

**ĐẠI HỌC QUỐC GIA HÀ NỘI
KHOA Y DƯỢC**

LƯƠNG THỊ HỒNG

**CHIẾT XUẤT VÀ ĐÁNH GIÁ TÁC DỤNG CỦA
CAO SÂM NGỌC LINH TRÊN MÔ HÌNH GÂY
SUY NHƯỢC THẦN KINH Ở ĐỘNG VẬT THỰC
NGHIỆM**

KHÓA LUẬN TỐT NGHIỆP ĐẠI HỌC NGÀNH DƯỢC SĨ

Hà Nội – 2017

**ĐẠI HỌC QUỐC GIA HÀ NỘI
KHOA Y DƯỢC**

NGƯỜI THỰC HIỆN: LƯƠNG THỊ HỒNG

**CHIẾT XUẤT VÀ ĐÁNH GIÁ TÁC DỤNG CỦA
CAO SÂM NGỌC LINH TRÊN MÔ HÌNH GÂY
SUY NHƯỢC THẦN KINH Ở ĐỘNG VẬT THỰC
NGHIỆM**

KHÓA LUẬN TỐT NGHIỆP ĐẠI HỌC NGÀNH DƯỢC SĨ

Khóa: QH2012.Y

Người hướng dẫn: Th.S. PHAN MINH ĐỨC.

PGS.TS. NGUYỄN THANH HẢI.

Hà Nội – 2017

LỜI CẢM ƠN

Bằng tất cả sự chân thành nhất, tôi xin bày tỏ lòng biết ơn đến những người đã đóng góp công sức vào sự thành công của khóa luận này!

Tôi xin chân thành bày tỏ lòng kính trọng và biết ơn sâu sắc tới Bác sĩ.Th.S.Phan Minh Đức – giảng viên bộ môn Liên chuyên khoa, PGS.TS.Nguyễn Thanh Hải - giảng viên bộ môn bào chế, PGS. TS. Dương Thị Ly Hương- giảng viên bộ môn Dược lý và TS. Nguyễn Hữu Tùng – giảng viên bộ môn hóa dược khoa Y Dược, ĐHQGHN, đã hướng dẫn tận tình, động viên và giúp đỡ tôi trong suốt quá trình thực hiện khóa luận.

Tôi cũng xin gửi lời cảm ơn tới các thầy cô, các kỹ thuật viên các bộ môn và khoa Y - Dược Trường Đại học Quốc gia Hà Nội đã giúp đỡ tôi trong suốt quá trình làm thực nghiệm tại trường.

Xin cảm ơn Ban giám hiệu, Phòng đào tạo, các phòng ban đã tạo mọi điều kiện giúp tôi hoàn thành khóa luận. Cảm ơn các thầy cô khoa Y - Dược Trường Đại học Quốc gia Hà Nội đã quan tâm dìu dắt và truyền kiến thức cho tôi trong 5 năm học vừa qua.

Cuối cùng, tôi xin gửi lời cảm ơn tới gia đình và bạn bè đã luôn ủng hộ, động viên và khích lệ tôi trong quá trình học tập và làm khóa luận.

Hà Nội, tháng 6 năm 2017

Sinh viên

Lương Thị Hồng

DANH MỤC CÁC CHỮ VIẾT TẮT

KRGE: Sâm Hàn quốc

EMP: elevated plus maze-mê cung hình chữ thập treo cao

FST: Swimming test Thí nghiệm chuột bơi

VG: Sâm Ngọc Linh

TKTW: Thần kinh trung ương

DANH MỤC CÁC BẢNG

Tên bảng
Bảng 1.1: Hàm lượng saponin của Sâm Ngọc Linh so sánh với các loại Panax spp
Bảng 1.2: Các saponin dẫn chất của 20(S)-protopanaxadiol
Bảng 1.3: Các saponin dẫn chất của 20(S)-protopanaxatriol
Bảng 1.4: Các saponin có cấu trúc ocotillol và dẫn chất của axit oleanolic
Bảng 1.5: Axit oleanolic
Bảng 1.6: Các chất béo được tìm thấy
Bảng 1.7: Thành phần axit amin chủ yếu
Bảng 1.8: Các nguyên tố vi lượng
Bảng 3.9: Tác dụng của sâm Ngọc Linh lên số lần lưu của chuột ở tay kín/tay hở
Bảng 3.10: Tác dụng của sâm Ngọc Linh lên thời gian lưu của chuột ở tay kín/tay hở
Bảng 3.11: Tác dụng của sâm Ngọc Linh lên thời gian bơi của chuột
Bảng 3.12: Tác dụng của sâm Ngọc Linh lên số lần lưu của chuột ở buồng sáng/buồng tối
Bảng 3.13: Tác dụng của sâm Ngọc Linh thời gian lần lưu của chuột ở buồng sáng/buồng tối

MỤC CÁC ĐỒ THỊ VÀ HÌNH VẼ

Tên hình vẽ, đồ thị
Hình 1.1: Sâm Ngọc Linh ngoài thiên nhiên
Hình 1.2: Hình thái sâm Ngọc Linh
Hình 1.3: Cây sâm Ngọc Linh
Hình 1.4: Cây sâm Ngọc Linh sống trên mặt đất và hình dạng củ sâm
Hình 1.5: Máy cô quay chân không thu hồi dung môi
Hình 3.6: Dụng cụ thử nghiệm EMP
Hình 3.7: Tác dụng của sâm Ngọc Linh lên số lần lưu của chuột ở tay kín/tay hở
Hình 3.8: Tác dụng của sâm Ngọc Linh lên thời gian lưu của chuột ở tay kín/tay hở
Hình 3.9: Tác dụng của sâm Ngọc Linh lên thời gian bơi của chuột
Hình 3.10: Tác dụng của sâm Ngọc Linh lên số lần lưu của chuột ở buồng sáng/buồng tối
Hình 3.11: Tác dụng của sâm Ngọc Linh thời gian lần lưu của chuột ở buồng sáng/buồng tối

MỤC LỤC

LỜI CẢM ƠN	
DANH MỤC CÁC CHỮ VIẾT TẮT.....	
DANH MỤC CÁC BẢNG	
MỤC CÁC ĐỒ THỊ VÀ HÌNH VẼ	
ĐẶT VẤN ĐỀ	1
CHƯƠNG 1 – TỔNG QUAN.....	3
1.1. Giới thiệu về cây Sâm Ngọc Linh.....	3
1.1.1. Đặc điểm thực vật	3
1.1.2. Danh pháp khoa học	4
1.1.3. Đặc điểm hình thái.....	5
1.1.4. Sinh thái và phân bố	6
1.1.5. Bảo tồn và nhân giống	8
1.1.6. Thành phần hóa học	8
1.1.7. Tác dụng dược lý.....	14
1.1.8. Công dụng.....	15
1.2. Bệnh suy nhược thần kinh	15
1.2.1. Khái niệm.....	15
1.2.2. Dịch tể học.	15
1.2.3. Theo y học hiện đại	15
1.3. Một số mô hình nghiên cứu tác dụng suy nhược thần kinh của sâm ngọc linh trên thực nghiệm.	18
1.3.1. Grip test	18
1.3.2. Thử nghiệm EPM (Elevated Plus Maze)	19
1.3.3. Thử nghiệm chuột bơi (swimming test)	19
1.3.4. Thử nghiệm đánh giá hoạt động tự nhiên của chuột (spontaneous activity test).	20
1.3.5. Thử nghiệm Rota – rod	20
1.3.6. Open field test.....	20
1.3.7. Light/dark test.....	21
CHƯƠNG 2 : ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU.....	22

2.1. Nguyên vật liệu và thiết bị.....	22
2.1.1. Nguyên liệu.....	22
2.1.2. Hóa chất.....	22
2.1.3. Dụng cụ và thiết bị.....	22
2.2. Nguyên cứu chiết xuất	22
2.3. Nghiên cứu tác dụng chống suy nhược thần kinh	22
2.3.1. Đối tượng.....	22
2.3.2. Nội dung nghiên cứu.	23
2.3.3. Phương pháp nghiên cứu.....	23
2.3.4. Xử lý số liệu.....	25
CHƯƠNG 3: KẾT QUẢ THỰC NGHIỆM VÀ BÀN LUẬN	26
3.1. Chiết xuất saponin toàn phần.....	26
3.1.1. Chuẩn bị dược liệu	26
3.1.2. Lựa chọn phương pháp chiết	26
3.1.3. Lựa chọn dung môi.....	26
3.1.4. Chiết xuất saponin toàn phần.....	26
3.2. Nghiên cứu tác dụng chống suy nhược thần kinh	26
3.2.1. Thử nghiệm EPM	26
3.2.2. Thử nghiệm chuột bơi.....	30
3.2.3. Dark/light test	31
3.3. BÀN LUẬN:	33
3.3.1. Về các test nghiên cứu:	33
d. Tác dụng chống suy nhược thần kinh của sâm ngọc linh.....	38
CHƯƠNG 4: KẾT LUẬN VÀ KIẾN NGHỊ.....	39
4.1. Kết luận	39
4.2. Kiến nghị	39
TÀI LIỆU THAM KHẢO	41
TÀI LIỆU TIẾNG VIỆT	41

ĐẶT VẤN ĐỀ

Sâm Ngọc Linh *Panax vietnamensis* Ha et Grush là một loài *Panax* mới, cho đến nay chỉ mới phát hiện ở Việt Nam, được biết đến trên thế giới với tên gọi Vietnamese ginseng. Là một loài cây thuộc họ Cam tùng (Araliaceae), còn gọi là sâm Việt Nam, sâm Khu Năm (sâm K5), sâm trúc (sâm đốt trúc, trúc tiết nhân sâm) củ ngải rọm con hay cây thuốc giầu, là loại sâm quý được tìm thấy tại miền Trung Trung Bộ Việt Nam, mọc tập trung ở các huyện miền núi Ngọc Linh thuộc huyện Đăk Tô tỉnh Kon Tum, huyện Nam Trà My tỉnh Quảng Nam. Những nghiên cứu liên quan đến saponin và tính dược lý của sâm ngọc linh. Theo truyền thống, sâm ngọc linh là một cây thuốc có nhiều công dụng: chống stress vật lý, chống stress tâm lý và trầm cảm, chống oxy hóa não hóa, phòng chống ung thư, bảo vệ tế bào gan. Nghiên cứu dược lý lâm sàng của sâm Ngọc Linh cũng cho kết quả tốt: bệnh nhân ăn ngon, ngủ tốt, lên cân, tăng thị lực, hoạt động trí tuệ và thể lực cải thiện, gia tăng sức đề kháng, cải thiện các trường hợp suy nhược thần kinh và suy nhược sinh dục, nâng cao huyết áp ở người bị huyết áp thấp.[1,3]

Sâm Ngọc Linh cũng là loại nhân sâm thứ 20 được tìm thấy trên thế giới. Theo kết quả nghiên cứu từ năm 1978 của Bộ Y tế Việt Nam, phân thân rễ của cây sâm Ngọc Linh Việt Nam chứa 26 hợp chất saponin có cấu trúc hóa học đã biết và 24 saponin có cấu trúc mới không có trong các loại sâm khác, trong khi sâm Triều Tiên có khoảng 25 saponin. Những kết quả nghiên cứu, phân lập thành phần hóa học mới nhất được công bố còn kéo dài danh sách saponin của sâm Ngọc Linh hơn nữa, lên tổng cộng 52 loại. Như vậy, sâm Việt Nam là một trong những loại sâm có hàm lượng saponin nhiều nhất, tương tự một số cây sâm quý đã từng được nghiên cứu sử dụng từ lâu trên thế giới. Trong thành phần saponin, majonosid - R2 (M-R2) là saponin chính thuộc nhóm ocotillol, đặc trưng cho sâm Việt Nam, không có trong các cây sâm *Panax* có giá trị khác như: nhân sâm, tam thất và sâm Hoa kỳ. M-R2 chiếm gần 50% saponin toàn phần và có nhiều tác dụng dược lý quan trọng. Ngoài ra, nhân sâm còn chứa rất nhiều thành phần khác như: các chất chống oxy hóa, peptitde, polysaccharide, acid béo, vitamin, 18 axit amin, 20 chất khoáng vi lượng và hàm lượng tinh dầu là 0,1%. Vì vậy ngày nay, những công nghệ chiết suất dược liệu cũng rất được quan tâm. Trong chương trình hợp tác nghiên cứu với Trường Đại học Hiroshima- Nhật Bản (1998 – 2001), việc nghiên cứu thành phần hoá học của lá Sâm Việt Nam đã được thực hiện. Đó là tiền đề cho những nghiên cứu tiếp theo về dược lý cơ bản. Bên cạnh việc nghiên cứu một số tác dụng dược lý điển

hình của họ Nhân Sâm, công trình này được thực hiện chủ yếu định hướng vào tác dụng chống mệt mỏi suy nhược cơ của sâm Ngọc Linh[6,7] . Trong bài khóa luận này chúng tôi tiến hành nghiên cứu: **“Chiết xuất và đánh giá tác dụng của cao sâm Ngọc Linh trên mô hình gây suy nhược thần kinh ở động vật thực nghiệm.**

1- Chiết xuất cao sâm Ngọc Linh.

2- Đánh giá hiệu quả của cao sâm Ngọc Linh trên mô hình gây suy nhược thần kinh ở động vật thực nghiệm.

CHƯƠNG 1 – TỔNG QUAN

1.1. Giới thiệu về cây Sâm Ngọc Linh

1.1.1. Đặc điểm thực vật

1.1.1.1. Lịch sử phát hiện

Trước khi có sự phát hiện từ phía các nhà khoa học, sâm Ngọc Linh đã được các đồng bào dân tộc thiểu số Trung Trung bộ Việt Nam, đặc biệt là dân tộc Xê Đăng, sử dụng như một loại củ rừng, mà họ gọi là củ ngải rơm con hay cây thuốc giầu, chữa nhiều loại bệnh theo các phương thuốc cổ truyền.[18,19,20]. Dựa trên những thông tin lưu truyền trong cộng đồng các dân tộc thiểu số Quảng Nam, Kon Tum về một loại củ quý hiếm trên núi Ngọc Linh có tác dụng tốt đối với sức khỏe con người, và do nhu cầu của kháng chiến đã khiến ngành dược khu Trung Trung Bộ quyết phải tìm ra cây sâm chi Panax tại miền Trung, mặc dù trước đó nhiều nhà khoa học cho rằng chi Panax chỉ có ở miền Bắc. [15,16]

Năm 1973, khu Y tế Trung Trung bộ cử một tổ 4 cán bộ do dược sĩ Đào Kim Long làm trưởng đoàn, kỹ sư Nguyễn Bá Hoạt, dược sĩ Nguyễn Châu Giang, dược sĩ Trần Thanh Dân là thành viên, đi điều tra phát hiện cây sâm theo hướng chân núi Ngọc Linh thuộc huyện Đắc Tô tỉnh Kon Tum. Khi đoàn lên tỉnh Kon Tum, Ban Dân y Kon Tum cử thêm dược tá Nguyễn Thị Lê trợ giúp cho đoàn, dẫn đường lên núi Ngọc Linh. [12,14]. Sau nhiều ngày vượt suối băng rừng, đến 9 giờ sáng ngày 19 tháng 03 năm 1973, ở độ cao 1.800 mét so với mặt biển, đoàn đã phát hiện hai cây sâm đầu tiên và ngay buổi chiều cùng ngày đã phát hiện được một vùng sâm rộng lớn thuộc phía Tây núi Ngọc Linh. Sau 15 ngày nghiên cứu toàn diện về hình thái, sinh thái, quần thể, quần lạc, phân bố, di cư và phát tán, dược sĩ Đào Kim Long đã xác định núi Ngọc Linh là quê hương của cây sâm mới, đặc biệt quý hiếm, chưa từng xuất hiện tại bất cứ nơi nào khác trên thế giới. Theo đánh giá của Tiến sĩ Trần Chí Liêm, nguyên Thứ trưởng Bộ Y tế Việt Nam: đây là cống hiến quan trọng cho khoa học, bổ sung tri thức mới về vùng phân bố chi Panax xuống vĩ tuyến 15 và bổ sung cho chi Panax họ Araliaceae một loài mới[1-4,6-8]



Hình 1.1: Sâm Ngọc Linh ngoài tự nhiên.

