TÍNH KÍCH ỨNG DA VÀ ĐỘC TÍNH BẤT THƯỜNG CỦA CHẾ PHẨM TINH DẦU BƯỞI

Hồ Thị Thạch Thúy*, Trần Thị Thu Hồng, Trần Thị Được

Trường Đại học Quốc tế Hồng Bàng

TÓM TẮT

Tinh dầu vỏ bưởi được sử dụng rộng rãi nhờ khả năng chống oxy hóa, đặc tính chống viêm và kháng nấm. Nghiên cứu này được thực hiện với mục đích kiểm tra mức độ an toàn của chế phẩm tinh dầu vỏ bưởi đối với người sử dụng. Thí nghiệm thử kích ứng trên da ở 18 thỏ và thử độc tính bất thường trên 15 chuột nhắt trắng, sử dụng mẫu tinh dầu bưởi có xuất xứ từ 3 công ty khác nhau trên địa bàn Thành phố Hồ Chí Minh. Kết quả cho thấy chế phẩm tinh dầu bưởi có thể gây kích ứng da ở mức độ nhẹ hoặc trung bình và có độc tính bất thường.

***Từ khóa**: Tinh dầu bưởi, kích ứng da, độc tính bất thường.*

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Tinh dầu bưởi có nhiều đặc tính có ích và được áp dụng trong đời sống và trong lĩnh vực sức khỏe nhờ có chứa thành phần chính là limonene và các chất chống oxy hóa mạnh như vitamin C, myrcen, terpinen, pinen...[1], [2]. Vitamin C trong tinh dầu bưởi giúp tăng cường sức đề kháng cho cơ thể, chống oxy hóa, bảo vệ cơ thể khỏi các tác hại từ môi trường bên ngoài và ánh nắng mặt trời. Một trong những công dụng của tinh dầu bưởi là làm mượt và óng tóc, giảm tóc gãy rụng, giảm xơ rối, phục hồi tóc bị hư tổn, kích thích mọc tóc và giúp tóc chắc khỏe. Tinh dầu bưởi được sử dụng rộng rãi, đặc biệt thích hợp với phụ nữ bị rụng tóc sau sinh [3].

Tuy nhiên, bên cạnh những đặc tính tốt của tinh dầu bưởi thì vẫn có những bệnh nhân bị dị ứng với tinh dầu làm cho viêm loét da hoặc gây ra các tổn thương da khác [4]. Tinh dầu bưởi có thể xảy ra các phản ứng nhạy cảm khác nhau tùy vào cơ địa từng người. Việc sử dụng tinh dầu bưởi nồng độ cao có thể là nguy cơ gây hại cho sức khỏe người dùng, đặc biệt là người bị hen suyễn mãn tính, da dễ phản ứng nhạy cảm; trẻ sơ sinh không nên sử dụng hoặc tiếp xúc với tinh dầu [3]. Hiện nay, trên thị trường mỹ phẩm Việt Nam có rất nhiều sản phẩm từ các loại tinh dầu thiên nhiên, tuy nhiên phần lớn các sản phẩm này vẫn chưa được kiểm tra về mức độ an toàn. Riêng về tinh dầu bưởi, Bộ Khoa học và Công nghệ đã công bố Tiêu chuẩn Việt Nam TCVN 11423:2016 quy định các đặc tính của tinh dầu bưởi như tỉ trọng, chỉ số khúc xạ, độ quay cực,... nhưng các sản phẩm tinh dầu bưởi đang lưu hành trên thị trường hiện nay chưa có một nghiên cứu nào đánh giá về tính kích ứng da cũng như mức độ an toàn cho người sử dụng. Đối với các sản phẩm dùng ngoài, tính kích ứng da là một trong những tiêu chí quan trọng hàng đầu. Chính vì vậy, việc nghiên cứu tính kích ứng da và độc tính của chế phẩm tinh dầu bưởi là cần thiết, nhằm kiểm tra mức độ an toàn của tinh dầu bưởi và tạo cơ sở cho việc sử dụng các chế phẩm tinh dầu bưởi trên thị trường.

