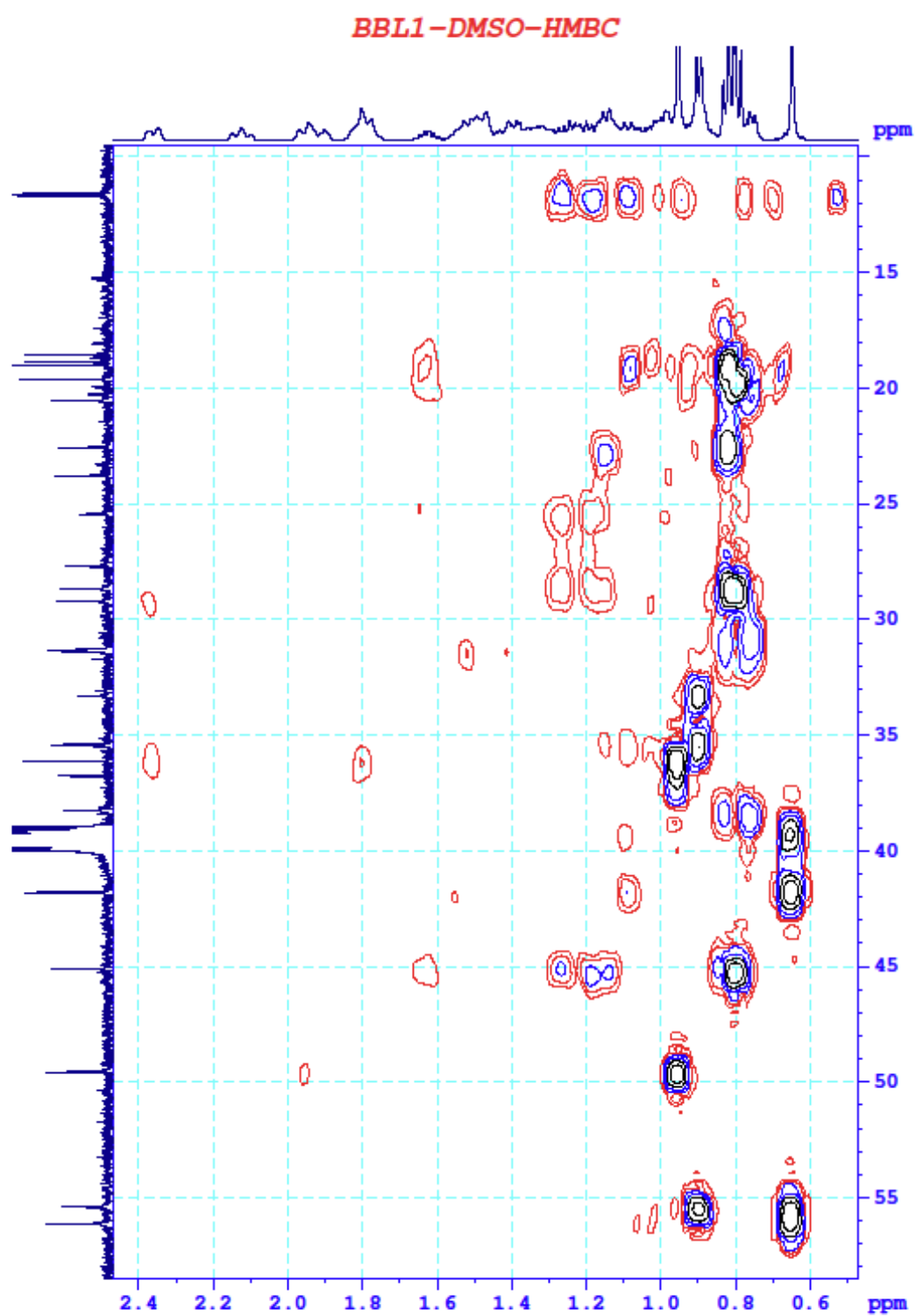
DEPT135

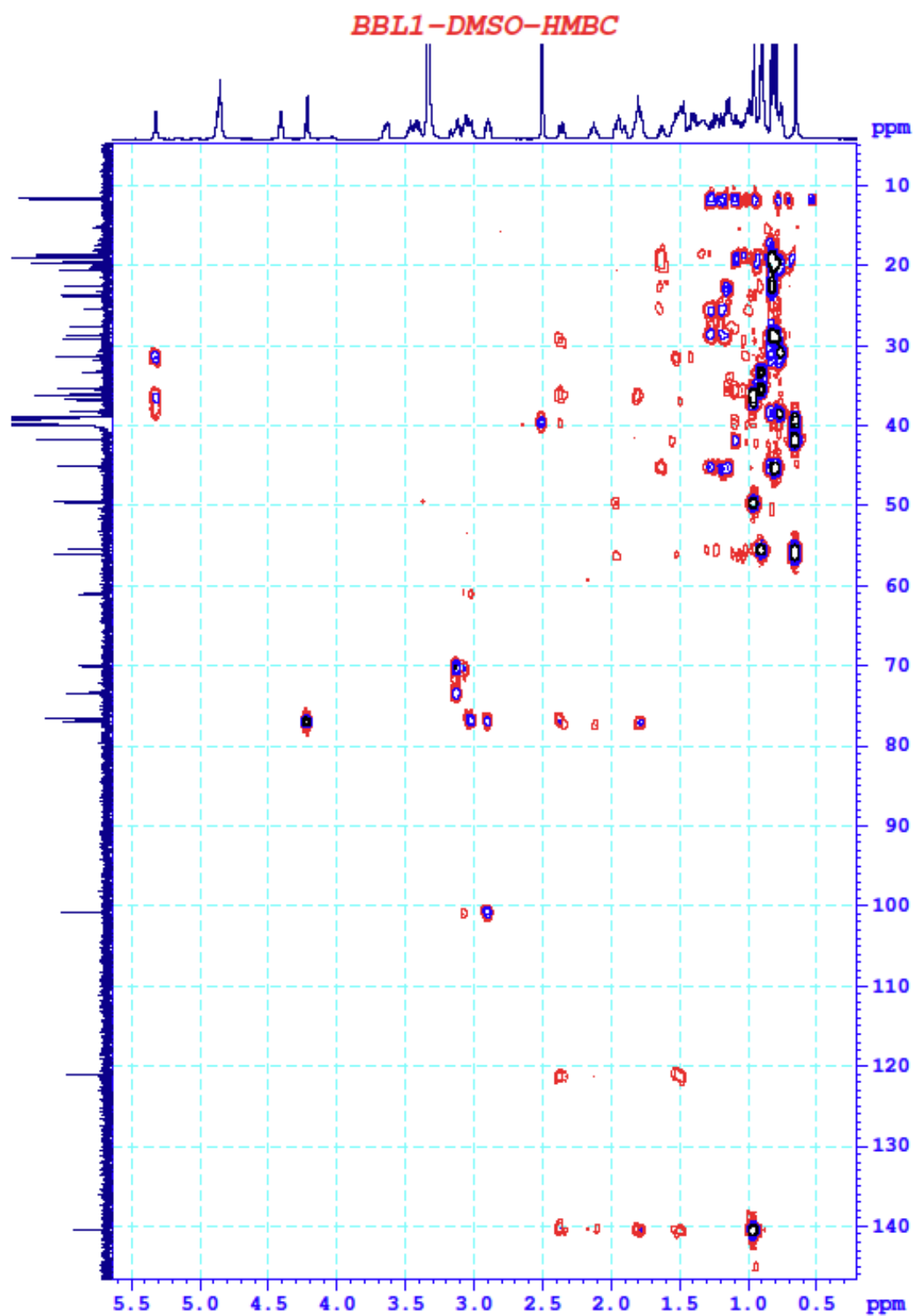
CH&CH3

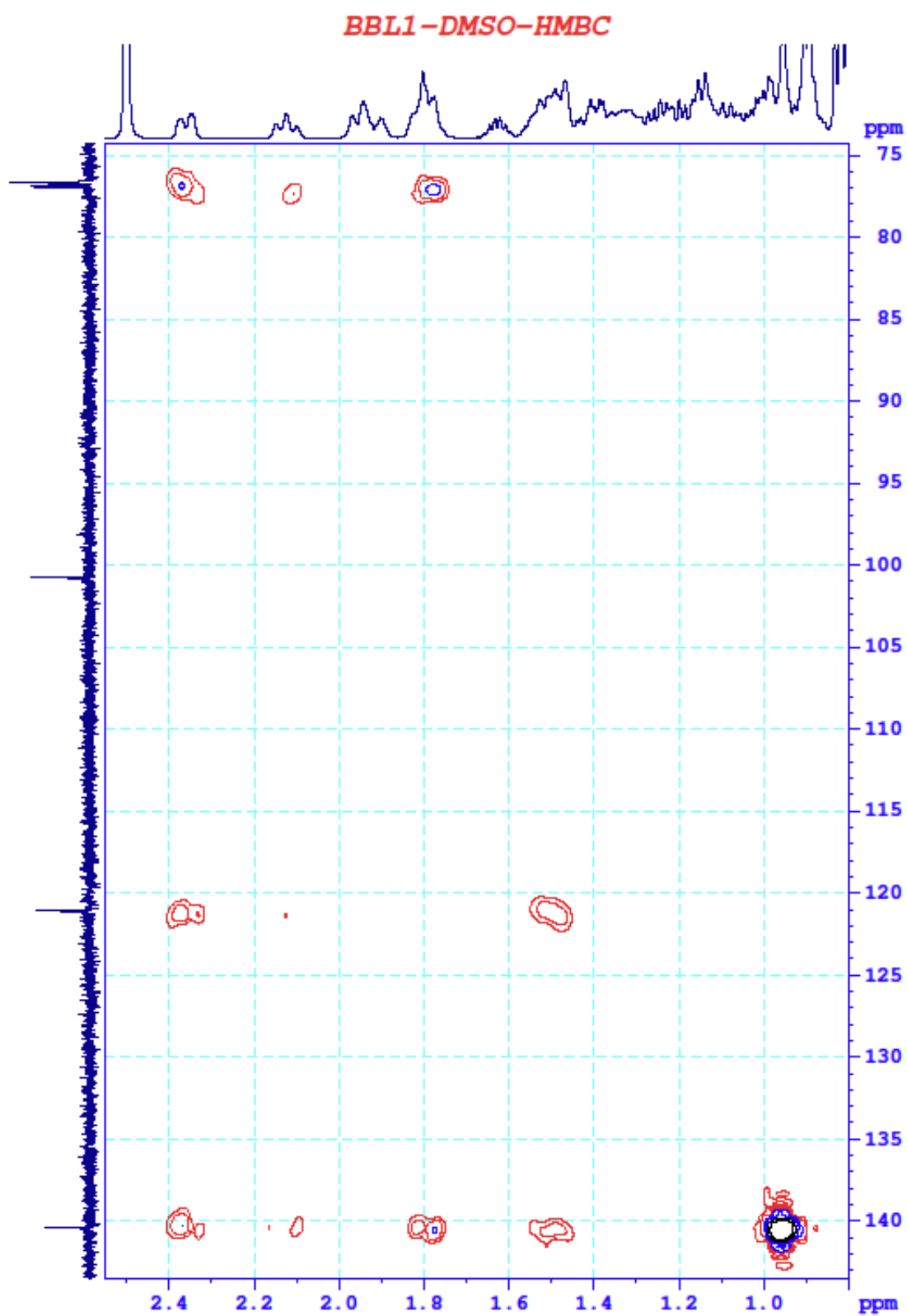
CH2

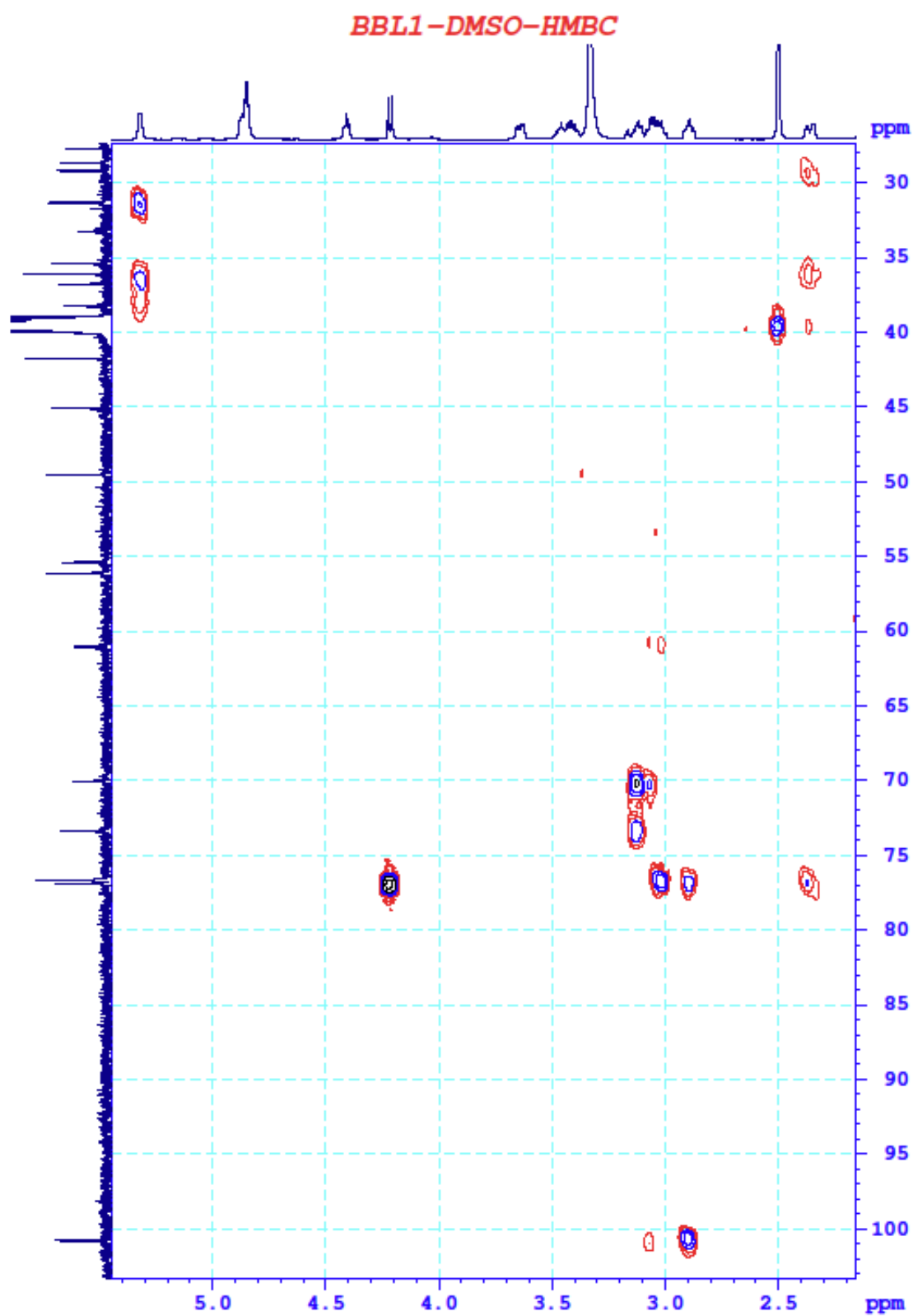


Phổ HMBC

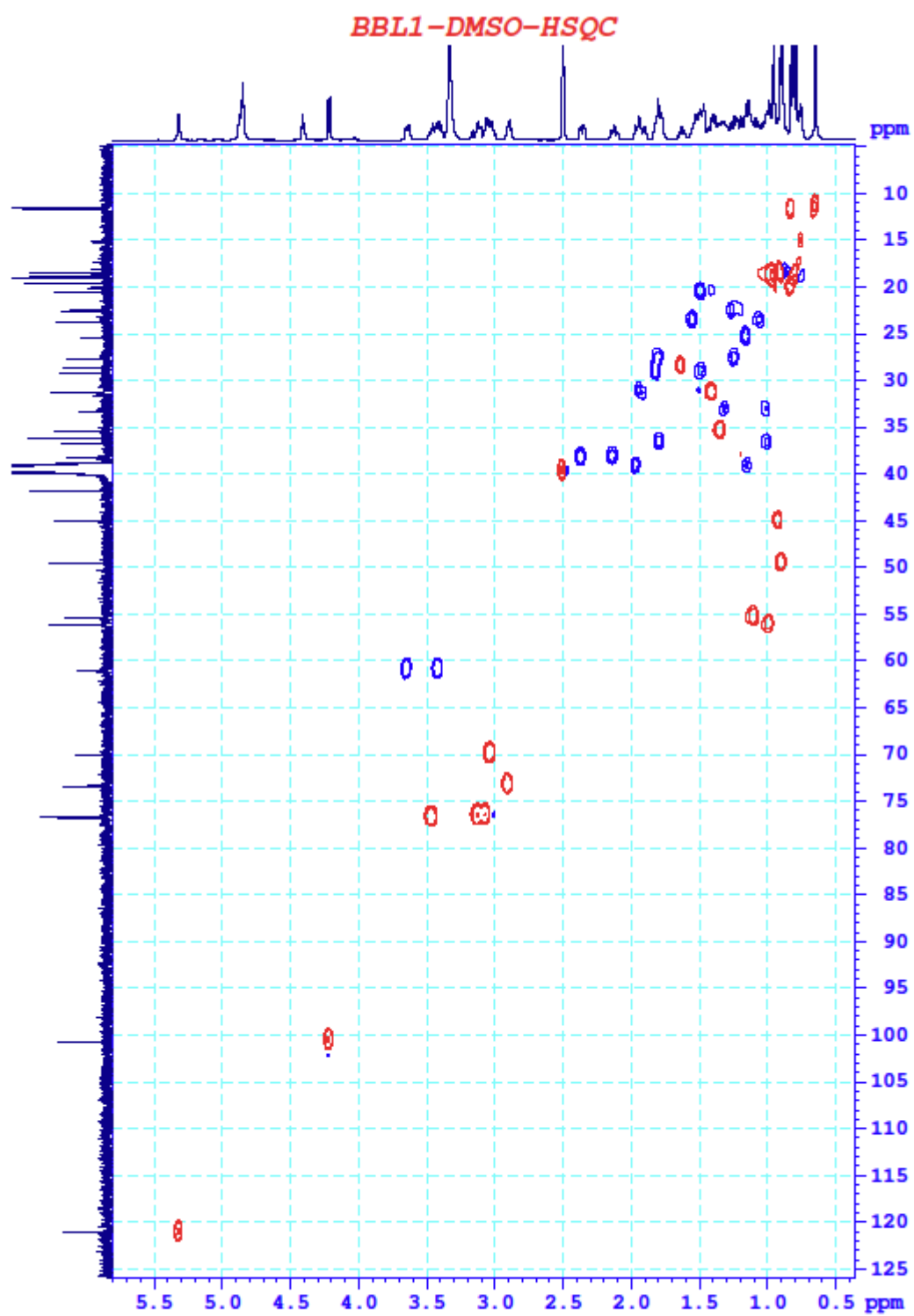


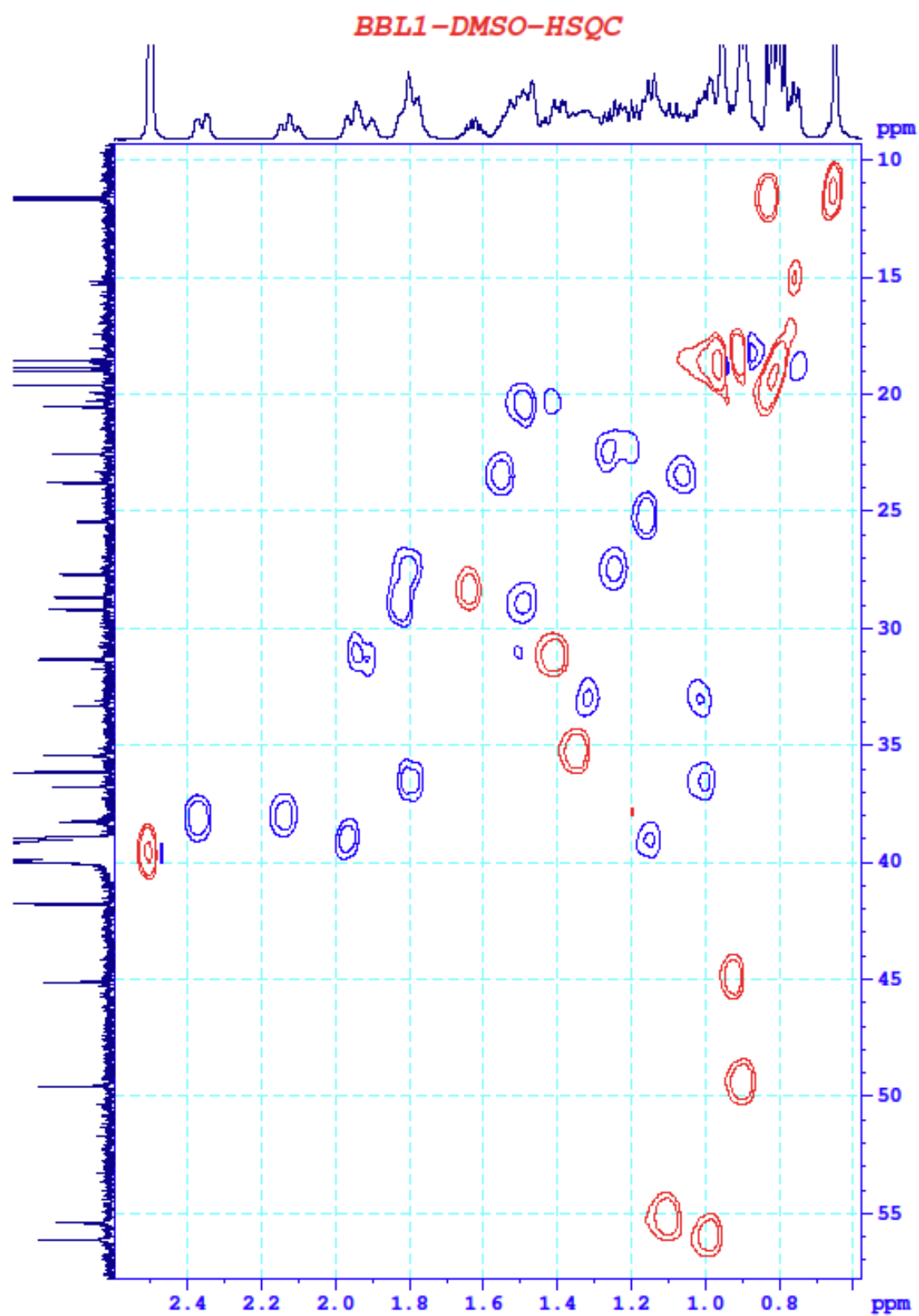


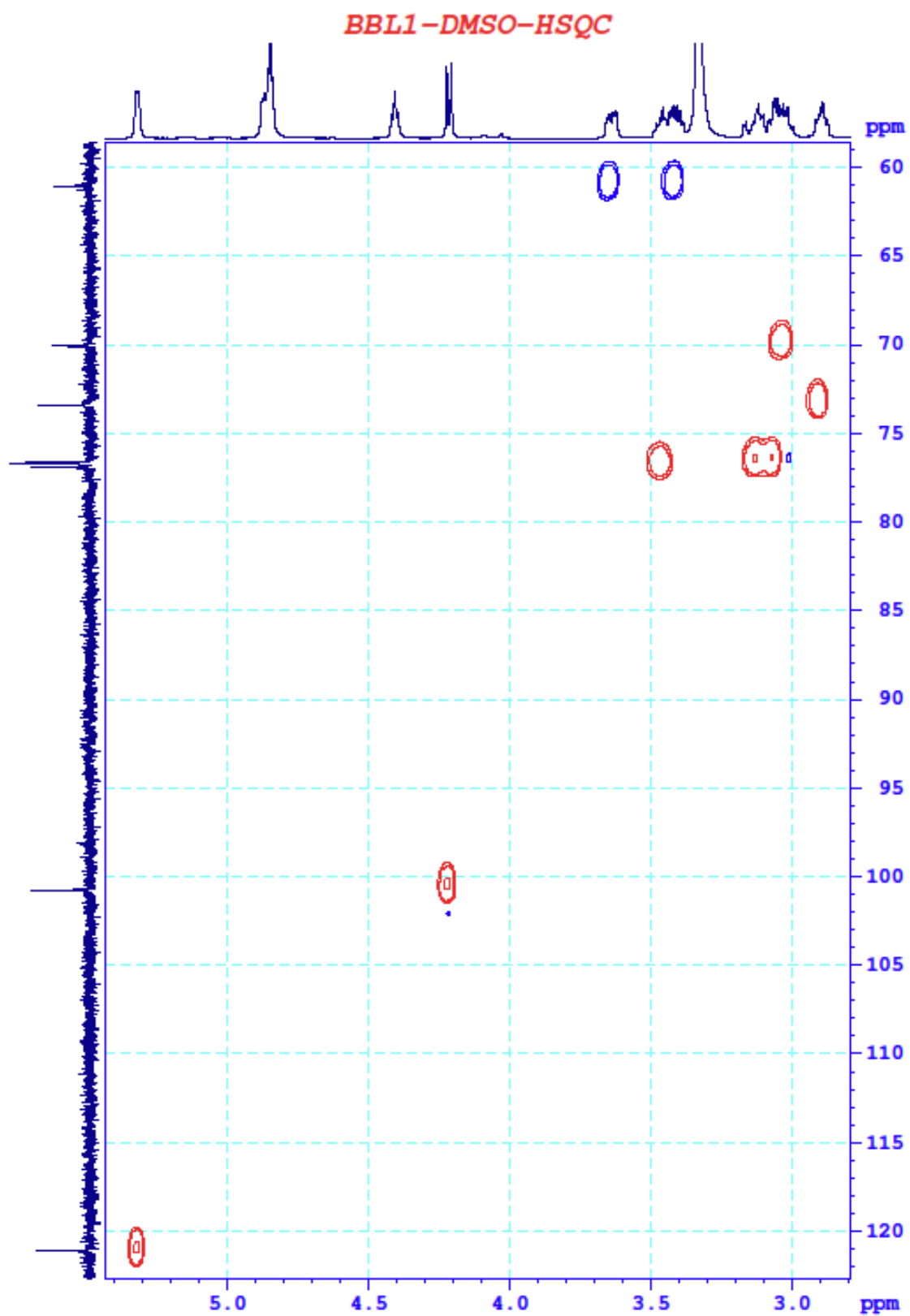




Phổ HSQC



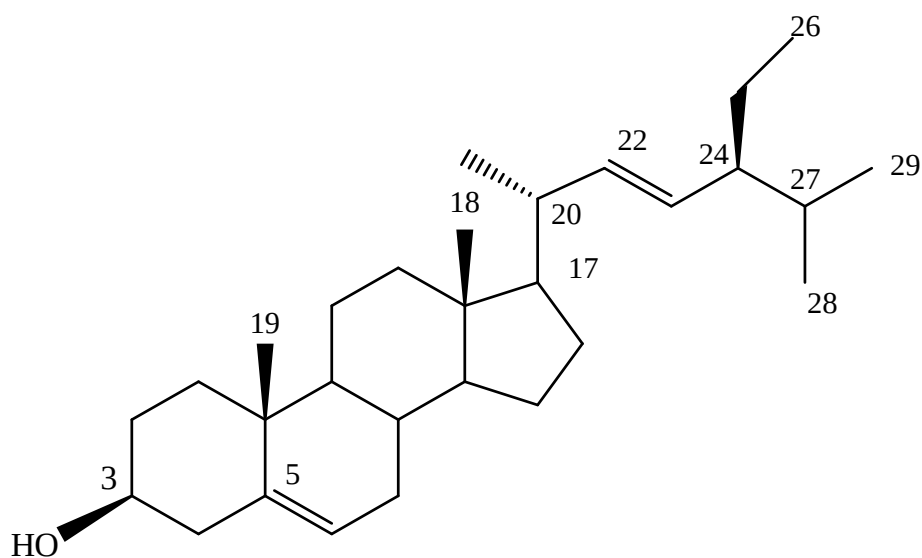




PHỤ LỤC 8

PHỤ LỤC 8: PHỔ CỦA CHẤT BBV7-BBL2

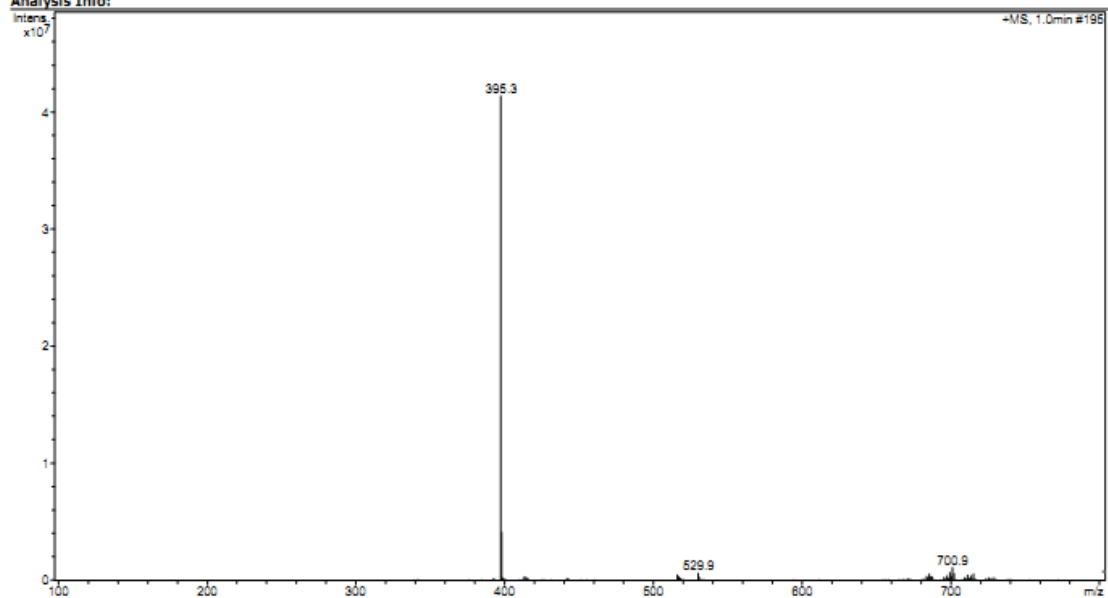
- MS
- ^1H -NMR
- ^{13}C -NMR
- DEPT



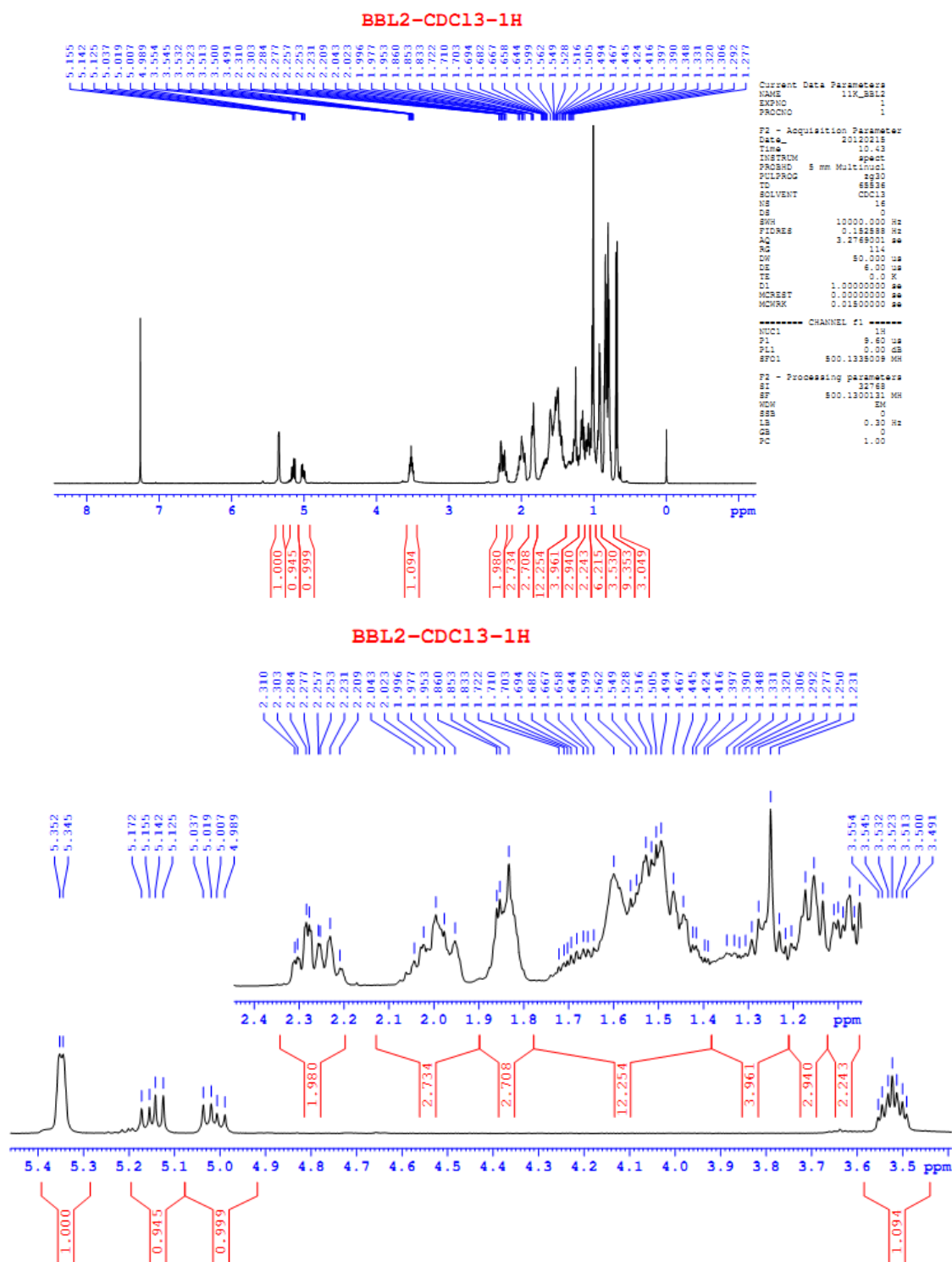
Phổ ESI-MS

Display Report - Selected Window Selected Analysis

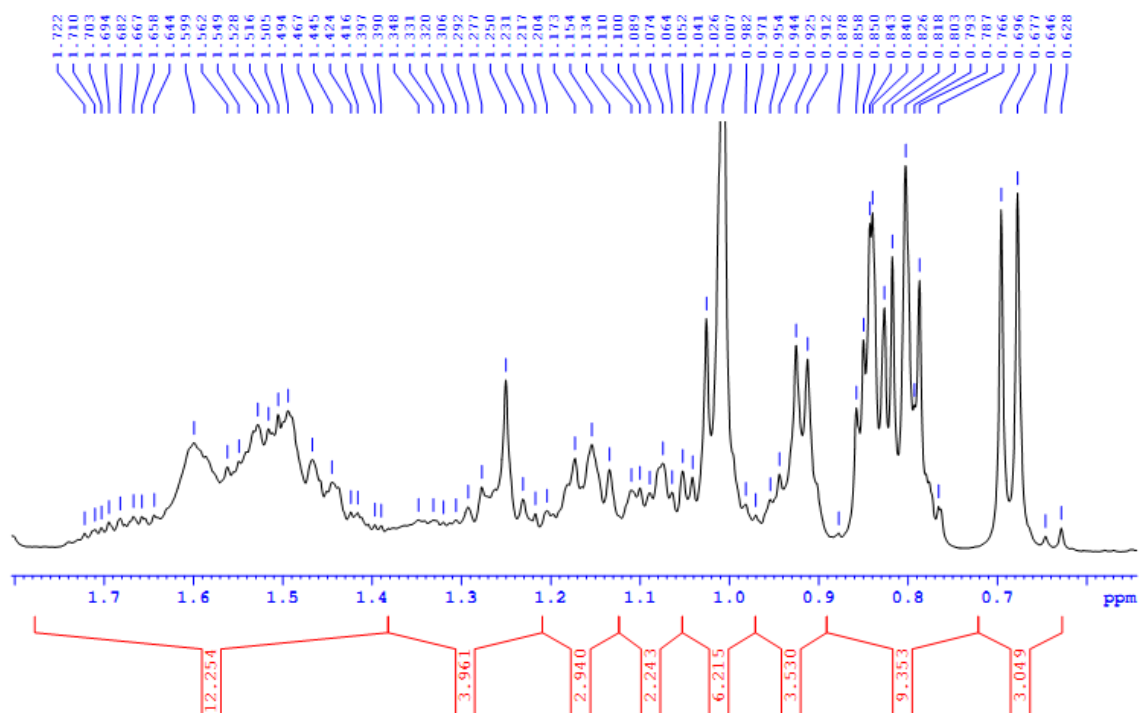
Analysis Name: 12040311.d Instrument: Agilent 6310 Ion Trap Print Date: 4/5/2012 12:14:23 PM
Method: DO MS.m Operator: Phong PTHC, Vien Hoa HCTN Acq. Date: 4/3/2012 5:26:06 PM
Sample Name: BBL2
Analysis Info:



