

# ẢNH HƯỞNG CỦA DỊCH TRÍCH VỎ QUẢ LỤU (*Punica granatum*) LÊN SỰ ỨNG CHẾ HÌNH THÀNH TINH THỂ CALCIUM OXALATE GÂY BỆNH SỎI THẬN TRONG ĐIỀU KIỆN IN VITRO

Nguyễn Phạm Tuấn<sup>1\*</sup>, Bằng Hồng Lam<sup>2</sup>, Nguyễn Phạm Tú<sup>1</sup>,  
Lê Thảo Nguyễn<sup>3</sup>, Trần Đức Tài<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Trung tâm Công nghệ Sinh học tỉnh An Giang; <sup>2</sup>Đại học An Giang; <sup>3</sup>Đại học Gachon.

\*Tác giả liên hệ: ngphamtuan1983@gmail.com

Nhận bài: 05/04/2020 Hoàn thành phản biện: 11/05/2020 Chấp nhận bài: 31/08/2020

## TÓM TẮT

Nghiên cứu sử dụng dịch trích vỏ quả lựu được thực hiện để đánh giá khả năng ức chế tinh thể Calcium oxalate, gồm 03 giai đoạn chính là hình thành, phát triển và ngưng tụ. Mẫu vỏ quả lựu được ly trích bằng phương pháp ngâm dầm với ethanol 80% để tạo cao chiết. Phân trầm ức chế hạt nhân tinh thể Calcium oxalate của cao chiết vỏ quả lựu được xác định bằng phương pháp đo quang phổ ở bước sóng 620 nm; trong khi đó, hiệu quả ức chế phát triển tinh thể Calcium oxalate của cao chiết được đánh giá bằng mật độ quang của mẫu thử ở bước sóng 214 nm trong thời gian 600 giây. Hiệu quả ức chế ngưng tụ tinh thể calcium oxalate của cao chiết được xác định bằng cách đo lường mật độ quang ở bước sóng 620 nm vào các khoảng thời gian 30, 60, 90, 180 và 360 phút. Kết quả nghiên cứu cho thấy, độ ẩm của mẫu đạt 71,89% và hiệu suất cao chiết đạt 4,59%. Cao chiết vỏ quả lựu có sự hiện diện của các hợp chất flavonoid, alkaloid, saponin, terpenoid, tanin và phenol. Cao chiết vỏ quả lựu có khả năng ức chế hình thành hạt nhân, phát triển và ngưng tụ của tinh thể Calcium oxalate với giá trị IC<sub>50</sub> lần lượt là 0,76 mg/mL; 0,75 mg/mL và 0,99 mg/mL.

**Từ khóa:** Calcium oxalate, Cây lựu, Hạt nhân, Ngưng tụ, Phát triển, Sỏi thận

## INHIBITION OF CALCIUM OXALATE CRYSTALLISATION CAUSING KIDNEY STONES IN VITRO BY AN EXTRACT OF *Punica granatum* PEEL

Nguyen Pham Tuan<sup>1\*</sup>, Bang Hong Lam<sup>2</sup>, Nguyen Pham Tu<sup>1</sup>,  
Le Thao Nguyen<sup>3</sup>, Tran Duc Tai<sup>3</sup>

<sup>1</sup>An Giang Biotechnolog Center; <sup>2</sup>An Giang University; <sup>3</sup>Gachon University.

## ABSTRACT

The study on using Pomegranate peel extract to inhibit the formation of Calcium oxalate, including three main phases: nucleation, growth, and aggregation was conducted. The plant samples were extracted from maceration method with 80% of ethanol. The inhibitory percentage of nucleation was determined by spectrophotometer at 620 nm, whereas the growth assay was evaluated by measuring of sample in 600 seconds at wavelength 214 nm. The aggregation assay was conducted by measuring at the period of 30, 60, 90, 180, and 360 minutes at wavelength 620 nm to determine the inhibitory percentage. The results showed that moisture and the yield of Pomegranate peel extract were 71.89% and 4.59%. The extract of Pomegranate peel had the presence of bioactive compounds such as alkaloid, flavonoid, saponin, terpenoid, tannin and phenol. The extract *Punica granatum* peel had the ability to inhibit nucleation, growth and aggregation of Calcium oxalate crystallisation and IC<sub>50</sub> value of extract was 0.76 mg/mL, 0.75 mg/mL, and 0.99 mg/mL, respectively.

