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

NGƯỜI HƯỚNG DẪN KHOA HỌC:

1. GS. TS. Thái Hoàng

2. PGS. TS. Vũ Quốc Trung

HÀ NỘI – 2024

LỜI CAM ĐOAN

Tôi xin cam đoan những nội dung trình bày trong luận án do tôi thực hiện dưới sự hướng dẫn của GS. TS Thái Hoàng, PGS. TS Vũ Quốc Trung. Các kết quả nghiên cứu được trình bày trong luận án là trung thực, khách quan và chưa từng được bảo vệ ở bất kỳ học vị nào.

Tôi xin cam đoan rằng mọi sự giúp đỡ cho việc thực hiện luận án đã được cám ơn, các thông tin trích dẫn trong luận án này đều được chỉ rõ nguồn gốc.

Hà Nội, ngày 24 tháng 05 năm 2024

Tác giả luận án

Lương Phú Hoàng

LỜI CẢM ƠN

Trước hết, tôi xin dành lời cảm ơn đặc biệt nhất, trân trọng và sâu sắc nhất tới GS.TS. Thái Hoàng và PGS.TS. Vũ Quốc Trung đã hết lòng tận tình hướng dẫn, động viên, truyền cho tôi tinh thần làm việc nghiêm túc, niềm say mê nghiên cứu khoa học trong quá trình học tập và nghiên cứu.

Tôi xin chân thành gửi lời cảm ơn tới PGS.TS. Nguyễn Thúy Chinh và tập thể các nhà khoa học của Phòng Hóa lý vật liệu phi kim loại - Viện Kỹ thuật nhiệt đới - Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam đã cho tôi những kinh nghiệm nghiên cứu, cho tôi nhiều ý kiến chỉ dẫn quý báu trong quá trình tiến hành đề tài luận án, là tấm gương về nghiên cứu khoa học để tôi phấn đấu vươn lên.

Tôi xin trân trọng cảm ơn Ban Giám đốc, thầy giáo, cô giáo cùng toàn thể cán bộ phòng Đào tạo Học viện Khoa học và Công nghệ - Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam đã giúp đỡ tôi trong quá trình học tập và hoàn thành luận án.

Tôi muốn dành một lời cảm ơn hết sức chân thành cho bạn bè, đồng nghiệp, các thành viên trong Phòng Hóa lý vật liệu phi kim loại - Viện Kỹ thuật nhiệt đới - Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam đã luôn tạo điều kiện giúp đỡ, kiếm tìm tài liệu và luôn khuyến khích, động viên tôi trong quá trình thực hiện đề tài nghiên cứu.

Cuối cùng, tôi luôn cảm ơn những người thân đã gánh vác công việc gia đình, chăm chút, lo lắng dõi theo từng ngày tôi làm luận án.

Hà Nội, ngày 24 tháng 05 năm 2024

Tác giả luận án

Lương Phú Hoàng

MỤC LỤC

Trang

MỞ ĐẦU 1
CHƯƠNG 1. TỔNG QUAN 3
1.1. Giới thiệu về chitosan 3
1.1.1. Cấu tạo của chitosan 3
1.1.2. Các đặc trưng, tính chất của chitosan 4
1.1.3. Ứng dụng của chitosan trong lĩnh vực y sinh 5
1.2. Giới thiệu về alginate 7
1.2.1. Cấu tạo và phân loại alginate 7
1.2.2. Các tính chất của alginate 9
1.2.3. Ứng dụng của alginate trong lĩnh vực y sinh 11
1.3. Vật liệu tổ hợp polymer thiên nhiên mang thuốc trên cơ sở alginate và chitosan 13
1.3.1. Vật liệu tổ hợp polymer thiên nhiên mang thuốc trên cơ sở alginate ... 13
1.3.2. Vật liệu tổ hợp polymer thiên nhiên mang thuốc trên cơ sở chitosan .. 13
1.3.3. Vật liệu tổ hợp polymer thiên nhiên mang thuốc trên cơ sở alginate/chitosan 14
1.4. Giới thiệu về trà hoa vàng và polyphenol trà 18
1.4.1. Giới thiệu về trà hoa vàng 18
1.4.2. Polyphenol 19
1.5. Vật liệu tổ hợp polymer/polyphenol trà 37
CHƯƠNG 2. THỰC NGHIỆM 39
2.1. Nguyên liệu, hóa chất và dụng cụ 39
2.1.1. Nguyên liệu và hóa chất 39
2.1.2. Dụng cụ và thiết bị 39
2.2. Quy trình tách chiết cao từ lá trà hoa vàng 40

2.2.1. Quy trình chiết tách cao từ lá trà hoa vàng 40
2.2.2. Quy trình chiết tách và làm giàu hàm lượng polyphenol tổng trong lá trà hoa vàng 40
2.3. Chế tạo vật liệu tổ hợp alginate/chitosan mang polyphenol từ cao chiết lá trà hoa vàng 42
2.3.1. Chế tạo màng tổ hợp alginate/chitosan/cao chiết từ lá trà hoa vàng bằng phương pháp dung dịch 42
2.3.2. Chế tạo tổ hợp hạt alginate/chitosan/cao tổng từ cao tổng trà hoa vàng bằng phương pháp vi nhũ 42
2.4. Các phương pháp nghiên cứu 44
2.4.1. Phương pháp khảo sát thành phần hóa học của cao tổng chiết tách từ lá trà hoa vàng. 44
2.4.2. Phương pháp sắc ký bản mỏng (TLC) 45
2.4.3. Định lượng polyphenol tổng theo phương pháp Folin – Denis 46
2.4.4. Phương pháp phổ hồng ngoại biến đổi Fourier (FT-IR) 47
2.4.5. Phương pháp xác định phân bố kích thước hạt 47
2.4.6. Phương pháp hiển vi điện tử quét 48
2.4.7. Phương pháp nhiệt lượng quét vi sai (DSC) 48
2.4.8. Phương pháp phổ hấp thụ tử ngoại - khả kiến (UV-Vis) 49
2.4.9. Các phương pháp phân tích định lượng 50
2.5. Đánh giá hoạt tính sinh học của cao tổng và tổ hợp AG/CS/CT 56
2.5.1. Phương pháp đánh giá hoạt tính ức chế tế bào ung thư 56
2.5.2. Phương pháp đánh giá hoạt tính chống oxi hóa (phương pháp phản ứng thông qua quét/bắt gốc tự do DPPH) 58
2.5.3. Phương pháp đánh giá hoạt tính kháng viêm (phương pháp xác định khả năng ức chế sản sinh NO) 59
CHƯƠNG 3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN 61

3.1. Các đặc trưng, tính chất của cao chiết (CC) và cao tổng (CT) trà hoa vàng 61
3.1.1. Kết quả định tính một số hợp chất tự nhiên có trong cao chiết và cao tổng trà hoa vàng 61
3.1.2. Các đặc trưng hình thái, cấu trúc của CC và CT 64
3.2. Màng tổ hợp AG/CS mang CC 67
3.2.1. Phổ FTIR của màng tổ hợp AG, CS, AG/CS 67
3.2.2. Đặc trưng nhiệt của màng tổ hợp AG/CS mang CC 73
3.2.3. Ảnh FESEM màng tổ hợp AG/CS mang CC 74
3.2.4. Hiệu suất mang CC của các màng tổ hợp AG/CS 76
3.2.5. Nghiên cứu giải phóng CC từ màng tổ hợp AG/CS mang CC trong các dung dịch pH khác nhau 77
3.2.6. Động học giải phóng CC từ màng tổ hợp AG/CS mang CC 85
3.3. Tổ hợp hạt AG/CS mang CT trà hoa vàng 94
3.3.1. Phân bố kích thước hạt của hạt AG/CS mang CT 94
3.3.2. Phổ FTIR của tổ hợp hạt AG/CS mang CT 96
3.3.3. Hình thái cấu trúc của hạt tổ hợp AG/CS mang CT 98
3.3.4. Đặc trưng nhiệt của tổ hợp hạt AG/CS mang CT 101
3.3.5. Hiệu suất mang CT trong các hạt tổ hợp AG/CS mang CT 102
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 103
3.3.7. Động học giải phóng CT từ AG/CS/CT 106
3.3.8. Kết quả đánh giá hoạt tính sinh học của CT và vật liệu hạt tổ hợp AG/CS/CT 112
Tóm tắt kết quả mục 3.3 118
KẾT LUẬN 119
NHỮNG ĐÓNG GÓP MỚI CỦA LUẬN ÁN 120
DANH MỤC CÁC CÔNG TRÌNH CÔNG BỐ 121

TÀI LIỆU THAM KHẢO 122

PHỤ LỤC

DANH MỤC CÁC KÝ HIỆU, CÁC CHỮ VIẾT TẮT

AG	Alginate
AG/CS	Alginate/chitosan
AC73CC5	Alginate/chitosan /cao chiết*, với tỷ lệ khối lượng (7 : 3 : 5*)
AC73CC10	Alginate/chitosan /cao chiết*, với tỷ lệ khối lượng (7 : 3 : 10*)
AC73CC15	Alginate/chitosan /cao chiết*, với tỷ lệ khối lượng (7 : 3 : 15*)
AC73CC20	Alginate/chitosan /cao chiết*, với tỷ lệ khối lượng (7 : 3 : 20*)
AC73CC0	Alginate/chitosan /cao chiết*, với tỷ lệ khối lượng (7 : 3 : 0*)
AC70CC10	Alginate/chitosan /cao chiết*, với tỷ lệ khối lượng (7 : 0 : 10*)
AG/CS/CT	Alginate/chitosan/cao tổng
AG/CS/CT10	Alginate/chitosan/cao tổng*, với tỷ lệ khối lượng (2 : 1 : 10*)
AG/CS/CT20	Alginate/chitosan/cao tổng*, với tỷ lệ khối lượng (2 : 1 : 20*)
AG/CS/CT30	Alginate/chitosan/cao tổng*, với tỷ lệ khối lượng (2 : 1 : 30*)
AG/CS/CT50	Alginate/chitosan/cao tổng*, với tỷ lệ khối lượng (2 : 1 : 50*)
APTT	Thời gian đông máu nội sinh
AS	Alginate sunfat
C	Catechin
CC	Cao chiết
CT	Cao tổng
CS	Chitosan
DMEM	Môi trường nuôi cấy tế bào (Dulbecco's Modified Eagle Medium)
DPPH	2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl
DSC	Phân tích nhiệt quét vi sai (Differential Thermal Analyzer)
ECG	Epicatechin gallate
EGCG	Epigallocatechin gallate
F86	Pluronic

FESEM	Hiển vi điện tử quét phân giải cao (Field Emission Scanning Electron Microscope)
FTIR	Phổ hồng ngoại biến đổi Fourier (Fourier-transform infrared)
GTE	Chiết xuất trà xanh (Green tea extract)
HEPES	*N*-2-hydroxyethylpiperazine-N-2-ethane sulfonic acid
HPLC	Sắc ký lỏng hiệu năng cao (High-performance liquid chromatography)
KLPT	Khối lượng phân tử
LOV	Lovastatin
NIF	Nifedipin
PCN	Nifedipine – poly lactic acid
PECTP	Tổ hợp chitosan/alginate mang polyphenol
PLA	Poly lactic acid
CT	Cao trà hoa vàng làm giàu polyphenol tổng
PSS	Propylen glycol alginate natri sulfat
PT	Thời gian đông máu ngoại sinh
PVP	Polyvinylpyrrolidone
SEM	Kính hiển vi quét electron (Scanning Electron Microscopy)
SGS	Natri guluronat sunfat
STCT	Natri tripolyphotphat
T_{nc}	Nhiệt độ nóng chảy
T_{ph}	Nhiệt độ phân hủy
TGA	Phân tích nhiệt khối lượng (Thermal Gravimetri Analysis)
THV	Trà hoa vàng
TT	Thời gian đông máu chung
UV-Vis	Phương pháp phổ tử ngoại - khả kiến (Ultraviolet–visible)
ΔH_m	Enthalpy nóng chảy

*(*tính trên cơ sở tổng khối lượng của alginate và chitosan)*

DANH MỤC CÁC BẢNG

Trang

Bảng 1.1. Hàm lượng polyphenol tổng (%) theo dự đoán của mô hình tối ưu và thực tế trích ly được 30

Bảng 1.2. Khả năng chống oxi hóa của polyphenol trong trà xanh và probucol trên chuột béo phì.....34

Bảng 1.3. Độ bền kéo, độ bền kéo dài, độ thấm hơi nước và độ ẩm của màng curdlan/chitosan 38

Bảng 2.1. Các mẫu màng tổ hợp AG/CS/CC đã chế tạo 42

Bảng 2.2. Các mẫu hạt AG/CS/CT đã chế tạo.....44

Bảng 2.3. Phản ứng định tính một số nhóm chất đặc trưng chứa trong cao tổng trà hoa vàng 44

Bảng 2.4. Mật độ quang (A) ứng với các nồng độ pha loãng (C) của CC trong các dung dịch pH khác nhau 51

Bảng 2.5. Phương trình đường chuẩn và hệ số hồi quy (R^2) của CC trong các môi trường dung dịch pH khác nhau 51

Bảng 2.6. Phương trình đường chuẩn và hệ số hồi quy (R^2) của CT trong các dung dịch pH khác nhau. 54

Bảng 3.1. Kết quả định tính các hợp chất tự nhiên trong mẫu cao chiết và cao tổng trà hoa vàng 61

Bảng 3.2. Đặc trưng phổ FTIR của AG, CS và màng tổ hợp AG/CS 69

Bảng 3.3. Đặc trưng phổ FTIR các mẫu màng tổ hợp AG/CS mang CC.....70

Bảng 3.4. Giả thiết về liên kết hydro được hình thành giữa các nhóm chức của AG, CS và các polyphenol trong cao THV 71

Bảng 3.5. Các giá trị DSC của các màng tổ hợp mang CC 74

Bảng 3.6. Hiệu suất mang CC của các màng tổ hợp AG/CS.....76

Bảng 3.7 a. Hàm lượng CC giải phóng (%) từ các màng tổ hợp AC73 trong dung dịch pH 2 77

Bảng 3.7b. Hàm lượng CC giải phóng (%) từ các màng tổ hợp AC73 trong dung dịch pH 4,5 78

Bảng 3.7c. Hàm lượng CC giải phóng (%) từ các màng tổ hợp AC73 trong dung dịch pH 6,8 78
Bảng 3.7d. Hàm lượng CC giải phóng (%) từ các màng tổ hợp AC73 trong dung dịch pH 7,4 79
Bảng 3.8. Các tham số của các phương trình hồi quy phản ánh giải phóng nhanh CC từ các màng tổ hợp AC73CC5, AC73CC10, AC73CC15 và AC73CC20 trong 10 giờ đầu ở dung dịch pH 2 88
Bảng 3.9. Các tham số của các phương trình hồi quy phản ánh giải phóng nhanh CC từ các màng tổ hợp AC7CC5, AC73CC10, AC73CC15 và AC73CC20 trong 10 giờ đầu ở dung dịch pH 4,5 88
Bảng 3.10. Các tham số của các phương trình hồi quy phản ánh giải phóng nhanh CC từ các màng tổ hợp AC73CC5, AC73CC10, AC73CC15 và AC73CC20 trong 10 giờ đầu ở dung dịch pH 6,8 89
Bảng 3.11. Các tham số của các phương trình hồi quy phản ánh giải phóng nhanh CC từ các màng tổ hợp AC73CC5, AC73CC10, AC73CC15 và AC73CC20 trong 10 giờ đầu ở dung dịch pH 7,4 89
Bảng 3.12. Các tham số của các phương trình động học giải phóng có kiểm soát CC từ các màng tổ hợp AC73CC trong dung dịch pH 2 91
Bảng 3.13. Các tham số của các phương trình động học giải phóng có kiểm soát CC từ các màng tổ hợp AC73CC trong dung dịch pH 4,5 91
Bảng 3.14. Các tham số của các phương trình động học giải phóng có kiểm soát CC từ các màng tổ hợp AC73CC trong dung dịch pH 6,8 92
Bảng 3.15. Các tham số của các phương trình động học giải phóng có kiểm soát CC từ các màng tổ hợp AC73CC trong dung dịch pH 7,4 92
Bảng 3.16. Kích thước hạt trung bình của các mẫu hạt tổ hợp AG/CS/CT có hàm lượng CT khác nhau 95
Bảng 3.17. Dao động của một số nhóm đặc trưng của CT và hạt tổ hợp AG/CS/CT 97
Bảng 3.18. Các đặc trưng DSC của hạt tổ hợp AG/CS/CT với hàm lượng CT khác nhau 101

Bảng 3.19. Hiệu suất mang CT của các tổ hợp hạt AG/CS/CT.....103
Bảng 3.20. Các tham số của phương trình hồi quy phản ánh giải phóng nhanh CT từ hạt tổ hợp AG/CS/CT trong các dung dịch pH 2, pH 4,5, pH 6,8 và pH 7,4 theo các mô hình động học khác nhau.....109
Bảng 3.21. Các tham số của phương trình hồi quy phản ánh giải phóng có kiểm soát CT từ hạt tổ hợp AG/CS/CT trong các dung dịch pH 2, pH 4,5, pH 6,8 và pH 7,4 theo các mô hình động học khác nhau.110
Bảng 3.22. Kết quả gây độc tế bào trên dòng ung thư biểu mô ở người (KB) từ CT và các mẫu hạt tổ hợp 113
Bảng 3.23. Kết quả gây độc tế bào trên dòng tế bào ung thư gan ở người (HepG2) từ CT và các mẫu hạt tổ hợp 113
Bảng 3.24. Kết quả khả năng gây độc tế bào thận gốc phôi ở người (HEK-293A) từ CT và các mẫu hạt tổ hợp 114
Bảng 3.25. Kết quả thử hoạt tính chống oxy hóa trên hệ DPPH của CT và mẫu hạt tổ hợp.....115
Bảng 3.26. Khả năng ức chế sản sinh NO của CT và các mẫu hạt tổ hợp 117

DANH MỤC CÁC HÌNH VẼ, ĐỒ THỊ

Trang

Hình 1.1. Một đoạn cấu trúc hóa học của chitin 3
Hình 1.2. Cấu trúc hóa học của chitosan 4
Hình 1.3. Trong tảo nâu chứa nhiều alginate 7
Hình 1.4. Công thức cấu tạo của 2 acid cấu tạo nên alginic acid.....8
Hình 1.5. Công thức cấu tạo của sodium alginate.....8
Hình 1.6. Công thức cấu tạo của calcium alginate.....9
Hình 1.7. Công thức cấu tạo của ammonium alginate 9
Hình 1.8. Ảnh FESEM của các màng tổng hợp AG/CS = 4/1, LS 10%*, PCL 0 %* (a). AG/CS = 4/1, LS 10 %*, PCL 3 %* (b). AG/CS = 4/1, LS 10 %*, PCL 5 %* (c). AG/CS = 4/1, LS 10 %*, PCL 10 %* (d) 14
Hình 1.9. Cây trà hoa vàng.....18
Hình 1.10. Cấu trúc các polyphenol đơn giản.....20
Hình 1.11. Cấu trúc tổng quát của flavonoid 20
Hình 1.12. Cấu trúc của hợp chất flavon.....21
Hình 1.13. Cấu trúc của hợp chất flavonol.....21
Hình 1.14. Cấu trúc của hợp chất flavanone 22
Hình 1.15. Cấu trúc của hợp chất dihydroflavonol 22
Hình 1.16. Cấu trúc của hợp chất flavanol.....22
Hình 1.17. Cấu trúc của hợp chất chalcon 23
Hình 1.18. Cấu trúc của hợp chất isoflavon 23
Hình 1.19. Cấu trúc của hợp chất anthocyanidin 24
Hình 1.20. Công thức cấu tạo của catechin.....25
Hình 1.21. Công thức cấu tạo của (-)-EGCG.....25
Hình 1.22. Công thức cấu tạo của ECG 26
Hình 1.23. Công thức cấu tạo của C và EC.....27
Hình 1.24. Công thức cấu tạo của anthoxanthin 28
Hình 1.25. Công thức cấu tạo hợp chất leucoanthocyanin 29

Hình 1.26. Sắc ký đồ HPLC của các mẫu dịch chiết trà hoa vàng trong dung môi methanol: (a) C. impressinervis, (b) C. euphlebia, (c) C. microcarpa,.....33
Hình 2.1. Quy trình chiết tách cao từ lá trà hoa vàng 40
Hình 2.2. Quy trình chiết tách từ lá trà hoa vàng và làm giàu hàm lượng polyphenol tổng từ lá trà hoa vàng.....41
Hình 2.3. Quy trình chế tạo vật liệu tổ hợp hạt AG/CS/CT.....43
Hình 2.4. Thiết bị phổ hồng ngoại NEXUS 670 (Hoa Kỳ).....47
Hình 2.5. Thiết bị phân tích kích thước hạt Zetasizer.....47
Hình 2.6. Thiết bị hiển vi điện tử quét phát xạ trường (FESEM) 48
Hình 2.7. Sơ đồ khối của hệ thiết bị DSC 48
Hình 2.8. Thiết bị phổ UV-Vis (Cintra 40, GBC, Hoa Kỳ) 50
Hình 3.1. Sắc ký đồ cao tổng trà hoa vàng trong các hệ dung môi khác nhau ...62
Hình 3.2. Phổ FTIR của CC 64
Hình 3.3. Phổ FTIR của CT và CC 65
Hình 3.4. Ảnh FESEM của CT (A, B) và CC (C, D).....66
Hình 3.5. Phổ UV – Vis của CT.....67
Hình 3.6. Phổ FTIR của AG, CS, màng tổ hợp AG/CS.....68
Hình 3.7. Phổ FTIR của màng tổ hợp AG/CS mang CC 70
Hình 3.8. Các mô hình giả thiết liên kết giữa các thành phần AG, CS và EGCG đại diện cho polyphenol trong cao THV [109] 72
Hình 3.9. Giản đồ DSC của các màng tổ hợp mang CC.....73
Hình 3.10. Ảnh FESEM của các mẫu màng: A: AC73CC0, B: AC73CC5, (C): AC70CC10, D: AC73CC10, E: AC73CC15, F: AC73CC20.....75
Hình 3.11a. Hàm lượng CC giải phóng từ màng tổ hợp AC73CC10 trong các dung dịch pH khác nhau.....80
Hình 3.11b. Hàm lượng CC giải phóng từ màng tổ hợp AC73CC20 trong các dung dịch pH khác nhau.....81
Hình 3.12a. Hàm lượng CC giải phóng từ màng tổ hợp AC73CC trong dung dịch pH 2 82

Hình 3.12b. Hàm lượng CC giải phóng từ màng tổ hợp AC73CC trong dung dịch pH 4,5 82
Hình 3.12c. Hàm lượng CC giải phóng từ màng tổ hợp AC73CC trong dung dịch pH 6,8 83
Hình 3.12d. Hàm lượng CC giải phóng từ màng tổ hợp AC73CC trong dung dịch pH 7,4 83
Hình 3.13. Đồ thị phản ánh giải phóng nhanh CC từ màng tổ hợp AC73CC10 theo các mô hình động học khác nhau trong dung dịch pH 7,4 86
Hình 3.14. Đồ thị phản ánh giải phóng chậm có kiểm soát CC từ màng tổ hợp AC73CC10 theo các mô hình động học khác nhau trong dung dịch pH 7,4 90
Hình 3.15. Giản đồ phân bố kích thước hạt của tổ hợp hạt AG/CS/CT mang các hàm lượng CT khác nhau 95
Hình 3.16. Phổ FTIR tổ hợp hạt AG/CS/CT với các tỉ lệ CT khác nhau.....97
Hình 3.17. Mô hình mô tả sự hình thành liên kết ngang STPP với CS 98
Hình 3.18. Hình ảnh ngoại quan của các mẫu hạt tổ hợp AG/CS/CT với hàm lượng CT khác nhau 99
Hình 3.19. Ảnh SEM của các hạt tổ hợp AG/CS/CT với hàm lượng CT khác nhau và CT 100
Hình 3.20. Giản đồ DSC của hạt tổ hợp AG/CS/CT với hàm lượng CT khác nhau 101
Hình 3.21. Hàm lượng CT giải phóng từ hạt tổ hợp AG/CS/CT10 (A) và AG/CS/CT50 (B) theo thời gian thử nghiệm trong dung dịch pH 7,4 104
Hình 3.22. Hàm lượng CT giải phóng từ hạt tổ hợp AG/CS/CT trong các dung dịch pH khác nhau: pH 2 (A), pH 4,5 (B), pH 6,8 (C), pH 7,4 (D). 105
Hình 3.23. Đồ thị động học giải phóng CT từ hạt tổ hợp AG/CS/CT10 theo các mô hình động học khác nhau trong dung dịch pH 7,4.....108

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 khoẻ, 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 poymer 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 hydro 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. 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.

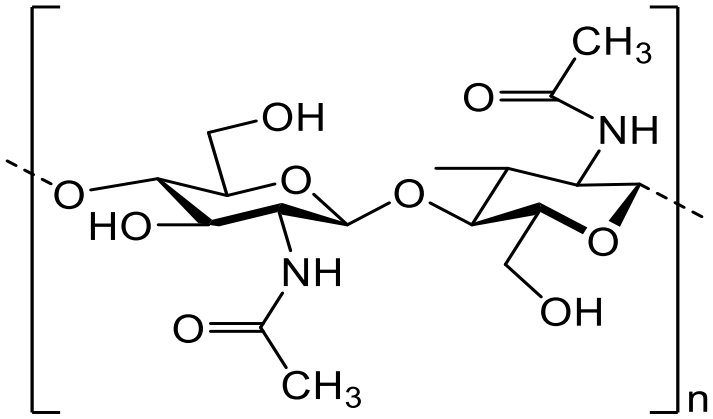
CHƯƠNG 1. TỔNG QUAN

1.1. Giới thiệu về chitosan

Chitosan (CS) là dẫn xuất deacetyl hoá của chitin, là polysaccharide tự nhiên phong phú [1, 2]. 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… [3, 4]. 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 [2]. 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 [5]. CS có nhiều đặc tính độc đáo như không độc hại, tương hợp sinh học và phân hủy sinh học [6]. 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 [7, 8]. CS được sử dụng rộng rãi trong các lĩnh vực như: công nghệ sinh học, dược phẩm, xử lý nước thải, mỹ phẩm...

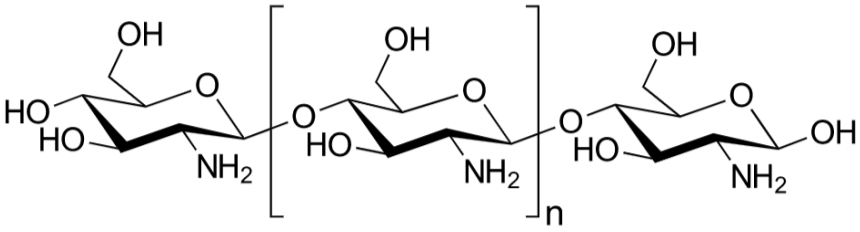
1.1.1. Cấu tạo của chitosan

Chitin là một polysaccharide gồm các đơn vị *N*-acetyl-*D*-glucosamine liên kết với nhau bằng liên kết β-1,4-glucoside (Hình 1.1). Chitin được phân loại như một dẫn xuất celluloso [5].



Hình 1.1. Một đoạn cấu trúc hóa học của chitin [5]

CS là một polysaccharide mạch thẳng được cấu tạo từ các *D*-glucosamine (đơn vị đã deacetyl hóa) và *N*-acetyl-*D*-glucosamine (đơn vị chứa nhóm acetyl) liên kết tại vị trí β-(1-4) (Hình 1.2).



Hình 1.2. Cấu trúc hóa học của chitosan [5]

1.1.2. Các đặc trưng, tính chất của chitosan

Tính chất vật lí

CS là chất rắn, xốp, nhẹ, hình vảy hoặc dạng bột, màu trắng hay vàng nhạt, không mùi vị, độ nhớt tương đối cao phụ thuộc vào quá trình chế tạo [9 -11].

CS có khối lượng phân tử khác nhau ứng với các nguồn chitin khác nhau. Sản phẩm CS có khối lượng phân tử từ 100,000 Da đến 1,200,000 Da phụ thuộc vào quá trình xử lý. CS thường được phân loại dựa vào khối lượng phân tử [12, 13].

Mức độ deacetyl hoá

Độ deacetyl hóa được sử dụng để phân biệt chitin và chitosan. Khi độ deacetyl hóa của chitin lớn hơn hoặc bằng 50% (phụ thuộc vào nguồn gốc của polymer), nó trở nên tan trong môi trường acid và được gọi là chitosan [14, 15]. Mức độ deacetyl hoá của CS được xác định theo một số các phương pháp: phổ FT-IR, phổ UV-Vis, phổ ^{1}H-NMR, phổ ^{13}C-NMR trạng thái rắn, sắc ký thẩm thấu gel, các phương pháp chuẩn độ, hấp phụ màu thuốc nhuộm, phân tích thành phần.

Khối lượng phân tử trung bình

Khối lượng phân tử trung bình (KLPTTB) của CS phụ thuộc vào nguồn gốc và các thông số của quá trình deacetyl hóa như: nhiệt độ, thời gian và nồng độ NaOH. CS có thể thu được từ quá trình deacetyl hóa chitin phần lớn có KLPTTB nằm trong khoảng 200 - 500 kDa, thậm chí có thể có khối lượng phân tử lớn tới 1000 kDa. Sau đó, để thuận lợi trong quá trình sử dụng, CS cần được làm giảm KLPTTB bằng các phương pháp hóa học hoặc enzyme xuống tới KLPT thấp hơn [14, 15]. Như các loại polymer hữu cơ khác, KLPTTB của CS được xác định theo các phương pháp sau: sắc ký thẩm thấu, tán xạ ánh sáng và đo độ nhớt [16].

Tính chất hóa học

CS là dẫn xuất amine polysaccharide mạch thẳng với hàm lượng nitrogen

cao, với cấu trúc là bộ khung *D*-glucosamine. Cấu trúc CS bao gồm các nhóm chức $–NH_2$, –OH dễ dàng tạo liên kết hydro giữa các phân tử và hình thành muối trong các phản ứng hóa học với các acid hữu cơ và vô cơ [17].

CS hòa tan nhiều trong dung dịch acid loãng (pH < 6,0) [18, 19]. Ở pH thấp, CS được proton hóa thành chất mang điện tích dương nên tăng khả năng hòa tan trong nước. Khi pH ≥ 6, các nhóm amine của CS bị đề proton hóa khiến phân tử CS trở nên không tan. Quá trình chuyển hóa giữa hòa tan - không hòa tan xảy ra xung quanh độ pH từ 6 đến 6,5. CS và một số dẫn xuất của CS có chứa các nhóm chức trong đó các nguyên tử oxygen và nitrogen của nhóm chức còn cặp electron chưa sử dụng. Vì vậy, chúng có khả năng tạo phức phối trí với hầu hết các kim loại nặng và các kim loại chuyển tiếp như: Hg_2^{2+}, Cd^{2+}, Zn^{2+}, Cu^{2+}, Ni^{2+}, Co^{2+}... Tùy nhóm chức trên mạch polymer mà thành phần và cấu trúc của phức sẽ khác nhau. Hơn nữa, CS tạo phức với các kim loại như Ag^+, Cu^{2+}, Ni^{2+}… sẽ sẽ hình thành các liên kết ngang trong mạch phân tử CS làm tăng cường hoạt tính kháng khuẩn [20].

Dược lý/hoạt tính sinh học

CS có khả năng kích thích làm tăng cường hệ thống miễn dịch cơ thể, hạn chế sự phát triển của các tế bào u bướu, ung thư, HIV/AIDS, chống tia tử ngoại, chống ngứa dị ứng… [21, 22]. Ngoài ra, CS có thể hấp thụ các chất có hại trong đường ruột, phòng chống bệnh tiểu đường, hạ huyết áp, phòng bệnh xơ cứng động mạch, đào thải độc tố và hấp thụ kim loại nặng, cải thiện cơ năng tiêu hóa [23 - 25]. CS có khả năng thúc đẩy làm lành da, phục hồi vết thương, cầm máu, thấm máu ở vị trí bị xuất huyết [26].

CS có hoạt tính kháng khuẩn cao, an toàn với cơ thể người. Hoạt tính kháng khuẩn của CS phụ thuộc vào nồng độ và KLPT. CS có tính thấm khí, kháng khuẩn và chống nấm mốc tốt... Bản chất là một polymer thiên nhiên nên CS bị phân hủy bởi các enzyme như lysozyme, chitosanate… tạo thành các oligome và tiếp tục phân hủy thành *N*-glucosamine, một hợp chất nội sinh có trong cơ thể người. Tuy nhiên, một trong những nhược điểm của CS là không hòa tan trong môi trường trung tính bởi vì CS có cấu trúc tinh thể phức tạp, cũng như sự hiện diện của nhóm amine và bị chi phối bởi độ deacetyl hóa dẫn tới làm giảm tính ứng dụng của CS [27, 28].

1.1.3. Ứng dụng của chitosan trong lĩnh vực y sinh

1.1.3.1. Ứng dụng của chitosan trong lĩnh vực y sinh trên thế giới

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 bước đầu được ứng dụng trong y sinh dựa trên khả năng tương thích sinh học, tính ổn định tương đối cao và duy trì được một số tính chất của CS ban đầu. Đặc biệt do kích thước nhỏ và bề mặt riêng lớn nên CS có khả năng hấp phụ cao. Dựa vào tính chất này, nano-CS được sử dụng làm chất hấp phụ các loại thuốc dùng trong y học [27-29].

Theo các nghiên cứu của Chrystalla Protopapa và cộng sự (năm 2022) về các loại thuốc dùng theo đường mũi và đường miệng, các loại thuốc có khối lượng phân tử lớn có khả năng tăng sinh khả dụng sau khi phối hợp với CS [31]. Các viên nang nano hydroxytyrosol (HT) được mang bởi các hạt nano CS thông qua quá trình gel hóa ion với sodium bisulphate kết hợp với sóng siêu âm. Các tác giả thực hiện nhiều nghiên cứu trên tổ hợp các hạt nano-HT bao gồm: đặc điểm cấu trúc hình thái kích thước hạt, FE-SEM, ATR-FTIR, XRD, DSC, giải phóng *in vitro*, đánh giá khả năng chống oxy hóa và hoạt tính sinh học của tổ hợp. Kết quả cho thấy, viên nang nano có dạng các khối cầu có kích thước dao động trong khoảng 119,50 - 365,21 nm với điện thế zeta (ζ) dương (17,50 mV - 18,09 mV). Hiệu suất bao bọc của nano-CS với 5 mg/g HT (HTS1) và 20 mg/g HT (HTS2) lần lượt là 77,13 % và 56,30 %. Sự hình thành các viên nang nano-HT dẫn đến việc tăng nhiệt độ thủy tinh hóa của tổ hợp. Nghiên cứu giải phóng HT khỏi tổ hợp nano cho thấy HTS2 giải phóng tới 67,12 % HT (HTS1 58,89 %) trong dung dịch mô phỏng quá trình tiêu hóa ở đường tiêu hóa. Nano-HT có đặc tính chống oxy hóa và hoạt tính sinh học (chống lại các dòng tế bào ung thư A549 và MDA – MB - 231) cao hơn HT tự do [32].

1.1.3.2. Ứng dụng của chitosan trong lĩnh vực y sinh ở Việt Nam

Vật liệu sinh học chitosan/carrageenan/lovastatin (CsCL) chế tạo bằng phương pháp dung dịch khi thay đổi hàm lượng lovastatin (Lov) và cố định hàm lượng chitosan/carrageenan với tỉ lệ (1:9). Kết quả trên phổ hồng ngoại FT-IR và FESEM cho thấy các thành phần của vật liệu tổ hợp có cấu trúc hóa học ổn định, phân tán ổn định giữa nhờ hình thành liên kết hydro và tương tác lưỡng cực. Khả năng giải phóng Lov trong môi trường mô phỏng dịch dạ dày và dịch ruột tại pH 2 và pH 7,4 bị ảnh hưởng bởi hàm lượng Lov. Kết quả thu được mẫu vật liệu sinh học CsCL195 với tỉ lệ Cs : C : L (1 : 9 : 0,5) được đánh giá tốt nhất so với các mẫu tổ hợp còn lại vì: các hạt phân tán đều; polymer nền bền nhiệt; nhiệt phân hủy đạt 52,3 ^{o}C; quá trình giải phóng thuốc kém ở môi trường pH 2 (dịch vị) và giải phóng tốt ở

môi trường pH 7,4 (dịch ruột) tạo điều kiện cho thuốc hấp thu qua tế bào niêm mạc ruột vào máu, từ đó tăng hiệu quả điều trị cholesterol máu [33].

Tác giả Nguyễn Thúy Chinh và các đồng nghiệp ở Viện Kỹ thuật nhiệt đới nghiên cứu chế tạo vật liệu tổ hợp acid polylactic/chitosan (PLA/CS) mang thuốc nifedipin bằng phương pháp dung dịch và phương pháp vi nhũ. Các đặc trưng tính chất và khả năng giải phóng thuốc của vật liệu tổ hợp nano PLA/CS/nifedipin cũng đã được xác định. Từ đó nghiên cứu giải phóng nifedipin từ vật liệu nano PLA/CS/nifedipin. Kết quả cho thấy nifedipin giải phóng theo 2 giai đoạn (ban đầu giải phóng nhanh và sau đó giải phóng chậm có kiểm soát) [34].

Cũng tại Viện Kỹ thuật nhiệt đới - Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam, Trần Đại Lâm và các cộng sự đã nghiên cứu sản xuất chitosan với kích thước nano làm chất dẫn thuốc ứng dụng trong dược phẩm [35]. CS cũng được sử dụng với các mục đích như: tác nhân giảm béo và chống tăng cholesterol máu, chống đông máu, điều trị vết thương và bỏng, phòng ngừa bệnh ung thư, tăng cường chức năng của gan, phòng chữa bệnh tiểu đường và hạ huyết áp… [36].

1.2. Giới thiệu về alginate

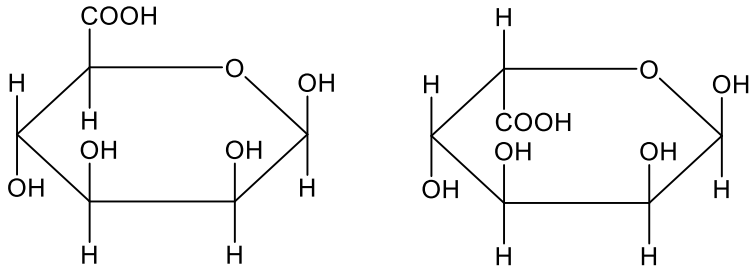
1.2.1. Cấu tạo và phân loại alginate

Alginate (AG) là loại polymer sinh học biển phong phú trên thế giới [37, 38]. AG là tên gọi chung cho các muối của alginic acid, là anionic polysaccharide được tách chiết từ rong nâu (Hình 1.3). 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 [39, 40].

Hình 1.3. Trong tảo nâu chứa nhiều alginate

Nguồn AG chủ yếu tìm thấy ở thành tế bào và mô liên kết của tảo nâu ở biển thuộc họ *Phaeophyceae*, tảo bẹ *Macrocystis pyrifera*, *Ascophyllum nodosum* và các loài *Laminari*a nhưng nhiều nhất là ở tảo nâu dưới dạng muối AG [37]. AG tồn tại ở dạng không gian dưới 2 dạng là alginic acid và muối calcium alginate, magnesium alginate ở thành tế bào tảo nâu, tạo nên cấu trúc lưới gel bền vững trên thành tế bào tảo nâu.

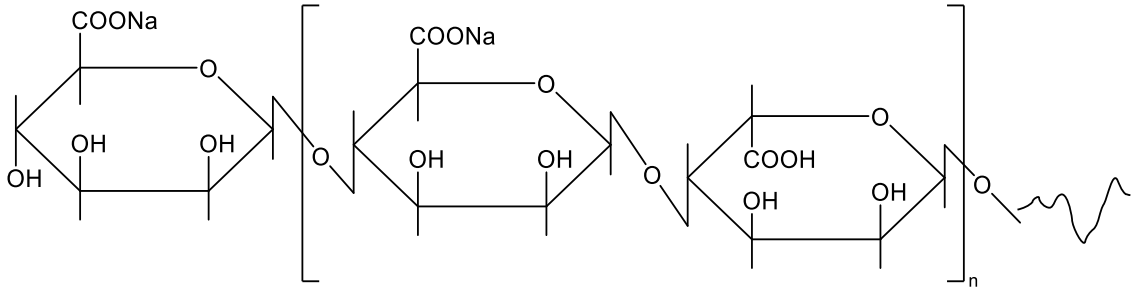
Cấu tạo của alginate là các chuỗi phân tử β-*D*-mannuronic acid (M) và α-*L*-guluronic acid (G) liên kết với nhau bằng liên kết 1-4 glucoside (Hình 1.4). Có 3 loại liên kết có thể gặp trong 1 phân tử alginate: (M-M-M), (G-G-G), (M-M-G) tạo thành các khối (block) liên kết ngẫu nhiên trong mạch [41].



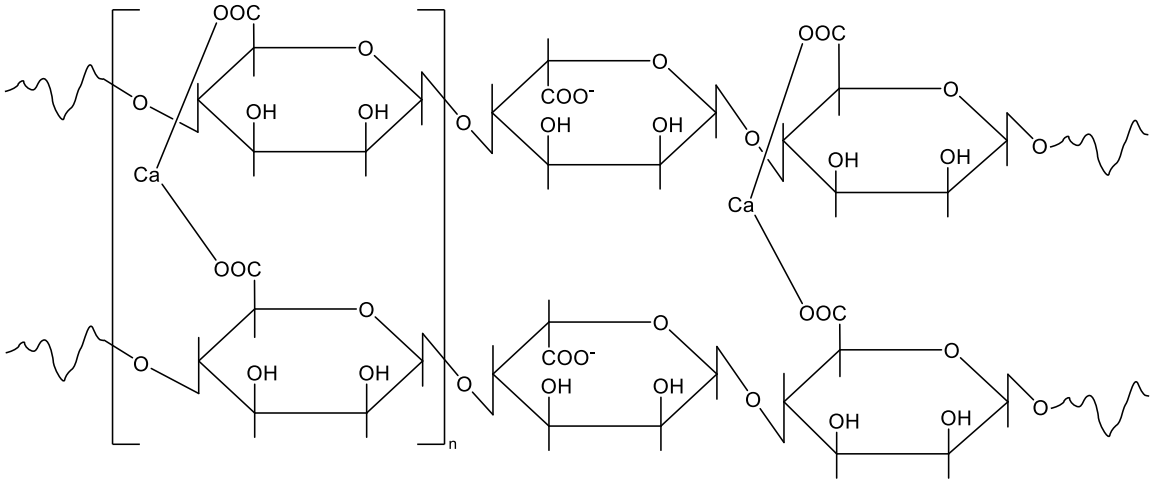
β-*D*-mannuronic acid α - *L* – guluronic acid

Hình 1.4. Công thức cấu tạo của 2 acid cấu tạo nên alginic acid [37]

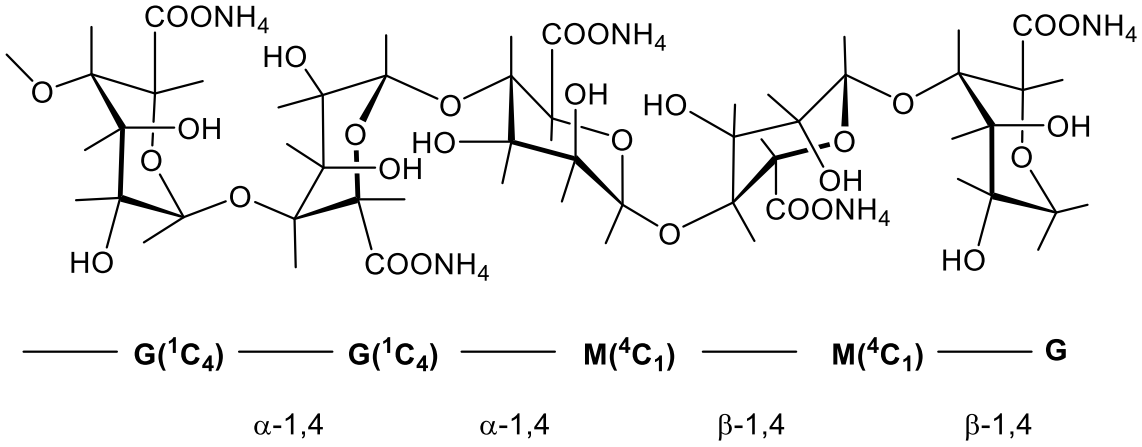
Khi alginic acid tạo muối với các ion kim loại khác nhau sẽ tạo nên các muối AG khác nhau (các Hình 1.5 - 1.7). Một số dạng muối AG hay gặp như: sodium alginate $(C_5H_7O_4COONa)_n$, potassium alginate $(C_5H_7O_4COOK)_n$, calcium alginate $((C_5H_7O_4COO)_2Ca)_n$, ammonium alginate $(C_5H_7O_4COONH_4)_n$...



Hình 1.5. Công thức cấu tạo của sodium alginate [40]



Hình 1.6. Công thức cấu tạo của calcium alginate



Hình 1.7. Công thức cấu tạo của ammonium alginate [41]

1.2.2. Các tính chất của alginate

Tính chất vật lí

Các tính chất cơ học của gel AG thường được tăng cường bằng cách tăng chiều dài của khối block liên kết ngẫu nhiên trong mạch và khối lượng phân tử. Mỗi loại AG kiểm soát sự ổn định của gel, tỷ lệ giải phóng thuốc từ gel, hình thái và tương tác của các chất được mang bởi gel AG. AG có khối lượng phân tử trung bình càng lớn thì độ nhớt dung dịch của nó càng cao. Khi tăng khối lượng phân tử của AG có thể cải thiện các tính chất vật lý của dung dịch gel. Tuy nhiên, dung dịch AG được hình thành từ polymer khối lượng phân tử cao thường rất nhớt và đây là yếu tố không mong muốn trong quá trình sản xuất AG [42 - 44].

Tính chất hóa học

AG được tạo thành từ β-*D*-mannuronic acid (M) và α-*L*-guluronic acid (G) (Hình 1.4) bởi liên kết (1-4) glycoside tạo thành anionic polysaccharide. Theo công thức cổ điển của Haworth, 2 monome này chỉ khác nhau ở nhóm carboxyl nằm ở trên và dưới mặt phẳng của vòng pyranose. Hai gốc monome này có cấu tạo dạng ghế và có cấu hình khác nhau: mannuronic acid có cấu hình $^4C_1$ còn guluronic acid là $^1C_4$ (Hình 1.4). Chính sự khác nhau của mạch cấu trúc nên 2 gốc uronic này thể hiện các tính chất hóa học, sinh học khác nhau [45]. Tính chất vật lý, hóa học và sinh học của AG thay đổi tùy thuộc vào khối lượng phân tử, độ nhớt và tỷ lệ M/G cũng như trình tự sắp xếp các gốc uronic trong polymer. Tỷ lệ M/G là thông số quan trọng đặc trưng cho tính chất hoá học, tính chất vật lý của AG và có ý nghĩa quan trọng trong nghiên cứu khả năng tạo gel. AG tách chiết từ rong nâu có tỷ lệ M/G dao động từ 0,2 đến 2,5, khối lượng phân tử trung bình từ 100 kDa đến 1.500 kDa [46]. Từ những cơ sở đó nhìn chúng alginat có một số tính chất cụ thể như sau:

- Tính chất của muối alginate với kim loại hóa trị I: tan được trong nước tạo dung dịch có độ nhớt cao, dễ bị cắt mạch bởi các yếu tố acid, kiềm mạnh, enzyme… Khi tương tác với acid vô cơ muối alginate tách ra dưới alginic acid tự do, được ứng dụng rộng rãi trong các ngành công nghiệp.
- Tính chất của muối alginate với kim loại hóa trị II: Có độ chắc cao, có khả năng tạo màu tùy theo kim loại, không hòa tan trong nước, khi ẩm thì dẻo, khi khô có độ cứng cao và khó thấm nước, tỉ trọng thấp.

Dược lý/hoạt tính sinh học

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... [47, 48].

Mặc dù khả năng tương thích sinh học của AG đã được đánh giá rộng rãi trong *in vitro* cũng như *in vivo*, tuy nhiên vẫn còn nhiều tranh luận về tác động của

các hợp chất AG [49-51]. AG thu được từ các nguồn tự nhiên có thể có mặt các tạp chất khác nhau như kim loại nặng, nội độc tố, protein và các hợp chất polyphenolic. Đặc biệt, AG được tinh chế qua nhiều công đoạn với độ tinh khiết rất cao đã không gây ra bất kỳ phản ứng lạ nào cho cơ thể khi cấy ghép vào động vật [51]. Tương tự như vậy, không có phản ứng đáng kể nào xảy ra khi alginat có độ tinh khiết cao được tiêm vào chuột [48].

1.2.3. Ứng dụng của alginate trong lĩnh vực y sinh

1.2.3.1. Ứng dụng của alginate trong lĩnh vực y sinh trên thế giới

Ứng dụng của AG dựa trên hai tính chất chính: Khi hòa tan trong nước AG tạo thành dung dịch có độ nhớt cao nên được sử dụng để làm đặc dung dịch. AG có khả năng hình thành gel khi có mặt của ion Ca^{2+} và Na^{+}, do vậy được dùng để chế tạo vật liệu dạng màng hoặc sợi [49].

Sản phẩm thủy phân AG có khối lượng phân tử từ 5 kDa đến 20 kDa thể hiện một số hoạt tính dược lý đáng chú ý [50]. AG đóng vai trò quan trọng trong ngành dược do AG có nguồn gốc thiên nhiên, không độc hại, có khả năng tự phân hủy sinh học và giá thành thấp. Do khả năng hấp thu ion mạnh nên AG được dùng làm chất hấp thụ các nguyên tố phóng xạ [51], đào thải các kim loại nặng như cadmium, chromium và copper ra khỏi cơ thể [52]. AG khối lượng phân tử thấp được sử dụng để điều chế các loại thuốc viên nang, thuốc kháng sinh có tác dụng kháng khuẩn [53]; chống ung thư [54, 55]; kháng viêm [56]; hỗ trợ điều trị các bệnh tăng huyết áp, hạ đường huyết và giảm cholesterol [57]; thuốc chống dị ứng, chống oxy hóa, kháng khuẩn đường ruột [58]; điều trị bệnh nhồi máu cơ tim [59]; kháng vi khuẩn ở vòm họng [60]. Khả năng chống đông máu của dẫn xuất AG đã được quan tâm nghiên cứu [61-64]. Mặc dù, AG không có khả năng chống đông máu nhưng các dẫn xuất alginate sulphate (AS) có tính chất và cấu trúc tương tự như chất chống đông máu (heparin) được sản sinh trong tế bào gan [61].

Trong nghiên cứu của nhóm tác giả Deepti Rekha Sahoo (năm 2021) đã chỉ ra AG có thể dễ dàng được xử lý làm vật liệu mang thuốc dưới các dạng hydrogel, vi nang, vi cầu, bọt biển và sợi. Từ đó, các vật liệu cao phân tử có nguồn gốc sinh

học dựa trên AG này được sử dụng trong việc chữa lành mô, hỗ trợ lành sẹo, thúc đẩy quá trình chữa lành vết thương, tái tạo xương mới và phát triển của tế bào [65]. Cũng trong năm 2021, nghiên cứu của Raha Ahmad Raus và cộng sự cũng cho thấy các dạng vật liệu khác nhau của AG đóng vai trò quan trọng trong tổ hợp mang thuốc, hỗ trợ chức năng của gan và tim… Những ứng dụng trên của AG có được nhờ việc thay đổi cấu trúc dễ dàng và pha trộn với các polymer khác bằng các phương pháp vật lý, hóa học. Tổ hợp chứa dẫn xuất AG thu được có cấu trúc, chức năng và tính chất mới nhằm mục đích cải thiện độ bền cơ học, khả năng tương thích với tế bào và đặc tính của quá trình gel hóa [66].

1.2.3.2. Ứng dụng của alginate trong lĩnh vực y sinh ở Việt Nam

Năm 2019, Nguyễn Văn Thành đã nghiên cứu điều chế AG khối lượng phân tử thấp bằng phương pháp thủy phân trong môi trường acid dùng làm thực phẩm chức năng hỗ trợ chống đông máu. Tác giả đã xây dựng quy trình sản xuất sodium guluronate sulphate (SGS) từ sodium alginate của rong nâu *T.ornata*. Chế phẩm SGS có độ tinh sạch cao, khối lượng phân tử trung bình 25,408 kDa, độ polymer hóa phân tử trung bình 107, chỉ số đa phân tán 1,35. Kết quả đánh giá hoạt tính của SGS cho thấy hoạt tính chống đông máu phụ thuộc vào khối lượng phân tử trung bình và nồng độ của SGS. Chế phẩm SGS có tác dụng kéo dài thời gian đông máu nội sinh và thời gian đông máu chung nhưng tác dụng kéo dài thời gian đông máu ngoại sinh không đáng kể. SGS không độc đối với chuột thí nghiệm [37].

Năm 2020, Thạch Thị Lộc đã chế tạo hạt tổ hợp polymer alginate/chitosan mang thuốc lovastatin (AG/CS/LOV) với thành phần LOV chiếm 10 % trong hạt vật liệu tổ hợp. Kết quả thử nghiệm độc tính cấp và độc tính bán trường diễn các hạt vật liệu tổ hợp AG/CS/LOV trên chuột cho thấy liều gây chết trung bình (LD50) của vật liệu AG/CS/LOV cao hơn 5000 mg/kg thể trọng. Kết quả thử nghiệm lâm sàng trên chuột điều trị bằng vật liệu AG/CS/LOV trong 28 ngày đã chứng minh không có sự khác biệt đáng kể về các chỉ số trọng lượng cơ thể, huyết học, sinh hóa, trọng lượng trung bình của nội tạng của chuột sau khi điều trị bằng hạt vật liệu tổ hợp so với mẫu đối chứng. Hạt vật liệu tổ hợp AG/CS/LOV an toàn và có thể định hướng nghiên cứu tác dụng giảm cholesterol trên động vật và người [67, 68].

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

1.3.1. Vật liệu tổ hợp polymer thiên nhiên mang thuốc trên cơ sở alginate

Năm 2020, João Silva và cộng sự đã chế tạo tổ hợp alginate/polyphenol (AG/PP) nhằm đánh giá mô hình động học giải phóng polyphenol (PP) trên cơ sở muối của các nguyên tố vô cơ (Ca^{2+}, Zn^{2+}, Ba^{2+}, Mg^{2+}…). Kết quả thu được cho thấy nồng độ NaCl quyết định độ nhớt của dung dịch AG, khả năng kéo sợi và tạo màng của các chất tạo màng sinh học. Muối AG của các cation Ca^{2+}, Zn^{2+} và Ba^{2+} là phù hợp nhất để tạo ra các gel AG/PP. Đặc biệt, chúng có thể tạo các liên kết chéo với các PP. Từ đó, có thể chế tạo các miếng dán từ tổ hợp muối vô cơ của AG với các PP tự nhiên vào mục đích chống oxy hóa trên da, cung cấp thêm lựa chọn mới cho các liệu pháp trị liệu dựa trên flavonoid tự nhiên [69].

Băng gạc cầm máu có chứa AG thường dùng cho các tổn thương ở da, giúp cầm máu làm nhanh lành vết thương ở vùng màng nhầy miệng và ruột. Sự bám dính của các ion Ca^{2+} trong AG với Na^{+} trong huyết tương sẽ kích thích hoạt động của các tiểu cầu và đông máu tại vùng bị tổn thương. Việc bổ sung AG vào các loại băng gạc cũng làm giảm sự hình thành mô hạt trong quá trình làm lành vết thương. Các nghiên cứu về sự lành vết thương ở màng nhầy miệng trên chó cho thấy băng gạc có chứa AG làm tăng đáng kể việc cầm máu đối với các vết thương sâu 2 mm [70].