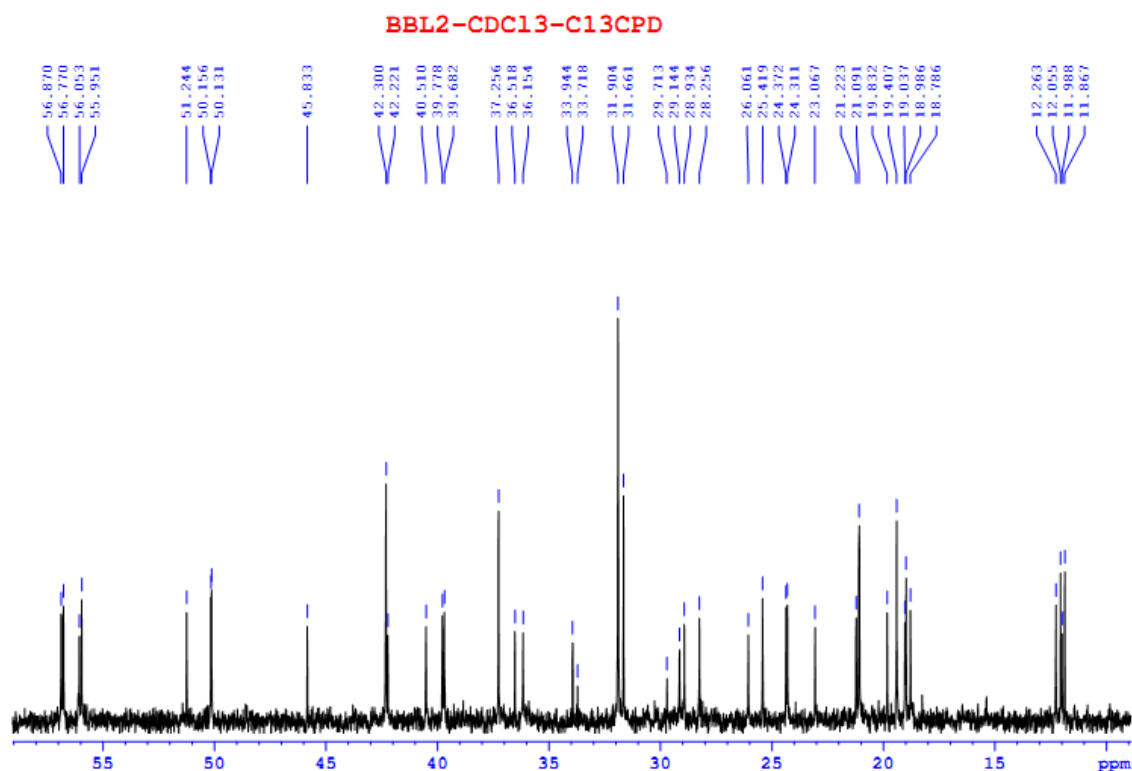
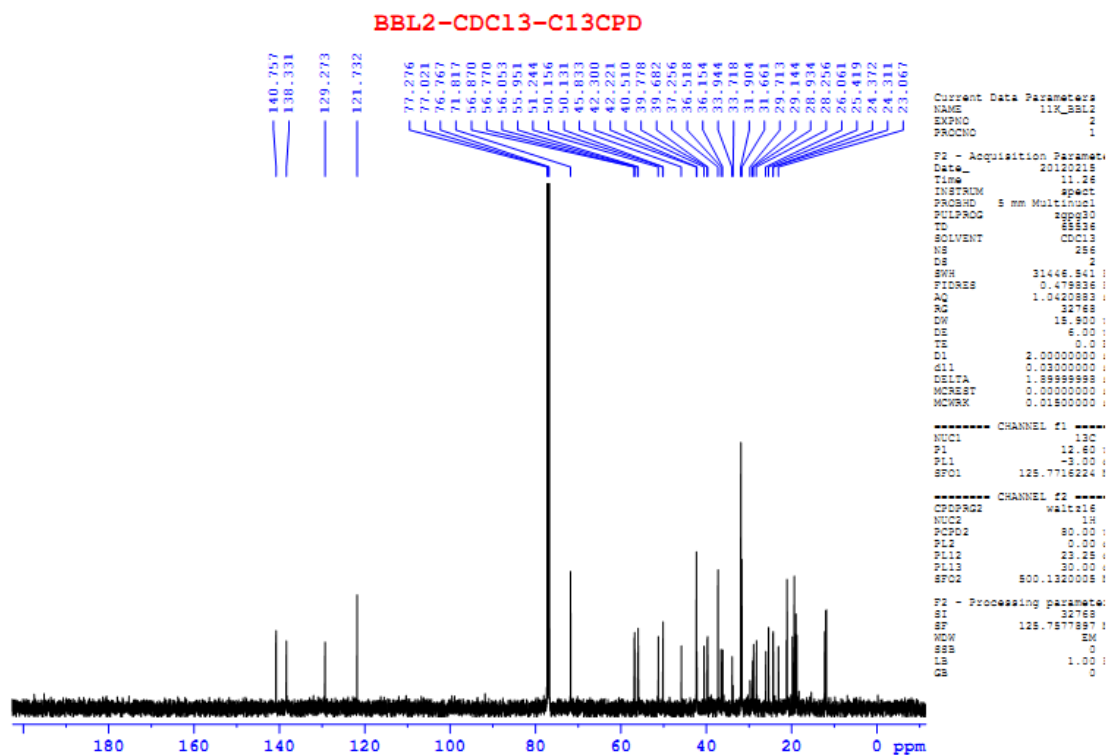
Phổ ^1H -NMR



BBL2-CDC13-1H



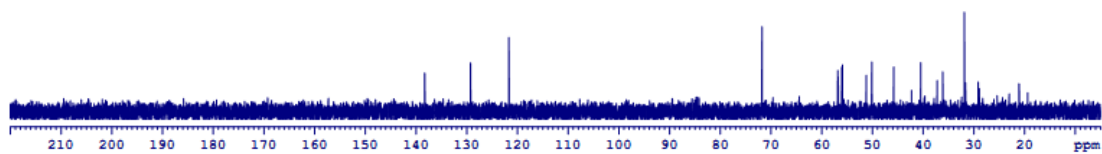
Pho ¹³C-NMR



Phổ DEPT

BBL2-CDC13-C13CPD &DEPT

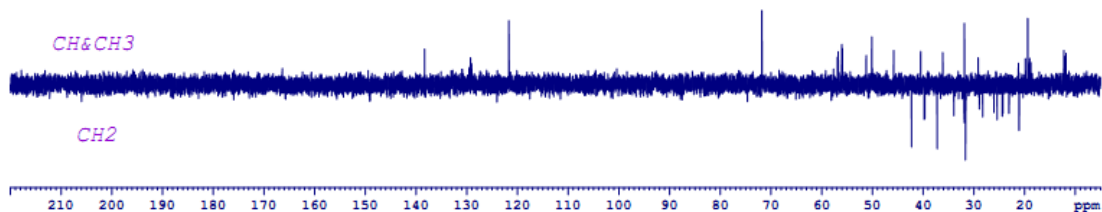
DEPT90



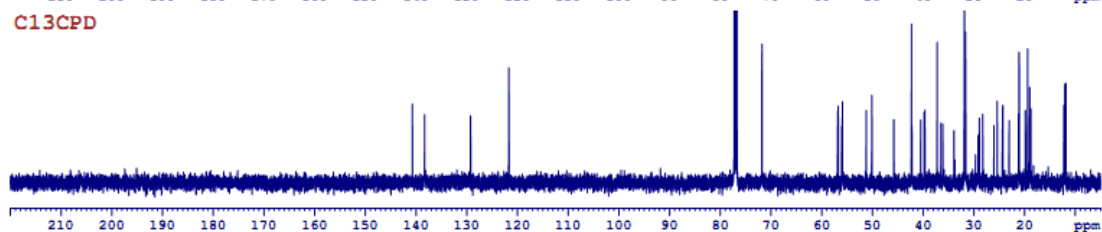
DEPT135

CH&CH3

CH2

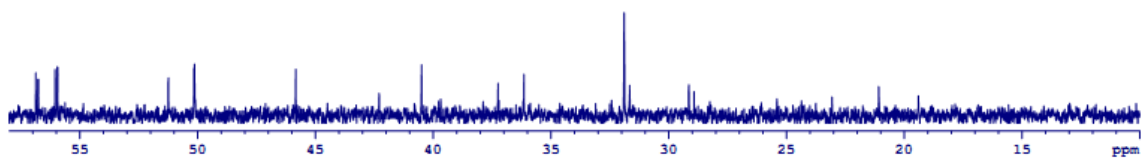


C13CPD



BBL2-CDC13-C13CPD &DEPT

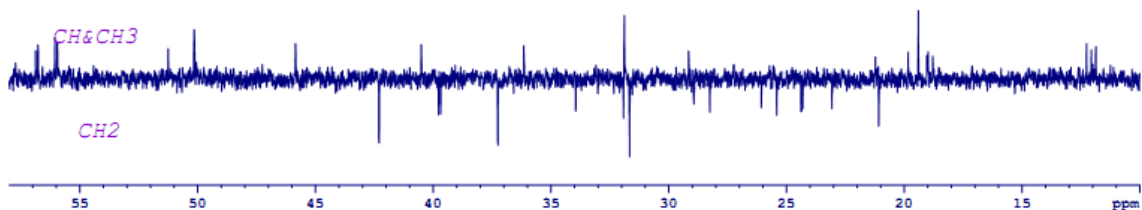
DEPT90



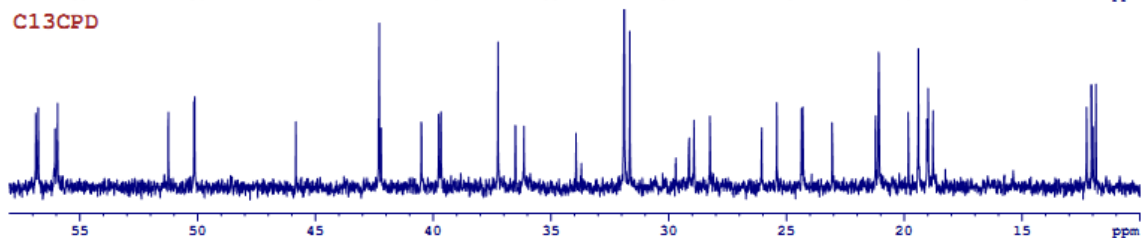
DEPT135

CH&CH3

CH2



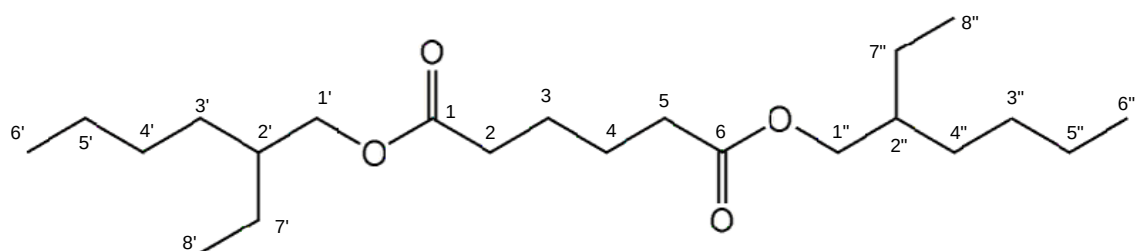
C13CPD



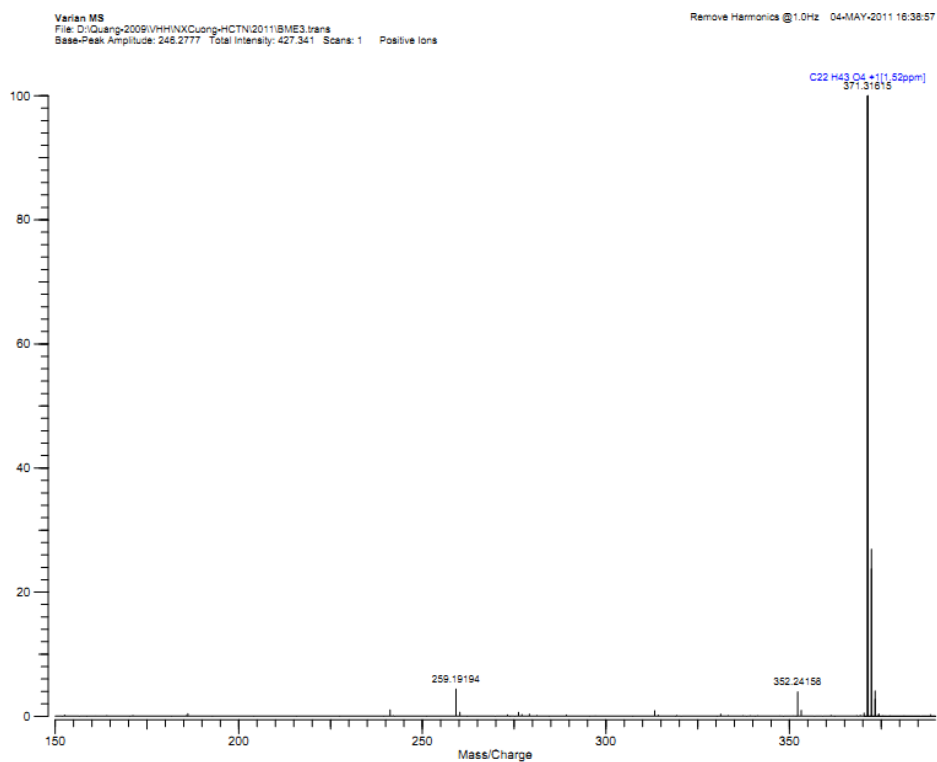
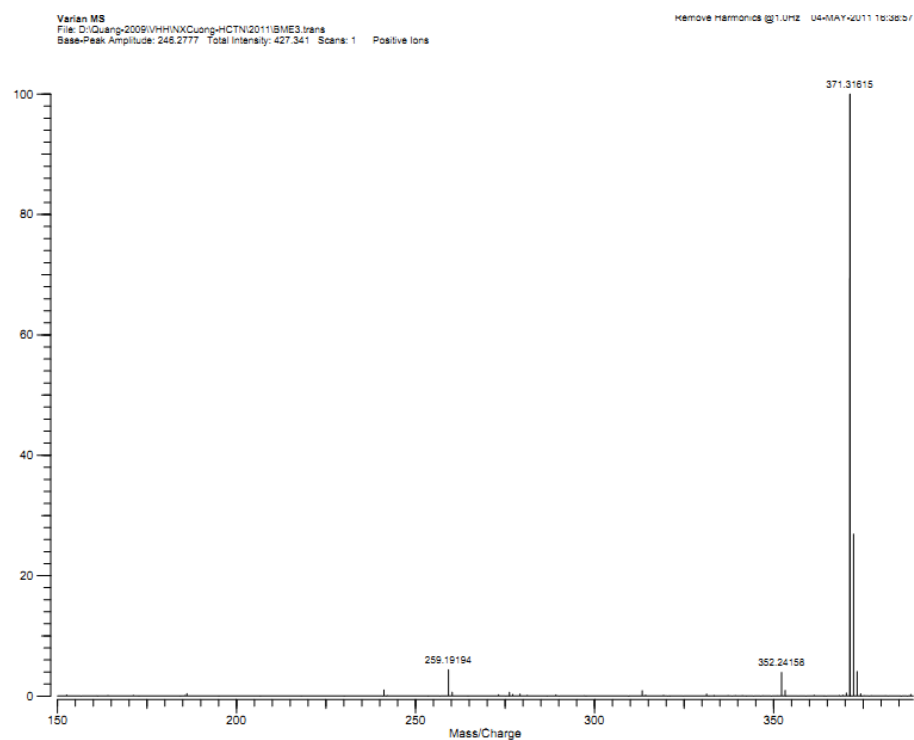
PHỤ LỤC 9

PHỤ LỤC 9: PHỔ CỦA CHẤT BBV8 (BME3)

- MS
- ^1H -NMR
- ^{13}C -NMR
- DEPT
- HMBC
- HSQC

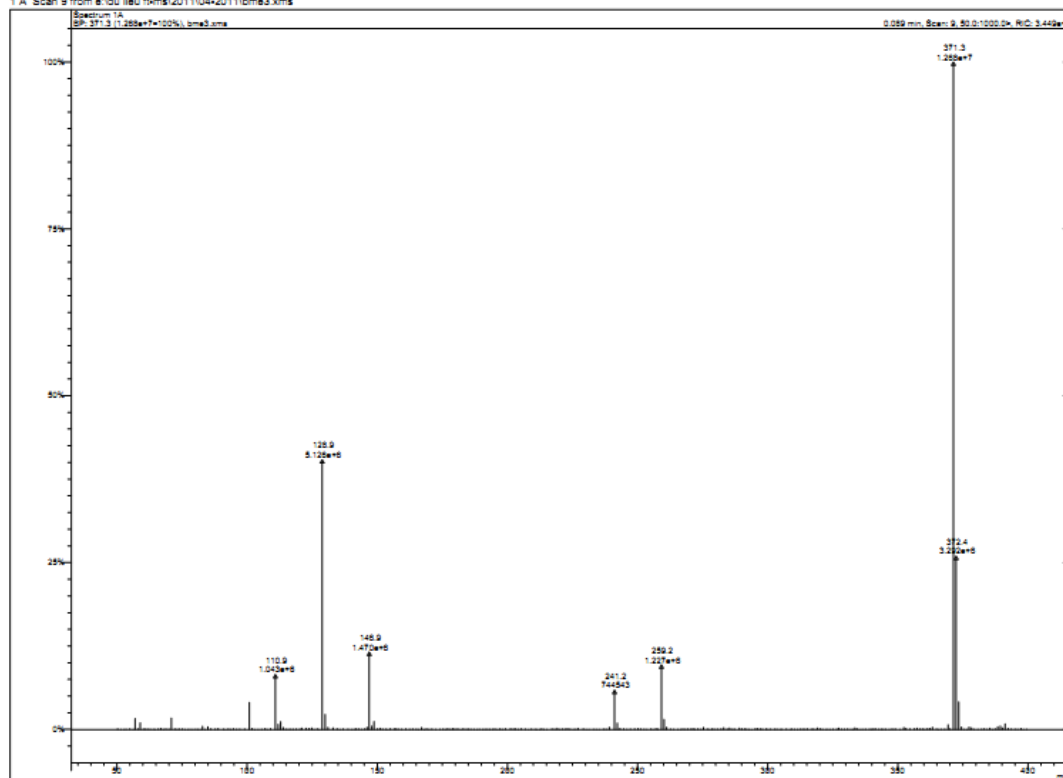


Phổ ESI-MS

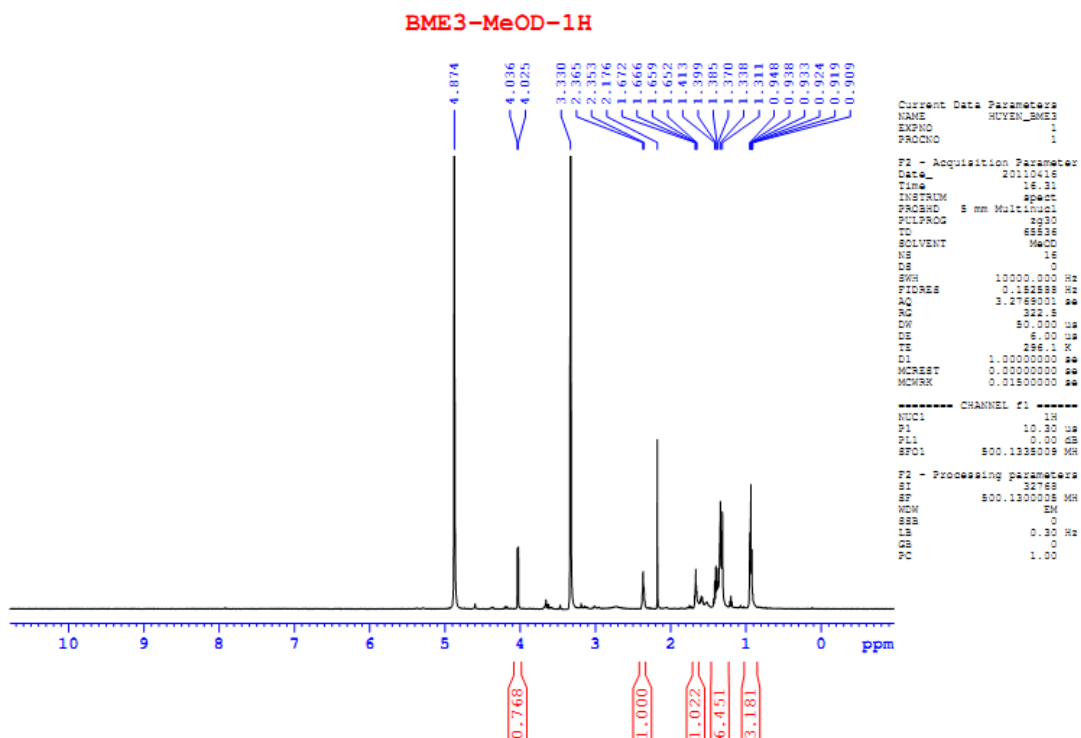
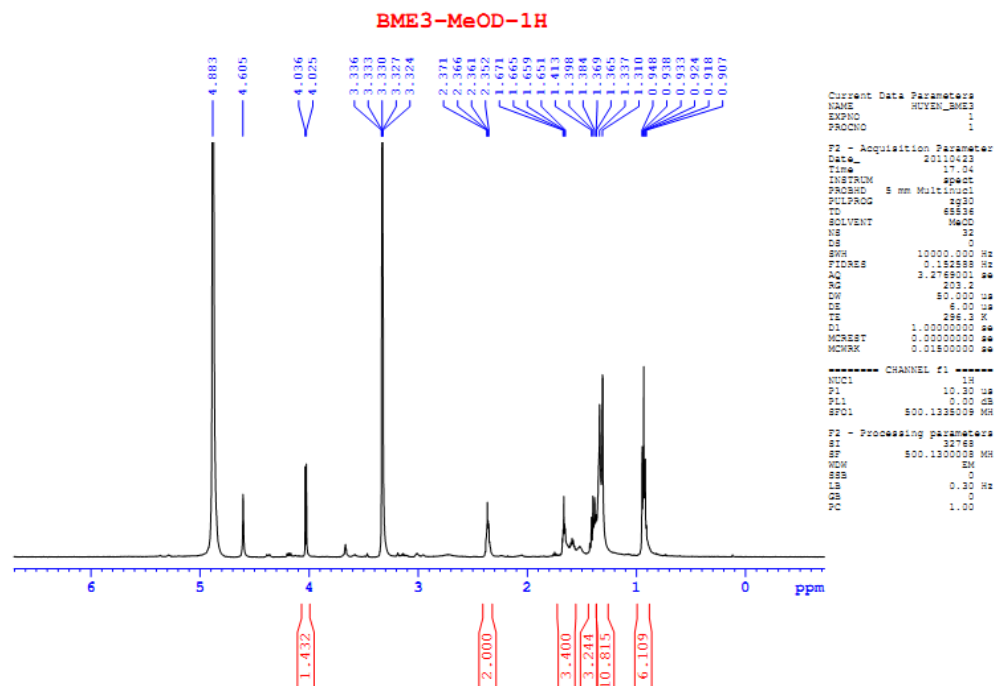


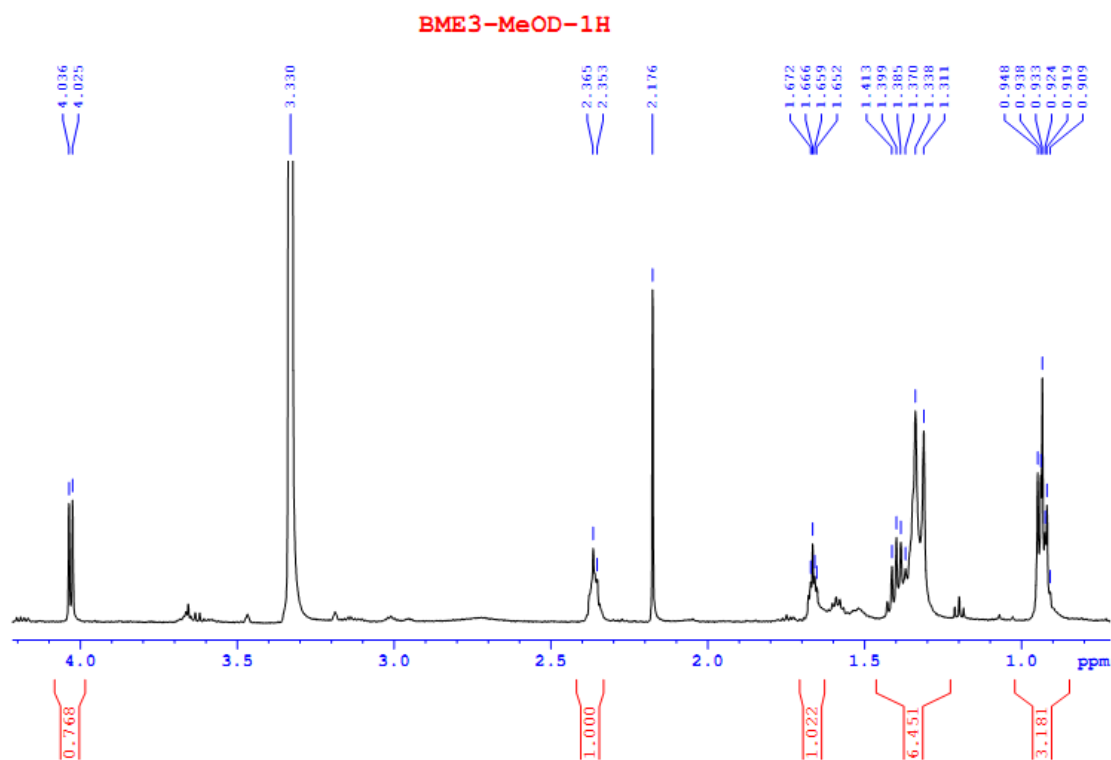
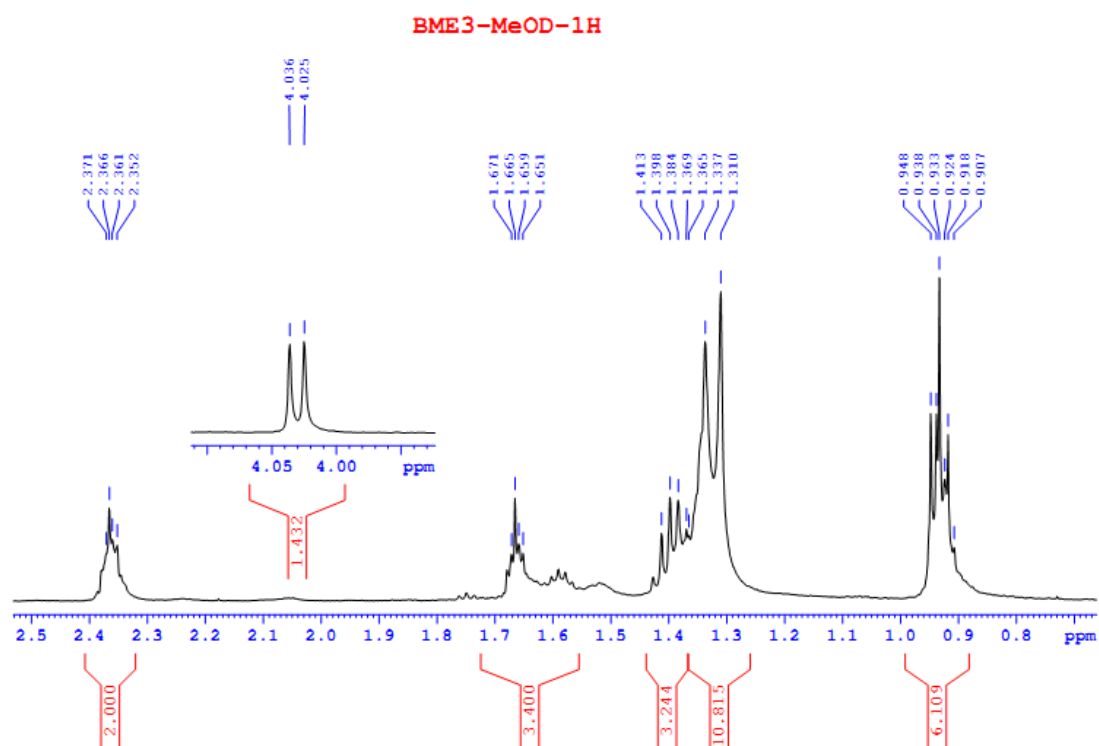
Spectrum 1A Plot - 4/27/2011 3:51 PM

1 A Scan 9 from e:\du\file\fxms\2011\04-2011\bm63.ms

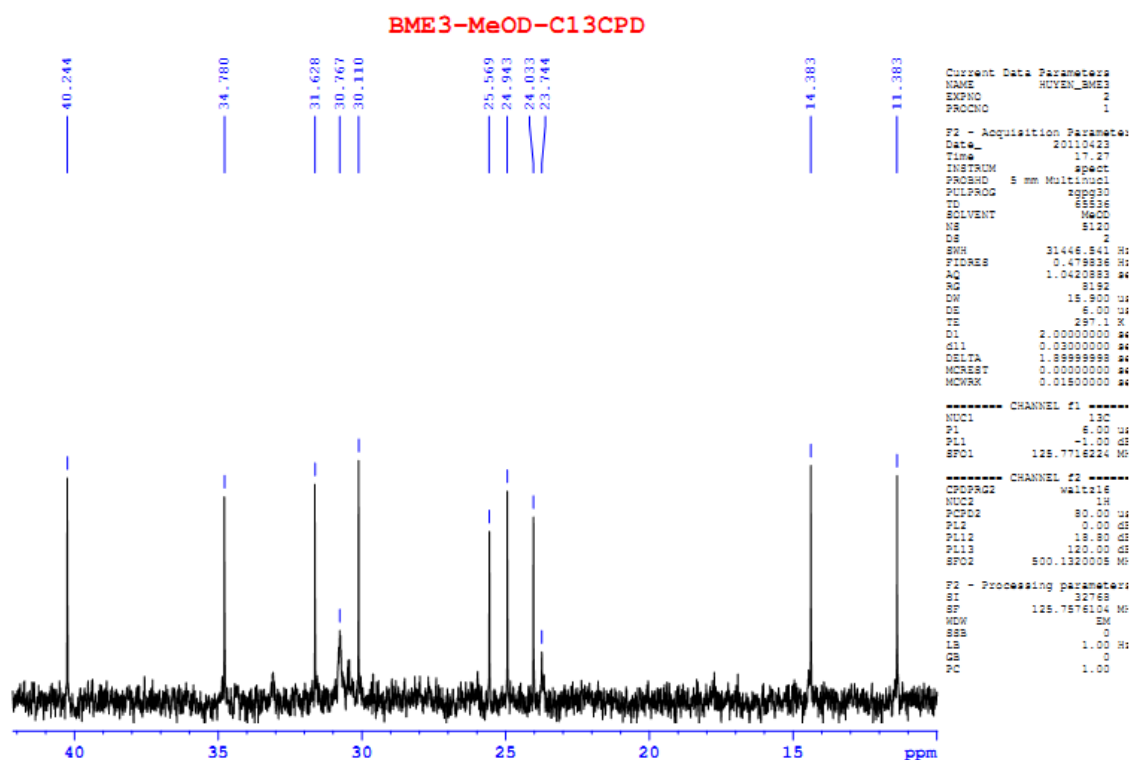
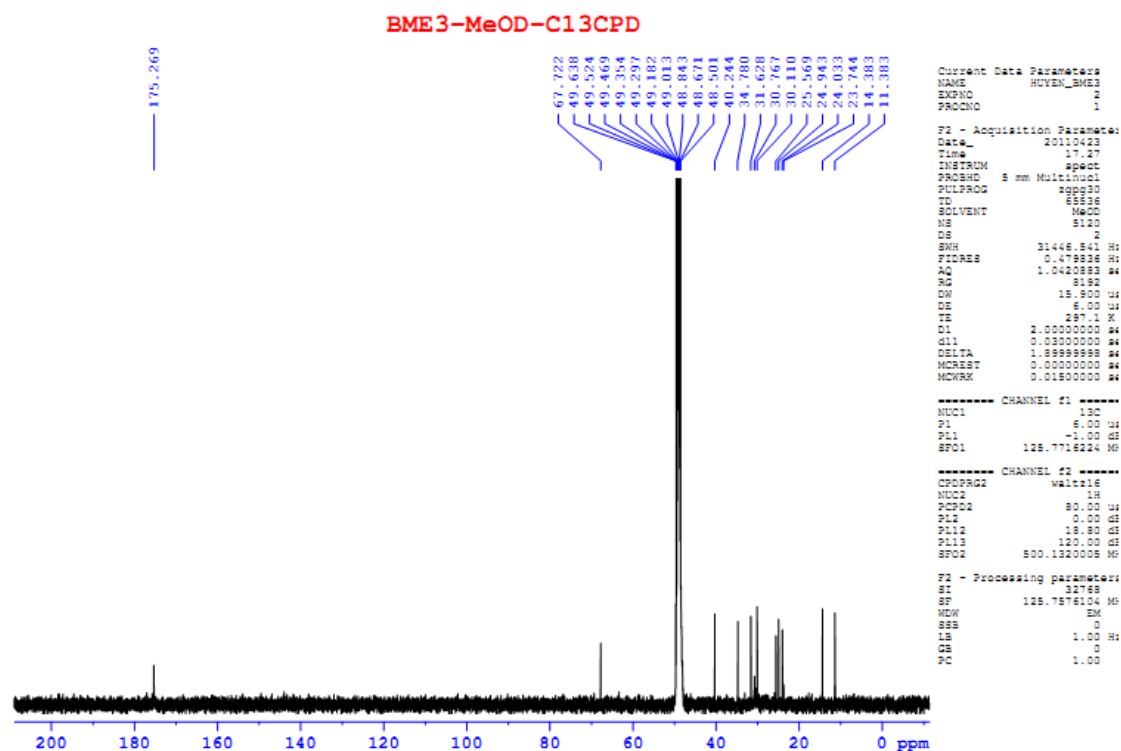


