

**VIỆN HÀN LÂM KHOA HỌC VÀ CÔNG NGHỆ VIỆT NAM
VIỆN SINH THÁI VÀ TÀI NGUYÊN SINH VẬT**

NGUYỄN THỊ THU THỦY

**NGHIÊN CỨU THÀNH PHẦN HÓA HỌC VÀ TÁC DỤNG DIỆT
TẾ BÀO UNG THƯ CỦA LÁ XẠ ĐEN
(*Ehretia asperula* Zoll. & Mor)**

LUẬN VĂN THẠC SỸ SINH HỌC

HÀ NỘI – 2017

**VIỆN HÀN LÂM KHOA HỌC VÀ CÔNG NGHỆ VIỆT NAM
VIỆN SINH THÁI VÀ TÀI NGUYÊN SINH VẬT**

NGUYỄN THỊ THU THỦY

**NGHIÊN CỨU THÀNH PHẦN HÓA HỌC VÀ TÁC DỤNG DIỆT
TẾ BÀO UNG THƯ CỦA LÁ XẠ ĐEN
(*Ehretia asperula* Zoll. & Mor)**

CHUYÊN NGÀNH: SINH HỌC THỰC NGHIỆM

Mã số: 60 42 01 14

LUẬN VĂN THẠC SỸ SINH HỌC

NGƯỜI HƯỚNG DẪN KHOA HỌC

PGS.TS. NGUYỄN TIẾN ĐẠT

HÀ NỘI - 2017

LỜI CAM ĐOAN

Tôi xin cam đoan bản luận văn là công trình nghiên cứu của tôi dưới sự hướng dẫn của PGS.TS. Nguyễn Tiến Đạt. Các số liệu, kết quả nêu trong luận văn là trung thực và chưa từng được công bố trong bất kỳ công trình nào khác. Nếu không đúng như đã nêu trên, tôi xin hoàn toàn chịu trách nhiệm về đề tài của mình.

Tác giả luận văn

Nguyễn Thị Thu Thủy

LỜI CẢM ƠN

Trước hết, tôi xin bày tỏ lòng biết ơn sâu sắc tới PGS.TS Nguyễn Tiến Đạt, Trung tâm nghiên cứu và Chuyên giao công nghệ, Viện Hàn lâm Khoa Học và Công nghệ Việt Nam đã tận tình hướng dẫn trong suốt quá trình học tập và thực hiện nghiên cứu.

Tôi xin cảm ơn Lãnh đạo Viện Y sinh nhiệt đới – Trung tâm Nhiệt đới Việt – Nga và các bạn đồng nghiệp phòng Thách nghi và Y học quân sự đã tạo điều kiện và giúp đỡ tôi trong suốt quá trình thực hiện, bảo vệ luận văn.

Tôi xin chân thành cảm ơn Ban Lãnh đạo, thầy cô giáo Viện Sinh thái và Tài nguyên Sinh vật, các cán bộ nghiên cứu của phòng Hoạt tính Sinh học - Viện Hóa sinh biển, phòng Sinh học thực nghiệm - Viện Hóa học các Hợp chất thiên nhiên, Viện Hàn lâm khoa học và Công nghệ Việt Nam đã nhiệt tình giúp đỡ và tạo điều kiện thuận lợi để tôi hoàn thành bản luận văn này.

Luận văn được tiến hành dưới sự hỗ trợ của đề tài: “Nghiên cứu thành phần hóa học, đánh giá hoạt tính sinh học của một số hợp chất phân lập được từ cây Xạ đen tại tỉnh Hoà Bình. Thử nghiệm tạo chế phẩm làm thực phẩm chức năng từ các cao chiết tiềm năng”, do GS. TS. Đặng Đình Kim, Viện Công nghệ môi trường, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam làm chủ nhiệm. Tôi xin chân thành cảm ơn GS. TS. Đặng Đình Kim, ThS. Vũ Thị Nguyệt đã nhiệt tình giúp đỡ và tạo điều kiện thuận lợi để tôi hoàn thành bản luận văn này.

Cuối cùng tôi xin cảm ơn gia đình thân yêu, bạn bè, người thân và đồng nghiệp – những người đã luôn ở bên tôi, luôn động viên, khích lệ và là chỗ dựa vững chắc cho tôi trong suốt quá trình học tập và nghiên cứu.