1.3.2. Vật liệu tổ hợp polymer thiên nhiên mang thuốc trên cơ sở chitosan

Ashish Dev và các cộng sự đã chế tạo tổ hợp acid polylactic/chitosan ứng dụng giải phóng thuốc kháng HIV. Từ kết quả đánh giá động học, quá trình giải phóng thuốc bị ảnh hưởng bởi nhiều yếu tố như: sự phân hủy polymer, khối lượng phân tử, tương tác giữa polymer và thuốc… Đồng thời, nghiên cứu cũng chỉ ra rằng giải phóng thuốc trong môi trường kiềm tốt hơn trong môi trường acid và trung tính [71].

Nhóm của nghiên cứu của Nguyễn Thúy Chinh đã nghiên cứu sự giải phóng thuốc nifedipin (NIF) được mang bởi tổ hợp vật liệu acid polylactic/chitosan (PLA/CS) [72]. Kết quả cho thấy NIF giải phóng từ các hạt nano PLA/CS và màng tổ hợp PLA/CS theo 2 giai đoạn nhanh và chậm, có kiểm soát trong các dung dịch pH được khảo sát. Sau 28 giờ thử nghiệm, hàm lượng NIF giải phóng đạt từ 61,89 % đến 85,24 % phụ thuộc vào thành phần và pH dung dịch. Tuổi thọ của viên nang bào chế từ hạt nano PLA/CS mang NIF là trên 24 tháng với điều kiện bảo quản dưới

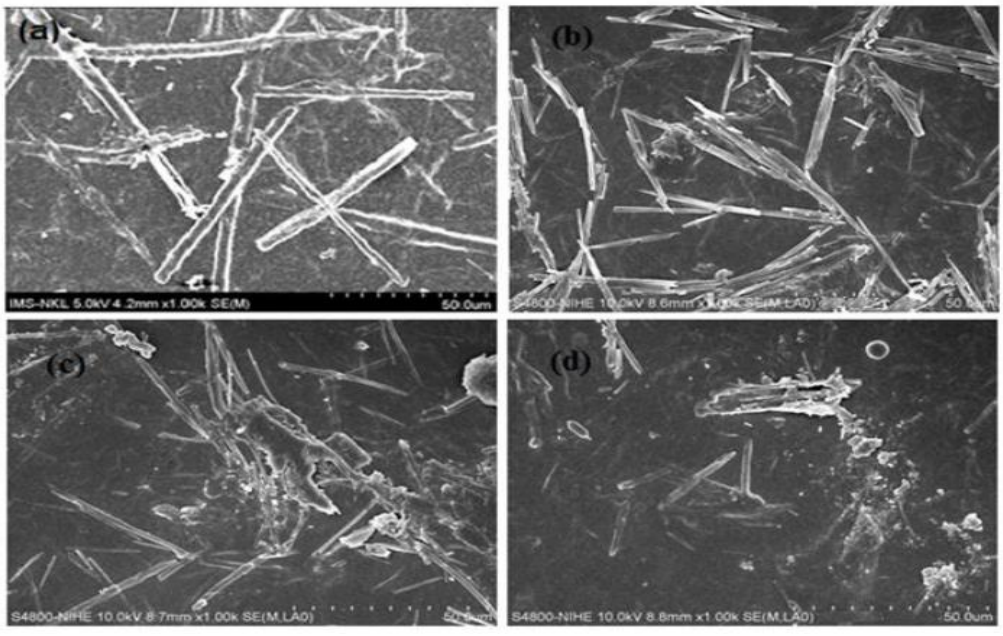
30 ^{o}C. Hạt nano PLA/CS mang NIF gây giảm huyết áp chuột thử nghiệm ở tất cả thời điểm thử nghiệm: 30 phút, 1 giờ, 2 giờ và 4 giờ sau khi uống thuốc.

Năm 2018, nghiên cứu của Brian Alfaro-Gonzales [73] cho thấy khi chế tạo vật liệu chitosan – nano bạc bằng phương pháp hóa siêu âm tạo ra chế phẩm ổn định và có thể kết hợp với kháng sinh – lactam, có khả năng kháng các vi khuẩn kháng kháng sinh, bào tử vi khuẩn và chống nhiễm trùng [74].

1.3.3. Vật liệu tổ hợp polymer thiên nhiên mang thuốc trên cơ sở alginate/chitosan

1.3.3.1. Vật liệu tổ hợp alginate/chitosan dạng màng

Năm 2018, Thái Hoàng và cộng sự đã nghiên cứu ảnh hưởng của polycaprolacton đến tính chất và hình thái của vật liệu tổ hợp alginate/chitosan/lovastatin (AG/CS/LS) [75]. Hình 1.8 cho thấy, polycaprolacton giúp nâng cao khả năng tương thích, tương tác và phân tán của CS, AG và LS trong màng tổ hợp. Do đó, LS được phân tán tốt hơn trong màng AG/CS/LS, dẫn đến cấu trúc của các màng tổ hợp trở nên đồng đều và chặt chẽ hơn. Tổng hàm lượng giải phóng LS từ các màng tổ hợp đạt gần 95 % sau 30 giờ thử nghiệm trong dung dịch pH 6,8.



Hình 1.8. Ảnh FESEM của các màng tổng hợp [75]

AG/CS = 4/1, LS 10%, PCL 0 %* (a). AG/CS = 4/1, LS 10 %*, PCL 3 %* (b). AG/CS = 4/1, LS 10 %*, PCL 5 %* (c). AG/CS = 4/1, LS 10 %*, PCL 10 %* (d) [75].*

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

Màng CS được chế tạo bằng phương pháp tách pha cảm ứng nhiệt, sau đó phủ AG lên bề mặt màng bằng thiết bị thẩm tách để chế tạo màng alginate/chitosan (AG/CS) [76]. Kết quả cho thấy AG đã được phủ lên màng CS một cách hiệu quả. Màng AG/CS có hàm lượng nước 71,8 % cao hơn so với màng CS không phủ AG 61,8 %. Dựa vào việc khảo sát sự phân hủy màng AG/CS và màng CS, khối lượng của màng AG/CS và màng CS giảm xuống còn khoảng 75 % so với khối lượng ban đầu sau 30 ngày thử nghiệm *in vitro*. Màng AG/CS cho thấy tiềm năng ứng dụng tốt hơn so với màng CS khi được ứng dụng trong các kỹ thuật tái tạo mô [76].

Năm 2014, Cecilia Zorzi Bueno và các cộng sự đã nghiên cứu kiểm soát tính chất của màng alginate/chitosan (AG/CS) xốp thông qua việc bổ sung các hàm lượng khác nhau của chất hoạt động bề mặt (pluronic F68). Sự thay đổi lượng nhỏ của pluronic F68 dẫn đến sự thay đổi đáng kể về tính chất vật lý và hóa học của tổ hợp vật liệu AG/CS. Độ dày, độ nhám, độ xốp và sự hấp thụ chất lỏng của màng AG/CS tăng cùng với lượng chất hoạt động bề mặt được sử dụng, trong khi tính chất cơ học và tính ổn định trong môi trường nước giảm. Màng AG/CS có bổ sung pluronic F68 không gây độc tế bào cho các tế bào L929. Tóm lại, có thể điều chỉnh các tính chất lý hóa của tổ hợp AG/CS thông qua sự thay đổi tỷ lệ chất hoạt động bề mặt đưa vào tổ hợp nhằm đáp ứng các mục đích sử dụng khác nhau trong các lĩnh vực y sinh [77].

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 [78].

1.3.3.2. Vật liệu tổ hợp alginate/chitosan dạng hạt

Vào năm 2015, nghiên cứu của Adelfo García Ceja và cộng sự đã đánh giá

riêng biệt khả năng tồn tại của *lactobacillus acidophilus* và *lactobacillus reuteri* và khi kết hợp với AG hoặc tổ hợp AG/CS. Tổ hợp hạt AG, AG/CS có chứa *lactobacillus acidophilus* và *lactobacillus reuteri* được thêm vào sữa, mật ong hoa đào hoặc mứt dâu và được lưu trữ ở 5 ^{o}C trong 30 ngày. Sự tồn tại của *lactobacilli* trong các vi hạt cũng được nghiên cứu trong các môi trường mô phỏng hệ tiêu hóa trong cơ thể người. Kết quả cho thấy, hạt *lactobacilli* kết hợp AG/CS bảo quản tốt hơn so với hạt kết hợp AG và cải thiện sự sống của *lactobacilli* khi lưu trữ trong sữa, mật ong hoa đào hoặc mứt blackberry. Trong các điều kiện môi trường mô phỏng hệ tiêu hóa của cơ thể, tổ hợp AG/CS ngăn ngừa sự giảm *lactobacilli* trong dạ dày; trong khi đó, thuốc sẽ giải phóng thuận lợi hơn trong môi trường đường ruột. *Lactobacilli* kết hợp với AG/CS đã được chế tạo thành công và mang lại nhiều lợi ích cho sức khỏe hơn cho người tiêu dùng so với *lactobacilli* hoặc *lactobacill*/AG [79].

Ping Li và các cộng sự đã chế tạo hạt nano-AG/CS mang thuốc nifedipin. Việc chế tạo tổ hợp nano AG/CS/nifedipin tương đối khó khăn vì nifedipin là chất kỵ nước trong hệ AG/CS ưa nước. Nghiên cứu đã chế tạo thành công tổ hợp nifedipin kỵ nước trong nano-AG/CS bằng cách sử dụng kỹ thuật tiền gel ion hóa với kích thước nano có đường kính 20-50 nm với tỷ lệ khối lượng tối ưu của natri alginate : $CaCl_2$: chitosan là 30 : 6,7 : 3,2 trong môi trường acid. Mô hình giải phóng thuốc *in vitro* cho thấy nifedipin giải phóng nhanh trong 2 giờ đầu, sau đó là giai đoạn giải phóng có kiểm soát. Sau 24 giờ, hàm lượng nifedipin giải phóng ra khỏi tổ hợp CS/AG trong dung dịch pH 1,5; 6,8 và 7,4 lần lượt là 26,52 %, 69,69 % và 56,50 % [80].

Bằng kỹ thuật tiền gel ion hóa, Azevedo đã chế tạo tổ hợp nano-CS/AG mang vitamin B_2 với hiệu suất mang thuốc (EE %) và khả năng tải thuốc (LC %) tương ứng là ∼55 % và ∼2 % [81]. Kết quả nghiên cứu cho thấy nano-CS/AG có thể được sử dụng để mang vitamin B_2 với độ ổn định trong tối thiểu 5 tháng. Bên cạnh đó, vật liệu tổ hợp này có thể được sử dụng để tăng độ ổn định của vitamin trong các thực phẩm hoặc sản phẩm nước giải khát.

Năm 2013, tổ hợp nano-CS/AG mang thuốc tamoxifen với các tỉ lệ CS/AG và hàm lượng thuốc khác nhau đã được nhóm nghiên cứu của Martı´nez chế tạo thành công bằng phương pháp nhũ tương. Kết quả thu được các hạt riêng biệt có

dạng hình cầu và kích thước 19-28 nm. Tốc độ giải phóng thuốc và tương tác giữa thuốc và tổ hợp vật liệu phụ thuộc vào cấu trúc hạt nano. Hàm lượng thuốc giải phóng ra sau 24 giờ đạt gần 99 %. Theo kết quả thu được, nano-CS/AG/tamoxifen được sử dụng như một vật liệu có khả năng kiểm soát phân phối chống ung thư, đặc biệt là những tổ hợp vật liệu chứa hàm lượng AG cao [82].

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 [83, 84].

Các tổ hợp polymer của sodium alginate với CS đã được phát triển để mang các phân tử có hoạt tính sinh học giá trị cao như các hợp chất phenolic [85, 86]. Năm 2017, R Stoica và cộng sự đã chế tạo tổ hợp CS/AG mang polyphenol (PECTP) chiết xuất từ hoa hồng bằng cách thay đổi nồng độ polyphenol trong tổ hợp (0,25 ml polyphenol - PECTP0,25; 0,5 ml polyphenol - PECTP0,5 và 1 ml polyphenol - PECTP1), đồng thời đánh giá động học giải phóng polyphenol trong môi trường dung dịch pH 1,2 và pH 7,4. Hàm lượng polyphenol giải phóng từ tổ hợp PECTP giảm dần khi tăng hàm lượng polyphenol. Gần 60 % hàm lượng polyphenol giải phóng khỏi PECTP0,25 sau 3 giờ, PECTP0,5 sau 4 giờ và PECTP1 sau 6 giờ. Kết quả chỉ ra rằng sự giải phóng polyphenol trong môi trường pH 7,4 (mô phỏng dịch ruột) nhanh hơn nhiều so với môi trường pH 1,2 (mô phỏng dịch dạ dày) [85].

Ru Feng và cộng sự chế tạo thành công tổ hợp microgel chitosan/sodium alginate (CS/ALG) để mang các polyphenol từ vỏ của *Juglans regia L.* (JRP-Microgel). Từ đó khảo sát các đặc tính hóa lý của JRP- Microgel và sự giải phóng và biến đổi thành phần của hợp chất phenolic trong các dung dịch mô phỏng hệ thống tiêu hóa của cơ thể. Kết quả cho thấy các hạt JRP-Microgel tồn tại ở dạng bán tinh thể và dạng hình cầu với kích thước hạt đồng đều. Hạt JRP-Microgel có độ bền

lý hóa ổn định hơn so với JRP không được mang bởi tổ hợp CS/ALG. Hơn nữa, hạt JRP-Microgel cho thấy khả năng giải phóng tốt trong các dung dịch mô phỏng hệ thống tiêu hóa. Trong các giai đoạn giải phóng, thành phần phenolic được mang bởi hạt JRP-Microgel có độ giải phóng ổn định và hiệu quả hơn nhiều so với thành phần của phenolic trong JRP không được mang bởi CS/ALG. Từ đó, cho thấy rằng hạt JRP-Microgel có thể kiểm soát sự giải phóng JRP trong quá trình tiêu hóa. Các kết quả trên cung cấp cơ sở thực nghiệm cho ứng dụng chế tạo tổ hợp microgel để cải thiện sinh khả dụng của các hợp chất phenolic trong cơ thể người [87] cũng như phát triển cho các nghiên cứu tiếp theo [88].

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 (Hình 1.9). 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) [89].

Hình 1.9. Cây trà hoa vàng

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), germanni (Ge), potassium (K), zinc (Zn), molybdenum (Mo), vanadium (V), manganese (Mn) và các vitamin B1, B2, C. Các hợp chất trong THV có khả năng kiềm 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 ly, đại tiện ra máu… [90].

Theo các nhà khoa học Trung Quốc, THVcó 9 tác dụng chính [89]:

– 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 được 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 mạnh 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.

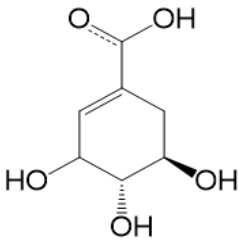
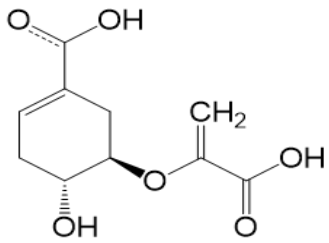
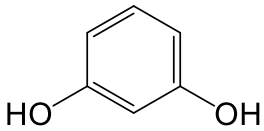
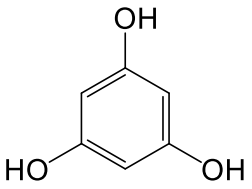
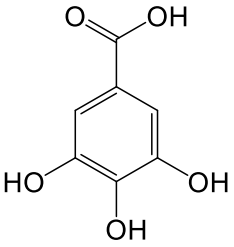
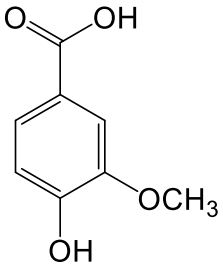
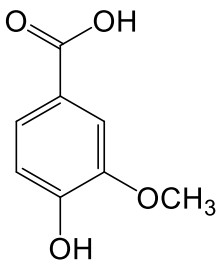
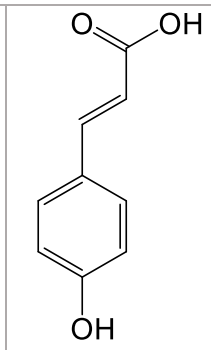
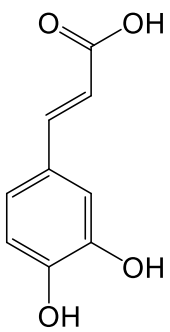
1.4.2. Polyphenol

1.4.2.1. Giới thiệu chung về polyphenol

Polyphenol là các hợp chất có nguồn gốc tự nhiên, tồn tại trong thực vật. Chúng được chứng minh có khả năng chống oxy hóa vô cùng hiệu quả [91, 92]. Polyphenol có thể bảo vệ cơ thể, giúp cơ thể chống lại nhiều loại bệnh khác nhau do gốc tự do gây ra. Cấu tạo chung của các polyphenol là trong phân tử có vòng thơm (vòng benzene) chứa một hay hai, ba... nhóm hydroxyl (–OH) gắn trực tiếp vào vòng benzene. Tùy thuộc vào số lượng và vị trí tương hỗ của các nhóm OH gắn vào vòng benzene mà các tính chất vật lý, hoá học hoặc hoạt tính sinh học thay đổi [93].

Hợp chất của polyphenol bao gồm [93]:

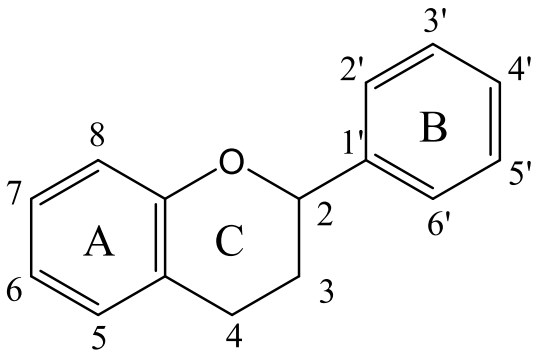
Những hợp chất polyphenol đơn giản: Chỉ có một số ít hợp chất phenolic đơn giản (hợp chất chỉ chứa 1 vòng benzene) tồn tại trong tự nhiên. Chẳng hạn, resorcinol (1,3-dihydroxybenzene) và phloroglucinol (1,3,5-trihydroxybenzene) là những hợp chất được hình thành từ nhựa cây và vỏ cây ăn trái (Hình 1.10).

			
Shikimic acid	Chorismic acid	Resorcinol	Phloroglucinol
				
Galic acid	Vanilic acid	Vanillin aldehyde	p-caumaric acid	Caffeic acid

Hình 1.10. Cấu trúc các polyphenol đơn giản [93]

Phenolic acid là những hợp chất có đặc điểm của nhóm chức carboxylic (vaxit gallic, vanillic acid...) và hydroxibenzoic aldehyde là những hợp chất có đặc điểm của nhóm chức aldehyde (vanillin aldehyde). Các acid dẫn xuất cinnamic phổ biến là cinnamic acid, *p*-coumaric acid, caffeic acid, ferulic acid, 5-hydroxyferulic acid và sinapic acid.

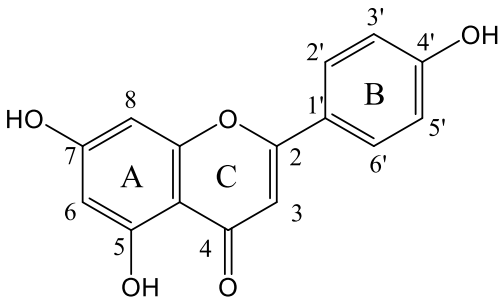
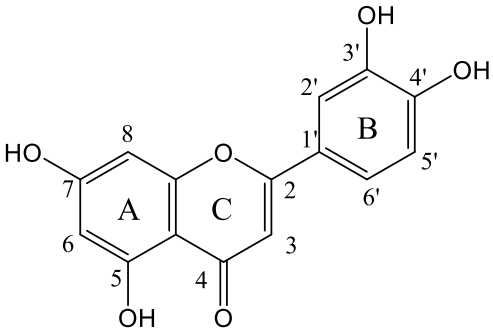
Flavonoid: Những hợp chất thuộc họ flavonoid có số lượng lớn, được nghiên cứu nhiều nhất trong các hợp chất polyphenol. Hiện nay có hơn 8000 hợp chất thuộc họ flavonoid đã được phát hiện.



Hình 1.11. Cấu trúc tổng quát của flavonoid [93]

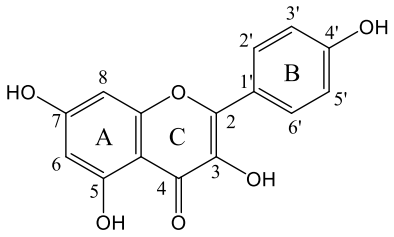
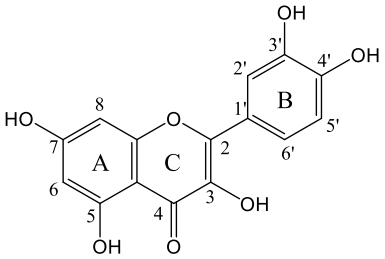
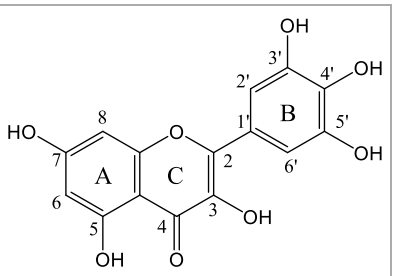
Dựa vào bản chất của cấu trúc, flavonoid được phân loại theo nhiều cách khác nhau, flavonoid gồm 2 vòng thơm và một vòng pyran (Hình 1.11). Cấu trúc chung của các flavonoid là khung xương 15 carbon, chứa 2 vòng benzen nối với nhau bằng chuỗi liên kết 3 carbon. Các flavonoid được chia thành nhiều nhóm nhỏ, một số nhóm flavonoid nổi bật như: anthocyanidin, flavanol…

Flavon: Tại vòng có chứa dị tố oxygen chứa nhóm ceton ở C4 và một liên kết đôi ở C2=C3 (ví dụ: apigenin và luteolin ở Hình 1.12. Vòng A là thành phần quan trọng của flavon xuất phát từ phloroglucinol và vòng B có thể có các nhóm thế ở các vị trí C3', C4'và C5').

	
Apigenin	Luteolin

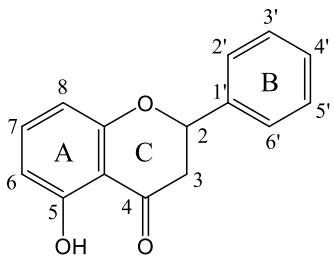
Hình 1.12. Cấu trúc của hợp chất flavon [93]

Flavonol: Là những hợp chất flavon có một nhóm OH ở C3 (Hình 1.13). Flavonol có rất nhiều trong các loài thực vật và phổ biến là: quercetin, kaempferol và myricetin (Hình 1.13).

		
Kaempferol	Quercetin	Myricetin

Hình 1.13. Cấu trúc của hợp chất flavonol [93]

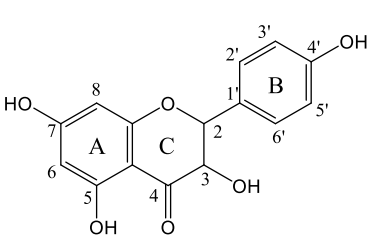
Flavanon: Có một nhóm ceton ở C4 và không có liên kết đôi ở C2, C3 (2-phenyl-2,3-dihydropyran-4-on). Flavanon là đồng phân của chalcon và được tổng hợp bằng phản ứng nhân tạo và phản ứng sinh hóa. Flavanon có 1 trung tâm bất đối ở C2 tạo nên 2 đồng phân quang học quan trọng có hoạt tính sinh học. Một số flavanon phổ biến là naringenin, eriodictyol và hespertin (Hình 1.14).

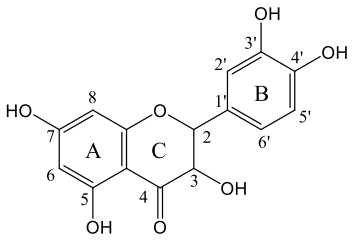


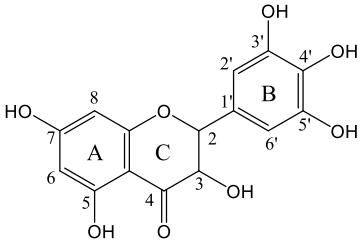
Flavanon	Naringenin

Hình 1.14. Cấu trúc của hợp chất flavanone [93]

Dihydroflavonol: Là flavanon được gắn nhóm thế OH ở C3 (2- phenyl-3-hydroxy-2,3-dihydropyran-4-on) (Hình 1.15). Chúng có 2 carbon bất đối C2 và C3 nên tạo ra hai cặp đôi đồng phân quang học. Những hợp chất dihydroflavonol phổ biến: aromanderin, taxifolin và ampelopsin.



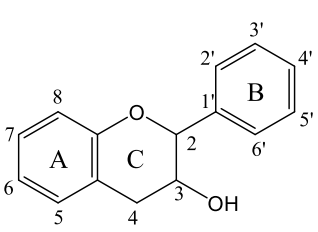


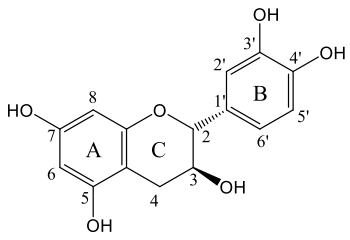


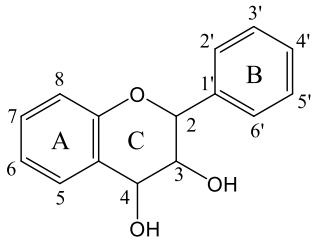
Aromanderin	Taxifolin	Ampelospin

Hình 1.15. Cấu trúc của hợp chất dihydroflavonol [93]

Flavanol: Không có nhóm ceton ở C4 và liên kết đôi ở C2, C3 (Hình 1.16). Flavanol được chia làm hai dạng: (1) flavan-3,4-diol và (2) flavan-3-ol. Catechin và epicatechin là những hợp chất flavan-3-ol phân bố rộng rãi và có trong thành phần của trà xanh. Chúng có thể kết hợp với gallic acid để tạo ra epigallocatechin gallate hoặc epicatechin gallate.



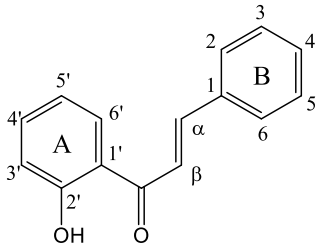
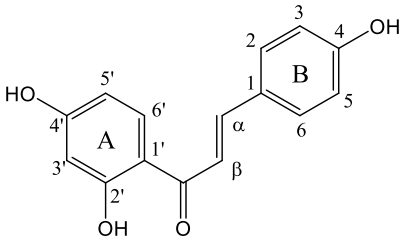
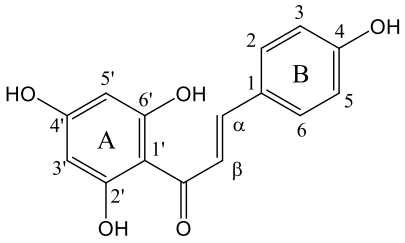




Flavan-3-ol	Catechin	Flavan-3,4-diol

Hình 1.16. Cấu trúc của hợp chất flavanol [93]

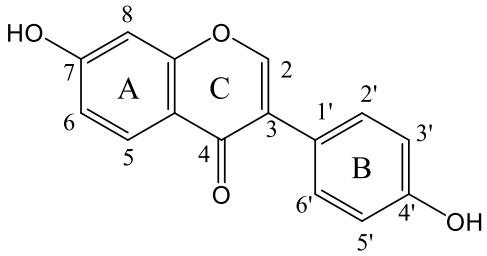
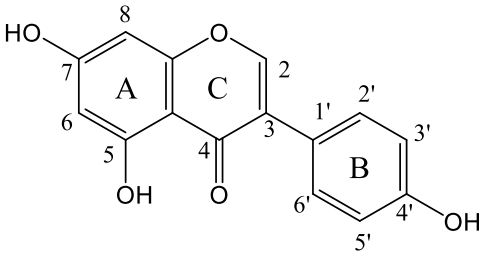
Chalcon và dihydrochalcon: Là những hợp chất flavonoid mạch hở trong đó có hai vòng thơm được liên kết với nhau bằng nhóm carbonyl và liên kết đôi C_α=C_β. Cách đánh số thứ tự trong chalcon bị đảo ngược so với cách đánh số thứ tự trong flavonoid (ví dụ: vòng A có số thứ tự 1'-6', vòng B có số thứ tự 1-6 (Hình 1.17).

		
2'-hydrogenxychacol	2'4'4'-tryhydrogenxychacol	Phloretin

Hình 1.17. Cấu trúc của hợp chất chalcon [93]

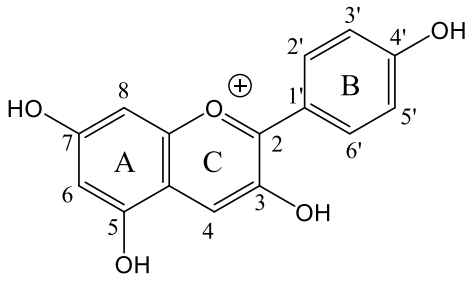
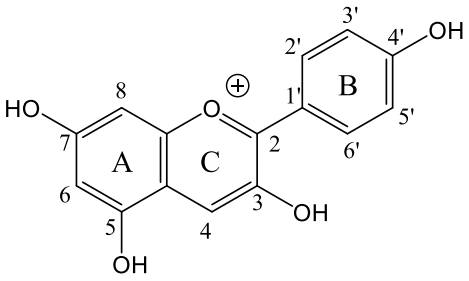
Sự có mặt của liên kết chưa bão hòa α, β và không có vòng C trung tâm là hai đặc điểm khác biệt của chalcon, tạo ra những hợp chất có tính chất hóa học khác nhau từ hợp chất flavonoid. Chalcon được tổng hợp nhờ vào xúc tác enzyme chalcon. Đây là hợp chất trung gian quan trọng có trong thực vật, vì nó là tiền chất để tạo ra hầu hết các hợp chất flavonoid.

Isoflavone: Trong isoflavon vòng B được thế vào C3 thay vì C2 như trong hợp chất flavonoid (ví dụ: genistein và daidzein ở Hình 1.18).

	
Daidren	Genistein

Hình 1.18. Cấu trúc của hợp chất isoflavon [93]

Anthocyanidin: Có bộ khung hóa học dựa trên ion pyrylium (Hình 1.19). Đặc điểm nổi bật của hợp chất này là một ion mang điện tích dương. Hầu hết các hợp chất của anthocyanidin là nhân tố chủ yếu tạo ra những màu sắc khác nhau ở thực vật và hoa. Hai hợp chất anthocyanidin phổ biến là cyanidin, pelargonidin.

	
Pelargonidin	Cyanidin

Hình 1.19. Cấu trúc của hợp chất anthocyanidin [93]

1.4.2.2. Polyphenol trong trà

Trà là loại thức uống phổ biến ở hầu hết các quốc gia trên khắp thế giới, điều đó phần nào thừa nhận tác dụng của trà đối với sức khoẻ con người. Các nhà khoa học đã tìm thấy tác dụng sinh học của dịch chiết lá trà chủ yếu nhờ các polyphenol có tác dụng quét/bắt dọn dẹp các gốc tự do. Các gốc tự do sinh ra và tích luỹ trong cơ thể là nguyên nhân dẫn đến bệnh tật và làm tăng tốc độ lão hoá cơ thể con người. Polyphenol trà có khả năng chống ô xy hóa, kháng viêm, phòng chống ung thư, giúp động mạch co giãn để duy trì lưu lượng máu và giữ cho động mạch không bị xơ vữa chống lại sự phá hủy nội tạng.

1.4.2.3. Polyphenol trong trà xanh

Các hợp chất polyphenol là sản phẩm chuyển hóa thứ cấp của thực vật, đa dạng về cấu trúc và chức năng. Trong cây, hàm lượng polyphenol biến đổi trong từng bộ phận của cây và loại cây. Các polyphenol không hòa tan trong nước (lignin, hydroxycinnamic acid...) thường phân bố ở thành tế bào, trong khi loại hòa tan thường cư trú ở không bào [94, 95].

Nhóm các hợp chất polyphenol là thành phần được quan tâm nhiều nhất trong trà do những đặc tính quý giá như khả năng chống ung thư, chống oxy hóa, giảm cholesterol trong máu… [96, 97]. Các hợp chất polyphenol trong trà chủ yếu là các hợp chất flavonoid, trong đó chia thành 5 nhóm chính:

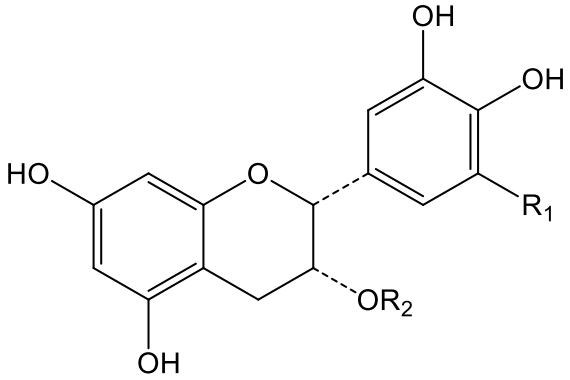
- Hợp chất catechin
- Hợp chất anthoxanthin
- Hợp chất anthocyanin

– Hợp chất leucanthocyanidin

– Các phenol acid carboxylic và một số chất khác

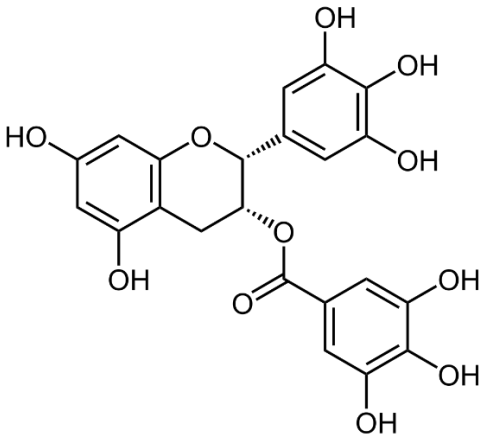
Hợp chất catechin

Trong thực vật, catechin thường tồn tại ở trạng thái tự do hoặc ở dạng ester với gallic acid. Catechin trong trà thuộc họ flavonoid là thành phần chính của polyphenol trà. Catechin có vai trò quyết định hoạt tính sinh học và tính chất cảm quan của nước trà [96, 97]. Catechin có công thức cấu tạo chung như sau (Hình 1.20).



Hình 1.20. Công thức cấu tạo của catechin [97]

Hợp chất EGCG: Là thành phần chính trong các catechin trà, công thức phân tử $C_{22}H_{18}O_{11}$ (Hình 1.21). Hợp chất EGCG không màu, kết tinh hình kim nhỏ, vị chát hơi đắng, tạo kết tủa với gelatin, tan trong nước, dễ tan trong aceton, ethanol... [97].



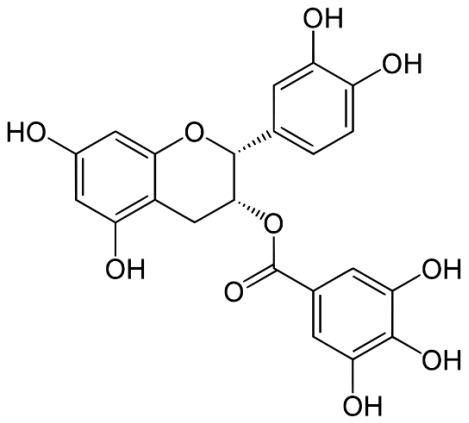
Hình 1.21. Công thức cấu tạo của (-)-EGCG [96, 97]

Trong công thức phân tử vừa có gốc galloyl vừa có 3 nhóm –OH ở các vòng benzene nên EGCG có cấu trúc phân tử và các trung tâm hoạt động chống oxi hóa hiệu quả nhất trong các catechin trà. Nghiên cứu hiệu quả quét/bắt gốc tự do DPPH

của catechin và các dẫn xuất [98]. Hàm lượng EGCG trong lá trà phụ thuộc rất lớn vào giống trà, độ non già của lá và mùa vụ thu hoạch [99].

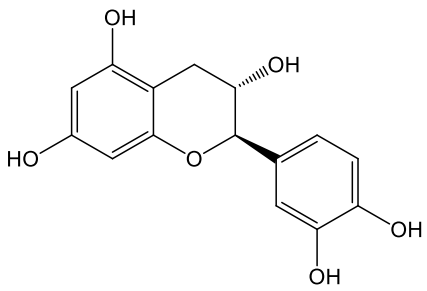
Hợp chất EGC là thành phần catechin có hàm lượng đứng thứ 2 chỉ sau EGCG. EGC có công thức phân tử $C_{15}H_{14}O_7$, kết tinh hình kim nhỏ không màu, vị chát mạnh nhưng có vị ngọt, không tác dụng với gelatin, tan trong nước và ethylacetate [100]. Trong lá trà, hàm lượng EGC thay đổi theo giống, độ non già của lá và mùa vụ thu hoạch [100]. Với thành phần EGC trong lá trà, Yu Li Lin và cộng sự [100] thu được kết quả hàm lượng EGC là 1,1 ± 0,1 %, trong khi kết quả đạt tới 3,6 đến 5,2% trong nghiên cứu của Lihu Yao và cộng sự [101] về hàm lượng EGC trong lá trà trồng tại Australia.

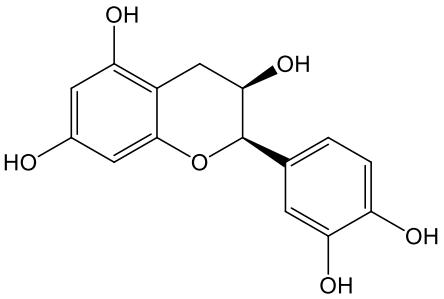
Epicatechin gallate (ECG) là thành phần có hàm lượng thường đứng thứ 3 sau EGCG và EGC. Đây là một trong các catechin được galloyl hóa (Hình 1.22) có vị chát hơi đắng, tác dụng với gelatin cho kết tủa màu trắng, tan trong nước, dễ tan trong aceton, ethanol, ethylacetate... Hàm lượng ECG cũng thay đổi tùy theo giống trà, độ non già của lá và mùa vụ thu hoạch. Kết quả nghiên cứu của Lin và Yao về hàm lượng catechin này trong lá trà trồng tại Đài Loan và Australia là 1,1 ± 0,1 % và từ 3,2 đến 4,1 % tương ứng [101].



Hình 1.22. Công thức cấu tạo của ECG [100]

Hợp chất EC và C (Hình 1.23): Đây là 2 cấu tử catechin có hàm lượng thấp nhất trong các catechin trà. Công thức phân tử của nó là $C_{15}H_{11}O_6$, ở dạng tinh khiết không màu, kết tinh hình lăng trụ, chát dịu có dư vị ngọt, không kết tủa với gelatin, khó tan trong nước lạnh nhưng dễ tan trong nước nóng, ethanol, aceton... [100].





Catechin (C)	Epicatechin (EC)

Hình 1.23. Công thức cấu tạo của C và EC [100]

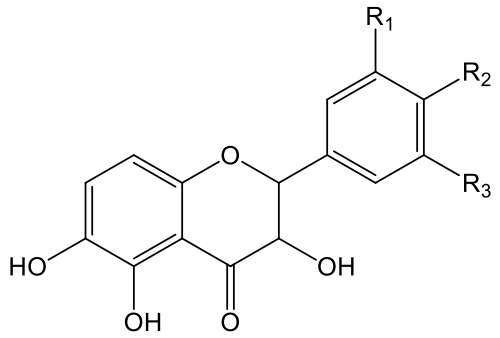
Cũng giống các thành phần khác, hàm lượng EC và C thay đổi theo giống, độ non già của lá... Kết quả phân tích của Lin và cộng sự trong 10 giống trà trồng tại Đài Loan cho hàm lượng trung bình của EC và C lần lượt là 0,33% và 0,13% CK [100].

Tính chất của các hợp chất catechin có trong trà

Các hợp chất catechin trong lá trà ở thể rắn là những chất kết tinh không màu, hình kim hoặc hình lăng trụ, có vị chát ở mức độ khác nhau. Các catechin đều dễ tan trong nước nóng, rượu, aceton, ethylacetate tạo dung dịch không màu, không tan trong các dung môi không phân cực hoặc ít phân cực như benzene hoặc chloroform. Các catechin tác dụng với $FeCl_3$ tạo kết tủa xanh thẫm hoặc xanh nhạt tuỳ theo số lượng nhóm hydroxyl trong phân tử. Dễ bị oxy hóa bởi dung dịch $KMnO_4$ trong môi trường acid, dung dịch I_2 trong môi trường kiềm thậm chí chúng có thể tự oxy hóa trong không khí ẩm. Dưới ảnh hưởng của men oxy hóa khử hoặc nhiệt độ cao, các catechin bị oxy hóa, sản phẩm oxy hóa trung gian của chúng cũng gây ra hàng loạt các biến đổi hóa học làm chuyển hóa các chất có trong lá trà, góp phần tạo ra các chất có mùi thơm đặc trưng cho trà.

Hợp chất anthoxanthin (flavonol)

Hợp chất anthoxanthin trong trà là: kaempferol, quercetin và myricetin. Các hợp chất này thường tồn tại ở cả dạng tự do và kết hợp (dạng glycoside). Hàm lượng anthoxanthin trong trà rất thấp nếu so sánh với các catechin trong các giống trà trồng tại Trung Quốc, chúng chỉ dao động trung bình từ 0,4 –1,5 % [100]. Chúng có công thức cấu tạo chung như Hình 1.24 [101].



Hình 1.24. Công thức cấu tạo của anthoxanthin [101]

Trong đó:

- Nếu R1 = R3 = (-H); R2 = (-OH): Kaempferol.
- Nếu R1 = R2 = (-OH); R3 = (-H): Quercetin.
- Nếu R1 = R2= R3 = (-OH): Myricetin.

Hợp chất anthocyanin

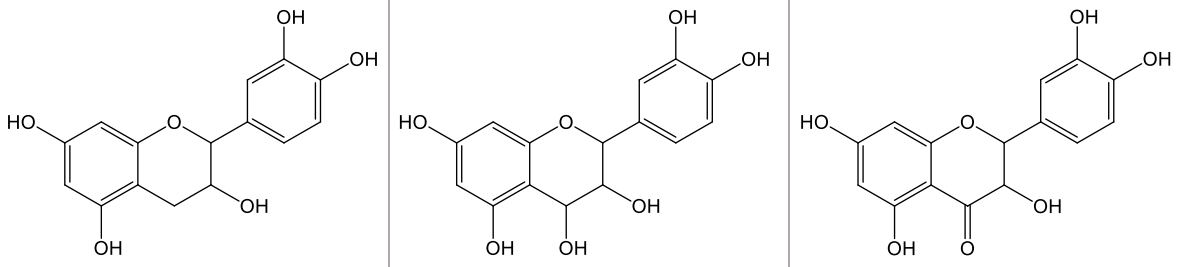
Trong thực vật, hầu như các hợp chất anthocyanin đều tồn tại ở trạng thái kết hợp với các gốc đường (glycoside). Tất cả các anthocyanin đều có chứa trong vòng pyran oxy hóa trị tự do. Ở trạng thái tự do, anthocyanin gồm 3 aglycon chủ yếu là pelargonidin, cyanidin và delphinidin. Các glycoside của anthocyanin được tạo thành do gốc đường glucoza, galactoza hoặc ramnoza kết hợp với gốc aglycon có màu gọi là anthocyanidin. Do đó, khi thủy phân các glycoside của anthocyanin thì được đường và anthocyanidin [102]. Chúng tan trong nước và có trong dịch bào thực vật, có vị đắng và màu sắc thay đổi phụ thuộc vào nhiều yếu tố như: hàm lượng catechin và anthoxanthin, nhiệt độ dung dịch và nồng độ của chúng. Nhìn chung, các giống trà có búp màu tím thường hàm lượng anthocyanin cao hơn búp màu xanh [100].

Phenol carboxylic acid

Phenol carboxylic acid là nhóm chất tự nhiên có trong thực vật, trong phân tử có chứa nhóm phenol và nhóm carboxylic. Trong lá trà tươi có nhiều acid hữu cơ như: gallic acid, ellagic acid, methadigallic acid, chlorogenic acid, cafeic acid, para-coumaric acid, galloylquinic acid. Tuy nhiên hàm lượng của chúng không cao. Trong các acid này, gallic acid có vai trò quan trọng trong việc hình thành vị chát và hoạt tính kháng oxi hóa của dịch chiết trà. Pedro Fernández Cáceres và cộng sự [103] đã chỉ ra hàm lượng gallic acid trong 12 mẫu trà xanh có nguồn gốc từ Trung Quốc và Nhật Bản là rất thấp, chỉ dao động từ 0,004 % đến 0,12 %.

Hợp chất leucoanthocyanin

Hợp chất leucoanthocyanin là sự kết hợp của các gốc aglycol với gốc đường (glycoside) (Hình 1.25). Các leucoanthocyanin trong thành phần polyphenol trà thường gặp là leucoxyanidin và leucodelphinidin. Chúng tồn tại ở cả trạng thái tự do và dạng glycoside. Hàm lượng của chúng trong lá trà tươi rất ít nếu so sánh với các catechin. Các leucoanthocyanin là dạng trung gian giữa catechin và anthocyanin.



Catechin	Leucocyadinin	Quercetin

Hình 1.25. Công thức cấu tạo hợp chất leucoanthocyanin [104]

Sự tổng hợp tannin hay polyphenol trong lá trà chịu ảnh hưởng rất lớn bởi cường độ chiếu sáng, khi cường độ chiếu sáng tăng thì hàm lượng này tăng và ngược lại. Do vậy trong một năm, hàm lượng polyphenol trong lá trà thường đạt cực đại vào mùa hè và thấp hơn ở mùa thu và mùa xuân. Chế độ canh tác, dinh dưỡng cho cây trà cũng ảnh hưởng đến hàm lượng tannin và polyphenol trong cây trà. Nhìn chung, khi tăng lượng bón phân đạm thì hàm lượng polyphenol trong lá trà giảm và hàm lượng này tăng khi tăng lượng lân và potassium [104]. Ngoài các yếu tố trên thì hàm lượng polyphenol trong lá trà cũng chịu ảnh hưởng của các yếu tố như thổ nhưỡng, khí hậu, tuổi cây... Nguyễn Văn Chung và Trương Hương Lan [105] đã khảo sát hàm lượng polyphenol tổng số trong trà xanh tại Phú Thọ, Thái Nguyên và Lâm Đồng lần lượt đạt trung bình 14,8 %, 18,5 % và 18,8 % tính theo khối lượng chất khô.

1.4.2.4. Polyphenol trong trà hoa vàng

Các hợp chất polyphenol có mặt trong THVcũng tương đồng với các nhóm hợp chất polyphenol trong trà xanh bao gồm: catechin, anthoxanthin, anthocyanin, leucanthocyanidin, các phenol carboxylic acid và một số chất khác. Tuy nhiên, hàm lượng polyphenol tổng số trong THV được đánh giá cao hơn so với polyphenol trong trà xanh. Trong cây, hàm lượng polyphenol trong THV tập trung nhiều nhất ở hoa và lá non [106]. Nhiều nghiên cứu về thành phần hóa học được thực hiện trên THV [

107, 108]. Các nghiên cứu này đều tập trung vào việc phân lập các hợp chất polyphenol trong THV và đánh giá hoạt tính sinh học của polyphenol chiết xuất từ THV. Ví dụ như nghiên cứu của Song và cộng sự [107,] đã xác định được hàm lượng của polyphenol tổng số, proanthocyanidin, tannin và flavonoid từ dịch chiết trong dung môi aceton/ EtOH/ nước của 6 mẫu THV: *C. Impressinervis, C. Euphlebia, C. Microcarpa, C. Nitidissima, C. Tunghinensis, C. Chrysantha* bằng phương pháp HPLC và LC–ESI-MS

Jiang Li Na và cộng sự, sử dụng phương pháp phân tích sắc kí hiệu năng cao (HPLC) phân lập thành công 9 loại polyphenol có trong cánh hoa, nhị hoa và lá từ 22 giống THV. Trong đó, các polyphenol GCG, ECG và CG tồn tại trong tất cả các giống THV. Một số mẫu không có các polyphenol: GA, GC, EGC, C, EC và EGCG. Trong các mẫu, hàm lượng của EC nhiều nhất, tiếp theo EGC, GCG và ECG. Hàm lượng EGC, C, EC, EGCG, GCG, ECG cao nhất trong lá, tiếp theo là nhị hoa và cánh hoa. Hàm lượng CG cao nhất ở cánh hoa, nhị hoa và lá. Hàm lượng GA và GC cao nhất ở nhị hoa, lá và cánh hoa. Đánh giá toàn diện dựa trên hàm lượng polyphenol tổng số, hàm lượng polyphenol cao nhất chứa trong nhị hoa tiếp theo là cánh hoa và lá. Vì vậy, các kết quả hàm lượng polyphenol tổng số từ nhị hoa có thể được sử dụng làm căn cứ cho việc phát hiện các loài mới của THV cũng như phát triển các hoạt tính quý trong cây THV [109].

Tại Việt Nam, Nguyen Thi Hong Van và cộng sự [90] đã phân lập thành công 5 flavonoid được phân lập từ những bông hoa của THV(Hu) Tuyama, bao gồm: catechin, epicatechin, quercetin, quercetin-3-O-metyl ete và kaempferol. Trong số năm hợp chất, quercetin-3-O-methyl eter lần đầu tiên được phân lập từ các loài THV này. Hồ Thị Ngọc Trâm [94] đã tiến hành nghiên cứu các điều kiện: dung môi, nhiệt độ, thời gian chiết xuất cho chiết xuất polyphenol để thu được hàm lượng polyphenol tốt nhất từ lá THV bằng phương pháp chiết xuất có hỗ trợ siêu âm (Bảng 1.1).

Bảng 1.1. Hàm lượng polyphenol tổng (%) theo dự đoán của mô hình tối ưu và thực tế trích ly được [94]

	Yếu tố khảo sát			Hàm lượng polyphenol tổng (%)
	Nhiệt độ (^{0}C)	Thời gian (phút)	% EtOH	
Giá trị dự đoán	55,4	45,38	45	13,25 ± 0,04
Thực nghiệm kiểm chứng	55	45	45	13,27 ± 0,15

Kết quả so sánh không có sai lệch quá nhiều giữa hàm lượng polyphenol dự đoán và thực tế cho thấy mô hình dự đoán tương thích với thông số thực tế. Mô hình tối ưu hóa quá trình trích ly polyphenol từ phụ phẩm trà oolong: (độ ẩm 8 – 10 %) kết hợp siêu âm (tần suất 40 kHz, công suất 1000 W/l): nhiệt độ trích ly 55 ^{o}C, thời gian 45 phút, trong 250 ml dung môi ethanol 45 %, tỉ lệ nguyên liệu : dung môi 1 : 25 (g/ml), kích thước vụn trà < 1 mm. Lượng polyphenol tổng thực tế trích ly được trong điều kiện trên đạt 13,27 % (tính theo hàm lượng chất khô).

Jia-Ni Lin và các cộng sự đã nghiên cứu thành phần hóa học và hoạt động chống ung thư của THV chống lại các tế bào ung thư vú MDA-MB-231. Kết quả cho thấy chiết xuất lá THV ức chế tổng hợp acid béo, đã được chứng minh có vai trò quan trọng trong quá trình ngăn cản sự hình thành lipid và quá trình hình thành khối u, có tác dụng làm giảm khả năng tồn tại của tế bào ung thư vú [110].

Các nghiên cứu về đặc tính chống oxi hóa của polyphenol của cho thấy các hợp chất được tìm thấy trong lá THV được chứng minh là có khả năng chống oxi hóa và chống viêm, có lợi cho sức khỏe, bao gồm: ellagitannin, proanthocyanidin, taxifolin deoxyhexose, các dẫn xuất apigenin, kaempferol, các dẫn xuất quecetin, glucosyl isorhamnetin, catechin–(epi) afezelechin polymerisation và platphyllosid [111]. Các hợp chất này tồn tại không đáng kể trong lá trà thông thường.

Lá THV có thể uống, điều chỉnh các chất béo trong cơ thể, lượng đường trong máu, giải độc gan và thận. Thí nghiệm về tác dụng hạ đường huyết của chiết xuất *Camellia chrysantha* trên mô hình chuột mắc bệnh tiểu đường loại 2 của Lai Wang và cộng sự cho thấy polyphenol trong THV có khả năng là giảm cholesterol toàn phần và góp phần làm tăng mức cholesterol lipoprotein mật độ cao giúp cải thiện về chỉ số mỡ ở động mạch [112].

1.4.2.5. Tình hình nghiên cứu và sử dụng polyphenol trà trong lĩnh vực y sinh trên thế giới và Việt Nam

Trà đã được sử dụng như là một phương thuốc trong y học phương đông từ rất lâu. Nhiều công trình đã công bố về tác dụng của trà và các chất chiết từ trà lên nhiều bệnh khác nhau [113, 114].

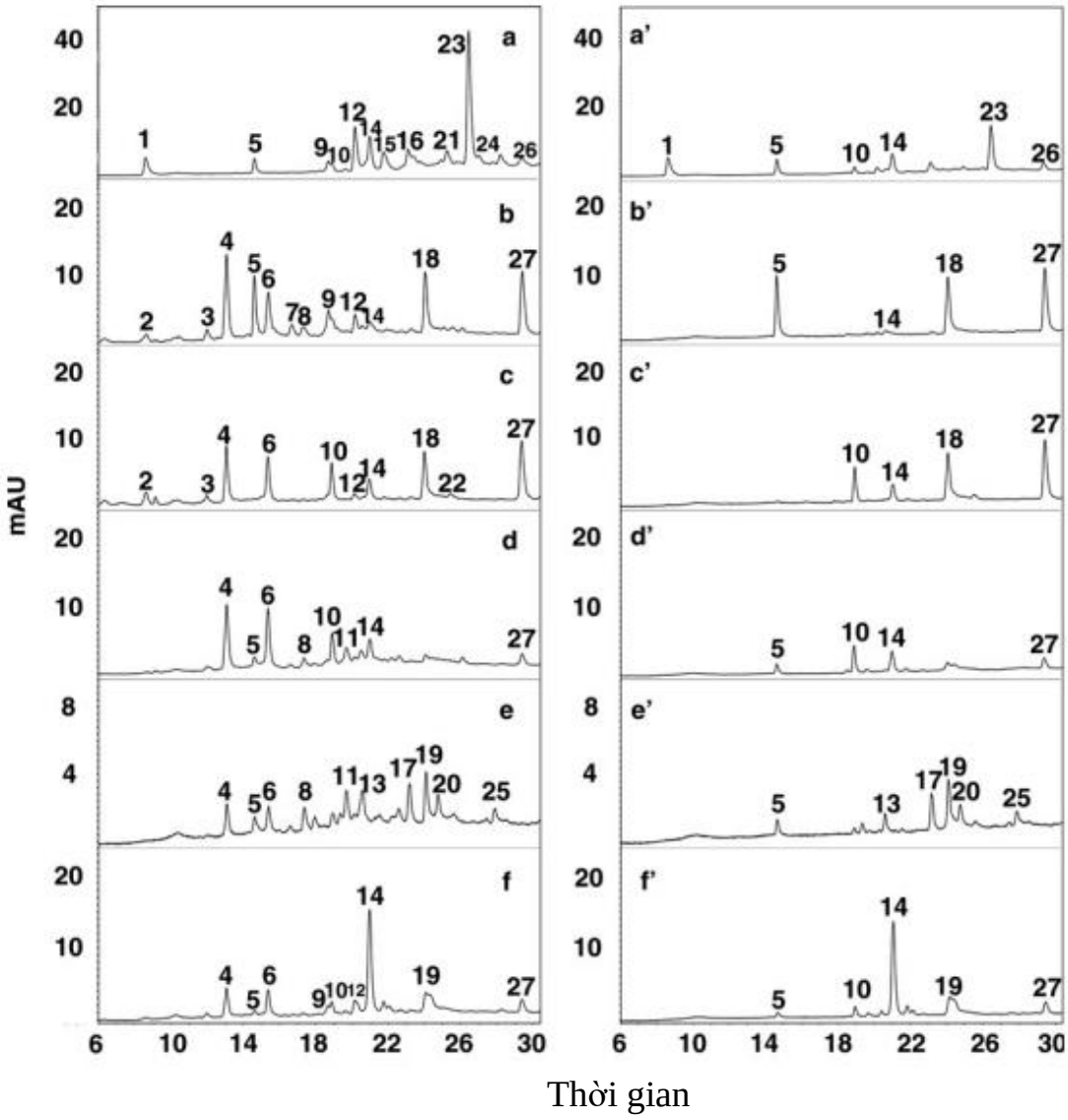
Trà giúp con người có được một trí nhớ tốt và lâu, chống lại bệnh Alzheimer [115]:

Catechin trong trà có khả năng ức chế sự phát triển của enzyme gọi là butyrylcholinesteraza (BuChE), enzyme này có nhiều trong các protein có trong óc của những bệnh nhân bị bệnh lú lẫn (Alzheimer), đồng thời nó cũng ức chế phân hóa tố của axetylcholinesteraza (AChE), chính phân hóa tố này làm phân hủy nhanh chóng chất dẫn truyền thần kinh (Neutrotransmitter) của hệ giao cảm và ở chỗ nối thần kinh cơ… Khi uống trà, catechin trong trà phát tán nhanh đến hệ trung khu thần kinh, sau đó đến các cơ quan trên toàn cơ thể, thực hiện nhiệm vụ phòng chống bệnh.

