

Khảo sát tác dụng an thần của bài thuốc Bá tử dưỡng tâm hoàn không có thạch xương bồ trên thực nghiệm

Nguyễn Phương Dung¹, Lê Thị Thu Hương^{2,*}

¹Đại học Y Dược Tp.HCM, ²Đại học Nguyễn Tất Thành

*catus.nts@gmail.com

Tóm tắt

Tình hình chung và mục tiêu nghiên cứu: Theo thống kê của bác sĩ Nguyễn Xuân Huyền, số bệnh nhân đến khám vì mất ngủ chiếm 10-20% ở phòng khám chuyên khoa thần kinh. Theo nghiên cứu của Qi Fengqi và cộng sự trên thực nghiệm cho thấy Bá tử dưỡng tâm hoàn có tác dụng an thần. Trong bài Bá tử dưỡng tâm hoàn, vị thuốc Thạch xương bồ có tác dụng cải thiện các triệu chứng phụ của mất ngủ. Tuy nhiên, độc tính của tinh dầu Thạch xương bồ tăng theo hàm lượng β -asaron chứa trong đó. Mục đích nghiên cứu là khảo sát tác dụng an thần của cao chiết từ bài thuốc Bá tử dưỡng tâm hoàn không có Thạch xương bồ trên thực nghiệm. **Phương pháp nghiên cứu:** Độc tính cấp đường uống theo phương pháp Kaber-Behren. Khảo sát thời gian ngủ của chuột trên mô hình an thần kéo dài thời gian ngủ với Pentobarbital. Đánh giá thời gian ra ngăn sáng của chuột trên mô hình hai ngăn sáng - tối.

Kết quả: Nghiên cứu độc tính cấp cho thấy liều uống 27,48g cao/kg thể trọng là liều tối đa không gây chết chuột thử nghiệm. Cao thuốc liều 1,14g/kg chuột, liều 2,29g/kg chuột và 4,57g/kg chuột tại thời điểm 60 phút làm tăng thời gian ngủ không có ý nghĩa thống kê so với lô chứng (lô uống nước cất). Cao thuốc liều 2,29g/kg chuột và liều 4,57g/kg chuột, tại thời điểm 60 phút, thời gian ra ngăn sáng tăng có ý nghĩa thống kê so với lô chứng.

Nhận 15.01.2018
Được duyệt 10.09.2018
Công bố 20.09.2018

Từ khóa
Bá tử dưỡng tâm,
an thần,
 β -asaron

© 2018 Journal of Science and Technology - NTTU

1 Đặt vấn đề

Ở Việt Nam, theo một thống kê của bác sĩ Nguyễn Xuân Huyền số người đến khám vì mất ngủ chiếm 10% - 20% ở chuyên khoa thần kinh [1, 2]. Theo nghiên cứu của Qi Fengqi và cộng sự (Đại học Hắc Long Giang) trên thực nghiệm cho thấy Bá tử dưỡng tâm hoàn có tác dụng an thần [3]. Trong bài Bá tử dưỡng tâm hoàn, vị thuốc Thạch xương bồ có tác dụng cải thiện các triệu chứng phụ của mất ngủ. Tuy nhiên, độc tính của tinh dầu Thạch xương bồ tăng theo hàm lượng β -asaron chứa trong đó. Năm 2003, Hội đồng các chế phẩm thuốc có nguồn gốc dược liệu (Committee on Herbal Medicinal Products) thuộc Cơ quan Quản lý Dược phẩm Châu Âu (EMA) đã giới hạn hàm lượng β -asaron trong thực phẩm, đồ uống có cồn và các sản phẩm thuốc dược liệu là 115mcg/ngày, tức là khoảng 2mcg/kg cân nặng/ngày^{[4][5]}. Tại Việt Nam, Cục Quản lý Dược đã có Công văn số 14975/QLD-ĐK ngày 02/10/2012.