Phổ ^1H -NMR





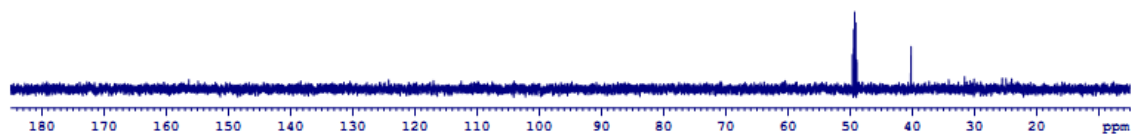
Pho ¹³C-NMR



Phổ DEPT

BME3-MeOD-C13CPD&DEPT

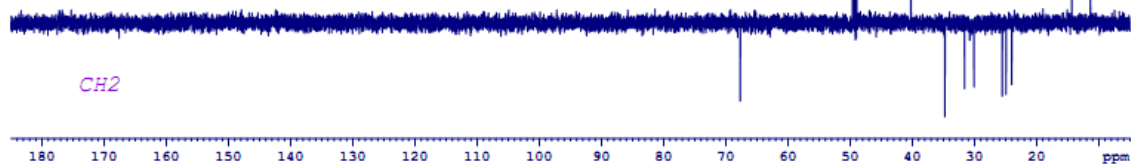
DEPT90



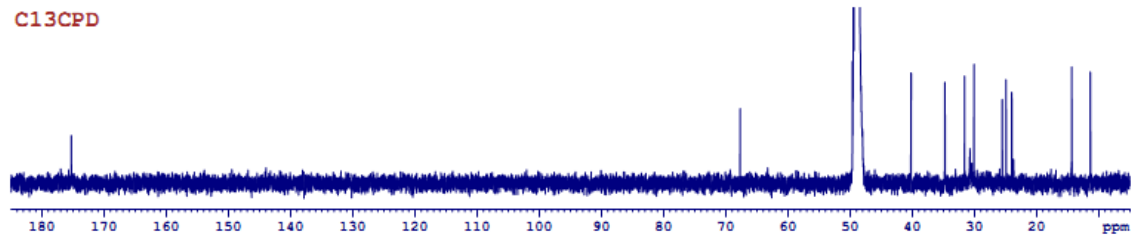
DEPT135

CH&CH3

CH2

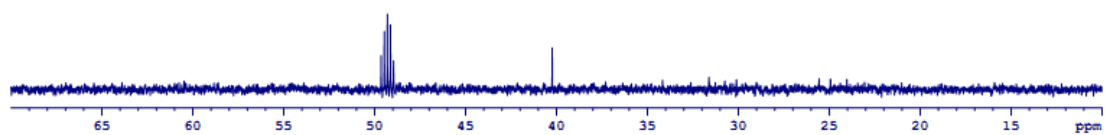


C13CPD



BME3-MeOD-C13CPD&DEPT

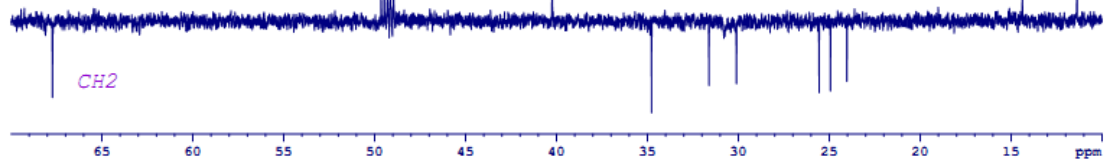
DEPT90



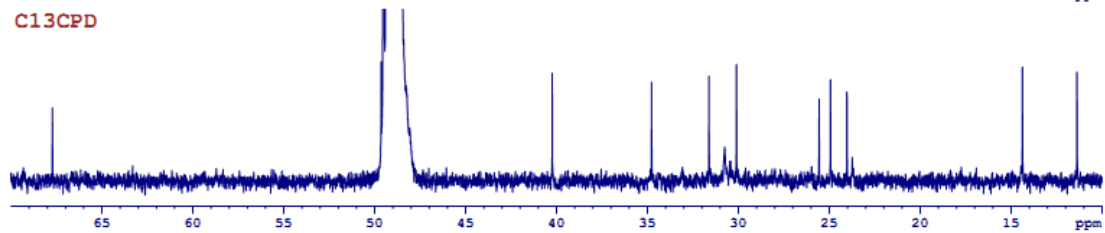
DEPT135

CH&CH3

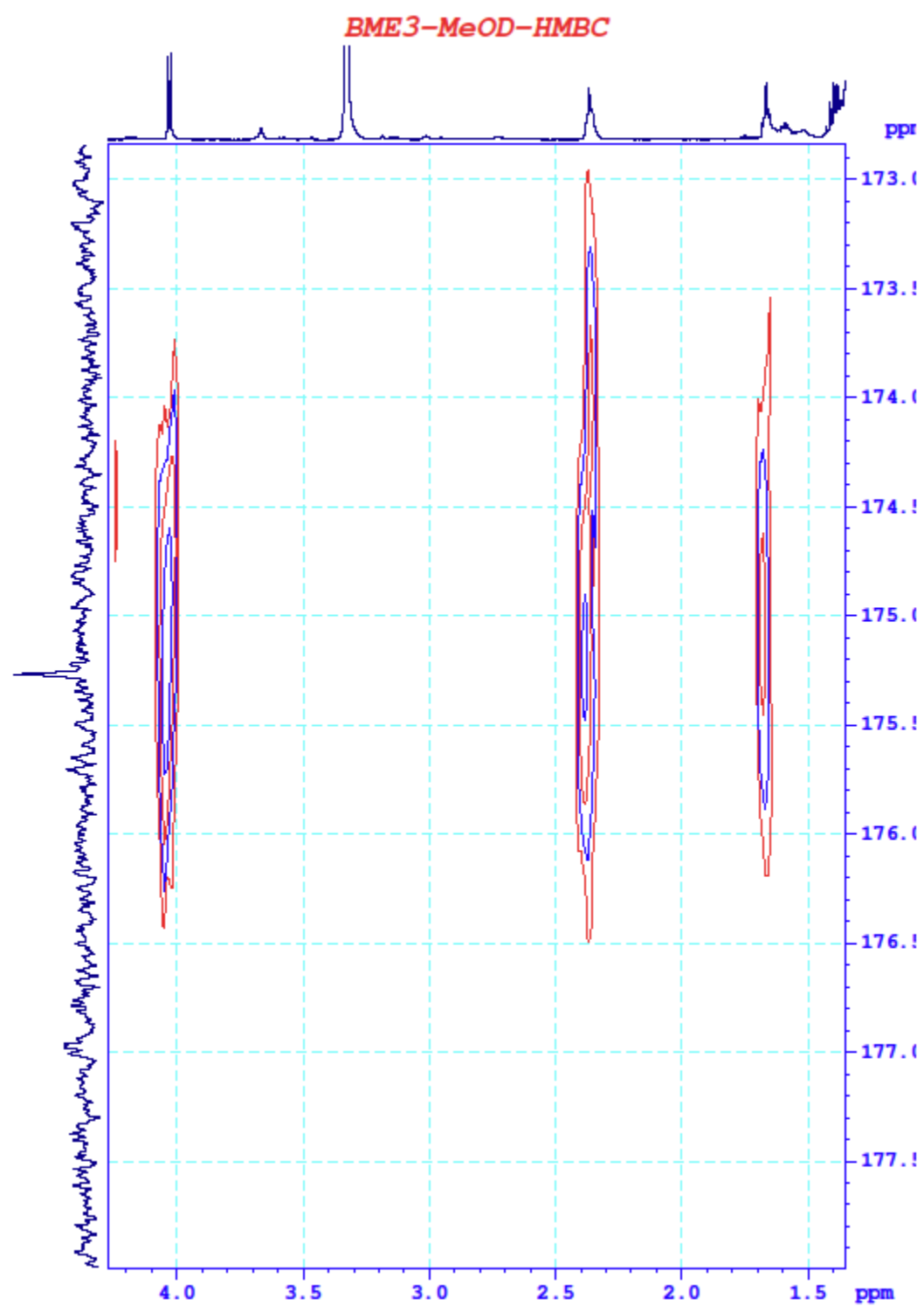
CH2

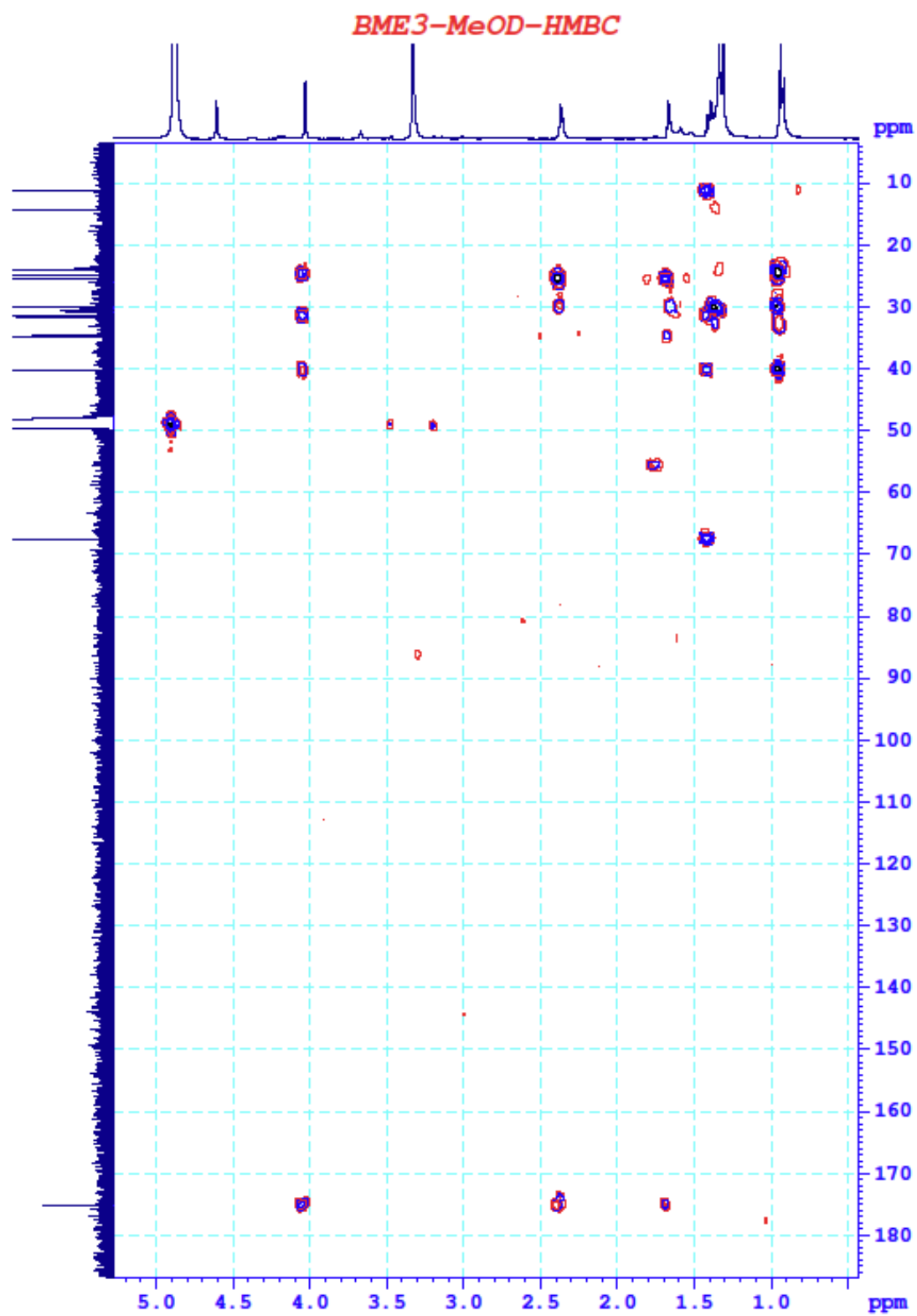


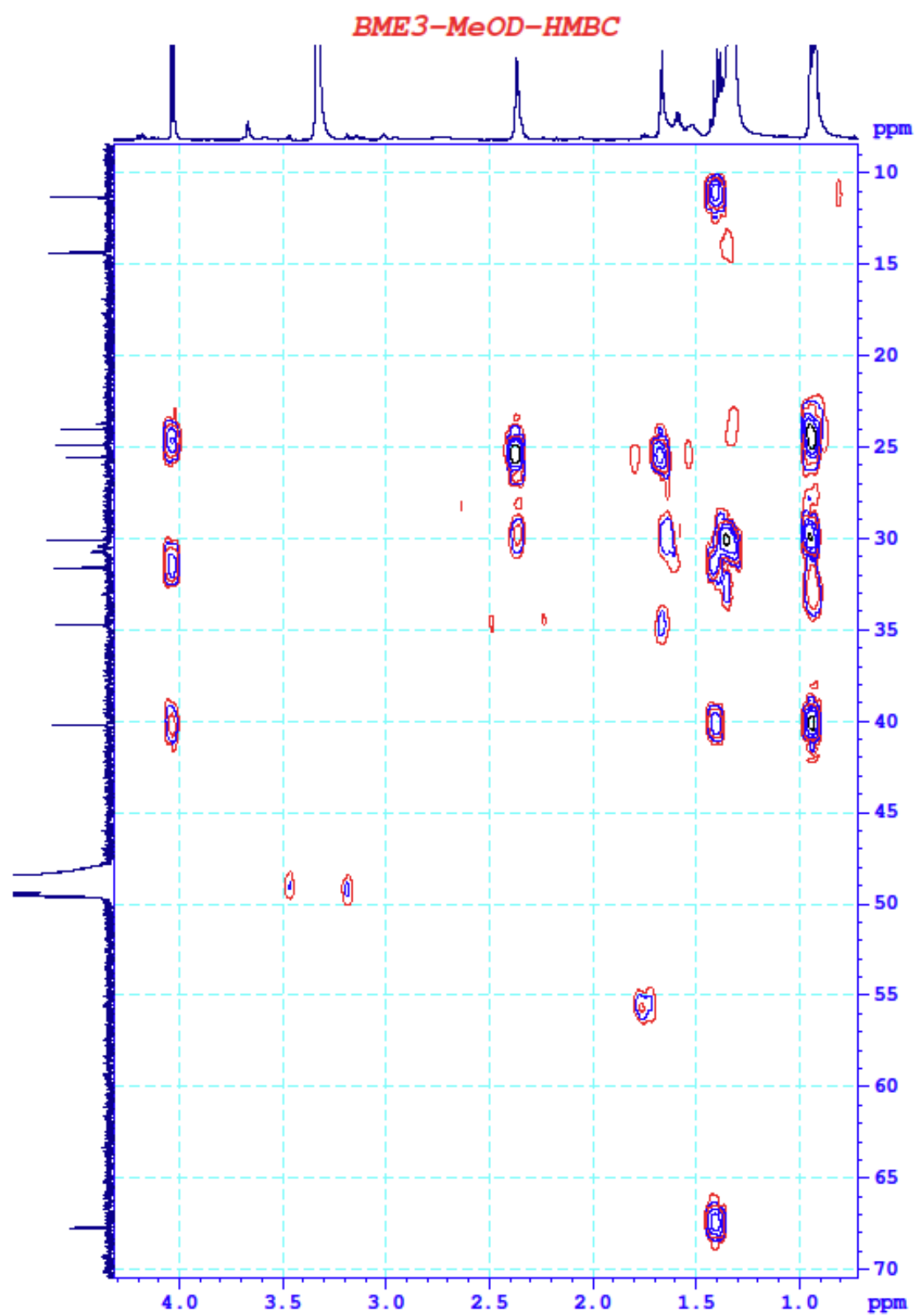
C13CPD



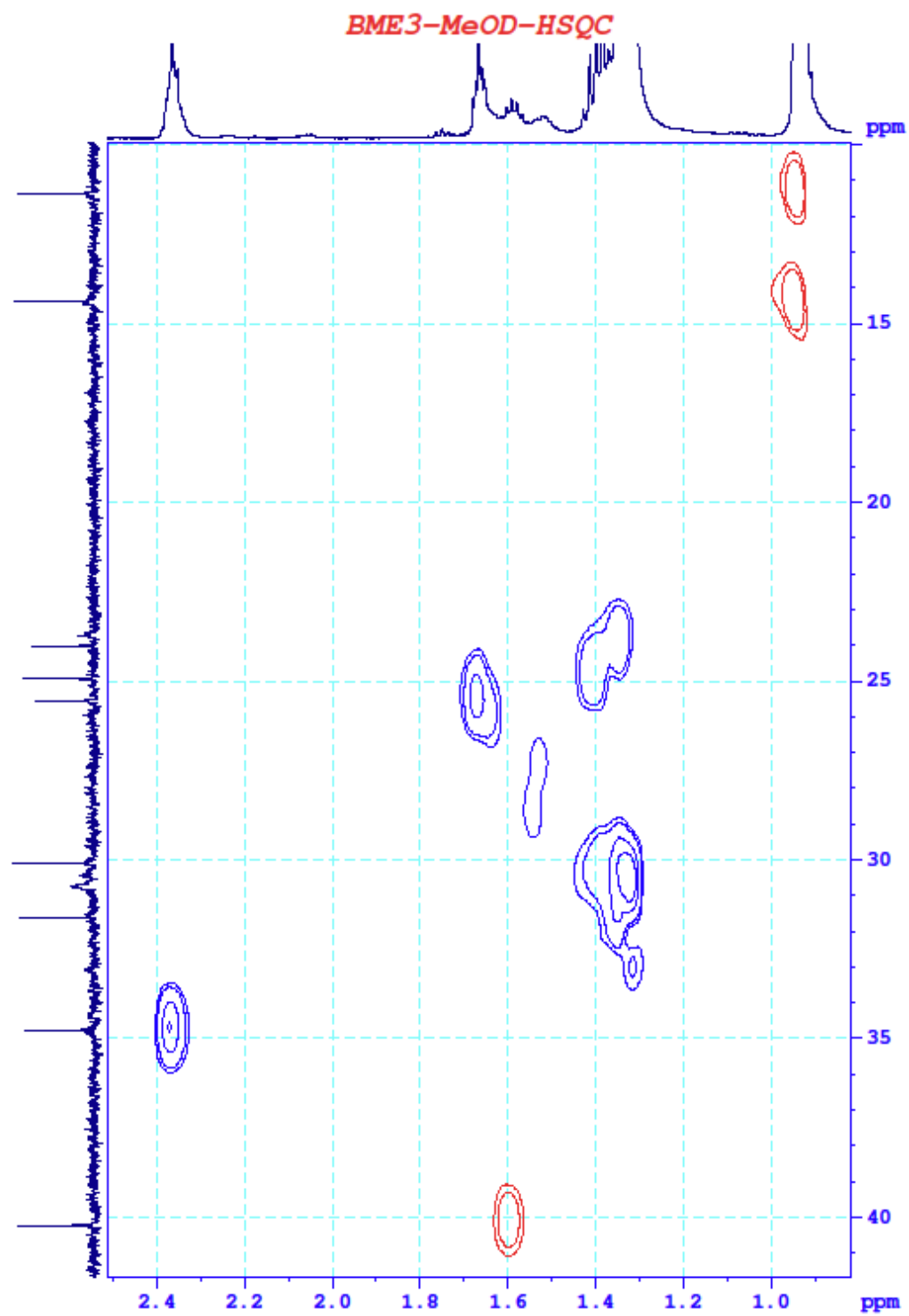
Phổ HMBC

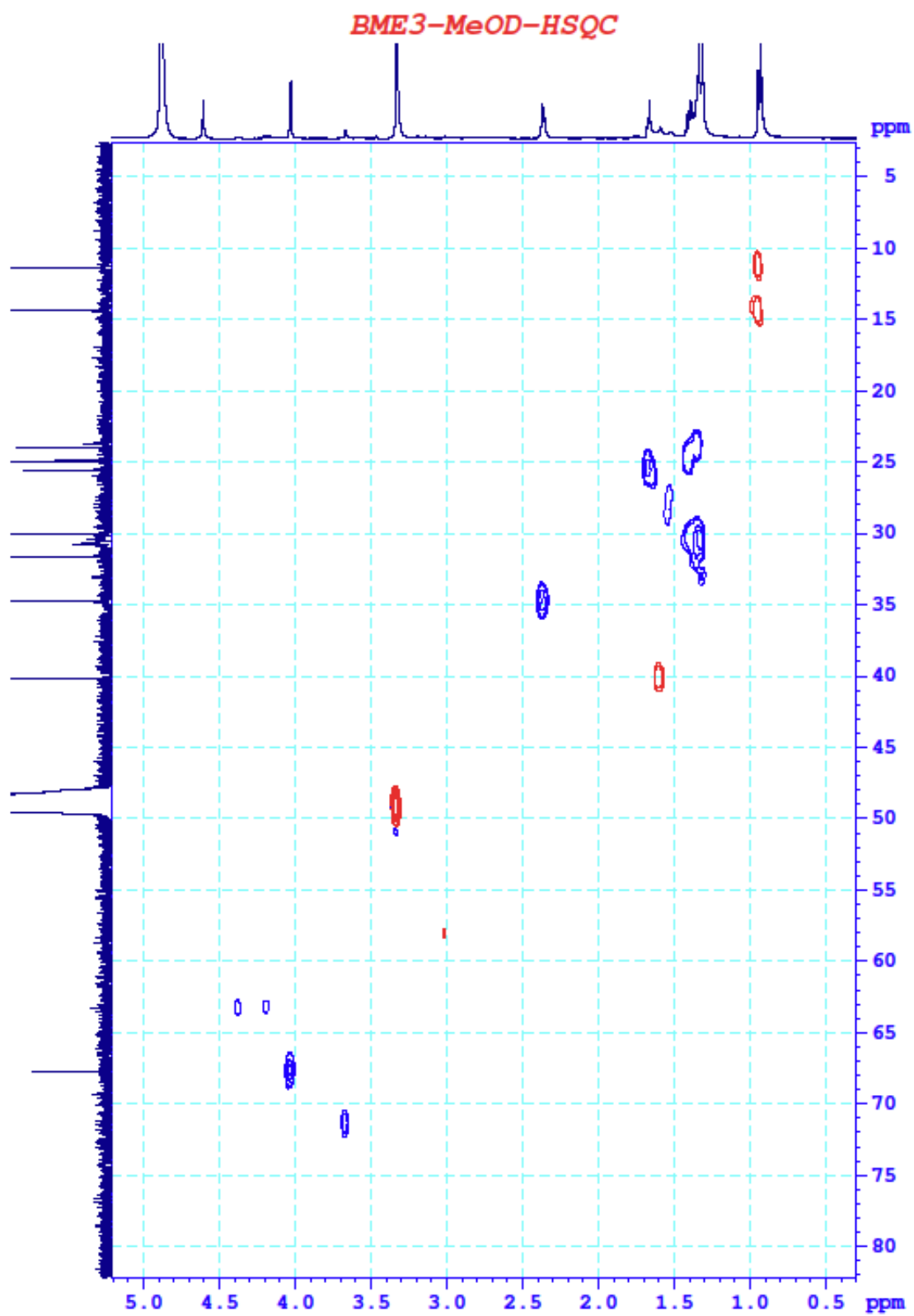






Phổ HSQC

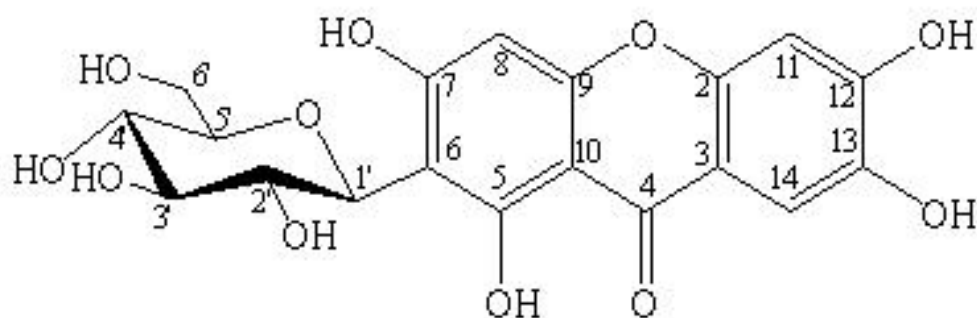




PHỤ LỤC 10

PHỤ LỤC 10: PHỔ CỦA CHẤT BBL3

- MS
- ^1H -NMR
- ^{13}C -NMR
- DEPT
- HMBC
- HSQC



Phổ ESI-MS

Display Report - Selected Window Selected Analysis

Analysis Name: 12040314.d

Method: DO MS.m

Sample Name: BBL3

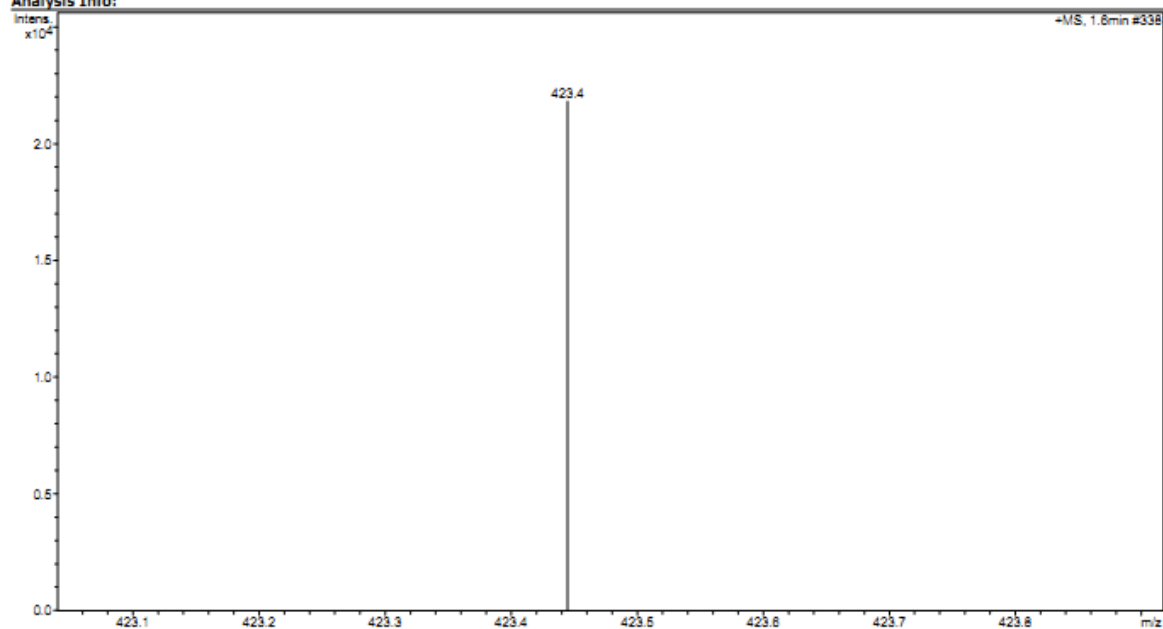
Analysis Info:

Instrument: Agilent 6310 Ion Trap

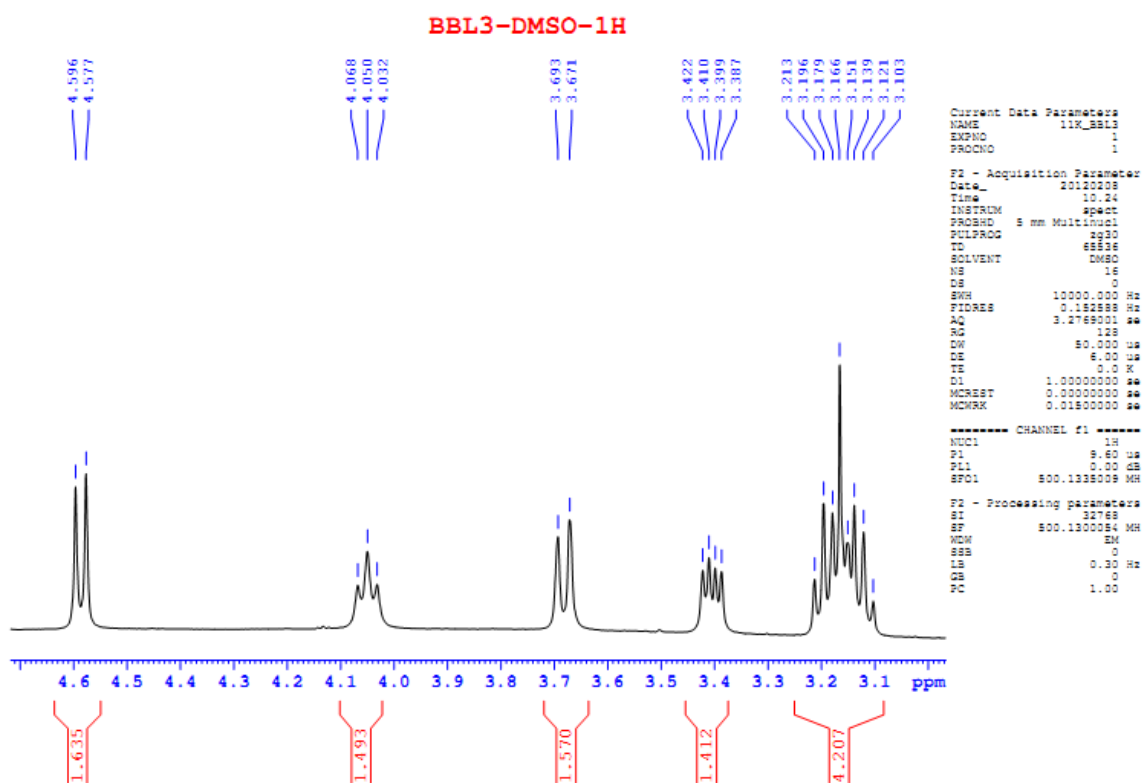
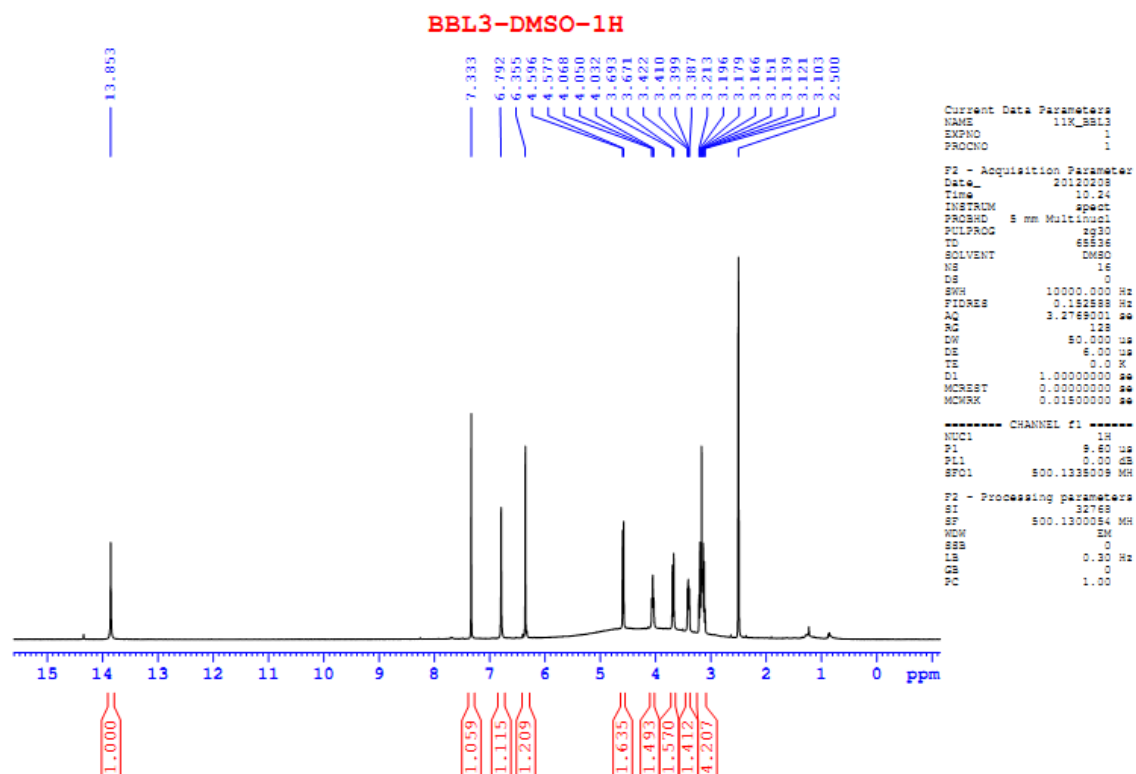
Operator: Phong PTHC, Vien Hoa HCTN

Print Date: 4/5/2012 1:13:17 PM

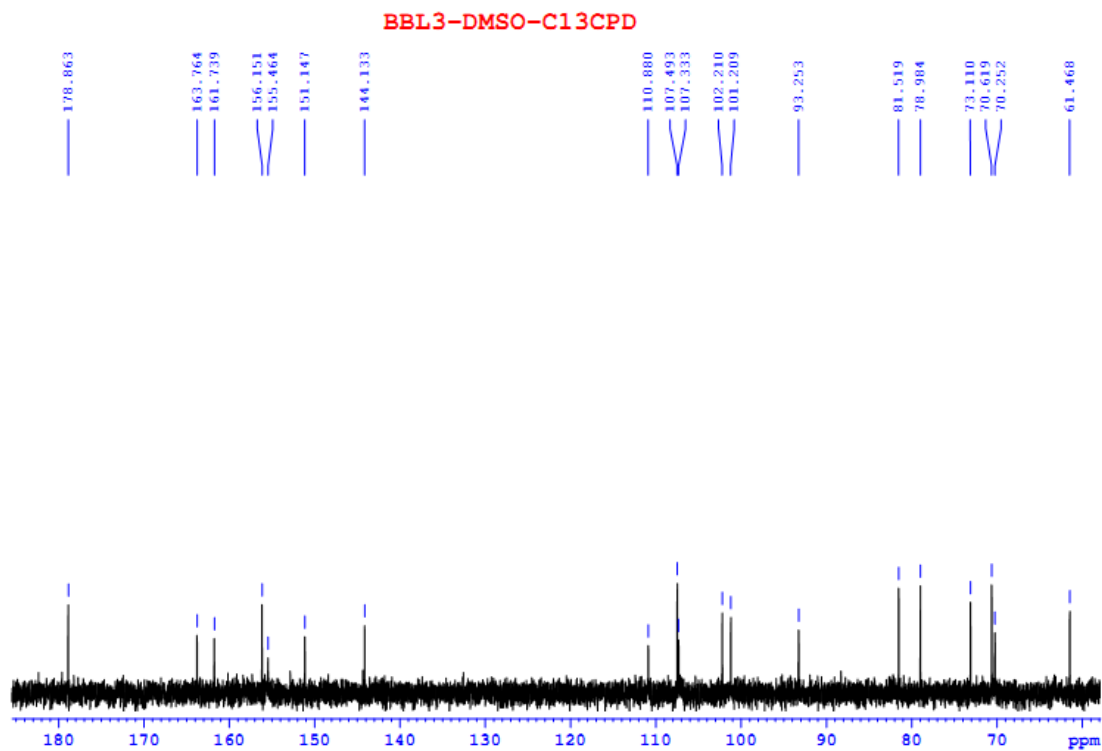
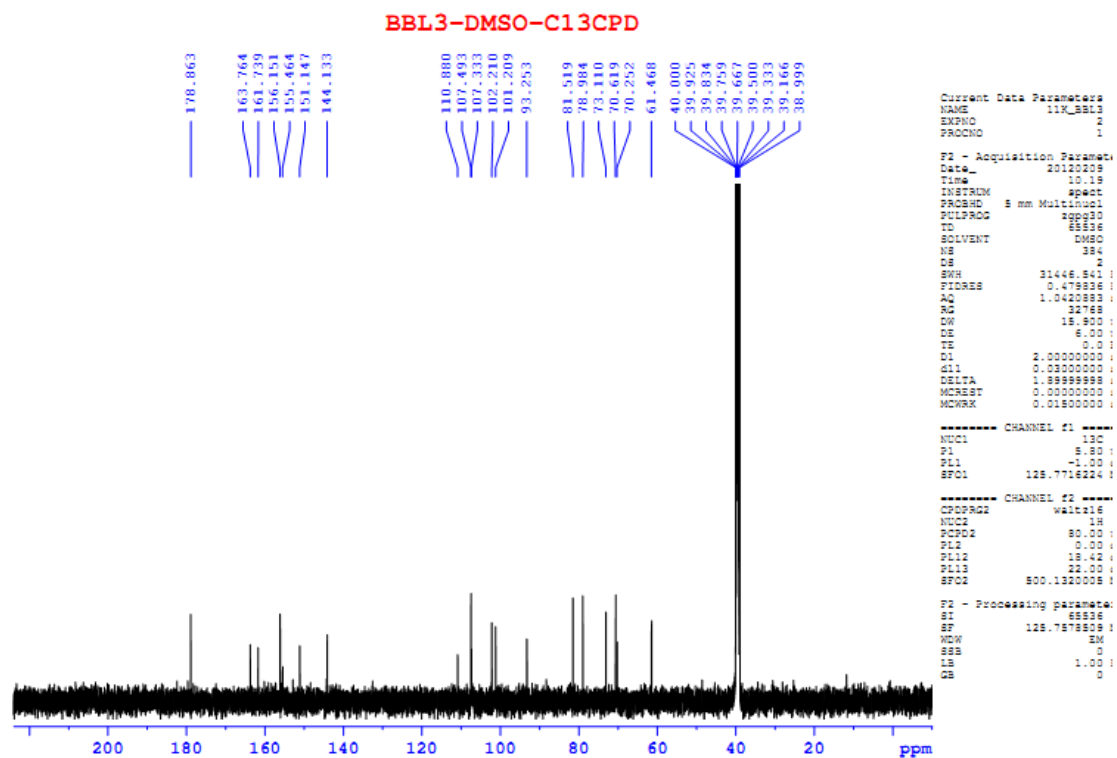
Acq. Date: 4/3/2012 6:16:59 PM



