

Bài báo nghiên cứu

KHẢO SÁT HOẠT TÍNH ỨC CHẾ ENZYME XANTHINE OXIDASE VÀ TRUNG HOÀ GỐC TỰ DO DPPH CỦA MỘT SỐ SẢN PHẨM TRÀ TỪ CÂY *CAMELLIA SINENSIS* (L.) KuntzeNguyễn Trung Hiếu¹, Cao Lý Tấn Thông^{2*}¹Trường THPT Chuyên Trần Đại Nghĩa Thành phố Hồ Chí Minh, Việt Nam²Khoa Dược, Trường Đại học Y Dược Thành phố Hồ Chí Minh, Việt Nam*Tác giả liên hệ: Cao Lý Tấn Thông – Email: cltthong.chdlldct22@ump.edu.vn

Ngày nhận bài: 16-02-2023; ngày nhận bài sửa: 21-6-2023; ngày duyệt đăng: 23-6-2023

TÓM TẮT

Ngoài công dụng làm thức uống, cây trà (*Camellia sinensis*) còn được quan tâm trong y học hiện đại vì có nhiều tác dụng bảo vệ sức khỏe. Nhằm bổ sung thông tin vào hồ sơ tác dụng dược lý của cây trà, nghiên cứu này được tiến hành với mục tiêu đánh giá hoạt tính ức chế xanthine oxidase *in vitro* và hoạt tính trung hoà gốc tự do DPPH, qua đó dự đoán tiềm năng hỗ trợ điều trị bệnh gout của cây trà. Ba sản phẩm trà phổ biến trên thị trường là trà xanh, trà đen và trà oolong được chiết xuất với hai loại dung môi là ethanol 90% và nước cất, thu được sáu cao chiết. Qua thử nghiệm *in vitro*, tất cả các cao đều thể hiện khả năng trung hoà DPPH tương đối tốt (IC_{50} 45 - 55 $\mu\text{g/mL}$, acid ascorbic có IC_{50} $0,01 \pm 0,00$ $\mu\text{g/mL}$), cao ethanol 90% của trà oolong cho thấy hoạt tính ức chế xanthine oxidase khá mạnh (IC_{50} $24,63 \pm 0,01$, allopurinol có IC_{50} $1,51 \pm 0,00$ $\mu\text{g/mL}$). Kết quả của nghiên cứu gợi ý rằng trà oolong có tiềm năng hỗ trợ điều trị bệnh gout.

Từ khóa: *Camellia sinensis*; DPPH; trà oolong; xanthine oxidase

1. Mở đầu

Cây Trà có tên khoa học là *Camellia sinensis* (L.) Kuntze, thuộc họ Theaceae. Bộ phận dùng chủ yếu của cây Trà là búp lá non (Do, 2015). Búp trà chứa: tanin (hỗn hợp catechin 30-35%), một số flavonoid (kaempferol, quercetin), một số acid phenol đơn giản (acid caffeic, acid protocatechuic, acid gallic), alkaloid nhân purin (caffeine 2,5-4,5%, theophylline và theobromine chiếm hàm lượng rất nhỏ)... (Pham, 2011). Thành phần polyphenol của trà (tanin, flavonoid, các acid phenol) đã được chứng minh có tác dụng chống oxy hoá tốt (Pham, 2011).

Có nhiều cách chế biến trà sau khi thu hái, mỗi cách chế biến sẽ làm thay đổi thành phần hoá học và hương vị của trà, dẫn đến thay đổi cảm nhận của người dùng lẫn hoạt tính

Cite this article as: Nguyen Trung Hieu, & Cao Ly Tan Thong (2023). *In vitro* investigation on xanthine oxidase inhibitory effect and DPPH free radical scavenging capacity of tea products from *Camellia sinensis* (L.) Kuntze. *Ho Chi Minh City University of Education Journal of Science*, 20(6), 992-1003.

sinh học. Trà xanh (green tea) là sản phẩm sấy khô nhẹ nhàng của búp trà tươi ở nhiệt độ 60-80°C, không trải qua quá trình lên men nên thành phần được giữ nguyên (Yanagimoto et al., 2003). Trà đen (black tea) là trà xanh được lên men lâu nhất, mức độ oxy hoá của trà đen rất cao (Yanagimoto et al., 2003). Trà oolong (oolong tea) có xuất xứ từ Đài Loan, mức độ oxy hoá kém hơn trà đen nhưng mạnh hơn trà xanh (Yanagimoto et al., 2003). Nhìn chung, thành phần polyphenol của búp trà thay đổi sau khi lên men, khiến cho một số hoạt tính sinh học thay đổi theo. Hoạt tính ức chế xanthine oxidase của trà xanh và các chế phẩm trà lên men nói trên chưa được khảo sát rõ, vì vậy giá trị của chúng trong y học chưa được hiểu biết tường tận.

Xanthine oxidase (XO) là một enzyme oxy hoá - khử, xúc tác cho quá trình oxy hoá hypoxanthine thành xanthine và xanthine thành acid uric, là hai giai đoạn cuối cùng của quá trình chuyển hoá purin trong cơ thể. Thông thường, acid uric được đào thải qua thận, nhưng do bản chất kém phân cực, khó tan trong nước, nên nếu acid uric tích lũy với hàm lượng cao trong máu sẽ dẫn đến hiện tượng kết tinh trong dịch khớp, sụn xương... gây ra bệnh gout (Gunduđdu et al., 2020). Vì vậy, các chất ức chế XO mạnh có tác dụng làm giảm sinh tổng hợp acid uric, có ý nghĩa trên lâm sàng để phòng và điều trị gout. Trong đó, allopurinol là thuốc điều trị gout có cơ chế như trên.

