

BỘ GIÁO DỤC VÀ ĐÀO TẠO

VIỆN HÀN LÂM KHOA HỌC

VÀ CÔNG NGHỆ VIỆT NAM

HỌC VIỆN KHOA HỌC VÀ CÔNG NGHỆ



LƯƠNG PHÚ HOÀNG

**NGHIÊN CỨU CHẾ TẠO VÀ ĐẶC TRƯNG VẬT LIỆU TỔ HỢP
CHITOSAN/ALGINATE CHỨA CÁC POLYPHENOL TRONG TRÀ
HOA VÀNG (*CAMELLIA CHRYSANTHA*)**

Chuyên ngành: Hoá hữu cơ

Mã số: 9440114

LUẬN ÁN TIẾN SĨ HOÁ HỮU CƠ

HÀ NỘI – 2024

Công trình được hoàn thành tại: Học viện Khoa học và Công nghệ Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam

Người hướng dẫn khoa học 1: GS. TS. Thái Hoàng

Người hướng dẫn khoa học 2: PGS. TS. Vũ Quốc Trung

Phản biện 1: ...

Phản biện 2: ...

Phản biện 3:

Luận án sẽ được bảo vệ trước Hội đồng chấm luận án tiến sĩ, họp tại Học viện Khoa học và Công nghệ - Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam vào hồi ... giờ ...', ngày ... tháng ... năm 2024

Có thể tìm hiểu luận án tại:

1. Thư viện Học viện Khoa học và Công nghệ
2. Thư viện Quốc gia Việt Nam

DANH MỤC CÁC CÔNG TRÌNH CÔNG BỐ CỦA TÁC GIẢ

1. Luong Phu Hoang, Nguyen Thuy Chinh, Vu Quoc Trung, Thai Hoang, Alginate/Chitosan film loading Golden Flower Tea (*Camellia Chrysantha*) Extract: Preparation and characterization, *Vietnam Journal of Science and Technology*, 2018:56:209-218.
2. Luong Phu Hoang, Nguyen Thuy Chinh, Vu Quoc Trung, Thai Hoang, Ly Thi Ngoc Lien, Tran Thi Kim Ngan, Tran Do Mai Trang, Pham The Dan, Preparation and Assessment of Some Characteristics of Nanoparticles Based on Sodium Alginate, Chitosan and *Camellia chrysantha* Polyphenols. *International Journal of Polymer Science, (SCIE) 2021 (3): 1-11.*
3. Luong Phu Hoang, Nguyen Thuy Chinh, Ly Thi Ngoc Lien, Thai Hoang, Vu Quoc Trung, Characterization of alginate/chitosan film loading golden camellia extract (*camellia chrysantha*), *Tạp chí phân tích Hóa, Lý và Sinh học*, 2022: 27(1):250-260.

MỞ ĐẦU

Trà hoa vàng (*Camellia chrysantha*) là một loài thực vật hạt kín trong họ Theaceae. Cây được tìm thấy ở Việt Nam (Tam Đảo, Quảng Ninh, Lâm Đồng, Tuyên Quang, Yên Bái, Cúc Phương) và Trung Quốc. Trong trà hoa vàng có hơn 400 thành phần hoá học, không có độc và tác dụng phụ, trong đó phải kể tới hàm lượng chính là các hợp chất phenolic, amino acid, folic acid, protein, vitamin B1, B2, C, E, acid béo... cùng rất nhiều các thành phần dinh dưỡng tự nhiên. Ngoài ra, trong trà hoa vàng còn có vài chục loại amino acid và rất nhiều các nguyên tố vi lượng Ge, Se, Mo, Zn, V... có tác dụng bảo vệ sức khỏe, nâng cao sức đề kháng, ngăn ngừa bệnh tật. Gần đây, áp dụng các phương pháp nghiên cứu hiện đại, các nhà khoa học đã tìm thấy tác dụng sinh học của dịch chiết từ lá và hoa trà hoa vàng chủ yếu là nhờ các polyphenol. Các nghiên cứu chỉ ra rằng hợp chất polyphenol trà có đặc tính chống oxy hóa, kháng viêm và hỗ trợ chống ung thư, chống lại sự phá hủy nội tạng...

Chitosan (CS) và dẫn xuất đã được ứng dụng trong nhiều lĩnh vực khác nhau. Trong y sinh và hóa dược, CS được sử dụng làm màng chữa vết thương, chất giúp tái tạo mô xương, thuốc chữa bệnh... Vật liệu nano trên cơ sở CS cũng được nghiên cứu ứng dụng trong y sinh do có tính ổn định tương đối cao mà vẫn duy trì được một số tính chất của chitosan ban đầu. Do có kích thước nhỏ, cấu trúc xốp nên CS có khả năng hấp phụ cao, nano - CS được sử dụng làm chất hấp phụ các chất khác nhau, đặc biệt là các loại thuốc dùng trong y học.

Alginate (AG) là polymer sinh học biển phong phú trên thế giới, được phát hiện đầu tiên bởi Stanford (1881). Vai trò thông thường của alginate trong dược phẩm là chất làm đặc, tạo gel, chất ổn định và trong các sản phẩm thuốc có kiểm soát quá trình giải phóng. Các dạng thuốc uống có sử dụng alginate rất phổ biến trong các ứng dụng liên quan đến dược phẩm. Cả CS và AG đều là các polymer tự nhiên, không độc hại, có khả năng phân hủy sinh học, tương thích sinh học cao và nhạy pH. Chúng được kết hợp sử dụng rộng rãi trong việc hình thành các vi hạt thông qua lực hút tĩnh điện giữa các nhóm chức amino và acid trong cấu tạo của CS và AG. Lựa chọn bào chế thuốc dưới dạng nano tiểu phân để kiểm soát giải phóng dược chất là một hướng nghiên cứu đầy tiềm năng của ngành hóa dược. Dựa trên các ưu điểm như: kiểm soát giải phóng dược chất ổn định hơn, giảm thiểu các nguy cơ quá liều, thuận lợi để bào chế các dạng thuốc khác nhau.

Nhược điểm của các polyphenol trong trà là kém bền với nhiệt độ và ánh sáng. Chính vì vậy, một trong những hướng nghiên cứu mới là tổ hợp các polymer thiên nhiên mang dược chất và kiểm soát giải phóng tốt các dược chất với polyphenol trà hoa vàng nhằm ứng dụng trong hỗ trợ điều trị các bệnh khác nhau và chống oxi hóa, ung thư. Trong số các polymer nguồn gốc thiên nhiên được sử dụng làm chất mang polyphenol trà hoa vàng, nổi bật nhất là AG và CS nhờ các đặc tính tốt của chúng: các liên kết hydrogen và tương tác lưỡng cực giữa AG - CS góp phần kiểm soát tốc độ giải phóng thuốc cũng như phát huy hoạt tính sinh học vốn có của AG và CS. Các công trình đã công bố cho thấy vấn đề nghiên cứu, chế tạo vật liệu tổ hợp AG/CS chứa các hợp chất quý như các polyphenol trong trà hoa vàng định hướng hỗ trợ điều trị một số bệnh như phòng chống ung thư, ức chế sinh trưởng của các tế bào ung thư, chống oxi hóa và nghiên cứu quá trình giải phóng thuốc mới chỉ bắt đầu. Vì vậy, nghiên cứu sinh lựa chọn đề tài **“Nghiên cứu chế tạo và đặc trưng vật liệu tổ hợp chitosan/alginate chứa các polyphenol trong trà hoa vàng (*Camellia chrysantha*)”**.

Mục tiêu của đề tài luận án:

1. Chiết tách, chế tạo thành công tổ hợp AG/CS chứa cao trà hoa vàng bằng phương pháp dung dịch và vi nhũ tương.
2. Đánh giá được các đặc trưng, tính chất và hình thái cấu trúc của tổ hợp AG/CS chứa cao trà hoa vàng.
3. Xây dựng được mô hình/phương trình động học giải phóng thuốc thích hợp, từ đó thăm dò khả năng ức chế tế bào, chống oxi hóa, ung thư của tổ hợp AG/CS chứa cao trà hoa vàng.

Các nội dung nghiên cứu chính của đề tài luận án:

1. Chế tạo tổ hợp AG/CS/ chứa cao trà hoa vàng bằng phương pháp dung dịch và vi nhũ tương.
2. Nghiên cứu các đặc trưng tính chất của tổ hợp AG/CS mang cao trà hoa vàng.
3. Nghiên cứu sự giải phóng thuốc từ tổ hợp AG/CS chứa cao trà hoa vàng.
4. Nghiên cứu thăm dò khả năng ức chế tế bào, chống oxi hóa của tổ hợp polymer thiên nhiên AG/CS chứa cao trà hoa vàng.

CHƯƠNG 1. TỔNG QUAN

1.1. Giới thiệu về chitosan

Chitosan (CS) là dẫn xuất deacetyl hoá của chitin, là polysaccharide tự nhiên phong phú. CS được tìm thấy trong thành phần của vỏ giáp xác, côn trùng, động vật thân mềm và màng tế bào của một số loại nấm... Sản lượng phế thải được tách ra từ các loại côn trùng và động vật này hàng năm được ước tính $10^9 - 10^{10}$ tấn/năm. Một trong những đặc tính quan trọng nhất của CS là khả năng kháng khuẩn. Nhóm amine có thêm proton trong CS có khả năng ức chế sự phát triển của vi khuẩn. CS có nhiều đặc tính độc đáo như không độc hại, tương hợp sinh học và phân hủy sinh học. CS nhận được nhiều sự quan tâm vì các hoạt tính sinh học của chúng như tính kháng khuẩn, chống ung thư và tăng sức đề kháng. CS được sử dụng rộng rãi trong các lĩnh vực như: công nghệ sinh học, dược phẩm, xử lý nước thải, mỹ phẩm...

1.2. Giới thiệu về alginate

Alginate (AG) là loại polymer sinh học biển phong phú trên thế giới. AG là tên gọi chung cho các muối của alginic acid, là anionic polysaccharide được tách chiết từ rong nâu. Hàm lượng và chất lượng của AG có sự thay đổi theo giống loài, mùa vụ, độ tuổi của rong, bộ phận cây rong và điều kiện sống.

AG được xem là nguồn polysaccharide phong phú và có thể tái tạo, đáp ứng nhu cầu cho các lĩnh vực sản xuất công nghiệp phát triển mạnh mẽ trong tương lai. Đặc biệt, AG không độc, không gây miễn dịch, có khả năng thích ứng và phân hủy sinh học cao nên còn được gọi là “hợp chất xanh” và được xem là vật liệu mới phục vụ cho các ngành công nghiệp thực phẩm, mỹ phẩm, dược phẩm...

