

**BỘ GIÁO DỤC VÀ ĐÀO TẠO  
ĐẠI HỌC THÁI NGUYÊN**

**VIỆN HÀN LÂM KH&CN VIỆT NAM  
VIỆN SINH THÁI VÀ TÀI NGUYÊN SINH VẬT**

**VŨ ANH TÚ**

**NGHIÊN CỨU THÀNH PHẦN HÓA HỌC VÀ  
KHẢO SÁT HOẠT TÍNH SINH HỌC SAN HỒ MÈM  
*SINULARIA DISSECTA* Ở VIỆT NAM**

**LUẬN VĂN THẠC SĨ SINH HỌC**

**Hướng dẫn khoa học  
TS. NGUYỄN HOÀI NAM**

**Hà Nội – 2015**

**BỘ GIÁO DỤC VÀ ĐÀO TẠO  
ĐẠI HỌC THÁI NGUYÊN**

**VIỆN HÀN LÂM KH&CN VIỆT NAM  
VIỆN SINH THÁI VÀ TÀI NGUYÊN SINH VẬT**

**NGHIÊN CỨU THÀNH PHẦN HÓA HỌC VÀ  
KHẢO SÁT HOẠT TÍNH SINH HỌC SAN HỒ MÈM  
*SINULARIA DISSECTA* Ở VIỆT NAM**

**LUẬN VĂN THẠC SĨ SINH HỌC**

**Học viên: Vũ Anh Tú**  
**Cao học: Khóa 17**  
**Chuyên ngành: Sinh học thực nghiệm**  
**Mã số: 60420114**  
**Hướng dẫn khoa học: TS. Nguyễn Hoài Nam**

**Hà Nội – 2015**

### ***Lời cảm ơn***

*Luận văn được hoàn thành tại Viện Hoá sinh biển, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam. Tôi xin chân thành cảm ơn TS Nguyễn Hoài Nam, người thầy đã tận tình hướng dẫn, hết lòng chỉ bảo và tạo mọi điều kiện giúp đỡ tôi trong thời gian làm luận văn. Tôi cũng xin chân thành cảm ơn GS. VS Châu Văn Minh, TS Nguyễn Văn Thanh, TS Nguyễn Xuân Cường và tập thể cán bộ phòng Dược liệu biển, Viện Hóa sinh biển đã tạo điều kiện, giúp đỡ tôi trong quá trình thực hiện luận văn. Tôi xin gửi lời cảm ơn chân thành tới TS Đỗ Thị Thảo và các anh chị Phòng Thử nghiệm sinh học, Viện Công nghệ sinh học đã giúp đỡ và tạo điều kiện cho tôi hoàn thành các nghiên cứu về hoạt tính sinh học và thử nghiệm dược lý.*

*Tôi xin chân thành cảm ơn tới Lãnh đạo Viện Sinh thái và Tài nguyên sinh vật, Trường Đại học Thái Nguyên đã tạo điều kiện cho tôi được học tập và nghiên cứu. Tôi xin chân thành cảm ơn gia đình và bạn bè đã động viên tôi trong suốt quá trình học tập nghiên cứu. Luận văn này được hỗ trợ kinh phí và thực hiện trong khuôn khổ nội dung của Nhiệm vụ nhánh Hợp tác quốc tế với L.B.Nga cấp Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam và Nhiệm vụ Trọng điểm cấp Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam, VAST.TĐ.ĐAB.02/13-15 do TS. Nguyễn Hoài Nam làm chủ nhiệm.*

*Tác giả luận văn*

*Vũ Anh Tú*

### ***Lời cam đoan***

*Tôi xin cam đoan đây là công trình nghiên cứu của riêng tôi được thực hiện dưới sự hướng dẫn của TS. Nguyễn Hoài Nam. Các số liệu, kết quả nêu trong Luận văn là trung thực và chưa từng được ai công bố trong bất kỳ công trình nào khác. Tôi xin cam đoan rằng mọi sự giúp đỡ cho việc thực hiện Luận văn này đã được cảm ơn và các thông tin trích dẫn trong Luận văn đã được chỉ rõ nguồn gốc.*

