



Original Article

Formulation and Acute Toxicity, Anti-Inflammatory, Analgesic Effects of Hard Capsules Containing Dry Extract of *Siegesbeckia Orientalis* in Experimental Animals

Tran Thi Van Anh^{1,*}, Pham Quoc Tuan¹, Nguyen Van Khanh², Dao Viet Hung¹,
Nguyen Thanh Hai², Ngo Thi Xuan Thinh¹, Ha Thanh Hoa¹, Dang Kim Thu²,
Nguyen Thi Thuy Linh², Nguyen Thu Quynh³

¹Phu Tho College of Medicine and Pharmacy, 2201 Hung Vuong, Gia Cam, Viet Tri, Phu Tho, Vietnam

²VNU University of Medicine and Pharmacy, 144 Xuan Thuy, Cau Giay, Hanoi, Vietnam

³Thai Nguyen University of Medicine and Pharmacy, 284 Luong Ngoc Quyen, Thai Nguyen, Vietnam

Received 12 September 2023

Revised 09 October 2023; Accepted 02 November 2023

Abstract: This study aimed to investigate the acute toxicity, analgesic, and anti-inflammatory effects of hard capsules containing dry extract of *Siegesbeckia orientalis* L. (CKHT) in animal models. Hard capsules were prepared using the volumetric method, with Avicel PH 102 as the diluent excipient and magnesium carbonate as the adsorbent excipient. The acute toxicity of CKHT was assessed on mice at a dose of 2,400 mg/kg body weight. The anti-inflammatory effect was evaluated using a carrageenan-induced paw edema model in rats, while the analgesic effect was tested using an acetic acid-induced writhing model in mice. The results showed that CKHT administered at the doses of 102.2 mg/kg/day, 204.4 mg/kg/day, and 408.8 mg/kg/day had a significant anti-inflammatory effect on the carrageenan-induced rat paw edema model by reducing the paw volume and increasing the percentage of edema inhibition compared to the untreated group ($p < 0.001$). The dose of CKHT 408.8 mg/kg/day showed anti-inflammatory effects similar to aspirin at the dose level of 200 mg/kg/day ($p > 0.05$). In the analgesic study, mice treated with CKHT at the doses of 188.7 mg/kg/day, 377.4 mg/kg/day, and 754.8 mg/kg/day had a significant reduction in acetic acid-induced writhing within 30 minutes compared to the untreated group ($p < 0.001$). Furthermore, CKHT did not show acute toxicity (no LD₅₀) at the dose of 2,400 mg/kg body weight. These results suggested that CKHT exhibited acute analgesic and anti-inflammatory effects in animal models.

Keywords: Dried extract of *Siegesbeckia orientalis* L.; capsules; anti-inflammatory; analgesic.

* Corresponding author.

E-mail address: anhthu23081985@gmail.com

<https://doi.org/10.25073/2588-1132/vnumps.4555>

Bào chế và đánh giá độc tính cấp, tác dụng giảm đau, chống viêm của viên nang cứng chứa Cao Hy thiêm trên động vật thực nghiệm

Trần Thị Vân Anh^{1,*}, Phạm Quốc Tuấn¹, Nguyễn Văn Khanh², Đào Việt Hưng¹, Nguyễn Thanh Hải², Ngô Thị Xuân Thịnh¹, Hà Thanh Hòa¹, Đặng Kim Thu², Nguyễn Thị Thùy Linh², Nguyễn Thu Quỳnh³

¹Trường Cao đẳng Y Dược Phú Thọ, 2201 đường Hùng Vương, Gia Cẩm, Việt Trì, Phú Thọ, Việt Nam

²Trường Đại học Y Dược, Đại học Quốc gia Hà Nội, 144 Xuân Thủy, Cầu Giấy, Hà Nội, Việt Nam

³Trường Đại học Y Dược Thái Nguyên, 284 Lương Ngọc Quyến, Thái Nguyên, Việt Nam

Nhận ngày 12 tháng 9 năm 2023

Chỉnh sửa ngày 09 tháng 10 năm 2023; Chấp nhận đăng ngày 02 tháng 11 năm 2023

Tóm tắt: Nghiên cứu được thực hiện nhằm bào chế viên nang cứng chứa cao khô từ bài thuốc Cao Hy thiêm, đánh giá độc tính cấp, tác dụng giảm đau và chống viêm cấp trên động vật thực nghiệm của viên nang cứng bào chế. Viên nang cứng được bào chế theo phương pháp đông theo thể tích sử dụng Avicel PH 102 là tá dược độn và magesi carbonat là tá dược hút. Độc tính cấp của viên nang cứng được đánh giá trên chuột nhắt trắng tới mức liều 2.400 mg/kg thể trọng. Tác dụng chống viêm cấp được đánh giá trên mô hình chuột cống trắng gây phù bàn chân bằng carrageenin. Mô hình gây đau quận bằng acid acetic trên chuột nhắt trắng được sử dụng để đánh giá tác dụng giảm đau của viên nang cứng. Kết quả nghiên cứu cho thấy viên nang có độ rã tốt và an toàn trên động vật thực nghiệm. Viên nang cứng liều 102,2 mg/kg/ngày, 204,4 mg/kg/ngày, và 408,8 mg/kg/ngày có tác dụng chống viêm cấp trên mô hình gây phù bàn chân chuột cống trắng bằng carrageenin thông qua làm giảm thể tích bàn chân chuột, tăng tỷ lệ phần trăm ức chế phù so với nhóm chứng bệnh lý ($p < 0,001$). Với liều 408,8 mg/kg/ngày, viên nang cứng có tác dụng chống viêm tương đương aspirin liều 200 mg/kg/ngày ($p > 0,05$). Đối với tác dụng giảm đau, viên nang cứng liều 188,7 mg/kg/ngày, 377,4 mg/kg, và 754,8 mg/kg/ngày có tác dụng giảm đau ngoại vi do làm giảm đáng kể số cơn đau quận bụng do acid acetic gây ra trên chuột nhắt trắng trong 30 phút so với nhóm chứng bệnh lý ($p < 0,001$). Các số liệu nghiên cứu đã chỉ ra rằng, viên nang cứng chứa cao khô từ bài thuốc Cao Hy thiêm có tác dụng giảm đau, chống viêm cấp trên động vật thực nghiệm.

Từ khóa: Cao khô Hy thiêm (CKHT); viên nang; giảm đau; chống viêm.

1. Mở đầu

Chuyên luận Cao Hy thiêm trong Dược điển Việt Nam (ĐĐVN) V (tập 2) gồm dược liệu Hy thiêm và Thiên niên kiện, có công năng: thanh nhiệt, trừ thấp, tán phong, thông kinh chỉ thống;

chủ trị: các chứng phong thấp sưng nóng đỏ đau, chân tay tê bại, đau lưng mỏi gối do phong thấp nhiệt gây nên [1]. Hai thảo dược sử dụng trong công thức thuốc cổ truyền trên để kiểm và sẵn có. Tác dụng và công dụng của các dược liệu này đã được chứng minh trên thực tế. Trong đó, Hy

* Tác giả liên hệ.

