

BỘ GIÁO DỤC VÀ ĐÀO TẠO
TRƯỜNG ĐẠI HỌC NGUYỄN TẤT THÀNH

BÁO CÁO TỔNG KẾT
ĐỀ TÀI KHOA HỌC VÀ CÔNG NGHỆ CẤP CƠ SỞ
NĂM 2021 - 2022

Tên đề tài: **Khảo sát tác động giảm đau, an thần của cao chiết ngó sen**
(*Nelumbo nucifera* Gaertn. Nelumbonaceae)

Số hợp đồng: 2021.01.83

Chủ nhiệm đề tài: Võ Thị Thu Hà

Đơn vị công tác: Khoa Dược

Thời gian thực hiện: 04/2021 – 12/2021

TP. Hồ Chí Minh, ngày 26 tháng 05 năm 2022

**BỘ GIÁO DỤC VÀ ĐÀO TẠO
TRƯỜNG ĐẠI HỌC NGUYỄN TẤT THÀNH**

**BÁO CÁO TỔNG KẾT
ĐỀ TÀI KHOA HỌC VÀ CÔNG NGHỆ CẤP CƠ SỞ
NĂM 2021 - 2022**

Tên đề tài: **Khảo sát tác động giảm đau, an thần của cao chiết ngó sen
(*Nelumbo nucifera* Gaertn. Nelumbonaceae)**

Số hợp đồng : 2021.01.83

Chủ nhiệm đề tài: Võ Thị Thu Hà

Đơn vị công tác: Khoa Dược

Thời gian thực hiện: 04/2021 – 12/2021

Các thành viên phối hợp và cộng tác:

STT	Họ và tên	Chuyên ngành	Cơ quan công tác	Ký tên

MỤC LỤC

MỞ ĐẦU	1
CHƯƠNG 1. TỔNG QUAN TÀI LIỆU	3
1.1. Tổng quan về sen	3
1.1.1. Tổng quan thực vật học	3
1.1.2. Mô tả thực vật	4
1.1.3. Tác dụng dược lý.....	7
1.2. Độc tính cấp	10
1.2.1. Khái niệm	10
1.2.2. Nguyên tắc thử nghiệm độc tính cấp.....	11
1.2.3. Các phương pháp tính LD ₅₀	11
1.3. Đại cương về đau	12
1.3.1. Định nghĩa về đau	12
1.3.2. Cơ chế gây đau	13
1.3.3. Cơ chế tác dụng của thuốc giảm đau	14
1.3.4. Thuốc giảm đau và các mặt hạn chế	14
1.3.5. Các mô hình giảm đau thực nghiệm	15
1.4. Đại cương về an thần	18
1.4.1. Ngủ.....	18
1.4.2. Mất ngủ	18
1.4.3. Thuốc an thần, gây ngủ	19
1.4.4. Các mô hình an thần thực nghiệm.....	19
CHƯƠNG 2. NỘI DUNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU	21
2.1. Đối tượng nghiên cứu.....	21
2.1.1. Dược liệu nghiên cứu	21
2.1.2. Động vật thử nghiệm.....	21
2.1.3. Hóa chất	21
2.1.4. Dụng cụ và thiết bị	21
2.2. Phương pháp nghiên cứu.....	22
2.2.1. Chiết xuất dược liệu	22

2.2.2. Phương pháp đo độ ẩm.....	22
2.2.3. Khảo sát sơ bộ hóa thực vật	23
2.2.4. Khảo sát độc cấp đường uống	25
2.2.5. Khảo sát tác động giảm đau <i>in vivo</i>	26
2.3. Phân tích thống kê kết quả	28
CHƯƠNG 3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN	29
3.1. Kết quả chiết xuất.....	29
3.2. Kết quả khảo sát thành phần hóa thực vật.....	29
3.3. Kết quả độc tính cấp đường uống	30
3.4. Khảo sát tác động giảm đau trung ương của cao ngó sen.....	32
3.5. Khảo sát tác động giảm đau ngoại biên của cao ngó sen.....	34
3.6. Khảo sát tác động an thần của cao ngó sen.....	37
3.7. Bàn luận	39
3.7.1. Khảo sát về thành phần hóa học.....	39
3.7.2. Khảo sát độc cấp đường uống	39
3.7.3. Tác động giảm đau trung ương	40
3.7.4. Tác động giảm đau ngoại biên	40
3.7.5. Tác động an thần	41
CHƯƠNG 4. KẾT LUẬN VÀ KIẾN NGHỊ	42
4.1. Kết luận	42
4.2. Đề nghị	42
TÀI LIỆU THAM KHẢO	44

DANH MỤC CÁC KÝ HIỆU, CÁC CHỮ VIẾT TẮT

Ký hiệu	Từ tiếng anh	Nghĩa tiếng việt
AMP	Adenosine monophosphate	Adenosin monophosphat
ABTS	2,2'-azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid)	Acid 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid)
CCl ₄	Carbon tetrachloride	Cacbon tetraclorua
COX	Cyclooxygenase	Enzyme cyclooxygenase
Dmax	Dose maximum	Liều tối đa
DPPH picrylhydrazyl	2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl	2,2-diphenyl-1-
Ds	Dose safe	Liều an toàn
FRAP	Ferric reducing-antioxidant power	Lực chống oxi hóa bằng
phương pháp khử sắt		
GABA	Gamma-Aminobutyric acid	Acid γ -aminobutyric
GOT	Glutamic oxaloacetic transaminase	Enzyme chuyển glutamic
oxaloacetic		
GPT	Glutamic pyruvic transaminase	Enzyme chuyển glutamic pyruvic
HIV ở	Human immunodeficiency virus	Virus suy giảm miễn dịch người
IgE	Immunoglobulin E	Globulin miễn dịch loại E
MAOIs monoamin	Monoamine oxidase inhibitors	Ức chế enzyme oxidase
NSAIDs	Nonsteroidal Anti – Inflammatory Drugs	Thuốc kháng viêm không steroid
PG	Prostaglandin	Prostaglandin

SNRIs	Serotonin-norepinephrine reuptake	Thuốc ức chế tái hấp thu Inhibitors serotonin-
norepinephrine		
TCA	Tricyclic antidepressant	Thuốc chống trầm cảm ba vòng
TGF- β 1	Transforming growth factor beta-1	Yếu tố tăng trưởng beta-1
TNF- α	Tumor necrosis factor alpha	Yếu tố hoại tử khối u
alpha		

DANH MỤC CÁC HÌNH ẢNH

Hình 1.1. Một số bộ phận của cây Sen.....	5
Hình 1.2. Thành phần hóa học trong phôi của sen.....	6
Hình 1.3. Thành phần hóa học trong lá sen	6
Hình 1.4. Thành phần hóa học trong hạt sen	6
Hình 2.1. Quy trình chiết khảo sát sơ bộ thành phần hóa thực vật	23
Hình 3.1. Cao còn ngó sen	29
Hình 3.2. Đại thể (a) chuột đực và (b) chuột cái sinh lý sau 14 ngày.....	31
Hình 3.3. Đại thể (a) chuột đực và (b) chuột cái dùng cao ngó sen liều 61,6 g/kg theo đường uống sau 14 ngày theo dõi	31
Hình 3.4. Tiềm thời giạt đuôi giữa các lô vào các khoảng thời gian	33
Hình 3.5. Số lần đau quặn của lô chứng, lô đối chứng, lô thử nghiệm 1	35
Hình 3.6. Số lần đau quặn của lô chứng, lô đối chứng, lô thử nghiệm 2.....	36
Hình 3.7. So sánh số lần đau quặn giữa 2 lô thử nghiệm.....	37
Hình 3.8. Thời gian chuột bám trên máy Rota-rod tại các thời điểm sau dùng thuốc của các lô.....	38

DANH MỤC CÁC BẢNG

Bảng 2.1. Các phản ứng đặc trưng để xác định các nhóm hợp chất	24
Bảng 3.1. Hiệu suất chiết của các cao từ ngó sen	29
Bảng 3.2. Kết quả khảo sát thành phần hóa thực vật từ cao ngó sen.....	30
Bảng 3.3. Tiềm thời giạt đuôi chuột (giây) của các lô vào các khoảng thời gian.....	32
Bảng 3.4. Số lần đau quặn của chuột ở các lô tại các thời gian khảo sát.....	34
Bảng 3.5. Kết quả khảo sát thời gian bám trên máy Rota-Rod.....	38

TÓM TẮT KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU

STT	Công việc thực hiện	Kết quả đạt được
1	Chiết xuất dược liệu và khảo sát độc tính cấp đường uống	Quy trình chiết và kết quả khảo sát độc tính cấp đường uống
2	Khảo sát tác dụng giảm đau ngoại biên	Bảng số liệu kết quả tác động giảm đau ngoại biên
3	Khảo sát tác dụng giảm đau trung ương	Bảng số liệu kết quả tác động giảm đau trung ương
4	Khảo sát tác dụng an thần	Bảng số liệu kết quả tác động an thần
5	Xử lý số liệu, đánh giá kết quả, viết tổng kết	Bài báo cáo tổng kết

STT	Sản phẩm đăng ký	Sản phẩm đã đạt được
1	Kết quả tác động giảm đau ngoại biên của cao chiết từ ngó sen	Bảng kết quả tác động giảm đau ngoại biên của cao chiết từ ngó sen
2	Kết quả tác động giảm đau trung ương của cao chiết từ ngó sen	Bảng kết quả tác động giảm đau trung ương của cao chiết từ ngó sen
3	Kết quả tác động an thần của cao chiết từ ngó sen	Bảng kết quả tác động an thần của cao chiết từ ngó sen
4	Bài báo khoa học	Bài báo khoa học đăng trên tạp chí Khoa học và Công nghệ - Đại học Nguyễn Tất Thành

Thời gian thực hiện: 04/2021 – 12/2021

Thời gian nộp cuốn báo cáo: 05/2022

MỞ ĐẦU

Việt Nam là đất nước có nguồn dược liệu phong phú do thảm thực vật đa dạng và khí hậu thuận lợi để phát triển. Đây cũng là điều kiện quan trọng để cung cấp nguyên liệu sản xuất thuốc trong nước. Đã có rất nhiều dược liệu quý được thế giới công nhận như cây hồi, quế, atiso, sâm Ngọc Linh... Trong đó sen (*Nelumbo nucifera* Gaertn.) là một loài dược liệu phổ biến và rất giàu tiềm năng để nghiên cứu phát triển mạnh ở Việt Nam.

Sen là loại cây mọc ở dưới nước, được trồng ở nhiều nơi trong nước ta như đầm, hồ, ao,... để làm thức ăn hay dùng làm thuốc [13]. Các bộ phận khác nhau của cây sen đều có thể sử dụng trong y học cổ truyền. Đã có rất nhiều nghiên cứu về tác dụng dược lý của sen như khả năng chống oxy hóa của vỏ hạt sen ở nghiên cứu của Chen và cộng sự [18]; năm 2014, Lin Yuan và cộng sự chứng minh tác dụng bảo vệ gan của dịch chiết ethyl acetat, butanol từ lá sen [53]; năm 1997, Mukherjee chứng minh tác dụng hạ glucose huyết của ngó sen [40]; năm 2015, Zhang và cộng sự cũng đã chứng minh khả năng kháng ung thư của isoliensinin [54]; năm 2011, Jiang và cộng sự phân lập các chất từ lá sen có tác dụng kháng virus HIV [26], nghiên cứu của Kuo và cộng sự (2005) chứng minh dịch chiết từ hạt sen kháng HSV-1...[30]. Trong những năm gần đây các nhà khoa học quan tâm nhiều đến tác dụng điều trị rối loạn thần kinh trung ương của cây sen như giảm căng thẳng, giảm đau, trầm cảm và rối loạn nhận thức, mất ngủ. Trong nghiên cứu *in vitro* vào năm 2015, Mallika Kumarihamy và cộng sự đã chứng minh những dẫn chất chiết từ cây sen như nuciferine, N-nor-nuciferine, asimilobine, arnepavine, O-methylcoclaurine, N-methylcoclaurine, coclaurine, neferine có ái lực với các thụ thể liên quan đến giảm đau và rối loạn hành vi [31]. Tại Việt Nam, những bài thuốc chữa mất ngủ, giảm đau được bào chế từ các bộ phận của sen được dân gian lưu truyền từ lâu đời [13]. Tuy nhiên, những nghiên cứu về tác dụng dược lý trên các bộ phận của cây sen, đặc biệt là ngó sen vẫn còn rất hạn chế. Do đó để làm rõ hơn các tác dụng chưa được chứng minh đầy đủ của cây sen, chúng tôi tiến hành thực hiện đề tài “Khảo sát tác

động giảm đau, an thần của cao chiết ngó sen (*Nelumbo nucifera* Gaertn.)” với mục tiêu cụ thể như sau:

- Khảo sát tác động giảm đau ngoại biên của cao chiết ngó sen.
- Khảo sát tác động giảm đau trung ương của cao chiết ngó sen.
- Khảo sát tác động an thần của cao chiết ngó sen.

CHƯƠNG 1. TỔNG QUAN TÀI LIỆU

1.1. Tổng quan về sen

1.1.1. Tổng quan thực vật học

❖ Họ Nelumbonaceae

Là một dạng cây thủy sinh nổi trên mặt nước có độ sâu đến 2m. **Lá:** hình khiên, đường kính có thể tới 75 cm, cuống lá to, nổi trên mặt nước, lá đơn [23]. **Thân rễ:** to, cuống dài có gai nhỏ. **Hoa:** lưỡng tính, xếp xoắn vòng. Lá đài 2; cánh hoa nhiều, màu trắng hay hồng, xếp xoắn, ít phân biệt lá đài. **Nhị:** nhiều xếp xoắn ốc [7]. **Bộ nhị:** nhiều lá noãn rời đính thành nhiều vòng, vòi sâu trong đế hoa có hình nón ngược (gương sen) [7], bầu nhụy 1 ô có 1 noãn hình thoi, vòi nhụy ngắn, các đầu nhụy có dạng hình tròn. **Quả:** hạch, không nẻ. Nhiều hạt không có nội nhũ và ngoại nhũ, phôi lớn; 2 lá mầm dày [51].

Họ Nelumbonaceae có 1 chi duy nhất và có 2 loài phân bố chủ yếu ở khu vực nhiệt đới [23].

❖ Chi *Nelumbo*:

Dạng sống: thân cỏ nổi trên mặt nước. **Lá:** đơn, có hình cầu phiến lá có màu xanh lục, không thấm nước, có rìa, cuống lá dài từ 1-2m, có gai. **Hoa:** cuống hoa dài hơn cuống lá, hoa có đường kính 10-23cm, cánh màu hồng hoặc trắng, hình elip thuôn dài đến hình trứng ngược 5-10 x 3-5cm. **Nhị hoa:** dài hơn so với đế hoa, chỉ nhị mảnh, bao phấn tuyến tính 1-2mm; nối với phần phụ có hình chùy đến 7mm thì cong vào trong. Đế hoa cùng phát triển có hình nón ngược. Quả thuôn dài hoặc hình trứng 1-2 x 7-15cm nhẵn, màng ngoài dày, cứng [51].

Chi có 2 loài:

- *Nelumbo nucifera* ssp. *nucifera* Gaertn.: được tìm thấy trên khắp Ấn Độ và Châu Á cũng như ở Malaysia, New Guinea và Úc. Hoa có màu hồng.
- *Nucumbo nucifera* ssp. *lutea* (Willd.): bị giới hạn ở nửa phía đông của Bắc Mỹ, lục địa từ miền nam Canada đến Florida. Hoa có màu trắng [23].

Việt Nam chỉ có một loài là *Nelumbo nucifera* ssp. *nucifera* Gaertn..

➤ Vị trí trong bảng phân loại thực vật:

Tên khoa học: *Nelumbo nucifera* Gaertn.

Tên thường gọi: Sen.

Tên nước ngoài: Sacred lotus, Chinese water-lily, Indian lotus, Egyptian bean.

Theo hệ thống phân loại của Takhtajan [8], vị trí của loài *Nelumbo nucifera* Gaertn., được sắp xếp như sau:

Ngành Ngọc Lan (Magnoliophyta)

Lớp Ngọc Lan (Magnoliopsida)

Phân lớp Ngọc lan (Magnoliidea)

Bộ Sen (Nelumbonales)

Họ Sen (Nelumbonaceae)

Chi Sen (*Nelumbo*)

Loài *Nelumbo nucifera* Gaertn.

1.1.2. Mô tả thực vật

Cây thủy sinh với thân rễ hình trụ mọc trong bùn thường gọi là ngó sen (ngẫu tiết). Lá nổi trên mặt nước, cuống lá dài và có gai nhỏ, phiến lá hình khiên, to, đường kính từ 60-70cm có gân tỏa tròn. Hoa to màu trắng hoặc màu đỏ hồng, đều lưỡng tính. Đài 3-5cm, màu lục. Tròng gồm rất nhiều cánh màu hồng hay màu trắng một phần, những cánh ngoài còn có màu lục như lá đài. Nhị nhiều, bao phấn 2 ô, nứt theo kẻ dọc. Trung đới mọc dài ra thành một phần hình trắng, thường gọi là gạo sen. Nhiều lá noãn rời nhau đựng trong một đế hoa loe ra thành hình nón ngược, gọi là gương sen. Mỗi lá noãn có 1-2 tiểu noãn. Quả (thường được gọi là hạt sen) chứa một hạt gọi là liên nhục, không nội nhũ. Hai lá mầm dày. Chồi mầm (liên tâm) gồm 4 lá non gập vào phía trong [13].

1.1.2.1. Phân bố

Phân bố nhiều nơi ở Việt Nam [13].

1.1.2.2. Bộ phận dùng

Dùng toàn cây : Hoa, lá, củ, thân rễ [37].

Dân gian thường dùng tươi hoặc khô.



(a)



(b)



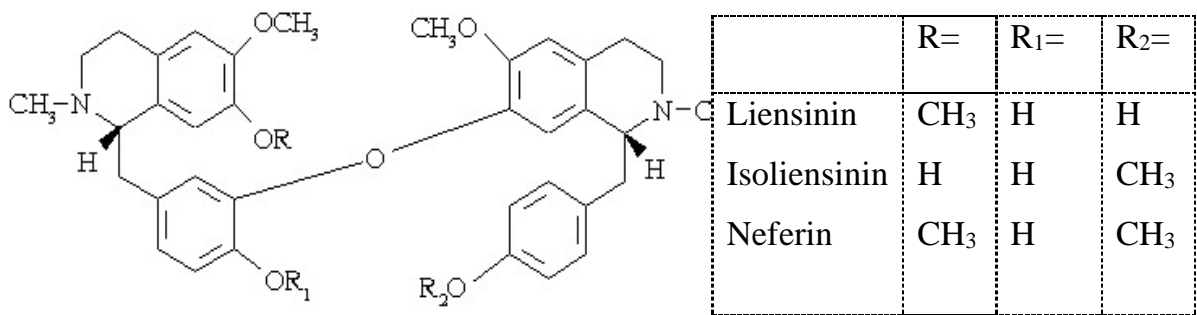
(c)

Hình 1.1. Một số bộ phận của cây Sen

(a) Hoa sen (b) Lá sen (c) Ngó sen

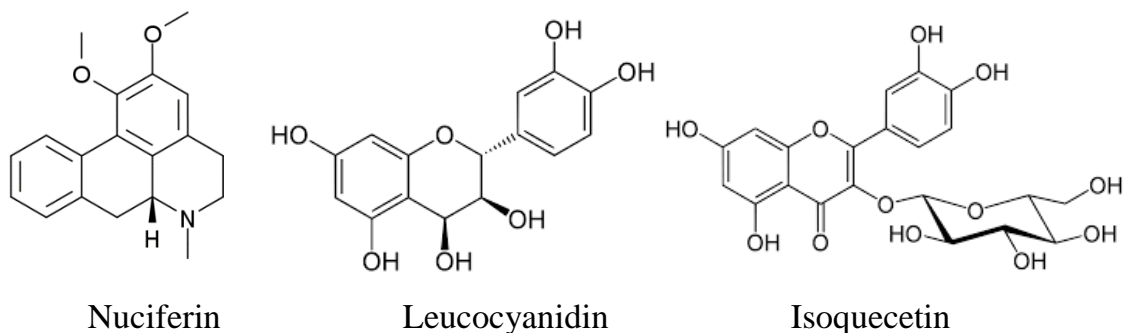
1.1.2.3. Thành phần hóa học

Theo Mukherjee và cộng sự (2009) chứng minh từng bộ phận của cây sen đều có nhóm hoạt chất liên quan tới các tác dụng dược lý khác nhau như: alkaloid, acid béo, đường, vitamin,... Trong phiôi của sen các hoạt chất alkaloid khác nhau như: liensinin, isoliensinin, neferin [37].



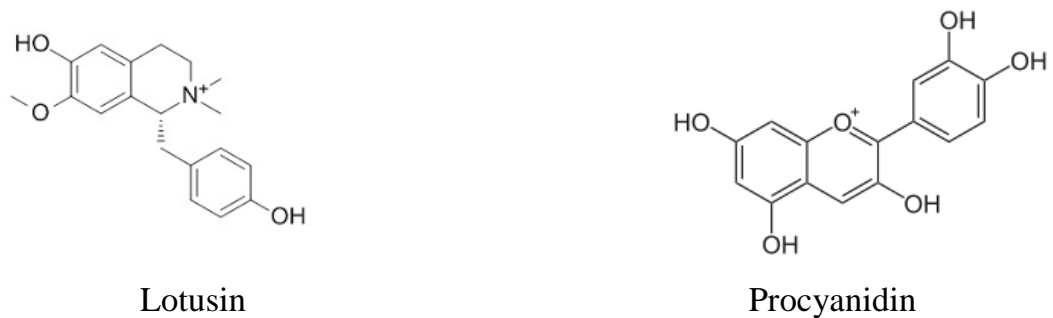
Hình 1.2. Thành phần hóa học trong phiôi của sen

Trong lá sen chứa các chất hóa học như: nor – nuciferin, nuciferin, remerin và hai alkaloid đối kháng với serotonin: asimilobin và lirinidin. Hai alkaloid trên đều ức chế sự co bóp động mạch thỏ gây ra bởi serotonin. Ngoài ra, alkaloid nelumbin cũng được chứng minh trong lá và cuống của cây sen gây ảnh hưởng trên tim [37]. Sharma và cộng sự (2016) cũng phân lập được trong có thêm một số hoạt chất như nelumbosid, isoquercetin, leucocyanidin, leucodelphinidin [45].



Hình 1.3. Thành phần hóa học trong lá sen

Trong mầm của hạt sen chưa nảy mầm chứa lượng lớn glutathion. Khi hạt nảy mầm và phát triển thì lượng glutathion ngày càng giảm. Ngoài ra, hạt sen còn chứa các alkaloid như liensinin, lotusin, ..., acid béo [37].



Hình 1.4. Thành phần hóa học trong hạt sen

Trong dịch chiết nước và ether của hoa sen đều có flavonoid: quercetin, luteolin, isoquercetin và glucoluteolin, glycoside kaempferol. Các chất này có tác dụng làm săn se niêm mạc ruột nên giảm tiêu chảy trong dịch tả [37].

1.1.3. Tác dụng dược lý

1.1.3.1. Nghiên cứu tại nước ngoài

Tác dụng chống oxy hóa

Theo Chen và cộng sự (2018) chứng minh dịch chiết methanol của vỏ hạt sen có khả năng chống oxy hóa trong mô hình in vitro gồm các phương pháp: DPPH, ABTS, FRAP. Tác dụng được chứng minh do flavonoid (procyanidin) và tanin (epicatchin) là chủ yếu [18]. Năm 2018, Jiang và cộng sự đã phân lập các flavonoid mới: nelumbosid (A-D) và các alkaloid, chứng minh tác dụng chống oxy hóa của các chất trên trong mô hình dùng L-ascorbic là chất đối chứng [25].

Tác dụng kháng steroid

Năm 2015, Paudel và cộng sự cho thấy dịch chiết ether của hạt sen ức chế sản sinh các hormon steroid. Nghiên cứu được thực hiện ở tinh hoàn và buồng trứng chuột, kết quả cho thấy làm chậm sự phát triển sinh dục đối với chuột cái còn đối với chuột đực thì giảm khả năng di chuyển và số lượng tinh trùng [42]. Theo Mehta và cộng sự (2013) dịch chiết từ ethanol của hạt sen gây ra sự ức chế estrogen ở chuột cái do tác dụng kháng steroid [34].

Tác dụng kháng virus

Theo Jiang và cộng sự (2011) các chiết xuất phân đoạn của ngó sen gồm chủ yếu là polysaccharid, galocatechin, protein,..., có khả năng ức chế enzyme phiên mã ngược của HIV-1, điều chỉnh các TNF- α có thể ức chế trực tiếp virus [26].

Tác dụng miễn dịch

Năm 2012, Karki và cộng sự đã chứng minh dịch chiết lá sen có tác dụng ức chế tăng nồng độ IgE trong máu, hoạt động của đại thực bào, thúc đẩy tăng trưởng của lớp biểu bì trong mô hình viêm da dị ứng gây bởi 2,4-dinitrochlorobenzen [27].