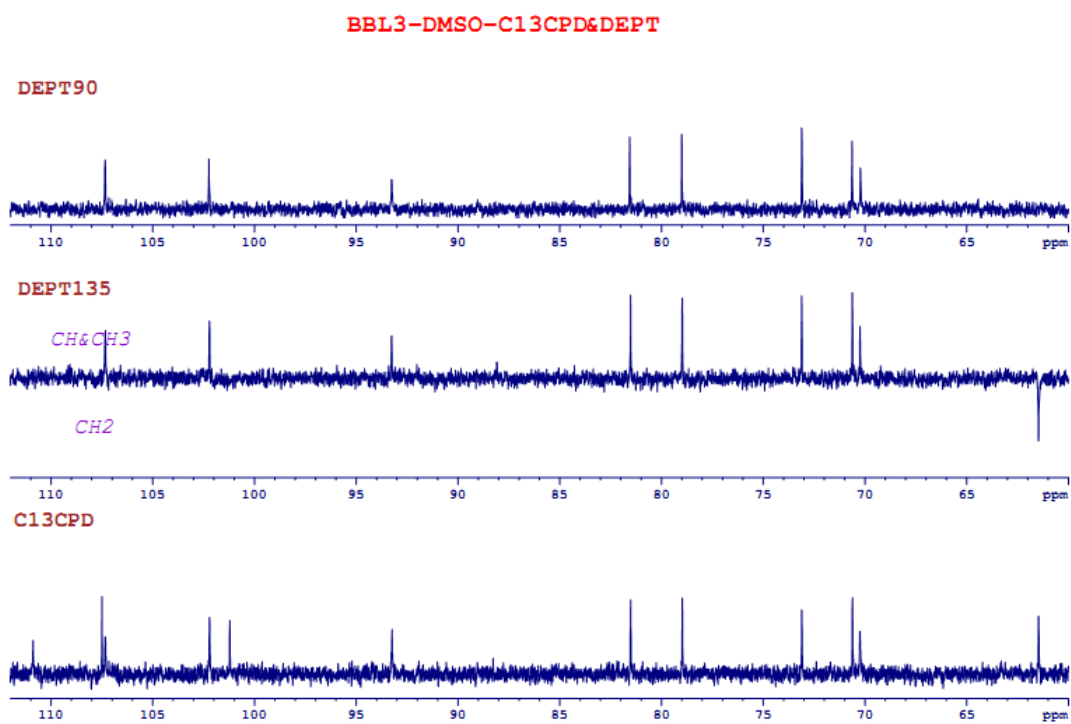
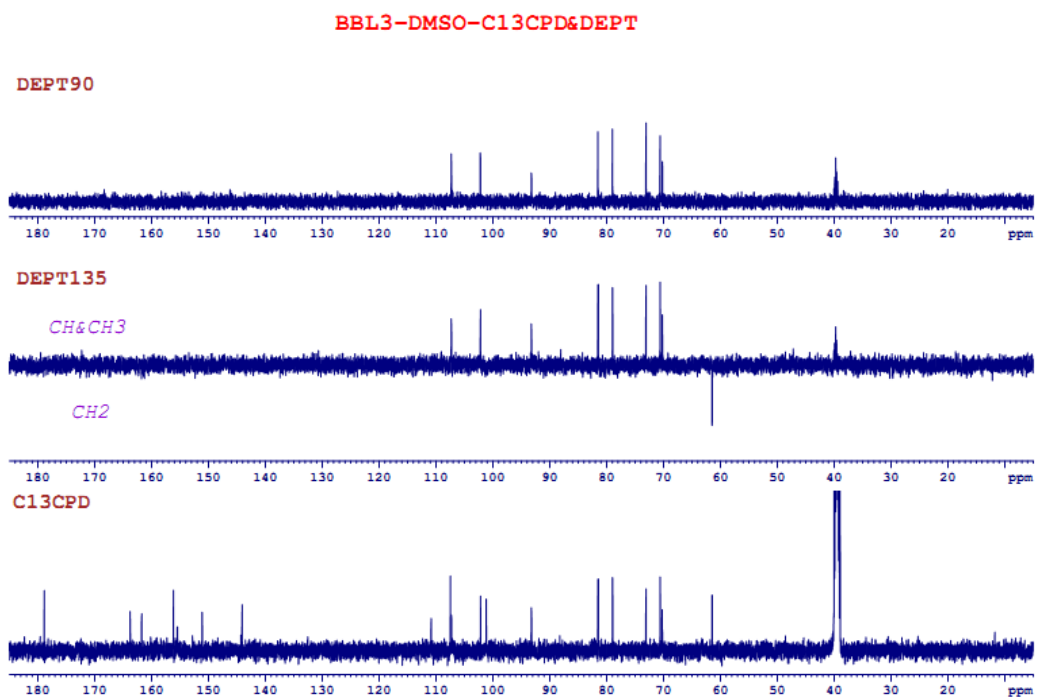
Phổ ^1H -NMR



