

1. **Nguyễn Thị Nhung và cộng sự**, Các nhân tố ảnh hưởng đến sự hài lòng của sinh viên đối với chương trình đào tạo theo định hướng ứng dụng CDIO tại trường Đại học Công nghiệp Hà Nội. Tập san sinh viên nghiên cứu khoa học 269, Số 9.2019.
2. **Lê Huyền Trang**, Đánh giá sự hài lòng của sinh viên về chất lượng dịch vụ đào tạo tại trường Cao đẳng Kỹ thuật công nghệ Bà Rịa Vũng Tàu. Luận văn thạc sỹ. Trường Đại học Bà Rịa Vũng Tàu. 2019.
3. **Hair J., Anderson, R., Tatham, R. and Black, W.**, Multivariate data analysis, Prentice Hall, New Jersey. 1998.
4. **Nunnally, J., and I. Bernstein.**, "Psychometric Theory 3rd edition (MacGraw-Hill, New York)". 1994.
5. **Parasuraman. A. Z.V và Berry. L.**, "SERVQUAL: A multiple-item scale for measuring consumer perceptions of service quality", Journal of Retailing. 64(Spring), 1988, pp. 12-40.

NGHIÊN CỨU ĐỘC TÍNH CẤP CỦA CAO ĐỊNH CHUẨN KIỂM SOÁT HÀM LƯỢNG NUCIFERIN TỪ LÁ SEN (NELUMBO NUCIFERA GAERTN.) TRÊN CHUỘT NHẮT TRẮNG

Trần Lê Chiêu Bích¹, Huỳnh Huỳnh Anh Thi¹, Phạm Đoàn Vi²,
Đỗ Châu Minh Vĩnh Thọ¹

TÓM TẮT

Đặt vấn đề: Sen là một trong số ít các dược thảo mà tất cả các bộ phận dùng đều được sử dụng và đều là những vị thuốc quý, có giá trị sinh học cao. Có nhiều nghiên cứu dược lý hiện đại đã chứng minh dịch chiết lá Sen có nhiều hoạt tính sinh học trên in vivo như: an thần [2],[4], chống béo phì [2], giảm cholesterol [2], hạ đường huyết [7], chống oxy hóa [8] trong máu có liên quan đến sự hiện diện của thành phần nuciferin có trong lá Sen. Tuy nhiên, hiện nay hầu như chưa có nghiên cứu đánh giá về tính an toàn của cao định chuẩn hàm lượng nuciferin từ lá Sen (Nelumbo nucifera Gaertn.). Do đó, thử nghiệm đánh giá độc tính cấp của cao định chuẩn kiểm soát hàm lượng nuciferin nhằm đánh giá độ an toàn cho việc thiết lập mức liều sử dụng hiệu quả an toàn cho các cao định chuẩn hàm lượng nuciferin là một yêu cầu cấp thiết.

Mục tiêu nghiên cứu: Đánh giá độc tính cấp của cao định chuẩn kiểm soát hàm lượng nuciferin từ lá sen hồng trên chuột nhắt trắng. **Đối tượng và phương pháp nghiên cứu:** Độc tính cấp của Cao lá Sen hồng được xác định trên chuột nhắt chủng Swiss albino, qua đường uống, mô hình liều cố định, theo hướng dẫn của Bộ Y tế [1], tác giả Đỗ Trung Đàm[3] và các nghiên cứu [5], [6]. Liều thử giới hạn ban đầu là 50g/kg/1 lần duy nhất. **Kết quả:** Trong các khoảng thời gian quan sát 72h và 7 ngày, chuột không có bất kỳ hiệu ứng độc tính nào về hành vi, ăn uống, tiêu tiểu và không có chuột nào bị chết. **Kết luận:** Cao định chuẩn hàm lượng nuciferin từ lá Sen (Nelumbo nucifera Gaertn.) không gây độc tính cấp đường uống trên chuột nhắt trắng ở liều thử nghiệm tối đa cho uống qua kim là 50 g/kg. Cao định chuẩn hàm lượng

nuciferin từ lá Sen an toàn trên mô hình thử nghiệm độc tính cấp, có thể ứng dụng trong công nghệ bào chế dược phẩm.