**Keywords:** Aggregation, Calcium oxalate, Growth, Kidney stone, Nucleation, *Punica granatum*

## 1. MỞ ĐẦU

Tinh thể Calcium oxalate là thành phần chính của hơn 60% các trường hợp sỏi thận ở người và tinh thể tồn tại ở hai dạng chính là Calcium oxalate monohydrate (COM) và Calcium oxalate dihydrate (COD). Trong cơ thể người, sỏi thận có 02 dạng kích thước: nhỏ và lớn. Sỏi có kích thước nhỏ, cơ thể người có thể thải ra ngoài mà không gây ảnh hưởng đến sức khỏe. Ngược lại, sỏi có kích thước lớn có thể làm tắt nghẽn đường tiết niệu gây đau cho bệnh nhân. Ngoài ra, các biện pháp y khoa có hiệu quả trong việc điều trị sỏi Calcium oxalate nhưng có nguy cơ tái phát là 50% và nhiều tác dụng phụ như tổn thương mạch máu ở thận và các cơ quan xung quanh,... (Trần Đức Tài, 2016). Xu hướng hiện nay trên thế giới và Việt Nam là nghiên cứu và phát triển các sản phẩm có nguồn gốc từ tự nhiên để hỗ trợ và điều trị bệnh, do có ít tác dụng phụ hơn và dễ tìm. Phạm Đức Vịnh và cs. (2014) đánh giá tác dụng ức chế sỏi tiết niệu in vitro, in vivo và phân lập hoạt chất có tác dụng ức chế sỏi tiết niệu của cao chiết từ thân cây Ý dĩ (*Coix lachrymal-jobi* L.). Kết quả, phân lập được hợp chất coumarin từ phân đoạn ethyl acetate có hiệu quả hoạt động ức chế cao nhất ( $IC_{50} = 2,35$  mM) thấp hơn đối chứng dương Natri citrate ( $IC_{50} = 9,61$  mM). Nguyễn Quỳnh Chi và cs. (2015) đánh giá tác dụng ức chế hình thành tinh thể Calcium oxalate từ một số loài thuộc chi *Ficus* L. bằng phương pháp tạo sỏi oxalate trong nước tiểu nhân tạo trên đĩa 96 giếng. Kết quả, cao chiết từ lá cây Sung (*Ficus racemosa*) và lá cây Lâm vồ (*Ficus rumphii*) thể hiện tác dụng ức chế sự hình thành tinh thể Calcium oxalate. Theo kinh nghiệm dân gian, vỏ quả trái lựu được sử dụng như một loại thảo dược và có khả năng điều trị các bệnh về tiết niệu và sỏi thận (Kachkoul và cs., 2018). Đồng thời, vỏ quả của trái lựu là một nguồn phụ phẩm có thể

tận dùng để ly trích các hợp chất có hoạt tính sinh học để nghiên cứu và ứng dụng trong nhiều lĩnh vực khác nhau. Nghiên cứu được thực hiện nhằm đánh giá hiệu quả ức chế hình thành tinh thể Calcium oxalate gây sỏi thận của cây dược liệu, hướng tới tạo ra nguồn nguyên liệu cho quá trình sản xuất các sản phẩm có dược tính phòng và điều trị bệnh.

## 2. NỘI DUNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

### 2.1. Nguyên vật liệu

Nguyên liệu quả lựu thu từ các chợ đầu mối ở huyện Châu Thành, tỉnh An Giang. Hóa chất và thiết bị gồm máy đo quang phổ, máy đông khô chân không, Natri oxalate (Sigma, Mỹ), Tris HCl (Merck, Mỹ), Natri chloride (Merck, Mỹ), Calcium chloride (Merck, Mỹ),... hóa chất và thiết bị cần thiết khác.

### 2.2. Phương pháp nghiên cứu

#### 2.2.1. Phương pháp tạo cao chiết từ vỏ quả lựu

Quả lựu được thu từ chợ Cần Đăng, huyện Châu Thành, tỉnh An Giang và tiến hành loại bỏ phần thịt quả, thu phần vỏ và đông khô phần vỏ quả lựu bằng máy đông khô trong 96 giờ và nghiền thành bột mịn. 200 g mẫu bột của vỏ quả lựu được ngâm dầm với ethanol 80% với tỷ lệ nguyên liệu và dung môi là 1:10 (w/v), ở nhiệt độ phòng, trong 72 giờ và để trong tối để tránh quá trình oxy hóa. Sau đó, hỗn hợp được lọc qua giấy lọc Whatman có đường kính 0,45 $\mu$ m, thu dịch lọc và bỏ phần cặn. Phần dịch lọc sau đó được tiến hành cô quay chân không để đuổi dung môi và đông khô bằng máy đông khô để thu cao chiết vỏ quả lựu. Cao chiết vỏ quả lựu sau khi đông khô được bảo quản ở điều kiện nhiệt độ  $-20^{\circ}\text{C}$  và thực hiện các nghiên cứu tiếp theo.

### 2.2.2. Định tính các hợp chất có hoạt tính sinh học của cao chiết cây vỏ quả lựu

Tiến hành định tính các hợp chất có hoạt tính sinh học trong cao chiết của vỏ quả lựu theo phương pháp của Yadav và cs. (2014) (Bảng 1).

**Bảng 1.** Định tính hợp chất trong cao chiết của vỏ quả lựu

Hợp chất	Thực nghiệm	Hiện tượng
Alkaloid	1mL dịch trích + vài giọt TT Mayer	Kết tủa màu nâu
Flavonoid	1mL dịch trích + 2mL Pb(OAc) <sub>4</sub> 10%	Xuất hiện màu vàng
Saponin	3mL dịch trích + 6mL H <sub>2</sub> O → đun nóng	Xuất hiện bọt
Steroid	1mL dịch trích + 2mL CHCl <sub>3</sub> + 2mL H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> đậm đặc	Xuất hiện vòng đỏ nâu giữa 2 lớp
Tannin và phenol	0,5mL dịch trích + 10mL H <sub>2</sub> O + 2 - 3 giọt FeCl <sub>3</sub> 0,1%	Kết tủa xanh dương đen
Terpenoid	2mL dịch trích + 2mL (CH <sub>3</sub> CO) <sub>2</sub> O + 2 - 3 giọt H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> đậm đặc	Xuất hiện màu đỏ đậm