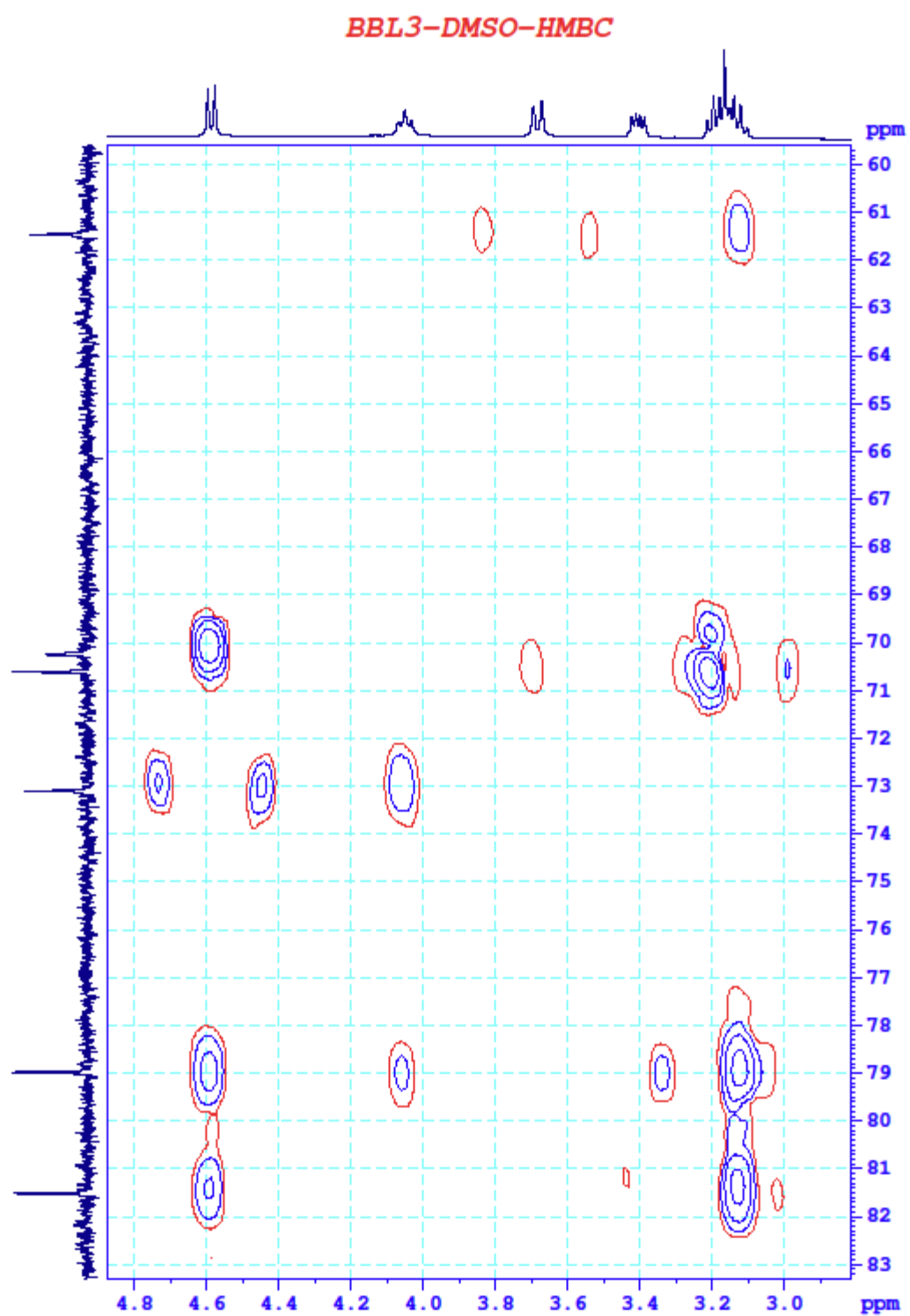
Phô ^{13}C -NMR

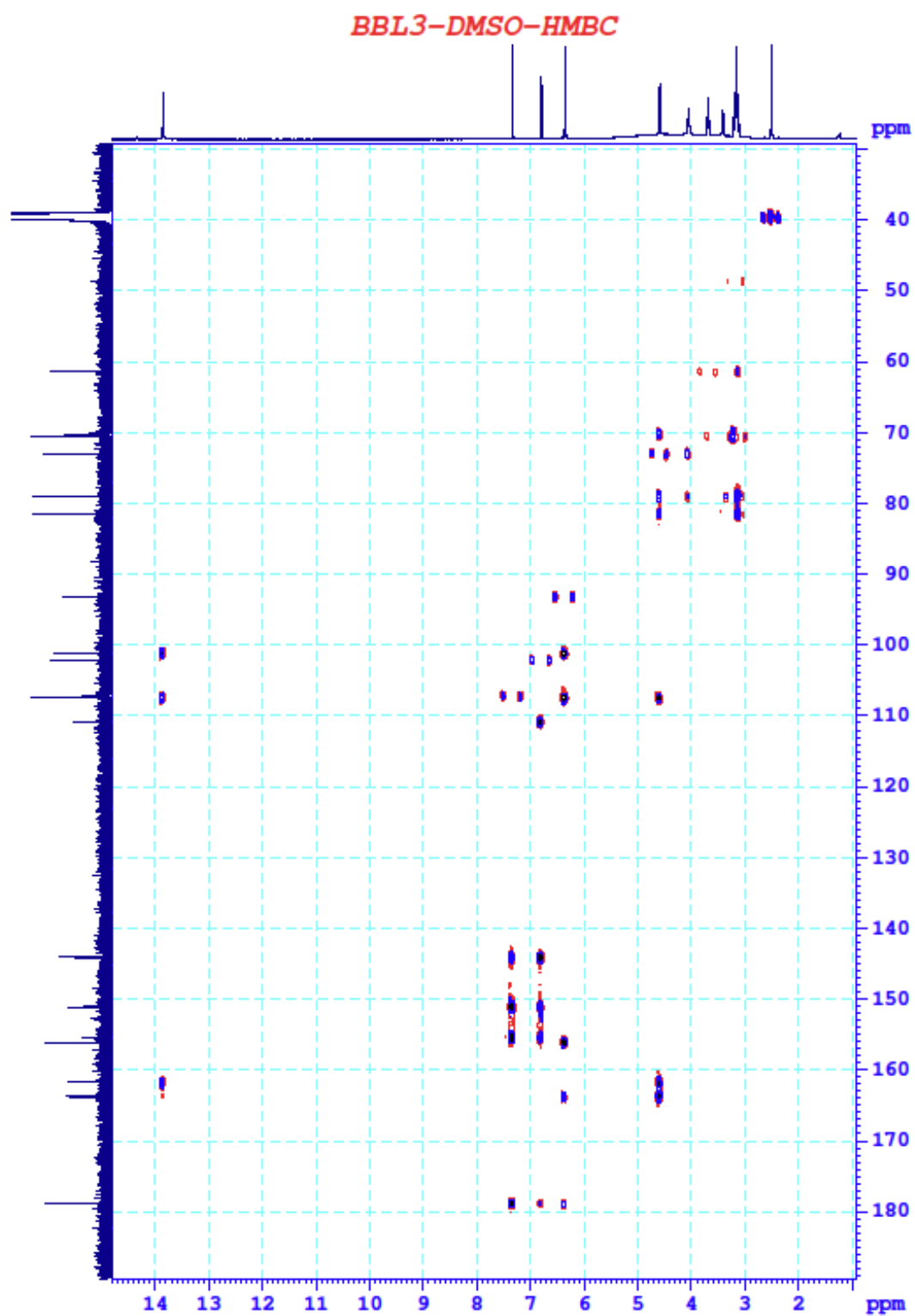


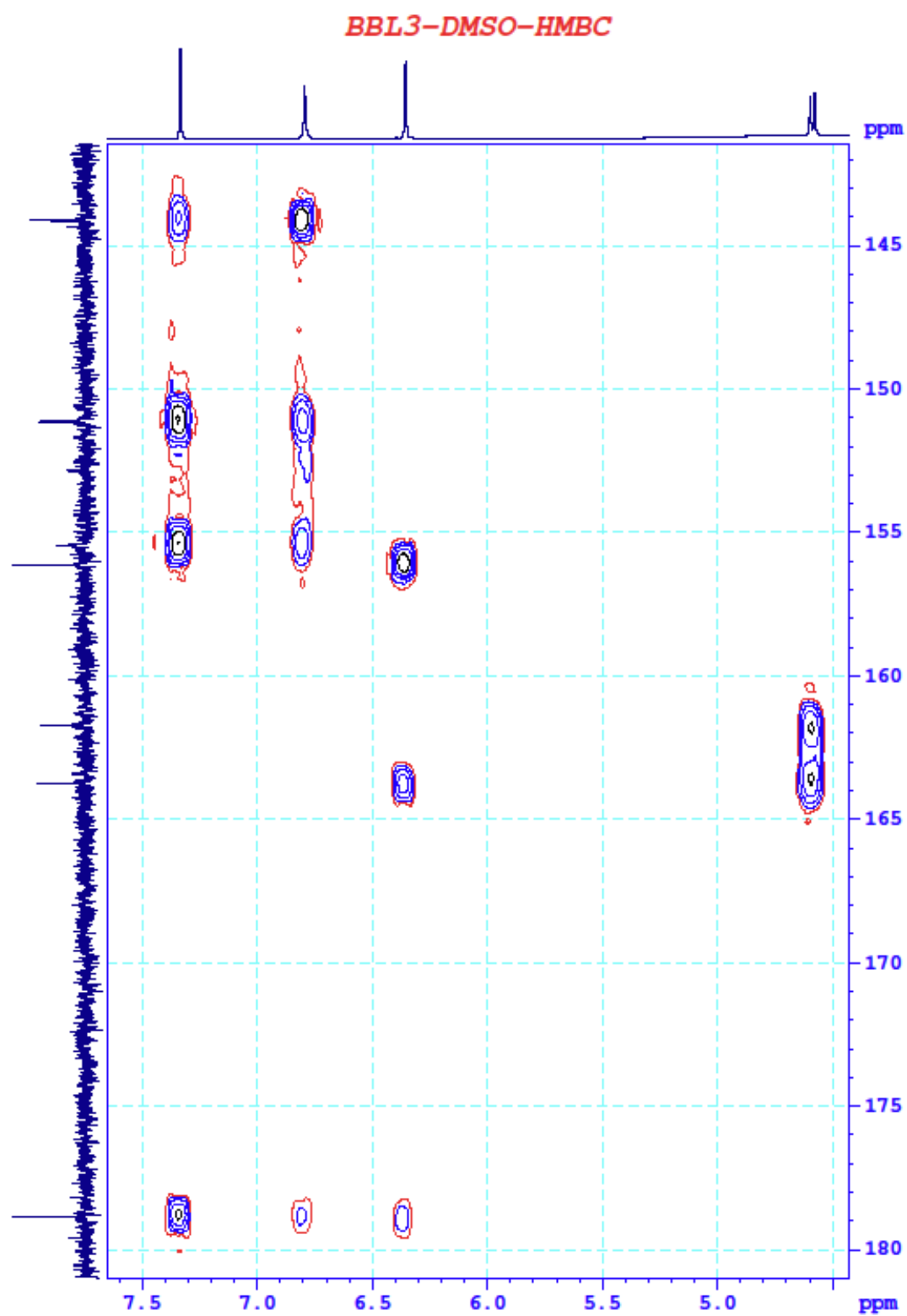
Phổ DEPT

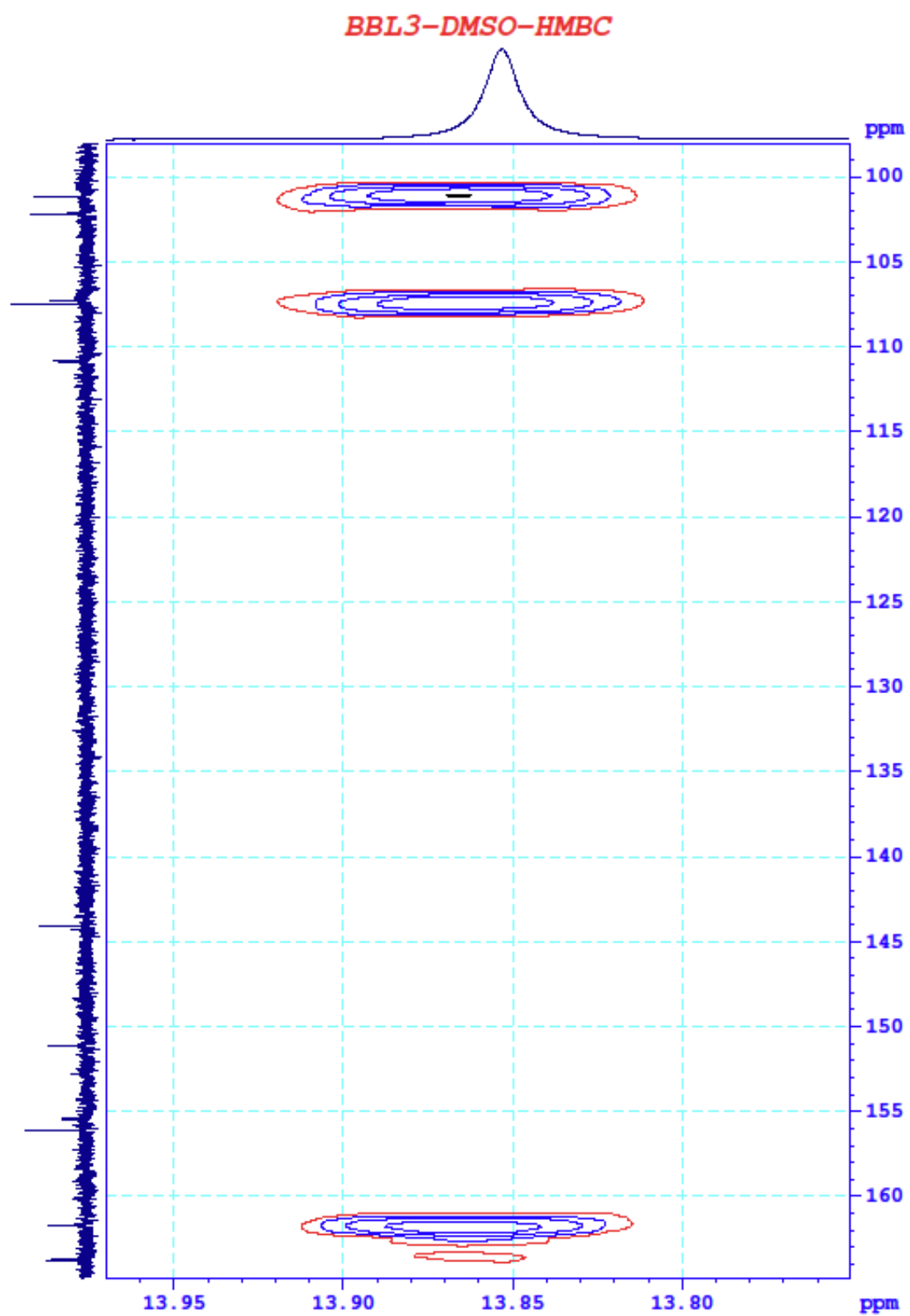


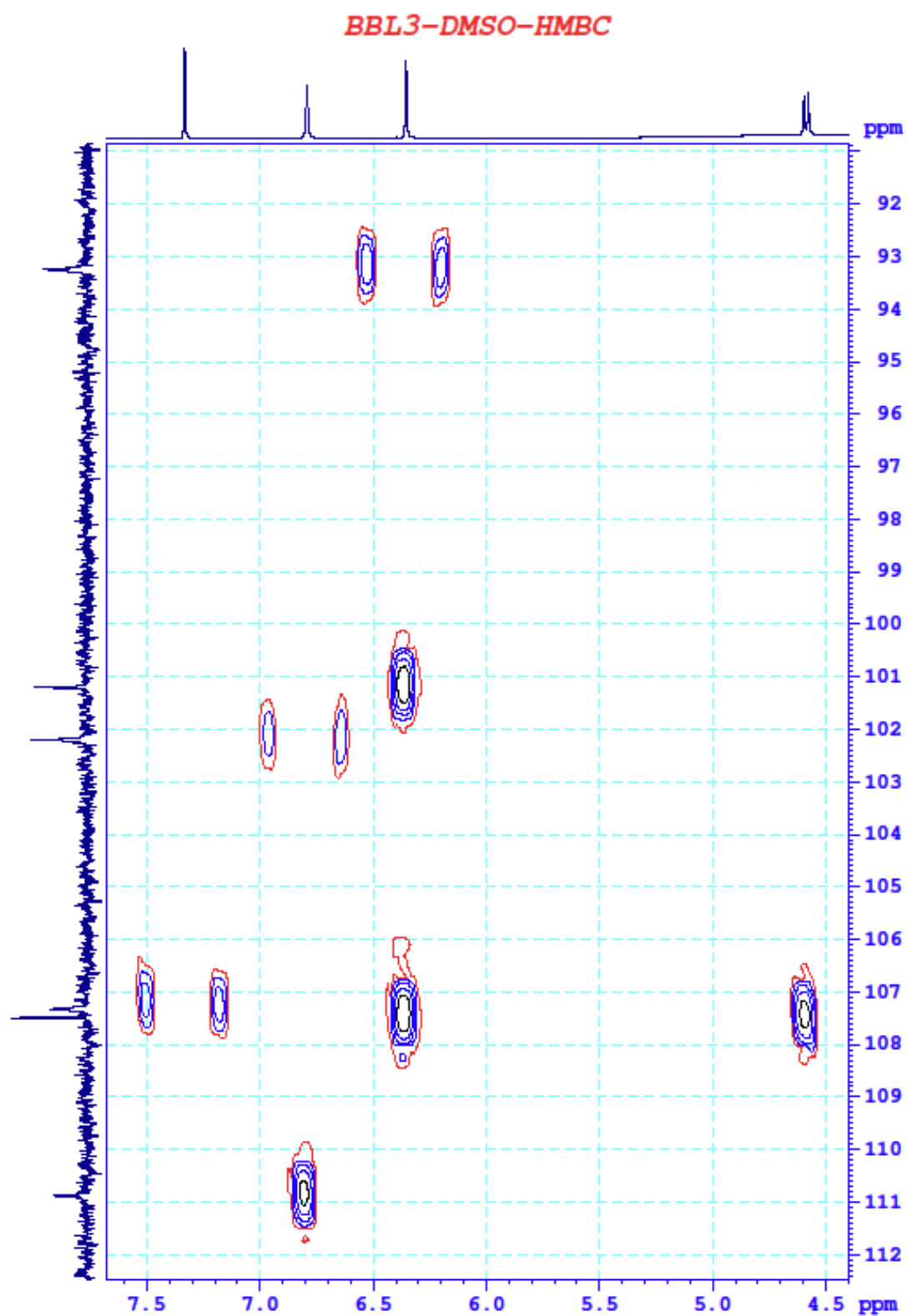
Phổ HMBC



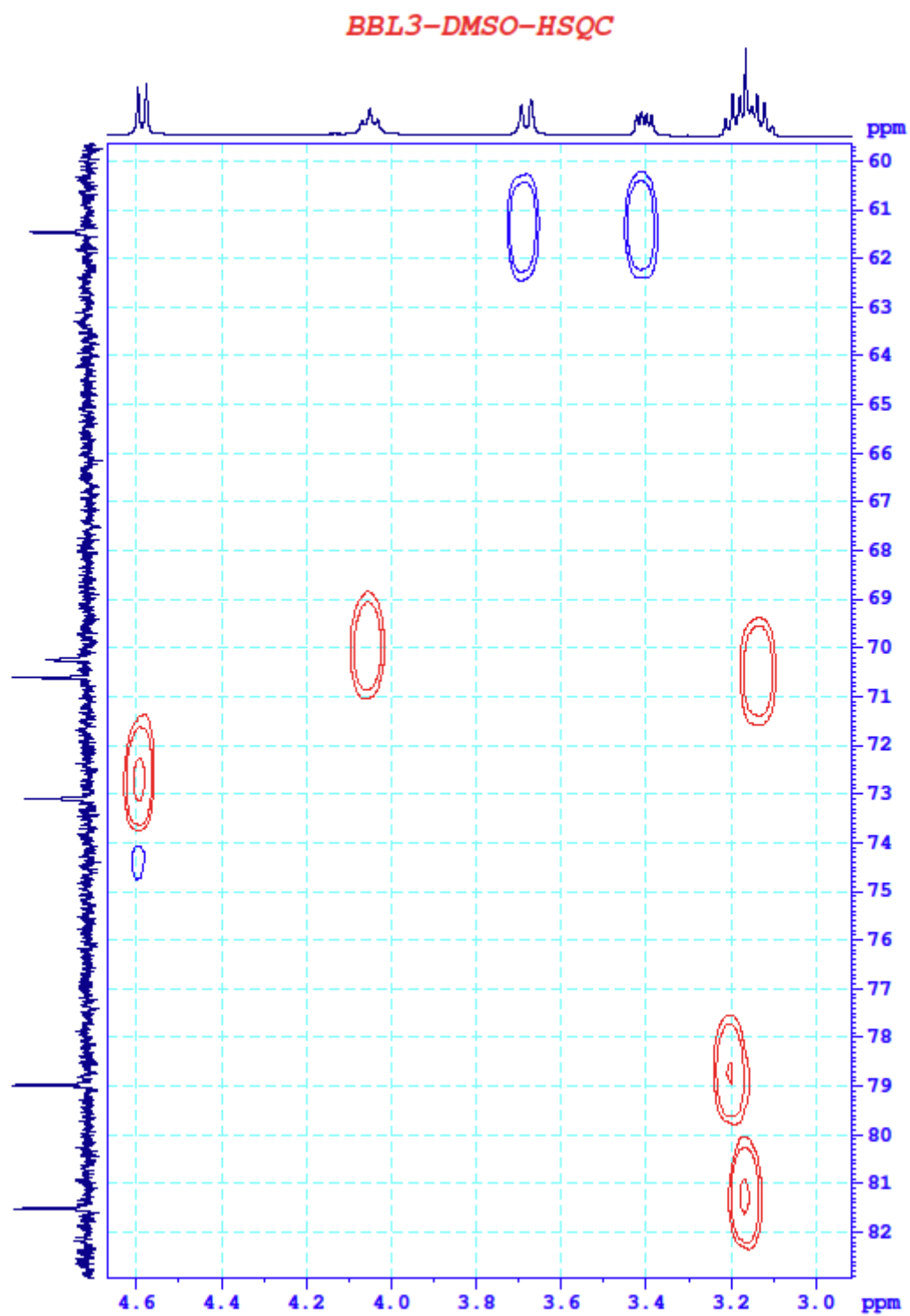


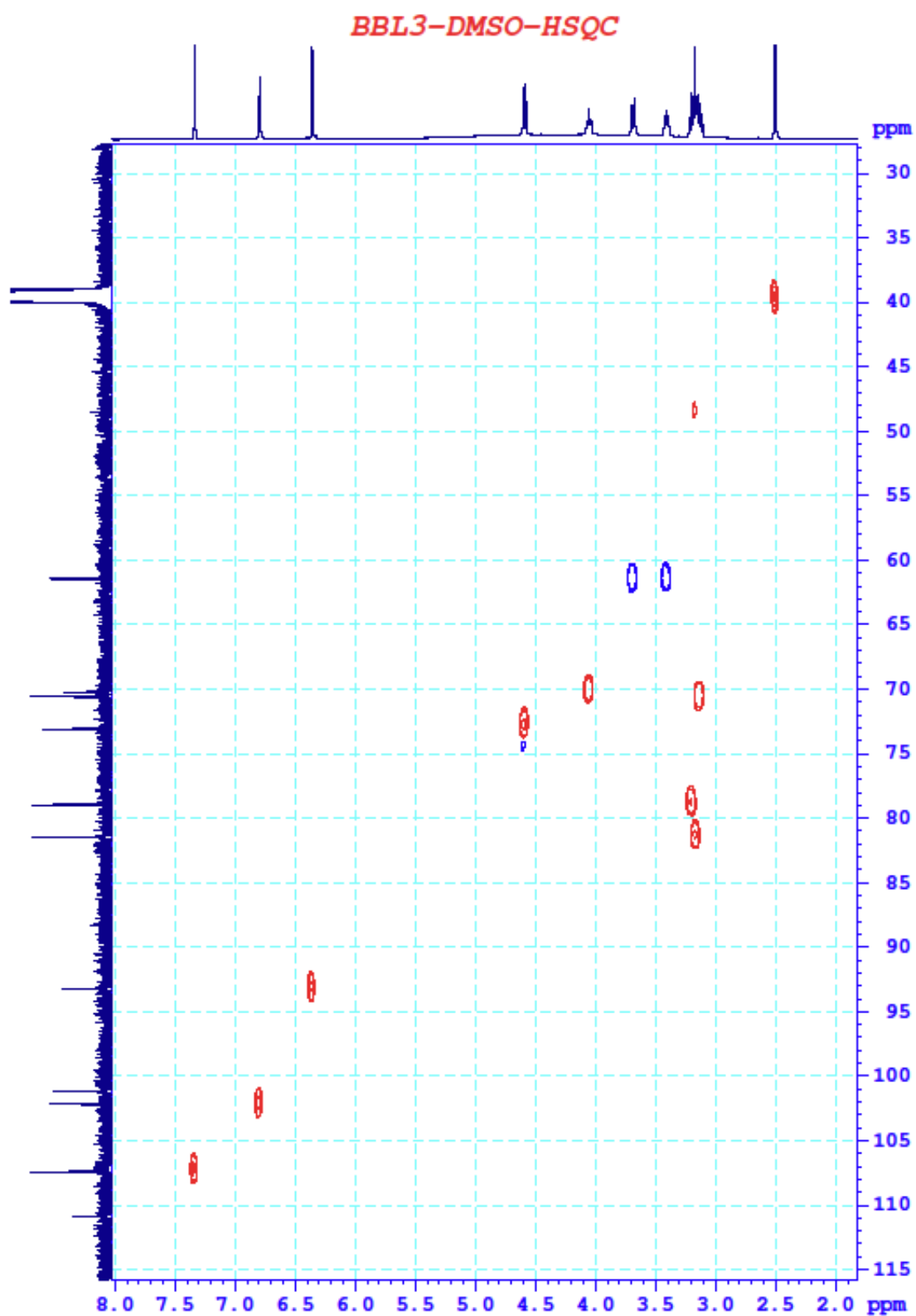






Phổ HSQC

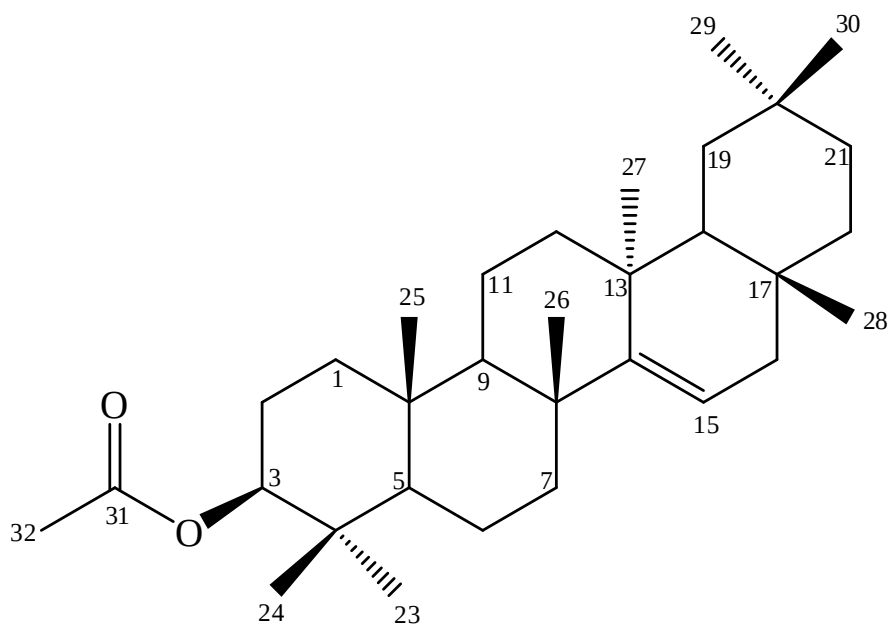




PHỤ LỤC 11

PHỤ LỤC 11: PHỔ CỦA CHẤT BBL5

- MS
- ^1H -NMR
- ^{13}C -NMR
- DEPT
- HMBC
- HSQC



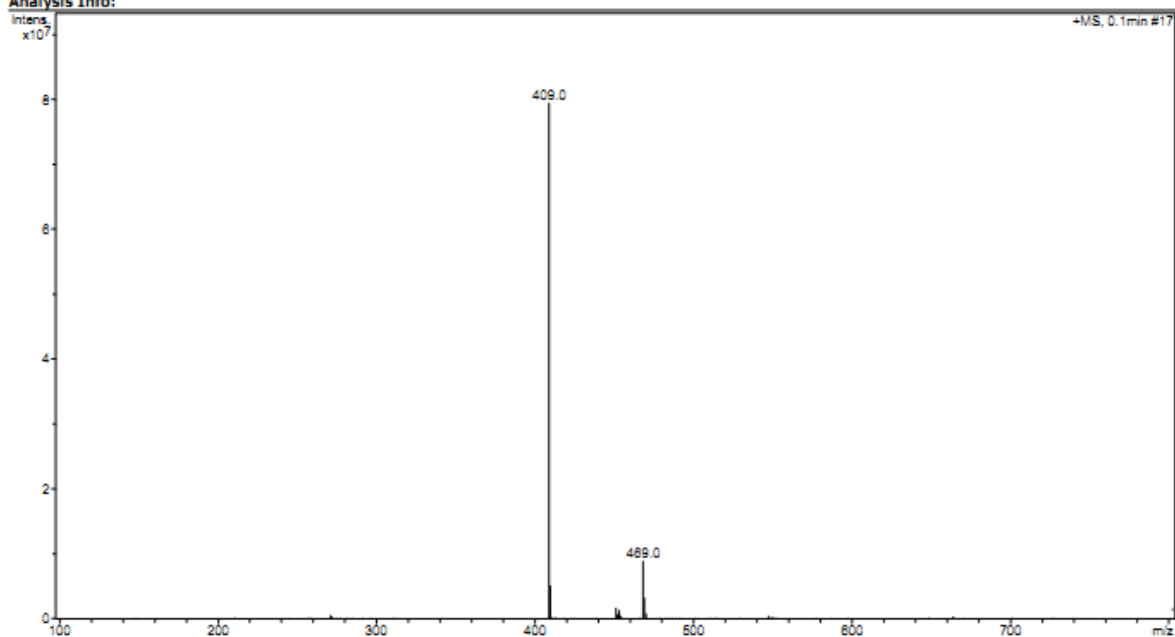
Phổ ESI-MS

Display Report - Selected Window Selected Analysis

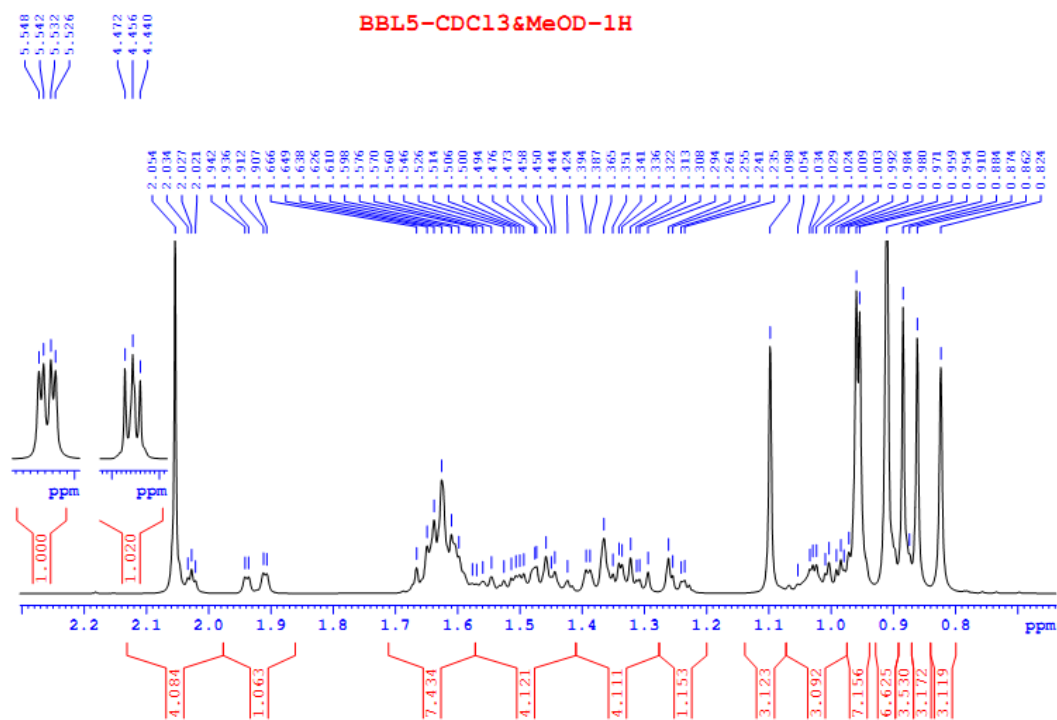
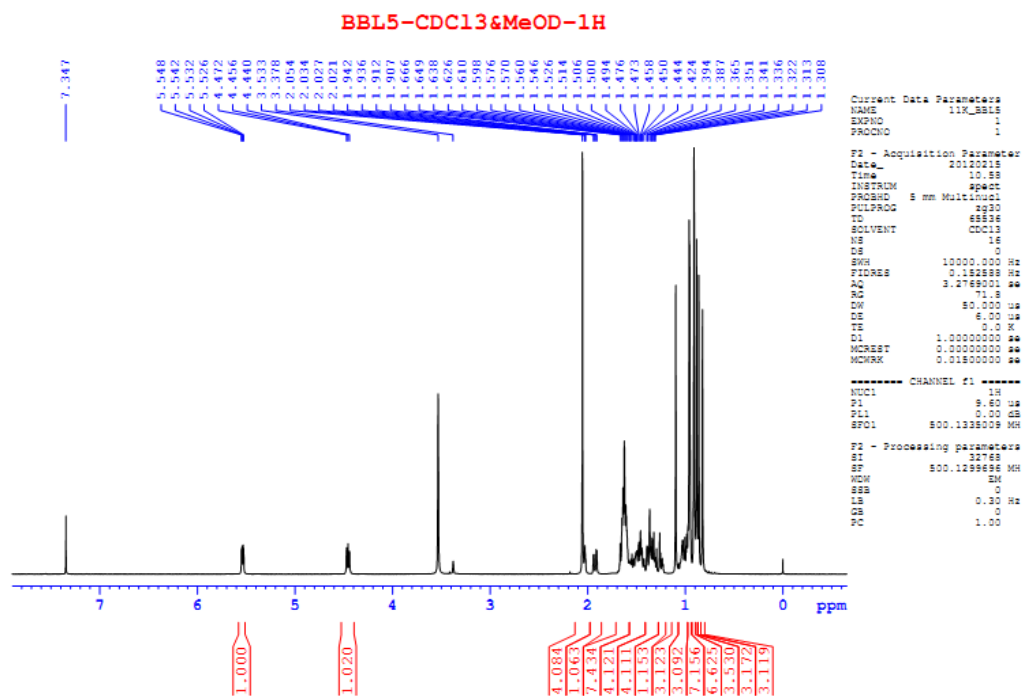
Analysis Name: 12040312...d
Method: DO MS.m
Sample Name: BBL5
Analysis Info:

Instrument: Agilent 6310 Ion Trap
Operator: Phong PTHC, Vien Hoa HCTN

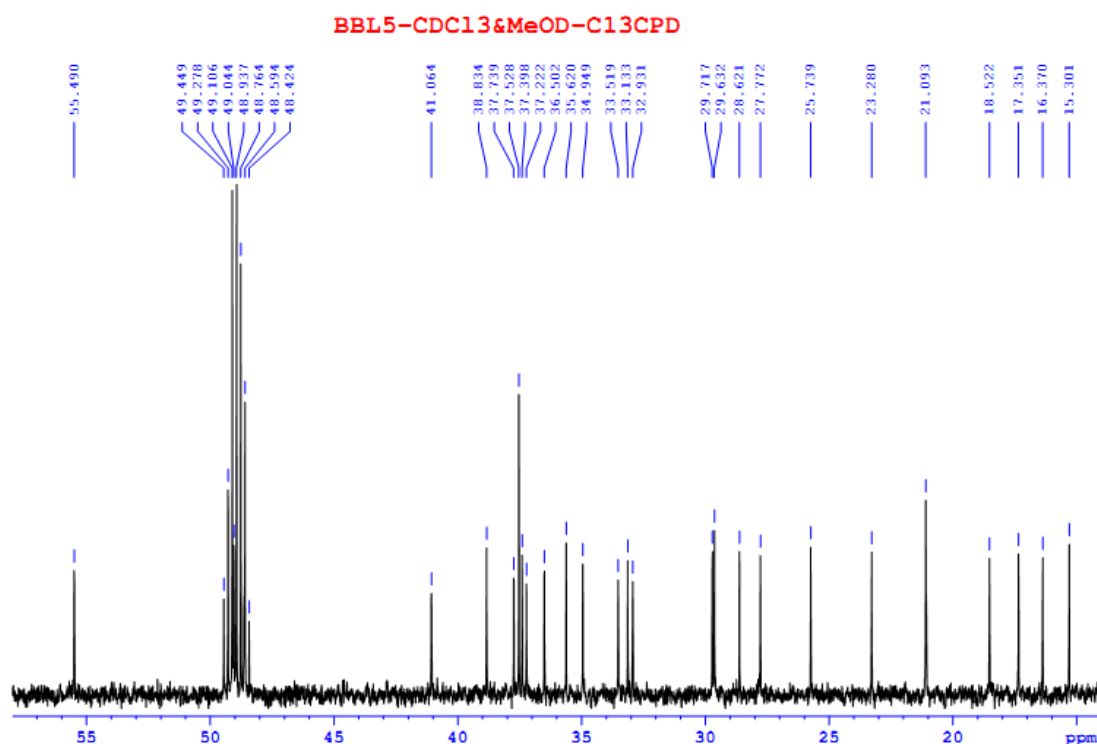
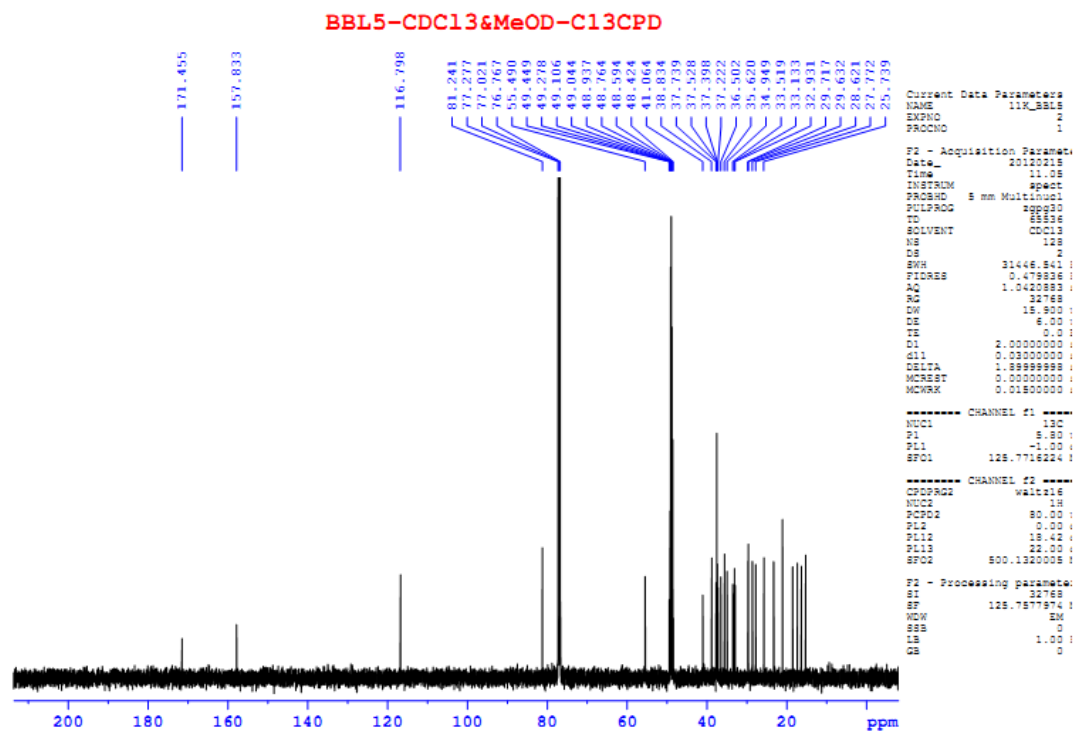
Print Date: 4/5/2012 12:45:53 PM
Acq. Date: 4/3/2012 5:47:42 PM