Địa chỉ email: anhthu23081985@gmail.com

<https://doi.org/10.25073/2588-1132/vnumps.4555>

thêm là dược liệu chính đóng vai trò chủ đạo trong cao thuốc, tạo nên tác dụng giảm đau và chống viêm.

Hiện nay có nhiều chế phẩm điều trị, hỗ trợ điều trị bệnh viêm khớp đang lưu hành trên thị trường có thành phần Hy thiêm và Thiên niên kiện như: Kiện khớp tiêu thống, Hoàng thấp linh, Gút Tuệ Linh, Traly Gout. Tuy nhiên, hiện nay vẫn chưa có nghiên cứu hay sản phẩm nào trên thị trường phát triển từ công thức Cao Hy thiêm trong ĐĐVN V. Chính vì vậy, việc nghiên cứu chuyển dạng bào chế cao lỏng Hy thiêm sang dạng viên nang cứng ổn định về chất lượng, thuận lợi cho sử dụng, bảo quản và việc đánh giá tác dụng giảm đau, chống viêm trên động vật thực nghiệm góp phần chứng minh tác dụng và công dụng của chế phẩm này, từ đó là cơ sở khoa học, thực tiễn để có thể ứng dụng sản xuất ra sản phẩm điều trị, hỗ trợ điều trị cho người bệnh mắc bệnh viêm khớp.

2. Nguyên liệu, thiết bị và phương pháp nghiên cứu

2.1. Nguyên liệu, hóa chất, thiết bị

2.1.1. Hóa chất, dung môi và chất chuẩn

Nguyên liệu: CKHT chuẩn hóa hàm lượng kirenol, darutosid và darutigenol tương ứng là 6,79 mg/g cao khô; 3,09 mg/g cao khô và 2,24 mg/g cao khô, được bào chế theo công thức trong chuyên luận Cao Hy thiêm của ĐĐVN V.

Chất chuẩn: Kirenol, darutosid và darutigenol độ tinh khiết 98% (HPLC) (Wuhan ChemFaces Biochemical Co. Ltd., Trung Quốc).

Thuốc đối chiếu: Aspirin 100 mg dạng viên bao tan trong ruột (Công ty Cổ phần Traphaco).

Hóa chất và dung môi: Acid acetic (Merck, Đức), carrageenin (BDH Chemicals Ltd., Anh), nước muối sinh lý 0,9% (dạng tiêm truyền - B.Braun Việt Nam), cồn 90°, nước cất, acetonitril (Merck, Đức), methanol (Merck, Đức), natri clorid (Trung Quốc).

Tá dược: Celullose vi tinh thể (Avicel PH 102), tinh bột, magnesi carbonat, natri

crosscarmellose, natri lauryl sulfat, colloidal silicon dioxide (Aerosil), talc và nang cứng số 0 (Việt Nam) đạt tiêu chuẩn dược dụng.

2.1.2. Động vật nghiên cứu

Chuột nhắt trắng chủng Swiss, không phân biệt giống, khỏe mạnh, đạt tiêu chuẩn thí nghiệm, trọng lượng 22 ± 2 g do Viện Vệ sinh Dịch tễ Trung ương cung cấp.

Chuột cống trắng chủng Wistar, giống cái, khỏe mạnh, đạt tiêu chuẩn thí nghiệm, trọng lượng 200 ± 20 g do Học viện Quân Y cung cấp.

Chuột được nuôi trong phòng nuôi động vật thí nghiệm (nhiệt độ 24 ± 2 °C, ánh sáng tự nhiên) ổn định ít nhất một tuần trước khi tiến hành nghiên cứu. Động vật được nuôi bằng thức ăn chuẩn do Viện Vệ sinh Dịch tễ Trung ương cung cấp, uống nước tự do.

Các thí nghiệm được tiến hành trong phòng riêng biệt, yên tĩnh tại khu chăn nuôi động vật thí nghiệm của Trường Đại học Y Dược, Đại học Quốc gia Hà Nội.

Liều dùng tính theo số gam bột viên nang cứng chứa CKHT. Liều dự kiến sử dụng trên lâm sàng có tác dụng là 31,45 mg/kg/ngày [2]. Ngoại suy liều từ người sang động vật thực nghiệm, chuột nhắt trắng tính theo hệ số 12, liều dùng có tác dụng tương đương trên người cho chuột nhắt là 377,4 mg/kg/ngày, với chuột cống trắng, tính theo hệ số 6,5 là 204,4 mg/kg/ngày.

2.1.3. Trang thiết bị nghiên cứu

Hệ thống lồng nuôi chuột dạng top type MVCS 70 Rack (Hàn Quốc), máy đo thể tích bàn chân chuột Plethysmometer 37140 (Ugo Basile, Italy), máy đo khối lượng riêng của bột SVM 223 (Erweka-Đức), cân kỹ thuật Practum 612-1S (Sartorius, Đức), máy thử độ rã DTG1000 (Copley Scientific, Anh), máy đo hàm ẩm nhanh Ohaus MB45 (Thụy sĩ) và một số thiết bị, dụng cụ phụ trợ khác.

2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Đánh giá một số đặc tính hóa lý của cao khô Hy thiêm

Phân bố kích thước hạt

Sử dụng các kích thước cỡ rây khác nhau.

Mất khối lượng do làm khô

Tiến hành theo phụ lục 9.6, ĐĐVN V, cân chính xác khoảng 1 g CKHT, trải đều trên đĩa cân, gia nhiệt ở nhiệt độ 105 °C, theo dõi và đọc kết quả trong 10 phút.

Tính hút ẩm

Cân một lượng chính xác khoảng 2 g CKHT, trải thành lớp mỏng. Bảo quản mẫu trong bình kín ở độ ẩm tương đối $75 \pm 5\%$, nhiệt độ 25 ± 2 °C (sử dụng dung dịch natri clorid bão hòa 35% để duy trì độ ẩm). Sau 1, 2, 4, 8, 12, 24 và 96 giờ lấy mẫu ra cân lại khối lượng, xác định phần trăm khối lượng tăng lên so với khối lượng cao khô ban đầu [3].

Tỷ trọng, độ trơn chảy

Tiến hành trên máy đo khối lượng riêng biểu kiến Erweka. Cân chính xác một lượng khoảng 50 g bột CKHT nguyên liệu cho vào ống đong, đọc thể tích thực V_t (ml), rồi rung đến thể tích không đổi V_{bk} (ml). Khối lượng riêng thực và khối lượng riêng biểu kiến được xác định bằng các công thức:

$$D_t = \frac{m}{V_t} \qquad D_{bk} = \frac{m}{V_{bk}}$$

Trong đó: D_t , D_{bk} là khối lượng riêng thực và biểu kiến (g/ml);

m là khối lượng CKHT (g);

V_t , V_{bk} là thể tích thực và biểu kiến (ml).

