

BỘ GIÁO DỤC  
VÀ ĐÀO TẠO

VIỆN HÀN LÂM KHOA HỌC  
VÀ CÔNG NGHỆ VIỆT NAM

HỌC VIỆN KHOA HỌC VÀ CÔNG NGHỆ



**Đỗ Thị Thu Hiền**

**ĐÁNH GIÁ HOẠT TÍNH KHÁNG VIÊM VÀ GÂY ĐỘC TẾ BÀO  
UNG THƯ *IN VITRO* CỦA MỘT SỐ HỢP CHẤT PHÂN LẬP TỪ  
CÂY BẢY LÁ MỘT HOA (*PARIS SP.*) TẠI XÃ BÌNH VĂN,  
HUYỆN CHỢ MỚI, TỈNH BẮC KẠN**

**LUẬN VĂN THẠC SĨ SINH HỌC THỰC NGHIỆM**

*Hà Nội – 2024*

BỘ GIÁO DỤC  
VÀ ĐÀO TẠO

VIỆN HÀN LÂM KHOA HỌC  
VÀ CÔNG NGHỆ VIỆT NAM

**HỌC VIỆN KHOA HỌC VÀ CÔNG NGHỆ**



**Đỗ Thị Thu Hiền**

**ĐÁNH GIÁ HOẠT TÍNH KHÁNG VIÊM VÀ GÂY ĐỘC TẾ BÀO  
UNG THƯ *IN VITRO* CỦA MỘT SỐ HỢP CHẤT PHÂN LẬP TỪ  
CÂY BẢY LÁ MỘT HOA (*PARIS SP.*) TẠI XÃ BÌNH VĂN,  
HUYỆN CHỢ MỚI, TỈNH BẮC KẠN**

**LUẬN VĂN THẠC SĨ SINH HỌC THỰC NGHIỆM**

**Mã số: 84 20 114**

NGƯỜI HƯỚNG DẪN KHOA HỌC:

Hướng dẫn 1: PGS.TS. Đỗ Thị Thảo

Hướng dẫn 2: PGS.TS. Hoàng Lê Tuấn Anh

*Hà Nội – 2024*

**LỜI CAM ĐOAN**

*Tôi xin cam đoan đề tài nghiên cứu trong luận văn này là công trình nghiên cứu của tôi, được thực hiện dưới sự hướng dẫn khoa học của PGS. TS. Đỗ Thị Thảo và PGS. TS. Hoàng Lê Tuấn Anh. Các số liệu, kết quả nghiên cứu đảm bảo trung thực và chưa từng xuất hiện trong bất cứ một nghiên cứu nào. Tôi xin hoàn toàn chịu trách nhiệm về các nghiên cứu của mình.*

**Tác giả luận văn****Đỗ Thị Thu Hiền**

## LỜI CẢM ƠN

Đầu tiên, tôi xin bày tỏ lời cảm ơn sâu sắc tới PGS. TS. Đỗ Thị Thảo và PGS. TS. Hoàng Lê Tuấn Anh - người Cô, người Thầy đã tận tình hướng dẫn, hết lòng chỉ bảo và giúp đỡ tôi hoàn thành luận văn này.

Tôi xin chân thành cảm ơn Ban lãnh đạo và quý đồng nghiệp Trung tâm Phát triển công nghệ và Dịch vụ đo lường - Trung tâm Nghiên cứu và Phát triển công nghệ cao và Phòng Thử nghiệm sinh học - Viện Công nghệ sinh học đã tạo điều kiện, hỗ trợ tôi trong suốt quá trình thực hiện luận văn.


Tôi xin trân trọng cảm ơn Ban lãnh đạo Học viện Khoa học và Công nghệ, khoa Công nghệ sinh học và quý thầy cô giảng dạy các bộ môn đã nhiệt tình giảng dạy, truyền đạt kiến thức, giúp đỡ và tạo điều kiện thuận lợi cho tôi trong quá trình học tập và hoàn thành luận văn.

Tôi xin cảm ơn sự hỗ trợ về mặt kinh phí từ nhiệm vụ: “Phát triển nhóm nghiên cứu xuất sắc hạng I về ứng dụng các phương pháp phân tích hiện đại trong nghiên cứu chất lượng và an toàn thực phẩm”, mã số: NCXS 01.02/23-25 thuộc Chương trình phát triển nhóm nghiên cứu xuất sắc tại Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam.

