

BỘ GIÁO DỤC VÀ ĐÀO TẠO

TRƯỜNG ĐẠI HỌC VINH



VÕ THỊ QUỲNH TRANG

**NGHIÊN CỨU MỘT SỐ THÀNH PHẦN HÓA HỌC
VÀ HOẠT TÍNH SINH HỌC CỦA 2 LOÀI TRÀ HOA
VÀNG (*CAMELLIA SP.*) PHÂN BỐ Ở HÀ TĨNH**

LUẬN VĂN THẠC SỸ SINH HỌC

Nghệ An- 2022

BỘ GIÁO DỤC VÀ ĐÀO TẠO

TRƯỜNG ĐẠI HỌC VINH



VÕ THỊ QUỲNH TRANG

**NGHIÊN CỨU MỘT SỐ THÀNH PHẦN HÓA HỌC
VÀ HOẠT TÍNH SINH HỌC CỦA 2 LOÀI TRÀ HOA
VÀNG (*CAMELLIA SP.*) PHÂN BỐ Ở HÀ TĨNH**

Chuyên ngành: Sinh học thực nghiệm

Mã số: 8.42.01.14

LUẬN VĂN THẠC SĨ SINH HỌC

Người hướng dẫn khoa học: TS.BS. Vũ Văn Khoa

Người hướng dẫn khoa học: TS Phan Xuân Thiệu

TS. BS Vũ Văn Khoa

Nghệ An- 2022

NGHỆ AN – 202

LỜI CẢM ƠN

Để hoàn thành tốt luận văn này, bên cạnh quá trình học tập và tìm tòi nghiên cứu, tôi đã nhận được sự hỗ trợ và giúp đỡ của toàn thể quý thầy cô và cán bộ công nhân viên của trường Đại học Vinh. Với tình cảm chân thành cho phép tôi được bày tỏ lòng biết ơn sâu sắc và lời cảm ơn gửi đến Ban giám hiệu, phòng Sau Đại học, Trung tâm Thực hành- Thí nghiệm, Viện Hàn Lâm khoa học và công nghệ Việt Nam đã tận tình giúp đỡ và tạo điều kiện để tôi hoàn thành luận văn.

Tôi xin bày tỏ lòng biết ơn và gửi lời cảm ơn chân thành tới **T.S Phan Xuân Thiệu và TS.BS Vũ Văn Khoa** đã tận tâm, trách nhiệm hướng dẫn nhiệt tình và động viên, chia sẻ với tôi nhiều kinh nghiệm quý báu và tạo điều kiện để tôi hoàn thành đề tài nghiên cứu này.

Cuối cùng tôi xin gửi lời cảm ơn tới gia đình, bạn bè và đồng nghiệp đã động viên tinh thần và ủng hộ tôi những lúc khó khăn.

Tôi xin chân thành cảm ơn!

Tác giả

Võ Thị Quỳnh Trang

MỤC LỤC

LỜI CẢM ƠN	i
DANH MỤC BẢNG.....	iv
CÁC CHỮ VIẾT TẮT	v
MỞ ĐẦU	1
1.1. Tổng quát thực vật học của trà hoa vàng	3
1.1.1. Vị trí phân loại chi <i>Camellia</i> L.....	3
1.1.2. Đặc điểm chi <i>Camellia</i> L.	3
1.2. Thành phần hóa học	9
1.2.1. Nhóm chất polyphenol	9
1.2.2. Nhóm alkaloid	10
1.2.3. Nhóm tinh dầu.....	10
1.2.4. Nhóm saponin	10
1.2.5. Nhóm polysaccharide.....	11
1.2.6. Nhóm acid amin	11
1.3. Tác dụng của Trà Hoa Vàng	12
1.3.1. Tác dụng chống oxi hóa	12
1.3.2. Tác dụng chống ung thư.....	13
1.3.3. Tác dụng theo y học cổ truyền.....	15
1.3.4. Giá trị kinh tế	15
1.4. Lịch sử nghiên cứu.....	16
1.4.1. Nước ngoài	16
1.4.2. Trong nước	18
1.5. Đánh giá tổng quan tình hình nghiên cứu tại tỉnh Hà Tĩnh	21
1.6. Mô hình nghiên cứu in vitro trong điều trị ung thư	22
1.7. Những đặc tính quan trọng trong phát triển nuôi cấy tế bào của tế bào ung thư	22
1.8. Tổng quan về chống oxi hóa và stress oxi hóa	23
1.8.1. Tổng quan về stress oxi hóa	23
1.8.2. Tìm hiểu về các gốc tự do	24
1.8.3. Cơ chế của quá trình kháng oxi hóa.....	25

CHƯƠNG 2.....	26
ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU	26
2.1. Đối tượng nghiên cứu.....	26
2.2. Nguyên liệu, hóa chất và thiết bị.....	26
2.2.1. Tế bào thử nghiệm	26
2.2.2. Hóa chất	26
2.2.3. Động vật	27
2.2.4. Thiết bị và dụng cụ.....	27
2.3. Phương pháp nghiên cứu.....	27
2.3.1. Thu mẫu thực vật	27
2.3.2. Phương pháp chiết xuất cao toàn phần	27
2.3.3. Phương pháp định tính các nhóm chất hóa học thường gặp.....	28
2.3.4. Phương pháp định tính EGCG trong các mẫu cao chiết.....	31
2.3.5. Phương pháp định lượng polyphenol tổng số	31
2.3.6. Phép thử sinh học xác định tính độc tế bào (cytotoxic assay)	33
2.3.7. Phương pháp chống oxi hoá (MDA).....	35
2.3.8. Phương pháp xử lý số liệu.....	36
KẾT QUẢ VÀ BÀN LUẬN	37
3.1. Chiết cao tổng số trà hoa vàng	37
3.2. Khảo sát thành phần hoá học có trong trà hoa vàng.....	38
3.2.1. Kết quả định tính nhóm flavonoid	38
3.2.2. Định tính nhóm coumarin	40
3.2.3. Kết quả sàng lọc nhóm tanin.....	42
3.2.4. Kết quả sàng lọc nhóm saponin	43
3.2.5. Kết quả sàng lọc nhóm đường khử	45
3.2.6. Kết quả sàng lọc nhóm polysaccharide.....	46
3.2.7. Kết quả sàng lọc nhóm acid amin	47
3.2.8. Kết quả sàng lọc nhóm alkaloid	48
3.3. Kết quả định tính EGCG trong các mẫu cao chiết.....	49
3.4. Kết quả định lượng polyphenol tổng số trong các mẫu cao chiết.....	50
3.5. Thử nghiệm hoạt tính sinh học.....	53
3.5.1. Thử nghiệm hoạt tính chống oxy hoá peroxy hoá lipid.....	53

3.5.2. Thử nghiệm hoạt tính gây độc tế bào ung thư	53
KẾT LUẬN VÀ KIẾN NGHỊ.....	76
I. KẾT LUẬN.....	76
II. KIẾN NGHỊ.....	76
TÀI LIỆU THAM KHẢO.....	78
TÀI LIỆU TIẾNG VIỆT	78
TÀI LIỆU TIẾNG ANH	79
TÀI LIỆU INTERNET	83

DANH MỤC BẢNG

Bảng 1: So sánh đặc điểm hình thái của 2 loài trà hoa vàng tại khu vực nghiên cứu.	6
Bảng 2: Xây dựng đường chuẩn thuốc thử	32
Bảng 3. 1: Hiệu suất chiết cao còn của mẫu trà hoa vàng	37
Bảng 3. 2: Xác định độ ẩm trong cao cô đặc	38
Bảng 3. 3: Kết quả sàng lọc nhóm flavonoid bằng phản ứng hóa học.....	38
Bảng 3. 4: Kết quả sàng lọc nhóm coumarin bằng phản ứng hóa học.....	40
Bảng 3. 5: Kết quả sàng lọc nhóm tanin bằng phản ứng hóa học.....	42
Bảng 3. 6: Kết quả sàng lọc nhóm saponin bằng phản ứng hóa học	43
Bảng 3. 7: Kết quả sàng lọc nhóm đường khử bằng phản ứng hóa học	45
Bảng 3. 8: Kết quả sàng lọc nhóm polysaccharide bằng phản ứng hóa học.....	46
Bảng 3. 9: Kết quả định tính nhóm acid amin bằng phản ứng hóa học	47
Bảng 3. 10: Kết quả định tính nhóm alkaloid bằng phản ứng hóa học	48
Bảng 3. 11: Kết quả xây dựng đường chuẩn theo chất đối chiếu acid galic	50
Bảng 3. 12 Kết quả định lượng polyphenol trong tổng số mẫu cao	52
Bảng 3. 13: Hoạt tính chống peroxy hóa của mẫu nghiên cứu	53
Bảng 3.14: Khả năng gây độc tế bào của dịch chiết HVQ trên các dòng tế bào	54
Bảng 3. 15: Khả năng gây độc tế bào của dịch chiết HHT trên các dòng tế bào.....	56
Bảng 3. 16: Khả năng gây độc tế bào của các mẫu LVQ trên các dòng tế bào ung thư.....	57
Bảng 3.17: Khả năng gây độc tế bào của dịch chiết LHT trên các dòng tế bào ung thư.....	59
Bảng 3. 18: Khả năng gây độc tế bào của dịch chiết NHT trên các dòng tế bào ung thư.....	61
Bảng 3.19: Khả năng gây độc tế bào của dịch chiết NVQ trên các dòng tế bào ung thư.....	63
Bảng 4: Tổng hàm lượng polyphenol đã báo cáo trước đây	71

DANH MỤC HÌNH

Hình 1. 1. Mẫu trà hoa vàng tại vườn quốc gia Vũ Quang	3
Hình 1. 2. Trà hoa vàng hà tĩnh (Camellia hatinhensis)	5

Hình 1. 3. Trà hoa vàng vũ quang (<i>Camellia vuquangensis</i>).....	5
Hình 1. 4. Một số nhóm chất catechin có trong chi <i>Camellia</i>	10
Hình 1. 5. Một số acid amin trong Trà Hoa Vàng	12
Hình 3. 1. Hình ảnh định tính flavonoid bằng phản ứng ống nghiệm	39
Hình 3. 2. Sắc ký đồ định tính flavonoid trong các mẫu cao	40
Hình 3.3. Hình ảnh định tính coumarin trong phản ứng đóng/mở vòng Laton và phản ứng với thuốc thử Diazo	41
Hình 3.4. Hình ảnh định tính tanin bằng phản ứng ống nghiệm.....	42
Hình 3. 5. Hình ảnh định tính saponin qua các phản ứng ống nghiệm	44
Hình 3. 6. Sắc ký đồ định tính saponin trong các mẫu cao.....	44
Hình 3. 7. Hình ảnh định tính đường khử bằng phản ứng ống nghiệm	45
Hình 3. 8. Hình ảnh định tính polysaccharide bằng phản ứng ống nghiệm.....	46
Hình 3. 9. Hình ảnh định tính acid amin bằng phản ứng Ninhydrin.....	47
Hình 3.10. Hình ảnh định tính alkaloid bằng phản ứng Mayer,.....	49
Hình 3.11 Sắc ký đồ HPLC định tính EGCG trong các mẫu cao chiết	50
Hình 3. 12. Phổ hấp thụ UV của dung dịch chuẩn và các dung dịch thử	51
Hình 3. 13. Đồ thị biểu diễn đường chuẩn xác định nồng độ acid galic.....	52
Hình 3. 14. Hình ảnh các tế bào ung thư bị ức chế bởi dịch chiết HVQ	55
Hình 3. 15. Hình ảnh các tế bào ung thư bị ức chế bởi dịch chiết HHT	57
Hình 3. 16. Hình ảnh các tế bào ung thư bị ức chế bởi dịch chiết LVQ.....	59
Hình 3. 17. Hình ảnh tế bào ung thư bị ức chế bởi dịch chiết LHT.....	61
Hình 3. 18. Hình ảnh tế bào ung thư bị ức chế bởi dịch chiết NHT	63
Hình 3. 19. Hình ảnh tế bào ung thư bị ức chế bởi dịch chiết NVQ.....	65

CÁC CHỮ VIẾT TẮT

DMSO		Dimetyl sunfoxit
TLC		Phương pháp sắc ký mỏng
IC ₅₀		Inhibit Cellular Proliferation by 50% - Nồng độ ức chế 50% sự phát triển của tế bào
ĐĐVN		Dược điển Việt Nam
HDL (high density lipoprotein cholesterol)		lipoprotein cholesterol tỷ trọng cao, giá trị tối ưu là > 60 mg/dL.
LDL (low density lipoprotein cholesterol)		lipoprotein cholesterol tỷ trọng thấp, giá trị tối ưu là dưới 100 mg/dL.
HPLC		Phương pháp sắc ký lỏng hiệu năng cao
ATCC		American type culture collection
MDA		Malonyl dialdehyd
HTCO		Hoạt tính chống oxi hóa

FASN		Fatty acid synthase
GABA		Gamma- Aminobutyric Acid
LVQ		Lá Vũ Quang
LHT		Lá Hà Tĩnh
HVQ		Hoa Vũ Quang
HHT		Hoa Hà Tĩnh
NVQ		Nụ Vũ Quang
NHT		Nụ Hà Tĩnh
LD50		Liều gây chết trung bình
DPPH		Khả năng bắt gốc tự do
Mẫu Tr		Mẫu trắng

MỞ ĐẦU

LÝ DO CHỌN ĐỀ TÀI

Trà hoa vàng (*Yellow Camellia*) là tên gọi chung cho các loài có hoa màu vàng, thuộc chi Trà (*Camellia L.*), họ Chè (*Theaceae*). Trà hoa vàng được phát hiện đầu tiên ở Quảng Tây, Trung Quốc vào những năm 60 của thế kỷ XX, và nhận được sự quan tâm của nhiều nhà khoa học [44]

Trà hoa vàng ở Việt Nam phân bố ở 3 vùng chính là Vùng Đông Bắc, gồm các tỉnh: Lạng Sơn, Quảng Ninh, Tuyên Quang, Bắc Kạn, Thái Nguyên và Vĩnh Phúc – Vùng này có 25 loài; vùng Bắc Trung Bộ gồm các tỉnh từ Thanh Hóa đến Thừa Thiên Huế có 10 loài; vùng Tây Nguyên và Nam Tây Nguyên gồm tỉnh Gia Lai, Đắk Nông, Lâm Đồng, Bình Phước hiện có 16 loài. Như vậy, hiện nay các loài Trà hoa vàng chủ yếu phân bố ở Miền Bắc và Bắc Trung Bộ và theo đánh giá của một số nhà thực vật học nước ngoài, vùng Đông Bắc Việt Nam được coi như là nơi phát sinh của chi *Camellia* nói chung và của các loài Trà hoa vàng nói riêng của thế giới. [12]

Theo một số kết quả nghiên cứu thì hoa của Trà hoa vàng có tác dụng hạ huyết áp, giảm tiểu đường, hạ cholesterol, hạ mỡ máu, chống u bướu, tăng cường hệ miễn dịch và kéo dài tuổi thọ. Một số kết quả phân tích về thành phần hoá học trong lá cho thấy, trong lá của Trà hoa vàng có chứa rất nhiều nguyên tố vi lượng như: Germanium (Ge), Selenium (Se), Mangan (Mn), Molypden (Mo), Kẽm (Zn), Vanadium [11]

Ở Trung Quốc, nhiều loài Trà hoa vàng được dùng làm thuốc bởi tác dụng bảo vệ gan, thải độc, hạ cholesterol máu, chống béo phì, tốt cho hệ tim mạch, giúp cho tâm trí tỉnh táo và tăng cường sinh lực ... Trong số các loài Trà hoa vàng ở Quốc gia này, có loài *Camellia nitidissima* được coi là cây thuốc đặc biệt quý giá, nên có tên gọi là “*Kim hoa trà*” (Golden Camellia) [27]. Theo "*Camellia International Journal*", các hợp chất của chè hoa vàng có khả năng kiềm chế sự sinh trưởng của các khối u đến 33,8% trong khi chỉ cần đạt đến ngưỡng 30% đã có thể xem là thành công trong điều trị ung thư; giúp giảm đến 35% hàm lượng cholesterol trong máu, trong khi dùng các loại thuốc khác thì mức độ giảm chỉ là 33,2%... Lá chè hoa vàng có thể uống để điều chỉnh các chất béo trong cơ thể, lượng đường trong máu, giải độc gan và thận.

Tháng 1 năm 2018, các nhà khoa học Việt Nam và Nhật Bản đã đến khảo sát tại vườn Quốc gia Vũ Quang, Hà Tĩnh đã công bố 2 loài Trà hoa vàng mới trên tạp chí Plant Taxonomy, 2 loài này đều được đặt tên theo địa phương. Tuy nhiên, đến nay chưa có một công trình khoa học nào công bố về giá trị dược học của 2 loài trà hoa vàng này. Vì vậy, để có những dẫn liệu về thành phần hoá học và hoạt tính sinh học của trà hoa vàng thu hái tại vườn Quốc gia Vũ Quang chúng tôi tiến hành nghiên cứu: ***“Nghiên cứu một số thành phần hóa học và hoạt tính sinh học của hai loài trà hoa vàng (Camellia sp.) phân bố ở Hà Tĩnh”***.

MỤC TIÊU NGHIÊN CỨU

Mục tiêu tổng quát

Xác định thành phần hoá học cơ bản và thử nghiệm hoạt tính kháng ung thư của 2 loài trà hoa vàng phân bố tại vườn Quốc gia Vũ Quang, Hà Tĩnh.

Mục tiêu cụ thể

- Phân tích một số thành phần hóa học cơ bản có trong 2 loài trà hoa vàng phân bố tại vườn Quốc gia Vũ Quang.
- Khảo sát hoạt tính kháng ô xy hoá và kháng 6 dòng tế bào ung thư có trong dịch chiết lá, hoa và nụ trà hoa vàng thu hái tại vườn quốc gia Vũ Quang.

Nội dung nghiên cứu

Nội dung 1: Phân tích các thành phần hoá học có trong lá, hoa, nụ của hai trà hoa vàng phân bố tại Hà Tĩnh

Nội dung 2: Thử nghiệm khả năng kháng oxy hoá dịch chiết trà hoa vàng .

Nội dung 3: Thử nghiệm dịch chiết methanol 70% của một số loài hoa và lá trên 06 dòng tế bào ung thư

CHƯƠNG 1: TỔNG QUAN

1.1. Tổng quát thực vật học của trà hoa vàng

1.1.1. Vị trí phân loại chi *Camellia* L

Theo hệ thống phân loại thực vật của Takhtajan (2009) [6], vị trí phân loại của chi *Camellia* L. có thể được tóm tắt như sau:

Giới: Thực vật (*Plantae*)

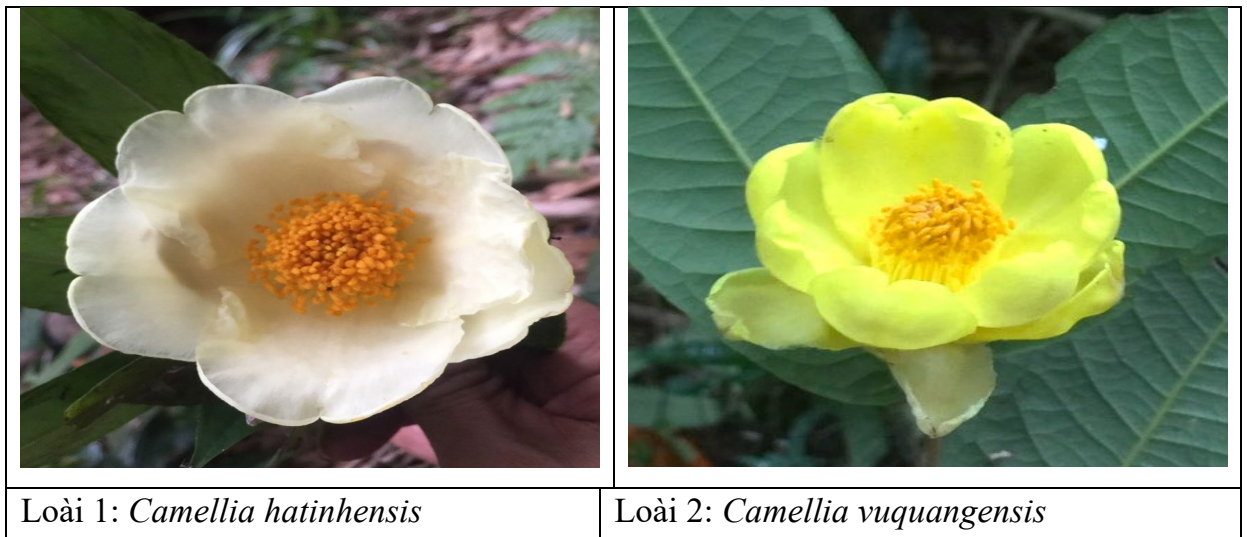
Ngành: Ngọc lan (*Magnoliophyta*).

Lớp: Ngọc lan (*Magnoliopsida*)

Phân lớp: Sô (*Dilleniidae*)

Bộ: Trà (*Theales*)

Họ: Chè (*Theaceae*)



Hình 1. 1. Mẫu trà hoa vàng tại vườn quốc gia Vũ Quang

1.1.2. Đặc điểm chi *Camellia* L.

1.1.2.1. Đặc điểm hình thái chi *Camellia* L.

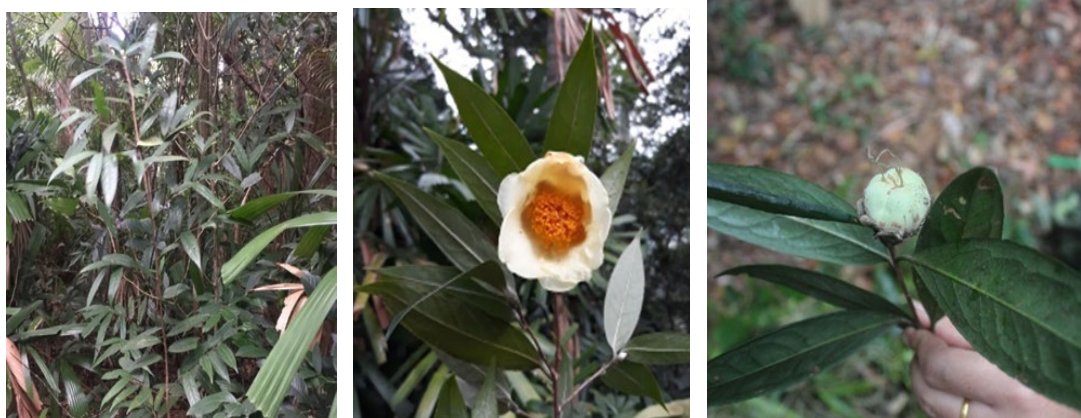
Cây bụi hoặc cây nhỏ, thường xanh, cành nhẵn hay có lông. Lá thường có cuống, đơn, mọc so le, không có lá kèm; chóp lá nhọn, có đầu nhọn hoặc kéo dài thành đuôi; gốc lá hình nêm hẹp, nêm rộng, tròn hay hình tim; mép có răng cưa nhọn hoặc tù. Hoa đều, lưỡng tính, kích thước lớn hoặc nhỏ, mọc đơn độc ở nách lá hoặc đầu cành. Hoa màu đỏ, trắng hoặc vàng. Cuống hoa ngắn hoặc gần như không có cuống. Lá bắc 2-10, mọc xoắn trên cuống hoa. Cánh hoa 4-19, hợp một phần ở gốc cùng với vòng nhị ngoài. Nhị nhiều, dính với nhau ở phía gốc, vòng nhị phía trong

rời nhau, chỉ nhị dài. Bầu trên, 1-5 ô, vòi nhụy 1-5, dạng sợi, rời hoặc dính nhau; bầu và vòi nhụy nhẵn hay phủ lông mịn. Quả nang, hình cầu dẹt hoặc hình trứng, khi khô chẻ ô từ trên xuống thành 3, 4 hay 5 mảnh; có trụ hay không; vỏ quả dày hay mỏng, hóa gỗ. Hạt 1 đến nhiều hạt trong mỗi ô, hình cầu, nửa cầu hay hình nêm, vỏ hạt màu nâu, nâu hạt giẻ nhạt hoặc nâu hồng, phủ lông hay nhẵn [13], [21],[7],[5].

Trà hoa vàng hà tĩnh (*Camellia hatinhensis*) là cây bụi hoặc khi trưởng thành là cây gỗ nhỏ, cao hơn trà hoa vàng vũ quang, khoảng 4-12 m, cành khi non bề mặt có lông, khi già trở nên nhẵn. Lá có cuống, phiến lá dày và dai, hình thuôn, cỡ 11-15 cm x 3-5 cm, mũi nhọn đến có đuôi dài, gốc phiến lá hình nêm đôi khi hơi tròn, mặt trên nhẵn, mặt dưới có lông, gân giữa lõm ở mặt trên, lồi ở mặt dưới, gân bên 10-14 cặp, lõm ở mặt trên và lồi ở mặt dưới, mép phiến lá có răng cưa, cuống lá ngắn, cỡ 1-1,3 mm, có nhiều lông. Hoa đơn độc, mọc đầu cành, màu vàng nhạt hoặc rất nhạt, đường kính 8-9 cm, cuống hoa cỡ 2-3 mm, có lông. Trà hoa vàng hà tĩnh có khoảng 9-10 đài hoa, hình dạng gần tròn, cao 0,4-2,3 cm, rộng 0,3-2,1 cm, xung quanh mép có các lông mịn, 2 mặt đều có lông. Tràng hoa có dạng hình elip, gần tròn hay hình trứng ngược, kích thước 2,7-4,8 cm x 2,3-4,5 cm, có lông. Bộ nhị nhiều, có tới 300 nhị dính lại với nhau xếp thành 5-6 vòng ngoài ở phía trên cánh hoa ở một khoảng cách 0,5-1,3 cm, dài 3-3,5 cm. Bầu nhụy gồm 2 ô, hình dạng gần tròn, có lông, cỡ 0,5-0,4 cm, nhụy, rời nhau, vòi nhụy dài 3-3,3 cm. Quả có hình cầu, nhiều lông, đường kính cỡ 3,5-4 cm, trong quả có 3 ô, mỗi ô mang 1-2 hạt. Hạt hình tròn hay gần như tròn, cỡ 1,5-2 x 1-1,5 cm, bề mặt nhẵn.

Trà hoa vàng vũ quang (*Camellia vuquangensis*) thuộc loại cây gỗ nhỏ hoặc cây bụi, cành và lá non có màu tím, nhiều, cây có độ cao khoảng 3-8m. Hoa mọc thành cụm, thường mọc ở vị trí đầu cành hoặc nách lá, hoa có màu vàng nhạt, đường kính của hoa có cỡ 8-9,5 cm, cuống thường, chỉ khoảng cỡ 2-2,3 mm, trên hoa có nhiều lông tơ. Hoa của loài này gồm có 6-7 đài hoa, có hình dạng vẩy nhỏ đến dạng gần tròn, cao cỡ 0,4-2,2 cm, rộng 0,4-1,6 cm, mép đài có lông măng, ở 2 mặt có chứa lông tơ. Cánh hoa có hình elip, hình trứng ngược hoặc thuôn, chiều rộng 1,5-2,5 cm, phía trên có khía, mặt trong gần như nhẵn, mặt ngoài có lông tơ ở giữa. Cánh hoa liên kết với chỉ nhị (liên kết) ở vòng ngoài ở chiều cao 0,6-1,8 cm tính từ gốc. Bộ nhị nhiều, với gần 290 nhị, xếp thành 5-6 vòng, nhị có màu vàng nhạt, dài 3,5-4,5 cm, có lông về phía dưới khoảng $\frac{1}{2}$ chiều dài của nhị. Các nhị ở phía ngoài liên kết lại với

nhau ở khoảng 2-2,4 mm, tạo hình chén . Bầu nhụy có 3 ô, hình dạng gần tròn, chiều dài 1-1,3 cm, nhụy không dính liền mà rời nhau, vòi nhụy dài 3-3,3 cm, có lông tơ với chiều dài đến $\frac{1}{2}$ chiều dài vòi nhụy. Cuống lá dài 8-10mm, rậm lông; có dạng thuôn, cỡ 12-23 x 4-7 cm; ở phía gốc cuống lá có tai. Mép phiến lá có nhiều răng cưa, gân bên có từ 17-22 cặp, các gân lõm ở mặt trên, lồi mặt dưới. Quả hình cầu, có lông, đường kính cỡ 3 cm, 3 ô, mỗi ô mang 1-2 hạt. Hạt hình tròn hay gần tròn, có kích cỡ 1,5 cm x 1.5 cm, bề mặt nhẵn.



Hình 1. 2. Trà hoa vàng hà tĩnh (*Camellia hatinhensis*)



Hình 1. 3. Trà hoa vàng vũ quang (*Camellia vuquangensis*)

Hai loài trà hoa vàng này đều là loài đặc hữu chỉ được tìm thấy ở vùng phân bố hẹp tại vườn quốc gia Vũ Quang, Hà Tĩnh. Tuy nhiên dù phân bố ở cùng 1 khu vực địa lý, hình thái bên ngoài của cơ quan sinh dưỡng và sinh sản như thân, lá, hoa , quả, hạt của 2 loài thể hiện một số đặc điểm khác nhau thông qua bảng so sánh sau:

Bảng 1. So sánh đặc điểm hình thái của 2 loài trà hoa vàng tại khu vực nghiên cứu

	Đặc điểm	<i>Camellia vuquangensis</i>	<i>Camellia hatinhensis</i>
1	Thân	Thân bụi hoặc gỗ nhỏ H = 3-8 m	Thân bụi (khi nhỏ), gỗ (trưởng thành), H = 4-12 m
2	Lá	Cuống dài 8-10mm, rậm lông; Dạng thuôn, cỡ 12-23 x 4-7 cm; Gốc cuống lá có tai/ có các răng; Mép phiến lá có nhiều răng cưa, Gân bên có từ 17-22 cặp, các gân lõm ở mặt trên, lồi mặt dưới.	Cuống ngắn 1-1.3mm, nhiều lông; Dạng thuôn, cỡ 11-15 x 3-5 cm, Gốc phiến lá hình nêm/ hơi tròn, Mép phiến lá có răng cưa, Gân bên 10-14 cặp, các gân lõm ở mặt trên và lồi ở mặt dưới.
3	Hoa	Hoa của loài này gồm có 6-7 đài hoa, có hình dạng vẩy nhỏ đến dạng gần tròn, cao cỡ 0,4-2,2 cm, rộng 0,4-1,6 cm, mép đài có lông măng, ở 2 mặt có chứa lông tơ. Cánh hoa có hình elip, hình trứng ngược hoặc thuôn, chiều rộng 1,5-2,5 cm, phía trên có khía, mặt trong gần như nhẵn, mặt ngoài có lông tơ ở giữa. Cánh hoa liên kết với chỉ nhị (liên kết) ở vòng ngoài ở chiều cao 0,6-1,8 cm tính từ gốc. Bộ nhị nhiều, với gần 290 nhị, xếp thành 5-6 vòng, nhị có màu vàng nhạt, dài 3,5-4,5 cm, có lông về phía dưới khoảng ½ chiều dài của nhị. Các nhị ở phía ngoài liên kết lại với nhau ở khoảng 2-2,4 mm, tạo hình chén . Bầu nhụy có 3 ô, hình dạng gần tròn, chiều dài 1-1,3 cm, nhụy không dính liền mà rời nhau, vòi nhụy dài 3-3,3 cm, có lông tơ với chiều dài đến ½ chiều dài vòi nhụy.	Hoa đơn độc, mọc đầu cành, Hoa màu vàng nhạt – rất nhạt; Đường kính 8-9cm, cuống hoa cỡ 2-3 mm, có lông; Đài 9-10, gần tròn, cao 0.4-2.3cm, rộng 0.3-2.1 cm, có lông ở cả 2 mặt, quanh mép có các lông mịn; Tròng hoa 10-11, dạng elip, cao 2,7-4,8 cm x rộng 2,3-4,5 cm, có lông ở cả 2 mặt; Các nhị ở vòng ngoài dính lại với nhau trên cánh hoa ở một khoảng cách 0.5-1.3 cm; Bộ nhị nhiều, tới 300 nhị, xếp thành 5-6 vòng, dài 3-3.5 cm. Bầu 3 ô, gần tròn, có lông, cỡ 0.5-0.4 cm, nhụy 3, rời nhau, dài 3-3.3 cm, có nhiều lông.
4	Quả	Quả hình cầu, có lông, đường kính cỡ 3 cm, 3 ô, mỗi ô mang 1-2 hạt.	Quả hình cầu, nhiều lông, đường kính 3.5cm, 3 ô, mỗi ô mang 1 hạt.
5	Hạt	Hạt hình tròn hay gần tròn, cỡ 1,5 cm x 1.5 cm, nhẵn.	Hạt hình tròn hay gần tròn, cỡ 2cm x 1 – 1.5 cm, nhẵn.

