

ĐẠI HỌC THÁI NGUYÊN
TRƯỜNG ĐẠI HỌC SƯ PHẠM

THÂN THỊ KIM PHƯỢNG

**NGHIÊN CỨU ĐẶC ĐIỂM THỰC VẬT HỌC VÀ HOẠT TÍNH
SINH HỌC CỦA CAO CHIẾT TỪ LOÀI *Adinandra bockiana***

LUẬN VĂN THẠC SĨ SINH HỌC

Thái Nguyên, tháng 12/2020

**ĐẠI HỌC THÁI NGUYÊN
TRƯỜNG ĐẠI HỌC SƯ PHẠM**

THÂN THỊ KIM PHƯỢNG

**NGHIÊN CỨU ĐẶC ĐIỂM THỰC VẬT HỌC VÀ HOẠT TÍNH
SINH HỌC CỦA CAO CHIẾT TỪ LOÀI *Adinandra bockiana***

Ngành: Sinh học thực nghiệm

Mã số: 8420114

LUẬN VĂN THẠC SĨ SINH HỌC

Người hướng dẫn khoa học: PGS.TS. Nguyễn Hữu Quân

Thái Nguyên, tháng 12/2020

LỜI CAM ĐOAN

Tôi xin cam đoan đây là công trình nghiên cứu của tôi. Mọi trích dẫn trong luận văn đều ghi rõ nguồn gốc. Các số liệu, kết quả nghiên cứu trong luận văn là trung thực và chưa được ai công bố.

Thái Nguyên, tháng 12 năm 2020

Tác giả luận văn

Thân Thị Kim Phụng

**XÁC NHẬN
CỦA KHOA CHUYÊN MÔN**

**XÁC NHẬN
CỦA GIÁO VIÊN HƯỚNG DẪN**

PGS.TS. Nguyễn Hữu Quân

LỜI CẢM ƠN

Lời đầu tiên em xin bày tỏ lòng biết ơn chân thành và sâu sắc tới PGS.TS. Nguyễn Hữu Quân, giảng viên Khoa Sinh học, Trường Đại học Sư phạm - Đại học Thái Nguyên đã tận tình hướng dẫn, chỉ bảo và tạo mọi điều kiện giúp đỡ em trong quá trình nghiên cứu và hoàn thành luận văn.

Em cũng xin chân thành cảm ơn PGS.TS. Phạm Văn Khang, giảng viên Khoa Hóa học đã hướng dẫn em về tách chiết và định tính các chất hóa học.

Em xin chân thành cảm ơn sự giúp đỡ của cô Trần Thị Hồng, kỹ thuật viên Phòng thí nghiệm Công nghệ tế bào thực vật, cô Cao Thị Phương Thảo, kỹ thuật viên Phòng thí nghiệm Thực vật học thuộc Khoa Sinh học Trường Đại học Sư phạm - Đại học Thái Nguyên đã tạo mọi điều kiện giúp em trong suốt quá trình nghiên cứu.

Em xin chân thành cảm ơn các thầy cô giáo thuộc Khoa Sinh học và các thầy cô giáo thuộc bộ phận sau đại học, Phòng Đào tạo, Trường Đại học Sư phạm - Đại học Thái Nguyên đã tạo mọi điều kiện thuận lợi cho em trong quá trình học tập và hoàn thành luận văn.

Em xin bày tỏ lời biết ơn đến gia đình, bạn bè đã động viên, khuyến khích và giúp đỡ em trong tiến trình học tập và hoàn thành luận văn.

Em xin cảm ơn sự hỗ trợ kinh phí từ đề tài Quỹ Nafosted “Phân tích thành phần hóa học và tìm kiếm các hợp chất thứ cấp có hoạt tính kháng ung thư và kháng viêm từ một số loài thực vật thuộc chi Dương đồng (*Adinandra*) ở Việt Nam”, mã số 106.02-2018.338.

Thái Nguyên, tháng 12 năm 2020

Tác giả luận văn

Thân Thị Kim Phụng

MỤC LỤC

LỜI CAM ĐOAN	i
LỜI CẢM ƠN	ii
MỤC LỤC	iii
DANH MỤC CHỮ VIẾT TẮT	iv
DANH MỤC BẢNG	v
DANH MỤC HÌNH.....	vi
MỞ ĐẦU	1
1. Đặt vấn đề	1
2. Mục tiêu nghiên cứu	1
3. Nội dung nghiên cứu.....	2
CHƯƠNG I. TỔNG QUAN TÀI LIỆU	3
1.1. Giới thiệu chung về thực vật thuộc chi Dương đồng (<i>Adinandra</i>).....	3
1.1.1. Chi Dương đồng (<i>Adinandra</i>).....	3
1.1.2. Loài <i>Adinandra bockiana</i>	5
1.2. Hoạt tính sinh học và thành phần hóa học của các loài thuộc chi <i>Adinandra</i> ...6	
1.2.1. Nghiên cứu về hoạt tính sinh học	6
1.2.2. Nghiên cứu về thành phần hóa học.....	9
CHƯƠNG II. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU	12
2.1. Vật liệu, địa điểm và thời gian nghiên cứu.....	12
2.1.1. Vật liệu và môi trường nuôi cấy	12
2.1.2. Hóa chất, thiết bị.....	12
2.1.3. Địa điểm và thời gian nghiên cứu.....	14
2.2. Phương pháp nghiên cứu	14
2.2.1. Phương pháp phân loại hình thái	14
2.2.2. Phương pháp giải phẫu thực vật	14
2.2.3. Phương pháp điều chế mẫu thử hoạt tính	15
2.2.4. Phương pháp thử hoạt tính kháng khuẩn của cao chiết.....	16
2.2.5. Phương pháp xác định khả năng chống oxy hóa DPPH.....	16
2.2.6. Phương pháp xác định tính độc tế bào ung thư nuôi cấy dạng đơn lớp	16
2.2.7. Phương pháp định tính cao chiết	17