*Học viên thực hiện Luận văn*

*Vũ Anh Tú*

## Danh mục chữ viết tắt

CC	Sắc ký cột (Column chromatography)
YMC	Sắc ký cột pha ngược
TLC	Sắc ký lớp mỏng (Thin Layer Chromatography)
MPLC	Sắc ký lỏng trung áp
NMR	Phổ cộng hưởng từ nhân (Nuclear Magnetic Resonance)
<sup>13</sup> C	Phổ cộng hưởng từ hạt nhân cacbon 13 (Carbon-13 Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy)
<sup>1</sup> H-NMR	Phổ cộng hưởng từ hạt nhân proton (Proton Magnetic Resonance Spectroscopy)
HMBC	Phổ tương tác dị hạt nhân qua nhiều liên kết (Heteronuclear Multiple Bond Connectivity)
HSQC	Phổ tương tác dị hạt nhân qua 1 liên kết (Heteronuclear Single-Quantum Coherence)
Mp	Điểm nóng chảy (Melting point)
MTT	[3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)2,5-diphenyltetrazolium bromide]
LU-1	Dòng tế bào ung thư phổi người (Lung carcinoma <i>cell</i> line)
MCF-7	Dòng tế bào ung thư vú người (Human breast cancer <i>cell</i> line)
KB	Dòng tế bào ung thư biểu mô
HepG2	Dòng tế bào ung thư gan người
TBUT	Tế bào ung thư

## MỤC LỤC

MỞ ĐẦU	1
<b>CHƯƠNG I. TỔNG QUAN TÀI LIỆU</b>	2
I.1. Giới thiệu về san hô mềm	2
I.2. Tình hình nghiên cứu về hóa học và hoạt tính sinh học một số loài san hô mềm điển hình thuộc giống <i>Sinularia</i> trên thế giới	9
I.3. Tình hình nghiên cứu về hóa học và hoạt tính sinh học giống <i>Sinularia</i> trong nước	12
<b>CHƯƠNG II. ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU</b>	13
II.1. Đối tượng nghiên cứu	13
II.2. Phương pháp nghiên cứu	14
<i>II.2.1. Phương pháp thu thập mẫu sinh vật biển</i>	14
<i>II.2.2. Phương pháp nghiên cứu xử lý mẫu tạo dịch chiết</i>	14
<i>II.2.3. Phương pháp phân lập, xác định cấu trúc các hợp chất</i>	16
<i>II.2.4. Phương pháp nghiên cứu thử nghiệm hoạt tính diệt tế bào ung thư</i>	17
<b>CHƯƠNG III. THỰC NGHIỆM VÀ KẾT QUẢ</b>	19
III.1. Xử lý mẫu, tạo dịch chiết phục vụ nghiên cứu	19
III.2. Phân lập các hợp chất, hằng số vật lý, dữ liệu phổ của các hợp chất	20
III.3. Thử nghiệm hoạt tính gây độc tế bào các hợp chất phân lập được	25
<b>CHƯƠNG IV. BÀN LUẬN KẾT QUẢ</b>	28
IV.1. Kết quả xác định cấu trúc các hợp chất	28
IV.2. Đánh giá hoạt tính gây độc tế bào các hợp chất phân lập được	52
<b>KẾT LUẬN</b>	53
Tài liệu tham khảo	55
Danh mục công trình công bố	58
<b>PHỤ LỤC</b>	

## MỞ ĐẦU

Cùng với sự tiến hóa nhanh của văn minh nhân loại và sự phát triển vượt bậc của khoa học kỹ thuật thì các căn bệnh nguy hiểm cũng đã gia tăng rất nhiều, đặc biệt có thể thấy sự gia tăng ngày một lớn của căn bệnh ung thư quái ác, thuộc tứ chứng nan y trong y học. Nó đã gây ra nỗi ám ảnh đáng sợ cho loài người. Và các biệt dược phục vụ công tác chữa bệnh, các thực phẩm chức năng hỗ trợ phục hồi sức khỏe giúp người bệnh có thể chống lại bệnh tật tốt nhất đang được các nhà khoa học rất chú trọng nghiên cứu.

Các sinh vật biển có thể đã có rất nhiều người biết đến như Hải sâm, Sao biển, Cá ngựa, cầu gai, san hô, bọt biển... hay gần gũi hơn nữa là các thực phẩm giàu dinh dưỡng trong bữa ăn như các loài ốc, sò, cá, cua, sứa biển ... đang được nghiên cứu rất nhiều theo hướng thực phẩm hoặc thực phẩm chức năng. Nghiên cứu về nguồn hợp chất thiên nhiên biển đã được bắt đầu từ những năm 50 của thế kỷ trước và đang ngày càng nhận được sự quan tâm của các nhà khoa học trên thế giới. Những nghiên cứu về nguồn dược liệu biển trong thời gian gần đây tăng cả về chất lượng và số lượng và đã đạt được những thành quả rất đáng chú ý. Đã có nhiều hợp chất có nguồn gốc biển trở thành các loại thuốc quan trọng trong các lĩnh vực của cuộc sống loài người. Các sinh vật biển trở thành tâm điểm cho nhiều công trình nghiên cứu có ý nghĩa to lớn cho sức khỏe và đời sống. Các nguồn dược liệu từ sinh vật biển có thể bổ sung, hỗ trợ và còn có thể điều trị các căn bệnh nguy hiểm ngày càng gia tăng trong xã hội phát triển.

