

STUDY ON ACUTE ORAL TOXICITY AND ANTI-HYPERLIPIDEMIC EFFECT OF LEAF EXTRACTS OF *VERNONIA AMYGDALINA* DEL., ASTERACEAE

Tran Ly Minh Chau, Hoang Thi Phuong Lien*

Nguyen Tat Thanh University

ARTICLE INFO	ABSTRACT
Received: 09/4/2021 Revised: 24/5/2021 Published: 07/6/2021	This study evaluates the acute oral toxicity and anti-hyperlipidemic effect of aqueous and ethanol extract obtained from bitter leaf (<i>Vernonia amygdalina</i> Del., Asteraceae). Oral acute toxicity of bitter leaf extracts was investigated in male and female <i>Swiss albino</i> mice by monitoring mortality and toxicity within 72 hours. The anti-hyperlipidemic activity of studied extracts were evaluated against elevated total cholesterol, triglycerides level in tyloxapol induced hyperlipidemic mice. Anti-hyperlipidemic drug fenofibrate (50 mg/kg) was used as a positive control. The leaf extracts of bitter leaf were virtually non-toxic (D_{max} of the ethanol extract was 22 g/kg and LD_{50} of the aqueous extract was 21.45 g/kg). The ethanol extract showed acute anti-hyperlipidemic effect in the tyloxapol-induced hyperlipidemia model. Particularly, dose 1,000 mg/kg of ethanol extract lowered both triglycerides and total cholesterol level whereas dose 500 mg/kg only lowered triglycerides level compared to tween group. The aqueous extract did not show the anti-hyperlipidemic effect.
KEYWORDS Bitter leaf <i>Vernonia amygdalina</i> Del. Acute toxicity Anti-hyperlipidemic effect Tyloxapol	

KHẢO SÁT ĐỘC TÍNH CẤP VÀ TÁC DỤNG HẠ LIPID MÁU CỦA CAO CHIẾT LÁ CÂY LÁ ĐẮNG (*Vernonia amygdalina* Del., Asteraceae)

Trần Lý Minh Châu, Hoàng Thị Phương Liên*

Trường Đại học Nguyễn Tất Thành

THÔNG TIN BÀI BÁO	TÓM TẮT
Ngày nhận bài: 09/4/2021 Ngày hoàn thiện: 24/5/2021 Ngày đăng: 07/6/2021	Nghiên cứu thực hiện nhằm khảo sát độc tính cấp, tác dụng hạ lipid máu của cao chiết nước và cao chiết cồn 96% từ lá cây Lá đắng (<i>Vernonia amygdalina</i> Del., Asteraceae). Thử nghiệm độc tính cấp đường uống của cao chiết lá cây Lá đắng trên chuột nhắt đực và cái, chủng <i>Swiss albino</i>, theo dõi tỉ lệ chết và biểu hiện độc tính trong vòng 72 giờ. Khảo sát tác động hạ lipid máu thực hiện trên mô hình gây tăng lipid máu bằng tyloxapol với thuốc đối chứng là fenofibrat 50 mg/kg. Kết quả thu được cho thấy, cao chiết lá cây Lá đắng ít độc (D_{max} cao cồn 22 g/kg và LD_{50} cao nước 21,45 g/kg). Trong thử nghiệm khảo sát tác động hạ lipid máu, cao chiết cồn với liều 1.000 mg/kg thể hiện tác dụng làm giảm nồng độ triglycerid và cholesterol, trong khi liều 500 mg/kg chỉ làm giảm nồng độ triglycerid. Cao chiết nước ở cả hai liều 500 mg/kg và 1000 mg/kg chưa thể hiện tác động hạ lipid máu.
TỪ KHÓA Lá đắng <i>Vernonia amygdalina</i> Del. Độc tính cấp Hạ lipid máu Tyloxapol	

