

ĐẶC TÍNH GÂY ĐỘC CỦA CAO CHIẾT KHÔNG PHÂN CỰC TỪ CÂY NGẢI CỨU LÊN ẤU TRÙNG TÔM ARTEMIA

Bùi Thị Kim Lý⁽¹⁾, Hoàng Thành Chí⁽¹⁾

(1) Trường Đại học Thủ Dầu Một

Ngày nhận bài 12/4/2022; Ngày phản biện 16/4/2022; Chấp nhận đăng 26/5/2022

Liên hệ Email: chiht@tdmu.edu.vn

<https://doi.org/10.37550/tdmu.VJS/2022.04.328>

Tóm tắt

Artemisia vulgaris hay còn gọi là ngải cứu là một loại thảo dược được trồng phổ biến ở Việt Nam. Ngoài công dụng như một loại rau, ngải cứu còn được sử dụng rộng rãi trong các bài thuốc dân gian để giải quyết các vấn đề sức khỏe thông thường như điều hòa kinh nguyệt, trị ho và cảm lạnh, chán ăn, giảm mụn trứng cá và cầm máu. Nhiều nghiên cứu khác nhau đã được thực hiện trên đối tượng này về các tác dụng sinh học chẳng hạn như chống ung thư, chống oxy hóa, chống tiểu đường, chống vi khuẩn và chống viêm. Trong bài báo này, chúng tôi tiến hành thử nghiệm về tác động gây độc trên ấu trùng tôm của các phân đoạn dung môi khác nhau của cao chiết từ cây ngải cứu, thử nghiệm được thực hiện trong hai mốc thời gian khác nhau để phát hiện các tác dụng sinh học của các dịch chiết. Kết quả thí nghiệm cho thấy các cao chiết có tác động đáng kể sau 24 giờ xử lý với ấu trùng tôm, với giá trị LC50 lần lượt là $183,60 \pm 7,40$; $164,50 \pm 9,10$; $264,80 \pm 19,20$ và $511,30 \pm 31,10$ ($\mu\text{g/mL}$) đối với các phân đoạn theo thứ tự là chloroform, n-hexane, ethyl acetate và nước.

Từ khóa: *Artemia*, *Artemisia vulgaris*, ấu trùng tôm, ngải cứu

Abstract

TOXIC PROPERTIES OF NON-POLAR EXTRACTS OF ARTEMISIA VULGARIS ON ARTEMIA SHRIMP LARVAE

Artemisia vulgaris, also known as mugwort, is a herb that is widely available in Vietnam. Aside from its use as a vegetable, mugwort has been widely used in folk remedies to address common health issues such as menstruation regulation, cough and cold treatment, anorexia, acne reduction, and haemostasis. Various studies have been conducted on this object for biological effects such as anticancer, antioxidant, anti-diabetes, anti-bacteria, and anti-inflammation. A brine shrimp lethal assay was performed in two timelines of treatment exposure to detect bio-effects in different fractions of the extract. The extracts had a significant impact after 24 hours of exposure, with LC50 values of 183.60 ± 7.40 ; 164.50 ± 9.10 ; 264.80 ± 19.20 and 511.30 ± 31.10 ($\mu\text{g/mL}$) for chloroform, n-hexane, ethyl acetate, and water, respectively.

1. Giới thiệu

Artemisia là chi Asteraceae lớn nhất, có khoảng hơn 500 loài (Sanz và *nnk.*, 2008; Vallès và *nnk.*, 2001). Đây là nhóm thực vật có lịch sử lâu đời và được sử dụng nhiều trong y học dân gian với nhiều mục đích khác nhau nhờ có các đặc tính kháng khuẩn, chống viêm, chống thấp khớp và kháng khuẩn (Abad và *nnk.*, 2012). *Artemisia* là hợp chất được phân lập từ các thành viên của chi này, là hợp chất được biết đến nhiều nhất và đã được sử dụng rộng rãi trong điều trị bệnh sốt rét (Rydén và *nnk.*, 2007; Tu, 2016). *Artemisia vulgaris* còn gọi là Ngải cứu, là một thành viên của chi *Artemisia*, cây có nguồn gốc từ Châu Âu và nhanh chóng lan rộng khắp thế giới nhờ khả năng thích nghi cao (Barney và *nnk.*, 2003; USDA, 2021). Sự đa dạng của các thành phần hoạt chất có hoạt tính sinh học trong cây làm cho ngải cứu được ứng dụng nhiều trong y học, bao gồm các đặc tính chống oxy hóa, chống ung thư và chống viêm (Ekiert và *nnk.*, 2020; Lee, 2011; Li và *nnk.*, 2016; Tsimogiannis và *nnk.*, 2004).

