

BỘ GIÁO DỤC VÀ ĐÀO TẠO
ĐẠI HỌC THÁI NGUYÊN

BÁO CÁO TÓM TẮT
KHOA HỌC VÀ CÔNG NGHỆ CẤP BỘ

**XÁC ĐỊNH THÀNH PHẦN HÓA HỌC VÀ THỬ NGHIỆM MỘT SỐ
HỢP CHẤT HÓA HỌC CÓ HOẠT TÍNH CHỐNG UNG THƯ
TRONG LOÀI TRI MẪU (*ANEMARRHENA ASPHODELOIDES*)**

Mã số: B2017-TNA-42

Chủ nhiệm đề tài: TS. Phạm Văn Khang

Thái Nguyên, 5/2019

BỘ GIÁO DỤC VÀ ĐÀO TẠO
ĐẠI HỌC THÁI NGUYÊN

BÁO CÁO TÓM TẮT
ĐỀ TÀI KHOA HỌC VÀ CÔNG NGHỆ CẤP BỘ

**XÁC ĐỊNH THÀNH PHẦN HÓA HỌC VÀ THỬ NGHIỆM MỘT SỐ
HỢP CHẤT HÓA HỌC CÓ HOẠT TÍNH CHỐNG UNG THƯ
TRONG LOÀI TRI MẪU (*ANEMARRHENA ASPHODELOIDES*)**

Mã số: B2017-TNA-42

Xác nhận của tổ chức chủ trì

Chủ nhiệm đề tài

TS. Phạm Văn Khang

Thái Nguyên, 5/2019

**DANH SÁCH CÁC THÀNH VIÊN THAM GIA NGHIÊN CỨU ĐỀ TÀI
VÀ ĐƠN VỊ PHỐI HỢP CHÍNH**

1. Danh sách thành viên tham gia nghiên cứu đề tài

TT	Họ và tên	Đơn vị công tác và lĩnh vực chuyên môn	Nội dung nghiên cứu cụ thể được giao
1	TS. Nguyễn Thị Thanh Hương	- Trường Đại học Sư phạm- ĐH Thái Nguyên; - Hóa hữu cơ	Phân lập và xác định cấu trúc các hợp chất từ mẫu nghiên cứu
2	PGS. TS. Nguyễn Thị Hiền Lan	- Trường Đại học Sư phạm- ĐH Thái Nguyên; - Hóa học	Nghiên cứu tài liệu, tư vấn chuyên môn trong các nghiên cứu phân tích cấu trúc và hoạt tính sinh học của sản phẩm
3	TS. Nguyễn Hữu Quân	- Trường Đại học Sư phạm - ĐH Thái Nguyên; - Hóa sinh học	Thư ký đề tài
4	Th.s. Đinh Thúy Vân	- Trường Đại học Sư phạm- ĐH Thái Nguyên; - Hóa hữu cơ	Phân lập và xác định cấu trúc các hợp chất từ mẫu nghiên cứu
5	ThS. Nông Thị Anh Thư	- Trường Đại học Y-Dược – Đại học Thái Nguyên. - Dược liệu thực vật.	Thu thập mẫu nghiên cứu và chiết xuất mẫu nghiên cứu. Đánh giá hoạt tính ức chế tế bào ung thư.
6	CN. Nguyễn Thúy Quỳnh	- Đại học Thái Nguyên - Học viên cao học chuyên ngành Hóa hữu cơ	Phân lập các hợp chất từ mẫu nghiên cứu
7	KTV. Nguyễn Công Biên	- Trường Đại học Sư phạm- ĐH Thái Nguyên; - Hóa hữu cơ.	Thu thập mẫu nghiên cứu và chiết xuất mẫu nghiên cứu.

2. Danh sách các đơn vị phối hợp chính

Tên đơn vị trong và ngoài nước	Nội dung phối hợp nghiên cứu	Họ và tên người đại diện đơn vị
Phòng thử nghiệm sinh học, Viện Công nghệ sinh học	Đánh giá hoạt tính ức chế tế bào ung thư	TS. Đỗ Thị Thảo Nghiên cứu viên
Viện Hóa học – Viện Hàn Lâm KH & CN Việt nam	Phối hợp nghiên cứu và tổ chức trao đổi chuyên môn, tổ chức seminar khoa học	GS. TS Nguyễn Văn Tuyền - Viện Trưởng
Phòng phát triển dược liệu mới, Viện dược học, Trường Đại học khoa học và Công nghệ Hoa Đông, Trung Quốc	Cung cấp tư liệu, trao đổi chuyên môn, phối hợp nghiên cứu, tổ chức seminar khoa học. Tham gia viết bài báo ISI	GS. Ma Lei, Trưởng phòng

BỘ GIÁO DỤC VÀ ĐÀO TẠO
ĐẠI HỌC THÁI NGUYÊN

THÔNG TIN VỀ KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU

1. Thông tin chung

- Tên Đề tài: Xác định thành phần hóa học và thử nghiệm một số hợp chất hóa học có hoạt tính chống ung thư trong loài Tri mẫu (*Anemarrhena asphodeloides*)
- Mã số: B2017-TNA-42
- Chủ nhiệm đề tài: TS. Phạm Văn Khang
- Email: phamvankhang@dhsptn.edu.vn
- Điện thoại: 0917146083
- Cơ quan chủ trì: Đại học Thái Nguyên
- Thời gian thực hiện: 24 tháng (Từ 1/2017-12/2018) (gia hạn 6/2019)

2. Mục tiêu

Xác định thành phần hóa học, phân lập và xác định được cấu trúc hóa học các hợp chất phân lập được (15 hợp chất). Đánh giá hoạt tính ức chế tế bào ung thư của các hợp chất phân lập được: Đánh giá hoạt tính chống ung thư trên 2 dòng tế bào bằng mô hình in vitro (trong ống nghiệm) và lựa chọn hợp chất có hoạt tính mạnh để đánh giá hoạt tính cảm ứng/kích hoạt enzyme caspase tìm kiếm các hoạt chất có khả năng đưa tế bào ung thư vào quá trình tự chết apoptosis.

3. Tính mới và tính sáng tạo

Đề tài xác định thành phần hóa học, phân lập và xác định được cấu trúc hóa học các hợp chất phân lập được (15 hợp chất), trong đó có hợp chất mới. Đánh giá hoạt tính ức chế tế bào ung thư của các hợp chất phân lập được: Đánh giá hoạt tính chống ung thư trên 2 dòng tế bào bằng mô hình in vitro (trong ống nghiệm) và lựa chọn hợp chất có hoạt tính mạnh để đánh giá hoạt tính cảm ứng/kích hoạt enzyme caspase tìm kiếm các hoạt chất có khả năng đưa tế bào ung thư vào quá trình tự chết apoptosis. Kết quả nghiên cứu đã phát hiện ra một số hợp chất mới và kết quả đánh giá hoạt tính rất khả quan về hoạt tính kháng một số dòng tế bào ung thư ở người.

4. Kết quả nghiên cứu

Qua quá trình thực hiện đề tài, nhóm nghiên cứu đã đạt được những kết quả tốt theo mục tiêu đề ra, cụ thể:

- Đã đánh giá sơ bộ thành phần hóa học của các nhóm hợp chất hữu cơ có trong dịch chiết ethanol và các phân đoạn (dichloromethane, ethyl acetate và *n*-butanol) bằng các phản ứng đặc trưng.
- Đã phân lập được 19 hợp chất từ mẫu nghiên cứu, trong đó có 5 hợp chất mới.
- Đã nghiên cứu xác định cấu trúc của các hợp chất thu được bằng các phương pháp phổ hiện đại như ^1H , ^{13}C -NMR, HSQC, HMBC và phổ MS.
- Đã nghiên cứu hoạt tính ức chế tế bào ung thư *in vitro* trên 02 dòng tế bào ung thư ở người là tế bào ung thư HeLa và tế bào ung thư gan A549 của chất đã phân lập được. Đã đánh giá khả năng ức chế caspase hợp chất có khả năng ức chế tốt tế bào ung thư, nhận thấy chất này có khả năng ức chế tốt enzym caspase.

5. Sản phẩm

5.1. Sản phẩm khoa học

1. Pham Van Khang, Ngo Duc Hieu, Nguyen Thi Hien Lan, Sida Shen, Lei Ma, (2018), “Two new steroidal glycosides from *Anemarrhena asphodeloides* rhizome, and their cytotoxic activity *in vitro*”, *Phytochemistry Letters* 28, pp.164-167 (ISI).
2. Pham Van Khang, Nguyen Thi Hien Lan, Le Quang Truong, Mai Thi Minh Chau, Mai Xuan Truong, Dinh Thuy Van, Nguyen Thi Quynh Anh, Lei Ma., (2018), “Isolation of new glycosides from *Anemarrhena asphodeloides* rhizome and screening of their anticancer activity”, *Letters in Organic Chemistry*, 16(6), pp. 474-477(ISI).
3. Pham Van Khang, Dao Mai Phuong & Lei Ma (2017) “New steroids from *Anemarrhena asphodeloides* rhizome and their α -glucosidase inhibitory activity”, *Journal of Asian Natural Product Research*, 19, pp. 468-473 (ISI).
4. Phạm Văn Khang, Thẩm Hương Thảo, Đào Mai Phương, Ngô Đức Hiếu, (2018), “Phân lập, xác định cấu trúc và đánh giá tác dụng độc tính tế bào của một số hợp chất từ thân rễ loài tri mẫu ở Việt Nam”, *Tạp chí Dược liệu*, 23 (6), tr. 339 - 345.

