

XÁC ĐỊNH ĐỘC TÍNH CỦA VITAMIN C DO VIỆN HÓA HỌC CÔNG NGHIỆP VIỆT NAM TỔNG HỢP

*Bạch Thị Tâm**; *Vũ Thị Thu Hà***; *Phạm Minh Tú***
*Trần Bình Trọng***; *Nguyễn Thị Tuyết Mai***

TÓM TẮT

Nghiên cứu xác định độc tính cấp (LD_{50}) và độc tính bán trường diễn của vitamin C do Viện Hóa học Công nghiệp Việt Nam tổng hợp, kết quả cho thấy: (1) LD_{50} của vitamin C theo đường uống trên chuột nhắt trắng 12.700 ± 370 mg/kg/thể trọng (liều cao gấp khoảng 590 lần so với liều dùng thông thường trên người); (2) khi cho thử thí nghiệm uống liên tục trong 42 ngày với liều 300 mg và 600 mg/kg thể trọng mỗi ngày, vitamin C không ảnh hưởng đến sự phát triển trọng lượng cơ thể và điện tim của thỏ; không làm thay đổi các chỉ số huyết học; không làm thay đổi nồng độ ure và creatinin máu, hoạt độ ALT và AST máu thỏ; không làm thay đổi cấu trúc mô gan, thận, lách của thỏ thí nghiệm. Như vậy, vitamin C do Viện Hóa học Công nghiệp Việt Nam tổng hợp có độc tính rất thấp và độ an toàn cao.

* Từ khóa: Vitamin C; Độc tính cấp; Độc tính bán trường diễn.

ACUTE AND SUBACUTE TOXICITIES OF VITAMIN C MANUFACTURED BY VIETNAM INSTITUTE OF INDUSTRIAL CHEMISTRY

SUMMARY

This study aimed to determine the acute and subacute toxicities of vitamin C on mice and rabbits. The results showed that: (1) In acute toxicity study, the oral LD_{50} dose for vitamin C was 12.700 ± 370 mg/kg in mice (approximately 590 times as many as usual dose on human); (2) In subacute toxicity study, the daily oral vitamin C at the doses of 300 mg and 600 mg/kg/body weight per day was given to rabbits for 42 days. No significant changes were found in animal weights, electrocardiogram, haematological parameters, liver parameters (AST and ALT) and renal parameters (urea and creatinine). No pathological changes were observed in the rabbit's liver, kidneys and spleen. Our data suggest that oral vitamin C manufactured by Vietnam Institute of Industrial Chemistry has low toxicity and high safety.

* Key words: Vitamin C; Acute toxicity; Subacute toxicity.

* Học viện Quân y

** Viện Hóa học Công nghiệp Việt Nam

Phản biện khoa học: GS. TS. Nguyễn Liêm

PGS. TS. Nguyễn Văn

Minh

ĐẶT VẤN ĐỀ

Vitamin C rất cần thiết cho hoạt động sống của cơ thể người và động vật. Hiện nay, phần lớn nguyên liệu để sản xuất vitamin C đều phải nhập ngoại. Để chủ động nguồn vitamin C trong nước cho việc sản xuất thuốc, Viện Hóa học Công nghiệp Việt Nam đã tiến hành nghiên cứu tổng hợp vitamin C với quy mô công nghiệp. Việc xác định độc tính của sản phẩm trên động vật thí nghiệm là một khâu quan trọng trong quy trình nghiên cứu. Đề tài này được thực hiện nhằm: *Xác định LD₅₀ trên chuột nhắt trắng theo đường uống và xác định độc tính bán trường diễn của vitamin C được tổng hợp tại Viện Hóa học Công nghiệp Việt Nam trên thử nghiệm.*

ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU**1. Nguyên vật liệu, thiết bị và đối tượng nghiên cứu.**

* *Nguyên vật liệu:*

- Vitamin C do Viện Hóa học Công nghiệp Việt Nam tổng hợp, đạt tiêu chuẩn cơ sở.

* *Thiết bị:*

- Máy xét nghiệm hóa sinh, máy xét nghiệm huyết học và bộ tiểu phẫu.