1.1.1.2. Phân loại

- Giới: Plantae
- Ngành: Magnoliophyta
- Bộ: Apiales
- Họ: Araliaceae
- Chi: Panax
- Loài: *Panax vietnamensis* Ha et Grush
- Tên khác: Sâm Việt Nam, Sâm Ngọc Linh, Sâm Khu Năm, Thuốc Dấu.
- Tên nước ngoài: Vietnamese ginseng[6,7]



Hình 1.2: Hình thái Sâm Ngọc Linh.

1.1.2. Danh pháp khoa học

Ngày 8 tháng 6 năm 1973 tại văn phòng Ban Dân y Khu 5 dược sĩ Đào Kim Long, chủ nhiệm đề tài nghiên cứu sâm Ngọc Linh đã nêu rõ đặc điểm hình thái, sinh thái học, quần thể, thảm thực vật, khả năng thích nghi, cách phát tán, khả năng tái sinh của cây nhân sâm này, kèm theo báo cáo có các tiêu bản mẫu cây ép khô, ảnh chụp và 3kg sâm đã phơi khô. Dược sĩ Đào Kim Long đã đặt tên khoa học của cây

sâm Ngọc Linh này là *Panax articulatus* KL Dao (trong kháng chiến để giữ bí mật nên thường gọi là Sâm K5), hay *Panax articulatus* Kim Long Đào theo tên người phát hiện. 12 năm sau, tên Nhân sâm Việt Nam và tên khoa học là *Panax vietnamesis* Ha et Grushy, họ Ngũ gia Araliaceae, được công bố tại Viện Thực vật Kamarov (Liên Xô cũ) năm 1985, do Hà Thị Dung và I. V. Grushvitsky đặt tên. Áp dụng Quy tắc quốc tế về danh pháp thực vật công bố năm 1994 (ICBN - Tokyo code), điều 1, mục 3 phần C, danh pháp khoa học của sâm Ngọc Linh có thể được nối tên của người thứ hai công bố với tên người thứ nhất qua chữ ex, và khi đó tên khoa học của cây nhân sâm Ngọc Linh được viết hợp pháp theo luật quốc tế hiện nay sẽ phải là *Panax articulatus* KL Dao (1973) ex Ha et Gruskv (1985)[6,7]

1.1.3. Đặc điểm hình thái

Đây là một loại cây thân thảo sống lâu năm, cao 40cm đến 100cm, thoát nhìn rất giống nhân sâm Triều Tiên, nhưng nhìn kỹ sẽ thấy thân rễ có sẹo và các đốt như đốt trúc do thân khí sinh rụng hàng năm để lại.[6]

Sâm Ngọc Linh có dạng thân khí sinh thẳng đứng, màu lục hoặc hơi tím, nhỏ, có đường kính thân độ 4-8mm, thường tàn lụi hàng năm tuy thỉnh thoảng cũng tồn tại một vài thân trong vài năm. Thân rễ có đường kính 1-2cm, mọc bò ngang như củ hoàng tinh trên hoặc dưới mặt đất độ 1-3cm, mang nhiều rễ nhánh và củ. Các thân mang lá và tương ứng với mỗi thân mang lá là một đốt dài khoảng 0,5-0,7cm, tuy sâm chỉ có một lá duy nhất không rụng suốt từ năm thứ 1 đến năm thứ 3 và chỉ từ năm thứ 4 trở đi mới có thêm 2 đến 3 lá]. Trên đỉnh của thân mang lá là lá kép hình chân vịt mọc vòng với 3-5 nhánh lá. Cuống lá kép dài 6-12mm, mang 5 lá chét, lá chét ở chính giữa lớn hơn cả với độ dài 12-15 cm, rộng 3-4 cm. Lá chét phiến hình bầu dục, mép khía răng cưa, chóp nhọn, lá có lông ở cả hai mặt. Cây 4-5 năm tuổi có hoa hình tán đơn mọc dưới các lá thẳng với thân, cuống tán hoa dài 10-20 cm có thể kèm 1-4 tán phụ hay một hoa riêng lẻ ở phía dưới tán chính. Mỗi tán có 60-100 hoa, cuống hoa ngắn 1-1.5 cm, lá đài 5, cánh hoa 5, màu vàng nhạt, nhị 5, bầu 1 ô với 1 vòi nhụy. Quả mọc tập trung ở trung tâm của tán lá, dài độ 0,8cm-1cm và rộng khoảng 0,5cm-0,6cm, sau hai tháng bắt đầu chuyển từ màu xanh đến xanh thẫm, vàng lục, khi chín ngà màu đỏ cam với một chấm đen không đều ở đỉnh quả. Mỗi quả chứa một hạt, một số quả chứa 2 hạt và số quả trên cây bình quân khoảng 10 đến 30 quả.[7]

Sâm Ngọc Linh có thể sống rất lâu, thậm chí trên 100 năm, sinh trưởng khá chậm. Bộ phận dùng làm thuốc chủ yếu là thân rễ, củ và ngoài ra cũng có thể dùng lá và rễ con. Vào đầu tháng 1 hàng năm, sâm xuất hiện chồi mới sau mùa ngủ đông,

thân khí sinh lớn dần lên thành cây sâm trưởng thành có 1 tán hoa. Từ tháng 4 đến tháng 6, cây nở hoa và kết quả. Tháng 7 bắt đầu có quả chín và kéo dài đến tháng 9. Cuối tháng 10, phần thân khí sinh tàn lụi dần, lá rụng, để lại một vết sẹo ở đầu củ sâm và cây bắt đầu giai đoạn ngủ đông hết tháng 12. Chính căn cứ vào vết sẹo trên đầu củ mỗi mùa đông đến mà người ta có thể nhận biết cây sâm bao nhiêu tuổi, phải ít nhất 3 năm tuổi tức trên củ có một sẹo (sau 3 năm đầu sâm chỉ rụng một lá) mới có thể khai thác, khuyến cáo là trên 5 năm tuổi. Mùa đông cũng là mùa thu hoạch tốt nhất phần thân rễ của sâm[1-3]



Hình 1.3: Cây Sâm Ngọc Linh

1.1.4. Sinh thái và phân bố

1.1.4.1. Đặc điểm sinh thái

Sâm Ngọc linh là loại thân thảo ưa ẩm và ưa bóng, sinh trưởng ở độ cao từ 1200-2100m so với mặt nước biển, mọc rải rác hay tập trung thành đám nhỏ dưới tán rừng. Môi trường rừng có sâm luôn ẩm ướt, thường xuyên có mây mù, nhiệt độ khoảng 15-18 °C, lượng mưa khoảng 3000 mm/năm. Đất rừng tại đây được tạo thành do lá cây mục lâu ngày, có màu nâu đen, tơi xốp, hàm lượng mùn cao và chứa nhiều nước. [8,14]

Sâm Ngọc Linh sinh trưởng mạnh trong mùa xuân hè. Mùa hoa quả từ tháng 5-10, cây ra hoa quả tương đối đều hàng năm. Sau khi quả chín rụng xuống đất, tồn tại qua mùa đông khoảng 4 tháng và sẽ nảy mầm vào mùa xuân năm sau, Sâm có khả năng tái sinh từ hạt khá tốt. [6,7]

Sâm có phần thân trên mặt đất lụi hàng năm, để lại vết sẹo rõ. Mỗi năm từ đầu mầm thân rễ (kể cả phần thân rễ phân nhánh) chỉ mọc lên một thân mang lá. Căn cứ vào vết sẹo trên thân rễ để tính tuổi của Sâm[1-3]



Hình 1.4: Cây sâm Ngọc Linh sống trên đất mùn và hình dạng củ sâm.

1.1.4.2. Đặc điểm phân bố

Trong số hơn mười loài và dưới loài đã biết của chi Nhân Sâm (*Panax*), ở Việt Nam có ba loại mọc tự nhiên và một loại là cây nhập trồng. Sâm Ngọc Linh được phát hiện sau cùng vào 1973. Đến 1985 nó mới được công bố là hoàn toàn mới đối với khoa học. Đến nay Sâm Ngọc Linh chỉ mới được phát hiện duy nhất ở vùng núi Ngọc Linh thuộc hai tỉnh Quảng Nam và Kon Tum.[6]

Ngọc Linh là dãy núi cao thứ hai của Việt Nam. Có tọa độ địa lý từ 107°50' - 108°7' kim tuyến Đông và từ 14°44' - 15°13' vĩ tuyến Bắc, đỉnh cao nhất là Ngọc Linh cao 2598m. Những điểm vốn trước đây có sâm Ngọc Linh mọc tự nhiên từ độ cao khoảng 1500-2200m, chủ yếu tập trung ở 1800-2000m, thuộc đại bàn hai huyện Đăk Tô (Tỉnh Kon Tum) và Trà Vinh (tỉnh Quảng Nam). Về giới hạn cũng như phân bố của loài sâm này ở núi Ngọc Linh hiện nay đã có nhiều thay đổi, những nghiên cứu thực địa mới nhất cho thấy sâm còn mọc cả ở núi Ngọc Lum Heo thuộc xã Phước Lộc, huyện Phước Sơn, tỉnh Quảng Nam, đỉnh núi Ngọc Am thuộc Quảng Nam, Đắc Glây thuộc Kontum, núi Langbian ở Lạc Dương tỉnh Lâm Đồng cũng rất có thể có loại sâm này.[7]

Sâm mọc tập trung dưới chân núi Ngọc linh, một ngọn núi cao 2,578m với lớp đất vàng đỏ trên đá granit dày trên 50cm, có độ mùn cao, tơi xốp và rừng nguyên sinh còn rộng, nên được gọi là sâm Ngọc Linh.[6]

Sâm Ngọc Linh thường mọc dưới tán rừng ẩm, nhiều mùn, thích hợp với nhiệt độ ban ngày từ 20°C-25°C ban đêm 15°C-18°C. Tổng lượng mưa trung bình năm của vùng sâm là từ 2.600 - 3.200mm. Nhiệt độ trung bình năm dao động từ 15 -18,5°C

Tổng lượng bốc hơi trung bình năm từ 670 - 770 mm. Độ ẩm trung bình từ 85,5 - 87,5 %. Chúng mọc dày thành đám dưới tán rừng dọc theo các suối ẩm trên những mảnh đất nhiều mùn[6,7]

1.1.5. Bảo tồn và nhân giống

Trước nguy cơ tuyệt chủng của giống sâm quý, Chính phủ Việt Nam đã quyết định thành lập vùng cấm quốc gia ở khu vực có sâm mọc tập trung tại 2 tỉnh Kon Tum và Quảng Nam, đồng thời xếp sâm Ngọc Linh vào danh sách các loại cây cấm khai thác, mua bán bất hợp pháp; tỉnh Quảng Nam và huyện Nam Trà My cũng đã ban hành nhiều cơ chế, chính sách khuyến khích bảo tồn, phát triển cây sâm Ngọc Linh[14,15].

1.1.6. Thành phần hóa học

1.1.6.1. Hợp chất saponin từ phần dưới mặt đất của Sâm Ngọc Linh

Hợp chất saponin được xem là thành phần hoạt chất chủ yếu của cây Sâm Ngọc Linh cũng như của các loài sâm khác trên thế giới. Từ phần dưới mặt đất của Sâm Ngọc Linh hoang dại đã phân lập và xác định được cấu trúc protopanaxadiol oxid II và 52 hợp chất saponin bao gồm 26 saponin đã biết và 26 saponin có cấu trúc mới được đặt tên là vina-ginsenoside-R1-R24 và 20-O-Me-G.Rh13,4,5).[3,6]

Các saponin dammaran được xem là hoạt chất quyết định cho các tác dụng sinh học có giá trị cũng chiếm một tỉ lệ rất cao về hàm lượng và số lượng trong thành phần hợp chất saponin của Sâm Ngọc Linh (50/52saponin được phân lập)[7,11]

Trong đó các saponin dẫn chất của 20(S)-protopanaxadiol gồm 22 hợp chất với các đại diện chính là: ginsenoside-Rb1, -Rb3, -Rd.[12]

Các saponin dẫn chất của 20(S)-protopanaxatriol gồm 17 hợp chất với các đại diện chính là: ginsenoside- Re, -Rg1, notoginsenoside -R1[11]

Các saponin có cấu trúc ocotillol gồm 11 hợp chất với các đại diện chính là: majonoside -R1 và -R2. Đặc biệt M-R2 chiếm gần 50% hàm lượng saponin toàn phần từ phần dưới mặt đất của Sâm Ngọc Linh và trở thành 1 hợp chất chủ yếu của Sâm Ngọc Linh so với thành phần saponin trong các loài sâm khác trên thế giới và gấp 48 lần hiệu suất chiết được từ Đại diệp tam thất (*Panax japonicum* C.A. Mey. Var. major (Burk.) C.Y.Wu et K.M.Feng).[32,35]

Hai saponin dẫn chất của acid oleanolic chỉ chiếm một tỉ lệ rất thấp với hemsloside -Ma3 được phát hiện đầu tiên trong một loài *Panax* thuộc họ Nhân

sâm. Hợp chất này trước đây đã được phân lập từ *Hemsleya macrosperma* C.Y.Wu họ Bầu bí (Cucurbitaceae)[34]

Phần trên mặt đất có 19 saponin damaran đã được phân lập, gồm 11 saponin đã biết và 8 saponin có cấu trúc mới đặt tên là vinagensenosid-L1-L8.[35]

Bảng 1.1: Hàm lượng saponin của Sâm Ngọc Linh so sánh với các loại *Panax* spp[12]

