

BỘ GIÁO DỤC VÀ ĐÀO TẠO

BỘ Y TẾ

HỌC VIỆN Y DƯỢC HỌC CỔ TRUYỀN VIỆT NAM



LÊ THỊ DIỆU THÚY

**XÂY DỰNG QUY TRÌNH BÀO CHẾ VÀ ĐÁNH
GIÁ ĐỘC TÍNH CỦA CAO ĐẶC TỪ BÀI THUỐC
KNC TRÊN THỰC NGHIỆM**

LUẬN VĂN THẠC SỸ Y HỌC

Hà Nội – 2020

BỘ GIÁO DỤC VÀ ĐÀO TẠO

BỘ Y TẾ

HỌC VIỆN Y DƯỢC HỌC CỔ TRUYỀN VIỆT NAM



LÊ THỊ DIỆU THÚY

**XÂY DỰNG QUY TRÌNH BẢO CHẾ VÀ ĐÁNH
GIÁ ĐỘC TÍNH CỦA CAO ĐẶC TỪ BÀI
THUỐC KNC TRÊN THỰC NGHIỆM**

LUẬN VĂN THẠC SỸ Y HỌC

Chuyên ngành: Y học cổ truyền

Mã số: 8720115

Người hướng dẫn khoa học: PGS.TS. Đạm Xuân Cảnh

Hà Nội – 2020

LỜI CẢM ƠN

Với lòng kính trọng và biết ơn sâu sắc, em chân thành gửi lời cảm ơn tới:

- **PGS.TS Đậu Xuân Cảnh**, Giám đốc Học viện Y dược học cổ truyền Việt Nam, người thầy trực tiếp hướng dẫn, đã dành nhiều thời gian và công sức dạy bảo, truyền đạt cho em nhiều kiến thức quý báu.

- TS. Nguyễn Hoàng Ngân, Trưởng khoa Nghiên cứu thực nghiệm Học viện Quân y cùng tập thể các y bác sỹ trong khoa đã tận tình giúp đỡ trong quá trình em tiến hành đề tài tại khoa.

- Ths. Nguyễn Thị Ngọc, Bác sỹ khoa Khám bệnh Bệnh viện Tuệ Tĩnh – Học viện Y dược học cổ truyền Việt Nam, đã có những ý kiến hướng dẫn, chỉ bảo giúp em hoàn thành luận văn.

- Các thầy cô Phòng Đào tạo sau đại học, các thầy cô trong Hội đồng thông qua Đề cương, Hội đồng bảo vệ luận văn tốt nghiệp đã có những ý kiến hướng dẫn, chỉ bảo giúp em hoàn thành luận văn.

Con gửi tới ba mẹ lòng biết ơn sâu sắc, những người có công sinh thành, nuôi dưỡng, dạy dỗ và luôn dành cho con những tình cảm yêu quý nhất.

Xin gửi lời cảm ơn tới toàn thể gia đình, bạn bè, những người luôn động viên, giúp đỡ và tạo những điều kiện thuận lợi giúp tôi hoàn thành luận văn này.

Hà Nội ngày 14 tháng 06 năm 2020

Tác giả luận văn

Lê Thị Diệu Thúy

LỜI CAM ĐOAN

Những số liệu có được trong luận văn này do tôi trực tiếp thu thập tại khoa Nghiên cứu thực nghiệm Học viện Quân y và Khoa Dược lý – Học viện Y dược học cổ truyền Việt Nam. Kết quả nghiên cứu này chưa từng được công bố và không trùng lặp với bất kỳ nghiên cứu nào khác.

Tôi hoàn toàn chịu trách nhiệm về tất cả những vấn đề trình bày trong luận văn này.

Hà Nội, ngày 14 tháng 06 năm 2020

Tác giả luận văn

Lê Thị Diệu Thúy

DANH MỤC CÁC CHỮ VIẾT TẮT

YHCT :	Y học cổ truyền
YHHD :	Y học hiện đại
PHTT :	Phong hàn thấp tý
PTNT :	Phong thấp nhiệt tý
LD :	Lethal dose – Liều chết
ALD :	Absolute lethal dose – Liều chết tuyệt đối
MLD :	Median lethal dose – Liều chết trung bình
TI :	Therapeutic index – Chỉ số điều trị
ALT :	Alanine Amino Transferases
AST :	Aspartate Amino Transferases
TCCS :	Tiêu chuẩn cơ sở
NXB :	Nhà xuất bản
OECD :	Organisation for Economic Co – operation and Development

MỤC LỤC

LỜI CẢM ƠN	1
Chương I TỔNG QUAN TÀI LIỆU	3
1.1. Các phương pháp chiết xuất và bào chế thuốc Y học cổ truyền	3
1.1.1. Định nghĩa bào chế	3
1.1.2. Các phương pháp bào chế.....	3
1.1.3. Một số dạng thuốc bào chế thông thường [1],[2],[3]	3
1.1.4. Các bước bào chế cao đặc [2],[3],[15].....	4
1.1.5. Yêu cầu chất lượng cao đặc [2],[15]	5
1.2. Tổng quan về phương pháp nghiên cứu độc tính của thuốc [32].....	5
1.2.1. Tổng quan về độc tính cấp [22],[32]	6
1.2.2. Tổng quan về độc tính bán trường diễn [28],[22]	9
1.2.3. Ý nghĩa về tính an toàn của thuốc YHCT	11
1.3. Tổng quan về bài thuốc “KNC”	14
1.3.1. Thành phần bài thuốc:	14
1.3.2. Cơ sở thiết kế bài thuốc:	14
1.3.3. Tác dụng và chỉ định điều trị: [11]	15
1.3.4. Cách sử dụng:	16
1.3.5. Tiêu chuẩn kiểm định chất lượng các vị thuốc và cách bào chế theo dược điển Việt Nam V	16
2.1. Vật liệu nghiên cứu	29
2.1.1. Chế phẩm nghiên cứu:	29
2.1.2. Các vật liệu và phương tiện khác.....	30
2.2. Đối tượng nghiên cứu.....	31
2.2.1. Đánh giá độc tính cấp :.....	31
2.2.2. Đánh giá độc tính bán trường diễn:	31
2.3. Địa điểm và thời gian nghiên cứu	32
2.4. Phương pháp nghiên cứu.....	32
2.4.1. Thiết kế nghiên cứu	32
2.4.2. Bào chế và xây dựng tiêu chuẩn cơ sở cao đặc KNC	32

2.4.3. <i>Đánh giá độc tính cấp</i>	33
2.4.4. <i>Đánh giá độc tính bán trường diễn</i>	34
2.5. Phương pháp xử lý số liệu.....	35
2.6. Đạo đức nghiên cứu	35
3.1. Quy trình bào chế và xây dựng tiêu chuẩn cơ sở cao đặc KNC.....	36
3.1.1. <i>Kết quả bào chế cao đặc</i>	36
3.2. Nghiên cứu độc tính cấp.....	38
3.3. Nghiên cứu độc tính bán trường diễn.....	40
3.3.1. <i>Tình trạng chung và sự thay đổi thể trọng của chuột cống trắng</i>	40
<i>khi dùng dài ngày</i>	40
3.3.2. <i>Sự thay đổi huyết học của chuột</i>	41
3.3.3. <i>Sự thay đổi chức năng sinh hóa của chuột</i>	44
3.3.4. <i>Ảnh hưởng của dung dịch KNC đối với điện tim chuột ở đạo trình DII</i>	47
3.3.5 <i>Sự thay đổi về mô bệnh học ở gan, lách và thận của chuột</i>	48
Chương IV BÀN LUẬN	53
4.1. Về độc tính cấp.....	53
4.2. Về độc tính bán trường diễn.....	54
4.2.1. <i>Ảnh hưởng của dung dịch KNC đến tình trạng chung và sự thay đổi cân nặng của chuột cống</i> :	54
4.2.2. <i>Ảnh hưởng của dung dịch KNC đến chức năng tạo máu:</i>	55
4.2.3. <i>Ảnh hưởng của dung dịch KNC đến chức năng gan:</i>	56
4.2.4. <i>Ảnh hưởng của dung dịch KNC đến chức năng thận</i>	57
4.2.5. <i>Ảnh hưởng của cao đặc KNC đến điện tim chuột</i>	57
4.2.6. <i>Ảnh hưởng của dung dịch KNC đến kết quả mô bệnh học</i>	57
KẾT LUẬN	58
KIẾN NGHỊ.....	
TÀI LIỆU THAM KHẢO.....	
PHỤ LỤC.....	

DANH MỤC BẢNG

Bảng 3.1. Số chuột chết ở các lô chuột.....	39
Bảng 3.2. Ảnh hưởng của cao đặc KNC đến thể trọng chuột.....	40
Bảng 3.3. Ảnh hưởng của cao đặc KNC đến số lượng hồng cầu và huyết sắc tố trong máu chuột	41
Bảng 3.4. Ảnh hưởng của cao đặc KNC đến hematocrit và thể tích trung bình hồng cầu trong máu.....	42
Bảng 3.5. Ảnh hưởng của cao đặc KNC đến số lượng bạch cầu và tiểu cầu trong máu	43
Bảng 3.6. Ảnh hưởng của cao đặc KNC đến hoạt độ ALT và AST trong máu chuột	44
Bảng 3.7. Ảnh hưởng của cao đặc KNC đến hàm lượng billirubin toàn phần trong máu chuột.....	45
Bảng 3.8. Ảnh hưởng của cao đặc KNC đến hàm lượng albumin và cholesterol trong máu chuột.....	46
Bảng 3.9. Ảnh hưởng của cao đặc KNC đến hàm lượng creatinin trong máu chuột	47
Bảng 3.10. Ảnh hưởng của cao đặc KNC đối với điện tim chuột ở đạo trình DII.....	47

DANH MỤC ẢNH

Ảnh 1.1: Độc hoạt.....	16
Ảnh 1.2: Tần giao.....	17
Ảnh 1.3: Ngưu tất.....	18
Ảnh 1.4: Thục địa.....	19
Ảnh 1.5: Tế tân.....	20
Ảnh 1.6: Đương quy	21
Ảnh 1.7: Đỗ trọng	22
Ảnh 1.8: Phòng phong	23
Ảnh 1.9: Tang ký sinh.....	24
Ảnh 1.10: Bạch thược	25
Ảnh 1.11: Khương hoạt.....	26
Ảnh 1.12: Đảng sâm.....	27
Ảnh 1.13: Xuyên khung	27
Ảnh 1.14: Cam thảo	28
Hình 3.1: Hình ảnh đại thể gan, lách, thận chuột lô chứng	49
Hình 3.2: Hình ảnh đại thể gan, lách, thận chuột lô trị 1.....	49
Hình 3.3: Hình ảnh đại thể gan, lách, thận chuột lô trị 2.....	49
Hình 3.4: Hình ảnh vi thể gan chuột lô chứng.....	50
Hình 3.5: Hình ảnh vi thể gan chuột lô chứng.....	50
Ảnh 3.6: Hình ảnh vi thể gan chuột lô trị 2	50
Ảnh 3.7: Hình ảnh vi thể lách chuột lô chứng	51
Ảnh 3.8: Hình ảnh vi thể lách chuột lô trị 1	51
Ảnh 3.9: Hình ảnh vi thể lách chuột lô trị 2	51
Ảnh 3.10: Hình ảnh vi thể thận chuột lô chứng.....	52
Ảnh 3.11: Hình ảnh vi thể thận chuột lô trị 1	52
Ảnh 3.12: Hình ảnh vi thể thận chuột lô trị 2	52

ĐẶT VẤN ĐỀ

Ở Việt Nam, chính sách quốc gia về thuốc và định hướng chiến lược chăm sóc sức khỏe nhân dân giai đoạn 2000 – 2020 có yêu cầu “phát huy, thừa kế có chọn lọc, đánh giá tính an toàn, hiệu lực của thuốc đồng thời hiện đại hóa dạng bào chế từ thuốc cổ truyền để sử dụng rộng rãi trong cộng đồng”[17]. Chế phẩm đông dược hiện nay được xem là lĩnh vực có nhiều tiềm năng phát triển. Sử dụng chế phẩm thuốc đông y là xu hướng mới được người bệnh và bác sỹ cân nhắc lựa chọn trong điều trị[17].

So với thuốc Tây y chủ yếu điều trị triệu chứng bệnh, thuốc Đông y mang lại hiệu quả điều trị lâu dài trên cơ sở lý luận “bệnh là do mất thăng bằng và rối loạn âm và dương”, “nguyên tắc điều trị chủ yếu là lập lại cân bằng âm dương và điều hòa âm dương” [13]. Tuy nhiên, nhược điểm của thuốc đông y là mất thời gian sắc thuốc, không có tính cơ động dễ vận chuyển như thuốc Tây y. Bên cạnh đó, trên lâm sàng các bác sỹ y học cổ truyền thường sử dụng những bài thuốc cổ phương kết hợp gia giảm. Tuy các bài thuốc mang hiệu quả điều trị nhất định nhưng chưa được kiểm định về tính an toàn, chưa có hành lang pháp lý để sử dụng rộng rãi trên thị trường. Theo Cục quản lý y dược cổ truyền – Bộ y tế về nhu cầu sử dụng, có khoảng 80% dân số ở các nước đang phát triển sử dụng thuốc từ thảo dược để chăm sóc và bảo vệ sức khỏe, nhất là những người cao tuổi, người mắc bệnh mạn tính, bệnh khó chữa[17]. Vậy nhưng sản xuất đông dược chỉ đang chiếm thị phần rất nhỏ, xấp xỉ 1 – 1,5%[17]. Vấn đề đặt ra đó không chỉ là những bài thuốc, cây thuốc đơn thuần mà còn là di sản văn hóa dân tộc cần được bảo vệ, phát huy, phát triển. Do đó việc triển khai hiện đại hóa y học cổ truyền, nghiên cứu bào chế các bài thuốc y học cổ truyền thành dạng dễ sử dụng là yêu cầu tất yếu được đặt ra [17].

Trong số đó, bài thuốc “KNC” là bài thuốc kinh nghiệm được Phó giáo sư. Tiến sĩ Đạm Xuân Cảnh sử dụng trên lâm sàng khá nhiều và mang lại hiệu quả tốt cho nhiều bệnh nhân mắc bệnh về khớp như: thoái hóa khớp gối,

thoái hóa cột sống cổ, thoái hóa cột sống thắt lưng, viêm khớp dạng thấp. Tuy nhiên: “Thuốc muốn được sử dụng an toàn và có hiệu lực. Xét về tổng thể thì an toàn còn quan trọng hơn hiệu lực, vì một thuốc dù có hiệu lực đến đâu, nhưng nếu không an toàn thì cũng không được sử dụng. Để chứng minh thuốc có an toàn hay không thì phải nghiên cứu độc tính” [34]. Theo thông tư 29/2018/TT-BYT ban hành ngày 29/10/2018, hồ sơ đề nghị phê duyệt nghiên cứu thử thuốc trên lâm sàng yêu cầu: “Tài liệu nghiên cứu tiền lâm sàng của thuốc cần thử: các báo cáo nghiên cứu về tác dụng dược lý, độc tính, tính an toàn, đề xuất về liều dùng, đường dùng, cách sử dụng”[21]. Theo thông tư 03/2012/TT-BYT ban hành ngày 02/02/2012, thuốc thử lâm sàng phải bảo đảm các yêu cầu: “Đã được nghiên cứu ở giai đoạn tiền lâm sàng, có các tài liệu chứng minh tính an toàn để có thể thử nghiệm các giai đoạn tiếp theo” và “có công thức, dạng bào chế và quy trình bào chế ổn định”[33].

Vì lý do như trên nên chúng tôi tiến hành nghiên cứu đề tài “Xây dựng quy trình bào chế và đánh giá độc tính của cao đặc từ bài thuốc KNC trên thực nghiệm” với 2 mục tiêu như sau:

1. *Xây dựng quy trình bào chế cao đặc từ bài thuốc “KNC”*
2. *Xác định độc tính cấp và độc tính bán trường diễn của cao đặc “KNC”*

Chương I

TỔNG QUAN TÀI LIỆU

1.1. Các phương pháp chiết xuất và bào chế thuốc Y học cổ truyền

1.1.1. Định nghĩa bào chế

Bào chế có nghĩa là dùng các phương pháp về vật lý để làm thay đổi một phần tính dược của dược liệu tiện lợi cho chế biến và sử dụng trong sản xuất và điều trị [1],[2],[3].

1.1.2. Các phương pháp bào chế

- **Phương pháp hỏa chế:** Dùng nhiệt để xử lý dược liệu, gồm nhiều mức độ như: nung, bào, chích, lùi, hơ, sấy.

- **Phương pháp thủy chế:** có tác dụng làm cho thuốc sạch sẽ mềm mại, thuận tiện trong việc bào, thái thành phiến, làm giảm bớt độc tính của thuốc, đó là: rửa, đãi, ngâm, đập, thủy phi.

- **Phương pháp thủy hỏa hợp chế:** là phương pháp chung, nấu, tôi

+ Chung: Dùng rượu hoặc các phụ liệu khác tẩm vào dược liệu dùng phương pháp đun cách thủy cho chín như chung Thực địa, chung Hà thủ ô, chung Thực đại hoàng.

+ Nấu: Dùng nước lã hoặc nước thuốc hoặc phụ kiện khác cho dược liệu vào đun lên.

+ Tôi: Mục đích để cho thuốc dòn dễ bào chế, cách làm: cho thuốc vào lửa nung đỏ, lấy ra nhúng vào nước lã hoặc giấm như: Đại giả thạch, Từ thạch...

- **Các phương pháp khác:** chế bằng rượu, tẩm hoàng thổ, tẩm nước đậu đen, nước cam thảo, chế mật, chế gừng, chế giấm, chế nước vo gạo, tẩm đồng tiện, chế dòn, tạo men, phơi khô trong bóng râm, phơi nắng [1],[2],[3].

1.1.3. Một số dạng thuốc bào chế thông thường [1],[2],[3]

- **Thuốc phiến:** Dược liệu sau khi chọn lọc, rửa sạch, ngâm ủ cho mềm đem ra thái, bào, độ dày 1mm – 2mm.

- **Thuốc sắc (thuốc thang):** Dùng một chất lỏng (nước hoặc rượu) đồ ngập dược liệu, đun sôi lên, chắt lấy nước uống.

- **Thuốc cao:** Dùng nước để nấu dược liệu rồi cô lại đến mức độ nhất định. Tùy vào thể chất có 3 loại: cao lỏng, cao đặc, cao khô.

+ Cao lỏng: Là dạng thể chất lỏng sánh, có mùi vị đặc trưng của dược liệu dùng để bào chế cao. Quy ước 1ml cao lỏng tương ứng với 1g dược liệu dùng bào chế cao thuốc.

+ Cao đặc: Là khối đặc quánh. Hàm lượng dung môi dùng chiết xuất còn lại trong cao không quá 20%.

+ Cao khô: Là một khối hay bột khô, đồng nhất nhưng rất dễ hút ẩm. Cao khô không được có độ ẩm lớn hơn 5%.

- **Thuốc hoàn:** Thuốc được làm dưới dạng viên tròn với nhiều cỡ khác nhau. Dược liệu phần lớn đã được tán bột mịn hoặc có khi làm từ cao mềm các loại, sau đó thêm vào các chất tá dược để làm thành dạng viên.

- **Thuốc tán:** Là dạng thuốc mà dược liệu được tán thành bột để uống trong hay dùng ngoài. Loại uống trong thường uống với nước ấm hoặc cho vào bao vải cột kỹ bỏ vào sắc chung với thuốc thang. Loại thuốc bột dùng ngoài phải được sấy thật khô và tán thật mịn, dùng rắc lên vết thương hay thổi vào lỗ tai, lỗ mũi.

1.1.4. Các bước bào chế cao đặc [2],[3],[15]

- **Giai đoạn I:** Chiết xuất dược liệu bằng các dung môi thích hợp.

Tùy thuộc vào bản chất dược liệu, dung môi, tiêu chuẩn chất lượng của thành phẩm cũng như điều kiện quy mô sản xuất và trang thiết bị, có thể sử dụng các phương pháp chiết xuất: ngâm, hầm, hãm, sắc, ngấm kiệt, chiết xuất ngược dòng, chiết xuất bằng thiết bị siêu âm, chiết xuất bằng phương pháp sử dụng điện trường và các phương pháp khác.

