



Nghiên cứu định chuẩn hóa học và độc tính cấp trên động vật thực nghiệm của chế phẩm giảm cân CHM-WL

A STUDY OF CHEMICAL STANDARDIZATION AND ACUTE TOXICITY IN ANIMAL MODELS OF THE HERBAL WEIGHT LOSS FORMULATION CHM-WL

Đái Thị Việt Lan*¹, Lê Ngọc Hùng², Nguyễn Thị Hồng Vân²

1. Công ty cổ phần phòng chẩn trị y học cổ truyền Daibio
2. Trung tâm Nghiên cứu và Chuyển giao Công nghệ

TÓM TẮT

Mục tiêu: Điều chế viên nang giảm cân từ các nguyên liệu Nưa, Chè xanh, Cà phê xanh, phân tích định lượng hoạt chất trong nguyên liệu viên nang và đánh giá độ an toàn của chế phẩm làm cơ sở cho điều trị giảm cân.

Phương pháp nghiên cứu: Cao nguyên liệu từ Nưa, Chè xanh và Cà phê xanh được bào chế bằng phương pháp chiết với các dung môi phù hợp và cô đặc chân không để thu được cao, sau đó pha trộn các nguyên liệu và tá dược để thu được viên nang chế phẩm giảm cân. Các hoạt chất trong cao nguyên liệu và viên nang chế phẩm được xác định sử dụng máy quang phổ và khối phổ phân giải cao HLC-DAD-QTOF (model X500R, Sciex). Nghiên cứu độ an toàn của chế phẩm trên chuột nhắt trắng, được cho ăn chế phẩm với các liều khác nhau tăng dần và theo dõi các chỉ tiêu theo chuẩn OECD.

Kết quả và bàn luận: Nghiên cứu sử dụng các chất chuẩn cơ sở glucomannan, a xit chlorogenic và EGCG để định lượng hoạt chất trong nguyên liệu bột củ Nưa, cao hạt Cà phê xanh, cao lá Chè xanh tương ứng là 81,0% KGM; 48,0% a xit chlorogenic và 33,1% EGCG. Viên nang giảm cân CHM-WL bào chế từ 230mg bột củ Nưa, 145mg cao lá Chè xanh, 100mg cao hạt Cà phê xanh được định chuẩn với ba chất chuẩn cơ sở trên có thành phần chất chuẩn cơ sở lần lượt là 186,3mg KGM; 47,9 mg a xit chlorogenic và 48,0 mg EGCG. Nghiên cứu đã xác định không có độc tính cấp của viên nang tới liều 10g/kgP.

Từ khóa: Bột Nưa, cao Chè xanh, cao Cà phê xanh, viên nang giảm cân, định lượng, béo phì và độc tính cấp.

SUMMARY

Objectives: The objectives of this research are to prepare weight loss hard capsules from Amorphophallus konjac, green tea leaf and green coffee bean extracts to quantitatively determine active compounds in the capsule ingredients, and then to assess the safety of weight loss hard capsules.

Ngày nhận bài: 10/8/2021

Ngày phản biện: 13/8/2021

Ngày chấp nhận đăng: 31/8/2021



Subjects and methods: *Amorphophallus konjac*, green tea leaf and green coffee bean extracts were prepared following solvent extraction method and then vacuum dried by a rotary evaporator to dryness. Then, a formula for weight-loss dry capsules was developed by mixing main ingredients with chosen excipients. The bioactive compounds containing in the ingredient extracts and the capsule were examined using a spectrophotometer and HPLC-DAD-QTOF (model X500R, Sciex). The assessment of capsule safety was performed on white mice fed with weight-loss capsules at increasing dose then observed for standard parameters following OECD guide.

Results: Study uses preliminary standards glucomannan, chlorogenic acid and EGCG to quantify its corresponding content of 81,0% KGM in KGM-rich *Amorphophallus* powder, 48,0% chlorogenic acid in green coffee bean extract and 33,1% EGCG in catechin-rich green tea leaf extract. Each weight loss hard capsule CHM-WL composing of 230mg KGM-rich *Amorphophallus* powder, 145mg catechin-rich green tea leaf extract, 100mg chlorogenic acid-rich green coffee bean extract was quantified with three mentioned preliminary standards showed their corresponding contents of 186,3mg KGM; 47,9 mg chlorogenic acid and 48,0 mg EGCG. The product CHM-WL showed no acute toxicity at dose of 10g/kgP.