Trà chống lão hóa [116]:

EGCG giúp tăng hoạt tính của các enzyme chống oxy hóa như: superoxit dismutaza, catalaza, glutathion peroxidaza, glutathion reductaza, glucose-6-phosphat dehydrogenaza và cải thiện những chất chống oxy hóa không phải là enzyme như: α –tocopherol, ascorbic acid và glutathion. Hơn nữa, nó còn cải thiện sự malonaldehyde và mức độ carbonyl hóa protein. Đặc biệt, EGCG còn là chất chống oxy hóa trung tính, bảo vệ các nơron thần kinh trong việc giảm nhẹ tác hại của quá trình oxy hóa và lão hóa lên não chuột già. Kết quả nghiên cứu này khá khả quan đối với tác dụng chống lão hóa của EGCG trên người [116].

Nhiều nghiên cứu về tác dụng chống oxy hóa của THV đã được thực hiện. Lixia Song và cộng sự đã tiến hành đánh giá khả năng chống oxy hóa của polyphenol trong 6 mẫu THV thu hái ở Trung Quốc theo mô hình DPPH. Phổ sắc ký HPLC của các mẫu dịch chiết THV trong dung môi methanol. Cho thấy, đã có phản ứng rõ rệt giữa các thành phần catechin trong trà với DPPH, thể hiện rõ khi các đỉnh tương ứng tồn tại trong sắc ký đồ ban đầu của các chiết xuất ban đầu biến mất sau khi thêm DPPH [117] (Hình 1.26).



Hình 1.26. Sắc ký đồ HPLC của các mẫu dịch chiết trà hoa vàng trong dung môi methanol: (a) C. impressinervis, (b) C. euphlebia, (c) C. microcarpa, (d) *C. nitidissima*, (e) *C. tunghinensis*; (f) *C. chrysantha*, (a')–(f'): các mẫu tương ứng khi thêm DPPH [117].

Hoạt tính chống oxi hóa của catechin, trong thử nghiệm chống lại sự hình thành các gốc tự do DPPH trong dung dịch nước được xếp theo trật tự giảm dần: epicatechin gallate ≈ epigallocatechin gallte > epigallocatechin > gallic acid > epicatechin ≈ catechin [117]. Với hàm lượng catechin tổng chiếm khoảng 30 % khối lượng khô, trà và dịch chiết trà cũng thể hiện tính chống oxy hóa rất mạnh, đóng góp khoảng 70 - 80 % khả năng chống oxy hóa của trà [118, 119].

Yokozawa Kitani và cộng sự [120] đã nghiên cứu thử nghiệm *in vivo* khả năng chống oxy hóa của polyphenol trong trà xanh trên đối tượng là chuột đã được làm tăng cholesterol (chuột béo phì). Các tác giả đã khảo sát ảnh hưởng của polyphenol trong trà xanh đến khả năng chống oxy hóa huyết thanh và mức cholesterol của những con chuột béo phì và so sánh chúng với probucol, một chất chống oxy hoá giảm cholesterol (Bảng 1.2). Để đánh giá hoạt tính chống oxy hóa, các tác giả đã khảo sát sự thay đổi oxy hóa lipoprotein mật độ thấp phân lập từ huyết thanh của chuột béo phì với độ nhạy cao, cũng như khả năng chống oxy hóa huyết thanh tự phát ra từ tế bào não của chuột. Việc kiểm soát nồng độ polyphenol có hiệu quả ức chế quá trình oxy hóa lipoprotein và tăng hoạt tính chống oxy hóa huyết thanh ở probucol. Tuy nhiên, cần tăng lượng polyphenol lớn hơn probucol để giảm mức cholesterol toàn phần. Đặc biệt là, chất polyphenol của trà cũng góp phần làm tăng mức cholesterol lipoprotein mật độ cao giúp cải thiện về chỉ số mỡ ở động mạch, trong khi probucol không có hiệu ứng này. Như vậy, polyphenol của trà có thể gây ra phản ứng chống loét huyết khối do tính chất chống oxy hoá và tăng mức cholesterollipoprotein mật độ cao [117].

Bảng 1.2. Khả năng chống oxi hóa của polyphenol trong trà xanh và probucol trên chuột béo phì [117]

Nhóm	Hoạt động chống oxi hóa (%)
Chuột bình thường	44,5 ± 2,5
Chuột béo phì	33,2 ± 3,0
0,1 % polyphenol	41,8 ± 4,2
0,5 % polyphenol	41,8 ± 4,2
2,5 % polyphenol	43,8 ± 4,3
0,1 % probucol	49,2 ± 6,2

Trà hiệu quả đến bệnh viêm khớp:

Trà xanh có thể giúp ngăn ngừa và giảm nguy cơ viêm khớp dạng thấp, bảo vệ sụn bằng cách chặn các enzyme phá hủy sụn. Trà xanh có chứa epigallocatechin-3-gallat (EGCG), có khả năng chống được viêm loét, ngăn chặn sự sinh sản của một số phân tử trong hệ thống miễn dịch thường gây ra hiện tượng viêm nhiễm và phá hủy

các khớp xương ở những người bị bệnh viêm khớp. EGCG cũng có khả năng ngăn chặn các chất gây nhiễm trong các mô liên kết của những người bị bệnh viêm khớp.

Trà xanh có tác dụng với những bệnh nhân bị "Gút":

Quercetin không những có nhiều hiệu quả trong việc chống bệnh "Gút" (bệnh thống phong, loại viêm khớp xương, với nhiều uric acid trong máu) mà còn bảo vệ và ức chế oxidaza của xanthin là sản phẩm phân hủy nitrogen của việc cắt mạch, là vật phẩm trung gian trong việc phân hủy nucleic acid thành uric acid, leukotrien tổng hợp và sự hội tụ tế bào bạch huyết. Theo các nghiên cứu trà được trồng ở ngoài nắng thì có nhiều quercetin hơn trà được trồng trong bóng râm. Quercetin vẫn tồn tại trong điều kiện nhiệt độ nấu ăn mà không bị tiêu hủy [118].

Trà xanh có tác giảm stress [119]:

L-theanin là một loại amino acid trong trà xanh làm giảm căng thẳng và lo âu, kích thích thư giãn, tạo sự chú ý, tập trung tư tưởng và sáng tạo hơn. Theanin có tác dụng khác polyphenol và catechin. Trong trà xanh polyphenol và catechin có công dụng chống lại sự oxy hóa. Tùy theo thời điểm thu hái trong năm, thổ nhưỡng, vị trí địa lí mà polyphenol và catechin sẽ thu được với các hàm lượng khác nhau.

Polyphenol do tự nhiên sản sinh ra, tuy nhiên chính lá trà biến đổi chất theanin thành chất catechin, việc biến đổi này tùy theo các yếu tố ngoại cảnh, độ non, già của lá trà. Theo giáo sư Helen Charley, theanin là một amino acid chính có trong lá trà xanh có trọng lượng khoảng 1 – 2 % so với trà khô. Khi trà quá già thì quá trình oxi hóa của acid béo và các theaflavin làm mất đi theanin. Vì vậy, nếu ẩm độ có trong trà từ 6,5 – 7,5 % thì trà sẽ bị hư hại. Bởi vậy, trà nên giữ trong hộp có nắp được đậy kín và bảo quản ở nhiệt độ khoảng 30 ^{0}C.

Trà xanh giúp tăng cường hệ thống miễn dịch:

Polyphenol và flavonoid tìm thấy trong trà xanh giúp tăng cường hệ miễn dịch, tăng cường sức đề kháng trong việc chống nhiễm trùng. Công bố của Rubin và Artsikhovskaya [120] cho thấy nhiều tính chất sinh hóa có ý nghĩa quan trọng của polyphenol trong cây trà trong đó các enzyme đã giữ một vai trò rất quan trọng. Các hoạt chất trong trà chống lại không những sự xâm nhập bởi siêu vi trùng, vi trùng, nấm mà hơn nữa là do những yếu tố do cơ khí làm hư hại. Dưới vai trò của enzyme làm tăng thêm sự sản xuất của một polymer không tan, chất này có nhiệm vụ như là

thành trì chống đỡ mọi nguyên nhân làm cây bị nhiễm trùng. Các chất trung gian của quá trình oxy hóa các polyphenol trà đã ngăn ngừa và làm giảm đi sự nhiễm trùng cho cây bằng cách làm vô hiệu hóa mọi hoạt động của virus, hoặc che chở cho các enzyme không đủ sức chống trọi mọi sự tấn công từ ngoài. Làm vô hiệu hóa các vi trùng phát triển nhất thời hoặc vĩnh viễn ở cây trà.

Bên cạnh đó L-theanin được xếp vào nhóm alkylamin chống lại những sự nhiễm trùng, hoặc vi trùng xâm nhập, hit phải phấn hoa, các hồng cầu lạ sẽ trở thành vô hại. L-theanin có nhiều trong trà xanh, nhưng ít có trong táo, nấm, rượu đỏ hay rượu trắng.

Trà xanh (EGCG) giúp giảm đi lượng đường trong máu [121]:

Nghiên cứu của Myung Kwan Han cho thấy: lượng đường trong nước tiểu của bệnh nhân bị tiểu đường giảm đi đáng kể trong thời gian bệnh nhân tham dự Lễ hội trà. Tại phòng hoá sinh, theo nghiên cứu của Đại học Quốc gia Chonbuk: EGCG ức chế sự phát triển của tế bào IL-1 beta và IFN-gamma là chất trung gian của RINm5F tác dụng lên tế bào trong tụy để tế bào sản sinh insulin. EGCG làm cho tế bào IL-1- beta và IFN-gamma trong tụy nhỏ lại vì sự thu nhỏ của chúng sẽ làm giảm đi lượng nitrogen mono oxide (NO) sản xuất, làm giảm đi mức độ hợp thành nitrogen mono oxide (NO) của sự tổng hợp (iNOS) mARN và mức độ protein của tế bào RINmF (RINmF)

Trà có tác dụng hỗ trợ chống ung thư [122]:

Tác dụng ngăn chặn và chữa trị bệnh ung thư của trà và các hợp chất catechin được nghiên cứu mạnh mẽ nhất. Khi tiến hành nghiên cứu *in vivo*, nhiều công trình công bố cho thấy trà và các polyphenol chiết được từ trà như EGCG, EGC, ECG,... có khả năng tương tác, ngăn chặn và hạn chế quá trình khơi mào, hình thành và phát triển của tế bào ung thư. Các thử nghiệm *in vivo* cho thấy khả năng tương tác trực tiếp và tăng cường hiệu quả của EGCG, EC vào hệ thống bảo vệ bằng enzyme của tế bào, hạn chế sự hình thành của các tác nhân gây biến đổi trong tế bào. Nghiên cứu của Yasuyoshi Miyata và cộng sự [123] chứng minh rằng trà xanh với thành phần chủ yếu là các polyphenol, đặc biệt là EGCG có khả năng ức chế sự phát triển của một số dòng tế bào ung thư. Nghiên cứu dịch tễ học ở Nhật – một trong những quốc gia sử dụng trà nhiều nhất, đã chỉ ra mối quan hệ tỷ lệ nghịch giữa thói quen uống trà xanh và tỷ lệ người chết vì ung thư. Trà xanh có thể bảo vệ cơ thể khỏi ung thư bằng cách làm ngưng chu trình tế bào, kể cả chu trình nguyên phân của tế bào ung thư.

1.5. Vật liệu tổ hợp polymer/polyphenol trà

Nghiên cứu về vật liệu mang thuốc và tổ hợp vật liệu có hoạt tính sinh học mang thuốc. Trong đó, chế tạo hệ thống hạt có kích thước nano tạo thành một hệ thống phân phối thuốc đa năng, có thể vượt qua hàng rào sinh học và đưa thuốc đến tế bào/khoang nội bào cụ thể vào những thời điểm thích hợp và liều lượng phù hợp. Đồng thời, các hệ thống phân phối nano có khả năng cải thiện sự ổn định của thuốc, tăng thời gian hiệu quả điều trị và cho phép quản lý qua đường ruột hoặc đường uống, ngăn ngừa hoặc giảm thiểu sự xuống cấp của thuốc và sự trao đổi chất cũng như dòng chảy tế bào. Các hạt nano gồm các polymer tổng hợp phân huỷ sinh học, polymer sinh học tự nhiên, lipid và polysaccharide đã được phát triển và thử nghiệm trong những thập kỷ qua. Các hoạt tính polyphenol trà được nghiên cứu và phát triển rộng rãi trong các lĩnh vực y sinh. Tuy nhiên 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 [123]. Các 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... [124] 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 [125]. Nhóm nghiên cứu của Ying Zhou và cộng sự [126] đã tiến hành nghiên cứu ảnh hưởng của polyphenol trà lên màng curdlan/CS/polyphenol trà ứng dụng vào việc bảo quản thịt với tỉ lệ curdlan/CS là 4 : 1 (khối lượng : khối lượng), màng tổ hợp có độ bền kéo cao, khả năng chống nước, hạn chế trao đổi khí và mất nước giữa bên trong và bên ngoài lớp màng (Bảng 1.3).

Bảng 1.3. Độ bền kéo, độ bền kéo dài, độ thấm hơi nước và độ ẩm của màng curdlan/chitosan [126]

Hàm lượng polyphenol trà	Độ bền kéo (TS)	Độ bền kéo dài (EB)	Độ thấm hơi nước (WVP.10^{-11} ($g.m^{-1}.s^{-1}.Pa^{-1}$))	Độ ẩm (MC %)
0 %	40,02 ± 0,16	20,03 ± 0,19	12,0 ± 1,0	30,29 ± 1,64
0,6 %	20,24 ± 0,35	20,76 ± 0,24	5,3 ± 0,2	14,0 ± 0,7
1,8 %	25,73 ± 1,05	14,9 ± 0,7	5,3 ± 0,2	14,0 ± 0,7
3,0 %	23,45 ± 0,63	14,9 ± 0,7	5,3 ± 0,2	14,1 ± 0,6

Vấn đề thường gặp phải trong quá trình chế tạo các tổ hợp polymer mang thuốc là kích thước của vật liệu tổ hợp, với các vật liệu tổ hợp polymer mang thuốc có kích thước càng nhỏ khả năng vận chuyển và phân phối thuốc càng dễ dàng. Có nhiều phương pháp chế tạo tổ hợp polymer mang thuốc được tiến hành như phương pháp vi nhũ, phương pháp vi hạt... Tuy nhiên, kích thước hạt vẫn còn nằm ở phạm vi micrometer cần được giảm xuống kích thước nano. Do đó, Kamaruddin [127] đã tiến hành tổng hợp hạt nano polyvinylpyrrolidon (PVP)/chiết xuất trà xanh (GTE) bằng phương pháp phun điện thủy động lực học. Đường kính của các hạt PVP/GTE dao động từ 231 nm đến 1164 nm và đường kính trung bình của các sợi nano PVP/GTE khoảng 49 nm.

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 [74]. Lá THV được thu hái vào tháng 12/2017 tại xã Tam Quan, huyện Tam Đảo, tỉnh Vĩnh Phúc.

Alginate (AG) ở dạng bột màu trắng, độ nhớt 300-500 mpa.s, do hãng Sigma - Aldrich (Hoa Kỳ) sản xuất.

Chitosan (CS) có độ deacetyl hoá 75 – 85 % và độ nhớt 1220 cP, M_n = 1,61.10^5 Da, do hãng Sigma-Aldrich (Hoa Kỳ) sản xuất.

Sodium tripolyphosphate (STPP) dạng hạt, màu trắng, độ tinh khiết 85 %, do hãng Sigma - Aldrich (Hoa Kỳ) sản xuất.

Potassium chlorite (KCl) rắn, sodium hydroxide (NaOH) rắn, calcium chloride ($CaCl_2$) rắn, mono potassium phosphate (KH_2PO_4) rắn, dung dịch hydrochloric acid (HCl) 37 %, ethanol, acetic acid (CH_3COOH) 99, formic acid (HCOOH) 98 % - 100 %, ethylacetate, toluen: đều là sản phẩm thương mại của Trung Quốc.

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).

2.1.2. Dụng cụ và thiết bị

Ống đong, pipette, cốc thủy tinh, bình hình nón, burette, đũa thủy tinh, bản mỏng tráng sẵn silicagel Merck Alufolien 60 F_{254}. Máy khuấy từ, cân phân tích, máy sấy, thiết bị siêu âm, thiết bị ly tâm, thiết bị cô quay áp suất thấp, thiết bị đông khô, máy soi bản mỏng.

Kính hiển vi ngược (Axiovert 40 CFL); buồng đếm tế bào (Fisher, Hoa Kỳ); máy quang phổ (BioTek) ; tủ ấm CO_2, tủ lạnh sâu -80 ^oC, bình nitrogen lỏng, cân phân tích, máy đo pH.

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

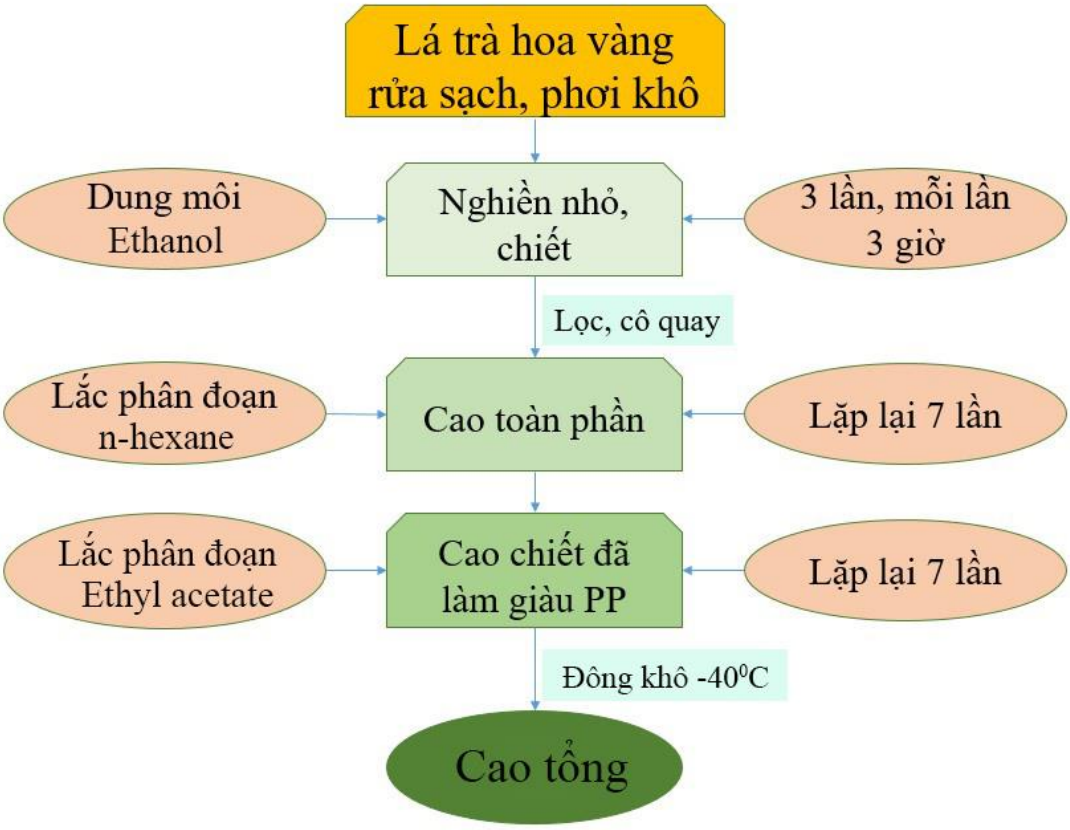
Quy trình chiết tách cao từ lá THV được trình bày trên Hình 2.1.

Hình 2.1. Quy trình chiết tách cao từ lá trà hoa vàng

Lấy 3 kg lá THV được rửa sạch, phơi khô và nghiền nhỏ. Mẫu nghiên cứu được ngâm trong dung môi ethanol, kết hợp rung siêu âm trong thời gian 7 ngày. Dịch lọc được cất quay bằng dung môi ethanol trong máy chưng cất cô quay áp suất thấp, sau đó được đông khô ở nhiệt độ -40 ^oC bằng thiết bị đông khô FreeZone 2.5 (Labconco, Hoa Kỳ) tại Viện Hóa học các hợp chất thiên nhiên - Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam. Khối lượng mẫu cao chiết sau khi chiết tách từ 3 kg nguyên liệu lá THV ban đầu là 22 gam. Được bảo quản trong ngăn mát của tủ lạnh và sử dụng cho các nghiên cứu của Luận án.

2.2.2. Quy trình chiết tách và làm giàu hàm lượng polyphenol tổng trong lá trà hoa vàng

Quy trình chiết tách cao từ lá THV và làm giàu hàm lượng polyphenol tổng được trình bày trên Hình 2.2.



Hình 2.2. Quy trình chiết tách từ lá trà hoa vàng và làm giàu hàm lượng polyphenol tổng từ lá trà hoa vàng

Lấy 5 kg lá THV được rửa sạch, phơi khô và nghiền nhỏ sau đó mẫu nghiên cứu được cất quay trong dung môi ethanol (3 lần, mỗi lần 3 giờ) bằng máy cất quay Buchi R220 ở 70 ^{o}C tại Phòng Phân tích hóa tiêu chuẩn, Viện Dược liệu. Dịch chiết được cất loại dung môi bằng máy cô quay áp suất thấp thu được mẫu cao toàn phần. Cao toàn phần được loại tạp chất bằng dung môi *n*-hexane (lặp lại 7 lần), sau khi loại bỏ *n*-hexan, tiếp tục lắc phân đoạn với ethylacetate (lặp lại 7 lần), thu được cao tổng đã làm giàu polyphenol (cao tổng). Mẫu cao tổng được đông khô ở ở nhiệt độ -40 ^{o}C bằng thiết bị đông khô FreeZone 2.5 (Labconco, Hoa Kỳ) tại Viện Hóa học các hợp chất thiên nhiên - Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam. Khối lượng mẫu cao tổng sau khi chiết tách từ 5 kg nguyên liệu lá THV ban đầu là 10 gam. Được bảo quản trong ngăn mát của tủ lạnh và sử dụng cho các nghiên cứu của Luận án.

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

Cốc 1: Cân 0,07 g alginate (AG) cho vào 25 ml nước, khuấy đều hỗn hợp đến tan, sau đó cho từ từ 10 ml dung dịch cao chiết từ lá THV (gọi tắt là CC) được hòa tan trong ethanol với các khối lượng tương ứng được trình bày ở Bảng 2.1. Khuấy hỗn hợp trong 1 giờ, sau đó siêu âm 3 lần, mỗi lần 5 phút.

Cốc 2: Cân 0,03 g chitosan (CS) cho vào 20 ml CH_3COOH 1 %, khuấy đều đến tan.

Đổ từ từ cốc 2 vào cốc 1 kết hợp khuấy từ trong 1 giờ, sau đó siêu âm 3 lần. Sau khi dung dịch ổn định, đổ ra đĩa pettri và để bay hơi tự nhiên trong 48 giờ.

Các mẫu còn lại được chuẩn bị tương tự với tỉ lệ AG/CS cố định là về khối lượng, hàm lượng CC được thêm vào theo các tỉ lệ: 0 %, 5 %, 10 %, 15 % và 20 % tính theo tổng khối lượng của hỗn hợp AG và CS. Các mẫu màng AG/CS/CC với các thành phần khác nhau được tổng hợp ở Bảng 2.1.

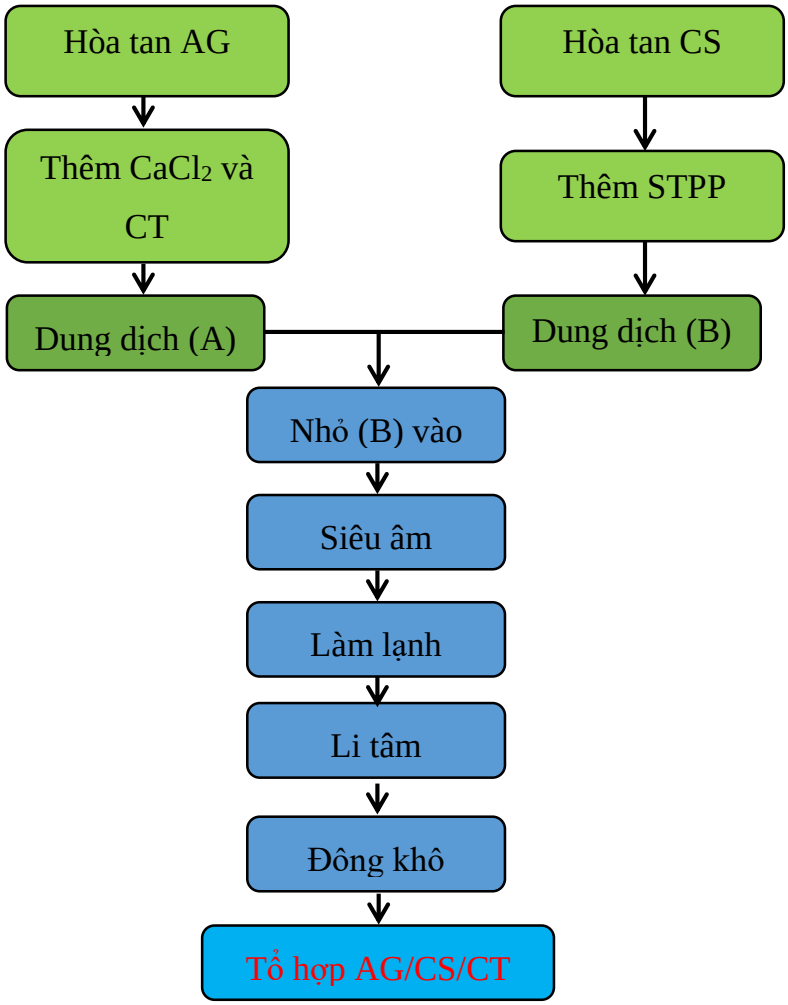
Bảng 2.1. Các mẫu màng tổ hợp AG/CS/CC đã chế tạo

Tỉ lệ khối lượng AG/CS/CC	Khối lượng AG, CS và CC (gram)	Kí hiệu mẫu	Khối lượng sản phẩm (gram)
AG/CS/CC* = /5 %	0,07 : 0,03 : 0,005	AC73CC5	0,105
AG/CS/CC* = /10 %	0,07 : 0,03 : 0,01	AC73CC10	0,110
AG/CS/CC* = /15 %	0,07 : 0,03 : 0,015	AC73CC15	0,115
AG/CS/CC* = /20 %	0,07 : 0,03 : 0,02	AC73CC20	0,120
AG/CS/CC* = /0 %	0,07 : 0,03 : 0,00	AC73CC0	0,100
AG/CS/CC* = 7/0/10 %	0,07 : 0,00 : 0,01	AC70CC10	0,080

**: 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

Quy trình chế tạo tổ hợp hạt alginate/chitosan/cao tổng (AG/CS/CT) từ cao tổng trà hoa vàng (THV) đã được làm giàu hàm lượng polyphenol tổng bằng phương pháp vi nhũ ở quy mô phòng thí nghiệm được trình bày trên Hình 2.3.



Hình 2.3. Quy trình chế tạo vật liệu tổ hợp hạt AG/CS/CT

Cốc 1: Cân 0,08 g AG cho vào 80 ml nước cất, khuấy đều đến tan. Sau đó, cho từ từ lần lượt 10 ml dung dịch $CaCl_2$ 0,002 M và 20 ml dung dịch CT hòa tan trong ethanol với các khối tỷ lệ khối lượng tương ứng được trình bày trong Bảng 2.2. Khuấy đều hỗn hợp trong vòng 1 giờ, sau đó siêu âm 3 lần, mỗi lần 5 phút.

Cốc 2: Cân 0,04 g CS cho vào 80 ml CH_3COOH 1 %, khuấy đều đến tan, tiếp theo cho từ từ 0,02 g sodium tripolyphosphate vào hỗn hợp khuấy từ trong 3 giờ.

Đổ từ từ cốc 2 vào cốc 1 kết hợp khuấy từ trong 2 giờ, sau đó siêu âm 3 lần, kết hợp làm lạnh. Sau khi dung dịch ổn định, tiến hành ly tâm với tốc độ 6000 vòng/phút. Phần lắng được thu lại và tiến hành đông khô ở -40 ^oC bằng thiết bị đông khô FreeZone 2.5 (Labconco, Hoa Kỳ) tại Viện Hóa học các hợp chất thiên nhiên - Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam.

Các mẫu còn lại được chuẩn bị tương tự với tỉ lệ AG/CS cố định là về khối

lượng, hàm lượng CT được thêm vào theo các tỉ lệ: 10 %, 20 %, 30 % và 50 % tính theo tổng khối lượng của hỗn hợp AG và CS. Các mẫu hạt AG/CS/CT với các thành phần khác nhau được thể hiện ở Bảng 2.2.

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	Khối lượng sản phẩm (gram)
AG/CS/CT* = 8/4/10 %	0,08 : 0,04 : 0,012	AG/CS/CT10	0,132
AG/CS/CT * = 8/4/20 %	0,08 : 0,04 : 0,024	AG/CS/CT20	0,144
AG/CS/CT * = 8/4/30 %	0,08 : 0,04 : 0,036	AG/CS/CT30	0,156
AG/CS/CT * = 8/4/50 %	0,08 : 0,04 : 0,06	AG/CS/CT50	0,180

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

2.4. Các phương pháp nghiên cứu

2.4.1. Phương pháp khảo sát thành phần hóa học của cao tổng chiết tách từ lá trà hoa vàng.

Các thí nghiệm sau được thực hiện tại Phòng Hóa lý và vật liệu phi kim loại - Viện Kỹ thuật nhiệt đới - Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam.

Các phản ứng định tính một số nhóm chất đặc trưng chứa trong cao tổng trà hoa vàng được tóm tắt trong Bảng 2.3 [96, 97]

Bảng 2.3. Phản ứng định tính một số nhóm chất đặc trưng chứa trong cao tổng trà hoa vàng

STT	Nhóm chất	Phản ứng định tính	Dấu hiệu nhận biết
1	Alcaloid	Với thuốc thử Mayer	Phản ứng dương tính nếu có kết tủa màu trắng hoặc vàng nhạt.
		Với thuốc thử Bouchardat	Phản ứng dương tính nếu có mà đỏ thẫm.
		Với thuốc thử Dragendorff	Phản ứng dương tính nếu có kết tủa màu da cam.
2	Saponin	Hiện tượng tạo bọt	Phản ứng dương tính nếu thấy tạo bọt khi khuấy.

3	Flavonoid	Phản ứng Shinoda với thuốc thử (Mg/HCl)	Màu đỏ, hồng, da cam xuất hiện chứng tỏ sự có mặt của flavon, flavonol và các dẫn xuất hydro của chúng.
		Phản ứng với dung dịch NaOH 10%	Phản ứng có kết quả dương tính khi xuất hiện màu vàng cam.
		Phản ứng diazo hóa	Phản ứng có kết quả khi xuất hiện màu da cam.
4	Tannin	Phản ứng với dung dịch chì acetate 10%	Phản ứng dương tính nếu kết tủa xuất hiện
		Phản ứng với dung dịch gelatin 1%	Phản ứng dương tính nếu xuất hiện kết tủa.
5	Polyphenol tổng	Phản ứng với dung dịch NaOH 10%	Phản ứng dương tính nếu xuất hiện màu vàng.
		Phản ứng với dung dịch $FeCl_3$/HCl	Phản ứng dương tính nếu xuất hiện màu lục, xanh, đen.

2.4.2. Phương pháp sắc ký bản mỏng (TLC)

Cơ sở phương pháp: Sắc ký lớp mỏng (TLC – thin layr chromatography) là kỹ thuật sắc ký phổ biến vì khá nhanh gọn và tiện lợi. Giúp nhận biết các nhóm chất có trong mẫu cao tổng chiết tách từ lá trà hoa vàng. Với phương pháp sắc ký lớp mỏng tiến hành tại Viện Kỹ thuật nhiệt đới - Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam, thành phần trong hỗn hợp được xác định nhờ so sách hệ số lưu của hỗn hợp (R_f) và hệ số lưu của một số chất đã biết [96].

Nguyên tắc: Kỹ thuật này dựa vào mức độ tương tác của các chất khác nhau trong mẫu cao tổng chiết tách từ lá trà hoa vàng với pha tĩnh lớp mỏng và pha động (hệ dung môi chạy sắc ký).

Một số hệ dung môi được sử dụng:

- Hệ dung môi (TEAF: 5:3:1:1): (Toluen : ethylacetate : acetone : formic acid).
- Toluen : ethylacetate : formic acid = 5:4:1.
- Ethylacetate : formic acid : Nước = 8:1:1.

Hiện màu bằng dung dịch H_2SO_4 10% được phun đều trên lớp mỏng. Xác định hệ số lưu R_f theo công thức: $R_f = a/b$. Trong đó a là khoảng di chuyển của chất nghiên cứu, b là khoảng di chuyển của dung môi.

2.4.3. Định lượng polyphenol tổng theo phương pháp Folin – Denis

Cơ sở phương pháp: Với lá THV, do chưa có phương pháp nào được công bố chính thức để định lượng polyphenol toàn phần nên trong phạm vi nghiên cứu, đề tài áp dụng phương pháp định lượng theo TCVN 9745 - 1:2013 tại Viện Kỹ thuật nhiệt đới - Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam.

Nguyên tắc: Polyphenol có trong mẫu trà được chiết bằng dung môi ethanol ở 60°C. Định lượng polyphenol tổng trong trà bằng phương pháp đo quang, dùng thuốc thử Folin Ciocalteu chứa photpho-vonframic acid, phản ứng xảy ra theo cơ chế oxy hóa - khử. Nhóm hydroxyl trong polyphenol dễ bị oxy hóa, sản phẩm của phản ứng có màu xanh lam của tungsten và molybdenum, độ hấp thụ cực đại ở bước sóng 765 nm. Xây dựng đường chuẩn dựa trên gallic acid [128, 129].

Hàm lượng polyphenol tổng trong mẫu cao chiết và cao tổng được tính theo công thức:

$$m = \frac{A_t . C_c . V_{mẫu} .}{A_c . m_{mẫu}(100 - B) . 10} . (mg \frac{GAE}{gDl})$$

$$\%m = \frac{A_t . C_c . V_{mẫu} .}{A_c . m_{mẫu}(100 - B) . 10.1000} . 100$$

A_t: Giá trị đo quang của mẫu thử.

A_c: Giá trị đo quang của mẫu chuẩn.

C_c: Nồng độ mẫu chuẩn.

$V_{mẫu}$: Thể tích mẫu.

$m_{mẫu}$: Khối lượng mẫu.

B: Độ ẩm mẫu.

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

Phổ hồng ngoại biến đổi Fourier (FT-IR) của vật liệu tổ hợp AG/CS/CC và AG/CS/CT được ghi bằng thiết bị phổ hồng ngoại biến đổi Fourier Nexus 670 (Hoa Kỳ) (Hình 2.4) tại Viện Kỹ thuật nhiệt đới - Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam. Các mẫu được quét phổ ở vùng phổ từ 400 cm^{-1} đến 4000 cm^{-1}, với độ phân giải 8 cm^{-1}, số lần quét là 3240 lần. Phổ FT-IR được ghi dưới dạng đường cong sau khi đã bù trừ phổ nền của không khí (khi ghi phổ ở dạng màng) hoặc nền KBr (khi ghi phổ ở dạng hạt).

Hình 2.4. Thiết bị phổ hồng ngoại NEXUS 670 (Hoa Kỳ)

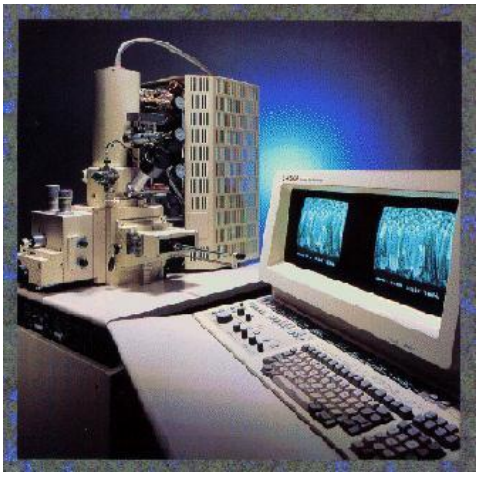
2.4.5. Phương pháp xác định phân bố kích thước hạt

Các hạt tổ hợp AG/CS mang CC hoặc CT được xác định phân bố kích thước hạt trên thiết bị Zetasizer Ver 620 (Hình 2.5) tại Viện Khoa học vật liệu - Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam. Thiết bị dùng một hệ quang học gồm 1 nguồn sáng laser rắn bán dẫn có bước sóng 32 nm và công suất 10 mW, dải đo kích thước 0,6 nm – 6 µm, dải đo thế zeta từ -200 mV đến +200 mV.

Hình 2.5. Thiết bị phân tích kích thước hạt Zetasizer

2.4.6. Phương pháp hiển vi điện tử quét

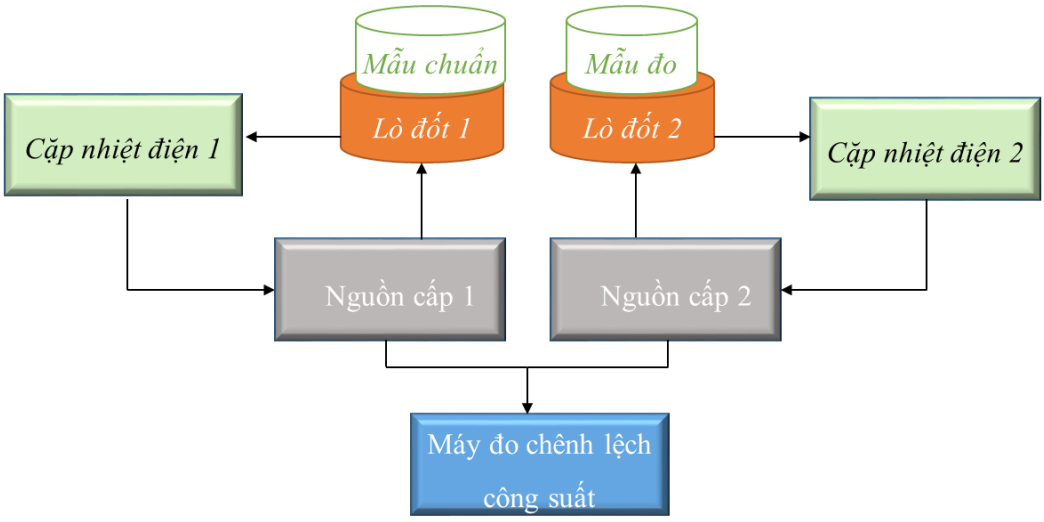
Hình thái, cấu trúc của vật liệu được quan sát và ghi ảnh trên thiết bị hiển vi điện tử quét trường phát xạ (FESEM) (FESEM S - 4800, Hitachi, Nhật Bản) (Hình 2.6) trong môi trường khí trơ tại Viện Vệ sinh dịch tễ Trung ương và Viện Khoa học vật liệu - Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam. Trước khi tiến hành, mẫu được phủ một lớp platinum mỏng để không bị tích điện trên bề mặt mẫu.



Hình 2.6. Thiết bị hiển vi điện tử quét phát xạ trường (FESEM)

2.4.7. Phương pháp nhiệt lượng quét vi sai (DSC)

Tính chất nhiệt của màng tổ hợp và hạt tổ hợp AG/CS/CC và AG/CS/CT được xác định trên thiết bị DSC - 60 (Nhật Bản) (Hình 2.7) tại Khoa Hóa học, Trường Đại học Sư phạm Hà Nội với tốc độ gia nhiệt 10 °C/phút trong môi trường khí trơ từ nhiệt độ phòng tới 600 °C.



Hình 2.7. Sơ đồ khối của hệ thiết bị DSC

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

Khi chiếu một chùm sáng có bước sóng phù hợp đi qua một dung dịch chất màu, các phân tử hấp thụ sẽ hấp thụ một phần năng lượng chùm sáng, một phần ánh sáng truyền qua dung dịch. Xác định cường độ chùm ánh sáng truyền qua đó ta có thể xác định được nồng độ của dung dịch.

Cường độ của tia đơn sắc trước và sau khi đi qua môi trường hấp thụ được liên hệ với nhau bởi định luật Lambert-Beer.

$$A = -\log(I/I_0) = \varepsilon.l.C$$

Với: A: Mật độ quang.

C: Nồng độ (mol/lít).

l: Chiều dài lớp dung dịch (chiều dày cuvet đựng mẫu), (cm).

ε: Hệ số hấp thu phân tử có thứ nguyên hay hệ số hấp thu mol đặc trưng cho cường độ hấp thu của chất nghiên cứu ở bước sóng đã cho (l/mol.cm).

I: cường độ chùm sáng đi qua dung dịch.

I_o: cường độ chùm sáng đi qua dung môi.

Phương pháp phổ UV-Vis được áp dụng để xác định định tính (nhận biết chất), xác định định lượng, xác định cấu trúc, nghiên cứu phức chất (xác định thành phần, hằng số bền), hệ số hấp thu phân tử... Vùng bức xạ được sử dụng gồm vùng tử ngoại (UV) 200 - 400 nm và vùng khả kiến (Vis) 400 - 800 nm. Hiệu suất mang cao, đường chuẩn và hàm lượng cao giải phóng ra theo thời gian thử nghiệm trong các dung dịch pH khác nhau của màng vật liệu AG/CS/CC và hạt tổ hợp AG/CS/CT được tiến hành trên thiết bị phổ UV-Vis (Cintra 40, GBC, Hoa Kỳ) (Hình 2.8) ở bước sóng từ 200 nm đến 400 nm tại Viện Kỹ thuật nhiệt đới - Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam. Số liệu được xử lí bằng phần mềm (Excel 2016) để xây dựng các phương trình đường chuẩn phụ thuộc mật độ quang và nồng độ của cao trong các dung dịch pH khác nhau.

Hình 2.8. Thiết bị phổ UV-Vis (Cintra 40, GBC, Hoa Kỳ)

2.4.9. Các phương pháp phân tích định lượng

Xây dựng đường chuẩn của CC và CT trong các dung dịch pH khác nhau:

Quá trình giải phóng cao từ vật liệu tổ hợp trong các dung dịch có pH khác nhau được mô phỏng tương tự như trong các dịch của các cơ quan tiêu hóa điển hình trong cơ thể người như:

pH 2: tương ứng với phần dưới dạ dày - nơi thuốc được lưu lại từ 1 đến 3 giờ.

pH 4,5: tương ứng với phần trên của dạ dày - nơi thuốc được lưu lại từ 30 đến 60 phút; tương ứng với ruột non - nơi thuốc ở lại từ 1 đến 5 giờ và ruột già - nơi thuốc ở lại 10 giờ.

pH 6,8: tương ứng với vùng đại tràng trong cơ thể - nơi thuốc được lưu lại từ 10 đến 15 giờ.

pH 7,4: tương ứng với vùng tá tràng trong cơ thể - nơi thuốc được lưu lại từ 30 đến 60 phút.

Các bước tiến hành: cân 0,015 g CC, cho vào cốc chứa 200 ml dung dịch đệm ở các pH khác nhau và khuấy từ liên tục trong 48 giờ với tốc độ 500 vòng/phút. Sau 48 giờ, lọc bỏ phần CC không tan và ghi phổ UV - Vis của dung dịch CC ở các nồng độ khác nhau bằng phương pháp pha loãng. Bước sóng hấp thụ cực đại (λ_{max}) của CC trong các môi trường dung dịch pH: 2,0; 4,5; 6,8 và 7,4 lần lượt là 226 nm, 233 nm, 227nm và 231 nm. Mật độ quang theo nồng độ của CC trong các môi trường pH khác nhau được thống kê trên Bảng 2.4.

Bảng 2.4. Mật độ quang (A) ứng với các nồng độ pha loãng (C) của CC trong các dung dịch pH khác nhau

Mẫu	V dung dịch thêm vào (ml)	C (g/ml)	Mật độ quang A trong các môi trường			
			pH 2	pH 4,5	pH 6,8	pH 7,4
1	0	$7{,}50.10^{-5}$	1,020	0,839	0,873	1,093
2	2	$6{,}25.\ 10^{-5}$	0,864	0,707	0,752	0,897
3	4	$5{,}36.\ 10^{-5}$	0,741	0,619	0,677	0,777
4	6	$4{,}69.\ 10^{-5}$	0,660	0,550	0,610	0,698
5	8	$4{,}17.\ 10^{-5}$	0,604	0,491	0,555	0,611
6	10	$3{,}75.\ 10^{-5}$	0,551	0,458	0,505	0,550
7	12	$3{,}41.\ 10^{-5}$	0,506	0,417	0,471	0,507
8	14	$3{,}13.\ 10^{-5}$	0,460	0,375	0,415	0,473
9	16	$2{,}88.\ 10^{-5}$	0,427	0,337	0,384	0,445
10	18	$2{,}67.\ 10^{-5}$	0,409	0,304	0,360	0,403
11	20	$2{,}50.\ 10^{-5}$	0,388	0,289	0,338	0,365

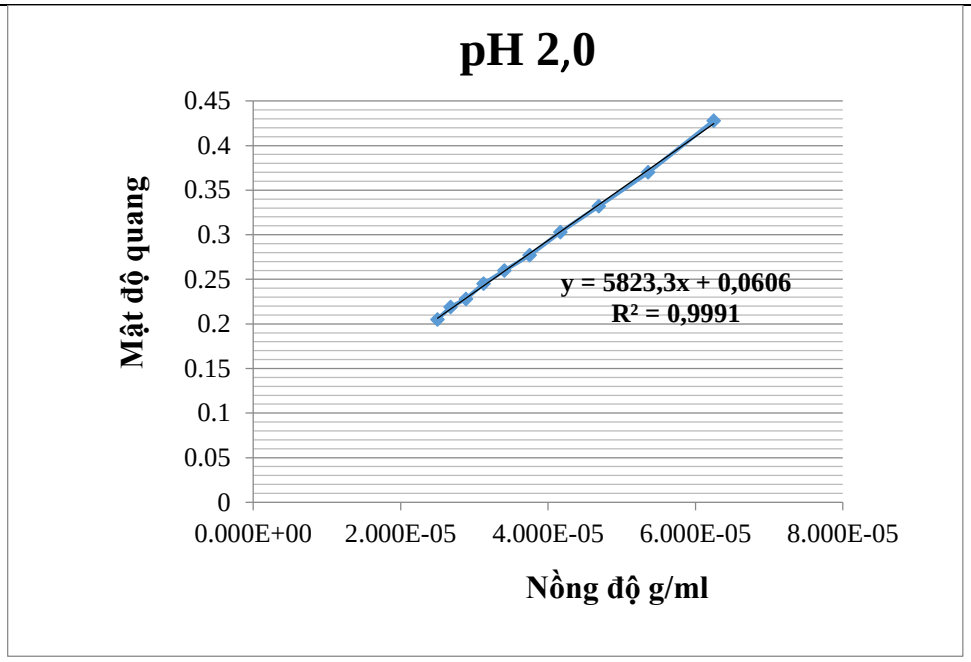
Số liệu trong (Bảng 2.4) được xử lý bằng phần mềm (Excel 2016). Các phương trình đường chuẩn của CC trong các dung dịch với pH khác nhau có các hệ số hồi quy tương ứng được thống kê ở Bảng 2.5.

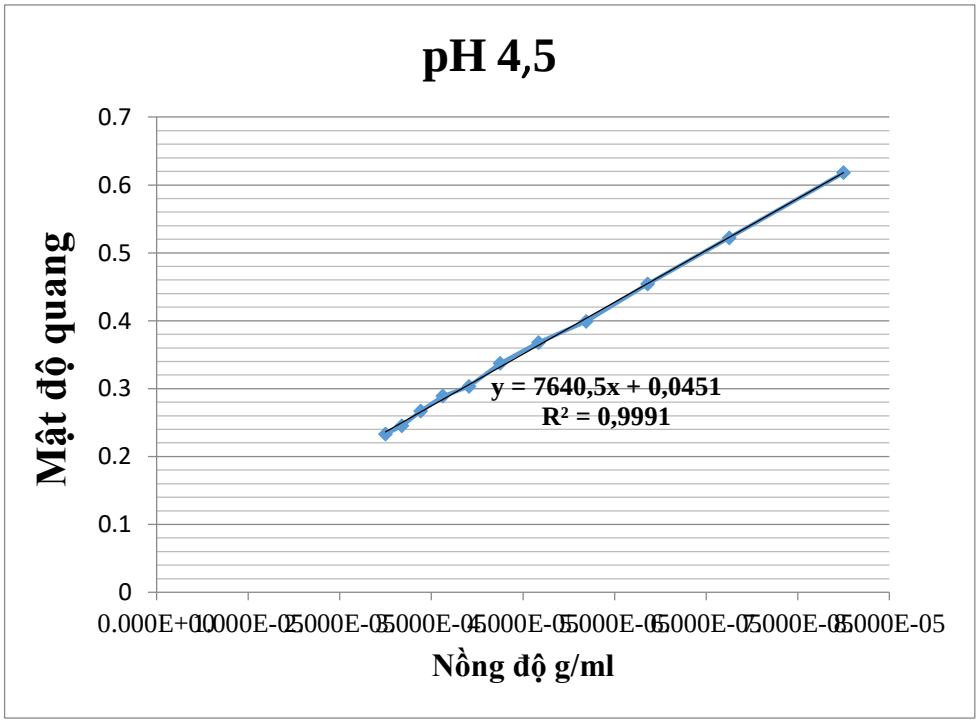
Bảng 2.5. Phương trình đường chuẩn và hệ số hồi quy (R^2) của CC trong các môi trường dung dịch pH khác nhau

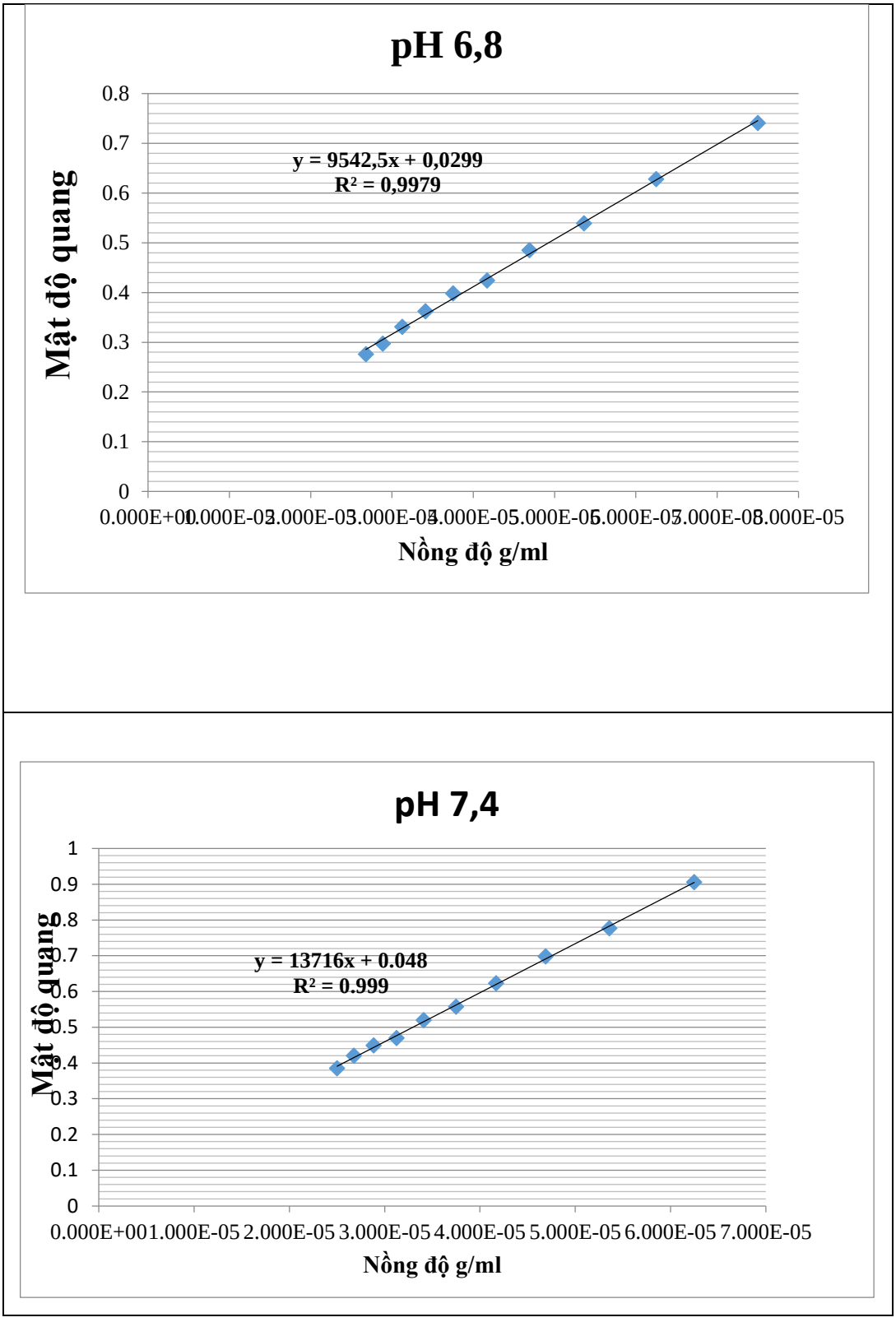
Dung dịch	λ_{max}	Phương trình đường chuẩn	R^2
pH 2	226	y = 12709x + 0,0673	0,9996
pH 4,5	233	y = 10916x + 0,0300	0,9954
pH 6,8	227	y = 13453x + 0,0394	0,9957
pH 7,4	231	y = 13940x + 0,0315	0,9977

Trong đó, x và y lần lượt là nồng độ (C) và độ hấp thụ quang (A) của CC trong các dung dịch pH khác nhau. Kết quả thu được cho thấy các giá trị hệ số hồi quy của các phương trình đường chuẩn CC trong Bảng 2.5 đều lớn hơn 0,995. Vì vậy, các phương trình đường chuẩn này được áp dụng để xác định hàm lượng CC được giải phóng từ tổ hợp màng AG/CS/CC trong các dung dịch pH khác nhau.