Ngoài ra, các gốc oxy tự do phản ứng (ROS) là phụ phẩm của phản ứng oxy hoá xanthine được xúc tác bởi XO, như superoxid (O_2^-), hydroperoxid (H_2O_2), gây hại cho sức khoẻ (Gunduđdu et al., 2020). Vì vậy, việc ức chế enzyme XO và trung hoà các gốc tự do sẽ hỗ trợ điều trị bệnh gout, góp phần bảo vệ sức khoẻ.

Nghiên cứu này sử dụng mô hình ức chế enzyme xanthine oxidase *in vitro* và mô hình trung hoà gốc tự do DPPH để dự đoán tiềm năng hỗ trợ điều trị gout và chống oxy hoá của ba sản phẩm trà phổ biến trên thị trường. Các kết quả của nghiên cứu này đóng góp bằng chứng về tác dụng làm hạ acid uric máu và chống oxy hoá vào hồ sơ dược lí của cây trà.

2. Địa điểm, thời gian và phương pháp nghiên cứu

2.1. Địa điểm và thời gian nghiên cứu

Tổng thể nghiên cứu được thực hiện từ tháng 10 đến tháng 12 năm 2022. Đề mục đánh giá mẫu nghiên cứu và chiết cao được thực hiện tại Phòng Thực hành Lí-Hoá-Sinh của Trường THPT Chuyên Trần Đại Nghĩa, Thành phố Hồ Chí Minh. Đề mục đo lường hoạt tính ức chế enzyme xanthine oxidase và trung hoà gốc tự do DPPH được thực hiện tại Bộ môn Dược liệu, Trường Đại học Y Dược Thành phố Hồ Chí Minh

2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Đánh giá mẫu trà và điều chế cao

- **Nguyên tắc chung**

Mẫu trà được nghiền nhỏ thành bột thô (kích thước hạt 0,5 mm). Các mẫu bột này được xác định độ ẩm bằng phương pháp sấy. Bột dược liệu được chiết xuất bằng hai loại

dung môi là ethanol 90% hoặc nước cất, theo phương pháp ngâm nóng. Dịch chiết được cô cách thủy để loại dung môi và thu lấy cao đặc.

Cao đặc được ghi nhận các tính chất cảm quan (màu sắc, mùi) và khối lượng. Độ ẩm của cao được xác định bằng phương pháp sấy dựa trên hướng dẫn của Dược điển Việt Nam V (Vietnam, 2017). Dữ liệu khối lượng và độ ẩm của cao, khối lượng và độ ẩm của bột được liệu được dùng để tính hiệu suất chiết.

• **Phương pháp thực hiện**

1. *Kiểm tra mẫu và nghiền thành bột:* ghi nhận và chụp ảnh bao bì sản phẩm, mã hoá mẫu, chụp ảnh, sấy mẫu trong tủ sấy đối lưu ở 65°C trong 15 phút, nghiền mẫu lúc còn nóng và rây để thu được bột thô (kích thước hạt 0,5 mm).

2. *Xác định độ ẩm của nguyên liệu:* điều chỉnh tủ sấy ở nhiệt độ 100°C, sấy khô chén sứ rồi để nguội trong bình hút ẩm chứa silica gel. Cân và ghi nhận khối lượng chén sứ sau khi nguội (m_0). Cân chính xác khoảng 2,0 g bột dược liệu (m_m) vào chén sứ, sấy ở nhiệt độ 100°C trong 30 phút, làm nguội trong bình hút ẩm chứa silica gel. Cân và ghi nhận khối lượng chén sứ chứa bột sau khi nguội (m_t). Thực hiện lại quy trình sấy – làm nguội – cân, đến khi khối lượng chén không đổi (2 lần cân liên tiếp có kết quả chênh lệch không quá 0,5 mg), ghi nhận giá trị m_t . Độ ẩm của nguyên liệu ($\%h_m$) được xác định theo công thức 1:

$$\%h_m = \frac{m_t - m_0}{m_m} \times 100 \tag{1}$$

Quá trình cân được thực hiện 3 lần. Độ ẩm của nguyên liệu được trình bày dưới dạng $\overline{\%h_m} \pm SEM$, $\overline{\%h_m}$ là giá trị trung bình 3 lần và SEM là độ lệch chuẩn trung bình.

3. *Chiết xuất:* cân chính xác khoảng 80 g bột dược liệu vào chai thủy tinh cổ nhỏ. Làm ẩm bột với 100 mL dung môi (cồn 90% hoặc nước cất) trong 15 phút. Bột dược liệu được chiết xuất theo phương pháp ngâm nóng, tỉ lệ dược liệu – dung môi là 1 : 5. Tiến hành chiết xuất theo các thông số ghi trong Bảng 1.

