

NGHIÊN CỨU ĐỘC TÍNH CẤP (LD₅₀) CỦA CHẾ PHẨM VI NHŨ TƯƠNG CND TRÊN CHUỘT NHẮT TRẮNG (*Mus musculus var. albino*)

Lê Phúc Chiến^{1*}, Nguyễn Thị Thanh Tâm²,
Nguyễn Nguyên Bảo³, Trần Phi Hoàng³,
Hồ Thái Như Quỳnh³, Trần Cẩm Tú¹, Nguyễn Thị Như Quỳnh¹

¹Viện Sinh học Nhiệt đới, Viện Hàn lâm KH&CN Việt Nam

²Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, ĐHQG TP. HCM

³Trường Đại học Văn Lang

*Email: lephuchien@gmail.com

Ngày nhận bài: 30/12/2019; Ngày chấp nhận đăng: 02/3/2020

TÓM TẮT

Chế phẩm vi nhũ tương CND (chitosan - neem - dầu vỏ hạt điều) được kết hợp từ 3 sản phẩm vi nhũ tương bao gồm chitosan, dầu neem và dầu vỏ hạt điều. Đây là một trong những sản phẩm từ thiên nhiên, có khả năng chống lại côn trùng, vi sinh vật gây bệnh và được dùng như một sản phẩm bảo vệ thực vật có nguồn gốc sinh học. Độc tính cấp LD₅₀ của chế phẩm CND được xác định qua đường uống bằng phương pháp Litchfield - Wilcoxon trên chuột nhắt trắng *Mus musculus var. albino*. Thử nghiệm độc tính cấp trên chuột được chia ra thành 5 nhóm gồm: Dầu vỏ hạt điều, neem, chitosan, neem - chitosan và chitosan - neem - dầu vỏ hạt điều. Ở mỗi nhóm, chuột được xử lý với liều từ 2 g/kg/ngày, 5 g/kg/ngày, 15 g/kg/ngày và 30 g/kg thể trọng chuột/ngày trong 10 ngày thí nghiệm. Sau 10 ngày thí nghiệm chuột có hoạt động và ăn uống bình thường; đồng tử mắt chuột bình thường; không có biểu hiện của khó thở hay tím tái; lông mượt, chuột đi ngoài phân khô... Chế phẩm vi nhũ tương CND không gây độc tính cấp LD₅₀ cho chuột nhắt trắng.

Từ khóa: Chế phẩm sinh học CND, CND, độc tính cấp, LD₅₀, vi nhũ tương.

1. GIỚI THIỆU

Tổng quan kinh tế - xã hội Việt Nam năm 2018, tổng sản phẩm trong nước (GDP) quý IV năm 2018 ước tính tăng 7,31% so với cùng kỳ năm trước, trong đó khu vực nông, lâm nghiệp và thủy sản tăng 3,90%. Khu vực nông, lâm nghiệp và thủy sản đạt mức tăng trưởng cao nhất trong 7 năm qua, khẳng định chuyển đổi cơ cấu ngành đã phát huy hiệu quả (theo Tổng cục Thống kê năm 2018, ngày 28/12/2018). Nhưng với sự biến đổi khí hậu thất thường như hiện nay đã tạo điều kiện thuận lợi để các loài sâu, bệnh hại, phát triển, gây ảnh hưởng nghiêm trọng đến mùa màng như làm giảm năng suất cây trồng và ảnh hưởng đến đời sống của người dân. Do tình trạng đó, thuốc bảo vệ thực vật đã đóng vai trò quan trọng đối với sự phát triển nông nghiệp của nước ta. Thuốc bảo vệ thực vật là các sản phẩm giúp bảo vệ mùa màng khỏi sự tấn công của sâu bệnh, cỏ dại và bệnh tật. Các sản phẩm này cũng giúp chúng ta sử dụng tài nguyên thiên nhiên như đất nông nghiệp, nước và lao động một cách hiệu quả hơn. Tuy nhiên, việc lạm dụng thuốc bảo vệ thực vật đã gây ảnh hưởng đến chất lượng nông sản, hình thành các loại sâu kháng thuốc, làm ô nhiễm môi trường sống, mất cân bằng hệ sinh thái do dư lượng hóa chất tồn đọng trong môi trường và ảnh hưởng nghiêm trọng đến sức khỏe con