Mặc dù có những hạn chế so với y học hiện đại nhưng việc sử dụng các loại thảo mộc trong điều trị bệnh hiện đang dần được sử dụng trở lại (Salmerón-Manzano và *nnk.*, 2020; Yuan và *nnk.*, 2016). Sự tiến bộ của khoa học cũng như sự ra đời của nhiều lĩnh vực nghiên cứu thực vật giúp cung cấp một lượng lớn các bằng chứng khoa học chính xác và thuyết phục về công dụng của các loại thảo mộc (Ellen, 2006; Okogun, 2002). Nhờ đó các loại thảo mộc đã trở thành một nguồn cung quan trọng cho ngành công nghiệp dược phẩm và nghiên cứu khoa học (Djordjevic, 2017; Han và *nnk.*, 2007; Ozioma và *nnk.*, 2019; Pan và *nnk.*, 2013). Trong phạm vi nghiên cứu này, chúng tôi đánh giá khả năng gây độc trên ấu trùng tôm của các cao chiết dung môi khác nhau từ cây Ngải cứu nhằm cung cấp thêm bằng chứng khoa học cho loài cây này.

2. Phương pháp nghiên cứu

2.1. Chuẩn bị mẫu

Phần trên mặt đất của cây Ngải cứu được thu hái và định danh bởi Dược sĩ Đặng Văn Mỹ, An Giang. Dược liệu được rửa sạch và được phơi khô hoàn toàn, sau đó được nghiền thành bột. Dịch chiết thô được thu nhận sau khi ngâm dầm với methanol. Dịch chiết thô sau đó được chiết phân đoạn theo độ phân cực dung môi tăng dần, lần lượt trong các dung môi n-hexane, chloroform, ethyl acetate, và nước. Các dung dịch gốc chiết xuất phân đoạn sau đó được hòa tan trong DMSO.

2.2. Thử nghiệm gây độc trên ấu trùng tôm

Thử nghiệm này được thực hiện bằng cách sử dụng ấu trùng ấp nở từ *Artemia salina*. Trứng *Artemia* được ấp trong dung dịch NaCl 1% (khối lượng/thể tích) trong điều kiện sục khí oxy liên tục cho đến khi trứng nở. Ấu trùng sau đó được phân phối với mật độ 30 con trong mỗi cốc có chứa vừa đủ 20mL dung dịch NaCl 1%. Ấu trùng tôm được nuôi cùng các cao chiết ở các nồng độ khác nhau trong khoảng 5 và 24 giờ. Sau thời gian thí nghiệm, ấu trùng còn di chuyển được thì được phân loại là còn sống và tỷ

lệ được tính toán so với nhóm đối chứng. Hàm hồi quy phi tuyến tính được sử dụng (LC50) để xác định giá trị nồng độ gây chết 50% ấu trùng tôm trong các thử nghiệm.

