

BỘ Y TẾ
TRƯỜNG ĐẠI HỌC DƯỢC HÀ NỘI
☪

96-64-249/100

3/7/96

ĐỀ TÀI CẤP BỘ

**NGHIÊN CỨU CÂY CHÈ DÂY
LÀM THUỐC ĐIỀU TRỊ BỆNH
LOÉT DẠ DÀY - HÀNH TÁ TRÀNG**

Chủ nhiệm đề tài: PGS. PTS. Phạm Thanh Kỳ

Hà Nội - 1995

2630

3/7/96

Chủ nhiệm đề tài:

PGS. PTS. Phạm Thanh Kỳ

Các cán bộ phối hợp thực hiện:

- GS. TS. Hoàng Tích Huyền
- BS. CK II Phó Đức Thuận
- PGS. PTS. Nguyễn Xuân Dũng
- DS. Phùng Thị Vinh
- PGS. PTS. Trịnh Văn Bảo
- PTS. Nguyễn Thị Hà
- PTS. Nguyễn Khắc Viện
- DS. Nông Hữu Đức
- DS. Đặng Thị Việt Hồng

NGHIÊN CỨU CHÈ DÂY LÀM THUỐC ĐIỀU TRỊ BỆNH LOÉT DẠ DÀY - HÀNH TÁ TRÀNG



I. ĐẶT VẤN ĐỀ:

Bệnh loét dạ dày - hành tá tràng là một bệnh có nhiều người mắc ở trên thế giới cũng như trong nước ta. Bên cạnh dùng những thuốc có nguồn gốc hoá dược việc nghiên cứu những bài thuốc, cây thuốc có ở trong nước để điều trị bệnh loét dạ dày - hành tá tràng đang được quan tâm.

Chè dây là một dược liệu chưa được ghi vào danh mục "Những cây thuốc và vị thuốc Việt Nam" của Giáo sư Đỗ Tất Lợi và những sách dược liệu khác. Nhân dân địa phương thường dùng lá nấu nước uống như nước chè. Bệnh viện Y học dân tộc tỉnh Cao Bằng và bệnh viện Y học dân tộc quân đội dùng chè dây để sắc hay hãm uống chữa đau dạ dày. Cho tới nay chúng tôi chưa thấy tài liệu nào trong nước ta công bố nghiên cứu về thực vật, thành phần hoá học, độc tính cũng như tác dụng dược lý của chè dây. Do đó chúng tôi đã đăng ký đề tài này ở cấp Bộ nghiên cứu về cây chè dây làm thuốc điều trị loét dạ dày - hành tá tràng với nội dung sau :

- 1- Nghiên cứu đặc điểm thực vật, định tên khoa học của chè dây.
- 2- Nghiên cứu về thành phần hoá học :
 - Xác định các nhóm chất chính có trong chè dây.
 - Chiết xuất và phân lập thành phần chính.
 - Nhận dạng các chất phân lập được.
- 3- Nghiên cứu độc tính của chè dây và thử một số tác dụng sinh học.
- 4- Bào chế 1 dạng thuốc đưa thử tác dụng trên lâm sàng.
(Phần thử trên lâm sàng do BS. Vũ Nam thực hiện dưới sự hướng dẫn của GS. Hoàng Bảo Châu, GS. Nguyễn Khánh Trạch).

II. NGUYÊN LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU :

1- Nguyên liệu :

- Đã lấy mẫu cây có hoa, quả, nghiên cứu đặc điểm thực vật và định tên khoa học.
- Dược liệu dùng nghiên cứu thành phần hoá học và tác dụng sinh học trên cùng cây và cùng một địa điểm.

2- Phương pháp nghiên cứu :

2.1- Về thực vật :

- Quan sát đặc điểm thực vật bằng mắt thường và kính lúp.
- Vi phẫu dược cắt, nhuộm kép theo phương pháp trong tài liệu "Thực hành dược liệu" và chụp ảnh qua kính hiển vi MÈN - 15.

