

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

MAI HƯƠNG

**NGHIÊN CỨU HOẠT TÍNH SINH HỌC VÀ THÀNH PHẦN
HÓA HỌC TRONG RỄ CÂY THỔ PHỤC LINH
(*SMILAX GLABRA* ROXB.) CỦA VIỆT NAM**

Chuyên ngành: Sinh học thực nghiệm

Mã số: 60420114

LUẬN VĂN THẠC SĨ SINH HỌC

Người hướng dẫn khoa học: TS. NGUYỄN QUỐC VƯỢNG

HÀ NỘI, 2013

LỜI CẢM ƠN

Tôi xin chân thành bày tỏ lòng biết ơn sâu sắc của mình tới TS. Nguyễn Quốc Vượng, người thầy đã tận tình hướng dẫn, chỉ bảo, động viên và giúp đỡ tôi trong suốt quá trình nghiên cứu và thực hiện luận văn này.

Tôi xin gửi lời cảm ơn chân thành tới mọi thành viên phòng Công nghệ Hóa dược, Viện Hóa sinh biển, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam đã giúp đỡ và tạo điều kiện cho tôi hoàn thành luận văn này. Đồng thời tôi xin gửi lời cảm ơn sâu sắc tới phòng hoạt chất sinh học - Viện Hóa sinh biển, phòng thử nghiệm sinh học - Viện Công nghệ sinh học và tập thể cán bộ Viện Hóa sinh biển đã giúp đỡ tôi thực hiện các nội dung của đề tài.

Tôi xin gửi lời cảm ơn đến lãnh đạo Viện và cơ sở đào tạo Viện Sinh thái và Tài nguyên sinh vật đã tạo điều kiện cho tôi trong thời gian tôi học tập và hoàn thiện luận văn này.

Cuối cùng, với lòng biết ơn sâu sắc, tôi xin bày tỏ lời cảm ơn tới những người thân trong gia đình, các anh chị em lớp CHST K15 những người đã luôn ủng hộ, giúp đỡ tôi trong suốt thời gian học tập và nghiên cứu.

Đề tài luận văn được thực hiện tại phòng Công nghệ hóa dược – Viện Hóa sinh biển, theo tiến độ thực hiện đề tài VAST0402/13 – 14 thuộc Viện Hàn lâm khoa học và Công nghệ Việt Nam.

Hà Nội, Tháng 11 năm 2013

Tác giả luận văn

Mai Hương

MỤC LỤC

LỜI CẢM ƠN.....	i
MỤC LỤC.....	iii
DANH MỤC TỪ VIẾT TẮT.....	vi
DANH MỤC BẢNG VÀ HÌNH VẼ.....	ix
MỞ ĐẦU	1
MỤC ĐÍCH VÀ Ý NGHĨA KHOA HỌC CỦA ĐỀ TÀI.....	3
CHƯƠNG 1 : TỔNG QUAN.....	4
1.1. Thực vật học và tác dụng chữa bệnh của Thổ phục linh (<i>Smilax glabra</i> Roxb.).....	4
1.1.1. Thực vật	4
1.1.2. Tác dụng chữa bệnh	6
1.2. Astilbin và thành phần hóa học trong rễ cây Thổ phục linh.....	8
1.2.1. Astilbin.....	8
1.2.2. Thành phần hóa học trong rễ Thổ phục linh.....	9
1.3. Hoạt tính sinh học của rễ cây Thổ phục linh	13
1.4. Tình hình nghiên cứu cây Thổ phục linh trên thế giới và trong nước.....	16
1.4.1. Tình hình nghiên cứu trong nước	16
1.4.2. Tình hình nghiên cứu ngoài nước	17
CHƯƠNG 2: CÁC PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU	19
2.1. Phương pháp tạo các cao chiết và phân lập các hoạt chất	19
2.1.1. Phương pháp tạo cao chiết.....	19
2.1.2. Các phương pháp phân lập.....	20
2.1.2.1. Sắc ký lớp mỏng (<i>thin layer chromatography- TLC</i>).....	20
2.1.2.2. Sắc ký lớp mỏng điều chế (<i>Preparative thin layer chromatography – PTLC</i>)	21
2.1.2.3. Sắc ký cột (<i>Column chromatography- CC</i>).....	22
2.2. Phương pháp xác định cấu trúc.....	22
2.2.1. Phổ hồng ngoại (<i>Infrared - IR</i>)	22
2.2.2. Phổ tử ngoại (<i>UV-VIS</i>)	23
2.2.3. Phổ cộng hưởng từ hạt nhân (<i>NMR</i>).....	23
2.2.4. Phổ khối lượng (<i>Mass spectrometry- MS</i>).....	24