Chỉ số nén Carr (C) tính theo công thức:

$$C = \frac{D_{bk} - D_t}{D_{bk}} \times 100$$

Tiến hành 3 lần và lấy kết quả trung bình [4].

2.2.2. Nghiên cứu xây dựng công thức và quy trình bào chế viên nang cứng chứa cao khô Hy thiêm

Xây dựng công thức bào chế

Thành phần dự kiến công thức bào chế viên nang cứng chứa CKHT được trình bày như trong Bảng 1.

Quy trình bào chế

Cân các thành phần theo công thức rồi trộn theo nguyên tắc đồng lượng. Tá dược điều hoà trơn chảy được trộn sau cùng. Hỗn hợp khối bột

được rây qua rây 0,5 mm rồi đóng vào nang cứng số 0. Sản phẩm được bảo quản trong lọ nhựa, đậy kín, tránh ẩm và ánh sáng.

Lựa chọn công thức bào chế dựa trên việc đánh giá khối lượng riêng biểu kiến và chỉ số nén của khối bột đóng nang, độ rã của viên nang.

Bảng 1. Thành phần công thức khảo sát bào chế viên nang cứng chứa CKHT

Thành phần	Vai trò
CKHT	Dược chất.
Avicel PH 102	Tá dược độn, rã.
Tinh bột	Tá dược độn, rã.
Magnesi carbonat	Tá dược độn, hút.
Natri crosscarmellose	Tá dược siêu rã.
Natri lauryl sulfat	Tá dược gây thấm, điều hoà trơn chảy.
Aerosil	Tá dược điều hoà trơn chảy.
Talc	Tá dược điều hoà trơn chảy.
Nang cứng số 0	

Đánh giá viên nang thành phẩm

Đánh giá độ rã của viên nang theo phụ lục 11.6 trong ĐĐVN V. Định lượng hàm lượng kirenol, darutosid và darutigenol trong viên nang bằng phương pháp sắc ký lỏng hiệu năng cao được xây dựng trong nghiên cứu đã công bố [5].

2.2.3. Nghiên cứu độc tính cấp của viên nang cứng chứa cao khô Hy thiêm

Nghiên cứu độc tính cấp của viên nang nghiên cứu trên chuột nhắt trắng chủng Swiss theo OECD (2001) [6] và của Đỗ Trung Đàm (2014) [7].

Thử nghiệm được thực hiện trên chuột nhắt trắng, giống cái. Chuột được nuôi ổn định trong điều kiện phòng thí nghiệm, nhịn ăn 3 giờ trước khi thử nghiệm, uống nước tự do. Cho từng lô chuột uống bột viên nang pha trong nước cất với liều tăng dần để xác định tỷ lệ chuột chết từ liều cao nhất không gây chết đến liều thấp nhất gây chết toàn bộ lô chuột thí nghiệm. Thể tích mẫu thử mỗi lần cho chuột nhắt uống là 0,1 ml/10 g chuột.

Chuột được ăn trở lại sau 1 giờ, nước uống bình thường. Theo dõi chuột liên tục trong vòng 4 - 6 giờ đầu, theo dõi tỷ lệ chết trong vòng 72 giờ sau khi uống mẫu thử.

- Thử nghiệm thăm dò:

Tiến hành từng nhóm trên 2 động vật thí nghiệm/nhóm, cho uống một số mức liều nhằm xác định khoảng liều cho thử nghiệm chính thức. Ban đầu, xác định liều trung bình (liều mà một con sống, 1 con chết) rồi lấy các khoảng liều về hai phía liều trung bình.

- Thử nghiệm chính thức:

Sau khi thử nghiệm thăm dò, động vật thí nghiệm được chia thành từng lô, mỗi lô 10 động vật. Mỗi lô được cho uống một mức liều. Thông thường, thiết kế thí nghiệm với lô đầu uống liều tối đa không gây chết động vật và lô cuối cùng uống liều tối thiểu gây chết toàn bộ động vật (nếu thử nghiệm thăm dò cho thấy mẫu thử có độc tính gây chết động vật) hoặc dùng liều tăng dần đến liều tối đa mà chuột dung nạp được bằng đường uống (nếu thử nghiệm thăm dò cho thấy mẫu thử không gây chết động vật).

Chỉ tiêu theo dõi: tỷ lệ chết trong vòng 72 giờ.

2.2.4. Nghiên cứu tác dụng chống viêm cấp của viên nang cứng chứa cao khô Hy thiêm

Tác dụng chống viêm cấp được đánh giá trên mô hình gây phù chân chuột bằng carrageenin [8]. Chuột công trắng chủng Wistar, khỏe mạnh, trọng lượng 200 ± 20 g, không phân biệt giống được chia ngẫu nhiên thành 5 lô, mỗi lô 10 con.

Lô 1 (Chứng sinh học): uống nước cất 0,2 ml/10 g.

Lô 2 (Chứng dương): uống aspirin liều 200 mg/kg cân nặng.

Lô 3 (CKHT 1/2): uống bột viên nang chứa CKHT liều 102,2 mg/kg cân nặng.

Lô 4 (CKHT1): uống bột viên nang chứa CKHT liều 204,4 mg/kg cân nặng.

Lô 5 (CKHT 2): uống bột viên nang chứa CKHT liều 408,8 mg/kg cân nặng.

Chuột các lô được uống nước hoặc mẫu thử 5 ngày liên tục trước khi gây viêm. Ngày thứ 5, sau khi uống nước hoặc thử 1 giờ, chuột ở các nhóm được gây viêm bằng cách tiêm carrageenin 1% (pha trong nước muối sinh lý, ngay trước khi tiêm), thể tích 0,05 ml/chuột vào gan bàn chân sau, bên phải của chuột.

Đo thể tích chân chuột (đến khớp cổ chân) bằng máy đo thể tích bàn chân chuột vào các thời điểm: trước khi gây viêm (V_0); sau khi gây viêm 2 giờ (V_2), 3 giờ (V_3), 5 giờ (V_5) và 7 giờ (V_7). Kết quả được tính theo công thức của Fontaine.

Độ tăng thể tích chân của từng chuột được tính theo công thức:

$$\Delta V\% = \frac{V_t - V_0}{V_0} \times 100$$

Trong đó: V_0 là thể tích chân chuột trước khi gây viêm (μ l); V_t là thể tích chân chuột sau khi gây viêm (μ l).

