

KHẢO SÁT ĐỘC TÍNH CẤP VÀ TÁC DỤNG HẠ ACID URIC CỦA CAO CHIẾT NƯỚC LÁ CÂY DUNG (*SYMPLOCOS COCHINCHINENSIS* (Lour.) S. Moore)

Lê Văn Huân^{1*}, Chung Khánh Linh², Trương Quốc Quyền¹, Phạm Thảo Nguyên²,
Bùi Nguyễn Biên Thùy², Nguyễn Hoàng Minh³, Vũ Thị Thanh Tuyền²

¹ Khoa Công nghệ Sinh học - Trường Đại học Bình Dương

² Khoa Dược - Trường Đại học Y Dược Thành phố Hồ Chí Minh

³ Trung tâm Sâm và Dược liệu Thành phố Hồ Chí Minh - Viện Dược liệu

TÓM TẮT

Hiện chưa có nhiều nghiên cứu tại Việt Nam công bố chi tiết về tác dụng sinh học và độc tính của lá cây Dung (*Symplocos cochinchinensis* (Lour.) S. Moore). Đề tài cung cấp cơ sở về tính an toàn và tác dụng dược lý của lá cây Dung qua khảo sát độc tính cấp đường uống và tác động hạ acid uric máu *in vivo* của dược liệu này. Lá cây Dung được xay thô và tiến hành chiết xuất bằng phương pháp chiết nóng sử dụng dung môi là nước với tỷ lệ dược liệu:dung môi là 1:7. Chuột được gây tăng acid uric bằng kali oxonat (liều 300 mg/kg) và được cho uống cao chiết nước lá Dung hoặc allopurinol. Cao chiết nước lá Dung (SCW) thể hiện độc tính cấp đường uống với LD₀ = 7,5 g/kg và tác động hạ acid uric ở liều 0,5 g/kg và 1,0 g/kg. Cao chiết nước lá Dung có tác dụng dự phòng tăng acid uric trên mô hình gây tăng acid uric máu chuột bằng kali oxonat.

Từ khóa: Allopurinol, acid uric máu, độc tính cấp, lá Dung, *Symplocos cochinchinensis*.

MỞ ĐẦU

Điều trị tăng acid uric máu và duy trì hàm lượng acid uric trong máu ở mức cho phép có ý nghĩa quan trọng trong việc kiểm soát bệnh, hạn chế tối đa các biến chứng tại khớp và các tổ chức khác (thận, tim mạch) giúp phòng chống bệnh gout và các bệnh thứ phát do tăng acid uric máu. Việc sử dụng các loại tân dược với liệu trình dài thường gây tác dụng phụ. Chính vì thế, việc nghiên cứu tìm ra những thuốc có nguồn gốc từ dược liệu ít tác dụng phụ, sản xuất dễ dàng, giá thành phù hợp với mọi người là điều mà rất nhiều nhà nghiên cứu quan tâm.

Cây Dung (*Symplocos cochinchinensis* (Lour.) S. Moore) thường mọc phổ biến ở một số vùng núi các tỉnh miền Trung của nước ta (Phạm Hoàng Hộ, 1999). Lá Dung từ lâu đã được dùng làm thức uống truyền thống của người dân địa phương. Nước sắc lá Dung có màu vàng óng, có nhiều tác dụng như hỗ trợ tiêu hóa tốt, hỗ trợ điều trị đau dạ dày, tá tràng, giúp thanh lọc cơ thể, tiêu mỡ, cân bằng huyết áp, hỗ trợ kháng khuẩn, kháng viêm, mau lành vết thương, giúp thông huyết, giảm đau khớp xương... Trên thế giới, đã có nhiều nghiên cứu về thành phần hóa học của cây Dung và những cây cùng chi với những thành phần chính được ghi nhận là saponin, flavonoid, lignan và các polyphenol (Đoàn Thị Mai Hương, 2007); cũng như các thử nghiệm *in vivo* về tác dụng của cây Dung trong điều trị đái tháo đường, kháng khối u, chống oxy hóa, chống glycat hóa,... đã được chứng minh (Antony *et al.*, 2014). Tuy nhiên, các báo cáo về tính an toàn và tác động hạ acid uric máu còn rất hạn chế. Hơn nữa, ở Việt Nam, những nghiên cứu công bố về thành phần hóa học và tác dụng sinh học của lá cây Dung (*Symplocos cochinchinensis* (Lour.) S. Moore) còn rất sơ sài. Từ những cơ sở trên, đề tài thực hiện “Khảo sát độc tính cấp và tác dụng hạ acid uric của cao chiết nước lá cây Dung (*Symplocos cochinchinensis* (Lour.) S. Moore)” nhằm cung cấp cơ sở khoa học về tính an toàn và giá trị sử dụng của dược liệu này.