Xây dựng phương trình đường chuẩn của CT hoàn toàn tương tự như CC. Kết quả thu được (λ_{max}) và phương trình đường chuẩn của CT trong các dung dịch pH khác nhau và hệ số hồi quy tương ứng được trình bày ở Hình 2.9 và Bảng 2.6.


pH 2,0
Mật độ quang
0.45
0.4
0.35
0.3
0.25
0.2
0.15
0.1
0.05
0
y = 5823,3x + 0,0606
R² = 0,9991
0.000E+00
2.000E-05
4.000E-05
6.000E-05
8.000E-05
Nồng độ g/ml


pH 4,5
Mật độ quang
0.7
0.6
0.5
0.4
0.3
0.2
0.1
0
y = 7640,5x + 0,0451
R² = 0,9991
Nồng độ g/ml



Hình 2. 9. Đồ thị đường chuẩn CT trong các dung dịch pH: 2,0; 4,5; 6,8 và 7,4

Bảng 2.6. Phương trình đường chuẩn và hệ số hồi quy (R^2) của CT trong các dung dịch pH khác nhau.

Dung dịch	λ_{max}	Phương trình đường chuẩn	R^2
pH 2	222	y = 5823,3x + 0,0606	0,9991
pH 4,5	233	y = 7640,5x + 0,0451	0,9991
pH 6,8	225	y = 9542,5x + 0,0299	0,9979
pH 7,4	226	y = 13716x + 0,0480	0,9990

Các phương trình đường chuẩn ở (Bảng 2.6) được sử dụng để xác định hàm lượng CT giải phóng từ tổ hợp hạt AG/CS/CT trong các dung dịch pH khác nhau.

Xác định hiệu suất mang CC và CT của vật liệu tổ hợp AG/CS:

Tương tự như xây dựng đường chuẩn của CC và CT trong các dung dịch pH khác nhau, đường chuẩn của CC và CT cũng được xây dựng trong dung môi ethanol để xác định hiệu suất mang CC và CT từ vật liệu tổ hợp AG/CS. Ghi phổ UV - Vis các dung dịch của CC và CT được pha loãng theo các nồng độ khác nhau và sử dụng phần mềm Excel để xử lý số liệu. Kết quả thu được trong dung môi ethanol CC và CT có bước sóng hấp thụ cực đại λ_{max} là 233,55 nm và 234,67 nm. Phương trình đường chuẩn của CC trong ethanol là y = 1492x + 0,3981 với hệ số hồi quy R^2 = 0,9957, trong đó, y là mật độ quang (A), x là nồng độ (C). Phương trình đường chuẩn của CT trong ethanol là y = 3513,8x + 0,0023 với hệ số hồi quy R^2 = 0,9951, trong đó, y là mật độ quang (A), x là nồng độ (C).

Các bước tiến hành: Vật liệu tổ hợp AG/CS mang CC và CT được sấy chân không ở 40^{o}C trong 8 giờ. Hòa tan chính xác 0,1 gram mẫu CC và CT trong 200 mL ethanol thích hợp trong 8 giờ để CC và CT trong mẫu hòa tan hoàn toàn vào ethanol. Lọc dung dịch và ghi phổ UV-Vis tại bước sóng cực đại tương ứng với CC và CT. Khối lượng CC và CT mang bởi tổ hợp AG/CS được xử lý bằng phần mềm (Excel 2016) sử dụng đường chuẩn của CC và CT trong ethanol. Hiệu suất mang CC và CT của vật liệu tổ hợp AG/CS được tính theo công thức sau:

$$Hiệu\ suất\ mang\ thuốc\ (\%) = \frac{Khối\ lượng\ thuốc\ được\ mang}{Khối\ lượng\ thuốc\ ban\ đầu}.100\ \%$$

Thử nghiệm giải phóng CC và CT từ vật liệu tổ hợp AG/CS mang CC và CT theo thời gian:

Quá trình giải phóng *in vitro* CC và CT từ vật liệu tổ hợp AG/CS/CC và AG/CS/CT được thực hiện trong các dung dịch pH khác nhau.

Cân chính xác 0,1 gram vật liệu tổ hợp AG/CS/CC và AG/CS/CT đưa vào bình chứa 200 ml dung dịch đệm ở 37 ^oC. Khuấy hỗn hợp bằng máy khuấy từ với tốc độ 4000 vòng/phút. Cứ sau mỗi giờ khuấy từ, hút chính xác 5 ml dung dịch đồng thời bù 5 ml dung dịch đệm để duy trì thể tích dung dịch. Dung dịch sau khi lọc được đo mật độ quang ở bước sóng λ_{max} đã xác định từ phương trình đường chuẩn đối với từng dung dịch pH khác nhau. Thử nghiệm giải phóng CC và CT được tiến hành trong 32 giờ liên tục. Phần trăm CC và CT giải phóng tại các thời điểm được chọn và tính theo công thức sau:

$$\%\ CC = \frac{Khối\ lượng\ CC\ giải\ phóng\ tại\ thời\ điểm\ t}{Khối\ lượng\ CC\ ban\ đầu}.100\ \%$$

$$\%\ CT = \frac{Khối\ lượng\ CT\ giải\ phóng\ tại\ thời\ điểm\ t}{Khối\ lượng\ CT\ ban\ đầu}.100\ \%$$

** Xây dựng phương trình động học giải phóng CC và CT từ tổ hợp AG/CS/CC và AG/CS/CT trong các dung dịch pH khác nhau:*

Phân tích quá trình giải phóng CC, CT từ tổ hợp AG/CS/CC, AG/CS/CT được mô tả bằng phương trình động học giải phóng. Một loạt mô hình động học liên quan đến quá trình giải phóng CC, CT được lựa chọn từ các phương trình toán học quan trọng nhất. Tuy nhiên, cơ chế giải phóng CC, CT phụ thuộc vào nồng độ, pH, bản chất của CC, CT và AG, CS. Các mô hình động học giải phóng phổ biến là [130]:

(i) Động học bậc không: $W_t = W_o + K_1.\ t$

(ii) Động học bậc 1: $\log C = \log C_o - K_2.\ t / 2{,}303$

(iii) Phương trình Higuchi: $W = K_3.\ t^{1/2}$

(iv) Phương trình Hixson – Crowell: $W_o^{1/3} – W_t^{1/3} = K_4.\ t$

(v) Phương trình định luật năng lượng Korsmeyer-Peppas:

$$\frac{M_t}{M_\infty} = K_5 . t^n$$

Trong đó:

t: thời gian giải phóng CC, CT.

M_t/M_∞: là phần CC, CT giải phóng vào môi trường hòa tan.

K_5: là hằng số đặc trưng cho hệ CC, CT - polymer.

n: là hằng số khuếch tán, đặc trưng cho cơ chế giải phóng dược chất.

W_t: lượng CC, CT giải phóng ở thời điểm t.

W_0: lượng CC, CT ở thời điểm ban đầu.

K_1, K_2, K_3, K_4: hằng số tốc độ phản ứng.

C: nồng độ CC, CT ở thời điểm t.

C_o: nồng độ CC, CT ban đầu.

Động học bậc 0 cho thấy quá trình giải phóng CC, CT ra khỏi hệ là bất biến, không phụ thuộc vào nồng độ của nó trong hệ. Động học bậc 1 cho thấy quá trình giải phóng CC, CT ra khỏi hệ là sự tuyến tính với nồng độ của CC, CT trong hệ. Mô hình động học Hixon - Crowell cho thấy khả năng CC, CT bị hòa tan khi có sự thay đổi diện tích bề mặt hệ mang CC, CT. Mô hình động học Higuhi cho thấy quá trình dược chất giải phóng theo công thức phần trăm dược chất giải phóng tỉ lệ thuận với căn bậc 2 thời gian và phụ thuộc vào sự khuếch tán của CC, CT ra khỏi hệ. Mô hình động học Korsmeyer Peppas mô tả cơ chế giải phóng CC, CT từ hệ polymer có thể tuân theo định luật khuếch tán Fick (loại I) hoặc cơ chế không Fick (cơ chế Fick II), cho thấy có nhiều hơn một loại hiện tượng trong quá trình giải phóng thuốc [131, 132]. Khi $n \leq 0,5$, sự giải phóng dược chất tuân theo định luật khuếch tán Fick. Khi $n > 0,5$, sự giải phóng dược chất là bất qui tắc (không tuân theo định luật khuếch tán Fick). Khi $n = 1$, giải phóng dược chất không tuân theo định luật Fick mà tuân theo động học bậc một hoặc động học bậc không.

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

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

Phương pháp xác định tính độc tế bào (cytotoxic assay) đối với tế bào nuôi cấy dạng đơn lớp:

Phương pháp thử độ độc tế bào *in vitro* được Viện Ung thư Quốc gia Hoa Kỳ

(National Cancer Institute – NCI) xác nhận là phép thử độ độc tế bào chuẩn nhằm sàng lọc, phát hiện các chất có khả năng kìm hãm sự phát triển hoặc diệt tế bào ung thư (TBUT), tế bào thận gốc phôi ở người (HEK-293A) ở điều kiện *in vitro*. Phép thử này được thực hiện theo phương pháp của Skekan và cộng sự (1990). Phép thử tiến hành xác định hàm lượng protein tế bào tổng số dựa vào mật độ quang học (OD – Optical Density) đo được khi thành phần protein của tế bào được nhuộm bằng Sulforhodamine B (SRB). Giá trị OD máy đo được tỉ lệ thuận với lượng SRB gắn với phân tử protein, do đó lượng tế bào càng nhiều (lượng protein càng nhiều) thì giá trị OD càng lớn. Phép thử được thực hiện trong điều kiện cụ thể như sau:

Trypsin hóa tế bào thí nghiệm để làm rời tế bào và đếm trong buồng đếm để điều chỉnh mật độ cho phù hợp với thí nghiệm.

Chất thử đã pha ở các nồng độ được đưa vào các giếng của đĩa 96 giếng. Giếng không có chất thử nhưng có TBUT (190 μL) sẽ được sử dụng làm đối chứng ngày 0. Sau 1 giờ, giếng đối chứng ngày 0 tế bào sẽ được cố định bằng Trichloracetic acid – TCA 20 %.

Ủ trong tủ ấm 72 giờ. Sau 72 giờ, tế bào được cố định bằng TCA trong 1 giờ, được nhuộm bằng SRB trong 30 phút ở 37 ^{o}C, rửa 3 lần bằng acetic acid rồi để khô ở nhiệt độ phòng.

10 mM unbuffered tris base để hòa tan lượng SRB, lắc nhẹ trong 10 phút rồi đọc kết quả OD ở bước sóng 540 nm trên máy Elisa Plate Reader (Biotek).

Phần trăm ức chế sự phát triển của tế bào khi có mặt chất thử sẽ được xác định thông qua công thức sau:

$$\%\ \text{ức chế}\ = 100\% - \frac{OD(mẫu) - OD(ngày\ 0)}{OD(DMSO) - OD(ngày\ 0)}$$

Phép thử được lặp lại 3 lần để đảm bảo tính chính xác. Ellipticine ở các nồng độ 10 μg/ml; 2 μg/ml; 0,4 μg/ml; 0,08 μg/ml được sử dụng như là chất đối chứng tham khảo.

DMSO 1 % luôn được sử dụng như đối chứng âm. Giá trị IC_{50} (nồng độ ức chế 50 % sự phát triển) sẽ được xác định nhờ vào phần mềm máy tính TableCurve 2Dv4.

Theo tiêu chuẩn của Viện Ung thư Quốc gia Hoa Kỳ (NCI), cặn chiết được

coi có hoạt tính tốt với $IC_{50} \leq 20$ µg/ml, trong khi chất tinh khiết được coi có hoạt tính tốt khi $IC_{50} \leq 5$ µM [Hughes JP, (2011)].

Phương pháp xác định tính độc tế bào (cytotoxic assay) đối với tế bào nuôi cấy dạng đơn lớp được thực hiện tại phòng thử nghiệm Sinh học Viện Công nghệ Sinh học - Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam.

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

Nguyên tắc của phương pháp:

Hoạt tính chống oxy hóa của mẫu được xác định thông qua phản ứng quét/bắt gốc tự do (DPPH). Phản ứng được tiến hành theo phương pháp của Kai Marxen và cộng sự (2007) [133], dựa trên nguyên tắc 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) có khả năng tạo ra các gốc tự do bền trong dung môi ethanol (EtOH) bão hoà. Khi cho các chất thử nghiệm vào dung dịch này, nếu chất có khả năng làm trung hoà hoặc quét/bắt các gốc tự do sẽ làm giảm cường độ hấp thụ ánh sáng của các gốc tự do DPPH. Hoạt tính chống oxy hoá được đánh giá thông qua giá trị hấp thụ ánh sáng của dịch thí nghiệm so với đối chứng khi đọc trên máy Elisa ở bước sóng 515 nm.

Cách tiến hành:

Pha dung dịch DPPH có nồng độ 1mM trong ethanol (EtOH). Chất thử được pha trong DMSO 100 % sao cho nồng độ cuối cùng đạt được một dãy các nồng độ 256 µg/ml; 64 µg/ml; 16 µg/ml; 4 µg/ml và 1 µg/ml. Để thời gian phản ứng 30 phút ở 37 ^{0}C, đọc mật độ hấp phụ của DPPH chưa phản ứng bằng máy đọc Biotek ở bước sóng 517 nm.

% bẫy gốc tự do DPPH của mẫu thử được tính theo công thức sau:

$$\mathbf{SC\% = (OD_{trắng} - OD_{mẫu\ thử}) / OD_{trắng}\ (\%).}$$

EC_{50} được tính theo giá trị SC tương quan với các nồng độ khác nhau của chất thử, thí nghiệm được lặp lại với n = 3.

Phương pháp đánh giá hoạt tính chống oxy hóa của mẫu được xác định thông qua phản ứng quét/bắt gốc tự do (DPPH) được thực hiện tại phòng thử nghiệm Sinh học Viện Công nghệ Sinh học - Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam.

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

Phương pháp nuôi cấy tế bào in vitro:

Dòng tế bào RAW 264.7 được nuôi cấy trong môi trường DMEM với thành phần kèm theo gồm 2 mM L-glutamine, 10 mM HEPES, và 1,0 mM sodium pyruvate, ngoài ra bổ sung 10 % fetal bovine serum – FBS (GIBCO).

Tế bào được cấy chuyển sau 3-5 ngày với tỉ lệ (1:3) và nuôi trong tủ ấm CO_2 ở điều kiện 37 ^oC, 5 % CO_2

Phương pháp xác định khả năng ức chế sản sinh NO của tế bào macrophage RAW 264.7:

Phương pháp xác định khả năng ức chế sản sinh NO của tế bào macrophage RAW 264.7 được thực hiện tại phòng thử nghiệm Sinh học Viện Công nghệ Sinh học - Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam.

Tế bào RAW 274.7 được đưa vào đĩa 96 giếng ở nồng độ 2 x 105 tế bào/giếng và nuôi trong tủ ấm ở 37 ^oC và 5 % CO_2 trong 24 giờ.

Tiếp theo, môi trường nuôi cấy được loại bỏ, thay bằng môi trường DMEM không có FBS trong 3 giờ.

Tế bào sau đó được ủ mẫu nghiên cứu ở các nồng độ khác nhau trong 2 giờ trước khi được kích thích sản sinh yếu tố NO bằng LPS (1µg/ml) trong 24 giờ.

Một số giếng không được ủ mẫu mà chỉ sử dụng dung dịch pha mẫu được coi là đối chứng âm. Trong khi đối chứng dương được sử dụng là NG-Methyl-Larginine acetate (L-NMMA) (Sigma) ở các nồng độ 100 µg/ml; 20 µg/ml; 4 µg/ml và 0,8 µg/ml.

Nitrite (NO_2^-), được xem là chỉ thị cho việc tạo NO, sẽ được xác định nhờ bộ Griess Reagent System (Promega Cooperation, WI, USA). Cụ thể là, 100 µL môi trường nuôi tế bào (ủ mẫu) được chuyển sang đĩa 96 mới và được thêm vào 100 µL Griess reagent: 50 µL of 1 % (khối lượng/thể tích) sulfanilamide trong 5 % (thể tích/thể tích) phosphoric acid và 50 µL 0,1 % (khối lượng/thể tích) N-1-naphthylethylenediamine dihydrochloride pha trong nước.

Hỗn hợp này được ủ tiếp ở nhiệt độ phòng trong 10 phút và hàm lượng nitrite sẽ được đo bằng máy microplate reader ở bước sóng 540 nm. Môi trường DMEM không FBS được sử dụng như giếng trắng (blank).

Hàm lượng nitrite của từng mẫu thí nghiệm được xác định nhờ vào đường cong hàm lượng chuẩn $NaNO_2$ và được so sánh % với mẫu chứng âm (LPS).

Khả năng ức chế sản sinh NO của mẫu được xác định nhờ công thức:

% ức chế =100 - [hàm lượng NO_{sample}/hàm lượng NO_{LPS}] x 100

Phép thử được lặp lại 3 lần để đảm bảo tính chính xác. Giá trị IC_{50} (nồng độ ức chế 50 % sự hình thành NO) sẽ được xác định nhờ vào phần mềm máy tính TableCurve 2Dv4.

CHƯƠNG 3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

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

3.1.1. Kết quả định tính một số hợp chất tự nhiên có trong cao chiết và cao tổng trà hoa vàng

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

Định tính một số hợp chất tự nhiên có trong mẫu cao chiết và cao tổng trà hoa vàng

Bảng 3.1. Kết quả định tính các hợp chất tự nhiên trong mẫu cao chiết và cao tổng trà hoa vàng

Nhóm chất	***Thuốc thử***	***Mẫu***	
		Cao chiết	***Cao tổng***
Alcaloid	Với thuốc thử Mayer	++	+++
	Với thuốc thử Bouchardat	+	++
	Với thuốc thử Dragendorff	++	+++
Saponin	Hiện tượng tạo bọt	+++	+++
Flavonoid	Phản ứng Shinoda với thuốc thử (Mg/HCl)	+++	+++
	Phản ứng với dung dịch NaOH 10%	++	++
	Phản ứng diazo hóa	+	++
Tannin	Phản ứng với dung dịch chì acetate 10%	++	++
	Phản ứng với dung dịch gelatin 1%	++	+
Polyphenol tổng	Phản ứng với dung dịch NaOH 10%	++	+++
	Phản ứng với dung dịch $FeCl_3$/HCl	+++	+++

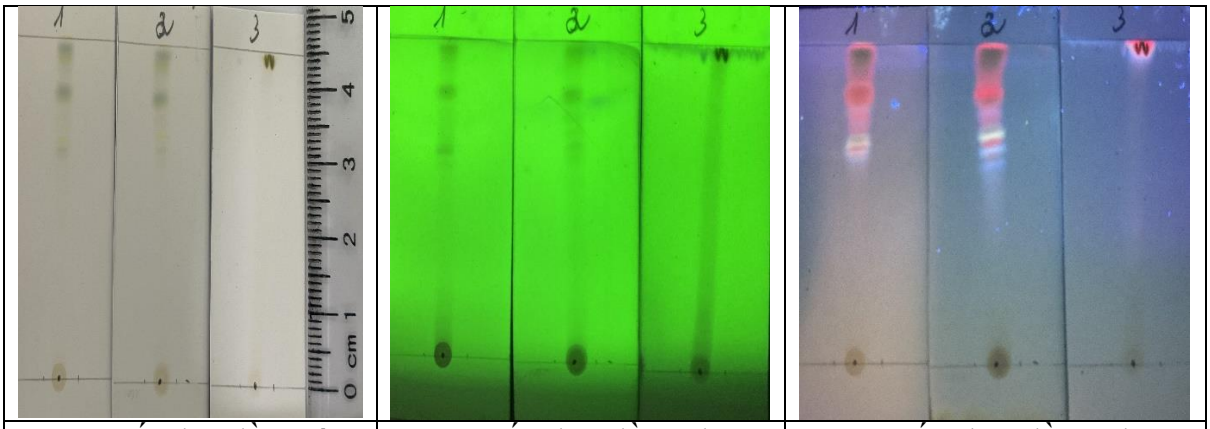
Ghi chú: *(+): Các mức phản ứng dương tính.*

Mức độ phản ứng biểu thị bằng số lượng dấu (+).

Kết quả định tính thể hiện trong Bảng 3.1 cho thấy, 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: alcaloid, saponin, flavonoid, tannin và polyphenol tổng. Tất cả các mẫu đều cho kết quả dương tính với thuốc thử. Các mức độ thể hiện kết quả thí nghiệm phản ánh hàm lượng các thành phần hợp chất có trong mẫu. Tuy nhiên, với các thuốc thử khác nhau thì kết quả định tính cũng có khác nhau.

Phân tích thành phần các hợp chất tự nhiên trong cao tổng trà hoa vàng bằng phương pháp sắc ký lớp mỏng

Bản mỏng tráng sẵn silicagel Merck Alufolien 60 F_{254} với 3 hệ dung môi được thăm dò với các mức độ phân cực khác nhau. Bản mỏng cao tổng sau khi cho chạy qua các hệ dung môi, lấy ra để khô sau đó quan sát ở các điều kiện khác nhau (Hình 3.1) sử dụng chất hiện màu là dung dịch H_2SO_4 10 %.



a. Sắc ký đồ ở ánh sáng thường trước khi phun thuốc thử	*b.* Sắc ký đồ ở bước sóng 254 nm trước khi phun thuốc thử	*c.* Sắc ký đồ ở bước sóng 254 nm sau khi phun thuốc thử

Hình 3.1. Sắc ký đồ cao tổng trà hoa vàng trong các hệ dung môi khác nhau

1. Hệ dung môi (TEAF: 5:3:1:1) : (toluen – ethylacetate – acetone - formic acid).
2. Toluen : ethylacetate : formic acid = 5:4:1.
3. Ethylacetate : formic acid : nước = 8:1:1.

Sắc ký đồ trên Hình 3.1 cho thấy xuất hiện nhiều băng vạch có màu sắc khác nhau. Hệ dung môi ít phân cực (TEAF: 5:3:1:1): (toluen - ethylacetate - acetone - formic acid) và toluene : ethylacetate : formic acid = 5:4:1 cho thấy các vết tách ra rõ rệt và màu sắc rõ ràng hơn so với hệ dung môi ethylacetate : formic acid : nước =

8:1:1 có mức độ phân cực cao hơn. Hệ toluene : ethylacetate : formic acid = 5:4:1 xuất hiện nhiều băng vạch có màu sắc rõ ràng nhất so với 2 hệ dung môi còn lại.

Quan sát màu sắc các băng vạch, kết hợp đối chiếu, so sánh với các nghiên cứu về polyphenol thiên nhiên khác có thể nhận thấy: 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 [98, 99]. Từ các kết quả phân tích thành phần các hợp chất polyphenol trong mẫu CT cho thấy, CT chứa nhiều thành phần polyphenol phong phú và hàm lượng polyphenol khá cao.

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

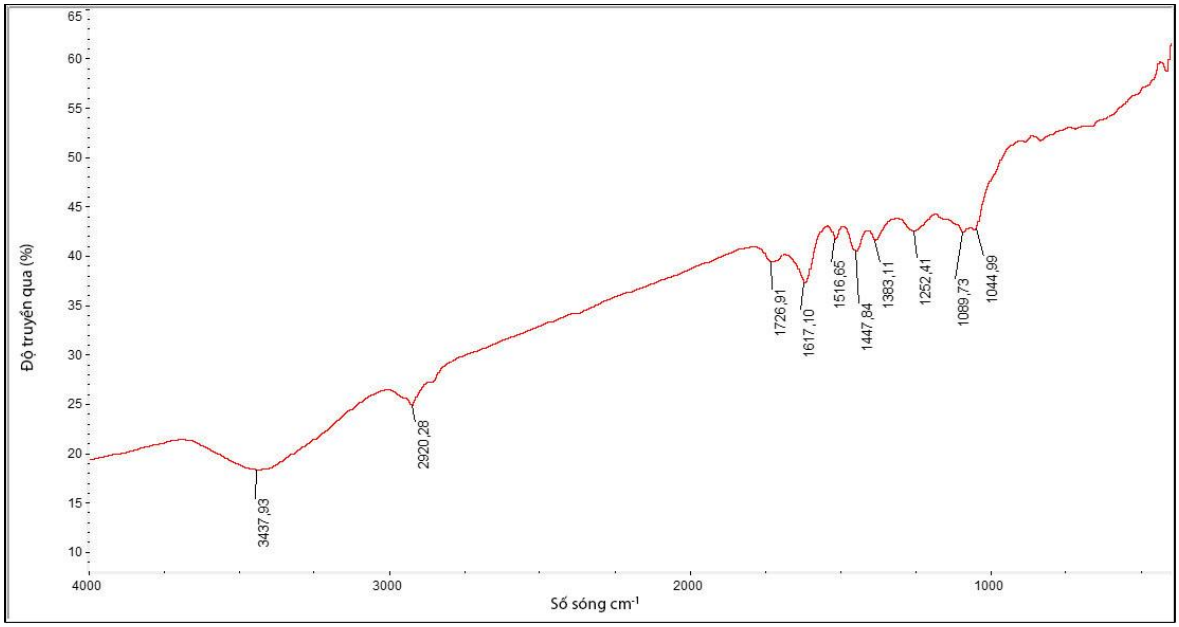
Hàm lượng polyphenol tổng trong CC và mẫu cao CT được xác định theo phương pháp Folin – Denis theo TCVN: 9745 – 1 : 2013 (phụ lục 1 và phụ lục 2).

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 %. Cùng đối tượng và phương pháp nghiên cứu, mẫu THV thu hái tại huyện Ba Chẽ, tỉnh Quảng Ninh [135] có hàm lượng polyphenol tổng đạt 6,943 %, cao hơn gấp 1,46 lần so với mẫu THV thu hái tại huyện Tam Đảo, tỉnh Vĩnh Phúc. Điều này cho thấy các yếu tố về vị trí địa lí, thổ nhưỡng, không khí… có ảnh hưởng đáng kể đến hàm lượng polyphenol [93, 98]. Thành phần hóa học và tác dụng sinh học của THV đã thu hút sự chú ý của các nhà khoa học, các nghiên cứu chỉ ra rằng THV còn chứa nhiều thành phần hóa học có hoạt tính sinh học khác như: flavonoid, saponin, polysacarit, acid amine… Tuy nhiên, nổi trội hơn cả là các polyphenol trong THV [102]. Từ đó, nhằm mục đích loại bỏ bớt các tạp chất chứa trong mẫu cao chiết và phát huy hiệu quả tác dụng của các polyphenol trong THV khi được mang bởi các tổ hợp polymer AG và CS. Hàm lượng polyphenol tổng (CT) được làm giàu đạt giá trị 300,25 mg/g (GAE/CT) hoặc 30,25 % tính theo đơn vị %. Quy trình làm giàu hàm lượng polyphenol tổng (Hình 2.2) đã làm tăng hàm lượng CT trong THV lên gấp 6,35 lần so với CC.

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

Dựa vào phổ FTIR của CC (Hình 3.2), có thể thấy: các dao động hóa trị của các liên kết O–H và C–H trong CC lần lượt xuất hiện ở các sóng 3427 cm^{-1} và 2920 cm^{-1}. Bên cạnh đó, còn có các dao động biến dạng của nhóm –CH và $–CH_3$ trong CC xuất hiện ở 1447 cm^{-1} và 1383 cm^{-1}. Vân phổ ở vị trí sóng 1726 cm^{-1} và 1617 cm^{-1} đặc trưng cho các dao động hóa trị của liên kết C=O và C=C. Vân phổ ở vị trí sóng 1516 cm^{-1} đặc trưng cho dao động hóa trị của nhóm amine. Ngoài ra, vân phổ đặc trưng cho dao động biến dạng của nhóm C–OH và dao động hóa trị của C–O có ở vị trí sóng 1252 cm^{-1} và 1044 cm^{-1}. Từ phổ hồng ngoại của CC, có thể thấy CC chứa nhiều thành phần như hợp chất phenolic, acid amine... [136]. Do đó, CC đã được sử dụng như một tổ hợp chất trong các nghiên cứu của luận án này. Thêm vào đó, THV đã được tiến hành làm giàu hàm lượng polyphenol tổng cho các nghiên cứu chuyên sâu hơn trong luận án.

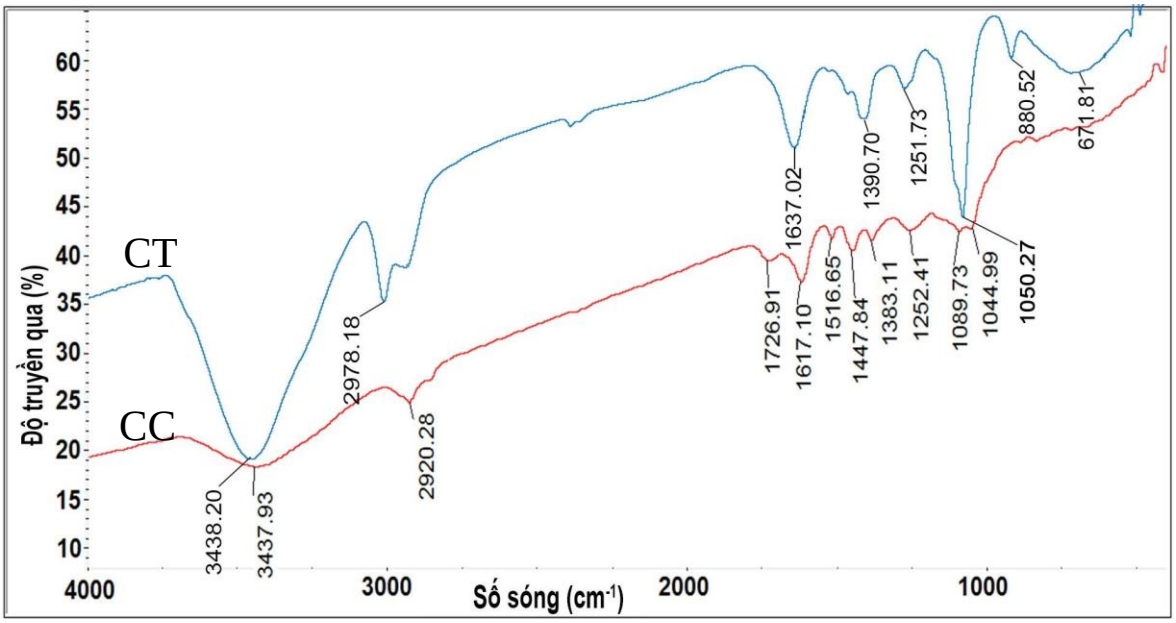


Hình 3.2. Phổ FTIR của CC

3.1.2.2. Phổ hồng ngoại biến đổi Fourier (FTIR) của CT

Phổ FTIR của CT (Hình 3.3) có sự xuất hiện của một vân phổ rộng với cường độ mạnh ở số sóng 3438 cm^{-1} đặc trưng cho dao động hóa trị của nhóm O–H. Các vân phổ đặc trưng khác như: vân phổ ở 2978 cm^{-1} của dao động hóa trị nhóm

C–H; vân phổ ở 1637 cm^{-1} của dao động nhóm C=C hoặc C=O chứa liên kết hydro; vân phổ ở 1447 cm^{-1} và 1383 cm^{-1} của dao động biến dạng nhóm –CH và $–CH_3$. Ngoài ra, còn có dao động hóa trị không đối xứng và đối xứng của nhóm C–O lần lượt là ở 1251 cm^{-1} và 1050 cm^{-1}.

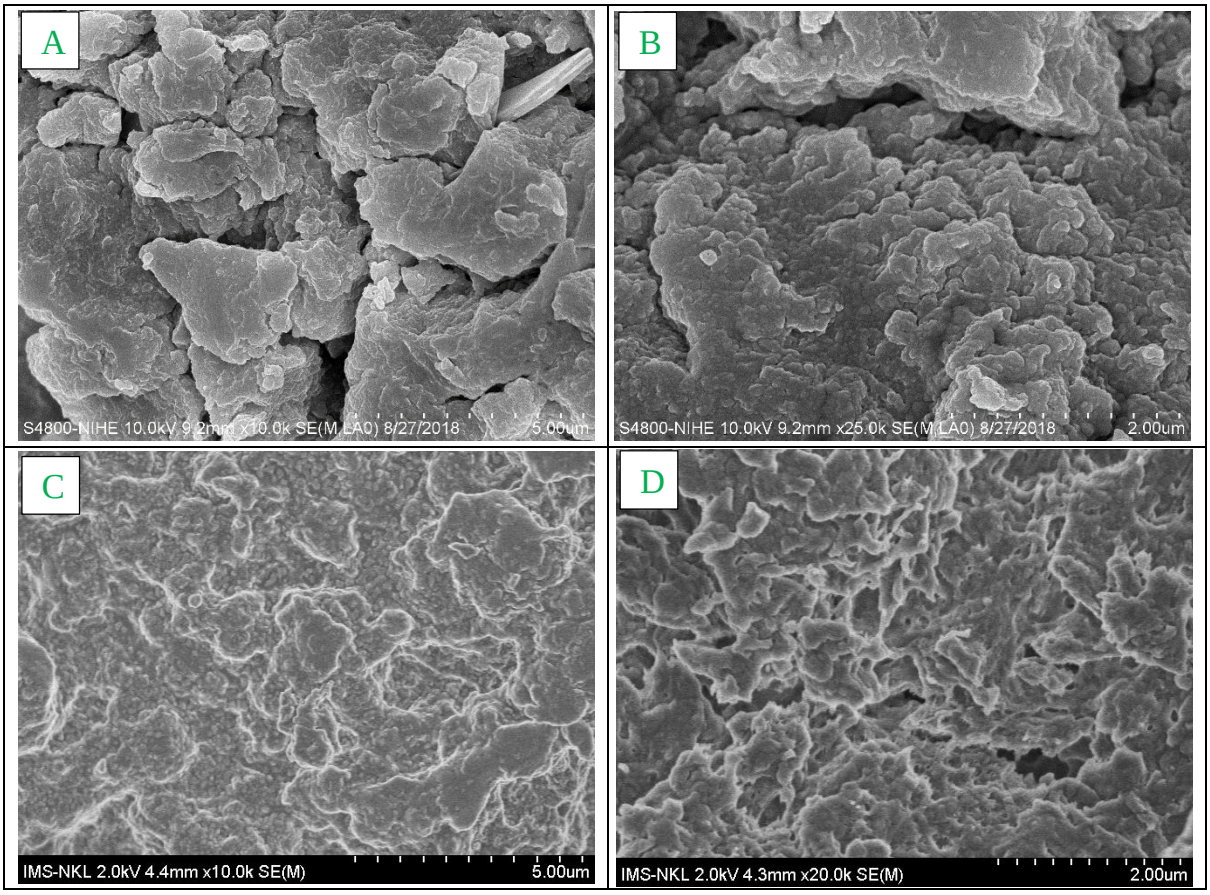


Hình 3.3. Phổ FTIR của CT và CC

Đối chiếu với phổ FTIR của CC Hình 3.2 và Hình 3.3, có thể thấy: 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 3.4 là ảnh FESEM của mẫu CT và CC với các mức độ phóng đại 10.000, 20.000 và 25.000 lần. Quan sát tổng thể các mẫu có thể thấy các mẫu đều có cấu trúc hạt với kích thước không đồng đều, đường kính các hạt dao động trong khoảng 100 – 200 nm. Các hạt 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.

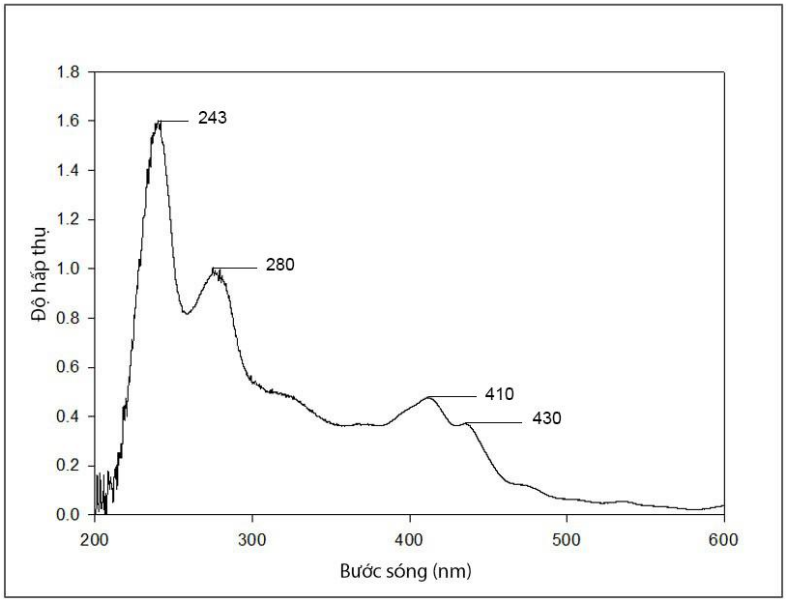


Hình 3.4. Ảnh FESEM của CT (A, B) và CC (C, D)

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 ethanol xuất hiện nhiều đỉnh hấp phụ ở các bước sóng khác nhau (Hình 3.5). 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. Trong dung môi ethanol, bước sóng hấp phụ cực đại (λ_{max}) của các polyphenol lần lượt: EC 280 nm, GCG 275 nm và 279,5 nm, ECG 279 – 280 nm, EGC 271 nm, EGCG 275 nm [94]. Trong dung môi nước, EGCG có dải hấp thụ trong khoảng 248 – 361 nm với λ_{max} = 273,6 nm, dải phổ của ECG trong khoảng 254 – 378 nm với λ_{max} = 269,6 nm và của EC là 252-328 nm với λ_{max} = 278,4 nm. Kết quả nghiên cứu của Judy Gopal [124] cho thấy cường độ hấp thụ của các nhóm chức polyphenol đặc trưng có sự dịch chuyển nhẹ trong cùng một mẫu khi được chế tạo với các kích thước hạt tổ hợp khác nhau.

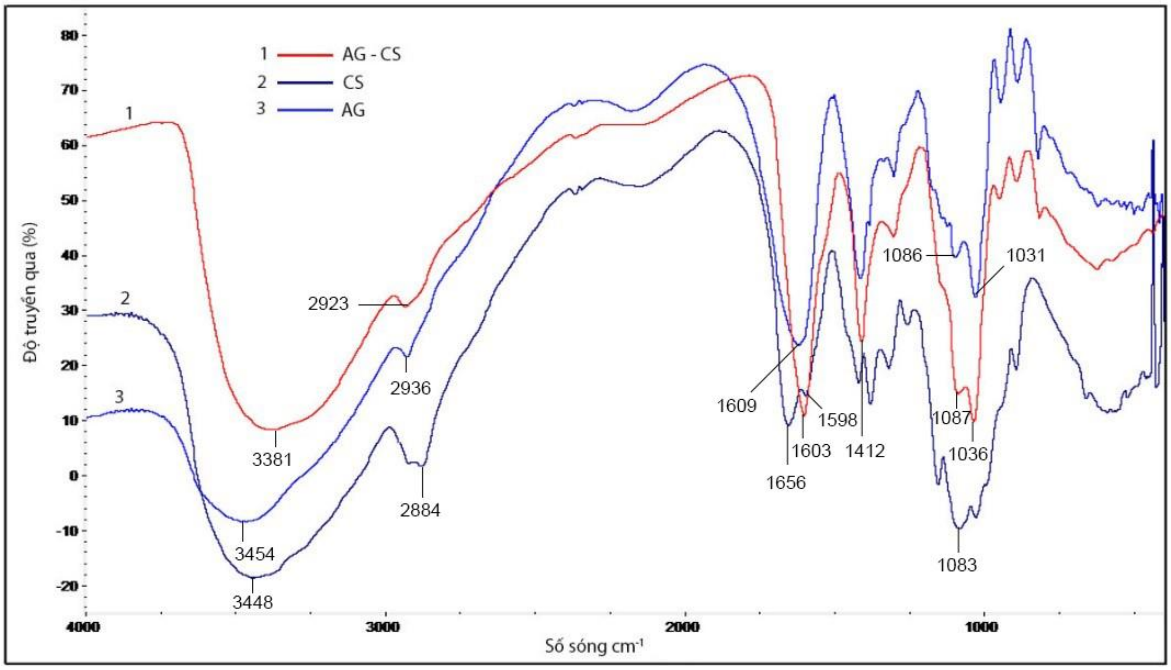


Hình 3.5. Phổ UV – Vis của CT

3.2. Màng tổ hợp AG/CS mang CC

3.2.1. Phổ FTIR của màng tổ hợp AG, CS, AG/CS

Phổ FTIR của AG với một số dao động hóa trị đặc trưng cho các nhóm chức trong mạch đại phân tử AG như sau: vân phổ xuất hiện ở 3448 cm^{-1} đặc trưng cho dao động hóa trị của nhóm –OH, vân phổ ở 2923 cm^{-1} đặc trưng cho dao động hóa trị của nhóm –CH. Dao động hóa trị của nhóm –C=O xuất hiện ở 1626 cm^{-1} và nhóm –C–O xuất hiện ở 1032 cm^{-1}. Ngoài các vân phổ đặc trưng cho các nhóm chức, còn có các vân phổ dao động xuất hiện ở 947 cm^{-1}, 891 cm^{-1} và 824 cm^{-1} đặc trưng cho cấu trúc vòng saccharide trong đại phân tử AG (Phụ lục 3).



Hình 3.6. Phổ FTIR của AG, CS, màng tổ hợp AG/CS

Phổ FTIR của CS cho thấy các vân phổ dao động đặc trưng trong CS như: vân phổ rộng, tù, cường độ mạnh ở 3442 cm^{-1} đặc trưng cho dao động của các nhóm –OH và nhóm $–NH_2$. Dao động của các nhóm –CH ở 2924 cm^{-1} và 1383 cm^{-1}; dao động của nhóm C–O cho thấy các vân phổ ở 1152 cm^{-1} và 1027 cm^{-1}. Vân phổ đặc trưng cho dao động hóa trị nhóm C=O và dao động biến dạng nhóm –OH ở 1644 cm^{-1}. Vân phổ ở vị trí 1418 cm^{-1} đặc trưng cho dao động biến dạng của nhóm $–NH_2$. Vân phổ xuất hiện ở khoảng ở 889 cm^{-1} đặc trưng cho cấu trúc vòng trong đại phân tử CS (Phụ lục 4).

Phổ FTIR của màng tổ hợp AG/CS trên Hình 3.6 được trình bày cùng với phổ FTIR của từng vật liệu polymer thành phần để đánh giá được mức độ tương tác giữa các vật liệu polymer với nhau. Dựa vào bảng đặc trưng phổ FTIR của AG, CS và màng tổ hợp AG/CS (Bảng 3.2), ta thấy đã có sự dịch chuyển đáng kể vị trí của các vân phổ đặc trưng cho nhóm chức $–NH_2$ và –OH trên phổ của AG/CS. Điều này chứng tỏ đã có sự tương tác giữa AG với CS thông qua tương tác lưỡng cực lưỡng cực và liên kết hydro giữa nhóm $–NH_2$ và –OH trong CS với nhóm –COOH của AG.

Kết quả phân tích phổ FTIR của màng tổ hợp AG/CS cho thấy sự tương đồng

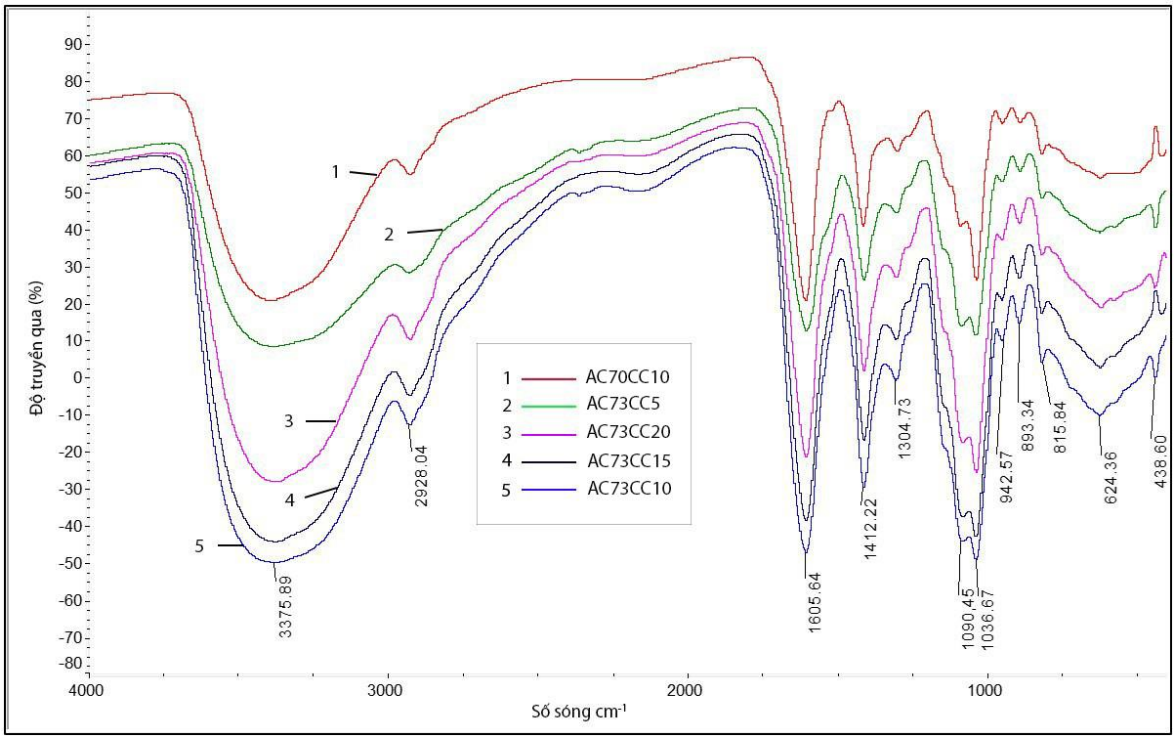
về vị trí các vân phổ so với kết quả đánh giá tương tác giữa các nhóm chức trong CS và AG trong viên nang AG/CS mang inulin sử dụng thông qua đường uống [137] và trong tổ hợp AG/CS mang hoạt chất ginsenoside Rb1 và dược chất lovastatin [138].

Bảng 3.2. Đặc trưng phổ FTIR của AG, CS và màng tổ hợp AG/CS

Mẫu / Nhóm	Số sóng (cm^{-1})		
	AG	CS	AG/CS
$\nu_{-NH2, -OH.}$	3453,65	3447,62	3380,52
ν_{CH}	2936,21	2883,51	2928,81
$\nu_{C=O}$	1656,12	-	1644,11
$\delta_{-NH2, C=C}$	1609,21	1598,29	1603,50
ν_{C-O-C}	1031,91	-	1036,47
	1086,20	1082,75	1087,61

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) và hàm lượng CC được thêm vào theo tỉ lệ: 0 %, 5 %, 10 %, 15 %, 20 % trình bày ở Hình 3.7. 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, C=O hoặc C=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 (Bảng 3.3). Sự biến mất pic ở 1726 cm^{-1} (dao động kéo dài C=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 C-C hoặc hàm lượng các chất chứa nhóm C=O trong tổ hợp khá nhỏ nên không xuất hiện được tín hiệu trên phổ. Sự tương đồng về hình dạng giữa các phổ (Hình 3.7) đã chứng tỏ hàm lượng CC đưa vào các mẫu không ảnh hưởng nhiều tới tương tác của AG và CS.



Hình 3.7. Phổ FTIR của màng tổ hợp AG/CS mang CC

Bảng 3.3. Đặc trưng phổ FTIR các mẫu màng tổ hợp AG/CS mang CC

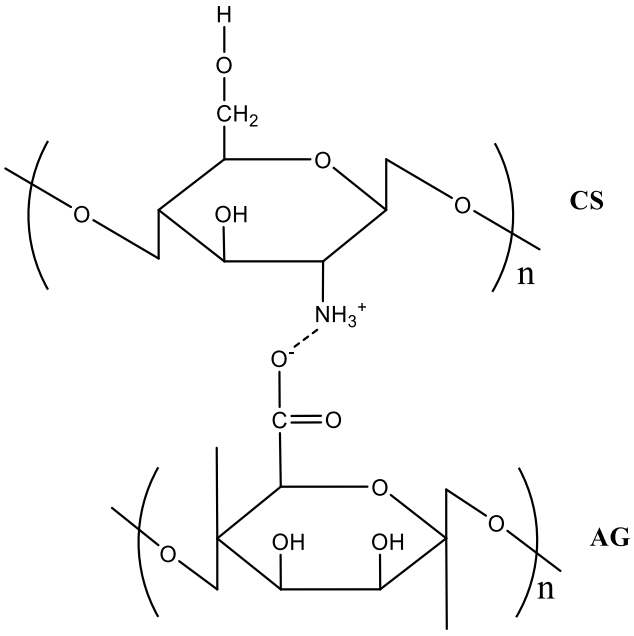
Mẫu / Nhóm	Số sóng (cm^{-1})				
	AC73CC5	AC70CC10	AC73CC10	AC73CC15	AC73CC20
$\nu_{NH2,\ OH}$	3382,00	3392,37	3375,89	3376,72	3376,52
ν_{CH}	2930,80	2926,49	2928,04	2928,11	2927,14
$\nu_{C=C}$	1602,74	1606,96	1605,64	1605,10	1605,05
δ_{NH2}	1411,29	1414,25	1412,22	1411,28	1411,32
ν_{C-O-C}	1086,48-1037,47	1087,61-1036,12	1090,45-1036,67	1079,08-1036,81	1081,93-1036,47

Nguyên nhân của sự dịch chuyển các pic đặc trưng trong phổ FTIR của CC cũng như của AG, CS trong màng tổ hợp là do các tương tác tĩnh điện giữa nhóm amine (-NH_2) trong CS với nhóm carboxyl (-COOH) trong AG. Tương tự, các polyphenol trong CC đã tương tác với AG, CS thông qua các tương tác lưỡng cực – lưỡng cực, liên kết hydro giữa các nhóm chức đặc trưng (amine, acid, alcohol …). Các mô hình giả thiết sự hình thành liên kết giữa các liên kết được trình bày trong Bảng 3.4 và các Hình 3.8a, 3.8b, 3.8c. Thông qua các liên kết hydro giữa các nhóm chức của AG, CS và polyphenol trong trà giúp tăng cường khả năng trương nở của màng tổ hợp

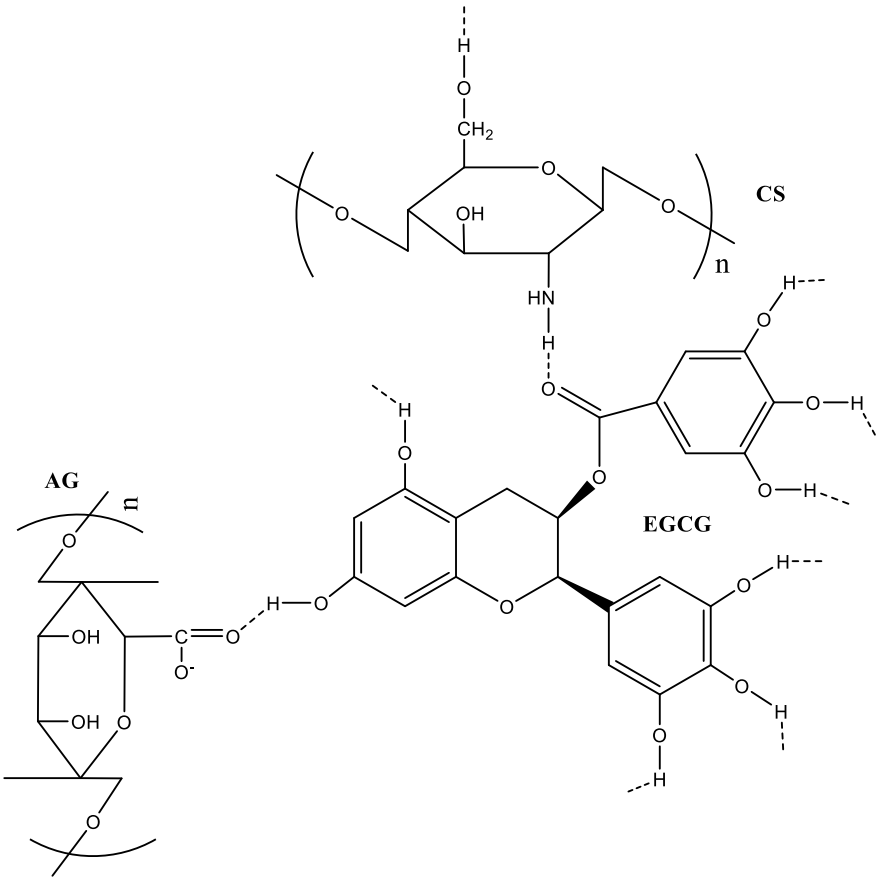
trong các dung dịch pH khác nhau, ảnh hưởng tới mức độ phân ly của các ion, điều này thuận lợi cho việc điều chỉnh sự phát triển và sử dụng của màng tổ hợp trong các ứng dụng như thuốc trúng đích, kiểm soát thời gian giải phóng thuốc…

Bảng 3.4. Giả thiết về liên kết hydro được hình thành giữa các nhóm chức của AG, CS và các polyphenol trong cao THV

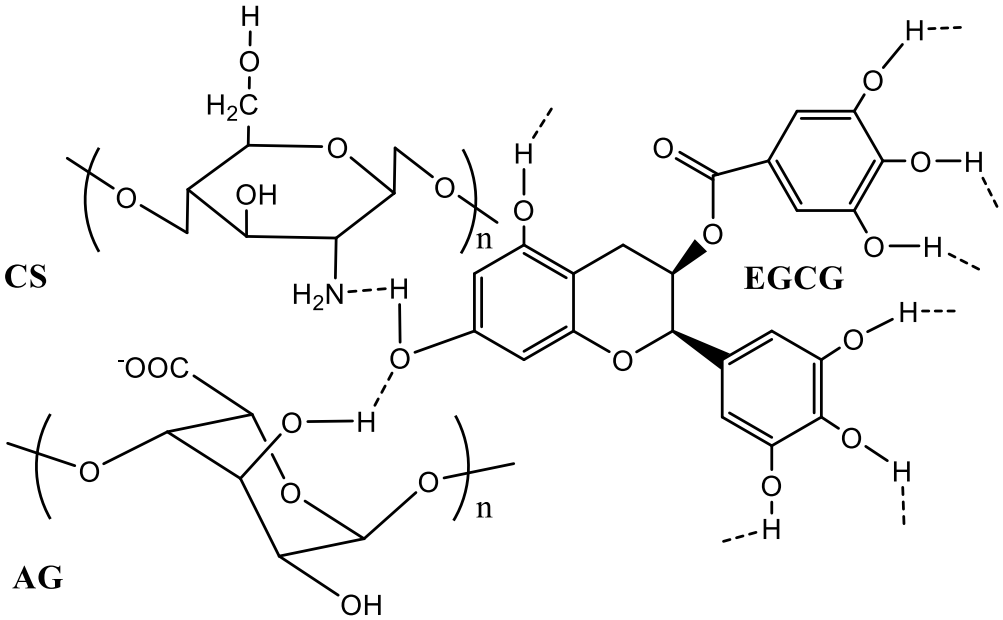
Chất	Liên kết hydro
CS và CS	CS–N–H…O(H)–CS; CS–O–H…N(H)–CS
AG và AG	AG–O–H…O=C–AG; AG–O–H…O(H)–AG
AG và CS	AG–C=O…H–O–CS; AG–C=O…H–N–CS AG–O–H…O(H)–CS; AG–O–H…N(H)–CS CS–O–H…O(H)–AG; CS–N–H…O(H)–AG
PP và PP	PP–C=O…H–O–PP; CT–O–H …O(H)–PP
AG và PP	PP–O–H…O=C–AG; PP–C=O…H–O–AG AG–O–H…O(H)–PP; PP–O–H…O(H)–AG
CS và PP	PP–C=O…H–O–CS; PP–C=O…H–N–CS PP–O–H…O(H)–CS; PP –O–H…N(H)–CS CS–O–H…O(H)–PP; CS–N–H…O(H)–PP



a) Mô hình giả thiết tương tác lưỡng cực giữa AG, CS



b) Mô hình giả thiết liên kết hydro giữa AG, CS và EGCG trong cao THV [109]



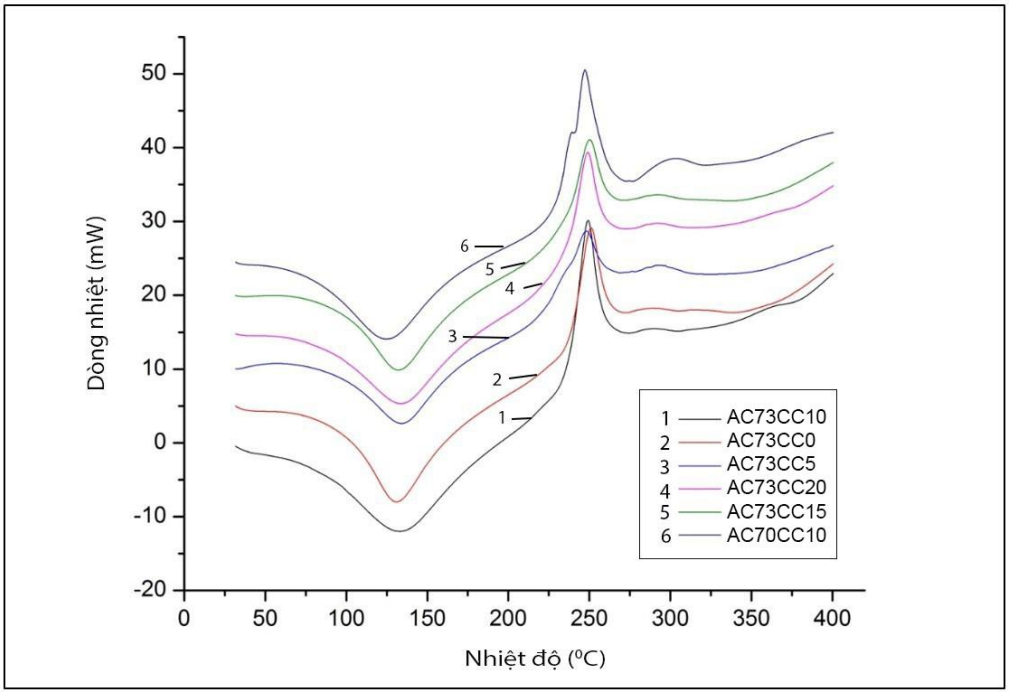
c) Mô hình giả thiết liên kết hydro giữa AG, CS và EGCG trong cao THV [109]

Hình 3.8. Các mô hình giả thiết liên kết giữa các thành phần AG, CS và EGCG đại diện cho polyphenol trong cao THV [109]

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

Đặc trưng nhiệt của 5 mẫu màng tổ hợp AC73CC với hàm lượng CC khác nhau (Bảng 2.1) và màng không chứa CS (AC70CC10) được đánh giá bằng phương pháp nhiệt lượng quét vi sai (DSC) (Hình 3.9). Dựa vào bảng liệt kê các giá trị T_{nc}, T_{ph} và ΔH_m thu được từ giản đồ DSC (Bảng 3.5). 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 ^oC với ΔH_m = 424 – 498 (J/g) và pic tỏa nhiệt đặc trưng cho T_{ph} nằm trong khoảng 246,1 – 250,7 ^oC.

