Vietnam Journal of Community Medicine, Vol 63, No 2 (2022) 175-181

ASSESSMENT ON TOXICITY OF FATTY OIL EXTRACTED FROM PERILLA SEEDS

Tran Ba Kien[1], Duong Anh Tuyet[1,*], Nguyen Thuy Duong[2], Nguyen Thi Dong[3]

[1]*Hai Duong Central College of Pharmacy - 324 Nguyen Luong Bang, Thanh Binh, Hai Duong, Vietnam*
[2]*Hanoi University of Pharmacy - 13-15 Le Thanh Tong, Phan Chu Trinh, Hoan Kiem, Hanoi, Vietnam*
[3]*Administration of science technology and training - 138A Giang Vo, Ba Dinh, Hanoi, Vietnam*

Received 09/12/2021
Revised 25/01/2022; Accepted 28/02/2022

ABSTRACT

Fatty oil extracted from perilla seeds contains unsaturated fatty acids linolenic acid and linoleic acid which have good effects in lowering blood lipids. The study was conducted to determine the toxicity of perilla seed oil as a basis for developing production of perilla seed fatty oil into a safe product, supporting the treatment of dyslipidemia. The test results showed that the test product prepared from fatty oil extracted from perilla seeds at a dose of 40mL/kg (Acid linoleic 58,48%, acid linolenic 19,27%) – the highest dose that could be given to rats through a curved needle - did not show acute toxicity. When administered in repeated dose for 28 days, perilla seed oil showed no toxicity in rabbits.

Keywords: Acute toxicity, semi-permanent toxicity, perilla seed oil.

*Corressponding author
Email address: Duonganhtuyetdkh@gmail.com
Phone number: (+84) 917 623 626
https://doi.org/10.52163/yhc.v63i2.315

ĐÁNH GIÁ ĐỘC TÍNH CỦA DẦU BÉO CHIẾT XUẤT TỪ HẠT TÍA TÔ

Trần Bá Kiên[1], Dương Ánh Tuyết[1,*], Nguyễn Thùy Dương[2], Nguyễn Thị Đông[3]

[1]Trường CĐ Dược Trung ương Hải Dương - 324 Nguyễn Lương Bằng, P. Thanh Bình, Thành phố Hải Dương, Việt Nam
[2]Trường Đại học Dược Hà Nội - 13-15 P. Lê Thánh Tông, Phan Chu Trinh, Hoàn Kiếm, Hà Nội, Việt Nam
[3]Cục Khoa học công nghệ và Đào tạo, Bộ Y tế - 138A Giảng Võ, Ba Đình, Hà Nội, Việt Nam

Ngày nhận bài: 09 tháng 12 năm 2021
Chỉnh sửa ngày: 25 tháng 01 năm 2022; Ngày duyệt đăng: 28 tháng 02 năm 2022

TÓM TẮT

Dầu béo chiết xuất từ hạt tía tô chứa các axit béo không no acid linolenic và acid linoleic có tác dụng tốt trong việc hạ lipid máu. Kết quả thử nghiệm cho thấy, sản phẩm thử nghiệm được điều chế từ dầu béo hạt tía tô với liều lượng 40mL/kg (Acid linoleic 58,48%, acid linolenic19,27%) - liều cao nhất có thể cho chuột uống bằng kim cong đầu tù - không cho thấy độc tính cấp. Khi dùng liều lặp lại trong 28 ngày, dầu béo hạt tía tô không có biểu hiện độc tính trên thỏ.

Từ khóa: Độc tính cấp, độc tính bán trường diễn, dầu béo hạt tía tô.