Tác dụng kháng viêm

Năm 2019, Moon Seong và cộng sự đã phân lập protein của hạt sen và chứng minh tác dụng kháng viêm trong đại thực bào RAW264.7 được kích thích bởi polyliposaccharid. Protein của hạt sen làm giảm sản xuất protein gây viêm, nitric oxid và enzyme COX-2, TNF- α ,... [35].

Tác dụng hạ glucose huyết

Supasorn Sakuljaitrong (2013) đã chứng minh dịch chiết của hoa sen có tác dụng hạ đường huyết, trên chuột đái tháo đường, Dịch chiết cho thấy tác dụng cải thiện khả năng dung nạp glucose trên mô hình gây bệnh đái tháo đường. [47].

Tác dụng ngăn ngừa tái hẹp lòng mạch và xơ vữa động mạch

Theo Karki và cộng sự (2013) dịch chiết từ lá và rễ sen có tác dụng giảm hẹp diện tích thành mạch trong vòng 4 tuần ở chuột [28]. Bên cạnh đó, Lee và cộng sự (2010) cho thấy trong mô hình thỏ bị xơ vữa động mạch do chế độ ăn nhiều cholesterol, dịch chiết lá sen cũng ức chế sự tăng sinh và di chuyển các tế bào cơ trơn mạch máu (VSMC - vascular smooth muscle cells), cải thiện nồng độ cholesterol trong huyết tương [32].

Tác dụng chống loạn nhịp

Qian và cộng sự cho thấy các hợp chất như dauricin và neferin, được phân lập từ hạt sen có tác dụng trên tim mạch. Các chất có tác dụng chống loạn nhịp và ức chế kết tập tiểu cầu ở thỏ [43].

Trong tâm nhĩ lợn, tác dụng kích thích của adrenalin bị suy giảm bởi nerferin ở liều 30 μ mol/l. Tương tự adrenalin, isoprenalin cũng bị ức chế bởi nerferin liều 30 μ mol/l, tương tự với tác động của propranolol. Ngoài ra, nerferin chặn kênh Ca²⁺ giống với verapamil [33].

Tác dụng bảo vệ gan

Năm 2014, Lin Yuan và cộng sự đã đánh giá tác dụng bảo vệ gan của dịch chiết ethyl acetat và butanol từ lá sen trong mô hình gây độc tế bào gan bởi CCl₄. Giá trị GPT và GOT trong các nhóm điều trị đã giảm đáng kể sau khi dùng các dịch chiết với liều 523mg/kg; và 261,5mg/kg. Dịch chiết butanol còn có tác dụng hiệu quả ở mức liều thấp hơn là 130,8mg/kg [53].

Tác dụng điều trị xơ phổi

Năm 2005, Xiao và cộng sự đã chứng minh tác dụng của isoliensinin – hoạt chất phân lập từ hạt sen trên chuột bị gây xơ phổi bằng bleomycin. Nghiên cứu đã chứng minh isoliensinin ức chế hydroxyprolin, giảm chấn thương mô học ở phổi, ức chế yếu tố hoại tử TNF- α , TGF- β 1 [52].

Tác dụng chống béo phì

Năm 2010, Wu Cheng và cộng sự đã chứng minh flavonoid từ dịch chiết lá sen có tác dụng giảm hoạt động của enzyme FAS (fatty acid synthase), glutamic oxaloacetic transaminase, tăng phosphoryl hóa protein kinase kích hoạt bởi AMP trong gan làm giảm tích lũy lipid và trọng lượng chuột [50].

Tác dụng chống ung thư

Trong số các alkaloid được phân lập từ cây sen, Zhang và cộng sự (2015) đã chứng minh isoliensinin có tác dụng gây độc tế bào mạnh nhất, chủ yếu bằng cách gây ra apoptosis trên tế bào ung thư vú [54].

1.1.3.2. Nghiên cứu trong nước

Tại Việt Nam, nhiều nghiên cứu về thành phần hóa học của cây sen cũng được thực hiện. Vào năm 2011, Đỗ Châu Minh Vĩnh Thọ “Nghiên cứu thành phần alkaloid trong lá sen”. Năm 2012, Văn Quốc Hoàng nghiên cứu đề tài “Khảo sát thành phần hóa học của lá sen được thu hái ở huyện Điện Bàn, tỉnh Quảng Nam” cho thấy lá sen chứa nhiều nuciferine nhất. Nuciferine chiết ra từ lá sen có công dụng kéo dài giấc ngủ. Ngoài ra, lá sen còn chứa nhiều vitamin C, alkaloid tác dụng an thần mạnh hơn tâm sen. Về hóa học, lá sen chứa 0,2-0,3% tanin, 0,77-0,84% alkaloid trong đó có nuciferine, nor-nuciferine, roemerine, anonain, liriodenin, pro-nuciferine, O-nornuciferine, arneparin, N noramepavin, metyl-coclaurin, nepherin, dehydro roemerine, dehydro nuciferine, dehydroanonain, N-metyl lisococclaurin. Tác giả Nguyễn Văn Đàn trong đề tài “Nghiên cứu độc tính và tác dụng an thần của cao Bình vôi – Lạc tiên – Lá sen – Lá vông nem trên chuột nhắt trắng” vào năm 2014 đã chứng minh cao chiết nước Bình vôi - Lạc tiên - Lá sen - Lá vông nem có tác dụng hợp đồng gây ngủ với thiopental [6]. Năm 2015, Nguyễn Văn Hải và cộng sự đã đề

ngiht chiết xuất nuciferin từ lá sen bằng dầu hỏa. Nuciferin là một trong các alkaloid chính trong lá sen (*Nelumbo nucifera* G., Nelumbonaceae) [9]. Năm 2018, Nguyễn Ngọc Hồng và Trần Thị Kim Ngân đã “Nghiên cứu thành phần hóa thực vật, tác dụng quét gốc tự do và chống oxy hóa của lá sen (*Nelumbo nucifera* Gaertn.)”. Tác dụng chống oxy hóa *in vivo* đã khẳng định khả năng bảo vệ gan của các mẫu cao chiết lá sen trên mô hình chuột nhất trắng bị gây độc bởi CCl₄. Hoạt tính quét gốc tự do 1,1-diphenyl-2-picryl-hydrazyl (DPPH.), nitric oxit (NO.) và chống oxy hóa *in vivo* ở cả cao chiết lá trưởng thành và lá non đều mạnh [11].

1.2. Độc tính cấp

1.2.1. Khái niệm

Độc tính của thuốc là tính chất được biểu hiện bằng tác dụng không mong muốn, có hại cho cơ thể. Độc tính của thuốc có thể nhẹ như thay đổi hành vi, thay đổi vận động, buồn nôn, mẩn ngứa, có thể rất nặng, thậm chí gây tử vong. Độc tính cấp của một chất là độc tính xảy ra sau khi sử dụng một liều đơn với các đường sử dụng khác nhau như uống, tiêm trong da, dưới da, tĩnh mạch, phúc mô, hô hấp [4].

Thử nghiệm độc tính cấp thường được tiến hành sớm trong quá trình phát triển một thuốc nhằm cung cấp thông tin về độc tính tiềm tàng của nó. Thông tin thu thập được là cơ sở để xác định mức độ độc và cơ chế gây độc. Ngoài ra, nghiên cứu độc tính cấp của thuốc trên động vật thí nghiệm còn giúp xác định liều chết trung bình (liều làm chết 50% số động vật thí nghiệm) trong những điều kiện nhất định và được ký hiệu là LD₅₀.

Liều chết (Lethal dose, viết tắt là LD) là liều gây chết động vật thí nghiệm. Liều chết không áp dụng thử cho người mà chỉ thử trên các động vật thí nghiệm, gồm có:

- o Liều chết tuyệt đối (Absolute lethal dose, viết tắt là ALD): ký hiệu là LD₁₀₀, là liều nhỏ nhất gây chết 100% động vật thí nghiệm.
- o Liều chết trung bình (Mean lethal dose, viết tắt là MLD): ký hiệu là LD₅₀ là liều gây chết 50% động vật thí nghiệm.
- o Liều chết tối thiểu: là liều khi thử trên một lô động vật thấy có một con chết.

- o Liều dưới liều chết (Infralethal dose, viết tắt là ILD): còn gọi là liều dung nạp tối đa, ký hiệu là LD_0 là liều lớn nhất không làm chết động vật thí nghiệm. Liều dung nạp tối đa có thể gây độc nhẹ hoặc nặng cho con vật nhưng không gây chết.
- o Liều an toàn (No observed adverse effect level, viết tắt là NOAEL): là mức liều cao nhất mà không gây ra bất kỳ triệu chứng không mong muốn nào có thể quan sát được [4].

1.2.2. Nguyên tắc thử nghiệm độc tính cấp

Thử nghiệm độc tính cấp chủ yếu dựa vào phản ứng toàn ứng hay bất ứng (sống hay chết) của động vật thử nghiệm. Động vật thử nghiệm có thể là chuột nhắt, chuột cống, đôi khi cũng thực hiện trên thỏ, chó, mèo, khỉ... Số lượng ít nhất cho mỗi nhóm là 6 con. Khối lượng các con vật nên xấp xỉ nhau và chênh lệch không nên quá 20%.

Chuẩn bị động vật thử nghiệm: về nguyên tắc, trước khi dùng thuốc phải để cho động vật nhịn đói ít nhất 12 giờ, nước vẫn để uống đầy đủ.

Tiến hành: chia động vật thử nghiệm thành nhiều lô tương tự nhau. Tất cả động vật trong cùng một lô nhận cùng một liều thuốc trong cùng một điều kiện rồi ghi phân suất tử vong trong 24 giờ. Lặp lại thử nghiệm ở các lô kế tiếp với liều gia tăng theo một cấp số lựa chọn.

Sau khi dùng thuốc xong, theo dõi chuột liên tục sau khi cho chuột uống 3 – 4 giờ, rồi định kỳ trong 24 giờ, 48 giờ và 72 giờ, nếu tìm thấy mạch thì thời gian theo dõi chỉ cần 24 giờ. Sau đó thời gian quan sát là từ 7 – 14 ngày [4].

Kết thúc thử nghiệm các động vật sống được ghi lại cân nặng, số động vật tử vong được mổ để khám nghiệm tử thi, bất kỳ sự thay đổi về sinh lý đều được ghi nhận chi tiết. Nếu không thể mổ ngay lập tức, xác cần được đông lạnh để hạn chế phân hủy. Việc mổ phải được thực hiện trong vòng 16 giờ từ khi chết [15].

1.2.3. Các phương pháp tính LD_{50}

Từ số liệu thu được có rất nhiều cách tính LD_{50} . Thông thường, các phương pháp phải dựa vào phép tính số học và đồ thị. Trong các phép tính số học, có phương

pháp tính theo trị số của liều dùng như phương pháp Behrens, phương pháp Karber – Behrens,..., có phương pháp theo logarit của liều như phương pháp Spearman – Karber, phương pháp Bliss, ...

Khi vẽ đồ thị, có phương pháp dùng giấy kẻ milimet như phương pháp Behrens, phương pháp Behrens – Karber, có phương pháp sử dụng giấy kẻ logarit – probit như phương pháp Miller – Tainter, phương pháp Litchfield – Wilcoxon.

Các trường hợp không xác định LD₅₀

❖ Không thể xác định được LD₅₀

Có nhiều thuốc cho uống với liều uống rất cao mà thú vật thử nghiệm không chết. Ví dụ, được liệu sau khi chiết và cô lại chỉ có thể cô đến mức độ đặc nhất có thể qua kim để cho chuột uống. Chuột nhất trắng được cho uống tối đa với liều từ 0,2 – 0,4 ml/10g thể trọng chuột nhưng chuột vẫn không chết. Như vậy không thể xác định được LD₅₀ của thuốc.

❖ Không muốn xác định LD₅₀

Ví dụ, qua thăm dò nghiên cứu thấy một thuốc có liều tác dụng ở người là 0,6 mg/kg. Chuột nhất trắng được cho uống với liều gấp 500 lần liều tác dụng ở người nhưng vẫn không chết.

Có 2 cách xử lý trong trường hợp này:

- Tiếp tục cho chuột dùng liều cao hơn cho đến khi có chuột chết để xác định LD₅₀.
- Do chuột đã dùng thuốc ở liều gấp 500 lần so với người tính cho 1 kg cân nặng mà chuột vẫn không chết, điều đó cho thấy thuốc có độ an toàn cao, nên không muốn thử tiếp liều cao hơn để xác định LD₅₀ [4].

1.3. Đại cương về đau

1.3.1. Định nghĩa về đau

Định nghĩa đau của Hiệp hội nghiên cứu đau quốc tế (International Association for the Study of Pain - IASP) năm 1994: “Đau là một cảm giác khó chịu và sự chịu đựng về cảm xúc có liên quan đến tổn thương mô hiện có hoặc tiềm tàng, hoặc được mô tả như tổn thương tương tự.”[2]

1.3.2. Cơ chế gây đau

Khi kích thích đau, nhờ có neuron cảm giác, kích thích đi vào sừng sau của tủy sống, tiếp xúc với bó Dejerine, chạy chéo qua chất xám sang phía đối lập rồi lên đến đồi thị, để lên vỏ não. Bó Dejerine còn gọi là bó tủy – đồi thị.

Sau khi xung đau được truyền tới não có rất nhiều cấu trúc dưới não cùng tham gia tạo phản ứng đau như: cấu tạo lưới (formatio reticularis), đồi thị (thalamus), vùng dưới đồi (hypothalamus), hệ viền (limbic).

Tiến trình gây đau được điều chỉnh bởi chất truyền thần kinh ức chế và chất truyền thần kinh kích thích cũng như các đáp ứng về tâm lý và sinh lý. Từ khi chịu kích thích đến khi nhận biết cảm giác đau phải trải qua 4 quá trình cơ bản [10]:

- Sự tải nạp (transduction): là tiến trình mà kích thích có hại được chuyển thành tín hiệu điện tại receptor đau.
- Sự dẫn truyền (đường truyền lên-transmission): là quá trình phát tán tín hiệu dọc theo màng tế bào thần kinh, nhờ các chất kích thích như PG, các chất trung gian gây viêm làm thay đổi tính thấm của màng tế bào thần kinh tạo dòng Na^+ đi vào, K^+ đi ra gây khử cực màng. Xung lực điện được truyền từ receptor đau đến sừng lưng tủy sống đến đồi thị, cuối cùng là vỏ não và các phần khác của não để được xử lý.
- Sự điều chỉnh (đường truyền xuống-modulation): neuron từ đồi thị và cuống não phóng thích chất truyền ức chế như norepinephrin, serotonin, GABA, glycin, endorphin và enkephalin để ức chế chất P và các chất truyền thần kinh kích thích khác của sợi truyền lên.
- Nhận biết cảm giác đau (perception): Sự nhận biết cảm giác đau không những chịu ảnh hưởng của sự sản sinh hoặc xử lý các tín hiệu đau bất thường mà còn của các đáp ứng xúc cảm về tâm lý và kinh nghiệm đau có trước. Sự nhạy cảm hóa ở ngoại biên và trung ương: trong điều kiện dẫn truyền bình thường có sự cân bằng giữa chất dẫn truyền kích thích và chất truyền ức chế. Tuy nhiên, sự cân bằng này có thể thay đổi ở ngoại biên và trung ương dẫn đến nhạy cảm và đáp ứng quá độ [10].

1.3.3. Cơ chế tác dụng của thuốc giảm đau

Có nhiều cơ chế như: làm tăng ngưỡng đau, làm thay đổi giá trị cảm giác đau hoặc làm giảm khả năng tiếp nhận kích thích đau [5].

- Làm tăng ngưỡng đau: những thuốc tác dụng theo cơ chế này là thuốc giảm đau vì khi ngưỡng đau tăng lên, những kích thích trước đây gây đau nay trở thành kích thích dưới ngưỡng, dẫn đến không cảm nhận được đau.
- Làm thay đổi giá trị cảm giác đau, tức là làm cảm giác đau ít khó chịu hơn.
- Làm giảm khả năng tiếp nhận kích thích đau: qua các cơ chế thần kinh thể dịch, có những yếu tố vật lý, hóa học, sinh học tác động lên các thụ thể đau làm cho bệnh nhân giảm khả năng tiếp nhận các kích thích đau, kể cả những chất nội sinh gây đau như bradykinin, histamin, prostaglandin, serotonin.

1.3.4. Thuốc giảm đau và các mặt hạn chế

Thuốc giảm đau được chia làm 3 loại:

- Thuốc giảm đau loại morphin gồm morphin và các dẫn xuất opioid: codein, fentanyl, tramadol, oxymorphon, hydrocodon,...

Tác dụng giảm đau là do thuốc kích thích trên receptor mu (μ), kappa (κ). Morphin ức chế các điểm chốt trên đường dẫn truyền cảm giác đau của hệ thần kinh trung ương như tủy sống, hành tủy, đồi thị và vỏ não [14].

- Thuốc giảm đau không phải opioid hoạt động với cơ chế ức chế nên ức chế COX thành lập PG, đặc biệt: PGE2. Chúng được chỉ định trong các trường hợp giảm đau nhẹ và trung bình, cấp và mạn. Gồm: acetaminophen, aspirin và NSAIDs [10].
- Thuốc giảm đau hỗ trợ có tác dụng hiệp đồng, làm tăng tác dụng giảm đau của opioid và các thuốc không phải morphin. Đặc biệt đối với đau do thần kinh [8].
- Thuốc chống trầm cảm bao gồm: TCA, MAOIs, SNRIs.
- Thuốc chống động kinh: phenytoin, carbamazepin, valproat, gabapentin.

Để giảm đau cho các bệnh thần kinh do đái tháo đường, zona, đau dây thần kinh, dự phòng cơn đau nửa đầu, có thể dùng các thuốc như sau: phenytoin, carbamazepin và valproat [14]

Tổ chức y tế Thế giới khuyến cáo sử dụng thuốc theo bậc thang giảm đau:

- Bậc 1 (đau nhẹ): dùng các thuốc giảm đau loại không phải morphin như paracetamol, các thuốc kháng viêm không steroid (NSAIDs).
- Bậc 2 (đau vừa): phối hợp các thuốc opioid yếu (codein, oxycodon) với paracetamol, thuốc kháng viêm không steroid hoặc các thuốc giảm đau hỗ trợ.
- Bậc 3 (đau nặng): dùng thuốc giảm đau loại opioid mạnh: morphin, hydromorphon, methadon,... phối hợp với NSAIDs [14].

1.3.5. Các mô hình giảm đau thực nghiệm

1.3.5.1. Các phương pháp gây đau bằng nhiệt

Trong phương pháp này, các tác nhân gây đau sử dụng là nhiệt độ. Nhiệt độ ở đây có thể dùng bóng đèn điện công suất lớn, có khi lại thêm kính hội tụ để tập trung ánh sáng vào điểm kích thích, dùng bức xạ nhiệt, dùng nước nóng hoặc dùng tấm kim loại nóng. Vị trí tác động thường là da, đuôi hoặc chân chuột. Nơi tác động thường là da, đuôi hoặc chân chuột. Thông số cần được xác định là “tiềm thời” (latency time) - thời gian từ khi chuột tiếp xúc với kích thích nhiệt đến khi chuột nhận cảm được tổn thương thông qua các biểu hiện như kêu chít chít, quấy đuôi, liếm chân, da mấp máy, co cơ da...[5].

Mô hình 1: Gây đau bằng tấm nóng trên chân chuột (Woolfe và McDonald, 1944)

Để chuột lên một tấm kim loại nóng hoặc làm nóng trên bề mặt kính có nhiệt độ $55^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$, bên trong có một khung hình trụ rỗng 2 đầu để giữ chuột [3]. Được làm nóng bởi chất lỏng sôi. Mô hình đánh giá hoạt động của trên não, các phản ứng xảy ra là phản ứng tích hợp trên tủy [22]. Nhiệt ở tấm nóng làm đau chân chuột, nhận biết qua các biểu hiện liếm chân hoặc nhảy lên, bám lên mép của khung. Ghi nhận tiềm thời trước khi dùng thuốc 60, 30 phút; sau khi dùng thuốc 0, 30, 60, 90 và 120 phút. Tiềm thời nhận cảm đau của chuột bình thường là từ 10 – 20 giây. Đối với chuột đã dùng thuốc, nếu sau 30 giây, chuột vẫn chưa cảm nhận được đau thì ngừng và ghi nhận tiềm thời là 30 giây. Thuốc có tác dụng giảm đau trong mô hình này sẽ có tiềm thời dài hơn so với lô không dùng thuốc [5], [49]. Mô hình phù hợp với

nghiên cứu thuốc giảm đau opioid (thuốc giảm đau gây ngủ). Tuy nhiên, Jacob và Bosovski nếu dùng nhiệt độ cao hơn ở 65°C thì Natri salicylat cũng có tác dụng [5].

Mô hình 2: Gây đau bằng nước nóng trên đuôi chuột (Ben-Bassat và cộng sự, 1959)

Tác nhân gây đau trong mô hình này là nước nóng. Nhúng đuôi chuột được đánh dấu khoảng 5 cm trong nước nóng ở nhiệt độ chính xác khoảng 55°C, chuột sẽ cảm nhận được đau mà biểu hiện là đuôi quẫy mạnh hoặc giật đuôi ra khỏi nước. Sau khi nhấc chuột ra khỏi nước thì lau khô đuôi. Thời gian từ khi nhúng đuôi chuột vào nước nóng đến khi đuôi chuột quẫy mạnh gọi là tiềm thời cảm nhận đau, thường dưới 5 giây. Thời gian này được ghi nhận bằng đồng hồ bấm giây, đơn vị 0,5 giây. Cho chuột dùng chất thử, sau đó lại đo tiềm thời. Nếu chuột không cảm nhận được đau sau 6 giây thì chất này có tác dụng giảm đau. Nếu sau 10s mà chuột không cảm nhận đau thì nhấc đuôi chuột lên và ghi nhận tiềm thời là 10s [10]. Nhúng chuột vào nước ở các khoảng thời gian thử nghiệm được tiến hành 2 lần và cách nhau 15s [49].

1.3.5.2. Các phương pháp gây đau bằng điện

Mô hình 1: Gây đau bằng dòng điện cực ở đuôi chuột (Kakunaga và cộng sự, 1966)

Trong mô hình này chuột được kẹp lên bằng cặp kẹp cá sấu trên đuôi, dòng điện dương được gắn gần cuối đuôi. Các xung sóng được truyền đi từ một nguồn điện ổn định, điện áp không đổi với cường độ 40-50V. Tần số kích thích là 1shock/s với xung thời gian là 2,5ms. Thời gian cảm nhận đau bình thường là 3-4s. Khi dùng thuốc có tác dụng giảm đau thì thời gian cảm nhận có thể là 15 phút [49].

Mô hình 2: Gây đau bằng sốc lưới điện ở chuột (Blake và cộng sự, 1963)

Chuột được đặt lên vỉ lưới điện, khoảng cách giữa các dây là 1mm. Vỉ lưới được nối với nguồn điện và máy đo sóng được tính bằng miliampe. Bật nguồn điện với cường độ dòng điện ngày càng tăng dần để chuột cảm nhận đau. Khi đau chuột giật mình, tăng cường sự vận động, cố gắng nhảy lên. Những hành vi sẽ được đánh dấu trên máy hiện sóng bằng dao động của các xung hiện thị - đau đáp ứng ngưỡng. Ngưỡng đau được đánh giá 2 lần ở mỗi con chuột trước khi dùng thuốc và đánh giá sau khi dùng thuốc 15, 30, 60, 90, 120 phút [49].

1.3.5.3. Các phương pháp gây đau cơ học

Mô hình 1: Gây đau bằng cách ép lên chân chuột (Takesue và cộng sự, 1969)

Mô hình này sử dụng máy đo đau (Algesimeter). Dùng máy này tăng dần áp suất đè lên chân chuột, thì đến một áp suất nào đó, chuột sẽ cảm nhận được đau với các biểu hiện vùng vẫy, giật chân, phát ra tiếng kêu. Áp suất chỉ trên máy lúc này chính là áp suất đau ngưỡng. Dùng một thuốc giảm đau thì khi kích thích chuột ở mức áp suất này, chuột không nhận thấy đau. Muốn chuột cảm nhận được đau, phải tăng mức này lên. Do đó, nếu cho chuột dùng một chất thử mà làm tăng ngưỡng đau có ý nghĩa thống kê thì chất này có tác dụng giảm đau [5].

Mô hình 2: Gây đau bằng cách ép lên chân chuột bị viêm (Chipkin và cộng sự, 1983)

Trên mô hình gây đau bằng cách ép lên chân chuột, áp suất đau ngưỡng rất lớn ở chuột bình thường, thường vào khoảng 10 vạch trên thang 20 vạch của máy đo đau. Mức này có thể làm chuột tổn thương. Nếu trước khi đo áp suất đau ngưỡng, gây viêm chân chuột bằng một chất gây viêm cấp như caragenin thì khi chân chuột bị viêm sưng lên, thì áp suất đau ngưỡng giảm rất nhiều, thường chỉ khoảng 5 vạch trên thang 20 vạch. Tóm lại, nếu cho chuột dùng chất thử mà thấy áp suất đau ngưỡng tăng có ý nghĩa thống kê so với không dùng thì chất này có tác dụng giảm đau [5].