Keywords: KGM-rich *Amorphophallus* powder, green tea leaf extract, green coffee bean extract, weight-loss dry capsule, quantitative analysis and acute toxicity.

ĐẶT VẤN ĐỀ

Béo phì là vấn nạn trên thế giới và đang hiện hữu ở nước ta, dẫn tới nhiều chứng bệnh tim mạch, huyết áp cao, tiểu đường... Sử dụng thực phẩm bảo vệ sức khỏe để hỗ trợ điều trị người béo phì đang ngày càng được chú ý thay thế cho sản phẩm tân dược với nhiều hiệu ứng phụ. Nhiều nghiên cứu đang tập trung theo hướng phối hợp các dược liệu để bào chế sản phẩm giảm cân với tính hiệu quả, an toàn cao [1]. Củ Nưa *Amorphophallus krausei* phát triển và thu mẫu ở An Giang để nghiên cứu sản xuất bột Nưa giàu glucomannan (bột KGM), một hoạt chất có tác dụng giảm nhu cầu ăn vì khi đưa vào cơ thể sẽ tạo cảm giác no, giảm cholesterol, lipoprotein và chất béo trung tính [2]. Hạt Cà phê xanh *Coffea arabica*, phổ biến và thu mẫu ở Đắk Nông, sử dụng trong sản phẩm giảm cân; có khả năng giảm tích mỡ, giảm khối lượng cơ thể chuột theo cơ chế ức chế giải phóng glucose vào máu do hoạt tính của axit chlorogenic (CGA) chiếm tới 5–14% trong hạt tươi dùng để tạo cao chiết hạt Cà phê xanh giàu CGA

(cao CFX) [3]. Lá Chè xanh *Camellia sinensis*, phổ biến và thu mẫu ở Thái Nguyên, chủ yếu chứa nhóm hoạt chất polyphenol nhiều hoạt tính sinh học do tác dụng khử các gốc tự do trong đó các catechin chiếm đa số có hoạt tính kháng béo phì dùng để tạo cao chiết lá Chè xanh giàu EGCG (cao CXA) [4]. Mỗi dược liệu nói trên có hoạt tính hỗ trợ điều trị béo phì và máu nhiễm mỡ nhưng hiện thị trường chưa có sản phẩm sử dụng nguyên liệu dạng cao của 3 dược liệu này để hỗ trợ điều trị các triệu chứng trên. Kiểm tra chất lượng bột Nưa, cao CFX, cao CXS và chế phẩm giảm cân CHM-WL tạo thành từ 3 nguyên liệu trên là yếu tố quan trọng trong nghiên cứu cũng như đảm bảo chất lượng ổn định của cả nguyên liệu và sản phẩm. Các chất chuẩn cơ sở là glucomannan 95,0%, axit chlorogenic 97,6% và EGCG 97,6% tinh chế từ nguyên liệu tương ứng được sử dụng để phân tích tiêu chuẩn hóa học. Độ tinh cấp và bán trường diễn thực nghiệm trên động vật là tiêu chí an toàn để sử dụng sản phẩm. Vì vậy, nghiên cứu này sử dụng các nguyên liệu Nưa, Chè xanh, Cà phê xanh để tạo viên nang giảm cân; sử dụng chất chuẩn



cơ sở tương ứng để phân tích định lượng đồng thời đánh giá độ an toàn của chế phẩm làm cơ sở cho điều trị giảm cân.

NGUYÊN LIỆU, ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

Đối tượng nghiên cứu

Củ Nưa tươi được thu mua ở An Giang để sản xuất bột KGM, hạt Cà phê xanh ở Đắc Nông để sản xuất cao CFX và lá Chè xanh khô ở Phú Thọ để chế tạo cao CXA.

Động vật thực nghiệm

Chuột nhắt trắng chủng Swiss khoẻ mạnh, cả 2 giống, trọng lượng 18 – 22g do Viện Vệ sinh dịch tễ Trung ương cung cấp. Động vật thí nghiệm được nuôi trong điều kiện phòng thí nghiệm 5 ngày trước khi bắt đầu nghiên cứu và trong suốt thời gian nghiên cứu.

Máy móc, hóa chất phục vụ nghiên cứu

Cân điện tử, độ chính xác 0,001g, dung dịch đệm a xít formic-NaOH, H₂SO₄ 3M, NaOH 6M, thuốc thử 3,5-dinitrosalicylic acid, máy quang phổ UV-VIS, khối phổ phân giải cao HLC-DAD-QTOF (model X500R, Sciex), methanol, ACN/H₂O, axit formic.

