

KHẢO SÁT HOẠT TÍNH GIẢI LO ÂU CỦA MỘT SỐ TINH DẦU TỪ VỎ QUẢ CÂY CHI CITRUS HỌ RUTACEACE

Duong Phuoc An*, Huynh Thi Bích Tuyen**, Nguyễn Ngọc Khôi*

TÓM TẮT

Mở đầu: Nhiều công trình nghiên cứu trên thú vật cũng như trên người cho thấy tinh dầu của vỏ quả từ chi Citrus có tác dụng an thần giải lo, tuy vậy, cho đến nay, chưa có khảo sát nào trên các loại tinh dầu của các loài chi Citrus có tại Việt nam về tác dụng này.

Mục tiêu: Nghiên cứu được tiến hành nhằm khảo sát thành phần hóa học và sàng lọc tác dụng an thần giải lo của các tinh dầu chi Citrus trên mô hình được lý thực nghiệm.

Phương pháp: Chuột nhắt trắng đực chủng Swiss albino được sử dụng trong khảo sát đặc tính giải lo âu với hai mô hình môi trường mở và mô hình chữ thập nâng cao. Các kỹ thuật GC-MS được sử dụng trong khảo sát thành phần hóa học của các loại tinh dầu trên.

Kết quả: Chuột sử dụng tinh dầu Tắc liều 1g/kg (p.o), số lần và thời gian vào nhánh mở tăng lên có ý nghĩa thống kê, chứng tỏ tinh dầu Tắc ở liều này có tác dụng giải lo âu. Các loại tinh dầu Citrus khác như Cam, Chanh, Bưởi, Quýt không cho thấy tác dụng này. Khảo sát thành phần hóa học bằng GC-MS, ở tinh dầu Tắc có sự hiện diện của một số thành phần mà không phát hiện ở 4 loại tinh dầu còn lại.

Kết luận: Tinh dầu Tắc đã thể hiện tác dụng giải lo âu chứng minh qua mô hình chữ thập nâng cao. Tác dụng này là chuyên biệt do không bị ảnh hưởng bởi sự vận động tự nhiên của chuột thử nghiệm. Hoạt tính này có khả năng là do sự khác biệt về thành phần của tinh dầu của tinh dầu Tắc so với các loại tinh dầu khác.

Từ khóa: tinh dầu, Citrus, giải lo âu, mô hình chữ thập nâng cao

ABSTRACT

ANXIOLYTIC-LIKE EFFECTS OF ESSENTIAL OILS FROM THE PEEL OF CITRUS PLANTS ON THE ELEVATED PLUS-MAZE MODEL IN MICE

Duong Phuoc An, Huynh Thi Bích Tuyen, Nguyen Ngoc Khoi

* Y Hoc TP. Ho Chi Minh * Vol. 14 - Supplement of No 1 - 2010: 35-40

Background: Mounting evidence suggests the essential oil from peel of Citrus can have anxiolytic effect.

Objectives: This experiment was performed to investigate the anxiolytic-like effects and the composition of the essential oils of five Citrus plants including Citrus grandis, Citrus sinensis, Citrus limonia, Citrus reticulata and Citrus japonica.

Method: Essential oils from fresh peel were obtained by hydrodistillation and orally administered to Swiss albino male mice 60 min before experimental procedures. Two paradigms were used is elevated plus maze and open field tests. Essentials oils composition were analysed by GC-MS technique.

Results: Single treatment with essential oil of C. japonica (1g/kg) augmented the number of entries and the percentage time spent in the open arms of the elevated plus maze indicating an anxiolytic-like effects. These effects were observed in the absence of motor impairment in both tests. The analysis results by GC-MS showed the differences in composition of these essential oils.

Conclusion: Our findings indicate that C. japonica essential oil exhibits an anxiolytic-like effect.

* Khoa Dược - Đại học Y Dược Tp.HCM
Địa chỉ liên hệ: DS. Duong Phuoc An

** Trường Đại học Dân lập Văn Lang
ĐT: 0913 770 137

Email: phuocan.duong@gmail.com

Key words: Essential oils, Citrus, anxiolytic, elevated plus maze.