Tác dụng chống viêm của thuốc được đánh giá bằng khả năng ức chế phản ứng phù (I%).

$$I\% = \frac{\Delta \bar{V}_c\% - \Delta \bar{V}_t\%}{\Delta \bar{V}_0\%} \times 100$$

Trong đó: $\Delta \bar{V}_c$: trung bình độ tăng thể tích chân chuột ở lô mô hình (μ l); $\Delta \bar{V}_t$: trung bình độ tăng thể tích chân chuột ở lô uống mẫu (μ l).

Tỷ lệ giảm phù của các lô thử so với lô chứng bệnh lý và được tính theo công thức:

$$\Delta I\% = \frac{I_c\% - I_t\%}{I_c\%} \times 100$$

Trong đó: $\Delta I\%$: tỷ lệ giảm phù so với lô chứng bệnh lý; $I_c\%$: tỷ lệ ức chế phù của lô chứng bệnh lý; $I_t\%$: tỷ lệ ức chế phù của lô thử.

2.2.5. Nghiên cứu tác dụng giảm đau của viên nang cứng chứa cao khô Hy thiêm

Tác dụng giảm đau của viên nang cứng được đánh giá theo mô hình gây đau quận bằng acid acetic [8].

Chuột nhắt trắng chủng Swiss được chia ngẫu nhiên thành 5 lô, mỗi lô 10 con.

Lô 1 (Chứng sinh học): uống nước cất 0,2 ml/10 g.

Lô 2 (Chứng dương): uống aspirin liều 150 mg/kg cân nặng/ngày.

Lô 3 (CKHT 1/2): uống bột viên nang chứa CKHT liều 188,7 mg/kg cân nặng/ngày.

Lô 4 (CKHT 1): uống bột viên nang chứa CKHT liều 377,4 mg/kg cân nặng/ngày.

Lô 5 (CKHT 2): uống bột viên nang chứa CKHT liều 754,8 mg/kg cân nặng/ngày.

Chuột các đợc uống nước hoặc thuốc mỗi ngày 1 lần vào buổi sáng, với thể tích 0,1 ml/10g cân nặng/ngày trong 5 ngày liên tục. Ngày thứ 5, sau khi uống thuốc 1 giờ, tiến hành gây đau quận bằng cách tiêm phúc mạc mỗi chuột 0,1 ml/10g cân nặng dung dịch acid acetic 1%. Sau khi tiêm acid acetic, chuột xuất hiện cơn đau quận với biểu hiện thóp bụng lại, áp bụng xuống sàn, duỗi dài thân và chân sau. Đếm số cơn quận đau của từng chuột trong mỗi 5 phút cho đến phút thứ 30 sau khi tiêm acid acetic. So sánh số cơn quận đau giữa các lô nghiên cứu, tính tỷ lệ giảm số cơn đau quận của các nhóm so với nhóm chứng (I%) theo công thức:

$$I\% = \frac{Dc - Dt}{Dc} \times 100$$

Trong đó: Dc là số cơn đau quận của lô chứng; Dt là số cơn đau quận của lô thử.

2.2.6. Xử lý số liệu

Số liệu đợc nhập và xử lý bằng phần mềm Graphpad Prism 7, biểu diễn dưới dạng $\bar{X} \pm SD$ (với số liệu phân bố chuẩn). So sánh giá trị trung bình giữa các lô bằng one-way ANOVA, kèm hậu kiểm Tukey's t-test. Các đồ thị đợc vẽ bởi phần mềm Graphpad Prism 7. Sự khác biệt có ý nghĩa thống kê khi $p < 0,05$.

3. Kết quả nghiên cứu

3.1. Một số đặc tính lý hoá của cao khô Hy thiêm

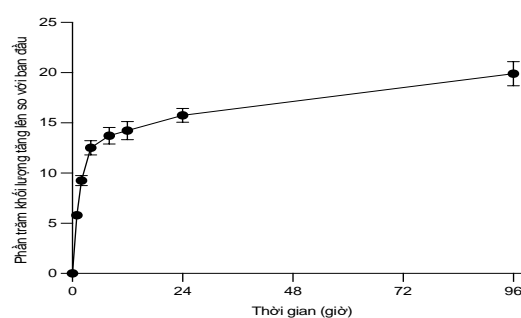
Việc đánh giá đặc tính hóa lý của cao thuốc để từ đó xây dựng công thức và quy trình bào chế

thích hợp cho viên nang cứng. Kết quả đánh giá các đặc tính của CKHT đợc trình bày trong Bảng 2 và Hình 1.

Kết quả ở Bảng 2 cho thấy CKHT khô, mịn với kích thước hạt nhỏ hơn 355 μm , bột có khả năng trơn chảy ($C = 25,8$). Tuy nhiên, cao khô có khả năng hút ẩm mạnh ở ngay 4 giờ đầu tiên, sau 24 giờ hàm ẩm tăng lên 15,75% và đạt 19,89% sau 96 giờ (Hình 1).

Bảng 2. Đặc tính hóa lý của CKHT

Chỉ tiêu hóa lý	Kết quả đánh giá
Phân bố kích thước hạt (μm)	< 355
Mất khối lượng do làm khô (%)	4,17 \pm 0,21
Tỷ trọng không gổ (g/ml)	0,737 \pm 0,029
Tỷ trọng gổ (g/ml)	0,956 \pm 0,031
Chỉ số nén Carr	25,8 \pm 0,7



Hình 1. Khả năng hút ẩm của CKHT sau 24 giờ.

3.2. Bào chế viên nang cứng chứa cao khô Hy thiêm

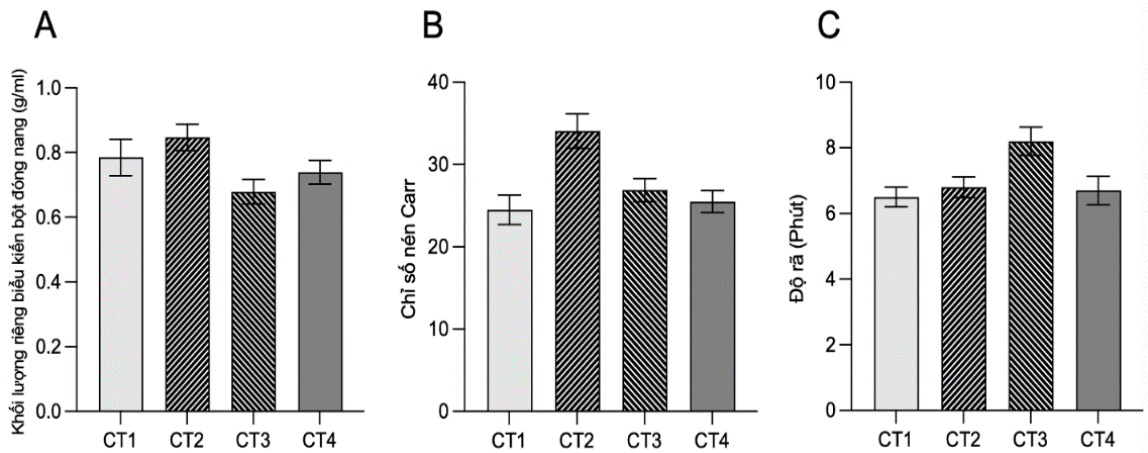
Tiến hành bào chế viên nang cứng với các thành phần trong công thức như trong Bảng 3. Kết quả thu đợc như trong Hình 2.