2.2- Về hoá học :

- Định tính các nhóm chất trong dược liệu theo phương pháp trong tài liệu "Thực hành dược liệu" và "Phân tích hoá thực vật".
- Độ chảy đo trên máy OSI (Pháp) tại phòng nghiên cứu tổng hợp hữu cơ của trường ĐH Dược.
- Các nguyên tố vi lượng đo trên máy quang phổ phát xạ UCn- 30 (Nga) tại phòng quang phổ của cục địa chất Việt Nam.
- Phổ UV đo trên máy Spectrophotometer UV-160A Shimadzu - (Japan) tại viện hoá học công nghiệp.
- Phổ IR đo trên máy PYE UNICAM SP200 dạng viên nén KBr tại phòng nghiên cứu trung tâm của Trường.
- Phổ khối (MS) đo tại viện khối phổ của Trường Đại học tổng hợp Amsterdam (Hà Lan).
- Phổ $^1\text{H-NMR}$ và $^{13}\text{C-NMR}$ đo tại Trường Đại học Tổng hợp Uppsala (Thụy Điển).
- Phổ nhiễu xạ tia X (X-ray) đo tại viện tinh thể học Trường Đại học Tổng hợp Tự do Berlin (Đức).

2.3- Về tác dụng sinh học :

- Thử độc tính cấp và bán cấp theo phương pháp của viện Kiểm nghiệm thuốc Bucaret (Rumani) tại viện Y học cổ truyền Trung ương.
- Thử tác dụng giảm đau trên máy Analgesymetter, thực hiện tại phòng đông y thực nghiệm viện y học cổ truyền TW.

- Thử tác dụng kháng khuẩn bằng kỹ thuật khuếch tán trên môi trường đặc, đo đường kính vòng vô khuẩn đánh giá tác dụng ức chế vi khuẩn đối chiếu với một số kháng sinh.
- Xác định hoạt tính chống oxy hoá trên ty thể tế bào gan chuột. Thực hiện phản ứng peroxy hoá lipit màng ty thể và định lượng Malodialdehyd (MDA) tạo thành bằng phản ứng với thiobacbituric. Sản phẩm màu được đo bằng quang phổ kế ở bước sóng 535nm. Hoạt tính chống oxy hoá (AOA) của mẫu thử được tính bằng % lượng MDA giảm đi so với lô chứng (ứng với lô chứng có AOA bằng 0).

III. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU

1- Về mặt thực vật.

1.1- Xác định tên khoa học :

Chúng tôi đã lấy được mẫu cây có hoa, quả đem về phân tích và GS. Vũ Văn Chuyên đã định tên khoa học của cây chè dây là : *Ampelopsis cantoniensis* Planch. Họ Nho (Vitaceae).

1.2- Đặc điểm thực vật của cây :

Cây chè dây còn có tên gọi là Thau rả (Tày), Khau rả (Nùng) mọc ở vùng núi tỉnh Cao bằng. Quan sát thấy các đặc điểm sau :

- Cây dạng dây leo dài tới trên 10m, thân non có màu xanh, thân già màu nâu, thường leo lên các bụi rậm, cây to khác, hoặc mọc bò lan trên mặt đất. Cây sống nhiều năm.

- Lá mọc so le, mỗi lá có 7 - 11 lá chét, lá chét lẻ (cuối cùng) thường to hơn các lá chét khác. Lá chét đầu đôi khi phân nhánh tạo thành lá kép 2 lần lông chim. Tua cuốn mọc đối diện với lá.

- Hoa : mọc thành cụm xim hai ngã đối diện với lá và ở đầu cành, cuống cụm hoa thường dài 4 - 5 cm mới phân nhánh. Hoa nhỏ, cuống mỗi hoa 1 - 2 mm phủ nhiều lông.

Đài : 5 liền nhau thành hình chén cao 1mm phủ nhiều lông nhỏ.

Tràng : 5 cánh rời nhau, rộng 1 mm, dài 1,3 - 1,5mm hai mép uốn cong thành hình mũi giấy.

Bộ nhị : chỉ nhị dài 0,5mm dính lưng, bao phấn 0,5mm hướng trong. Bao phấn 2 ô, khi chín nứt dọc thành 2 rãnh.

Bộ nhụy : hình trụ, bầu trên có 2 - 3 lá noãn hàn liền, 1 vòi, 1 núm.

- **Quả** : loại mọng, lúc non có màu xanh, khi chín màu đỏ, trên đỉnh quả còn vết tích của vòi nhụy như một cái gai nhỏ.

- **Hạt** : Quả chứa 2 - 3 hạt nhỏ mặt ngoài màu nâu đen, 2 mép trắng trong, vỏ cứng như hạt chè.