Theo đó, tạm ngừng cấp số đăng kí mới, đăng kí lại các chế phẩm thuốc ho bổ phế chứa dược liệu Thạch xương bồ; khuyến khích các công ty nghiên cứu thay thế Thạch xương bồ bằng một vị thuốc khác có tác dụng tương tự về mặt y học cổ truyền và trong thành phần không có β -asaron [4, 5]. Bài thuốc Bá tử dưỡng tâm hoàn, các vị thuốc được phối ngũ theo Quân, Thần, Tá, Sứ, trong đó Thạch xương bồ có vai trò làm tá (vai trò giải quyết triệu chứng phụ của bài thuốc) có tác dụng khai khiếu tinh thần, cố thận, hành khí, không có tác dụng an thần, được sử dụng với liều thấp (4g/1 thang thuốc) bằng 6% tổng khối lượng của 1 thang thuốc [6]. Câu hỏi nghiên cứu được đặt ra là bài thuốc Bá tử dưỡng tâm hoàn không có Thạch xương bồ có tác dụng an thần hay không? Đề tài này thực hiện nhằm đánh giá tính an toàn cũng như khảo sát tác dụng an thần, gây ngủ của cao chiết nước bài thuốc trên bằng các mô hình được lí thực nghiệm, góp phần làm sáng tỏ tác dụng dược lí, xây dựng hồ sơ tiền lâm sàng và làm cơ sở cho các nghiên cứu lâm

sàng tiếp theo. Đồng thời đưa ra một cơ sở khoa học về độ an toàn và tác dụng an thần của bài thuốc Bá tử dưỡng tâm hoàn không có vị Thạch xương bồ.

2 Đối tượng – Phương pháp nghiên cứu

2.1 Đối tượng nghiên cứu

- Dược liệu nghiên cứu

Dược liệu thử: Bá tử nhân, Mạch môn, Huyền sâm, Thực địa, Cam thảo, Kì tử, Đương qui, Phục thần, được cung cấp bởi Nhà Thuốc Tân Nam Xương, 82 Ưu Long, P.11, Q.8, Tp.HCM.

- Thuốc đối chứng

Diazepam là một chất dẫn xuất benzodiazepine, thường được sử dụng như thuốc an thần, giảm căng cơ và trong điều trị bệnh diazepam được dùng như thuốc kháng co giật. Diazepam là thuốc an thần, giải lo, gây ngủ, thuộc nhóm 1,4-benzodiazepin.

Cơ chế tác động: làm thuận lợi cho tác dụng ức chế thần kinh của γ -aminobutyric (GABA).

Tác dụng: làm giảm căng thẳng, kích động, lo âu, an thần, gây ngủ. Ngoài ra còn có tác dụng giãn cơ, chống co giật. [7. 8]

- Động vật thực nghiệm

Chuột nhắt trắng đực chủng *Swiss albino*, khỏe mạnh, 6 – 8 tuần tuổi, trọng lượng trung bình 25 – 32g, cung cấp bởi Viện Pasteur Tp.HCM và được nuôi ổn định ít nhất một tuần trước khi thử nghiệm.

2.2 Phương pháp nghiên cứu

Điều chế cao: Các cao bằng phương pháp chiết nóng với dung môi là nước.

Tiêu chuẩn hóa cao đặc

Xác định độ ẩm: Tiến hành theo phương pháp mất khối lượng do làm khô Phụ lục 9.6 – ĐVN IV.

Xác định độ tro toàn phần: Tiến hành theo Phụ lục 12.6 – ĐVN IV^[7].

Độc tính cấp của bài thuốc Bá tử dưỡng tâm hoàn không có vị Thạch xương bồ.

Độc tính cấp đường uống là xác định độc tính cấp của một chất sau khi dùng một liều đơn ngắn hạn qua đường uống. Căn cứ vào các dấu hiệu bất thường của động vật thử nghiệm để đánh giá độc tính cấp của chất thử nghiệm.

Điều kiện thí nghiệm

Thuốc thử nghiệm: cao được hòa tan trong nước cất.

Chuẩn bị động vật thí nghiệm: chuột nhắt trắng đực giống *Swiss albino*, 6-7 tuần tuổi, trọng lượng 20 ± 2 g, được nuôi ổn định trong khoảng thời gian một tuần trước khi thử nghiệm, được cung cấp đủ thức ăn và nước uống. Cho chuột nhịn đói 12 giờ trước khi cho uống thuốc.

Đường dùng thuốc: đường uống (p.o.). Thể tích uống 0,2ml/10g thể trọng.

Số lần dùng thuốc: dùng một lần duy nhất trong một ngày

trong khoảng thời gian từ 8-9 giờ sáng.

Chỉ tiêu đánh giá kết quả: theo dõi biểu hiện về hành vi và vận động của chuột trong vòng 72 giờ đầu và 14 ngày sau khi dùng thuốc. Ghi chép các diễn tiến trong thời gian đó.