DOI: <https://doi.org/10.34238/tnu-jst.4298>

* Corresponding author. Email: htplien@ntt.edu.vn

1. Đặt vấn đề

Những năm gần đây, lá cây Lá đắng (*Vernonia amygdalina* Del., Asteraceae) được sử dụng phổ biến ở trong dân gian để điều trị đái tháo đường, tăng lipid máu, giảm đau, kháng viêm...[1]. Một số nghiên cứu trên thế giới đã khảo sát thành phần hóa học cũng như tác dụng dược lý của loài cây này [2]-[6]. Tuy nhiên, các nghiên cứu về độc tính cũng như tác dụng dược lý của loài cây này ở Việt Nam vẫn còn khá hạn chế. Bài báo này trình bày các kết quả thu được từ nghiên cứu được tiến hành từ tháng 5/2020 tới tháng 9/2020, với mục tiêu khảo sát độc tính cấp đường uống và tác động hạ lipid máu cấp của cao chiết nước và cao chiết cồn lá cây Lá đắng *Vernonia amygdalina* Del.

2. Đối tượng và phương pháp nghiên cứu

2.1. Động vật thử nghiệm

Chuột nhắt trắng, trưởng thành 6 - 7 tuần tuổi, chủng *Swiss albino*, nặng từ 18 - 26 g, khỏe mạnh, không dị tật do Viện Vaccin và Sinh phẩm Y tế Nha Trang cung cấp. Chuột được nuôi ổn định trong lồng nhựa kích thước 25 x 35 x 15 cm, ở nhiệt độ phòng trong vòng 5 ngày trước khi tiến hành thử nghiệm, cung cấp nước và thức ăn đầy đủ.

2.2. Dược liệu

Mẫu lá tươi cây Lá đắng được thu hái tự nhiên tại quận 9, thành phố Hồ Chí Minh vào tháng 5/2020, loại bỏ các lá hư hại, rửa sạch, sấy ở nhiệt độ 60°C, xay nhỏ tại bộ môn Dược liệu – Đại học Nguyễn Tất Thành.

Chiết nóng bột dược liệu với nước cất theo tỷ lệ 1/15 (kl/tt) trên bếp cách thủy 90°C, chiết 2 lần, 30 phút/lần, cô dịch chiết trên bếp cách thủy ở 70°C, thu được cao chiết nước toàn phần. Từ 1 kg dược liệu khô, thu được 240,92 g cao nước, hiệu suất 24,09% với độ ẩm trung bình là 4,64%.

Sử dụng phương pháp ngâm kiệt với dung môi cồn 96%, bốc hơi trên bếp cách thủy ở 60°C, thu được cao chiết cồn toàn phần. Từ 1 kg dược liệu khô, thu được 172,87 g cao cồn, hiệu suất 17,29% với độ ẩm trung bình là 10,91%.

2.3. Khảo sát độc tính cấp đường uống

Chuột thử nghiệm (50% đực, 50% cái) được nhịn đói ít nhất 12 giờ trước thử nghiệm, cho uống nước đầy đủ. Đối với cao nước, liều đầu tiên được thử nghiệm là 46 g/kg tương ứng với nồng độ tối đa 0,92 g/ml của cao có thể qua kim. Cao cồn được phân tán trong nước (trợ tan bằng tween 80 5%), liều đầu tiên được thử nghiệm là 22 g/kg tương ứng với nồng độ tối đa 0,44 g/ml của cao có thể qua kim. Tiến hành song song với chuột đối chứng cho uống dung dịch tween 80 5% (tt/tt). Theo tác giả Đỗ Trung Đàm, thể tích thích hợp để khảo sát độc tính cấp đường uống đối với chuột nhắt trắng nặng 20 g là 0,2 - 1,0 ml [7]. Do đó, đề tài tiến hành cho uống với thể tích 0,5 ml/10 g thể trọng chuột. Mỗi liều khảo sát tiến hành trên 6 - 10 chuột. Theo dõi và ghi nhận cử động tổng quát, biểu hiện hành vi, trạng thái lông, ăn uống, tiêu tiểu và số lượng chết của chuột 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 trong 14 ngày và những chuột sống sót sau 14 ngày đều được mổ để quan sát đại thể các cơ quan. Chuột chết hay không trong 72 giờ đầu tiên sẽ quyết định bước tiếp theo: Tiếp tục tiến hành thử nghiệm với các liều khác để xác định LD₅₀ hoặc không cần tiếp tục tiến hành thử nghiệm tiếp theo [7].