Bảng 3. Thành phần các công thức bào chế viên nang cứng

Thành phần (mg)	CT1	CT2	CT3	CT4
CKHT	368	368	368	368
Avicel PH 102	88	-	-	44
Tinh bột	-	88	-	-
Magnesi carbonat	-	-	88	44
Natri crosscarmellose	15	15	15	15
Natri lauryl sulfat	2	2	2	2
Aerosil	2	2	2	2
Talc	5	5	5	5
Tổng khối lượng	480	480	480	480

Kết quả Hình 2 cho thấy khi dùng các tá dược khác nhau ảnh hưởng tới khối lượng riêng biểu kiến, chỉ số nén của hỗn hợp bột đóng nang và độ rã của viên nang. Khi sử dụng Avicel PH 102, khối bột có khả năng trộn chảy tốt nhất và độ rã của viên nang nhanh nhất. Tá dược đơn tinh

bột có xu hướng làm giảm độ trộn chảy của hỗn hợp bột, còn magnesi carbonat giúp khối bột trộn chảy tốt hơn. Do vậy, công thức CT4 được lựa chọn bào chế viên nang cứng để đảm bảo khả năng trộn chảy cũng như hạn chế sự hút ẩm của khối bột đóng nang.



Hình 2. (A) Khối lượng riêng biểu kiến, (B) chỉ số nén của khối bột đóng nang, (C) Độ rã của viên nang.

3.3. Kết quả nghiên cứu độc tính cấp của viên nang cứng chứa cao khô Hy thiêm

3.3.1. Kết quả thử nghiệm thăm dò

Trong vòng 24 giờ sau uống chế phẩm thử, tất cả chuột đều khỏe mạnh, cử động bình thường, không có biểu hiện co giật, tiêu chảy hay xù lông, thở gấp. Sau 72 giờ, thử nghiệm thăm dò chưa xác định được liều cao nhất không gây chết chuột và liều thấp nhất gây chết 2/2 động vật.

3.3.2. Kết quả thử nghiệm chính thức

Trên cơ sở thử nghiệm thăm dò, để khẳng định độc tính của bột viên nang nghiên cứu, tiến hành thử nghiệm chính thức trên 40 chuột nhất

trắng, được chia ngẫu nhiên thành 4 lô, mỗi lô 10 con. Cho từng lô chuột uống bột viên nang cứng chứa CKHT pha trong nước cất với 4 mức liều thử tăng dần: 300 mg/kg, 600 mg/kg, 1.200 mg/kg, 2400 mg/kg. Theo dõi chuột trong vòng 4-6 giờ đầu, số chuột chết trong vòng 72 giờ. Kết quả xác định tỷ lệ chết chuột nhất trắng của mẫu thử được thể hiện trên Bảng 4.

Như vậy, trong 72 giờ sau uống bột viên nang cứng chứa CKHT với các mức liều khác nhau từ liều thấp nhất là 300 mg/kg thể trọng đến liều cao nhất là 2.400 mg/kg thể trọng không có chuột nào chết cũng như không có chuột nào xuất hiện triệu chứng bất thường.

Bảng 4. Tỷ lệ chết chuột nhất trắng ở các liều dùng khác nhau

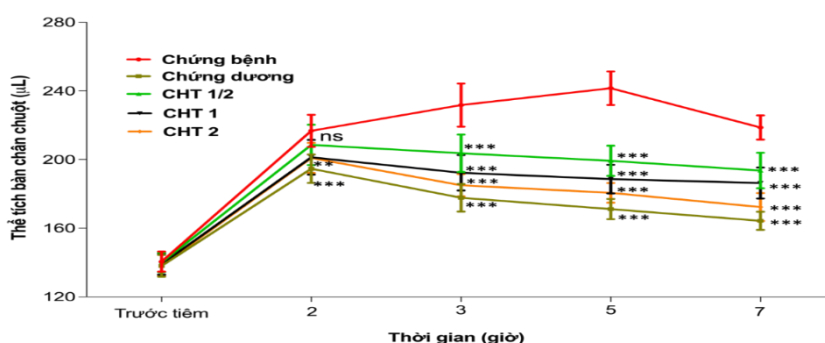
Lô	Liều dùng (mg/kg)	Số chuột/lô (n)	Số chuột chết trong vòng 72 giờ	Tỷ lệ % chuột chết
1	300	10	0	0
2	600	10	0	0
3	1.200	10	0	0
4	2.400	10	0	0

3.4. Kết quả nghiên cứu tác dụng chống viêm cấp của viên nang cứng chứa cao khô Hy thiêm

Kết quả đánh giá tác dụng chống viêm cấp trên mô hình gây phù chân chuột bằng carrageenin của viên nang nghiên cứu được trình bày ở Hình 3, Bảng 5 và Bảng 6.

Kết quả Hình 3 cho thấy thể tích bàn chân chuột ở các lô dùng chứng dương aspirin và lô

dùng viên nang cứng ở 2 mức liều 204,4 mg/kg/ngày và 408,8 mg/kg/ngày đều giảm có ý nghĩa thống kê so với nhóm chứng bệnh lý tại các thời điểm sau gây viêm (sau 2 giờ, 3 giờ, 5 giờ và 7 giờ) ($p < 0,001$). Thể tích bàn chân chuột ở lô dùng viên nang cứng liều 102,2 mg/kg/ngày giảm có nghĩa thống kê so với nhóm chứng bệnh lý tại thời điểm 3 giờ, 5 giờ, và 7 giờ sau gây viêm ($p < 0,001$).



Hình 3. Ảnh hưởng của viên nang cứng chứa CKHT tới thể tích bàn chân chuột tại các thời điểm sau gây viêm (n = 10).

Ghi chú: dữ liệu được biểu diễn dưới dạng $\bar{X} \pm SD$; so sánh giữa các lô bằng one-way ANOVA, kèm hậu kiểm Tukey's t-test. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, ns: không có sự khác biệt so với lô chứng bệnh.