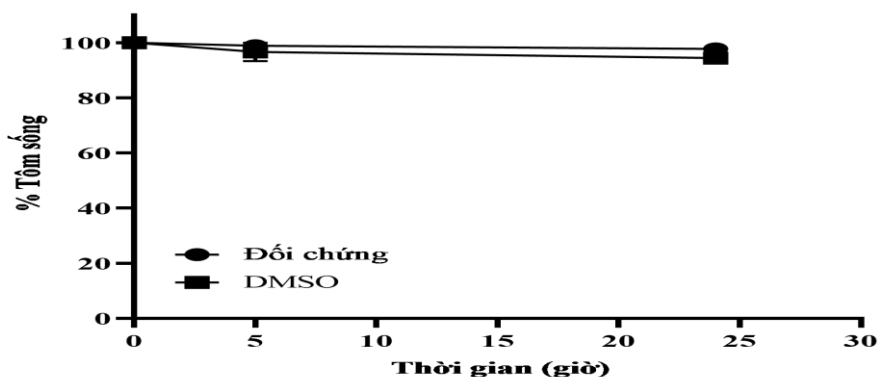
2.3. Data analysis

Các thí nghiệm đã được tiến hành ít nhất ba lần. Phần mềm Graphpad prism phiên bản 9.0.0 được sử dụng để phân tích. Sự khác biệt đáng kể được mô tả bằng giá trị p nhỏ hơn 0,03 (*); 0,002 (**); 0,0002 (***) và 0,0001 (****). Dữ liệu được trình bày dưới dạng trung bình $\pm$ sai số chuẩn của giá trị trung bình.

3. Kết quả và thảo luận

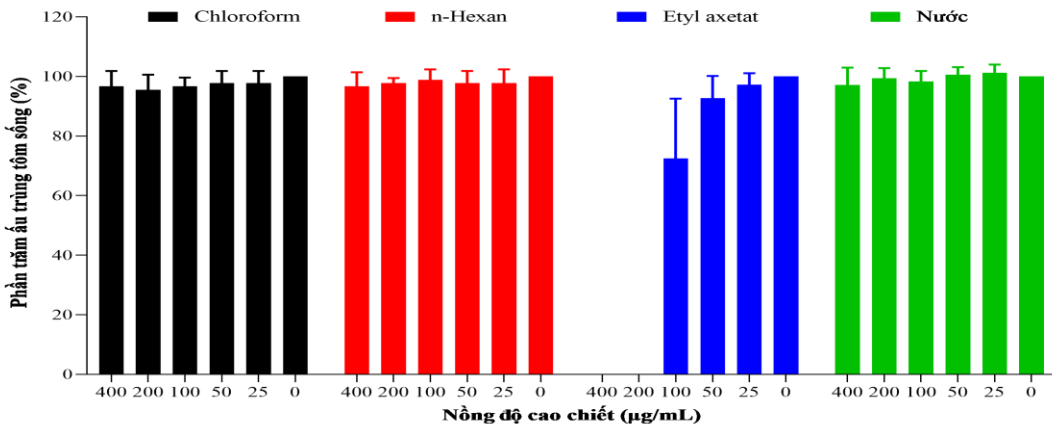
3.1. Solvent toxicity test

Thử nghiệm độc tính trên ấu trùng tôm *Artemia* nuôi trong điều kiện nước muối sinh lý là một phương pháp sàng lọc sơ cấp đơn giản dùng để đánh giá sơ bộ hoạt tính sinh học của hoạt chất được Michael mô tả vào năm 1959 (Michael và nnk., 1956). Nhiều hợp chất đã được phát hiện dựa trên kết quả của thử nghiệm này về tác dụng sinh học của chúng, bao gồm các đặc tính chống ung thư và kháng khuẩn (José Luis Carballo và nnk., 2002; Nguta và nnk., 2011; Urmi và nnk., 2013; Zhao và nnk., 1992). Dung môi thường được sử dụng trong nghiên cứu để hòa tan các hợp chất và vận chuyển thuốc (Maes và nnk., 2012); tuy nhiên, trong một số trường hợp, việc sử dụng dung môi không thích hợp tác động đến sự sống của sinh vật thử nghiệm và dẫn đến sai lệch kết quả (Kelava và nnk., 2011). Trong thí nghiệm này, chúng tôi đánh giá độc tính của dung môi DMSO trên ấu trùng tôm ở 2 thời điểm thí nghiệm là sau năm và hai mươi bốn giờ. DMSO là dung môi lưỡng cực có khả năng hòa tan được các loại dung môi, ở các nghiên cứu trước đây DMSO được xác định là một dung môi an toàn để tiến hành các thí nghiệm, và các giá trị liều gây chết trung bình của nó ở liều lượng cao đã được ghi lại một cách tỉ mỉ (Kelava và nnk., 2011; Wu, 2014). Để so sánh độc tính của DMSO trên ấu trùng tôm, ANOVA một chiều đã được sử dụng. Kết quả phân tích cho thấy sự khác biệt giữa ba nhóm không có ý nghĩa thống kê; $F(2) = 1,53$, $p = 0,22$. Các kết quả chỉ ra rằng DMSO không có ảnh hưởng gì đến khả năng sống (di chuyển) của Nauplius.