Ghi giờ cho chuột uống thuốc, giờ xuất hiện các triệu chứng khác thường. Ghi nhận số chuột chết trong từng lô. Xác định LD₅₀ theo phương pháp Karber-Behrens (nếu có). Nếu không có chuột chết thì giá trị liều uống thử độc tính là D_{max}. Từ LD₅₀ hoặc D_{max} tìm ra liều an toàn với chuột [9].

Khảo sát tác dụng kéo dài thời gian ngủ với Pentobarbital

Mục đích: Khảo sát tác dụng kích thích hay ức chế hệ thần kinh trung ương của các cao 1 và cao 2, biểu hiện bằng việc rút ngắn hay kéo dài tiềm thời ngủ và thời gian ngủ do pentobarbital gây ra. Cao chiết có tác dụng hiệp lực với pentobarbital khi tiềm thời ngủ ngắn đi và thời gian ngủ được kéo dài. Cao chiết có tác dụng đối kháng pentobarbital khi thời gian ngủ ngắn đi.

Chỉ tiêu đánh giá: Chuột được coi là ngủ khi mất phản xạ thăng bằng, ghi nhận thời gian ngủ được tính từ lúc chuột mất phản xạ thăng bằng đến khi phục hồi phản xạ này [10].



Hình 2.1 Chuột ở trạng thái ngủ khi mất phản xạ thăng bằng

Nguyên tắc

Pentobarbital được sử dụng để gây ngủ với liều 50mg/kg tiêm phúc mô (thể tích tiêm 0,1ml/10g chuột). Tác động gây ngủ của pentobarbital thể hiện ngay sau khi tiêm, cụ thể là chuột bị mất phản xạ thăng bằng.

Tiến hành: chuột được chia ngẫu nhiên thành 8 lô như sau:

- Lô 1 (n=10): Lô chứng uống nước cất trong 7 ngày
- Lô 2 (n=10): lô đối chiếu, uống diazepam liều 0,5mg/kg chuột, 1 liều duy nhất.
- Lô 3 (n=10): uống cao với liều 1/5D_{max} trong 7 ngày.
- Lô 4 (n=10): uống cao với liều 1/10D_{max} trong 7 ngày.
- Lô 5 (n=10): uống cao với liều 1/20D_{max} trong 7 ngày.

Một giờ sau lần uống cuối cùng vào ngày thứ 7 (thể tích uống là 0,1ml/10g chuột), tiến hành tiêm phúc mô pentobarbital (i.p, 50mg/kg), quan sát ghi nhận tiềm thời ngủ và thời gian ngủ của chuột.

Ghi lại thời gian ngủ của chuột bằng đồng hồ để tính toán kết quả.

Chỉ tiêu theo dõi: so sánh thời gian ngủ giữa các lô chuột.

- Thời gian ngủ: tính từ lúc chuột mất phản xạ thăng bằng cho đến khi chuột có lại phản xạ thăng bằng.

Mô hình 2 ngăn sáng - tối (Light – dark test)

Thiết bị thử nghiệm Panlab Black and White box – Tây Ban Nha được thực hiện trong một hộp nhựa Perspex được chia thành 2 ngăn sáng (250 x 250 x 240mm, lắp bóng đèn trắng 100W) và ngăn tối (160 x 250 x 240mm, lắp bóng đèn đỏ 40W). Hai bóng đèn cách sàn 370mm. Hai ngăn thông nhau bởi một cửa có kích thước 70 x 70 mm ở bên dưới, chính giữa hộp. Thời gian và số lần chuột di chuyển vào các ngăn được máy tính ghi nhận thông qua phần mềm chuyên dụng (PPC Win v2.0.03).

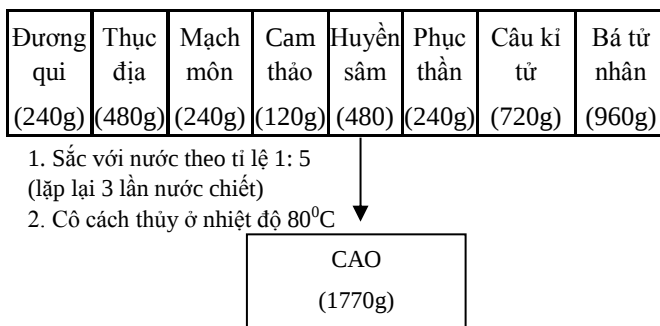
Tiến hành: Chuột được chia ngẫu nhiên thành 8 lô:

- Lô 1 (n=10): Lô chứng uống nước cất trong 7 ngày
- Lô 2 (n=10): lô đối chiếu, uống diazepam liều 1mg/kg chuột, 1 liều duy nhất.
- Lô 3 (n=10): uống cao với liều $1/5D_{max}$ trong 7 ngày.
- Lô 4 (n=10): uống cao với liều $1/10D_{max}$ trong 7 ngày.
- Lô 5 (n=10): uống cao với liều $1/20D_{max}$ trong 7 ngày.