Hà Nội, ngày 30 tháng 10 năm 2017

Học viên

Nguyễn Thị Thu Thủy

MỤC LỤC

LỜI CAM ĐOAN	i
LỜI CẢM ƠN	ii
MỤC LỤC	iii
DANH MỤC HÌNH	v
DANH MỤC BẢNG	vi
KÝ HIỆU VIẾT TẮT	vii
LỜI MỞ ĐẦU	1
CHƯƠNG 1: TỔNG QUAN	3
1.1. Giới thiệu về lá Xạ đen	3
1.1.1. Đặc điểm sinh thái và sự phân bố.	3
1.1.2. Một số nghiên cứu về thành phần hóa học và hoạt tính sinh học các hợp chất của cây xạ đen	4
1.1.3. Tác dụng sinh học	12
1.1.4. Một số bài thuốc y học cổ truyền:	13
1.2. Giới thiệu chung về các phương pháp Sắc kí	13
1.2.1. Phương pháp sắc kí lớp mỏng (SKLM).	13
1.2.2. Phương pháp sắc ký cột	17
1.3. Sơ bộ các phương pháp xác định cấu trúc	19
1.3.1. Phổ khối lượng MS	20
1.3.2. Phổ cộng hưởng từ hạt nhân NMR	21
1.3.3. Phổ $^1\text{H-NMR}$	22
1.3.4. Phổ $^{13}\text{C-NMR}$	22
1.3.5. Phổ DEPT	23
1.3.6. Phổ 2D-NMR	23
1.4. Giới thiệu một số phương pháp thử hoạt tính gây độc tế bào	25
CHƯƠNG 2: THỰC NGHIỆM	27
2.1. Mẫu thực vật	27

2.2. Dụng cụ, thiết bị và hóa chất.....	28
2.2.1. Dụng cụ và thiết bị chiết tách mẫu.....	28
2.2.2. Dụng cụ thiết bị xác định cấu trúc	29
2.2.3. Hoá chất.....	29
2.2.4. Dòng tế bào (cell lines)	30
2.3. Chiết phân đoạn.....	30
2.4. Phân lập một số hợp chất trong cây xạ đen.....	32
2.4.1. Phân lập hợp chất Ed 3.2 và Ed 5.5	33
2.4.2. Phân lập hợp chất Ed 17.3.....	35
2.4.3. Phân lập hợp chất Ed 11.4.....	36
2.5. Hằng số vật lý và các số liệu phổ nghiệm	37
2.5.1. Hợp chất Ed 3.2.....	37
2.5.2. Hợp chất Ed 5.5.....	37
2.5.3. Hợp chất Ed 17.3.....	38
2.5.4. Hợp chất Ed 11.4.....	38
2.6. Phương pháp thử khả năng gây độc tế bào (cytotoxicity).....	39
CHƯƠNG 3: KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN.....	42
3.1. Hợp chất 1: Ed 3.2	42
3.2. Hợp chất 2: Ed 5.5	44
3.3. Hợp chất 3: Ed 17.3	47
3.4. Hợp chất 4: Ed 11.4.....	50
3.5. Kết quả thử nghiệm hoạt tính gây độc tế bào.....	54
CHƯƠNG 4: KẾT LUẬN VÀ KIẾN NGHỊ	56
4.1. KẾT LUẬN	56
4.2. KIẾN NGHỊ.....	56
TÀI LIỆU THAM KHẢO	58
PHỤ LỤC PHỔ	62

DANH MỤC HÌNH

Hình 1.1. <i>Ehretia asperula</i> Zoll. & Mor	3
Hình 1.2: Cấu trúc một số hợp chất theo tài liệu	8
Hình 1.3: Cấu trúc của một số hợp chất theo tài liệu	9
Hình 1.4: Cấu trúc của một số hợp chất theo tài liệu	10
Hình 1.5: Cấu trúc một số hợp chất theo tài liệu	11
Hình 1.6: Cấu trúc của một số hợp chất theo tài liệu	12
Hình 2.1. Mẫu Xạ đen thu được tại Hòa Bình	27
Hình 2.2. Mẫu tiêu bản Xạ đen đã được giám định	28
Hình 2.3. Sơ đồ chiết phân đoạn, phân lập cao xạ đen	32
Hình 2.4. Sơ đồ phân lập hợp chất Ed 3.2 và Ed 5.5	34
Hình 2.5. Sơ đồ phân lập hợp chất Ed 17.3	35
Hình 2.6. Sơ đồ phân lập hợp chất Ed 11.4	36
Hình 3.1. Phổ $^1\text{H-NMR}$ (CD_3OD , 500 MHz) của hợp chất Ed 3.2	42
Hình 3.2: Phổ $^1\text{H-NMR}$ (CD_3OD , 500 MHz) của hợp chất Ed 5.5	44
Hình 3.3. Phổ $^{13}\text{C-NMR}$ (CD_3OD , 125 MHz) của hợp chất Ed 5.5	45
Hình 3.4. Phổ DEPT của hợp chất Ed 5.5	45
Hình 3.5. Phổ $^1\text{H-NMR}$ (CD_3OD , 500 MHz) của hợp chất Ed 17.3	47
Hình 3.6. Phổ $^{13}\text{C-NMR}$ (CD_3OD , 125 MHz) của hợp chất Ed 17.3	48
Hình 3.7. Phổ $^1\text{H-NMR}$ (CD_3OD , 500 MHz) của hợp chất Ed 11.4	50
Hình 3.8. Phổ $^{13}\text{C-NMR}$ (CD_3OD , 125 MHz) của hợp chất Ed 11.4	51
Hình 3.9. Phổ hai chiều HSQC của hợp chất Ed 11.4	52
Hình 3.10. Phổ hai chiều HMBC của hợp chất Ed 11.4	52