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Rối loạn chuyển hóa lipid máu gây nguy cơ cao trong việc hình thành vữa xơ động mạch và dẫn đến các tai biến tim mạch. Theo tài liệu của Tổ chức Y tế thế giới, các bệnh tim mạch là nguyên nhân gây tử vong hàng đầu trên toàn cầu. Ước tính có khoảng 17,9 triệu người chết vì bệnh tim mạch mỗi năm, chiếm 32% tổng số ca tử vong trên toàn cầu. Hơn 3/4 số ca tử vong do bệnh tim mạch diễn ra ở các nước có thu nhập thấp và trung bình [1]. Việc dùng lâu dài các thuốc hạ mỡ máu gây ra nhiều tác dụng phụ [2]. Tía tô là dược liệu phổ biến tại Việt Nam, dầu béo chiết xuất từ hạt tía tô có chứa acid linolenic và acid linoleic, đã được chứng minh có tác dụng tốt trong việc hạ lipid máu [3], [4]. Do đó nghiên cứu được tiến hành nhằm xác định độc tính cấp và độc tính bán trường diễn của dầu béo của hạt tía tô để làm cơ sở cho việc định hướng phát triển dược liệu tía tô thành chế phẩm an toàn, cung ứng cho bệnh nhân rối loạn lipid máu nhằm kiểm soát mỡ máu, hạn chế tiến triển các biến chứng của rối loạn lipid máu.

2. ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Nguyên liệu nghiên cứu

Mẫu thử: Là dầu béo được chiết xuất từ hạt tía tô (*Perilla frutescens*, *Lamiaceae*) thu hoạch tại Hải Dương (nghiên cứu đã chiết xuất và xác định hàm lượng acid linoleic chiếm 58,48%, acid linolenic chiếm 19,27%, hiệu suất chiết xuất dầu béo từ hạt tía tô đạt 30,1%) với liều thiết kế cho động vật thực nghiệm uống (sau đây gọi là chế phẩm thử).

Động vật nghiên cứu: Chuột nhắt trắng trưởng thành, giống cái; Thỏ (cả hai giống, trọng lượng 2.0-2.8kg)

*Tác giả liên hệ
Email: Duonganhtuyetdkh@gmail.com
Điện thoại: (+84) 917 623 626
https://doi.org/10.52163/yhc.v63i2.315

cung cấp bởi Viện Vệ sinh dịch tễ và trung tâm G1-Viện kiểm nghiệm chế phẩm thử Trung ương; động vật được nuôi ổn định với điều kiện phòng thí nghiệm 5 ngày trước khi thực hiện nghiên cứu, thức ăn đầy đủ, uống nước tự do.

Thiết bị và dụng cụ nghiên cứu: Cân kĩ thuật Precisa-BJ610C, TE 412 (Sartoius), bộ hóa chất phân tích huyết học (URIT), bộ hóa chất xét nghiệm các thông số sinh hóa máu: AST, ALT, cholesterol toàn phần, glucose, protein toàn phần, creatinin (Teco Diagnostics).

2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Thử độc tính cấp

Phương pháp thử độc tính cấp theo hướng dẫn của Bộ Y tế kết hợp với hướng dẫn của OECD và tài liệu khác [5-7]

Thiết kế thí nghiệm

- Chuột được chia ngẫu nhiên vào các lô. Thử nghiệm thăm dò trên một số chuột hạn chế (3 chuột/lô x 3 lô) để xác định mức liều cao nhất có thể cho chuột nhắt trắng uống mà không gây chết (X mL/kg). Thiết kế thử nghiệm với lô đầu uống liều tối đa không gây chết động vật nào và lô cuối uống liều tối thiểu gây chết toàn bộ động vật. Thiết kế thử nghiệm chính thức như sau:

Nhóm chuột	Số chuột thử nghiệm	Thể tích uống (mL/10g)	Số lần uống/24h	Liều dùng (mL/kg)
Mức liều 1	10	0.2	1	X/2
Mức liều 2	10	0.2	2	X

- Chuột nhắt trắng nhịn ăn 3 giờ, kiểm tra cân nặng trước thử nghiệm. Đưa chế phẩm thử vào dạ dày chuột bằng kim cong đầu tù, 2 lần uống cách nhau ít nhất 2 giờ. Sau khi uống mẫu thử 2 giờ, chuột được cho ăn trở lại.

Theo dõi, đánh giá (sau lần uống chế phẩm thử cuối cùng)

Theo dõi liên tục trong 4 giờ*:* ghi lại biểu hiện bất thường. Trong vòng 72 giờ đến hết 14 ngày, ghi chép các thông số:

+ Tình trạng chung của chuột: hoạt động tự nhiên, tư thế, màu sắc (mũi, tai, đuôi), lông, phân, nước tiểu...

+ Sự tiêu thụ thức ăn, nước uống.

