

**“Nghiên cứu quy trình tạo sinh khối tế bào  
thông đỏ (*Taxus wallichiana* Zucc.) để chiết  
xuất hoạt chất điều trị ung thư”**

Chuyên ngành: Công nghệ dược phẩm

Mã số: 62 73 01 01

Họ và tên nghiên cứu sinh: Vũ Bình Dương

Họ và tên Người hướng dẫn:

1. GS.TSKH. Phan Đình Châu
2. TS. Triệu Duy Điệt

Cơ sở đào tạo: Học viện Quân y

# MỤC LỤC

Trang

|                                                                                                                              |    |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Trang phụ bìa                                                                                                                |    |
| Lời cảm ơn                                                                                                                   |    |
| Lời cam đoan                                                                                                                 |    |
| Mục lục                                                                                                                      |    |
| Danh mục chữ viết tắt trong luận án                                                                                          |    |
| Danh mục các bảng                                                                                                            |    |
| Danh mục các hình                                                                                                            |    |
| ĐẶT VẤN ĐỀ .....                                                                                                             | 1  |
| CHƯƠNG 1: TỔNG QUAN TÀI LIỆU.....                                                                                            | 3  |
| 1.1. CÂY THÔNG ĐỎ.....                                                                                                       | 3  |
| 1.1.1. Tên khoa học .....                                                                                                    | 3  |
| 1.1.2. Đặc điểm thực vật và phân bố.....                                                                                     | 3  |
| 1.1.3. Thành phần hóa học .....                                                                                              | 5  |
| 1.1.4. Tác dụng sinh học.....                                                                                                | 9  |
| 1.1.5. Các thuốc điều trị ung thư nguồn gốc từ thông đỏ.....                                                                 | 9  |
| 1.2. CÔNG NGHỆ SINH KHỐI TẾ BÀO THỰC VẬT.....                                                                                | 11 |
| 1.2.1. Khái niệm, ưu điểm và khó khăn khi triển khai.....                                                                    | 11 |
| 1.2.2. Quy trình tạo sinh khối tế bào thực vật .....                                                                         | 13 |
| 1.2.3. Các yếu tố ảnh hưởng tới sự phát triển tế bào và hàm lượng hoạt<br>chất trong nuôi cấy tế bào thực vật.....           | 15 |
| 1.3.1. Nhu cầu nguồn nguyên liệu paclitaxel trong điều trị ung thư.....                                                      | 21 |
| 1.3.2. Sản xuất paclitaxel bằng công nghệ sinh khối tế bào thực vật .....                                                    | 22 |
| 1.3.3. Phương pháp định lượng paclitaxel và các dẫn chất sử dụng trong<br>đánh giá chất lượng sinh khối tế bào thông đỏ..... | 28 |
| 1.3.4. Các phương pháp chiết xuất phân lập paclitaxel từ sinh khối tế bào<br>thông đỏ .....                                  | 29 |