* *Động vật thí nghiệm:*

90 chuột nhắt trắng dòng Swiss trưởng thành, trọng lượng 20 ± 2 gr.

24 thử trường thành, khỏe mạnh, trọng lượng $2,0 \pm 0,2$ kg.

Các động vật đạt tiêu chuẩn thí nghiệm do Ban Chăn nuôi, Học viện Quân y cung cấp và được nuôi dưỡng trong điều kiện phòng thí nghiệm.

* *Thời gian, địa điểm nghiên cứu:* từ tháng 4 đến tháng 7 - 2011 tại Trung tâm Nghiên cứu Sinh-Y-Dược học Quân sự, Học viện Quân y và Khoa Giải phẫu bệnh, Bệnh viện 103.

2. Phương pháp nghiên cứu.

* *Xác định độc tính cấp của vitamin C theo đường uống:*

Theo phương pháp của Abrham W.B, Turner A và quy định của Bộ Y tế Việt Nam và Tổ chức Y tế Thế giới về nghiên cứu độc tính của thuốc [3, 4, 1, 5]. Tiến hành thí nghiệm trên chuột nhắt trắng. Chia chuột ngẫu nhiên làm 09 nhóm, 10 con/nhóm. Cho từng nhóm chuột uống vitamin C đã pha loãng với các mức liều tương đương 9.000 mg, 10.000 mg, 11.000 mg, 12.000 mg, 13.000 mg, 14.000 mg, 15.000 mg, 16.000 mg và 17.000 mg vitamin C/kg/thể trọng. Sau khi uống vitamin C, chuột được nuôi dưỡng và theo dõi liên tục trong 72 giờ. Đánh giá sự thay đổi tập tính và tỷ lệ chuột chết theo từng nhóm thí nghiệm (liều cao nhất không gây chết chuột và liều thấp nhất gây chết toàn bộ chuột để tính LD₅₀).

* *Nghiên cứu độc tính bán trường diễn:*

Theo phương pháp Abrham W.B [3], quy định của Tổ chức Y tế Thế giới và Bộ Y tế về hiệu lực và an toàn của thuốc y học cổ truyền [1, 5].

- Thiết kế thí nghiệm: chia thử ngẫu nhiên thành 3 nhóm, mỗi nhóm 8 con. Nhóm 1 (nhóm chứng): uống liên tục trong 42 ngày nước cất liều 5 ml/kg thể trọng/24 giờ. Nhóm 2: uống liên tục trong 42 ngày vitamin C với mức liều (1) tương đương 300 mg/kg thể trọng/24 giờ. Nhóm 3: uống vitamin C liên tục trong 42 ngày với mức liều (2) tương đương 600 mg/kg thể trọng/24 giờ.

- Các chỉ tiêu: sinh lý - dược lý (tình trạng chung, hoạt động, ăn uống, trọng lượng cơ thể, điện tim); huyết học (số lượng hồng cầu, hemoglobin, bạch cầu và tiểu cầu); hóa sinh (aspartate amino transferase [AST]; alanin amino transferase [ALT], ure và creatinin);

mô bệnh học (gan, lách và thận thỏ). Vào ngày thứ 42, giết thỏ, lấy bệnh phẩm làm tiêu bản.

- Thời điểm xét nghiệm: trước khi uống vitamin C (T_0), sau 3 tuần (T_3) và sau 6 tuần (T_6) uống vitamin C.

KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU VÀ BÀN LUẬN

1. Kết quả xác định LD_{50} .

Bảng 1: Số chuột nhắt trắng chết trong 72 giờ sau uống vitamin C với mức liều khác nhau.

LÔ NGHIÊN CỨU	n	LIỀU (mg/kg/24 giờ)	SỐ CHUỘT CHẾT	SỐ CHUỘT SỐNG
Lô 1	10	9.000	0	10
Lô 2	10	10.000	2	8
Lô 3	10	11.000	3	7
Lô 4	10	12.000	4	6
Lô 5	10	13.000	5	5
Lô 6	10	14.000	7	3
Lô 7	10	15.000	8	2
Lô 8	10	16.000	9	1
Lô 9	10	17.000	10	0

Tính LD_{50} theo công thức cải tiến của Livschitz, cho kết quả $LD_{50} = 12.700 \pm 370$ mg/kg/thể trọng. Đây là mức liều rất cao, gấp 590 lần so với liều dùng thông thường trên người nên Vitamin C có độc tính thấp [2, 3].

