

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)

CHUYÊN NGÀNH: Dược học cổ truyền

MÃ SỐ: 62.72.04.06

TÓM TẮT LUẬN ÁN TIẾN SĨ DƯỢC HỌC

HÀ NỘI - 2014

CÔNG TRÌNH ĐÃ HOÀN THÀNH TẠI:

Trường Đại học Dược Hà Nội

Trường Đại học Y Hà Nội

Viện Hàn Lâm Khoa học-Công nghệ Việt Nam

Trung tâm Kiểm Nghiệm Hà Nội

Người hướng dẫn khoa học:

PGS.TS. Nguyễn Thái An

PGS.TS. Thái Nguyễn Hùng Thu

Phản biện 1:

Phản biện 2:

Phản biện 3:

Luận án sẽ được bảo vệ trước hội đồng chấm luận án cấp Trường tổ chức tại trường Đại học Dược Hà Nội.

Vào hồi giờ, ngày tháng năm 2014

Có thể tìm đọc luận án tại:

- Thư viện Quốc gia Hà Nội
- Thư viện Trường Đại học Dược Hà Nội

A. GIỚI THIỆU LUẬN ÁN

1. Tính cấp thiết của luận án

Cây Gạo trong dân gian còn thường được gọi với các tên khác là Mộc miên, Cổ bời, 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. Trên thế giới, một số nước như Trung Quốc, Ấn Độ, Pakisxtan, Ai Cập, Australia, Thái Lan, Srilanka, Nepal đã dùng các bộ phận của cây như hoa, vỏ thân và rễ 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. 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. 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***” đã được thực hiện.

2. Mục tiêu của luận án

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 căn phân đoạn ethyl acetat chiết xuất từ vỏ thân.

3. Những đóng góp mới của luận án

3.1. Về thực vật

- Đã giám định tên khoa học của loài nghiên cứu thu hái tại Hương Sơn, Mỹ Đức, Hà Nội; mô

tả chi tiết đặc điểm thực vật; đặc điểm vi học của lá, vỏ thân, hoa.

3.2. Về thành phần hóa học

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

- Đã chiết xuất, phân lập và nhận dạng cấu trúc hóa học của 8 hợp chất từ vỏ thân và 7 hợp chất từ lá loài nghiên cứu. Trong đó có 2 hợp chất lần đầu tiên phân lập được từ họ Gạo (*Bombacaceae*) bao gồm: Momor cerebroside I, 7α -hydroxysitosterol và 3 hợp chất lần đầu tiên phân lập được từ chi *Bombax* L. gồm: Friedelin, Epicatechin, Catechin.

- Đã xây dựng được phương pháp cho phép định lượng đồng thời các hợp chất dạng tinh thể đã phân lập 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.

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

3.3. Về tác dụng sinh học

- Thử độc tính cấp của vỏ thân và lá cây Gạo ở mức liều 100 – 300 g dược liệu/kg chuột không thấy biểu hiện ngộ độc. Ở liều trên 220g/kg, bắt đầu xuất hiện chuột chết khi thử với cao nước hoa. Xác định được $LD_{50} = 500,71 \pm 28,28$ g/kg đối với hoa Gạo.

- Đã xác định được vỏ thân và cần phân đoạn ethyl acetat chiết xuất từ vỏ thân cây Gạo với các liều 6g và 12g dược liệu/kg có tác dụng làm giảm đau theo cơ chế ngoại vi và không có tác dụng giảm đau theo cơ chế trung ương trên chuột nhắt trắng. Với liều 8g dược liệu/kg cân nặng chuột cống trắng, cần phân đoạn ethyl acetat chiết xuất từ vỏ thân có tác dụng chống viêm cấp. Với liều 12g dược liệu/kg chuột nhắt trắng, cao nước vỏ thân và cần phân đoạn ethyl acetat chiết xuất từ vỏ thân 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 làm giảm thời gian chảy máu. Lá cây Gạo 6g và 12g dược liệu/kg chuột nhắt trắng có tác dụng bảo vệ gan trên mô hình gây tổn thương gan chuột nhắt trắng bằng paracetamol thông qua tác dụng hạn chế tăng hoạt độ ASAT, ALAT và hạn chế tổn thương cả cấu trúc đại thể và vi thể gan. Với liều 6g và 12g dược liệu/kg chuột nhắt trắng, cao nước lá cây Gạo 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.

4. Ý nghĩa của luận án

- Giám định tên khoa học mẫu dược liệu giúp cho kết quả nghiên cứu về hóa học và tác dụng sinh học được khẳng định rõ nguồn gốc.

- Xác định đặc điểm vi học góp phần tiêu chuẩn hóa dược liệu.

- Kết quả nghiên cứu về thành phần hóa học đã phát hiện những hợp chất lần đầu tiên được phân lập từ họ *Bombacaceae*, từ chi *Bombax* L. Là cơ sở khoa học tiếp tục cho các hướng nghiên cứu về tác dụng sinh học dựa trên thành phần hoạt chất có trong dược liệu.

