

BỘ GIÁO DỤC VÀ ĐÀO TẠO

BỘ Y TẾ

ĐẠI HỌC Y DƯỢC THÀNH PHỐ HỒ CHÍ MINH

NGUYỄN THANH TUẤN

NGHIÊN CỨU TÁC DỤNG ĐIỀU HÒA LIPID MÁU  
CỦA VIÊN NANG CỨNG  
NGƯỜI TẮT - ĐAN SÂM - TAM THẤT TRÊN THỰC NGHIỆM

LUẬN ÁN TIẾN SĨ Y HỌC

TP. HỒ CHÍ MINH, Năm 2024

BỘ GIÁO DỤC VÀ ĐÀO TẠO

BỘ Y TẾ

ĐẠI HỌC Y DƯỢC THÀNH PHỐ HỒ CHÍ MINH

NGUYỄN THANH TUẤN

NGHIÊN CỨU TÁC DỤNG ĐIỀU HÒA LIPID MÁU  
CỦA VIÊN NANG CỨNG  
NGƯỜI TẮT - ĐAN SÂM - TAM THẤT TRÊN THỰC NGHIỆM

NGÀNH: Y HỌC CỔ TRUYỀN

MÃ SỐ: 62720201

LUẬN ÁN TIẾN SĨ Y HỌC

NGƯỜI HƯỚNG DẪN KHOA HỌC:

- TS. NGUYỄN THỊ SƠN
- PGS.TS. TRẦN KIM TRANG

TP. HỒ CHÍ MINH, Năm 2024

## **LỜI CAM ĐOAN**

Tôi cam đoan đây là công trình nghiên cứu của riêng tôi, các kết quả nghiên cứu được trình bày trong luận án là trung thực, khách quan và chưa từng được công bố ở bất kỳ nơi nào.

Tác giả luận án

Nguyễn Thanh Tuấn

## MỤC LỤC

|                                                                                                       |      |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------|------|
| Lời cam đoan .....                                                                                    | i    |
| Danh mục các chữ viết tắt và thuật ngữ Anh - Việt.....                                                | ii   |
| Danh mục các bảng.....                                                                                | v    |
| Danh mục các biểu đồ.....                                                                             | vii  |
| Danh mục các hình.....                                                                                | viii |
| <b>ĐẶT VẤN ĐỀ</b> .....                                                                               | 1    |
| <b>Chương 1. TỔNG QUAN TÀI LIỆU</b> .....                                                             | 3    |
| 1.1. Lipid máu và rối loạn lipid máu trong Y học hiện đại.....                                        | 3    |
| 1.2. Lý luận Y học cổ truyền về rối loạn lipid máu .....                                              | 14   |
| 1.3. Sự tương đồng giữa chứng đàm thấp và rối loạn lipid máu .....                                    | 19   |
| 1.4. Phương pháp nghiên cứu tác động của thuốc trên chuyển hóa lipid .....                            | 21   |
| 1.5. Phương pháp bào chế dược liệu thành viên nang .....                                              | 25   |
| 1.6. Giới thiệu về viên MIX.....                                                                      | 26   |
| 1.7. Tình hình nghiên cứu thuốc điều hòa lipid máu từ dược liệu ở Việt Nam và trên thế giới .....     | 35   |
| <b>Chương 2. ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU</b> .....                                            | 37   |
| 2.1. Thiết kế nghiên cứu .....                                                                        | 37   |
| 2.2. Đối tượng nghiên cứu .....                                                                       | 37   |
| 2.3. Trang thiết bị và hóa chất .....                                                                 | 39   |
| 2.4. Thời gian và địa điểm nghiên cứu .....                                                           | 39   |
| 2.5. Phương pháp và công cụ đo lường, thu thập số liệu .....                                          | 40   |
| 2.6. Quy trình nghiên cứu .....                                                                       | 57   |
| 2.7. Phương pháp thống kê, xử lý số liệu .....                                                        | 57   |
| <b>Chương 3. KẾT QUẢ</b> .....                                                                        | 58   |
| 3.1. Bào chế và tiêu chuẩn cơ sở viên MIX.....                                                        | 58   |
| 3.2. Tính an toàn của viên MIX trên chuột nhắt trắng .....                                            | 74   |
| 3.3. Tác dụng điều hòa lipid máu của viên MIX trên chuột nhắt trắng.....                              | 79   |
| 3.4. Tác động ức chế hoạt tính HMG-CoA reductase của viên MIX <i>in vitro</i> và <i>in vivo</i> ..... | 86   |
| <b>Chương 4. BÀN LUẬN</b> .....                                                                       | 90   |

|                                                                                                                                            |     |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| 4.1. Bào chế và tiêu chuẩn cơ sở viên MIX.....                                                                                             | 90  |
| 4.2. Tính an toàn của viên MIX trên chuột nhắt trắng .....                                                                                 | 95  |
| 4.3. Tác dụng điều hòa lipid máu của viên MIX trên chuột nhắt trắng.....                                                                   | 104 |
| 4.4. Tác động ức chế HMG-CoA reductase của viên MIX <i>in vitro</i> và <i>in vivo</i> .....                                                | 116 |
| 4.5. Tác dụng theo YHCT của viên MIX .....                                                                                                 | 124 |
| Tính mới của đề tài .....                                                                                                                  | 127 |
| <b>KẾT LUẬN</b> .....                                                                                                                      | 129 |
| <b>KIẾN NGHỊ</b> .....                                                                                                                     | 130 |
| DANH MỤC BÀI BÁO ĐÃ CÔNG BỐ CÓ LIÊN QUAN ĐẾN LUẬN ÁN                                                                                       |     |
| TÀI LIỆU THAM KHẢO                                                                                                                         |     |
| PHỤ LỤC                                                                                                                                    |     |
| Phụ lục 1. Phiếu kiểm nghiệm Nguru tất                                                                                                     |     |
| Phụ lục 2. Phiếu kiểm nghiệm Đan sâm                                                                                                       |     |
| Phụ lục 3. Phiếu kiểm nghiệm Tam thất                                                                                                      |     |
| Phụ lục 4. Kết quả nồng độ thành phần lipid máu của các lô chuột trên mô hình gây RLLM nội sinh bằng tyloxapol                             |     |
| Phụ lục 5. Kết quả trọng lượng và nồng độ thành phần lipid máu của các lô chuột trên mô hình gây RLLM ngoại sinh bằng chế độ ăn giàu lipid |     |
| Phụ lục 6. Kết quả tác động ức chế hoạt tính HMG-CoA reductase của viên MIX <i>in vivo</i>                                                 |     |

## DANH MỤC CHỮ VIẾT TẮT VÀ THUẬT NGỮ ANH - VIỆT

| Chữ viết tắt | Chữ nguyên                                          | Nghĩa tiếng Việt                        |
|--------------|-----------------------------------------------------|-----------------------------------------|
| ACC          | American College of Cardiology                      | Trường môn tim Hoa Kỳ                   |
| ACE          | Angiotensin Converting Enzyme                       | Ức chế men chuyển                       |
| ACAT         | Acyl-CoA Cholesterol<br>Acyltransferase             |                                         |
| AMPK         | Adenosine Monophosphate<br>activated Protein Kinase | Protein kinase kích hoạt bởi<br>AMP     |
| AHA          | American Heart Association                          | Hội tim Hoa Kỳ                          |
| AST          | Aspartate Aminotransferase                          |                                         |
| ALT          | Alanine Aminotransferase                            |                                         |
| BMI          | Body Mass Index                                     | Chỉ số khối cơ thể                      |
| BTMXV        | Bệnh Tim Mạch Xơ Vữa                                |                                         |
| CS           | Cộng Sự                                             |                                         |
| CK           | Creatine Kinase                                     |                                         |
| CYP7A1       | Cholesterol 7 Alpha Hydroxylase                     |                                         |
| CETP         | Cholesteryl Ester Transfer Protein                  | Protein vận chuyển<br>cholesterol ester |
| CE           | Cholesterol Ester                                   |                                         |
| CM           | Chylomycron                                         |                                         |
| ĐĐVN         | Dược Điển Việt Nam                                  |                                         |
| $\Delta$ OD  | Delta Optical Density                               | Độ chênh lệch mật độ quang              |
| EDTA         | Ethylenediamine Tetraacetic Acid                    |                                         |
| EAS          | European Atherosclerosis Society                    | Hội xơ vữa mạch máu châu<br>Âu          |
| ESC          | European Society of Cardiology                      | Hội tim châu Âu                         |
| eGFR         | estimated Glomerular Filtration<br>Rate             | Độ lọc cầu thận ước đoán                |
| FAS          | Fatty Acid Synthase                                 |                                         |
| FXR          | Farnesoid X Receptor                                | Thụ thể acid mật                        |

|                   |                                                  |                                                        |
|-------------------|--------------------------------------------------|--------------------------------------------------------|
| FA                | Fatty Acid                                       | Acid béo                                               |
| GFR               | Glomerular Filtration Rate                       | Độ lọc cầu thận                                        |
| HDL               | High Density Lipoprotein                         | Lipoprotein tỷ trọng cao                               |
| HMG-CoA           | 3-Hydroxy-3-Methylglutaryl<br>Coenzym A          |                                                        |
| HPLC              | High Performance Liquid<br>Chromatography        | Sắc ký lỏng hiệu năng cao                              |
| IDL               | Intermediate Density Lipoprotein                 | Lipoprotein tỷ trọng trung<br>gian                     |
| IC <sub>50</sub>  | Inhibitory Concentration 50                      | Nồng độ ức chế 50%                                     |
| LPL               | Lipoprotein Lipase                               |                                                        |
| Lp (a)            | Lipoprotein (a)                                  |                                                        |
| LCAT              | Lecithin Cholesterol Acyltransferase             |                                                        |
| LXR               | Liver X Receptor                                 | Thụ thể X của gan                                      |
| LDL               | Low Density Lipoprotein                          | Lipoprotein tỷ trọng thấp                              |
| LDL-R             | Low Density Lipoprotein Receptor                 | Thụ thể lipoprotein tỷ trọng<br>thấp                   |
| LD <sub>0</sub>   | Lethal Dose 0%                                   | Liều dưới liều chết                                    |
| LD <sub>50</sub>  | Lethal Dose 50%                                  | Liều chết trung bình                                   |
| LD <sub>100</sub> | Lethal Dose 100%                                 | Liều chết tuyệt đối                                    |
| mRNA              | Messenger RNA                                    | RNA thông tin                                          |
| NADPH             | Nicotinamide Adenine Dinucleotide<br>Phosphate   |                                                        |
| NPC1L1            | Niemann-Pick C1 Like 1                           |                                                        |
| NO                | Nitric Oxide                                     |                                                        |
| PPARs             | Peroxisome Proliferator Activated<br>Receptors   | Thụ thể kích hoạt tăng sinh<br>peroxisome proliferator |
| PCSK9             | Proprotein Convertase Subtilisin<br>Kexin Type 9 |                                                        |
| PL                | Phospholipid                                     |                                                        |
| ROS               | Reactive Oxygen Species                          | Gốc tự do oxy hoá                                      |

|       |                                           |                                    |
|-------|-------------------------------------------|------------------------------------|
| RLLM  | Rối Loạn Lipid Máu                        |                                    |
| SREBP | Sterol Regulatory Element Binding Protein | Protein gắn yếu tố điều hoà sterol |
| TB    | Trung Bình                                |                                    |
| TC    | Total Cholesterol                         | Cholesterol toàn phần              |
| TG    | Triglycerid                               |                                    |
| TT    | Thuốc thử                                 |                                    |
| VLDL  | Very Low Density Lipoprotein              | Lipoprotein tỷ trọng rất thấp      |
| WHO   | World Health Organization                 | Tổ chức Y tế thế giới              |
| XVĐM  | Xơ Vữa Động Mạch                          |                                    |
| YHHĐ  | Y Học Hiện Đại                            |                                    |
| YHCT  | Y Học Cổ Truyền                           |                                    |

## DANH MỤC CÁC BẢNG

|                                                                                                                     |    |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Bảng 1.1. Phân loại statin theo mức hiệu lực của ESC/EAS .....                                                      | 12 |
| Bảng 1.2. Sự tương đồng giữa chứng đàn thấp và RLLM .....                                                           | 21 |
| Bảng 1.3. Một số mô hình gây tăng lipid máu bằng chế độ ăn .....                                                    | 22 |
| Bảng 1.4. Một số mô hình gây tăng lipid máu bằng tyloxapol .....                                                    | 23 |
| Bảng 1.5. Một số phương pháp đánh giá tác động của thuốc trên chuyển hóa lipid ở mức độ phân tử, tế bào .....       | 24 |
| Bảng 1.6. Sự phối ngũ các vị thuốc trong viên MIX .....                                                             | 34 |
| Bảng 1.7. Tóm tắt một số nghiên cứu thuốc điều hòa lipid máu từ dược liệu .....                                     | 36 |
| Bảng 2.1. Tiêu chuẩn chất lượng mẫu nguyên liệu Ngưu tất, Đan sâm, Tam thất .....                                   | 38 |
| Bảng 2.2. Công thức chiết xuất cao Ngưu tất - Đan sâm - Tam thất .....                                              | 40 |
| Bảng 2.3. Công thức bào chế một viên MIX.....                                                                       | 43 |
| Bảng 2.4. Chương trình dung môi sắc ký định lượng ginsenosid Rg1 .....                                              | 48 |
| Bảng 2.5. Điều kiện bảo quản và thời gian kiểm nghiệm .....                                                         | 49 |
| Bảng 2.6. Tiêu chí khảo sát độ ổn định của viên MIX.....                                                            | 50 |
| Bảng 2.7. Bố trí thử nghiệm khảo sát tác dụng điều hòa lipid máu của viên MIX trên mô hình gây RLLM nội sinh .....  | 53 |
| Bảng 2.8. Bố trí thử nghiệm khảo sát tác dụng điều hòa lipid máu của viên MIX trên mô hình gây RLLM ngoại sinh..... | 54 |
| Bảng 2.9. Bố trí thử nghiệm định lượng hoạt tính HMG-CoA reductase <i>in vitro</i> .....                            | 56 |
| Bảng 2.10. Bố trí thử nghiệm định lượng hoạt tính HMG-CoA reductase <i>in vivo</i> .....                            | 56 |
| Bảng 3.1. Kết quả chiết xuất và bào chế cao Ngưu tất - Đan sâm - Tam thất .....                                     | 58 |
| Bảng 3.2. Kết quả bào chế cao khô MIX .....                                                                         | 59 |
| Bảng 3.3. Kết quả bào chế viên MIX .....                                                                            | 60 |
| Bảng 3.4. Kết quả độ ẩm viên MIX.....                                                                               | 60 |
| Bảng 3.5. Kết quả độ đồng đều khối lượng và độ rã viên MIX .....                                                    | 60 |
| Bảng 3.6. Kết quả khảo sát tính tương thích hệ thống của hệ thống sắc ký.....                                       | 66 |
| Bảng 3.7. Kết quả khảo sát khoảng tuyến tính của acid oleanolic .....                                               | 67 |
| Bảng 3.8. Kết quả khảo sát khoảng tuyến tính của acid salvianolic B.....                                            | 67 |
| Bảng 3.9. Kết quả khảo sát khoảng tuyến tính của ginsenosid Rg1 .....                                               | 68 |
| Bảng 3.10. Kết quả độ chính xác acid oleanolic .....                                                                | 69 |

|                                                                                                                   |     |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| Bảng 3.11. Kết quả độ chính xác acid salvianolic B .....                                                          | 69  |
| Bảng 3.12. Kết quả độ chính xác ginsenosid Rg1 .....                                                              | 70  |
| Bảng 3.13. Kết quả độ đúng acid oleanolic .....                                                                   | 70  |
| Bảng 3.14. Kết quả độ đúng acid salvianolic B .....                                                               | 71  |
| Bảng 3.15. Kết quả độ đúng ginsenosid Rg1 .....                                                                   | 71  |
| Bảng 3.16. Kết quả định lượng hàm lượng acid oleanolic, acid salvianolic B và ginsenosid Rg1 trong viên MIX ..... | 72  |
| Bảng 3.17. Kết quả khảo sát độ nhiễm khuẩn của viên MIX.....                                                      | 72  |
| Bảng 3.18. Kết quả khảo sát độ ổn định ở điều kiện lão hóa cấp tốc.....                                           | 73  |
| Bảng 3.19. Kết quả khảo sát độ ổn định ở điều kiện dài hạn .....                                                  | 73  |
| Bảng 3.20. Kết quả độc tính cấp.....                                                                              | 74  |
| Bảng 3.21. Ảnh hưởng của viên MIX đến trọng lượng cơ thể chuột.....                                               | 75  |
| Bảng 3.22. Ảnh hưởng của viên MIX đến chức năng tạo máu .....                                                     | 75  |
| Bảng 3.23. Ảnh hưởng của viên MIX đến mức độ tổn thương tế bào gan .....                                          | 76  |
| Bảng 3.24. Ảnh hưởng của viên MIX đến chức năng thận .....                                                        | 77  |
| Bảng 3.25. Ảnh hưởng của viên MIX đến trọng lượng tương đối gan, tim, thận .....                                  | 77  |
| Bảng 3.26. Ảnh hưởng của viên MIX đến vi thể gan, tim, thận .....                                                 | 78  |
| Bảng 3.27. Nồng độ thành phần lipid máu của các lô trên mô hình gây RLLM nội sinh.....                            | 79  |
| Bảng 3.28. Trọng lượng cơ thể chuột của các lô trên mô hình gây RLLM ngoại sinh.                                  | 83  |
| Bảng 3.29. Nồng độ thành phần lipid máu của các lô trên mô hình gây RLLM ngoại sinh .....                         | 83  |
| Bảng 3.30. Nồng độ protein trong hỗn dịch protein gan chuột .....                                                 | 86  |
| Bảng 3.31. Tác động ức chế hoạt tính HMG-CoA reductase của atorvastatin <i>in vitro</i> ....                      | 87  |
| Bảng 3.32. Tác động ức chế hoạt tính HMG-CoA reductase của viên MIX <i>in vitro</i> .....                         | 88  |
| Bảng 3.33. Tác động ức chế hoạt tính HMG-CoA reductase của viên MIX <i>in vivo</i> .....                          | 88  |
| Bảng 4.1. Một số nghiên cứu độc tính cấp từ Ngưu tất, Đan sâm, Tam thất .....                                     | 97  |
| Bảng 4.2. Một số nghiên cứu độc tính bán trường diễn từ Ngưu tất, Đan sâm, Tam thất .....                         | 103 |
| Bảng 4.3. Một số nghiên cứu tác dụng điều hòa lipid máu từ Ngưu tất.....                                          | 115 |

## DANH MỤC CÁC BIỂU ĐỒ

|                                                                                                                               |    |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Biểu đồ 3.1. Đường biểu diễn sự tương quan giữa nồng độ acid oleanolic và diện tích pic .....                                 | 67 |
| Biểu đồ 3.2. Đường biểu diễn sự tương quan giữa nồng độ acid salvianolic B và diện tích pic .....                             | 68 |
| Biểu đồ 3.3. Đường biểu diễn sự tương quan giữa nồng độ ginsenosid Rg1 và diện tích pic .....                                 | 68 |
| Biểu đồ 3.4. Nồng độ TC máu của các lô trên mô hình gây RLLM nội sinh .....                                                   | 80 |
| Biểu đồ 3.5. Nồng độ HDL-C máu của các lô trên mô hình gây RLLM nội sinh .....                                                | 80 |
| Biểu đồ 3.6. Nồng độ LDL-C máu của các lô trên mô hình gây RLLM nội sinh .....                                                | 81 |
| Biểu đồ 3.7. Nồng độ TG máu của các lô trên mô hình gây RLLM nội sinh .....                                                   | 82 |
| Biểu đồ 3.8. Nồng độ TC máu của các lô trên mô hình gây RLLM ngoại sinh .....                                                 | 84 |
| Biểu đồ 3.9. Nồng độ HDL-C máu của các lô trên mô hình gây RLLM ngoại sinh ....                                               | 85 |
| Biểu đồ 3.10. Nồng độ LDL-C máu của các lô trên mô hình gây RLLM ngoại sinh ...                                               | 85 |
| Biểu đồ 3.11. Nồng độ TG máu của các lô trên mô hình gây RLLM ngoại sinh .....                                                | 86 |
| Biểu đồ 3.12. Đường biểu diễn sự tương quan giữa % ức chế HMG-CoA reductase và log nồng độ atorvastatin <i>in vitro</i> ..... | 87 |

## DANH MỤC CÁC HÌNH

|                                                                                                   |     |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| Hình 1.1. Cấu trúc phân tử lipoprotein.....                                                       | 3   |
| Hình 1.2. Con đường mevalonate trong sinh tổng hợp cholesterol.....                               | 5   |
| Hình 1.3. Cấu trúc HMG-CoA reductase.....                                                         | 6   |
| Hình 1.4. Chuyển hóa lipid máu ngoại sinh.....                                                    | 7   |
| Hình 1.5. Chuyển hóa lipid máu nội sinh.....                                                      | 7   |
| Hình 1.6. Các yếu tố hình thành XVĐM.....                                                         | 10  |
| Hình 1.7. Quy trình bào chế dược liệu thành viên nang.....                                        | 25  |
| Hình 2.1. Nguyên liệu Ngưu tất, Đan sâm, Tam thất.....                                            | 37  |
| Hình 2.2. Viên nang cứng Ngưu tất - Đan sâm - Tam thất (viên MIX).....                            | 37  |
| Hình 2.3. Quy trình nghiên cứu .....                                                              | 57  |
| Hình 3.1. Quy trình bào chế cao khô MIX.....                                                      | 58  |
| Hình 3.2. Quy trình bào chế viên MIX.....                                                         | 59  |
| Hình 3.3. Sắc ký đồ định tính sự hiện diện của acid oleanolic trong viên MIX .....                | 61  |
| Hình 3.4. Sắc ký đồ định tính sự hiện diện của acid salvianolic B trong viên MIX.....             | 61  |
| Hình 3.5. Sắc ký đồ định tính sự hiện diện của ginsenosid Rg1 trong viên MIX.....                 | 62  |
| Hình 3.6. Sắc ký đồ HPLC đánh giá tính đặc hiệu của quy trình định lượng acid oleanolic .....     | 62  |
| Hình 3.7. Sắc ký đồ HPLC đánh giá tính đặc hiệu của quy trình định lượng acid salvianolic B ..... | 64  |
| Hình 3.8. Sắc ký đồ HPLC đánh giá tính đặc hiệu của quy trình định lượng ginsenosid Rg1.....      | 65  |
| Hình 3.9. Hình ảnh mô học giải phẫu vi thể trên gan.....                                          | 78  |
| Hình 3.10. Hình ảnh mô học giải phẫu vi thể trên tim .....                                        | 78  |
| Hình 3.11. Hình ảnh mô học giải phẫu vi thể trên thận .....                                       | 78  |
| Hình 4.1. Quá trình chuyển hoá các hợp chất trong dược liệu bởi hệ vi sinh vật đường ruột.....    | 119 |

## ĐẶT VẤN ĐỀ

Rối loạn lipid máu là một trong những yếu tố nguy cơ chính của bệnh tim mạch do xơ vữa, điều kiện sinh lý bệnh cơ bản của bệnh tật và tử vong tim mạch.<sup>1</sup> Số liệu thống kê cho thấy bệnh tim mạch do xơ vữa hiện đang là nhóm bệnh chiếm tỷ lệ cao nhất, thường gặp nhất trong cộng đồng và là nguyên nhân hàng đầu gây tử vong trên thế giới. Ở châu Âu mỗi năm có trên 4 triệu người tử vong do bệnh tim mạch do xơ vữa.<sup>1</sup> Tại Hoa Kỳ, bệnh tim mạch do xơ vữa cũng là nguyên nhân hàng đầu gây tử vong, ước tính chi phí hàng năm trên 200 tỷ đô la cho các vấn đề liên quan đến sức khỏe.<sup>2</sup> Tại Việt Nam, hiện chưa có số liệu thống kê cụ thể về tỷ lệ mắc và tử vong bệnh tim mạch do xơ vữa trên cả nước.<sup>3</sup> Do đó, liệu pháp điều trị rối loạn lipid máu có giá trị quan trọng, góp phần làm giảm nguy cơ chung về các biến cố tim mạch. Hướng dẫn điều trị tăng cholesterol máu của Hội tim châu Âu - Hội xơ vữa mạch máu châu Âu,<sup>1</sup> với chiến lược nên hạ nồng độ LDL-C “Càng thấp càng tốt” để phòng ngừa bệnh tim mạch do xơ vữa cũng nhận được sự đồng thuận từ các chuyên gia Hoa Kỳ.<sup>2</sup> Hướng dẫn chẩn đoán và điều trị rối loạn lipid máu của Hội tim mạch học Quốc gia Việt Nam,<sup>3</sup> LDL-C cũng được khuyến cáo là mục tiêu điều trị đầu tiên.

Tuy không được sử dụng trong thuật ngữ Y học cổ truyền, nhưng từ nguyên nhân gây bệnh, cơ chế bệnh sinh và biểu hiện lâm sàng của rối loạn lipid máu nhận thấy có nhiều điểm tương đồng với chứng đàm thấp theo lý luận Y học cổ truyền.<sup>5</sup> Thuốc hóa đàm trừ thấp, hoạt huyết hoá ứ không những cải thiện được triệu chứng lâm sàng chứng đàm thấp mà còn có hiệu quả trong việc điều hòa rối loạn lipid máu.<sup>6,7,8</sup>

Điều trị rối loạn lipid máu thành công nhìn chung bao gồm 2 biện pháp chính: Thay đổi lối sống và sử dụng thuốc.<sup>1-4</sup> Thuốc điều trị rối loạn lipid máu có nguồn gốc hóa học tổng hợp như nhóm: Statin, fibrat, ức chế hấp thu cholesterol hay ức chế proprotein convertase subtilisin- kexin type 9 tuy mang lại hiệu quả giảm lipid máu khá tốt, song cùng với những tác dụng bất lợi đã ảnh hưởng phần nào đến chiến lược điều trị.<sup>1,2,9-15</sup> Trong khi việc điều trị rối loạn lipid máu cần liên tục và lâu dài, vì thế, bên cạnh hiệu quả, vấn đề an toàn cũng là tiêu chí quan trọng. Nhằm khắc phục những hạn chế của thuốc hóa học tổng hợp, nghiên cứu kết hợp các thuốc có nguồn gốc tự

hiện đang được các nhà khoa học ở Việt Nam cũng như trên thế giới quan tâm. Liệu pháp kết hợp hiện là một lựa chọn tốt trên thực hành lâm sàng bởi vì có thể làm tăng khả năng đạt được các mục tiêu điều trị đồng thời giúp giảm liều dùng và tác dụng phụ của thuốc.<sup>1,2,16,17</sup> Ngưu tất, Đan sâm, Tam thất là những dược liệu có tác dụng hoạt huyết hóa ứ, thông kinh mạch theo lý luận Y học cổ truyền.<sup>18,19</sup> Theo kết quả nghiên cứu dược lý, cả 3 dược liệu đều có tác dụng hạ lipid máu,<sup>20-29</sup> cải thiện diễn tiến sinh xơ vữa động mạch thông qua các tác dụng như giãn mạch, ổn định huyết áp, chống đông máu, kháng viêm, chống oxy hóa.<sup>30-36</sup> Ngoài ra, còn có tác dụng bảo vệ gan, tăng cường miễn dịch cơ thể và ít tác dụng phụ.<sup>37-40</sup> Bên cạnh đó, kết quả từ nghiên cứu tiền đề cao chiết kết hợp Ngưu tất - Đan sâm - Tam thất có hiệu quả làm giảm cholesterol máu tương đương với thuốc nhóm statin trên thực nghiệm. Tuy nhiên, dạng cao chiết khá bất tiện khi sử dụng và chưa có các nghiên cứu dược lý đầy đủ.<sup>41</sup> Với mong muốn tạo ra một chế phẩm có được tác dụng hạ lipid máu hiệu quả, an toàn và tiện dụng, đồng thời thỏa được yêu cầu từ cơ chế tác dụng theo Y học hiện đại đến lý pháp biện chứng theo Y học cổ truyền. Công thức kết hợp Ngưu tất - Đan sâm - Tam thất được bào chế thành dạng viên nang cứng và đặt tên là “Viên nang cứng Ngưu tất - Đan sâm - Tam thất”, gọi tắt là viên MIX (viên kết hợp). Hiện nay, chưa có nghiên cứu đánh giá tác dụng của viên MIX trên chuyển hóa lipid. Do đó, để cung cấp những bằng chứng khoa học nhằm ứng dụng viên MIX trong hỗ trợ phòng và điều trị rối loạn lipid máu, đề tài: “Nghiên cứu tác dụng điều hòa lipid máu của viên nang cứng Ngưu tất - Đan sâm - Tam thất trên thực nghiệm” được thực hiện với các mục tiêu sau:

### **Mục tiêu tổng quát**

Nghiên cứu hiệu quả của chế phẩm điều hòa lipid máu từ Ngưu tất - Đan sâm - Tam thất, với tên gọi là viên MIX.

### **Mục tiêu cụ thể**

1. Bào chế và xây dựng tiêu chuẩn cơ sở viên MIX.
2. Đánh giá tính an toàn của viên MIX trên chuột nhắt trắng.
3. Khảo sát tác dụng điều hòa lipid máu của viên MIX trên chuột nhắt trắng.
4. Khảo sát tác động ức chế hoạt tính HMG-CoA reductase của viên MIX *in vitro* và *in vivo*.

## Chương 1. TỔNG QUAN TÀI LIỆU

### 1.1. Lipid máu và rối loạn lipid máu trong Y học hiện đại

#### 1.1.1. Lipid máu

##### 1.1.1.1. Khái niệm lipid máu

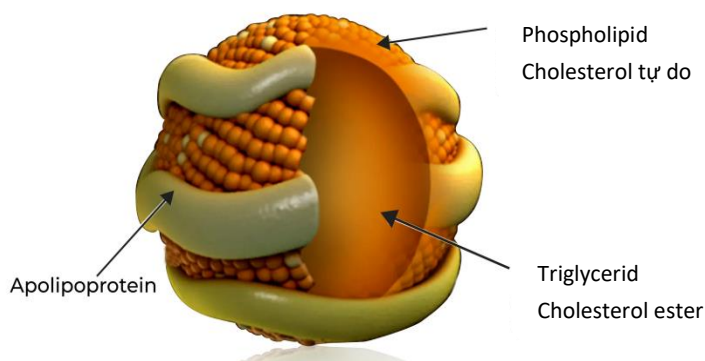
Lipid là thành phần không thể thiếu và có vai trò quan trọng trong cơ thể. Lipid tham gia cấu tạo tế bào, các hoạt động chuyển hoá và nguồn cung cấp năng lượng chính cho cơ thể (chiếm 25 - 30% tổng năng lượng). Ngoài ra, còn có tác dụng bảo vệ các cơ quan trong cơ thể dưới những tác động từ bên ngoài.

Lipid trong cơ thể tồn tại ở 2 khu vực: Lipid trong tế bào và lipid huyết tương.<sup>9,42</sup>

- *Lipid trong tế bào gồm:* Lipid cấu trúc và lipid dự trữ.
- *Lipid huyết tương gồm:* Acid béo (Fatty acid - FA) tự do, triglycerid (TG), cholesterol và phospholipid (PL).

Cholesterol toàn phần (TC) gồm: Cholesterol tự do, cholesterol ester (CE) và PL. Vì không tan trong nước nên lipid trong huyết tương không lưu hành dưới dạng tự do mà được gắn với protein đặc hiệu (apoprotein) tạo thành lipoprotein vận chuyển trong máu và hệ bạch huyết.

Cấu trúc lipoprotein (Hình 1.1): Là những phân tử hình cầu, bao gồm phần nhân chứa những phân tử không phân cực là TG và CE, xung quanh bao bọc bởi lớp các phân tử phân cực là PL, cholesterol tự do và các protein được gọi là các apolipoprotein (apo).



**Hình 1.1. Cấu trúc phân tử lipoprotein**

“Nguồn: Feingold KR, 2021”<sup>42</sup>

Phân loại lipoprotein: Bằng phương pháp điện di và siêu ly tâm, phân ra các loại lipoprotein chính theo tỷ trọng tăng dần.

Chylomycron (CM): Lipoprotein có tỷ trọng lớn nhất ( $< 0,95 \text{ g/mL}$ ), được tạo thành duy nhất bởi tế bào niêm mạc ruột, Chức năng chủ yếu là vận chuyển TG và cholesterol ngoại sinh về gan.

Very low density lipoprotein (VLDL): Lipoprotein có tỷ trọng rất thấp ( $0,96 - 1,006 \text{ g/mL}$ ), được tạo thành chủ yếu ở gan, chứa nhiều TG. Chức năng là vận chuyển TG nội sinh vào hệ tuần hoàn.

Intermediate density lipoprotein (IDL): Lipoprotein có tỷ trọng trung gian là sản phẩm chuyển hóa của VLDL.

Low density lipoprotein (LDL): Lipoprotein có tỷ trọng thấp ( $1,020 - 1,063 \text{ g/mL}$ ), là sản phẩm chuyển hóa của VLDL, chứa nhiều cholesterol. Chức năng chính là vận chuyển cholesterol được tổng hợp ở gan đến các mô ngoại vi.

High density lipoprotein (HDL): Lipoprotein có tỷ trọng cao ( $1,064 - 1,210 \text{ g/mL}$ ), được tổng hợp ở gan và ruột, một phần do chuyển hóa của VLDL. Chức năng chính của HDL là vận chuyển cholesterol dư thừa từ các mô ngoại vi trở về gan để tạo thành acid mật và bài tiết qua đường mật. HDL là lipoprotein có tác dụng làm giảm tiến trình sinh XVĐM.

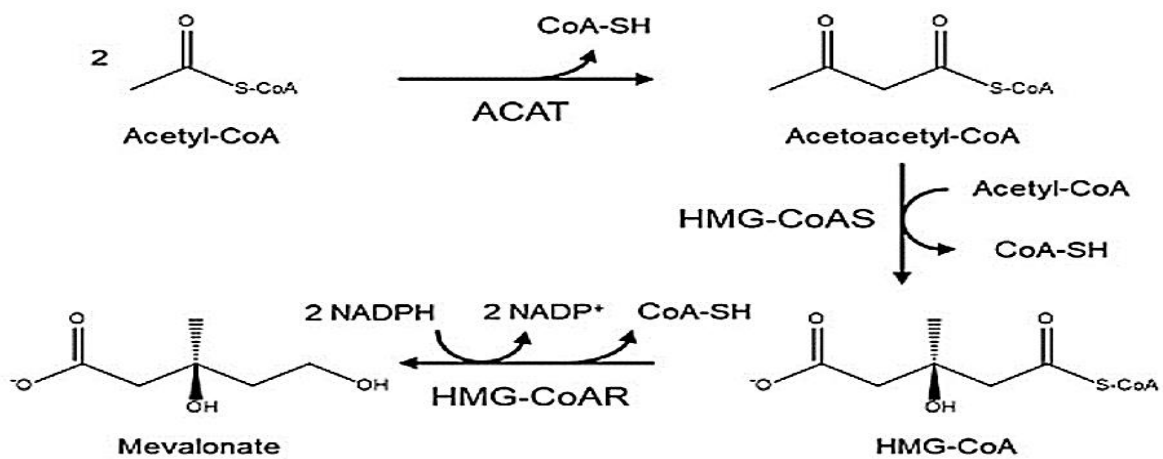
Lp(a): Được tổng hợp ở gan với số lượng ít, có cấu trúc tương tự như LDL nhưng có thêm một protein gắn vào apo-B100 gọi là apo(a). Hiện nay, nhiều nghiên cứu đã chứng minh Lp(a) có thể là yếu tố nguy cơ độc lập của bệnh mạch vành.

#### 1.1.1.2. Tổng hợp cholesterol và vai trò của HMG-CoA reductase

##### **Tổng hợp cholesterol**

Cholesterol trong cơ thể được cung cấp từ hai nguồn<sup>43</sup>: Tổng hợp trong tế bào (70%) và hấp thu từ hệ tiêu hóa (30%). Hầu hết quá trình tổng hợp cholesterol xảy ra ở gan và ruột. Ngoài ra, cholesterol còn được tổng hợp ở tuyến thượng thận, tinh hoàn, buồng trứng, da và hệ thần kinh. Quá trình tổng hợp cholesterol nội sinh rất phức tạp bao gồm 27 bước, cần hơn 20 enzyme khác nhau tham gia chuyển hóa 30 phân tử carbon của acetyl-CoA thành cấu trúc 4 vòng có 27 carbon, có thể chia thành 4 giai đoạn: (1) tổng hợp mevalonate từ acid acetic dưới dạng acetyl CoA; (2) biến đổi mevalonate thành isopren hoạt hóa; (3) biến đổi 6 đơn vị isopren hoạt hóa thành

squalen; (4) biến đổi squalen thành nhân steroid có 4 vòng tạo thành cholesterol. Trong giai đoạn 1, bước chuyển hóa HMG-CoA thành mevalonate dưới xúc tác HMG-CoA reductase là một trong những bước quan trọng nhất. Đây là giai đoạn được nghiên cứu chuyên sâu trong điều hòa sinh tổng hợp cholesterol (Hình 1.2). Tăng hoạt tính HMG-CoA reductase sẽ làm tăng tổng hợp cholesterol. Ngược lại, kiểm soát hoặc ức chế hoạt tính HMG-CoA reductase sẽ làm giảm tổng hợp cholesterol.



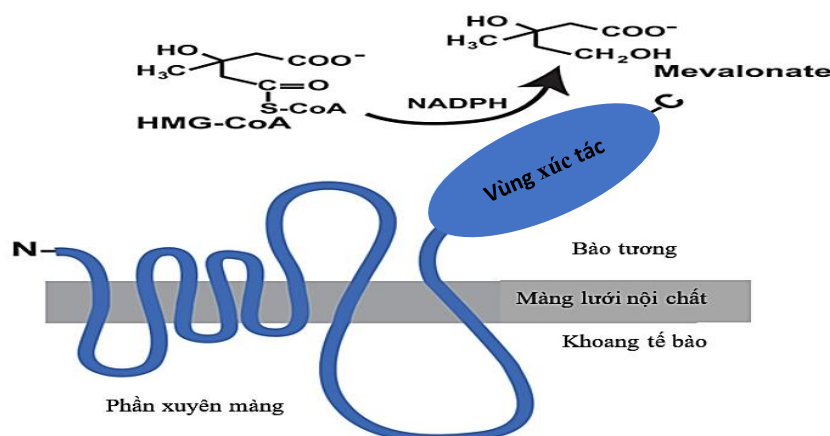
**Hình 1.2. Con đường mevalonate trong sinh tổng hợp cholesterol**

“Nguồn: Gesto DS, 2020”<sup>43</sup>

### Vai trò của HMG-CoA reductase

HMG CoA reductase, enzyme xúc tác quá trình chuyển hóa HMG-CoA thành mevalonate, một bước trọng quá trình sinh tổng hợp không chỉ cholesterol mà còn cả isoprenoid cần thiết cho chức năng bình thường của tế bào. HMG-CoA reductase chủ yếu nằm ở màng lưới nội chất trơn, hệ thống golgi và màng sinh chất, sử dụng NADPH dạng khử làm đồng yếu tố và có khả năng xúc tác phản ứng khử HMG-CoA thành acid mevalonic. Enzyme HMG-CoA reductase gồm hai phần: (1) phần thân dầu ở bề mặt màng và phần xuyên màng; (2) phần thân nước nằm trong dịch bào tương. Đoạn protein bề mặt và xuyên màng cần thiết cho sự nhận diện, nhạy cảm và gắn với các cấu trúc sterol. Trung tâm hoạt động của HMG-CoA reductase là nhóm carboxyl vị trí tận cùng trong phần thân nước (Hình 1.3). Thông thường trong các tế bào động vật có vú, HMG-CoA reductase bị ức chế bởi cholesterol có nguồn gốc ngoại sinh và sản phẩm thoái hoá LDL-C thông qua LDL-R. Các chất ức chế cạnh tranh HMG-CoA reductase (điển hình như nhóm statin) làm giảm tổng hợp

cholesterol trong gan, tăng LDL-R trên màng tế bào gan, làm tăng hấp thu LDL-C vào gan. Vì vậy, làm giảm nồng độ cholesterol máu.<sup>44</sup>



**Hình 1.3. Cấu trúc HMG-CoA reductase**

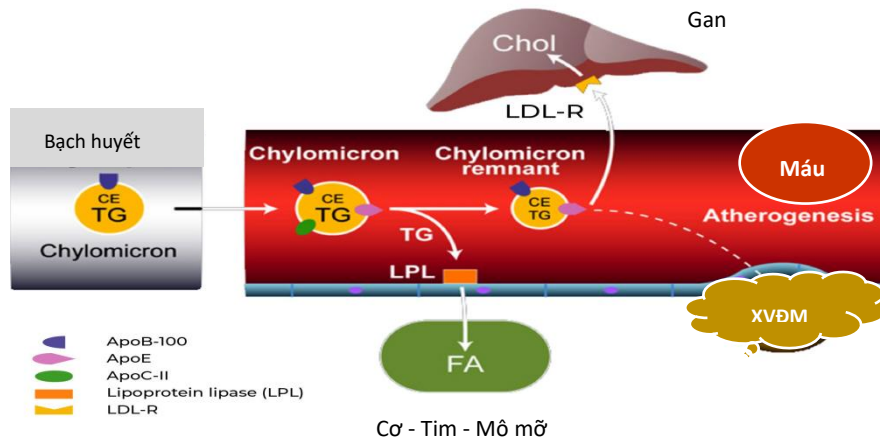
“Nguồn: Jo Y, 2010”<sup>44</sup>

#### 1.1.1.3. Chuyển hóa lipid máu

Ở người bình thường, quá trình tổng hợp và chuyển hoá lipid diễn ra cân bằng nhau, phụ thuộc vào nhu cầu của cơ thể. Vì vậy, duy trì được sự ổn định về nồng độ các thành phần lipid máu. Khi có sự bất thường, rối loạn chuyển hoá lipid sẽ xảy ra. Sự chuyển hoá lipid trong cơ thể được diễn ra theo hai con đường ngoại sinh và nội sinh.<sup>42,45,46</sup>

##### **Chuyển hóa lipid máu ngoại sinh**

Con đường chuyển hóa lipid máu ngoại sinh liên quan chủ yếu đến lipid có nguồn gốc từ thức ăn. Hơn 95% lipid trong thức ăn là TG, còn lại là PL, FA và cholesterol. Tại dạ dày - tá tràng, TG được thủy phân thành monoglycerid và FA bởi enzyme lipase tụy. Tại niêm mạc ruột non, monoglycerid và FA được hấp thu trong các hạt micelle. Sau khi hấp thụ vào tế bào ruột, tại hệ thống golgi, TG được tái tạo và cùng CE tạo thành phần lõi của CM. CM theo hệ tuần hoàn vận chuyển đến mô mỡ và cơ. Tại các mô, dưới tác dụng của enzyme LPL, TG bị thủy phân thành monoglycerid và FA, được các mô dự trữ hay sử dụng làm nguồn cung cấp năng lượng (Hình 1.4). Quá trình này xảy ra liên tục làm cho các CM bị mất dần TG tạo thành các CM tàn dư giàu cholesterol. CM tàn dư được bắt giữ tại tế bào gan nhờ những thụ thể đặc hiệu. Tại gan, cholesterol trong CM tàn dư cũng được chuyển hóa thành acid mật, một phần cholesterol cùng TG tham gia vào quá trình tạo VLDL.

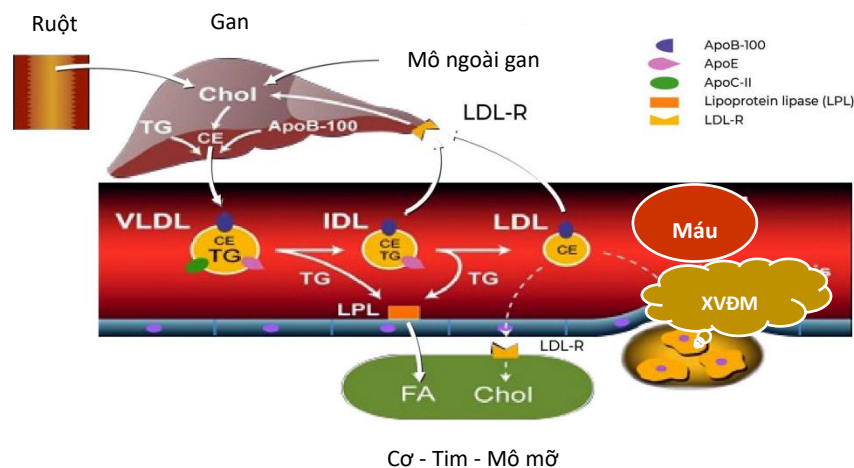


### Hình 1.4. Chuyển hóa lipid máu ngoại sinh

“Nguồn: Feingold KR, 2021”<sup>42</sup>

## Chuyển hóa lipid máu nội sinh

Con đường chuyển hóa lipid máu nội sinh liên quan đến lipid có nguồn gốc từ gan (Hình 1.5). VLDL giàu TG chứa apoprotein là apo-B100, apo-E và apo-C được tổng hợp ở gan (90%) và một phần ở ruột (10%) vào máu đến các mô ngoại vi. Tại đây, TG bị tách ra do tác dụng của LPL, đồng thời apo-C cũng được chuyển để tạo thành HDL, VLDL chỉ còn lại apo-B100 và apo-E, do đó kích thước bị giảm dần. Việc loại bỏ dần TG khỏi VLDL dẫn đến sự hình thành IDL. IDL tiếp tục được chuyển hóa để tạo thành LDL. LDL chủ yếu chứa CE và Apo B-100, chức năng chính LDL là vận chuyển cholesterol được tổng hợp ở gan đến các mô ngoại vi. Như vậy, LDL là sản phẩm của quá trình chuyển hóa VLDL và được hấp thụ chủ yếu ở gan thông qua LDL-R.



### Hình 1.5. Chuyển hóa lipid máu nội sinh

“*Nguồn: Feingold KR, 2021*”<sup>42</sup>

### 1.1.2. Rối loạn lipid máu

#### 1.1.2.1. Khái niệm rối loạn lipid máu

RLLM là tình trạng rối loạn chuyển hóa lipid - lipoprotein dẫn đến sự thay đổi bất thường (tăng hoặc giảm) về nồng độ của các thành phần lipid - lipoprotein trong máu (tăng TC, giảm HDL-C, tăng LDL-C và tăng TG ...) và thường được phát hiện cùng lúc với một số bệnh lý thuộc nhóm bệnh tim mạch - nội tiết - chuyển hóa, đồng thời cũng là yếu tố nguy cơ của nhóm bệnh lý này.<sup>4,9</sup>

#### 1.1.2.2. Nguyên nhân gây rối loạn lipid máu

Nguyên nhân gây RLLM thường là sự kết hợp của nhiều yếu tố: Sự lão hóa của cơ thể tăng dần theo thời gian, chế độ ăn nhiều chất béo, khiếm khuyết gen, bệnh nội tiết - chuyển hóa, thường được chia thành 2 nhóm nguyên phát và thứ phát.<sup>9,46</sup>

- *Nhóm nguyên phát*: Thường liên quan đến những rối loạn về di truyền, thiếu hụt LPL, giảm LDL-R ở màng tế bào hoặc khi apo-E sản xuất bất thường dẫn đến tăng tổng hợp hay giảm thanh thải các thành phần của lipoprotein. Đây là nguyên nhân hàng đầu gây RLLM ở trẻ em và bệnh xảy ra có tính chất gia đình.

- *Nhóm thứ phát*: Thường liên quan đến bệnh lý đái tháo đường, suy tuyến yên, suy giáp, cường cortisol, gan nhiễm mỡ không do rượu, hội chứng thận hư ... Ngoài ra, còn là hậu quả của chế độ ăn nhiều mỡ bão hòa, uống nhiều rượu, một số loại thuốc ảnh hưởng đến chuyển hóa lipid máu như các thuốc hạ áp (thuốc lợi tiểu, thuốc chẹn beta), estrogen.

#### 1.1.2.3. Triệu chứng lâm sàng rối loạn lipid máu

RLLM là bệnh lý sinh học, xảy ra sau một thời gian dài mà không thể nhận biết được, vì thường không có triệu chứng lâm sàng đặc hiệu. Phần lớn triệu chứng lâm sàng của RLLM chỉ được phát hiện khi nồng độ các thành phần lipid máu tăng cao kéo dài hoặc gây ra các biến chứng ở các cơ quan như XVĐM, nhồi máu cơ tim, tai biến mạch máu não, viêm tụy cấp, ban vàng ở mi mắt, u vàng ở khuỷu tay - đầu gối. RLLM thường được phát hiện muộn trong nhiều bệnh lý khác nhau của nhóm bệnh tim mạch - nội tiết - chuyển hóa.<sup>4,9</sup>

#### 1.1.2.4. Cận lâm sàng rối loạn lipid máu.

Bộ xét nghiệm lipid máu thường quy bao gồm TC, HDL, LDL và TG. Mẫu máu xét nghiệm cần được thực hiện sau 10 giờ nhịn đói.<sup>1,2,4,9</sup>

#### 1.1.2.5. Chẩn đoán rối loạn lipid máu

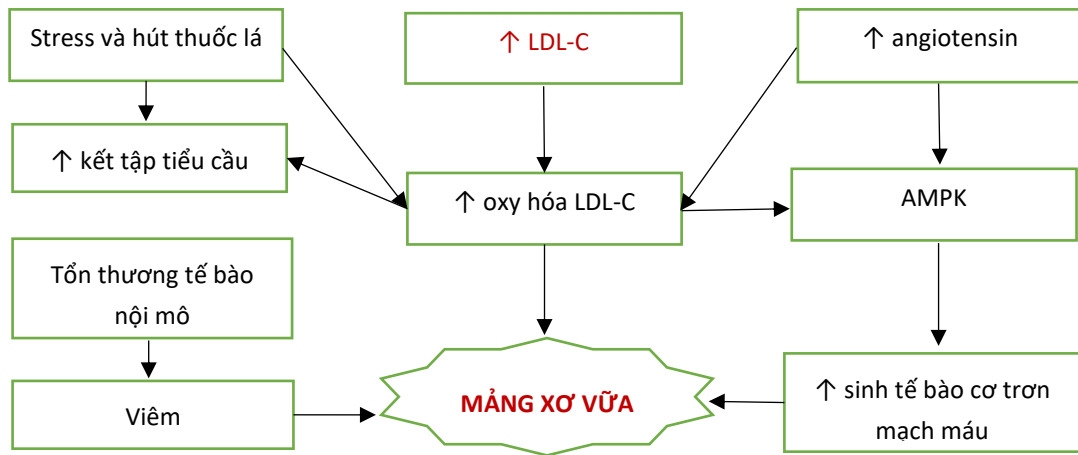
RLLM thường không có triệu chứng lâm sàng, nhưng có thể được phát hiện bằng xét nghiệm đo nồng độ các thành phần lipid máu. Chẩn đoán xác định khi có một trong các tiêu chuẩn cận lâm sàng sau<sup>4</sup>:

- TC: Trên 200 mg/dL
- HDL-C: Dưới 40 mg/dL đối với nam và dưới 50 mg/dL đối với nữ
- LDL-C: Trên 100 mg/dL
- TG: Trên 150 mg/dL

#### 1.1.2.6. Rối loạn lipid máu và xơ vữa động mạch

RLLM là một trong những yếu tố khởi đầu cho tiến trình hình thành và phát triển XVĐM. XVĐM là một bệnh hệ thống, gây tổn thương các động mạch ở nhiều cơ quan khác nhau. Không giống như tăng huyết áp và đái tháo đường, XVĐM âm thầm tiến triển mà không có dấu hiệu nhận biết cụ thể trên lâm sàng cho đến khi bệnh nhân bắt đầu xuất hiện các triệu chứng do thiếu máu nuôi.<sup>47</sup>

Cơ chế hình thành mảng xơ vữa khởi đầu là do rối loạn chức năng của lớp nội mô mạch máu. LDL trong máu xâm nhập vào thành mạch qua lớp nội mô bị tổn thương hoặc rối loạn chức năng. LDL bị oxy hoá nhẹ bởi tế bào nội mô kích hoạt sự biểu thị các glycoprotein bám dính trên tế bào nội mô, qua đó thu hút bạch cầu đơn nhân. Sau khi đi vào thành mạch, bạch cầu đơn nhân biến thành đại thực bào. Chúng chuyển LDL oxy hoá nhẹ thành LDL oxy hoá nhiều, gắn vào các thụ thể của đại thực bào và di chuyển vào đại thực bào, biến tế bào này thành tế bào bọt. Các đại thực bào hay tế bào bọt sau khi bão hòa lipid có thể phóng thích một lượng lớn các sản phẩm bao gồm cholesterol. Các sản phẩm này có thể gây tổn thương thêm lớp nội mô và tham gia vào tiến trình sinh XVĐM. Ngoài ra, LDL oxy hoá còn ức chế tế bào nội mô tổng hợp nitric oxide (NO) làm giảm các chức năng của tế bào nội mô điều hoà trương lực thành mạch, chống kết tập tiểu cầu, cân bằng đông và chống đông máu. Mảng xơ vữa ngày càng dày lên, chiếm thể tích ngày càng nhiều trong lòng động mạch, có thể làm hẹp lòng động mạch và suy yếu thành mạch hạn chế lưu thông máu, rạn vỡ mảng xơ vữa dẫn đến hình thành huyết khối và cuối cùng gây tắc nghẽn động mạch (Hình 1.6). Những biểu hiện chính của huyết khối do XVĐM: Bệnh mạch vành, bệnh mạch máu não, bệnh động mạch ngoại vi.<sup>47,48</sup>



**Hình 1.6. Các yếu tố hình thành XVDM**

“Nguồn: Singh RB, 2002”<sup>48</sup>

#### 1.1.2.7. Hướng dẫn điều trị rối loạn lipid máu

RLLM là một bệnh lý cần được điều trị liên tục và lâu dài với mục đích làm giảm tối đa các biến cố tim mạch.

Hướng dẫn của ESC/EAS,<sup>1</sup> ACC/AHA<sup>2</sup>: (1) tối đa hóa việc sử dụng liệu pháp statin với hiệu lực phù hợp cho từng mức độ nguy cơ (Bảng 1.1); (2) xác định LDL-C là mục tiêu điều trị đầu tiên; (3) bằng các liệu pháp thuốc và thay đổi lối sống làm giảm nồng độ LDL-C càng thấp càng tốt. Cả hai hướng dẫn đồng thuận về việc giảm 50% LDL-C cũng như xác định giá trị chính xác của LDL-C để tích cực hơn trong thực hành lâm sàng. Hướng dẫn của Hội tim mạch học Quốc gia Việt Nam<sup>3</sup>: (1) xác định mức mục tiêu LDL-C tùy theo phân tầng nguy cơ của bệnh nhân; (2) chọn loại statin với liều thích hợp để đạt được mức LDL-C mục tiêu; (3) thực hiện các biện pháp thay đổi lối sống và chọn lựa các thực phẩm có ảnh hưởng tốt đến LDL-C. Hướng dẫn cũng đưa ra kết luận 4 nhóm đối tượng được hưởng lợi từ liệu pháp statin: (1) BTMXV; (2) bệnh nhân có LDL- C  $\geq 190$  mg/dL; (3) bệnh nhân từ 40 - 75 tuổi có đái tháo đường và LDL- C từ 70 - 189 mg/dL; (4) bệnh nhân có LDL- C từ 70 - 189 mg/dL và nguy cơ mắc bệnh tim mạch gây tử vong trong 10 năm  $\geq 10\%$  theo thang điểm SCORE (Systematic coronary risk evaluation).

#### 1.1.2.8. Điều trị rối loạn lipid máu

Điều trị RLLM bao gồm 2 phương pháp chính: Thay đổi lối sống và sử dụng thuốc. Thay đổi lối sống là chỉ định đầu tiên, là phương pháp nền cơ bản trong suốt

quá trình điều trị. Có sự biến thiên đáng kể trong điều trị RLLM bằng cách thay đổi lối sống và sử dụng thuốc.<sup>1-4</sup>

### **Thay đổi lối sống**

Tiết chế, hoạt động thể lực và kiểm soát cân nặng là chỉ định cơ bản đầu tiên trong điều trị RLLM và được áp dụng tiếp tục trên những bệnh nhân dùng thuốc.<sup>1-4</sup>

### **Điều trị bằng thuốc**

Thuốc hạ lipid máu được sử dụng kết hợp khi phương pháp thay đổi lối sống không đạt mục tiêu hoặc trên những nhóm bệnh nhân có chỉ định dùng thuốc ngay từ đầu theo hướng dẫn.<sup>1-4</sup>

#### **- Thuốc nhóm statin**

Statin là nhóm thuốc hạ lipid máu duy nhất được khuyến cáo chỉ định phòng ngừa tiên phát và thứ phát các biến cố tim mạch do XVĐM. Hiện có 7 chất ức chế HMG-CoA reductase (statin) được chấp thuận ở Hoa Kỳ để giảm mức cholesterol máu. Trong đó, 3 statin có nguồn gốc từ nấm (lovastatin, simvastatin và pravastatin) và 4 statin được tổng hợp (atorvastatin, rosuvastatin, fluvastatin và pitavastatin).<sup>49</sup>

Do cấu trúc phân tử statin tương tự HMG-CoA, vì thế statin tác động theo hướng ức chế cạnh tranh với HMG-CoA, làm giảm đáng kể hoạt tính HMG-CoA reductase, do đó, làm giảm tổng hợp cholesterol ở gan. Sự giảm tổng hợp cholesterol ở gan, làm giảm cholesterol trong lưới nội chất dẫn đến sự di chuyển của các protein liên kết yếu tố điều hòa sterol (Sterol regulatory element binding protein - SREBP) từ lưới nội chất đến hệ thống golgi. Tại hệ thống golgi, SREBP bị phân cắt bởi protease thành các yếu tố phiên mã hoạt động. Sau đó, các SREBP sẽ chuyển vị trí vào nhân làm tăng sự biểu hiện của một số gen bao gồm HMG-CoA reductase và quan trọng nhất là LDL-R. Sự gia tăng HMG-CoA reductase sẽ khôi phục sự tổng hợp cholesterol ở gan về bình thường. Trong khi sự gia tăng biểu hiện LDL-R dẫn đến sự gia tăng số lượng LDL-R trên màng tế bào gan, làm tăng thanh thải apo-B và apo-E chứa lipoprotein (LDL và VLDL). Việc tăng thanh thải LDL, VLDL là nguyên nhân chính làm giảm LDL-C và TG máu. Đáp ứng điều trị thuốc nhóm statin từ 1 - 2 tuần, đạt tối đa sau 4 - 6 tuần và duy trì trong suốt quá trình điều trị. Thuốc có tác dụng làm giảm LDL-C 20 - 60%, giảm TG 10 - 33% và tăng HDL-C 5 - 10%. Ngoài ra, nhiều nghiên cứu đã minh chứng nhóm statin còn có những tác dụng tích cực khác:

Cải thiện chức năng lớp nội mạc, kháng viêm, chống huyết khối và ổn định mảng xơ vữa, gọi chung là tác dụng đa hướng. Tuy nhiên, sự khác biệt về những tác dụng này giữa các thuốc và sự liên quan về mặt lâm sàng vẫn còn chưa chắc chắn.

Tác dụng phụ statin: Đau cơ, có thể chuyển thành bệnh cơ tăng CK, nếu không điều trị dẫn đến viêm cơ/ly giải cơ vân. Đau đầu, đau bụng, buồn nôn, táo bón, tiêu chảy, nổi mẩn đỏ (thường gặp nhất), tăng các thông số chức năng gan (AST, ALT, phosphatase kiềm, bilirubine toàn phần).

**Bảng 1.1. Phân loại statin theo mức hiệu lực của ESC/EAS**

| <b>Hiệu lực cao<br/>(hạ LDL-C &gt; 50%)</b> | <b>Hiệu lực trung bình<br/>(hạ LDL-C 30 - 49%)</b> | <b>Hiệu lực thấp<br/>(hạ LDL-C &lt; 30%)</b> |
|---------------------------------------------|----------------------------------------------------|----------------------------------------------|
| Atorvastatin (40) - 80 mg                   | Atorvastatin 10 (20) mg                            | <i>Simvastatin 10 mg</i>                     |
| Rosuvastatin 20 - (40) mg                   | Rosuvastatin (5) 10 mg                             | Pravastatin 10 - 20 mg                       |
|                                             | Simvastatin 20 - 40 mg                             | Lovastatin 20 mg                             |
|                                             | Pravastatin 40 - (80) mg                           | <i>Fluvastatin 20 - 40 mg</i>                |
|                                             | Lovastatin 40 mg                                   | <i>Pitavastatin 1 mg</i>                     |
|                                             | Fluvastatin XL 80 mg                               |                                              |
|                                             | <i>Fluvastatin 40 mg</i>                           |                                              |
|                                             | <i>Pitavastatin 2 - 4 mg</i>                       |                                              |

“Nguồn: Mach F, 2019”<sup>1</sup>

Thuốc, liều dùng in nghiêng được Cục quản lý thuốc và Dược phẩm Hoa Kỳ cho phép nhưng chưa được kiểm chứng trong các nghiên cứu thử nghiệm lâm sàng ngẫu nhiên.

*- Thuốc nhóm fibrat*

Fibrat có chức năng chính như là chất gắn kết với PPAR- $\alpha$ , làm tăng LPL, apo-AI, apo-AII và giảm apo-CIII. Tác dụng chính là tăng oxy hoá FA ở gan và cơ trơn. Fibrat làm tăng phân giải TG thông qua LPL và giảm phân giải lipid trong các mô mỡ. Tác dụng làm giảm TG, LDL-C và tăng HDL-C máu, chống kết tập tiểu cầu, giảm fibrinogen. Ngoài ra, còn có những tác động trực tiếp trên mạch máu có thể ảnh hưởng đến quá trình sinh XVĐM.

Tác dụng phụ: Đau bụng, buồn nôn, tiêu chảy (2 - 5%), nổi mẩn đỏ, tăng men gan,

yếu cơ, sỏi mật. Không nên dùng fenofibrat nếu GFR < 30 mL/phút/1,73 m<sup>2</sup> da. Không nên kết hợp gemfibrozil với statin vì tăng nguy cơ hủy cơ vân.

Có 2 nhóm chính: Fenofibrat giảm TG 41 - 53%, LDL-C 6 - 20% và tăng HDL-C 5 - 20%; Gemfibrozil giảm TG 35 - 50%, LDL-C 10 - 15% và tăng HDL-C 5 - 20%. Fibrat có thể kết hợp với statin khi dùng statin không đáp ứng. Thận trọng khi kết hợp fibrat và statin cùng lúc với thuốc chuyển hóa qua cytochrome P450.

*- Thuốc nhóm các chất resin kết hợp acid mật*

Resin kết hợp với acid mật tạo thành phức hợp không hoà tan do đó ngăn sự tái hấp thu các acid mật vào chu trình gan - ruột. Khi acid mật bị các resin hấp thu, tế bào gan sẽ tăng sinh tổng hợp các acid mật từ cholesterol. Lượng cholesterol trong gan giảm, làm gia tăng LDL-R màng tế bào gan, làm tăng hấp thu LDL-C vào gan.

Tác dụng giảm LDL-C 15 - 30%, tăng TG và tăng nhẹ HDL-C. Resin là thuốc được lựa chọn điều trị bệnh nhân tăng cholesterol máu có tính chất gia đình dị hợp tử, bệnh nhân không đạt được mục tiêu LDL-C khi đã dùng liều statin tối đa dung nạp được (kết hợp cùng với statin) hoặc bệnh nhân không dung nạp với statin. Không dùng các chất resin kết hợp acid mật khi TG ≥ 300 mg/dL.

*- Thuốc nhóm acid nicotinic*

Tác dụng ức chế sự ly giải mỡ ở mô mỡ, giảm ester hoá TG tại gan, tăng hoạt tính LPL. Được chỉ định khi đã dùng statin liều tối đa mà không đạt được mục tiêu LDL-C (kết hợp cùng với statin), bệnh nhân không dung nạp với statin. Tác dụng giảm LDL-C 10 - 25%, TG 25 - 30%, tăng HDL-C 15 - 35%.

Tác dụng phụ: Rối loạn tiêu hoá, tổn thương gan đã được ghi nhận. Acid nicotinic không nên sử dụng khi tăng ALT > 2 lần, tăng đường huyết chưa kiểm soát.