Bảng 5. Ảnh hưởng của viên nang cứng tới trung bình tỷ lệ % tăng thể tích bàn chân chuột tại các thời điểm sau gây viêm (n = 10)

Lô	Sau 2 giờ	Sau 3 giờ	Sau 5 giờ	Sau 7 giờ
	Độ phù (%)	Độ phù (%)	Độ phù (%)	Độ phù (%)
Lô 1 (chứng bệnh)	54,32 ± 3,75	64,96 ± 5,45	71,99 ± 3,15	77,70 ± 7,49
Lô 2 (chứng dương)	41,10 ± 1,75	36,03 ± 0,72	36,69 ± 0,79	38,02 ± 0,02
p_{2-1}	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001
Lô 3 (CKHT 1/2)	48,94 ± 5,35	45,69 ± 9,99	42,52 ± 8,12	38,47 ± 9,194
p_{3-1}	> 0,05	< 0,001	< 0,001	< 0,001
Lô 4 (CKHT 1)	44,83 ± 6,76	38,72 ± 12,47	35,9 ± 10,12	34,29 ± 10,33
p_{4-1}	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001
Lô 5 (CKHT 2)	45,24 ± 1,92	38,04 ± 2,99	35,55 ± 2,95	35,03 ± 2,94
p_{5-1}	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001

Bảng 6. Tỷ lệ (%) giảm phù chân chuột so với nhóm chứng bệnh lý của nhóm tham chiếu và các nhóm dùng viên nang cứng

Lô	Tỷ lệ (%) giảm phù so với nhóm chứng bệnh lý			
	Sau 2 giờ	Sau 3 giờ	Sau 5 giờ	Sau 7 giờ
Lô 2 (chứng dương)	24,33	55,20	66,32	65,48
Lô 3 (CKHT 1/2)	9,90	29,66	40,93	31,05
Lô 4 (CKHT 1)	17,47	40,39	50,12	38,54
Lô 5 (CKHT 2)	16,72	47,93	57,50	55,93

Kết quả Bảng 5 và Bảng 6 cho thấy, lô chuột dùng aspirin liều 200mg/kg có độ phù bàn chân chuột giảm có ý nghĩa thống kê so với lô chứng bệnh lý ($p < 0,001$), tỷ lệ % giảm lần lượt là 24,33%, 55,20%, 66,32%, và 65,48% tại thời điểm 2 giờ, 3 giờ, 5 giờ, và 7 giờ sau khi gây viêm so với nhóm chứng bệnh lý. Lô chuột dùng viên nang cứng ở cả 3 mức liều 102,2 mg/kg/ngày, 204,4 mg/kg/ngày, và 408,8 mg/kg/ngày đều có độ phù bàn chân chuột giảm có nghĩa thống kê so với nhóm chứng bệnh lý tại thời điểm 3 giờ, 5 giờ, và 7 giờ sau khi gây viêm. Đáng lưu ý, tại thời điểm 7 giờ sau khi gây viêm, thể tích bàn chân chuột ở lô dùng viên nang liều

408,8 mg/kg/ngày và lô chứng dương aspirin 200 mg/kg/ngày không có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê ($p > 0,05$), tỷ lệ giảm phù bàn chân chuột so với nhóm chứng bệnh lý lần lượt là 55,93% và 65,48%.

3.5. Kết quả nghiên cứu tác dụng giảm đau cấp của viên nang cứng chứa cao khô Hy thiêm

Kết quả tác dụng của giảm đau cấp của viên nang nghiên cứu tới số cơn đau quặn của chuột nhắt trắng đếm được trong tổng số 30 phút được thể hiện trong Bảng 7.

Bảng 7. Ảnh hưởng của viên nang cứng lên số cơn quặn đau của chuột nhắt trắng trong 30 phút sau tiêm acid acetic (n = 10)

Lô	n	Số cơn đau quặn (số cơn trong mỗi 5 phút)						Tổng số cơn đau trong 30 phút
		0-5 phút	5-10 phút	10-15 phút	15-20 phút	20-25 phút	25-30 phút	
Lô 1 (chứng bệnh)	10	22,9 ± 4,58	41,1 ± 5,97	31,90 ± 5,57	24,80 ± 4,16	21,30 ± 4,97	17,20 ± 3,52	159,2 ± 17,47
Lô 2 (chứng dương)	10	9,00 ± 3,09	10,2 ± 1,48	10,10 ± 2,92	9,30 ± 2,87	10,40 ± 2,67	10,50 ± 2,84	59,50 ± 10,77
p ₂₋₁								< 0,001
Lô 3 (CKHT 1/2)	10	18,90 ± 2,92	24,30 ± 3,71	24,10 ± 4,93	21,00 ± 4,22	17,90 ± 3,28	16,60 ± 2,22	122,80 ± 16,44
p ₃₋₁								< 0,001
p ₃₋₂								< 0,001
Lô 4 (CKHT 1)	10	13,60 ± 3,60	19,50 ± 4,17	13,20 ± 3,91	13,10 ± 3,18	12,70 ± 2,45	11,80 ± 1,69	83,90 ± 13,41
p ₄₋₁								< 0,001
p ₄₋₂								< 0,01
Lô 5 (CKHT 2)	10	11,70 ± 2,45	14,50 ± 3,69	14,10 ± 2,13	11,20 ± 2,39	11,70 ± 2,83	10,60 ± 1,96	
p ₅₋₁								< 0,001
p ₅₋₂								> 0,05

(Ghi chú: dữ liệu được biểu diễn dưới dạng $\bar{X} \pm SD$; so sánh giữa các lô bằng one-way ANOVA, kèm hậu kiểm Tukey's t-test. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ so với lô chứng bệnh).

Kết quả Bảng 7 cho thấy, lô chuột dùng aspirin liều 150 mg/kg/ngày có số cơn đau quặn trong 30 phút giảm có ý nghĩa thống kê so với nhóm chứng bệnh lý ($p < 0,001$), tỷ lệ giảm là 62,63 %. Lô chuột dùng viên nang cứng ở cả 3 mức liều 188,7 mg/kg/ngày; 377,4 mg/kg, và 754,8 mg/kg/ngày đều làm giảm có ý nghĩa thống kê số cơn đau quặn bụng trong 30 phút so

với nhóm chứng bệnh lý, tỷ lệ giảm lần lượt là 22,86 %, 47,30 %, và 53,64% ($p < 0,001$). Đặc biệt, lô chuột dùng viên nang cứng liều 754,8 mg/kg/ngày có số cơn đau quặn bụng giảm không có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê so với lô chuột dùng aspirin liều 150 mg/kg/ngày ($p > 0,05$).

