

ĐẠI HỌC QUỐC GIA HÀ NỘI
TRƯỜNG ĐẠI HỌC KHOA HỌC TỰ NHIÊN


Trần Thị Huyền Nga

**NGHIÊN CỨU CHIẾT XUẤT, TINH CHẾ VÀ XÁC ĐỊNH
HOẠT TÍNH SINH HỌC CỦA MỘT VÀI CAROTENOID
TỪ CÂY CỎ VIỆT NAM DÙNG ĐỂ SẢN XUẤT
THỰC PHẨM CHỨC NĂNG**

Chuyên ngành: Hóa sinh học

Mã số: 62 42 30 15

TÓM TẮT LUẬN ÁN TIẾN SĨ SINH HỌC

Hà Nội 2010

Công trình được hoàn thành tại: Trường Đại học Khoa học Tự nhiên,
ĐHQGHN

Người hướng dẫn khoa học: PGS.TS. Nguyễn Văn Mùi
TS. Phan Quốc Kinh

Phản biện 1: PGS.TS Phạm Hoàng Ngọc

Phản biện 2: GS.TS Đỗ Ngọc Liên

Phản biện 3: GS.TS Nguyễn Xuân Thắng

Luận án sẽ được bảo vệ trước Hội đồng cấp nhà nước chấm luận án
tiến sĩ họp tại:

Vào hồi: giờ ngày tháng năm

Có thể tìm hiểu luận án tại:

- Thư viện Quốc gia Việt Nam
- Trung tâm Thông tin – Thư viện, Đại học Quốc gia Hà Nội

**DANH MỤC CÔNG TRÌNH KHOA HỌC CỦA TÁC GIẢ
LIÊN QUAN ĐẾN LUẬN ÁN**

1. **Tran Thi Huyen Nga**, Luu Van Quynh, Ha Thi Bich Ngoc, Nguyen Van Mui (2006). Study of β - carotene from some vegetation in Vietnam. *VNU, J Nat., Sci., & Tech.*, 22(3): 239 -244.
2. Luu Vân Quỳnh, **Trần Thị Huyền Nga**, Hà Thị Bích Ngọc, Nguyễn Văn Mùi (2006). Nghiên cứu β -carotene từ gốc *Momordica cochinchinensis* (Lour.) Spreng và mướp đắng *Momordica charantia* L. *Báo cáo khoa học, Hội thảo 'Khoa học Công nghệ quản lý nông học vì sự phát triển nông nghiệp bền vững ở VN' Đại học Nông nghiệp 1 Hà nội, 10/10/2006*; pp 295-301.
3. Hà Thị Tâm Tiến, Nguyễn Văn Mùi, **Trần Thị Huyền Nga**, Hà Thị Bích Ngọc (2006). Điều tra, tách chiết và đánh giá hoạt tính sinh học của lutein ở cúc vạn thọ *Tagetes erecta* L. *Báo cáo khoa học, Hội thảo 'Khoa học Công nghệ quản lý nông học vì sự phát triển nông nghiệp bền vững ở VN' Đại học Nông nghiệp 1 Hà nội, 10/10/2006*; pp 344-349
4. Nguyễn Thị Hải Thanh, Nguyễn Văn Mùi, Hà Thị Bích Ngọc, **Trần Thị Huyền Nga** (2006). Điều tra, tách chiết và đánh giá hoạt tính sinh học của lycopene từ một số thực vật Việt Nam, *Báo cáo khoa học, Hội thảo "Khoa học Công nghệ quản lý nông học vì sự phát triển nông nghiệp bền vững ở VN"*, *Đại học Nông nghiệp 1 Hà nội, 10/10/2006*; pp317 - 323.
5. Do Xuan Hoan, Tran Thi Quynh Trang, **Tran Thi Huyen Nga**, Nguyen Van Mui (2007). Examine some biological effects of carotenoids and flavonoids from leaves of certain yellow *Camellia* species. *VNU, J Nat., Sci., & Tech.*, 23(1): 124 – 130.
6. Nguyễn Thu Huyền, Nguyễn Văn Mùi, **Trần Thị Huyền Nga**, Trần Thị Quỳnh Trang (2007). Điều tra, phân tích từ lá của một số cây họ bầu bí Cucurbitaceae. *Báo cáo hội nghị khoa học "Hoá sinh y dược, Hạ Long, Quảng Ninh, năm 2007"*, pp196 – 200.

7. Nguyễn Thị Phương Thảo, Nguyễn Văn Mùi, **Trần Thị Huyền Nga** (2007). Điều tra carotenoit trong một số loài rau ở Việt Nam. *Báo cáo hội nghị khoa học “Hoá sinh y dược, Hạ Long, Quảng Ninh, năm 2007”*, pp201 - 205.
8. Hà Thị Bích Ngọc, **Trần Thị Huyền Nga**, Nguyễn Văn Mùi (2007). Điều tra hợp chất carotenoit trong một số thực vật của Việt Nam. *Tạp chí Khoa học ĐHQGHN, KHTN & CN*, 23(2) : 59 – 63.
9. Hà Quốc Dương, **Trần Thị Huyền Nga**, Hà Thị Bích Ngọc, Nguyễn Văn Mùi (2008). Nghiên cứu hoạt tính sinh học của beta-caroten, lycopene và lutein trong một số thực vật Việt Nam, *Hội nghị Khoa học toàn quốc lần IV về “Hóa sinh và Sinh học phân tử phục vụ nông, sinh, y học và công nghiệp thực phẩm” Trung tâm Hội nghị Quốc gia Hà Nội, 15-17/10 năm 2008*, pp587-590.
10. Nguyễn Thúy Hạnh, **Trần Thị Huyền Nga** (2008). Điều tra và thử hoạt tính một số carotenoit trong hoa màu vàng ở Việt Nam. *Hội nghị Khoa học toàn quốc lần IV về “Hóa sinh và Sinh học phân tử phục vụ nông, sinh, y học và công nghiệp thực phẩm” Trung tâm Hội nghị Quốc gia Hà Nội, 15-17/10 năm 2008*, pp 636-638.
11. Phùng Xuân Lê, **Trần Thị Huyền Nga** (2008). Nghiên cứu ảnh hưởng của lutein lên sự sinh trưởng của vi sinh vật bị chiếu UV tia tử ngoại. *Hội nghị Khoa học toàn quốc lần IV về “Hóa sinh và Sinh học phân tử phục vụ nông, sinh, y học và công nghiệp thực phẩm” Trung tâm Hội nghị Quốc gia Hà Nội, 15-17/10 năm 2008*, pp 67-70.
12. Nguyễn Văn Phòng, **Trần Thị Huyền Nga** (2008). Điều tra và thử hoạt tính hợp chất carotenoit trong hoa của một số loài thực vật Việt Nam. *Hội nghị Khoa học toàn quốc lần IV về “Hóa sinh và Sinh học phân tử phục vụ nông, sinh, y học và công nghiệp thực phẩm” Trung tâm Hội nghị Quốc gia Hà Nội, 15-17/10 năm 2008*, pp 636-638.
13. **Trần Thị Huyền Nga**, Nguyễn Văn Mùi, Lê Huy Hoàng, Phan Quốc Kinh (2010). Nghiên cứu một số hoạt tính sinh học của thực phẩm chức năng TPCN Ocpola. *Tạp chí Dược học*, 411(2): 23-28.
14. **Trần Thị Huyền Nga**, Nguyễn Văn Mùi (2010). Nghiên cứu khả năng cảm ứng hoạt động enzyme caspase-3 của β -carotene, lutein và lycopene. *Tạp chí Công nghệ Sinh học*, 8(2): 201-205.
15. Trần Ngọc Thái, **Trần Thị Huyền Nga**, Nguyễn Thị Huyền, Nguyễn Văn Mùi, (2010). Tinh sạch và xác định cấu trúc hóa của của β -caroten từ Gấc *Momordica cochinchinensis* (Lour.) Sprengs. và lutein từ hoa cúc vạn thọ *Tagetes erecta* L. *Tạp chí Y học*, 372(2):159-162.

MỞ ĐẦU

1. Tính cấp thiết của đề tài

Trong y học hiện đại, các carotenoid đã được sử dụng làm thuốc như β – carotene, lutein, lycopene, zeaxanthin...; bên cạnh đó các carotenoid còn được dùng làm mỹ phẩm, bảo vệ da, làm đẹp da như là lycopene...Ngoài ra, chúng còn được dùng rộng rãi để làm các phẩm màu thực phẩm; hay trong ngành sản xuất thức ăn cho chăn nuôi gà, nuôi trồng thủy sản như tôm, cá hồi...Chúng không phải là một thuốc đặc trị nhưng lại là nguồn bổ sung dinh dưỡng rất tốt cho cơ thể, mang lại sức khỏe và vẻ đẹp cho con người. Gần đây, thị phần các sản phẩm thực phẩm chức năng và thuốc chứa carotenoid chiếm một lượng không nhỏ trên thị trường dược thế giới. Báo cáo của BCC, một công ty chuyên phân tích thông tin thị trường ở Mỹ, về thị phần các carotenoid trên toàn thế giới năm 2005 cho thấy chúng chiếm khoảng 887 triệu đô la Mỹ riêng trong năm 2004, dự kiến lên tới một tỉ đô la Mỹ vào năm 2009, trong đó β – carotene chiếm thị phần lớn nhất, với khoảng 242 triệu đô la Mỹ, tiếp theo là lutein khoảng 139 triệu đô la Mỹ, asthaxanthin, canthaxanthin... Qua đó, ta có thể thấy rằng nhu cầu về carotenoid đang tăng trên thế giới, và ở nước ta cũng vậy, nhu cầu này đang ngày càng gia tăng.