*- Thuốc nhóm ức chế hấp thu cholesterol*

Ezetimibe là thuốc đầu tiên của nhóm này. Ezetimibe có tác dụng ức chế sự hấp thu cholesterol trong thức ăn và mật qua ức chế NPC1L1 trong các tế bào biểu mô ruột. Ezetimibe gắn kết với NPC1L1 sẽ giảm hấp thu cholesterol ở ruột, do đó, lượng cholesterol từ ruột đến gan giảm. NPC1L1 còn được biểu hiện ở gan, ức chế NPC1L1 làm giảm hấp thu cholesterol ở gan. Nồng độ cholesterol ở gan giảm làm tăng LDL-R ở màng tế bào gan. Ezetimibe không ảnh hưởng đến sự hấp thu TG, FA, acid mật và các vitamin A, D, K. Ezetimibe kết hợp với statin khi đã dùng liều statin

tối đa dung nạp được mà không đạt mục tiêu LDL-C hoặc bệnh nhân không dung nạp với statin. Không cần chỉnh liều trên bệnh nhân suy thận, suy gan nhẹ hoặc lớn tuổi. Tác dụng giảm LDL-C 15 - 22%, không thay đổi TG, HDL-C.

- *Thuốc nhóm ức chế proprotein convertase subtilisin- kexin type 9 (PCSK9)*

Alirocumab và evolocumab là những kháng thể đơn dòng nhân bản có tác dụng ức chế PCSK9 làm tăng LDL-R ở bề mặt tế bào gan, do đó, làm giảm LDL-C máu. Cơ chế tác dụng này một phần giống nhóm thuốc statin (làm tăng LDL-R). Con đường thanh thải chính LDL-C trong máu là thông qua LDL-R ở màng tế bào gan. Các kháng thể đơn dòng PCSK9 liên kết với PCSK9, ngăn PCSK9 tương tác với LDL-R và làm thoái hóa LDL-R. Giảm thoái hóa LDL-R, làm tăng LDL-R ở màng tế bào gan, làm tăng thanh thải LDL-C, làm giảm LDL-C máu. Tác dụng giảm LDL-C 50 - 70% độc lập với điều trị nền (statin, ezetimibe).

- *Kết hợp thuốc:* Bệnh nhân RLLM đặc biệt có bệnh lý tim mạch, đái tháo đường hoặc nguy cơ cao không triệu chứng có thể không đạt được mục tiêu với đơn trị liệu, do đó cần kết hợp thuốc.

Hiện kết hợp duy nhất được chứng minh lợi ích lâm sàng là statin với ezetimibe. Niacin kết hợp statin làm tăng HDL-C, giảm TG tốt hơn so với khi dùng riêng lẻ. Fenofibrat kết hợp statin làm tăng HDL-C, giảm LDL-C và TG.<sup>1,2</sup>

## **1.2. Lý luận Y học cổ truyền về rối loạn lipid máu**

RLLM là danh từ bệnh học YHHĐ và không có từ đồng nghĩa trong bệnh học YHCT. Nhưng từ nguyên nhân gây bệnh, triệu chứng lâm sàng và phương pháp điều trị nhận thấy có nhiều điểm tương đồng với chứng đàm thấp theo lý luận YHCT.<sup>5,50</sup>

### **1.2.1. Khái niệm đàm thấp.**

Đàm thấp là sản phẩm bệnh lý, đàm là chất đặc và thấp là chất loãng. Đàm thấp do tân dịch ngưng tụ biến hóa thành.<sup>50,51,52</sup> Tân dịch là tất cả các chất dịch bình thường trong cơ thể. Tân là chất trong, dịch là chất đục. Tân dịch là một trong những cơ sở vật chất cho sự sống, do dinh dưỡng của đồ ăn, thức uống hóa ra, nhờ sự khí hóa của tam tiêu đi khắp toàn thân, nuôi dưỡng tạng phủ, kinh mạch, cơ nhục và bì phu. Do lục dâm, thất tình làm chức năng của các tạng tỳ, thận, phế, can bị ảnh hưởng, tân dịch không phân bố và vận hành được ngưng tụ thành thấp, thấp hóa thành đàm.

Đàn sau khi hình thành theo khí phân bố khắp nơi trong cơ thể làm ảnh hưởng đến sự vận hành của khí huyết, sự thăng giáng của khí mà gây ra các chứng bệnh ở các bộ phận của cơ thể. Đàn có thể được chia thành hai loại: (1) đàn hữu hình hay ngoại đàn là để chỉ sản phẩm được sinh ra ở phế, thận và được bài tiết ra ngoài cơ thể; (2) đàn vô hình hay nội đàn là để chỉ đàn do chức năng tạng phủ rối loạn hoặc hư suy sinh ra, khó quan sát được, chỉ có thể nhận biết được thông qua biểu hiện triệu chứng lâm sàng.

#### 1.2.2. Chức năng của các tạng liên quan đến sự hình thành đàn thấp

Nguồn gốc sinh ra đàn thấp là do sự vận hóa bất thường của tân dịch, do tân dịch ngưng tụ và biến hóa thành. Bình thường sự vận hóa tân dịch trong cơ thể được điều hòa bởi các tạng tỳ, thận, phế, can. Vì vậy, đàn thấp có liên quan đến chức năng của các tạng này.<sup>50</sup>

- *Tạng tỳ*: Tỳ chủ vận hóa, dưới tác dụng vận hóa của tỳ, thủy dịch được chuyển hóa thành tân dịch, đưa lên phế và phân bố khắp nơi trong cơ thể nuôi dưỡng tạng phủ, kinh mạch, cơ nhục và bì phu. Phần tân dịch dư thừa sau khi các cơ quan sử dụng được tỳ đưa lên phế, sau đó xuống thận, thông qua tác dụng khí hóa của phế và thận tạo thành mồ hôi, nước tiểu và được bài tiết ra ngoài. Khi chức năng vận hóa của tỳ bị rối loạn, thủy dịch không thể chuyển hóa hết thành tân dịch, phần còn lại tích tụ trong cơ thể tạo thành đàn thấp.

- *Tạng thận*: Thận chủ thủy, chức năng chủ trì và điều tiết tân dịch trong cơ thể. Thận dương có chức năng thúc đẩy quá trình phân bố và bài tiết tân dịch. Ngược lại, thận âm có chức năng kìm hãm quá trình này. Thận dương có chức năng khí hóa, ôn ấm tỳ dương, làm cho chức năng vận hóa của tỳ dương được diễn ra bình thường, thủy dịch được phân bố khắp nơi trong cơ thể. Thận dương hư khiến cho tỳ dương không được ôn ấm, chức năng vận hóa bị rối loạn, làm cho sự vận hành thủy dịch trong cơ thể không được thông lợi, thủy dịch ứ trệ trong cơ thể tạo thành đàn thấp.

- *Tạng phế*: Phế chủ tuyên phát, túc giáng, thông điều thủy đạo làm cho sự vận hành của thủy dịch trong cơ thể thông suốt, thủy dịch vận hành linh hoạt trong cơ thể. Khi chức năng của phế bị rối loạn, tân dịch tích tụ lại tạo thành đàn thấp.

- *Tạng can*: Can chủ sơ tiết, có tác dụng duy trì khí cơ toàn thân thông suốt, thúc đẩy huyết và tân dịch vận hành. Chức năng này có liên quan mật thiết đến sự vận hóa của

tỳ. Khi chức năng sơ tiết của can bị rối loạn làm ảnh hưởng đến chức năng vận hóa của tỳ, khiến cho thủy thấp không được vận hành, tích tụ lại tạo thành đàm thấp.

### 1.2.3. Nguyên nhân và cơ chế bệnh sinh chứng đàm thấp

Tiên thiên bất túc, ẩm thực thất điều, thất tình, ngũ tổn, bệnh lâu ngày đây là những nguyên nhân chính làm cho chức năng của các tạng phủ rối loạn, hư suy sinh ra đàm thấp.<sup>5,50</sup>

- *Tiên thiên bất túc*: Thận dương hư không ôn ấm được tỳ dương, tỳ không vận hóa được thủy thấp, sinh đàm thấp.

- *Ẩm thực thất điều*: Ăn uống không điều độ, ăn uống quá nhiều đồ béo ngọt, uống nhiều rượu làm tổn thương tỳ, tỳ hư không vận hóa được thủy thấp, thủy thấp tích tụ lại lâu ngày sinh đàm thấp.

- *Thất tình (yếu tố tinh thần)*: Lo nghĩ nhiều hại tỳ, giận dữ quá hại can, can mộc vượng khắc tỳ thổ làm tỳ thổ suy yếu dẫn đến chức năng vận hóa bị suy giảm, thủy thấp tích tụ sinh đàm thấp.

- *Ngũ tổn*: Thói quen sinh hoạt ít vận động kéo dài (nằm nhiều hại khí, ngồi nhiều hại cơ nhục). Khí và cơ nhục đều được nuôi dưỡng bởi tạng tỳ, tỳ khí hư chức năng vận hóa bị suy giảm sinh đàm thấp.

- *Bệnh lâu ngày, tích tuổi*: Thể chất suy yếu, chức năng tạng phủ thường bị suy giảm, dẫn đến chức năng vận hóa bị suy giảm, thủy thấp ứ trệ sinh đàm thấp.

Đàm thấp sau khi hình thành theo khí phân bố đến khắp nơi trong cơ thể: Ngoài thì ra cơ nhục, bì phu; Trong đến tạng phủ làm cho kinh lạc bế tắc, huyết mạch không thông, mạch lạc ứ trệ làm ảnh hưởng đến sự vận hành khí huyết sẽ gây ra khí trệ huyết ứ. Đàm thấp có đặc điểm: Nặng, đục, dính, trở, vì vậy, thường gây thể bệnh giãng co, tình trạng bệnh kéo dài.

### 1.2.4. Điều trị chứng đàm thấp bằng YHCT

#### 1.2.4.1. Nguyên tắc điều trị

Theo quan niệm Y gia: Thầy thuốc bảo: “Trăm bệnh đều do đờm sinh ra, cho nên chữa bệnh thì quá bán là chữa đờm”. Trương Cảnh Nhạc thì nói: “Đờm vốn không sinh ra bệnh, mà vì bệnh mới sinh ra đờm” và “Nếu chỉ biết chữa đờm mà không biết đờm do đâu mà sinh ra thì kết quả đờm lại càng nhiều”. Theo Hải Thượng Lãn Ông: “Chữa đờm trước phải điều hòa khí, khí thuận đờm tự tiêu”. Chữa đàm không có phép

bồ, không có phép công mà chỉ vỗ về khéo léo mà thôi, vì đàm có sẵn từ lúc mới sinh ra và là vật chất để nuôi sống cơ thể. Khi chữa bệnh không nên vét sạch đàm mà chỉ loại bỏ những phần đàm dư thừa mà thôi.<sup>52</sup>

#### 1.2.4.2. Điều trị chứng đàm thấp bằng thuốc YHCT

Đàm thấp là một chứng bệnh có đặc điểm là “Bản hư tiêu thực”: “Tiêu” là đàm thấp, huyết ú; “Bản” là công năng tạng phủ thất điều hoặc hư tổn trong đó liên quan đặc biệt đến tỳ, can, thận. Vì vậy, khi điều trị cần chú ý phân biệt các biểu hiện thực hư của bệnh và theo nguyên tắc: Cấp trị tiêu, hoãn trị bản hoặc tiêu bản đồng trị. Trị tiêu phải chú ý hóa đàm trừ thấp, hoạt huyết hoá ú; Trị bản phải chú ý kiện tỳ, bổ can thận.<sup>5,50,51</sup> Chứng đàm thấp thường gặp trong các thể lâm sàng sau:

##### - *Thể tỳ hư đàm thấp*

Triệu chứng: Thể tạng béo, người nặng nề, đầu căng nặng, ngực tức nặng, tay chân tê mỏi. Có thể kèm theo tâm quý, mất ngủ, miệng nhạt, ăn kém. Chết lưỡi bệu, rêu lưỡi ướt. Mạch huyền hoạt.

Phép trị: Kiện tỳ, hóa đàm, trừ thấp.

Bài thuốc cổ phương: Bán hạ bạch truật thiên ma thang.

##### - *Thể tỳ thận dương hư*

Triệu chứng: Người cảm giác nặng nề, bụng đầy chướng, người lạnh, chân tay lạnh, sợ lạnh, sắc mặt nhợt, lưng gối đau mỏi, đại tiện nát, tiểu trong dài. Rêu lưỡi trắng dày, nhớt, lưỡi bệu có vết hằn răng. Mạch trầm nhược.

Phép trị: Ôn bổ tỳ thận.

Bài thuốc cổ phương: Hữu quy hoàn.

##### - *Thể can thận âm hư*

Triệu chứng: Đầu váng, chóng mặt, ù tai, mất ngủ, hay quên, lưng gối đau mỏi, tóc bạc, răng rụng, miệng khô, tiểu đêm. Rêu lưỡi vàng dày. Mạch tế sắc.

Phép trị: Tư bổ can thận.

Bài thuốc cổ phương: Kỳ cúc địa hoàng thang.

##### - *Thể can uất tỳ hư*

Triệu chứng: Đau hai bên mạng sườn từng cơn, đau đầu, chóng mặt, người mệt mỏi, tính khí thất thường, hay thở dài, ăn uống kém, đại tiện lỏng. Chết lưỡi bệu, rêu lưỡi trắng mỏng, nhớt. Mạch huyền.

Phép trị: Sơ can giải uất.

Bài thuốc cổ phương: Tiêu dao tán.

- *Thể thấp nhiệt nội kết*

Triệu chứng: Đau nặng đầu, chóng mặt, cảm giác tức ngực, phiền nhiệt, người mệt mỏi, tay chân nặng nề, đầy bụng, buồn nôn, miệng khô đắng, đại tiện phân nát, nước tiểu vàng. Chất lưỡi đỏ, rêu lưỡi vàng nhớt. Mạch hoạt sác.

Pháp điều trị: Thanh nhiệt lợi thấp.

Bài thuốc cổ phương: Tứ linh tán kết hợp Lục nhát tán.

- *Khí trệ huyết ứ*

Triệu chứng: Ngực sườn đầy tức, đau nhói vùng ngực, đau vùng thượng vị, tâm phiền. Chất lưỡi tím, có thể có điểm ứ huyết. Mạch huyền khẩn.

Phép trị: Hoạt huyết hóa ứ.

Bài thuốc cổ phương: Huyết phủ trục ứ thang.

Với mỗi thể lâm sàng, tùy từng tình trạng của người bệnh, có thể sử dụng bài thuốc cổ phương, bài thuốc đối chứng lập phương, bài thuốc nghiệm phương để gia giảm thành phần, liều lượng các vị thuốc cho phù hợp.

1.2.4.3. Điều trị chứng đàm thấp bằng phương pháp không dùng thuốc

- *Thể châm*

Thể châm là phương pháp châm phổ biến và được sử dụng rộng rãi trong điều trị các bệnh không dùng thuốc của YHCT. Tùy theo từng thể lâm sàng có thể chọn phương huyết và kỹ thuật châm như sau<sup>5</sup>:

Thể tỳ hư đàm thấp: Tỳ du, Túc tam lý, Tam âm giao (châm bổ). Phong long (châm tả).

Thể tỳ thận dương hư: Tỳ du, Thận du, Túc tam lý, Thái Khê, Mệnh môn, Tam âm giao (châm bổ và/hoặc cứu). Phong long (châm tả).

Thể can thận âm hư: Can du, Thận du, Thái Khê, Tam âm giao (châm bổ). Phong long (châm tả).

Thể can uất tỳ hư: Túc tam lý, Tam âm giao, Tỳ du (châm bổ). Can du, Thái xung, Phong long (châm tả).

Thể thấp nhiệt nội kết: Túc tam lý, tam âm giao, tỳ du (châm bổ). Can du, thái xung, phong long (châm tả).

Thể khí trệ huyết ứ: Túc tam lý, Tam âm giao (châm bổ). Cách du, Huyết hải, Phong long (châm tả).

Châm cả hai bên, lưu kim 20 - 30 phút/lần/ngày, liệu trình từ 15 - 20 ngày.

*- Tập luyện dưỡng sinh*

Dưỡng sinh là một phương pháp rèn luyện cơ thể một cách toàn diện.<sup>5,50</sup> Các phương pháp tập luyện dưỡng sinh bao gồm: Ăn uống đúng cách, tập thở, tự xoa bóp, vận động và nghỉ ngơi đúng cách. Mục đích là luyện tập để có một cơ thể khỏe mạnh cả về thể chất lẫn tinh thần, góp phần điều hòa lipid máu.

### **1.3. Sự tương đồng giữa chứng đàm thấp và rối loạn lipid máu**

Chứng đàm thấp trong YHCT và RLLM trong YHHĐ có nhiều điểm tương đồng từ nguyên nhân gây bệnh, cơ chế bệnh sinh và phương pháp điều trị.<sup>5,9,46,50,53</sup>

#### **1.3.1. Nguyên nhân gây bệnh**

*- Yếu tố thể chất*

Thường là do tiên thiên bất túc. Yếu tố này có thể xem như những rối loạn về di truyền, thiếu enzyme LPL, giảm LDL-R, rối loạn chức năng tuyến yên, tuyến giáp, tuyến thượng thận sẽ gây RLLM.

*- Yếu tố ẩm thực*

Ăn uống không điều độ, ăn nhiều đồ béo ngọt, uống nhiều rượu làm chức năng vận hóa của tỳ bị suy giảm, thủy thấp không vận hóa được tích tụ lại lâu ngày sinh đàm thấp. Chế độ ăn nhiều chất béo, ngọt, uống nhiều rượu cũng là nguyên nhân gây thừa cân, béo phì, RLLM.

*- Yếu tố vận động thể lực*

Ít vận động thể lực lâu ngày (nằm nhiều hại khí, ngồi nhiều hại cơ nhục) gây tỳ khí hư, chức năng vận hóa bị ảnh hưởng mà sinh đàm thấp. Ít hoạt động thể lực cũng cũng là một trong những nguyên nhân dẫn đến thừa cân, béo phì gây RLLM.

*- Yếu tố tinh thần*

Tình chí gây tổn hại tạng phủ, dẫn đến chức năng vận hóa bị suy giảm, thủy thấp ứ trệ sinh đàm thấp. Căng thẳng (stress) kéo dài làm tăng sử dụng lipid dự trữ của cơ thể nên cũng gây RLLM.

*- Bệnh lâu ngày, tích tuổi*

Bệnh lâu ngày, tuổi cao thể chất suy yếu, chức năng tạng phủ suy giảm, dẫn

đến chức năng vận hóa bị suy giảm, thủy thấp ứ trệ sinh đàm thấp. Cũng giống như một số bệnh lý mạn tính theo YHHĐ như đái tháo đường, suy giáp, bệnh thận mạn nếu không kiểm soát tốt cũng gây RLLM.

### 1.3.2. Cơ chế bệnh sinh

Chứng đàm thấp thường do lục dâm, thất tình làm cho chức năng của các tạng tỳ, phế, thận, can bị ảnh hưởng, tân dịch không được phân bố và vận hành, ngưng tụ thành thấp, thấp hóa thành đàm. Đàm thấp ứ trệ tại kinh lạc, ngăn cản khí huyết vận hành sẽ gây khí trệ huyết ứ. Theo YHHĐ, sự lão hóa của cơ thể, chế độ ăn nhiều chất béo, khiếm khuyết gen, bệnh nội tiết - chuyển hóa ... làm cho quá trình hấp thu, tổng hợp, chuyển hóa và bài tiết cholesterol bất thường sẽ gây RLLM. RLLM diễn tiến sinh XVĐM làm hẹp lòng động mạch và suy yếu thành mạch hạn chế lưu thông máu, rạn vỡ mảng xơ vữa dẫn đến hình thành huyết khối gây tắc nghẽn động mạch.

### 1.3.3. Biểu hiện lâm sàng

Đàm trong bệnh lý RLLM là đàm vô hình, sinh ra và theo khí huyết lưu hành, phân bố khắp nơi trong cơ thể. Khi gặp điều kiện thuận lợi sẽ gây bệnh cho cơ thể với các biểu hiện lâm sàng như đầu thống, huyễn vựng, tâm quý, ma mộc ... Tương tự như một số triệu chứng lâm sàng thường gặp trong BTMXV như đau đầu, chóng mặt, đau ngực, tê tay chân ...

### 1.3.4. Phương pháp điều trị

#### - Thay đổi lối sống

Các phương pháp tập thể dục dưỡng sinh, thực dưỡng theo YHCT cũng giống như hoạt động thể lực, tiết chế của YHHĐ. Hướng dẫn người bệnh tập các bài tập luyện thở, luyện hình phù hợp với thể tạng và tình hình sức khỏe của từng người bệnh. Hướng dẫn người bệnh ăn những thức ăn thanh đạm, hạn chế sử dụng chất béo, ngọt, không nên uống nhiều rượu, bia. Các phương pháp này giúp tăng cường sức khỏe, tăng tiêu hao năng lượng, giảm thừa cân, béo phì, điều hòa lipid máu.

#### - Điều trị bằng thuốc

Tại Trung Quốc, hiện có hơn 50 dược liệu, bài thuốc cổ truyền được cấp phép sử dụng để phòng và điều trị RLLM.<sup>17,54</sup> Ở Việt Nam, nhiều chế phẩm từ dược liệu, bài thuốc/công thức kết hợp có hiệu quả giảm lipid máu đã được chứng minh như trà hạ mỡ Ngưu tất,<sup>6</sup> viên Lipidan,<sup>7</sup> viên Thanh mạch an,<sup>8</sup> viên Hạ mỡ,<sup>55</sup> viên Cholestin.<sup>56</sup>

**Bảng 1.2. Sự tương đồng giữa chứng đằm thấp và rối loạn lipid máu**

| <b>RỐI LOẠN LIPID MÁU</b>                                         | <b>CHỨNG ĐẪM THẤP</b>                                                           |
|-------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------|
| <b>Nguyên nhân gây bệnh</b>                                       | <b>Nguyên nhân gây bệnh</b>                                                     |
| Di truyền, thiếu LPL, giảm LDL-R                                  | Tiên thiên bất túc                                                              |
| Ăn uống không điều độ, ăn nhiều đồ béo ngọt, uống nhiều rượu      | Ăn thực thất điều: Ăn uống không điều độ, ăn nhiều đồ béo ngọt, uống nhiều rượu |
| Ít vận động thể lực lâu ngày dẫn đến thừa cân, béo phì gây RLLM   | Ít vận động thể lực lâu ngày (nằm nhiều hại khí, ngồi nhiều hại cơ nhục)        |
| Bệnh mạn tính: Đái tháo đường, suy giáp, bệnh thận mạn; Tích tuổi | Bệnh lâu ngày, tích tuổi: Thể chất suy yếu, chức năng tạng phủ suy giảm         |
| Căng thẳng (stress) kéo dài làm rối loạn chuyển hóa lipid         | Thất tình gây tổn hại tạng phủ, chức năng vận hóa bị suy giảm                   |
| <b>Triệu chứng lâm sàng</b>                                       | <b>Triệu chứng lâm sàng</b>                                                     |
| Đau đầu                                                           | Đầu thống                                                                       |
| Chóng mặt                                                         | Huyễn vựng                                                                      |
| Đau ngực                                                          | Tâm quý                                                                         |
| Tê bì                                                             | Dị cảm                                                                          |
| <b>Điều trị</b>                                                   | <b>Điều trị</b>                                                                 |
| Thay đổi lối sống: Hoạt động thể lực, tiết chế                    | Thay đổi lối sống: Tập thể dục, dưỡng sinh, thực dưỡng                          |
| Thuốc: Hóa học tổng hợp, có thể kết hợp thuốc thảo dược           | Thuốc: Thảo dược, có thể kết hợp thuốc hóa học tổng hợp                         |

#### **1.4. Phương pháp nghiên cứu tác động của thuốc trên chuyển hóa lipid**

RLLM là bệnh chuyển hóa thường gặp trong cộng đồng và đang ngày càng gia tăng. Việc nghiên cứu, phát triển các phương pháp phòng và điều trị, trong đó thuốc là một trong những mối quan tâm đặc biệt hiện nay của Y học. Một trong những bước đầu tiên để nghiên cứu thuốc mới là cần xây dựng được các phương pháp/mô hình thử nghiệm để đánh giá tính an toàn và hiệu quả trước khi khảo sát tác dụng trên các thử nghiệm lâm sàng. Khi đánh giá tác động của một thuốc trên chuyển hóa lipid, cần áp dụng đa dạng các mô hình sẽ cho kết quả thuyết phục hơn. Việc lựa chọn các

mô hình thử nghiệm sẽ thuận lợi hơn, nếu dự đoán trước cơ chế tác dụng của thuốc nghiên cứu. Hiện nay, các mô hình truyền thống đánh giá tác động của thuốc trên chuyển hóa lipid như sử dụng chế độ ăn giàu lipid hay tiêm chất diện hoạt (tyloxapol, poloxamer-407 hoặc tween-80) vẫn đang được sử dụng rộng rãi trong các nghiên cứu. Bên cạnh đó, phương pháp đánh giá tác động của thuốc ở mức độ phân tử, tế bào, định lượng một số yếu tố có vai trò quan trọng trong điều hòa chuyển hóa lipid như HMG-CoA reductase, LPL, LDL-R, PCSK9, LXRs, ngày càng được quan tâm.<sup>57-60</sup>

#### 1.4.1. Trên động vật gây tăng lipid máu bằng chế độ ăn

Gây tăng cholesterol máu bằng cách cho mỡ và cholesterol vào thức ăn cũng có thể thực hiện ở nhiều loài động vật. Sự tăng cholesterol máu này có tính chất ngoại sinh (đưa từ bên ngoài vào). Các thuốc có tác dụng chống tăng cholesterol máu gây ra bởi chế độ ăn tác động do một hay nhiều cơ chế liên quan đến sự ức chế hấp thu cholesterol ở ruột, tăng chuyển hóa cholesterol ảnh hưởng đến sự sản sinh lipoprotein hoặc tăng nhanh thanh thải lipoprotein.<sup>57</sup> Từ những thử nghiệm ban đầu phát triển cho mô hình này, chuột cống trắng trưởng thành được gây tăng cholesterol máu bằng cách bổ sung vào thức ăn với hỗn hợp cholesterol 1%, mỡ động vật, acid cholic 1% và propylthiouracil (PTU) 0,01%.<sup>57</sup> Sau này, mô hình gây tăng lipid máu ngoại sinh được ứng dụng rộng rãi trong các phòng thí nghiệm, chủ yếu trên chuột với chế độ ăn giàu lipid (Bảng 1.3). Thông thường mô hình gây tăng lipid máu ngoại sinh chỉ phù hợp nghiên cứu sàng lọc ban đầu các thuốc có tác dụng trên sự hấp thu, chuyển hóa và bài tiết cholesterol.

**Bảng 1.3. Một số mô hình gây tăng lipid máu bằng chế độ ăn**

| Tác giả                           | Năm  | ĐVTN              | Chế độ ăn giàu lipid                                             | Thời điểm khảo sát |
|-----------------------------------|------|-------------------|------------------------------------------------------------------|--------------------|
| Cicero AF và CS <sup>28</sup>     | 2003 | Chuột cống Wistar | Lipid 25,5% (cholesterol 10%), protein 19%                       | 4 tuần             |
| Hainida E và CS <sup>61</sup>     | 2008 | Chuột cống Wistar | Cholesterol 20 mg/kg, acid cholic 2 g/kg                         | 5 tuần             |
| Ji W, Gong BQ <sup>29</sup>       | 2008 | Chuột cống Wistar | Lipid 25,5% (cholesterol 10%), protein 19%                       | 4 tuần             |
| Nassiri-Asl M và CS <sup>62</sup> | 2009 | Chuột nhắt trắng  | Cholesterol 10 g, acid cholic 10 g và PTU 3 g, pha trong dầu lạc | 4 tuần             |

|                            |      |                     |                                                                                      |         |
|----------------------------|------|---------------------|--------------------------------------------------------------------------------------|---------|
| Xia W <sup>35</sup>        | 2011 | Chuột cống          | Mỡ heo 10%                                                                           | 4 tuần  |
| Oh, SD và CS <sup>24</sup> | 2014 | Chuột Spague-Dawley | Mỡ heo 31,7 g/kg, dầu đậu nành 3,2 g/kg                                              | 6 tuần  |
| Lim C và CS <sup>25</sup>  | 2017 | Chuột nhắt trắng    | Mỡ heo 177,5 g/kg, dầu đậu nành 25 g/kg, cholesterol 12,9 g/kg, acid cholic 4,3 g/kg | 12 tuần |

#### 1.4.2. Trên động vật gây tăng lipid máu bằng chất diện hoạt

Mô hình gây tăng lipid máu bằng cách sử dụng chất diện hoạt (surface actived agent, surfactant) không ion hóa như tyloxapol, poloxamer-407 hoặc tween-80 bằng đường tiêm. Các chất này gây tăng lipid máu trên động vật thông qua các enzyme tham gia vào quá trình chuyển hóa lipid.<sup>57</sup> Sự tăng lipid máu này có tính chất nội sinh (tổng hợp trong cơ thể) có thể thực hiện được trên nhiều loài động vật. Mô hình gây tăng lipid máu nội sinh có ưu điểm là đơn giản, nhanh và chi phí thấp, phù hợp cho nghiên cứu sàng lọc ban đầu các thuốc có tác dụng trên sinh tổng hợp và thải trừ cholesterol (Bảng 1.4).

**Bảng 1.4. Một số mô hình gây tăng lipid máu bằng tyloxapol**

| Tác giả                          | Năm  | ĐVTN                  | Liều dùng/<br>đường dùng | Thời điểm khảo<br>sát sau dùng thuốc |
|----------------------------------|------|-----------------------|--------------------------|--------------------------------------|
| Frantz, Hinkeman <sup>57</sup>   | 1955 | Chuột cống Wistar     | 100 mg/kg, IP            | 18 giờ                               |
| Tamasi và CS <sup>57</sup>       | 1968 | Chuột cống đực Wistar | 200 mg/kg, IP            | 6 giờ                                |
| Zeniya M, Reuben A <sup>64</sup> | 1988 | Chuột nhắt trắng đực  | 600 mg/kg, IV            | 3, 24, 72 giờ                        |
| Chen J, Li X <sup>65</sup>       | 2007 | Chuột nhắt trắng      | 400 mg/kg, IP            | 6, 12, 24 giờ                        |
| Bertges L.C và CS <sup>66</sup>  | 2011 | Chuột cống đực Wistar | 200 mg/kg, IP            | 24 giờ, 3 ngày, 6 ngày, 9 ngày       |
| Rasouli M và CS <sup>63</sup>    | 2016 | Chuột cống Wistar     | 400 mg/kg, IV            | 1 giờ, 2 ngày, 9 ngày                |
| Ibrahim AY và CS <sup>67</sup>   | 2016 | Chuột nhắt trắng      | 200 mg/kg, IP            | 7 giờ, 24 giờ                        |

Tyloxapol làm tăng nồng độ cholesterol và TG máu trên động vật thí nghiệm. Liều tyloxapol sử dụng và thời điểm đánh giá khác nhau trong các nghiên cứu. Tyloxapol sử dụng trong mô hình gây tăng lipid máu cấp thường tiêm một liều duy nhất, gây mô hình tăng lipid máu mạn tính thường tiêm 3 ngày/tuần, trong 2 - 3 tuần.<sup>57</sup>

#### 1.4.3. Trên phân tử, tế bào

Phương pháp đánh giá tác động của thuốc ở mức độ phân tử, tế bào, định lượng một số yếu tố có vai trò quan trọng trong điều hòa chuyển hóa lipid như HMG- CoA reductase, LPL, LDL-R, PCSK9, LXR ..., giúp sàng lọc và giải thích cơ chế tác dụng của thuốc nghiên cứu (Bảng 1.5). Nghiên cứu xác định mức độ biểu hiện của HMG-CoA reductase, SREBP, LDL-R bằng cách dùng dòng tế bào hepG2.<sup>60,68-71</sup> Tế bào được nuôi cấy trong môi trường thích hợp, tìm nồng độ dùng trong nghiên cứu của thuốc thông qua thử nghiệm độc tế bào, cho tế bào phơi nhiễm với thuốc và xác định mức độ của các phân tử quan tâm bằng kỹ thuật RT-PCR và western blot. Các chỉ số này cũng có thể xác định bằng cách dùng mô gan chuột thay vì một dòng tế bào cụ thể. Đánh giá tác động của thuốc trên hoạt tính LPL bằng cách sử dụng test ELISA. Đánh giá tác động của thuốc trên hoạt tính HMG-CoA reductase bằng cách sử dụng mô gan chuột đem ly tâm lấy phần dịch đồng thể chứa HMG-CoA reductase.<sup>59</sup> Dưới sự xúc tác của HMG-CoA reductase, HMG-CoA và NADPH được chuyển thành mevalonate và NADP<sup>+</sup>. Lượng NADPH còn lại được xác định dựa vào phương pháp hấp thụ phân tử UV - Vis. Ức chế hoạt tính HMG-CoA reductase sẽ làm giảm tốc độ oxy hóa NADPH.<sup>59</sup>

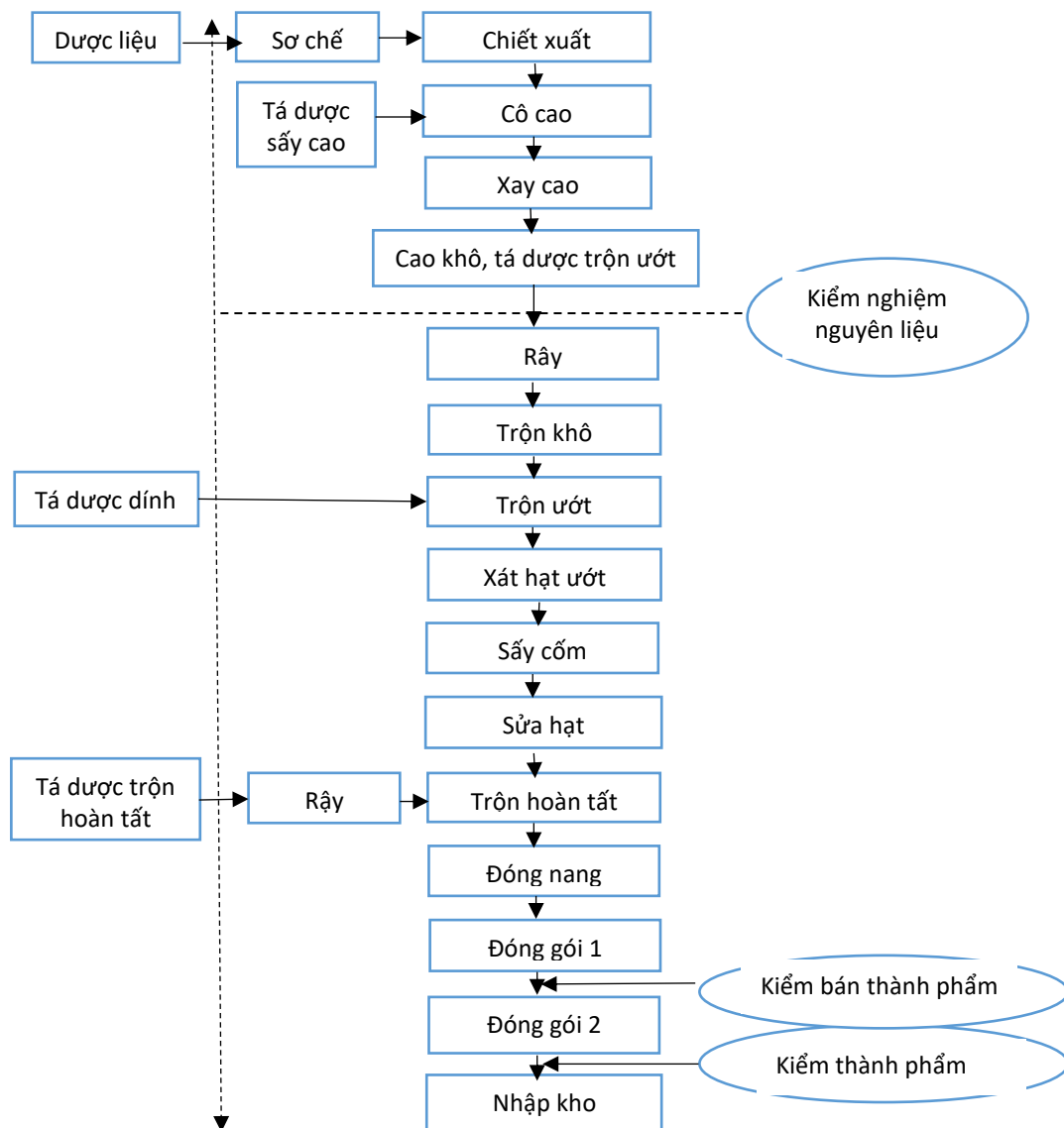
**Bảng 1.5. Một số phương pháp đánh giá tác động của thuốc trên chuyển hóa lipid ở mức độ phân tử, tế bào**

| Tác giả                    | Năm  | Tiêu chí đánh giá chính                                                            |
|----------------------------|------|------------------------------------------------------------------------------------|
| Ma J và CS <sup>68</sup>   | 2000 | HMG-CoA reductase                                                                  |
| Dan H và CS <sup>69</sup>  | 2001 | HMG-CoA reductase, SREBP, CYP7A1                                                   |
| Karu N và CS <sup>70</sup> | 2007 | Pancreatic lipase                                                                  |
| Gai W và CS <sup>71</sup>  | 2010 | HMG-CoA reductase, superoxide dismutase, glutathion peroxidase, lipid peroxidation |
| Xia W và CS <sup>35</sup>  | 2011 | HMG-CoA reductase                                                                  |
| Liu Q và CS <sup>72</sup>  | 2011 | HMG-CoA reductase                                                                  |
| Han JS và CS <sup>60</sup> | 2017 | HMG-CoA reductase, LDL-R                                                           |

Trên đây là một số phương pháp/mô hình nghiên cứu thuốc hạ lipid. Mỗi mô hình bên cạnh những ưu điểm vẫn có một số hạn chế nhất định và như vậy, một thuốc thử nghiệm không thể được chấp nhận hay loại bỏ dựa trên một mô hình duy nhất. Để cho nghiên cứu thuận lợi hơn, nên xem xét cơ chế gây tăng lipid máu của động vật thí nghiệm và có thể, nếu biết được cơ chế tác dụng của thuốc nghiên cứu.

### 1.5. Phương pháp bào chế dược liệu thành viên nang

Quá trình tạo ra một viên nang từ dược liệu thường bao gồm các bước (Hình 1.7).



**Hình 1.7. Quy trình bào chế dược liệu thành viên nang**

Quy trình trên là một quy trình tổng quan và có thể có những biến thể khác tùy thuộc vào công thức và quy mô sản xuất của mỗi chế phẩm. Nhưng để đảm bảo chất lượng và an toàn cần tuân thủ các tiêu chí và tiêu chuẩn chung theo ĐĐVN V.<sup>18</sup>

## 1.6. Giới thiệu về viên MIX

### 1.6.1. Thành phần dược liệu trong viên MIX

#### 1.6.1.1. Nguru tất

- Tên khoa học: *Achyranthes bidentata* Blume, họ Rau dền (Amaranthaceae).<sup>18,19</sup>  
 - *Bộ phận dùng*: Rễ (*Radix Achyranthis bidentatae*)  
 - *Thành phần hóa học*

Hiện nay, các nghiên cứu về hóa thực vật đã phân lập và xác định được các thành phần hóa học chính trong rễ Nguru tất bao gồm các hợp chất saponin, polysaccharid, ecdysteroid. Ngoài ra, còn có các thành phần khác như alkaloid, coumarin, arginin, acid amin và một số nguyên tố vi lượng ...<sup>73-79</sup> Từ dịch chiết cồn Nguru tất đã phân lập được 5 acid oleanolic glycosid mới: (1) 18-(beta-D-glucopyranosyloxy)-28-oxoolean-12-en-3beta-yl3-O-(beta-D-glucopyranosyl)-beta-D-glucopyranosiduronic acid methyl ester; (2) achyranthosid C dimethyl ester; (3) achyranthosid C butyl dimethyl ester; (4) achyranthosid E dimethyl ester; (5) achyranthosid E butyl methyl ester và 10 hợp chất khác đã được phân lập.<sup>74,76</sup> Từ dịch chiết nước Nguru tất đã phân lập được 7 hợp chất: (1) n-butyl-beta-D-fructopyranosid; (2) acid oleanolic; (3) 3-O-[beta-D-glucopyranosyl], acid oleanolic 28-O-beta-D-glucopyranosid; (4) allantoin; (5) 20-hydroxy ecdyson; (6) acid glutamic; (7) 3-O-[beta-D-glucopyranosyl], acid oleanolic 28-O-beta-D-glucopyranosyl ester.<sup>78</sup>

- *Tác dụng dược lý*

#### **Tác dụng trên chuyển hóa lipid**

Nhiều nghiên cứu đã chứng minh chế phẩm (từ dịch chiết nước, cồn) của Nguru tất có tác dụng hạ lipid máu. Nghiên cứu của Đoàn Thị Nhu<sup>20</sup> về tác dụng dược lý hạ cholesterol máu và hạ huyết áp của dịch chiết saponin từ Nguru tất trên mô hình thỏ gây tăng cholesterol máu ngoại sinh, kết quả cho thấy saponin là thành phần chính và có hàm lượng tương đối cao trong rễ Nguru tất. Với liều uống 5g và 10 g/kg/ngày có tác dụng hạ cholesterol máu và hạ huyết áp trên thỏ. Dịch chiết saponin từ Nguru tất với liều uống 1,2 g/kg thể trọng, trong 8 tuần, trên chuột với chế độ ăn giàu lipid, kết quả: (1) làm giảm đáng kể trọng lượng cơ thể chuột, chỉ số sinh xơ vữa, nồng độ TC, VLDL-C, LDL-C, TG máu và nồng độ TC, TG trong gan so với nhóm chỉ ăn chế độ giàu lipid; (2) làm tăng đáng kể về nồng độ HDL-C máu, nồng độ TC và TG trong

phân so với nhóm chỉ ăn chế độ giàu lipid.<sup>23</sup> Nghiên cứu của Oh SD và cộng sự<sup>24</sup> về tác dụng của dịch chiết Ngưu tất trên mô hình biệt hóa tế bào mỡ 3T3-L1 chuột được nuôi bằng chế độ ăn giàu lipid, với liều uống 0,5 g/kg/ngày, trong 6 tuần, kết quả làm giảm đáng kể nồng độ TG máu và trọng lượng cơ thể chuột.

Một số nghiên cứu lâm sàng đã chứng minh tác dụng điều hòa lipid máu của chế phẩm từ công thức kết hợp dược liệu có Ngưu tất là thành phần chính: Nguyễn Thị Sơn<sup>6</sup> nghiên cứu tác dụng của trà hạ mỡ Ngưu tất (Ngưu tất, Đan sâm, Hà thủ ô đỏ, Đương quy) trên 107 bệnh nhân RLLM sau 2 tháng dùng thuốc, kết quả nồng độ TC giảm 15,98%, LDL-C giảm 16,64% và không có tác dụng phụ đáng kể. Nguyễn Văn Ánh<sup>56</sup> nghiên cứu tác dụng điều trị RLLM của viên cholestin (Ngưu tất, Hoè hoa, Nghệ) trên bệnh nhân RLLM, sau 2 tháng dùng thuốc, kết quả nồng độ TC giảm 15,3%, HDL-C tăng 16% và LDL-C giảm 13,5%.

#### **Tác dụng dược lý khác**

Chế phẩm từ dịch chiết Ngưu tất có tác dụng kháng viêm giảm đau trên thực nghiệm và lâm sàng.<sup>30</sup> Hợp chất polypeptid chiết xuất từ Ngưu tất có tác dụng chống stress oxy hóa, bảo vệ và tái tưới máu cơ tim bị tổn thương do thiếu máu cục bộ.<sup>31</sup> Dịch chiết Ngưu tất có tác dụng làm giảm tổn thương tế bào thần kinh, cải thiện sự phục hồi chức năng cảm giác, vận động và nhận thức trên chuột bị thiếu máu não cục bộ do do thắt động mạch não giữa.<sup>80</sup> Hợp chất polysaccharid chiết xuất từ Ngưu tất có thể ức chế sự tăng sinh khối u, tác dụng này liên quan đến sự tăng cường đáp ứng miễn dịch của cơ thể.<sup>81</sup>

#### **- Tính an toàn**

Ngưu tất được sử dụng để phòng và điều trị bệnh (dùng riêng lẻ hay kết hợp với các dược liệu khác) bằng đường uống, dưới dạng trà, viên hay thuốc sắc truyền thống. Nhìn chung, các dạng chế phẩm này được đánh giá an toàn khi sử dụng. Tuy nhiên, vẫn có dữ liệu về độc tính của Ngưu tất được công bố. Liều LD<sub>50</sub> của Ngưu tất bằng đường uống là 437,85 g dược liệu khô/kg thể trọng chuột nhắt trắng.<sup>6</sup>

#### **- Theo YHCT**

Tính vị, quy kinh: Vị đắng, chua, tính bình, không độc. Quy kinh can, thận.<sup>18</sup>

Công năng, chủ trị: Hoạt huyết thông kinh, bổ can thận, mạnh gân cốt. Chủ trị đau lưng gối, mỏi gân xương, rối loạn kinh nguyệt, tăng huyết áp, RLLM, XVĐM.<sup>18,19</sup>

Liều dùng, kiêng kị: Liều dùng 6 -12 g/24 giờ, người bị khí hư, phụ nữ có thai không nên dùng.<sup>18</sup>

#### 1.6.1.2. Đan sâm

Tên khoa học: *Salvia miltiorrhiza* Bunge, họ Bạc hà (Lamiaceae).<sup>18,19</sup>

- *Bộ phận dùng*: Rễ và thân rễ (*Radix et Rhizoma Salviae miltiorrhizae*)

- *Thành phần hóa học*

Thành phần hóa học của Đan sâm đã được nghiên cứu từ năm 1930. Hiện nay, có hơn 200 hợp chất đã được xác định, phân lập từ Đan sâm và được chia thành hai nhóm chính.<sup>32,82,83</sup> Nhóm các hợp chất không phân cực: Hơn 30 hợp chất diterpen đã được phân lập và xác định. Hầu hết đều là các hợp chất diterpen chinon dạng tanshinon, bao gồm tanshinon I, tanshinon IIA, tanshinon IIB, cryptotanshinon, dihydrotanshinone ... Trong đó, tanshinon IIA và cryptotanshinon được nghiên cứu nhiều nhất. Nhóm các hợp chất phân cực: Hơn 50 hợp chất đã được phân lập và xác định như danshensu, acid salvianolic A, acid salvianolic B, protocatechuic aldehyde, acid protocatechuic ... Nhóm các hợp chất khác: Baicalin,  $\beta$ -sitosterol, acid ursolic và daucosterol phân lập từ dịch chiết cồn. 5,3'-dihydroxy-7,4'-dimethoxy flavanon phân lập từ dịch chiết ethyl acetat.

- *Tác dụng dược lý*

#### **Tác dụng trên chuyển hóa lipid**

Nhiều nghiên cứu đã chứng minh tác dụng của Đan sâm trong phòng và điều trị một số bệnh lý về tim mạch, chuyển hóa.<sup>32,82</sup> Nghiên cứu của Lim C và cộng sự<sup>25</sup> về tác dụng hạ lipid máu của dịch chiết Đan sâm trên chuột với chế độ ăn giàu lipid, kết quả nhóm sử dụng dịch chiết Đan sâm, nồng độ TG máu giảm 33,05% và không tăng trọng lượng chuột. Ji W và Gong BQ<sup>26</sup> nghiên cứu tác dụng hạ lipid máu của dịch chiết Đan sâm trên chuột gây tăng lipid máu ngoại sinh với liều uống 50 mg, 100 mg và 150 mg/kg/ngày, trong 4 tuần, kết quả làm giảm TC, TG và tăng HDL-C máu. Nghiên cứu của Li S và Wan L<sup>36</sup> về tác dụng phòng ngừa XVĐM của dịch chiết Đan sâm trên mô hình gây tăng lipid máu và XVĐM, kết quả nhóm thử sử dụng dịch chiết Đan sâm nồng độ TG máu giảm đáng kể và giảm sinh XVĐM so với nhóm đối chứng không dùng thuốc. Nghiên cứu của Horie Y và cộng sự<sup>37</sup> về tác dụng hạ lipid máu của thuốc kết hợp Đan sâm - Tam thất - Long não trên chuột với chế độ ăn có

còn kéo dài, với liều uống 0,4 mg/kg/ngày, liên tục trong 2 tuần, kết quả không làm tăng nồng độ TG máu.

### **Tác dụng dược lý khác**

Đan sâm đã được chứng minh là một thuốc đa thành phần, tác dụng trên đa mục tiêu.<sup>82</sup> Các hoạt chất từ Đan sâm đặc biệt là tanshinon I, IIA, cryptotanshinon, acid salvianolic A, B có tác dụng bảo vệ làm giảm tổn thương tế bào cơ tim do thiếu máu cục bộ thông qua các đặc tính chống oxy hóa, kháng viêm, giãn mạch và ức chế hiện tượng chết tế bào.<sup>83,84</sup> Dịch chiết nước từ Đan sâm có tác dụng hạ huyết áp qua tác động ức chế men chuyển angiotensin (Angiotensin converting enzyme - ACE) trên thực nghiệm.<sup>85</sup> Acid phenolic từ Đan sâm có tác dụng hạ đường huyết trên thực nghiệm.<sup>86</sup> Dịch chiết Đan sâm có tác dụng bảo vệ và phục hồi tổn thương tế bào thần kinh do thiếu máu não cấp.<sup>87,88</sup> Ngoài ra, Đan sâm còn có khả năng ức chế sự tăng sinh tế bào ung thư vú.<sup>89</sup>

#### **- Tính an toàn**

Đan sâm đã được sử dụng để phòng và điều trị bệnh (dùng riêng lẻ hay kết hợp với các dược liệu khác) dưới dạng viên, bột, dịch chiết hay thuốc sắc truyền thống. Nhìn chung, các dạng chế phẩm này được đánh giá an toàn khi sử dụng. Tuy nhiên, dữ liệu về độc tính của Đan sâm cũng được công bố. LD<sub>50</sub> đường tiêm phúc mạc của Đan sâm (Danshensu) trên chuột là 2,35 g/kg thể trọng.<sup>90</sup>

#### **- Theo YHCT**

Tính vị, quy kinh: Vị đắng, tính hàn, không độc. Quy kinh tâm, can.<sup>18</sup>

Công năng, chủ trị: Hoạt huyết thông kinh, thanh tâm lương huyết. Chủ trị đau thất ngực, mất ngủ, tâm phiền, kinh nguyệt không đều, đau bụng kinh.<sup>18,19</sup>

Liều dùng, kiêng kị: Liều dùng 6 - 12 g/24 giờ, không dùng chung với Lê lô.<sup>18</sup>

### **1.6.1.3. Tam thất**

Tên khoa học: *Panax notoginseng* (Burk.) F. H.Chen, họ Nhân sâm (Araliaceae).<sup>18,19</sup>

- **Bộ phận dùng:** (Rễ củ) (*Radix Panasís notoginseng*)

- **Thành phần hóa học**

Các nghiên cứu về hóa thực vật đã phân lập và xác định trên 200 hợp chất hóa học có trong Tam thất. Ngoài 3 hợp chất chính là saponin, polysaccharid và dencichin,

còn có flavonoid, cyclopeptid, saccharid và một số nguyên tố vi lượng. Các saponin triterpenoid là thành phần quan trọng nhất của Tam thất với hơn 80 loại hợp chất đã được phân lập và xác định, chia thành 3 nhóm chính: Protopanaxadiol (ginsenosid Rb1, G-Rb2, G-Rc, G-Rd...), protopanaxatriol (ginsenosid Rg1, G-Re, G-Rf ...) và acid oleanolic. Trong đó, ginsenosid Rg1, G-Rb1, G-Re, và notoginsenosid R1 là các thành phần chiếm ưu thế. Mặc dù trong Tam thất có rất nhiều hợp chất hoạt tính sinh học, nhưng hiện tại các nghiên cứu đặc biệt quan tâm đến hợp chất saponin.<sup>33,34,38,91</sup>

- *Tác dụng dược lý*

### **Tác dụng trên chuyển hóa lipid**

Nhiều nghiên cứu đã chứng minh tác dụng điều hòa lipid máu từ Tam thất. Nghiên cứu của Cicero AF và cộng sự<sup>28</sup> về tác dụng của bột Tam thất trên nồng độ lipid và fibrinogen máu chuột với chế độ ăn giàu lipid, kết quả sau 4 tuần dùng thuốc, so với fluvastatin liều 3 mg/kg/ngày, bột Tam thất liều 43 mg và 86 mg/kg/ngày có tác dụng tương đương trong việc làm giảm TC (23,70%, 19,29%), TG (21,59%, 18,55%), nhưng giảm rõ rệt hơn về nồng độ fibrinogen máu. Nghiên cứu của Ji W và Gong BQ<sup>29</sup> về tác dụng hạ lipid máu của dịch chiết ethanol Tam thất trên chuột gây tăng lipid máu ngoại sinh, kết quả dịch chiết ethanol Tam thất có tác dụng làm giảm nồng độ TC, LDL-C và TG máu. Nghiên cứu của Xu Q và cộng sự<sup>92</sup> đã chứng minh dịch chiết saponin Tam thất với liều uống 100 và 200 mg/kg trong 7 ngày, làm giảm nồng độ TC và TG máu trên chuột tăng lipid máu. Nghiên cứu của Joo IW và cộng sự<sup>93</sup> về tác dụng hạ lipid máu và kháng viêm của dịch chiết Tam thất so sánh với atorvastatin trên chuột gây tăng lipid máu nội sinh bằng poloxamer- 407, kết quả dịch chiết Tam thất với liều 40 mg và 100 mg/kg, có tác dụng làm giảm nồng độ TC, TG máu tương đương với atorvastatin liều 1,34 mg/kg. Nghiên cứu của Hou Y và cộng sự<sup>94</sup> đã chứng minh ginsenosid Rg1 có tác dụng kháng viêm, điều hòa lipid máu và làm giảm tổn thương gan trên chuột gây mô hình gan nhiễm mỡ không do rượu.

### **Tác dụng dược lý khác**

Ginsenosid Rb1, G- Rg1 chiết xuất từ Tam thất có tác dụng làm giảm tổn thương tế bào gan trên chuột gây mô hình gây viêm gan cấp bằng lipopolysaccharid và galactosamin.<sup>39</sup> Ginsenosid Rb1, G-Rg1 có tác dụng giãn mạch, hạ huyết áp thông qua việc kích hoạt NO tế bào nội mô mạch máu.<sup>95</sup> Ginsenosid Rg1 bảo vệ tế bào cơ

tim khỏi tình trạng thiếu oxy thông qua tác dụng chống oxy hóa và cân bằng calci nội bào trên thực nghiệm.<sup>96</sup> Saponin Tam thất có tác dụng ức chế kết tập tiểu cầu vào tế bào nội mô mạch máu bị tổn thương vượt trội hơn so với aspirin.<sup>97</sup> Saponin Tam thất có tác dụng làm giảm diễn tiến sinh XVĐM thông qua việc điều hòa lipid máu và chống viêm trên thực nghiệm.<sup>98</sup> Dịch chiết saponin Tam thất có tác dụng ức chế sự tăng sinh tế bào cơ trơn mạch máu trên chuột tăng lipid máu.<sup>99</sup> Saponin Tam thất có tác dụng ức chế sự tăng sinh nội mạc động mạch chủ chuột.<sup>100</sup> Dịch chiết saponin Tam thất có tác dụng bảo vệ chống lại sự thiếu oxy - glucose/tổn thương tế bào nội mô mạch máu não *in vitro*. Ngoài ra, còn có tác dụng giãn mạch và tăng lưu lượng tuần hoàn máu não có thể làm gia tăng hiệu quả điều trị đột quỵ do thiếu máu não cục bộ.<sup>101</sup> Dịch chiết saponin từ Tam thất có tác dụng làm hạ đường huyết và giảm cân, giúp phòng ngừa diễn tiến bệnh thận do đái tháo đường trên thực nghiệm.<sup>102,103</sup> Dịch chiết saponin Tam thất có tác dụng cải thiện chức năng thận và giảm lượng protein niệu trên bệnh nhân bệnh thận mạn.<sup>104</sup> Saponin Tam thất có tác dụng hỗ trợ điều trị ung thư đại trực tràng.<sup>105</sup> Dịch chiết từ Tam thất có hoạt tính kháng khuẩn chống lại *Streptococci* gây bệnh.<sup>106</sup>

#### - Tính an toàn

Tam thất cũng đã được sử dụng từ lâu để phòng và điều trị bệnh (dùng riêng lẻ hay kết hợp với các dược liệu khác) dưới dạng viên, bột, dịch chiết hay thuốc sắc truyền thống. Các dạng chế phẩm này được đánh giá an toàn khi sử dụng. Tuy nhiên, dữ liệu về độc tính của Tam thất vẫn được ghi nhận. Liều LD<sub>50</sub> của Tam thất bằng đường uống là 1,65 g/kg/kg thể trọng chuột.<sup>107</sup>

#### - Theo YHCT

Tính vị, quy kinh: Vị ngọt hơi đắng, tính ôn. Vào kinh can, vị.<sup>18</sup>

Công năng, chủ trị: Tán huyết, chỉ huyết, tiêu sưng giảm đau. Chủ trị các loại chảy máu, nhất là chảy máu có huyết ứ, sưng đau do chấn thương, ngực bụng đau nhói.<sup>18,19</sup>

Liều dùng, kiêng kị: Liều dùng 4 - 8 g/24 giờ. Phụ nữ có thai không dùng.<sup>18</sup>

#### 1.6.2. Cơ sở kết hợp Ngưu tất - Đan sâm - Tam thất

Viên MIX là chế phẩm được bào chế từ công thức kết hợp dược liệu theo tỷ lệ Ngưu tất 50% - Đan sâm 30% - Tam thất 20% dựa trên đặc tính về tác dụng dược lý

hạ lipid máu của từng dược liệu và lý luận phối ngũ theo YHCT, với mục đích tăng tác dụng điều trị thông qua cơ chế tác dụng hiệp đồng để giảm liều từng dược liệu và hạn chế những tác dụng phụ không mong muốn. Cụ thể là nhằm đạt được hiệu quả giảm lipid máu và hạn chế được tác dụng phụ (nếu có) của từng loại dược liệu trong công thức. Theo kết quả từ các nghiên cứu dược lý cả 3 dược liệu đều có tác dụng hạ lipid máu,<sup>20-29</sup> cải thiện được diễn tiến sinh XVĐM thông qua tác dụng giãn mạch, chống đông máu, kháng viêm, chống oxy hoá, giảm chết tế bào.<sup>30-36</sup> Bên cạnh đó, còn có tác dụng bảo vệ tế bào gan, tế bào cơ tim, tế bào thần kinh, tăng cường miễn dịch cơ thể và ít tác dụng phụ.<sup>37-40</sup>

**Nguru tất** đã được sử dụng từ lâu đời trong các bài thuốc cổ phương: Huyết phủ trục ứ thang, Thiên ma câu đằng ẩm, Độc hoạt tang kí sinh ... Từ những năm đầu của thập niên 80, tại Việt Nam nhiều công trình nghiên cứu thực nghiệm và lâm sàng đã chứng minh tác dụng hạ lipid máu của Nguru tất và khi kết hợp với các thảo dược khác dưới nhiều dạng bào chế khác nhau: Trà hạ mỡ Nguru tất,<sup>6</sup> cao Nguru tất,<sup>20</sup> viên hạ mỡ Nguru tất,<sup>55</sup> viên Cholestin.<sup>56</sup> Một nghiên cứu lâm sàng trên bệnh nhân RLLM sử dụng chế phẩm Nguru tất liều cao để điều trị, một số bệnh nhân bị rối loạn tiêu hoá phải giảm liều hoặc tạm ngưng điều trị.<sup>55</sup> Một nghiên cứu trên thực nghiệm cho thấy khi sử dụng Nguru tất liều thấp sẽ ức chế được sự phát triển khối u phổi, ngược lại khi sử dụng liều cao kéo dài sẽ kích thích phát triển khối u phổi ở chuột.<sup>107</sup> Trong khi thời gian điều trị RLLM thường kéo dài khá lâu, vì vậy, Nguru tất chiếm tỷ lệ cao nhất trong công thức kết hợp (50%).

**Đan sâm, Tam thất** cũng đã được chứng minh có tác dụng hạ lipid máu trên thực nghiệm và lâm sàng. Ngoài ra, Đan sâm còn có tác dụng bảo vệ tế bào thần kinh, tăng cường miễn dịch cho cơ thể, ức chế phát triển khối u.<sup>88,89</sup> Tam thất có tác dụng bảo vệ tế bào gan, thận, tăng cường miễn dịch cơ thể, hỗ trợ điều trị ung thư.<sup>39,94,104,105</sup> Hy vọng Đan sâm, Tam thất có khả năng giảm được tác dụng bất lợi của Nguru tất đồng thời duy trì, thậm chí có thể nâng cao được hiệu quả làm giảm lipid máu khi dùng kết hợp. Tam thất là một dược liệu quý, ngoài những tác dụng tốt trên tim mạch, chuyển hóa đã được chứng minh. Hiện nay, Tam thất còn được kết hợp với nhiều loại thuốc khác để tăng hiệu quả điều trị và giảm tác dụng phụ của thuốc kết hợp. Một nghiên cứu đã chứng minh khi kết hợp Tam thất - Đan sâm làm tăng đáng kể mức độ hấp thu

các thành phần hợp chất chính có trong Tam thất - Đan sâm so với khi sử dụng riêng lẻ.<sup>108</sup> Từ kết quả này có thể nhận định sự hiệp đồng tác dụng khi kết hợp Tam thất - Đan sâm. Ở một khía cạnh khác, điều này có thể giải thích bản chất của sự tương thích giữa các vị thuốc trong bài thuốc YHCT. Nghiên cứu thực nghiệm so sánh tác dụng của Tam thất với fluvastatin trên chuột với chế độ ăn giàu lipid kết quả: So với fluvastatin, Tam thất có tác giảm nồng độ TC và TG tương đương với fluvastatin, nhưng giảm rõ rệt hơn về nồng độ fibrinogen máu.<sup>28</sup> Một nghiên cứu tổng hợp kết quả từ các thử nghiệm lâm sàng đã đưa ra kết luận: Tác dụng hạ lipid máu của Tam thất có thể không mạnh bằng statin nhưng có độ an toàn cao hơn, do đó, trên bệnh nhân tổn thương gan hoặc lớn tuổi có tăng lipid máu có thể sử dụng Tam thất để hạ lipid máu.<sup>34</sup> Một nghiên cứu thực nghiệm trên chuột gây mô hình tổn thương gan và XVĐM, kết quả cho thấy: Tam thất thể hiện tốt tác dụng hạ lipid và ổn định các thông số chức năng gan, nhưng hiệu quả giảm lipid máu tốt hơn khi kết hợp với atorvastatin; Tam thất có thể kết hợp với các thuốc hạ lipid máu khác để có được tác dụng hiệp đồng giảm lipid máu và giảm tác dụng phụ gây tổn thương gan khi sử dụng lâu dài.<sup>40</sup> Hy vọng, khi Tam thất kết hợp với Đan sâm, Ngưu tất sẽ là một thuốc đa thành phần có thể có tác dụng trên đa mục tiêu liên quan đến các mục tiêu của BTMXV và giảm được tác dụng phụ của thuốc hóa học tổng hợp khi sử dụng kết hợp.

Nghiên cứu thuốc YHCT hiện nay có xu hướng phân tích cụ thể thành phần hoạt chất có trong thuốc, giải thích cơ chế tác dụng dựa trên các tiêu chuẩn và mô hình nghiên cứu thuốc YHHĐ. Các hợp chất saponin, polysaccharid (Ngưu tất); Diterpen, acid phenolic (Đan sâm); Saponin, polysaccharid (Tam thất) có tác động đến các yếu tố điều hòa chuyển hóa lipid máu như: ACAT, HMG-CoA reductase, LDL-R, CEPT, LPL, CYP7A1, PPPA- $\alpha$ , LXR- $\alpha$  và một số yếu tố khác. Acid oleanolic (phần sapogenin của saponin) có tác dụng ức chế hoạt tính ACAT làm giảm hấp thu cholesterol từ ruột, giảm tổng hợp acetoacetyl- coA làm giảm tổng hợp cholesterol nội sinh, do đó, làm giảm nồng độ cholesterol máu.<sup>109</sup> Acid oleanolic ức chế LXR- $\alpha$  làm giảm hấp thu cholesterol ở ruột, tăng cường vận chuyển lượng cholesterol dư thừa từ ngoại biên về lại gan, tăng chuyển hóa cholesterol thành acid mật và tăng bài tiết mật, do đó, làm giảm cholesterol máu.<sup>110</sup> Dihydrotanshinon I có tác dụng ức chế CETP làm giảm TC, LDL-C, TG, tăng HDL-C.<sup>27</sup> Ginsenosid Rg1 có

tác dụng làm tăng hoạt tính của PPAR- $\alpha$ .<sup>94</sup> Saponin Tam thất có tác dụng ức chế hoạt tính HMG-CoA reductase ở gan làm giảm tổng hợp cholesterol. Tổng hợp cholesterol ở gan giảm, khởi kích tăng tổng hợp và biểu hiện LDL-R ở màng tế bào gan, làm tăng hấp thu LDL-C vào gan. Do đó, làm giảm nồng độ cholesterol máu.<sup>35</sup> Vì vậy, khi kết hợp Ngưu tất - Đan sâm - Tam thất sẽ tạo thành một thuốc mới thể hiện tính năng đa thành phần, đa mục tiêu trên chuyển hóa lipid.

