

## ĐÁNH GIÁ ĐỘC TÍNH CẤP TÍNH VÀ BÁN MÃN TÍNH CỦA CHIẾT XUẤT ETANOL HÀNH ĐEN (*Allium ascalonicum* L.) TRÊN CHUỘT SWISS ALBINO

TRẦN THỊ PHƯƠNG NHUNG

Viện Công nghệ sinh học và thực phẩm, Trường Đại học Công nghiệp thành phố Hồ Chí Minh  
tranthiphuongnhung@iuh.edu.vn

**Tóm tắt.** Hành đen, sản phẩm mới chế biến từ hành tím (*Allium ascalonicum* L.), có nhiều đặc tính dược lý và sinh học. Trong hành đen chứa terpenoid, saponin, tannins và các hợp chất phenolic thể hiện tính kháng sinh và khả năng chống lại tế bào ung thư. Trong nghiên cứu này, độc tính của chiết xuất ethanol hành đen (EtAA) đã được khảo sát. Trong thử nghiệm độc tính cấp tính, những con chuột được sử dụng EtAA (1000, 3000, 5000 và 7000 mg/kg) liên tục trong 7 ngày và theo dõi đến ngày thứ 14. Thử nghiệm độc tính mãn tính, chuột liên tục được sử dụng EtAA (100, 200, 300 và 400 mg/kg) trong 12 tuần. Trong khi đó động vật đối chứng được cho uống nước cất. Trọng lượng cơ thể, lượng thức ăn và nước tiêu thụ của con vật được theo dõi hàng ngày. Ngoài ra, các thông số sinh hóa máu, huyết học, trọng lượng cơ thể và mô bệnh học nội tạng của chúng đều được đo tại các thời điểm quan sát cụ thể. Kết quả của thử nghiệm độc tính cấp tính và bán mãn tính không ghi nhận bất cứ trường hợp tử vong nào. EtAA không gây ra bất thường đáng kể về các thông số sinh lý hoặc thay đổi bệnh lý ở các cơ quan của chuột. EtAA an toàn ở các liều lượng đã nghiên cứu và không gây độc cấp tính hoặc mãn tính trên các mô hình động vật.

**Từ khóa:** EtAA, *Allium ascalonicum* L., hành đen, độc tính cấp, độc tính bán mãn tính

### EVALUATION OF ACUTE AND SUB-CHRONIC TOXICITY OF THE ETHANOL EXTRACT OF BLACK SHALLOT (*Allium ascalonicum* L.) IN SWISS ALBINO MOUSE

**Abstract.** Black shallot, the new processing product from shallot (*Allium ascalonicum* L.), possesses many pharmacological and biological properties. Black shallot contains terpenoids, saponins, tannins and phenolic compounds that exhibit antibiotic properties and resistance to cancer cells. In this study, the toxicity profile of ethanolic extract of black shallot (EtAA) was investigated. In acute toxicity tests, mice were administered with EtAA (1000, 3000, 5000 and 7000 mg/kg), for 14 days. In the sub-chronic toxicity test, for 12 weeks, the experimental animals were given EtAA (100, 200, 300 and 400 mg/kg). On the other hand, control animals were fed distilled water. The animals' body weight, food and water consumptions were monitored weekly. In addition, their biochemical and hematological parameters, histopathology, and body and organ weights were all measured at specific observation time points. According to the results of the acute toxicity and sub-chronic test, no mortality was found, EtAA did not cause significant abnormalities in the physiological parameters or pathological changes in the major organs of the rats. These results indicate that EtAA is safe at the studied dosage levels and causes no acute or chronic toxicity in animal models.

**Keywords:** EtAA, *Allium ascalonicum* L., black shallot, acute toxicity, sub-chronic toxicity

#### 1. GIỚI THIỆU

Y học cổ truyền có lịch sử lâu dài trong việc cải thiện sức khỏe con người. Dược liệu thiên nhiên đa dạng và phong phú là nguồn tài nguyên quý giá để khám phá thêm các loại thuốc mới. Trong những năm gần đây, đã có rất nhiều công trình nghiên cứu chứng minh được tính hiệu quả của việc chữa bệnh bằng thảo dược. Chính vì vậy, một lượng lớn công chúng quan niệm rằng các sản phẩm y học cổ truyền là an toàn vì chúng được bào chế từ các nguồn vật liệu tự nhiên [1] và do lịch sử lâu dài của chúng trong điều trị bệnh [2]. Tuy nhiên, thực tế cho thấy nhiều loại cây dùng trong y học cổ truyền trong thành phần có chứa các chất có khả năng gây độc, gây đột biến và ung thư [2,3,4,5] như axit aristolochic trong cây thuộc họ Aristolochia có khả năng gây ung thư, suy thận, bệnh đường tiết niệu ở người [6]. Một số loại thuốc truyền thống có chứa các thành phần độc hại như axit aristolochic, pyrrolizidine alkaloids, benzophenanthrine alkaloids, lectin, viscotoxin, glycoside cyanogenic, furanocoumarins có khả năng gây chết người [7]. Những tác dụng phụ như vậy đã làm dấy lên lo ngại về tính an toàn của thảo dược. Vì vậy, các loại thảo

được trước khi được sử dụng trong điều trị bệnh cần được khảo sát nghiêm ngặt về độc tính. WHO đã kêu gọi khẩn trương thiết lập các tiêu chuẩn để đánh giá tính an toàn của thảo dược trước khi sử dụng [8]. Đánh giá dược lý và độc tính là điều cần thiết cho sự phát triển hoặc tiêu chuẩn hóa một loại thảo dược nào đó [9,10]. Vì sự an toàn, thảo dược cần được thử nghiệm độc tính *in vitro*, sau đó sử dụng các mô hình động vật để kiểm tra lâm sàng. Hành tím (*Allium ascalonicum* L.) là loại gia vị nổi tiếng và là nguồn cung cấp cacbonhydrat, vitamin A, B, C, kaempferon, catechin và tannin. Sự hiện diện của các hợp chất hoạt tính sinh học trong hành tím giải thích về những lợi ích sức khỏe như chống ung thư, chống béo phì, chống vi khuẩn, chống viêm, chống oxy hóa, bảo vệ gan, thận [11]. Gần đây, hành đen, sản phẩm chế biến mới của hành tím, đã được phát triển thông qua quá trình lên men trong buồng điều chỉnh nhiệt độ và độ ẩm. Moreno-Rojas và cộng sự (2018) đã tìm thấy flavonoid, organosulfur, amino acids và các hợp chất khác trong các thành phần hóa thực vật của hành đen [12]. Một số hoạt tính sinh học của hành đen như đặc tính chống oxy hóa, chống ung thư và chống viêm đã được báo cáo trong các nghiên cứu trước đây [13]. Mặc dù một số tác giả đã báo cáo về tác dụng dược lý của hành đen, tuy nhiên độ an toàn *in vivo* của chúng vẫn chưa được xác định. Do đó, mục đích chính của bài báo này là nghiên cứu độc tính cấp tính và bán mãn tính của EtAA trên chuột Swiss albino để khảo nghiệm tính an toàn của chiết xuất hành đen. Từ đó có thể sử dụng chiết xuất này tiếp tục nghiên cứu ứng dụng trong điều trị các bệnh như viêm khớp dạng thấp, viêm gan, viêm dạ dày....

## 2. NGUYÊN LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

### 2.1. Nguyên liệu thực vật

Hành tím (*Allium ascalonicum* L.) được thu hái tại thị xã Vĩnh Châu, tỉnh Sóc Trăng vào tháng 3 năm 2019 và mẫu chúng được lưu giữ tại Viện Công nghệ Sinh học và Công nghệ Thực phẩm, Trường Đại học Công nghiệp Thành phố Hồ Chí Minh, Việt Nam. Hành tím được rửa sạch bằng nước máy và bóc vỏ, sau đó được ủ trong buồng kín (75°C, độ ẩm tương đối 90%) trong 20 ngày [14]. Chiết xuất hành đen (EtAA) được sản xuất theo Tran và cộng sự (2020) [13]. Hành đen được cắt lát và ngâm với 5 thể tích dung dịch ethanol 98% trong 7 ngày, lặp lại hai lần. Dịch chiết xuất được lọc bằng giấy Whatman. Dịch lọc cuối cùng được ngưng tụ bởi máy cô quay chân không (IKA- Đức) ở áp suất giảm (130 mmBar), 60°C. Dư lượng ethanol trong chiết xuất được loại bỏ thông qua thăng hoa sấy khô (Hình 1). Sau đó chiết xuất hành đen (EtAA) được bảo quản ở 4°C cho đến khi sử dụng tiếp [13].



Hình 1. Hành đen, các sản phẩm chế biến từ hành tím, màu nâu sẫm, vị ngọt.