|                                                                                                                                        |     |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| CHƯƠNG 2: NGUYÊN VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU                                                                                    | 31  |
| 2.1. NGUYÊN LIỆU, HÓA CHẤT VÀ THIẾT BỊ NGHIÊN CỨU                                                                                      | 31  |
| 2.1.1. Nguyên liệu và hoá chất                                                                                                         | 31  |
| 2.1.2. Thiết bị nghiên cứu                                                                                                             | 31  |
| 2.2. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU                                                                                                            | 32  |
| 2.2.1. Xây dựng quy trình tạo sinh khối thông đỏ                                                                                       | 32  |
| 2.2.2. Nghiên cứu thành phần hoá học và chiết xuất phân lập một số chất chính, xây dựng TCCS của nguyên liệu sinh khối tế bào thông đỏ | 36  |
| 2.2.3. Phương pháp phân tích xử lý kết quả nghiên cứu                                                                                  | 41  |
| CHƯƠNG 3. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU                                                                                                           | 42  |
| 3.1. XÂY DỰNG QUY TRÌNH TẠO SINH KHỐI TẾ BÀO THÔNG ĐỎ                                                                                  | 42  |
| 3.1.1. Tạo callus thông đỏ                                                                                                             | 42  |
| 3.1.2. Duy trì nuôi cấy callus thông đỏ trong môi trường thạch                                                                         | 48  |
| 3.1.3. Kết quả nuôi cấy trong môi trường lỏng                                                                                          | 52  |
| 3.1.4. Kết quả nuôi cấy trên hệ thống bioreactor 5 lít                                                                                 | 64  |
| 3.1.5. Kết quả nghiên cứu thu hoạch sinh khối tế bào thông đỏ                                                                          | 65  |
| 3.2. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU THÀNH PHẦN HÓA HỌC, CHIẾT XUẤT PHÂN LẬP, XÂY DỰNG TIÊU CHUẨN CƠ SỞ CỦA SINH KHỐI TẾ BÀO THÔNG ĐỎ               | 70  |
| 3.2.1. Xác định thành phần hóa học trong sinh khối tế bào thông đỏ                                                                     | 70  |
| 3.2.2. Chiết xuất phân lập và nhận dạng một số chất chính trong sinh khối tế bào thông đỏ                                              | 81  |
| 3.2.3. Chiết xuất, tinh chế paclitaxel trong sinh khối tế bào thông đỏ                                                                 | 89  |
| 3.2.4. Kết quả nghiên cứu xây dựng tiêu chuẩn cơ sở của nguyên liệu sinh khối tế bào thông đỏ và hoạt chất                             | 97  |
| CHƯƠNG 4: BÀN LUẬN                                                                                                                     | 104 |
| 4.1. QUY TRÌNH TẠO SINH KHỐI TẾ BÀO THÔNG ĐỎ                                                                                           | 104 |
| 4.1.1. Về nuôi cấy tạo callus thông đỏ                                                                                                 | 104 |

|                                                                                                                       |     |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| 4.1.2. Về duy trì nuôi cấy callus thông đỏ trong môi trường thạch .....                                               | 108 |
| 4.1.3. Về nuôi cấy tế bào thông đỏ trong môi trường lỏng .....                                                        | 111 |
| 4.1.4. Về nuôi cấy tế bào thông đỏ trên hệ thống bioreactor 5 lít.....                                                | 124 |
| 4.1.5. Về quy trình thu hoạch sinh khối tế bào thông đỏ .....                                                         | 126 |
| 4.2. NGHIÊN CỨU THÀNH PHẦN HÓA HỌC, CHIẾT XUẤT PHÂN LẬP, XÂY DỰNG TIÊU CHUẨN CƠ SỞ CỦA SINH KHỐI TẾ BÀO THÔNG ĐỎ..... | 126 |
| 4.2.1. Về nghiên cứu thành phần hóa học .....                                                                         | 126 |
| 4.2.2. Về chiết xuất, phân lập và nhận dạng các chất chính có trong sinh khối tế bào thông đỏ .....                   | 129 |
| 4.2.3. Về chiết xuất, tinh chế paclitaxel trong sinh khối tế bào thông đỏ.....                                        | 130 |
| 4.2.4. Về kết quả xây dựng TCCS của sinh khối tế bào thông đỏ .....                                                   | 133 |
| KẾT LUẬN.....                                                                                                         | 135 |
| KIẾN NGHỊ .....                                                                                                       | 137 |
| CÁC CÔNG TRÌNH NGHIÊN CỨU CỦA TÁC GIẢ ĐÃ CÔNG BỐ LIÊN QUAN ĐẾN LUẬN ÁN .....                                          | 138 |
| TÀI LIỆU THAM KHẢO.....                                                                                               | 139 |
| PHẦN PHỤ LỤC.....                                                                                                     | 155 |