YHCT ít khi sử dụng độc vị, mà thường kết hợp nhiều vị thuốc (ít nhất là hai vị thuốc) thành bài thuốc/công thức thuốc. Lý luận phối ngũ trong bài thuốc theo Quân, Thân, Tá, Sứ với mục đích tăng cường tác dụng có lợi và khắc chế những tác dụng không mong muốn của từng vị thuốc. Ngoài ra, sự kết hợp nhiều vị thuốc trong một bài thuốc sẽ tạo cho bài thuốc một đặc tính như hài hòa về hàn, nhiệt, ôn, lương phù hợp với bệnh cảnh lâm sàng và cơ địa người bệnh.<sup>17,111,112</sup>

Dựa vào phân tích tác dụng của các vị thuốc,<sup>18,19</sup> có thể biện giải vai trò của từng vị thuốc trong công thức như sau (Bảng 1.6).

**Bảng 1.6. Sự phối ngũ các vị thuốc trong viên MIX**

| Vị thuốc | Tính vị | Quy kinh  | Tác dụng dược lý YHCT                            | Vai trò |
|----------|---------|-----------|--------------------------------------------------|---------|
| Ngưu tất | Bình    | Can, thận | Hoạt huyết thông kinh, bổ can thận, mạnh gân cốt | Quân    |
| Đan sâm  | Hàn     | Tâm, can  | Hoạt huyết thông kinh, thanh tâm lương huyết     | Thân    |
| Tam thất | Ôn      | Can, vị   | Tán huyết, chỉ huyết, tiêu sưng giảm đau         | Tá      |

Khi xét tác dụng chung của bài thuốc là tổng hợp tác dụng của các vị thuốc cấu thành.<sup>112</sup> Dựa vào tác dụng dược lý YHCT của Ngưu tất, Đan sâm, Tam thất, khi kết hợp lại với nhau có thể suy luận tác dụng chung của công thức thuốc là: Hoạt huyết hóa ứ, thông kinh mạch, bổ can thận. Nếu xem xét về tính thì Ngưu tất có tính bình, Đan sâm có tính hàn, Tam thất có tính ôn. Khi kết hợp thì Ngưu tất có tỷ lệ cao nhất (50%), tính hàn của Đan sâm sẽ được trung hòa bởi tính ôn của Tam thất, tạo nên đặc điểm chung của công thức kết hợp khá hài hòa (tính bình). RLLM thuộc phạm vi chứng đàm thấp theo lý luận YHCT. Thuốc hoạt huyết hóa ứ làm cho khí huyết lưu thông, kinh

mạch thông thoáng, có thể cải thiện được triệu chứng lâm sàng chứng đờm thấp và góp phần giải quyết nguyên nhân sinh đờm.

**Tóm lại:** Trên phương diện lý thuyết cơ chế tác dụng điều hòa lipid máu của Viên MIX là: (1) theo YHHĐ: Giảm tổng hợp cholesterol, giảm hấp thu cholesterol và tăng chuyển hóa và bài tiết cholesterol; (2) theo YHCT: Hoạt huyết hóa ứ, thông kinh mạch, bổ can thận.

Từ cơ sở lý luận, nghiên cứu tiền đề khảo sát tác dụng hạ cholesterol máu của cao kết hợp Ngưu tất 50% - Đan sâm 30% - Tam thất 20% với liều uống 20 g dược liệu khô/kg/ngày trong 4 tuần trên chuột nhắt trắng gây mô hình tăng cholesterol máu ngoại sinh được tiến hành, kết quả cho thấy: Nhóm dùng cao kết hợp liều 20 g dược liệu khô/kg, hiệu quả làm giảm nồng độ cholesterol máu tương đương so với nhóm đối chứng dùng cao Ngưu tất liều 20 g dược liệu khô/kg, cao Đan sâm liều 20 g dược liệu khô/kg, cao Tam thất liều 20 g dược liệu khô/kg (49,70%, 53,78%, 58,11%, 60,53%). Trong khi hàm lượng Ngưu tất trong cao kết hợp giảm 50% so với cao Ngưu tất, hàm lượng Đan sâm trong cao kết hợp giảm 70% so với cao Đan sâm, hàm lượng Tam thất trong cao kết hợp giảm 80% so với cao Tam thất. Với kết quả về nồng độ cholesterol máu đạt được sau thử nghiệm đã chứng minh công thức kết hợp Ngưu tất - Đan sâm - Tam thất có tác dụng hạ cholesterol máu và sự kết hợp nhiều loại dược liệu liều thấp cũng có tác dụng tương đương khi dùng một loại dược liệu liều cao. Lovastatin thuộc nhóm thuốc statin, tác dụng hạ cholesterol máu từ 20 - 60%, cao kết hợp liều 20 g dược liệu khô/kg cũng có hiệu quả giảm cholesterol máu tương đương với lovastatin liều 20 mg/kg. Mặc khác, khi tăng liều cao kết hợp lên gấp đôi (40 g dược liệu khô/kg) thì hiệu quả làm giảm cholesterol máu tăng không đáng kể (khoảng 6%).<sup>41</sup> Tổng hợp kết quả nghiên cứu tiền đề cho thấy kết hợp Ngưu tất 50% - Đan sâm 30% - Tam thất 20% có thể là một công thức kết hợp hoàn chỉnh.

### **1.7. Tình hình nghiên cứu thuốc điều hòa lipid máu từ dược liệu ở Việt Nam và trên thế giới**

Trong những thập niên gần đây, hàng trăm loại thuốc có nguồn gốc từ thảo dược đã được báo cáo có hiệu quả trong phòng và điều trị RLLM dưới các dạng bào chế khác nhau như hoạt chất, dịch chiết của một loại dược liệu hay bài thuốc/công thức kết hợp. Tuy nhiên, hầu hết các nghiên cứu chỉ tập trung vào mục tiêu chính là

điều chỉnh nồng độ các thành phần lipid máu (TC, HDL-C, LDL-C, TG), về cơ chế tác dụng theo YHHĐ ít được nghiên cứu (Bảng 1.7).

**Bảng 1.7. Tóm tắt một số nghiên cứu thuốc điều hòa lipid máu từ dược liệu**

| Tác giả                          | Năm  | Chế phẩm                                    | Đối tượng | Thời gian | Liều dùng                  | Kết quả                       |
|----------------------------------|------|---------------------------------------------|-----------|-----------|----------------------------|-------------------------------|
| Đoàn Thị Nhu và CS <sup>20</sup> | 1988 | Dịch chiết<br>Nguru tất                     | Thỏ       | 24<br>giờ | 10 g/kg                    | Giảm TC máu                   |
| Đoàn Thị Nhu và CS <sup>21</sup> | 1991 | Viên<br>Bidentin                            | Thỏ       | 4<br>ngày | 10<br>g/kg/ngày            | Giảm TC máu                   |
| Lathaa BP và CS <sup>23</sup>    | 2011 | Dịch chiết<br>Nguru tất                     | Chuột     | 8<br>tuần | 1,2 g/kg                   | Giảm TC, LDL,<br>TG, tăng HDL |
| Oh SD và CS <sup>24</sup>        | 2014 | Dịch chiết<br>Nguru tất                     | Chuột     | 6<br>tuần | 0,5<br>g/kg/ngày           | Giảm TG                       |
| Nguyễn Thị Son <sup>6</sup>      | 2007 | Trà hạ mỡ<br>Nguru tất                      | Người     | 8<br>tuần | 40 g/ngày                  | Giảm TC, LDL                  |
| Nguyễn Thùy Hương <sup>55</sup>  | 2013 | Viên nén<br>Hạ mỡ                           | Người     | 4<br>tuần | 10<br>viên/ngày            | Giảm TC máu                   |
| Lim C và CS <sup>25</sup>        | 2017 | Dịch chiết<br>Đan sâm                       | Chuột     | 6<br>tuần | 1 g/kg/ngày                | Giảm TG máu                   |
| Ji W và Gong BQ <sup>26</sup>    | 2008 | Dịch chiết<br>Đan sâm                       | Chuột     | 4<br>tuần | 50, 100, 150<br>mg/kg/ngày | Giảm TC, TG,<br>tăng HDL      |
| Horie Y và CS <sup>37</sup>      | 2009 | Viên<br>Đan sâm -<br>Tam thất -<br>Long não | Chuột     | 2<br>tuần | 0,4<br>mg/kg/ngày          | Không làm tăng<br>TG máu      |
| Cicero AF và CS <sup>28</sup>    | 2003 | Bột Tam<br>thất                             | Chuột     | 4<br>tuần | 43, 86<br>mg/kg/ngày       | Giảm TC, TG<br>máu            |
| Xu Q và CS <sup>92</sup>         | 1993 | Dịch chiết<br>Tam thất                      | Chuột     | 7<br>ngày | 100, 200<br>mg/kg/ngày     | Giảm TC, TG<br>máu            |

## Chương 2. ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

### 2.1. Thiết kế nghiên cứu

Nghiên cứu thử nghiệm tiền lâm sàng trên chuột nhắt trắng gây RLLM.

### 2.2. Đối tượng nghiên cứu

#### 2.2.1. Nguyên liệu nghiên cứu

Nguyên liệu Ngưu tất, Đan sâm, Tam thất khô được cung cấp bởi Công ty cổ phần Dược Lâm Đồng (LADOPHAR), đạt tiêu chuẩn chất lượng Ngưu tất, Đan sâm (ĐĐVN V), Tam thất (TCCS), (Bảng 2.1, Hình 2.1, PL 1, 2, 3).



**Ngưu tất**

**Đan sâm**

**Tam thất**

**Hình 2.1. Nguyên liệu Ngưu tất, Đan sâm, Tam thất**

“Nguồn: LADOPHAR, 2018”<sup>PL 1-3</sup>

Viên nang cứng Ngưu tất - Đan sâm - Tam thất (viên MIX) được bào chế tại LADOPHAR (Hình 2.2). Số lô: 021218NC. Ngày sản xuất: 02/12/2018. Quy cách đóng gói: Hộp x 5 vỉ x 10 viên. Viên nang số 0, màu cam, bên trong chứa cốm màu nâu, vị đắng hơi chát, mùi thơm đặc trưng của dược liệu. Thành phần trong một viên gồm 350 mg cao khô MIX và tá dược vừa đủ 430 mg (tương ứng 0,93 g dược liệu/viên).



**Hình 2.2. Viên nang cứng Ngưu tất - Đan sâm - Tam thất (viên MIX)**

**Bảng 2.1. Tiêu chuẩn chất lượng mẫu nguyên liệu Nguru tất, Đan sâm, Tam thất**

| <b>Tiêu chí</b>                     | <b>Nguru tất</b>                                       | <b>Đan sâm</b>                                                          | <b>Tam thất</b>                                                                               |
|-------------------------------------|--------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------|
| Mô tả                               | Đúng                                                   | Đúng                                                                    | Đúng                                                                                          |
| Vi phẫu                             | Đạt                                                    | Đạt                                                                     | Đạt                                                                                           |
| Soi bột                             | Đạt                                                    | Đạt                                                                     | Đạt                                                                                           |
| Định tính                           | Đúng                                                   | Đúng                                                                    | Đúng                                                                                          |
| Độ ẩm (%)                           | 11,25 (đạt)                                            | 11,4 (đạt)                                                              | 12,9 (đạt)                                                                                    |
| Tạp chất (%)                        | 0,81 (đạt)                                             | 0,0 (đạt)                                                               | 0,61 (đạt)                                                                                    |
| Tro toàn phần (%)                   | 8,48 (đạt)                                             | 9,1 (đạt)                                                               | 5,1 (đạt)                                                                                     |
| Tro không tan trong acid (%)        |                                                        | 2,3 (đạt)                                                               | 2,2 (đạt)                                                                                     |
| Kim loại nặng                       | Pb: 0,002 ppm (đạt); Cd, Hg, As: Không phát hiện (đạt) | Không phát hiện (đạt)                                                   | Giới hạn Pb: Không phát hiện (đạt)                                                            |
| Chất chiết được trong dược liệu (%) | 9,6 (đạt)                                              | Trong nước: 37,2 (đạt).<br>Trong ethanol: 17,4 (đạt)                    | 19,1 (đạt)                                                                                    |
| Định lượng (%)                      |                                                        | Tanshinon II <sub>A</sub> : 0,31 (đạt)<br>Acid salvianolic B: 4,6 (đạt) | Notoginsenosid R1: 0,52 (đạt)<br>Tổng ginsenosid Rg1, G- Rb1 và notoginsenosid R1: 7,32 (đạt) |

### 2.2.2. Động vật nghiên cứu

Chuột nhắt trắng đực (chủng *Swiss albino*, 5 - 6 tuần tuổi, trọng lượng  $22 \text{ g} \pm 2 \text{ g}$ ) được cung cấp bởi Viện Vắc xin và Sinh phẩm Y tế Nha Trang. Chuột khỏe mạnh, không có biểu hiện bất thường, được nuôi trong môi trường thí nghiệm (chu kỳ 12 giờ sáng - tối, nhiệt độ  $27 \pm 2 \text{ }^{\circ}\text{C}$  và độ ẩm tương đối  $< 70 \%$ ) trong lồng kích thước  $25 \times 35 \times 15 \text{ cm}$  (8 chuột/lồng) và được cung cấp thức ăn (thực phẩm viên được cung cấp bởi Viện Vắc xin và Sinh phẩm Y tế Nha Trang), nước uống đầy đủ.

## 2.3. Trang thiết bị và hóa chất

### 2.3.1. Trang thiết bị

Máy phân tích huyết học CELL - DYN 1700 (Mỹ), máy sinh hóa bán tự động Screen Master 3000 (Arezzo, Ý), máy ly tâm lạnh Hermel Z36HK (Đức), máy nghiền đồng thể IKA T25 Basis (Malaysia), máy đo quang UV - Vis Unicam, HE  $\lambda$  - 10 SY vision 32 Software, thermo Spectrorius, máy sắc ký lỏng Agilent 1260 Infinity II Prime, máy cô quay Buchi (Thụy Sĩ).

Tủ sấy SANYO MOV - 112 (Nhật), cân phân tích Libror AEL - 40SM (Precisa - Thụy Sĩ), lò nung LENTON FURNACES, bình ngưng kiệt, khay inox, nồi inox, becher, ống đông, đĩa thủy tinh, ống nghiệm, cối chày. Bộ dụng cụ mổ gồm: Kéo, nhíp, kẹp, bàn phẫu thuật, đinh ghim. Dụng cụ nuôi và chăm sóc chuột.

### 2.3.2. Hóa chất

Các thuốc thử, dung môi, hóa chất sử dụng trong nghiên cứu đạt tiêu chuẩn: Atorvastatin (PZ001- Sigma - Aldrich - Mỹ), tyloxapol (T0307 - 10G, Sigma - Aldrich - Mỹ). Cholesterol, acid cholic (Sigma - Aldrich - Mỹ).  $\beta$  - Nicotinamid adenin dinucleotid phosphat tetrasodium dạng khử (NADPH) ( N5130 - Sigma - Aldrich - Mỹ), D,L - Dithiothreitol (DDT) (D0632 - Sigma - Aldrich - Mỹ), D,L - 3 - Hydroxy - 3 - Methylglutaryl - Coenzym A sodium salt (HMG-CoA) (N5130 - Sigma - Aldrich - Mỹ), Dimethyl sulfoxid (DMSO - Merk - Đức), Ethylendinitrilo tetraacetic acid disodium salt dehydrate (EDTA) độ tinh khiết  $\geq 99\%$  (N6505 - Sigma - Aldrich - Mỹ), Sucrose (Merck - Đức), Tris base (Sigma - Aldrich - Mỹ), ginsenosid Rg1 (CAS 22427-39-0 - Chengdu Herbpurify - Trung Quốc), acid oleanolic (CAS 508-02-1 - Chengdu Herbpurify - Trung Quốc), acid salvianolic B (CAS 121521-90-2 - Desite - Trung Quốc), ethanol 70% (Việt Nam).

Các bộ KIT định lượng TC, HDL-C, LDL-C và TG (Human Co., Germany - Đức).

## 2.4. Thời gian và địa điểm nghiên cứu

Thực hiện chiết xuất và bào chế viên MIX: Phòng Hóa - Chế phẩm - Trung tâm Sâm và Dược liệu Tp. HCM; Phòng bào chế - LADOPHAR.

Thực hiện các thử nghiệm xây dựng tiêu chuẩn cơ sở của chế phẩm: Phòng kiểm tra chất lượng - LADOPHAR.

Thực hiện các thử nghiệm dược lý trên động vật thí nghiệm: Phòng thí nghiệm Y dược cổ truyền - Khoa YHCT - Đại học Y dược Tp. HCM, Phòng Dược lý - Hóa sinh - Trung tâm Sâm và Dược liệu Tp. HCM.

Thực hiện giải phẫu bệnh, soi vi phẫu mẫu gan, tim, thận: Khoa Giải phẫu bệnh - Bệnh viện Chợ Rẫy Tp. HCM.

Thời gian thực hiện nghiên cứu: Từ tháng 10/2017 đến tháng 10/2021.

## 2.5. Phương pháp, công cụ đo lường, thu thập số liệu

### 2.5.1. Bào chế và xây dựng tiêu chuẩn cơ sở viên MIX

#### 2.5.1.1. Bào chế viên MIX

##### **Chiết xuất và bào chế cao khô MIX**

Chiết xuất và bào chế cao khô MIX được tham khảo từ quy trình chung về chiết xuất và bào chế cao từ dược liệu theo DDVN V bao gồm 2 giai đoạn<sup>18</sup>:

(1) Chiết xuất và bào chế cao Nguru tất - Đan sâm - Tam thất

- *Chuẩn bị nguyên liệu*: 12 kg hỗn hợp dược liệu đạt chuẩn bao gồm Nguru tất, Đan sâm, Tam thất được lấy theo tỷ lệ (Bảng 2.2), xay nhỏ, rây qua rây 2 mm. Bột dược liệu được làm ẩm với một lượng ethanol 70% vừa đủ để cho nguyên liệu ẩm đều (khoảng 12 lít), đậy kín để yên trong 2 giờ.

**Bảng 2.2. Công thức chiết xuất cao Nguru tất - Đan sâm - Tam thất**

| Thành phần             | Đơn vị | Số lượng |
|------------------------|--------|----------|
| Nguru tất              | Kg     | 6        |
| Đan sâm                | Kg     | 3,6      |
| Tam thất               | Kg     | 2,4      |
| Ethanol 70% (dung môi) | Lít    | 144      |

- *Chiết xuất*: Cho dược liệu vào bình ngấm kiệt, đặt một lớp bông thấm nước lên trên ống thoát dịch chiết, để bột dược liệu không gây tắc bình và lẫn vào dịch chiết. Sau đó đặt giấy lọc đã cắt vừa vặn đáy bình. Cho từ từ bột dược liệu đã được làm ẩm vào bình, vừa cho vừa san đều và nén nhẹ các lớp dược liệu. Cho dược liệu đến 2/3 thể tích của bình, đặt giấy lọc và tấm sứ để tránh xáo trộn dược liệu khi đổ dung môi. Đổ dung môi vào bình và ngâm lạnh, mở khóa ống thoát dịch chiết và đổ dung môi lên khối dược liệu tới khi có vài giọt dịch chiết chảy ra và không còn bọt khí, đóng khóa

lại. Đồ tiếp dung môi cách mặt được liệu 3 - 5 cm. Ngâm lạnh trong 24 giờ đảm bảo hoạt chất đã hòa tan vào dung môi tới bão hòa. Hết thời gian ngâm lạnh, mở khóa cho dịch chiết chảy từng giọt vào bình hứng, thường xuyên thêm dung môi để ngập mặt được liệu 3 - 5 cm. Rút dịch với tốc độ 3 lít/giờ, mỗi ngày rút 24 lít dịch chiết, đồng thời châm thêm 24 lít dung môi. Tiến hành rút và châm thêm dung môi cho đến khi hết 144 lít.

- *Cô dịch chiết*: Tập trung dịch chiết, cô quay dưới áp suất giảm để thu hồi dung môi (mỗi lần 5 lít), sau đó tiến hành cô trên bếp cách thủy thu được cao Nguru tất - Đan sâm - Tam thất.

## (2) Bào chế cao khô MIX

Vận hành tủ sấy hút chân không. Cho cao Nguru tất - Đan sâm - Tam thất vào khay inox. Đun nóng nước RO đến 70 °C trong nồi inox, cho maltodextrin vào khuấy tan hoàn toàn, cho cao Nguru tất - Đan sâm - Tam thất vào nồi khuấy tan.

Sấy vi sóng chân không qua 2 giai đoạn:

Giai đoạn 1: Áp suất 120 milibar, nhiệt độ 70 °C, thời gian sấy 24 giờ.

Giai đoạn 2: Áp suất 10 milibar, nhiệt độ 70 °C, thời gian sấy 24 giờ.

Kiểm tra độ ẩm của mẻ sấy bằng cân sấy ẩm  $\leq 3\%$ , kiểm tra ở nhiệt độ 80 °C.

Thu được cao khô sau sấy.

## Bào chế viên MIX

Viên nang cứng là dạng bào chế được xác định để bào chế chế phẩm từ dược liệu Nguru tất, Đan sâm, Tam thất, sử dụng uống trực tiếp. Viên MIX được bào chế theo quy trình bào chế thuốc viên từ cao khô dược liệu của LADOPHAR bao gồm các giai đoạn:

- *Xay cao*

Xay thô lần 1 bằng máy nghiền và sàng hạt (không sử dụng lưới). Xay mịn lần 2 bằng máy nghiền và sàng hạt, lưới inox đường kính 200  $\mu\text{m}$ .

Kiểm tra độ ẩm sau khi xay  $\leq 3\%$ , kiểm tra ở nhiệt độ 80°C. Thu được cao mịn sau xay, cho vào 2 lớp túi PE buộc kín.

- *Pha chế cốm*

Cao khô xát qua máy xát hạt đứng (lưới 1,5 mm), rây colloidal silicon dioxide qua rây mịn, trộn ngoài cao. Cho hỗn hợp cao vào máy trộn siêu tốc, cho lactose 200

mesh, tricalciphosphat, magnesi carbonat vào trộn khô 3 phút, tốc độ 80 vòng/phút. Sử dụng 175 g ethanol 96% (tá dược dính) cho một nồi, trộn ướt 5 phút, tốc độ 70 vòng/phút, tạo hạt tốc độ thấp.

Sấy tĩnh: Sấy không tải nhiệt độ 70 °C trước 20 - 30 phút cho nóng tủ sấy, sau đó tắt nhiệt, cho cốm vào sấy không nhiệt đến khi se mặt (sấy gió).

Sửa hạt: Qua máy xát hạt đứng, lưới 1,5 mm.

Sấy lần 2: Sấy ở nhiệt độ 70 °C, độ ẩm dưới 3%

Trộn hoàn tất: Sử dụng 32 g tale cho 5,45 kg cốm, rây talc qua rây mịn.

Trộn đồng nhất: Cho cốm đã được xát hạt đạt yêu cầu kích thước và đạt độ ẩm trộn với bột talc. Bật máy trộn tốc độ 28 vòng/phút, thời gian 7 phút.

Lấy mẫu kiểm nghiệm bán thành phẩm, cho bán thành phẩm vào 2 lớp túi PE buộc kín, cho vào thùng dán nhãn biệt trữ, chuyển qua khu vực biệt trữ bán thành phẩm.

#### *- Đóng nang*

Đóng nang tốc độ 300, nang số 0.

Khối lượng trung bình viên: 430 mg.

Tính chất: Viên nang màu đỏ nâu, có mùi thơm đặc trưng.

Định kỳ 30 phút, kiểm tra khối lượng trung bình, sai số cho phép  $\pm 7,5\%$  so với khối lượng trung bình viên.

Độ rã quy định  $\leq 30$  phút.

Bảo mẫu kiểm nghiệm bán thành phẩm viên, nếu đạt yêu cầu chuyển sang giai đoạn ép vỉ.

#### *- Giai đoạn ép vỉ*

Số lượng viên/vỉ: 10 viên.

Năng suất ép vỉ: 54 vỉ/phút.

Thông số: Nhiệt độ ép màng AI, PVDC: 160 °C.

Nhiệt độ khuôn thổi: 110 °C.

#### *- Giai đoạn đóng gói cấp 2*

Quy cách hộp 5 vỉ x 10 viên

Cho vỉ vào trong túi nhôm kèm theo toa hướng dẫn đã gấp cạnh vào hộp.

#### *- Nhập kho.*

**Bảng 2.3. Công thức bào chế cho một viên MIX**

| <b>Thành phần</b>         | <b>Đơn vị</b> | <b>1 viên</b> |
|---------------------------|---------------|---------------|
| Cao khô MIX               | Mg            | 350           |
| Lactose 200 mesh          | Mg            | 34,5          |
| Tricalci phosphat         | Mg            | 31,11         |
| Magnesi carbonat          | Mg            | 7,5           |
| Colloidal silicon dioxide | Mg            | 4,5           |
| Tổng                      | Mg            | 429,52        |

#### 2.5.1.2. Xây dựng tiêu chuẩn cơ sở viên MIX

##### **Yêu cầu chất lượng**

- *Cảm quan*: Viên nang số 0, màu cam, bên trong chứa cốm màu nâu, khô, đồng đều về hình dạng và màu sắc, không có hiện tượng hút ẩm.
- *Độ ẩm*: Không quá 9,0%.
- *Độ đồng đều khối lượng*:  $\pm 7,5\%$  so với khối lượng trung bình viên.
- *Độ rã*: Không quá 30 phút.
- *Định tính*: Thử nghiệm phép thử định tính của acid oleanolic, acid salvianolic B và ginsenosid Rg1.
- *Định lượng*: Hàm lượng acid oleanolic trong 1 g chế phẩm không dưới 1 mg tính theo chế phẩm khô kiệt, hàm lượng acid salvianolic B trong 1 g chế phẩm không dưới 1 mg tính theo chế phẩm khô kiệt và hàm lượng ginsenosid Rg1 trong 1 g chế phẩm không dưới 1 mg tính theo chế phẩm khô kiệt.
- *Độ nhiễm khuẩn*: Phải đạt yêu cầu theo DĐVN V (Phụ lục 13.6, mức 4).
- *Độ ổn định của viên MIX*: Khảo sát độ ổn định để xác định tuổi thọ và hạn sử dụng của chế phẩm.

##### **Phương pháp thử**

- *Cảm quan*: Trải một lượng bột thuốc trong nang vừa đủ tạo thành một lớp mỏng trên tờ giấy trắng, quan sát bằng mắt thường dưới ánh sáng tự nhiên.
- *Độ ẩm*: Thực hiện theo DĐVN V (Phụ lục 9.6).

Xác định độ ẩm của chế phẩm theo phương pháp xác định mất khối lượng do làm khô. Cân chính xác 1 g bột thuốc trong nang đã được nghiền mịn, cho vào chén thủy tinh (đã sấy và cân bì), sấy ở nhiệt độ 105 °C, trong 4 giờ. Lấy ra để nguội trong

bình hút ẩm rồi cân, tính tỷ lệ khối lượng mất đi do làm khô.

- *Độ đồng đều khối lượng*: Thực hiện theo theo ĐĐVN V (Phụ lục 11.3).

Cân khối lượng của một viên nang, bỏ vỏ nang, lấy hết bột thuốc trong nang, dùng bông lau sạch vỏ nang và cân khối lượng vỏ nang. Khối lượng thuốc trong nang là hiệu số giữa khối lượng viên nang và vỏ nang. Tiến hành tương tự với 19 viên khác, lấy ngẫu nhiên. Tính khối lượng trung bình thuốc trong nang.

- *Độ rã*: Thử theo ĐĐVN V (Phụ lục 11.6).

Cho vào mỗi ống thử nghiệm 1 viên nang, cho 1 đĩa vào mỗi ống. Treo giá đỡ ống thử trong cốc có nước đã được duy trì ở 37 °C và vận hành máy đo độ rã trong thời gian 30 phút. Lấy giá đỡ ống thử ra và quan sát chế phẩm thử. Mẫu thử đạt yêu cầu khi cả 6 viên đều rã.

- *Định tính*: Bằng phương pháp sắc ký lớp mỏng

Lấy 10 viên nang, bỏ vỏ nang lấy bột thuốc bên trong, nghiền mịn, trộn đều, để thực hiện các phép thử định tính.

#### ***Định tính acid oleanolic***

Dung dịch thử: Cân 1 g chế phẩm, thêm 1 mL nước làm ẩm hoàn toàn chế phẩm, thêm 80 mL ethanol 96% (TT), đun cách thủy trong 40 phút, lấy ra để yên 20 phút. Lấy 10 mL dung dịch ở phía trên, thêm 10 mL dung dịch acid hydrocloric (TT), đun hồi lưu 60 phút, cô dịch chiết còn khoảng 5 mL rồi thêm 5 mL nước, chiết với 20 mL cloroform (TT). Bốc hơi dịch chiết cloroform đến cạn, hòa cạn trong 1 mL ethanol (TT) được dung dịch thử.

Dung dịch đối chiếu: Dung dịch acid oleanolic nồng độ 1 mg/mL.

Điều kiện sắc ký: Bản mỏng silica gel 60 F<sub>254</sub>, dung môi triển khai là hỗn hợp của toluen - ethyl acetat - acid formic (7,5: 2,5: 1).

Cách tiến hành: Chấm riêng biệt lên bản mỏng 10 µL dung dịch đối chiếu và 10 - 20 µL dung dịch thử. Khai triển sắc ký với hệ dung môi đã chọn trong bình kín. Sau khi triển khai sắc ký, lấy bản mỏng ra, để khô ngoài không khí.

Cách phát hiện: Phun thuốc thử H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 10% trong ethanol, sấy ở 105 °C trong vài phút đến khi hiện rõ vết.

Yêu cầu: Quan sát dưới ánh sáng thường trên sắc ký đồ của dung dịch thử phải có vết có cùng màu và giá trị R<sub>f</sub> với vết của chuẩn acid oleanolic trên sắc ký đồ của

dung dịch đối chiếu.

***Định tính acid salvianolic B***

Dung dịch thử: Cân 1 g chế phẩm, thêm 1 mL nước làm ẩm hoàn toàn chế phẩm, thêm 10 mL ethanol 96% (TT), siêu âm trong 30 phút, lọc lấy dịch lọc làm dung dịch thử.

Dung dịch đối chiếu: Dung dịch acid salvianolic B nồng độ 150 µg/mL

Điều kiện sắc ký: Bản mỏng silica gel 60 F<sub>254</sub>, dung môi triển khai là hỗn hợp của toluen - ethyl acetat - aceton - acid formic (5: 2: 2: 1).

Cách tiến hành: Chấm riêng biệt lên bản mỏng 10 µL dung dịch đối chiếu và 10 - 20 µL dung dịch thử. Khai triển sắc ký với hệ dung môi đã chọn trong bình kín. Sau khi triển khai sắc ký, lấy bản mỏng ra, để khô ngoài không khí.

Cách phát hiện: Phun thuốc thử H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 10% trong ethanol, sấy ở 105 °C trong vài phút đến khi hiện rõ vết.

Yêu cầu: Quan sát dưới ánh sáng tử ngoại ở bước sóng 254 nm, trên sắc ký đồ của dung dịch thử phải có vết cùng màu sắc và giá trị R<sub>f</sub> với vết của chuẩn acid salvianolic B trên sắc ký đồ của dung dịch đối chiếu.

***Định tính ginsenosid Rg1***

Dung dịch thử: Cân 1 g chế phẩm, thêm 1 mL nước làm ẩm hoàn toàn chế phẩm, thêm 10 mL ethanol 96% (TT), siêu âm trong 30 phút, lọc lấy dịch lọc làm dung dịch thử.

Dung dịch đối chiếu: Dung dịch chuẩn ginsenosid Rg1 nồng độ 1 mg/mL.

Điều kiện sắc ký: Bản mỏng silica gel 60 F<sub>254</sub>, dung môi triển khai là hỗn hợp của n-butanol - acid acetic - nước (7: 1: 2).

Cách tiến hành: Chấm riêng biệt lên bản mỏng 10 µL dung dịch đối chiếu và 10 - 20 µL dung dịch thử. Khai triển sắc ký với hệ dung môi đã chọn trong bình kín. Sau khi triển khai sắc ký, lấy bản mỏng ra, để khô ngoài không khí.

Cách phát hiện: Phun thuốc thử H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 10% trong ethanol, sấy ở 105 °C trong vài phút đến khi hiện rõ vết.

Yêu cầu: Quan sát dưới ánh sáng thường trên sắc ký đồ của dung dịch thử phải có vết có cùng màu và giá trị R<sub>f</sub> với vết của chuẩn ginsenosid Rg1 trên sắc ký đồ của dung dịch đối chiếu.

- *Định lượng*: Bằng phương pháp HPLC

***Định lượng acid oleanolic***

Điều kiện sắc ký:

Cột sắc ký: C18 (Luna), 250 mm x 4,6 mm, 5  $\mu$ m.

Nhiệt độ cột: 25 °C.

Detector: PDA, đặt ở bước sóng 286 nm.

Thể tích tiêm: 10  $\mu$ L.

Tốc độ dòng: 1,0 mL/phút.

Pha động: Acid hydrochloric 0,0012 M - AcCN (2: 8)

Dung dịch thử: Cân chính xác 0,14 g chế phẩm, thêm 1 mL nước để làm ẩm hoàn toàn, thêm 10 mL dung dịch ethanol 70% (TT), siêu âm trong 30 phút, ly tâm, gạn lấy dịch trong, tiến hành lặp lại quá trình trên hai lần nữa, mỗi lần 10 mL ethanol 70% (TT). Tập trung dịch trong cho vào bình định mức 50 mL, định mức vừa đủ với dung môi ethanol 70% (TT). Hút 10 mL dung dịch này, thêm 1 mL dung dịch acid hydrochloric 6 M (TT), trộn đều, làm ấm ở 75 °C trong 22 giờ, làm nguội, chuyển toàn bộ dung dịch thu được vào cốc có mỏ 50 mL, dùng dung dịch ethanol 70% (TT) để tráng bình chứa dung dịch đem thủy phân, tập trung dịch sau khi thủy phân và dịch tráng vào cốc có mỏ 50 mL trên rồi cô đến cạn. Hòa tan cặn thu được trong methanol cho vào bình định mức 10 mL, định mức đến vạch cùng dung môi. Lọc dung dịch thu được qua màng lọc 0,45  $\mu$ m được dung dịch tiêm sắc ký.

Dung dịch chuẩn: Chuẩn bị dung dịch chuẩn acid oleanolic trong methanol có các dãy nồng độ là 0,001; 0,01; 0,05; 0,1 và 0,4 mg/mL. Lọc các dung dịch này qua màng lọc 0,45  $\mu$ m được dung dịch tiêm sắc ký.

Cách tiến hành:

Tiêm riêng biệt khoảng 10  $\mu$ L dung dịch chuẩn và thử vào hệ thống sắc ký. Ghi sắc ký đồ và diện tích pic của acid oleanolic.

Xây dựng phương trình hồi quy biểu thị sự đáp ứng của diện tích pic theo nồng độ của dung dịch chuẩn acid oleanolic, hệ số tương quan  $R^2 \geq 0,99$ .

Dựa vào phương trình hồi quy tính hàm lượng acid oleanolic trong mẫu thử (mg/mL). Hàm lượng acid oleanolic có trong chế phẩm (mg/g).

$$X \text{ (mg/g)} = \frac{C \times 50}{m_t}$$

Trong đó:  $m_t$ : Khối lượng mẫu thử (g)

C: Hàm lượng acid oleanolic trong mẫu thử (mg/mL)

### ***Định lượng acid salvianolic B***

Điều kiện sắc ký:

Cột sắc ký: C18 (Luna), 250 mm x 4,6 mm, 5  $\mu$ m.

Nhiệt độ cột: 25 °C.

Detector: PDA, đặt ở bước sóng 286 nm.

Thể tích tiêm: 10  $\mu$ L.

Tốc độ dòng: 1,0 mL/phút.

Pha động: Acetonitril - acid phosphoric 0,1% (25: 75)

Dung dịch thử: Cân chính xác 0,5 g chế phẩm cho vào bình nón nút mài, thêm 40 mL methanol 75% (TT), đập nút, sau đó đun hồi lưu trên cách thủy 1 giờ, để nguội, chuyển vào bình định mức 50 mL và thêm methanol 75% (TT) đến vạch. Lắc đều, lọc qua giấy lọc sau đó lọc qua màng lọc 0,45  $\mu$ m được dung dịch tiêm sắc ký.

Dung dịch chuẩn: Chuẩn bị dung dịch chuẩn acid salvianolic B trong methanol có các dãy nồng độ là 0,03; 0,06; 0,09; 0,12; 0,15 và 0,18 mg/mL. Lọc các dung dịch này qua màng lọc 0,45  $\mu$ m được dung dịch tiêm sắc ký

Cách tiến hành:

Tiêm riêng biệt khoảng 10  $\mu$ L dung dịch chuẩn và thử vào hệ thống sắc ký. Ghi sắc ký đồ và diện tích pic của acid salvianolic B.

Xây dựng phương trình hồi quy biểu thị sự đáp ứng của diện tích pic theo nồng độ của dung dịch chuẩn acid salvianolic B, hệ số tương quan  $R^2 \geq 0,99$ .

Dựa vào phương trình hồi quy tính hàm lượng acid salvianolic trong mẫu thử (mg/mL). Hàm lượng acid salvianolic B có trong chế phẩm (mg/g).

$$Y \text{ (mg/g)} = \frac{C \times 50}{m_t}$$

Trong đó:  $m_t$ : Khối lượng mẫu thử (g)

C: Hàm lượng acid salvianolic B trong mẫu thử (mg/mL)

***Định lượng ginsenosid Rg1***

Điều kiện sắc ký:

Cột sắc ký: C18 (Luna), 250 mm x 4,6 mm, 5  $\mu$ m.

Nhiệt độ cột: 30 °C.

Detector: PDA, đặt ở bước sóng 203 nm.

Thể tích tiêm: 20  $\mu$ L.

Pha động:

Pha động A: Nước - acid acetic (100: 0,01).

Pha động B: Acetonitril - acid acetic (100: 0,01).

**Bảng 2.4. Chương trình dung môi sắc ký định lượng ginsenosid Rg1**

| Thời gian (phút)    | Pha động B (%)        | Tốc độ dòng (mL/phút) |
|---------------------|-----------------------|-----------------------|
| 0 - 30              | 19 $\rightarrow$ 21,2 | 1,0                   |
| 30 - 35             | 21,2 $\rightarrow$ 26 | 1,0                   |
| 35 - 40             | 26 $\rightarrow$ 28   | 1,0                   |
| 40 - 50             | 28 $\rightarrow$ 38   | 1,0                   |
| 50 - 60             | 38 $\rightarrow$ 55   | 1,0                   |
| 60 - 65             | 55                    | 1,0                   |
| 65 - 70             | 55 $\rightarrow$ 80   | 1,0                   |
| 70 $\rightarrow$ 75 | 80 $\rightarrow$ 95   | 1,0                   |
| 75 $\rightarrow$ 76 | 95 $\rightarrow$ 19   | 1,0                   |
| 76 $\rightarrow$ 85 | 19                    | 1,0                   |

Dung dịch thử: Cân chính xác 1 g chế phẩm, thêm 2 mL thấm ướt hoàn toàn chế phẩm, thêm tiếp 35 mL hỗn hợp methanol: nước (80: 20), đun hồi lưu trong 60 phút lấy ra để nguội, cho vào bình định mức 50 mL, định mức đến vạch cùng dung môi, lọc qua giấy lọc. Dịch lọc thu được lọc tiếp qua màng lọc 0,45  $\mu$ m được dung dịch tiêm sắc ký.

Dung dịch chuẩn: Chuẩn bị dung dịch chuẩn ginsenosid Rg1 trong methanol có các dãy nồng độ là 0,02; 0,04; 0,1; 0,15 và 0,2 mg/mL. Lọc các dung dịch này qua màng lọc 0,45  $\mu$ m được dung dịch tiêm sắc ký.

Cách tiến hành:

Tiêm riêng biệt khoảng 20 µL dung dịch chuẩn và thử vào hệ thống sắc ký.

Ghi sắc ký đồ và diện tích pic của ginsenosid Rg1.

Xây dựng phương trình hồi quy biểu thị sự đáp ứng của diện tích pic theo nồng độ của dung dịch chuẩn ginsenosid Rg1, hệ số tương quan  $R^2 \geq 0,99$ .

Dựa vào phương trình hồi quy tính hàm lượng ginsenosid Rg1 trong mẫu thử (mg/mL). Hàm lượng ginsenosid Rg1 có trong chế phẩm (mg/g).

$$Z \text{ (mg/g)} = \frac{C \times 50}{m_t}$$

Trong đó:  $m_t$ : Khối lượng mẫu thử (g)

C: Hàm lượng ginsenosid Rg1 trong mẫu thử (mg/mL)

- *Độ nhiễm khuẩn*: Thử theo ĐĐVN V (Phụ lục 13.6).

- *Độ ổn định của viên MIX*

Mẫu thử: Viên nang cứng Ngưu tất - Đan sâm - Tam (viên MIX). Số lô: 021218NC. Ngày sản xuất: 02/12/2018. Quy cách đóng gói: Hộp x 5 vỉ x 10 viên.

Điều kiện lưu mẫu và thời gian kiểm nghiệm (Bảng 2.5). Mẫu sau khi lấy ra khỏi nơi bảo quản vào ngày đã ghi trong thời gian biểu được để ở nhiệt độ 20 °C - 25 °C và tiến hành kiểm nghiệm (không quá 2 tuần kể từ khi lấy ra khỏi nơi bảo quản).

**Bảng 2.5. Điều kiện bảo quản và thời gian kiểm nghiệm**

| Điều kiện bảo quản        | Khoảng thời gian kiểm nghiệm (tháng) |   |   |   |    |    |    |
|---------------------------|--------------------------------------|---|---|---|----|----|----|
|                           | 0                                    | 3 | 6 | 9 | 12 | 18 | 24 |
| Dài hạn                   | x                                    | x | x | x | x  | x  | x  |
| Nhiệt độ: 30 °C ± 2 °C;   |                                      |   |   |   |    |    |    |
| Độ ẩm tương đối: 75% ± 5% |                                      |   |   |   |    |    |    |
| Lão hóa cấp tốc           | x                                    | x | x |   |    |    |    |
| Nhiệt độ: 40 °C ± 2 °C    |                                      |   |   |   |    |    |    |
| Độ ẩm tương đối: 75% ± 5% |                                      |   |   |   |    |    |    |

Các phương pháp kiểm nghiệm độ ổn định được tiến hành theo TCCS với các tiêu chí, yêu cầu (Bảng 2.6). Độ đồng đều khối lượng chỉ kiểm thời điểm ban đầu.

Ghi chép và lập bảng tổng hợp kết quả theo từng lô, từng điều kiện bảo quản. Nhận xét kết quả, bàn luận, kết luận và đề nghị tuổi thọ/hạn sử dụng của chế phẩm.

**Bảng 2.6. Tiêu chí khảo sát độ ổn định của viên MIX**

| <b>Tiêu chí</b>        | <b>Yêu cầu</b>                                                                                                                                                                                                                    |
|------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Cảm quan               | Viên nang cứng số 0, màu cam, bên trong chứa cốm màu nâu, vị đắng hơi chát, mùi thơm đặc trưng của dược liệu                                                                                                                      |
| Độ đồng đều khối lượng | $\pm 7,5\%$ so với khối lượng trung bình viên                                                                                                                                                                                     |
| Độ ẩm                  | Không quá 9,0%                                                                                                                                                                                                                    |
| Định tính              | Thể hiện phép thử định tính của acid oleanolic, acid salvianolic B và ginsenosid Rg1                                                                                                                                              |
| Độ rã                  | Không quá 30 phút                                                                                                                                                                                                                 |
| Định lượng             | Hàm lượng acid oleanolic: Không dưới 1 mg/g tính theo chế phẩm khô kiệt<br>Hàm lượng acid salvianolic B: Không dưới 1 mg/g tính theo chế phẩm khô kiệt<br>Hàm lượng ginsenosid Rg1: Không dưới 1 mg/g tính theo chế phẩm khô kiệt |

#### 2.5.2. Đánh giá tính an toàn của viên MIX trên chuột nhắt trắng

##### 2.5.2.1. Độc tính cấp

Phương pháp xác định độc tính cấp của viên MIX trên chuột nhắt trắng bằng đường uống được tiến hành theo hướng dẫn của Tổ chức Y tế thế giới về thuốc có nguồn gốc từ thảo dược<sup>113</sup> và tham khảo phương pháp xác định độc tính của thuốc của Đỗ Trung Đàm<sup>114</sup>.

Viên MIX được tháo bỏ vỏ nang, cân trọng lượng bột thuốc trong viên của 10 viên và lấy khối lượng trung bình của 1 viên. Bột thuốc được hòa với nước cất cho chuột uống bằng kim đầu tù chuyên dụng (kim hơi cong có đầu tù với độ dài đưa vào đến dạ dày chuột). Thể tích cho uống là 20 mL/kg và không quá 0,5 mL/một chuột, ngày uống một lần trong khoảng thời gian 8 - 9 giờ sáng. Liều thử nghiệm sau đó được quy đổi thành số lượng viên uống/kg.

Chuột nhắt trắng đực (chủng *Swiss albino*, 5 - 6 tuần tuổi, trọng lượng trung bình  $22 \pm 2$  g) được nuôi ổn định ít nhất một tuần trước khi thử nghiệm.

Chuột được chia thành nhiều lô, mỗi lô 10 con. Những chuột ở cùng một lô sẽ nhận cùng một liều thuốc khảo sát. Sự đánh giá dựa vào phản ứng toàn ứng hay bất ứng (sống hay chết) nhận thấy ở mỗi chuột trong nhóm sau 72 giờ. Chuột được tiếp tục theo dõi sau 14 ngày uống để ghi nhận những triệu chứng bất thường (nếu có).

Có 3 trường hợp có thể xảy ra:

- *Trường hợp 1*: Sau khi cho chuột uống mẫu thử, số chuột trong lô thử nghiệm vẫn bảo toàn, xác định liều cao nhất có thể bơm qua kim mà không làm chết chuột. Liều này được ký hiệu là  $D_{\max}$  và liều tương đối an toàn  $D_s$  dùng trong các thực nghiệm được lý có thể bằng  $1/5 D_{\max}$  hoặc lớn hơn  $1/5 D_{\max}$ .
- *Trường hợp 2*: Sau khi cho chuột uống mẫu thử, tỷ lệ tử vong là 100% thì đây là liều chết tuyệt đối  $LD_{100}$ . Tính toán và gây lô thử nghiệm để tiếp tục xác định được liều không làm chết con vật nào  $LD_0$ . Từ đó, suy ra liều  $LD_{50}$  được tính theo công thức Behrens- Karber.<sup>114</sup>
- *Trường hợp 3*: Sau khi cho uống mẫu thử, tỷ lệ tử vong thấp hơn 100%, không xác định được liều gây chết tuyệt đối. Đối với trường hợp này, không thể suy ra liều  $LD_{50}$ , nhưng có thể xác định được liều tối đa không gây chết chuột, gọi là liều dưới liều chết  $LD_0$ . Liều tương đối an toàn  $D_s$  dùng cho thực nghiệm được lý có giá trị bằng  $1/5$  hoặc  $1/10 LD_0$ .

#### 2.5.2.2. Độc tính bán trường diễn

Phương pháp xác định độc tính bán trường diễn của viên MIX trên chuột nhắt trắng bằng đường uống được tiến hành theo hướng dẫn của Tổ chức Y tế thế giới về thuốc có nguồn gốc từ thảo dược,<sup>113</sup> và tham khảo hướng dẫn thử nghiệm tiền lâm sàng và lâm sàng thuốc đông y, thuốc từ dược liệu của Bộ Y tế.<sup>115</sup>

Viên MIX được tháo bỏ vỏ nang, bột thuốc được hòa với nước cất và cho chuột uống hàng ngày vào thời điểm 8 - 9 giờ sáng, liên tục trong 2 tháng. Thể tích cho uống là 10 mL/kg.

Chuột nhắt trắng đực (chủng *Swiss albino*, 5 - 6 tuần tuổi, trọng lượng  $22 \pm 2$  g) được nuôi ổn định ít nhất một tuần trước khi thử nghiệm.

Chuột chia thành 2 lô, mỗi lô 10 con. Lô chứng uống nước cất, lô thử nghiệm uống viên MIX với liều 4 viên/kg/ngày x 2 tháng (gấp 4 lần liều dự kiến sử dụng trên người 50 kg, tính theo hệ số 12).

Lấy máu tĩnh mạch đuôi xét nghiệm (mẫu máu lấy vào buổi sáng trước khi cho chuột ăn).

- *Thời điểm xét nghiệm*: Trước thử nghiệm, sau 1 tháng và sau 2 tháng. Riêng các xét nghiệm đại thể lấy gan, tim, thận tiến hành sau khi kết thúc thử nghiệm.

- *Các chỉ tiêu đánh giá*

Tình trạng chung, trọng lượng cơ thể chuột. Đánh giá tác động đến cơ quan tạo máu thông qua số lượng hồng cầu, bạch cầu, tiểu cầu, các chỉ số liên quan đến hồng cầu (hemoglobin, hematocrit, MCV, MCH, MCHC).

Đánh giá mức độ tổn thương tế bào gan thông qua định lượng hoạt độ enzyme AST, ALT.

Đánh giá chức năng thận thông qua định lượng nồng độ urea, creatinin.

Trọng lượng tương đối của gan, tim, thận (g%), giải phẫu vi thể (các khảo sát vi thể mô gan, tim, thận).

Trọng lượng tương đối được tính bằng công thức:

$$g\% = (\text{Trọng lượng cơ quan} / \text{Trọng lượng cơ thể}) \times 100.$$

2.5.3. Khảo sát tác dụng điều hòa lipid máu của viên MIX trên chuột nhắt trắng

2.5.3.1. Tác dụng điều hòa lipid máu của viên MIX trên chuột nhắt trắng gây RLLM nội sinh bằng tyloxapol

Được thực hiện theo phương pháp của Goldfarb S<sup>58</sup> và tham khảo hướng dẫn thử nghiệm tiền lâm sàng và lâm sàng thuốc đông y, thuốc từ dược liệu của Bộ Y tế,<sup>115</sup> kết hợp với phác đồ dự phòng trên mô hình gây RLLM nội sinh cấp bằng tyloxapol.

Viên MIX được tháo bỏ vỏ nang, bột thuốc được hòa với nước cất và cho chuột uống. Thời điểm cho chuột uống vào lúc 8 - 9 giờ sáng, thể tích cho uống là 10 mL/kg. Liều thử nghiệm là 1 viên và 2 viên/kg thể trọng chuột.

Chuột nhắt trắng đực (chủng *Swiss albino*, 5 - 6 tuần tuổi, trọng lượng trung bình  $22 \pm 2$  g) được nuôi ổn định một tuần trước khi thử nghiệm. Chuột được chia ngẫu nhiên vào các lô (Bảng 2.7).

Các lô chứng uống nước cất, hai lô thử uống viên MIX liều 1 viên/kg/ngày (M1) và 2 viên/kg/ngày (M2), lô đối chứng uống atorvastatin liều 60 mg/kg/ngày (AT60) và cho uống theo phác đồ dự phòng liên tục trong 7 ngày, cho nhịn đói 16

giờ trước khi gây RLLM. Ngày thứ 7, tiến hành gây RLLM bằng cách tiêm tĩnh mạch đuôi chuột một liều duy nhất tyloxapol 250 mg/kg, 0,1 mL/10 g. Sau khi tiêm tyloxapol, các lô chuột được cho uống nước cất, M1, M2 và AT60, 3 lần sau 1 giờ, 9 giờ và 23 giờ. Cho chuột nhịn đói qua đêm, 24 giờ sau khi tiêm tyloxapol tiến hành lấy máu tĩnh mạch đuôi định lượng nồng độ các thành phần lipid máu: TC, HDL-C, LDL-C, TG.

**Bảng 2.7. Bố trí thử nghiệm khảo sát tác dụng điều hòa lipid máu của viên MIX trên mô hình gây RLLM nội sinh**

| Nhóm                  | Lô (n = 10)          | Mẫu thử uống |
|-----------------------|----------------------|--------------|
| Sinh lý (tyloxapol -) | Lô 1 (chứng sinh lý) | Nước cất     |
|                       | Lô 2 (thử)           | M2           |
| Bệnh lý (tyloxapol +) | Lô 3 (chứng bệnh lý) | Nước cất     |
|                       | Lô 4 (thử 1)         | M1           |
|                       | Lô 5 (thử 2)         | M2           |
|                       | Lô 6 (đối chứng)     | AT60         |

#### 2.5.3.2. Tác dụng điều hòa lipid máu của viên MIX trên chuột nhắt trắng gây RLLM ngoại sinh bằng chế độ ăn giàu lipid

Được thực hiện theo phương pháp của Hainida E<sup>61</sup> và tham khảo hướng dẫn thử nghiệm tiền lâm sàng và lâm sàng thuốc đông y, thuốc từ dược liệu của Bộ Y tế,<sup>115</sup> với phác đồ dự phòng trên mô hình gây RLLM ngoại sinh bằng chế độ ăn giàu lipid.

Viên MIX được tháo bỏ vỏ nang, bột thuốc được hòa với nước cất và cho chuột uống, thể tích cho uống là 10 mL/kg. Liều thử nghiệm là 1 viên và 2 viên/kg.

Chuột nhắt trắng đực (chủng *Swiss albino*, 5 - 6 tuần tuổi, trọng lượng trung bình  $22 \pm 2$  g) được nuôi ổn định một tuần trước khi thử nghiệm. Chuột được cân trọng lượng trước khi đưa vào thử nghiệm, chia ngẫu nhiên vào các lô (Bảng 2.8).

Các lô chứng uống nước cất, hai lô thử uống viên MIX liều 1 viên/kg/ngày (M1) và liều 2 viên/kg/ngày (M2), lô đối chứng uống atorvastatin liều 10 mg/kg/ngày (AT10) trong 6 tuần.

Nhóm sinh lý: Lô 1 (chứng sinh lý) cho uống nước cất sáng, chiều với chế độ ăn bình thường trong suốt thời gian thử nghiệm.

Nhóm bệnh lý: Các lô được cho uống dung dịch giàu lipid (cholesterol 25 mg, acid cholic 1%, dầu dừa vừa đủ 10 mL) vào lúc 8 - 9 giờ sáng. Từ 15 - 16 giờ chiều, các lô được cho uống như sau: Lô 2 (chứng bệnh lý) uống nước cất, lô 3 (thử 1) uống M1, lô 4 (thử 2) uống M2, lô 5 (đối chứng) uống AT10. Tiến hành cân, kiểm tra trọng lượng chuột ở tất cả các lô mỗi tuần. Sau 6 tuần, tiến hành lấy máu tĩnh mạch đuôi chuột để định lượng nồng độ các thành phần lipid máu (TC, HDL-C, LDL-C và TG).

**Bảng 2.8. Bố trí thử nghiệm khảo sát tác dụng điều hòa lipid máu của viên**

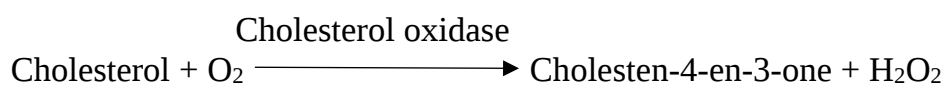
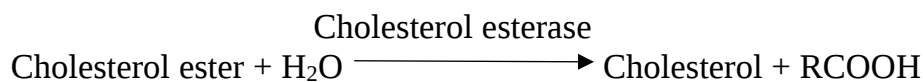
**MIX trên mô hình gây RLLM ngoại sinh**

| Nhóm                    | Lô (n = 7)           | Mẫu thử uống |
|-------------------------|----------------------|--------------|
| Sinh lý (cholesterol -) | Lô 1 (chứng sinh lý) | Nước cất     |
| Bệnh lý (cholesterol +) | Lô 2 (chứng bệnh lý) | Nước cất     |
|                         | Lô 3 (thử 1)         | M1           |
|                         | Lô 4 (thử 2)         | M2           |
|                         | Lô 5 (đối chứng)     | AT10         |

#### 2.5.3.3. Phương pháp định lượng thành phần lipid máu

Mẫu máu thử nghiệm được lấy từ tĩnh mạch đuôi chuột, sau đó đem quay ly tâm 3000 vòng trong 15 phút ở nhiệt độ phòng, lấy huyết tương. Huyết tương được ủ với thuốc thử đặc hiệu trước khi đo quang để xác định nồng độ các thành phần lipid máu.

Theo hướng dẫn của bộ KIT định lượng lipid máu Human Co., Germany về nguyên tắc định lượng: Tất cả CE trong huyết tương bị thủy phân thành cholesterol tự do và FA bởi enzyme cholesterol esterase. Với sự hiện diện oxygen, cholesterol tự do bị oxy hóa bởi enzyme cholesterol oxidase thành cholesten-4-ene-3-one và hydroperoxide (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>). H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> phản ứng với p-chlorophenol và 4-aminoantipyrin dưới xúc tác enzym peroxidase để hình thành chất màu quinoneimin.



Độ mạnh chất màu tỷ lệ với nồng độ cholesterol và có thể đo được bằng quang phổ ở bước sóng từ 480 - 520 nm. LDL được ước lượng từ công thức Friedewald:

$$\text{LDL} = \text{TC} - (\text{VLDL} + \text{HDL}). \text{VLDL được ước lượng bằng } 1/5 \text{ TG.}$$

2.5.4. Khảo sát tác động ức chế hoạt tính HMG-CoA reductase của viên MIX *in vitro* và *in vivo*

2.5.4.1. Phương pháp tạo dịch đồng thể enzyme từ gan chuột nhắt trắng bình thường

Tạo dịch đồng thể enzyme từ gan chuột nhắt trắng được thực hiện theo phương pháp của Patel HD và cộng sự,<sup>52</sup> với một số thay đổi cho phù hợp với điều kiện phòng thí nghiệm của Trương Đình Phước và cộng sự.<sup>116</sup>

Chuẩn bị các dung dịch: Đệm định lượng (Tris HCl 0,1M; EDTA 1 mM; NaCl 75 mM), dung dịch sucrose 0,25 M lạnh (0 - 4 °C), dithiothreitol 1mM, dung dịch NaCl 0,9 %.

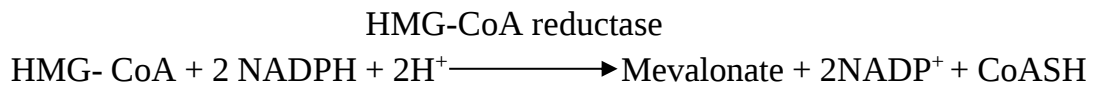
Chuột nhắt trắng đực (chủng *Swiss albino*, 5 - 6 tuần tuổi, trọng lượng  $22 \pm 2$  g) được nuôi ổn định một tuần trước khi thử nghiệm. Chuột được cho nhịn đói 24 giờ trước khi bắt đầu thử nghiệm. Sau đó, chuột được gây mê bằng đá CO<sub>2</sub>, cố định trên bàn mổ, bơm rửa làm sạch máu và dịch trong gan bằng dung dịch NaCl 0,9%. Gan tách nhanh, cho vào dung dịch sucrose 0,25 M lạnh (0 - 4 °C), rửa sạch máu. Đưa mô gan đã xác định khối lượng vào ống thủy tinh, bổ sung dung dịch sucrose 0,25 M lạnh (4 mL/g mô gan). Đồng thể hóa mẫu mô trong 1 phút (khoảng 20 giây/lần, sau đó ngưng 10 giây để tránh enzyme bị mất hoạt tính bởi nhiệt, lặp lại 3 lần). Ly tâm dịch đồng thể lần một ở 0 °C trong 15 phút với lực ly tâm 5000 G/phút, bỏ cặn, thu dịch. Bổ sung 0,1 mL dung dịch CaCl<sub>2</sub> 88 mM trên mỗi mL dịch thu được, lắc đều, để ổn định trong 5 phút ở 0 - 4 °C. Ly tâm lần thứ 2 ở 0 °C trong 35 phút với lực ly tâm 13500 G/phút, bỏ dịch thu cặn. Hòa tan cặn trong dung dịch bảo quản enzyme. Cặn được đồng thể hóa (20 giây), thu được dịch mô đồng nhất, bảo quản ở 0 - 4 °C.

2.5.4.2. Phương pháp tạo dịch đồng thể enzyme từ gan chuột nhắt trắng gây RLLM nội sinh bằng tyloxapol

Thực hiện mô hình gây RLLM nội sinh cấp bằng tyloxapol theo mục 2.5.3.1. Cho chuột nhịn đói qua đêm, 24 giờ sau khi tiêm tyloxapol tiến hành mổ tách gan tạo dịch đồng thể enzyme theo hướng dẫn mục 2.5.4.1.

#### 2.5.4.3. Phương pháp định lượng hoạt tính HMG-CoA reductase

HMG-CoA và NADPH được chuyển thành mevalonate và  $\text{NADP}^+$  dưới sự xúc tác của enzyme HMG-CoA reductase. Sự ức chế HMG-CoA reductase làm giảm tốc độ oxy hóa NADPH.<sup>59</sup> Hàm lượng NADPH còn lại được xác định dựa vào phương pháp hấp thụ phân tử UV - Vis (đo động học) ở bước sóng 340 nm sau 5 phút phản ứng. Hoạt tính HMG- CoA reductase được đánh giá thông qua độ giảm hàm lượng NADPH.



**Bảng 2.9. Bố trí thử nghiệm định lượng hoạt tính HMG-CoA reductase *in vitro***

| Thành phần                                      | Mẫu trắng   | Mẫu chứng | Atorvastatin | Viên MIX |
|-------------------------------------------------|-------------|-----------|--------------|----------|
| NADPH 5 mM ( $\mu\text{L}$ )                    | 30          | 30        | 30           | 30       |
| HMG-CoA 1 mM ( $\mu\text{L}$ )                  | 30          | 30        | 30           | 30       |
| Dithioreitol 1 mM ( $\mu\text{L}$ )             | 10          | 10        | 10           | 10       |
| Atorvastatin ( $\mu\text{L}$ )                  | -           | -         | 50           | -        |
| Viên MIX ( $\mu\text{L}$ )                      | -           | -         | -            | 50       |
| Dịch đồng thể enzyme gan chuột bình thường (mg) | -           | 1         | 1            | 1        |
| Đệm định lượng ( $\mu\text{L}$ )                | Vừa đủ 1000 |           |              |          |

Cho hỗn hợp vào trong ống nghiệm, trộn đều, ủ ở nhiệt độ 37 °C và đo độ hấp thụ ở bước sóng 340 nm bằng máy đo quang UV - Vis Unicam sau 5 phút phản ứng. Mỗi mẫu được thực hiện lặp lại 3 lần. Dựa vào % ức chế, xây dựng phương trình hồi quy và ước lượng giá trị  $\text{IC}_{50}$  của atorvastatin và viên MIX tại nồng độ có hoạt độ HMG-CoA reductase bằng 50% so với chứng.

**Bảng 2.10. Bố trí thử nghiệm định lượng hoạt tính HMG-CoA reductase *in vivo***

| Thành phần                                                  | Mẫu trắng   | Mẫu thử |
|-------------------------------------------------------------|-------------|---------|
| NADPH 5 mM ( $\mu\text{L}$ )                                | 30          | 30      |
| HMG-CoA 1 mM ( $\mu\text{L}$ )                              | 30          | 30      |
| Dithioreitol 1 mM ( $\mu\text{L}$ )                         | 10          | 10      |
| Dịch đồng thể enzyme gan chuột gây RLLM bằng tyloxapol (mg) | -           | 1       |
| Đệm định lượng ( $\mu\text{L}$ )                            | Vừa đủ 1000 |         |

Cho hỗn hợp vào trong ống nghiệm, trộn đều, ủ ở nhiệt độ 37 °C và đo độ hấp thu ở bước sóng 340 nm bằng máy đo quang UV - Vis Unicam sau 5 phút phản ứng. Hoạt tính ức chế enzyme thể hiện thông qua độ giảm lượng NADPH sau 5 phút, so sánh sự khác biệt đối với các lô thử nghiệm.