2. Kết quả xác định độc tính bán trường diễn.

- Thay đổi trọng lượng cơ thể và điện tim (đạo trình DII):

Trọng lượng cơ thể thỏ ở các lô nghiên cứu trong cùng một thời điểm xét nghiệm thay đổi không có ý nghĩa thống kê, nhưng

tăng có ý nghĩa thống kê ($p < 0,05$) khi so sánh ở các thời điểm trước - sau trong cùng một lô nghiên cứu.

Kết quả về nghiên cứu về điện tim thỏ thực nghiệm: không có sự thay đổi rõ rệt về điện tim của thỏ thực nghiệm (cả chu kỳ và biên độ sóng QRS trên đạo trình chuẩn DII) giữa các nhóm nghiên cứu tại cùng một thời điểm và sau 3, 6 tuần uống vitamin C ($p > 0,05$). Không có sóng bất thường trên điện tim thỏ ở đạo trình DII.

- Ảnh hưởng của vitamin C đến một số chỉ tiêu huyết học của thỏ:

Bảng 2: Ảnh hưởng của vitamin C đến số lượng huyết cầu thô.

THỜI ĐIỂM XÉT NGHIỆM	LỖ CHỨNG (a) (n = 8)	VITAMIN C LIỀU 1 (b) (n = 8)	VITAMIN C LIỀU 2 (c) (n = 8)	p
Số lượng hồng cầu ($\times 10^{12}/l$, $\bar{X} \pm SD$)				
T ₀	4,75 ± 0,40	4,76 ± 0,40	4,92 ± 0,38	p _{a/b/c} > 0,05
T ₃	4,96 ± 0,30	5,02 ± 0,44	5,09 ± 0,55	p _{a/b/c} > 0,05
T ₆	4,77 ± 0,40	4,69 ± 0,23	4,84 ± 0,45	p _{a/b/c} > 0,05
p	p _{0/3/6} > 0,05	p _{0/3/6} > 0,05	p _{0/3/6} > 0,05	-
Số lượng bạch cầu ($\times 10^9/l$, $\bar{X} \pm SD$)				
T ₀	6,50 ± 1,59	6,76 ± 0,71	6,69 ± 1,37	p _{a/b/c} > 0,05
T ₃	7,33 ± 1,80	7,49 ± 1,39	7,18 ± 2,81	p _{a/b/c} > 0,05
T ₆	7,41 ± 1,62	7,56 ± 1,87	7,54 ± 2,16	p _{a/b/c} > 0,05
p	p _{0/3/6} > 0,05	p _{0/3/6} > 0,05	p _{0/3/6} > 0,05	-
Số lượng tiểu cầu ($\times 10^9/l$, $\bar{X} \pm SD$)				
T ₀	488,50 ± 59,87	486,20 ± 25,91	474,63 ± 107,51	p _{a/b/c} > 0,05
T ₃	477,50 ± 84,70	467,88 ± 73,69	460,25 ± 62,41	p _{a/b/c} > 0,05
T ₆	450,38 ± 51,60	443,50 ± 27,09	447,50 ± 41,14	p _{a/b/c} > 0,05
p	p _{0/3/6} > 0,05	p _{0/3/6} > 0,05	p _{0/3/6} > 0,05	-

(T₀: xuất phát điểm, T₃: sau 3 tuần, T₆: sau 6 tuần)

So với lô chứng, số lượng hồng cầu, bạch cầu và tiểu cầu máu thô ở các lô uống vitamin C ở cùng một thời điểm xét nghiệm thay đổi không có ý nghĩa thống kê. Số lượng hồng cầu, bạch cầu và tiểu cầu trong cùng một lô thử nghiệm cứu ở các thời điểm sau so với thời điểm trước cũng không có sự khác biệt (p > 0,05).