Nghiên cứu về thành phần hóa học và các hoạt tính sinh học trong các loài san hô sẽ góp phần chuyển những sinh vật không có giá trị về mặt hải sản trở thành những sinh vật biển có giá trị trong nghiên cứu y dược. Chính vì vậy, hiện này đang có rất nhiều nghiên cứu tập trung vào tìm kiếm các hợp chất từ san hô mềm và nghiên cứu hoạt tính sinh học các hợp chất phát hiện được.

## CHƯƠNG I. TỔNG QUAN TÀI LIỆU

### I.1. Giới thiệu về san hô mềm

San hô là loài sinh vật biển thuộc lớp Anthozoa, lớp Anthozoa được chia thành hai phân lớp tùy theo số xúc tu, hoặc các đường đối xứng và một loạt các bộ phận tương ứng với kiểu xương ngoài và bao gồm phân lớp san hô có tám xúc tu được gọi là san hô tám ngăn Octocorallia, và phân lớp san hô có số xúc tu lớn hơn tám và là bội số của sáu được gọi là san hô sáu ngăn Hexacorallia. Các san hô mềm, san hô sừng và bút chì biển thuộc phân lớp san hô Octocorallia, san hô cứng nằm trong phân lớp Hexacorallia. Theo thống kê trên thế giới, phân lớp Octocorallia có khoảng 2000 loài chia làm 310 giống và 45 họ.

San hô là những sinh vật rất đơn giản, chúng tồn tại ở khắp các vùng biển, nông cũng như sâu và là những cá thể hình trụ rất nhỏ có hàng xúc tu ở đỉnh, được sử dụng để bắt mồi trong môi trường nước. Mặc dù trông giống như cây, san hô thực sự là những động vật và cấu tạo tương tự như con sứa và hải quỳ, chúng thuộc vào nhóm động vật biển có các trâm gây ngứa (thích ty bào). Có đến hàng trăm kiểu san hô khác nhau nhưng tất cả đều do các cá thể nhỏ bé, còn gọi là polyp tạo nên. Các cá thể này tiết ra canxi cacbonat để tạo bộ xương cứng, xây nên các rạn san hô tại các vùng biển nhiệt đới. Trên thế giới, rạn san hô ngầm ước tính bao phủ trên 284.300 km<sup>2</sup>, chủ yếu ở vùng biển Ấn Độ - Thái Bình Dương (91,9%). Các rạn san hô mềm phân bố rộng rãi trên đại dương thế giới và có vai trò quan trọng trong hệ sinh thái rạn san hô, chúng tạo ra nguồn vật chất hữu cơ, habitat, tham gia tạo rạn. Cuộc sống cộng sinh của san hô mềm với các loài tảo biển đã tạo nên đặc điểm sinh học vô cùng thú vị của san hô mềm. Rất nhiều hợp chất thứ cấp như các diterpen dạng cembranoid, các steroids ... từ san hô mềm có thể được sinh ra từ những mối tương tác với môi trường sinh thái như vậy [1]

Tuy một đầu san hô trông như một cơ thể sống, nhưng nó thực ra là đầu của nhiều cá thể giống nhau hoàn toàn về di truyền, đó là các polip. Các polip là các sinh vật đa bào với nguồn thức ăn là nhiều loại sinh vật nhỏ hơn, từ sinh vật phù du tới các loài cá nhỏ.



Polip thường có đường kính một vài milimet, cấu tạo bởi một lớp biểu mô bên ngoài và một lớp mô bên trong giống như sứa được gọi là ngoại chất. Polip có hình dạng đối xứng trục với các xúc tu mọc quanh một cái miệng ở giữa - cửa duy nhất tới xoang vị (hay dạ dày), cả thức ăn và bã thải đều đi qua cái miệng này.

Dạ dày đóng kín tại đáy polip, nơi biểu mô tạo một bộ xương ngoài được gọi là đĩa nền. Bộ xương này được hình thành bởi một vành hình khuyên chứa canxi ngày càng dày thêm. Các cấu trúc này phát triển theo chiều thẳng đứng và thành một dạng ống từ đáy polip, cho phép nó co vào trong bộ xương ngoài khi cần trú ẩn.

Polip mọc bằng cách phát triển khoang hình cốc (calices) theo chiều dọc, đôi khi chia thành vách ngăn để tạo một đĩa nền mới cao hơn. Qua nhiều thế hệ, kiểu phát triển này tạo nên các cấu trúc san hô lớn chứa canxi, và lâu dài tạo thành các rạn san hô.