1.1.2.2. Đặc điểm phân bố chi *Camellia* L.

***Trên thế giới:**

Chi *Camellia* được bắt đầu nghiên cứu bởi nhà thực vật Linne người Thụy Điển từ đầu thế kỷ XVII trong cuốn “*Genera Plantarum*”, ông đặt tên chi Trà là *Camellia* để tưởng nhớ người cha quá cố Camellus. Sau đó gần 20 năm, các loài *Camellia japonica*, *Camellia sinensis* mới được nghiên cứu và mô tả [37].

Camellia là chi lớn nhất của họ Theaceae; số lượng loài ước tính từ 120 đến 300 loài. Sự phân bố của chi *Camellia* tập trung ở Nam và Đông Á với sự phân bố chính ở Trung Quốc (khoảng 80%) và Đông Nam Á (khoảng 20%) bao gồm Việt Nam, Lào, Thái Lan, Indonesia và Singapore (Orel & Curry, 2015; Sealy, 1958 ; Trần, 2002). Chi *Camellia* L. có khoảng 280 loài, phân bố chủ yếu ở nhiệt đới và á nhiệt đới, có nguồn gốc ở khu vực miền đông và miền nam châu Á, từ phía đông dãy Himalaya tới Nhật Bản và Indonesia.

- Châu Á: Ấn độ, Bangladesh, Đài Loan, Hàn Quốc, Indonesia, Iran, Malaysia, Myanmar, Nepal, Nhật Bản, Sri-lanka, Trung Quốc, Việt Nam.
- Châu Phi: Burundi, Ethiopia, Kenya, Maritius, Nam Phi, Uganda.
- Nam Mỹ: Argentina, Brazil, Ecuador, Peru.
- Châu Đại Dương: Australia, New-Zeland.
- Châu Âu: Thổ Nhĩ Kỳ, Liên xô (cũ)

Trà hoa vàng được phân bố nhiều châu lục trên thế giới nhưng nơi phân bố nhiều là tại Trung Quốc với 238 loài và 78 loài đặc hữu. Chi *Camellia* ở Trung Quốc có khoảng 30 loài trà hoa vàng. Trung Quốc được xem như là trung tâm phát sinh của các loài trà hoa vàng [38] . Tuy nhiên, ngoài Trung Quốc các loài Trà hoa vàng còn có ở Lào, Campuchia và một số nước khác ở Đông Nam Á, song hiện không có tư liệu chính xác về số loài hiện có ở mỗi quốc gia.

Ở Trung Quốc, các loài *Camellia* đã được quan tâm bảo tồn và phát triển từ khá sớm. Đến nay có nhiều trung tâm bảo tồn và nghiên cứu phát triển Trà, trong đó có Trà hoa vàng. Vườn ngân hàng gen *Camellia* Nam Ninh là nơi lưu giữ bộ sưu tập lớn nhất Trà hoa vàng (*Camellia chrysantha*.M.Sealy) trên thế giới. Lưu giữ hơn 20 loài *Camellia* và 15 thứ trà hoa vàng (*Camellia chrysantha*) nhằm bảo tồn, nghiên

cứu, lai tạo giống và nghiên cứu về trồng trọt. Có 3000 cá thể được lưu giữ, từ đó tạo ra 7000 dòng lai từ cây bố mẹ là Trà hoa vàng (*Camellia chrysantha*.M.Sealy) và các loài khác trong chi *Camellia* L..

Các loài Trà hoa vàng ưa khí hậu nóng ẩm, thường mọc ở nơi đất tơi xốp bên bờ suối có bóng râm, thoát nước tốt. Phạm vi phân bố tự nhiên rất hẹp, chỉ thấy mọc hoang ở vùng đồi gò có độ cao khoảng 100-200m. Tại huyện Ung Ninh - Nam Ninh - Quảng Tây - Trung Quốc, các loài Trà hoa vàng được đưa vào danh sách các loài cây bảo hộ cấp I của Trung Quốc.

Có 6 loài trong bộ sưu tập được thu từ Việt Nam, gồm: *C. chrysantha*.M.Sealy, *C. ptilosperma* S. Ye Liang & Q. T. Chen, *C. tunghinensis* H.T. Chang, *C. murauchii* Ninh & Hakoda, *C. impressinervis* Hung T. Chang & S. Ye Liang và *C. amplexicaulis* (Pitard) Cohen-Stuart. Ngoài ra, còn nhiều vườn khác lưu giữ các loài và giống *Camellia*, bao gồm: Guilin Botanic Garden Yanshan - Quảng Tây (20 loài); The Jinhua International *Camellia* Species Garden - Chiết Giang (25 loài); The Fangcheng Golden *Camellia* Nature Reserve and Gene Bank - Quảng Tây (28 loài và giống Trà hoa vàng); Kunming Institute of Botany - Vân Nam (25 loài, trong đó có 8 loài từ Việt Nam), bao gồm: *C. crassiphylla* Ninh & Hakoda; *C. cucphuongensis* Ninh & Rosmann; *C. hakodae*.M.Sealy; *C. rosmannii* Ninh; *C. vidalii* J.C.Rosmann; *C. dongnaiensis* Orel; *C. luteocerata* Orel; *C. inusitata* Orel Curry&Luu.

***Ở Việt Nam**

Việt Nam được các nhà khoa học xác định nằm trong trung tâm đa dạng sinh học của các loài Trà được tìm thấy ở một số khu vực như Tam Đảo, Quảng Ninh, Lâm Đồng, Tuyên Quang, Yên Bái, Cúc Phương, Vũ Quang, Quế Phong ... Đến nay đã xác định có 58 loài *Camellia* L., thuộc các nhóm: Trà, Hải đường, Trà mi, Sở (Trà dầu), trong đó có 27 loài *Camellia* L. có hoa màu vàng [19].

Ngày 10.7, thông tin từ Vườn quốc gia Vũ Quang cho biết, các nhà nghiên cứu đặt tên cho 2 loài trà hoa vàng này theo địa danh mà nó được tìm thấy, loài thứ nhất là trà mi Vũ Quang (*Camellia vuquangensis*), loài thứ 2 là trà mi Hà Tĩnh (*Camellia hatinhensis*). Hai loài trà này thuộc chi trà mi (*Camellia*) thuộc thực vật họ chè (Theaceae). Điều đặc biệt là cả 2 loài trà mi được tìm thấy đều là trà mi hoa vàng,

loài được các nhà nghiên cứu trên thế giới rất quan tâm. 2 loài này chưa từng được mô tả về hình thái từ trước đó tại khu vực Vườn quốc gia Vũ Quang.

Loài Trà hoa vàng vũ quang (*Camellia vuquangensis*) có đặc điểm là cây bụi, cao 3-8m. Tại Vườn quốc gia Vũ Quang, loài này được phát hiện tại các đai thấp từ 50-100m so với mực nước biển, phân bố ở sinh cảnh ven sông suối, số cá thể được tìm thấy rất ít [60].

Loài thứ hai là Trà hoa vàng hà tĩnh (*Camellia hatinhensis*) có đặc điểm là cây bụi hoặc gỗ nhỏ, cao 4-12m. Loài này được phân bố rộng hơn, tại vườn quốc gia Vũ Quang, loài này được phát hiện ở vành đai cao tầm 100-700m so với mực nước biển, mọc chung với một số loài khác như cây dẻ, kết Balansea,..[60]

1.2. Thành phần hóa học

Các nhóm chất có mặt trong Trà Hoa Vàng theo một số tài liệu nghiên cứu có mặt một số chất sau: saponin, alcaloid, polysaccharid, polyphenol, tinh dầu, flavonoid. Ngoài ra còn có mặt một số nguyên tố như: kẽm hữu cơ tự nhiên, selen, molybden, mangan, vanadi cùng một số nguyên tố vi lượng và vitamin thiết yếu. Tuy nhiên các nhóm chất sau là các nhóm chất có vai trò quan trọng và là thành phần quyết định nên các tính chất chủ yếu của trà:

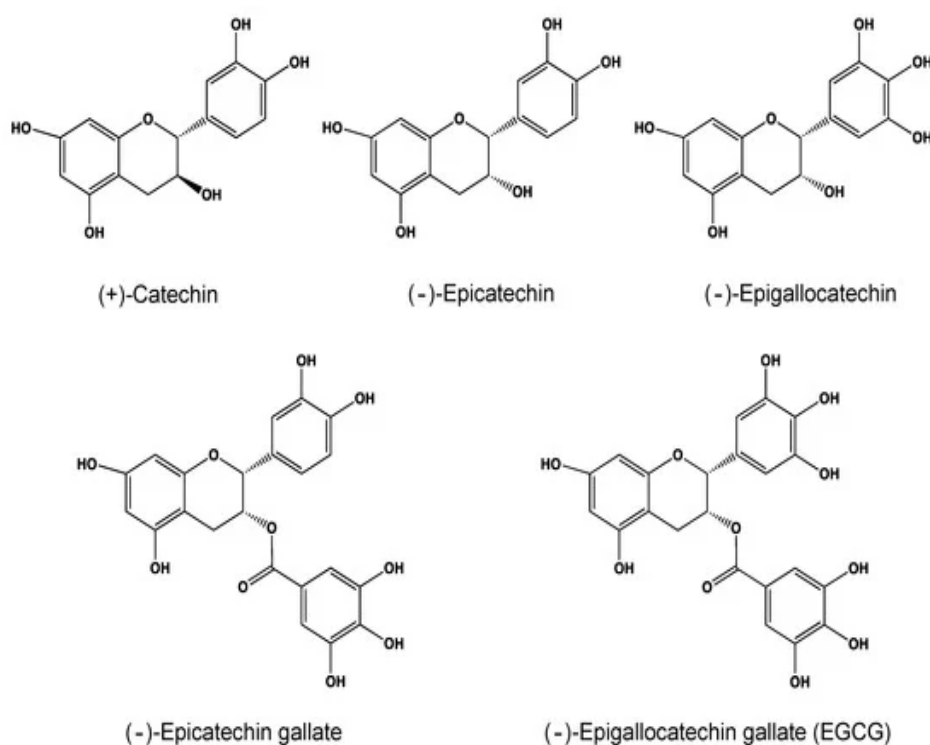
1.2.1. Nhóm chất polyphenol

Polyphenol là nhóm chất dễ bị biến đổi. Polyphenol là phân tử hữu cơ có nhóm OH gắn liền trực tiếp vào vòng. Các polyphenol trong lá là loại polyphenol trung bình, gồm một lượng nhỏ acid gallic, chiếm 48% [35].

Theo nghiên cứu thực tế người ta tìm được hơn 500 polyphenol khác nhau như epicatechin (EC), gallocatechin (GC), catechin (C), epicatechin gallat (ECG), epigallocatechin gallat (ECCG),.. nhưng chủ yếu thành phần polyphenol đều thuộc nhóm flavonoid và tanin ngưng tụ.

Lượng tanin trong trà hoa vàng chiếm 15-30%, đây chính là thành phần làm cho trà có vị chát. Năm 2011, Peng và cộng sự đã phân lập thành phần flavonoid từ hoa của trà Hoa Vàng bằng sắc ký cột bao gồm quercetin, rutin, vitexin, kaempferol. Năm 2013 Wei, J.B và cộng sự đã xác định được sự có mặt của nhóm chất flavonoid trong lá Trà hoa vàng, bao gồm: *vitexin*, *isovitexin*, *quercetin-7-O-β-D-glucopyranosid* và *kaempferol 7-O-β-D-glucopyranosid* [37]. Ngoài ra Wei, J. B cũng đã tiến hành đánh giá tác dụng chống oxy hóa in- vitro của các nhóm chất và đã

phân lập ra và đánh giá được *quercetin-7-O-β-D- glucopyranosid* là chất chống oxy hóa tốt nhất .



Hình 1. 4. Một số nhóm chất catechin có trong chi *Camellia*

1.2.2. Nhóm alkaloid

Là nhóm quan trọng nhất trong lá trà, chất này quyết định nên chất lượng của trà và nó không bị biến đổi trong quá trình chế biến. Nhóm chất này bao gồm: theobromin, cafein, theophyllin, adenin, guanin,.. Đây là các hợp chất tự nhiên có tác dụng sinh học cao [21], [34].

1.2.3. Nhóm tinh dầu

Nhóm tinh dầu thường chiếm 0,014% vào mùa xuân 0,007 % vào mùa hạ. Các thành phần chủ yếu của nhóm tinh dầu trong lá trà hoa vàng bao gồm: aldehyd, hexanol, hexanal. Ngoài ra còn có thêm một số hợp chất như: methyl salicylat, citronellol,.. giúp tạo nên hương thơm đặc trưng cho lá trà [21].

1.2.4. Nhóm saponin

Hàm lượng saponin có trong trà hoa vàng tương đối cao và saponin trong trà hoa vàng chủ yếu là loại saponin triterpenoid và loại oleanane. Saponin có tác dụng long đờm, chữa ho, giúp tăng sự thấm của tế bào và làm cho các hoạt chất khác dễ hòa tan, hấp thụ. Saponin còn có tác dụng chống viêm, kháng khuẩn, kháng nấm và

ức chế hoạt động của virus cũng như tế bào ung thư, hạn chế sự phát triển của các khối u [17]. Nghiên cứu về thành phần hóa học của trà hoa vàng đã phân lập được 188 hợp chất saponin có trong hoa, rễ, thân, lá, hạt của các loài thuộc chi *Camellia*. Trong đó, có đến 87 loại saponin có trong *C. Siensis*, các hợp chất saponin còn lại có trong các loài *C. siensis* var. *assamica*, *C. oleifera*, *C. japonica* và *C. sasanqua* [34].

1.2.5. Nhóm polysaccharide

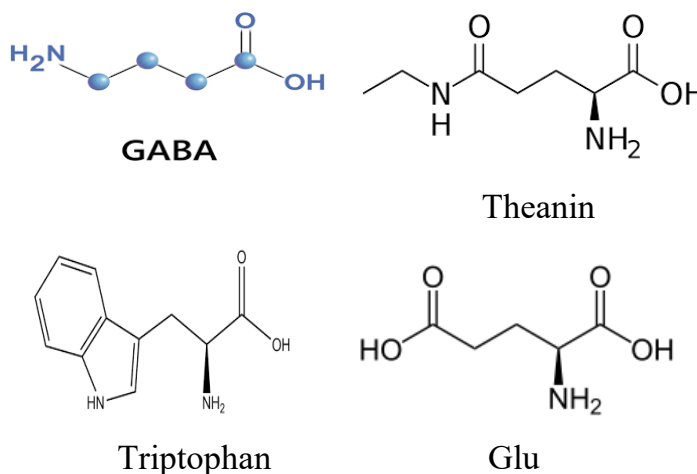
Nhóm chất này được tìm thấy trong trà là một polysaccharide có chứa tính axit được liên kết với protein không chứa tinh bột, 44,2% đường trung tính, 43,1 % axit uronic và chứa đến 3,5% protein. Polysaccharide trong trà được chia thành 2 loại là polysaccharide trung tính và polysaccharide axit. Trong polysaccharide trung tính có chứa 82,7% đường, 12,9% axit uronic, trong khi polysaccharide axit chứa 85,5% đường, 39,8% axit uronic. Thành phần đường có trong polysaccharide axit là Rha, Ara, Gal còn polysaccharide trung tính chủ yếu là thành phần Gal [23].

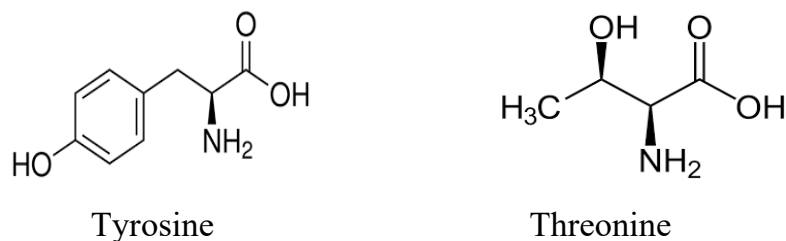
1.2.6. Nhóm acid amin

Theo nghiên cứu có đến 6 loại acid amin thiết yếu có trong trà hoa vàng do Jia-Ni Lin và cộng sự phát hiện, các acid amin bao gồm: GABA, theanin, triptophan, glu, tyrosine, threonine,.

Trong các hợp chất GABA là chất dẫn truyền thần kinh quan trọng trong hệ thần kinh của loài động vật có vú

Nhóm chất theanin là một axit amin tự do có hàm lượng nhiều trong cây trà. Đây là thành phần chính chịu trách nhiệm cho hương vị của trà [38]





Hình 1. 5. Một số acid amin trong Trà hoa vàng

1.3. Tác dụng của trà hoa vàng

1.3.1. Tác dụng chống oxy hóa

Khả năng chống oxy hóa của trà do hoạt tính của các hợp chất polyphenol [24],[30]. Một nghiên cứu vào năm 2017 đã so sánh khả năng chống oxy hóa của các gốc tự do được thể hiện nhiều nhất ở hợp chất polyphenol. Cụ thể khả năng bắt gốc tự do nằm ở nhóm flavonoid, catechin. Trong nhóm flavonoid có rutin làm giảm tỉ lệ cholesterol bị oxy hóa giúp ngăn ngừa các bệnh lão hóa, xơ vữa động mạch và mất trí nhớ ở người già. Đồng thời nghiên cứu cho thấy epicatechin và catechin giúp bảo vệ chống lại sự tan máu hồng cầu do AAPH (2.2'- Azobis (2- amidinopropan) dihydrochlorid), còn lại những hợp chất thuộc nhóm catechin như epicatechin gallat (ECG), epigallocatechin gallat (ECGG) được nghiên cứu là có hiệu quả nhất trong quá trình ức chế sự oxy hóa do AAPH gây ra [29].

Trong nghiên cứu của Wang Bing và cộng sự năm 2018 cho thấy tác dụng bắt các gốc tự do và chống oxy hóa của thành phần tinh dầu và chiết xuất ethanol. Bằng cách so sánh chỉ số I C₅₀ của tinh dầu hoa và lá cây, chiết xuất ethanol với vitamin C trong các test DPPH (2,2- diphenyl 1-1- pycrylhydrazyl) và ABTS (2, 2'- azino-bis (3- ethylbenz- thiazoline- 6 sulfonic acid) cho thấy được tác dụng tương tự [52].

Theo một số kết quả nghiên cứu thì hoa của Trà hoa vàng có tác dụng hạ huyết áp, giảm tiểu đường, hạ cholesterol, hạ mỡ máu, chống u bướu, tăng cường hệ miễn dịch và kéo dài tuổi thọ. Một số kết quả phân tích về thành phần hoá học trong lá cho thấy, trong lá của Trà hoa vàng có chứa rất nhiều nguyên tố vi lượng như: Germanium (Ge), Selenium (Se), Mangan (Mn), Molybden (Mo), Kẽm (Zn), Vanadium Germanium có hoạt tính sinh lý rất cao, có thể phát huy, tăng cường năng lực hấp thu O₂ của tế bào, đảm bảo cung cấp dưỡng khí cho cơ thể, có lợi cho việc trao đổi chất.

Germanium hữu cơ làm tăng sức đề kháng, chống u bướu, hạn chế tế bào u bướu phát triển, tăng khả năng miễn dịch, có tác dụng phòng và chống ung thư. Selenium có tác dụng chống oxy hoá, có thể tiêu trừ các gốc tự do có hại trong cơ thể, nâng cao năng lực tự bảo vệ, do đó kéo dài tuổi thọ. Vanadium có thể xúc tiến cơ năng tạo máu, giảm cholesterol trong huyết tương. Nghiên cứu lâm sàng chứng tỏ Trà hoa vàng giúp giảm mỡ máu rõ rệt hơn alpha-Naphthothioureia, thuốc đã được thế giới công nhận về công dụng giúp giảm mỡ máu [7].

1.3.2. Tác dụng chống ung thư

Theo nghiên cứu năm 2016 của Malgozata Kujawska và các cộng sự cho thấy chiết xuất *Camelia sinensis* có tác dụng chống lại tác nhân chống ung thư gan N-nitrosodiethylamine (NDEA) ở chuột bằng các phương pháp xét nghiệm sinh hóa và mô học trên chiết xuất của lá trà giúp bảo vệ gan chuột khỏi ung thư tế bào gan [34]. Theo "*Camellia International Journal*" (Tạp chí chuyên nghiên cứu về Chè của thế giới), các hợp chất của chè hoa vàng có khả năng kiểm chế sự sinh trưởng của các khối u đến 33,8% trong khi chỉ cần đạt đến ngưỡng 30% đã có thể xem là thành công trong điều trị ung thư. FASN được xác định là chất đóng vai trò vô cùng quan trọng cho quá trình phát triển của ung thư và tạo mỡ. Một nghiên cứu đã chỉ ra lá trà hoa vàng có tác dụng ức chế FASN làm suy giảm sự tăng sinh và phát triển của khối u với 1 số cơ chế như ngăn sự xáo trộn của màng, ức chế quá trình sao chép liên tục DNA. Đồng thời trà hoa vàng giúp chứng minh được khả năng khởi động quá trình chết theo chương trình của tế bào ung thư [38].

Viện Lý Hóa – Viện Hàn lâm khoa học Liên Xô (cũ) đã sử dụng những hợp chất flavonoid hoặc 7 polyphenol có độc tính thấp như những chất chống oxy hóa để nghiên cứu lâm sàng điều trị một số dạng ung thư và cho rằng cơ chế chống khối u của flavonoid không chỉ do khả năng chống oxy hóa mà còn tác dụng tổng hợp do khả năng phản ứng đa dạng của phân tử flavonoid. Dịch chiết polyphenol trong trà xanh có tác dụng ức chế sự phát triển tế bào của dòng tế bào ung thư phổi LU -1 và dòng tế bào ung thư gan Hep – G2, tác dụng rõ nhất trên dòng LU – 1 với giá trị IC50 là 3, 84 μ M của EGCG Trà xanh. Bước đầu phát hiện sự tăng hoạt độ của enzym caspase – 3 trên dòng tế bào LU -1 được bổ sung EGCG Trà xanh vào môi trường nuôi cấy [41].

Okuda và cộng sự là một trong những tác giả đầu tiên có những nghiên cứu về các hợp chất chống ung thư có trong chi *Camellia*. Cụ thể hợp chất chính ở đây là Epigallocatechin gallate (EGCG), một nhóm chất polyphenol có trong trà xanh được xem là chất ngăn ngừa ung thư hiệu quả. Sau đó nhiều nghiên cứu đã chứng minh hoạt động chống khối u của chất này qua chiết xuất từ lá của chi này [43].

Vào năm 1999, Suganuma và cộng sự đã nghiên cứu tác dụng của một số hợp chất nhóm polyphenol như: epicatechin (EC), epigallocatechin gallate (EGCG), epigallocatechin (EGC) và epicatechin gallate (ECG) trong việc ức chế sự phát triển của dòng tế bào ung thư phổi PC-9. Nghiên cứu của họ là được thúc đẩy bởi phát hiện ra rằng chiết xuất trà xanh (chính là trà) có tác dụng ức chế mạnh hơn trong các tế bào khối u đang phát triển hơn so với hàm lượng polyphenol được chỉ định mà cụ thể là việc sử dụng hợp chất EGCG giúp cho sự chết theo chương trình của tế bào ung thư phổi PC-9 tăng lên [45].

Vào năm 2000, Mimoto và cộng sự đã đánh giá tác động của EGCG đối với khối u phổi do cisplatin một chất dùng để điều trị ung thư phổi nhưng cũng có thể gây nên ung thư ở động vật. Mittal và cộng sự đã dành riêng nghiên cứu của họ về EGCG giúp ức chế sự hình thành và phát triển của tế bào ung thư vú (dòng MCF7) mà không gây ảnh hưởng xấu đến sự phát triển của tế bào bình thường. Roy và cộng sự cũng đạt được kết quả khá giống với kết quả thu được của Mittal và đồng nghiệp nhưng dòng tế bào thử nghiệm là dòng tế bào ung thư vú MDA-MB-468 cho thấy sự ức chế tăng sinh tế bào ung thư vú và quá trình chết theo chương trình của tế bào ung thư phụ thuộc vào sự tăng liều lượng EGCG [39].

Vào năm 2012, Jin đã báo cáo hoạt động chống khối u của polysaccharide với tỉ lệ chống lại khối u là 85,6% (phụ thuộc vào liều lượng) và được các tác giả tuyên bố rằng hợp chất này có đặc tính chống khối u mạnh mẽ trong cơ thể sống. Tingting và cộng sự đã nghiên cứu hoạt động chống khối u trong ống nghiệm của 3 thành phần chính là: saponin, protein và polysaccharide trên dòng tb u gan ở người (HepG2) và dòng tế bào gan chuột bình thường (IAR20) cho thấy kết quả khá tốt. Cụ thể, polysaccharide chống lại tế bào Hep G2 ($IC_{50} = 5,826 \mu\text{g} / \text{mL}$), tiếp theo là saponin ($IC_{50} = 26,754 \mu\text{g} / \text{mL}$) và (protein ($IC_{50} = 36,794 \mu\text{g} / \text{mL}$) Tỷ lệ ức chế của ba hợp chất trên tế bào Hep G2 cao hơn 80% khi được thử nghiệm trên dòng IAR20 [32], [31].

1.3.3. Tác dụng theo y học cổ truyền

Một số công trình nghiên cứu khác cũng cho thấy hoa của chè hoa vàng giúp giảm triệu chứng xơ vữa động mạch do máu nhiễm mỡ, điều hòa huyết áp, hạ đường huyết; chữa kiết lỵ, đại tiện ra máu... Lá chè hoa vàng có thể uống để điều chỉnh các chất béo trong cơ thể, lượng đường trong máu nhờ nhóm chất EGCG là chất có hoạt tính sinh học cao nhất giúp hỗ trợ giảm trọng lượng của cơ thể, giải độc gan và thận.

Theo y học Trung Quốc, chè hoa vàng (cả lá và hoa) có 9 tác dụng chính như làm giảm tổng hàm lượng lipid trong huyết thanh máu; làm giảm lượng cholesterol mật độ thấp và tăng lượng cholesterol mật độ cao; làm hạ huyết áp rõ ràng và tác dụng được duy trì trong thời gian tương đối dài; 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; tăng hưng phấn thần kinh, duy trì trạng thái bình thường của tuyến giáp; lợi tiểu mạnh; giải độc gan và thận, ngăn ngừa xơ vữa động mạch máu; ức chế và tiêu diệt vi khuẩn, chống viêm, chống dị ứng.

1.3.4. Giá trị kinh tế

Ở Trung Quốc cũng đã phát triển vùng trồng trà hoa vàng tại Phòng Thành, tỉnh Quảng Tây với diện tích hàng vạn hecta, trong đó có nhiều loài, nhiều nguồn gen có nguồn gốc từ Việt Nam. Trần Ninh cho biết, trong một lần tham gia hội thảo quốc tế về trà hoa vàng tại Quảng Tây, ông đã được một doanh nghiệp Trung Quốc giới thiệu loại “*Golden Camellia*” dạng nước có giá tiền Việt Nam khoảng 4,76 triệu đồng/chai. Doanh nghiệp này cũng đã trồng thành công vùng trà hoa vàng nguyên liệu rộng hơn 20 ha và sản xuất các sản phẩm xuất khẩu tại một xưởng sản xuất tại Quảng Tây chỉ với 80 công nhân, mỗi năm cho lợi nhuận hơn 80 tỷ đồng. Trung Quốc cũng đã xây dựng Vườn *Camellia* Quốc tế, đã trồng thành công những vùng trà hoa vàng nguyên liệu rộng hàng chục hecta; nghiên cứu thành công các chế phẩm và sản xuất, xuất khẩu hàng loạt dược liệu và thực phẩm chức năng làm từ trà hoa vàng như Superior tea, Golden Camellia...

Ngoài ra, các nghiên cứu của nước ngoài cũng chỉ ra rằng, Trà hoa vàng còn có khả năng hấp thu CO₂, H₂S, Cl, HF và các thể khí độc hại khác, có tác dụng bảo vệ môi trường mạnh, làm sạch không khí. Một công viên Trà hoa vàng đã được xây

dựng tại Nam Ninh - Trung Quốc để phục vụ người dân thăm quan và là nơi bảo vệ nguồn gen cho các nhà khoa học nghiên cứu.

1.4. Lịch sử nghiên cứu

1.4.1. Nước ngoài

Các loài trong chi *Camellia* phân bố nhiều nhất ở Trung Quốc, tập trung ở các tỉnh Vân Nam, Quảng Tây, Quảng Đông và kéo xuống miền bắc Việt Nam. Trung Quốc là quốc gia Châu Á đi đầu trong nghiên cứu, ứng dụng và khai thác các nguồn lợi kinh tế từ cây trà. Cây trà đã được nghiên cứu ở quốc gia này từ thế kỷ XVII, họ không chỉ khai thác mà còn lai tạo ra được nhiều loại trà có giá trị kinh tế cao. Từ giữa thế kỷ XX, Trung Quốc đã đầu tư cho việc nghiên cứu rất sâu và hệ thống về chi *Camellia* ở Côn Minh, từ việc phát hiện, phân loại, lai tạo, phát triển, khai thác cho đến tạo dựng nên các ngân hàng gen phục vụ cho công tác bảo tồn và phát triển. Điển hình là ông Cheng Jin Shui, trong 20 năm ông đã tạo ra được hơn 100 loài trà khác nhau.

Thống kê nhiều nghiên cứu cho thấy, chi *Camellia* ở Trung Quốc có 238 loài với 78 loài đặc hữu. Còn ở Việt Nam, chi này cũng có tới 58 loài với 27 loài đặc hữu, Đài Loan có 8 loài với 2 loài đặc hữu, tiếp đến là các nước Lào, Ấn Độ, Thái Lan, Campuchia và Inddoonexxia cũng có một số loài trong chi này.

Trà hoa vàng gồm các loài thuộc họ chè (*Theaceae*), chi Trà (*Camelia*) có hoa màu vàng. Theo các nhà khoa học, số loài trong chi *Camelia* trên thế giới có khoảng 200 – 300 loài, phân bố ở vùng nhiệt đới châu Á và vùng Đông Nam Á. Trung tâm phân bố được xác định là tỉnh Quảng Tây của Trung Quốc và phía Bắc của Việt Nam (Phú Thọ - Cao Bằng – Quảng Ninh).

Theo "*Camellia International Journal*" (Tạp chí chuyên nghiên cứu về Chè của thế giới), các hợp chất của chè hoa vàng có khả năng kiềm chế sự sinh trưởng của các khối u đến 33,8% trong khi chỉ cần đạt đến ngưỡng 30% đã có thể xem là thành công trong điều trị ung thư; giúp giảm đến 35% hàm lượng cholesterol trong máu, trong khi dùng các loại thuốc khác thì mức độ giảm chỉ là 33,2%... Một số công trình nghiên cứu khác cũng cho thấy hoa của chè hoa vàng giúp giảm triệu chứng xơ vữa động mạch do máu nhiễm mỡ, điều hòa huyết áp, hạ đường huyết; chữa kiết lỵ, đại tiện ra

máu... Lá chè hoa vàng có thể uống để điều chỉnh các chất béo trong cơ thể, lượng đường trong máu, giải độc gan và thận.

Tác dụng chữa bệnh của trà hoa vàng đã được hơn 120 nhà khoa học của thế giới khẳng định một lần nữa tại Hội nghị quốc tế về Trà hoa vàng tổ chức ở Nam Ninh, Trung Quốc vào năm 1994: trà hoa vàng có thể chiết xuất 9 vi chất khác nhau, thành phần của nó có chứa các nguyên tố như Se, Ge, Mo, Mn, V, Zn và một số nguyên tố khác có tác dụng bảo vệ sức khỏe, ngăn ngừa ung thư, củng cố tính đàn hồi của thành mạch, điều hoà các enzyme hoạt hoá cholesterol,...làm giảm nguy cơ một số bệnh mãn tính như đột quỵ, suy tim, ung thư...