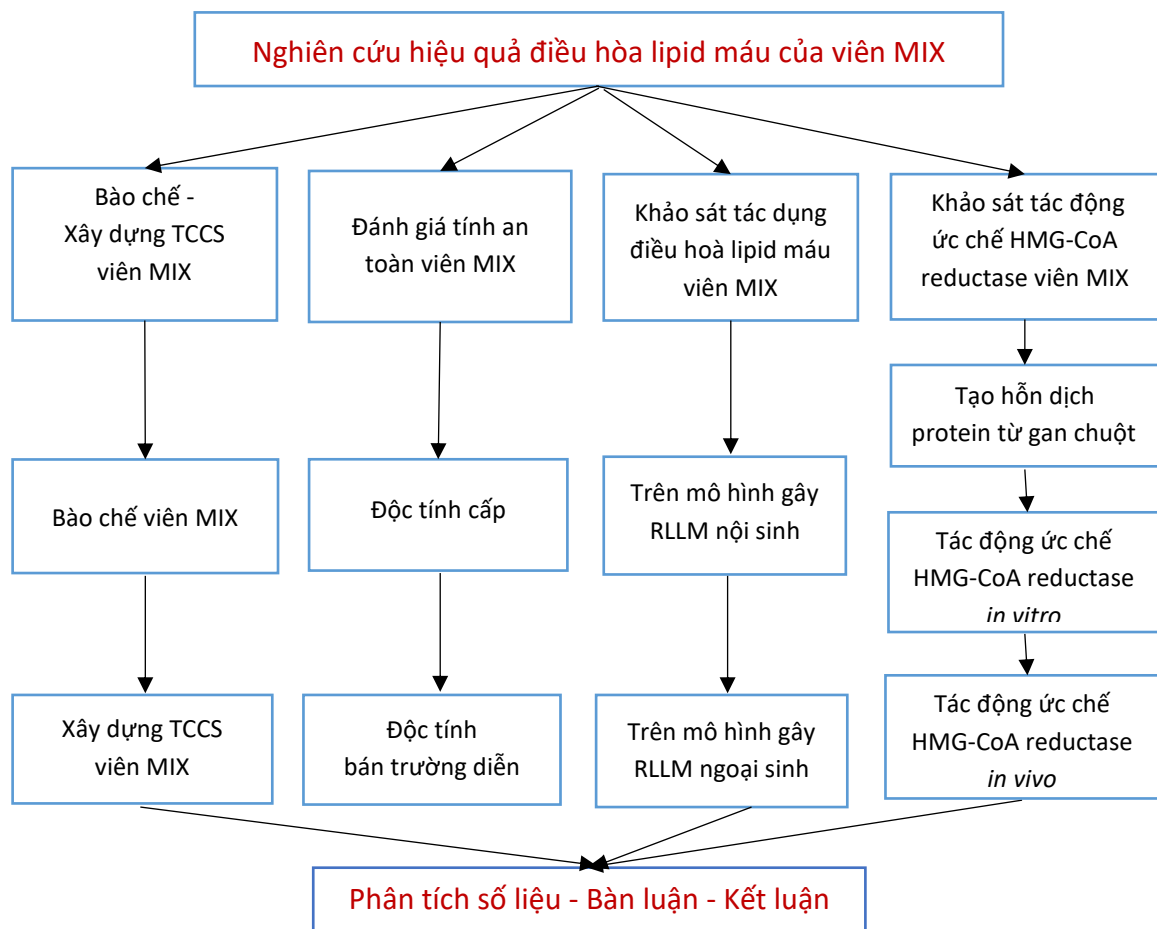
Công thức tính  $\Delta OD$ :  $\Delta OD = OD_{5 \text{ phút}} - OD_{0 \text{ phút}}$

Công thức tính % ức chế hoạt tính enzyme:

$$\% \text{ ức chế enzyme} = [(\Delta OD \text{ chứng} - \Delta OD \text{ thử}) / \Delta OD \text{ chứng}] \times 100$$

## 2.6. Quy trình nghiên cứu

Đề tài nghiên cứu được tiến hành từng bước theo quy trình (Hình 2.3).



**Hình 2.3. Quy trình nghiên cứu**

## 2.7. Phương pháp thống kê, xử lý số liệu

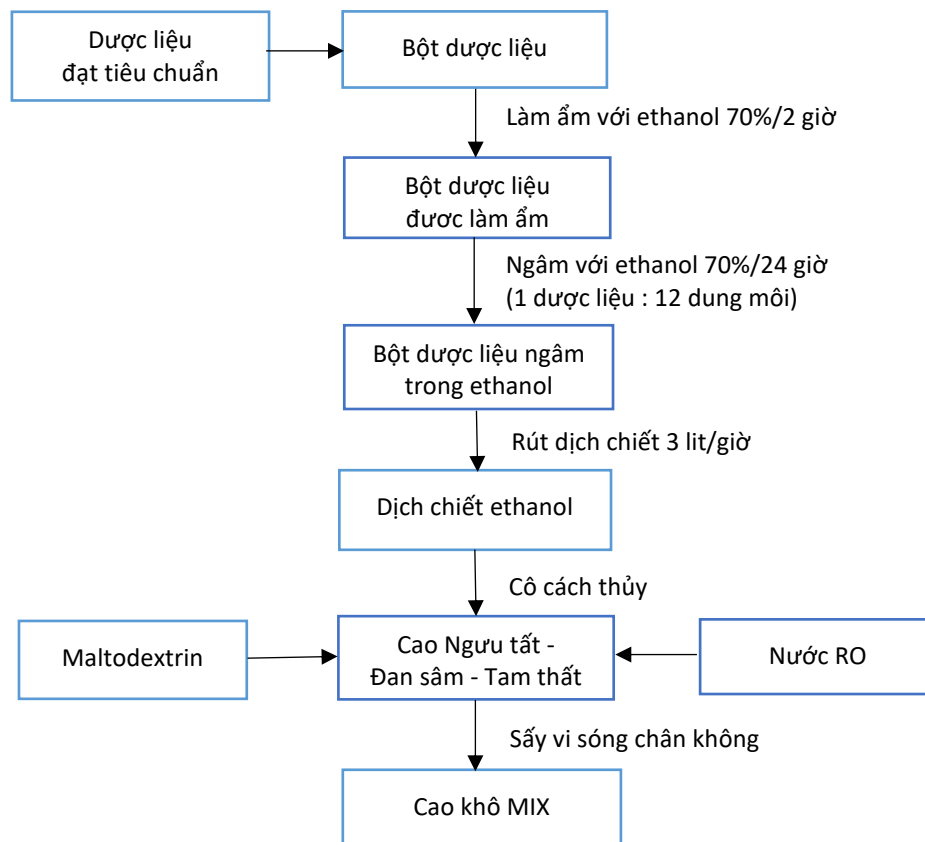
Các số liệu được biểu thị bằng trị số trung bình:  $M \pm SEM$  (Standard error of the mean) và xử lý thống kê dựa vào phép kiểm One-Way ANOVA và hậu kiểm bằng Student-Newman-Keuls test (phần mềm Sigma Stat 3.5, USA). Kết quả thử nghiệm đạt ý nghĩa thống kê với độ tin cậy 95% khi  $P < 0,05$  so với lô chứng và đối chứng.

### Chương 3. KẾT QUẢ

#### 3.1. Bào chế và tiêu chuẩn cơ sở viên MIX

##### 3.1.1. Bào chế viên MIX

Chiết xuất và bào chế cao Nguru tất - Đan sâm - Tam thất bằng phương pháp ngâm kiệt, sử dụng ethanol 70% làm dung môi cho hiệu suất chiết 36,24% (tính theo chế phẩm cao khô kiệt). Quy trình đơn giản, dễ thực hiện, dễ triển khai trong sản xuất sau này (Hình 3.1).



**Hình 3.1. Quy trình bào chế cao khô MIX**

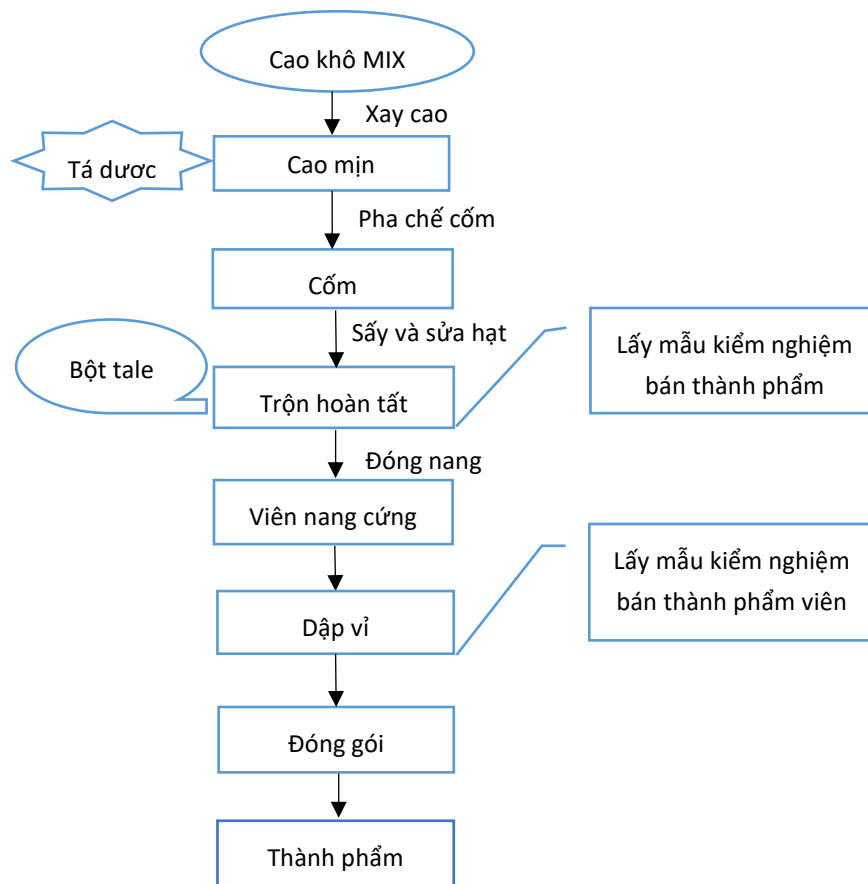
**Bảng 3.1. Kết quả chiết xuất và bào chế cao Nguru tất - Đan sâm - Tam thất**

| Thành phần                                  | Đơn vị | Khối lượng |
|---------------------------------------------|--------|------------|
| Nguru tất - Đan sâm - Tam thất              | Kg     | 12         |
| Ethanol 70%                                 | Lít    | 144        |
| Cao Nguru tất - Đan sâm - Tam thất: 5,6 kg. |        |            |

Bào chế cao khô MIX theo quy trình chung về bào chế cao khô từ dược liệu, dưới hỗ trợ trang thiết bị hiện đại đạt chuẩn Good Manufacturing Practice - World Health Organization (GMP - WHO), đây là điều kiện đảm bảo cho chế phẩm đạt tiêu chuẩn chất lượng (Hình 3.1).

**Bảng 3.2. Kết quả bào chế cao khô MIX**

| Thành phần                        | Đơn vị | Số lượng |
|-----------------------------------|--------|----------|
| Cao Ngưu tất - Đan sâm - Tam thất | Kg     | 5,6      |
| Maltodextrin                      | Kg     | 0,9      |
| Nước RO                           | Lít    | 2        |
| Cao khô MIX: 4,7 kg               |        |          |



**Hình 3.2. Quy trình bào chế viên MIX**

Bào chế viên MIX theo quy trình chung về bào chế thuốc viên từ cao khô dược liệu, dưới hỗ trợ trang thiết bị hiện đại đạt chuẩn GMP - WHO, đây là điều kiện đảm bảo cho chế phẩm đạt tiêu chuẩn chất lượng (Hình 3.2).

**Bảng 3.3. Kết quả bào chế viên MIX**

| Thành phần                                                                                             | 12.857 viên | 1 viên |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------|--------|
| Cao khô MIX                                                                                            | 4,5 kg      | 350 mg |
| Tá dược (colloidal silicon dioxide, lactose 200 mesh, tricalciphosphat, magnesi carbonat, ethanol 96%) | 1 kg        | 80 mg  |
| Tổng                                                                                                   | 5,5 kg      | 430 mg |

Như vậy, 12 kg hỗn hợp dược liệu bào chế được 12.857 viên, hàm lượng 430 mg/viên (tương ứng 0,93 g dược liệu/viên).

### 3.1.2. Tiêu chuẩn cơ sở viên MIX

#### Cảm quan

Viên nang cứng số 0, màu cam, bên trong chứa cốm màu nâu, vị đắng hơi chát, mùi thơm đặc trưng của dược liệu.

#### Độ ẩm

**Bảng 3.4. Kết quả độ ẩm của viên MIX**

| Mẫu | KL bì (g) | KL mẫu (g) | KL bì + mẫu trước sấy (g) | KL bì + mẫu sau sấy (g) | Độ ẩm (%) | Độ ẩm TB (%) |
|-----|-----------|------------|---------------------------|-------------------------|-----------|--------------|
| 1   | 21,8019   | 1,0976     | 22,8995                   | 22,8239                 | 6,89      |              |
| 2   | 18,2976   | 1,0120     | 19,3096                   | 19,2386                 | 7,02      | 6,95         |

*KL: Khối lượng*

Như vậy, viên MIX đạt yêu cầu về độ ẩm theo ĐĐVN V.

#### Độ đồng đều khối lượng và độ rã

**Bảng 3.5. Kết quả độ đồng đều khối lượng và độ rã viên MIX**

| Tiêu chí               | Mức chất lượng                                | Kết quả       |
|------------------------|-----------------------------------------------|---------------|
| Độ đồng đều khối lượng | $\pm 7,5\%$ so với khối lượng trung bình viên | Đạt           |
| Độ rã                  | Không quá 30 phút                             | 13 phút (đạt) |

Như vậy, viên MIX đạt yêu cầu về độ đồng đều khối lượng và độ rã theo ĐĐVN V.

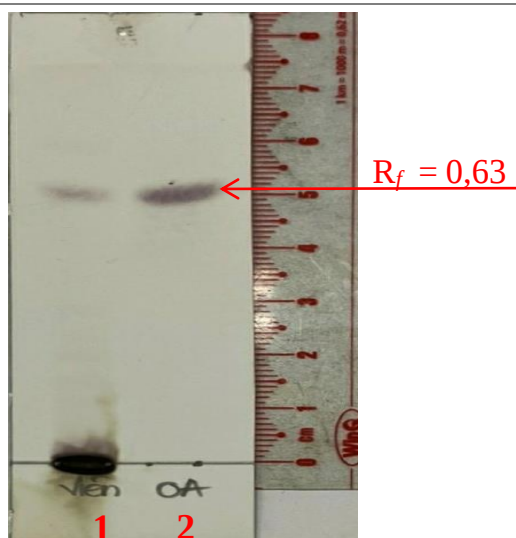
#### Định tính

Bằng phương pháp sắc ký lớp mỏng với vết đối chiếu là các chất chuẩn acid oleanolic, acid salvianolic B, ginsenosid Rg1, kết quả:

---

**Dung môi triển khai: Toluen - etyl acetat - acid formic (7,5: 2,5: 1)**

---




---

1: Mẫu thử viên MIX; 2: Mẫu chuẩn acid oleanolic

---

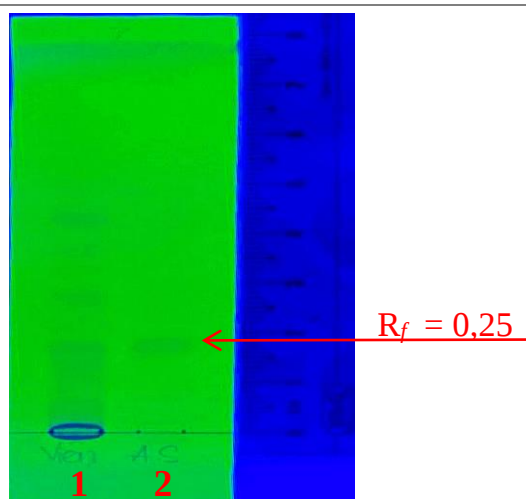
**Hình 3.3. Sắc ký đồ định tính sự hiện diện của acid oleanolic trong viên MIX**

Quan sát sắc ký đồ (Hình 3.3) cho thấy, mẫu thử viên MIX có vết có màu tím và giá trị  $R_f = 0,63$  tương đồng với chuẩn acid oleanolic khi phát hiện bằng thuốc thử  $H_2SO_4$  10% trong ethanol. Như vậy, mẫu viên MIX có sự hiện diện của acid oleanolic.

---

**Dung môi triển khai: Toluen - ethyl acetat - acetone - acid formic (5: 2: 2: 1).**

---




---

1: Mẫu thử viên MIX, 2: Mẫu chuẩn acid salvianolic B

---

**Hình 3.4. Sắc ký đồ định tính sự hiện diện của acid salvianolic B trong viên MIX**

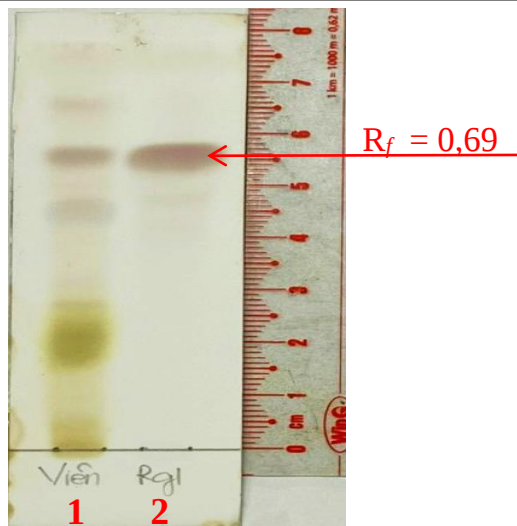
Quan sát sắc ký đồ (Hình 3.4) cho thấy, mẫu thử viên MIX có vết tắt quang và

giá trị  $R_f = 0,25$  tương đồng với chuẩn acid salvianolic B khi soi dưới đèn UV bước sóng 254 nm. Như vậy, mẫu viên MIX có sự hiện diện của acid salvianolic B.

---

**Dung môi triển khai: *n*-butanol - acid acetic - nước (7: 1: 2)**

---




---

1: Mẫu thử viên MIX; 2: Mẫu chuẩn ginsenosid Rg1

---

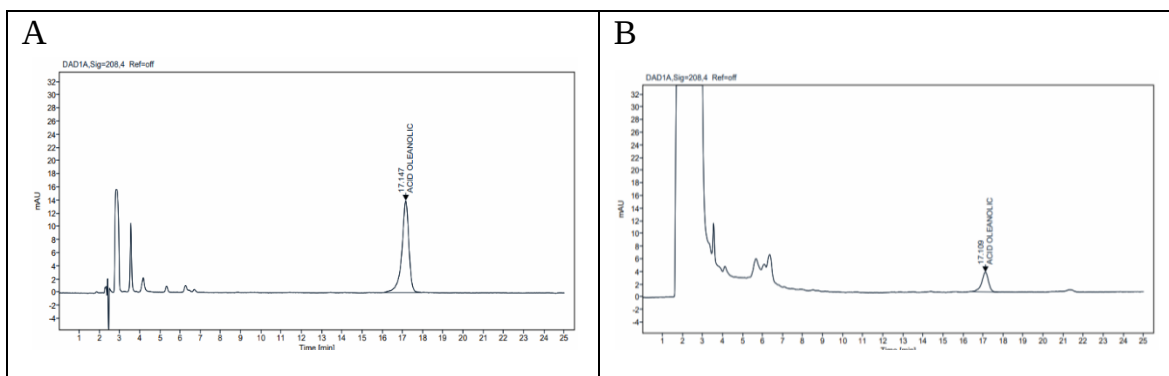
**Hình 3.5. Sắc ký đồ định tính sự hiện diện của ginsenosid Rg1 trong viên MIX**

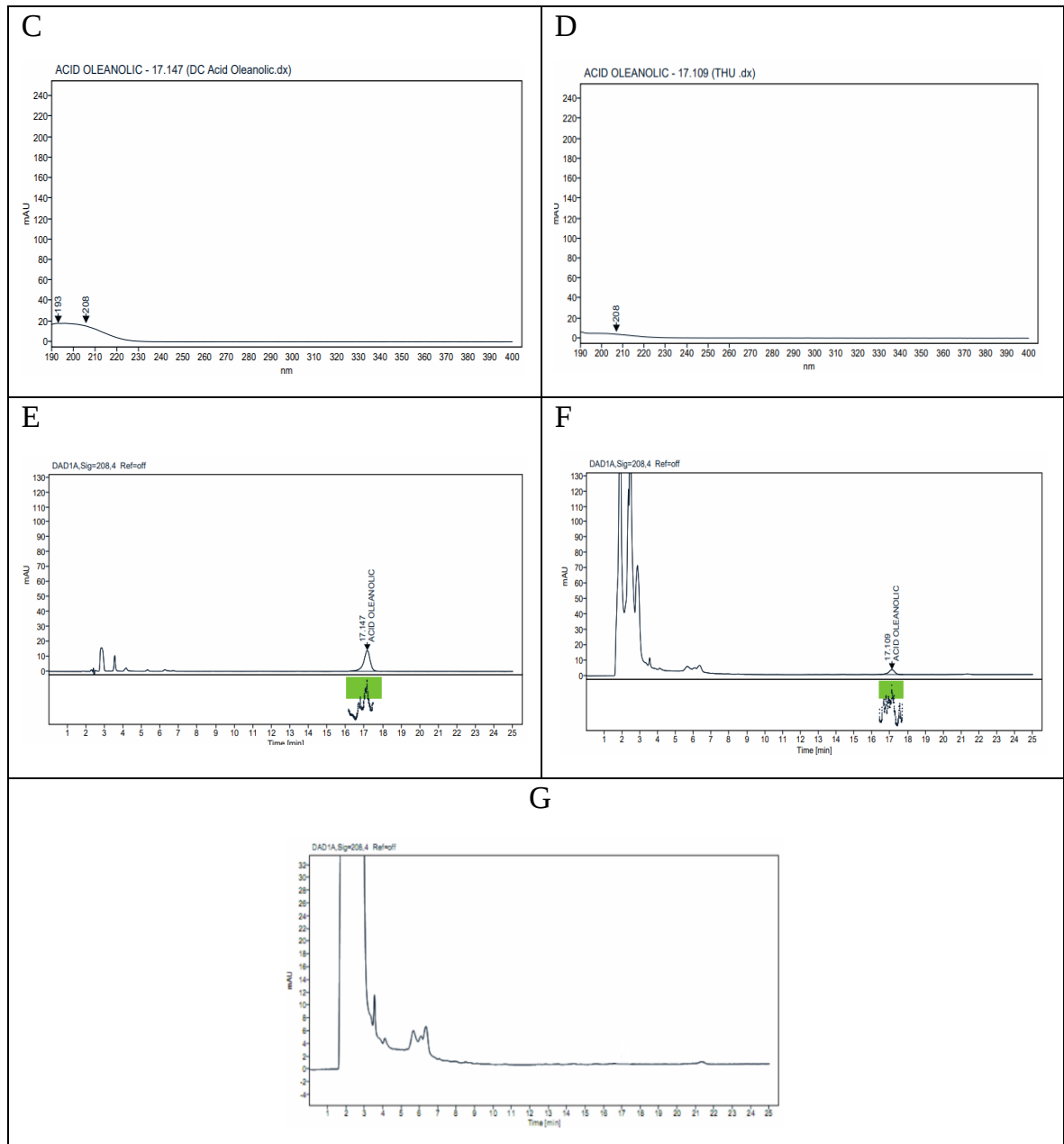
Quan sát sắc ký đồ (Hình 3.5) cho thấy, mẫu thử viên MIX có vết có màu tím và giá trị  $R_f = 0,69$  tương đồng với chuẩn ginsenosid Rg1 khi phát hiện bằng thuốc thử  $H_2SO_4$  10% trong ethanol. Như vậy, mẫu viên MIX có sự hiện diện của ginsenosid Rg1.

**Định lượng**

*Tính đặc hiệu*

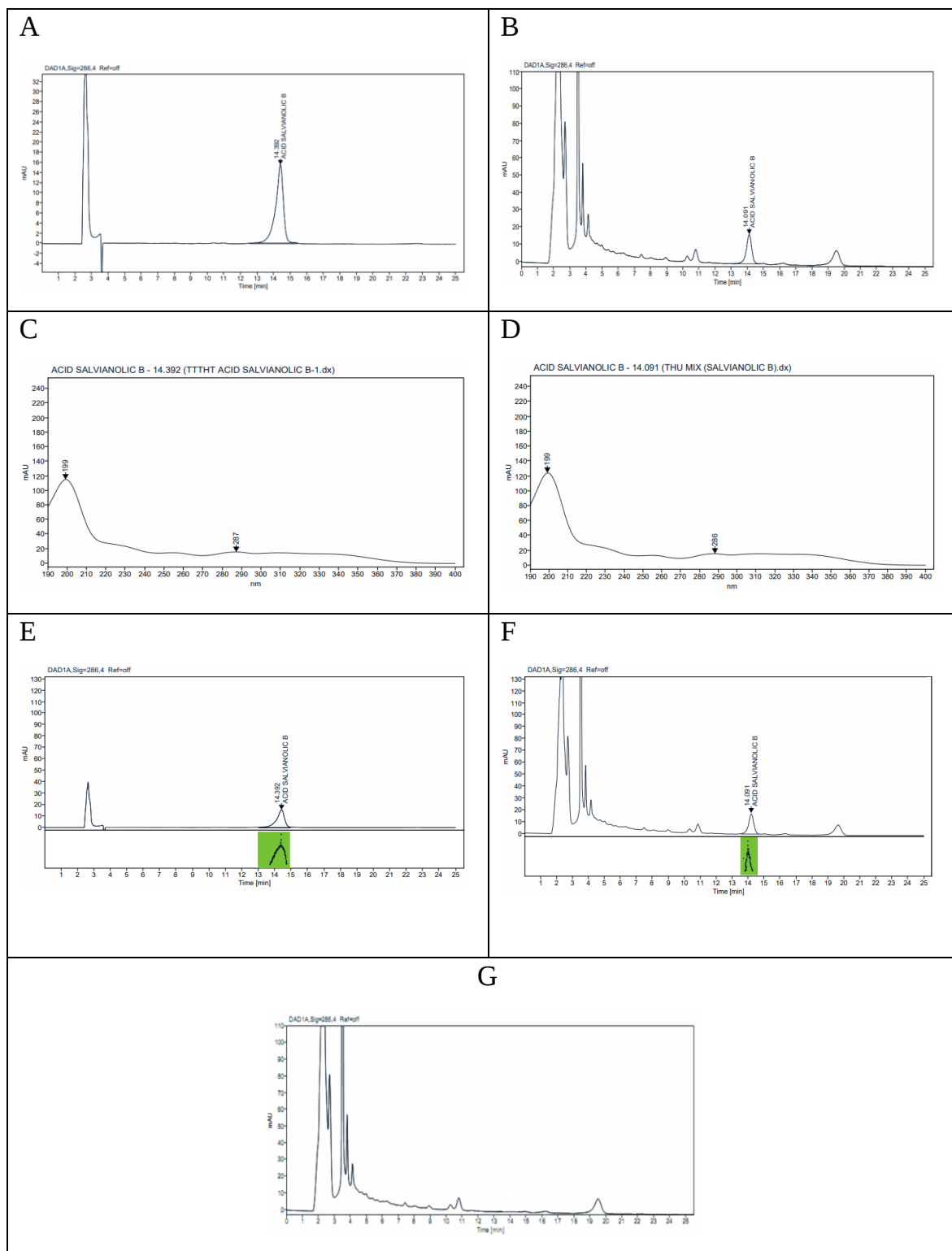
Tiến hành sắc ký dung dịch đối chiếu, dung dịch thử và dung dịch placebo theo quy trình phân tích, kết quả (Hình 3.6, 3.7, 3.8):





**Hình 3.6. Sắc ký đồ HPLC đánh giá tính đặc hiệu của quy trình định lượng acid oleanolic**

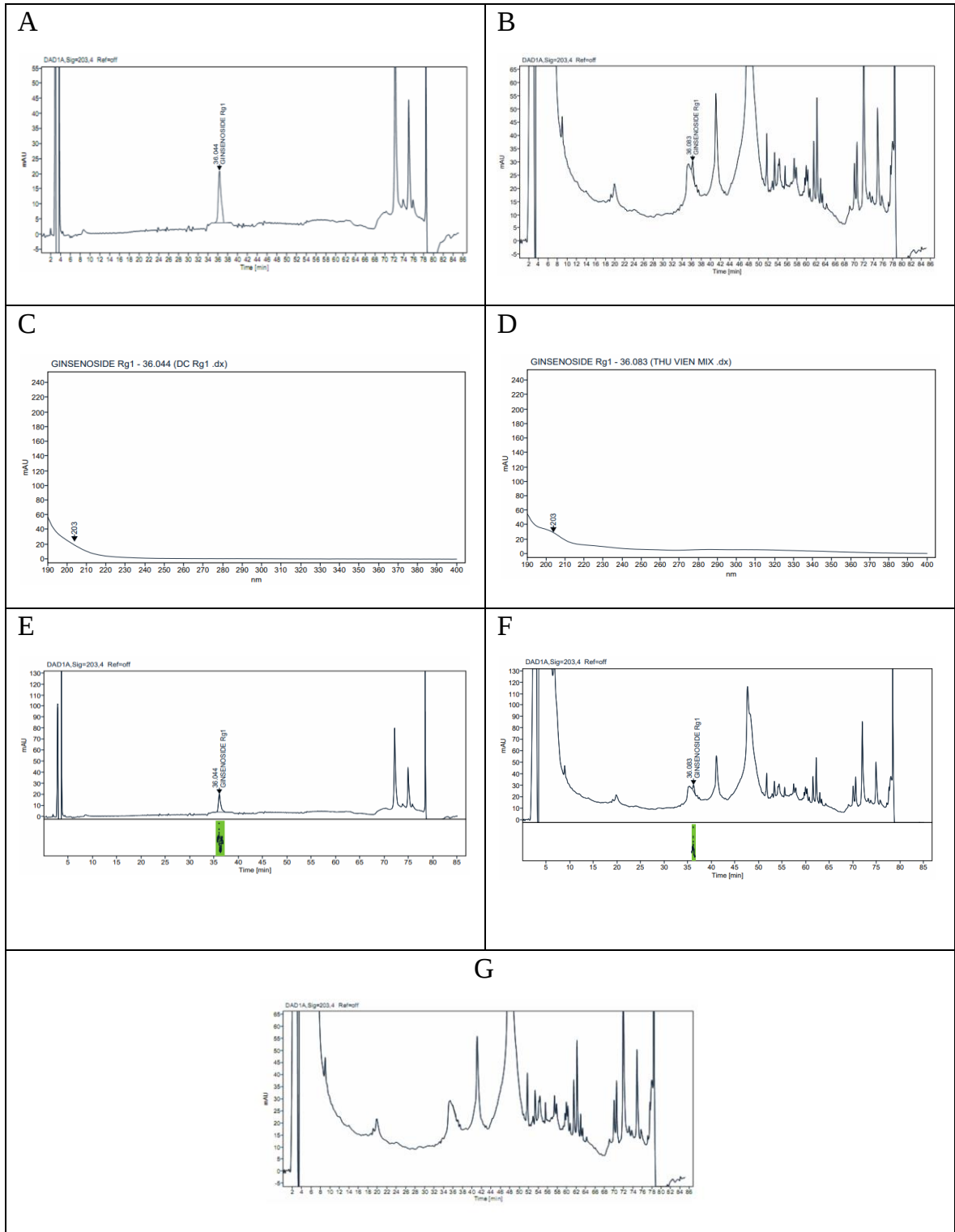
Sắc ký đồ của dung dịch thử (Hình 3.6 B) cho pic có thời gian lưu tương đương với thời gian lưu của pic acid oleanolic trên sắc ký đồ của các dung dịch đối chiếu (Hình 3.6 A). Phổ hấp thụ UV tại pic acid oleanolic của dung dịch đối chiếu và dung dịch thử (Hình 3.6 C, D) tương đương nhau, đều có đỉnh hấp thụ ở khoảng 208 nm. Sắc ký đồ của dung dịch placebo (Hình 3.6 G) không có pic nào tại thời gian lưu của pic acid oleanolic. Độ tinh khiết của pic acid oleanolic (Hình 3.6 E, F) > 999,0. Như vậy, quy trình định lượng đạt yêu cầu về tính đặc hiệu.



**Hình 3.7. Sắc ký đồ HPLC đánh giá tính đặc hiệu của quy trình định lượng acid salvianolic B**

Sắc ký đồ của dung dịch thử (Hình 3.7 B) cho pic có thời gian lưu tương đương với thời gian lưu của pic acid salvianolic B trên sắc ký đồ của các dung dịch đối chiếu (Hình 3.7 A). Phổ hấp thụ UV tại pic acid salvianolic B của dung dịch đối chiếu và

dung dịch thử (Hình 3.7 C, D) tương đương nhau, đều có đỉnh hấp thu ở khoảng 286 nm. Sắc ký đồ của dung dịch placebo (Hình 3.7 G) không có pic nào tại thời gian lưu của pic acid salvianolic B. Độ tinh khiết của pic acid salvianolic B (Hình 3.7 E, F) > 999,0. Như vậy, quy trình định lượng đạt yêu cầu về tính đặc hiệu.



**Hình 3.8. Sắc ký đồ HPLC đánh giá tính đặc hiệu của quy trình định lượng ginsenosid Rg1**

Sắc ký đồ của dung dịch thử (Hình 3.8 B) cho pic có thời gian lưu tương đương với thời gian lưu của pic ginsenosid Rg1 trên sắc ký đồ của các dung dịch đối chiếu. (Hình 3.8 A). Phổ hấp thu UV tại pic ginsenosid Rg1 của dung dịch đối chiếu và dung dịch thử (Hình 3.8 C, D) tương đương nhau, đều có đỉnh hấp thu ở khoảng 203 nm. Sắc ký đồ của dung dịch placebo (Hình 3.8 G) không có pic nào tại thời gian lưu của pic ginsenosid Rg1. Độ tinh khiết của pic ginsenosid Rg1 (Hình 3.8 E, F) > 999,0. Như vậy, quy trình định lượng đạt yêu cầu về tính đặc hiệu.

*Tính tương thích hệ thống*

Tiến hành sắc ký dung dịch chuẩn acid oleanolic, acid salivanolic B và ginsenosid Rg1, 6 lần với những điều kiện như mô tả ở quy trình phân tích định lượng và ghi lại thời gian lưu, diện tích pic, kết quả (Bảng 3.6).

**Bảng 3.6. Kết quả khảo sát tính tương thích hệ thống của hệ thống sắc ký**

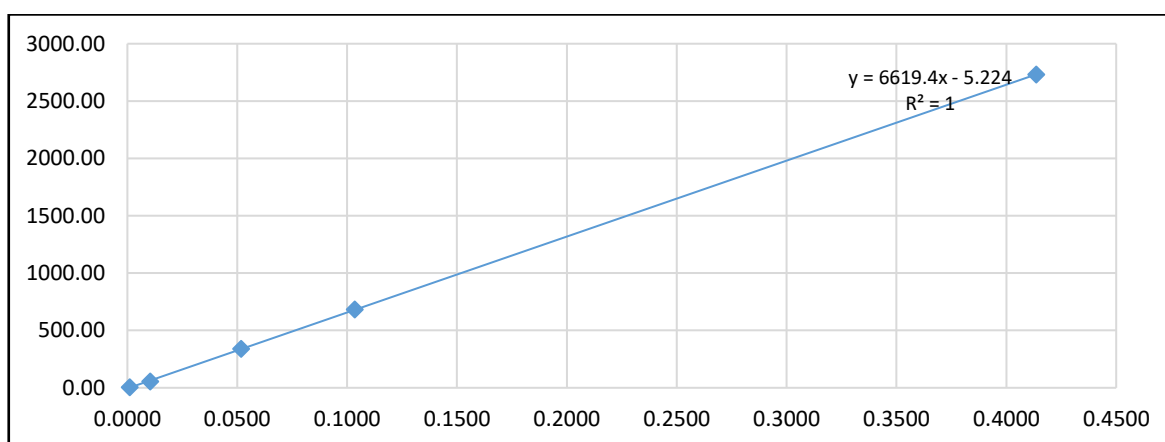
| Số<br>tiêm<br>mẫu | Acid oleanolic   |                  | Acid salivanolic B |                  | Ginsenosid Rg1   |                  |
|-------------------|------------------|------------------|--------------------|------------------|------------------|------------------|
|                   | Thời<br>gian lưu | Diện tích<br>pic | Thời<br>gian lưu   | Diện tích<br>pic | Thời gian<br>lưu | Diện tích<br>pic |
| 1                 | 17,147           | 339,53682        | 14,392             | 566,88194        | 36,044           | 539,10596        |
| 2                 | 17,133           | 338,98930        | 14,381             | 565,63051        | 36,052           | 538,87191        |
| 3                 | 17,148           | 339,10974        | 14,405             | 567,05392        | 36,067           | 539,83276        |
| 4                 | 17,154           | 340,04752        | 14,380             | 566,71083        | 36,046           | 540,00166        |
| 5                 | 17,140           | 338,85690        | 14,395             | 565,84827        | 36,055           | 538,67914        |
| 6                 | 17,162           | 339,48492        | 14,390             | 566,50283        | 36,063           | 539,78338        |
| TB                | 17,147           | 339,338          | 14,391             | 566,438          | 36,055           | 539,379          |
| RSD<br>(%)        | 0,06             | 0,13             | 0,06               | 0,10             | 0,03             | 0,10             |

*TB: Trung bình; RSD: Độ lệch chuẩn tương đối*

RSD của thời gian lưu và diện tích pic của acid oleanolic, acid salivanolic B và ginsenosid Rg1 đều < 2%. Như vậy, quy trình định lượng đạt yêu cầu về tính tương thích hệ thống, phù hợp cho việc định lượng acid oleanolic, acid salivanolic B và ginsenosid Rg1 trong chế phẩm.

*Khoảng tuyến tính***Bảng 3.7. Kết quả khảo sát khoảng tuyến tính của acid oleanolic**

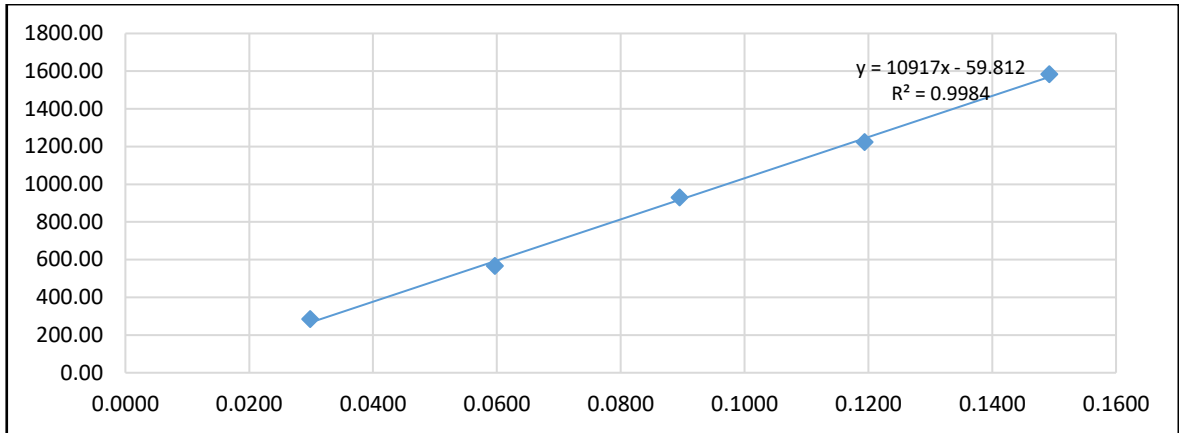
| Mẫu                  | Nồng độ (mg/mL) | Diện tích pic         |
|----------------------|-----------------|-----------------------|
| 1                    | 0,0010          | 5,06520               |
| 2                    | 0,0103          | 53,76911              |
| 3                    | 0,0517          | 339,63909             |
| 4                    | 0,1034          | 683,86306             |
| 5                    | 0,4136          | 2731,33640            |
| Phương trình hồi quy |                 | $y = 6619,4x - 5,224$ |
| Hệ số tương quan     |                 | $R^2 = 1$             |

**Biểu đồ 3.1. Đường biểu diễn sự tương quan giữa nồng độ acid oleanolic và diện tích pic**

Khảo sát trên dãy dung dịch chuẩn acid oleanolic với nồng độ từ 0,0010 mg/mL đến 0,4136 mg/mL, kết quả (Bảng 3.7, Biểu đồ 3.1). Như vậy, có sự tương quan tuyến tính giữa nồng độ và diện tích pic với hệ số tương quan  $R^2 = 1$ .

**Bảng 3.8. Kết quả khảo sát khoảng tuyến tính của acid salvianolic B**

| Dung dịch            | Nồng độ (mg/mL) | Diện tích pic         |
|----------------------|-----------------|-----------------------|
| 1                    | 0,0298          | 283,76324             |
| 2                    | 0,0597          | 566,25646             |
| 3                    | 0,0895          | 929,97433             |
| 4                    | 0,1194          | 1223,31768            |
| 5                    | 0,1492          | 1584,03440            |
| 6                    | 0,1790          | 1892,41141            |
| Phương trình hồi quy |                 | $y = 10917x - 59,812$ |
| Hệ số tương quan     |                 | $R^2 = 0,9984$        |

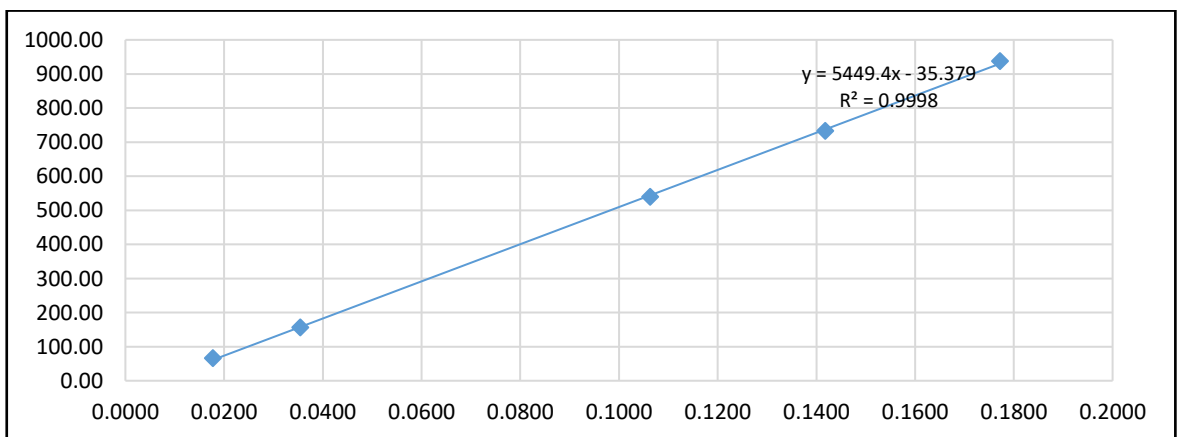


**Biểu đồ 3.2. Đường biểu diễn sự tương quan giữa nồng độ acid salvianolic B và diện tích pic**

Khảo sát trên dãy dung dịch chuẩn acid salvianolic B với nồng độ từ 0,0298 mg/mL đến 0,1790 mg/mL, kết quả (Bảng 3.8, Biểu đồ 3.2). Như vậy, có sự tương quan tuyến tính giữa nồng độ và diện tích pic với hệ số tương quan  $R^2 = 0,9984$ .

**Bảng 3.9. Kết quả khảo sát khoảng tuyến tính của ginsenosid Rg1**

| Dung dịch            | Nồng độ (mg/mL)        | Diện tích pic |
|----------------------|------------------------|---------------|
| 1                    | 0,0177                 | 66,11201      |
| 2                    | 0,0354                 | 155,74963     |
| 3                    | 0,1063                 | 539,31264     |
| 4                    | 0,1418                 | 732,34601     |
| 5                    | 0,1772                 | 936,81603     |
| Phương trình hồi quy | $y = 5449,4x - 35,379$ |               |
| Hệ số tương quan     | $R^2 = 0,9998$         |               |



**Biểu đồ 3.3. Đường biểu diễn sự tương quan giữa nồng độ ginsenosid Rg1 và diện tích pic**

Khảo sát trên dãy dung dịch chuẩn ginsenosid Rg1 với nồng độ từ 0,0177 mg/mL đến 0,1772 mg/mL, kết quả (Bảng 3.9, Biểu đồ 3.3). Như vậy, có sự tương quan tuyến tính giữa nồng độ và diện tích pic với hệ số tương quan  $R^2 = 0,9998$ .

*Độ chính xác*

Tiến hành định lượng acid oleanolic, acid salvianolic B và ginsenosid Rg1 trong viên MIX trên 6 lần thử, được thực hiện bởi 2 kiểm nghiệm viên vào 2 thời điểm khác nhau. Độ chính xác trung gian được tính dựa trên kết quả của 2 kiểm nghiệm viên, kết quả (Bảng 3.10, 3.11, 3.12).

**Bảng 3.10. Kết quả độ chính xác acid oleanolic**

| Kiểm nghiệm viên 1 |         |               |           | Kiểm nghiệm viên 2 |         |               |           |
|--------------------|---------|---------------|-----------|--------------------|---------|---------------|-----------|
| Lần thử            | KLM (g) | Diện tích pic | HL (mg/g) | Lần thử            | KLM (g) | Diện tích pic | HL (mg/g) |
| 1                  | 0,1410  | 73,38314      | 4,53      | 1                  | 0,1416  | 80,00231      | 4,48      |
| 2                  | 0,1434  | 72,68353      | 4,41      | 2                  | 0,1403  | 82,49304      | 4,34      |
| 3                  | 0,1419  | 72,57391      | 4,45      | 3                  | 0,1404  | 83,47745      | 4,39      |
| 4                  | 0,1402  | 71,28442      | 4,43      | 4                  | 0,1407  | 84,07482      | 4,41      |
| 5                  | 0,1453  | 72,47105      | 4,34      | 5                  | 0,1410  | 85,75895      | 4,49      |
| 6                  | 0,1402  | 73,01338      | 4,53      | 6                  | 0,1418  | 84,86459      | 4,42      |
| TB (%)             |         |               | 4,45      | TB (%)             |         |               | 4,42      |
| RSD (%)            |         |               | 1,6       | RSD (%)            |         |               | 1,3       |

*KLM: Khối lượng mẫu; HL: Hàm lượng*

RSD của 6 lần thử < 2%, đạt yêu cầu về độ lặp lại; RSD của 12 lần thử < 2, đạt yêu cầu về độ lặp lại. Như vậy, quy trình định lượng đạt yêu cầu về độ chính xác.

**Bảng 3.11. Kết quả độ chính xác acid salvianolic B**

| Kiểm nghiệm viên 1 |         |               |           | Kiểm nghiệm viên 2 |         |               |           |
|--------------------|---------|---------------|-----------|--------------------|---------|---------------|-----------|
| Lần thử            | KLM (g) | Diện tích pic | HL (mg/g) | Lần thử            | KLM (g) | Diện tích pic | HL (mg/g) |
| 1                  | 0,5601  | 396,39606     | 4,01      | 1                  | 0,5527  | 393,01859     | 4,05      |
| 2                  | 0,5533  | 391,59300     | 4,02      | 2                  | 0,5522  | 397,84819     | 4,10      |
| 3                  | 0,5503  | 395,10470     | 4,07      | 3                  | 0,5414  | 394,03614     | 4,15      |
| 4                  | 0,5567  | 394,12895     | 4,01      | 4                  | 0,5508  | 398,40347     | 4,12      |
| 5                  | 0,5361  | 394,58905     | 4,17      | 5                  | 0,5523  | 394,03942     | 4,07      |
| 6                  | 0,5476  | 394,03942     | 4,08      | 6                  | 0,5432  | 395,25427     | 4,14      |
| TB (%)             |         |               | 4,06      | TB (%)             |         |               | 4,10      |
| RSD (%)            |         |               | 1,5       | RSD (%)            |         |               | 1,0       |

RSD của 6 lần thử < 2%, đạt yêu cầu về độ lặp lại; RSD của 12 lần thử < 2, đạt yêu cầu về độ lặp lại. Như vậy, quy trình định lượng đạt yêu cầu về độ chính xác.

**Bảng 3.12. Kết quả độ chính xác ginsenosid Rg1**

| Kiểm nghiệm viên 1 |         |               |           | Kiểm nghiệm viên 2 |         |               |           |
|--------------------|---------|---------------|-----------|--------------------|---------|---------------|-----------|
| Lần thử            | KLM (g) | Diện tích pic | HL (mg/g) | Lần thử            | KLM (g) | Diện tích pic | HL (mg/g) |
| 1                  | 1,0129  | 117,1596      | 1,48      | 1                  | 1,0659  | 119,30248     | 1,47      |
| 2                  | 1,0143  | 120,99716     | 1,52      | 2                  | 1,0845  | 118,30583     | 1,44      |
| 3                  | 1,0136  | 119,43895     | 1,51      | 3                  | 1,0657  | 120,49184     | 1,48      |
| 4                  | 1,0482  | 120,79543     | 1,47      | 4                  | 1,0581  | 121,06883     | 1,50      |
| 5                  | 1,0166  | 117,03216     | 1,48      | 5                  | 1,0655  | 120,40005     | 1,48      |
| 6                  | 1,0381  | 120,01054     | 1,48      | 6                  | 1,0583  | 119,58759     | 1,48      |
| TB (%)             |         |               | 1,49      | TB (%)             |         |               | 1,48      |
| RSD (%)            |         |               | 1,3       | RSD (%)            |         |               | 1,5       |

RSD của 6 lần thử < 2%, đạt yêu cầu về độ lặp lại; RSD của 12 lần thử < 2, đạt yêu cầu về độ lặp lại. Như vậy, quy trình định lượng đạt yêu cầu về độ chính xác.

*Độ đúng*

**Bảng 3.13. Kết quả độ đúng acid oleanolic**

| MNĐ  | TTDD     | KLP     | NĐLT    | Diện tích | NĐTT    | TLPH | TB   | RSD  |
|------|----------|---------|---------|-----------|---------|------|------|------|
|      | ĐCG (mL) | (g)     | (mg/mL) | pic       | (mg/mL) | (%)  | (%)  | (%)  |
| 80%  | 1,0      | 0,1404  | 0,010   | 61,84751  | 0,010   | 98,0 | 98,1 | 0,15 |
|      | 1,0      | 0,1492  | 0,010   | 62,05070  | 0,010   | 98,3 |      |      |
|      | 1,0      | 0,1442  | 0,010   | 61,94667  | 0,010   | 98,1 |      |      |
| 100% | 1,2      | 0,1423  | 0,012   | 75,24830  | 0,012   | 98,0 | 98,5 | 0,71 |
|      | 1,2      | 0,1432  | 0,012   | 76,34052  | 0,012   | 99,3 |      |      |
|      | 1,2      | 0,1402  | 0,012   | 75,47506  | 0,012   | 98,3 |      |      |
| 120% | 1,4      | 0,1482  | 0,014   | 89,61004  | 0,014   | 99,0 | 98,5 | 0,38 |
|      | 1,4      | 0,1438  | 0,014   | 88,90554  | 0,014   | 98,2 |      |      |
|      | 1,4      | 0,14290 | 0,014   | 89,10685  | 0,014   | 98,4 |      |      |

MNĐ: Mức nồng độ; TTDDĐCG: Thể tích dung dịch đối chiếu gốc; KLP: Khối lượng placebo; NĐLT: Nồng độ lý thuyết; NĐTT: Nồng độ tìm thấy; TLPH: Tỷ lệ phục hồi.

Tỷ lệ phục hồi ở tất cả các nồng độ đều nằm trong khoảng 98,0% - 102,0%; RSD của tỷ lệ phục hồi ở mỗi mức nồng độ < 2%. Như vậy, quy trình định lượng đạt yêu cầu về độ đúng.

**Bảng 3.14. Kết quả độ đúng acid salvianolic B**

| MNĐ  | TTDD     | KLP    | NĐLT    | Diện tích | NĐTT    | TLPH | TB   | RSD  |
|------|----------|--------|---------|-----------|---------|------|------|------|
|      | ĐCG (mL) | (g)    | (mg/mL) | pic       | (mg/mL) | (%)  | (%)  | (%)  |
| 80%  | 12,0     | 0,5051 | 0,036   | 325,58693 | 0,035   | 98,6 | 99,1 | 0,51 |
|      | 12,0     | 0,5068 | 0,036   | 329,50925 | 0,036   | 99,6 |      |      |
|      | 12,0     | 0,5145 | 0,036   | 327,08493 | 0,035   | 99,0 |      |      |
| 100% | 14,0     | 0,5075 | 0,042   | 393,10234 | 0,041   | 99,3 | 99,4 | 0,33 |
|      | 14,0     | 0,5091 | 0,042   | 395,29932 | 0,042   | 99,8 |      |      |
|      | 14,0     | 0,5077 | 0,042   | 392,48858 | 0,041   | 99,2 |      |      |
| 120% | 16,0     | 0,5014 | 0,048   | 459,10384 | 0,048   | 99,6 | 99,4 | 0,51 |
|      | 16,0     | 0,5036 | 0,048   | 455,03964 | 0,047   | 98,8 |      |      |
|      | 16,0     | 0,5083 | 0,048   | 460,02869 | 0,048   | 99,7 |      |      |

Tỷ lệ phục hồi ở tất cả các nồng độ đều nằm trong khoảng 98,0% - 102,0%; RSD của tỷ lệ phục hồi ở mỗi mức nồng độ < 2%. Như vậy, quy trình định lượng đạt yêu cầu về độ đúng.

**Bảng 3.15. Kết quả độ đúng ginsenosid Rg1**

| MNĐ  | TTDD     | KLP    | NĐLT    | Diện tích | NĐTT    | TLPH | TB   | RSD  |
|------|----------|--------|---------|-----------|---------|------|------|------|
|      | ĐCG (mL) | (g)    | (mg/mL) | pic       | (mg/mL) | (%)  | (%)  | (%)  |
| 80%  | 1,4      | 1,0496 | 0,025   | 97,80332  | 0,024   | 98,5 | 98,9 | 0,52 |
|      | 1,4      | 1,0035 | 0,025   | 98,02834  | 0,024   | 98,7 |      |      |
|      | 1,4      | 1,0462 | 0,025   | 99,10295  | 0,025   | 99,5 |      |      |
| 100% | 1,6      | 1,0059 | 0,028   | 118,10403 | 0,028   | 99,3 | 98,8 | 0,56 |
|      | 1,6      | 1,0235 | 0,028   | 116,39662 | 0,028   | 98,2 |      |      |
|      | 1,6      | 1,0446 | 0,028   | 117,24004 | 0,028   | 98,8 |      |      |
| 120% | 1,8      | 1,0257 | 0,032   | 136,96030 | 0,032   | 99,2 | 98,7 | 0,48 |
|      | 1,8      | 1,0693 | 0,032   | 135,30482 | 0,031   | 98,2 |      |      |
|      | 1,8      | 1,0642 | 0,032   | 136,08842 | 0,031   | 98,6 |      |      |

Tỷ lệ phục hồi ở tất cả các nồng độ đều nằm trong khoảng 98,0% - 102,0%; RSD của tỷ lệ phục hồi ở mỗi mức nồng độ < 2%. Như vậy, quy trình định lượng đạt yêu cầu về độ đúng.

#### *Định lượng*

**Bảng 3.16. Kết quả định lượng hàm lượng acid oleanolic, acid salvianolic B và ginsenosid Rg1 trong viên MIX**

| Tiêu chí khảo sát  | Mẫu thử | KL (g) | Diện tích pic | HL (mg/mL) | HL (mg/g) | TB/khan (mg/g) |
|--------------------|---------|--------|---------------|------------|-----------|----------------|
| Acid oleanolic     | 1       | 0,1410 | 73,38314      | 0,0119     | 4,21      | 4,47           |
|                    | 2       | 0,1434 | 72,68353      | 0,0118     | 4,10      |                |
| Acid salvianolic B | 1       | 0,5601 | 396,3961      | 0,0418     | 3,73      | 4,01           |
|                    | 2       | 0,5533 | 391,593       | 0,0413     | 3,74      |                |
| Ginsenosid Rg1     | 1       | 1,0129 | 117,1596      | 0,0280     | 1,38      | 1,50           |
|                    | 2       | 1,0143 | 120,9972      | 0,0287     | 1,41      |                |

*KL: Khối lượng; HL: Hàm lượng.*

Như vậy, viên MIX định lượng theo điều kiện trên có chứa hàm lượng acid oleanolic 4,47 mg/g, acid salvianolic B 4,01 mg/g và ginsenosid Rg1 1,50 mg/g. Kết quả thẩm định quy trình định lượng đồng thời hàm lượng acid oleanolic, acid salvianolic B và ginsenosid Rg1 trong viên MIX bằng phương pháp HPLC nêu trên cho thấy độ tin cậy cao từ cách xử lý mẫu đến điều kiện phân tích, đảm bảo tính đặc hiệu, tính tương thích hệ thống, khoảng tuyến tính, độ chính xác, độ đúng.

#### **Độ nhiễm khuẩn**

**Bảng 3.17. Kết quả khảo sát độ nhiễm khuẩn của viên MIX**

| Tiêu chí khảo sát                                                                                          | Mức chất lượng         | Kết quả |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------|---------|
| Tổng số vi khuẩn hiếu khí                                                                                  | Không quá $10^4$ CFU/g | Đạt     |
| Tổng số bào tử nấm men, mốc                                                                                | Không quá $10^2$ CFU/g | Đạt     |
| Tổng số <i>Enterobacteria</i>                                                                              | Không quá $10^2$ CFU/g | Đạt     |
| <i>Escherichia coli</i> , <i>Salmonella</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i> | Không được có          | Đạt     |

Như vậy, viên MIX đạt yêu cầu về độ nhiễm khuẩn theo DĐVN V

**Độ ổn định của viên MIX****Bảng 3.18. Kết quả khảo sát độ ổn định ở điều kiện lão hóa cấp tốc**

| <b>Tiêu chí khảo sát</b> |                    | <b>Kết quả</b> |                |                |
|--------------------------|--------------------|----------------|----------------|----------------|
|                          |                    | <b>Ban đầu</b> | <b>3 tháng</b> | <b>6 tháng</b> |
| Cảm quan                 |                    | Đúng           | Đúng           | Đúng           |
| Độ đồng đều khối lượng   |                    | Đạt            |                |                |
| Độ ẩm (%)                |                    | 6,95 (đạt)     | 7,15 (đạt)     | 7,62 (đạt)     |
| Định tính                |                    | Đúng           | Đúng           | Đúng           |
| Độ rã (phút)             |                    | 13 (đạt)       | 16 (đạt)       | 20 (đạt)       |
| Định lượng (%)           | Acid oleanolic     | 4,45 (đạt)     | 4,32 (đạt)     | 4,10 (đạt)     |
|                          | Acid salvianolic B | 4,06 (đạt)     | 3,87 (đạt)     | 3,64 (đạt)     |
|                          | Ginsenosid Rg1     | 1,49 (đạt)     | 1,38 (đạt)     | 1,20 (đạt)     |

Sau 6 tháng bảo quản ở nhiệt độ lão hóa cấp tốc, viên MIX vẫn giữ nguyên tình trạng ban đầu về các tiêu chí cảm quan, định tính, độ ẩm, độ rã, định lượng acid oleanolic, acid salvianolic B và ginsenosid Rg1 (thay đổi trong giới hạn cho phép).

**Bảng 3.19. Kết quả khảo sát độ ổn định ở điều kiện dài hạn**

| Tiêu chí khảo sát      |       | Kết quả       |               |               |               |               |               |               |
|------------------------|-------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|
|                        |       | Ban đầu       | 3 tháng       | 6 tháng       | 9 tháng       | 12 tháng      | 18 tháng      | 24 tháng      |
| Cảm quan               |       | Đúng          | Đúng          | Đúng          | Đúng          | Đúng          | Đúng          | Đúng          |
| Độ đồng đều khối lượng |       | Đạt           |               |               |               |               |               |               |
| Độ ẩm (%)              |       | 6,95<br>(đạt) | 7,08<br>(đạt) | 7,20<br>(đạt) | 7,35<br>(đạt) | 7,52<br>(đạt) | 7,49<br>(đạt) | 8,23<br>(đạt) |
| Định tính              |       | Đúng          | Đúng          | Đúng          | Đúng          | Đúng          | Đúng          | Đúng          |
| Độ rã (phút)           |       | 13 (đạt)      | 14 (đạt)      | 16 (đạt)      | 17 (đạt)      | 19 (đạt)      | 22 (đạt)      | 24 (đạt)      |
| Định lượng (%)         | AO    | 4,45<br>(đạt) | 4,40<br>(đạt) | 4,32<br>(đạt) | 4,22<br>(đạt) | 4,15<br>(đạt) | 4,07<br>(đạt) | 3,63<br>(đạt) |
|                        | ASB   | 4,06<br>(đạt) | 4,01<br>(đạt) | 3,95<br>(đạt) | 3,88<br>(đạt) | 3,82<br>(đạt) | 3,74<br>(đạt) | 3,63<br>(đạt) |
|                        | G-Rg1 | 1,49<br>(đạt) | 1,45<br>(đạt) | 1,42<br>(đạt) | 1,37<br>(đạt) | 1,31<br>(đạt) | 1,26<br>(đạt) | 1,19<br>(đạt) |
|                        |       |               |               |               |               |               |               |               |
|                        |       |               |               |               |               |               |               |               |
|                        |       |               |               |               |               |               |               |               |

AO: Acid oleanolic; ASB: Acid salvianolic B; G-Rg1: Ginsenosid Rg1

Sau 24 tháng bảo quản ở nhiệt độ thường, viên MIX vẫn giữ nguyên tình trạng ban đầu về các tiêu chí cảm quan, định tính, độ ẩm, độ rã, định lượng acid oleanolic, acid salvianolic B và ginsenosid Rg1 (thay đổi trong giới hạn cho phép).

Như vậy, căn cứ vào kết quả kiểm nghiệm xác định được tuổi thọ của chế phẩm viên MIX là 24 tháng và đề nghị hạn sử dụng là 24 tháng cho chế phẩm này.

### 3.2. Tính an toàn của viên MIX trên chuột nhắt trắng

#### 3.2.1. Độc tính cấp

Đánh giá độc tính cấp của viên MIX trên chuột nhắt trắng được tiến hành theo hướng dẫn của Tổ chức Y tế thế giới và Đỗ Trung Đàm, kết quả:

Với liều 32 viên/kg là liều cao nhất có thể bơm qua kim mà không làm chết chuột, còn gọi là  $D_{max}$ . Theo dõi chuột thử nghiệm trong 72 giờ sau khi cho uống, nhận thấy toàn bộ chuột vẫn ăn uống và sinh hoạt bình thường, không ghi nhận dấu hiệu bất thường và không có chuột chết. Tiếp tục theo dõi trong 14 ngày, tất cả các chuột đều ăn uống và sinh hoạt bình thường. Vì vậy, chưa xác định được  $LD_{50}$  của viên MIX trên chuột nhắt trắng bằng đường uống (Bảng 3.20).

**Bảng 3.20. Kết quả độc tính cấp**

| Liều dùng  | Thời gian   | Tình trạng chung                                                                                                 | Tỷ lệ chết |
|------------|-------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------|
| 32 viên/kg | Sau 72 giờ  | Chuột ăn uống và sinh hoạt bình thường, phản xạ tốt với kích thích, niêm mạc hồng, lông mượt, mắt sáng, phân khô | 0%         |
|            | Sau 14 ngày | Chuột ăn uống và sinh hoạt bình thường, phản xạ tốt với kích thích, niêm mạc hồng, lông mượt, phân khô           | 0%         |

Như vậy, viên MIX không thể hiện độc tính cấp đường uống với liều cao nhất có thể bơm qua kim để cho chuột uống là 32 viên/kg, tương đương với 136 viên/người 50 kg (gấp 34 lần liều dự kiến sử dụng hàng ngày là 4 viên).