Phương pháp nghiên cứu

Điều chế các cao nguyên liệu và bào chế sản phẩm CHM-WL

Củ Nưa tươi (30kg/mê) được dùng để sản xuất bột KGM trên dây chuyền đồng bộ qua các bước: bóc vỏ; nghiền trong ethanol 60%; tách ly tâm thu bột sơ chế dưới 120 mesh; tinh chế bột sơ chế bằng ethanol 60% và tách ly tâm 3 lần; sấy lạnh bột cuối cùng; thu được 2,8g bột KGM [2]. Hạt Cà phê xanh (5kg) được nghiền thành bột mịn; chiết ethanol 90% tỷ lệ dung môi/nguyên liệu là 1/1, gia nhiệt ở 50°C trong 3 giờ; tinh chế loại tạp bằng chiết pha lỏng bằng clorofooc tỷ lệ 4/1; cô quay chân không pha nước; thu được 520g cao CFX [3]. Lá Chè xanh khô (20kg) được nghiền thành bột mịn; chiết trong

nước với tỷ lệ nước/nguyên liệu 2/1 ở 80°C trong 60 phút, pH=2.5 điều chỉnh bằng a xít boric; tinh chế bằng chiết pha lỏng lần lượt bằng clorofooc và ethyl axetate để loại tạp trong đó có caffein và lipid; cô đặc chân không thu được cao 850g cao CXA [4]. Viên nang CHM-WL được bào chế từ 3 nguyên liệu có hàm lượng 230mg bột KGM, 145mg cao CXA và 100mg cao CFX với các tá dược vừa đủ 600mg/viên nang số 0 [2].

Nghiên cứu định lượng chất chuẩn cơ sở (CCCS) trong nguyên liệu cao và viên nang

Định lượng KGM trong bột KGM và chế phẩm với CCCS KGM bằng máy quang phổ. Cân 0,2g mẫu; hòa tan trong 50 ml dung dịch đệm a xít formic-NaOH ở nhiệt độ phòng trong 24 giờ; lọc, thủy phân KGM thành glucose bằng H₂SO₄ 3M ở 100°C trong 120 phút; trung hòa bằng NaOH 6M. Định lượng dung dịch thủy phân KGM theo đường chuẩn glucose với thuốc thử 3,5-dinitrosalicylic acid bằng quang phổ UV-VIS ở 550nm [3]. Hàm lượng KGM trong mẫu (%) xác định theo công thức:

$$C_{KGM} = [T \times F \times (5C_{\text{glucose}} - C_{\text{glucose-0}}) \times 50] / (m \times 1000) \times 100$$
, trong đó:

m: Khối lượng mẫu thử (g); C_{glucose}: Hàm lượng glucose trong dung dịch KGM sau thủy phân

C_{glucose-0}: Hàm lượng glucose trong dung dịch KGM trước thủy phân

T: Tỷ lệ giữa khối lượng phần glucose liên kết trong phân tử KGM và khối lượng phần glucose tạo thành sau thủy phân (T≈0,9)

F: Hệ số tương quan giữa nồng độ glucose và nồng độ KGM.

Phân tích axit chlorogenic và EGCG tương ứng trong cao CFX, cao CXA và viên nang bằng khối phổ phân giải cao HLC-DAD-QTOF (model X500R, Sciex). Cân 0,5g mẫu; siêu âm hòa đến tan hoàn toàn trong methanol ở 40°C. Tối ưu điều kiện phân tích trên cột Hypersil GOLD C18, 150 mm x 2,1 mm x 3 μm; nhiệt độ cột 35°C; thể tích bơm



mẫu 2 µl; tốc độ dòng: 0,45ml/phút; hệ dung môi gradient ACN/H₂O (có bổ sung 0,1% axit formic) như sau 0-1,2 phút: 95% C, 1,2-15 phút: 95%-60%, 15-17 phút: 60%, 17-18 phút: 60-95%, 18-25 phút: 95%; tốc độ dòng 0,45 ml/phút; phát hiện với đầu dò UV bước sóng 254 nm để định tính hai CCCS axit chlorogenic, EGCG bằng thời gian lưu trên sắc ký đồ với đầu dò DAD và phổ khối ion mẹ, ion mảnh đặc trưng thu được bằng đầu dò QTOF ở chế độ ion hóa phun điện từ ESI và phát hiện ion âm và dương; điều kiện thế dòng ion -4.500 V, khí va chạm He với năng lượng va chạm -20 V, khoảng khối đo 70-2.000 Da trong thời gian tích tín hiệu 0.25 giây và thế khử tích đám mây -80 V [2]. Xây dựng đường chuẩn để định lượng axit chlorogenic và EGCG trong dung dịch cao CFX, cao CXA và viên nang bằng H₂LC-DAD.