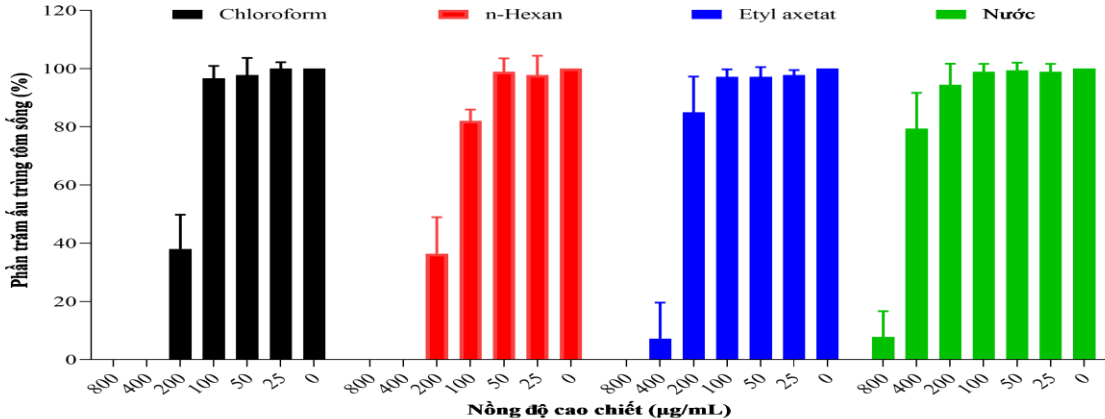


Hình 1. Tác động của dung môi DMSO lên sự sống của ấu trùng tôm

Hai mốc thời gian phơi nhiễm 5 giờ và 24 giờ được sử dụng để kiểm tra ảnh hưởng của các cao chiết xuất đối với khả năng sống của tôm. Kết quả sau 5 giờ xử lý cho thấy ngoại trừ cao etyl axetat, các cao khác gần như không có tác động nhiều đến sự sống của ấu trùng tôm (Hình 2). LC50 của cao etyl axetat được xác định là $112,90 \pm 11,40 \mu\text{g/mL}$. Tuy nhiên, sau 24 giờ phơi nhiễm, tỷ lệ ấu trùng chết tăng dần khi tăng nồng độ của chất chiết xuất (Hình 3). Cloroform; n-hexan; etyl axetat; và các phần nước có giá trị LC50 là $184,60 \pm 7,40$; $164,50 \pm 9,10$; $264,80 \pm 19,20$ và $511,30 \pm 31,10$ tương ứng.



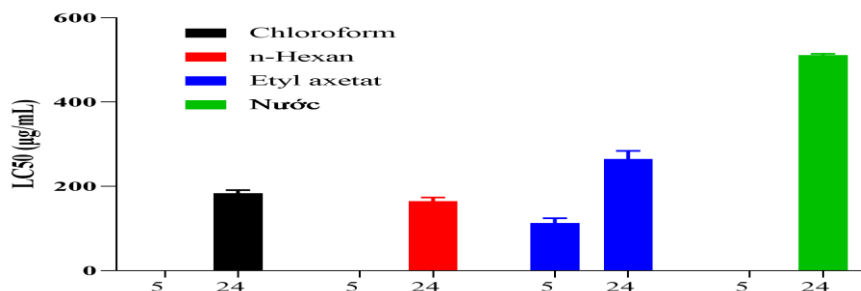
Hình 2. Tác động của các loại cao chiết trên sự sống ấu trùng tôm sau 5 giờ đồng xử lý



Hình 3. Tác động của các loại cao chiết trên sự sống ấu trùng tôm sau 24 giờ đồng xử lý