- **Giai đoạn II: Cô đặc và sấy khô dịch chiết.**

Để cao đặc đạt độ ẩm còn lại không quá 20%, quá trình này thường được tiến hành trong các thiết bị dưới áp suất giảm, ở nhiệt độ không quá 60°C.

Nếu không có thiết bị cô đặc và sấy dưới áp suất giảm thì được phép cô cách thủy và sấy ở nhiệt độ không quá 80°C. Tuyệt đối không được cô trực tiếp trên lửa. Trường hợp muốn có cao thuốc chứa tỷ lệ hoạt chất thấp, phải tiến hành loại tạp chất bằng phương pháp thích hợp tùy thuộc vào bản chất của dược liệu, dung môi và phương pháp chiết xuất (dung môi thường dùng là cồn có nồng độ khác nhau).

1.1.5. Yêu cầu chất lượng cao đặc [2],[15]

- Thể chất: Khối đặc quánh, sờ không dính tay.
- Màu sắc, mùi vị: màu sắc đồng nhất, không có váng mốc, không có cặn bã dược liệu và vật lạ.
- Độ ẩm: mất khối lượng do làm khô không quá 20%
- Độ nhiễm khuẩn: Đạt yêu cầu quy định về độ nhiễm khuẩn theo dược điển V: Không được có *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*.
- + Tổng số vi khuẩn hiếu khí không gây bệnh sống lại không quá 10.000 khuẩn lạc trong 1ml.
- + Tổng số nấm mốc không gây bệnh không quá 100 khuẩn lạc trong 1 ml.
- Bảo quản: Đựng trong dụng cụ bao gói kín, để nơi thoáng mát, khô ráo, nhiệt độ ít thay đổi.

1.2. Tổng quan về phương pháp nghiên cứu độc tính của thuốc [32]

Một thuốc muốn được sử dụng trên lâm sàng phải chứng minh được có tính hiệu quả và có độc tính trong mức chấp nhận được.

Độc tính của thuốc bao gồm rất nhiều nghiên cứu trong đó 2 nghiên cứu rất quan trọng là độc tính cấp, độc tính bán trường diễn. Đối với các sản phẩm có định hướng sử dụng đường dùng ngoài da hoặc trên niêm mạc thì nghiên cứu xác định tính kích ứng da và niêm mạc là rất cần thiết. Ngoài ra khi thời gian dùng thuốc rất dài thì cần quan tâm tới độc tính trường diễn, một số loại thuốc thực hiện nghiên cứu về độc tính trên sinh sản và phát triển phôi thai, độc

tính sinh ung thư, độc tính trên hệ thống miễn dịch, tính sinh kháng thể và các độc tính bất thường khác.

1.2.1. Tổng quan về độc tính cấp [22],[32]

1.2.1.1. Một số thuật ngữ

- Độc tính của thuốc (toxicity): là tính chất được biểu hiện bằng tác dụng không mong muốn, có hại cho cơ thể. Độc tính có thể nhiều mức độ: thay đổi hành vi, vận động, buồn nôn, nôn, mất ngủ, thậm chí có thể tử vong.

- Liều chết: kí hiệu LD (lethal dose). Là liều tại đó gây chết con vật dùng thuốc.

- Liều chết tuyệt đối (ALD: Absolute lethal dose): liều nhỏ nhất gây chết 100% con vật dùng thuốc. Nếu sử dụng liều cao hơn tất cả các con cũng đều chết. Kí hiệu là LD100.

- Liều chết trung bình (MLD: Median lethal dose) hay còn gọi là LD50 liều làm chết 50% số con vật làm thí nghiệm.

- Liều chết tối thiểu: là liều khi thử trên một lô động vật có 1 con chết.

- Liều dưới liều chết: liều lớn nhất không làm chết con vật nào. Có thể gây độc mức độ nặng hay nhẹ cho động vật nhưng không gây chết. Kí hiệu LD0. Viết tắt ILD (infralethal dose) hay MTD (maximum tolerated dose).

- Liều an toàn: là mức liều cao nhất mà không gây ra bất kỳ tai biến nào có thể quan sát được (NOAEL: No observed adverse effect level).

1.2.1.2. Tầm quan trọng của việc xác định LD50[22]

- Biết LD50 sẽ có phương hướng dùng liều thí nghiệm dược lý một cách đúng đắn. Theo kinh nghiệm của Phó giáo sư – Tiến sĩ khoa học Đỗ Trung Đàm, liều có tác dụng dược lý thường vào khoảng 1/10 của LD50. Do đó phải xác định LD50 trước khi nghiên cứu dược lý.

- Liều LD50 và liều có tác dụng dược lý (ED: effective dose) trên động vật thí nghiệm là một trong những cơ sở để suy ra liều dùng trong điều trị ở người dựa vào một số phương pháp tính ngoại suy.

- Biết LD50 mới xác định được chỉ số điều trị, một thông số rất quan trọng để quyết định xem có nên đưa thuốc vào dùng trên người hay không.

Chỉ số điều trị TI (therapeutic index) là tỷ số giữa liều chết trung bình LD50 và liều hữu hiệu trung bình ED50:

$$TI = \frac{LD50}{ED50}$$

- Một chất có $TI \geq 10$ dùng được trong điều trị và ít gây ra độc hại, nếu dùng ở liều điều trị.

1.2.1.3. Các cách tính LD50 [22]

- **Phương pháp Behrens:**

Phương pháp này dùng trị số tích lũy, với quan niệm là: một con vật đã chết ở một liều nào đó, thì cũng chết ở liều lớn hơn, cũng như một con vật sống ở liều nào đó thì cũng sống nếu dùng liều nhỏ hơn.

- **Phương pháp Spearman – Karber**

- Phương pháp này không dùng trị số tích lũy, nhưng khi tính toán, liều được tính theo logarit của liều. Để đảm bảo chính xác, phương pháp này yêu cầu bước nhảy liều tính theo logarit liều phải giống nhau. Nếu bước nhảy liều không giống nhau thì có thể lấy bước nhảy liều trung bình, nhưng mức độ chính xác có giảm.

- **Phương pháp Reed – Muench**

Phương pháp này chủ yếu dựa theo phương pháp của Behrens (1929), nhưng 2 tác giả trên thấy tỷ lệ tăng giảm theo logarit liều thì đúng hơn là theo tỷ lệ tăng giảm số học đơn thuần.

- **Phương pháp Bliss**

Phương pháp này khá phức tạp, phải dùng đồ thị trên hệ trục logarit - probit và sử dụng một số bảng phụ lục.

- **Phương pháp Miller – Tainter**

Phương pháp này cũng sử dụng giấy logarit – probit và một số bảng số,

nhưng cách tính khá đơn giản.

- **Phương pháp Thomson**

Phương pháp này không cần phải có liều LD0 và LD100 nhưng phải tính tần suất chết trung bình 3 liều nhỏ liên tiếp nhỏ hơn 0,5 và tần suất chết trung bình 3 liều lớn liên tiếp lớn hơn 0,5. Phương pháp này cũng không cần vẽ đồ thị để tính giới hạn tin cậy.

- **Phương pháp Lichfield – Wilcoxon**

Phương pháp này phải tiến hành vẽ đồ thị trên giấy logarit – probit, sử dụng một số toán đồ và bảng số. Nhưng việc tính toán khá nhanh, lại có thể kiểm tra lại đồ thị đã vẽ có đúng không và tính được giới hạn tin cậy.

- **Phương pháp Persin**

Là phương pháp của tác giả người Nga, công thức:

$$LD50 = \frac{\sum |(a+b).(m-n)|}{200}$$

Trong đó a và b là trị số của các liều liên tiếp; còn m và n là tỷ lệ chết tính theo % của các liều tương ứng với a và b.

- **Phương pháp Behrens – Schlosser**

Phương pháp này dùng phép tính theo trị số của liều dùng, cộng với phép tính cũng có phần phức tạp, nên phương pháp này còn ít được áp dụng.

- **Phương pháp Livchich**

Là phương pháp của tác giả người Nga. Kết quả của cách tính này khác nhiều so với các cách tính còn lại. Vì vậy, không nên áp dụng cách tính này

- **Phương pháp dùng Excel của máy tính**

Phương pháp này có ưu điểm là chính xác, cách tính nhanh và ai tính cũng cho kết quả như nhau, nhưng có nhược điểm là có thể có những trị số kết quả bất thường. Vì vậy, cần kiểm tra lại bằng phương pháp Lichfield-Wilcoxon sẽ cho kết quả chính xác.

Về nguyên tắc khi nói đến xác định độc tính cấp là phải xác định LD50. Tuy nhiên, cũng có trường hợp không xác định được LD50. Một thuốc chỉ cô đặc được đến một nồng độ nhất định, thể tích mỗi lần dùng cũng có giới hạn tùy thuộc loài động vật và đường dùng. Vì vậy khi ta đã cô đặc thuốc tới nồng độ cao nhất, dùng với thể tích lớn nhất cho phép mà chuột vẫn không chết thì không thể xác định được LD50.

1.2.2. Tổng quan về độc tính bán trường diễn [28],[22]

Do thuốc cô truyền phần lớn dùng dài ngày mới thấy rõ tác dụng nên thí nghiệm trường diễn có nhiều ý nghĩa thực tiễn hơn.

Độc tính bán trường diễn là một nghiên cứu độc tính đa liều (multi dose toxicity), mục đích để xác định các tác dụng không mong muốn gây ra bởi thuốc khi dùng trong một thời gian dài với liều nhỏ.

Nghiên cứu độc tính bán trường diễn cung cấp các thông tin chi tiết về các cơ quan có thể bị tổn thương khi dùng thuốc, các ảnh hưởng lên chức năng sinh lý, huyết học, tế bào học, các biến đổi trên các chỉ số sinh hóa. Cung cấp những gợi ý để tính liều an toàn, cũng như khả năng hồi phục các tổn thương do thuốc khi dùng thuốc [14].

Thời gian nghiên cứu nghiên cứu độc tính bán trường diễn khác nhau tùy theo quy định của từng quốc gia cũng như từng hướng dẫn của các tổ chức. Ở Việt Nam thời gian nghiên cứu thường gấp 4 lần thời gian dự kiến dùng cho người [12], [15].

Loài động vật được khuyến cáo hàng đầu là chuột cống trắng, tiếp đến là các loài gặm nhấm khác. Chuột cống tốt nhất là bao gồm cả 2 giới, chuột cái chưa đẻ và không đang có thai. Tuổi chuột tốt nhất ngay sau khi dứt sữa, và trước 9 tuần tuổi. Chuột cần có sự đồng đều về cân nặng, sự khác nhau không nên quá 20% so với cân nặng trung bình [16].

Đường dùng thuốc cho động vật thường là đường dùng dự kiến dùng cho người. Ngoài ra, có thể dùng thêm một đường dùng khác.

Các lô chuột được cho uống mỗi lô một liều khác nhau và theo dõi sát các biểu hiện của độc tính.

Trong nghiên cứu độc tính bán trường diễn, tình trạng chung, thể trọng, mức độ ăn uống, bài tiết của động vật được ghi chép và đánh giá để xác định ảnh hưởng của thuốc tới các chỉ số này.

Các thông số hay được sử dụng để đánh giá độc tính bán trường diễn bao gồm các thông số về huyết học: số lượng hồng cầu, hemoglobin, hemoglobin trung bình hồng cầu, hematocrit, thể tích trung bình hồng cầu, số lượng bạch cầu, công thức bạch cầu, mức độ hủy hoại tế bào gan (thông qua AST, ALT), chức năng gan (albumin, prothrombin, bilirubin), cholesterol, chức năng lọc của cầu thận (thông qua creatinin).

Một số thông số hóa sinh khác như: các chất: acid uric, protein toàn phần, glucose, cholesterol toàn phần, triglycerid, LDL, HDL; các enzym: amylase, phosphatase acid, phosphatase kiềm, aldolase, lipase, CK, G-6-PD...; các chất điện giải: Ca^{++} , Na^{+} , K^{+} , Cl^{-}

Xét nghiệm đại thể và vi thể:

- Đại thể: Gan, thượng thận, lách, dạ dày, thận, tim, phổi, ruột.
- Vi thể (kính hiển vi, kính hiển vi điện tử): gan, thận, tim.

Nghiên cứu độc tính bán trường diễn cung cấp thông tin chi tiết về ảnh hưởng của thuốc lên các chức phận và cơ quan chính của cơ thể như huyết học, chức năng gan, thận, hô hấp. Các thông tin này giúp quyết định có dùng thuốc đó trên thử nghiệm lâm sàng được hay không và nếu có thử nghiệm thì cần theo dõi những độc tính nào, ưu tiên theo dõi các độc tính đã biết trước ở nghiên cứu độc tính bán trường diễn.

1.2.3. Ý nghĩa về tính an toàn của thuốc YHCT

1.2.3.1. Thực trạng về sử dụng thuốc YHCT trong khám và điều trị [28]

- Vẫn đang dùng phương pháp đánh giá theo cảm quan là chính, chưa xây dựng được phương pháp đánh giá thống nhất, khách quan và khoa học chất lượng của thuốc.

- Việc tìm hiểu mối liên hệ giữa tác dụng sinh học, tác dụng điều trị của thuốc với các hoạt chất hay nhóm hoạt chất chỉ mới được đặt ra trong những năm gần đây.

- Phần lớn các vị thuốc và bài thuốc vẫn còn được sử dụng theo kinh nghiệm.

- Dạng thuốc sử dụng phổ biến là thuốc sắc, thuốc rượu hoặc cao đơn hoàn tán.

1.2.3.2. Tính an toàn và hiệu lực của thuốc YHCT [28]

Theo Quyết định số 371/BYT-QĐ, các bước quan trọng đánh giá hiệu lực và tính an toàn của thuốc YHCT

**** Bước 1:** Xác định đặc điểm chất lượng thuốc cổ truyền :

- Xác định tiêu chuẩn, quy cách, phẩm chất các dược liệu trong chế phẩm.

- Xác định chất đặc trưng.

- Xác định quy trình bào chế sản xuất.

**** Bước 2:** Xác định tác dụng dược lý và độc tính của thuốc cổ truyền:

- Xác định tác dụng dược lực, dược lý của thuốc (xem phụ lục 2 kèm theo).

- Xác định độc tính: cấp, bán cấp, trường diễn của thuốc (xem phụ lục 3 kèm theo).

- Các phương pháp thực nghiệm (phải là phương pháp chuẩn quốc gia hoặc quốc tế) gồm:

- Phương pháp thử nghiệm dược lực, dược lý cơ bản tiến hành trên mô hình động vật hoặc thực nghiệm sinh học có liên quan chặt chẽ với người bệnh.

- Phương pháp thử độc tính trên động vật:

+ Độc tính toàn thân (thay đổi sinh lý, sinh hoá, huyết học, giải phẫu...)

+ Độc tính cấp diễn (độc tính xuất hiện trong vòng 24-36 giờ).

+ Độc tính trường diễn (xuất hiện trong thời gian dùng thuốc đưa đánh giá kéo dài từ 3 đến 6 tháng). Có thể thử nghiệm độc tính bán cấp với thời gian 2 tháng.

+ Độc tính tại chỗ (tính kích ứng của thuốc, sự hấp thu của cơ thể).

+ Độc tính chuyên biệt (đặc biệt) nói chung không thử nghiệm song nếu được yêu cầu thì phải thực hiện.

**** Bước 3:** Các giai đoạn đánh giá hiệu quả lâm sàng:

Được tiến hành sau khi đã xác minh quy cách chất lượng thuốc và xác định được độc tính, tác dụng dược lý của thuốc.

- Giai đoạn 1: Quan sát sơ bộ hiệu lực của thuốc để làm cơ sở cho các giai đoạn đánh giá tiếp.

+ Có phác đồ điều trị phù hợp.

+ Tiến hành trên một số ít (10-30) người khoẻ mạnh (20-30 tuổi), các chức năng gan, tim, thận bình thường, không có tiền sử dị ứng với thức ăn, thuốc (cũng có thể tiến hành trên một số bệnh nhân tình nguyện).

+ Xác định liều dùng, đường dùng thuốc.

+ Quan sát ghi chép theo đề cương.

+ Phân tích, đánh giá.

+ Báo cáo kết quả.

- Giai đoạn 2: Xác định hiệu lực và khẳng định thêm tính an toàn của thuốc đưa đánh giá.

+ Có phác đồ điều trị thích hợp.

+ Tiến hành trên một số bệnh nhân hạn chế (30-50) và chia làm 2 nhóm: nhóm thuốc đánh giá và nhóm đối chứng (cũng có thể chỉ có nhóm bệnh nhân dùng thuốc cần đánh giá). Các bệnh nhân này phải được theo dõi nội trú.

+ Phân nhóm: Nếu là 2 nhóm thì dùng phương pháp so sánh đối tượng bệnh nhân phải giống nhau cả về số lượng, giới tính, thời gian mắc bệnh: thuốc dùng để so sánh phải là loại thuốc đã xác định hiệu quả hoặc dùng placebo (thuốc vờ). Nếu chỉ có một nhóm dùng thuốc đưa đánh giá thì dùng phương pháp tự đối chiếu.

+ Liều lượng thuốc hàng ngày và thời gian điều trị phải xác định rõ và tuân thủ đúng phác đồ.

+ Theo dõi ghi chép đúng, không sai, không sót các biến đổi lâm sàng; kiểm tra cận lâm sàng, tác dụng xấu hoặc tác dụng phụ của thuốc trên người nếu có.

+ Đánh giá tác dụng điều trị theo 4 mức:

Khỏi hẳn - Có tiến bộ rõ - Có tiến bộ - Không có tiến bộ.

+ Xử lý số liệu bằng xác suất thống kê và báo cáo kết quả.

- Giai đoạn 3: Triển khai đánh giá lâm sàng trên phạm vi rộng lớn hơn để xác định kết quả của giai đoạn 2.

+ Đề cương đánh giá như ở giai đoạn 2.

+ Số lượng bệnh nhân khoảng 100-150: phương pháp đánh giá là phương pháp mù kép.

+ Cách tiến hành giống như giai đoạn 2: thực hiện ở 3 trung tâm có điều kiện trang bị kỹ thuật và cán bộ có năng lực.

+ Theo dõi ghi chép, đánh giá tác dụng điều trị và báo cáo kết quả như giai đoạn 2.

- Giai đoạn 4: Khi thuốc đã được sản xuất và sử dụng rộng rãi, nếu cần phải phát hiện những trường hợp độc hại mà các giai đoạn nêu trên không phát hiện được thì tiến hành tiếp giai đoạn 4. Số lượng bệnh nhân khoảng 200

bệnh nhân trở lên và được thực hiện ở nhiều trung tâm của nhiều vùng trong cả nước. Cách tiến hành như giai đoạn 2 và 3.

- Giai đoạn 5: Khi phát hiện thấy thuốc đang dùng có tác dụng cho một chỉ định mới, phải tiến hành đánh giá hiệu quả bằng giai đoạn 5 để khẳng định chỉ định mới của thuốc. Cách tiến hành như giai đoạn 2 và 3. Số lượng bệnh nhân khoảng 100 bệnh nhân trở lên.

1.3. Tổng quan về bài thuốc “KNC”

1.3.1. Thành phần bài thuốc:

Bài thuốc gồm 14 vị, tổng hàm lượng bài thuốc 97g.

Độc hoạt.....10g	Phòng phong.....10g
Tần giao.....10g	Tang ký sinh.....10g
Ngưu tất.....10g	Bạch thược.....05g
Thục địa.....05g	Khương hoạt.....05g
Tế tân.....05g	Đẳng sâm.....10g
Đương quy.....05g	Xuyên khung.....05g
Đỗ trọng.....05g	Cam thảo.....02g

1.3.2. Cơ sở thiết kế bài thuốc:

- “KNC” là bài thuốc được xây dựng dựa trên kinh nghiệm lâm sàng nhiều năm của PGS.TS. Đậu Xuân Cảnh – Giám đốc Học viện Y dược học cổ truyền Việt Nam, trưởng khoa Cơ xương khớp bệnh viện Tuệ Tĩnh.