- Xây dựng phương pháp xác định hàm lượng một số hoạt chất phân lập từ dược liệu góp phần định tính và tiêu chuẩn hóa dược liệu.

- Kết quả nghiên cứu về độc tính và thử tác dụng sinh học đã chứng minh dược liệu không gây độc ở mức liều nghiên cứu (phù hợp với mức liều thường dùng) và góp phần giải thích kinh nghiệm sử dụng trong dân gian. Là cơ sở khoa học để có thể ứng dụng rộng rãi việc sử dụng dược liệu này trong điều trị bệnh ở mức liều phù hợp, cho hiệu quả điều trị tốt nhất.

5. Bố cục của luận án

Luận án gồm 4 chương, 40 bảng, 54 hình, 228 tài liệu tham khảo, 18 phụ lục. Luận án có 148 trang gồm các phần chính: Đặt vấn đề (2 trang), tổng quan (37 trang), nguyên vật liệu và phương pháp nghiên cứu (13 trang), kết quả nghiên cứu (68 trang), bàn luận (25 trang), kết luận và kiến nghị (3 trang).

B. NỘI DUNG CỦA LUẬN ÁN

CHƯƠNG 1. TỔNG QUAN

Đã tập hợp và trình bày có hệ thống các kết quả nghiên cứu từ trước tới nay về thực vật học, thành phần hóa học và tác dụng sinh học của loài *Bombax malabaricum* DC. trên thế giới và ở Việt Nam.

CHƯƠNG 2. NGUYÊN VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Nguyên vật 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. Lá, hoa và vỏ thân rửa sạch, sấy khô ở 50°C làm mẫu nghiên cứu đặc điểm vi học và hóa học. Lá, vỏ thân chiết thành cao lỏng 4:1 để thử tác dụng sinh học

- Chuột nhắt trắng, chủng Swiss, cả hai giống, khỏe mạnh, khối lượng $20 \pm 2g$. Chuột cống trắng, cả hai giống, khỏe mạnh, khối lượng $120 \pm 20g$, do Viện Vệ sinh dịch tễ Trung ương cung cấp.

2.2. Phương pháp nghiên cứu

- 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 cùng với sự giúp đỡ của các chuyên gia thực vật học.

- 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.

- Định tính các nhóm chất hữu cơ chính trong dịch chiết toàn phần bằng các phản ứng đặc trưng. Định tính bằng sắc ký lớp mỏng với bản mỏng Silica gel GF254 (Merck).

- Chiết xuất bằng methanol và tách các thành phần bằng chiết lỏng lỏng với các dung môi có độ phân cực tăng dần.

- 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 μm , Fuji Silica Chemical Ltd.).

- Xác định độ tinh khiết của các hợp chất bằng SKLM, HPLC và hàm lượng được sơ bộ xác định bằng phương pháp HPLC.

- Nhận dạng các hợp chất phân lập được dựa vào các dữ liệu phổ MS, NMR, độ chảy, so sánh với dữ liệu phổ có trong thư viện phổ và tài liệu thu thập được.

- Đánh giá độc tính cấp theo hướng dẫn 371 do Bộ Y tế ban hành và xác định LD₅₀ (nếu có) theo phương pháp Litchfield – Wilcoxon.

- Đánh giá tác dụng giảm đau trên chuột nhắt trắng gây quận đau bằng acid acetic (phương pháp

Koster) và gây đau bằng mâm nóng.

- Đánh giá tác dụng chống viêm cấp bằng carragenin trên mô hình gây phù chân chuột và mô hình gây viêm màng bụng.
- Đánh giá tác dụng chống viêm mạn theo mô hình gây u hạt thực nghiệm trên chuột bằng amiant.
- Đánh giá tác dụng cầm máu thông qua đánh giá thời gian máu chảy, máu đông.
- Đánh giá tác dụng bảo vệ gan trên mô hình gây tổn thương gan thực nghiệm bằng paracetamol.
- Các số liệu thực nghiệm được xử lý theo phương pháp thống kê sinh học, sử dụng công cụ phân tích số liệu (Data analysis) của Microsoft Excel.

CHƯƠNG 3. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU

3.1. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU VỀ MẶT THỰC VẬT

3.1.1. Đặc điểm thực vật và giám định tên khoa học

Mô tả chi tiết và đầy đủ các bộ phận của cơ quan dinh dưỡng (thân, lá), cơ quan sinh sản (hoa, đài, cánh hoa, bộ nhị, nhụy) của loài nghiên cứu, so sánh với tiêu bản lưu trữ tại phòng Tiêu bản Quốc gia Việt Nam, viện Sinh thái và Tài nguyên Sinh vật, đối chiếu với các khóa phân loại và tham khảo các tài liệu, đã giám định tên khoa học loài nghiên cứu thu hái tại Hương Sơn, Mỹ Đức, Hà Nội là *Bombax malabaricum* DC., họ Gạo (Bombacaceae). Tên đồng nghĩa: *Bombax ceiba*. Tên Việt Nam: Mộc miên, Cổ bối, Ban chi hoa, Anh hùng thụ.