2.4. Khảo sát tác dụng hạ lipid máu cấp

Chuột đực được nuôi ổn định ở điều kiện thử nghiệm trong 7 ngày, sau đó được chia ngẫu nhiên thành 8 lô, mỗi lô gồm 8 con. Chuột nhịn đói ít nhất 12 giờ trước khi thử nghiệm. Chuột được chia ngẫu nhiên vào các lô:

- Lô sinh lý (SL): uống nước cất.

- Lô chứng bệnh (CB): uống nước cất.
- Lô tá dược (Tw80): uống Tween 80 1,2% pha trong nước cất.
- Lô chứng dương (CD): uống fenofibrate, liều 50 mg/kg [8].
- Lô thử nghiệm cao cồn, liều 500 mg/kg (C500): uống cao cồn, liều 500 mg/kg.
- Lô thử nghiệm cao cồn, liều 1000 mg/kg, (C1000): uống cao cồn, liều 1000 mg/kg.
- Lô thử nghiệm cao nước (N500): uống cao nước, liều 500 mg/kg.
- Lô thử nghiệm cao nước (N1000): uống cao nước, liều 1000 mg/kg.

Ngay sau khi uống nước, cao thử nghiệm hoặc thuốc đối chứng, chuột được gây tăng lipid máu cấp bằng cách tiêm tĩnh mạch đuôi tyloxapol, liều 250 mg/kg pha trong nước muối sinh lý NaCl 0,9%. Riêng lô sinh lý được tiêm nước muối sinh lý. Điều kiện uống hoặc cho tiêm ở tất cả các lô là 0,1 ml/10g. Sau 24 giờ tiêm tyloxapol, chuột được gây mê bằng CO₂, lấy máu tim để định lượng triglycerid (TG) và cholesterol toàn phần (TC) trong huyết tương theo nguyên tắc enzym màu [8], [9].

2.5. Phân tích thống kê kết quả

Các số liệu trình bày dưới dạng số trung bình $\pm$ SEM (standard error of mean - sai số chuẩn của giá trị trung bình) và được phân tích thống kê sử dụng phép kiểm Mann - Whitney và Kruskal - Wallis với phần mềm SPSS 20.0. Sự khác biệt có ý nghĩa thống kê khi $p < 0,05$.

3. Kết quả nghiên cứu

3.1. Kết quả độc tính cấp đường uống của cao lá cây Lá đắng

Nồng độ cao tối đa có thể qua kim cho uống của cao nước là 0,92 g/ml, cho chuột uống với thể tích 0,5 ml/10 g thể trọng chuột, tương ứng với liều 46 g cao/kg. Ở liều này, sau uống thuốc, chuột có triệu chứng giảm hoạt động, thụ động, hô hấp nhanh, co thắt vùng bụng liên tục, sau đó chuột thụ động, nằm im tại chỗ, co giật liên tục hai chân sau rồi tử vong. Với liều khởi đầu là 46 g/kg, tỉ lệ chuột tử vong trong 72 giờ là 100%. Tiếp tục tiến hành thử nghiệm ở các liều khác nhau, thu được kết quả thử nghiệm sơ khởi: LD₁₀₀ = 34,5 g/kg, LD₀ = 12,0 g/kg. Thực hiện thử nghiệm xác định LD₅₀ cho kết quả biểu diễn ở Bảng 1.