+ Số động vật chết: Xác định tỷ lệ động vật chết ở các lô trong vòng 72 giờ để tính toán LD_{50}. Khi có động vật chết, mổ để quan sát đại thể các cơ quan phủ tạng, làm vi thể để xác định nguyên nhân.

2.2.2. Thử độc tính bán trường diễn

Theo hướng dẫn thử độc tính liều lặp lại 28 ngày qua đường uống trên động vật gặm nhấm của OECD TG-407 và tài liệu khác [5, 6, 8].

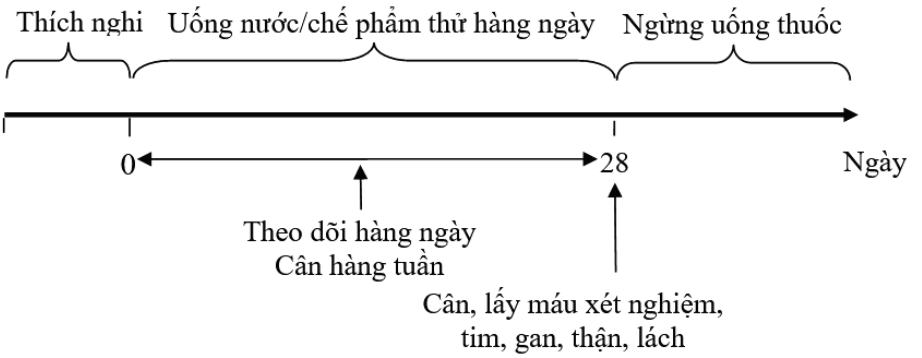
Thiết kế thí nghiệm

Thỏ chia ngẫu nhiên thành 3 nhóm và thử với các mức liều như ở bảng sau:

Lô	Số thỏ thí nghiệm	Thể tích cho uống (ml mẫu thử/kg thỏ)
Chứng	8	0,3 ml nước cất/kg thỏ
Thí nghiệm 1	8	0,1 ml chế phẩm thử/kg thỏ
Thí nghiệm 2	8	0,3 ml chế phẩm thử/kg thỏ

Thỏ được nuôi trong điều kiện thí nghiệm như nhau, đủ chế độ dinh dưỡng; cho uống chế phẩm thử hoặc nước hàng ngày vào 9 giờ sáng, liên tục trong 28 ngày.

Trong suốt quá trình thử nghiệm, theo dõi tình trạng chung của động vật, hàng tuần cân để theo dõi khối lượng cơ thể đồng thời điều chỉnh lượng chế phẩm thử uống. Tại thời điểm kết thúc (sau 28 ngày uống chế phẩm thử) và thời gian nuôi hồi phục (nếu cần), lấy máu từ tĩnh mạch tai của từng động vật cho vào hai loại ống nghiệm riêng: ống có chứa chất chống đông để làm các xét nghiệm huyết học và ống không chứa chất chống đông, ly tâm lấy huyết thanh để làm các xét nghiệm hóa sinh. Mổ toàn bộ động vật để quan sát đại thể các cơ quan, lấy ngẫu nhiên 2 động vật trong mỗi lô để làm tiêu bản vi thể gan và thận. Qui trình xác định độc tính bán trường diễn được mô tả ở hình sau.



Theo dõi và đánh giá

+ Tình trạng toàn thân: hàng ngày theo dõi biểu hiện của động vật thực nghiệm (tình trạng da, lông, mắt, sự tiết dịch mũi, miệng, hô hấp, phân, nước tiểu…), hoạt động tự nhiên, tư thế, hành vi, sự tiêu thụ thức ăn, nước uống. Hàng tuần cân động vật thực nghiệm để theo dõi sự thay đổi khối lượng cơ thể đồng thời điều chỉnh lượng chế phẩm thử uống.

+ Các thông số huyết học: số lượng hồng cầu, bạch cầu, tiểu cầu, nồng độ hemoglobin, tỷ lệ hematocrit, thể tích trung bình hồng cầu.

+ Các thông số hóa sinh: hoạt độ transaminase huyết thanh (AST, ALT), glucose, cholesterol toàn phần, protein toàn phần, creatinin huyết thanh (máy sinh hóa bán tự động TC-3300 plus - tại Đại học Dược Hà Nội)

+ Đại thể cơ quan: Mổ toàn bộ động vật sau thử nghiệm và quan sát cảm quan các cơ quan tim, gan, thận, lách. Cân ngay khối lượng các cơ quan và tính tỷ lệ so với khối lượng cơ thể.