3.1.2. Đặc điểm vi học

3.1.2.1. Đặc điểm vi phẫu

*** Cấu tạo giải phẫu lá:**

- *Phần gân lá*: hình dạng mặt trên và dưới đều lồi, mặt dưới lồi nhiều hơn. Biểu bì trên: một lớp tế bào hình tròn nhỏ, xếp sát nhau, phủ bên ngoài một lớp cu tin bất màu xanh. Mô dày trên 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 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 bao quanh cung gỗ bất màu xanh ở giữa. Mô dày dưới gồm 4-5 hàng tế bào mô dày tròn. Biểu bì dưới là lớp tế bào hình tròn. Giữa gân lá, trong mô khuyết, mô dày có các tinh thể calci oxalat hình cầu gai. *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.

*** Cấu tạo giải phẫu cành**

- Lát cắt hình tròn, ngoài cùng là lớp biểu bì. Mô dày tròn gồm 4-5 lớp tế bào, liên tục quanh thân. Mô mềm vỏ gồm các tế bào hình bầu dục nằm ngang xếp lộn xộn, các mạch dẫn hình tròn hay bầu dục có kích thước lớn nằm rải rác. Mô cứng bất màu xanh đậm. Có các bó sợi libe 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. Tinh thể calci oxalat hình cầu gai nằm trong mô mềm vỏ, mô mềm ruột. Mô mềm ruột cấu tạo bởi các tế bào hình trứng hoặc đa giác, có màng mỏng. Lõi gỗ bất màu xanh.

3.1.2.2. Đặc điểm bột dược liệu

* **Bột hoa**: Bột màu đỏ nâu, vị nhạt, không mùi. Soi dưới kính hiển vi có các đặc điểm sau: Hạt phấn, lông che chở, tinh thể calci oxalat hình cầu gai, mảnh cánh hoa, bó sợi mang mảnh mạch xoắn, mảnh cánh hoa mang mạch xoắn.

* **Bột lá:** Bột màu xanh sáng, vị nhạt, không mùi. Soi dưới kính hiển vi có các đặc điểm sau: Lỗ khí và mảnh biểu bì mang lỗ khí, lông tiết, tinh thể calci oxalat hình cầu gai, mảnh mô giậu, túi tiết, bó sợi mang mạch xoắn mảnh mạch xoắn, mảnh phiến lá.

* **Bột vỏ thân:** Bột màu vàng nâu, nhiều xơ. Soi dưới kính hiển vi có các đặc điểm sau: Mảnh bần, tinh thể calci oxalat hình cầu gai, tế bào cứng, mảnh mô cứng, mảnh mô mềm, mảnh mang màu, mảnh mạch vạch.

3.2. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU VỀ THÀNH PHẦN HÓA HỌC

3.2.1. Định tính các nhóm chất hữu cơ

- Trong vỏ thân cây Gạo có 9 nhóm chất: glycosid tim, alcaloid, saponin, flavonoid, coumarin, tanin, acid hữu cơ, đường khử, sterol.

- Trong lá và hoa cây gạo có chứa 11 nhóm chất: glycosid tim, alcaloid, saponin, flavonoid, coumarin, tanin, acid hữu cơ, đường khử, sterol, acid amin và caroten.

3.2.2. Phân lập và nhận dạng các hợp chất phân lập từ vỏ thân và lá

3.2.2.1. 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, nhiệt độ nóng chảy: 188-189°C. Tan trong ether, ethanol, methanol; không tan trong nước. Phổ khối lượng ESI-MS xuất hiện pic ion phân tử tại m/z 427 $[M+H]^+$ kết hợp với phổ 1H -NMR và ^{13}C -NMR có thể dự đoán 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). 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 (CH_3), 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 150,96 (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) nhận được sự phù hợp hoàn toàn ở tất cả các vị trí tương ứng. 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.

❖ **BBV2**

Tính chất: Hợp chất **BBV2** thu được dưới dạng chất kết tinh màu trắng, tinh thể hình lăng trụ. Tan trong chloroform, ethanol, methanol. Nhiệt độ nóng chảy: 263-263,5°C. Phổ khối lượng ESI-MS xuất hiện pic ion phân tử tại m/z 427 $[M+H]^+$ kết hợp với phổ 1H -NMR và ^{13}C -NMR có thể dự đoán công thức phân tử là $C_{30}H_{50}O$ ($M=426$).

Phổ $^1\text{H-NMR}$ 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 $^1\text{H-NMR}$ có dạng phổ của một hợp chất triterpen. Phổ $^{13}\text{C-NMR}$ 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 $\delta_{\text{C}} 6,57/\delta_{\text{H}} 0,88$ (dd, $J=7,0$ Hz) đặc trưng cho nhóm methyl liên kết với carbon C-4 của khung friedelan.

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 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 $\text{C}_{30}\text{H}_{50}\text{O}$ ($M=426$).

❖ **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. Phổ khối lượng ESI-MS xuất hiện pic ion phân tử tại m/z 291 $[\text{M}+\text{H}]^+$ kết hợp với phổ $^1\text{H-NMR}$ và $^{13}\text{C-NMR}$ có thể dự đoán công thức phân tử là $\text{C}_{15}\text{H}_{14}\text{O}_6$ ($M=290$).