người. Vì vậy, thuốc bảo vệ thực vật có nguồn gốc sinh học ra đời và ngày càng được quan tâm chú trọng hơn do ưu điểm không chỉ ngăn tình trạng kháng thuốc của sâu bệnh hại mà quan trọng là giảm ô nhiễm môi trường tạo ra nông sản an toàn và ít độc hại đối với con người.

Trong nông nghiệp, chitosan được sử dụng như một chất xử lý hạt giống có nguồn gốc từ thiên nhiên và kích thích tăng trưởng cho cây trồng, chitosan cũng được sử dụng như một loại thuốc bảo vệ thực vật sinh học thân thiện với môi trường, tăng sức đề kháng để chống lại côn trùng, mầm bệnh và các bệnh truyền qua đất khi áp dụng trên lá hoặc đất. Chitosan làm tăng quang hợp, thúc đẩy và nâng cao tăng trưởng thực vật, kích thích sự hấp thu chất dinh dưỡng, làm tăng tỷ lệ nảy mầm và tăng sức sống cây trồng, phá hủy nang tuyến trùng mà không gây hại cho các sinh vật có lợi cho đất. Các ứng dụng nông nghiệp của chitosan có thể làm giảm căng thẳng môi trường do thiếu hụt dinh dưỡng và hạn hán, tăng cường sức sống hạt giống, nâng cao chất lượng cây, tăng năng suất, giảm sâu hại trên các loại rau và trái cây. Chitosan phòng trừ được các bệnh cây do các nhóm vi sinh vật như nấm, vi khuẩn, tuyến trùng và cả virút. Có thể coi chitosan như một loại vắc-xin thực vật [1].

Cây neem (hay còn gọi là cây xoan Ấn Độ) là một loại cây sống ở vùng nhiệt đới, được trồng nhiều ở Ấn Độ. Hiện nay, tỉnh Bình Thuận là vùng trồng loại cây này có hàm lượng hoạt chất rất cao. Dầu neem từ lâu đã được nghiên cứu sử dụng làm thuốc trừ sâu ở nhiều nước trên thế giới như Ấn Độ, Trung Quốc, Nhật Bản,... do có chứa nhiều hoạt chất có khả năng tiêu diệt sâu, bệnh hại như azadirachtin, salanin, nimbin,... Cũng như các loại thuốc thảo mộc khác, dầu neem có đặc tính phân hủy sinh học cao, không tồn đọng trong môi trường tự nhiên, hầu như không độc cho người [2].

Dầu vỏ hạt điều có chứa các hợp chất phenol tự nhiên như acid anacardic, là hợp chất chiếm tỷ lệ cao nhất trong dầu vỏ hạt điều có khả năng chống lại vi sinh vật gây hại với đặc tính phân hủy sinh học cao và không bền vững trong môi trường nên cũng được ứng dụng trong phòng trừ sâu bệnh hại. Hiệu lực của dầu vỏ hạt điều lên côn trùng trong phòng thí nghiệm và ở tự nhiên cũng ở mức độ nhất định [3].

Hiện nay, Viện Sinh học Nhiệt đới đã nghiên cứu chế phẩm vi nhũ tương CND (chitosan - neem - dầu vỏ hạt điều) để thử nghiệm hiệu lực diệt và xua đuổi một gao như *Sitophilus oryzae*, trên ấu trùng sâu khoang (*Spodoptera litura*) nhằm tạo ra chế phẩm phòng trừ một hại kho và trừ sâu có tính ưu việt hơn so với thuốc bảo vệ thực vật thông thường, không tồn đọng trong môi trường, giảm được lượng thuốc cần sử dụng thông qua các thử nghiệm trên các đối tượng côn trùng gây hại. Để có cơ sở khoa học chắc chắn về độ an toàn của chế phẩm CND nên nhóm tác giả tiến hành nghiên cứu này.