Hiện nay, thị trường dược nước ta nhu cầu về carotenoid cũng đang nóng dần lên, tuy nhiên hầu hết các sản phẩm đều phải nhập khẩu. Ở Việt Nam, gấc đã được biết đến như là một nguồn β – carotene dồi dào, nhưng hiện tại các công ty dược phẩm trong nước mới chỉ dừng lại ở chỗ thu mua gấc từ bà con rồi thu các sản phẩm dầu gấc, chứa hỗn hợp các carotene. Những sản phẩm carotene tinh sạch đưa vào các sản phẩm thuốc hay thực phẩm chức năng đều nhập khẩu từ các nước tiên tiến, có nguồn gốc chủ yếu là từ vi tảo *Dunaliella salina* hay bán tổng hợp...

Đất nước ta với nhiều loại thực vật phong phú của miền nhiệt đới là nguồn tài nguyên đa dạng phong phú để tìm kiếm thêm các loại carotenoid mới, làm nguyên liệu để sản xuất các carotenoid cung cấp cho nhu cầu sử dụng làm thuốc, thực phẩm chức năng, mỹ phẩm, phẩm màu, phụ gia thức ăn của gia cầm, cá tôm... hay để xuất khẩu.

Từ đó, chúng tôi tiến hành đề tài **“Nghiên cứu chiết xuất, tinh chế và xác định hoạt tính sinh học của một vài carotenoid từ cây cỏ Việt Nam dùng để sản xuất thực phẩm chức năng”**.

Đề tài này không chỉ có ý nghĩa khoa học mà còn có ý nghĩa thực tiễn cho công cuộc bảo vệ và nâng cao sức khỏe cộng đồng.

2. Mục đích nghiên cứu

- Chiết xuất, tinh chế một số carotenoid có trong cây cỏ Việt Nam và xác định bản chất hóa học của một số carotenoid bằng các phương pháp hiện đại như sắc ký bản mỏng, sắc ký lỏng hiệu năng cao, khối phổ và cộng hưởng từ. Qua đó sàng lọc, để tìm các thực vật có chứa hàm lượng cao β - carotene, lycopene và lutein.

- Nghiên cứu hoạt tính chống oxy hóa của β - carotene, lycopene, lutein, và sản phẩm thực phẩm chức năng TPCN Ocpola trong điều kiện *in vitro* qua các chỉ số enzyme oxy hóa như catalase, peroxidase, cytochrome b5, GOT, GPT, và lên tế bào gan chuột. Nghiên cứu khả năng gây độc lên dòng tế bào ung thư biểu mô miệng KB, ung thư tuyến tiền liệt LNCap, khảo sát khả năng cảm ứng caspase-3 lên dòng tế bào ung thư phổi LU-1, ung thư vú MCF-7. Nghiên cứu ảnh hưởng của các hoạt chất carotenoid và TPCN Ocpola trong điều kiện *in vivo* lên chuột bị gây độc bởi CCl_4 .

Dựa vào các kết quả về nghiên cứu hóa học và một số hoạt tính sinh học của một số các carotenoid có trong cây cỏ Việt Nam, luận án đề xuất một số kiến nghị sử dụng nguồn cây cỏ giàu carotenoid của Việt Nam để góp phần sản xuất dược phẩm, thực phẩm chức năng.

3. Nội dung nghiên cứu

- Thu thập các thực vật ở Việt Nam, có chứa các carotenoid như β - carotene, lycopene và lutein.
- Tách chiết, tinh sạch các hợp chất carotenoid trên bằng các phương pháp khác nhau.
- Xác định bản chất hóa học các carotenoid thu được từ các kết quả trên bằng các phương pháp hiện đại như HPLC, ghi phổ khối, phổ cộng hưởng từ hạt nhân.
- Nghiên cứu hoạt tính sinh học của chúng lên cơ thể sinh vật qua một số mô hình thực nghiệm để kiểm tra khả năng chống oxy hóa, phòng chống ung thư của các carotenoid trên.

4. Những đóng góp mới của luận án

- Đã có đóng góp mới trong nghiên cứu hàm lượng β -carotene trong lá gấc và cùi vàng thịt gấc, trước đây chỉ mới chú ý đến màng

KIẾN NGHỊ

Từ đó, tôi xin đưa ra một số kiến nghị như sau:

(1). Ứng dụng nguồn cây cỏ giàu carotenoid của Việt Nam để góp phần sản xuất thuốc, dược phẩm, thực phẩm chức năng, mỹ phẩm, phụ gia thực phẩm... phục vụ cho công cuộc bảo vệ và nâng cao sức khỏe cộng đồng.

(2). Tiếp tục nghiên cứu khả năng ức chế các tế bào ung thư khác theo phương pháp cytotoxic assay, nghiên cứu khả năng ức chế sự phát triển các khối u trên mô hình chuột, thỏ bị gây ung thư bởi các tác nhân gây ung thư thực nghiệm... của các carotenoid có nhiều ở thực vật nước ta.

KẾT LUẬN

Từ những kết quả trên, tôi đi đến một số kết luận như sau:

1. Kết quả tách chiết và tinh sạch carotenoid:
 - Đã thu thập và phân tích sàng lọc 128 mẫu thực vật nhằm tìm kiếm nguồn carotenoid (β -carotene, lycopene, lutein).
 - Xác định được hàm lượng của các carotenoid trong 68 mẫu thực vật, trong đó β -carotene có nhiều nhất trong gấc, màng hạt gấc (22 mg/100g), (cùi thịt 11,4 mg/100g) và đặc biệt là mẫu lá gấc bánh tẻ (15 mg/100g) - một phát hiện rất mới, chứa hàm lượng cao β -carotene và lycopene. Hàm lượng lycopene có nhiều nhất trong thịt quả cà chua (45 mg/100g), lutein cao nhất ở cánh hoa cúc vạn thọ (714 mg/100g).
 - Đã xây dựng được quy trình chiết xuất và tinh chế β -carotene, lycopene, lutein tinh sạch đáp ứng độ tinh khiết, và đủ số lượng cho các nghiên cứu sinh học tiếp theo.
2. Kết quả thử hoạt tính sinh học của các chế phẩm carotenoid và thực phẩm chức năng TPCN Ocpola.
 - Các chế phẩm tinh sạch β -carotene, lutein, lycopene và TPCN Ocpola có ảnh hưởng lên hoạt độ của enzyme catalase, peroxidase trong máu người, làm giảm hoạt độ enzyme khi tăng nồng độ các hoạt chất từ thấp đến cao.
 - Các chế phẩm β -carotene, lutein, lycopene tinh sạch và TPCN Ocpola có khả năng bảo vệ tế bào gan chuột khỏi tác hại của H_2O_2 .
 - Hoạt tính của catalase, peroxidase, GOT và GPT trong máu và gan chuột ở các lô uống hoạt chất kèm CCl_4 đều giảm rõ rệt so với lô chuột bị gây độc bởi CCl_4 . Ở các lô chuột được uống thêm các carotenoid, hàm lượng cytochrome b5 trong máu và gan tăng lên so với lô chuột bị gây độc CCl_4 .
 - Các chế phẩm carotenoid tinh sạch và thực phẩm chức năng TPCN Ocpola đã thể hiện độc tính đối với hai dòng tế bào ung thư biểu mô miệng KB và ung thư tuyến tiền liệt LNCap.
 - Các chế phẩm carotenoid tinh sạch và thực phẩm chức năng TPCN Ocpola có khả năng cảm ứng với enzyme caspase-3 trên hai dòng tế bào ung thư phổi LU-1 và ung thư vú MCF-7.
3. Kết quả ứng dụng: Sản phẩm thực phẩm chức năng TPCN Ocpola và Kingpharocula đã được cấp giấy phép để sản xuất và đưa ra thị trường.

hạt gấc. Từ đây có thể tận dụng được nguồn nguyên liệu trong sản xuất các sản phẩm có chứa β -carotene.

- Phát hiện ra khả năng cảm ứng enzyme caspase-3, là một enzyme chìa khóa dẫn đến quá trình chết theo chương trình của các tế bào ung thư phổi và ung thư vú, đưa ra thêm bằng chứng về khả năng ức chế ung thư của các carotenoid.
- Góp phần đưa ra sản phẩm Thực phẩm chức năng có tên là Ocpola, và Kingpharocula với thành phần chính là cao thu được từ cánh hoa cúc vạn thọ, lá gấc, bổ sung dinh dưỡng cho mắt, bảo vệ mắt, tăng cường thị lực, tăng cường hoạt động của điểm vàng, làm đẹp da...

5. BỐ CỤC LUẬN ÁN

Luận án gồm 98 trang, trong đó có 7 bảng và 38 hình.