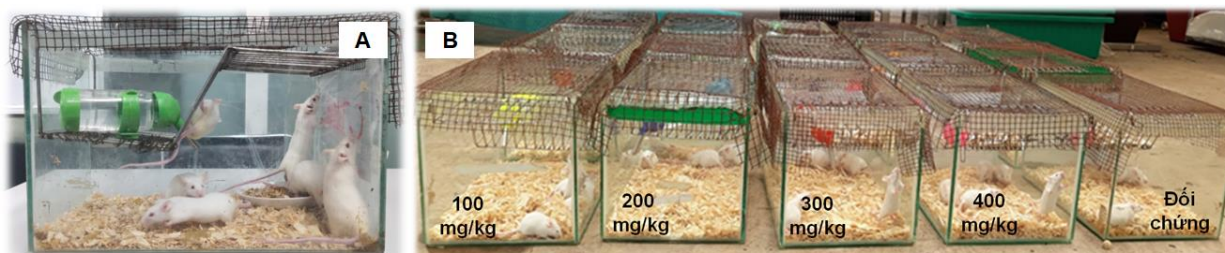
### 2.2. Phân tích hóa học:

Sàng lọc hợp chất có hoạt tính sinh học trong EtAA theo các kỹ thuật chung bao gồm terpenoid (xét nghiệm Salkowski), saponin (thử nghiệm froth), alkaloid (thử nghiệm của Dragendor và Mayer) [15], tannin (phân tích Makkar 1993 và Porter 1986), steroid (xét nghiệm Sofowora), flavonoid (xét nghiệm Evans 2002) [16,17]. Carbohydrates (thử nghiệm Molishs và Bial's). Proteins (thử nghiệm Biuret). Phenolics (thử nghiệm EtSI + lead acetate + water, Potassium dichromate). Terpenoids (thử nghiệm EtSI + Cloroform + H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> đậm đặc) [18]. Flavones, Xanthones (thử nghiệm Fortaleza: Edições EUF) [19].

### 2.3. Động vật thí nghiệm:

Chuột nhắt trắng Swiss albino (18-20 g) được Viện Pasteur Tp. HCM cung cấp. Lồng nuôi chuột được làm bằng kính, kích thước 15cm x 30cm. Máng treo bằng inox móc vào thành lồng để đựng thức ăn và nước uống. Các lồng được đặt trong nhà nuôi tiêu chuẩn với chu kỳ sáng/tối là 12h/12h, nhiệt độ (24 ± 1°C) trong suốt thời gian thử nghiệm. Nước uống sạch được chứa trong bình có vòi uống, sử dụng thức ăn viên nhân tạo dành cho động vật gặm nhấm. Quy trình thử nghiệm được tiến hành theo hướng dẫn chung của NIH về Chăm sóc và Sử dụng Động vật tại Phòng thí nghiệm [20]. 60 chuột đực được sử dụng cho thử nghiệm độc

tính cấp tính và bán mãn tính (6 chuột/nhóm). Chuột thí nghiệm được nuôi trong 2 tuần để thích ứng với điều kiện sống trước khi bắt đầu các quy trình thí nghiệm. Quy trình thử nghiệm tuân thủ nghiêm ngặt theo Tuyên bố Helsinki (1975) [21].



Hình 2. Hệ thống nuôi chuột thí nghiệm (A. Lòng nuôi chuột thí nghiệm; B. Mô hình thử độc tính bán mãn tính)

#### 2.4. Nghiên cứu độc tính:

Nghiên cứu này được thiết kế dựa trên các khuyến nghị của Tổ chức Y tế Thế giới (WHO). Chúng tôi đã thực hiện theo hướng dẫn đánh giá độc tính của thảo dược được trình bày trong “Hướng dẫn chung về phương pháp nghiên cứu và đánh giá y học cổ truyền” và hướng dẫn của Tổ chức Hợp tác và Phát triển Kinh tế (OECD) về nghiên cứu và xử lý động vật [22]. Các khuyến nghị đã được tuân theo về số lượng và giới tính của động vật được sử dụng [23]. Tất cả các thí nghiệm đều được lặp lại 3 lần.

**Thử độc tính cấp tính:** Nghiên cứu độc tính cấp tính của EtAA được thực hiện bằng phương pháp thử nghiệm 'Lên và Xuống' trên chuột Swiss albino theo hướng dẫn của Tổ chức Phát triển Kinh tế (OECD). 425 [24]. 30 con chuột đã được sử dụng để thử nghiệm độc tính cấp tính. Trước khi nghiên cứu độc tính cấp tính, những con chuột được cân và nhịn ăn qua đêm. Chuột được phân chia vào 2 nhóm thử nghiệm: Nhóm chứng được uống nước bình thường. Các nhóm uống EtAA chuột được uống EtAA nồng độ 1000, 3000, 5000, 7000 mg nguyên liệu khô/kg thể trọng [25]. Chất chiết xuất sử dụng bằng đường miệng với một liều duy nhất/ngày. Da, lông, mắt, vận động cơ xương, dấu hiệu tuần hoàn, hệ thống thần kinh, nhịp hô hấp và hành vi có ý thức của động vật được quan sát hàng ngày. Trọng lượng cơ thể cũng được đo mỗi tuần một lần. Các động vật thử nghiệm được uống EtAA trong 7 ngày liên tục và quan sát đến ngày thứ 14. Trước khi phẫu thuật động vật thí nghiệm được gây chết vì hít khí CO<sub>2</sub> [26].

**Thử độc tính bán mãn tính:** Tổng cộng 30 con chuột được cho uống EtAA mỗi ngày một lần với liều lượng 100, 200, 300, 400 mg nguyên liệu khô/kg thể trọng [25] trong 12 tuần, sau đó là thời gian phục hồi là 4 tuần. Chuột nhóm chứng được uống nước hàng ngày. Chiết xuất được sử dụng bằng đường miệng. Những con chuột được quan sát hàng ngày về các hành vi bất thường và các dấu hiệu bất lợi khác của độc tính. Mức tiêu thụ thức ăn và nước uống cũng như trọng lượng cơ thể được ghi lại hàng tuần. Tất cả các con vật đều được cho chết vì hít khí CO<sub>2</sub> vào cuối quá trình thử nghiệm. Mẫu máu được lấy cho các xét nghiệm sinh hóa. Gan, thận, tim đã được thu thập, cân và bảo quản trong formandehyt 10% [26].



Hình 3. A. Chuột bị chết vì hít khí CO<sub>2</sub>; B. Phẫu thuật chuột để thu nhận tim, gan, thận

#### 2.5. Kiểm tra thể chất:

Tác dụng độc cấp tính và bán mãn tính của chiết xuất ethanol được xác định bằng cách sử dụng phác đồ theo hướng dẫn 423 của OECD [23]. Chuột được quan sát trong suốt 14 ngày nghiên cứu độc tính cấp tính và 12 tuần nghiên cứu độc tính bán mãn tính. Sự thay đổi các dấu hiệu được so sánh với tình trạng cơ bản: Trong hệ thần kinh trung ương (CNS): hoạt động vận động, mất điều hòa, phản xạ nghiêng, phản xạ giác mạc, liệt bàn chân, hoạt động cầm nắm, phản ứng báo động, run, giật đầu và co giật. Ở mắt: nhãn khoa,

ngoại nhân, giãn đồng tử, rung giật nhãn cầu, chảy nước mắt, giãn màng mi và đục giác mạc. Về da: xanh xao, tím tái và sung huyết. Các dấu hiệu chung: tiết nước bọt, cương cứng ở đuôi, tiêu chảy, mất nước (thử nghiệm Robichaud), khó thở, chảy nước mũi, thụ động, hung hăng, sợ hãi [23].

### 2.6. Trọng lượng cơ thể:

Trọng lượng cơ thể của chuột được theo dõi cẩn thận trước khi bắt đầu nghiên cứu. Trọng lượng cơ thể được đo bằng cân điện tử (FEJ-3000B, dung tích 3000 g, Trung Quốc), mỗi tuần một lần trong quá trình nghiên cứu [27]. Phần trăm thay đổi trọng lượng cơ thể được tính theo công thức:  $[W(\%) = \text{Trọng lượng cơ thể vào cuối mỗi tuần} - \text{trọng lượng cơ thể ban đầu} / \text{Trọng lượng cơ thể ban đầu}] \times 100$  [28].

### 2.7. Thức ăn, nước uống tiêu thụ:

Lượng thức ăn và nước uống được ghi lại hàng ngày. Lượng thức ăn và nước tiêu thụ được đo lường trước khi cung cấp cho mỗi nhóm, phần còn lại được thu nhận và tính toán vào ngày hôm sau để có được sự khác biệt. Thức ăn hàng ngày tính theo đơn vị g/chuột/ngày và lượng nước tiêu thụ (ml/chuột /ngày) [29].

### 2.8. Phân tích huyết học và sinh hóa máu:

Các thông số huyết học như tổng số bạch cầu, hồng cầu, hemoglobin, tiểu cầu (PLT) ... được xác định bằng máy phân tích huyết học tự động (Simens, Bayer ADVIA120, Đức) [26]. Máy phân tích sinh hóa tự động Hitachi 7020 được sử dụng để phát hiện aspartate aminotransferase (AST), alanin aminotransferase (ALT), phosphatase kiềm, nitơ urê máu, tổng số protein, albumin, glucose, bilirubin tổng, creatinin, tổng cholesterol, triglycerid, creatine kinase, nồng độ ion natri, ion kali và ion clorua [26].

### 2.9. Trọng lượng cơ quan tương đối:

Các cơ quan quan trọng đã được kiểm tra kỹ lưỡng. Các cơ quan như tim, gan, thận được phẫu thuật cắt bỏ, làm sạch bằng dung dịch nước muối lạnh, đặt trên giấy thấm, sau đó cân (trọng lượng nội tạng tuyệt đối tính bằng gam). Trọng lượng cơ quan tương đối (ROW) của mỗi con sau đó được tính như sau:  $ROW(\%) = [\text{Trọng lượng nội tạng tuyệt đối (g)} \div \text{Trọng lượng cơ thể chuột vào ngày phẫu thuật (g)}] \times 100$  [26].