+ Mô bệnh học: Lấy ngẫu nhiên 2 thỏ ở từng lô để làm tiêu bản vi thể gan và thận, các mẫu gan và thận được cố định bằng dung dịch Carnoy, vùi trong parafin, cắt các lát mỏng 5 - 7 µm, nhuộm hematoxylin – eosin và quan sát dưới kính hiển vi quang học để đánh giá cấu trúc hình thái vi thể gan, thận (Tiêu bản vi thể gan, thận được thực hiện và đánh giá bởi Ths.BS.Trần Ngọc Minh, Bộ môn Giải phẫu bệnh - Trường Đại học Y Hà Nội)

Phương pháp xử lý số liệu: Kết quả được biểu diễn dưới dạng M ± SE (M: giá trị trung bình từng lô, SE: sai số chuẩn). So sánh giá trị trung bình giữa các lô bằng one – way ANOVA, dùng Dunnett test để so sánh giá trị trung bình của lô thử so với lô chứng.

3. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU VÀ BÀN LUẬN

3.1. Kết quả thử độc tính cấp

- *Kết quả thử nghiệm thăm dò*: Sau 4 giờ theo dõi liên tục, tất cả chuột đều không có biểu hiện bất thường; sau 72 giờ, tất cả chuột đều còn sống và không xuất hiện chuột chết trong vòng 14 ngày sau uống chế phẩm thử. Kết thúc thử nghiệm thăm dò xác định được liều 40mL dầu béo từ hạt tía tô/kg chuột (là mức liều cao nhất có thể cho uống được) không gây chết chuột nhắt trắng.

- *Kết quả thử nghiệm chính thức*: Trình bày trong bảng sau

Nhóm chuột	Số chuột thử nghiệm	Thể tích uống (mL/10g)	Số lần uống/24h	Liều dùng (mL/kg)	Số chuột chết
Mức liều 1	10	0.2	1	20 mL/kg	0
Mức liều 2	10	0.2	2	40 mL/kg	0

Sau khi uống chế phẩm thử 4 giờ: 6/10 chuột ở mức liều 2 có biểu hiện tiêu chảy, giảm hoạt động, 4/10 không có biểu hiện bất thường. Các chuột phản xạ tốt với các kích thích, không khó thở. Sau khi uống chế phẩm thử 4 – 12 giờ: cả 10/10 chuột ở mức liều 2 đều bị tiêu chảy, giảm hoạt động, tụm lại thành đám. Sau khi uống chế phẩm thử 12 – 24 giờ: 9/10 chuột ở mức liều 2 giảm dần hiện tượng tiêu chảy, hoạt động hồi phục dần về bình thường, ăn uống, phản xạ tốt, phân khô, nước tiểu bình thường. Còn 1 chuột vẫn còn tình trạng tiêu chảy, rất ít hoạt động. Sau khi uống chế phẩm thử 72 giờ: các chuột không còn biểu hiện bất thường.

100% chuột thử nghiệm đều còn sống sau 14 ngày

dùng chế phẩm thử. Vì không có chuột chết nên chưa xác định được liều LD_{50} của dầu béo từ hạt tía tô. Như vậy, chế phẩm thử với liều 40mL/kg – liều cao nhất có thể cho chuột uống, không thấy biểu hiện độc tính cấp.

3.2. Kết quả thử độc tính bán trường diễn

3.2.1. Ảnh hưởng đến tình trạng toàn thân:

Thỏ ở các lô trong suốt quá trình nghiên cứu đều ăn uống, hoạt động bình thường, không có biểu hiện bất thường.

3.2.2. Ảnh hưởng đến tăng trưởng khối lượng cơ thể

Bảng 1. Kết quả theo dõi cân nặng của Thỏ trong 28 ngày thử nghiệm

	Lô 1 (chứng)	**Lô 2 (0,1ml/kg)**	**Lô 3 (0,3ml/kg)**
Bắt đầu	2,31±0,07	2,48±0,08	2,50±0,13
Tuần 1	2,63±0,13	2,55±0,07	2,61±0,13
Tuần 2	2,71±0,10	2,75±0,06	2,69±0,12
Tuần 3	2,73±0,09	2,76±0,05	2,70±11
Tuần 4	2,66±0,13	2,75±0,05	2,73±0,11

Trong suốt 28 ngày nghiên cứu, cân nặng thỏ đều tăng lên ở cả lô chứng và lô thử. Không có khác biệt về tăng trưởng khối lượng cơ thể giữa các lô chứng với các lô thử tại tất cả các thời điểm nghiên cứu.