Các giá trị T_{nc} và T_{ph} của màng AC70CC đều thấp hơn so với 5 màng tổ hợp AC73CT. Từ đó, có thể thấy: sự xuất hiện của CS giúp tăng cường độ ổn định nhiệt của màng tổ hợp do hình thành các tương tác tĩnh điện, liên kết hydro với AG và các polyphenol làm tăng độ bền liên kết giữa các thành phần của tổ hợp. Đối với các màng tổ hợp có CS (AC73CC), sự khác nhau về hàm lượng của CC đã ảnh hưởng đến đặc trưng nhiệt của màng. Trong đó, T_{nc} của màng AC73CC10 và AC73CC15 cao hơn so với T_{nc} của màng các màng AC73CC0, AC73CC5 và AC73CC20 (Bảng 3.5). Từ đó, có thể nhận định rằng cấu trúc của các màng AC73CC10 và AC73CC15 với hàm lượng CC từ 10 – 15 % chặt chẽ và ổn định hơn so với các màng còn lại. Khi hàm lượng CC đưa vào màng tổ hợp lên đến 20%, giá trị T_{ph} của màng tổ hợp lại giảm đi.



Hình 3.9. Giản đồ DSC của các màng tổ hợp mang CC

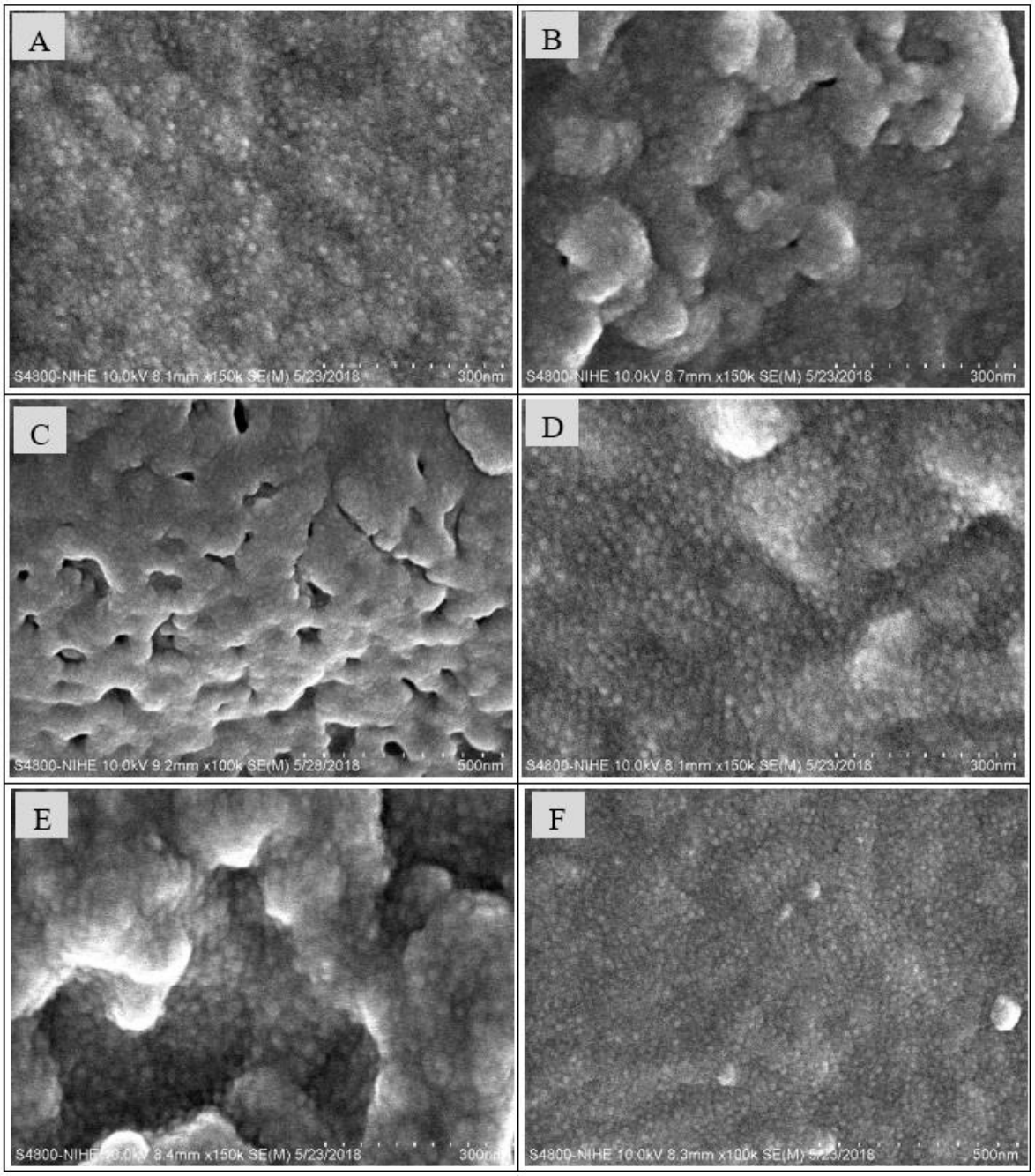
Bảng 3.5. Các giá trị DSC của các màng tổ hợp mang CC

Mẫu	T_{nc} (°C)	T_{ph} (°C)	ΔH_m (J/g)
AC73CC0	131,4	247,6	460
AC73CC5	132,8	249	498
AC70CC10	124,4	246,1	461
AC73CC10	134,8	249,9	456
AC73CC15	135,0	250,7	424
AC73CC20	133,7	248,8	475

Mặt khác, enthalpy nóng chảy (ΔH_m) của 2 màng AC73CC10 và AC73CC15 nhỏ hơn so với các màng còn lại, đặc biệt là nhỏ hơn so với màng AC73CC5. Tương ứng với độ tinh thể trong các mẫu này thấp hơn của các mẫu khác, dẫn đến việc hòa tan các mẫu này dễ dàng hơn trong các dung dịch đệm pH, giúp CC giải phóng từ các mẫu tổ hợp AC73CC trong các môi trường thử nghiệm thuận lợi hơn (Bảng 3.5).

3.2.3. Ảnh FESEM màng tổ hợp AG/CS mang CC

So sánh ảnh FESEM của các mẫu màng được phóng to ở các độ phóng đại 100.000 và 150.000 lần, có thể thấy: các hạt tổ hợp có kích thước tương đối nhỏ với sự phân tán khá đồng đều. Tổ hợp AG/CS không có CC (AC73CC0) có bề mặt khá đồng nhất với kích thước hạt khoảng 20 nm, thể hiện được sự tương tác tốt giữa AG và CS (Hình 3.10A). Tổ hợp màng AC70CC10 không có CS đã làm giảm khả năng tương tác giữa thành phần CC và AG, do đó màng có sự phân tán không đồng đều và có độ xốp cao hơn (Hình 3.10C). Cấu trúc này của màng AC70CC10 có thể ảnh hưởng đến đặc tính nhiệt và sự giải phóng thuốc từ màng AG/CC.



Hình 3.10. Ảnh FESEM của các mẫu màng: A: AC73CC0, B: AC73CC5, (C): AC70CC10, D: AC73CC10, E: AC73CC15, F: AC73CC20.

Đối với 4 mẫu màng AC73CC đều có tỉ lệ khối lượng cố định của AG và CS (AG : CS = 7 : 3) với hàm lượng khác nhau của CC, cấu trúc đồng đều hơn và không xuất hiện các lỗ xốp (Hình 3.10B, D, E và F). Pha phân tán có kích thước trong khoảng 20 - 100 nm. Trong đó, màng AC73CC10 có sự đồng đều về kích thước hạt và ổn định về cấu trúc nhất.

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

Hiệu suất mang CC của các màng tổ hợp AG/CS phụ thuộc vào các yếu tố như tỉ lệ AG và CS, hàm lượng CC và phương pháp chế tạo tổ hợp... Hiệu suất mang CC càng cao chứng tỏ phương pháp chế tạo cũng như tỉ lệ phối trộn giữa các thành phần là phù hợp. Điều này sẽ giúp tiết kiệm được chi phí cũng như nâng cao hiệu quả sử dụng của thuốc. Hiệu suất mang CC của các màng tổ hợp AG/CS được trình bày trong Bảng 3.6.

Bảng 3.6. 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

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 %. Cho 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

Đối với các mẫu màng tổ hợp AG/CS chứa CC, hiệu suất mang CC của các mẫu 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 đối đa là 82,44 %. Tuy nhiên, khi hàm lượng CC tăng lên đến 20 % hiệu suất mang cao bởi tổ hợp AC73 lại giảm. Điều này có thể 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 %.

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

Hàm lượng CC giải phóng được khảo sát đối với 4 mẫu màng tổ hợp AC73 với hàm lượng CC khác nhau trong các dung dịch pH (2; 4,5; 6,8; 7,4) trong 30 giờ thử nghiệm được thống kê chi tiết trong các Bảng 3.7a – 3.7d. Nghiên cứu này không tiến hành với mẫu màng tổ hợp không chứa CS. Các yếu tố ảnh hưởng đến hàm lượng CC giải phóng như thời gian, pH dung dịch và hàm lượng CC đưa vào màng tổ hợp đã được đánh giá. Từ đó, tiến hành xây dựng các mô hình động học giải phóng CC từ các màng tổ hợp.

Bảng 3.7 a. Hàm lượng CC giải phóng (%) từ các màng tổ hợp AC73 trong dung dịch pH 2

Mẫu / Thời gian (giờ)	AC73CC5	AC73CC10	ACP3CC15	AC73CC20
0	0	0	0	0
1	8,60 ± 0,07	11,20 ± 0,14	15,98 ± 0,31	23,70 ± 0,11
2	15,70 ± 0,12	14,42 ± 0,13	17,23 ± 0,08	29,58 ± 0,23
3	19,07 ± 0,22	18,65 ± 0,12	21,75 ± 0,09	33,35 ± 0,12
4	23,92 ± 0,11	23,69 ± 0,18	24,27 ± 0,12	36,94 ± 0,16
5	25,48 ± 0,24	32,21 ± 0,22	26,35 ± 0,23	41,05 ± 0,03
6	34,12± 0,03	39,00 ± 0,02	29,00 ± 0,08	48,41 ± 0,13
7	49,17 ± 0,01	47,94 ± 0,21	37,70 ± 0,16	51,79 ± 0,22
8	55,17 ± 0,13	58,92 ± 0,33	46,33 ± 0,22	56,14 ± 0,15
9	58,88 ± 0,17	63,22 ± 0,12	51,52 ± 0,15	62,32 ± 0,04
10	61,96 ± 0,22	63,98 ± 0,43	56,74 ± 0,43	66,08 ± 0,13
14	61,99 ± 0,12	65,07 ± 0,03	58,05 ± 0,08	73,71 ± 0,12
18	62,04 ± 0,02	65,56 ± 0,22	59,05 ± 0,03	75,17 ± 0,17
22	63,27 ± 0,15	68,67 ± 0,24	59,86 ± 0,45	76,93 ± 0,34
26	63,49 ± 0,28	74,13 ± 0,02	60,48 ± 0,32	78,17 ± 0,32
30	63,82 ± 0,19	74,98 ± 0,03	61,23 ± 0,17	80,54 ± 0,43

Bảng 3.7b. Hàm lượng CC giải phóng (%) từ các màng tổ hợp AC73 trong dung dịch pH 4,5

Mẫu / Thời gian (giờ)	AC73CC5	AC73CC10	ACP3CC15	AC73CC20
0	0	0	0	0
1	14,44 ± 0,12	42,18 ± 0,12	54,34 ± 0,17	55,30 ± 0,11
2	30,45 ± 0,11	53,26 ± 0,14	67,82 ± 0,08	58,16 ± 0,02
3	40,51 ± 0,34	60,60 ± 0,44	77,47 ± 0,09	65,71 ± 0,19
4	51,35 ± 0,11	69,62 ± 0,21	66,43 ± 0,25	70,72 ± 0,01
5	73,60 ± 0,24	77,06 ± 0,04	76,95 ± 0,18	74,05 ± 0,12
6	84,30 ± 0,33	80,31 ± 0,12	85,02 ± 0,11	76,60 ± 0,37
7	88,42 ± 0,12	89,37 ± 0,22	85,26 ± 0,14	81,61 ± 0,45
8	90,43 ± 0,15	91,73 ± 0,39	88,90 ± 0,21	85,33 ± 0,11
9	96,80 ± 0,18	92,21 ± 0,17	91,13 ± 0,33	91,84 ± 0,14
10	96,13 ± 0,32	92,80 ± 0,11	93,76 ± 0,14	94,88 ± 0,17
14	96,66 ± 0,12	93,67 ± 0,23	96,44 ± 0,32	95,04 ± 0,05
18	97,19 ± 0,05	93,24 ± 0,09	96,61 ± 0,21	95,69 ± 0,23
22	97,67 ± 0,29	93,93 ± 0,18	96,72 ± 0,23	96,11 ± 0,04
26	97,93 ± 0,12	94,09 ± 0,13	96,91 ± 0,19	96,88 ± 0,34
30	99,25 ± 0,24	96,05 ± 0,09	96,95 ± 0,31	97,72 ± 0,12

Bảng 3.7c. Hàm lượng CC giải phóng (%) từ các màng tổ hợp AC73 trong dung dịch pH 6,8

Mẫu / Thời gian (giờ)	AC73CC5	AC73CC10	ACP3CC15	AC73CC20
0	0	0	0	0
1	23,24 ± 0,11	59,65 ± 0,34	46,73 ± 0,12	43,43 ± 0,32
2	30,52 ± 0,21	61,59 ± 0,22	68,59 ± 0,22	56,39 ± 0,19
3	40,01 ± 0,11	65,13 ± 0,19	73,32 ± 0,34	65,20 ± 0,03
4	43,57 ± 0,23	68,81 ± 0,22	83,88 ± 0,19	71,80 ± 0,12
5	49,12 ± 0,07	70,58 ± 0,32	86,51 ± 0,38	78,30 ± 0,14
6	52,23 ± 0,13	79,70 ± 0,11	93,03 ± 0,26	87,30 ± 0,35
7	67,76 ± 0,12	87,19 ± 0,17	94,42 ± 0,12	89,67 ± 0,12
8	74,03 ± 0,13	94,92 ± 0,16	94,92 ± 0,18	89,85 ± 0,26

Mẫu / Thời gian (giờ)	AC73CC5	AC73CC10	ACP3CC15	AC73CC20
9	82,38 ± 0,32	97,17 ± 0,18	97,59 ± 0,17	92,73 ± 0,17
10	94,53 ± 0,44	98,49 ± 0,32	97,98 ± 0,21	96,27 ± 0,12
14	96,40 ± 0,17	98,50 ± 0,11	98,06 ± 0,16	97,72 ± 0,18
18	96,86 ± 0,41	98,01 ± 0,19	98,75 ± 0,17	97,92 ± 0,13
22	97,34 ± 0,15	98,48 ± 0,45	98,86 ± 0,11	98,13 ± 0,19
26	97,57 ± 0,24	98,82 ± 0,22	98,84 ± 0,06	98,49 ± 0,33
30	99,59 ± 0,12	98,91 ± 0,03	99,14 ± 0,16	99,04 ± 0,19

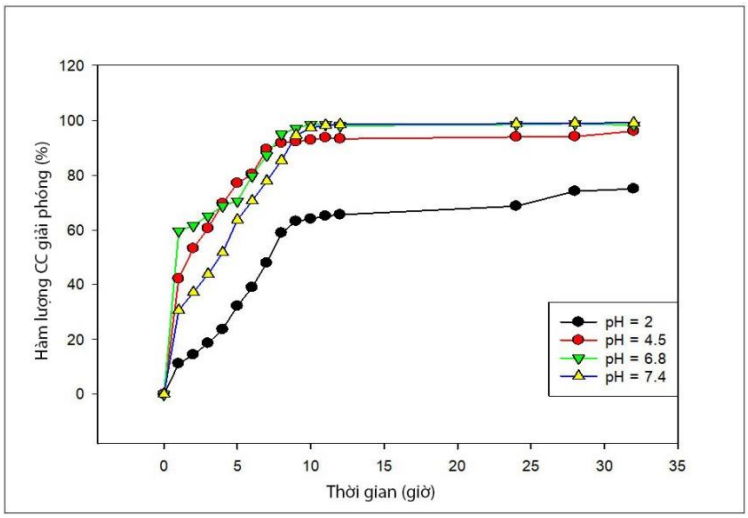
Bảng 3.7d. Hàm lượng CC giải phóng (%) từ các màng tổ hợp AC73 trong dung dịch pH 7,4

Mẫu / Thời gian (giờ)	AC73CC5	AC73CC10	ACP3CC15	AC73CC20
0	0	0	0	0
1	24,65 ± 0,03	30,65 ± 0,17	53,33 ± 0,21	58,76 ± 0,34
2	34,39 ± 0,22	37,16 ± 0,12	57,96 ± 0,10	61,93 ±
3	43,93 ± 0,12	43,84 ± 0,45	65,17 ± 0,13	67,12 ± 0,18
4	51,86 ± 0,33	51,67 ± 0,23	71,79 ± 0,12	74,12 ± 0,17
5	60,22 ± 0,27	63,65 ± 0,18	76,32 ± 0,22	77,08 ± 0,17
6	68,85 ± 0,08	70,59 ± 0,19	80,73 ± 0,29	80,93 ± 0,18
7	77,39 ± 0,14	77,81 ± 0,26	83,44 ± 0,36	83,28 ± 0,19
8	86,63 ± 0,19	85,35 ± 0,09	86,66 ± 0,08	85,48 ± 0,23
9	94,30 ± 0,22	94,55 ± 0,34	90,79 ± 0,12	89,89 ± 0,19
10	96,92 ± 0,07	97,22 ± 0,18	96,86 ± 0,23	94,67 ± 0,22
14	97,67 ± 0,18	98,23 ± 0,14	97,73 ± 0,12	97,24 ± 0,19
18	98,10 ± 0,11	98,46 ± 0,12	98,05 ± 0,12	98,95 ± 0,11
22	98,21 ± 0,17	98,75 ± 0,17	98,67 ± 0,23	99,23 ± 0,32
26	98,54 ± 0,19	99,02 ± 0,19	99,38 ± 0,17	99,49 ± 0,34
30	98,71 ± 0,27	99,04 ± 0,15	98,88 ± 0,27	99,57 ± 0,18

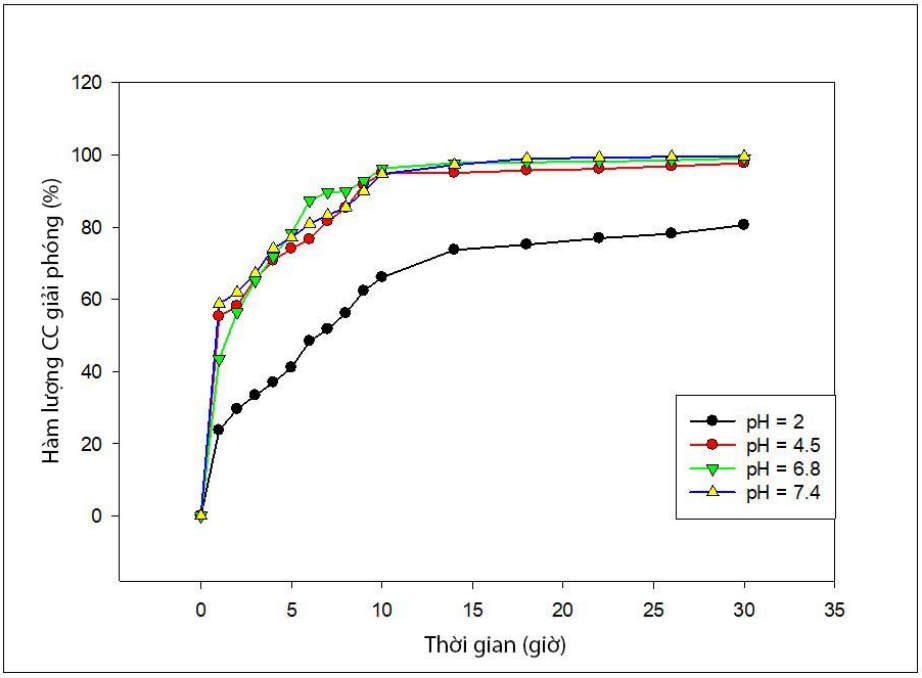
3.2.5.1. Ảnh hưởng của pH dung dịch đến hàm lượng CC giải phóng

Quan sát các Hình 3.11a, Hình 3.11b mô tả hàm lượng CC giải phóng từ màng tổ hợp AC73CC10 và AC73CC20 trong các dung dịch pH khác nhau, có thể nhận thấy:

Thứ nhất, đối với mẫu màng AC73CC10 thử nghiệm trong dung dịch pH 2, hàm lượng CC được giải phóng thấp nhất. Sau 30 giờ khảo sát, hàm lượng CC giải phóng mới chỉ đạt 74,98 %. Trong khi đó, hàm lượng CC giải phóng trong các dung dịch pH còn lại cao hơn nhiều với giá trị nằm trong khoảng 96,05 – 99,04 %. Tương tự, đối với mẫu màng AC73CC20, hàm lượng CC được giải phóng thấp nhất trong dung dịch pH 2 (80,54 %) so với các dung dịch pH còn lại (97,72 – 99,57 %). Sự khác biệt về hàm lượng CC được giải phóng ở môi trường pH 2 so với các pH 4,5; 6,8 và 7,4 có thể do: proton H^+ trong dung dịch acid phản ứng với nhóm amine ($–NH_2$) trong CS, hình thành các ion NH_3^+ trên bề mặt các phân tử dẫn đến quá trình giải phóng CC bị ngăn cản. Tương tự, tương tác tĩnh điện giữa các nhóm chức amine trong CS với các nhóm carbonyl trong AG trong môi trường trung tính (pH 6,8 và 7,4) cũng tốt hơn so với môi trường acid (pH 2), dẫn tới CC được giải phóng nhiều hơn. Ngoài ra, trong môi trường acid, CS dễ dàng hòa tan còn AG lại khó tan hơn mà bị trương nở, thủy phân trong nước. Điều này làm ảnh hưởng đến quá trình giải phóng CC ra khỏi màng tổ hợp. Kết quả này tương đồng với các kết quả nghiên cứu động học giải phóng polyphenol trà trong vi hạt tổ hợp AG/CS của Anna Wang và cộng sự trong môi trường pH 1,2 – 7,4 [138] và động học giải phóng lovastatin, ginsenoside Rb1 trong tổ hợp AG/AG trong môi trường pH 1,2 và pH 7,4 của Thạch Thị Lộc [67].



Hình 3.11a. Hàm lượng CC giải phóng từ màng tổ hợp AC73CC10 trong các dung dịch pH khác nhau

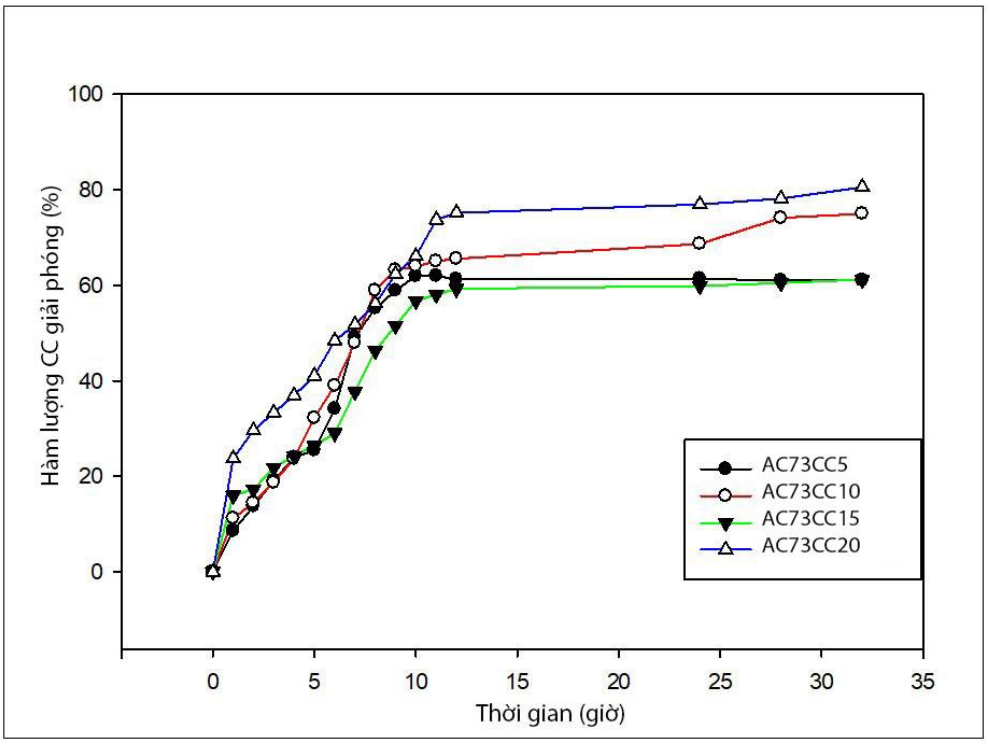


Hình 3.11b. Hàm lượng CC giải phóng từ màng tổ hợp AC73CC20 trong các dung dịch pH khác nhau

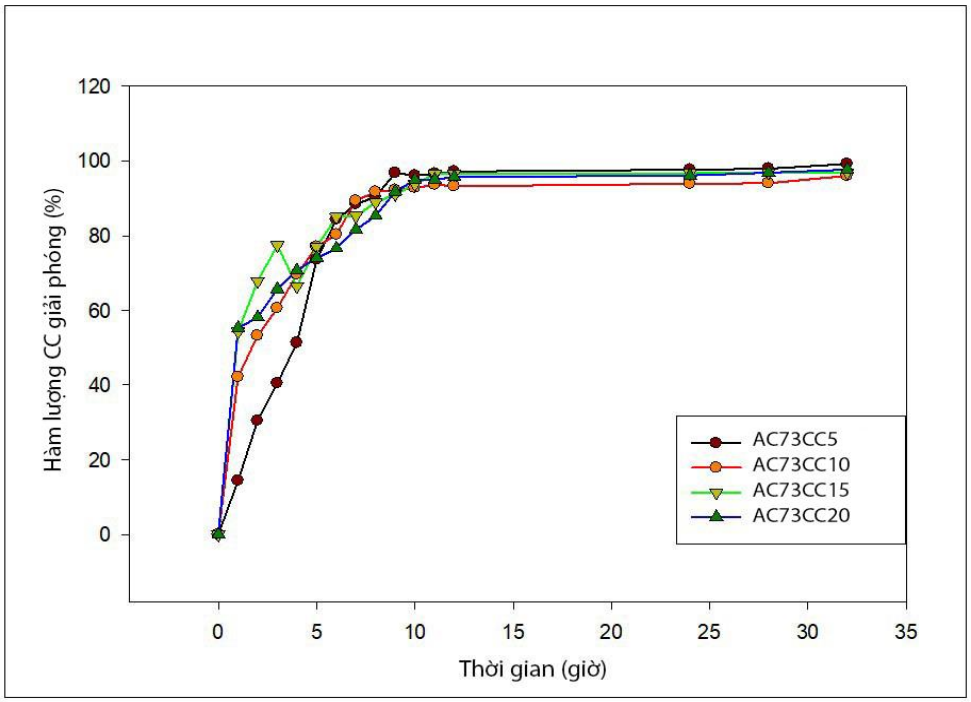
Thứ hai, hàm lượng và tốc độ giải phóng CC từ các màng tổ hợp AC73CC10 và AC73CC20 trong 3 môi trường pH 4,5; 6,8 và 7,4 có sự tương đồng với nhau. Trong đó, đối với mẫu màng AC73CC20, sau 1 giờ khảo sát, hàm lượng CC giải phóng lớn nhất ở dung dịch pH 4,5 và pH 7,4, cao hơn 2,33 – 2,48 lần so với dung dịch pH 6,8. Tuy nhiên, sau 10 giờ khảo sát, tốc độ giải phóng trở nên tương đồng với hàm lượng CC đã giải phóng từ màng AC73CC20 nằm trong khoảng 94,67 – 97,72 %. Đối với mẫu màng AC73CC10, sau 1 giờ khảo sát, hàm lượng CC giải phóng lớn nhất từ màng AC73CC10 ở dung dịch pH 6,8, cao hơn 1,41 lần so với ở dung dịch pH 4,5 và cao hơn 1,95 lần so với ở dung dịch pH 7,4. Tuy nhiên, sau 10 giờ khảo sát, tốc độ giải phóng CC từ màng AC73CC10 trở nên tương đồng với hàm lượng CC đã giải phóng nằm trong khoảng 97,22 – 98,49 % đối với 2 dung dịch pH 6,8 và pH 7,4.

Từ các kết quả trên, có thể rút ra nhận định: Quá trình giải phóng CC khỏi màng tổ hợp AC73CC phụ thuộc nhiều vào pH của dung dịch. Hàm lượng CC được giải phóng trong môi trường kiềm nhẹ tốt hơn so với môi trường acid, cụ thể pH 7,4 ≈ pH 6,8 > pH 4,5 > pH 2.

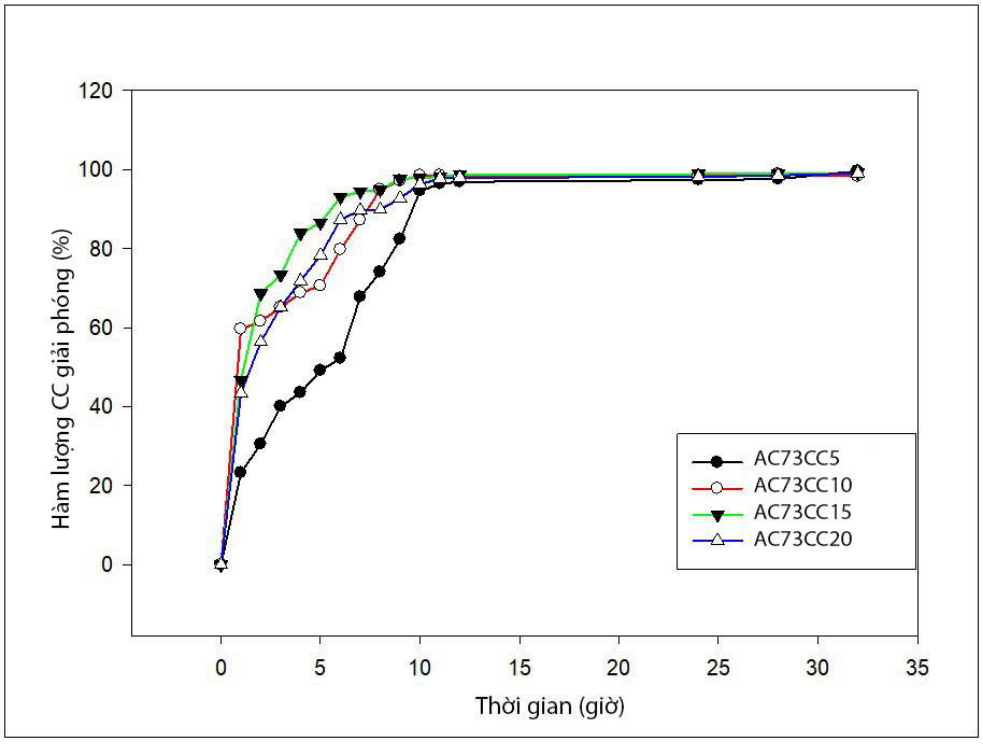
3.2.5.2. Ảnh hưởng của thời gian đến giải phóng CC



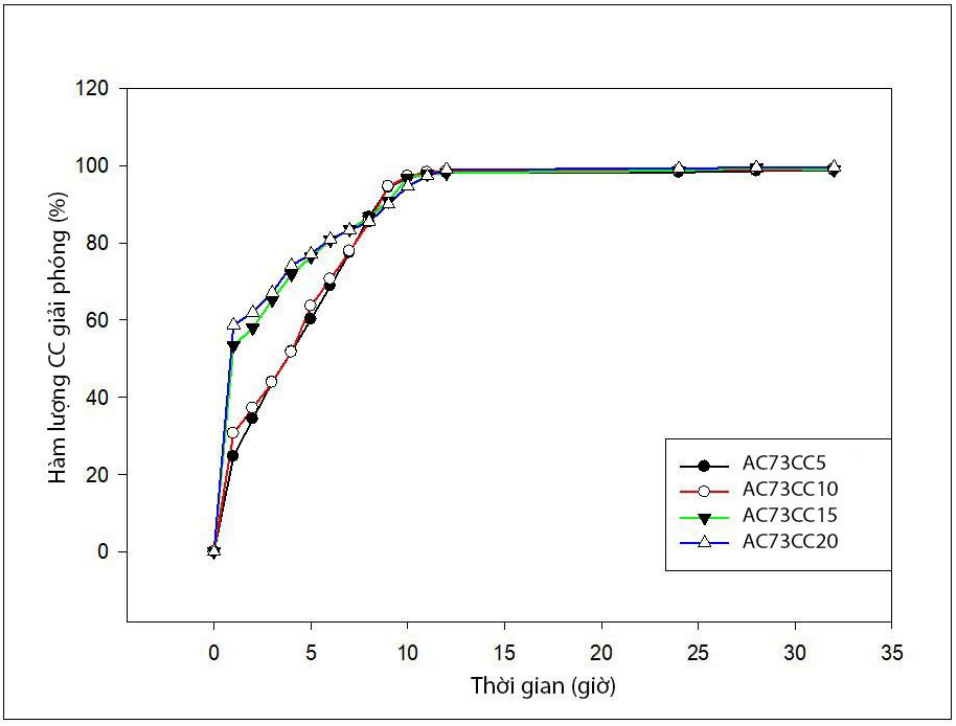
Hình 3.12a. Hàm lượng CC giải phóng từ màng tổ hợp AC73CC trong dung dịch pH 2



Hình 3.12b. Hàm lượng CC giải phóng từ màng tổ hợp AC73CC trong dung dịch pH 4,5



Hình 3.12c. Hàm lượng CC giải phóng từ màng tổ hợp AC73CC trong dung dịch pH 6,8



Hình 3.12d. Hàm lượng CC giải phóng từ màng tổ hợp AC73CC trong dung dịch pH 7,4

Quan sát các Hình 3.12a – 3.12d mô tả hàm lượng CC giải phóng từ màng tổ hợp AC73CC trong dung dịch với giá trị pH khác nhau, có thể thấy: hàm lượng CC giải phóng tăng theo thời gian thử nghiệm. Trong đó, 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 lượng CC 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 khảo sát ở các dung dịch pH 4,5; 6,8 và 7,4. Riêng với các màng tổ hợp được khảo sát ở dung dịch pH 2, lượng CC được giải phóng chỉ từ 61,23 % đến 80,54 %.

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

Hàm lượng CC đã được đưa vào các màng tổ hợp là 5 %, 10 %, 15 % và 20 % so với tổng khối lượng của màng AG/CS. Ảnh hưởng của hàm lượng CC trong tổ hợp màng đến sự giải phóng CC được trình bày trong các Bảng 3.7a – 3.7d và các Hình 3.12a – 3.12d.

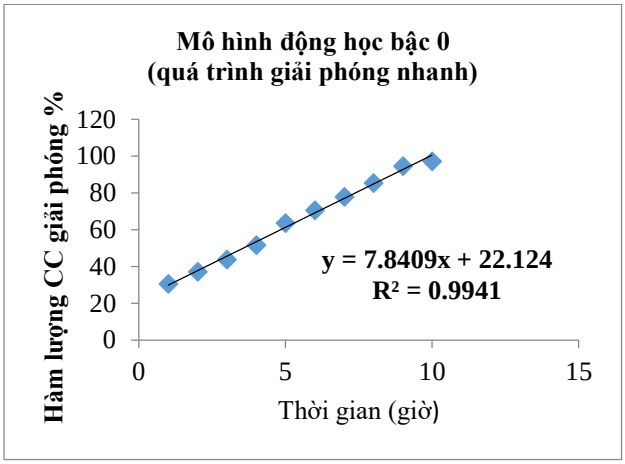
Ở các dung dịch pH 2; 4,5 và 7,4, trong 1 giờ đầu khảo sát, hàm lượng CC giải phóng từ các màng tổ hợp tăng khi tăng hàm lượng CC đưa vào. Ví dụ: ở dung dịch pH 2, hàm lượng CC được giải phóng từ các mẫu AC73CC5, AC73CC10, AC73CC15 và AC73CC20 lần lượt là 8,60 %, 11,20 %, 15,98 % và 23,70 %. Có thể giải 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 với nhau chiếm ưu thế hơn liên kết hydro giữa CC – AG/CS, làm cho CC dễ 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. Điều này cho thấy khả năng mang CC của màng tổ hợp phụ thuộc vào bản chất của các polymer, môi trường pH, phương pháp tổng hợp... Các kết quả nghiên cứu này cũng tương đồng với các hệ tổ hợp AG/CS mang các polyphenol thiên nhiên của

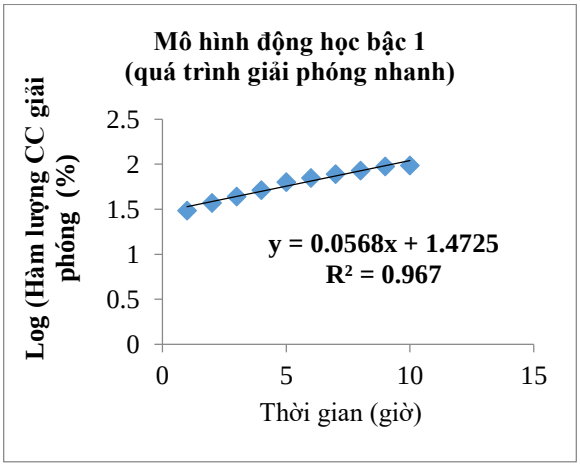
Rusandica Stoica và cộng sự (khảo sát ảnh hưởng của nồng độ polyphenol và pH đến kích thước hạt, điện thế zeta và tốc độ giải phóng) [85].

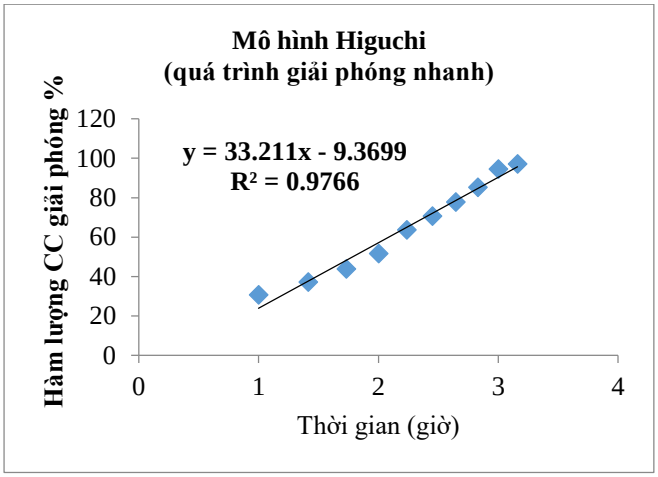
3.2.6. Động học giải phóng CC từ màng tổ hợp AG/CS mang CC

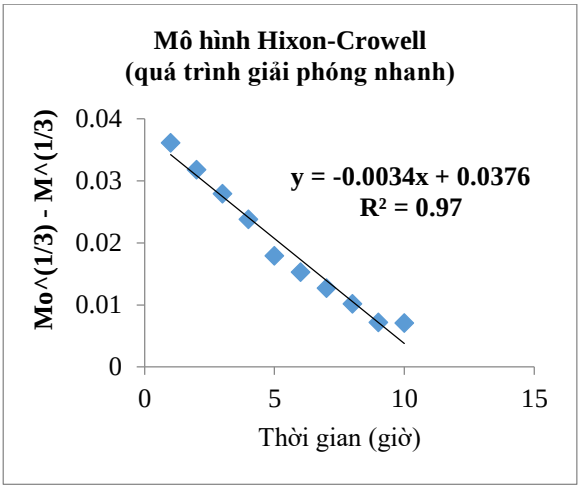
Các mô hình động học giải phóng CC từ màng tổ hợp được lựa chọn từ các phương trình toán học [130]. Cơ chế động học giải phóng CC phụ thuộc vào các yếu tố pH dung dịch, hàm lượng CC mang bởi tổ hợp cũng như bản chất của CC và polymer AG, CS được đánh giá bằng các tham số của phương trình hồi quy như hệ số hồi quy (R^2) và hằng số (k) theo các mô hình động học bậc 0 (ZO), bậc một (FO), Higuchi (HG), Hixson - Crowell (HCW) và Korsmeyer - Peppas (KMP). Quá trình giải phóng CC từ các màng AC73CC5, AC73CC10, AC73CC15 và AC73CC20 trong các dung dịch pH 2, pH 4,5, pH 6,8 và pH 7,4 được đánh giá theo hai giai đoạn (các Hình 3.13, 3.14): giai đoạn nhanh và giai đoạn có kiểm soát như đã đề cập ở mục 3.2.5.

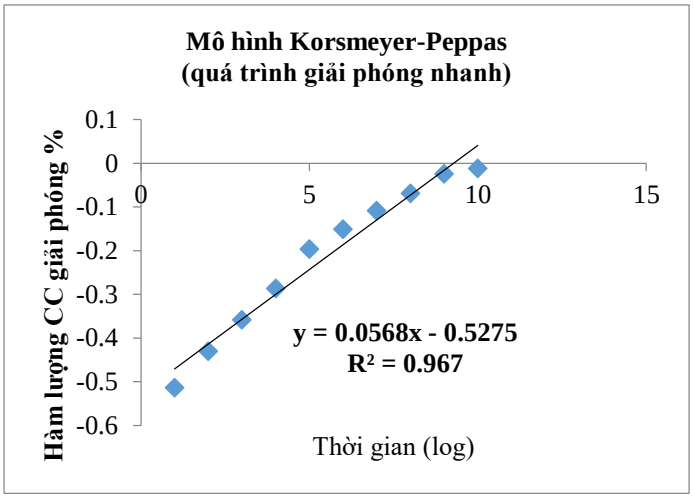
3.2.6.1. Động học quá trình giải phóng nhanh











Hình 3.13. Đồ thị phản ánh giải phóng nhanh CC từ màng tổ hợp AC73CC10 theo các mô hình động học khác nhau trong dung dịch pH 7,4

Các tham số bao gồm hệ số hồi quy (R^2), hằng số (k) và hằng số khuếch tán (n) của các phương trình hồi quy phản ánh giai đoạn giải phóng nhanh CC từ các màng tổ hợp AC73CC trong 10 giờ đầu ở các dung dịch pH khác nhau được trình bày ở Bảng 3.8 – 3.11.

Trong đó, đồ thị phản ánh giai đoạn giải phóng nhanh CC từ màng tổ hợp AC73CC10 (hàm lượng CC chiếm 10 % tính theo tổng khối lượng AG/CS) trong môi trường pH 7,4 theo các mô hình động học khác nhau được trình bày trên Hình 3.13. Căn cứ vào hệ số hồi quy, cơ chế giải phóng và mô hình động học phù hợp cho giải phóng nhanh CC từ màng tổ hợp AC73CC (mô hình nào có hệ số hồi quy lớn nhất (gần với 1) là thích hợp nhất). Vì vậy, mô hình động học bậc 0 (ZO) phù hợp với động học giải phóng thuốc trong giai đoạn nhanh ứng với dung dịch pH 2; 6,8 và 7,4 của các mẫu tổ hợp với giá trị R^2 lần lượt 0,969; 0,980 và 0,995. Nghĩa là, quá trình giải phóng CC ra khỏi hệ AG/CS là bất biến, không phụ thuộc vào nồng độ của CC trong hệ.

Với dung dịch pH 4,5, CC giải phóng từ màng tổ hợp AC73CC10 theo mô hình động học Higuchi co hệ số hồi quy R^2 lớn nhất ($R^2 \geq 0,893$). Điều này cho thấy sự khuếch tán của CC ở giai đoạn giải phóng nhanh phụ thuộc vào sự khuếch tán của CC ra khỏi hệ AG/CS.

Mô hình động học bậc 0 (ZO) phù hợp với động học giải phóng thuốc

trong giai đoạn giải phóng nhanh ứng với dung dịch pH 2 của các mẫu màng tổ hợp đều có giá trị $R^2 > 0,950$. Trong dung dịch pH 2 (môi trường acid mạnh HCl), AG không tan, dẫn tới giải phóng CC ra khỏi màng tổ hợp AG/CS bị cản trở bởi rào cản tương tác tĩnh điện giữa AG với CS. Với các mẫu màng tổ hợp được khảo sát giải phóng CC trong các môi trường pH 4,5, 6,8, 7,4, tương tác tĩnh điện giữa AG và CS giảm, khả năng trương nở và hòa tan của AG, CS tốt hơn so với dung dịch pH 2, do đó, khả năng hòa tan và giải phóng CC diễn ra nhanh hơn [138].

Các tham số của phương trình hồi quy như hệ số hồi quy (R^2) và hằng số tốc độ phản ứng (k) theo các mô hình động học bậc 0 (ZO), bậc một (FO), Higuchi (HG), Hixson – Crowell (HCW) và Korsmeyer – Peppas (KMP) phản ánh các quá trình giải phóng CC từ các màng AC73CC5, AC73CC10, AC73CC15, và AC73CC20 trong các dung dịch pH 2, pH 4,5, pH 6,8 và pH 7,4 được thống kê trong các Bảng 3.8 – 3.11.

Bảng 3.8. Các tham số của các phương trình hồi quy phản ánh giải phóng nhanh CC từ các màng tổ hợp AC73CC5, AC73CC10, AC73CC15 và AC73CC20 trong 10 giờ đầu ở dung dịch pH 2

	ZO		FO		HG		HCW		KMP		
	R^2	k	R^2	k	R^2	k	R^2	k	R^2	k	n
AC73CC5	0,978	6,652	0,968	0,039	0,938	27,83	0,973	-0,005	0,968	0,102	0,090
AC73CC10	0,969	6,433	0,952	0,041	0,928	26,91	0,963	-0,004	0,952	0,089	0,094
AC73CC15	0,950	4,686	0,986	0,028	0,876	19,24	0,969	-0,004	0.986	0,133	0,064
AC73CC20	0,996	4,706	0,981	0,201	0,97	19,85	0,985	-0,003	0,981	0,233	0,048

Bảng 3.9. Các tham số của các phương trình hồi quy phản ánh giải phóng nhanh CC từ các màng tổ hợp AC7CC5, AC73CC10, AC73CC15 và AC73CC20 trong 10 giờ đầu ở dung dịch pH 4,5

	ZO		FO		HG		HCW		KMP		
	R^2	k	R^2	k	R^2	k	R^2	k	R^2	k	n
AC73CC5	0.930	5,736	0,882	0,016	0,978	25,13	0,801	-0,002	0,882	0,459	0,036
AC73CC10	0,920	9,524	0,801	0,043	0,964	41,66	0,807	-0,004	0,810	0,210	0,082
AC73CC15	0,864	3,876	0,824	0,010	0,893	16,84	0,549	-0,001	0,824	0,585	0,002
AC73CC20	0,734	6,723	0,981	0,011	0,978	18,66	0,961	-0,001	0,981	0,534	0,026

Bảng 3.10. Các tham số của các phương trình hồi quy phản ánh giải phóng nhanh CC từ các màng tổ hợp AC73CC5, AC73CC10, AC73CC15 và AC73CC20 trong 10 giờ đầu ở dung dịch pH 6,8

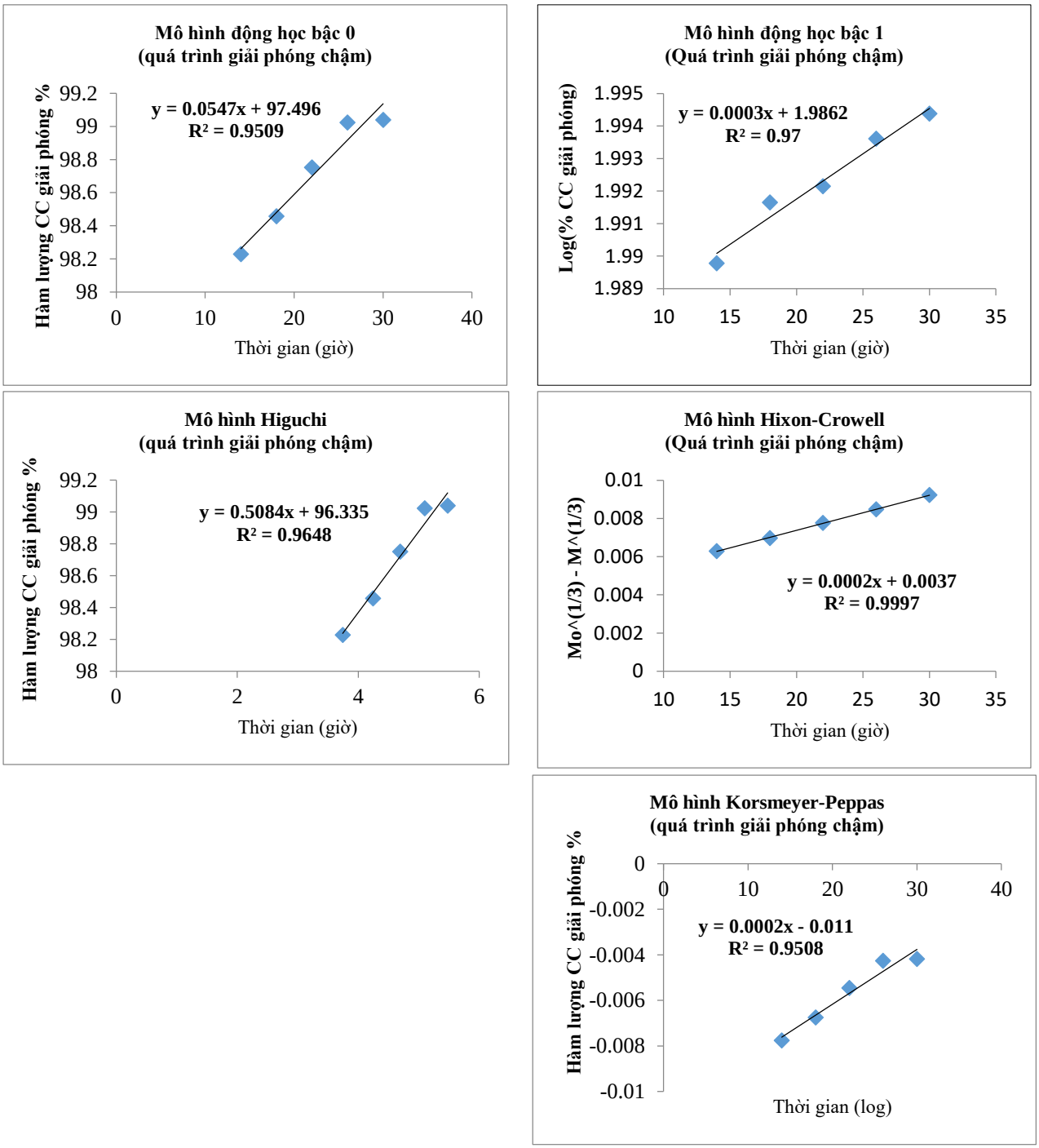
	ZO		FO		HG		HCW		KMP		
	R^2	k	R^2	k	R^2	k	R^2	k	R^2	k	n
AC73CC5	0,964	4,920	0,972	0,012	0,916	20,49	0,912	-0,001	0,915	0,551	0,018
AC73CC10	0,980	7,587	0,975	0,027	0,936	31,65	0,980	-0,003	0,970	0,230	0,063
AC73CC15	0,817	4,911	0,738	0,029	0,912	22,17	0,516	-0,002	0,734	0,571	0,029
AC73CC20	0,917	5,550	0,859	0,015	0,975	24,45	0,759	-0,002	0,860	0,486	0,034

Bảng 3.11. Các tham số của các phương trình hồi quy phản ánh giải phóng nhanh CC từ các màng tổ hợp AC73CC5, AC73CC10, AC73CC15 và AC73CC20 trong 10 giờ đầu ở dung dịch pH 7,4

	ZO		FO		HG		HCW		KMP		
	R^2	k	R^2	k	R^2	k	R^2	k	R^2	k	n
AC73CC5	0,994	7,841	0,967	0,025	0,977	33,21	0,970	-0,003	0,967	0,297	0,057
AC73CC10	0,995	8,294	0,943	0,028	0,987	35,31	0,954	-0,003	0,929	0,263	0,064
AC73CC15	0,984	4,657	0,960	0,012	0,992	19,98	0,922	-0,002	0,961	0,530	0,028
AC73CC20	0,984	3,891	0,968	0,010	0,986	16,65	0,908	-0,001	0,968	0,576	0,022

Kết quả trong các Bảng 3.8 – 3.11 cho thấy thấy động học giải phóng CC tuân theo mô hình Higuchi là phù hợp nhất, phần trăm CC giải phóng tỉ lệ với căn bậc 2 thời gian và phụ thuộc vào quá trình khuếch tán CC ra khỏi màng tổ hợp AG/CS.