Từ khóa: Độc tính cấp, LD₅₀, nuciferin, lá sen hồng, cao định chuẩn.

SUMMARY

STUDY ON ACUTE TOXICITY OF THE STANDARDIZED EXTRACT OF NUCIFERINE CONTENT FROM LOTUS LEAVES (NELUMBO NUCIFERA GAERTN.) IN EXPERIMENTAL ANIMALS

Background: In the treasure of Vietnamese medicinal plants, the Lotus (Nelumbo nucifera Gaertn., Nelumbonaceae) is one of the few herbs whose components are highly valuable medicines. Many modern pharmacological studies proved that the Lotus leaf extracts have many biological activities in vivo, such as insomnia, anti-obesity, inhibiting the growth of cancer cells, and antioxidant effects related to the presence of nuciferine in lotus leaves. Currently, there are many preparations made from the raw materials of Folium Nelumbinis that are becoming more and more popular. However, almost no studies evaluate the acute toxicity of the standardized extract of nuciferine content from Lotus leaves. Therefore, conducting an acute toxicity test of a controlled high level of nuciferine is very necessary to establish safe dose levels. **Objectives:** This study investigated the acute toxicity of the standardized extract of nuciferine from Folium Nelumbinis in Swiss albino rats for evaluating its safety profile. **Materials and method:** Acute toxicity was determined in mice with Swiss albino strain, orally, in a fixed dose model, following the guidelines of the Ministry of Health and Do Trung Dam. The initial test dose limit is 50 g/kg/time only. **Results:** During the 72h and 7 days observation periods, rats did not show any behavioral, feeding, or urinary toxicity, and none of the mice died. **Conclusion:** The product did not show acute oral toxicity in mice with the maximum oral dose of 50 g/kg, equivalent to 233,75 g in humans of 55 kg.

¹Trường Đại học Y Dược Cần Thơ

²Trường Đại học Tây Đô

Chịu trách nhiệm chính: Đỗ Châu Minh Vĩnh Thọ

Email: dcmvtho@ctump.edu.vn

Ngày nhận bài: 29.8.2022

Ngày phản biện khoa học: 28.9.2022

Ngày duyệt bài: 11.10.2022

Hence, the extract can be utilized safely for therapeutic use in pharmaceutical preparation.

Keywords: acute toxicity, LD₅₀, nuciferine, Folium nelumbinis, standardized extract.

I. ĐẶT VẤN ĐỀ

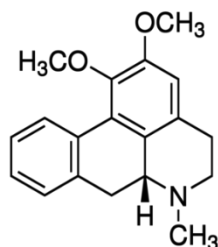
Cây Sen (*Nelumbo nucifera* Gaertn., Nelumbonaceae) đã được con người sử dụng từ rất lâu như một loại thảo dược, đặc biệt ở Việt Nam. Danh y Hải Thượng Lãn Ông đã viết: "Cây mọc từ dưới bùn đen mà không ô nhiễm mùi bùn, đượm khí thơm trong lành của trời đất nên củ, lá, hoa, tua, vỏ quả, ruột đều là thuốc hay".

Các nghiên cứu dược lý đã chứng minh dịch chiết lá sen có nhiều hoạt tính sinh học in vivo như: an thần [2],[4], chống béo phì[4], hạ cholesterol huyết, chống oxy hóa[4] [8], hạ đường huyết [7], một nghiên cứu mới năm 2022 của tác giả Anupam Bishayee đánh giá hoạt tính sinh học của sen có khả năng chống lại sự phát triển của tế bào ung thư.

Lá sen chứa nhiều hợp chất khác nhau, trong đó nhóm alkaloid và flavonoid là hai thành phần chính chiếm tỉ lệ tương đối lớn và cho tác dụng sinh học chủ yếu. Hàm lượng alkaloid toàn phần của lá sen chiếm từ 0,77 - 0,84% tùy điều kiện khí hậu, thổ nhưỡng. Có khoảng 15 alkaloid đã được xác định. Các alkaloid trong lá Sen có cấu trúc isoquinolin bao gồm các phân nhóm aporphin, proaporphin, benzyloquinolin và bisbenzyloquinolin[6]. Trong đó, các alkaloid có cấu trúc aporphin chiếm phần lớn về tỉ lệ cũng như số lượng trong alkaloid toàn phần của lá sen.

