

Nghiên cứu xây dựng quy trình tạo chế phẩm có tác dụng điều hòa miễn dịch từ lá chay Bắc Bộ (*Artocarpus tonkinensis* A. Cheval. ex Gagnep.)

Trịnh Thị Thuý^{1*}, Đào Đức Thiện¹, Trần Đức Quân¹, Nguyễn Thanh Tâm¹,
Trần Quan Hưng¹, Phạm Thị Ninh¹, Trần Văn Lộc¹, Trần Văn Sung¹,
Lê Thị Hồng Nhung², Ngô Thị Thủy³, Nguyễn Duy Như³, Domenico V. Delfino⁴

¹Viện Hoá học, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam

²Trường Đại học Công nghiệp Hà Nội

³Công ty TNHH Tuệ Linh

⁴Khoa Y, Trường Đại học Tổng hợp Perugia, Italia

Ngày nhận bài 8.10.2015, ngày chuyển phân biện 15.10.2015, ngày nhận phân biện 24.11.2015, ngày chấp nhận đăng 30.11.2015

Lá chay Bắc Bộ (*Artocarpus tonkinensis* A. Chev. ex Gagnep.) được sử dụng trong y học cổ truyền Việt Nam để điều trị đau lưng và viêm khớp. Những nghiên cứu trước đây cho thấy, căn chiết ethanol của lá chay có hoạt tính ức chế miễn dịch, chống viêm và kháng ung thư [1-6]. Bài viết này giới thiệu kết quả nghiên cứu quy trình chiết flavonoid tổng một cách hiệu quả để tạo chế phẩm từ lá chay (*A. tonkinensis*, AT2). Thành phần hóa học chính của cao chiết được xác định bằng cách sử dụng sắc ký lớp mỏng (TLC), sắc ký lỏng hiệu năng cao (HPLC) và sắc ký lỏng gắn khối phổ (HPLC-MS/MS). Quy trình chiết khá đơn giản và khả thi ở quy mô lớn, có thể dễ dàng áp dụng trong công nghiệp dược phẩm.

Việc đánh giá độc tính cấp tính và bán trường diễn của căn chiết ethanol từ lá chay AT2 được thực hiện tương ứng trên chuột và thỏ. Trong thử nghiệm độc tính cấp tính, cho chuột uống đến liều cao nhất có thể (nồng độ và thể tích tối đa cho phép) là 42,9 g/kg trọng lượng cơ thể, nhưng chưa thấy biểu hiện triệu chứng độc tính cấp rõ rệt và không có chuột chết trong thời gian theo dõi 7 ngày sau uống mẫu thử AT2. Trong thử nghiệm độc tính bán trường diễn, cho thỏ uống AT2 liều 0,6 g/kg/ngày (lô 1) và 1,8 g/kg/ngày (lô 2) liên tục trong 8 tuần. Kết quả cho thấy: cả hai liều trên đều không làm ảnh hưởng xấu đến tình trạng chung, mức độ tăng trọng lượng và không ảnh hưởng đến các chỉ số tạo máu, chức năng gan (AST, ALT, bilirubin toàn phần, albumin, cholesterol) và chức năng thận (creatinin); không gây tổn thương rõ rệt về mặt hình thái khi quan sát đại thể các cơ quan và cấu trúc vi thể gan, thận của thỏ khi cho thỏ uống AT2 ở liều 0,6 g (lô 1) và 1,8 g/kg/ngày (lô 2) liên tục trong 8 tuần. Những kết quả này đã chứng minh rằng, AT2 có độ an toàn cao và tiếp tục chứng minh tính an toàn và hiệu quả khi sử dụng cây thuốc này trong y học cổ truyền.

Từ khóa: auronol glucoside, chay Bắc Bộ (*artocarpus*), độc tính bán trường diễn, độc tính cấp, flavonol glycosides.