2. ĐỐI TƯỢNG, VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Đối tượng

Chuột nhắt trắng dòng *Mus musculus* var. *albino* 2-3 tháng tuổi, trọng lượng 25 ± 3 g/con, thu nhận từ Viện Kiểm nghiệm Thuốc TP. HCM, tổng cộng 220 con, được nuôi trong phòng nuôi động vật thí nghiệm 1 tuần trước khi nghiên cứu bằng thức ăn chuẩn dành cho động vật nghiên cứu, nước sạch uống tự do.

2.2. Địa điểm

Phòng Thí nghiệm Công nghệ Sinh học Động vật, Viện Sinh học Nhiệt đới - Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam.

2.3. Vật liệu - dụng cụ

Chế phẩm thử nghiệm: là hỗn hợp dung dịch vi nhũ tương được cung cấp bởi Viện Sinh học Nhiệt đới gồm 5 sản phẩm, các hỗn hợp này được pha thành các nồng độ khác nhau để nghiên cứu độc tính cấp, bao gồm:

- Dung dịch vi nhũ tương dầu vỏ hạt điều (DVHĐ)
- Dung dịch vi nhũ tương dầu neem
- Dung dịch vi nhũ tương chitosan
- Hỗn hợp vi nhũ tương chitosan - dầu neem
- Hỗn hợp vi nhũ tương CND chitosan - neem - dầu vỏ hạt điều

Thành phần các chất có trong chế phẩm vi nhũ tương CND: chitosan 1%, neem 35%, DVHĐ 12%, Tween 80 (13%), acid lactic 1%, nước cất...

Các dụng cụ khác:

- Bình nước Pet Water Bottle 125 mL
- Tấm lưới kim loại mạ kẽm, hộp nhựa chữ nhật Duy Tân
- Găng tay cao su y tế, khẩu trang y tế Perfetta
- Bơm tiêm sử dụng một lần Vinahankook 1 mL/cc, kim cong đầu tù
- Dụng cụ mổ chuột: dao Bistouri, kéo metzenbaum, cắt mô mềm, kẹp crile, bocal...

2.4. Phương pháp nghiên cứu

2.4.1. Thu nhận nguồn chuột

Chuột nhắt trắng *Mus musculus* var. *albino* 2-3 tháng tuổi, trọng lượng 25 ± 3 g/con được mua ở Viện kiểm nghiệm thuốc TP. HCM, ăn theo tiêu chuẩn động vật nghiên cứu, uống nước (đun sôi để nguội) tự do.

2.4.2. Thiết kế chuồng chuột

Dùng hộp nhựa sạch, sau đó cắt miếng lưới kim loại mạ kẽm theo hình chữ nhật lớn hơn miệng hộp 5 cm, bẻ lưới gấp lại bằng kích thước miệng hộp tạo thành nắp. Khoét một lỗ nhỏ ở trên lưới để đặt bình nước uống cho chuột. Dùng dây buộc xung quanh miệng để giữ cố định miếng lưới, đồng thời ngăn chuột không chạy ra ngoài.

Việc dùng lưới thay thế cho nắp nhựa của hộp để có nhiều không khí, giúp quá trình quan sát chuột dễ hơn đồng thời giúp thông thoáng mùi hôi từ chất thải của chuột.

Lót một lớp trấu ở phía dưới để trấu hút ẩm, giữ vệ sinh chuồng, khử mùi hôi thối, không ảnh hưởng đến môi trường xung quanh khu vực nuôi.

Sau khi hoàn thành việc lắp đặt chuồng đảm bảo tạo môi trường sống tốt nhất cho chuột. Nhóm nghiên cứu phân phối ngẫu nhiên mỗi chuồng 10 cá thể chuột.