Bảng 1. Kết quả thử nghiệm xác định độc tính cấp cao chiết nước lá cây Lá đắng

Liều (g/kg)	Số động vật/lô	Số động vật chết/lô	Phân suất tử vong (%)
12,0	10	0	0
16,5	10	2	20
21,0	10	4	40
25,5	10	9	90
30,0	10	9	90
34,5	10	10	100

Dựa theo bảng số liệu, tính toán theo phương pháp Behrens – Kärber, ghi nhận LD₅₀ là 21,45 $\pm$ 1,07 g/kg. Tuy nhiên, theo như hệ thống phân loại độc tính của GSH (Globally harmonized system of classification and labeling of chemicals) thì cao nước lá cây Lá đắng được xếp vào nhóm 5 (ít độc) [10].

Cao cồn được phân tán trong nước với nồng độ tween 80 là 5% (tt/tt). Nồng độ tối đa có thể qua kim cho uống là 0,44 g/ml, cho chuột uống với thể tích 0,5 ml/10 g thể trọng chuột, tương ứng với liều 22 g cao/kg. Tất cả chuột vẫn sống khỏe mạnh, ăn cám, uống nước, tiêu tiểu, cử động bình thường, không có dấu hiệu bất thường và không có chuột chết trong vòng 72 giờ. Tiếp tục theo dõi chuột trong vòng 14 ngày, kết quả cho thấy không có chuột nào chết, lông và các biểu hiện bình thường.

Kết quả giải phẫu sau 14 ngày theo dõi cho thấy không có thay đổi nào về đại thể tim, phổi, gan, thận, hệ tiêu hóa, màu sắc, kích thước giữa các lô sinh lý, lô tween 80 và cao thử.

3.2. Kết quả khảo sát mô hình gây tăng lipid máu cấp

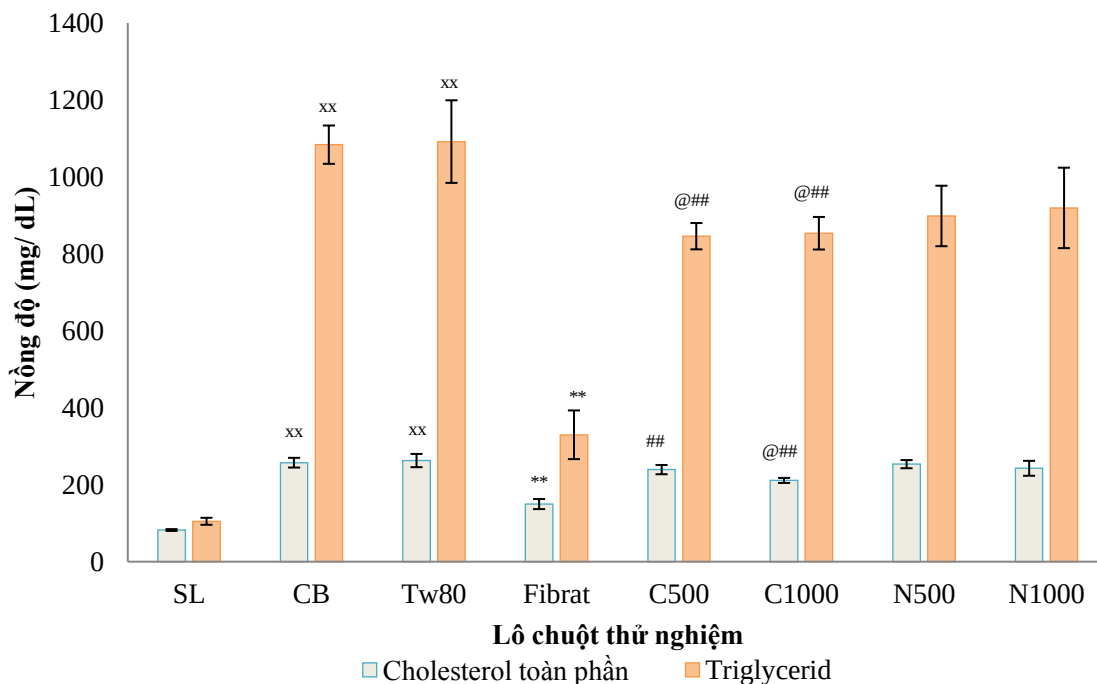
Đề tài chọn liều thử nghiệm là 500 mg/kg và 1000 mg/kg (khoảng 1/20 và 1/40 LD₅₀ cao nước và D_{max} cao cồn), dung môi phân tán cao cồn là Tween 80 nồng độ 1,2% để khảo sát tác động hạ lipid máu cấp của cao chiết lá cây Lá đắng trên chuột nhắt. Kết quả thử nghiệm được biểu diễn ở Bảng 2 và Hình 1.