NGUYÊN VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

Mẫu thử

Lá cây Dung do ThS. Lê Văn Huân thu hái tại huyện Trà Bồng, tỉnh Quảng Ngãi vào tháng 10/2016. Mẫu được định danh bởi TS. Võ Văn Lẹo và lưu tại Labo Dược liệu, khoa Dược, Đại học Y Dược TP.HCM, số hiệu của mẫu lưu là NP-SC/102016. Lá của cây Dung được phơi khô, xay thành bột thô, bảo quản ở nhiệt độ phòng (25°C).

Hóa chất và thiết bị

Kali oxonat (Sigma-Mỹ), bộ kit acid uric (Human-Đức). Allopurinol của công ty cổ phần XNK Y Tế Domesco.

Máy sinh hoá bán tự động Sreen Master 3000.

Động vật thử nghiệm

Chuột nhắt trắng đực (chủng *Swiss albino*, 5 - 6 tuần tuổi) được cung cấp bởi Viện Vắc xin và Sinh phẩm Y tế Nha Trang và được để ổn định 1 tuần trước thực nghiệm. Chuột được nuôi bằng thực phẩm viên được cung cấp

bởi Viện Vắc xin và Sinh phẩm Y tế Nha Trang và nước uống đầy đủ. Thể tích dịch chiết lá Dung dùng cho đường uống hay tiêm màng bụng được tính toán dựa theo trọng lượng của chuột (10 mg/kg).

Phương pháp nghiên cứu

Chiết xuất dược liệu

Nguyên liệu lá cây Dung được thu hái tại huyện Trà Bồng, tỉnh Quảng Ngãi. Nguyên liệu lá khô được xay thô và tiến hành chiết xuất bằng phương pháp chiết nóng sử dụng dung môi là nước với tỷ lệ dược liệu:dung môi là 1:7. Dịch chiết thu được đem cô để thu dung môi thu được cao toàn phần lá Dung (SCW) có thể chất đặc sánh, màu vàng sẫm, vị đắng nhẹ, mùi thơm đặc trưng.

Khảo sát độc tính cấp đường uống trên chuột nhắt

Theo "Phương pháp xác định độc tính cấp của thuốc" (Đỗ Trung Đàm, 2014). Nghiên cứu độc tính cấp của mẫu thử trên động vật thí nghiệm, chủ yếu là xác định liều chết trung bình nếu có (liều gây chết 50% số con vật thí nghiệm, gọi là LD₅₀: lethal dose 50%) trong những điều kiện nhất định. Biết LD₅₀ mới xác định được chỉ số điều trị TI (Therapeutic index) là một thông số rất quan trọng để quyết định xem có nên đưa thuốc vào dùng trên người hay không và là một trong những cơ sở để suy ra liều để khảo sát tác dụng dược lý trên động vật thí nghiệm và suy ra liều điều trị ở người, thường là khoảng 1/10 LD₅₀ hoặc nhỏ hơn. Chỉ số điều trị TI là tỉ số giữa liều chết trung bình LD₅₀ và liều hữu hiệu trung bình ED₅₀. Nếu chỉ số điều trị càng lớn thì phạm vi điều trị càng lớn và độc tính càng thấp.