Loại aglycon	<i>Panax ginseng</i>	<i>Panax notoginseng</i>	<i>Panax quinquefolius</i>	<i>Panax vietnamensis</i>
20(S)-ppd	2,9	2,1	2,7	3,1
20(S)-ppt	0,6	2,4	1,2	2,0
Ocotillol	-	-	0,04	5,6
Oleanolic acid	0,02	-	0,07	0,09
Hiệu suất toàn phần(%)	3,5	4,5	4,0	10,8

Ghi chú : 20(S)-ppd:20(S)-protopanaxadiol; 20(S)-ppt: 20(S)-protopanaxatriol

Bảng 1.2: Các saponin dẫn chất của 20(S)-protopanaxadiol[6]

Tên	Túy	R1	R2	Hiệu suất(%)
G-Rb1*	(A)	-Glc2- Glc	-Glc6- Glc	2,0
G-Rb2	(A)	-Glc2- Glc	-Glc6-Ara(p)	0,012
G-Rb3*	(A)	-Glc2- Glc	-Glc6-Xyl	0,11
G-Rc	(A)	-Glc2- Glc	-Glc6-Ara(f)	0,013
G-Rd*	(A)	-Glc2- Glc	-Glc	0,87
PG-RC1	(A)	-Glc2- Glc6-Ac	-Glc	0,001
GY-IX	(A)	-Glc	-Glc6-Xyl	0,002
GY-XVII	(A)	-Glc	-Glc6- Glc	0,036
Q-R1	(A)	-Glc2- Glc6-Ac	-Glc6- Glc	0,012
Q-R1	(A)	-Glc2- Glc2-Xyl	-Glc6- Glc	0,072
M-F1	(B)	-Glc2- Glc	-Glc	0,001
VG-R3	(H)	-Glc2- Glc	-Glc	0,009
VG-R7	(A)	-Glc2- Glc2-Xyl	-Glc	0,01
VG-R8	(C)	-Glc2- Glc	-Glc	0,004
VG-R9	(B)	-Glc2- Glc	-Glc	0,004
VG-R13	(E)	-Glc2- Glc	-Glc	0,002

VG-R24	(A)	-Glc2-Xyl	-Glc	0,001
VG-R23	(A)	-Glc2- Glc	-Ara	0,001
VG-R22	(A)	-Glc2- Glc	-Xyl	0,001
VG-R16	(D)	-Glc2- Glc	-Glc	0,003
VG-R21	(G)	-Glc2- Glc	-Glc	0,001
VG-R20	(F)	-Glc2- Glc	-Glc	0,003

Ghi chú: G= ginsenoside; PG= pseudo-ginsenoside; GY= gypenoside; Q= quinquenoside N= notoginsenoside; M= majonoside; VG= vina-ginsenoside. *: các saponin chính

Bảng 1.3: Các saponin dẫn chất của 20(S)-protopanaxatrol[6]

Tên	Túy	R1	R2	R3	Hiệu suất(%)
G-Re*	(I)	-H	-Glc2-Rha	-Glc	0,17
20-glc-G-Rf	(I)	-H	-Glc2-Glc	-Glc	0,01
G-Rg1*	(I)	-H	-Glc	-Glc	1,37
G-Rh1	(I)20(R),20(S)	-H	-Glc	-H	0,008
G-Rh1	(I)	-H	-Glc	-H	0,021
PG-RS1	(I)	-H	-Glc2-Rha-6Ac	-Glc	0,013
N-R1*	(I)	-H	-Glc2-Xyl	-Glc	0,36
N-R6	(I)	-H	-Glc	-Glc6-aGlc	0,01
VG-R4	(I)	-Glc2-Glc	-H	-Glc	0,004
VG-R12	(K)	-H	-Glc	-H	0,005
VG-R15	(J)	-H	-Glc	-Glc	0,003
VG-R17	(K)	-H	-Glc	-Glc	0,002
VG-R18	(K)	-H	-Glc	-Glc	0,002
VG-R19	(L)	-Glc2-Glc	-H	-Glc	0,006
OMe-GRh1	(I)	-H	-Glc	-CH3	0,015
VG-R25	(G)	-H	-Glc	-Glc	0,003
G-Rh4	(M)	-H	-Glc	-H	0,014

Ghi chú: *: các saponin chính yếu trong thành phần saponin dẫn chất protppanaxatriol

Glc: b-D-glucopyranosyl; a-Glc: a-glucopyranosyl; GlcA: b-D-glucuronopyranosyl;
 Rha: a-L-rhamnopyranosyl; Xyl: b-D-xylopyranosyl; Ara: a--arabinopyranosyl;
 Ara(f): a-L-arabinofuranosyl; Ara(p): a-L-arabinopyranosyl; Ac: acetyl.

Bảng 1.4: Các saponin có cấu trúc ocotillol và dẫn chất của acid oleanolic[6]

Tên	Túy	R1	R2	Hiệu suất (%)
PG-RT4	(N)	-Glc	-CH3	0,065
24(S)-PG-F11	(N)	-Glc2-Rha	-CH3	0,005
M-R1*	(N)	-Glc2-Glc	-CH3	0,14
M-R2 *	(N)	-Glc2-Xyl	-CH3	5,29
VG-R1	(N)	-Glc2-Rha-6Ac	-CH3	0,033
VG-R2	(N)	-Glc2-Xyl-6Ac	-CH3	0,014
VG-R5	(N)	-Glc2-Xyl4-aGlc	-CH3	0,008
VG-R6	(N)	-Glc2-Xyl-6Ac	-CH3	0,006
VG-R14	(N)	-Glc2-Xyl	-CH2OH	0,02
VG-R10	(O)	-Glc	-CH3	0,007
VG-R1	(O)	-Glc2-Xyl	-CH3	0,03

Bảng 1.5: Acid oleanolic[6]

Tên	Túy	R1	R2	Hiệu suất(%)
G-R0	(P)	-Glc2-Glc	-Glc	0,038
H-Ma3	(P)	-Glc2-Glc-3Ara(p)	-Glc	0,05

Ghi chú: H= hemsloside

1.1.6.2. Hợp chất polyacetylen

Có 7 hợp chất đã được phân lập, 5 hợp chất đã được xác định cấu trúc với panaxynol và heptadeca-1,8(E)-dien-4,6-diyn-3,10-diol là 2 polyacetylen chính yếu. Hai hợp chất mới là 10 acetoxy-heptadeca-8€-en-4,6-diyn-3-ol và heptadeca-1,8(E),10(E)-trien-4,6-diyn-3,10-diol[3,6,7,11,12,33-35].

1.1.6.3. Thành phần axit béo.

Bảng 1.6: Các chất béo được tìm thấy[6]

STT	Số cacbon của hợp chất	%	Tên của axit béo
1	8C	vết	Acid caprylic
2	10C	vết	Acid capric
3	11C	vết	
4	12C	0,22	Acid lauric
5	13C	0,31	
6	14C	1,33	Acid myristic
7	15C	0,40	Acid pentadecausic
8	15C-1	0,31	
9	16C	29,62	Acid palmitic
10	16C-1	vết	Acid palmitoleic
11	17C	1,13	Acid heptadecausic
12	17C-1	vết	
13	18C	4,48	Acid stearic
14	18C-1	13,26	Acid oleic
15	18C-2	40,04	Acid linoleic
16	18C-3	2,61	Acid linolenic
17	20C	1,51	Acid arachidic

1.1.6.4. Thành phần axit amin

Bảng 1.7: Thành phần acid amin chủ yếu[6]

STT	Acid amin	Acid amin (%)	Acid amin thủy giải (%)
1	Tryptophan	10,20	-
2	Lysin	17,90	5,29
3	Histidin	1,02	2,59
4	Arginin	46,66	12,90
5	Axit Aspartic	7,60	10,38
6	Threonin	1,20	5,19
7	Serin	5,12	5,19

8	Axit Glutamic	2,05	6,49
9	Prolin	3,07	15,58
10	Glycin	4,10	5,19
11	Alanin	-	5,19
12	Cystin	1,53	Vết
13	Valin	0,51	1,29
14	Methionin	0,51	Vết
15	Isoleucin	1,02	2,59
16	leucin	1,02	5,19
17	Tyrosin	0,51	6,49
18	Phenylanin	0,51	6,49

1.1.6.5. Thành phần các nguyên tố vi đa lượng

Bảng 1.8: Các nguyên tố vi lượng[6]

STT	Nguyên tố vi lượng	Hàm lượng(ppm)	STT	Nguyên tố vi lượng	Hàm lượng(ppm)
1	K	9349,19	11	Br	17,27
2	Ca	2844,74	12	Ni	10,61
3	Mg	1950,19	13	Cu	6,23
4	Fe	491,21	14	Cr	4,10
5	Sr	169,87	15	Y	1,51
6	Ti	120,65	16	I	0,24
7	B	140,00	17	Co	0,15
8	Rb	91,62	18	As	0,10
9	Mn	68,10	19	Se	0,05
10	Zn	26,11	20	Hg	0,04

1.1.6.6. Các thành phần khác

➤ Hợp chất Sterol.

- β – Sitosterol và daucosterin (β – Sitosteryl – 3 – o - β –D – glucopyranosid)

➤ Hợp chất Gluxit: (định lượng theo phương pháp Bertran).

- Đường tự do: 6,19%

- Đường toàn phần: 26,77%
- Các thành phần khác: (trong thân rễ và rễ củ tươi).
- Tinh dầu: 0,05 – 0,10%
- Sinh tố C: 0,059%. [6,7]

1.1.7. Tác dụng dược lý

- Tác dụng trên hệ TKTW: Sâm Ngọc Linh liều thấp có tác dụng kích thích thần kinh, làm tăng hoạt động và trí nhớ, nhưng liều cao lại ức chế thần kinh. [6]

- Tác dụng chống trầm cảm: Sâm Ngọc Linh có tác dụng chống trầm cảm ở liều uống một lần 200mg/kg hoặc liều 50 – 100 mg/kg dùng luôn 7 ngày ở chuột nhắt trắng, majonosid R₂ tiêm trong màng bụng có tác dụng chống trầm cảm ở cả 3 liều: 3.1; 6.2; và 12,5 mg/kg. [6]

- Tác dụng tăng sinh lực: Sâm Ngọc Linh có tác dụng tăng sinh lực trong thí nghiệm chuột bơi, làm tăng sinh lực chống lại sự mệt mỏi, giúp phục hồi sức lực. [6]

- Tác dụng sinh thích ứng.

+ Trong stress vật lý, cho chuột nhắt trắng uống Sâm Ngọc Linh liều 100mg/kg có tác dụng làm tăng khả năng chịu đựng đối với nước nóng(37 – 42) và lạnh (-5°C) làm kéo dài thời gian sống thêm của chuột thí nghiệm. [6]

+ Trong stress cô lập, chuột nhắt trắng được nuôi riêng từng con trong 4 tuần, thời gian ngủ khi tiêm natri barbital giảm đi 30%. Sâm Ngọc linh liều uống 50 – 100 mg/kg hoặc hoạt chất majonosid R₂ tiêm trong màng bụng liều 3.1; 12.5 mg/kg làm thời gian ngủ trở lại gần bình thường. [6]

- Tác dụng chống oxy hóa: trên thí nghiệm in vitro dùng dịch nổi của dịch não, gan và phân đoạn vi thể gan của mô não chuột và phân đoạn vi thể gan của chuột nhắt trắng, saponin sâm Ngọc Linh ở nồng độ 0.05 – 0.5 mg/kg có tác dụng chống oxy hóa, ức chế sự hình thành MDA (malonyl chaldehyd) là sản phẩm của quá trình oxy hóa lipip màng sinh học. [6]

- Tác dụng kích thích miễn dịch

+ Bột chiết sâm Ngọc Linh liều uống 500mg/kg và majonosid R₂ tiêm trong màng bụng có tác dụng làm tăng chỉ số thực bào trong thí nghiệm in vitro và in vivo ở chuột nhắt trắng, [6]

+ Dùng liều Escherichia coli gây chết chuột nhắt trắng. nếu kết hợp dùng sâm và majonosid R₂ với liều trên sẽ làm tăng tỷ lệ số chuột sống sót. Có lẽ do thuốc làm tăng tác dụng thực bào với E. coli. [6]

- Tác dụng phục hồi máu: Trong thí nghiệm làm giảm hồng cầu và bạch cầu ở động vật thí nghiệm, sâm Việt Nam có tác dụng làm phục hồi số lượng hồng cầu và bạch cầu đã bị giảm.[6]

- Các tác dụng dược lý khác: sâm Ngọc Linh còn có tác dụng tăng cường nội tiếp tố sinh dục, điều hòa hoạt động của tim, tác dụng chống tăng cholesterol máu, tác dụng bảo vệ gan, có tác dụng chống viêm và ức chế sự phát triển vi khuẩn Streptococcus gây bệnh viêm họng ở người[6]

1.1.8. Công dụng

Theo y học cổ truyền sâm Ngọc Linh cũng có tác dụng tương tự nhân sâm và thậm chí còn có tác dụng mạnh hơn. Bổ 5 tạng(tâm, can, tỳ ,phế, thận) , yếu tinh thần, định hồn phách, làm khỏi sợ hãi, trừ tà khí, sáng mắt, uống lâu nhẹ mình, tăng tuổi thọ.[6,7]

1.2. Bệnh suy nhược thần kinh

1.2.1. Khái niệm.

Suy nhược thần kinh là một hội chứng rối loạn tâm thể biểu hiện qua các rối loạn hoạt động thần kinh cao cấp và thể lực, dễ mệt mỏi sau một sự gắng sức về hoạt động trí óc hoặc thể lực, kèm theo các cảm giác khó chịu, rối loạn tư duy, mất ngủ hay quên, đau đầu hoặc đau và co thắt các cơ, cấu kính, lo âu, đặc trưng chủ yếu là sự giảm hoạt động tư duy và lao động thể lực[5,9,13].

1.2.2. Dịch tể học.

Suy nhược thần kinh là một bệnh phổ biến ở Việt Nam và trên thế giới.

Ở Việt Nam bệnh tâm căn suy nhược chiếm 3 – 4%

Ở các Tây Âu chiếm tới 5 – 10% số dân.

Bệnh xuất hiện ở người lao động trí óc nhiều hơn người lao động chân tay, nam nhiều hơn nữ nhiều nhất ở lứa tuổi 20 – 45[5,9,13].

1.2.3. Theo y học hiện đại

1.2.3.1. Nguyên nhân gây bệnh.

Nguyên nhân của bệnh tâm căn suy nhược là do những nhân tố gây chấn thương tâm thần tác động trên người bệnh, thông thường cường độ không mạnh lắm nhưng kéo dài như:

- Những thất bại trong công việc và đời sống, tình yêu, vợ chồng, con cái, người thân, giữa cá nhân và tập thể. Tóm lại là những xung đột giữa nhân cách người bệnh với môi trường xung quanh.