$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, CD_3OD) δ_{ppm} : 4,83 (1H, d, $J=2,5$ Hz, H-2); 4,19 (1H, m, H-3); 2,74 (1H, dd, $J=16,0$; 2,0 Hz, H_a -4); 2,88 (1H, dd, $J=16,0$; 4,5 Hz, H_b -4); 5,96 (1H, d, $J=1,5$ Hz, H-6); 5,96 (1H, d, $J=1,5$ Hz, H-8); 6,99 (1H, d, $J=1,5$ Hz, H-2'); 6,78 (d, $J=8,5$ Hz, H-5'); 6,82 (1H, dd, $J=8,5$; 1,5 Hz, H-6');

$^{13}\text{C-NMR}$ (125 MHz, CD_3OD) δ_{ppm} : 79,85 (C-2); 67,46 (C-3); 29,22 (C-4); 157,93 (C-5); 95,90 (C-6); 157,30 (C-7); 96,41 (C-8); 157,57 (C-9); 100,09 (C-10); 132,26 (C-1'); 115,32 (C-2'); 145,74 (C-3'); 145,90 (C-4'); 115,91 (C-5'); 119,41 (C-6').

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 cho thấy hợp chất **BBV3** là 3,3',4',5,7-pentahydroxyflavan (epicatechin) với công thức phân tử là $\text{C}_{15}\text{H}_{14}\text{O}_6$. Kết quả so sánh các dữ kiện phổ $^{13}\text{C-NMR}$ của **BBV3** với epicatechin 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. Đây là lần đầu tiên epicatechin được phân lập từ vỏ thân cây Gạo.

❖ **BBV4**

Tính chất: Hợp chất **BBV4** thu được dưới dạng tinh thể hình kim, chất kết tinh màu vàng nhạt, tan trong methanol, ethanol. Nhiệt độ nóng chảy: 175 – 177°C. Phổ khối lượng ESI-MS xuất hiện pic ion phân tử tại m/z 289 $[\text{M}-\text{H}]^-$ kết hợp với phổ $^1\text{H-NMR}$ và $^{13}\text{C-NMR}$ có thể dự đoán công thức phân tử là $\text{C}_{15}\text{H}_{14}\text{O}_6$ ($M=290$).

Phổ $^1\text{H-NMR}$ 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 $^1\text{H-NMR}$ 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 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 $^{13}\text{C-NMR}$ 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 thấy có sự phù hợp hoàn toàn. Như vậy **BBV4** là (+)-catechin ($\text{C}_{15}\text{H}_{14}\text{O}_6$).

❖ **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 ESI-MS xuất hiện pic ion tại m/z 845,3 $[\text{M}+\text{H}]^+$ kết hợp với phổ $^1\text{H-NMR}$ và $^{13}\text{C-NMR}$ có thể dự đoán công thức phân tử là $\text{C}_{48}\text{H}_{93}\text{NO}_{10}$ ($M=844$).

Trên phổ $^1\text{H-NMR}$ và $^{13}\text{C-NMR}$ 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 ($-\text{NH}-\text{C}=\text{O}$); 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 CH_2 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 nối 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. Tất cả các vị trí của **BBV5** được gán theo các dữ liệu phổ NMR hai chiều là HSQC và HMBC, cùng với số liệu phổ khối lượng ESI-MS cho phép khẳng định hợp chất **BBV5** là một cerebroside có công thức phân tử $\text{C}_{48}\text{H}_{93}\text{NO}_{10}$ có tên gọi là momor-cerebroside I.

❖ **BBV6**

Tính chất: Hợp chất **BBV6** dưới dạng bột màu trắng. Soi dưới KHV, vật kính 40 có hình lăng trụ dài. Nhiệt độ nóng chảy: 283-284°C. Tan trong cloroform, ít tan trong methanol. Phổ khối lượng ESI-MS cho pic ion mảnh tại m/z 397,3 $[\text{M}+\text{H}-\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6]^+$ và pic ion phân tử là 575,3 $[\text{M}-\text{H}]$ tương ứng với công thức phân tử $\text{C}_{35}\text{H}_{60}\text{O}_6$.

$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, DMSO) δ_{ppm} : 3,43 (1H, m, H-3); 5,32 (1H, br s, H-6); 0,68 (3H, s, H-18); 0,96 (3H, s, H-19); 0,91 (3H, d, $J=6,5$ Hz, H-21); 0,84 (3H, t, $J = 7,6$ Hz, H-26); 0,81 (3H, d, $J=6,8$ Hz, H-27); 0,83 (3H, d, $J=7,3$ Hz, H-29); 4,22 (1H, d, $J=8,0$ Hz, H-1'); 2,90 (m, H-2'); 3,12 (m, H-3'); 3,02 (m, H-4'); 3,07 (m, H-5'); 3,40 (m, H-6'a); 3,64 (dd, $J = 6,0; 10,0$ Hz, H6'b).