ĐẶT VẤN ĐỀ

Tại Việt Nam, có rất nhiều loài thuộc chi Citrus như Chanh Citrus limonia Osbeck, Bưởi Citrus grandis (L.) Osbeck, Cam Citrus sinensis (L.) Osbeck, Quýt Citrus reticulata Blanco... Nhiều công trình nghiên cứu cho thấy tinh dầu của vỏ quả từ chi Citrus có tác dụng an thần giải lo, ví dụ như nghiên cứu trên tinh dầu cây Cam đắng Citrus aurantium L. được chứng minh có tác dụng an thần giải lo trên hai mô hình thử nghiệm là mô hình với hai ngăn sáng-tối và mô hình chôn bi (marble burying) ở chuột nhắt (**Error! Reference source not found.**). Tinh dầu Chanh có tác dụng chống stress ở chuột nhắt thông qua tác động trên hệ thống serotonin và dopamin (**Error! Reference source not found.**). Trên người cũng đã có những quan sát tương tự, chẳng hạn, khi phun tinh dầu cam ở phòng chờ bệnh viện làm giảm cảm giác lo lắng ở các bệnh nhân (**Error! Reference source not found., Error! Reference source not found.**). Việc phát hiện tác dụng dược lý mới này ở những cây thuộc chi Citrus hứa hẹn sẽ mang đến những lựa chọn mới trong việc điều trị và phòng ngừa chứng lo âu. Nghiên cứu này được tiến hành nhằm khảo sát thành phần hóa học và sàng lọc tác dụng an thần giải lo của các tinh dầu chi Citrus trên mô hình dược lý thực nghiệm.

NGUYÊN LIỆU - PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

Nguyên liệu

Bưởi năm roi Citrus grandis và Cam sành Citrus sinensis được thu thập nhà vườn tỉnh Cần Thơ; Quýt đường Citrus reticulata ở huyện Lai Vung tỉnh Đồng Tháp; Chanh Citrus limonia Đà Lạt; Tắc (Quất) Citrus japonica lấy mẫu tại TP. Hồ Chí Minh. Các mẫu nguyên liệu được lưu tại phòng Thí nghiệm trung tâm, Khoa Dược, ĐHY Dược TP. Hồ Chí Minh.

Súc vật nghiên cứu: chuột nhắt trắng đực (chủng Swiss albino, 6-7 tuần tuổi, trọng lượng trung bình 20 ± 2 g) được cung cấp bởi Viện Vacxin và Sinh Phẩm Y Tế (Nha Trang), chuột được nuôi ổn định ít nhất 1 tuần trước khi tiến hành thử nghiệm. Chuột được nuôi từng nhóm 7-8 con trong lồng kích thước $22 \times 34 \times 25$ cm, cho ăn cám viên tổng hợp, bổ sung thêm giá, rau xanh, cho uống nước đầy đủ. Tất cả chuột được mã hóa bằng chữ và số để thuận tiện cho việc phân tích kết quả sau này.

Chung cất tinh dầu: Nguyên liệu được xử lý bằng cách gọt lấy phần vỏ ngoài xanh. Cắt nhỏ, sau đó cho vào hệ thống chung cất tinh dầu theo phương pháp chung cất lôi cuốn hơi nước, tinh dầu sau chung cất sẽ được làm khan bằng NaSO_4 khan, được bảo quản trong lọ kín và lưu trữ ở nhiệt độ từ $4 - 5^\circ\text{C}$.

Phân tích thành phần hóa học: Tiến hành với máy GC-MS Agilent 190918- 433 tại Viện Khoa Học và Công Nghệ TP. HCM với cột sắc ký HP-5MS, $0,25\mu\text{m} \times 30\text{m} \times 0,25\mu\text{m}$, thể tích bơm 1ml, áp suất 7,05 pa, tốc độ dòng: 0,9ml/phút.