Một số nghiên cứu cụ thể hơn trong những năm gần đây cho thấy: Trà hoa vàng có khả năng giúp giảm đến 35% hàm lượng cholesterol trong máu, giảm tới 36.1% lượng lipoprotein trong máu, cao hơn 10% so với các liệu pháp chữa trị sử dụng tây dược hiện nay. Các nghiên cứu về thành phần hóa học và dược tính của nhiều loài Trà hoa vàng đã cho thấy: thành phần của Trà hoa vàng có các chất khác nhau thuộc 13 nhóm chất, trong đó, các thành phần quan trọng nhất liên quan đến các nhóm chất có tác dụng là Saponin, Polysaccharid, Polyphenol, Flavonoid.

Ở Trung Quốc, trà hoa vàng được gọi là Kim trà (*Golden Camellia*) và được đưa vào quốc phẩm của Trung Quốc chỉ sau Gấu trúc. Các loài *Camellia* đã được quan tâm bảo tồn và phát triển từ khá sớm. Đến nay có nhiều trung tâm bảo tồn và nghiên cứu phát triển Trà, trong đó có Trà hoa vàng. Vườn ngân hàng gen *Camellia* Nam Ninh là nơi lưu giữ bộ sưu tập lớn nhất Trà hoa vàng (*Camellia Chrysantha* M.Sealy) trên thế giới. Lưu giữ hơn 20 loài *Camellia* và 15 thứ trà hoa vàng (*Camellia chrysantha*) nhằm bảo tồn, nghiên cứu, lai tạo giống và nghiên cứu về trồng trọt. Có 3,000 cá thể được lưu giữ, từ đó tạo ra 7,000 dòng lai từ cây bố mẹ là Trà hoa vàng (*Camellia Chrysantha*. M.Sealy) và các loài khác trong chi *Camellia*. Trong đó, có 6 loài trong bộ sưu tập được thu từ Việt Nam, gồm: *C. chrysantha* M.Sealy, *C. ptilosperma* S. Ye Liang & Q. T. Chen, *C. tunghinensis* H.T. Chang, *C. murauchii* Ninh & Hakoda, *C. impressinervis* Hung T. Chang & S. Ye Liang và *C. amplexicaulis* (Pitard) Cohen-Stuart [17].

1.4.2. Trong nước

Trong những năm của nửa đầu thế kỷ XX nhiều nhà thực vật quốc tế đã tiến hành nhiều đợt khảo sát và thu thập các mẫu vật trong đó có các loài thuộc chi *Camellia* ở Việt Nam. Trong số đó phải kể đến các nhà thực vật học người pháp như Eberhardt và Petelot đã thu thập được các mẫu *Camellia amplexicaulis* và *Camellia caudata*. Các loài này đã được Gagnepain công bố trong “*Thực vật chí Đông Dương*” xuất bản năm 1943 [44].

Từ năm 1990 đến 1998, nhiều cuộc khảo sát của các nhà nghiên cứu thuộc Viện điều tra quy hoạch rừng, Viện sinh thái và tài nguyên, Trường Đại học nông lâm Thái Nguyên,... Các kết quả nghiên cứu thực vật được thông báo hay đăng tải trên các kỷ yếu của các hội thảo. Tuy nhiên, cho đến nay, công tác nghiên cứu về cây trà hoa vàng ở Việt Nam chưa đủ nhiều và tương xứng với giá trị của nó. Ngoài việc tìm thêm được số loài và xác định khu vực phân bố của loài cây quý như đã nói, các nhà khoa học Việt Nam vẫn chưa quan tâm đến loài cây cảnh và dược liệu quý hiếm này một cách đúng mức.

Việt Nam nằm trong trung tâm đa dạng sinh học của các loại trà với khoảng 58 loài *Camellia*, trong đó, có trên 30 loài có hoa màu vàng, phân bố ở vùng nhiệt đới có độ cao từ 500 mét trở xuống. Vùng phân bố chính của Trà hoa vàng ở Việt Nam là các vùng núi thuộc vòng cung Đông Triều (trong đó có huyện Ba Chẽ, Quảng Ninh), vòng cung Bắc Sơn, vòng cung sông Ngâm, dãy núi Tam Đảo và một số điểm thuộc dãy Trường Sơn của Việt Nam. Điều đáng chú ý là tất cả các loài cây này đều có nguy cơ đe dọa cao do các hoạt động khai thác tài nguyên rừng, chuyển đổi đất rừng sang các mục đích sử dụng khác hoặc trồng rừng lấy gỗ, những năm gần đây có thêm 1 áp lực lớn nữa là thu hái cả cây để bán cho các thương nhân Trung Quốc.

Vào năm 2007, sau gần một thế kỷ loài trà hoa vàng được phát hiện, Viện Dược liệu (Bộ Y tế) có công trình: “Bước đầu khảo sát thành phần hóa học của một số loài trà hoa vàng *Camellia sp.* ở Việt Nam”. Kết quả của đề tài khoa học cấp Viện này cũng mới chỉ dừng lại ở mức xác định được một số nhóm chất của 5/20 loại trà hoa vàng bằng phương pháp sắc ký lớp mỏng.

Theo PGS.TS. Trần Ninh (Đại học Quốc gia Hà Nội), người đã 16 năm chuyên nghiên cứu về trà hoa vàng: Các nhà khoa học Việt Nam đã tìm thấy 20 loài *Camellia* tại khu vực miền núi phía bắc, như Vườn Quốc gia Tam Đảo, Vườn Quốc gia Cúc

Phương và một số khu rừng ở Thái Nguyên, Tuyên Quang, Lạng Sơn,... tại đây đã tìm thấy các loài như: *C.crasdiphylla*, *C.Tamdaoensis*, *C.murauchi*, *C.gilbertii*, *C.cucphuongensis*,... Trong số này, có loài chỉ tìm thấy khoảng 50 cá thể bên một dòng suối trong vùng lõi Vườn quốc gia Tam Đảo. PGS.TS. Trần Ninh cũng cho biết: “Kết quả nghiên cứu của các nhà khoa học Trung Quốc, Nhật Bản và trong nước cũng đã khẳng định trong các mẫu trà hoa vàng được khảo sát không tìm thấy thành phần alcoloid (caffein) trong khi chất này chiếm tỷ lệ đáng kể ở chè xanh thông thường”.

Ngoài ra, một số nhà khoa học đã có những nghiên cứu về Trà hoa vàng như: Trần Ngọc Hải cũng phát hiện trà hoa vàng trong khu vực rừng tái sinh thuộc xã Phước Lộc (Lâm Đồng). Năm 2003, Nguyễn Thiện Tịch (ĐH. Khoa học Tự nhiên TP.HCM) cũng đã tìm thấy một loài trà có hoa màu vàng đậm rất đẹp tại Lâm Đồng. Mới đây, các nhà thực vật Việt Nam cũng đã tìm lại được loài trà hoa vàng *Camellia dormoyana* tại VQG Nam Cát Tiên, đây là loài trà hoa vàng đầu tiên được các nhà thực vật người Pháp phát hiện tại Đông Dương và công bố vào đầu thế kỷ XX.

Tại tỉnh Đồng Nai Trong khuôn khổ đề tài: “Nghiên cứu khả năng bảo tồn ngoại vi và nhân giống một số loài trà hoa vàng nhằm bảo vệ và phát triển”, GS.Ngô Quang Đê, Lê Thanh Sơn và Đinh Thị Lệ đã tiến hành giám hom 2 loài: Trà hoa vàng A vì (*Camellia tonkinensis*) và Trà hoa vàng Sơn Động (*Camellia euphlebia*) nhằm tìm hiểu khả năng nhân giống hom của Trà hoa vàng để đưa vào sản xuất.

Trong thời gian qua, Trường đại học Dược Hà Nội đã phối hợp với Viện công nghệ sinh học thuộc Viện Hàn lâm khoa học Việt Nam và Đại học quốc gia Seoul Hàn Quốc đã xác định tính đa dạng sinh học, nghiên cứu một số thành phần hóa học, tác dụng sinh học và khả năng phát triển sản phẩm của cây trà hoa vàng tại Ba Chẽ, Quảng Ninh. Kết quả cho thấy:

Thứ nhất, về đa dạng sinh học, dựa vào đặc điểm hình thái của các mẫu so sánh với các loài, tài liệu thực vật, trà hoa vàng phổ biến ở Ba Chẽ có đặc điểm gần giống nhất với loài *Camellia frisanga*. Mẫu này có đặc điểm hình thái khác biệt so với trà hoa vàng Tam Đảo. Đặc điểm có thể phân biệt chính là lá có thể chất cứng, đánh, bề mặt gồ ghề. Còn lá của trà hoa vàng Tam Đảo có thể chất mềm và phẳng. Loài này cũng có tỉ lệ khác biệt rất lớn so với loài *Camelia euflivia* được xác định là có ở huyện

Tiên Yên. Ngoài những trà hoa vàng phổ biến này, huyện Ba Chẽ còn có thêm 2 loài nữa, trong đó, có một loài đã được xác định tên khoa học là *Camelia frisanperris*. Và một loài có tên trà hoa vàng có hoa nhỏ hơn nhưng chưa xác định được do không giống về mặt hình thái với bất kì loài trà hoa vàng nào đã công bố trước đó. Các phân tích, so sánh được thực hiện tại đại học quốc gia Soeul Hàn Quốc cho thấy, loài trà hoa vàng ở huyện Ba Chẽ dù có nhiều đặc điểm biến thái khác nhau có nghĩa là có nhiều hình thái khác nhau. Nhưng thành phần hóa học cơ bản giống nhau. Và vì vậy dự đoán chúng có tác dụng sinh học giống nhau.

Thứ hai, về thành phần hóa học, các nhóm chất được xác định trong lá và hoa của trà hoa vàng gồm có: Saponin, Polyphenon, Flavonoid, Tanin, đường khử tự do, acid amin, Sterol và chất béo. Phần lớn các nhóm chất này là các nhóm chất tự nhiên có hoạt tính sinh học cao, trong đó hoa của trà hoa vàng có hàm lượng Polyphenol và Flavonoid cao gấp đôi so với thành phần tương ứng của trà xanh.

Trà hoa vàng được đánh giá là loại thực vật chứa thành phần dinh dưỡng phong phú nhất trong tự nhiên. Ngoài tác dụng là cảnh, làm giàu rừng, cải thiện môi trường, nó còn giá trị dược liệu rất quý. Qua các nghiên cứu khoa học thì nó có chứa tới hơn 400 thành phần dinh dưỡng, nổi trội như là Saponin, Tea polyphenon và các nguyên tố như Selenium (Se), Germanium (Ge), Kẽm (Zn), Vanadium (V), Molybden (Mo), Mangan (Mn), Kalium (K) và các vitamin B1, B2, C.

Thứ ba, về tác dụng sinh học, cả lá và hoa trà hoa vàng đều có tác dụng chống oxy hóa mạnh. Với giá trị SC50 từ 15 – 17/microgam/ml cho thấy trà hoa vàng có tiềm năng bảo vệ sức khỏe và chống lão hóa, kéo dài tuổi thanh xuân nhờ khả năng dọn gốc tự do, phòng ngừa những căn bệnh mãn tính, hiểm nghèo như ung thư, tiểu đường và tim mạch. Lá trà hoa vàng có tác dụng kháng tế bào ung thư trên mô hình thử nghiệm invitro và phòng tế bào ung thư phổi, ung thư da, ung thư gan, ung thư đại tràng, ung thư vú và ung thư dạ dày. Trong đó, tác dụng kháng tế bào ung thư gan và ung thư da là lớn nhất. Nếu dịch chiết được làm giàu hoặc tinh chế, tác dụng này có thể mạnh hơn nhiều mở ra triển vọng về dòng sản phẩm kháng ung thư và bảo vệ sức khỏe. Do có hàm lượng Flavonoid cao từ 7 – 15% trà hoa vàng có tác dụng hạ đường huyết, ổn định huyết áp. Cả lá và hoa trà hoa vàng đều có tác dụng Polycerol – Triglycerid máu và LDL Cholesterol. Mặt khác, cải thiện đáng kể HDL Cholesterol, trên mô hình tăng lipid máu nội sinh trên chuột. Điều này giúp giảm tình trạng giảm

gan nhiễm mỡ, phòng ngừa việc giảm xơ vữa mạch máu, từ đó giảm nguy cơ đột quỵ hoặc nhồi máu cơ tim. Về độ an toàn, thử nghiệm cho thấy, trà hoa vàng Ba chẽ không xuất hiện độc tính cấp với liều tối đa mà chuột có thể dung nạp. Thử nghiệm độc tính bán trường diễn, cho thấy Trà hoa vàng Ba Chẽ không ảnh hưởng đến khối lượng, chức năng gan, thận, chức năng bào máu trên động vật thực nghiệm. Từ các nghiên cứu cho thấy, trà hoa vàng Ba Chẽ là một dược liệu an toàn, với những tác dụng sinh học quý có thể khai thác cho chăm sóc và bảo vệ sức khỏe cho cộng đồng.

Hiện nay, trà hoa vàng đã được phát triển, trồng ở nhiều nơi trong cả nước, như ở huyện Ba Chẽ, huyện Hoàn Bô (Quảng Ninh), Tam Đảo (Vĩnh Phúc), Yên Thế, Sơn Động, Lục Nam (Bắc Giang), Quế Phong (Nghệ An), Lâm Đồng,... Ở huyện Ba Chẽ, việc phát triển trồng và chế biến Trà hoa vàng chủ yếu được thực hiện bởi công ty cổ phần Lâm đặc sản Đạp Thanh phối hợp của Công ty cổ phần Thung lũng dược phẩm xanh, các sản phẩm tương đối đa dạng như dược liệu tươi và dược liệu khô đóng gói từ lá, hoa của trà hoa vàng, trà túi lọc,... Đặc biệt là sản phẩm hoa được xử lý bằng công nghệ sấy lạnh tiên tiến. Hiện tại, Trường đại học Dược Hà Nội đang triển khai các sản phẩm trà túi lọc và nghiên cứu các sản phẩm mới là nước uống trà hoa vàng đóng chai và viên nang cứng làm từ lá của trà hoa vàng,... mục đích là tạo ra các dạng bào chế hiện đại hơn, có tác dụng ổn định.

1.5. Đánh giá tổng quan tình hình nghiên cứu tại tỉnh Hà Tĩnh

Tháng 1 năm 2018, 5 nhà khoa học Việt Nam và 2 nhà khoa học Nhật Bản cùng thạc sỹ Nguyễn Việt Hùng, cán bộ của VQG Vũ Quang, đã thu được mẫu 2 loài Trà hoa vàng lạ và sau đó họ đã công bố 2 loài Trà hoa vàng mới trên tạp chí Plant Taxonomy, 2 loài này đều được đặt tên theo địa phương, đó là *Camellia vuquangensis* Luong, Tran & L. T. Nguyen và *Camellia hatinhensis* Luong, Tran & L. T. Nguyen.

Cho đến nay, trên địa bàn tỉnh Hà Tĩnh, các nhà khoa học mới chỉ phát hiện và mô tả được 2 loài Trà hoa vàng, đó là: *Camellia vuquangensis* và *Camellia hatinhensis*. Các nghiên cứu khác về 2 loài này như: sự phân bố, khả năng sinh trưởng, tái sinh, thành phần hóa học, khả năng nhân giống và gây trồng,... đều chưa được tiến hành.

Để có cơ sở khoa học cho công tác bảo tồn và phát triển các loài Trà hoa vàng ở Hà Tĩnh, rất cần triển khai các nghiên cứu cụ thể về các loài, giá trị của chúng, sự

phân bố, khả năng sinh trưởng, phát triển trong tự nhiên và khả năng nhân giống, trông bởi con người.

1.6. Mô hình nghiên cứu in vitro trong điều trị ung thư

Để sàng lọc nhanh các hoạt chất có tác dụng chống ung thư, phương pháp nuôi cấy tế bào in vitro thường được sử dụng. Trong mô hình in vitro, các chế phẩm được thử bằng cách ủ trực tiếp với các dòng tế bào ung thư có nguồn gốc từ người hay động vật được nuôi cấy ở điều kiện đặc biệt và môi trường thích hợp để tạo dạng đơn lớp (2D) hay dạng khối cầu (3D). Phương pháp nuôi cấy 2D là phương pháp cơ bản nhất nhưng có nhiều hạn chế vì không mô phỏng được điều kiện in vivo của cơ thể. Còn các tế bào trong mô hình nuôi cấy 3D phát triển trong không gian ba chiều phản ánh đầy đủ các mối quan hệ giữa tế bào với tế bào, tế bào với chất nền ngoại bào và tế bào với môi trường dinh dưỡng như trong cơ thể bình thường. Trong mô hình này, các chỉ số như tỷ lệ tế bào sống/chết, chỉ số IC_{50} , tỷ số tăng/giảm kích thước khối cầu các tế bào ung thư và các ảnh hưởng của chế phẩm lên hình thái tế bào sẽ được đánh giá [46],[48]. Tại các phòng thí nghiệm Việt Nam thường sử dụng các dòng tế bào ung thư người như tế bào ung thư cổ tử cung (HeLa), ung thư biểu mô vú (MCF-7), MCF-7 kháng Tamocifen (MCF-7/TamR), MCF-7 kháng Adriamicin (MCF-7/ADR), ung thư phổi (A549), ung thư buồng trứng (OVCAR-8), ung thư gan (HepG2) trong nghiên cứu in vitro.

1.7. Những đặc tính quan trọng trong phát triển nuôi cấy tế bào của tế bào ung thư

Các tế bào ung thư đòi hỏi không chặt chẽ về chế độ nuôi dưỡng và chúng có thể phát triển được ở môi trường nuôi cấy trong ống nghiệm (in vitro). Còn các tế bào bình thường đòi hỏi môi trường trung gian phức tạp và chúng chỉ sống được trong một thời gian nhất định trong ống nghiệm, các tế bào non như nguyên bào sợi có thể sống được lâu hơn với một số lượng nhân chia tối thiểu và cuối cùng chúng cũng sẽ chết. Ngược lại, các tế bào tế bào ung thư sống sót dễ dàng hơn do chúng đòi hỏi các yếu tố trung gian đơn giản hơn, chỉ gồm các carbohydrate, protein, vitamin và muối khoáng cần thiết. Nhiều tế bào ác tính được gọi là bất tử “immortal” chúng có thể được giữ vô hạn định trong môi trường nuôi cấy [9]. Các tế bào bình thường nuôi cấy trong ống nghiệm phát triển theo một quy luật, khi đáy của của bình nuôi cấy phủ hoàn toàn một lớp tế bào, các tế bào sẽ ngừng phân chia. Hiện tượng này được gọi là

ức chế tiếp xúc. Các tế bào ung thư không có hiện tượng này chúng có thể phát triển chồng đồng, tập hợp lại thành các khối hay các cục tế bào. Các tế bào ung thư do thiếu sự gắn kết với nhau như tế bào bình thường, do trên bề mặt tế bào mất các phân tử dính vì vậy chúng có thể tự tách ra từ đáy bình nuôi cấy và nổi lên trên môi trường nuôi cấy. Tất cả các tế bào bình thường, trừ tế bào máu đều cần môi trường nuôi cấy có độ chắc nhất định để tạo điều kiện cho tế bào phát triển gọi là môi trường đệm. Các tế bào ung thư không cần thiết phải có môi trường như vậy, chúng có thể phát triển thậm chí trong môi trường chuyển động chúng vẫn phát triển được. Các tế bào ung thư có thể phát triển được ở trong thạch mềm trong đó chúng nằm lơ lửng thành khối tế bào hình 14 tròn, còn các tế bào bình thường, kể cả nguyên bào sợi sẽ chết nếu như thạch ngăn cản chúng phát triển lên trên bề mặt của đĩa nuôi cấy [9]. Sự phát triển của các tế bào khối u thường bất chước tế bào khối u trong cơ thể (invivo), trong ống nghiệm các tế bào khối u phát triển tự quản và không phụ thuộc vào các yếu tố kích thích phát triển bên ngoài, nhiều tế bào ung thư tiết các yếu tố kích thích sự phát triển tác động vào ngay chính bản thân nó và gọi là kích thích tự tiết hoặc sinh ra các các thụ thể yếu tố phát triển nhanh, chúng có thể đáp ứng với các kích thích tối thiểu của môi trường bên ngoài, chính vì vậy mà chúng dễ tồn tại. Các tế bào khối u phát triển quá mức và không chịu sự chỉ huy điều hoà của cơ thể do các tế bào khối u không đáp ứng với ảnh hưởng ức chế bình thường của tế bào bên cạnh. Do các tế bào không gắn kết với nhau, nên chúng có thể tách xa nhau và điều này cho phép chúng di chuyển dễ dàng (trong cơ thể gây xâm lấn và di căn ung thư). Sự thiếu các kích thích ức chế tiếp xúc làm cho tế bào phát triển quá mức kết quả là tạo thành khối tế bào chồng đồng lẫn độn không cấu trúc. Điều này thể hiện trong cơ thể sự phát triển của tế bào u là rối loạn sự sắp xếp của cơ quan và tổ chức. [9]

1.8. Tổng quan về chống oxy hóa và stress oxy hóa

1.8.1. Tổng quan về stress oxy hóa

Stress oxy hóa hay còn gọi là căng thẳng oxy hóa là hiện tượng mất cân bằng chất chống oxy hóa và các gốc tự do.

Thông thường, cơ thể chúng ta có khả năng điều hòa quá trình oxy hóa và duy trì hàm lượng gốc tự do ở mức độ cho phép nên cơ thể vẫn khỏe mạnh. Nhưng sự gia tăng đột ngột các tác động từ bên ngoài sẽ phá vỡ sự ổn định quá trình oxy hóa và

khả năng tự “thu dọn” các gốc tự do của cơ thể. Chính vì vậy khi quá trình stress oxy hóa diễn ra sẽ làm phá hủy các phân tử sinh học trong quá trình oxy hóa như : protein, lipid, các acid nucleic,... Không chỉ thế stress oxy hóa còn gây ra nhiều bệnh đặc biệt là các bệnh lý về tim mạch như: suy tim, xơ vữa động mạch, gây ra các rối loạn về chức năng tế bào [14].

1.8.2. Tìm hiểu về các gốc tự do

1.8.2.1. Gốc tự do là gì?

Gốc tự do là các phân tử chứa oxy với số lượng electron không đồng đều, khiến chúng dễ dàng phản ứng với các phân tử khác và gây ra phản ứng hóa học chuỗi lớn trong cơ thể. Chúng có lớp điện tử ngoài cùng chứa một điện tử không ghép cặp (hay gọi là điện tử đơn độc), do có điện tử không ghép cặp ở lớp ngoài cùng nên gốc tự do rất không ổn định, chúng luôn có xu hướng cướp điện tử của các nguyên tử hay phân tử khác để trở về trạng thái ổn định, nhưng lại biến các nguyên tử hoặc các phân tử này trở thành gốc tự do, làm cho cấu trúc tế bào bị thay đổi và bị phá vỡ, tổn thương đến màng tế bào và các phân tử khác.

1.8.2.2. Nguồn gốc phát sinh ra các gốc tự do

Gốc tự do được tạo ra bởi hai nguồn là ngoại sinh và nội sinh:

Nguồn gốc ngoại sinh: Là do các yếu tố bên ngoài tác động vào cơ thể sinh vật như: ô nhiễm môi trường (thuốc trừ sâu, thuốc diệt cỏ..), các tác nhân như phóng xạ, , sự căng thẳng kéo dài quá mức hay tia tử ngoại từ ánh sáng mặt trời gây nên,... [14]

Nguồn gốc nội sinh: Chủ yếu được tạo thành do chuỗi hô hấp của tế bào hoặc qua các quá trình chuyển biến nội sinh của cơ thể như: phản ứng viêm của các mô bị tổn thương, hoạt động của tế bào bạch cầu,.. [14]

1.8.2.3. Ảnh hưởng của gốc tự do đối với cơ thể

Gốc tự do dễ dàng gây ra các phản ứng với các thành phần khác của tế bào nên nó gây ra sự rối loạn đối với hoạt động bình thường của tế bào. Đồng thời các gốc tự do làm đẩy nhanh quá trình lão hóa và phát sinh nên nhiều bệnh tật ở người.

Các tế bào bị tổn thương do gốc tự do gây ra khiến cơ thể hình thành nên một số bệnh lý như: Bệnh lý tim mạch do tắc động mạch, bệnh lý ở hệ thần kinh gây nên bệnh mất trí nhớ tuổi già, bệnh đục thủy tinh thể. Không chỉ thế một số nghiên cứu còn chỉ ra

gốc tự do chính là nguyên nhân gây đột biến gen khi nó tấn công vào các DNA và các chất sinh học có trong tế bào làm tăng nguy cơ mắc các bệnh ung thư.

1.8.3. Cơ chế của quá trình kháng oxi hóa

Các chất kháng oxi hóa hoạt động bằng cách liên kết với các electron của các gốc tự do và chuyển thành các gốc bền vững. Đồng thời những chất này sẽ tham gia vào chuỗi phản ứng của gốc tự do để làm ngưng phản ứng diễn ra. Các chất chống oxi hóa được hoạt động theo nguyên tắc bao gồm: [14]

- Phát hiện ra các gốc oxy tự do hoạt động có hoạt tính cao tổn thương tế bào qua cơ chế hoạt động của enzyme xúc tác hoặc phản ứng trực tiếp lên chúng
- Ức chế sự hình thành của các gốc oxy tự do ngăn ngừa sự hình thành của nó diễn ra trong tế bào (như qua chuỗi vận chuyển điện tử của hoạt động hô hấp diễn ra trong ty thể)
- Loại bỏ hoặc sửa chữa những ảnh hưởng do gốc tự do gây nên bằng cách loại bỏ các phân tử sinh học bị biến đổi trong quá trình oxi hóa ra khỏi cơ thể.

CHƯƠNG 2

ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Đối tượng nghiên cứu

Đối tượng nghiên cứu của đề tài là hai loài trà hoa vàng *Camellia hatinhensis* và *Camellia vuquangensis* phân bố ở Vườn quốc gia Vũ Quang, huyện Vũ Quang, tỉnh Hà Tĩnh.

Mẫu *Camellia hatinhensis*: gồm lá, hoa và nụ được thu vào 12 giờ ngày 16/12/2020; Tọa độ thu mẫu: 105° 20' 47,51736"; 18° 18' 57,92472"

Mẫu *Camellia vuquangensis*: gồm lá, hoa và nụ được thu vào 10 giờ ngày 15/12/2020; Tọa độ thu mẫu: 105° 20' 20,08428"; 18° 13' 27,290388"

Mẫu thực vật được giám định bởi PGS.TS Lê Thị Hương chuyên gia thực vật, Khoa Sinh học, Đại học Vinh.

2.2. Nguyên liệu, hóa chất và thiết bị

2.2.1. Tế bào thử nghiệm

Trong nghiên cứu này, thử nghiệm hoạt tính kháng ung thư từ dịch chiết lá và hoa của hai loài trà hoa vàng được thực hiện trên 6 dòng tế bào ung thư: Tế bào ung thư vú (MCF7), tế bào ung thư phổi (A549), tế bào ung thư đại tràng (HT-29), tế bào ung thư gan (HepG2), tế bào ung thư dạ dày (AGS) và tế bào ung thư da (SK-Mel-2). Các dòng tế bào ung thư do GS.TS. J.M Pezzuto, trường Đại học Hawaii và GS.TS Jeanette Maier, trường Đại học Milan cung cấp.

2.2.2. Hóa chất

Hoá chất được thực hiện trong nghiên cứu gồm có: dung môi chiết mẫu là *ethanol* 70%

- Hóa chất dùng trong thử nghiệm gây độc tế bào ung thư gồm có: FBS của GIBCO và Dimethyl sulfoxit (DMSO) của hãng Invitrogen; Chất tham khảo là Ellipticine (Sigma, USA), Trypsin (Sigma), Trichloroacetic acid – TCA (Sigma, USA), Sulforhodamine B (SRB) (Sigma, USA), Unbuffered Tris base (Sigma, USA) và một số hóa chất thông thường khác.
- Hoá chất thử nghiệm kháng oxy hoá gồm có: Trolox (Sigma Aldrich) Ascorbic acid (Fisher), đệm phosphat hoặc đệm KCl, Acid tricloacetic (TCA, Fisher),

Acid thiobarbituric (TBA) (Sigma Aldrich), FeSO₄, H₂O, Đĩa 96 giếng nhựa (Corning, USA), pipette (eppendorf).

2.2.3. Động vật

Chuột thuần chủng dòng BALB/C khỏe mạnh không phân biệt giống, không mắc bệnh, đạt khối lượng 24-26g

2.2.4. Thiết bị và dụng cụ

- Thiết bị dùng cho chiết xuất và phân lập gồm có: Cân điện tử có độ chính xác 0,001 gam, cân phân tích Precisa 262SMA-FR, máy cô quay chân không, tủ sấy Memmert, Binder-FD115. Các dụng cụ thí nghiệm thường quy: cốc có mỏ, bình nón, ống nghiệm, đĩa thủy tinh, pipet, bình gạn, phễu lọc, giấy lọc...
- Thiết bị dùng trong phân tích thành phần hóa học gồm có: Đèn soi tử ngoại hai bước sóng 254 nm và 365 nm. Pha tĩnh dùng trong sắc ký cột: silica gel pha thường cỡ hạt 0,063-0,200 mm (Merck), (0,040 - 0,063 mm, Merck); Sephadex LH-20 (Amersham Bioscience, Uppsala, Thụy Sỹ). Bản mỏng tráng sẵn DC-Alufolien 60 F254 (Merck) (silica gel, 0,25 mm) và bản mỏng pha đảo RP-18 F254 (Merck, 0,25 mm)... Sắc ký cột: các loại cột sắc ký có kích cỡ khác nhau. Máy đo phổ cộng hưởng từ hạt nhân NMR được ghi trên máy Bruker Avance 500MHz.
- Thiết bị dùng trong thử nghiệm gây độc tế bào ung thư gồm có: Đĩa 96 giếng nhựa (Corning, USA), Pipette (eppendorf), tủ ấm CO₂, máy đọc ELISA 96 giếng (Bio-rad), máy lắc và máy tính có cài phần mềm máy tính TableCurve.

2.3. Phương pháp nghiên cứu

2.3.1. Thu mẫu thực vật

Mẫu được thu hái tại vườn Quốc gia Vũ Quang gồm lá, hoa và nụ của 2 loài trà hoa vàng. Mẫu được rửa sạch, sấy khô trong tủ sấy ở nhiệt độ 45°C

2.3.2. Phương pháp chiết xuất cao toàn phần

2.3.2.1. Sơ chế nguyên liệu

Mẫu sau khi sấy khô, được cắt nhỏ với kích 0,3-0,5 cm.

2.3.2.2. Chiết cao toàn phần

Bước 1: Dung môi sử dụng: Hỗn hợp ethanol/nước = 7/3 khoảng 2tuần ở nhiệt độ phòng, sau đó thu dịch lỏng. Tiếp tục ngâm nguyên liệu trong bình với dung môi

lần 2 và lần 3 trong thời gian 1 ngày, sau đó đánh mẫu bằng máy siêu âm và chiết mẫu thu dịch lỏng

Hiệu suất thu nhận cao còn

$$P\% = \frac{M_c - M_{bđ}}{M_{bđ}} \times 100$$

Trong đó:

P: Hiệu suất cao thu được(%).

M_c: Khối lượng cao còn thu được (g).

M_{bđ}: Khối lượng dược liệu ban đầu (g).

- *Bước 2: Loại bỏ dung môi*

Dịch chiết sau khi thu được sẽ dung máy cô quay chân không để loại bỏ dung môi ở áp suất thấp thu được cao tổng. Áp suất được tạo ra bằng bơm, hút khí nên dịch chiết sôi ở nhiệt độ thấp.

2.3.3. Phương pháp định tính các nhóm chất hóa học thường gặp

Cân khoảng 100 mg cao chiết, thêm 25 ml ethanol 70%, siêu âm 15 phút, lọc, dịch lọc được dùng để làm các phản ứng định tính trong ống nghiệm.