### 2.10. Đánh giá mô học:

Gan, thận, tim được bảo quản trong dung dịch formandehyt 10%, cố định trong 36 - 48 giờ và trải qua các quy trình mô học thông thường để kiểm tra mô bệnh học. Các phân mô được kiểm tra dưới kính hiển vi với vật kính x40 để kiểm tra hình thái và số lượng tế bào [26].

### 2.11. Phân tích thống kê:

Các kết quả thực nghiệm được biểu diễn dưới dạng  $\bar{X} \pm SD$ . Dữ liệu được phân tích thống kê bằng cách phân tích ANOVA. Mức ý nghĩa được sử dụng để kiểm định sai khác giữa các nghiệm thức là  $p < 0,05$ .

## 3. KẾT QUẢ VÀ BIỆN LUẬN

### 3.1. Phân tích hóa học của EtAA

Phân tích định tính các chất hóa học trong EtAA cho thấy sự hiện diện các hợp chất như alkaloid, flavonoid, tannins, phenol, terpenoid, saponin, proteins, carbohydrates, steroid; không có sự hiện diện của flavones, xanthones (bảng 1). Đồng thời, theo báo cáo của Moreno-Rojas và cộng sự (2018) [12], Tran và cộng sự (2020) [13] một số hợp chất có hoạt tính sinh học như organosulfur, quecertin 3-glycoside, isorhamnetin, ... cũng hiện diện trong EtAA.

Bảng 1. Thành phần hóa học của chiết xuất ethanol hành đen

Các hợp chất	EtAA	Các hợp chất	EtAA
Alkaloids	+	Flavones	-
Flavonoids	+	Xanthones	-
Saponin	+	Proteins	+
Phenols	+	Carbohydrates	+
Terpenoids	+	Steroid	+
Tannins	+		

(+) Hiện diện trong EtAA (-) Không hiện diện trong EtAA

### 3.2. Kiểm tra thể chất:

Quan sát thấy rằng không có trường hợp tử vong hoặc dấu hiệu nhiễm độc xảy ra liên quan đến sử dụng chiết xuất EtAA được ghi nhận ở động vật với liều 1000, 3000, 5000 và 7000 mg/kg. Do đó, liều gây chết gần đúng ( $LD_{50}$ ) của chiết xuất EtAA ở chuột thí nghiệm cao hơn 7000 mg/kg. Các dấu hiệu lâm sàng như thay đổi da, lông, mắt và màng nhầy (mũi), nhịp hô hấp, dấu hiệu tuần hoàn (nhịp tim và huyết áp), hiệu

ứng tự trị (tiết nước bọt, đổ mồ hôi, đái dầm, tiểu không tự chủ và đại tiện) và hệ thống thần kinh trung ương (buồn ngủ, buồn ngủ, dáng đi, run và co giật) không xuất hiện.

### 3.3. Trọng lượng cơ thể và lượng thức ăn, nước uống tiêu thụ

Bảng 2. Ảnh hưởng của EtAA đến lượng thức ăn, nước uống tiêu thụ và trọng lượng cơ thể chuột trong thử nghiệm độc tính cấp tính

Nhóm thí nghiệm	Lượng thức ăn (g)	Lượng nước uống (ml)	Trọng lượng cơ thể	
			Trọng lượng cơ thể (g)	% thay đổi trọng lượng
Đối chứng	4,61 <sup>a</sup> ± 0,6	6,64 <sup>a</sup> ± 0,1	22,36 <sup>a</sup> ± 0,2	0,17 <sup>a</sup> ± 0,1
1000 mg/kg	5,17 <sup>c</sup> ± 0,3	7,11 <sup>b</sup> ± 0,3	22,81 <sup>b</sup> ± 0,2	0,19 <sup>b</sup> ± 0,2
3000 mg/kg	5,12 <sup>c</sup> ± 0,1	7,09 <sup>b</sup> ± 0,3	22,78 <sup>b</sup> ± 0,2	0,19 <sup>b</sup> ± 0,1
5000 mg/kg	4,91 <sup>b</sup> ± 0,3	5,83 <sup>c</sup> ± 0,4	22,99 <sup>c</sup> ± 0,1	0,21 <sup>c</sup> ± 0,1
7000 mg/kg	5,01 <sup>b</sup> ± 0,2	5,94 <sup>c</sup> ± 0,6	23,41 <sup>c</sup> ± 0,2	0,21 <sup>c</sup> ± 0,3

Số liệu được trình bày dưới dạng Mean ± SD. Các chữ cái a,b,c trong cùng một cột biểu thị sự khác biệt có ý nghĩa của các nghiệm thức khảo sát theo kiểm định LSD ở mức độ tin cậy 95%

Bảng 3. Ảnh hưởng của EtAA đến lượng thức ăn, nước uống và trọng lượng cơ thể chuột trong thử nghiệm độc tính bán mãn tính

Nhóm thí nghiệm	Lượng thức ăn (g)	Lượng nước uống (ml)	Trọng lượng cơ thể	
			Trọng lượng cơ thể (g)	% thay đổi trọng lượng
Đối chứng	4,89 <sup>a</sup> ± 0,9	7,36 <sup>a</sup> ± 0,03	31,68 <sup>a</sup> ± 0,4	0,61 <sup>a</sup> ± 0,1
100 mg/kg	5,23 <sup>b</sup> ± 0,5	7,51 <sup>b</sup> ± 0,04	31,97 <sup>b</sup> ± 0,5	0,65 <sup>b</sup> ± 0,1
200 mg/kg	5,21 <sup>b</sup> ± 0,8	7,55 <sup>b</sup> ± 0,05	32,03 <sup>b</sup> ± 0,6	0,66 <sup>b</sup> ± 0,2
300 mg/kg	5,37 <sup>c</sup> ± 0,5	7,88 <sup>c</sup> ± 0,07	32,01 <sup>b</sup> ± 0,6	0,67 <sup>c</sup> ± 0,3
400 mg/kg	5,41 <sup>c</sup> ± 0,1	7,92 <sup>c</sup> ± 0,04	31,91 <sup>ac</sup> ± 0,7	0,67 <sup>c</sup> ± 0,1

Số liệu được trình bày dưới dạng Mean ± SD. Các chữ cái a,b,c trong cùng một cột biểu thị sự khác biệt có ý nghĩa của các nghiệm thức khảo sát theo kiểm định LSD ở mức độ tin cậy 95%

Lượng thức ăn và nước uống trung bình hàng ngày của chuột sử dụng các liều EtAA khác nhau được thể hiện trong bảng 2 và 3. Trong suốt thời gian thử nghiệm, không có thay đổi đáng kể ( $p < 0,05$ ) về lượng thức ăn hàng ngày của các nhóm chuột được uống EtAA (5,01±0,2g thử độc tính cấp và 5,41±0,1g thử độc tính bán mãn tính) so với nhóm đối chứng (4,61±0,6 và 4,89±0,9g). Những con chuột ở được uống 5000 và 7000 mg/kg (thử độc tính cấp tính) có biểu hiện giảm đáng kể ( $p < 0,05$ ) lượng nước hàng ngày (5,83±0,4 và 5,94±0,6ml) trong thời gian thử nghiệm khi so sánh với nhóm đối chứng (6,64±0,1ml). Trong khi đó ở mô hình thử độc tính bán mãn tính đã có sự tăng lên giữa các nhóm uống EtAA (7,92±0,04) so với đối chứng (7,36±0,03) ( $p < 0,05$ ). Nguyên nhân chuột được uống EtAA với liều lượng cao làm cho nhu cầu nước hàng ngày giảm nhẹ, liều lượng EtAA thấp kích thích sự thèm ăn và uống của chuột. Tuy nhiên, lượng thức ăn và nước uống tiêu thụ hàng ngày của chuột vẫn nằm trong giới hạn nhu cầu ăn, uống của chuột Swiss albino bình thường (lượng thức ăn từ 3,1±0,1 đến 6,3±0,3g; lượng nước uống từ 3,9±0,2 đến 8,2±0,3ml) theo kết quả của Alexander và cộng sự (2006) [30].

Nhìn chung, trọng lượng cơ thể của chuột sử dụng các liều EtAA tăng nhẹ sau 14 ngày uống EtAA. Khác biệt rõ rệt nhất về % thay đổi trọng lượng của nhóm uống EtAA liều cao (500 và 7000 mg/kg) (21%) so với nhóm đối chứng (0,61%) ( $p < 0,05$ ) trong thử độc tính cấp tính (bảng 2). Sau 12 tuần thử nghiệm, thay đổi trọng lượng cơ thể giữa các nhóm được uống EtAA liều 300 và 400 mg/kg (0,67%) cũng khác biệt rõ rệt so với nhóm đối chứng (0,61%) ( $p < 0,05$ ) trong thử độc tính bán mãn tính (bảng 3). Kết quả được giải thích là do EtAA kích thích hấp thu glucose và leucine trong ruột, làm tăng tỷ lệ trao đổi chất khi chuột nghỉ ngơi. Vì vậy, tăng trọng của chuột tăng lên trong thời gian thử nghiệm. Tuy nhiên, thay đổi trọng lượng của chuột trong thời gian thử nghiệm nằm trong khoảng giới hạn về trọng lượng cơ thể chuột Swiss albino (từ 31-33g) theo thống kê của Webster và cộng sự (1955) [31]. Điều đó cho thấy rằng EtAA không có độc tính, không ảnh hưởng đến sự tăng trưởng của chuột.