2.4.3. Tiến hành khảo sát chế phẩm

Thí nghiệm được bố trí theo kiểu hoàn toàn ngẫu nhiên, mỗi nghiệm thức được phân các lô tương ứng, mỗi lô gồm 10 cá thể chuột ($n = 10$). Các lô nghiệm thức thí nghiệm lần lượt là:

- Nghiệm thức 1: đối chứng, chỉ dùng nước (đã đun sôi để nguội)
- Nghiệm thức 2: dung dịch vi nhũ tương dầu vỏ hạt điều (DVHĐ)
- Nghiệm thức 3: dung dịch vi nhũ tương dầu neem
- Nghiệm thức 4: dung dịch vi nhũ tương chitosan

- Nghiệm thức 5: hỗn hợp vi nhũ tương chitosan - dầu neem
- Nghiệm thức 6: hỗn hợp vi nhũ tương CND (chitosan - neem - DVHĐ)

Nghiên cứu độc tính cấp của thuốc thử trên chuột nhắt trắng bằng đường uống trong thí nghiệm này dựa theo phương pháp Litchfield-Wilcoxon, hướng dẫn của Tổ chức Y tế Thế giới và thông tư hướng dẫn về thử thuốc trên lâm sàng của Bộ Y tế [4, 5]. Việc chia thuốc bảo vệ thực vật thành nhiều nhóm độc, căn cứ vào trị số LD₅₀ (mg/kg), các nhóm độc được chia như sau:

Bảng 1. Phân loại thuốc bảo vệ thực vật theo mức độ độc dựa vào LD₅₀ qua đường uống theo WHO [4].

Độ độc tính	Phân nhóm độc	Qua đường miệng (mg/kg)		Qua da (mg/kg)	
		Thể rắn	Thể lỏng	Thể rắn	Thể lỏng
1	Độc rất nhẹ	> 2000	> 3000		
2	Độc nhẹ	500 - 2000	2000 - 3000	> 1000	> 4000
3	Độc trung bình	50 - 500	200 - 2000	100 - 1000	400 - 4000
4	Độc	5 - 50	20 - 200	10 - 100	40 - 400
5	Độc mạnh	5	20	10	40

Tổ chức Hợp tác và Phát triển Kinh tế (Organisation for Economic Cooperation and Development - OECD) đã thống nhất phân loại các hóa chất theo mức độ độc dựa vào việc xác định LD₅₀ gần đúng [4, 5].

Bảng 2. Phân loại hoá chất theo mức độ độc dựa vào LD₅₀ theo OECD [4]

Cấp độ độc	Mức độ độc	Liều LD ₅₀ gần đúng (mg/kg)
1	Cực kỳ độc	Từ 0 đến ≤ 5
2	Rất độc	> 5 đến ≤ 50
3	Độc	> 50 đến ≤ 300
4	Độc vừa	> 300 đến ≤ 2000
5	Độc thấp	> 2000 đến ≤ 5000
6	Gần như không độc	> 5000

Dựa vào Phương pháp xác định độc tính của thuốc của tác giả Đỗ Trung Đàm [4] và nghiên cứu của Harlita *et al.* [6] về độc tính cấp tính của chiết xuất vỏ hạt điều năm 2016 cho thấy, kết quả khả năng gây độc tính cấp tính (LD₅₀) của chiết xuất vỏ hạt điều là 2018 mg/kg nên nhóm nghiên cứu thăm dò ở liều 2 g/kg trên 2 con chuột thí nghiệm và 2 chuột đối chứng. Hơn thế nữa, nhóm nghiên cứu đã dựa vào phân loại hoá chất theo mức độ độc dựa vào LD₅₀ qua đường uống theo OECD chọn mức liều lượng LD₅₀ cao nhất là 5 g/kg để khảo sát. Tiếp theo đó là sử dụng các liều cao hơn là 15 g/kg và 30 g/kg để khảo sát cho tất cả 5 thí nghiệm như trên.