2.3. Phương pháp HPLC xác định hàm lượng các hợp chất.....	24
2.4. Phương pháp thử nghiệm hoạt tính sinh học của các cao chiết.....	25
2.4.1. Hoạt tính độc tế bào invitro	25
2.4.1.1. Nguyên liệu.....	25
2.4.1.2. Phương pháp nuôi cấy tế bào invitro.....	25
2.4.1.3. Phép thử sinh học xác định hoạt tính gây độc tế bào (cytotoxic assay).....	25
2.4.2. Hoạt tính chống oxy hóa	26
2.4.2.1. Phương pháp đo MDA.....	26
2.4.2.2. Phương pháp phân lập và nhân nuôi trực tiếp tế bào gan chuột	28
CHƯƠNG 3: THỰC NGHIỆM	30
3.1. Phân lập astilbin, một số hợp chất và tạo các cao chiết TPL- EtOH, TPPL-As40	30
3.1.1. Phân lập astilbin và các hợp chất gần astilbin trên sắc ký lớp mỏng	30
3.1.1.1. Quy trình phân lập astilbin và các hợp chất gần astilbin theo SKLM.....	30
3.1.1.2. Số liệu phổ của các chất phân lập được	32
3.1.2. Khảo sát một số vùng nguyên liệu Thổ phục linh ở miền Bắc.....	33
3.1.2.1. Thu mua Thổ phục linh tại các vùng khảo sát	33
3.1.2.2. Quy trình chung phân lập và xác định hàm lượng astilbin từ rễ Thổ phục linh khô	35
3.1.3. Giám định thu mua mẫu và xử lý mẫu Thổ phục linh	37
3.1.3.1. Giám định mẫu thực vật.....	37
3.1.3.2. Thu mua và xử lý mẫu	37
3.1.4. Tạo các cao chiết TPL-EtOH, TPL-As40.....	38
3.2. Xác định hàm lượng astilbin trong các cao chiết TPL-EtOH, TPL-As40.....	39
3.2.1. Thiết lập thông số cho sắc ký lỏng	39
3.2.2. Thiết lập chương trình chạy	40
3.2.3. Thiết lập các điều kiện thí nghiệm cho hệ thống sắc ký lỏng.....	40
3.2.4. Thiết lập trình tự chạy cho các mẫu.....	41
3.2.5. Kiểm tra sự có mặt của hợp chất cần phân tích trong các mẫu	42

3.3. Thử nghiệm hoạt tính độc tế bào và hoạt tính chống oxy hóa của các cao chiết	45
3.3.1. Thử nghiệm hoạt tính độc tế bào các cao chiết TPL-EtOH, TPL-As40	45
3.3.2. Thử nghiệm hoạt tính chống oxy hóa	47
CHƯƠNG 4: KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN.....	49
4.1. Astilbin và một số hoạt chất tách được từ rễ Thổ phục linh.....	49
4.2. Khảo sát hàm lượng astilbin trong rễ TPL tại miền Bắc.....	58
4.3. Cao chiết TPL-EtOH, TPL-As40.....	58
4.4. Hàm lượng astilbin trong các cao chiết TPL-EtOH, TPL-As40.....	58
4.4.1. Kết quả xây dựng đường chuẩn định lượng astilbin.....	59
4.4.2. Đánh giá hàm lượng hợp chất astilbin trong mẫu cao chiết Thổ phục linh.....	61
4.5. Hoạt tính độc tế bào và hoạt tính chống oxy hóa của các dịch chiết	63
4.5.1. Kết quả sàng lọc tính độc tế bào trên 3 dòng tế bào ung thư KB, LU-1, MCF-7	63
4.5.2. Hoạt tính chống oxy hóa của các dịch chiết	65
KẾT LUẬN	67
KIẾN NGHỊ	68
TÀI LIỆU THAM KHẢO	69
PHỤ LỤC	76