2.2.8. Phân lập các hợp chất	19
2.2.9. Phương pháp xử lý và phân tích kết quả	20
CHƯƠNG III. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN	21
3.1. Đặc điểm hình thái, giải phẫu của loài <i>Adinandra bockiana</i>	21
3.1.1. Đặc điểm hình thái của loài <i>Adinandra bockiana</i>	21
3.1.2. Đặc điểm giải phẫu của loài <i>Adinandra bockiana</i>	22
3.2. Hoạt tính sinh học của cao chiết từ loài <i>Adinandra bockiana</i>	25
3.2.1. Hoạt tính kháng khuẩn của cao chiết từ loài <i>A. bockiana</i>	25
3.2.2. Hoạt tính chống oxy hóa của cao chiết loài <i>A.bockiana</i>	28
3.2.3. Hoạt tính kháng tế bào ung thư của cao chiết ethanol từ loài <i>A. bockiana</i> ..	30
3.3. Khảo sát các hợp chất có trong dịch chiết của cây <i>A. bockiana</i>	31
3.3.1. Định tính polyphenol	31
3.3.2. Định tính tanin	31
3.3.3. Định tính các flavonoid	32
3.3.4. Định tính các coumarin.....	32
3.3.5. Phân tích thành phần các hợp chất trong cao chiết của loài <i>A. bockiana</i>	33
3.4. Kết quả tách chiết một số hợp chất có trong dịch chiết cây <i>A. bockiana</i>	34
KẾT LUẬN VÀ KIẾN NGHỊ	35
KẾT LUẬN.....	35
KIẾN NGHỊ.....	35
CÁC CÔNG TRÌNH KHOA HỌC ĐÃ CÔNG BỐ.....	36
TÀI LIỆU THAM KHẢO	37

DANH MỤC CHỮ VIẾT TẮT

Chữ viết tắt	Tên tiếng Anh	Nghĩa tiếng Việt
DMSO	Dimethyl sulfoxide	
DPPH	2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl	
EC ₅₀	Effective concentration 50%	Nồng độ 50% tác dụng tối đa
ELISA	Enzyme linked immunosorbent assay	Thử nghiệm miễn dịch gắn enzyme
EtOH	Ethanol	
Hep G2	Hepatocellular carcinoma human	Ung thư gan ở người
HPLC	High Performance Liquid Chromatography	Phương pháp sắc ký lỏng hiệu năng cao
IC ₅₀	Inhibitory concentration 50%	Nồng độ ức chế 50% cá thể
ISSR	Inter Simple Sequence Repea	Đánh giá sự sai khác di truyền ở thực vật.
LB	Luria Bertani	Môi trường nuôi cấy chủng vi sinh vật
MCF-7	Ardeno carcinoma	Ung thư vú
MeOH	Methanol	
MIC	Minimalinhibitory concentration	Nồng độ tối thiểu ức chế
MS/MS	Mass spectrometry	Phương pháp khối phổ
NMR	Nuclear Magnetic Resonance	Cộng hưởng từ hạt nhân
OD		Mật độ quang học
TTC	Triphenyl tetrazolium chloride	Chỉ thị màu
TLC	Thin layer chromatography	Sắc ký lớp mỏng

DANH MỤC BẢNG

Bảng 1.1. Danh sách các loài thuộc chi <i>Adinandra</i> phân bố tại Việt Nam	3
Bảng 2.1. Các hóa chất sử dụng trong thí nghiệm.....	12
Bảng 2.2. Thiết bị sử dụng trong thí nghiệm.....	13
Bảng 3.1. Hoạt tính kháng khuẩn của cao chiết từ loài <i>A. bockiana</i>	25
Bảng 3.2. Hoạt tính chống oxy hóa của cao chiết	29
Bảng 3.3. Tác động gây độc tế bào ung thư của cao chiết	30