Mở đầu: 2 trang

Chương 1. Tổng quan tài liệu: 21 trang

Chương 2. Nguyên liệu và phương pháp nghiên cứu: 22 trang

Chương 3. Kết quả và thảo luận: 34 trang

Kết luận và kiến nghị: 2 trang

Các công trình khoa học của tác giả liên quan đến luận án (15 công trình) : 2 trang

Tài liệu tham khảo: 15 trang, có 22 tài liệu tiếng Việt, 102 tài liệu tiếng Anh, 6 tài liệu trang web.

PHỤ LỤC 1. Hình ảnh sắc ký bản mỏng các mẫu nghiên cứu

PHỤ LỤC 2. Kết quả sắc ký bản mỏng các carotenoid trong các mẫu nghiên cứu

PHỤ LỤC 3. Hình ảnh sắc ký hiệu năng cao các mẫu nghiên cứu

PHỤ LỤC 4. Kết quả sắc ký lỏng hiệu năng cao các mẫu nghiên cứu

PHỤ LỤC 5. Các bảng số liệu nghiên cứu trong luận án

PHỤ LỤC 6. Khôỉi phổ các carotenoid

PHỤ LỤC 7. Phổ cộng hưởng từ hạt nhân các carotenoid

PHỤ LỤC 8. Chứng nhận tiêu chuẩn sản phẩm TPCN Ocpola

PHỤ LỤC 9. Chứng nhận tiêu chuẩn sản phẩm Kingpharocula

Chương 1. TỔNG QUAN TÀI LIỆU

1.1. TỔNG QUAN VỀ CAROTENOID

1.1.1. Carotenoid

1.1.1.1. Giới thiệu chung

1.1.1.2. Cấu trúc hóa học và phân loại các carotenoid

1.1.1.3. Tính chất vật lý

1.1.1.4. Tính chất hóa học

1.1.2. Vai trò của các carotenoid

1.1.2.1. Vai trò của carotenoid trong thực vật

1.1.2.2. Chức năng của các carotenoid đối với đời sống động vật và sức khỏe con người

1.1.3. Một số carotenoid điển hình

1.1.3.1. Beta-carotene

1.1.3.2. Lycopene

1.1.3.3. Lutein

1.2. CÁC NGHIÊN CỨU VỀ THỰC PHẨM CHỨC NĂNG, ĐƯỢC PHÂN PHỤC VỤ ĐỜI SỐNG

1.2.1. Khái niệm về thực phẩm chức năng

1.2.2. Vai trò của thực phẩm chức năng trong cuộc sống hiện đại

Chương 2 NGUYÊN LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. NGUYÊN LIỆU

2.1.1. Nguyên liệu và đối tượng

- Chúng tôi đã sử dụng 128 mẫu thực vật, thu thập ở Thành phố Hà Nội, được định loại bởi PGS.TS Trần Ninh (Khoa Sinh học, Trường ĐH KHTN).

- Máu người, được cung cấp bởi Viện Huyết học và Truyền máu Trung Ương.

- Chuột nhắt trắng đực, dòng Swiss, được cung cấp bởi Viện Vệ sinh Dịch tễ Trung Ương.

- Các dòng tế bào ung thư biểu mô miệng KB, ung thư tuyến tiền liệt LNCap, ung thư vú MCF-7, ung thư phổi LU-1, do GS. J. M. Pezzuto (đại học Hawaii Hoa Kỳ cung cấp).

2.1.2. Hóa chất và các thiết bị thí nghiệm

- Hoá chất: hoá chất có độ tinh khiết cao, của hãng Sigma, Merck, Fluka, Prolab, Trung Quốc... đảm bảo độ tin cậy cho các thí nghiệm.

- Thiết bị: máy sắc ký lỏng cao áp HPLC 10Av của Shimazu, máy đo quang phổ Bionet, khối phổ MS-Engine-5989-HP, máy cộng hưởng từ hạt nhân 500MHz AVANCE VARIAN, máy cô quay, máy đo pH, bơm nhu động, hệ thống cột sắc ký, máy lắc, máy siêu âm, cân phân tích, tủ sấy...

2.2. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.2.1. Phương pháp chiết xuất và tinh chế các carotenoid

- Sấy khô

Bảng 3.2. Thành phần viên nang thực phẩm chức năng Ocpola

Thành phần	Hàm lượng cao	Hàm lượng carotenoid
Cao cánh hoa cúc vạn thọ	150 mgr	6mgr lutein
Cao thịt quả mướp đắng chín	75mgr	0,04mgr β -carotene
Cao lá gấc	75mgr	0,1 mgr β -carotene

Sản phẩm được đưa ra bởi Phân viện Công nghệ mới và Bảo vệ Môi trường, Trung tâm Khoa học Kỹ thuật - Công nghệ Quân sự (Viện KHCN Quân sự) kết hợp với các nghiên cứu của Liên hiệp Khoa học Sản xuất – Công nghệ mới và Khoa Sinh học, Trường Đại học KHTN, ĐHQG HN, dưới sự chủ trì của Thiếu Tướng Phạm Sơn Dương. Đề tài luận án này thực hiện các nghiên cứu về các tác dụng sinh học của sản phẩm TPCN, đưa ra đề xuất về các thành phần của sản phẩm.

3.3.2 Thực phẩm chức năng Kingpharocula

Sản phẩm được trình bày dưới dạng viên nang mềm, có thành phần gồm 200mg lutein từ cánh hoa cúc vạn thọ và 5mg piperine từ hạt hồ tiêu. Sở dĩ chúng tôi kết hợp với piperine – một alkaloid từ hạt hồ tiêu bởi vì nó làm tăng sự hấp thu tối ưu lutein vào cơ thể. Đây cũng là một sản phẩm bổ sung dinh dưỡng, có tác dụng làm sáng mắt, dưỡng mắt, tăng cường thị lực, hỗ trợ phòng tránh thoái hóa điểm vàng, quáng gà, giúp làm giảm quá trình lão hóa và làm đẹp da.

Sản phẩm được cấp chứng nhận tiêu chuẩn sản phẩm theo quyết định số 1476/2010/YT-CNTC của Bộ Y tế ngày 10/02/2010, kèm theo các chỉ tiêu chất lượng sản phẩm công bố. Đây là một sản phẩm của Công ty cổ phần dược phẩm Kingphar Việt Nam, được sản xuất tại Công ty cổ phần Dược – Vật tư y tế Hải Dương dưới sự cố vấn khoa học của các nhà khoa học Liên hiệp Khoa học sản xuất – Công nghệ mới và Khoa Sinh học, Trường Đại học KHTN, ĐHQG HN.

dụng của lutein từ cánh hoa cúc vạn thọ lúc đưa vào sản phẩm bổ sung dinh dưỡng.

Ngoài ra, chúng tôi còn phát triển thêm một sản phẩm mới, cũng có thành phần chủ yếu là lutein từ cánh hoa cúc vạn thọ, kết hợp với piperine từ hạt hồ tiêu, có tên là Kingpharocola. Đây cũng là một TPCN có tác dụng bảo vệ mắt, tăng cường thị lực.

3.3.1 Thực phẩm chức năng Ocpola



Hình 3.13. Sản phẩm TPCN Ocpola

Từ những kết quả khả quan về khả năng chống oxy hóa của lutein cũng như β -carotene, lycopene, chúng tôi đã kết hợp 3 thành phần cao từ cánh hoa cúc, cao quả mướp đắng chín và lá gấc tạo nên một sản phẩm thực phẩm chức năng với mục đích đưa ra một sản phẩm có tác dụng bổ sung dinh dưỡng cho mắt, bảo vệ mắt, tăng cường thị lực, đặc biệt là tăng cường hoạt động của điểm vàng.

Sản phẩm được trình bày dưới dạng viên nang bột tên là OCPOLA, theo tiêu chuẩn cơ sở số: 07/2006/HOPHARCO, có thành phần như bảng 2.

Viên nang cứng, có màu xanh lá cây đậm, bột viên nang màu vàng xám, đóng trong lọ nhựa, 60 viên/lọ. SĐK: 559/2007/YT-CNTC được sản xuất bởi Công ty cổ phần Dược – Trang thiết bị Y tế Hòa Bình.

Sản phẩm đạt tiêu chuẩn với các chỉ tiêu vi sinh vật, kim loại nặng và các hóa chất không mong muốn nằm trong giới hạn cho phép.

- Ngâm chiết:

Lượng 10gr bột khô mẫu thực vật được trộn đều với 100ml dung môi ether dầu hỏa (acetone), ngâm trong bình kín, tối màu, qua đêm (24-48h). Dung dịch ngâm được lọc qua phễu có giấy lọc để thu dịch trong, đem cô bằng hệ thống cô quay thu hồi dung môi để thu cao chiết.

- Sắc ký bản mỏng:

Lượng 0,1gr cao khô các mẫu thực vật được hòa tan lại với 1ml hệ dung môi sắc ký bản mỏng (hệ 1,2,3 như trên bảng 2.2) rồi đem ly tâm ở 4 °C để loại bỏ cặn không tan, thu lại cao bằng bốc hơi cách thủy. Cao được hòa tan lại với 1ml dung môi sắc ký để chấm lên bản sắc ký silicagel trắng sẵn.