2.4.4. Cách cho chuột uống thuốc [4]

- Pha liều 5 g/kg thể trọng chuột (chuột có trọng lượng khoảng 25 g). Tam suất: $25 \text{ g} \times 5 \text{ g}/1000 \text{ g} = 0,125 \text{ g}$ mẫu. Cân 0,125 g chế phẩm pha trong 1,5 mL nước/chuột, nhân với số chuột cần uống. Tương tự cách tính cho các liều 15 g/kg, 30 g/kg...

- Bắt chuột ra khỏi chuồng bằng cách nắm đuôi chuột, nhẹ nhàng để chuột lên vỉ lưới, kéo nhẹ chuột về phía sau để chuột bám vào vỉ lưới.

- Một tay nắm đuôi chuột, ngón cái và ngón trỏ của tay còn lại nắm chặt phần da gáy và 2 lỗ tai chuột, đặt chuột nằm ngửa trong lòng bàn tay, 3 ngón còn lại nắm da lưng chuột và giữ thân chuột thẳng.

- Cho kim cong đầu tù vào mõm chuột, đẩy nhẹ từ từ và hơi ngả phần đầu tù nhẹ vào phía sau đầu chuột để đầu kim vào thực quản thẳng tới dạ dày. Tại đây, nước cất và chế phẩm được cho chuột uống vào lúc 8-10 giờ sáng, 0,5 mL/chuột/lần, 3 lần trong ngày.

Trước khi tiến hành thí nghiệm, cho chuột nhịn ăn 16 giờ, nước uống tự do. Sau 16 giờ, chia ngẫu nhiên chuột thành 6 lô, mỗi lô 10 con. Các lô thử được cho uống thuốc với thể tích 0,5 mL/10 g trọng lượng chuột/lần, 3 lần/24 giờ, mỗi lần cách nhau 3 giờ.

Theo dõi tình trạng chung của chuột và số lượng chuột chết ở mỗi lô trong vòng 72 giờ sau khi cho chuột uống thuốc lần cuối. Tiếp tục theo dõi chuột trong 7 ngày tiếp theo. Tìm liều cao nhất không gây chết chuột (0%), liều thấp nhất gây chết chuột hoàn toàn (100%) và liều trung gian.

Từ đó xây dựng đồ thị tuyến tính để xác định LD₅₀ của thuốc thử (nếu có). Sau đó, tiếp tục theo dõi tình trạng chung của chuột (hoạt động, ăn uống, bài tiết...) ở mỗi lô cho đến hết 10 ngày sau khi uống thuốc. Tiến hành mổ chuột, quan sát tình trạng các nội quan ngay sau khi có chuột chết (nếu có) để xác định nguyên nhân gây độc.

3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Sau 3 lần uống thuốc với lượng lớn, chuột có biểu hiện mệt mỏi nhẹ, giảm vận động và ăn uống. Sau liên tục 24 giờ, 72 giờ và 7 ngày tiếp theo, quan sát chuột ở cả các lô thí nghiệm cho thấy chuột trở lại hoạt động, vận động và ăn uống bình thường; đồng tử mắt chuột bình thường; không có biểu hiện của khó thở hay tím tái; lông mượt, chuột đi ngoài phân khô, một số chuột có đi ngoài phân lỏng, nhưng sau đó nhanh chóng trở lại bình thường.