### 2.2.3. Khảo sát khả năng ức chế sự hình thành hạt nhân tinh thể Calcium oxalate của cao chiết vỏ quả lựu

Phương pháp thử nghiệm khả năng ức chế sự hình thành tinh thể Calcium oxalate của cao chiết vỏ trái lựu được thực hiện theo phương pháp của Saha và cs. (2013) và Phatak và cs. (2015). Tất cả các phản ứng được thực hiện ở nhiệt độ 37°C trong máy khuấy từ gia nhiệt. Chuẩn bị dung dịch Calcium chloride ở nồng độ 4 mM và natri oxalate ở nồng độ 50 mM trong buffer gồm Tris 0,05 M và Natri chloride 0,15 M ở điều kiện pH = 6,5. Quá trình phân tích sự ức chế được sự hình thành tinh thể CaOx thực hiện bằng cách, 950 µL calcium chloride được trộn với 100 µL cao chiết vỏ trái lựu ở các nồng độ khác nhau và mẫu đối chứng là mẫu không có cao chiết (nước cất). Quá trình tạo hạt nhân sỏi Calcium oxalate được bắt đầu khi hỗn hợp phản ứng với 950 µL Natri oxalate. Lắc đều hỗn hợp trong 2-3 phút. Sự tạo thành tinh thể Calcium oxalate. % Ức chế =  $(C-S)/C \times 100$ .

Trong đó: C: OD mẫu đối chứng; S: OD mẫu có cao chiết.

Chất chuẩn được sử dụng để so sánh hiệu quả ức chế sự hình thành hạt nhân tinh thể Calcium oxalate với cao chiết vỏ trái lựu là chất Natri citrate được pha trong nước cất

và được thực hiện ở mức nồng độ tương tự như cao chiết. Đánh giá hiệu quả ức chế dựa vào IC<sub>50</sub>.

### 2.2.4. Khảo sát khả năng ức chế sự phát triển của tinh thể Calcium oxalate của cao chiết vỏ quả lựu

Phương pháp thử nghiệm khả năng ức chế sự phát triển của tinh thể Calcium oxalate của cao chiết vỏ quả lựu được thực hiện theo phương pháp của Chaudhary và cs. (2010). Phản ứng được thực hiện bằng cách thêm lần lượt 1 mL Calcium chloride 4 mM và 1 mL Natri oxalate 4 mM vào 1,5 mL dung dịch buffer chứa Natri chloride (90 mM) và Tris HCl (10 mM) ở điều kiện pH = 7,2. Sau đó, thêm vào hỗn hợp 30 µL tinh thể Calcium oxalate monohydrate (1,5 mg/mL) chuẩn bị trong buffer natri acetate 50 mM (pH = 5,7). Phản ứng giữa Calcium chloride và Natri oxalate với tinh thể hạt nhân dẫn tới sự phân bố CaOx trên bề mặt tinh thể.

Mẫu đối chứng: phản ứng giữa Calcium chloride và Natri oxalate diễn ra trong 10 phút. Thêm 0,5 mL nước cất và đo độ hấp thụ ở bước sóng  $\lambda = 214$  nm để xác định độ giảm của góc oxalate tự do ban đầu. Đo giá trị OD mỗi phút 1 lần và vẽ đồ thị tính hệ số góc.

Mẫu thử: phản ứng giữa Calcium chloride và Natri oxalate diễn ra trong 10 phút, lần lượt thêm 0,5 mL cao chiết vỏ quả lựu ở các nồng độ khác nhau được thêm vào đo ở bước sóng  $\lambda = 214$  nm. Đo giá trị OD mỗi phút 1 lần và vẽ đồ thị tính hệ số góc.

$$\% \text{Ức chế} = (C-S)/C \times 100.$$

Trong đó: C: hệ số góc chất ức chế;  
S: hệ số góc chất đối chứng.

2.2.5. *Khảo sát hiệu quả ức chế ngưng tụ tinh thể Calcium oxalate của cao chiết vỏ quả lựu*

Chuẩn bị hỗn hợp tinh thể Calcium oxalate monohydrate theo phương pháp của Saha và cs. (2013). Trộn đều hỗn hợp gồm Calcium chloride và Natri oxalate cùng ở nồng độ 50 mM. Sau đó, hỗn hợp được ủ trong bể điều nhiệt ở nhiệt độ 60°C trong 01 giờ nhằm tinh thể cân bằng và ổn định (không phát triển hay hòa tan trong dung môi) (Hess và cs., 1989) và làm mát ở 37°C qua đêm. Hỗn hợp được ly tâm với tốc độ 5.000 vòng/phút và trong 10 phút, thu phần cặn, bỏ phần dịch, thu được tinh thể Calcium oxalate monohydrate và bảo quản tinh thể ở điều kiện nhiệt độ 4°C.

Thử khả năng ức chế ngưng tụ tinh thể COM của cao chiết vỏ quả lựu theo phương pháp Saha và cs. (2013). Tinh thể Calcium oxalate monohydrate được hòa tan trong buffer gồm Tris 0,05 M và calcium chloride 0,15 M được chuẩn bị ở pH = 6,5, nhiệt độ 37°C và nồng độ cuối cùng là 1 mg/mL. Thêm 500  $\mu$ L nước cất. Đo độ hấp thu của giá trị OD đối chứng không có dịch

trích ở  $\lambda = 620$  nm vào khoảng thời gian 30, 60, 90, 180 và 360 phút.