- Thường gặp trong những sang chấn trường diễn kế tiếp nhau hoặc kết hợp với nhau.

Bệnh suy nhược thần kinh thường xuất hiện từ từ sau một thời gian sang chấn và nó bộc lộ rõ rệt khi gặp một nhân tố thúc đẩy.

- Hay gặp ở những loại hình thần kinh yếu.
- Hay gặp ở những người lao động trí óc quá mức.
- Cuộc sống quá căng thẳng.
- Trên cơ sở một bệnh viêm nhiễm mạn tính, viêm loét dạ dày – tá tràng.
- Hay gặp ở những bệnh nhân nhiễm độc mạn tính: nhiễm độc do nghề nghiệp hoặc nghiện rượu mạn tính, hoặc thiếu dinh dưỡng kéo dài, hoặc thiếu ngủ lâu ngày.

Bệnh danh theo YHCT: Kinh quý, chính xung, thất miên, kiện vong.

Nguyên nhân gây ra bệnh là do chấn thương tâm lý kéo dài như lo nghĩ căng thẳng thần kinh quá độ, hoặc do loại hình thần kinh yếu dẫn đến sự rối loạn hoạt động công năng (tinh, khí, thần) của các tạng đặc biệt là Tâm, Can, Tỳ, Thận[5,9,13].

1.2.3.2. Cơ chế bệnh sinh.

Chủ yếu là do sự suy yếu của tổ chức lưới – thân não lên vỏ não, tức là làm rối loạn môi liên hệ lưới – vỏ não do các dòng xung đột từ bên ngoài vào không được sàng lọc qua các tổ chức lưới – thân não mà nó dồn cả lên vỏ não. Vì vậy, vỏ não không chịu đựng được, dẫn đến sự suy yếu ức chế, suy yếu quá trình hưng phấn và cuối cùng hậu quả của sự căng thẳng quá trình thần kinh – tâm thần ở vỏ não đi đến sự ức chế giới hạn. Nó chia làm 3 giai đoạn:

- Giai đoạn đầu: do quá trình ức chế suy yếu nên trên lâm sàng biểu hiện trạng thái kích thích bùng nổ, khí sắc dao động trong ngày, mất tập trung tư tưởng, khó ngủ.

- Giai đoạn 2: sự suy yếu của quá trình hưng phấn biểu hiện trên lâm sàng: chóng mặt, mệt mỏi, giảm sự chú ý, đau đầu, dễ cảm xúc.

- Gian đoạn 3: rơi vào trạng thái ức chế giới hạn để bảo vệ tế bào thần kinh não tránh những kích thích quá mức. Hậu quả là suy yếu cả 2 quá trình: hưng phấn và ức chế. Biểu hiện trạng thái ức chế trên lâm sàng là: người bệnh bàng quan, vô cảm hoặc trầm cảm, có khuynh hướng phát sinh ra ám ảnh và sợ hãi [5,9,13].

1.2.3.3. Các biểu hiện lâm sàng.

❖ Hội chứng kích thích suy nhược.

- Bệnh nhân dễ bị kích thích bởi những kích thích nhỏ. Ví dụ: tiếng ồn, những xung đột nhỏ trong cuộc sống lại dễ làm bệnh nhân bực tức, phản ứng mạnh.

- Sự kích thích dễ bùng nổ nhưng cũng dễ tắt và được thay thế bằng phản ứng suy nhược mệt mỏi.

- Người bệnh thường thiếu ngủ. Thời kỳ sau, bệnh nhân nghỉ ngơi cũng không hồi phục lại được[5,9,13].

❖ **Nhức đầu.**

- Bệnh nhân có tê đầu đầu âm ỉ, khu trú hoặc lan tỏa ra cả đầu. Đau suốt ngày hoặc chỉ vài giờ trong ngày.

- Đặc điểm: nhức đầu đặc biệt tăng lên khi xúc động hay mệt mỏi và giảm đi khi thoải mái hoặc được ngủ tốt [5,9,13].

❖ **Mất ngủ.**

Ngủ không sâu, ngủ hay mê, ngủ không đầy giấc. Sáng dậy thường mệt mỏi, ban ngày có thể ngủ gà[5,9,13].

❖ **Các triệu chứng về cơ thể và thần kinh.**

- Có thể có cảm giác đau mỗi cột sống và thắt lưng.

- Rối loạn cảm giác, giác quan và nội tạng, gây ra chóng mặt, hoa mắt, cảm giác đau nhức ở trong xương, kiến bò trên da hoặc cảm giác nóng, lạnh, tê, run tay[5,9,13].

❖ **Các rối loạn thực vật nội tạng.**

- Mạch: không đều, lúc nhanh, lúc chậm.

- Huyết áp dao động, khi cao, khi thấp.

- Có thể có cảm giác hồi hộp, trống ngực hoặc đau vùng trước tim.

- Thân nhiệt có thể tăng một chút hoặc giảm.

- Có thể có rối loạn tiêu hóa: đầy bụng, chướng bụng. ăn khó tiêu, phân khi táo, khi nát.

- Có thể tăng tiết mồ hôi.

- Nam: di tinh hoặc xuất tinh sớm hoặc liệt dương.

- Nữ: rối loạn kinh nguyệt, thông kinh.

Tất cả những thay đổi này đều chịu ảnh hưởng do các yếu tố chấn thương tâm thần[5,9,13].

❖ **Các rối loạn về mặt tâm thần.**

Rối loạn về cảm xúc: người bệnh hay lo âu, khí sắc hơi trầm, tập trung kém, trí nhớ giảm, hay quên, hay bồn chồn, lo lắng[5,9,13].

1.2.3.4. Các thể lâm sàng.

❖ **Thể cường.**

Bệnh nhân dễ bị kích thích, dễ xúc cảm, khó ngủ và các triệu chứng thần kinh thực vật nội tạng biểu hiện rầm rộ[5,9,13].

❖ **Thể nhược.**

Biểu hiện trạng thái hưng phấn giảm.

- Chóng mệt mỏi
- Khí sắc giảm
- Khả năng lao động giảm
- Ban ngày hay có triệu chứng ngủ gà
- Những kích thích mạnh thì bệnh nhân đáp ứng yếu và ngược lại, những kích thích yếu thì bệnh nhân phản ứng mạnh.
- Ở một số bệnh nhân, khi tình trạng này kéo dài sẽ trở lên gây yếu và suy kiệt[5,9,13].

❖ **Thể trung gian.**

Bệnh cảnh lâm sàng biểu hiện các trạng thái kích thích lẫn suy nhược, khí sắc có khuynh hướng giảm, bàng quan, có khi trầm cảm, có ám ảnh sợ hãi, khả năng lao động lên xuống thất thường khi thì hưng phấn khi thì giảm sút, có nhiều rối loạn thực vật nội tạng[5,9,13].

1.3. Một số mô hình nghiên cứu tác dụng suy nhược thần kinh của sâm ngọc linh trên thực nghiệm.

Cơ sở của việc nghiên cứu các hoạt động thần kinh trên các mô hình động vật là dựa trên sự tương đồng giữa hoạt động thần kinh ở người và động vật. Về sự căng thẳng, lo âu, trầm cảm mặc dù không có cơ sở để nói rằng động vật biểu hiện sự căng thẳng theo cùng cách với con người, nhưng chắc chắn rằng việc thay đổi hành vi ở các loài gặm nhấm biểu lộ sự căng thẳng TK. Ví dụ sự thay đổi hành vi từ bình thường sang tự vệ, hoặc sự thay đổi ngoại hình ở các loài này thường kèm với các hoạt động thần kinh quá khích. Vì vậy, nếu không hoàn toàn giống nhau thì cũng có sự tương đồng giữa căng thẳng TK ở người và các loài gặm nhấm[21,29,40,44,47,50,51]. Đây chính là cơ sở để các thử nghiệm sinh học tìm hiểu tác dụng chống rối loạn lo âu, trầm cảm của thuốc ra đời. Sau đây chúng tôi giới thiệu một số thử nghiệm nghiên cứu tác dụng chống lo âu, trầm cảm đang được sử dụng.

1.3.1. Grip test

Thử nghiệm Grip cũng là một trong những thử nghiệm được sử dụng khá rộng rãi để nghiên cứu các rối loạn lo âu, trầm cảm. Thử nghiệm này đánh giá khả năng đeo bám, sức căng cơ và phối hợp vận động của chuột, từ đó đánh giá được tác dụng giãn cơ cũng như tác dụng của thuốc. Phương pháp này cung cấp ước lượng định lượng về độ bền và khả năng phối hợp của động vật.

Dụng cụ sử dụng trong thử nghiệm này là một sợi dây dài 50cm căng giữa hai cột thẳng đứng. Chuột sau khi uống thuốc 60 phút, được đặt lên dây bằng hai chân trước. Quan sát hiện tượng bám trên dây của chuột và cho điểm[21-23,28,31,32]

1.3.2. Thử nghiệm EPM (Elevated Plus Maze)

Thử nghiệm EPM là một trong những bài kiểm tra phổ biến nhất trong việc đánh giá hành vi lo lắng ở chuột. Cơ sở của thử nghiệm là động vật gặm nhấm có bản năng thích khám phá và rất sợ những nơi hở. Con chuột được lựa chọn sẽ dành thời gian trong tay hở không được bảo vệ hoặc cánh tay kín được bảo vệ, tất cả đều cao khoảng 1 m so với sàn nhà. Chuột có xu hướng tránh các khu vực hở, đặc biệt là khi chúng được thắp sáng, thích những khoản không tối và không gian kín hơn. Khi bị đặt vào môi trường không quen thuộc, chúng sẽ biểu lộ sự tò mò, sợ hãi và căng thẳng. Khi xử dụng thuốc chống rối loạn lo âu, trầm cảm làm giảm sự lo lắng, sợ hãi, căng thẳng ở chuột, do đó làm tăng khả năng khám phá ở cả những nơi hở. [38,39,44,48]

Thử nghiệm EPM dùng dụng cụ là một hình chữ thập có hai tay kín (closed arms) và hai tay hở (open arms) thiết kế vuông góc với nhau, giữa các tay là một khoảng trung tâm. Dụng cụ được đặt cách sàn nhà một khoảng nhất định (tùy vào động vật nghiên cứu là chuột nhắt hay chuột cống mà khoảng cách này cao hay thấp). Khi thí nghiệm, chuột được đặt vào trung tâm của dụng cụ, mặt hướng về phía tay hở và cho tự do đi lại khám phá trong 5 phút. Theo bản năng, khi được đặt trong môi trường mới, chuột có xu hướng khám phá và sẽ đi lại giữa các tay[21-24,27-31]. Tuy nhiên, do dụng cụ được đặt trên cao và có những vùng hở, sẽ làm chuột bị căng thẳng, lo âu, do đó, chuột sẽ đi lại chủ yếu giữa các tay kín-là những nơi an toàn với chúng hơn. Nếu trước khi thí nghiệm, chuột được dùng thuốc chống lo âu, trầm cảm, cảm giác lo âu sợ hãi, căng thẳng sẽ không còn, các tay mở không còn đáng sợ nữa. Vì vậy, chuột sẽ tăng thời gian lưu lại trong tay mở và tăng số lần chuột đi vào.

1.3.3. Thử nghiệm chuột bơi (swimming test)

Các thử nghiệm bơi bắt buộc (FST) ở chuột hoặc chuột được sử dụng để đánh giá các thuốc đang được sàng lọc cho các hoạt động liên quan đến hệ TKTW. FST là một thử nghiệm rất đáng tin cậy trong các phòng thí nghiệm, nhạy cảm, và tương đối có chọn lọc đối với các thuốc trên TKTW. Phác đồ của FST bao gồm việc đưa con vật vào một bình chứa đầy nước và ghi lại thời gian chúng vận động. Chuột hoặc chuột nhắt, sau 2 phút đấu tranh mãnh liệt, đã chấp nhận một trạng thái bất thường (di chuyển trong nước chỉ bằng những cử động nhẹ cần thiết để giữ đầu trên mặt nước), xen kẽ với các hoạt động bơi lội. 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 chống lo âu, trầm cảm làm cho sự bất động được giảm đi. Thử nghiệm dựa trên sự quan sát chuột bơi trong nước. Từ đó xác định được thời gian bơi của chuột và so sánh với mẫu chứng[29-31,40,41,42].

1.3.4. Thử nghiệm đánh giá hoạt động tự nhiên của chuột (spontaneous activity test).

Cơ sở của thử nghiệm là dựa trên quan sát hoạt động tự nhiên của chuột. Thuốc chống rối loạn lo âu, trầm cảm sẽ làm tăng hoạt động bình thường của chuột. Hoạt động của chuột được đo bằng máy hoặc dụng cụ đo đặc biệt[21,23,28,31].

1.3.5. Thử nghiệm Rota – rod

Rota-Rod cũng là một trong những thử nghiệm được áp dụng nhiều trong nghiên cứu tác dụng chống lo âu, trầm cảm của thuốc.

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 chống lo âu, trầm cảm làm tăng phối hợp thần kinh-cơ, tăng khả năng giữ thăng bằng và định hướng không gian nên tăng khả năng đeo bám trên thanh quay của chuột.

Sự tăng thời gian bám trên thanh quay của chuột so với nhóm chứng là bằng chứng cho tác dụng chống lo âu, trầm cảm của thuốc nghiên cứu[21,28-30]

1.3.6. Open field test.

Ban đầu được giới thiệu như là một thước đo của hành vi cảm xúc ở chuột, Open field test đã chứng minh là thành công khi thực hiện trên chuột. Thử nghiệm này cung cấp một cơ hội để đánh giá một cách có hệ thống môi trường mới lạ, hoạt động vận động chung, và cung cấp một cơ sở ban đầu cho các hành vi liên quan đến hành vi lo lắng ở loài gặm nhấm. Ngoài ra, tiếp xúc lặp lại hoặc mở rộng chiều dài cung cấp một phương pháp để đánh giá quen thuộc với môi trường mới này. Từ đó nhận thấy rằng có hai yếu tố ảnh hưởng đến hành vi lo lắng trong không gian mở. Thứ nhất là sự cô lập về mặt xã hội do sự tách biệt với những con cùng lồng khi thực hiện bài kiểm tra. Thứ hai là căng thẳng được tạo ra bởi ánh sáng rực rỡ, không được bảo vệ.

Động vật gặm nhấm sẽ dành một khoảng thời gian đáng kể để khám phá ngoại biên, thường là tiếp xúc với các bức tường (thigmotaxis), hơn là khu vực trung tâm không được bảo vệ. Các con chuột dành nhiều thời gian khám phá khu vực trung tâm chứng tỏ hành vi lo lắng sợ hãi đã được giảm đi[21,24,26,28,31,37].