- Sắc ký lỏng hiệu năng cao:

Pha động: acetonitrine:methanol:chloroform = 55:23:22 (v/v/v). Tốc độ dòng 0,85 ml/phút, thời gian chạy 20 phút, pH 2-8, nhiệt độ 30°C. Pha tĩnh: cột silical gep C18, trên máy HPLC-10Av, Shimazu.

- Sắc ký cột lọc gel:

Cột lọc gel Pharmacia Biotech chiều dài 40 cm, đường kính 1,5 cm. Pha tĩnh là hạt silicagel (Merck) có kích thước 0,063 x 0,2 mm. Pha động là hệ dung môi rửa giải ether dầu hỏa : acetone được pha theo tỷ lệ tương ứng 90:10. Nhiệt độ: 30 °C.

Cân 20 g silicagel ngâm trong hệ dung môi rửa giải trong 24 giờ, sử dụng để nhồi cột.

Mẫu đưa lên cột được chuẩn bị như sau: cân 2 gr mẫu cao thực vật, hoà tan với 10 ml ether dầu hỏa : acetone (95/5, v/v), để lắng, sau 1 giờ lọc bỏ cặn thu phần dịch phía trên khoảng 8 ml. Tốc độ dòng chảy của bơm nhu động là 20 ml/giờ, thu mỗi phân đoạn là 2 ml cho đến khi các chất trên cột được đẩy ra hết. Các phân đoạn được đo mật độ quang phổ với các bước sóng hấp phụ cực đại tương ứng với từng chất. Các phân đoạn có cùng độ hấp phụ quang học giống nhau, giống với chất chuẩn được gộp lại thu được dịch chứa carotenoid tinh sạch. Dung dịch được đem bốc hơi cách thủy để thu carotenoid ở dạng tinh khiết, khô, có màu đặc trưng.

- Ghi phổ khối các carotenoid:

- Ghi phổ cộng hưởng từ hạt nhân ¹H và ¹³C các carotenoid

2.2.2. Nghiên cứu hoạt tính chống oxy hóa của các carotenoid tinh sạch

- *Xác định ảnh hưởng của chế phẩm đến hoạt độ enzyme peroxidase theo phương pháp E.C Xavran*
- *Xác định ảnh hưởng của chế phẩm đến hoạt độ enzyme catalase theo phương pháp Bach và Zubkova*
- *Xác định chỉ số GOT và GPT trên máy phân tích chỉ số máu tại Bệnh viện Medlatec.*
- *Định lượng hàm lượng cytochrome b5 theo phương pháp của Schenkman*
- *Thí nghiệm chống oxy hoá của chế phẩm tinh sạch lên tế bào gan chuột*

2.2.3. Nghiên cứu hoạt tính sinh học các carotenoid lên các dòng tế bào ung thư in vitro

- *Phương pháp thử độ độc tế bào lên các dòng tế bào ung thư (Cytotoxic assay)*
- *Nghiên cứu khả năng cảm ứng lên enzyme Caspase 3 của các caroteoid trên dòng tế bào ung thư phổi LU1 và ung thư vú MCF7*

2.2.4. Nghiên cứu tác dụng sinh học của các carotenoid lên chuột thực nghiệm theo phương pháp của Favari

- *Mô hình nghiên cứu:*

Động vật thí nghiệm là chuột nhắt đực dòng Swiss, được cân từng con, đánh dấu, phân nhóm ngẫu nhiên trước khi làm thí nghiệm. Chúng được chia thành 10 nhóm, mỗi nhóm có 10 con, gồm:

- Nhóm 1: uống NaCl 0,9% x 2ml/kg thể trọng chuột
 - Nhóm 2: uống CCl₄ x 2ml/kg thể trọng chuột
 - Nhóm 3: uống CCl₄ x 2ml/kg thể trọng chuột kèm theo β-carotene tinh sạch x 2,5g/kg thể trọng chuột
 - Nhóm 4: uống CCl₄ x 2ml/kg thể trọng chuột kèm theo lutein tinh sạch x 2,5g/kg thể trọng chuột
 - Nhóm 5: uống CCl₄ x 2ml/kg thể trọng chuột kèm theo lycopene tinh sạch x 2,5g/kg thể trọng chuột
 - Nhóm 6: uống CCl₄ x 2ml/kg thể trọng chuột kèm theo TPCN Ocpola x 2,5g/kg thể trọng chuột
 - Nhóm 7: uống β-carotene tinh sạch x 2,5g/kg thể trọng chuột
 - Nhóm 8: uống lutein tinh sạch x 2,5g/kg thể trọng chuột
 - Nhóm 9: uống lycopene tinh sạch x 2,5g/kg thể trọng chuột
 - Nhóm 10: uống TPCN Ocpola x 2,5g/kg thể trọng chuột
- *Các chỉ tiêu nghiên cứu trên chuột:*

này xảy ra không phải vì các hoạt chất bị giảm hoạt tính cảm ứng lên caspase-3, mà tại vì lúc này chúng tác động lên quá trình chết theo chương trình của các tế bào ung thư nên tỉ lệ sống sót các tế bào giảm mạnh, do đó caspase-3 cũng giảm theo.

Trên dòng tế bào ung thư vú, khi nồng độ sạch beta-carotene, lycopene, lutein và thực phẩm chức năng Ocpola ở 6,25 µg/ml hoạt độ caspase-3 ở các giếng lần lượt là 52,3 (ng/100 µl), 42,9 (ng/100 µl), 72,9 (ng/100 µl), 53,5(ng/100 µl). Kết quả nghiên cứu của chúng tôi cũng cho thấy beta-carotene, lycopene, và lutein có khả năng hỗ trợ chứ chúng không hoàn toàn có thể là chất chữa trị ung thư.

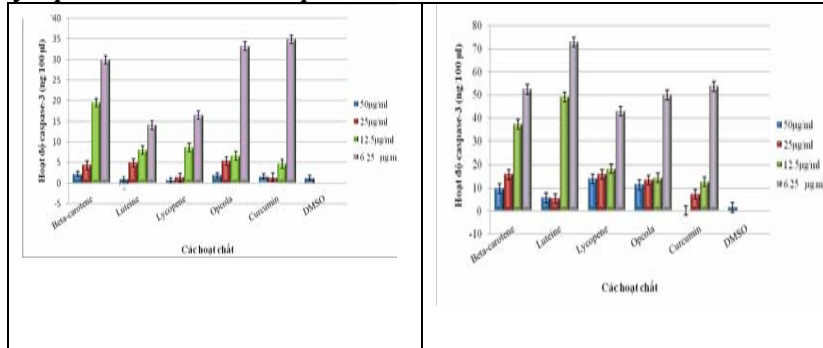
3.3. KẾT QUẢ ỨNG DỤNG VÀO THỰC TẾ

Ngoài nguồn carotenoid từ những thực phẩm, hoa quả như kết quả ở phần 3.1, ngày nay các chất bổ sung dinh dưỡng còn được các nhà khoa học, dược sĩ khuyến dùng trong một số trường hợp bị thiếu hụt. Từ những kết quả khả quan về khả năng chống oxy hóa của lutein cũng như β-carotene, lycopene, chúng tôi đã kết hợp thành phần cao từ cánh hoa cúc và một số thành phần cao từ thịt quả mướp đắng, lá gấc hay piperine tạo nên một số sản phẩm thực phẩm chức năng với mục đích đưa ra một sản phẩm có tác dụng bổ sung dinh dưỡng cho mắt, bảo vệ mắt đặc biệt là khỏi tác hại của tia UV ánh sáng mặt trời, tăng cường thị lực, đặc biệt là tăng cường hoạt động của diêm vàng. Đây là một hướng đi đang thu hút rất nhiều quan tâm của các nhà nghiên cứu trên toàn thế giới, đặc biệt là ở Việt Nam, một đất nước đang phát triển với nguồn tài nguyên thiên nhiên phong phú, dồi dào.

Lutein đã được công nhận là một hoạt chất có khả năng bảo vệ mắt, tăng cường thị lực [*Dược điển Hoa Kỳ (United States Pharmacopoeia)*], bởi vậy chúng tôi đã tập trung vào lutein từ nguồn cánh hoa cúc vạn thọ. Ban đầu, chúng tôi đã kết hợp thành phần của cao cánh hoa cúc vạn thọ và cao thịt mướp đắng, cao lá gấc thành sản phẩm TPCN Ocpola. Bên cạnh những nghiên cứu về tác dụng sinh học của các hoạt chất carotenoid, chúng tôi đã tiến hành nghiên cứu một số hoạt tính sinh học lên chuột và lên tế bào ung thư của TPCN Ocpola, như đã trình bày ở phần kết quả 3.2.2, 3.2.3. Hơn nữa, chúng tôi còn tiến hành nghiên cứu hoạt tính chống oxy hóa tổng số và độc tính của sản phẩm lên chuột theo đúng quy trình tiêu chuẩn của Bộ Y tế ban hành. Đây là những bằng chứng cụ thể để khẳng định lại tác

Như vậy, qua việc tiến hành thí nghiệm *in vitro* này với mục đích nhằm khẳng định về khả năng phòng ngừa ung thư của carotenoid (β -carotene, lycopene và lutein), cùng với những kết quả thu được trên đây chúng tôi có thể nói rằng các chế phẩm thu được từ ba đối tượng thực vật nghiên cứu thể hiện tính độc hay nói cách khác là thể hiện khả năng ức chế sự phát triển của các dòng tế bào ung thư.