Phản ứng ức chế ngưng tụ tinh thể Calcium oxalate monohydrate của cao chiết vỏ quả lựu được thực hiện các nồng độ khác nhau. Tinh thể được hòa tan trong buffer gồm Tris 0,05 M và Natri chloride 0,15 M được chuẩn bị ở pH = 6,5, nhiệt độ 37°C và nồng độ cuối cùng là 1 mg/mL. Thêm 0,5 mL cao chiết ở các nồng độ và đo độ hấp thu ở bước sóng  $\lambda = 620$  nm vào khoảng thời gian 30, 60, 90, 180 và 360 phút.

$$\% \text{Ức chế ngưng tụ} = (1-S_i/S_c) \times 100.$$

Trong đó: S<sub>i</sub>: hệ số góc chất ức chế;  
S<sub>c</sub>: hệ số góc chất đối chứng.

2.3. **Phương pháp thống kê**

Số liệu được xử lý bằng phần mềm Excel 2013 và thống kê bằng phần mềm Statgraphics plus 16.0. Kiểm tra sự khác biệt giữa các trung bình theo phép thử LSD và Duncan.

3. **KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN**

3.1. **Kết quả tạo cao chiết và định tính các hợp chất có hoạt tính sinh học từ cao chiết vỏ quả lựu**

Để đánh giá hiệu quả của phương pháp trích cao, người ta thường dựa trên hiệu suất trích cao. Hiệu suất trích cao phản ánh sự tối ưu của việc kết hợp các điều kiện khác nhau trong phương pháp ly trích. Quy trình trích cao được thực hiện với cây lựu là 3.000 g (khô), độ ẩm của vỏ quả lựu là 71,82% và hiệu suất chiết cao đạt 4,59% (Bảng 2).

**Bảng 2.** Độ ẩm, hiệu suất và định tính các hợp chất có hoạt tính sinh học của cao chiết vỏ quả lựu

Chỉ tiêu theo dõi	Kết quả	Định tính
Khối lượng mẫu tươi (g)	3.000	Saponin (+)
Độ ẩm (%)	71,89	Flavonoid (+)
Khối lượng mẫu khô (g)	400	Terpenoids (+)
Khối lượng cao khô (g)	18,35	Alkaloid (+)
Hiệu suất chiết (%)	4,59	Tanin và phenol (+)
		Steroid (-)

'+' : Dương tính và '-' : Âm tính.

Trong quá trình tạo cao chiết, dung môi ethanol 80% được sử dụng cho quá trình ly trích, nguyên nhân là do nếu sử dụng nước làm loại dung môi để ly trích thì mẫu trích nhiễm nhiều tạp chất như các acid hữu cơ, đường và protein tan trong nước ảnh hưởng tới quá trình định tính hay định lượng các hợp chất thiên nhiên. Ngoài ra, nếu sử dụng cồn tuyệt đối sẽ giảm hiệu suất chiết cao do ethanol khó thấm vào mẫu. Vì vậy, sử dụng ethanol 80% làm dung môi sẽ tạo một môi trường tối ưu cho việc ly trích, tăng sự tiếp xúc mẫu và dung môi, tăng hiệu suất trích ly và bảo quản mẫu khỏi các vi sinh vật (Bandar và cs., 2013).

Cao chiết vỏ quả lựu có sự hiện diện của các hợp chất alkaloid, terpenoid, saponin, flavonoid, tanin và phenol (Bảng 2). Kết quả nghiên cứu tương tự nghiên cứu của Hasan và cs. (2018) khi tiến hành định tính các hợp chất sinh học có trong vỏ quả lựu. Theo Saranya và cs. (2014), các hợp chất saponin, flavonoid và terpenoids có khả năng ức chế sự hình thành và làm tan tinh thể Calcium oxalate. Saponin có các đặc tính chống kết tinh bằng cách ngăn cản quá trình của mucoprotein, các chất thúc đẩy quá trình kết tinh (Joshi và cs., 2005). Flavonoid ức chế sự kết tinh Canxi oxalate ở nước tiểu của người cũng như trong các mô hình động vật và lắng đọng tinh thể.

**Bảng 3.** Kết quả ức chế hình thành hạt nhân tinh thể Calcium oxalate bằng Natri citrate và cao chiết vỏ quả lựu

Nồng độ (mg/mL)	Phần trăm ức chế (%) của chất chuẩn Natri citrate	Nồng độ (mg/mL)	Phần trăm ức chế (%) của cao chiết vỏ quả lựu
0	0 <sup>l</sup>	0	0 <sup>l</sup>
0,25	30,42 <sup>k</sup> ± 0,39	0,25	40,92 <sup>k</sup> ± 0,55
0,50	39,48 <sup>h</sup> ± 0,51	0,50	45,49 <sup>h</sup> ± 0,70
0,75	45,42 <sup>g</sup> ± 0,42	0,75	49,49 <sup>g</sup> ± 0,53
1	49,55 <sup>f</sup> ± 0,57	1	56,59 <sup>f</sup> ± 0,86
2	53,47 <sup>e</sup> ± 0,47	2	68,08 <sup>e</sup> ± 0,11
4	65,16 <sup>d</sup> ± 0,50	4	74,25 <sup>d</sup> ± 0,36
6	75,29 <sup>c</sup> ± 0,46	6	81,58 <sup>c</sup> ± 0,50
8	80,62 <sup>b</sup> ± 0,48	8	90,25 <sup>b</sup> ± 0,54
10	88,10 <sup>a</sup> ± 0,14	10	97,25 <sup>a</sup> ± 0,13
IC <sub>50</sub> (mg/mL)	1,16		0,76

