

Khảo sát độc tính cấp và thăm dò tác dụng đông máu của dịch chiết nước từ lá cây Lầu đỏ *Psychotria rubra* (Lour.) Poir, Rubiaceae

Hoàng Thị Phương Liên **, Nguyễn Thị Thùy Trang, Nguyễn Lê Thanh Tuyền *

Khoa Dược, Đại học Nguyễn Tất Thành

*nguyenlethanhtuyend09@gmail.com, **htplien@ntt.edu.vn

Tóm tắt

Ở Việt Nam, Lầu đỏ (*Psychotria rubra*) được dùng trong dân gian để điều trị nhiều bệnh, đặc biệt là xuất huyết, băng huyết... Nghiên cứu này tiến hành khảo sát độc tính cấp, khảo sát ảnh hưởng lên thời gian đông máu của cao chiết nước từ lá Lầu đỏ. Dược liệu được thu hái tại tỉnh Quảng Bình, sấy khô và chiết nóng với nước ở 90°C và cô thành cao đặc. Nghiên cứu xác định được LD₅₀ của cao Lầu đỏ là 25,01g/kg. Trên mô hình *in vivo* ở liều 2,50 và 1,25g/kg chuột, cao Lầu đỏ có tác dụng cầm máu nhưng không làm thay đổi thời gian đông máu. Trên mô hình *in vitro*, ở 3 nồng độ khảo sát: 0,5; 1,0; 2,0mg/ml, cao Lầu đỏ không làm thay đổi thời gian PT và APTT so với mẫu chứng DMSO. Như vậy, cao Lầu đỏ có tác dụng cầm máu nhưng không làm ảnh hưởng đến quá trình đông máu. Đây là dược liệu có tiềm năng ứng dụng trong điều trị cầm máu, xuất huyết cần được quan tâm nghiên cứu.

Nhận 24.09.2018
Được duyệt 15.10.2018
Công bố 25.12.2018

Từ khóa
Lầu đỏ, *Psychotria rubra*, độc tính cấp, cầm máu, đông máu

© 2018 Journal of Science and Technology - NTTU

1 Giới thiệu

Trong những năm gần đây, thuốc có nguồn gốc từ dược liệu thiên nhiên đang trở thành đề tài nghiên cứu được quan tâm vì các dược liệu này không những hiệu quả mà còn hạn chế được các tác dụng phụ khi sử dụng lâu dài. Lầu đỏ có tên khoa học là *Psychotria rubra*, thuộc họ Cà phê – Rubiaceae, là một loại cây có nhiều ở Việt Nam, phân bố phổ biến ở hầu hết các tỉnh vùng trung du và núi thấp, nhất là các tỉnh từ Quảng Bình trở ra. Một số nghiên cứu trên thế giới đã được thực hiện để khảo sát tính chống oxy hóa, gây độc tế bào và tác dụng kháng viêm của cây Lầu đỏ [1,2,3]. Theo kinh nghiệm dân gian, lá cây Lầu đỏ được sử dụng trong điều trị nhiều bệnh, đặc biệt là xuất huyết, tiêu ra máu, sử dụng cho phụ nữ sau sinh nhằm cầm máu và giảm đau [4]. Tuy nhiên, các nghiên cứu về độc tính và tác dụng dược lý, đặc biệt là tác động trên quá trình cầm máu và đông máu của dược liệu này còn hạn chế. Do đó, để đảm bảo tính an toàn, hiệu quả trong sử dụng, nghiên cứu đã tiến hành khảo sát độc tính cấp và thăm dò tác dụng cầm máu, đông máu của dịch chiết nước lá Lầu đỏ trên các mô hình thực nghiệm.

2 Nguyên vật liệu và phương pháp nghiên cứu

2.1 Nguyên vật liệu

2.1.1 Dược liệu

Lá Lầu đỏ (*Psychotria rubra*) được thu hái tại huyện Minh Hóa, tỉnh Quảng Bình. Lá sau khi thu hái được rửa sạch, sấy ở 60°C trong 24 giờ.