Phổ ^1H -NMR



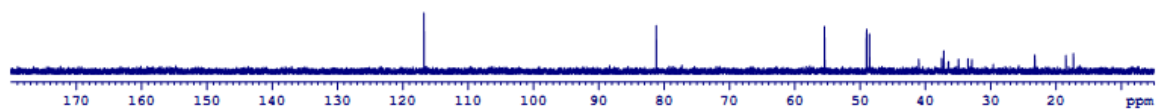
Pho ¹³C-NMR



Phổ DEPT

BBL5-CDC13&MeOD-C13CPD&DEPT

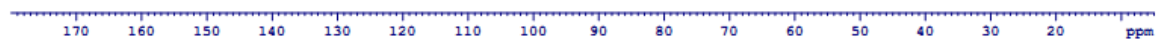
DEPT90



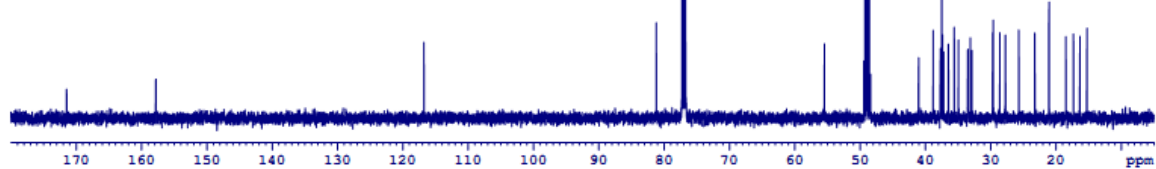
DEPT135

CH&CH3

CH2



C13CPD



BBL5-CDC13&MeOD-C13CPD&DEPT

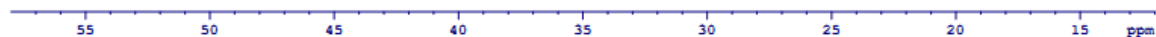
DEPT90



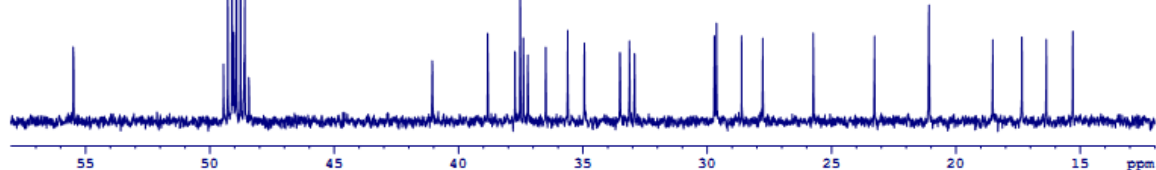
DEPT135

CH&CH3

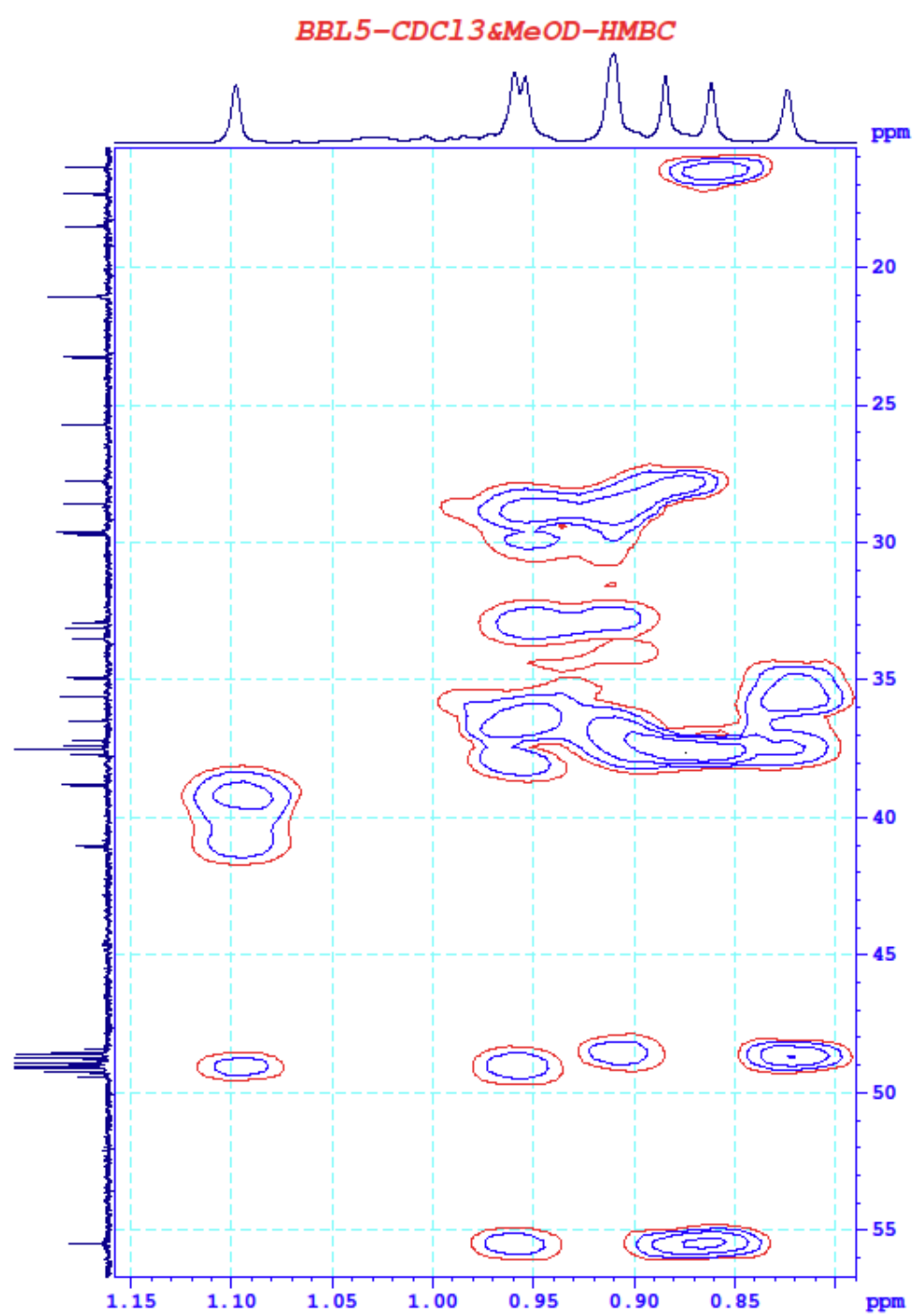
CH2

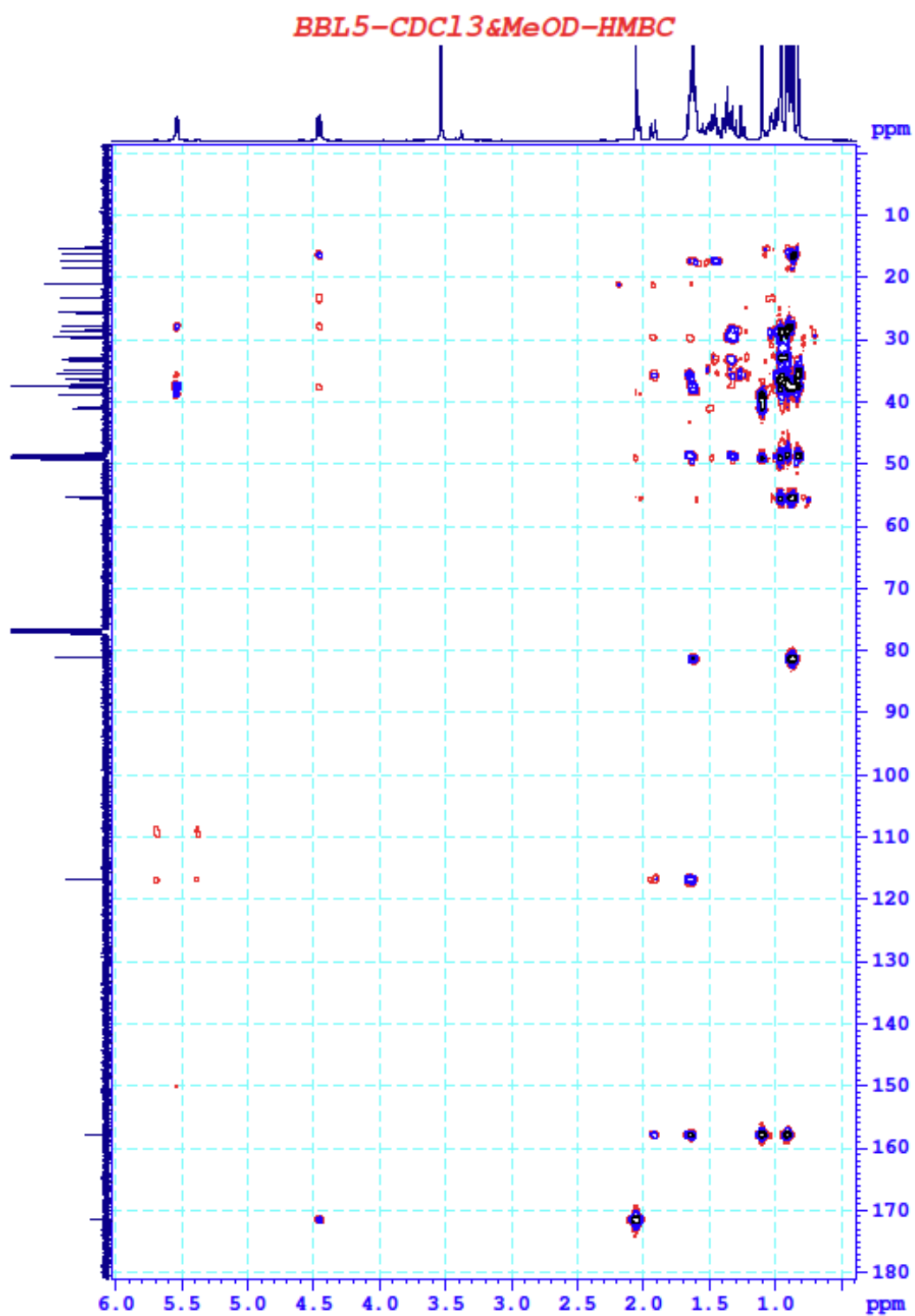


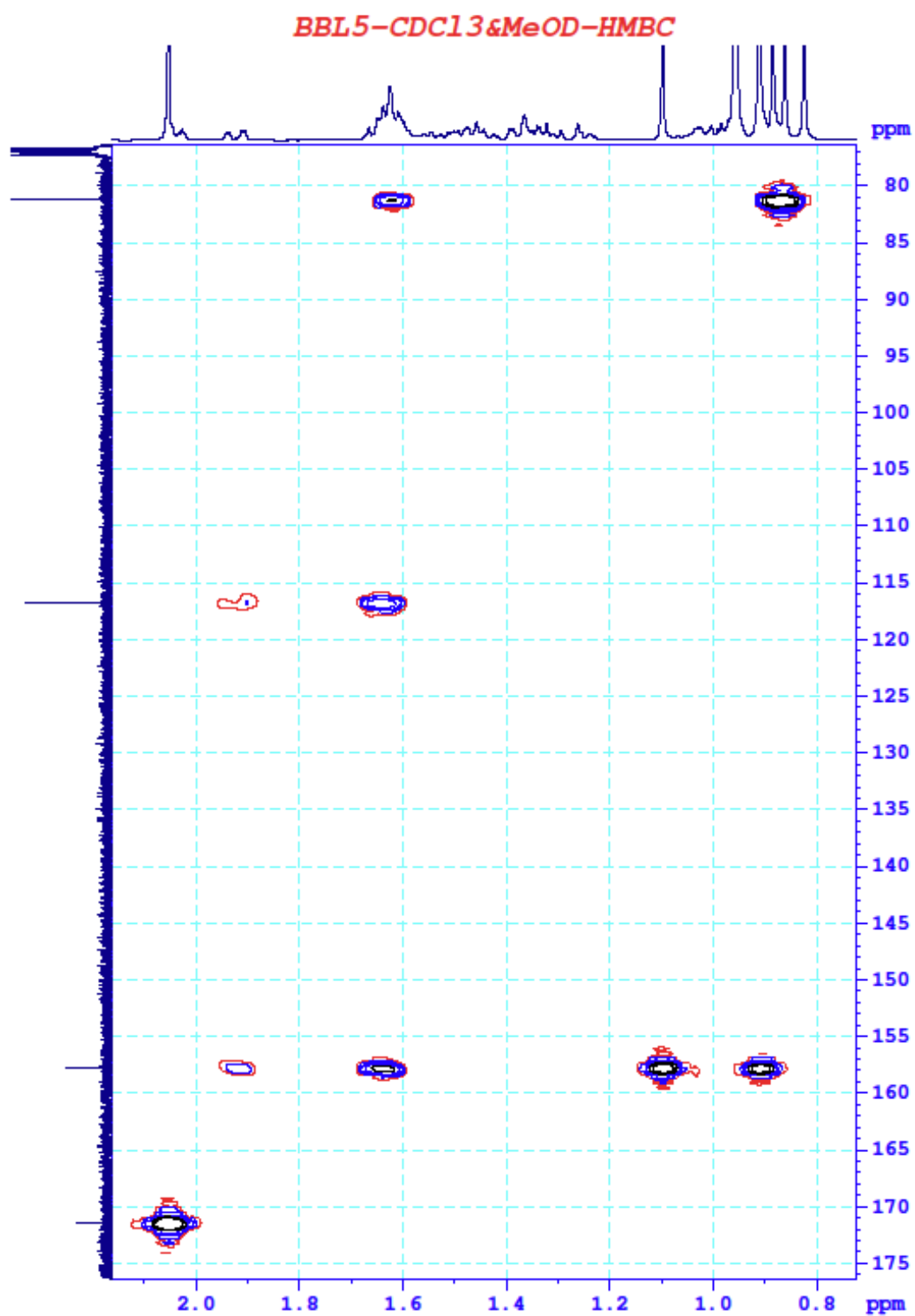
C13CPD



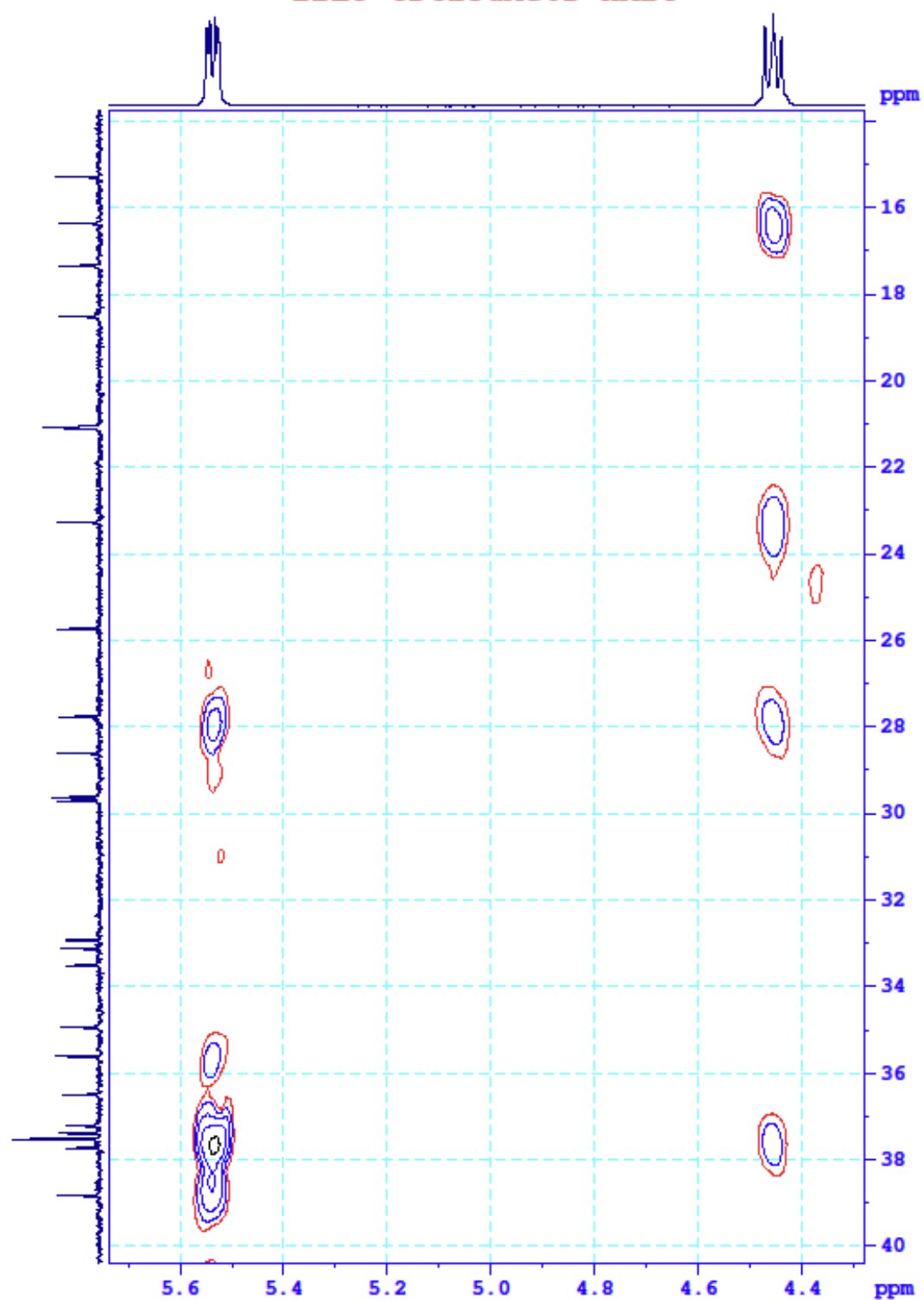
Phổ HMBC

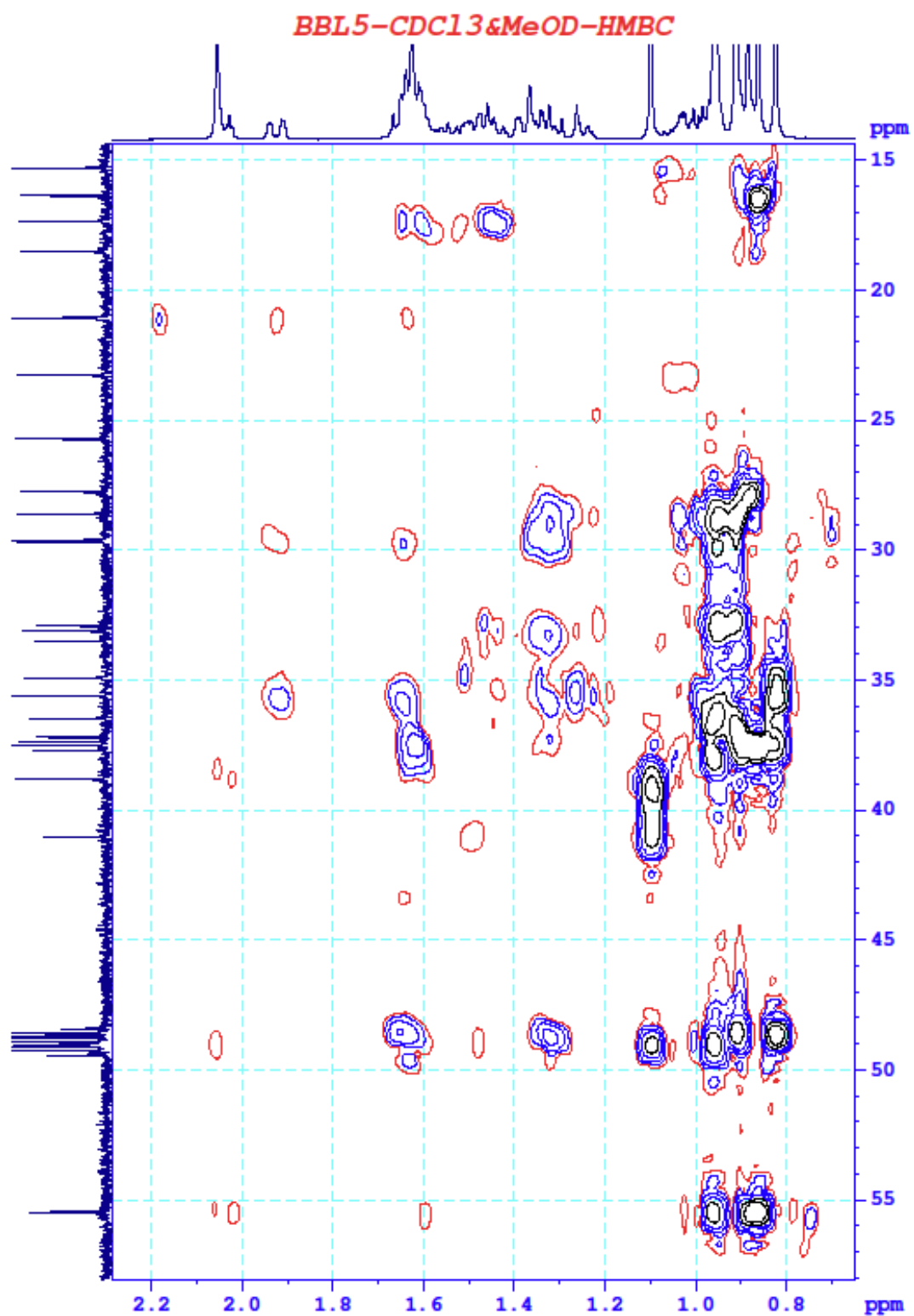




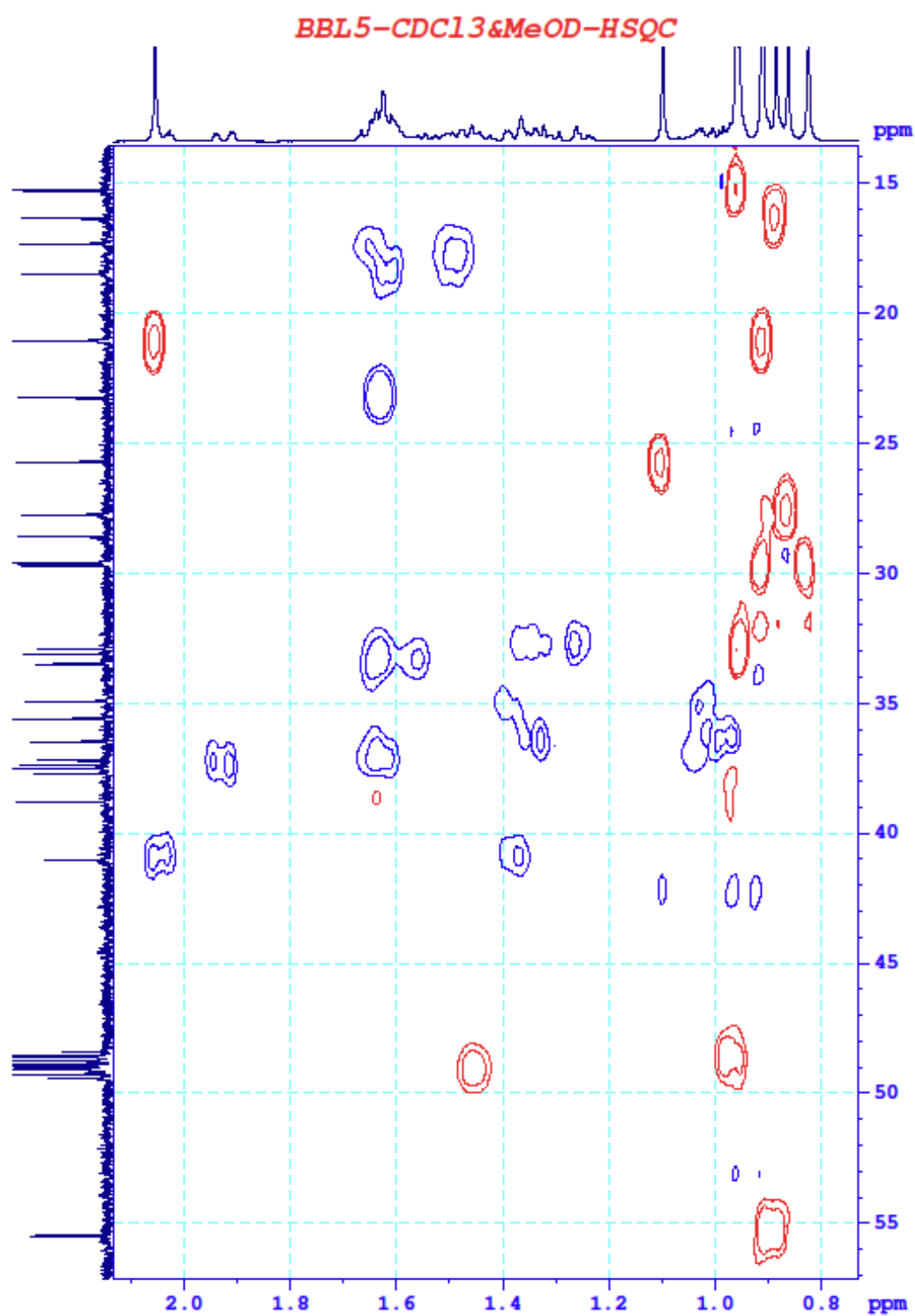


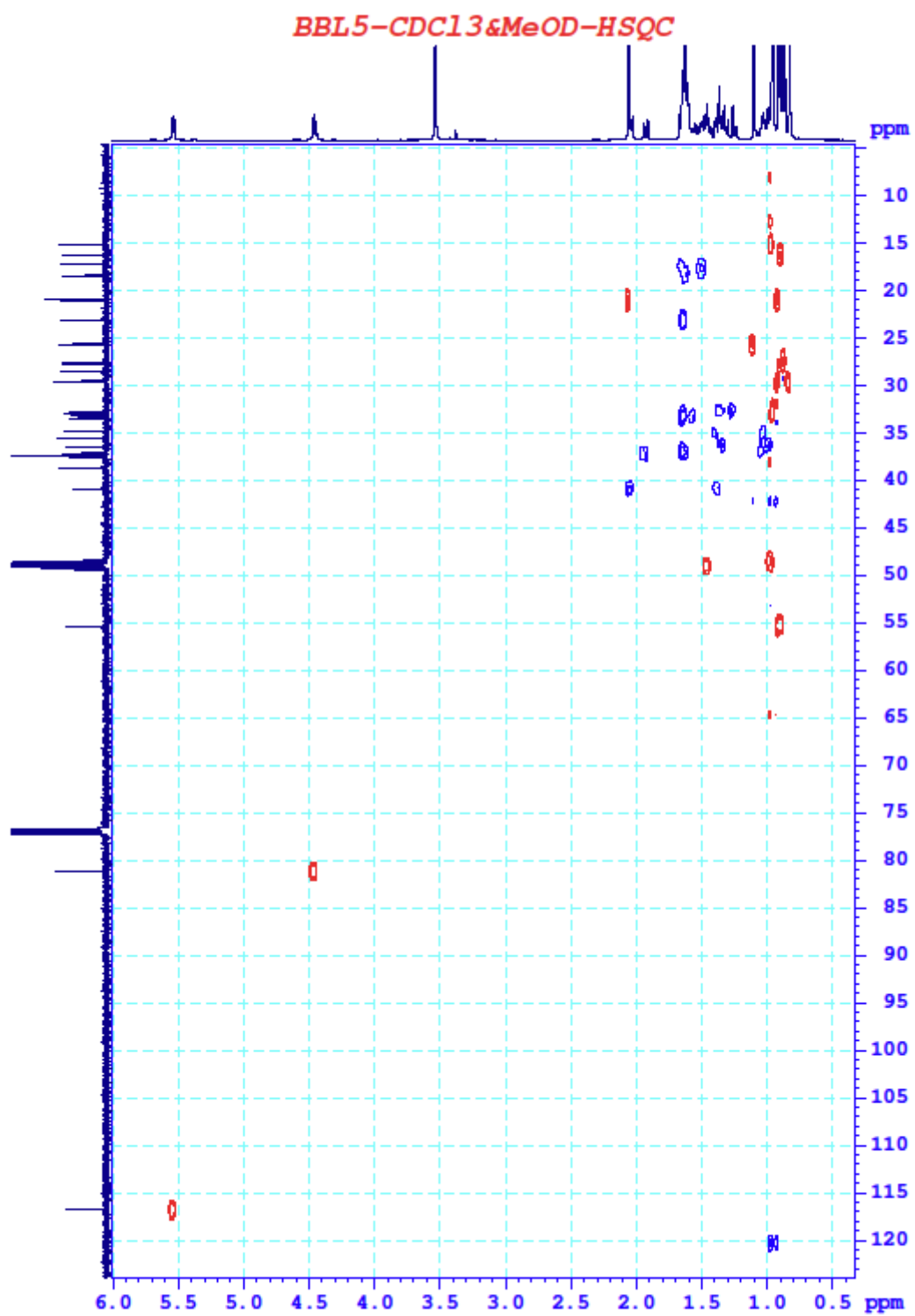
BBL5-CDC13&MeOD-HMBC





Phổ HSQC

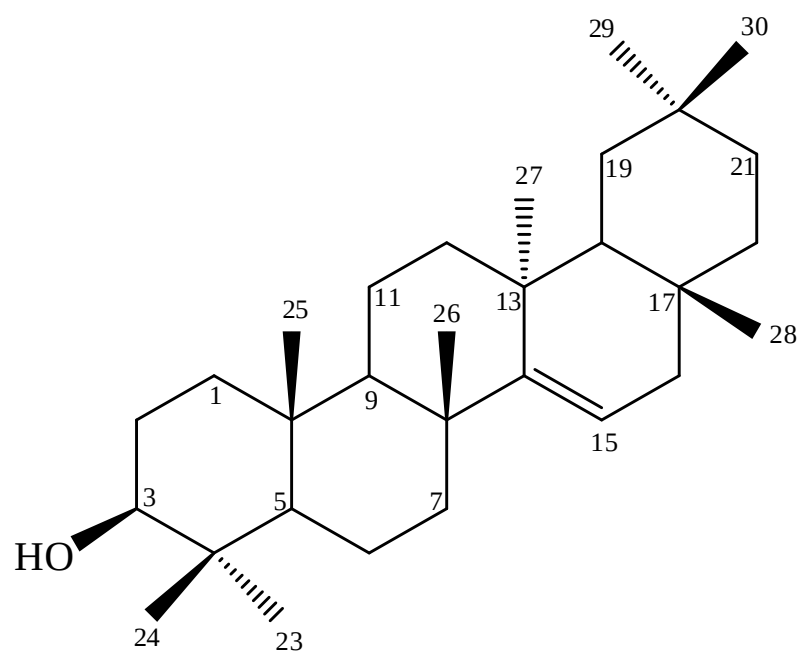




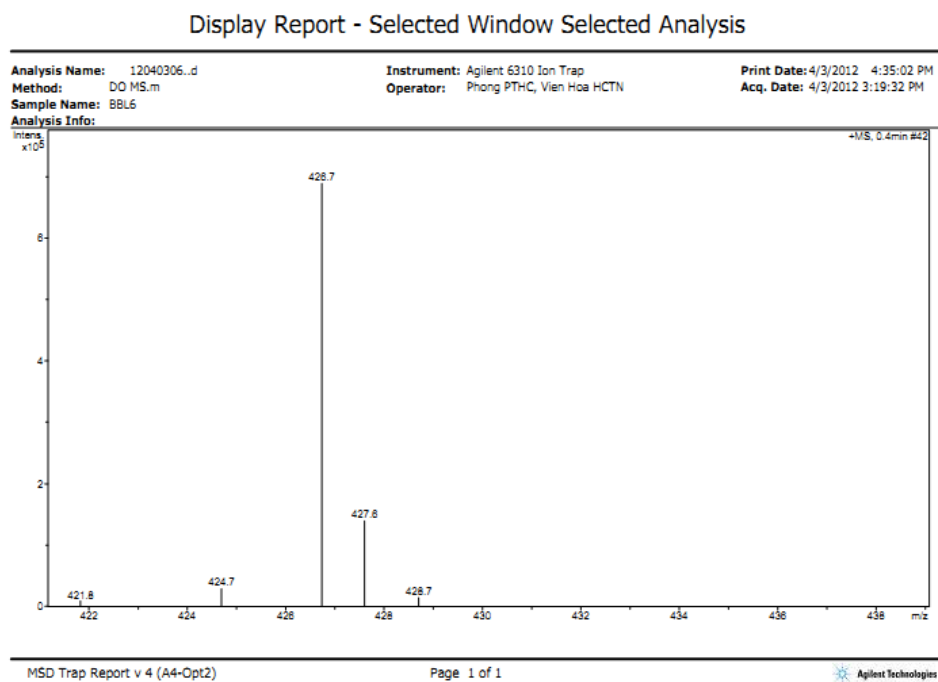
PHỤ LỤC 12

PHỤ LỤC 12: PHỔ CỦA CHẤT BBL6

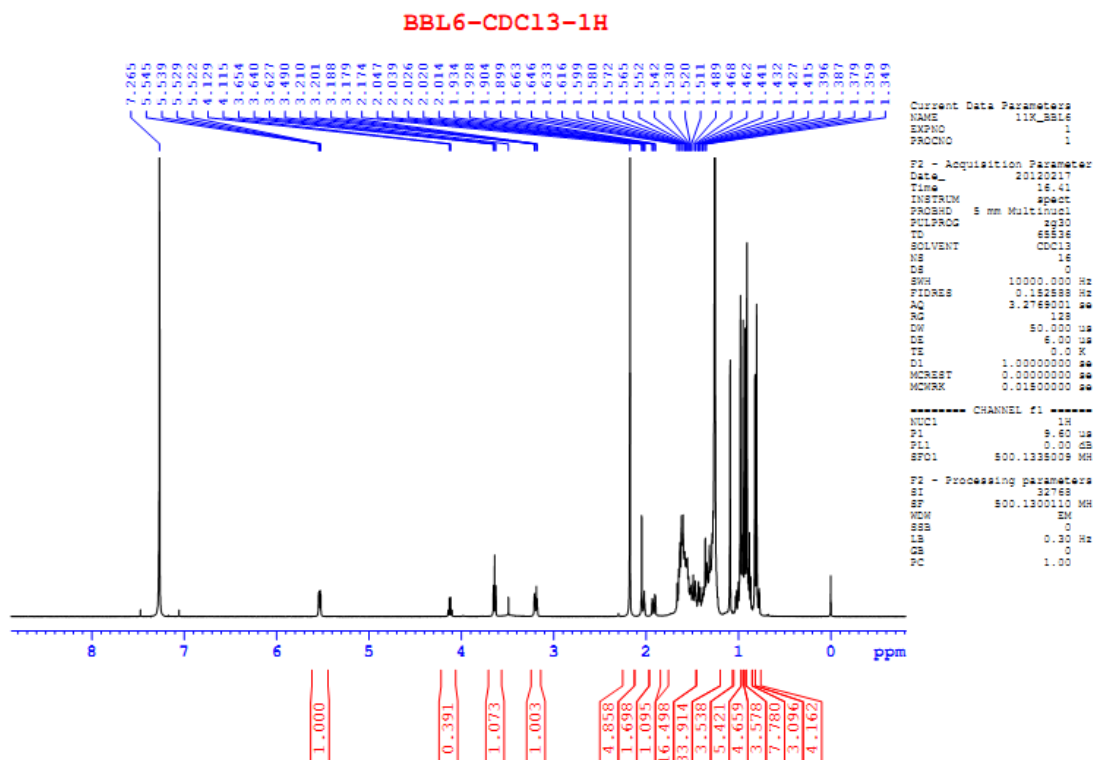
- MS
- ^1H -NMR
- ^{13}C -NMR
- DEPT
- HMBC
- HSQC

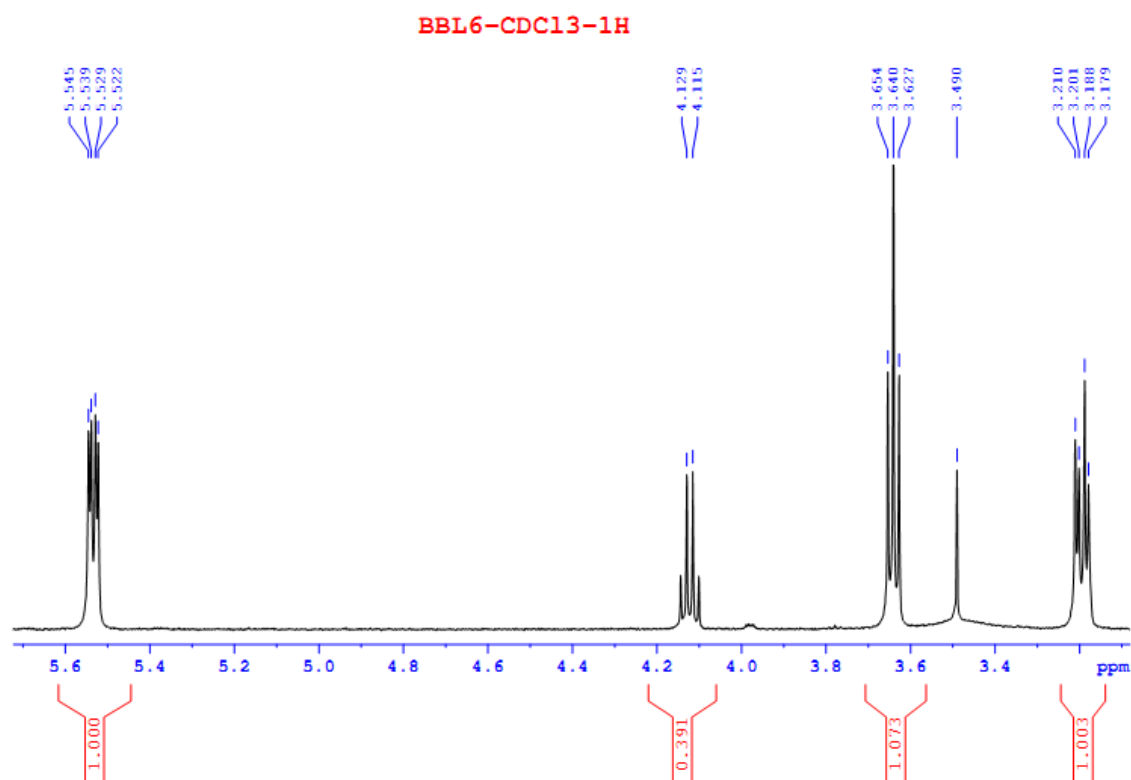
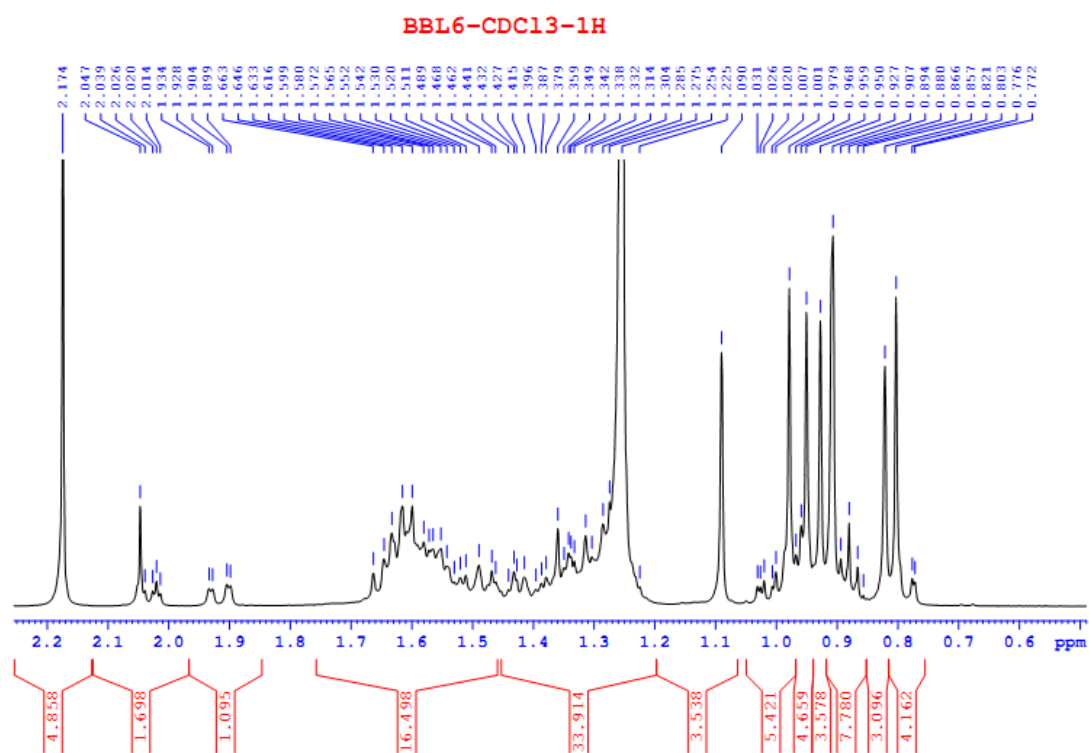


Phổ ESI-MS

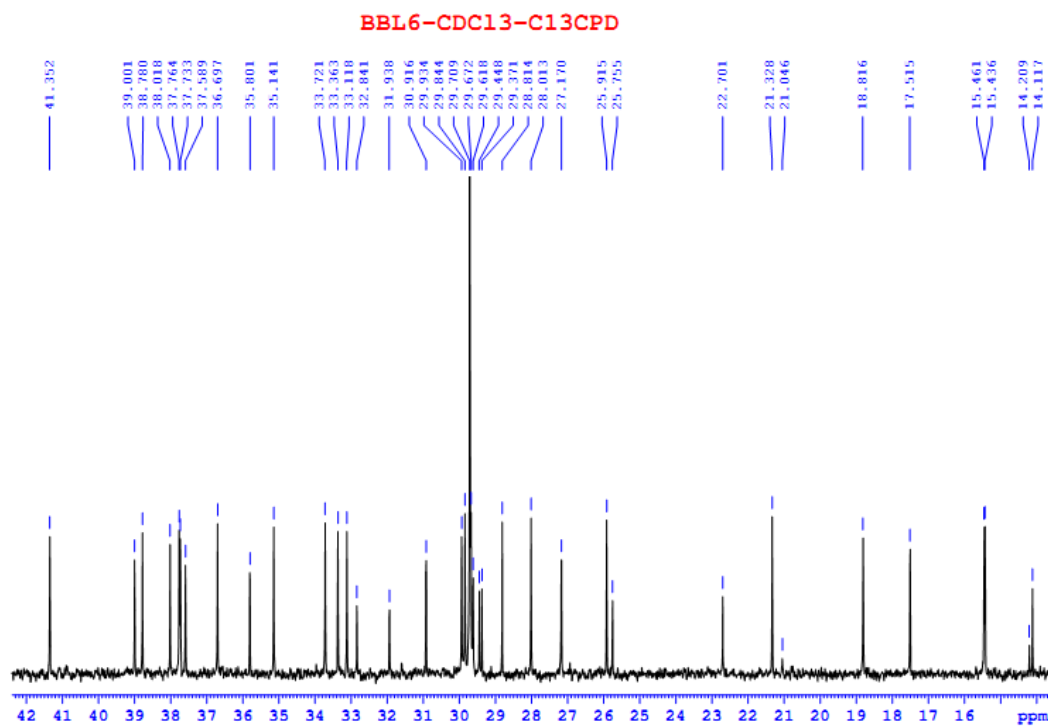
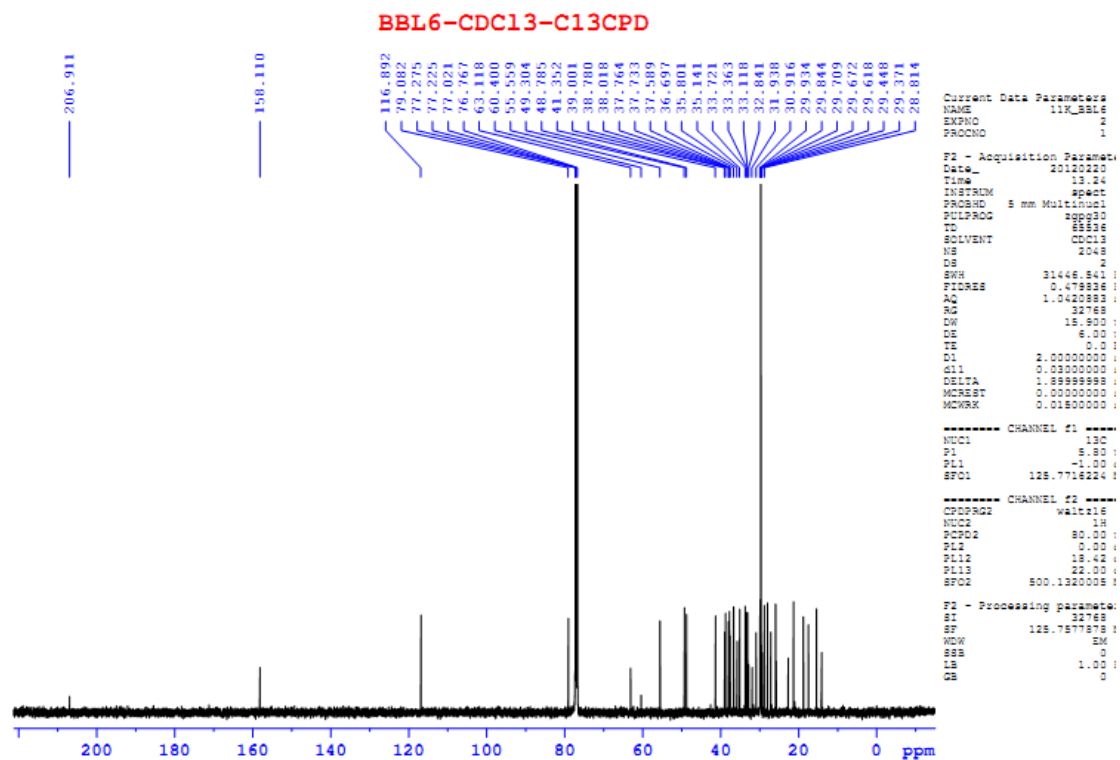