*a, b, c, d, e, f, g, h, k: Các chữ cái khác nhau trong cùng một cột biểu thị mức sai khác có ý nghĩa thống kê ở mức  $\alpha=0,05$ ; Số liệu được trình bày dưới dạng trung bình ± sai số chuẩn*

### 3.2. Hiệu quả ức chế sự hình thành hạt nhân tinh thể Calcium oxalate của cao chiết vỏ quả lựu

Các hợp chất muối citrate là các chất ức chế quá trình hình thành sỏi Calcium oxalate và Calcium phosphate. Chúng tạo thành các phức chất với ion Calcium nên làm giảm nồng độ tinh thể Calcium oxalate, tăng hiệu quả ức chế ngưng tụ và kết tinh của sỏi bằng cách tăng hoạt tính của các urine macromolecule. Natri citrate hay Kali citrate giúp tăng độ hòa tan của acid uric, do đó ngăn ngừa sự kết tủa muối Calcium oxalate (Gupta và cs., 2011). Vì vậy, Natri citrate là chất chuẩn cho thí nghiệm ức chế quá trình hình thành sỏi Calcium oxalate, gồm ba giai đoạn: hạt nhân, phát triển và ngưng tụ.

Ở nồng độ natri citrate 10 mg/mL, hiệu quả ức chế sự hình thành hạt nhân tinh thể Calcium oxalate (COM) đạt 88,10 ± 0,14%; kể đến là ở nồng độ Natri citrate 8 mg/mL, hiệu quả ức chế sự hình thành hạt nhân tinh thể COM đạt 80,62 ± 0,48% và thấp nhất ở mẫu đối chứng, hiệu quả ức chế sự hình thành hạt nhân tinh thể COM đạt 0% (Bảng 3). Tiến hành xây dựng đường biểu diễn hiệu quả ức chế sự hình thành hạt nhân tinh thể COM của Natri citrate và suy ra giá trị IC<sub>50</sub> của Natri citrate là 1,16 mg/mL.

Tương tự, ở nồng độ cao chiết vỏ quả lựu 10 mg/mL, hiệu quả ức chế sự hình thành hạt nhân của tinh thể COM đạt  $97,25 \pm 0,13\%$ ; kể đến là ở nồng độ cao chiết vỏ quả lựu 8 mg/mL, hiệu quả ức chế sự hình thành hạt nhân tinh thể COM đạt  $90,25 \pm 0,54\%$  và thấp nhất ở mẫu đối chứng, hiệu quả ức chế sự hình thành hạt nhân tinh thể COM đạt 0% (Bảng 3). Tiến hành xây dựng đường biểu diễn hiệu quả ức chế sự hình thành hạt nhân tinh thể COM của cao chiết vỏ quả lựu và suy ra giá trị  $IC_{50}$  của cao chiết là 0,76 mg/mL.

Giá trị  $IC_{50}$  của cao chiết ( $IC_{50} = 0,76$  mg/mL) thấp hơn  $IC_{50}$  của Natri citrate ( $IC_{50} = 1,16$  mg/mL). Nguyên nhân là do cao chiết vỏ quả lựu có chứa các hợp chất (flavonoid, saponin và terpenoid) có khả năng kết hợp mạnh với ion  $Ca^{2+}$  tạo thành muối tan làm giảm mật độ của tinh thể nhanh chóng hơn so với chất chuẩn Natri citrate (Gupta và cs., 2011). Kết quả nghiên cứu thấp hơn Nirmaladevi và cs. (2012) cho rằng, dịch trích hoa *H. rosa-sinensis* Linn có khả năng ức chế hình thành hạt nhân tinh thể Calcium oxalate đạt khoảng 30% tại nồng độ 1.400  $\mu$ g/mL. Agarwal và cs. (2015) khả năng ức chế hạt nhân tinh thể Calcium oxalate cao nhất đạt  $60,06 \pm 0,19\%$  của cao chiết *A. aspera* L. tại nồng độ 1.000  $\mu$ g/mL,  $49,93 \pm 0,07\%$  của cao chiết *B. pinnatum* Lam. ở nồng độ 1.000  $\mu$ g/mL. Trần Đức Tài (2016), cao chiết cây Bùm sùm hiệu quả ức chế hình thành hạt nhân tinh thể Calcium oxalate với giá trị  $IC_{50} = 1,76$  mg/mL.

### 3.3. Hiệu quả ức chế sự phát triển tinh thể Calcium oxalate của cao chiết vỏ quả lựu

Hiệu quả ức chế sự phát triển của tinh thể COM đạt cao nhất là  $79,97 \pm 0,21\%$  ở nồng độ Natri citrate 10 mg/mL và thấp nhất, hiệu quả ức chế sự phát triển tinh thể COM đạt 0% ở mẫu đối chứng. Tiến hành xây dựng đường biểu diễn hiệu quả ức chế sự phát triển tinh thể COM của natri citrate

và suy ra giá trị  $IC_{50}$  của Natri citrate là 0,89 mg/mL (Bảng 4).