#### 3.2.2. Độc tính bán trường diễn

Đánh giá độc tính bán trường diễn của viên MIX trên chuột nhắt trắng được tiến hành theo hướng dẫn của Tổ chức Y tế thế giới và hướng dẫn thử nghiệm tiền lâm sàng và lâm sàng thuốc đông y, thuốc từ dược liệu của Bộ Y tế, kết quả:

### Ảnh hưởng của viên MIX đến tình trạng chung và trọng lượng chuột

**Bảng 3.21. Ảnh hưởng của viên MIX đến trọng lượng cơ thể chuột**

| Lô (n = 10) | Trọng lượng chuột (g) |             |              |
|-------------|-----------------------|-------------|--------------|
|             | Trước thử nghiệm      | Sau 1 tháng | Sau 2 tháng  |
| Chứng       | 23,1 ± 0,7            | 35,3 ± 1,3* | 30,3 ± 1,2*  |
| Viên MIX    | 23,7 ± 0,5            | 37,7 ± 0,7* | 41,6 ± 0,8*# |

#:  $P < 0,05$  so với lô CSL cùng thời điểm; \*:  $P < 0,05$  so với trước thử nghiệm

Trong suốt thời gian thử nghiệm (2 tháng), chuột trong lô uống viên MIX liều 4 viên/kg có mức độ ăn uống, đi lại bình thường. Tình trạng da lông, phân và các biểu hiện bên ngoài không khác biệt so với chuột trong lô chứng uống nước cất.

Trọng lượng cơ thể chuột của lô chứng uống nước cất và lô thử uống viên MIX liều 4 viên/kg ở thời điểm sau 1 và 2 tháng đều có sự khác biệt đạt ý nghĩa thống kê so với trước thử nghiệm ( $P < 0,05$ ).

Ở thời điểm sau 2 tháng, trọng lượng cơ thể chuột ở lô thử uống viên MIX tăng có sự khác biệt đạt ý nghĩa thống kê so với lô chứng sinh lý ( $P < 0,05$ ). Như vậy, viên MIX liều 4 viên/kg làm tăng trọng lượng chuột sau 2 tháng sử dụng (Bảng 3.21).

### Ảnh hưởng của viên MIX đến chức năng tạo máu

**Bảng 3.22. Ảnh hưởng của viên MIX đến chức năng tạo máu**

| Tiêu chí khảo sát/<br>Lô (n = 10)  |          | Trước thử nghiệm | Sau 1 tháng | Sau 2 tháng |
|------------------------------------|----------|------------------|-------------|-------------|
| Hồng cầu<br>( $10^6/\text{mm}^3$ ) | Chứng    | 8,5 ± 0,2        | 10,7 ± 0,3* | 9,9 ± 0,2*  |
|                                    | Viên MIX | 8,8 ± 0,1        | 10,3 ± 0,1* | 10,1 ± 0,1* |
| Hemoglobin<br>(g/dL)               | Chứng    | 14,0 ± 0,3       | 16,6 ± 0,3* | 15,0 ± 0,9* |
|                                    | Viên MIX | 14,7 ± 0,2       | 16,1 ± 0,2* | 15,8 ± 0,1* |
| Hematocrit<br>(%)                  | Chứng    | 47,1 ± 1,2       | 56,8 ± 1,5* | 51,6 ± 1,4* |
|                                    | Viên MIX | 50,3 ± 1,0       | 55,1 ± 0,8* | 51,7 ± 0,9* |
| MCV (fL)                           | Chứng    | 55,1 ± 1,0       | 53,7 ± 1,1  | 51,3 ± 0,7* |
|                                    | Viên MIX | 56,9 ± 0,9       | 50,5 ± 3,0  | 51,0 ± 0,6* |
| MCH (pg)                           | Chứng    | 16,5 ± 0,5       | 15,7 ± 0,4  | 14,8 ± 0,8  |
|                                    | Viên MIX | 16,7 ± 0,2       | 15,6 ± 0,1  | 15,7 ± 0,1  |
| MCHC<br>(g/dL)                     | Chứng    | 35,8 ± 3,9       | 29,3 ± 0,2  | 29,0 ± 1,6  |
|                                    | Viên MIX | 29,2 ± 0,2       | 29,2 ± 0,2  | 30,8 ± 0,4  |

|                                    |          |                  |                      |                      |
|------------------------------------|----------|------------------|----------------------|----------------------|
| Bạch cầu<br>( $10^3/\text{mm}^3$ ) | Chứng    | $4,3 \pm 0,2$    | $6,3 \pm 0,3^*$      | $7,8 \pm 0,6^*$      |
|                                    | Viên MIX | $3,9 \pm 0,4$    | $7,5 \pm 0,7^*$      | $9,3 \pm 0,9^*$      |
| Tiểu cầu<br>( $10^3/\text{mm}^3$ ) | Chứng    | $808,1 \pm 85,0$ | $1013,2 \pm 45,5^*$  | $1187,4 \pm 105,6^*$ |
|                                    | Viên MIX | $777,7 \pm 83,6$ | $1029,4 \pm 103,7^*$ | $1268,5 \pm 97,9^*$  |

\*:  $P < 0,05$  so với trước thử nghiệm.

Số lượng hồng cầu, bạch cầu, tiểu cầu, nồng độ hemoglobin và hematocrit ở lô chứng uống nước cất và lô thử uống viên MIX liều 4 viên/kg ở các thời điểm sau 1 và 2 tháng tăng đạt ý nghĩa thống kê so với trước thử nghiệm. Tuy nhiên không có sự khác biệt giữa lô chứng và lô thử ở cùng một thời điểm.

Như vậy, viên MIX liều 4 viên/kg sau 2 tháng không ảnh hưởng đến số lượng hồng cầu, bạch cầu, tiểu cầu và nồng độ hemoglobin, hematocrit máu (Bảng 3.22).

Chỉ số MCV ở lô chứng uống nước cất và lô thử uống viên MIX liều 4 viên/kg thể trọng, sau 1 tháng không thay đổi so với trước thử nghiệm nhưng tăng đạt ý nghĩa thống kê so với trước thử nghiệm sau 2 tháng. Tuy nhiên không có sự khác biệt giữa lô chứng và lô thử ở cùng một thời điểm.

Như vậy, viên MIX liều 4 viên/kg sau 2 tháng không ảnh hưởng đến chỉ số MCV của hồng cầu (Bảng 3.22). Chỉ số MCH, MCHC ở lô chứng cho uống nước cất và lô thử uống viên MIX liều 4 viên/kg tại các thời điểm sau 1 và 2 tháng không có sự khác biệt đạt ý nghĩa thống kê so với trước thử nghiệm. Không có sự khác biệt đạt ý nghĩa thống kê của chỉ số MCV, MCHC giữa lô chứng và lô thử ở cùng một thời điểm. Như vậy, viên MIX liều 4 viên/kg sau 2 tháng không ảnh hưởng đến chỉ số MCH, MCHC của hồng cầu (Bảng 3.22).

#### **Ảnh hưởng của viên MIX đến mức độ tổn thương tế bào gan**

**Bảng 3.23. Ảnh hưởng của viên MIX đến mức độ tổn thương tế bào gan**

| Tiêu chí khảo sát/Lô (n = 10) |          | Trước thử nghiệm | Sau 1 tháng    | Sau 2 tháng    |
|-------------------------------|----------|------------------|----------------|----------------|
| AST (U/L)                     | Chứng    | $44,0 \pm 1,7$   | $42,6 \pm 0,8$ | $41,8 \pm 1,2$ |
|                               | Viên MIX | $44,4 \pm 1,2$   | $40,2 \pm 1,7$ | $40,7 \pm 2,7$ |
| ALT (U/L)                     | Chứng    | $44,8 \pm 1,0$   | $44,1 \pm 2,2$ | $44,2 \pm 1,4$ |
|                               | Viên MIX | $45,4 \pm 1,7$   | $45,2 \pm 1,5$ | $43,7 \pm 1,6$ |

Hoạt độ AST, ALT ở lô chứng cho uống nước cất và lô thử uống viên MIX liều 4 viên/kg tại các thời điểm sau 1 tháng và 2 tháng không có sự khác biệt đạt ý

nghĩa thống kê so với trước thử nghiệm. Không có sự khác biệt đạt ý nghĩa thống kê của hoạt độ AST, ALT giữa lô chứng và lô thử uống viên MIX liều 4 viên/kg ở cùng một thời điểm.

Như vậy, viên MIX liều 4 viên/kg sau 2 tháng không ảnh hưởng đến hoạt độ AST, ALT máu (Bảng 3.23).

#### **Ảnh hưởng của viên MIX đến chức năng thận**

**Bảng 3.24. Ảnh hưởng của viên MIX đến chức năng thận**

| <b>Tiêu chí khảo sát/Lô (n = 10)</b> |          | <b>Trước thử nghiệm</b> | <b>Sau 1 tháng</b> | <b>Sau 2 tháng</b> |
|--------------------------------------|----------|-------------------------|--------------------|--------------------|
| Urea (mg/dL)                         | Chứng    | 47,2 ± 2,2              | 47,7 ± 2,2         | 48,3 ± 0,9         |
|                                      | Viên MIX | 47,7 ± 1,7              | 51,7 ± 1,7         | 50,0 ± 4,1         |
| Creatinin (mg/dL)                    | Chứng    | 0,6 ± 0,0               | 0,66 ± 0,0         | 0,6 ± 0,0          |
|                                      | Viên MIX | 0,62 ± 0,0              | 0,66 ± 0,0         | 0,62 ± 0,0         |

Nồng độ urea, creatinin ở lô chứng cho uống nước cất và lô thử uống viên MIX liều 4 viên/kg tại các thời điểm sau 1 và 2 tháng không có sự khác biệt đạt ý nghĩa thống kê so với trước thử nghiệm. Không có sự khác biệt đạt ý nghĩa thống kê của nồng độ urea, creatinin giữa lô chứng và lô thử uống viên MIX liều 4 viên/kg ở cùng một thời điểm. Như vậy, viên MIX liều 4 viên/kg sau 2 tháng không ảnh hưởng đến nồng độ urea, creatinin máu (Bảng 3.24).

#### **Ảnh hưởng của viên MIX đến trọng lượng tương đối gan, tim, thận**

**Bảng 3.25. Ảnh hưởng của viên MIX đến trọng lượng tương đối gan, tim, thận**

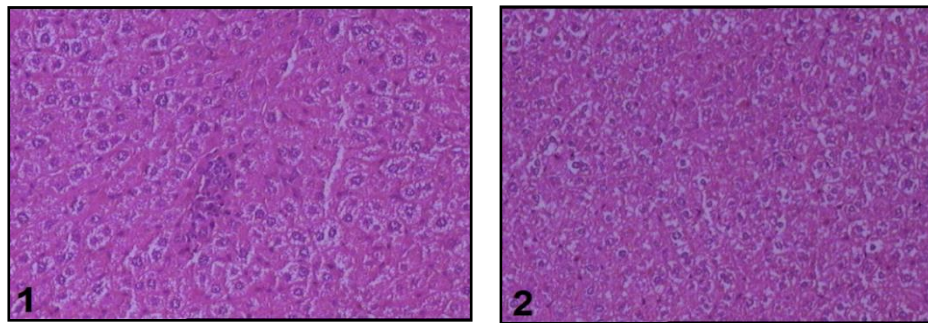
| <b>Trọng lượng tương đối của cơ quan (g %)</b> | <b>Lô (n = 10)</b> |                 |
|------------------------------------------------|--------------------|-----------------|
|                                                | <b>Chứng</b>       | <b>Viên MIX</b> |
| Gan                                            | 3,7 ± 0,1          | 3,4 ± 0,1       |
| Tim                                            | 0,3 ± 0,0          | 0,3 ± 0,0       |
| Thận                                           | 0,8 ± 0,0          | 0,8 ± 0,0       |

Trọng lượng tương đối gan, tim, thận ở lô thử uống viên MIX liều 4 viên/kg tại thời điểm sau 2 tháng không có sự khác biệt đạt ý nghĩa thống kê so với lô chứng. Như vậy, viên MIX liều 4 viên/kg sau 2 tháng không ảnh hưởng đến trọng lượng gan, tim, thận (Bảng 3.25).

### Ảnh hưởng của viên MIX đến vi thể gan, tim, thận

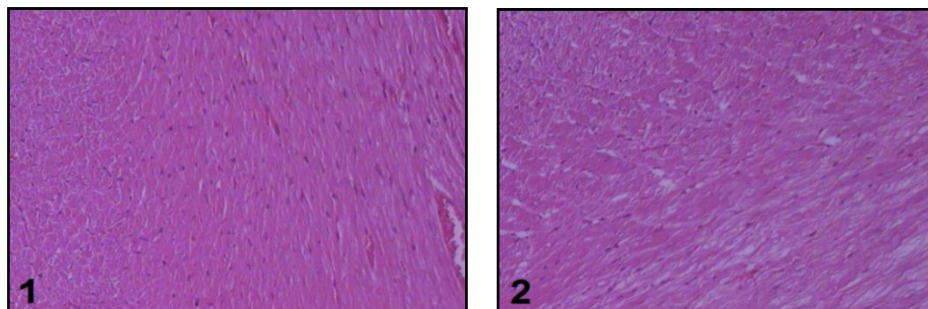
**Bảng 3.26. Ảnh hưởng của viên MIX đến vi thể gan, tim, thận**

| Mô   | Lô (n = 10)                  |                              |
|------|------------------------------|------------------------------|
|      | Chứng                        | Viên MIX                     |
| Gan  | Viêm gan mạn tính mức độ nhẹ | Viêm gan mạn tính mức độ nhẹ |
| Tim  | Mô tim bình thường           | Mô tim bình thường           |
| Thận | Mô thận bình thường          | Mô thận bình thường          |



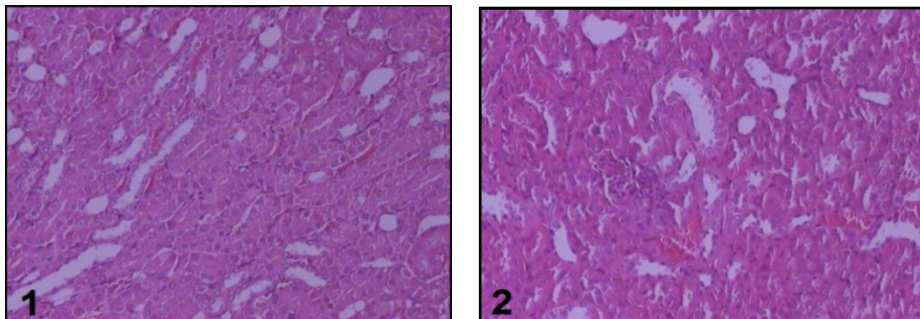
**Hình 3.9. Hình ảnh mô học giải phẫu vi thể trên gan**

1: Lô chứng; 2: Lô uống viên MIX



**Hình 3.10. Hình ảnh mô học giải phẫu vi thể trên tim**

1: Lô chứng; 2: Lô uống viên MIX



**Hình 3.11. Hình ảnh mô học giải phẫu vi thể trên thận**

1: Lô chứng; 2: Lô uống viên MIX

Giải phẫu vi thể của gan, tim, thận ở lô thử uống viên MIX liều 4 viên/kg sau 2 tháng không có sự khác biệt so với lô chứng (Bảng 3.26 và Hình 3.9, 3.10, 3.11). Như vậy, viên MIX liều 4 viên/kg sau 2 tháng cho uống không ảnh hưởng đến vi thể gan, tim, thận trên chuột nhắt trắng

### 3.3. Tác dụng điều hòa lipid máu của viên MIX trên chuột nhắt trắng

#### 3.3.1. Kết quả khảo sát tác dụng điều hòa lipid máu của viên MIX trên mô hình gây RLLM nội sinh

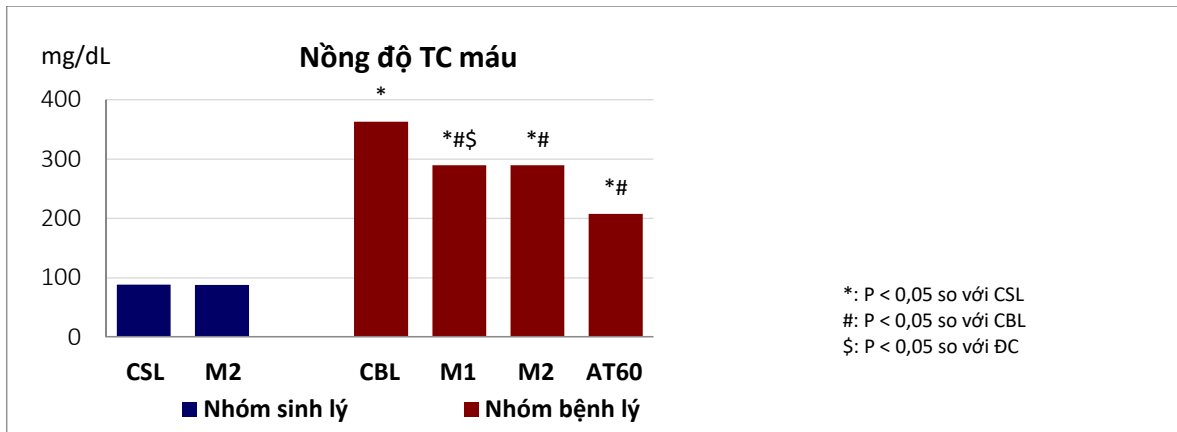
Nồng độ các thành phần lipid máu của các lô chuột tại thời điểm 24 giờ sau khi tiêm tyloxapol gây rối loạn lipid máu (Bảng 3.27).

**Bảng 3.27. Nồng độ thành phần lipid máu của các lô trên mô hình gây RLLM nội sinh**

| Nhóm                     | Lô<br>(n=10) | TC<br>(mg/dL)  | HDL-C<br>(mg/dL) | LDL-C<br>(mg/dL) | TG<br>(mg/dL)  |
|--------------------------|--------------|----------------|------------------|------------------|----------------|
| Sinh lý<br>(tyloxapol -) | CSL          | 88,3 ± 3,8     | 40,2 ± 1,0       | 12,4 ± 0,5       | 90,6 ± 3,9     |
|                          | M2           | 87,9 ± 1,8     | 39,5 ± 1,9       | 11,7 ± 1,3       | 94,8 ± 3,3     |
|                          |              | (↓ 0,5%)       | (↓ 1,7%)         | (↓ 5,6%)         | (↑ 4,6%)       |
| Bệnh lý<br>(tyloxapol +) | CBL          | 363,0 ± 19,4*  | 23,5 ± 1,2*      | 31,2 ± 2,0*      | 805,0 ± 19,7*  |
|                          |              | (↑ 311,1%)     | (↓ 41,5%)        | (↑ 151,6%)       | (↑ 788,5%)     |
|                          | M1           | 289,4 ± 15,5*# | 26,8 ± 1,3*      | 25,8 ± 1,0*#     | 715,0 ± 12,4*# |
|                          |              | (↓ 20,3%)      | (↑ 14,0%)        | (↓ 17,3%)        | (↓ 11,2%)      |
|                          | M2           | 212,0 ± 12,0*# | 30,4 ± 2,3*#     | 21,6 ± 1,3*#     | 655,3 ± 25,9*# |
|                          |              | (↓ 41,6%)      | (↑ 29,4%)        | (↓ 30,8%)        | (↓ 18,6%)      |
|                          | AT60         | 207,7 ± 10,5*# | 34,0 ± 1,8*#     | 19,8 ± 1,3*#     | 645,0 ± 22,1*# |
|                          |              | (↓ 42,8%)      | (↑ 44,7%)        | (↓ 36,5%)        | (↓ 19,9%)      |

\*:  $P < 0,05$  so với CSL; #:  $P < 0,05$  so với CBL; \$:  $P < 0,05$  so với ĐC

Trong nhóm bệnh lý (tiêm tyloxapol): Lô chứng bệnh lý (uống nước cất) nồng độ TC tăng 311,1%, LDL-C tăng 151,6%, TG tăng 788,5% và HDL-C giảm 41,5% đạt ý nghĩa thống kê so với lô chứng sinh lý ( $P < 0,05$ ). Như vậy, có thể sử dụng mô hình này để đánh giá tác dụng điều hòa lipid máu của thuốc nghiên cứu trên các thành phần TC, HDL-C, LDL-C, TG máu.



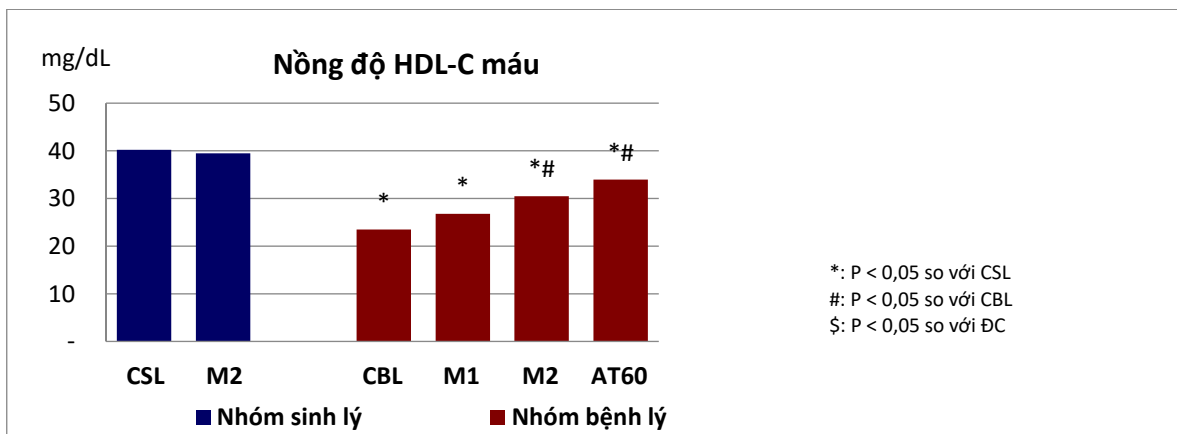
**Biểu đồ 3.4. Nồng độ TC máu của các lô trên mô hình gây RLLM nội sinh**

*Trong nhóm sinh lý:* Lô uống viên MIX liều 2 viên/kg nồng độ TC không khác biệt so với lô chứng sinh lý. Như vậy, viên MIX liều 2 viên/kg không ảnh hưởng trên nồng độ TC máu ở chuột bình thường.

*Trong nhóm bệnh lý:*

- Lô chứng bệnh lý (uống nước cất) nồng độ TC tăng khác biệt đạt ý nghĩa thống kê so với lô chứng sinh lý ( $P < 0,05$ ).
- Lô thử uống viên MIX liều 1 viên và 2 viên/kg nồng độ TC giảm khác biệt đạt ý nghĩa thống kê so với lô chứng bệnh lý ( $P < 0,05$ ) nhưng vẫn còn tăng đạt ý nghĩa thống kê so với lô chứng sinh lý.
- Lô đối chứng uống atorvastatin liều 60 mg/kg nồng độ TC giảm khác biệt đạt ý nghĩa thống kê so với lô chứng bệnh lý ( $P < 0,05$ ) nhưng vẫn còn tăng đạt ý nghĩa thống kê so với lô chứng sinh lý.

Như vậy, viên MIX cả 2 liều và atorvastatin liều 60 mg/kg đều có tác dụng làm giảm nồng độ TC máu trên mô hình gây RLLM nội sinh (Bảng 3.27, Biểu đồ 3.4).



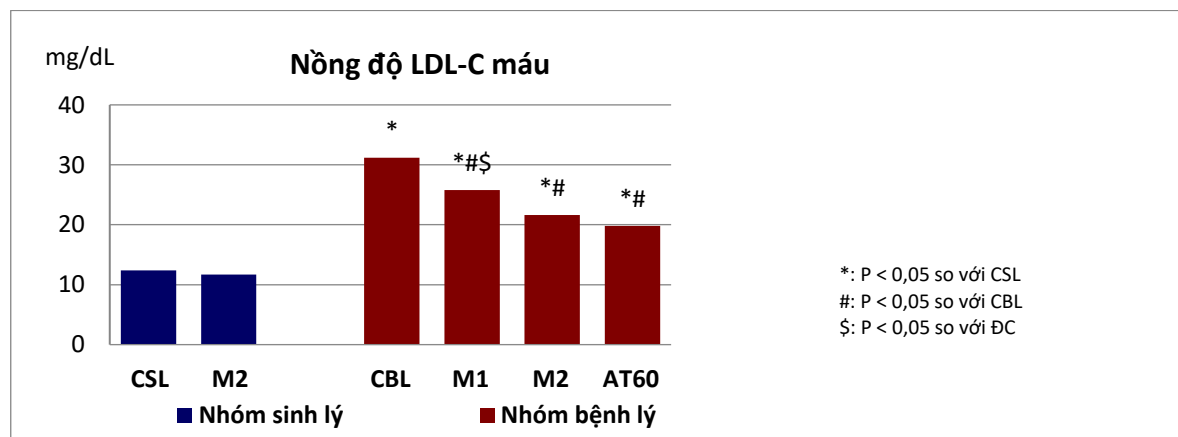
**Biểu đồ 3.5. Nồng độ HDL-C máu của các lô trên mô hình gây RLLM nội sinh**

*Trong nhóm sinh lý:* Lô uống viên MIX liều 2 viên/kg nồng độ HDL-C không khác biệt so với lô chứng sinh lý. Như vậy, viên MIX liều 2 viên/kg không ảnh hưởng trên nồng độ HDL-C máu ở chuột bình thường.

*Trong nhóm bệnh lý:*

- Lô chứng bệnh lý (uống nước cất) nồng độ HDL-C giảm khác biệt đạt ý nghĩa thống kê so với lô chứng sinh lý ( $P < 0,05$ ).
- Lô thử uống viên MIX liều 1 viên/kg nồng độ HDL-C tăng không khác biệt đạt ý nghĩa thống kê so với lô chứng bệnh lý; Liều 2 viên/kg nồng độ HDL-C tăng khác biệt đạt ý nghĩa thống kê so với lô chứng bệnh lý ( $P < 0,05$ ).
- Lô đối chứng uống atorvastatin liều 60 mg/kg nồng độ HDL-C tăng khác biệt đạt ý nghĩa thống kê so với lô chứng bệnh lý ( $P < 0,05$ ).

Như vậy, viên MIX liều 2 viên/kg và atorvastatin liều 60 mg/kg đều có tác dụng làm tăng nồng độ HDL-C máu trên mô hình gây RLLM nội sinh (Bảng 3.27, Biểu đồ 3.5)



**Biểu đồ 3.6. Nồng độ LDL-C máu của các lô trên mô hình gây RLLM nội sinh**

*Trong nhóm sinh lý:* Lô uống viên MIX liều 2 viên/kg nồng độ LDL-C không khác biệt so với lô chứng sinh lý. Như vậy, viên MIX liều 2 viên/kg không ảnh hưởng trên nồng độ LDL-C máu ở chuột bình thường.

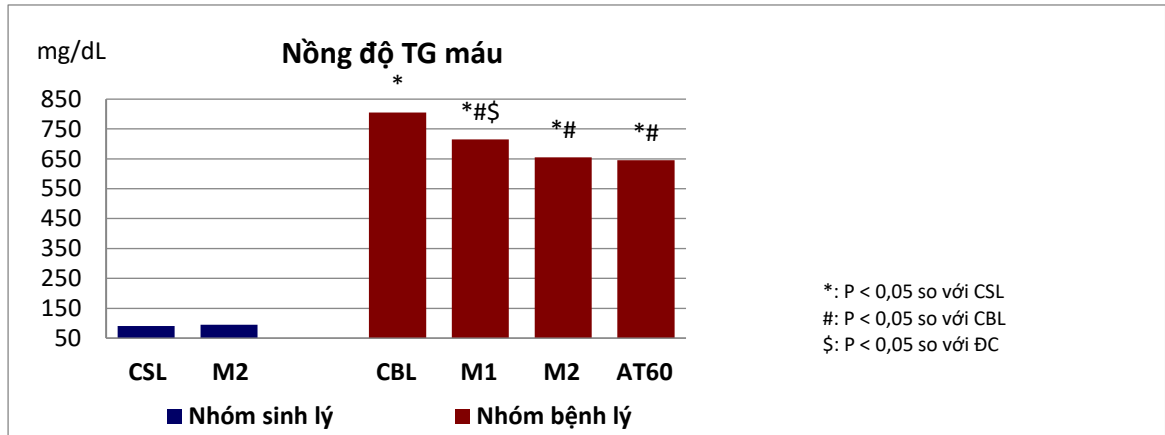
*Trong nhóm bệnh lý:*

- Lô chứng bệnh lý (uống nước cất) nồng độ LDL-C tăng khác biệt đạt ý nghĩa thống kê so với lô chứng sinh lý ( $P < 0,05$ ).
- Lô thử uống viên MIX liều 1 viên và 2 viên/kg nồng độ LDL-C giảm khác biệt đạt ý nghĩa thống kê so với lô chứng bệnh lý ( $P < 0,05$ ) nhưng vẫn còn tăng đạt ý nghĩa

thống kê so với lô chứng sinh lý.

- Lô đối chứng uống atorvastatin liều 60 mg/kg nồng độ LDL-C giảm khác biệt đạt ý nghĩa thống kê so với lô chứng bệnh lý ( $P < 0,05$ ) nhưng vẫn còn tăng đạt ý nghĩa thống kê so với lô chứng sinh lý.

Như vậy, viên MIX cả 2 liều và atorvastatin liều 60 mg/kg đều có tác dụng làm giảm nồng độ LDL-C máu trên mô hình gây RLLM nội sinh (Bảng 3.27, Biểu đồ 3.6)



**Biểu đồ 3.7. Nồng độ TG máu của các lô trên mô hình gây RLLM nội sinh**

*Trong nhóm sinh lý:* Lô uống viên MIX liều 2 viên/kg nồng độ TG không khác biệt so với lô chứng sinh lý. Như vậy, viên MIX liều 2 viên/kg không ảnh hưởng trên nồng độ TG máu ở chuột bình thường.

*Trong nhóm bệnh lý:*

- Lô chứng bệnh lý (uống nước cất) nồng độ TG tăng khác biệt đạt ý nghĩa thống kê so với lô chứng sinh lý ( $P < 0,05$ ).
- Lô thử uống viên MIX liều 1 viên và 2 viên/kg nồng độ TG giảm khác biệt đạt ý nghĩa thống kê so với lô chứng bệnh lý ( $P < 0,05$ ) nhưng vẫn còn tăng đạt ý nghĩa thống kê so với lô chứng sinh lý.
- Lô uống atorvastatin liều 60 mg/kg nồng độ TG giảm khác biệt đạt ý nghĩa thống kê so với lô chứng bệnh lý ( $P < 0,05$ ) nhưng vẫn còn tăng đạt ý nghĩa thống kê so với lô chứng sinh lý.

Như vậy, viên MIX cả 2 liều và atorvastatin liều 60 mg/kg đều có tác dụng làm giảm nồng độ TG máu trên mô hình gây RLLM nội sinh (Bảng 3.27, Biểu đồ 3.7).

### 3.3.2. Kết quả khảo sát tác dụng điều hòa lipid máu của viên MIX trên mô hình gây RLLM ngoại sinh

Trọng lượng cơ thể chuột của lô uống atorvastatin ở tuần thứ nhất và tuần thứ 6 (kết thúc thử nghiệm) có sự khác biệt đạt ý nghĩa thống kê so với lô chứng sinh lý ( $P < 0,05$ ). Trọng lượng cơ thể chuột ở các lô còn lại khác biệt không đạt ý nghĩa thống kê. Trọng lượng cơ thể chuột ở lô chứng bệnh lý không có sự khác biệt đạt ý nghĩa thống kê so với lô chứng sinh lý. Như vậy, mô hình gây RLLM ngoại sinh này không ảnh hưởng trên trọng lượng cơ thể chuột (Bảng 3.28).

**Bảng 3.28. Trọng lượng cơ thể chuột của các lô trên mô hình gây RLLM ngoại sinh (g)**

| Nhóm                       | Lô<br>(n=7) | Tuần<br>0  | Tuần<br>1     | Tuần<br>2  | Tuần<br>3  | Tuần<br>4  | Tuần<br>5  | Tuần<br>6               |
|----------------------------|-------------|------------|---------------|------------|------------|------------|------------|-------------------------|
| Sinh lý<br>(cholesterol -) | CSL         | 19,5 ± 0,8 | 21,7 ± 1,6    | 24,5 ± 3,1 | 27,2 ± 3,7 | 27,9 ± 3,6 | 27,6 ± 3,0 | 28,7 ± 3,2              |
|                            | CBL         | 20,7 ± 1,0 | 22,6 ± 3,0    | 25,6 ± 4,6 | 28,0 ± 5,5 | 28,9 ± 5,6 | 27,0 ± 5,1 | 25,3 ± 5,3              |
| Bệnh lý<br>(cholesterol+)  | M1          | 19,8 ± 1,5 | 21,5 ± 1,5    | 24,2 ± 1,9 | 25,9 ± 1,9 | 26,7 ± 2,2 | 28,6 ± 2,3 | 27,3 ± 2,4              |
|                            | M2          | 20,2 ± 1,2 | 22,6 ± 1,9    | 26,1 ± 1,7 | 28,4 ± 2,3 | 29,6 ± 2,6 | 19,5 ± 3,8 | 28,0 ± 3,3              |
|                            | AT10        | 20,0 ± 1,1 | 18,1 ± 2,3* # | 22,2 ± 2,6 | 24,7 ± 2,4 | 25,2 ± 3,1 | 24,9 ± 3,0 | 23,7 ± 2,5 <sup>#</sup> |

\*:  $P < 0,05$  so với CSL cùng thời điểm khảo sát; #:  $P < 0,05$  so với CBL cùng thời điểm khảo sát.

Nồng độ thành phần lipid máu của các lô chuột tại thời điểm sau 6 tuần uống dung dịch giàu lipid gây rối loạn lipid máu (Bảng 3.28).

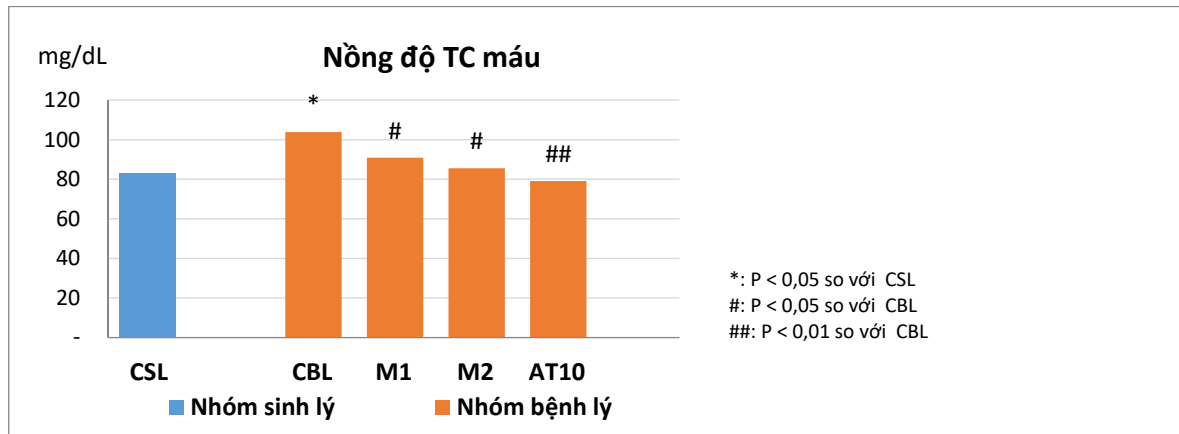
**Bảng 3.29. Nồng độ thành phần lipid máu của các lô trên mô hình gây RLLM ngoại sinh**

| Nhóm                       | Lô<br>(n=7) | TC<br>(mg/dL)              | HDL-C<br>(mg/dL)       | LDL-C<br>(mg/dL)           | TG<br>(mg/dL)            |
|----------------------------|-------------|----------------------------|------------------------|----------------------------|--------------------------|
| Sinh lý<br>(cholesterol -) | CSL         | 82,8 ± 3,4                 | 51,6 ± 4,8             | 19,5 ± 6,4                 | 58,7 ± 9,1               |
|                            | CBL         | 103,9 ± 16,7*<br>(↑ 25,5%) | 47,9 ± 8,0<br>(↓ 7,2%) | 41,1 ± 19,3*<br>(↑ 110,8%) | 74,5 ± 18,3<br>(↑ 26,9%) |

|                           |      |                                       |                          |                                      |                          |
|---------------------------|------|---------------------------------------|--------------------------|--------------------------------------|--------------------------|
| Bệnh lý<br>(cholesterol+) | M1   | 90,9 ± 14,6 <sup>#</sup><br>(↓ 12,5%) | 56,7 ± 13,1<br>(↑ 18,4%) | 17,0 ± 8,6 <sup>#</sup><br>(↓ 58,6%) | 86,0 ± 15,5<br>(↑ 15,4%) |
|                           | M2   | 85,6 ± 9,0 <sup>#</sup><br>(↓ 17,6%)  | 50,1 ± 7,7<br>(↑ 4,6%)   | 19,6 ± 8,0 <sup>#</sup><br>(↓ 52,3%) | 79,3 ± 22,3<br>(↑ 6,4%)  |
|                           | AT10 | 79,1 ± 5,7 <sup>##</sup><br>(↓ 23,8%) | 47,9 ± 7,0<br>(0,0%)     | 16,5 ± 6,1 <sup>#</sup><br>(↓ 59,9%) | 73,6 ± 19,3<br>(↓ 1,2%)  |

\*:  $P < 0,05$  so với CSL; #:  $P < 0,05$  so với CBL; ##:  $P < 0,01$  so với CBL

Trong nhóm bệnh lý (uống dung dịch giàu lipid): Lô chứng bệnh lý (uống nước cất) nồng độ TC tăng 25,5%, LDL-C tăng 110,8% đạt ý nghĩa thống kê so với lô chứng sinh lý ( $P < 0,05$ ). Như vậy, có thể sử dụng mô hình này để đánh giá tác dụng điều hòa lipid máu của thuốc nghiên cứu trên thành phần lipid máu: TC, LDL-C (Bảng 3.29).

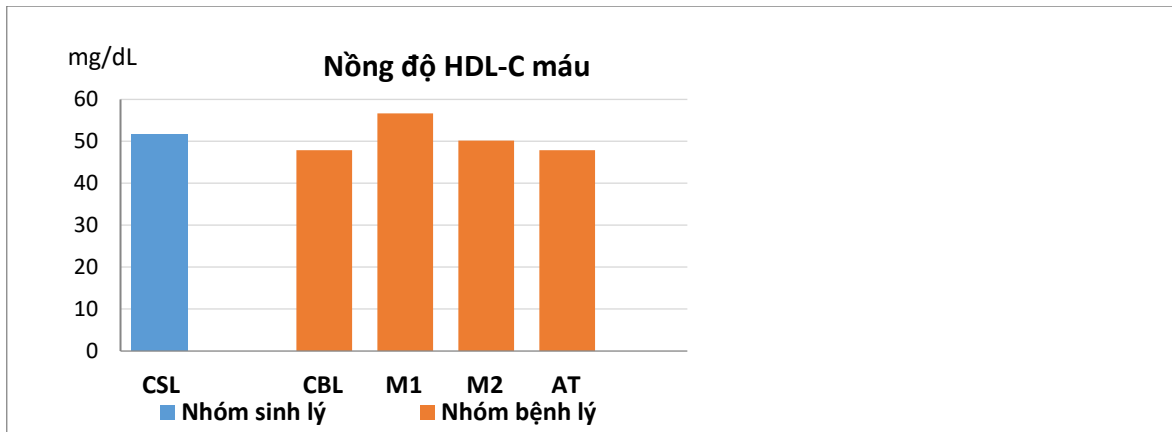


**Biểu đồ 3.8. Nồng độ TC máu của các lô trên mô hình gây RLLM ngoại sinh**

Trong nhóm bệnh lý:

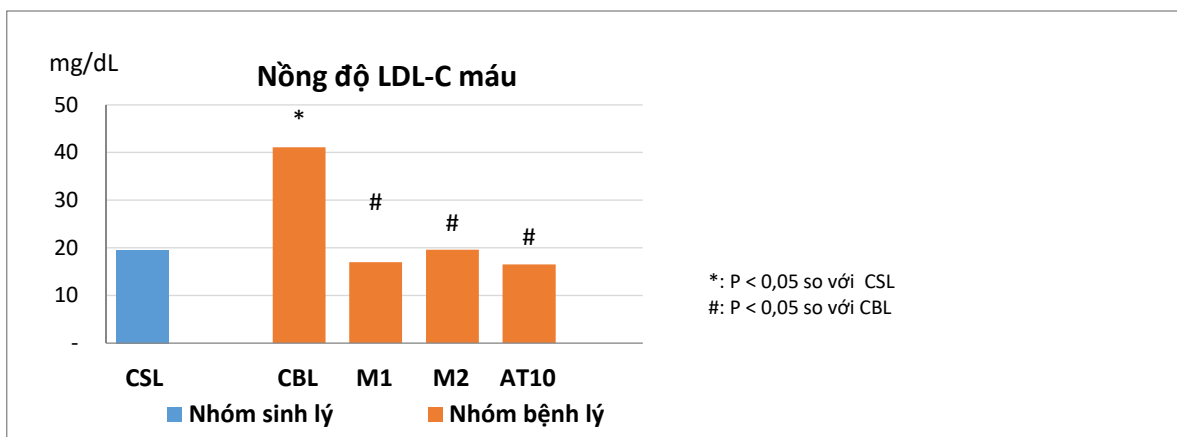
- Lô chứng bệnh lý (uống nước cất) nồng độ TC tăng khác biệt đạt ý nghĩa thống kê so với lô chứng sinh lý ( $P < 0,05$ ).
- Lô thử uống viên MIX liều 1 viên và 2 viên/kg nồng độ TC giảm khác biệt đạt ý nghĩa thống kê so với lô chứng bệnh lý ( $P < 0,05$ ) và đưa nồng độ TC về mức bình thường khi so sánh với lô chứng sinh lý.
- Lô đối chứng uống atorvastatin liều 10 mg/kg nồng độ TC giảm khác biệt đạt ý nghĩa thống kê so với lô chứng bệnh lý ( $P < 0,05$ ) và đưa nồng độ TC về mức bình thường khi so sánh với lô chứng sinh lý.

Như vậy, viên MIX cả 2 liều và atorvastatin liều 10 mg/kg đều có tác dụng làm giảm nồng độ TC máu trên mô hình gây RLLM ngoại sinh (Bảng 3.29 - Biểu đồ 3.8).



**Biểu đồ 3.9. Nồng độ HDL-C máu của các lô trên mô hình gây RLLM ngoại sinh**

Nồng độ HDL-C ở lô chứng bệnh lý (uống nước cất) không có sự khác biệt đạt ý nghĩa thống kê so với lô chứng sinh lý. Vì vậy, không đánh giá được tác dụng của thuốc thử viên MIX cũng như thuốc đối chứng atorvastatin trên nồng độ HDL-C máu trong thử nghiệm này (Bảng 3.29 - Biểu đồ 3.9).



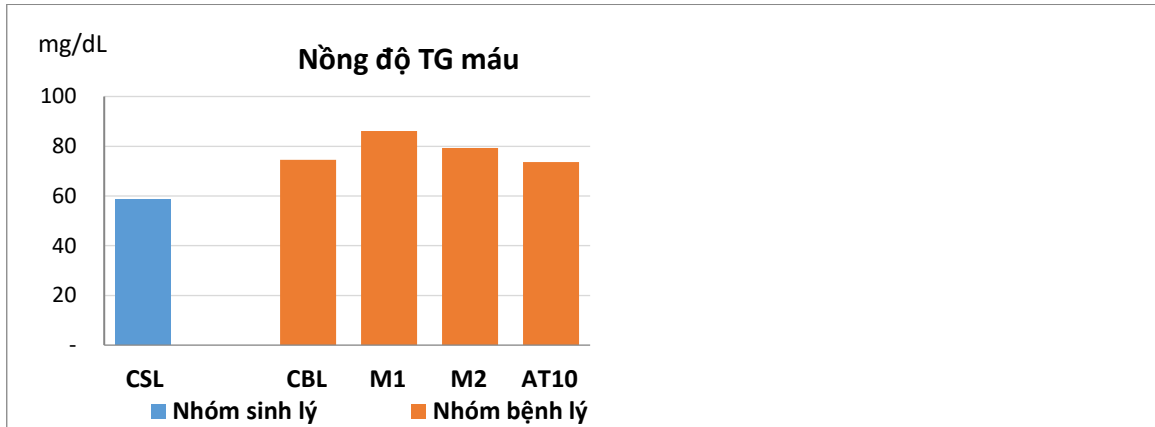
**Biểu đồ 3.10. Nồng độ LDL-C máu của các lô trên mô hình gây RLLM ngoại sinh**

*Trong nhóm bệnh lý:*

- Lô chứng bệnh lý (uống nước cất) nồng độ LDL-C tăng khác biệt đạt ý nghĩa thống kê so với lô chứng sinh lý ( $P < 0,05$ ).
- Lô thử uống viên MIX liều 1 viên và 2 viên/kg nồng độ LDL-C giảm khác biệt đạt ý nghĩa thống kê so với lô chứng bệnh lý ( $P < 0,05$ ) và đưa nồng độ LDL-C về mức bình thường khi so sánh với lô chứng sinh lý.
- Lô đối chứng uống atorvastatin liều 10 mg/kg nồng độ LDL-C giảm khác biệt đạt ý nghĩa thống kê so với lô chứng bệnh lý ( $P < 0,05$ ) và đưa nồng độ LDL-C về mức

bình thường khi so sánh với lô chứng sinh lý.

Như vậy, viên MIX cả 2 liều và atorvastatin liều 10 mg/kg đều có tác dụng làm giảm nồng độ LDL-C máu trên mô hình gây RLLM ngoại sinh (Bảng 3.29 - Biểu đồ 3.10).



**Biểu đồ 3.11. Nồng độ TG máu của các lô trên mô hình gây RLLM ngoại sinh**

Nồng độ TG ở lô chứng bệnh lý (uống nước cất) không có sự khác biệt đạt ý nghĩa thống kê so với lô chứng sinh lý. Vì vậy, không đánh giá được tác dụng của thuốc thử viên MIX cũng như thuốc đối chứng atorvastatin trên nồng độ TG máu trong thử nghiệm này (Bảng 3.29 - Biểu đồ 3.11).

### 3.4. Tác động ức chế hoạt tính HMG-CoA reductase của viên MIX *in vitro* và *in vivo*

#### 3.4.1. Kết quả xác định nồng độ protein trong hỗn dịch protein gan chuột nhắt trắng

**Bảng 3.30. Nồng độ protein trong hỗn dịch protein gan chuột**

| Mẫu                                    | Nồng độ protein (g/dL) | Mẫu | Nồng độ protein (g/dL) |
|----------------------------------------|------------------------|-----|------------------------|
| 1                                      | 2,6                    | 6   | 3                      |
| 2                                      | 2,5                    | 7   | 2,9                    |
| 3                                      | 3,1                    | 8   | 2,3                    |
| 4                                      | 3,3                    | 9   | 3                      |
| 5                                      | 3,2                    | 10  | 2,6                    |
| Nồng độ protein: $2,85 \pm 0,105$ g/dL |                        |     |                        |

Thực hiện quy trình thu nhận dịch đồng thể gan theo phương pháp mục 2.5.4.1, tiến hành xác định nồng độ protein trong 10 mẫu hỗn dịch protein gan bằng bộ KIT định lượng protein toàn phần và thu được nồng độ protein trong các mẫu dịch đồng

thể gan là  $2,85 \pm 0,105$  g/dL (Bảng 3.30). Từ đó, hút lượng dịch đồng thể gan tương ứng với khoảng 1 mg protein trong 1 mL dung dịch phản ứng xác định hoạt tính HMG-CoA reductase *in vitro* và *in vivo*.

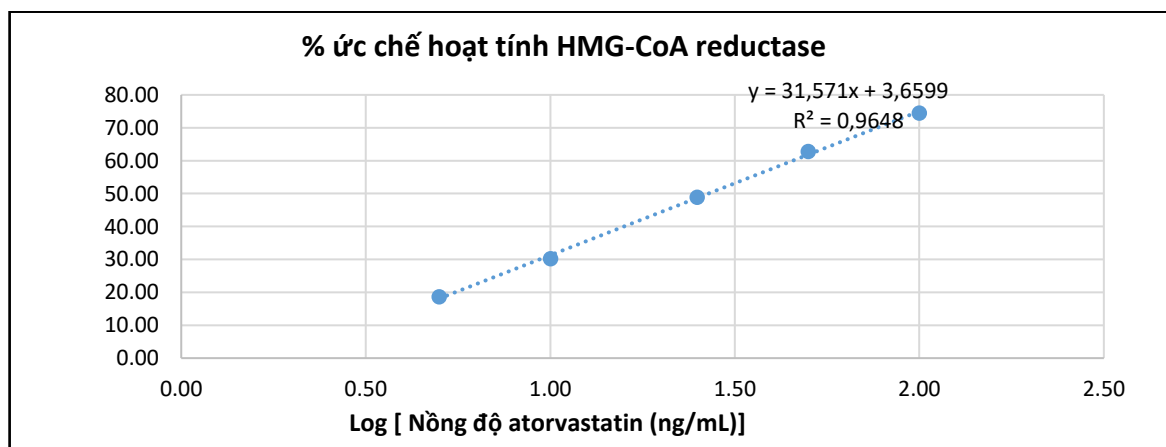
#### 3.4.2. Kết quả khảo sát tác động ức chế hoạt tính HMG-CoA reductase của atorvastatin và viên MIX *in vitro*

Tác động ức chế hoạt tính HMG-CoA reductase của atorvastatin được thể hiện ở các dãy nồng độ (Bảng 3.31).

**Bảng 3.31. Tác động ức chế hoạt tính HMG-CoA reductase của atorvastatin *in vitro***

| Atorvastatin (ng/mL) | $\Delta OD$ | % ức chế hoạt tính enzyme |
|----------------------|-------------|---------------------------|
| 0                    | 0,043       | 0,00                      |
| 1                    | 0,040       | 6,98                      |
| 5                    | 0,035       | 18,60                     |
| 10                   | 0,030       | 30,23                     |
| 25                   | 0,022       | 48,84                     |
| 50                   | 0,016       | 62,79                     |
| 100                  | 0,011       | 74,42                     |
| 1000                 | 0,003       | 93,02                     |

Tác động ức chế hoạt tính HMG-CoA reductase của atorvastatin *in vitro* ở nồng độ 1 ng/mL là 6,98% và tiếp tục tăng dần ở các nồng độ tiếp theo. Ở nồng độ 1000 ng/mL tác động ức chế hoạt tính HMG-CoA reductase của atorvastatin là 93,02% so với chứng.



**Biểu đồ 3.12. Đường biểu diễn sự tương quan giữa % ức chế hoạt tính HMG-CoA reductase và log nồng độ atorvastatin *in vitro***

Đường hồi quy tuyến tính thể hiện sự phụ thuộc của % ức chế hoạt tính HMG-CoA reductase vào nồng độ atorvastatin được thể hiện (Biểu đồ 3.12). Từ phương trình hồi quy tuyến tính  $y = 31,571x + 3,6599$  với  $R^2 = 0,9648$  và  $IC_{50}$  ước lượng được tương ứng là 29,36 ng/mL.

Tác động ức chế hoạt tính HMG-CoA reductase của viên MIX được thể hiện ở các dãy nồng độ (Bảng 3.32).

**Bảng 3.32. Tác động ức chế hoạt tính HMG-CoA reductase của viên MIX *in vitro***

| Viên MIX<br>( $\mu\text{g/mL}$ ) | Lần 1<br>$\Delta\text{OD}$ | Lần 2<br>$\Delta\text{OD}$ | Lần 3<br>$\Delta\text{OD}$ | $\Delta\text{OD TB}$ | % ức chế |
|----------------------------------|----------------------------|----------------------------|----------------------------|----------------------|----------|
| 0                                | 0,044                      | 0,048                      | 0,052                      | 0,048                | -        |
| 8000                             | 0,025                      | 0,027                      | 0,024                      | 0,025                | 47,91    |
| 4000                             | 0,034                      | 0,024                      | 0,032                      | 0,030                | 37,50    |
| 2000                             | 0,028                      | 0,033                      | 0,032                      | 0,031                | 35,42    |
| 1000                             | 0,038                      | 0,027                      | 0,043                      | 0,036                | 25,00    |

Sau 3 lần lặp lại thử nghiệm, viên MIX ở nồng độ cao nhất 8000  $\mu\text{g/mL}$  thể hiện tác dụng ức chế hoạt tính HMG-CoA reductase *in vitro* tương đương 47,91% ( $< 50\%$ ) so với chứng, nên chưa xác định được giá trị  $IC_{50}$  của viên MIX.

### 3.2.3. Tác động của viên MIX trên hoạt tính HMG-CoA reductase *in vivo*

Hoạt tính HMG-CoA reductase của các lô chuột tại thời điểm 24 giờ sau khi tiêm tyloxapol gây RLLM (Bảng 3.33).

**Bảng 3.33. Tác động ức chế hoạt tính HMG-CoA reductase của viên MIX *in vivo***

| Nhóm                  | Lô (n = 12) | $\Delta\text{OD TB}$                              |
|-----------------------|-------------|---------------------------------------------------|
| Sinh lý (tyloxapol -) | CSL         | $0,044 \pm 0,002$                                 |
|                       | M2          | $0,039 \pm 0,003$ ( $\downarrow 12,83\%$ )        |
| Bệnh lý (tyloxapol +) | CBL         | $0,090 \pm 0,003^{**}$ ( $\uparrow 103,21\%$ )    |
|                       | M1          | $0,036 \pm 0,005^{##}$ ( $\downarrow 60,17\%$ )   |
|                       | M2          | $0,034 \pm 0,004^{###*}$ ( $\downarrow 62,21\%$ ) |
|                       | AT60        | $0,031 \pm 0,004^{###*}$ ( $\downarrow 65,09\%$ ) |

\*:  $P < 0,05$  so với CSL; \*\*:  $P < 0,001$  so với CSL; #:  $P < 0,05$  so với CBL;

##:  $P < 0,001$  so với CBL

*Trong nhóm bệnh lý (tiêm tyloxapol):* Lô chứng bệnh lý (uống nước cất) hoạt tính HMG-CoA reductase tăng 103,21% đạt ý nghĩa thống kê so với lô chứng sinh lý ( $P < 0,001$ ). Do đó, có thể sử dụng mô hình này để đánh giá tác động ức chế hoạt tính HMG-CoA reductase của thuốc nghiên cứu.

*Trong nhóm sinh lý:* Lô uống viên MIX liều 2 viên/kg hoạt tính HMG-CoA reductase không khác biệt so với lô chứng sinh lý. Như vậy, viên MIX liều 2 viên/kg không ảnh hưởng trên hoạt tính HMG-CoA reductase ở chuột bình thường.

*Trong nhóm bệnh lý:*

- Lô chứng bệnh lý (uống nước cất) hoạt tính HMG-CoA reductase tăng đạt ý nghĩa thống kê so với lô chứng sinh lý ( $P < 0,001$ ).
- Lô thử uống viên MIX liều 1 viên và 2 viên/kg hoạt tính HMG-CoA reductase giảm khác biệt đạt ý nghĩa thống kê so với lô chứng bệnh lý ( $P < 0,001$ ); Liều 2 viên/kg hoạt tính HMG-CoA reductase giảm khác biệt đạt ý nghĩa thống kê so với lô chứng sinh lý ( $P < 0,05$ ).
- Lô đối chứng uống atorvastatin liều 60 mg/kg hoạt tính HMG-CoA reductase giảm khác biệt đạt ý nghĩa thống kê so với lô chứng bệnh lý ( $P < 0,001$ ) và cũng giảm khác biệt đạt ý nghĩa thống kê so với lô chứng sinh lý ( $P < 0,05$ ).

Như vậy, viên MIX cả 2 liều và atorvastatin liều 60 mg/kg đều có tác dụng làm giảm hoạt tính HMG- CoA reductase *in vivo*.

## Chương 4. BÀN LUẬN

Xu hướng sử dụng thuốc điều trị RLLM hiện nay là hướng về thuốc có nguồn gốc tự nhiên vì những đặc tính: Phù hợp với quy luật sinh lý của cơ thể, hiệu quả điều trị không thể phủ nhận và ít tác dụng bất lợi hơn so với thuốc có nguồn gốc hóa học tổng hợp. Vì vậy, đã thu hút sự quan tâm của các nhà khoa học trong việc tìm hiểu, nghiên cứu và phát triển thuốc mới. Tại Việt Nam, nhiều chế phẩm từ thảo dược có hiệu quả điều trị RLLM đã được công bố như viên Lipidan,<sup>7</sup> viên Thanh mạch an,<sup>8</sup> viên Cholestin.<sup>56</sup> Nguru tất, Đan sâm, Tam thất là những dược liệu cổ truyền được đã sử dụng lâu đời, an toàn và có tác dụng điều hòa lipid máu khi sử dụng riêng lẻ. Tuy nhiên, khi kết hợp theo công thức và bào chế dưới dạng viên, liệu tính an toàn và tác dụng điều hòa lipid máu có thay đổi hay không? Để làm sáng tỏ vấn đề này, việc xây dựng quy trình bào chế và tiêu chuẩn chất lượng, đánh giá tính an toàn, khảo sát tác dụng và cơ chế điều hòa lipid máu của viên MIX là cần thiết. Nhằm góp phần công bố khoa học giá trị của chế phẩm này.

### 4.1. Bào chế và tiêu chuẩn cơ sở viên MIX

#### 4.1.1. Bào chế viên MIX

Theo khuyến cáo của WHO, dược liệu đạt tiêu chuẩn chất lượng cần phải đạt 3 yêu cầu: Tính xác thực, độ tinh khiết không có lẫn tạp chất và định lượng các thành phần hoạt chất chính phải nằm trong giới hạn đã xác định.<sup>117</sup> Thông thường, đánh giá chất lượng dược liệu dựa trên tiêu chuẩn Dược điển Việt Nam hiện hành, Dược điển tham chiếu hay tiêu chuẩn của nhà sản xuất. Nguyên liệu Nguru tất, Đan sâm, Tam thất dùng trong nghiên cứu được LADOPHAR cung cấp, đạt tiêu chuẩn chất lượng (Nguru tất, Đan sâm theo DDVN V; Tam thất theo TCCS) về: Mô tả, vi phẫu, soi bột, định tính, độ ẩm, tạp chất, tro toàn phần, tro không tan trong acid, kim loại nặng, chất chiết được trong dược liệu, định lượng. Đây là tiêu chuẩn bước đầu rất cần thiết để tiến hành những giai đoạn tiếp theo của quá trình bào chế viên MIX.

Xu hướng hiện nay là nghiên cứu hiện đại hóa các vị thuốc, bài thuốc YHCT dưới các dạng bào chế hiện đại như viên nén, viên nang, cốm ...<sup>112</sup> Với dạng bào chế hiện đại không những chỉ để phân liều một cách chính xác, an toàn, tiện dụng mà còn góp phần quan trọng trong việc cải thiện sinh khả dụng, tăng tính ổn định của chế

phẩm. So với chế phẩm thuốc sắc bằng phương pháp sắc thuốc thang truyền thống, các chế phẩm hiện đại với ưu điểm tiện lợi, lượng thuốc phải uống ít, vì vậy có thể giúp người bệnh dễ dàng tuân thủ liệu trình điều trị. Tuy nhiên, nhược điểm là không thể cá thể hóa được. Ngược lại, ưu điểm của chế phẩm thuốc sắc truyền thống là có thể cá thể hóa được để phù hợp với chứng trạng lâm sàng và cơ địa của người bệnh.

Trong thảo dược chứa nhiều thành phần hóa học khác nhau, việc lựa chọn phương pháp chiết xuất có thể ảnh hưởng đến kết quả nghiên cứu của chế phẩm. Một số phương pháp chiết xuất hiện đại cho hiệu quả tốt và tiết kiệm thời gian như chiết xuất có hỗ trợ vi sóng, chiết xuất bằng xung điện trường, chiết xuất bằng dung môi dưới áp suất cao ...<sup>18</sup> Tuy nhiên, những phương pháp này chưa thể áp dụng rộng rãi trong điều kiện thực tế ở Việt Nam. Các phương pháp chiết xuất truyền thống như phương pháp ngâm kiệt, phương pháp ngâm, phương pháp sắc, phương pháp chiết hồi lưu, phương pháp chiết soxhlet ..., thể hiện hiệu quả chiết khá cao, dễ thực hiện, an toàn và chi phí phù hợp với qui mô phòng thí nghiệm và cơ sở sản xuất. Mục đích của đề tài là nghiên cứu tác dụng điều hòa lipid máu của viên MIX, chế phẩm được bào chế từ Ngưu tất - Đan sâm - Tam thất. Vì vậy, giai đoạn chiết xuất để thu được cao toàn phần và tối đa các hoạt chất từ dược liệu là rất quan trọng. Chính thành phần saponin (nhóm hợp chất chủ yếu của Ngưu tất, Tam thất) thể hiện nhiều tác dụng dược lý như hạ lipid máu, chống đông máu, chống oxy hóa, kháng viêm, bảo vệ tế bào gan.<sup>118</sup> Do đó, việc lựa chọn phương pháp chiết xuất và dung môi phù hợp dùng để chiết được cao toàn phần và saponin toàn phần luôn được quan tâm. Nghiên cứu lựa chọn phương pháp ngâm kiệt vì: Phương pháp này hiện đang được sử dụng khá phổ biến trong các phòng thí nghiệm, mang lại hiệu suất chiết khá cao, có thể ứng dụng trong thực tế sản xuất với quy mô công nghiệp và đây cũng là phương pháp chiết saponin từ dược liệu được sử dụng nhiều so với các phương pháp khác.<sup>119,120</sup>

Phương pháp ngâm kiệt chi phối bởi độ hòa tan và sự khuếch tán của dung môi. Độ hòa tan bị chi phối bởi quy tắc cơ bản là chất có cùng bản chất phân cực hòa tan tốt vào nhau. Ethanol là dung môi bán phân cực, có khả năng hòa tan được nhiều hợp chất và ít tạp chất trong dược liệu, nhiệt độ sôi thấp nên khi cô dịch chiết hoạt chất ít bị phân hủy, không độc hại nếu còn tồn dư trong chế phẩm. Với ưu điểm là không độc hại, rẻ tiền, dễ tìm trên thị trường. Hiện nay, ethanol ở các nồng độ khác

nhau là dung môi được sử dụng nhiều nhất để chiết xuất dược liệu. Nghiên cứu Lathaa BP và cộng sự<sup>23</sup> sử dụng ethanol 70% để chiết xuất Ngưu tất, dịch chiết thu được có hàm lượng saponin khá cao. Nguyễn Quang Tuyền<sup>121</sup> sử dụng ethanol 65% để chiết cao toàn phần từ Tam thất, hàm lượng cao chiết thu được là 14,61%.

Quá trình chiết cao dược liệu chịu ảnh hưởng của nhiều yếu tố chính như tỷ lệ dược liệu: dung môi, nồng độ dung môi, nhiệt độ và thời gian chiết. Vì vậy, cần được khảo sát nhằm xác định khoảng thích hợp nhất cho quá trình chiết xuất với mục tiêu thu được hiệu suất chiết cao nhất. Tỷ lệ dược liệu và dung môi: Nếu sử dụng quá nhiều dung môi dịch chiết sẽ bị loãng, lẫn nhiều tạp chất; Nếu sử dụng ít dung môi sẽ không chiết kiệt được hoạt chất trong dược liệu.<sup>18</sup> Đan sâm, Tam thất là những dược liệu quý, chứa nhiều hợp chất có tác dụng dược lý quan trọng. Nghiên cứu tiền đề sử dụng ethanol 70% để chiết hỗn hợp dược liệu Ngưu tất - Đan sâm - Tam thất, với tỷ lệ dược liệu: dung môi là (1: 20) (g/mL) cho hiệu suất chiết 39,33%, hàm lượng saponin toàn phần là 18,96% (phương pháp Namba).<sup>41</sup> Tham khảo quy trình chiết xuất từ các nghiên cứu trước đây,<sup>23,41,121</sup> dựa vào dược liệu nghiên cứu và để thuận lợi cho ứng dụng sản phẩm cao chiết trong quá trình điều chế thuốc. Nghiên cứu sử dụng ethanol 70% làm dung môi, với tỷ lệ dược liệu: dung môi là 1: 12 (g/mL), cho hiệu suất chiết 36,24%. Ưu điểm của phương pháp này là thiết bị chiết xuất đơn giản, dung môi rẻ tiền, dễ mua và thân thiện môi trường. Tuy nhiên, phương pháp này có hạn chế là tốn nhiều thời gian để chiết kiệt hết hợp chất có trong dược liệu.