5.2. Sản phẩm đào tạo

- Hướng dẫn 02 Luận văn thạc sĩ (đã bảo vệ)

1. Nguyễn Thúy Quỳnh (2017), *Nghiên cứu phân lập một số hợp chất hóa học từ thân rễ loài thực vật Tri mẫu*, Luận văn thạc sĩ, Trường ĐH Sư phạm – ĐHTN.
2. Đào Mai Phương (2018), *Phân lập, xác định cấu trúc và đánh giá hoạt tính ức chế tế bào ung thư một số hợp chất hóa học từ thân rễ loài thực vật Tri mẫu*, Luận văn thạc sĩ, Trường ĐH Sư phạm – ĐHTN.

- Hướng dẫn 04 đề tài sinh viên nghiên cứu khoa học

1. Mai Thị Minh Châu (2018), *Nghiên cứu phân lập, xác định cấu trúc và đánh giá hoạt tính sinh học của hợp chất glycoside từ loài thực vật Tri mẫu (Anemarrhenae Aspheloides)*, đề tài SV NCKH, Trường ĐH Sư phạm – ĐHTN.
2. Ngô Đức Hiếu, Lê Quang Trường (2018), *Phân lập, xác định cấu trúc và đánh giá hoạt tính sinh học của hợp chất steroid từ loài thực vật Tri mẫu (Anemarrhenae Aspheloides)*, đề tài SV NCKH, Trường ĐH Sư phạm – ĐHTN.
3. Trần Thị Huệ, Trần Thị Xuân (2017). *Bước đầu nghiên cứu thành phần hóa học trong loài Tri mẫu (Anemarrhena asphodeloides)*, đề tài SV NCKH, Trường ĐH Sư phạm – ĐHTN.
4. Đinh Thị Hoài (2017). *Nghiên cứu phân lập hợp chất có trong dịch chiết etyl axetat của loài Tri mẫu (Anemarrhena asphodeloides)*, đề tài SV NCKH, Trường ĐH Sư phạm – ĐHTN.

5.3. Sản phẩm ứng dụng

- Quy trình phân lập các hợp chất tinh khiết từ loài Tri mẫu;
- Hợp chất tinh sạch và bộ phổ xác định cấu trúc của chất tinh sạch (phổ cộng hưởng từ hạt nhân và phổ khối lượng);
- Báo cáo kết quả thử nghiệm hoạt chất ức chế tế bào ung thư.

6. Phương thức chuyển giao, địa chỉ ứng dụng, tác động và lợi ích mang lại của kết quả nghiên cứu

6.1. Phương thức chuyển giao

- Kết quả của đề tài được công bố là các bài báo khoa học trên các tạp chí trong nước và quốc tế và các báo cáo khoa học tại các hội nghị khoa học cấp quốc gia và quốc tế.
- Được nộp thư viện làm tài liệu tham khảo phục vụ giảng dạy và học tập đại học và sau đại học chuyên ngành hoá hữu cơ, các hợp chất thiên nhiên, Hóa dược, v.v. tại Đại học Thái Nguyên.

6.2. Địa chỉ ứng dụng

- Là tài liệu tham khảo cho cán bộ làm công tác nghiên cứu, giảng viên giảng dạy về hoá học, Tổng hợp hữu cơ, Hóa dược.
- Làm tư liệu cho các công ty dược nghiên cứu làm tư liệu phát triển các loại thuốc mới đặc biệt là trong lĩnh vực phát triển thuốc kháng ung thư.
- Chuyên giao cho công ty chuyên sản xuất dược phẩm và thực phẩm chức năng,....

6.3. Tác động và lợi ích mang lại của kết quả nghiên cứu

6.3.1. Đối với lĩnh vực giáo dục và đào tạo

- Phục vụ công tác đào tạo đại học và sau đại học tại ĐH Thái Nguyên, kết quả của đề tài là tài liệu tham khảo tốt cho sinh viên, học viên cao học, nghiên cứu sinh và cán bộ giảng dạy ngành Hóa học tại Đại học Thái Nguyên.

6.3.2. Đối với lĩnh vực khoa học và công nghệ có liên quan

- Kết quả của đề tài có ý nghĩa đặc biệt trong lĩnh vực hóa hữu hữu cơ nói chung và trong lĩnh vực hóa học các hợp chất thiên nhiên nói riêng. Kết quả công bố của đề tài giúp cho các nhà khoa học trong nước và trên thế giới đang nghiên cứu trong lĩnh vực này có thêm thông tin bổ ích về những hợp chất đã phân lập được có cấu trúc và hoạt tính sinh học lý thú.

6.3.3. Đối với phát triển kinh tế-xã hội

Kết quả của đề tài góp phần nâng cao số lượng các hợp chất có hoạt tính sinh học cao, làm tăng sự lựa chọn đối tượng và giảm đáng kể kinh phí trong việc nghiên cứu sản xuất các loại thuốc mới. Góp phần vào quá trình tìm ra các chủng thuốc mới phục vụ đời sống.

6.3.4. Đối với tổ chức chủ trì và các cơ sở ứng dụng kết quả nghiên cứu

- Nâng cao năng lực nghiên cứu cho nhóm nghiên cứu đề tài.
- Tăng cường hợp tác nghiên cứu khoa học của cán bộ Đại học Thái Nguyên với các cơ sở khác ở trong và ngoài nước.
- Các công ty dược phẩm có thêm những lựa chọn nghiên cứu để tìm ra chủng thuốc mới trong lĩnh vực ức chế sự phát triển của các chủng tế bào ung thư.

INFORMATION ON RESEARCH RESULTS

1. General Information

- Project title: Study on chemical compositions and evaluation of anticancer activities of some compounds in *Anemarrhena asphodeloides*.
- Code number: B2017-TNA-42
- Coordinator: Dr. Pham Van Khang
- Email: phamvankhang@dhsptn.edu.vn
- Phone: 0917146083
- Implementing institution: Thai Nguyen University
- Duration: 24 months, from 1/2017 to 12/2018 (Extension: June 2019)

2. Objectives

To study the chemical composition, extraction and isolation, identification the structures of isolated compounds from samples. To evaluate the anticancer activities of some compounds on two cancer cell lines in *in vitro*. Select compound exhibits good anticancer activities to screening activity on caspase enzyme leads the cells to apoptosis.

3. Creativeness and innovativeness

The project is aim to study the chemical composition, extraction and isolation, identification the structures of isolated compounds from samples (about 15 compounds), including 5 new compounds. To evaluate the anticancer activities of some compounds on two cancer cell lines in *in vitro*. Select compound exhibits good anticancer activities to screening activity on caspase enzyme leads the cells to apoptosis. The research results of project have been found some new compounds and results of the evaluation of anticancer activity against some human cancer cell lines are very positive.

4. Research results

Through the implementation of the research project, the research team has achieved good results according to its objectives, detail as :

- Primary experiment the chemical composition for screening organic compounds groups by using characteristic reaction of dichloromethane, ethyl acetate and *n*-butanol extractions.
- Isolated 19 compounds from samples, including new compounds.

- It has studied structure determination of compounds obtained by modern spectral methods such as ^1H , ^{13}C -NMR, HSQC, HMBC and MS spectrum.
- It has studied in vitro anti-cancer activity of two human cancer cell lines namely HeLa cells and A549 liver cancer cells of isolated compounds. To evaluate the biological activities of compounds on caspase enzyme to select good activities. It has *thereby* shown that some isolated compounds are have great prospects for research on novel anti-cancer compounds.

5. Products

5.1. Scientific publications

1. Pham Van Khang, Ngo Duc Hieu, Nguyen Thi Hien Lan, Sida Shen, Lei Ma, (2018), "Two new steroidal glycosides from *Anemarrhena asphodeloides* rhizome, and their cytotoxic activity *in vitro*", *Phytochemistry Letters* 28, pp.164-167 (ISI).
2. Pham Van Khang, Nguyen Thi Hien Lan, Le Quang Truong, Mai Thi Minh Chau, Mai Xuan Truong, Dinh Thuy Van, Nguyen Thi Quynh Anh, Lei Ma., (2018), "Isolation of new glycosides from *Anemarrhena asphodeloides* rhizome and screening of their anticancer activity", *Letters in Organic Chemistry*, 16(6), pp. 474-477(ISI).
3. Pham Van Khang, Dao Mai Phuong & Lei Ma (2017) "New steroids from *Anemarrhena asphodeloides* rhizome and their α -glucosidase inhibitory activity", *Journal of Asian Natural Product Research*, 19, pp. 468-473 (ISI, Q2).
4. Pham Van Khang, Tham Huong Thao, Dao Mai Phuong, Ngo Duc Hieu, (2018), "Isolation, structural identification and evaluation of cytotoxic activity of some compounds from *Anemarrhena asphodeloides* Bunge rhizomes in Viet Nam", *Journal of Medicinal Materials*, 23 (6),tr. 339 - 345.