1.3.5.4. Các phương pháp gây đau bằng hóa chất

Mô hình 1: Gây đau bằng acid acetic (Koster và cộng sự, 1959)

Động vật thử nghiệm được tiêm acid acetic vào phúc mô thì phản ứng đau và quá trình viêm diễn ra cấp tính do kích hoạt cảm thụ đau. Hạn chế của mô hình: không chọn lọc do acid acetic hoạt động gián tiếp bằng cách sản sinh các chất trung gian nội sinh kích thích các tế bào thần kinh cảm thụ đau. Acid acetic nhạy cảm với NSAIDs, thuốc giảm đau loại morphin [22].

Sau khi chuột dùng thuốc hoặc chất thử được 1 giờ, tiến hành gây đau bằng cách tiêm phúc mạc dung dịch acid acetic. Dung dịch acid acetic sẽ làm cho chuột đau quặn với các biểu hiện là toàn thân vươn dài, uốn cong người, một hoặc cả hai chân

sau duỗi ra, hóp bụng. Các biểu hiện của đau quặn như trên tạo thành từng cơn. Đếm các cơn quặn đau trong các khoảng thời gian mười phút [5].

Mô hình 2: Gây đau bằng formaldehyd ở chuột (Dubuisson and Dennis, 1977)

Formaldehyd 10% được tiêm vào bàn chân chuột. Tất cả các chân đều được bảo vệ cách ly khỏi trấu hoặc các yếu tố khác. Chuột biểu hiện đau khi liếm, cắn bàn chân. Mỗi con chuột được đặt vào lồng riêng biệt để quan sát. Quan sát tại thời điểm 30, 60 phút và ghi theo thang điểm đau [49]. Ưu điểm của sử dụng formaldehyd trong mô hình làm gây đau cấp tính và gây đau cơ bởi 1 hóa chất duy nhất trong thời gian tương đối ngắn, mang tính sàng lọc các hợp chất mới do mô hình gồm viêm, đau thần kinh và đau cảm thụ [22].

1.4. Đại cương về an thần

1.4.1. Ngủ

Ngủ là trạng thái sinh lý không có ý thức và có thể thức tỉnh trở lại do kích thích cảm giác hoặc do kích thích khác [3].

Người ta thường chia giấc ngủ làm hai loại:

- Loại giấc ngủ sóng chậm: Trong giấc ngủ này, các chức năng thực vật đều giảm như giảm nhịp tim, nhịp thở, giảm huyết áp, nhiệt độ, giảm chuyển hoá cơ bản [3].
- Loại giấc ngủ REM (còn gọi là ngủ nghịch thường, khử đồng bộ): Là giấc ngủ sinh lý bình thường, trong lúc đó mắt có cử động nhanh dù vẫn nhắm. Trong giấc ngủ này, não đang hoạt động nhưng không có ý thức. Cứ khoảng 90 phút lại có một giấc ngủ REM xen kẽ vào giấc ngủ sóng chậm [3].

1.4.2. Mất ngủ

Mất ngủ là một tình trạng lâm sàng phổ biến được đặc trưng bởi khó ngủ hoặc khó duy trì giấc ngủ (thường xuyên tỉnh giấc, khó trở lại giấc ngủ sau khi thức dậy hoặc thức dậy sớm vào buổi sáng) [17].

Tỷ lệ mắc các triệu chứng mất ngủ hàng năm ở người trưởng thành dao động từ 35% đến 50% và tỷ lệ rối loạn mất ngủ dao động từ 12% đến 20% [17].

Các yếu tố nguy cơ bao gồm: Trầm cảm, giới tính nữ, người cao tuổi, tình trạng kinh tế xã hội thấp, tình trạng hôn nhân (nguy cơ cao hơn trong ly dị/ly thân so với người đã kết hôn hoặc chưa từng kết hôn) và chủng tộc [17].

Phân loại

- Mất ngủ cấp tính: Nguyên nhân có thể do bệnh tật, thay đổi thuốc hoặc do căng thẳng. Mất ngủ cấp tính nên được điều trị bằng cách giải quyết nguyên nhân cơ bản (nếu có thể) và phối hợp với thuốc an thần, gây ngủ [48].

- Mất ngủ mạn tính: Có thể phát triển khi mất ngủ cấp tính xảy ra kéo dài [40]. Mất ngủ mạn tính được điều trị tốt nhất bằng cách sử dụng các phương pháp không dùng thuốc như liệu pháp hành vi nhận thức [21].

1.4.3. Thuốc an thần, gây ngủ

Thuốc an thần, gây ngủ là thuốc ức chế thần kinh trung ương [2].

❖ Cơ chế tác dụng

Thuốc an thần, gây ngủ ức chế dẫn truyền ở tổ chức lưới của não giữa, làm giảm hoạt động của synap thần kinh chủ yếu bằng cách làm tăng hoạt tính của GABA và glycin – là các chất dẫn truyền loại ức chế, làm thuận lợi cho mở kênh Cl^- . Cl^- vào tế bào, làm tăng ưu cực gây ức chế thần kinh trung ương. Ngoài ra, các thuốc an thần gây ngủ còn tác dụng theo một số cơ chế khác: kích thích receptor của serotonin, ức chế acid glutamic, kháng histamin và ức chế kênh Na^+ [2].

❖ Phân loại:

Theo cấu trúc, các thuốc an thần, gây ngủ được chia thành 3 nhóm:

- Dẫn chất acid barbituric (các barbiturat): Barbitol, pentobarbitol, butobarbitol...
- Dẫn chất benzodiazepin: Diazepam, clonazepam, lorazepam, triazolam...
- Thuốc cấu trúc khác: Buspiron, zolpidem, glutethimid...

1.4.4. Các mô hình an thần thực nghiệm

❖ Mô hình leo cây (Grip test)

Chuột được đặt lên một dây thép dài 50cm, cách mặt đất 45cm bằng hai chân trước. Quan sát khả năng bám trên dây của chuột. Thí nghiệm này đánh giá khả năng đeo bám và phối hợp vận động của chuột, từ đó đánh giá được tác dụng giãn cơ cũng

như tác dụng an thần của thuốc. Hầu hết các thuốc an thần loại diazepam đều có tác dụng giãn cơ [12].

❖ *Mô hình Rota-rod*

Cơ sở của thử nghiệm này là dựa trên khả năng phối hợp thần kinh-cơ, khả năng định hướng không gian, sức căng cơ, khả năng giữ thăng bằng của động vật. Thuốc an thần ức chế thần kinh trung ương, làm giảm phối hợp thần kinh-cơ, giảm khả năng giữ thăng bằng và định hướng không gian nên giảm khả năng đeo bám trên thanh quay của chuột [12].

❖ *Mô hình chuột bơi*

Cơ sở của thử nghiệm cũng là dựa trên sự phối hợp vận động thần kinh-cơ và bản năng sống sót của động vật. Thuốc an thần làm giảm sự phối hợp thần kinh-cơ của động vật, do đó, khi uống thuốc an thần, khả năng bơi của chuột sẽ giảm đi. Thử nghiệm dựa trên sự quan sát chuột bơi trong nước [12].

CHƯƠNG 2. NỘI DUNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Đối tượng nghiên cứu

2.1.1. Dược liệu nghiên cứu

Ngó sen được thu hái tại huyện Hồng Ngự, tỉnh Đồng Tháp.

Ngó sen sau khi rửa sạch đem phơi trong 5 ngày đến khi khô hoàn toàn. Sau đó đem ngó sen khô đi xay nhỏ thành bột.

2.1.2. Động vật thử nghiệm

Chuột nhắt trắng đực và cái, chủng *Swiss albino*, trưởng thành, khỏe mạnh, không dị tật do Viện vắc xin và sinh phẩm y tế Nha Trang cung cấp. Trọng lượng từ 18-26g.

Chuột mua về được nuôi ổn định ít nhất hai ngày trước khi tiến hành thử nghiệm. Chuột được cung cấp thức ăn và nước uống đầy đủ hàng ngày.

2.1.3. Hóa chất

- Nước cất 2 lần.
- Cồn 70 độ, 90 độ.
- Nước muối sinh lý NaCl 0,9% (Công ty CP TM Thiết bị Y tế Vĩnh Phúc).
- Dung dịch acid acetic băng 1% (Fuangdong, Guanghua Chemical Factory, Trung Quốc): dùng để gây đau quặn ở chuột.
- Aspirin PH₈ 500mg (Mekophar, hộp 20 vỉ x 10 viên nén bao phim: thuốc đối chứng trong thử nghiệm giảm đau ngoại biên.
- Morphin chlorhydrate 1‰ (Công ty cổ phần Dược phẩm Trung ương 2): thuốc đối chứng trong thử nghiệm giảm đau trung ương..
- Diazepam (Diazepam 5mg, Vidipha, hàm lượng 5mg diazepam, hộp 10 vỉ x 10 viên nén): thuốc đối chứng dùng trong thử nghiệm an thần.

2.1.4. Dụng cụ và thiết bị

- Bocal nhựa, bocal thủy tinh, kim cho uống, kéo, nhíp.
- Vỉ lưới.
- Bông y tế, kim tiêm (VINAHANKOOK).

- Cốc có mỏ, erlen, phễu thủy tinh, pipet...
- Cân kỹ thuật Kern KP 2400-2N, Đức.
- Cân phân tích hiệu Sartorius, Đức.
- Bếp cách thủy Baths HH-S6, Trung Quốc.
- Đồng hồ bấm giây Q&Q HS-43, Trung Quốc.
- Máy kiểm tra vận động chuột nhắt Mouse Rota-rod (Model: 47650, Ugo Basile).

2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Chiết xuất dược liệu

Cân khoảng 250 g bột ngó sen khô vào cốc có mỏ, làm ẩm lượng bột vừa đủ bằng dung môi cồn 70⁰ (không để dư quá nhiều dung môi ở đáy cốc), làm ẩm trong khoảng 2-3 giờ. Cho dược liệu đã làm ẩm vào bình ngấm kiệt gạn bằng mặt không nén chặt (lượng dược liệu chiếm 2/3 thể tích bình), thêm dung môi vào ngập mặt dược liệu 2-3 cm, đậy kín. Ngâm lạnh trong 24 giờ. Rút dịch chiết với tốc độ khoảng 1 ml/phút, thêm dung môi để luôn tạo một lớp dung môi trên bề mặt khối dược liệu. Kết thúc ngấm kiệt khi đã chiết hết hoặc gần hết hoạt chất dược liệu bằng cách xác định lượng dung môi cho vào gấp 6 – 7 lần lượng dược liệu hoặc lượng cặn khô trong 10 ml dịch chiết cuối cùng phải nhỏ hơn 0,02 g. Tập trung toàn bộ dịch chiết và được cô lại thành cao đặc bằng bếp cách thủy ở nhiệt độ 70⁰C.

Hiệu suất chiết cao tính bằng công thức sau:

$$\text{Hiệu suất H (\%)} = \frac{\text{Khối lượng cao thu được}}{\text{Khối lượng dược liệu đã dùng}} \times 100$$

2.2.2. Phương pháp đo độ ẩm

Sử dụng cân phân tích độ ẩm MB45. Khởi động máy bằng cách nhấn nút ON/OFF. Đầu tiên, gấp một tấm giấy bạc vừa khay cân của máy. Bỏ tấm giấy bạc lên khay cân, đóng nắp lại, bấm TARE, mở nắp ra. Dùng vảy mica trải đều bột dược liệu khô hoặc dùng đũa thủy tinh trải một lớp mỏng cao đều trên giấy bạc (≥ 500 mg), đóng nắp máy lại, bấm START. Máy sẽ được gia nhiệt ở 110⁰C để làm bay hơi nước. Trong quá trình đo, khối lượng mẫu được cân liên tục. Khi sự làm khô kết thúc, độ

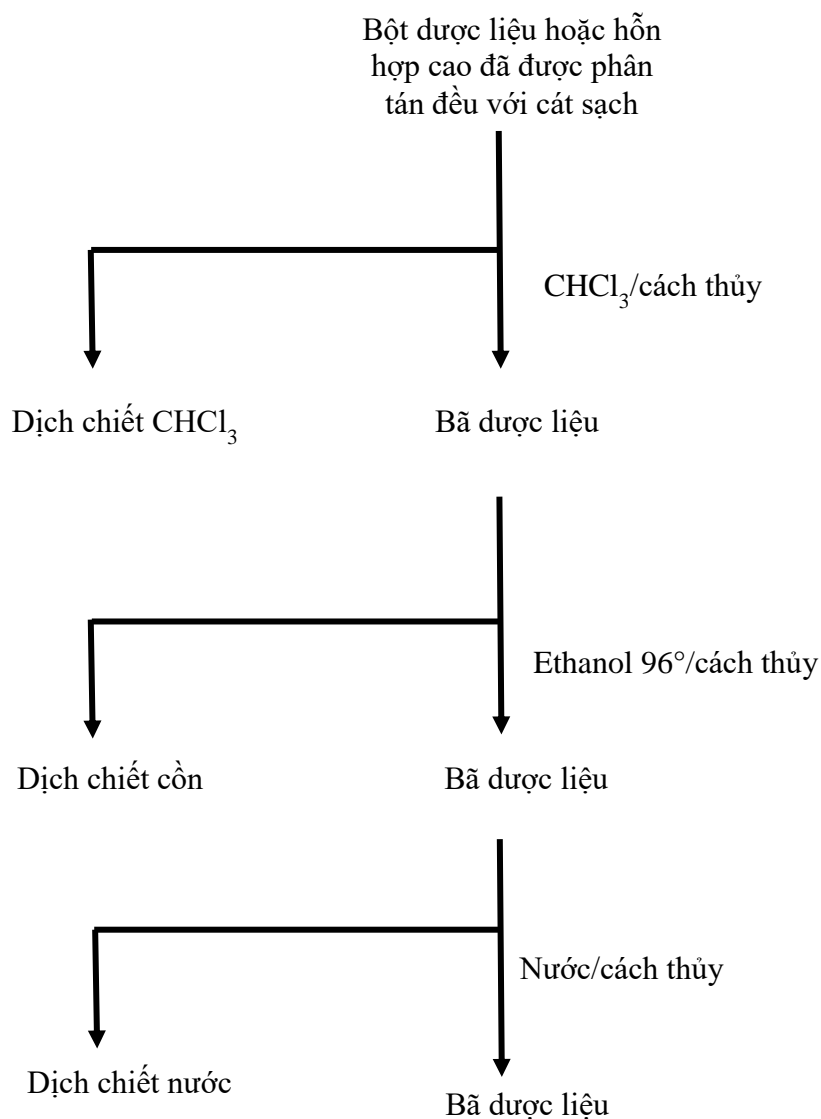
âm của mẫu được hiển thị trên màn hình máy. Sau khi sử dụng máy, vệ sinh và tắt nguồn. Phương pháp thực hiện theo nguyên tắc mất khối lượng do làm khô.

Độ ẩm được xác định theo công thức:

$$\text{Độ ẩm W (\%)} = \frac{\text{Khối lượng đầu} - \text{Khối lượng sau}}{\text{Khối lượng đầu}} \times 100$$

2.2.3. Khảo sát sơ bộ hóa thực vật

Cao chiết được tiến hành khảo sát sơ bộ thành phần hóa thực vật theo quy trình được trình bày như hình 2.1.



Hình 2.1. Quy trình chiết khảo sát sơ bộ thành phần hóa thực vật

Dịch chiết ở từng giai đoạn được tiến hành định tính xác định các nhóm hợp chất

Bảng 2.1. Các phản ứng đặc trưng để xác định các nhóm hợp chất

Nhóm hợp chất	Thuốc thử/cách phát hiện	Phản ứng dương tính
Tinh dầu	Bốc hơi tới cần	Có mùi thơm
Acid béo	Nhỏ dung dịch lên giấy	Vết trong mờ
Carotenoid	H ₂ SO ₄ đậm đặc	Màu xanh dương đậm
Triterpenoid	Hòa cần bằng Anhydrid acetic và CHCl ₃ , cho vào ống nghiệm thêm H ₂ SO ₄ đậm đặc	Vòng nhẫn nâu đỏ đến tím
Alkaloid	Thuốc thử Mayer	Tủa màu trắng-vàng nhạt
	Thuốc thử Bertrand	Tủa trắng
	Thuốc thử Bouchardardat	Tủa đỏ nâu
	Thuốc thử Dragendorff	Tủa đỏ cam
	Thuốc thử Hager	Tủa vàng cam
Coumarin	NaOH 10%	Phát huỳnh quang dưới UV 365
Tannin	Dung dịch FeCl ₃	Màu xanh rêu/xanh đen
	Dung dịch gelatin muối	Tủa bông trắng
Anthraquinon	NaOH 10%	Lớp kiềm từ hồng tới đỏ
Flavonoid (dẫn chất có cấu trúc γ -pyron và γ -dihydropyron)	Mg kim loại, HCl đậm đặc	Dung dịch từ hồng đến đỏ
Anthocyanosid	HCl 10%, NaOH 10%	Màu hồng tới đỏ sau khi thêm HCl 10%, chuyển sang màu xanh khi cho NaOH 10%
Proanthocyanosid	HCl 10%	Màu hồng tới đỏ
Saponin	Lắc mạnh	Tạo bọt bền
Acid hữu cơ	Tinh thể Na ₂ CO ₃	Sủi bọt khí

Nhóm hợp chất	Thuốc thử/cách phát hiện	Phản ứng dương tính
Polyuronic	Cồn 96%	Tủa bông

2.2.4. Khảo sát độc cấp đường uống

Nguyên tắc: Cho chuột thử nghiệm dùng liều cao của cao dược liệu trong điều kiện ổn định ở tất cả các lô, quan sát các phản ứng xảy ra trong vòng 72 giờ và tiếp tục theo dõi đến đủ 14 ngày [4].

Tiến hành: Chia chuột ngẫu nhiên vào các lô, mỗi lô gồm 6 con (3 con đực và 3 con cái). Cho chuột thử nghiệm nhịn đói 12 giờ nhưng vẫn được uống nước đầy đủ trước khi cho uống cao dược liệu liều tối đa có thể qua đường uống (nồng độ đặc nhất có thể qua kim uống đầu dò, thể tích cho uống 0,2 ml/10g trọng lượng chuột). Theo dõi và ghi nhận cử động tổng quát, biểu hiện hành vi, số lượng chuột chết trong 72 giờ và tiếp tục theo dõi đến đủ 14 ngày. Mổ và quan sát đại thể của những con chết và những con sống sau 14 ngày quan sát.

Có 3 trường hợp xảy ra:

Trường hợp 1: Sau khi chuột được uống cao dược liệu, số lượng chuột thử nghiệm trong lô vẫn bảo toàn, xác định liều cao nhất có thể qua kim mà không làm chết chuột thử nghiệm. Liều này ký hiệu là D_{max} và liều tương đối an toàn D_s dùng trong các thử nghiệm dược lý có thể bằng hoặc lớn hơn $1/5 D_{max}$.

Trường hợp 2: Sau khi chuột được uống cao dược liệu, tỷ lệ tử vong là 100% thì thử với liều giảm 1/2 so với liều ban đầu. Tiếp tục giảm liều cho đến khi tìm được liều tối thiểu gây chết 100% chuột (LD_{100}) và liều tối đa không gây chết chuột (LD_0). Tiến hành thử nghiệm xác định LD_{50} : chia chuột làm 4 lô, mỗi lô ít nhất 6 con. Chia 4 liều theo cấp số cộng để xác định từ $LD_0 - LD_{100}$. Ở những liều gần LD_{50} , tăng số lượng chuột mỗi lô lên để kết quả đo lường chính xác hơn. Theo dõi trong 72 giờ, ghi nhận biểu hiện và số lượng chuột tử vong hoặc sống ở các lô, lập phân suất tử vong để tìm LD_{50} . Sau đó áp dụng phương pháp Behrens – Karber để xác định LD_{50} .

Trường hợp 3: Sau khi chuột được uống cao dược liệu, phân suất tử vong thấp hơn 100%, không xác định được liều gây chết tuyệt đối, không thể xác định được LD₅₀. Tuy nhiên trong trường hợp này có thể xác định liều tối đa không gây chết chuột, gọi là liều dưới liều chết (LD₀). Khi đó, liều tương đối an toàn D_s dùng trong các thử nghiệm dược lý có giá trị bằng 1/5 hoặc 1/10 liều LD₀.

2.2.5. Khảo sát tác động giảm đau *in vivo*

2.2.5.1. Khảo sát tác động giảm đau trung ương bằng phương pháp nhúng đuôi chuột

Chuẩn bị chuột: Trước khi thực hiện thí nghiệm, đo tiềm thời cảm nhận đau của chuột. Những con chuột có tiềm thời cảm nhận đau quá 5 giây không được đưa vào thử nghiệm.

Chia chuột (đã thử tiềm thời) ngẫu nhiên vào lô, mỗi lô gồm 9 con. Cho chuột dùng thuốc với thể tích 10 ml/kg thể trọng.

- ❖ Lô chứng: cho chuột uống nước cất.
- ❖ Lô đối chứng: cho uống dung dịch morphin chlorhydrate với liều 5mg/kg.
- ❖ Lô thử nghiệm 1: cho chuột uống cao ngó sen với liều 1,5 g/kg.
- ❖ Lô thử nghiệm 2: cho chuột uống cao ngó sen với liều 3 g/kg.

Chuột được cố định với đuôi thả tự do. Nhúng đuôi chuột vào nước nóng trong bếp cách thủy đã được cài đặt ở nhiệt độ $55 \pm 0,5^\circ\text{C}$. Sử dụng đồng hồ bấm giây để ghi nhận tiềm thời của chuột, bắt đầu từ lúc nhúng đuôi vào nước và kết thúc khi đuôi quẫy mạnh ra khỏi nước. Tiềm thời được ghi nhận tại các thời điểm: trước khi dùng thuốc và ở 30, 60, 90, 120 phút sau khi dùng thuốc. Đo 2 lần liên tiếp, mỗi lần cách nhau 15s ở mỗi thời điểm và ghi nhận tiềm thời dài hơn. Lưu ý: dùng bông gòn lau khô đuôi chuột sau mỗi lần nhúng và rút đuôi chuột ra khỏi nước nóng nếu sau 10 giây chuột vẫn không có phản ứng. So sánh tiềm thời cảm nhận đau giữa các lô. Nếu tiềm thời của lô thử kéo dài hơn so với lô chứng thì chứng tỏ chất thử nghiệm có tác dụng giảm đau trung ương [5].

2.2.5.2. Khảo sát tác động giảm đau ngoại biên bằng phương pháp gây đau quận bằng acid acetic

Chia chuột ngẫu nhiên thành lô, mỗi lô 9 con. Cho chuột dùng thuốc với thể tích 10 ml/kg thể trọng. Chuột được chia thành các lô như sau:

- Lô chứng: cho uống nước cất 2 lần.
- Lô đối chứng: cho uống dung dịch aspirin với liều 50 mg/kg.
- Lô thử nghiệm 1: cho chuột uống cao ngó sen với liều 1.5 mg/kg.
- Lô thử nghiệm 2: cho chuột uống cao ngó sen với liều 3 mg/kg.

Sau khi dùng thuốc 60 phút, tất cả các chuột được gây đau bằng cách tiêm phúc mô dung dịch acid acetic 1% pha trong nước cất. Mỗi chuột được đặt vào bocal thủy tinh riêng. Đếm số lần đau quặn ở chuột (biểu hiện: toàn thân vươn dài, uốn cong người, một hoặc cả hai chân sau duỗi ra, hóp bụng) trong các khoảng thời gian sau, tính từ thời điểm dung dịch acid acetic được tiêm: 5 – 10 phút, 10 – 15 phút, 15 – 20 phút, 20 – 25 phút, 25 – 30 phút, 30 – 35 phút, 35 – 40 phút. So sánh số lần đau quặn ở cùng thời điểm giữa các lô. Nếu số lần đau ở lô thử giảm so với lô chứng thì chứng tỏ chất thử nghiệm có tác dụng giảm đau ngoại biên [5].

2.2.5.3. Khảo sát tác động an thần bằng máy Rota-rod

Chuột được tập chạy trên máy Rota-rod với tốc độ 36 vòng/phút, 3 phút mỗi ngày trong 3 ngày trước khi tiến hành thí nghiệm. Vào ngày thứ 4, những chuột bám trên máy quay Rota-rod trong hơn 3 phút được đưa vào thí nghiệm.

Chia chuột ngẫu nhiên vào các lô, mỗi lô gồm 9 con.

- Lô chứng: Uống nước cất.
- Lô đối chứng: Uống diazepam liều 10 mg/kg.
- Lô thử nghiệm 1: Uống cao ngó sen liều 1,5 g/kg.
- Lô thử nghiệm 2: Uống cao ngó sen liều 3 g/kg.

Cho chuột dùng thuốc với thể tích 10 ml/kg thể trọng chuột. Sau khi uống thuốc 30 phút, đặt chuột lên máy quay với tốc độ 36 vòng/phút. Quan sát trong 10 phút. Ghi nhận thời gian chuột bám trên máy quay ở các thời điểm sau khi dùng thuốc 30, 60, 90 phút của mỗi lô [12].

2.3. Phân tích thống kê kết quả

Các số liệu trong phân kết quả tác dụng giảm đau, an thần được trình bày ở dạng bảng. Sự khác biệt giữa các lô được phân tích bằng phép kiểm Mann-Whitney và phép kiểm Krusal Wallis với phần mềm IBM SPSS Statistic 20.0 và $p < 0,05$ được cho là có ý nghĩa thống kê.