Bảng 1. Thông số quy trình chiết cao ethanol 90% và cao nước

Số lần chiết	Lượng dung môi (mL)	Thời gian chiết (giờ)	Nhiệt độ bếp cách thủy (°C)
1	200	4	65 °C
2	100	4	65 °C

Dịch chiết được lọc qua bông gòn và giấy lọc 102. Dùng dung môi trắng bã dược liệu, bông và giấy lọc để bổ sung thể tích đến 400 mL, thu được cao lỏng 1 : 5.

4. *Cô đặc cao lỏng:* cao lỏng được cho vào đĩa Petri có đường kính lớn đặt trên bếp cách thủy. Cô cạn cao lỏng ở nhiệt độ bếp 65°C đến khi đặc quánh.

5. *Xác định độ ẩm của cao đặc:* điều chỉnh tủ sấy ở nhiệt độ 100°C, sấy khô chén sứ rồi để nguội trong bình hút ẩm chứa silica gel. Cân và ghi nhận khối lượng chén sứ sau khi nguội (m_0). Cân chính xác khoảng 2,0 g cao (m_e) vào chén sứ, sấy ở nhiệt độ 100°C trong 45 phút, làm nguội trong bình hút ẩm chứa silica gel. Cân và ghi nhận khối lượng chén sứ chứa cao sau khi nguội (m_t). Thực hiện lại quy trình sấy – làm nguội – cân, đến khi khối

lượng chén không đổi (hai lần cân liên tiếp có kết quả chênh lệch không quá 0,5 mg), ghi nhận giá trị m_t . Độ ẩm của cao (% h_e) được xác định theo công thức 2:

$$\%h_e = \frac{m_t - m_0}{m_e} \times 100 \quad (2)$$

Quá trình cân được thực hiện 3 lần. Độ ẩm của cao được trình bày dưới dạng $\overline{\%h_e} \pm \text{SEM}$, $\overline{\%h_e}$ là giá trị trung bình ba lần và SEM là độ lệch chuẩn trung bình.

Quá trình cô cao lỏng được xem là hoàn thành khi độ ẩm của cao không vượt quá 20% (theo quy định của cao đặc trong Dược điển Việt Nam V).

6. *Xác định khối lượng của cao đặc và tính hiệu suất chiết*: hiệu suất chiết (%H) là phần trăm lượng cao đặc thu được từ một khối lượng dược liệu cho trước, sau khi đã trừ đi độ ẩm, được tính theo công thức 3:

$$\%H = \frac{m_e \times (100 - \%h_e)}{m_m \times (100 - \%h_m)} \times 100 \quad (3)$$

2.2.2. Phương pháp đo lường hoạt tính ức chế enzyme xanthine oxidase

• Nguyên tắc chung

Phương pháp đánh giá hoạt tính ức chế XO dựa theo mô tả của Kai-Wei Lin và cộng sự (2011) (Lin, Yang, & Lin, 2011). Hoạt tính ức chế XO của các cao chiết được đánh giá thông qua lượng acid uric được tạo thành sau khi xử lý enzyme với các mẫu cao, nồng độ acid uric được xác định bằng cách đo độ hấp thụ UV-VIS ở bước sóng 290 nm. Chất chứng dương là allopurinol. Mỗi nghiệm thức được lặp lại ba lần.

• Quy trình thực hiện

1. *Pha dung dịch đệm phosphate 70 mM (pH 7,5)*: cân chính xác khoảng 9,21 g K_2HPO_4 và 2,33 g KH_2PO_4 vào bình định mức 1000 mL, thêm 300 mL nước cất 2 lần, lắc đều, siêu âm không gia nhiệt, điền dung môi đến vạch.

2. *Chuẩn bị mẫu thử*: cân chính xác 2,0 mg từng mẫu cao hoặc allopurinol vào eppendorf, bổ sung chính xác 2 mL DMSO, siêu âm nhẹ và vortex, thu được các dung dịch gốc có nồng độ 1 mg/mL. Các dung dịch này được pha loãng thành dãy nồng độ thử nghiệm bằng dung dịch đệm phosphate 70 mM (pH 7,5).

3. *Chuẩn bị dung dịch xanthine 150 μ M*: cân chính xác 2,28 mg xanthine vào bình định mức 100 mL, thêm 30 mL dung dịch đệm phosphate, siêu âm không gia nhiệt, thêm một vài giọt NaOH 0,1% để trợ tan, điền dung môi đến vạch. Bọc kín, ủ lạnh trong tủ 4°C. Dung dịch này kém bền, dùng ngay sau khi pha.

4. *Chuẩn bị enzyme XO*: lấy chính xác 89,3 μ L enzyme XO vào bình định mức 10 mL, điền dung môi (đệm phosphate) đến vạch. Bọc kín, ủ lạnh trong tủ 4°C.

5. *Thực hiện*: tiến hành đồng thời mẫu chứng, mẫu chứng trắng, mẫu thử, mẫu thử trắng. Mỗi nồng độ thử nghiệm của mẫu chứng, mẫu chứng trắng, mẫu thử (cao/chứng dương), mẫu thử trắng, được thực hiện lặp lại 3 lần. Quy trình thực hiện gồm 4 bước:

- 1) Thêm vào mỗi giếng thử đệm phosphate 70 mM, mẫu thử và XO theo Bảng 2
- 2) Ủ hỗn hợp ở 37°C trong 15 phút
- 3) Thêm 60 μ L dung dịch xanthine, ủ hỗn hợp ở 37°C trong 30 phút
- 4) Đo độ hấp thụ UV-VIS ở bước sóng 290 nm.