Chỉ số phân loại 1.4

Đặt vấn đề

Loài chay Bắc Bộ (*Artocarpus tonkinensis* A. Cheval. ex Gagnep.) thuộc họ Dâu tằm - Moraceae là cây đại mộc, mọc hoang và được trồng phổ biến ở các tỉnh miền Bắc nước ta như Bắc Ninh, Bắc Giang, Tuyên Quang, Hà Giang, Thanh Hoá. Lá và rễ cây chay được thu hái hầu như quanh năm để dùng làm thuốc; vỏ và rễ màu đỏ dùng để ăn trâu. Theo kinh nghiệm dân gian, nước sắc lá chay dùng để chữa đau

lưng và viêm khớp dạng thấp rất tốt [2]. Trong chiến tranh, lá chay được dùng để điều trị bệnh liên quan đến tự miễn như nhược cơ, lupus ban đỏ cho bộ đội. Mặc dù cây chay đã được sử dụng trong dân gian từ rất lâu, nhưng cho đến nay chưa có công trình nào nghiên cứu một cách bài bản về tính an toàn của cây này. Phan Chúc Lâm, Phan Thị Phi Phi và cộng sự đã sử dụng dịch chiết thô của lá chay Bắc Bộ trong việc điều trị bệnh nhược cơ, một bệnh có nguyên nhân do quá mẫn cảm và làm chất chống thải ghép cho các ca

*Tác giả liên hệ: Tel: 0978987562; Email: thuy@ich.vast.vn

Study on technical procedure for producing a preparation with immune-regulation activity from *Artocarpus tonkinensis* leaves

Summary

Artocarpus tonkinensis A. Chev. ex Gagnep. leaves have been used in Vietnamese traditional medicine for the treatment of backache and joint disorders. The aqueous ethanol extract of *A. tonkinensis*'s leaves has been developed in Vietnam as herbal functional food and medicine due to its various biological activities including immunosuppressive, anti-inflammation, and anticancer. This study determined the efficient extraction of total flavonoids from the leaves of *A. tonkinensis* (AT). Active components including two rare auronol glucosides and flavonol glycosides were analyzed using TLC, HPLC and HPLC-MS/MS.

Furthermore, the authors evaluated the toxicological properties of an ethanolic extract from *A. tonkinensis* leaves (AT2), including acute and sub-chronic toxicity to mice and rabbits, respectively. In acute toxicity test, AT2 showed no effect on survival, clinical observations, macroscopic examination of organs, body weight or food, and water consumption. In sub-chronic toxicity assay, AT2 did not change behaviors, body weight, and histopathological assessment of kidney and liver. Moreover, most of biochemical and hematological parameters remained unchanged. In conclusion, the results of preclinical toxicological investigation indicated that the AT2 well tolerated both acute and subchronic administration. These results demonstrated a wide margin of safety for the therapeutic use of *A. tonkinensis* products and further evidenced the efficacy of the traditional use of this medicinal plant.

Keywords: acute toxicity, *artocarpus tonkinensis*, auronol glucosides, flavonol glycosides, sub-chronic toxicity.

Classification number 1.4

cây ghép da trên chuột thực nghiệm [1]. Nghiên cứu trước đây của chúng tôi cho thấy, thành phần hóa học của vỏ chay Bắc Bộ là các hợp chất triterpenoids, oxyresveratrol, catechin và artotonkin [3]. Trong khi thành phần chủ yếu từ rễ chay thu ở Trung Quốc là các hợp chất isoprenyl flavonoid như artotonins A và B [4]. Kết quả nghiên cứu trước đây cho thấy, cặn chiết ethyl acetat từ lá chay có tác dụng kháng viêm khi thử trên chuột thực nghiệm bị gây viêm khớp bằng collagen [5], trong khi cặn chiết *n*-butanol có hoạt tính ức chế miễn dịch rất tốt khi thử nghiệm bằng phương pháp kích thích chuyển dạng lympho bào (lymphocyte stimulation reaction) [6]. Đi sâu nghiên cứu thành phần hóa học định hướng hoạt tính sinh học, hai chất thuộc nhóm auronol glucosid ít gặp trong tự nhiên là maesopsin 4-*O*- β -D-glucopyranosid (hovetrichosid C, **1**), alphitonin 4-*O*- β -D-glucopyranosid (**2**) và ba hợp chất glucosid khác là kaempferol 3-*O*-glucopyranosid (astragalin, **3**), artonkin-4'-*O*- β -D-glucopyranosid (**4**), benzyl-*O*- β -D glucopyranosid (**5**) và catechin đã được phân lập, xác định cấu trúc [7-8]. Kết quả thử hoạt tính ức chế miễn dịch bằng phương pháp chuyển dạng lympho bào cho thấy, các glycoside được tách ra đều có hoạt tính ức chế miễn dịch rất tốt khi thử nghiệm bằng phương pháp kích thích chuyển dạng lympho bào (lymphocyte stimulation reaction) khi so sánh với cyclosporin A, là thuốc đang được sử dụng rộng rãi để chống thải ghép hoặc điều trị các bệnh tự miễn. Điều thú vị là chất astragalin (**3**) có tác dụng ức chế miễn dịch ở nồng độ cao nhưng lại có hoạt tính tăng cường miễn dịch ở nồng độ thấp, tức là có hoạt tính điều hòa miễn dịch [6, 8]. Ngoài ra chất hovetrichosid C (**1**) còn có tác dụng kìm hãm tăng sinh tế bào ung thư tủy xương cấp (OCI-AML) rất tốt và có tính chọn lọc cao [9]. Kết quả nghiên cứu về hóa học định hướng hoạt tính cho thấy, hầu hết các hợp chất có trong dịch chiết phân cực của lá chay đều có hoạt tính tốt và không gây tác dụng phụ. Điều này đã khích lệ chúng tôi nghiên cứu tạo chế phẩm định hướng ứng dụng điều trị các bệnh tự miễn như viêm khớp dạng thấp, lupus ban đỏ và hỗ trợ điều trị ung thư. Bài báo trình bày kết quả nghiên cứu quy trình điều chế chế phẩm và độc tính cấp, bán trường diễn trên động vật của chế phẩm tạo được.