Cuối cùng, tôi xin bày tỏ lòng biết ơn chân thành và sâu sắc nhất tới gia đình, người thân và bạn bè đã luôn quan tâm, khích lệ, động viên tôi trong suốt quá trình học tập và hoàn thành luận văn này.

Xin trân trọng cảm ơn!

**Tác giả luận văn**



**Đỗ Thị Thu Hiền**

## MỤC LỤC

<b>DANH MỤC CÁC KÝ HIỆU, CÁC CHỮ VIẾT TẮT .....</b>	<b>vi</b>
<b>DANH MỤC CÁC BẢNG .....</b>	<b>viii</b>
<b>DANH MỤC CÁC HÌNH .....</b>	<b>ix</b>
<b>MỞ ĐẦU .....</b>	<b>1</b>
<b>CHƯƠNG 1. TỔNG QUAN NGHIÊN CỨU.....</b>	<b>3</b>
<b>1.1. BỆNH VIÊM VÀ CƠ SỞ KHOA HỌC CỦA PHƯƠNG PHÁP ĐƯỢC LỰA CHỌN ĐỂ ĐÁNH GIÁ HOẠT TÍNH KHÁNG VIÊM <i>IN VITRO</i>.....</b>	<b>3</b>
1.1.1. Bệnh viêm.....	3
1.1.2. Cơ sở khoa học của phương pháp được lựa chọn để đánh giá hoạt tính kháng viêm <i>in vitro</i> .....	5
<b>1.2. BỆNH UNG THƯ VÀ CƠ SỞ KHOA HỌC CỦA PHƯƠNG PHÁP ĐƯỢC LỰA CHỌN ĐỂ ĐÁNH GIÁ HOẠT TÍNH GÂY ĐỘC TẾ BÀO UNG THƯ <i>IN VITRO</i> .....</b>	<b>6</b>
1.2.1. Giới thiệu chung về bệnh ung thư .....	6
1.2.2. Cơ sở khoa học của phương pháp được lựa chọn để đánh giá hoạt tính gây độc tế bào ung thư <i>in vitro</i> .....	7
<b>1.3. SƠ LƯỢC VỀ CHI <i>PARIS</i> .....</b>	<b>9</b>
1.3.1. Đặc điểm thực vật và phân bố của chi <i>Paris</i> .....	9
1.3.2. Ứng dụng của chi <i>Paris</i> trong y học cổ truyền.....	10
1.3.3. Một số thành phần hóa học chính của chi <i>Paris</i> .....	11
1.3.4. Một số hoạt tính sinh học của chi <i>Paris</i> .....	12
<b>CHƯƠNG 2. ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU.....</b>	<b>16</b>
<b>2.1. ĐỐI TƯỢNG NGHIÊN CỨU .....</b>	<b>16</b>
<b>2.2. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU .....</b>	<b>16</b>
2.2.1. Phương pháp điều chế các dịch chiết.....	16
2.2.2. Các phương pháp nghiên cứu và cô lập các hợp chất .....	17