Bảng 2. Thiết kế thử nghiệm ức chế XO

	Mẫu chứng (μL)	Mẫu chứng trắng (μL)	Mẫu thử (μL)	Mẫu thử trắng (μL)
Đệm phosphate (μL)	110	140	60	90
Mẫu thử (μL)	-	-	50	-
Dung dịch XO (μL)	30	-	30	50
Dung dịch xanthine (μL)	60	60	60	60

6. *Tính toán:* phần trăm ức chế XO (%I) được tính theo công thức 4:

$$\%I = \left(1 - \frac{A_t - A_{tt}}{A_c - A_{ct}}\right) \times 100 \quad (4)$$

Trong đó:

A_t : độ hấp thụ của acid uric sinh ra ở cuvet thử

A_{tt} : độ hấp thụ của acid uric sinh ra ở cuvet thử trắng

A_c : độ hấp thụ của acid uric sinh ra ở cuvet chứng

A_{ct} : độ hấp thụ của acid uric sinh ra ở cuvet chứng trắng

2.2.3. Phương pháp đo lường hoạt tính trung hòa gốc tự do DPPH

- **Nguyên tắc chung**

Gốc tự do DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) là một gốc tự do bền, có màu tím và có độ hấp thụ cực đại ở bước sóng 517 nm. Khi có mặt chất chống oxy hóa, nó sẽ bị khử thành 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazin (DPPH-H), có màu vàng. Hoạt tính trung hòa gốc tự do DPPH của dịch thủy phân được đánh giá thông qua độ hấp thụ UV-Vis ở bước sóng 517 nm. Phương pháp đánh giá hoạt tính trung hòa gốc tự do DPPH dựa theo mô tả của Turkmen và cộng sự (2006) (Turkmen et al., 2006). Chất chứng dương là acid ascorbic. Mỗi nghiệm thức được lặp lại ba lần.

- **Quy trình thực hiện**

1. *Chuẩn bị mẫu thử:* cân chính xác 2,0 mg từng mẫu cao hoặc acid ascorbic vào eppendorf, bổ sung chính xác 2 mL methanol, vortex nhẹ, thu được các dung dịch gốc có nồng độ 1 mg/mL. Các dung dịch này được pha loãng thành dãy nồng độ thử nghiệm bằng methanol.

2. *Chuẩn bị dung dịch DPPH 0,1 mM:* cân chính xác 3,94 mg DPPH vào bình định mức 100 mL, thêm 30 mL methanol, lắc đều, điền dung môi đến vạch. Dung dịch này kém bền, dùng ngay sau khi pha.

3. *Thực hiện:* tiến hành đồng thời mẫu chứng, mẫu chứng trắng, mẫu thử, mẫu thử trắng. Mỗi nồng độ thử nghiệm của mẫu chứng, mẫu chứng trắng, mẫu thử (cao/chứng dương), mẫu thử trắng, được thực hiện lặp lại 3 lần. Quy trình thực hiện gồm 4 bước:

- 1) Lấy chính xác 0,5 mL dung dịch mẫu thử đã pha loãng ở các nồng độ khác nhau và mẫu trắng vào ống thử
- 2) Thêm vào ống thử 1,5 mL dung dịch DPPH 0,1 mM
- 3) Ủ trong bóng tối 60 phút
- 4) Đo độ hấp thụ UV-VIS ở bước sóng 517 nm.

Bảng 3. Thiết kế thử nghiệm trung hoà DPPH

	Mẫu chứng trắng (mL)	Mẫu chứng (mL)	Mẫu thử trắng (mL)	Mẫu thử (mL)
Methanol (mL)	2,0	0,5	1,5	-
Dung dịch DPPH (mL)	-	1,5	-	1,5
Mẫu thử (mL)	-	-	0,5	0,5

4. *Tính toán:* phần trăm trung hoà DPPH (%N) được tính theo công thức 5

$$\%N = \left(1 - \frac{A_t - A_{tt}}{A_c - A_{ct}}\right) \times 100 \tag{5}$$

Trong đó:

A_t : độ hấp thụ của dung dịch ở cuvet thử

A_{tt} : độ hấp thụ của dung dịch ở cuvet thử trắng

A_c : độ hấp thụ của dung dịch ở cuvet chứng

A_{ct} : độ hấp thụ của dung dịch ở cuvet chứng trắng.

2.2.4. *Phương pháp xử lí số liệu*

Dữ liệu được xử lí bằng phần mềm Microsoft Excel 365. Mỗi nghiệm thức được lặp lại 3 lần và lấy giá trị trung bình ± S.E.M để tính toán. Sự phụ thuộc của %I hoặc %N (y) vào nồng độ mẫu thử f(x) được biểu diễn thành các điểm dữ liệu phi tuyến tính. Từ các điểm đó, đường xu hướng đa thức bậc II được thiết lập có dạng $y = f(x) = ax^2 + bx + c$. Thay thế giá trị $y = 50$ và giải phương trình $f(x) - 50 = 0$ để tìm ra giá trị ức chế 50% (IC₅₀) của các mẫu cao trên hai hoạt tính.

