Khảo sát độc tính cấp, khả năng kháng oxi hóa và kháng viêm của cao Trầu không (*Piper betle* l. Piperaceae)

Nguyễn Thị Bạch Tuyết, Hoàng Thị Phương Liên, Bùi Thái Quỳnh Thi, Nguyễn Nhựt Trường, Lê Thị Quỳnh Nhi

Khoa Dược, Đại học Đại học Nguyễn Tất Thành
ntbtuyet@ntt.edu.vn

Tóm tắt

Cao Trầu không đã được tiêu chuẩn hóa, được chiết xuất với dung môi cồn 96 % và nước. Hoạt tính kháng oxi hóa của cao Trầu không được xác định theo phương pháp khử gốc tự do DPPH. Thử nghiệm *in vivo* được thực hiện trên chuột nhắt trắng *Swiss albino*, (6-8) tuần tuổi, trọng lượng trung bình khoảng 22 g. Khảo sát độc tính cấp đường uống của cao. Chuột được uống cao Trầu không với liều duy nhất 5.000 mg/kg trọng lượng chuột với thể tích 50 mL/kg trọng lượng chuột, theo dõi tỉ lệ chết và biểu hiện độc tính cấp trong vòng 14 ngày. Hiệu quả kháng viêm của cao Trầu không với liều (200, 400 và 800) mg/kg được đánh giá gây viêm bàn chân chuột nhắt bằng carrageenan 1 %. Diclofenac liều 5 mg/kg được sử dụng làm chất đối chứng. Kết quả cho thấy cao Trầu không thể hiện hoạt tính kháng oxi hóa với IC_{50} là 8,25 µg/mL, kém 3 lần so với quercetin. Cao Trầu không gây ra độc tính cấp đường uống ở nồng độ 5.000 mg/kg, được xếp vào phân loại 6 – chất gần như không có độc tính theo GSH. Ở mô hình gây viêm bằng carragenan, cao Trầu không thể hiện tác động làm giảm độ phù chân chuột đáng kể ở liều 200 mg/kg ($p < 0,05$) và tương đương với diclofenac liều 5 mg/kg ($p > 0,05$)

Nhận 19/08/2022
Được duyệt 03/03/2023
Công bố 30/03/2023

Từ khóa
cao Trầu không, DPPH, chống oxi hóa, kháng viêm

® 2022 Journal of Science and Technology - NTTU

1 Mở đầu

Hiện nay, thuốc và các sản phẩm từ dược liệu có xu hướng được người tiêu dùng lựa chọn bởi tính hiệu quả, khả năng giảm thiểu tác dụng phụ khi sử dụng lâu dài. Trầu không (*Piper belte* Piperaceae) còn được biết đến như một nguồn dược liệu giàu tiềm năng, được báo cáo rộng rãi về hoạt tính kháng vi sinh vật gây bệnh tại khoang miệng [1-4]. Năm 2012, nhóm tác giả Nguyễn Đinh Nga đã tiến hành tiêu chuẩn hóa cao Trầu không (cao TrK) nhưng sử dụng các dung môi độc hại như dichloromethane để tinh chế phân đoạn có hoạt tính kháng mạnh *Candida* spp [1, 2]. Vì vậy, năm 2020, nhóm tác giả Phạm Bền Chí, Nguyễn Đinh Nga đã tiến hành nghiên cứu cải tiến quy trình chiết xuất cao lá TrK chỉ với các dung môi an toàn (cồn 96 % và nước) nhằm cung cấp nguồn nguyên liệu chất lượng và kiểm soát về giới hạn nhiễm khuẩn, vi sinh vật, dư lượng hoá chất bảo vệ thực vật, chì. Năm 2021, Phạm Bền Chí và cộng sự đã tiêu chuẩn hóa cao TrK nhằm bào chế các chế phẩm dùng tại chỗ (kem, gel, nước súc miệng) hoặc toàn thân (viên gel nhai,…) [4-7] và cũng chứng minh khả năng kháng mạnh vi sinh vật gây bệnh tại khoang miệng (*C. albicans* ATCC 10231, *S. mutans* ATCC 35668) [4]. Các bệnh lí tại khoang miệng do vi sinh vật gây ra thường có triệu chứng viêm kèm theo. Bên cạnh đó, đã có giả thuyết chứng minh quá trình viêm liên quan đến quá trình oxi hóa [8,9]. Do đó, để có thể hướng tới hỗ trợ điều trị bệnh răng miệng, cao TrK

cũng cần được chứng minh về tính an toàn, hoạt tính chống oxi hóa cũng như hoạt tính kháng viêm.

2 Đối tượng và phương pháp nghiên cứu

2.1 Đối tượng nghiên cứu

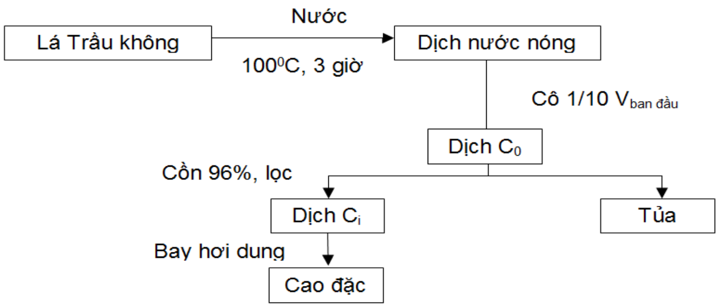
2.1.1 Mẫu thử

Cao TrK đã được tiêu chuẩn hóa, được cung cấp bởi nhóm tác giả Phạm Bền Chí và cộng sự (2020) [4-7].

Quy trình chiết cao TrK:

Lá TrK tươi thu mua được rửa sạch, cắt nhỏ và chiết bằng phương pháp đun sôi trong nước ở 100 ^{0}C (tỉ lệ khối lượng TrK/thể tích nước là 1:5) trong 3 giờ. Cô dịch chiết thu được đến khoảng 1/10 thể tích ban đầu thu được dịch C_0.

Tiếp theo, thêm cồn 96 % vào dịch C_0 với tỉ lệ dịch C_0: cồn 96 % (1:16) thì xuất hiện tủa, lọc thu lấy dịch C_i. Dịch chiết C_i được cô cách thủy, thu được cao TrK.