*Tác giả liên hệ: ThS. Hồ Thị Thạch Thúy
Email: thuyhtt@hiu.vn

2. ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Đối tượng nghiên cứu

Đối tượng nghiên cứu trong đề tài này là tính kích ứng da và độc tính bất thường của ba mẫu tinh dầu bưởi và được khảo sát bằng phương pháp thử trực tiếp trên thỏ và chuột nhắt trắng. Các mẫu tinh dầu bưởi được mua từ ba nguồn khác nhau, và được ký hiệu là TD1, TD2 và TD3.

2.2. Dụng cụ, vật tư và hóa chất thí nghiệm

- Tông đơ điện hoặc một thiết bị thích hợp để làm sạch lông thỏ.
- Kéo, pince.
- Để đánh giá tính kích ứng da, trong thí nghiệm này sử dụng thỏ trắng trưởng thành, đực hoặc cái (không sử dụng thỏ có chửa hoặc đang cho con bú), khỏe mạnh, cân nặng không dưới 2 kg, được mua ở trại thỏ Phan Anh, Dĩ An, Bình Dương. Thỏ được nhốt riêng từng con và nuôi dưỡng trong điều kiện thí nghiệm ít nhất 5 ngày trước khi thử.
- Để khảo sát độc tính bất thường, nhóm tác giả sử dụng chuột nhắt trắng khỏe mạnh, cân nặng 18 g đến 22 g, chưa dùng vào thí nghiệm, nếu là chuột cái thì phải là chuột không có thai hoặc đang cho con bú, được chăn nuôi trong điều kiện bình thường [5].

2.3. Phương pháp nghiên cứu

2.3.1. Thử kích ứng trên da

Thử kích ứng trên da là một phương pháp sinh học dựa vào mức độ phản ứng của da thỏ với chất thử so với phần da kế bên không đắp chất thử. Phép thử không áp dụng cho các chất axit hoặc kiềm mạnh (pH < 2 hoặc pH > 11,5) và các chất đã biết là có kích ứng trên da. Thí nghiệm tiến hành theo quy trình được hướng dẫn trong tài liệu [5] ở điều kiện nhiệt độ phòng, độ ẩm tương đối 30 – 70%, ánh sáng đảm bảo 12 giờ tối, 12 giờ sáng hằng ngày.

a) Chuẩn bị mẫu thử

- Mẫu thử: sử dụng mẫu tinh dầu bưởi là TD1, TD2 và TD3.
- Mẫu chứng âm là dung dịch nước muối sinh lý natri clorid 0.9%.
- Mẫu chứng dương là cloroform.

b) Chuẩn bị động vật thí nghiệm

Trước ngày thí nghiệm, làm sạch lông thỏ ở vùng lưng đều về hai bên cột sống một khoảng đủ rộng (khoảng 10 cm x 15 cm) để đặt các mẫu thử và đối chứng. Chỉ những thỏ có da khỏe mạnh, đồng đều và lành lặn mới được dùng vào thí nghiệm.

c) Đặt mẫu thử

Mỗi mẫu thử được thử trên 6 thỏ khác nhau (tổng số 18 thỏ). Liều mẫu thử trên mỗi thỏ là 0,5 mL [1]. Đặt mẫu thử đã chuẩn bị ở trên lên miếng gạc không gây kích ứng 2,5 cm x 2,5 cm có độ dày thích hợp rồi đắp lên da. Cố định miếng gạc bằng băng dính không gây kích ứng ít nhất trong 4 giờ. Sau đó bỏ gạc và băng dính, chất thử còn lại được làm sạch bằng dung dịch nước muối sinh lý natri clorid 0.9 % [5].

Sơ đồ đặt mẫu thử có thể bố trí như sau:

Hình 1. *Sơ đồ đặt mẫu thử*

d) Quan sát và ghi điểm

Quan sát và ghi điểm phản ứng trên chỗ da đặt chất thử so với da kề bên không đặt chất thử ở các thời điểm 1 giờ, 24 giờ, 48 giờ và 72 giờ sau khi làm

sạch mẫu thử. Có thể kéo dài hơn thời gian quan sát khi có tổn thương sâu để có thể đánh giá đầy đủ hơn về khả năng hồi phục hoặc không hồi phục của vết thương nhưng không quá 14 ngày [5].