CHƯƠNG 3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Kết quả chiết xuất

Cao đặc ngó sen có thể chất đặc sệt, màu nâu đen, có mùi thơm đặc trưng.



Hình 3.1. Cao còn ngó sen

Bảng 3.1. Hiệu suất chiết của các cao từ ngó sen

	Khối lượng cao (g)	Hiệu suất chiết (%)	Độ ẩm của cao (%)
Cao ngó sen	31,12	20,75	15,35

Nhận xét: Các cao chiết thỏa yêu cầu về độ ẩm của ĐĐVN V [1].

3.2. Kết quả khảo sát thành phần hóa thực vật

Cao đặc dược liệu được trộn với cát mịn với tỉ lệ (1:6). Sau khi cân 5g cao dược liệu và 30g cát mịn, trộn đều cát và cao trên bếp cách thủy để cao phân tán đều và tơi xốp, không vón cục. Sau đó chiết phân đoạn hỗn hợp lần lượt với các dung môi: chloroform, cồn 96°, nước cất. Cô các dung môi đến thể tích thích hợp và thực hiện các phản ứng định tính các thành phần hóa học với các hóa chất khác nhau.

Sự hiện diện các thành phần hóa học được xác định bởi các phản ứng định tính hóa học và thể hiện kết quả trong bảng 3.2.

Bảng 3.2. Kết quả khảo sát thành phần hóa thực vật từ cao ngó sen

Nhóm hợp chất	Dịch chiết nước	Dịch chiết EtOH	Dịch chiết CHCl ₃	Kết quả
Chất béo			-	-
Carotenoid			-	-
Tinh dầu			-	-
Triterpenoid			+	+
Alkaloid	-	+	+	±
Coumarin		-	-	-
Anthraquinon			-	-
Flavonoid	+	+	+	+
Anthocyanosid	-	-		-
Proanthocyanidin	+	+		+
Tanin	-	-		-
Polyphenol	-	-		-
Saponin	+	+		+
Acid hữu cơ	+	+		+
Hợp chất polyuronic	+			+

Ghi chú: (-): âm tính; (+): dương tính; (±): nghi ngờ

Thực hiện phản ứng

Không thực hiện phản ứng

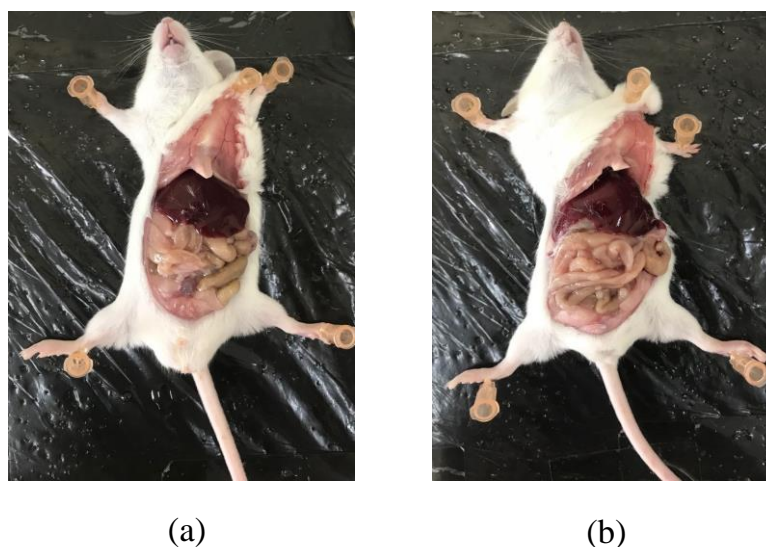
Như vậy các nhóm hoạt chất có trong cao chiết ngó sen gồm: triterpenoid, flavonoid, proanthocyanidin, saponin, acid hữu cơ, hợp chất polyuronic, nghi ngờ có alkaloid.

3.3. Kết quả độc tính cấp đường uống

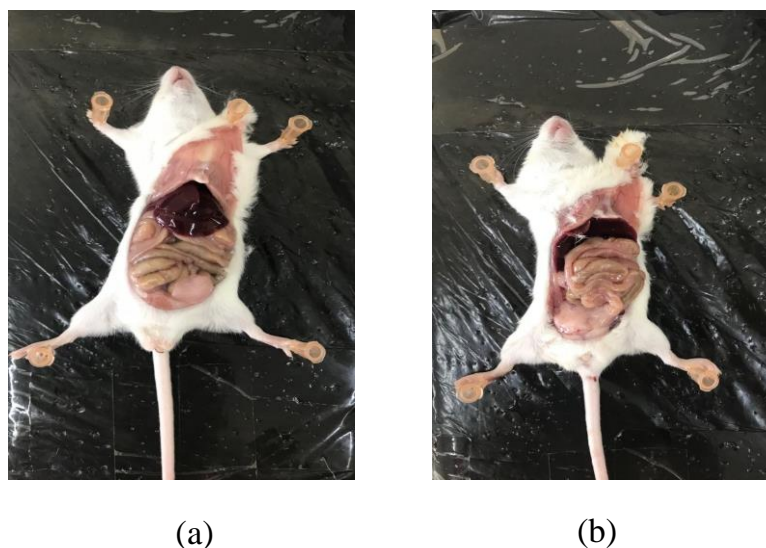
Sau khi khảo sát, đối với cao ngó sen, nồng độ đặc nhất có thể qua kim cho uống là 1,23 g/ml. Chuột được uống thử nghiệm với thể tích 0,5 ml/10g khối lượng, tương ứng với liều 61,6 g/kg.

Quan sát thấy sau 24 giờ đầu ở cao ngó sen, toàn bộ chuột không có dấu hiệu bất thường, vẫn ăn uống bình thường. Tiếp tục quan sát trong 48 giờ và 72 giờ, không có hiện tượng lạ xảy ra. Theo dõi tiếp tục 14 ngày, chuột vẫn sống khỏe mạnh và bình thường.

Chuột được giải phẫu để quan sát các cơ quan trong cơ thể. Kết quả cho thấy không có bất kì thay đổi ở các đại thể như tim, gan, thận, phổi, hệ tiêu hóa.



Hình 3.2. Đại thể (a) chuột đực và (b) chuột cái sinh lý sau 14 ngày



Hình 3.3. Đại thể (a) chuột đực và (b) chuột cái dùng cao ngó sen liều 61,6 g/kg theo đường uống sau 14 ngày theo dõi

Như vậy, cao ngó sen không xác định được LD_{50} , không thể hiện độc tính cấp đường uống với liều tối đa có thể cho uống qua kim (D_{max}) là 61,6 g/kg.

3.4. Khảo sát tác động giảm đau trung ương của cao ngó sen

Chuột tại các lô được dùng thuốc với thể tích 0,1 ml/10g thể trọng. Nhúng đuôi chuột vào nước nóng trong bể cách thủy đã được cài đặt và giữ ổn định ở nhiệt độ $55 \pm 0,5^\circ\text{C}$. Sử dụng đồng hồ bấm giây để ghi nhận tiềm thời của chuột. Tiềm thời được ghi nhận tại các thời điểm: trước khi dùng thuốc và ở 30, 60, 90, 120 phút sau khi dùng thuốc. Kết quả được ghi nhận như bảng 3.3.

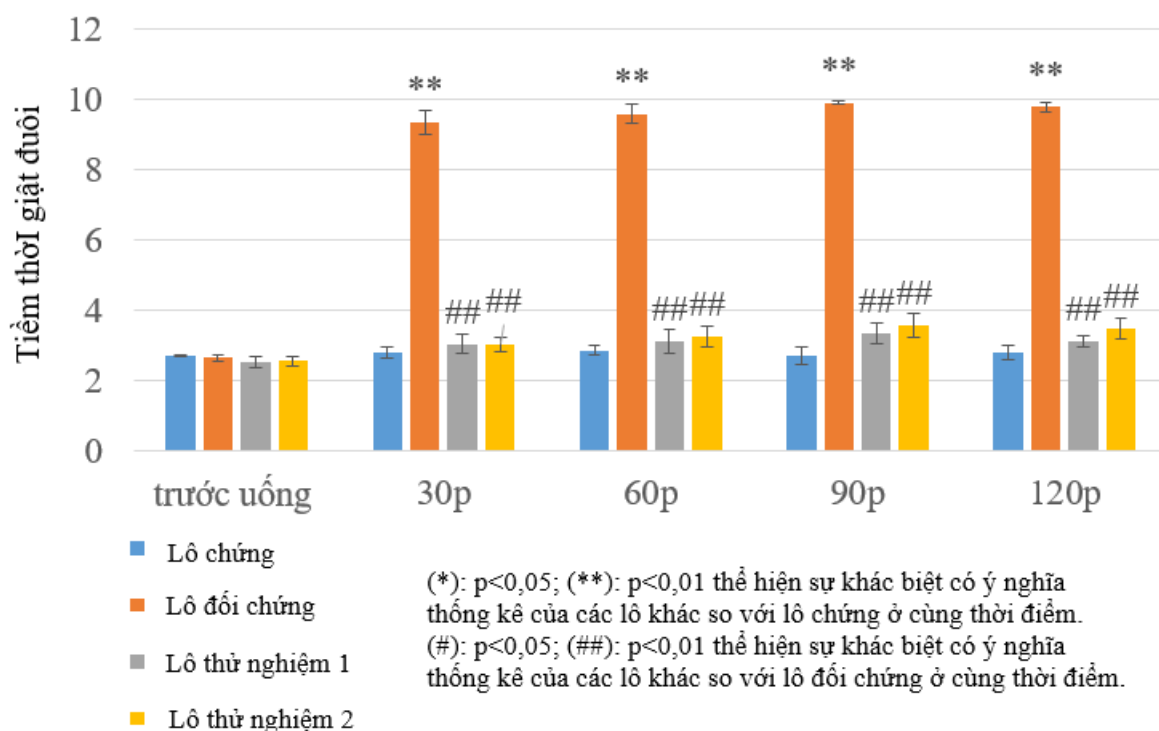
Bảng 3.3. Tiềm thời giật đuôi chuột (giây) của các lô vào các khoảng thời gian

Lô	Trước uống	Sau khi uống			
		30p	60p	90p	120p
Chứng	2,7 $\pm 0,03$	2,8 $\pm 0,15$	2,86 $\pm 0,14$	2,7 $\pm 0,25$	2,8 $\pm 0,22$
Đối chứng	2,65 $\pm 0,08$	9,35** $\pm 0,33$	9,6** $\pm 0,26$	9,92** $\pm 0,06$	9,79** $\pm 0,13$
Lô thử nghiệm 1	2,53 $\pm 0,16$	3,04## $\pm 0,27$	3,13## $\pm 0,34$	3,36## $\pm 0,29$	3,12## $\pm 0,17$
Lô thử nghiệm 2	2,56 $\pm 0,12$	3,04## $\pm 0,2$	3,26## $\pm 0,28$	3,58## $\pm 0,33$	3,48## $\pm 0,29$

Ghi chú:

(**): $p - \text{value} < 0,01$ thể hiện sự khác biệt có ý nghĩa thống kê so với lô chứng ở cùng thời điểm.

(##): $p - \text{value} < 0,01$ thể hiện sự khác biệt có ý nghĩa thống kê so với lô đối chứng ở cùng thời điểm.



Hình 3.4. Tiềm thời giật đuôi giữa các lô vào các khoảng thời gian

Ở giai đoạn trước khi thử nghiệm, tiềm thời giật đuôi ở các lô khác nhau không có ý nghĩa thống kê ($p > 0,05$).

Sau khi uống thuốc thử nghiệm, lô đối chứng dùng morphin liều 5mg/kg đường uống có tiềm thời giật đuôi tăng có ý nghĩa thống kê so với lô chứng trong suốt thời gian thử nghiệm ($p < 0,01$), bắt đầu từ phút 30 và kéo dài đến phút 120, đạt hiệu lực cao nhất ở phút thứ 90. Như vậy morphin liều 5 mg/kg đường uống thể hiện tác động giảm đau trung ương trong mô hình nhúng đuôi chuột.

Lô thử nghiệm 1 sử dụng cao ngó sen với liều 1,5 g/kg có tiềm thời giật đuôi tăng so với lô chứng bắt đầu từ phút 30 và kéo dài đến phút 120 nhưng sự khác biệt này không có ý nghĩa thống kê ($p > 0,05$). Tiềm thời giật đuôi dài nhất của lô thử nghiệm 1 là ở vào khoảng 90 phút sau khi uống cao.

Lô thử nghiệm 2 sử dụng cao ngó sen với liều 3 g/kg có tiềm thời giật đuôi tăng so với lô chứng bắt đầu từ phút 30 và kéo dài đến phút 120 nhưng sự khác biệt này không có ý nghĩa thống kê ($p > 0,05$). Tiềm thời giật đuôi dài nhất của lô thử nghiệm 2 là ở vào khoảng 90 phút sau khi uống cao.

Các lô thử nghiệm sử dụng cao ngô sen liều 1,5 g/kg và 3 g/kg đều không thể hiện tác động giảm đau trung ương, tiềm thời giạt đuôi khác biệt không có ý nghĩa thống kê so với lô chứng ($p>0,05$).

3.5. Khảo sát tác động giảm đau ngoại biên của cao ngô sen

Tất cả các chuột sau khi dùng thuốc 60 phút đều được gây đau bằng tiêm phúc mô dung dịch acid acetic 1% pha trong nước cất. Mỗi con chuột được đặt trong 1 bocal thủy tinh riêng. Đếm số lần đau quặn ở chuột trong các khoảng thời gian liên tục sau khi tiêm acid acetic: 5 - 10 phút, 10 - 15 phút, 15 - 20 phút, 20 - 25 phút, 25 - 30 phút, 30 - 35 phút, 35 - 40 phút. Với lô thử nghiệm 1, kết quả được trình bày như bảng 3.4.

Bảng 3.4. Số lần đau quặn của chuột ở các lô tại các thời gian khảo sát

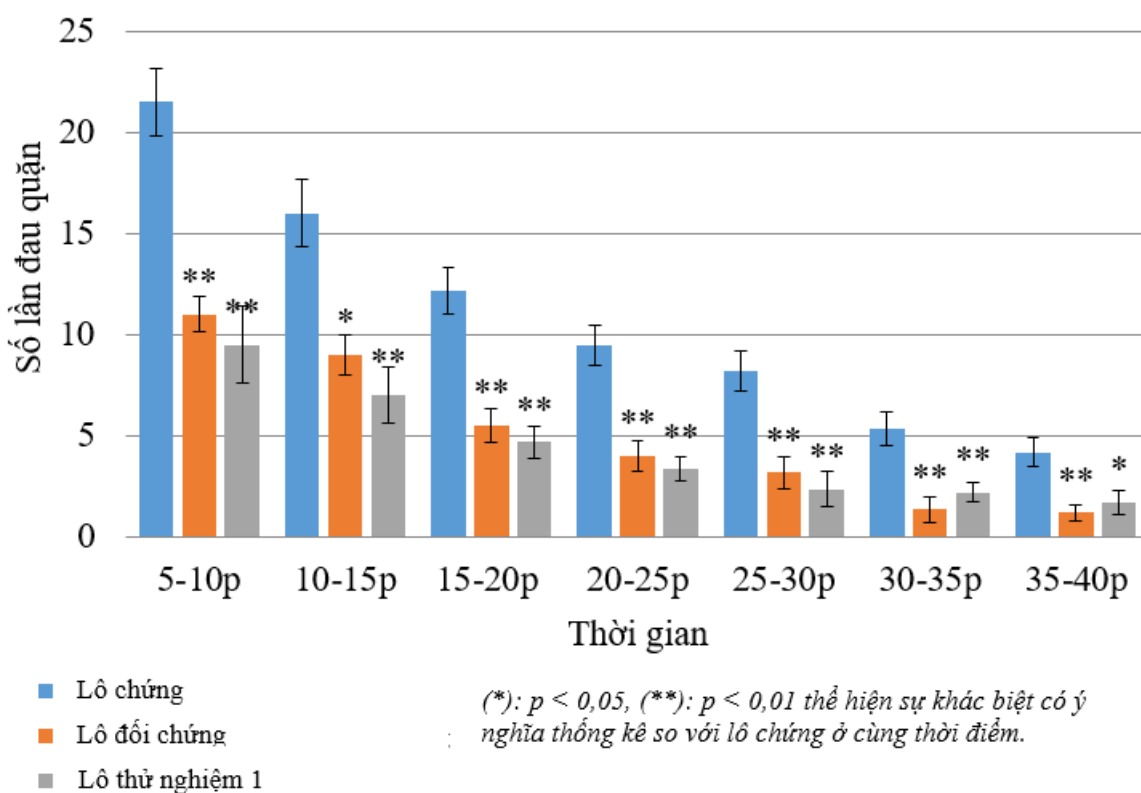
Lô	Thời gian khảo sát						
	5-10p	10-15p	15-20p	20-25p	25-30p	30-35p	35-40p
Chứng	21,5 ±1,65	16 ±1,65	12,17 ±1,14	9,5 ±0,99	8,17 ±0,98	5,33 ±0,84	4,17 ±0,7
Đối chứng	11** ±0,89	9* 0,97	5,5** ±0,85	4** ±0,77	3,17** ±0,79	1,33** ±0,61	1,17** ±0,4
Lô thử nghiệm 1	9,5** ±1,89	7** ±1,39	4,67** ±0,8	3,33** ±0,61	2,33** ±0,88	2,17** ±0,48	1,67* ±0,61
Lô thử nghiệm 2	9,67** ±1,2	6**# ±0,45	3,17**# ±0,17	1,67**# ±0,33	1,67** ±0,49	0,5** ±0,34	0,5** ±0,34

Ghi chú:

(*): $p - value < 0,05$, (**): $p - value < 0,01$ thể hiện sự khác biệt có ý nghĩa thống kê so với lô chứng ở cùng thời điểm.

(#): $p - value < 0,05$: thể hiện sự khác biệt có ý nghĩa thống kê so với lô đối chứng ở cùng thời điểm.

Đối với lô thử nghiệm 1 sử dụng cao ngô sen với liều 1,5 g/kg, kết quả được thể hiện như sau

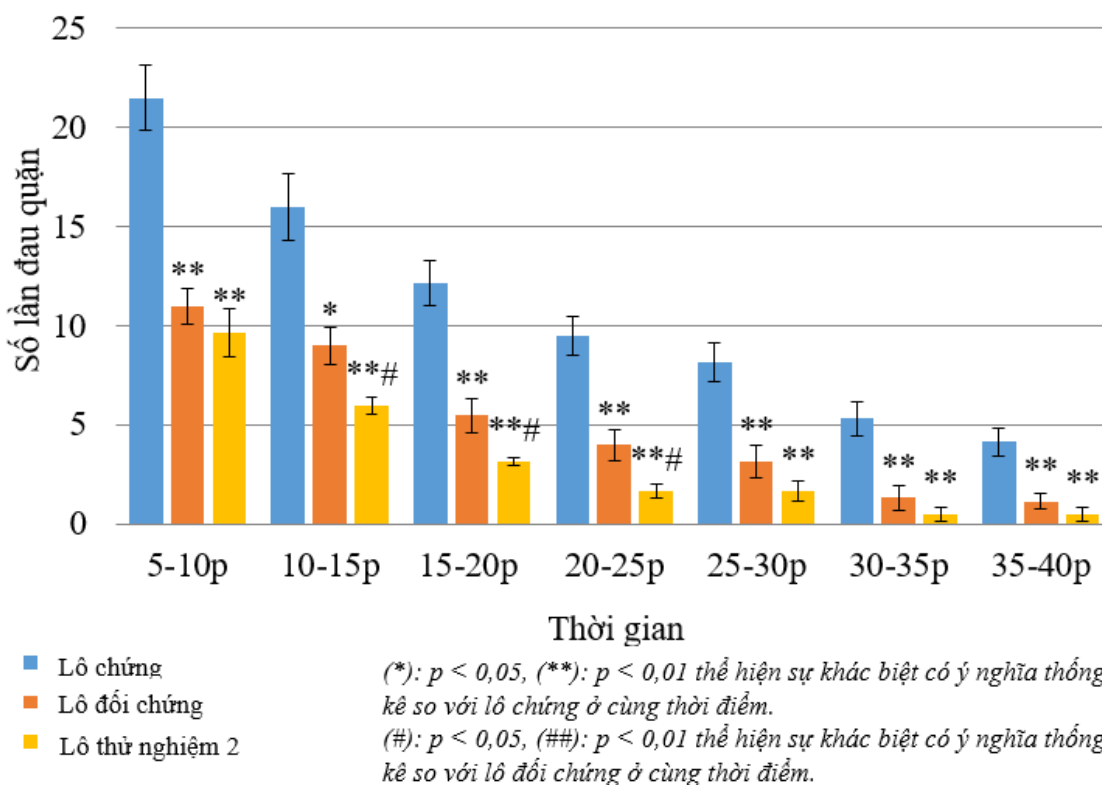


Hình 3.5. Số lần đau quận của lô chứng, lô đối chứng, lô thử nghiệm 1

Số lần đau quận của chuột ở lô đối chứng sử dụng aspirin liều 50mg/kg giảm có ý nghĩa thống kê ($p < 0,05$) so với chuột ở lô chứng bắt đầu từ phút thứ 5 và kéo dài đến hết thí nghiệm. Kết quả cho thấy aspirin có tác dụng giảm đau ngoại biên, được sử dụng làm đối chứng cho mô hình thử nghiệm.

Lô thử nghiệm 1 sử dụng cao ngó sen với liều 1,5 g/kg có số lần đau quận giảm có ý nghĩa thống kê ($p < 0,05$) so với lô chứng trong suốt thời gian thử nghiệm. Ở phút 25-30 số lần đau quận của lô thử nghiệm 1 giảm 3,5 lần so với lô chứng. Vào các khoảng thời gian còn lại số lần đau quận giảm khoảng 2 lần so với lô chứng. So với lô đối chứng, số lần đau quận của lô thử nghiệm 1 giảm hơn từ phút thứ 5 đến phút thứ 30 nhưng sự khác biệt này không có ý nghĩa thống kê ($p > 0,05$).

Với lô thử nghiệm 2, kết quả được trình bày như hình 3.6



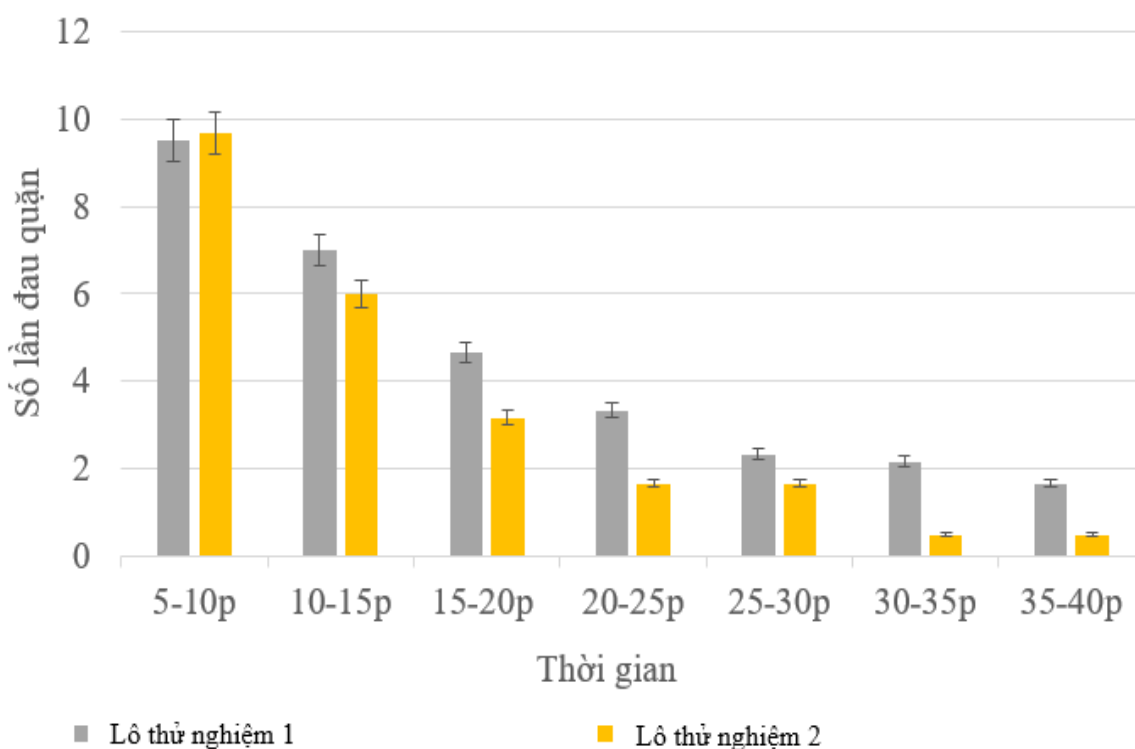
Hình 3.6. Số lần đau quận của lô chứng, lô đối chứng, lô thử nghiệm 2

Lô thử nghiệm 2 sử dụng cao ngô sen với liều 3 g/kg có số lần đau quận giảm có ý nghĩa thống kê ($p < 0,01$) so với lô chứng trong suốt thời gian thử nghiệm. Số lần đau quận của lô thử nghiệm giảm hơn 10,66 lần so với lô chứng ở phút 30-35 trong quá trình thử nghiệm, đây là khoảng thời gian giảm nhiều nhất so với lô chứng.