$$TI = LD_{50} / ED_{50} \quad \text{Điều kiện: } TI \geq 10$$

Chuột nhắt chia thành các lô tương tự, những chuột ở cùng một lô sẽ nhận cùng một liều chất 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 DS dùng trong các thực nghiệm dược 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, tỉ lệ tử vong là 100% thì đây là liều chết tuyệt đối - LD₁₀₀. Tính toán và gây lô thử nghiệm để tiếp tục xác định được liều không làm chết con vật nào - LD₀. Từ đó, suy ra liều LD₅₀ được tính theo công thức Behrens-Karber.
- Trường hợp 3: Sau khi cho uống mẫu thử, phân suất tử vong thấp hơn 100%, không xác định được liều gây chết tuyệt đối. Đối với trường hợp này, không thể suy ra liều LD₅₀, nhưng có thể xác định được liều tối đa không gây chết chuột, gọi là liều dưới liều chết - LD₀. Liều tương đối an toàn DS dùng cho thực nghiệm dược lý có giá trị bằng 1/5 hoặc 1/10 LD₀.

Khảo sát tác dụng hạ acid uric của mẫu thử

Gây tăng acid uric cho chuột bằng kali oxonat (Watabe *et al.*, 2006).

Lô chứng sinh lý: uống nước cất liên tục 4 ngày; ngày 5 tiêm màng bụng NaCl 0,9%.

Lô chứng bệnh lý: uống nước cất liên tục 4 ngày; ngày 5 tiêm màng bụng kali oxonat (liều 300 mg/kg) và 1 giờ sau cho uống nước cất.

Lô thử cao chiết cho uống một lần vào buổi sáng trong 4 ngày liên tục; ngày 5 tiêm màng bụng kali oxonat (liều 300 mg/kg) và 1 giờ sau cho uống cao chiết.

Lô đối chiếu: uống nước cất liên tục 4 ngày; ngày 5 tiêm màng bụng kali oxonat (liều 300 mg/kg) và 1 giờ sau cho uống allopurinol (liều 10 mg/kg).

Tiến hành lấy máu đuôi chuột sau 1 giờ khi đã hoàn thành cho chuột tiêm và uống nước/cao chiết như thiết kế thí nghiệm.

Nồng độ acid uric trong huyết tương được xác định theo hướng dẫn của kit thử Human-Đức.

Đánh giá kết quả

Các số liệu được biểu thị bằng trị số trung bình: $M \pm SEM$ (Standard Error of the Mean - Sai số chuẩn của giá trị

trung bình) và xử lý thống kê dựa vào phép kiểm One-Way ANOVA hậu kiểm Student-Newman-Keuls hoặc T-test (phần mềm SigmaStat-3.5). Kết quả thử nghiệm đạt ý nghĩa thống kê với độ tin cậy 95% khi $p < 0,05$.

KẾT QUẢ

Hiệu suất chiết và chất lượng của cao chiết nước

Hiệu suất chiết cao với dung môi nước là 20,14%, sau khi cô loại dung môi thu cao đặc, màu vàng sẫm, có mùi thơm đặc trưng của dược liệu. Cao có độ ẩm trung bình 15,8%, độ tro toàn phần trung bình là 14,21%.

Ảnh hưởng của cao chiết trên trọng lượng của chuột thí nghiệm

Chuột được uống nước cất hoặc mẫu thử một lần vào buổi sáng, liên tục trong 4 ngày. Tiến hành cân chuột vào ngày thứ 1 (D1) và ngày thứ 5 (D5) nhằm đánh giá khả năng ảnh hưởng của cao chiết đến khối lượng của chuột. Kết quả được thể hiện ở Bảng 1.

Bảng 1. Ảnh hưởng của cao chiết nước từ lá cây Dung đến trọng lượng cơ thể chuột

Lô	n	D1 (Mean $\pm$ SEM)	D5 (Mean $\pm$ SEM)	Giá trị p
Chứng	8	24,75 $\pm$ 0,77	26,13 $\pm$ 0,55	0,164
Liều thử 1 (2,5 g/kg)	8	24,75 $\pm$ 0,96	24,88 $\pm$ 1,22	0,786
Liều thử (5,0 g/kg)	8	22,88 $\pm$ 0,88	21,75 $\pm$ 0,73	0,051

Nhận xét: Trong thời gian nghiên cứu, trọng lượng của chuột ở lô chứng, liều thử 1 và liều thử 2 không có sự thay đổi có ý nghĩa thống kê ($p > 0,05$).