5.2. Training results

- 02 master of theses

1. Nguyen Thuy Quynh (2017), *Study on isolation the compounds from Anemarrhena asphodeloides rhizome*, TNU - Thai Nguyen University of Education.

2. Dao Mai Phuong (2018), *Isolation, identification of structures and evaluation the anti-cancer activities the compounds from Anemarrhena asphodeloides rhizome*, TNU - Thai Nguyen University of Education.

- 04 scientific research students

1. Mai Thi Minh Chau (2018), *Study on the isolation, identification of structures and evaluation the biological activities of glycoside compounds from Anemarrhena asphodeloides*, TNU - Thai Nguyen University of Education.
2. Ngo Đuc Hieu, Le Quang Truong (2018), *Isolation, identification of structures and evaluation the biological activities of steroid compounds from Anemarrhena asphodeloides*, TNU - Thai Nguyen University of Education.
3. Tran Thi Hue, Tran Thi Xuan (2017), *Primary study on chemical compositions of Anemarrhena asphodeloides rhizome*, TNU - Thai Nguyen University of Education.
4. Dinh Thi Hoai (2017), *Study on the isolation of compounds from ethyl acetate extract from Anemarrhena asphodeloides*, TNU - Thai Nguyen University of Education.

5.3. Application results

- Procedures for extraction and isolation of pure compounds from *Anemarrhena asphodeloides*;
- Isolated compounds and their NMR, MS data;
- Anti-cancer activities report.

6. Transfer alternatives, application institutions, impacts and benefits of research results

6.1. Transfer method

- The research results are scientific articles published in national and international *journals* and scientific reports at national and international scientific conferences.
- This research article is submitted at library to be as a reference material for teaching and learning of undergraduate and graduate programs in major of organic chemistry, natural compounds, pharmaceutical chemistry, etc. at Thai Nguyen University.

6.2. Application address

- It is a reference material for researchers, lecturers teaching in chemistry, natural products, organic synthesis and pharmaceutical chemistry.
- It is a documentation for pharmaceutical companies to develop new drug type, especially in the field of development of anti-cancer drugs.
- It can be transferred if companies and enterprises have demand for research and development of drugs

6.3. Effects and benefits of research results

6.3.1. In term of the education and training field

- It is to serve undergraduate and postgraduate training at Thai Nguyen University. The results of the research project are good reference material for undergraduate and graduate students, master and doctoral students and lecturers in chemistry at Thai Nguyen university.

6.3.2. In term of relevant science and technology

- The results of this research project have special significance in the field of organic synthesis in general and in that of heterocyclic chemistry in particular. The results of research project. The published results of research project will help Vietnam and international scientists who are working in this field to have more useful information about the new quinoline derivatives having structures and interesting biological activities .

6.3.3. In term of the socio-economic development

- The results of research project have contributed to raising the number of highly bioactive compounds, increasing the choice of subjects and significantly reducing the cost of research into the production of new drugs. It contributes to the process of finding new strains serving people.

6.3.4. In term of the implementing institution and establishments applying research results

- The team of research project is improved the research capacity
- The scientific research cooperation of Thai Nguyen University's staffs with other other facilities in Vietnam and abroad is strengthened.
- Pharmaceutical companies have more research options to find new strains of medications in the field of the growth inhibition of cancer cell strains.

MỞ ĐẦU

Như đã biết, động thực vật là nguồn tài nguyên phong phú và là nguồn cung cấp các hợp chất thiên nhiên có hoạt tính sinh học vô cùng quý giá. Việc khai thác và sử dụng các loài thực động thực vật để làm thuốc và hỗ trợ chữa bệnh đã được thực hiện từ lâu. Hiện nay, xu hướng nghiên cứu tìm kiếm các hợp chất thiên nhiên có hoạt tính sinh học cao từ các loài động thực vật làm dược phẩm chữa bệnh ngày càng thu hút được sự quan tâm của các nhà khoa học. Từ thực tế nhận thấy các hợp chất thiên nhiên thường có hoạt tính mạnh, độ ổn định cao và có độc tính thấp so với các hợp chất nguồn gốc tổng hợp.

Thực vật Tri mẫu là một trong những loài thực vật thuộc họ Thùa (Agavaceae) đã được sử dụng từ lâu để chữa một số bệnh như: viêm nhiễm, thấp khớp, bệnh thần kinh. Gần đây, nhiều nghiên cứu đã chứng minh dịch chiết cao tổng số và hợp chất hóa học được phân lập từ loài thực vật này có khả năng ức chế nhiều dòng tế bào ung thư và bảo vệ tế bào não dưới các tác động gây tổn thương của glutamat, hyperglycemia, beta-amyloid nhằm định hướng chữa bệnh Alzheimer và Parkinson.

Ở Việt Nam, Tri mẫu thường mọc hoang và được trồng tại vùng núi phía Bắc (Thái Nguyên, Bắc Kạn, Tuyên Quang, Lạng Sơn,...), nó được dùng trong các bài thuốc trị đau khớp, đau dạ dày và viêm đại tràng. Đến nay, ở Việt Nam có ít các công trình nghiên cứu về thành phần hóa học và hoạt tính sinh học của loài thực vật này, các nghiên cứu này tương đối đơn giản và chưa có tính hệ thống cao, nên việc tiến hành nghiên cứu về thành phần hóa học và hoạt tính sinh học của loài thực vật này để làm cơ sở cho việc sử dụng làm thuốc chữa bệnh là rất cần thiết, có ý nghĩa khoa học và thực tiễn.

Nhóm nghiên cứu đã tiến hành phân lập được một số hợp chất từ thực vật này, và tiến hành đánh giá hoạt tính ức chế tế bào ung thư phổi (A549) và ung thư cổ tử cung (HeLa), kết quả cho thấy các chất phân lập được thể hiện hoạt tính ức chế mạnh tế bào ung thư trên. Do đó, chúng tôi đề xuất đề tài: “**Xác định thành phần hóa học và thử nghiệm một số hợp chất hóa học có hoạt tính chống ung thư trong loài Tri mẫu (*Anemarrhena asphodeloides*)**”.

Đề tài này khi hoàn thành sẽ cung cấp các thông tin khoa học giá trị làm cơ sở khoa học quan trọng để sử dụng loài thực vật này làm thuốc chữa bệnh và sàng lọc các hợp chất có hoạt tính tốt để tiến hành nghiên cứu tiếp theo. Đồng thời góp phần vào đào tạo nguồn nhân lực cho vùng núi phía Bắc và cả nước.

Chương 1

TỔNG QUAN

1.1. Khái quát về loài Tri mẫu (*Anemarrhena asphodeloides* Bunge)

1.1.1. Đặc điểm thực vật học

1.1.1.1. Tên khoa học

- Tên khoa học: *Anemarrhena asphodeloides* Bunge. Họ: Thùa (Agavaceae).
- Tên Việt Nam: Tri mẫu.
- Tên khác: Zhi mu (Trung Quốc), Chimo (Nhật Bản), Ji mo (Hàn Quốc).

1.1.1.2. Đặc điểm thực vật

1.1.1.3. Phân bố

1.1.2. Công dụng của loài Tri mẫu^[1]

Tri mẫu có vị đắng, tính lạnh, không độc, có tác dụng tu thận, bổ thủy, tá hỏa, thường được dùng chữa bệnh tiêu khát (đái đường), hạ thủy, ích khí. Hiện nay Tri mẫu dùng làm thuốc chữa ho tiêu đờm, chữa sốt, sốt do viêm phổi.

1.2. Tình hình nghiên cứu về hoạt tính sinh học loài Tri mẫu

Như đã trình bày ở trên, trong loài thực vật này thì thành phần hóa học chủ yếu là các saponin, các nghiên cứu về hoạt tính sinh học của hai loài này cũng định hướng theo tác dụng sinh học của loại hợp chất đó. Dịch chiết tổng số của loài thực vật tri mẫu (*Anemarrhena asphodeloides* Bunge) chỉ ra khả năng bảo vệ tế bào não và cải thiện trí nhớ trên chuột thực nghiệm với tác nhân gây tổn thương amyloid β -peptide và một số tác nhân khác^[10-17]. Đồng thời thể hiện khả năng ức chế các dòng tế bào ung thư HeLa, HepG2, BC, MKN45, và KATO-III với liều lượng IC₅₀ khoảng μ M^[14-15, 31].