$^{13}\text{C-NMR}$ (125 MHz, DMSO) δ_{ppm} : 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); 100,79 (C-1'); 73,42 (C-2'); 76,67 (C-3'); 70,08 (C-4'); 76,67 (C-5'); 61,07 (C-6').

Từ những dữ kiện phổ trên kết hợp với so sánh số liệu phổ $^{13}\text{C-NMR}$ của hợp chất daucosterol nêu trong tài liệu 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.

❖ **BBV7**

Hợp chất **BBV7** thu được dưới dạng tinh thể hình kim, có điểm nóng chảy 170-172°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 $\text{C}_{29}\text{H}_{48}\text{O}$ ($M=412$).

¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃) δ_{ppm} : 3,53 (m, H-3); 5,35 (br d, $J=3,5$ Hz, H-6); 0,84 (3H, s, H-18); 1,03 (3H, s, H-19); 0,91 (3H, d, $J=6,5$ Hz, H-21); 5,15 (1H, dd, $J=8,5$; 15,0 Hz, H-22); 5,02 (1H, dd, $J=8,5$; 15,0 Hz, H-23); 0,84 (3H, t, $J=8,5$ Hz, H-26); 0,81 (3H, d, $J=6,8$ Hz, H-28); 0,68 (3H, d, $J=9,5$ Hz, H-29).

¹³C-NMR (125 MHz, CDCl₃) δ_{ppm} : 37,26 (C-1); 31,66 (C-2); 71,82 (C-3); 42,30 (C-4); 140,76 (C-5); 121,73 (C-6); 31,90 (C-7); 31,90 (C-8); 50,16 (C-9); 36,52 (C-10); 21,09 (C-11); 39,78 (C-12); 42,30 (C-13); 56,87 (C-14); 24,37 (C-15); 28,93 (C-16); 56,05 (C-17); 11,99 (C-18); 19,41 (C-19); 40,51 (C-20); 21,22 (C-21); 138,33 (C-22); 129,27 (C-23); 51,24 (C-24); 31,90 (C-25); 21,22 (C-26); 25,42 (C-27); 19,04 (C-28); 12,26 (C-29).

Dựa vào các số liệu phổ NMR và ESI-MS, **BBV7** được xác định là stigmasterol. Kết hợp so sánh phổ ¹³C-NMR giữa **BBV7** và stigmasterol thấy hoàn toàn phù hợp tại các vị trí tương ứng. Như vậy, **BBV7** được xác định là 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 [M+H]⁺ tương ứng với công thức phân tử là C₂₂H₄₂O₄ (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 CH₂ có độ dịch chuyển hóa học trong khoảng từ δ 1,31 đến 1,67.

Phổ ¹³C-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 CH₂ 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.

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.

3.2.2.2. 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 lupeol, daucosterol và stigmasterol đã phân lập được và nhận dạng ở vỏ thân. Sau đây là các chất còn lại (**BBL3**, **BBL5**, **BBL6** và **BBL7**):

❖ **BBL3**

Hợp chất **BBL3** phân lập được dưới dạng tinh thể màu vàng. Tan trong methanol, ethanol nóng; không tan trong n-hexan. Phổ khối lượng ESI-MS xuất hiện pic ion phân tử tại m/z 423 [M+H]⁺ tương ứng với công thức phân tử C₁₉H₁₈O₁₁ (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 ¹³C-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 (CH₂) 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 một trong những thành phần chính của cây Gạo.

❖ **BBL5**

Tính chất: Tinh thể hình lăng trụ. Nhiệt độ nóng chảy: 290 – 292°C. Phổ khối lượng ESI-MS xuất hiện pic ion phân tử tại $m/z = 469 [M+H]^+$ tương ứng với công thức phân tử $C_{32}H_{52}O_2$ ($M = 468$).

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.

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.

❖ **BBL6**

Tính chất: là tinh thể hình kim, không màu, tan trong methanol, ethanol, cloroform, ethyl acetat. Nhiệt độ nóng chảy: 281 - 282°C. Phổ khối lượng ESI-MS xuất hiện pic ion phân tử tại 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, 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.

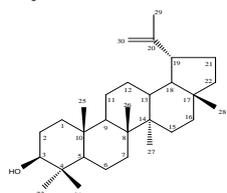
❖ **BBL7**

Tính chất: Tinh thể hình kim, không màu, tan trong methanol, ethanol. Nhiệt độ nóng chảy 138-140°C. Phổ khối lượng ESI-MS xuất hiện pic ion phân tử tại m/z 412,9 $[M-H_2O+H]^+$ tương ứng với công thức phân tử của **BBL7** là $C_{29}H_{50}O_2$ ($M = 430$).

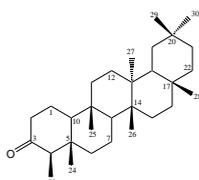
Phổ 1H -NMR cho thấy sự có mặt của 2 nhóm thế methyl bậc ba δ 0,69 (s, H-18), δ 1,00 (s, H-19), 3 nhóm thế methyl bậc hai δ 0,93 (d, 6,6; H-21), δ 0,83 (d, 7,3; H-26), δ 0,84 (t, 7,5; H-29) và 1 nhóm thế methin bậc một δ 0,81 (d, 6,8; H-27). Trên phổ NMR cũng xác nhận sự có mặt của

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).