3.2.3.2. Kết quả cảm ứng enzyme Caspase 3 của các β -carotene, lycopene và lutein và Ocpola lên LU-1 và MCF-7



Hình 3.11. Cảm ứng của các chế phẩm tinh sạch và TPCN lên dòng tế bào ung thư phổi

Hình 3.12. Cảm ứng của các chế phẩm tinh sạch và Ocpola lên dòng tế bào ung thư vú

Từ những kết quả trên, ta có thể thấy rằng đối với dòng tế bào ung thư phổi khi nồng độ các chế phẩm tinh sạch β -carotene, lycopene, lutein và TPCN Ocpola ở nồng độ 6,25 $\mu\text{g/ml}$, hoạt độ caspase-3 là 29,93 (ng/100 μl) với beta-carotene; 16,5 (ng/100 μl) với lycopene; 14,05 (ng/100 μl) với lutein, và 33,25 (ng/100 μl) với TPCN Ocpola, ($P < 0,05$), ở nồng độ này, tế bào ung thư sống sót 100%, trong khi đó, curcumin là chất đối chứng dương chỉ cảm ứng với caspase-3 lên 34,88 (ng/100 μl). Do khả năng cảm ứng với caspase-3 tăng khi cho các hoạt chất vào, nên bước đầu ta có thể kết luận chúng có khả năng kiểm soát các tế bào ung thư, hay sự phát triển của khối u. Ở tỉ lệ tế bào sống 100% (khi nồng độ các hoạt chất là 6,25 $\mu\text{g/ml}$) thì TPCN Ocpola có hoạt tính tốt nhất so với các hoạt chất còn lại và mạnh hơn so với chất đối chứng dương curcumin.

Còn tại các nồng độ các chế phẩm β -carotene, lutein, lycopene và TPCN Ocpola tăng dần từ 6,25 $\mu\text{g/ml}$ lên 12,5 $\mu\text{g/ml}$, 25 $\mu\text{g/ml}$ và 50 $\mu\text{g/ml}$ thì kết quả lại cho thấy hoạt độ caspase-3 lại giảm đi. Nghịch lí

Cho động vật nhịn ăn 24 giờ trước khi lấy máu. Mẫu máu và gan chuột được xác định các chỉ số GOT (AST-aspartate transaminase) và GPT (ALT-alanin transaminase). Những enzyme này được coi là những chỉ tiêu sinh học đáng tin cậy về sự tổn thương ở tế bào gan. Các chỉ số này được xác định tại Phòng Sinh hóa, Bệnh viện Medlatec. Chúng tôi cũng định lượng cytochrome b5 trong máu và gan chuột. Ngoài ra chúng tôi còn xác định chỉ số peroxidase và catalase trong máu và gan chuột.

Chương 3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. KẾT QUẢ CHIẾT XUẤT VÀ TINH SẠCH CÁC CAROTENOID

3.1.1. Chiết xuất các carotenoid

Từ hơn 200 mẫu thu thập được, chúng tôi đã tiến hành sử dụng nhiều hệ dung môi khác nhau phù hợp cho từng mẫu khác nhau như n-hexane, ether dầu, acetone, chloroform, ethylacetate, cồn... để tách chiết carotenoid, từ đó chúng tôi đã tách chiết thành công được 128 mẫu để thu cao thô tổng số và tiến hành sắc ký bản mỏng. Kết quả khảo sát với 128 mẫu thực vật bằng sắc ký bản mỏng bước đầu cho thấy sự có mặt của các chất carotenoid trong mẫu nghiên cứu khi tiến hành cùng 3 chất chuẩn β -carotene, lutein và lycopene. Chúng tôi thu được 119 mẫu chứa β -carotene, 113 mẫu chứa lutein và 50 mẫu chứa lycopene. Các mẫu cánh hoa, lá các loài cây, rau chủ yếu chứa β -carotene và lutein. Phổ các mẫu có chứa lycopene ít hơn, và tập trung chủ yếu là các củ quả.

Từ kết quả sắc ký lỏng hiệu năng cao, chúng tôi đã xác định được hàm lượng β -carotene, lutein và lycopene trong 68 mẫu thực vật.

Các mẫu chứa β -carotene là phổ biến nhất, trong đó ta có thể chú ý đến một số mẫu có hàm lượng cao như màng hạt gấc chín (22 mg/100g), củ thịt vàng quả gấc (11,4 mg/100g), lá gấc bánh tẻ (15 mg/100g), màng hạt mướp đắng chín (9,2 mg/100g), củ thịt vàng quả mướp đắng chín (4,8 mg/100g), lá rau dệu (6,9 mg/100g), quả hồng chín (1,903 mg/100g), tiếp đến là các mẫu như rau ngót, thịt đu đủ chín, củ khoai lang vàng... Không chỉ màng hạt quả gấc chín mà phần củ thịt vàng và lá gấc cũng chứa hàm lượng cao carotene. Đặc biệt, chúng tôi đã phát hiện ra một nguồn β -carotene hoàn toàn mới, đó là lá gấc bánh tẻ, với hàm lượng cao (15 mg/100g). Phát hiện này có thể cho ta hướng tới một nguồn nguyên liệu chứa β -carotene mới,

an toàn và có giá thành rẻ, bên cạnh màng hạt gấc chín và cùi thịt vàng quả gấc chín.

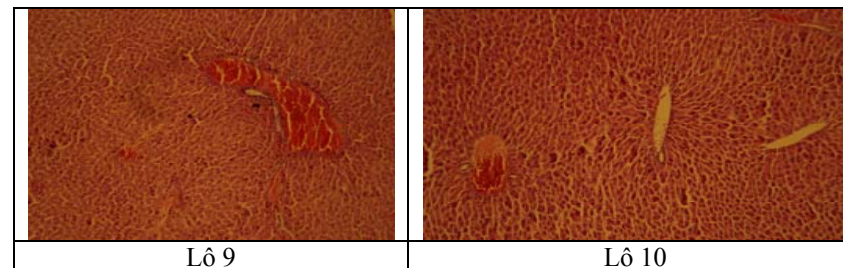
Chúng tôi nhận thấy lycopene tập trung chủ yếu ở các loại củ quả có màu đỏ, như cà chua (45 mg/100g), quả hồng trứng (6,7 mg/100g), đu đủ chín (2 mg/100g), lá gấc (8,9 mg/100g). Từ trước tới nay, cà chua vẫn là nguồn lycopene chính phục vụ cho đời sống con người, nó chứa hàm lượng cao (45 mg/100g), có hoạt tính sinh học cao.

Đối với lutein, ta có thể thấy rằng các mẫu chứa lutein cũng khá phổ biến trong thiên nhiên tuy nhiên hàm lượng lại không cao như β -carotene. Hàm lượng lutein cao nhất là ở mẫu cánh hoa cúc vạn thọ (714 mg/100g), tiếp đến là mẫu lá tía tô (1,45 mg/100g), rau dền tía (1,36 mg/100g), thịt quả bí đỏ (1,37 mg/100g)... Các mẫu rau có màu xanh đậm cũng chứa lutein tuy nhiên hàm lượng không cao, không nhiều hơn hẳn như các mẫu trên.

3.1.2. Kết quả tinh sạch các carotenoid

Với kết quả HPLC, thời gian lưu của các phân đoạn β -carotene, lutein và lycopene tách khỏi cột phù hợp với các chất chuẩn. LCMS và NMR cũng cho kết quả về màu sắc, khối lượng phân tử, nhiệt độ nóng chảy hay công thức phù hợp với các carotenoid nghiên cứu. Điều này chứng tỏ rằng quy trình tách chiết và tinh sạch của chúng tôi có hiệu quả tốt, thu được chế phẩm có độ tinh sạch cao, đảm bảo độ tin cậy cho các nghiên cứu tiếp theo.