Phương pháp nghiên cứu và thực nghiệm

Điều chế chế phẩm AT2

Nguyên liệu: mẫu chay thu tại chùa Tam Trinh, Bạch Mai, Hà Nội (10.2013). Tên cây do ThS Nguyễn Thế Anh xác định, tiêu bản (số AT2013-VHH) được lưu giữ tại Viện Hoá học, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam. Mẫu thu về được tách riêng lá và cành, loại bỏ lá vàng úa, phơi khô tự nhiên và sấy lại ở nhiệt độ 55-60°C đạt độ ẩm 10-12%, sau đó xay nhỏ.

Thiết bị, hóa chất: thiết bị chiết được chế tạo bằng thép không gỉ, dung tích 150 l, có khuấy; thiết bị cất dung môi dung tích 150 l. Cồn (EtOH) thực phẩm được dùng làm dung môi chiết. Sắc ký cột: nhựa Diaion HP-20, Sephadex LH-20 cho cột đầu, silicagel 60, 40-63 μm (Merck) cho các cột tiếp theo. Sắc ký lớp mỏng: silicagel 60 F-254 (Merck). Sắc ký lỏng hiệu năng cao gắn khối phổ: thiết bị LC/MS/MS Xevo-TQMS Waters - Mỹ. Cột: UPLC C18 cỡ hạt 1,7 μm , 2,1 x 150 mm; pha động: MeOH-H₂O 0,1% formic acid. Chế độ chạy Gradient theo tỷ lệ MeOH tăng dần từ 10 đến 100% trong thời gian 25 phút. Tốc độ dòng 0,25 ml/phút. Điều kiện phân tích MS: nguồn ion hóa ESI, điện thế nguồn 3,2 kV, nhiệt độ buồng ion hóa 180°C, áp suất khí Nitơ 500 l/h, khí trơ cho MS2 là Argon 8 psi. Mode đo Positive ions, fullscan toàn dải khối từ m/z 100 đến m/z 1300, tốc độ quét phổ 5000 amu/s. Các loại phổ được đo tại Viện Hoá học, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam.

Quy trình tạo chế phẩm: 30 kg lá chay đã xay nhỏ được nạp vào thiết bị chiết có gia nhiệt, dung tích 150 l, có khuấy. Cho 120 l dung môi cồn 70% và khuấy trong 6 giờ ở nhiệt độ 50-60°C x 3 lần; lọc và gộp dịch chiết, cất loại dung môi ethanol dưới áp suất giảm, thu được cao ethanol dạng sền sệt. Cao này được sấy trong tủ sấy chân không ở 50-60°C thu được cao khô, ký hiệu AT 2 (4,52 kg, hiệu suất 15,1%, so với mẫu lá khô). Cao chiết AT2 dạng bột, có màu vàng sẫm, tan tốt trong EtOH và nước.