Viên nang cứng hiện là một trong những dạng bào chế phổ biến nhất của thuốc, thực phẩm chức năng. Cấu tạo viên bao gồm hai phần: Một vỏ nang rỗng để chứa dược chất, gắn liền với dược chất và đưa vào cơ thể cùng với dược chất, sau khi tan rã giải phóng dược chất, vỏ nang được tiêu hóa trong cơ thể; Một đơn vị phân liều của dược chất đã được bào chế dưới dạng thích hợp để đóng vào nang (bột, cốm, pellet ...).<sup>18,112</sup>

Nghiên cứu lựa chọn dạng bào chế cho công thức kết hợp Ngưu tất - Đan sâm - Tam thất là dạng viên nang cứng dùng để uống vì những ưu điểm: Che dấu được mùi vị hơi đắng, chát của dược chất (cao khô MIX), bảo vệ dược chất tránh những tác động bất lợi của môi trường, hình dạng thuôn, bề mặt trơn bóng nên dễ nuốt, tiện sử dụng, có thể sản xuất ở những quy mô khác nhau, tính sinh khả dụng cao (công

thức bào chế đơn giản, ít sử dụng tá dược, ít tác động của kỹ thuật bào chế) so với viên nén.<sup>112</sup>

Trong quá trình thiết lập công thức điều chế thuốc, ngoài dược chất không thể thiếu tá dược. Những tá dược này tuy không có tác dụng điều trị nhưng giúp chế phẩm được ổn định, tăng sinh khả dụng. Do thành phần trong cao dược liệu rất phức tạp có thể có tương tác qua lại giữa tá dược - dược chất, tá dược - môi trường hấp thu. Mặc khác, với mục đích là đưa được tối đa lượng cao dược liệu vào nang, cần hạn chế tối đa việc sử dụng nhiều loại tá dược và lựa chọn tá dược với tỷ lệ thấp nhất nhưng vẫn đảm bảo cốt đóng nang có độ trơn chảy tốt, viên nang đạt độ rã và độ đồng đều khối lượng. Vì vậy, cần lựa chọn tá dược phù hợp để điều chế và đảm bảo tính ổn định lâu dài, tăng sinh khả dụng của chế phẩm. Dựa vào những tiêu chí trên, nghiên cứu đã lựa chọn được các tá dược maltodextrin, ethanol 96%, lactose, magnesi carbonat, talc, tricalci phosphat, colloidal silicon dioxide phù hợp điều chế viên MIX trên quy mô phòng thí nghiệm và sẵn sàng sản xuất trên quy mô công nghiệp. Maltodextrin, sản phẩm thủy phân không hoàn toàn từ tinh bột dạng bột màu trắng, dễ hút ẩm, dễ tiêu hóa, hấp thu nhanh và gần như không có hương vị làm tá dược độn. Sử dụng ethanol 96% làm tá dược dính do khả năng bay hơi nhanh và hạn chế thủy phân nên làm giảm ảnh hưởng của nhiệt và nước với dược chất. Lactose với vị ngọt dịu, tan nhanh trong nước, ít hút ẩm, dễ phối hợp với dược chất và tá dược khác, làm tá dược độn. Magnesi carbonat tác dụng làm giảm ma sát và chống dính, talc có tác dụng làm trơn cần bổ sung để cải thiện khả năng trơn chảy của cốt. Tricalci phosphat dạng bột hay tinh thể trắng, không mùi vị, không tan trong nước có tác dụng hút ẩm. Colloidal silicon dioxide chất bột màu trắng, mịn, nhẹ, không mùi vị, tác dụng hút ẩm, cải thiện độ rã của thuốc. Với kết quả thu được, quy trình bào chế viên MIX thỏa được các yêu cầu về điều kiện bào chế, tạo ra chế phẩm mới tiện dụng, có ý nghĩa khoa học và thực tiễn. Bước tiếp theo là xác định tiêu chuẩn cơ sở của chế phẩm.

#### 4.1.2. Tiêu chuẩn cơ sở viên MIX

Chế phẩm bào chế từ dược liệu hướng đến việc sử dụng làm thuốc hoặc hỗ trợ điều trị bệnh thì cần thiết phải tiêu chuẩn hóa chế phẩm nhằm đảm bảo tính an toàn, hiệu quả và chất lượng chế phẩm giúp loại trừ những tác dụng bất lợi ảnh hưởng đến sức khỏe người bệnh khi sử dụng.<sup>122</sup> Hiện nay, ĐĐVN V được xem là tài liệu có tính

pháp lý cao nhất, vì vậy, xây dựng tiêu chuẩn cơ sở viên MIX dựa trên tiêu chí, tiêu chuẩn chung thuốc viên từ dược liệu theo ĐĐVN V.<sup>18</sup>

Theo khuyến cáo của WHO, đánh giá chất lượng thảo dược và các chế phẩm từ thảo dược phải dựa vào hàm lượng hoạt chất chính (hoặc chất đánh dấu sinh học)<sup>117</sup>. Hiện nay, một hoặc hai chất đánh dấu sinh học hoặc hoạt chất có tác dụng dược lý trong thảo dược hoặc hỗn hợp thảo dược đang được ứng dụng để đánh giá tính xác thực và chất lượng của thuốc thảo dược.<sup>123</sup> Các nghiên cứu về hóa thực vật đã phân lập và xác định hợp chất chính của Ngưu tất là acid oleanolic<sup>74,79</sup>; Đan sâm là tanshinon IIA, acid salvianolic A, acid salvianolic B<sup>82-84</sup>; Tam thất là ginsenosid Rg1, G-Rb1, notoginsenosid.<sup>33,34,38</sup> Các hợp chất này cũng đã được chứng minh có tác dụng hạ lipid máu, hạ đường huyết, chống đông máu, kháng viêm, tăng cường miễn dịch, bảo vệ gan ...<sup>22,32,33,96</sup> Dựa trên kết quả đánh giá khả năng chính là hạ lipid máu, nghiên cứu chọn acid oleanolic, acid salvianolic B và ginsenosid Rg1 là chất đánh dấu sinh học chính để đánh giá chất lượng viên MIX.<sup>83,110, 124-126</sup>

Có nhiều phương pháp đánh giá chất lượng chế phẩm từ thảo dược: Các phương pháp thô sơ như dựa vào hình dạng, màu sắc, mùi vị có thể dẫn đến những kết luận sai lầm. Các phương pháp hiện đại như phương pháp sắc ký lớp mỏng, HPLC việc đánh giá chất lượng chế phẩm chính xác hơn.<sup>127-130</sup> Phương pháp sắc ký lớp mỏng được sử dụng chủ yếu để định tính và cũng có thể sử dụng để định lượng hoạt chất trong thuốc. Tuy có một số nhược điểm, nhưng vì kỹ thuật dễ thực hiện và hiệu quả kinh tế nên vẫn đang được sử dụng rộng rãi ở nhiều phòng thí nghiệm và hầu hết các cơ sở sản xuất. Phương pháp HPLC với khả năng định lượng tốt, độ nhạy và độ chính xác cao nên ngày càng được ứng dụng phổ biến để đánh giá chất lượng chế phẩm từ thảo dược. Vì vậy, nghiên cứu ứng dụng phương pháp sắc ký lớp mỏng, HPLC để đánh giá chất lượng viên MIX. Kết quả định tính, trong viên MIX có chứa các vết có R<sub>f</sub> trùng với chất chuẩn acid oleanolic, acid salvianolic B, ginsenosid Rg1 chứng tỏ trong viên MIX có chứa thành phần các dược liệu Ngưu tất, Đan sâm, Tam thất. Kết quả định lượng viên MIX theo phương pháp HPLC cho thấy trong 1 g chế phẩm có chứa 4,47 mg acid oleanolic, 4,01 mg acid salvianolic B và 1,50 mg ginsenosid Rg1. Như vậy, hàm lượng acid oleanolic, acid salvianolic B và ginsenosid Rg1 trong viên MIX sử dụng nghiên cứu khá cao, chứng tỏ chất lượng nguyên liệu

đầu vào tốt, phương pháp và dung môi chiết xuất ít làm ảnh hưởng đến hoạt chất. Đồng thời, phương pháp đạt tính tương thích hệ thống, tính đặc hiệu, khoảng tuyến tính, độ đúng, độ chính xác, đảm bảo tính chính xác cho kết quả định lượng hàm lượng acid oleanolic, acid salvianolic B và ginsenosid Rg1 trong chế phẩm.

Các chỉ tiêu khác của viên MIX về cảm quan, độ đồng đều khối lượng, độ ẩm, độ rã, độ nhiễm khuẩn, độ ổn định đều đạt theo yêu cầu của một dạng viên nang cứng, theo quy định ĐĐVN V.

Như vậy, nghiên cứu đã xác định tiêu chuẩn cơ sở viên MIX đầy đủ các chỉ tiêu theo quy định hiện hành. Viên MIX bước đầu đã được kiểm nghiệm đạt yêu cầu chất lượng tiêu chuẩn cơ sở, bảo đảm tính xác thực của các kết quả nghiên cứu thực nghiệm. Đây là tiêu tiêu chí cần thiết và quan trọng để thực hiện các nghiên cứu lâm sàng tiếp theo.

#### **4.2. Tính an toàn của viên MIX trên chuột nhắt trắng**

Phần lớn thuốc từ thảo dược sử dụng trong dân gian đều dựa vào kinh nghiệm hoặc bằng chứng YHCT về liều lượng và tác dụng điều trị, có rất ít thông tin về độc tính. Trước đây người ta cho rằng thảo dược đã được sử dụng lâu đời có thể được xem là an toàn và không độc tính. Tuy nhiên, một số khảo sát gần đây đã ghi nhận các tác dụng bất lợi của nhiều thảo dược. Điều này làm tăng mối quan ngại về độc tính có thể xuất hiện khi sử dụng. Vì vậy, đánh giá tính an toàn của thuốc từ thảo dược trên động vật thí nghiệm trước khi sử dụng trên người là rất quan trọng.<sup>57,113,114</sup>

Luật Dược Việt Nam, tất cả các bài thuốc tân phương cần phải nghiên cứu độc tính trước khi tiến hành nghiên cứu lâm sàng.<sup>131</sup> Đánh giá độc tính của thuốc trên động vật thí nghiệm là một phần không thể thiếu trong quá trình nghiên cứu và phát triển thuốc mới. Trong đó, việc đánh giá độc tính cấp và độc tính bán trường diễn thường được thực hiện. Kết quả từ thử nghiệm độc tính sẽ cung cấp bằng chứng khoa học về tính an toàn của thuốc trước khi tiến hành thử nghiệm trên người.

Ngưu tất, Đan sâm, Tam thất đã được nghiên cứu độc tính trên động vật, kết quả: Đã xác định được liều LD<sub>50</sub> cao gấp nhiều lần so với liều sử dụng trên người; Không ảnh hưởng đến các thông số về huyết học, sinh hóa cũng như trọng lượng và vi thể (gan, thận) trong thử nghiệm độc tính dài ngày.<sup>6,90,121</sup> Tuy nhiên, khi kết hợp thành công thức thuốc và bào chế thành dạng viên nang, liệu có làm tăng hoặc giảm

độc tính hay không? Để làm rõ vấn đề này, nghiên cứu tiến hành thử nghiệm độc tính cấp và độc tính bán trường diễn của viên MIX trên động vật thí nghiệm.

Hiện nay, chuột nhắt trắng được xem là động vật thí nghiệm có giá trị trong hầu hết các nghiên cứu Y sinh như độc tính, dược lý, hóa sinh, miễn dịch học, ung thư ... Theo phương pháp xác định độc tính của thuốc của Đỗ Trung Đàm,<sup>114</sup> hướng dẫn thử nghiệm tiền lâm sàng và lâm sàng thuốc đông y, thuốc từ dược liệu của Bộ Y tế.<sup>115</sup> Động vật nghiên cứu thường được sử dụng là chuột nhắt trắng, chuột cống trắng, thỏ ... Về giới tính của động vật thí nghiệm: Tùy theo thí nghiệm và có khi do đợt mua, có thể chỉ thử trên các con đực hoặc chỉ thử trên các con cái, cũng có thể dùng cả 2 phái đực và cái. Nghiên cứu sử dụng chuột nhắt trắng đực làm động vật thí nghiệm để đánh giá tính an toàn của viên MIX vì: (1) Chuột nhắt trắng có tính tương đồng về di truyền với người tương đối cao, nhỏ, khá vô hại, dễ chăm sóc và nuôi dưỡng, vòng đời ngắn; (2) chuột nhắt trắng đực dễ mua, chi phí thấp hơn; (3) chuột thí nghiệm từ 4 - 6 tuần tuổi đang trong giai đoạn phát triển để chuyển sang giai đoạn trưởng thành, trong các thí nghiệm cần thời gian dài (độc tính bán trường diễn) nếu nuôi chung chuột đực và cái, chuột cái sẽ giao phối và sinh sản, phần nào ảnh hưởng đến kết quả nghiên cứu.

#### 4.2.1. Độc tính cấp

Nghiên cứu độc tính cấp nhằm cung cấp thông tin cho việc đánh giá mức độ độc của thuốc, dự đoán triệu chứng và biện pháp điều trị ngộ độc cấp, đồng thời làm căn cứ để thiết lập mức liều cho các nghiên cứu tiếp theo (độc tính bán trường diễn, tác dụng dược lý). Các chỉ số cần xác định trong thử độc tính cấp bao gồm: Liều chết tuyệt đối ( $LD_{100}$ ), liều chết trung bình ( $LD_{50}$ ), liều dưới liều chết ( $LD_0$ ), liều an toàn ( $D_{max}$ ) và những biểu hiện ngộ độc điển hình có thể quan sát được trên động vật thí nghiệm và khả năng hồi phục (nếu có).

Kết quả thử nghiệm độc tính cấp của viên MIX trên chuột nhắt trắng bằng đường uống cho thấy tất cả chuột trong lô không có biểu hiện hành vi bất thường, ăn uống và sinh hoạt bình thường, không thấy xuất hiện chuột chết trong 72 giờ sau khi uống thuốc thử. Theo dõi tiếp 14 ngày sau khi uống thuốc thử, tất cả các chuột đều sinh hoạt bình thường. Với lập luận của Behrens “Những con vật đã sống ở một mức liều thử nào đó thì sẽ sống với tất cả những mức liều thấp hơn và những con vật đã

chết ở một mức liều sẽ chết ở tất cả các mức liều cao hơn”<sup>114</sup> Với liều 32 viên/kg, tương đương liều 136 viên/người 50 kg là liều cao nhất có thể bơm qua kim đầu tù chuyên dụng mà không làm chết chuột, còn gọi là  $D_{\max}$ . Vì thế, chưa xác định được liều gây độc tính cấp và chưa tính được  $LD_{50}$  của viên MIX trên chuột nhắt trắng bằng đường uống, nên  $D_{\max} = 32$  viên/kg.

Như vậy, viên MIX không thể hiện độc tính cấp bằng đường uống trên động vật thí nghiệm ở liều 32 viên/kg. Nếu theo hướng dẫn đánh giá mức độ độc tính thuốc có nguồn gốc thảo dược của WHO, viên MIX là chế phẩm không độc tính.<sup>113</sup> Hiện nay, chế phẩm từ dược liệu dạng viên nang cứng, liều dùng thông thường từ 4 - 8 viên/ngày/người 50 kg, ít khi vượt quá 10 viên/ngày. Từ kết quả thử nghiệm cho thấy viên MIX có độ an toàn khá cao.

#### **So sánh với những nghiên cứu có liên quan trong nước và trên thế giới**

Tham khảo được một số tài liệu về độc tính cấp từ Ngưu tất, Đan sâm, Tam thất (Bảng 4.1). Tuy nhiên, những nghiên cứu này được thực hiện trên chế phẩm khác nhau, đối tượng nghiên cứu và đường dùng thuốc cũng khác nhau, nên việc so sánh chỉ mang tính chất tham khảo.

**Bảng 4.1. Một số nghiên cứu độc tính cấp từ Ngưu tất, Đan sâm, Tam thất**

| <b>Chế phẩm</b>                                                       | <b>Đối tượng nghiên cứu</b> | <b>Đường dùng</b> | <b>Liều <math>LD_{50}</math></b> |
|-----------------------------------------------------------------------|-----------------------------|-------------------|----------------------------------|
| Trà Ngưu tất (Ngưu tất) <sup>6</sup>                                  | Chuột nhắt                  | Uống              | 437,85 g/kg                      |
| Thuốc Danshensu (Đan sâm) <sup>90</sup>                               | Chuột nhắt                  | Tĩnh mạch         | 2,356 g/kg                       |
| Bột Tam thất (Tam thất) <sup>121</sup>                                | Chuột nhắt                  | Uống              | 1,65 g/kg                        |
| Dịch chiết kết hợp acid salvianolic B - ginsenosid Rg1 <sup>132</sup> | Chuột nhắt                  | Tĩnh mạch         | 1,747 g/kg                       |

Viên MIX khi dùng liều cao nhất 32 viên/kg mà không làm chết động vật thí nghiệm. Đối chiếu liều  $LD_{50}$  theo các công bố trước đây của Ngưu tất,<sup>6</sup> Đan sâm,<sup>90</sup> Tam thất<sup>121</sup> nhận thấy sự kết hợp làm gia tăng liều  $LD_{50}$  trên động vật thí nghiệm. Như vậy, kết hợp 3 dược liệu Ngưu tất, Đan sâm, Tam thất có khả năng làm giảm độc tính cấp so với khi chỉ dùng độc vị. Đây là một trong các cơ sở góp phần chứng minh hiệu quả an toàn khi kết hợp nhiều vị thuốc trong bài thuốc YHCT.

#### 4.2.2. Độc tính bán trường diễn

Thử nghiệm độc tính bán trường diễn được tiến hành sau khi đã có thông tin về độc tính cấp trên động vật và mẫu thử được dự tính sử dụng dài ngày trên người. Mục đích của nghiên cứu độc tính bán trường diễn là xác định khả năng dung nạp của động vật thí nghiệm khi dùng mẫu thử nhiều lần, đường cho thuốc là đường dự kiến sử dụng trên người.

Theo hướng dẫn thử nghiệm độc tính bán trường diễn thuốc có nguồn gốc từ thảo dược của WHO,<sup>113</sup> hướng dẫn thử nghiệm tiền lâm sàng và lâm sàng thuốc đông y, thuốc từ dược liệu của Bộ Y tế.<sup>115</sup> Trường hợp mẫu thử không thể hiện độc tính cấp hoặc rất ít độc có thể thử độc tính bán trường diễn trên một loài động vật (gặm nhấm). Căn cứ vào kết quả thử nghiệm, viên MIX không thể hiện độc tính cấp, do đó, có thể tiến hành thử nghiệm độc tính bán trường diễn của viên MIX trên một loài động vật, cụ thể là chuột nhắt trắng. Thời gian thử độc tính bán trường diễn trên động vật thí nghiệm thường được tính dựa theo thời gian dự kiến sử dụng trên người.<sup>113,115</sup> Viên MIX thời gian dự kiến sử dụng trên người là 1 tháng bằng đường uống, do đó thời gian thử nghiệm độc tính bán trường diễn là 2 tháng. Về liều lượng thuốc thử nghiệm: Ở nước ta, thường chỉ dùng một liều tương đương với liều sử dụng trên người để chứng minh thuốc nghiên cứu không có độc. Gần đây có dùng thêm một liều gấp 3 - 4 lần liều sử dụng trên người.<sup>114</sup> Nghiên cứu tiền đề đánh giá độc tính bán trường diễn cao chiết kết hợp Ngưu tất 50% - Đan sâm 30% - Tam thất 20% trên chuột nhắt trắng với liều uống tương đương liều dự kiến trên người, thời gian thử nghiệm là 2 tháng, kết quả: Không ghi nhận bất thường về các thông số sinh hóa, huyết học cũng như giải phẫu vi đại thể tim, gan, thận. Vì vậy, trong nghiên cứu sử dụng một liều 4 viên/kg, gấp 4 lần liều dự kiến sử dụng trên người (liều dự kiến sử dụng trên người là 4 viên/ngày) để thử nghiệm. Nhằm tiết kiệm thời gian, chi phí và động vật thí nghiệm. Nếu sử dụng thuốc liều cao mà kết quả thử nghiệm không ghi nhận bất thường thì chứng tỏ thuốc nghiên cứu có độ an toàn cao.

Đánh giá độc tính bán trường diễn thuốc từ dược liệu nên kiểm tra càng nhiều tiêu chí càng tốt,<sup>113</sup> do đó, các tiêu chí đánh giá trong nghiên cứu bao gồm: Tình trạng chung, trọng lượng cơ thể chuột, các thông số huyết học, sinh hoá (đánh giá chức năng gan, thận), trọng lượng và đặc điểm giải phẫu bệnh (gan, tim, thận) của chuột,

kết quả đánh giá độc tính bán trường diễn của viên MIX sau 2 tháng dùng thuốc:

#### 4.2.2.1. Ảnh hưởng của viên MIX đến tình trạng chung và sự thay đổi trọng lượng cơ thể chuột

Trong suốt thời gian thử nghiệm, cả 2 lô (lô chứng uống nước cất và lô thử uống viên MIX) chuột ăn uống, sinh hoạt bình thường, lông mượt, mắt sáng, phân khô và không thấy biểu hiện gì đặc biệt.

Từ kết quả ảnh hưởng của viên MIX lên trọng lượng cơ thể chuột cho thấy trọng lượng chuột của cả 2 lô ở thời điểm sau 1 tháng và 2 tháng đều có sự khác biệt đạt ý nghĩa thống kê so với trước thử nghiệm. Ở thời điểm sau 2 tháng, trọng lượng chuột ở lô thử uống viên MIX có sự tăng khác biệt đạt ý nghĩa thống kê so với lô chứng. Điều này có thể được giải thích: Chuột thí nghiệm 5 - 6 tuần tuổi, đang trong giai đoạn tăng trưởng và phát triển để chuyển sang giai đoạn trưởng thành nên trọng lượng chuột của lô chứng và lô thử sau 2 tháng thử nghiệm đều tăng so với trước thử nghiệm. Mặt khác, bên cạnh tình trạng chung, sự thay đổi bất thường trọng lượng cơ thể động vật thí nghiệm (giảm trọng lượng) trong các thử nghiệm độc tính được xem là tiêu chí quan trọng, là một dấu hiệu để đánh giá tình trạng sức khỏe của động vật và cũng là một trong những dấu hiệu đầu tiên cảnh báo về độc tính của thuốc. Không có sự thay đổi bất thường về tình trạng chung, trọng lượng cơ thể chuột trong thử nghiệm độc tính bán trường diễn, ngụ ý rằng viên MIX được dung nạp tốt.

#### 4.2.2.2. Ảnh hưởng của viên MIX đến cơ quan tạo máu

Máu là một trong những tổ chức quan trọng có khả năng biểu hiện tình trạng bệnh lý của nhiều cơ quan khác nhau trong cơ thể. Nếu thuốc có ảnh hưởng đến cơ quan tạo máu thì trước hết các thành phần của máu sẽ bị thay đổi. Các thông số của tế bào máu ngoại vi có giá trị lớn trong việc đánh giá chức năng tạo máu.<sup>133,134</sup> Để đánh giá sự ảnh hưởng của thuốc đến hồng cầu, tiến hành đếm số lượng hồng cầu. Một trong những chức năng quan trọng của hồng cầu là chức năng hô hấp, chính thành phần hemoglobin trong hồng cầu có vai trò quan trọng trong vận chuyển oxy và cacbonic trong cơ thể. Các chỉ số về hồng cầu (số lượng hồng cầu, Hb, Hct, MCV, MCH, MCHC) giúp đánh giá chức năng của hồng cầu, đồng thời giúp chẩn đoán thiếu máu ở hầu hết các loài động vật. Các chỉ số về bạch cầu (số lượng bạch cầu và công thức bạch cầu) cũng là các chỉ số quan trọng cần được xác định. Chức năng

chính của bạch cầu là thực bào và sản xuất gamma globulin, là một phần của hệ miễn dịch. Do đó, sự thay đổi các chỉ số về bạch cầu, ngoài việc phản ánh chức năng của cơ quan tạo máu, còn giúp đánh giá hoạt động của hệ miễn dịch của cơ thể. Bên cạnh các chỉ số về hồng cầu và bạch cầu, chỉ số về tiểu cầu cũng giúp đánh giá chức năng của cơ quan tạo máu. Tiểu cầu có vai trò quan trọng trong quá trình đông máu, cầm máu. Thuốc ảnh hưởng đến số lượng, chất lượng tiểu cầu sẽ ảnh hưởng đến quá trình đông - cầm máu trong cơ thể. Theo WHO, đánh giá được càng nhiều các thông số của máu càng có khả năng đánh giá chính xác độc tính của thuốc.<sup>113</sup> Vì vậy, nghiên cứu tiến hành định lượng các thành phần của máu gồm: Số lượng hồng cầu, Hb, Hct, MCV, MCH, MCHC, số lượng bạch cầu và số lượng tiểu cầu, kết quả thử nghiệm cho thấy số lượng hồng cầu, nồng độ Hb, Hct, số lượng bạch cầu, số lượng tiểu cầu cả 2 lô tại thời điểm sau 1 tháng và 2 tháng tăng có sự khác biệt đạt ý nghĩa thống kê so với trước thử nghiệm. Điều này có thể được giải thích: Chuột thí nghiệm đang trong giai đoạn phát triển để chuyển sang giai đoạn trưởng thành và các chỉ số về hồng cầu, bạch cầu, tiểu cầu vẫn trong giới hạn bình thường ở chuột trưởng thành,<sup>134</sup> không có sự khác biệt giữa lô chứng và lô thử ở cùng một thời điểm. Vì vậy, có thể kết luận rằng: Viên MIX liều 4 viên/kg/ngày uống liên tục trong 2 tháng không làm thay đổi các thông số tế bào máu ngoại vi qua xét nghiệm huyết học. Điều này có nghĩa viên MIX không thể hiện độc tính đến chức năng của cơ quan tạo máu trên động vật thí nghiệm.

#### 4.2.2.3. Ảnh hưởng của viên MIX đến mức độ tổn thương tế bào gan

Trong cơ thể, gan là một cơ quan đảm nhận nhiều chức năng như tổng hợp, chuyển hoá và bài tiết. Gan đóng vai trò quan trọng trong quá trình chuyển hoá và thải trừ thuốc, phản ứng có hại của thuốc là nguyên nhân dẫn đến tổn thương gan. Tổn thương gan do thuốc hiện đang là vấn đề phổ biến, gần như tất cả các thuốc đều có thể gây tổn thương gan và đây cũng chính là nguyên nhân gây viêm gan cấp thường gặp nhất. Vì vậy, nghiên cứu ảnh hưởng của thuốc đến gan là rất cần thiết khi đánh giá độc tính của thuốc. Để đánh giá mức độ tổn thương tế bào gan, thường định lượng hoạt độ các enzyme AST và ALT trong máu. Enzyme AST không đặc hiệu cho gan vì còn có trong nhiều cơ quan khác như tim, não, thận, phổi, tụy, cơ ... và có thể tăng cao khi các cơ quan này bị tổn thương. Enzyme ALT phần lớn ở gan, hoạt độ enzyme

ALT thường được sử dụng như một dấu ấn sinh học đặc hiệu cho các vấn đề về gan. Do đó, enzyme ALT đặc hiệu cho tổn thương tế bào gan hơn so với enzyme AST. Sự gia tăng hoạt độ enzyme AST và ALT thường gắn liền với độc tính của thuốc thử làm tổn thương tế bào gan.<sup>135</sup> Từ kết quả ảnh hưởng của viên MIX lên mức độ tổn thương tế bào gan cho thấy sau 2 tháng dùng thuốc, hoạt độ enzyme AST, ALT ở lô chứng và lô thử uống viên MIX không có sự khác biệt đạt ý nghĩa thống kê so với trước thử nghiệm. Không có sự khác biệt đạt ý nghĩa thống kê về hoạt độ enzyme AST, ALT giữa lô chứng và lô thử ở cùng một thời điểm. Như vậy, viên MIX liều 4 viên/kg sau 2 tháng dùng thuốc không gây độc và tổn thương gan.

Hiện nay, trong các nhóm thuốc điều trị RLLM, nhóm statin nổi lên như là nhân tố chủ đạo. Tuy nhiên, tác dụng không mong muốn đáng quan tâm là độc tính trên gan, làm tăng hoạt độ các thành phần chức năng gan (AST, ALT, phosphatase kiềm, bilirubine toàn phần). Theo hướng dẫn của ACC/AHA, ESC/EAS, cần kiểm tra hoạt độ enzyme ALT trước và trong quá trình điều trị bằng statin.<sup>1,2</sup> Trên bệnh nhân RLLM khi sử dụng nhóm statin, hoạt độ enzyme AST, ALT tăng từ 0,5 - 2% phụ thuộc vào liều điều trị.<sup>10</sup> Viên MIX không gây độc tính trên gan sau 2 tháng dùng thuốc, điều này cho thấy ưu điểm của chế phẩm trong điều trị một bệnh lý mà cần thời gian lâu dài như RLLM.

#### 4.2.2.4. Ảnh hưởng của viên MIX đến chức năng thận

Thận là cơ quan rất quan trọng, được ưu tiên tưới máu và giữ vai trò sống còn của cơ thể. Chức năng chính của thận là bài tiết phần lớn những sản phẩm cuối cùng của quá trình chuyển hóa trong cơ thể. Thận có đặc điểm là dễ bị ngộ độc và tổn thương hơn các cơ quan khác là vì cơ quan có lượng máu lưu thông nhiều nhất. Chính vì vậy, khi đưa thuốc vào cơ thể, thuốc có thể gây độc và tổn thương thận, từ đó ảnh hưởng đến chức năng thận. Đánh giá chức năng thận là một yêu cầu bắt buộc khi nghiên cứu độc tính của một thuốc mới. Ở người, độ lọc cầu thận ước tính (estimated glomerular filtration rate - eGFR) được dùng để sàng lọc và phát hiện tổn thương thận sớm, giúp chẩn đoán bệnh thận mạn và theo dõi tình trạng hiện tại của thận. eGFR dựa trên kết quả xét nghiệm creatinin máu cùng với các biến số khác như tuổi, giới tính, chủng tộc và phụ thuộc vào phương trình sử dụng. Vì vậy, không thể sử dụng eGFR để đánh giá ảnh hưởng của thuốc đến chức năng thận trên động vật thí nghiệm.

Hiện nay hầu hết các phòng thí nghiệm sử dụng nồng độ urea và creatinin máu để đánh giá chức năng thận trên động vật thí nghiệm. Urea trong máu được tạo ra từ quá trình phân hủy protein trong thức ăn, được lọc qua cầu thận và khoảng 40% được tái hấp thu ở ống thận. Nồng độ urea trong máu thường phụ thuộc vào chế độ ăn uống hàng ngày. Bản thân urea không độc nhưng nó là sản phẩm của  $\text{NH}_3$  là chất độc đối với cơ thể nên khi urea máu tăng là biểu hiện gián tiếp của sự tăng các độc chất trong cơ thể. Creatinin là chất chuyển hóa cuối cùng do quá trình hoạt động của cơ tạo ra. Creatinin là thành phần ổn định nhất trong máu, hầu như không phụ thuộc vào chế độ ăn hoặc những thay đổi sinh lý, mà chỉ phụ thuộc vào khả năng bài tiết của thận. Creatinin được bài tiết qua thận qua quá trình lọc tại cầu thận và không được tái hấp thu ở ống thận. Khi thận bị tổn thương, nồng độ creatinin máu tăng sớm hơn urea máu. Vì vậy, creatinin máu là tiêu chí chính dùng để đánh giá và theo dõi chức năng thận.<sup>135</sup>

Từ kết quả ảnh hưởng của viên MIX đến chức năng thận cho thấy sau 2 tháng dùng thuốc, nồng độ urea, creatinin ở lô chứng và lô thử không có sự khác biệt đạt ý nghĩa thống kê so với trước thử nghiệm. Không có sự khác biệt đạt ý nghĩa thống kê của nồng độ creatinin, urea giữa lô chứng và lô thử ở cùng một thời điểm. Như vậy, viên MIX liều 4 viên/kg sau 2 tháng dùng thuốc không gây độc và tổn thương thận.

#### 4.2.2.5. Ảnh hưởng của viên MIX đến trọng lượng - giải phẫu vi thể gan, tim, thận

So sánh trọng lượng và giải phẫu vi thể gan, tim, thận giữa lô chứng với lô thử uống viên MIX, để đánh giá sơ bộ ảnh hưởng của thuốc đến gan, tim, thận. Từ kết quả ảnh hưởng của viên MIX đến trọng lượng - giải phẫu vi thể gan, tim, thận tại thời điểm kết thúc thử nghiệm (sau 2 tháng) cho thấy:

Quan sát đại thể gan, tim, thận của chuột nhắt trắng ở cả 2 lô đều thấy kích thước, màu sắc và mật độ bình thường. Trọng lượng gan, tim, thận ở lô thử không có sự khác biệt đạt ý nghĩa thống kê so với lô chứng.

Cấu trúc vi thể gan, tim, thận ở lô thử không có sự khác biệt so với lô chứng. Hình ảnh viêm gan mạn tính mức độ nhẹ xảy ở tất cả các chuột trong cả 2 lô, điều này có thể được giải thích do ảnh hưởng của kỹ thuật tách mẫu và xử lý tiêu bản gan.

Như vậy, viên MIX liều 4 viên/kg sau 2 tháng dùng thuốc không ảnh hưởng đến trọng lượng và cấu trúc vi thể tim, gan, thận.

Tổng hợp kết quả thử nghiệm độc tính bán trường diễn có thể đưa ra nhận định: Viên MIX liều 4 viên/kg/ngày, uống liên tục trong 2 tháng không gây độc tính bán trường diễn trên chuột nhắt trắng. Cụ thể là không ảnh hưởng đến các thông số đánh giá chức năng của cơ quan tạo máu, không làm thay đổi một số chức năng của gan, thận, không thay đổi trọng lượng và cấu trúc gan, tim, thận. Điều này rất quan trọng trong việc xem xét khả năng có thể sử dụng chế phẩm này lâu dài trên lâm sàng. Một nghiên cứu lâm sàng trên bệnh nhân RLLM sử dụng chế phẩm từ Ngưu tất liều cao để điều trị, có một số trường hợp bị rối loạn tiêu hoá phải giảm liều hay phải tạm ngưng điều trị.<sup>55</sup> Một nghiên cứu thực nghiệm cho thấy khi sử dụng Ngưu tất liều cao, kéo dài sẽ gây tác dụng độc cho cơ thể động vật.<sup>107</sup> Ngưu tất, Đan sâm, Tam thất là những vị thuốc đã được sử dụng lâu đời trong YHCT để phòng và trị bệnh và không ghi nhận độc tính ở liều dùng thông thường. ĐĐVN V chuyên luận dược liệu cũng không ghi nhận kiêng kị khi kết hợp Ngưu tất, Đan sâm, Tam thất.<sup>18</sup> Việc kết hợp Ngưu tất với Đan sâm, Tam thất (trong đó Ngưu tất giảm 50%) có thể giảm được tác dụng bất lợi nói trên. Kết quả nghiên cứu độc tính cấp và độc tính bán trường diễn của viên MIX đã chứng minh tính ưu việt của sự kết hợp này.

#### **So sánh với những nghiên cứu có liên quan trong nước và trên thế giới**

Tham khảo được một số báo cáo về độc tính bán trường diễn của chế phẩm có một hay nhiều thành phần Ngưu tất, Đan sâm, Tam thất (Bảng 4.2). Đối chiếu với kết quả độc tính bán trường diễn của viên MIX cho thấy khuynh hướng kết hợp dược liệu liều thấp có thể mang lại hiệu quả nâng cao tính an toàn của thuốc khi sử dụng dài ngày. Đây cũng là một trong những nguyên tắc kết hợp thuốc theo YHCT.

**Bảng 4.2. Một số nghiên cứu độc tính bán trường diễn từ Ngưu tất, Đan sâm, Tam thất**

| <b>Chế phẩm</b>                                                                      | <b>Đường dùng</b> | <b>Kết quả</b>                                                                                                                                                                       |
|--------------------------------------------------------------------------------------|-------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Trà hạ mỡ Ngưu tất<br>(Ngưu tất, Đan sâm,<br>Hà thủ ô đỏ, Đương<br>quy) <sup>6</sup> | Uống              | Liều 40 g/kg thể trọng chuột sau 2 tháng dùng thuốc, không làm thay đổi thành phần tế bào máu, chức năng gan, thận và cấu trúc vi, đại thể gan thận so nhóm chứng (không dùng thuốc) |

|                                                                                          |      |                                                                                                                                                                                                |
|------------------------------------------------------------------------------------------|------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Viên nén Hạ mỡ<br>(Hà thủ ô, Nguru tất,<br>Đại hoàng, Sơn tra,<br>Sa nhân) <sup>55</sup> | Uống | Liều 0,9 g/kg thể trọng chuột sau 1 tháng<br>dùng thuốc, không thay đổi thành phần tế<br>bào máu, chức năng gan, thận và cấu trúc<br>vi, đại thể gan thận so nhóm chứng<br>(không dùng thuốc)  |
| Viên Thanh mạch<br>an (Giảo cổ lam,<br>Chè đắng, Hòe,<br>Nguru tất) <sup>136</sup>       | Uống | Liều 2 viên/kg thể trọng chuột sau 2 tháng<br>dùng thuốc, không thay đổi thành phần tế<br>bào máu, chức năng gan, thận và cấu trúc<br>vi, đại thể gan thận so nhóm chứng<br>(không dùng thuốc) |

#### 4.3. Tác dụng điều hòa lipid máu của viên MIX trên chuột nhắt trắng

Khi đánh giá tác động của một thuốc trên quá trình chuyển hóa lipid, cần áp dụng đa dạng các phương pháp/mô hình sẽ cho kết quả thuyết phục nhất. Nếu dự đoán được cơ chế tác dụng của thuốc thì sự lựa chọn các mô hình thử nghiệm sẽ thuận tiện hơn. Hiện nay, các mô hình truyền thống đánh giá tác động của thuốc trên chuyển hóa lipid như sử dụng chế độ ăn giàu lipid hay tiêm chất diện hoạt (tyloxapol, poloxamer-407 hoặc tween-80) vẫn đang được sử dụng phổ biến trong các nghiên cứu.<sup>63,65,66,72</sup>

Với mục tiêu nghiên cứu thuốc điều hòa lipid máu từ Nguru tất, Đan sâm, Tam thất nhằm góp phần vào việc lựa chọn thuốc phù hợp trong phòng và điều trị RLLM. Đã có nhiều nghiên cứu về tác dụng điều hòa lipid máu từ Nguru tất, Đan sâm, Tam thất trên thực nghiệm và lâm sàng. Tuy nhiên, các nghiên cứu này sự kết hợp các dược liệu về thành phần và liều lượng khác nhau, sử dụng phương pháp và dung môi chiết xuất khác nhau, dạng chế phẩm, đối tượng và thời gian nghiên cứu cũng khác nhau. Vì vậy, để có kết quả minh chứng tác dụng điều hòa lipid máu của viên MIX, nghiên cứu được tiến hành.

Nhìn chung một thuốc muốn được sử dụng trên người, trước hết phải chứng minh có tác dụng trên động vật thí nghiệm. Để thực hiện được nghiên cứu thuốc hạ lipid máu trên động vật thí nghiệm, việc đầu tiên phải gây được mô hình tăng lipid máu. Theo nguyên nhân và cơ chế bệnh sinh RLLM, nồng độ cholesterol trong máu

được quyết định bởi cả sự hấp thu lẫn tổng hợp. Trong đó, cholesterol tổng hợp nội sinh chiếm 70% (phần lớn được tổng hợp tại gan) và cholesterol hấp thu ngoại sinh chiếm 30% (hấp thu từ ruột).<sup>9</sup> Viên MIX, trên phương diện lý thuyết thể hiện tác dụng điều hòa lipid máu thông qua tác động theo thứ tự: (1) giảm tổng hợp cholesterol; (2) giảm hấp thu cholesterol; (3) tăng chuyển hóa và bài tiết cholesterol. Vì vậy, nghiên cứu chọn hai mô hình gây RLLM nội sinh và ngoại sinh để đánh giá tác dụng của thuốc nghiên cứu.

Nhiều mô hình được lý về lipid đã được nghiên cứu và ứng dụng thành công trên động vật thí nghiệm. Tuy nồng độ các thành phần lipid máu thay đổi trong mô hình nghiên cứu trên động vật có một số khác biệt nhất định so với nồng độ các thành phần lipid máu trên người. Nhưng phần lớn các mô hình nghiên cứu này cho kết quả có sự tương đồng khá cao với nghiên cứu lâm sàng.<sup>137</sup>

Động vật thí nghiệm thường được sử dụng trong các mô hình gây RLLM là chuột nhắt trắng, chuột cống trắng, thỏ.<sup>50,115</sup> Nghiên cứu chọn chuột nhắt trắng để làm động vật thí nghiệm, vì: Dễ chăm sóc và nuôi dưỡng, chi phí phù hợp và quan trọng hơn là thành phần thức ăn gần giống với người do đó sẽ cho kết quả nghiên cứu đáng tin cậy hơn so với những loài động vật khác. Liu Q và cộng sự<sup>72</sup> cho rằng sự phân bố các thành phần lipid máu trên chuột gây RLLM cũng tương tự như ở người và kết quả thu được từ nghiên cứu ủng hộ quan điểm mô hình gây RLLM trên chuột có thể là một mô hình động vật thích hợp để đánh giá tác dụng hạ lipid máu của thuốc nghiên cứu.

Mô hình gây RLLM trên động vật thường được sử dụng để thử tác dụng hạ lipid của một thuốc mới. Trong nghiên cứu, thuốc thử là viên MIX, trên phương diện lý thuyết về cơ chế tác dụng chính là giảm tổng hợp cholesterol. Như vậy, việc nghiên cứu và so sánh tác dụng của thuốc thử với thuốc đối chứng một phần dựa trên sự tương đồng về cơ chế tác dụng của 2 thuốc. Nghiên cứu sử dụng thuốc đối chứng là atorvastatin (nhóm statin) được xếp vào nhóm thuốc hạ lipid máu cao, dễ tìm trên thị trường và chi phí phù hợp. Cơ chế tác dụng chính của nhóm statin là ức chế cạnh tranh HMG-CoA reductase và làm tăng số lượng LDL-R trên màng tế bào gan, do đó làm giảm nồng độ cholesterol máu.

Viên MIX, thành phần chính là cao khô dược liệu, liều dự kiến sử dụng trên người là số lượng viên/ngày. Vì vậy, nghiên cứu sử dụng số lượng viên/kg để thử nghiệm tác dụng dược lý trên động vật thí nghiệm. Liều thử nghiệm tác dụng dược lý trên động vật thí nghiệm có thể quy đổi từ liều dự kiến sử dụng trên người hoặc tính theo liều  $D_{max}$ .<sup>115</sup>

Hiện nay, các hướng dẫn chẩn đoán và điều trị RLLM thường tập trung vào mục tiêu nồng độ các thành phần lipid máu như TC, HDL-C, LDL-C, TG<sup>1,2</sup>. Vì vậy, trong nghiên cứu các thành phần lipid máu được định lượng để đánh giá cũng bao gồm: TC, HDL-C, LDL-C, TG.

#### 4.3.1. Tác dụng điều hòa lipid máu của viên MIX trên mô hình gây RLLM nội sinh.

Mô hình gây RLLM nội sinh được thực hiện bằng cách sử dụng chất hoạt diện (surface actived agent, surfactant) không ion hóa như tyloxapol, poloxamer-407 hoặc tween-80 bằng đường tiêm. Các chất này đã chứng minh gây được RLLM trên động vật thông qua các enzyme tham gia vào quá trình chuyển hóa lipid.<sup>58,64,65,66,72,93,138</sup> Tham khảo kết quả từ những nghiên cứu,<sup>51,64,65,66</sup> nghiên cứu lựa chọn tyloxapol, vì: Đơn giản liều sử dụng, an toàn và có khả năng gây RLLM cao. Về cơ chế tác dụng: Tyloxapol làm tăng hoạt tính HMG-CoA reductase (tăng tổng hợp cholesterol) và giảm hoạt tính LPL (giảm chuyển hóa CM và VLDL), dẫn đến làm thay đổi rõ rệt nồng độ các thành phần lipid máu (tăng TC, giảm HDL-C, tăng LDL-C và TG).

Quá trình tăng lipid máu bằng tyloxapol thông thường gồm 2 giai đoạn: Giai đoạn 1 là sự tăng đột ngột nồng độ các thành phần lipid máu đạt mức đỉnh cao gấp 2 - 3 lần sau 24 giờ; Giai đoạn 2 nồng độ các thành phần lipid máu sẽ giảm dần và trở về bình thường sau 24 giờ tiếp theo. Những thuốc tác dụng trên sự tổng hợp cholesterol sẽ thể hiện tác dụng trong giai đoạn 1, các thuốc tác dụng lên sự chuyển hóa và bài tiết cholesterol sẽ thể hiện tác dụng trong giai đoạn 2. Vì vậy, nghiên cứu chọn thời điểm 24 giờ sau khi tiêm tyloxapol để định lượng nồng độ các thành phần lipid máu trên chuột thí nghiệm. Trên mô hình gây RLLM nội sinh, những thuốc tác động trên sự tổng hợp cholesterol sẽ thể hiện tác dụng trong giai đoạn 1, do đó, atorvastatin được chọn làm thuốc đối chứng trong nghiên cứu này là có cơ sở. Trên lâm sàng đáp ứng điều trị đối với thuốc nhóm statin đạt tối đa sau 4 - 6 tuần dùng thuốc. Trên thực nghiệm vì thời gian thực hiện mô hình ngắn (thời gian dùng thuốc 7

ngày), nên thuốc thử cũng như thuốc đối chứng phải sử dụng liều cao mới có thể đánh giá nhanh được tác dụng của thuốc. Tham khảo về liều atorvastatin sử dụng làm thuốc đối chứng từ nghiên cứu của Liu Q,<sup>72</sup> Chung Thị Mỹ Duyên,<sup>139</sup> nghiên cứu chọn liều atorvastatin là 60 mg/kg. Thuốc thử viên MIX từ liều dự kiến sử dụng thử tác dụng điều hòa lipid máu trên người là 4 viên/ngày, ngoại suy liều thử trên chuột nhắt trắng là 1 viên/kg. Nghiên cứu chọn 2 liều: Liều 1 là 1 viên/kg và liều 2 gấp đôi liều 1 là 2 viên/kg. Sau khi tiêm tyloxapol tất cả chuột ở các lô không ghi nhận có biểu hiện hành vi bất thường, ăn uống và sinh hoạt bình thường, kết quả khảo sát tác dụng điều hòa lipid máu của viên MIX trên mô hình gây RLLM nội sinh:

Trong nhóm sinh lý: Lô thử uống viên MIX liều 2 viên/kg nồng độ TC, HDL-C, LDL-C và TG không có sự khác biệt đạt ý nghĩa thống kê so với lô chứng sinh lý. Điều này có nghĩa là viên MIX liều 2 viên/kg không ảnh hưởng trên nồng độ TC, HDL-C, LDL-C và TG máu ở chuột bình thường.

Tác dụng của viên MIX trên các thành phần lipid máu trong nhóm bệnh lý: Lô chứng bệnh lý sau khi tiêm tyloxapol 24 giờ nồng độ TC tăng 311,1%, HDL-C giảm 41,6%, LDL-C tăng 151,6%, TG tăng 788,5%, đạt ý nghĩa thống kê so với lô chứng sinh lý. Sự tăng cao nồng độ TG và cholesterol trong máu chuột sau khi tiêm tyloxapol có thể được giải thích là do ức chế enzyme LPL làm giảm dị hóa VLDL. Trong VLDL, nồng độ TG cao hơn nhiều lần so với cholesterol. Như vậy, mô hình thực nghiệm này khá ổn định và kết quả của nghiên cứu cũng khá tương đồng với kết quả của một số nghiên cứu trong và ngoài nước.<sup>58,65,66,139</sup> Đây là điều kiện cần thiết để tiến hành đánh giá tác dụng điều hòa lipid máu của viên MIX.

Lô thử uống viên MIX liều 1 viên/kg, nồng độ TC giảm 20,3%, LDL-C giảm 17,3%, và TG giảm 11,2% so với lô chứng bệnh lý ( $P < 0,05$ ), HDL-C tăng 14,0% không có sự khác biệt đạt ý nghĩa thống kê so với lô chứng bệnh lý. Lô thử uống viên MIX liều 2 viên/kg, nồng độ TC giảm 41,6%, HDL-C tăng 29,4%, LDL-C giảm 30,8%, và TG giảm 18,6% so với lô chứng bệnh lý ( $P < 0,05$ ). Lô đối chứng uống atorvastatin liều 60mg/kg, nồng độ TC giảm 42,8%, HDL-C tăng 44,7%, LDL-C giảm 36,5%, và TG giảm 19,9% so với lô chứng bệnh lý ( $P < 0,05$ ). Như vậy, viên MIX liều 2 viên/kg không ảnh hưởng trên nồng độ TC, HDL-C, LDL-C và TG máu ở chuột bình thường. Trong nhóm bệnh lý cả lô thử và lô đối chứng đều làm thay đổi

nồng độ TC, HDL-C, LDL-C và TG so với lô chứng bệnh lý. Tuy nhiên, ở lô thử uống viên MIX liều 2 viên/kg và lô đối chứng uống atorvastatin liều 60 mg/kg nồng độ các thông số TC, HDL-C, LDL-C và TG không khác biệt nhau, điều này có nghĩa hiệu quả làm giảm nồng độ TC, tăng HDL-C, giảm LDL-C và giảm TG máu của viên MIX liều 2 viên/kg tương đương với atorvastatin liều 60 mg/kg.

#### 4.3.2. Tác dụng điều hòa lipid máu của viên MIX trên mô hình gây RLLM ngoại sinh.

Một số nghiên cứu ở Việt Nam và trên thế giới gây mô hình RLLM ngoại sinh để đánh giá tác dụng hạ lipid máu của thuốc nghiên cứu bằng cách cho chuột ăn hoặc uống cholesterol. Với chế độ ăn giàu cholesterol có thể làm tăng nồng độ cholesterol trong máu và đây cũng là nguyên nhân chính gây RLLM. Nghiên cứu của Nassiri-Asl M khi cho chuột uống hỗn hợp giàu cholesterol (10 g cholesterol, 10 g acid cholic và 3 g PTU, pha trong dầu lạc vừa đủ 100 mL) với liều 10 mL/kg/ngày, trong 4 tuần. Kết quả cho thấy ở nhóm sử dụng hỗn hợp giàu cholesterol, nồng độ TC tăng 160,8%, LDL-C tăng 66,3% so với nhóm chứng sinh lý.<sup>62</sup> Nghiên cứu tiền đề, gây mô hình RLLM ngoại sinh trên chuột nhắt trắng bằng cách cho uống cholesterol đơn thuần, kết quả nồng độ cholesterol máu đạt được nhưng không cao và cần thời gian dài.<sup>41</sup> Bổ sung acid cholic và PTU là biện pháp giúp làm tăng hấp thu và giảm chuyển hóa cholesterol. Kết quả mô hình ổn định, độ đồng nhất cao hơn và rút ngắn được thời gian nghiên cứu. Tuy nhiên, acid cholic khan hiếm ở thị trường Việt Nam và chi phí cũng tương đương đối cao. Vì vậy, nghiên cứu điều chỉnh hỗn hợp giàu lipid bằng cách tăng lượng cholesterol, giảm lượng acid cholic và không sử dụng PTU (cholesterol 25 mg, acid cholic 1% và dầu dừa vừa đủ 10 mL) với liều uống 10 mL/kg thể trọng/ngày. Sau khi điều chỉnh, vẫn gây được mô hình RLLM ổn định. Kết quả nồng độ các thành phần lipid máu thay đổi sau khi gây mô hình của nghiên cứu cũng khá tương đồng với các kết quả của Nassiri-Asl M và cộng sự,<sup>62</sup> Tạ Thu Thủy,<sup>140</sup> Huỳnh Thị Mỹ Hiền.<sup>141</sup>

Trên lâm sàng đáp ứng điều trị RLLM trung bình từ sau 4 - 6 tuần dùng thuốc. Vì vậy, trên thực nghiệm mô hình gây RLLM ngoại sinh, nghiên cứu chọn thời gian là 6 tuần mới có thể đánh giá được tác dụng của thuốc thử và thuốc đối chứng. Thuốc thử viên MIX từ liều dự kiến sử dụng thử tác dụng điều hòa lipid máu trên người là 4 viên/ngày, ngoại suy ra liều thử trên chuột là 1 viên/kg. Nghiên cứu chọn 2 liều:

Liều 1 là 1 viên/kg và liều 2 gấp đôi liều một là 2 viên/kg. Tham khảo liều atorvastatin sử dụng làm thuốc đối chứng từ những nghiên cứu trước đây,<sup>62,140,141</sup> nghiên cứu chọn liều atorvastatin là 10 mg/kg.

Từ kết quả khảo sát tác dụng điều hòa lipid máu của viên MIX trên mô hình gây RLLM nội sinh, viên MIX liều uống 2 viên/kg không ảnh hưởng trên nồng độ TC, HDL-C, LDL-C và TG máu ở chuột bình thường. Do đó, bố trí thử nghiệm tác dụng điều hòa lipid máu của viên MIX trên mô hình gây RLLM ngoại sinh không có lô uống viên MIX liều 2 viên/kg trong nhóm sinh lý.

Trước thử nghiệm, chuột được lựa chọn và chia ngẫu nhiên vào các lô, giữa các lô không có sự khác biệt về trọng lượng. Để đảm bảo đồng nhất về chế độ ăn, chuột ở các lô được nuôi ăn cùng một loại thức ăn và nước uống đầy đủ trong suốt quá trình thử nghiệm. Kết quả thử nghiệm cho thấy trọng lượng cơ thể chuột của lô chứng bệnh lý không có sự khác biệt đạt ý nghĩa thống kê so với lô chứng sinh lý, chứng tỏ mô hình gây RLLM ngoại sinh này không ảnh hưởng lên trọng lượng cơ thể chuột. Do đó, thử nghiệm này không đánh giá được sự ảnh hưởng của thuốc thử viên MIX cũng như thuốc đối chứng atorvastatin lên trọng lượng cơ thể chuột cho dù kết quả cho thấy trọng lượng cơ thể chuột uống atorvastatin liều 10 mg/kg giảm đạt ý nghĩa thống kê so với các lô còn lại ở tuần thứ nhất và có sự khác biệt đạt ý nghĩa thống kê so với lô sinh lý ở tuần thứ 6 ( $P < 0,05$ ).

Từ kết quả mô hình gây RLLM ngoại sinh cho thấy khi uống hỗn hợp giàu lipid sau 6 tuần đã gây được tình trạng RLLM rõ rệt trên chuột. Ở lô chứng bệnh lý, nồng độ TC tăng 25,5%, LDL-C tăng 110,8% đạt ý nghĩa thống kê so với lô chứng sinh lý ( $P < 0,05$ ). Điều này có thể được giải thích: (1) khi chế độ ăn giàu cholesterol liên tục trong thời gian dài gây bão hòa sự tổng hợp cholesterol trong gan, làm giảm LDL-R trên màng tế bào gan, giảm hấp thu LDL-C vào gan, do đó, nồng độ LDL-C trong máu tăng cao; (2) acid cholic làm tăng sự hấp thu cholesterol từ ruột, đồng thời giảm tổng hợp acid mật từ cholesterol tự do. Cholesterol tự do dư thừa sẽ được ester hóa tạo thành CE dự trữ. Khi đó, LDL-R bị thoái hóa để phòng quá tải cholesterol cho tế bào gan, do đó, làm tăng cholesterol máu. LDL-R là một glycoprotein có trọng lượng phân tử 160 kDa, có trên bề mặt của hầu hết các tế bào trong cơ thể. Tại tế bào gan là nơi có số lượng LDL-R nhiều nhất, khoảng 2/3 lượng LDL-C được hấp thu tại

gan. Số lượng LDL-R phụ thuộc vào nồng độ LDL-C máu, nếu nồng độ LDL-C trong máu tăng thì LDL-R tăng và ngược lại. Các chất làm tăng số lượng LDL-R trên màng tế bào gan (điển hình như nhóm statin) sẽ tăng hấp thu LDL-C vào gan, do đó, làm giảm LDL-C máu. Nồng độ HDL-C, TG không có sự khác biệt đạt ý nghĩa thống kê so với lô chứng sinh lý, chứng tỏ mô hình này không ảnh hưởng lên nồng độ HDL-C và TG trên chuột bình thường. So với mô hình gây RLLM nội sinh bằng tyloxapol, mô hình gây RLLM ngoại sinh bằng chế độ ăn giàu lipid có sự thay đổi nồng độ các thành phần lipid máu ít điển hình hơn (đặc biệt là nồng độ TG) điều này có thể được giải thích: Tyloxapol ngoài tác dụng tăng hoạt tính HMG-CoA reductase (làm tăng tổng hợp cholesterol), còn có tác dụng giảm hoạt tính LPL (làm giảm chuyển hóa CM và VLDL), vì vậy, làm thay đổi rõ rệt nồng độ các thành phần lipid máu (tăng TC, giảm HDL-C, tăng LDL-C và TG).

LDL-C là lipoprotein trong thành phần chứa 75 - 80% lipid và rất giàu cholesterol. Chức năng LDL-C là vận chuyển cholesterol từ gan đến các mô ngoại vi và là yếu tố chính tham gia vào tiến trình sinh XVDM. Hiện nay, LDL-C là mục tiêu điều trị đầu tiên trên bệnh nhân RLLM.<sup>1,2</sup> Vì vậy, có thể sử dụng 2 thành phần TC và LDL-C để đánh giá tác động của thuốc nghiên cứu và thuốc đối chứng trên mô hình này. Trên mô hình gây RLLM ngoại sinh, có thể nhận thấy mức độ tăng cao nồng độ TC và LDL-C máu. Vì tác dụng hạ cholesterol máu mạnh, với cơ chế ức chế hoạt tính HMG-CoA reductase và tăng số lượng LDL-R, nhóm statin được sử dụng chủ yếu trong điều trị tăng cholesterol máu so với các nhóm thuốc khác (ví dụ nhóm fibrat với cơ chế kích hoạt PPAR- $\alpha$ , làm tăng hoạt tính LPL, thường được chỉ định trong các trường hợp tăng TG máu). Vì vậy, nghiên cứu chọn atorvastatin làm thuốc đối chứng là phù hợp.

Tác dụng của viên MIX trên các thành phần lipid máu trong nhóm bệnh lý: Lô chứng bệnh lý có nồng độ HDL-C và TG máu không có sự khác biệt đạt ý nghĩa thống kê so với lô chứng sinh lý, chứng tỏ mô hình gây RLLM ngoại sinh này không ảnh hưởng trên nồng độ HDL-C và TG máu ở chuột bình thường. Do đó, thử nghiệm này không đánh giá được tác động của thuốc thử cũng như thuốc đối chứng trên nồng độ HDL-C và TG máu. Lô thử uống viên MIX liều 1 viên/kg, nồng độ TC giảm 12,5%, LDL-C giảm 58,6% đạt ý nghĩa thống kê so với lô chứng bệnh lý ( $P < 0,05$ ).

Lô thử uống viên MIX liều 2 viên/kg, TC giảm 17,6%, LDL-C giảm 52,3% đạt ý nghĩa thống kê so với lô chứng bệnh lý ( $P < 0,05$ ). Lô đối chứng uống atorvastatin liều 10mg/kg, nồng độ TC giảm 23,9%, LDL-C giảm 59,8% đạt ý nghĩa thống kê so với lô chứng bệnh lý ( $P < 0,05$ ). Nồng độ TC và LDL-C giữa các lô uống viên MIX ở 2 liều thử nghiệm và lô đối chứng uống atorvastatin liều 10 mg/kg không có sự khác biệt nhau, điều này có nghĩa tác dụng làm giảm TC và LDL-C của viên MIX không có sự tương quan liều thử nghiệm. Như vậy, viên MIX đã thể hiện hiệu quả làm giảm TC, LDL-C tương đương với thuốc đối chứng atorvastatin và đưa nồng độ TC và LDL-C về mức bình thường khi so sánh với lô chứng sinh lý trên mô hình gây RLLM ngoại sinh ở chuột nhắt trắng.

Kết quả nghiên cứu thực nghiệm là cơ sở xác định liều thuốc tối ưu sử dụng trên nghiên cứu lâm sàng. Viên MIX ở 2 mức liều 1 viên và 2 viên/kg đều thể hiện tác dụng điều hòa RLLM trên cả 2 mô hình nội sinh và ngoại sinh. Tuy nhiên, liều 2 viên/kg hiệu quả làm tăng HDL-C tốt hơn. Như vậy, mức liều tương đương được kỳ vọng có hiệu quả điều hòa lipid máu trên thử nghiệm lâm sàng là 8 viên/ngày.

Viên MIX thể hiện rõ tác dụng điều hòa lipid máu trên cả 2 mô hình thực nghiệm. Điều này có thể được lý giải dựa vào tác dụng dược lý hạ lipid máu từ các thành phần có trong viên MIX: Trên mô hình RLLM nội sinh giúp nghiên cứu sàng lọc ban đầu các thuốc có tác dụng trên sinh tổng hợp, chuyển hóa và bài tiết cholesterol. Theo kết quả kiểm nghiệm trong viên MIX có thành phần acid oleanolic, acid salvianolic B và ginsenosid Rg1 và với hàm lượng khá cao. Acid oleanolic đã được chứng minh tác dụng hạ lipid máu, hạ đường huyết, chống oxy hóa, chống viêm, bảo vệ tế bào gan, tế bào cơ tim, tế bào thần kinh, tăng cường miễn dịch, chống ung thư ...<sup>124,125,142</sup> Acid oleanolic ức chế LXR- $\alpha$  làm giảm hấp thu cholesterol ở ruột, tăng cường vận chuyển lượng cholesterol dư thừa từ ngoại biên về lại gan, tăng chuyển hóa cholesterol thành acid mật và tăng bài tiết mật, vì vậy, làm giảm cholesterol máu.<sup>109,110</sup> Ginsenosid Rg1 làm giảm nồng độ TC, TG máu trên thực nghiệm thông qua các tác động: Ginsenosid Rg1 có tác dụng tăng hoạt tính PPAR- $\alpha$  làm tăng quá trình oxy hóa FA, do đó, làm giảm TG; Ginsenosid Rg1 tăng hoạt tính CYP-7A1 làm tăng chuyển hóa cholesterol thành acid mật, làm giảm cholesterol máu; Ginsenosid Rg1 ức chế sự biểu hiện SREBP-1C và tăng quá trình oxy hóa FA.<sup>94</sup> Dịch

chiết từ Tam thất có tác dụng kích hoạt FXR/LXR- $\alpha$ , làm giảm nồng độ TC, LDL-C, TG và tăng HDL-C máu.<sup>29</sup> Saponin Tam thất có tác dụng làm giảm nồng độ HMG-CoA reductase trong gan, giảm tổng hợp cholesterol ở gan. Tổng hợp cholesterol ở gan giảm, khởi kích sự tăng tổng hợp và biểu hiện LDL-R ở màng tế bào gan, làm tăng hấp thu LDL-C vào gan, do đó, làm giảm nồng độ LDL-C máu.<sup>35</sup> Fatty acid synthase (FAS), enzyme xúc tác bước cuối cùng của quá trình sinh tổng hợp acid béo. Saponin từ Tam thất có thể ức chế FAS và do đó làm giảm nồng độ TG máu.<sup>109</sup> Dịch chiết từ Đan sâm có tác dụng kích hoạt FXR/LXR- $\alpha$ , làm giảm nồng độ TC, LDL-C, TG và tăng HDL-C máu. Ngoài ra, nồng độ TC, TG trong gan cũng giảm đáng kể.<sup>26</sup> Hoạt chất dihydrotanshinon I chiết xuất từ Đan sâm có tác dụng ức chế CETP làm giảm TC, LDL-C, TG, tăng HDL-C, apo-A1 trong máu và gan chuột.<sup>27</sup> Dịch chiết từ Đan sâm làm tăng hoạt tính enzyme CYP7A1, làm tăng chuyển hóa cholesterol tự do thành acid mật và tăng bài tiết mật, làm giảm cholesterol máu.<sup>107</sup> Dịch chiết Đan sâm có tác dụng tăng LDL-R trên màng tế bào gan, làm tăng sự hấp thu LDL-C vào gan, do đó, làm giảm nồng độ cholesterol máu.<sup>107</sup>

Trên mô hình RLLM ngoại sinh giúp nghiên cứu sàng lọc ban đầu các thuốc có tác dụng trên sự hấp thu, chuyển hóa và bài tiết cholesterol. ACAT, enzyme có vai trò quan trọng trong việc hấp thu, vận chuyển và dự trữ cholesterol dưới dạng CE. Ức chế ACAT làm giảm nồng độ TC và LDL-C máu, giảm sự tích tụ CE trên thành động mạch, ngăn ngừa sự hình thành XVĐM. Acid oleanolic ức chế hoạt động ACAT làm giảm hấp thu cholesterol từ ruột, do đó, làm giảm nồng độ cholesterol máu.<sup>107</sup> Trên thực nghiệm chuột với chế độ ăn giàu lipid, dịch chiết saponin từ Nguưu tấ có tác dụng giảm hấp thu lipid từ thức ăn và tăng bài tiết lipid qua phân, do đó, làm giảm nồng độ lipid máu và trọng lượng cơ thể chuột.<sup>23</sup> Phytosterol còn được gọi là sterol thực vật, có cấu trúc hóa học và chức năng giống cholesterol của người. Phytosterol trong Nguưu tấ có tác dụng ức chế cạnh tranh với các enzyme hấp thu cholesterol ở ruột, làm giảm hấp thu và tăng bài tiết cholesterol, do đó, làm giảm nồng độ cholesterol máu. Những nghiên cứu gần đây cũng cho rằng sterol thực vật có tác dụng tích cực đến quá trình chuyển hóa cholesterol trong tế bào ruột và để đáp ứng với việc giảm cung cấp cholesterol ngoại sinh, sự hấp thu cholesterol qua trung gian thụ thể được tăng cường thể hiện qua tăng số lượng LDL-R ở màng tế bào gan, do đó, làm

giảm nồng độ cholesterol máu.<sup>143</sup> Ức chế đồng thời hấp thu và tổng hợp cholesterol là một cách để đạt được mức giảm LDL-C cao hơn.<sup>16</sup> Tác dụng làm giảm hấp thu cholesterol từ acid oleanolic và ức chế tổng hợp cholesterol từ ginsenosid Rg1 khả năng sẽ gia tăng hiệu quả làm giảm cholesterol máu. Điều này, phần nào đã được minh chứng qua kết quả giảm cholesterol máu và việc sử dụng viên MIX liều thấp cũng có hiệu quả tương đương với atorvastatin liều cao trên thực nghiệm.