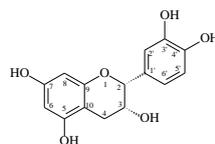
Phổ $^{13}\text{C-NMR}$ của **BBL7** xuất hiện tín hiệu của 29 carbon đặc trưng cho các hợp chất thuộc vào một khung sterol. Các tín hiệu trên phổ DEPT cho thấy hợp chất này có 6 nhóm methyl tại δ 11,65 (C-18); 18,26 (C-19); 18,83 (C-21); 19,81 (C-26); 23,11 (C-28); 12,01 (C-29); có 10 nhóm methylen 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 $^{13}\text{C-NMR}$ của hợp chất 7α -hydroxy sitosterol xác định được **BBL7** là 7α -hydroxy sitosterol.



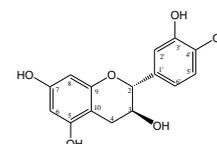
BBV1 & BBL4 (Lupeol)



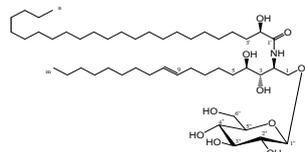
BBV2 (Friedelin)



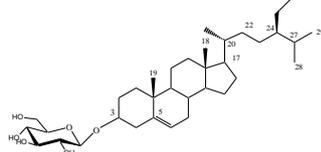
BBV3 (Epicatechin)



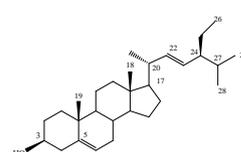
BBV4 (Catechin)



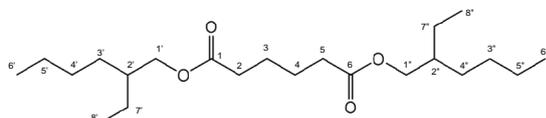
BBV5 (Momor-cerebroside I)



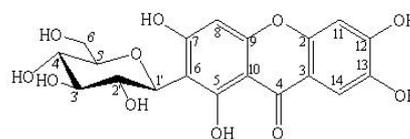
BBV6 & BBL1 (Daucosterol)



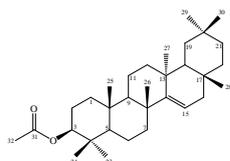
BBV7 & BBL2 (Stigmasterol)



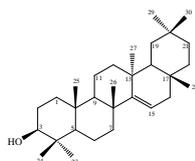
BBV8 (Bis (2-ethyl hexyl) adipat)



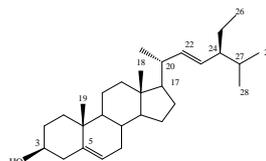
BBL3 (Mangiferin)



BBL5 (Taraxeryl acetat)



BBL6 (Taraxerol)



BBL7 (7α -hydroxysitosterol)

3.2.3. 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.

3.2.3.1. 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 được tiêm vào hệ thống sắc ký. Xử lý tương tự với các căn 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, chúng tôi 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.

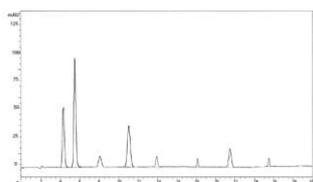
❖ *Với dịch chiết vỏ thân cây Gạo:*

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 10 μ l. 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.

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, stigmaterol 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. Sắc ký đồ dịch chiết vỏ thân thu được như hình 3.37.



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

❖ *Với dịch chiết lá cây Gạo:*

Sử dụng chế độ gradient dung môi với kênh A và B tương tự như trên nhưng với tỷ lệ và thời gian thay đổi khác. 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 này được gọi là CTSK2. Với CTSK2, 7 hợp chất mangiferin, daucosterol, 7 α -hydroxysitosterol, lupeol, taraxeryl acetat, stigmaterol 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.

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

Tiến hành sắc ký từng hợp chất phân lập được từ vỏ thân hay lá cây Gạo thu được các sắc ký đồ chỉ có duy nhất 1 pic trong thời gian 30 phút. Điều đó một lần nữa khẳng định các 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, chúng tôi tạm dùng chúng như chất đối chiếu để khảo sát phương pháp định lượng chúng trong vỏ thân và lá cây Gạo.

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

Định tính bằng phương pháp so sánh phổ khối lượng của các pic có cùng thời gian lưu của mẫu thử và hỗn hợp chất đối chiếu. 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.

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 $^{\circ}$ C, nhiệt độ của heat block là 400 $^{\circ}$ C, vùng quét m/z là 100-1000. Thế phá mảnh +4,5kV.

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 hợp chất phân lập được. Ngoài các pic của các hợp chất nghiên cứu, trên sắc ký đồ của mẫu thử chuẩn bị từ vỏ thân hay lá cây Gạo còn xuất hiện thêm các pic khác và cũng được tách hoàn toàn khỏi các chất phân tích.