Đánh giá phản ứng trên da ở các mức độ gây ban đỏ, phù nề theo quy định ở **Bảng 1**.

Bảng 1. *Mức độ phản ứng trên da thỏ*

Phản ứng	Điểm đánh giá
Sự tạo vẩy và ban đỏ	
- Không ban đỏ	0
- Ban đỏ rất nhẹ (vừa đủ nhận thấy)	1
- Ban đỏ nhận thấy rõ	2
- Ban đỏ vừa phải đến nặng	3
- Ban đỏ nghiêm trọng (đỏ tấy) đến tạo thành vẩy để ngăn ngừa sự tiến triển của ban đỏ	4
Gây phù nề	
- Không phù nề	0
- Phù nề rất nhẹ (vừa đủ nhận thấy)	1
- Phù nề nhận thấy rõ (viền phù nề phồng lên rõ)	2
- Phù nề vừa phải (da phồng lên khoảng 1 mm)	3
- Phù nề nghiêm trọng (da phồng lên trên 1 mm và có lan rộng ra vùng xung quanh)	4
Tổng số điểm kích ứng tối đa có thể	8

Trên mỗi thỏ, điểm phản ứng được tính bằng tổng số điểm ở hai mức độ ban đỏ và phù nề chia cho số lần quan sát. Điểm kích ứng của mẫu thử được lấy trung bình điểm phản ứng của các thỏ đã thử.

Chỉ sử dụng các điểm ở những thời gian quan sát ở 24 giờ, 48 giờ và 72 giờ để tính kết quả.

Dựa vào điểm trung bình kích ứng của mẫu để phân loại phản ứng trên da thỏ.

Bảng 2. *Phân loại các phản ứng trên da thỏ*

Loại phản ứng	Điểm trung bình
Kích ứng không đáng kể	0 – 0.5
Kích ứng nhẹ	> 0.5 – 2.0
Kích ứng vừa phải	> 2.0 – 5.0
Kích ứng nghiêm trọng	> 5.0 – 8.0

2.3.2. Thử độc tính bất thường

Độc tính bất thường của thuốc được xác định bằng cách theo dõi số chuột chết trong thời gian 48 giờ sau khi cho chuột một liều thuốc qua đường dùng theo quy định [6], [7], [8].

a) Chuẩn bị dung dịch thử

Chuẩn bị dung dịch thử bằng cách phân tán đều 0,1 mL mẫu thử trong 0,4 mL nước cất.

Có 3 dung dịch thử được chuẩn bị từ 3 mẫu tinh dầu TD1, TD2 và TD3.

b) Tiến hành thử

Dùng 15 chuột chia thành 3 lô đánh dấu theo thứ tự lô 1, 2, 3.

Lô 1: 5 chuột cho uống dung dịch thử của mẫu tinh dầu TD1.

Lô 2: 5 chuột cho uống dung dịch thử của mẫu tinh dầu TD2.

Lô 3: 5 chuột cho uống dung dịch thử của mẫu tinh dầu TD3.

Cho mỗi chuột uống 0.5 mL dung dịch thử bằng

một kim cong đầu tù, phải đảm bảo đưa thuốc vào trong thực quản hoặc dạ dày [6], [7], [8].

2.3.3. Phương pháp phân tích dữ liệu

Kết quả được xử lý bằng phần mềm Microsoft Excel, trình bày dưới dạng giá trị trung bình ± sai số chuẩn của giá trị trung bình (Mean ± SEM), đánh giá ý nghĩa thống kê bằng phép kiểm Cronbach's Alpha trên phần mềm SPSS 20.0 [9].

3. KẾT QUẢ VÀ BÀN LUẬN

3.1. Tính kích ứng của tinh dầu bưởi trên da thỏ

Sau khi tính điểm và xử lý số liệu, cho kết quả hệ số Cronbach's Alpha của thang đo đều lớn hơn 0.8 và nhỏ hơn 0.95 nên tất cả các biến quan sát đều được chấp nhận.