1.3. Vật liệu tổ hợp polymer thiên nhiên mang thuốc trên cơ sở alginate và chitosan

Những năm gần đây, vật liệu polymer thiên nhiên mang thuốc trên cơ sở alginate và chitosan được quan tâm nghiên cứu rộng rãi dưới 2 dạng phổ biến: dạng màng và dạng hạt.

Theo nghiên cứu của Mariana Altenhofen trong năm 2012, màng AG và tổ hợp AG/CS chứa natamycin (tác nhân kháng khuẩn) có cấu trúc liên tục và dễ tương tác tĩnh điện với CS. Sự gia tăng hàm lượng CS ảnh hưởng đến hình thái và tính chất của màng. Khi tăng hàm lượng CS dẫn đến sự phá vỡ liên kết của màng AG/CS và tăng tốc độ giải phóng thuốc natamycin nhanh hơn so với cấu trúc màng khác. Động học giải phóng natamycin trong môi trường nước rất chậm, bị cản trở rõ rệt trong màng tổ hợp AG/CS do tương tác tĩnh điện giữa CS và natamycin. Các mẫu giải phóng natamycin từ màng

AG và AG/CS trong nước cho thấy màng đã đáp ứng được yêu cầu kháng khuẩn, có khả năng ứng dụng cao trong bảo quản thực phẩm từ sữa. Năm 2016, nhóm nghiên cứu của Bhunchu đã chế tạo tổ hợp nano-CS/AG làm vật liệu mang thuốc để điều trị ung thư dựa vào khả năng dễ hấp thu nội bào và tăng hiệu quả điều trị tính chất của CS và AG. Kích thước nhỏ hơn của các hạt nano cho phép thâm nhập qua các mao mạch máu và dễ hấp thụ vào các tế bào ung thư với hiệu quả cao. Tổ hợp vật liệu mang thuốc này đã cải thiện được các thông số quan trọng như sinh khả dụng của thuốc thông qua đường uống, độ ổn định hóa trị liệu chống lại sự xuống cấp enzyme, giảm độc tính của thuốc và tăng hiệu quả điều trị.

1.4. Giới thiệu về trà hoa vàng và polyphenol trà

1.4.1. Giới thiệu về trà hoa vàng

Trà hoa vàng (THV) hay còn gọi là kim hoa trà (*Camellia chrysantha*) là một loài thực vật hạt kín trong họ Theaceae. THV thường được tìm thấy ở Việt Nam (Tam Đảo, Ba Chẽ Quảng Ninh, Lâm Đồng, Tuyên Quang, Yên Bái, Cúc Phương) và Trung Quốc (Tây Nam tỉnh Quảng Tây)

THV được ứng dụng nhiều trong y sinh do chứa hơn 400 hoạt chất, trong đó có các polyphenol và các nguyên tố vi lượng như selenium (Se), germani (Ge), potassium (K), vitamin B1, B2, C... Các hợp chất trong THV có khả năng kiểm chế sự sinh trưởng của các khối u đến 33,8 %, giảm đến 35 % hàm lượng cholesterol trong máu, giảm triệu chứng xơ vữa động mạch do máu nhiễm mỡ, điều hòa huyết áp, hạ đường huyết, chữa kiết lỵ, đại tiện ra máu...

Theo các nhà khoa học Trung Quốc, THV có 9 tác dụng chính:

- Trong lá trà có những hoạt chất làm giảm tổng hàm lượng lipid trong huyết thanh máu, giảm lượng cholesterol mật độ thấp (cholesterol xấu) và tăng lượng cholesterol mật độ cao (cholesterol tốt).
- Nước sắc lá trà có tác dụng hạ huyết áp rõ ràng và tác dụng duy trì trong thời gian tương đối dài.
- Nước sắc lá trà có tác dụng ức chế sự tụ tập của tiểu cầu, chống sự hình thành huyết khối gây tắc nghẽn mạch máu.
- Phòng ngừa ung thư và ức chế sự phát triển của các khối u khác.
- Hưng phấn thần kinh.
- Lợi tiểu mạnh.
- Giải độc gan và thận, ngăn ngừa xơ vữa động mạch máu.

- Ức chế và tiêu diệt vi khuẩn.
- Ngoài ra, lá trà còn có tác dụng chống viêm, chống dị ứng và duy trì trạng thái bình thường của tuyến giáp.

1.5. Vật liệu tổ hợp polyme/polyphenol trà

Các hoạt tính quan trọng trong thành phần của polyphenol trà rất khó sử dụng vì tính ổn định hóa học kém và không bền. Nghiên cứu rộng khắp trên thế giới tập trung vào việc chế tạo các tổ hợp polymer chứa các hoạt chất quý như EGCG, EGC... trong THV có kích thước nano để dễ dàng trong việc hấp thụ, kiểm soát quá trình giải phóng thuốc và tăng khả năng sử dụng các dược liệu quý trong THV. Bao gồm các nghiên cứu như sử dụng hoạt chất polyphenol có trong trà xanh vào việc ức chế và chống ung thư được tập trung nghiên cứu. Các thử nghiệm *in vitro* cho thấy polyphenol được mang bởi các hạt nano chitosan, poly(caprolacton) và poly(lactide-co-glucoside) giúp tăng cường khả năng phân tán của các hoạt chất polyphenol, có khả năng chống ung thư vú, hoại tử... Tổng hợp, đặc trưng và các nghiên cứu độc tính tế bào của các hạt nano polyphenol/CS (polyphenol chiết xuất từ trà) lên gan và dạ dày cũng cho thấy tổ hợp hạt nano polyphenol/CS có hiệu quả ức chế tế bào ung thư.

Nhận xét:

Từ các công trình nghiên cứu trong và ngoài nước cho thấy AG và CS là 2 polymer nguồn gốc thiên nhiên có tiềm năng sử dụng làm chất mang thuốc. Vấn đề nghiên cứu, sử dụng AG/CS với một số loại thuốc kháng viêm, kháng vi khuẩn, điều trị ung thư mới chỉ bắt đầu. Thông qua các liên kết hydro, tương tác lưỡng cực giữa AG và CS, tỷ lệ phối trộn AG/CS, có thể kiểm soát tốc độ giải phóng thuốc một cách thuận lợi.

Vật liệu tổ hợp chứa polyphenol trà và AG/CS với kích thước nano giúp các phân tử thuốc dễ dàng đi qua thành tế bào, làm tăng khả năng hấp thu thuốc cũng như khắc phục được một số nhược điểm của polyphenol trà như kém bền với nhiệt, nhạy cảm với ánh sáng chưa được tập trung nghiên cứu. Vì vậy, vật liệu tổ hợp chứa polyphenol trà được sử dụng vào các mục đích: điều trị các bệnh tim mạch, ung thư, bảo quản thực phẩm... sẽ tiếp tục được nghiên cứu trong đề tài luận án này.

CHƯƠNG 2. THỰC NGHIỆM

2.1. Nguyên liệu, hóa chất và dụng cụ

2.1.1. Nguyên liệu và hóa chất

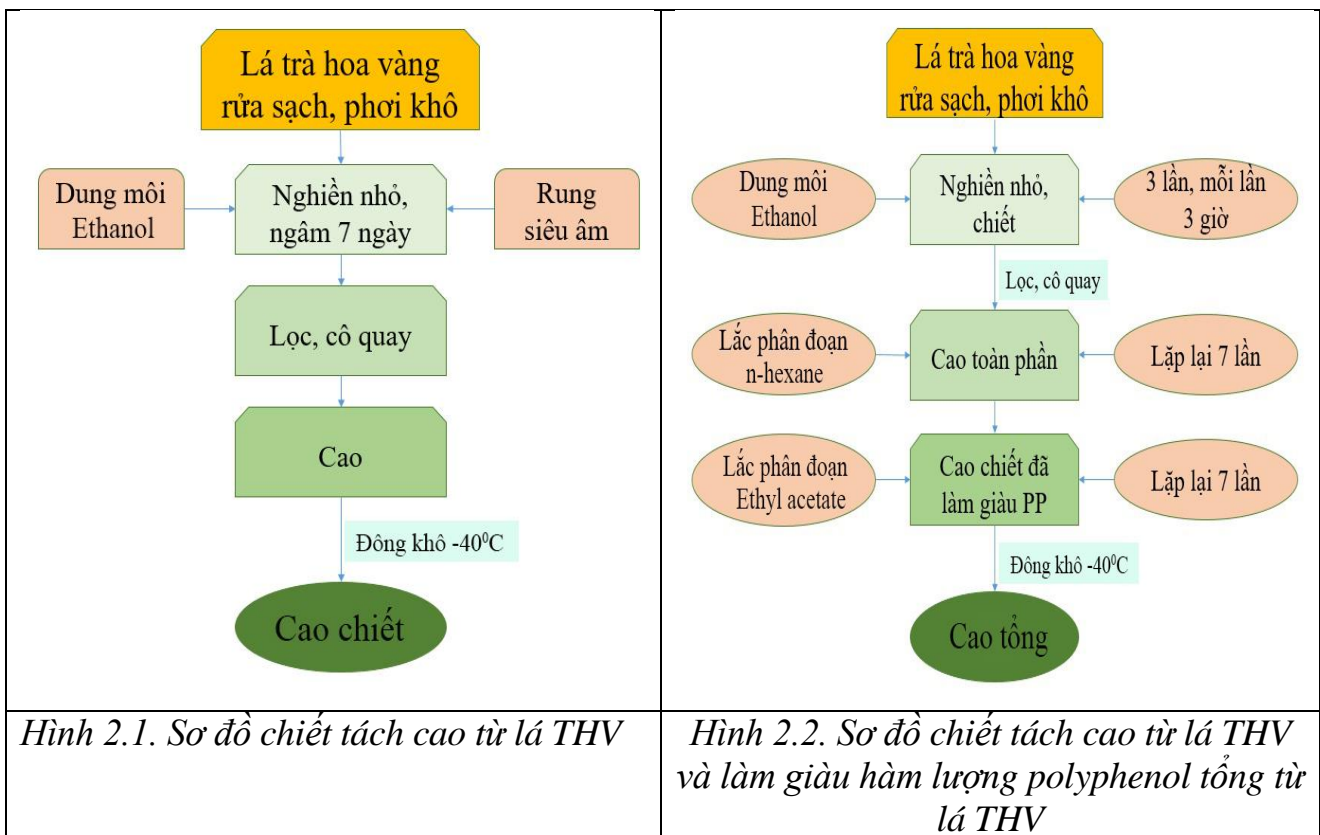
Cao chiết THV chiết tách từ lá THV Tam Đảo thuộc loài trà (*Camellia tamdaoensis* Ninh at Hakoda) được tìm thấy và công bố năm 2010 bởi 2 nhà khoa học Trần Ninh và Hakoda Naotoshi. Lá THV được thu hái vào tháng 12/2017 tại xã Tam Quan, Huyện Tam Đảo, tỉnh Vĩnh Phúc.