Hàm lượng CCCS $C_{\text{cccs-mẫu}}$ trong mẫu (%) xác định như sau: $C_{\text{cdc-mẫu}} = (C_{\text{cccs-chuẩn}} \times V) / m \times 100$, trong đó:

m: Khối lượng mẫu thử (g); V: Thể tích dung môi pha mẫu thử (ml)

$C_{\text{cccs-chuẩn}}$: Nồng độ CCCS xác định theo đường chuẩn (g/ml).

Nghiên cứu độ an toàn của viên nang

Độ an toàn được nghiên cứu tại Trung tâm Nghiên cứu và Chuyển giao Công nghệ. Nghiên cứu độc

tính cấp theo phương pháp Sharwan *et al.* [5], Hướng dẫn OECD số 24 (2001) [6] trên 21 chuột nhất trắng. Thể tích mẫu thử mỗi lần cho chuột nhất uống là 0,2 ml/10g chuột. Thử 1 lần liều sơ bộ 2g/kg cân nặng cho 01 chuột uống. Chuột còn lại được chia ngẫu nhiên thành các lô (n= 10) rồi cho uống mẫu thử. Nếu chuột phản ứng bình thường thì xác định liều cao nhất khi chia chuột thành 2 lô: lô chứng uống dung môi pha thuốc NaCMC 0,1 % và lô 2 thử liều mẫu thử cao nhất có thể cho uống 10g/kgP chia làm 2 lần. Chuột được cho ăn trở lại sau 2 giờ, nước uống bình thường. Theo dõi liên tục trong 4 giờ đầu; các chỉ tiêu trong 72 giờ đầu theo quy định và tiếp tục theo dõi trong 7 ngày sau khi uống viên nang thử.

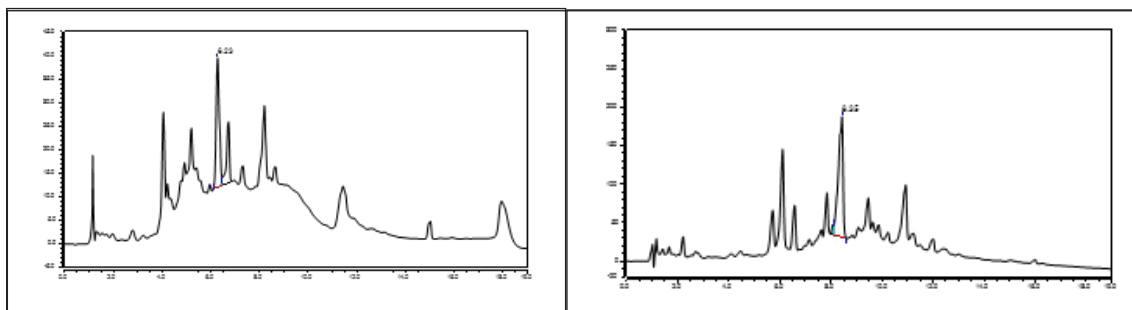
Xử lý số liệu

Các số liệu thu thập được xử lý trên phần mềm SPSS, với mức ý nghĩa p<0,05.

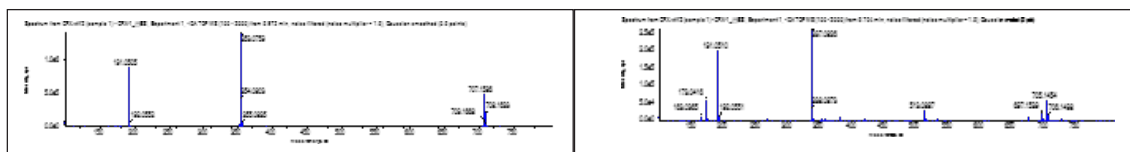
KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU

Phân tích chất chuẩn cơ sở trong nguyên liệu và viên nang

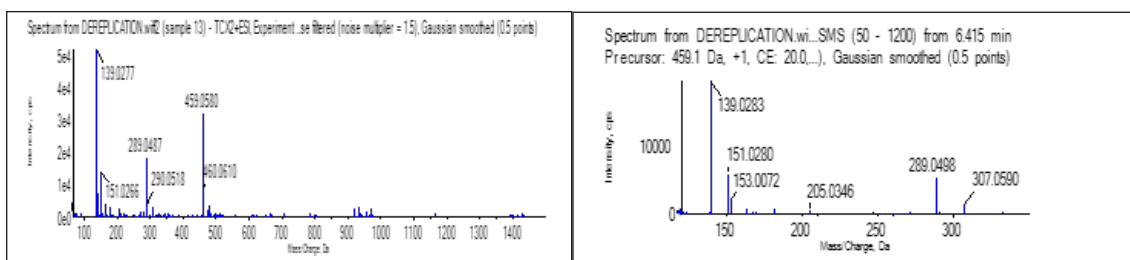
Phân tích hàm lượng CCCS đặc trưng của nguyên liệu và chế phẩm là tiêu chuẩn đánh giá chất lượng quan trọng. Kết quả phân tích định tính 2 hoạt chất axit chlorogenic và EGCG trong cao CFX, cao CXA và viên nang CHM-WL bằng kỹ thuật HPLC-QTOF thể hiện trong hình từ 1 tới 3.



Hình 1. Định a axit chlorogenic (trái) và EGCG (phải) với thời gian lưu tương ứng 6,23 phút và 8,38 phút trên sắc ký đồ cao CFX và cao CXA



Hình 2. Phổ khối ion mẹ (trái) và các ion mảnh (phải) ở mode đo âm định danh a xít chlorogenic với thời gian lưu 6,23 phút trên sắc ký đồ CCCS sạch, cao CFX và viên nang CHM-WL có m/z = 354.0803



Hình 3. Phổ khối ion mẹ (a) và các ion mảnh (b) ở mode đo dương định danh EGCG với thời gian lưu 8,38 phút trên sắc ký đồ CCCS sạch, cao CXA và viên nang CHM-WL có m/z = 459.0580

Dựa vào sắc ký đồ và phổ khối có thể khẳng định trong điều kiện sắc ký tối ưu hai hoạt chất có thời gian lưu tương ứng 6,23 phút và 8,38 phút trùng với thời gian lưu của CCCS và cùng có phổ

khối ion mẹ tương ứng m/z = 354.0803 và m/z = 459.0580 cùng các ion mảnh đặc trưng.

Bảng 1 thể hiện kết quả định lượng các hoạt chất trong cao thành phần và viên nang.

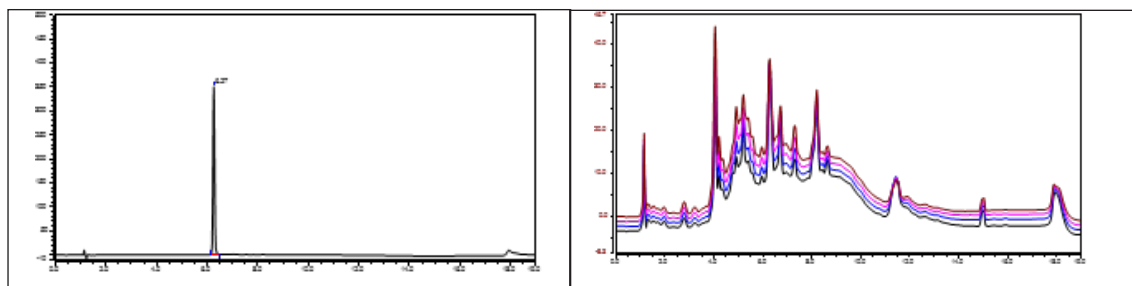
Bảng 1. Định lượng các CCCS trong các cao tương ứng và viên nang

Mẫu	CCCS	Hàm lượng CCCS trong cao (%)	Hàm lượng CCCS trong viên nang (%)	Khối lượng CCCS trong (viên nang (mg	Khối lượng cao trong viên nang ((mg
Bột KGM	KGM	81,2	29,8	186,3	230
Cao CFX	CGA	48,1	8,2	48,0	100
Cao CXA	EGCG	33,0	8,1	47,9	145

Như vậy, kết quả định lượng hoạt chất KGM trong bột KGM là 81,2% và chiếm 29,8% khối lượng bột nguyên liệu viên nang CHM-WL tương ứng 186,3mg/viên.