- Bài thuốc “KNC” được xây dựng trên cơ sở gia giảm thành phần và liều lượng các vị trong bài thuốc cổ phương “Độc hoạt tang ký sinh”:

+ Thành phần bài thuốc “Độc hoạt tang ký sinh”

Độc hoạt.....08 -12g	Phòng phong.....08 -12g
Tần giao.....08 - 12g	Tang ký sinh.....12 -24g
Ngưu tất.....12 -16g	Bạch thược.....12 -16g

Sinh địa.....	16 - 24g	Bạch linh.....	12 -16g
Tế tân.....	04 - 08g	Đẳng sâm.....	12 -16g
Đương quy.....	12 -16g	Xuyên khung.....	06 - 12g
Đỗ trọng.....	12 -16g	Quế chi.....	04g
		Cam thảo.....	04g

+ Gia giảm các vị thuốc: Bỏ vị Bạch linh, Quế chi, thêm vị Khương hoạt, thay Sinh địa bằng Thục địa. Trong đó :

- Vị thuốc Khương hoạt có tác dụng khu phong, tán hàn, trừ thấp đối với phần trên của cơ thể, phối hợp với vị thuốc Độc hoạt có tác dụng trừ phong hàn thấp vùng dưới cơ thể, như vậy làm tăng thêm phạm vi tác dụng của bài thuốc.

- Vị thuốc Thục địa có tính ôn so với Sinh địa có tính hàn. Thay Sinh địa bằng Thục địa làm giảm tính nê trệ của bài thuốc. Bên cạnh đó vị thuốc Quế chi với tác dụng ôn ấm kinh lạc cũng có thể lược bỏ để cân bằng tính ôn ấm của bài thuốc.

- Vị thuốc Bạch linh tuy có tác dụng trừ thấp, giảm tính nê trệ của Sinh địa nhưng cũng có tác dụng thẩm thấp lợi tiểu. Do vậy mà lược bỏ vị thuốc này.

1.3.3. Tác dụng và chỉ định điều trị: [11]

- Tác dụng: khu phong, tán hàn, trừ thấp, thông kinh hoạt lạc, tư bổ can thận.

- Phân tích bài thuốc:

- + Độc hoạt, Tang ký sinh khu phong trừ thấp, hoạt lạc thông tý là chủ dược.

- + Phòng phong, Tế tân, Tần giao, khu phong tán hàn trừ thấp

- + Khương hoạt khu phong, tán hàn trừ thấp, tác dụng chủ yếu phần trên cơ thể

+ Xuyên khung, Đương quy, Bạch thược hoạt huyết thông lạc hòa dinh là thần.

+ Đỗ trọng, Thục địa, Ngưu tất dưỡng huyết, bổ can thận là tá.

+ Đẳng sâm, Cam thảo ích khí, bổ trợ tác dụng trừ phong thấp là sứ.

- Chỉ định: Các vị thuốc hợp lại thành bài thuốc vừa có tác dụng vừa trị tiêu vừa trị bản, vừa phò chính khu tà, phù hợp điều trị chứng phong hàn thấp tý. Trên lâm sàng dùng cho các bệnh về xương khớp như: thoái hóa khớp, viêm khớp dạng thấp, thoái hóa cột sống cổ, cột sống thắt lưng.

- Kiên kỵ: không dùng cho bệnh nhân thể nhiệt hoặc bệnh khớp ở giai đoạn sưng - nóng - đỏ - đau, không dùng cho phụ nữ có thai.

1.3.4. Cách sử dụng:

Sắc uống ngày 1 thang, uống chia 2 lần, mỗi

lần 250ml. Mỗi liệu trình dùng 10 thang.

1.3.5. Tiêu chuẩn kiểm định chất lượng các vị thuốc và cách bào chế theo dược điển Việt Nam V [15]

1.3.5.1. Độc hoạt [1],[15]



Ảnh 1.1: Độc hoạt

- Tên khoa học: *Radix Angelicae pubescentis*

- Bộ phận dùng: Rễ phơi hay sấy khô của cây độc hoạt, họ Hoa tán.

- *Tính vị, quy kinh:* Vị đắng, cay, tính hơi ấm. Quy vào kinh thận, bàng quang.

- *Mô tả:* Rễ cái hình trụ, trên to, dưới nhỏ, đầu dưới phân 2 đến 3 nhánh hoặc hơn, dài 10cm đến 30cm. Đầu rễ phình ra, hình nón ngược với nhiều vân ngang. Đường kính 1,5cm đến 3cm, đỉnh trên còn sót lại ít gốc thân, mặt ngoài màu nâu xám hay nâu thẫm, có vân nhăn dọc, với các lỗ vỏ, hơi lồi ngang và những vết sẹo rễ con hơi nổi lên. Chất tương đối rắn chắc, khi ẩm thì mềm. Mặt bẻ gãy có vỏ màu xám trắng, với nhiều khoang dầu màu nâu rải rác, gỗ từ màu vàng xám đến vàng nâu, tầng phát sinh màu nâu. Mùi thơm ngát đặc biệt, vị đắng và hăng, nếm hơi tê lưỡi.

- *Bào chế:* Dược liệu khô, loại bỏ tạp chất, rửa sạch, ủ mềm, thái phiến mỏng, phơi khô hay sấy khô ở nhiệt độ thấp.

1.3.5.2. *Tần giao* [1],[15]



Ảnh 1.2: Tần giao

- *Tên khoa học:* *Radix Gentianae*

- *Bộ phận dùng:* Rễ đã được phơi hay sấy khô của một số loài Tần giao, họ Long đởm.

- *Tính vị, quy kinh:* Khô, bình. Vào các kinh vị, đại tràng, can, đờm.

- *Mô tả:* Rễ gần như hình trụ, trên to, dưới nhỏ, xoắn vặn, dài 10 cm đến 30 cm, đường kính 1 cm đến 3 cm. Mặt ngoài màu nâu hơi vàng đến màu

vàng hơi xám, có nếp nhăn theo chiều dọc hoặc vằn. Đầu rễ còn sót lại mẩu gốc thân. Chất cứng, giòn, dễ bị bẻ gãy. Mặt bề

hơi có dầu, phần vỏ có màu vàng hoặc vàng nâu, phần gỗ màu vàng. Mùi đặc trưng, vị đắng, hơi chát.

- *Bào chế*: Lấy dược liệu khô chưa thái lát, rửa sạch, ủ mềm, thái lát dày, phơi khô.

1.3.5.3. *Ngưu tất* [1],[15]



Ảnh 1.3: Ngưu tất

- *Tên khoa học*: *Radix Achiranthis bidentatae*
- *Bộ phận dùng*: Rễ phơi hoặc sấy khô của cây ngưu tất, họ Dền
- *Tính vị quy kinh*: Vị đắng chua, tính bình. Qui vào kinh can, thận
- *Mô tả*: Rễ hình trụ, dài 20cm đến 30cm, đường kính 0,5cm đến 1,0cm. Đầu trên mang vết tích của gốc thân, đầu dưới thuôn nhỏ. Mặt ngoài màu vàng nâu, có nhiều nếp nhăn dọc nhỏ và vết tích của rễ con.

- *Bào chế*: Cắt bỏ rễ con, loại bỏ đất, buộc thành bó nhỏ, phơi đến khi héo, khô nhăn, xông lưu huỳnh 2 lần cho mềm. Cắt bằng phần đầu, phơi khô.

1.3.5.4. Thực địa [1],[15]



Ảnh 1.4: Thực địa

- Tên khoa học: *Radix Rehmaniae glutinosae praeparata*
- Bộ phận dùng: Rễ cây sinh địa, họ Hoa mồm sói.
- Tính vị, quy kinh: Vị ngọt, tính hơi ấm. Qui kinh tâm, can, thận.
- Mô tả: Phiến dày hoặc khối không đều. Mặt ngoài bóng. Chất mềm, dai, khó bẻ gãy. Mặt cắt ngang đen nhánh, mịn bóng.

Không mùi, vị ngọt.

- Bào chế: Sinh địa 100 kg

Sa nhân 1,5 kg

Gừng tươi 10,0 kg

Rượu (hàm lượng ethanol 22 % đến 25 %) 45,0 L

Lấy sinh địa, loại bỏ đất cát, rửa sạch, để ráo nước. Lấy gừng tươi, rửa sạch, thái nhỏ hoặc xay ướt. Lấy sa nhân, loại bỏ tạp chất, rửa sạch, đập, giã hoặc xay nhỏ. Cho gừng tươi và sa nhân vào nồi nấu hai vỏ. Thêm nước, đun sôi, điều chỉnh nhiệt độ để sôi âm ỉ trong 1h, rút dịch chiết sa nhân - gừng để được khoảng 50 L. Cho sinh địa đã ráo nước vào nồi nấu hai vỏ. Tẩm sinh địa với 1.2 lượng rượu theo công thức (22,5 L) cùng với dịch chiết sa nhân - gừng, ngâm ủ trong 2 h. Nếu lượng dịch sa nhân - gừng, rượu chưa đủ ngập sinh địa thì bổ sung thêm nước sạch (về cao hơn mặt sinh địa 2 cm đến 3 cm). Tiến hành nấu trong 3 ngày, mỗi ngày đun âm ỉ trong 6h.

Đêm ngừng nấu. Sau mỗi ngày bổ sung thêm nước sôi cho đủ ngập. Đến ngày thứ 4 thì rút dịch nấu, gộp cùng ½ lượng rượu còn lại. Sinh địa trong nồi được đảo trộn dưới cho đều. Đồ lượng dịch nấu gộp với rượu ở trên vào nồi và ngâm ủ trong 2 h. Bổ sung nước cho ngập rồi đun âm ỉ tiếp trong 6 h. Đêm ngừng nấu. Ngày thứ 5 tiếp tục nấu và điều chỉnh lượng nước sao cho lượng dịch nấu rút ra ngày hôm sau chỉ còn khoảng 9 L đến 10 L. Sinh địa được nấu trở nên đen nhánh, có mùi thơm, vị ngọt. Để nguyên hoặc thái lát dày 3 mm đến 4 mm. Sấy, tẩm với dịch còn lại trong quá trình sấy. Quá trình tẩm – sấy (hoặc phơi nắng) được làm liên tục cho tới khi hết dịch và thực địa thu được trở nên đen, láng bóng, khô, dẻo, thớ dai chắc, sờ không dính tay là được.

1.3.5.5. Tế tân [1],[15]



Ảnh 1.5: Tế tân

- Tên khoa học: *Radix et Rhizoma Asari*
- Bộ phận dùng: Rễ và thân rễ phơi khô của cây Bắc tế tân hoặc cây Hán thành tế tân, hoa Tế tân, họ Mộc hương.
- Tính vị, quy kinh: Vị cay, tính ấm. Qui vào kinh tâm, phế thận.
- Mô tả: + Bắc tế tân: Thường cuộn lại thành một khối lỏng lẻo. Thân rễ mọc ngang hình trụ, không đều, phân nhánh ngắn, dài 1cm đến 10cm, đường kính 2mm đến 4mm, mặt ngoài màu nâu xám, xù xì, với những mấu vòng, đốt dài 2mm đến 3mm, có các vết sẹo thân hình đĩa ở đầu nhánh. Rễ mảnh dẻ, mọc gần nhau ở các mấu, dài 10cm đến 20cm, đường kính 1mm, mặt ngoài

màu vàng xám, nhẵn hoặc có vết nhăn dọc, với những rễ con nhỏ hoặc vết sẹo. Chất giòn, dễ bị bẻ gãy, mặt bẻ phẳng, màu trắng hoặc hơi vàng. Mùi hăng và thơm, vị cay với cảm giác tê lưỡi.

+ Hán Thành tế tân: Thân rễ có đường kính 1mm đến 5mm, đốt dài 0,1cm đến 1cm.

+ Hoa tế tân: Thân rễ dài 5cm đến 20cm, đường kính 1mm đến 2mm, đốt dài 0,2cm đến 1cm. Mùi và vị hơi nhẹ.

Dược liệu sau khi cắt đoạn gồm những đoạn dài ngắn không đều.

Các đoạn thân rễ hình trụ tròn, mặt ngoài màu nâu xám, có nhiều vòng nốt sần. Đoạn rễ mảnh hơn, mặt ngoài màu nâu xám, mịn hoặc có nếp nhăn dọc. Mặt cắt trắng ngà hoặc màu trắng. Mùi hăng và thơm, vị cay với cảm giác tê lưỡi.

- *Bào chế*: Lấy dược liệu khô, loại bỏ tạp chất, vẩy nước vào cho mềm, cắt thành từng đoạn, phơi âm can cho khô.

1.3.5.6. Đương quy [1],[15]



Ảnh 1.6: Đương quy

- *Tên khoa học*: *Radix Angenicar sinensis*
- *Bộ phận dùng*: rễ phơi hay sấy khô của cây Đương quy, họ Hoa tán.
- *Tính vị, quy kinh*: Vị ngọt, cay, tính ấm. Quy vào kinh tâm, can, tỳ.
- *Mô tả*: Rễ dài 10cm đến 20cm, gồm nhiều nhánh, thường phân biệt thành 3 phần: Phần đầu gọi là quy đầu, phần giữa gọi là quy thân, phần dưới

gọi là quy vĩ. Đường kính quy đầu từ 1,0cm đến 3,5cm, đường kính quy thân và quy vĩ từ 0,3cm đến 1,0cm. Mặt ngoài màu nâu nhạt, có nhiều nếp nhăn dọc. Mặt cắt ngang màu vàng ngà có vân tròn và nhiều điểm tinh dầu. Mùi thơm đặc biệt, vị ngọt, cay, hơi đắng.

- *Bào chế*: Đương quy đã loại bỏ tạp chất, rửa sạch, ủ mềm, thái lát mỏng, phơi khô hoặc sấy khô ở nhiệt độ thấp.

1.3.5.7. *Đỗ trọng* [1],[15]



Ảnh 1.7: Đỗ trọng

- *Tên khoa học*: *Cortex Eucommiae*
- *Bộ phận dùng*: Vỏ thân phơi hay sấy khô của cây Đỗ trọng, họ Đỗ trọng.
- *Tính vị, quy kinh*: Vị ngọt, tính ấm. Quy kinh can, thận.
- *Mô tả*: Dược liệu là những miếng vỏ phẳng hoặc hai bên mép hơi cong vào, to nhỏ không đều, dày 0,2cm đến 0,7cm, màu xám tro. Mặt ngoài sần sùi, có nhiều nếp nhăn dọc và vết tích của cành con. Mặt trong có vỏ màu sẫm, trơn, chất giòn, dễ bẻ gãy, mặt bẻ có nhiều sợi màu trắng ánh bạc, có tính đàn hồi như cao su. Vị hơi đắng.

1.3.5.8. Phòng phong [1],[15]



Ảnh 1.8: Phòng phong

- *Tên khoa học*: *Radix Saposhnikoviae divaricatae*
- *Bộ phận dùng*: Rễ phơi khô của cây phòng phong, họ Hoa tán.
- *Tính vị, quy kinh*: Vị cay, ngọt, tính ấm. Qui kinh can, bàng quang
- *Mô tả*: Rễ có hình nón hay hình trụ dài, dần thắt nhỏ lại về phía dưới, hơi ngoằn ngoèo, dài 15cm đến 30cm, đường kính 0,5cm đến 2cm. Mặt ngoài màu nâu xám, sần sùi với những vân ngang, lớp vỏ ngoài thường bong tróc ra, nhiều nốt bì không trắng và những u lồi do vết rễ con để lại. Phần đầu rễ mang nhiều vân lõi hình vòng cung, đôi khi là những túm gốc cuống lá dạng sợi có màu nâu, dài 2cm đến 3cm. Thễ chất nhẹ, dễ gãy, vết gãy không đều, vỏ ngoài màu nâu và có vết nứt, lõi màu vàng nhạt. Mùi thơm, vị đặc trưng, hơi ngọt. Dược liệu sau khi đã thái lát: Các lát hình tròn hoặc hình elip. Bên ngoài màu nâu xám có các nếp nhăn dọc, sần sùi, đôi khi có các u lồi ngang kéo dài giống các lỗ vỏ, các lát đầu rễ có mang các gốc cuống lá dạng sợi. Mặt cắt màu nâu nhạt và phần vỏ bị nứt, khe nứt màu vàng nhạt, phần gỗ có các tia xuyên tâm. Mùi thơm, vị hơi ngọt.
- *Bào chế*: Loại bỏ tạp chất, rửa sạch, ủ mềm, thái lát dày và phơi khô.

1.3.5.9. Tang ký sinh [1],[15]



Ảnh 1.9: Tang ký sinh

- Tên khoa học: *Herba Loranthi Gracifilolii*
- Bộ phận dùng: Những đoạn thân cành và lá phơi khô, lấy từ cây tầm gửi, họ Tầm gửi, sống ký sinh trên cây Dâu tằm, họ Dâu tằm.
- Tính vị, quy kinh: Vị đắng, tính bình. Quy kinh can, thận.
- Mô tả: Những đoạn thân, cành hình trụ, dài 3cm đến 4cm, đường kính 0,3cm đến 0,7cm, có phân nhánh, những mấu lồi là vết của cành và lá. Mặt ngoài màu nâu xám, có nhiều lỗ bì nhỏ, đôi khi có những vết nứt ngang. Chất cứng rắn. Mặt cắt ngang thấy rõ 3 phần: phần vỏ mỏng màu nâu, gỗ trắng ngà, ruột màu xám và xốp. Lá khô nhăn nhúm, nguyên hoặc bị cắt thành từng mảnh. Lá hình trái xoan. Đầu và góc phiến lá hơi nhọn, màu nâu xám, dài 3,5cm đến 4,5cm, gân lá hình mạng lưới.
- Bào chế: Loại bỏ tạp chất, cắt ngắn, phơi hoặc sấy khô ở nhiệt độ thấp.

-
1.3.5.10. Bạch thược [1],[15]



Ảnh 1.10: Bạch thược

- *Tên khoa học: Radix Paeoniae lactiflorae*
- *Bộ phận dùng: rễ cạo bỏ lớp vỏ ngoài phơi hay sấy khô của cây Thược dược, họ Hoàng liên*
- *Tính vị, quy kinh: Vị ngọt, đắng, chua, tính lạnh. Quy vào kinh can, tỳ, phế.*
- *Mô tả: Rễ hình trụ tròn, thẳng hoặc đôi khi hơi uốn cong, hai đầu phẳng; đều nhau hoặc một đầu to hơn, dài 5cm đến 18cm, đường kính 1cm đến 2,5cm. Mặt ngoài hơi trắng hoặc hồng nhạt, đôi khi có màu nâu thẫm, nhăn hoặc có nếp nhăn dọc và vết tích của rễ nhỏ. Chất rắn chắc, nặng, khó bẻ gãy. Mặt cắt phẳng màu trắng ngà hoặc hơi phớt hồng, vỏ hẹp, gỗ thành tia rõ, đôi khi có khe nứt. Không mùi. Vị hơi đắng và chua.*
- *Bào chế: Loại bỏ tạp chất, bỏ đầu đuôi và rễ con, cạo sạch vỏ ngoài sau đó luộc chín hoặc luộc chín rồi bỏ vỏ, phơi khô hoặc thái lát phơi khô.*

1.3.5.11. *Khương hoạt* [1],[15]



Ảnh 1.11: Khương hoạt

- *Tên khoa học: Rhizoma et Radix Noiopterygii*
- *Bộ phận dùng:* Thân rễ và rễ đã phơi khô của cây Khương hoạt
Khương hoạt lá rộng, họ Hoa tán
- *Tính vị, quy kinh:* Tân, khô, ôn. Vào các kinh bàng quang, can, thận.
- *Mô tả:* Thân rễ hình trụ, hơi cong queo, dài 4 cm đến 13 cm, đường kính 0,6 cm đến 2,5 cm, đầu thân rễ có sẹo gốc thân khí sinh. Mặt ngoài màu nâu đến nâu đen. Nơi bị tróc vỏ ngoài màu vàng, khoảng giữa các đốt ngắn, có vòng mấu nhỏ, gần liền nhau, tựa như hình con tằm (quen gọi là Tằm khương), hoặc khoảng giữa có các đốt kéo dài dạng đốt tre (gọi là Trúc tiết khương). Trên đốt có nhiều sẹo rễ con, dạng điểm hoặc dạng bướu và vẩy, màu nâu. Thê nhẹ, chất giòn xốp, dễ bẻ gãy. Mặt bẻ không phẳng, có nhiều kẽ nứt. vỏ màu từ vàng nâu đến nâu tối, có chất dầu, có điểm chấm dầu, màu nâu. Gỗ màu trắng vàng, tia ruột xếp theo hướng xuyên tâm rõ. Lõi (ruột) màu vàng đến vàng nâu. Mùi thơm, vị hơi đắng và cay.
- *Bào chế:* loại bỏ rễ con và đất, thái lát dày, phơi hoặc sấy khô.