Nghiên cứu trước đây về độc tính của tảo hai roi độc đối với hành vi và sức sống của ấu trùng tôm đã quan sát thấy hiệu ứng đầu tiên sau khoảng nửa giờ đến một giờ tiếp xúc, với tác động đầy đủ biểu hiện sau bốn giờ xử lý (Neves và nnk., 2017). Nauplius có thể tồn tại mà không cần thức ăn trong 48 giờ, và tỷ lệ tử vong có xu hướng tăng sau đó, mặc dù chất chiết xuất không có tác dụng trong 48 giờ đầu tiên tiếp xúc (Jose Luis Carballo và nnk., 2002; Otang, 2013). Kết quả thí nghiệm cho thấy sau 5 giờ tiếp xúc, tác dụng của các chiết xuất phân đoạn chưa rõ rệt nên không thể kết luận. Trong khi đó, sau 24 giờ xử lý, tác dụng gây chết ấu trùng tôm bởi tác động của các cao chiết đã được ghi nhận (hình 3, 4). Các phương pháp xử lý được coi là có ý nghĩa khi

giá trị LC₅₀ đối với dịch chiết tổng nhỏ hơn 250µg/mL và đối với các tinh chất phân lập là nhỏ hơn 40µg/mL (Jose Luis Carballo và *nnk.*, 2002; Rieser và *nnk.*, 1996). Các phân đoạn chloroform và n-hexan cho thấy có nhiều hoạt tính sinh học tiềm năng do giá trị LC₅₀ thấp hơn 250µg/mL.



Hình 4. Giá trị LC₅₀ của các loại cao chiết trên sự sống ấu trùng tôm sau 24 giờ đồng xử lý

Các nghiên cứu trước đã chứng minh rằng chiết xuất chloroform của Ngải cứu có tác dụng chống co thắt khí quản và ruột non gây ra bởi 5-hydroxytryptamine, methacholine, histamine và phenylethylamine (Natividad và *nnk.*, 2011). Sự cân bằng của áp suất tâm thu và tâm trương ở chuột được duy trì bằng chiết xuất chloroform từ cây Ngải cứu để đáp ứng với kích thích của norepinephrine (Tigno và *nnk.*, 2000). Yomogin và 1,2,3,4-diepoxy-11 (13) -eudesmen-12,8-olide được phân lập từ phân đoạn chloroform của Ngải cứu (Natividad và *nnk.*, 2011). Trong phân đoạn n-hexan của Ngải cứu có 95 thành phần hóa thực vật đã được phát hiện, trong đó $0,18 \pm 0,01\%$ được xác định là Artemisinin, đã được đề xuất để điều trị sốt rét và thử nghiệm lâm sàng chống ung thư (Numonov và *nnk.*, 2019; Xu và *nnk.*, 2020). Ngoài ra, Artemisinin và chất chuyển hóa của nó, dihydroartemisinin, đã được sử dụng trong y học trong một thời gian dài và đã chữa khỏi bệnh sốt rét cho hàng triệu người kể từ khi phát hiện ra bởi Tu YouYou, người đã được trao giải Nobel Sinh lý học hoặc Y học năm 2015 cho công trình này (Tu, 2016). Kết quả của nghiên cứu này đã chứng minh rằng chiết xuất phân đoạn chloroform và n-hexan của Ngải cứu trồng ở Việt Nam có các hoạt tính sinh học đáng chú ý.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] Abad, M., Bedoya, L., Apaza Ticona, L., & Bermejo, P. (2012). The Artemisia L. Genus: A Review of Bioactive Essential Oils. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 17, 2542-2566. DOI: 10.3390/molecules17032542.
- [2] Barney, J., & DiTommaso, A. (2003). The biology of Canadian weeds. 118. *Artemisia vulgaris* L. *Canadian journal of plant science*, 83(1), 205-215.
- [3] Carballo, J. L., Hernández-Inda, Z. L., Pérez, P., & García-Grávalos, M. D. (2002). A comparison between two brine shrimp assays to detect in vitro cytotoxicity in marine natural products. *BMC Biotechnology*, 2(1), 17. DOI: 10.1186/1472-6750-2-17
- [4] Carballo, J. L., Hernández-Inda, Z., Pérez, P., & García-Grávalos, M. (2002). A comparison between two brine shrimp assays to detect in vitro cytotoxicity in marine natural products. *BMC biotechnology*, 2, 17. DOI: 10.1186/1472-6750-2-17.