Độc tính cấp đường uống trên chuột nhắt của cao chiết nước từ lá cây Dung

Cho chuột uống đồng lượng cao thử ở nồng độ tối đa phân tán trong nước cất qua kim là 1500 mg/ml, thể tích cho chuột uống 20 ml/kg (tương đương 30 g cao/kg). Sau khi cho uống mẫu thử, chuột có biểu hiện lừ đừ, lông xù và chết sau 4-24 giờ thử nghiệm, chảy máu móng mắt, gan xung huyết.

Tiến hành xác định LD₀: Số lượng chuột chết và sống ở mỗi lô sau 72 giờ được trình bày ở Bảng 2.

Bảng 2. Kết quả thử độc tính cấp cao chiết nước lá cây Dung

Liều dùng (g/kg)	Số chuột thử (n _i)	Số chuột chết (r _i)	Tỷ lệ % chết
7,5	10	0	0
10	10	1	10
15	10	2	20
20	10	6	60
25	10	8	80
30	10	10	100

Tiến hành giảm liều cao thử, kết quả cho thấy ở liều uống 7,5 g/kg thể trọng, chuột vẫn có biểu hiện xù lông như trên và sau 6 giờ tất cả các chuột đều sinh hoạt bình thường và không ghi nhận được phân suất tử vong trong 72 giờ. Liều này được xác định là liều dưới liều chết (Infraethal dose): LD₀.

Theo dõi tiếp tục trong 14 ngày, các chuột đều sinh hoạt bình thường và không ghi nhận được phân suất tử vong.

Liều tương đối an toàn trên chuột nhắt trắng cho các thử nghiệm tác dụng dược lý

Liều tương đối an toàn Ds trên chuột nhắt trắng có thể được lấy giá trị $\leq 1/5$ hoặc $1/10$ LD₀ (đảm bảo chỉ số trị liệu > 10).

Tác dụng dự phòng tăng acid uric của cao chiết nước từ lá cây Dung

Kết quả ở Bảng 3 cho thấy hàm lượng acid uric ở lô chứng bệnh lý tăng 41,27%, đạt ý nghĩa thống kê so với lô chứng sinh lý ($p < 0,001$). Lô chuột tiêm màng bụng kali oxonat và uống allopurinol liều 10 mg/kg trọng lượng chuột có hàm lượng acid uric giảm 50,00%- đạt ý nghĩa thống kê so với lô chứng bệnh lý ($p < 0,001$); phục hồi hàm lượng acid uric máu trở về mức bình thường khi so sánh với lô chứng sinh lý ($p = 0,193$).

Bảng 3. Kết quả tác dụng hạ acid uric máu của cao chiết nước từ lá cây Dung

Lô thử nghiệm (n =8)		Hàm lượng acid uric (U/L) (Mean $\pm$ SEM)
Chứng sinh lý		1,94 $\pm$ 0,12
Kali oxonat (+)	Chứng bệnh lý	3,30 $\pm$ 0,13*
	Allopurinol liều 10 mg/kg	1,65 $\pm$ 0,19 [#] (50,00%)
	Mẫu SCW liều 0,5 g/kg	2,51 $\pm$ 0,08 [#] (23,85%)
	Mẫu SCW liều 1,0 g/kg	2,39 $\pm$ 0,07 [#] (27,67%)

(*) : $p < 0,05$ so với lô chứng sinh lý

(#) : $p < 0,05$ so với lô chứng bệnh lý

(...): Phần trăm hạ acid uric so với lô chứng bệnh lý

Lô chuột tiêm màng bụng kali oxonat và uống mẫu cao chiết nước lá cây Dung (SCW) ở các liều thử nghiệm đều có hàm lượng acid uric giảm (23,85% - 27,67%) - đạt ý nghĩa thống kê so với lô chứng bệnh lý ($p < 0,001$).