Tổng hợp từ những luận chứng trên, suy luận tác dụng điều hòa lipid máu của viên MIX thông qua cơ chế giảm tổng hợp, giảm hấp thu, tăng chuyển hóa và bài tiết cholesterol là có cơ sở và kết quả thực nghiệm cũng đã góp phần chứng minh cho cơ sở lý luận này. Tuy nhiên, cần có thêm những nghiên cứu chuyên sâu trên từng mô hình cụ thể để có minh chứng khoa học thuyết phục.

Nhiều nghiên cứu về dịch tễ và lâm sàng đã kết luận tăng **LDL-C** là một trong những nguyên nhân chính sinh XVDM. Nồng độ cholesterol máu càng cao thì nguy cơ mắc BTMXV càng cao, giảm cholesterol máu sẽ làm giảm tỷ lệ mắc bệnh và tử vong tim mạch. Hướng dẫn của ESC/EAS<sup>1</sup>, ACC/AHA<sup>2</sup> nhấn mạnh tầm quan trọng của việc giảm LDL-C, mặc dù cách tiếp cận để đạt mục tiêu LDL-C có khác nhau. Bằng chứng lâm sàng mạnh mẽ chứng minh statin làm giảm LDL-C dẫn đến giảm đáng kể nguy cơ mắc bệnh tim mạch, nên hầu hết các hướng dẫn hiện nay khuyến dùng LDL-C là mục tiêu điều trị chính và statin là liệu pháp đầu tay.<sup>1,2</sup> Viên MIX với hiệu quả làm giảm đến 41,5% TC, 58,6% LDL-C tương đương với atorvastatin trên thực nghiệm, điều này hy vọng viên MIX sẽ có tác dụng làm giảm nồng độ LDL-C trên thử nghiệm lâm sàng.

Hiện nay, **HDL-C** được xem là yếu tố có tác dụng bảo vệ, chống sinh XVDM. Cứ tăng 1 mg/dL HDL-C sẽ làm giảm 2 - 3% nguy cơ mắc và 3,7 - 4,7% tử vong do bệnh tim mạch.<sup>144</sup> Một số nghiên cứu về statin cũng đã đồng thuận kết luận: Liệu pháp statin làm giảm đáng kể nồng độ LDL-C và tỷ lệ mắc các biến cố tim mạch. Tuy nhiên, statin không loại bỏ nguy cơ tim mạch cả khi mức LDL-C được kiểm soát. Vì vậy, nguy cơ tim mạch vẫn còn sót lại đáng kể sau khi điều trị bằng statin, đặc biệt là trên bệnh nhân đái tháo đường. Nồng độ HDL-C thấp đã được xác định là yếu tố nguy cơ độc lập, quan trọng đối với tim mạch, tăng nồng độ HDL-C làm giảm các biến cố tim mạch.<sup>145</sup> Một phân tích tổng hợp dữ liệu từ 23 nghiên cứu lâm sàng ở khu vực

châu Á - Thái Bình Dương đã đưa ra kết luận: Có mối tương quan nghịch giữa nồng độ HDL-C thấp với bệnh mạch vành trên tất cả bệnh nhân. Nồng độ HDL-C thấp và không có bất thường thành phần lipid máu khác có liên quan đến tăng nguy cơ mắc bệnh mạch vành.<sup>146</sup> Vai trò của HDL-C trong XVĐM chủ yếu là do khả năng mang lượng cholesterol dư thừa từ ngoại biên về lại gan để tiếp tục đào thải qua mật, do đó làm giảm cholesterol máu. Ngoài ra, HDL-C còn có chức năng bảo vệ thành mạch, thông qua đặc tính kháng viêm, chống oxy hóa, chống huyết khối và bảo vệ tế bào nội mô.<sup>147</sup> Hướng dẫn của ESC/EAS<sup>1</sup>, ACC/AHA<sup>2</sup> nồng độ HDL-C thấp là một yếu tố tiên đoán mạnh và độc lập nguy cơ phát triển sớm XVĐM. Tăng nguy cơ tim mạch liên quan đến nồng độ HDL-C thấp, đặc biệt trong ngưỡng từ 25 - 45 mg/dL. Viên MIX với hiệu quả làm tăng nồng độ HDL-C lên đến 29,5% tương đương với atorvastatin trên thực nghiệm, hy vọng viên MIX sẽ có tác dụng làm tăng nồng độ HDL-C máu trên thử nghiệm lâm sàng.

**TG** là thành phần chính của lipoprotein giàu TG bao gồm CM, VLDL và phần tàn dư của chúng được tạo ra trong quá trình chuyển hóa TG. Nồng độ TG tăng có liên quan đến tăng nguy cơ mắc bệnh tim mạch và nồng độ TG  $\geq 500$  mg/dL là yếu tố nguy cơ gây viêm tụy cấp. Hiện nay, điều trị RLLM thường tập trung vào việc làm giảm LDL-C, sau đó là tăng HDL-C và ít chú trọng giảm TG. Tuy nhiên, nhiều nghiên cứu gần đây đã chứng minh rằng tăng TG máu cũng góp phần vào sự hình thành và phát triển XVĐM. Một phân tích tổng hợp gồm 29 nghiên cứu tiền cứu đã đưa ra kết luận nồng độ TG là một yếu tố nguy cơ tim mạch độc lập và mạnh mẽ.<sup>148</sup> Nghiên cứu PRISE IT-TIMI 22 khảo sát trên 4162 bệnh nhân nhập viện vì hội chứng vành cấp được điều trị bằng statin hoạt lực cao đã kết luận rằng: Điều trị giảm nồng độ TG lúc đối  $< 150$  mg/dL có liên quan đến việc giảm nguy cơ mắc bệnh mạch vành tái phát so với TG cao hơn ngay cả khi đã điều chỉnh mức LDL-C và HDL-C. Cứ giảm 10 mg/dL TG, tử vong do nhồi máu cơ tim giảm 1,6% và giảm 1,4% hội chứng mạch vành cấp tái phát.<sup>149</sup>

Khuyến cáo từ Hội tim Hoa Kỳ,<sup>150</sup> TG ngày càng có vai trò quan trọng trong việc đánh giá yếu tố nguy cơ bệnh tim mạch và hướng dẫn các phương pháp tiếp cận điều trị nhằm giảm hậu quả liên quan tăng TG. Nhiều bằng chứng từ dữ liệu dịch tễ và lâm sàng đã kết luận nồng độ TG tăng cao là một yếu tố nguy cơ độc lập đối với

bệnh tim mạch.<sup>151</sup> Hướng dẫn của ESC/EAS,<sup>1</sup> ACC/AHA<sup>2</sup> giảm nồng độ TG máu là một trong những biện pháp quan trọng để giảm thêm nguy cơ tim mạch sau khi đạt được mục tiêu LDL-C. Viên MIX với hiệu quả làm giảm đến 18,5% TG tương đương với atorvastatin trên thực nghiệm, điều này củng cố thêm khả năng điều hòa lipid máu của viên MIX trên nghiên cứu lâm sàng.

Với mong muốn từng bước ứng dụng viên MIX trong phòng và điều trị RLLM nhằm góp phần giảm tỷ lệ mắc bệnh và tử vong do BTMXV. Nghiên cứu đã tiến hành khảo sát tác dụng điều hòa lipid máu của viên MIX trên thực nghiệm. Đây là kết quả đầu tiên chứng minh về hiệu quả điều hòa lipid máu của viên MIX và góp phần củng cố bằng chứng về tác dụng hạ lipid máu của các dược liệu kết hợp.

#### **So sánh với những nghiên cứu có liên quan trong nước và trên thế giới**

Cho đến thời điểm hiện tại chưa ghi nhận nghiên cứu về tác dụng điều hòa lipid máu của viên MIX. Trong phạm vi nghiên cứu này, sự kết hợp các dược liệu trong công thức, trong đó Nguru tất (50%) được xem là dược liệu đóng vai trò chính. Do đó, kết quả nghiên cứu chỉ so sánh với các nghiên cứu chế phẩm từ Nguru tất hoặc khi Nguru tất là thành phần chính (Bảng 4.3).

**Bảng 4.3. Một số nghiên cứu tác dụng điều hòa lipid máu từ Nguru tất**

| <b>Chế phẩm</b>                    | <b>Liều dùng</b> | <b>Đường dùng</b> | <b>Đối tượng nghiên cứu</b> | <b>Kết quả</b>                                               |
|------------------------------------|------------------|-------------------|-----------------------------|--------------------------------------------------------------|
| Cao Nguru tất <sup>20</sup>        | 10 g/kg          | Uống              | Thỏ                         | Giảm 34,3% cholesterol                                       |
| Viên Bidentin <sup>21</sup>        | 10 g/kg          | Uống              | Thỏ                         | Giảm 40,4% cholesterol                                       |
| Dịch chiết Nguru tất <sup>23</sup> | 0,12 g/kg        | Uống              | Chuột nhắt                  | Giảm TC 44,95%, LDL-C 68,07%, TG 44,89% và tăng HDL-C 70,61% |
| Dịch chiết Nguru tất <sup>24</sup> | 0,5 g/kg         | Uống              | Chuột nhắt                  | Giảm TG máu và trọng lượng cơ thể chuột                      |

Tuy nhiên, các nghiên cứu trước đây sử dụng chế phẩm được chiết xuất và dạng bào chế khác nhau, đối tượng nghiên cứu và thời gian dùng thuốc cũng khác nhau, nên việc so sánh chỉ có tính chất tham khảo.

#### 4.4. Tác động ức chế hoạt tính HMG-CoA reductase của viên MIX *in vitro* và *in vivo*

Mục tiêu chính của điều trị RLLM hiện nay là làm giảm nồng độ LDL-C “Càng thấp càng tốt” nhằm giảm yếu tố nguy cơ BTMXV.<sup>1</sup> Một trong những cách hiệu quả nhất của việc làm giảm nồng độ cholesterol máu là kiểm soát sự tổng hợp cholesterol nội sinh. HMG-CoA reductase, enzyme xúc tác phản ứng chuyển HMG-CoA thành acid mevalonic, hợp chất đầu tiên trong quá trình sinh tổng hợp cholesterol, dẫn đến gia tăng nồng độ cholesterol máu. Vì HMG-CoA reductase là enzyme quan trọng trong quá trình sinh tổng hợp cholesterol nên đã được xem là mục tiêu chính để điều trị tăng cholesterol máu. Dựa trên tiêu chí ức chế hoạt động của HMG-CoA reductase, nhiều loại thuốc điều trị RLLM như statin đã được nghiên cứu và hiệu quả của chúng trong việc kiểm soát nồng độ cholesterol đã được công nhận. Theo các khuyến cáo hiện nay chỉ có duy nhất nhóm thuốc ức chế HMG-CoA reductase (statin) được đề nghị chỉ định trong phòng và điều trị RLLM.<sup>1,2</sup> Tuy nhiên, HMG-CoA reductase cũng xúc tác sinh tổng hợp nhiều isoprenoid cần thiết cho các chức năng bình thường của cơ thể. Vì vậy, các loại thuốc ức chế HMG-CoA reductase nếu sử dụng rộng rãi cũng gây ra các tác dụng phụ nghiêm trọng như đau cơ, tiêu cơ vân và suy thận cấp và các tác dụng bất lợi khác như tăng men gan, tăng đường huyết, rối loạn cảm giác và trầm cảm cũng đã được ghi nhận khi sử dụng kéo dài.<sup>1,2,10,11,14</sup>

Mô hình thử tác động ức chế hoạt tính HMG-CoA reductase nhằm giúp sàng lọc các thuốc có tác động tương tự nhóm statin và giải thích cơ chế tác dụng của các thuốc hạ lipid máu. Trên thế giới, nhiều công trình nghiên cứu phát triển thuốc sử dụng các bộ KIT thương mại để tiến hành thử nghiệm *in vitro*. Do bộ KIT thương mại sử dụng nguồn enzyme HMG-CoA reductase dạng tinh khiết nên giá thành rất cao, do đó chưa phù hợp cho mục tiêu nghiên cứu sàng lọc. Một số nghiên cứu gần đây đã đề xuất quy trình sử dụng dịch đồng thể gan có chứa HMG-CoA reductase để thay thế mở rộng thêm các mô hình sàng lọc thuốc cũng như dược liệu hạ lipid máu trên thực nghiệm.<sup>59,116</sup> Bên cạnh đó, hầu hết các nghiên cứu dược lý thực nghiệm ở Việt Nam ứng dụng mô hình gây RLLM nội sinh bằng tyloxapol để khảo sát tác dụng hạ lipid máu, nhưng chưa thể giải thích được cơ chế tác dụng của thuốc.<sup>136,139</sup> Vì vậy, việc tạo dịch đồng thể chứa enzyme HMG-CoA reductase từ mô gan chuột nhắt trắng và ứng dụng phương pháp

định lượng enzyme này là rất cần thiết, để mở rộng thêm mô hình sàng lọc và giải thích cơ chế tác dụng của thuốc trên *in vitro* và *in vivo*.

Thảo dược là nguồn tiềm năng của các dược chất chữa bệnh. Vì vậy, việc tìm kiếm chất ức chế HMG-CoA reductase từ thảo dược để thay thế cho các loại thuốc hóa học tổng hợp giống nhóm statin hiện đang rất được quan tâm. Những nghiên cứu trong nước theo hướng sàng lọc tác dụng hạ lipid máu của các dược liệu hay bài thuốc/công thức kết hợp chỉ tập trung chính trên các thành phần lipid máu và so sánh với hiệu lực của các statin, chưa có những đánh giá về cơ chế tác động có tương đồng với các statin. Vì thế, việc ứng dụng phương pháp định lượng hoạt tính HMG-CoA reductase trong xác định cơ chế sẽ làm tiền đề cho việc nâng cao giá trị sử dụng và phát triển các chế phẩm từ thảo dược trong phòng và điều trị RLLM.

#### 4.4.1. Tác động ức chế hoạt tính HMG-CoA reductase của viên MIX *in vitro*

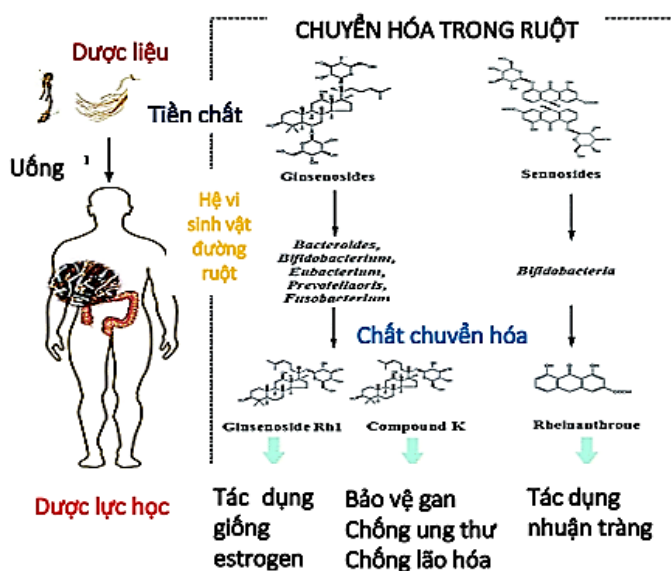
Quy trình đánh giá tác động ức chế hoạt tính HMG-CoA reductase *in vitro* trên dịch đồng thể enzyme thu được từ gan chuột nhắt trắng khỏe mạnh đã được Trung tâm Sâm và Dược liệu Tp. HCM và Bộ môn Dược lý - Khoa Dược - Đại học Y dược Tp. HCM ứng dụng để nghiên cứu và đăng tải 2 bài báo trên Tạp chí Y học Thành phố Hồ Chí Minh và Tạp chí International Journal of Pharmacological Research. Nhóm tác giả cũng tiến hành so sánh quy trình với bộ KIT thương mại của hãng Sigma, cho thấy không có sự khác biệt đáng kể.<sup>116,152</sup>

Atorvastatin thuộc nhóm statin với tác dụng ức chế HMG-CoA reductase làm giảm tổng hợp cholesterol nội sinh. Kết quả cho thấy atorvastatin bắt đầu ức chế ở nồng độ 1 ng/mL và sự ức chế tăng dần theo nồng độ. Ở nồng độ 1000 ng/mL, tỷ lệ % ức chế lên đến 93,02%. Nồng độ ức chế 50% (IC<sub>50</sub>) hoạt tính HMG-CoA reductase của atorvastatin trong nghiên cứu ước lượng là 29,36 ng/mL. Nghiên cứu của Patel HD,<sup>59</sup> IC<sub>50</sub> là 9,07 ng/mL, Trương Đình Phước,<sup>116</sup> IC<sub>50</sub> là 14,89 ng/mL. Đây cũng là cơ sở khẳng định dịch đồng thể gan thu được chứa HMG-CoA reductase có khả năng xúc tác phản ứng chuyển HMG-CoA thành acid mevalonic. Trong tế bào gan chuột có hai loại enzyme có khả năng xúc tác phản ứng chuyển HMG-CoA: (1) HMG-CoA lyase xúc tác phản ứng chuyển HMG-CoA thành acetoacetat và acetyl-CoA; (2) HMG-CoA reductase xúc tác phản ứng chuyển HMG-CoA thành acid mevalonic. Trong tế bào HMG-CoA lyase phân bố ở ty thể. Theo quy trình tạo dịch đồng thể

enzyme, sau khi đồng nhất mẫu mô, dịch đồng thể sẽ được ly tâm lần một với lực ly tâm 5000 G/phút trong 15 phút, thu dịch, bỏ cặn. Với lực ly tâm này, phần dịch sẽ không có phân đoạn nhân và ty thể do tỷ trọng lớn nên hiện diện chủ yếu ở phần cặn. Do đó, có thể nhận định dịch đồng thể thu được chứa lượng HMG-CoA lyase không đáng kể, sự chuyển hóa HMG-CoA là do HMG-CoA reductase (enzyme nằm trong microsom tế bào gan) xúc tác.<sup>116</sup> Kết quả thử nghiệm cho thấy dịch đồng thể từ gan chuột nhắt trắng có chứa HMG- CoA reductase có khả năng xúc tác phản ứng chuyển HMG- CoA thành acid mevalonic và có thể sử dụng dịch đồng thể enzyme này thực hiện các nghiên cứu tiếp theo.

Viên MIX được bào chế từ Ngưu tất - Đan sâm - Tam thất có tác dụng hạ lipid máu trên thực nghiệm. Kết quả cho thấy viên MIX ở nồng độ cao nhất 8000 µg/mL thể hiện tác dụng ức chế hoạt tính HMG-CoA reductase *in vitro* tương đương 47,91% (< 50%) nên chưa xác định được giá trị IC<sub>50</sub> của viên MIX. Nghĩa là viên MIX chưa thể hiện tác động ức chế HMG-CoA reductase điển hình trong khảo sát *in vitro*. Điều này có thể được giải thích: (1) một số khảo sát về dược động học cho thấy một số tiền dược (prodrug) hoặc ginsenosid, polysaccharid sau khi được hấp thu vào máu qua đường uống có thể bị chuyển hóa lần đầu (first- pass metabolim) bởi các enzyme có trong ruột, gan, máu hay hệ vi sinh vật (microbiome) đường ruột để tạo ra các chất chuyển hóa hoặc các hợp chất thứ cấp có hoạt tính sinh học điển hình trong khảo sát *in vivo*.<sup>153</sup> Nghiên cứu của Zhou SS và cộng sự<sup>153</sup> cũng đã mô tả sơ đồ chuyển hoá các ginsenosid Re, ginsenosid Rc bởi hệ vi sinh vật đường ruột tạo thành các ginsenosid thứ cấp và cuối cùng là hợp chất K. Hoạt tính và khả dụng sinh học của các ginsenosid thứ cấp cải thiện hơn các ginsenosid tiền chất. Hệ vi sinh vật đường ruột có thể tạo ra nhiều enzyme như  $\beta$ -D -glucuronidase,  $\beta$ -D -glucosidase,  $\beta$ -galactosidase, nitroreductase, azoreductase,  $\alpha$ -L -rhamnosidase và  $\beta$ -xylosidase. Dưới tác động của một số enzyme đặc hiệu, các thành phần hoạt tính của dược liệu được chuyển hóa thành các chất có hoạt tính mới và có các tác dụng sinh học khác nhau (Hình 4.1).<sup>154</sup> Saponin Tam thất chịu trách nhiệm chính cho các ứng dụng lâm sàng, nhưng khả dụng sinh học bằng đường uống thấp. Tuy nhiên, hệ vi sinh vật đường ruột có thể chuyển hóa saponin để tạo ra các chất chuyển hóa thứ cấp có hoạt tính sinh học tiềm năng. Chen MY và cộng sự<sup>155</sup> đã mô tả quá trình chuyển hóa của

saponin Tam thất bằng cách ủ chúng với vi sinh vật đường ruột của người, kết quả cho thấy các chất chuyển hóa nhiều nhất là ginsenosid F<sub>1</sub>, protopanaxatriol, ginsenosid Rh<sub>2</sub>, hợp chất ginsenosid K và protopanaxadiol có các tác dụng dược lý liên quan mạnh hơn khi so sánh với ginsenosid tiền chất; (2) mẫu thử là viên MIX thành phần có tá dược, đây cũng có thể là yếu tố gây nhiễu trong ghi nhận kết quả ức chế hoạt tính HMG-CoA reductase *in vitro*; (3) viên MIX thành phần chính là cao khô dược liệu (cao toàn phần) chứa nhiều thành phần khác nhau không phải là một hoạt chất tinh khiết, có thể các hoạt chất có hoạt tính sinh học trong mẫu thử không đủ lượng và không đủ mạnh để thể hiện tác động ức chế hoạt tính HMG-CoA reductase *in vitro*. Kết quả thử nghiệm cũng khá tương đồng với kết quả nghiên cứu của Chung Thị Mỹ Duyên.<sup>156</sup>



**Hình 4.1. Quá trình chuyển hoá các hợp chất trong dược liệu bởi hệ vi sinh vật đường ruột**

“Nguồn: Lin L, 2019”<sup>155</sup>

Định hướng nghiên cứu tiếp theo tiến hành khảo sát tác động ức chế hoạt tính HMG-CoA reductase *in vitro* ở dạng cao chiết và trên các hoạt chất cụ thể được phân lập từ viên MIX. Hy vọng kết quả thu được sau thử nghiệm sẽ góp phần làm sáng tỏ hơn về tác động ức chế hoạt tính HMG-CoA reductase *in vitro* của viên MIX.

#### 4.4.2. Tác động ức chế hoạt tính HMG- CoA reductase của viên MIX *in vivo*

Dựa trên cơ sở lý luận *in vitro* và tham khảo quy trình đánh giá tác động ức chế hoạt tính HMG- CoA reductase *in vivo* trên chuột nhắt trắng gây RLLM bằng tyloxapol

đã được ứng dụng tại Trung tâm Sâm và Dược liệu Tp. HCM và Bộ môn Dược lý - Khoa Dược - Đại học Y dược Tp. HCM. Nghiên cứu *in vivo* được thiết kế để đánh giá tác động ức chế hoạt tính HMG- CoA reductase của viên MIX và thuốc đối chứng là atorvastatin trên chuột nhắt trắng gây RLLM bằng tyloxapol.

Tyloxapol hiện được sử dụng rộng rãi để gây mô hình RLLM cấp trên động vật thí nghiệm, nhằm giúp sàng lọc các thuốc hạ lipid máu. Tyloxapol làm tăng hoạt tính HMG-CoA reductase, enzyme giới hạn tốc độ sinh tổng hợp cholesterol, kết quả thử nghiệm cho thấy khi sử dụng tyloxapol liều duy nhất 250 mg/kg tiêm tĩnh mạch sau 24 giờ đã làm thay đổi đáng kể nồng độ hoạt tính HMG-CoA reductase (tăng 103,21%, gấp 2,04 lần) và có sự khác biệt đạt ý nghĩa thống kê so với lô chứng sinh lý. Đồng thời atorvastatin liều 60 mg/kg cũng có tác động ức chế hoạt tính HMG-CoA reductase (giảm 65,09%) khác biệt đạt ý nghĩa thống kê so với chứng bệnh lý. Vì vậy, sử dụng mô hình gây RLLM nội sinh bằng tyloxapol để khảo sát tác động ức chế hoạt tính HMG-CoA reductase *in vivo* của viên MIX và thuốc đối chứng atorvastatin là có cơ sở.

Viên MIX liều sử dụng để khảo sát tác dụng điều hòa lipid máu trên chuột nhắt trắng là 1 viên và 2 viên/kg, nghiên cứu cũng sử dụng liều này để đánh giá tác động ức chế hoạt tính HMG-CoA reductase *in vivo*, kết quả:

Nhóm sinh lý: Lô thử uống viên MIX liều 2 viên/kg hoạt tính HMG-CoA reductase giảm 12,83% nhưng không có sự khác biệt đạt ý nghĩa thống kê so với lô chứng sinh lý. Điều này có nghĩa là viên MIX liều 2 viên/kg không ảnh hưởng trên hoạt tính HMG-CoA reductase trên chuột bình thường.

Nhóm bệnh lý: Lô thử uống viên MIX liều 1 viên và 2 viên/kg, thể hiện tác động làm giảm hoạt tính HMG-CoA reductase lần lượt là 60,17% và 62,21% đạt ý nghĩa thống kê so với lô chứng bệnh lý ( $P < 0,001$ ). Lô uống liều 2 viên/kg thể hiện tác động làm giảm hoạt tính HMG-CoA reductase và khác biệt đạt ý nghĩa thống kê so với lô chứng sinh lý nhưng không khác biệt đạt ý nghĩa thống kê so với liều 1 viên/kg. Lô đối chứng uống atorvastatin liều 60 mg/kg hoạt tính HMG-CoA reductase giảm 65,09% so với lô chứng bệnh lý ( $P < 0,001$ ). Như vậy, tác động làm giảm hoạt tính HMG-CoA reductase giữa các lô uống viên MIX ở 2 liều và lô đối chứng uống atorvastatin liều 60 mg/kg không có sự khác biệt nhau, điều này có nghĩa tác động

làm giảm hoạt tính HMG-CoA reductase của viên MIX tương đương với atorvastatin.

Kết quả thử nghiệm đã chứng minh tác động ức chế HMG-CoA reductase *in vivo* của viên MIX giống một phần cơ chế của nhóm thuốc statin. Trên người hoặc động vật tăng cholesterol máu được sử dụng chất ức chế HMG-CoA reductase (nhóm statin), sự giảm tổng hợp cholesterol sẽ dẫn đến phản ứng bù trừ bằng việc kích hoạt SREBP. Kết quả là HMG-CoA reductase và LDL-R được điều chỉnh tăng lên, nhưng do có sự hiện diện của chất ức chế HMG-CoA reductase sẽ bù trừ cho HMG-CoA reductase tăng lên, dẫn đến mức độ tổng hợp cholesterol bình thường. Tuy nhiên, sự gia tăng biểu hiện LDL-R sẽ làm tăng hấp thu LDL-C, do đó, làm giảm nồng độ cholesterol máu. Vì vậy, trong thử nghiệm này, sự ức chế HMG-CoA reductase có thể phản ánh tác dụng của viên MIX trong việc giảm cholesterol máu.

Như vậy, viên MIX thể hiện tác dụng ức chế hoạt tính HMG-CoA reductase *in vivo*. Điều này có thể được giải thích do các hoạt chất trong viên MIX đã chuyển thành các hoạt chất thứ cấp có tác dụng sinh học trong cơ thể. Hợp chất saponin có tác dụng hạ lipid máu, chống oxy hóa, kháng viêm, chống đông máu ...<sup>15,16,27</sup> Một nghiên cứu thực nghiệm đã chứng minh saponin Tam thất có tác dụng làm giảm nồng độ HMG-CoA reductase trong gan chuột.<sup>28</sup> Một số nghiên cứu cũng đã chứng minh hợp chất saponin có tác dụng làm hạ cholesterol máu nhưng chưa giải thích được cơ chế tác dụng.<sup>15,27</sup> Tuy nhiên, viên MIX thành phần chính là cao toàn phần chứa nhiều thành phần khác nhau không phải là một hoạt chất tinh khiết. Tác động ức chế hoạt tính HMG-CoA reductase *in vivo* có thể do hợp chất saponin hoặc các hoạt chất hoạt tính sinh học khác khác tương tác với nhau hoặc thông qua tác động các enzyme của hệ vi sinh vật đường ruột, gan, máu để tạo ra các chất chuyển hóa hoặc các hoạt chất thứ cấp tác động trên hoạt tính HMG-CoA reductase.

### **So sánh với những nghiên cứu có liên quan trong nước và trên thế giới**

Đây là nghiên cứu đầu tiên đánh giá tác động ức chế hoạt tính HMG-CoA reductase của viên MIX. Trong viên MIX, Nguru tất chiếm tỷ lệ cao nhất (50%). Vì vậy, kết quả chỉ so sánh với các nghiên cứu từ Nguru tất hoặc Nguru tất là thành phần chính trong bài thuốc/công thức kết hợp. Mặc dù đã có nhiều nghiên cứu về tác dụng hạ lipid máu từ Nguru tất. Nhưng đến thời điểm hiện tại, chưa ghi nhận báo cáo đánh giá tác động ức chế hoạt tính HMG-CoA reductase. Vì thế, chưa thể so sánh hiệu quả

ức chế hoạt tính HMG-CoA reductase của thuốc nghiên cứu. Tuy nhiên trong thử nghiệm *in vivo*, sự gia tăng hoạt tính HMG-CoA reductase cũng phù hợp với sự thay nồng độ các thành phần lipid máu do tyloxapol và việc sử dụng viên MIX có tác dụng làm giảm đáng kể hoạt tính HMG-CoA reductase và nồng độ các thành phần lipid máu trên chuột nhắt trắng. Kết quả của nghiên cứu cũng phù hợp với kết quả của các nghiên cứu trước đây đã chứng minh việc làm giảm hoạt tính HMG-CoA reductase là nguyên nhân giảm cholesterol máu của các chế phẩm từ thảo dược.<sup>51,136,139,152,156</sup>

Hiện nay, BTMXV là nguyên nhân hàng đầu gây tàn tật và tử vong trên toàn thế giới. BTMXV là nhóm bệnh lý do đa yếu tố gây nên và với cơ chế bệnh sinh phức tạp. Một loại thuốc tác động trên một mục tiêu có thể không mang lại việc điều trị hiệu quả, một loại thuốc cùng giải quyết được nhiều mục tiêu, hiệu quả và an toàn hiện đang được các nhà khoa học quan tâm nghiên cứu. Đan sâm, Tam thất là những thuốc thảo dược có tác dụng rất tốt cho tim mạch, có thể sử dụng riêng lẻ hoặc kết hợp với các loại thuốc khác để phòng và điều trị bệnh tim mạch, chuyển hóa.<sup>32,33</sup> Một nghiên cứu về thuốc kết hợp Đan sâm - Tam thất đã kết luận rằng: Các hợp chất trong Đan sâm - Tam thất giống như một thuốc đa thành phần có tác dụng trên đa mục tiêu liên quan đến các mục tiêu của bệnh tim mạch và có thể tăng đạt mục tiêu điều trị khi kết hợp với các loại thuốc khác.<sup>157</sup> Kết hợp Đan sâm - Tam thất làm gia tăng hiệu quả chống kết tập tiểu cầu trên thực nghiệm.<sup>158</sup> Một nghiên cứu lâm sàng trên bệnh nhân đau ngực do thiếu máu cơ tim đã đưa ra kết luận: So với điều trị bằng nitrat, điều trị bằng viên kết hợp Đan sâm - Tam thất - Long não cải thiện đáng kể triệu chứng đau ngực, tỷ lệ bị tác dụng phụ khi sử dụng nitrat và trên kết quả điện tâm đồ.<sup>159</sup>

Stress oxy hóa làm tăng sản xuất ROS, đây là yếu tố có vai trò quan trọng trong cơ chế sinh XVĐM. Hợp chất polypeptid chiết xuất từ Nguưu tât có tác dụng giảm stress oxy hóa, bảo vệ và tái tưới máu cơ tim bị tổn thương do thiếu máu cục bộ trên thực nghiệm.<sup>31</sup> Đan sâm giảm mức độ peroxid hóa lipid có thể cải thiện tình trạng tổn thương tế bào thần kinh do thiếu máu não cấp.<sup>87</sup> Tanshinone IIA chiết xuất từ Đan sâm có thể ức chế sự hình thành XVĐM trên thỏ ăn với chế độ ăn giàu lipid.<sup>83</sup> Acid salvianolic B chiết xuất từ Đan sâm có tác dụng làm giảm stress oxy hóa, giảm quá trình oxy hóa LDL và giảm độc tế bào.<sup>160</sup> Dịch chiết từ Tam thất có khả năng làm giảm yếu tố nguy cơ mắc bệnh tim mạch liên quan đến tăng lipid máu và

stress oxy hóa.<sup>35</sup> Viêm tham gia vào tất cả các giai đoạn của quá trình sinh xơ vữa, từ khởi đầu tổn thương đến các biến chứng do huyết khối. Các hợp chất saponin (Ngưu tất, Tam thất), acid phenolic (Đan sâm) ngoài tác dụng chống oxy hóa, còn có tác dụng kháng viêm, giãn mạch, ức chế sự tăng sinh tế bào cơ trơn mạch máu, chống kết tập tiểu cầu và giảm hiện tượng chết tế bào.<sup>17,32,33</sup>

Thảo dược chứa nhiều dược chất có thể có tương tác bất lợi với thuốc hóa học tổng hợp khi sử dụng kết hợp. Tuy nhiên, một nghiên cứu tổng hợp dữ liệu từ các nghiên cứu đã đưa ra kết luận: Phần lớn các thảo dược không có tương tác bất lợi với thuốc tổng hợp hóa học.<sup>161</sup> Kết hợp danshen (thuốc bào chế từ Đan sâm) và clopidogrel có tác dụng tốt hơn so với khi sử dụng clopidogrel đơn thuần (giảm tần suất và thời gian cơn đau ngực, giảm một số tác dụng phụ và trên kết quả điện tâm đồ). Danshen kết hợp với clopidogrel có thể khắc phục được sự kháng clopidogrel, do đó, mang lại hiệu quả điều trị tốt hơn.<sup>162</sup> Fibrinogen là một yếu tố nguy cơ độc lập đối với bệnh tim mạch, nhóm statin có thể làm giảm nhẹ nồng độ fibrinogen máu. Atorvastatin có hiệu quả làm giảm mạnh nồng độ cholesterol máu, nhưng lại làm gia tăng nồng độ fibrinogen máu trên một số bệnh nhân.<sup>163,164</sup> So với fluvastatin liều 3 mg/kg/ngày, bột Tam thất liều 43 và 86 mg/kg/ngày có tác dụng tương đương trong việc làm giảm nồng độ TC (23,70%, 19,29%) và TG (21,59%, 18,55%) nhưng giảm rõ rệt hơn về nồng độ fibrinogen máu trên chuột với chế độ ăn giàu lipid.<sup>28</sup> Việc sử dụng lâu dài thuốc nhóm statin hay kết hợp với thuốc điều trị RLLM khác, một trong những tác dụng bất lợi là tổn thương gan do thuốc.<sup>10,165</sup> Hoạt chất ginsenosid Rb1, G-Rg1 chiết xuất từ Tam thất có tác dụng bảo vệ và chống lại tổn thương tế bào gan chuột trên mô hình gây viêm gan.<sup>39</sup> Một nghiên cứu thực nghiệm trên chuột gây XVĐM và tổn thương gan, Tam thất có tác dụng làm hạ lipid máu và ổn định các thành phần chức năng gan, nhưng hiệu quả giảm lipid máu tốt hơn khi kết hợp với atorvastatin, do đó, có thể kết hợp Tam thất với thuốc hạ lipid hóa học tổng hợp để có được tác dụng hiệp đồng hạ lipid máu và giảm tổn thương gan.<sup>40</sup> Đau cơ, có thể chuyển thành bệnh cơ tăng CK cũng là một trong những tác dụng bất lợi nghiêm trọng khi sử dụng nhóm statin, đặc biệt trên những bệnh nhân dùng statin liều cao.<sup>1,2</sup> Kết hợp atorvastatin với Đan sâm - Cát căn làm giảm nồng độ TC, TG, LDL-C và tăng HDL-C máu tốt hơn so với khi sử dụng riêng lẻ. Ngoài ra, Đan sâm - Cát căn có thể

làm giảm tác dụng bất lợi của atorvastatin trên gan và cơ (giảm hoạt độ AST, ALT và CK máu).<sup>166</sup> Như vậy, Nguru tất, Đan sâm, Tam thất ngoài tác dụng hạ lipid máu còn có những tác dụng tích cực khác như giãn mạch, chống oxy hóa, kháng viêm, chống đông máu và bảo vệ gan. Đây là cơ sở khoa học giá trị giúp định hướng nghiên cứu tiếp theo của viên MIX trên các tác dụng như hạ huyết áp, giãn mạch, chống đông máu, chống oxy hóa, kháng viêm và bảo vệ gan.

Do nhu cầu hiện nay về thuốc điều trị RLLM, hàng loạt các loại thuốc uống nguồn gốc hóa học tổng hợp được các tập đoàn, các công ty Dược phẩm nghiên cứu và phát triển như thuốc nhóm statin, fibrat, thuốc ức chế sự hấp thu cholesterol, nhóm ức chế PCSK9. Tuy nhiên, các thuốc hóa học tổng hợp này chưa phải là giải pháp tối ưu đối với một quốc gia đang phát triển như Việt Nam do vấn đề chi phí và tác dụng phụ. Trong khi việc điều trị RLLM đòi hỏi cần có thời gian lâu dài, vì thế, bên cạnh hiệu quả làm giảm lipid máu, thì vấn đề an toàn và hiệu quả kinh tế cũng là những tiêu chí quan trọng. Nghiên cứu chế phẩm từ thảo dược có hiệu quả điều trị cao và ít tác dụng phụ là yêu cầu bức thiết. Hy vọng thành công của viên MIX trên các nghiên cứu lâm sàng sẽ giúp cho người bệnh có thêm một lựa chọn thuốc phòng và điều trị RLLM hiệu quả.

#### **4.5. Tác dụng theo YHCT của viên MIX**

YHHĐ là nền Y học thực nghiệm dựa trên các bằng chứng khoa học về nguyên nhân gây bệnh và cơ chế bệnh sinh, việc chẩn đoán xác định cần kết hợp kết quả cận lâm sàng. YHCT là nền Y học dựa trên nền tảng học thuyết âm dương, ngũ hành, thiên nhân hợp nhất. Việc chẩn đoán bệnh dựa vào tứ chẩn, bát cương, hội chứng bệnh. Sau khi chẩn đoán bệnh, người thầy thuốc sẽ căn cứ vào tình trạng bệnh cụ thể mà thiết lập một đơn thuốc điều trị, gọi là biện chứng luận trị.<sup>111,112</sup> Bên cạnh đó, hiện nay thuốc có nguồn gốc tự nhiên không những chỉ thầy thuốc Đông y mà cả thầy thuốc Tây y cũng sử dụng để phòng và điều trị bệnh. Vì thế, việc thiết lập đơn thuốc có sử dụng thêm tác dụng dược lý hiện đại ngày càng được quan tâm<sup>111</sup>.

YHCT ít khi sử dụng độc vị, mà thường kết hợp nhiều vị thuốc (ít nhất là hai vị thuốc) thành bài thuốc/công thức thuốc nhằm để giải quyết những yêu cầu đặt ra trong điều trị: Giải quyết những triệu chứng chính, triệu chứng phụ; Tăng tác dụng của vị thuốc chính; Đưa các vị thuốc chính đến tạng phủ, kinh lạc bị bệnh; Điều hòa

tính năng của các vị thuốc.<sup>111</sup> Lý luận phối ngũ các vị thuốc trong bài thuốc YHCT theo theo Quân, Thân, Tá, Sứ với mục đích tăng cường tác dụng có lợi và khắc chế những tác dụng không mong muốn của từng vị thuốc. Ngoài ra, sự kết hợp nhiều vị thuốc trong một bài thuốc sẽ tạo cho bài thuốc một đặc tính như hài hòa về hàn, nhiệt, ôn, lương phù hợp với bệnh cảnh lâm sàng và từng cơ địa người bệnh.<sup>17,111</sup> Theo lý luận YHCT, dùng thuốc có tính hàn lương kéo dài sẽ làm mất dương khí. Ngược lại, dùng thuốc có tính ôn nhiệt kéo dài sẽ làm tổn hao tân dịch. Theo chiều hướng nào cũng sẽ làm mất cân bằng âm dương, gây bất lợi cho cơ thể. Vì vậy, một bài thuốc, đặc biệt là khi dùng để điều trị bệnh lý cần thời gian lâu dài (như RLLM) nên có tính bình để cơ thể dễ dung nạp và đồng thời hạn chế được các rối loạn do đặc tính quá hàn hoặc quá nhiệt của thuốc gây nên. Viên MIX được bào chế từ công thức kết hợp Ngưu tất 50% - Đan sâm 30% - Tam thất 20%. Dựa vào liều lượng, tác dụng của các thành phần kết hợp, có thể biện giải vai trò của từng vị thuốc trong viên MIX như sau:

**Ngưu tất** có thể xem là **Quân** do chiếm tỷ lệ cao nhất trong công thức (50%), có tác dụng chính là hoạt huyết hóa ứ, thông kinh mạch, bổ can thận.

**Đan sâm** được xem là **Thân** do có tác dụng hoạt huyết thông kinh, thanh tâm lương huyết, hỗ trợ tác dụng hoạt huyết hóa ứ của Ngưu tất.

**Tam thất** được xem là **Tá** vì có tác dụng tán huyết, chỉ huyết, tăng cường tác dụng hoạt huyết hóa ứ thông kinh của Ngưu tất, Đan sâm.

Nếu xem xét về tính thì Ngưu tất có tính bình, Đan sâm có tính hàn, Tam thất có tính ôn. Khi kết hợp với nhau thì Ngưu tất có tỷ lệ cao nhất (50%), tính hàn của Đan sâm sẽ được trung hòa bởi tính ấm của Tam thất, tạo nên đặc điểm chung của công thức kết hợp khá hài hòa (tính bình). Mỗi vị thuốc trong bài thuốc đều có tác dụng riêng, khi xét tác dụng chung của bài thuốc là tổng hợp tác dụng của các thành phần cấu thành. Dựa vào tác dụng dược lý YHCT của Ngưu tất, Đan sâm, Tam thất, khi kết hợp lại với nhau có thể suy luận tác dụng chung của viên MIX là: Hoạt huyết hóa ứ, thông kinh mạch, bổ can thận.

RLLM không có danh từ bệnh học trong YHCT, nhưng theo lý luận RLLM thuộc phạm vi chứng đàm thấp. Đàm thấp là một chứng bệnh có đặc điểm là “Bản hư, tiêu thực”. “Tiêu” là đàm thấp, huyết ứ; “Bản” là chức năng tạng phủ rối loạn hoặc hư suy trong đó liên quan đến các tạng tỳ, thận, phế, can mà đặc biệt là 3 tạng

tỳ, thận, can.<sup>5,50</sup> Vì vậy, khi điều trị cần chú ý phân biệt các biểu hiện thực hư của bệnh. Trị tiêu phải chú ý hóa đàm trừ thấp, hoạt huyết hoá ứ. Trị bản phải chú ý kiện tỳ, bổ can thận. Theo lý luận YHCT: Tỳ chủ vận hóa bao gồm vận hóa thức ăn và thủy dịch, dưới tác dụng vận hóa của tỳ, thủy dịch được chuyển hóa thành tân dịch, lên phế và phân bố toàn thân. Tỳ còn có tác dụng mang thủy dịch dư thừa sau khi các cơ quan tổ chức sử dụng lên phế sau đó xuống thận, dưới tác dụng khí hóa của phế và thận tạo thành mồ hôi, nước tiểu bài tiết ra ngoài. Khi chức năng vận hóa của tỳ bị rối loạn, thủy dịch không thể chuyển hóa hết thành tân dịch, phần còn lại tích tụ trong cơ thể tạo thành đàm thấp.<sup>50</sup> Thận chủ thủy, chức năng chủ trì và điều tiết tân dịch trong cơ thể. Thận dương có tác dụng thúc đẩy quá trình phân bố và bài tiết tân dịch trong cơ thể. Thận dương có tác dụng khí hóa, ôn ấm tỳ dương, từ đó làm cho chức năng vận hóa của tỳ được diễn ra bình thường, thủy dịch trong cơ thể được phân bố toàn thân. Khi thận dương hư, khiến tỳ dương không được ôn ấm, chức năng vận hóa bất thường làm cho sự vận hành thủy dịch trong cơ thể không được thông lợi, ứ trệ lại lâu ngày tạo thành đàm thấp.<sup>50</sup> Can chủ sơ tiết, có tác dụng duy trì khí cơ toàn thân thông suốt, thúc đẩy huyết và tân dịch vận hành. Chức năng này có liên quan mật thiết đến sự vận hóa của tỳ. Khi chức năng sơ tiết của can bị rối loạn làm ảnh hưởng đến chức năng vận hóa của tạng tỳ, khiến cho thủy thấp không được vận hành tích tụ lại mà sinh đàm thấp.<sup>50</sup> Theo lý luận YHCT viên MIX có tác dụng: (1) hoạt huyết hóa ứ làm cho khí huyết lưu thông, kinh mạch thông thoáng sẽ cải thiện các triệu chứng bệnh “Tiêu”; (2) bổ can thận sẽ góp phần giải quyết được gốc của bệnh “Bản”, từ đó sẽ tác động đến đàm thấp, huyết ứ. Ngược lại, khi khí huyết lưu thông, kinh mạch thông thoáng, tân dịch phân bố và vận hành bình thường sẽ không ngưng tụ biến hóa thành đàm thấp. Liên hệ với RLLM có thể giải quyết được nguyên nhân (giảm tổng hợp, giảm hấp thu, tăng chuyển hóa và bài tiết cholesterol) và cải thiện triệu chứng lâm sàng do hậu quả của RLLM (đau đầu, chóng mặt, đau ngực, tê tay chân).

Một số nghiên cứu lâm sàng YHCT cũng đã nhận định rằng: Chứng đàm thấp chiếm tỷ lệ cao nhất trên bệnh nhân được chẩn đoán RLLM và thuốc hóa đàm, hoạt huyết hoá ứ không những cải thiện được triệu chứng lâm sàng của chứng đàm thấp mà còn có hiệu quả trong việc điều hòa RLLM. Nghiên cứu lâm sàng về tác dụng điều trị hội chứng RLLM của viên nang Lipidan, kết quả: Với tác dụng lý khí, hóa

đàm, trừ thấp, viên Lipidan cải thiện được triệu chứng lâm sàng và nồng độ các thành phần lipid máu ở nhóm bệnh thể tỳ hư đàm thấp tốt hơn so với các nhóm bệnh khác.<sup>7</sup> Nghiên cứu tác dụng điều chỉnh lipid máu của viên Thanh mạch an trên bệnh nhân rối loạn chuyển hóa lipid, kết quả: Thể đàm thấp, đàm nhiệt chiếm tỷ lệ cao nhất (53,57%) trên bệnh nhân được chẩn đoán RLLM. Viên Thanh mạch an với tác dụng thanh nhiệt, trừ đàm, hoạt huyết hóa ứ, có tác dụng cải thiện tốt triệu chứng lâm sàng trên nhóm bệnh thể đàm thấp, đàm nhiệt và khí trệ huyết ứ. Đối với nhóm thể bệnh này, khả năng điều chỉnh RLLM tốt hơn so với nhóm các thể bệnh khác.<sup>8</sup>

Theo lý luận YHCT viên MIX có tác dụng hoạt huyết hóa ứ, thông kinh mạch, bổ can thận. Lý luận này phù hợp phép trị RLLM trong YHCT. Kết quả nghiên cứu thực nghiệm đã góp phần chứng minh về mối liên quan giữa cơ sở lý luận của YHCT về sử dụng thuốc hóa đàm trừ thấp, hoạt huyết hóa ứ trong điều trị RLLM là có cơ sở. Tuy nhiên, cần tiếp tục tiến hành các nghiên cứu lâm sàng đánh giá tác dụng điều hòa lipid máu và cải thiện triệu chứng lâm sàng trên từng chứng bệnh cụ thể theo YHCT. Để cung cấp chứng cứ khoa học, từ đó, đưa ra hướng dẫn sử dụng viên MIX phù hợp với chẩn đoán YHCT.

### **Tính mới của đề tài**

Đề tài tiến hành nghiên cứu thuốc điều trị một bệnh lý chiếm tỷ lệ cao trong cộng đồng. Việc điều trị bằng thuốc có nguồn gốc hóa học tổng hợp mang lại hiệu quả, song còn một số bất cập về tác dụng phụ và chi phí điều trị. Vì vậy, việc không ngừng nghiên cứu và phát triển thuốc mới, thuốc có nguồn gốc từ thảo dược hiệu quả và an toàn, chi phí phù hợp vẫn là nhu cầu cần thiết và là hướng nghiên cứu hiện đang được các nhà khoa học trong nước và trên thế giới quan tâm.

Viên MIX là một chế phẩm có nguồn gốc từ thảo dược được bào chế từ công thức kết hợp 3 dược liệu cổ truyền Ngưu tất, Đan sâm, Tam thất, dưới dạng viên nang cứng, mang tính kế thừa, phát triển và hiện đại hóa thuốc YHCT.

Viên MIX được bào chế dưới hỗ trợ trang thiết bị hiện đại, đạt tiêu chuẩn chất lượng cơ sở là một điều kiện đảm bảo cho chế phẩm có chất lượng ổn định. Đây là tiêu chí quan trọng cho những nghiên cứu tiếp theo. Nghiên cứu ứng dụng phương pháp HPLC để định lượng hàm lượng acid oleanolic, acid salvianolic B và ginsenosid Rg1, góp phần đánh giá chất lượng từ nguyên liệu đầu vào đến chế phẩm.

Tác dụng điều hòa lipid máu của viên MIX tương đương với atorvastatin đã góp phần chứng minh được tính ưu việt của sự kết hợp dược liệu để giảm liều dùng, giảm tác dụng phụ mà vẫn duy trì được hiệu quả điều trị. Có thể hiệu lực giảm lipid máu của viên MIX không bằng thuốc hóa học tổng hợp, nhưng với độ an toàn cao. Hy vọng trong tương lai, viên MIX sẽ là một lựa chọn thích hợp cho bệnh nhân có nồng độ các thành phần lipid máu không quá cao, bệnh nhân RLLM có bệnh lý gan, thận đi kèm hoặc có thể kết hợp với thuốc hạ lipid máu khác để tăng đạt mục tiêu điều trị và khắc phục tác dụng bất lợi của thuốc kết hợp.

Hiện nay, không chỉ thầy thuốc Đông y sử dụng thuốc có nguồn gốc thảo dược để phòng và điều trị bệnh, mà cả thầy thuốc Tây y cũng quan tâm ngày càng nhiều. Vì thế, việc chứng minh cơ chế tác dụng theo YHHĐ là vấn đề khó khăn nhất của một nghiên cứu thuốc YHCT. Tuy nhiên, nghiên cứu đã chứng minh được một phần cơ chế tác dụng điều hòa lipid máu của viên MIX thông qua tác động ức chế HMG-CoA reductase giống nhóm thuốc statin, góp phần nâng cao vị thế của thuốc YHCT trong phòng và điều trị RLLM.

RLLM thuộc phạm vi chứng đàm thấp theo theo lý luận YHCT. Viên MIX có tác dụng hoạt huyết hóa ứ, thông kinh mạch, bổ can thận phù hợp với phép trị RLLM trong YHCT. Kết quả của nghiên cứu đã góp phần chứng minh về mối liên quan giữa cơ sở lý luận YHCT về sử dụng thuốc hóa đàm trừ thấp, hoạt huyết hóa ứ trong điều trị RLLM là có cơ sở.

Tổng hợp kết quả nghiên cứu của đề tài, có thể nhận định: (1) viên MIX đạt tiêu chuẩn chất lượng thông qua kết quả kiểm nghiệm; (2) viên MIX an toàn thông qua đánh giá về độc tính cấp và độc tính bán trường diễn; (3) hiệu quả điều hòa lipid máu của viên MIX khá cao thông qua khảo sát tác dụng điều hòa lipid máu; (4) viên MIX có tác động ức chế hoạt tính HMG-CoA reductase thông qua khảo sát tác động ức chế HMG-CoA reductase *in vivo*. Hướng đến với mong muốn sử dụng viên MIX trên các nghiên cứu lâm sàng, nhằm đánh giá tính an toàn và hiệu quả điều hòa RLLM.

## KẾT LUẬN

Qua thời gian nghiên cứu từ tháng 10/2017 đến tháng 10/2021, luận án đã hoàn thành các mục tiêu đã đề ra như sau:

### 1. Bào chế và xây dựng tiêu chuẩn cơ sở viên MIX

- Viên nang cứng Ngưu tất - Đan sâm - Tam (viên MIX) hàm lượng 430 mg (350 mg cao khô dược liệu và tá dược vừa đủ 430 mg).
- Viên MIX đạt yêu cầu chất lượng tiêu chuẩn cơ sở, thời gian sử dụng 24 tháng.

### 2. Đánh giá tính an toàn của viên MIX trên chuột nhắt trắng

- Viên MIX liều 32 viên/kg không thể hiện độc tính cấp.
- Viên MIX liều 4 viên/kg/ngày trong 2 tháng không thể hiện độc tính bán trường diễn.

### 3. Khảo sát tác dụng điều hòa lipid máu của viên MIX trên chuột nhắt trắng

- Trên mô hình gây RLLM máu nội sinh bằng tyloxapol: Viên MIX liều 1 viên/kg/ngày trong 7 ngày thể hiện tác dụng giảm TC, LDL-C, TG; Viên MIX liều 2 viên/kg/ngày trong 7 ngày thể hiện tác dụng giảm TC, LDL-C, TG và tăng HDL-C tương đương với atorvastatin liều 60 mg/kg.
- Trên mô hình gây RLLM ngoại sinh bằng chế độ ăn giàu lipid: Viên MIX liều 1 viên và 2 viên/kg/ngày trong 6 tuần đều thể hiện tác dụng giảm TC, LDL-C tương đương với atorvastatin liều 10 mg/kg.

### 4. Khảo sát tác động ức chế hoạt tính HMG-CoA reductase của viên MIX

#### *in vitro* và *in vivo*

- Viên MIX ở nồng độ 8000  $\mu\text{g/mL}$  chưa thể hiện tác động ức chế hoạt tính HMG-CoA reductase *in vitro*.
- Viên MIX liều 1 viên và 2 viên/kg/ngày trong 7 ngày đều thể hiện tác động ức chế hoạt tính HMG-CoA reductase tương đương với atorvastatin liều 60 mg/kg *in vivo*.

## **KIẾN NGHỊ**

Các kết quả đạt được của đề tài là cơ sở khoa học để thực hiện các hướng nghiên cứu tiếp theo, nhằm có thêm dữ liệu tiền lâm sàng cần thiết trước khi tiến hành thử nghiệm lâm sàng, một số kiến nghị như sau:

1. Khảo sát tác dụng điều hòa lipid máu khi kết hợp viên MIX với atorvastatin trên thực nghiệm.
2. Khảo sát tác dụng điều hòa lipid máu khi kết hợp viên MIX với ezetimibe trên thực nghiệm.

## **DANH MỤC BÀI BÁO ĐÃ CÔNG BỐ LIÊN QUAN ĐẾN LUẬN ÁN**

1. Nguyễn Thanh Tuấn, Nguyễn Thị Sơn, Trần Kim Trang. Khảo sát tính an toàn của viên nang cứng Nguru tất - Đan sâm - Tam thất trên thực nghiệm. *Tạp chí Y học Tp. HCM*. 2019; 23(4):250-255.
2. Nguyễn Thanh Tuấn, Nguyễn Thị Sơn, Trần Kim Trang. Tác dụng điều hòa lipid máu của viên nang cứng Nguru tất - Đan sâm - Tam thất trên mô hình gây tăng lipid máu bằng tyloxapol (Triton WR-1339). *Tạp chí Y học Tp. HCM*. 2019; 23(4):256-260.

## TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Mach F, Baigent C, Catapano AL, et al; ESC Scientific Document Group. 2019 ESC/EAS Guidelines for the management of dyslipidaemias: Lipid modification to reduce cardiovascular risk. *Eur Heart J*. 2020 Jan 1;41(1):111-188. doi: 10.1093/eurheartj/ehz455.
2. Reiter-Brennan C, Osei AD, Iftekhar Uddin SM, et al. ACC/AHA lipid guidelines: Personalized care to prevent cardiovascular disease. *Cleve Clin J Med*. 2020 Apr;87(4):231-239. doi: 10.3949/ccjm.87a.19078.
3. Hội Tim mạch học Quốc gia Việt Nam. *Khuyến cáo về chẩn đoán và điều trị rối loạn Lipid 2015*:3-17.
4. Pappan N, Awosika AO, Rehman A. *Dyslipidemia*. 2024 Mar 4. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2024 Jan. PMID: 32809726.
5. Bộ Y tế. *Hướng dẫn chẩn đoán và điều trị bệnh theo Y học cổ truyền kết hợp Y học cổ truyền và Y học hiện đại*. 1. 2020:51-58.
6. Nguyễn Thị Sơn, Nguyễn thị Bay. Nghiên cứu tác dụng của trà Hạ mỡ Ngưu tất trên bệnh nhân rối loạn lipid máu. *Tạp chí Y học Thành phố Hồ Chí Minh*. 2007; 11(2):71-75.
7. Đỗ Quốc Hương. *Nghiên cứu độc tính và hiệu quả của viên nang Lipidan trong điều trị hội chứng rối loạn lipid máu*. Luận án tiến sĩ Y học. Trường Đại học Y Hà Nội.2016:92-122.
8. Hà Thị Hồng Linh. *Tác dụng điều chỉnh lipid máu của viên nang Thanh mạch an*. Luận văn chuyên khoa cấp 2 Y học cổ truyền. Đại Học Y Dược TP.HCM.2015:92-102.
9. Mai Thế Trạch, Nguyễn Thy Khuê. Rối loạn chuyển hóa lipid. *Nội tiết học đại cương*. Nhà xuất bản Y học; 2007:457-502.
10. Alsheikh-Ali AA, Maddukuri PV, Han H, Karas RH. Effect of the magnitude of lipid lowering on risk of elevated liver enzymes, rhabdomyolysis, and cancer:

- Insights from large randomized statin trials. *J Am Coll Cardiol.* 2007 Jul 31;50(5):409-18. doi: 10.1016/j.jacc.2007.02.073.
11. Bruckert E, Hayem G, Dejager S, et al. Mild to moderate muscular symptoms with high-dosage statin therapy in hyperlipidemic patients-the PRIMO study. *Cardiovascular Drugs and Therapy.* 2005; 19(6): 403-14. doi: 10.1007/s10557-005-5686-z.
  12. Harper CR, Jacobson TA. The broad spectrum of statin myopathy: From myalgia to rhabdomyolysis. *Curr Opin Lipidol.* 2007 Aug;18(4):401-8. doi: 10.1097/MOL.0b013e32825a6773.
  13. Szadkowska I, Stanczyk A, Aronow WS, et al. Statin therapy in the elderly: A review. *Arch Gerontol Geriatr.* 2010 Jan-Feb; 50(1):114-8. doi: 10.1016/j.archger.2008.12.012.
  14. Langsjoen PH, Langsjoen JO, Langsjoen AM, Lucas LA. Treatment of statin adverse effects with supplemental Coenzyme Q10 and statin drug discontinuation. *Biofactors.* 2005; 25(1-4):147-52. doi: 10.1002/biof.5520250116.
  15. Preiss D, Sattar N. Statins and the risk of new-onset diabetes: A review of recent evidence. *Curr Opin Lipidol.* 2011 Dec; 22(6):460-6. doi: 10.1097/MOL.0b013e32834b4994.
  16. Ballantyne CM, Houri J, Notarbartolo A, et al. Effect of ezetimibe coadministered with atorvastatin in 628 patients with primary hypercholesterolemia: A prospective, randomized, double-blind trial. *Circulation.* 2003 May 20; 107(19):2409-15. doi: 10.1161/01.CIR.0000068312.21969.C8.
  17. Sham TT, Chan CO, Wang YH, et al. A review on the traditional Chinese medicinal herbs and formulae with hypolipidemic effect. *Biomed Res Int.* 2014; 2014:925302. doi: 10.1155/2014/925302.
  18. Bộ Y tế. *Dược điển Việt Nam V.* Nhà xuất bản Y học; 2017.
  19. *Từ điển Bách Khoa Dược Học.* Nhà xuất bản Từ điển Bách khoa Hà Nội; 1999:206;436-437;588-589.

20. Đoàn Thị Nhu, Nguyễn Quang Hoan, Quách Mai Loan và cộng sự. Nghiên cứu dược lý cây Nguru tất về tác dụng hạ cholesterol máu và hạ huyết áp. *Dược học*. 1988; 1:11-13.
21. Đoàn Thị Nhu, Phạm Kim Mãn, Nguyễn Kim Phụng. Nghiên cứu tác dụng hạ cholesterol máu của chế phẩm Bidentin bào chế từ rễ Nguru tất. *Thông báo dược liệu*. 1991; 23(3-4):48-50.
22. He X, Wang X, Fang J, et al. The genus *Achyranthes*: A review on traditional uses, phytochemistry, and pharmacological activities. *J Ethnopharmacol*. 2017 May 5; 203:260-278. doi: 10.1016/j.jep.2017.03.035.
23. Latha BP, Reddy IRM, Vijaya T, et al. Effect of saponin rich extract of *Achyranthes aspera* on high fat diet fed male wistar rats. *Journal of Pharmacy Research*. 2011; 4:3190-3193.
24. Oh SD, Kim M, Min BI, et al. Effect of *Achyranthes bidentata* Blume on 3T3-L1 Adipogenesis and rats fed with a high-fat diet. *Evid Based Complement Alternat Med*. 2014; 2014:158018. doi: 10.1155/2014/158018.
25. Lim C, Lim S, Lee B, Kim B, Cho S. Effect of methanol extract of *Salvia miltiorrhizae* Radix in high-fat diet-induced hyperlipidemic mice. *Chin Med*. 2017 Oct 13; 12:29. doi: 10.1186/s13020-017-0150-0.
26. Ji W, Gong BQ. Hypolipidemic activity and mechanism of purified herbal extract of *Salvia miltiorrhiza* in hyperlipidemic rats. *J Ethnopharmacol*. 2008 Sep 26; 119(2):291-8. doi: 10.1016/j.jep.2008.07.013.
27. Lin XH, Xu WR, Liu P, et al. The hyperlipidemic study of dihydrotanshinone I. *Zhong Cao Yao*. 2008; 39:1378-1380.
28. Cicero AF, Vitale G, Savino G, Arletti R. *Panax notoginseng* (Burk.) effects on fibrinogen and lipid plasma level in rats fed on a high-fat diet. *Phytother Res*. 2003 Feb; 17(2):174-8. doi: 10.1002/ptr.1262.
29. Ji W, Gong BQ. Hypolipidemic effects and mechanisms of *Panax notoginseng* on lipid profile in hyperlipidemic rats. *J Ethnopharmacol*. 2007 Sep 5; 113(2):318-24. doi: 10.1016/j.jep.2007.06.022.