1.3- Đặc điểm vi phẫu lá :

Tiêu bản cắt ngang lá, nhuộm kép, soi dưới kính hiển vi, quan sát thấy các đặc điểm sau :

- Hình dạng tiêu bản có đặc điểm : Gân chính của lá lõm nhọn hình tháp về phía mặt trên phiến lá.

- Về cấu tạo : Từ ngoài vào trong có :

1 : Biểu bì

2 : Mô dày

3 : Lông che chở đơn bào

4 : Bó sợi

5 : Bó li be - gỗ gân chính

6 : Mô dậu

7 : Bó li be - gỗ gân phụ

8 : Tế bào mô mềm chứa Ca oxalat hình kim

9 : Lỗ khí ở biểu bì dưới.

1.4- Đặc điểm vi phẫu thân :

1 : Biểu bì

2 : Mô mềm vỏ

3 : Mô dày

4 : Bó sợi

5 : Bó li be - gỗ

6 : Tia ruột

7 : Mô mềm ruột

1.5- Đặc điểm bột lá :

Dược liệu sấy khô, tán nhỏ. Soi dưới kính hiển vi thấy các đặc điểm sau :

1 : Lông che chở đơn bào

2 : Tế bào mô mềm chứa Ca oxalat hình kim

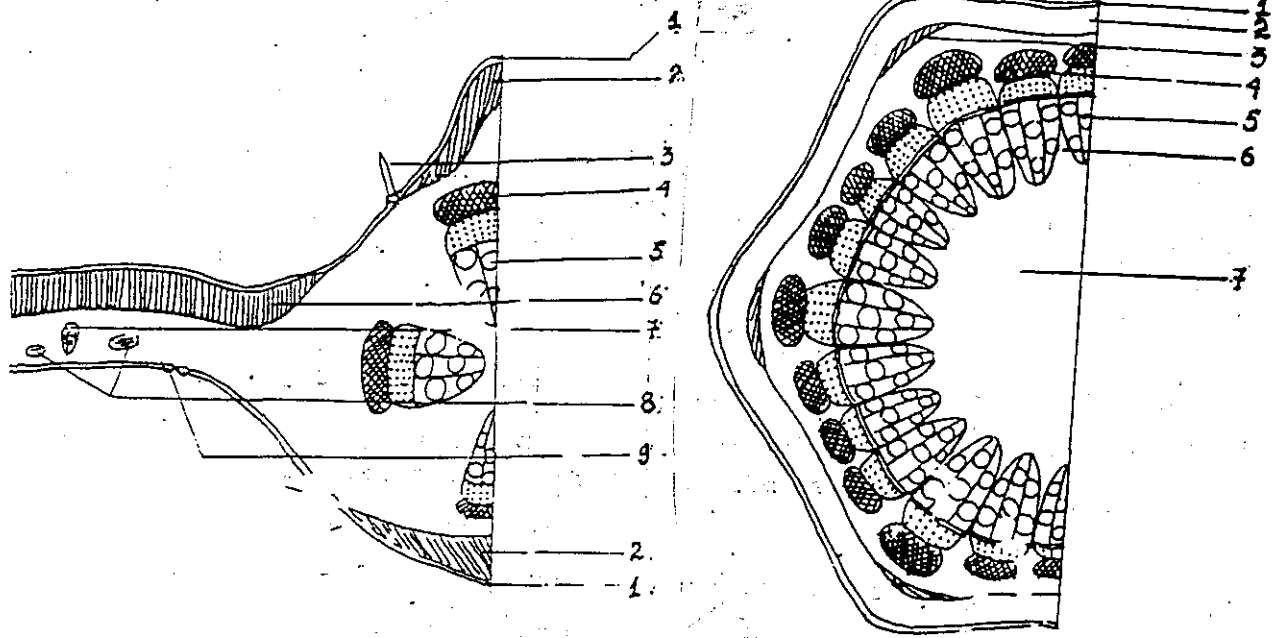
3 : Tinh thể Ca oxalat hình kim và hình khối