So với lô đối chứng – lô sử dụng aspirin liều 50 mg/kg, lô thử nghiệm 2 có số lần đau quận giảm hơn và có ý nghĩa thống kê ($p < 0,05$) ở phút thứ 10 đến phút thứ 25.

So với lô đối chứng – lô sử dụng aspirin liều 50 mg/kg, lô thử nghiệm có số lần đau quận giảm hơn và có ý nghĩa thống kê ($p < 0,05$) ở phút thứ 10 đến phút thứ 25. Từ phút thứ 10 đến phút 20 số lần đau quận của lô thử nghiệm 2 so với lô đối chứng giảm khoảng 1,5 lần. Phút thứ 20 - 25, số lần đau của lô thử 2 giảm 2,4 lần so với lô đối chứng.

So sánh tác động giảm đau giữa 2 mức liều của cao ngô sen, kết quả được trình bày như hình 3.7



Hình 3.7. So sánh số lần đau quận giữa 2 lô thử nghiệm

Ở phút thứ 5-10, lô thử nghiệm 2 sử dụng cao ngó sen 3 g/kg có số lần đau quận nhiều hơn lô thử nghiệm 1 sử dụng cao ngó sen 1,5 g/kg nhưng sự khác biệt này không có ý nghĩa thống kê ($p > 0,05$). Ở phút thứ 10 đến phút thứ 40 của lô thử nghiệm 2 lại có số lần đau quận ít hơn lô thử nghiệm 1 nhưng sự khác biệt không có ý nghĩa thống kê ($p > 0,05$).

Như vậy: Lô thử nghiệm sử dụng cao ngó sen liều 1,5 g/kg và 3 g/kg có số lần đau quận giảm có ý nghĩa thống kê so với lô chứng ($p < 0,05$) và khả năng giảm đau khác nhau không có ý nghĩa giữa hai mức liều thử nghiệm. Vậy cao ngó sen ở liều 1,5 g/kg và 3 g/kg thể hiện tác động giảm đau ngoại biên trên mô hình thử nghiệm.

3.6. Khảo sát tác động an thần của cao ngó sen

Sau khi cho chuột ở các lô dùng thuốc với thể tích 10 ml/kg thể trọng chuột. Chuột được đặt lên máy Rota-rod. Ghi nhận thời gian chuột bám trên máy quay ở các thời điểm sau khi dùng thuốc 30, 60, 90 phút của mỗi lô.

Kết quả khảo sát tác động an thần được trình bày như bảng 3.5.

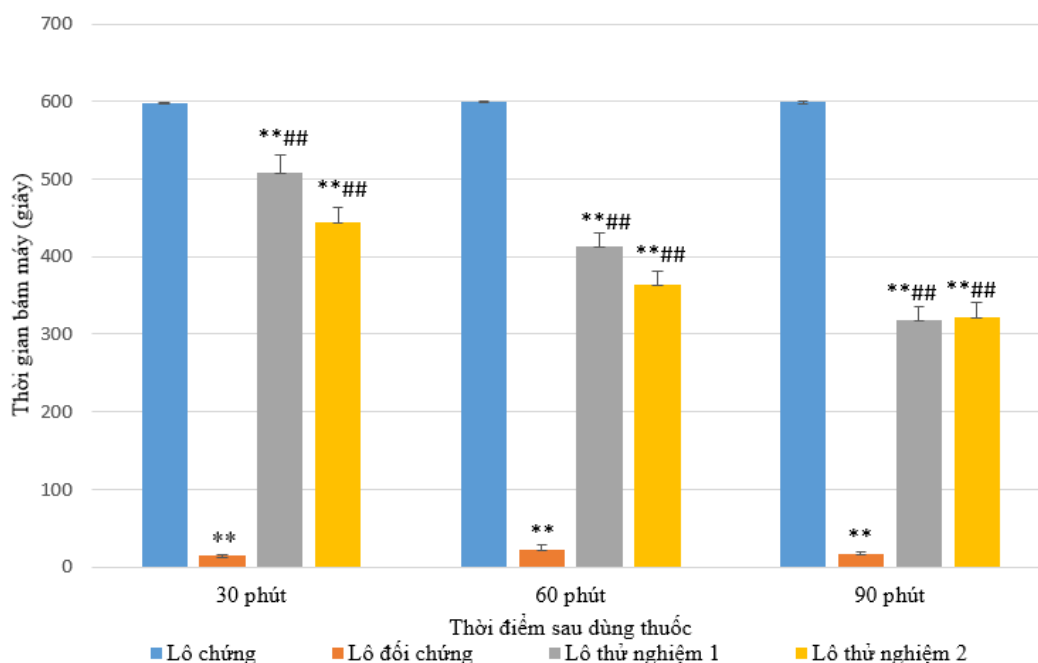
Bảng 3.5. Kết quả khảo sát thời gian bám trên máy Rota-Rod

Lô	Thời gian bám trên máy Rota-Rod (giây)		
	30 phút	60 phút	90 phút
Lô chứng	597,33 ± 1,67	598,78 ± 1,22	598,67 ± 1,11
Lô đối chứng	14** ± 2,6	22,78** ± 5,3	16,22** ± 3,08
Lô thử nghiệm 1	507,78 ***## ± 23,38	412,44***## ± 17,99	318,67***## ± 16,62
Lô thử nghiệm 2	448,89 ***## ± 19,16	363,89 ***## ± 16,73	322,11 ***## ± 18,59

Ghi chú:

(**): p – value < 0,01 thể hiện sự khác biệt có ý nghĩa thống kê so với lô chứng ở cùng thời điểm.

(##): p – value < 0,01 thể hiện sự khác biệt có ý nghĩa thống kê so với lô đối chứng ở cùng thời điểm.



(*): p < 0,05, (**): p < 0,01 thể hiện sự khác biệt có ý nghĩa thống kê so với lô chứng ở cùng thời điểm.

(#): p < 0,05, (##): p < 0,01 thể hiện sự khác biệt có ý nghĩa thống kê so với lô đối chứng ở cùng thời điểm.

Hình 3.8. Thời gian chuột bám trên máy Rota-rod tại các thời điểm sau dùng thuốc của các lô

Lô đối chứng sử dụng diazepam liều 10 mg/kg bằng đường uống cho kết quả an thần có ý nghĩa thống kê so với lô chứng. Điều này chứng tỏ có thể sử dụng thuốc diazepam với liều 10 mg/kg (PO) làm thuốc đối chứng trong mô hình khảo sát tác động an thần.

Tác động làm giảm thời gian bám trên máy quay Rota-rod của cao ngô sen liều 1,5 g/kg và liều 3 g/kg đều khác biệt có ý nghĩa thống kê so với lô chứng ở các thời điểm khảo sát. Tuy nhiên tác động làm giảm thời gian bám trên máy quay Rota-rod của cao ngô sen liều 1,5 g/kg và liều 3 g/kg đều lớn hơn so với lô đối chứng và sự khác biệt này có ý nghĩa thống kê. Như vậy, cao ngô sen thể hiện tác động an thần trên mô hình thực nghiệm, nhưng tác động này yếu hơn so với diazepam 10 mg/kg (PO).

3.7. Bàn luận

3.7.1. Khảo sát về thành phần hóa học

Kết quả nghiên cứu của đề tài cho thấy: Các nhóm hoạt chất có trong cao ngô sen gồm: triterpenoid, flavonoid, proanthocyanidin, saponin, acid hữu cơ, hợp chất polyuronic, nghi ngờ có alkaloid. So sánh với nghiên cứu của Xu Zhao và cộng sự (2014), trong dịch chiết cồn của ngô sen cũng đã tìm thấy sự hiện diện của lượng lớn flavonoid [55].

3.7.2. Khảo sát độc cấp đường uống

Chuột được đưa vào thử nghiệm nhịn ăn không quá 12 giờ, vẫn cung cấp đầy đủ nước để đảm bảo hoạt động sinh lý bình thường của chuột. Sau đó, chuột được dùng liều tối đa qua kim là 61,6 g/kg với thể tích cho uống 0,5 ml/10g thể trọng chuột, đây là thể tích uống tối đa của chuột nhất trắng. Quan sát thấy sau 24 giờ đầu ở cao ngô sen, toàn bộ chuột không có dấu hiệu bất thường, vẫn ăn uống bình thường. Tiếp tục quan sát trong 48 giờ và 72 giờ, không có hiện tượng lạ xảy ra. Theo dõi tiếp tục 14 ngày, chuột vẫn sống khỏe mạnh và bình thường. Chuột được giải phẫu để quan sát các cơ quan trong cơ thể. Kết quả cho thấy không có bất kì thay đổi ở các đại thể như tim, gan, thận, phổi, hệ tiêu hóa. Do đó cao cồn ngô sen không xác

định được LD₅₀, không thể hiện độc tính cấp đường uống với liều tối đa có thể cho uống qua kim (Dmax) là 61,6 g/kg.

3.7.3. Tác động giảm đau trung ương

Các lô thử nghiệm sử dụng với liều cao ngó sen 1,5 g/kg, 3 g/kg không có tác động giảm đau trung ương trong mô hình gây đau bằng phương pháp nhúng đuôi chuột.

3.7.4. Tác động giảm đau ngoại biên

Cao ngó sen liều 1,5 g/kg có tác dụng giảm đau từ phút thứ 5 đến phút thứ 30 ($p < 0,05$). So với lô đối chứng sử dụng aspirin liều 50mg/kg, lô thử nghiệm có số lần đau quặn khác biệt không có ý nghĩa thống kê ($p > 0,05$). Như vậy lô thử nghiệm 1 có tác dụng giảm đau tương đương với aspirin liều 50mg/kg từ phút thứ 5 tới phút 30.

Cao ngó sen liều 3 g/kg có tác dụng giảm đau trong suốt quá trình thử nghiệm ($p < 0,05$). So với lô đối chứng sử dụng aspirin liều 50 mg/kg, lô thử nghiệm có số lần đau quặn giảm hơn có ý nghĩa ($p < 0,05$) ở phút thứ 10 đến phút thứ 25.

Khi so sánh tác động giảm đau ở 2 mức liều, cao ngó sen với liều 3 g/kg có số lần đau quặn giảm hơn có ý nghĩa ($p < 0,05$) ở phút thứ 20 đến phút 25 và từ phút 30 đến phút 35 so với cao ngó sen ở liều 1,5 g/kg. Tuy nhiên sự khác biệt về tác dụng giảm đau giữa 2 mức liều của cao ngó sen không có ý nghĩa thống kê. Như vậy lô thử nghiệm sử dụng cao ngó sen liều 1,5 g/kg và 3 g/kg có số lần đau quặn giảm có ý nghĩa thống kê so với lô chứng ($p < 0,05$) và khả năng giảm đau khác nhau không có ý nghĩa giữa hai mức liều thử nghiệm.

Nghiên cứu về tác dụng giảm đau của cao chiết ngó sen đã được thực hiện trên mô hình động vật thí nghiệm với chất đối chứng là aspirin. Đây là thuốc giảm đau có cơ chế ức chế không chọn lọc trên COX do đó ức chế tổng hợp prostaglandin gây đau, viêm và sốt. Do đó aspirin thường được sử dụng làm thuốc đối chứng trong các mô hình thử tác dụng giảm đau ngoại biên. Trong mô hình này, acid acetic được sử dụng đưa vào phúc mô sẽ gây giải phóng các chất trung gian gây viêm như bradykinin, histamin kích thích các sợi thần kinh truyền tín hiệu tạo ra phản ứng co thắt ở bụng. Kết quả giảm đau này tương ứng với kết quả của một số nghiên cứu

trên thế giới như nghiên cứu của Muhammad Ali Rajput và cộng sự (2019) đã chứng minh hoạt tính giảm đau của dịch chiết hạt và vỏ hạt sen trong mô hình gây đau quận bằng acid acetic tương đương với aspirin. Nghiên cứu cho thấy những bộ phận của cây sen giàu flavonoid, saponin và tannin sẽ có nhiều tiềm năng trong việc hỗ trợ các rối loạn liên quan đến đau [44].

3.7.5. Tác động an thần

Trong thử nghiệm tác động an thần trên máy Rota-rod, cao ngó sen liều 1,5 g/kg và liều 3 g/kg có thời gian bám máy đều lớn hơn so với lô chứng và sự khác biệt này có ý nghĩa thống kê. Như vậy, cao ngó sen thể hiện tác động an thần trên mô hình thực nghiệm, nhưng tác động này yếu hơn so với diazepam 10 mg/kg (PO). Trên thế giới đã có nhiều nghiên cứu chứng minh sự liên quan giữa các bộ phận khác nhau của cây sen với tác động an thần. Trong nghiên cứu *in vitro* vào năm 2015, Mallika Kumarihamy và cộng sự đã chứng minh những dẫn chất chiết từ cây sen như nuciferine, N-nor-nuciferine, asimilobine, arnepavine, O-methylcoclaurine, N-methylcoclaurine, coclaurine, neferine có ái lực với các thụ thể liên quan đến giảm đau và rối loạn hành vi [31]. Vào năm 2021, nghiên cứu của Singeun Kim và cộng sự cũng đã chứng minh được tác động kéo dài thời gian ngủ của dịch chiết lá sen so với nhóm chứng trên mô hình thực nghiệm so sánh với pentobarbital [29].

Như vậy, cao ngó sen cho uống liều 1,5 g/kg và 3 g/kg thể hiện tác động giảm đau, an thần trong quá trình thử nghiệm. Từ đó, kết quả của đề tài cung cấp cơ sở khoa học về tính an toàn và tác dụng dược lý của cao thử, tạo tiền đề nghiên cứu, phát triển các chế phẩm từ cao ngó sen ứng dụng trong phòng và/hoặc điều trị các bệnh liên quan đến rối loạn về đau và thần kinh trên lâm sàng.

CHƯƠNG 4. KẾT LUẬN VÀ KIẾN NGHỊ

4.1. Kết luận

Sau khi khảo sát, đề tài thu được một số kết quả như sau:

Chiết được cao đặc ngó sen dung môi còn 70° với hiệu suất chiết là 20,75%, độ ẩm 15,35% phù hợp với tiêu chuẩn của Dược điển Việt Nam V.

Khảo sát sơ bộ thành phần hóa thực vật cho thấy các nhóm hoạt chất có trong cao còn Ngó sen gồm: Triterpenoid, flavonoid, proanthocyanidin, saponin, acid hữu cơ, hợp chất polyuronic, nghi ngờ có alkaloid.

Khảo sát độc cấp đường uống

Đối với cao ngó sen, nồng độ đặc nhất có thể qua kim cho uống là 1,23 g/ml. Chuột được uống thử nghiệm với thể tích 0,5 ml/10g khối lượng, tương ứng với liều 61,6 g/kg.

Khảo sát tác động giảm đau

Khảo sát tác động giảm đau trung ương: cao ngó sen đều không thể hiện tác động giảm đau trung ương ở liều 1,5 mg/kg, 3 g/kg trên mô hình thực nghiệm.

Khảo sát tác động giảm đau ngoại biên: cao ngó sen cho tác dụng giảm đau ngoại biên trong phương pháp gây đau quận bằng acid acetic so với lô chứng trong suốt thời gian khảo sát. Đồng thời cho tác dụng giảm đau tương đương với thuốc đối chứng aspirin liều 50 mg/kg trên mô hình thực nghiệm.

Khảo sát tác động an thần

Cao ngó sen liều 1,5 g/kg và liều 3 g/kg có thời gian bám máy đều lớn hơn so với lô chứng và sự khác biệt này có ý nghĩa thống kê. Như vậy, cao ngó sen thể hiện tác động an thần trên mô hình thực nghiệm, nhưng tác động này yếu hơn so với diazepam 10 mg/kg (PO).

4.2. Đề nghị

Từ kết quả thu được của đề tài có thể tiếp tục thực hiện theo hướng nghiên cứu như sau:

Chiết phân đoạn cao ngó sen để tinh khiết các hoạt chất có tác dụng dược lý.

Khảo sát thêm tác động dược lý khác như: tác động cầm máu, tác dụng hạ đường huyết... nhằm tạo nhiều cơ sở dữ liệu khoa học về tác dụng dược lý của ngó sen.
Khảo sát các dạng bào chế phù hợp với tác dụng dược lý để tiến hành chuẩn hóa cao chiết ngó sen thành sản phẩm với liều dùng an toàn và hiệu quả.

Chủ nhiệm đề tài
(Ký và ghi rõ họ tên)

TÀI LIỆU THAM KHẢO

Tài liệu tham khảo Tiếng Việt

1. Bộ Y tế (2018), *Dược điển Việt Nam V*, NXB Y Học.
2. Bộ Y Tế (2012), *Dược lý học tập 1*, Nhà xuất bản y học, Hà Nội, tr. 94-95.
3. Bộ Y Tế (2012), *Giải phẫu sinh lý người*, Nhà xuất bản Giáo dục Việt Nam, tr. 388-391.
4. Đỗ Trung Đàm (2014), *Phương pháp xác định độc tính của thuốc*, NXB Y học, Hà Nội, tr.15 – 189.
5. Đỗ Trung Đàm (2017), *Thuốc giảm đau chống viêm và các phương pháp nghiên cứu tác dụng dược lý*, NXB Y học, Hà Nội, tr.17-426.
6. Nguyễn Văn Đán (2014), “Nghiên cứu độc tính và tác dụng an thần của cao bình vôi – lạc tiên – lá sen – lá vông nem trên chuột nhắt trắng”, *tạp chí Y Học TP. Hồ Chí Minh*, 18 (1).
7. Trương Thị Đẹp (2010), *Thực Vật Dược*, NXB Giáo Dục, tr.194-195.
8. Lê Bích Đình, Trần Văn Ôn (2007), *Thực Vật Học*, NXB Y Học, tr.390-392.
9. Nguyễn Văn Hải (2015), “Chiết xuất nuciferin từ lá sen bằng dầu hỏa”, *Tạp chí Dược liệu*, 6, tr.324-328.
10. Trần Thị Thu Hằng (2017), *Dược lực học*, NXB Phương Đông, Hồ Chí Minh, tr.193-211.
11. Nguyễn Ngọc Hồng và cộng sự (2019), “Nghiên cứu thành phần hóa thực vật, tác dụng quét gốc tự do và chống oxy hóa của lá sen (*Nelumbo nucifera* Gaertn.)”, *tạp chí Nông nghiệp & Phát triển Nông thôn*, 23, tr.74-80.
12. Dương Thị Ly Hương, Nguyễn Thị Bích Thủy (2016), “Đánh giá tác dụng an thần, giải lo của bài thuốc “Chè an thần” trên động vật thực nghiệm”, *Tạp chí Dược học*, 481: tr.40-44.
13. Đỗ Tất Lợi (2019), *Những Cây Thuốc Và Vị Thuốc Việt Nam*, NXB Y Học, tr.783-786.
14. Đào Văn Phan (2019), *Dược lý học*, NXB Y Học, Hà Nội, tr.103-116.

Tài liệu tham khảo Tiếng Anh

15. Akhila J.S., Shyamjith, Deepa, Alwar M.C. (2007), “Acute toxicity studies and determination median lethal dose”, *Current Science*, 93(7): p.917-920.
16. Buddhadev S.G., Buddhadev S.S. (2014), “Nelumbo Nucifera The Phytochemical Profile And Traditional Uses”, *Pharma Science Monitor*, 5(3): p.1-12.
17. Buysse, D. J. (2013), “Insomnia”, *JAMA*, 309(7): p.706.
18. Chen H., Sun K., Yang Z., Guo X., Wei S. (2018) “Identification of Antioxidant and Anti- α -amylase Components in Lotus (*Nelumbo nucifera*, Gaertn.) Seed Epicarp”, *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 187(3): p.677-690.
19. Chen G., Zhu M., Guo M., (2019), “Research advances in traditional and modern use of *Nelumbo nucifera*: phytochemicals, health promoting activities and beyond”, *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 59(1): p.189-209.
20. Cole B.E. (2002), “Clinical review article: pain management: classifying, understanding, and treating pain”, *Hospital Physician*, 38(6): p.23-30.
21. Cunnington, D., Junge, M. F., Fernando, A. T. (2013), “Insomnia: prevalence, consequences and effective treatment”, *The Medical Journal of Australia*, 199(8): p.36–40.
22. Dzoyem J.P., McGaw L.J., Kuete V., Bakowsky U. (2017), “Medicinal Spices and Vegetables from Africa”, *Academic Press, USA*, p.239–270.
23. Hayes V., Schneider L.E., and Carlquist S. (2000), “International Journal of Plant Sciences”, *Current Perspectives on Basal Angiosperms*, 161(6): p.183-191.
24. Huang B., He J., Ban X., Zeng H., Yao X., Wang Y. (2011), “Antioxidant activity of bovine and porcine meat treated with extracts from edible lotus (*Nelumbo nucifera*) rhizome knot and leaf”, *Meat Science*, 87: p.46-53.
25. Jiang X.L., Wang L., Wang E.J., Zhang G.L., Chen B., Wang M.K., Li F. (2018), “Flavonoid glycosides and alkaloids from the embryos of *Nelumbo nucifera* seeds and their antioxidant activity”, *Fitoterapia*, 125: p.184-190.

26. Jiang Y., Ng T.B., Liu Z., Wang C., Li N., Qiao W., Liua F. (2011), “Immunoregulatory and anti-HIV-1 enzyme activities of antioxidant components from lotus (*Nelumbo nucifera* Gaertn.) rhizome”, *Bioscience reports*, 31(5): p.381-390.
27. Karki R., Jung M.A., Kim K.J., Kim D.W. (2012), “Inhibitory Effect of *Nelumbo nucifera* (Gaertn.) on the Development of Atopic Dermatitis-Like Skin Lesions in NC/Nga Mice”, *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2012: 7 pages.
28. Karki R., Jeon E.R., and Kim D.W. (2013), “*Nelumbo nucifera* leaf extract inhibits neointimal hyperplasia through modulation of smooth muscle cell proliferation and migration”, *Nutrition*, 29(1): p.268–275.
29. Kim S., Hong K.B., Jo K. (2021), “Quercetin-3-O-glucuronide in the Ethanol Extract of Lotus Leaf (*Nelumbo nucifera*) Enhances Sleep Quantity and Quality in a Rodent Model via a GABAergic Mechanism”, *Molecules*, 26, 3023.
30. Kuo Y.C., Lin Y.L., Liu C.P., and Tsai W.J. (2005), “Herpes simplex virus type 1 propagation in HeLa cells interrupted by *Nelumbo nucifera*”, *Journal of Biomedical Science*, 12(6): p.1021– 1034.
31. Kumarihamy M., et al (2015), “In vitro opioid receptor affinity and in vivo behavioral studies of *Nelumbo nucifera* flower”, *J Ethnopharmacol*, 174 (4), p.57- 65
32. Lee H.J., Chen C.C., Chou F.P. (2010), “Water extracts from *nelumbo nucifera* leaf reduced plasma lipids and atherosclerosis in cholesterol-fed rabbits”, *Journal of Food Biochemistry*, 34(4): p.779–795.
33. Li G.R., Lue F.H., and Qian J.Q. (1988), “Effects of neferine on physiologic properties and dose-effect response of isoprenaline and Ca^{2+} in guinea pig atria”, *Acta Pharmacologica Sinica*, 23(4): p.241–245.
34. Mehta N.R., Patel E.P., Patani P.V., Shah B. (2013), “*Nelumbo Nucifera* (Lotus): A Review on Ethanobotany, Phytochemistry and Pharmacology”, *Indian Journal of Pharmaceutical and Biological Research*, 1(4): p.152-167.

35. Moon S.H., Ahn C.B., Oh Y., Je J.Y. (2019), “Lotus (*Nelumbo nucifera*) seed protein isolate exerts anti-inflammatory and antioxidant effects in LPS-stimulated RAW264.7 macrophages via inhibiting NF- κ B and MAPK pathways, and upregulating catalase activity”, *International Journal of Biological Macromolecules*, 138: p.791-797.
36. Moniruzzaman M. et al (2016), “Sedative and Anxiolytic-Like Actions of Ethanol Extract of Leaves of *Glinus oppositifolius* (Linn.) Aug. DC, *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2016, 8541017.
37. Mukherjee P.K, Mukherjee D., Maji A.K., Saha K., Rai S., Heinrich M. (2009), “The sacred lotus (*Nelumbo nucifera*) – phytochemical and therapeutic profile”, *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 61: p.407–422.
38. Mukherjee P.K., Pal M., Pal S.K., Saha K. and Saha B.P. (1998), “Pharmacognostical Profile Of Rhizome Of *Nelumbo Nucifera* Gaertn”, *Ancient Science of life*, 15(4): p.268 - 276.
39. Mukherjee P.K., Pal M., Saha K. and Saha B.P., Das J. (1996), “Diuretic activity of the rhizomes of *Nelumbo nucifera* Gaertn (Fam. Nymphaeaceae)”, *Phytother Res*, 10(5): p.424–425.
40. Mukherjee P.K., Saha K., Pal M., and Saha B.P. (1997), “Effect of *Nelumbo nucifera* rhizome extract on blood sugar level in rats”, *Journal of Ethnopharmacology*, 58(3): p.207–213.
41. Ogle B.M., Dao H.T.A., Mulokozi G. and Hambraeus L. (2001), “Micronutrient composition and nutritional importance of gathered vegetables in Vietnam,” *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, 52(6): p.485–499.
42. Paudel K.R. and Panth N. (2015), “Phytochemical Profile and Biological Activity of *Nelumbo nucifera*”, *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 15: 16 pages.
43. Qian J.Q. (2002), “Cardiovascular pharmacological effects of bisbenzylisoquinoline alkaloid derivatives”, *Acta Pharmacologica Sinica*, 23(12): p.1086–1092.