Bảng 3. Kết quả đánh giá số chuột chết ở mỗi lô trong 10 ngày sau khi uống chế phẩm

Lô	Số chuột thí nghiệm	Thể tích cho uống	Số chuột sống/chết sau 72 giờ	Số chuột sống/chết sau 7 ngày tiếp
1	10	0,5 mL × 3 lần	10/0	10/0
2	10	0,5 mL × 3 lần	10/0	10/0
3	10	0,5 mL × 3 lần	10/0	10/0
4	10	0,5 mL × 3 lần	10/0	10/0
5	10	0,5 mL × 3 lần	10/0	10/0
6	10	0,5 mL × 3 lần	10/0	10/0

Các lô thí nghiệm ở chuột nhất trắng được uống thuốc thử với mức liều khác nhau, từ liều thấp nhất 2 g chế phẩm/kg thể trọng, đến liều 5 g/kg, 15 g/kg và cao nhất 30 g/kg thể trọng; Thể tích cho uống là 0,5 mL/10 g × 3 lần trong 24 giờ. Chuột đã uống đến liều 30 g/kg thể trọng là liều tối đa có thể dùng được bằng đường uống để đánh giá độc tính cấp của thuốc thử, nhưng không có chuột nào chết.

Theo dõi chuột trong 72 giờ, không thấy xuất hiện triệu chứng bất thường nào, không có chuột nào chết. Tiếp tục theo dõi chuột thêm 7 ngày sau uống thuốc, vẫn không thấy xuất hiện triệu chứng bất thường nào trên chuột, không có chuột nào chết.

Chưa tìm thấy LD₅₀ của chế phẩm theo đường uống trên chuột nhắt trắng. Với mức liều cao nhất có thể cho chuột uống trong 24 giờ là 30 g/kg thể trọng không xuất hiện độc tính cấp. Với chế phẩm có liều chết LD₅₀ gấp trên 6 lần mức gây độc của OECD (5000 mg/kg) được xem là an toàn (như Bảng 2) [4].

Kết quả không tìm thấy LD₅₀ cũng như không thấy biểu hiện của độc tính cấp khi cho chuột uống đến mức liều tối đa, cho thấy chế phẩm vi nhũ tương VND có tính an toàn cao trong thử nghiệm đánh giá độc tính cấp trên chuột.

Năm 2011, Carvalho *et al.* đã nghiên cứu độc tính cấp tính, bán cấp và tác dụng gây đột biến của axit anacardic từ hạt điều (*Anacardiummernidentale* Linn.) trên chuột cho kết quả rằng liều gây chết tối thiểu cấp tính của axit anacardic trên chuột BALB/c cao hơn 2000 mg/kg [7]. Năm 2016, độc tính cấp tính của chiết xuất vỏ hạt điều (*Anacardiummernidentale* L.) ở Albino Rat được nghiên cứu bởi Harlita *et al.* đã cho ra kết quả khả năng gây độc tính cấp tính (LD₅₀) của chiết xuất vỏ hạt điều là 2018 mg/kg [6]. Trong khi ở nghiên cứu này thí nghiệm chế phẩm vi nhũ tương DVHĐ là 30 g/kg, về mặt thành phần của chế phẩm khác với Harlita [6], nhưng gấp 6 lần so với chuẩn cho phép của Bộ Y tế và OECD (5000 mg/kg), và cuối cùng cũng không gây chết cho chuột. Do đó, không xác định được LD₅₀ từ chế phẩm DVHĐ và cả chế phẩm VND.