Tương tự, hiệu quả ức chế sự phát triển của tinh thể COM đạt cao nhất là  $95,35 \pm 0,44\%$  ở nồng độ cao chiết 10 mg/mL và thấp nhất, hiệu quả ức chế sự phát triển tinh thể COM đạt 0% ở mẫu đối chứng (Bảng 4). Tiến hành xây dựng đường biểu diễn hiệu quả ức chế sự phát triển tinh thể COM của cao chiết vỏ quả lựu và suy ra giá trị  $IC_{50}$  của cao chiết là 0,75 mg/mL.

Chất chuẩn Natri citrate có  $IC_{50} = 0,89$  mg/mL cao hơn  $IC_{50}$  của cao chiết là  $IC_{50} = 0,75$  mg/mL nên cao chiết có khả năng ức chế mạnh quá trình phát triển của tinh thể Calcium oxalate do có khả năng hình thành các hợp chất tan với ion calcium và ion oxalate làm giảm khả năng hình thành sỏi (Gupta và cs., 2011). Cao chiết vỏ quả lựu có khả năng ức chế sự phát triển của sỏi Calcium oxalate bằng cách bao phủ bên ngoài các hạt tinh thể nên ngăn cản khả năng kết hợp của chúng, ngoài ra các hợp chất thiên nhiên còn tương tác và ngăn cản sự kết hợp của ion Calcium và ion oxalate, ngăn ngừa sự phát triển của sỏi (De Cógáin và cs., 2015). Khi tăng hiệu quả ức chế, hiệu quả ức chế giảm là do cao chiết gia tăng sự hình thành của các tinh thể COD lên và giảm sự hình thành của COM, những tinh thể COD không có ái lực lớn nên có thể dễ dàng có thể loại thải ra ngoài, giảm nguy cơ sỏi thận nên cao chiết của cây vỏ quả lựu có khả năng ức chế phát triển.

Kết quả này thấp hơn nghiên cứu của Nirmaladevi và cs. (2012), cao chiết nước của *H. rosa-sinensis* Linn. đạt hiệu quả ức chế sự phát triển tinh thể Calcium oxalate dưới 35% ở mức nồng độ 1.400  $\mu$ g/mL và Kalpana và cs. (2013), cao chiết ethanol thân cây *B. cultivar Monthan* đạt hiệu quả 70% ức chế sự phát triển hạt nhân tinh thể Calcium oxalate ở nồng độ 1.600  $\mu$ g/mL. Trần Đức Tài (2016), cao chiết cây Bùm sùm ức chế sự phát triển của tinh thể Calcium oxalate với  $IC_{50} = 1,5$  mg/mL.

**Bảng 4.** Kết quả ức chế sự phát triển tinh thể Calcium oxalate của natri citrate và cao chiết vỏ quả lựu

Nồng độ (mg/mL)	Phần trăm ức chế (%) của chất chuẩn Natri citrate	Nồng độ (mg/mL)	Phần trăm ức chế (%) của cao chiết vỏ quả lựu
0	0 <sup>l</sup>	0	0 <sup>l</sup>
0,25	29,29 <sup>k</sup> ± 0,56	0,25	31,20 <sup>k</sup> ± 0,12
0,50	39,84 <sup>h</sup> ± 0,51	0,50	41,42 <sup>h</sup> ± 0,20
0,75	44,55 <sup>g</sup> ± 0,55	0,75	49,23 <sup>g</sup> ± 0,22
1	54,10 <sup>f</sup> ± 0,43	1	59,62 <sup>f</sup> ± 0,30
2	59,70 <sup>e</sup> ± 0,56	2	67,32 <sup>e</sup> ± 0,15
4	65,15 <sup>d</sup> ± 0,22	4	74,78 <sup>d</sup> ± 0,20
6	69,98 <sup>c</sup> ± 0,12	6	82,19 <sup>c</sup> ± 0,32
8	75,29 <sup>b</sup> ± 0,15	8	89,78 <sup>b</sup> ± 0,44
10	79,97 <sup>a</sup> ± 0,21	10	95,35 <sup>a</sup> ± 0,37
IC <sub>50</sub> (mg/mL)	0,89		0,75

*a, b, c, d, e, f, g, h, k: Các chữ cái khác nhau trong cùng một cột biểu thị mức sai khác có ý nghĩa thống kê ở mức  $\alpha=0,05$ ; Số liệu được trình bày dưới dạng trung bình  $\pm$  sai số chuẩn*

### 3.4. Hiệu quả ức chế ngưng tụ tinh thể Calcium oxalate của cao chiết vỏ quả lựu

Hiệu quả ức chế ngưng tụ tinh thể COM có sự khác biệt giữa các nồng độ natri citrate khảo sát (Bảng 5). Mẫu đối chứng, hiệu quả ức chế ngưng tụ tinh thể COM đạt 0%; trong khi đó, hiệu quả ức chế ngưng tụ của tinh thể COM đạt cao nhất 63,61 ± 0,13% ở nồng độ Natri citrate 10 mg/mL. Tiến hành xây dựng đường biểu diễn hiệu quả ức chế ngưng tụ tinh thể COM của Natri citrate và suy ra giá trị IC<sub>50</sub> của Natri citrate là 2,68 mg/mL.