4 : Sợi

5 : Lỗ khí

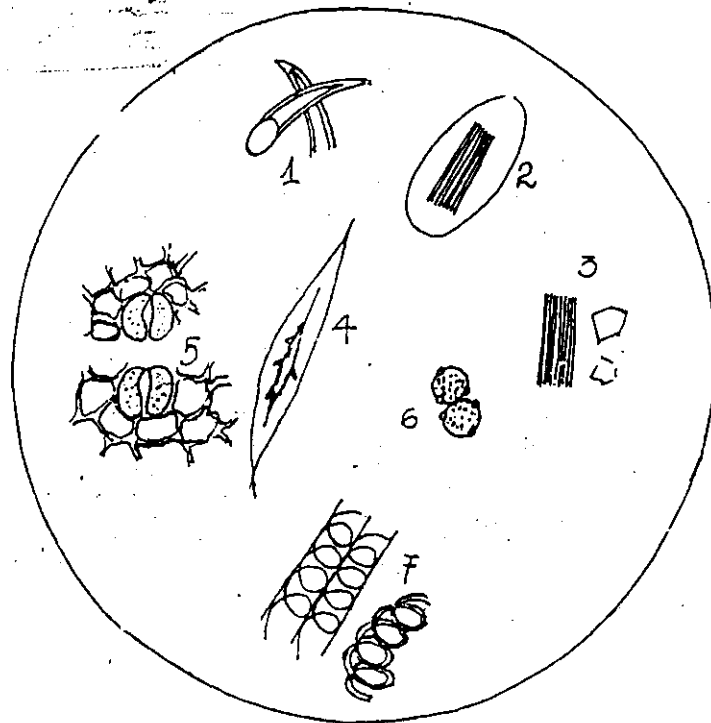
6 : Hạt phấn có màu vàng.

7 : Mạch xoắn.



Vi phẫu tổng quát lá

Vi phẫu tổng quát thân



Đặc điểm bột lá

2- Về thành phần hoá học :

2.1- Xác định các nhóm chất có trong dược liệu.

Kết quả định tính các nhóm chất có trong dược liệu được ghi ở bảng 1.

Bảng 1 : Kết quả định tính các nhóm chất trong dược liệu.

Các nhóm chất	Phản ứng	Kết quả	Kết luận
FLAVONOID	- Pư Shinoda - Với NaOH 10% - Với hơi NH ₃ - Với dd AlCl ₃ 2%	+ + + +	Có Flavonoid
SAPONIN	- Tạo bọt	-	Không có Saponin
ANTRAGLYCOSID	- Với NaOH	-	Không có Antraglycosid
TANIN	- Với dd FeCl ₃ 5% - Với dd gelatin 2%	+ +	Có Tanin
ALCALOID	- Với T.T. Mayer - Với T.T. Bouchardat - Với T.T. Dragendorff	- - -	Không có Alcaloid
ACID HỮU CƠ	+ Bột Na ₂ CO ₃	+	Có acid hữu cơ
ĐƯỜNG KHỬ	+ Fehling A+Fehling B	+	Có đường khử
PHYTOSTEROL	- Pư Liebermann	+	Có phytosterol
CHẤT BÉO	- Nhỏ 1 - 2 giọt d/chiết lên giấy lọc → hơi nóng	-	Không có chất béo

2.2- Xác định các nguyên tố vi lượng trong lá chè dây.

Kết quả phân tích trên máy quang phổ phát xạ UCΠ - 30 (Nga) tại phòng phân tích quang phổ của Cục Địa chất Việt Nam cho biết:

Mn : 0,7%, Mg : 0,5%, Ca : 0,5%, Si : 0,02%, Al : 0,007%,
Cu : 0,005%, Cr : 0,002%, Fe : 0,001%, Ag : 0,001% và Ti : 0,001%.

2.3- Định tính Flavonoid trong dược liệu bằng SKLM.

- Dùng chất hấp phụ : Silicagen G MERCK đã tráng sẵn.
- Dịch chấm sắc ký : dịch chiết dược liệu bằng cồn.
- Hệ dung môi khai triển :

Toluen : Ethylacetat : Acid formic [5 : 6 : 1]

Sau khi khai triển tấm sắc ký cho bay hết hơi dung môi rồi quan sát dưới ánh sáng thường, dưới đèn tử ngoại, hơi trên hơi amoniac, phun thuốc thử là hỗn hợp acid oxalic - boric 10% [5 : 15]. Kết quả được ghi ở bảng 2 .