Các nghiên cứu về chitosan cho thấy, chitosan là chất có thể làm giảm cân với một liều lượng nhất định và phải sử dụng một thời gian mới thấy được tác dụng. Điển hình như nghiên cứu của Tanaka *et al.*, chuột cái BALB/c được cho ăn chế độ chitosan 5% (4,4 ± 0,7 g/ngày/con) trong 4 tuần, giảm trọng lượng cơ thể tương quan với giảm đáng kể tiêu thụ thức ăn và thay đổi trong hệ thực vật đường ruột bình thường [8]. Theo Vahouny *et al.*, không có sự khác biệt đáng kể về tăng cân đã được quan sát giữa những con chuột bạch tạng Charles River bị phơi nhiễm và kiểm soát trong một nghiên cứu kéo dài 4 tuần với chitosan 1% hoặc 5% [9]. Một nghiên cứu khác của Hirano (1996) đã báo cáo LD₅₀ bằng miệng đối với chitosan là 16 g/kg trọng lượng cơ thể ở chuột, kết quả gây chán ăn và giảm trọng lượng ở chuột [10]. Mặc khác nữa, các nghiên cứu về neem của Dương Anh Tuấn và cộng sự [11] đều cho rằng hoạt chất azadirachtin - là chất gây ngán ăn mạnh nhất từ hạt nhân neem, và tác giả Srivastava (2001) [12] cũng cho rằng azadirachtin nếu sử dụng liều cao nhất (1500 mg/kg) có thể được sử dụng làm liều cơ bản để xác định mức độ không ảnh hưởng của azadirachtin để tính biên độ an toàn của nó. Trong các thí nghiệm của nhóm nghiên cứu, dù đã thử ở liều tối đa 30 g/kg thể trọng chuột (gấp 6 lần so với chuẩn cho phép của Bộ Y tế và OECD (5000 mg/kg)), azadirachtin trong dầu neem nói riêng, chế phẩm chitosan, chitosan và azadirachtin trong chế phẩm VND nói chung đã minh chứng được tác động gây giảm trọng lượng cơ thể chuột và giảm tiêu thụ thức ăn ở chuột như các tác giả trên đã nói, nhưng quan trọng nhất là chế phẩm này hầu như không gây độc cho chuột, vẫn không gây chết chuột trong tất cả các thí nghiệm này. Chính vì thế, thí nghiệm không xác định được LD₅₀ ở các chế phẩm từ dầu neem, chitosan, DVHĐ... và cả sản phẩm cuối cùng của nhóm nghiên cứu là chế phẩm vi nhũ tương VND cũng không xác định được LD₅₀.

Qua các thí nghiệm trên cho thấy, chế phẩm vi nhũ tương VND không gây độc cho các lô chuột trong thí nghiệm. Chế phẩm vi nhũ tương phân loại hoá chất theo mức độ độc dựa vào LD₅₀ qua đường uống theo OECD được xếp vào độ độc cấp độ 6: liều lượng chế phẩm lớn hơn 5000 mg/kg là gần như không độc. Do đó, từ những thí nghiệm trên, nhóm nghiên cứu vẫn chưa xác định được độc tính cấp LD₅₀ của chế phẩm vi nhũ tương VND.