Tương tự, hiệu quả ức chế ngưng tụ tinh thể COM có sự khác biệt giữa các nồng độ cao chiết khảo sát (Bảng 5). Mẫu đối chứng, hiệu quả ức chế ngưng tụ tinh thể COM đạt 0%; trong khi đó, hiệu quả ức chế ngưng tụ của tinh thể COM đạt cao nhất 90,68 ± 0,09% ở nồng độ cao chiết vỏ quả lựu 10 mg/mL. Tiến hành xây dựng đường biểu diễn hiệu quả ức chế ngưng tụ tinh thể COM của cao chiết vỏ quả lựu và suy ra giá trị IC<sub>50</sub> của cao chiết là 0,99 mg/mL.

**Bảng 5.** Kết quả ức chế ngưng tụ tinh thể Calcium oxalate của Natri citrate và cao chiết vỏ quả lựu

Nồng độ (mg/mL)	Phần trăm ức chế (%) của chất chuẩn Natri citrate	Nồng độ (mg/mL)	Phần trăm ức chế (%) của cao chiết vỏ quả lựu
0	0 <sup>l</sup>	0	0 <sup>l</sup>
0,25	20,60 <sup>k</sup> ± 0,65	0,25	29,53 <sup>k</sup> ± 0,40
0,50	35,13 <sup>h</sup> ± 0,14	0,50	39,76 <sup>h</sup> ± 1,30
0,75	40,11 <sup>g</sup> ± 0,22	0,75	48,23 <sup>g</sup> ± 0,24
1	44,77 <sup>f</sup> ± 0,71	1	55,29 <sup>f</sup> ± 0,44
2	49,99 <sup>e</sup> ± 0,80	2	60,32 <sup>e</sup> ± 0,23
4	53,32 <sup>d</sup> ± 0,23	4	66,48 <sup>d</sup> ± 0,28
6	57,18 <sup>c</sup> ± 0,47	6	73,19 <sup>c</sup> ± 0,09
8	60,47 <sup>b</sup> ± 0,36	8	83,11 <sup>b</sup> ± 0,31
10	63,61 <sup>a</sup> ± 0,13	10	90,68 <sup>a</sup> ± 0,33
IC <sub>50</sub> (mg/mL)	2,68		0,99

*a, b, c, d, e, f, g, h, k: Các chữ cái khác nhau trong cùng một cột biểu thị mức sai khác có ý nghĩa thống kê ở mức  $\alpha=0,05$ ; Số liệu được trình bày dưới dạng trung bình  $\pm$  sai số chuẩn*

Natri citrate có IC<sub>50</sub> = 2,68 mg/mL cao hơn IC<sub>50</sub> của cao chiết là IC<sub>50</sub> = 0,99 mg/mL. Cao chiết vỏ quả lựu có khả năng ức chế mạnh giai đoạn ngưng tụ là do các

hợp chất thiên nhiên trong cao chiết bao phủ bên ngoài các tinh thể khiến chúng không thể kết tụ lại với nhau và cây lựu có chứa các hợp chất saponin, terpenoid là những



chất có khả năng ức chế sự hình thành sỏi bằng cách tương tác ức chế với các mucoprotein, nguyên nhân chính gây sự quá bão hòa của các tinh thể Calcium oxalate, khiến chúng ngưng tụ tạo nên sỏi, nên hiệu quả ức chế của cao chiết sẽ tăng lên khi được nghiên cứu ở động vật. Tuy nhiên khi tăng mức nồng độ của cao chiết, hiệu quả ức chế giảm là do cao chiết gia tăng sự hình thành của các tinh thể COD lên nhiều lần, giảm sự hình thành của COM, nhưng những tinh thể COD không có ái lực lớn nên có thể dễ dàng có thể loại thải ra ngoài, không những thế giảm sự quá bão hòa của tinh thể Calcium oxalate trong cơ thể, giảm nguy cơ sỏi thận nên cao chiết vỏ quả lựu có khả năng ức chế ngưng tụ (Atmani và cs., 2000).

Kết quả nghiên cứu cao hơn Vyawahare và cs. (2014), cao chiết lá cây *M. Charantia* L. đạt hiệu quả ức chế ngưng tụ sỏi Calcium oxalate hơn 30% ở nồng độ 500 µg/mL. Nghiên cứu của Agarwal và cs. (2015) *P. niruri* L. hiệu quả ức chế ngưng tụ sỏi Calcium oxalate đạt mức 58,62% ± 0,02%. Trần Đức Tài (2016), cao chiết cây Bùm sùm cho hiệu quả ức chế ngưng tụ của tinh thể Calcium oxalate với IC<sub>50</sub> = 0,8 mg/mL.

#### 4. KẾT LUẬN

Cao chiết vỏ quả lựu có khả năng ức chế sự hình thành, phát triển và ngưng tụ tinh thể Calcium oxalate gây bệnh sỏi thận trong điều kiện in vitro với giá trị IC<sub>50</sub> lần lượt là 0,76 mg/mL; 0,75 mg/mL và 0,99 mg/mL. Tiếp tục nghiên cứu đánh giá hiệu quả của cao chiết trong điều kiện in vivo và phân tách các hợp chất có khả năng ức chế tinh thể Calcium oxalate từ cao chiết vỏ quả lựu.