2.1.2 Động vật thí nghiệm

Chuột nhắt trắng giống *Swiss albino* từ 7 đến 8 tuần tuổi ở cả hai phái, thể trọng chuột từ 20 – 25g được cung cấp bởi Viện Vaccin và Sinh phẩm Y tế Nha Trang. Chuột được nuôi ổn định 5 ngày trước khi tiến hành thử nghiệm. Trong quá trình thử nghiệm, chuột được cung cấp đầy đủ thức ăn (cám viên) và nước uống. Khi thử nghiệm độc tính cho chuột nhịn đói 12 giờ nhưng vẫn cung cấp nước đầy đủ.

2.2 Phương pháp nghiên cứu

2.2.1 Chiết xuất dược liệu

Chiết dược liệu bằng phương pháp chiết nóng theo tỉ lệ 1g bột dược liệu: 5ml nước cất trên bếp cách thủy 90°C, chiết 2 lần, 30 phút/lần chiết. Dịch chiết được cô bay hơi trên bếp cách thủy ở nhiệt độ 70°C, thu được cao chiết nước từ lá Lầu đỏ. Khối lượng cao toàn phần thu được từ 1000g dược liệu khô Lá Lầu đỏ là 220,45g. Hiệu suất chiết là 20,05%. Hàm ẩm cao là 9,05%. Cao thu được có màu nâu đỏ, đặc sệt, mùi thơm nhẹ của dược liệu.

2.2.2 Khảo sát độc tính cấp đường uống

Cho chuột (50% đực, 50% cái) nhịn đói 12 giờ trước khi cho uống thuốc liều tối đa có thể qua đường uống (tối đa



0,2ml/10g). Theo dõi và ghi nhận cử động tổng quát, biểu hiện về hành vi, trạng thái lông, ăn uống, tiêu tiểu và số lượng chuột chết trong 72 giờ. Nếu sau 72 giờ, chuột không có dấu hiệu bất thường hoặc chết, tiếp tục theo dõi trong 14 ngày. Chuột chết hay không trong 72 giờ đầu tiên sẽ quyết định bước tiếp theo của thử nghiệm: thử nghiệm sẽ được tiến hành với liều thấp hơn liều trước hoặc không cần tiếp tục tiến hành thử nghiệm. [5]

2.2.3 Khảo sát tác động trên quá trình cầm máu, đông máu *in vivo* [1,6]

Chuột được cho uống nước cất (nhóm chứng) hoặc uống cao (nhóm thử) với liều được ngoại suy từ kết quả thử độc tính cấp trong 7 ngày. 90 phút sau liều cuối cùng, cắt đuôi chuột một đoạn 5mm từ đầu tận cùng. Giọt máu đầu tiên được hứng lên lam và tính thời gian cho đến khi máu đông hoàn toàn để xác định thời gian đông máu. Đồng thời, đuôi chuột được nhúng lập tức vào nước muối sinh lý ở 37°C. Thời gian được tính từ khi bắt đầu nhúng đuôi đến khi máu ngừng chảy để xác định thời gian chảy máu.

2.2.4 Khảo sát tác động trên quá trình đông máu *in vitro* [1] Lấy máu chuột nhắt (*Swiss albino*), chống đông bằng dung dịch citrate 3,8%, tỉ lệ máu và citrate là 9:1, li tâm (3000 vòng/phút, trong 15 phút) thu huyết tương nghèo tiểu cầu (PPP).

Để xác định thời gian hoạt hóa thromboplastin từng phần (APTT) *in vitro*, lấy huyết tương nghèo tiểu cầu (PPP) ủ với cao thử và thuốc thử APTT trong 3 phút ở 37°C. Thời gian đông máu APTT được xác định từ khi bắt đầu thêm calci clorid.

Để đánh giá thời gian prothrombin (PT), ủ huyết tương không tiểu cầu với cao thử 3 phút ở 37°C. Thời gian đông máu được bắt đầu tính từ khi cho thuốc thử PT.

2.2.5 Phân tích thống kê kết quả

Kết quả được xử lý bằng phần mềm Microsoft Excel, trình bày dưới dạng giá trị trung bình $\pm$ sai số chuẩn của

giá trị trung bình (Mean $\pm$ SEM) và được đánh giá ý nghĩa thống kê bằng phép kiểm Mann-Whitney trên phần mềm SPSS 23.0. Sự khác biệt có ý nghĩa khi $p < 0,05$.