Nuciferin – một hoạt chất chính từ lá sen – là một alkaloid có khung apomorphin có cấu trúc như Hình 1 [2]. Bên cạnh đó, theo nghiên cứu năm 1963 của Bernauer K đánh giá trong thành phần cao lá sen còn có pronuciferin có thể chuyển thành nuciferin trong môi trường acid.

Nuciferin đã được chứng minh có tác dụng chống loạn thần ở loài gặm nhấm [4][6]. Hoạt chất này là cũng một chất chủ vận nghịch đảo mạnh tại thụ thể 5-HT7 của con người [6].



Hình 1 – Cấu trúc hóa học của nuciferin [2]

Tại Việt Nam hiện nay, việc sử dụng lá sen trong điều trị, hỗ trợ điều trị bệnh ngày càng phổ

biến. Tuy nhiên, hiện có rất ít nghiên cứu về độc tính cấp của cao chiết từ lá sen có kiểm soát thành phần nuciferin – là chất có hoạt tính sinh học chính. Vì vậy, nghiên cứu này được thực hiện nhằm mục tiêu đánh giá độc tính cấp của cao định chuẩn kiểm soát hàm lượng nuciferin trên chuột nhắt trắng Swiss albino. Nghiên cứu này sẽ là tiền đề giúp triển khai các nghiên cứu tiếp theo nhằm tạo ra sản phẩm an toàn và hiệu quả đưa đến người tiêu dùng.

II. ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Đối tượng nghiên cứu. Cao định chuẩn hàm lượng nuciferin 10% chiết suất từ lá Sen (*Nelumbo nucifera* Gaertn.) (gọi tắt là cao định chuẩn)

Cao định chuẩn hàm lượng nuciferin 10% được chiết theo các quy trình của nhóm nghiên cứu: lá sen khô sau khi xử lý tạt tấm acid H₂SO₄ 2% ngâm lạnh với cồn 70°C, cô áp suất thấp, cần toàn phần thu được hòa tan với acid; kiềm hóa với dung dịch NH₃ 12,5%, chiết kiệt alcaloid với Ethyl acetat, cô áp suất thấp thu được cao alkaloid. Cao định chuẩn lá Sen có kiểm soát hàm lượng nuciferin được xác định bằng phương pháp sắc ký lỏng ghép với đầu dò dây diod quang (HPLC/PDA)[3].

Cao định chuẩn thu được có dạng bột, màu vàng kem nhạt, được đựng trong lọ thủy tinh tối màu đậy kín. Cao đạt yêu cầu tiêu chuẩn cơ sở (TCCS) với độ ẩm 12%, định tính đạt yêu cầu bằng vi phẫu, soi bột, phản ứng hóa học và sắc lý lớp mỏng, độ tro toàn phần, định lượng hàm lượng nuciferin trong cao định chuẩn lá sen được xác định bằng phương pháp sắc ký lỏng hiệu năng cao với đầu dò dây diod quang là 10%, dư lượng kim loại nặng toàn phần không quá 10 phần triệu Pb (ĐDVN V).

Động vật thử nghiệm: Chuột nhắt, đực và cái, chủng Swiss albino, 6 tuần tuổi, trọng lượng 18 - 22g, cung cấp bởi Viện Vaccin và Sinh phẩm y tế Nha Trang. Sử dụng chuột khỏe mạnh, không có biểu hiện bất thường, được nuôi ổn định trong môi trường thí nghiệm 5 ngày. Chuột được nuôi trong lồng 25 x 35 x 15 cm, cung cấp thức ăn và nước uống đầy đủ [1], [3].

2.1.2. Hóa chất, dụng cụ, thuốc thử. Bình nước Pet Water Bottle 125 mL, tấm lưới kim loại mạ kẽm, hộp nhựa chữ nhật Duy Tân, găng tay cao su y tế, khẩu trang y tế, bơm tiêm sử dụng một lần 1 mL/cc, kim cong đầu tù, cân phân tích Mettler Toledo, cân kỹ thuật. Nước tinh khiết, cao định chuẩn kiểm soát hàm lượng nuciferin lá sen hồng.