### 3.4. Huyết học và sinh hóa máu

Bảng 4. Ảnh hưởng của EtAA đến thành phần huyết học máu chuột trong thử nghiệm độc tính cấp tính

Chỉ tiêu	Đối chứng	1000 mg/kg	3000 mg/kg	5000 mg/kg	7000 mg/kg
RBC ( $\times 10^6$ tb/mm <sup>3</sup> )	8,1 <sup>a</sup> ± 0,5	7,2 <sup>b</sup> ± 0,9	7,5 <sup>b</sup> ± 0,7	8,2 <sup>c</sup> ± 0,5	7,9 <sup>c</sup> ± 0,8
HGB (g/dl)	12,1 <sup>a</sup> ± 0,8	12,8 <sup>b</sup> ± 0,5	12,7 <sup>b</sup> ± 0,9	12,1 <sup>c</sup> ± 0,9	11,9 <sup>c</sup> ± 0,6
HCT (%)	37,6 <sup>a</sup> ± 0,6	38,3 <sup>b</sup> ± 0,6	37,9 <sup>b</sup> ± 0,8	37,8 <sup>b</sup> ± 0,7	38,4 <sup>c</sup> ± 0,9
MCH (pg)	15,1 <sup>a</sup> ± 1,1	15,2 <sup>a</sup> ± 1,2	14,9 <sup>a</sup> ± 0,9	15,6 <sup>b</sup> ± 0,8	15,4 <sup>b</sup> ± 1,1
MCHC (%)	32,3 <sup>a</sup> ± 2,7	32,6 <sup>a</sup> ± 2,2	32,4 <sup>a</sup> ± 1,9	33,4 <sup>b</sup> ± 2,4	32,6 <sup>a</sup> ± 1,9
PLT ( $\times 10^3$ tb/mm <sup>3</sup> )	601 <sup>a</sup> ± 72	606 <sup>a</sup> ± 45	619 <sup>a</sup> ± 67	647 <sup>b</sup> ± 57	652 <sup>b</sup> ± 75
WBC ( $\times 10^3$ /mm <sup>3</sup> )	2,6 <sup>a</sup> ± 1,1	2,9 <sup>a</sup> ± 1,2	2,7 <sup>a</sup> ± 0,9	3,2 <sup>b</sup> ± 0,6	3,1 <sup>b</sup> ± 0,9
Lymphocyte (%)	85,1 <sup>a</sup> ± 4,5	88,5 <sup>b</sup> ± 3,8	99,7 <sup>b</sup> ± 4,7	101,2 <sup>b</sup> ± 4,1	103,1 <sup>b</sup> ± 3,6
Monocyte (%)	0,8 <sup>a</sup> ± 0,1	0,7 <sup>a</sup> ± 0,2	0,8 <sup>a</sup> ± 0,2	0,6 <sup>b</sup> ± 0,3	0,6 <sup>b</sup> ± 0,2
Neutrophil (%)	13,6 <sup>a</sup> ± 4,1	14,7 <sup>b</sup> ± 3,7	13,8 <sup>a</sup> ± 4,6	14,4 <sup>b</sup> ± 3,8	14,5 <sup>b</sup> ± 3,5
Eosinophil (%)	0,5 <sup>a</sup> ± 0,1	0,5 <sup>a</sup> ± 0,3	0,6 <sup>a</sup> ± 0,2	0,6 <sup>a</sup> ± 0,2	0,7 <sup>b</sup> ± 0,2
Basophil (%)	0,2 <sup>a</sup> ± 0,1	0,2 <sup>a</sup> ± 0,1	0,3 <sup>a</sup> ± 0,2	0,3 <sup>a</sup> ± 0,2	0,4 <sup>b</sup> ± 0,1

Số liệu được trình bày dưới dạng Mean ± SD. Các chữ cái a,b,c trong cùng một hàng biểu thị sự khác biệt có ý nghĩa của các nghiệm thức khảo sát theo kiểm định LSD ở mức độ tin cậy 95%

Việc sử dụng các nghiên cứu trên động vật để khảo sát các tác động độc hại của chiết xuất thảo dược có ý nghĩa cao [32]. Tùy thuộc vào yêu cầu quy định, các nghiên cứu độc tính cấp tính và bán mãn tính đã được thực hiện trong 14 và 90 ngày [23,33,34]. Các xét nghiệm huyết học cho thấy không có sự khác biệt đáng kể về lượng RBC, hemoglobin, WBC và PLT ở tất cả các liều EtAA so với đối chứng ( $p < 0,05$ ) (bảng 4). Trong sự khác biệt về số lượng các loại bạch cầu, lượng tế bào lympho có sự tăng nhẹ ở liều 5000 và 7000 mg/kg (101,2 ± 4,1% và 103,1 ± 3,6%) so với liều 1000 mg/kg (88,5 ± 3,8%) và so với nhóm đối chứng (85,1 ± 4,5%) ( $p < 0,05$ ).

Bảng 5. Ảnh hưởng của EtAA đến thành phần sinh hóa máu chuột trong thử nghiệm độc tính cấp tính

Chỉ tiêu	Đối chứng	1000 mg/kg	3000 mg/kg	5000 mg/kg	7000 mg/kg
Protein tổng (g/dl)	5,1 <sup>a</sup> ± 0,2	5,2 <sup>a</sup> ± 0,4	5,4 <sup>ab</sup> ± 0,4	5,7 <sup>b</sup> ± 0,3	5,8 <sup>b</sup> ± 0,1
Albumin (g/dl)	3,1 <sup>a</sup> ± 0,5	3,2 <sup>a</sup> ± 0,7	3,5 <sup>b</sup> ± 0,6	3,5 <sup>b</sup> ± 0,6	3,6 <sup>b</sup> ± 0,3
Glucose (mg/dl)	158 <sup>a</sup> ± 4,1	161 <sup>a</sup> ± 3,8	171 <sup>bc</sup> ± 4,6	169 <sup>b</sup> ± 3,9	167 <sup>b</sup> ± 4,1
Tryglicerid (mg/dl)	135 <sup>a</sup> ± 5,7	144 <sup>bc</sup> ± 4,8	145 <sup>bc</sup> ± 4,2	141 <sup>ab</sup> ± 3,9	149 <sup>c</sup> ± 3,8
ALT (U/l)	69,9 <sup>a</sup> ± 0,8	71,2 <sup>ab</sup> ± 0,5	69,3 <sup>a</sup> ± 0,5	75,2 <sup>bc</sup> ± 0,3	73,5 <sup>b</sup> ± 0,5
AST (U/l)	99,7 <sup>a</sup> ± 0,7	101,1 <sup>ab</sup> ± 0,9	98,6 <sup>a</sup> ± 0,5	105,4 <sup>c</sup> ± 0,6	106,3 <sup>c</sup> ± 0,7
ALP (U/l)	117,6 <sup>a</sup> ± 0,4	112,8 <sup>c</sup> ± 0,7	113,2 <sup>c</sup> ± 0,9	118,3 <sup>a</sup> ± 0,6	115,5 <sup>ab</sup> ± 0,8
Bilirubin tổng ( $\mu$ mol/l)	0,26 <sup>a</sup> ± 0,05	0,27 <sup>a</sup> ± 0,05	0,31 <sup>b</sup> ± 0,04	0,32 <sup>b</sup> ± 0,04	0,32 <sup>b</sup> ± 0,03
Urea (mmol/l)	12,1 <sup>a</sup> ± 0,4	12,5 <sup>b</sup> ± 0,5	12,4 <sup>ab</sup> ± 0,3	12,3 <sup>ab</sup> ± 0,6	12,9 <sup>c</sup> ± 0,5
Creatinine ( $\mu$ mol/l)	0,43 <sup>a</sup> ± 0,01	0,43 <sup>a</sup> ± 0,03	0,51 <sup>bc</sup> ± 0,02	0,52 <sup>bc</sup> ± 0,03	0,49 <sup>b</sup> ± 0,04
Uric acid (mg/l)	12,4 <sup>a</sup> ± 0,1	12,7 <sup>c</sup> ± 0,2	12,6 <sup>ab</sup> ± 0,1	12,3 <sup>a</sup> ± 0,2	12,5 <sup>ab</sup> ± 0,03
HDL-C (mg/dl)	21,6 <sup>a</sup> ± 0,8	22,7 <sup>c</sup> ± 0,9	22,6 <sup>c</sup> ± 0,8	22,6 <sup>c</sup> ± 0,8	21,9 <sup>b</sup> ± 0,6
BUN(mg %)	15,7 <sup>a</sup> ± 0,4	15,9 <sup>a</sup> ± 0,6	16,1 <sup>ab</sup> ± 0,3	16,8 <sup>c</sup> ± 0,7	16,9 <sup>c</sup> ± 0,7

Số liệu được trình bày dưới dạng Mean ± SD. Các chữ cái a,b trong cùng một hàng biểu thị sự khác biệt có ý nghĩa của các nghiệm thức khảo sát theo kiểm định LSD ở mức độ tin cậy 95%

Sau khi dùng liều cấp tính và lặp lại trong 7 ngày, kết quả cho thấy không có sự thay đổi đáng kể trong các giá trị sinh hóa máu ở chuột (bảng 5). Không có thay đổi liên quan nào được tìm thấy về mức ALT, AST, ALP hoặc creatinine, urea, BUN... là những chỉ số về chức năng gan và thận. Mức hiển thị các thông số huyết học và sinh hóa máu chuột trong thử nghiệm độc tính cấp tính đều nằm trong chế độ kiểm soát, không vượt ngoài khoảng giới hạn về tỷ lệ huyết học và sinh hóa máu ở chuột Swiss albino bình thường theo thống

kê của Wilson và cộng sự (2016) [35]. Do đó, nghiên cứu này chỉ ra rằng, EtAA không gây ra tác dụng độc cấp tính ở liều lượng đã thử nghiệm.