- [5] Colvin, D. (2018). A Review on Comparison of the Extraction Methods Used in Licorice Root: Their Principle, Strength and Limitation. *Medicinal & Aromatic Plants*, 07. DOI: 10.4172/2167-0412.1000323.
- [6] Djordjevic, S. (2017). *From Medicinal Plant Raw Material to Herbal Remedies*.
- [7] Ekiert, H., Pajor, J., Klin, P., Rzepiela, A., Ślesak, H., & Szopa, A. (2020). Significance of *Artemisia vulgaris* L.(Common Mugwort) in the History of Medicine and Its Possible Contemporary Applications Substantiated by Phytochemical and Pharmacological Studies. *Molecules*, 25(19), 4415.
- [8] Ellen, R. (2006). *Ethnobiology and the science of humankind - Introduction*. *Journal of the Royal Anthropological Institute*, S1-S22.
- [9] Han, G.-S., & Ballis, H. (2007). Ethnomedicine and dominant medicine in multicultural Australia: a critical realist reflection on the case of Korean-Australian immigrants in Sydney. *Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine*, 3(1), 1. DOI: 10.1186/1746-4269-3-1.
- [10] Kelava, T., ČAVAR, I., & ČULO, F. J. P. b. (2011). *Biological actions of drug solvents*. 113(3), 311-320.
- [11] Lee, J. K. (2011). Anti-inflammatory effects of eriodictyol in lipopolysaccharide-stimulated raw 264.7 murine macrophages. *Arch Pharm Res*, 34(4), 671-679. DOI: 10.1007/s12272-011-0418-3
- [12] Li, C.-z., Jin, H.-h., Sun, H.-x., Zhang, Z.-z., Zheng, J.-x., Li, S.-h., & Han, S.-h. (2016). Eriodictyol attenuates cisplatin-induced kidney injury by inhibiting oxidative stress and inflammation. *European journal of pharmacology*, 772, 124-130. DOI: 10.1016/j.ejphar.2015.12.042
- [13] Maes, J., Verlooy, L., Buenafe, O. E., de Witte, P. A. M., Esguerra, C. V., & Crawford, A. D. (2012). Evaluation of 14 Organic Solvents and Carriers for Screening Applications in Zebrafish Embryos and Larvae. *PLOS ONE*, 7(10), e43850. DOI: 10.1371/journal.pone.0043850
- [14] Michael, A. S., Thompson, C. G., & Abramovitz, M. (1956). *Artemia salina* as a Test Organism for Bioassay. *Science*, 123(3194), 464. DOI: 10.1126/science.123.3194.464
- [15] Natividad, G. M., Broadley, K. J., Kariuki, B., Kidd, E. J., Ford, W. R., & Simons, C. (2011). Actions of *Artemisia vulgaris* extracts and isolated sesquiterpene lactones against receptors mediating contraction of guinea pig ileum and trachea. *J Ethnopharmacol*, 137(1), 808-816. DOI: 10.1016/j.jep.2011.06.042
- [16] Neves, R. A. F., Fernandes, T., Santos, L. N. D., & Nascimento, S. M. (2017). Toxicity of benthic dinoflagellates on grazing, behavior and survival of the brine shrimp *Artemia salina*. *PloS one*, 12(4), e0175168-e0175168. DOI: 10.1371/journal.pone.0175168
- [17] Nguta, J., Mbaria, J., Gakuya, D., Gathumbi, P., Kabasa, J., & Kiama, S. (2011). Biological screening of Kenya medicinal plants using *Artemia salina* L. (Artemiidae). *Pharmacologyonline*, 2, 458-478.
- [18] Numonov, S., Sharopov, F., Salimov, A., Sukhrobov, P., Atolikshoeva, S., Safarzoda, R., . Aisa, H. A. (2019). *Assessment of Artemisinin Contents in Selected Artemisia Species from Tajikistan (Central Asia)*. 6(1), 23.
- [19] Okogun, J. I. (2002). Chapter 12 - Drug discovery through ethnobotany in Nigeria: some results. In M. M. Iwu & J. C. Wootton (Eds.), *Advances in Phytomedicine* (Vol. 1, 145-154): Elsevier.