3.2.6.2. Động học quá trình giải phóng có kiểm soát



Hình 3.14. Đồ thị phản ánh giải phóng chậm có kiểm soát CC từ màng tổ hợp AC73CC10 theo các mô hình động học khác nhau trong dung dịch pH 7,4

Bảng 3.12. Các tham số của các phương trình động học giải phóng có kiểm soát CC từ các màng tổ hợp AC73CC trong dung dịch pH 2

	ZO		FO		HG		HCW		KMP		
	R2	k	R2	k	R2	k	R2	k	R2	k	n
AC73CC5	0,925	0,710	0,927	0,0190	0,910	6,500	0,676	-0.0002	0,927	0,556	0,004
AC73CC10	0,880	0,108	0,900	0,0004	0,904	1,184	0,783	-0,0005	0,900	0,602	0,001
AC73CC15	0,981	0,190	0,980	0,0006	0,990	1,757	0,980	0,0001	0,980	0,557	0,001
AC73CC20	0,990	0,416	0,992	0,.0010	0,980	3,824	0,493	-0,0005	0,992	0,682	0,002

Bảng 3.13. Các tham số của các phương trình động học giải phóng có kiểm soát CC từ các màng tổ hợp AC73CC trong dung dịch pH 4,5

	ZO		FO		HG		HCW		KMP		
	R^2	k	R^2	k	R^2	k	R^2	k	R^2	k	n
AC73CC5	0,668	0,140	0,669	0,0003	0,620	1,248	0,932	0,0002	0,669	0,912	0,0006
AC73CC10	0,926	0,148	0,928	0,0003	0,905	1,352	0,988	0,0002	0,989	0,945	0,0007
AC73CC15	0,971	0,033	0,972	0,0001	0,981	0,309	0,999	0,0003	0,972	0,960	0,0001
AC73CC20	0,966	0,144	0,968	0,0003	0,937	1,038	0,996	0,0002	0,965	0,935	0,0006

Bảng 3.14. Các tham số của các phương trình động học giải phóng có kiểm soát CC từ các màng tổ hợp AC73CC trong dung dịch pH 6,8

	ZO		FO		HG		HCW		KMP		
	R^2	k	R^2	k	R^2	k	R^2	k	R^2	k	n
AC73CC5	0,529	0,041	0,528	0,0002	0,493	0,364	0,994	0,0002	0,893	0,953	0,0003
AC73CC10	0,836	0,177	0,839	0,0003	0,804	1,605	0,959	0,0001	0,834	0,937	0,0008
AC73CC15	0,781	0,056	0,780	0,0001	0,812	0,529	0,997	0,0003	0,780	0,975	0,0002
AC73CC20	0,810	0,121	0,808	0,0002	0,853	1,027	0,985	0,0002	0,808	0,955	0,0005

Bảng 3.15. Các tham số của các phương trình động học giải phóng có kiểm soát CC từ các màng tổ hợp AC73CC trong dung dịch pH 7,4

	ZO		FO		HG		HCW		KMP		
	R^2	k	R^2	k	R^2	k	R^2	k	R^2	k	n
AC73CC5	0,951	0,055	0,951	0,0002	0,965	0,508	0,999	0,0002	0,951	0,975	0,0002
AC73CC10	0,970	0,063	0,970	0,0001	0,978	0,585	0,999	0,0002	0,97	0,969	0,0003
AC73CC15	0,759	0,091	0,760	0,0002	0,784	0,851	0,989	0,0002	0,760	0,966	0,0003
AC7CC20	0,738	0,130	0,736	0,0003	0,782	1,234	0,971	0,0002	0,736	0,961	0,0006

Động học giải phóng chậm, có kiểm soát CC từ các màng tổ hợp AC73CC được thể hiện trên Hình 3.14 và các Bảng 3.12 – 3.15. Kết quả cho thấy trong 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 CC từ màng tổ hợp tuân theo định luật Fick loại 1, có nghĩa là giải phóng CC chỉ tuân theo cơ chế khuếch tán thông thường. Với các mẫu được khảo sát trong các dung dịch pH còn lại, lượng CC được giải phóng trong giai đoạn giải phóng chậm 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 dung dịch pH 4,5, lớn hơn 0,96 với dung dịch pH 6,8 và lớn hơn 0,97 với dung dịch pH 7,4. Kết quả này tương đồng với kết quả nghiên cứu giải phóng thuốc Lovastatin từ màng tổ hợp alginate/chitosan của nhóm nghiên cứu Thạch Thị Lộc (138).

Tóm tắt kết quả mục 3.2

1. Kết quả phân tích phổ FTIR 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 màng tổ hợp AG/CS 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 màng tổ hợp AG/CS dao động trong khoảng 64,32 – 88,73 %. Hàm lượng CC giải phóng khỏi màng tổ hợp AG/CS trong dung dịch pH 4,5, 6,8 và 7,4 diễn ra nhanh và ổn định hơn so với trong dung dịch pH 2. Hàm lượng CC ban đầu và thời gian 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 O. 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 màng tổ hợp AG/CS.

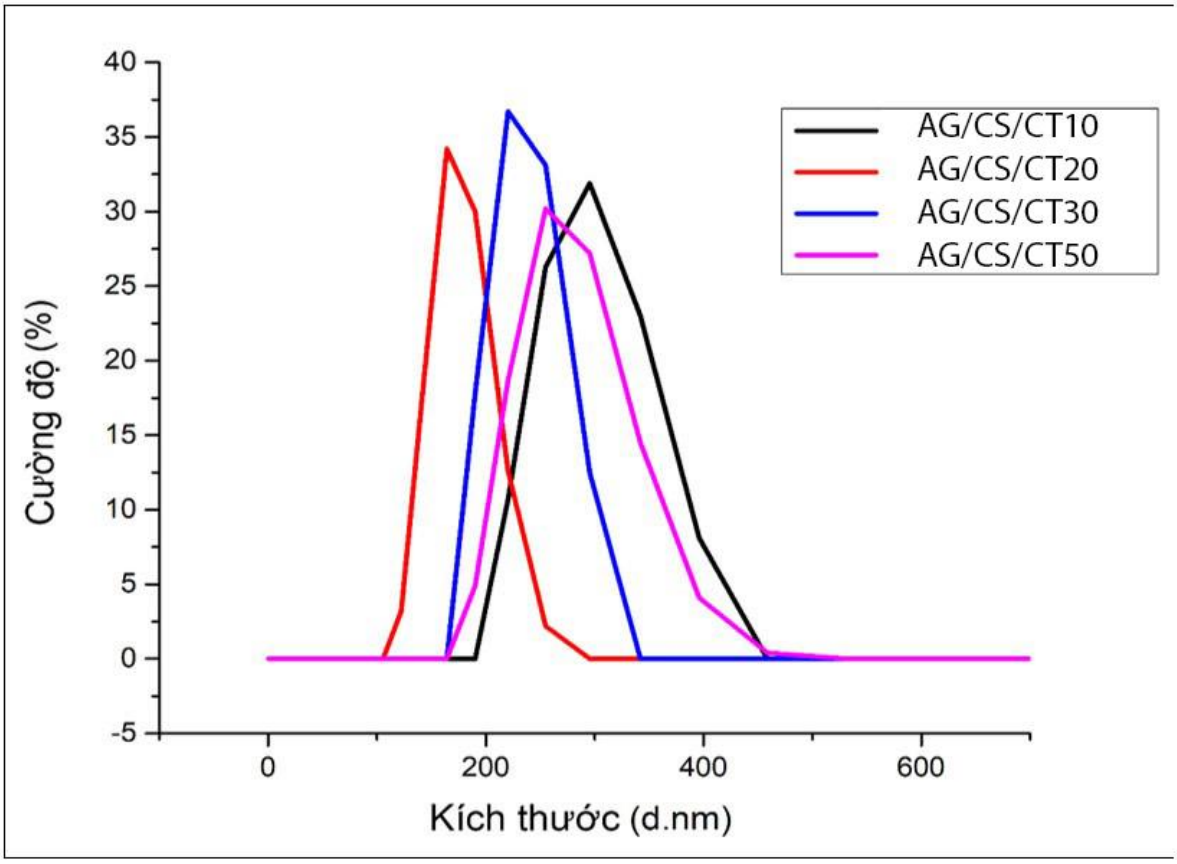
Động học giải phóng chậm có kiểm soát CC từ các màng tổ hợp AC73CC cho thấy trong dung dịch pH 2, động học giải phóng CC theo các mô hình FO, HG và KMP đều có giá trị hệ số hồi quy $R^2 > 0,900$. Với các mẫu giải phóng CC trong các dung dịch pH còn lại, giai đoạn giải phóng CC có kiểm soát đều tuân theo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

3.3. Tổ hợp hạt AG/CS mang CT trà hoa vàng

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. Mẫu CT đã được làm giàu hàm lượng polyphenol tổng lên đến 30,25 %, cao gấp 6,35 lần so với hàm lượng polyphenol tổng trong CC (4,763 %). Từ đó chế tạo 4 mẫu tổ hợp hạt AG/CS/CT10, AG/CS/CT20, AG/CS/CT30 và AG/CS/CT50 với hàm lượng CT tương ứng lần lượt là 10 %, 20 %, 30 % và 50 % tính theo tổng khối lượng của AG và CS. Trong đó, hàm lượng PP tổng tương ứng là 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

Kích thước hạt là một trong những đặc trưng quan trọng của hạt vật liệu tổ hợp AG/CS mang CT, vì nó ảnh hưởng trực tiếp đến sinh khả dụng, hiệu quả hoạt động của hệ mang thuốc trong cơ thể. Kích thước hạt nhỏ sẽ thuận lợi cho hệ thống lưới nội mô hấp thu, nâng cao tỷ lệ sử dụng thuốc và giảm tác dụng phụ của thuốc. Giản đồ phân bố kích thước và kích thước hạt của vật liệu tổ hợp AG/CS/CT phân tán trong nước cất được xác định bằng phương pháp tán xạ ánh sáng động được thể hiện trên Hình 3.15 và trong Bảng 3.16.



Hình 3.15. Giản đồ phân bố kích thước hạt của tổ hợp hạt AG/CS/CT mang các hàm lượng CT khác nhau

Bảng 3.16. Kích thước hạt trung bình của các mẫu hạt tổ hợp AG/CS/CT có hàm lượng CT khác nhau

Mẫu	Khoảng kích thước hạt (nm)	Kích thước hạt		Độ rộng pic (nm) (r)	Kích thước hạt trung bình (nm) D = d ± r/2
		d (nm)	%		
AG/CS/CT10	220,2 – 396,1	295,6	100	48,52	295,6 ± 24,26
AG/CS/CT20	141,8 - 295,3	182,3	100	21,63	182,3 ± 10,82
AG/CS/CT30	164,2 – 342,0	235,8	100	32,00	235,8 ± 16,00
AG/CS/CT50	190,1 – 396,1	284,3	100	43,81	284,3 ± 21,91

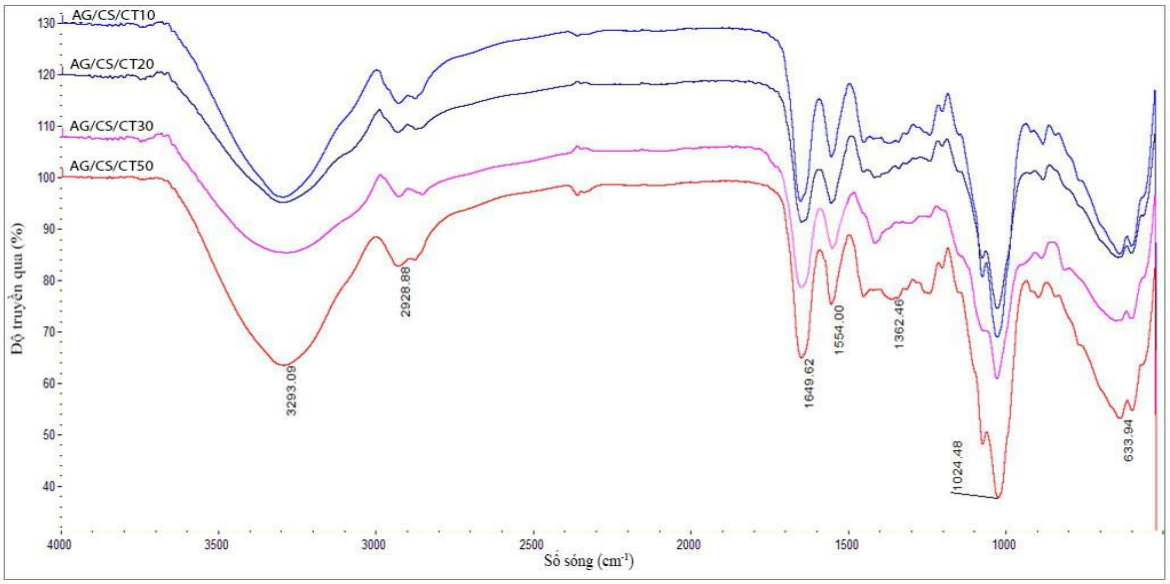
Kích thước hạt trung bình của các mẫu hạt tổ hợp AG/CS/CT dao động trong khoảng 141,8 – 396,1 nm. Trong đó, kích thước hạt trung bình của AG/CS/CT10,

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. Vai trò của các hệ mang thuốc có kích thước nano đã được nghiên cứu và cho thấy các hiệu quả tích cực như: Nâng cao khả năng hấp thu thuốc vào các khối u hoặc vị trí mà thuốc tác dụng, tăng độ tan của dược chất ít tan, tăng sinh khả dụng của các thuốc nói chung, đặc biệt các tác nhân chống ung thư, cho phép kiểm soát tốt hơn về thời gian và sự phân bố của các thuốc trong cơ thể [137, 138].

So với tổ hợp AG/CS mang một số thuốc khác, hạt nano AG/CS/CT thu được có kích thước hạt trung bình nhỏ hơn. Ví dụ, trong nghiên cứu của Rusandica Stoica và cộng sự, kích thước của tổ hợp hạt AG/CS chứa các CT tự nhiên tăng từ 962 nm đến 2207 nm khi thay đổi tỉ lệ khối lượng AG : CS (9,3 : 1) bằng tỉ lệ khối lượng AG : CS (6 : 1). Ngoài ra, kích thước của hạt còn phụ thuộc vào pH dung dịch [85].

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

Phổ FTIR của các mẫu hạt vật liệu tổ hợp AG/CS/CT với các tỉ lệ CT khác nhau được trình bày trên Hình 3.16.

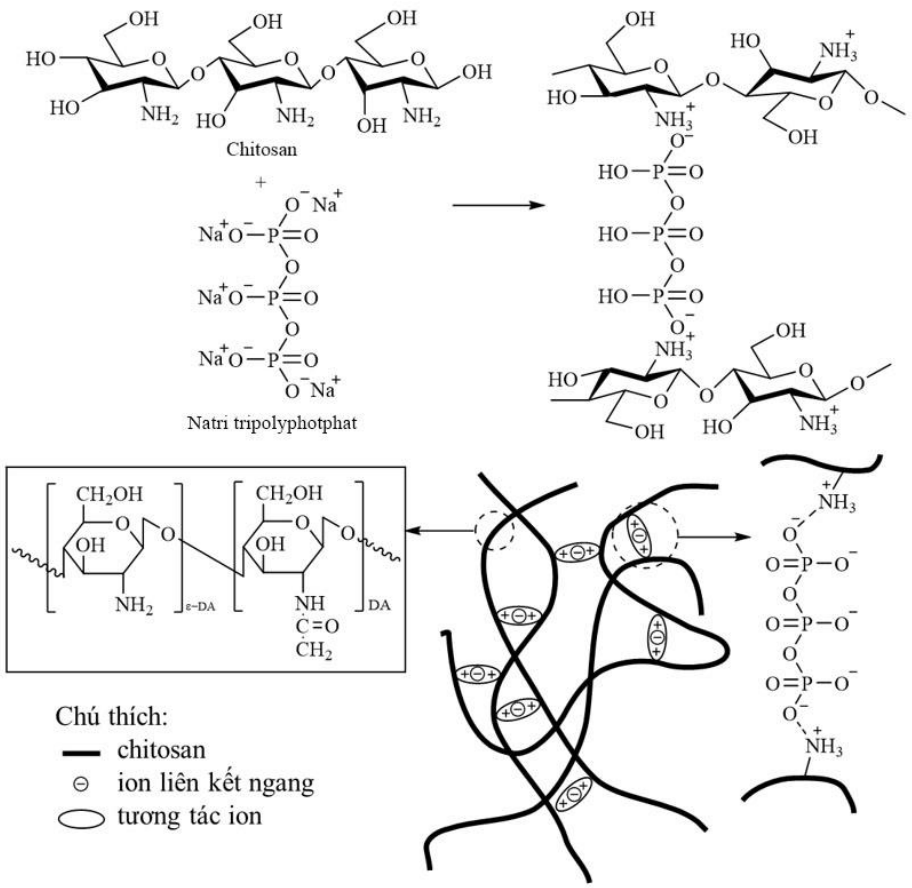


Hình 3.16. Phổ FTIR tổ hợp hạt AG/CS/CT với các tỉ lệ CT khác nhau

Quan sát Hình 3.16, ta thấy các vân phổ dao động đặc trưng của CT như: –OH, C–H, C–O có xuất hiện trên phổ FTIR với số sóng dịch chuyển nhẹ. Ngoài ra, có một số đỉnh mới ở số sóng 1554 cm^{-1} đặc trưng cho dao động của nhóm N–H trong CS. Trên phổ FTIR, còn có các nhóm chức đặc trưng cho các polymer trong AG như: –OH, C=O, C–O, trong CS là –OH, C–O, NH với CT là –OH, C–O, C=C, C=O. Phổ FTIR hạt tổ hợp AG/CS/CT cường độ pic của các nhóm chức đặc trưng này có thể ảnh hưởng tới nhau. Do đó, số sóng 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. Dao động của một số nhóm đặc trưng trong phổ FTIR của các hạt tổ hợp AG/CS/CT được trình bày trong Bảng 3.17. 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 cm^{-1} trong các mẫu hạt tổ hợp. Các mẫu hạt tổ hợp AG/CS/CT có sự dịch chuyển nhỏ số sóng 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 giữa các nhóm hydroxyl, carbonyl và amine [137]. Ngoài ra, còn có sự hình thành liên kết ngang giữa chất tạo liên kết ngang STPP với AG, CS như mô hình trên Hình 3.17 [137, 138].

Bảng 3.17. Dao động của một số nhóm đặc trưng của CT và hạt tổ hợp AG/CS/CT

Mẫu / Dao động	Số sóng (cm^{-1})				
	CT	AG/CS/CT10	AG/CS/CT20	AG/CS/CT30	AG/CS/CT50
$\nu_{NH_2,\ OH}$	3438,20	3295,41	3293,75	3288,83	3299,09
ν_{CH}	2978,18	2929,17	2931,41	2927,09	2928,88
$\nu_{C=O}$	1637,02	1651,24	1648,92	1654,52	1649,62
$\nu_{C=C}$	1637,02	1551,30	1556,21	1552,43	1554,00
ν_{NH_2, CH_2}	1390,70	1455,49	1416,59	1416,46	1362,46
ν_{C-O-C}	1251,73; 1050,27	1027,12	1026,45	1027,94	1024,48



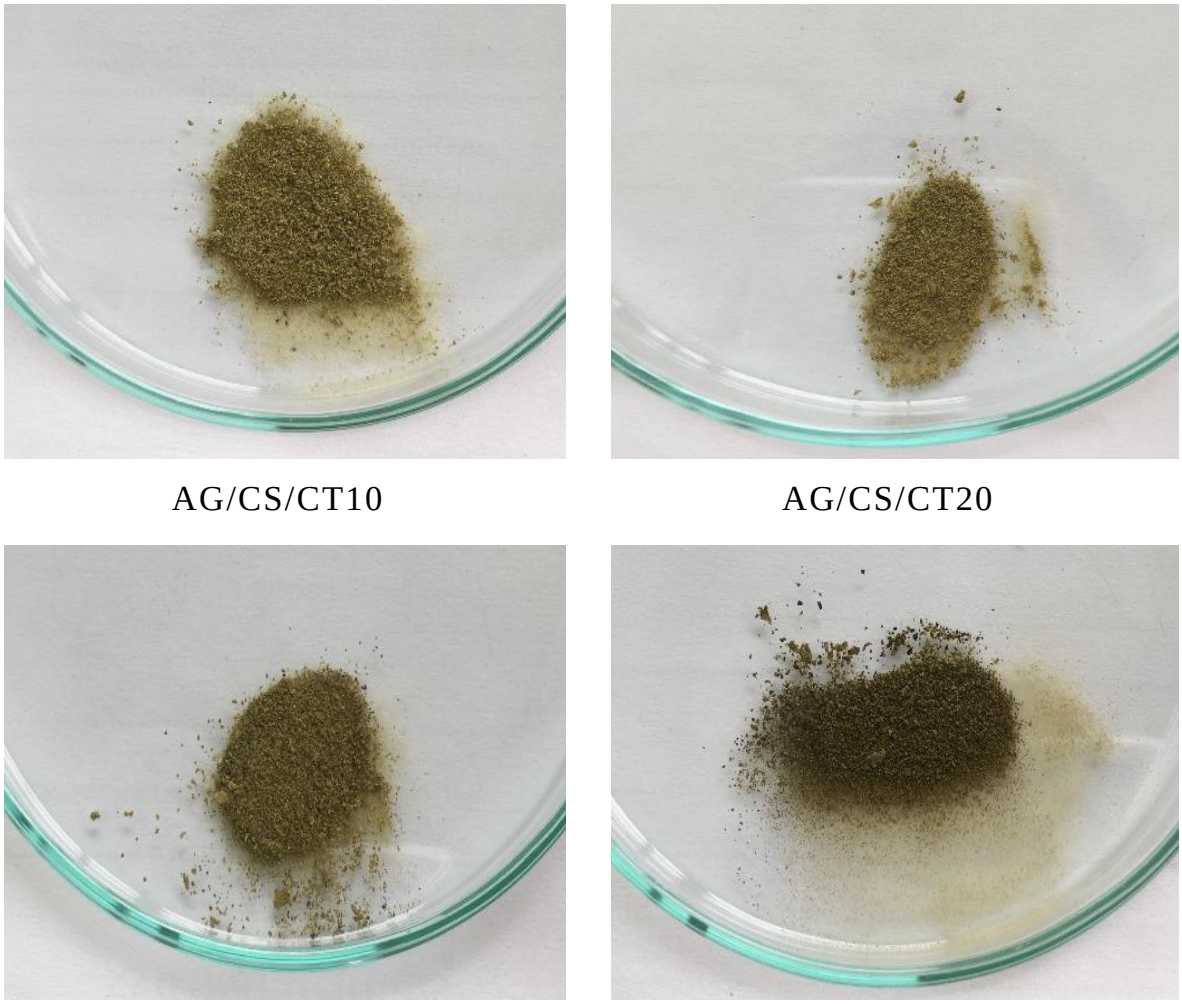
Hình 3.17. Mô hình mô tả sự hình thành liên kết ngang STPP với CS [137,138]

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

Hình ảnh tổ hợp hạt AG/CS/CT với hàm lượng CT khác nhau

Hình ảnh ngoại quan các mẫu tổ hợp hạt AG/CS/CT với hàm lượng CT khác nhau được trình bày trên Hình 3.18.

Các mẫu hạt AG/CS/CT thu được ở dạng bột khô, xốp, màu vàng sẫm. Màu sắc các hạt vật liệu tổ hợp có sự khác biệt rõ ràng do hàm lượng CT được đưa vào các mẫu tổ hợp khác nhau. Các hạt tổ hợp AG/CS/CT có màu đậm dần theo sự tăng hàm lượng của CT trong mẫu. Quan sát Hình 3.18 ta thấy màu nhạt nhất là mẫu AG/CS/CT10, màu đậm nhất là mẫu AG/CS/CT50.



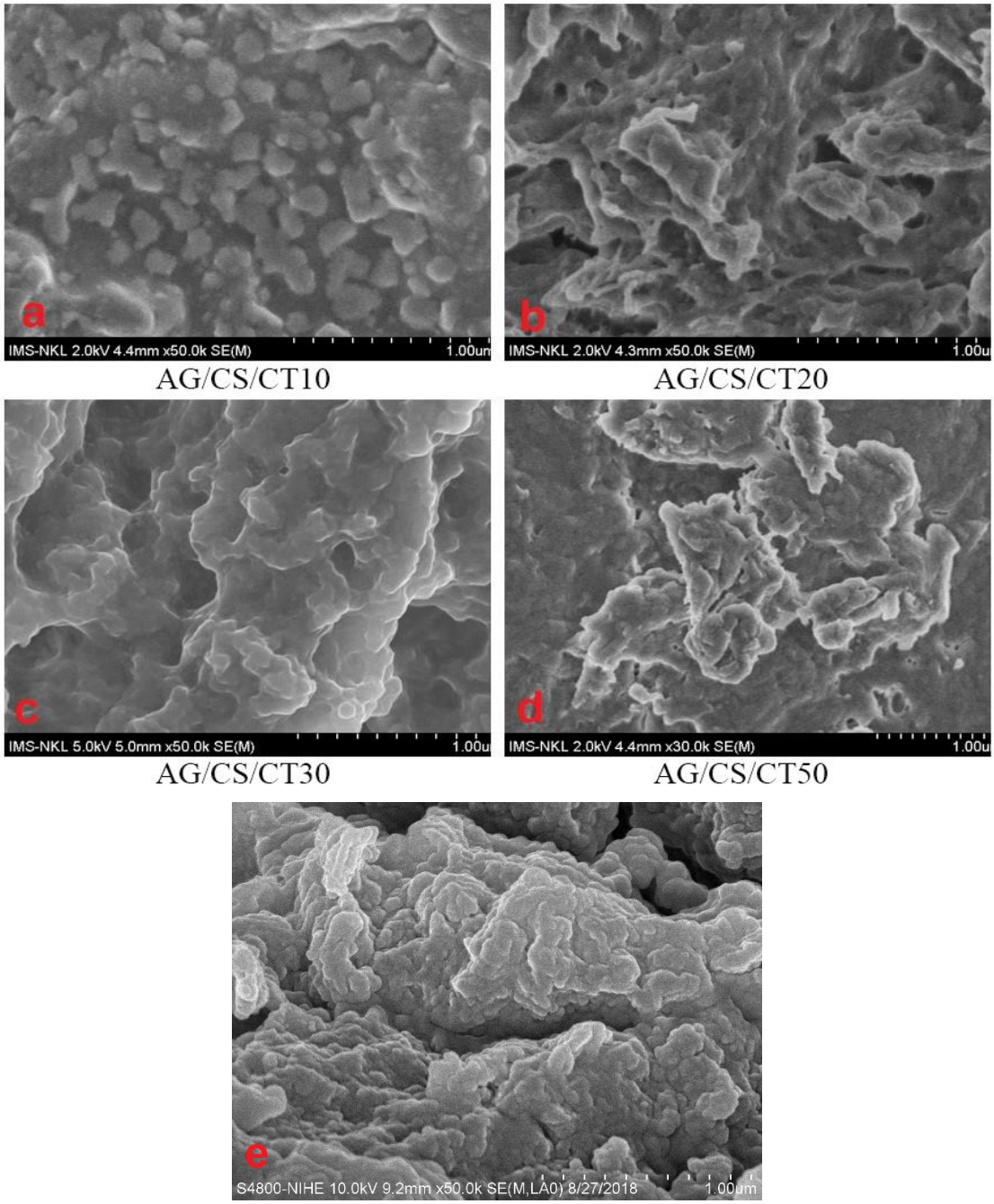
AG/CS/CT10 AG/CS/CT20

AG/CS/CT30 AG/CS/CT50

Hình 3.18. Hình ảnh ngoại quan của các mẫu hạt tổ hợp AG/CS/CT với hàm lượng CT khác nhau

Ảnh SEM tổ hợp AG/CS/CT với hàm lượng CT khác nhau

Hình 3.19 là ảnh SEM của các tổ hợp AG/CS/CT với các hàm lượng CT khác nhau và CT. Mẫu tổ hợp AG/CS/CT10 với hàm lượng CT đưa vào thấp nhất trong các mẫu được khảo sát cho thấy sự khác biệt hình thái rõ nhất. Các hạt tách rời nhau, kích thước dao động trong khoảng 50 – 200 nm.



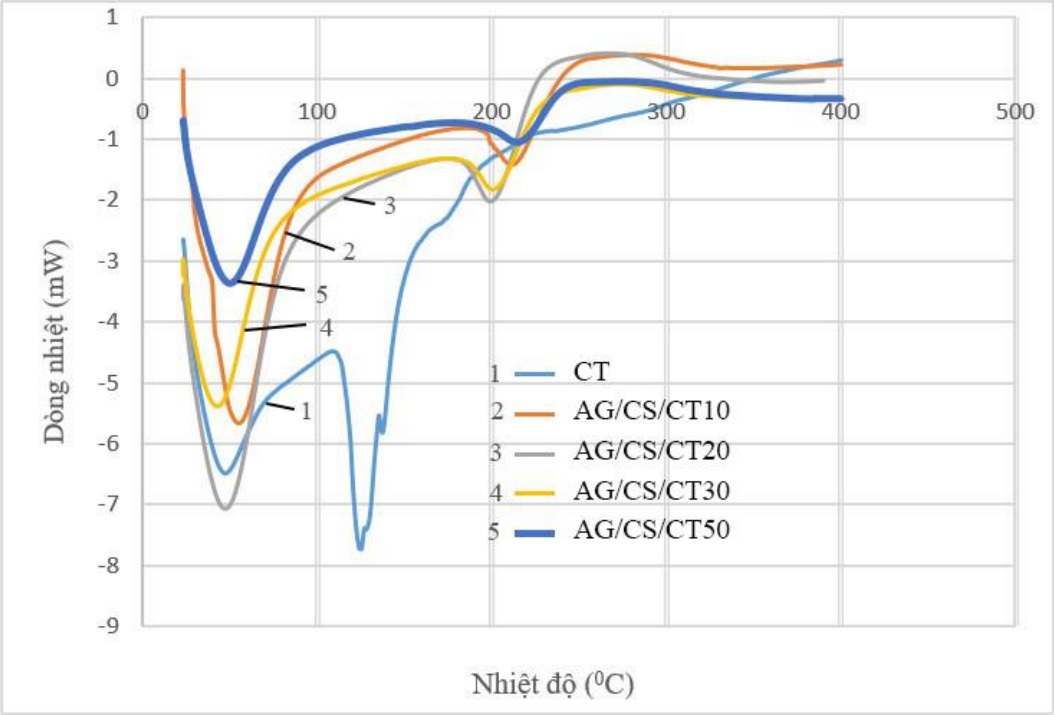
Hình 3.19. Ảnh SEM của các hạt tổ hợp AG/CS/CT với hàm lượng CT khác nhau và CT

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 kết 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 (Hình 3.19e) với các mẫu tổ hợp AG/CS/CT khác, ta thấy các mẫu hạt tổ hợp có kích thước đồng đều hơn. Điều này

phản ánh tương tác tốt giữa các nhóm chức trong AG/CS với nhóm chức trong CT thông qua các liên kết hydro và tương tác lưỡng cực. Kết quả này cũng tương đồng với các nghiên cứu về tổ hợp hạt vi cầu AG/CS chứa polyphenol trong trà của Anna Wang và cộng sự [138].

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

Giản đồ nhiệt lượng quét vi sai (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 3.20 và trong Bảng 3.18.



Hình 3.20. Giản đồ DSC của hạt tổ hợp AG/CS/CT với hàm lượng CT khác nhau

Bảng 3.18. Các đặc trưng DSC của hạt tổ hợp AG/CS/CT với hàm lượng CT khác nhau

Mẫu	T_{nc} (°C)	T_{ph} (°C)	ΔH_m (J/g)
CT	47,2	125,0	28,27
AG/CS/CT10	53,3	209,3	133,39
AG/CS/CT20	57,4	209,1	147,33
AG/CS/CT30	51,6	208,9	131,69
AG/CS/CT50	48,0	212,1	201,89

Dễ dàng nhận thấy, T_{nc} cũng như T_{ph} của mẫu CT đều thấp hơn so với các mẫu hạt tổ hợp CT chứa AG và CS. Chênh lệch về T_{ph} trong các mẫu không nhiều, dao động từ 47,2 – 57,4 ^oC. T_{ph} và ΔH_m của hạt tổ hợp AG/CS/CT50 so với CT cao hơn lần lượt là 1,7 lần và 7,5 lần. Như vậy, kết hợp AG/CS và CT đã cải thiện đáng kể T_{ph} và ΔH_m của các mẫu hạt tổ hợp. T_{ph} của các mẫu hạt tổ hợp cao hơn nhiều so với mẫu CT. Trong các mẫu hạt tổ hợp AG/CS/CT, mẫu AG/CS/CT50 có T_{nc} thấp (48 ^oC) nhưng T_{ph} lại cao nhất (212 ^oC). Ngược lại, ΔH_m của CT thấp hơn hẳn so với các mẫu tổ hợp. Mẫu AG/CS/CT50 có ΔH_m cao nhất (201,89 J/g). Kết hợp với các kết quả phân tích phổ FTIR và ảnh SEM ta có thể khẳng định các mẫu hạt tổ hợp đã liên kết với nhau thông qua liên kết hydro và tương tác lưỡng cực giữa các nhóm chức đặc trưng của AG, CS, các polyphenol trong CT dẫn đến làm tăng nhiệt nóng chảy và nhiệt phân hủy.

So sánh với các tổ hợp màng tổ hợp AC73CC có hàm lượng CC khác nhau ở Bảng 3.5, có thể thấy T_{nc} của các mẫu tổ hợp hạt thấp hơn hơn so với các màng tổ hợp. Các mẫu hạt tổ hợp nóng chảy ở nhiệt độ khoảng 50 ^oC. Các mẫu màng có thành phần khối lượng CC và CT tương tự nhau như (AC73CT10 với AG/CS/CT10) và (AC73CT20 với AG/CS/CT20) đều có T_{nc}, T_{ph} cao hơn hẳn so với các 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 cũng cao hơn so với các mẫu hạt tổ hợp có thành phần 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 3.19). Các mẫu hạt tổ hợp chứa CT có hiệu suất mang CT cao hơn so với các mẫu màng tổ hợp chứa CC. Điều này có thể do sự khác biệt giữa phương pháp dung dịch (chế tạo mẫu màng) và phương pháp vi nhũ (chế tạo mẫu hạt). Theo đó, các liên kết ngang tạo thành do có chất tạo liên kết ngang STPP khi chế tạo các hạt tổ hợp CT đã ảnh hưởng tới tương tác giữa CT với các polymer AG, CS. Mẫu hạt tổ hợp AG/CS/CT50 (hàm lượng CT chiếm 50 % tính

theo tổng khối lượng AG và CS) có thể làm tăng tương tác CT – CT, giảm tương tác giữa CT với AG, CS, dẫn đến làm giảm hiệu suất mang CT so với mẫu hạt tổ hợp AG/CS/CT30 (Bảng 3.19).

Bảng 3.19. 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

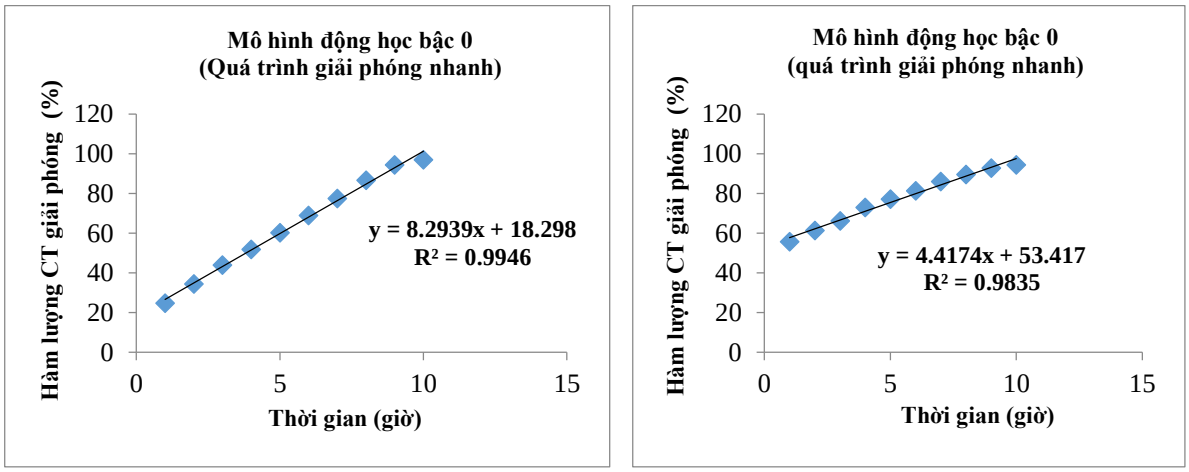
3.3.6. Nghiên cứu giải phóng CT từ tổ hợp hạt AG/CS mang CT trong các môi trường dung dịch pH khác nhau

Trong nghiên cứu này, hàm lượng CT giải phóng từ hạt tổ hợp AG/CS/CT_n (n = 10 – 50) trong các dung dịch pH mô phỏng các cơ quan tiêu hóa điển hình tương ứng trong cơ thể người như: pH 2,0 tương ứng với phần dưới dạ dày - nơi thuốc được lưu lại từ 1 đến 3 giờ; pH 4,5 tương ứng với phần trên của dạ dày - nơi thuốc được lưu lại từ 30 đến 60 phút, ruột non - nơi thuốc ở lại từ 1 đến 5 giờ và ruột già - nơi thuốc được lưu trữ 10 giờ; pH 6,8 tương ứng với vùng đại tràng trong cơ thể - nơi thuốc được lưu lại từ 10 đến 15 giờ và cuối cùng pH 7,4, vùng tá tràng trong cơ thể - nơi thuốc được lưu lại từ 30 đến 60 phút. Các yếu tố ảnh hưởng như thời gian, pH dung dịch, hàm lượng CT đã được khảo sát để đánh giá động học giải phóng CT từ các hạt tổ hợp AG/CS/CT.

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 khảo sát như trên Hình 3.21. 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 CT nhanh trong 10 giờ đầu tiên và có kiểm soát trong 20 giờ tiếp theo. Ban đầu, CT giải phóng xảy ra ngay lập tức trên bề mặt của hạt tổ hợp. Sau đó, quá trình giải phóng CT được kiểm soát bởi sự khuếch tán từ bên trong hạt tổ hợp. Cụ thể, đối với

mẫu AG/CS/CT50, hơn 55 % hàm lượng CT được giải phóng trong 1 giờ đầu tiên ở dung dịch pH 7,4, trong khi phải mất tới 4 giờ để giải phóng gần 55 % CT ở dung dịch pH 2,0 và dung dịch pH 4,5. Trong 10 giờ đầu, hàm lượng CT giải phóng tương đối đồng đều và đạt trên 90% ở tất cả các mẫu. Trong 20 giờ sau đó, quá trình giải phóng CT được kiểm soát, chậm lại và đạt xấp xỉ 100 % với tất cả các mẫu. Điều này cũng diễn ra khá tương tự với mẫu AG/CS/CT10 khi hàm lượng CT giải phóng nhanh trong 10 giờ đầu (> 90 %) và ổn định trong 20 giờ tiếp theo.

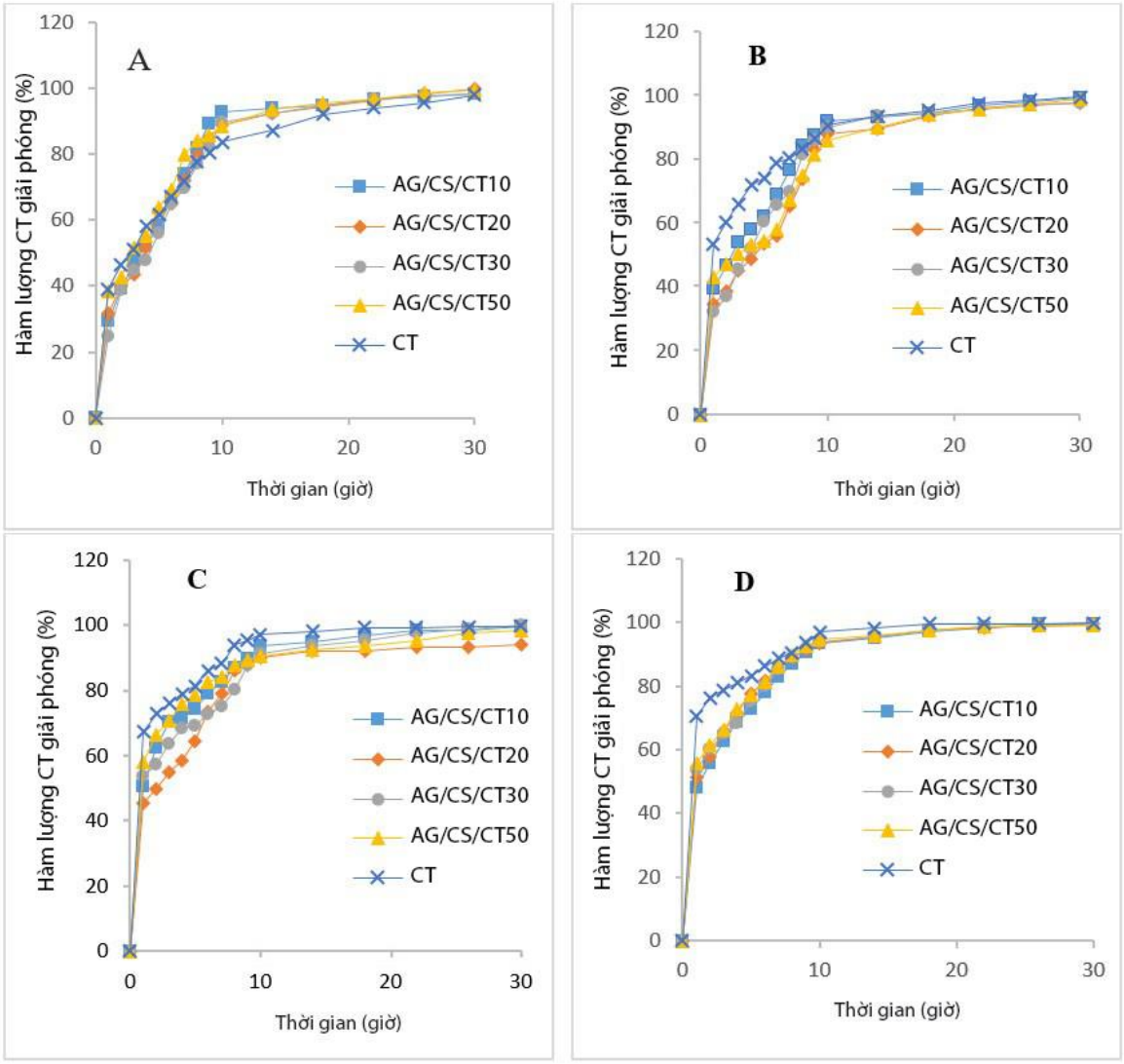


Hình 3.21. Hàm lượng CT giải phóng từ hạt tổ hợp AG/CS/CT10 (A) và AG/CS/CT50 (B) theo thời gian thử nghiệm trong dung dịch pH 7,4

3.3.6.2. Ảnh hưởng của dung dịch pH

Đồ thị trên Hình 3.22 cho thấy pH dung dịch có ảnh hưởng lớn đến quá trình giải phóng CT từ tổ hợp AG/CS/CT. Quá trình giải phóng CT ở các dung dịch pH khác nhau được sắp xếp theo thứ tự: pH 2,0 < pH 4,5 < pH 6,8 ≈ pH 7,4 [23, 24]. Cụ thể, trong giờ đầu tiên, hàm lượng CT giải phóng tương ứng với mẫu AG/CS/CT30 trong các dung dịch 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 dung dịch từ thấp đến cao, lần lượt là: 89,40 %; 90,04 %; 91,09 %; 93,82 %. Sau 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 tương tự với kết quả giải phóng CC từ màng tổ hợp AC73CT đã trình bày ở mục 3.2.5.1 cũng như từ chitosan với các tổ hợp thuốc khác [25,26]. Tuy nhiên, ở cùng một thời gian trong dung dịch pH 2: sau 1 giờ đầu tiên, hàm lượng CT giải phóng thấp nhất ứng với mẫu AG/CS/CT30 là 24,78 %, trong khi mẫu màng

AC73CC20 giải phóng CC tốt nhất cũng chỉ đạt 23,70 %, mẫu màng tổ hợp giải phóng CC thấp nhất là AC73CC5 (8,6 %). Sau 30 giờ, mẫu hạt tổ hợp AG/CS/CT20 đạt hàm lượng CT giải phóng cao nhất (99,67 %), trong khi với mẫu màng giải phóng CC tốt nhất là AC73CC20 cũng chỉ đạt 78,17 %. Sự khác biệt về hàm lượng CC và CT giải phóng từ vật liệu tổ hợp có thể do đặc điểm hình thái cấu trúc của các tổ hợp được chế tạo theo các phương pháp khác nhau. Phương pháp dung dịch cho sản phẩm ở dạng màng với 2 pha (pha nền và pha phân tán) sẽ có khả năng mang thuốc và giải phóng thuốc khác so với phương pháp vi nhũ cho sản phẩm ở dạng hạt [72]. Cũng như kích thước hạt ở dạng nano cũng thuận lợi cho việc kiểm soát các quá trình như khuếch tán, tăng độ tan của dược chất ít tan,... làm tăng hiệu quả sử dụng của thuốc [82, 83].



Hình 3.22. Hàm lượng CT giải phóng từ hạt tổ hợp AG/CS/CT trong các dung dịch pH khác nhau: pH 2 (A), pH 4,5 (B), pH 6,8 (C), pH 7,4 (D).

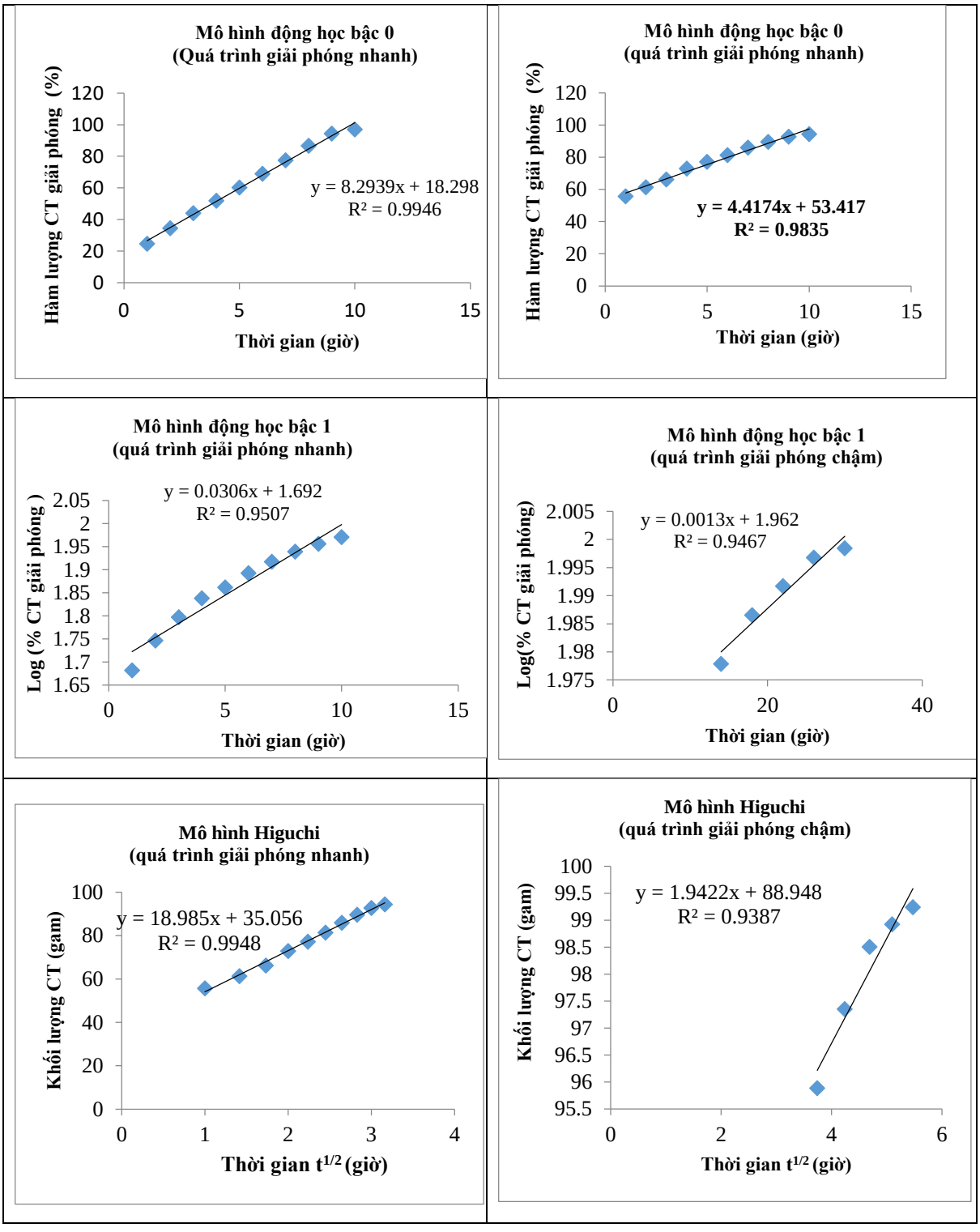
3.3.6.3. Ảnh hưởng của hàm lượng CT

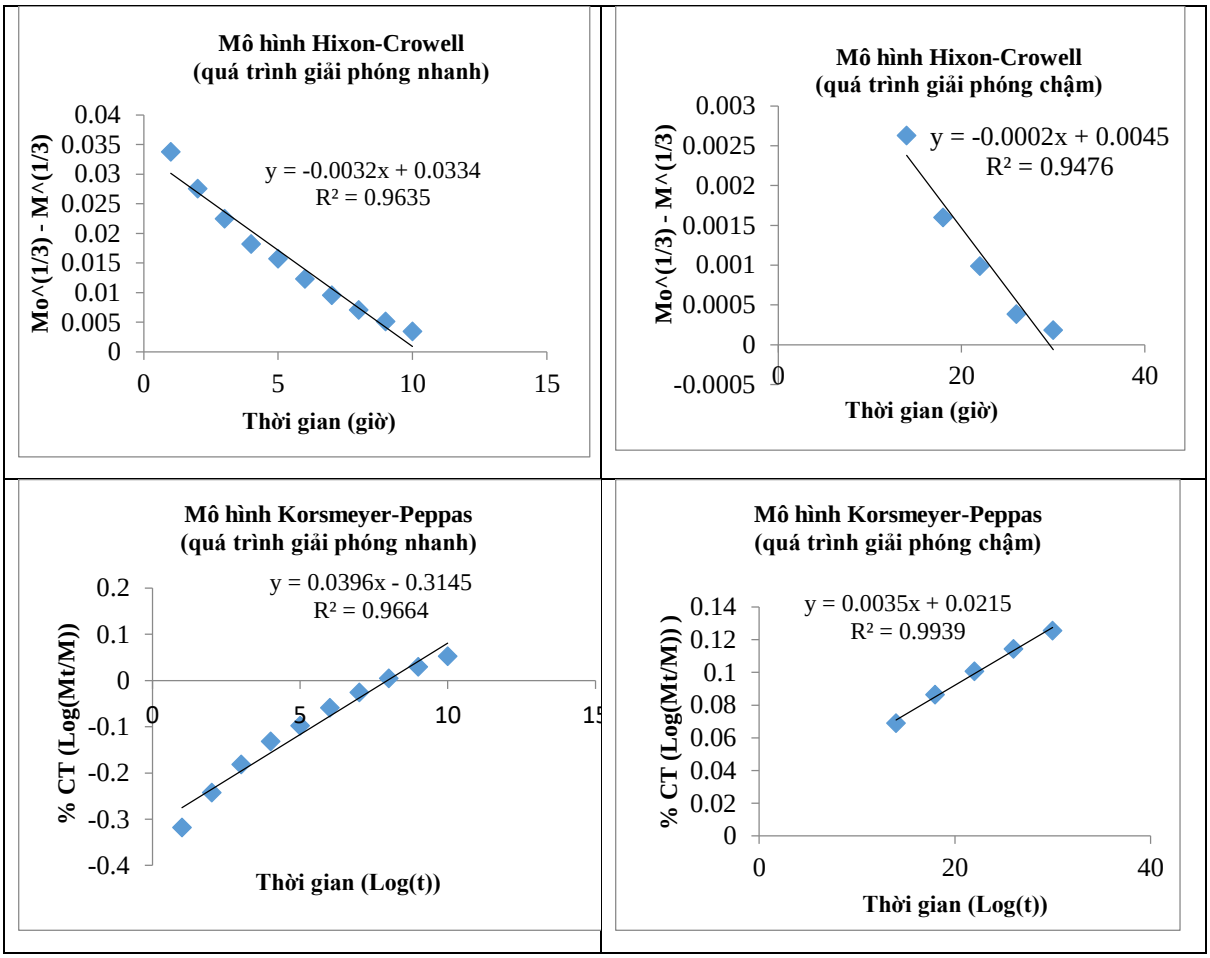
Từ Hình 3.22 có thể thấy, trong tất cả các dung dịch pH, các mẫu CT không mang bởi tổ hợp AG/CS đều giải phóng nhanh hơn so với các mẫu CT được mang bởi AG/CS, do mẫu CT được giải phóng trực tiếp mà không giải phóng từ bề mặt tổ hợp AG/CS/CT hoặc chịu ảnh hưởng của tương tác giữa các phân tử, nhóm chức trong tổ hợp AG/CS [137, 138], nhất là ở các dung dịch pH 4,5; 6,8; 7,4. Tuy nhiên, tại dung dịch pH 2, % CT giải phóng chậm, sau 10 giờ trở đi, CT còn giải phóng chậm hơn so với CT được mang bởi tổ hợp AG/CS. Kết quả này cho thấy quá trình giải phóng CT chịu ảnh hưởng đáng kể bởi dung dịch pH có tính acid mạnh.