DANH MỤC TỪ VIẾT TẮT

Viết tắt	Viết đầy đủ
Ac	Nhóm axetyl
ACN	Axetonitritin
<i>n</i> -Bu	Nhóm <i>n</i> -butyl
BALB/c	Chuột bạch tạng
¹³ C-NMR	Phổ cộng hưởng từ hạt nhân Cacbon 13 (Cacbon-13 Nuclear Magnetic Resonance)
CC	Sắc ký cột (Column chromatography)
DCM	Diclometan
DMF	<i>N,N</i> -Dimethylformamit
DMSO	Dimethylsulfoxid ((CH ₃) ₂ SO)
DPPH	1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl
ED ₅₀	Nồng độ bảo vệ tối thiểu 50%
EMME	Ethoxymethylenmalonat
ESI-MS	Phổ khối lượng phun mù điện tử (Electrospray Ionization Mass Spectrometry)
Et	Nhóm etyl
EtOAc	Etyl axetat
EtOH	Etanol
¹ H-NMR	Phổ cộng hưởng từ hạt nhân Proton (Proton Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy)
HMBC	Phổ tương tác dị hạt nhân qua nhiều liên kết (Heteronuclear Multiple Bond Correlation)
HPLC	Sắc ký lỏng hiệu năng cao (High Performance Liquid Chromatography)
HTCO	Hoạt tính chống oxy hóa

HSQC	Phổ tương tác dị hạt nhân qua một liên kết (Heteronuclear Single Quantum Coherence)
IC ₅₀	Nồng độ ức chế 50% (Inhibitory Concentration 50%)
IR	Phổ hồng ngoại (Infrared spectroscopy)
KB	Tế bào ung thư biểu mô (Human Epidemoid Carcinoma)
LU-1	Tế bào ung thư phổi (Human Lung Carcinoma)
MCF-7	Dòng tế bào ung thư vú người (MCF-7 Human breast adenocarcinoma cell line)
MTT	3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)2,5-diphenyltetrazoli bromua
MCPBA	<i>m</i> -Chloroperbenzoic acid
MDA	Malonyl dialdehyd
MS	Phổ khối lượng (Mass spectrometry)
Me	Nhóm metyl
n-hx	n-hexan
NMR	Phổ cộng hưởng từ hạt nhân (Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy)
OD	Mật độ quang (Optical Density)
PTLC	Sắc ký lớp mỏng điều chế (Preparative thin layer chromatography)
Ph	Nhóm phenyl
SRB	Sulforhodamine B
TBA	Thiobarbituric acid
TLC	Sắc ký lớp mỏng (thin layer chromatography)
TPL	Thỏ phục linh
TPL-As40	Mẫu astilbin thô
TPL-EtOH	Mẫu cặn chiết còn
UV-VIS	Phổ tử ngoại

s	Singlet	br	Broad
d	Doublet	dd	Doublet of doublets
t	Triplet	dm	Doublet of multiplets
q	Quartet	ppm	Parts per million
m	Multiplet		