44. Rajput, M.A., Zehra T., Ali F. (2019) , “Assessment of analgesic activity of nelumbo nucifera fruit ethanol extract”, *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, 11(11), 1-5
45. Sharma B.R., Gautam L.N.S., Adhikari D., Karki R. (2016), “A Comprehensive Review on Chemical Profiling of Nelumbo Nucifera: Potential for Drug Development”, *Phytotherapy Research*, 31(1): p.3-26.
46. Sinha S., Mukherjee P.K., Mukherjee K., Pal M., Mandal S.C. and Saha B.P. (2000), “Evaluation of antipyretic potential of Nelumbo nucifera stalk extract”, *Phytotherapy Research*, 14(4): p.272–274.
47. Sakuljaitrong S., Buddhakala N., Chomko S. and Talubmook C. (2013), “Effects of Flower Extract from Lotus (Nelumbo nucifera) on Hypoglycemic and Hypolipidemic in Streptozotocin-induced Diabetic Rats”, *International Journal of Scientific & Engineering Research*, 4(7): p.1441-1446.
48. Sutton, E. L. (2014), “Insomnia”, *Medical Clinics of North America*, 98(3): p.565–581.
49. Vogel H.G., Vogel W.H., Schölkens B.A., Sandow J., Müller G., Volgel W.F. (2016), “Drug Discovery and Evaluation: Pharmacological Assays”, *Springer-Verlag Berlin Heidelberg, Germany*, p.670-773.
50. Wu C.H., Yang M.Y., Chan K.C., Chung P.J., Ou T.T., Wang C.J. (2010). “Improvement in high-fat diet-induced obesity and body fat accumulation by a *Nelumbo nucifera* leaf flavonoid-rich extract in mice”, *J. Agric. Food Chem*, 58: p.7075–7081
51. Wu Z.Y., Raven P.H., Hong D. (2001), “Nelumbonaceae”, *Flora of China*, 6: p.114.
52. Xiao J.H., Zhang J.H., Chen H.L., Feng X.L., and Wang J.L. (2005), “Inhibitory effects of isoliensinine on bleomycin-induced pulmonary fibrosis in mice”, *Planta Medica*, 71(3): p.225– 230.

53. Yuan L., Gu X., Yin Z., Kang W. (2014), “Antioxidant Activities In Vitro And Hepatoprotective Effects Of Nelumbo Nucifera Leaves In Vivo”, *Afr J Tradit Complement Altern Med.*, 11(3): p.85-91.
54. Zhang X., Wang X., Wu T. (2015), “Isoliensinine induces apoptosis in triple-negative human breast cancer cells through ROS generation and p38 MAPK/JNK activation,” *Scientific Reports*, 29(5): p.1–1
55. Zhao X., Shen J., Chang K. J., Kim S.H. (2013), “Analysis of Fatty Acids and Phytosterols in Ethanol Extracts of Nelumbo nucifera Seeds and Rhizomes by GC-MS”, *J. Agric. Food Chem.*, 61 (28), 6841–684

PHỤ LỤC 3: MINH CHỨNG ĐI KÈM

1. SẢN PHẨM DẠNG 2: (quy trình, sơ đồ, bảng vẽ, cơ sở dữ liệu.....)

Bảng kết quả tác động giảm đau trung ương của cao chiết từ ngó sen

Lô	Trước uống	Sau khi uống			
		30p	60p	90p	120p
Chứng	2,7 ± 0,03	2,8 ± 0,15	2,86 ± 0,14	2,7 ± 0,25	2,8 ± 0,22
Đối chứng	2,65 ± 0,08	9,35** ± 0,33	9,6** ± 0,26	9,92** ± 0,06	9,79** ± 0,13
Lô thử nghiệm 1 (cao chiết ngó sen liều 1,5 g/kg)	2,53 ± 0,16	3,04## ± 0,27	3,13## ± 0,34	3,36## ± 0,29	3,12## ± 0,17
Lô thử nghiệm 2 (cao chiết ngó sen liều 3 g/kg)	2,56 ± 0,12	3,04## ± 0,2	3,26## ± 0,28	3,58## ± 0,33	3,48## ± 0,29

Bảng kết quả tác động giảm đau ngoại biên của cao chiết từ ngó sen

Lô	Thời gian khảo sát						
	5-10p	10-15p	15-20p	20-25p	25-30p	30-35p	35-40p
Chứng	21,5 ±1,65	16 ±1,65	12,17 ±1,14	9,5 ±0,99	8,17 ±0,98	5,33 ±0,84	4,17 ±0,7
Đối chứng	11** ±0,89	9* 0,97	5,5** ±0,85	4** ±0,77	3,17** ±0,79	1,33** ±0,61	1,17** ±0,4
Lô TN 1 (1,5 g/kg)	9,5** ±1,89	7** ±1,39	4,67** ±0,8	3,33** ±0,61	2,33** ±0,88	2,17** ±0,48	1,67* ±0,61
Lô TN 2 (3 g/kg)	9,67** ±1,2	6**# ±0,45	3,17**# ±0,17	1,67**# ±0,33	1,67** ±0,49	0,5** ±0,34	0,5** ±0,34

Bảng kết quả tác động an thần của cao chiết từ ngó sen

Lô	Thời gian bám trên máy Rota-Rod (giây)		
	30 phút	60 phút	90 phút
Lô chứng	597,33 ± 1,67	598,78 ± 1,22	598,67 ± 1,11
Lô đối chứng	14** ± 2,6	22,78** ± 5,3	16,22** ± 3,08
Lô thử nghiệm 1 (1,5 g/kg)	507,78 *** ± 23,38	412,44*** ± 17,99	318,67*** ± 16,62
Lô thử nghiệm 2 (3 g/kg)	448,89 *** ± 19,16	363,89 *** ± 16,73	322,11 *** ± 18,59

2. SẢN PHẨM DẠNG 3: (toàn văn bài báo, sách chuyên khảo....)

Bài báo

Võ Thị Thu Hà, Thái Gia Mẫn, Mai Thị Ngọc Ánh (2021), “Khảo sát tác động giảm đau, an thần của cao chiết ngó sen (*Nelumbo nucifera* Gaertn. Nelumbonaceae) trên chuột nhắt trắng”, *Tạp chí khoa học và công nghệ - Đại học Nguyễn Tất Thành*, 15, tr 59-63.

PHỤ LỤC 4: (thuyết minh đề cương)

1- Thuyết minh đề tài. (photo bản đã ký với Trường)

Khảo sát tác động giảm đau và an thần của cao chiết ngó sen (*Nelumbo nucifera* Gaertn. Nelumbonaceae) trên chuột nhắt trắng

Võ Thị Thu Hà*, Thái Gia Mẫn, Mai Thị Ngọc Ánh

Khoa Dược - Đại học Nguyễn Tất Thành
vttha*@ntt.edu.vn

Tóm tắt

Sen (*Nelumbo nucifera* Gaertn.) thuộc dạng cây thủy sinh nổi trên mặt nước. Ở Việt Nam, các bộ phận của cây Sen đều có thể sử dụng trong y học cổ truyền. Mục tiêu của nghiên cứu là xác định độc tính cấp và tác dụng giảm đau, an thần của cao chiết ngó sen. Dùng phương pháp ngâm kiệt nguyên liệu sơ chế với cồn 70 độ để thu được cao đặc. Thử nghiệm độc tính cấp sử dụng liều tối đa trên chuột được theo dõi trong 14 ngày. Khảo sát tác động giảm đau trung ương trên mô hình nhúng đuôi chuột, tác động giảm đau ngoại biên trên mô hình gây đau quặn bụng bằng acid acetic. Tác động an thần được khảo sát bằng phương pháp Rotarod. Kết quả định tính xác định được liều dung nạp tối đa (LD₀) đối với cao chiết ngó sen là 61,6 g/kg. Cao chiết ngó sen liều 1,5 g/kg và 3 g/kg thể hiện tác động an thần và giảm đau ngoại biên nhưng không có tác động giảm đau trung ương trên mô hình thực nghiệm. Kết quả nghiên cứu có thể được định hướng cho các nghiên cứu sâu hơn về các dạng chế phẩm từ tự nhiên trong hỗ trợ điều trị các bệnh căng thẳng, mất ngủ.

Nhận 22.10.2021
Được duyệt 07.11.2021
Công bố 10.11.2021

Từ khóa
ngó sen, độc tính cấp, an thần, giảm đau, rotarod.

© 2021 Journal of Science and Technology - NTTU

1 Đặt vấn đề

Ở Việt Nam, Sen là một loài thực vật được trồng rất phổ biến và có nhiều lợi ích sử dụng trong dân gian. Đã có nhiều nghiên cứu khoa học chứng minh các tác dụng dược lí của cây Sen như chống oxy hóa, kháng viêm, hạ đường huyết,... [1-3]. Những năm gần đây, các nhà khoa học quan tâm nhiều đến tác dụng điều trị rối loạn thần kinh trung ương của cây Sen như giảm căng thẳng, giảm đau, trầm cảm và rối loạn nhận thức, mất ngủ. Trong nghiên cứu in vitro vào năm 2015, Mallika Kumarihamy và cộng sự đã chứng minh những dẫn chất chiết từ cây Sen như nuciferine, N-nor-nuciferine, asimilobine, arnepavine, O-methylcoclaurine, N-methylcoclaurine, coclaurine, neferine có ái lực với các thụ thể liên quan đến giảm đau và rối loạn hành vi [4]. Tại Việt Nam, tác giả Nguyễn Văn Đán trong đề tài “Nghiên cứu độc tính và tác dụng an thần của cao Bình vôi - Lạc tiên - lá Sen -

lá Vông nem trên chuột nhắt trắng” vào năm 2014 đã chứng minh cao chiết nước Bình vôi, Lạc tiên, lá Sen, lá Vông nem có tác dụng hợp đồng gây ngủ với thiopental [5]. Các nhà khoa học trong nước có nhiều đề tài nghiên cứu về hạt Sen, hoa Sen, tim Sen,... nhưng những nghiên cứu về ngó sen vẫn còn hạn chế. Việc xác định tác dụng dược lí của cao chiết ngó sen góp phần chứng minh cho các ứng dụng dân gian. Nghiên cứu tác động giảm đau và an thần của cao chiết ngó sen trên mô hình thực nghiệm nhằm cung cấp thêm nguồn dữ liệu khoa học về tác dụng dược lí của dược liệu đầy tiềm năng này.

2 Phương pháp nghiên cứu

2.1 Thú vật thử nghiệm

Chuột nhắt trắng, đực, trưởng thành, chủng *Swiss albino*, khối lượng (22 – 25) g, khỏe mạnh, không dị tật do Viện Vắc xin và Sinh phẩm Y tế Nha Trang cung cấp. Chuột được chia nuôi trong các hộp nhựa

trắng (8 – 10) con, cho quen với môi trường ít nhất 2 ngày trước khi tiến hành thử nghiệm.

2.2 Dược liệu nghiên cứu và chất đối chứng

Dược liệu nghiên cứu: ngó sen được thu hái tại huyện Hồng Ngự, tỉnh Đồng Tháp.

Ngó sen sau khi thu hái rửa sạch đem phơi trong 5 ngày đến khi khô hoàn toàn. Sau đó đem ngó sen khô đi xay nhuyễn thành bột.

Chiết ngâm kiệt với dung môi cồn 70 độ. Cô thành cao đặc trên bếp cách thủy ở nhiệt độ 70 °C.



Hình 1 a - ngó sen tươi; b - ngó sen khô; c - bột ngó sen

Chất đối chứng trong mô hình giảm đau:

- Aspirin (acid acetylsalicylic, Mekophar) hàm lượng 500 mg. Có tác dụng giảm đau, hạ sốt, kháng viêm, là thuốc đối chứng dùng trong giảm đau ngoại biên.

- Morphin (morphin sulfat, Công ty Cổ phần Dược phẩm Trung ương 2) hàm lượng 30 mg; morphin là thuốc giảm đau mạnh, tác động chủ yếu lên hệ thần kinh trung ương, được dùng làm chất đối chứng trong thử nghiệm giảm đau trung ương.

Chất đối chứng trong mô hình an thần:

- Diazepam (Vidipha): hàm lượng 5 mg diazepam. Có tác dụng an thần, gây ngủ, là thuốc đối chứng dùng trong thử nghiệm an thần.

Khảo sát độc tính cấp đường uống

Chọn chuột ngẫu nhiên, lô 6 con (gồm 3 con đực và 3 con cái). Cho chuột thử nghiệm uống nước bình thường và nhịn đói ít nhất 12 giờ. Cho chuột uống cao dược liệu với liều tối đa có thể qua đường uống (nồng độ đặc nhất qua kim uống, với thể tích uống 0,5 mL/10 g trọng lượng chuột). Theo dõi và ghi nhận tất cả các cử động, biểu hiện, số lượng chết của chuột trong 72 giờ đầu và tiếp tục theo dõi đến 14 ngày. Mô và quan sát đại thể của những con chết và số con còn sống sau 14 ngày quan sát [6].

Khảo sát tác động giảm đau trung ương

Chuột được cố định với đuôi thả tự do. Nhúng ngập đuôi chuột không quá 5 cm vào nước nóng trong bếp cách thủy đã được cài đặt ở nhiệt độ ổn định (55 ± 0,5) °C. Tiềm thời giết đuôi là thời gian tính từ lúc

nhúng đuôi chuột vào nước đến khi chuột giật mạnh đuôi ra khỏi mặt nước.

Trước khi tiến hành thí nghiệm, những chuột có tiềm thời giết đuôi không quá 5 giây được đưa vào thí nghiệm. Chuột đạt tiêu chuẩn chia ngẫu nhiên vào các lô, mỗi lô gồm 9 con. Chuột được cho uống liều duy nhất với thể tích 0,1 mL/10 g trọng lượng chuột [7]:

- Lô chứng: uống nước cất

- Lô đối chứng: uống morphin liều 5 mg/kg

- Lô thử nghiệm 1: uống cao ngó sen liều 1,5 g/kg

- Lô thử nghiệm 2: uống cao ngó sen liều 3 g/kg

Đo tiềm thời giết đuôi tại các thời điểm (30, 60, 90, 120) phút sau khi dùng thuốc. Lau khô đuôi chuột sau mỗi lần đo, nếu chuột không phản ứng sau 10 giây thì nhấc chuột ra để tránh bỏng đuôi chuột. Đo 2 lần liên tiếp và ghi nhận tiềm thời dài hơn.

Khảo sát tác động giảm đau ngoại biên

Chia chuột ngẫu nhiên vào các lô, mỗi lô gồm 9 con. Chuột được cho uống liều duy nhất với thể tích 0,1 mL/10 g trọng lượng chuột [7]:

- Lô chứng: uống nước cất

- Lô đối chứng: uống aspirin liều 50 mg/kg

- Lô thử nghiệm 1: uống cao ngó sen liều 1,5 g/kg

- Lô thử nghiệm 2: uống cao ngó sen liều 3 g/kg

Sau khi dùng thuốc 60 phút, tất cả các chuột được gây đau bằng cách tiêm phúc mô dung dịch acid acetic 1 % (0,1 mL/10 g). Mỗi chuột được đặt vào bocal thủy tinh riêng. Đếm số lần đau quặn ở chuột (biểu hiện: toàn thân vờn dài, ưỡn cong người, hóp bụng và duỗi ít nhất một chân sau) trong các khoảng thời gian: (5 – 10) phút, (10 – 15) phút, (15 – 20) phút, (20 – 25) phút, (25 – 30) phút, (30 – 35) phút, (35 – 40) phút, tính từ thời điểm tiêm dung dịch acid acetic.

Khảo sát tác động an thần

Chuột được tập chạy trên trục quay Rotarod với tốc độ 36 vòng/phút, 3 phút mỗi ngày trong 3 ngày trước khi tiến hành thí nghiệm. Vào ngày thứ 4, những chuột bám trên trục quay Rotarod trong hơn 3 phút được đưa vào thí nghiệm [8, 9].

Chia chuột ngẫu nhiên vào các lô, mỗi lô gồm 9 con

- Lô chứng: uống nước cất.

- Lô đối chứng: uống diazepam liều 10 mg/kg.

- Lô thử nghiệm 1: uống cao ngó sen liều 1,5 g/kg.

- Lô thử nghiệm 2: uống cao ngó sen liều 3 g/kg

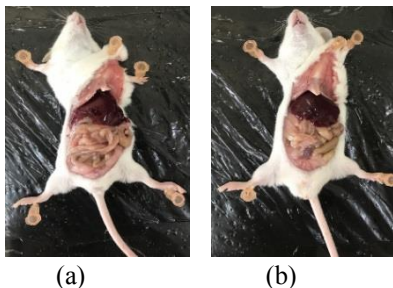
Cho chuột dùng thuốc với thể tích 0,1 mL/10 g trọng lượng chuột. Sau khi uống thuốc 30 phút, đặt chuột lên trục quay Rotarod với tốc độ 36 vòng/phút. Quan

sát trong 10 phút. Ghi nhận thời gian chuột bấm trên máy quay ở các thời điểm sau khi dùng thuốc (30, 60 và 90) phút của mỗi lô.

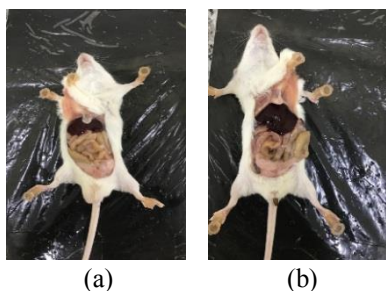
3 Kết quả và thảo luận

3.1 Khảo sát độc tính cấp

Sau khi chuột nhịn đói 12 giờ, cho chuột uống cao ngó sen với nồng độ đặc nhất qua kim uống là 1,23 g/mL (tương ứng với liều 61,6 g/kg), thể tích cho uống là 0,5 mL/10 g thể trọng chuột. Quan sát thấy sau 24 giờ đầu ở lô uống cao ngó sen, toàn bộ chuột không có dấu hiệu bất thường, vẫn ăn uống bình thường. Tiếp tục quan sát trong 48 giờ và 72 giờ, không có hiện tượng lạ xảy ra. Theo dõi tiếp tục 14 ngày, chuột vẫn sống khỏe mạnh và bình thường. Chuột được giải phẫu để quan sát các cơ quan trong cơ thể. Kết quả cho thấy không có bất kì thay đổi ở các đại thể như tim, gan, thận, phổi, hệ tiêu hóa.



Hình 2 Đại thể (a) chuột đực và (b) chuột cái sinh lí sau 14 ngày



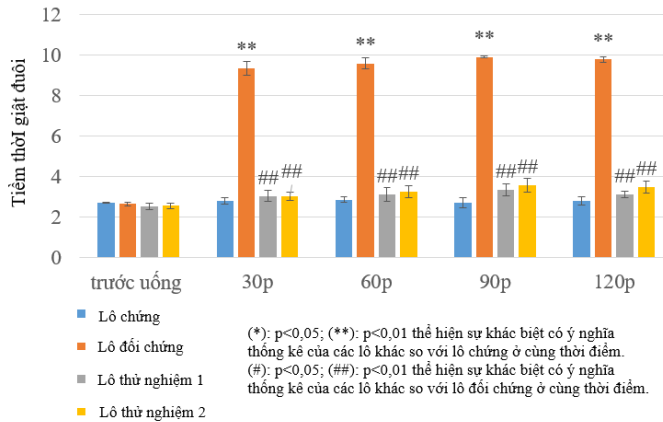
Hình 3 Đại thể (a) chuột đực và (b) chuột cái dùng cao liều 61,6 g/kg theo đường uống sau 14 ngày theo dõi

Như vậy, cao ngó sen không xác định được LD₅₀, không thể hiện độc tính cấp đường uống với liều tối đa có thể cho uống qua kim (Dmax) là 61,6 g/kg.

3.2 Khảo sát tác động giảm đau trung ương

Kết quả khảo sát tác động giảm đau trung ương của cao ngó sen

Kết quả khảo sát tác động giảm đau trung ương của cao ngó sen trên chuột nhắt được ghi nhận như sau (Hình 4):



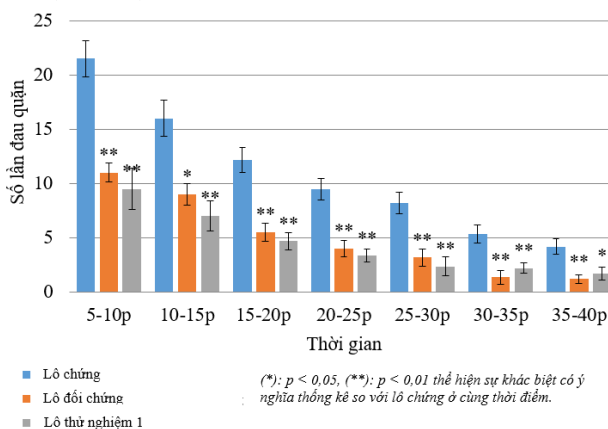
Hình 4 Tiềm thời giật đuôi giữa các lô vào các khoảng thời gian

Sau thử nghiệm, lô đối chứng dùng morphin liều 5 mg/kg đường uống có tiềm thời giật đuôi tăng thống kê so với lô chứng trong suốt thời gian thử nghiệm ($p < 0,01$) tại tất cả các thời điểm (30, 60 và 90) phút. Các lô thử nghiệm sử dụng cao ngó sen liều 1,5 g/kg và 3 g/kg đều không thể hiện tác động giảm đau trung ương, tiềm thời giật đuôi khác biệt không có ý nghĩa thống kê so với lô chứng ($p > 0,05$).

3.3 Khảo sát tác động giảm đau ngoại biên

Kết quả khảo sát tác động giảm đau ngoại biên cao ngó sen

Với lô thử nghiệm 1, kết quả khảo sát tác động giảm đau ngoại biên của cao ngó sen được trình bày như sau (Hình 5):

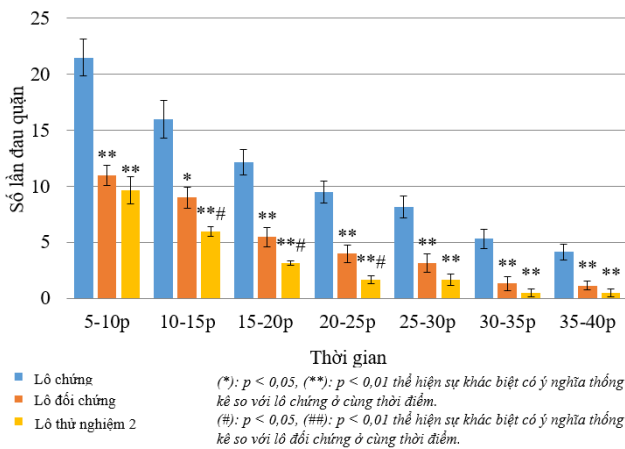


Hình 5 Số lần đau quận của lô chứng, lô đối chứng, lô thử nghiệm 1

Số lần đau quận của chuột ở lô đối chứng sử dụng aspirin liều 50 mg/kg giảm có ý nghĩa thống kê ($p < 0,05$) so với chuột ở lô chứng bắt đầu từ phút thứ 5 và kéo dài đến hết quá trình thí nghiệm. Lô thử nghiệm 1 sử dụng cao ngó sen với liều 1,5 g/kg có số lần đau quận giảm có ý nghĩa thống kê ($p < 0,05$) so với lô

chứng trong suốt thời gian thử nghiệm. Ở phút 25 đến phút 30 số lần đầu quận của lô thử nghiệm 1 giảm 3,5 lần so với lô chứng. Vào các khoảng thời gian còn lại số lần đầu quận giảm khoảng 2 lần so với lô chứng. So với lô đối chứng, số lần đầu quận của lô thử nghiệm 1 giảm hơn từ phút thứ 5 đến phút thứ 30 nhưng sự khác biệt này không có ý nghĩa thống kê ($p > 0,05$).

Với lô thử nghiệm 2, kết quả được trình bày như Hình 6:

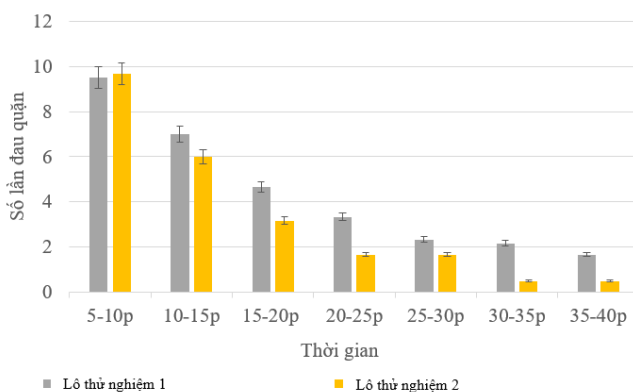


Hình 6 Số lần đầu quận của

lô chứng, lô đối chứng, lô thử nghiệm 2

Lô thử nghiệm 2 sử dụng cao ngô sen với liều 3 g/kg có số lần đầu quận giảm có ý nghĩa thống kê ($p < 0,01$) so với lô chứng trong suốt thời gian thử nghiệm. Số lần đầu quận của lô thử nghiệm giảm nhiều nhất so với lô chứng ở phút 30 đến phút 35 trong quá trình thử nghiệm. So với lô đối chứng, lô sử dụng aspirin liều 50 mg/kg, lô thử nghiệm 2 có số lần đầu quận giảm hơn và có ý nghĩa thống kê ($p < 0,05$) ở phút thứ 10 đến phút thứ 25.