1.3. Tình hình nghiên cứu thành phần hóa học của loài Tri mẫu

Cho đến nay người ta đã phát hiện loài Tri mẫu (*Anemarrhena asphodeloides* Bunge) có thành phần hóa học phong phú và đa dạng. Các nghiên cứu đã chỉ ra, thành phần hóa học chính của Tri mẫu là hợp chất saponin và phenolic, ngoài ra cũng có một vài hợp chất flavonoid, lignans, anemaran và xanthonen đã được phân lập [4-45].

Chương 2

THỰC NGHIỆM

2.1. Hóa chất và thiết bị phân lập

2.2. Phương pháp xử lý mẫu thực vật, chiết tách và xác định cấu trúc các chất phân lập được

2.2.1. Xử lý mẫu thực vật

2.2.2. Chiết tách các chất

Mẫu phân thân rễ của loài Tri mẫu được chặt nhỏ và chiết hồi lưu với ethanol ở 90°C. Quay cất thu hồi dung môi dưới áp suất giảm thu được cặn chiết ethanol. Cặn đó chiết lần lượt với các dung môi có độ phân cực tăng dần dichloromethane, ethyl acetate (EA), *n*-butanol. Sau đó cất thu hồi dung môi dưới áp suất giảm thu được các cặn tổng số.

Phân lập cặn tổng số và các cặn ở các phân đoạn bằng phương pháp sắc ký cột trên silica gel pha thuận và pha đảo với các hệ dung môi thích hợp.

2.2.3. Xác định cấu trúc các chất

Cấu trúc của các hợp chất được khảo sát nhờ sự kết hợp các phương pháp phổ hiện đại như phổ cộng hưởng từ hạt nhân proton ¹H, cacbon ¹³C, phổ hai chiều HSQC và HMBC, phổ khối lượng ESI-MS và một số phương pháp khác.

2.3. Phương pháp thử nghiệm hoạt tính gây độc tế bào ung thư

2.3.1. Vật liệu và hóa chất

- FBS của GIBCO, Invitrogen, TCA (Sigma), SRB (Sigma)
- Đĩa 96 giếng nhựa (Corning, USA), pipette (Eppendorf), máy đọc ELISA 96 giếng (Bio-rad)
- Chất tham khảo: Ellipticine
- Các hóa chất thông thường khác
- Các dòng tế bào ung thư do GS. TS. J. M. Pezzuto, Trường Đại học Hawaii và GS.

Jeanette Maier, trường Đại học Milan, Italia cung cấp.

2.3.2. Phương pháp xác định tính độc tế bào ung thư (cytotoxic assay)

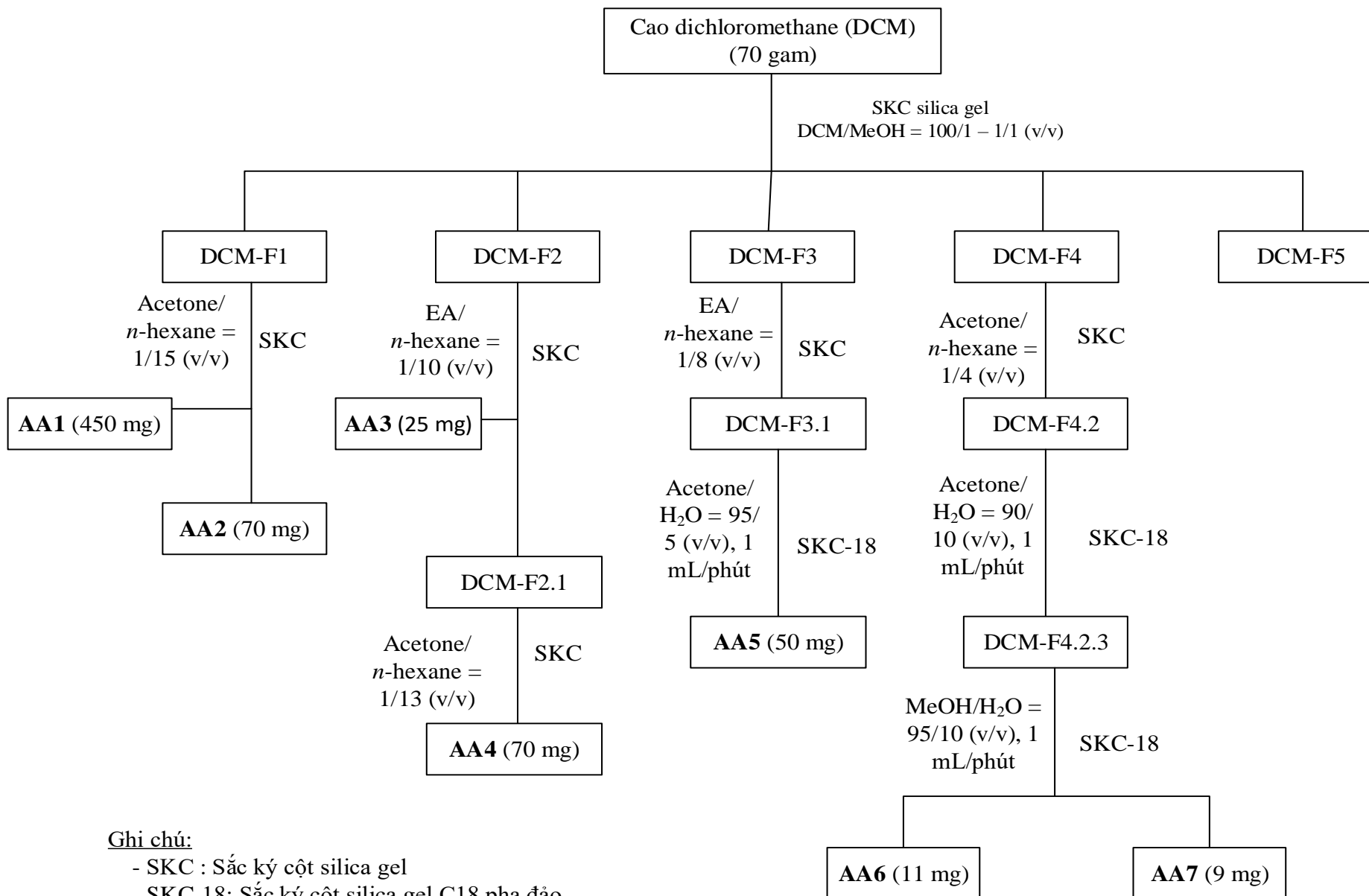
2.4. Chiết xuất hợp chất từ thân rễ Tri mẫu

2.4.1. Chiết xuất cao ethanol từ thân rễ của loài Tri mẫu

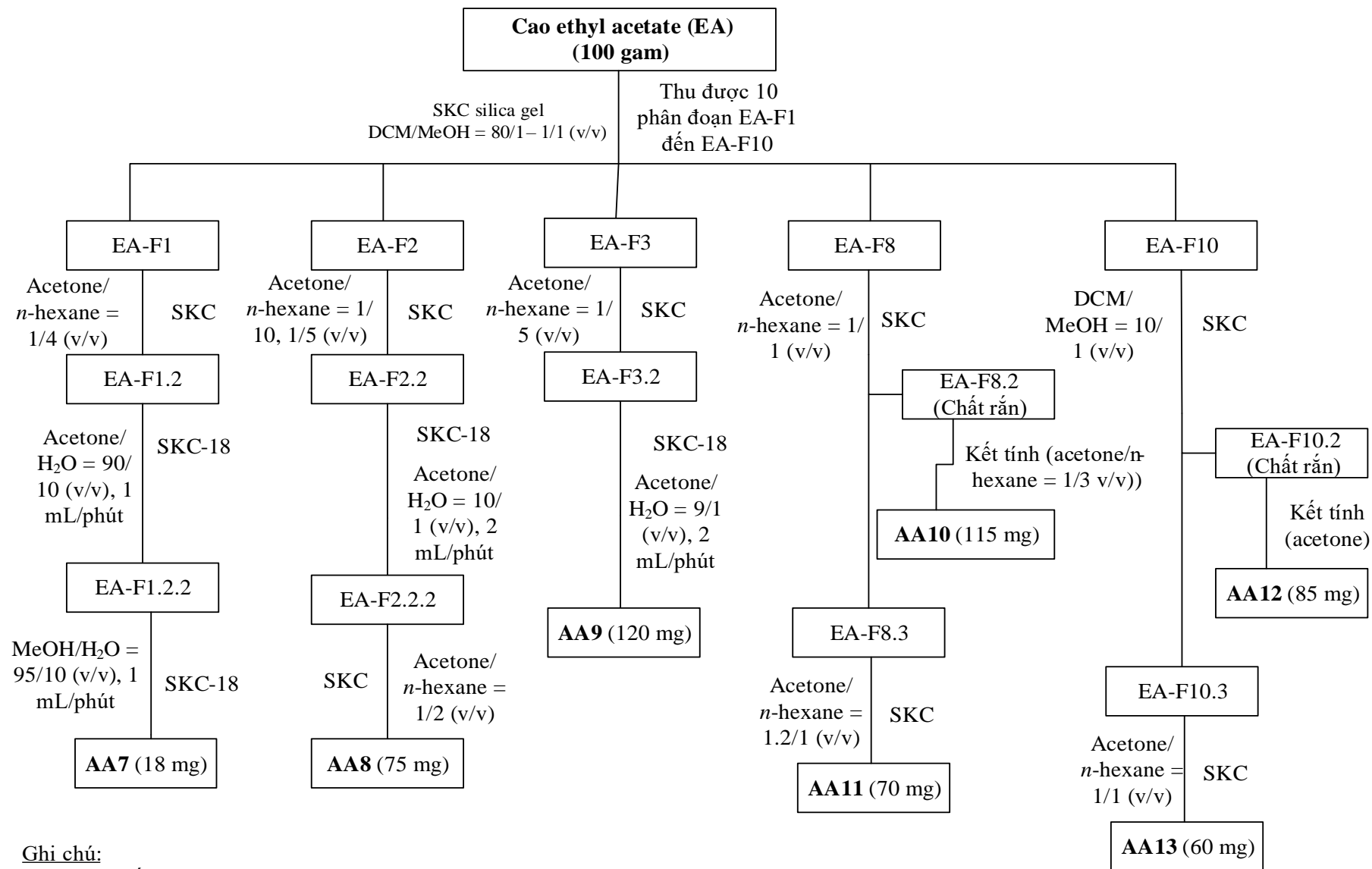
10 kg mẫu khô từ thân rễ của loài tri mẫu sau khi lấy về được đem chặt nhỏ sấy khô và chiết hồi lưu với ethanol 90% ở nhiệt độ 70°C trong thời gian 3 giờ và lặp lại 3 lần. Cát thu hồi dung môi được cạn chiết ethanol và phân bố đều trong lượng nước vừa đủ. Dịch chiết còn được chiết lần lượt với các dung môi có độ phân cực tăng dần: dichloromethane, ethyl acetate và *n*-butanol. Thu hồi dung môi thu được các cao chiết lần lượt có khối lượng là: dichloromethane (160 gam), ethyl acetate (233 gam) và *n*-butanol (410 gam).