Hình 1 Quy trình chiết và cô cao TrK

Bảng 1 Chỉ tiêu cao TrK đã được tiêu chuẩn hóa [7]

Chỉ tiêu	Mức chất lượng	Phương pháp thử - TLTK
Hình thức cảm quan	Đặc, sánh, màu nâu đen và có mùi thơm đặc trưng	Phụ lục 1.1, DĐVN V , Dựa vào nhận xét cảm quan
Cắn không tan trong nước	Không quá 3 % (tính trên lượng cao khô kiệt)	DĐVN V, trang 1387-1390 (0,1000 g cao)
Mất khối lượng do làm khô	Không quá 20 %	Phụ lục 9.6, DĐVN V, Sử dụng cân hồng ngoại, (0,100 g, 105 ^{0}C)
Dư lượng hóa chất bảo vệ thực vật	Không quá 20 ng/kg cao (ppb)	Phụ lục 12.17 - 4.5 - 5.2 , DĐVN V GC-MS/MS
Giới hạn nhiễm khuẩn	Tổng số vi sinh vật hiếu khí < 10^4 CFU/g Tổng số nấm < 10^2 CFU/g	Phụ lục 13.6, DĐVN V, Cấy trải bề mặt với lượng mẫu 0,2000 g, độ pha loãng tối thiểu 100 lần
Hàm lượng Pb	Không quá 20 µg Pb/ngày	Phụ lục 9.4.8 - 9.4.11 - 4.4, DĐVN V F AAS (0,5000 g cao)
Định lượng hydroxychavicol (HC)	Phải cho hàm lượng HC trong cao TrK ≥ 15 %	Phụ lục 5.3, DĐVN V HPLC - PDA
Hoạt tính kháng vi sinh vật	MIC = (2-4) mg/mL, (*C. albicans* ATCC 10231); MIC = (62,5-125) oc, (*S.mutans* ATCC 35668	CLSI M07 Vi pha loãng trong môi trường thạch

2.1.2 Đối tượng nghiên cứu

Chuột nhắt trắng đực, chủng *Swiss albino*, (6-8) tuần tuổi, khối lượng trung bình (22 ± 2) g, được cung cấp bởi Viện Vắc-xin và Sinh phẩm Y tế Nha Trang. Chuột khỏe mạnh, không dị tật, không có biểu hiện bất thường, được nuôi ổn định trong môi trường tiến hành thí nghiệm 5 ngày. Chuột được nuôi trong bocal nhựa có lót lớp trấu ở đáy. Chuột được cung cấp đầy đủ thức ăn và nước uống trong suốt thời gian thử nghiệm.

2.1.3 Hóa chất

Carrageenan 1 % (Sigma Aldrich, USA) pha trong dung dịch nước muối sinh lí.

Dung dịch chống thấm Ornano imbidente (Ugo Basile, Italy) pha trong 1 mL với 250 mg NaCl trong 500 mL nước cất.

Diclofenac (viên nén Voltaren 50 mg, Novartis, Italy).

DPPH - Sigma Aldrich

Quercetin - Sigma Aldrich

Methanol - Sigma Aldrich

2.1.4 Thiết bị

Máy đo thể tích chân chuột Plethysmometer Ugo Basile

Máy đo quang phổ UV-Vis.

Cân phân tích, cân kĩ thuật, falcon 15 mL, falcon 50 mL, eppendorf 2 mL, micropipet 1.000 µL, micropipet 100 µL, micropipet 10 µL.

2.2 Phương pháp nghiên cứu

Khảo sát hoạt tính chống oxi hóa *in vitro* bằng phương pháp khử gốc tự do DPPH

Nguyên tắc: DPPH là một gốc tự do bền, dung dịch có màu tím, bước sóng cực đại hấp thu tại 517 nm. Các chất có khả năng chống oxi hóa sẽ trung hòa gốc DPPH bằng cách cho hydrogen, làm giảm độ hấp thu tại bước sóng hấp thu cực đại ban đầu, màu của dung dịch phản ứng sẽ nhạt dần, chuyển từ tím sang vàng nhạt [10].

Tiến hành thí nghiệm: phản ứng khử gốc tự do của cao TrK bằng phương pháp DPPH [10] được thực hiện như sau:

- Cao TrK được pha trong nước tạo dung dịch nền 1,000 µg/mL. Sau đó pha loãng thành các dung dịch có nồng độ từ (0 tới 100) µg/mL.
- Quercetin pha trong methanol với nồng độ mẹ 100 µg/mL, sau đó pha loãng thành các dung dịch có nồng độ khác nhau từ (0,5 tới 4) µg/mL.
- DPPH được pha trong methanol ở nồng độ 0,1 mM, bảo quản trong tối ở nhiệt độ phòng.
- Cho 100 µL mẫu cao thử hoặc mẫu đối chứng quercetin ở các nồng độ khác nhau vào ependorf, sau đó thêm 400 µL DPPH và lắc đều, giữ ổn định trong tối ở nhiệt độ phòng trong 30 phút. Đo độ hấp thu quang phổ ở bước sóng 517 nm.

Tiến hành đo mẫu thử, mẫu chứng đồng thời với mẫu chứng âm (nước + MeOH), mẫu trắng (cao TrK + MeOH). Thí nghiệm lặp lại 3 lần, lấy giá trị trung bình.

Tính hoạt tính chống oxi hóa (HTCO) theo công thức:

$$\text{HTCO (\%)} = \left(1 - \frac{\text{OD}_{\text{thử}} - \text{OD}_{\text{trắng}}}{\text{OD}_{\text{chứng}} - \text{OD}_{\text{chứng âm}}}\right) \times 100$$

OD: độ hấp thu của mẫu chứng âm

$OD_{thử}$: độ hấp thu của mẫu thử

$OD_{chứng}$: độ hấp thu của mẫu đối chứng

$OD_{trắng}$: độ hấp thu của mẫu trắng

2.2.1 Khảo sát độc tính cấp đường uống trên chuột nhắt trắng

Thí nghiệm khảo sát độc tính cấp của cao TrK được tiến hành theo phương pháp liều cố định theo Hướng dẫn của OECD 423 [11].

Đầu tiên, cho chuột nhịn đói ít nhất 12 giờ trước khi tiến hành thí nghiệm. Chuột được chia ngẫu nhiên thành 2 lô, mỗi lô gồm 6 chuột.

Lô 1: chuột bình thường uống nước cất (đối chứng sinh lí).

Lô 2: chuột bình thường uống cao TrK liều 5.000 mg/kg trọng lượng chuột

Tất cả chuột uống nước cất hoặc cao TrK liều duy nhất 5.000 mg/kg với thể tích tối đa 50 mL/kg trọng lượng chuột vào 9 giờ sáng [11-13].

Sau khi chuột uống thuốc, tiến hành theo dõi và ghi nhận các cử động tổng quát, biểu hiện về hành vi, trạng thái lông, ăn uống, ghi nhận tỉ lệ tử vong của chuột trong vòng 14 ngày [12]. Từ đó xác định liều gây chết 50 % con chuột (LD_{50}).

Bảng 2 Bảng phân loại hóa chất theo mức độ độc dựa vào LD_{50} theo OECD [11].