Bố trí thí nghiệm

Chuột được chia ngẫu nhiên thành 7 nhóm, cho uống 60 phút trước khi thử nghiệm:

- Nhóm 1: nhóm chứng, uống dung dịch Tween 80 12%
- Nhóm 2: nhóm đối chiếu, uống diazepam liều 2 mg/kg chuột
- Nhóm 3: nhóm thử, uống tinh dầu Bưởi liều 1g/kg chuột
- Nhóm 4: nhóm thử, uống tinh dầu Cam liều 1g/kg chuột
- Nhóm 5: nhóm thử, uống tinh dầu Chanh liều 1g/kg chuột
- Nhóm 6: nhóm thử, uống tinh dầu Quýt liều 1g/kg chuột
- Nhóm 7: nhóm thử, uống tinh dầu Tắc (Quất) liều 1g/kg chuột

Các loại tinh dầu và diazepam đều được pha trong dung dịch Tween 80 12%

Mô hình môi trường mở (Open field test): Bộ dụng cụ gồm 1 hộp kích thước 40×40×40 cm, với tường trong suốt, đáy hộp được chia ra làm 16 ô vuông có kích thước bằng nhau. Cường độ chiếu sáng ở sàn là 100 lux. Tất cả chuột được đặt cố định vào 1 góc của mô hình, thực hiện thử nghiệm trong 5 phút, ghi nhận số ô vuông chuột di chuyển vào (bằng cả 4 chân), số lần đứng lên.

Mô hình chữ thập nâng cao (Elevated plus maze): gồm 2 cánh tay mở (30 cm × 5 cm) và 2 cánh tay đóng (30 cm × 5 cm) với tường cao 25 cm, làm bằng Plexiglas. Phần giao nhau giữa các cánh tay là 1 hình vuông (5 cm × 5 cm). Bộ dụng cụ này được đặt cao hơn nền nhà 73 cm, cường độ chiếu sáng ở các cánh tay 25 lux. Tất cả chuột được đặt ở vùng trung tâm, hướng về phía cánh tay mở, sau đó chuột được tự do di chuyển khám phá trong 5 phút, ghi nhận số lần ra vào và thời gian lưu lại ở các vùng cánh tay (đóng và/hoặc mở) của chuột.

Sau mỗi thử nghiệm, mô hình được lau sạch bằng nước để tránh mùi. Các thử nghiệm đều được ghi hình bằng 1 camera đặt ở vị trí thích hợp, hành vi của chuột sau đó được phân tích bằng phần mềm Eventlog 1.0 (EMCO software) bởi 1 chuyên viên độc lập có kinh nghiệm.

Xử lý số liệu thực nghiệm

Các dữ liệu được biểu thị dưới dạng Mean±SEM. Sử dụng phần mềm SPSS phiên bản 16, qua phân tích các số liệu bằng phép kiểm Kolmogorov-Smirnov cho thấy có sự phân bố không bình thường ở một số dãy số liệu, số liệu được thống kê sử dụng phép kiểm Kruskal-Wallis, tiếp theo dùng phép kiểm Mann-Whitney-U test để so sánh sự khác biệt giữa các lô. Sự khác nhau được xem là có ý nghĩa khi giá trị p<0,05.

Bảng 2. Thành phần hóa học của tinh dầu Cam, Chanh, Quýt, Bưởi, Tắc

STT	Thành phần	Công thức	Bưởi (%)	Cam (%)	Chanh (%)	Quýt (%)	Tắc (%)
-----	------------	-----------	----------	---------	-----------	----------	---------