3 Kết quả và bàn luận

3.1 Kết quả độc tính cấp đường uống

Cho chuột uống cao Lầu đỏ với nồng độ đặc nhất qua kim là 4,76g/ml, thể tích cho uống là 0,2ml/10 g thể trọng chuột. Chuột tử vong trong 1 đến 3 giờ. Trong 30 – 45 phút sau khi cho uống, chuột bắt đầu giảm hoạt động, nằm im, hô hấp nhanh, có triệu chứng co thắt vùng bụng liên tục. Biểu hiện chuột trước khi chết: chuột thụ động, nằm im tại chỗ, hai chân sau co giật.

Tiếp tục tiến hành thử nghiệm sơ khởi, xác định được: nồng độ tối đa không gây chết chuột (LD0) là 21,05g/kg, nồng độ tối thiểu gây chết 100% chuột thử nghiệm (LD100) là 34,30g/kg. Từ kết quả thu được, tiến hành thử nghiệm xác định LD₅₀: chuột được chia thành 6 lô, gồm cả 2 phái, được cho uống cao chiết từ lá Lầu đỏ với các liều lần lượt là: 21,05; 23,70; 26,35; 29,50; 31,30; 34,30g/kg thể trọng chuột. Kết quả được trình bày ở Bảng 1.

Bảng 1 Kết quả thử nghiệm xác định LD₅₀

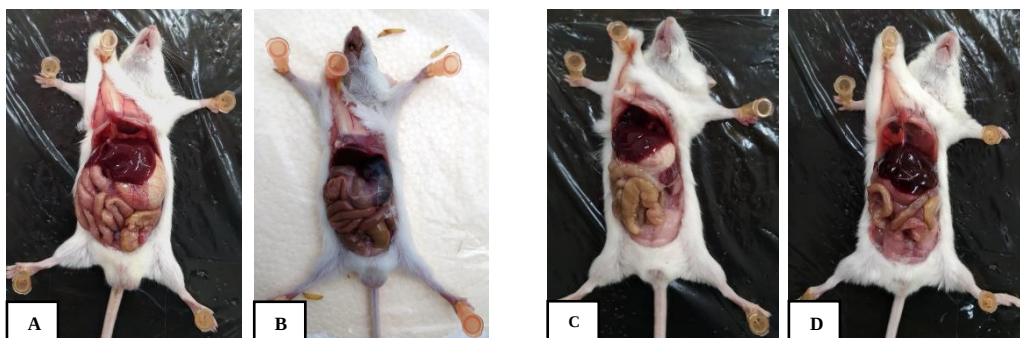
Liều (g/kg)	21,05	23,70	26,35	29,50	31,30	34,30
Số chuột/lô	6	10	12	12	10	6
Số chuột chết/lô	0	6	6	9	9	6
Tỉ lệ chết (%)	0	60	50	75	90	100

Theo phương pháp Behrens – Karber, LD₅₀ được xác định như sau:

$$LD_{50} = LD_{100} - \frac{\Sigma(a \times d)}{n_{tb}} = 25,01g/kg.$$

(a: số thú chết trung bình của 2 liều kế tiếp; d: hiệu số của 2 liều kế tiếp; ntb: số thú vật trung bình của các nhóm)

Vậy LD₅₀ của cao chiết nước từ lá Lầu đỏ là 25,01g/kg.



Hình 1 Đại thể chuột sau thử nghiệm độc tính cấp

A: Sinh lý; B: Chuột chết trong 1 giờ; C: Chuột cái còn sống sau 14 ngày; D: Chuột đực còn sống sau 14 ngày

3.2. Kết quả tác động trên quá trình cầm máu, đông máu *in vivo*

Từ kết quả thử nghiệm độc tính cấp, xác định LD₅₀ = 25,01g/kg. Từ đó, ngoại suy liều thử nghiệm tác động cầm

máu và đông máu của cao chiết nước từ lá Lầu đỏ là 2,50g/kg (1/10 LD₅₀) và 1,25g/kg (1/20 LD₅₀). Kết quả về thời gian đông máu và thời gian chảy máu *in vivo* được trình bày trong Bảng 2 và Bảng 3.