3. Kết quả và thảo luận

3.1. Đánh giá mẫu trà và điều chế cao

3.1.1. *Ghi nhận thông tin mẫu và nghiền bột*

Các thông tin về ba sản phẩm trà được trình bày trong Bảng 4 và hình ảnh lấy mẫu được minh hoạ trong Hình 1.

Bảng 4. Thông tin định danh các sản phẩm trà

STT	Tên sản phẩm	Nhà SX	Ngày SX	Ký hiệu
1	Trà xanh Cacaomi	Cty TNHH CASA	14-09-2022	T1
2	Trà đen Việt Nam Phúc Long	Cty TNHH Phúc Long	19-11-2021	T2
3	Trà oolong Vũ Gia	Trà Bảo Lộc Vũ Gia	05-09-2022	T3



1

2

3

Hình 1. Hình ảnh ba mẫu trà. 1-1: T1, 1-2: T2, 1-3: T3

Các mẫu trà được nghiền và rây qua rây 0,5 mm để đồng nhất hoá kích thước, tạo thuận lợi cho việc chiết xuất.

3.1.2. Kết quả đo độ ẩm của các mẫu trà T1 → T3

Các mẫu T1 → T3 có độ ẩm lần lượt là $7,38 \pm 0,99$; $6,07 \pm 0,63$; $7,08 \pm 0,72\%$. Tất cả mẫu bột đều có độ ẩm nằm trong giới hạn cho phép của Dược điển Việt Nam V.

3.1.3. Đánh giá cảm quan của cao lỏng

Các cao ethanol có màu đen ánh lục do chứa nhiều diệp lục tố, mùi thơm. Các cao nước có màu nâu cánh gián, mùi thơm đặc trưng cho từng loại trà.

3.1.4. Kết quả đo độ ẩm của cao chiết

Các mẫu T1C, T1N, T2C, T2N, T3C, T3N có độ ẩm lần lượt là $12,40 \pm 1,14$; $11,19 \pm 1,33$; $9,96 \pm 1,20$; $12,65 \pm 2,12$; $14,99 \pm 0,65$; $11,06 \pm 0,90\%$. Tất cả các cao đều có độ ẩm nằm trong giới hạn cho phép của cao đặc theo quy định của Dược điển Việt Nam V.

Chú thích: T1C = cao trà xanh được chiết bằng cồn 90%; T1N = cao trà xanh được chiết bằng nước cất; T2C = cao trà đen được chiết bằng cồn 90%; T2N = cao trà đen được chiết bằng nước cất; T3C = cao trà oolong được chiết bằng cồn 90%; T3N = cao trà oolong được chiết bằng nước cất

3.1.5. Hiệu suất chiết

Cao đặc sau khi được đo độ ẩm thì tiến hành cân và ghi nhận khối lượng, kết quả được trình bày trong Bảng 5.

Bảng 5. Hiệu suất chiết các cao trà T1C → T3N

Số hiệu	Hiệu suất (%)	Số hiệu	Hiệu suất (%)
T1C	$6,03 \pm 0,01$	T2N	$20,83 \pm 0,36$
T1N	$9,72 \pm 0,04$	T3C	$8,50 \pm 0,00$
T2C	$12,33 \pm 0,08$	T3N	$19,29 \pm 0,05$

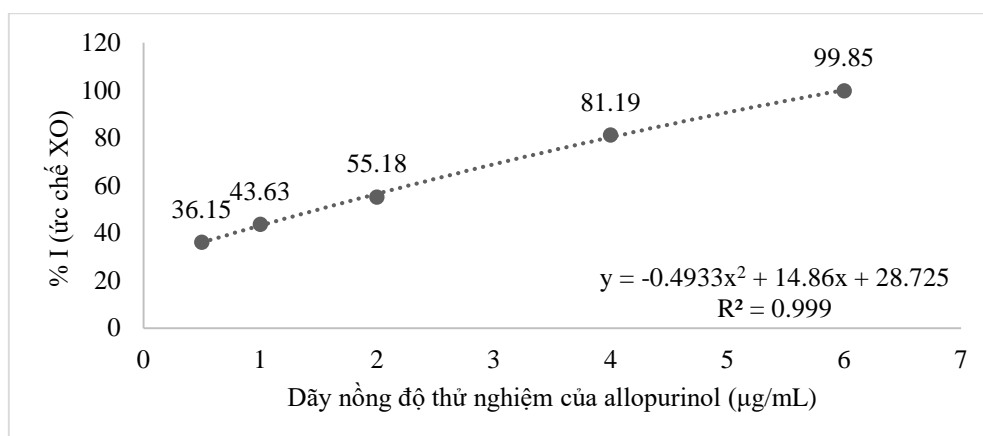
Nhận xét

Hiệu suất chiết ethanol 90% thấp hơn nước cất. Hiệu suất chiết trà đen (T2) cao nhất.

3.2. Hoạt tính ức chế enzyme xanthine oxidase của các mẫu cao

3.2.1. Giá trị IC_{50} của chứng dương allopurinol

Sự phụ thuộc của phần trăm ức chế XO (y, %I) vào nồng độ allopurinol f(x) được biểu diễn thành các điểm dữ liệu phi tuyến tính. Đường hồi quy phi tuyến tính cho các điểm này được trình bày trong Hình 2.