DANH MỤC BẢNG VÀ HÌNH VẼ

Danh mục bảng

Bảng 3.1: Hệ dung môi phân tích mẫu theo thời gian	41
Bảng 4.1: Cấu trúc phân tử của 3 hợp chất tách được rễ thỏ phục linh.....	50
Bảng 4.2: Kết quả khảo sát hàm lượng astilbin trong rễ TPL tại 8 tỉnh miền Bắc...58	
Bảng 4.3: Đường chuẩn, r^2 , LOD, LOQ của các chất astilbin.....	61
Bảng 4.4: Kết quả định lượng hàm lượng của astilbin trong các mẫu	62
Bảng 4.5: Kết quả sàng lọc tính độc tế bào trên dòng tế bào ung thư KB	63
Bảng 4.6: Kết quả sàng lọc tính độc tế bào trên dòng tế bào ung thư LU-1 ..	64
Bảng 4.7: Kết quả sàng lọc tính độc tế bào trên dòng tế bào ung thư MCF-7	64
Bảng 4.8: Kết quả xác định hoạt tính chống oxi hóa.....	65

Danh mục hình vẽ

Hình 1.1: Cây thỏ phục linh.....	4
Hình 1.2: Công thức cấu tạo của astilbin	9
Hình 1.3. Dihydroflavonol được tách từ rễ thỏ phục linh	10
Hình 1.4: Một số các flavonoid khác được tách ra từ RSG	11
Hình 1.5: Các phenylpropanoid glycoside được tách từ RSG.....	11
Hình 1.6: Lignan glycoside được tách từ RSG.....	12
Hình 1.7: Các polyphenol, phenolic acid và glycoside của nó được tách ra từ RSG	12
Hình 1.8: Các cấu tử phenolic mới được tách từ RSG.....	18
Hình 3.1: Sơ đồ tách astilbin và các hợp chất gần trên SKLM.....	31
Hình 3.2: Hình ảnh các mẫu Thỏ phục linh ở các vùng.....	35
Hình 3.3: Sơ đồ phân lập astilbin từ rễ Thỏ phục linh khô	36
Hình 3.4: Mẫu Thỏ phục linh thân lá và củ tươi	37

Hình 3.5: Hình ảnh mẫu Thổ phục linh tươi tại Tuyên Quang	38
Hình 3.6: Sơ đồ tạo cao chiết TPL-EtOH, TPL-As40, TPL-Đường	39
Hình 3.7: Sơ đồ trình tự chạy các mẫu	42
Hình 3.8: Sắc ký đồ của mẫu Thổ phục linh AE trên cột Zorbax Eclipse XDB C ₁₈ (4,6 x 150nm, 5μm)	43
Hình 3.9: Sắc ký đồ của mẫu Thổ phục linh- đường trên cột Zorbax Eclipse XDB C ₁₈ (4,6 x 150nm, 5μm)	43
Hình 3.10: Sắc ký đồ của mẫu Thổ phục linh- AS40 trên cột Zorbax Eclipse XDB C ₁₈ (4,6 x 150nm, 5μm)	44
Hình 3.11: Sắc ký đồ của mẫu Thổ phục linh- EtOH trên cột Zorbax Eclipse XDB C ₁₈ (4,6 x 150nm, 5μm)	44
Hình 4.1: Chất 1 (Astilbin)	50
Hình 4.2: Phổ ¹ H-NMR của astilbin	52
Hình 4.3: Phổ ¹³ C-NMR của astilbin	52
Hình 4.4: Engeletin	53
Hình 4.5: Phổ ¹ H-NMR của engeletin	54
Hình 4.6: Phổ ¹³ C-NMR của engeletin	54
Hình 4.7: 3-O-caffeoyl-shikimic acid	55
Hình 4.8: Phổ ¹ H-NMR của chất 3	56
Hình 4.9: Phổ ¹³ C-NMR của chất 3	57
Hình 4.10: Phổ HMBC của chất 3	57
Hình 4.11: Sắc ký đồ của hợp chất astilbin tại bước sóng 291 nm trên cột Zorbax eclipse XDB C ₁₈	60
Hình 4.12: Đồ thị đường chuẩn astilbin	60
Hình 4.13: Sắc ký đồ của mẫu thổ phục linh-As40 và astilbin trên cột Zorbax eclipse XDB C ₁₈ (4,6 x 150 nm, 5μm)	61