#### TÀI LIỆU THAM KHẢO

##### 1. Tài liệu tiếng Việt

Trần Đức Tài. (2016). Ảnh hưởng của dịch trích lá và thân cây Bùm sùm (*Carmona microphylla* L.) lên sự ức chế hình thành tinh thể Calcium oxalate gây bệnh sỏi thận

trong điều kiện in vitro. Luận văn tốt nghiệp Đại học, Đại học Cần Thơ.

Nguyễn Quỳnh Chi, Nguyễn Hoàng Anh và Phạm Thị Thanh Hà. (2015). Nghiên cứu đánh giá tác dụng của dịch chiết nước từ một số loài thuộc chi *Ficus* L. trên mô hình tạo sỏi Calci oxalate in vitro. *Tạp chí Dược học*, 2, 131 - 139.

Phạm Đức Vịnh, Trần Thúy Ngân, Nguyễn Thị Đông, Nguyễn Thị Thanh Nhài, Nguyễn Quỳnh Chi, Nguyễn Thùy Dương và Nguyễn Hoàng Anh. (2014). Nghiên cứu tác dụng dược lý thực nghiệm trên sỏi tiết niệu và phân lập chất có hoạt tính của Ý Dĩ (*Coix lachrymal-jobi* L.). *Tạp chí Dược học*, 3(455), 17 - 22.

##### 2. Tài liệu tiếng nước ngoài

Agarwal, K., & Varma, R. (2015). In-vitro Calcium oxalate crystallization inhibition by *Achyranthes aspera* L. and *Bryophyllum pinnatum* Lam. *British Journal of Pharmaceutical Research*, 5(2), 146 - 152.

Atmani, F., & Khan, S. R. (2000). Effects of an extract from *Herniaria hirsuta* on calcium oxalate crystallization in vitro. *Bju International*, 85(6), 621 - 625.

Atodariya, U., Barad, R. & Upadhyay, U. (2013). Anti-Urolithiatic Activity of *Dolichos Biflorus* Seeds. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*, 2(2), 209 - 213.

Bandar, H., Hijazi, A., Rammal, H., Hachem, A., Saad, Z., & Badran, B. (2013). Techniques for the extraction of bioactive compounds from *Lebanese Urtica Dioica*. *American Journal of Phytomedicine and Clinical Therapeutics*, 1(6), 507 - 513.

Chaudhary, A., Singla, S. K., & Tandon, C. (2010). In vitro evaluation of *Terminalia arjuna* on calcium phosphate and calcium oxalate crystallization. *Indian Journal of pharmaceutical sciences*, 72(3), 340 - 345.

De Cógáin, M. R., Lee, H. J., & Lieske, J. C. (2015). Aqueous extract of *Costus arabicus* inhibits calcium oxalate crystal growth and adhesion to renal epithelial cells. *Urolithiasis*, 43(2), 119 - 124.

Gupta, M., Bhayana, S., & Sikka, K. (2011). Role of urinary inhibitors and promoters in calcium oxalate crystallisation. *International Journal of Research in Pharmacy and Chemistry*, 1(4), 793 - 798.



- Kalpana, S., Nirmaladevi, R., Rai, T. S. & Karthika, P. (2013). Inhibition of Calcium oxalate crystallization in vitro by extract of *Banana cultivar monthan*. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, 5(4), 649 - 653.
- Nirmaladevi, R., Kavitha, D., & Padma, P. R. (2012). Evaluation of antilithiatic potential of *Hibiscus rosa-sinensis* Linn, in vitro. *Journal of Pharmacy Research*, 5(8), 4353 - 4356.
- Phatak, R. S., & Hendre, A. S. (2015). In-vitro antiurolithiatic activity of *Kalanchoe pinnata* extract. *International Journal of Pharmacognosy and Phytochemical Research*, 7, 275 - 279.
- Saha, S., & Ramtej, J. V. (2013). Inhibition of calcium oxalate crystallisation in vitro by an extract of *Bergenia ciliata*. *Arab Journal of Urology*, 11(2), 187 - 192.
- Saranya, R., & Geetha, N. (2014). Inhibition of Calcium Oxalate (Caox) Crystallization In Vitro by The Extract of Beet Root (*Beta Vulgais* L.). *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, 6(2), 361 - 365.
- Kachkoul, R., Houssaini, T. S., Miyah, Y., Mohim, M., Habbani, R. E., & Lahrichi, A. (2018). The study of the inhibitory effect of calcium oxalate monohydrate's crystallization by two medicinal and aromatic plants: *Ammi visnaga* and *Punica granatum*. *Prog Urol*, 28(3), 156 - 165.
- Vyawahare, J. N., Shelke, P. A., & Baheti, D. G. (2014). Inhibition of Calcium Oxalate Crystallization in Vitro by Extract of *Momordica Charantia* Linn. *International Journal Of Pharmaceutical And Chemical Sciences*, 3(2), 448 - 452.
- Yadav, M., Chatterji, S., & Watal, G. (2014). Preliminary phytochemical screening of six medicinal plants used in traditional medicine. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, 6(5), 539 - 542.