DANH MỤC BẢNG

Bảng 1.1. Hoạt tính sinh học của các căn chiết xạ đen trên vi khuẩn Gram dương Gram âm.....	5
Bảng 3.1. Bảng so sánh số liệu phổ $^1\text{H-NMR}$ của Ed 3.2 với số liệu phổ $^1\text{H-NMR}$ của caffeic acid	43
Bảng 3.2. Bảng so sánh số liệu phổ $^1\text{H-NMR}$ và $^{13}\text{C-NMR}$ của Ed 5.5 với số liệu phổ $^1\text{H-NMR}$ của Methyl caffedte	46
Bảng 3.3. Bảng so sánh số liệu phổ $^1\text{H-NMR}$ và $^{13}\text{C-NMR}$ của Ed 17.3 với số liệu phổ $^1\text{H-NMR}$ của Rosmarinic acid	49
Bảng 3.4. Bảng so sánh số liệu phổ $^1\text{H-NMR}$ và $^{13}\text{C-NMR}$ của Ed 11.4 với số liệu phổ $^1\text{H-NMR}$ của Methyl rosmarinate	53
Bảng 3.5: Kết quả hoạt tính gây độc tế bào	54

KÝ HIỆU VIẾT TẮT

Ký hiệu	Tiếng Anh	Tiếng Việt
Ed	<i>Ehretia asperula</i> Zoll. & Mor	Xạ đen
¹³ C-NMR	Carbon (13) Nucleaedr Magnetic Resonance	Phổ cộng hưởng từ hạt nhân carbon (13)
¹ H-NMR	Hydro (1) Nucleaedr Magnetic Resonance	Phổ cộng hưởng từ hạt nhân proton (1)
DEPT	Distortionless Enhancement by	Phổ DEPT
HMBC	Polarization Transfer Heteronucleaedr Multiple Bond Coherence	Phổ tương tác dị hạt nhân qua nhiều liên kết
HSQC	Heteronucleaedr Single Quantum Correlation	Phổ tương tác dị hạt nhân qua một liên kết
δ	Chemical shift	Độ chuyển dịch hóa học
ppm	Part per million	Một phần triệu
s	Singlet	
d	Doublet	
dd	Double of doublet	
R _f	retardation factors	Phát triển chậm
Hep-G2	Human hepatocellular carcinoma	Tế bào Ung thư gan
LU-1	Human lung adenocarcinoma	Tế bào Ung thư phổi
MCF-7	Human breaedst adenocarcinoma	Tế bào Ung thư vú
HeLa	HeLa cervical cancer cells	Tế bào Ung thư cổ tử cung HeLa
W	Water	nước
D	Dichloromethane	
H	<i>n</i> -Hexane	
M	Methanol	
E	Ethyl acetate	
A	Acetone	

LỜI MỞ ĐẦU

Vai trò quan trọng của các hợp chất thiên nhiên có hoạt tính sinh học đã được khẳng định từ các nền y học cổ truyền cho đến y học hiện đại. Giá trị của chúng không chỉ có công dụng trực tiếp làm thuốc chữa bệnh mà còn có thể dùng làm nguyên mẫu hoặc cấu trúc dẫn đường cho sự phát hiện và phát triển nhiều dược phẩm mới. Việt Nam được đánh giá có nguồn tài nguyên dược liệu phong phú và có nhiều kinh nghiệm sử dụng nguồn dược liệu này nhờ vào nền y học cổ truyền lâu đời. Theo thống kê ở Việt Nam hiện có hơn 13000 loài thực vật trong đó khoảng 4000 loài được sử dụng làm thuốc. Đây là một lợi thế để chúng ta khai thác nguồn dược liệu này phục vụ cho cuộc sống. Các nghiên cứu hoá học theo định hướng hoạt tính sinh học là con đường ngắn nhất và hiệu quả nhất để tìm kiếm có chọn lọc các hoạt chất từ nguồn tài nguyên thiên nhiên.

Ung thư được coi là một trong những căn bệnh nan y do khả năng kháng thuốc, gây di căn mạnh của các tế bào ung thư. Chính vì thế, việc phát triển những loại dược phẩm mới đặc trị hoặc ngăn ngừa quá trình di căn ung thư đang là vấn đề cấp thiết của y học hiện đại. Cây xạ đen có tên khoa học là *Ehretia asperula* Zoll. & Mor, họ Vòi Voi (Boraginaceae). Xạ đen phân bố chủ yếu tại các tỉnh Sơn La, Hà Nam, Quảng Ninh, Hòa Bình, chúng mọc tự nhiên trong rừng. Xạ đen là cây thân gỗ mọc leo thành bụi, nhánh non tròn, không lông. Dài trung bình 5-7m có khi tới hàng chục mét, thân già vỏ nâu đốm trắng, chồi và lá non có màu tím đỏ. Tại Việt Nam đã có một số công trình nghiên cứu về cây Xạ đen như: Lê Thế Trung và cộng sự (1999) đã nghiên cứu về khả năng chữa ung thư của cây xạ đen Hòa Bình; Nguyễn Huy Cường (2008) nghiên cứu thành phần hóa học và thăm dò hoạt tính sinh học cây xạ đen.