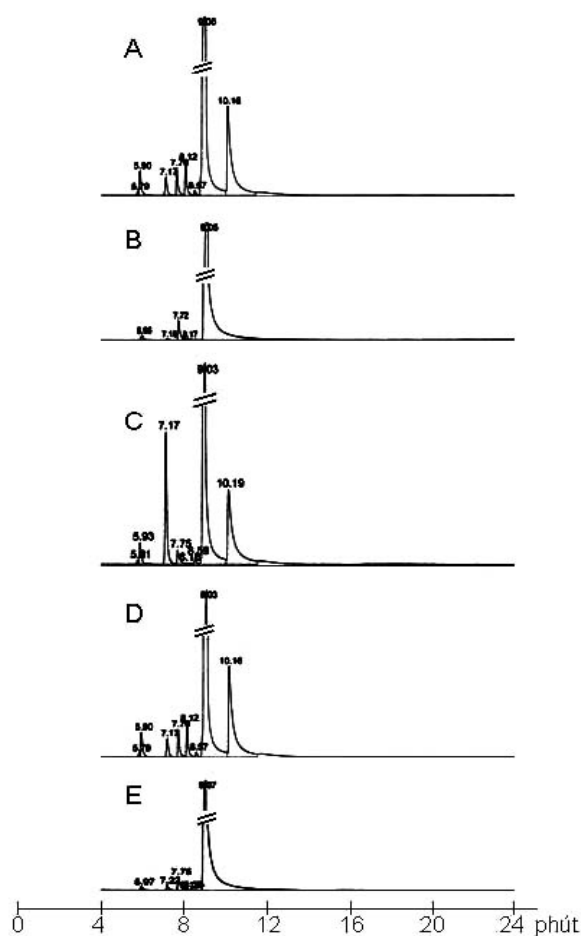
KẾT QUẢ VÀ BÀN LUẬN

Chung cất tinh dầu

Bảng 1. Kết quả chung cất tinh dầu Cam, Chanh, Quýt, Bưởi, Tắc

Tinh dầu	Khối lượng vỏ (g)	Khối lượng tinh dầu thu được (g)	Hiệu suất (%)
Bưởi	600	2,62±0,08	0,44±0,01
Cam	600	2,56±0,07	0,43±0,01
Chanh	600	1,22±0,35	0,2±0,004
Quýt	300	2,69±0,04	0,89±0,01
Tắc	300	1,35±0,09	0,45±0,03

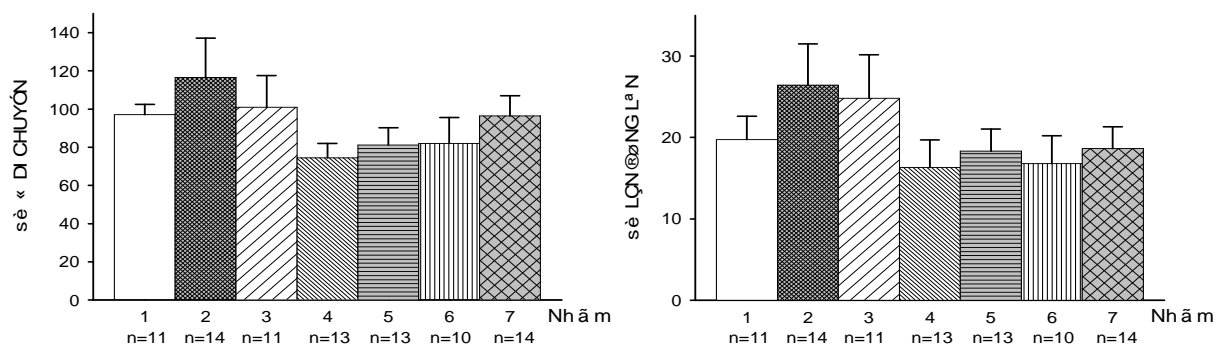
Thành phần hóa học của tinh dầu Cam, Chanh, Quýt, Bưởi, Tắc



Hình 1. Sắc đồ của các loại tinh dầu phân tích bằng GC/MS: Cam (A), Chanh (B), Quýt (C), Bưởi (D), Tắc (E)