1.3.7. Light/dark test.

Các thử nghiệm thăm dò tối ánh sáng, được phát triển bởi Crawley và Goodwin, là một tiền thân của EPM và cung cấp một phương tiện để kiểm tra hành vi lo lắng giống như ở loài gặm nhấm. Giống như EPM, chuột tiếp xúc với môi trường mới với các khu vực được bảo vệ (vùng tối) và các khu vực không được bảo vệ (vùng sáng). Hầu hết các con chuột tự nhiên biểu hiện sự ưu tiên cho khoang tối, bảo vệ. Các biện pháp quan trọng để đánh giá hành vi liên quan đến lo lắng trong thiết kế này là sự thay đổi trong sự sẵn sàng để khám phá khu vực được chiếu sáng, không được bảo vệ, phản ánh tăng hoặc giảm số lượng chuyển tiếp giữa các khoang và thời gian dành trong mỗi ngăn, trong một bài kiểm tra 5 phút. Điều trị bằng thuốc chống rối loạn lo âu, trầm cảm làm tăng số lần chuyển tiếp giữa hai ngăn, mà không làm thay đổi sở thích của chuột dành nhiều thời gian hơn vào khoang tối. Sự gia tăng hoạt động thăm dò này được giải thích như một sự ức chế khám phá[21-23,28-31,45]

Ngoài các thử nghiệm đã trình bày ở trên, còn có nhiều mô hình khác cũng đang được sử dụng như: Thử nghiệm giấc ngủ barbitol (barbitol sleeping time test), phản ứng chống lại cảm lạnh (cold swimming test), Y-maze test.....

CHƯƠNG 2 : ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Nguyên vật liệu và thiết bị

2.1.1. Nguyên liệu

Sâm Ngọc linh được lấy từ vườn sâm Ngọc linh trên núi Ngọc Linh thuộc huyện Nam Trà My Tỉnh Quảng Nam của Viện nghiên cứu phát triển y dược học cổ truyền Việt Nam.

2.1.2. Hóa chất

- Ethanol 85%
- Nước cất vô trùng

2.1.3. Dụng cụ và thiết bị

- Thiết bị chiết và cô quay thuốc
- Ống đong
- Cân phân tích
- Máy cô quay chân không thu hồi dung môi
- Cốc 500 ml
- Bình nón
- Máy chiết lắc
- Cốc có mỏ
- Bình định mức 50ml, 100ml
- Thiết bị phục vụ thử nghiệm
- Lòng nuôi chuột
- Thùng nhựa cao 40cm để phục vụ bơi
- Các mô hình EPM và Dark/light test
- Bơm, kim tiêm nhựa

2.2. Nguyên cứu chiết xuất

Lựa chọn quy trình chiết xuất saponin toàn phần được thực hiện như sau:

- Phương pháp chiết: Chiết siêu âm
- Dung môi chiết xuất: Ethanol 85% - Nước
- Số lần chiết: 5 lần
- Thời gian chiết: 5 giờ

2.3. Nghiên cứu tác dụng chống suy nhược thần kinh

2.3.1. Đối tượng

Chuột nhắt trắng khỏe mạnh đủ tiêu chuẩn, không phân biệt đực cái, trọng lượng từ 20-25g, do Học Viện Quân Y cung cấp.

Chuột được chia lô ngẫu nhiên từ 8-10 chuột/lô, nuôi trong điều kiện nhiệt độ và ánh sáng tự nhiên tại phòng nuôi chuột của Khoa Y – Dược Đại học Quốc Gia Hà Nội. Chuột được cho ăn, uống theo nhu cầu cho đến trước khi tiến hành thí nghiệm.

2.3.2. Nội dung nghiên cứu.

Nghiên cứu tác dụng chống suy nhược thần kinh của Sâm Ngọc Linh:

- Thử nghiệm EPM
- Thử nghiệm chuột bơi
- Thử nghiệm Dark/light test

2.3.3. Phương pháp nghiên cứu.

Các thí nghiệm được tiến hành trong phòng riêng biệt, yên tĩnh và ánh sáng phù hợp với mỗi thử nghiệm như: thử nghiệm EMP trong phòng được chiếu sáng bằng đèn 32W, thử nghiệm sáng/tối khoang sáng được chiếu sáng bằng đèn 40W. Thời gian tiến hành thí nghiệm trong khoảng 9h sáng đến 5h chiều. Riêng thí nghiệm chuột bơi tiến hành trong điều kiện ánh sáng bình thường. Trong ngày tiến hành thí nghiệm, chuột được chuyển vào phòng thí nghiệm trước đó 1h để làm quen với điều kiện phòng.

Chuột được chia ngẫu nhiên thành 5 lô (8-10 chuột/lô), uống thuốc hoặc nước cất liên tục trong 7 ngày. Thí nghiệm bắt đầu vào ngày thứ bảy sau khi uống thuốc 60 phút.

Lô 1: Uống dd sâm ngọc linh 100mg/kg - tương đương 10ml/kg

Lô 2: Uống dd sâm ngọc linh 200mg/kg - tương đương 10ml/kg

Lô 3: Uống dd sâm ngọc linh 300mg/kg - tương đương 10ml/kg

Lô 4: Uống dd hồng sâm hàn quốc 200mg/kg – tương đương 10ml/kg.

Lô 5: Uống nước cất.

2.3.3.1. Nghiên cứu tác dụng chống suy nhược thần kinh của thuốc:

a. Thử nghiệm EPM.

❖ Chuẩn bị dụng cụ:

Dụng cụ được thiết kế và làm dựa vào các tài liệu nghiên cứu tham khảo được trên thế giới. Dụng cụ được đặt cách sàn nhà một khoảng 50cm.

❖ Tiến hành:

Ngày thứ 7, sau khi uống thuốc 60 phút, đặt từng chuột vào trung tâm của dụng cụ, mặt chuột hướng về phía một tay hở. Quan sát chuột trong 5 phút. Ghi lại số lần chuột đi vào mỗi tay và tổng thời gian chuột ở trong các tay hở và các tay kín. Số lần chuột đi vào một tay được tính với những lần chuột đi vào tay đó bằng cả 4 chân. Để đảm bảo sự sai lệch thời gian từ khi dùng thuốc đến khi thí nghiệm của từng cá thể trong một lô là không quá lớn, mỗi lô được cho uống thuốc làm hai đợt, cách nhau 20 phút.

b. Thử nghiệm chuột bơi:

❖ Tiến hành:

Ngày thứ 7, chuột được cho uống lần lượt các dung dịch nước cất, hồng sâm hàn quốc và sâm ngọc linh (100mg/kg, 200mg/kg, 300mg/kg). Sau khi uống 60 phút, cho chuột bơi trong xô nhựa có chứa nước ấm $35 \pm 2^{\circ}\text{C}$. Theo bản năng, khi mới thả vào nước, chuột sẽ bơi, sau đó khi đã mệt, chuột sẽ có thời gian bất động, chỉ có đầu nhô lên khỏi mặt nước để thở, sau đó chuột không còn giữ được bất động trên mặt nước nữa và chìm xuống. Quan sát, dùng đồng hồ bấm giờ ghi lại thời gian chuột bơi. Thí nghiệm được tiến hành trong 6 phút trong đó 2 phút đầu để chuột làm quen với môi trường và tính từ phút thứ 2 trở đi và tính thời gian bơi của chuột. Để đảm bảo sự khác biệt về thời gian từ khi uống thuốc đến khi tiến hành thí nghiệm giữa các cá thể trong một lô là không quá lớn, mỗi lô cũng được cho uống thuốc làm 2 đợt cách nhau 20 phút.

Thời gian bơi = 240 (s) – thời gian bất động.

c. Dark/light test.

❖ Chuẩn bị

Dụng cụ được thiết kế và làm dựa theo mô tả của các tài liệu nghiên cứu tham khảo được trên thế giới

❖ Tiến hành

Ngày thứ 7, chuột được uống lần lượt các dung dịch nước cất, dung dịch hồng sâm, dung dịch sâm ngọc linh (100mg/kg, 200mg/kg, 300mg/kg). Sau khi uống thuốc 60 phút, chuột được cho vào một buồng được chiếu sáng rực rỡ bằng các điốt trắng (390 lux), trong khi đó buồng khác lại tối (2 lux). Chuột được đặt vào mặt tối và cửa được mở tự động 3 giây sau khi con chuột được cho vào buồng tối. Cánh cửa được sử dụng để chuột không vào phòng chứa ánh sáng ngay lập tức sau khi giải phóng với động lực thoát khỏi thí nghiệm, vì độ trễ để vào buồng ánh sáng có thể đóng vai trò như một chỉ số về hành vi lo lắng. Chuột được phép di chuyển tự do giữa hai

buồng trong 5 phút. Để đảm bảo sự sai lệch thời gian từ khi dùng thuốc đến khi thí nghiệm của từng cá thể trong một lô là không quá lớn, mỗi lô được cho uống thuốc làm hai đợt, cách nhau 20 phút.

2.3.4. Xử lý số liệu

Số liệu thu được từ các thử nghiệm được phân tích thống kê bằng phần mềm Excel 2013, sử dụng phần mềm SPSS. Sự sai khác có ý nghĩa thống kê khi $p < 0,05$.

CHƯƠNG 3: KẾT QUẢ THỰC NGHIỆM VÀ BÀN LUẬN

3.1. Chiết xuất saponin toàn phần.

3.1.1. Chuẩn bị dược liệu

Dược liệu sâm ngọc Linh thu hái tại vườn sâm Ngọc Linh trên núi Ngọc Linh đã được phơi khô rồi thái nhỏ.

3.1.2. Lựa chọn phương pháp chiết

Sử dụng phương pháp chiết sóng siêu âm. Đây là phương pháp chiết sử dụng sóng siêu âm có tần số lớn hơn 20Hz, có khả năng tác động mạnh vào dược chất làm tăng sự thẩm thấu dung môi chiết, tăng hòa tan dược chất, phương pháp này có thể chiết kiệt, hiệu suất cao.

3.1.3. Lựa chọn dung môi

Chọn ethanol và nước làm dung môi chiết vì ethanol hòa tan được saponin, rẻ tiền và không độc.

3.1.4. Chiết xuất saponin toàn phần

- Cân chính xác 200g củ sâm ngọc linh, sau khi rửa sạch phơi khô, xay – nghiền nhỏ được ngâm chiết kỹ bằng dung môi ethanol 85% 5 lần (mỗi lần 400ml) sử dụng thiết bị siêu âm ở 40 °C trong 5 giờ. Thu lấy dịch chiết. tiếp tục thêm dung môi đến ngập dược liệu và chiết đến khi dược chiết trong suốt (5 lần) Sau khi tiến hành chiết dịch còn xong chúng tôi tiến hành chiết tiếp dịch nước và thực hiện giống như chiết dịch cồn. Gộp các dịch chiết ethanol và dịch chiết nước thu được lọc qua giấy lọc, gom lại và cất từng loại dung môi dưới áp suất giảm thu được $m_{\text{caocồn}} = 38,02 \text{ g}$, $m_{\text{caonước}} = 54,8 \text{ g}$.

3.2. Nghiên cứu tác dụng chống suy nhược thần kinh

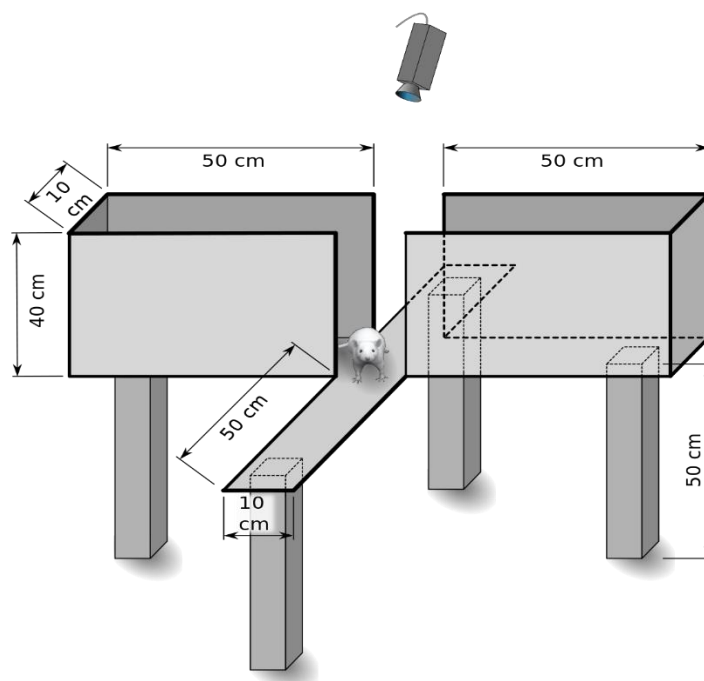
3.2.1. Thử nghiệm EPM

❖ Dụng cụ thí nghiệm:

Qua tham khảo tài liệu trên thế giới, chúng tôi đã làm được dụng cụ dùng cho thí nghiệm này là một hình chữ thập gồm có:

- Hai tay kín (closed arms) , mỗi tay có kích thước: 40 x 5 x 15cm (dài x rộng x cao)
- Hai tay hở (open arms) mỗi tay có kích thước: 40 x 5 x 0,2cm

Hai tay kín được làm vuông góc với hai tay hở, tạo nên một khoảng trung tâm có diện tích 5 x 5cm. Chuột thí nghiệm sẽ được đặt ở vùng trung tâm này khi bắt đầu vào thí nghiệm.[26,27,31]



Hình 3.6. Dụng cụ thử nghiệm EPM

❖ **Kết quả thí nghiệm:**

- Kết quả thử nghiệm với Sâm Ngọc Linh:

Chuột sau khi chia lô được cho uống thuốc 7 ngày liên. Ngày thứ 7, sau khi uống thuốc 60 phút, đặt từng chuột vào trung tâm của dụng cụ thí nghiệm, mặt chuột hướng về một tay hở. Quan sát chuột trong 5 phút, ghi lại thời gian và số lần chuột đi vào mỗi tay. Kết quả được trình bày ở bảng 9 và 10.

Bảng 3.9: Tác dụng của Sâm Ngọc Linh lên số lần lưu của chuột ở tay kín/tay hở.