Bảng 3: Ảnh hưởng của vitamin C đến hàm lượng huyết sắc tố (n = 8).

THỜI ĐIỂM XÉT NGHIỆM	HÀM LƯỢNG HUYẾT SẮC TỐ (g/dl)			p
	Lô chứng (a) (n = 8)	Vitamin C liều 1 (b) (n = 8)	Vitamin C liều 2 (c) (n = 8)	
T ₀	9,96 ± 0,90	10,20 ± 0,77	10,18 ± 0,51	p _{a/b/c} > 0,05
T ₃	10,28 ± 0,63	10,36 ± 0,75	10,29 ± 0,75	p _{a/b/c} > 0,05
T ₆	9,93 ± 0,69	9,79 ± 0,36	9,76 ± 0,60	p _{a/b/c} > 0,05
p	p _{0/3/6} > 0,05	p _{0/3/6} > 0,05	p _{0/3/6} > 0,05	-

Hàm lượng huyết sắc tố của thô ở các lô nghiên cứu tại một thời điểm xét nghiệm không có sự khác biệt và cũng không có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê (p > 0,05) tại các thời điểm trước - sau trong cùng một lô nghiên cứu.

* Ảnh hưởng của vitamin C đến một số chỉ tiêu hóa sinh:

Bảng 4: Ảnh hưởng của vitamin C đến nồng độ ure và creatinin máu thỏ.

THỜI ĐIỂM XÉT NGHIỆM	LÔ CHỨNG (a) (n = 8)	VITAMIN C LIỀU 1 (b) (n = 8)	VITAMIN C LIỀU 2 (c) (n = 8)	p
Nồng độ ure máu thỏ (mmol/l, X ± SD)				
T ₀	2,71 ± 0,75	2,20 ± 0,49	2,93 ± 0,52	p _{a/b/c} > 0,05
T ₃	2,49 ± 0,22	2,81 ± 0,52	3,09 ± 0,31	p _{a/b/c} > 0,05
T ₆	2,53 ± 0,33	2,68 ± 0,45	3,10 ± 0,21	p _{a/b/c} > 0,05
p	p _{0/3/6} > 0,05	p _{0/3/6} > 0,05	p _{0/3/6} > 0,05	-
Nồng độ creatinin máu thỏ (μmol/l, X ± SD)				
T ₀	90,13 ± 16,42	89,00 ± 11,66	87,13 ± 15,46	p _{a/b/c} > 0,05
T ₃	106,88 ± 16,70	113,25 ± 18,12	108,63 ± 31,49	p _{a/b/c} > 0,05
T ₆	103,50 ± 6,74	110,88 ± 17,63	105,88 ± 17,02	p _{a/b/c} > 0,05
p	p _{0/3/6} > 0,05	p _{0/3/6} > 0,05	p _{0/3/6} > 0,05	-

So sánh giá trị nồng độ ure và creatinin máu thỏ của các lô thuốc thử so với lô chứng ở cùng một thời điểm xét nghiệm thấy sự thay đổi không có ý nghĩa thống kê. Nồng độ ure và creatinin máu thỏ ở các thời điểm xét nghiệm sau so với thời điểm xét nghiệm trước của cùng một lô nghiên cứu cũng không có sự khác biệt (p > 0,05).

Bảng 5: Ảnh hưởng của vitamin C đến hoạt độ AST và ALT máu thỏ.

THỜI ĐIỂM XÉT NGHIỆM	LÔ CHỨNG (a) (n = 8)	VITAMIN C LIỀU 1 (b) (n = 8)	VITAMIN C LIỀU 2 (c) (n = 8)	p
Hoạt độ enzym AST máu thỏ (UI, X ± SD)				
T ₀	35,75 ± 7,72	34,13 ± 11,24	35,38 ± 11,06	p _{a/b/c} > 0,05
T ₃	35,00 ± 8,91	37,13 ± 12,10	40,88 ± 11,63	p _{a/b/c} > 0,05
T ₆	37,50 ± 9,24	39,63 ± 14,24	40,00 ± 26,14	p _{a/b/c} > 0,05
p	P _{0/3/6} > 0,05	P _{0/3/6} > 0,05	P _{0/3/6} > 0,05	-
Hoạt độ enzym ALT máu thỏ (UI, X ± SD)				
T ₀	55,00 ± 8,45	57,88 ± 10,75	56,63 ± 19,25	p _{a/b/c} > 0,05
T ₃	58,38 ± 12,98	58,75 ± 16,35	59,38 ± 20,28	p _{a/b/c} > 0,05
T ₆	60,50 ± 19,53	61,88 ± 21,05	63,63 ± 27,68	p _{a/b/c} > 0,05
p	p _{0/3/6} > 0,05	p _{0/3/6} > 0,05	p _{0/3/6} > 0,05	-