Phân lập hoạt chất từ chế phẩm AT2: hòa tan cặn AT2 (100 g) trong nước cho đến khi tan hoàn toàn (tỷ lệ 100 g cặn/300 ml H₂O), chiết phân lớp với *n*-hexan (x 4 lần); phần không tan trong *n*-hexan được đưa lên cột trao đổi ion với nhựa Diaion HP-20. Rửa cột bằng nước khử ion thu được phân đoạn 1 (pđ A1), hỗn hợp nước khử ion/MeOH (tỷ lệ 1:1, v/v) thu được phân đoạn 2 và 3 (A2, A3), với MeOH thu được phân đoạn 4 (A4). Sau khi kiểm tra qua sắc ký lớp mỏng silicagel, hệ dung môi EtOAc-MeOH-H₂O (65:5:3,

v/v/v) phân đoạn chứa phần lớn flavonol glycosid (pđ A3) được hòa tan trong lượng vừa đủ MeOH và đưa lên cột Sephadex LH-20, dung môi MeOH thu được 4 phân đoạn (A3.1-A3.4). Phân đoạn chính A3.3 chứa nhiều chất chính, được kiểm tra bằng sắc ký lớp mỏng silicagel với hệ dung môi EtOAc-MeOH-H₂O (65:5:3, v/v/v) được hòa tan trong EtOAc-MeOH (1:1, v/v) lượng vừa đủ và đưa lên cột silicagel, giải hấp bằng hệ dung môi EtOAc-MeOH-H₂O (65:5:2, v/v/v) thu được 5 phân đoạn (A3.3.1-A3.3.5). Phân đoạn A3.3.3 chứa hai chất chính là phân đoạn giàu flavonol glycoside được xác định bằng sắc ký lỏng hiệu năng cao (HPLC). Làm sạch lại các phân đoạn bằng sắc ký cột với chất mang và dung môi thích hợp, thu được các chất sạch có số thứ tự 1-8. Các chất này được dùng để thử hoạt tính (*in vitro*, *in vivo*) và làm chất đối chứng để xác định hàm lượng một số chất chính chứa trong chế phẩm AT2.

Đánh giá tính an toàn của chế phẩm AT2 trên động vật thực nghiệm

Độc tính cấp:

Động vật: chuột nhắt trắng chủng *Swiss* (đực và cái), cả 2 giống khỏe mạnh, trọng lượng $20,0 \pm 2,0$ g, do Viện Vệ sinh dịch tễ trung ương cung cấp.

Thực nghiệm: hòa tan mẫu AT2 bằng nước cất thành các nồng độ khác nhau, cho chuột uống với thể tích đồng nhất, mỗi lần 0,25 ml/10 g trọng lượng chuột. Lượng AT2 uống trong ngày được chia làm 2 lần, uống cách nhau 2 giờ.

Chuột nhắt trắng được chia ngẫu nhiên thành từng lô (10 con/lô). Cho uống thuốc thử với liều tăng dần từ liều cao nhất không gây chết chuột đến liều thấp nhất gây chết 100% chuột. Chuột được nhịn ăn 12 giờ trước khi uống thuốc, vẫn uống nước đầy đủ. Theo dõi số chuột chết trong 72 giờ đầu và tình trạng chung của chuột trong suốt 7 ngày sau uống thuốc thử (ăn uống, hoạt động, bài tiết...). Những chuột chết trong 2 giờ đầu được mổ để quan sát đại thể các cơ quan. Xác định LD₅₀ theo tỷ lệ chuột chết trong 72 giờ đầu sau uống mẫu thử theo phương pháp Litchfield - Wilcoxon [10, 11]

Độc tính bán trường diễn:

Độc tính bán trường diễn được đánh giá trên thỏ theo đường uống [11].

Động vật: thỏ chủng *Newzealand White* (đực và cái), lông trắng, cả 2 giống khoẻ mạnh, trọng lượng 1,8-2,2 kg (Trung tâm Nghiên cứu dê và thỏ Sơn Tây cung cấp). Động vật được nuôi trong phòng thí nghiệm từ 3 ngày trước và trong suốt thời gian nghiên cứu bằng thức ăn chuẩn dành cho động vật thí nghiệm (do Viện Vệ sinh dịch tễ trung ương và Công ty liên doanh Guyomarc'h - VCN sản xuất), uống nước tự do.

Thỏ được chia làm 3 lô (10 con/lô), mỗi con nhốt riêng một chuồng:

- Lô chứng: uống nước lọc 3 ml/kg/ngày.

- Lô trị 1: uống AT2 liều 0,6 g/kg/ngày (liều có tác dụng tương đương liều dùng trên người, tính theo hệ số 3).

- Lô trị 2: uống AT2 1,8 g/kg/ngày (gấp 3 lần lô trị 1).

Thỏ được uống nước hoặc mẫu thử với thể tích đồng nhất 3 ml/kg/ngày trong 8 tuần liền, mỗi ngày một lần vào buổi sáng.

Các chỉ tiêu theo dõi trước và trong quá trình nghiên cứu:

- Tình trạng chung, trọng lượng của thỏ.