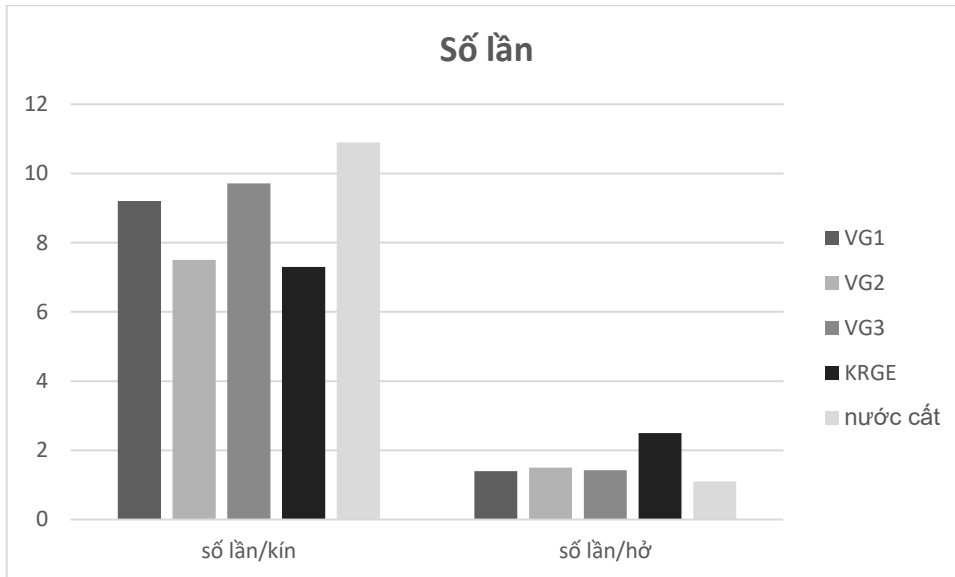
Lô	Thuốc uống	n	Số lần/ tay kín	p	Số lần/tay hở	p
1	Nước cất	10	10,9 ± 2,23		1	
2	KRGE 200 mg/kg	10	7,3 ± 2,11	P1-2< 0,05	2,5 ± 1,58	P1-2< 0,05
3	VG 100mg/kg	10	9,2 ± 2,35	P1-3>0,05 P2-3>0,05	1,4 ± 0,84	P1-3>0,05 P2-3>0,05
4	VG 200mg/kg	10	7,5 ± 2,12	P1-4>0,05 P2-4>0,05	1,5 ± 1,08	P1-4>0,05 P2-4>0,05
5	VG 300mg/kg	7	9,71 ± 3,3	P1-5>0,05 P2-5>0,05	1,43±0,976	P1-5>0,05 P2-5>0,05

Bảng 3.10: Tác dụng của Sâm Ngọc Linh lên thời gian chuột lưu ở tay kín/tay hở

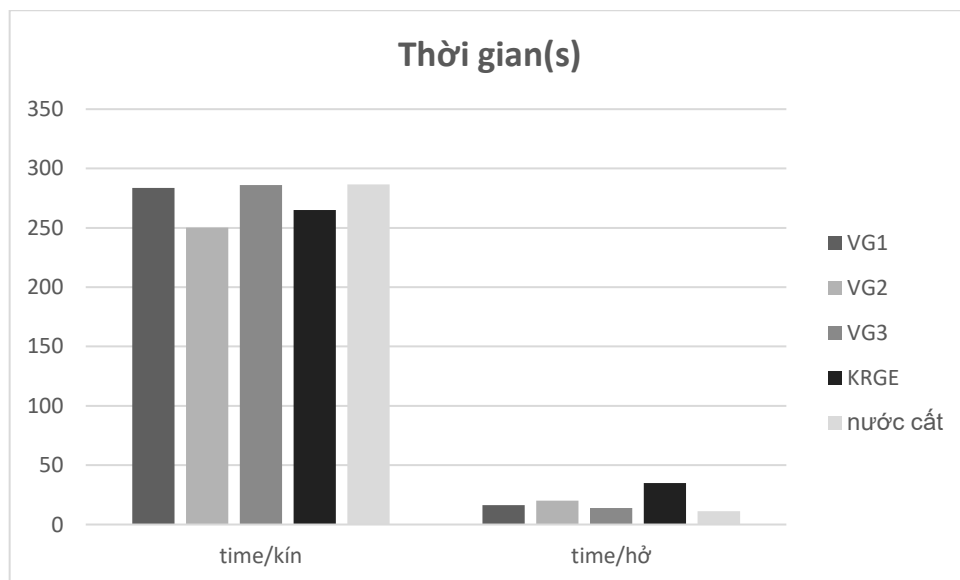
Lô	Thuốc uống	n	Thời gian/ tay kín (s)	p	Thời gian/ tay hở (s)	p
1	Nước cất	10	291,5		11,3 ± 10,05	
2	KRGE 200 mg/kg	10	265 ± 24,91	P1-2< 0,05	35 ± 24,91	P1-2<0,05
3	VG 100mg/kg	10	283,6 ± 14,33	P1-3>0,05 P2-3>0,05	16,4 ± 14,33	P1-3>0,05 P2-3<0,05
4	VG 200mg/kg	10	276,5	P1-4>0,05 P2-4>0,05	20,2 ± 14,08	P1-4>0,05 P2-4>0,05
5	VG 300mg/kg	7	286 ± 11,79	P1-5>0,05 P2-5<0,05	14 ± 11,79	P1-5>0,05 P2-5<0,05

Nhận xét:

- KRGE liều 200 mg/kg có ý nghĩa thống kê so với chứng(p<0,05).
- VG 100 mg/kg, 300mg/kg, 200mg/kg không có ý nghĩa thống kê so với với mẫu chứng (p>0,05).



Hình 3.7: Tác dụng của sâm ngọc linh lên số lần liếm của chuột trên tay kín/tay hở



Hình 3.8: Tác dụng của sâm ngọc linh lên thời gian liếm của chuột trên tay kín/tay hở

3.2.2. Thử nghiệm chuột bơi.

Thử nghiệm được tiến hành như sau: Chuột sau khi chia lô được cho uống thuốc 7 ngày liền, ngày thứ 7 sau khi uống thuốc 60 phút, chuột được cho bơi trong nước ấm $35 \pm 2^{\circ}\text{C}$. Quan sát và tính thời gian chuột bơi được trong 4 phút. Dùng đồng hồ bấm giây ghi lại thời gian chuột từ phút thứ 2 và ghi lại thời gian bơi của chuột.

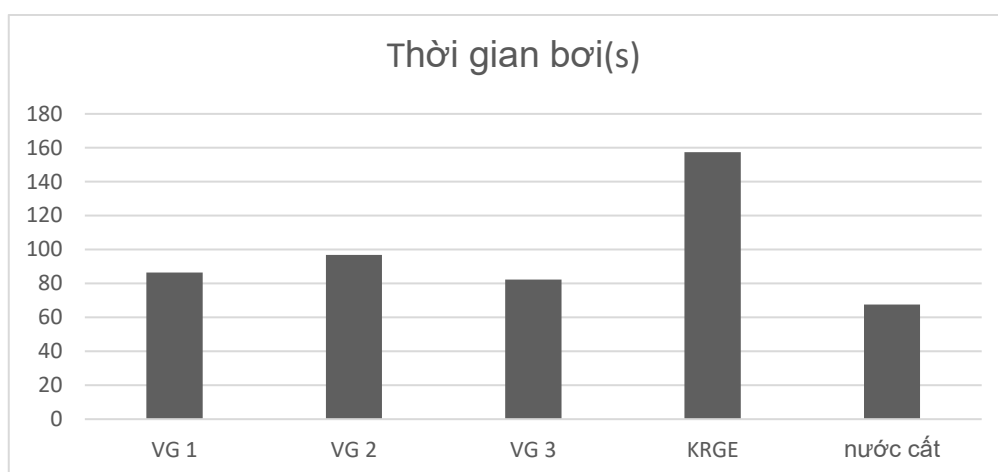
Kết quả được trình bày ở bảng 11:

Bảng 3.11: Tác dụng của sâm ngọc linh lên thời gian bơi của chuột

Lô	Nhóm	n	Thời gian bơi(s)	p
1	Nước cất	10	$67,5 \pm 27,11$	
2	KRGE200 mg/kg	10	$157,4 \pm 42,43$	P1-2< 0,05
3	VG 100mg/kg	10	$86,4 \pm 15,19$	P1-3>0,05 P2-3<0,001
4	VG 200mg/kg	10	$96,8 \pm 12,3$	P1-4<0,05 P2-4<0,001
5	VG 300mg/kg	7	$82,29 \pm 24,53$	P1-5>0,05 P2-5<0,001

Nhận xét:

- KRGE 200 mg/kg có ý nghĩa thống kê so với chứng (p<0,05)
- VG 100mg/kg, VG 300mg/kg không có ý nghĩa thống kê so với mẫu chứng (p > 0,05)
- VG 200mg/kg có ý nghĩa thống kê so với mẫu chứng (p< 0,05)
- VG 200mg/kg cho tác dụng tương đương với KRGE



Hình 3.9: Tác dụng của sâm ngọc linh lên thời gian bơi của chuột.

3.2.3. Dark/light test

Chuột sau khi chia lô được cho uống thuốc 7 ngày liền. Ngày thứ 7, sau khi uống thuốc 60 phút, Chuột được đặt vào mặt tối và cửa được mở tự động 3 giây sau khi con chuột được cho vào buồng tối. Quan sát chuột trong 5 phút, ghi lại thời gian và số lần ra vào buồng sáng và buồng tối. Kết quả được trình bày ở bảng 12 và 13.

Bảng 3.12: Tác dụng của Sâm Ngọc Linh lên số lần lưu của chuột ở buồng sáng/buồng tối.

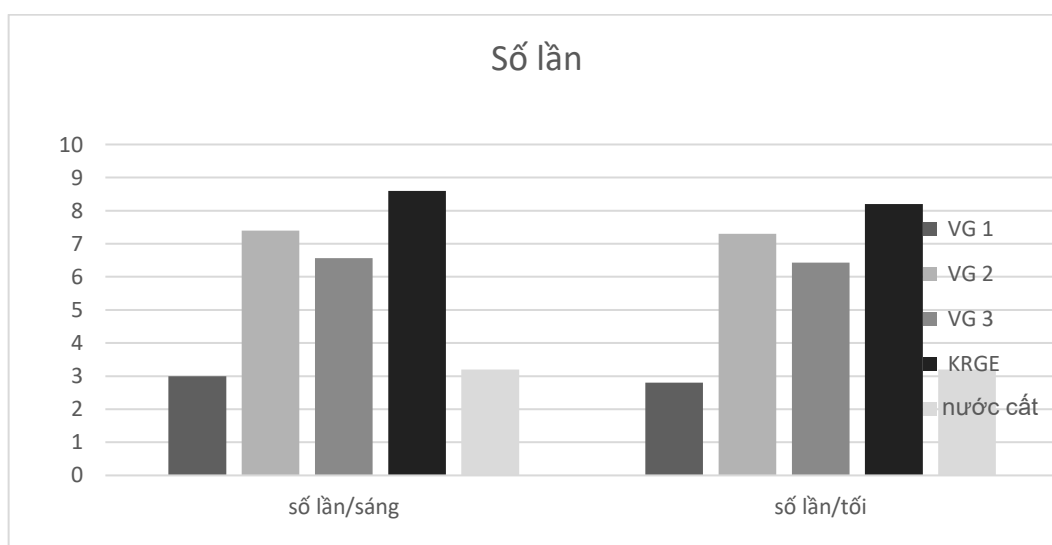
Lô	Thuốc uống	n	Số lần/buồng sáng	p	Số lần/buồng tối	p
1	Nước cất	10	3,2 ± 2,33		3,2 ± 2,35	
2	KRGE200 mg/kg	10	8,6 ± 2,72	P1-2 < 0,05	8,2 ± 2,66	P1-2 < 0,001
3	VG 100mg/kg	10	3 ± 2	P1-3 > 0,05 P23 < 0,001	2,8 ± 2,09	P1-3 > 0,05 P2-3 < 0,001
4	VG 200mg/kg	10	7,4 ± 1,43	P14 < 0,001 P24 > 0,05	7,3 ± 1,49	P1-4 < 0,001 P2-4 > 0,05
5	VG 300mg/kg	7	6,57 ± 5,47	P1-5 > 0,05 P25 > 0,05	5	P1-5 > 0,05 P2-5 < 0,05

Bảng 3.13: Tác dụng của Sâm Ngọc Linh lên thời gian chuột lưu ở buồng sáng/buồng tối.

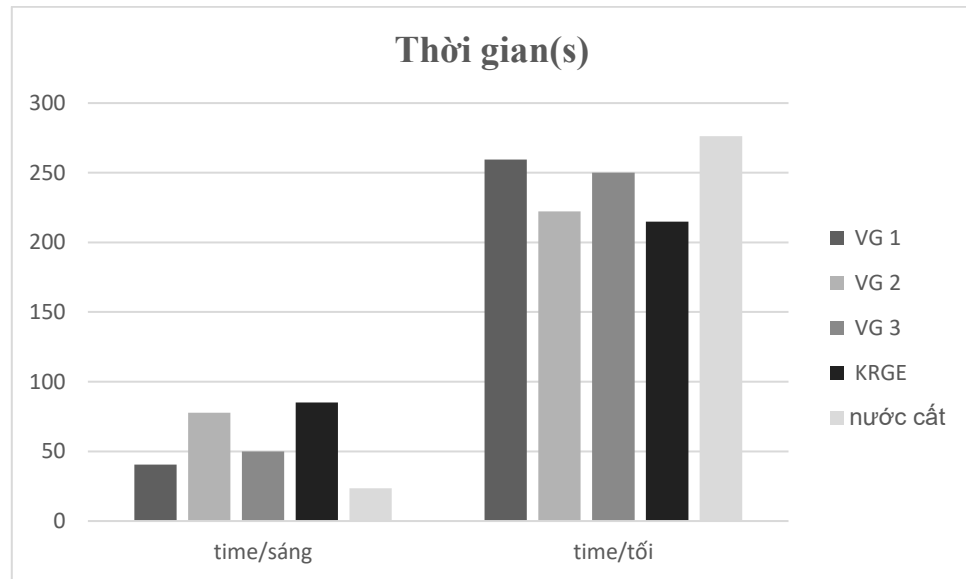
Lô	Thuốc uống	n	Thời gian/ Buồng sáng (s)	p	Thời gian/ Buồng tối (s)	p
1	Nước cất	10	23,8 ± 26,04		276,2 ± 26,04	
2	KRGE 200 mg/kg	10	85 ± 15,03	P1-2 < 0,001	215 ± 15,03	P1-2 < 0,001
3	VG 100mg/kg	10	40,6 ± 26,61	P1-3 > 0,05 P2-3 < 0,001	259,4 ± 26,61	P1-3 > 0,05 P2-3 < 0,001
4	VG 200mg/kg	10	77,8 ± 16,07	P1-4 < 0,001 P2-4 > 0,05	222,2 ± 25,03	P1-4 < 0,001 P2-4 > 0,05
5	VG 300mg/kg	10	39	P1-5 > 0,05 P2-5 < 0,05	261	P1-5 > 0,05 P2-5 < 0,05

Nhận xét:

- KRGE 200 mg/kg có ý nghĩa thống kê so với chứng (p < 0,001)
- VG 100mg/kg, VG 300mg/kg không có ý nghĩa thống kê so với chứng (p > 0,05)
- VG 200mg/kg có ý nghĩa thống kê một cách rõ rệt so với chứng (p < 0,001)
- So với KRGE, VG 200mg/kg không có sự khác biệt rõ ràng (p > 0,05).