Chuột được cho uống 60 phút trước thử nghiệm. Thể tích uống là 0,1 ml/10g chuột.

Chuột được đặt ở cửa ngăn cách vùng sáng và tối, hướng ra ngăn sáng. Sau đó, chuột được tự do khám phá trong 5 phút. Ghi nhận lại thời gian ở vùng sáng của chuột. Chuột được tính là ra vùng sáng khi cả 4 chân vượt qua lần phân cách giữa 2 vùng [11].

3 Kết quả



Hình 3.1 Qui trình chiết xuất cao thuốc

3.1 Tiêu chuẩn hóa cao

Cảm quan: Các cao có thể chất quánh, màu đen, mùi thơm được liệu, vị ngọt.

Độ tan: dung môi hòa tan là nước

Bảng 3.1 Độ tan trong nước của cao

Mẫu	Cao 1
Số ml nước hòa tan 1 g cao	20 ml
Số ml nước hòa tan 1 g cao	15 ml
Số ml nước hòa tan 1 g cao	10 ml
Độ tan	Tan

Nhận xét: Cao chiết tan tốt trong dung môi nước

Độ ẩm

Bảng 3.2 Độ ẩm của cao .

Lần thực hiện	Độ ẩm (%)	Trung bình
Lần 1	16,5	16,8 ± 0,21%
Lần 2	16,7	
Lần 3	17,2	

Độ tro toàn phần

Bảng 3.3 Độ tro toàn phần của cao .

Lần thực hiện	Độ ẩm (%)	Trung bình
Lần 1	4,5	4,47 ± 0,15%
Lần 2	4,7	
Lần 3	4,2	

Thử nghiệm dược lí

Độc tính cấp

Chuột thử nghiệm được cho uống cao thuốc Bá tử dưỡng tâm hoàn không có Thạch xương bồ với liều tối đa có thể bơm qua kim là 27,48g cao/kg chuột (cao khô tuyệt đối của cao là 22,86g/kg chuột).

Thể tích cho chuột uống là 20ml/kg thể trọng chuột.

Trong thời gian 72 giờ và 2 tuần quan sát, không ghi nhận bất kì dấu hiệu bất thường nào xảy ra trên chuột thử nghiệm. Tất cả các chuột đều ăn uống và hoạt động bình thường, không có chuột chết. Do đó, không tìm được LD₅₀ và xác định được D_{max} là 27,48g cao/kg chuột.

Quan sát đại thể

Sau 2 tuần theo dõi, mô chuột ở tất cả các lô để quan sát đại thể các phủ tạng của chuột.

Kết quả: Tất cả các chuột thử nghiệm không thấy bất kì thay đổi bệnh lí nào về hình thái đại thể của các cơ quan tim, gan, thận, bàng quang và hệ thống tiêu hóa.

Theo “Phương pháp xác định độc tính cấp” của Đỗ Trung Đàm liều tác dụng của các cao dược liệu không tìm được LD₅₀ thường vào khoảng 1/4 – 1/20D_{max}. Từ D_{max} chúng tôi quyết định chọn liều cho các thử nghiệm tiếp theo là 1/5, 1/10, 1/20 D_{max} tính theo cao khô tuyệt đối: Cao thuốc liều 4,57g/kg (1/5D_{max}), liều 2,29g/kg (1/10D_{max}), liều 1,14g/kg (1/20D_{max})

Sử dụng các liều trên để thực hiện thử nghiệm trên các mô hình an thần, giải lo âu.

Khảo sát tác dụng kéo dài thời gian ngủ với Pentobarbital

Thời gian ngủ của các lô thử nghiệm

Bảng 3.4 Thời gian ngủ của chuột (phút) ở các lô thử nghiệm.