Bảng 2. Nồng độ cholesterol toàn phần và triglycerid của chuột thử nghiệm

Lô	Số lượng	Cholesterol toàn phần (mg/dL)	Triglycerid (mg/dL)
SL	8	82,22 ± 2,36	104,95 ± 9,07
CB	8	257,23 ^{xx} ± 12,63	1083,56 ^{xx} ± 49,85
Tw80	8	262,75 ^{xx} ± 17,18	1091,57 ^{xx} ± 107,31
CD	8	149,71 ^{**} ± 13,08	329,74 ^{**} ± 63,27
C500	8	239,25 ^{##} ± 12,03	845,73 ^{@##} ± 34,22
C1000	8	211,07 ^{@##} ± 6,56	853,45 ^{@##} ± 42,31
N500	8	253,38 ± 10,60	898,31 ± 78,59
N1000	8	242,63 ± 19,37	919,25 ± 104,53

^{xx} p < 0,01 so với lô SL, ^{**} p < 0,01 so với lô CB,

[@] p < 0,05 so với lô Tw80, ^{##} p < 0,01 so với lô CD



^{xx} p < 0,01 so với lô SL, ^{**} p < 0,01 so với lô CB,

[@] p < 0,05 so với lô Tw80, ^{##} p < 0,01 so với lô CD

Hình 1. Nồng độ cholesterol toàn phần và triglycerid của chuột thử nghiệm

Kết quả thu được cho thấy 24 giờ sau tiêm tĩnh mạch đuôi chuột tyloxapol liều 250 mg/kg, nồng độ TG và TC ở lô chứng bệnh tăng đáng kể so với chuột ở lô sinh lý (p < 0,01), lần lượt là 10,32 lần và 3,13 lần. Tương tự, ở lô tween 80, nồng độ TG và TC tăng đáng kể (p < 0,01) lần lượt là 10,40 lần và 3,19 lần. Khi so sánh lô chứng bệnh và tween 80 cho thấy sự khác biệt không có ý nghĩa thống kê (p > 0,05). Như vậy, tween 80 không làm ảnh hưởng đến nồng độ lipid máu. Chuột được điều trị với thuốc fenofibrate liều 50 mg/kg, có sự giảm nồng độ TG (69,57%) và TC (41,80%) so với lô chứng bệnh (p < 0,01).

Đối với chuột được uống cao chiết cồn liều 500 mg/kg, nồng độ TG máu giảm 22,52% ($p < 0,05$), trong khi nồng độ TC có giảm so với lô tween 80, nhưng sự khác biệt không có ý nghĩa thống kê. Cao cồn liều 1000 mg/kg, nồng độ TG máu và TC giảm lần lượt 21,81% và 19,67% so với lô tween 80 ($p < 0,05$) và có sự khác biệt giữa hai liều khảo sát với lô chứng dương ($p < 0,01$).

Kết quả thử nghiệm ở hai lô chuột được điều trị bằng cao chiết nước liều 500 mg/kg và 1000 mg/kg, cho thấy nồng độ TC và TG so với lô chứng bệnh không có ý nghĩa thống kê ($p > 0,05$).

4. Kết luận

Ở thử nghiệm độc tính cấp, đối với cao nước lá cây Lá đắng, giá trị LD_{50} là $21,45 \pm 1,07$ g/kg. Trong quá trình thử nghiệm, ghi nhận được hiện tượng co giật, thụ động, co thắt vùng bụng và tử vong ở những liều cao. Cao ethanol 96% của Lá đắng không thể hiện độc tính cấp đường uống, không làm chết chuột ở liều giới hạn 22 g/kg.