Hình 3.10: Tác dụng của sâm ngọc linh lên số lần lưu của chuột ở buồng sáng/tối



Hình 11: tác dụng của sâm ngọc linh lên thời gian lưu của chuột ở buồng sáng/tối

3.3. BÀN LUẬN:

3.3.1. Về các test nghiên cứu:

a. Lựa chọn test nghiên cứu:

Ngày nay, đặc biệt là ở các nước phát triển, chứng suy nhược thần kinh ngày càng phổ biến và ảnh hưởng không chỉ đến cá nhân và còn đến toàn xã hội. Có thể nói các nghiên cứu có liên quan đến các thuốc chống rối loạn lo âu, trầm cảm chưa bao giờ là cũ. Trên thế giới, hiện nay, các thử nghiệm được dùng để đánh giá tác dụng về mặt tâm thần thường được sử dụng động vật là chuột (cả chuột nhắt và chuột cống). Các thử nghiệm được dùng phổ biến bao gồm:

- Thử nghiệm Grip (Grip Test).
- Thử nghiệm EPM (EPM Test).
- Thử nghiệm Rota-Rod (Rota-Rod Test).
- Thử nghiệm môi trường mở (Open-field test)
- Thử nghiệm đo hoạt động tự nhiên của chuột bằng lồng rung (Spontaneous activity Test)
- Đo thời gian ngủ của chuột khi uống thuốc ngủ barbital sau khi đã dùng thuốc cần được nghiên cứu (Barbital sleeping time Test).

- Thử nghiệm chuột bơi (Forced swimming Test).
- Thử nghiệm môi trường sáng/ tối (Light/dark Test).
- Thử nghiệm Y-maze
- Thử nghiệm tránh thụ động (Passive avoidance test)
- Trong số đó mô hình thử nghiệm EPM và mô hình thử nghiệm Rota-Rod là hai mô hình được sử dụng phổ biến nhất
- Trong phạm vi của đề tài khóa luận này, chúng tôi lựa chọn các thử nghiệm:

❖ *Thử nghiệm EPM*

Thử nghiệm EMP đã được mô tả như một phương pháp đơn giản để đánh giá phản ứng lo lắng của loài gặm nhấm theo File và đồng nghiệp¹. Thử nghiệm EPM được Pellow và cộng sự phát triển từ các mô hình thử nghiệm mê cung khác (Y-maze, Zero maze) năm 1985-1986 và được ứng dụng rộng rãi từ đó đến nay. Thật vậy, EMP đã được sử dụng rộng rãi trong hơn hai thập kỷ, và hiện có hơn 2.000 báo cáo liên quan đến chủ đề này. EMP đã được sửa đổi thành một mê cung nâng lên với bốn tay (hai mở và hai tay kín) được sắp xếp để tạo thành một hình dạng dấu cộng và được mô tả bởi Handley và Mithani³. Các tác giả này mô tả việc đánh giá hành vi lo lắng của loài gặm nhấm bằng cách sử dụng tỷ lệ thời gian dành cho cánh tay mở để thời gian dành cho cánh tay khép kín. Thử nghiệm này dựa trên bản năng của chuột là sợ những nơi hở và có bản năng thích khám phá. Khi được đặt trong dụng cụ hình chữ thập để ở trên cao, chuột sẽ bị cảm giác lo lắng do độ cao nên ít tiếp xúc với tay hở. Đây sẽ là điều kiện để phát hiện tác dụng chống lo âu sợ hãi.[28,30]

Căng thẳng lo âu là một triệu chứng đi kèm với nhiều rối loạn của hệ TKTW và bản thân nó cũng là một rối loạn. Ở người, nó được biểu hiện bằng sự hồi hộp xen lẫn mệt mỏi, kiệt sức. Ở các loài động vật gặm nhấm, sự lo âu căng thẳng thường liên quan đến các hành vi tự vệ như: bất động, tìm chỗ trú ẩn, liếm lông, nhảy dựng... Các hành vi này ở động vật có thể quan sát được. Có lẽ đây cũng là cơ sở để các mô hình thử nghiệm dựa trên sự quan sát động vật thí nghiệm như EPM, Open field (vùng mở)... ra đời.[33,38]

Một ưu điểm nữa của EPM là không cần huấn luyện động vật trước khi làm thí nghiệm, điều kiện nuôi dưỡng cũng không cần đặc biệt. Thí nghiệm này cho kết quả với độ lặp lại cao.[39]

Dụng cụ để tiến hành thí nghiệm EPM đơn giản, có thể chế tạo được trong điều kiện Việt nam.[44]

Về thời gian thí nghiệm: trong thí nghiệm EPM, thời gian quan sát mỗi chuột là 5 phút là dựa trên suy luận đây là khoảng thời gian chuột biểu lộ hành vi tự vệ hoặc trốn tránh rõ nhất. Nếu khoảng thời gian này kéo dài hơn 5 phút, chuột có thể quen với môi trường, làm ảnh hưởng đến kết quả[44,48].

❖ *Thử nghiệm chuột bơi:*

Chuột bơi là mô hình thí nghiệm kinh điển của Dược lý học. Ở Việt nam mô hình này được sử dụng chủ yếu trong các nghiên cứu tác dụng tăng lực của thuốc.

Tuy nhiên, hiện nay nhiều nghiên cứu trên thế giới cũng sử dụng mô hình chuột bơi để đánh giá tác dụng trên TKTW. [26,31,42]

Dựa trên suy luận thuận thuốc kích thích TKTW làm tăng sự phối hợp thần kinh cơ dẫn đến tăng khả năng vận động và sức vươn của động vật. Khi bị thả vào nước, theo bản năng tự nhiên, chuột sẽ có phản xạ vươn lên và bơi để sống sót. Chuột sẽ chỉ ngừng bơi và chìm khi sự phối hợp thần kinh cơ không còn. Thời gian chuột bơi càng dài chứng tỏ chuột giữ được sự phối hợp thần kinh- cơ lâu. Thí nghiệm này có tính khả thi cao vì phương pháp tiến hành không quá phức tạp, việc huấn luyện người theo dõi thí nghiệm cũng không khó khăn, trang thiết bị phục vụ cho thí nghiệm dễ kiếm[21,25]

❖ *Dark/light test*

Kiểm tra chuyển tiếp ánh sáng / tối là một trong những bài kiểm tra được sử dụng rộng rãi nhất để đo lường sự lo lắng giống như hành vi ở chuột. Thử nghiệm sáng tối dựa trên sự ác cảm bẩm sinh của loài gặm nhấm đối với các khu vực được chiếu sáng mạnh và hành vi khám phá tự nhiên của loài gặm nhấm với các tác động

bên ngoài tức là môi trường mới lạ và ánh sáng. Thử nghiệm này nhạy cảm với các thuốc an thần, chống lo âu sợ hãi, trầm cảm... Thiết bị kiểm tra bao gồm khoang tối và khoang sáng được chiếu sáng. Một khe hẹp, rộng 3cm, cao 5cm kết nối hai buồng. Chuột được phép di chuyển tự do giữa hai buồng. Số lần và thời gian dành cho buồng sáng thể hiện sự lo lắng ít hay nhiều của chuột với không gian sáng. Phương pháp này dễ thực hiện và kết quả tương đối chính xác. Tuy nhiên, sự khác nhau giữa các phòng thí nghiệm khiến cho việc lặp lại hoặc so sánh kết quả giữa các phòng thí nghiệm rất khó khăn. [28,45]

Trong thử nghiệm này tôi sử dụng phiên bản khác với phiên bản gốc. Đầu tiên, buồng sáng lớn hơn buồng tối ở phiên bản ban đầu, trong khi kích thước của hai buồng là giống nhau trong phiên bản thử nghiệm của chúng tôi. Thứ hai, trong phiên bản ban đầu, buồng sáng không có trần và tường, buồng sáng là trong suốt (Crawley và Goodwin, 1980), trong khi chúng tôi sử dụng chất dẻo màu trắng đục cho trần và tường của buồng sáng. Những khác biệt này, cụ thể là kích cỡ và độ mở của buồng sáng, cho phép phát hiện đồng thời sự lo lắng không gian sáng cũng như sự lo lắng không gian mở trong phiên bản gốc của bài kiểm tra. Tuy nhiên, trong thử nghiệm của tôi, hành vi giống như lo âu trong không gian mở ở chuột được thử nghiệm trong thử nghiệm EMP. Mặc dù thử nghiệm sáng/ tối và EMP đều được sử dụng để đánh giá hành vi lo âu, nhưng kết quả không phải lúc nào cũng nhất quán. Thử nghiệm chuyển đổi ánh sáng / tối của tôi và các bài kiểm tra trên EMP đánh giá các khía cạnh khác nhau của hành vi lo âu, chẳng hạn như sự lo lắng không gian sáng và hành vi lo lắng giống như không gian mở [28,31,45].

❖ **Một số thí nghiệm chưa làm được:**

Như đã nói ở trên, có rất nhiều thử nghiệm có thể dùng để đánh giá tác dụng kích thích TKTW của thuốc. Mỗi thí nghiệm đều có những ưu điểm và nhược điểm riêng. Trong khuôn khổ của đề tài khóa luận, vì điều kiện thời gian và kinh phí không cho phép, chúng tôi mới chọn tiến hành các thử nghiệm như đã trình bày ở trên. Trong những tài liệu tham khảo trên thế giới, đây là những thử nghiệm mà chúng tôi thấy rằng có tính hợp lý và khả thi nhất và có thể thực hiện được trong khuôn khổ khóa luận. Để nghiên cứu kỹ hơn tác dụng kích thích TKTW của sâm ngọc linh, nên áp dụng các thử nghiệm này:

✓ Thử nghiệm đo giấc ngủ Barbitol:

Thử nghiệm này dùng để đánh giá tác dụng giảm thời gian ngủ của thuốc. Thử nghiệm có ưu điểm hơn thử nghiệm chuột bơi vì đánh giá tác dụng trực tiếp hơn chứ

không gián tiếp qua các cơ chế thần kinh – cơ, khả năng định hướng không gian, khả năng chịu lạnh....

Ngoài ra, việc tiến hành thí nghiệm cũng đơn giản, dễ thực hiện, và thử nghiệm hoàn toàn thực hiện được ở Việt nam. Đồng thời cho kết quả cũng tương đối chính xác.

✓ Y-maze test

Thử nghiệm này có ưu điểm là dụng cụ thí nghiệm hiện đại, có độ chính xác cao. Dụng cụ thí nghiệm này đã có mặt và được sử dụng ở Việt nam.

✓ Thử nghiệm đánh giá hoạt động tự nhiên của chuột

Thử nghiệm này có độ chính xác cao, dụng cụ thí nghiệm hiện đại. Dụng cụ này đã được sử dụng ở Việt nam.

✓ Thử nghiệm Rota – rod

Thử nghiệm này cũng dùng để đánh phối hợp thần kinh – cơ của chuột. Dụng cụ này cũng đã được sử dụng ở Việt nam, có độ chính xác cao, dễ thực hiện và việc huấn luyện người làm thí nghiệm dễ dàng.

b. Điều kiện nghiên cứu.

Thí nghiệm EMP được thực hiện trong phòng tối, còn thí nghiệm chuột bơi và thử nghiệm sáng tối được thực hiện trong phòng với ánh sáng vừa phải và yên tĩnh.

Trên thực tế, chúng tôi thực hiện các thử nghiệm EMP trong điều kiện môi trường có ánh sáng và tiếng động. Thử nghiệm chuột bơi và sáng/tối cũng trong điều kiện có tiếng ồn. Nên kết quả là các số liệu thu được rất dao động, khó đánh giá.

Cũng các thí nghiệm đó nhưng tiến hành trong môi trường phù hợp với điều kiện của từng thử nghiệm thì thu được kết quả rất tập chung và dễ phân tích.

Từ những điều trên chúng tôi thấy rằng, môi trường nghiên cứu là cực kỳ quan trọng đối với các thử nghiệm đánh giá tác dụng của thuốc trên hệ TKTW.

c. Lựa chọn thuốc chứng dương

Nhân sâm từ lâu đã được sử dụng như một phương thuốc truyền thống cho các vấn đề sức khỏe khác nhau. Người ta tin rằng có nhiều lợi ích về thể chất và tâm lý như tăng năng lượng / tăng sức bền, kích thích tinh thần, cải thiện tâm trạng, tăng cường nhận thức. Từ các kết quả nghiên cứu trên thế giới chứng minh rằng nhân sâm có tác dụng chống mệt mỏi. [27,41]

Nhân sâm có các chức năng dược lý bao gồm chống oxy hóa, tăng cường miễn dịch và bình thường hóa hệ thống chuyển hóa của con người. Trong y học cổ truyền phương đông, nhân sâm đã được sử dụng chủ yếu để tăng cường sức chịu đựng và giảm căng thẳng về thể chất và sự mệt mỏi. Một thử nghiệm ngẫu nhiên, mù đôi, giả

được đã cho thấy rằng nhân sâm có tác dụng chống mệt mỏi ở những bệnh nhân bị mệt mỏi mãn tính tự phát. Ngoài ra, nhân sâm đã được chứng minh là có hoạt động chống mệt mỏi trong một nghiên cứu động vật. Trong một nghiên cứu khác, nhân sâm làm tăng khối lượng cơ, thời gian bơi bền... Nhân sâm có tác dụng chống sự lo lắng đã được chứng minh trên mô hình thí nghiệm sự lo lắng với diazepam bằng việc sử dụng thử nghiệm EMP. Thử nghiệm EMP cho thấy rằng nhân sâm làm tăng số lần và thời gian chuột lưu trên cánh tay hở. Trong thử nghiệm sáng/tối, nhân sâm cũng làm tăng thời gian và số lần lưu giữ của chuột trong buồng sáng.[27,32,38,41].

Dựa vào kết quả của những nghiên cứu trên chúng tôi đã lựa chọn nhân sâm hàn quốc làm chứng dương cho thử nghiệm này.

Liều của KGRE dùng trong thử nghiệm nghiên cứu chống suy nhược thần kinh là liều 200mg/kg. Chúng tôi đã tham khảo liều từ các nghiên cứu trên thế giới trước đây và tiến hành khảo sát liều của KGRE có tác dụng chống lo âu, trầm cảm.

d. Tác dụng chống suy nhược thần kinh của sâm ngọc linh

- Trên thử nghiệm EMP, sâm ngọc linh liều 100, 200, 300mg/kg không cho tác dụng rõ rệt ($p > 0,05$) so với mẫu chứng. Điều đó cho thấy rằng, VG không thể hiện rõ tác dụng chống suy nhược thần kinh của sâm ngọc linh trên thử nghiệm này.

- Thử nghiệm chuột bơi, VG ở liều 100mg/kg, 300mg/kg không gây tác dụng rõ ràng trong thử nghiệm này ($p > 0,05$). VG liều 200mg/kg làm rõ rệt thời gian bơi so với mẫu chứng ($p < 0,05$). Điều đó chứng tỏ, VG liều 200mg/kg có tác dụng chống suy nhược thần kinh trên thử nghiệm này.