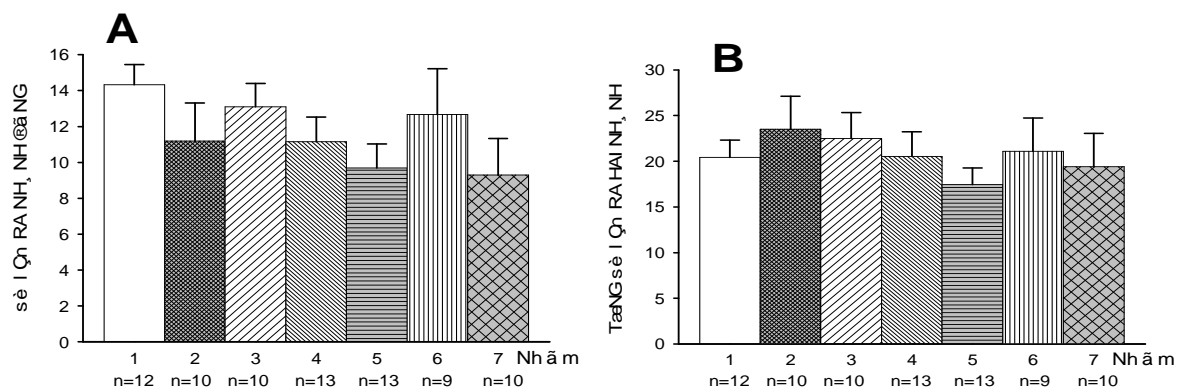
1	4-methyl-(1-methylethyl) bicyclo[3.1.0]hex-2-en	C10H16	0,33	0,28	0,25	0,15	0,15
2	1R-alpha-pinen	C10H16	2,40	0,81	1,94	0,91	0,64
3	4-methylen-1-(1-methylethyl) cyclohexen	C10H16	1,87	0,21	0,21	1,42	0,77
4	Beta-pinen	C10H16	2,39	2,59	-	2,71	2,17
5	Beta-myrcen		-	-	1,64	-	-
6	Alpha-phellandren	C10H16	2,88	-	-	-	-
7	3-methyl-6-(1-methylethylidene) cyclohexen	C10H16	0,44	-	0,61	-	-
8	Limonen	C10H16	67,4	96,11	61,72	94,82	94,74
9	2-methyl-5,1-methylethyl bicyclo[3.1.0]hexan-2-ol	C10H18	22,27	-	21,10	-	-
10	7,7-dimethyl-2-methylen bicyclo[2.2.1]heptan	C10H16	-	-	-	-	0,21
11	1,2,3,4a,5,6,8a-octahydro-7-methyl-4-methylen-1-(methylethyl) naphthalen	C15H24	-	-	-	-	1,32
12	6,6-dimethyl-2-methylen-,(1S) bicyclo[3.1.1]heptan	C10H16	-	-	11,35	-	-
13	7,11-dimethyl-3-methylen-,(Z) 1,6,10-dodecatrien	C15H24	-	-	0,05	-	-
14	2,4a,5,6,7,8,9,9a-octahydro-3,5,5-trimethyl-9-methylen-(4aS-cis) 1H-benzocyclohepten	C15H24	-	-	1,12	-	-

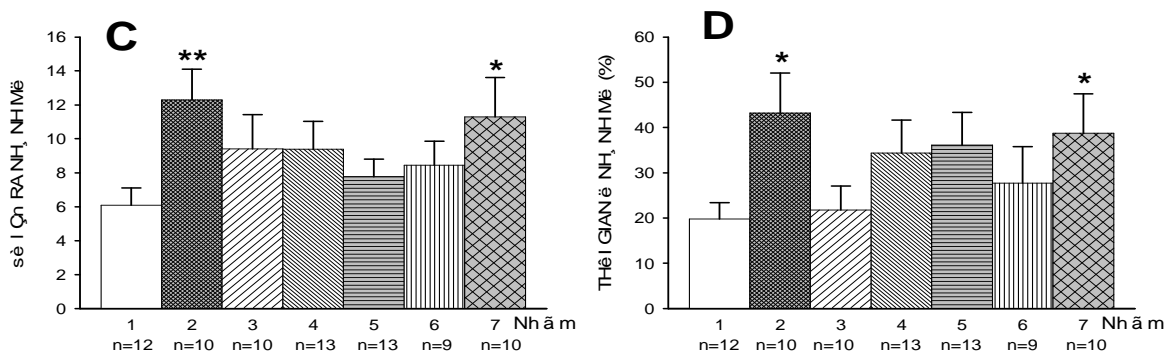
Mô hình môi trường mở



Hình 2. Ảnh hưởng của tinh dầu Citrus và diazepam trên số ô di chuyển và số lần đứng lên trong thử nghiệm mô hình môi trường mở. n thể hiện số chuột trong mỗi nhóm.

Mô hình chữ thập nâng cao





Hình 3. Ảnh hưởng của tinh dầu Citrus và diazepam trong thử nghiệm mô hình chữ thập nâng cao trên số lần ra nhánh đóng (A), tổng số lần vào cả hai nhánh (B), số lần vào nhánh mở (C) và thời gian ở nhánh mở (D). n thể hiện số chuột trong mỗi nhóm, * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ so với nhóm chứng (nhóm 1).