Alginate, chitosan, sodium tripolyphosphate, potassium chlorite, sodium hydroxide, calcium chloride, ... các dòng tế bào ung thư biểu mô KB và tế bào gan ở người HepG2 có nguồn gốc từ Bảo tàng giống chuẩn Hoa kỳ (ATCC).

2.2. Quy trình tách chiết cao từ lá trà hoa vàng

2.2.1. Quy trình chiết tách cao từ lá trà hoa vàng

Quy trình chiết tách cao từ lá trà hoa vàng (CC) và làm giàu hàm lượng polyphenol tổng (CT) từ lá trà hoa vàng được trình bày trên Hình 2.1 và Hình 2.2.



2.3. Chế tạo vật liệu tổ hợp alginate/chitosan mang polyphenol từ cao chiết lá trà hoa vàng

2.3.1. Chế tạo màng tổ hợp alginate/chitosan/cao chiết từ lá trà hoa vàng bằng phương pháp dung dịch

Bảng 2.1. Các mẫu màng tổ hợp AG/CS/CC đã chế tạo

Tỉ lệ khối lượng AG/CS/CC	Khối lượng AG, CS và CC (gram)	Kí hiệu mẫu
AG/CS/CC* = 7/3/5 %	0,07 : 0,03 : 0,005	AC73CC5
AG/CS/CC* = 7/3/10 %	0,07 : 0,03 : 0,01	AC73CC10
AG/CS/CC* = 7/3/15 %	0,07 : 0,03 : 0,015	AC73CC15
AG/CS/CC* = 7/3/20 %	0,07 : 0,03 : 0,02	AC73CC20
AG/CS/CC* = 7/3/0 %	0,07 : 0,03 : 0,00	AC73CC0
AG/CS/CC* = 7/0/10 %	0,07 : 0,00 : 0,01	AC70CC10

*: Tính trên cơ sở tổng khối lượng của AG và CS

2.3.2. Chế tạo tổ hợp hạt alginate/chitosan/cao tổng từ cao tổng trà hoa vàng bằng phương pháp vi nhũ

Bảng 2.2. Các mẫu hạt AG/CS/CT đã chế tạo

Tỉ lệ khối lượng AG/CS/CT	Khối lượng AG, CS và CT* (gam)	Kí hiệu mẫu
AG/CS/CT* = 8/4/10 %	0,08 : 0,04 : 0,012	AG/CS/CT10
AG/CS/CT* = 8/4/20 %	0,08 : 0,04 : 0,024	AG/CS/CT20
AG/CS/CT* = 8/4/30 %	0,08 : 0,04 : 0,036	AG/CS/CT30
AG/CS/CT* = 8/4/50 %	0,08 : 0,04 : 0,06	AG/CS/CT50

*: Tính trên cơ sở tổng khối lượng của AG và CS

2.4. Các phương pháp nghiên cứu

Phương pháp sắc ký bản mỏng (TLC).

Định lượng polyphenol tổng theo phương pháp Folin – Denis.

Phương pháp phổ hồng ngoại biến đổi Fourier (FT-IR).

Phương pháp xác định phân bố kích thước hạt.

Phương pháp hiển vi điện tử quét.

Phương pháp nhiệt lượng quét vi sai (DSC).

Phương pháp phổ hấp thụ tử ngoại - khả kiến (UV-Vis).

Các phương pháp phân tích định lượng.

2.5. Đánh giá hoạt tính sinh học của CT và tổ hợp AG/CS/CT

Phương pháp đánh giá hoạt tính ức chế tế bào ung thư.

Phương pháp đánh giá hoạt tính chống oxi hóa (phương pháp phản ứng thông qua quét/bắt gốc tự do DPPH) .

Phương pháp đánh giá hoạt tính kháng viêm (phương pháp xác định khả năng ức chế sản sinh NO).

CHƯƠNG 3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Các đặc trưng, tính chất của cao chiết và cao tổng trà hoa vàng

3.1.1. Kết quả định lượng polyphenol tổng theo phương pháp Folin – Denis

Nhằm góp phần đánh giá thành phần các hợp chất tự nhiên cơ bản có trong cao chiết (CC) và cao tổng (CT) của trà hoa vàng. NCS tiến hành các phản ứng định tính, sắc ký lớp mỏng và định lượng polyphenol tổng theo phương pháp Folin – Denis.

Kết quả định tính cho thấy rằng, thành phần các hợp chất đặc trưng trong CC và CT khá phong phú, có đầy đủ các nhóm hợp chất tự nhiên phổ biến như: alkaloid, saponin, flavonoid, tannin và polyphenol tổng. Tất cả các mẫu đều cho kết quả dương tính với thuốc thử.

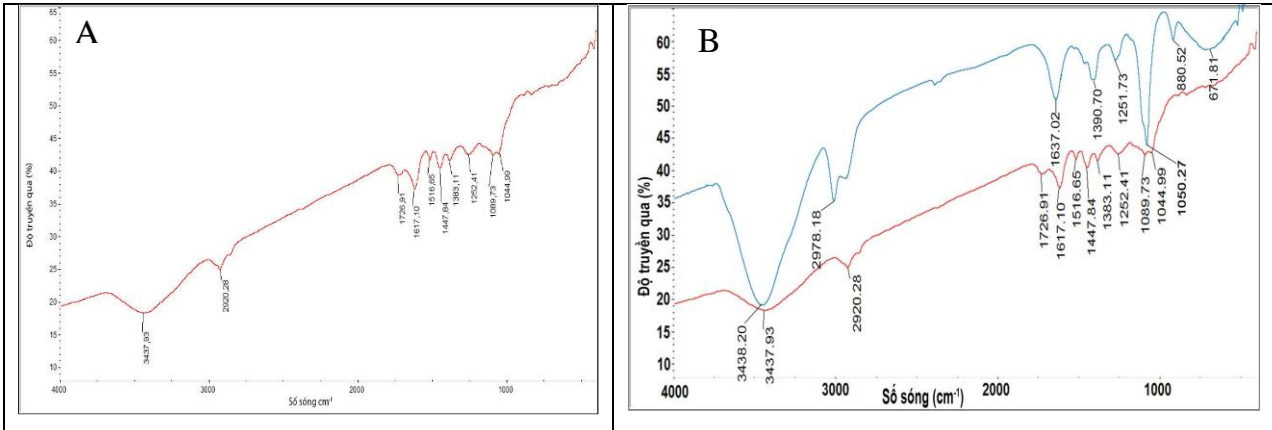
Sắc ký đồ cao tổng trà hoa vàng trong các hệ dung môi khác nhau, Trong mẫu CT có nhiều nhóm polyphenol được tách ra với các màu sắc khác nhau. Trong đó băng vạch màu đỏ và màu đỏ tím tương ứng với anthocyanin, vùng ánh sáng xanh có thể tương ứng với một số phenol đơn giản. Dải màu vàng tương ứng với polyphenol thuộc nhóm flavonoid. Ví dụ: rutin, catechin, quercetin, luteolin hoặc myricetin. Dải màu nâu được quan sát thấy trong quá trình phân tách tương ứng với flavon. Từ các kết quả phân tích thành phần các hợp chất polyphenol trong mẫu CT và CC cho thấy, CT chứa nhiều thành phần polyphenol phong phú và hàm lượng polyphenol khá cao.

Hàm lượng polyphenol tổng trong CC và mẫu cao CT được xác định theo phương pháp Folin – Denis theo TCVN: 9745 – 1 : 2013.

Hàm lượng polyphenol tổng trong mẫu cao chiết (CC) và mẫu cao đã được làm giàu hàm lượng polyphenol tổng (CT) được xác định theo phương pháp Folin – Denis theo TCVN: 9745 – 1 : 2013. Kết quả, mẫu CC chứa hàm lượng polyphenol tổng đạt giá trị 47,63 mg/g (GAE/CC) hoặc tương đương với 4,763 % tính theo đơn vị % và mẫu đã làm giàu hàm lượng polyphenol tổng (CT) đạt giá trị 300,25 mg/g (GAE/CC) hoặc 30,25 % tính theo đơn vị %. Quy trình làm giàu hàm lượng polyphenol tổng đã làm tăng hàm lượng CT trong trà hoa vàng lên gấp 6,35 lần.

3.1.2. Các đặc trưng hình thái, cấu trúc của CC và CT

3.1.2.1. Phổ hồng ngoại biến đổi Fourier (FTIR) của CC

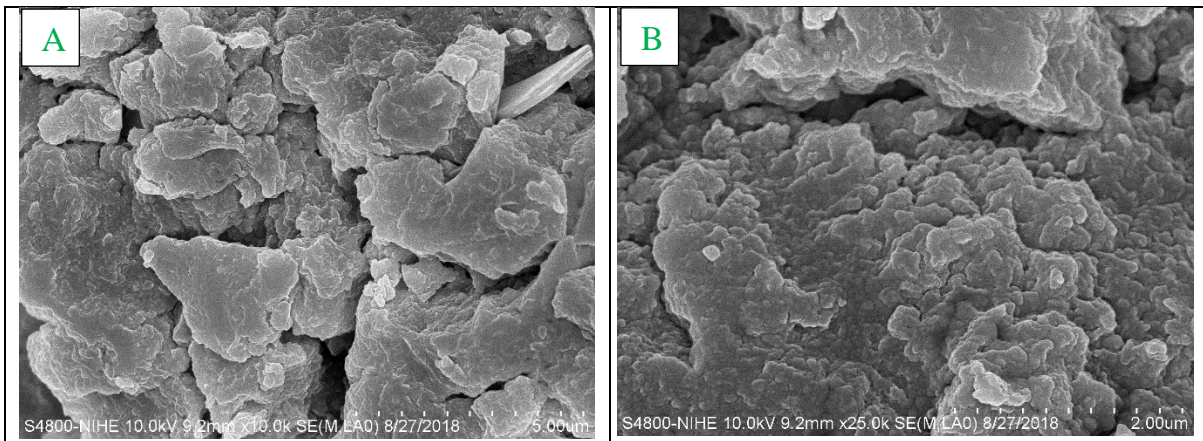


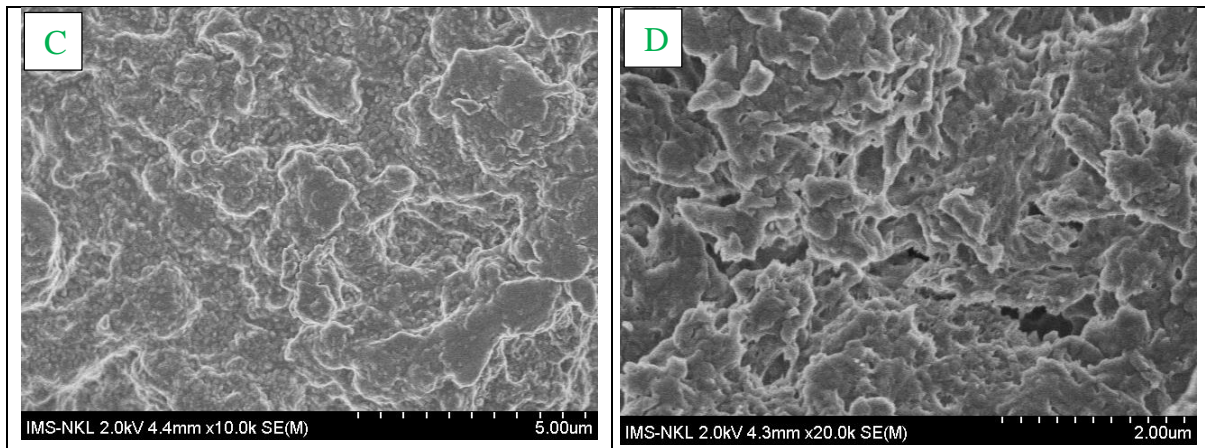
Hình 3.1. Phổ FTIR của CC (A) và phổ chồng CC và CT (B)