2.4.2. Thử nghiệm phân tích thành phần hóa học bằng phản ứng định tính

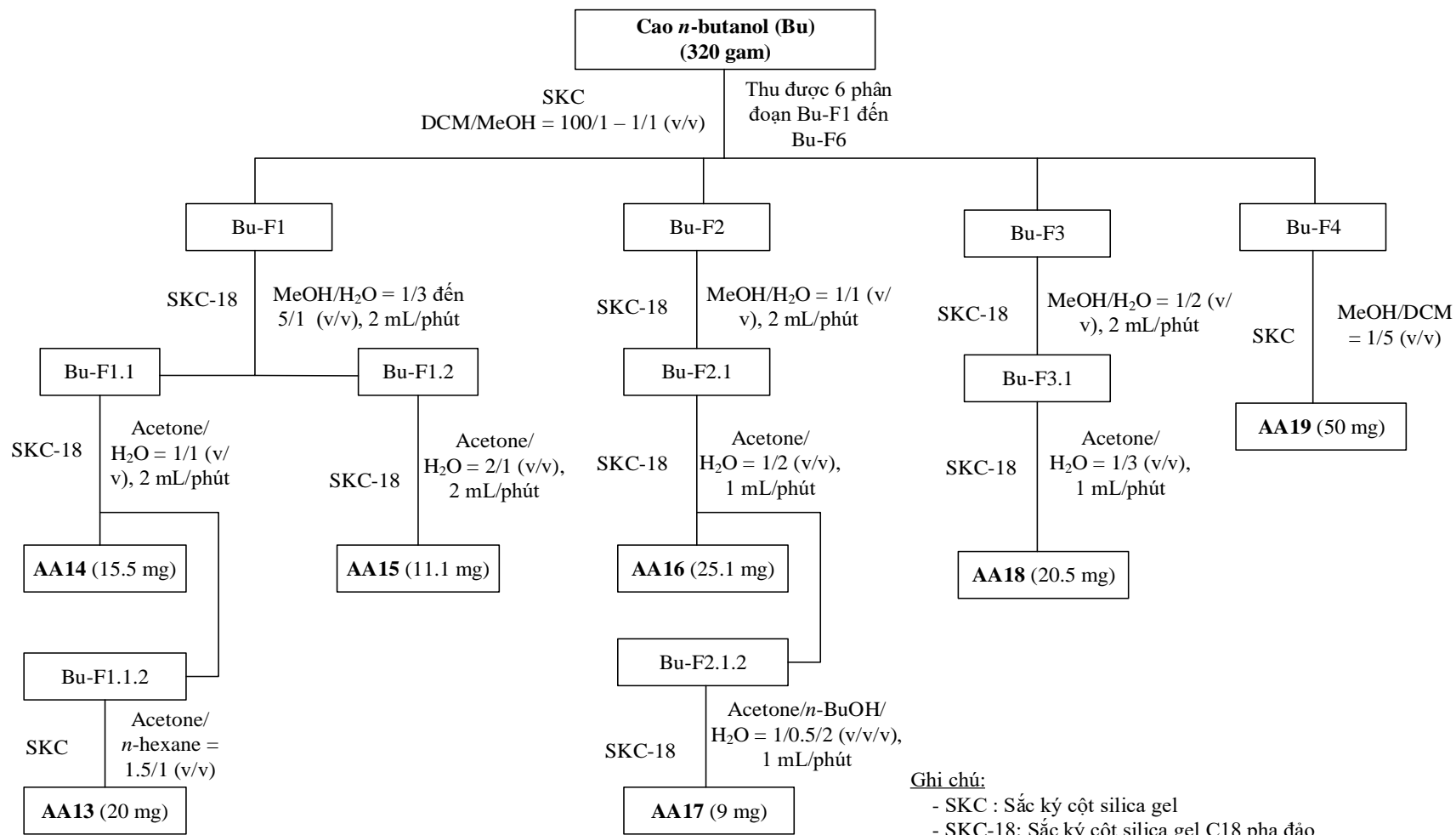
2.4.3. Quy trình phân lập các chất từ phần rễ của loài Tri mẫu



Sơ đồ phân lập cao chiết dichloromethane (DCM)



Sơ đồ phân lập cao chiết ethyl acetate (EA)



2.4.4. Xác định hoạt tính độc tế bào trên dòng tế bào HeLa (tế bào ung thư cổ tử cung) và tế bào A549 (tế bào ung thư gan)

Được thực hiện trên các dòng tế bào ung thư HeLa (cổ tử cung): do GS. TS. J. M. Pezzuto, Trường Đại học Hawaii và GS. Jeanette Maier, trường Đại học Milan, Italia cung cấp. Các hóa chất cần thiết khác của các hãng Sigma, GIBCO, Invitrogen v.v.

Chương 3

KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU VÀ THẢO LUẬN

3.1. Kết quả phân tích định tính thành phần nhóm hợp chất

Bảng 3.1. Kết quả định tính một số nhóm chất hữu cơ có trong cao chiết ethanol 90% (EtOH), dichloromethane (DCM), ethyl acetate (EA) và *n*-butanol (BuOH)