3.2.3. Ảnh hưởng thông số huyết học

Bảng 2. Các thông số huyết học của thỏ sau 28 ngày dùng chế phẩm thử

Thông số huyết học	**Lô 1 (chứng)**	**Lô 2 (0,1ml/kg)**	**Lô 3 (0,3ml/kg)**
WBC (10^9/L)	9,10 ± 0,92	9,08 ± 0,60	9,13 ± 1,01
LYM%	3,24±0,15	2,91 ± 0,21	3,34±0,37
RBC (10^{12}/L)	4,85 ± 0,09	4,78 ± 0,16	5,02 ± 0,19
HGB (g/dL)	12,89 ± 0,16	12,98 ± 0,35	13,74 ± 0,48
HCT (%)	26,93 ± 0,34	26,95 ± 0,79	28,46 ± 0,85
MCV (fL)	55,73 ± 0,90	56,86 ± 0,86	56,94 ± 0,66
PLT(10^9/L)	147,00± 17,09	154,75 ± 18,83	157,13 ± 16,77

Tại thời điểm sau uống chế phẩm thử 28 ngày, không có sự khác biệt về thông số huyết học giữa các lô dùng chế phẩm thử Dầu béo từ hạt tía tô so với lô chứng.

3.2.4. Ảnh hưởng thông số sinh hóa

Bảng 3. Các thông số hóa sinh của thỏ sau 28 ngày dùng chế phẩm thử

Thông số hóa sinh	**Lô 1 (chứng)**	**Lô 2 (0,1ml/kg)**	**Lô 3 (0,3ml/kg)**
Glucose (mmol/L)	7,77 ± 0,47	6,20 ±0,17*	6,20 ± 0,38*
Cholesterol (mmol/L)	2,25 ±0,55	1,98 ±0,53	1,74 ± 0,39
Protein (g/L)	100,02 ±4,17	94,58 ±3,13	94,45±3,14

Sau uống chế phẩm thử 28 ngày, glucose huyết thanh giảm khác biệt so với lô chứng (p<0,05). Cholesterol và protein toàn phần ở lô uống Dầu béo từ hạt tía tô đều giảm nhẹ so với lô chứng.

3.2.5. Ảnh hưởng chức năng gan, thận

Bảng 4. Các thông số thể hiện chức năng gan, thận của thỏ sau 28 ngày dùng chế phẩm thử

Thông số hóa sinh	Lô 1 (chứng)	Lô 2 (0,1ml/kg)	Lô 3 (0,3ml/kg)
ALT (U/L)	181,56 ± 24,44	201,85 ±21,69	210,22 ±24,54
AST (U/L)	133,20 ± 17,57	161,05 ±18,95	160,95 ±17,93
Creatinin (µmol/L)	135,27 ± 12,28	122,88 ±14,62	159,78 ± 6,67

Sau uống chế phẩm thử 28 ngày, các thông số AST, ALT tăng nhẹ, creatinin giảm ở lô uống dầu béo từ hạt tía tô liều 0,1ml/kg và tăng nhẹ ở lô 0,3ml/kg.

3.2.6. Thay đổi về mô bệnh học trên thỏ

- Về đại thể: Ảnh hưởng của chế phẩm Dầu béo từ hạt tía tô lên sự thay đổi tỷ lệ khối lượng các cơ quan so với khối lượng cơ thể được trình bày ở bảng sau:

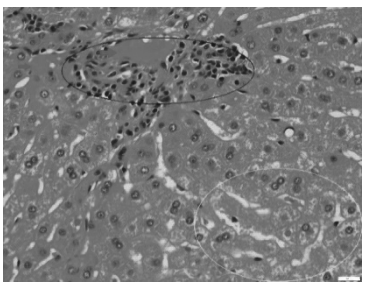
Bảng 5. Tỷ lệ khối lượng các cơ quan so với khối lượng cơ thể của thỏ sau 28 ngày dùng chế phẩm thử