Kết quả của nhóm dùng VG 200mg/kg so với nhóm dùng KRG không có sự khác biệt rõ ràng ($p > 0,05$).

Như vậy, ở liều 200mg/kg, cho tác dụng tương đương với KRG 200mg/kg.

- Thử nghiệm sáng/tối, VG ở liều 100mg/kg, 300mg/kg không cho tác dụng rõ rệt so với mẫu chứng ($p > 0,05$). Nhưng VG liều 200mg/kg làm rõ rệt thời gian và số lần di chuyển trong buồng sáng so với mẫu chứng ($P < 0,001$). Điều đó chứng tỏ, VG liều 200mg/kg có tác dụng chống suy nhược thần kinh.

Kết quả của nhóm dùng VG 200mg/kg so với nhóm dùng KRG không có sự khác biệt rõ ràng ($p > 0,05$).

Như vậy, ở liều 200mg/kg, cho tác dụng tương đương với KRG 200mg/kg.

CHƯƠNG 4: KẾT LUẬN VÀ KIẾN NGHỊ

4.1. Kết luận

Qua thời gian nghiên cứu đề tài chúng tôi đã thu được các kết quả theo các nội dung nghiên cứu đã đề ra như sau:

- Đã đưa ra qui trình chiết xuất saponin toàn phần từ dược liệu sâm Ngọc Linh.
- Đã tiến hành được các mô hình đánh giá tác dụng chống suy nhược thần kinh của sâm Ngọc Linh.

4.2. Kiến nghị

Từ những kết quả nghiên cứu được, chúng tôi có một số kiến nghị như sau:

- Về việc nghiên cứu thêm:

Trong khóa luận này, chúng tôi chỉ tiến hành được những mô hình thí nghiệm căn bản và có tính kinh điển mất. Vì đây cũng là nghiên cứu khởi đầu không thể tránh được các sai sót, cần có những nghiên cứu sâu hơn. Chúng tôi đã chỉ ra rằng uống VG tạo ra kích thích TKTW, chống lo âu sợ hãi. Do những hạn chế của nghiên cứu này, các thành phần cụ thể liên quan đến các hoạt động sinh lý tâm thần qua thử nghiệm EMP vẫn chưa được thể hiện rõ. Đây có thể là trọng tâm đánh giá trong các nghiên cứu tương lai. Qua tìm hiểu, chúng tôi nhận thấy một số mô hình nghiên cứu tác dụng an chống lo âu, trầm cảm trên động vật có thể áp dụng nghiên cứu tiếp:

1. Thử nghiệm nghiệm giấc ngủ barbital.
2. Thử nghiệm đánh giá mức độ ngủ của chuột.
3. Thử nghiệm môi trường mở (open field test)
4. Thử nghiệm đánh giá hoạt động tự nhiên của chuột.

- Về quá trình chiết xuất:

Trong nghiên cứu này chúng tôi sử dụng phương pháp chiết siêu âm, nhưng trong quá trình tiến hành còn nhiều sai sót, cần khắc phục và cần tiến hành nghiên cứu sâu hơn. Đây có thể là một nghiên cứu trọng tâm tương lai. Trong các thử nghiệm tiếp theo chúng tôi kiến nghị một số phương pháp tiến hành được trong phòng thí nghiệm và có thể mang lại hiệu suất cao hơn:

- Phương pháp chiết bằng soxhlet

- Phương pháp chiết hồi lưu
- Phương pháp chiết ngấm kiệt

TÀI LIỆU THAM KHẢO

TÀI LIỆU TIẾNG VIỆT

1. Báo cáo điều tra trữ lượng khoanh vùng cây sâm K5 Tỉnh Quảng Nam - Đà Nẵng (9/1979), *Ty y tế Quảng Nam - Đà Nẵng*.
2. Bộ Y tế (2008), *Y học cổ truyền*, NXB Y học, Hà Nội.
3. Bộ y tế (2011), *Dược liệu học*, Nhà xuất bản Y học, Hà Nội.
4. Báo cáo tóm tắt tổng kết đề tài khoa học áp dụng một số biện pháp kỹ thuật trong tạo giống gieo trồng nhằm bảo vệ, nuôi trồng và phát triển nguồn sâm K5 tại Trà Linh - Trà My (Quảng Nam), *Công ty dược phẩm Quảng Nam - Đà Nẵng*, 197.
5. Bộ Y tế - Viện y học cổ truyền Việt Nam. *Đánh giá tác dụng của thuốc “Long Quy Sinh” trên bệnh nhân suy nhược thần kinh*.
6. Đỗ Huy Bích (2006), *Những cây thuốc và động vật làm thuốc ở Việt Nam (tập 2) – phần 1*, NXB Khoa học kỹ thuật, 704 – 713.
7. Đỗ Tất Lợi (1999), *Những cây thuốc và vị thuốc Việt Nam*, Nhà xuất bản Y học, 808- 810.
8. Phạm Hoàng Hộ, *Cây cỏ Việt Nam*, NXB trẻ.
9. Nguyễn Thị Hạnh, *Bài giảng Y học cổ truyền: Tâm căn suy nhược*, ĐHY khoa Thái Nguyên.
10. Từ Minh Koóng, *Kỹ thuật sản xuất dược phẩm tập 1, phần 2*, 145-162.
11. Trần Công Luận, *Kết quả nghiên cứu về thành phần hóa học Sâm Ngọc Linh, Trung tâm Sâm và Dược liệu TP.HCM - Viên Dược Liệu*.
12. *Nghiên cứu về sâm ngọc linh và hàm lượng các chất trong sâm ngọc linh* truy cập ngày, tại trang web <http://text.123doc.org/document/71210-nghien-cuu-ve-sam-ngoc-linh-va-ham-luong-cac-chat-trong-sam-ngoc-linh.htm>.
13. Nguyễn Thiên Quyền (Biên dịch), *Chẩn đoán phân biệt chứng hậu trong đông y*, 492-497.
14. Sách đỏ Việt Nam, NXB khoa học kỹ thuật, 88.
15. Tạp chí sinh học (9/1985), 45-48.

16. Tạp chí Khoa học ĐHQGHN: Khoa học Y Dược (1/2016), "Nghiên cứu thành phần Saponin và điều chế phức Saponin Phytosome của củ cây tam thất *Panax Notoginseng* trồng ở Tây Bắc Việt Nam". 32, 1-7.
17. Thư viện quốc gia Việt Nam (1992), "Nghiên cứu về Saponin đỉnh lãg và dạng bào chế từ đỉnh lãg".
18. Viện y học bản địa Việt Nam, truy cập ngày, tại trang web <http://dongvietbac.com.vn/suy-nhuoc-met-moi-nhuoc-co.html>.
19. Viện Dược Liệu (2006), *Nghiên Cứu Thuốc Từ Thảo Dược*, NXB Khoa Học Kỹ Thuật, 200-222
20. Vũ Phương Xuân (2000), *Thực vật chí Việt Nam*, Tập 2, NXB khoa học và kỹ thuật.

TÀI LIỆU NƯỚC NGOÀI

21. Bailey Kathleen Rand Crawley Jacqueline N (2009), "Anxiety-related behaviors in mice".
22. Bao, L., Cai, X., Wang, J., Zhang, Y., Sun, B. and Li, Y. (2016), "Anti-Fatigue Effects of Small Molecule Oligopeptides Isolated from *Panax ginseng* CA Meyer in Mice", *Nutrients*. 8(12), 807.
23. Bum, E. N., Taiwe, G. S., Moto, F., Ngoupaye, G., Nkantchoua, G., Pelanken, M., Rakotonirina, S. and Rakotonirina, A. (2009), "Anticonvulsant, anxiolytic, and sedative properties of the roots of *Nauclea latifolia* Smith in mice", *Epilepsy & Behavior*. 15(4), 434-440.
24. Calabrese, E. J. (2008), "An assessment of anxiolytic drug screening tests: hormetic dose responses predominate", *Critical reviews in toxicology*. 38(6), 489-542.
25. Can Adem, Dao David T, Arad Michal, Terrillion Chantelle E, Piantadosi Sean C and Gould Todd D (2012), "The mouse forced swim test", *JoVE (Journal of Visualized Experiments)*(59), e3638-e3638.
26. Carobrez, A. and Bertoglio, L. (2005), "Ethological and temporal analyses of anxiety-like behavior: the elevated plus-maze model 20 years on", *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*. 29(8), 1193-1205.

27. Carr, M. N., Bekku, N. and Yoshimura, H. (2006), "Identification of anxiolytic ingredients in ginseng root using the elevated plus-maze test in mice", *European journal of pharmacology*. 531(1), 160-165.
28. Castagné Vincent, Moser Paul and Porsolt Roger D (2009), "Behavioral assessment of antidepressant activity in rodents".
29. Chuck, T. L., McLaughlin, P. J., Arizzi LaFrance, M. N., Salamone, J. D. and Correa, M. (2006), "Comparison between multiple behavioral effects of peripheral ethanol administration in rats: sedation, ataxia, and bradykinesia", *Life sciences*. 79(2), 154-161.
30. Daley, M., Morin, C. M., LeBlanc, M., Grégoire, J.-P. and Savard, J. (2009), "The economic burden of insomnia: direct and indirect costs for individuals with insomnia syndrome, insomnia symptoms, and good sleepers", *Sleep*. 32(1), 55-64.
31. dela Peña, I. J. I., Kim, H. J., Botanas, C. J., de la Peña, J. B., Van Le, T. H., Nguyen, M. D., Park, J. H. and Cheong, J. H. (2016), "The psychopharmacological activities of Vietnamese ginseng in mice: characterization of its psychomotor, sedative–hypnotic, antistress, anxiolytic, and cognitive effects", *Journal of Ginseng Research*.
32. Deng, J., Zhou, Y., Bai, M., Li, H. and Li, L. (2010), "Anxiolytic and sedative activities of *Passiflora edulis* f. *flavicarpa*", *Journal of Ethnopharmacology*. 128(1), 148-153.
33. Duc, N. M., Kasai, R., Ohtani, K., Aiko, I., Nguyen, T. N., Yamasaki, K. and Tanaka, O. (1994), "Saponins from Vietnamese ginseng, *Panax vietnamensis* Ha et Grushv. collected in central Vietnam. III", *Chemical and pharmaceutical bulletin*. 42(3), 634-640.
34. Duc, N. M., Kasai, R., Ohtani, K., Ito, A., Nham, T., Yamasaki, K. and Tanaka, O. (1994), "Saponins from Vietnamese ginseng, *Panax vietnamensis* Ha et Grushv. collected in central Vietnam. II", *Chemical and pharmaceutical bulletin*. 42(1), 115-122.
35. Duc, N. M., Nham, N. T., Kasai, R., Ito, A., Yamasaki, K. and Tanaka, O. (1993), "Saponins from Vietnamese ginseng, *Panax vietnamensis* Ha et Grushv. collected in central Vietnam. I", *Chemical and pharmaceutical bulletin*. 41(11), 2010-2014.

36. Emamghoreishi, M., Khasaki, M. and Aazam, M. F. (2005), "Coriandrum sativum: evaluation of its anxiolytic effect in the elevated plus-maze", *Journal of Ethnopharmacology*. 96(3), 365-370.
37. Heydorn, W. E. (2000), "Zaleplon-a review of a novel sedative hypnotic used in the treatment of insomnia", *Expert opinion on investigational drugs*. 9(4), 841-858.
38. Jamal, H., Ansari, W. H. and Rizvi, S. J. (2008), "Evaluation of chalcones—a flavonoid subclass, for, their anxiolytic effects in rats using elevated plus maze and open field behaviour tests", *Fundamental & clinical pharmacology*. 22(6), 673-681.
39. Komada Munekazu, Takao Keizo and Miyakawa Tsuyoshi (2008), "Elevated plus maze for mice", *JoVE (Journal of Visualized Experiments)*(22), e1088-e1088.
40. Ma, G. D., Chiu, C. H., Hsu, Y. J., Hou, C. W., Chen, Y. M. and Huang, C. C. (2017), "Changbai Mountain ginseng (*Panax ginseng* CA Mey) extract supplementation improves exercise performance and energy utilization and decreases fatigue-associated parameters in mice", *Molecules*. 22(2), 237.
41. Park, J. H., Cha, H. Y., Seo, J. J., Hong, J. T., Han, K. and Oh, K. W. (2005), "Anxiolytic-like effects of ginseng in the elevated plus-maze model: comparison of red ginseng and sun ginseng", *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*. 29(6), 895-900.
42. Petit Demouliere, B., Chenu, F. and Bourin, M. (2005), "Forced swimming test in mice: a review of antidepressant activity", *Psychopharmacology*. 177(3), 245-255.
43. Ren, L., Wang, F., Xu, Z., Chan, W. M., Zhao, C. and Xue, H. (2010), "GABA A receptor subtype selectivity underlying anxiolytic effect of 6-hydroxyflavone", *Biochemical pharmacology*. 79(9), 1337-1344.
44. Rodgers, R. and Dalvi, A. (1997), "Anxiety, defence and the elevated plus-maze", *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*. 21(6), 801-810.
45. Takao Keizo and Miyakawa Tsuyoshi (2006), "Light/dark transition test for mice", *JoVE (Journal of Visualized Experiments)*(1), e104-e104.
46. Thuốc quý của người việt "Tác dụng của sâm ngọc linh".

47. Tolardo, R., Zetterman, L., Bitencourtt, D. R., Mora, T. C., de Oliveira, F. L., Biavatti, M. W., Amoah, S. K. S., Bürger, C. and de Souza, M. M. (2010), "Evaluation of behavioral and pharmacological effects of *Hedyosmum brasiliense* and isolated sesquiterpene lactones in rodents", *Journal of ethnopharmacology*. 128(1), 63-70.
48. Walf Alicia Aand Frye Cheryl A (2007), "The use of the elevated plus maze as an assay of anxiety-related behavior in rodents", *Nature protocols*. 2(2), 322-328.
49. Wei, X. Y., Yang, J. Y., Wang, J. H. and Wu, C. F. (2007), "Anxiolytic effect of saponins from *Panax quinquefolium* in mice", *Journal of ethnopharmacology*. 111(3), 613-618.
50. Zhu, H., Mingler, M. K., McBride, M. L., Murphy, A. J., Valenzuela, D. M., Yancopoulos, G. D., Williams, M. T., Vorhees, C. V. and Rothenberg, M. E. (2010), "Abnormal response to stress and impaired NPS-induced hyperlocomotion, anxiolytic effect and corticosterone increase in mice lacking NPSR1", *Psychoneuroendocrinology*. 35(8), 1119-1132.
51. Kim H.J., Kim P., Shin C.Y. A comprehensive review of the therapeutic and pharmacological effects of ginseng and ginsenosides in central nervous system. *J Ginseng Res*. 2013;37:8–29.