Về cơ bản, các vân phổ trên phổ FTIR của CT vẫn có sự tương đồng về vị trí với các vân phổ trên phổ FTIR của CC. Tuy nhiên, cường độ của các vân phổ trong mẫu CT đều mạnh hơn. Trong đó, sự khác biệt rõ ràng nhất thể hiện ở hai vân phổ thuộc vị trí 1726 cm^{-1} và 1516 cm^{-1} đặc trưng cho dao động hóa trị của nhóm C=O và nhóm amine: trên phổ FTIR của CT không còn xuất hiện của hai vân phổ này. Điều đó có thể do việc làm giàu CT đã loại bỏ các hợp chất chứa nhóm chức carbonyl, amine và acid amine trong CC hoặc hàm lượng của các nhóm chất chứa các nhóm chức này ít nên pic dao động đặc trưng không xuất hiện trên phổ.

3.1.2.3. Ảnh hiển vi điện tử quét phát xạ trường (FESEM) của CC và CT

Hình 3.2 là ảnh FESEM của mẫu CT và CC với các mức độ phóng đại khác nhau. Quan sát thấy các hạt đều có xu hướng kết dính, kết tụ thành khối lại với nhau tạo thành các khối cấu trúc tập trung và khe rỗng. Nguyên nhân của sự kết tụ có thể do sự hình thành tương tác giữa các liên kết hydro trong các polyphenol.

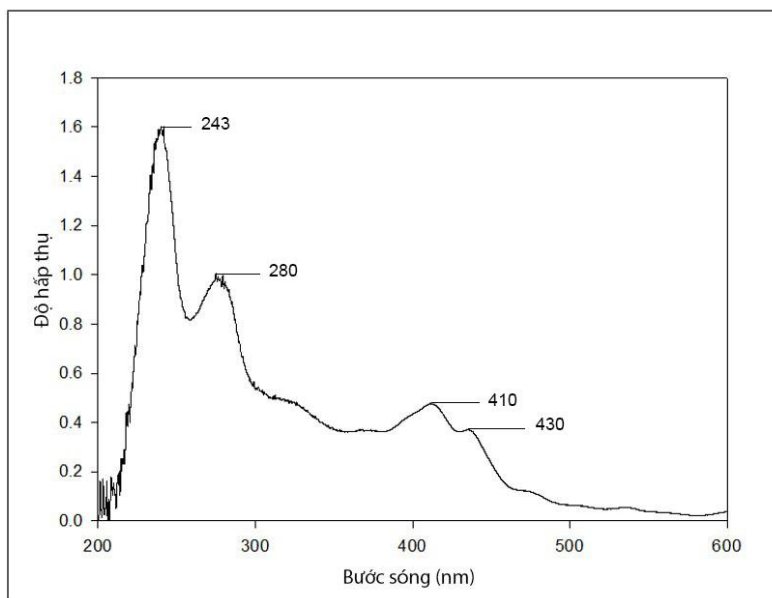




Hình 3.2. Ảnh FESEM của CT (A, B) và CC (C, D)

3.1.2.4. Phổ UV – Vis của CT

CT là một hỗn hợp nhiều thành phần trong đó có các polyphenol như EGCG, ECG, EG... Vì vậy trong phổ UV-Vis của CT trong dung môi etanol xuất hiện nhiều đỉnh hấp phụ ở các bước sóng khác nhau (Hình 3.3). Trên phổ UV-Vis của CT, xuất hiện đỉnh hấp phụ mạnh ở bước sóng từ 240 – 300 nm. Trong đó, có 2 đỉnh hấp phụ cực đại trong khoảng 243 – 246 nm và 270 – 280 nm.



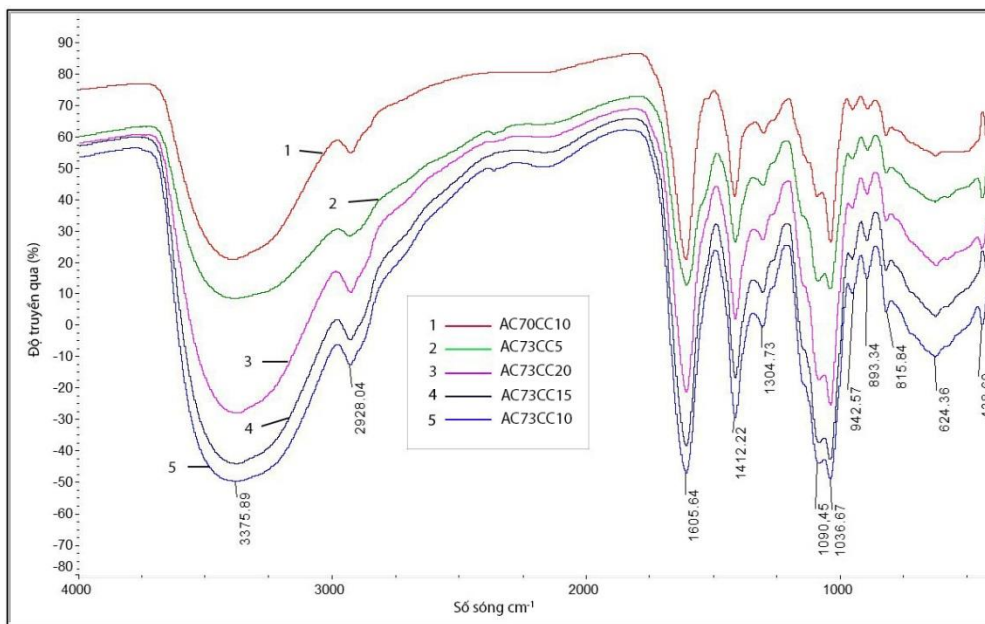
Hình 3.3. Phổ UV – Vis của CT

3.2. Màng tổ hợp AG/CS mang CC

3.2.2. Phổ FTIR của màng tổ hợp AG/CS mang CC

Phổ FTIR của màng tổ hợp AG/CS mang CC với các tỉ lệ AG/CS (7/0; 7/3) và hàm lượng CC được thêm vào theo tỉ lệ: 0 %, 5 %, 10 %, 15 %, 20 % trình bày ở Hình 3.4. Có thể thấy: các vân phổ đặc trưng của AG, CS và CC vẫn xuất hiện

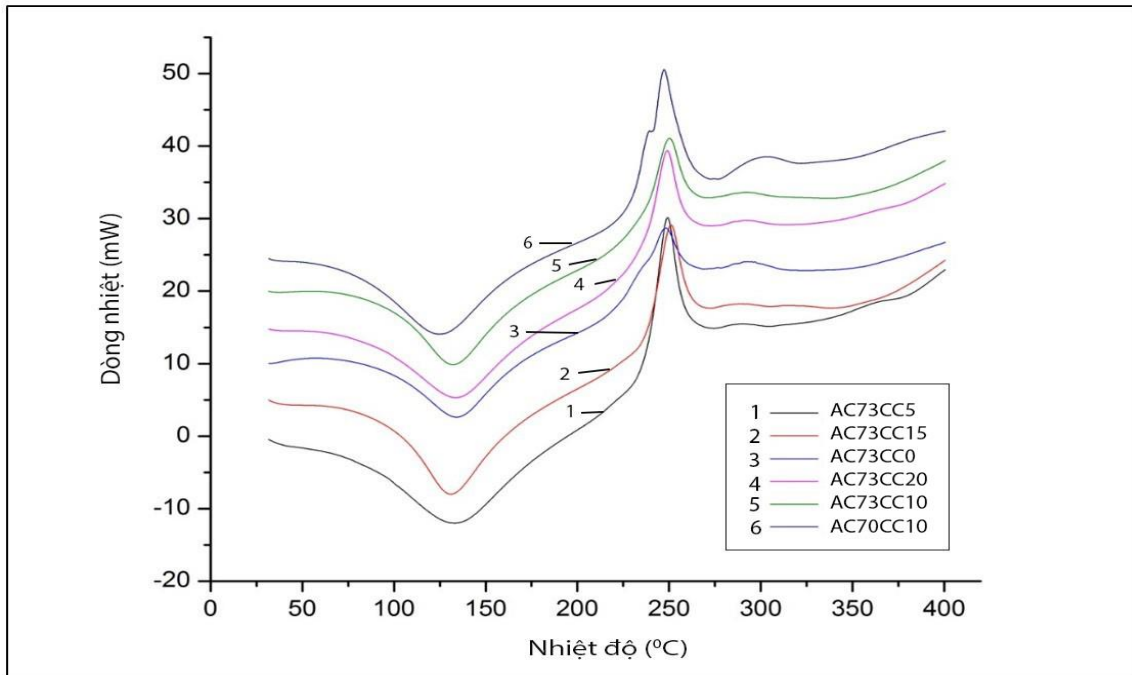
trong phổ FTIR của các màng này và các pic tương ứng với nhóm NH_2 , OH , CH , $\text{C}=\text{O}$ hoặc $\text{C}=\text{C}$. Mặc dù CS không có mặt trong mẫu AC70CC10 nhưng kết quả phân tích phổ FTIR của mẫu này vẫn tương tự như các mẫu AG/CS/CC do sự cộng hưởng của các nhóm chức đặc trưng. Sự biến mất pic ở 1726 cm^{-1} (dao động kéo dài $\text{C}=\text{O}$, trong phổ FTIR của CC) trong các màng tổ hợp có thể do nó đã bị che phủ bởi đỉnh của pic dao động $\text{C}-\text{C}$ hoặc hàm lượng các chất chứa nhóm $\text{C}=\text{O}$ trong tổ hợp khá nhỏ nên không xuất hiện được tín hiệu trên phổ. Sự tương đồng về hình dạng giữa các phổ chứng tỏ hàm lượng CC đưa vào các mẫu không ảnh hưởng nhiều tới tương tác của AG và CS.