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 mẫu có hàm lượng CT cao hơn. Ở các dung dịch pH khác nhau, ví dụ dung dịch pH 2,0 và dung dịch pH 4,5, CT giải phóng từ hạt tổ hợp AG/CS/CT30 thấp hơn so với hạt tổ hợp 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

Tương tự như các màng tổ hợp AC73CT mang hàm lượng CC khác nhau, quá trình giải phóng CT từ tổ hợp hạt AG/CS/CT cũng tuân theo các phương trình động học dựa trên động học bậc 0 (ZO), động học bậc nhất (FO), mô hình Higuchi (HG), mô hình Hixson - Crowell (HCW) và mô hình Korsmeyer - Peppas (KMP) khi nghiên cứu cơ chế giải phóng CT từ hạt tổ hợp AG/CS/CT trong dung dịch có pH khác nhau. Hàm lượng CT giải phóng được tính toán bằng phương pháp hồi quy sử dụng phần mềm Microsoft Excel 2016 (Hình 3.23).


Mô hình động học bậc 0
(Quá trình giải phóng nhanh)
Hàm lượng CT giải phóng (%)
y = 8.2939x + 18.298
R² = 0.9946
Thời gian (giờ)
Mô hình động học bậc 0
(quá trình giải phóng nhanh)
Hàm lượng CT giải phóng (%)
y = 4.4174x + 53.417
R² = 0.9835
Thời gian (giờ)
Mô hình động học bậc 1
(quá trình giải phóng nhanh)
Log (% CT giải phóng)
y = 0.0306x + 1.692
R² = 0.9507
Thời gian (giờ)
Mô hình động học bậc 1
(quá trình giải phóng chậm)
Log(% CT giải phóng)
y = 0.0013x + 1.962
R² = 0.9467
Thời gian (giờ)
Mô hình Higuchi
(quá trình giải phóng nhanh)
Khối lượng CT (gam)
y = 18.985x + 35.056
R² = 0.9948
Thời gian t1/2 (giờ)
Mô hình Higuchi
(quá trình giải phóng chậm)
Khối lượng CT (gam)
y = 1.9422x + 88.948
R² = 0.9387
Thời gian t1/2 (giờ)



Hình 3.23. Đồ thị động học giải phóng CT từ hạt tổ hợp AG/CS/CT10 theo các mô hình động học khác nhau trong dung dịch pH 7,4

Giá trị hệ số hồi quy (R^2) thu được từ các phương trình hồi quy được sử dụng để xác định cơ chế giải phóng và mô hình phù hợp nhất. Các mô hình động học giải phóng CT từ các hạt tổ hợp AG/CS/CT trong các dung dịch pH khác nhau ở giai đoạn giải phóng nhanh được trình bày trong Bảng 3.20. 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, CT giải phóng tuân theo mô hình động học KMP và bậc 0; ở dung dịch pH 7,4, CT giải phóng tuân theo mô hình động học HG. Trong các mô hình này, các tổ hợp hạt ở trạng thái rắn giải phóng thuốc theo từng lớp [132].

Bảng 3.20. Các tham số của phương trình hồi quy phản ánh giải phóng nhanh CT từ hạt tổ hợp AG/CS/CT trong các dung dịch pH 2, pH 4,5, pH 6,8 và pH 7,4 theo các mô hình động học khác nhau

pH	Mẫu	ZO		FO		HG		HCW		KMP		
		R^2	K	R^2	K	R^2	K	R^2	K	R^2	K	n
pH 2	CT	0,989	2,698	0,980	0,006	0,986	11,51	0,994	0,003	0,980	0,705	0,014
	AG/CS/CT10	0,996	7,063	0,960	0,023	0,982	29,97	0,979	0,005	0,966	0,302	0,061
	AG/CS/CT20	0,992	6,493	0,963	0,021	0,981	27,59	0,976	0,006	0,963	0,317	0,049
	AG/CS/CT30	0,990	6,818	0,928	0,024	0,984	29,05	0,959	0,007	0,930	0,278	0,055
	AG/CS/CT50	0,978	6,011	0,958	0,018	0,975	25,64	0,967	0,007	0,958	0,372	0,042
pH 4,5	CT	0,988	3,329	0,981	0,018	0,983	14,18	0,984	0,004	0,981	0,666	0,018
	AG/CS/CT10	0,881	7,462	0,976	0,017	0,977	24,97	0,986	0,004	0,981	0,386	0,048
	AG/CS/CT20	0,977	0,950	0,993	0,020	0,923	24,76	0,991	0,005	0,995	0.317	0,052
	AG/CS/CT30	0,994	6,672	0,970	0,022	0,977	28,28	0,982	0,007	0,975	0,310	0,058
	AG/CS/CT50	0,951	4,810	0,976	0,015	0,883	19,80	0,969	0,005	0,990	0,391	0,042
pH 6,8	CT	0,970	3,842	0,940	0,010	0,995	16,63	0,951	0,005	0,940	0,549	0,023
	AG/CS/CT10	0,951	4,239	0,903	0,011	0,981	18,41	0,921	0,003	0,942	0,810	0,035
	AG/CS/CT20	0,983	5,425	0,977	0,015	0,963	22,95	0,980	0,005	0,985	4,118	0,044
	AG/CS/CT30	0,981	3,977	0,980	0,011	0,955	16,77	0,982	0,004	0,987	2,535	0,033
	AG/CS/CT50	0,946	3,423	0,913	0,009	0,991	14,97	0,926	0,003	0,914	6,169	0,020
pH 7,4	CT	0,991	4,942	0,964	0,154	0,993	21,14	0,975	0,010	0,964	0,395	0,035
	AG/CS/CT10	0,983	4,964	0,951	0,013	0,999	21,38	0,963	0,003	0,967	0,485	0,040
	AG/CS/CT20	0,960	4,726	0,924	0,012	0,993	20,55	0,937	0,004	0,953	0,516	0,038
	AG/CS/CT30	0,986	4,960	0,968	0,012	0,989	19,70	0,975	0,004	0,979	0,524	0,036
	AG/CS/CT50	0,984	4,417	0,963	0,011	0,995	18,99	0,971	0,004	0,977	0,546	0,034

Tương tự, với động học giải phóng có kiểm soát CT từ hạt tổ hợp AG/CS/CT ở giai đoạn thứ hai (sau 10 giờ), các thông số của phương trình hồi quy phản ánh quá trình giải phóng chậm CT ở các dung dịch pH khác nhau được trình bày trong Bảng 3.21. Ở tất cả các dung dịch pH giải phóng chậm CT, đều tuân theo mô hình động học KMP, với các giá trị hằng số khuếch tán (n) nằm trong khoảng từ 0,0003 đến 0,005. Điều này có nghĩa là giải phóng CT từ hạt tổ hợp tuân theo định luật khuếch tán thứ nhất của Fick [118, 119].

Bảng 3.21. Các tham số của phương trình hồi quy phản ánh giải phóng có kiểm soát CT từ hạt tổ hợp AG/CS/CT trong các dung dịch pH 2, pH 4,5, pH 6,8 và pH 7,4 theo các mô hình động học khác nhau

pH	Mẫu	ZO		FO		HG		HCW		KMP		
		R^2	K	R^2	K	R^2	K	R^2	K	R^2	K	n
pH 2	CT	0,630	0,083	0,629	0,0002	0,676	0,790	0,615	0,0001	0,623	0,975	0,001
	AG/CS/CT10	0,983	0,295	0,982	0,0006	0,986	2,722	0,982	0,0002	0,998	1,002	0,004
	AG/CS/CT20	0,982	0,530	0,996	0,001	0,999	4,342	0,997	0,0003	0,996	0,863	0,002
	AG/CS/CT30	0,944	0,375	0,940	0,0007	0,967	3,501	0,942	0,0003	0,940	0,879	0,002
	AG/CS/CT50	0,972	0,365	0,971	0,0007	0,983	3,382	0,971	0,0003	0,971	0,890	0,002
pH 4,5	CT	0,743	0,001	0,784	0,325	0,743	0,001	0,743	0,0001	0,743	0,974	0,001
	AG/CS/CT10	0,996	0,390	0,996	0,0008	0,984	3,269	0,995	0,0002	0,999	0,993	0,004
	AG/CS/CT20	0,875	0,509	0,869	0,001	0,907	4,791	0,871	0,0003	0,971	0,936	0,005
	AG/CS/CT30	0,993	0,256	0,993	0,0005	0,991	2,447	0,993	0,0002	0,999	1,001	0,004
	AG/CS/CT50	0,946	0,513	0,935	0,01	0,966	4,787	0,942	0,0004	0,986	0,948	0,005

pH	Mẫu	ZO		FO		HG		HCW		KMP		
		R^2	K	R^2	K	R^2	K	R^2	K	R^2	K	n
pH 6,8	CT	0,971	0,345	0,969	0,001	0,985	3,576	0,970	0,0004	0,969	0,886	0,002
	AG/CS/CT10	0,936	0,346	0,935	0,0007	0,950	2,882	0,935	0,0002	0,992	1,579	0,004
	AG/CS/CT20	0,976	0,136	0,976	0,0003	0,972	1,152	0,976	0,0001	0,999	9,915	0,003
pH 6,8	AG/CS/CT30	0,972	0,409	0,970	0,0008	0,984	3,793	0,970	0,0003	0,995	4,993	0,004
	AG/CS/CT50	0,982	0,392	0,982	0,0008	0,979	3,613	0,982	0,0003	0,982	8,884	0,002
pH 7,4	CT	0,943	0,614	0,935	0,0013	0,961	5,717	0,937	0,0007	0,935	0,806	0,003
	AG/CS/CT10	0,983	4,964	0,951	0,013	0,999	21,38	0,963	0,003	0,967	0,485	0,040
	AG/CS/CT20	0,960	4,726	0,924	0,012	0,993	20,55	0,937	0,004	0,953	0,516	0,038
	AG/CS/CT30	0,986	4,960	0,968	0,012	0,989	19,70	0,975	0,004	0,979	0,524	0,036
	AG/CS/CT50	0,984	4,417	0,963	0,011	0,995	18,99	0,971	0,004	0,977	0,546	0,034

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)

Ung thư biểu mô (Carcinoma): Là bất kỳ bệnh ung thư phát sinh từ các tế bào biểu mô. Một số ung thư biểu mô phổ biến nhất là: ung thư biểu mô tế bào đáy, ung thư biểu mô tế bào vảy, ung thư biểu mô tế bào thận, ung thư biểu mô cổ tử cung, ung thư biểu mô tế bào gan, ung thư biểu mô tế bào phổi...

Đã có nhiều nghiên cứu về thành phần hóa học và hoạt tính gây độc tế bào ung thư của trà hoa vàng. Điển hình trong đó là các hợp polyphenol trong trà như EGCG, EGC, EG… Tuy nhiên, chưa có công bố nào liên quan đến tổ hợp hạt chứa polyphenol trong THV kết hợp CS và AG.

Từ kết quả nghiên cứu khả năng gây độc tế bào ung thư biểu mô miệng ở người (KB) (Bảng 3.22) ta thấy: các mẫu nghiên cứu đã thể hiện hoạt tính với giá trị IC_{50} từ 14,63 – 43,17 μg/ml trên dòng tế bào KB. Chất đối chứng dương Elliticine hoạt động ổn định trong thí nghiệm. Đáng chú ý, theo tiêu chuẩn của Viện Ung thư quốc gia Hoa Kỳ (NIC), cặn chiết được coi có hoạt tính tốt khi $IC_{50} \leq 20$ μg/ml. Vì vậy, có thể khẳng định CT có giá trị IC_{50} = 14,63 ± 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 ± 1,35 đến 43,17 ± 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 ± 1,35 (phụ lục 5).

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 ± 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). Như vậy, 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 thành phần chính của CT là PP chiếm đến 30,25 % về khối lượng CT thể hiện hoạt tính gây độc tế bào ung thư KB khá hiệu quả.

Bảng 3.22. 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 µg/ml	% ức chế					
	CT	AG/CS/CT 10	AG/CS/CT 20	AG/CS/CT 30	AG/CS/CT 50	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 ±1,56	43,17 ± 3,11	31,61 ± 1,98	25,08 ± 1,35	29,49 ± 1,46	0,34 ±0,04

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

Ung thư gan là tình trạng các khối u ác tính phát sinh trong gan, dẫn đến việc phá hủy các tế bào gan và cản trở khả năng hoạt động bình thường của cơ quan quan trọng này. Đây cũng là một trong những bệnh lý ác tính với số ca mắc cũng như tử vong cao hàng đầu tại Việt Nam. Shuangfeng Li và cộng sự cho thấy polyphenol cải thiện các rối loạn chuyển hóa thông qua con đường trực tiếp hoặc gián tiếp để bảo vệ gan và chống ung thư gan [139].

Kết quả thể hiện hoạt tính gây độc tế bào ung thư gan ở người bởi CT và hạt tổ hợp AG/CS/CT được thể hiện trong Bảng 3.23. Kết quả cho thấy CT gây độc tế bào HepG2 với giá trị IC_{50} = 17,31 ± 0,27 và AG/CS/CT50 gây độc tế bào HepG2 với giá trị IC_{50} = 16,36 ± 0,37, thể hiện hoạt tính tốt với tế bào HepG2 (theo tiêu chuẩn của Viện Ung thư quốc gia Hoa Kỳ (NIC)). Hơn nữa, IC_{50} = 16,36 ± 0,37 của AG/CS/CT50 (tương ứng với hàm lượng PP trong mẫu đạt khoảng 15%) còn thấp hơn so với mẫu CT không mang bởi tổ hợp. Kết quả này cho thấy hạt nano AG/CS/CT50 đã phát huy hiệu quả tăng cường khả năng hòa tan, phân tán của CT trong tổ hợp so với CT không được mang bởi tổ hợp (phụ lục 6).

Bảng 3.23. 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} (µg/ml)
1	CT	17,31 ± 0,27
2	AG/CS/CT10	>100
3	AG/CS/CT20	>100
4	AG/CS/CT30	48,89 ± 3,08
5	AG/CS/CT50	16,36 ± 0,67
6	Ellipticine	3,5 ± 0.30

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

HEK 293A được xem là một mô hình tốt trong khảo sát *in vitro* về thận vì khả năng dễ lưu trữ, sinh trưởng và phát triển, thể hiện nhiều chức năng chuyên biệt của tế bào thận người và có khả năng thay đổi các phân tử protein giống như người để thể hiện các hoạt động sinh học [140].

Trong khuôn khổ đề tài luận án, 4 mẫu hạt tổ hợp AG/CS/CT chứa hàm lượng CT khác nhau và CT được khảo sát khả năng gây độc tế bào thận gốc phôi ở người (HEK-293A). Kết quả trong Bảng 3.24 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 với giá trị IC_{50} đều > 100 (µg/ml). 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 lớn khi đánh giá hoạt tính sinh học của CT và tổ hợp AG/CS/CT.

Bảng 3.24. Khả năng gây độc tế bào thận gốc phôi ở người (HEK-293A) từ CT và các mẫu hạt tổ hợp

TT	Tên mẫu	Nồng độ thử (µg/ml)	% ức chế	Giá trị IC50 (µg/ml)
1	CT	200	26,99	>100
		40	13,85	
		8	7,19	
		1,6	2,97	
2	AG/CS/CT10	200	18,46	>100
		40	11,77	
		8	6,02	
		1,6	1,56	
3	AG/CS/CT20	200	18,31	>100
		40	13,21	
		8	4,94	
		1,6	-0,31	
4	AG/CS/CT30	200	22,31	>100

		40	13,42	
		8	7,53	
		1,6	0,62	
5	AG/CS/CT50	200	38,45	>100
		40	28,24	
		8	11,27	
		1,6	4,27	
	Ellipticine	200	93,53	0,04 ± 0,03
		40	75,84	
		8	52,69	
		1,6	24,73	

3.3.8.2. Kết quả đánh giá hoạt tính chống oxi hóa

Khả năng chống oxi hóa của các CT được các nhà khoa học về thực phẩm và dược phẩm đặc biệt quan tâm. Hiện nay, hoạt tính chống oxi hóa thường được đánh giá dựa vào khả năng làm mất màu gốc tự do bền như 2,2-diphenyl-1-picrylhydraxyl (DPPH). Vì các phản ứng của DPPH rất nhạy cảm với các điều kiện thí nghiệm như nồng độ của chất chống oxi hóa, bản chất của dung môi, nhiệt độ, thời gian và pH của dung dịch.

Bảng 3.25. Kết quả thử hoạt tính chống oxy hóa trên hệ DPPH của CT và mẫu hạt tổ hợp

TT	**Tên mẫu**	**Nồng độ thử (µg/ml)**	**% bắt giữ gốc tự do**	**Giá trị EC_{50} (µg/ml)**
1	CT	256	89	13,99 ± 0,26
		64	77	
		16	37,5	
		4	3	
2	AG/CS/CT10	256	91	31,16 ± 2,31
		64	89,5	
		16	57,5	
		4	2	
3	AG/CS/CT20	256	92	14,57 ± 0,41

		64	89,5	
		16	59	
		4	5	
4	AG/CS/CT30	256	90	14,37 ± 0,17
		64	85,5	
		16	56,5	
		4	5	
5	AG/CS/CT50	256	91	13,99 ± 0,26
		64	88,5	
		16	46	
		4	5	
	Quercetin	32	100	9,97 ± 0,25
		8	45,5	
		2	0	
		0,5	0	

Dựa trên kết quả thu được trong Bảng 3.25, mẫu CT ở các nồng độ 256 µg/ml và nồng độ 64 µg/ml có khả năng bắt giữ gốc tự do DPPH của CT ở các ngưỡng 89% và 77%. Giá trị EC_{50} của mẫu CT là 14,4 µg/ml, theo tiêu chuẩn của Viện Ung thư Quốc gia Hoa Kỳ (NIC) cho thấy CT có tác dụng rõ rệt trong việc ức chế gốc tự do (phụ lục 8). Đối chiếu với kết quả nghiên cứu của Ngô Thị Thảo [135] đối với 3 mẫu THV ở Ba Chẽ, Quảng Ninh chưa làm giàu hàm lượng PP ($PP_{tổng}$ = 6,943 %), giá trị EC_{50} tốt nhất chỉ đạt EC_{50}=25,88 µg/ml, cho thấy làm giàu CT có tác dụng rõ rệt trong việc ức chế gốc tự do.

Khả năng chống oxi hóa của tổ hợp hạt AG/CS/CT tăng khi tăng nồng độ của các mẫu thử và hàm lượng CT trong hạt tổ hợp AG/CS/CT. Tổ hợp AG/CS/CT50 có EC_{50} = 13,99 ± 0,26 bằng với EC_{50} của CT không mang bởi hạt tổ hợp. Các mẫu AG/CS/CT20, AG/CS/CT30 có khả năng quét/bắt các gốc tự do DPPH hiệu quả với giá trị lần lượt là 14,57 ± 0,41 và 14,37 ± 0,17, xấp 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 phát huy sinh khả dụng của PP trong cao chiết khi được mang bởi tổ hợp.

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

NO đóng vai trò quan trọng trong cơ chế cầm máu và trong tế bào cơ trơn (đặc biệt là cơ trơn mạch máu), neuron và hệ thống dạ dày ruột.

Khả năng ức chế sản sinh NO của tế bào macrophage RAW 264.7 từ CT và các hạt tổ hợp AG/CS/CT thể hiện trong Bảng 3.26 (phụ lục 9).

Bảng 3.26. 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 Dexamethasome	14,20 ± 0,54

Khả năng ức chế sản sinh NO của CT có giá trị IC_{50} = 20,14 ± 1,46, mẫu AG/CS/CT10 có giá trị IC_{50} > 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 dexamethasome IC_{50} = 14,20 ± 0,54 hoạt động ổn định trong thí nghiệm. Đối chiếu với kết quả nghiên cứu của Bùi Hữu Trung và Nguyễn Thị Thanh Mai về hoạt tính ức chế gốc tự do NO từ cao chiết và thành phần các hoạt chất cô lập từ cúc hoa trắng cho thấy, khả năng ức chế gốc tự do NO là do sự có mặt của polyphenol có trong các nhóm như: flavonoid, dẫn xuất của acid caffeoylquinic, các dẫn xuất của acid caffeic và các phenol đơn giản. Hoạt tính ức chế sản sinh NO bị ảnh hưởng bởi số lượng và vị trí nhóm -OH trên vòng phenol, số lượng vòng polyphenol, nhóm chức gắn trên vòng phenol... Hoạt tính ức chế gốc tự do NO từ CT vẫn thể hiện ở mức hiệu quả với IC_{50} = 20,14 ± 1,46, gấp 7 lần so với IC_{50} = 142,8 của dịch cao chiết cúc hoa trắng trong dung môi methanol. Khi đưa CT vào hạt tổ hợp, hoạt tính ức chế gốc tự do NO của các mẫu AG/CS/CT20, AG/CS/CT30, AG/CS/CT50 vẫn thể hiện hoạt tính nhưng chưa thực sự phát huy hiệu quả như mong muốn. Có thể, các nhóm -OH trên polyphenol hình thành liên kết hydro với nhóm amino và carboxyl trên AG, CS đã làm giảm hoạt tính của CT [141].

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 các hạt tổ hợp AG/CS/CT theo 2 giai đoạn: nhanh trong 10 giờ đầu tiên và có kiểm soát ở 20 giờ tiếp theo. Các yếu tố như pH dung dịch, thời gian và hàm lượng thuốc ảnh hưởng nhiều đến hàm lượng CT giải phóng. Trong giai đoạn giải phóng nhanh, hàm lượng CT giải phóng không tuân theo mô hình động học nhất định, trong 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 hạt tổ hợp AG/CS/CT 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 trong khoảng 64,32 – 88,73 %, với CT mang bởi các hạt tổ hợp AG/CS/CT trong khoảng 78,43 - 89,55 %.

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

Với 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. Trong giai đoạn giải phóng có kiểm soát, CT giải phóng từ các mẫu hạt tổ hợp 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 ± 0,26 µg/ml và mẫu tổ hợp AG/CS/CT có giá trị EC_{50} dao động từ 13,99 ± 0,26 µg/ml – 31,16 ± 2,31 µg/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 %, các hạt tổ hợp chứa CT đạt 78,43 - 89,55 %.

2. Xây dựng được các mô hình động học phù hợp với 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 AC73CC 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.

DANH MỤC CÁC CÔNG TRÌNH CÔNG BỐ

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.*

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Carmen Jiménez Gómez, Juan Antonio Cecilia, 2020, *Chitosan: A Natural Biopolymer with a Wide and Varied Range of ACTlications*, National Library of Medicine, 25(17), 1-43.
2. Benedict Terkula Iber, Nor Azman Kasan, Donald Torsabo, Jenifer Wese Omuwa, , 2022, *A Review of Various Sources of Chitin and Chitosan in Nature*, Journal of Renewable Materials, 10(4), 1097-1123.
3. Hamid Amiri, Mortaza Aghbashlo, Minaxi Sharma, James Gaffey, Louise Manning, Seyed Masoud Moosavi Basri, John F. Kennedy, Vijai Kumar Gupta, Meisam Tabatabaei, 2022, *Chitin and chitosan derived from crustacean waste valorization streams can support food systems and the UN Sustainable Development Goals*, Nature Food, 3, 822-828.
4. Gohar Ali, Monika Sharma, El Sayed Salama, Zhenmin Ling, Xiangkai Li, 2022, *Applications of chitin and chitosan as natural biopolymer: potential sources, pretreatments, and degradation pathways*, Biomass Conversion and Biorefinery.
5. Inmaculada Aranaz, Andrés Alcántara, Maria Concepción Civera, Concepción Arias, Begoña Elorza, Angeles Heras Caballero, Niuris Acosta, 2021, *Chitosan: An Overview of Its Properties and Applications*, Polymers, 13, 1-27.
6. Rita Singh, Kirti Shitiz, *Antaryami Singh, Chitin and chitosan: biopolymers for wound management*, International Wound Journal, 2017, 14, 1276-1289.
7. Ananya Pattnaik, Sanghamitra Pati, Sangram Keshari Samal, 2022, *Chitosan-Polyphenol Conjugates for Human Health*, Open Access Journals, 12, 1768, 1-23.
8. Sherin Joseph, Srinivasan Krishnamoorthy, Paranthaman, Moses, Anandharamakrishnan, 2021, *A review on source-specific chemistry, functionality, and applications of chitin and chitosan*, Carbohydrate Polymer Technologies and Applications, 2(25), 1-14.

9. Jianlong Wang, Can Chen, 2014, *Chitosan-based biosorbents: Modification and application for biosorption of heavy metals and radionuclides*, Bioresource Technology, 160, 129-141.
10. Nguyễn Công Minh, Nguyễn Văn Hòa, Phạm Thị Đan Phượng, Trang Sĩ Trung, 2017, *Nghiên cứu cải tiến quy trình thu nhận chitin từ phế liệu tôm bằng kết hợp xử lý nhiệt và tẩy màu*, Tạp Chí Khoa Học Và Công Nghệ Việt Nam, 13(2), 27-33.
11. Amro El-Badawy, David Feldhake, Raghuraman Venkatapathy, 2010, *State of the science literature review:everything nanosilver and more, in Scientific, Technical, Research, Engineering and Modeling Support Final Report. K.V. Jessica Sandord*, Editor. U.S. Environmental Protection Agency: Washington, U.S.
12. Po Hui Chen, Ya His Hwang, Ting Yun Kuo, Fang Hsuan Liu, Juin Yih Lai, Hsyue Jen Hsieh, 2007, *Improvement in the properties of chitosan membranes using natural organic acid solutions as solvents for chitosan dissolution*, Journal of Medical and Biological Engineering, 27(1), 23-28.
13. Pradip Kumar Dutta, Joydeep Dutta, Tripathi, 2004, *Chitin and chitosan: Chemistry, properties and applications*, Journal of Scientific and Industrial Research, 63, 20-31.
14. No H K, Lee K S, Meyers S P, 2000, *Correlation between physicochemical characterеristichitosan and binding capacities of chitosan products*, Journal of Food Science, 65, 1134-1137.
15. Daniela Enescu, *Use of Chitosan in Surface Modification of Textile Materials*, Roumanian Biotechnological Letters. 2008, 13(6), 4037-4048.
16. Moutafa Mohamed Gaballa Fouda, 2005, *Use of Natural polysacaritdes in Medical Textile Applications*, Doctor Thesis of Dem Fachbereich Chemie der Universität Duisburg - Essen.
17. Clough Roger, 2001, *High - energy radiation and polymes: A review of commercial Processes and emerging applications*, Nuclear Instruments and Methods in Physichitosan Research, 185, 8-33.
18. Vijay Kumar Thakur, Manju Kumari Thakur, 2014, *Recent Advances in Graft Copolymeization and Applications of Chitosan: A Review. A Chitosan*, ACS Sustainable Chemistry and Engineering, 2637-2652.

19. Sânia de Andrade, Rasiah Ladchumananandasivam, Brismak da Rocha, Débora Belarmino, Alcione Galvão, 2012, *The Use of Exoskeletons of Shrimp (Litopenaeus vanammei) and Crab (Ucides cordatus) for the Extraction of Chitosan and Production of Nanomembrane*, Materials Sciences and Applications, 3, 495-508.

20. Mukku Shrinivas Rao, Kyaw Aye Nyein, Trang Si Trung, Willem Stevens, 2007, *Optimum Parameters for Production of Chitin and Chitosan from Squilla (S. empusa)*, Applycation Polyme Science, 103 (6), 3694–3700.

21. Keyur Desai, Kevin Kit, Jiajie Li and Svetlana Zivanovic, 2008, *Morphological and surface properties of electrospun chitosan nanofibers*, Biomacromolecules, 9(3), 1000-1006.

22. Trang Sĩ Trung, Phan Thanh Lộc, Nguyễn Công Minh, Phạm Thị Đan Phương, 2019, *Nghiên cứu sản xuất chitosan khối lượng phân tử thấp từ xác tôm mịn trong quá trình sản xuất dịch đạm thủy phân*, Tạp Chí Khoa Học và Công Nghệ Thủy Sản, Sở Khoa học và Công nghệ thành phố Hồ Chí Minh, 146-153.

23. Po HsiangChang, Keisuke Sekine, Hsiao MeiChao, Shan hui Hsu, Edward Chern, 2017, *Chitosan promotes cancer progression and stem cell properties in association with Wnt signaling in colon and hepatocellular carcinoma cells*, Scientific Reports, 7, 1-14.

24. Shing Hwa Liu, Fang Ying Cai , Meng Tsan Chiang, 2015, *Long-Term feeding of chitosan ameliorates glucose and lipid metabolism in a high-fructose-diet-impaired rat model of glucose tolerance*, Marine Drugs, 13(12), 7302-7313.

25. Suhad Bahijri, Lubna Alsheikh, Ghada Ajabnoor, Anwar Borai, 2017, *Effect of supplementation with chitosan on weight, cardiometabolic, and other risk indices in wistar rats fed normal and high-fat/high-cholesterol diets dd libitum*, Nutrition and Metabolic Insights, 10, 1-8.

26. Ahmad Oryan , Sonia Sahvieh, 2017, *Effectiveness of chitosan scaffold in skin, bone and cartilage healing*, International Journal of Biological Macromolecules, 104(A), 1003-1011.

27. Masalova, Kulikouskaya, Shutava, Agabekov, 2012, *Alginatee and chitosan gel nanoparticles for efficient protein entrapment*, Sciverse Sciencedirect, 69-75.

28. No H.K., Meyers S.P., Xu X, 2007, *Applications of chitosan for improvement of quality and shelf life of foods: A Review*, Journal of FoodScience, 72 (5), 87-100.

29. Vipin Bansal, Pramod Kumar Sharma, Nitin Sharma, Om Prakash Pal and Rishabha Malviya, 2011, *Applications of chitosan and chitosan derivatives in drug delivery*, Advancesin Biological Research, 5(1), 28-37.

30. Jayachandran Venkatesan, Ira Bhatnagar, Se-Kwon Kim, 2014, *Chitosan-Alginate Biocomposite Containing Fucoidan for Bone Tissue Engineering*, Mar. Drugs, 12, 300-316.

31. Chrystalla Protopapa, Angeliki Siamidi, Panagoula Pavlou, Marilena Vlachou, 2022, *Excipients Used for Modified Nasal Drug Delivery: AMini-Review of the Recent Advances,* Materials, 15, 1-15.

32. Touseef Ahmed Wani, Masoodi, Rehana Akhter, Towseef Akram, Adil Gani, Nadeem Shabir, 2022, *Nanoencapsulation of hydroxytyrosol in chitosan crosslinked with sodium bisulfate tandem ultrasonication: Techno-characterization, release and antiproliferative properties*, Ultrasonics Sonochemistry, 82, 1-10.

33. Ha Manh Hung, Vu Quoc Manh, Vu Thi Thu Thao, Dao Thi Phuon Thuy, Pham Tien Dung, Nguyen Thi Bich Viet, Duong Khanh Linh, Nguyen Ngoc Linh, Doan Thi Yen Oanh, Nguyen Thuy Chinh, Thai Hoang, Vũ Quoc Trung, 2022, *Evaluation of the effect of the chitosan/carrageenan ratio on lovastatin release from chitosan/carrageenan based biomaterials,* Vietnam Journal of Chemistry, 60, 72-78.

34. Nguyen Thuy Chinh, Nguyen Thi Thu Trang, Tran Thi Mai, Do Van Cong, Mai Duc Huynh, Tran Huu Trung, Vu Viet Thang, Thai Hoang, Nguyen Vu Giang, 2017, *Influence of polyethylene oxide content on somecharacteristics of PLA/CS films loading nifedipine*, Vietnam Journal of Science and Technology, 55(6), 716-724.

35. Dai Lam Tran, Van Hong Le, Hoai Linh Pham, Thi My Nhung Hoang, Thi Quy Nguyen, Thien Tai Luong, Phuong Thu Ha, Xuan Phuc Nguyen, 2010, *Biomedical and environmental applications of magnetic nanoparticles*, Advances in Natural Sciences: Nanoscience and Nanotechnology, 1, 1-5.

36. Huei Ping Tzeng, Shing Hwa Liu, Meng Tsan Chiang, 2022, *Antidiabetic Properties of Chitosan and Its Derivatives*, Marine Drugs, 20(784), 1-16.

37. Nguyễn Văn Thành, Nghiên cứu điều chế alginate khối lượng phân tử thấp dùng làm thực phẩm chức năng hỗ trợ phòng chống đông máu, Trường Đại học Nha Trang, Luận án Tiến sĩ, 2019.

38. Angel Serrano Aroca, María Ferrandis Montesinos, Ruibing Wang, 2021, *Antiviral Properties of Alginatee-Based Biomaterials: Promising Antiviral Agents against SARS-CoV-2*, American Chemical Society, 37(1), 213-219.

39. Jothisaraswathi S., Babu B. and Rengasamy R, 2006, *Seasonal studies on alginate and its composition II: Turbinaria conoides (J.Ag.) Kütz. (Fucales, Phaeophyceae).* Journal of Applied Phycology, 4, 5897-5907

40. Andres García, Tania Castillo, Diego Ramos, Carlos Ahumada Manuel, Cinthia Núñez, Enrique Galindo, Jochen Büchs, Carlos Peña, 2020, *Molecular weight and viscosifying power of alginatees produced by mutant strains of Azotobacter vinelandii under microaerophilic conditions*, Biotechnology Reports, 26, 1-7.

41. Rinaudo, 2014, *Biomaterials based on a natural polysaccharite: alginate*, Revista Especializada en Ciencias Químico Biológicas, 17(1), 92-96.

42. Meera George, Emilia Abraham, 2006, *Polyionic hydrocolloids for the intestinal delivery of protein drugs*, Journal Control Release, 114, 1–14.

43. Sapna Raghav, Pallavi Jain Dinesh Kumar, 2021, *Alginatees: Properties and ACTlications*, Wiley Online Library, 19, 399-422.

44. Haug, Myklestad, Larsen, Smidsrodo, 1967, *Correlation between chemical structure and physical properties of alginate*, Acta chemica Scandinavica, 21, 768-778.

45. Ewelina Godek, Elzbieta Grzdka, 2019, *Alginatees - structure, properties, applications*, 74(1), 109-124.

46. Rioux Laurie Eve, Turgeon Sylvie, Beaulieu, Martin, 2007, *Characterization of polysaccharides extracted from brown seaweeds*, Carbohydrate Polymes. 69(3), 530-537.

47. Kuen Yong Lee, David Mooney, 2012, *Alginate: properties and biomedical Applications. Progress in Polymer Science*, 37(1),106-126.

48. Dharmendra Jain, Daniel Bar Shalom, 2014, *Alginate drug delivery systems: application in context of pharmaceutical and biomedical research*, Drug Development and Industrial Pharmacy, 40(12), 1576-1584.

49. Shengyi Liu, Guangyang Liu, Yuetao Yi, 2012, *Novel vanadyl complexes of alginate saccharides: synthesis, characterization, and biological activities*, Carbohydrate Polymes, 121, 86-91.

50. Mikinori Ueno, Tatsuya Oda, 2014, *Biological activities of alginate*, Advances in food and nutrition research, 72, 95-112.

51. Hye Jin Hong, Jungho Ryu, In Su Park, Taegong Ryu, Kang Sup Chung, Byuong Gyu Kim, 2016, *Investigation of the strontium (Sr(II)) adsorption of an alginate microsphere as a lowcost adsorbent for removal and recovery from seawater*, Journal of Environmental Management, 165, 263-270.

52. Xing Xuteng, Wang Jihui, Hu Wenbin, 2017, *Inhibition behavior of Cu-benzoltriazolecalcium alginate gel beads by piercing and solidification*, Materials and Design, 126, 322-330.

53. Salah Tawfik, Hassan Hefni, 2016, *Synthesis and antimicrobial activity of polysaccharide alginate derived cationic surfactant-metal(II) complexes*, International Journal of Biological Macromolecules, 82, 562-572.

54. Alessandra Paula Alves de Sousa, Márcia Rocha Torres, Cláudia Pessoa, Manoel Odorico de Moraes, Francisco Dário Rocha Filho, Ana Paula Negreiros Nunes Alves, Letícia Veras Costa-Lotufo, 2007, *In vivo growth-inhibition of Sarcoma 180 tumor by alginates from brown seaweed Sargassum vulgare*, Carbohydrate Polymes, 69(1), 7-13.

55. Yu Khotimchenko, 2011, *The antitumor properties of nonstarch polysaccharides: Carrageenans, alginates, and pectins*, Russian Journal of Marine Biology, 36(6), 401-412.

56. Rui Zhou, Xuyang Shi, Yan Gao, Nan Cai, Zedong Jiang, Xu Xu, 2015, *Antiinflammatory activity of guluronate oligosaccharides obtained by oxidative degradation from alginate in lipopolysaccharide-activated murine macrophage RAW 264.7 cells*, Journal of Agricultural and Food Chemistry, 63(1),160-168.

57. Jenny Paxman, Richardson, Peter Dettmar, Bernard Corfe, 2008, *Alginate reduces the increased uptake of cholesterol and glucose in overweight male subjects: a pilot study*, Nutrition Research, 28(8), 501-505.

58. Alan Mackie, Adam Macierzanka, Kristi Aarak, Neil Rigby, Roger Parker, Guy Channell, Stephen Harding, Balazs Bajka, 2016, *Sodium alginate decreases the permeability of intestinal mucus*, Food Hydrocoll, 52, 749-755.

59. Emil Ruvinov, Smadar Cohen, 2016, *Alginate biomaterial for the treatment of myocardial infarction: Progress, translational strategies, and clinical outlook: From ocean algae to patient bedside*, Advanced Drug Delivery Reviews, 96, 54-76.

60. Catherine Taylor Nordgård, Astrid Bjørkøy, Kurt Draget, 2015, *Guluronate oligosaccharides as enhancers of nanoparticle drug delivery in the oral cavity*, Bioactive Carbohydrates and Dietary Fibre, 5(1), 72-78.

61. Øystein Arlov, Finn Lillelund Aachmann, Anders Sundan, Terje Espevik, Gudmund Skjåk-Bræk, 2014, *Heparin-like properties of sulfated alginates with defined sequences and sulfation degrees*, Biomacromolecules, 15(7), 2744-2750.

62. Huang Ronghua, Du Yumin, Yang Jianhong, 2003, *Preparation and in vitro anticoagulant activities of alginate sulfate and its quaterized derivatives*, Carbohydrate Polymes, 52, 19-24.

63. Xia Zhao, Guangli Yu, Huashi Guan, Nan Yue, Zhenqing Zhang, Haihua Li, 2007, *Preparation of low-molecular-weight polyguluronate sulfate and its anticoagulant and antiinflammatory activities*, Carbohydrate Polymes, 69(2), 272-279.

64. Lihong Fan, Lan Jiang, Yongmei Xu, Yue Zhou, Yuan Shen, Weiguo Xie, Zhongheng Long, Jinping Zhou, 2011, *Synthesis and anticoagulant activity of sodium alginate sulfates*, Carbohydrate Polymes, 83(4), 1797-1803.

65. Deepti Rekha Sahoo, Trinath Biswal, 2021, *Alginatee and its application to tissue engineering*, SN ACTlied Sciences, 1-19.

66. Raha Ahmad Rausa, Wan Mohd FazliWan, NawawiabRicca, Rahman Nasaruddin, 2021, *Alginatee and alginatee composites for biomedical applications*, Asian Journal of Pharmaceutical Sciences, 16(3), 280-306.

67. Thạch Thị Lộc, 2020, *Nghiên cứu chế tạo, xác định đặc trưng, tính chất tổ hợp polymer alginatee/chitosan mang hoạt chất Ginsenoside Rb1 và thuốc Lovastatin*, Trường Đại học Vinh, Luận án Tiến sĩ Hóa học.

68. Nguyen Thuy Chinh, Thach Thi Loc, Le Duc Giang, Nguyen Thi Thu Trang, Tran Thi Mai, Thai Hoang, 2018, *Effect of polyethylene oxide on properties of chitosan/alginatee/lovastatin composites*, Vietnam Journal of Science and Technology, 56(2A), 156-162.

69. João Silva, Pavlo Vanat, Dorinda Marques-da-Silva, Joaquim Rui Rodriguesa, Ricardo Lagoa, 2020, *Metal alginatees for polyphenol delivery systems: Studies on crosslinking ions*, Bioactive Materials, 5, 447-457.

70. Katrina Varner, Task Order Manager, 2010, *State of the science literature review:everything nanosilver and more, in Scientific, Technical, Research, Engineering and Modeling SuCTort Final Report. K.V. Jessica Sandord*, Editor. U.S. Environmental Protection Agency: Washington, U.S.

71. Ashish Dev, Binulal, Anitha, Nair, Furuike, Tamura, Jayakumar, 2010, *Preparation of poly(lactic acid)/chitosan nanoparticles for anti-HIV drug delivery applications*, Carbohydrate Polymes, 80, 833-838.

72. Nguyễn Thúy Chinh, 2016, *Nghiên cứu sự giải phóng thuốc nifedipin được mang bởi vật liệu tổ hợp poly acid lactic/chitosan*, Học viện Khoa học và Công nghệ, Luận án Tiến sĩ Hóa học.

73. Alfaro González, Ulate, Alvarado, Arguello Miranda, 2018, *Chitosan-Silver Nanoparticles as an approach to control bacterial proliferation, spores and antibiotic-resistant bacteria*, Biomedical Physic and Engineering Express, 4, 1-35.

74. Chintan Pansara, Wei Yee Chan, Ankit Parikh, Darren J Trott, Tejal Mehta, Renuka Mishra, Sanjay Garg, 2019, *Formulation optimization of chitosan-stabilized silver nanoparticles using in vitro antimicrobial assay*, National Library of Medicine, 108(2), 1007-1016.

75. Nguyen Thuy Chinh, Thach Thi Loc, Le Duc Giang, Ngo Phuong Thuy, Vu Thi Hien, Thai Hoang, 2018, *Effect of polycaprolactone on characteristichitosan and morphology of alginate/chitosan/lovastatin*, Vietnam Journal of Science and Technology, 56 (4A), 13-21.

76. Shyh Ming Kuo, Shwu Jen Chang, Yun Ting Hsu, Ta Wei Chen, 2005, *Evaluation of Alginate coated Chitosan Membrane for Guided Tissue Regeneration*, Proceedings of the 2005 IEEE Engineering in Medicine and Biology 27th Annual Conference (Shanghai, China), 1-4.

77. Cecilia Zorzi Bueno, Ana Maria Antunes Dias, Hermínio José Cipriano de Sousa, Mara Elga Medeiros Braga, Ângela Maria Moraes, 2014, *Control of the properties of porous chitosan–alginate membranes through the addition of different proportions of Pluronic F68*, Materials Science and Engineering, 44, 117-125.

78. Mariana Altenhofen da Silva, Andre´a Cristiane Krause Bierhalz, Theo Guenter Kieckbusch, 2012, *Modelling natamycin release from alginate/chitosan active films*, International Journal of Food Science and Technology, 47, 740-746.

79. Adelfo García Ceja, Emma Mani Lopez, Enrique Palou, Aurelio Lopez Malo, 2015, *Viability during refrigerated storage in selected food products and during simulated gastrointestinal conditions of individual and combined lactobacilli encapsulated in alginate or alginate-chitosan*, LWT - Food Science and Technology, 63, 482-489.

80. Ping Li, Ya Ni Dai, Jun Ping Zhang, Ai Qin Wang and Qin Wei, 2008, *Chitosan-Alginate Nanoparticles as a Novel Drug Delivery System for Nifedipine*, Internaional Journal Biomedical Science, 4(3), 221-228.

81. Maria Azevedo, Ana Bourbon, António Vicente, Miguel Cerqueira, 2014, *Alginate/chitosan nanoparticles for encapsulation and controlled release of vitamin B2*, International Journal of Biological Macromolecules, 71, 141-146.

82. A. Martı´nez, P. Arana, A. Ferna´ndez, R. Olmo, C. Teijo´n, M.D. Blanco, 2013, *Synthesis and characterisation of alginate/chitosan nanoparticles as tamoxifen controlled delivery systems*, Journal of Microencapsulation, 30(4), 398-408.

83. S Bhunchu, P Rojsitthisak, 2014, *Biopolymeic alginate-chitosan nanoparticles as drug delivery carriers for cancer therapy*, Pharmazie, 69, 563-570.

84. S Bhunchu, C Muangnoi, P Rojsitthisak, P Rojsitthisak, 2016, *Curcumin diethyl disuccinate encapsulated in chitosan/alginatee nanoparticles for improvement of its in vitro cytotoxicity against MDA-MB-231 human breast cancer cells*, National Library of Medicine, 71(12), 691-700.

85. Rusandica Stoica, Raluca Somoghi, Sanda Maria Doncea, 2017, *Preparation of alginatee-chitosan polyelectrolyte complexes for encapsulation of natural polyphenols*, Optoelectronics and Advanced Materials Rapid Communications, 11, 113-118.

86. Hamid Hamedi, Sara Moradi, Alan Tonelli, Samuel Hudson, 2019, *Preparation and Characterization of Chitosan–Alginatee Polyelectrolyte Complexes Loaded with Antibacterial Thyme Oil Nanoemulsions*, Applied Sciences, 1-18.

87. Ru Feng, Lu Wang, Peng Zhou, Zhen Luo, Xiaoyu Li, Lili Gao, 2020, *Development of the pH responsive chitosan-alginatee based microgel for encapsulation of Jughans regia L. polyphenols under simulated gastrointestinal digestion in vitro*, Carbohydrate Polymers, 250, 1-10.

88. Peng Zhou, Ru Feng, Zhen Luo, Xiaoyu Li, Lu Wang, Lili Gao, 2020, *Synthesis, identification and bioavailability of Juglans regia L. polyphenols-Hohenbuehelia serotina polysaccharides nanoparticles*, Food Chemitry, 329, 1-9.

89. Juan Zhao, Ting Liu, Dianpeng Zhang, Huiling Wu, Taotao Zhang, Dan Dong, Nanyan Liao, 2021, *Bacterial Community Composition in the Rhizosphere Soil of Three Camellia chrysantha Cultivars Under Different Growing Conditions in China*, Journal of Soil Science and Plant Nutrition, 21, 2689-2701.

90. Nguyen Thi Hong Van, Pham Cao Bach, Cam Thi Inh, Doan Lan Phuong, Le Tat Thanh, Tran Quoc Toan, Pham Quoc Long, 2019, *Flavonoidsisolated from the flowers of camellia chrysantha,* Vietnam Journal of Science and Technology, 57(3), 287-293.

91. Juanjuan Yi, Shubin Li, Chao Wang, Nana Cao, Hang Qu, Cuilin Cheng, Zhenyu Wang, Lu Wang, Liping Zhou, 2019, *Potential applications of polyphenols on main ncrnas regulations as novel therapeutic strategy for cancer,* Biomedicine and Pharmacotherapy, 113, 1-8.

92. Xavier Montané, Oliwia Kowalczyk, Belen Reig-Vano, Anna Bajek, Krzysztof Roszkowski, Remigiusz Tomczyk, Wojciech Pawliszak, Marta Giamberini, Agnieszka Mocek-Płóciniak, Bartosz Tylkowski, 2020, *Current Perspectives of the Applications of Polyphenols and Flavonoids in Cancer Therapy*, Molecules, 25, 1-26.

93. Nguyễn Minh Thông, 2016, *Nghiên cứu cấu trúc, khả năng chống oxi hóa của một số polyphenol và dẫn xuất trên nền fullerene (C60) bằng phương pháp hóa tính toán*, Luận án tiến sĩ, Đại học khoa học Huế.

94. Hồ Thị Ngọc Trâm, 2014, *Nghiên cứu ứng dụng sóng siêu âm cải thiện quá trình trích ly polyphenol từ phụ phẩm trà Oolong*, Luận văn Thạc sĩ, Đại học nông lâm Thành phố Hồ Chí Minh.

95. Ponnusamy Ponmurugan, Shivaji Kavitha, Mani Suganya và Balasubramanian Mythili Gnanamangai, 2019, *Tea Polyphenols Chemistry for Pharmaceutical ACTlications*, Tea - Chemistry and Pharmacology, 1-15.

96. Bansal, Choudhary, Sharma, Sharad Kumar, Lohan, Bhardwaj, NavneetSyan, Jyoti, 2013, *Tea: A native source of antimicrobial agents*, Food Research International, 53, 568-584.

97. Mendel Friedman, 2007, *Overview of antibacterial, antitoxin, antiviral, and antifungal activities of tea flavonoids and teas*, Wiley Online Library, 51, 116-134.

98. Zhaoming Yan, Yinzhao Zhong, Yehui Duan, Qinghua Chen, Fengna Lib, 2020, *Antioxidant mechanism of tea polyphenols and its impact on health benefits*, Animal Nutrition, 6(2),115–123.

99. Chia-Nan Chen, Chia-Min Liang, Jueng Rong Lai, Yao-Jen Tsai, Jyh Shyan Tsay, Jen Kun Lin, 2003, *Capillary Electrophoretic Determination of Theanine, Caffeine, and Catechins in Fresh Tea Leaves and Oolong Tea and Their Effects on Rat Neurosphere Adhesion and Migration*, Journal of Agricultural and Food Chemistry, 51, 7495-7503.

100. Ngô Hữu Hợp, 1983, *Hóa sinh trà*, Đại học Bách Khoa Hà Nội.

101. Sumit Bansal, Shivani Choudhary, Manu Sharma, Suthar Sharad Kumar, Sandeep Lohan, Varun Bhardwaj, Navneet Syan, Saras Jyoti, 2013, *Tea: A native source of antimicrobial agents*, Food Research International, 53, 568–584.

102. Đỗ Ngọc Quỹ, Nguyễn Kim Phong, 1997, *Cây trà Việt Nam*, Nhà Xuất Bản Nông Nghiệp, Hà Nội.

103. Pedro Fernández Cáceres, María Martín, Fernando Pablos, Gustavo González, 2002, *Study of Catechin and Xanthine Tea Profiles as Geographical Tracers*, Journal of Agricultural and Food Chemistry, 50, 1833-1839.

104. Ashray Gupta, 2012, *Extraction, Purification, Identification and Estimation of Catechins from Camellia sinens*.

105. Nguyễn Văn Chung, Trương Hương Lan, 2007, *Nghiên cứu công nghệ sản xuất polyphenol từ trà xanh Việt Nam. Trong: các công trình nghiên cứu ứng dụng công nghệ sinh học – công nghệ thực phẩm giai đoạn 2001 - 2005*, Nhà Xuất Bản Lao động - Xã hội, 256-260.

106. Tran Duc Manh, Nguyen Toan Thang, Hoang Thanh Son, Dang Van Thuyet, Phung Dinh Trung, Nguyen Van Tuan, Dao Trung Duc, Mai Thi Linh, Vu Tien Lam, Nguyen Huu Thinh, Nguyen Thi Thu Phuong, Tran Van Do, 2019, *Golden Camellias: A Review*, Archives of Current Research International. 16(2), 1-8.

107. Lixia Song, Xiangshe Wang, Xueqin Zheng, Dejian Huang, 2011, *Polyphenolic antioxidant profiles of yellow camellia*, Journal of Agricultural and Food Chemistry, 129, 351-357.

108. Dongye He, Shu Jia, Yongping Xu, 2019, *Effect of Different Processing Methods on Phytochemical Contents and Neuroprotective Activity of Camellia euphlebia Leaves Extract*, BioMed Research International, 1-8.

109. Jiang Li Na, Li Ji Yuan, Fan Zheng qi, Tong Ran, Mo Run Hong, Li Zhi Hui, Jiang Chang Jie, 2020, *Content Analysis of Polyphenols in Flowers of Yellow Camellia*, Forest Research, 33(4): 117-126.

110. Jia Ni Lin, Hui Ji Lin, 2013, *Chemical Constituents and Anticancer Activity of Yellow Camellias against MDA-MB-231 Human Breast Cancer Cells*, Food Chem, 61, 9638−9644.

111. Ponnusamy Ponmurugan, Shivaji Kavitha, Mani Suganya và Balasubramanian Mythili Gnanamangai, 2019, *Tea Polyphenols Chemistry for Pharmaceutical Applications*, Tea - Chemistry and Pharmacology, 1-15.

112. Lai Wang, Debmalya Roy, Sen Sen Lin, Sheng Tao Yuan, Li Sun, 2017, *Hypoglycemic effect of Camellia chrysantha extract on type 2 diabetic mice model*, Bangladesh J Pharmacol, 12, 359-363.

113. George Orel, Peter Wilson, Anthony Curry, Luu Hong Truong, 2014, *Four New Species and Two New Sections of Camellia (Theaceae) from Vietnam*, A Journal for Botanical Nomenclature, 23 (3), 307-318.

114. Tia Rains, Sanjiv Agarwal, Kevin Maki, 2011, *Antiobesity effects of green tea catechins: a mechanistic review*, The Journal of Nutritional Biochemistry, 22(1), 1-7.

115. Kazuki Ide, Norihiro Matsuoka, Hiroshi Yamada, Daisuke Furushima, Koji Kawakami, 2018, *Effects of Tea Catechins on Alzheimer's Disease: Recent Updates and Perspectives*, National Library Of Mecidine, 23(9), 1-13.

116. Domenico Fusco, Giuseppe Colloca, Maria Rita Lo Monaco, Matteo Cesari, 2007, *Effects of antioxidant suCTlementation on the aging process*, 2 (3), 277-387.

117. Yokozawa, kitani, 2002, *Antioxidative activity of green polyphenol in cholesterol-fed rats*, National Institutes of Health, 50 (12), 3549-3552.

118. Eun Young Ko, Shivraj Hariram Nile, Kavita Sharma, Guan Hao Li, Se Won Parka, 2014, *Effect of different exposed lights on quercetin and quercetin glucoside content in onion (Allium cepa L.),* Saudi Journal of Biological Sciences, 1-6.

119. Jackson Williams, Julian Everett, Nathan D'Cunha, Domenico Sergi, Ekavi Georgousopoulou, Richard Keegan, Andrew McKune, Duane Mellor, Nicola Anstice, Nenad Naumovski, 2019, *The Effects of Green Tea Amino Acid L-Theanine Consumption on the Ability to Manage Stress and Anxiety Levels: A Systematic Review,* Plant Foods for Human Nutrition, 1-12.

120. Rubin, Artsikhovskaya, 1963, *Biochemistry and Physiology of Plant Immunity Hardcover*.

121. Myung Kwan Han, 2003, *Epigallocatechin gallate, a constituent of green tea, suppresses cytokine-induced pancreatic beta-cell damage*, Experimental and Molecular Medicine, 35(2), 136-139.

122. Yasuyoshi Miyata, Yohei Shida, Tomoaki Hakariya, Hideki Sakai, 2019, *Anti-Cancer Effects of Green Tea Polyphenols Against Prostate Cancer*, National Library of Medicine, 1-19.

123. Zhe Cheng Zhif, Zhang Yu Han Jing, Wang Yongyong, Wang Xiaoqiang Chen Yundong, Shao Yong Cheng, Weilong Zhou, Xiaolei Lu, Zhengqi Wu, 2020, *A review on anti-cancer effect of green tea catechins,* Journal of Functional Foods, 74, 1-20.

124. Pengxiao Cao, Manicka Vadhanam, Wendy A. Spencer, Jian Cai, Ramesh Gupta, 2011, *Sustained systemic delivery of green polyphenols by polymeric implants significantly diminishes benzo[a]pyrene-induced DNA adducts,* National Institutes of Health, 877-886.

125. Young Jin Kim, Mi Ran Park, Min Sung Kim, Oh Hyeong Kwon, 2012, *Polyphenol-loaded polycaprolactone nanofibers for effective growth inhibition of human cancer cells,* Materials Chemistry and Physics, 133:674–680.

126. Amit Shirode, Dhruba Bharali, Sameera Nallanthighal, Justin Coon, Shaker Mousa, Ramune Reliene, 2015, *Nanoencapsulation of pomegranate bioactive compounds for breast cancer chemoprevention*, National Library of Medicine, 10, 475–484.