- Đánh giá chức năng tạo máu thông qua số lượng hồng cầu, hàm lượng hemoglobin, hematocrit, thể tích trung bình hồng cầu, số lượng bạch cầu, công thức bạch cầu và số lượng tiểu cầu.

- Đánh giá chức năng gan thông qua định lượng một số enzym và chất chuyển hoá trong máu: ALT, AST, bilirubin toàn phần, albumin và cholesterol toàn phần.

- Đánh giá chức năng thận thông qua định lượng creatinin huyết thanh.

Các thông số theo dõi được kiểm tra vào trước lúc uống mẫu thử, sau 4 và 8 tuần uống mẫu thử.

- Mô bệnh học: sau 8 tuần uống mẫu thử, thỏ được mổ để quan sát đại thể toàn bộ các cơ quan. Kiểm tra ngẫu nhiên cấu trúc vi thể gan, thận của 30% số thỏ ở mỗi lô.

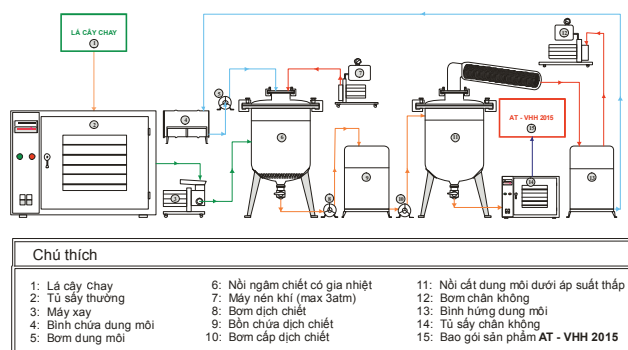
Các số liệu nghiên cứu được xử lý thống kê theo phương pháp t-test Student và test “trước - sau”. Số liệu được biểu diễn dưới dạng: $\bar{X} \pm SD$. Sự khác biệt có ý nghĩa khi $p < 0,05$. Độc tính cấp và bán trường diễn

được thực hiện tại Bộ môn Dược lý, Trường Đại học Y Hà Nội.

Kết quả và thảo luận

Xây dựng quy trình chiết tạo chế phẩm từ lá chay Bắc Bộ (*A. tonkinensis*)

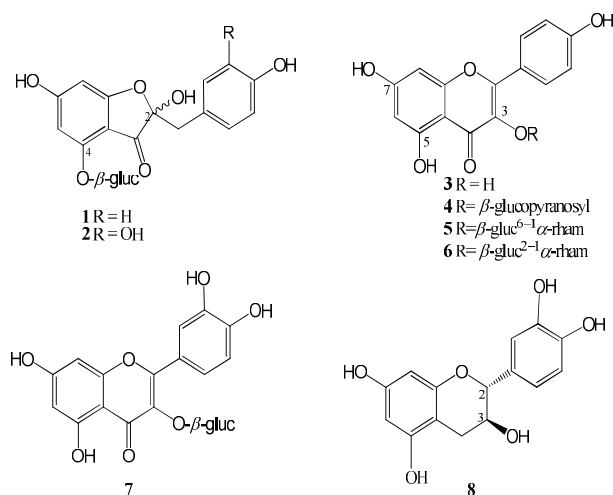
Dân gian Việt Nam thường dùng nước sắc lá chay để điều trị viêm khớp dạng thấp. Kết quả nghiên cứu trước đây đã chỉ ra rằng, các hợp chất có hoạt tính tốt đều thuộc nhóm chất flavonoid glycoside, tan tốt trong dung môi phân cực như EtOH, nước [6-8]. Để tìm dung môi chiết một cách hiệu quả các chất này từ lá chay (*A. tonkinensis*), hỗn hợp dung môi methanol và ethanol (MeOH, EtOH) và nước ở ba nồng độ khác nhau (90, 70 và 50%, v/v) đã được thử nghiệm quy mô phòng thí nghiệm. Kết quả cho thấy, hỗn hợp MeOH-H₂O và EtOH-H₂O (70:30, v/v) cho hiệu suất chiết cao và ít chất màu chlorophin. Nhưng ethanol an toàn hơn methanol, nên ethanol 70% được chọn để thử nghiệm ở quy mô pilot. Khảo sát chiết bằng hỗn hợp EtOH 70% ở ba nhiệt độ khác nhau (25-35°C, 50-60°C và 80-90°C) cho thấy, lượng cặn thô tăng khi gia nhiệt, nhưng tăng không đáng kể ở nhiệt độ 80-90°C. Để tiết kiệm năng lượng và tránh phân hủy hoạt chất, chúng tôi đã chọn được thông số cho quá trình chiết là: EtOH 70%, tỷ lệ mẫu/dung môi (lần 1: 1/5, lần 2 và 3: 1/4), nhiệt độ 50-60°C, thời gian cho mỗi lần chiết khoảng 6 h (hình 1). Quy trình thử nghiệm được lặp lại 3 mẻ, mỗi mẻ chiết 3 lần, loại dung môi dưới áp suất giảm, sấy khô thu được 4,52 kg/mẻ, hiệu suất trung bình là 15,1% (so với nguyên liệu lá khô).