3.2.3.4. 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, tính đặc hiệu, khoảng nồng độ tuyến tính. Độ đúng được kiểm tra bằng phương pháp thêm. 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 khoảng 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 hợp chất thu được có trong 100g vỏ thân cây Gạo: epicatechin (12,3mg); catechin (6,7mg); daucosterol (1,8mg); lupeol (9,5mg); stigmasterol (1,9mg) và friedelin (7,6mg).

❖ Xác định hàm lượng các 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. Hàm lượng của 7 hợp chất trong 100g một mẫu lá Gạo khô là: mangiferin (8,1mg), daucosterol (1,1mg), 7 α -hydroxysitosterol (0,9mg), lupeol (5,7mg), taraxeryl acetat (4,1mg), stigmasterol (0,9mg) và taraxerol (5,1mg).

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

3.3.1. Đánh giá độc tính cấp

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

Chuột uống cao nước vỏ thân cây Gạo với mức liều 100-300g dl/kg chuột. Trong suốt 7 ngày theo dõi chuột ở tất cả các lô đều hoạt động, ăn uống, bài tiết bình thường, không thấy biểu hiện bất thường kèm theo và không gây chết chuột ở tất cả các lô thí nghiệm.

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

Sau khi uống cao nước lá cây Gạo với mức liều 100-300g dl/kg chuột, 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. Quan sát thấy không xuất hiện chuột chết trong vòng 72 giờ sau khi uống thuốc thử.

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

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

Phương pháp gây quận đau bằng acid acetic

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

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

Liều 12g dược liệu/kg/ngày: Các chuột ở lô uống VGE có số cơn quận 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 dược liệu/kg/ngày có số cơn quận đau ở tất cả các thời điểm nghiên cứu giảm có ý nghĩa thống kê so với chuột ở lô uống VGE 6g dược liệu/kg/ngày.

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

T	Lô	Số cơn quận đau của chuột					
		0-5 phút	5-10 phút	10-15 phút	15-20 phút	20-25 phút	25-30 phút
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): $p > 0,05$ *: $p < 0,05$ **: $p < 0,01$ ***: $p < 0,001$

Phương pháp gây đau bằng mâm nóng

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	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

Mô hình gây phù chân chuột bằng carragenin

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 ₁)		Sau 4 giờ (V ₂)		Sau 6 giờ (V ₃)		Sau 24 giờ (V ₄)	
	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 ($p > 0,05$). Cẩn 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).

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 cẩn 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 cẩn 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

Cao nước vỏ thân cây Gạo và cẩn 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 cẩn phân đoạn ethyl acetat chiết xuất từ vỏ thân cây gạo (VGE) làm giảm rõ rệt ($p < 0,05$).

Bảng 3.24. Tác dụng của cao nước và cẩn 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

Bảng 3.25. Tác dụng của cao nước và căn 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: 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: 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 của VG lên thời gian chảy máu

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 \pm 18,49	54,80 \pm 25,60	>0,05
Lô 2: VG 6g dl/kg	50,70 \pm 9,90	49,70 \pm 12,90	>0,05
Lô 3: VG 12g dl/kg	53,40 \pm 18,29	37,70 \pm 7,26	<0,05

Kết quả ở bảng 3.27 cho thấy: 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 ($p < 0,05$).

Tác dụng của VG lên thời gian đông máu

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.

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

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

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 của LG lên khối lượng gan chuột nhất trắng

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}

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 ($p < 0,001$).

Tác dụng của LG lên hoạt độ ASAT và ALAT

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 ($p < 0,001$).

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 ASAT 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

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

i	Lô	Hoạt độ ALAT 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

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).

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

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

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

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

Về mặt đại thể gan chuột trong các lô chuột uống silymarin và uống cao lỏng lá cây Gạo đều biểu hiện tổn thương gan giảm so với lô chứng bệnh lý (gan màu đỏ, xung huyết nhẹ, hầu như không thấy tổn thương). Về mặt vi thể biểu hiện tổn thương gan chuột cũng giảm so với lô chứng bệnh (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).

CHƯƠNG 4. BÀN LUẬN

4.1. Về thực vật

Hiện tại theo 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. Ở Việt Nam chỉ có từ 5 đến 6 loài thuộc chi *Bombax* L. họ Gạo (*Bombacaceae*), do đó vấn đề đầu tiên là xác 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 *Bombax malabarricum* DC. và *Bombax ceiba* L. là hai loài khác nhau. Nhưng hiện nay, Võ Văn Chi, Phạm Hoàng Hộ 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.

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 tâm 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.

4.2. Về thành phần hóa học

Kết quả định tính các nhóm chất trong vỏ thân, lá và hoa của loài *Bombax malabaricum* DC. cho thấy có sự tương đồng về thành phần hóa học giữa vỏ thân, hoa và lá, bao gồm các nhóm hợp chất glycosid tim, alcaloid, saponin, flavonoid, coumarin, tanin, acid hữu cơ, đường khử, sterol, acid amin và caroten. Riêng caroten và acid amin không có trong vỏ thân.