Hình 2. Biểu đồ đường phi tuyến tính biểu diễn sự phụ thuộc của %I vào nồng độ allopurinol

Dựa vào phương trình phi tuyến tính trên, giá trị IC_{50} của allopurinol được tính toán là $1,51 \pm 0,00 \mu\text{g/mL}$.

3.2.2. Tính giá trị IC_{50} của các mẫu cao

Thực hiện tương tự chứng dương allopurinol, đường hồi quy phi tuyến tính của sáu mẫu cao T1C → T3N cũng được thiết lập, qua đó giá trị IC_{50} được tính toán nhờ vào phương trình phi tuyến tính (Bảng 6).

Bảng 6. Kết quả tìm IC_{50} trên hoạt tính ức chế xanthine oxidase của các cao trà

Mẫu	Phần trăm ức chế %I ứng với mỗi nồng độ (µg/mL)					Giá trị IC_{50} (µg/mL)
	25	50	100	150	200	
T1C	44,68 ± 0,02	57,70 ± 0,04	64,96 ± 0,05	84,06 ± 0,01	98,90 ± 0,02	36,68 ± 0,02
T1N	40,85 ± 0,00	49,65 ± 0,03	54,85 ± 0,01	67,66 ± 0,03	85,10 ± 0,04	70,43 ± 0,01
T2C	25,24 ± 0,01	37,62 ± 0,01	46,36 ± 0,02	57,59 ± 0,01	78,12 ± 0,05	114,25 ± 0,02
T2N	34,34 ± 0,04	43,02 ± 0,04	51,10 ± 0,04	64,13 ± 0,06	81,20 ± 0,03	92,17 ± 0,01
T3C	48,78 ± 0,04	58,42 ± 0,02	67,91 ± 0,04	81,79 ± 0,02	96,13 ± 0,03	24,63 ± 0,01
T3N	42,17 ± 0,01	55,63 ± 0,00	62,83 ± 0,01	79,04 ± 0,03	91,32 ± 0,00	43,90 ± 0,02

Nhận xét

Xét theo dung môi chiết là ethanol 90%, hoạt tính ức chế XO mạnh dần theo thứ tự: $T2C < T1C < T3C$ (IC_{50} lần lượt là $114,25 \pm 0,02 > 36,68 \pm 0,02 > 24,63 \pm 0,01 \mu\text{g/mL}$).

Xét theo dung môi chiết là nước cất, hoạt tính ức chế XO mạnh dần theo thứ tự: $T2N < T1N < T3N$ (IC_{50} lần lượt là $92,17 \pm 0,01 > 70,43 \pm 0,01 > 43,90 \pm 0,02 \mu\text{g/mL}$).

Xét trên cả 2 dung môi chiết xuất, nhìn chung hoạt tính ức chế XO mạnh dần theo thứ tự $T2 < T1 < T3$.

Tất cả các cao chiết đều có hoạt tính yếu hơn allopurinol ($IC_{50} 1,51 \pm 0,00 \mu\text{g/mL}$).

Thảo luận

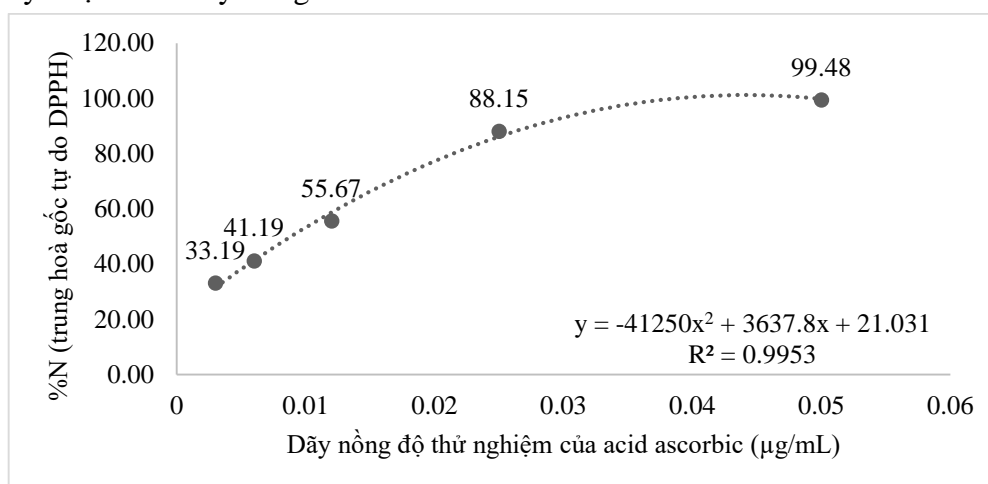
Trong một số nghiên cứu trước đây trên cùng đối tượng là trà, có một số hợp chất tự nhiên đã được chứng minh hoạt tính ức chế XO như flavonoid, một số acid phenol đơn giản, lignan... (Mehmood et al., 2019). Đây là các hợp chất có độ phân cực trung bình, tan được trong ethanol 90%, khó tan trong nước. Vì vậy, hoạt tính ức chế XO của các cao ethanol 90% có thể là do sự hiện diện của những hợp chất này trong trà.