	Tim (%)	Gan (%)	Thận (%)	Lách (%)	Phổi (%)
Lô 1 (chứng)	0,30±0,03	3,07±0,59	0,56±0,05	0,05±0,01	0,15±0,03
Lô 2 (0,1ml/kg)	0,31±0,01	3,33±0,26	0,56±0,02	0,05±0,01	0,14±0,03
Lô 3 (0,3ml/kg)	0,31±0,01	3,41±0,16	0,55±0,03	0,05±0,01	0,10±0,04

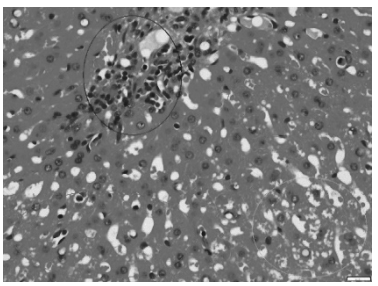
Tại thời điểm sau khi dùng liều lặp lại 28 ngày, tỷ lệ khối lượng các cơ quan tim, gan, thận, phổi, lách, thượng thận/khối lượng cơ thể của các động vật ở các lô dùng chế phẩm thử và lô chứng nhìn chung không có sự khác biệt.

- Về vi thể *(mẫu gan, thận được xử lý và và quan sát dưới kính hiển vi quang học độ phóng đại 250)*

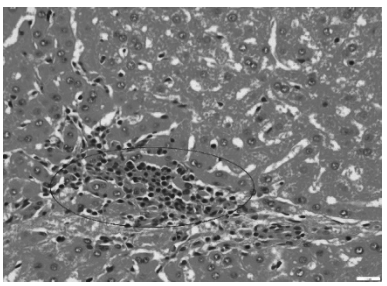
Hình ảnh cấu trúc vi thể gan của đại diện các lô được thể hiện trong hình 1, 2, 3



Hình 1. Ảnh và mô tả trên các mảnh cắt từ mô gan lô chứng



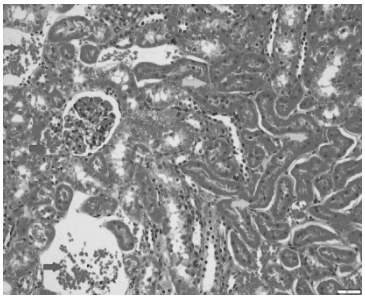
Hình 2. Ảnh và mô tả trên các mảnh cắt từ mô gan (liều 0,1ml/kg)



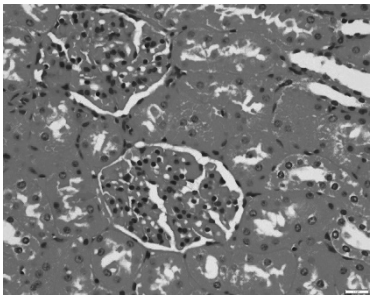
Hình 3. Ảnh và mô tả trên các mảnh cắt từ mô gan lô 3 (liều 0,3ml/kg)

Ở tất cả các hình ảnh quan sát được: cấu trúc gan không bị xóa, nhận rõ các tiểu thùy, tĩnh mạch trung tâm, khoảng cửa, các bè gan xắp xếp hướng xuyên tâm. Các tế bào gan có hình thái trong giới hạn bình thường, không có nhân lớn bất thường, không hoại tử. Một số ít tế bào gan thoái hóa nhẹ (thoái hóa nước, thoái hóa hạt). Mô gan không thấy xâm nhập tế bào viêm. Khoảng cửa không tăng sinh xơ, không xâm nhập viêm. Mô gan không tổn thương ở cả 3 tiêu bản vi thể.