2.1.3. Tiêu chuẩn loại trừ. Động vật thử

nghiệm mang thai, tổn thương, chết trong quá trình thực nghiệm; cao định chuẩn không đạt một trong các yêu cầu chất lượng (TCCS) đã đề ra.

2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Thiết kế nghiên cứu. Sử dụng phương pháp xác định độc tính cấp mô hình liều cố định, theo Quyết định 141/QĐ-K2ĐT ngày 27/10/2015 của Bộ Y tế [1] và Tài liệu Nghiên cứu Độc tính thuốc của tác giả Đỗ Trung Đàm [5].

Nguyên tắc: Cho chuột thử nghiệm dùng cùng liều mẫu thử trong điều kiện ổn định như nhau, quan sát các phản ứng xảy ra trong vòng 72 giờ và 7 ngày.

2.2.3. Phương pháp nghiên cứu. Cho 10 chuột nhin đối ít nhất 12 giờ trước khi cho uống mẫu thử liều tối đa có thể qua đường uống, thể tích 50 ml/kg theo tài liệu của Đỗ Trung Đàm [5]. Theo dõi và ghi nhận cử động tổng quát, biểu hiện về hành vi, trạng thái lông, ăn uống, tiêu tiểu và số lượng chết của chuột trong vòng 72 giờ. Nếu sau 72 giờ, chuột không có dấu hiệu bất thường hoặc chết, tiếp tục theo dõi trong vòng 7 ngày. Có 3 trường hợp có thể xảy ra:

- Trường hợp 1: Sau khi chuột uống mẫu thử, số chuột thử nghiệm vẫn bảo toàn, xác định liều của mẫu thử cao nhất có thể qua kim mà không làm chuột chết (D_{max}).

- Trường hợp 2: Sau khi cho chuột uống mẫu thử, tỷ lệ chuột tử vong là 100% thì thử với liều giảm $\frac{1}{2}$ liều đầu. Tiếp tục giảm liều đến khi tìm được liều tối thiểu gây chết 100% chuột (LD_{100}) và liều tối đa không gây chết chuột (LD_0). Tiến

hành thử nghiệm xác định LD_{50} : chia chuột làm 4 lô, mỗi lô ít nhất 6 con. Chia 4 liều theo cấp số cộng khoảng từ LD_0 - LD_{100} . Ở những liều gần LD_{50} , tăng số lượng chuột lên để sự đo lường được chính xác hơn. Theo dõi trong 72 giờ, ghi nhận các diễn biến của chuột, số lượng chuột chết ở mỗi lô, lập phân suất tử vong để tìm LD_{50} .

- Trường hợp 3: Sau khi cho uống mẫu thử, tỷ lệ chuột chết thấp hơn 100%, không xác định được liều LD_{100} , không xác định được LD_{50} . Trường hợp này có thể xác định liều tối đa không gây chết chuột, gọi là liều dưới liều chết (LD_0).

Tiến hành khảo sát độc tính cấp đường uống của cao định chuẩn được khảo sát trên 10 chuột nhắt trắng (5 đực, 5 cái). Mẫu thử cao định chuẩn được cho chuột nhắt uống 1 lần duy nhất ở nồng độ cao thử đậm đặc nhất có thể qua kim cho chuột uống là 1g cao/ml với thể tích tối đa có thể cho chuột nhắt uống là 50 ml/kg, tương ứng với liều 50 g cao/kg. Dung môi phân tán cao định chuẩn là nước tinh khiết.

III. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU

Sau khi cho uống, chuột nhắt giảm di chuyển trong 15 phút, sau đó tất cả chuột di chuyển bình thường, khỏe mạnh, cử động bình thường. Trong thời gian 72 giờ quan sát, không có chuột nào bị chết. Tiếp tục theo dõi chuột trong 07 ngày ở điều kiện chăm sóc bình thường, kết quả cho thấy không có chuột nào bị chết; chuột không có bất thường về hành vi, trạng thái lông, ăn uống, tiêu tiểu.