Bảng 3. *Điểm kích ứng trên da thỏ ở các thời điểm khác nhau*

Tinh dầu	Điểm kích ứng								
	Mẫu chứng (-)			Mẫu chứng (+)			Mẫu tinh dầu		
	24 giờ	48 giờ	72 giờ	24 giờ	48 giờ	72 giờ	24 giờ	48 giờ	72 giờ
TD1	0.0	0.0	0.0	2.3	4.3	5.2	2.0	3.2	3.3
TD2	0.0	0.0	0.0	4.3	1.7	1.3	3.1	1.3	2.4
TD3	0.0	0.0	0.0	1.0	2.0	3.0	0.2	1.3	1.0

Công thức tính toán: Điểm kích ứng của TD(n) ở mẫu X vào thời điểm t = trung bình Điểm ban đỏ 6 thỏ + trung bình Điểm phù nề 6 thỏ.

Bảng 4. *Điểm kích ứng trên da thỏ đối với các mẫu thử tinh dầu*

Tinh dầu	Điểm kích ứng		
	Mẫu chứng (-)	Mẫu chứng (+)	Mẫu tinh dầu
TD1	0.00 ± 0.00	4.00 ± 0.63	2.72 ± 0.84
TD2	0.00 ± 0.00	2.45 ± 0.83	2.27 ± 1.14
TD3	0.00 ± 0.00	2.00 ± 0.00	0.83 ± 0.14

Đối chiếu điểm kích ứng với các mức độ quy định trên **Bảng 2** để xác định khả năng gây kích ứng trên da thỏ của mẫu thử và được thể hiện trong **Bảng 5**.

Bảng 5. *Bảng so sánh loại kích ứng của 3 mẫu tinh dầu*

Mẫu tinh dầu	Điểm kích ứng	Loại kích ứng
TD1	2.72 ± 0.84	Kích ứng vừa phải
TD2	2.27 ± 1.14	Kích ứng vừa phải
TD3	0.83 ± 0.14	Kích ứng nhẹ

Trong kết quả này mẫu chứng dương có sự khác biệt lớn vì cơ địa da thỏ khác nhau và cloroform chắc chắn gây kích ứng da nên mức độ gây kích ứng khác nhau.

TD3 là tinh dầu bưởi tự nhiên được chiết bằng phương pháp vật lý qua 2 giai đoạn: giai đoạn đầu chưng cất hơi nước vỏ bưởi thu được tinh dầu thô, giai đoạn 2 tinh chế, nâng cao hàm lượng d-limonene bằng công nghệ chưng tách chân không phân đoạn, có thể theo phương pháp chiết xuất này tinh dầu hoàn toàn tự nhiên, không có dung môi hữu cơ và hàm lượng hoạt chất cao nên sản phẩm chỉ gây kích ứng ở mức độ nhẹ.

Hình 2. *Thử tính kích ứng da của mẫu tinh dầu TD1*

Hình 3. *Thử tính kích ứng da của mẫu tinh dầu TD2*

Hình 4. *Thử tính kích ứng da của mẫu tinh dầu TD3*

3.2. Thử độc tính bất thường

Quan sát chuột 48 giờ sau khi dùng thuốc. Nếu không có chuột nào chết thì mẫu thử đạt yêu cầu [6], [7].

Sau khi cho chuột nhắt trắng uống dung dịch thử, chuột đều có các triệu chứng trước khi chết như gãi mõm liên tục, chạy hoảng loạn, ngã xiêu vẹo, co giật, run rẩy, ra mồ hôi, tím tái ở tai, chân, đuôi...

Bảng 6. *Thử độc tính bất thường của tinh dầu bưởi*

Mẫu thử	Liều thử nghiệm (mL)	Tình trạng chuột sau 48 giờ
TD1	0.5	Chết
TD2	0.5	Chết
TD3	0.5	Chết

Cả 3 mẫu tinh dầu đều không đạt về độc tính bất thường vì với liều 0.5 mL tinh dầu đều gây chết 100% thú vật thử nghiệm trong vòng 48 giờ. Với liều 0.1 mL tinh dầu pha trong 0.4 mL nước cất/20 g chuột tương ứng 4.25 g/kg thể trọng (tỉ trọng tinh dầu bưởi nằm trong khoảng 0.85 - 0.86). Theo phân loại độc tính của GHS (Globally Harmonised System for Classification of Chemicals) những chất có giá trị độc tính cấp LD_{50} trong khoảng > 5,000 mg/kg thể trọng, được coi là chất gần như không độc [12].