1.3.5.12. *Đẳng sâm* [1],[15]



Ảnh 1.12: Đẳng sâm

- *Tên khoa học: Radix Codonopsis*
- *Bộ phận dùng:* Rễ phơi hay sấy khô của cây đẳng sâm, họ Hoa chuông
- *Tính vị, quy kinh:* Vị ngọt, tính bình. Quy kinh tỳ, phế
- *Mô tả:* Dược liệu thái phiến là các lát dày hình gần tròn. Bên ngoài màu nâu xám tới nâu vàng, đôi khi có các nốt seọ thân lồi lên ở các lát cắt từ rễ chính. Bề mặt phiến màu vàng nhạt hoặc nâu nhạt ở phần vỏ và màu vàng nhạt ở phần gỗ; có khe nứt hoặc tia xuyên tâm. Mùi thơm đặc trưng, vị ngọt.
- *Bào chế:* Lấy dược liệu chưa thái lát, ủ mềm, thái phiến dày, phơi khô.

1.3.5.13. Xuyên khung [1],[15]



Ảnh 1.13: Xuyên khung

- *Tên khoa học: Rhizoma Ligustici wallichii*
- *Bộ phận dùng:* Thân rễ phơi khô của cây Xuyên khung, họ Hoa tán.
- *Tính vị, quy kinh:* Vị đắng, tính âm. Quy kinh can, đờm, tâm bào.
- *Mô tả:* Phần rễ (quen gọi là củ) có hình khối méo mó, nhiều dạng, đường kính 2 cm đến 5 cm, có nhiều u không đều nổi lên. Bề ngoài màu nâu đất, có nếp nhăn, xù xì, có vết tích của rễ con còn sót lại. Phía đỉnh có vết thân cây cắt di, hình tròn, lõm xuống. Chất cứng, khó bẻ gãy. Mặt cắt ngang màu vàng nâu. Mùi thơm, vị cay hơi tê.
- *Bào chế:* Lấy thân rễ, cắt bỏ gốc thân, rửa sạch, phơi hoặc sấy nhẹ cho khô. Khi dùng thái phiến.

1.3.5.14. Cam thảo [1],[15]



Ảnh 1.14: Cam thảo

- *Tên khoa học: Radix et Rhizoma Glycyrrhizae*
- *Bộ phận dùng:* Rễ cây cam thảo, họ Đậu
- *Tính vị, quy kinh:* Vị ngọt, tính bình, quy 12 kinh
- *Mô tả:* Đoạn rễ hình trụ, thẳng hay hơi cong queo, thường dài 20 cm đến 100 cm, đường kính 0,6 cm đến 3,5 cm. Lớp bên ngoài cùng bị cạo bỏ hoặc dính chặt. Rễ chưa cạo lớp bên ngoài có màu nâu đỏ hoặc nâu xám có các vết sẹo của rễ con, những vết nhăn dọc và các lỗ vỏ nhô lên. Rễ đã cạo lớp bên có màu vàng nhạt.. Mặt cắt ngang có nhiều tia ruột từ trung tâm tỏa ra, trông giống như nan hoa bánh xe, đôi khi có khe nứt, tầng phát sinh libe-gỗ thành vòng rõ.
- *Bào chế:* Lấy rễ Cam thảo, phun nước cho mềm. thái phiến, phơi hoặc sấy khô.

Chương II

ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Vật liệu nghiên cứu

2.1.1. Chế phẩm nghiên cứu:

cao đặc KNC bào chế từ bài thuốc “KNC”

* Thành phần bài thuốc:

STT	Tên dược liệu	Số lượng
1	Độc hoạt	12g
2	Tần giao	10g
3	Ngưu tất	10g
4	Thục địa	10g
5	Tế tân	08g
6	Đương quy	05g
7	Đỗ trọng	15g
8	Phòng phong	05g
9	Tang ký sinh	05g
10	Bạch thược	05g
11	Khương hoạt	05g
12	Đẳng sâm	05g
13	Xuyên khung	05g
14	Cam thảo	02g

Các dược liệu trong bài thuốc được dùng dưới dạng dược liệu khô và đạt tiêu chuẩn trong Dược điển Việt Nam V được chế biến theo qui định của YHCT và cân theo tỷ lệ như trên.

Cao nước chiết xuất từ bài thuốc KNC có tỷ lệ 1:1 (1g dược liệu/1ml cao), được đựng trong chai nhựa nút kín.



Hình 2.1. Các vị thuốc trong bài KNC

Từ cao nước KNC có tỉ lệ 1:1 tiến hành nghiên cứu chiết xuất và bào chế cao đặc KNC; xây dựng tiêu chuẩn cơ sở và kiểm định tiêu chuẩn cho cao đặc KNC tại Học viện Quân Y. Cao đặc KNC đạt tiêu chuẩn cơ sở được sử dụng là chế phẩm nghiên cứu.

Tùy theo mức liều sử dụng cho chuột uống, cao đặc KNC được pha loãng trong nước cất thành các dung dịch có nồng độ khác nhau, dùng để đánh giá độc tính cấp và độc tính bán trường diễn trên thực nghiệm.

2.1.2. Các vật liệu và phương tiện khác

- Thuốc, hóa chất nghiên cứu độc tính
- + Nước cất, Aceton – PA, Cloroform – PA, Amoniac – PA, Toluen – PA, Ethanol - PA
- + Kit định lượng các enzym và chất chuyển hóa trong máu: ALT (alanin aminotransferase), AST (aspartat aminotranferase), bilirubin toàn phần, albumin, cholesterol, creatinin và glucose
- + Dung dịch xét nghiệm máu
- + Các hóa chất xét nghiệm và làm tiêu bản mô bệnh học
- Trang thiết bị nghiên cứu thực nghiệm
- + Máy đo quang phổ UV –Vis UVD – 2960 – Mỹ

- + Bếp điện, nồi nhôm để chiết xuất, nồi cô cao cách thủy
- + Máy lắc siêu âm
- + Cân phân tích Sartorius độ chính xác 0,0001g – Đức
- + Cân kỹ thuật điện tử ACB – Plus độ chính xác 0,01g – Anh
- + Tủ sấy – Trung Quốc
- + Máy đo hàm ẩm tự động SHIMADZU, model MOC 63u, Nhật
- + Hệ thống phân tích sắc ký
- + Thiết bị quay chân không EYELA, N1200B, Nhật
- + Máy xét nghiệm sinh hóa Biochemical Systems International Srl, Italia, model 3000 Evolution, hóa chất của hãng.

+ Máy phân tích huyết học Humancount 30TS, hãng Human, Đức, sử dụng phần mềm phân tích huyết học dành cho chuột thí nghiệm, hóa chất của hãng;

- + Máy điện tim Fukuda FX 7102, Nhật Bản
- + Kim cong đầu tù dành cho chuột uống thuốc, Nhật Bản
- + Ống micropipette chuyên dụng để lấy máu hốc mắt.
- + Bộ dụng cụ mổ động vật cỡ nhỏ và các dụng cụ thí nghiệm khác.

2.2. Đối tượng nghiên cứu

2.2.1. Đánh giá độc tính cấp :

60 con chuột nhắt trắng chủng Swiss thuần chủng trưởng thành, không phân biệt giống, cân nặng mỗi con tại thời điểm bắt đầu thí nghiệm là 18 – 22g.

2.2.2. Đánh giá độc tính bán trường diễn:

30 chuột cống trắng trưởng thành dòng Wistar, không phân biệt giống, đạt tiêu chuẩn thí nghiệm, cân nặng mỗi con tại thời điểm bắt đầu thí nghiệm là 160 – 180 g.

Động vật thí nghiệm do Ban chăn nuôi động vật thí nghiệm - Học viện Quân Y cung cấp và nuôi dưỡng trong phòng nuôi động vật thí nghiệm một tuần trước khi tiến hành thí nghiệm. Động vật ăn thức ăn theo tiêu chuẩn thức

ăn cho động vật nghiên cứu, nước sạch đun sôi để nguội uống tự do. Hằng ngày theo dõi ghi chép diễn biến kết quả thí nghiệm.

2.3. Địa điểm và thời gian nghiên cứu

- **Địa điểm nghiên cứu:** Bộ môn Dược lý – Học viện Y dược học cổ truyền Việt Nam, Khoa Nghiên cứu thực nghiệm Học viện Quân y.

- **Thời gian nghiên cứu:** Từ tháng 3/2019 đến tháng 7/2019.

2.4. Phương pháp nghiên cứu

2.4.1. Thiết kế nghiên cứu

- Bào chế cao đặc KNC và xây dựng tiêu chuẩn cơ sở cao đặc KNC
 - Nghiên cứu độc tính cấp của cao đặc KNC: được xác định trên chuột nhắt trắng theo đường uống bằng phương pháp Litchfield – Wilcoxon theo quy định và hướng dẫn của Bộ Y tế và Tổ chức Y tế thế giới, tổ chức OECD (Organisation for Economic Co – operation and Development) [19], [20], [38], [39],[40]

- Nghiên cứu độc tính bán trường diễn của cao đặc KNC: được xác định trên chuột cống trắng theo đường uống theo quy định và hướng dẫn của Bộ Y tế, tổ chức Y tế thế giới, tổ chức OECD[19], [20], [38], [39],[40].

2.4.2. Bào chế và xây dựng tiêu chuẩn cơ sở cao đặc KNC

- Nhận 9700 ml cao lỏng KNC tỉ lệ 1:1 bào chế từ 100 thang bài thuốc KNC tại Bệnh viện Tuệ Tĩnh.

- Lọc loại tạp chất
- Gộp các dịch chiết, cô dịch chiết thành cao đặc.
- Xây dựng TCCS của cao đặc KNC trên các chỉ tiêu sau:
 - + Hình thức: Về màu sắc, mùi vị, độ đồng nhất, độ tan trong nước, cặn bã dược liệu hoặc tạp chất lạ.
 - + Khối lượng: Mất khối lượng do làm khô không quá 20%.
 - + Định tính: Có phản ứng định tính của Độc hoạt, Bạch thược, Thục địa.
 - + Giới hạn nhiễm khuẩn: Theo yêu cầu của Dược Điển Việt Nam V[2],[15]:

- Không được có *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*.
- Tổng số vi khuẩn hiếu khí không gây bệnh sống lại không quá 10.000 khuẩn lạc trong 1ml.
- Tổng số nấm mốc không gây bệnh không quá 100 khuẩn lạc trong 1 ml.

2.4.3. Đánh giá độc tính cấp

Xác định LD₅₀ của bài thuốc KNC trên chuột nhắt trắng chủng Swiss đường uống bằng phương pháp của Litchfield – Wilcoxon [21], theo quy định của Bộ Y tế Việt Nam[19],[20], hướng dẫn của Tổ chức y tế thế giới [39],[40] và hướng dẫn của OECD [38] về đánh giá tính an toàn và hiệu lực của thuốc.

Chuột nhắt trắng chủng Swiss gồm 60 con chia ngẫu nhiên thành 6 lô, mỗi lô 10 con. Trước khi thí nghiệm chuột nhịn ăn 12 giờ, cho uống nước bình thường. Sau 12 giờ nhịn ăn, cho chuột uống thuốc với thể tích 0,2 ml/10g thể trọng/ lần nhưng với các liều tăng dần, tối đa 3 lần /24 giờ, mỗi lần uống cách nhau 3 giờ. Tìm liều cao nhất không gây chết chuột, liều thấp nhất gây chết 100% số chuột và các liều trung gian. Chuột được uống thuốc bằng cách đưa thẳng thuốc thử vào dạ dày bằng kim cong đầu tù.

Theo dõi tình trạng chung (vận động, bài tiết...) và số lượng chuột chết ở mỗi lô trong 72 giờ. Sau đó tiếp tục theo dõi tình trạng chung của chuột đến hết ngày thứ 7 sau khi uống thuốc thử lần đầu.

Liều dùng được tính theo g cao đặc/kg/ngày. Dự kiến từ 8g dược liệu khô của bài thuốc “KNC” tạo ra 1g cao đặc KNC. Liều dự kiến sử dụng trên người là 12,2 g cao đặc/người/ngày (97g dược liệu khô/người/ngày). Tính quân bình một người 50kg thì liều dùng dự kiến trên người sẽ là 0,244 g cao đặc/kg/ngày (1,952g dược liệu khô/kg/ngày). Quy đổi ra liều tương đương trên chuột nhắt với hệ số quy đổi là 12 thì liều dự kiến có tác dụng trên chuột nhắt là 2,928 g cao đặc/kg/ngày (23,424g dược liệu khô/kg/ngày).

Tiến hành phẫu tích quan sát tình trạng các tạng ngay sau khi có chuột chết để xác định nguyên nhân gây độc.

2.4.4. Đánh giá độc tính bán trường diễn

Theo quy định của Bộ Y tế Việt Nam [19],[20], hướng dẫn của Tổ chức Y tế thế giới [39] , [40], và hướng dẫn của OECD [38] về đánh giá tính an toàn và hiệu lực của thuốc.

Chuột cống trắng được chia ngẫu nhiên thành 3 lô, mỗi lô 10 con, mỗi con được nhốt riêng một chuồng. Chuột được cho uống thuốc hoặc nước cất liên tục trong 90 ngày, thể tích cho uống là 10ml/kg/24h.

- Lô chứng sinh lý: uống nước cất

- Lô trị 1: uống cao đặc KNC liều dự kiến gấp 7 lần liều dùng thường dùng trên người. Quy đổi ra liều tương đương trên chuột cống với hệ số quy đổi là 07 thì liều dự kiến có tác dụng trên chuột cống là 1,708g cao đặc/kg/ngày (13,664g dược liệu khô/kg/ngày).

- Lô trị 2: uống cao đặc KNC liều gấp 5 lần lô trị 1.

Các chỉ tiêu đánh giá:

- *Sinh lý – dược lý*: theo dõi tình trạng chung, hoạt động, ăn uống, cân nặng, điện tim của chuột.

- *Huyết học*: hồng cầu, hemoglobin, hematocrit, thể tích trung bình hồng cầu, bạch cầu, tiểu cầu.

- *Sinh hóa*: nồng độ men gan AST, ALT trong máu, bilirubin toàn phần, creatinin máu, albumin huyết tương, cholesterol máu.

- *Mô bệnh học*: vào ngày thứ 90, giết chuột, quan sát hình ảnh đại thể gan, lách, thận. Sau đó làm tiêu bản nhuộm HE các tạng để đánh giá hình ảnh vi thể của chuột.

Thời điểm xét nghiệm: lấy máu xét nghiệm các chỉ số sinh hóa, huyết học, xác định cân nặng của chuột, ghi điện tim tại 3 thời điểm: xuất phát điểm, sau 45 ngày uống thuốc, sau 90 ngày uống thuốc.

2.5. Phương pháp xử lý số liệu

Số liệu được xử lý theo thuật toán thống kê y sinh học với sự hỗ trợ của chương trình phần mềm Microsoft office excel, SPSS 19.0 của Tổ chức Y tế Thế giới, tính tỷ lệ %, hệ số tương quan, OR, Chi – square Test, T – Test.

2.6. Đạo đức nghiên cứu

Nghiên cứu được thực hiện với mục đích xác định độc tính cấp, độc tính bán trường diễn của bài thuốc “KCN” trên thực nghiệm nhằm mục đích tìm ra thêm một phương pháp điều trị mới đảm bảo an toàn và hiệu quả cho bệnh nhân Thoái hóa khớp . Ngoài ra không có bất cứ mục đích nào khác.

Chương III

KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU

3.1. Quy trình bào chế và xây dựng tiêu chuẩn cơ sở cao đặc KNC

3.1.1. Kết quả bào chế cao đặc

Bào chế cao đặc KNC được thực hiện theo các bước sau:

- Từ 100 thang thuốc KNC ở dạng dược liệu khô, mỗi thang 97g, tiến hành sắc thuốc, nhận 9700 ml cao lỏng KNC tỉ lệ 1:1 bào chế từ Bệnh viện Tuệ Tĩnh

- Lọc loại tạp chất

- Gộp các dịch chiết, cô dịch chiết thành cao đặc

Từ 9700 ml cao lỏng KNC tỉ lệ 1: 1 cô đặc được 1212,5g cao đặc KNC

Kết quả tính toán cho thấy: Từ 8g dược liệu khô của bài thuốc KNC tạo ra 1 g cao đặc KNC. Từ 100 thang dược liệu khô có khối lượng 9700g tạo ra 1212,5g cao đặc KNC.

* Yêu cầu chất lượng:

- Tính chất, cảm quan : Chế phẩm dạng khối mềm, màu nâu, có mùi dược liệu đặc trưng, đồng nhất.

- Mất khối lượng do làm khô : Không quá 20%.

- Định tính : Phải đạt theo quy định: Trên sắc ký đồ của dung dịch thử có các vết phát huỳnh quang cùng màu sắc và giá trị R_f với các vết có trong sắc ký đồ của dung dịch đối chiếu.

- Giới hạn nhiễm khuẩn : Tổng số vi sinh vật hiếu khí không quá CFU/g 10^4 ; tổng số nấm không quá CFU/g 10^2 ; không quá 10^2 CFU vi khuẩn gram âm dung nạp mật trong 1 g. Không có *Salmonella* trong 10 g. Không có *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* trong 1 g.

* Phương pháp thử

- Tính chất, cảm quan: Bằng cảm quan, cao đặc phải đạt theo yêu cầu đã nêu.

- Mất khối lượng do làm khô: Tiến hành theo phụ lục 12.16 (xác định mất khối lượng do làm khô) - ĐDVN V: Cân nhanh 0,5g mẫu thử đã nghiền thành bột mịn vào một cốc đáy bằng có đường kính khoảng 50 mm và chiều cao khoảng 30 mm đã được sấy khô và xác định khối lượng. Sấy ở nhiệt độ 100° C đến 105°C trong 3 giờ. Lấy ra để nguội trong bình hút ẩm có chất hút ẩm phosphor pentoxyd hoặc silica gel, sau đó cân. Tính toán kết quả theo phần trăm khối lượng: mất khối lượng do làm khô < 20%.

*** Định tính**

Định tính bạch thực: phương pháp SKLM

- **Dung dịch thử:** Lấy khoảng 1,5 g chế phẩm, thêm 20 ml ethanol 96%. Khuấy hoặc siêu âm để hòa tan. Lọc, bốc hơi dịch lọc tới khô trên cách thủy. Hòa tan cản trở lại bằng 2 ml ethanol 96%.

- **Dung dịch đối chiếu:** Cân chính xác khoảng 0,5 g bột bạch thực chuẩn vào bình nón nút mài 50 ml, thêm 20 ml ethanol 96%, siêu âm 20 phút. Lọc, bốc hơi dịch lọc tới khô trên cách thủy. Hòa tan cản trở lại bằng 2 ml ethanol 96%.

- **Tiến hành:** Chấm riêng biệt lên bản mỏng 10 µl mỗi dung dịch đối chiếu và thử. Triển khai sắc ký đến khi dung môi đi được lớn hơn 2/3 bản mỏng. Lấy bản mỏng ra, để khô ngoài không khí.

- **Hiện màu:** Phun dung dịch vanilin 5% trong acid sulfuric (TT). Sấy ở 105°C tới khi hiện rõ vết.

- **Yêu cầu:** Trên sắc ký đồ của dung dịch thử phải có các vết có cùng màu sắc và giá trị R_f với các vết có trong sắc ký đồ của dung dịch đối chiếu.

Định tính độc hoạt: phương pháp SKLM

- **Dung dịch thử:** Lấy khoảng 2,0 g chế phẩm vào bình nón nút mài 50 ml, thêm 20 ml ether (TT), lắc siêu âm trong 30 phút. Lọc, bốc hơi dịch lọc tới khô trên cách thủy. Hòa tan cản trở lại bằng 2 ml cloroform (TT).

- **Dung dịch đối chiếu:** Lấy khoảng 2,0 g bột độc hoạt chuẩn vào bình nón nút mài 50 ml, thêm 20 ml ether (TT), ngâm qua đêm. Lọc, bốc hơi dịch lọc tới khô trên cách thủy. Hòa tan cản trở lại bằng 2 ml cloroform (TT).

- **Tiến hành:** Chấm riêng biệt lên bản mỏng 2 μ l mỗi dung dịch đối chiếu và thử. Sau khi triển khai, lấy bản mỏng ra, để khô ngoài không khí. Quan sát dưới ánh sáng tử ngoại ở bước sóng 366 nm.