Trong mô hình môi trường mở, tinh dầu Citrus và diazepam không làm thay đổi ô di chuyển cũng như số lần đứng lên của chuột, sự vận động của chuột không bị ảnh hưởng bởi các chất đã sử dụng. Kết quả này được tiếp tục khẳng định qua mô hình chữ thập nâng cao, hai thông số thể hiện khả năng vận động của chuột là số lần chuột vào nhánh đóng cũng như tổng số lần vào cả hai nhánh cũng không thay đổi. Điều đó chứng minh, so với nhóm chứng, ở các liều đã sử dụng, tinh dầu Citrus và diazepam không làm thay đổi sự vận động bình thường của chuột. Đây là cơ sở để đánh giá tác dụng giải lo âu sau này.

Mô hình chữ thập nâng cao (Elevated plus maze) là mô hình được sử dụng rộng rãi nhất để sàng lọc các thuốc có tác dụng trên sự lo âu⁽¹⁾. Mô hình này được xây dựng trên sự tương phản giữa nhu cầu khám phá vùng lãnh thổ mới của chuột và bản năng tránh xa các vùng có thể có nguy hiểm (không gian mở và cao so với nền nhà của cánh tay mở). Số lần ra vùng cánh tay mở và thời gian ở vùng cánh tay mở của thú được xem là hành vi thể hiện mức độ lo âu của thú khi ở môi trường mới. Những thuốc có tác dụng giải lo âu có khả năng làm tăng thời gian và số lần vào cánh tay mở của thú. Ở nhóm chuột sử dụng tinh dầu Tắc liều 1g/kg (p.o), số lần và thời gian vào nhánh mở tăng lên có ý nghĩa thống kê, chứng tỏ tinh dầu Tắc ở liều này có tác dụng giải lo âu. Các

loại tinh dầu Citrus khác như Cam, Chanh, Bưởi, Quýt không cho thấy tác dụng này.

Khi khảo sát thành phần hóa học bằng GC-MS, điều khá đặc biệt ngoài sự khác nhau về tỷ lệ thành phần của 5 loại tinh dầu, ở tinh dầu Tắc có sự hiện diện của 7,7-dimethyl-2-methylen bicyclo[2.2.1]heptan (0,21%) và 1,2,3,4a,5,6,8a-octahydro-7-methyl-4-methylen-1-(methylethyl) naphthalen (1,32%) mà không phát hiện ở 4 loại tinh dầu còn lại. Rất có thể sự khác biệt trong thành phần hóa học này góp phần vào sự khác biệt về hoạt tính sinh học, cụ thể là tác dụng giải lo âu.

KẾT LUẬN

Trong nghiên cứu này, lần đầu tiên tinh dầu Tắc đã thể hiện tác dụng giải lo âu chứng minh qua mô hình chữ thập nâng cao. Tác dụng này là chuyên biệt do không bị ảnh hưởng bởi sự vận động tự nhiên của chuột thử nghiệm. Hoạt tính này có khả năng là do sự khác biệt về thành phần của tinh dầu của tinh dầu Tắc so với các loại tinh dầu khác. Tuy vậy, cần có những nghiên cứu tiếp theo để làm sáng tỏ vấn đề này.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Carobrez A. P. and Bertoglio L. J. (2005), "Ethological and Temporal Analyses of Anxiety-like Behavior: the Elevated Plus-Maze Model 20 years on", *Neurosci. Biobehav. Rev.*, 29, 1193-1205.
- Komiya Migiwa, Takeuchi Takashi, Harada Etsumori (2006), "Lemon oil vapor causes an anti-stress effect via modulating the 5-HT and DA activities in mice", *Behavioural Brain Research*, 172, 240-249

3. Lehrner J. , Eckersberger Christine, Walla P. , Potsch G., Deecke L.(2000), "Ambient odor of orange in a dental office reduces anxiety and improves mood in female patients", *Physiology & Behavior*, 71, 83-86
4. Lehrner J. , Marwinski G. , Lehr S., Jöhren P., Deecke L. (2005), "Ambient odors of orange and lavender reduce anxiety and improve mood in a dental office", *Physiology & Behaviour*, 86, 92-95.
5. Pultrni D. M. Aline, Galindo A. Luciane, Costa Mirtes (2006), "Effect of the essential oil from *Citrus aurantium* L. In experimental anxiety models in mice", *Life Sciences*, 78, 1720-1725.