Cấp độ độc	Mức độ độc	Liều LD_{50} gần đúng (mg/kg)
1	Cực độc	từ 0 đến ≤ 5
2	Rất độc	> 5 đến ≤ 50
3	Độc	> 50 đến ≤ 300
4	Độc vừa	> 300 đến ≤ 2.000
5	Độc thấp	> 2.000 đến ≤ 5.000
6	Gần như không độc	> 5.000

2.2.2 Khảo sát tác động kháng viêm cấp trên mô hình gây viêm bàn chân chuột bằng carrageenan.

Nguyên tắc: mô hình kháng viêm được thực hiện bằng cách gây phù chân chuột bằng carragenan [14]. Carragenan là polysaccharid cấu tạo từ các polymer của β-(1,3)-D- galactose và β-(1,4)-3,6-hydroD-galactose. Do là hợp chất cao phân tử nên khi vào trong cơ thể, carrageenan trở thành kháng nguyên thông qua cơ chế miễn dịch kháng nguyên kháng thể. Mức độ viêm tối đa ở trong thời gian (3-5) giờ. Mẫu có tác dụng kháng viêm sẽ làm giảm mức độ phù chân chuột. Carragenan gây viêm cấp theo 2 pha: pha 1 giải phóng histamine, serotonin; pha 2 giải phóng bradykinin, protease, prostaglandin, lysosom [14].

Thực hiện:
Chuột đực được chia làm 5 lô (8 chuột/lô), sao cho V_0 (thể tích bàn chân chuột trước khi gây viêm - đo bằng thiết bị Plethysmometer, Ugo Basile, Italy) khác biệt không có ý nghĩa thống kê.
Lô 1 (sinh lí): uống nước cất
Lô 2 (chứng bệnh): uống nước cất
Lô 3 (chứng dương): uống diclofenac 5 mg/kg
Lô 4 (TrK 200): uống cao TrK liều 200 mg/kg
Lô 5 (TrK 400): uống cao TrK liều 400 mg/kg.
Lô 6 (TrK 800): uống cao TrK liều 800 mg/kg
Chuột được nhịn đói 12 giờ và cho uống nước cất hoặc diclofenac hoặc cao thử với thể tích 10 mL/kg trọng lượng chuột. Sau khi uống nước cất, diclofenac và cao thử 1 giờ, chuột ở các lô từ 2 đến 6 được tiêm 0,025 mL dịch treo carrageenan 1 % vào gan bàn chân phải sau để gây viêm bàn chân; chuột lô sinh lí được tiêm dung dịch NaCl 0,9 %. Sau đó, tất cả chuột được cho vào lồng có giá đỡ để tránh nhiễm trùng chân. Đo thể tích bàn chân chuột lần lượt sau (1, 3, 5, 24, 48, 72, 96, 120 và 144) giờ (V_t) sau khi gây viêm.
Mức độ phù bàn chân chuột X (%) được tính theo công thức:

$$X (\%) = [(V_t - V_0)/V_0] \times 100$$

Trong đó V_0 và V_t: thể tích chân chuột tại thời điểm trước và sau khi gây viêm (mL)
Sau khi đo thể tích bàn chân ở thời điểm (24, 48, 72, 96, 120 và 144) giờ, chuột được cho uống nước cất, diclofenac hoặc cao TrK 01 lần/ngày trong 7 ngày.
Xử lí kết quả và phân tích thống kê
Kết quả được trình bày ở dạng giá trị trung bình ± SEM (sai số chuẩn của giá trị trung bình). Sự khác biệt giữa các lô được phân tích bằng phép kiểm One-way ANOVA, paired sample t-test, Kruskal-Wallis và Mann-Whitney với phần mềm SPSS 22 [15]. Sự khác biệt có ý nghĩa thống kê khi $p < 0,05$.

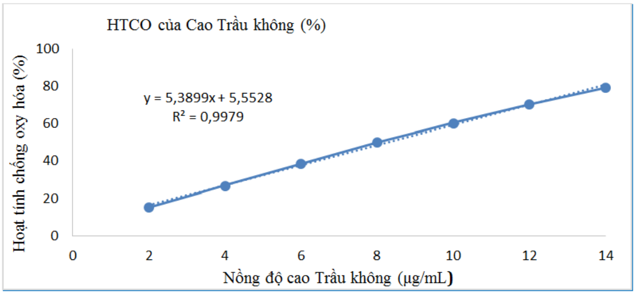
3 Kết quả nghiên cứu

3.1 Kết quả hoạt tính chống oxi hóa của cao TrK

Dung dịch DPPH có màu tím có độ hấp thu ở bước sóng 517 nm, khi có sự hiện diện của các chất kháng oxi hóa ở nồng độ thích hợp, dung dịch sẽ chuyển sang màu vàng. Do đó, giá trị OD càng thấp chứng tỏ khả năng trung hòa gốc tự do của chất chống oxi hóa càng cao.
Kết quả khảo sát hoạt tính chống oxi hóa *in vitro* bằng phương pháp DPPH của cao TrK ở các nồng độ khác nhau (20, 40, 60, 80 và 100) µg/mL được trình bày trong Bảng 3 và Hình 2.
Thông qua kết quả Bảng 3, ta thiết lập được phương trình thực nghiệm tuyến tính y = ax + b trong khoảng nồng đô từ 2 đến 14. Thay y = 50 để tìm x và xác định IC_{50} của mẫu thử (với x là nồng độ của mẫu thử có HTCO bằng 50 %).

Bảng 3 Hoạt tính chống oxi hóa *in vitro* bằng phương pháp DPPH của cao TrK

Mẫu thử	**Nồng độ của cao TrK** (µg/mL)	**Hoạt tính chống oxi hóa (HTCO %)**
1	2	15,14
2	4	26,90
3	6	38,45
4	8	49,94
5	10	60,46
6	12	70,39
7	14	79,42

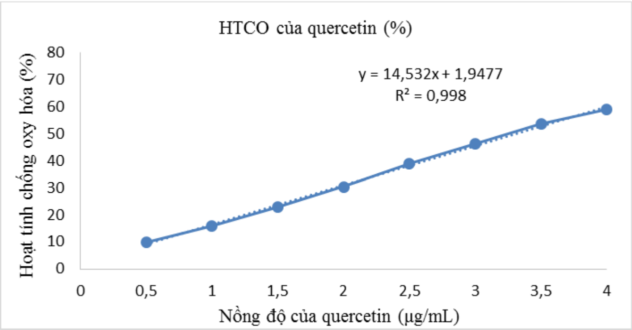


Hình 2 Hoạt tính chống oxi hóa *in vitro* bằng phương pháp DPPH của cao TrK

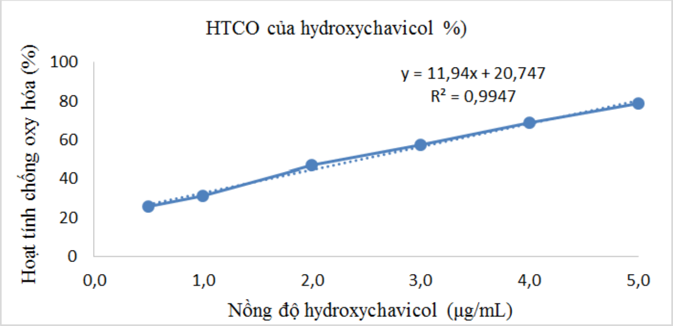
Tương tự, nghiên cứu cũng tiến hành xác định giá trị IC_{50} của chất đối chứng quercetin và hydroxychavicol (hoạt chất chính trong cao TrK). Kết quả được trình bày ở Bảng 4, Hình 3 và Hình 4.