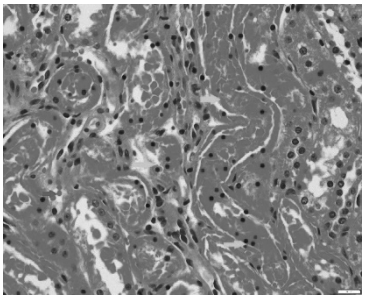
Hình ảnh cấu trúc vi thể thận của đại diện các lô được thể hiện trong hình 4,5,6



Hình 4. Ảnh và mô tả trên các mảnh cắt từ mô thận lô chứng



Hình 5. Ảnh và mô tả trên các mảnh cắt từ mô thận lô 1 (0,1ml/kg)



Hình 6. Ảnh và mô tả trên các mảnh cắt từ mô thận lô 3 (0,3ml/kg)

Ở tất cả hình ảnh quan sát được: cấu trúc thận nhận rõ các đơn vị thận. Các cầu thận có hình thái trong giới hạn bình thường, không thấy tăng sinh cuộn mao mạch cầu thận, màng đáy không dầy, khoang Bowman rõ, không bị hẹp. Các ống thận có hình thái bình thường. Tế bào ống thận không hoại tử. Mô kẽ không tăng sinh xơ, không xâm nhập viêm. Các tế bào ống thận không lắng đọng glycogen, màng đáy ống thận không dầy. Kết luận: Mô thận không thấy tổn thương ở cả 3 tiêu bản vi thể.

Như vậy, chế phẩm Dầu béo từ hạt tía tô không thể hiện các dấu hiệu của độc tính khi dùng liều lặp lại 28 ngày trên thỏ với các mức liều thử 0,1 ml/kg/ngày (liều tương đương liều thể hiện tác dụng dược lý) và 0,3ml/kg/ngày.

Do đó 0,3ml/kg được coi là mức liều không quan sát thấy các tác dụng không mong muốn liên quan đến việc dùng chế phẩm dầu béo từ hạt tía tô. Tiêu bản vi thể gan, thận cho thấy, sau 28 ngày dùng chế phẩm thử liên tục, cấu trúc vi thể gan và thận thỏ ở các lô dùng chế phẩm thử nhìn chung đều không khác biệt so với lô chứng tương ứng.

Nghiên cứu độc tính cấp và độc tính bán trường diễn của dầu hạt Tía tô trên loài gặm nhấm và chó của Hui-Xing Zang và cộng sự cũng cho kết quả tương tự [9] hay một nghiên cứu khác của Zhenhua Yang cũng không thấy biểu hiện độc tính trên chó của dầu hạt tía tô [10].

4. KẾT LUẬN

Chế phẩm thử với liều 40mL/kg – liều cao nhất có thể cho chuột uống qua kim cong đầu tù, không thấy biểu hiện độc tính cấp. Khi dùng liều lặp lại 28 ngày với liều 0,3 ml/kg, dầu béo từ hạt tía tô không thể hiện độc tính trên Thỏ.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

[1] Cardiovascular diseases, https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/cardiovascular-diseases-(cvds), Accessed 20 June 2021

[2] To MT, Tram VT, Academic Pharmacology 2. Medical Publishing House, 2018.

[3] Kyeong RL, Kyung HK, Jung BK, et al., High accumulation of γ-linolenic acid and Stearidonic acid in transgenic Perilla seeds. BMC Plant Biology, 2019; 19: 120.

[4] Kim SR, Je J, Jeong K, et al., Perilla Oil Decreases Aortic and Hepatic Lipid Accumulation by Modulating Lipogenesis and Lipolysis in High-Fat Diet-Fed Mice, Journal of Medicinal Food 2018; 22(1), 14-21.

[5] Guidelines for preclinical and clinical trials of traditional and herbal medicines - Ministry of Health, https://thuvienphapluat.vn/van-ban/The-thao-Y-te/Quyet-dinh-141-QD-K2DT-2015-Huong-dan-thu-nghiem-tien-lam-sang-lam-sang-thuoc-dong-y-414589.aspx. Accessed 14 March 2021.

[6] OECD, Test Guidelines for Chemicals, OECD, 2021; Section 4, Test No. 407,420,423,425.

[7] Shayne CG., Drug safetey evalution, Wiley, 2002.

[8] Dam DT, How to express dosage of substances extracted from medicinal herbs. Medical Publishing House 2015; p. 565-568.

[9] Zhang H, Guan J, Tian Y et al., Acute and sub-chronic 90-day oral toxicity study of Perilla seed oil in rodents and Beagle dogs, Regulatory Toxicology and Pharmacology, 2019; 103: 229-236.

[10] Yang Z, Ren T, Lu D et al., Evaluating the safety of phytosterols removed perilla seed oil-based lipid emulsion, Taylor & Francis, 2016; 13(10): 1345-1356.