2.3.3.1. Định tính flavonoid

2.3.3.1.1. Định tính bằng phản ứng ống nghiệm

- *Phản ứng cyanidin*: Cho 2 ml dịch lọc vào một ống nghiệm, thêm một ít bột magie kim loại, rồi thêm vài giọt acid hydrocloric đặc. Đun nóng trên cách thủy sau vài phút thấy xuất hiện màu tím đỏ, chứng tỏ phản ứng dương tính.
- *Phản ứng với dung dịch FeCl₃ 5%*: Cho 2 ml dịch lọc vào một ống nghiệm, thêm 2-3 giọt FeCl₃ 5%, thấy dung dịch có màu xanh đen là phản ứng dương tính.
- *Phản ứng với kiềm*: cho vào ống nghiệm 1 ml dịch lọc, thêm vài giọt dung dịch NaOH 10%, phản ứng dương tính khi màu vàng của dung dịch tăng thêm.

2.3.3.1.2. Định tính bằng sắc ký lớp mỏng

Chuẩn bị mẫu: Cân khoảng 100 mg cao chiết, thêm 10 ml nước cất, siêu âm trong 10 phút, sau đó lắc với 5 ml *n*-butanol. Lấy lớp *n*-butanol cô cách thủy đến cạn, hòa tan cạn trong 1 ml methanol thu được dịch chấm sắc ký.

Điều kiện sắc ký:

Bản mỏng: sử dụng Silica gel 60 GF254 (Merck).

Dung môi khai triển là ethyl acetat – acid formic – methanol – nước (25:1:1:1).

Thuốc thử hiện vết: acid boric/acid oxalic.

Cách tiến hành: chấm riêng biệt 10 µl mỗi dung dịch mẫu thử lên bản mỏng đã hoạt hóa ở 105°C trong 1 giờ, tiến hành sắc ký theo ĐĐVN V . Sau khi khai triển hệ dung môi được 8 cm, lấy bản mỏng ra sấy cho bay hết dung môi, phun thuốc thử acid boric/acid oxalic, sấy bản mỏng đến khi các vết hiện rõ. Quan sát bản mỏng dưới ánh sáng tử ngoại bước sóng 366 nm, sắc ký đồ của dung dịch thử phải có các vết phát quang sáng hơn so với sắc ký đồ của dung dịch thử trước khi phun thuốc thử [2].

2.3.3.2. Định tính coumarin

Định tính bằng phản ứng ống nghiệm

- *Phản ứng mở và đóng vòng lacton:* Cho vào 2 ống nghiệm mỗi ống 1 ml dịch lọc, ống 1 thêm 0,5 ml dung dịch NaOH 10%, ống 2 để nguyên. Sau đó đun cả 2 ống nghiệm trên cách thủy sôi trong vài phút. Ống thứ nhất có màu vàng xuất hiện. Sau đó cho thêm vào mỗi ống 2 ml nước cất thấy ống thứ nhất trong hơn ống thứ 2, nhưng sau khi acid hóa bằng vài giọt HCl đặc thì cả 2 ống đều đục như nhau là phản ứng dương tính.

- *Phản ứng với thuốc thử diazo:* Cho vào ống nghiệm 1 ml dịch lọc, thêm vào đó 2 ml dung dịch NaOH 10%. Đun cách thủy tới sôi, để nguội, thêm vài giọt thuốc thử diazo (mới pha), thấy xuất hiện tủa màu đỏ gạch là phản ứng dương tính.

2.3.3.3. Định tính tanin

Cho vào 3 ống nghiệm mỗi ống 2ml dịch chiết nước và thực hiện các phản ứng sau:

- Ống 1: 2 ml dịch lọc, thêm 2 giọt FeCl₃ 5%. Phản ứng dương tính khi xuất hiện tủa xanh đen hoặc xanh nâu nhạt.

- Ống 2: 2 ml dịch lọc, thêm 2 giọt chì acetat 10%. Phản ứng dương tính khi xuất hiện tủa bông.

- Ống 3: 2 ml dịch lọc, thêm 5 giọt dung dịch gelatin 1%. Phản ứng dương tính khi xuất hiện tủa bông trắng.

2.3.3.4 Định tính saponin

2.3.3.4.1. Định tính bằng phản ứng ống nghiệm

- *Quan sát hiện tượng tạo bọt*: Cho 1 ml dịch lọc vào ống nghiệm có dung tích 20 ml, thêm vào đó 10 ml nước cất. Bịt ống nghiệm bằng ngón tay cái, lắc mạnh ống nghiệm theo chiều dọc 5 phút, để yên và quan sát. Mẫu thử có chứa saponin nếu xuất hiện bọt bền sau 10 phút.

- *Phản ứng Salkowski*: Cho 1 ml dịch lọc vào ống nghiệm, bốc hơi dịch lọc đến cạn. Hòa tan một ít cặn trong 1 ml anhydrid acetic, thêm vào dung dịch 0,5 ml cloroform. Dùng pipet nhỏ từ từ 1-2 ml H_2SO_4 vào thành ống nghiệm. Phản ứng dương tính khi xuất hiện vòng tím đỏ ở mặt ngăn cách.

2.3.3.4.2. Định tính bằng sắc ký lớp mỏng

Chuẩn bị mẫu: Cân khoảng 100 mg cao chiết, thêm 10 ml nước cất, siêu âm trong 10 phút, sau đó lắc với 5 ml *n*-butanol. Lấy lớp *n*-butanol cô cách thủy đến cạn, hòa tan cặn trong 1 ml methanol thu được dịch chấm sắc ký.

Điều kiện sắc ký:

Bản mỏng: Silica gel 60 GF254 (Merck).

Dung môi khai triển: chlorform – methanol – nước (65:35:10, lớp dưới).

Thuốc thử hiện vết: H_2SO_4 10%/ethanol.

Cách tiến hành: chấm riêng biệt 10 μ l mỗi dung dịch mẫu thử lên bản mỏng đã hoạt hóa ở 105°C trong 1 giờ, tiến hành sắc ký theo ĐĐVN V. Sau khi khai triển hệ dung môi được 8 cm, lấy bản mỏng ra sấy cho bay hết dung môi, phun thuốc thử H_2SO_4 10%/ethanol, sấy bản mỏng đến khi các vết hiện rõ. Quan sát bản mỏng dưới ánh sáng thường, sắc ký đồ của dung dịch thử phải có các vết màu hồng, tím [2].

2.3.3.5. Định tính đường khử

Định tính bằng phản ứng ống nghiệm: Lấy 1 ml dịch lọc cho vào ống nghiệm. Thêm vào đó 0,5 ml TT Fehling A và 0,5 ml TT Fehling B. Đun sôi cách thủy vài phút thấy xuất hiện tủa đỏ gạch là phản ứng dương tính.

2.3.3.6. Định tính polysaccharide

Định tính bằng phản ứng ống nghiệm:

Cho vào 2 ống nghiệm:

Ống 1: 4 ml nước cất + 5 giọt thuốc thử Lugol.

Ống 2: 4 ml dịch lọc + 5 giọt thuốc thử Lugol.

Quan sát màu ống 2 đậm hơn ống 1 thì phản ứng dương tính.

2.3.3.7. Định tính acid amin

Định tính bằng phản ứng ống nghiệm: Lấy 1 ml dịch lọc cho vào ống nghiệm. Thêm vài giọt thuốc thử ninhydrin 3%, đun cách thủy sôi 2 phút, dung dịch chuyển màu tím là phản ứng dương tính.

2.3.3.8. Định tính alkaloid

Định tính bằng phản ứng ống nghiệm: Lấy 100 mg cao chiết cho vào bình nón dung tích 50 ml, thêm 15 ml dung dịch H_2SO_4 2%, đun sôi vài phút. Để nguội, lọc dịch chiết vào bình gạn, kiểm tra hóa dịch lọc bằng dung dịch NH_4OH 6N đến pH kiềm. Chiết alkaloid bằng cloroform ($CHCl_3$) 3 lần, mỗi lần 5 ml. Dịch chiết $CHCl_3$ được gộp lại và lắc với H_2SO_4 2%. Gạn lấy lớp nước acid, cho vào 3 ống nghiệm, mỗi ống khoảng 1ml để làm các phản ứng sau:

- Với thuốc thử Mayer (tủa trắng hay vàng nhạt)
- Với thuốc thử Bouchardat (tủa nâu)
- Với thuốc thử Dragendorff (tủa vàng cam hoặc đỏ)

2.3.4. Phương pháp định tính EGCG trong các mẫu cao chiết

Phương pháp sắc ký lỏng hiệu năng cao [1]

Chuẩn bị mẫu:

Mẫu thử: cân khoảng 5 mg cao, thêm 10 ml methanol, siêu âm cho tan hoàn toàn.

Mẫu chuẩn: cân chính xác khoảng 1 mg EGCG, thêm 10 ml methanol, siêu âm cho tan hoàn toàn. Các mẫu được lọc qua màng lọc kích thước 0,45 μm trước khi triển khai sắc ký.

Điều kiện sắc ký gồm có: Hệ thống sắc ký HPLC-DAD Shimadzu, cột Agilent C_{18} (5 μm , 4,5 x 250mm), nhiệt độ lò cột: 40°C, tốc độ dòng: 1,0 ml/phút

Pha động gồm Acetonitril- acid phosphoric 0,1%, tỷ lệ 10/90.

Thể tích tiêm: 10 μl

Bước sóng phát hiện: 270 nm

2.3.5. Phương pháp định lượng polyphenol tổng số

Phương pháp định lượng taninoid trong dược liệu [3]

Chuẩn bị mẫu:

Dung dịch chuẩn: cân chính xác khoảng 50 mg acid galic chuẩn vào một bình định mức 100 ml màu nâu, thêm nước để hòa tan và vừa đủ đến vạch. Hút chính xác 5 ml dung dịch trên vào bình định mức 50 ml màu nâu, thêm nước vừa đủ, lắc đều thu được dung dịch có nồng độ acid galic khoảng 0,05 mg/ml.

Dung dịch thử: cân chính xác khoảng 100 mg cao chiết vào bình định mức 25 ml màu nâu, thêm 20 ml nước, siêu âm trong 15 phút, thêm nước vừa đủ, lắc đều. Lọc, bỏ 10 ml dịch lọc đầu.

Khảo sát cực đại hấp thụ quang: Hút chính xác 1,6 ml dung dịch chuẩn và 0,8 ml mỗi dung dịch thử vào các bình định mức 10 ml màu nâu đã được đánh số thứ tự, sau đó thêm vào mỗi bình 0,4 ml thuốc thử Folin-Ciocalteu, 4,0 ml nước cất và dung dịch Na_2CO_3 vừa đủ 10 ml, lắc đều. tiến hành quét phổ hấp thụ UV của các dung dịch này trong khoảng bước sóng từ 400 – 850 nm, lựa chọn bước sóng hấp thụ cực đại để tiến hành phân tích.

Xây dựng đường chuẩn: Pha dãy dung dịch chuẩn S1, S2, S3, S4, S5 và dung dịch mẫu trắng Tr vào các bình định mức 25 ml riêng biệt màu nâu với thành phần như sau:

Bảng 2. Xây dựng đường chuẩn thuốc thử

	S1	S2	S3	S4	S5	Tr
Dung dịch chuẩn (ml)	1,0	2,0	3,0	4,0	5,0	0
Thuốc thử Folin-Ciocalteu (ml)	1	1	1	1	1	1
Nước cất (ml)	11	10	9	8	7	12
Dung dịch Na_2CO_3 29% (ml)	Vừa đủ 25 ml					

Đo độ hấp thụ của các dung dịch thu được và xây dựng đường chuẩn với độ hấp thụ là trục tung và nồng độ dung dịch là trục hoành.

Định lượng polyphenol tổng số trong các mẫu cao: Hút chính xác 0,8 ml dung dịch thử vào bình định mức 10 ml màu nâu, thêm 0,4 ml thuốc thử Folin-Ciocalteu, 4,0 ml nước cất và dung dịch Na_2CO_3 vừa đủ 10 ml, lắc đều. Đo độ hấp thụ của dung dịch thu được. Nồng độ dung dịch đo quang của mẫu thử được tính theo công thức:

$$C = \frac{Y-b}{a} \times \frac{H}{100} \quad (\mu\text{g/ml})$$

Trong đó: C là nồng độ dung dịch đo quang của mẫu thử ($\mu\text{g/ml}$)

A là độ hấp thụ của dung dịch thử

a,b là các hệ số của phương trình đường chuẩn của acid galic

H: độ tinh khiết của chất chuẩn (%)

Hàm lượng polyphenol trong các mẫu cao đặc được xác định theo công thức:

$$X_1 = \frac{C \times 25 \times 25}{m} \quad (\text{mg GAE/g})$$

Trong đó: X là hàm lượng polyphenol tổng số trong các mẫu cao đặc tính theo acid galic (mg GAE/g)

C: nồng độ dung dịch đo quang của mẫu thử ($\mu\text{g/ml}$)

m là khối lượng cao (mg)

Hàm lượng polyphenol trong các mẫu cao lỏng được xác định theo công thức:

$$X_2 = \frac{X_1 \times m_l}{m_d} \quad (\text{mg GAE/g})$$

Trong đó: X₂ là hàm lượng polyphenol tổng số trong các mẫu cao lỏng tính theo acid galic (mg GAE/g)

m_l là khối lượng cao lỏng (g)

m_d là khối lượng cao đặc thu được sau khi sấy (g)

2.3.6. Phép thử sinh học xác định tính độc tế bào (cytotoxic assay)

2.3.6.1. Phương pháp nuôi cấy tế bào ung thư

Tế bào ung thư được nuôi cấy theo hướng dẫn thường qui của ATCC (American type culture collection), có là nuôi cấy tế bào là dạng đơn lớp và dạng hỗn dịch. Cụ thể, sáu dòng tế bào ung thư thử nghiệm sẽ được nuôi trong các môi trường nuôi cấy phù hợp có bổ sung 10% huyết thanh phôi bò FBS và các thành phần cần thiết khác ở điều kiện 5% CO₂, ở 37°C, Sau 3 ngày cả 6 dòng tế bào đều được cấy chuyển.

Quy trình cấy chuyển được thực hiện như sau: Đầu tiên, cần kiểm tra sơ bộ các tế bào có phát triển hay không dưới kính hiển vi, loại bỏ môi trường nuôi cấy cũ, tráng qua bằng PBS. Tách tế bào bằng Trypsin–EDTA ở 37°C trong 1-3 phút, vỗ nhẹ vào bình nuôi. Cho thêm 5 ml môi trường nuôi cấy (DMSO). Để xác định tỉ lệ cấy chuyển phù hợp đếm mật

độ tế bào bằng buồng đếm hồng cầu. Sau đó ly tâm trong 9000-1000 vòng/phút trong 5 phút để loại bỏ Trypsin. Để có mật độ tế bào phù hợp với sự phát triển của tế bào hòa cấy tế bào với môi trường nuôi cấy cần thiết. Đưa tế bào vào tủ ấm nuôi cấy CO₂, để nuôi cấy với thời gian tùy thuộc từng loại tế bào. Chai nuôi cấy luôn để nằm ngang các tế bào dính bám chai. Trong quá trình nuôi cấy các dạng tế bào không bám đáy thì không cần thực hiện Trypsin hóa.

2.3.6.2. Phép thử sinh học xác định tính độc tế bào (cytotoxic assay)

Phương pháp thử độ độc tế bào ung thư *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:

- Chất thử được pha thành các dải nồng độ thích hợp
- 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, thêm tế bào đã điều chỉnh nồng độ phù hợp ở trên vào các giếng này sao cho nồng độ chất thử trong giếng là 100 µg/ml; 20 µg/ml; 4 µg/ml và 0.8 µg/ml. Ủ trong tủ ấm 48 giờ. Giếng không có chất thử nhưng có TBUT (180µl) sẽ được sử dụng làm đối chứng ngày 0. Sau 1 giờ, giếng đối chứng ngày 0 tế bào sẽ được cố định bằng Trichloroacetic acid – TCA 20%.
- Sau 48 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.

- Đọc kết quả OD ở bước sóng 515-540 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:

$$\% \text{ ức chế} = 100\% - \frac{[\text{OD}(\text{chất thử}) - \text{OD}(\text{ngày 0})] \times 100}{\text{OD}(\text{đối chứng âm}) - \text{OD}(\text{ngày 0})}$$

- 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 dương;
- DMSO 10% luôn được sử dụng như đối chứng âm. Giá trị IC₅₀ (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), căn chiết được coi có hoạt tính tốt với IC₅₀ ≤ 20 µg/ml, trong khi chất tinh khiết được coi có hoạt tính tốt khi IC₅₀ ≤ 5 µM [Hughes JP, (2011)]

2.3.7. Phương pháp chống oxi hoá (MDA)

Phương pháp chống oxi hóa thông qua ức chế quá trình peroxidation lipid màng tế bào (thử nghiệm MDA) được thực hiện theo phương pháp của Stroeve EA, Makarova VG (1998), Jelili A Badmus *et al.*, (2011) và của Viện Dược liệu - Bộ Y Tế (2006), có sự thay đổi nhỏ cho phù hợp với điều kiện của phòng thí nghiệm. Xác định khả năng ức chế peroxy hoá lipid của mẫu nghiên cứu qua việc xác định hàm lượng malonyl dialdehyd (MDA), là sản phẩm của quá trình peroxy hoá lipid màng tế bào. MDA có khả năng phản ứng với acid thiobarbituric để tạo thành phức hợp trimethin (có màu hồng) có đỉnh hấp thụ cực đại ở λ = 532 nm.

Pha mẫu thử:

- Cân mẫu sau đó pha thành các nồng độ 10.000 µg/ml, 2000 µg/ml, 400 µg/ml, 80 µg/ml, 16 µg/ml nên sau khi cho 0,1 ml mẫu thử ở các nồng độ thử nghiệm được cho phản ứng với 1 ml dịch đồng thể năo và thêm 0,8 ml đệm phosphat, 0,1 ml hệ Fenton vừa đủ 2 ml thì nồng độ mẫu trong ống thử giảm xuống 20 lần còn 500 µg/ml, 100 µg/ml, 20 µg/ml, 4 µg/ml; 0,8 µg/ml.

Cách tiến hành: Tách não chuột và nghiền đồng thể trong dung dịch đệm phosphat (pH=7,4) theo tỉ lệ 1:10 ở nhiệt độ 0-4°C. Sau đó lấy 1ml dịch đồng thể thêm vào 0,1 ml mẫu thử ở các nồng độ và 0,8ml đệm phosphat thêm 0,1ml hệ Fenton (FeSO₄ 0,1 mM: H₂O₂ 15mM theo tỉ lệ 1:1). Ủ hỗn hợp ở 37°C trong 15 phút. Dừng phản ứng bằng 1 ml acid tricloacetic 10%. Li tâm 12000 vòng trong 5 phút. Lấy dịch trong cho phản ứng với 1 ml acid thiobarbituric 0,8% (theo tỉ lệ 2:1). Ủ ở nhiệt độ 100°C 15 phút. Làm lạnh và tiến hành đo ở bước sóng $\lambda = 532$ nm. Chất Trolox được sử dụng làm chất đối chiếu tham khảo.

Công thức phần trăm hoạt tính chống oxi hoá (HTCO) được tính như sau:

$$\text{HTCO (\%)} = [(\text{OD}_C - \text{OD}_T) / \text{OD}_C] \times 100$$

OD_C: Mật độ quang học của giếng chứng không có mẫu thử

OD_T: Mật độ quang học của mẫu

2.3.8. Phương pháp xử lý số liệu

Số liệu nghiên cứu được xử lý thống kê trên phần mềm SPSS

CHƯƠNG 3

KẾT QUẢ VÀ BÀN LUẬN

3.1. Chiết cao tổng số trà hoa vàng

Lá và hoa của trà hoa vàng sau khi thu hái, loại bỏ những phần dập nát, hư hỏng, rửa sạch, sấy khô ở nhiệt độ 60°C với mục đích bảo quản nguyên liệu khỏi bị nhiễm mốc, vi khuẩn và hạn chế các biến đổi hóa học có thể xảy ra trong nguyên liệu như bị thủy phân, oxy hóa,... Sau khi sấy khô nguyên liệu được chuyển sang máy xay và nghiền. Ngâm trong cồn 70%, sau đó chiết mẫu 3 lần thu dịch chiết.

Bảng 3.1. Hiệu suất chiết cao cồn của mẫu trà hoa vàng

Tên mẫu	Nguyên liệu ban đầu (g)	Khối lượng cao chiết (g)	Hiệu suất (%)
LHT	600	54	9,0
HHT	3200	390	12,2
NHT	1200	100	8,33
LVQ	400	38	9,5
HVQ	2500	320	12,8
NVQ	400	47	11,75

Kết quả bảng 3.1 cho thấy, khối lượng và hiệu suất cao tổng của 6 mẫu trà hoa vàng. Thông qua tính toán hiệu suất thu nhận cao cồn của các mẫu trà nằm trong khoảng từ 9,0 đến 12,8% trong đó hiệu suất cao thu được ở bộ phận hoa của 2 loài trà cao hơn các bộ phận còn lại. Hiệu suất chiết cao cồn của loài hoa Vũ Quang là cao nhất (12,8 %) và thấp nhất ở lá Hà Tĩnh (9,0 %).

Các mẫu trà hoa vàng từ lá, hoa và nụ được chiết dịch và cô quay chân không ở dạng cao lỏng, sau đó cô đặc và xác định độ ẩm trong cao. Kết quả nghiên cứu được trình bày ở bảng 3.2:

Bảng 3.2. Xác định độ ẩm trong cao cô đặc

TT	Ký hiệu mẫu	Tên mẫu	Khối lượng cao lỏng (g)	Khối lượng cao đặc (g)	Độ ẩm cao đặc (%)
1	LHT	Lá <i>Camellia hatinhensis</i>	10,75	3,68	16,55
2	LVQ	Lá <i>Camellia vuquangensis</i>	3,80	2,10	5,05
3	HHT	Hoa <i>Camellia hatinhensis</i>	3,7	2,79	12,70
4	HVQ	Hoa <i>Camellia vuquangensis</i>	4,1	2,83	13,2
5	NVQ	Nụ <i>Camellia vuquangensis</i>	3,7	3,34	13,30
6	NHT	Nụ <i>Camellia hatinhensis</i>	5,1	3,42	14,25

Kết quả bảng 3.2 cho thấy mặc dù cô đặc mẫu, song độ ẩm của cao đặc ở mẫu LVQ là 5,05%; Các mẫu còn lại từ 12,7 % đến 16,55%.

3.2. Khảo sát thành phần hoá học có trong trà hoa vàng

Để khảo sát thành phần hoá học cơ bản có trong 2 loài trà hoa vàng phân bố ở Hà Tĩnh, phương pháp định tính bằng các phản ứng hoá học và định lượng bằng sắc ký lỏng đã được thực hiện. Kết quả được thể hiện như sau:

3.2.1. Kết quả định tính nhóm flavonoid

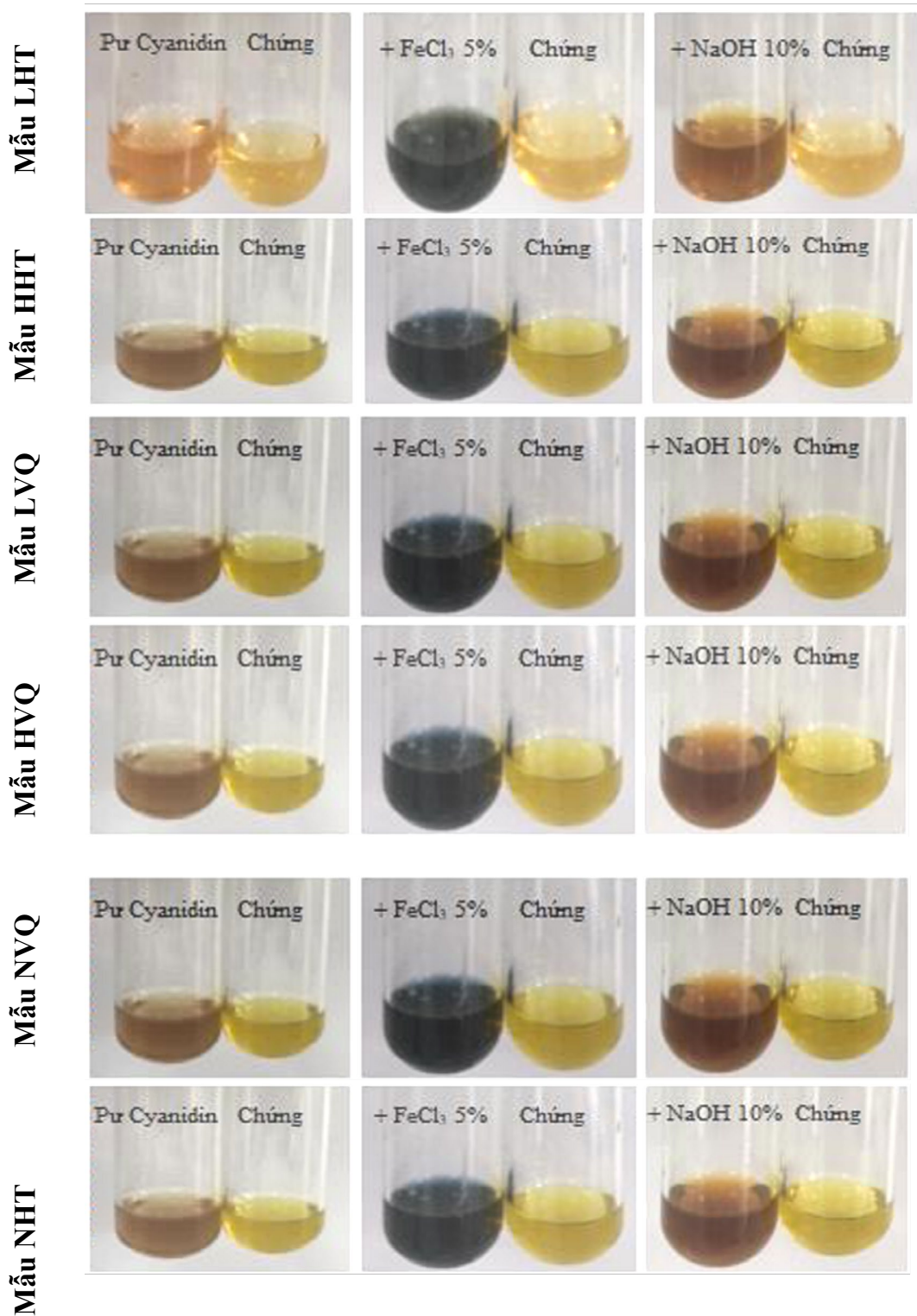
Kết quả định tính nhóm chất flavonoid trong các mẫu cao được trình bày ở bảng 3.3 và hình 3.1.

Bảng 3.3. Kết quả sàng lọc nhóm flavonoid bằng phản ứng hóa học

TT	Mẫu	Kết quả			Kết luận
		Phản ứng Cyanidin	Phản ứng với kiềm	Phản ứng với FeCl ₃	
1	LHT	+	++	++	Có
2	HHT	++	++	++	Có
3	LVQ	+	++	++	Có

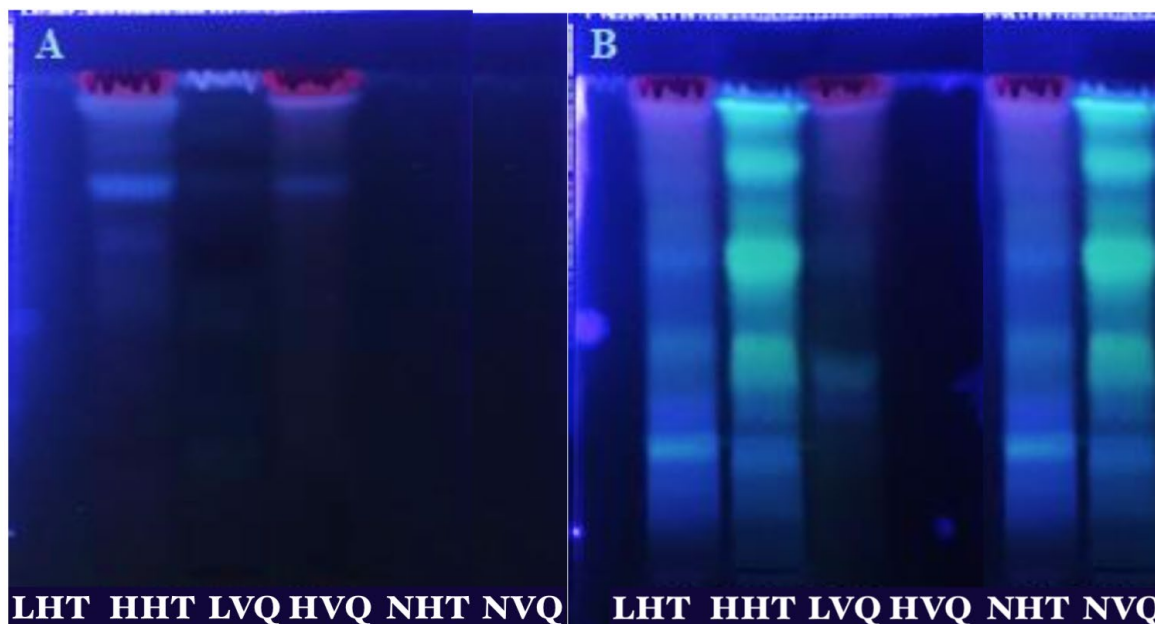
4	HVQ	++	++	++	Có
5	NVQ	+	++	++	Có
6	NHT	++	++	++	Có

Chú thích: (-): âm tính, (+): dương tính, (++) : dương tính rõ.



Hình 3. 1. Hình ảnh định tính flavonoid bằng phản ứng ống nghiệm

Kết quả định tính nhóm chất flavonoid trong các mẫu cao bằng sắc ký lớp mỏng được thể hiện ở hình 3.2:



Hình 3. 2. Sắc kí đồ định tính flavonoid trong các mẫu cao

A: Quan sát dưới ánh sáng tử ngoại bước sóng 366 nm trước khi phun thuốc thử;

B: Quan sát dưới ánh sáng tử ngoại bước sóng 366 nm sau khi phun thuốc thử.

Từ kết quả bảng 3.3 và hình 3.1 cho thấy, dịch chiết của mẫu LHT, LVQ và NVQ phản ứng Cyanidin ở mức 1 +, các mẫu còn lại đều ở mức 2+. Trong phản ứng với iếm và FeCl₃ 06 mẫu dịch chiết đều phản ứng ở mức 2+. Điều này có thể cho thấy trong các dịch chiết này đều chứa flavonoid. Kết luận này còn được khẳng định trong bản sắc ký lớp mỏng (hình 3.2) ở bước sóng 366nm trước và sau khi phun thuốc thử.