Bảng 6. Ảnh hưởng của EtAA đến thành phần huyết học máu ngoại vi chuột trong thử độc tính bán mãn tính

Chỉ tiêu	Đối chứng	100 mg/kg	300 mg/kg	500 mg/kg	700 mg/kg
RBC ( $\times 10^6$ /tb/mm <sup>3</sup> )	8,9 <sup>a</sup> ± 0,6	8,6 <sup>ab</sup> ± 0,8	8,8 <sup>a</sup> ± 0,5	9,2 <sup>c</sup> ± 0,4	9,3 <sup>c</sup> ± 0,5
HGB (g/dl)	11,9 <sup>a</sup> ± 0,4	12,1 <sup>a</sup> ± 0,4	12,4 <sup>ab</sup> ± 0,3	12,7 <sup>b</sup> ± 0,8	13,1 <sup>c</sup> ± 0,3
HCT (%)	39,8 <sup>a</sup> ± 0,7	39,9 <sup>a</sup> ± 0,6	40,1 <sup>a</sup> ± 0,4	40,6 <sup>b</sup> ± 0,8	40,9 <sup>b</sup> ± 0,7
MCH (pg)	14,9 <sup>a</sup> ± 1,2	14,8 <sup>a</sup> ± 1,2	15,1 <sup>ab</sup> ± 1,1	15,4 <sup>b</sup> ± 1,1	15,8 <sup>c</sup> ± 1,2
MCHC (g/dl)	33,4 <sup>a</sup> ± 2,1	33,3 <sup>a</sup> ± 2,7	32,9 <sup>b</sup> ± 2,2	33,7 <sup>c</sup> ± 1,7	33,8 <sup>c</sup> ± 1,6
PLT ( $\times 10^3$ /tb/mm <sup>3</sup> )	607 <sup>a</sup> ± 65	608 <sup>a</sup> ± 73	621 <sup>b</sup> ± 58	619 <sup>b</sup> ± 62	625 <sup>c</sup> ± 53
WBC ( $\times 10^3$ /mm <sup>3</sup> )	2,9 <sup>a</sup> ± 1,3	2,9 <sup>a</sup> ± 1,5	3,1 <sup>ab</sup> ± 1,2	3,3 <sup>b</sup> ± 1,3	3,4 <sup>b</sup> ± 1,3
Lymphocyte (%)	77,7 <sup>a</sup> ± 5,8	79,5 <sup>b</sup> ± 6,4	80,5 <sup>b</sup> ± 6,7	80,6 <sup>b</sup> ± 5,9	81,1 <sup>c</sup> ± 4,9
Monocyte (%)	0,7 <sup>a</sup> ± 0,2	0,8 <sup>ab</sup> ± 0,1	0,7 <sup>a</sup> ± 0,3	0,8 <sup>ab</sup> ± 0,3	0,7 <sup>a</sup> ± 0,3
Neutrophil (%)	14,3 <sup>a</sup> ± 2,8	14,5 <sup>a</sup> ± 3,2	14,8 <sup>b</sup> ± 4,1	14,7 <sup>ab</sup> ± 2,9	15,1 <sup>c</sup> ± 4,1
Eosinophil (%)	0,4 <sup>a</sup> ± 0,1	0,5 <sup>b</sup> ± 0,2	0,5 <sup>b</sup> ± 0,4	0,4 <sup>a</sup> ± 0,4	0,5 <sup>b</sup> ± 0,3
Basophil (%)	0,3 <sup>a</sup> ± 0,2	0,3 <sup>a</sup> ± 0,3	0,4 <sup>ab</sup> ± 0,2	0,4 <sup>ab</sup> ± 0,2	0,3 <sup>a</sup> ± 0,2

Số liệu được trình bày dưới dạng Mean ± SD. Các chữ cái a,b,c trong cùng một hàng biểu thị sự khác biệt có ý nghĩa của các nghiệm thức khảo sát theo kiểm định LSD ở mức độ tin cậy 95%

Bảng 7. Ảnh hưởng của EtAA đến thành phần sinh hóa máu ngoại vi chuột trong thử độc tính bán mãn tính

Chỉ tiêu	Đối chứng	100 mg/kg	300 mg/kg	500 mg/kg	700 mg/kg
Protein tổng (g/dl)	5,8 <sup>a</sup> ± 0,4	5,8 <sup>a</sup> ± 0,4	5,7 <sup>a</sup> ± 0,8	5,5 <sup>b</sup> ± 0,5	5,6 <sup>ab</sup> ± 0,5
Albumin (g/dl)	3,2 <sup>a</sup> ± 0,2	3,3 <sup>a</sup> ± 0,4	3,3 <sup>a</sup> ± 0,1	3,4 <sup>ab</sup> ± 0,5	3,5 <sup>b</sup> ± 0,2
Glucose (mg/dl)	161 <sup>a</sup> ± 4,8	166 <sup>b</sup> ± 4,2	164 <sup>ab</sup> ± 5,4	179 <sup>c</sup> ± 3,6	177 <sup>c</sup> ± 4,8
Tryglicerid (mg/dl)	138 <sup>a</sup> ± 7,2	139 <sup>a</sup> ± 6,8	144 <sup>b</sup> ± 6,3	149 <sup>c</sup> ± 7,3	148 <sup>c</sup> ± 5,4
ALT (U/l)	71,3 <sup>a</sup> ± 0,8	71,5 <sup>a</sup> ± 0,5	72,1 <sup>b</sup> ± 0,6	72,6 <sup>c</sup> ± 0,4	72,5 <sup>c</sup> ± 0,6
AST (U/l)	92,3 <sup>a</sup> ± 0,6	92,4 <sup>a</sup> ± 0,5	93,4 <sup>b</sup> ± 0,6	93,6 <sup>b</sup> ± 0,5	94,1 <sup>c</sup> ± 0,6
ALP (U/l)	115,8 <sup>a</sup> ± 0,8	115,7 <sup>a</sup> ± 0,6	116,4 <sup>b</sup> ± 0,9	115,9 <sup>ab</sup> ± 0,5	116,3 <sup>b</sup> ± 0,7
Bilirubin tổng ( $\mu$ mol/l)	0,25 <sup>a</sup> ± 0,03	0,26 <sup>a</sup> ± 0,05	0,27 <sup>b</sup> ± 0,02	0,27 <sup>b</sup> ± 0,06	0,27 <sup>b</sup> ± 0,05
Urea (mmol/l)	13,8 <sup>a</sup> ± 0,5	14,1 <sup>b</sup> ± 0,3	14,7 <sup>c</sup> ± 0,3	13,9 <sup>a</sup> ± 0,5	14,1 <sup>b</sup> ± 0,5
Creatinine ( $\mu$ mol/l)	0,52 <sup>a</sup> ± 0,02	0,53 <sup>a</sup> ± 0,02	0,55 <sup>b</sup> ± 0,01	0,55 <sup>b</sup> ± 0,03	0,56 <sup>b</sup> ± 0,05
Uric acid (mg/l)	12,9 <sup>a</sup> ± 0,3	13,1 <sup>a</sup> ± 0,3	13,4 <sup>b</sup> ± 0,7	12,9 <sup>a</sup> ± 0,5	13,5 <sup>b</sup> ± 0,2
HDL-C (mg/dl)	22,2 <sup>a</sup> ± 0,4	22,7 <sup>b</sup> ± 0,3	23,4 <sup>c</sup> ± 0,4	23,5 <sup>c</sup> ± 0,7	23,5 <sup>c</sup> ± 0,6
BUN (mg %)	16,8 <sup>a</sup> ± 0,3	16,9 <sup>a</sup> ± 0,6	17,2 <sup>ab</sup> ± 0,7	17,3 <sup>b</sup> ± 0,8	17,7 <sup>c</sup> ± 0,7

Số liệu được trình bày dưới dạng Mean ± SD. Các chữ cái a,b,c trong cùng một hàng biểu thị sự khác biệt có ý nghĩa của các nghiệm thức khảo sát theo kiểm định LSD ở mức độ tin cậy 95%

Sự thay đổi các thông số huyết học là minh chứng cụ thể để đánh giá độc tính. Những thay đổi trong các thông số này có thể được gây ra bởi việc sử dụng các chất tự nhiên trong thử nghiệm độc tính [36]. Hầu hết các thông số huyết học, như hemoglobin, tổng số hồng cầu, bạch cầu, bạch cầu trung tính, bạch cầu lympho, mono, bạch cầu đơn nhân và số lượng tiểu cầu ... ở chuột được uống EtAA không khác biệt đáng kể so với đối chứng ( $p < 0,05$ ). Chiết xuất EtAA không ảnh hưởng xấu đến sức khỏe động vật.