## DANH MỤC CÁC CHỮ VIẾT TẮT

| <b>Viết tắt</b> | <b>Chú thích</b>                  |
|-----------------|-----------------------------------|
| 10-DAB          | 10-deacetylbaocatin III           |
| 2,4,5-T         | 2,4,5-trichlorophenoxyacetic acid |
| 2,4-D           | 2,4-dichlorophenoxyacetic acid    |
| ACN             | Acetonitril                       |
| B5              | Môi trường Gamborg                |
| BAP             | 6-Benzyl amino purin              |
| Bu (i)          | Isobutyl                          |
| Bz              | Benzoyl                           |
| CA              | Caffeic acid                      |
| cs              | Cộng sự                           |
| DCM             | Dichloromethan                    |
| ĐĐVN            | Dược điển Việt Nam                |
| FA              | Ferulic acid                      |
| FE              | Fungal elicitor (elicitor từ nấm) |
| GA              | Gibberelic acid                   |
| HPOL            | Hydroperoxid lyase                |
| HPLC            | Sắc ký lỏng hiệu năng cao         |
| HQC             | Mẫu kiểm tra ở nồng độ cao        |
| IAA             | Indole – 3 acetic acid            |
| IBA             | Indole – 3 butyric acid           |
| JA              | Jasmonic acid                     |
| KL              | Khối lượng                        |
| KLK             | khối lượng tế bào khô             |
| Kn              | Kinetin                           |
| LQC             | Mẫu kiểm tra ở nồng độ thấp       |

|      |                                           |
|------|-------------------------------------------|
| MeOH | Methanol                                  |
| MJ   | Methyl jasmonic                           |
| MS   | Môi trường Murashige - Skoog              |
| NAA  | 1-Naphtalen acetic acid                   |
| PhL  | Phenylalanin                              |
| PL   | Phụ lục                                   |
| PVP  | Polivinyll pyrrolidon                     |
| SA   | Salicylic acid                            |
| SD   | Độ lệch chuẩn                             |
| SH   | Môi trường Hildebrandt                    |
| SKLM | Sắc ký lớp mỏng                           |
| SKTB | Sinh khối tế bào                          |
| Tc   | Taxuyunnanine C                           |
| TCCS | Tiêu chuẩn cơ sở                          |
| USP  | United States Pharmacopeia (Dược điển Mỹ) |
| Xyl  | Xylosyl                                   |

## DANH MỤC CÁC BẢNG

| <b>Bảng</b> | <b>Tên bảng</b>                                                             | <b>Trang</b> |
|-------------|-----------------------------------------------------------------------------|--------------|
| 3.1         | Kết quả khảo sát lựa chọn chất sát khuẩn                                    | 42           |
| 3.2         | Kết quả khảo sát thời gian tiệt khuẩn.                                      | 43           |
| 3.3         | Thành phần các loại môi trường nuôi cấy                                     | 44           |
| 3.4         | Kết quả khảo sát lựa chọn môi trường nuôi cấy                               | 45           |
| 3.5         | Ảnh hưởng của môi trường tới sự phát triển của callus                       | 45           |
| 3.6         | Ảnh hưởng của loại chất kích thích sinh trưởng tới sự phát triển của callus | 47           |
| 3.7         | Ảnh hưởng của nồng độ NAA tới sự phát triển callus                          | 47           |
| 3.8         | Ảnh hưởng của nồng độ kinetin tới sự phát triển callus                      | 48           |
| 3.9         | Đặc tính của tế bào sau các lần cấy chuyển trong môi trường SH              | 50           |
| 3.10        | Ảnh hưởng của nồng độ đường đến sự phát triển callus                        | 51           |
| 3.11        | Ảnh hưởng của nhiệt độ đến tốc độ phát triển tế bào                         | 51           |
| 3.12        | Ảnh hưởng của pH môi trường tới sự phát triển của callus                    | 52           |
| 3.13        | Ảnh hưởng của số lần cấy chuyển tới tốc độ phát triển của tế bào            | 53           |
| 3.14        | Ảnh hưởng của tỷ lệ mẫu cấy ban đầu tới tốc độ phát triển của tế bào        | 55           |
| 3.15        | Ảnh hưởng của pH môi trường tới tốc độ phát triển của tế bào thông đỏ       | 55           |
| 3.16        | Ảnh hưởng của nhiệt độ nuôi cấy tới tốc độ phát triển của tế bào thông đỏ   | 56           |
| 3.17        | Ảnh hưởng của các chất kích thích sinh trưởng đến tốc độ phát triển tế bào  | 57           |
| 3.18        | Ảnh hưởng của nồng độ BAP đến đến tốc độ phát triển tế bào                  | 57           |
| 3.19        | Ảnh hưởng của nồng độ NAA đến tốc độ phát triển tế bào                      | 58           |
| 3.20        | Ảnh hưởng của nồng độ saccharose tới tốc độ phát triển tế bào               | 59           |