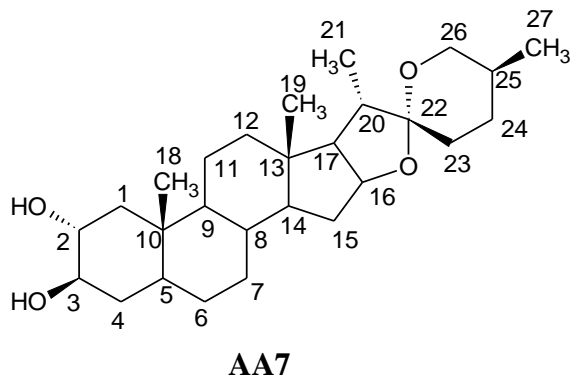
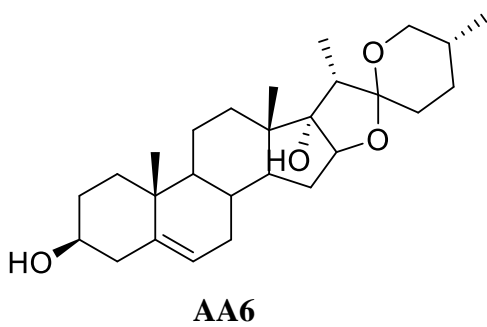
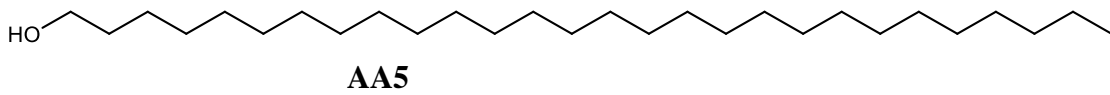
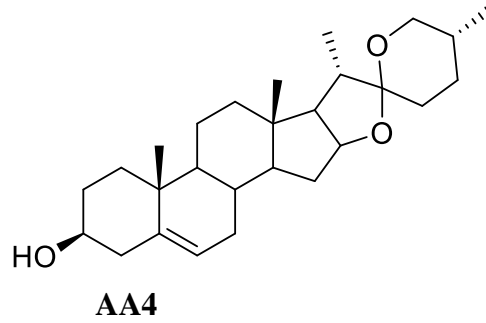
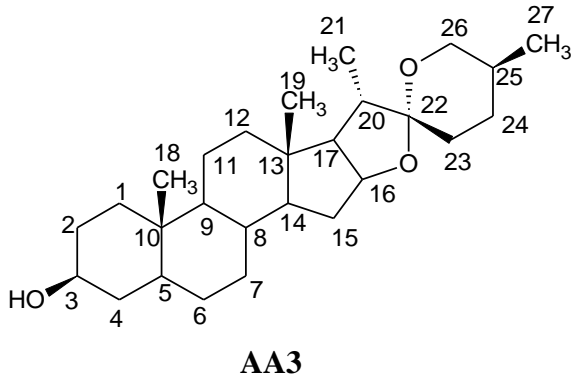
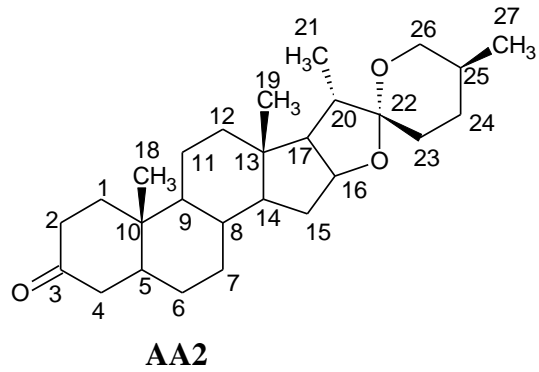
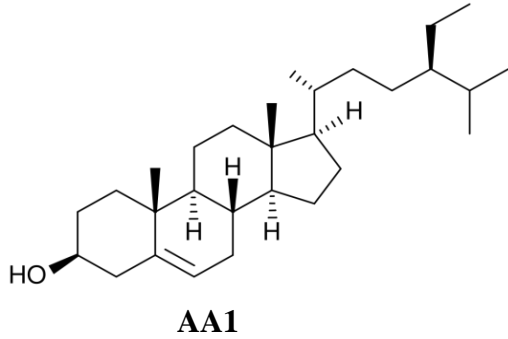
TT	Nhóm chất	Phản ứng	Kết quả định tính thành phần			
			EtOH	DCM	EA	BuOH
1	Polyphenol	dd FeCl ₃ 5%	+++	++	+++	+++
		H ₂ SO ₄ đặc	-	-	+	+
2	Alkaloid	Dragendoff	+	+	+	+
		Mayer	-	-	-	-
3	Flavonoid	Mg/HCl đặc	++	+	++	++
4	Coumarin	NaOH đặc	+	+	+	+
5	Steroid	Lieberman-Bourchar	+++	+++	+++	+++
6	Glycoside tim	Keller-Kilian	-	-	-	-
7	Saponin	Tạo bọt	+++	+	+++	+++
		Lieberman-Bourchar	+++	+++	+++	+++
+++: Hiện tượng rất rõ; ++ Hiện tượng rõ; +: Có hiện tượng; -: Không có hiện tượng						

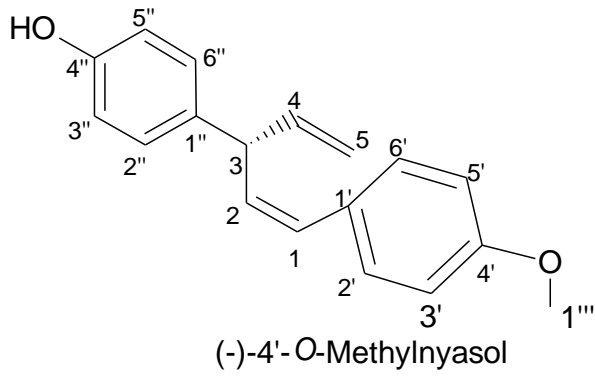
Từ kết quả phân tích ở bảng trên ta thấy trong cao chiết ethanol của thân rễ loài tri mẫu có mặt nhóm hợp chất hữu cơ có hoạt tính sinh học như hợp chất phenolic, steroid và saponin. Khi chiết phân đoạn cao chiết ethanol theo chiều tăng dần độ phân cực của dung môi (Từ dichloromethane, ethyl acetate và *n*-butanol) các nhóm chất do có độ phân cực khác nhau nên mức độ phân bố có sự khác nhau. Các nhóm hợp chất này có ý nghĩa trong việc ứng dụng làm thuốc chữa bệnh: tác dụng chống oxi hóa, tác động lên enzym, kháng sinh, chống viêm, điều trị ung thư, diệt khuẩn, hạ huyết áp. Steroid và saponin có tác động tới hệ thần kinh, điều trị ung thư, diệt khuẩn, hạ huyết áp,... Đây là cơ sở để tiến hành các nghiên cứu tiếp theo.

Sau khi định tính nhóm hợp chất, chúng tôi tiến hành sắc ký để phân lập các hợp chất thu được 19 hợp chất được phân lập bằng phương pháp sắc ký cột với các hệ dung môi rửa giải khác nhau và kết tinh lại để tinh chế chất như đã trình bày ở phần thực nghiệm.

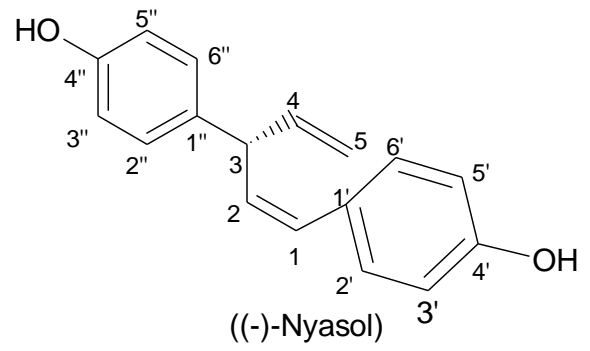
Các chất rắn này được dùng làm thực nghiệm đo phổ để xác định cấu trúc và đánh giá hoạt tính sinh học.