Bên cạnh đó, cao chiết nước của 3 loại trà chứa chủ yếu là các chất phân cực mạnh, điển hình như các tanin (Pham, 2011). Tính chất hoá học của tanin là gây đông tụ protein (Ngo & Tran, 2010), vì vậy tanin trong cao nước trà có thể làm biến tính enzyme xanthine oxidase, ảnh hưởng đến kết quả thử nghiệm trên enzyme.

3.3. Hoạt tính trung hoà gốc tự do DPPH của các mẫu cao

3.3.1. Giá trị IC_{50} của chứng dương acid ascorbic

Sự phụ thuộc của phần trăm trung hoà DPPH (y, %N) vào nồng độ acid ascorbic f(x) được biểu diễn thành các điểm dữ liệu phi tuyến tính. Đường hồi quy phi tuyến tính cho các điểm này được trình bày trong Hình 3.



Hình 3. Biểu đồ đường phi tuyến tính biểu diễn sự phụ thuộc của %N vào nồng độ acid ascorbic

Dựa vào phương trình phi tuyến tính trên, giá trị IC_{50} của acid ascorbic được tính toán là $0,01 \pm 0,00 \mu\text{g/mL}$.

3.3.2. Tính giá trị IC_{50} của các mẫu cao

Thực hiện tương tự chứng dương acid ascorbic, đường hồi quy phi tuyến tính của sáu mẫu cao T1C \rightarrow T3N cũng được thiết lập, qua đó giá trị IC_{50} được tính toán nhờ vào phương trình phi tuyến tính (Bảng 7).

Bảng 7. Kết quả IC_{50} trên hoạt tính trung hoà gốc tự do DPPH của các cao trà

Mẫu	Phần trăm trung hoà %N ứng với mỗi nồng độ ($\mu\text{g/mL}$)					Giá trị IC_{50} ($\mu\text{g/mL}$)
	20	40	60	80	100	
T1C	37,44 ± 0,30	46,54 ± 0,58	56,87 ± 0,17	63,62 ± 1,29	69,37 ± 0,44	45,39 ± 0,00
T1N	35,56 ± 0,08	43,08 ± 0,30	52,88 ± 0,22	62,79 ± 0,22	70,66 ± 0,30	53,90 ± 0,00
T2C	41,02 ± 0,25	48,94 ± 0,25	56,22 ± 0,17	60,33 ± 0,14	67,25 ± 0,58	43,46 ± 0,01
T2N	39,91 ± 0,76	45,83 ± 0,38	54,34 ± 0,71	62,09 ± 0,60	70,31 ± 0,91	49,43 ± 0,00
T3C	36,74 ± 0,08	42,43 ± 0,25	52,05 ± 0,08	65,90 ± 0,38	73,18 ± 0,68	53,77 ± 0,01
T3N	39,44 ± 0,33	43,96 ± 0,66	54,87 ± 0,75	62,15 ± 0,71	71,77 ± 0,79	51,17 ± 0,01

Nhận xét

Xét theo dung môi chiết là ethanol 90%, hoạt tính trung hoà gốc tự do DPPH mạnh dần theo thứ tự: **T3C < T1C < T2C** (IC_{50} lần lượt là $53,77 \pm 0,02 > 45,39 \pm 0,00 > 43,46 \pm 0,01 \mu\text{g/mL}$).

Xét theo dung môi chiết là nước cất, hoạt tính trung hoà gốc tự do DPPH mạnh dần theo thứ tự: **T1N < T3N < T2N** (IC_{50} lần lượt là $53,90 \pm 0,00 > 51,17 \pm 0,01 > 49,43 \pm 0,00 \mu\text{g/mL}$).

Tất cả các cao chiết đều có hoạt tính yếu hơn acid ascorbic ($IC_{50} 0,01 \pm 0,00 \mu\text{g/mL}$).

Thảo luận

Hoạt tính trung hoà gốc tự do DPPH được tìm thấy ở nhiều nhóm hợp chất tự nhiên, đặc biệt là các phenol, bao gồm: acid phenol đơn giản, lignan, stilbenoid, flavonoid, tanin... và một số carotenoid (Turkmen et al., 2006). Trong nghiên cứu của chúng tôi, trà oolong cho hoạt tính kém hơn trà xanh và trà đen, có thể do quá trình sản xuất đặc trưng của trà oolong đã oxy hoá một phần các hợp chất phenol, điều đó làm tăng hương vị của trà, song phần nào làm giảm hoạt tính chống oxy hoá. Tuy nhiên, hoạt tính trung hoà gốc tự do DPPH không khác biệt giữa các cao chiết từ ethanol 90% hoặc nước cất, vì vậy cả 3 loại trà đều có tác dụng tốt, đồng thời cả 2 dung môi đều thích hợp để sản xuất cao Trà có tác dụng chống oxy hoá tương đối mạnh.

4. Kết luận và kiến nghị

4.1. Kết luận

Nghiên cứu này đã khảo sát hoạt tính ức chế xanthine oxidase và trung hoà gốc tự do DPPH của ba sản phẩm trà phổ biến trên thị trường Việt Nam (trà xanh, trà đen, trà oolong), bằng cách thử nghiệm độc lập cao chiết ethanol 90% và nước cất của ba loại trà nói trên theo các mô hình in vitro hiện đại. Kết quả của nghiên cứu cho thấy trà oolong có hoạt tính ức chế XO tương đối mạnh, $IC_{50} 24,63 \pm 0,01 \mu\text{g/mL}$ (cao ethanol 90%) và $43,90 \pm 0,02 \mu\text{g/mL}$ (cao nước), đồng thời có khả năng trung hoà gốc tự do DPPH khá tốt, $IC_{50} 53,77 \pm 0,02 \mu\text{g/mL}$ (cao ethanol 90%) và $51,17 \pm 0,01 \mu\text{g/mL}$ (cao nước). Đây là những bằng chứng cho thấy trà oolong có nhiều tiềm năng trong việc hỗ trợ điều trị, giảm nhẹ bệnh gout.