| <b>Bảng</b> | <b>Tên bảng</b>                                                                                                      | <b>Trang</b> |
|-------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------|
| 3.21        | Ảnh hưởng của các elicitor tới tốc độ phát triển tế bào và hàm lượng paclitaxel trong tế bào                         | 60           |
| 3.22        | Ảnh hưởng của nồng độ MJ tới tốc độ phát triển tế bào và hàm lượng paclitaxel trong tế bào                           | 60           |
| 3.23        | Ảnh hưởng của thời gian tiếp xúc giữa tế bào và MJ tới tốc độ phát triển tế bào và hàm lượng paclitaxel trong tế bào | 61           |
| 3.24        | Ảnh hưởng của thời điểm tiếp xúc giữa tế bào và MJ tới tốc độ phát triển tế bào và hàm lượng paclitaxel khối tế bào  | 62           |
| 3.25        | Ảnh hưởng của thời điểm bổ sung saccharose                                                                           | 63           |
| 3.26        | Ảnh hưởng của nồng độ saccharose bổ sung vào môi trường                                                              | 64           |
| 3.27        | Kết quả nuôi cấy trên hệ thống bình nuôi cấy 5 lít                                                                   | 65           |
| 3.28        | Kết quả phân tích dư lượng NAA, BAP và hàm lượng paclitaxel trong các mẻ nuôi cấy sinh khối thông đỏ                 | 67           |
| 3.29        | Khảo sát điều kiện pha động                                                                                          | 71           |
| 3.30        | Chương trình chạy sắc ký                                                                                             | 73           |
| 3.31        | Độ lặp lại của hệ thống                                                                                              | 74           |
| 3.32        | Sự phụ của diện tích pic vào nồng độ paclitaxel và baccatin III                                                      | 75           |
| 3.33        | Kết quả xác định giới hạn định lượng dưới của paclitaxel                                                             | 76           |
| 3.34        | Kết quả xác định giới hạn định lượng dưới của baccatin III                                                           | 76           |
| 3.35        | Kết quả xác định độ chính xác                                                                                        | 77           |
| 3.36        | Tỷ lệ (%) tìm thấy paclitaxel và baccatin III                                                                        | 78           |
| 3.37        | Kết quả khảo sát độ ổn định của mẫu thử                                                                              | 78           |
| 3.38        | Kết quả định tính sơ bộ thành phần hóa học SKTB thông đỏ                                                             | 79           |
| 3.39        | Kết quả định lượng paclitaxel trong sinh khối thông đỏ và mẫu lá thông đỏ tự nhiên bằng HPLC                         | 81           |
| 3.40        | Số liệu phổ $^{13}\text{C}$ -NMR của các chất 1 – 6                                                                  | 85           |