3.2. Kết quả xác định cấu trúc các hợp chất

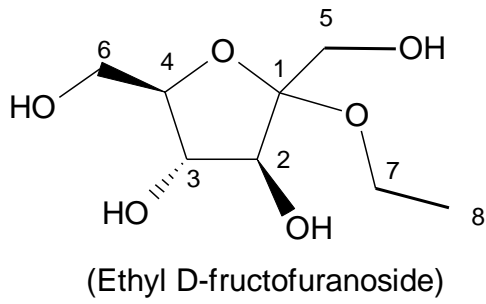




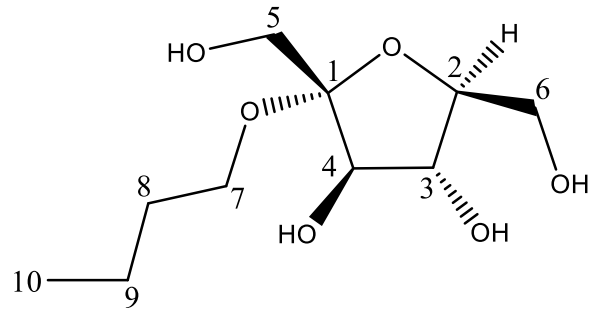
AA8



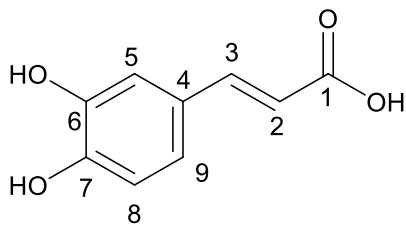
AA9



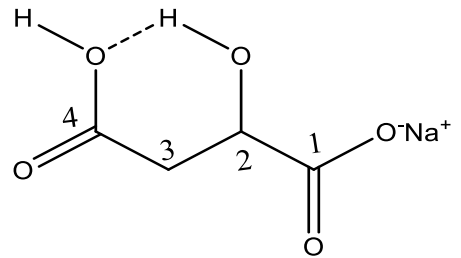
AA10



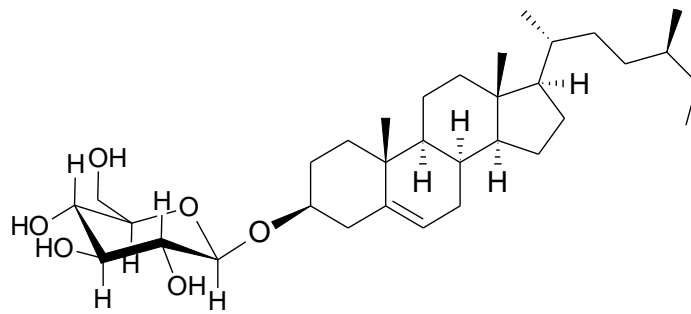
AA11



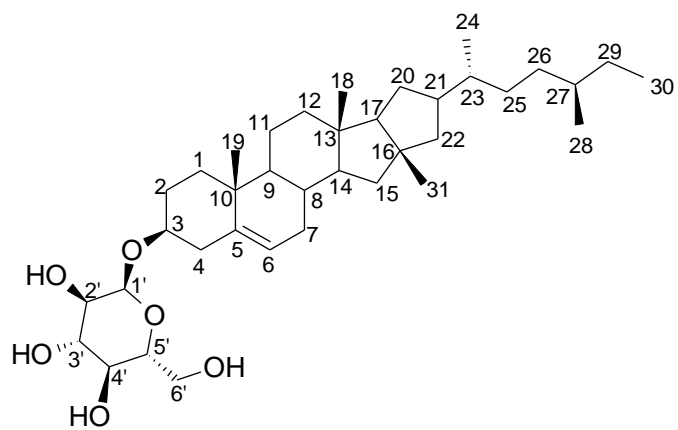
AA12



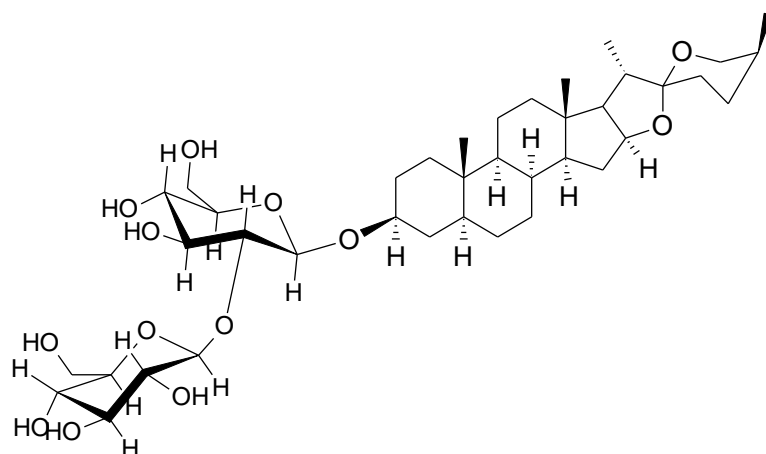
AA13



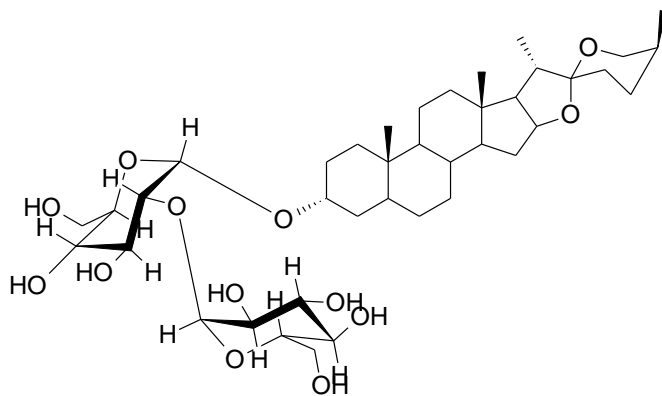
AA14



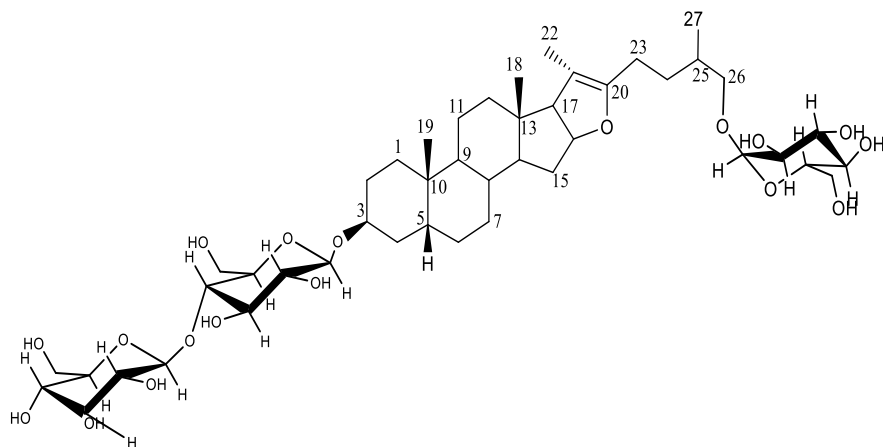
AA15



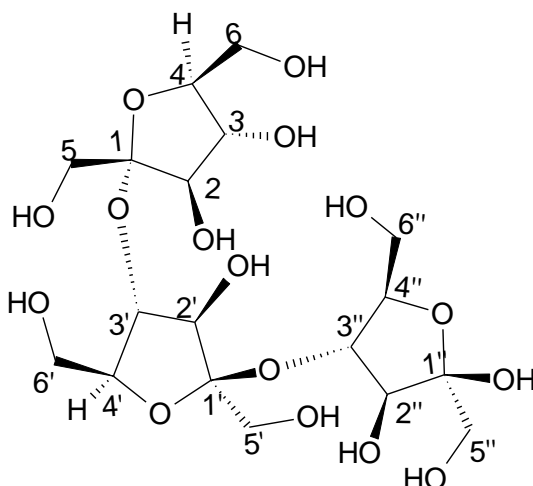
AA16



AA17



AA18



AA19

3.5. Kết quả nghiên cứu hoạt tính độc tế bào trên dòng tế bào ung thư HeLa (cổ tử cung) và A549 (tế bào ung thư gan)

Các bước thực nghiệm được trình bày ở chương 2. Kết quả thí nghiệm được trình bày ở bảng 3.28.

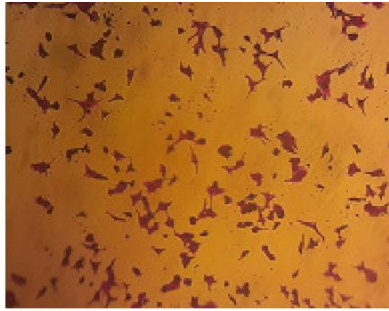
Bảng 3.28: Tác động gây độc tế bào ung thư của các mẫu nghiên cứu

TT	Hợp chất	Khả năng ức chế tế bào (IC ₅₀ µg/mL)	
		HeLa	A549
1	AA2	>100	>100
2	AA3	50.41±4.33	60.26±6.48
3	AA4	86.65±6.63	79.54±7.98
4	AA5	72.36±3.02	54.68± 2.73
5	AA6	27.25±1.41	16.71±1.32
6	AA7	44.41±4.31	46.25±3.48
7	AA8	34.99±2.25	40.62±5.49
8	AA9	25.94±2.12	31.29±2.48
9	AA10	>100	>100
10	AA11	>100	>100
11	AA12	10.22±0.42	13.01±0.45
12	AA13	>100	>100
13	AA14	89.56±3.29	>100
14	AA15	0.55±0.08	0.79± 0.12
15	AA16	7.42±0.38	12.55±0.70
16	AA17	7.15±0.58	11.94±0.92
17	AA18	>100	93.06±4.17
18	AA19	>100	>100
19	Ellipticine	0.40±0.06	0.38 ± 0.02

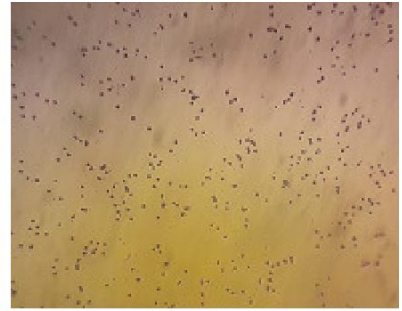
Một số hình ảnh tế bào thể hiện tác động của các mẫu đến sự phát triển của tế bào A549



AA12 (20ug/ml)



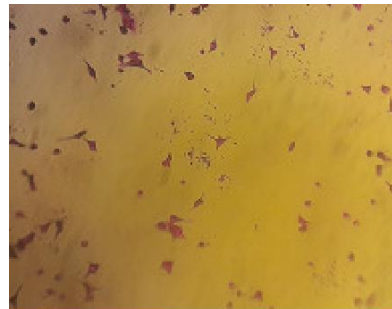
AA18 (100ug/ml)



AA16 (20ug/ml)



AA15 (4ug/ml)



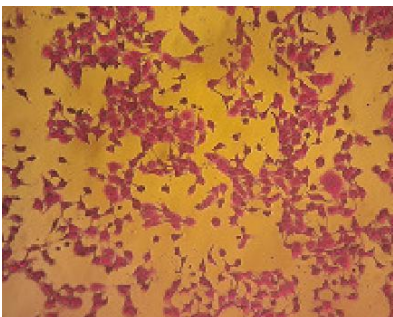
AA15 (0.8 ug/ml)