Các thông số sinh hóa trong huyết thanh liên quan đến các chỉ số sức khỏe và có ý nghĩa chẩn đoán trong đánh giá lâm sàng thường quy về tình trạng sức khỏe (bảng 4 và 5). ALT và AST chủ yếu được sử dụng trong đánh giá hoạt động của gan và tim. Sự giảm nhẹ ALT và AST được quan sát cho thấy rằng EtAA không có tác dụng gây độc cho gan và tim [37]. Đó là kết quả của việc ổn định màng sinh chất do đó bảo tồn tính toàn vẹn cấu trúc của tế bào cũng như sửa chữa các tổn thương mô gan [38]. Không có thay đổi đáng kể nào về tổng lượng protein ở chuột được uống EtAA, điều này cho thấy rằng không có dấu hiệu suy giảm chức năng thận [37]. Các phép đo tổng số protein phản ánh tình trạng dinh dưỡng và được sử dụng để sàng lọc, giúp chẩn đoán các bệnh về thận, gan và nhiều bệnh lý khác [39]. Mức cholesterol toàn phần và

triglyxerit biểu thị sự hiện diện của các tác nhân giảm lipid huyết trong thuốc [40]. EtAA không ảnh hưởng đến chất điện giải trong huyết thanh ( $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  và  $\text{Cl}^-$ ). Các thông số chức năng thận, likeurea, creatin và acid uric, không cho thấy bất kỳ thay đổi đáng kể nào. Không quan sát thấy sự khác biệt có ý nghĩa thống kê về các thông số chức năng gan như alanin aminotranferase (ALT), aspartate aminotransferase (AST) và phosphatase kiềm (ALP). Ngoài ra, không có thay đổi liên quan nào được tìm thấy trong tổng số protein, albumin và globulin. Mức hiển thị các thông số huyết học và sinh hóa máu chuột trong thử nghiệm độc tính bán mãn tính đều nằm trong chế độ kiểm soát, không vượt ngoài khoảng giới hạn về tỷ lệ huyết học và sinh hóa máu ở chuột Swiss albino bình thường [41].

### 3.5. Trọng lượng cơ quan tương đối:

Trọng lượng cơ quan/cơ thể là chỉ số thể hiện sự nhạy cảm về độc tính của thảo dược, bất kỳ thay đổi nhỏ nào cũng có tầm quan trọng đáng kể [42]. Tim, gan và thận đóng vai trò quan trọng trong quá trình trao đổi chất. Các chức năng quan trọng của gan và thận làm cho chúng luôn là đối tượng thường xuyên bị các hợp chất độc hại tấn công [43]. Trong nghiên cứu này, trọng lượng cơ quan tương đối của tim, gan, thận được ghi nhận lúc mổ ở các nhóm uống EtAA tăng nhẹ so với nhóm đối chứng ( $p < 0,05$ ) (bảng 8 và 9) (Cụ thể: ROW(%) tim trong thử độc cấp tính là  $0,88 \pm 0,02$  uống EtAA 7000 mg/kg,  $0,82 \pm 0,03$  đối chứng; ROW(%) gan trong thử độc bán mãn tính là  $7,98 \pm 2,03$  uống EtAA 400 mg/kg,  $7,89 \pm 2,05$  đối chứng; ROW(%) thận trong thử độc cấp tính là  $1,95 \pm 0,11$  uống EtAA 7000 mg/kg,  $1,79 \pm 0,11$  đối chứng). Kết quả cho thấy EtAA kích thích hoạt động trao đổi và đào thải các chất. Tuy nhiên, trọng lượng tương đối của tim, gan, thận chuột được uống EtAA không vượt quá giới hạn trọng lượng các cơ quan này ở chuột khỏe mạnh [ROW(%) gan là 0,82-1,04; ROW(%) tim là 0,08-0,13; ROW(%) thận là 0,2-0,28] [31]. Do đó, EtAA không gây ra bất kỳ tác dụng độc hại nào đối với thận, gan và tim. Kết quả phù hợp nghiên cứu của Bindhu và cộng sự (2007) về đánh giá trọng lượng nội tạng cho các nghiên cứu về độc tính của loài gặm nhấm [42].

Bảng 8. Ảnh hưởng của EtAA trọng lượng tương đối của tim, gan, thận chuột trong thử nghiệm độc tính cấp tính

Nhóm thí nghiệm	Tim (%)	Gan (%)	Thận (%)
Đối chứng	$0,82^a \pm 0,03$	$7,85^a \pm 2,12$	$1,79^a \pm 0,11$
1000 mg/kg	$0,83^a \pm 0,04$	$7,91^b \pm 2,08$	$1,81^a \pm 0,09$
3000 mg/kg	$0,85^{ab} \pm 0,02$	$7,92^b \pm 1,95$	$1,87^b \pm 0,08$
5000 mg/kg	$0,89^c \pm 0,03$	$7,96^c \pm 2,06$	$1,88^b \pm 0,12$
7000 mg/kg	$0,88^{bc} \pm 0,02$	$7,97^c \pm 2,11$	$1,95^c \pm 0,11$

Số liệu được trình bày dưới dạng Mean  $\pm$  SD. Các chữ cái a,b,c trong cùng một cột biểu thị sự khác biệt có ý nghĩa của các nghiệm thức khảo sát theo kiểm định LSD ở mức độ tin cậy 95%

Bảng 9. Ảnh hưởng của EtAA đến trọng lượng tương đối của tim, gan, thận chuột trong thử nghiệm độc tính bán mãn tính

Nhóm thí nghiệm	Tim (g%)	Gan (g%)	Thận (g%)
Đối chứng	$0,79^a \pm 0,04$	$7,89^a \pm 2,05$	$1,82^a \pm 0,09$
100 mg/kg	$0,84^b \pm 0,05$	$7,94^b \pm 1,85$	$1,81^a \pm 0,12$
200 mg/kg	$0,83^b \pm 0,03$	$7,92^{ab} \pm 1,99$	$1,86^b \pm 0,11$
300 mg/kg	$0,87^b \pm 0,03$	$7,95^b \pm 2,07$	$1,88^b \pm 0,07$
400 mg/kg	$0,88^{bc} \pm 0,05$	$7,98^b \pm 2,03$	$1,87^b \pm 0,07$

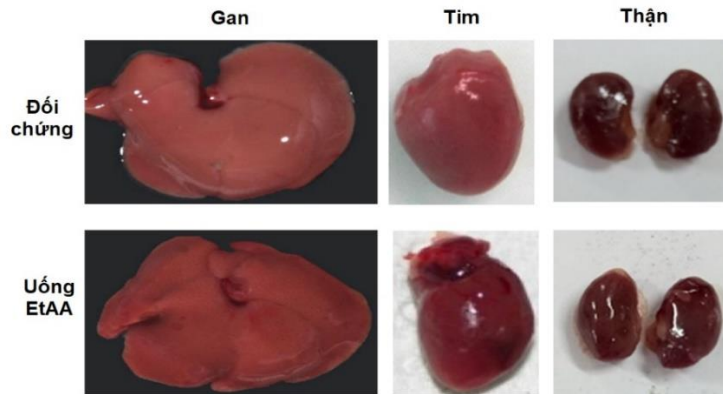
Số liệu được trình bày dưới dạng Mean  $\pm$  SD. Các chữ cái a,b,c trong cùng một cột biểu thị sự khác biệt có ý nghĩa của các nghiệm thức khảo sát theo kiểm định LSD ở mức độ tin cậy 95%

### 3.6. Phân tích mô học cơ quan:

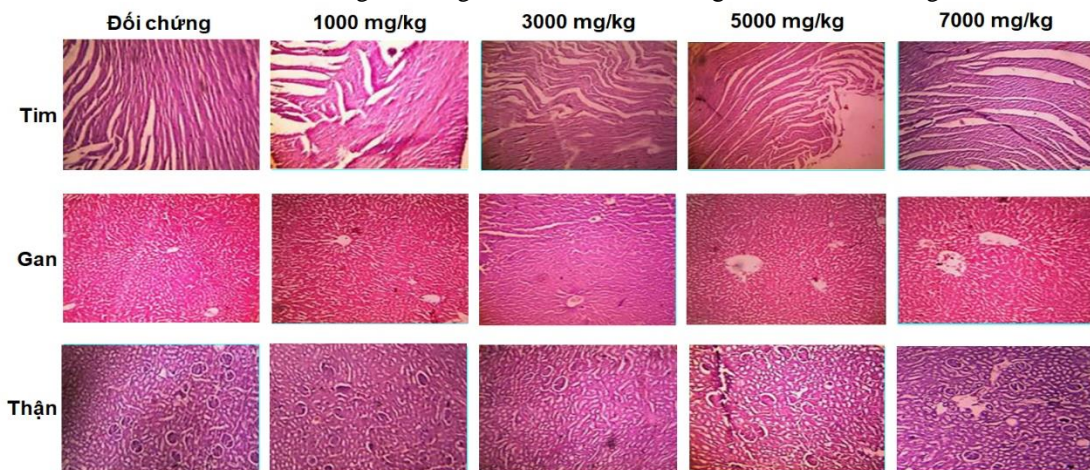
Kiểm tra vĩ mô đối với tất cả các cơ quan nội tạng được nghiên cứu, cụ thể là dạ dày, ruột non, ruột già, lá lách, gan, tim và thận không tìm thấy bất kỳ thay đổi nào về vị trí, hình dạng, kích thước, màu sắc, kết cấu và tổng thể khi so sánh với các cơ quan của nhóm đối chứng. Các phần của các cơ quan khác nhau như gan, tim và thận của nhóm đối chứng và được uống EtAA (Hình 4) và không có bất kỳ tổn thương bệnh lý nào. Các nghiên cứu mô học cho thấy không có bất thường trong mô gan, thận và tim ở những con chuột được uống EtAA với liều lượng cấp tính và bán mãn tính. Mô gan hiển thị các tế bào gan bình thường mà không có bất kỳ sự mở rộng nào trong lớp lót sinusoids, tĩnh mạch trung tâm và tĩnh mạch cửa gan, kiến trúc tiểu thùy gan không bị ảnh hưởng, tế bào gan và tế bào Kupffer bình thường ở tất cả các nhóm uống EtAA so với đối chứng (Hình 5 và 6). Hình ảnh hiển vi thận cho thấy cấu trúc cầu thận và ống thận còn nguyên