Ở thử nghiệm khảo sát tác động hạ lipid máu, cao cồn liều 500 mg/kg và 1000 mg/kg đều thể hiện tác động hạ lipid máu so với lô Tween 80, trong đó, tác động hạ lipid máu thể hiện rõ rệt hơn ở liều 1000 mg/kg (giảm cả chỉ số TG và TC) so với liều 500 mg/kg (giảm TG). Hai mức liều của cao chiết nước (500 mg/kg và 1000 mg/kg) chưa thể hiện tác động hạ lipid máu so với lô chứng bệnh trên mô hình chuột nhất bị tăng lipid máu bằng tyloxapol liều 250 mg/kg.

Đề tài là cơ sở cho việc nghiên cứu thuốc từ cao lá Lá đắng trong việc phòng ngừa và/hoặc hỗ trợ điều trị rối loạn lipid máu.

TÀI LIỆU THAM KHẢO/ REFERENCES

- [1] T. H. H. Nguyen, T. H. Doan, and T. H. Tran, "Antidiabetic effect of ethanolic leaf extract of *Vernonia amygdalina* Del. in mice," (in Vietnamese), *TNU Journal of Science and Technology*, vol. 225, no. 01, pp. 144-149, 2020.
- [2] O. A. Adaramoye, O. Akintayo, J. Achem, and M. A. Fafunso, "Lipid-lowering effects of methanolic extract of *Vernonia amygdalina* leaves in rats fed on high cholesterol diet," *Vascular health and risk management*, vol. 4, no. 1, p. 235, 2008.
- [3] A. A. Adedapo, O. J. Aremu, and A. A. Oyagbemi, "Anti-oxidant, anti-inflammatory and antinociceptive properties of the acetone leaf extract of *Vernonia amygdalina* in some laboratory animals," *Advanced pharmaceutical bulletin*, vol. 4, no. 2, pp. 591-598, 2014.
- [4] D.-B. Asante, I. T. Henneh, and D. O. Acheampong, "Anti-inflammatory, anti-nociceptive and antipyretic activity of young and old leaves of *Vernonia amygdalina*," *Biomedicine & Pharmacotherapy*, vol. 111, pp. 1187-1203, 2019.
- [5] T. Bihonegn, M. Giday, and G. Yimer, "Antimalarial activity of hydromethanolic extract and its solvent fractions of *Vernonia amygdalina* leaves in mice infected with *Plasmodium berghei*," *SAGE open medicine*, vol. 7, pp. 1-10, 2019.
- [6] K. WeiOng, A. Hsu, and L. Song, "Polyphenols-rich *Vernonia amygdalina* shows anti-diabetic effects in streptozotocin-induced diabetic rats," *Journal of ethnopharmacology*, vol. 133, no. 2, pp. 598-607, 2011.
- [7] T. D. Do, Methods for determining acute toxicity. Medical Publishing House (in Vietnamese), 2014, pp. 15-184.
- [8] T. H. T. Do, H. A. Nguyen, and T. D. Le, "Study on treatment effect in acute lipid disorders of aqueous extract from the An Giang traditional remedy containing some medicinal plants," (in Vietnamese), *Ho Chi Minh City Journal of Medicine*, vol. 23, no. 2, pp. 680-684, 2019.
- [9] D. N. T. Nguyen, M. H. Tran, and N. T. Huynh, "Hypolipidemic effect of ethanolic extract from *Pandanus amaryllifolius* leaves on triton WR-1339-induced hyperlipidemia in mice," *International Journal of Pharmacological Research*, vol. 8, no. 12, pp. 131-136, 2018.
- [10] United Nations, *A Guide to The Globally Harmonized System of Classification and Labeling of Chemicals (GHS)*, 4th ed, 2011, pp. 109-120.