Bảng 1. Kết quả thử độc tính cấp đường uống của Cao lá Sen hồng

Chuột thử nghiệm	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Phái	♂	♂	♂	♂	♂	♀	♀	♀	♀	♀
Trọng lượng (g)	19,4	17,6	17,7	18,3	17,5	22,1	18,2	18,3	18,8	20,5
Thể tích uống (ml)	0,97	0,88	0,89	0,92	0,88	1,11	0,91	0,92	0,94	1,03
Tổng trọng lượng (g)	188,4									
Tổng thể tích (ml)	9,45									
Số chuột thử nghiệm	10									
Số chuột chết sau 72 giờ	0									
Số chuột chết sau 5 ngày	0									
Trọng lượng sau 72 giờ (g)	24,1	23,5	19,9	22,7	19,7	25,4	22,4	21,5	25,2	24,0
Trọng lượng sau 7 ngày (g)	21,0	26,1	22,0	24,6	22,9	26,5	24,4	23,6	27,7	27,5

Như vậy, sản phẩm cao lá Sen hồng không làm chết chuột, thể hiện độc tính cấp đường uống trên chuột nhắt với liều tối đa có thể cho uống là 50 g cao/kg, tương ứng với liều 233,75 g cao ở người lớn nặng 55 kg.

IV. BÀN LUẬN

Nhóm nghiên cứu đã lựa chọn mô hình liều cố định theo hướng dẫn của tổ chức Hợp tác và

Phát triển kinh tế (Organization for Economic Cooperation and Development – OECD) và Bộ y tế vì đây là phương pháp phù hợp với tất cả các trường hợp cần xác định độc tính cấp. Theo OECD, với sản phẩm có liều chết LD_{50} lớn hơn 5000 mg/kg được xem là an toàn (xem bảng 2) [1],[5].

Bảng 2. Phân loại hóa chất theo mức độ độc dựa vào LD_{50} theo OECD [1]

Cấp độ độc	Mức độ độc	Liều LD50 gần đúng (mg/kg)
1	Cực kỳ độc	Từ 0 đến ≤ 5
2	Rất độc	> 5 đến ≤ 50
3	Độc	> 50 đến ≤ 300
4	Độc vừa	> 300 đến ≤ 2000
5	Độc thấp	> 2000 đến ≤ 5000
6	Gần như không độc	> 5000

Sau thử nghiệm sơ bộ dự đoán mẫu thử có thể không độc, thử nghiệm giới hạn đã được nhóm lựa chọn thực hiện đầu tiên với mức liều đường uống cao nhất có thể nhằm giảm số lượng động vật và thời gian thử nghiệm mà vẫn hoàn thành mục tiêu nghiên cứu. Với mức liều cao nhất có thể cho chuột uống (về nồng độ và thể tích) là 50 g cao/kg thể trọng nhưng chưa ghi nhận được bất kỳ biểu hiện độc tính cấp nào của chuột và không có chuột chết trong vòng 72 giờ và trong 7 ngày, vì vậy chưa xác định được LD₅₀ trên chuột nhắt chủng Swiss albino theo đường uống.

Dựa theo kết quả thu được, mức liều thử nghiệm tối đa gấp 10 lần giới hạn của Bộ y tế và OECD (5000 mg), phân loại mức độ 6 – “Gần như không độc”. Điều này cho thấy cao định chuẩn hàm lượng nuciferin có tính an toàn cao trong thử nghiệm đánh giá độc tính cấp trên chuột.

So sánh với một nghiên cứu năm 2012 của tác giả K K Patel, Fedelic A Toppo, P K Singour đánh giá trên dịch chiết ethanol các bộ phận trên mặt đất của sen, các chuột thử nghiệm đã chết 100% ở liều 600 mg/kg thể trọng sau 3 ngày, một nghiên cứu khác năm 2001 của tác giả Nguyễn Thị Nhung đánh giá liều LD₅₀ theo phương pháp Behrens là 330mg/kg thể trọng cho thấy cao định chuẩn hàm lượng nuciferin của nhóm nghiên cứu có tính an toàn cao hơn.