Bảng 2 Kết quả thử nghiệm khảo sát thời gian chảy máu của cao Lầu đỏ trên mô hình *in vivo*

Lô	Sinh lí	LD ₅₀ /10	LD ₅₀ /20
Thời gian (s) TB ± SEM	237,88 ± 27,91	59,75** ± 13,01	92,00** ± 14,35
% so với lô Sinh lí		25,12%**	38,67%**

Chú thích: *: $p < 0,05$; **: $p < 0,01$

Bảng 3 Kết quả thử nghiệm khảo sát thời gian đông máu của cao Lầu đỏ trên mô hình *in vivo*

Lô	Sinh lí	LD ₅₀ /10	LD ₅₀ /20
Thời gian (s) TB ± SEM	252,75 ± 13,29	248,63 ± 10,23	275,63 ± 8,96
% so với lô Sinh lí		98,37%	109,05%

Thời gian chảy máu trung bình của lô sinh lí là 237,88 ± 27,91 giây. Ở các lô thử nghiệm, sau khi cho chuột uống cao chiết nước từ Lầu đỏ với liều 2,50 và 1,25g/kg, thời gian chảy máu giảm đáng kể so với lô sinh lí ($p < 0,01$), tỉ lệ giảm lần lượt là 74,88% (Lô 2) và 61,32% (Lô 3). Thời gian chảy máu giữa 2 liều thử nghiệm khác biệt không có ý nghĩa thống kê ($p > 0,05$).

Thời gian đông máu trung bình của lô sinh lí là 252,75 ± 13,29 giây. Ở các lô thử nghiệm, thời gian đông máu thay đổi không đáng kể so với lô sinh lí ($p > 0,05$) và không có sự khác biệt về thời gian đông máu giữa hai lô thử nghiệm.

3.3 Kết quả tác động trên quá trình đông máu *in vitro*

Đánh giá ảnh hưởng của Lầu đỏ trên con đường đông máu ngoại sinh và nội sinh qua 2 thông số PT và APTT. Huyết tương nghèo tiểu cầu được ủ với cao Lầu đỏ ở các nồng độ 0,5; 1,0; 2,0mg/ml. Kết quả được so sánh với mẫu chứng DMSO là dung môi hòa tan cao, được trình bày ở Bảng 4.

Bảng 4 Tác động của cao Lầu đỏ lên PT và APTT

Mẫu	PT (s) TB ± SEM	APTT (s) TB ± SEM
DMSO	18,48 ± 1,16	24,48 ± 1,73
0,5 mg/ml	17,00 ± 1,21	26,89 ± 3,62

1,0 mg/ml	17,55 ± 0,34	28,66 ± 2,69
2,0 mg/ml	17,51 ± 1,44	21,94 ± 1,78

Sau khi ủ huyết tương với cao chiết từ Lầu đỏ ở các nồng độ thử nghiệm, thời gian PT và APTT thay đổi không đáng kể so với lô chứng ($p > 0,05$).

3.4. Bàn luận

Nghiên cứu xác định được LD₅₀ của cao chiết nước từ lá Lầu đỏ là 25,01g/kg thể trọng chuột.

Sau khi xác định độc tính cấp, đề tài tiến hành khảo sát ảnh hưởng của cao chiết Lầu đỏ lên thời gian chảy máu, đông máu *in vivo* ở 2 liều 2,50 và 1,25g/kg. Kết quả cho thấy Lầu đỏ làm giảm thời gian chảy máu đáng kể so với lô sinh lí ở cả hai liều thử nghiệm ($p < 0,01$), tác động này không khác biệt giữa 2 liều. Tuy nhiên, cao Lầu đỏ không làm thay đổi thời gian đông máu so với lô sinh lí ($p > 0,05$).

Trên mô hình *in vitro*, cao chiết nước lá Lầu đỏ ở tất cả các nồng độ thử nghiệm không làm thay đổi thời gian PT và APTT so với mẫu chứng DMSO.