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

Lupeol: 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...). Lupeol có nhiều tác dụng dược lý: chống viêm, chống oxy hóa, hạ huyết áp, chống sốt rét, bảo vệ gan, antiangiogenic và đặc biệt kìm hãm sự phát triển tế bào ung thư.

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*. 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.

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). 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.

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)... là những hợp chất có tác dụng kháng nấm mạnh trên một số chủng như *Pseudomonas lachrymans*, *Pythium aphanidermatum*, *Botrytis cinerea*...

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, 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. Bên cạnh đó, 7 α -hydroxy sitosterol lần đầu tiên được phân lập từ họ Gạo (Bombacaceae).

DEHA (Diethylhexyl adipat). Loài *Bombax malabaricum* DC. chứa nhiều gôm, nhựa mủ và đây là lần đầu hợp chất này được phân lập từ loài cũng như từ họ Bombacaceae. Tuy nhiên có ý kiến cho rằng hợp chất này có thể là lẫn từ ngoài vào do vậy cần làm thêm các thí nghiệm chứng minh sự có mặt của hợp chất này trong cây Gạo.

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., có tác dụng chống oxy hoá, giảm đau, bảo vệ gan

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, *Seriphidium santolium* Poljak. 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.

Taraxerol: Tương tự taraxeryl acetate, 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 được phân lập từ

các loài như *Myrica rubra*, *Codonopsis pilosula*. Taraxerol có tác dụng chống viêm tương đương với indomethacin và 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.

Về kết quả xác định hàm lượng các hợp chất

Về phương pháp xử lý mẫu

Để định lượng một số hợp 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.

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

Với sắc ký đồ riêng của từng chất 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 âm, hàm lượng thực tế và kiểm tra độ ổn định theo thời gian. Thực tế lượng các chất phân lập được còn ít và thời gian không cho phép có thể thực hiện các công việc trên.

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, 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".

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.

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

được 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.

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. Bên cạnh đó mới chỉ tiến hành với 1 mẫu dược liệu, do vậy các kết quả thu được chưa thể đại diện cho hàm lượng các hợp chất trong dược liệu nhưng vẫn là một giá trị có thể dùng để ước lượng hàm lượng các chất trong các bộ phận vỏ thân và lá của cây Gạo.

Như vậy, với việc tiến hành phân tích đồng thời một số 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 hợp chất nếu có chất đối chiếu phù hợp.

4.3. Về thử độc tính cấp và tác dụng sinh học

Với liều uống cao nước vỏ thân và liều uống lá cây Gạo tăng dần từ 100g/kg đến 300g/kg thể trọng (gấp 50 lần liều dùng thông thường), không quan sát được chuột bị chết, đây là thể tích tối đa, chuột có khả năng dung nạp được.

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 $LD_{50} = 500,71$ g/kg (gấp 75 lần liều thông thường).

Về tác dụng giảm đau: Cao nước vỏ thân cây Gạo có tác dụng giảm quặn đau tốt, phù hợp với tài liệu tham khảo của Đỗ Tất Lợi, Võ Văn Chi và kinh nghiệm dân gian sử dụng cây Gạo để trị đau nhức xương khớp, đau răng, là đau ngoại vi do kích thích ngọn dây thần kinh nhận và dẫn truyền cảm giác đau ở ngoại biên.

Về tác dụng chống viêm: cao lỏng vỏ thân và căn 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., 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.

Đánh giá thời gian chảy máu, thời gian đông máu: 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...

Về tác dụng bảo vệ gan và chống oxy hóa: 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, alcaloid, saponin, flavonoid, coumarin, tanin, acid hữu cơ, đường khử, sterol. Trong lá và hoa gồm có: glycosid tim, alcaloid, 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.

- Từ lá loài *Bombax malabaricum* DC. đã phân lập được 7 hợp chất là: daucosterol, stigmasterol, mangiferin, lupeol, taraxeryl acetat, taraxerol và 7α -hydroxysitosterol.

- Trong đó có 2 hợp chất lần đầu tiên phân lập được từ họ Gạo (Bombacaceae): momorcerebroside 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, 7α -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 cần 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.

- Cẩn phân đoạn ethyl acetat chiết xuất từ vỏ thân cây Gạo liều 8g được liều/kg cân nặng chuột cống trắng có tác dụng chống viêm cấp.
- Cao nước vỏ thân và cẩn phân đoạn ethyl acetat chiết xuất từ vỏ thân cây Gạo với liều 12g được liều/kg chuột nhắt trắng có tác dụng chống viêm mạn tính.
- Cao nước vỏ thân cây Gạo với liều 12g được liều/kg chuột nhắt trắng có tác dụng làm giảm thời gian châu máu.
- Cao nước lá cây Gạo ở cả hai liều 6g và 12g được liều/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 nhắt trắng.
- Cao nước lá cây Gạo ở cả hai liều 6g và 12g được liều/kg chuột nhắt 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.
- 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.

DANH MỤC CÁC CÔNG TRÌNH ĐÃ CÔNG BỐ

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* DC.)”, *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.