DANH MỤC HÌNH

Hình 1.1. Một số loài thuộc chi <i>Adinandra</i>	4
Hình 1.2. Mẫu cây <i>A. bockiana</i> phát hiện tại Trung Quốc [28]	6
Hình 1.3. Các hợp chất flavonoid và triterpene saponins từ <i>A. nitida</i>	9
Hình 1.4. Các hợp chất saponin thuộc loài <i>A.nitida</i>	10
Hình 2.1. Một số thiết bị sử dụng trong các thí nghiệm	13
Hình 2.2. Quy trình điều chế mẫu cao chiết loài <i>A.bockiana</i>	15
Hình 2.3. Sơ đồ phân lập các chất	20
Hình 3.1. Đặc điểm hình thái của loài <i>A. bockiana</i> thu tại xã Liêm Phú, huyện Văn Bàn, tỉnh Lào Cai	21
Hình 3.2. Giải phẫu cắt ngang thân cây <i>A. bockiana</i>	23
Hình 3.3. Giải phẫu cắt ngang lá cây <i>A.bockiana</i>	25
Hình 3.4. Hoạt tính kháng khuẩn của cao chiết đối với vi khuẩn <i>B. subtilis</i>	26
Hình 3.5. Hoạt tính kháng của cao chiết đối với vi khuẩn <i>L. Plantarum</i>	26
Hình 3.6. Hoạt tính kháng của cao chiết đối với vi khuẩn <i>E.coli</i>	27
Hình 3.7. Hoạt tính kháng của cao chiết đối với vi khuẩn <i>S. marcescens</i>	27
Hình 3.8. Hoạt tính kháng của cao chiết đối với vi khuẩn <i>S. lutea</i>	28
Hình 3.9. Màu sắc của mẫu khử gốc tự do DPPH trước khi đo của cao ethanol ...	30
Hình 3.10. Phản ứng với muối sắt (III) (A) và với dung dịch H ₂ SO ₄ đặc (B).....	31
Hình 3.11. Định tính tanin bằng phản ứng với thuốc thử vanilin/H ₂ SO ₄ (A) và định tính flavonoid (B).	32
Hình 3.12. Định tính coumarin phản ứng với NaOH (A) và HCl đặc (B)	32
Hình 3.13. Sắc kí đồ cao chiết ethanol (T), cao chiết ethyl acetate (E) và cao chiết dichloromethane (D)	33
Hình 3.14. Sắc ký lớp mỏng một số đoạn của cao chiết.....	34
Hình 3.15. Sắc ký lớp mỏng so sánh cao tổng số và chất A1.....	34

MỞ ĐẦU

1. Đặt vấn đề

Việt Nam là quốc gia nằm trong vùng nhiệt đới gió mùa, có hệ thực vật phong phú với nguồn dược liệu dồi dào và có truyền thống sử dụng nguồn dược liệu từ tự nhiên lâu đời. Hệ thực vật được coi là một nguồn nguyên liệu vô cùng quý cho các nghiên cứu về hợp chất thiên nhiên, cũng như những nghiên cứu về hoạt tính sinh học theo hướng hiện đại. Nghiên cứu hoạt tính sinh học của các hợp chất có nguồn gốc từ thực vật đóng vai trò quan trọng trong sự phát triển về lĩnh vực y dược phục vụ cho cuộc sống của con người.

Xu hướng sử dụng các hợp chất thiên nhiên có sẵn trong cây để điều chế dược phẩm, thực phẩm hiện đang được các nhà khoa học đặc biệt quan tâm. Trong số các hợp chất thu được, có những hợp chất thể hiện hoạt tính gây độc tế bào ung thư, một số khác lại thể hiện hoạt tính kháng vi sinh vật. Tác dụng chữa bệnh, tăng cường và bảo vệ sức khỏe con người ở nhiều loài thực vật chủ yếu là do các hợp chất tự nhiên mà chúng đã sinh tổng hợp, tích lũy trong quá trình sinh trưởng và phát triển.

Trên thế giới đã có một số công trình công bố về thành phần hóa học và tác dụng sinh học của một số loài thực vật thuộc chi Dương đồng (*Adinandra*), họ Chè (*Theaceae*). Kết quả của những nghiên cứu đã chỉ ra nhiều hợp chất phân lập từ loài *Adinandra nitida* đã thể hiện hoạt tính kháng rộng như kháng viêm, chống oxi hóa, diệt trừ các gốc tự do, chống ung thư cũng như chống lại một số loài vi khuẩn gây bệnh. Ở Việt Nam, những nghiên cứu về chi *Adinandra* đã bước đầu tập trung ở việc thống kê danh sách thành phần loài, ngoại trừ loài *Adinandra lienii* đã được công bố về đặc điểm giải phẫu, hoạt tính sinh học của cao chiết và trình tự đoạn gen *matK*. Trong khi loài *Adinandra bockiana* chưa có công bố nào về đặc điểm thực vật học, hoạt tính sinh học cũng như thành phần hóa học. Do đó, nghiên cứu về các đặc tính sinh học cũng như tìm ra được cấu trúc hóa học, thành phần các hợp chất mới và hoạt tính sinh học của các hợp chất mới của loài này là rất cần thiết. Xuất phát từ các cơ sở trên chúng tôi tiến hành thực hiện đề tài: **“Nghiên cứu đặc điểm thực vật học và hoạt tính sinh học của cao chiết từ loài *Adinandra bockiana*”**.

2. Mục tiêu nghiên cứu

- Phân tích được đặc điểm thực vật học của loài *A.bockiana* thu thập được.