- **Yêu cầu:** Trên sắc ký đồ của dung dịch thử phải có các vết phát huỳnh quang cùng màu sắc và giá trị R_f với các vết có trong sắc ký đồ của dung dịch đối chiếu.

Định tính thực địa: phương pháp SKLM

- **Dung dịch thử:** Lấy khoảng 1,0 g chế phẩm vào bình nón nút mài 100 ml, thêm 50 ml methanol (TT). Siêu âm trong 30 phút. Lọc, bốc hơi dịch lọc tới khô trên cách thủy. Hòa tan cản trở lại bằng 5 ml nước. Lắc với n- butanol đã bão hòa nước (TT) 4 lần, mỗi lần 10 ml. Gộp dịch chiết n- butanol, cô đến cạn. Hòa tan cản trong 2 ml methanol (TT) được dung dịch thử.

- **Dung dịch đối chiếu:** Lấy khoảng 2 g bột thực địa chuẩn vào bình nón nút mài 100 ml, tiến hành tương tự như đối với dung dịch thử.

- **Tiến hành:** Chấm riêng biệt lên bản mỏng 5 μ l mỗi dung dịch đối chiếu và thử. Sau khi triển khai, lấy bản mỏng ra, để khô ngoài không khí.

- **Hiện màu:** Phun dung dịch 2- aminoethyl diphenylorinat 1% trong methanol (TT), sấy bản mỏng ở 105⁰C trong 5 phút. Quan sát bản mỏng dưới ánh sáng tử ngoại ở bước sóng 366 nm.

- **Yêu cầu:** Trên sắc ký đồ của dung dịch thử phải có các vết phát huỳnh quang cùng màu sắc và giá trị R_f với các vết có trong sắc ký đồ của dung dịch đối chiếu.

*** Giới hạn nhiễm khuẩn**

Không nhiễm khuẩn (Thử theo phụ lục 13.6 (thử giới hạn nhiễm khuẩn) – Dược điển Việt Nam V)

3.2. Nghiên cứu độc tính cấp

Ở mỗi lô chuột nhất trắng, mỗi lô 10 con, được uống thuốc thử theo liều tăng dần từ 12,0g cao đặc/kg thể trọng cho đến mức liều cao nhất có thể cho chuột uống trong 24 giờ là 42g cao đặc/kg thể trọng, uống 3 lần/24 giờ, cách nhau ít nhất 3 giờ. Theo dõi tình trạng chung của chuột và số lượng chuột chết ở mỗi lô trong 72 giờ. Sau đó tiếp tục theo dõi tình trạng chuột đến hết ngày thứ 7 sau khi uống thuốc.

Bảng 3.1. Số chuột chết ở các lô chuột

Lô chuột	Số chuột thí nghiệm	Liều dùng (g cao đặc/kg thể trọng)	Thể tích cho uống	Số chuột sống/chết sau 72 giờ	Số chuột sống/chết sau 168 giờ
Lô 1	10	12,0	0,2 mL/10g x 3lần	10/0	10/0
Lô 2	10	18,0	0,2 mL/10g x 3lần	10/0	10/0
Lô 3	10	24,0	0,2 mL/10g x 3lần	10/0	10/0
Lô 4	10	30,0	0,2 mL/10g x 3lần	10/0	10/0
Lô 5	10	36,0	0,2 mL/10g x 3lần	10/0	10/0
Lô 6	10	42,0	0,2 mL/10g x 3lần	10/0	10/0

Nhận xét: Cao đặc KNC được cho chuột ở các lô uống với các mức liều khác nhau, ở cùng thể tích 0,2 mL/10g/lần x 3 lần (tức 60mL/kg).

Chuột được uống từ mức liều thấp nhất là 12,0g cao đặc/kg thể trọng cho đến mức liều cao nhất có thể cho chuột uống trong 24 giờ là 42g cao đặc/kg thể trọng, không có chuột thí nghiệm nào bị chết sau uống thuốc 72 giờ. Ở các mức liều cho uống, các chuột đi ngoài bình thường. Tất cả chuột thí nghiệm ở các lô đều ăn uống bình thường, nước tiểu bình thường, lông mượt, mắt trong, quan sát hoạt động của chuột thấy chuột bình thường.

Theo dõi tiếp các chuột cho đến hết 7 ngày (168 giờ) sau uống thuốc thấy các chuột hoạt động, ăn uống bình thường, chất thải bình thường, không có chuột nào chết.

3.3. Nghiên cứu độc tính bán trường diễn

3.3.1. Tình trạng chung và sự thay đổi thể trọng của chuột cống trắng khi dùng dài ngày

3.3.1.1. Tình trạng chung:

Chuột cống trắng được theo dõi hàng ngày về tình trạng chung gồm hoạt động, ăn uống, tình trạng lông, da, niêm mạc, chất tiết. Các chuột ở cả lô chứng và các lô dùng cao đặc KNC đều hoạt động bình thường. Chuột lông mượt, da niêm mạc bình thường, ăn uống bình thường, phân thành khuôn.

3.3.1.2. Sự thay đổi thể trọng chuột:

Bảng 3.2. Ảnh hưởng của cao đặc KNC đến thể trọng chuột

* Nhận xét:

Thời điểm xét nghiệm	Thể trọng (g)	Lô nghiên cứu			p
		Lô chứng sinh lý (1)	Lô trị 1 (2)	Lô trị 2 (3)	
Trước thí nghiệm (a)	n	10	10	10	$p_{2-1} > 0,05$
	\bar{x}	168,10	167,50	168,50	$p_{3-2} > 0,05$
	SD	3,42	4,54	3,93	$p_{3-1} > 0,05$
Sau 45 ngày (b)	n	10	10	10	$p_{2-1} > 0,05$
	\bar{x}	198,40	197,60	199,70	$p_{3-2} > 0,05$
	SD	5,57	4,92	7,01	$p_{3-1} > 0,05$
Sau 90 ngày (c)	n	10	10	10	$p_{2-1} > 0,05$
	\bar{x}	216,00	215,50	216,80	$p_{3-2} > 0,05$
	SD	4,77	3,14	5,91	$p_{3-1} > 0,05$
p		$p_{b-a} < 0,05; p_{c-b} < 0,05; p_{c-a} < 0,05$			

*** Nhận xét:**

- So sánh giữa các thời điểm sau so với trước thấy thể trọng chuột của cả ba lô nghiên cứu đều tăng, sự thay đổi có ý nghĩa thống kê với $p < 0,05$.

- Thể trọng của chuột ở hai lô uống Cao đặc KNC so với thể trọng của chuột ở lô chứng sinh lý tại tất cả các thời điểm đo không thấy có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê $p > 0,05$

3.3.2. Sự thay đổi huyết học của chuột

Bảng 3.3. Ảnh hưởng của cao đặc KNC đến số lượng hồng cầu và huyết sắc tố trong máu chuột

Thời điểm XN	Lô chứng sinh lý (1)	Lô trị 1 (2)	Lô trị 2 (3)	p
Số lượng hồng cầu chuột ($\times 10^{12}/l$)				
Trước thí nghiệm (a)	8,25 \pm 0,84	8,22 \pm 0,56	8,21 \pm 0,77	$p_{2-1} > 0,05$ $p_{3-2} > 0,05$ $p_{3-1} > 0,05$
Sau 45 ngày (b)	8,34 \pm 0,78	8,38 \pm 0,62	8,32 \pm 1,15	
Sau 90 ngày (c)	8,22 \pm 0,38	8,30 \pm 1,11	8,26 \pm 0,64	
p	$p_{b-a} > 0,05; p_{c-b} > 0,05; p_{c-a} > 0,05$			-
Hàm lượng huyết sắc tố trong máu chuột (g/L)				
Trước thí nghiệm (a)	137,70 \pm 8,29	134,00 \pm 10,27	139,10 \pm 12,47	$p_{2-1} > 0,05$ $p_{3-2} > 0,05$ $p_{3-1} > 0,05$
Sau 45 ngày (b)	139,50 \pm 9,65	136,80 \pm 10,64	138,60 \pm 11,67	
Sau 90 ngày (c)	141,80 \pm 9,13	138,10 \pm 15,37	140,90 \pm 10,27	
p	$p_{b-a} > 0,05; p_{c-b} > 0,05; p_{c-a} > 0,05$			-

*** Nhận xét:**

- So sánh các lô với nhau trong cùng một thời điểm, số lượng hồng cầu và hàm lượng huyết sắc tố trong máu chuột thay đổi không có ý nghĩa thống kê ($p > 0,05$).

- So sánh trong từng lô giữa các thời điểm thí nghiệm, số lượng hồng cầu và hàm lượng huyết sắc tố trong máu chuột thay đổi không có ý nghĩa thống kê ($p > 0,05$).

Bảng 3.4. Ảnh hưởng của cao đặc KNC đến hematocrit và thể tích trung bình hồng cầu trong máu

Thời điểm XN	Lô chứng sinh lý (1)	Lô trị 1 (2)	Lô trị 2 (3)	p
Hematocrit (%)				
Trước thí nghiệm (a)	41,10 ± 1,82	41,04 ± 2,98	41,72 ± 2,25	$p_{2-1} > 0,05$
Sau 45 ngày (b)	41,69 ± 2,77	41,76 ± 2,41	41,79 ± 3,14	$p_{3-2} > 0,05$
Sau 90 ngày (c)	41,66 ± 2,34	41,52 ± 4,04	40,56 ± 2,04	$p_{3-1} > 0,05$
p	$p_{b-a} > 0,05; p_{c-b} > 0,05; p_{c-a} > 0,05$			-
Thể tích trung bình hồng cầu (fl)				
Trước thí nghiệm (a)	50,60 ± 2,17	50,90 ± 2,38	50,30 ± 1,89	$p_{2-1} > 0,05$
Sau 45 ngày (b)	50,90 ± 2,77	51,00 ± 2,11	50,40 ± 1,96	$p_{3-2} > 0,05$
Sau 90 ngày (c)	50,70 ± 2,54	50,80 ± 3,22	50,50 ± 2,37	$p_{3-1} > 0,05$
p	$p_{b-a} > 0,05; p_{c-b} > 0,05; p_{c-a} > 0,05$			-

*** Nhận xét:**

- So sánh các lô với nhau trong cùng một thời điểm, hematocrit và thể tích trung bình hồng cầu trong máu chuột thay đổi không có ý nghĩa thống kê ($p > 0,05$).

- So sánh trong từng lô giữa các thời điểm thí nghiệm, hematocrit và thể tích trung bình hồng cầu trong máu chuột thay đổi không có ý nghĩa thống kê ($p > 0,05$).

Bảng 3.5. Ảnh hưởng của cao đặc KNC đến số lượng bạch cầu và tiểu cầu trong máu

Thời điểm XN	Lô chứng sinh lý (1)	Lô trị 1 (2)	Lô trị 2 (3)	p
Số lượng bạch cầu (G/l)				
Trước thí nghiệm (a)	10,52 ± 1,03	10,26 ± 2,81	9,95 ± 2,07	$p_{2-1} > 0,05$ $p_{3-2} > 0,05$ $p_{3-1} > 0,05$
Sau 45 ngày (b)	10,84 ± 2,03	11,37 ± 2,14	11,13 ± 2,17	
Sau 90 ngày (c)	10,01 ± 2,95	11,19 ± 3,24	10,68 ± 2,73	
p	$p_{b-a} > 0,05; p_{c-b} > 0,05; p_{c-a} > 0,05$			-
Số lượng tiểu cầu (G/l)				
Trước thí nghiệm (a)	622,00 ± 96,42	605,80 ± 125,77	600,80 ± 96,12	$p_{2-1} > 0,05$ $p_{3-2} > 0,05$ $p_{3-1} > 0,05$
Sau 45 ngày (b)	580,20 ± 88,76	602,50 ± 130,31	616,10 ± 72,91	
Sau 90 ngày (c)	594,00 ± 86,79	590,40 ± 86,05	614,40 ± 121,07	
p	$p_{b-a} > 0,05; p_{c-b} > 0,05; p_{c-a} > 0,05$			-

*** Nhận xét:**

- So sánh các lô với nhau trong cùng một thời điểm, số lượng bạch cầu và số lượng tiểu cầu trong máu chuột thay đổi không có ý nghĩa thống kê ($p > 0,05$).

- So sánh trong từng lô giữa các thời điểm thí nghiệm, số lượng bạch cầu và số lượng tiểu cầu trong máu chuột thay đổi không có ý nghĩa thống kê ($p > 0,05$).

3.3.3. Sự thay đổi chức năng sinh hóa của chuột

Bảng 3.6. Ảnh hưởng của cao đặc KNC đến hoạt độ ALT và AST trong máu chuột

Thời điểm XN	Lô chứng sinh lý (1)	Lô trị 1 (2)	Lô trị 2 (3)	p
Hoạt độ AST (UI/l)				
Trước thí nghiệm (a)	83,20 ± 15,22	82,90 ± 11,50	85,20 ± 15,34	$p_{2-1} > 0,05$ $p_{3-2} > 0,05$ $p_{3-1} > 0,05$
Sau 45 ngày (b)	86,60 ± 15,06	89,10 ± 11,25	85,40 ± 18,42	
Sau 90 ngày (c)	91,60 ± 24,27	90,20 ± 14,00	84,40 ± 15,53	
p	$p_{b-a} > 0,05; p_{c-b} > 0,05; p_{c-a} > 0,05$			-
Hoạt độ ALT (UI/l)				
Trước thí nghiệm (a)	66,80 ± 16,93	64,40 ± 12,38	68,40 ± 17,54	$p_{2-1} > 0,05$ $p_{3-2} > 0,05$ $p_{3-1} > 0,05$
Sau 45 ngày (b)	67,40 ± 23,59	66,00 ± 14,61	65,40 ± 14,33	
Sau 90 ngày (c)	61,20 ± 13,03	63,10 ± 15,47	65,20 ± 11,56	
p	$p_{b-a} > 0,05; p_{c-b} > 0,05; p_{c-a} > 0,05$			-

*** Nhận xét:**

- So sánh các lô với nhau trong cùng một thời điểm, hoạt độ các enzym AST và ALT trong máu chuột thay đổi không có ý nghĩa thống kê ($p > 0,05$).
- So sánh trong từng lô giữa các thời điểm thí nghiệm, hoạt độ các enzym AST và ALT trong máu của chuột thay đổi không có ý nghĩa thống kê ($p > 0,05$).

Bảng 3.7. Ảnh hưởng của cao đặc KNC đến hàm lượng bilirubin toàn phần trong máu chuột

Thời điểm XN	Lô chứng sinh lý (1)	Lô trị 1 (2)	Lô trị 2 (3)	p
Bilirubin toàn phần ($\mu\text{mol/L}$)				
Trước thí nghiệm (a)	72,70 \pm	77,30 \pm	76,90 \pm	$p_{2-1} > 0,05$ $p_{3-2} > 0,05$ $p_{3-1} > 0,05$
	21,86	17,76	14,46	
Sau 45 ngày (b)	76,70 \pm	75,50 \pm	75,90 \pm	
	23,20	27,65	18,85	
Sau 90 ngày (c)	79,10 \pm	75,10 \pm	74,90 \pm	
	15,35	18,55	16,91	
p	$p_{b-a} > 0,05; p_{c-b} > 0,05; p_{c-a} > 0,05$			-

*** Nhận xét:**

- So sánh các lô với nhau trong cùng một thời điểm, các chỉ số bilirubin toàn phần máu chuột thay đổi không có ý nghĩa thống kê ($p > 0,05$).

- So sánh trong từng lô giữa các thời điểm thí nghiệm, các chỉ số bilirubin toàn phần máu chuột thay đổi không có ý nghĩa thống kê ($p > 0,05$).

Bảng 3.8. Ảnh hưởng của cao đặc KNC đến hàm lượng albumin và cholesterol trong máu chuột

Thời điểm XN	Lô chứng sinh lý (1)	Lô trị 1 (2)	Lô trị 2 (3)	p
Albumin huyết tương (g/l)				
Trước thí nghiệm (a)	31,30 ± 2,79	31,50 ± 2,27	31,40 ± 2,67	$p_{2-1} > 0,05$
Sau 45 ngày (b)	31,40 ± 2,32	31,70 ± 2,16	31,60 ± 2,46	$p_{3-2} > 0,05$ $p_{3-1} > 0,05$
Sau 90 ngày (c)	31,50 ± 2,37	31,80 ± 1,55	32,50 ± 1,72	
p	$p_{b-a} > 0,05; p_{c-b} > 0,05; p_{c-a} > 0,05$			-
Cholesterol toàn phần (mmol/l)				
Trước thí nghiệm (a)	1,17 ± 0,23	1,19 ± 0,47	1,16 ± 0,34	$p_{2-1} > 0,05$
Sau 45 ngày (b)	1,19 ± 0,14	1,16 ± 0,17	1,18 ± 0,32	$p_{3-2} > 0,05$ $p_{3-1} > 0,05$
Sau 90 ngày (c)	1,15 ± 0,25	1,13 ± 0,29	1,14 ± 0,13	
p	$p_{b-a} > 0,05; p_{c-b} > 0,05; p_{c-a} > 0,05$			-

*** Nhận xét:**

- So sánh các lô với nhau trong cùng một thời điểm, các chỉ số albumin và cholesterol toàn phần máu chuột thay đổi không có ý nghĩa thống kê ($p > 0,05$).

- So sánh trong từng lô giữa các thời điểm thí nghiệm, các chỉ số albumin và cholesterol toàn phần máu chuột thay đổi không có ý nghĩa thống kê ($p > 0,05$).

Bảng 3.9. Ảnh hưởng của cao đặc KNC đến hàm lượng creatinin trong máu chuột

Thời điểm XN	Lô chứng sinh lý (1)	Lô trị 1 (2)	Lô trị 2 (3)	p
Creatinin (mmol/l)				
Trước thí nghiệm (a)	46,90 ± 7,16	47,60 ± 4,60	49,10 ± 5,36	$p_{2-1} > 0,05$
Sau 45 ngày (b)	48,20 ± 9,02	47,30 ± 5,14	48,80 ± 8,18	$p_{3-2} > 0,05$
Sau 90 ngày (c)	48,40 ± 12,05	46,90 ± 4,68	46,30 ± 8,11	$p_{3-1} > 0,05$
p	$p_{b-a} > 0,05; p_{c-b} > 0,05; p_{c-a} > 0,05$			-

*** Nhận xét:**

- So sánh các lô với nhau trong cùng một thời điểm, nồng độ creatinin máu chuột thay đổi không có ý nghĩa thống kê ($p > 0,05$).
- So sánh trong từng lô giữa các thời điểm thí nghiệm, nồng độ creatinin máu chuột thay đổi không có ý nghĩa thống kê ($p > 0,05$).

3.3.4. Ảnh hưởng của dung dịch KNC đối với điện tim chuột ở đạo trình DII

Bảng 3.10. Ảnh hưởng của cao đặc KNC đối với điện tim chuột ở đạo trình DII

Thời điểm XN	Lô chứng sinh lý (1)	Lô trị 1 (2)	Lô trị 2 (3)	p
Tần số tim (CK/phút, $\bar{x} \pm SD$)				
Trước thí nghiệm (a)	490,00 ± 13,34	488,80 ± 10,52	488,20 ± 12,59	$p_{2-1} > 0,05$
Sau 45 ngày (b)	489,80 ± 15,80	486,80 ± 18,63	489,80 ± 7,73	$p_{3-2} > 0,05$ $p_{3-1} > 0,05$

Sau 90 ngày (c)	489,40 ± 21,54	479,90 ± 9,91	486,50 ± 16,30	
p	$p_{b-a} > 0,05; p_{c-b} > 0,05; p_{c-a} > 0,05$			-
Biên độ (mV, $\bar{x} \pm SD$)				
Trước thí nghiệm (a)	0,319 ± 0,044	0,318 ± 0,025	0,316 ± 0,031	$p_{2-1} > 0,05$ $p_{3-2} > 0,05$ $p_{3-1} > 0,05$
Sau 45 ngày (b)	0,318 ± 0,034	0,316 ± 0,038	0,319 ± 0,022	
Sau 90 ngày (c)	0,316 ± 0,042	0,318 ± 0,034	0,318 ± 0,039	
p	$p_{b-a} > 0,05; p_{c-b} > 0,05; p_{c-a} > 0,05$			-
Sóng bất thường	Không	Không	Không	-

Nhận xét:

- So sánh các lô với nhau trong cùng một thời điểm, tần số và biên độ của điện tim chuột ở đạo trình DII không có sự thay đổi có ý nghĩa thống kê ($p > 0,05$).