Như vậy, cao chiết nước lá cây Dung thể hiện tác dụng hạ acid uric, kết quả này góp phần cung cấp cơ sở cho việc nghiên cứu, phát triển sản phẩm từ cây Dung có thể ứng dụng trong hỗ trợ phòng ngừa bệnh gout, cũng như góp phần mở ra hướng ứng dụng mới của lá cây Dung so với cách sử dụng như truyền thống.

KẾT LUẬN

Cao chiết nước lá cây Dung thể hiện độc tính cấp đường uống, không có sự khác biệt về trọng lượng cân của chuột trong suốt quá trình nghiên cứu. Liều thử nghiệm tác dụng được lý của cao chiết nước lá cây Dung (SCW $\leq 1/5$ hoặc $1/10$ LD₀; LD₀ = 7,5 g/kg) là 0,5 g/kg và 1,0 g/kg. Cao chiết nước lá Dung ở liều 0,5 g/kg và 1,0 g/kg có tác dụng hạ acid uric trên mô hình gây tăng acid uric máu chuột bằng kali oxonat, ở các liều thử nghiệm đều có hàm lượng acid uric giảm (23,85% - 27,67%) và tác dụng yếu hơn so với allopurinol. Đề tài mở ra triển vọng nghiên cứu và phát triển sản phẩm từ lá Dung ứng dụng trong phòng các bệnh về tăng acid uric máu.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Antony AK, Philip RM, et al (2014). Antidiabetic property of *Symplocos cochinchinensis* is mediated by inhibition of alpha glucosidase and enhanced insulin sensitivity. *Plos one* 9: 1-13.
- Đoàn Thị Mai Hương, Laurence V, et al. (2007). Hai saponin từ cây Dung lá thon *Symplocos lancifolia* Sieb. & Zucc (Symplocaceae)". *Tạp chí Hóa học* 45: 184-189.
- Đỗ Trung Đàm (2014). *Phương pháp xác định độc tính của thuốc*. NXB Y học, Hà Nội, 15-157: 199-215.
- Phạm Hoàng Hộ (1999). *Cây cỏ Việt Nam*. NXB Trẻ, Hà Nội: 664-674.
- Watabe S, Kimura K, Fukui T (2006). Effect of Human Placenta Extract on Potassium Oxonate- induced Elevation of Blood Uric Acid Concentration. *J Health Sci* 52(6): 738-742.

STUDY ON ACUTE ORAL TOXICITY AND ANTI-HYPERURICEMIA EFFECT OF AQUEOUS EXTRACT FROM *SYMPLOCOS COCHINCHINENSIS* LEAVES

Le Van Huan^{1*}, Chung Khanh Linh², Truong Quoc Quyen¹, Pham Thao Nguyen², Bui Nguyen Bien Thuy², Nguyen Hoang Minh³, Vu Thi Thanh Tuyen²

¹ Faculty of Biotechnology - Binh Duong University

² Faculty of Pharmacy - University of Pharmacy and Medicine at Ho Chi Minh City

³ Research Center of Ginseng and Medicinal Materials - National Institute of Medicinal Materials, Ho Chi Minh City

SUMMARY

Due to the fact that there are still not many researches in Vietnam focusing on bioactivities and toxicity of *Symplocos cochinchinensis* leaves, effort has been made to pursue this study with the aim of evaluating the acute oral toxicity and anti-hyperuricemia property of SC aqueous extract in order to provide the evidence for the safety and the mentioned pharmacological effect of this plant. *Symplocos cochinchinensis* (SC) leaves were extracted using water as a solvent in the presence of heat (SC:water =1:7). Potassium oxonate (IP 300 mg/kg)-induced hyperuricemia mice and treated with SC aqueous extract or allopurinol. The aqueous extract of *Symplocos cochinchinensis* leaves had oral acute toxicity in mice with LD₀=7.5 g/kg as well as anti-hyperuricemia effect at the doses of 0.5 g/kg and 1.0 g/kg; effect at the doses of 0.5 g/kg and 1.0 g/kg were lower to those of 10 mg/kg allopurinol.

Keywords: Allopurinol, uric acid, acute oral toxicity, potassium oxonate, *Symplocos cochinchinensis*.

* Author for correspondence: Tel: +84-0934126086; Email: lvhuan@bdu.edu.vn