So sánh tác động giảm đau giữa 2 mức liều của cao ngô sen, kết quả được trình bày như Hình 7:



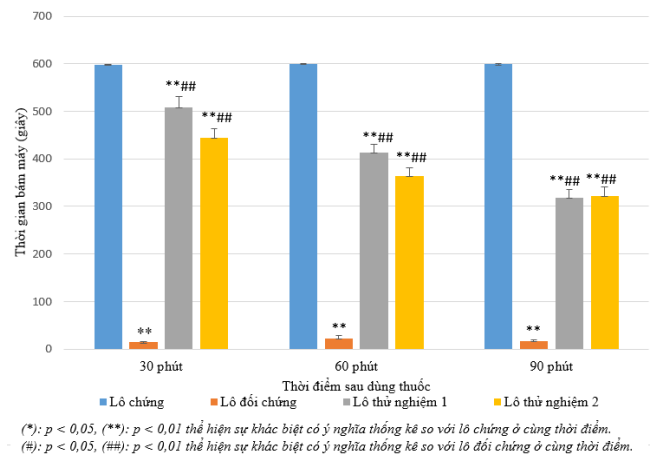
Hình 7 So sánh số lần đầu quận giữa 2 lô thử nghiệm

Ở phút thứ 5 đến phút 10, lô thử nghiệm 2 sử dụng cao ngô sen 3 g/kg có số lần đầu quận nhiều hơn lô thử nghiệm 1 sử dụng cao ngô sen 1,5 g/kg nhưng sự khác biệt này không có ý nghĩa thống kê ($p > 0,05$). Ở phút thứ 10 đến phút thứ 40 của lô thử nghiệm 2 lại có số lần đầu quận ít hơn lô thử nghiệm 1 nhưng sự khác biệt không có ý nghĩa thống kê ($p > 0,05$).

Như vậy, lô thử nghiệm sử dụng cao ngô sen liều 1,5 g/kg và 3 g/kg có số lần đầu quận giảm có ý nghĩa thống kê so với lô chứng ($p < 0,05$) và khả năng giảm đau khác nhau không có ý nghĩa giữa hai mức liều thử nghiệm. Vậy cao ngô sen ở liều 1,5 g/kg và 3 g/kg thể hiện tác động giảm đau ngoại biên trên mô hình thử nghiệm.

3.4 Khảo sát tác động an thần của cao ngô sen

Kết quả khảo sát tác động an thần được trình bày như sau (Hình 8):



Hình 8 Thời gian chuột bám trên trục quay Rotarod tại các thời điểm sau dùng thuốc của các lô

Lô đối chứng sử dụng diazepam liều 10 mg/kg bằng đường uống cho kết quả an thần có ý nghĩa thống kê so với lô chứng tại tất cả các thời điểm của thử nghiệm. Tác động làm giảm thời gian bám trên trục quay Rotarod của chuột uống cao ngô sen liều 1,5 g/kg và liều 3 g/kg đều khác biệt có ý nghĩa thống kê so với lô chứng ở các thời điểm khảo sát. Tuy nhiên, tác động làm giảm thời gian bám trên trục quay Rotarod của chuột uống cao ngô sen liều 1,5 g/kg và liều 3 g/kg đều lớn hơn so với lô đối chứng và sự khác biệt này có ý nghĩa thống kê. Như vậy, cao ngô sen thể hiện tác động an thần trên mô hình thực nghiệm, nhưng tác động này yếu hơn so với diazepam 10 mg/kg (PO).

4 Kết luận

Kết quả của nghiên cứu cho thấy cao ngó sen liều 1,5 g/kg và 3 g/kg thể hiện tác động an thần và giảm đau ngoại biên nhưng không có tác động giảm đau trung ương trên mô hình thực nghiệm. Kết quả của nghiên cứu có thể được định hướng cho các nghiên cứu sâu

hơn về các dạng chế phẩm tự nhiên nhằm hỗ trợ bệnh nhân trong điều trị giảm đau hay giảm lo âu, căng thẳng.

Lời cảm ơn

Nghiên cứu được tài trợ bởi Quỹ phát triển Khoa học và Công nghệ - Đại học Nguyễn Tất Thành, mã đề tài 2021.01.83/HĐ-KHCN.

Tài liệu tham khảo

1. Jiang X.L. et al (2018), “Flavonoid glycosides and alkaloids from the embryos of *Nelumbo nucifera* seeds and their antioxidant activity”, *Fitoterapia*, 125: p.184-190.
2. Moon S.H. et al (2019), “Lotus (*Nelumbo nucifera*) seed protein isolate exerts anti-inflammatory and antioxidant effects in LPS-stimulated RAW264.7 macrophages via inhibiting NF- κ B and MAPK pathways, and upregulating catalase activity”, *International Journal of Biological Macromolecules*, 138: p.791-797.
3. Sakuljaitrong S. et al (2013), “Effects of Flower Extract from Lotus (*Nelumbo nucifera*) on Hypoglycemic and Hypolipidemic in Streptozotocin-induced Diabetic Rats”, *International Journal of Scientific & Engineering Research*, 4(7): p.1441-1446.
4. Kumarihamy M. et al (2015), “In vitro opioid receptor affinity and in vivo behavioral studies of *Nelumbo nucifera* flower”, *J Ethnopharmacol*, 174 (4), p.57- 65
5. Nguyễn Văn Đán (2014), “Nghiên cứu độc tính và tác dụng an thần của cao bình vôi – lạc tiên – lá sen – lá vông nem trên chuột nhắt trắng”, *Tạp chí Y học Tp. Hồ Chí Minh*, 18 (1).
6. Đỗ Trung Đàm (2017), *Phương pháp xác định độc tính của thuốc*, NXB Y học, Hà Nội, tr. 15-189.
7. Đỗ Trung Đàm (2017), *Thuốc giảm đau chống viêm và các phương pháp nghiên cứu tác dụng dược lí*, NXB Y học Hà Nội, tr. 17-426.
8. Dương Thị Ly Hương, Nguyễn Thị Bích Thủy (2016), “Đánh giá tác dụng an thần, giải lo của bài thuốc “Chè an thần” trên động vật thực nghiệm”, *Tạp chí Dược học*, 481: tr.40-44.
9. Moniruzzaman M. et al (2016), “Sedative and Anxiolytic-Like Actions of Ethanol Extract of Leaves of *Glinus oppositifolius* (Linn.) Aug. DC, Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine, 2016, 8541017.

Evaluation of analgesic and anxiolytic activities of extract from the rhizome of *Nelumbo nucifera* Gaertn. Nelumbonaceae

Vo Thi Thu Ha, Thai Gia Man, Mai Thi Ngoc Anh

Pharmacy Faculty, Nguyen Tat Thanh University

vttha@ntt.edu.vn

Abstract In Viet Nam, *Nelumbo nucifera* Gaertn. Nelumbonaceae is a popular aquatic plant. All parts of *Nelumbo nucifera* Gaertn. have been used in traditional medicine. The objective of this study was to evaluate acute toxicity, analgesic and anxiolytic effects of extract of *Nelumbo nucifera* Gaertn. The percolation method with 70 % ethanol was conducted to obtain the extract. *Acute toxicity* test was performed on Swiss albino *mice* at the maximum possible *oral dose*. Mice were observed up to 14 days post-treatment. Central analgesic effect was evaluated with tail immersion model, peripheral analgesic effect was evaluated with writhing test using 1 % acetic acid in mice. The anxiolytic effect was investigated based on Rotarod performance. The results revealed that the maximum possible infralethal dose of the extract at 61,6 g/kg mouse body weight. The rhizome of *Nelumbo nucifera* Gaertn. extract at doses of 1,5 g/kg and 3 g/kg mouse body weight show anxiolytic and peripheral analgesic effects but no central analgesic effects. The results of this study would be useful for further study on natural medicine used in supporting the treatment of conditions as stress, insomnia.

Keywords *Nelumbo nucifera* Gaertn, acute toxicity, analgesic, anxiolytic, Rotarod.

THUYẾT MINH

ĐỀ TÀI NGHIÊN CỨU KHOA HỌC CẤP CƠ SỞ NĂM 2020

MÃ SỐ ĐỀ TÀI: 2020.01.83

I. THÔNG TIN CHUNG VỀ ĐỀ TÀI

1. Tên đề tài (Tiếng Việt và Tiếng Anh)

- Tiếng Việt: Khảo sát tác động giảm đau, an thần của cao chiết Ngó sen (*Nelumbo nucifera* Gaertn. Nelumbonaceae)

- Tiếng Anh: Evaluation of analgesic and sedative effects of Nodus Nelumbinis Rhizomatis extract (*Nelumbo nucifera* Gaertn. Nelumbonaceae).

2. Lĩnh vực nghiên cứu:

- Kỹ thuật và công nghệ; Khoa học Xã hội nhân văn
 Khoa học sức khỏe Kinh tế Tài chính

3. Thời gian thực hiện: ...9... tháng (Từ tháng...04/2021...đến tháng 12/2021)

4. Kinh phí thực hiện (kinh phí Nhà trường): 20.000.000 VNĐ

5. Chủ nhiệm đề tài:

Họ và tên: Võ Thị Thu Hà

Ngày, tháng, năm sinh: 03/06/1985

Giới tính: Nữ

Đơn vị công tác: Khoa Dược – trường Đại học Nguyễn Tất Thành

Chức vụ: Giảng viên

Địa chỉ liên lạc: 300A Nguyễn Tất Thành, P13, Q4, TP Hồ Chí Minh

Điện thoại: 0914407679

Email: vttha@ntt.edu.vn

5. Các tổ chức phối hợp và thành viên chính tham gia thực hiện đề tài (nếu có)

5.1. Tên cơ quan :

Họ và tên thủ trưởng tổ chức:

Địa chỉ:

Điện thoại:

5.2. Cán bộ giảng viên

TT	Họ và tên	Chuyên ngành	Đơn vị	Nội dung chính tham gia
1	Võ Thị Thu Hà	Dược lý	Khoa	Chủ nhiệm đề tài

			Dược	
2	Nguyễn Thị Bạch Tuyết	Dược lý	Khoa Dược	Thành viên
3	Nguyễn Thị Thùy Trang	Dược lý	Khoa Dược	Thành viên
4	Hoàng Thị Phương Liên	Dược lý	Khoa Dược	Thành viên

II. MỤC TIÊU, NỘI DUNG NGHIÊN CỨU VÀ PHƯƠNG ÁN THỰC HIỆN ĐỀ TÀI

6. Mục tiêu của đề tài (*Bám sát và cụ thể hoá định hướng mục tiêu theo đặt hàng*)

Việt Nam là đất nước có nguồn dược liệu phong phú do thảm thực vật đa dạng và khí hậu thuận lợi để phát triển. Đây cũng là điều kiện quan trọng để cung cấp nguyên liệu sản xuất thuốc trong nước. Đã có rất nhiều dược liệu quý được thế giới công nhận như cây hời, quế, atiso, sâm Ngọc Linh... Trong đó sen (*Nelumbo nucifera* Gaertn.) là một loài dược liệu phổ biến và rất giàu tiềm năng để nghiên cứu phát triển mạnh ở Việt Nam.

Sen là loại cây mọc ở dưới nước, được trồng ở nhiều nơi trong nước ta như đầm, hồ, ao,... để làm thức ăn hay dùng làm thuốc [1]. Các bộ phận khác nhau của cây sen đều có thể sử dụng trong y học cổ truyền. Đã có rất nhiều nghiên cứu về tác dụng dược lý của sen như khả năng chống oxy hóa của vỏ hạt sen ở nghiên cứu của Chen và cộng sự [2]; năm 2014, Lin Yuan và cộng sự chứng minh tác dụng bảo vệ gan của dịch chiết ethyl acetat, butanol từ lá sen [3]; năm 1997, Mukherjee chứng minh tác dụng hạ glucose huyết của Ngó sen [4]; năm 2015, Zhang và cộng sự cũng đã chứng minh khả năng kháng ung thư của isoliensinin [5]; năm 2011, Jiang và cộng sự phân lập các chất từ lá sen có tác dụng kháng virus HIV [6], nghiên cứu của Kuo và cộng sự (2005) chứng minh dịch chiết từ hạt sen kháng HSV-1...[7]. Trong những năm gần đây các nhà khoa học quan tâm nhiều đến tác dụng điều trị rối loạn thần kinh trung ương của cây sen như giảm căng thẳng, giảm đau, trầm cảm và rối loạn nhận thức, mất ngủ. Trong nghiên cứu in vitro vào năm 2015, Mallika Kumarihamy và cộng sự đã chứng minh những dẫn chất chiết từ cây sen như nuciferine, N-nor-nuciferine, asimilobine, arnepavine, O-methylcoclaurine, N-methylcoclaurine, coclaurine, neferine có ái lực với các thụ thể liên quan đến giảm đau và rối loạn hành vi [8]. Tại Việt Nam, những bài thuốc chữa mất ngủ, giảm đau được bào chế từ các bộ phận của sen được dân gian lưu truyền từ lâu đời [1]. Tuy nhiên, những nghiên cứu về tác dụng dược lý trên các bộ phận của cây sen, đặc biệt là ngó sen vẫn còn rất hạn chế. Do đó để làm rõ hơn các tác dụng chưa được chứng minh đầy đủ của cây sen, chúng

tôi tiến hành thực hiện đề tài “Khảo sát tác động giảm đau, an thần của cao chiết Ngó sen (*Nelumbo nucifera* Gaertn.)” với mục tiêu cụ thể như sau:

- Khảo sát tác động giảm đau ngoại biên của cao chiết Ngó sen.
- Khảo sát tác động giảm đau trung ương của cao chiết Ngó sen.
- Khảo sát tác động an thần của cao chiết Ngó sen.

7. Tình trạng đề tài

- Mới
- Kế tiếp hướng nghiên cứu của chính nhóm tác giả
- Kế tiếp nghiên cứu của người khác

8. Tổng quan tình hình nghiên cứu, luận giải mục tiêu và nội dung nghiên cứu

8.1. Ngoài nước

Sen (*Nelumbo nucifera* Gaertn.) là một dạng cây thủy sinh nổi trên mặt nước có độ sâu đến 2m với thân rễ hình trụ mọc trong bùn thường gọi là Ngó sen (ngẫu tiết - *Nodus Nelumbinis Rhizomatis*). Lá nổi trên mặt nước, cuống lá dài và có gai nhỏ, phiến lá hình khiên, to, đường kính từ 60-70cm có gân tỏa tròn. Hoa to màu trắng hoặc màu đỏ hồng [1]. Theo Mukherjee và cộng sự (2009) cho thấy từng bộ phận của cây sen đều có nhóm hoạt chất liên quan tới các tác dụng dược lý khác nhau như: alkaloid, acid béo, đường, vitamin,... Trong phiến của sen các hoạt chất alkaloid khác nhau như: liensinin, isoliensinin, neferin. Trong lá sen chứa các chất hóa học như: nor – nuciferin, nuciferin, remerin và hai alkaloid đối kháng với serotonin: asimilobin và lirinidin. Hai alkaloid trên đều ức chế sự co bóp động mạch thỏ gây ra bởi serotonin. Ngoài ra, alkaloid nelumbin cũng được chứng minh trong lá và cuống của cây sen gây ảnh hưởng trên tim [9]. Sharma và cộng sự (2016) cũng phân lập được trong lá sen có thêm một số hoạt chất như nelumbosid, isoquercetin, leucocyanidin, leucodelphinidin [10]. Trong mầm của hạt sen chứa nảy mầm chứa lượng lớn glutathion. Khi hạt nảy mầm và phát triển thì lượng glutathion ngày càng giảm. Ngoài ra, hạt sen còn chứa các alkaloid như liensinin, lotusin,..., acid béo [9]. Trong dịch chiết nước và ether của hoa sen đều có flavonoid: quercetin, luteolin, isoquercetin và glucoluteolin, glycoside kaempferol. Các chất này có tác dụng làm săn se niêm mạc ruột nên giảm tiêu chảy trong dịch tả [9].

Theo Chen và cộng sự (2018) chứng minh dịch chiết methanol của vỏ hạt sen có khả năng chống oxy hóa trong mô hình in vitro gồm các phương pháp: DPPH, ABTS, FRAP. Tác dụng được chứng minh do flavonoid (procyanidin) và tanin (epicatchin) là chủ yếu [11]. Năm 2018, Jiang và cộng sự đã phân lập các flavonoid mới: nelumbosid (A-D) và các

alkaloid, chứng minh tác dụng chống oxy hóa của các chất trên trong mô hình dùng L-ascorbic là chất đối chứng [12]. Trong nghiên cứu vào năm 2011, Jiang và cộng sự đã cho thấy các chiết xuất phân đoạn của Ngó sen gồm chủ yếu là polysaccharid, gallocatechin, protein, ..., có khả năng ức chế enzyme phiên mã ngược của HIV-1, điều chỉnh các TNF- α có thể ức chế trực tiếp virus [13]. Năm 2014, Lin Yuan đánh giá tác dụng bảo vệ gan của dịch chiết ethyl acetat và butanol từ lá sen trong mô hình gây độc tế bào gan bởi CCl₄. Giá trị GPT và GOT trong các nhóm điều trị đã giảm đáng kể sau khi dùng các dịch chiết với liều 523mg/kg; và 261,5mg/kg. Dịch chiết butanol còn có tác dụng hiệu quả ở mức liều thấp hơn là 130,8mg/kg [14]. Trong nghiên cứu *in vitro* vào năm 2015, Mallika Kumarihamy và cộng sự đã chứng minh những dẫn chất chiết từ cây sen như nuciferine, N-nor-nuciferine, asimilobine, arnepavine, O-methylcoclaurine, N-methylcoclaurine, coclaurine, neferine có ái lực với các thụ thể liên quan đến giảm đau và rối loạn hành vi [8]. Nghiên cứu đóng vai trò quan trọng trong định hướng cho các nghiên cứu *in vivo* về tác dụng giảm đau và an thần của cây sen.

8.2. Trong nước

Tại Việt Nam, nhiều nghiên cứu về thành phần hóa học của cây sen cũng được thực hiện. Vào năm 2011, Đỗ Châu Minh Vĩnh Thọ “Nghiên cứu thành phần alkaloid trong lá sen”. Năm 2012, Văn Quốc Hoàng nghiên cứu đề tài “Khảo sát thành phần hóa học của lá sen được thu hái ở huyện Điện Bàn, tỉnh Quảng Nam” cho thấy lá sen chứa nhiều nuciferine nhất. Nuciferine chiết ra từ lá sen có công dụng kéo dài giấc ngủ. Ngoài ra, lá sen còn chứa nhiều vitamin C, alkaloid tác dụng an thần mạnh hơn tâm sen. Về hóa học, lá sen chứa 0,2-0,3% tanin, 0,77-0,84% alkaloid trong đó có nuciferine, nor-nuciferine, roemerine, anonain, liriodenin, pro-nuciferine, O-nornuciferine, arneparin, N noramepavin, metyl-coclaurin, nephelin, dehydro roemerine, dehydro nuciferine, dehydroanonain, N-metyl lisococlaurin. Tác giả Nguyễn Văn Đàn trong đề tài “Nghiên cứu độc tính và tác dụng an thần của cao Bình vôi – Lạc tiên – Lá sen – Lá vông nem trên chuột nhắt trắng” vào năm 2014 đã chứng minh cao chiết nước Bình vôi-Lạc tiên-Lá sen-Lá vông nem có tác dụng hợp đồng gây ngủ với thiopental [15]. Năm 2015, Nguyễn Văn Hải và cộng sự đã đề nghị chiết xuất nuciferin từ lá sen bằng dầu hỏa. Nuciferin là một trong các alkaloid chính trong lá sen (*Nelumbo nucifera* G., Nelumbonaceae) [16]. Năm 2018, Nguyễn Ngọc Hồng và Trần Thị Kim Ngân đã “Nghiên cứu thành phần hóa thực vật, tác dụng quét gốc tự do và chống oxy hóa của lá sen (*Nelumbo nucifera* Gaertn.)”. Tác dụng chống oxy hóa *in vivo* đã khẳng định khả năng bảo vệ gan của các mẫu cao chiết

lá sen trên mô hình chuột nhắt trắng bị gây độc bởi CCl_4 . Hoạt tính quét gốc tự do 1,1-diphenyl-2-picryl-hydrazyl (DPPH.), nitric oxit (NO.) và chống oxy hóa *in vivo* ở cả cao chiết lá trưởng thành và lá non đều mạnh [17].

8.3. Luận giải về việc đặt ra mục tiêu và những nội dung, phạm vi/đối tượng cần nghiên cứu của đề tài

Ở Việt Nam, cây sen là một loài thực vật được trồng rất phổ biến và có nhiều lợi ích sử dụng trong dân gian. Những năm gần đây, các nhà khoa học quan tâm nhiều đến tác dụng điều trị rối loạn thần kinh trung ương của cây sen như giảm căng thẳng, giảm đau, trầm cảm và rối loạn nhận thức, mất ngủ. Trong nghiên cứu *in vitro* vào năm 2015, Mallika Kumarihamy và cộng sự đã chứng minh những dẫn chất chiết từ cây sen như nuciferine, N-nor-nuciferine, asimilobine, arnepavine, O-methylcoclaurine, N-methylcoclaurine, coclaurine, neferine có ái lực với các thụ thể liên quan đến giảm đau và rối loạn hành vi [8]. Các nhà khoa học trong nước có nhiều đề tài nghiên cứu về hạt sen, hoa sen, tim sen...nhưng những nghiên cứu về Ngó sen vẫn còn rất hạn chế. Vì vậy việc xác định một số tác dụng dược lý của cao chiết Ngó sen góp phần tạo dữ liệu khoa học chứng minh cho các tác dụng đang được ứng dụng theo dân gian của loài cây này. Do đó đề tài “Khảo sát tác động giảm đau, an thần của cao chiết Ngó sen (*Nelumbo nucifera* Gaertn.)” được thực hiện với các mục tiêu cụ thể như sau:

- Khảo sát tác động giảm đau ngoại biên của cao chiết Ngó sen.
- Khảo sát tác động giảm đau trung ương của cao chiết Ngó sen.
- Khảo sát tác động an thần của cao chiết Ngó sen.

9. Tài liệu tham khảo

1. Đỗ Tất Lợi (2004), Những Cây Thuốc Và Vị Thuốc Việt Nam, tr.783-786.
2. Chen H., Sun K., Yang Z., Guo X., Wei S. (2018) “Identification of Antioxidant and Anti- α -amylase Components in Lotus (*Nelumbo nucifera*, Gaertn.) Seed Epicarp”, Applied Biochemistry and Biotechnology, 187(3): p.677-690.
3. Yuan L., Gu X., Yin Z., Kang W. (2014), “Antioxidant Activities In Vitro And Hepatoprotective Effects Of *Nelumbo Nucifera* Leaves In Vivo”, Afr J Tradit Complement Altern Med., 11(3): p.85-91.
4. Mukherjee P.K., Saha K., Pal M., and Saha B.P. (1997), “Effect of *Nelumbo nucifera* rhizome extract on blood sugar level in rats”, Journal of Ethnopharmacology, 58(3): p.207-213.