- So sánh trong từng lô giữa các thời điểm thí nghiệm, tần số và biên độ của điện tim chuột ở đạo trình DII không có sự thay đổi ý nghĩa thống kê ($p > 0,05$).

- Không có sóng bất thường trên điện tim ở đạo trình DII của các lô chuột tại các thời điểm nghiên cứu.

3.3.5 Sự thay đổi về mô bệnh học ở gan, lách và thận của chuột**3.3.5.1. Đại thể**

Quan sát đại thể bằng mắt thường và dưới kính lúp có độ phóng đại 25 lần thấy: màu sắc, hình thái của gan, lách và thận ở hai lô dùng Cao đặc KNC không khác so với chứng. Hình ảnh đại thể gan, lách, thận của các chuột đại diện cho các lô chuột nghiên cứu được trình bày ở các ảnh 1, 2 và 3.



Hình 3.1: Hình ảnh đại thể gan, lách, thận chuột lô chứng (chuột 06, lô chứng)



Hình 3.2: Hình ảnh đại thể gan, lách, thận chuột lô trị 1 (chuột 12, lô trị 1)



Hình 3.3: Hình ảnh đại thể gan, lách, thận chuột lô trị 2 (chuột 25, lô trị 2)

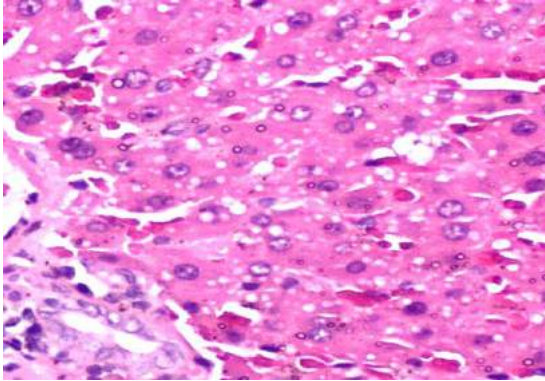
Nhận xét ảnh: Hình ảnh đại thể các tạng gan, lách, thận của chuột ở các lô trị 1 (ảnh 2), lô trị 2 (ảnh 3), là các lô cho uống cao đặc KNC, có màu nâu đỏ thẫm đồng đều, bề mặt nhẵn, không có u cục hoặc xuất huyết, có đàn hồi khi ấn xuống, không khác biệt so với hình ảnh gan, lách, thận của chuột ở lô chứng (ảnh 1).

3.3.5.2. Vi thể

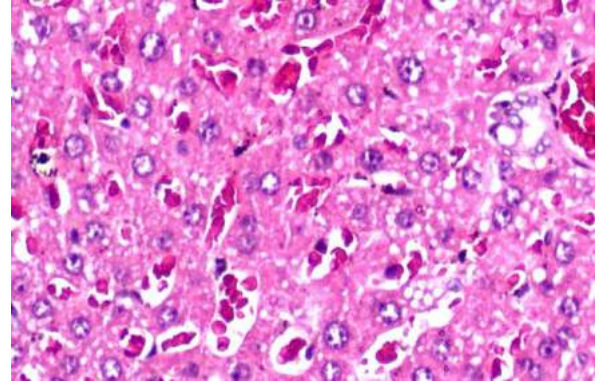
Các tiêu bản mô bệnh học đọc tại khoa hình thái giải phẫu bệnh, bệnh viện 103. Kết quả nghiên cứu về mô bệnh học gan, lách, thận chuột cho thấy Cao đặc KNC dùng đường uống với liều 0,94g cao đặc/kg/ngày và liều 4,70g

cao đặc/kg/ngày liên tục trong 90 ngày, không gây tổn thương trên gan, thận, lách của chuột.

Hình ảnh mô bệnh học gan chuột đại diện cho các lô chuột nghiên cứu

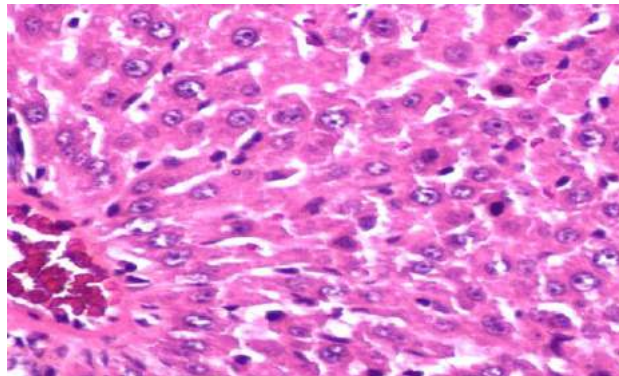


Hình 3.4: Hình ảnh vi thể gan chuột lô chứng (chuột 9, lô chứng). HE, x



Hình 3.5: Hình ảnh vi thể gan chuột lô chứng (chuột 9, lô chứng). HE, x 400

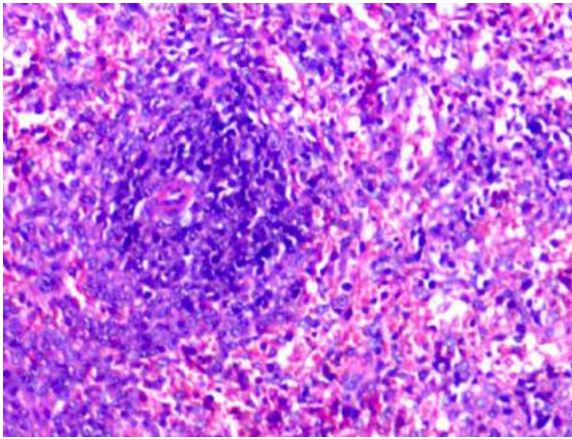
400



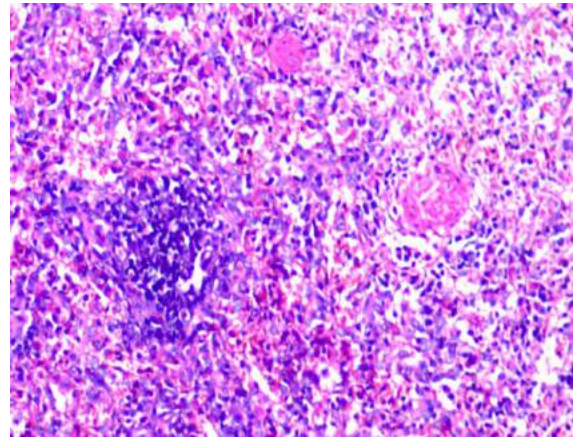
Ảnh 3.6: Hình ảnh vi thể gan chuột lô trị 2 (chuột 27, lô trị 2). HE, x 400

Nhận xét ảnh: Hình ảnh vi thể gan dưới kính hiển vi với độ khuếch đại 400 lần của chuột ở lô trị 1 (ảnh 5) và lô trị 2 (ảnh 6), là các lô cho uống cao đặc KNC, không khác biệt so với hình ảnh vi thể gan chuột ở lô chứng (ảnh 4). Trên hình ảnh không thấy ở xuất huyết hoặc ổ hoại tử, thoái hóa tế bào gan.

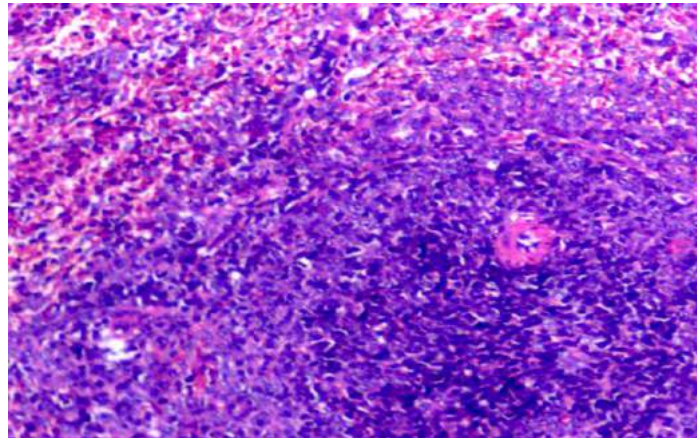
Hình ảnh mô bệnh học lách chuột đại diện cho các lô chuột nghiên cứu



Ảnh 3.7: Hình ảnh vi thể lách chuột lô chứng (chuột 2, lô chứng). HE, x 400



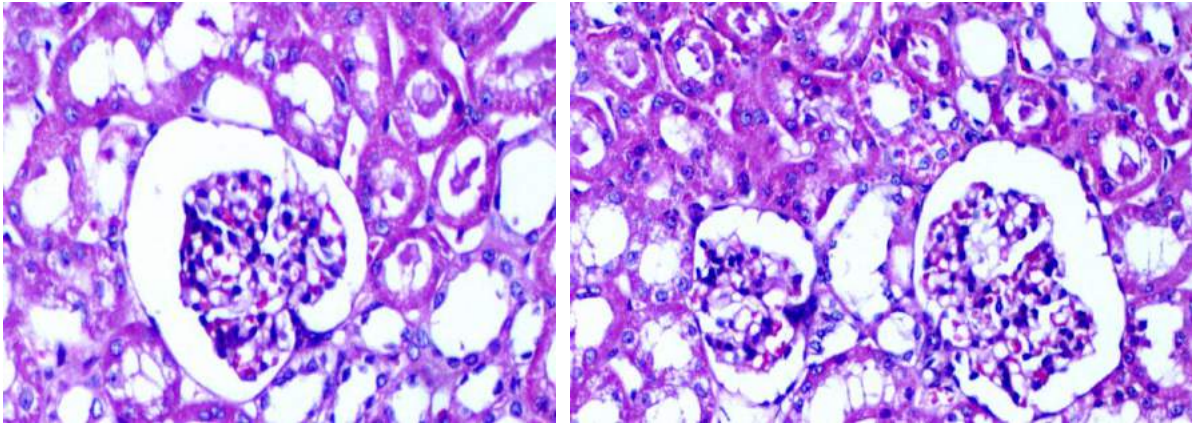
Ảnh 3.8: Hình ảnh vi thể lách chuột lô trị 1 (chuột 11, lô trị 1). HE, x 400



Ảnh 3.9: Hình ảnh vi thể lách chuột lô trị 2

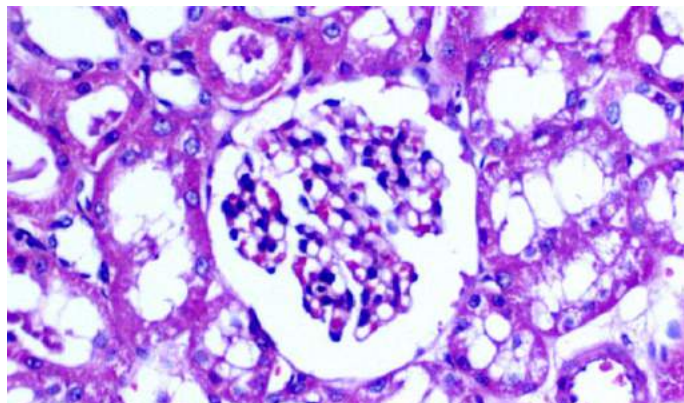
Nhận xét ảnh: Hình ảnh vi thể lách dưới kính hiển vi với độ khuếch đại 400 lần của chuột ở lô trị 1 (ảnh 8) và lô trị 2 (ảnh 9), là các lô cho uống cao đặc KNC, không khác biệt so với hình ảnh vi thể lách chuột ở lô chứng (ảnh 7). Trên hình ảnh thấy vùng tủy trắng bắt màu xanh thẫm, tập trung các nang lympho lớn. Vùng tủy đỏ có màu xanh đỏ, với các xoang nang chứa nhiều hồng cầu và một số đại thực bào. Không thấy ở xuất huyết hoặc hoại tử.

Hình ảnh mô bệnh học thận chuột đại diện cho các lô chuột nghiên cứu



Ảnh 3.10: Hình ảnh vi thể thận chuột lô chứng (chuột 9, lô chứng). HE, x 400

Ảnh 3.11: Hình ảnh vi thể thận chuột lô trị 1 (chuột 18, lô trị 1). HE, x 400



Ảnh 3.12: Hình ảnh vi thể thận chuột lô trị 2 (chuột 23, lô trị 2). HE, x 400

Nhận xét ảnh: Hình ảnh vi thể thận dưới kính hiển vi với độ khuếch đại 400 lần của chuột ở lô trị 1 (ảnh 11) và lô trị 2 (ảnh 12), là các lô cho uống cao đặc KNC, không khác biệt so với hình ảnh vi thể thận chuột ở lô chứng (ảnh 10). Cấu trúc các vùng chức năng thận bình thường.

Chương IV

BÀN LUẬN

4.1. Về độc tính cấp

Liều dự kiến có tác dụng ở chuột nhất là 2,928g cao đặc/kg/ngày. Thực tế tiến hành cho các lô chuột dùng liều 12g, 18g, 24g, 30g, 36g, 42g/kg thể trọng chuột, lần lượt gấp 4, gấp 6, gấp 8, gấp 10, gấp 12 lần liều dự kiến. Chuột đã được cho uống tới mức liều cao nhất là 42,0g/kg/ngày, gấp gần 13 lần liều dự kiến có tác dụng mà các chuột vẫn bình thường, không có chuột nào chết. Theo phân loại độc tính của GHS (Globally Harmonised System for Classification of Chemicals) những chất có giá trị độc tính cấp LD50 trong khoảng > 5000 mg/kg thể trọng, được coi là chất gần như không độc [36]. Chứng tỏ cao đặc KNC có tính an toàn cao trong thử nghiệm độc tính cấp theo đường uống.

Trên lâm sàng, liều có tác dụng dược lý thường vào khoảng 1/10 của LD50. Do đó phải xác định LD50 trước khi nghiên cứu dược lý. Liều LD50 và liều có tác dụng dược lý trên động vật thí nghiệm là một trong những cơ sở để suy ra liều dùng trong điều trị ở người dựa vào một số phương pháp tính ngoại suy. Biết LD50 mới xác định được chỉ số điều trị, một thông số rất quan trọng để quyết định xem có nên đưa thuốc vào dùng trên người hay không [22]. So sánh với các đề tài nghiên cứu độc tính cấp khác về thuốc, độc tính LD50 cũng mang lại kết quả không tìm được LD50. Ví dụ: “Nghiên cứu độc tính cấp và đánh giá hiệu quả điều trị đột quy do nhồi máu não của viên An cung ngư hoàng hoàn” của nhóm tác giả Nguyễn Minh Hà, Nguyễn Công Thực, Nguyễn Minh Hiện, Hoàng Thị Bình Minh, cho chuột uống đến liều cao nhất có thể (nồng độ và thể tích tối đa cho phép) là 7,5gr/kg trọng lượng nhưng chưa thấy biểu hiện ngộ độc và chuột chết trong vòng 72 giờ, vì vậy chưa xác định được LD50 trên chuột nhất trắng theo đường uống.

Có rất nhiều thuốc cho uống với liều rất cao mà con vật không chết. Lấy một ví dụ về xác định độc tính cấp của một dược liệu nào đó. Chúng ta biết

rằng, một con chuột nhất chỉ có thể cho uống với thể tích tối đa một lần là 1ml. Dược liệu sắc và cô lên, cũng chỉ có thể cô đến một mức độ nhất định, nếu cô quá sẽ thành cao đặc và không thể cho uống được. Ví dụ một dược liệu mà mức tối đa là từ 10g dược liệu được 1 ml cao. Cho một con chuột nhất nặng 20g uống 1 ml tức là đã dùng liều 10g dược liệu cho 20g hoặc 500g cho 1 kg cân nặng chuột [22]. Nếu ở liều này mà chuột vẫn không chết thì không thể xác định được LD50 mà chỉ có thể kết luận là:

“Đã cho uống đến liều 500 g/kg cân nặng chuột tính theo dược liệu khô, chuột nhất trắng vẫn không chết”.

Trong trường hợp khác, một thuốc qua thăm dò nghiên cứu thấy một người lớn cân nặng 50 kg, uống 30 mg một ngày là có tác dụng chữa bệnh. Như vậy, liều dùng có tác dụng ở người là 0,6 mg/kg.

Cho chuột nhất trắng uống một liều gấp 500 lần liều đó, tức là 300 mg/kg cân nặng, chuột vẫn không chết. Có 2 cách xử trí: Hoặc tiếp tục dùng liều cao hơn đến khi có chuột chết, qua đó sẽ xác định được LD50. Hoặc cho rằng đã dùng một liều ở chuột nhất trắng gấp 500 lần liều dùng ở người tính cho 1 kg cân nặng, chuột vẫn không chết, chứng tỏ thuốc có độ an toàn cao, nên không muốn thử tiếp với liều cao hơn để xác định LD50 và kết luận là “Đã cho chuột nhất trắng uống liều gấp 500 lần (300 mg/kg) liều dùng có tác dụng ở người, chuột vẫn không chết, chứng tỏ thuốc có độ an toàn cao.

4.2. Về độc tính bán trường diễn

4.2.1. Ảnh hưởng của dung dịch KNC đến tình trạng chung và sự thay đổi cân nặng của chuột cống :

- So sánh giữa các thời điểm sau so với trước thấy thể trọng chuột của cả ba lô nghiên cứu đều tăng và thể trọng của chuột ở hai lô uống Cao đặc KNC so với thể trọng của chuột ở lô chứng sinh lý tại tất cả các thời điểm đo không thấy có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê

$(p > 0,05)$.

- Như vậy Cao đặc KNC với các mức liều và thời gian sử dụng trong nghiên cứu chưa thấy gây ra các thay đổi trên sự phát triển thể trọng của chuột.

Bàn thêm về cách chọn động vật thí nghiệm. Khi đánh giá độc tính bán trường diễn chúng ta thường dùng chuột cống trắng vì chuột cống trắng ít khi xảy ra những trường hợp bất thường hơn chuột nhắt trắng. Các động vật khác cũng cũng có thể được dùng, nhưng giá thành đắt và vì con vật to nên tốn hóa chất thí nghiệm. Các nghiên cứu cho thấy, chuột cái nhạy cảm hơn với hóa chất nên dùng sẽ cho kết quả tốt hơn. Cần dùng các con vật trưởng thành, khỏe mạnh, không dùng chuột già, chuột cái không được mang thai hoặc đang nuôi con bú. Khối lượng các con vật nên xấp xỉ nhau, chênh lệch không nên quá 20% [22].

4.2.2. Ảnh hưởng của dung dịch KNC đến chức năng tạo máu:

- So sánh các lô với nhau trong cùng một thời điểm, và trong từng lô giữa các thời điểm thí nghiệm, số lượng hồng cầu và hàm lượng huyết sắc tố, hematocrit, số lượng bạch cầu, số lượng tiểu cầu trong máu chuột, thay đổi không có ý nghĩa thống kê ($p > 0,05$).

Như vậy Cao đặc KNC với các mức liều và thời gian sử dụng trong nghiên cứu chưa thấy gây ra các thay đổi trên các chỉ tiêu về chức năng tạo máu của chuột.

- Cụ thể :

+ Hồng cầu: là những tế bào không có nhân, sau khi nhuộm Giemsa rồi nhìn qua kính hiển vi sẽ thấy hồng cầu hình tròn, màu hồng, ở giữa hơi nhạt. Số lượng hồng cầu được biểu thị bằng triệu/mm³ hoặc có thể ghi là 10⁶/mm³ máu. Hiện nay, thường được biểu thị theo đơn vị quốc tế mới là T/L. T ở đây là tetra bằng 10¹², còn L là lít. Lít ở đây được ký hiệu bằng L (chữ in hoa), vì nếu viết chữ l thường dễ lẫn với số 1 hoặc ký hiệu khác. Số lượng hồng cầu được biểu thị theo đơn vị tính bằng T/L cũng tương đương với đơn vị tính

bằng triệu/mm³ hoặc 10⁶ / mm³, nhưng rõ ràng là đơn giản hơn. Số lượng hồng cầu ở chuột cống trắng, tùy theo các lô thí nghiệm, hồng cầu có thể dao động từ 8 đến 10 T/L.

+ Hemoglobin: định lượng để biết được khả năng vận chuyển oxy của hồng cầu. Đơn vị tính là g/L. Ở chuột cống trắng, tùy theo các lần thí nghiệm, hemoglobin dao động từ 125 – 145 g/L.

+ Hematocrit: phản ánh được một phần tình trạng của hồng cầu. Nếu ly tâm máu đã chống đông, ta sẽ được 2 phần, phần trên lỏng là huyết tương, phần dưới đặc là các huyết cầu. Ở chuột cống trắng, tùy theo các lần thí nghiệm, hematocrit dao động 37 – 43%.