Hình 1: sơ đồ điều chế chế phẩm AT2 từ lá chay Bắc Bộ (*A. tonkinensis*)

Bằng phương pháp sắc ký cột lặp lại trên chất mang và dung môi rửa giải thích hợp đã phân lập được 8 chất sạch từ cặn AT2. Bằng các phương pháp phổ kết

hợp như phổ cộng hưởng từ hạt nhân (NMR), phổ khối (MS) và so sánh với số liệu đã công bố đã xác định được cấu trúc của các chất là: maesopsin 4-O- β -D-glucoside (hovetrichoside C) (1), alphonin-O- β -D-glucoside (2), kaempferol (3), astragalin (kaempferol 3-O- β -D-glucopyranoside) (4), kaempferol 3-rutinosid (5), kaempferol 3-neohesperidoside (6), quercetin 3-O- β -D-glucopyranoside (7), catechin (8) (hình 2) [6, 8].



1: maesopsin 4-O- β -D-glucopyranoside (hovetrichoside C); 2: alphonin-O- β -D-glucopyranoside; 3: kaempferol; 4: astragalin; 5: kaempferol 3-rutinoside; 6: kaempferol 3-neohesperidoside; 7: quercetin 3-O- β -D-glucopyranoside; 8: catechin

Hình 2: cấu trúc một số chất chính được xác định từ lá chay Bắc Bộ

Việc phân tích phổ để xác định cấu trúc của các chất 5, 6, 7, quercetin 3-rutinosid và afzelechin-(4 α →8)-catechin-3-O- β -D-glucopyranoside sẽ được công bố trong một bài báo khác [12]. Các chất này được dùng làm chất đối chứng trong phân tích thành phần hóa học chế phẩm AT2 bằng phương pháp sắc ký lỏng hiệu năng cao gắn khối phổ (HPLC-ESI-MS). So sánh thời gian lưu, khối lượng phân tử với chất đối chứng, đã xác định được thành phần hóa học chính của chế phẩm AT2 (bảng 1). Theo kết quả nghiên cứu trước đây của chúng tôi và tra cứu tài liệu, hầu hết các hợp chất phenol glycoside trên đều có hoạt tính sinh học tốt. Theo đó, chất chính hovetrichoside C, astragalin có hoạt tính kháng ung thư, kháng viêm và ức chế miễn dịch tốt [6, 9, 13]. Vì vậy, cần chiết EtOH 70% (AT2) được đánh giá độ an toàn và tác dụng kháng viêm *in vivo* mà không cần phải tách riêng từng chất sạch [14].

Bảng 1: các chất chính trong chế phẩm AT2 được xác định bằng phổ khối HPLC/ESI-MS

Chất số	Tên chất	Peak ion phân tử (m/z)*	Công thức phân tử	Tài liệu tham khảo
1	hovetrichoside C	473 [M+Na] ⁺	C ₂₁ H ₂₂ O ₁₁	[6]
2	alphonin-O- β -D-glucopyranoside	489 [M + Na] ⁺	C ₂₁ H ₂₂ O ₁₂	[6]
3	kaempferol	287 [M+H] ⁺	C ₁₅ H ₁₀ O ₆	[12, 14]
4	astragalin	449 [M+H] ⁺	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₁	[6]
5	kaempferol 3-rutinoside	617 [M+Na] ⁺	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₅	[14, 15]
6	kaempferol 3-neohesperidoside	617 [M+Na] ⁺	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₅	[15]
7	quercetin 3-O- β -D-glucopyranoside	465 [M+H] ⁺	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₂	[14]
8	catechin	291 [M+H] ⁺	C ₁₅ H ₁₄ O ₆	[8]

* Peak tại m/z so sánh với chất đối chứng tách được và số liệu đã công bố [14]