Bảng 4 Hoạt tính chống oxi hóa *in vitro* bằng phương pháp DPPH của quercetin

Mẫu thử	**Nồng độ của quercetin** (µg/mL)	**Hoạt tính chống oxi hóa** (HTCO %)	**Nồng độ của hydroxychavicol** (µg/mL)	**Hoạt tính chống oxi hóa** (HTCO %)
1	0,5	9,97	0,5	25,74
2	1,0	16,04	1,0	31,44
3	1,5	22,85	2,0	46,98
4	2,0	30,44	3,0	57,49
5	2,5	38,86	4,0	69,00
6	3,0	46,31	5,0	78,91
7	3,5	53,57		
8	4,0	59,11		



Hình 3 Hoạt tính chống oxi hóa *in vitro* bằng phương pháp DPPH của chứng dương quercetin



Hình 4 Hoạt tính chống oxi hóa *in vitro* bằng phương pháp DPPH của hydroxychavicol

Kết quả tổng hợp về phương trình tuyến tính, giá trị IC_{50} của cao TrK, quercetin, hydroxychavicol được trình bày ở Bảng 5.

Bảng 5 Kết quả khảo sát hoạt tính chống oxi hóa *in vitro* của cao TrK, quercetin và hydroxychavicol

Mẫu thử	**Phương trình tuyến tính**	**R^2**	**IC_{50} (μg/mL)**
Cao TrK	Y = 5,3899x + 5,5528	0,9979	8,25
Quercetin	Y = 14,532x + 1,9477	0,9980	3,07
Hydroxychavicol	Y = 11,94x + 20,747	0,9947	2,45

Nhận xét: kết quả cho thấy rằng hiệu quả trung hòa gốc tự do DPPH của cao TrK tăng tuyến tính với nồng độ. Khi nồng độ tăng từ 2 µg/mL tới 14 µg/mL thì hiệu quả loại bỏ gốc tự do cũng tăng dần từ 15,14 % tới 79,42 %. Cao TrK có khả năng trung hòa các gốc tự do DPPH với phương trình Y = 5,3899 x + 5,5528 và với giá trị IC_{50} là 8,25 µg/mL, thấp hơn 3 lần so với chất đối chứng quercetin với giá trị IC_{50} là 3,07 µg/mL và thấp gấp 4 lần so với hydroxychavicol (IC_{50} = 2,45 µg/mL). Hơn nữa, nhóm tác giả đã định lượng cao TrK có hàm lượng hydroxychavicol chiếm khoảng 20 % trong cao tổng [7], vì thế tính kháng oxi hóa của cao tổng kém gấp 4 lần so với chất chuẩn hydroxychavicol. Do đó, kết quả thu được là hoàn toàn phù hợp.

Từ kết quả cho thấy, cao TrK có hoạt tính kháng oxi hóa mạnh, có tiềm năng sử dụng như một chất chống oxi hóa tự nhiên, làm giảm thiểu việc tạo ra các gốc tự do, giảm bớt các bệnh do stress oxi hóa gây ra như viêm cấp, viêm mạn tính, nhằm ứng dụng tạo ra sản phẩm điều trị bệnh răng miệng. Do đó, tiếp tục tiến hành khảo sát hoạt tính kháng viêm cũng như tính an toàn của cao TrK.

3.2 Kết quả độc tính cấp đường uống trên chuột nhắt trắng

Để khẳng định cơ sở khoa học về độ an toàn của cao TrK đối với chuột thử nghiệm, chế phẩm đã được khảo sát khả năng gây độc tính cấp. Sau 72 giờ uống 1 liều duy nhất cao TrK với nồng độ 5.000 mg/kg trọng lượng

chuột (thể tích 50 mL/kg trọng lượng), tất cả chuột đều khỏe mạnh, cử động bình thường, không có biểu hiện co giật, tiêu chảy hay xù lông, thở gấp. Bên cạnh đó, chuột ăn uống và di chuyển bình thường trong suốt 14 ngày thử nghiệm.

Độc tính chia làm 2 loại độc tính cấp (14 ngày) và độc tính bán trường diễn (6 tháng). Theo hướng dẫn của Bộ Y tế và OECD 423 thì mô hình độc tính cấp cần theo dõi tỉ lệ sống/chết và khối lượng chuột. Khi đã xác định được độc tính cấp của chuột với liều LD_{50}, tiến hành thử nghiệm độc tính bán trường diễn (6 tháng) và theo dõi các chỉ số về sinh hóa. Khi xác định được cao có hoạt tính kháng viêm, mới cần thử độc tính bán trường diễn vì bán trường diễn kéo dài 6 tháng, cần nhiều chuột hơn và tốn nhiều chi phí cho các loại xét nghiệm hơn, nên khi đã chắc chắn cao có hoạt tính kháng viêm thì mới thử bán trường diễn. Đây là trình tự của một nghiên cứu tiền lâm sàng.

Bảng 6 Tỉ lệ chuột sống/chết ở các lô thử nghiệm

Lô thử nghiệm	Số chuột thử nghiệm	Số chuột chết	Tỉ lệ chuột chết (%)
Lô 1 (đối chứng sinh lí)	6	0	0
Lô 2 (cao TrK liều 5.000 mg/kg)	6	0	0

Ảnh hưởng của cao TrK đến trọng lượng chuột tại 2 thời điểm trước và sau thử nghiệm

Bảng 7 Sự thay đổi trọng lượng chuột trong quá trình thử nghiệm

Lô thử nghiệm (n = 6)	**Kết quả cân nặng (g)**		
	Trước TN (To)	**Cuối thử nghiệm**	**Khối lượng gia tăng**
Lô 1 (sinh lí)	$29,13 \pm 1,13$	$43,42 \pm 2,19$	$14,29 \pm 1,51$
Lô 2 (TrK 5.000 mg/kg)	$28,02 \pm 0,86$	$39,35 \pm 1,45$	$11,33 \pm 1,26$

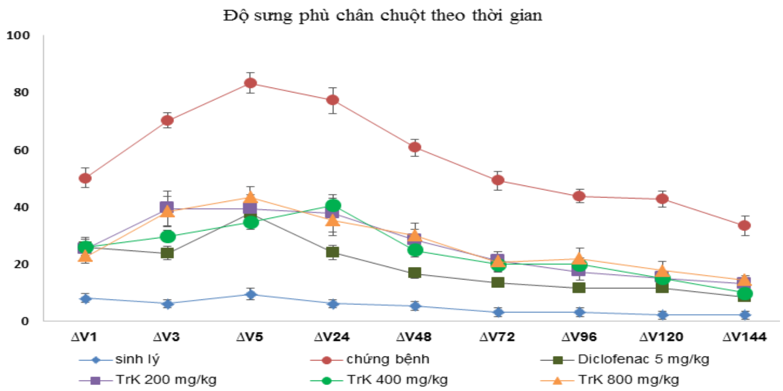
Bảng 7 cho thấy chuột ở 2 lô thử nghiệm đều tăng trung bình khoảng (11-14) g trong vòng 14 ngày. Sự khác biệt về trọng lượng chuột giữa 2 lô không có ý nghĩa thống kê ($p > 0,05$). Điều đó cho thấy cao TrK không làm ảnh hưởng đến cân nặng của chuột thử nghiệm.