+ Thể tích trung bình hồng cầu (MCV) trong một đơn vị thể tích máu đơn vị là femto lít. Ở chuột cống trắng, tùy theo các lần thí nghiệm, MCV dao động 48-52 fl

+ Bạch cầu: có nhiều loại. Một số thuốc có thể ảnh hưởng đến số lượng và chất lượng của bạch cầu. Bạch cầu luôn thay đổi hình dạng, nhưng nói chung là những tế bào có nhân, hơi tròn, đường kính 12-14 μ m. Xem tươi trên kính hiển vi, bạch cầu không cso màu sắc. Nhuộm sẽ thấy rõ nhân bắt nhiều màu khác nhau. Ở chuột cống trắng, tùy theo các lần thí nghiệm, bạch cầu dao động 8-12 G/L.

+ Tiểu cầu: nhiệm vụ tham gia vào cơ chế đông máu. Thuốc làm tăng hoặc giảm tiểu cầu có thể có ảnh hưởng đến quá trình đông máu. Ở chuột cống trắng, tùy theo các lần thí nghiệm, tiểu cầu dao động 500-700 G/L

4.2.3. Ảnh hưởng của dung dịch KNC đến chức năng gan:

- So sánh các lô với nhau trong cùng một thời điểm, và so sánh trong từng lô giữa các thời điểm thí nghiệm về các chỉ số: hoạt độ enzym AST và ALT, albumin và cholesterol toàn phần, bilirubin toàn phần trong máu chuột thay đổi không có ý nghĩa thống kê ($p > 0,05$).

Như vậy Cao đặc KNC với các mức liều và thời gian sử dụng trong nghiên cứu không gây rối loạn chức năng gan trên chuột nghiên cứu.

Cụ thể:

+ AST, ALT: là 2 transaminase giúp liên hệ chuyển hóa giữa protein và glucid. AST – aspartat – amino – transferase, trước đây gọi là GOT (glutamico – oxaloacetic transaminase), có nhiều ở tim, gan, rồi đến cơ, thận, phổi, tham gia xúc tác phản ứng acid glutamic tác dụng với acid oxaloacetic.

4.2.4. Ảnh hưởng của dung dịch KNC đến chức năng thận

- So sánh các lô với nhau trong cùng một thời điểm và so sánh trong từng lô giữa các thời điểm thí nghiệm, nồng độ creatinin máu chuột thay đổi không có ý nghĩa thống kê ($p > 0,05$).

Như vậy Cao đặc KNC với các mức liều và thời gian sử dụng trong nghiên cứu không gây rối loạn chức năng thận trên chuột nghiên cứu

4.2.5. Ảnh hưởng của cao đặc KNC đến điện tim chuột

Không có sóng bất thường trên điện tim ở đạo trình DII của các lô chuột tại các thời điểm nghiên cứu.

Như vậy Cao đặc KNC với các mức liều và thời gian sử dụng trong nghiên cứu chưa thấy gây ra các thay đổi trên điện tim chuột ở đạo trình DII.

4.2.6. Ảnh hưởng của dung dịch KNC đến kết quả mô bệnh học

- Quan sát đại thể bằng mắt thường và dưới kính lúp có độ phóng đại 25 lần thấy: màu sắc, hình thái của gan, lách và thận ở hai lô dùng Cao đặc KNC không khác so với chúng.

- Các tiêu bản mô bệnh học đọc tại khoa hình thái giải phẫu bệnh, bệnh viện 103. Kết quả nghiên cứu về mô bệnh học gan, lách, thận chuột cho thấy Cao đặc KNC dùng đường uống với liều 0,94g cao đặc/kg/ngày và liều 4,70g cao đặc/kg/ngày liên tục trong 90 ngày, không gây tổn thương trên gan, thận, lách của chuột.

Chương V

KẾT LUẬN

5.1. Tiêu chuẩn cơ sở cao đặc KNC

- Từ 100 thang thuốc KNC với các nguyên liệu khô, qua quy trình bào chế thu được cao đặc KNC với công thức điều chế cho 100g như sau

Độc hoạt	Tám mươi hai phẩy năm gam	82,5g
Phòng phong	Tám mươi hai phẩy năm gam	82,5g
Tần giao	Tám mươi hai phẩy năm gam	82,5g
Tang ký sinh	Tám mươi hai phẩy năm gam	82,5g
Ngưu tất	Tám mươi hai phẩy năm gam	82,5g
Đẳng sâm	Tám mươi hai phẩy năm gam	82,5g
Bạch thược	Bốn mươi một phẩy hai lăm gam	41,25g
Thục địa	Bốn mươi một phẩy hai lăm gam	41,25g
Khuong hoạt	Bốn mươi một phẩy hai lăm gam	41,25g
Tế tân	Bốn mươi một phẩy hai lăm gam	41,25g
Đương quy	Bốn mươi một phẩy hai lăm gam	41,25g
Đỗ trọng	Bốn mươi một phẩy hai lăm gam	41,25g
Xuyên khung	Bốn mươi một phẩy hai lăm gam	41,25g
Cam thảo	Mười sáu phẩy hai lăm gam	16,25g
Nước tinh khiết	Vừa đủ theo quy trình	

- Cao đặc KNC được kiểm tra về chất lượng thông qua các tiêu chí sau:

+ Tính chất, cảm quan : Chế phẩm dạng khối mềm, màu nâu, có mùi dược liệu đặc trưng, đồng nhất.

+ Mất khối lượng do làm khô : Tiến hành theo phụ lục 12.16 (xác định mất khối lượng do làm khô) - ĐDVN V: mất khối lượng do làm khô < 20%.

+ Định tính : Tiến hành định tính một số vị thuốc: Bạch thược, Độc hoạt, Thục địa đạt yêu cầu theo quy định: Trên sắc ký đồ của dung dịch thử có các vết phát huỳnh quang cùng màu sắc và giá trị R_f với các vết có trong sắc ký đồ của dung dịch đối chiếu.

+ Giới hạn nhiễm khuẩn : Không nhiễm khuẩn: Tổng số vi sinh vật hiếu khí không quá 10^4 CFU/g; tổng số nấm không quá 10^2 CFU/g; Không có *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* trong 1 g.

5.3.Nghiên cứu độc tính cấp

Chưa tìm thấy LD_{50} của Cao đặc KNC theo đường uống trên chuột nhắt trắng với mức liều cao nhất có thể cho chuột uống là 42g cao đặc/kg thể trọng.

5.4.Nghiên cứu độc tính bán trường diễn

Trên các lô chuột dùng Cao đặc KNC liều 1,708g cao đặc/kg/ngày, và liều 8,54g cao đặc/kg/ngày, trong 90 ngày liên tục, cho thấy:

- Chuột khỏe mạnh, tăng trọng tốt, đều.

- Chưa thấy ảnh hưởng các sóng điện tim ở đạo trình DII của chuột ($p > 0,05$).

- Không làm thay đổi các chỉ số huyết học (hồng cầu, huyết sắc tố, hematocrit, thể tích trung bình hồng cầu, bạch cầu, tiểu cầu).

- Không làm thay đổi các chỉ tiêu sinh hóa máu đánh giá chức năng gan, thận (hoạt độ các enzym AST, ALT, Albumin huyết tương, Cholesterol toàn phần, Bilirubin toàn phần, Creatinin).

- Không gây tổn thương mô bệnh học gan, lách, thận.

Như vậy Cao đặc KNC an toàn ở các mức liều và thời gian đã dùng.

KIẾN NGHỊ

- Tiếp tục nghiên cứu tác dụng của bài thuốc KNC trên thực nghiệm, trên lâm sàng.
- Phát triển bài thuốc sang các dạng chế phẩm khác như: viên nang, siro.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

Tài liệu tiếng Việt

1. Nguyễn Xuân Hương (2008), “Bào chế đông dược”. *Các phương pháp bào chế đông dược*, NXB Y học.

2. Bệnh viện y học cổ truyền quân đội (2007), “Tổng quan và kỹ thuật chung bào chế cao thuốc”. *Phương pháp bào chế một số bài thuốc đông y và nấu cao đơn giản*, NXB Quân đội nhân dân.

3. Trường đại học Y Hà Nội – Khoa Y học cổ truyền (2005), “Đại cương về bào chế đông dược”, *Bào chế đông dược*, NXB Y học.

4. Đỗ Tất Lợi (2011), *Những cây thuốc và vị thuốc Việt Nam*, NXB Thời đại.

5. Trần Văn Thanh (2002), “Nghiên cứu chiết xuất Ajmalicin từ rễ dừa cạn (*Catharanthus rous* G.Don) và bào chế viên nén Ajmalicin”, Luận án tiến sĩ dược học, trường Đại học Dược Hà Nội.

6. Nguyễn Thị Bích Thủy (2014), “Khảo sát sự đáp ứng của sản xuất so với thực tế sử dụng thuốc đông dược tại bệnh viện YHCTTW năm 2014”, Luận văn dược sĩ chuyên khoa cấp I, trường Đại học Dược Hà Nội.

7. Phạm Thị Thúy Hà (2006), “Khảo sát chính sách sản phẩm và chiến lược kinh doanh nhóm thuốc đông dược”, Khóa luận tốt nghiệp dược sĩ khóa 2001 - 2006, trường Đại học Dược Hà Nội.

8. Hoàng Thị Hảo (2017), “Nghiên cứu điều chế cao đặc ngũ vị tiêu độc và khảo sát một số chỉ tiêu chất lượng”, Khóa luận tốt nghiệp dược sĩ, trường Đại học Dược Hà Nội.

9. Nguyễn Thị Thu Hiền (2015), “Khảo sát sự đáp ứng của bào chế so với

sử dụng thuốc đông dược tại bệnh viện YHCT Hà Tĩnh năm 2015”, Luận văn dược sĩ chuyên khoa cấp I, trường Đại học Dược Hà Nội.

10. **Đỗ Thùy Linh** (2014), “Nghiên cứu điều chế cao đặc Testin và ứng dụng vào bào chế viên nang cứng”, Khóa luận tốt nghiệp dược sĩ, trường Đại học Dược Hà Nội.
11. **Nguyễn Xuân Thành** (2015), “Đánh giá quy trình sản xuất cao hy thiêm làm nguyên liệu sản xuất thuốc hy đan”, Luận văn dược sĩ chuyên khoa cấp I, trường Đại học Dược Hà Nội.
12. **Nguyễn Nhược Kim** (2009), *Phương tế học*, NXB Y học.
13. **Trường Đại học Y Hà Nội** (2011), *Bài giảng y học cổ truyền tập 2*, NXB Y học.
14. **Nguyễn Nhược Kim, Hoàng Minh Chung** (2009), *Dược học cổ truyền*, NXB Y học.
15. **Bộ Y tế** (2017), *Dược điển Việt Nam V – lần xuất bản thứ năm*, NXB Y học.
16. **Nguyễn Phương Dung** (2016), *Dược học cổ truyền*, NXB Đại học sư phạm TP. Hồ Chí Minh.
17. **Từ Minh Koóng** (2009), *Kỹ thuật sản xuất dược phẩm, tập I*, NXB Y học.
18. **Viện dược liệu** (2004), *Cây thuốc và động vật làm thuốc ở Việt Nam*, NXB Khoa học và kỹ thuật, tập I.
19. **Nguyễn Viết Thân** (2003), *Kiểm nghiệm dược liệu bằng phương pháp hiển vi, tập I*, NXB Khoa học và kỹ thuật.
20. **Bộ Y tế** (2014), Công văn 19098/QLD – ĐK về việc lưu hành thuốc từ dược liệu có phối hợp mới thành phần dược liệu.
21. **Bộ y tế** (2018), “*Quy định về thử thuốc trên lâm sàng*”, Thông tư số 29/2018/TT – BYT ngày 29 tháng 10 năm 2018.
22. **Đỗ Trung Đàm** (2014), *Phương pháp xác định độc tính của thuốc*, Nhà xuất bản y học.
23. **Đỗ Trung Đàm** (2006), “Phương pháp ngoại suy liều có hiệu quả tương đương giữa người và động vật thí nghiệm”, *Phương pháp nghiên cứu*

tác dụng dược lý của thuốc từ dược thảo, Nhà xuất bản khoa học và kỹ thuật, tr 377 – 392.

24. Chu Cửu Như (2013), *Xét nghiệm sử dụng trong lâm sàng*, Nhà xuất bản Y học.

25. Vũ Đình Vinh (2001), *Hướng dẫn sử dụng các xét nghiệm sinh hóa*, NXB Y học, tr 115 – 287.

26. Phạm Thị Minh Đức (2007), *Sinh lý học*, NXB Y học, Hà Nội.

27. Phạm Tử Dương, Nguyễn Thế Khanh (2001), *Xét nghiệm sử dụng trong lâm sàng*, NXB Y học, Hà Nội.

28. Bộ Y tế (1996), *Quy chế đánh giá tính an toàn và hiệu lực thuốc cổ truyền*, Hà Nội.

29. Lê Quang Hồng (2007), “Bệnh thoái hóa khớp”, *Hỏi đáp các bệnh về xương khớp*, NXB Hà Nội, tr 7 – 66.

30. Nguyễn Nghiêm Luật (2012), *Hóa sinh*, NXB Y học, Hà Nội.

31. Nguyễn Ngọc Lanh (2007), “Sinh lý bệnh quá trình lão hóa”, *Sinh lý bệnh và miễn dịch phần sinh lý bệnh*, NXB Y học.

32. Nguyễn Văn Phan (2015), “Nghiên cứu độc tính cấp, khả năng gây kích ứng của dung dịch Dr ECA trên thực nghiệm”, Luận văn tốt nghiệp Bác sỹ y khoa, trường Đại học Y Hà Nội.

33. Bộ y tế (2012), “Thông tư 03/2012/TT-BYT”, *Hướng dẫn về thử thuốc trên lâm sàng, Chương III, Điều 9*.

34. Dương Thị Ly Hương (2012), “Nghiên cứu tác dụng lên chức năng sinh sản và độc tính của rễ bá bệnh (*Eurycoma Longifolia J.*) thu hái tại Việt Nam trên động vật thực nghiệm”, Luận án tiến sỹ y học , trường Đại học Y Hà Nội.

35. Nguyễn Thị Tuyết Minh (2018), “Nghiên cứu độc tính và tác dụng hỗ trợ điều trị bệnh Gút mạn của cốm tan Tứ diệu tán”, Luận án tiến sỹ y học , trường Đại học Y Hà Nội.

36. Nguyễn Mạnh Cường, Phạm Ngọc Khanh, Trần Thu Hương, Nguyễn Ngọc Hiếu, Hồ Việt Đức, Vũ Thị Hà, Nguyễn Văn Tài, Nguyễn Thị Hồng Vinh (2013), “Nghiên cứu độc tính cấp và bán trường diễn của Indirubin-3'- Oxime và viên nang Vindoxim hỗ trợ điều trị bệnh ung thư”, Tạp chí Khoa học và Công nghệ 51 (3) (2013) 343-352.

37. Nguyễn Minh Hà, Nguyễn Công Thực, Nguyễn Minh Hiện, Hoàng Thị Bình Minh (2018), “Nghiên cứu độc tính cấp và đánh giá hiệu quả điều trị đột quy do nhồi máu não của viên An cung ngưi hoàng hoàn”, Viện Y học cổ truyền quân đội.

Tài liệu tiếng Anh

38. ARC (2000), “**Recommendation for the medical management of osteoarthritis of the hip and knee**”, American College of Rheumatology Subcommittee on Osteoarthritis Guidelines. Arthritis Rheum, 43: 1905 – 1915
39. Puett DW, Griffin MR: **Publish trial of nonmedicinal and noninvasive therapies for hip and knee osteoarthritis**. Ann intern Med 121: 133 -140, 1994.
40. Almant R.D, Alurphyw, Asche (2006). “Development of Criteria for the classification and reporting.
41. Arrich J, Piribauer F, Mad P, et al (2005), “**Intra – articular hyaluronic patients with osteoarthritis**”, Ann Rheu Dis; 65 suppl 11: 223 – 225.
42. Lequesne M (2004), “Guidelines for testing slow acting drugs in osteoarthritis”, J Rheumatol, 21.
43. Huskisson E.C (2004), Measurement of pain luncy.
44. OECD (2012), Drug Safety valuatuon I: Acute and subchronic toxicity assesement; USA Academy Press.
45. Turner R.A (2011), “Screening method in pharmacology”, Volume II 75 – 85.
46. WHO (2003), Resarch Guidelines For Evaluating the Safety and Efficacy of Herbal Medicines, ROWP, Manila, Philipines.
47. WHO (2000), General Guidelines for Methodologies on Research and Evaluation of Traditional Medicin, EDM/TRM, Geneva, Switzerland.

PHỤ LỤC

- 1. Phụ lục 1: Một số hình ảnh quá trình nghiên cứu**
- 2. Phụ lục 2: Kết quả thực nghiệm**
- 3. Phụ lục 3: Sơ đồ quy trình bào chế cao đặc KNC**

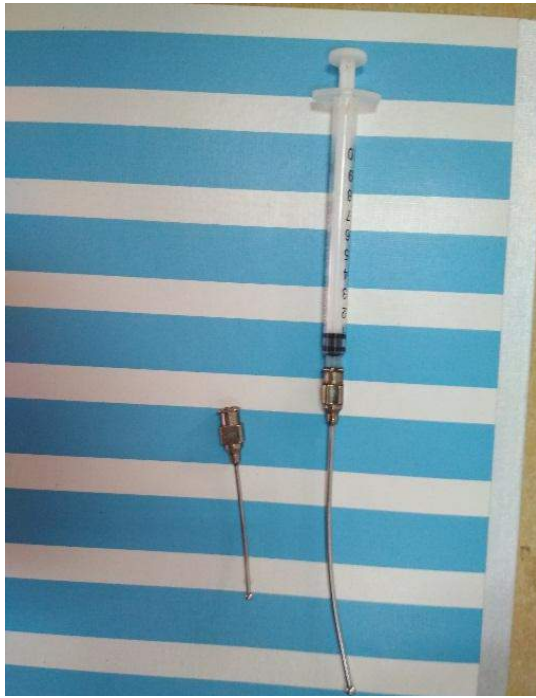
Phụ lục 1: Một số hình ảnh quá trình nghiên cứu



Lọ cao đặc KNC



Cho chuột uống dung dịch KNC bằng kim công đầu tù



Kim cong đầu tù



*Cho chuột uống nước qua
máng uống tự động*



*Chuột nhắt trắng Swiss thuần chủng
trưởng thành*



*Chuột cống trắng trưởng
thành dòng Wistar*

Phụ lục 2: Kết quả xây dựng tiêu chuẩn cơ sở cao đặc KNC

HỌC VIỆN QUÂN Y

KHOA NGHIÊN CỨU THỰC NGHIỆM

**KẾT QUẢ XÂY DỰNG TIÊU CHUẨN CƠ SỞ VÀ NGHIÊN CỨU
ĐỘC TÍNH BÀI THUỐC KNC TRÊN THỰC NGHIỆM**

**** Bản tiêu chuẩn cơ sở được xây dựng như sau**

• Công thức điều chế cho 100 g cao đặc KNC:

Độc hoạt	Tám mươi hai phẩy năm gam	82,5g
Phòng phong	Tám mươi hai phẩy năm gam	82,5g
Tần giao	Tám mươi hai phẩy năm gam	82,5g
Tang ký sinh	Tám mươi hai phẩy năm gam	82,5g
Ngưu tất	Tám mươi hai phẩy năm gam	82,5g
Đẳng sâm	Tám mươi hai phẩy năm gam	82,5g
Bạch thược	Bốn mươi một phẩy hai lăm gam	41,25g
Thục địa	Bốn mươi một phẩy hai lăm gam	41,25g
Khuông hoạt	Bốn mươi một phẩy hai lăm gam	41,25g
Tế tân	Bốn mươi một phẩy hai lăm gam	41,25g
Đương quy	Bốn mươi một phẩy hai lăm gam	41,25g
Đỗ trọng	Bốn mươi một phẩy hai lăm gam	41,25g
Xuyên khung	Bốn mươi một phẩy hai lăm gam	41,25g
Cam thảo	Mười sáu phẩy hai lăm gam	16,25g
Nước tinh khiết	Vừa đủ theo quy trình	

*** Yêu cầu chất lượng:**

- Tính chất, cảm quan : Chế phẩm dạng khối mềm, màu nâu, có mùi dược liệu đặc trưng, đồng nhất.