Dựa trên kết quả xây dựng đường chuẩn a xít chlorogenic và EGCG, định tính ở thời gian lưu tương ứng 6,23 phút và 8,38 phút trên sắc ký đồ HPLC-DAD của mẫu viên nang CHM-WL (hình 4),

hàm lượng hai hoạt chất axit chlorogenic và EGCG trong cao CFX, cao CXA và viên nang CHM-Giảm cân cũng thể hiện trong bảng 1. Hàm lượng a xít chlorogenic và EGCG trong cao CFX và cao CXA tương ứng là 48,1% và 33,0% chiếm 8,2% và 8,1% trong bột nguyên liệu viên nang tương ứng với 48,0mg/viên và 47,9mg/viên.



Hình 4. Sắc ký đồ a xít chlorogenic (trái) để xây dựng đường chuẩn với thời gian lưu 6,23 phút và sắc ký đồ viên nang CHM-WL (phải, 4 mẫu) để định lượng 2 hoạt chất a xít chlorogenic, EGCG tương ứng với thời gian lưu 6,23 phút và 8,38 phút

Kết quả độ độc tính cấp của viên nang CHM-WL

Kết quả thử độc tính cấp cho thấy khi cho chuột uống viên nang CHM-WL ở liều cao nhất 10 g/kg cân nặng theo khuyến cáo của OECD, chuột vẫn khỏe mạnh, hoạt động bình thường, không có bất thường xảy ra, không có chuột chết trong vòng 7 ngày.

BÀN LUẬN

Định lượng sự có mặt của cao thành phần thông qua hoạt chất đặc trưng trong viên nang đóng vai trò quan trọng trong nghiên cứu khả năng hỗ trợ chữa bệnh của chế phẩm cũng như đánh giá độ an toàn của chế phẩm, từ đó xác định liều lượng phù hợp. Kết quả thử độc tính cấp cho thấy ở liều cao nhất cân nặng theo khuyến cáo của OECD tương đương 10 g/kg, không có bất kỳ dấu hiệu bất thường nào được ghi nhận trên chuột tham gia thử nghiệm và không có chuột chết trong vòng 7 ngày.

KẾT LUẬN

Nghiên cứu đã định lượng các CCCS với hàm lượng 81,0% KGM; 48,0% a xít chlorogenic và 33,1% EGCG tương ứng trong nguyên liệu bột củ Nưa, cao lá Chè xanh, cao hạt Cà phê xanh. Định lượng các CCCS trong mỗi viên nang CHM-WL 600mg có thành phần gồm 230mg bột KGM, 145mg cao CXA, 100mg và cao CFX lần lượt là 186,3mg KGM; 47,9 mg a xít chlorogenic và 48,0 mg EGCG.

Viên nang CHM-WL có độ an toàn cao với độ độc tính cấp 10g/kg P và không có độc tính bán trường diễn ở các liều 120 mg/kg và 360 mg/kg thể trọng chuột trong 28 ngày.

Lời cảm ơn: Các tác giả cảm ơn Chương trình KHCN phục vụ phát triển bền vững vùng Tây Nam Bộ đã cung cấp kinh phí cho đề tài mã số KHCN-TNB/14-19/C21 để thực hiện nghiên cứu này.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Hotamisligil G. S., Erbay E. (2008). Nutrient sensing and inflammation in metabolic diseases. *Nat Rev Immunol* 8, 923-34.
- Lê Ngọc Hùng (2020). Báo cáo tổng kết đề tài “Nghiên cứu phát triển vùng dược liệu đặc hữu miền Tây Nam bộ (Rau đắng đất, Thù lù, Ngải *Zingiberaceae* và vài dược liệu khác từ sàng lọc) đạt chuẩn GACP phục vụ sản xuất đông dược trong nước và hướng tới xuất khẩu”, mã số KHCN-TNB/14-19/C21, Chương trình KHCN Tây Nam Bộ.



-
3. **Shengxi Meng et al (2013).** Roles of chlorogenic acid on regulating glucose and lipids metabolism: A review. *Evid Based Complement Alternat Med.*; 801457. doi: 10.1155/2013/801457
 4. **Lê Ngọc Hùng.** Báo cáo tổng kết đề tài “Nghiên cứu chế biến phụ phẩm chè xanh (lá chè già, chè đôn...) tỉnh Lào Cai thành một số sản phẩm có giá trị kinh tế cao, tăng thu nhập trong sản xuất chè của tỉnh”, Quyết định số 2710/QĐ-UBND ngày 19/8/2016 của UBND tỉnh Lào Cai.
 5. **G. Sharwan et al (2015).** Toxicity profile of traditional herbal medicine. *J. Ayu. Herb. Med*, 2015; 1(3): 81-90.
 6. **Guidance document on acute oral toxicity testing (2001).** OECD No 24, 1.