4. Bàn luận

Theo Y học cổ truyền, các dược liệu dùng để làm thuốc ở dạng đơn lẻ hoặc kết hợp thường được dùng dưới các dạng bào chế đơn giản như thuốc bột, thuốc thang hoặc được chiết nóng bằng các phương pháp khác nhau như hầm, hãm, sắc hoặc bào chế thành dạng phức tạp hơn như thuốc cao, thuốc hoàn dùng để uống. Với sự phát triển mạnh mẽ và những thành tựu của các ngành khoa học kỹ thuật và công nghệ dược phẩm thì sử dụng dược liệu dưới dạng cao khô mang nhiều ưu điểm như hạn chế sự nhiễm khuẩn và độ ổn định cao hơn so với các dạng cao đặc và cao lỏng và được ứng dụng để bào chế phát triển trong nhiều dạng thuốc rắn khác nhau. Do vậy, trong nghiên cứu này, dựa trên công thức Cao Hy thiêm trong chuyên luận của ĐVNV dưới dạng cao lỏng được bào chế thành cao khô và kiểm soát chất lượng với hàm lượng kirenol, darutosid và darutigenol trong cao lần lượt là 18,46 mg/g, 8,38 mg/g và 6,09 mg/g được đóng vào nang cứng gelatin số 0. Cao khô có khả năng trơn chảy, tuy nhiên lại hút ẩm mạnh [9]. Vì thế trong quá trình xây dựng công thức bào chế Avicel PH 102 và magnesi carbonat được sử dụng do các tá dược này có khả năng trơn chảy tốt, thường dùng làm tá dược dập thẳng [10]. Bên cạnh đó, magnesi carbonat là tá dược hút [11], khi phối hợp với Avicel PH 102 cũng cải thiện khả năng trơn chảy và hạn chế sự hút ẩm của khối bột đóng nang. Cuối cùng, viên nang sau khi bào chế nên được đóng trong bao bì kín, tránh ẩm để đảm bảo độ ổn định và tuổi thọ cho chế phẩm.

Chuột nhắt trắng uống viên nang cứng chứa CKHT với liều tăng dần từ 300 mg/kg/ngày đến liều cao nhất 2.400 mg/kg/ngày nhưng không có chuột nào xuất hiện biểu hiện bất thường và không có chuột nào chết. Từ những kết quả trên cho thấy, chế phẩm không gây ra độc tính cấp cho chuột thí nghiệm ở liều 2.400 mg/kg cân nặng, điều này có nghĩa là giá trị LD₅₀ ở khoảng cao hơn 2.400 mg/kg cân nặng. Theo GSH (Globally Harmonised Classification System for Chemical Substances and Mixtures - Hệ thống phân loại hài hòa toàn cầu đối với các chất và hỗn hợp hóa học) LD₅₀ của viên nang cứng được

xếp vào phân loại 5 - chất gần như không có độc tính.

Mô hình gây phù bàn chân chuột được tiến hành trên chuột cống trắng và sử dụng carrageenin như một kháng nguyên. Carrageenin có bản chất là polysaccharid tương đồng với cấu trúc vỏ vi khuẩn do đó đáp ứng miễn dịch của cơ thể chủ yếu là đáp ứng không đặc hiệu, với sự tham gia chủ yếu của đại thực bào và bạch cầu đa nhân trung tính. Biểu hiện của quá trình viêm này là giãn mạch, bạch cầu xuyên mạch, tăng tiết các autacoid như nitric oxid, histamin, serotonin, kinin, các prostaglandin,... là những chất trung gian thần kinh hoặc điều hòa thần kinh [8]. Tác dụng chống phù viêm ở giai đoạn đầu (0-2 giờ) được xem là tác dụng ức chế các chất trung gian amino acid (histamin, serotonin) và hoạt tính ở giai đoạn sau (4-24 giờ) được xem là tác dụng ức chế dẫn xuất của acid arachidonic, chủ yếu là các prostaglandin và bradykinin [12].

Aspirin là một thuốc chống viêm không steroid, tác dụng chủ yếu chống viêm cấp nên được chọn làm thuốc tham chiếu trên các mô hình viêm cấp. Mẫu nghiên cứu có tác dụng chống viêm cấp sẽ làm giảm thể tích phù bàn chân chuột so với lô chứng bệnh lý. Trong nghiên cứu này, aspirin liều 200 mg/kg/ngày và các lô dùng viên nang cứng liều 102,2 mg/kg/ngày (CKHT 1/2), 204,4 mg/kg/ngày (CKHT 1), 408,8 mg/kg/ngày (CKHT 2) có tác dụng chống viêm rõ rệt, thể hiện ở tác dụng làm giảm đáng kể mức phù chân chuột ($p < 0,001$) so với lô chứng sinh lý ở tất cả các thời điểm đo.

Trong dược liệu Hy thiêm có thành phần hóa học chính là sesquiterpenoid, diterpenoid, steroid và phenolic,... [13]. Trong đó, kirenol, darutosid và darutigenol là những diterpenoid được nghiên cứu nhiều trong những năm gần đây cho thấy có tác dụng giảm đau, chống viêm rất tốt [14]. Viên nang nghiên cứu chứa ba chất kirenol, darutosid và darutigenol lần lượt là 18,46 mg/g, 8,38 mg/g và 6,09 mg/g cao khô.

Acid acetic khi tiêm phúc mạc chuột sẽ tạo ra kích thích gây viêm và đau. Khi mức kích thích vượt qua ngưỡng đau của chuột, sẽ gây ra đáp ứng với đau của chuột hay còn gọi là cơn đau

quận. Tác động của acid acetic lên số cơn đau quận của chuột nhắt trắng có thể phụ thuộc vào nồng độ và liều lượng acid acetic được sử dụng cũng như đặc điểm của từng chuột. Thông thường, trong các nghiên cứu sử dụng mô hình quận đau acid acetic, số cơn đau quận đạt đỉnh vào khoảng 5-10 phút sau tiêm và dần giảm sau đó [15]. Trong nghiên cứu của chúng tôi, tiêm phúc mạc chuột 0,1 mL/10 gam cân nặng acid acetic 1% cho thấy số cơn đau quận của các lô đều đạt đỉnh trong khoảng thời gian 15-20 phút đầu và có xu hướng giảm dần sau đó. Tổng số cơn đau quận của lô chứng bệnh trong 30 phút đếm được là $159,20 \pm 17,47$ cơn. Kết quả nghiên cứu của chúng tôi tương đồng với nghiên cứu của Acharya Balkrishna và cộng sự (năm 2019) khi đánh giá tác dụng chống viêm giảm đau của công thức dược liệu “Peedantal Vati” trên mô hình chuột nhắt trắng gây đau quận bằng acid acetic. Kết quả nghiên cứu cho thấy, nhóm chứng bệnh tiêm phúc mạc 0,1 mL/10 gram cân nặng acid acetic 0,6% có tổng số cơn đau quận trong 20 phút đếm được là $72,50 \pm 11,8$ cơn [8]. Aspirin được sử dụng là đối chứng vì có khả năng ức chế sinh tổng hợp prostaglandin do ức chế có hồi phục enzym cyclooxygenase (COX), làm giảm $PGF_{2\alpha}$, làm giảm tính cảm thụ của các ngọn dây thần kinh cảm giác với các chất gây đau của phản ứng viêm như bradykinin, histamin, serotonin. Mẫu thử có tác dụng giảm đau sẽ làm tăng ngưỡng đau, do đó thời gian xuất hiện đau quận sẽ muộn hơn và số lượng cơn đau quận sẽ giảm đi. Kết quả nghiên cứu cho thấy, viên nang cứng liều 188,7 mg/kg/ngày, 377,4 mg/kg/ngày và 754,8 mg/kg/ngày uống trong 5 ngày liên tục làm giảm số cơn quận đau ở tất cả các thời điểm nghiên cứu. Ngoài ra, viên nang cứng liều 754,8 mg/kg/ngày đã thể hiện tác dụng giảm đau trên mô hình gây đau quận bằng acid acetic tương đương với aspirin liều 150 mg/kg thể trọng ($p > 0,05$).