Đánh giá độ an toàn của chế phẩm AT2

Độ an toàn của chế phẩm AT2 được đánh giá qua kết quả thử độc tính cấp trên chuột và độc tính bán trường diễn trên thỏ. Độc tính cấp và giá trị LD₅₀ trên chuột nhất trắng bằng đường uống được xác định theo phương pháp của Litfield-Wilcoxon [10], Cristiani Bürger và cộng sự [11]. Theo đó, 6 lô chuột nhất trắng được uống chế phẩm AT2 với liều tăng dần từ 21,4 g/kg đến liều cao nhất (42,9 g/kg). Sau khi uống lần đầu, không quan sát thấy biểu hiện bất thường nào của chuột ở tất cả các lô. Sau khi uống mẫu thử lần thứ hai, chuột có biểu hiện mệt, nằm yên hoặc ít hoạt động, ăn uống ít. Chuột uống AT2 liều càng cao, biểu hiện triệu chứng càng rõ. Ngày hôm sau tất cả chuột đều trở lại bình thường, không có chuột nào chết trong vòng 72 giờ sau khi uống mẫu thử. Tiếp tục theo dõi trong 7 ngày sau uống mẫu thử, thấy chuột vẫn khỏe mạnh, ăn uống, hoạt động, bài tiết bình thường và không có biểu hiện gì đặc biệt. Vì vậy, chưa xác định được độc tính cấp trên chuột nhất trắng, chưa tính được LD₅₀ và chế phẩm AT2 được cho là không gây độc cấp.

Về độc tính bán trường diễn cho thấy, với 2 liều thử nghiệm là uống AT2 liều 0,6 g/kg/ngày (liều có tác dụng tương đương liều dùng trên người, tính theo hệ số 3) và liều 1,8 g/kg/ngày (liều cao gấp 3 lần liều điều trị) trong suốt thời gian thí nghiệm, tình trạng chung của 3 lô thỏ đều hoạt động bình thường, nhanh nhẹn, mắt sáng, lông mượt, ăn uống tốt, phân khô và không nhận thấy biểu hiện gì đặc biệt trong suốt thời gian thử nghiệm. Sau 4 và 8 tuần uống AT2, trọng lượng thỏ, các chức năng tạo máu (số lượng hồng cầu, hàm lượng huyết sắc tố, hematocrit, thể tích trung bình hồng cầu,

số lượng bạch cầu, công thức bạch cầu và số lượng tiểu cầu), chức năng gan (nồng độ albumin, cholesterol và bilirubin toàn phần), chức năng thận (hàm lượng creatinin trong máu thỏ) không có sự thay đổi khác biệt so với lô chứng và so với trước khi uống AT2. Quan sát các cơ quan tim, phổi, gan, lách, tụy, thận và hệ thống tiêu hoá của tất cả các thỏ thực nghiệm, sau 8 tuần uống mẫu thử AT2 đều không thấy có thay đổi bệnh lý nào, không gây tổn thương rõ rệt về mặt hình thái khi quan sát đại thể và cấu trúc vi thể gan và thận của thỏ.

Kết luận

Nghiên cứu đã xây dựng được quy trình chiết lá chay an toàn, khả thi ở lượng lớn, hiệu suất chiết đạt 15,1% so với khối lượng lá khô. Cao chiết chứa các hợp chất flavonoid glycoside có nhiều hoạt tính tốt. Cao chiết AT2 với liều thử cao nhất là 42,9 g/kg, nhưng chưa xác định được độc tính cấp. Các nghiên cứu về độc tính, bán trường diễn ở mức liều 0,6 g/kg và 1,8 g/kg chế phẩm AT2 được coi là an toàn. Cao chiết lá chay rất có tiềm năng làm nguyên liệu để bào chế thực phẩm chức năng và thuốc, nhằm hỗ trợ điều trị một số bệnh liên quan đến miễn dịch.

Lời cảm ơn

Nhóm nghiên cứu xin chân thành cảm ơn Bộ Khoa học và Công nghệ và Bộ Ngoại giao Italia (Italian Ministero degli Esteri and AIRC) đã hỗ trợ thông qua nhiệm vụ hợp tác quốc tế Việt Nam - Italia (MS. 1/39/2013/NDT); cảm ơn Bộ môn Dược lý, Trường Đại học Y Hà Nội trong quá trình thử độc tính.