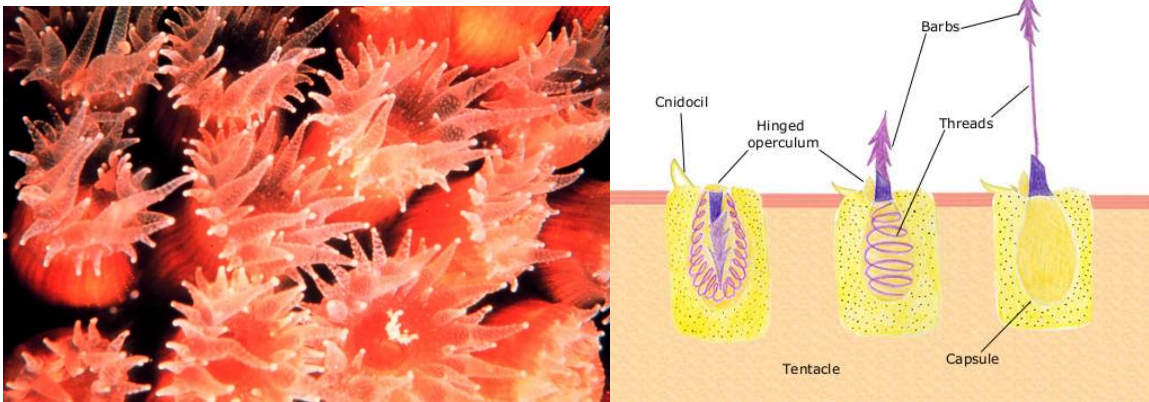
Sự hình thành bộ xương ngoài chứa canxi là kết quả của việc polip kết lắng aragonit khoáng từ các ion canxi thu được từ trong nước biển. Tuy khác nhau tùy theo loài và điều kiện môi trường, tốc độ kết lắng có thể đạt mức 10 g/m<sup>2</sup> polip/ngày. Điều này phụ thuộc mức độ ánh sáng, sản lượng ban đêm thấp hơn 90% so với giữa trưa.

Các xúc tu của polip bắt mồi bằng cách sử dụng các tế bào châm được gọi là nematocyst. Đây là các tế bào chuyên bắt và làm tê liệt các con mồi như sinh vật phù du, khi có tiếp xúc, nó phản ứng rất nhanh bằng cách tiêm chất độc vào con mồi. Các chất độc này thường yếu, nhưng ở san hô lửa, nó đủ mạnh để gây tổn thương cho con người. Các loài sứa và hải quỳ cũng có nematocyst. Chất độc mà nematocyst tiêm vào con mồi có tác dụng làm tê liệt hoặc giết chết con mồi, sau đó các xúc tu kéo con mồi vào trong dạ dày của polip bằng một dải biểu mô co giãn được gọi là hầu.

Các polip kết nối với nhau qua một hệ thống phức tạp gồm các kênh hô hấp tiêu hóa cho phép chúng chia sẻ đáng kể các chất dinh dưỡng và các sinh vật cộng sinh. Đối với các loài san hô mềm, các kênh này có đường kính khoảng 50-500µm

và cho phép vận chuyển cả các chất của quá trình trao đổi chất và các thành phần tế bào.

Ngoài việc dùng sinh vật phù du làm thức ăn, nhiều loài san hô, cũng như các nhóm Thích ti (*Cnidaria*) khác như hải quỳ (ví dụ giống *Aiptasia*), hình thành một quan hệ cộng sinh với nhóm tảo vàng đơn bào thuộc chi *Symbiodinium*. Thông thường, một polip sẽ sống cùng một loại tảo cụ thể. Thông qua quang hợp, tảo cung cấp năng lượng cho san hô và giúp san hô trong quá trình canxi hóa. Tảo hưởng lợi từ một môi trường an toàn, và sử dụng điôxít cacbon và các chất chứa nitơ mà polip thải ra.



Hình 1.1a. Cận cảnh các polip và tế bào châm ( Nguồn internet)

### ***Sinh sản Hữu tính***

San hô chủ yếu sinh sản hữu tính, với 25% san hô phụ thuộc tảo (san hô đá) tạo thành các quần thể đơn tính trong khi phần còn lại là lưỡng tính. Khoảng 75% san hô phụ thuộc tảo "phát tán con giống" bằng cách phóng các giao tử (trứng và tinh trùng) vào trong nước để phát tán các quần thể san hô ra xa. Các giao tử kết hợp với nhau khi thụ tinh để hình thành một ấu trùng rất nhỏ gọi là planula, thường có màu hồng và hình ôvan; một quần thể san hô cỡ trung bình mỗi năm có thể tạo vài nghìn ấu trùng này để vượt qua xác suất rất nhỏ của việc ấu trùng tạo được một quần thể mới.