So sánh khối lượng để biết rằng chuột uống cao TrK vẫn tăng trọng lượng. Điều này cũng cho thấy cao TrK không có độc, vì nếu một con vật bị trúng độc thì trọng lượng chuột có thể giảm sút.

Từ những kết quả trên cho thấy, cao TrK không gây ra độc tính cấp cho chuột thí nghiệm ở liều 5.000 mg/kg trọng lượng chuột. Khi nồng độ cao chiết 5.000 mg/kg không gây chết chuột thí nghiệm, điều này có nghĩa giá trị LD_{50} ở khoảng cao hơn 5.000 mg/kg trọng lượng chuột. Theo GSH (Globally Harmonised System for Classification of Chemicals), LD_{50} của cao TrK được xếp vào phân loại 6 – chất gần như không có độc tính [11]. Theo Đỗ Trung Đàm (2014), liều thử tác động dược lí thường vào khoảng 1/10 LD_{50} (trong giới hạn từ 1/5 tới 1/20 của LD_{50}) [13]. Theo nghiên cứu của Badrul Alam et al (2013) cho thấy cao chiết methanol lá TrK 200 mg/kg có tác động kháng viêm [16]. Từ đó, nghiên cứu sử dụng liều (200, 400 và 800) mg/kg cao TrK để tiến hành các thử nghiệm dược lí tiếp theo như thử nghiệm kháng viêm.

3.3 Khảo sát tác động kháng viêm của cao TrK

Sự thay đổi độ sưng phù chân chuột của các lô thử nghiệm theo thời gian (ΔV) được trình bày ở Bảng 8 và Hình 5.



Hình 5 Độ sưng phù chân chuột của các lô thử nghiệm theo thời gian (ΔV)

Bảng 8 Sự thay đổi độ phù chân chuột theo các lô thử nghiệm (%)

	Độ phù chân chuột theo thời gian (%)								
	ΔV1	ΔV3	ΔV5	ΔV24	ΔV48	ΔV72	ΔV96	ΔV120	ΔV144
Sinh lí	8,11 ± 1,46	6,18 ± 1,36	9,40 ± 2,02	6,18 ± 1,36	5,22 ± 1,53	3,14 ± 1,54	3,14 ± 1,54	2,18 ± 1,43	2,18 ± 1,43
Chứng bệnh	50,09$^{\#\#\#}$ ± 3,43	70,21$^{\#\#\#}$ ± 2,69	83,37$^{\#\#\#}$ ± 3,65	77,20$^{\#\#\#}$ ± 4,64	60,71$^{\#\#\#}$ ± 3,03	49,13$^{\#\#\#}$ ± 3,29	43,82$^{\#\#\#}$ ± 2,34	42,86$^{\#\#\#}$ ± 2,81	33,30$^{\#\#\#}$ ± 3,49
Diclofenac 5 mg/kg	26,01$^{***,\#\#\#}$ ± 2,83	23,83$^{***,\#\#}$ $^{\#}$± 2,22	37,75$^{***,\#\#\#}$ ± 4,22	24,08$^{***,\#\#\#}$ ± 2,57	16,70*** , $^{\#\#\#}$± 1,60	13,57*** , $^{\#\#\#}$± 1,56	11,57$^{***,\#\#\#}$ ± 1,65	11,57$^{***,\#\#\#}$ ± 1,65	8,43$^{***, \#\#\#}$ ± 1,58
TrK 200 mg/kg	25,32$^{**,\#\#\#}$± 4,04	39,43$^{**,\#\#\#}$ ± 6,18	39,34$^{***,\#\#\#}$ ± 4,93	37,66$^{**,\#\#\#}$± 6,58	28,37$^{***,\#\#\#}$ ± 3,81	21,31*** , $^{\#\#\#}$± 3,18	17,23$^{***,\#\#\#}$ ± 2,89	15,14$^{***,\#\#\#}$ ± 2,37	13,14$^{***,\#\#}$ ± 1,48
TrK 400 mg/kg	25,80$^{***,\#\#\#}$ ± 2,89	29,73*** , $^{\#\#\#}$± 1,96	34,62$^{***,\#\#\#}$ ± 2,45	40,62*** , $^{\#\#\#}$± 2,35	24,76$^{***,\#\#\#}$ ± 2,33	19,87$^{***,\#\#\#}$ ± 2,25	19,87*** , $^{\#\#\#}$± 2,16	14,90$^{***,\#\#\#}$ ± 1,80	9,85*** , $^{\#\#\#}$± 1,89
TrK 800 mg/kg	22,60$^{**,\#\#\#}$ ± 2,44	38,38$^{**,\#\#\#}$ ± 5,31	43,43$^{***,\#\#\#}$ ± 3,58	35,18$^{**,\#\#\#}$ ± 5,24	30,05$^{***,\#\#\#}$ ± 4,23	20,75$^{***,\#\#\#}$ ± 3,56	21,80$^{***,\#\#\#}$ ± 3,88	17,71$^{***,\#\#\#}$ ± 3,32	14,51$^{***,\#\#\#}$ ± 1,42

*, **, *** lần lượt p < 0,05; 0,01; 0,001 khác biệt có ý nghĩa thống kê so với chứng bệnh cùng thời điểm khảo sát.
$^{\#}$, $^{\#\#}$, $^{\#\#\#}$ lần lượt p < 0,05; 0,01; 0,001 khác biệt có ý nghĩa thống kê so với sinh lí cùng thời điểm khảo sát.

Bảng 8 cho ta thấy mức độ sưng phù chân chuột ở lô sinh lí cho với các lô chuột còn lại khác nhau có ý nghĩa thống kê (p < 0,001). Điều này chứng tỏ rằng thao tác tiêm không làm ảnh hưởng tới tình trạng sưng viêm bàn chân chuột.