4. KẾT LUẬN

Từ kết quả nghiên cứu nhóm tác giả đưa đến các kết luận như sau:

- Trong ba mẫu tinh dầu được khảo sát, mẫu tinh dầu bưởi TD3 gây kích ứng nhẹ với điểm kích ứng là 0.83 ± 0.14. Hai mẫu tinh dầu bưởi còn lại có mức độ gây kích ứng vừa phải và có điểm kích ứng lần lượt TD1 là 2.72 ± 0.84, TD2 là 2.27 ± 1.14.
- Tất cả 15 chuột được cho uống mẫu thử điều chế theo quy định từ 3 mẫu tinh dầu bưởi đều chết sau 2 giờ thử nghiệm. Do đó cả 3 mẫu tinh dầu bưởi đều không đạt quy định về độc tính bất thường.

LỜI CẢM ƠN

Nghiên cứu này được Trường Đại học Quốc tế Hồng Bàng cấp kinh phí thực hiện dưới mã số đề tài GV1927.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

[1] N. Thavanapong, "*The essential oil from peel and flower of citrus maxima*", Master's thesis, Silpakorn University, 2006.

[2] N.X.Dũng, "*The Essential Oil from the Flowers of Citrus maxima (J. Burman) Merrill from Vietnam*", Journal of Essential Oil Research , vol. 3, no. 5, pp. 359-360, 1991.

[3] P. N. Quỳnh, *Sản xuất tinh dầu vỏ bưởi*, 2014.

[4] "*What is the difference between skin irritation and skin allergy?*", 2015. [Online]. Available: https://synergieskin.com/terris-blog/what-is-the-difference-between-skin-irritation-and-a-skin-allergy/. [Accessed 2019].

[5] Bộ Y Tế, *Quyết định 3113/1999/QĐ-BYT Ban hành tiêu chuẩn giới hạn vi khuẩn, nấm mốc trong mỹ phẩm và phương pháp thử kích ứng trên da*, 1999.

6] Đ. T. Đàm, *"Phương pháp xác định độc tính cấp của thuốc"*, Hà Nội: NXB Y học, 1996.

[7] B. Y. Tế, *"Dược Điển Việt Nam"*, Nhà xuất bản Y học, 2018.

[8] N. T. Dong, *"Phương pháp nghiên cứu tác dụng Dược lý của thuốc từ thảo dược"*, Hà Nội: Nhà xuất bản Khoa học Kỹ thuật, 2006.

[9] N.Đ.Thọ, *"Phương pháp nghiên cứu khoa học trong kinh doanh"*, NXB Tài chính, 2013.

[10] L. P.Botham, "*Alternative methods for skin irritation testing: the current status*", Alternatives to laboratory animals: ATLA, vol. 26, pp. 195-211, 2015.

[11] ML.Tsai, "*Composition and Bioactivity of Essential Oil from Citrus grandis (L.) Osbeck 'Mato Peiyu' Leaf*", PubMed Central, 2017.

[12] GHS, *Globally Harmonised System for Classification of Chemicals*, 2011.

SKIN IRRITATION AND ABNORMAL TOXICITY OF ESSENTIAL OIL EXTRACTED FROM CITRUS MAXIMA MERR. PEELS

Ho Thi Thach Thuy, Tran Thi Thu Hong, Tran Thi Duoc

ABSTRACT

Essential oils extracted from Citrus maxima Merr. peels have been used widely arcording to their antioxidant, anti-inflammatory and antifungal properties. The objective of this study is to examine the safety level of citrus maxima essential oils for users. Skin irritation and abnormal toxicity tests were carried out respectively on 18 rabbits and 15 white mices. Citrus maxima oil samples from 3 different origins in Ho Chi Minh city were used. The experimental results show that oils extracted from Citrus maxima Merr. peels have average or slight irritation on skin and have abnormal toxicity.

Keywords: *Citrus maxima essential oil, skin irritation, abnormal toxicity.*

Received: 09/01/2020

Revised: 02/03/2020

Accepted for publication: 06/03/2020