Hình 3.4. Phổ FTIR của màng tổ hợp AG/CS mang CC

3.2.2. Đặc trưng nhiệt màng tổ hợp AG/CS mang CC

Đặc trưng nhiệt của 5 mẫu màng tổ hợp AC73CC với hàm lượng CC khác nhau (Hình 3.5) và màng không chứa CS (AC70CC10) được đánh giá bằng phương pháp nhiệt lượng quét vi sai (DSC). Có thể thấy, trong tất cả các mẫu phân tích đều có sự xuất hiện của hai pic bao gồm pic thu nhiệt đặc trưng cho T_{nc} nằm trong khoảng $124,4 - 135,0\text{ }^{\circ}\text{C}$ với $\Delta H_m = 424 - 498\text{ (J/g)}$ và pic tỏa nhiệt đặc trưng cho T_{ph} nằm trong khoảng $246,1 - 250,7\text{ }^{\circ}\text{C}$.



Hình 3.5. Giải đồ DSC của các màng tổ hợp mang CC

3.2.4. Hiệu suất mang CC của các màng tổ hợp AG/CS

So với các mẫu màng tổ hợp chứa CS (AC73CC), mẫu AC70CC10 không chứa CS có tỉ lệ phần trăm mang CC là thấp nhất 64,32 %. Có thể thấy, sự có mặt của CS đã làm tăng hiệu suất mang CC do sự cải thiện khả năng tương tác giữa các thành phần AG-CS và AG-CS-CC. Các mẫu màng tổ hợp AG/CS chứa CC, hiệu suất mang CC AC73CC5, AC73CC10, AC73CC15 và AC73CC20 nằm trong khoảng 70,72 – 82,44 %. Khi hàm lượng CC trong màng tổ hợp là 5 %, hiệu suất mang CC là 70,72 %, khi hàm lượng CC tăng lên trong khoảng 10 – 15 %, hiệu suất mang CC tăng lên đôi đa là 82,44 %. Tuy nhiên, khi hàm lượng CC tăng lên đến 20 % thì hiệu suất mang cao lại giảm. Điều này có thể lí giải do tương tác CC – CC chiếm ưu thế hơn tương tác CC – tổ hợp AG/CS nên hiệu suất mang CC của màng tổ hợp giảm. Nhìn chung, hiệu suất mang CC bởi màng tổ hợp AG/CS thích hợp nhất khi hàm lượng CC trong màng tổ hợp là 15 %.

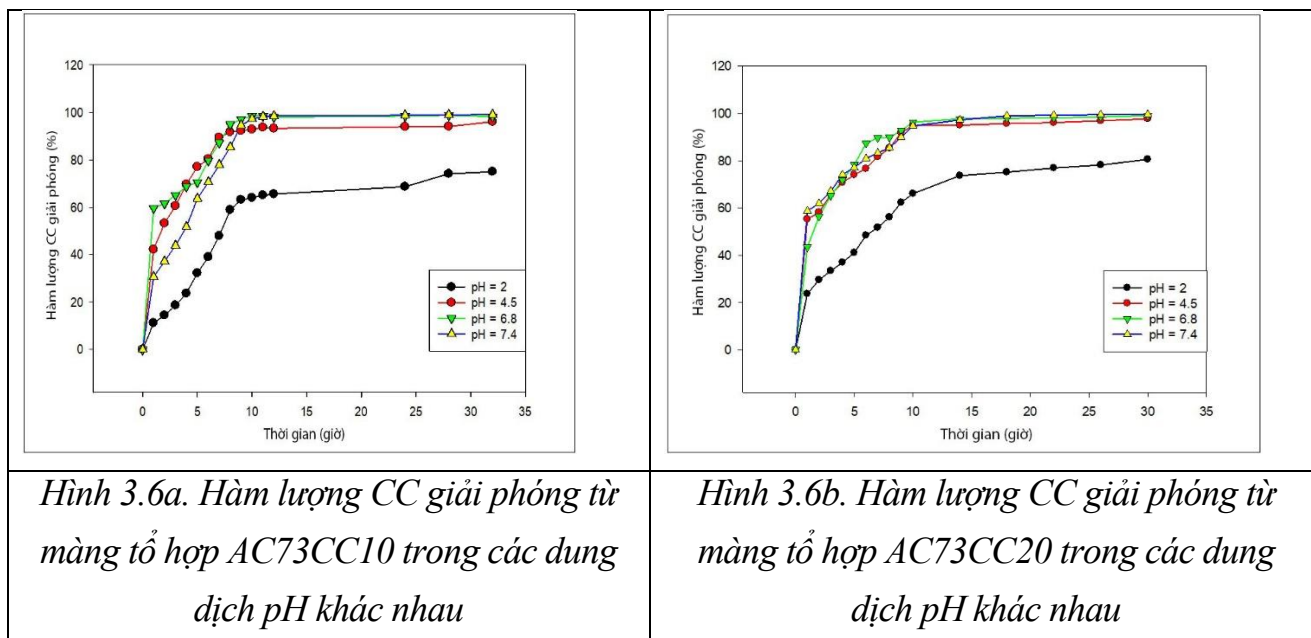
Bảng 3.1. Hiệu suất mang CC của các màng tổ hợp AG/CS

Mẫu	Khối lượng ban đầu của CC (% khối lượng)	Khối lượng được mang của CC (% khối lượng)	Hiệu suất mang CC (%)
AC73CC5	5	3,54	70,72
AC70CC10	10	6,43	64,32
AC73CC10	10	7,75	77,51
AC73CC15	15	12,37	82,44
AC73CC20	20	17,75	76,73

3.2.5. Nghiên cứu giải phóng CC từ màng tổ hợp AG/CS mang CC trong các dung dịch pH khác nhau

3.2.5.1. Ảnh hưởng của pH đến sự giải phóng CC

Quan sát các Hình 3.6a, Hình 3.6b mô tả hàm lượng CC giải phóng khỏi màng tổ hợp AC73CC10 và AC73CC20 trong các môi trường pH khác nhau, có thể nhận thấy:



Quá trình giải phóng CC khỏi màng tổ hợp AC73CC phụ thuộc nhiều vào giá trị pH của dung dịch. Hàm lượng CC được giải phóng trong môi trường kiềm nhẹ tốt hơn so với môi trường acid, cụ thể $\text{pH } 7,4 \approx \text{pH } 6,8 > \text{pH } 4,5 > \text{pH } 2$.

3.2.5.2. Ảnh hưởng của thời gian đến giải phóng CC

Hàm lượng CC giải phóng được nhiều nhất trong khoảng 3 giờ đầu tiên, do hàm lượng CC bám trên bề mặt và gần bề mặt màng lớn nên dễ dàng giải phóng. Sau đó được giải phóng giảm dần và ổn định trong 7 giờ tiếp theo với tổng hàm lượng được giải phóng nằm trong khoảng 56,74 – 66,08 % (pH 2) và 92,80 – 98,49 % (pH 4,5; 6,8 và 7,4). Sau 10 giờ, hàm lượng CC giải phóng bắt đầu có kiểm soát từ bên trong màng tổ hợp. Kết thúc 30 giờ khảo sát, CC được giải phóng gần như hoàn toàn với hàm lượng 96,05 – 99,59 % đối với các màng tổ hợp được tiến hành ở các dung dịch pH 4,5; 6,8 và 7,4. Riêng với các màng tổ hợp được khảo sát ở pH 2 chỉ đạt ngưỡng 61,23 – 80,54 %.

3.2.5.3. Ảnh hưởng của hàm lượng CC trong màng tổ hợp đến giải phóng CC

Ở các dung dịch pH 2; 4,5 và 7,4 trong 1 giờ đầu khảo sát, hàm lượng CC giải phóng từ các màng tổ hợp tăng khi tăng hàm lượng CC đưa vào. Ví dụ: ở dung dịch

pH 2, hàm lượng CC được giải phóng từ các mẫu AC73CC5, AC73CC10, AC73CC15 và AC73CC20 lần lượt là 8,60 %, 11,20 %, 15,98 % và 23,70 %. Có thể giải thích sự gia tăng hàm lượng CC giải phóng từ màng tổ hợp như sau: khi tăng hàm lượng CC đưa vào, lượng CC tập trung trên bề mặt màng tăng nên hàm lượng CC khuếch tán và giải phóng trong giai đoạn đầu tăng nhanh. Bên cạnh đó, khi tăng hàm lượng CC trong màng, liên kết hydro giữa CC chiếm ưu thế hơn liên kết hydro giữa CC - AG/CS, làm cho CC sẽ kết tụ lại với nhau, dẫn đến cấu trúc màng kém chặt chẽ hơn, do đó, CC giải phóng từ các màng tổ hợp có hàm lượng CC lớn sẽ dễ dàng hơn ở giai đoạn đầu.

3.2.6. Động học giải phóng CC từ màng tổ hợp AG/CS mang CC

Ở dung dịch pH = 2, động học giải phóng CC theo các mô hình FO, HG và KMP đều có giá trị hệ số hồi quy $R^2 > 0,900$. Mô hình động học KMP có hằng số khuếch tán (n) từ 0,001 - 0,004 chỉ ra cơ chế giải phóng từ tổ hợp tuân theo định luật Fick loại 1, có nghĩa là việc giải phóng CC chỉ tuân theo cơ chế khuếch tán thông thường. Với các mẫu pH còn lại trong giai đoạn giải phóng có kiểm soát đều tuân theo mô hình HCW với các giá trị R^2 đều lớn hơn 0,93 với các mẫu giải phóng ở pH = 4,5, lớn hơn 0,96 với pH = 6,8 và lớn hơn 0,97 với pH=7,4.

Tóm tắt kết quả mục 3.2

1. Kết quả phân tích phổ hồng ngoại cho thấy CC đã được mang các polymer AG và CS thông qua sự dịch chuyển các pic trong phổ, do các tương tác giữa các thành phần trong màng tổ hợp AC73CC (liên kết hydro, tương tác lưỡng cực).

2. Ảnh FESEM của các mẫu cho thấy các hạt tổ hợp có kích thước tương đối nhỏ, phân tán không đồng đều về kích thước. Kích thước của các tổ hợp AG/CS dao động trung bình 20 – 100 nm.