| <b>Bảng</b> | <b>Tên bảng</b>                                                                              | <b>Trang</b> |
|-------------|----------------------------------------------------------------------------------------------|--------------|
| 3.41        | Số liệu phổ $^1\text{H-NMR}$ của các chất 1 - 6                                              | 86           |
| 3.42        | Kết quả chiết xuất paclitaxel bằng các dung môi khác nhau                                    | 89           |
| 3.43        | Kết quả chiết xuất paclitaxel với DCM                                                        | 90           |
| 3.44        | Kết quả khảo sát nồng độ than hoạt tính sử dụng trong tinh chế paclitaxel                    | 91           |
| 3.45        | Kết quả khảo sát ảnh hưởng của tỷ lệ n-hexan sử dụng để tinh chế paclitaxel                  | 91           |
| 3.46        | Kết quả khảo sát ảnh hưởng của tỷ lệ dung môi tới hàm lượng và hiệu suất tinh chế paclitaxel | 92           |
| 3.47        | Kết quả tinh chế paclitaxel bằng sắc ký cột lần 1                                            | 93           |
| 3.48        | Kết quả tinh chế paclitaxel bằng sắc ký cột lần 2                                            | 94           |
| 3.49        | Kết quả tổng hợp về hiệu suất và hàm lượng paclitaxel qua các giai đoạn chiết xuất, tinh chế | 95           |
| 3.50        | Kết quả xác định độ ẩm trong sinh khối thông đỏ                                              | 97           |
| 3.51        | Kết quả xác định tro toàn phần của sinh khối thông đỏ                                        | 98           |
| 3.52        | Kết quả xác định tro không tan trong acid của sinh khối thông đỏ                             | 98           |
| 3.53        | Kết quả định lượng paclitaxel và baccatin III trong sinh khối tế bào thông đỏ                | 99           |

## DANH MỤC CÁC HÌNH

| Hình | Tên hình                                                                                        | Trang |
|------|-------------------------------------------------------------------------------------------------|-------|
| 1.1  | Thông đỏ ( <i>Taxus wallichiana</i> Zucc.)                                                      | 4     |
| 1.2  | Cấu trúc các bộ khung taxan cơ bản trong thông đỏ                                               | 5     |
| 1.3  | Quy trình tạo sinh khối tế bào thực vật                                                         | 14    |
| 1.4  | Sự phát triển của tế bào thực vật theo thời gian                                                | 19    |
| 1.5  | Con đường sinh tổng hợp của Paclitaxel                                                          | 23    |
| 2.1  | Sơ đồ quy trình chiết xuất SKTB thông đỏ làm phản ứng định tính                                 | 37    |
| 3.1  | Một số hình ảnh các mẫu thí nghiệm trong nuôi cấy callus                                        | 43    |
| 3.2  | Callus trên các môi trường khác nhau                                                            | 45    |
| 3.3  | Đồ thị biểu diễn khối lượng callus theo thời gian                                               | 46    |
| 3.4  | Hình ảnh callus thông đỏ ở 2 môi trường khác nhau                                               | 49    |
| 3.5  | Callus thông đỏ sau các lần cấy chuyển trong môi trường thạch SH                                | 49    |
| 3.6  | Hình ảnh tế bào thông đỏ qua các lần cấy chuyển                                                 | 53    |
| 3.7  | Đồ thị biểu diễn khối lượng tế bào theo thời gian nuôi cấy                                      | 54    |
| 3.8  | Sơ đồ quy trình thu hoạch sinh khối tế bào thông đỏ trong Bioreactor                            | 66    |
| 3.9  | Sơ đồ quy trình tạo sinh khối tế bào thông đỏ                                                   | 69    |
| 3.10 | Sắc ký đồ mẫu sinh khối thông đỏ xử lý theo phương pháp chiết lỏng - lỏng (a) và lỏng - rắn (b) | 70    |
| 3.11 | Sắc ký đồ hỗn hợp chuẩn paclitaxel và baccatin III trong hệ pha động III sử dụng cột Luna L43   | 72    |
| 3.12 | Phổ hấp thụ của paclitaxel (a) và baccatin III (b)                                              | 72    |
| 3.13 | Sắc ký đồ hỗn hợp chuẩn (a) và mẫu thử (b)                                                      | 74    |
| 3.14 | Đồ thị biểu diễn mối tương quan giữa diện tích pic và nồng độ paclitaxel và baccatin III        | 75    |