STT	Nước cất	Diazepam	Liều thử nghiệm		
			1,14 g/kg	2,29 g/kg	4,57 g/kg
1	73,50	129,60	100,40	82,10	104,00
	±	±	±	±	±
	5,02	7,51	11,73	8,90	12,35

Kết quả:

- Diazepam liều 0,5mg/kg chuột, tại thời điểm 60 phút sau khi uống, thời gian ngủ tăng có ý nghĩa thống kê so với lô chứng (lô uống nước cất)(p<0,001).

- Cao 1 liều 1,14g cao khô/kg chuột, tại thời điểm 60 phút sau khi uống, thời gian ngủ tăng so với lô chứng nhưng không có ý nghĩa thống kê ($p=0,054>0,05$).

- Cao 1 liều 2,29g cao khô/kg chuột, tại thời điểm 60 phút sau khi uống, thời gian ngủ tăng so với lô chứng nhưng không có ý nghĩa thống kê ($p=0,411>0,05$).

- Cao 1 liều 4,57g cao khô/kg chuột, tại thời điểm 60 phút sau khi uống, thời gian ngủ tăng so với lô chứng nhưng không có ý nghĩa thống kê ($p=0,089>0,05$).

- Kết luận: Các kết quả trên cho thấy trong thử nghiệm này, cả 3 lô sử dụng cao thuốc với 3 liều 1,14; 2,29; 4,57 cao khô/kg chuột tại thời điểm 60 phút làm tăng thời gian ngủ nhưng không có ý nghĩa thống kê so với lô chứng (lô uống nước cất), như vậy cao thuốc Bá tử dưỡng tâm hoàn không có Thạch xương bồ không thể hiện tác dụng an thần gây ngủ.

Mô hình 2 ngăn sáng - tối (Light – dark test)

Bảng 3.5 Thời gian ra ngăn sáng của chuột (giây) ở lô thử nghiệm

STT	Nước cất	Diazepam	Liều thử nghiệm		
			1,14 g/kg	2,29 g/kg	4,57 g/kg
1	94,11	152,33	117,38	160,40	161,00
	±	±	±	±	±
	11,14	10,08	13,45	13,91**	9,42**

** $p<0,001$ so với nhóm chứng

Kết quả:

Diazepam liều 0,5 mg/kg chuột, tại thời điểm 60 phút sau khi uống, thời gian ra ngăn sáng tăng có ý nghĩa thống kê so với lô chứng (lô uống nước cất) ($p=0,001$).

- Cao 1 liều 1,14 g cao khô/kg chuột, tại thời điểm 60 phút sau khi uống, thời gian ra ngăn sáng tăng so với lô chứng nhưng không có ý nghĩa thống kê ($p=0,199>0,05$).

- Cao 1 liều 2,29 g cao khô/kg chuột, tại thời điểm 60 phút sau khi uống, thời gian ra ngăn sáng tăng có ý nghĩa thống kê so với lô chứng ($p=0,002<0,01$).

- Cao 1 liều 4,57 g cao khô/kg chuột, tại thời điểm 60 phút sau khi uống, thời gian ra ngăn sáng tăng có ý nghĩa thống kê so với lô chứng ($p<0,001$).

Kết luận: Các kết quả trên cho thấy trong thử nghiệm này, liều 2,29 g cao khô/kg chuột và liều 4,57 g cao khô/kg chuột tại thời điểm 60 phút, thời gian ra ngăn sáng tăng có ý nghĩa thống kê so với lô chứng (lô uống nước cất).

4 Kết luận

Khảo sát một số tiêu chuẩn của cao chiết nước bài thuốc về hình thức cảm quan, độ tan trong nước, độ ẩm, độ tro toàn phần đạt theo tiêu chuẩn của ĐDVN IV

Tính an toàn của cao chiết nước bài thuốc

Độc tính cấp

Trong thử nghiệm độc tính cấp, liều cao nhất có thể bơm qua kim đầu tù cho chuột uống D_{max} là 27,48 g cao khô/kg chuột (cao khô tuyệt đối của cao 1 là 22,86g/kg chuột, khoảng 163,57g dược liệu khô).

Theo kết quả thử nghiệm độc tính cấp của cao chiết nước bài thuốc Bá tử dưỡng tâm hoàn không có Thạch xương bồ có thể khẳng định rằng cao chiết nước bài thuốc này có độ an toàn khá cao.