Theo các nghiên cứu độc tính cấp của nuciferin [4], [5] cho thấy nuciferin có tác động hướng thần, ức chế các hoạt động trên các cơ quan cảm giác nói chung, gây lơ mơ, và làm thay đổi ngưỡng co giật ở chuột thử nghiệm được ghi nhận ở mức liều đường uống 240 mg/kg trên chuột nhắt và 280 mg/kg trên chuột cống, và liều 83 mg/kg qua đường phúc mạc ở chuột nhắt [6]. Tuy nhiên, trong thử nghiệm này, với nồng độ nuciferin trong cao định chuẩn là 10%, tương đương với liều tối đa 50g cao/kg, liều nuciferin đã dùng là 5g/kg, chưa ghi nhận được các độc tính trên hệ thần kinh của chuột. Nhóm nghiên cứu nhận thấy sau khi cho uống, chuột nhắt giảm di chuyển trong 15 phút cần thực hiện thêm những thí nghiệm khác để tìm hiểu về cơ

chế và tác động trên hệ thần kinh của cao lá Sen hồng nhằm phát triển ứng dụng hiệu quả và đồng thời kiểm soát độc tính nếu có; quan trọng nhất là chúng ta biết được cao lá Sen hồng chiết theo quy trình của nhóm nghiên cứu hầu như không gây độc và không gây chết chuột dù đã dùng liều tối đa có thể. Liều 50g cao/kg ở chuột nhắt trắng tương đương liều dùng 233,75 g cao ở người nặng 55 kg (tính theo hệ số chuyển đổi là 11,76). Vì vậy, khi so sánh với liều dự kiến trong thành phẩm viên nang là 1,5g cao/kg/ngày vẫn chưa gây độc, cho thấy sản phẩm gần như không có độc tính và tính khả thi cao ở liều dự kiến.

V. KẾT LUẬN

Sản phẩm cao định chuẩn hàm lượng nuciferin chiết suất từ lá Sen (*Nelumbo nucifera* Gaertn.) không thể hiện độc tính cấp đường uống trên chuột nhắt ở liều tối đa có thể cho uống là 50 g/kg, ứng với 233,75 g cao ở người nặng 55 kg. Kết quả cho thấy việc uống cao định chuẩn kiểm soát hàm lượng nuciferin từ lá Sen hồng an toàn trên mô hình thử nghiệm có thể triển khai ứng dụng trong công nghệ bào chế dược phẩm.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Bộ Y tế (2015)** - Quyết định số 141/QĐ-K2ĐT ngày 27/10/2015 về việc ban hành tài liệu chuyên môn "Hướng dẫn thử nghiệm tiền lâm sàng và lâm sàng thuốc đông y, thuốc từ dược liệu".
- Đỗ Tất Lợi (2004)**. Những cây thuốc và vị thuốc Việt Nam, Nhà xuất bản Y học Hà Nội, tr. 783- 786.
- Đỗ Trung Đàm (2014)**, "Phương pháp xác định độc tính cấp của thuốc", Nhà xuất bản Y học, Hà Nội.
- Nguyễn Thị Nhung (2001)**, Nghiên cứu đặc điểm thực vật, thành phần hóa học và tác dụng sinh học của cây sen (*Nelumbo nucifera* Gaertn.) họ sen (*Nelumbonaceae*), Luận án tiến sĩ dược học, Đại học Dược Hà Nội.
- E Macko et al (1972)**, Studies on the pharmacology of nuciferine and related aporphines, Archives Internationales de Pharmacodynamie et de Therapie., 197(261), p. 261 – 273.
- Farrell MS, McCorvy JD, Huang X-P, Urban DJ, White KL, Giguere PM, et al. (2016)** In Vitro and In Vivo Characterization of the Alkaloid Nuciferine. PLoS One 11(3): e0150602. doi: 10.1371/journal.pone.0150602
- K Hoa Nguyen, T Nhan Ta, T Hong Minh Pham (2012)**, "Nuciferine stimulates insulin secretion from beta cells-an in vitro comparison with glibenclamide", Journal of Ethnopharmacology, 142(2), pp. 488-95.
- Ming-Juan Wu, Lisu Wang, Ching-Yi Weng, Jui-Hung Yen (2003)**, "Antioxidant activity of methanol extract of the lotus leaf (*Nelumbo nucifera* Gaertn.)", The American Journal of Chinese Medicine, 31(5), pp. 687-689.