3. Hiệu suất mang CC của tổ hợp dao động trong khoảng 64,32 - 88,73 %. Hàm lượng CC giải phóng khỏi màng tổ hợp AG/CS trong môi pH 4,5, pH 6,8 và 7,4 diễn ra nhanh và ổn định hơn so với pH 2. Hàm lượng CC đưa vào và thời gian giải phóng ảnh hưởng nhiều tới quá trình giải phóng CC. Quá trình giải phóng CC từ màng tổ hợp AG/CS gồm 2 giai đoạn, giai đoạn nhanh trong 10 giờ đầu và chậm trong khoảng thời gian khảo sát còn lại.

4. Quá trình giải phóng nhanh CC từ các màng tổ hợp trong các dung dịch pH 2; 6,8; 7,4 phù hợp với mô hình động học bậc 0. Với dung dịch khảo sát tại pH 4,5, CC giải phóng từ màng tổ hợp AC73CC10 theo mô hình động học Higuchi. Điều này cho

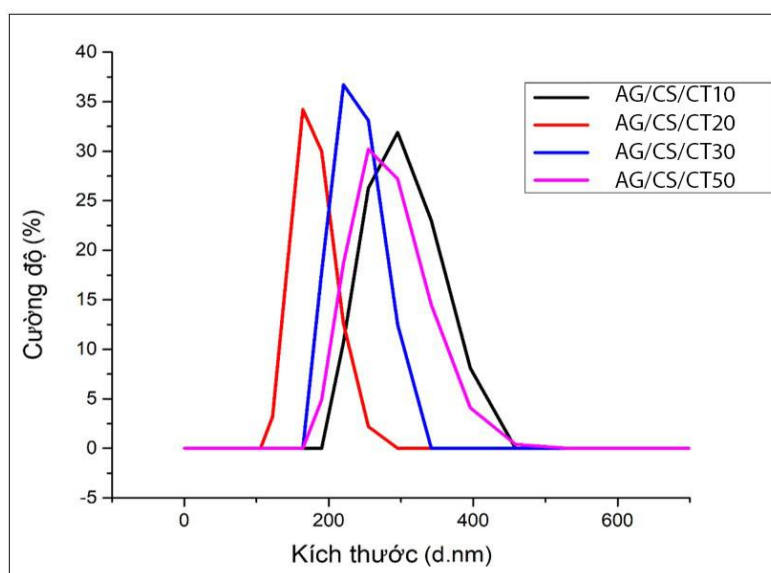
thấy sự khuếch tán của CC ở giai đoạn nhanh phụ thuộc vào sự khuếch tán của CC ra khỏi hệ AG/CS.

Động học giải phóng chậm có kiểm soát CC từ các màng tổ hợp AC73CC cho thấy ở dung dịch pH 2, động học giải phóng CC theo các mô hình FO, HG và KMP đều có giá trị hệ số hồi quy $R^2 > 0,900$. Với các mẫu pH còn lại trong giai đoạn giải phóng có kiểm soát đều tuân theo mô hình HCW với các giá trị R^2 đều lớn hơn 0,93 với các mẫu giải phóng ở pH 4,5, lớn hơn 0,96 với pH 6,8 và lớn hơn 0,97 với pH 7,4.

3.3. Tổ hợp hạt alginate/chitosan mang cao tổng trà hoa vàng

Trong đề tài này, NCS đã tiến hành chế tạo tổ hợp hạt AG/CS/CT bằng phương pháp vi nhũ với mẫu CT đã làm giàu hàm lượng polyphenol tổng (30,25 %) cao gấp 6,35 lần so với hàm lượng polyphenol tổng trong CC (4,763 %). Nhằm mục đích loại bỏ bớt các tạp chất chứa trong mẫu CC và phát huy hiệu quả tác dụng của các polyphenol trong THV khi được mang bởi tổ hợp hạt AG/CS. Sau đó xác định các tính chất, hình thái cấu trúc của 4 mẫu tổ hợp hạt AG/CS/CT10, AG/CS/CT20, AG/CS/CT30 và AG/CS/CT50 với hàm lượng CT là 10 %, 20 %, 30 % và 50 % tính theo tổng khối lượng của AG và CS. Trong đó, hàm lượng PP tổng đạt được tương ứng khoảng 3 %, 6 %, 9 % và 15 % tính theo tổng khối lượng của AG và CS.

3.3.1. Phân bố kích thước hạt của hạt AG/CS mang CT



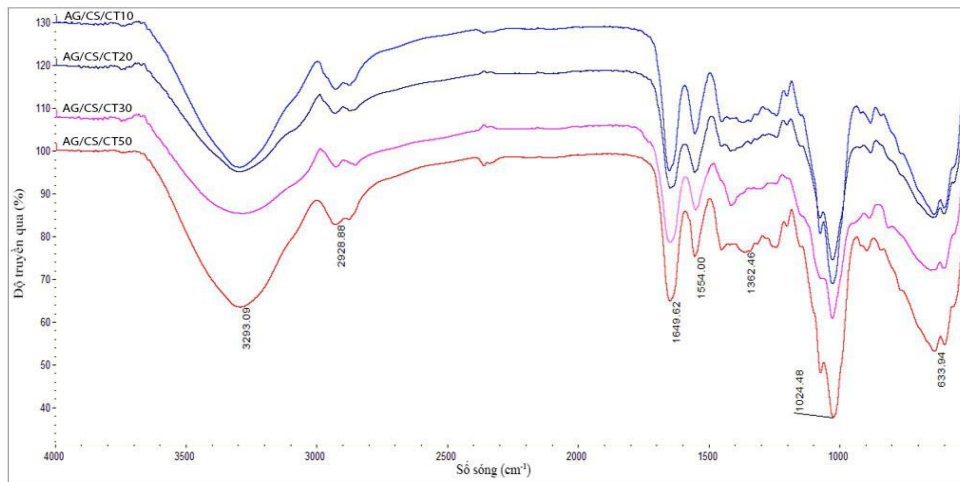
Hình 3.7. Đồ thị phân bố kích thước hạt của tổ hợp hạt nano AG/CS/CT mang các hàm lượng CT khác nhau

Kích thước hạt trung bình của các mẫu hạt tổ hợp AG/CS/CT dao động trong khoảng 141,8 – 396,1 nm. Kích thước hạt trung bình của AG/CS/CT10, AG/CS/CT20, AG/CS/CT30 và AG/CS/CT50 lần lượt là 295,6 nm, 182,3 nm, 235,8 nm và 284,3 nm.

Mẫu hạt tổ hợp AG/CS/CT20 chứa các hạt có kích thước trung bình nhỏ nhất (182,3 nm), mẫu hỗn hợp AG/CS/CT10 chứa các hạt có kích thước trung bình lớn nhất (295,6 nm). Nhìn chung, kích thước của các hạt tổ hợp mang CT có kích thước biến đổi không đồng đều, không theo quy luật nhất định. Sự khác nhau này có thể là do các hạt tổ hợp chịu ảnh hưởng của tương tác lưỡng cực, liên kết hydro giữa nước và CT, nước và polymer AG, CS.

3.3.2. Phổ FTIR của tổ hợp hạt AG/CS mang CT

Quan sát trên Hình 3.8, trên phổ hạt tổ hợp AG/CS/CT cường độ pic của các nhóm chức đặc trưng này có thể cộng hưởng với nhau. Do đó cường độ pic của các nhóm đặc trưng này trong phổ FTIR của các hạt tổ hợp AG/CS/CT lớn hơn so với các nhóm đặc trưng trong phổ FTIR của CS, AG hoặc CT riêng rẽ. Số sóng của các nhóm đặc trưng trong CT đều giảm trong các hạt tổ hợp AG/CS/CT. Cụ thể, số sóng đặc trưng cho nhóm $-OH$ của CT giảm từ 3438 cm^{-1} xuống còn $3288,83 - 3299,09\text{ cm}^{-1}$ trong các mẫu hạt tổ hợp. Các mẫu hạt tổ hợp AG/CS/CT có sự dịch chuyển nhỏ số sóng đặc trưng của các nhóm đặc trưng $-NH_2$, $-OH$... Điều này có thể AG, CS và CT đã tương tác với nhau bởi (liên kết hydro, tương tác tĩnh điện) thông qua liên kết hydroxyl, carbonyl và amine.



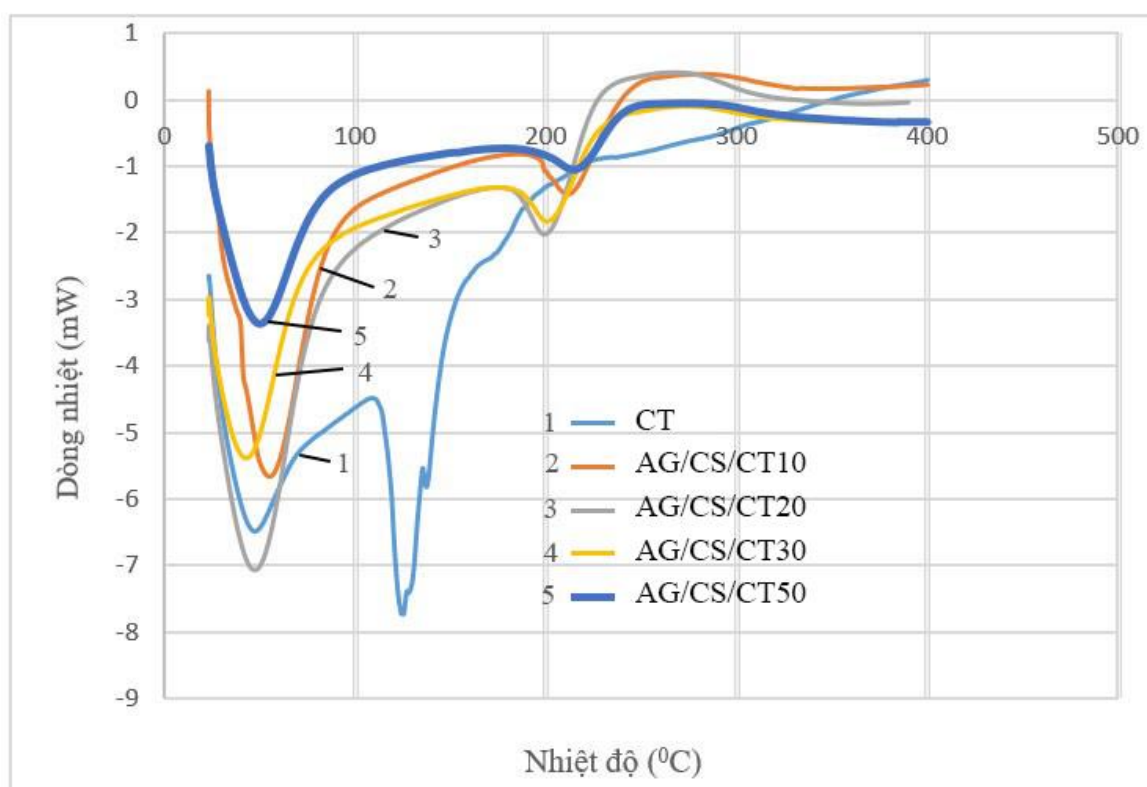
Hình 3.8. Phổ FTIR tổ hợp hạt AG/CS/CT với các tỉ lệ CT khác nhau

3.3.3. Hình thái cấu trúc của hạt tổ hợp AG/CS mang CT

Hàm lượng CT đưa vào hạt tổ hợp càng lớn, sự kết tụ các hạt càng rõ ràng hơn. Các mẫu hạt tổ hợp AG/CS/CT20, AG/CS/CT30, AG/CS/CT50 có xu hướng keo tụ lại với nhau, dẫn tới kích thước trung bình của các hạt này lớn hơn so với hạt tổ hợp AG/CS/CT10. So sánh ảnh SEM mẫu CT với các mẫu tổ hợp AG/CS/CT khác, ta thấy các mẫu hạt tổ hợp có kích thước đồng đều hơn.