Sau khi tiêm dung dịch carrageenan 1 %, độ sưng phù chân chuột ở lô chứng bệnh cao hơn so với lô sinh lí ở tất cả các thời điểm khảo sát, có ý nghĩa thống kê (p < 0,001) và độ sưng phù cao nhất rơi vào khoảng (3-5) giờ sau tiêm, đạt khoảng 75 %. Điều này chứng tỏ mô hình đã gây thành công tình trạng viêm bằng cách tiêm dưới da dung dịch carrageenan 1 % với liều 0,025 mL/con chuột.

Lô chứng dương diclofenac 5 mg/kg làm giảm rõ rệt độ phù chân chuột, thấp hơn có ý nghĩa thống kê so với lô chứng bệnh (p < 0,001) ở tất cả các thời điểm khảo sát. Cụ thể như sau: độ phù chân chuột ở các thời điểm (1, 3 5, 24, 48, 72, 96, 120 và 144) giờ của lô diclofenac lần lượt là (26,01; 23,83; 37,75, 24,08; 16,70; 11,57; 11,57, 11, 57 và 8,43) % so với chứng bệnh lần lượt là (50,09; 70,21, 83,37, 77,20; 60,71; 49,13; 43,82; 42,86 và 33,30) %. Từ đó, cho thấy rằng mô hình gây phù chân chuột bằng carrageenan 1 % đáp ứng tốt với thuốc đối chứng diclofenac 5 mg/kg.

So sánh mức độ phù chân chuột giữa lô chứng bệnh và 3 lô cao TrK

Mức độ phù chân chuột ở 3 lô cao TrK (200 , 400, và 800) mg/kg thấp hơn so với lô chứng bệnh ở tất cả các thời điểm khảo sát, có ý nghĩa thống kê (p < 0,05). Điều này chứng tỏ cao TrK khởi phát tác động rất nhanh, sau 2 giờ đã có thể phát huy được tác dụng kháng viêm.

Mức độ phù chân chuột ở cả 3 cao với liều thử (200, 400 và 800) mg/kg khác nhau không có ý nghĩa thống kê ở tất cả các thời điểm khảo sát (p > 0,05). Điều này cho thấy có thể sử dụng cao TrK liều 200 mg/kg cho các thử nghiệm tác dụng dược lí khác như khảo sát tác động bán trường diễn để hạn chế liều cũng như hạn chế tác dụng phụ không mong muốn của cao TrK.

So sánh mức độ phù chân chuột giữa lô diclofenac 5 mg/kg và 3 lô cao TrK

Lô chuột uống cao TrK (200, 400 và 800) mg/kg có khả năng làm giảm độ phù chân chuột, nhưng mức độ giảm không bằng so với lô diclofenac ở hầu hết các thời điểm khảo sát, nhưng sự khác nhau này không có ý nghĩa thống kê (p > 0,05). Như vậy, cao TrK thể hiện được hoạt tính kháng viêm ở liều uống (200, 400 và 800) mg/kg, tương đương với thuốc đối chứng diclofenac liều 5 mg/kg.

4 Bàn luận

Hoạt tính chống oxi hóa *in vitro* của cao TrK được đánh giá bằng thử nghiệm bắt gốc tự do DPPH, làm giảm màu tím của gốc tự do. Trong thử nghiệm này, sử dụng chất đối chứng là quercetin vì đã được nghiên cứu là một chất chống oxy hóa hiệu quả, đóng vai trò quan trọng trong việc duy trì nồng độ cân bằng của ROS và quá trình peroxy hóa lipid [17], giúp ngăn chặn hoặc làm chậm các quá trình oxi hóa diễn ra trong tế bào. Kết quả có thấy, cao TrK có hoạt tính chống oxi hóa với giá trị IC_{50} là 8,25 µg/mL, thấp hơn 3 lần so với quercetin (IC_{50} là 3,07 µg/mL) và thấp gấp 4 lần so với hydroxychavicol (IC_{50} = 2,45 µg/mL). Điều này cũng hoàn toàn hợp lí vì cao TrK này định lượng có hàm lượng hydroxychavicol chiếm khoảng 20 % [10]. Năm 2020, theo nghiên cứu của Bùi Thanh Tùng về tác dụng chống oxi hóa của các cao chiết ethanol 50 % TrK và các phân đoạn dịch chiết với các dung môi n-hexane, ethyl acetate (EtOAc) và n-butanol (n-BuOH) [18], kết quả cho thấy phân đoạn dịch chiết EtOAc có tác dụng chống oxi hóa cao nhất IC_{50}: (15,54 ± 0,48) µg/mL, sau đó là dịch chiết ethanol toàn phần IC_{50}: (31,31 ± 0,12) µg/mL và phân đoạn n-hexan IC_{50}: (83,67 ± 0,14) µg/mL, thấp nhất là phân đoạn n-BuOH IC_{50}: (95,60 ± 0,37) µg/mL. Kết quả nghiên cứu đã chỉ ra rằng phân đoạn EtOAc từ lá TrK có tiềm năng chống oxi hóa, khả năng trong phòng ngừa và điều trị viêm khớp, gout [18]. Ngoài ra, các nghiên cứu trước đây đã xác định được một số hợp chất phenol trong lá của *P. betle* bao gồm β-sitosterol, axit dotriacontanoic, tritriacontane, axit stearic, hydroxychavicol, chevibetol và allylpyrocatechol, cùng với các glucosit của chúng. Nhiều hợp chất trong số này bao gồm chevibetol, hydroxychavicol và allylpyrocatechol có các hoạt động chống oxi hóa [19]. Qua những kết quả đó, nhận thấy cao TrK có tiềm năng phòng ngừa tác động có hại của các gốc tự do, điều trị tốt các bệnh về viêm chẳng hạn như giảm làm triệu chứng viêm trong răng miệng.

Mô hình in vivo, liều gây chết 50 % (LD_{50}) số lượng chuột nhắt trắng *Swiss albino* của cao TrK được xác định lớn hơn 5.000 mg/kg trọng lượng chuột. Theo phân loại độc tính cấp của GHS (Globally Harmonised System for Classification of Chemicals) [11], những chất có giá trị độc tính cấp LD_{50} trong khoảng > 5.000 mg/kg được coi là chất gần như không độc. Kết quả này tương đồng với nghiên cứu độc tính của các loài Piper [20], cho thấy LD_{50} chiết xuất thô của TrK cao hơn 5.000mg/kg được phân loại 3 ở mức nhẹ gần như không độc. Một nghiên cứu khác về thử nghiệm độc tính cấp bằng mô hình liều cố định (300 và 2.000) mg/kg đã chứng minh cao TrK không thể hiện độc tính cấp ở liều (300 và 2.000) mg/kg [21]. Theo [13] liều an toàn thử tác động dược lí vào khoảng 1/10 LD_{50}. Theo [16], cao chiết methanol lá TrK 200 mg/kg có tác động kháng viêm. Từ đó, tác giả sử dụng liều (200, 400 và 800) mg/kg cao TrK để tiến hành các thử nghiệm dược lí tiếp theo như thử nghiệm kháng viêm.