Điều này có thể giải thích do quá trình cầm máu là sự kết hợp của nhiều giai đoạn khác nhau như: co mạch tại chỗ, kết tập tiểu cầu, tạo cục máu đông... [7] Cao Lầu đỏ có hiệu quả cầm máu, làm giảm thời gian chảy máu nhưng không làm ảnh hưởng đến các yếu tố đông máu và không làm thay đổi thời gian đông máu.

4 Kết luận

Đề tài tiến hành chiết cao đặc, xác định được LD₅₀ của cao Lầu đỏ là 25,01g/kg thể trọng chuột. Cao chiết từ lá cây Lầu đỏ có tác dụng cầm máu, làm giảm thời gian chảy máu trên mô hình cắt đuôi chuột nhất ở cả 2 liều thử nghiệm là 2,50 và 1,25g/kg. Cao Lầu đỏ không làm ảnh hưởng đến thời gian đông máu trên mô hình *in vivo*. Mô hình *in vitro* khảo sát ảnh hưởng của cao Lầu đỏ lên các thông số PT, APTT cho thấy ở các nồng độ thử nghiệm 0,5; 1,0; 2,0mg/ml; cao Lầu đỏ không làm thay đổi thời gian PT, APTT so với mẫu chứng DMSO.

Tài liệu tham khảo

1. Hao Chen *et al.*, (2014), Effect of *Toona microcarpa* Harms Leaf Extract on the Coagulation System, BioMed Research International.
2. Hayashi T., Smith F.T., Lee K.H., Antitumor agents. Psychorubrin, a new cytotoxic naphthoquinone from *Psychotria rubra* and its structure-activity relationships, J. Med. Chem., 30(11), (1987), 2005-8.
3. Jin, K. S., Kown, H. J., & Kim, B. W. (2014). Anti-Oxidative and Anti-Inflammatory Effects of *Malus huphensis*, *Ophiorrhiza cantonensis*, and *Psychotria rubra* Ethanol Extracts. Korean Journal of Microbiology and Biotechnology.
4. Từ điển cây thuốc Việt Nam, Võ Văn Chi, Nhà xuất bản Y học, 2012, trang 1305 – 1306.
5. Đỗ Trung Đàm (2014), Phương pháp xác định độc tính của thuốc, Nhà xuất bản Y học, Hà Nội, pp. 7, 15 – 215.
6. Zhou W., Abdurahman A., Umar A., Iskander G., Abdusalam E., Berké B., Besgaud B., Moore N. (2014), “Effects of *Cydonia oblonga* Miller extracts on blood hemostasis, coagulation and fibrinolysis in mice, and experimental thrombosis in rats”, Journal of Ethnopharmacology, 154, 63-169.
7. Bộ Y tế (2008), Giải phẫu sinh lý người, Nhà xuất bản Giáo dục Việt Nam, tr.78-86

Determination of acute toxicity and investigate coagulation activity of *Psychotria rubra* aqueous extract

Hoang Thi Phuong Lien **, Nguyen Thi Thuy Trang, Nguyen Le Thanh Tuyen *

Pharmacy Faculty of Nguyen Tat Thanh University

*nguyenlethanhtuyend09@gmail.com, **htplien@ntt.edu.vn

Abstract In Viet Nam, Lau do (*Psychotria rubra*) is used for treatments, such as bleeding. This study was conducted for the purpose of determining acute toxicity and evaluating the hemostatic and coagulation effects of *Psychotria rubra* aqueous extract. Lau do was collected at Quang Binh province, dried and extract to aqueous extract. The results showed that LD₅₀ of aqueous extract is 25,01mg/kg. In *in vivo* model, extract of *Psychotria rubra* has hemostatic effect at 2 dosages: 2,50 and 1,25g/kg but doesn't has coagulation effect. In *in vitro* model, the extract in 3 concentrations: 0,5; 1,0; 2,0mg/ml does not change PT and APTT time compare to DMSO. This extract shows significant hemostatic effect but doesn't has coagulation effect. This is a highly potential medicinal plant for the treatment of bleeding diseases and should be investigated the others pharmacological effects.

Keywords Lau do, *Psychotria rubra*, acute toxicity, hemostatic, coagulation.