Tài liệu tham khảo

- [1] Lam P.C, Phi P.T.P, Ha N.T.V, Anh P.T, Chinh T.T (1994), "Anapathological changes in spleen, thymus and bone-marrow of mice treated by products of traditional medicine plant (DY1)", *Revue Pharmaceutique*, **2**, pp.51-55.
- [2] Đỗ Tất Lợi (1991), *Những cây thuốc và vị thuốc Việt Nam*, Nxb Khoa học và Kỹ thuật, tr.597.
- [3] Lien T.P, Ripperger H, Porzel A, Sung T.V, Adam G (1998),

"Constituents of *Artocarpus tonkinensis*", *Die Pharmazie*, **53**, p.353.

[4] Ma J.P, Qiao X, Pan S, Shen H, Zhu G.F, Hou A.J (2010), "New isoprenylated flavonoids and cytotoxic constituents from *Artocarpus tonkinensis*", *J. A. Nat. Pro. Res.*, **12**, pp.586-592.

[5] Ngoc D.T.N, Catrina A.I, Lundberg K, Harris H.E, Ha N.T, Anh P.T, Larsson P (2005), "Inhibition by *Artocarpus tonkinensis* of the development of collagen-induced arthritis in rats", *Scandinavian Journal of Immunology*, **61**, pp.234-241.

[6] Thuy T.T, Amperdick C.K, Ninh P.T, Lien T.P, Thao T.T.P, Sung T.V (2004), "Immunosuppressive auronol glycosides from *Artocarpus tonkinensis*", *Die Pharmazie*, **59**, pp.297-300.

[7] Dang D.T.N, Eriste E, Liepinsh E, Thuy T.T, Erlandsson-Harris H., Sillard R., Larsson P (2009), "A novel anti-inflammatory compounds, artonkin-4'-O-glucoside, from the leaves of *Artocarpus tonkinensis* suppresses experimentally induced arthritis", *Scandinavian Journal of Immunology*, **69**(2), pp.110-118.

[8] Dung L.K., Thuy T.T, Sung T.V, Ninh P.T (2004), "Phenol glycosides from Vietnamese *Artocarpus tonkinensis*", *Journal of Materia Medica-Hanoi*, **9**(1), pp.2-6.

[9] Pozzesi N, Pierangeli S, Vacca C, Falchi L, Pettorossi V, Martelli M.P, Thuy T.T, Ninh P.T, Liberati A.M, Riccardi C, Sung T.V, Delfino D.V (2011), "Maesopsin 4-O-β-D-glucoside, a natural compound isolated from the leaves of *Artocarpus tonkinensis*, inhibits the growth of acute myeloid leukemia cells: a gene expression profile study", *Journal of Chemotherapy*, **23**(3), pp.150-157.

[10] Litfield, Wilcoxon (1949), "A simplified method of evaluating dose effect experiments", *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, **96**(2), pp.99-113.

[11] Cristiani Bürger, Doris Raquel Fischer, Dórys Angela Cordenunzzi, Anna Paula de Borja Batschauer, Valdir Cechinel Filho, Adair Roberto dos Santos Soares (2005), "Acute and subacute toxicity of the hydroalcoholic extract from *Wedelia paludosa* (Acmela brasiliensis) in mice", *J Pharm Pharmaceut Sci*, **8**(2), pp.370-373.

[12] Thuy T.T, Thien D.D, Dung L.T.K, Sung T.V, Delfino D (2015), *Flavonol and proanthocyanidin glycosides from the leaves of Artocarpus tonkinensis*, Quimica Nova.

[13] Fengyang Li, Dejie Liang, Zhengtao Yang, Tiancheng Wang, Wei Wang, Xiaojing Song, Mengyao Guo, Ershun Zhou, Depeng Li, Yongguo Cao, Naisheng Zhang (2013), "Astragalin suppresses inflammatory responses via down-regulation of NF-κB signaling pathway in lipopolysaccharide-induced mastitis in a murine model", *International Immunopharmacology*, **17**(2), pp.478-482.

[14] Sen Lin, Qinqin Zhu, Lingrong Wen, Bao Yang, Guoxiang Jiang, Haiyan Gao, Feng Chen, Yueming Jiang (2014), "Production of quercetin, kaempferol and their glycosidic derivatives from the aqueous-organic extracted residue of litchi pericarp with *Aspergillus awamori*", *Food Chemistry*, **145**, pp.220-227.

[15] Kohei Kazuma, Naonobu Noda, Masahiko Suzuki (2003), "Malonylated flavonol glycosides from the petals of *Clitoria ternatea*", *Phytochemistry*, **62**(2), pp.229-237.