5. Kết luận

Nghiên cứu đã sử dụng các tá dược độn và hút để cải thiện đặc tính dễ hút ẩm và trơn chảy kém của cao khô từ bài thuốc cao Hy thiêm. Viên nang cứng bào chế được có khả năng rất tốt. Thử

nghiệm độc tính cấp cho thấy chưa xác định được độc tính cấp. Viên nang cứng chứa CKHT liều 408,8 mg/kg/ngày có tác dụng chống viêm tương đương với aspirin liều 200 mg/kg/ngày ($p > 0,05$). Bên cạnh đó, viên nang cứng chứa CKHT liều 754,8 mg/kg/ngày có tác dụng giảm đau tương đương với aspirin liều 150 mg/kg/ngày ($p > 0,05$).

Lời cảm ơn

Tác giả xin chân thành cảm ơn Sở Khoa học và Công nghệ tỉnh Phú Thọ đã tài trợ kinh phí; Trung tâm Nghiên cứu và Chuyển giao Công nghệ Dược, Trường Cao đẳng Y Dược Phú Thọ; Bộ môn Bào chế và Công nghiệp Dược phẩm, Trường Đại học Y Dược, Đại học Quốc gia Hà Nội đã hỗ trợ thực hiện nghiên cứu này.

Tài liệu tham khảo

- [1] Vietnam's Ministry of Health, Vietnamese Pharmacopoeia V, Medical Publishing House, Hanoi, Vol. 2, 2017 (in Vietnamese).
- [2] D. T. Loi, Vietnamese Medicinal Plants and Remedies, Medical Publishing House, Hanoi, 2004 (in Vietnamese).
- [3] Y. Zhang, B. Xu, X. Wang, S. Dai, X. Shi, Y. Qiao, Optimal Selection of Incoming Materials from the Inventory for Achieving the Target Drug Release Profile of High Drug Load Sustained-Release Matrix Tablet, AAPS PharmSciTech, Vol. 20, No. 2, 2019, pp. 76, <https://doi.org/10.1208/s12249-018-1268-9>.
- [4] A. Goyal, V. Sharma, M. K. Sihag, S. K. Tomar, S. Arora, L. Sabikhi, A. K. Singh, Development and Physico-Chemical Characterization of Microencapsulated Flaxseed Oil Powder: A Functional Ingredient for Omega-3 Fortification, Powder Technology, Vol. 286, 2015, pp. 527-37, <https://doi.org/10.1016/j.powtec.2015.08.050>.
- [5] T. T. V. Anh, P. Q. Tuan, N. V. Khanh, D. V. Hung, N. T. Hai, N. Q. Tuan, N. T. X. Thinh, H. T. Hoa, Simultaneous Quantification of Kirenol, Darutoside and Darutigenol in *Siegesbeckia Orientalis* by HPLC-DPA Method, VNU Journal of Science: Medical and Pharmaceutical Sciences, Vol. 38, No. 2, 2022, pp. 1-10, <https://doi.org/10.25073/2588-1132/vnumps.4399>.

- [6] OECD - Test Guideline for the Testing of Chemicals/Section 4: Health Effects Test No. 425: Acute Oral Toxicity – Up and Down procedure, 2001.
- [7] D. T. Dam, Methods to determine drug toxicity, Medical Publishing House, Hanoi, 2014 (in Vietnamese).
- [8] B. Acharya, R. Ravikant, S. S. Sachin, K. S. Vinay, S. Ravikant, J. Khemraj, D. Raviraj, S. Niti, S. Sonia, P. Prateek, K. Pratima, R. A. Veena, Evaluation of Polyherbal Ayurvedic Formulation Peedantak Vati for Anti-Inflammatory and Analgesic Properties, Journal of Ethnopharmacology, Vol. 235, No. 10, 2019, pp. 361-374, <https://doi.org/10.1016/j.jep.2019.01.028>.
- [9] J. C. Byeon, J. B. Ahn, W. S. Jang, S. E. Lee, J. S. Choi, J. S. Park, Recent Formulation Approaches to Oral Delivery of Herbal Medicines. Journal of Pharmaceutical Investigation, Vol. 49, No. 1, 2019, pp. 17-26, <https://doi.org/10.1007/s40005-018-0394-4>.
- [10] C. Raymond, J. P. Sheskey, J. P. Weller, London: Handbook of Pharmaceutical Excipients: Fourth Edition/Edited Pharmaceutical Press; Washington, DC: American Pharmaceutical Association, 2003.
- [11] E. L. Peter, C. D. Sesaaazi, D-optimal Mixture Design Optimized Solid Formulation Containing Fruits Extracts of *Momordica Charantia* and *Abelmoschus Esculentus*, PLoS One, Vol. 17, No. 6, 2022, pp. e0270547, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0270547>.
- [12] R. Vinegar, W. Schreiber, R. Hugo, Biphasic Development of Carrageenin Edema in Rats, Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics Vol. 166, No. 1, 1969, pp. 96-103. <https://jpet.aspetjournals.org/content/166/1/96> (accessed on: September 1st, 2023).
- [13] N. T. Duong, P. T. Thuong, I. H. Hwang, K. T. Hoang, K. M. Nguyen, H. A. Nguyen, M. Na, Anti-Hyperuricemic, Anti-Inflammatory and Analgesic Effects of *Siegesbeckia Orientalis* L. Resulting from the Fraction with High Phenolic Content. BMC Complement Altern Med, Vol. 17, No. 1, 2017, pp. 191, <https://doi.org/10.1186/s12906-017-1698-z>.
- [14] Y. S. Li, J. Zhang, G. H. Tian, H. C. Shang, H. B. Tang, Kirenol, Darutoside and Hesperidin Contribute to the Anti-Inflammatory and Analgesic Activities of *Siegesbeckia Pubescens* Makino By Inhibiting COX-2 Expression and Inflammatory Cell Infiltration, J Ethnopharmacol, Vol. 268, 2021, pp. 113547, <https://doi.org/10.1016/j.jep.2020.113547>.
- [15] J. P. Dzoyem, L. J. McGaw, V. Kuete, U. Bakowsky, Chapter 9 – Anti – inflammatory and Antinociceptive Activities of African Medicinal Spices ang Vegetables, Medical Spices and Vegetables from Africa, 2017, pp. 239-270, <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-809286-6.00009-1>.