3.2.2. Định tính nhóm coumarin

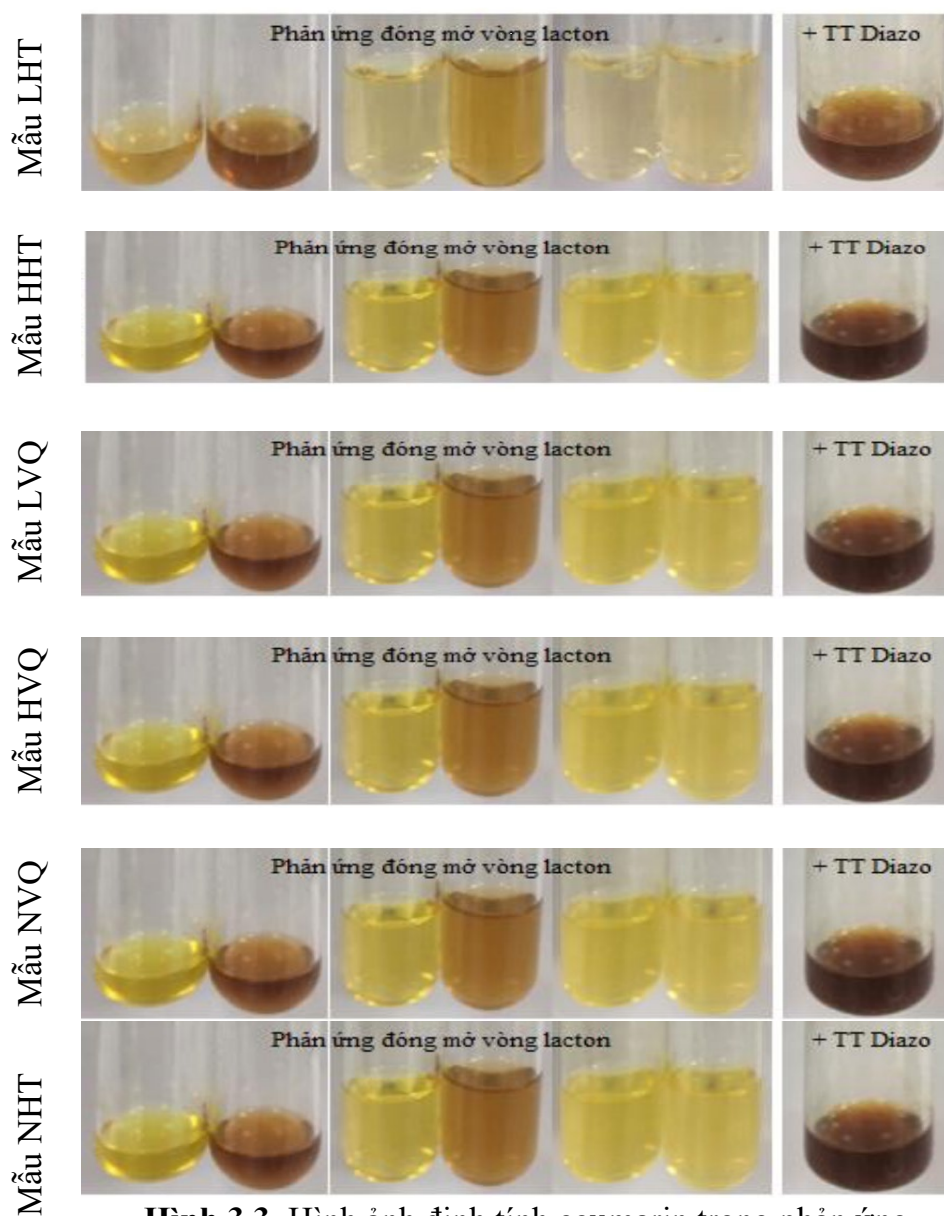
Kết quả định tính nhóm chất coumarin trong các mẫu cao được trình bày ở bảng 3.4 và hình 3.3.

Bảng 3. 4. Kết quả sàng lọc nhóm coumarin bằng phản ứng hóa học

TT	Mẫu	Kết quả		Kết luận
		Phản ứng đóng mở vòng lacton	Phản ứng với thuốc thử Diazo	
1	LHT	-	++	Không
2	HHT	-	++	Không

3	LVQ	-	++	Không
4	HVQ	-	++	Không
5	NVQ	-	++	Không
6	NHT	-	++	Không

Chú thích: (-): âm tính, (+): dương tính, (++) : dương tính rõ.



Hình 3.3. Hình ảnh định tính coumarin trong phản ứng đóng/mở vòng Laton và phản ứng với thuốc thử Diazo

Từ kết quả sàng lọc bảng 3.4. và hình 3.3 cho thấy, bằng phản ứng hóa học đóng/mở vòng Laton cho thấy, cả 6 mẫu dịch chiết trà hoa vàng đều phản ứng âm tính lớp Lacton và phản ứng dương tính ở mức 2+ với thuốc thử Diazo. Điều có thể khẳng định trong 6 mẫu cao chiết đều không chứa coumarin.

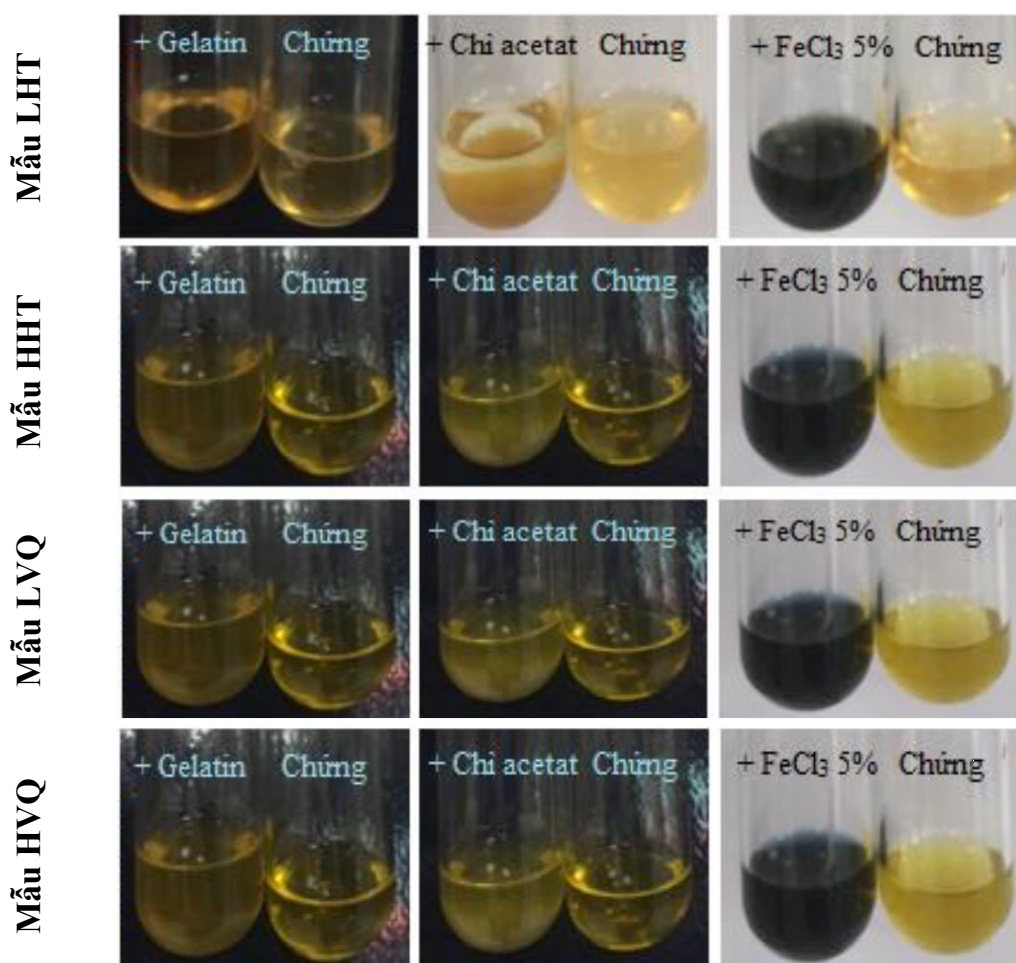
3.2.3. Kết quả sàng lọc nhóm tanin

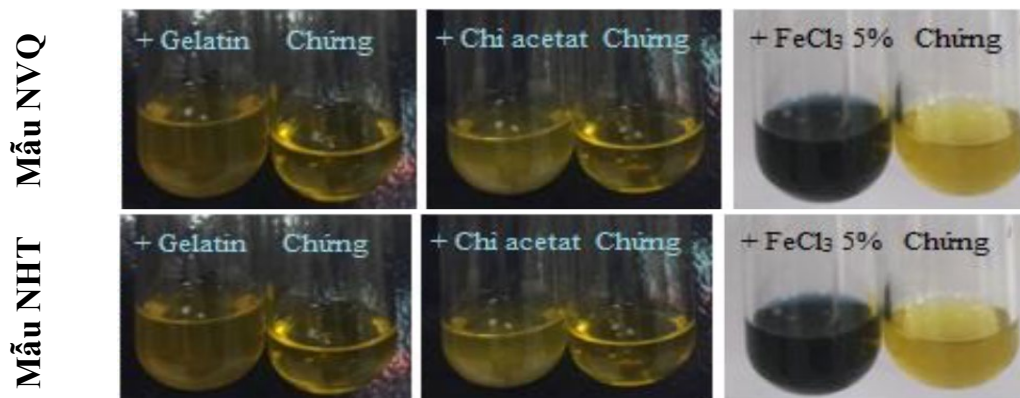
Kết quả định tính nhóm chất tanin trong các mẫu cao chiết được trình bày ở hình 3.4. và bảng 3.5:

Bảng 3. 5. Kết quả sàng lọc nhóm tanin bằng phản ứng hóa học

TT	Mẫu	Kết quả			Kết luận
		Phản ứng với Gelatin	Phản ứng với $\text{Pb}(\text{CH}_3\text{COO})_2$	Phản ứng với FeCl_3	
1	LHT	+	++	++	Có
2	HHT	-	++	++	Không
3	LVQ	+	++	++	Có
4	HVQ	-	++	++	Không
5	NHT	-	++	++	Có
6	NVQ	-	++	++	Không

Chú thích: (-): âm tính, (+): dương tính, (++) : dương tính rõ.





Hình 3.4. Hình ảnh định tính tanin bằng phản ứng ống nghiệm

Kết quả ở bảng 3.5 và hình 3.4 cho thấy, mẫu dịch chiết HHT, HVQ, NHT và NVQ không phản ứng với Gelatin, nhưng mẫu LHT, LVQ lại phản ứng dương tính ở mức + với Gelatin. Để khẳng định mẫu dịch chiết có chứa nhóm tanin chi, những mẫu này lại được thử tiếp với phản ứng $Pb(CH_3COO)_2$ và Phản ứng với $FeCl_3$. Với kết quả ở bảng 3.4 và hình 3.4 thấy rằng 2 mẫu cao chiết LHT và LVQ có chứa tanin, còn lại mẫu HHT, NHT và HVQ, NVQ không chứa tanin.

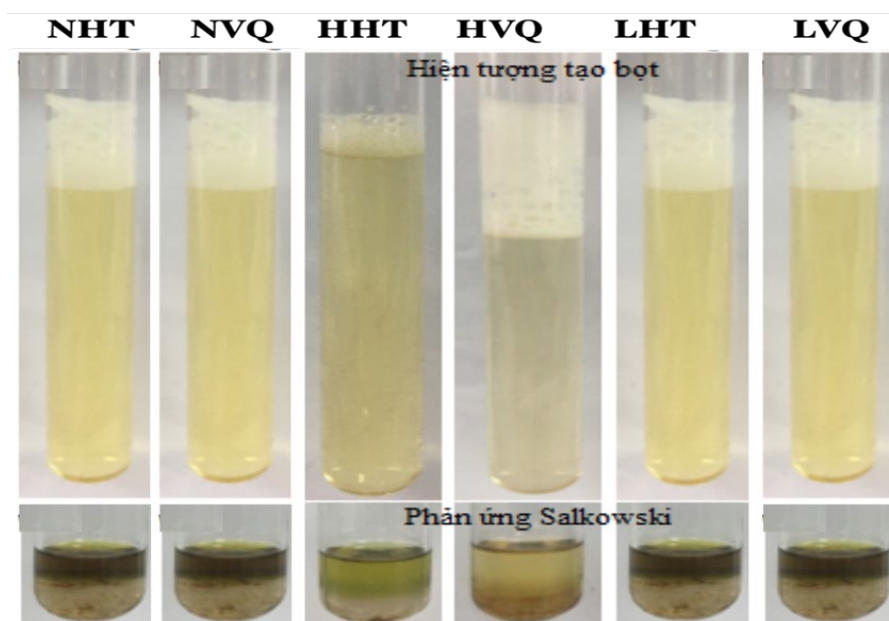
3.2.4. Kết quả sàng lọc nhóm saponin

Để xác định trong dịch chiết trà hoa vàng có chứa saponin, các mẫu dịch chiết này đã được thử nghiệm bằng hiện tượng tạo bọt và phản ứng Salkowski, sau đó khẳng định bằng phương pháp sắc ký đồ định tính. Kết quả được trình bày ở hình 3.5, hình 3.6 và bảng 3.6.

Bảng 3. 6. Kết quả sàng lọc nhóm saponin bằng phản ứng hóa học

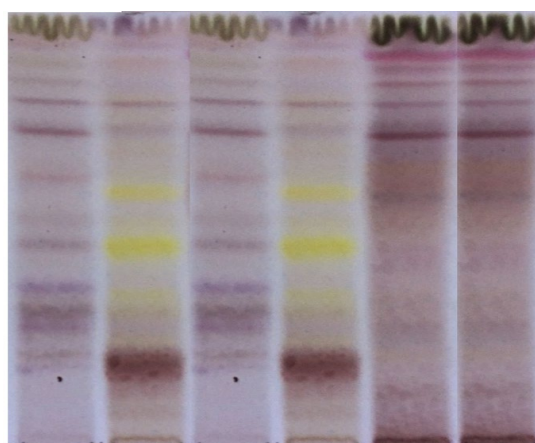
TT	Mẫu	Kết quả		Kết luận
		Hiện tượng tạo bọt	Phản ứng Salkowski	
1	LHT	+	++	Có
2	HHT	++	+	Có
3	LVQ	+	++	Có
4	HVQ	++	++	Có
3	NVQ	++	++	Có
4	NHT	++	++	Có

Chú thích: (-): âm tính, (+): dương tính, (++) : dương tính rõ.



Hình 3. 5. Hình ảnh định tính saponin qua các phản ứng ống nghiệm

Kết quả định tính nhóm chất saponin trong các mẫu cao bằng sắc ký lớp mỏng được trình bày ở các hình 3.6:



Hình 3. 6. Sắc ký đồ định tính saponin trong các mẫu cao

Thông qua hình ảnh 3.5 và 3.6 cho thấy, trong dịch chiết LHT và LVQ hiện tượng tạo bọt ít hơn dịch chiết trong mẫu HHT, HVQ, NVQ và NHT. Trong phản ứng Salkowski mức độ phản ứng của mẫu HHT ở mức độ 1+ còn các mẫu còn lại ở mức độ 2+. Điều này cho thấy, các mẫu dịch chiết này có thể có chứa saponin.

Để khẳng định điều này, khi sắc ký đồ định tính các mẫu dịch chiết đều cho thấy chúng có các vạch tương ứng với saponin ở hình 3.6 cho thấy 06 mẫu này đều chứa saponin.

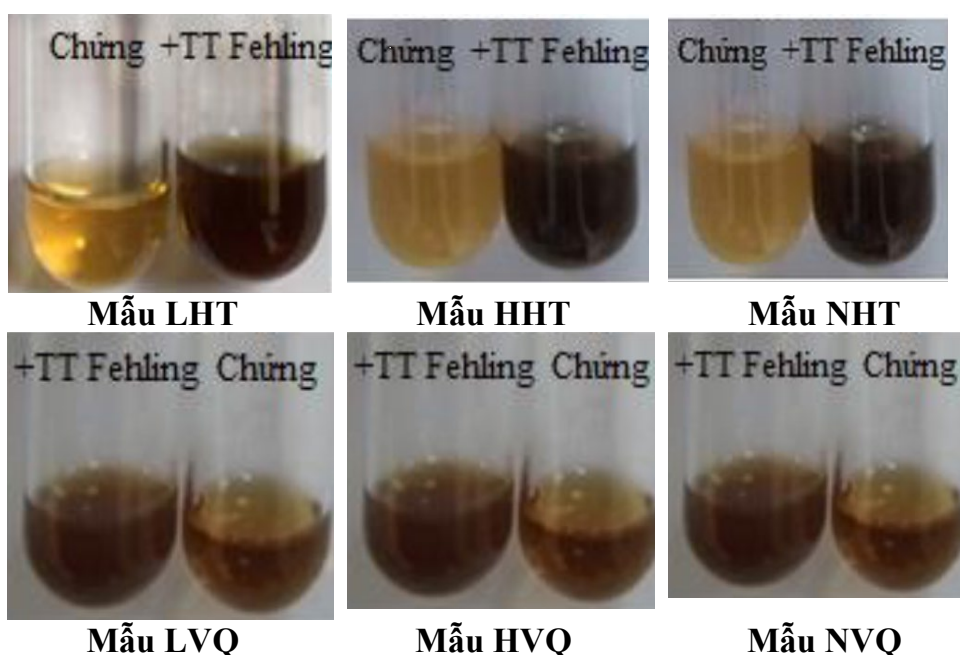
3.2.5. Kết quả sàng lọc nhóm đường khử

Kết quả định tính nhóm chất đường khử trong các mẫu cao chiết được trình bày ở hình 3.7 và bảng 3.7

Bảng 3. 7. Kết quả sàng lọc nhóm đường khử bằng phản ứng hóa học

TT	Mẫu	Kết quả Phản ứng với thuốc thử Fehling	Kết luận
1	LHT	++	Có
2	HHT	++	Có
3	NHT	++	Có
4	LVQ	++	Có
5	HVQ	++	Có
6	NVQ	++	Có

Chú thích: (-): âm tính, (+): dương tính, (++) : dương tính rõ.



Hình 3. 7. Hình ảnh định tính đường khử bằng phản ứng ống nghiệm

Kết quả thử phản ứng với thuốc thử Fehling ở bảng 3.7 và hình 3.7 cho thấy, cả 6 mẫu thử đều bắt màu với thuốc thử ở mức 2+. Vì vậy, có thể kết luận, dịch chiết các mẫu trà hoà vàng trong lá, hoa và nụ đều chứa đường khử.

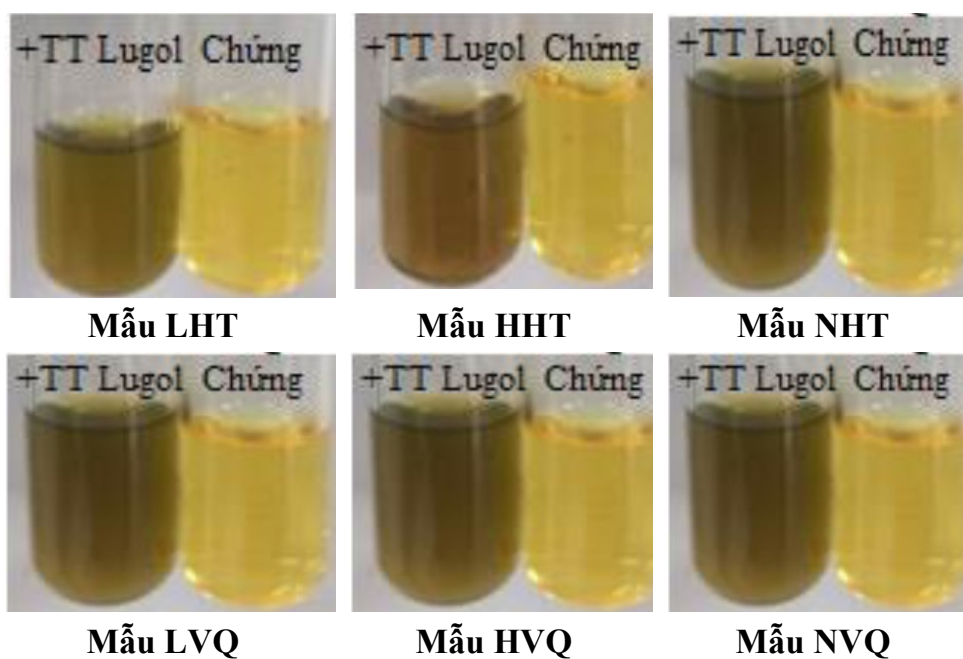
3.2.6. Kết quả sàng lọc nhóm polysaccharide

Để xác định nhóm chất polysaccharide trong các mẫu cao chiết, tất cả dịch chiết này đều được thử với thuốc thử Lugol. Kết quả được trình bày ở hình 3.8 và bảng 3.8

Bảng 3. 8. Kết quả sàng lọc nhóm polysaccharide bằng phản ứng hóa học

TT	Mẫu	Kết quả	Kết luận
		Phản ứng với thuốc thử Lugol	
1	LHT	++	Có
2	HHT	++	Có
3	NHT	++	Có
4	LVQ	++	Có
5	HVQ	++	Có
6	NVQ	++	Có

Chú thích: (-): âm tính, (+): dương tính, (++) : dương tính rõ.



Hình 3. 8. Hình ảnh định tính polysaccharide bằng phản ứng ống nghiệm

Kết quả khảo sát nhóm polysaccharide bằng phản ứng hoá học với thuốc thử Lugol ở bảng 3.8 và hình 3.8 cho thấy, cả 6 mẫu cao chiết đều phản ứng ở mức độ 2+ và bắt màu với thuốc thử. Điều này chứng tỏ trong mẫu chiết có chứa polysaccharide.

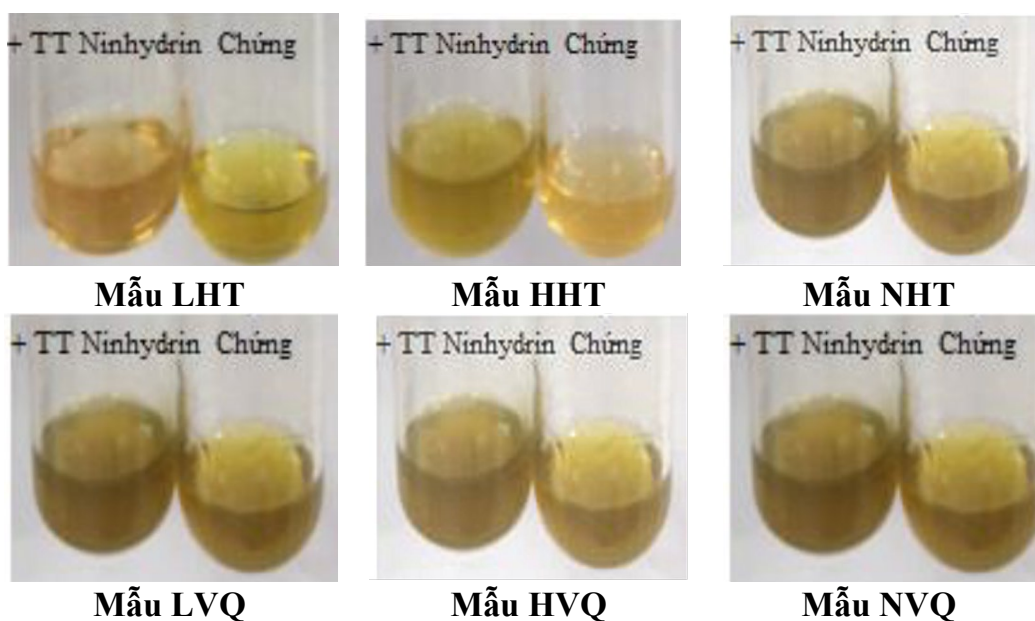
3.2.7. Kết quả sàng lọc nhóm acid amin

Để xác định nhóm chất nhóm acid amin trong các mẫu cao chiết, tất cả dịch chiết này đều được thử với thuốc thử Ninhydrin. Kết quả được trình bày ở hình 3.9 và bảng 3.9

Bảng 3. 9. Kết quả sàng lọc nhóm acid amin bằng phản ứng hóa học

TT	Mẫu	Kết quả	Kết luận
		Phản ứng với thuốc thử Ninhydrin	
1	LHT	-	Không
2	HHT	-	Không
3	HVQ	-	Không
4	LVQ	-	Không
5	NVQ	-	Không
6	NHT	-	Không

Chú thích: (-): âm tính,



Hình 3. 9. Hình ảnh định tính acid amin bằng phản ứng Ninhydrin

Từ kết quả bảng 3.9. và hình 3.9 cho thấy, bằng phản ứng Ninhydrin cho thấy, cả 6 mẫu dịch chiết trà hoa vàng đều không phản ứng Ninhydrin. Điều có thể khẳng định trong 6 mẫu cao chiết đều không chứa acid amin.

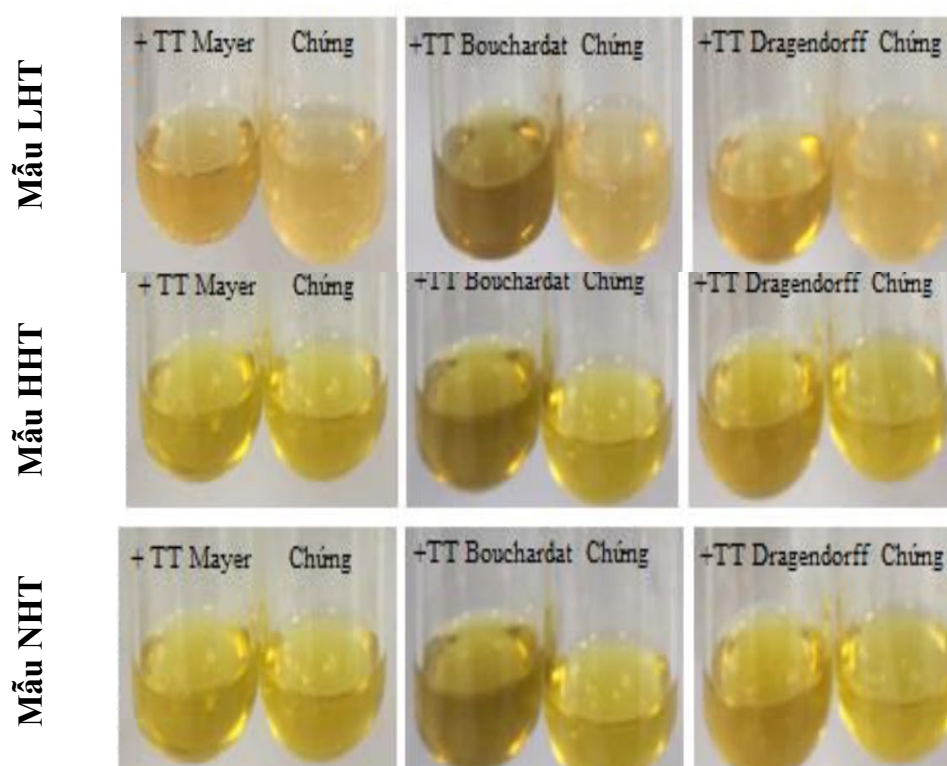
3.2.8. Kết quả sàng lọc nhóm alkaloid

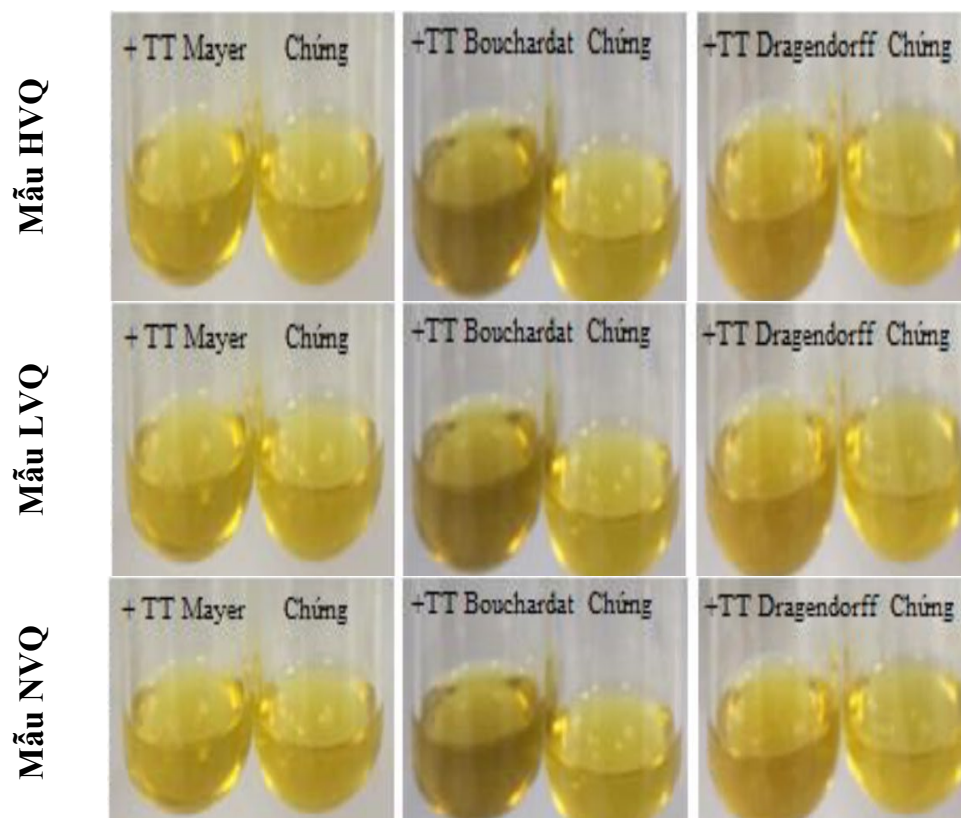
Kết quả định tính nhóm chất alkaloid trong các mẫu cao chiết được trình bày ở hình 3.10 và bảng 3.10

Bảng 3. 10. Kết quả định tính nhóm alkaloid bằng phản ứng hóa học

TT	Mẫu	Kết quả			Kết luận
		Phản ứng với TT Mayer	Phản ứng với TT Bouchardat	Phản ứng với TT Dragendorff	
1	LHT	-	-	-	Không
2	HHT	-	-	-	Không
3	NHT	-	-	-	Không
4	LVQ	-	-	-	Không
5	HVQ	-	-	-	Không
6	NVQ	-	-	-	Không

Chú thích: (-): âm tính, (+): dương tính, (++) : dương tính rõ.



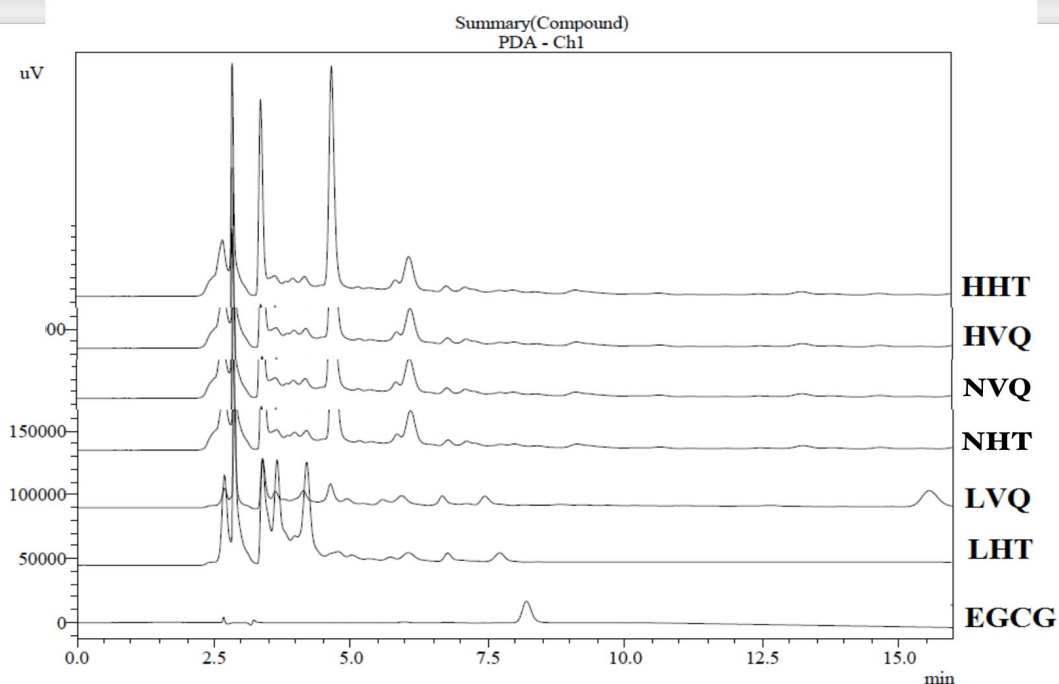


Hình 3.10. Hình ảnh định tính alkaloid bằng phản ứng Mayer, Bouchardat và Dragendorff

Để xác định nhóm chất alkaloid có trong mẫu cao chiết. 3 loại phản ứng thuốc thử Mayer, Bouchardat và Dragendorff đã được thực hiện. Từ kết quả bảng 3.10. và hình 3.10 cho thấy, cả 6 mẫu dịch chiết trà hoa vàng đều không phản ứng thuốc thử Mayer, Bouchardat và Dragendorff. Điều có thể khẳng định trong 6 mẫu cao chiết đều không chứa alkaloid.