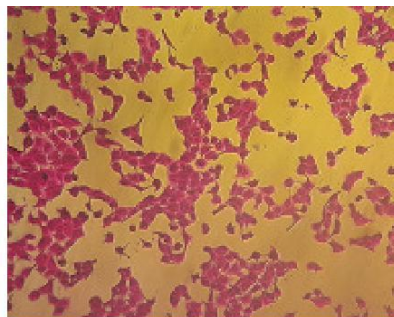
AA17 (100 ug/ml)



AA17 (20 ug/ml)

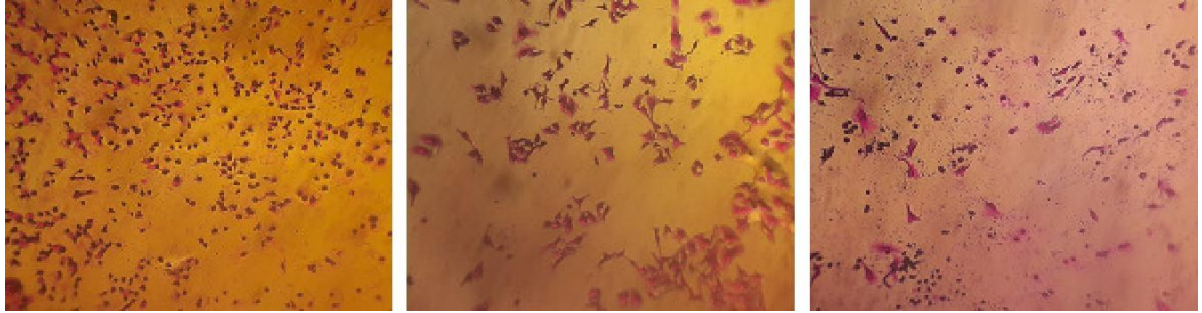


Đối chứng âm DMSO 0,1%



Đối chứng âm DMSO 0,1%

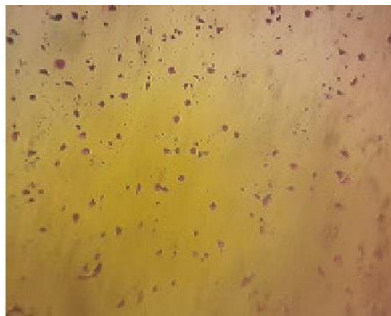
Một số hình ảnh tế bào thể hiện tác động của mẫu đến sự phát triển của tế bào HeLa



AA12 (20ug/ml)

AA18 (100ug/ml)

AA16 (20ug/ml)



AA15 (4ug/ml)

AA15 (0.8 ug/ml)

AA17 (20 ug/ml)



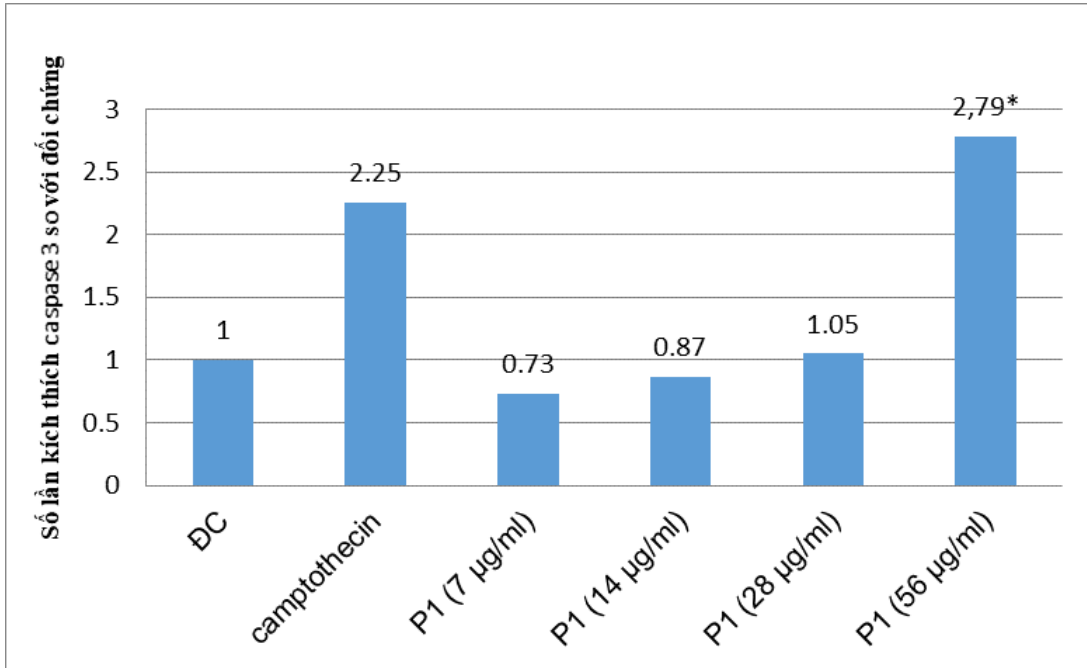
Đối chứng âm DMSO 0,1

Hình 3.122. Hình ảnh ức chế tế bào HeLa và A549

Qua bảng 3.28 nhận thấy trong số 18 mẫu thử nghiệm hoạt tính ức chế tế bào ung thư HeLa và A549 có 11 hợp chất thể hiện hoạt tính ức chế cả hai dòng tế bào dùng thí nghiệm.

Các chất thể hiện hoạt tính tốt là: AA12, AA15, AA16, AA17. Các hợp chất này thuộc nhóm hợp chất steroidal glycoside, đây là nhóm hợp chất thường thể hiện nhiều hoạt tính ức chế tế bào ung thư. Chất đối chứng dương Ellipticine hoạt động ổn định trong thí nghiệm. Các kết quả trên là chính xác với $r^2 \geq 0,99$.

Để kiểm tra khả năng kích hoạt cảm ứng enzym trong quá trình tự hủy của tế bào. Chúng tôi chọn mẫu **AA16** để thực nghiệm quá trình kích hoạt cảm ứng caspase-3 trên tế bào HeLa. Kết quả thể hiện hình sau:



**Hình 3.123. Khả năng cảm ứng sinh Caspase 3 của mẫu AA16 sau 24h;
(* với $P < 0,05$)**

Qua kết quả trên, chúng tôi nhận thấy:

- Ở nồng độ 56 µg/ml, mẫu AA16 đã thể hiện khả năng cảm ứng caspase 3 tốt ở mức có ý nghĩa thống kê ($P < 0.05$).
- Ở nồng độ thử nghiệm còn lại, AA16 chưa thể hiện khả năng cảm ứng caspase 3 ($P > 0.05$)

CHƯƠNG 4

KẾT LUẬN VÀ KIẾN NGHỊ

4.1. Kết luận

Đề tài nghiên cứu khoa học cấp Bộ: “Xác định thành phần hóa học và thử nghiệm một số hợp chất hóa học có hoạt tính chống ung thư trong loài Tri mẫu (*Anemarrhena asphodeloides*)” mã số: B2017-TNA-42 thực hiện nhiệm vụ nghiên cứu xác định thành phần, phân lập, xác định cấu trúc và đánh giá khả năng ức chế tế bào ung thư đã hoàn thành các nội dung trong thuyết minh được duyệt. Đề tài đã hoàn thành các nhiệm vụ nghiên cứu và đạt được các kết quả chính sau:

- Đã đánh giá sơ bộ thành phần hóa học của các nhóm hợp chất hữu cơ có trong dịch chiết ethanol và các phân đoạn (dichloromethane, ethyl acetate và *n*-butanol) bằng các phản ứng đặc trưng.

- Đã phân lập được 19 hợp chất từ mẫu nghiên cứu, trong đó có 5 hợp chất mới

- Đã nghiên cứu xác định cấu trúc của các hợp chất thu được bằng các phương pháp phổ hiện đại như ^1H , ^{13}C -NMR, HSQC, HMBC và phổ MS.

- Đã nghiên cứu hoạt tính ức chế tế bào ung thư *in vitro* trên 02 dòng tế bào ung thư ở người là tế bào ung thư HeLa và tế bào ung thư gan A549 của chất đã phân lập được, cụ thể: 11 hợp chất thể hiện hoạt tính ức chế cả hai dòng tế bào dùng trong thử nghiệm. Các chất thể hiện hoạt tính tốt là: **AA12, AA15, AA16, AA17**.

- Đã đánh giá khả năng kích hoạt caspase của hợp chất có khả năng ức chế tốt tế bào ung thư, nhận thấy chất **AA16** có khả năng kích thích tốt enzym caspase.

Kết quả đã đạt được của đề tài sẽ định hướng cho việc sử dụng loài Tri mẫu (*Anemarrhena asphodeloides* Bunge) trong y dược về khả năng điều trị ung thư và nhiều loại bệnh khác.

4.2. Kiến nghị

Do còn nhiều nội dung còn có thể phát triển từ đề tài này, đề nghị được tiếp tục đăng ký các đề tài KH-CN khác để phát triển nguồn dược liệu này vào mục đích làm thuốc chữa bệnh.