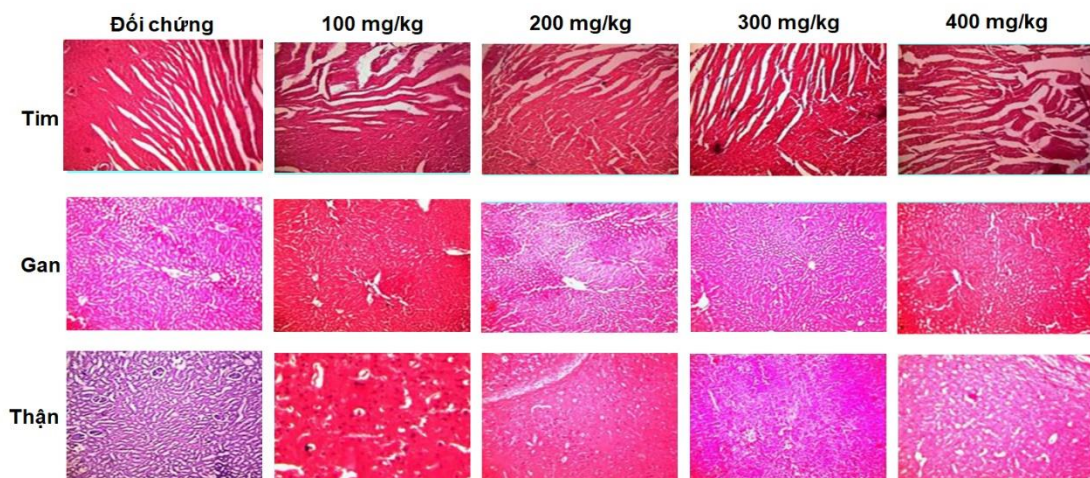
ven. Các búi mao mạch và kích thước của không gian Bowman cũng bình thường. Hơn nữa, các ống xoắn gần, ống lượn xa, quai Henle, ống góp, điểm vàng và tế bào trung bì bình thường ở nhóm uống EtAA so với đối chứng (Hình 5 và 6). Các đặc điểm mô học của tim cho thấy các tế bào tim bình thường với nhân nổi rõ, cấu trúc tế bào cơ tim và mô liên kết vẫn bình thường ở cả nhóm uống EtAA và nhóm chứng (Hình 5 và 6). Do đó, đánh giá mô bệnh học chỉ ra rằng EtAA không có bất kỳ tác dụng phụ nào đối với hình thái của các mô và những quan sát này đã hỗ trợ các kết quả sinh hóa nêu trên. Kết luận rằng EtAA không tạo ra bất kỳ tác dụng độc nào ở chuột Swiss albino.



Hình 4. Hình thái ngoài tim, gan, thận của chuột uống EtAA và đối chứng



Hình 5. Mô bệnh học tim, gan, thận (H&E10x) của chuột uống EtAA và đối chứng thử độc tính cấp tính sau 14 ngày



Hình 6. Mô bệnh học tim, gan, thận (H&E10x) chuột uống EtAA và đối chứng thử độc tính bán mãn tính sau 12 tuần

#### 4. KẾT LUẬN

Bản chất an toàn và hiệu quả của chiết xuất ethanol hành đen (EtAA) đã được xác nhận bằng cách kiểm tra độc tính cấp tính và bán mãn tính qua đường miệng theo quy định của OECD. Hành vi, phản ứng và các thông số thực nghiệm của động vật được khảo sát trong suốt 14 ngày thử nghiệm độc cấp tính và 12 tuần thử nghiệm độc bán mãn tính khá đồng đều và ổn định đã cho thấy sự an toàn của EtAA đối với động vật thử nghiệm. Với liều lượng thử nghiệm lên đến 7000 mg/kg EtAA (thử độc cấp tính) và 400 mg/kg EtAA (thử độc bán mãn tính) cho thấy sự tương tác của các thành phần trong EtAA tạo biên độ an toàn rộng trên động vật thí nghiệm.

#### LỜI CẢM ƠN

Các tác giả xin cảm ơn các đồng nghiệp và cộng sự từ Khoa Huyết học và Sinh hóa, Khoa Giải phẫu bệnh, Bệnh viện 175 Tp.HCM, Viện Pasteur Tp.HCM, Phòng Thí nghiệm Công nghệ Động vật Viện Công nghệ Sinh học và Thực phẩm, Trường Đại học Công nghiệp Tp.HCM đã hỗ trợ chúng tôi trong dự án này.

#### TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Calixto, JB. *Efficacy, safety, quality control, marketing and regulatory guidelines for herbal medicines (phytotherapeutic agents)*. Braz. J. Med. Biol. Res., 2000; 33: 179–189. DOI: 10.1590/S0100-879X2000000200004
2. Fennell, CW, Lindsey, KL, Mc Gaw, LJ, Sparg, SG, Stafford, GI, Elgorashi, EE, et al. *Assessing African medicinal plants for efficacy and safety: pharmacological screening and toxicology*. J. Ethnopharmacol, 2004; 94: 205–217. DOI: 10.1016/j.jep.2004.05.012
3. Kassie, F, Parzefall, W, Musk, S, Johnson, I, Lamprecht, G, Sontag, G, et al. *Genotoxic effects of crude juices from Brassica vegetables and juices and extracts from phytopharmaceutical preparations and spices of cruciferous plants origin in bacterial and mammalian cells*. Chem. Biol. Interact, 1996; 102: 1–16. DOI: 10.1016/0009-2797(96)03728-3
4. De Sã Ferrira, ICF, errão Vargas, VM. *Mutagenicity of medicinal plant extracts in salmonella/microsome assay*. Phytother. Res., 1999; 13: 397–400.
5. Adewunmi, CO, Ojewole, JAO. *Safety of traditional medicines, complementary and alternative medicines in Africa*. Afr. J. Tradit. Complement. Altern. Med., 2004; 1, 1–3. DOI: 10.4314/ajtcam.v1i1.31090
6. Jean-Pierre Cosyns. *Aristolochic acid and 'Chinese herbs nephropathy': a review of the evidence to date*. Drug Saf, 2003; 26(1): 33-48. DOI: 10.2165/00002018-200326010-00004.
7. Wei, Z, Baochang, C, Jinjun, S, Shouchuan, W, Liuqing, D. *Discovery and Current Status of Evaluation System of Bioavailability and Related Pharmaceutical Technologies for Traditional Chinese Medicines-Flos Lonicerae Japonicae-Fructus Forsythiae Herb Couples as an Example*. Int J Mol Sci. 2015; 16(12): 28812–28840. DOI: 10.3390/ijms161226132.
8. Campbell-Tofte, JIA, Mølgaard, P, Winther, K. *Harnessing the potential clinical use of medicinal plants as anti-diabetic agents*. Botanicals Targets Ther., 2012; 2, 7–19. DOI: 10.2147/BTAT.S17302
9. Perera, LMS, Escobar, A, Souccar, C, Remigio, MA, Mancebo, B. *Pharmacological and toxicological evaluation of *Rhizophora mangle* L., as a potential antiulcerogenic drug: Chemical composition of active extract*. J. Pharmacognosy Phytother, 2010; 2: 56–63.
10. Afolabi, SO, Akindele, AJ, Awodele, O, Anunobi, CC, Adeyemi, OO. *A 90 day chronic toxicity study of Nigerian herbal preparation DAS-77 in rats*. BMC Complement. Altern. Med., 2012; 12: 79-89. DOI: 10.1186/1472-6882-12-79