3.3. Kết quả định tính EGCG trong các mẫu cao chiết

Để xác định EGCG trong trà hoa vàng, tất cả dịch chiết đã được sử dụng sắc ký đồ. Kết quả được thể hiện ở hình 3.11

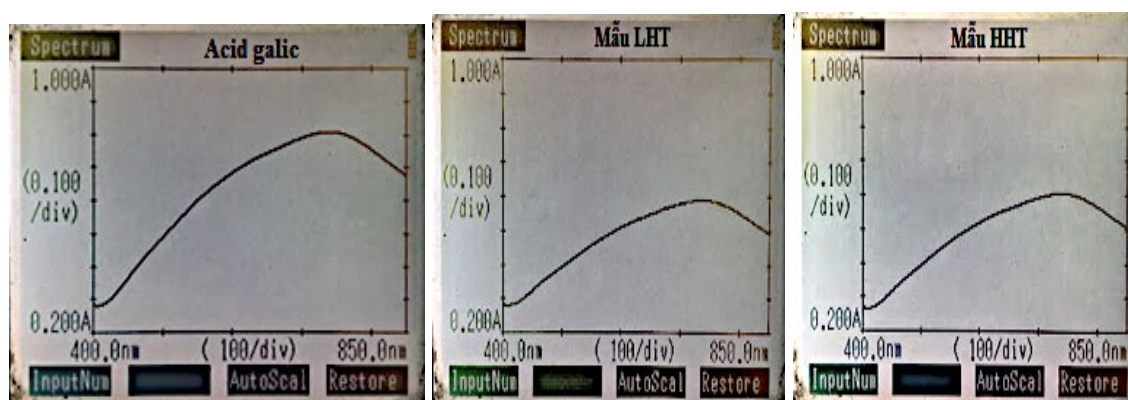


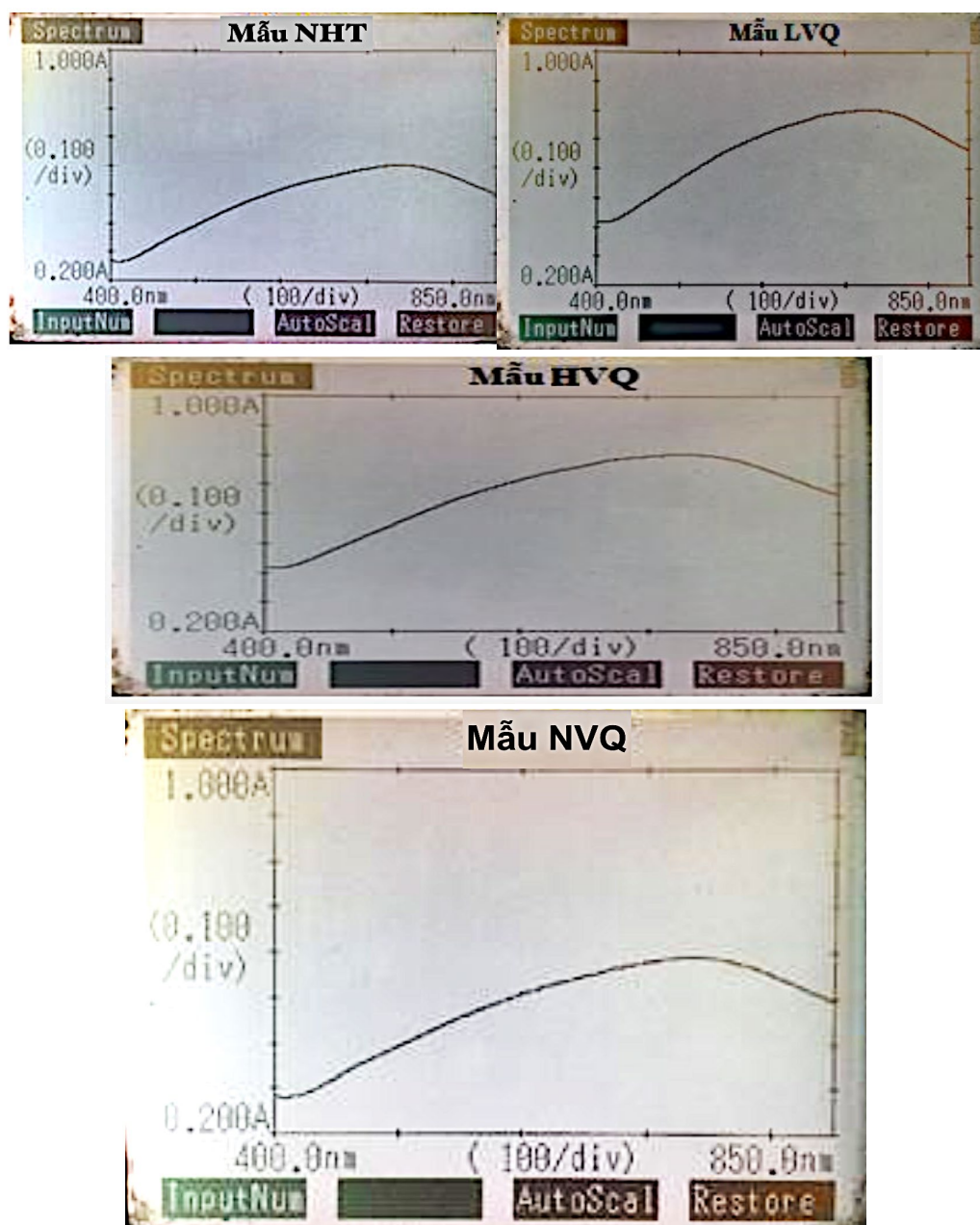
Hình 3. 11. Sắc ký đồ HPLC định tính EGCG trong các mẫu cao chiết

Kết quả hiển thị trên hình 3.11 chưa tìm những đỉnh tương ứng với EGCG, điều này có thể cả 6 mẫu cao chiết HHT, HVQ, LVQ, NVQ, NHT và LHT đều không có EGCG.

3.4. Kết quả định lượng polyphenol tổng số trong các mẫu cao chiết

Để xác định nhóm chất polyphenol trong mẫu trà hoa vàng, Các dịch chiết đã được quét phổ với dung dịch chuẩn trên máy đo quang phổ trong khoảng bước sóng từ 300 – 800 nm, thu được các phổ hấp thụ như hình 3.12:

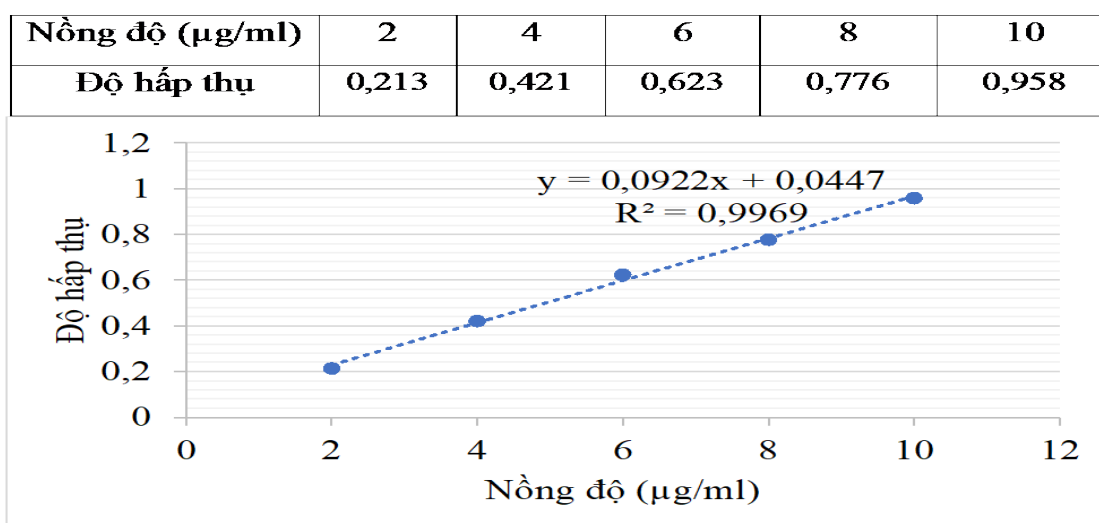




Hình 3. 12. Phổ hấp thụ UV của dung dịch chuẩn và các dung dịch thử

Kết quả hình 3.12 cho thấy dung dịch chuẩn và các dung dịch thử đều có giá trị cực đại hấp thụ tại bước sóng $737,0 \text{ nm} \rightarrow 740,0 \text{ nm}$. Do đó, lựa chọn $740,0 \text{ nm}$ là bước sóng phân tích.

Trong nghiên cứu này, chất đối chiếu được lựa chọn là acid galic. Kết quả xây dựng đường chuẩn được trình bày ở bảng 3.11 và hình 3.13:

Bảng 3.11. Kết quả xây dựng đường chuẩn theo chất đối chiếu acid galic**Hình 3. 13.** Đồ thị biểu diễn đường chuẩn xác định nồng độ acid galic

Dựa vào phương trình đường chuẩn acid galic, phối hợp với kết quả đo quang phổ dịch chiết. Qua tính toán, có thể định lượng được hàm lượng polyphenol tổng số trong các mẫu cao chiết như sau:

Bảng 3. 12. Kết quả định lượng polyphenol tổng số trong các mẫu cao

Mẫu	Khối lượng cao (mg)	Độ hấp thụ	Hàm lượng polyphenol tổng số trong cao đặc (mg GAE/g)	Hàm lượng polyphenol tổng số trong cao lỏng (mg GAE/g)	M ± SD (mg GAE/g)
LHT	10,7	0,554	322,66	942,54	942,40 ± 4,05
	10,4	0,537	320,88	937,36	
	10,5	0,547	324,28	947,29	
HHT	10,8	0,549	316,53	572,77	577,78 ± 3,84
	10,5	0,543	321,70	582,12	
	10,1	0,521	319,67	578,46	
NHT	10,2	0,529	312,53	472,72	471,10 ± 3,84
	10,4	0,513	324,77	472,12	
	10,3	0,529	329,34	468,46	
LVQ	10,3	0,568	344,40	456,73	454,35 ± 2,70
	10,5	0,577	343,65	455,74	
	10,8	0,586	339,75	450,57	
HVQ	10,4	0,578	324,42	366,73	334,33 ± 2,10
	10,5	0,578	333,55	335,75	
	10,9	0,589	330,73	450,53	
NVQ	10,2	0,562	324,44	356,73	341,01 ± 2,70
	10,4	0,573	323,63	325,74	
	10,9	0,585	329,75	340,57	

Kết quả ở bảng 3.12 cho thấy, hàm lượng polyphenol tổng số trong các mẫu cao lỏng LHT, HHT, NHT, LVQ, HVQ và NVQ tương ứng là $942,40 \pm 4,05$ mg GAE/g, $577,78 \pm 3,84$ mg GAE/g, $454,35 \pm 2,70$ mg GAE/g, $334,33 \pm 2,10$ mg GAE/g và $341,01 \pm 2,70$ mg GAE/g.

3.5. Thử nghiệm hoạt tính sinh học

3.5.1. Thử nghiệm hoạt tính chống oxy hoá peroxy hoá lipid

Phương pháp xác định hoạt tính kháng oxy hoá được thực hiện thông qua ức chế quá trình peroxidation lipid màng tế bào (thử nghiệm MDA). Kết quả được trình bày ở bảng 3.13.

Bảng 3. 13. Hoạt tính chống peroxy hóa của các mẫu nghiên cứu

Nồng độ ($\mu\text{g/ml}$)	Phần trăm hoạt tính chống oxy hóa (%)						
	LHT	HHT	NHT	LVQ	HVQ	NVQ	Trolox
100	77,49	82,09	72,03	77,49	77,57	75,57	76,15
20	58,46	73,74	63,34	68,29	60,30	59,32	71,85
4	23,43	31,71	30,31	34,96	32,63	31,43	48,00
0.8	18,40	19,39	18,38	24,84	24,70	23,90	16,31
IC₅₀	17.45$\pm$ 1.59	7.92$\pm$ 0.32	7.02$\pm$ 0.22	8.15$\pm$ 1.01	12.29$\pm$ 1.26	11.23$\pm$ 1.23	7.05$\pm$ 0.31

Kết quả phân tích thống kê cho thấy không có sự khác biệt về hoạt tính ức chế sự peroxy hoá lipid của dịch chiết trà hoa vàng trong 6 mẫu thí nghiệm có giá trị EC₅₀ đo được là giá trị IC₅₀ từ 7.92 - 17.45 $\mu\text{g/ml}$, gần tương đương với Trolox (EC₅₀ của Trolox $7,05 \pm 0,03$ $\mu\text{g/ml}$). Trong đó giá trị IC₅₀ thấp nhất là dịch chiết NHT (7.02 ± 0.22); cao nhất là LHT (17.45 ± 1.59). Xét tổng thể giá trị IC₅₀ của loài trà *Camellia hatinhensis* có khả năng kháng oxy hoá cao hơn loài *Camellia vuquangensis*

3.5.2. Thử nghiệm hoạt tính gây độc tế bào ung thư

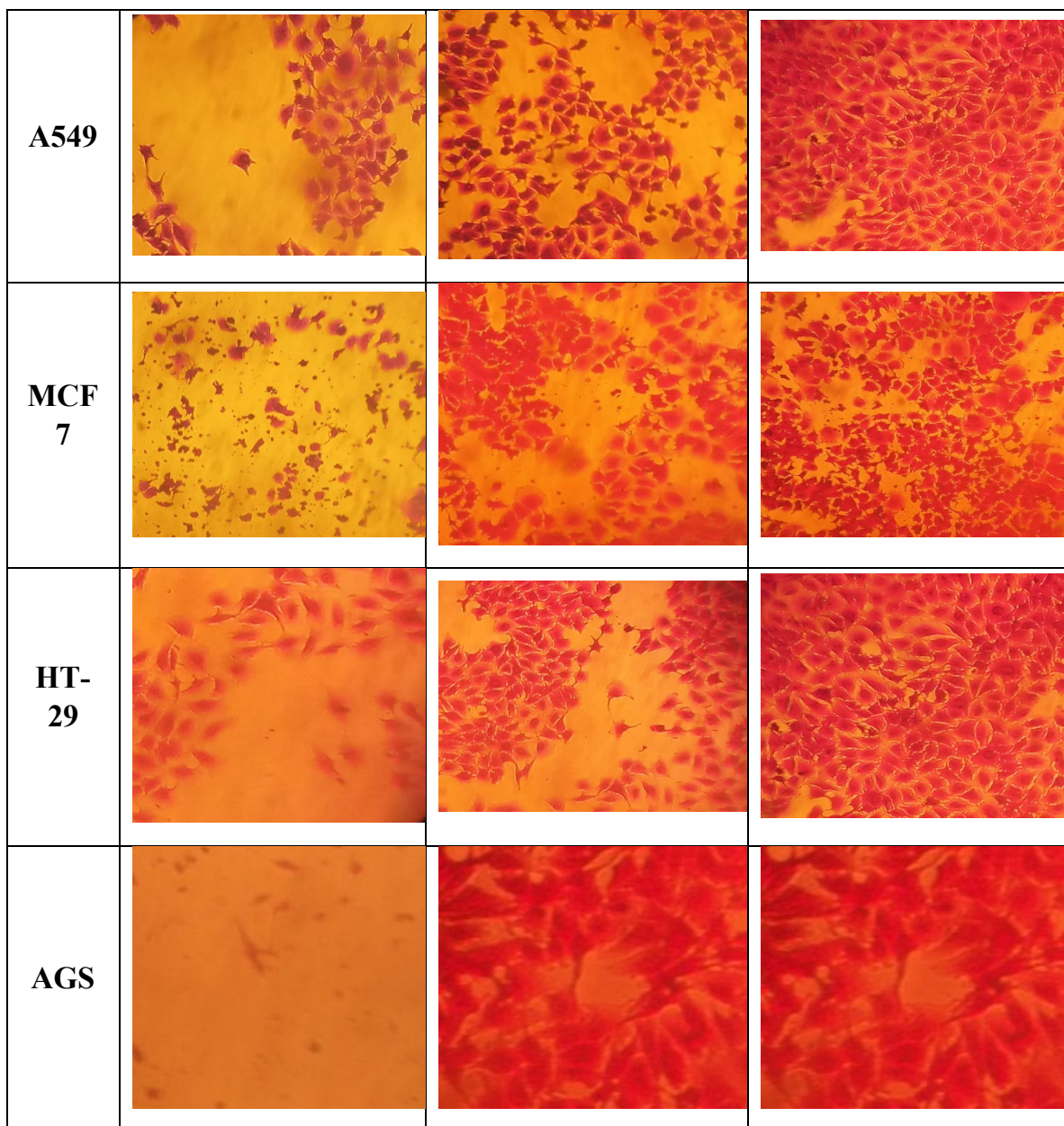
3.5.2.1. Đánh giá khả năng kháng tế bào ung thư của dịch chiết hoa Vũ Quang

Dịch chiết của loài trà hoa *Camellia vuquangensis* ng (HVQ) được thử trên 6 dòng tế bào ung thư ở các nồng độ khác nhau, kết quả được thể hiện ở bảng 3.14 và hình 3.14

Bảng 3. 14. Khả năng gây độc tế bào của dịch chiết HVQ trên các dòng tế bào

Nồng độ (µg/ml)	Tỷ lệ ức chế tế bào ung thư					
	HVQ					
	HepG2	A549	MCF7	HT-29	SK-Mel-2	AGS
100	83.47	62.86	78.56	62.08	74.15	58.11
20	19.17	14.55	17.37	15.00	17.06	17.31
4	4.79	1.86	6.42	6.05	7.02	2.69
0.8	-0.84	1.04	0.67	5.49	-6.64	-3.07
IC ₅₀	56.17±6.04	77.88±3.74	61.57±6.78	80.31±3.30	60.78±6.20	80.58±2.19
Nồng độ (µg/ml)	Ellipticine (chất đối chứng)					
	HepG2	A549	MCF7	HT-29	SK-Mel-2	AGS
10	96.07	92.62	86.13	97.24	96.01	93.19
2	79.38	86.61	75.17	77.05	82.77	80.63
0.4	51.22	49.25	51.22	51.56	49.41	48.94
0.08	24.08	21.04	24.32	26.15	21.06	24.03
IC ₅₀	0.39± 0.04	0.41± 0.05	0.38± 0.03	0.38± 0.02	0.42± 0.05	0.41± 0.03

Tế bào	Nồng độ 100 µg/ml	Nồng độ 20µg/ml	Nồng độ 0,8 µg/ml
HepG2			



Hình 3. 14. Hình ảnh các tế bào ung thư bị ức chế bởi dịch chiết HVQ

Kết quả bảng 3.14 và hình 3.14 ta thấy:

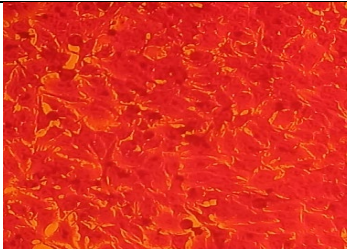
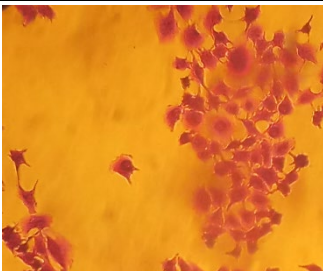
Hoạt tính ức chế tế bào ung thư của dịch chiết HVQ ức chế với tế bào ung thư rất tốt. Trong đó, thể hiện tốt nhất với dòng tế bào ung thư gan (HepG2), với giá trị $IC_{50} = 56,17 \mu\text{g/ml}$ và có thể ức chế được 83,47% tế bào ung thư ở nồng độ 100, $\mu\text{g/ml}$. Khả năng ức chế tế bào ung thư kém hơn ở dòng tế bào dạ dày (AS (HT-29)G) và dòng tế bào ung thư đại tràng, với $IC_{50} = 80,31$.

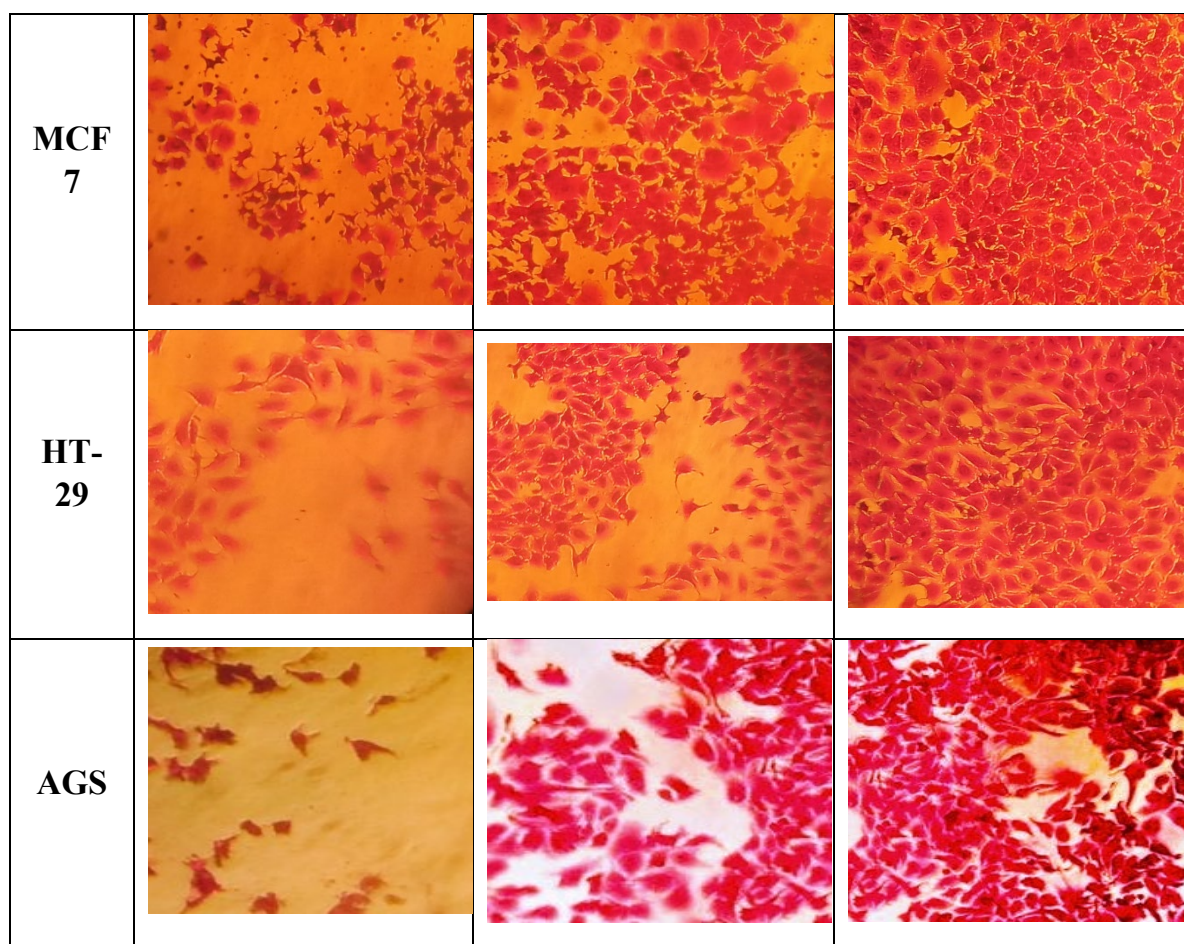
3.5.2.2. *Đánh giá khả năng kháng tế bào ung thư của dịch chiết HHT*

Dịch chiết HHT được thử trên 6 dòng tế bào ung thư ở các nồng độ khác nhau, kết quả được thể hiện ở bảng 3.15 và hình 3.15

Bảng 3.15. Khả năng gây độc tế bào của dịch chiết HHT trên các dòng tế bào

Nồng độ ($\mu\text{g/ml}$)	Tỷ lệ ức chế tế bào ung thư					
	HHT					
	HepG2	A549	MCF7	HT-29	SK-Mel-2	AGS
100	93.80	78.46	87.68	98.57	98.79	84.53
20	33.58	29.53	34.14	32.67	33.57	35.12
4	7.07	5.80	7.96	10.90	18.71	13.28
0.8	2.49	1.34	-1.72	9.73	4.83	1.30
IC ₅₀	38.04$\pm$4.09	48.01$\pm$4.57	37.68$\pm$2.84	39.31$\pm$3.80	34.73$\pm$3.45	36.89$\pm$2.27
Nồng độ ($\mu\text{g/ml}$)	Ellipticine (chất đối chứng)					
	HepG2	A549	MCF7	HT-29	SK-Mel-2	AGS
10	96.07	92.62	86.13	97.24	96.01	93.19
2	79.38	86.61	75.17	77.05	82.77	80.63
0.4	51.22	49.25	51.22	51.56	49.41	48.94
0.08	24.08	21.04	24.32	26.15	21.06	24.03
IC ₅₀	0.39$\pm$ 0.04	0.41$\pm$ 0.05	0.38$\pm$ 0.03	0.38$\pm$ 0.02	0.42$\pm$ 0.05	0.41$\pm$ 0.03

Tế bào	Nồng độ 100 $\mu\text{g/ml}$	Nồng độ 20 $\mu\text{g/ml}$	Nồng độ 0,8 $\mu\text{g/ml}$
HepG ₂			
A549			



Hình 3. 15. Hình ảnh các tế bào ung thư bị ức chế bởi dịch chiết HHT

Kết quả bảng 3.15 và hình 3.15 ta thấy:

Hoạt tính ức chế tế bào ung thư của dịch chiết HHT ức chế với tế bào ung thư rất cao với giá trị IC_{50} từ 36,89 đến 48,01. Trong đó, thể hiện tốt nhất với dòng tế bào ung thư da (SK-Mel-2), với giá trị $IC_{50} = 34,73$ và có thể ức chế được 98,79% tế bào ung thư ở nồng độ 100, $\mu\text{g/ml}$. Khả năng ức chế tế bào ung thư kém hơn ở dòng tế bào phổi A 549 với $IC_{50} = 48,01$.

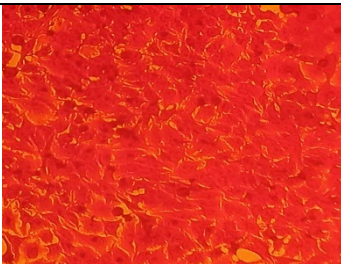
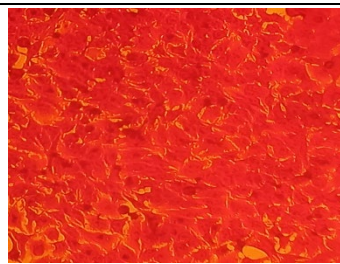
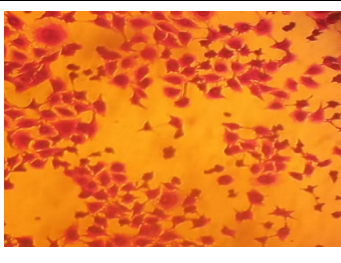
3.5.2.3. *Đánh giá khả năng kháng tế bào ung thư của dịch chiết LVQ*

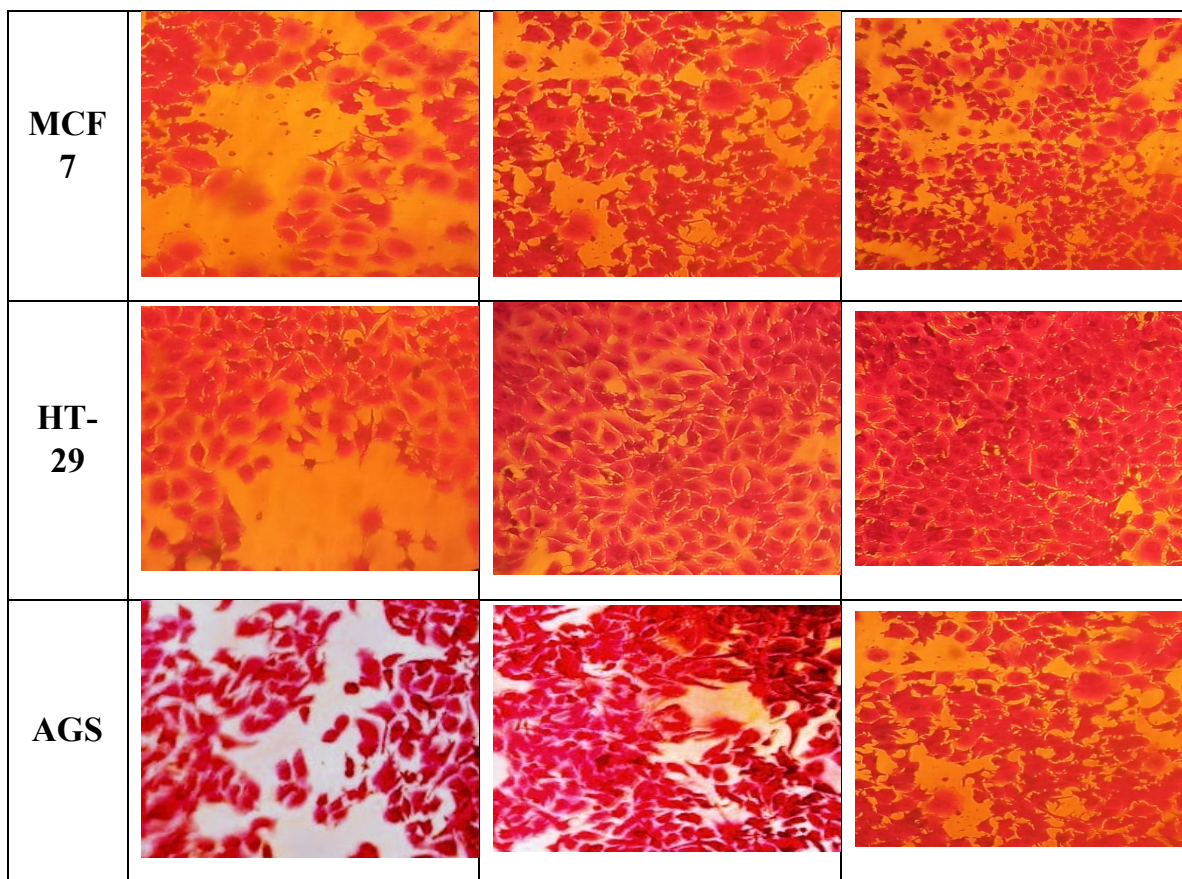
Dịch chiết LVQ được thử trên 6 dòng tế bào ung thư ở các nồng độ khác nhau, kết quả được thể hiện ở bảng 3.16 và hình 3.16

Bảng 3. 16. Khả năng gây độc tế bào của các mẫu LVQ trên các dòng tế bào ung thư

	Tỷ lệ ức chế tế bào ung thư bởi dịch chiết LVQ
--	--

Nồng độ (µg/ml)	HepG2	A549	MCF7	HT-29	SK-Mel-2	AGS
100	25.15	24.22	47.35	23.54	40.52	40.82
20	10.08	3.80	6.11	11.65	27.19	19.12
IC ₅₀	>100	>100	>100	>100	>100	>100
Nồng độ (µg/ml)	Ellipticine (chất đối chứng)					
	HepG2	A549	MCF7	HT-29	SK-Mel-2	AGS
10	96.07	92.62	86.13	97.24	96.01	93.19
2	79.38	86.61	75.17	77.05	82.77	80.63
0.4	51.22	49.25	51.22	51.56	49.41	48.94
0.08	24.08	21.04	24.32	26.15	21.06	24.03
IC ₅₀	0.39± 0.04	0.41± 0.05	0.38± 0.03	0.38± 0.02	0.42± 0.05	0.41± 0.03

Tế bào	Nồng độ 100 µg/ml	Nồng độ 20µg/ml	Nồng độ 0,8 µg/ml
HepG₂			
A549			



Hình 3. 16. Hình ảnh các tế bào ung thư bị ức chế bởi dịch chiết LVQ

Kết quả bảng 3.16 và hình 3.16 ta thấy:

Hoạt tính ức chế tế bào ung thư của dịch chiết LVQ ức chế kém hiệu quả với tế bào ung thư với giá trị $IC_{50} > 100$.