127. Ying Zhou, Tonglin Xu, Yu Zhang, Chong Zhang, 2019, *Effect of Tea Polyphenols on Curdlan/Chitosan Blending Film Properties and Its Application to Chilled Meat Preservation*, Coatings Open Access Journal, 9(4), 1-13.

128. Kamaruddin, 2017, *Synthesis of Polyvinylpyrrolidone (PVP)-Green Tea Extract Composite Nanostructures using Electrohydrodynamic Spraying Technique*, Materials Science and Engineering, 1-8.

129. Patricia Odumosu, Stephen Ojerinde, Myrrh Egbuchiem, 2015, *Polyphenolic contents of some instant tea brands and their anti-oxidant activities*, Journal of Applied Pharmaceutical Science, 5(9), 100-105.

130. Liang Li, Jinfeng Li, Shanshan Si, Linlin Wang, Chenjun Shi, Yujiao Sun, Zhenglin Liang, Shirui Mao, 2015, *Effect of formulation variables on in vitro release of a water-soluble drug from chitosan–sodium alginatee matrix tablets*, Asia Journal of Pharmaceutical Sciences, 10, 314-321.

131. Ngoc Duc Vu, Nhi Thi Yen Tran, Truong Dang Le, Nguyet Thi Minh Phan, Phu Le An Doan, Long Bao Huynh, Phat Tan Dao, 2022, *Kinetic Model of Moisture Loss and Polyphenol Degradation during Heat Pump Drying of Soursop Fruit (Annona muricata L.)*, Processes, 10, 1-15.

132. Ravi Theaj, Prakash Upputuri, Abul Kalam Azad Mandal, 2019, *Mathematical Modeling and Release Kinetics of Green Tea Polyphenols Released from Casein Nanoparticles*, National Library of Medicine, 18(3), 1137-1146.

133. Kai Marxen, Klaus Heinrich Vanselow, Sebastian Lippemeier, Ralf Hintze, Andreas Ruser and Ulf-Peter Hansen, 2007, *Determination of DPPH Radical Oxidation Caused by Methanolic Extracts of some Microalgal Species by Linear Regression Analysis of Spectrophotometric Measurements*, Sensors 7, 2080-2095.

134. Ngô Thị Thảo, Nguyễn Thị Hà Ly, Phạm Thị Lỉnh Giang, Trần Văn ơn, Hoàng Quỳnh Hoa, 2016, *Nghiên cứu đặc điểm thực vật, thành phần hóa học, tác dụng sinh học của cây trà hoa vàng thu hái tại huyện Ba Chẽ, tỉnh Quảng Ninh*, Kỉ Yếu Hội Nghị Khoa Học Công Nghệ, 610-614.

135. Jin Bin, Xiong, Hui, Yong Hong, Yu Zheng, Jun Xiang, Xia, YongXin, Cai Li, Zhi Heng, 2015, *Characterization and determination of antioxidant components in the leaves of Camellia chrysantha (Hu) Tuyama based on composition activity relationship approach*, Journal of Food and Drug Analysis, 23, 40-48.

136. Pravilovic Radoslava, Balanc Bojana, Djordjevic Verica, Vragolovic Nevenka, Bugarski, Pjanovic, 2019, *Diffusion of polyphenols from alginatee, alginatee/chitosan, and alginatee/inulin particles*, Journal of Food Process Engineering, 1-6.

137. Thạch Thị Lộc, Thái Hoàng, Nguyễn Thúy Chinh, Lê Đức Giang, 2018, *Nghiên cứu ảnh hưởng của một số chất tương hợp đến khả năng giải phóng thuốc lovastatin từ màng tổ hợp alginate/chitosan/lovastatin*, Tạp chí Hóa học, 56(3), 389-395.

138. Anna Wang, Ligen Wu, Linlu Jia, Xiuling Li and Yudan Sun, 2011, *Alginatee -chitosan microspheres for controlled release of tea polyphenol*, Advanced Materials Research, 152-153, 1726-1729.

139. Judy Gopal, Manikandan Muthu, Diby Paul, Doo Hwan Kim and Sechul Chun, 2016, *Bactericidal activity of greentea extracts: the importance of catechin containing nano particles*, Scientific Reports, 1-16.

140. Nikolai Chepelev, Mutiat Enikanolaiye, Leonid Chepelev, Abdulrahman Almohaisen, Qi Xuan Chen, Kylie Scoggan, Melanie Coughlan, Xu Liang Cao, Xiaolei Jin, William Willmore, 2013, *Bisphenol A Activates the Nrf1/2-Antioxidant Response Element Pathway in HEK 293 Cells*, Chemical Research in Toxicology, 26, 498-506.

141. Bùi Hữu Trung, Nguyễn Thị Thanh Mai, 2009, *Nghiên cứu mối quan hệ giữa hoạt tính ức chế gốc tự do NO với cấu trúc của các hoạt chất cô lập từ loài cúc hoa trắng*, Science And Technology Development, 12(10), 48-56.

PHỤ LỤC

Phụ lục 1. Kết quả phân tích hàm lượng polyphenol tổng số trong cao chiết lá trà hoa vàng

VIỆN HÀN LÂM KHOA HỌC VÀ CÔNG NGHỆ VIỆT NAM
VIỆN HÓA HỌC CÁC HỢP CHẤT THIÊN NHIÊN
PHÒNG CÔNG NGHỆ KHAI THÁC CHẾ BIẾN TÀI NGUYÊN THIÊN NHIÊN
Nhà 1H, số 18 Hoàng Quốc Việt, Q. Cầu Giấy – HàNội
Tel.: +844949388863, +84437912731; Fax: +84(0)37564 390

KẾT QUẢ PHÂN TÍCH (*Analytical records)*

Đơn vị gửi mẫu/*Customer*: Viện Kĩ thuật nhiệt đới/Institute for Tropical Technology

Tên các mẫu thử/*Name of samples*: Mẫu cao chiết/ extracts samples

Số mẫu/*Number of samples*: 1 mẫu/ 1 samples, Lượng mẫu: 0.1 g/mẫu/ 0.1 g/sample

Đặc điểm mẫu/*Characteristics of samples*: Mẫu rắn sau chiết, mẫu được gửi đến phòng thí nghiệm/ Solid samples sent to lab

Ngày nhận mẫu/*Date of receiving*: 13/8/2020

Ngày thử mẫu/*Date of testing*: 17/8/2020 đến 24/8/2020

Khối lượng mẫu Weight, gam	Nồng độ/ Concentration microgram/ml	Tổng polyphenol, %
0.0195	3.715	4.763

Cán bộ phân tích

ThS. Đặng Ngọc Phượng

P.Trưởng phòng

TS. Chu Quang Truyền

Xác nhận chữ ký của cơ quan

PHÓ VIỆN TRƯỞNG

VIỆN HÓA HỌC CÁC HỢP CHẤT THIÊN NHIÊN

Nguyễn Mạnh Cường

Phụ lục 2. Kết quả phân tích hàm lượng polyphenol tổng số từ cao chiết lá trà hoa vàng đã được làm giàu hàm lượng polyphenol tổng số

VIỆN CÔNG NGHIỆP THỰC PHẨM
TRUNG TÂM PHÂN TÍCH VÀ GIÁM ĐỊNH THỰC PHẨM QUỐC GIA
NATIONAL CENTER FOR FOOD ANALYSIS AND ASSESSMENT (NACEFA)
ISO/IEC 17025 – VILAS 259
Địa chỉ (Add.): 301 Nguyễn Trãi – Thanh Xuân – Hà Nội
Điện thoại (Tel.): (84) 24 38582752 Fax: (84) 24 38587962
Email: nacefa@firi.vn Website: http://www.firi.vn

Số: 0920029A/PKQ

PHIẾU KẾT QUẢ PHÂN TÍCH

Tên mẫu: **Cao chiết Polyphenol tổng**
Mô tả mẫu: Mẫu đóng trong vial nhựa, bảo quản nhiệt độ phòng
Số lượng mẫu: 01
Khách hàng: Lương Phú Hoàng
Địa chỉ: Viện Kỹ thuật Nhiệt đới
Ngày nhận mẫu: 28/09/2020
Thời gian thử nghiệm: 29/09/2020
Kết quả:

STT	Tên chỉ tiêu	Đơn vị tính	Kết quả	Phương pháp thử
01	Hàm lượng Polyphenol	mg/kg	**30,25**	FIRI.M.277 (Ref: TCVN 9745-1:2013)

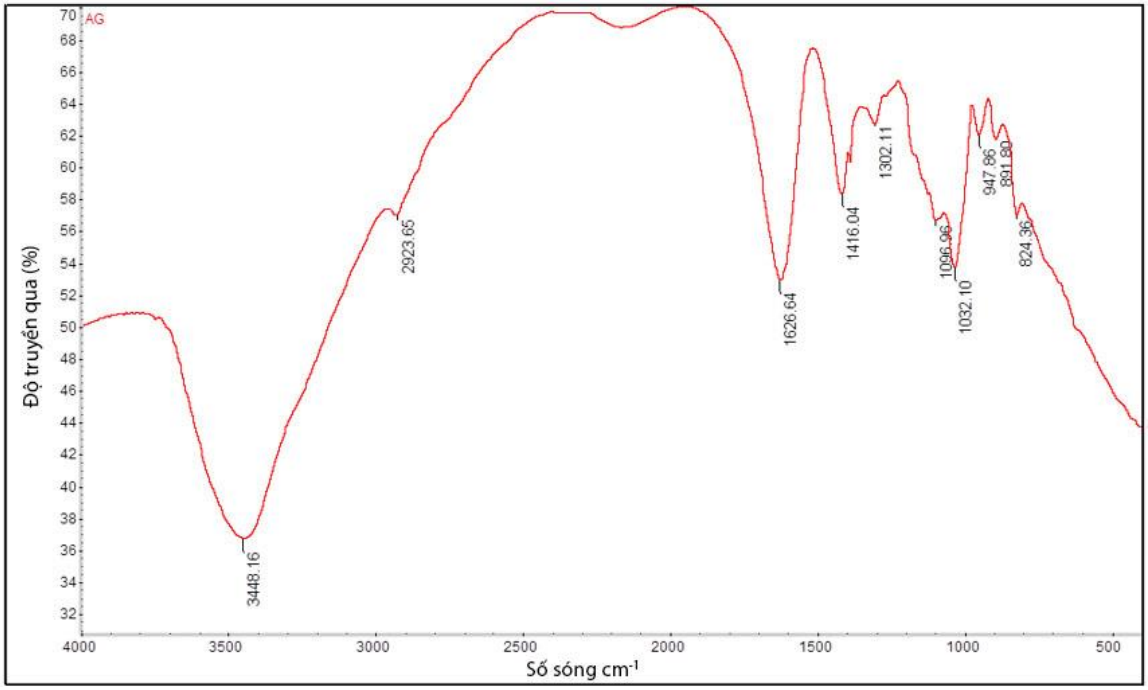
Hà Nội, ngày 30 tháng 09 năm 2020
GIÁM ĐỐC

TRUNG TÂM PHÂN TÍCH VÀ GIÁM ĐỊNH THỰC PHẨM QUỐC GIA

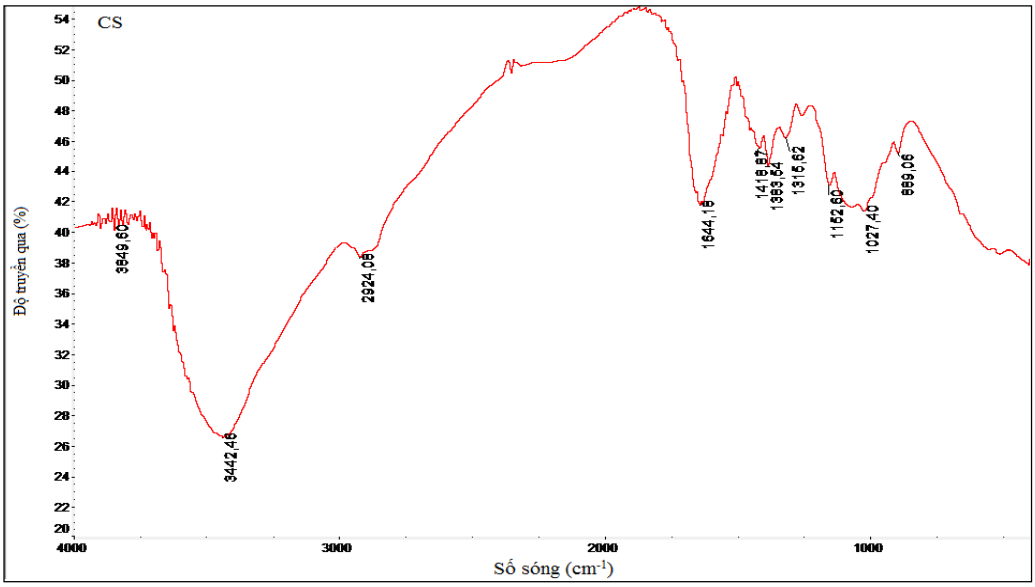
Lê Văn Trọng

1. *Các kết quả thử nghiệm ghi trong phiếu này chỉ có giá trị đối với mẫu do khách hàng cung cấp*
2. *Thông tin về mẫu và khách hàng được ghi theo yêu cầu của nơi gửi mẫu*
3. *Không được sao chép một phần phiếu kết quả thử nghiệm nếu không được sự đồng ý bằng văn bản của Trung tâm Phân tích và giám định thực phẩm Quốc gia*
4. *Không nhận khiếu nại trong trường hợp không có mẫu lưu hoặc hết thời hạn lưu mẫu theo quy định.*

Phụ lục 3. Phổ hồng ngoại của alginate



Phụ lục 4. Phổ hồng ngoại của chitosan



Phụ lục 5. Kết quả thử nghiệm hoạt tính gây độc tế bào KB: Ung thư biểu mô miệng ở người

VIỆN HÀN LÂM KHOA HỌC VÀ CÔNG NGHỆ VIỆT NAM
VIỆN CÔNG NGHỆ SINH HỌC
PHÒNG THỬ NGHIỆM SINH HỌC
Địa chỉ: 18 Đường Hoàng Quốc Việt, Quận Cầu Giấy, Hà Nội, Việt Nam
Tel: 844-38361744; Email: thaodo@ibt.ac.vn

KẾT QUẢ THỬ NGHIỆM HOẠT TÍNH GÂY ĐỘC TẾ BÀO

(Kết quả thử nghiệm chỉ có giá trị với mẫu đem thử)

- **Mẫu thử nghiệm: 05 mẫu ACP**
- **Các dòng tế bào sử dụng trong nghiên cứu:**
  + KB: Ung thư biểu mô miệng ở người (human carcinoma in the mouth)
- **Đơn vị gửi mẫu: Đại học Sư phạm Hà Nội**
- **Thời gian thử nghiệm: 7/2021**
- **Tài liệu tham khảo:**

- Alley MC, Scudiero DA, Monks A, Hursey ML, Czerwinski MJ, Fine DL, Abbott BJ, Mayo JG, Shoemaker RH, Boyd MR (1988) Feasibility of drug screening with panels of human tumor cell lines using a microculture tetrazolium assay. *Cancer research* 48(3):589-601.
- Hughes JP, Rees S, Kalindjian SB, Philpott KL (2011) Principles of early drug discovery. *British journal of pharmacology* 162(6):1239-1249.
- Monks A, Scudiero D, Skehan P, Shoemaker R, Paull K, Vistica D, Hose C, Langley J, Cronise P, Vaigro-Wolff A, Gray-Goodrich M (1991) Feasibility of a high-flux anticancer drug screen using a diverse panel of cultured human tumor cell lines. *Journal of the National Cancer Institute* 83(11):757-766.
- Shoemaker RH, Scudiero DA, Melillo G, Currens MJ, Monks AP, Rabow AA, Covell DG, Sausville EA (2002) Application of high-throughput, molecular-targeted screening to anticancer drug discovery. *Current topics in medicinal chemistry* 2(3):229-246.
- Skehan P, Storeng R, Scudiero D, Monks A, McMahon J, Vistica D, Warren JT, Bokesch H, Kenney S, Boyd MR (1990) New colorimetric cytotoxic assay for anticancer-drug screening. *Journal of the National Cancer Institute* 82(13):1107-1112

I. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

1.1. Vật liệu

Vật liệu và hoá chất:

- Các dòng tế bào ung thư ở người
- Môi trường nuôi cấy tế bào: DMEM (Dulbecco s Modified Eagle Medium) hoặc MEME (Minimum Esental Medium with Eagle salt), có bổ sung thêm L-glutamine, sodium pyruvat, $NaHCO_3$, penicillin/streptomycin, 10% FBS (Fetal Bovine Serum), Trypsin-EDTA (0.05%);

- Dụng cụ, thiết bị cơ bản: Kính hiển vi ngược (Axiovert 40 CFL); Buồng đếm tế bào (Fisher, Hoa kỳ) ; Máy quang phổ (BioTek) ; Tủ ấm CO2, Tủ lạnh sâu -80°C, bình nitơ lỏng, cân phân tích, máy đo pH và các dụng cụ thí nghiệm thông thường.
- Các hóa chất cơ bản khác: DMSO (Dimethyl sulfoxide), TCA (Trichloroacetic acid), Tris base, PBS (phosphate buffered saline), Ellipticine, SRB (Sulforhodamine B), Acetic acid v.v.
- Các dòng tế bào do GS. TS. J. M. Pezzuto, Trường Đại học Long-Island, US và GS. Jeanette Maier, trường Đại học Milan, Italia cung cấp.

1.2. Phương pháp xác định tính độc tế bào (cytotoxic assay) đối với tế bào nuôi cấy dạng đơn lớp

Phương pháp thử độ độc tế bào *in vitro* được Viện Ung thư Quốc gia Hoa Kỳ (National Cancer Institute – NCI) xác nhận là phép thử độ độc tế bào chuẩn nhằm sàng lọc, phát hiện các chất có khả năng kìm hãm sự phát triển hoặc diệt TBUT ở điều kiện *in vitro*. Phép thử này được thực hiện theo phương pháp của Skekan et al. (1990). Phép thử tiến hành xác định hàm lượng protein tế bào tổng số dựa vào mật độ quang học (OD – Optical Density) đo được khi thành phần protein của tế bào được nhuộm bằng Sulforhodamine B (SRB). Giá trị OD máy đo được tỉ lệ thuận với lượng SRB gắn với phân tử protein, do đó lượng tế bào càng nhiều (lượng protein càng nhiều) thì giá trị OD càng lớn. Phép thử được thực hiện trong điều kiện cụ thể như sau:

+ Trypsin hóa tế bào thí nghiệm để làm rời tế bào và đếm trong buồng đếm để điều chỉnh mật độ cho phù hợp với thí nghiệm.
+ Chất thử đã pha ở các nồng độ được đưa vào các giếng của đĩa 96 giếng. Giếng không có chất thử nhưng có TBUT (190 µL) sẽ được sử dụng làm đối chứng ngày 0. Sau 1 giờ, giếng đối chứng ngày 0 tế bào sẽ được cố định bằng Trichloracetic acid – TCA 20%.
+ Ủ trong tủ ấm 72 giờ. Sau 72 giờ, tế bào được cố định bằng TCA trong 1 giờ, được nhuộm bằng SRB trong 30 phút ở 37 °C, rửa 3 lần bằng acetic acid rồi để khô ở nhiệt độ phòng.
+ 10 mM unbuffered Tris base để hòa tan lượng SRB, lắc nhẹ trong 10 phút rồi đọc kết quả OD ở bước sóng 540 nm trên máy ELISA Plate Reader (Biotek).
+ Phần trăm ức chế sự phát triển của tế bào khi có mặt chất thử sẽ được xác định thông qua công thức sau:

$$\% \text{ ức chế } = 100\% - \frac{OD(mẫu) - OD(ngày0)}{OD(DMSO) - OD(ngày0)}$$

- Phép thử được lặp lại 3 lần để đảm bảo tính chính xác. Ellipticine ở các nồng độ 10 µg/mL; 2 µg/mL; 0,4 µg/mL; 0,08 µg/mL được sử dụng như là chất đối chứng tham khảo;
- DMSO 1% luôn được sử dụng như đối chứng âm. Giá trị IC_{50} (nồng độ ức chế 50% sự phát triển) sẽ được xác định nhờ vào phần mềm máy tính TableCurve 2Dv4.
- Theo tiêu chuẩn của Viện ung thư quốc gia Hoa Kỳ (NCI), cặn chiết được coi có hoạt tính tốt với $IC_{50} \leq 20$ µg/ml, trong khi chất tinh khiết được coi có hoạt tính tốt khi $IC_{50} \leq 5$ µM [Hughes JP, (2011)]

II. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Kết quả thí nghiệm được trình bày ở bảng 1.

Bảng 1. Khả năng gây độc tế bào của mẫu nghiên cứu

Nồng độ (µg/mL)	% ức chế				
	APC	**ACP10**	**ACP20**	**ACP30**	**APC50**
100	97.83	101.81	103.05	101.69	101.15
20	66.71	24.28	37.31	52.40	42.47
4	11.80	4.22	13.95	24.24	10.31
0.8	-1.12	-4.08	4.63	14.11	8.26
IC_{50}	**14.63±1.56**	**43.17±3.11**	**31.61±1.98**	**25.08±1.35**	**29.49±1.46**
Nồng độ (µg/mL)	**Ellipticine**				
10	98.72				
2	89.31				
0.4	50.91				
0.8	24.16				
IC_{50}	**0.34±0.04**				

Kết quả trên cho thấy: Các mẫu nghiên cứu đã thể hiện hoạt tính với giá trị IC_{50} từ 14.63 – 43.17 µg/mL trên dòng tế bào KB. Chất đối chứng dương Ellipticine hoạt động ổn định trong thí nghiệm.

III. KẾT LUẬN

1. **Các mẫu nghiên cứu đã thể hiện hoạt tính với giá trị IC_{50} từ 14.63 – 43.17 µg/mL trên dòng tế bào KB.**

Hà Nội, ngày 09 tháng 07 năm 2021

Xác nhận chữ kí

TRƯỞNG PHÒNG QUẢN LÝ TỔNG HỢP
VIỆN CÔNG NGHỆ SINH HỌC

Trần Hồ Quang

Trưởng phòng

PGS.TS. Đỗ Thị Thảo

Phụ lục 6. Kết quả thử nghiệm hoạt tính gây độc tế bào ung thư gan ở người HepG2 (human hepatocarcinoma)

VIỆN HÀN LÂM KHOA HỌC VÀ CÔNG NGHỆ VIỆT NAM
VIỆN CÔNG NGHỆ SINH HỌC
PHÒNG THỬ NGHIỆM SINH HỌC
Địa chỉ: 18 Đường Hoàng Quốc Việt, Quận Cầu Giấy, Hà Nội, Việt Nam
Tel: 844-38361744; Email: thaodo@ibt.ac.vn

KẾT QUẢ THỬ NGHIỆM HOẠT TÍNH GÂY ĐỘC TẾ BÀO

(Kết quả thử nghiệm chỉ có giá trị với mẫu đem thử)

- **Mẫu thử nghiệm: 05 mẫu, trên nhãn ghi tên rõ ràng;**
- **Các dòng tế bào sử dụng trong nghiên cứu:**
  + HepG2: Ung thư tế bào gan ở người (human hepatocarcinoma)
- **Đơn vị gửi mẫu: Trường Đại học Sư phạm**
- **Tài liệu tham khảo:**

- Alley MC, Scudiero DA, Monks A, Hursey ML, Czerwinski MJ, Fine DL, Abbott BJ, Mayo JG, Shoemaker RH, Boyd MR (1988) Feasibility of drug screening with panels of human tumor cell lines using a microculture tetrazolium assay. *Cancer research* 48(3):589-601.
- Hughes JP, Rees S, Kalindjian SB, Philpott KL (2011) Principles of early drug discovery. *British journal of pharmacology* 162(6):1239-1249.
- Monks A, Scudiero D, Skehan P, Shoemaker R, Paull K, Vistica D, Hose C, Langley J, Cronise P, Vaigro-Wolff A, Gray-Goodrich M (1991) Feasibility of a high-flux anticancer drug screen using a diverse panel of cultured human tumor cell lines. *Journal of the National Cancer Institute* 83(11):757-766.
- Shoemaker RH, Scudiero DA, Melillo G, Currens MJ, Monks AP, Rabow AA, Covell DG, Sausville EA (2002) Application of high-throughput, molecular-targeted screening to anticancer drug discovery. *Current topics in medicinal chemistry* 2(3):229-246.
- Skehan P, Storeng R, Scudiero D, Monks A, McMahon J, Vistica D, Warren JT, Bokesch H, Kenney S, Boyd MR (1990) New colorimetric cytotoxic assay for anticancer-drug screening. *Journal of the National Cancer Institute* 82(13):1107-1112

I. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

1.1. Vật liệu

Vật liệu và hoá chất:

- Môi trường nuôi cấy tế bào: DMEM (Dulbecco s Modified Eagle Medium) hoặc MEME (Minimum Esental Medium with Eagle salt), có bổ sung thêm L-glutamine, sodium pyruvat, $NaHCO_3$, penicillin/streptomycin, 10% FBS (Fetal Bovine Serum), Trypsin-EDTA (0.05%);
- Dụng cụ, thiết bị cơ bản: Kính hiển vi ngược (Axiovert 40 CFL); Buồng đếm tế bào (Fisher, Hoa kỳ) ; Máy quang phổ (BioTek) ; Tủ ấm CO2, Tủ lạnh sâu -80°C, bình nitơ lỏng, cân phân tích, máy đo pH và các dụng cụ thí nghiệm thông thường.

- Các hóa chất cơ bản khác: DMSO (Dimethyl sulfoxide), TCA (Trichloroacetic acid), Tris base, PBS (phosphate buffered saline), Ellipticine, SRB (Sulforhodamine B), Acetic acid v.v.
- Các dòng tế bào do GS. TS. J. M. Pezzuto, Trường Đại học Long-Island, US và GS. Jeanette Maier, trường Đại học Milan, Italia cung cấp.

1.2. Phương pháp xác định tính độc tế bào (cytotoxic assay) đối với tế bào nuôi cấy dạng đơn lớp

Phương pháp thử độ độc tế bào *in vitro* được Viện Ung thư Quốc gia Hoa Kỳ (National Cancer Institute – NCI) xác nhận là phép thử độ độc tế bào chuẩn nhằm sàng lọc, phát hiện các chất có khả năng kìm hãm sự phát triển hoặc diệt TBUT ở điều kiện *in vitro*. Phép thử này được thực hiện theo phương pháp của Skekan et al. (1990). Phép thử tiến hành xác định hàm lượng protein tế bào tổng số dựa vào mật độ quang học (OD – Optical Density) đo được khi thành phần protein của tế bào được nhuộm bằng Sulforhodamine B (SRB). Giá trị OD máy đo được tỉ lệ thuận với lượng SRB gắn với phân tử protein, do đó lượng tế bào càng nhiều (lượng protein càng nhiều) thì giá trị OD càng lớn. Phép thử được thực hiện trong điều kiện cụ thể như sau:

- Trypsin hóa tế bào thí nghiệm để làm rời tế bào và đếm trong buồng đếm để điều chỉnh mật độ cho phù hợp với thí nghiệm. Tiến hành đưa 190 µL tế bào vào đĩa 96 giếng để thử nghiệm.
- Mẫu thử được hòa tan trong DMSO 100% để có nồng độ ban đầu (stock) là 20 mg/mL. Tiến hành pha loãng mẫu trên đĩa 96 giếng bằng môi trường nuôi cấy tế bào (không có FBS) thành 4 dãy nồng độ từ cao xuống thấp. Chất thử đã pha loãng ở các nồng độ (10 µL) được đưa vào các giếng của đĩa 96 giếng đã chuẩn bị tế bào ở trên. Giếng không có chất thử nhưng có TBUT (190 µL) + DMSO 1% (10 µL) sẽ được sử dụng làm đối chứng ngày 0. Sau 1 giờ, giếng đối chứng ngày 0 tế bào sẽ được cố định bằng Trichloracetic acid – TCA 20%.
- Ủ trong tủ ấm 72 giờ. Sau 72 giờ, tế bào được cố định bằng TCA trong 1 giờ, được nhuộm bằng SRB trong 30 phút ở 37°C, rửa 3 lần bằng acetic acid rồi để khô ở nhiệt độ phòng.
- 10 mM unbuffered Tris base để hòa tan lượng SRB, lắc nhẹ trong 10 phút rồi đọc kết quả OD ở bước sóng 540 nm trên máy ELISA Plate Reader (BioTek).

- Phần trăm ức chế sự phát triển của tế bào khi có mặt chất thử sẽ được xác định thông qua công thức sau:

$$\%\ \text{ức chế} = 100\% - \frac{OD(\text{mẫu}) - OD(\text{ngày0})}{OD(DMSO) - OD(\text{ngày0})}$$

- Phép thử được lặp lại 3 lần để đảm bảo tính chính xác. Ellipticine ở các nồng độ 10 - 2 - 0,4 - 0,08 µg/mL được sử dụng như là chất đối chứng tham khảo; DMSO 1% luôn được sử dụng như đối chứng âm (nồng độ cuối cùng trong giếng thử là 0.05%). Giá trị IC_{50} (nồng độ ức chế 50% sự phát triển) sẽ được xác định nhờ vào phần mềm máy tính TableCurve 2Dv4.
- Theo tiêu chuẩn của Viện ung thư quốc gia Hoa Kỳ (NCI), cặn chiết được coi có hoạt tính tốt với $IC_{50} \leq 20$ µg/ml, trong khi chất tinh khiết được coi có hoạt tính tốt khi $IC_{50} \leq 5$ µM [Hughes JP, (2011)]

II. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Bảng 1. Khả năng gây độc tế bào của mẫu nghiên cứu

Ghi chú: các mẫu APC, APC50, APC30 mẫu bị bám vào đáy giếng ở nồng độ 100 µg/ml sau khi cố định tế bào, nên có ảnh hưởng đến giá trị OD đo được

Nồng độ (µg/mL)	APC		APC50		APC30	
	% Ức chế	Sai số	% Ức chế	Sai số	% Ức chế	Sai số
100	36.92	12.06	60.58	1.30	73.63	4.93
20	72.87	3.40	66.37	1.28	32.14	1.69
4	5.47	0.52	11.71	0.35	3.08	0.28
0.8	2.42	0.14	6.07	0.26	0.50	0.06
IC_{50}	**17.31±0.27**		**16.36±0.67**		**48.89±3.08**	
Nồng độ (µg/ml)	APC20		APC10		Ellipticine	
	% Ức chế	Sai số	% Ức chế	Sai số	% Ức chế	Sai số
100	46.13	1.83	42.19	2.36	97.78	1.05
20	23.12	0.91	19.40	1.59	80.76	0.94
4	2.69	0.25	3.88	0.28	51.31	1.26
0.8	1.55	0.16	-0.56	0.05	23.12	1.14
IC_{50}	**>100**		**>100**		**0.35±0.03**	

Ghi chú: Ellipticine được thử nghiệm ở dải nồng độ 10-2-0.4-0.08 µg/mL

Kết quả trên cho thấy 02 mẫu APC20 và APC10 chưa thể hiện hoạt tính gây độc ở các nồng độ nghiên cứu trên dòng HepG2. Các mẫu còn lại cho thấy mức hoạt tính gây độc tế bào với giá trị IC50 từ 16.36 – 48.89 µg/mL. Chất đối chứng dương Ellipticine hoạt động ổn định trong thí nghiệm.

III. KẾT LUẬN

1. **Hai mẫu APC20 và APC10 chưa thể hiện hoạt tính gây độc ở các nồng độ nghiên cứu trên dòng HepG2.**

2. Các mẫu còn lại cho thấy mức hoạt tính gây độc tế bào với giá trị IC50 từ 16.36 – 48.89 µg/mL.

Hà Nội, ngày 22 tháng 11 năm 2022

Xác nhận chữ kí

PHÓ TRƯỞNG PHÒNG QUẢN LÝ TỔNG HỢP

VIỆN CÔNG NGHỆ SINH HỌC

Lương Thị Lan Anh

Trưởng phòng

PGS.TS. Đỗ Thị Thảo

Phụ lục 7. Kết quả thử nghiệm hoạt tính gây độc tế bào thận gốc phôi ở người HEK-293A (human embryonic kidney cells)

VIỆN HÀN LÂM KHOA HỌC VÀ CÔNG NGHỆ VIỆT NAM
VIỆN CÔNG NGHỆ SINH HỌC
PHÒNG THỬ NGHIỆM SINH HỌC
Địa chỉ: 18 Đường Hoàng Quốc Việt, Quận Cầu Giấy, Hà Nội, Việt Nam
Tel: 844-38361744; Email: thaodo@ibt.ac.vn

KẾT QUẢ THỬ NGHIỆM HOẠT TÍNH GÂY ĐỘC TẾ BÀO

(Kết quả thử nghiệm chỉ có giá trị với mẫu đem thử)

- **Mẫu thử nghiệm: 05 mẫu ACP**
- **Các dòng tế bào sử dụng trong nghiên cứu:**
  + HEK-293A: Tế bào thận gốc phôi ở người (human embryonic kidney cells)
- **Đơn vị gửi mẫu: Đại học Sư phạm Hà Nội**
- **Thời gian thử nghiệm: 5/2021**
- **Tài liệu tham khảo:**

- Alley MC, Scudiero DA, Monks A, Hursey ML, Czerwinski MJ, Fine DL, Abbott BJ, Mayo JG, Shoemaker RH, Boyd MR (1988) Feasibility of drug screening with panels of human tumor cell lines using a microculture tetrazolium assay. *Cancer research* 48(3):589-601.
- Hughes JP, Rees S, Kalindjian SB, Philpott KL (2011) Principles of early drug discovery. *British journal of pharmacology* 162(6):1239-1249.
- Monks A, Scudiero D, Skehan P, Shoemaker R, Paull K, Vistica D, Hose C, Langley J, Cronise P, Vaigro-Wolff A, Gray-Goodrich M (1991) Feasibility of a high-flux anticancer drug screen using a diverse panel of cultured human tumor cell lines. *Journal of the National Cancer Institute* 83(11):757-766.
- Shoemaker RH, Scudiero DA, Melillo G, Currens MJ, Monks AP, Rabow AA, Covell DG, Sausville EA (2002) Application of high-throughput, molecular-targeted screening to anticancer drug discovery. *Current topics in medicinal chemistry* 2(3):229-246.
- Skehan P, Storeng R, Scudiero D, Monks A, McMahon J, Vistica D, Warren JT, Bokesch H, Kenney S, Boyd MR (1990) New colorimetric cytotoxic assay for anticancer-drug screening. *Journal of the National Cancer Institute* 82(13):1107-1112

I. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

1.1. Vật liệu

Vật liệu và hoá chất:

- Các dòng tế bào ung thư ở người, ở chuột và tế bào lành
- Môi trường nuôi cấy tế bào: DMEM (Dulbecco s Modified Eagle Medium) hoặc MEME (Minimum Esental Medium with Eagle salt), có bổ sung thêm L-glutamine, sodium pyruvat, $NaHCO_3$, penicillin/streptomycin, 10% FBS (Fetal Bovine Serum), Trypsin-EDTA (0.05%);

- Dụng cụ, thiết bị cơ bản: Kính hiển vi ngược (Axiovert 40 CFL); Buồng đếm tế bào (Fisher, Hoa kỳ) ; Máy quang phổ (BioTek) ; Tủ ấm CO2, Tủ lạnh sâu -80°C, bình nitơ lỏng, cân phân tích, máy đo pH và các dụng cụ thí nghiệm thông thường.
- Các hóa chất cơ bản khác: DMSO (Dimethyl sulfoxide), TCA (Trichloroacetic acid), Tris base, PBS (phosphate buffered saline), Ellipticine, SRB (Sulforhodamine B), Acetic acid v.v.
- Các dòng tế bào do GS. TS. J. M. Pezzuto, Trường Đại học Long-Island, US và GS. Jeanette Maier, trường Đại học Milan, Italia cung cấp.

1.2. Phương pháp xác định tính độc tế bào (cytotoxic assay) đối với tế bào nuôi cấy dạng đơn lớp

Phương pháp thử độ độc tế bào *in vitro* được Viện Ung thư Quốc gia Hoa Kỳ (National Cancer Institute – NCI) xác nhận là phép thử độ độc tế bào chuẩn nhằm sàng lọc, phát hiện các chất có khả năng kìm hãm sự phát triển hoặc diệt TBUT ở điều kiện *in vitro*. Phép thử này được thực hiện theo phương pháp của Skekan et al. (1990). Phép thử tiến hành xác định hàm lượng protein tế bào tổng số dựa vào mật độ quang học (OD – Optical Density) đo được khi thành phần protein của tế bào được nhuộm bằng Sulforhodamine B (SRB). Giá trị OD máy đo được tỉ lệ thuận với lượng SRB gắn với phân tử protein, do đó lượng tế bào càng nhiều (lượng protein càng nhiều) thì giá trị OD càng lớn. Phép thử được thực hiện trong điều kiện cụ thể như sau:

+ Trypsin hóa tế bào thí nghiệm để làm rời tế bào và đếm trong buồng đếm để điều chỉnh mật độ cho phù hợp với thí nghiệm.
+ Chất thử đã pha ở các nồng độ được đưa vào các giếng của đĩa 96 giếng. Giếng không có chất thử nhưng có TBUT (190 µL) sẽ được sử dụng làm đối chứng ngày 0. Sau 1 giờ, giếng đối chứng ngày 0 tế bào sẽ được cố định bằng Trichloracetic acid – TCA 20%.
+ Ủ trong tủ ấm 72 giờ. Sau 72 giờ, tế bào được cố định bằng TCA trong 1 giờ, được nhuộm bằng SRB trong 30 phút ở 37 °C, rửa 3 lần bằng acetic acid rồi để khô ở nhiệt độ phòng.
+ 10 mM unbuffered Tris base để hòa tan lượng SRB, lắc nhẹ trong 10 phút rồi đọc kết quả OD ở bước sóng 540 nm trên máy ELISA Plate Reader (Biotek).
+ Phần trăm ức chế sự phát triển của tế bào khi có mặt chất thử sẽ được xác định thông qua công thức sau:

$$\% \text{ ức chế } = 100\% - \frac{OD(mẫu) - OD(ngày0)}{OD(DMSO) - OD(ngày0)}$$

- Phép thử được lặp lại 3 lần để đảm bảo tính chính xác. Ellipticine ở các nồng độ 10 µg/mL; 2 µg/mL; 0,4 µg/mL; 0,08 µg/mL được sử dụng như là chất đối chứng tham khảo;
- DMSO 1% luôn được sử dụng như đối chứng âm. Giá trị IC_{50} (nồng độ ức chế 50% sự phát triển) sẽ được xác định nhờ vào phần mềm máy tính TableCurve 2Dv4.
- Theo tiêu chuẩn của Viện ung thư quốc gia Hoa Kỳ (NCI), cặn chiết được coi có hoạt tính tốt với $IC_{50} \leq 20$ µg/ml, trong khi chất tinh khiết được coi có hoạt tính tốt khi $IC_{50} \leq 5$ µM [Hughes JP, (2011)]

II. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Kết quả thí nghiệm được trình bày ở bảng 1.

Bảng 1. Phần trăm ức chế sự phát triển tế bào của mẫu nghiên cứu

% ức chế					
Nồng độ (µg/mL)	**ACP**	**Nồng độ (µg/mL)**	**ACP1**	**Nồng độ (µg/mL)**	**ACP2**
100	26.99	**100**	18.46	**150**	18.31
20	13.85	**20**	11.77	**30**	13.21
4	7.19	**4**	6.02	**6**	4.94
0.8	2.97	**0.8**	1.56	**1.2**	-0.31
IC_{50}	**>100**	**IC_{50}**	**>100**	**IC_{50}**	**>150**
Nồng độ (µg/mL)	**ACP3**	**Nồng độ (µg/mL)**	**ACP5**	**Nồng độ (µg/mL)**	**Ellipticine**
200	22.41	**250**	38.45	**10**	93.53
40	13.42	**50**	28.24	**2**	75.84
8	7.53	**10**	11.27	**0.4**	52.69
1.6	0.62	**2**	4.27	**0.08**	24.73
IC_{50}	**>200**	**IC_{50}**	**>250**	**IC_{50}**	**0.40 ± 0.03**

Kết quả trên cho thấy các mẫu chưa thể hiện hoạt tính ở các nồng độ nghiên cứu. Chất đối chứng dương Ellipticine hoạt động ổn định trong thí nghiệm.

III. KẾT LUẬN

1. **Các mẫu chưa thể hiện hoạt tính ở các nồng độ nghiên cứu**

Hà Nội, ngày 24 tháng 5 năm 2021

Xác nhận chữ kí

TRƯỞNG PHÒNG QUẢN LÝ TỔNG HỢP
VIỆN CÔNG NGHỆ SINH HỌC

Trần Hồ Quang

Trưởng phòng

PGS.TS. Đỗ Thị Thảo

Phụ lục 8. Kết quả thử nghiệm hoạt tính chống oxy hóa trên hệ DPPH

VIỆN HÀN LÂM KHOA HỌC & CÔNG NGHỆ VIỆT NAM
VIỆN HOÁ HỌC
PHÒNG HÓA SINH ỨNG DỤNG
Tel: (+84) 4-37914586
Phòng 601, Nhà A18,18 Hoàng Quốc Việt, Cầu Giấy, Hà Nội, Việt Nam

PHIẾU TRẢ KẾT QUẢ THỬ HOẠT TÍNH CHỐNG OXY HÓA DPPH

Người gửi mẫu: Lương Phú Hoàng
Ngày gửi: 04/2021
Số lượng mẫu: 05 mẫu

1. Nguyên lí của phép thử:

1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) là chất tạo ra gốc tự do được dùng để thực hiện sàng lọc tác dụng chống oxy hóa của các chất nghiên cứu. Hoạt tính chống oxy hóa thể hiện qua việc làm giảm màu của DPPH, được xác định bằng phương pháp đo quang ở bước sóng λ = 517 nm.

2. Cách tiến hành:

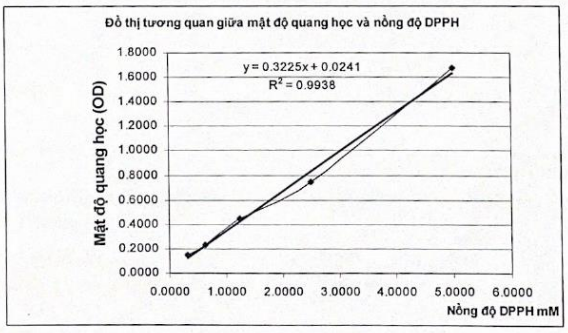
Pha dung dịch DPPH có nồng độ 1mM trong Methanol (MeOH). Chất thử được pha trong DMSO 100% sao cho nồng độ cuối cùng đạt được một dãy các nồng độ. Để thời gian phản ứng 30 phút ở 37^0C, đọc mật độ hấp phụ của DPPH chưa phản ứng bằng máy đọc Biotek ở bước sóng 517 nm.

% bẫy gốc tự do DPPH của mẫu thử được tính theo công thức sau:

$$SC\% = (OD_{trắng} - OD_{mẫu\ thử}) / OD_{trắng}\ (\%).$$

EC_{50} được tính theo giá trị SC tương quan với các nồng độ khác nhau của chất thử, thí nghiệm được lặp lại với n = 3.

Đường chuẩn biểu thị mối tương quan giữa nồng độ DPPH và mật độ quang học:



Tài liệu tham khảo

- Kai Marxen, Klaus Heinrich Vanselow, Sebastian Lippemeier, Ralf Hintze, Andreas Ruser and Ulf-Peter Hansen "Determination of DPPH Radical Oxidation Caused by Methanolic Extracts of some Microalgal Species by Linear Regression Analysis of Spectrophotometric Measurements" Sensors 2007, 7, 2080-2095.
- M. Burits and F. Bucar, Antioxidant activity of *Nigella sativa* essential oil, *Phytotherapy Research* **14** (2000), pp. 323–328.
- M. Cuendet, K. Hostettmann and O. Potterat, Iridoid glucosides with free radical scavenging properties from *Fagraea blumei*, *Helvetica Chimica Acta* **80** (1997), pp. 1144–1152.

3. Kết quả thử hoạt tính chống oxy hóa trên hệ DPPH

TT	Tên mẫu	Nồng độ thử (µg/ml)	% bắt giữ gốc tự do	Giá trị EC_{50} (µg/ml)
1	Polyphenol trà hoa vàng	256	89	13.99±0.26
		64	77	
		16	37.5	
		4	3	
2	AGN/CS/PP10	256	91	31.16±2.31
		64	89.5	
		16	57.5	
		4	2	
3	AGN/CS/PP20	256	92	14.57±0.41
		64	89.5	
		16	59	
		4	5	
4	AGN/CS/PP30	256	90	14.37±0.17
		64	85.5	
		16	56.5	
		4	5	
5	AGN/CS/PP50	256	91	13.99±0.26
		64	88.5	
		16	46	
		4	5	
	Quercetin	32	100	9.97±0.25
		8	45.5	
		2	0	
		0,5	0	

Hà Nội, ngày 29 tháng 04 năm 2021

Viện Hóa học xác nhận Bà Nguyễn Thị Thu Hà là Trưởng phòng HSUD

TL. VIỆN TRƯỞNG
TRƯỞNG PHÒNG QUẢN LÝ TỔNG HỢP

VIỆN HÓA HỌC

Nguyễn Thị Lan Anh

Trưởng phòng

Nguyễn Thị Thu Hà

Người trả kết quả

Nguyễn Thanh Trà

Phụ lục 9. Kết quả thử nghiệm hoạt tính ức chế nitric oxide (NO inhibition)

VIỆN HÀN LÂM KHOA HỌC VÀ CÔNG NGHỆ VIỆT NAM
VIỆN CÔNG NGHỆ SINH HỌC
PHÒNG THỬ NGHIỆM SINH HỌC

Địa chỉ: 18 Đường Hoàng Quốc Việt, Quận Cầu Giấy, Hà Nội, Việt Nam
Tel: 84-24-38361744; Email: thaodo@ibt.ac.vn

KẾT QUẢ THỬ NGHIỆM HOẠT TÍNH ỨC CHẾ NITRIC OXIDE (NO INHIBITION)

(Kết quả thử nghiệm chỉ có giá trị với mẫu đem thử)

- **Tên mẫu: 05 mẫu**
- **Đơn vị gửi mẫu: Đại học Sư phạm Hà Nội**
- **Tài liệu tham khảo:**

- Liao H, Banbury L, Liang H, Wang X, Lü X, Hu L, Wu J (2014) Effect of Honghua (Flos Carthami) on nitric oxide production in RAW 264.7 cells and α-glucosidase activity. *Journal of Traditional Chinese Medicine* 34(3): 362-368
- Combet S, Balligand JL, Lameire N, Goffin E, Devuyst O (2000) A specific method for measurement of nitric oxide synthase enzymatic activity in peritoneal biopsies. *Kidney International* 57(1):332-8
- Tsai PJ, Tsai TH, Yu CH, Ho SC (2007). Comparison of NO-scavenging and NO-suppressing activities of different herbal teas with those of green tea. *Food Chemistry*, *103*(1), 181-187.
- Bernardes NR, Heggdorne-Araújo M, Borges IF, Almeida FM, Amaral EP, Lasunskaia EB, Muzitano MF, Oliveira DB (2014). Nitric oxide production, inhibitory, antioxidant and antimycobacterial activities of the fruits extract and flavonoid content of Schinus terebinthifolius. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, *24*(6), 644-650.
- Cheenpracha S, Park EJ, Rostama B, Pezzuto JM, Chang LC (2010) Inhibition of nitric oxide (NO) production in lipopolysaccharide (LPS)-activated murine macrophage RAW 264.7 cells by the norsesterterpene peroxide, epimuqubilin A. *Marine drugs*, *8*(3), 429-437.

I. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

1.1. Vật liệu

- Lipopolysaccharides (LPS) từ *Escherichia- coli* của Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA). Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM), fetal bovine serum (FBS) were from Life Technologies, Inc., (Gaithersburg, MD, USA). Sodium nitrite, sulfanilamide, N-1-napthylethylenediamine dihydrochloride and dimethyl sulphoxide (DMSO) của Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA).

các hóa chất cần thiết khác của các hãng Sigma, GIBCO, Invitrogen, Promega v.v.

- ***Dòng tế bào:*** **RAW 264.7** do GS. TS. Domenico Delfino, Đại học Perugia, Italia cung cấp.

1.2. Phương pháp nuôi cấy tế bào in vitro

- Dòng tế bào RAW264.7 được nuôi cấy trong môi trường DMEM với thành phần kèm theo gồm 2 mM L-glutamine, 10 mM HEPES, và 1,0 mM sodium pyruvate, ngoài ra bổ sung 10% fetal bovine serum – FBS (GIBCO).
- Tế bào được cấy chuyền sau 3-5 ngày với tỉ lệ (1:3) và nuôi trong tủ ấm CO_2 ở điều kiện 37°C, 5% CO_2.

1.3. Phương pháp xác định khả năng ức chế sản sinh NO của tế bào macrophage RAW 264.7

- Tế bào RAW 274.7 được đưa vào đĩa 96 giếng ở nồng độ 2 x 10^5 tb/giếng và nuôi trong tủ ấm ở 37°C và 5% CO_2 trong 24h.
- Tiếp theo, môi trường nuôi cấy được loại bỏ, thay bằng môi trường DMEM không có FBS trong 3h.
- Tế bào sau đó được ủ mẫu nghiên cứu ở các nồng độ khác nhau trong 2h trước khi được kích thích sản sinh yếu tố NO bằng LPS (10 µg/mL) trong 24h.
- Một số giếng không được ủ mẫu mà chỉ sử dụng dung dịch pha mẫu được coi là đối chứng âm. Trong khi đối chứng dương được sử dụng là là Dexamethasone (Sigma) ở các nồng độ 100; 20; 4 và 0.8 µM.
- Nitrite (NO_2^-), được xem là chỉ thị cho việc tạo NO, sẽ được xác định nhờ bộ Griess Reagent System (Promega Cooperation, WI, USA). Cụ thể là, 100 µL môi trường nuôi tế bào (ủ mẫu) được chuyển sang đĩa 96 mới và được thêm vào 100 µL Griess reagent: 50 µL of 1% (w/v) sulfanilamide trong 5% (v/v) phosphoric acid và 50 µL 0.1% (w/v) N-1-naphthylethylenediamine dihydrochloride pha trong nước.
- Hỗn hợp này được ủ tiếp ở nhiệt độ phòng trong 10 phút và hàm lượng nitrite sẽ được đo bằng máy microplate reader ở bước sóng 540 nm. Môi trường DMEM không FBS được sử dụng như giếng trắng (blank).
- Hàm lượng nitrite của từng mẫu thí nghiệm được xác định nhờ vào đường cong hàm lượng chuẩn $NaNO_2$ và được so sánh % với mẫu chứng âm (LPS).
- Khả năng ức chế sản sinh NO tương ứng của mẫu được xác định nhờ công thức :

% ức chế =100%- [hàm lượng NO_{sample}/hàm lượng NO_{LPS}]*100

- Phép thử được lặp lại 3 lần để đảm bảo tính chính xác. Giá trị IC_{50} (nồng độ ức chế 50% sự hình thành NO) sẽ được xác định nhờ vào phần mềm máy tính TableCurve 2Dv4

1.4. Phép thử sinh học xác định khả năng gây độc tế bào bằng MTT

Phương pháp MTT được sử dụng để xác định sự phát triển của tế bào dưới tác động của chất nghiên cứu. Phương pháp này xác định sự phát triển của tế bào thông qua sự hình thành sản phẩm formazan mầu khi đưa MTT vào giếng tế bào dưới tác động của enzyme trong tế bào sống. Cụ thể như sau:

- Đĩa nuôi cấy tế bào để thử nghiệm sự biểu hiện NO ở trên, sau khi thu dịch nổi để xác định hàm lượng NO sẽ được thêm vào mỗi giếng là 90 µL môi trường nuôi cấy tế bào và 10 µL MTT (nồng độ cuối cùng là 5 mg/mL). Sau 4h, loại bỏ môi trường, tinh thể formazan được hòa tan bằng 50 µL DMSO 100%.
- Giá trị OD đo ở bước sóng 540 nm bằng máy quang phổ BioTek Elx800. Khả năng sống sót của tế bào khi có mặt chất thử sẽ được xác định thông qua công thức sau:

$$\% \text{ sống sót} = \frac{OD(mẫu) - OD(blank)}{OD(DMSO) - OD(blank)} \times 100$$

II. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU

Khả năng ức chế sản sinh NO của các mẫu nghiên cứu được thể hiện ở bảng sau:

Nồng độ (µg/mL)	ACP				ACP20			
	% ức chế NO		% tế bào sống		% ức chế NO		% tế bào sống	
	TB	Sai số	TB	Sai số	TB	Sai số	TB	Sai số
100	71.43	3.52	90.75	3.10	65.90	2.01	87.37	1.15
20	48.53	1.56	91.97	1.55	26.27	1.61	89.25	1.86
4	32.10	1.06			11.98	0.65		
0.8	13.36	1.03			4.15	0.30		
IC_{50}	**20.39±1.46**		-		**61.23±4.19**		-	
Nồng độ (µg/mL)	ACP10				ACP30			
	% ức chế NO		% tế bào sống		% ức chế NO		% tế bào sống	
	TB	Sai số	TB	Sai số	TB	Sai số	TB	Sai số
100	45.47	1.06	84.78	1.55	64.06	1.30	86.28	1.16
20	27.65	1.96	86.87	2.04	23.96	1.65	89.13	1.33
4	10.60	1.03			13.36	1.13		
0.8	2.76	0.25			5.01	0.13		
IC_{50}	**>100**		-		**66.53±3.76**		-	
Nồng độ (µg/mL)	ACP50							
	% ức chế NO		% tế bào sống					
	TB	Sai số	TB	Sai số				

100	72.35	1.30	86.59	1.02				
20	30.88	1.91	88.53	0.84				
4	14.75	1.26						
0.8	3.23	0.30						
IC_{50}	**47.93±3.25**		-					
Nồng độ (µM)	**Dexamethasome**							
	% ức chế NO		**% tế bào sống**					
	TB	**Sai số**	**TB**	**Sai số**				
100	89.54	1.96	86.51	2.15				
20	52.50	1.65	93.71	1.87				
4	39.59	1.56						
0.8	28.24	0.75						
IC_{50}	**14.20±0.54**		-					

Ghi chú: Các mẫu bôi vàng cho thấy lượng tế bào sống <80% ở những nồng độ thử này. Do vậy % ức chế NO ở những nồng độ này KHÔNG được sử dụng để tính IC50

Kết quả trên cho thấy: Ngoại trừ mẫu ACP10 chưa thể hiện hoạt tính ở các nồng độ thử nghiệm, các mẫu còn lại đã thể hiện hoạt tính ức chế sinh NO với giá trị IC_{50} từ 20.39 – 66.53 µg/mL. Đối chứng dương Dexamethasone hoạt động ổn định trong thí nghiệm.

KẾT LUẬN

1. **ACP10 chưa thể hiện hoạt tính ở các nồng độ thử nghiệm;**
2. **Các mẫu còn lại đã thể hiện hoạt tính ức chế sinh NO với giá trị IC_{50} từ 20.39 – 66.53 µg/mL.**

Hà Nội, ngày 22 tháng 11 năm 2022

Xác nhận chữ kí
PHÓ TRƯỞNG PHÒNG
PHỤ TRÁCH CÔNG VỤ

VIỆN CÔNG NGHỆ SINH HỌC

Lương Thị Lan Anh

Trưởng phòng

PGS.TS. Đỗ Thị Thảo