11. Sun, W, Shahrajabian, MH, Cheng, Q. *The insight and survey on medicinal properties and nutritive components of Shallot*. Journal of Medicinal Plants Research, 2019; 13(18):452-457. DOI: 10.5897 / JMPR2019.6836
12. Moreno-Rojas, JM, Moreno-Ortega, A, Ordóñez, JL, Moreno-Rojas, R, Pérez-Aparicio, J, Pereira-Caro, G. *Development and validation of UHPLC-HRMS methodology for the determination of flavonoids, amino acids and organosulfur compounds in black onion, a novel derived product from fresh shallot onions (*Allium cepa* var. *aggregatum*)*. LWT Food Science and Technology, 2018; 97:376-383. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2018.07.032>
13. Tran, GB, Nguyen, NT, Nguyen, HN, Pham, HH, Ngo TMT. *Chemical Composition and Antioxidant, Anti-Inflammatory, And Anticancer Effects of Ethanol Extract Of Black Shallot (*Allium Ascalonicum*)*. Pharmacophore, 2020; 11(3):30-37. ISSN-2229-5402.
14. Tran, GB, Dam SM, Le TNT. *Amelioration of single clove black garlic aqueous extract on dyslipidemia and hepatitis in chronic carbon tetrachloride intoxicated Swiss albino mice*. International Journal of Hepatology. 2018; 2018: 938-3950. <https://doi.org/10.1155/2018/9383950>
15. Erik, FO, Salares, LMB. *Phytochemical Screening and Antimicrobial Activity of Terminalia catappa L. Leaf Extract Against Potential Pathogens of Animals*. Journal of Science Engineering and Technology, 2018. 6: 15-26, ISSN: 2545-9732.
16. Muhammad, A, Mudi, SY. *Phytochemical Screening and Antimicrobial Activities of Terminalia catappa, Leaf Extracts*. Biokemistri, 2011; 23(1): 35–39, <http://doi.org/10.4314/biokem.v23i>.
17. Katiki, LM, Gomes, ACP, Barbieri, AME, Pacheco, PA, Rodrigues, L, Veríssimo, CJ, Gutmanis, G, Piza, AM, Louvandini, H, Ferreira, JFS. *Terminalia catappa: Chemical composition, in vitro and in vivo effects on Haemonchus contortus*. Vet Parasitol, 2017. 246: 118-123. <http://doi.org/10.1016/j.vetpar.2017.09.006>.
18. Sharma, A, Sharmab, AK, Chanda, T, Khardiyaa, M, Agarwalb, S. *Preliminary phytochemical screening of fruit peel extracts of annona squamosa linn.* Journal of Current Pharma Research, 2013, vol. 4(1), p.1038-1043. ISSN: 2230-7842.
19. Matos, FJA. *Introdução à Fitoquímica Experimental*. Fortaleza: Edições EUFC, 1997, 257 pages.
20. National Research Council (US) Committee for the Update of the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals. (2011). *Guide for the Care and Use of Laboratory Animals, 8th Edn*. Washington, DC: National Academies Press (US).
21. Declaration of Helsinki 1975. Recommendations guiding medical doctors in biomedical research involving human subjects, Adopted by the 29th World Medical Assembly, Tokyo, Japan. (October 1975).
22. OECD Test No. 408: *Repeated Dose 90-day Oral Toxicity Study in Rodents, OECD Guidelines for the Testing of Chemicals*. Organization for Economic Cooperation and Development, Paris, France, 1998. DOI: 10.1787/9789264071049-en
23. María del PO, QF, María, CL, Lucía, B, Javier, RQF, Mario, FG. *Evaluation of the acute and subchronic oral toxicity of ethanol extract from Valeriana pavnii species in Wistar rats*. Colombia Médica, 2010; 41(3): 45-54. ISSN 1657-9534
24. OECD. Organization for Economic Development. 2001. *Guideline for Testing of Chemicals*. Guidance, no. 425.
25. Toxtutor. *Testing for and Assessing Toxicity*. US National library of medicine, 2019. [Online] Available: <https://toxtutor.nlm.nih.gov/05-001.html>

26. Yu, C, Dong-jie, G, Hui, D, Min-feng, W, Ya-Nan, Z, Su, L, Rong, X, Jie, C, Xing-xiu, J, Bin, L, Qi, X, Fu-lun, L. *Acute and chronic toxicity of a polyherbal preparation – Jueyin granules*. BMC Complement Altern Med. 2018; 18: 148-161. DOI: 10.1186/s12906-018-2211-z
28. Parasuraman, S. *Toxicological screening*. J Pharmacol Pharmacother, 2011; 2(2): 74–79. DOI: 10.4103/0976-500X.81895
27. Mayur, P, Najam, AK, Kamal, KM. *Evaluation of Acute and Subacute Oral Toxicity Induced by Ethanolic Extract of Marsdenia tenacissima Leaves in Experimental Rats*. Sci. Pharm. 2017, 85(3): 29-40; <https://doi.org/10.3390/scipharm85030029>
28. Nashwan, AAA, Aied, MA, Marina, MB, Anand, R. *Acute and sub-acute oral toxicity of Dracaena cinnabari resin methanol extract in rats*. BMC Complementary and Alternative Medicine, 2018; 18: 50-64. DOI: 10.1186/s12906-018-2110-3
29. Prabhat, U, Rashmi, S, Kavindra, NT, Dubey, G P, Sunil KM. *Toxicity assessment of the alcoholic leaves extract of Reinwardtia indica*. Braz. J. Pharm. Sci., 2019; 55: 15-27. <http://dx.doi.org/10.1590/s2175-97902019000118224>
30. Alexander, AB, Danielle, RR, Gary, KB, Michael, GT. *Food Intake, Water Intake, and Drinking Spout Side Preference of 28 Mouse Strains*. Behav Genet, 2002; 32(6): 435–443. PMID: 12467341
31. Webster, SH, Liljegres, EJ. *Organ: body-weight ratios for certain organs of laboratory animals, part III. White Swiss mouse*. Developmental Dynamics, 1955; 97(1): 129 -153. <https://doi.org/10.1002/aja.1000970105>
32. Olson, H, Betton, G, Robinson, D, Thomas, K, Monro, A, Kolaja, G, Lilly, P, Sanders, J, Sipes, G, Bracken, W, Dorato, M, Deun, KV, Smith, P, Berger, B, Heller, A. *Concordance of the toxicity of pharmaceuticals in humans and in animals*. Regul Toxicol Pharmacol, 2000, 32(1): 56-67. DOI: 10.1006 / rtph.2000.1399.
33. Kpemissi, M, Metowogo, K, Melila, M, Veerapur, VP, Negru, M, Taulescu, M, Potârniche, AV, Suhas, DS, Puneeth, TA, Vijayakumar, S, Eklu-Gadegbeku, K. *Acute and subchronic oral toxicity assessments of Combretum micranthum (Combretaceae) in Wistar rats*. Toxicol, 2020; 7(2020): 162-168. <https://doi.org/10.1016/j.toxrep.2020.01.007>
34. Tabarraei, H, Hassan, J, Parvizi, MR, Golshahi, H. *Evaluation of the acute and sub-acute toxicity of the black caraway seed essential oil in Wistar rats*. Toxicol, 2019; 6: 869-874. <https://doi.org/10.1016/j.toxrep.2019.08.010>
35. Wilson, S, Dalila, CO, Araceli, H, Graziela, BS; Jackeline, SOB, Maristela, T, Amanda, RC, Silvânia, M, Ricardo, AF, Primavera, B. *Hematological and biochemical reference values for C57BL/6, Swiss Webster and BALB/c mice*. Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci., São Paulo, 2016; 53(2): 138-145, DOI: 10.11606/issn.1678-4456.v53i2p138-145.
36. Andrew, MA. *Clinical Chemistry and Metabolic Medicine, 7th edn*. International Journal of Laboratory Medicine, 2007; 1: 1-13. <https://doi.org/10.1258/000456307780117939>
37. Pari L, Murugan P. *Protective role of tetrahydrocurcumin against erythromycin estolate-induced hepatotoxicity*. Pharmacol Res, 2004; 49(5): 481-6. DOI: 10.1016/j.phrs.2003.11.005.
38. Tilkian, SM, Conover, BM, Tilkian, AG. *Clinical significance of laboratory tests. 2nd*. St. Louis, MO: Mosby, 1979; 282 pages. ISBN: 0801649625
39. Thierry, TA, Acha, AE, Paulin, N, Aphrodite, C, Pierre, K, Tazoacha, A. *Subacute toxicity study of water extract from Acanthus montanus*. Electronic Journal of Biology, 2011; 7 (1): 11–15.
40. Ogonnia, SO, Mbaka, GO, Anyika, EN, Emordi, JE, Nwakakwa, N. *A review of acute and subacute electronic toxicity of a tea polyherbal remedy in Nigeria*. Pak J Nutr. 2011; 10 : 1022–1028. ISSN 1680-5194

41. Wolford, ST, Schroer, RA, Gohs, FX, Gallo, PP, Brodeck, M, Falk, HB, Ruhren, R. *Reference range data base for serum chemistry and hematology values in laboratory animals*. Journal of Toxicology and Environmental Health, 1986; 18:161-188. DOI: 10.1080/15287398609530859
42. Michael, B, Yano, B, Sellers, RS, *et al*. *Evaluation of organ weights for rodent and non-rodent toxicity studies: a review of regulatory guidelines and a survey of current practices*. Toxicol Pathol, 2007; 35 (5): 742-750. DOI: 10.1080/01926230701595292.
43. M. Leach. *Interpretation of the full blood count in systemic disease – a guide for the physician*. J R Coll Phys Edinb, 2014; 44: 36-41. <https://doi.org/10.4997/JRCPE.2014.109>

Ngày nhận bài: 07/10/2020

Ngày chấp nhận đăng: 26/03/2021