4. KẾT LUẬN

Với liều 30 g/kg cân nặng, không thấy có biểu hiện độc cấp tính của chế phẩm vi nhũ tương CND (chitosan - neem - dầu vỏ hạt điều) trên chuột nhắt trắng. Chưa xác định được LD₅₀ trên chuột nhắt trắng bằng đường uống theo phương pháp Litchfield - Wilcoxon.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Nguyễn Hồng Sơn, Dương Văn Hợp - Nghiên cứu khả năng ứng dụng chế phẩm chitosan oligomer phòng trừ bệnh hại trên một số cây trồng, Nông nghiệp và Phát triển Nông thôn **3-4** (2014) 25-32.
2. Lê Thị Diệp Phụng - Đánh giá tác động của chế phẩm viên nén từ nhân hạt neem (*Azadirachta indica* A. Juss) lên ngài gạo (*Corcyra cephalonica* St.), Luận văn Kỹ sư Trường Đại học Nông Lâm TP.HCM (2006).
3. Bùi Văn Ái, Nguyễn Thị Bích Ngọc - Nghiên cứu sử dụng dầu vỏ hạt điều tạo chế phẩm bảo quản lâm sản, Viện Khoa học Lâm nghiệp Việt Nam (2002).
4. Đỗ Trung Đàm - Phương pháp xác định độc tính của thuốc, NXB Y học, Hà Nội (2014).
5. Bộ Y tế - Quyết định số 141/QĐ-K2ĐT ngày 27/10/2015 về việc ban hành tài liệu chuyên môn “Hướng dẫn thử nghiệm tiền lâm sàng và lâm sàng thuốc đông y, thuốc từ dược liệu”.
6. Harlita, Niken Satuti N.H., Mammed Sagi, Pudji Astuti - Acute toxicity of cashew nut shell extract (*Anacardium occidentale* L.) in albino rat (*Rattus norvegicus* Berkenhout 1769), Pakistan Journal of Biological Sciences **19** (2) (2016) 89-94.
7. Carvalho A.L, Annoni R., Silva P.R., Borelli P., Fock R.A., Trevisan M.T., Mauad T. - Acute, subacute toxicity and mutagenic effects of anacardic acids from cashew (*Anacardium occidentale* Linn.) in mice, Journal of Ethnopharmacology **135** (3) (2011) 730-736.
8. Yoshinori Tanaka, Shinichiro Tanioka, Miyoko Tanaka, Takahiko Tanigawa, Yukisato Kitamura, Saburo Minami, Yoshiharu Okamoto, Mariko Miyashita, Masanobu Nanno - Effects of chitin and chitosan particles on BALB/c mice by oral and parenteral administration, Biomaterials **18** (8) (1997) 591-595.
9. Vahouny G.V., Satchithanandam S., Cassidy M.M., Lightfoot F.B., Furda I. - Comparative effects of chitosan and cholestyramine on lymphatic absorption of lipids in the rat, American Journal of Clinical Nutrition **38** (2) (1983) 278-284.
10. Hirano S. - Chitin biotechnology applications, Biotechnology Annual Review **2** (1996) 237-258.
11. Dương Anh Tuấn, Nguyễn Minh Phương, Dương Ngọc Tú, Lưu Tham Mưu, Nguyễn Văn Giáp, Nguyễn Duy Trang - Azadirachtin - Hoạt chất gây ngán ăn mạnh đối với sâu khoang được phân lập từ hạt Neem (*Azadirachta indica*, họ Meliaceae) di thực vào Việt Nam, Hội nghị Khoa học và Công nghệ Hóa hữu cơ toàn quốc lần 2, Hà Nội (2001) 333-337.
12. Srivastava M.K., Raizada R.B. - Assessment of embryo/fetotoxicity and teratogenicity of azadirachtin in rats, Food and Chemical Toxicology **39** (10) (2001) 1023-1027.

ABSTRACT

STUDYING THE ACUTE TOXICITY (LD₅₀)
OF CND MICRO-EMULSION BIOPRODUCTS ON SWISS MICE
(*Mus musculus* var. *albino*)

Le Phuc Chien^{1*}, Nguyen Thi Thanh Tam², Nguyen Nguyen Bao³, Tran Phi Hoang³,
Ho Thai Nhu Quynh³, Tran Cam Tu¹, Nguyen Thi Nhu Quynh¹

¹*Institute of Tropical Biology, Vietnam Academy of Science and Technology (VAST)*

²*University of Science, VNU-HCM*

³*Van Lang University*

*Email: lephucchien@gmail.com

CND micro-emulsion bioproducts (chitosan - neem - cashew nut shell extract) was a combination of three micro-emulsion bioproducts included chitosan, neem oil and cashew nut shell extract. It was one of the products from nature, with resistance to insects and pathogenic microorganisms, and used as a plant protection product which had biologically original one. The oral acute toxicity LD₅₀ of CND bioproducts was evaluated on *Mus musculus* var. *albino* by the Litchfield - Wilcoxon's method. The treatments of acute toxicity were divided into 5 groups: Cashew nutshell extract, neem, chitosan, neem - chitosan and chitosan - neem - cashew nutshell extract. In each group, mice were treated with the dose of 2g/kg/day, 5g/kg/day, 15g/kg/day and 30g/kg body weight/day for 10 days in the experiment. After 10 treatment days, mice were active and eating normally; normal eye pupils; there were no signs of shortness of breath or cyanosis; the hair was smooth, the mice had dry faeces... CND micro-emulsion bioproducts did not cause acute toxicity LD₅₀ for Swiss mice.

Keywords: CND bioproducts, CND, acute toxicity, LD₅₀, micro-emulsions.