Mô hình gây viêm bàn chân chuột bằng carrageenan là mô hình thử tác dụng kháng viêm kinh điển, đơn giản, thuận tiện, thời gian tiến hành nhanh, tạo độ phù ổn định nên nghiên cứu đã chọn mô hình này. Carrageenan gây phản ứng viêm tiến triển theo 2 pha (pha 1 đặc trưng bởi sự phóng thích histamin, serotonin và các kinin; pha 2 đặc trưng bởi sự phóng thích prostaglandin) phù hợp để nghiên cứu các chất/dược liệu có tác dụng ức chế riêng lẻ hoặc đồng thời các chất trung gian hóa học. Kết quả kháng viêm cho thấy, cao TrK liều 200 mg/kg đều thể hiện tác dụng làm giảm độ sưng phù chân chuột so với lô chứng bệnh, có ý nghĩa thống kê (p < 0,05) ở tất cả các thời điểm khảo sát (1, 3, 5, 24, 48, 72, 96, 120 và 144) giờ sau tiêm. So với diclofenac 5 mg/kg, cao TrK liều 200 mg/kg thể hiện hoạt tính kháng viêm tương đương với thuốc diclofenac, khác biệt không có ý nghĩa thống kê.

Kết quả này tương tự với nghiên cứu của Badrul Alam và cộng sự (2013) [16] với liều 200 mg/kg của cao chiết

methanol TrK có khả năng làm giảm độ phù chân chuột rõ rệt. Ngoài ra, tác giả còn chứng minh được khả năng chống oxi hóa của cao chiết methanol bằng phương pháp DPPH, ONOO- và tổng ROS với các giá trị IC_{50} lần lượt là (16,33 ± 1,02; 25,16 ± 0,61 và 41,72 ± 0,48) µg/mL. Điều này càng chứng tỏ TrK là một dược liệu quý hiếm, có tiềm năng về chống oxi hóa, chống stress oxi hóa và từ đó có thể hạn chế được các quá trình viêm, tổn thương tế bào xảy ra. So sánh, cao TrK của tác giả với giá trị IC_{50} là 8,25 µg/mL thể hiện hoạt tính chống oxi hóa cao hơn cao chiết methanol của tác giả Badrul gấp 2 lần, thể hiện tiềm năng về kháng viêm mạnh của cao TrK [16].

Hoạt tính kháng viêm của cao TrK có thể giải thích nhờ vào hàm lượng hydroxychavicol tồn tại trong cao chiết − chiếm khoảng 20 %. Hydroxychavicol được xem là một chất có hoạt tính chống oxi hóa, kháng viêm mạnh. Điều này thể hiện nhờ vào sự ức chế peroxy hóa lipid, ức chế đáng kể yếu tố TNF-alpha trong tế bào bạch cầu trung tính [22]. Ngoài ra, hoạt tính chống oxi hóa của cao chiết có mối liên quan mật thiết tới khả năng kháng viêm. Như đã biết, stress oxi hóa xảy ra khi mất cân bằng giữa việc sản xuất gốc tự do và các chất chống oxi hóa. Có nhiều dạng gốc tự do, trong đó có nhóm chính là nhóm có oxigen hoạt động (Reactive oxigen Species: ROS). ROS được tạo ra từ các tế bào biểu mô, tế bào viêm, tế bào miễn dịch [23].Ở trạng thái bình thường, ROS có vai trò sinh lí như diệt vi sinh vật, là thể truyền tin thứ phát (H_2O_2), điều hòa tải nạp và sao mã thông tin, tăng sinh và biệt hóa tế bào. Dư thừa ROS sẽ gây oxi hóa các đại phân tử, oxi hóa lipid, gây tổn thương màng tế bào, protein và ADN, có thể khởi phát và tiến triển các bệnh lí viêm nhiễm. Việc dư thừa ROS gây ra tình trạng stress oxi hóa, kích hoạt các yếu tố phiên mã (NF-xB, AP-1, HIF-1α, Nrf-2), thúc đẩy sự biểu hiện của gen tiền viêm dẫn tới cảm ứng các protein như ICAM/VCAM, MCP-1, TNF-α, yếu tố tăng trưởng, TGF-β và gây viêm. Do đó, viêm và ROS có mối quan mật thiết với nhau [8, 24]. Vì vậy, hoạt động loại bỏ các gốc tự do của các chất chống oxi hóa mạnh được xem xét là nguồn tài nguyên đầy hứa hẹn trong điều trị viêm. Vì thế, theo phương pháp DPPH, cao TrK có hoạt tính chống oxi hóa mạnh với IC_{50} 8,25 µg/mL, có thể làm giảm sự hình thành gốc tự do, ngăn chặn sự oxi hóa lớp phospholipid màng tế bào − nguyên nhân dẫn tới phản ứng viêm của cơ thể.

Hơn nữa, viêm trong các bệnh lí răng miệng do vi sinh vật gây ra cũng có biểu hiện sưng, nóng, đỏ, đau. Vì vậy, hoạt tính kháng viêm của cao TrK có thể làm giảm được tình trạng viêm trong bệnh lí răng miệng.

Từ những kết quả trên, cho thấy có thể bào chế sản phẩm dạng viên nhai gel để điều trị bệnh lí răng miệng.

5 Kết luận

Cao TrK không gây ra độc tính cấp cho chuột thí nghiệm ở nồng độ 5.000 mg/kg trọng lượng chuột, được xếp vào phân loại 6 – chất gần như không có độc tính theo GSH (Globally Harmonised System for Classification of Chemicals).

Ngoài ra, trên mô hình gây viêm bàn chân chuột bằng carrageenan 1 %, cao TrK thể hiện tác động làm giảm độ phù chân chuột đáng kể ở liều 200 mg/kg tương đương với đối chứng diclofenac 5 mg/kg.

Lời cảm ơn

Nghiên cứu được tài trợ bởi Quỹ phát triển Khoa học và Công nghệ - Đại học Nguyễn Tất Thành, mã đề tài 2022.01.18/HĐ-KHCN.