30. Lu T, Mao C, Zhang L, Xu W. The research on analgesic and anti-inflammatory action of different processed products of *Achyranthes bidentata*. *Zhong Yao Cai*. 1997 Oct; 20(10):507-9.
31. Tie R, Ji L, Nan Y, et al. *Achyranthes bidentata* polypeptides reduces oxidative stress and exerts protective effects against myocardial ischemic/reperfusion injury in rats. *Int J Mol Sci*. 2013 Sep 30; 14(10):19792-804. doi: 10.3390/ijms141019792.
32. Li ZM, Xu SW, Liu PQ. *Salvia miltiorrhiza* Burge (Danshen): A golden herbal medicine in cardiovascular therapeutics. *Acta Pharmacol Sin*. 2018 May; 39(5):802-824. doi: 10.1038/aps.2017.193.
33. Wang T, Guo R, Zhou G, et al. Traditional uses, botany, phytochemistry, pharmacology and toxicology of *Panax notoginseng* (Burk.) F.H. Chen: A review. *J Ethnopharmacol*. 2016 Jul 21; 188:234-58. doi: 10.1016/j.jep.2016.05.005.
34. Duan L, Xiong X, Hu J, Liu Y, Li J, Wang J. *Panax notoginseng* saponins for treating coronary artery disease: A functional and mechanistic overview. *Front Pharmacol*. 2017 Oct 17; 8:702. doi: 10.3389/fphar.2017.00702.
35. Xia W, Sun C, Zhao Y, Wu L. Hypolipidemic and antioxidant activities of sanchi (*Radix notoginseng*) in rats fed with a high fat diet. *Phytomedicine*. 2011 Apr 15; 18(6):516-20. doi: 10.1016/j.phymed.2010.09.007.
36. Li S, Wan L. Experimental study on the preventive mechanism of *Radix Salvia miltiorrhiza* against atherosclerosis in rabbits' models. *J Huazhong Univ Sci Technolog Med Sci*. 2004; 24(3): 233-5. doi: 10.1007/BF02831998.
37. Horie Y, Kikuchi M, Yamagishi Y et al. Effect of a herbal medicine on fatty liver in rats fed ethanol chronically. *Nihon Arukoru Yakubutsu Igakkai Zasshi*. 2009; 44(6):636-48.
38. Ng TB. Pharmacological activity of sanchi ginseng (*Panax notoginseng*). *J Pharm Pharmacol*. 2006 Aug; 58(8):1007-19. doi: 10.1211/jpp.58.8.0001.
39. Komatsu K, Tanaka H, Nakagawa D, Kawashima K. Effect of notoginseng extracts and their components on lipopolysaccharide and galactosamine mixture-induced

- impaired hepatic function in mice. *Yakugaku Zasshi*. 2012; 132(7):831-6. Japanese. doi: 10.1248/yakushi.132.831.
40. Jiang QF, Huang MY, Wu KY, et al. Intervention effects of atorvastatin combined with *Panax notoginseng* saponins on rats with atherosclerosis complicated with hepatic injury. *Pharmacogn Mag*. 2017 Jul-Sep; 13(51):430-438. doi: 10.4103/pm.pm-424-16.
41. Nguyễn Thanh Tuấn, Nguyễn Phương Dung. Nghiên cứu tác dụng hạ cholesterol máu của cao chiết Ngưu tất - Đan sâm - Tam thất trên chuột nhắt trắng. *Tạp chí Y học Thành phố Hồ Chí Minh*. 2012; 16(1):150-156.
42. Feingold KR. Introduction to lipids and lipoproteins. 2021 Jan 19. In: Feingold KR, Anawalt B, Blackman MR, et al. Endotext [Internet]. South Dartmouth (MA): MDText.com, Inc.; 2000.
43. Gesto DS, Pereira CMS, Cerqueira NMFS, Sousa SF. An atomic-level perspective of HMG-CoA reductase: The target enzyme to treat hypercholesterolemia. *Molecules*. 2020 Aug 26; 25(17):3891. doi: 10.3390/molecules25173891.
44. Jo Y, Debose-Boyd RA. Control of cholesterol synthesis through regulated ER-associated degradation of HMG-CoA reductase. *Crit Rev Biochem Mol Biol*. 2010 Jun; 45(3):185-98. doi: 10.3109/10409238.2010.485605.
45. Phạm Đình Lữ. Chuyển hóa lipid. *Sinh lý học Y Khoa*. Nhà xuất bản Y học; 2008:30-43.
46. Phạm Hoàng Phiệt. Rối loạn chuyển hóa lipid. *Miễn dịch - Sinh lý bệnh*. Nhà xuất bản Y học; 2004:145-156.
47. Hồ Huỳnh Quang Trí, Phạm Nguyễn Vinh. Dịch tễ, bệnh sinh và yếu tố nguy cơ của xơ vữa động mạch. *Bệnh học tim mạch*. Nhà xuất bản Y học; 2006:67-76.
48. Singh RB, Mengi SA, Xu YJ, Arneja AS, Dhalla NS. Pathogenesis of atherosclerosis: A multifactorial process. *Exp Clin Cardiol*. 2002; 7(1):40-53.
49. Feingold KR. Cholesterol lowering drugs. 2021 Mar 30. In: Feingold KR, Anawalt B, Blackman MR, et al. Endotext [Internet]. South Dartmouth (MA): MDText.com, Inc.; 2000.

50. Bộ Y tế. *Lão khoa Y học cổ truyền*. Nhà xuất bản giáo dục Việt Nam; 2009:107-116.
51. Trần Thúy. *Nội khoa Y học cổ truyền*. 4. Nhà xuất bản Y học; 2006:5-41.
52. Hải Thượng Lãn Ông-Lê Hữu Trác. *Hải thượng Y tông tâm lĩnh*. 1(1-2). Nhà xuất bản Y học; 2005:216-240;25.
53. Nguyễn Thị Bay. *Bệnh học và điều trị nội khoa (Kết hợp Đông - Tây y)*. Nhà xuất bản Y học; 2007:53-60;367-379.
54. Guo M, Liu Y, Gao ZY, Shi DZ. Chinese herbal medicine on dyslipidemia: Progress and perspective. *Evid Based Complement Alternat Med*. 2014; 2014:163036. doi: 10.1155/2014/163036.
55. Nguyễn Thùy Hương. Nghiên cứu tác dụng của viên nén Hạ mỡ trong điều trị hội chứng rối loạn lipid máu. *Tạp chí Y học Thực hành*. 2013; 10(884):101-104.
56. Nguyễn Văn Ánh. Nghiên cứu tác dụng điều trị rối loạn lipid máu của viên cholestin. *Hội nghị toàn quốc về Y học cổ truyền*; 2007:98-102.
57. Viện Dược liệu. *Phương pháp nghiên cứu tác dụng dược lý của thuốc từ dược thảo*. Nhà xuất bản Khoa học và Kỹ thuật; 2006:131-138;355-367;377-378.
58. Goldfarb S. Rapid increase in hepatic HMG CoA reductase activity and *in vivo* cholesterol synthesis after Triton WR 1339 injection. *J Lipid Res*. 1978 May;19(4):489-94.
59. Patel HD, Shah GB, Trivedi V. Investigation of HMG- CoA reductase inhibitory activity of antihyperlipidemic herbal drugs *in vitro* study. *Asian Journal of Experimental Biological Sciences*. 2011; 2(1):63-68.
60. Han JS, Sung JH, Lee SK. Inhibition of cholesterol synthesis in HepG2 cells by GINST-decreasing HMG-CoA reductase expression via AMP-activated protein kinase. *J Food Sci*. 2017 Nov; 82(11):2700-2705. doi: 10.1111/1750-3841.13828.
61. Hainida E, Ismail A, Hashim N, et al. Effects of defatted dried roselle (*Hibiscus sabdariffa* L.) seed powder on lipid profiles of hypercholesterolemia rats. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 2008 ; 88 :1043-1050.

62. Nassiri-Asl M, Zamansoltani F, Abbasi E, Daneshi MM, Zangivand AA. Effects of *Urtica dioica* extract on lipid profile in hypercholesterolemic rats. *Zhong Xi Yi Jie He Xue Bao*. 2009 May; 7(5):428-33. doi: 10.3736/jcim20090506.
63. Rasouli M, Tahmouri H, Mosavi-Mehr M. The long term kinetic of plasma lipids and lipoproteins in tyloxapol injected rats. *J Clin Diagn Res*. 2016 Jun; 10(6):BF01-5. doi: 10.7860/JCDR/2016/18890.7993.
64. Zeniya M, Reuben A. Triton WR-1339-induced changes in serum lipids and biliary lipid secretion. *Am J Physiol*. 1988 Mar; 254(3 Pt 1): G346-54. doi: 10.1152/ajpgi.1988.254.3.
65. Chen J, Li X. Hypolipidemic effect of flavonoids from mulberry leaves in triton WR-1339 induced hyperlipidemic mice. *Asia Pac J Clin Nutr*. 2007; 16 Suppl 1:290-4.
66. Bertges L.C., Mourão CA Jr, Souza J.B., Cardoso V.A.C. Hyperlipidemia induced by Triton WR-1339 (tyloxapol) in Wistar rats. *Rev. Bras. Cien. Med. Saúde*. 2011;1(1):32-34.
67. Ibrahim AY, Hendawy SF, Elsayed AA, Omer EA. Evaluation of hypolipidemic *Marrubium vulgare* effect in Triton WR-1339-induced hyperlipidemia in mice. *Asian Pac J Trop Med*. 2016 May; 9(5):453-9. doi: 10.1016/j.apjtm.2016.03.038.
68. Ma J, Li Y, Ye Q, et al. Constituents of red yeast rice, a traditional Chinese food and medicine. *J Agric Food Chem*. 2000 Nov; 48(11):5220-5. doi: 10.1021/jf000338c.
69. Dan H, Wu J, Peng M, et al. Hypolipidemic effects of *Alismatis rhizome* on lipid profile in mice fed high-fat diet. *Saudi Med J*. 2011 Jul; 32(7):701-7.
70. Karu N, Reifen R, Kerem Z. Weight gain reduction in mice fed *Panax ginseng saponin*, a pancreatic lipase inhibitor. *J Agric Food Chem*. 2007 Apr 18; 55(8):2824-8. doi: 10.1021/jf0628025.
71. Gai W, Zhang Y-L, Ai L, Qiao Y-J. Screening of HMG- CoA reductase inhibitors from composite *Salvia miltiorrhiza* using autodock. *Chinese Journal of Natural Medicines*. 2010; 8(1):51-56.

72. Liu Q, Liu SN, Li LY, et al. A dyslipidemia animal model induced by poloxamer 407 in golden hamsters and pilot study on the mechanism. *Yao Xue Xue Bao*. 2011; 46(4):406-11.
73. Jiang Z, Qian J, Dong H, et al. The traditional Chinese medicine *Achyranthes bidentata* and our de novo conception of its metastatic chemoprevention: From phytochemistry to pharmacology. *Sci Rep*. 2017 Jun 20;7(1):3888. doi: 10.1038/s41598-017-02054-y.
74. Li J.X, Hareyama T, Tezuka Y, et al. Five new acid oleanolic glycosids from *Achyranthes bidentata* with inhibitory activity on osteoclast formation. *Planta Med*. 2005; 71(7): 673-9. doi: 10.1055/s-2005-871275.
75. Li X, Zhao W.T, Meng D.L, Qiao A.M. A new phytosteron from the roots of *Achyranthes bidentata*. *Fitoterapia*. 2007; 78(7-8): 607-8. doi: 10.1016/j.fitote.2007.04.002.
76. Mitaine-Offer AC, Marouf A, Hanquet B, Birlirakis N, Lacaille-Dubois MA. Two triterpene saponins from *Achyranthes bidentata*. *Chem Pharm Bull (Tokyo)*. 2001 Nov; 49(11):1492-4. doi: 10.1248/cpb.49.1492.
77. Wang Q, Yang L, Jiang H, et al. Three new phytoecdysteroids containing a furan ring from the roots of *Achyranthes bidentata* B1. *Molecules*. 2011; 16(7): 5989-97. doi: 10.3390/molecules16075989.
78. Wang T, Cui SY, Suo YR, Lu RH. Studies on water soluble chemical constituents in root of *Achyranthes bidentata*. *Zhongguo Zhong Yao Za Zhi*. 2004; 29(7):649-52.
79. Kiuchi F. Saponin constituents of *Achyranthes* root. *J Nat Med*. 2022 Mar; 76(2):343-351. doi: 10.1007/s11418-021-01591-1.
80. Shen H, Wu X, Zhu Y, Sun H. Intravenous administration of *Achyranthes bidentata* polypeptides supports recovery from experimental ischemic stroke *in vivo*. *PLoS One*. 2013; 8(2): e57055. doi: 10.1371/journal.pone.0057055.

81. Xiang DB, Li XY. Antitumor activity and immuno-potentiating actions of *Achyranthes bidentata* polysaccharides. *Zhongguo Yao Li Xue Bao*. 1993; 14(6):556-61.
82. Zhou L, Zuo Z, Chow MS. Danshen: An overview of its chemistry, pharmacology, pharmacokinetics, and clinical use. *J Clin Pharmacol*. 2005 Dec; 45(12):1345-59. doi: 10.1177/0091270005282630.
83. Wu Y, Xu S, Tian XY. The effect of salvianolic acid on vascular protection and possible mechanisms. *Oxid Med Cell Longev*. 2020 Sep 25; 2020:5472096. doi: 10.1155/2020/5472096.
84. Wu GB, Zhou EX, Qing DX. Tanshinone II A elicited vasodilation in rat coronary arteriole: roles of nitric oxide and potassium channels. *Eur J Pharmacol*. 2009 Sep 1; 617(1-3):102-7. doi: 10.1016/j.ejphar.2009.06.046.
85. Kang DG, Yun YG, Ryoo JH, et al. Anti-hypertensive effect of water extract of danshen on renovascular hypertension through inhibition of the renin angiotensin system. *Am J Chin Med*. 2002; 30(1): 87-93. doi: 10.1142/S0192415X02000107.
86. Huang MQ, Xie YL, Chen LD, et al. Antidiabetic effect of the total polyphenolic acids fraction from *Salvia miltiorrhiza* Bunge in diabetic rats. *Phytother Res*. 2012; 26(6): 944-8. doi: 10.1002/ptr.3654.
87. Kuang P, Tao Y, Tian Y. *Radix Salvia miltiorrhiza* treatment results in decreased lipid peroxidation in reperfusion injury. *J Tradit Chin Med*. 1996; 16(2):138-42.
88. Li DC, Bao XQ, Sun H, et al. Research progress in the study of protective effect of tanshinone IIA on cerebral ischemic stroke. *Yao Xue Xue Bao*. 2015; 50(6):635-9.
89. Yang W, Ju JH, Jeon MJ, et al. Danshen (*Salvia miltiorrhiza*) extract inhibits proliferation of breast cancer cells via modulation of Akt activity and p27 level. *Phytother Res*. 2010; 24(2): 198-204. doi: 10.1002/ptr.2945.
90. Gao Y, Liu Z, Li G et al. Acute and subchronic toxicity of danshensu in mice and rats. *Toxicol Mech Methods*. 2009; 19(5): 363-8. doi: 10.1080/15376510902810672.

91. Nguyễn Hữu Tùng. Nghiên cứu thành phần saponin và điều chế phức saponin phytosome của củ cây Tam thất (*Panax notoginseng*) trồng ở Tây Bắc Việt Nam. *Tạp chí Khoa học Đại học Quốc gia Hà Nội - Khoa học Y Dược*. 2016; 32(1):1-7.
92. Xu Q, Zhao Y, Cheng GH. Blood-lipid decreasing action of total saponins of *Panax notoginseng* (Burk.) F.H. Chen. *Zhongguo Zhong Yao Za Zhi*. 1993; 18(6):367-8, 383.
93. Joo IW, Ryu JH, Oh HJ. The influence of Sam-Chil-Geun (*Panax notoginseng*) on the serum lipid levels and inflammations of rats with hyperlipidemia induced by poloxamer-407. *Yonsei Med J*. 2010; 51(4): 504-10.doi: 10.3349/ymj.2010.51.4.504.
94. Hou Y, Gu D, Peng J, et al. Ginsenoside Rg1 regulates liver lipid factor metabolism in NAFLD model rats. *ACS Omega*. 2020 May 5; 5(19):10878-10890. doi: 10.1021/acsomega.0c00529.
95. Pan C, Huo Y, An X, et al. *Panax notoginseng* and its components decreased hypertension via stimulation of endothelial-dependent vessel dilatation. *Vascul Pharmacol*. 2012; 56(3-4): 150-8.doi: 10.1016/j.vph.2011.12.006.
96. Zhu D, Wu L, Li CR, et al. Ginsenosid Rg1 protects rat cardiomyocyte from hypoxia/reoxygenation oxidative injury via antioxidant and intracellular calcium homeostasis. *Journal of Cellular Biochemistry*. 2009; 108(1): 117-24.doi: 10.1002/jcb.22233.
97. Wang MM, Xue M, Xu YG, et al. *Panax notoginseng* saponin is superior to aspirin in inhibiting platelet adhesion to injured endothelial cells through COX pathway *in vitro*. *Thromb Res*. 2016 May; 141:146-52. doi: 10.1016/j.thromres.2016.03.022.
98. Zhang YG, Zhang HG, Zhang GY, et al. *Panax notoginseng* saponins attenuate atherosclerosis in rats by regulating the blood lipid profile and an anti-inflammatory action. *Clin Exp Pharmacol Physiol*. 2008 Oct; 35(10):1238-44. doi: 10.1111/j.1440-1681.2008.04997.

99. Wang J, Hu JH. Inhibitory effect of *Panax notoginseng* on the VSMC proliferation induced by hyperlipidemia serum. *Zhongguo Zhong Yao Za Zhi*. 2006 Apr; 31(7):588-90.
100. Wu L, Zhang W, Tang YH, et al. Effect of total saponins of *Panax notoginseng* root on aortic intimal hyperplasia and the expressions of cell cycle protein and extracellular matrix in rats. *Phytomedicine*. 2010 Mar;17(3-4):233-40. doi: 10.1016/j.phymed.2009.07.021.
101. Chen S, Liu J, Liu X, et al. *Panax notoginseng* saponins inhibit ischemia induced apoptosis by activating PI3K/Akt pathway in cardiomyocytes. *J Ethnopharmacol*. 2011; 137(1): 263-70.doi: 10.1016/j.jep.2011.05.011.
102. Yang CY, Xie ZG, Cheng WB, et al. Effect of *Panax notoginseng* on anti-hyperglycemic, anti-obese and prevention from kidney pathological in KK-Any mice. *Zhong Yao Cai*. 2009; 32(10):1571-6.
103. Yang CY, Wang J, Zhao Y. et al. Anti-diabetic effects of *Panax notoginseng* saponins and its major anti-hyperglycemic components. *J Ethnopharmacol*. 2010; 130(2): 231-6.doi: 10.1016/j.jep.2010.04.039.
104. Peng SL, Guo ZA. Effect of total saponins of *Panax notoginseng* on urinary albumin in patients with chronic renal failure. *Zhongguo Wei Zhong Bing Ji Jiu Yi Xue*. 2010; 22(12):744-6.
105. Wang CZ, Xie JT, Zhang B, et al. Chemopreventive effects of *Panax notoginseng* and its major constituents on SW480 human colorectal cancer cells. *Int J Oncol*. 2007; 31(5):1149-56.
106. Wajima T, Kinugawa R, Yamada T, et al. *Panax notoginseng* extract possesses significant antibacterial activity against pathogenic *Streptococci*. *Pharmacology*. 2019; 103(5-6): 221-227.doi: 10.1159/000496830.
107. Jin LQ, Zheng zj, Peng Y et al. Opposite effects on tumor growth depending on dose of *Achyranthes bidentata* polysaccharides in C57BL/6 mice. *Int Immunopharmacol*. 2007; 7(5): 568-77.doi: 10.1016/j.intimp.2006.12.009.

108. Huang J, Zhang J, Bai J, et al. LC-MS/MS determination and interaction of the main components from the traditional Chinese drug pair Danshen-Sanqi based on rat intestinal absorption. *Biomedical Chromatography*. 2016; 30(12): 1928-1934.doi: 10.1002/bmc.3768.
109. Wei JB, Jiao G, Hai YW, et al. Lipid-regulating effect of traditional Chinese medicine: Mechanisms of actions. *Evid Based Complement Alternat Med*. 2012; 2012: 970635.doi: 10.1155/2012/970635.
110. Lin YN, Chang HY, Wang CCN, et al. Oleanolic acid inhibits liver X receptor alpha and pregnane X receptor to attenuate ligand induced lipogenesis. *J Agric Food Chem*. 2018; 66(42):10964-10976doi: 10.1021/acs.jafc.8b03372.
111. Phan Quan Chí Hiếu. *Bệnh học và điều trị Đông y*. Nhà xuất bản Y học; 2007:246-254.
112. Phạm Xuân Sinh. *Dược học cổ truyền*. 1. Nhà xuất bản Y học; 2002:253-240.
113. World Health Organization. General guidelines for methodologies on research and evaluation of traditional medicine. 2000:28-31.
114. Đỗ Trung Đàm. *Phương pháp xác định độc tính của thuốc*, Nhà xuất bản Y học; 2014:11-157.
115. Bộ Y tế. *Hướng dẫn thử nghiệm tiền lâm sàng và lâm sàng thuốc đông y, thuốc từ dược liệu*. Ban hành kèm theo Quyết định số 141/QĐ-K2ĐT ngày 27 tháng 10 năm 2015 của Cục trưởng Cục Khoa học Công nghệ và Đào tạo. 2015.
116. Trương Đình Phước, Trần Thị Thiên Thanh, Huỳnh Ngọc Trinh, Trần Mạnh Hùng. Mô phỏng mô hình thử tác động ức chế HMG- CoA reductase từ nguồn gan chuột nhắt. *Tạp chí Y học Thành phố Hồ Chí Minh*. 2018; 22(1):340-347.
117. Pradhan N, Gavali J, Waghmare N. WHO Guidelines for standardization of herbal drugs. *International Ayurvedic Medical Journal*. 2015; 3:2238-2243.

118. Negi JS, Singh P, Pant GJ, Rawat MS. High-performance liquid chromatography analysis of plant saponins: An update 2005-2010. *Pharmacogn Rev.* 2011 Jul; 5(10):155-8. doi: 10.4103/0973-7847.91109.
119. Cheok CY, Salman HAK, Sulaiman R. Extraction and quantification of saponins: A review. *Food Res Int.* 2014; 59:16-40.
120. Dương Hồng Tố Quyên. *Nghiên cứu tiêu chuẩn hóa và đánh giá một số tác dụng sinh học của Sâm Việt Nam (Panax vietnamensis Ha et Grushv., Araliaceae)*”. Luận án Tiến sĩ Dược học. Đại học Y Dược TP. HCM.2019:43.
121. Nguyễn Quang Tuyền. *Nghiên cứu chiết tách một số hoạt chất trong củ Tam thất trồng ở Sapa, Việt Nam và khả năng ứng dụng trong công nghệ thực phẩm.* Luận án tiến sĩ Công nghệ thực phẩm. Trường Đại học Bách khoa Hà Nội.2017: 82-115.
122. Efferth T, Kaina B. Toxicities by herbal medicines with emphasis to traditional Chinese medicine. *Curr Drug Metab.* 2011; 12(10): 989-96.doi: 10.2174/138920011798062328.
123. Bansal A, Chhabra V, Rawal RK, et al. Chemometrics: A new scenario in herbal drug standardization. *J Pharm Anal.* 2014; 4(4): 223-233.doi: 10.1016/j.jpha.2013.12.001.
124. Ayeleso TB, Matumba MG, Mukwevho E. Oleanolic acid and its derivatives: Biological activities and therapeutic potential in chronic diseases. *Molecules.* 2017; 22(11): 1915.doi: 10.3390/molecules22111915.
125. Liu J. Pharmacology of acid oleanolic and acid ursolic. *J Ethnopharmacol.* 1995; 49(2): 57-68.doi: 10.1016/0378-8741(95)90032-2.
126. Christensen LP. Ginsenosids: Chemistry, biosynthesis, analysis and, potential health effects. *Adv Food Nutr Res.* 2009; 55: 1-99.doi: 10.1016/S1043-4526(08)00401-4.
127. Jiang Y, David B, Tu P. Recent analytical approaches in quality control of traditional Chinese medicines: A review. *Anal Chim Acta.* 2010; 657(1): 9-18.doi: 10.1016/j.aca.2009.10.024.

128. Fuzzati N. Analysis methods of ginsenosids. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.* 2004; 812(1-2): 119-33.doi: 10.1016 /j.jchromb.2004.07.039.
129. Gad HA, El-Ahmady SH, Abou-Shoer MI, et al. Application of chemometrics in authentication of herbal medicine: A review. *Phytochem Anal,* 2013; 24(1): 1-24.doi: 10.1002/pca.2378.
130. Xu C, Wang W, Wang B, et al. Analytical methods and biological activities of *Panax notoginseng* saponins: Recent trends. *J Ethnopharmacol.* 2019 May 23; 236:443-465. doi: 10.1016/j.jep.2019.02.035.
131. Luật Dược. Luật số: 105/2016/QH13 của Quốc hội nước CHXH Chủ nghĩa Việt Nam ban hành ngày 06 tháng 4 năm 2016, có hiệu lực từ ngày 01 tháng 01 năm 2017.
132. Zhao Q, Yang M, Deng Y, et al. The safety evaluation of salvianolic acid B and ginsenosid Rg1 combination on mice. *Int J Mol Sci.* 2015 Dec 9; 16(12):29345-56. doi: 10.3390/ijms161226176.
133. Nguyễn Đình Giậu, Nguyễn Chi Mai, Trần Thị Việt Hồng. *Sinh lý học người và động vật.* Nhà xuất bản Đại học Quốc gia TP. HCM; 2000.
134. Jacoby RO, Fox JG, Davisson M. Biology and diseases of mice. *Laboratory Animal Medicine.* 2002:35-120. doi: 10.1016/B978-012263951-7/50006-5.
135. Vũ Đình Vinh. *Hướng dẫn sử dụng các xét nghiệm sinh hoá.* Nhà xuất bản Y học; 2001.
136. Trần Mỹ Tiên, Chung Thị Mỹ Duyên, Nguyễn Thị Thu Hương. Khảo sát tác dụng hạ lipid máu của viên nang Thanh mạch an (chế phẩm phối hợp Chè đắng, Giảo cổ lam, Ngưu tất, Hoa hòe, Nghệ) trên thực nghiệm. *Tạp chí Y học Thành phố Hồ Chí Minh.* 2015; 19(5):182-190.
137. Chapman MJ. Animal lipoproteins: chemistry, structure and comparative aspects. *J Lipid Res.* 1980; 21(7):789-853.

138. Loginova VM, Tuzikov FV, Tuzikova NA, et al. Comparative characteristics of lipemia models induced by injections of Triton WR-1339 and poloxamer 407 in mice. *Bull Exp Biol Med.* 2013; 155(2): 284-7.doi: 10.1007/s10517-013-2133-1.
139. Chung Thị Mỹ Duyên, Nguyễn Thị Thu Hương. Tác dụng hạ lipid máu của chế phẩm Xích linh chi trên mô hình gây tăng lipid máu nội sinh bằng tyloxapol (Triton WR-1339). *Tạp chí Y học Thành phố Hồ Chí Minh.* 2014; 8(1):62-68.
140. Athyros VG, Papageorgiou AA, Mercouris BR, et al. Treatment with atorvastatin to the National Cholesterol Educational Program goal versus 'usual' care in secondary coronary heart disease prevention. The GREek atorvastatin and coronary-heart-disease Evaluation (GREACE) study. *Curr Med Res Opin.* 2002; 18(4): 220-8.doi: 10.1185/030079902125000787.
141. Tạ Thu Thủy. *Đánh giá tác dụng điều trị hội chứng rối loạn lipid máu của cao lỏng Đại an.* Luận án tiến sĩ Y học. Trường Đại học Y Hà Nội.2016:17-34;113-122.
142. Huỳnh Thị Mỹ Hiền, Lê Thị Lan Phương. Đánh giá tác dụng điều trị rối loạn lipid máu của cao Lá sen - Hà thủ ô đỏ (*Folium Nelumbinis - Radix Polygoni multiflori*) trên thực nghiệm. *Tạp chí Y học Thành phố Hồ Chí Minh.* 2016; 20(6):181-185.
143. Senthil S, Sridevi M, Pugalendi KV. Cardioprotective effect of oleanolic acid on isoproterenol induced myocardial ischemia in rats. *Toxicol Pathol.* 2007; 35(3): 418-23.doi: 10.1080/01926230701230312.
144. Katan, MB, Grundy, SM, Jones P, et al. Efficacy and safety of plant stanols and sterols in the management of blood cholesterol levels. *Mayo Clinic Proceedings.* 2003; 78(8): 965-78.doi: 10.4065/78.8.965.
145. Gordon DJ, Probstfield JL, Garrison RJ, et al. High-density lipoprotein cholesterol and cardiovascular disease. Four prospective American studies. *Circulation.* 1989; 79(1): 8-15.doi: 10.1161/01.cir.79.1.8.

146. Cziraky MJ, Watson KE, Talbert RL. Targeting low HDL-cholesterol to decrease residual cardiovascular risk in the managed care setting. *J Manag Care Pharm.* 2008; 14(8):3-28.
147. Huxley RR, Barzi F, Lam TH et al. Isolated low levels of High-density lipoprotein cholesterol are associated with an increased risk of coronary heart disease: An individual participant data meta-analysis of 23 studies in the Asia-Pacific region. *Circulation.* 2011; 124(19): 2056-64.doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.111.028373.
148. Verdier C, Martinez LO, Ferrieres J, et al. Targeting High-density lipoproteins: Update on a promising therapy. *Archives of Cardiovascular Diseases.* 2013; 106(11): 601-11.doi: 10.1016/j.acvd.2013.06.052.
149. Sarwar N, Danesh J, Eiriksdottir G, et al. Triglycerides and the risk of coronary heart disease: 10.158 incident cases among 262.525 participants in 29 Western prospective studies. *Circulation.* 2007; 115(4): 450-8.doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.106.637793.
150. Miller M, Cannon CP, Murphy SA, et al. Impact of Triglyceride levels beyond Low-density lipoprotein cholesterol after acute coronary syndrome in the PROVE ITTIMI-22 trial. *J Am Coll Cardiol.* 2008; 51(7): 724-30.doi: 10.1016/j.jacc.2007.10.038.
151. Miller M, Stone NJ, Ballantyne C, et al. Triglycerides and cardiovascular disease: A scientific statement from the American Heart Association. *Circulation.* 2011; 123(20): 2292-333.doi: 10.1161/CIR.0b013e3182160726.
152. Toth PP. Triglyceride-rich lipoproteins as a causal factor for cardiovascular disease. *Vasc Health Risk Manag.* 2016; 12: 171-83.doi: 10.2147/VHRM.S104369.
153. Nguyen Duong Ngoc Thoi, Tran Manh Hung, Huynh Ngoc Trinh. Hypolipidemic effect of ethanolic extract from *Pandanus amaryllifolius* leaves on Triton WR-1339-induced hyperlipidemia in mice. *International Journal of Pharmacological Research.* 2018; 8(12):131-136.

154. Zhou SS, Xu J, Zhu H, et al. Gut microbiota-involved mechanisms in enhancing systemic exposure of ginsenosids by coexisting polysaccharids in ginseng decoction. *Scientific reports*. 2016; 6: 22474.doi: 10.1038/srep22474.
155. Lin L, Luo L, Zhong M, et al. Gut microbiota: A new angle for traditional herbal medicine research. *The Royal Society of Chemistry*. 2019; 9(30): 17457-17472.doi: 10.1039/c9ra01838g.
156. Chen MY, Shao L, Zhang W, et al. Metabolic analysis of *Panax notoginseng* saponins with gut microbiota-mediated biotransformation by HPLC-DAD-Q-TOF-MS/MS. *J Pharm Biomed Anal*. 2018 Feb 20; 150:199-207. doi: 10.1016/j.jpba.2017.12.011.
157. Chung Thị Mỹ Duyên, Hà Quang Thanh, Nguyễn Hoàng Minh và cộng sự. Khảo sát tác dụng hạ lipid máu của một số dược liệu trên mô hình chuột gây tăng lipid máu bằng tyloxapol. *Tạp chí Dược liệu*. 2022; 27(3):184-1192.
158. Zheng CS, Xu XJ, Ye HZ, et al. Computational pharmacological comparison of *Salvia miltiorrhiza* and *Panax notoginseng* used in the therapy of cardiovascular diseases. *Exp Ther Med*. 2013;6(5): 1163-1168.doi: 10.3892/etm.2013.1291.
159. Yao Y, Wu WY, Liu AH, et al. Interaction of salvianolic acids and notoginsengosids in inhibition of ADP-induced platelet aggregation *Am J Chin Med*. 2008; 36(2): 313-28.doi: 10.1142/S0192415X08005795.
160. Wang G, Wang L, Xiong ZY, et al. Compound salvia pellet, a traditional Chinese medicine, for the treatment of chronic stable angina pectoris compared with nitrates: a meta-analysis. *Medical Science Monitor*. 2006; 12(1):SR1-7.
161. Yang TL, Lin FY, Chen YH, et al. Salvianolic acid B inhibits low-density lipoprotein oxidation and neointimal hyperplasia in endothelium-denuded hypercholesterolaemic rabbits. *J Sci Food Agric*. 2011; 91(1): 134-41.doi: 10.1002/jsfa.4163.

162. Posadzki P, Watson L, Ernst E. Herb drug interactions: An overview of systematic reviews. *Br J Clin Pharmacol*. 2013; 75(3): 603-18.doi: 10.1111/j.1365-2125.2012.04350. x.
163. Zhang Z, Wang Y, Tan W, et al. A review of danshen combined with clopidogrel in the treatment of coronary heart disease. *Evid Based Complement Alternat Med*. 2019; 2019: 2721413.doi: 10.1155/2019/2721413.
164. Sinzinger H, Rodrigues M. Atorvastatin and fibrinogen a small subgroup shows extreme response. *Atherosclerosis*. 1999; 145(2):415- 417.
165. Wierzbicki AS, Lumb PJ, Semra YK, et al. Effect of atorvastatin on plasma fibrinogen. *The Lancet*. 1998; 351(9102): 569-70.doi: 10.1016/s0140-6736(05)78556-1.
166. Armitage J. The safety of statins in clinical practice. *Lancet*. 2007; 370(9601): 1781-90.doi: 10.1016/S0140-6736(07)60716-8.
167. Cheung DW, Koon CM, Wong PH, et al. Evaluating efficacy and safety of combination medication of atorvastatin and a herbal formula containing *Salvia miltiorrhiza* and *Pueraria lobata* on hyperlipidemia. *Phytother Res*. 2017; 31(10): 1579-1589.doi: 10.1002/ptr.5888.

## PHỤ LỤC

### Phụ lục 1. Phiếu kiểm nghiệm Nguru tất



CÔNG TY CỔ PHẦN DƯỢC LÂM ĐỒNG  
LADOPHAR

### PHIẾU KIỂM NGHIỆM

Mẫu kiểm nghiệm: Nguru Tất

Nguồn gốc: Việt Nam

Ngày lấy mẫu: 12/11/2018

Tiêu chuẩn áp dụng: ĐDVN V

Yêu cầu kiểm nghiệm: Kiểm tra chất lượng

Tình trạng mẫu: Mẫu đóng trong túi PE

| Chỉ tiêu                           | Mức chất lượng                                                                                                                                                                                 | Kết quả                                                                                    |
|------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------|
| Mô tả                              | Rễ hình trụ dài 20 - 30 cm, đường kính 0,5 - 1 cm.<br>Đầu trên mang vết tích của gốc thân, đầu dưới<br>thuôn nhỏ. Mặt ngoài màu vàng nâu, có nhiều vết<br>nhấn dọc nhỏ và vết tích của rễ con. | Đúng                                                                                       |
| Vi phẫu                            | Phải đạt theo yêu cầu                                                                                                                                                                          | Đạt                                                                                        |
| Soi bột                            | Phải đạt theo yêu cầu                                                                                                                                                                          | Đạt                                                                                        |
| Định tính                          | Nguru tất                                                                                                                                                                                      | Đúng                                                                                       |
| Độ ẩm                              | Không quá 12%                                                                                                                                                                                  | Đạt (11,25%)                                                                               |
| Tạp chất                           | Tỷ lệ gốc thân còn sót lại: Không quá 1,0%<br>Tạp chất khác: Không quá 1,0%                                                                                                                    | Đạt (0,81%)<br>Đạt (0%)                                                                    |
| Tro toàn phần                      | Tro toàn phần không quá 9%                                                                                                                                                                     | Đạt (8,48%)                                                                                |
| Kim loại nặng                      | Pb: Không quá 0,3 ppm<br>Cd: Không quá 0,8 ppm<br>Hg: Không quá 1,0 ppm<br>As: Không quá 2,0 ppm                                                                                               | Đạt (0,002 ppm)<br>Đạt (không phát hiện)<br>Đạt (không phát hiện)<br>Đạt (không phát hiện) |
| Chất chiết được<br>trong dược liệu | Không dưới 6,5% tính theo dược liệu khô kiệt                                                                                                                                                   | Đạt (9,6%)                                                                                 |

**KẾT LUẬN:** Mẫu thử đạt các chỉ tiêu đã thử theo ĐDVN V.

BỘ PHẬN KTCL

CN. Đào Thị Hồng Lam

Đã đạt, ngày 18 tháng 11 năm 2018

GIÁM ĐỐC CHẤT LƯỢNG



DS. Nguyễn Thị Hồng Nhung

## Phụ lục 2. Phiếu kiểm nghiệm Đan sâm



CÔNG TY CỔ PHẦN DƯỢC LÂM ĐỒNG  
LADOPHAR

### PHIẾU KIỂM NGHIỆM

Mẫu kiểm nghiệm: Đan sâm

Ngày lấy mẫu: 12/11/2018

Yêu cầu kiểm nghiệm: Kiểm tra chất lượng

Tình trạng mẫu: Mẫu đóng trong túi PE

Nguồn gốc: Việt Nam

Tiêu chuẩn áp dụng: ĐDVN V

| Chỉ tiêu                        | Mức chất lượng                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       | Kết quả     |
|---------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------|
| Mô tả                           | Rễ hình trụ dài, hơi cong, dài 10 - 20 cm, đường kính 0,3 - 1 cm. Mặt ngoài màu nâu đỏ, thô ráp, có vân nhăn dọc. Vỏ rễ già bong ra, thường có màu nâu tía, chất cứng và giòn. Mặt bẻ gãy không chắc có vết nứt, phần gỗ màu vàng xám hoặc nâu tía với bó mạch màu trắng vàng, xếp theo hướng xuyên tâm. Mùi nhẹ, vị hơi đắng và se. | Đúng        |
| Vi phẫu                         | Phải đạt theo yêu cầu                                                                                                                                                                                                                                                                                                                | Đạt         |
| Soi bột                         | Phải đạt theo yêu cầu                                                                                                                                                                                                                                                                                                                | Đạt         |
| Định tính                       | Đan sâm                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              | Đúng        |
| Độ ẩm                           | Không quá 12%                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        | Đạt (11,4%) |
| Tạp chất                        | Không quá 1,0%                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       | Đạt (0%)    |
| Tro toàn phần                   | Không quá 10%                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        | Đạt (9,1%)  |
| Tro không tan trong acid        | Không quá 3%                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         | Đạt (2,3%)  |
| Kim loại nặng                   | Không được quá 30 ppm                                                                                                                                                                                                                                                                                                                | Đạt         |
| Chất chiết được trong dược liệu | Chất chiết được trong ethanol: Không ít hơn 15% tính theo dược liệu khô kiệt                                                                                                                                                                                                                                                         | Đạt (17,4%) |
|                                 | Chất chiết được trong nước: Không ít hơn 35% tính theo dược liệu khô kiệt                                                                                                                                                                                                                                                            | Đạt (37,2%) |
| Định lượng                      | Định lượng Tanshinon IIA: Không ít hơn 0,2% tính trên dược liệu khô kiệt.                                                                                                                                                                                                                                                            | Đạt (0,31%) |
|                                 | Định lượng acid Savianolic B: Không ít hơn 3% tính trên dược liệu khô kiệt                                                                                                                                                                                                                                                           | Đạt (4,6%)  |

**KẾT LUẬN:** Mẫu thử đạt các chỉ tiêu đã thử theo ĐDVN V.

BỘ PHẬN KTCL

CN. Đào Thị Hồng Lam

Đã đạt, ngày 18 tháng 11 năm 2018

GIÁM ĐỐC CHẤT LƯỢNG

DS. Nguyễn Thị Hồng Nhung

### Phụ lục 3. Phiếu kiểm nghiệm Tam thất



CÔNG TY CỔ PHẦN DƯỢC LÂM ĐỒNG  
LADOPHAR

#### PHIẾU KIỂM NGHIỆM

Mẫu kiểm nghiệm: Tam thất  
Ngày lấy mẫu: 12/11/2018  
Yêu cầu kiểm nghiệm: Kiểm tra chất lượng  
Tình trạng mẫu: Mẫu đóng trong túi PE

Nguồn gốc: Việt Nam  
Tiêu chuẩn áp dụng: TCCS

| Chỉ tiêu                        | Mức chất lượng                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                             | Kết quả                    |
|---------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------|
| Mô tả                           | Rễ củ có hình dạng thay đổi, hình trụ, hình nón, dài 1,5 - 4 cm, đường kính 1,2 - 2 cm. Mặt ngoài màu nâu xám hay vàng xám, trên mặt có những vết nhăn dọc nhỏ. Trên một đầu có những bướu nhỏ là vết tích của rễ con. Chất cứng rắn, khó bẻ. Khi đập vỡ, phần gỗ và phần vỏ dễ tách rời nhau. Mặt cắt có màu xám lục, xanh, vàng hoặc trắng xám, có những chấm nhỏ màu nâu. Phần gỗ ở trong màu xám nhạt. Mùi thơm nhẹ, vị đắng hơi ngọt. | Đúng                       |
| Vi phẫu                         | Phải đạt theo yêu cầu                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      | Đạt                        |
| Soi bột                         | Phải đạt theo yêu cầu                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      | Đạt                        |
| Định tính                       | Tam thất                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                   | Đúng                       |
| Độ ẩm                           | Không quá 14%                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              | Đạt (12,9%)                |
| Tạp chất                        | Không quá 1,0%                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                             | Đạt (0,61%)                |
| Tro toàn phần                   | Không quá 6%                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                               | Đạt (5,1%)                 |
| Tro không tan trong acid        | Không quá 3%                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                               | Đạt (2,2%)                 |
| Giới hạn chì                    | Không quá 3 ppm                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                            | Đạt (không phát hiện)      |
| Chất chiết được trong dược liệu | Không ít hơn 16% tính theo dược liệu khô kiệt                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              | Đạt (19,1%)                |
| Định lượng                      | Hàm lượng Notoginsenoside R1: Không dưới 0,4% tính theo dược liệu khô kiệt.<br>Tổng hàm lượng các Ginsenoside Rb1, Rg1 và Notoginsenoside R1: Không dưới 5% tính theo dược liệu khô kiệt.                                                                                                                                                                                                                                                  | Đạt (0,52%)<br>Đạt (7,32%) |

**KẾT LUẬN:** Mẫu thử đạt yêu cầu chất lượng theo TCCS.

Đà Lạt, ngày 20 tháng 11 năm 2018

BỘ PHẬN KTCL

CN. Đào Thị Hồng Lam



GIÁM ĐỐC CHẤT LƯỢNG

DS. Nguyễn Thị Hồng Nhung

**Phụ lục 4. Kết quả nồng độ thành phần lipid máu của các lô chuột trên mô hình gây RLLM nội sinh bằng tyloxapol**

**1. Nồng độ TC (mg/dL)**

| Nhóm sinh lý (tyloxapol -) |       |       | Nhóm bệnh lý (tyloxapol +) |        |        |        |        |
|----------------------------|-------|-------|----------------------------|--------|--------|--------|--------|
| STT                        | Chúng | M2    | STT                        | Chúng  | M1     | M2     | AT60   |
| 1                          | 68    | 82    | 1                          | 373    | 347    | 205    | 233    |
| 2                          | 76    | 84    | 2                          | 445    | 309    | 256    | 211    |
| 3                          | 84    | 91    | 3                          | 358    | 309    | 207    | 158    |
| 4                          | 86    | 88    | 4                          | 383    | 353    | 170    | 233    |
| 5                          | 87    | 97    | 5                          | 401    | 293    | 185    | 140    |
| 6                          | 81    | 86    | 6                          | 336    | 283    | 242    | 237    |
| 7                          | 107   | 87    | 7                          | 238    | 297    | 255    | 232    |
| 8                          | 99    | 80    | 8                          | 341    | 286    | 196    | 203    |
| 9                          | 104   | 86    | 9                          | 441    | 222    | 254    | 213    |
| 10                         | 91    | 98    | 10                         | 314    | 195    | 150    | 217    |
| TB                         | 88,30 | 87,90 | TB                         | 363,00 | 289,40 | 212,00 | 207,70 |
| SEM                        | 3,89  | 1,87  | SEM                        | 19,44  | 15,53  | 12,07  | 10,50  |

**2. Nồng độ HDL-C (mg/dL)**

| Nhóm sinh lý (tyloxapol -) |       |      | Nhóm bệnh lý (tyloxapol +) |       |      |      |      |
|----------------------------|-------|------|----------------------------|-------|------|------|------|
| STT                        | Chúng | M2   | STT                        | Chúng | M1   | M2   | AT60 |
| 1                          | 44,5  | 37,5 | 1                          | 27,1  | 29,6 | 29,6 | 28,9 |
| 2                          | 36,2  | 37,9 | 2                          | 22,9  | 26,6 | 21,6 | 32,1 |
| 3                          | 37,76 | 35   | 3                          | 25    | 29,6 | 22,5 | 25,2 |
| 4                          | 45    | 44,6 | 4                          | 18,8  | 32   | 34,6 | 41,4 |
| 5                          | 39,8  | 34,5 | 5                          | 28,7  | 31,2 | 36,7 | 27,2 |
| 6                          | 40,8  | 53,7 | 6                          | 16,2  | 19,9 | 20,2 | 34,7 |
| 7                          | 36,1  | 34,6 | 7                          | 25,1  | 28,4 | 33,6 | 36,1 |
| 8                          | 42,7  | 39,1 | 8                          | 19,5  | 19,9 | 24,4 | 34,7 |

|     |       |       |     |       |       |       |       |
|-----|-------|-------|-----|-------|-------|-------|-------|
| 9   | 41,6  | 35,3  | 9   | 26,2  | 27,6  | 28,8  | 42,9  |
| 10  | 37,9  | 42,8  | 10  | 25,4  | 23,2  | 42,4  | 36,5  |
| TB  | 40,22 | 39,50 | TB  | 23,49 | 26,80 | 30,44 | 33,97 |
| SEM | 1,03  | 1,92  | SEM | 1,28  | 1,39  | 2,30  | 1,82  |

### 3. Nồng độ LDL-C (mg/dL)

| Nhóm sinh lý (tyloxapol -) |       |       | Nhóm bệnh lý (tyloxapol +) |       |       |       |       |
|----------------------------|-------|-------|----------------------------|-------|-------|-------|-------|
| STT                        | Chúng | M2    | STT                        | Chúng | M1    | M2    | AT60  |
| 1                          | 12    | 14    | 1                          | 34    | 31    | 19    | 22    |
| 2                          | 12    | 21    | 2                          | 21    | 24    | 22    | 14    |
| 3                          | 14    | 13    | 3                          | 41    | 28    | 24    | 18    |
| 4                          | 10    | 11    | 4                          | 23    | 25    | 26    | 22    |
| 5                          | 9     | 14    | 5                          | 30    | 19    | 14    | 22    |
| 6                          | 13    | 11    | 6                          | 37    | 27    | 25    | 26    |
| 7                          | 15    | 8     | 7                          | 29    | 29    | 26    | 18    |
| 8                          | 13    | 7     | 8                          | 26    | 24    | 17    | 14    |
| 9                          | 12    | 8     | 9                          | 38    | 25    | 19    | 25    |
| 10                         | 14    | 10    | 10                         | 33    | 26    | 24    | 17    |
| TB                         | 12,40 | 11,70 | TB                         | 31,20 | 25,80 | 21,60 | 19,80 |
| SEM                        | 0,58  | 1,30  | SEM                        | 2,09  | 1,04  | 1,31  | 1,34  |

### 4. Nồng độ TG (mg/dL)

| Nhóm sinh lý (tyloxapol -) |     |     | Nhóm bệnh lý (tyloxapol +) |     |     |     |      |
|----------------------------|-----|-----|----------------------------|-----|-----|-----|------|
| STT                        | CSL | M2  | STT                        | CBL | M1  | M2  | AT60 |
| 1                          | 87  | 96  | 1                          | 858 | 704 | 610 | 643  |
| 2                          | 91  | 106 | 2                          | 750 | 712 | 756 | 632  |
| 3                          | 78  | 111 | 3                          | 758 | 776 | 765 | 770  |
| 4                          | 67  | 111 | 4                          | 847 | 709 | 577 | 703  |
| 5                          | 98  | 88  | 5                          | 752 | 756 | 519 | 510  |
| 6                          | 93  | 89  | 6                          | 919 | 720 | 702 | 707  |

|     |       |       |     |        |        |        |        |
|-----|-------|-------|-----|--------|--------|--------|--------|
| 7   | 101   | 86    | 7   | 765    | 720    | 695    | 631    |
| 8   | 94    | 92    | 8   | 842    | 729    | 714    | 626    |
| 9   | 85    | 83    | 9   | 729    | 626    | 608    | 600    |
| 10  | 112   | 86    | 10  | 830    | 699    | 607    | 628    |
| TB  | 90,60 | 94,80 | TB  | 805,00 | 715,10 | 655,30 | 645,00 |
| SEM | 3,94  | 86    | SEM | 19,72  | 12,47  | 25,97  | 22,14  |

*CSL: Chứng sinh lý; CBL: Chứng bệnh lý; M1: Viên MIX liều uống 1 viên/kg; M2: Viên MIX liều uống 2 viên/kg; AT60: Atorvastatin liều uống 60 mg/kg; TB: Trung bình; SEM: Standard error of the mean (sai số chuẩn của giá trị trung bình).*

**Phụ lục 5. Kết quả trọng lượng và nồng độ thành phần lipid máu của các lô chuột trên mô hình gây RLLM ngoại sinh bằng chế độ ăn giàu lipid.**

**1. Trọng lượng chuột (g)**

**Lô 1 (CSL)**

| <b>STT</b> | <b>Tuần 0</b> | <b>Tuần 1</b> | <b>Tuần 2</b> | <b>Tuần 3</b> | <b>Tuần 4</b> | <b>Tuần 5</b> | <b>Tuần 6</b> |
|------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|
| 1          | 18,1          | 19,9          | 22,2          | 25,1          | 22,4          | 24,6          | 23,4          |
| 2          | 20,5          | 24,9          | 29,9          | 34,8          | 34,0          | 23,3          | 31,9          |
| 3          | 19,9          | 21,0          | 24,7          | 29,0          | 30,0          | 30,8          | 31,2          |
| 4          | 19,3          | 22,0          | 25,4          | 27,1          | 29,3          | 31,1          | 31,3          |
| 5          | 18,9          | 21,7          | 24,8          | 24,7          | 27,0          | 28,0          | 28,1          |
| 6          | 19,2          | 21,9          | 24,8          | 25,5          | 25,9          | 26,4          | 25,6          |
| 7          | 20,3          | 20,8          | 19,9          | 24,5          | 26,9          | 29,2          | 29,6          |
| TB         | 19,5          | 21,7          | 24,5          | 27,2          | 27,9          | 27,6          | 28,7          |
| SEM        | 0,8           | 1,6           | 3,1           | 3,7           | 3,6           | 3,0           | 3,2           |

**Lô 2 (CBL)**

| <b>STT</b> | <b>Tuần 0</b> | <b>Tuần 1</b> | <b>Tuần 2</b> | <b>Tuần 3</b> | <b>Tuần 4</b> | <b>Tuần 5</b> | <b>Tuần 6</b> |
|------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|
| 1          | 22,0          | 26,1          | 29,0          | 31,9          | 32,0          | 25,7          | 23,8          |
| 2          | 20,8          | 24,4          | 29,7          | 32,4          | 34,0          | 23,7          | 20,1          |
| 3          | 22,0          | 17,8          | 18,3          | 18,9          | 20,4          | 20,4          | 19,5          |
| 4          | 19,5          | 23,6          | 28,1          | 32,2          | 33,9          | 34,6          | 32,6          |
| 5          | 19,6          | 19,5          | 19,8          | 22,7          | 23,0          | 24,7          | 23,5          |
| 6          | 20,6          | 22,0          | 27,8          | 31,9          | 32,3          | 33,0          | 32,4          |
| 7          | 20,1          | 25,0          | 26,3          | 26,2          | 26,5          | 26,9          | 25,5          |
| TB         | 20,7          | 22,6          | 25,6          | 28,0          | 28,9          | 27,0          | 25,3          |
| SEM        | 1,0           | 3,0           | 4,6           | 5,5           | 5,6           | 5,1           | 5,3           |

Lô 3 (M1)

| STT | Tuần 0 | Tuần 1 | Tuần 2 | Tuần 3 | Tuần 4 | Tuần 5 | Tuần 6 |
|-----|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|
| 1   | 21,8   | 22,2   | 24,5   | 25,4   | 26,3   | 27,8   | 26,0   |
| 2   | 20,1   | 21,7   | 24,3   | 25,6   | 23,5   | 25,4   | 25,0   |
| 3   | 19,6   | 22,5   | 25,8   | 27,8   | 28,1   | 30,0   | 28,6   |
| 4   | 18,6   | 23,3   | 27,0   | 29,2   | 30,4   | 31,6   | 30,2   |
| 5   | 19,7   | 21,5   | 23,9   | 25,9   | 27,3   | 27,7   | 26,6   |
| 6   | 21,4   | 20,7   | 22,1   | 23,6   | 25,0   | 26,7   | 24,6   |
| 7   | 17,6   | 18,8   | 21,6   | 24,2   | 26,3   | 30,7   | 30,2   |
| TB  | 19,8   | 21,5   | 24,2   | 26,0   | 26,7   | 28,6   | 27,3   |
| SEM | 1,5    | 1,5    | 1,9    | 2,0    | 2,2    | 2,3    | 2,4    |

Lô 4 (M2)

| STT | Tuần 0 | Tuần 1 | Tuần 2 | Tuần 3 | Tuần 4 | Tuần 5 | Tuần 6 |
|-----|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|
| 1   | 20,2   | 23,9   | 27,8   | 30,0   | 30,6   | 33,9   | 32,6   |
| 2   | 19,0   | 20,7   | 23,0   | 23,9   | 24,0   | 24,6   | 24,1   |
| 3   | 20,5   | 21,7   | 25,6   | 27,9   | 29,0   | 29,9   | 25,4   |
| 4   | 19,9   | 21,1   | 26,0   | 30,2   | 31,9   | 35,2   | 32,3   |
| 5   | 22,0   | 24,4   | 26,7   | 28,0   | 28,7   | 28,2   | 27,4   |
| 6   | 18,6   | 21,1   | 25,8   | 28,2   | 28,7   | 28,2   | 27,7   |
| 7   | 21,2   | 25,2   | 28,1   | 30,4   | 30,7   | 27,0   | 26,5   |
| TB  | 20,2   | 22,6   | 26,1   | 28,4   | 29,1   | 29,6   | 28,0   |
| SEM | 1,2    | 1,9    | 1,7    | 2,3    | 2,5    | 3,8    | 3,3    |

Lô 5 (AT10)

| STT | Tuần 0 | Tuần 1 | Tuần 2 | Tuần 3 | Tuần 4 | Tuần 5 | Tuần 6 |
|-----|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|
| 1   | 21,5   | 21,6   | 24,8   | 26,9   | 28,4   | 21,0   | 21,1   |
| 2   | 20,5   | 15,0   | 18,9   | 21,8   | 24,1   | 25,6   | 24,7   |
| 3   | 18,8   | 18,7   | 20,8   | 25,7   | 26,4   | 27,5   | 23,0   |
| 4   | 19,1   | 19,2   | 24,0   | 25,1   | 26,3   | 26,0   | 26,3   |

|     |       |      |      |      |      |      |      |
|-----|-------|------|------|------|------|------|------|
| 5   | 20,6  | 17,8 | 22,8 | 21,6 | 19,1 | 20,2 | 19,8 |
| 6   | 18,80 | 14,4 | 19,2 | 22,4 | 25,0 | 25,8 | 25,2 |
| 7   | 20,7  | 19,9 | 25,0 | 27,0 | 27,3 | 27,9 | 26,1 |
| TB  | 20,0  | 18,1 | 22,2 | 24,4 | 25,2 | 24,9 | 23,7 |
| SEM | 1,10  | 2,60 | 2,60 | 2,40 | 3,00 | 3,00 | 2,50 |

## 2. Nồng độ thành phần lipid máu

Lô 1 (CSL)

| STT | TC (mg/dL) | HDL-C (mg/dL) | LDL-C (mg/dL) | TG (mg/dL) |
|-----|------------|---------------|---------------|------------|
| 1   | 88,04      | 55,83         | 18,36         | 69,23      |
| 2   | 82,55      | 57,54         | 11,64         | 66,83      |
| 3   | 81,57      | 49,09         | 23,29         | 45,93      |
| 4   | 85,25      | 52,33         | 22,66         | 51,32      |
| 5   | 81,89      | 44,98         | 26,45         | 52,31      |
| 6   | 84,13      | 46,47         | 24,27         | 66,95      |
| 7   | 76,83      | 54,97         | 10,11         | 58,73      |
| TB  | 82,89      | 51,60         | 19,54         | 58,76      |
| SEM | 3,49       | 4,86          | 6,41          | 9,16       |

Lô 2 (CBL)

| STT | TC (mg/dL) | HDL-C (mg/dL) | LDL-C (mg/dL) | TG (mg/dL) |
|-----|------------|---------------|---------------|------------|
| 1   | 138,16     | 40,10         | 83,40         | 73,29      |
| 2   | 90,76      | 39,48         | 33,38         | 89,49      |
| 3   | 86,47      | 42,88         | 30,63         | 64,82      |
| 4   | 104,11     | 55,57         | 32,45         | 80,47      |
| 5   | 98,42      | 44,23         | 45,19         | 44,99      |
| 6   | 104,35     | 54,19         | 29,86         | 101,51     |
| 7   | 105,04     | 58,86         | 32,76         | 67,12      |
| TB  | 103,90     | 47,90         | 41,09         | 74,53      |
| SEM | 16,74      | 8,05          | 19,35         | 18,30      |

Lô 3 (M1)

| STT | TC (mg/dL) | HDL-C (mg/dL) | LDL-C (mg/dL) | TG (mg/dL) |
|-----|------------|---------------|---------------|------------|
| 1   | 90,35      | 52,49         | 19,12         | 93,68      |
| 2   | 89,08      | 64,01         | 10,07         | 74,99      |
| 3   | 97,71      | 61,85         | 17,81         | 90,26      |
| 4   | 119,23     | 80,24         | 25,80         | 65,95      |
| 5   | 86,65      | 40,45         | 29,81         | 81,95      |
| 6   | 78,75      | 48,43         | 7,43          | 114,47     |
| 7   | 74,63      | 49,43         | 8,98          | 81,12      |
| TB  | 90,91      | 56,70         | 17,00         | 86,06      |
| SEM | 14,62      | 13,15         | 8,67          | 15,55      |

Lô 4 (M2)

| STT | TC (mg/dL) | HDL-C (mg/dL) | LDL-C (mg/dL) | TG (mg/dL) |
|-----|------------|---------------|---------------|------------|
| 1   | 85,26      | 56,93         | 14,26         | 70,37      |
| 2   | 77,32      | 41,45         | 13,99         | 109,39     |
| 3   | 76,31      | 46,85         | 15,06         | 71,98      |
| 4   | 98,27      | 53,23         | 31,99         | 65,26      |
| 5   | 84,39      | 50,89         | 14,56         | 94,68      |
| 6   | 97,53      | 61,13         | 16,68         | 98,58      |
| 7   | 80,27      | 40,49         | 30,72         | 45,29      |
| TB  | 85,62      | 50,14         | 19,61         | 79,36      |
| SEM | 9,02       | 7,71          | 8,08          | 22,36      |

Lô 5 (AT10)

| STT | TC (mg/dL) | HDL-C (mg/dL) | LDL-C (mg/dL) | TG (mg/dL) |
|-----|------------|---------------|---------------|------------|
| 1   | 78,39      | 41,80         | 26,97         | 48,11      |
| 2   | 82,12      | 51,48         | 14,26         | 81,89      |
| 3   | 80,24      | 55,02         | 11,62         | 67,99      |
| 4   | 71,18      | 40,98         | 12,52         | 88,39      |

|     |       |       |       |        |
|-----|-------|-------|-------|--------|
| 5   | 72,95 | 40,64 | 21,87 | 52,19  |
| 6   | 81,14 | 47,81 | 18,30 | 75,16  |
| 7   | 88,01 | 57,69 | 9,89  | 102,13 |
| TB  | 79,15 | 47,92 | 16,49 | 73,69  |
| SEM | 5,70  | 7,04  | 6,19  | 19,34  |

*CSL: Uống nước cất; CBL: Uống cholesterol; M1: Uống dung dịch giàu lipid + viên MIX liều 1 viên/kg; M2: Uống dung dịch giàu lipid + viên MIX liều 2 viên/kg; AT10: Uống dung dịch giàu lipid + atorvastatin liều 10 mg/kg; TB: Trung bình; SEM: Standard error of the mean (sai số chuẩn của giá trị trung bình).*

**Phụ lục 6. Kết quả tác động ức chế hoạt tính HMG-CoA reductase của viên MIX *in vivo***

| Nhóm sinh lý (tyloxapol -) |       |       | Nhóm bệnh lý (tyloxapol +) |       |       |       |       |
|----------------------------|-------|-------|----------------------------|-------|-------|-------|-------|
| STT                        | CSL   | M2    | STT                        | CBL   | M1    | M2    | AT60  |
| 1                          | 0,039 | 0,02  | 1                          | 0,087 | 0,062 | 0,029 | 0,028 |
| 2                          | 0,042 | 0,048 | 2                          | 0,086 | 0,038 | 0,026 | 0,048 |
| 3                          | 0,04  | 0,03  | 3                          | 0,095 | 0,021 | 0,024 | 0,037 |
| 4                          | 0,05  | 0,056 | 4                          | 0,082 | 0,018 | 0,029 | 0,020 |
| 5                          | 0,038 | 0,037 | 5                          | 0,108 | 0,043 | 0,040 | 0,011 |
| 6                          | 0,043 | 0,042 | 6                          | 0,081 | 0,033 | 0,078 | 0,017 |
| 7                          | 0,05  | 0,038 | 7                          | 0,088 | 0,038 | 0,024 | 0,041 |
| 8                          | 0,046 | 0,045 | 8                          | 0,089 | 0,066 | 0,031 | 0,014 |
| 9                          | 0,048 | 0,037 | 9                          | 0,086 | 0,053 | 0,036 | 0,03  |
| 10                         | 0,055 | 0,029 | 10                         | 0,103 | 0,017 | 0,04  | 0,05  |
| 11                         | 0,052 | 0,043 | 11                         | 0,079 | 0,012 | 0,027 | 0,047 |
| 12                         | 0,027 | 0,037 | 12                         | 0,093 | 0,028 | 0,023 | 0,033 |
| TB                         | 0,044 | 0,039 | TB                         | 0,090 | 0,036 | 0,034 | 0,031 |
| SEM                        | 0,002 | 0,003 | SEM                        | 0,003 | 0,005 | 0,004 | 0,004 |

*CSL: Chứng sinh lý; CBL: Chứng bệnh lý; M1: Viên MIX liều uống 1 viên/kg; M2: Viên MIX liều uống 2 viên/kg; AT60: Atorvastatin liều uống 60 mg/kg; TB: Trung bình; SEM: Standard error of the mean (sai số chuẩn của giá trị trung bình).*