4.2. Kiến nghị

Thực hiện các nghiên cứu kế thừa mang tính chuyên sâu hơn, làm rõ thành phần hoá học mang hoạt tính sinh học đã được chứng minh trong nghiên cứu này; khảo sát tương quan giữa hàm lượng polyphenol toàn phần với hoạt tính ức chế xanthine oxidase và hoạt tính trung hoà gốc tự do DPPH của trà oolong.

- ❖ **Tuyên bố về quyền lợi:** Các tác giả xác nhận hoàn toàn không có xung đột về quyền lợi.
- ❖ **Lời cảm ơn:** Nhóm nghiên cứu trân trọng cảm ơn Trường THPT Chuyên Trần Đại Nghĩa và Bộ môn Dược liệu – Trường Đại học Y Dược Thành phố Hồ Chí Minh đã hỗ trợ trang thiết bị thí nghiệm.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Do, T. L. (2015). *Nhung cay thuoc va vi thuoc Viet Nam [Flora and fauna used for medicinal purposes in Viet Nam]*: Hong Duc Publishing House.
- Gundugdu, Ö., Noma, S. A. A., Taskin-Tok, T., Ateş, B., & Kishali, N. (2020). Evaluation of xanthine oxidase inhibitor properties on isoindoline-1,3-dion derivatives and calculation of interaction mechanism. *Journal of Molecular Structure*, 1204, 127523.
- Lin, K. W., Yang, S. C., & Lin, C. N. (2011). Antioxidant constituents from the stems and fruits of *Momordica charantia*. *Food Chemistry*, 127(2), 609-614.
- Mehmood, A., Ishaq, M., Zhao, L., & Safdar, B. (2019). Natural compounds with xanthine oxidase inhibitory activity: A review. *Chemical Biology & Drug Design*, 93(4), 387-418.
- Ngo, V. T., & Tran, H. (2010). *Duoc lieu hoc (Vol. 1) [Pharmacognosy (Volume 1)]*: Y hoc Publishing House.
- Pham, T. K. (2011). *Duoc lieu hoc (Vol. 2) [Pharmacognosy (Volume 2)]*. Y hoc Publishing House.
- Turkmen, N., Sari, F., Poyrazoglu, E. S., & Velioglu, Y. S. (2006). Effects of prolonged heating on antioxidant activity and colour of honey. *Food Chemistry*, 95(4), 653-657.
- Vietnam, P. C. o. (2017). *Vietnam Pharmacopoeia V (Vol. 2)*: Y hoc Publishing House.
- Yanagimoto, K., Ochi, H., Lee, K. G., & Shibamoto, T. (2003). Antioxidative activities of volatile extracts from green tea, oolong tea, and black tea. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51(25), 7396-7401.

**IN VITRO INVESTIGATION ON XANTHINE OXIDASE INHIBITORY EFFECT
AND DPPH FREE RADICAL SCAVENGING CAPACITY
OF TEA PRODUCTS FROM CAMELLIA SINENSIS (L.) Kuntze**

Nguyen Trung Hieu¹, Cao Ly Tan Thong^{2}*

¹Tran Dai Nghia Senior High School for The Gifted at Ho Chi Minh City, Vietnam

²Faculty of Pharmacy, University of Medicine and Pharmacy at Ho Chi Minh City, Vietnam

Corresponding author: Cao Ly Tan Thong – Email: cltthong.chdldct22@ump.edu.vn

Received: February 16, 2023; Revised: June 21, 2023; Accepted: June 23, 2023

ABSTRACT

Not only has the tea tree (Camellia sinensis) been used as a popular drink, but it is also a source of study in modern medicine since it has been proven to possess many health benefits. Aiming for providing supplementary information to the pharmacological profiles of tea trees, this study was carried out to measure the in vitro xanthine oxidase inhibitory effect and DPPH free radical scavenging capacity, to estimate the gout-relieving potential of this plant. Three brands of tea trees were investigated, including green tea, black tea, and oolong tea. These products were hot-macerated independently with ethanol 90% or distilled water, yielding six crude extracts. Through in vitro screening, all of the extracts showed a moderate capacity of DPPH free radical scavenging (IC_{50} values range between 45 and 55 $\mu\text{g/mL}$, compared to acid ascorbic with IC_{50} as $0.01 \pm 0.00 \mu\text{g/mL}$), the ethanol 90% extract of oolong tea exhibited quite strong inhibitory effect on xanthine oxidase (IC_{50} as $24.63 \pm 0.01 \mu\text{g/mL}$, compared to allopurinol with IC_{50} as $1.51 \pm 0.00 \mu\text{g/mL}$). The results suggested that oolong tea could potentially be a gout-relieving remedy.

Keywords: *Camellia sinensis*; DPPH; oolong tea; xanthine oxidase