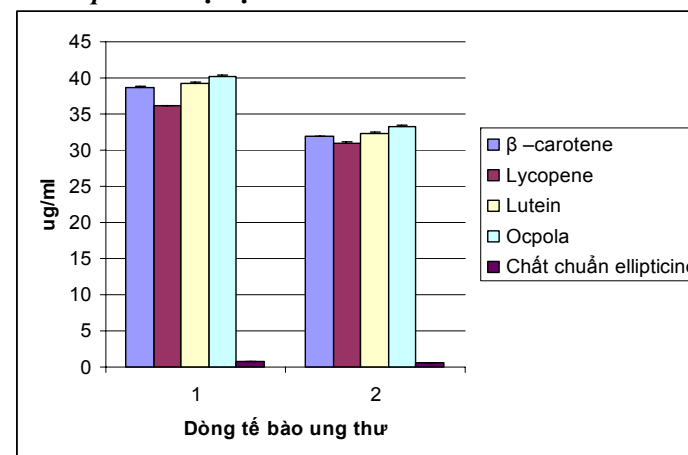
Chế phẩm β -carotene tinh sạch từ lá gấc có công thức phân tử là $C_{40}H_{56}$, (cấu tạo *all trans- β -carotene*). Qua phổ MS và NMR ta có thể thấy có pic m/z 538,0 $[M + H^+]$ chính là khối lượng phân tử của β -carotene (537) cộng với 1 của H^+ . Từ phổ 1H -NMR ta thấy xuất hiện 4 tín hiệu singlet đặc trưng ứng với 10 gốc methyl cộng hưởng tại δ 2,2; 1,98; 1,75; 1,05 và 2 tín hiệu doublet tại vị trí 6,635; 6,625 và một số tín hiệu multilet tương ứng với carbon bậc cao. Từ phổ ^{13}C -NMR thấy xuất hiện tín hiệu của 20 carbon, với 11 pic tương ứng carbon bậc cao tại vùng trường thấp và 9 pic ứng với 9 carbon bậc thấp tại vùng trường cao. Qua đó có thể kết luận được rằng phân tử có cấu tạo đối xứng, số lượng phân tử carbon trên phổ bị giảm $\frac{1}{2}$, do đó phân tử sẽ có 40 phân tử C. Qua phổ DEPT 90&135, xuất hiện 7 pic, ứng với 14 nhóm $=CH-$, 5 pic ứng với 10 gốc CH_3 và 3 pic ứng với 6 gốc CH_2 . Từ đó, ta có thể kết luận rằng chế phẩm β -carotene



Hình 3.9. Hình ảnh quan sát tiêu bản đúc cắt tế bào gan chuột ở 10 lô thí nghiệm

3.2.3. Hoạt tính của β -carotene, lycopene và lutein lên các dòng tế bào ung thư

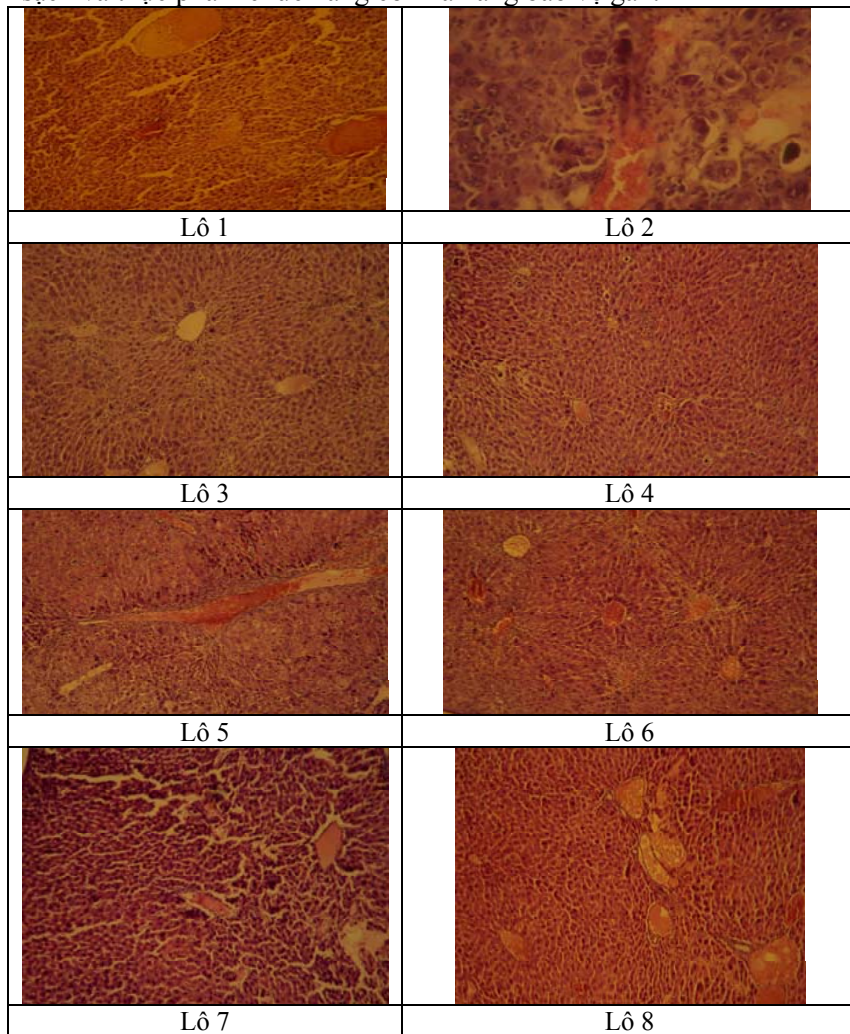
3.2.3.1. Kết quả thử độ độc lên tế bào



Hình 3.10. Nồng độ chế phẩm carotenoid và TPCN Ocpola tại giá trị IC_{50} của tế bào ung thư KB và LNCap

Chúng tôi tiến hành kiểm tra khả năng gây độc lên 2 dòng tế bào ung thư biểu mô miệng và ung thư tuyến tiền liệt. Các chế phẩm β -carotene, lycopene và lutein đều thể hiện độc tính trên hai dòng tế bào, tuy nhiên trên dòng tế bào ung thư KB thì chỉ số IC_{50} lớn hơn chỉ số IC_{50} đối với dòng LNCap. Điều này có nghĩa là các chế phẩm carotenoid thể hiện độc tính trên dòng tế bào ung thư LNCap mạnh hơn đối với dòng tế bào ung thư KB.

gan ở lô 7-10 khá tương đương với mẫu gan ở lô chuột đối chứng 1. Qua đây, ta có thể một lần nữa khẳng định rằng, các chế phẩm tinh sạch và thực phẩm chức năng có khả năng bảo vệ gan.



tinh sạch từ lá gấc có công thức phân tử là $C_{40}H_{56}$, (cấu tạo ***all trans-β-carotene***). Đây là lần đầu tiên trên thế giới, chúng tôi công bố các phổ ^1H-NMR , $^{13}C-NMR$, DEPT 90&135 của β -carotene từ lá gấc, bên cạnh β -carotene từ màng hạt gấc đã được nghiên cứu từ rất lâu.

Tương tự, lycopene tinh sạch từ thịt quả cà chua có công thức cấu tạo là $C_{40}H_{56}$, (***all-trans-lycopene***). Và lutein từ cánh hoa cúc vạn thọ có công thức là $C_{40}H_{56}O_2$, (***trans-lutein***).

Hiệu suất tinh sạch các carotenoid từ các mẫu nghiên cứu

Từ 6,6 kg lá gấc bánh tẻ tươi, chúng tôi thu được 550 g bột khô, rồi thu được 61 g cao và 85 mg β -carotene. Hiệu suất tinh sạch β -carotene từ lá gấc là $1,4 \cdot 10^{-2} \%$.

Từ 10 kg cà chua tươi, chúng tôi thu được 600 g bột thịt cà chua khô, 71g cao và 26 mg lycopene tinh sạch. Hiệu suất tinh sạch lycopene từ cà chua là $4,3 \cdot 10^{-2} \%$.

Từ 9,5 kg hoa cúc vạn thọ tươi, chúng tôi đã thu được 780 g bột khô cánh hoa cúc vạn thọ, thu được 120,56 g cao thô chứa lutein ester và 4,96 g lutein tinh sạch. Như vậy, chúng tôi thu được 630 mg/100g bột khô cánh hoa cúc vạn thọ. Hiệu suất lutein từ cánh hoa cúc vạn thọ là 0,63 %.

So với kết quả nghiên cứu và tính toán bằng HPLC rằng hàm lượng β -carotene trong lá gấc bánh tẻ là 15 mg; lycopene từ cà chua là 45mg; và lutein từ cánh hoa cúc vạn thọ là 714mg; ta thấy rằng kết quả tinh sạch carotenoid bằng quy trình chúng tôi đưa ra đạt hiệu suất khoảng 90%. Do đó, có thể kết luận rằng quy trình thu mẫu, chiết xuất và tinh sạch carotenoid của chúng tôi đã cho kết quả tốt, thu được các chế phẩm carotenoid tinh khiết với hiệu quả cao.

3.2. KẾT QUẢ THỬ HOẠT TÍNH SINH HỌC CỦA CÁC CAROTENOID

3.2.1. Hoạt tính chống oxy hóa trong điều kiện *in vitro*

3.2.1.1. Hoạt tính chống oxy hóa của các carotenoid tinh sạch lên catalase

Đối với chế phẩm β -carotene thu được từ lá gấc, ngay ở nồng độ 2,5 mg% đã làm giảm hoạt độ catalase gần một nửa, đó là 65% (nhóm máu A), 55,5% (nhóm máu B), 53,5% (nhóm máu AB), 57,5% (nhóm máu O). Cho tới nồng độ cuối 40 mg%, hoạt độ catalase giảm xuống thấp nhất, 17,6% (nhóm máu A), 15,1% (nhóm máu B), 15% (nhóm máu AB), 15,5% (nhóm máu O).

Khi tăng nồng độ chế phẩm lycopene từ 0 mg% đến 30 mg%, hoạt độ catalase giảm từ 100% xuống còn 48,3% đối với nhóm máu A, 33,3% đối với nhóm máu B, 43,1% đối với nhóm máu AB và 41,8% đối với nhóm máu O. Ảnh hưởng của chế phẩm lên catalase các nhóm máu có sự khác nhau, hoạt độ catalase giảm dần theo thứ tự B>O>AB>A.