Cao thuốc Bá tử dưỡng tâm hoàn không có Thạch xương bồ không thể hiện tác dụng an thần gây ngủ trên các liều thử nghiệm. Cao thuốc liều 2,29 g/kg chuột và liều 4,57 g/kg chuột, tại thời điểm 60 phút, thời gian ra ngăn sáng tăng có ý nghĩa thống kê so với lô chứng (lô uống nước cất) chứng tỏ cao thuốc có tác dụng an thần giải lo âu.

Tài liệu tham khảo

1. Nguyễn Sơn Tùng, Nguyễn Ngọc Khôi (2008), Khảo sát mô hình nghiên cứu tác dụng giải lo âu của một số phối hợp từ dược liệu”, tạp chí *Y Học TP. Hồ Chí Minh*, 14 (1), tr. 12.
2. Trần Mỹ Tiên, Nguyễn Thị Thu Hương, 2004, Trung tâm Sâm & Dược liệu Tp.Hồ Chí Minh, Viện Dược liệu, nghiên cứu một số tác dụng dược lý của lá sâm việt nam.
3. Qi Fengqi, LiBin, Liu Shilei, Che Xinying (2006), *experimental study on sedative-hypnotic function of baiziyangxin*, Heilongjiang university of chinese medicine, 19(2), pp. 95.
4. Bộ Y tế (2016), *Qui chế đánh giá tính an toàn và hiệu lực của thuốc cổ truyền* (Ban hành kèm theo quyết định số 371/BYT-QĐ ngày 12-03-1996 của Bộ trưởng Bộ Y tế, Phụ lục số 3: Hướng dẫn về khảo sát độc tính của thuốc cổ truyền.
5. Bộ Y tế (2012), *Thông tư ban hành Danh mục dược liệu có độc tính sử dụng làm thuốc tại Việt Nam*, Số: 33/2012/TT-BYT.
6. Nguyễn Thị Bay (2012), *Nội khoa Y học cổ truyền*, NXB Y học, tr. 423-435.
7. Bộ Y Tế (2018), *Dược điển Việt Nam V*, NXB Y học, trang 696-697, 810-811, 882-883, 930-931, PL. 812-813, PL. 236-237.
8. Bộ Y tế (2007), *Dược thư quốc gia Việt Nam*, NXB Y học, tr. 369-371, 1218-1219.
9. Đỗ Trung Đàm (2012), *Phương pháp xác định độc tính cấp của thuốc*, NXB Y học, tr. 50-57.
10. Nguyễn Lan Thùy Ty, Võ Phùng Nguyên, Nguyễn Hữu Đức (2008), “Đánh giá tác dụng an thần - gây ngủ của 2 chế phẩm có nguồn gốc dược liệu”, tạp chí *Y Học Tp.HCM*, 12 (2), tr. 106-111.
11. Qian XZ. (1996), The colour pictorial handbook of the Chinese herbal, *The common Chinese herbal medicine* vol 1 [in Chinese]. 1st ed. Beijing: Ren Min Wei Sheng Chu Ban She.

Study of sedative activity of extracts of Ba tu duong tam pill without acorus gramineus in Swiss albino mice

Nguyen Phuong Dung¹, Le Thi Thu Huong^{2,*}

¹University of medicine and pharmacy at HCMC

²Nguyen Tat Thanh University

*catus.nts@gmail.com

Abstract

Background and Aims: According to Dr. Nguyen Xuan Huyen, the number of patients diagnosed sleep disorders accounted for 10-20% in the neurological clinic. According to research by Qi Fengqi and his colleagues, Ba tu duong tam pill have a sedative effect in mice. In Ba tu duong tam pill, Acorus gramineus have effect of insomnia, but the toxicity of Acorus gramineus increases with the amount of β -asaron contained in it. The purpose of this study was to investigate the sedative effect of ba tu duong tam pill without acorus gramineus in swiss albino mice.

Method: Karber-Behren method was used to investigate the oral acute toxicity. The study of sleep time of mice on Pentobarbital sleeping test. Evaluate the timing of the mouse's light compartment on light-dark test.

Results: For the dose of 27,48g/kg, no visible toxic effects were observed. Ba tu duong tam without Acorus gramineus dose of 1,14g/kg; 2,29g/kg; 4,57g/kg do not show sedative effects. . Ba tu duong tam without Acorus gramineus dose of 2,29g/kg; 4,57g/kg showed sedative anxiolytic effects.

Keywords Ba tu duong tam, Sedative, β -asaron.