Tài liệu tham khảo

1. Nguyễn Đinh Nga và cs. (2010), "Thành phần và tác động kháng Candida spp. của tinh dầu và cao chiết từ lá Trầu không Việt Nam (*Piper betle* L. Piperaceae)", *Tạp chí Dược học*. 50 (410), tr. 27-30.
2. Phan Thị Thanh Thủy, Nguyễn Đinh Nga (2012), "Xây dựng tiêu chuẩn cơ sở cao chiết nước lá Trầu không (*Piper betle* L. Piperaceae)", *Luận văn Thạc sĩ Dược học, Đại học Y Dược TP. Hồ Chí Minh.*
3. Hoàng Thùy Dương và cs. (2021), Đánh giá hoạt tính sinh học của cao chiết lá Trầu không (*Piper betle* L.) thu nhận bằng phương pháp chiết siêu âm, *Tạp chí Khoa học và Công nghệ - Đại học Nguyễn Tất Thành,* 64 (3), tr. 37-42
4. Phạm Bền Chí và cs. (2020), "Khảo sát hoạt tính kháng *Candida spp*. của cao Trầu riêng rẽ và phối hợp với miconazol", *Tạp chí Khoa học và Công nghệ - Đại học Nguyễn Tất Thành,* 3 (4), pp. 58-63.
5. Pham Ben Chi, Vo Thi Bach Hue et al. (2021), " Analysis of pesticide residues in betel's extract (*Piper betle* L Piperaceae) by GC-MC/MS method", *Journal of Medicinal Meterials*, 26 (5), pp. 294-300.
6. Pham Ben Chi, Vo Thi Bach Hue et al. (2021), "Extraction and quantification of Hydroxy chavicol in Betel's leaves (*Piper betle* L. Piperaceae) by HPLC-PDA", *Journal of Medicinal Meterials*, 26 (3), pp. 169-175.
7. Phạm Bền Chí, Võ Thị Bạch Huệ, Nguyễn Đinh Nga (2021), "Nghiên cứu xây dựng tiêu chuẩn cơ sở cao trầu không (*Piper betle* L. Piperaceae)", *Luận văn Thạc sĩ Dược học, Đại học Y Dược TP. Hồ Chí Minh.*
8. Lei Y et al. (2015), "Redox regulation of inflammation: old elements, a new story", *Med Res Rev*. 35, pp. 306-340.
9. Magdalena L. Circu et al. (2010), "Reactive oxigen species, cellular redox systems, and apoptosis", *Free Radic Biol Med*. 48 (749-762).
10. Michael Antolovich et al. (2002), "Methods for testing antioxidant activity", *Critical Review*, pp. 183-198
11. United Nations (2005), *Test No. 423: Acute Oral toxicity - Acute Toxic Class Method*, A Guide to The Globally Harmonized System of Classification and Labeling of Chemicals (GHS), , pp. 1-14
12. Bộ Y tế (2015), Hướng dẫn thử nghiệm tiền lâm sàng và lâm sàng thuốc đông y, thuốc từ dược liệu, pp. 9-20.
13. Đỗ Trung Đàm (2014), Phương pháp xác định độc tính cấp của thuốc, *NXB Y học*, pp. 15-190.
14. Winter C. A. et al. (1962), "Carrageenin-induced edema in hind paw of the rat as an assay for antiiflammatory drugs", *Proc Soc Exp Biol Med*. 111, pp. 544-547**.**
15. Hoàng Trọng, Chu Nguyễn Mộng Ngọc (2008), *Phân tích dữ liệu nghiên cứu với SPSS*, Nhà xuất bản Hồng Đức, tr. 116-154.
16. Alam B. et al. (2013), "Antioxidant, analgesic and anti-inflammatory activities of the methanolic extract of *Piper betle* leaves". *Avicenna Journal of Phytomedicine*. 3 (2), pp. 112.
17. Priyanka Singh, et al. (2021), "The role of quercetin in plants", *Plant Physiology and Biochemistry*. 166, pp. 10-19.
18. Bùi Thanh Tùng và cs. (2020), "Nghiên cứu tác dụng chống oxi hóa và ức chế enzym xanthine oxidase *in vitro* của cao chiết lá Trầu không (*Piper betle* L.)", *VNU Journal of Science: Medical and Pharmaceutical Sciences*. 36 (2), pp. 16-24.
19. Noor Nazirahanie Abrahim, et al. (2012), "*Piper betle* shows antioxidant activities, inhibits MCF-7 cell proliferation and increases activities of catalase and superoxide dismutase", *BMC Complementary and Alternative Medicine*. 12(1), pp. 1-11
20. Arisa Sanubol, et al. (2017), "Pre-clinical evaluation of extracts and essential oils from betel-like scent Piper species identified potential cancer treatment", *African Journal of Traditional, Complementary and Alternative Medicines*. 14(1), pp. 89-102.
21. Boonyareth Maskiet, et al. (2015), "Acute and Chronic Toxicity Study of *Piper betle* L.Leaf Extract - การศึกษาความเป็นพิษเฉียบพลนั และพิษเรื้อรังของสารสกดั ใบพลู (Piper betle L.)." *Bulletin of the Department of Medical Sciences*. 57(1), pp. 1-21.
22. Sharma S. et al. (2009), "Evaluation of the antimicrobial, antioxidant, and anti-inflammatory activities of hydroxychavicol for its potential use as an oral care agent", *Antimicrob Agents Chemother*. 53 (1), pp. 216-222.

23. Circu M. L. et al. (2010), "Reactive oxigen species, cellular redox systems, and apoptosis", *Free Radic Biol Med*. 48 (6), pp. 749-762.
24. Chatterjee S. et al. (2016), "Oxidative Stress, Inflammation, and Disease. In: Oxidative Stress and Biomaterials". *Elsevier, Amsterdam*, pp. 35-38.

Study on acute oral toxicity, antioxidant and anti - inflammatory activities of betel's extract (*Piper betle* L. Piperaceae)

Nguyen Thi Bach Tuyet*, Hoang Thi Phuong Lien,
Bui Thai Quynh Thi, Nguyen Nhut Truong, Le Thi Quynh Nhi

Pharmacology Department, Faculty of Pharmacy, Nguyen Tat Thanh University
*ntbtuyet@ntt.edu.vn

Abstract The study used standardized betel leaf extract with 96 % alcohol and water. For *in vitro* study, antioxidant capacity of betel's extract was performed by DPPH method - free radical scavenging. *In vivo* testing was performed on *Swiss albino* mice, (6-8) weeks aged, with an average weight of about 22 g. The investigation of acute oral toxicity was performed at 5,000 mg/kg dosage with a volume of 50 mL/kg of rat, monitoring mortality and toxicity within 14 days. The anti-inflammatory effect of extract at doses of (200, 400 and 800) mg/kg was evaluated in mice induced with paw inflammation with 1 % carrageenan. Diclofenac 5 mg/kg was used as a drug reference. The results showed that betel's extract showed an antioxidant activity with IC_{50} of 8.25 µg/mL, about 3 times worse than quercetin. This extract does not cause acute oral toxicity at a concentration of 5,000 mg/kg, and is classified in category 6 – a substance that is almost non-toxic according to GSH (Globally Harmonised System for Classification of Chemicals). In the carragenan-induced inflammation model, this extract showed a significant reduction in paw edema in mice at (200, 400 and 800) mg/kg doses ($p < 0.05$).

Keywords Betel's extract, DPPH, antioxidant, anti-inflammatory, acute toxicity.