5. Zhang X., Wang X., Wu T. (2015), "Isoliensinine induces apoptosis in triple-negative human breast cancer cells through ROS generation and p38 MAPK/JNK activation," *Scientific Reports*, 29(5)
6. Jiang Y., Ng T.B., Liu Z., Wang C., Li N., Qiao W., Liua F. (2011), "Immunoregulatory and anti-HIV-1 enzyme activities of antioxidant components from lotus (*Nelumbo nucifera* Gaertn.) rhizome", *Bioscience reports*, 31(5): p.381-390.
7. Kuo Y.C., Lin Y.L., Liu C.P., and Tsai W.J. (2005), "Herpes simplex virus type 1 propagation in HeLa cells interrupted by *Nelumbo nucifera*", *Journal of Biomedical Science*, 12(6): p.1021– 1034.
8. Mallika Kumarihamy et al (2015), In vitro opioid receptor affinity and in vivo behavioral studies of *Nelumbo nucifera* flower, *J Ethnopharmacol*, 174 (4), p.57- 65
9. Mukherjee P.K, Mukherjee D., Maji A.K., Saha K., Rai S., Heinrich M. (2009), "The sacred lotus (*Nelumbo nucifera*) – phytochemical and therapeutic profile", *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 61: p.407–422.
10. Sharma B.R., Gautam L.N.S., Adhikari D., Karki R. (2016), "A Comprehensive Review on Chemical Profiling of *Nelumbo Nucifera*: Potential for Drug Development", *Phytotherapy Research*, 31(1): p.3-26.
11. Chen H., Sun K., Yang Z., Guo X., Wei S. (2018) "Identification of Antioxidant and Anti- α -amylase Components in Lotus (*Nelumbo nucifera*, Gaertn.) Seed Epicarp", *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 187(3): p.677-690.
12. Jiang X.L., Wang L., Wang E.J., Zhang G.L., Chen B., Wang M.K., Li F. (2018), "Flavonoid glycosides and alkaloids from the embryos of *Nelumbo nucifera* seeds and their antioxidant activity", *Fitoterapia*, 125: p.184-190.
13. Jiang Y., Ng T.B., Liu Z., Wang C., Li N., Qiao W., Liua F. (2011), "Immunoregulatory and anti-HIV-1 enzyme activities of antioxidant components from lotus (*Nelumbo nucifera* Gaertn.) rhizome", *Bioscience reports*, 31(5): p.381-390.
14. Yuan L., Gu X., Yin Z., Kang W. (2014), "Antioxidant Activities In Vitro And Hepatoprotective Effects Of *Nelumbo Nucifera* Leaves In Vivo", *Afr J Tradit Complement Altern Med.*, 11(3): p.85-91.
15. Nguyễn Văn Đán (2014), nghiên cứu độc tính và tác dụng an thần của cao bình vôi – lạc tiên – lá sen – lá vông nem trên chuột nhắt trắng, tạp chí Y Học TP. Hồ Chí Minh, 18 (1).
16. Nguyễn Văn Hải (2015), chiết xuất nuciferin từ lá sen bằng dầu hòa, Tạp chí Dược liệu, 6, tr.324-328.
17. Nguyễn Ngọc Hồng và cộng sự (2019), "Nghiên cứu thành phần hóa thực vật, tác dụng quét gốc tự do và chống oxy hóa của lá sen (*Nelumbo nucifera* Gaertn.)", tạp chí Nông nghiệp & Phát triển Nông thôn, 23, tr.74-80.

10. Nội dung nghiên cứu khoa học, triển khai thực nghiệm và phương án thực hiện

Đối tượng nghiên cứu

Dược liệu nghiên cứu

Ngó sen được thu hái tại huyện Hồng Ngự, tỉnh Đồng Tháp. Ngó sen sau khi rửa sạch đem phơi đến khi khô hoàn toàn. Sau đó đem ngó sen khô đi xay nhỏ thành bột.

Động vật thử nghiệm

Chuột nhắt trắng đực và cái, chủng *Swiss albino*, trưởng thành, khỏe mạnh, không dị tật do Viện vắc xin và sinh phẩm y tế Nha Trang cung cấp. Trọng lượng từ 20-25g.

Nội dung nghiên cứu:

Phần A: Tổng quan, thuyết minh đề tài

Phần B: Nội dung nghiên cứu

Nội dung 1:

a. Mục đích:

Khảo sát độc tính cấp đường uống của cao chiết Ngó sen

b. Phương pháp nghiên cứu:

Cho chuột thử nghiệm dùng liều cao của cao dược liệu trong điều kiện ổn định ở tất cả các lô, quan sát các phản ứng xảy ra trong vòng 72 giờ và tiếp tục theo dõi đến đủ 14 ngày.

c. Sản phẩm dự kiến:

Bảng kết quả khảo sát liều của cao chiết Ngó sen trên chuột nhắt trắng

d. Thời gian thực hiện:

Từ tháng 03/2021 – 05/2021

e. Các công việc thực hiện (Cần nêu rõ các hoạt động bố trí thí nghiệm, chỉ tiêu khảo sát đánh giá)

Chia chuột ngẫu nhiên vào các lô, mỗi lô gồm 6 con (3 con đực và 3 con cái). Cho chuột thử nghiệm nhịn đói 12 giờ nhưng vẫn được uống nước đầy đủ trước khi cho uống cao dược liệu liều tối đa có thể qua đường uống (nồng độ đặc nhất có thể qua kim uống đầu dò, thể tích cho uống 0,2ml/10g trọng lượng chuột).

Theo dõi và ghi nhận cử động tổng quát, biểu hiện hành vi, số lượng chuột chết trong 72 giờ và tiếp tục theo dõi đến đủ 14 ngày.

Mổ và quan sát đại thể của những con chết và những con sống sau 14 ngày quan sát.

Chỉ tiêu khảo sát đánh giá

Có 3 trường hợp xảy ra:

Trường hợp 1: Sau khi chuột được uống cao dược liệu, số lượng chuột thử nghiệm trong lô vẫn bảo toàn, xác định liều cao nhất có thể qua kim mà không làm chết chuột thử nghiệm. Liều này ký hiệu là D_{max} và liều tương đối an toàn D_s dùng trong các thử nghiệm

được lý có thể bằng hoặc lớn hơn $1/5 D_{max}$.

Trường hợp 2: Sau khi chuột được uống cao dược liệu, tỷ lệ tử vong là 100% thì thử với liều giảm $1/2$ so với liều ban đầu. Tiếp tục giảm liều cho đến khi tìm được liều tối thiểu gây chết 100% chuột (LD_{100}) và liều tối đa không gây chết chuột (LD_0). Tiến hành thử nghiệm xác định LD_{50} : chia chuột làm 4 lô, mỗi lô ít nhất 6 con. Chia 4 liều theo cấp số cộng để xác định từ $LD_0 - LD_{100}$. Ở những liều gần LD_{50} , tăng số lượng chuột mỗi lô lên để kết quả đo lường chính xác hơn. Theo dõi trong 72 giờ, ghi nhận biểu hiện và số lượng chuột tử vong hoặc sống ở các lô, lập phân suất tử vong để tìm LD_{50} . Sau đó áp dụng phương pháp Behrens – Karber để xác định LD_{50} .

Trường hợp 3: Sau khi chuột được uống cao dược liệu, phân suất tử vong thấp hơn 100%, không xác định được liều gây chết tuyệt đối, không thể xác định được LD_{50} . Tuy nhiên trong trường hợp này có thể xác định liều tối đa không gây chết chuột, gọi là liều dưới liều chết (LD_0). Khi đó, liều tương đối an toàn D_s dùng trong các thử nghiệm dược lý có giá trị bằng $1/5$ hoặc $1/10$ liều LD_0 .

Nội dung 2:

a. Mục đích:

Khảo sát tác động giảm đau trung ương của cao chiết Ngó sen

b. Phương pháp nghiên cứu:

Trước khi thực hiện thí nghiệm, đo tiềm thời cảm nhận đau của chuột. Những con chuột có tiềm thời cảm nhận đau quá 5 giây không được đưa vào thử nghiệm theo phương pháp nhúng đuôi chuột.

c. Sản phẩm dự kiến:

Bảng kết quả khảo sát tác động giảm đau trung ương của cao chiết Ngó sen

d. Thời gian thực hiện:

Từ tháng 06/2021 – 07/2021

e. Các công việc thực hiện (Cần nêu rõ các hoạt động bố trí thí nghiệm, chỉ tiêu khảo sát đánh giá)

Chia chuột (đã thử tiềm thời) ngẫu nhiên vào lô, mỗi lô gồm 6 con. Cho chuột dùng thuốc với thể tích 10ml/kg thể trọng.

❖ Lô chứng: cho chuột uống nước cất.

❖ Lô đối chứng: cho uống dung dịch morphin chlorhydrate

❖ Lô thử nghiệm: Uống cao Ngó sen

Chỉ tiêu khảo sát đánh giá

so sánh tiềm thời cảm nhận đau giữa các lô. Nếu tiềm thời của lô thử kéo dài hơn so với lô chứng thì chứng tỏ chất thử nghiệm có tác dụng giảm đau trung ương.

Nội dung 3:

a. Mục đích:

Khảo sát tác động giảm đau ngoại biên của cao chiết Ngó sen

b. Phương pháp nghiên cứu:

Phương pháp gây đau quận bằng acid acetic

c. Sản phẩm dự kiến:

Bảng kết quả khảo sát tác động giảm đau ngoại biên của cao chiết Ngó sen

d. Thời gian thực hiện:

Từ tháng 07/2021 – 08/2021

e. Các công việc thực hiện (*Cần nêu rõ các hoạt động bố trí thí nghiệm, chỉ tiêu khảo sát đánh giá*)

Chia chuột ngẫu nhiên thành lô, mỗi lô 6 con. Cho chuột dùng thuốc với thể tích 10ml/kg thể trọng.

- Lô chứng: cho uống nước cất.

- Lô đối chứng: cho uống dung dịch aspirin.

- Lô thử nghiệm: uống cao Ngó sen.

Chỉ tiêu khảo sát đánh giá

So sánh số lần đau quận ở cùng thời điểm giữa các lô. Nếu số lần đau ở lô thử giảm so với lô chứng thì chứng tỏ chất thử nghiệm có tác dụng giảm đau ngoại biên.

Nội dung 4:

a. Mục đích:

Khảo sát tác động an thần của cao chiết Ngó sen

b. Phương pháp nghiên cứu:

Khảo sát tác dụng an thần bằng thí nghiệm Rota-rod

c. Sản phẩm dự kiến:

Bảng kết quả khảo sát tác động an thần của cao chiết Ngó sen

d. Thời gian thực hiện:

Từ tháng 08/2021 – 09/2021

e. Các công việc thực hiện (*Cần nêu rõ các hoạt động bố trí thí nghiệm, chỉ tiêu khảo sát đánh giá*)

Chuột được tập chạy trên máy Rota-rod với tốc độ 36 vòng/phút, 3 phút mỗi ngày trong 3 ngày trước khi tiến hành thí nghiệm. Vào ngày thứ 4, những chuột bám trên máy quay

Rota-rod trong hơn 3 phút được đưa vào thí nghiệm.

Chia chuột ngẫu nhiên thành 6 lô, mỗi lô gồm 6 con.

- Lô chứng: Uống nước cất.
- Lô đối chứng: Uống diazepam.
- Lô thử nghiệm: uống cao chiết Ngó sen

Chỉ tiêu khảo sát đánh giá

So sánh thời gian chuột bám trên máy quay Rota-rod giữa các lô. Nếu thời gian của lô thử ngắn hơn có ý nghĩa thống kê so với lô chứng thì chứng tỏ chất thử nghiệm có tác dụng an thần.

Phần C: Báo cáo tổng kết đề tài

11. Cách tiếp cận, phương pháp nghiên cứu, kỹ thuật sử dụng (*Luận cứ tiếp cận vấn đề nghiên cứu, thiết kế nghiên cứu, phương pháp nghiên cứu, kỹ thuật sẽ sử dụng gắn với từng nội dung chính của đề tài; so sánh với các phương pháp giải quyết tương tự khác và phân tích để làm rõ được tính mới, tính độc đáo, tính sáng tạo của đề tài*)

11.1. Cách tiếp cận:

Gây mô hình khảo sát tác động giảm đau và an thần cho động vật thử nghiệm, so sánh sự khác nhau của lô chứng và lô thuốc thử nghiệm

11.2. Phương pháp nghiên cứu, kỹ thuật sử dụng:

Khảo sát tác động giảm đau trung ương của cao chiết Ngó sen bằng phương pháp nhúng đuôi chuột

Nhúng đuôi chuột vào nước nóng trong bếp cách thủy đã được cài đặt ở nhiệt độ $55 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$. Sử dụng đồng hồ bấm giây để ghi nhận tiềm thời của chuột, bắt đầu từ lúc nhúng đuôi vào nước và kết thúc khi đuôi quẫy mạnh ra khỏi nước. Tiềm thời được ghi nhận tại các thời điểm: trước khi dùng thuốc và ở 30, 60, 90, 120 phút sau khi dùng thuốc. Đo 2 lần liên tiếp, mỗi lần cách nhau 15s ở mỗi thời điểm và ghi nhận tiềm thời dài hơn. Lưu ý: dùng bông gòn lau khô đuôi chuột sau mỗi lần nhúng và rút đuôi chuột ra khỏi nước nóng nếu sau 10 giây chuột vẫn không có phản ứng. So sánh tiềm thời cảm nhận đau giữa các lô. Nếu tiềm thời của lô thử kéo dài hơn so với lô chứng thì chứng tỏ chất thử nghiệm có tác dụng giảm đau trung ương.

Khảo sát tác động giảm đau ngoại biên của cao chiết Ngó sen bằng phương pháp gây đau quận khi sử dụng acid acetic

Sau khi dùng thuốc 60 phút, tất cả các chuột được gây đau bằng cách tiêm phúc mô dung dịch acid acetic 1% pha trong nước cất. Mỗi chuột được đặt vào bocal thủy tinh riêng.

Đếm số lần đau quận ở chuột (biểu hiện: toàn thân vuron dài, uốn cong người, một hoặc cả hai chân sau duỗi ra, hóp bụng) trong các khoảng thời gian sau, tính từ thời điểm dung dịch acid acetic được tiêm: 5 – 10 phút, 10 – 15 phút, 15 – 20 phút, 20 – 25 phút, 25 – 30 phút, 30 – 35 phút, 35 – 40 phút. So sánh số lần đau quận ở cùng thời điểm giữa các lô. Nếu số lần đau ở lô thử giảm so với lô chứng thì chứng tỏ chất thử nghiệm có tác dụng giảm đau ngoại biên.

Khảo sát tác dụng an thần bằng thí nghiệm Rota-rod

Cho chuột dùng thuốc với thể tích 10ml/kg thể trọng chuột. Sau khi uống thuốc 30 phút, đặt chuột lên máy quay với tốc độ 36 vòng/phút. Quan sát trong 10 phút. Ghi nhận thời gian chuột bám trên máy quay của mỗi lô.

So sánh thời gian chuột bám trên máy quay Rota-rod giữa các lô. Nếu thời gian của lô thử ngắn hơn có ý nghĩa thống kê so với lô chứng thì chứng tỏ chất thử nghiệm có tác dụng an thần.

11.3. Tính mới, tính độc đáo, tính sáng tạo:

Góp phần làm sáng tỏ thêm những tác động dược lý chưa được tìm hiểu đầy đủ của cây sen tại Việt Nam. Đề tài mở ra hướng mới tìm kiếm các hợp chất mới trong tự nhiên có hoạt tính sinh học cao.

12. Tiến độ thực hiện đề tài

TT	Nội dung, công việc chủ yếu	Kết quả phải đạt	Thời gian
1	Nội dung 1: Chiết xuất dược liệu và khảo sát độc tính cấp đường uống	Cao chiết dược liệu	04/2021 – 05/2021
2	Nội dung 2: Khảo sát tác dụng giảm đau ngoại biên	01 bảng số liệu kết quả tác động giảm đau ngoại biên	06/2021 - 07/2021
3	Nội dung 3: Khảo sát tác dụng giảm đau trung ương	01 bảng số liệu kết quả tác động giảm đau trung ương	07/2021 - 08/2021
4	Nội dung 4: Khảo sát tác dụng an thần	01 bảng số liệu kết quả tác động an thần	09/2021 - 10/2021
5	Xử lý số liệu, đánh giá kết quả, viết tổng kết	Bài báo cáo tổng kết	10/2021 – 12/2021

III. SẢN PHẨM KHOA HỌC CÔNG NGHỆ, HIỆU QUẢ CỦA ĐỀ TÀI

13. Sản phẩm khoa học công nghệ của đề tài

TT	Tên sản phẩm	Đơn vị đo	Chất lượng sản phẩm	Số lượng/quy mô

1	Kết quả tác động giảm đau ngoại biên của cao chiết từ Ngó sen	Bảng kết quả tác động giảm đau ngoại biên của cao chiết từ Ngó sen	01
2	Kết quả tác động giảm đau trung ương của cao chiết từ Ngó sen	Bảng kết quả tác động giảm đau trung ương của cao chiết Ngó sen	01
3	Kết quả tác động an thần của cao chiết từ Ngó sen	Bảng kết quả tác động an thần của cao chiết từ Ngó sen	01
4	Bài báo khoa học	Bài báo khoa học đăng trên tạp chí Khoa học và Công nghệ - Đại học Nguyễn Tất Thành	01

14. Phạm vi và địa chỉ (dự kiến) ứng dụng các kết quả của đề tài

Kết quả của đề tài có ứng dụng trong lĩnh vực Y Dược học, có thể tạo tiền đề cho hướng nghiên cứu phát triển bài thuốc dân gian trở thành một chế phẩm có tác dụng giảm đau, an thần ở các cơ sở sản xuất dược phẩm

15 Tác động và lợi ích mang lại của kết quả nghiên cứu

15.1. Đối với lĩnh vực KH&CN có liên quan (Nêu những dự kiến đóng góp vào các lĩnh vực khoa học công nghệ ở trong nước và quốc tế)

Kết quả nghiên cứu sẽ là một đóng góp đáng kể vào việc khẳng định đường lối chính sách phát triển nguồn nguyên liệu tự nhiên để làm nguyên liệu sản xuất thuốc của bộ y tế. Đây cũng là đóng góp của các nhà khoa học vào sự phát triển khoa học kỹ thuật của thành phố, mở ra hướng nghiên cứu mới về thành phần và tác dụng của các hợp chất tự nhiên.


15.2. Đối với tổ chức chủ trì và các cơ sở ứng dụng kết quả nghiên cứu

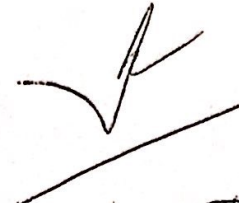
- Đối với tổ chức chủ trì: Kết quả nghiên cứu góp phần vào việc đào tạo, nâng cao trình độ chuyên môn, trình độ nghiên cứu cho giảng viên
- Đối với các cơ sở ứng dụng kết quả nghiên cứu: hướng tới bào chế sản phẩm mới có hoạt tính dược lý tốt từ thiên nhiên

Tp. Hồ Chí Minh, ngày..... thángnăm 2021

KHOA/VIỆN/PHÒNG/TRUNG TÂM

CHỦ NHIỆM ĐỀ TÀI


GS.TS. Nguyễn Văn Thanh
HIỆU TRƯỞNG


ThS. Võ Thị Thu Hà

TRƯỜNG ĐH NGUYỄN TẤT THÀNH

TRƯỞNG PHÒNG
KHOA HỌC CÔNG NGHỆ

PHÓ HIỆU TRƯỞNG




PGS.TS. Trần Thị Hồng



ĐÀO

Tp. Hồ Chí Minh, ngày 15 Tháng 4 năm 2021

HỢP ĐỒNG THỰC HIỆN ĐỀ TÀI NGHIÊN CỨU KHOA HỌC CẤP CƠ SỞ

Số: 2021.01.83 /HD-KHCN

Căn cứ Quyết định số 196/QĐ-NTT ngày 22/6/2015 về việc ban hành Quy định quản lý đề tài nghiên cứu khoa học và phát triển công nghệ Cấp cơ sở Trường Đại học Nguyễn Tất Thành;

CHÚNG TÔI GỒM:

1. Bên đặt hàng (Bên A): Trường ĐH Nguyễn Tất Thành

Đại diện là : Chức vụ:
Địa chỉ : 300A Nguyễn Tất Thành, P13, Quận 4, TP. Hồ Chí Minh
Điện thoại : (028) 39411189 Fax: (028) 39404759

2. Bên nhận đặt hàng (bên B):

Đại diện là : ThS. Võ Thị Thu Hà
Đơn vị công tác : Khoa Dược – Trường đại học Nguyễn Tất Thành
Địa chỉ : 300A – Nguyễn Tất Thành
Điện thoại : 0914407679
Số tài khoản : 0071000746529 Tên ngân hàng: Vietcombank -CN: Hồ Chí Minh
CMND : 025926579 MST: 8072011012



Cùng thoả thuận và thống nhất ký kết Hợp đồng thực hiện Đề tài khoa học và công nghệ cấp cơ sở (sau đây gọi tắt là Hợp đồng) với các điều khoản sau:

Điều 1. Đặt hàng và nhận đặt hàng thực hiện đề tài.

Bên A đặt hàng và Bên B nhận đặt hàng thực hiện đề tài “**Khảo sát tác động giảm đau, an thần của cao chiết Ngó sen (*Nelumbo nucifera* Gaertn. Nelumbonaceae)**” theo các nội dung trong Thuyết minh đề tài đã được Hội đồng phê duyệt (sau đây gọi tắt là Thuyết minh).

Thuyết minh là bộ phận không tách rời của Hợp đồng.

Điều 2. Thời gian thực hiện Hợp đồng

Thời gian thực hiện đề tài là 9 tháng, từ tháng 4 năm 2021 đến tháng 2 năm 2022

Điều 3. Kinh phí thực hiện đề tài

- Tổng kinh phí thực hiện đề tài là: **20.000.000 VNĐ (Hai mươi triệu đồng).**
- Tiền độ cấp kinh phí: Kinh phí được cấp làm 02 đợt:
Đợt 1: 50% tổng kinh phí, sau khi ký kết hợp đồng.
Đợt 2: 50% tổng kinh phí, sau khi báo cáo tổng kết của bên B được Hội đồng nghiệm thu đề tài thông qua.

Điều 4. Sản phẩm đề tài

- Báo cáo tổng kết
- Quy trình công nghệ liên quan đến nội dung đề tài / hoặc đề xuất kiến nghị (đối với

đề tài Kinh tế-Xã hội)

- Bài báo khoa học:

- Bài báo khoa học đăng trên tạp chí trong nước có chỉ số ISSN
- Bài báo khoa học đăng trên tạp chí quốc tế thuộc danh mục SCOPUS
- Bài báo khoa học đăng trên tạp chí quốc tế thuộc danh mục ISI

Điều 5. Gia hạn

1. Đề tài được phép gia hạn 1 lần và tối đa là 6 tháng. Bên B gửi đề nghị gia hạn cho Bên A trước 1 tháng so với thời gian kết thúc đề tài.

2. Nếu sau khi gia hạn, đề tài vẫn không thể nghiệm thu thì Bên A sẽ thành lập Hội đồng để thanh lý đề tài.

Điều 6. Xử lý tài chính

a) Đề tài đã kết thúc và đánh giá nghiệm thu từ mức “Đạt” trở lên thì Bên A thanh toán đầy đủ kinh phí cho Bên B theo điều 3 tại Hợp đồng này.

b) Trong trường hợp bên B không thực hiện đầy đủ các công việc để nghiệm thu đề tài theo đúng thời hạn quy định; thì Bên B có trách nhiệm hoàn trả lại tối thiểu 20% tổng kinh phí đã cấp. Mức hoàn trả do Bên A quyết định dựa vào báo cáo tổng kết và nội dung các minh chứng.

c) Trong trường hợp nghiệm thu đúng hạn, kết quả nghiệm thu đề tài "Không đạt" thì bên B không được nhận khoản kinh phí đợt 2; và bên A được quyền yêu cầu bên B chuyển giao toàn bộ kết quả nhiệm vụ.

d) Sau khi nghiệm thu, Bên B không thực hiện việc quyết toán theo yêu cầu của bên A thì bên A không có nghĩa vụ thanh toán kinh phí đợt 2 cho bên B và bên A có quyền thanh lý hợp đồng không cần có ý kiến của bên B.

Điều 7. Quyền sở hữu trí tuệ và sở hữu tài sản, thiết bị

1. Quyền sở hữu trí tuệ của sản phẩm, tài sản hình thành từ việc thực hiện đề tài này sẽ tuân theo quy định tại Luật Sở hữu trí tuệ số 50/2005/QH11 đã được sửa đổi bổ sung theo luật 36/2009/QH12 và luật số 42/2019/QH14. Chủ nhiệm đề tài muốn phổ biến, sử dụng kết quả nghiên cứu phải có sự thoả thuận bằng văn bản giữa hai Bên.

2. Các tài sản, thiết bị phục vụ cho việc thực hiện đề tài, được mua sắm bằng kinh phí do Bên A cấp, đều thuộc quyền sở hữu của Bên A.

3. Khi công bố bài báo/báo cáo, Ghi nhận sự tài trợ của Bên A trong các kết quả nghiên cứu của Đề tài được công bố, đăng tải cũng như trong các hoạt động khác liên quan đến Đề tài như sau:

+ Đối với các tài liệu tiếng Anh: “This research is funded by Nguyen Tat Thanh University, Ho Chi Minh city, Vietnam”.

+ Đối với các tài liệu tiếng Việt: “Nghiên cứu này được tài trợ bởi Trường Đại học Nguyễn Tất Thành, Thành phố Hồ Chí Minh, Việt Nam”.

Điều 8. Điều khoản chung

1. Trong quá trình thực hiện Hợp đồng, nếu một trong hai bên có yêu cầu sửa đổi, bổ sung nội dung hoặc có căn cứ để chấm dứt thực hiện Hợp đồng thì phải thông báo cho bên kia ít nhất là 15 ngày làm việc.

2. Hai bên cam kết thực hiện đúng các quy định của Hợp đồng và có trách nhiệm hợp tác giải quyết các vướng mắc phát sinh trong quá trình thực hiện theo quy định pháp luật.

3. Luật áp dụng: Hợp đồng này được điều chỉnh và giải thích theo các quy định pháp

luật của nước Cộng hòa Xã hội chủ nghĩa Việt Nam.

Điều 8. Hiệu lực của Hợp đồng

Hợp đồng này có hiệu lực từ ngày ký Hợp đồng này được lập thành 3 bản và có giá trị như nhau, Bên A giữ 2 bản, bên B giữ 1 bản.

Đại diện Bên A



TS. Trần Ái Cẩm

**Đại diện Bên B
CHỦ NHIỆM ĐỀ TÀI**

Ths. Võ Thị Thu Hà