- Mất khối lượng do làm khô : Không quá 20%.
- Định tính : Phải đạt theo quy định.
- Giới hạn nhiễm khuẩn : Tổng số vi sinh vật hiếu khí không quá CFU/g 10^4 ; tổng số nấm không quá CFU/g 10^2 ; không quá 10^2 CFU vi khuẩn gram âm dung nạp mật trong 1 g. Không có *Salmonella* trong 10 g. Không có *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* trong 1 g.

* Phương pháp thử

- Tính chất, cảm quan: Bằng cảm quan, cao đặc phải đạt theo yêu cầu đã nêu.
- Mất khối lượng do làm khô: Tiến hành theo phụ lục 12.13 (xác định mất khối lượng do làm khô) - DĐVN V.

Khoảng 1,0 g chế phẩm, sấy ở 80°C dưới áp suất giảm.

* Định tính

Định tính bạch thực: phương pháp SKLM

- **Dung dịch thử:** Lấy khoảng 1,5 g chế phẩm, thêm 20 ml ethanol 96%. Khuấy hoặc siêu âm để hòa tan. Lọc, bốc hơi dịch lọc tới khô trên cách thủy. Hòa tan cản trở lại bằng 2 ml ethanol 96%.

- **Dung dịch đối chiếu:** Cân chính xác khoảng 0,5 g bột bạch thực chuẩn vào bình nón nút mài 50 ml, thêm 20 ml ethanol 96%, siêu âm 20 phút. Lọc, bốc hơi dịch lọc tới khô trên cách thủy. Hòa tan cản trở lại bằng 2 ml ethanol 96%.

- **Dung môi khai triển:** Hỗn hợp của cloroform- ethyl acetat- methanol- acid formic (40: 5: 10: 0,2, tt/tt).

- **Bản mỏng:** Silica gel G, hoạt hóa ở 105°C trong 30 phút.

- **Tiến hành:** Chấm riêng biệt lên bản mỏng 10 μl mỗi dung dịch đối chiếu và thử. Triển khai sắc ký đến khi dung môi đi được lớn hơn 2/3 bản mỏng. Lấy bản mỏng ra, để khô ngoài không khí.

- **Hiện màu:** Phun dung dịch vanilin 5% trong acid sulfuric (TT). Sấy ở 105°C tới khi hiện rõ vết.

- **Yêu cầu:** Trên sắc ký đồ của dung dịch thử phải có các vết có cùng màu sắc và giá trị R_f với các vết có trong sắc ký đồ của dung dịch đối chiếu.

Định tính độc hoạt: phương pháp SKLM

- **Dung dịch thử:** Lấy khoảng 2,0 g chế phẩm vào bình nón nút mài 50 ml, thêm 20 ml ether (TT), lắc siêu âm trong 30 phút. Lọc, bốc hơi dịch lọc tới khô trên cách thủy. Hòa tan cản trở lại bằng 2 ml cloroform (TT).

- **Dung dịch đối chiếu:** Lấy khoảng 2,0 g bột độc hoạt chuẩn vào bình nón nút mài 50 ml, thêm 20 ml ether (TT), ngâm qua đêm. Lọc, bốc hơi dịch lọc tới khô trên cách thủy. Hòa tan cản trở lại bằng 2 ml cloroform (TT).

- **Dung môi khai triển:** Hỗn hợp của cyclohexan- ethyl acetat- acetone (8: 2: 0,5, tt/tt).

- **Bản mỏng:** Silica gel 60 F₂₅₄, hoạt hóa ở 105⁰C trong 30 phút.

- **Tiến hành:** Chấm riêng biệt lên bản mỏng 2 μ l mỗi dung dịch đối chiếu và thử. Sau khi triển khai, lấy bản mỏng ra, để khô ngoài không khí. Quan sát dưới ánh sáng tử ngoại ở bước sóng 366 nm.

- **Yêu cầu:** Trên sắc ký đồ của dung dịch thử phải có các vết phát huỳnh quang cùng màu sắc và giá trị R_f với các vết có trong sắc ký đồ của dung dịch đối chiếu.

Định tính thực địa: phương pháp SKLM

- **Dung dịch thử:** Lấy khoảng 1,0 g chế phẩm vào bình nón nút mài 100 ml, thêm 50 ml methanol (TT). Siêu âm trong 30 phút. Lọc, bốc hơi dịch lọc tới khô trên cách thủy. Hòa tan cản trở lại bằng 5 ml nước. Lắc với n- butanol đã bão hòa nước (TT) 4 lần, mỗi lần 10 ml. Gộp dịch chiết n- butanol, cô đến cạn. Hòa tan cản trở trong 2 ml methanol (TT) được dung dịch thử.

- **Dung dịch đối chiếu:** Lấy khoảng 2 g bột thực địa chuẩn vào bình nón nút mài 100 ml, tiến hành tương tự như đối với dung dịch thử.

- **Dung môi khai triển:** Hỗn hợp của Ethyl acetat- methanol- acid formic (16: 0,5: 2, tt/tt).

- **Bản mỏng:** Silica gel GF₂₅₄, hoạt hóa ở 105⁰C trong 30 phút.

- **Tiến hành:** Chấm riêng biệt lên bản mỏng 5 μ l mỗi dung dịch đối chiếu và thử. Sau khi triển khai, lấy bản mỏng ra, để khô ngoài không khí.

- **Hiện màu:** Phun dung dịch 2- aminoethyl diphenylorinat 1% trong methanol (TT), sấy bản mỏng ở 105⁰C trong 5 phút. Quan sát bản mỏng dưới ánh sáng tử ngoại ở bước sóng 366 nm.

- **Yêu cầu:** Trên sắc ký đồ của dung dịch thử phải có các vết phát huỳnh quang cùng màu sắc và giá trị R_f với các vết có trong sắc ký đồ của dung dịch đối chiếu.

*** Giới hạn nhiễm khuẩn**

Không nhiễm khuẩn (Thử theo phụ lục 13.6 (thử giới hạn nhiễm khuẩn) – Dược điển Việt Nam V)

**** Kết quả nghiên cứu độc tính cấp**

Bảng 1. Độc tính cấp theo đường uống của cao đặc KNC trên chuột nhắt trắng.

Lô chuột	Số chuột thí nghiệm	Liều dùng (g cao đặc/kg thể trọng)	Thể tích cho uống	Số chuột sống/chết sau 72 giờ	Số chuột sống/chết sau 168 giờ
Lô 1	10	12,0	0,2 mL/10g x 3lần	10/0	10/0
Lô 2	10	18,0	0,2 mL/10g x 3lần	10/0	10/0
Lô 3	10	24,0	0,2 mL/10g x 3lần	10/0	10/0
Lô 4	10	30,0	0,2 mL/10g x 3lần	10/0	10/0
Lô 5	10	36,0	0,2 mL/10g x 3lần	10/0	10/0
Lô 6	10	42,0	0,2 mL/10g x 3lần	10/0	10/0

Bảng 2: Ảnh hưởng của cao đặc KNC đến thể trọng chuột

Thời điểm xét nghiệm	Thể trọng (g)	Lô nghiên cứu			p
		Lô chứng sinh lý (1)	Lô trị 1 (2)	Lô trị 2 (3)	
Trước thí nghiệm (a)	n	10	10	10	$p_{2-1} > 0,05$
	\bar{x}	168,10	167,50	168,50	$p_{3-2} > 0,05$
	SD	3,42	4,54	3,93	$p_{3-1} > 0,05$
Sau 45 ngày (b)	n	10	10	10	$p_{2-1} > 0,05$
	\bar{x}	198,40	197,60	199,70	$p_{3-2} > 0,05$
	SD	5,57	4,92	7,01	$p_{3-1} > 0,05$
Sau 90 ngày (c)	n	10	10	10	$p_{2-1} > 0,05$
	\bar{x}	216,00	215,50	216,80	$p_{3-2} > 0,05$
	SD	4,77	3,14	5,91	$p_{3-1} > 0,05$
p		$p_{b-a} < 0,05; p_{c-b} < 0,05; p_{c-a} < 0,05$			

Bảng 3: Ảnh hưởng của cao đặc KNC đến số lượng hồng cầu và huyết sắc tố trong máu chuột

Thời điểm XN	Lô chứng sinh lý (1)	Lô trị 1 (2)	Lô trị 2 (3)	p
Số lượng hồng cầu chuột ($\times 10^{12}$ g/l)				
Trước thí nghiệm (a)	8,25 ± 0,84	8,22 ± 0,56	8,21 ± 0,77	$p_{2-1} > 0,05$
Sau 45 ngày (b)	8,34 ± 0,78	8,38 ± 0,62	8,32 ± 1,15	$p_{3-2} > 0,05$
Sau 90 ngày (c)	8,22 ± 0,38	8,30 ± 1,11	8,26 ± 0,64	$p_{3-1} > 0,05$
p	$p_{b-a} > 0,05; p_{c-b} > 0,05; p_{c-a} > 0,05$			-
Hàm lượng huyết sắc tố trong máu chuột (g/L)				

Trước thí nghiệm (a)	137,70 ± 8,29	134,00 ± 10,27	139,10 ± 12,47	$p_{2-1} > 0,05$ $p_{3-2} > 0,05$ $p_{3-1} > 0,05$
Sau 45 ngày (b)	139,50 ± 9,65	136,80 ± 10,64	138,60 ± 11,67	
Sau 90 ngày (c)	141,80 ± 9,13	138,10 ± 15,37	140,90 ± 10,27	
p	$p_{b-a} > 0,05; p_{c-b} > 0,05; p_{c-a} > 0,05$			-

Bảng 3.4. Ảnh hưởng của cao đặc KNC đến hematocrit và thể tích trung bình hồng cầu trong máu

Thời điểm XN	Lô chứng sinh lý (1)	Lô trị 1 (2)	Lô trị 2 (3)	p
Hematocrit (%)				
Trước thí nghiệm (a)	41,10 ± 1,82	41,04 ± 2,98	41,72 ± 2,25	$p_{2-1} > 0,05$ $p_{3-2} > 0,05$ $p_{3-1} > 0,05$
Sau 45 ngày (b)	41,69 ± 2,77	41,76 ± 2,41	41,79 ± 3,14	
Sau 90 ngày (c)	41,66 ± 2,34	41,52 ± 4,04	40,56 ± 2,04	
p	$p_{b-a} > 0,05; p_{c-b} > 0,05; p_{c-a} > 0,05$			-
Thể tích trung bình hồng cầu (fl)				
Trước thí nghiệm (a)	50,60 ± 2,17	50,90 ± 2,38	50,30 ± 1,89	$p_{2-1} > 0,05$ $p_{3-2} > 0,05$ $p_{3-1} > 0,05$
Sau 45 ngày (b)	50,90 ± 2,77	51,00 ± 2,11	50,40 ± 1,96	
Sau 90 ngày (c)	50,70 ± 2,54	50,80 ± 3,22	50,50 ± 2,37	
p	$p_{b-a} > 0,05; p_{c-b} > 0,05; p_{c-a} > 0,05$			-

Bảng 5: Ảnh hưởng của cao đặc KNC đến số lượng bạch cầu và tiểu cầu trong máu

Thời điểm XN	Lô chứng sinh lý (1)	Lô trị 1 (2)	Lô trị 2 (3)	p
Số lượng bạch cầu (G/l)				
Trước thí nghiệm (a)	10,52 ± 1,03	10,26 ± 2,81	9,95 ± 2,07	$p_{2-1} > 0,05$ $p_{3-2} > 0,05$ $p_{3-1} > 0,05$
Sau 45 ngày (b)	10,84 ± 2,03	11,37 ± 2,14	11,13 ± 2,17	
Sau 90 ngày (c)	10,01 ± 2,95	11,19 ± 3,24	10,68 ± 2,73	
p	$p_{b-a} > 0,05; p_{c-b} > 0,05; p_{c-a} > 0,05$			-
Số lượng tiểu cầu (G/l)				
Trước thí nghiệm (a)	622,00 ± 96,42	605,80 ± 125,77	600,80 ± 96,12	$p_{2-1} > 0,05$ $p_{3-2} > 0,05$ $p_{3-1} > 0,05$
Sau 45 ngày (b)	580,20 ± 88,76	602,50 ± 130,31	616,10 ± 72,91	
Sau 90 ngày (c)	594,00 ± 86,79	590,40 ± 86,05	614,40 ± 121,07	
p	$p_{b-a} > 0,05; p_{c-b} > 0,05; p_{c-a} > 0,05$			-

Bảng 6: Ảnh hưởng của cao đặc KNC đến hoạt độ ALT và AST trong máu chuột

Thời điểm XN	Lô chứng sinh lý (1)	Lô trị 1 (2)	Lô trị 2 (3)	p
Hoạt độ AST (UI/l)				
Trước thí nghiệm (a)	83,20 ± 15,22	82,90 ± 11,50	85,20 ± 15,34	$p_{2-1} > 0,05$ $p_{3-2} > 0,05$ $p_{3-1} > 0,05$
Sau 45 ngày (b)	86,60 ± 15,06	89,10 ± 11,25	85,40 ± 18,42	
Sau 90 ngày (c)	91,60 ± 24,27	90,20 ± 14,00	84,40 ± 15,53	
p	$p_{b-a} > 0,05; p_{c-b} > 0,05; p_{c-a} > 0,05$			-

Hoạt độ ALT (UI/l)				
Trước thí nghiệm (a)	66,80 ± 16,93	64,40 ± 12,38	68,40 ± 17,54	$p_{2-1} > 0,05$ $p_{3-2} > 0,05$ $p_{3-1} > 0,05$
Sau 45 ngày (b)	67,40 ± 23,59	66,00 ± 14,61	65,40 ± 14,33	
Sau 90 ngày (c)	61,20 ± 13,03	63,10 ± 15,47	65,20 ± 11,56	
p	$p_{b-a} > 0,05; p_{c-b} > 0,05; p_{c-a} > 0,05$			-

Bảng 7: Ảnh hưởng của cao đặc KNC đến hàm lượng bilirubin toàn phần trong máu chuột

Thời điểm XN	Lô chứng sinh lý (1)	Lô trị 1 (2)	Lô trị 2 (3)	p
Bilirubin toàn phần ($\mu\text{mol/L}$)				
Trước thí nghiệm (a)	72,70 ± 21,86	77,30 ± 17,76	76,90 ± 14,46	$p_{2-1} > 0,05$ $p_{3-2} > 0,05$ $p_{3-1} > 0,05$
Sau 45 ngày (b)	76,70 ± 23,20	75,50 ± 27,65	75,90 ± 18,85	
Sau 90 ngày (c)	79,10 ± 15,35	75,10 ± 18,55	74,90 ± 16,91	
p	$p_{b-a} > 0,05; p_{c-b} > 0,05; p_{c-a} > 0,05$			-

Bảng 8: Ảnh hưởng của cao đặc KNC đến hàm lượng albumin và cholesterol trong máu chuột

Thời điểm XN	Lô chứng sinh lý (1)	Lô trị 1 (2)	Lô trị 2 (3)	p
Albumin huyết tương (g/l)				

Trước thí nghiệm (a)	31,30 ± 2,79	31,50 ± 2,27	31,40 ± 2,67	$p_{2-1} > 0,05$ $p_{3-2} > 0,05$ $p_{3-1} > 0,05$
Sau 45 ngày (b)	31,40 ± 2,32	31,70 ± 2,16	31,60 ± 2,46	
Sau 90 ngày (c)	31,50 ± 2,37	31,80 ± 1,55	32,50 ± 1,72	
p	$p_{b-a} > 0,05; p_{c-b} > 0,05; p_{c-a} > 0,05$			-
Cholesterol toàn phần (mmol/l)				
Trước thí nghiệm (a)	1,17 ± 0,23	1,19 ± 0,47	1,16 ± 0,34	$p_{2-1} > 0,05$ $p_{3-2} > 0,05$ $p_{3-1} > 0,05$
Sau 45 ngày (b)	1,19 ± 0,14	1,16 ± 0,17	1,18 ± 0,32	
Sau 90 ngày (c)	1,15 ± 0,25	1,13 ± 0,29	1,14 ± 0,13	
p	$p_{b-a} > 0,05; p_{c-b} > 0,05; p_{c-a} > 0,05$			-

Bảng 9: Ảnh hưởng của cao đặc KNC đến hàm lượng creatinin trong máu chuột

Thời điểm XN	Lô chứng sinh lý (1)	Lô trị 1 (2)	Lô trị 2 (3)	p
Creatinin (mmol/l)				
Trước thí nghiệm (a)	46,90 ± 7,16	47,60 ± 4,60	49,10 ± 5,36	$p_{2-1} > 0,05$ $p_{3-2} > 0,05$ $p_{3-1} > 0,05$
Sau 45 ngày (b)	48,20 ± 9,02	47,30 ± 5,14	48,80 ± 8,18	
Sau 90 ngày (c)	48,40 ± 12,05	46,90 ± 4,68	46,30 ± 8,11	
p	$p_{b-a} > 0,05; p_{c-b} > 0,05; p_{c-a} > 0,05$			-

Bảng 3.10. Ảnh hưởng của cao đặc KNC đối với điện tim chuột ở đạo trình DII

Thời điểm XN	Lô chứng sinh lý (1)	Lô trị 1 (2)	Lô trị 2 (3)	p
Tần số tim (CK/phút, $\bar{x} \pm SD$)				
Trước thí nghiệm (a)	490,00 ± 13,34	488,80 ± 10,52	488,20 ± 12,59	$p_{2-1} > 0,05$ $p_{3-2} > 0,05$ $p_{3-1} > 0,05$
Sau 45 ngày (b)	489,80 ± 15,80	486,80 ± 18,63	489,80 ± 7,73	
Sau 90 ngày (c)	489,40 ± 21,54	479,90 ± 9,91	486,50 ± 16,30	
p	$p_{b-a} > 0,05; p_{c-b} > 0,05; p_{c-a} > 0,05$			-
Biên độ (mV, $\bar{x} \pm SD$)				
Trước thí nghiệm (a)	0,319 ± 0,044	0,318 ± 0,025	0,316 ± 0,031	$p_{2-1} > 0,05$ $p_{3-2} > 0,05$ $p_{3-1} > 0,05$
Sau 45 ngày (b)	0,318 ± 0,034	0,316 ± 0,038	0,319 ± 0,022	
Sau 90 ngày (c)	0,316 ± 0,042	0,318 ± 0,034	0,318 ± 0,039	
p	$p_{b-a} > 0,05; p_{c-b} > 0,05; p_{c-a} > 0,05$			-
Sóng bất thường	Không	Không	Không	-

KẾT LUẬN

Từ các kết quả thử nghiệm độc tính cấp và bán trường diễn của Cao đặc KCN, chúng tôi kết luận:

1.1. Độc tính cấp (LD50) của Cao đặc KCN theo đường uống trên chuột nhắt trắng.

Chưa tìm thấy LD₅₀ của Cao đặc KCN theo đường uống trên chuột nhắt trắng với mức liều cao nhất có thể cho chuột uống là 39g cao đặc/kg thể trọng.

1.2. Độc tính bán trường diễn của Cao đặc KCN trên chuột cống trắng.

Trên các lô chuột dùng Cao đặc KCN liều 0,94g cao đặc/kg/ngày, và liều 4,70g cao đặc/kg/ngày, trong 90 ngày liên tục, cho thấy:

- Chuột khỏe mạnh, tăng trọng tốt, đều.
 - Chưa thấy ảnh hưởng các sóng điện tim ở đạo trình DII của chuột ($p > 0,05$).
 - Không làm thay đổi các chỉ số huyết học (hồng cầu, huyết sắc tố, hematocrit, thể tích trung bình hồng cầu, bạch cầu, tiểu cầu).
 - Không làm thay đổi các chỉ tiêu sinh hóa máu đánh giá chức năng gan, thận (hoạt độ các enzym AST, ALT, Albumin huyết tương, Cholesterol toàn phần, Bilirubin toàn phần, Creatinin).
 - Không gây tổn thương mô bệnh học gan, lách, thận.
- Như vậy Cao đặc KCN an toàn ở các mức liều và thời gian đã dùng.

Xác nhận của cơ quan



Thiếu tướng
Hoàng Văn Lương

Người thực hiện

KTV. Bùi Văn Tám

TS. Nguyễn Hoàng Ngân

Phụ lục 3: Sơ đồ quy trình bào chế cao đặc KNC