- [20] Otang, M. (2013). Assessment of potential toxicity of three South African medicinal plants using the brine shrimp (*Artemia salina*) assay. *African Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 7, 1272-1279. DOI: 10.5897/AJPP12.264
- [21] Ozioma, E.-O., & Okaka, A. (2019). *Herbal Medicines in African Traditional Medicine*.
- [22] Pan, S.-Y., Zhou, S.-F., Gao, S.-H., Yu, Z.-L., Zhang, S.-F., Tang, M.-K., . . . Ko, K.-M. (2013). New Perspectives on How to Discover Drugs from Herbal Medicines: CAM's Outstanding Contribution to Modern Therapeutics. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 627375. DOI: 10.1155/2013/627375
- [23] Phung, N. T. K. (2007). *Phương pháp cô lập hợp chất hữu cơ*. NXB Đại học Quốc gia Thành phố Hồ Chí Minh.
- [24] Rieser, M. J., Gu, Z. M., Fang, X. P., Zeng, L., Wood, K. V., & McLaughlin, J. L. (1996). Five novel mono-tetrahydrofuran ring acetogenins from the seeds of *Annona muricata*. *J Nat Prod*, 59(2), 100-108. DOI: 10.1021/np960037q
- [25] Rydén, A., & Kayser III, O. (2007). *Bioactive Heterocycles III*. Springer.
- [26] Salmerón-Manzano, E., Garrido-Cárdenas, J., & Manzano-Agugliaro, F. (2020). Worldwide Research Trends on Medicinal Plants. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 17, 3376. DOI: 10.3390/ijerph17103376
- [27] Sanz, M., Vilatersana, R., Hidalgo, O., Garcia-Jacas, N., Susanna, A., Schneeweiss, G. M., & Vallès, J. J. T. (2008). *Molecular phylogeny and evolution of floral characters of Artemisia and allies (Anthemideae, Asteraceae): evidence from nrDNA ETS and ITS sequences*. 57(1), 66-78.
- [28] Tigno, X. T., de Guzman, F., & Flora, A. M. (2000). Phytochemical analysis and hemodynamic actions of *Artemisia vulgaris* L. *Clin Hemorheol Microcirc*, 23(2-4), 167-175.
- [29] Tsimogiannis, D. I., & Oreopoulou, V. (2004). Free radical scavenging and antioxidant activity of 5,7,3',4'-hydroxy-substituted flavonoids. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 5(4), 523-528. DOI: 10.1016/j.ifset.2004.05.006
- [30] Tu, Y. (2016). Artemisinin-A Gift from Traditional Chinese Medicine to the World (Nobel Lecture). *Angew Chem Int Ed Engl*, 55(35), 10210-10226. DOI: 10.1002/anie.201601967
- [31] Urmi, K. F., Mostafa, S., Begum, G., & Hamid, K. (2013). Comparative Brine Shrimp Lethality Bioassay of Different Plant Parts of *Bauhinia Purpurea* L. *Journal of Pharmaceutical Science and Research*, 5.
- [32] USDA, N. (2021). *The PLANTS Database*. <http://plants.usda.gov>
- [33] Vallès, J., & McArthur, E. (2001). *Artemisia Systematics and Phylogeny: Cytogenetic and Molecular Insights*. *USDA Forest Service Proceedings RMRS-P-21*.
- [34] Wu, C. (2014). An important player in brine shrimp lethality bioassay: The solvent. *Journal of advanced pharmaceutical technology & research*, 5(1), 57-58.
- [35] Xu, C., Zhang, H., Mu, L., & Yang, X. (2020). Artemisinins as Anticancer Drugs: Novel Therapeutic Approaches, Molecular Mechanisms, and Clinical Trials. 11(1608). DOI: 10.3389/fphar.2020.529881
- [36] Yuan, H., Ma, Q., Ye, L., & Piao, G. (2016). The Traditional Medicine and Modern Medicine from Natural Products. *Molecules*, 21(5). DOI: 10.3390/molecules21050559
- [37] Zhao, G., Hui, Y., Rupprecht, J. K., McLaughlin, J. L., & Wood, K. V. (1992). Additional bioactive compounds and trilobacin, a novel highly cytotoxic acetogenin, from the bark of *Asimina triloba*. *J Nat Prod*, 55(3), 347-356. DOI: 10.1021/np50081a011