3.3.4. Đặc trưng nhiệt của tổ hợp hạt AG/CS mang CT

Giản đồ DSC và các đặc trưng DSC của các mẫu hạt tổ hợp AG/CS/CT với hàm lượng CT khác nhau được trình bày trên Hình 3.9.



Hình 3.9. Giản đồ phân tích độ bền nhiệt của hạt tổ hợp AG/CS/CT với hàm lượng CT khác nhau

So sánh với các tổ hợp màng tổ hợp AC73CC có hàm lượng CC khác nhau ở Bảng 3.5 có thể nhận thấy T_{nc} của các mẫu tổ hợp hạt thấp hơn so với các màng tổ hợp. Các mẫu hạt tổ hợp nóng chảy ở nhiệt độ khoảng 50 °C. Cụ thể, các mẫu có thành phần khối lượng CC và CT tương tự nhau như (AC73CT10 với AG/CS/CT10) và (AC73CT20 với AG/CS/CT20) đều cho kết quả T_{nc} , T_{ph} của các mẫu màng tổ hợp cao hơn hẳn so với hạt tổ hợp. Điều này có thể giải thích bởi tương tác giữa các thành phần trong quá trình tạo màng tổ hợp bằng phương pháp dung dịch mạnh hơn so với tạo hạt tổ hợp bằng phương pháp vi nhũ, dẫn đến cấu trúc của các màng tổ hợp chặt chẽ hơn so với mẫu hạt tổ hợp. ΔH_m của mẫu màng tổ hợp cao hơn so với các mẫu hạt tổ hợp có thành phần so sánh tương tự.

3.3.5. Hiệu suất mang CT trong các hạt tổ hợp AG/CS mang CT

Các mẫu hạt tổ hợp chứa CT đều có tỉ lệ % CT khá cao, dao động từ 78,43% – 89,55%.

Bảng 3.2. Hiệu suất mang CT của các tổ hợp hạt AG/CS/CT

Kí hiệu mẫu	Khối lượng ban đầu của CT (% khối lượng)	Khối lượng thực tế của CT (% khối lượng)	Hiệu suất mang CT (%)
AG/CS/CT10	10	7,84	78,43
AG/CS/CT20	20	16,93	84,64
AG/CS/CT30	30	26,87	89,55
AG/CS/CT50	50	43,16	86,31

3.3.6. Nghiên cứu giải phóng CT từ tổ hợp hạt AG/CS mang CT trong các môi trường dung dịch pH khác nhau

3.3.6.1. Ảnh hưởng của thời gian đến động học giải phóng CT

Hàm lượng CT giải phóng từ các hạt tổ hợp tăng theo thời gian nghiên cứu như trên. Hàm lượng CT giải phóng từ hạt tổ hợp AG/CS/CT10 - AG/CS/CT50 xảy ra theo 2 giai đoạn tương tự như giải phóng CC từ các màng tổ hợp AC73CT: giải phóng nhanh trong 10 giờ đầu tiên và có kiểm soát trong 20 giờ tiếp theo.

3.3.6.2. Ảnh hưởng của dung dịch pH

Quá trình giải phóng CT ở các dung dịch pH khác nhau được sắp xếp theo thứ tự pH $2,0 < \text{pH } 4,5 < \text{pH } 6,8 \approx \text{pH } 7$. Cụ thể, trong giờ đầu tiên, hàm lượng CT giải phóng tương ứng với mẫu AG/CS/CT30 trong các pH 2,0; pH 4,5; pH 6,8; và pH 7,4 lần lượt là: 24,78 %; 32,35 %; 53,83 % và 53,51 %. Sau 10 giờ, hàm lượng CT giải phóng tương ứng với pH từ thấp đến cao lần lượt là: 89,40 %; 90,04 %; 91,09 %; 93,82 %, từ đó, hàm lượng CT giải phóng chậm và có kiểm soát. Sau 30 giờ, hàm lượng CT giải phóng dao động 97,65 % - 99,86 %. Các kết quả này gần như tương tự với kết quả giải phóng CC từ màng tổ hợp AC73CT đã trình bày ở mục (3.2.5.1) cũng như của chitosan với các tổ hợp thuốc khác.

3.3.6.3. Ảnh hưởng của hàm lượng CT

Trong tất cả các dung dịch pH, các mẫu CT không mang bởi tổ hợp AG/CS đều giải phóng nhanh hơn so với các mẫu CT được mang bởi AG/CS, do mẫu CT được giải phóng trực tiếp mà không giải phóng từ bề mặt tổ hợp AG/CS/CT hoặc chịu ảnh hưởng của tương tác giữa các phân tử, nhóm chức trong tổ hợp AG/CS, thậm chí nhất là ở các dung dịch pH (4,5; 6,8; 7,4). Quá trình giải phóng CT từ hạt tổ hợp mang hàm lượng CT khác nhau vẫn có 2 giai đoạn: giải phóng nhanh trong 10 giờ đầu và có kiểm soát

trong 20 giờ tiếp theo. Trong giai đoạn giải phóng nhanh, mẫu AG/CS chứa hàm lượng CT ít hơn được giải phóng với tốc độ chậm hơn so với vật liệu tổng hợp có hàm lượng CT cao hơn. Ở các dung dịch pH khác nhau, ví dụ pH 2,0 và pH 4,5, tốc độ giải phóng CT trong hạt tổ hợp AG/CS/CT30 thấp hơn AG/CS/CT10. Điều này có thể là do kích thước của các hạt và sự kết tinh của các hạt nano trong các mẫu tổ hợp. Vì vậy, hạt tổ hợp AG/CS/CT10 và AG/CS/CT20 phù hợp với yêu cầu vận chuyển thuốc tác dụng kéo dài, do có thể tồn tại trong dạ dày từ 1 đến 3 giờ trước khi chúng được vận chuyển đến ruột non và ruột già.

3.3.7. Động học giải phóng CT từ AG/CS/CT

Ở các dung dịch pH 2,0 và pH 6,8 hàm lượng CT được giải phóng phụ thuộc vào nồng độ CT, tương ứng với động học bậc 0, ở dung dịch pH 4,5 cơ chế giải phóng CT tuân theo mô hình động học KMP và bậc 0, ở dung dịch pH 7,4 quá trình giải phóng CT tuân theo mô hình động học HG.

3.3.8. Kết quả đánh giá hoạt tính sinh học của CT và vật liệu hạt tổ hợp AG/CS/CT

3.3.8.1. Kết quả thử nghiệm hoạt tính gây độc tế bào

Khả năng gây độc tế bào ung thư biểu mô miệng ở người (KB)

Các mẫu nghiên cứu đã thể hiện hoạt tính với giá trị IC_{50} từ 14,63 – 43,17 $\mu\text{g/ml}$ trên dòng tế bào KB. Theo tiêu chuẩn của Viện ung thư quốc gia Hoa Kỳ (NIC), căn chiết được coi có hoạt tính tốt khi $IC_{50} \leq 20 \mu\text{g/ml}$. Vì vậy, có thể khẳng định CT có giá trị $IC_{50} = 14,63 \pm 1,56$ thể hiện hoạt tính tốt với dòng tế bào ung thư biểu mô miệng ở người (KB). Các mẫu tổ hợp AG/CS/CT với tỉ lệ khác nhau cũng cho hoạt tính lên dòng tế bào KB từ $25,08 \pm 1,35$ đến $43,17 \pm 3,11$. Nhìn chung hoạt tính tăng khi hàm lượng CT tăng lên. Mẫu tổ hợp cho hoạt tính tốt nhất là AG/CS/CT30 với $IC_{50} = 25,08 \pm 1,35$.

Trong mẫu AG/CS/CT10 hàm lượng CT được đưa vào chỉ chiếm 10 % tính theo tổng khối lượng của AG và CS, tương đương với hàm lượng CT trong mẫu chỉ chiếm khoảng 1/10 so với hàm lượng CT không mang bởi AG và CS. Tuy nhiên IC_{50} của mẫu AG/CS/CT10 cho giá trị $IC_{50} = 43,17 \pm 3,11$ gấp khoảng 2,95 lần so với mẫu CT, tương tự các mẫu AG/CS/CT20, AG/CS/CT30, AG/CS/CT50 cũng có các giá trị IC_{50} gấp tương ứng 2,16; 1,71; 2,02 lần so với mẫu CT. Điều đó cho thấy hoạt tính của các tổ hợp đã tăng lên so với mẫu CT không được mang bởi tổ hợp (dựa trên % khối lượng CT đưa vào tổ hợp). Điều này cho thấy các yếu tố như: kích thước hạt nano, vai trò tương hỗ của AG và CS trong tổ hợp đã làm tăng hoạt tính của CT trong

tổ hợp, trong đó phải nhắc đến thành phần chính của CT là PP chiếm đến 30,25 % CT thể hiện hoạt tính gây độc tế bào ung thư KB khá hiệu quả.

Bảng 3.3. Kết quả gây độc tế bào trên dòng ung thư biểu mô ở người (KB) từ CT và các mẫu hạt tổ hợp

Nồng độ $\mu\text{g/ml}$	% ức chế					
	CT	AG/CS/C T10	AG/CS/C T20	AG/CS/C T30	AG/CS/C T50	Ellipticine
100	97,83	101,81	103,05	101,69	101,15	98,72
20	66,71	24,28	37,31	52,40	42,47	89,31
4	11,08	4,22	13,95	24,24	10,31	50,91
0,8	-1,12	-4,08	4,63	14,11	8,26	24,16
IC ₅₀	14,63 $\pm 1,56$	43,17 \pm 3,11	31,61 \pm 1,98	25,08 \pm 1,35	29,49 \pm 1,46	0,34 $\pm 0,04$

Khả năng gây độc tế bào ung thư tế bào gan ở người (HepG2)

Kết quả thể hiện hoạt tính gây độc tế bào ung thư gan ở người thể hiện trong Bảng 3.4. Kết quả cho thấy CT gây độc tế bào HepG2 với giá trị IC₅₀ = 17,31 \pm 0,27 và AG/CS/CT50 gây độc tế bào HepG2 với giá trị IC₅₀ = 16,36 \pm 0,37 đều thể hiện hoạt tính tốt với tế bào HepG2 (theo tiêu chuẩn của Viện ung thư quốc gia Hoa Kỳ (NIC)). Hơn nữa, IC₅₀ = 16,36 \pm 0,37 của AG/CS/CT50 còn thấp hơn so với mẫu CT không mang bởi tổ hợp, kết quả này cho thấy việc mang CT bởi AG và CS đã phát huy được hiệu quả trong việc tăng cường khả năng hòa tan, phân tán của CT trong tổ hợp so với CT không được mang bởi tổ hợp.