Đối với lutein, tại nồng độ khá thấp (2 mg%) nó đã gây giảm hoạt độ catalase nhanh chóng, đến 10 mg% đã làm giảm hoạt độ catalase tới gần mức tối thiểu, 27,3% với nhóm máu A, 33,3% với nhóm máu B, 30% với nhóm máu AB, 41,7% với nhóm máu O.

3.2.1.2. Hoạt tính chống oxy hóa của các chế phẩm tinh sạch các carotenoid lên peroxidase

Chế phẩm tinh sạch β-carotene có gây ảnh hưởng tới hoạt độ peroxidase máu người mạnh hơn hẳn so với cao lá gấc. Nồng độ β-carotene 25 mg% gây giảm hoạt độ peroxidase còn 70,7% (nhóm máu A), 67,5% (nhóm máu B), 82,1% (nhóm máu AB), 73,7% (nhóm máu O).

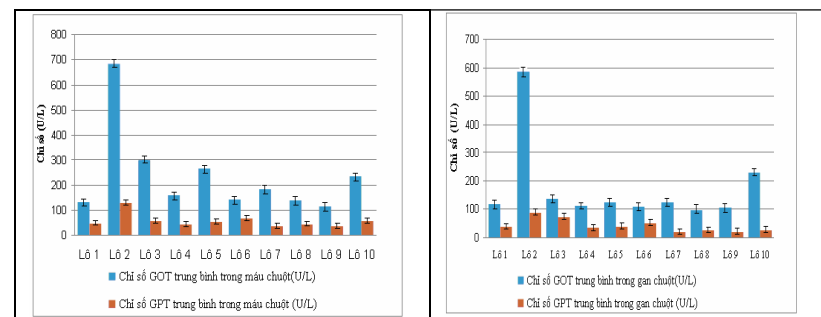
Ảnh hưởng của chế phẩm tinh sạch lycopene lên hoạt độ peroxidase được thể hiện qua sự giảm hoạt độ của enzyme từ 100% xuống còn 55,1% (nhóm máu A), 51% (nhóm máu B), 59,6% (nhóm máu AB), 45,8% (nhóm máu O) khi nồng độ lycopene tăng đến 40 mg%. Sự giảm hoạt độ diễn ra mạnh khi nồng độ lycopene ở mức từ 0 mg% đến 10 mg%, sau đó diễn tiến chậm hơn. Hiệu lực cạnh tranh của lycopene lên peroxidase của nhóm máu O là lớn nhất, tiếp theo là nhóm máu B, A, AB.

Đối với chế phẩm tinh sạch lutein thu được từ cao cánh hoa cúc vạn thọ chúng tôi cũng nhận thấy chúng đã gây giảm mạnh hoạt độ peroxidase ngay ở nồng độ khá thấp. Ở 2 mg%, hoạt độ peroxidase của nhóm máu A giảm còn 64,5%, nhóm máu B giảm còn 52,7%, nhóm máu AB giảm còn 54,8%, nhóm máu O giảm còn 55,3%. Đến nồng độ 25 mg%, hoạt độ giảm còn 29,1% (nhóm máu A), 21,4% (nhóm máu B), 25,4% (nhóm máu AB), 20,7% (nhóm máu O).

3.2.1.3 Khả năng chống oxy hóa của các chế phẩm lên tế bào gan chuột in vitro

Bảng 3.1. Khả năng chống oxy hóa lên tế bào gan chuột in vitro

DMSO	0,5360				
H ₂ O ₂	0,8567				



Hình 3.7. Các chỉ số GOT và GPT máu chuột

Hình 3.8. Các chỉ số GOT và GPT gan chuột

(Lô 1: uống NaCl 0,9%, lô 2: uống CCl₄, lô 3: uống CCl₄ + chế phẩm β-carotene, lô 4: uống CCl₄ + chế phẩm lutein, lô 5: uống CCl₄ + chế phẩm lycopene, lô 6: uống CCl₄ + hỗn hợp chế phẩm, lô 7: uống chế phẩm β-carotene, lô 8: chế phẩm lutein, lô 9: uống chế phẩm lycopene, lô 10: uống Ocypola)

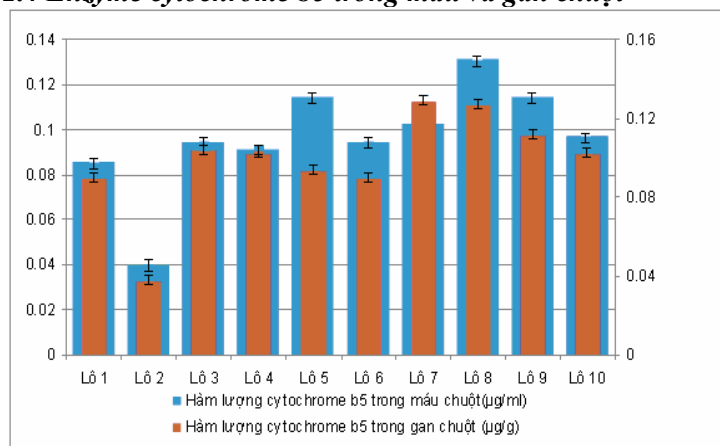
Khi tế bào gan bị phá hủy sẽ gây tăng cao, nhanh hoạt độ của GOT, GPT trong máu. Ở lô chuột bị gây độc, chỉ số GOT và GPT tăng cao nhất, ở các lô gây độc đồng thời sử dụng từng chế phẩm carotenoid, hoạt độ GOT và GPT đã giảm đi nhưng vẫn cao hơn so với lô đối chứng. Các lô gây độc đồng thời sử dụng hỗn hợp ba chế phẩm carotenoid hoạt độ GOT và GPT lại giảm mạnh nhất. Điều này chứng tỏ việc sử dụng carotenoid đã giúp cho hoạt độ GOT và GPT dần phục hồi lại nhưng rất chậm và không hoàn toàn ổn định. Nguyên nhân có thể do thời gian sử dụng chế phẩm trong 10 ngày còn ngắn hoặc nồng độ chế phẩm carotenoid bổ sung chưa đủ liều hoặc do chính bản chất của các enzyme GOT, GPT.

3.2.2.6. Quan sát tiêu bản đúc cắt tế bào gan chuột

Ở lô chuột uống CCl₄, tế bào gan bị tổn thương rất mạnh. Giữa các tế bào có khoảng trống rộng hơn những mẫu gan của chuột đối chứng, điều này chứng tỏ, gan của chúng có sự gắn kết yếu hơn. Bên cạnh đó, ta thấy xuất hiện rất nhiều đại thực bào có mặt quanh các mạch máu, còn gần đó là các tế bào đã bị chết, nhân của chúng đã bị teo đi, có kích thước bé hơn hẳn so với nhân những tế bào gan bên cạnh. Bên cạnh đó, ở các lô chuột từ 3 đến 6 là các lô chuột uống CCl₄ kèm với các chế phẩm carotenoid và thực phẩm chức năng của chúng tôi thì sự tổn thương ở gan nhẹ hơn hẳn. Tương tự, các mẫu

Kết quả từ hình 3.5 cho ta khẳng định sự thay đổi trong gan khi bị gây độc bởi CCl_4 và kết hợp với chế phẩm carotenoid của chúng tôi, bởi vì sự thay đổi giữa các lô chuột tương tự như với hoạt độ enzyme này trong máu.

3.2.2.4 Enzyme cytochrome b5 trong máu và gan chuột



Hình 3.6. Hàm lượng cytochrome b5 trong máu và gan chuột

(Lô 1: uống NaCl 0,9%, lô 2: uống CCl_4 , lô 3: uống CCl_4 + chế phẩm β -carotene, lô 4: uống CCl_4 + chế phẩm lutein, lô 5: uống CCl_4 + chế phẩm lycopene, lô 6: uống CCl_4 + hỗn hợp chế phẩm, lô 7: uống chế phẩm β -carotene, lô 8: chế phẩm lutein, lô 9: uống chế phẩm lycopene, lô 10: uống Ocpola)

Chúng ta có thể thấy hàm lượng cytochrome b5 có sự thay đổi đáng kể giữa các lô chuột nghiên cứu. Ở lô chuột đối chứng chỉ uống dung dịch muối sinh lý, hàm lượng cytochrome b5 là 0,085 μ g/ml ở máu và 0,089 μ g/g ở gan, nhưng ở lô chuột uống CCl_4 , hàm lượng này chỉ còn 0,04 μ g/ml ở máu và 0,037 μ g/g ở gan. Các lô chuột có uống CCl_4 , hàm lượng cytochrome b5 ổn định hơn, trở về các giá trị 0,09 μ g/ml ở máu và 0,1 μ g/g ở gan. Điều này chứng tỏ, các chế phẩm tinh sạch carotenoid và thực phẩm chức năng Ocpola của chúng tôi có khả năng cân bằng lượng cytochrome b5 ở chuột uống CCl_4 .