So với lô chứng, hoạt độ AST và ALT của thỏ ở các lô uống vitamin C ở cùng một thời điểm xét nghiệm thay đổi không có ý nghĩa thống kê. Hoạt độ AST và ALT ở các thời điểm sau so với thời điểm trước khi thỏ uống thuốc trong cùng một lô nghiên cứu cũng không có sự khác biệt ($p > 0,05$).

Như vậy, vitamin C không ảnh hưởng đến nồng độ ure, nồng độ creatinin và hoạt độ AST, ALT máu của thỏ nghiên cứu. Kết quả này chứng tỏ với liều sử dụng bằng đường uống, vitamin C không gây độc cho gan và thận thỏ nghiên cứu.

- Ảnh hưởng của Vitamin C đến một số chỉ tiêu mô bệnh học của thỏ:

Quan sát trên đại thể cho thấy: màu sắc, hình thái của gan, lách và thận ở 2 lô dùng vitamin C không khác so với chứng.

Hình ảnh vi thể của gan thỏ ở các lô dùng vitamin C không khác biệt so với lô chứng và không thấy hình ảnh tổn thương: các thành phần trong khoảng cửa bình thường, không tăng sinh xơ. Trong tiểu thùy, tế bào gan có bào tương thuần nhất, sắp xếp trật tự và mao mạch nan hoa điển hình.

Các vùng của thận có cấu trúc điển hình và rõ ràng. Tiểu cầu thận có khoang Bowman rõ, không có xung huyết chum mạch Malpighi. Ống thận và mô kẽ có cấu trúc bình thường.

Cấu tạo vi thể của lách thỏ không có sự biến đổi. Cấu trúc các tiểu thể Malpighi điển hình; không có tăng sinh nang lympho. Dây Bilotz và xoang tĩnh mạch điển hình.

KẾT LUẬN

1. LD₅₀ của vitamin C do Viện Hóa học Công nghiệp Việt Nam tổng hợp theo đường uống trên chuột nhắt trắng là 12.700 ± 370 mg/kg/thể trọng. Đây là mức liều rất cao, gấp khoảng 590 lần so với liều dùng thông thường trên người, nên vitamin C có độc tính thấp.

2. Vitamin C có độ an toàn cao: khi cho thỏ uống liên tục trong 42 ngày với các liều 300 mg và 600 mg/kg/thể trọng, vitamin C không ảnh hưởng đến sự phát triển trọng lượng cơ thể và điện tim của thỏ, không làm thay đổi các chỉ số huyết học (hồng cầu, huyết sắc tố, tiểu cầu và bạch cầu). Nồng độ ure, creatinin, hoạt độ ALT và AST máu ở lô thử thuốc ở mức bình thường. Hình ảnh mô bệnh học của gan, thận, lách thỏ bình thường.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Bộ Y tế CHXHCN Việt Nam. Quy định về nghiên cứu dược lý các thuốc y học cổ truyền dân tộc. Quyết định 371/QĐ-BYT. 1996.
2. Đỗ Trung Đàm. Phương pháp xác định độc tính cấp của thuốc. NXB Y học. Hà Nội. 1996.
3. Abrham W.B. Techniques of animal and clinical toxicology. Med. Pub. Chicago. 1978, pp.55-68.
4. Turner A. Screening methods in pharmacology. Academic Press, New York and London. 1965, pp.60-68.
5. WHO. Research guidelines for evaluating the safety and efficacy of herbal medicines. Manila, Philipin. 1993, pp.35-41.