Bảng 3.4. Kết quả gây độc tế bào trên dòng tế bào ung thư gan ở người (HepG2) từ CT và các mẫu hạt tổ hợp

TT	Tên mẫu	Giá trị IC ₅₀ ($\mu\text{g/ml}$)
1	CT	17,31 \pm 0,27
2	AG/CS/CT10	>100
3	AG/CS/CT20	>100
4	AG/CS/CT30	48,89 \pm 3,08
5	AG/CS/CT50	16,36 \pm 0,67
6	Ellipticine	3,5 \pm 0.30

Khả năng gây độc tế bào thận gốc phôi ở người (HEK-293A)

Kết quả trong Bảng 3.5 cho thấy, các mẫu nghiên cứu tại các nồng độ thử khác nhau từ 200 µg/ml xuống 1,6 µg/ml đều không thể hiện hoạt tính lên dòng tế bào lành tính HEK-293A tại các nồng độ đem thử với giá trị IC₅₀ đều > 100 (µg/ml) tại tất cả các nồng độ. Chất đối chứng dương Ellipticine hoạt động ổn định trong ống nghiệm. Kết quả này cho thấy CT và các tổ hợp AG/CS/CT chứa hàm lượng CT khác nhau không gây độc tế bào lên tế bào lành tính thận gốc phôi ở người (HEK-293A). Điều này có ý nghĩa cực kì lớn đến các đánh giá về hoạt tính sinh học của CT và tổ hợp AG/CS/CT.

Bảng 3.5. Kết quả khả năng gây độc tế bào thận gốc phôi ở người (HEK-293A) từ CT và các mẫu hạt tổ hợp

TT	Tên mẫu	Giá trị IC₅₀ (µg/ml)
1	CT	>100
2	AG/CS/CT10	>100
3	AG/CS/CT20	>100
4	AG/CS/CT30	>100
5	AG/CS/CT50	>100
	Ellipticine	0,04 ± 0,03

3.3.8.2. Kết quả đánh giá hoạt tính chống oxy hóa

Khả năng chống oxy hóa của tổ hợp hạt AG/CS/CT tăng khi tăng nồng độ của các mẫu thử. Khả năng chống oxy hóa tỉ lệ thuận với hàm lượng CT trong hạt tổ hợp AG/CS/CT. Rõ ràng nhất là tổ hợp AG/CS/CT50 cho kết quả EC₅₀ = 13,99 ± 0,26 bằng với EC₅₀ của CT không mang bởi hạt tổ hợp. Các mẫu AG/CS/CT20, AG/CS/CT30 cũng cho thấy khả năng quét/bắt các gốc tự do DPPH một cách hiệu quả với giá trị lần lượt là 14,57 ± 0,41 và 14,37 ± 0,17, sấp xỉ với mẫu CT không được mang bởi tổ hợp. Điều này một lần nữa thể hiện vai trò tương hợp của AG và CS trong việc phát huy sinh khả dụng của PP trong cao chiết khi được mang bởi tổ hợp.

Bảng 3.6. Kết quả thử hoạt tính chống oxy hóa trên hệ DPPH của CT và mẫu hạt tổ hợp

TT	Tên mẫu	Giá trị EC₅₀ (µg/ml)
1	CT	13,99 ± 0,26
2	AG/CS/CT10	31,16 ± 2,31
3	AG/CS/CT20	14,57 ± 0,41
4	AG/CS/CT30	14,37 ± 0,17
5	AG/CS/CT50	13,99 ± 0,26
	Quercetin	9,97 ± 0,25

3.3.8.3. Kết quả thử nghiệm hoạt tính ức chế nitric oxide (Nos Inhibition)

Bảng 3.7. Khả năng ức chế sản sinh NO của CT và các mẫu hạt tổ hợp

TT	Tên mẫu	Giá trị IC ₅₀ (µg/ml)
1	CT	20,14 ± 1,46
2	AG/CS/CT10	>100
3	AG/CS/CT20	61,23 ± 4,19
4	AG/CS/CT30	66,53 ± 3,76
5	AG/CS/CT50	47,93 ± 0,15
6	Chất đối chứng Dexamethasone	14,20 ± 0,54

Khả năng ức chế sản sinh NO của CT có giá trị IC₅₀ = 20,14 ± 1,46, mẫu AG/CS/CT10 có giá trị IC₅₀ > 100 (µg/ml) chưa thể hiện khả năng ức chế sản sinh NO, các mẫu hạt tổ hợp AG/CS/CT còn lại khả năng ức chế sản sinh NO từ 47,93 ± 0,15 đến 66,53 ± 3,76. Chất đối chứng dương dexamethasone IC₅₀ = 14,20 ± 0,54 hoạt động ổn định trong thí nghiệm. Nhìn chung, CT và các mẫu tổ hợp AG/CS/CT có thể hiện khả năng ức chế NO nhưng chưa đạt mức hiệu quả.

Tóm tắt kết quả mục 3.3

Đã chế tạo thành công tổ hợp hạt AG/CS/CT bằng phương pháp vi nhũ với các hàm lượng CT đưa vào tương ứng 10 %, 20 %, 30 %, 50 % tính theo tổng khối lượng AG và CS.

1. Tổ hợp hạt AG/CS/CT có độ kết tinh cao, kính thước dao động từ 182 nm - 295 nm. Các hạt có xu hướng kết tụ khi tăng hàm lượng CT đưa vào. Tổ hợp AG/CS/CT có nhiệt độ nóng chảy và nhiệt độ phân hủy khá thấp.

2. Hiệu suất mang CT của hạt tổ hợp AG/CS/CT trong khoảng 78,43 - 89,55 %. CT giải phóng từ các hạt tổ hợp AG/CS/CT theo hai giai đoạn: nhanh trong 10 giờ đầu tiên và có kiểm soát ở 20 giờ tiếp theo. Các yếu tố như pH, thời gian và hàm lượng thuốc ảnh hưởng nhiều đến hàm lượng CT giải phóng. Giai đoạn giải phóng nhanh, hàm lượng CT giải phóng không tuân theo mô hình động học nhất định, giai đoạn giải phóng CT có kiểm soát, các mẫu đều tuân theo mô hình động học Korsmeyer - Peppas với giá trị n < 0.5.

3. Kết quả nghiên cứu hoạt tính sinh học từ CT và các mẫu tổ hợp cho thấy, cả CT và các mẫu AG/CS/CT đều thể hiện hoạt tính gây độc tế bào ung thư KB, hoạt tính chống oxy hóa trên hệ DPPH, khả năng ức chế sản sinh NO cho kết quả khá tốt. Tất cả các mẫu nghiên cứu đều không gây độc với tế bào lành tính (tế bào thận gốc phôi ở người HEK-293A).

KẾT LUẬN

1. Đã chiết tách thành công cao chiết trà hoa vàng (THV) với hàm lượng polyphenol tổng đạt 4,763 % (CC) và làm giàu hàm lượng polyphenol tổng đạt giá trị 30,25 % (CT). Từ đó, đã chế tạo tổ hợp màng AC73CC chứa hàm lượng CC khác nhau bằng phương pháp dung dịch và tổ hợp hạt AG/CS/CT bằng phương pháp vi nhũ.

2. Hiệu suất mang CC từ các màng tổ hợp AC73CC dao động 64,32 – 88,73 %, với CT trong các hạt tổ hợp AG/CS/CT dao động 78,43 - 89,55 %.

3. Với các mẫu màng AC73CC, trong giai đoạn giải phóng CC nhanh, tuân theo mô hình Higuchi. Với giai đoạn giải phóng có kiểm soát trong dung dịch pH 2 các mô hình FO, HG và KMP đều có hệ số hồi quy $R^2 > 0,900$.

Các mẫu hạt tổ hợp AG/CS/CT, trong giai đoạn giải phóng nhanh, hàm lượng CT giải phóng từ hạt tổ hợp AG/CS/CT không tuân theo mô hình động học nhất định, giai đoạn giải phóng có kiểm soát, CT giải phóng từ các mẫu đều tuân theo mô hình Korsmeyer – Peppas với giá trị $n < 0.5$.

4. CT và các mẫu hạt tổ hợp AG/CS/CT đều thể hiện hoạt tính gây độc tế bào ung thư KB và ung thư gan HepG2. Hoạt tính chống oxy hóa trên hệ DPPH của CT có giá trị $EC_{50} = 13,99 \pm 0,26 \mu\text{g/ml}$ và mẫu tổ hợp AG/CS/CT có giá trị EC_{50} dao động từ $13,99 \pm 0,26 \mu\text{g/ml} - 31,16 \pm 2,31 \mu\text{g/ml}$. Tất cả các mẫu nghiên cứu đều không gây độc với tế bào lành tính (tế bào thận gốc phôi ở người (HEK-293A)). Các mẫu CT và AG/CS/CT30, AG/CS/CT50 đã thể hiện khả năng ức chế sản sinh NO.

NHỮNG ĐÓNG GÓP MỚI CỦA LUẬN ÁN

1. Đã chế tạo thành công các màng tổ hợp AG, CS chứa CC bằng phương pháp dung dịch và hạt tổ hợp AG, CS chứa CT bằng phương pháp vi nhũ. Xác định được hiệu suất mang CC từ màng tổ hợp dao động từ 64,32 – 88,73 %, CT các các hạt tổ hợp đạt 78,43 - 89,55 %.

2. Xây dựng được các mô hình động học phù hợp CC và CT trong các dung dịch pH khác nhau. Các yếu tố: thời gian, pH, hàm lượng CC, CT ảnh hưởng rõ rệt đến hàm lượng CC, CT giải phóng từ màng tổ hợp AC73CT và hạt tổ hợp AG/CS/CT.

3. Các hạt tổ hợp AG/CS/CT, CT đều thể hiện hoạt tính tốt với tế bào ung thư KB, ung thư gan HepG2, hoạt tính chống oxi hóa trên hệ DPPH và không gây độc với tế bào lành tính HEK-293A.