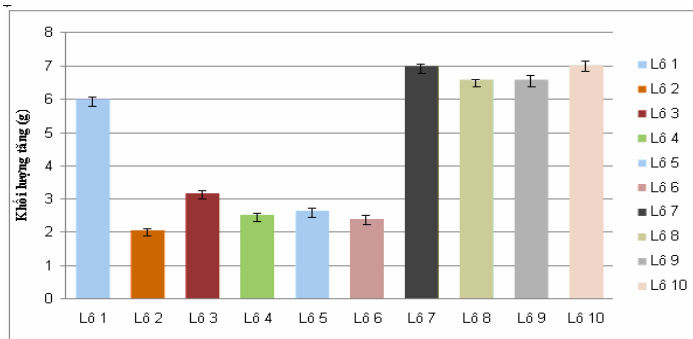
3.2.2.5. Các chỉ số GOT và GPT máu và gan chuột

Nồng độ μ g/ml	β -carotene	lutein	lycopene	Ocpola	Curcumin	
ED₅₀						
100	0,8696	0,7623	0,8290	0,8219	0,8308	37,5 uM
50	0,7757	0,7321	0,8135	0,7569	0,8050	18,75
25	0,7252	0,7151	0,7869	0,6980	0,7719	9,375
12,5	0,7188	0,6847	0,7190	0,6831	0,7356	4,69
6,25	0,6734	0,6648	0,6551	0,6487	0,7239	2,35
3,1	0,6204	0,6283	0,6251	0,6027	0,6817	1,17
% tế bào sống sót						
Nồng độ μ g/ml	β -caroten	lutein	lycopene	Ocpola	Curcumin	DMSO
100	101,51	88,98	96,77	95,94	96,98	62,57
50	90,55	85,45	94,96	88,35	93,97	
25	84,65	83,47	91,85	81,48	90,10	
12,5	83,91	79,93	83,92	79,73	85,86	
6,25	78,61	77,60	76,46	75,72	84,49	
3,1	72,41	73,34	72,96	70,36	79,57	

Từ kết quả bảng 3.1, chúng ta có thể thấy rằng khi tăng nồng độ các chế phẩm β -carotene, lutein, lycopene và TPCN Ocpola từ 3,1 μ g/ml lên tới 100 μ g/ml thì khả năng bảo vệ tế bào khỏi tác hại của H_2O_2 tăng, thể hiện ở chỗ % tế bào gan nuôi *in vitro* càng tăng từ khoảng 70% lên tới 100%. Khi cho H_2O_2 vào đĩa có tế bào gan chuột thì chúng chỉ sống sót 62,57% và curcumin là một chất có khả năng chống oxy hóa đã được mọi người biết đến cũng chỉ có khả năng bảo vệ cao nhất (96,98% tế bào sống sót) ở nồng độ 100 μ g/ml. Trong khi đó, chế phẩm tinh sạch β -carotene khi ở nồng độ 100 μ g/ml thì 100% tế bào sống sót. Chứng tỏ, β -carotene có khả năng bảo vệ tế bào khỏi tác hại của H_2O_2 . Tương tự, các chế phẩm lutein, lycopene cũng như thực phẩm chức năng Ocpola cũng có khả năng bảo vệ tế bào gan chuột khỏi tác hại của H_2O_2 .

3.2.2. Hoạt tính chống oxy hoá của β -carotene, lycopene và lutein trong điều kiện *in vivo* trên chuột

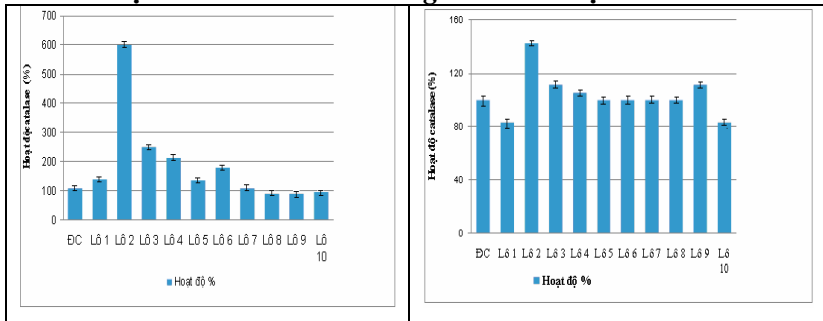
3.2.2.1. Sự thay đổi trọng lượng trung bình chuột trước và sau thí nghiệm



Hình 3.1. Sự thay đổi trọng lượng trung bình chuột trước và sau thí nghiệm (Lô 1: uống NaCl 0,9%, lô 2: uống CCl₄, lô 3: uống CCl₄ + chế phẩm β-carotene, lô 4: uống CCl₄ + chế phẩm lutein, lô 5: uống CCl₄ + chế phẩm lycopene, lô 6: uống CCl₄ + Ocpola, lô 7: uống chế phẩm β-carotene, lô 8: chế phẩm lutein, lô 9: uống chế phẩm lycopene, lô 10: uống Ocpola)

Từ kết quả từ hình 3.1, ta có thể thấy rằng lô chuột chỉ uống CCl₄, trọng lượng chuột giảm rõ rệt, sức sống kém. Khi cho uống kèm với các chế phẩm carotenoid của chúng tôi, chúng đã có sự phục hồi nhẹ. Còn những lô chuột bình thường và chuột uống bổ sung carotenoid có sự phát triển bình thường.

3.2.2.2 Hoạt tính của catalase trong máu và chuột

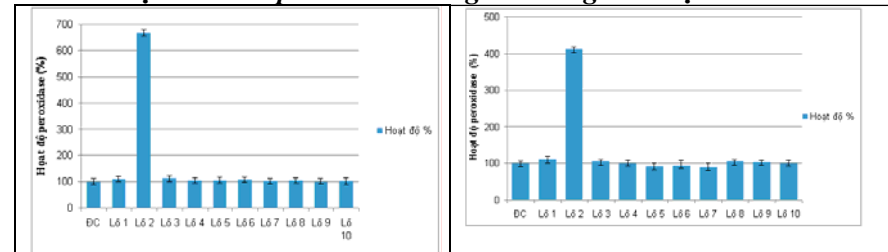


Hình 3.2. Sự thay đổi hoạt độ catalase máu chuột ở các lô thí nghiệm

(Lô 1: uống NaCl 0,9%, lô 2: uống CCl₄, lô 3: uống CCl₄ + chế phẩm β-carotene, lô 4: uống CCl₄ + chế phẩm lutein, lô 5: uống CCl₄ + chế phẩm lycopene, lô 6: uống CCl₄ + hỗn hợp chế phẩm, lô 7: uống chế phẩm β-carotene, lô 8: chế phẩm lutein, lô 9: uống chế phẩm lycopene, lô 10: uống Ocpola)

Ta có thể thấy rằng ở ống đối chứng, không có mẫu máu, lượng KMnO₄ sử dụng để trung hòa H₂O₂, ở đó, hoạt độ của catalase được coi là 100%. Ở lô 1, chuột chỉ uống muối sinh lí, hoạt độ có tăng nhẹ so với lô 2. Lô 2 là chuột uống CCl₄, Ở đây hoạt độ catalase đã tăng lên 600 lần, điều này chứng tỏ của chúng bị tổn thương rất nhiều. Còn đối với các lô chuột từ 3 đến 6, chuột ngoài uống CCl₄, còn được bổ sung thêm các chế phẩm tinh sạch beta-carotene, lycopene, lutein và Ocpola; ở đây, hoạt độ catalase có tăng, nhưng rõ ràng là nhỏ hơn hoạt độ ở lô chỉ uống CCl₄ đáng kể. Còn đối với các lô chuột còn lại từ 7 đến 10 là các lô chuột chỉ uống chế phẩm tinh sạch beta-carotene, lycopene, lutein và Ocpola; hoạt độ của enzyme catalase xoay quanh giá trị 100%. Từ đây, ta có thể thấy rằng khi gan bị tổn thương bởi CCl₄, các chế phẩm carotenoid của chúng tôi đã có tác dụng bảo vệ, hoạt độ của catalase giảm đi đáng kể. Điều này khẳng định việc khi gan chuột bị tổn thương bởi CCl₄, các chế phẩm carotenoid của chúng tôi đã có tác dụng làm giảm các tác hại tổn thương.

3.2.2.3 Hoạt tính của peroxidase trong máu và gan chuột



Hình 3.4. Sự thay đổi hoạt độ peroxidase máu chuột ở các lô thí nghiệm

(Lô 1: uống NaCl 0,9%, lô 2: uống CCl₄, lô 3: uống CCl₄ + chế phẩm β-carotene, lô 4: uống CCl₄ + chế phẩm lutein, lô 5: uống CCl₄ + chế phẩm lycopene, lô 6: uống CCl₄ + hỗn hợp chế phẩm, lô 7: uống chế phẩm β-carotene, lô 8: chế phẩm lutein, lô 9: uống chế phẩm lycopene, lô 10: uống Ocpola)

Ở lô 2, chuột chỉ uống CCl₄, hoạt độ peroxidase tăng lên rất mạnh, hơn 600%. Còn ở lô chuột từ 3 đến 6, chúng đã giảm được xuống còn xấp xỉ 100%. Các lô chuột không uống chất độc, mà chỉ uống chế phẩm carotenoid của chúng tôi, hoạt độ peroxidase cũng xoay quanh 100%.