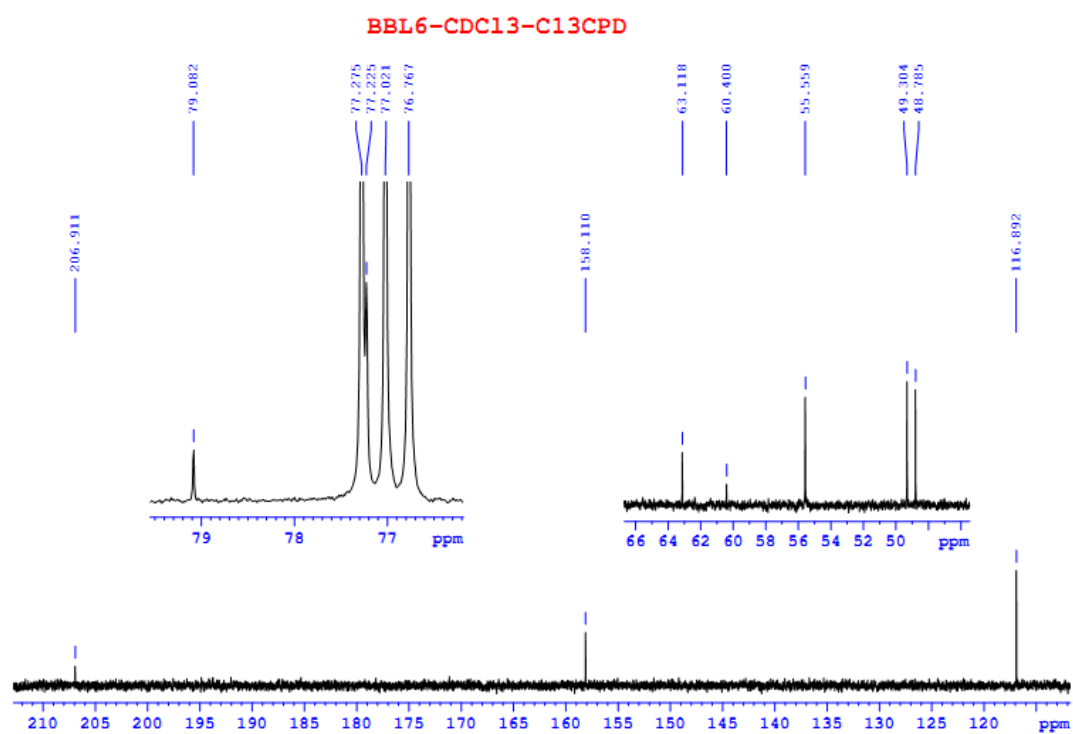
Phổ ^1H -NMR



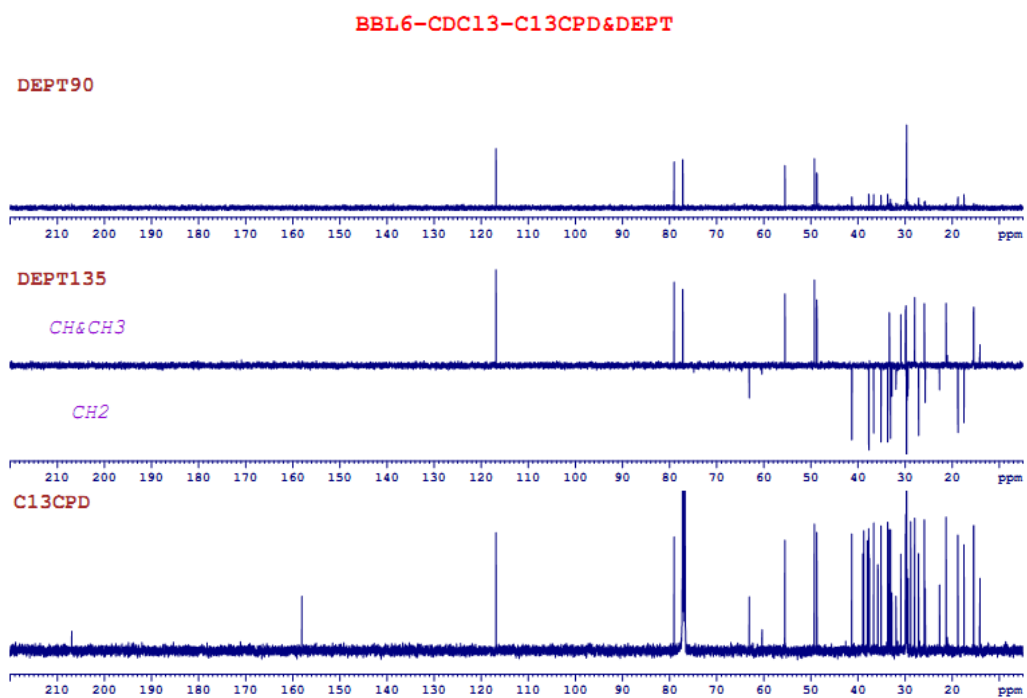


Ph² ¹³C-NMR



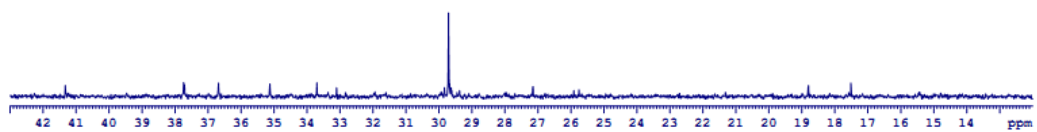


Phổ DEPT

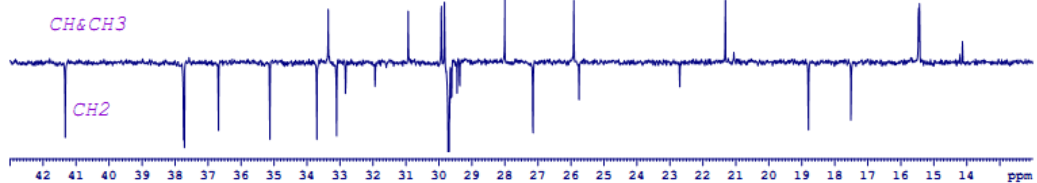


BBL6-CDC13-C13CPD&DEPT

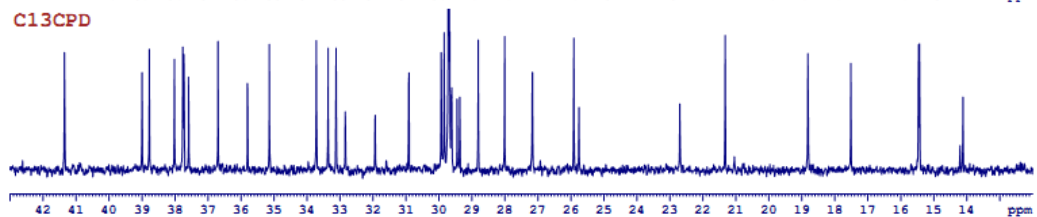
DEPT90



DEPT135

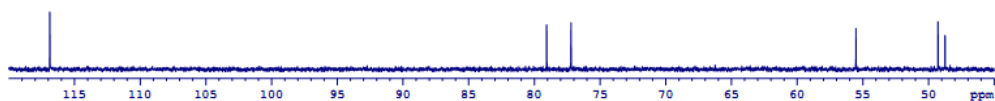


C13CPD



BBL6-CDC13-C13CPD&DEPT

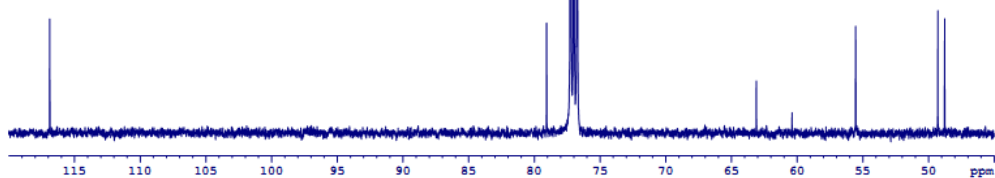
DEPT90



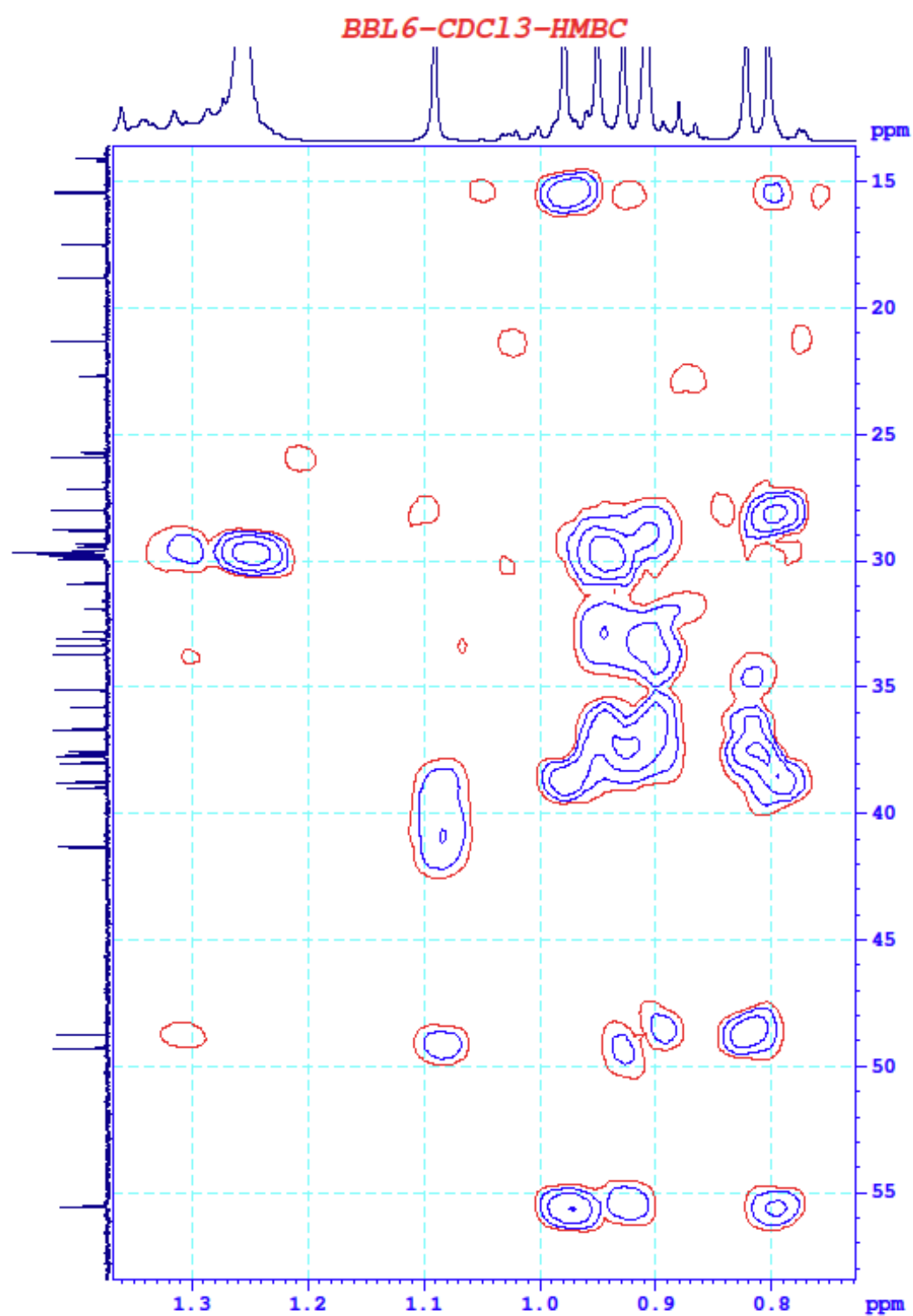
DEPT135



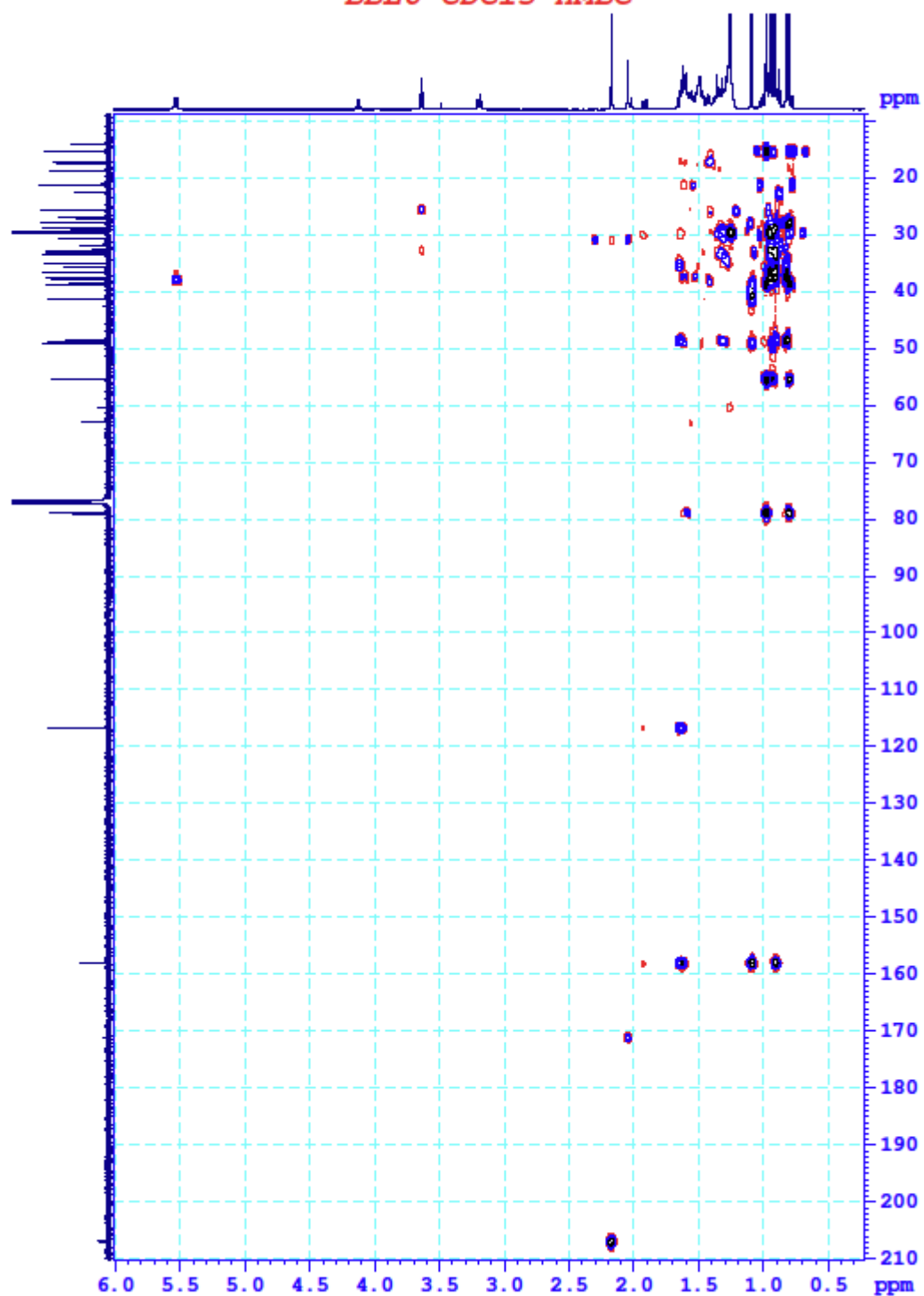
C13CPD

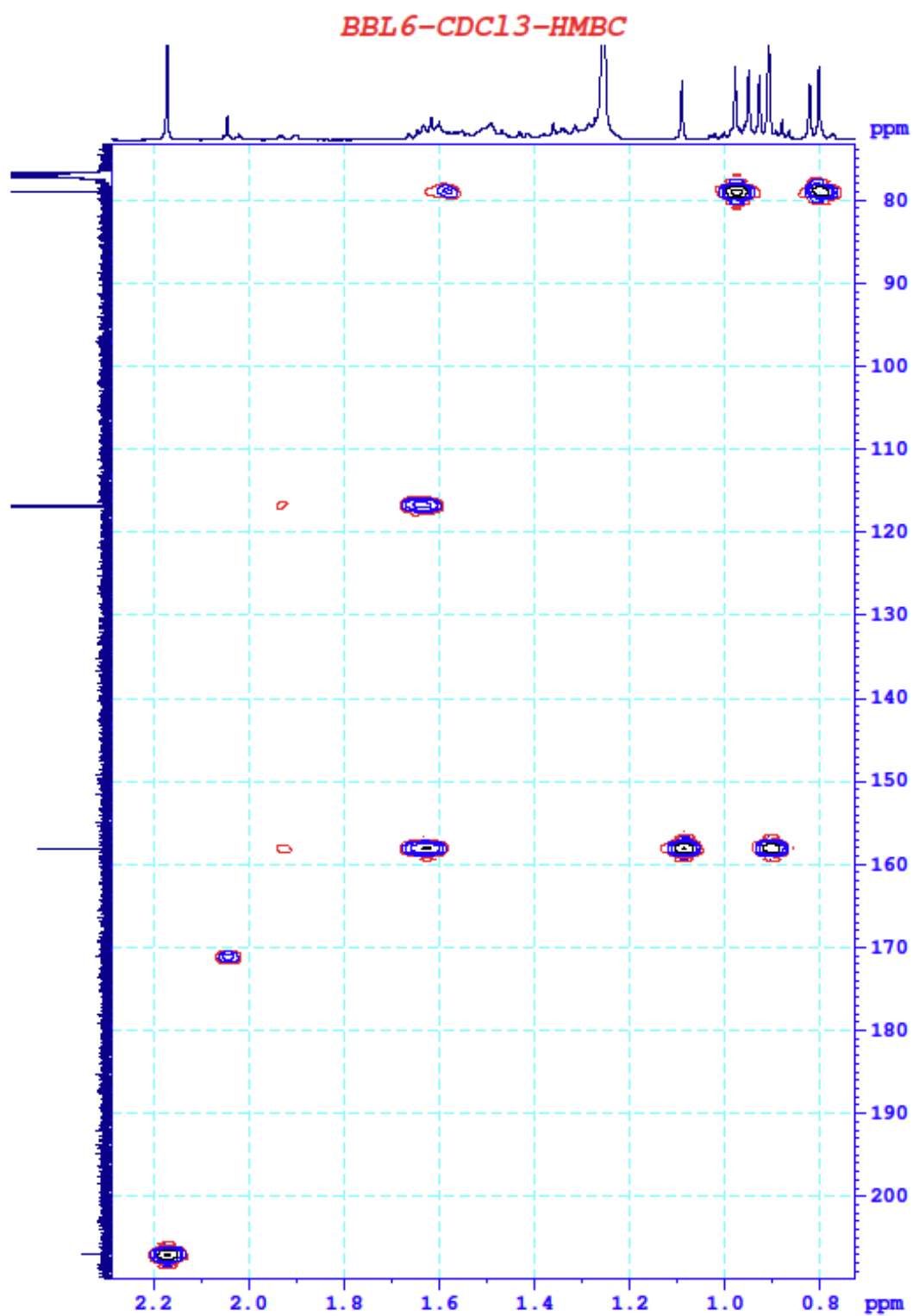


Phổ HMBC

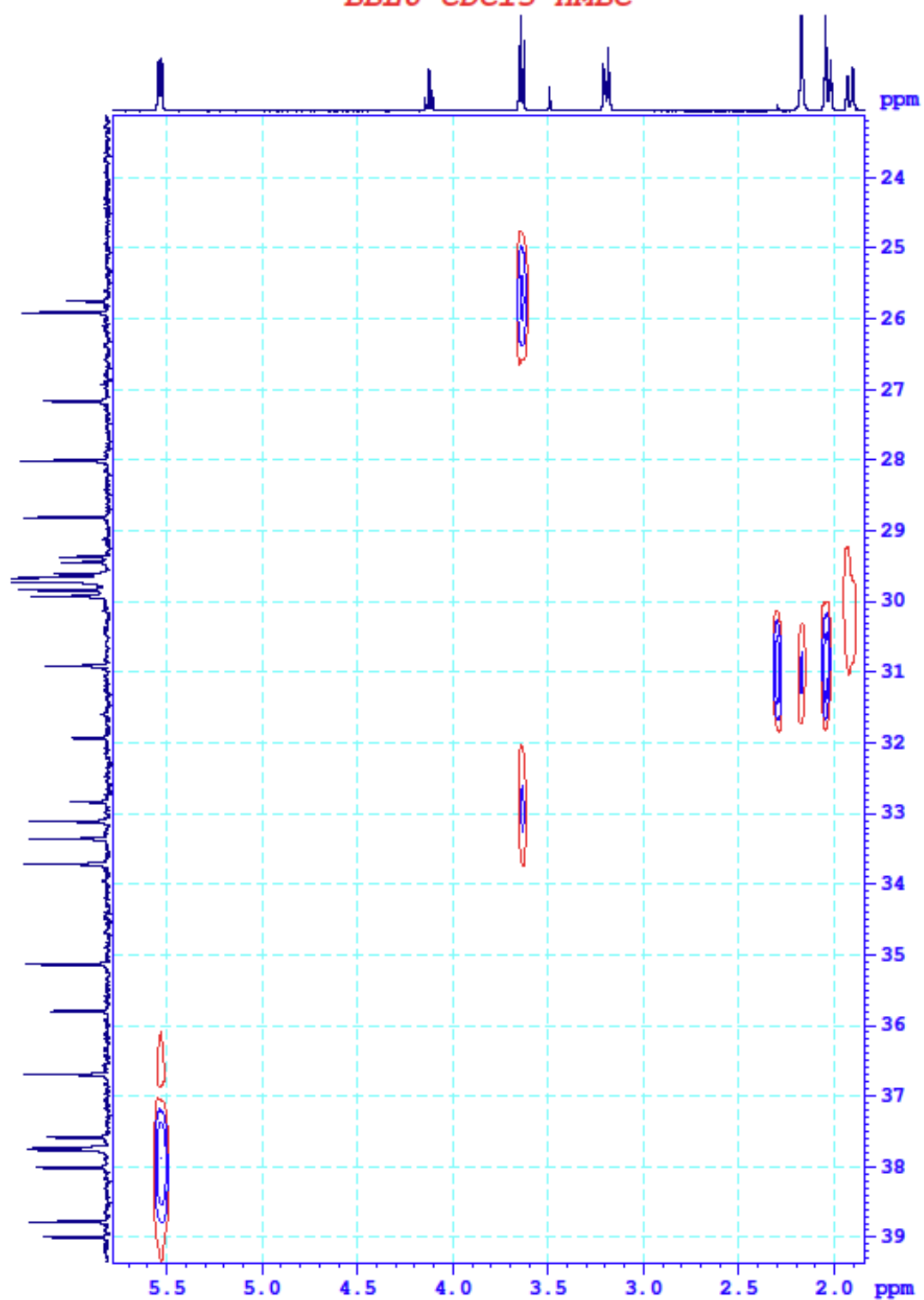


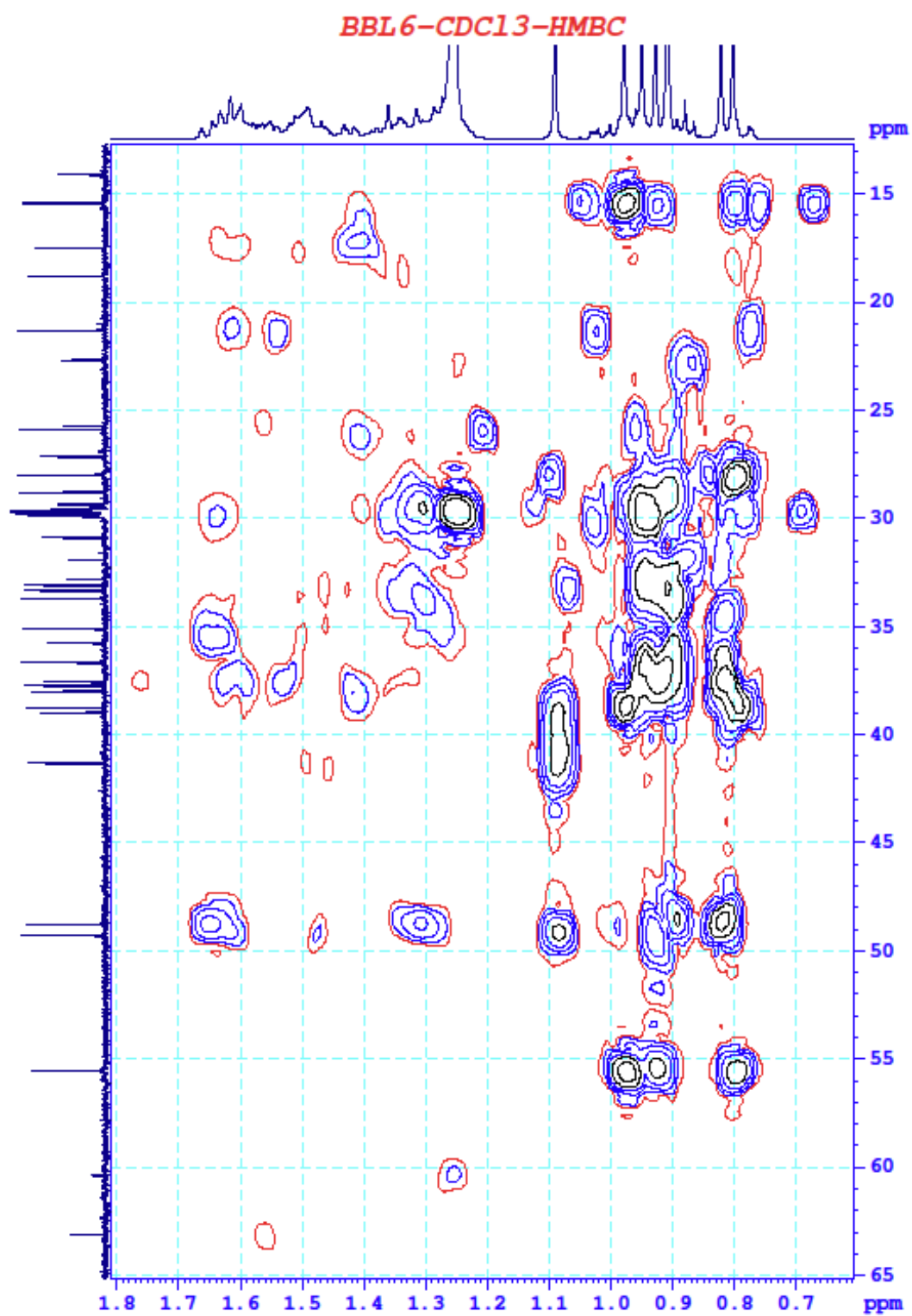
BBL6-CDC13-HMBC



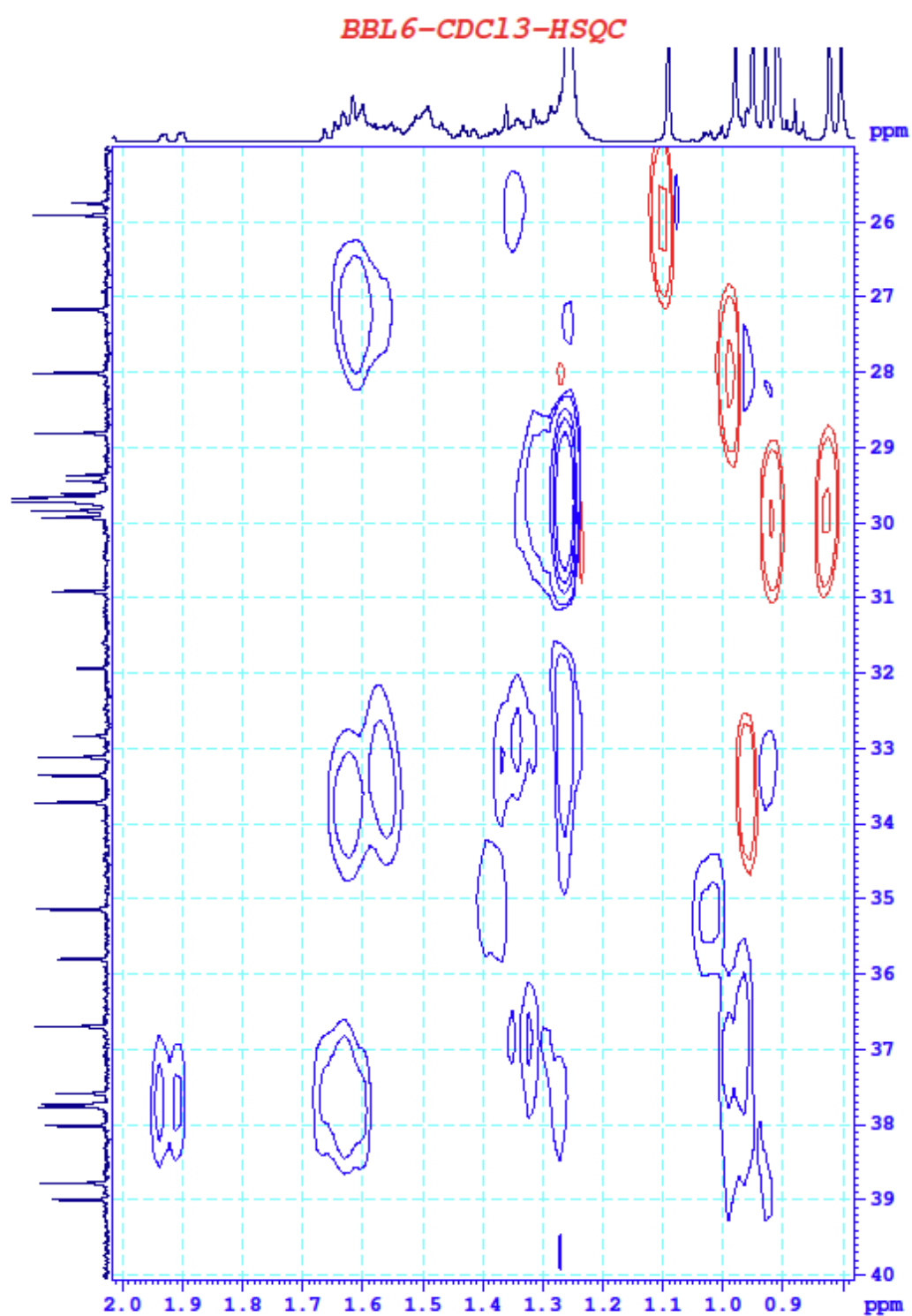


BBL6-CDC13-HMBC

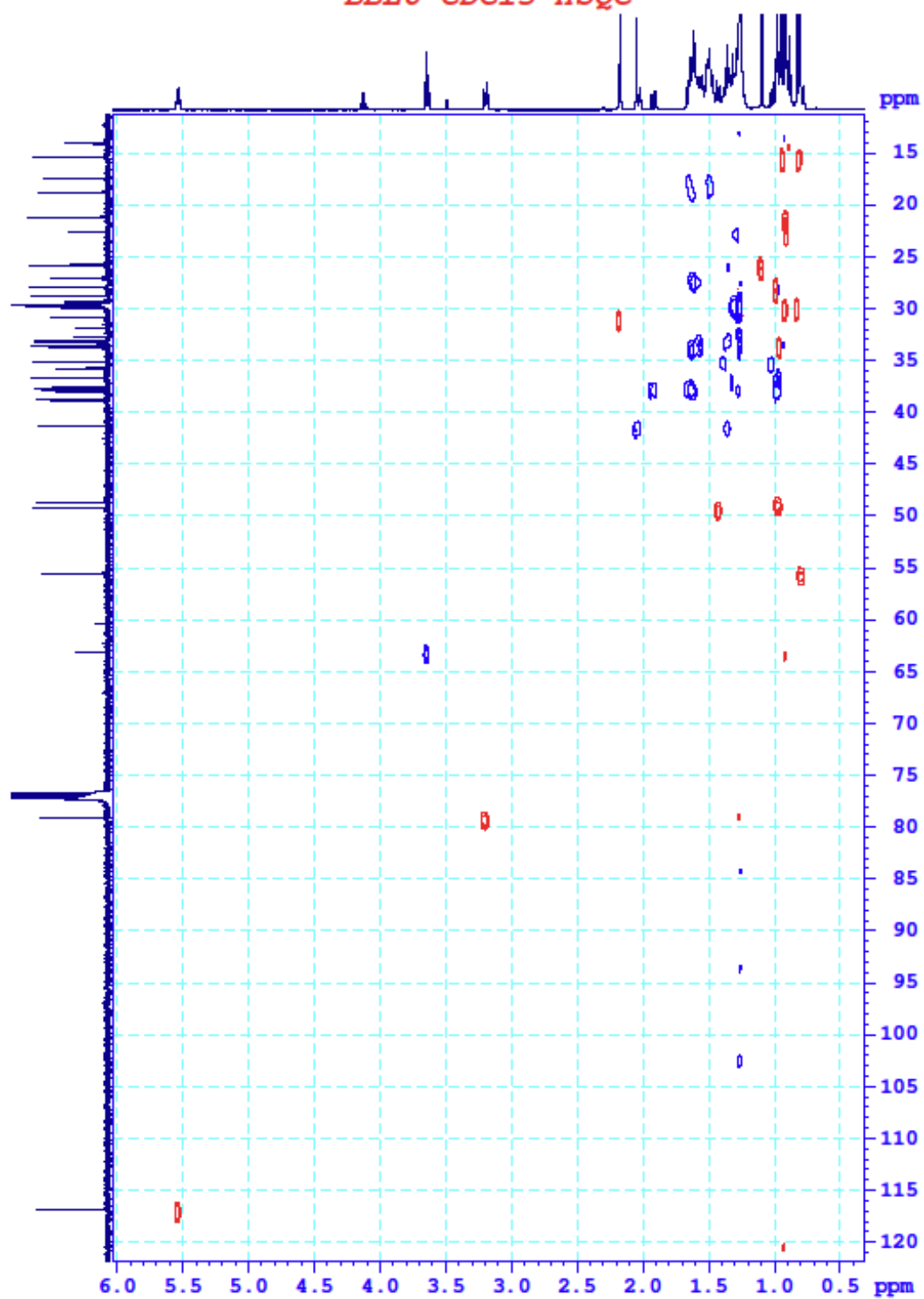




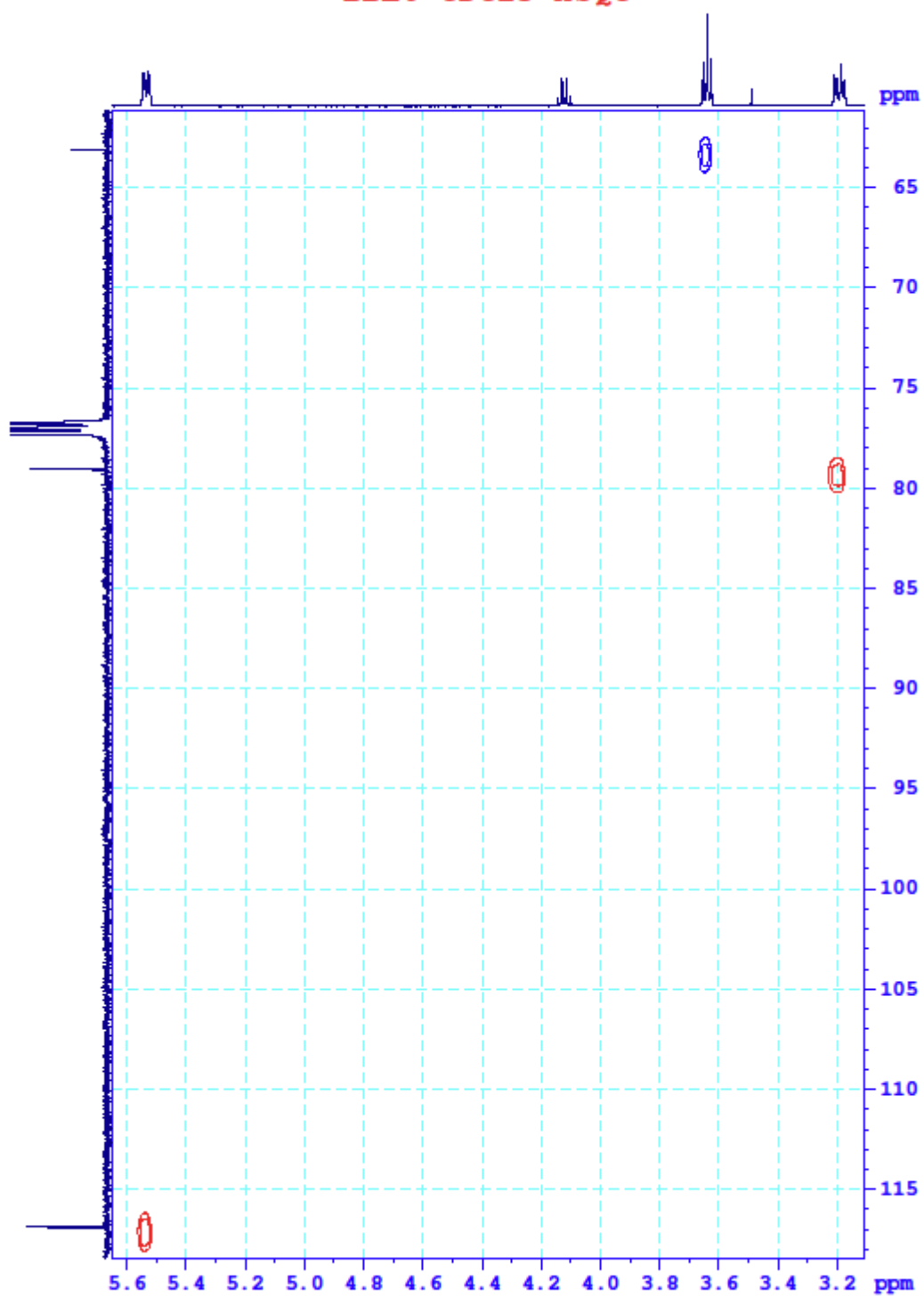
Phổ HSQC

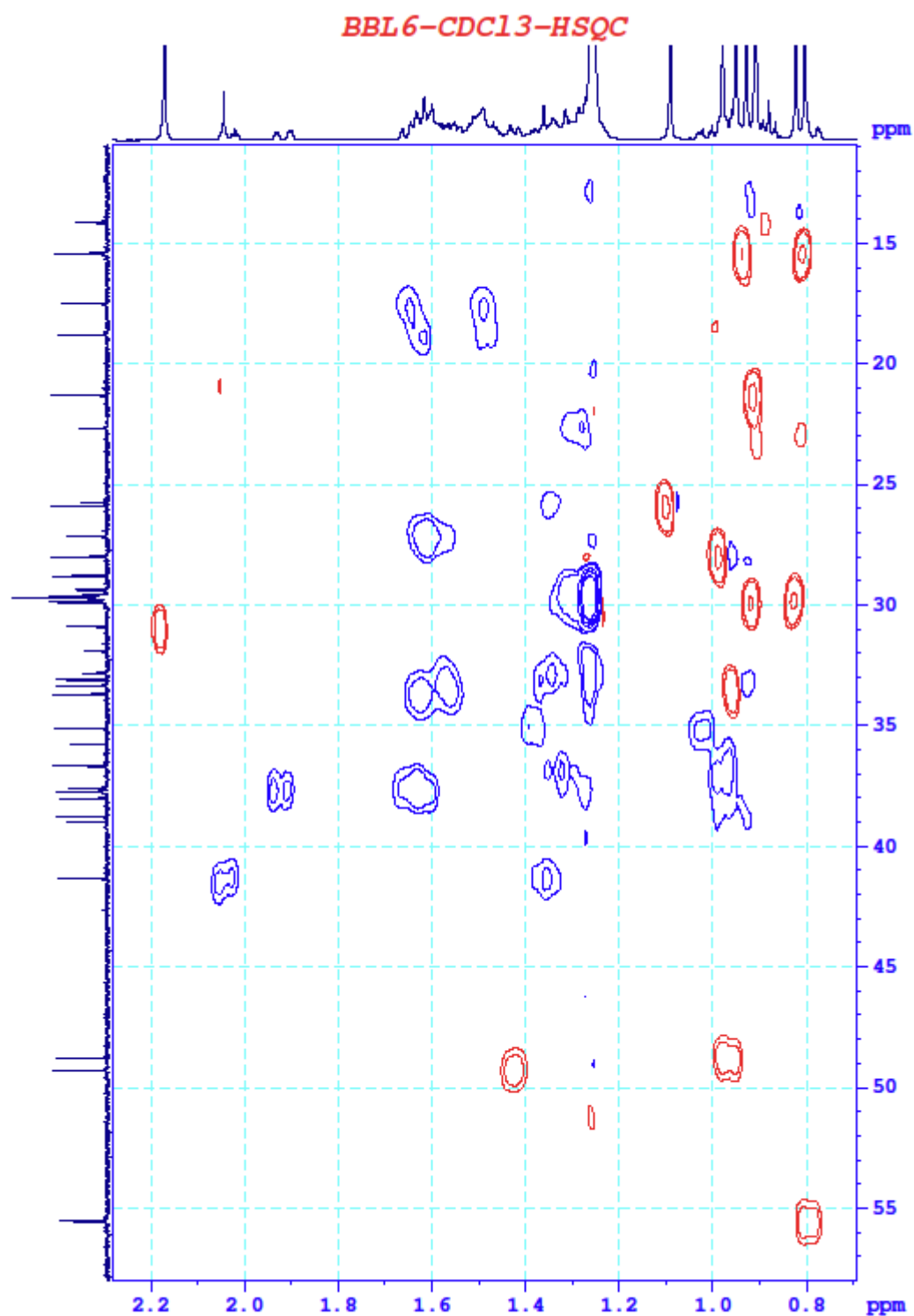


BBL6-CDC13-HSQC



BBL6-CDCl₃-HSQC

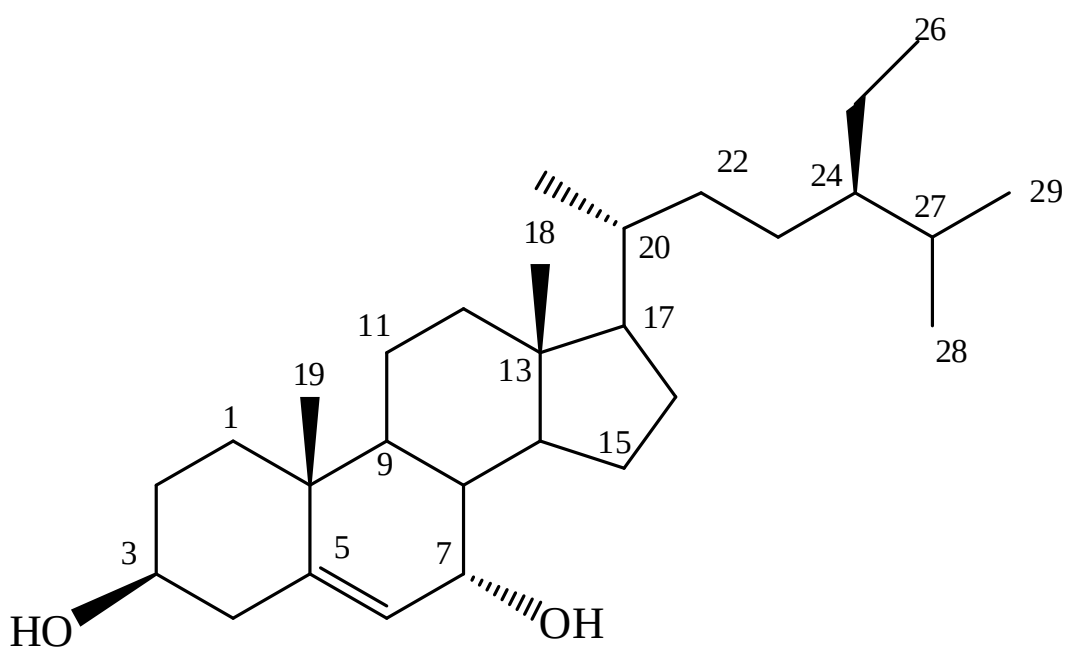




PHỤ LỤC 13

PHỤ LỤC 13: PHỔ CỦA CHẤT BBL7

- MS
- ^1H -NMR
- ^{13}C -NMR
- DEPT



Phổ ESI-MS

Display Report - Selected Window Selected Analysis

Analysis Name: 12040310.d

Method: DQ MS.m

Sample Name: BBL7

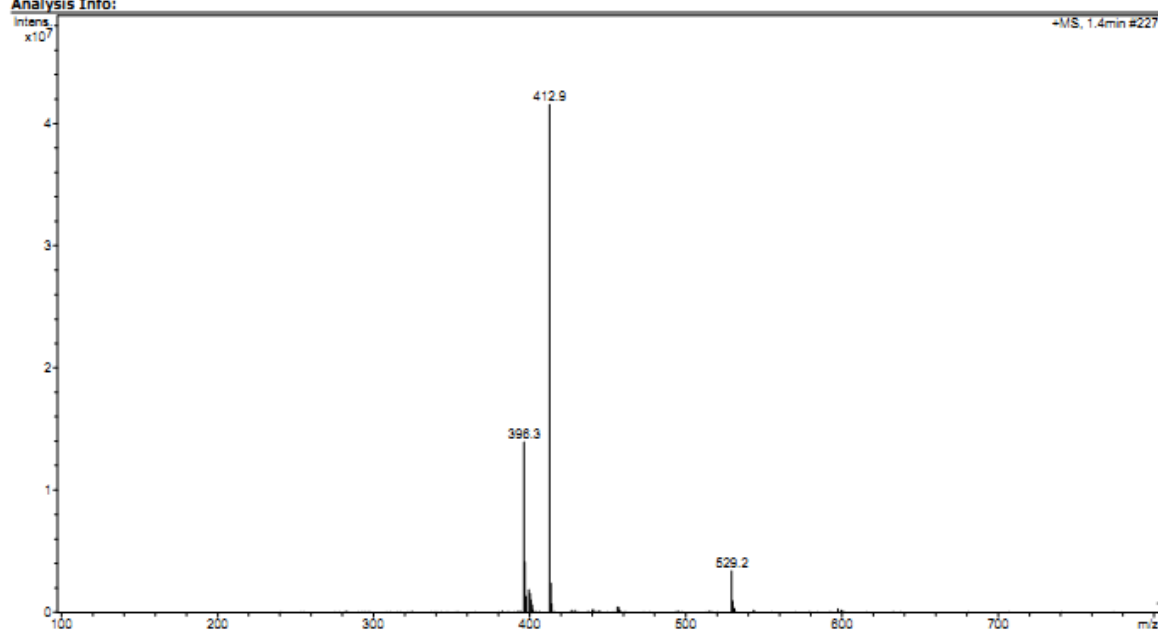
Analysis Info:

Instrument: Agilent 6310 Ion Trap

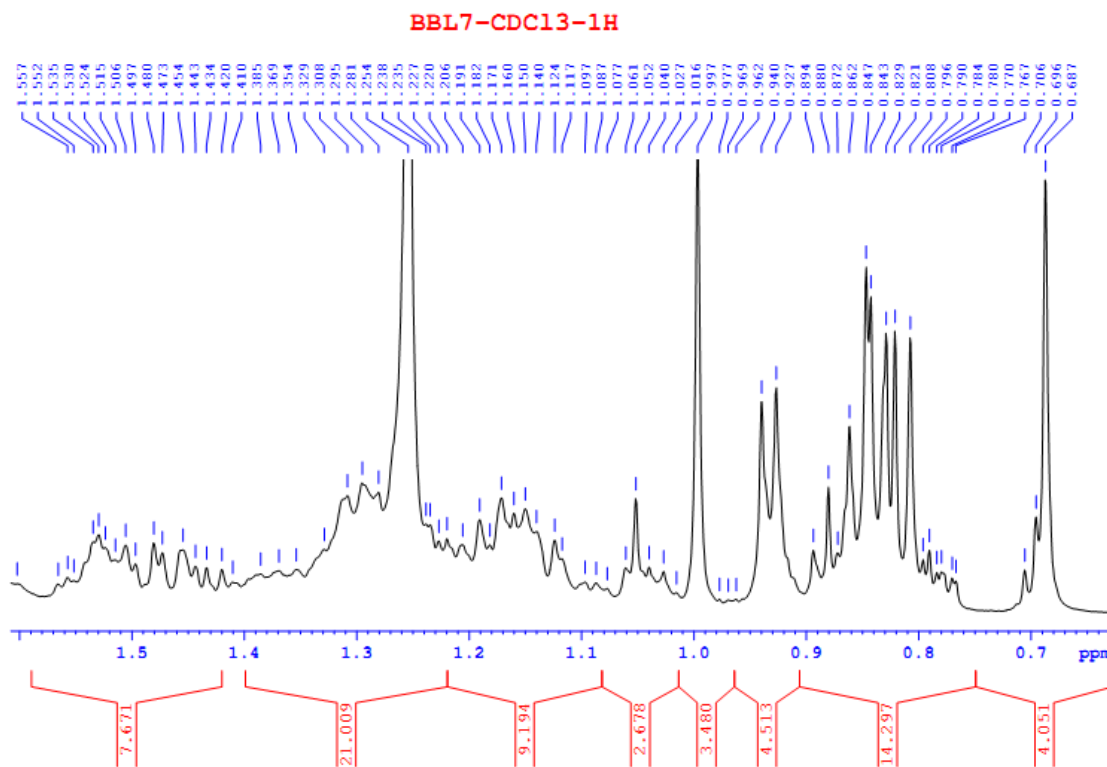
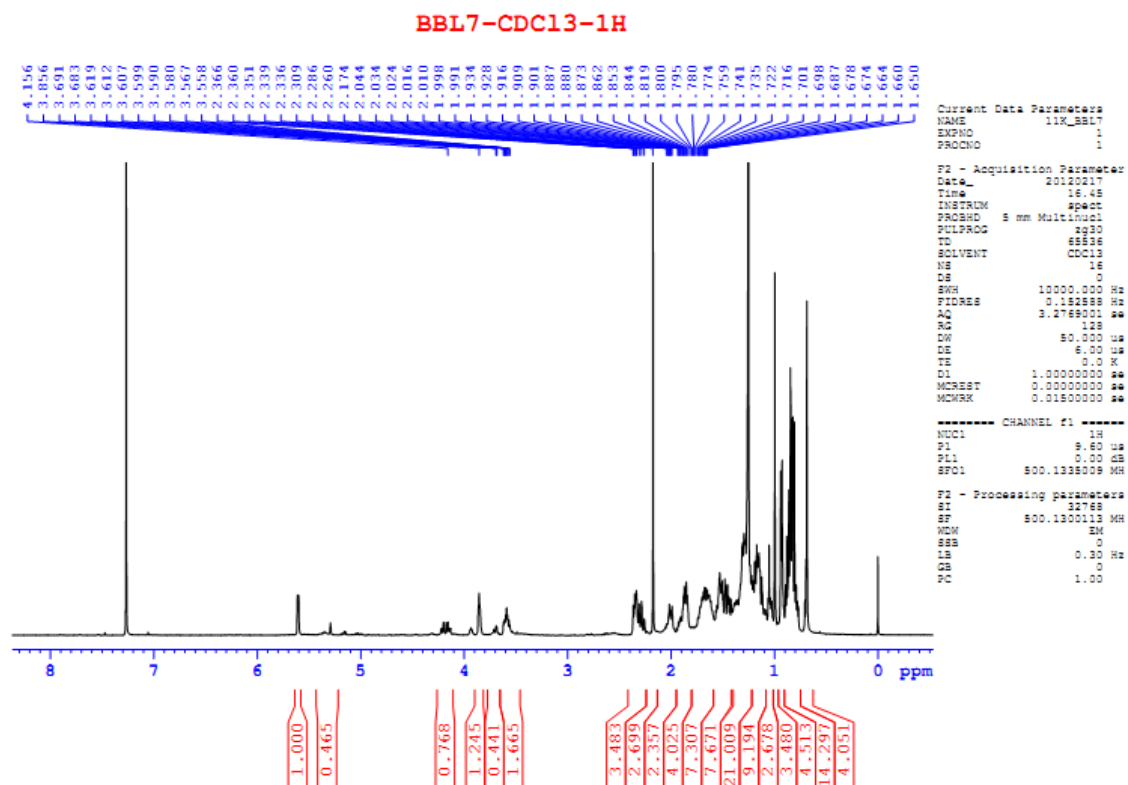
Operator: Phong PTHC, Vien Hoa HCTN

Print Date: 4/3/2012 4:44:08 PM

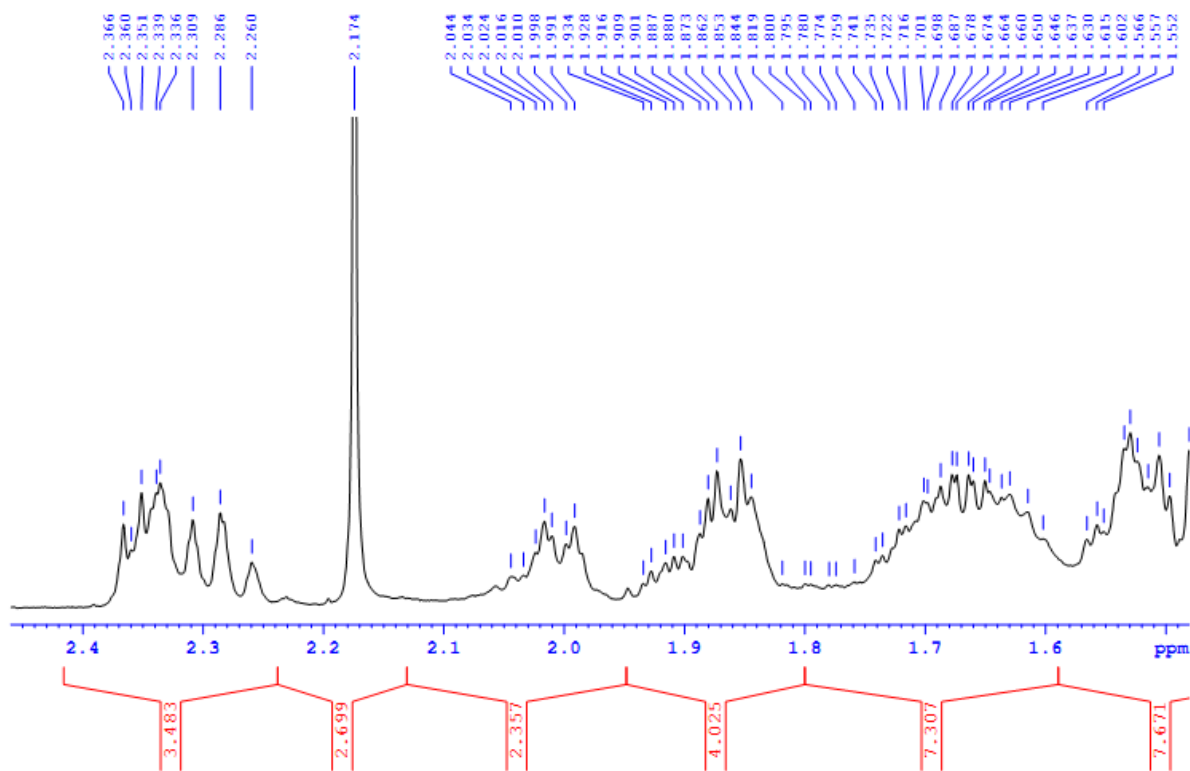
Acq. Date: 4/3/2012 4:40:11 PM



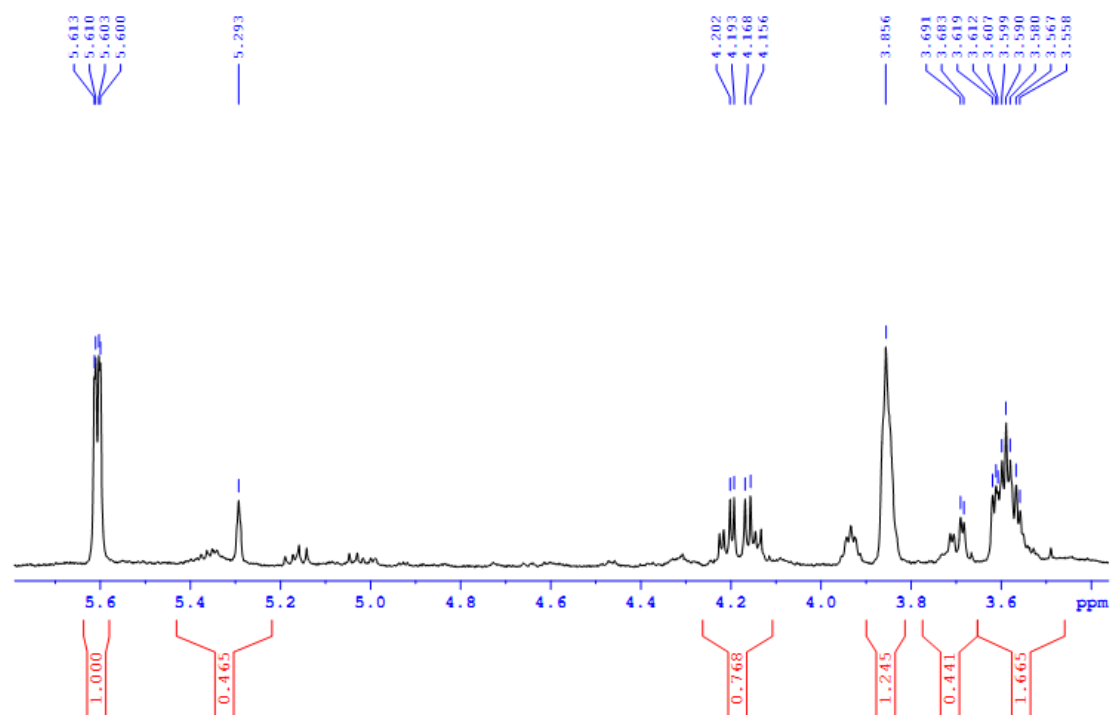
Phổ ^1H -NMR



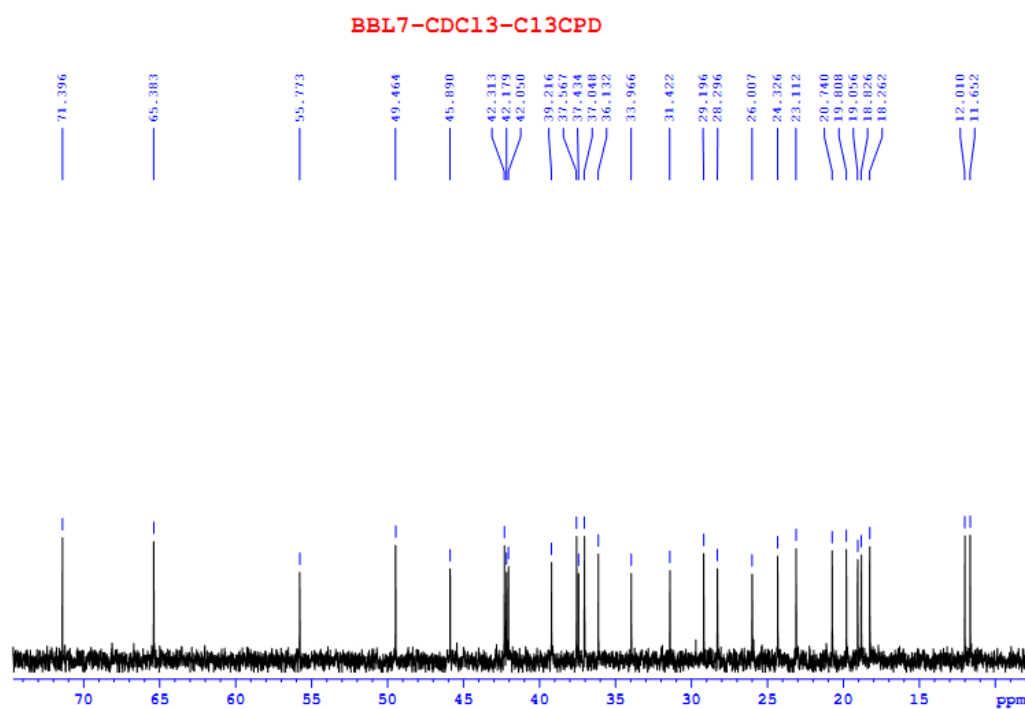
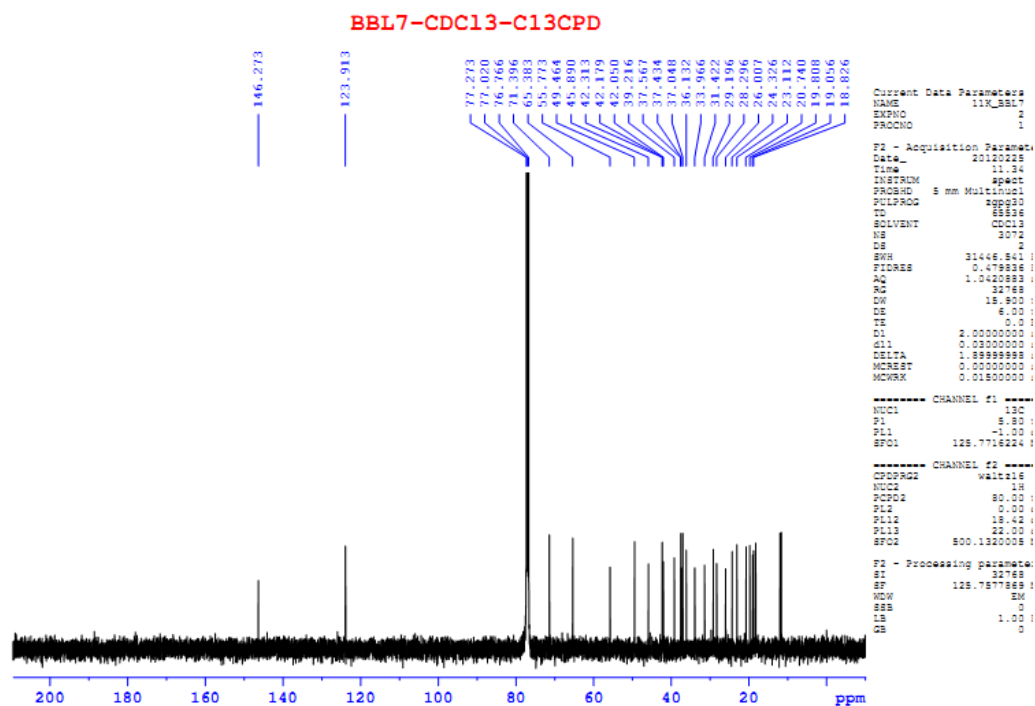
BBL7-CDCl3-1H



BBL7-CDCl3-1H



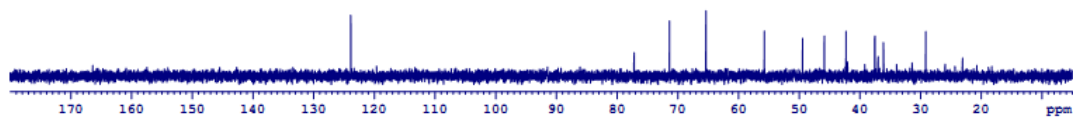
Pho ¹³C-NMR



Phổ DEPT

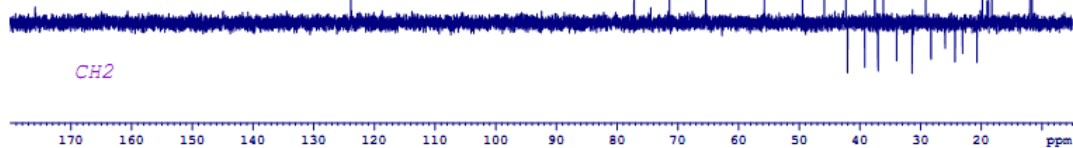
BBL7-CDC13-C13CPD&DEPT

DEPT90

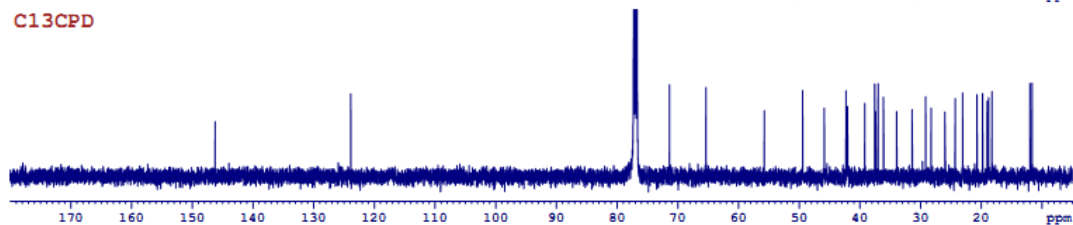


DEPT135

CH&CH3

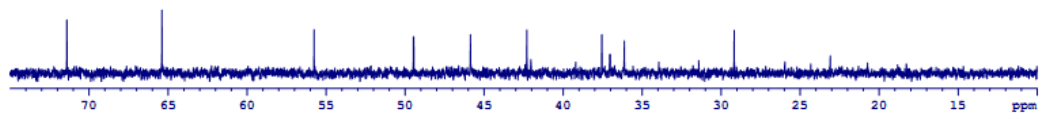


C13CPD



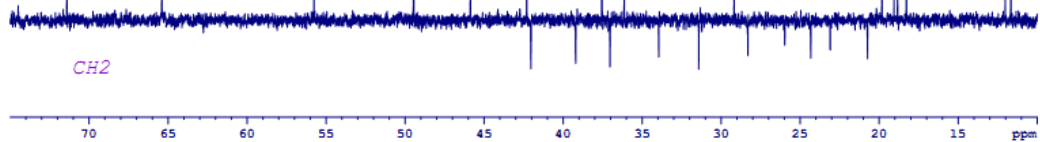
BBL7-CDC13-C13CPD&DEPT

DEPT90

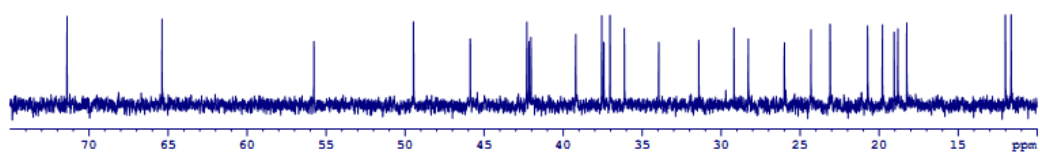


DEPT135

CH&CH3



C13CPD

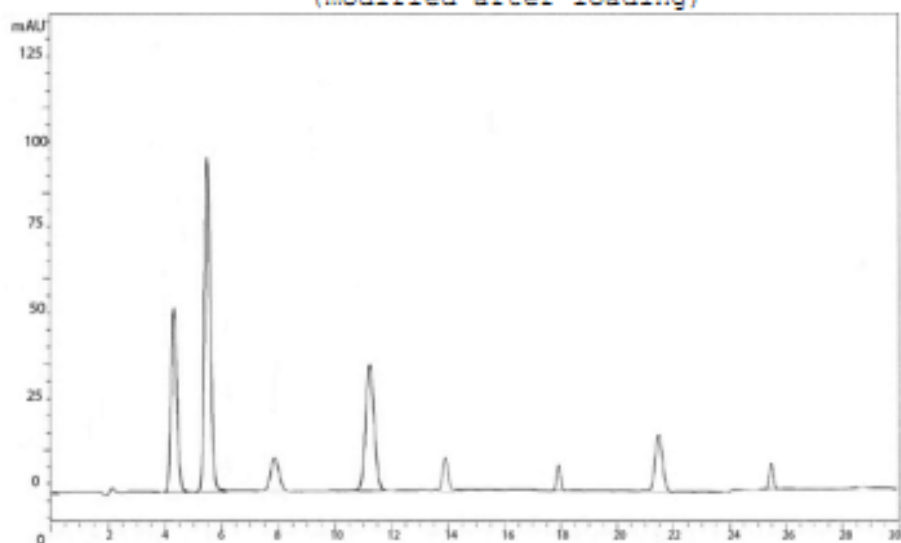


PHỤ LỤC 14

PHỤ LỤC 14

SẮC KÝ ĐỒ CỦA DỊCH CHIẾT TOÀN PHẦN VỎ THÂN CÂY GẠO

Acq. Operator : Minh Seq. Line : 1
 Acq. Instrument : Instrument 1 Location: Vial 1
 Injection Date : 10/18/2012 Inj : 1
 Inj Volume: 10.0 µl
 Acq. Method : C:\1\DATA\Minh\gao 2012-10-18 \gao.M
 Last changed : 10/18/2012 8:45:50 AM by Minh
 (modified after loading)
 Analysis Method : C:\1\METHODS\gao.M
 Last changed : 10/18/2012 2:51:21 PM by Minh
 (modified after loading)



Area Report

Sorted By : Signal
 Multiplier: : 1.0000
 Dilution: : 1.0000
 Use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs
 Signal 1: Sig=280,0 Ref=off

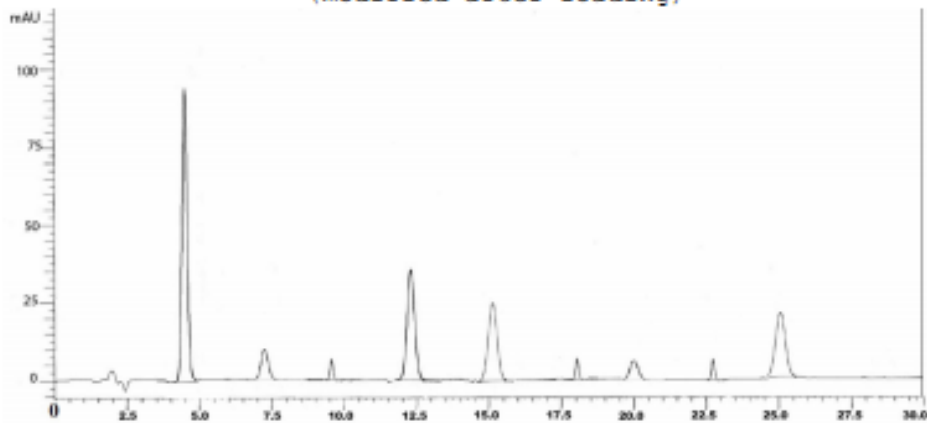
Peak #	RetTime [min]	Width [min]	Area [mAU*s]
1	4.371	0.1322	38872.3
2	5.405	0.1325	124346.4
3	7.894	0.2523	6783.3
4	11.385	0.2723	60351.1
5	13.903	0.1256	6570.3
6	17.917	0.3123	6012.1
7	21.358	0.3421	21500.3
8	25.473	0.2876	6134.1

PHỤ LỤC 15

PHỤ LỤC 15

SẮC KÝ ĐỒ CỦA DỊCH CHIẾT TOÀN PHẦN LÁ CÂY GẠO

```
Acq. Operator   : Minh                      Seq. Line : 1
Acq. Instrument : Instrument 1              Location: Vial 1
Injection Date  : 10/19/2012              Inj : 1
                                           Inj Volume: 10.0 µl
Acq. Method     : C:\1\DATA\Minh\gao 2012-10-19 \gao.M
Last changed    : 10/19/2012 7:25:50 AM by Minh
                  (modified after loading)
Analysis Method : C:\1\METHODS\gao.M
Last changed    : 10/19/2012 2:44:24 PM by Minh
                  (modified after loading)
```



Area Report

```
Sorted By : Signal
Multiplier: : 1.0000
Dilution: : 1.0000
Use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs
Signal 1: Sig=280,0 Ref=off
Peak RetTime Width Area
# [min] [min] [mAU*s]
-----|-----|-----|
1 4.420 0.1324 169479.3
2 7.126 0.1326 8302.2
3 9.501 0.1428 3567.4
4 12.114 0.1623 51023.5
5 15.193 0.1725 24570.1
6 18.005 0.2325 5369.4
7 19.984 0.1323 7320.5
8 22.680 0.1235 6589.6
9 25.007 0.2745 32054.2
```

*** End of Report ***

PHỤ LỤC 16

PHỤ LỤC 16
KẾT QUẢ KHẢO SÁT ĐỘ ĐÚNG CỦA CÁC HỢP CHẤT
CÓ TRONG VỎ THÂN CÂY GẠO

Kết quả khảo sát độ đúng với Epicatechin

TT	S mẫu (mAU.s)	S thêm (mAU.s)	C thêm (µg/mL)	C cũ (µg/mL)	C mới (µg/mL)	% tìm lại
1	38872	50345	7,34	24,25	31,40	97,44
2	38543	50245	7,34	24,04	31,34	99,39
3	38590	50346	7,34	24,07	31,40	99,84
4	38650	50355	7,34	24,11	31,41	99,41
5	38596	50346	7,34	24,07	31,40	99,79
6	38652	50345	7,34	24,11	31,40	99,31
Trung bình				24,11		99,20

Kết quả khảo sát độ đúng với Catechin

TT	S mẫu (mAU.s)	S thêm (mAU.s)	C thêm (µg/mL)	C cũ (µg/mL)	C mới (µg/mL)	% tìm lại
1	124346	136841	3,04	29,36	32,31	97,25
2	124367	137242	3,04	29,36	32,41	100,21
3	123454	136272	3,04	29,14	32,18	99,77
4	124356	136765	3,04	29,36	32,29	96,58
5	123243	136253	3,04	29,09	32,17	101,26
6	124562	137432	3,04	29,41	32,45	100,17
Trung bình				29,29		99,21

Kết quả khảo sát độ đúng với Daucosterol

TT	S mẫu (mAU.s)	S thêm (mAU.s)	C thêm (µg/mL)	C cũ (µg/mL)	C mới (µg/mL)	% tìm lại
1	6184	9030	1,36	3,06	4,42	99,97
2	6170	9034	1,36	3,06	4,43	100,58
3	6155	9052	1,36	3,05	4,43	101,75
4	6156	9065	1,36	3,05	4,44	102,16
5	6243	9153	1,36	3,09	4,48	102,19
6	6182	9082	1,36	3,06	4,45	101,85
Trung bình				3,06		101,42

Kết quả khảo sát độ đúng với Lupeol

TT	S mẫu (mAU.s)	S thêm (mAU.s)	C thêm (µg/mL)	C cũ (µg/mL)	C mới (µg/mL)	% tìm lại
1	60352	75841	7,17	28,36	35,65	101,60
2	60367	75842	7,17	28,37	35,65	101,51
3	60454	75672	7,17	28,41	35,57	99,82
4	60356	75665	7,17	28,37	35,56	100,42
5	60243	75753	7,17	28,31	35,61	101,74
6	60862	76132	7,17	28,60	35,78	100,16
Trung bình				28,40		100,88

Kết quả khảo sát độ đúng với Stigmasterol

TT	S mẫu (mAU.s)	S thêm (mAU.s)	C thêm (µg/mL)	C cũ (µg/mL)	C mới (µg/mL)	% tìm lại
1	6351	9130	1,92	4,36	6,27	99,41
2	6270	9134	1,92	4,31	6,27	102,43
3	6325	9172	1,92	4,35	6,30	101,83
4	6356	9165	1,92	4,37	6,30	100,46
5	6343	9153	1,92	4,36	6,29	100,48
6	6362	9132	1,92	4,37	6,27	99,07
Trung bình				4,35		100,61

Kết quả khảo sát độ đúng với Friedelin

TT	S mẫu (mAU.s)	S thêm (mAU.s)	C thêm (µg/mL)	C cũ (µg/mL)	C mới (µg/mL)	% tìm lại
1	21501	27500	4,27	15,93	20,31	102,68
2	21470	27242	4,27	15,90	20,12	98,79
3	21454	27372	4,27	15,89	20,22	101,29
4	21356	27165	4,27	15,82	20,07	99,42
5	21243	27153	4,27	15,74	20,06	101,14
6	21262	26832	4,27	15,75	19,82	95,33
Trung bình				15,84		99,77

PHỤ LỤC 17

PHỤ LỤC 17
KẾT QUẢ KHẢO SÁT ĐỘ ĐÚNG CỦA CÁC HỢP CHẤT
CÓ TRONG LÁ CÂY GẠO

Kết quả khảo sát độ đúng với mangiferin

TT	Smẫu (mAU.s)	S thêm (mAU.s)	C cũ (µg/ml)	C mới (µg/ml)	C tìm lại (µg/ml)	% tìm lại
1	169480	196595	40,00	46,39	6,39	99,48
2	168431	196245	39,75	46,31	6,56	<u>102,04</u>
3	169540	196346	40,01	46,34	6,33	<u>98,34</u>
4	168650	196355	39,80	46,34	6,54	101,64
5	168896	196546	39,86	46,38	6,52	101,44
6	168565	196145	39,78	46,29	6,51	101,18
	C thêm (µg/ml)	6,43			Trung bình	100,69

Kết quả khảo sát độ đúng với daucosterol

TT	Smẫu (mAU.s)	S thêm (mAU.s)	C cũ (µg/ml)	C mới (µg/ml)	C tìm lại (µg/ml)	% tìm lại
1	6194	9070	3,07	4,44	1,37	101,02
2	6170	9034	3,06	4,43	1,37	<u>100,58</u>
3	6125	9012	3,04	4,42	1,38	101,40
4	6156	9045	3,05	4,43	1,38	101,46
5	6243	9153	3,09	4,48	1,39	<u>102,19</u>
6	6162	9062	3,05	4,44	1,39	101,85
	C thêm (µg/ml)	1,36			Trung bình	101,42

Kết quả khảo sát độ đúng với 7α-hydroxysitosterol

TT	Smẫu (mAU.s)	S thêm (mAU.s)	C cũ (µg/ml)	C mới (µg/ml)	C tìm lại (µg/ml)	% tìm lại
1	3568	5871	4,29	7,04	2,76	100,17
2	3510	5850	4,22	7,02	2,80	<u>101,76</u>
3	3534	5872	4,25	7,04	2,80	101,68
4	3556	5865	4,27	7,04	2,76	100,41
5	3543	5853	4,26	7,02	2,76	100,44
6	3562	5862	4,28	7,03	2,75	<u>100,02</u>
	C thêm (µg/ml)	2,75			Trung bình	100,75

Kết quả khảo sát độ đúng với lupeol

TT	Smẫu (mAU.s)	S thêm (mAU.s)	C cũ (µg/ml)	C mới (µg/ml)	C tìm lại (µg/ml)	% tìm lại
1	50552	65841	23,76	30,95	7,19	100,29
2	50367	65542	23,67	30,80	7,14	<u>99,54</u>
3	50454	65672	23,71	30,87	7,16	99,82
4	50356	65665	23,66	30,86	7,20	100,42
5	50243	65453	23,61	30,76	7,15	99,77
6	50562	66032	23,76	31,04	7,27	<u>101,48</u>
	C thêm (µg/ml)	7,17			Trung bình	100,22

Kết quả khảo sát độ đúng với taraxeryl acetat

TT	Smẫu (mAU.s)	S thêm (mAU.s)	C cũ (µg/ml)	C mới (µg/ml)	C tìm lại (µg/ml)	% tìm lại
1	24501	31100	18,38	23,51	5,13	100,80
2	24470	30942	18,36	23,39	5,03	<u>98,85</u>
3	24454	31172	18,35	23,57	5,22	<u>102,61</u>
4	24356	30865	18,27	23,33	5,06	99,42
5	24243	30753	18,18	23,24	5,06	99,43
6	24562	31132	18,43	23,54	5,11	100,35
	C thêm (µg/ml)	5,09			Trung bình	100,25

Kết quả khảo sát độ đúng với stigmasterol

TT	Smẫu (mAU.s)	S thêm (mAU.s)	C cũ (µg/ml)	C mới (µg/ml)	C tìm lại (µg/ml)	% tìm lại
1	5370	8210	3,69	5,64	1,95	101,59
2	5340	8144	3,67	5,59	1,93	<u>100,28</u>
3	5325	8152	3,66	5,60	1,94	101,11
4	5456	8265	3,75	5,68	1,93	100,46
5	5343	8203	3,67	5,64	1,96	<u>102,27</u>
6	5362	8202	3,68	5,63	1,95	101,58
	C thêm (µg/ml)	1,92			Trung bình	101,22

Kết quả khảo sát độ đúng với taraxerol

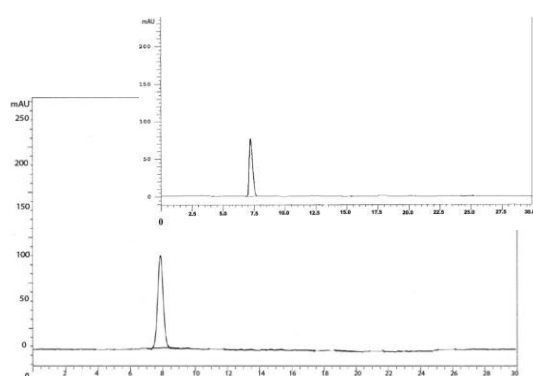
TT	Smẫu (mAU.s)	S thêm (mAU.s)	C cũ (µg/ml)	C mới (µg/ml)	C tìm lại (µg/ml)	% tìm lại
1	32055	39084	20,02	24,41	4,39	99,30
2	32367	39442	20,22	24,63	4,41	99,94
3	32345	39372	20,20	24,59	4,38	99,26
4	32356	39365	20,21	24,58	4,37	<u>99,00</u>
5	32243	39453	20,14	24,64	4,50	<u>101,84</u>
6	32562	39732	20,34	24,81	4,47	101,28
	C thêm (µg/ml)	4,42			Trung bình	100,10

PHỤ LỤC 18

PHỤ LỤC 18 **MỘT SỐ HÌNH ẢNH KIỂM TRA ĐỘ TINH KHIẾT** **CỦA CÁC CHẤT PHÂN LẬP BẰNG SKLM VÀ HPLC**

❖ **BBV6**

BBV6&TP



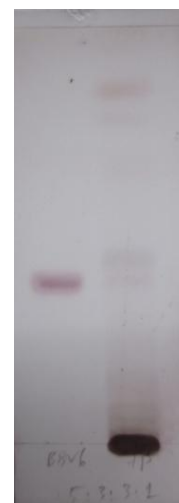
C:M:W
(4:1:0,1)



T:E:AC:AF
(5:3:3:1)



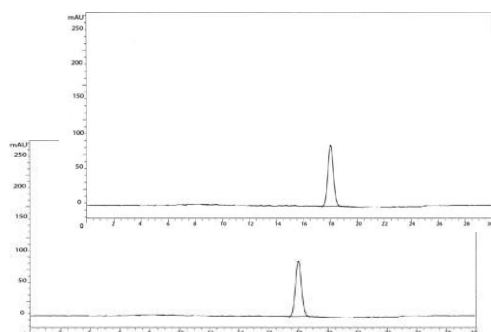
C: M
(8:3)



T:E:AC:AF
(5:3:3:1)

❖ **BBV7**

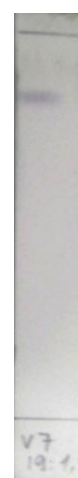
BBV7&TP



H:E
(9:1)



C:E:H
(19:1:1)



C:M
(19:1)