Bảng 2 : Vị trí và màu sắc các vết trên sắc ký lớp mỏng

Vết	Rf (x 100)	Độ đậm	á. sáng thường	UV 366nm	NH ₃ á.sáng thường	D.d Boric- oxalic	
						á.sáng thường	UV366
1	5-8	+	trắng sáng	sáng	sáng		vàng sáng
2	10-13	++	vàng	nâu vàng	vàng	vàng	vàng sáng rõ
3	18-23	+	vàng nâu	nâu	vàng cam - nâu	vàng	vàng sáng
4	25-30	V	mờ nhạt	nâu	vàng cam-nâu	vàng	vàng sáng
5	45-48	++++	vàng xám	nâu	vàng cam	vàng	nâu vàng sáng
6	47 50	V	vàng xám	nâu	vàng xám	vàng	
7	55-60	+++	vàng xăm	nâu vàng	vàng đậm	vàng	vàng sáng xanh
8	65-68	V	mờ nhạt	nâu	vàng nhạt	vàng nhạt	
9	70-75	V	mờ nhạt	nâu	vàng nhạt	vàng nhạt	

Ghi chú : V : vết mờ.

Nhận xét : Trong các vết trên sắc ký lớp mỏng có vết số 5 (Rf : 0,45 - 0,48) là vết lớn nhất và hiện màu đậm, sau đó là vết số 7 (Rf : 0,55 - 0,60).

2.4. Định lượng Flavonoid toàn phần.

Qua định tính chúng tôi thấy trong bột lá chè dây, ngoài flavonoid còn có tanin và clorophyl do đó trong quá trình định lượng đã tiến hành loại clorophyl bằng ete dầu hoả và loại tanin bằng bột da hoặc dung dịch gelatin 3%.

Quá trình định lượng được thực hiện theo nguyên tắc sau: Cân chính xác khoảng 2g bột dược liệu chiết trong bình Soxhlet bằng ete dầu hoả để loại clorophyl. Sau đó lấy túi dược liệu ra để ở nhiệt độ phòng cho bay hết hơi dung môi rồi chiết kiệt flavonoid bằng cồn 70°, cất thu hồi cồn, còn dịch chiết nước, để nguội rồi loại tanin bằng bột da hoặc bằng dung dịch gelatin 3% đến khi không còn tủa xuất hiện. Chiết lấy kiệt flavonoid bằng ethylacetat, bốc hơi dung môi rồi sấy cạn đến khối lượng không đổi, đem cân. Hàm lượng flavonoid toàn phần chứa trong mẫu thử được tính theo công thức :

$$X\% = \frac{b}{a} \times 100$$

b : khối lượng cân khô

a : khối lượng dược liệu khô tuyệt đối

Kết quả định lượng được ghi ở bảng 3.

Bảng 3 : Hàm lượng Flavonoid toàn phần trong lá chè dây.

Mẫu	Hàm lượng Flavonoid (%)	
	Loại tạt bằng bột da	Loại tạt bằng dd gelatin 3%
1	19,18	18,03
2	17,96	17,95
3	18,04	17,88
4	18,03	17,91
5	18,61	18,15
6	17,80	18,29
TB.	18,27 ± 0,55	18,03 ± 0,17

Nhận xét : - Hàm lượng flavonoid toàn phần trong lá chè dây khá cao (> 18%).

- Kết quả định lượng ở phương pháp loại tạt bằng bột da và phương pháp loại tạt bằng dung dịch gelatin 3% gần như nhau (sự sai khác không có ý nghĩa).

2.5- Định lượng tanin.

Chúng tôi đã định lượng tanin theo phương pháp oxy hoá (dùng $KMnO_4$ 0,1N, chỉ thị màu là Sulfoindigo) trong ĐĐVN I và phương pháp tủa với bột da theo ĐĐVNII tập 3. Kết quả định lượng được ghi ở bảng 4.

Bảng 4 :

	Hàm lượng Tanin (%)	
	Phương pháp oxy hoá	Phương pháp tủa với bột da
1	11,85	10,44
2	10,59	11,59
3	13,69	13,45
4	12,89	11,49
5	12,25	12,11
6	11,88	12,04
TB.	12,19 ± 1,11	11,85 ± 1,03

Nhận xét : - Hàm lượng Tanin trong lá chè dây khá cao (>11%)
- Kết quả định lượng bằng phương pháp oxy hoá cao hơn phương pháp định lượng bằng bột da, nhưng sự sai khác không có ý nghĩa thống kê.