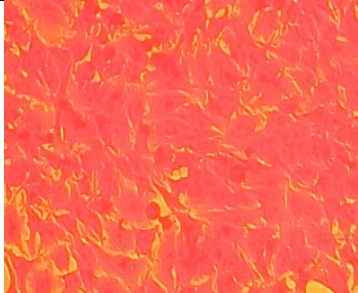
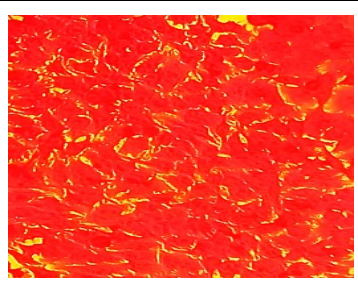
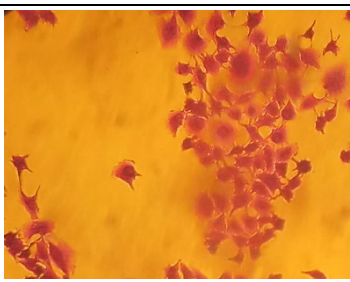
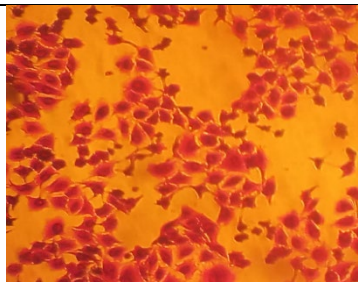
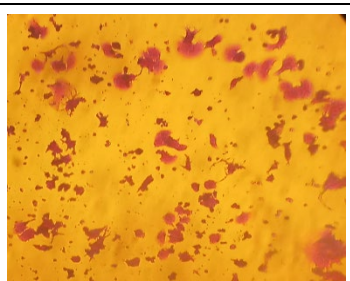
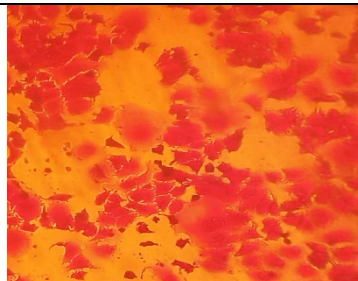
3.5.2.4. Đánh giá khả năng kháng tế bào ung thư của dịch chiết LHT

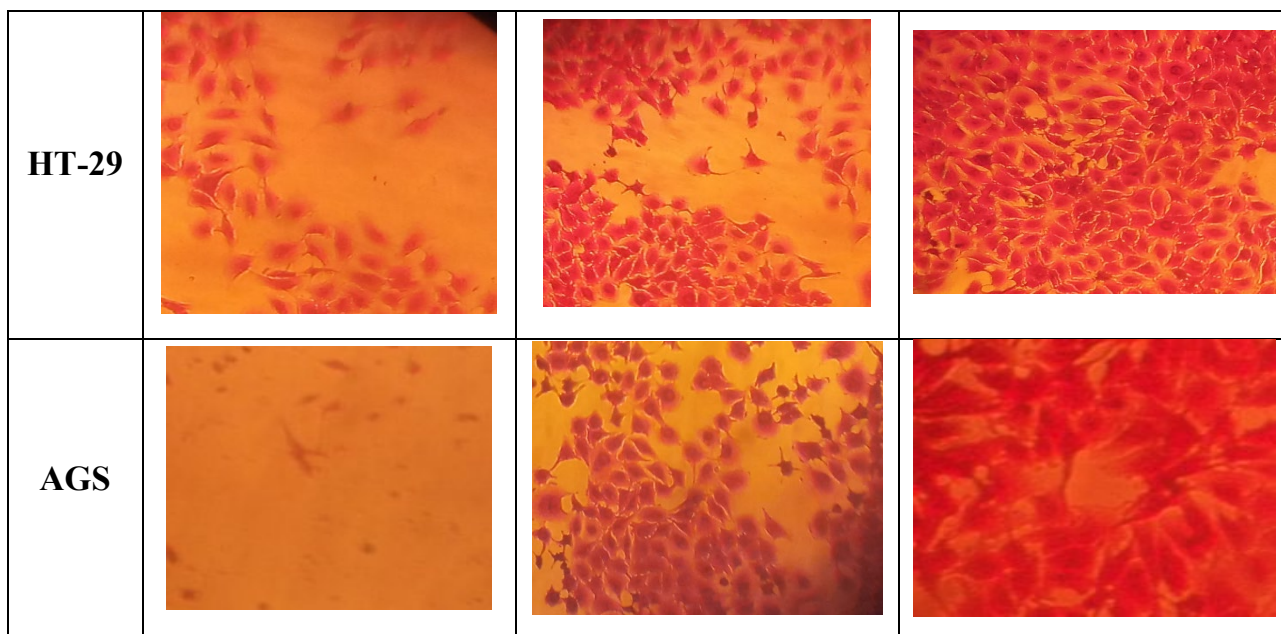
Dịch chiết LHT được thử trên 6 dòng tế bào ung thư ở các nồng độ khác nhau, kết quả được thể hiện ở bảng 3.17 và hình 3.17

Bảng 3. 17. Khả năng gây độc tế bào của dịch chiết LHT trên các dòng tế bào ung thư

Nồng độ ($\mu\text{g/ml}$)	Tỷ lệ ức chế tế bào ung thư					
	LHT					
	HepG2	A549	MCF7	HT-29	SK-Mel-2	AGS
100	75.71	67.98	64.03	74.51	79.08	62.90
20	19.29	11.22	16.28	21.95	22.74	23.80
4	13.35	2.72	4.69	10.89	9.53	1.25

0.8	-1.14	-0.67	-4.52	1.39	4.58	-0.73
IC ₅₀	59.07±3.13	76.26±6.82	72.27±2.94	58.12±3.03	56.25±2.85	68.34±5.15
Nồng độ (µg/ml)	Ellipticine (chất đối chứng)					
	HepG2	A549	MCF7	HT-29	SK-Mel-2	AGS
10	96.07	92.62	86.13	97.24	96.01	93.19
2	79.38	86.61	75.17	77.05	82.77	80.63
0.4	51.22	49.25	51.22	51.56	49.41	48.94
0.08	24.08	21.04	24.32	26.15	21.06	24.03
IC ₅₀	0.39± 0.04	0.41± 0.05	0.38± 0.03	0.38± 0.02	0.42± 0.05	0.41± 0.03

Tế bào	Nồng độ 100 µg/ml	Nồng độ 20µg/ml	Nồng độ 0,8 µg/ml
HepG2			
A549			
MCF7			



Hình 3. 17. Hình ảnh tế bào ung thư bị ức chế bởi dịch chiết LHT

Kết quả bảng 3.17 và hình 3.17 ta thấy:

Hoạt tính ức chế tế bào ung thư của dịch chiết LHT ức chế với tế bào ung thư rất tốt với giá trị IC₅₀ từ 56,25 đến 76,26. Trong đó, thể hiện tốt nhất với dòng tế bào ung thư da (SK-Mel2) và ung thư ruột (HT29) với IC₅₀ 58,12. Ung thư gan (HepG2) với IC₅₀ là 59,07 và có thể ức chế được 75,71% tế bào ung thư ở nồng độ 100, µg/ml. Khả năng ức chế tế bào ung thư kém hơn ở dòng tế bào ung thư phổi A549 với IC₅₀ 76,26 và ung thư vú MCF7 với IC₅₀ là 72,27.

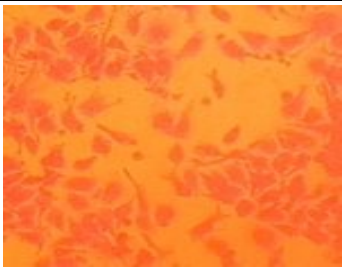
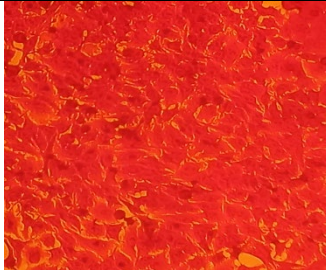
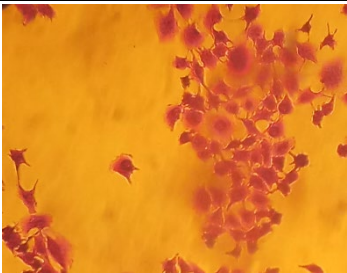
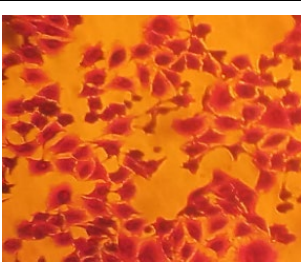
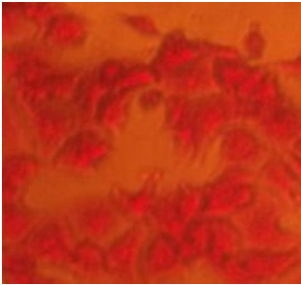
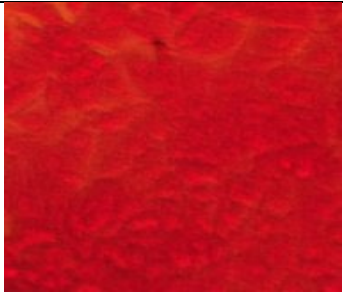
3.5.2.5. *Đánh giá khả năng kháng tế bào ung thư của dịch chiết NHT*

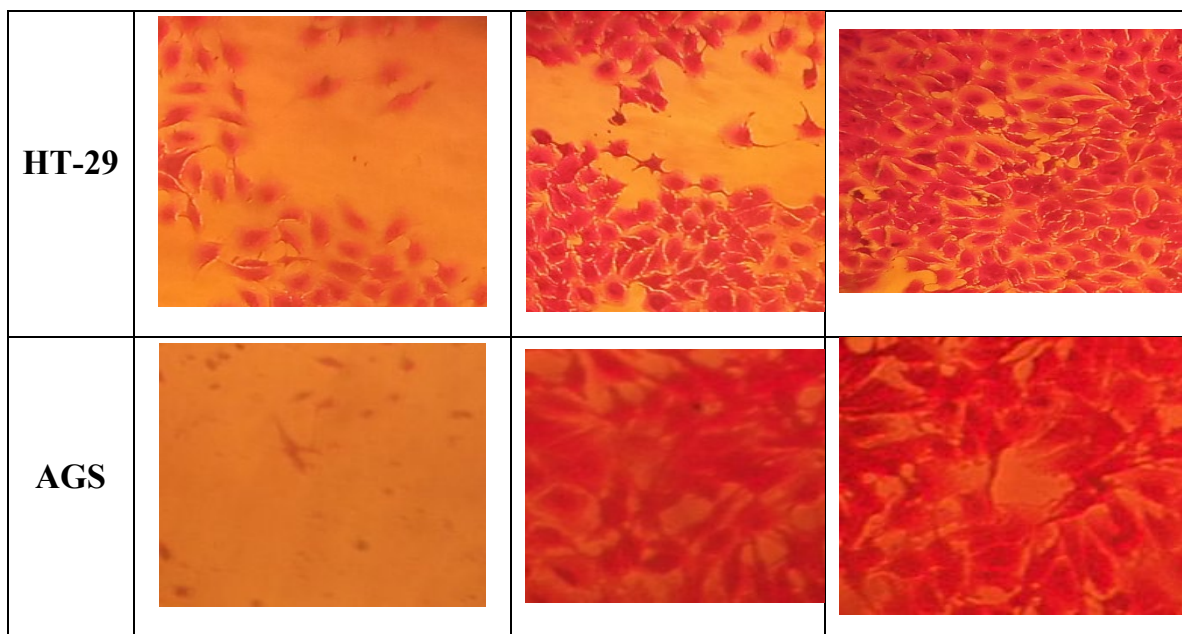
Dịch chiết NHT được thử trên 6 dòng tế bào ung thư ở các nồng độ khác nhau, kết quả được thể hiện ở bảng 3.18 và hình 3.18

Bảng 3. 18. Khả năng gây độc tế bào của dịch chiết NHT trên các dòng tế bào ung thư

Nồng độ (µg/ml)	Tỷ lệ ức chế tế bào ung thư					
	NHT					
	HepG2	A549	MCF7	HT-29	SK-Mel-2	AGS
100	83.80	68.46	77.68	88.47	88.79	74.33
20	33.38	29.63	24.14	22.67	23.57	25.12
4	7.07	5.80	7.56	10.60	18.71	13.48

0.8	2.42	1.36	-1.70	6.73	4.83	1.30
IC ₅₀	54.04± 4.29	58.01± 4.27	57.68± 2.88	59.37± 3.89	64.73± 3.45	56.09± 2.37
Nồng độ (µg/ml)	Ellipticine (chất đối chứng)					
	HepG2	A549	MCF7	HT-29	SK-Mel-2	AGS
10	96.07	92.62	86.13	97.24	96.01	93.19
2	79.38	86.61	75.17	77.05	82.77	80.63
0.4	51.22	49.25	51.22	51.56	49.41	48.94
0.08	24.08	21.04	24.32	26.15	21.06	24.03
IC₅₀	0.39± 0.04	0.41± 0.05	0.38± 0.03	0.38± 0.02	0.42± 0.05	0.41± 0.03

Tế bào	Nồng độ 100 µg/ml	Nồng độ 20µg/ml	Nồng độ 0,8 µg/ml
HepG2			
A549			
MCF7			



Hình 3. 18. Hình ảnh tế bào ung thư bị ức chế bởi dịch chiết NHT

Từ kết quả bảng 3.18 và hình 3.18 cho thấy : Hoạt tính ức chế tế bào ung thư của dịch chiết NHT ức chế với tế bào ung thư rất tốt với giá trị IC₅₀ từ 54,04 đến 64,73. Trong đó, thể hiện tốt nhất với dòng tế bào ung thư gan (HepG2) và tế bào ung thư dạ dày với IC 54,04 và 56,09. Ung thư gan (HepG2) với IC₅₀ là 54,04 và có thể ức chế được 83,8% tế bào ung thư ở nồng độ 100 µg/ml.

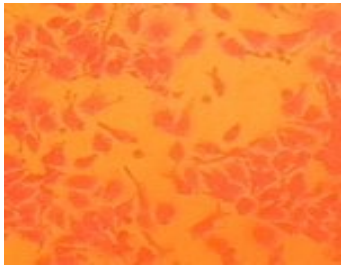
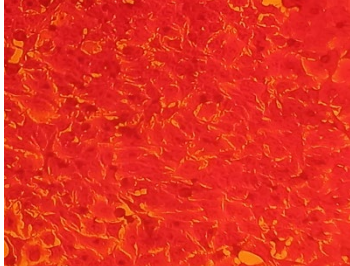
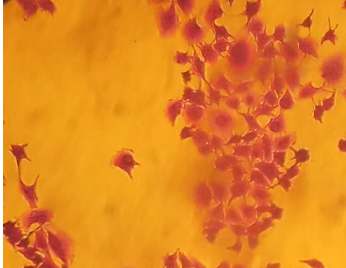
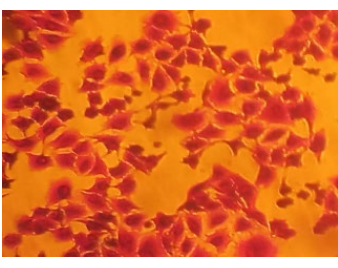
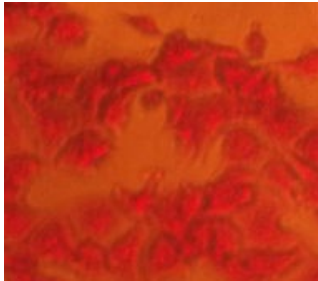
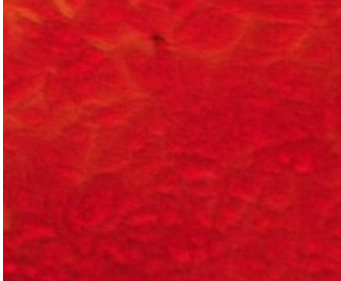
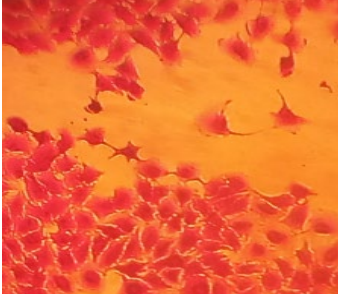
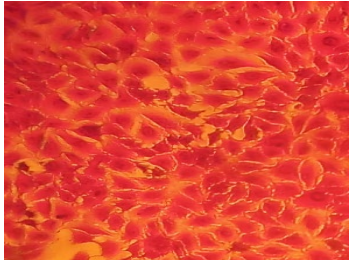
3.5.2.6. *Đánh giá khả năng kháng tế bào ung thư của dịch chiết NVQ*

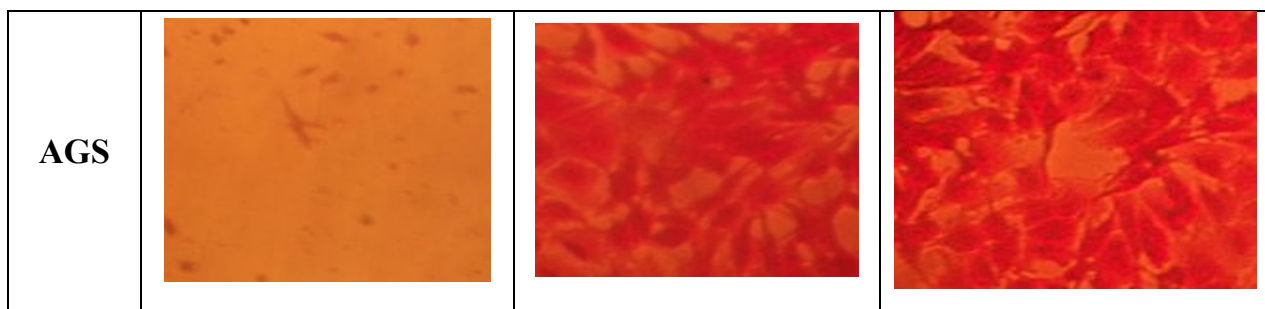
Dịch chiết NVQ được thử trên 6 dòng tế bào ung thư ở các nồng độ khác nhau, kết quả được thể hiện ở bảng 3.19

Bảng 3. 19. Khả năng gây độc tế bào của dịch chiết NVQ trên các dòng tế bào ung thư

Nồng độ (µg/ml)	NVQ					
	HepG2	A549	MCF7	HT-29	SK-Mel-2	AGS
100	71.71	60.98	61.03	70.51	72.06	61.90
20	19.29	11.22	16.28	21.95	22.74	13.70
4	13.35	2.72	4.69	10.89	9.53	1.05
0.8	-1.12	-0.66	-4.51	1.38	4.52	-0.70
IC₅₀	69.07±3.12	86.26±6.32	82.26±2.64	68.12±3.04	66.45±2.35	78.14±5.18
	Ellipticine (chất đối chứng)					
10	96.07	92.62	86.13	97.24	96.01	93.19

2	79.38	86.61	75.17	77.05	82.77	80.63
0.4	51.22	49.25	51.22	51.56	49.41	48.94
0.08	24.08	21.04	24.32	26.15	21.06	24.03
IC₅₀	0.39± 0.04	0.41± 0.05	0.38± 0.03	0.38± 0.02	0.42± 0.05	0.41± 0.03

Tế bào	Nồng độ 100 µg/ml	Nồng độ 20µg/ml	Nồng độ 0,8 µg/ml
HepG2			
A549			
MCF7			
HT-29			



Hình 3. 19. Hình ảnh tế bào ung thư bị ức chế bởi dịch chiết NVQ

Từ kết quả bảng 3.19 cho thấy : Hoạt tính ức chế tế bào ung thư của dịch chiết NVQ ức chế với tế bào ung thư rất tốt với giá trị IC₅₀ từ 66,45 đến 86,26. Trong đó, thể hiện tốt nhất với thể hiện tốt nhất với dòng tế bào ung thư da (SK-Mel2) với IC₅₀ là 66,45. Tế bào ung thư da (SK-Mel2) có thể ức chế được 72,06% tế bào ung thư ở nồng độ 100 µg/ml.

BÀN LUẬN

Trong vòng hai thập kỉ gần đây, xu hướng quay lại sử dụng các sản phẩm thuốc có nguồn gốc thảo dược để phòng và trị bệnh trở nên phổ biến. Dược điển các nước khu vực châu Á như Việt Nam, Hàn Quốc, Trung Quốc, Nhật Bản đều có các chuyên đề về dược liệu. Theo ước tính, 70% dân số toàn cầu vẫn sử dụng thuốc từ dược liệu trong chăm sóc sức khỏe ban đầu tại cộng đồng.

Trên thế giới, đã phát hiện được 265.000 loài thực vật. Trong đó có 150.000 loài được phân bố ở các vùng nhiệt đới, 35.000 loài có ở các nước ASEAN. Trong số này có ít nhất 6.000 loài được dùng làm thuốc. Các loài thực vật có chứa khoảng 5 triệu hợp chất hóa học. Cho tới nay, đã có 1.300 cây được nghiên cứu một cách có hệ thống về thành phần hóa học và giá trị chữa bệnh. Thuốc từ dược liệu được sử dụng không chỉ các nước Á Đông mà còn được tiêu thụ một lượng khá lớn ở các nước Phương Tây. Tại Mỹ năm 1980 giá trị số thuốc đó lên tới 8 tỉ đô la, tại thị trường Châu Âu lượng thuốc đông dược tiêu thụ cũng lên tới 2,3 tỉ đô la. Nhiều biệt dược đông dược của Trung Quốc được tiêu thụ mạnh ở các nước phát triển.

Nguồn tài nguyên cây cỏ và tri thức sử dụng cây cỏ làm thuốc là cơ sở quan trọng để sàng lọc và tìm ra thuốc mới. Hướng nghiên cứu này đang rất được coi trọng ở các nước có nền y học tiên tiến như Mỹ, Pháp, Nhật Bản, Trung Quốc.

Hợp chất thiên nhiên và các dẫn xuất có nguồn gốc từ thiên nhiên hoặc được tách chiết từ sinh vật sống trong tự nhiên, có thể có hoạt tính sinh học hoặc có tác dụng dược học dùng để bảo vệ, chăm sóc sức khỏe. Trong hệ thống y học hiện đại, các HCTN như saponin, tannin, ancaloit, alkenyl phenol, glycoalkaloid, flavonoid, sesquiterpenes lacton, terpenoit và este phorbol và nhiều loại khác cũng đã chứng tỏ khả năng chữa trị những bệnh khác nhau. Những thành công trong nghiên cứu hợp chất thiên nhiên đã thúc đẩy Viện Nghiên Cứu Ung thư Quốc gia (National Cancer Institute, NCI) của Hoa Kỳ khởi động dự án khảo sát hợp chất thiên nhiên trong điều trị ung thư vào những năm 1960. Một trong những hợp chất quan trọng được tìm thấy hiện nay là Paclitaxel (Taxol), chiết xuất từ cây thông đỏ. Không dừng lại ở đó, vào năm 1985, NCI tiếp tục khởi động dự án nghiên cứu liên quan đến hợp chất thiên nhiên. Dự án này đã mở rộng các chủng loại dược liệu nghiên cứu bao gồm thực vật, động vật, vi sinh vật và đặc biệt quan tâm đến các loại dược liệu có nguồn gốc từ sinh vật biển. Đây là bước

khởi đầu cho các nghiên cứu về hợp chất thiên nhiên có nguồn gốc từ sinh vật biển, một hướng mới đang thu hút được sự quan tâm hiện nay. Bên cạnh việc mở rộng các chủng loại thực vật, NCI mở rộng các dòng tế bào ung thư bao gồm cả các dòng ung thư khối u (ung thư phổi, ung thư vú, ung thư não..) và một vài dòng ung thư máu. Trong 5 năm đầu tiên của dự án, 100.000 mẫu vật liệu đã được kiểm tra bao gồm dịch chiết và hợp chất được phân lập, có hơn 60 dòng tế bào đã được khảo sát.

Trong các loại dược liệu trà hoa vàng được hơn 120 nhà khoa học trên thế giới khẳng định với các công trình nghiên cứu khác nhau. Trong đó, dược liệu có tới 33.8% hoạt chất có tác dụng ức chế và làm giảm quá trình phát triển của tế bào gây ung thư. Bên cạnh đó, trà còn chứa một số nguyên tố vi lượng khác như Se, Ge, Mo, Mn, V, Zn, acid amin... Các hợp chất như Polysaccharide, Polyphenol, Saponin, Flavonoids kết hợp với các nguyên tố vi lượng Selen, Germanium, Molybden, Vanadium, vitamin C, vitamin E... có trong cây thuốc có chống oxy hóa, ức chế gốc tự do, cân bằng chuyển hóa rất hiệu quả. Đặc biệt, hoạt chất EGCG trong trà được chứng minh có tác dụng mạnh gấp 200 lần so với vitamin E, hiệu quả gần 90% trong việc hạn chế sạm da.

Theo các nghiên cứu, các hợp chất polyphenol, polysaccharide trong trà có tác dụng giảm cholesterol máu, ngăn ngừa sự tổng hợp các acid béo trong cơ thể. Từ đó, hỗ trợ ổn định huyết áp, cải thiện tuần hoàn máu, chống huyết khối, ngăn ngừa các bệnh về tim mạch. Với tình trạng xơ cứng động mạch do lượng mỡ trong máu cao thì sử dụng các chế phẩm từ trà hoa vàng là bí quyết chữa trị rất có hiệu quả. Nếu kiên trì sử dụng trong khoảng 20 ngày những biểu hiện bệnh lý sẽ giảm hẳn. Các hoạt chất trong lá trà làm giảm tổng hàm lượng lipid trong huyết thanh máu, tăng cholesterol tốt và giảm cholesterol xấu, giảm 35% hàm lượng mỡ máu trong khi nếu dùng các loại thuốc khác thì chỉ giảm 33,2%.

Theo nghiên cứu, lá trà có tác dụng điều hòa lượng đường trong máu, cải thiện bệnh tiểu đường. Lý do là bởi các hợp chất chống oxy hóa trong trà có tác dụng dọn dẹp gốc tự do, giúp cải thiện các biến chứng của tiểu đường. Đồng thời, các hợp chất có tác dụng cân bằng chuyển hóa trong cơ thể, thúc đẩy quá trình trao đổi chất, đốt cháy mỡ béo. Do đó, đây là thức uống tốt cho người tiểu đường.

1. Định tính, định lượng và vai trò của các nhóm chất hóa học

Mỗi loại thực vật trong cùng một chi nhưng sự khác nhau về loài và vùng phân bố sẽ có sự sai khác về thành phần và hàm lượng các chất hoá học trong đó, do vậy để đánh giá giá trị của loài đó, việc khảo sát thành phần hoá học là rất cần thiết. Các kết quả nghiên cứu này là cơ sở cho việc nghiên cứu các hoạt tính sinh học có trong loài đó. Để xác định các chất hóa học có trong trà hoa vàng, các phản ứng hóa học với các chất thử, sắc ký lớp mỏng (TLC) và sắc ký lỏng hiệu năng cao đã được sử dụng để định tính và định lượng. Những phương pháp này được thực hiện đơn giản, kinh tế và nhanh gọn, được ứng dụng trong nhận dạng một hợp chất đã biết và phát hiện sự có mặt của nhiều loại hợp chất khác trong cây cỏ, ví dụ như phenols, steroids, alkaloid, flavonoid, và coumarin.

Qua các kết quả định tính flavonoid có trong mẫu trà hoa vàng trên hình 3.1, 3.2 và bảng 3.3 cho thấy, mẫu thử đã có phản ứng dương tính với 3 loại thuốc thử là cyanidin, FeCl_3 , dung dịch kiềm và thể hiện qua sắc ký đồ định tính quan sát thấy vết phát quang sáng hơn trước khi phun thuốc thử. Kết quả này cũng được khẳng định thông qua nghiên cứu của loài trà hoa vàng Thái Nguyên [10]. Nhóm Flavonoid đặc biệt các chất như rutin, queratin,.. Đã được Wei, J. B (2013) nghiên cứu trong môi trường invitro và được đánh giá có tác dụng chính trong chống oxy hóa [37].

Coumarin được biết đến là chất kích thích các đại thực bào để làm giảm albumin ngoại bào, cho phép tái hấp thu nhanh hơn các chất lỏng phù nề, làm săn lớp niêm mạc. Tuy nhiên, coumarin độc hại vừa phải đối với gan và thận, với (LD_{50}) là 275 mg / kg, độc tính thấp so với các hợp chất liên quan [59]. Qua kết quả định tính thông qua phản ứng ống nghiệm cho thấy cả 4 mẫu thử đều cho ra kết quả âm tính trong phản ứng mở, đóng vòng lacton và cho kết quả dương tính trong phản ứng với thuốc thử diazo. Qua kết quả thí nghiệm kết luận trong 2 loài trà hoa vàng đều không chứa coumarin. Kết quả này cũng tương tự với nghiên cứu trên đối tượng trà hoa vàng Thái Nguyên của nhóm tác giả trường Đại học dược Hà Nội [10].

Theo nghiên cứu của Manach và các cộng sự cho thấy các gốc tự do được sinh ra và tích lũy trong cơ thể, là nguyên nhân dẫn đến sự suy giảm về sức khỏe, gây ra nhiều loại bệnh ở người và làm tăng tốc độ quá trình lão hoá cơ thể con người. Hợp chất trong Tanin trong trà có tác dụng khử các gốc tự do ở mức độ cao như Axit Gallic và Isoflavones có thể hấp thụ khoảng 5% các gốc tự do cao. Các hợp chất tanin

có rất nhiều trong nhiều loài thực vật, chúng có vai trò bảo vệ khỏi bị các loài ăn chúng, và có lẽ cũng có tác dụng như thuốc trừ sâu, và điều hòa sinh trưởng của thực vật [41]. Tuy nhiên, tanin là chất gây nên vị chát đối với trà, nếu phân tích có nhiều tanin trong trà gây ảnh hưởng đến hương vị của trà. Từ những vai trò của nhóm tanin, thông qua kết quả định tính hàm lượng nhóm tanin trong trà hoa vàng Hà Tĩnh và Vũ Quang nằm ở bộ phận lá. Đối chiếu với trà hoa vàng Yên Ninh, Thái Nguyên, thông qua các phản ứng định tính thành phần tanin cũng chứa ở trong lá trà [10].

Saponin là nhóm chất có hàm lượng nhiều trong trà xanh. Dựa vào nghiên cứu Tingting và cộng sự đã chứng minh nhóm chất saponin đóng vai trò quan trọng trong hoạt động chống khối u. Thông qua kết quả định tính cả 6 mẫu chiết từ 2 loài trà hoa vàng đều có kết quả dương tính trong phản ứng Salkowski và quan sát cả 6 ống nghiệm đều có hiện tượng sủi bọt. Đồng thời qua kết quả sắc ký đồ ở hình 3.6 kết luận thành phần saponin đều có ở trong bộ phận lá, hoa, nụ của 2 loài trà. Kết quả này cũng được nghiên cứu ở trà hoa vàng Thái Nguyên cho thấy trong trà có chứa saponin ở mẫu lá trà [10].

Từ kết quả định tính ở hình 3.7 và bảng 3.7 cho thấy cả 6 mẫu cao đều có phản ứng dương tính với thuốc thử Fehling, điều này cho thấy trong 2 loài trà hoa vàng ở vườn quốc gia Vũ Quang đều có thành phần đường khử.

Polisaccharide theo nghiên cứu trong lá Trà hoa vàng có tác dụng giảm hàm lượng lipid máu; giảm cholesterol, triglycerid và LDL đồng thời cải thiện hàm lượng HDL trên động vật thực nghiệm và nghiên cứu của Tingting và cộng sự về khả năng chống lại khối u. Qua kết quả định tính với thuốc thử Lugol cả 6 mẫu cao chiết đều có kết quả dương tính, cho thấy trong 2 loài trà hoa vàng đều chứa thành phần polysaccharide. Kết quả này cũng tương tự ở trong trà hoa vàng Thái Nguyên [10].

Qua kết quả định tính ở bảng 3.9 và hình 3.9 cả 6 mẫu chiết đều không có phản ứng dương tính với thuốc thử Nynhidrin. Kết quả này cho thấy trong cả 2 loài trà hoa vàng phân bố ở Hà Tĩnh đều không có thành phần acid amin. Trong nghiên cứu loài trà hoa vàng Thái Nguyên của nhóm tác giả đại học dược Hà Nội và trà hoa vàng Ba Chẽ lại có thành phần acid amin. [15].

Theo nghiên cứu Karan Vasisht và cộng sự caffein trong nhóm chất alkaloid là thành phần chứa nhiều trong trà xanh, là chất gây nghiện, ảnh hưởng đến hệ thần kinh. Qua kết quả định tính ở hình 3.10 và bảng 3.10 kết luận cả 6 mẫu cao chiết đều

phản ứng âm tính với 3 thuốc thử Mayer, Bouchardat và Dragendorff cho thấy cả 2 loài trà hoa vàng đều không chứa thành phần alcoloid. Kết quả này cũng tương tự với kết quả của Lixa Song và cộng sự khi nghiên cứu trên 6 mẫu trà hoa vàng Trung Quốc bao gồm: *C. chrysantha*, *C. euphlebia*, *C. microcarpa*, *C. nitidissima*, *C. tunghinensis* và *C. impressinervis* [50]. Đặc tính này rất tốt nhằm sử dụng Trà hoa vàng để uống mà không ảnh hưởng đến hệ thần kinh như Trà xanh, có thể tận dụng lợi thế này của Trà hoa vàng để sử dụng thay thế Trà xanh

EGCG là nhóm chất có tính kháng oxi hóa và chống khối u hiệu quả. Qua sắc kí đồ định tính theo phương pháp HPLC, cho thấy pic và thời gian lưu của mẫu thử EGCG và 6 mẫu cao chiết không khớp nhau. Kết quả này cho thấy cả 6 mẫu thử đều không có hàm lượng EGCG. EGCG được biết là nhóm chất chủ yếu trong trà xanh nhưng theo kết luận và nghiên cứu của tác giả Trần Văn Ôn trong lá và hoa Trà hoa vàng Ba Chẽ, Quảng Ninh cũng không có EGCG, chỉ có nhóm polyphenol tổng cấu trúc gần tương tự [15]. Kết quả của chúng tôi cũng phù hợp với kết quả đã công bố cho Wang et al. (2016) người đã báo cáo về catechin và hoạt tính sinh học của *C. Sasanqua* [51]

Polyphenol là thành phần chính trong chè, chiếm từ 20 đến 30% trọng lượng khô của chè, trong đó catechin là nhóm chiếm ưu thế với 60–80% tổng số polyphenol. Các nghiên cứu và kết quả nghiên cứu trên động vật thí nghiệm đã cho thấy tiềm năng chống độc của polyphenol, polyphenol trong trà hoạt động như chất chống oxy hóa trong ống nghiệm bằng cách loại bỏ oxy phản ứng và các loại nitơ các ion kim loại và do đó trà có thể làm giảm nguy cơ mắc các bệnh bao gồm cả ung thư và bệnh tim mạch vành. Theo kết quả bảng 4 từ nghiên cứu của Zhang H và cộng sự đưa ra tổng số polyphenol trong lá, hoa và chồi của *C. vuquangensis* và *C. hatinhensis* nằm trong khoảng từ 319,3 đến 342,6 (mg GAE / g), có thể so sánh với tổng số polyphenol của các bộ phận khác nhau của *C. Sinensis* và thấp hơn hoa *C. nitidissima*.

Dựa vào kết quả định lượng ở bảng 3.11, 3.12 và hình ảnh về phổ hấp thụ và phương trình đường chuẩn ở hình 3.13 cho thấy mối quan hệ giữa mật độ quang và nồng độ chất chuẩn là tuyến tính trong khoảng nồng độ khảo sát với hệ số tương quan $R^2=0,99699 > 0,99$. Vì vậy, khoảng nồng độ khảo sát phù hợp để định lượng polyphenol toàn phần trong 2 mẫu trà hoa vàng vũ quang và trà hoa vàng hà tĩnh. Bảng định lượng cho thấy hàm lượng polyphenol có trong mẫu cao lá hoa vàng hà tĩnh

là nhiều nhất. So sánh với kết quả định lượng polyphenol bằng phương pháp đo quang cho thấy trong trà hoa vàng Thái Nguyên cho thấy hàm lượng polyphenol có trong lá trà là 6,7 % [10].

Bảng 4. Tổng hàm lượng polyphenol đã được báo cáo trước đây [58]

Loài	Bộ phận	Dung môi	Hàm lượng polyphenol tổng số (mg GAE/g)
<i>Camellia sinensis</i>	Lá mềm	Nd*	234.35
	Trà xanh	70% MeOH	210.2-143.2
	Trà xanh	70% MeOH	108.8-323.6
	Lá	95% EtOH	355.26-457.89
	Búp tươi	100% MeOH	258.23-304.73
	Lá	100% MeOH	152-223
	Chồi non	70% MeOH	167.2-204.2
	Hai lá tươi và một chồi	70% MeOH	266.33-266.49
	Lá	H ₂ O	20.7-36
	Trà xanh	H ₂ O	51.20
	Lá và chồi	50% MeOH	25.8 -98.2
	Lá tươi	70% MeOH	235.47
	Lá héo để trong nhà	70% MeOH	203.47
	Lá héo phơi ngoài trời	70% MeOH	158.45
	Trà xanh	H ₂ O	112.3
	Lá non	75% EtOH	329.395
	Chồi	75% EtOH	346.219
	Lá	60% EtOH	352.2
	Lá	40% EtOH	104.03-290.09
	Một chồi với hai lá	50% MeOH	173.90-201.04
<i>Camellia oleifera</i>	Lá	70% MeOH	125.51-136.34
	Vỏ	70% Acetone	42.52-234.90
<i>Camellia nitidissima</i>	Hoa	Dichloromethane fraction	85.02
		Ethyl acetate fraction	345.14
		<i>n</i> -Butanol fraction	164.19
		Water fraction	31.69
		95% EtOH	170.74
	Lá	10% EtOH	34.47

	Hoa	90% EtOH to 95% EtOH	550
	Lá	H ₂ O	8.36
	Lá	Acetone/ethanol/water (AEW; 2:2:1, v/ v/v)	152.2
<i>Camellia nitidissima</i> var. <i>microcarpa</i>	Lá	H ₂ O	8.61
<i>Camellia murauchii</i>	Lá	H ₂ O	10.30
<i>Camellia impressinervis</i>	Lá	H ₂ O	9.70
	Lá	Acetone/ethanol/water (AEW; 2:2:1, v/ v/v)	475.6
<i>Camellia euphlebia</i>	Lá	H ₂ O	9.70
	Lá	Acetone/ethanol/water (AEW; 2:2:1, v/ v/v)	257.8
<i>Camellia tungghinensis</i>	Lá	H ₂ O	5.87
	Lá	Acetone/ethanol/water (AEW; 2:2:1, v/ v/v)	67.2
<i>Camellia microcarpa</i>	Lá	Acetone/ethanol/water (AEW; 2:2:1, v/ v/v)	201.1
<i>C. chrysantha</i>	Lá	Acetone/ethanol/water (AEW; 2:2:1, v/ v/v)	138.2
<i>Camellia ptilophylla</i>	Chồi non	MeOH	280.74
<i>Camellia kucha</i>	Chồi non	MeOH	234.08

Như vậy, so sánh với các nghiên cứu của các loài thuộc chi trà nói chung và giữa các loài trà hoa vàng nói riêng nhận thấy 2 loài trà hoa vàng *camellia hatinhensis* và *camellia vuquangensis* về cơ bản đều có sự xuất hiện của các nhóm chất chính như flavonoid, polyphenol , polysaccharide, saponin,.. đây là các nhóm chất có vai trò quan trọng như kháng oxi hóa, kháng ung thư, kháng khuẩn,.. . Mặc dù Trà hoa vàng ở vườn quốc gia Vũ Quang có thành phần các nhóm chất tương tự với loài thuộc chi trà khác nhưng lại có 1 số thành phần khác nhau giữa trà hoa vàng và trà xanh (không chứa chất alcaloid, coumarin). Đặc tính này mở ra lý do vì sao Trà hoa vàng có giá trị kinh tế và chữa bệnh vượt trội hơn đặc biệt so với trà xanh và cần được nghiên cứu sâu hơn.

2 Chất chống oxy hóa và hoạt tính kháng oxy hóa ở 2 loài trà hoa vàng

Chất chống oxy hóa là chất mà khi có mặt của nó ở nồng độ thấp giúp ngăn chặn hoặc làm chậm quá trình oxy hóa chất khác. Sự oxy hóa là loại phản ứng hóa học trong đó electron được chuyển sang chất oxy hóa, có khả năng tạo các gốc tự do sinh ra phản ứng dây chuyền phá hủy tế bào sinh vật. Chất chống oxy hóa ngăn quá trình phá hủy này bằng cách khử đi các gốc tự do, kìm hãm sự oxy hóa bằng cách oxy hóa chính chúng. Để làm vậy người ta hay dùng các chất khử [44]. Chất khử hay còn gọi là chất chống oxy hóa gồm có 2 loại chính bao gồm: chất khử tự nhiên có thể là hợp chất phenolic (flavonoid, acid phenolic), hợp chất nito (amino acid, alcaloids) và chất khử tổng hợp (butyllated hydroxyanisole). Vào cuối thế kỉ XIX đầu thế kỉ XX, chất khử tổng hợp được nghiên cứu và sử dụng nhiều. Tuy nhiên, việc sử dụng các chất chống oxy hóa tổng hợp cần hạn chế vì có khả năng gây ung thư. Hiện nay thế giới đang đi tìm hoạt chất kháng oxy hóa tự nhiên cao đã được khẳng định và thể hiện công trình nghiên cứu qua các loài trà của các tác giả Tuyama (năm 2014), Huang XC (1994) và nghiên cứu của Wang Bin và cộng sự (năm 2018).

Quá trình peroxy hóa lipid là nguyên nhân gây ra tổn thương màng bao gồm lắp ráp, thành phần, cấu trúc và động lực của màng lipid [61]. Sự phân hủy của các sản phẩm được tạo ra trong quá trình peroxy hóa có thể gián tiếp làm hỏng các thành phần khác của tế bào [Desai, S. N., Farris, F. F., & Ray, S. D. (2014). Sự peroxy hóa lipid.]. Các nghiên cứu trước đây đã xác nhận quá trình peroxy hóa lipid là nguyên nhân gây ra các bệnh về não và hệ thần kinh trung ương. viêm khớp dạng thấp, rối loạn chức năng thận, thoái hóa mắt và đái tháo đường [Desai, S. N., Farris, F. F., & Ray, S. D. (2014). Sự peroxy hóa lipid.]. Thử nghiệm hoạt tính chống oxy hóa thông qua ức chế peroxy hóa lipid màng (thử nghiệm MDA) được thực hiện theo phương pháp được mô tả bởi Stroev và Makarova (1989), và Badmus (2011) với sự khác biệt nhỏ [24]. Khả năng ức chế quá trình peroxy hóa lipid của mẫu được xác định bằng cách xác định hàm lượng malondialdehyde (MDA), là sản phẩm của quá trình peroxy hóa lipid màng. Phương pháp MDA được thực hiện trên não chuột có ưu điểm chính xác hơn so với phương pháp DPPH thực hiện trên trà hoa vàng Thái Nguyên,. Phương pháp DPPH mới chỉ định tính được trong mẫu có sự ức chế oxy hóa diễn ra.

Trà hoa vàng ở vườn quốc gia Vũ Quang là loài mới phát hiện chưa được nghiên cứu hoạt tính chống oxi hóa, qua bảng số liệu khi nghiên cứu qua lá, hoa, nụ, Kết quả nghiên cứu ở bảng 3.13 cho thấy, khả năng chống oxi hóa cao thể hiện qua giá trị $[[IC]]_{(50)}$ các chỉ số từ 7.92 - 17.45 $\mu\text{g/ml}$, trong đó giá trị $[[IC]]_{(50)}$ ở Trà hoa vàng vũ quang cao hơn Trà hoa vàng hà tĩnh cho thấy mẫu cao chiết ở Trà hoa vàng hà tĩnh có hoạt tính chống oxi hóa mạnh hơn. Trà hoa vàng vũ quang phân bố ở vị trí địa lý thấp hơn, chúng tôi cho rằng từ đó có sự ảnh hưởng dẫn đến sự khác biệt về hàm lượng chất chống oxi hóa giữa 2 loài trà.

3. Hoạt tính kháng ung thư ở 2 loài trà hoa vàng

Ung thư là căn bệnh toàn cầu, báo cáo mới nhất của WHO (2018) đã ghi nhận 18,1 triệu trường hợp mắc ung thư mới và 9,6 triệu trường hợp tử vong trên toàn thế giới [52]. Ung thư vú là nguyên nhân hàng đầu gây tử vong do ung thư ở phụ nữ [27]. Năm 2020, có 685 000 ca tử vong trên toàn cầu trong tổng số 2,3 triệu phụ nữ được chẩn đoán mắc bệnh ung thư vú [52]. Trong khi đó, tỷ lệ ung thư vú ở 5 giới chiếm 0,5-1% tổng số ca bệnh [52]. Ung thư gan là bệnh phổ biến nhất ung thư trên toàn cầu, chiếm 9,1% tổng số ca tử vong do ung thư, với hơn 80% số ca được chẩn đoán ở các nước kém phát triển [53]. Hàng năm có khoảng 1,2 triệu ca ung thư đại tràng mới và khoảng 600.000 ca tử vong [57]. Năm 2018, ung thư dạ dày là nguyên nhân của 784.000 ca tử vong, ước tính có khoảng 1 triệu ca mắc mới mỗi năm [47]. Khoảng 2 đến 3 trường hợp mới được chẩn đoán mắc bệnh ung thư da không phải khối u ác tính, của bệnh ít nhất 132.000 khối u ác tính được chẩn đoán trên toàn cầu mỗi năm [55].

Ung thư đang đang là căn bệnh có tốc độ phát triển nhanh và gây tử vong cao ở Việt Nam cũng như trên thế giới. Hiện nay có rất nhiều phương pháp điều trị ung thư như: hóa trị, xạ trị, điều trị đích. Tuy nhiên hóa trị, xạ trị gây tổn thương đến các tế bào lành, làm suy giảm miễn dịch, rụng tóc,..Chính vì thực trạng cấp bách trên, các nhà khoa học đã và đang nghiên cứu hợp chất có khả năng ức chế nhiều dòng ung thư khác nhau, ít tác dụng phụ, không gây ảnh hưởng đến các tế bào lành đang là ưu tiên hàng đầu. Hiện nay, các nhà khoa học đã quan tâm nhiều vào các hợp chất thiên nhiên có hoạt tính chống ung thư. Từ đó việc sử dụng các hợp chất thiên nhiên từ các bài thuốc dân gian cho đến việc sàng lọc các hợp chất có hoạt tính sinh học được mở rộng

trên quy mô lớn. Từ năm 1960 đến năm 1982, 35.000 loài thực vật đã được lấy mẫu và kiểm tra khả năng tiêu diệt dòng tế bào ung thư máu của chuột L1210 và P388 [18]. Dự án nghiên cứu về hợp chất thiên nhiên được khởi động năm 1985, vào 5 năm đầu tiên của dự án 100.000 mẫu vật liệu đã được kiểm tra bao gồm dịch chiết và hợp chất được phân lập, có hơn 60 dòng tế bào đã được khảo sát. Chương trình đã nhận diện được một loạt hợp chất có khả năng tiêu diệt các tế bào ung thư khối u. Trong 5 năm tiếp theo, từ 1990 đến 1995, dưới sự hỗ trợ của những bước tiến trong nghiên cứu về tế bào ung thư đã tạo nên tảng cho nghiên cứu cơ chế sinh học phân tử tương tác giữa hợp chất thiên nhiên và tế bào ung thư. Các dữ liệu thu thập được cung cấp một nguồn thông tin vô cùng quý giá đối với việc nghiên cứu các thuốc điều trị ung thư mới [4].

Kế thừa những thành công về các hợp chất thiên nhiên góp phần vào việc điều trị ung thư, các hợp chất trong trà hoa vàng theo nhiều nghiên cứu đã cho thấy 1 số hợp chất như EGCG, saponin, polyphenol có khả năng kiềm chế sự phát triển của khối u. So sánh với nghiên cứu hoạt tính sinh học ở trà hoa vàng Ba Chẽ, dịch chiết lá trà thể hiện tác dụng ức chế trung bình trên 3 tế bào ung thư gan (Hep-G2), ung thư trực tràng (SW480) , ung thư vú (MDA-BA-231) còn trong đề tài này thông qua kết quả nghiên cứu thể hiện ở các bảng từ 3.14 đến 3.19 cho thấy mẫu HVQ, HHT, LHT, NHT, NVQ thể hiện hoạt tính kháng ung thư tốt ở trên 6 tế bào: Tế bào ung thư vú (MCF7), tế bào ung thư phổi (A549), tế bào ung thư đại tràng (HT-29) ,tế bào ung thư gan (Hep-G2), tế bào ung thư dạ dày (AGS) , tế bào ung thư da (SK-Mel-2). Trong đó thông qua bảng kết quả nghiên cứu cho thấy hoạt tính kháng ung thư ở bộ phận nụ của 2 loài trà hoa vàng tốt hơn so với các bộ phận còn lại của cây trà. Cả 2 loài đều có hoạt tính kháng ung thư cao, đây là đặc tính rất tốt, làm cơ sở cho nghiên cứu , sản xuất thuốc điều trị ung thư. Tuy nhiên, kết quả thử nghiệm mới chỉ dừng lại ở môi trường invitro, chưa có nghiên cứu trên đối tượng động vật và người

KẾT LUẬN VÀ KIẾN NGHỊ

I. KẾT LUẬN

1. Đã chiết được dịch chiết tổng số của cao methanol 70% của lá và hoa 2 loài *Camellia hatinhensis* và *Camellia vuquangensis*. Khối lượng cao chiết thu được từ 47-390 g, với hiệu suất thu nhận của các mẫu trà từ 9,0 đến 12,8%. Trong đó hiệu suất cao thu được ở bộ phận hoa của 2 loài trà cao hơn các bộ phận còn lại.
2. Bằng các phương pháp định tính hóa học, sắc ký lớp mỏng, sắc ký lỏng hiệu năng cao và đo phổ hấp thụ, chúng tôi đã xác định được dịch chiết ethanol từ lá và hoa của các mẫu nghiên cứu có các nhóm chất flavonoid, saponin, tannin, đường khử và polysaccharid, nhưng không có EGCG.
3. Hàm lượng polyphenol tổng số trong các mẫu cao LHT là $942,40 \pm 4,05$ mg GAE/g, HHT là $577,78 \pm 3,84$ mg GAE/g, LVQ là $454,35 \pm 2,70$ mg GAE/g và HVQ tương ứng là $334,33 \pm 2,10$ mg GAE/g.
4. Bốn mẫu nghiên cứu đều có thể ức chế sự peroxy hóa lipid mạnh với giá trị IC₅₀ từ 7.92 - 17.45 $\mu\text{g/ml}$.
5. Các mẫu HVQ, HHT, LHT, NHT, NVQ đã thể hiện hoạt tính ức chế sự phát triển của các dòng tế bào ung thư nghiên cứu với giá trị IC₅₀ từ 11.97 - 92.28 $\mu\text{g/ml}$. Trong đó, dịch chiết của từ nụ của hai loài có hoạt tính cao hơn so với các bộ phận còn lại.

II. KIẾN NGHỊ

1. Đề tài mới chỉ dừng lại ở mức định tính các nhóm hợp chất. Vì vậy, cần tiếp tục mở rộng xác định rõ thành phần hóa học và cấu trúc các hợp chất để có cơ sở cho việc nghiên cứu chuyên sâu và sử dụng.
2. Tiếp tục đánh giá khả năng ức chế khối u trên đối tượng động vật thực nghiệm và thử độc tính cấp và thử độc tính bán trường diễn của cao còn hai loài Trà hoa vàng trên chuột nhắt bằng đường uống.
3. Loài trà hoa vàng có giá trị dược liệu và kinh tế cao, vì thế cần nâng cao việc bảo tồn tại địa phương.

Nghệ An, ngày 18 tháng 08 năm 2022

CÁN BỘ HƯỚNG DẪN

A handwritten signature in blue ink, consisting of a series of loops and a long horizontal stroke at the end.

TS.BS Vũ Văn Khoa

NGƯỜI THỰC HIỆN

A handwritten signature in blue ink, featuring a stylized 'H' and 'T' followed by a long horizontal stroke.

Võ Thị Quỳnh Trang

TÀI LIỆU THAM KHẢO

TÀI LIỆU TIẾNG VIỆT

1. Dược điển Việt Nam V, phụ lục 5.3
2. Dược điển Việt Nam V, phụ lục 5.4
3. Dược điển Việt Nam V, phụ lục 12.6, phương pháp 2
4. Đái Duy Ban, Lữ Thị Cẩm Vân (1995), Hỏi và đáp về bệnh ung thư, Nxb Y học, Hà Nội.
5. Lê Khả Kế, Võ Văn Chi, Vũ Văn Chuyên, Phan Nguyên Hồng, Trần (1974), Cây cỏ thường thấy ở Việt nam, NXB khoa học và kỹ thuật, Hà Nội
6. Lương Thịnh Nghiệp (2000). Trung Quốc danh ưu Trà hoa. NXB Kim Thuần - Bắc Kinh
7. Ngô Thị Minh Duyên, Ngô Quang Hưng, Lê Sỹ Doanh, Ngô Quý Công, Nguyễn Văn Khương, Đánh giá tình hình sinh trưởng và khả năng tái sinh của Trà hoa vàng tại một số tỉnh phía bắc, Viện khoa học lâm nghiệp Việt Nam.
8. Nguyễn Thị Hà Ly và cộng sự, Nghiên cứu đặc điểm thực vật, thành phần học và tác dụng sinh học của Trà hoa vàng Thái Nguyên, NXB Đại học Dược Hà Nội
9. Nguyễn Chân Hùng (2004), Ung bướu học nội khoa, NXB Y học
10. Ngô Thị Thảo và cộng sự, “ Nghiên cứu đặc điểm thực vật, thành phần hóa học và tác dụng sinh học của Trà hoa vàng Thái Nguyên”.
11. Một số nghiên cứu về trà hoa vàng trên thế giới và ở Việt Nam hiện nay - Nam Động
12. Nguyễn Tập, Nguyễn Quỳnh Nga (2019). Vài nét về trà hoa vàng ở Việt Nam và các hoạt động bảo tồn, nhân giống, Tạp chí Dược liệu, Số 19.
13. Phạm Hoàng Hộ (2001), *Cây cỏ Việt Nam (Tập 2)*, NXB Trẻ, pp 424-432
14. Phạm Nguyễn Duy Bình (2016) Nghiên cứu thành phần hóa học và tác dụng dược lý cây bảy lá một hoa (*Paris polyphylla Smith Trilliaceae*) tại Nghệ An
15. Trần Văn on (2018), “ Nghiên cứu một số thành phần hóa học, tác dụng sinh học và phát triển sản phẩm từ cây trà hoa vàng tại Ba Chẽ, Quảng Ninh”, Bộ y tế trường Đại học Dược Hà Nội

16. Thành phần dược chất trong Trà Hoa Vàng HAKODA NINH ,Công ty Cổ phần Dược phẩm trà hoa vàng Hakoda Ninh Việt Nam. 2022
<https://goldencamelliahakodaninh.com/phan-tich-cac-thanh-phan-dinh-duong-trong-tra-hoa-vang-hakoda-ninh/>
17. Trịnh Kim Thủy và cộng sự (1994). Nghiên cứu chọn giống lai giống loài trà hoa vàng. Tạp chí đại học Lâm Nghiệp Bắc Kinh
18. Trần Thị Hồng Loan; Nguyễn Minh Hiền , 2016. Hợp chất thiên nhiên trong hóa trị ung thư.
19. Trần Ninh, Naotoshi (2010), Các loài trà VQG Tam Đảo, GTZ
20. Viện Dược liệu (2006), Cây thuốc và động vật làm thuốc Việt Nam, Nhà xuất bản Khoa học và Kỹ thuật.
21. Võ Văn Chi (2003), *Từ điển thực vật thông dụng*, Nxb khoa học kỹ thuật, pp

TÀI LIỆU TIẾNG ANH

22. Ai-ze, X. I. E. (2011), "Study on the Extraction of Polysaccharides from *Camellia chrysantha* (Hu) Tuyama by Acetone Precipitation", *Journal of Anhui Agricultural Sciences*, 25, 032.
23. Adaramoye OA, Odunola OA. LIPID PEROXIDATION INHIBITION AND ANTIRADICAL ACTIVITIES. *Acta Pol Pharm*. 2011;68(1):23–9.
24. .Brighente I M C, Dias M, Verdi L G, Pizzolatti M G (2007), "Antioxidant Activity and total phenolic content of some Brazilian species", *Pharmaceutical Boilogy*, Vol. 45, No. 2, pp. 156-161.
25. Chen JH, et al (1993), "The wholesome function elements of leaves artificial asexual propagation of *Camellia chrysantha* (Hu) Tuyama (golden camellia).", *Yu Jiankang Yanjiu*. 10. pp. 51-52.
26. Comşa Ş, Cîmpean AM, Raica M. The Story of MCF-7 Breast Cancer Cell Line : 40 years of Experience in Research. *Anticancer Res*. 2015;35(6):3147–54.
27. Dai L, Li JL, Liang XQ, Li L, Feng Y, Liu HZ, et al. Flowers of *Camellia nitidissima* cause growth inhibition, cell-cycle dysregulation and apoptosis in a human esophageal squamous cell carcinoma cell line. *Molecular Medicine Reports*. 2016 Aug 1;14(2):1117–22.

28. Grzesik M (2017), “ Antioxidant properties of catechins : Comparison with other antioxidants ”, Food Chemistry. 241, pp. 4800-492
29. .J. Sherma, B. Fried (2003), Handbook of Thin - Layer Chromatography, 3 editio,. New York: Marcel Dekker Inc.
30. Jin, X. Bioactivities of water-soluble polysaccharides from fruit shell of *Camellia oleifera* Abel: Antitumor and antioxidant activities. Carbohydr. Polym. 2012, 87, 2198–2201.
31. Jin, X.; Ning, Y. Antioxidant and antitumor activities of the polysaccharide from seed cake of *Camellia oleifera* Abel. Int J. Biol Macromol. 2012, 51, 364–368.
32. Itokawwa H, et al (1968), “ Isolation of Camelliagenin A,B and C from the fruit of *Camellia japonica* L”, Yakugaku zassi: Journal of the Pharmaceutical Society of Japan. 88, pp, 1463-1466
33. Karan Vasisht, Pritam Dev Sharma, Maninder Karan, Dev Dutt Rakesh, Sandeep Vyas, Shalini Sethi and Ritu Manktala (2003), Study to Promote the Industrial Exploitation of Green Tea Polyphenols in India, United Nations Industrial Development Organization (UNIDO).
34. Kamran G, Yosef G, Mohammad A, Ebrahimzadeh (2009), "Antioxidants Activity, flavonoids phenol and contents pells and 13 citrus species tissues", Pak. J. Pharm. Sci., Vol. 22, No. 3, pp. 277-28
35. Kujawskaa M, et al (2016), Protective effect of yellow tea extract on N-nitrosodiethylamine – induced liver carcinogenesis”, Pharmaceutical Biology. 54 ((9), pp. 1891-1900
36. Linnaeus, C.L. (1753). Species plantarum, Tomus 1, Holmiae.
37. Lin JN, et al (2013), “ Chemical Constituent and Anticancer Activity of Yellow Camellias against MDA-MB-231 Human Breast Cancer Cells ”, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 61, pp, 9638-9644.
38. Ming, T.L. & Bartholomew, B. (2007). Theaceae. In: Wu, Z.Y. & Raven P.H. (eds.); Flora of China, vol. 12; Science Press, Beijing and Missouri Bot. Garden press, St. Louis: 367-412.

39. Mimoto, J.; Kiura, K.; Matsuo, K.; Yoshino, T.; Takata, I.; Ueoka, H.; Kataoka, M.; Harada, M. (-)-Epigallocatechin gallate can prevent cisplatin-induced lung tumorigenesis in A/J mice. *Carcinogenesis* 2000, 21, 915–919.
40. Manach, C; Williamson, G; Morand, C; Scalbert, A; Rémésy, C (2005). "Bioavailability and bioefficacy of polyphenols in humans. I. Review of 97 bioavailability studies". *American Journal of Clinical Nutrition*.
41. PENG, X., YU, D. Y., FENG, B. M., TANG, L., WANG, Y. Q., & SHI, L. Y. (2011), "Chemical constituents from the flowers of *Camellia chrysantha*", *Guihaia*, 31(4), 550-553.
42. Peiyuan Li, Lini Hou, Wei Su, Rumei Lu, Chaocheng Deng, Liangquan Liu, Yongkun Deng, Nana Guo, Chengsheng Lu and Chunling He (2011), "Free radical scavenging capacity, antioxidant activity and phenolic content of *Pouzolzia zeylanica*", *Journal of the Serbian Chemical Society*, Vol. 76, No. 5, pp. 709-717.
43. Okuda, T.; Yoshida, T.; Hatano, T. Polyphenols from asian plants: Structural diversity and antitumor and antiviral activities. In *Phenolic Compounds in Food and Their Effects on*
44. Sealy, J.R. (1958). *A revision of the genus Camellia*. Royal Horticultural Society, London
45. Suganuma, M.; Okabe, S.; Kai, Y.; Sueoka, N.; Sueoka, E.; Fujiki, H. Synergistic effects of (2)-epigallocatechin gallate with (2)-epicatechin, sulindac, or tamoxifen on cancer-preventive activity in the human lung cancer cell line PC-91. *Cancer Res.* 1999, 59, 44–47.
46. Sutherland.M (1988). Cell and Enviroment Interaction in Tumor Microregions: Th multicell spheroid model. *Science*, 240, 177-184. Stroeve EA, Makarova VG. Determination of lipid peroxidation rate in tissue homogenate laboratory. *Lab Man Biochem.* 1989;243–56.
47. Smyth EC, Nilsson M, Grabsch HI, Grieken NCT Van, Lordick F. Seminar Gastric cancer. *Lancet* [Internet]. 2020;396(10251):635–48. Available from: [http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736\(20\)31288-5](http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736(20)31288-5).
48. Teicher.B et Andrew.P (2004). *Anticancer drug development guide*.

Human Press, New Jersey, 2, 3-23.

49. Tran Ninh and Luong Van Dung (2013), "Camellia Dilinhensis: A New yellow species from Vietnam", International Camellia Journal, pp. 87-89.
50. Werner Dabelstein, Arno Reglitzky, Andrea Schütze and Klaus Reders "Automotive Fuels" in Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry 2007, Wiley-VCH, Weinheim.
51. Wang B, et al (2018), “ Essential oils and ethanol extract from Camellia nitidissima and evaluation of their biological activity ”, Journal of Food Science and Technology. 55 (12), pp. 5075-5081.
52. Wang C-C, Ho C-T, Lee S-C, Way T-D. Isolation of eugenyl β -primeveroside from Camellia sasanqua and its anticancer activity in PC3 prostate cancer cells. J Food Drug Anal [Internet]. 2016 Jan;24(1):105–11. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jfda.2015.06.005>
53. World Health Organization WHO. Latest global cancer data: Cancer burden rises to 18.1 million new cases and 9.6 million cancer deaths in 2018. Press Release. 2018.
54. World Health Organization WHO. <https://www.who.int/news/item/22-07-2002-helping-people-reduce-their-risks-of-skin-cancer-and-cataract>. 2021.
55. World Health Organization WHO. No Title. 2020. p. 2020.
56. World Health Organization WHO. <https://www.who.int/news/item/22-07-2002-helping-people-reduce-their-risks-of-skin-cancer-and-cataract>. 2002. p. 2002.
57. Yin L, Jiang L, Shen Q, Xiong Q, Zhuo X, Zhang L, et al. NCAPH plays important roles in human colon cancer. Cell Death Dis [Internet]. 2017;8(3):e2680–e2680. <http://dx.doi.org/10.1038/cddis.2017.88>
58. Zhang H, Wu Q, Wei X, Qin X. Pancreatic lipase and cholesterol esterase inhibitory effect of Camellia nitidissima Chi flower extracts in vitro and in vivo. Food Biosci [Internet]. 2020 Oct;37:100682. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.fbio.2020.100682>
59. Vassallo, J. D. (2004). “Metabolic detoxification determines species differences in coumarin-induced hepatotoxicity”. *Toxicological Sciences*.

TÀI LIỆU INTERNET

60. <https://khoahoc.tv/phat-hien-2-loai-tra-mi-hoa-vang-cho-khoa-hoc-tai-vuon-quoc-gia-vu-quang-93630>
61. Gaschler MM, Stockwell BR. Lipid peroxidation in cell death. *Biochem Biophys Res Commun* [Internet]. 2017 Jan;482(3):419–25. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbrc.2016.10.086>