2.2.3. Các phương pháp xác định cấu trúc hóa học của các hợp chất hữu cơ.....	19
2.2.4. Phân lập các hợp chất từ cây Bảy lá một hoa .....	20
2.2.5. Phương pháp đánh giá khả năng ức chế Nitric Oxide (NO) trên mô hình tế bào RAW 264.7 được cảm ứng viêm bằng lipopolysaccharide (LPS).....	23
2.2.6. Phương pháp đánh giá khả năng gây độc trên tế bào nuôi cấy đơn lớp bằng thuốc nhuộm Sulforhodamine B .....	24
<b>CHƯƠNG 3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN.....</b>	<b>27</b>
<b>3.1. KẾT QUẢ SÀNG LỌC HOẠT TÍNH ỨC CHẾ SẢN SINH NO TRONG TẾ BÀO RAW 264.7 VÀ HOẠT TÍNH GÂY ĐỘC TẾ BÀO CỦA CÁC CAO CHIẾT TỪ MẪU BẢY LÁ MỘT HOA .....</b>	<b>27</b>
3.1.1. Kết quả sàng lọc hoạt tính ức chế sản sinh NO trong tế bào RAW 264.7 của các cao chiết từ mẫu Bảy lá một hoa.....	27
3.1.2. Kết quả sàng lọc hoạt tính gây độc trên một số dòng tế bào ung thư của các cao chiết từ mẫu Bảy lá một hoa.....	28
<b>3.2. KẾT QUẢ XÁC ĐỊNH CẤU TRÚC HÓA HỌC CỦA CÁC HỢP CHẤT PHÂN LẬP TỪ MẪU BẢY LÁ MỘT HOA.....</b>	<b>30</b>
3.2.1. Hợp chất PS1: Pennogenin 3- <i>O</i> - $\beta$ -D-glucopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 2)[ <i>O</i> - $\alpha$ -L-rhamnopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 3)]- $\beta$ -D-glucopyranoside .....	30
3.2.2. Hợp chất PS2: Gracillin .....	34
3.2.3. Hợp chất PS3: Paris saponin H.....	36
3.2.4. Hợp chất PS4: Methyl protogracillin.....	39
3.2.5. Hợp chất PS5: Paris saponin VII .....	42
3.2.6. Hợp chất PS6: Pennogenin-3- <i>O</i> - $\alpha$ -L-arabinosyl-(1 $\rightarrow$ 4)- $\beta$ -D-glucopyranoside.....	44
<b>3.3. KẾT QUẢ ĐÁNH GIÁ HOẠT TÍNH ỨC CHẾ SẢN SINH NO ĐỊNH HƯỚNG KHÁNG VIÊM VÀ GÂY ĐỘC TẾ BÀO CỦA CÁC HỢP CHẤT PHÂN LẬP TỪ MẪU BẢY LÁ MỘT HOA.....</b>	<b>48</b>

3.3.1. Kết quả đánh giá hoạt tính ức chế sản sinh NO định hướng kháng viêm của các hợp chất được phân lập từ cao chiết BuOH của mẫu Bảy lá một hoa.....	48
3.3.2. Kết quả đánh giá hoạt tính ức chế một số dòng tế bào ung thư của các hợp chất được phân lập từ cao chiết BuOH của mẫu Bảy lá một hoa..	49
<b>KẾT LUẬN VÀ KIẾN NGHỊ .....</b>	<b>54</b>
<b>TÀI LIỆU THAM KHẢO .....</b>	<b>56</b>

## DANH MỤC CÁC KÝ HIỆU, CÁC CHỮ VIẾT TẮT

<b>Ký hiệu</b>	<b>Tiếng Anh</b>	<b>Tiếng Việt</b>
$^{13}\text{C}$ -NMR	Carbon-13 Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy	Phổ cộng hưởng từ hạt nhân cacbon 13
$^1\text{H}$ -NMR	Proton Magnetic Resonance Spectroscopy	Phổ cộng hưởng từ hạt nhân proton
2D	Two Dimension	
3D	Three Dimension	
BLMH		Bảy lá một hoa
CC	Column Chromatography	Sắc ký cột
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium	
DMSO	Dimethyl sulfoxide	
ESI-MS	Electron Spray Ionization Mass Spectra	Phổ khối ion hóa phun điện tử
FBS	Fetal Bovine Serum	Huyết thanh bào thai bò
$\text{GI}_{50}$		Nồng độ của một loại thuốc làm giảm 50% sự phát triển của tế bào
HCC	HepatoCellular Carcinoma	Ung thư biểu mô tế bào gan
HEK-293A	Human Embryonic Kidney Cells	Tế bào thận gốc phôi ở người
HepG2	Human Hepato Carcinoma	Tế bào ung thư gan ở người
HIF	Hypoxia-Inducible Factor	Yếu tố cảm ứng thiếu oxy
HMBC	Heteronuclear Multiple Bond Connectivity	Phổ tương tác dị hạt nhân qua nhiều liên kết
HPLC	High Performance Liquid Chromatography	Sắc ký lỏng hiệu năng cao
HSQC	Heteronuclear Single Quantum Coherence	Phổ tương tác dị hạt nhân qua 1 liên kết
$\text{IC}_{50}$	Inhibitory concentration of 50%	Nồng độ ức chế 50%
IL	Interleukin	



LC <sub>50</sub>	Lethal Concentration	Lượng chất lơ lửng trong không khí cần thiết để tiêu diệt 50% động vật thử nghiệm trong khoảng thời gian quan sát được xác định trước
LNCaP	Human Prostate Carcinoma	Tế bào ung thư tiền liệt tuyến ở người
LPS	Lipopolysaccharide	
MEME	Minimum Essential Medium with Eagle salt	
MTT	3-(4, 5-dimethylthiazolyl-2)-2, 5 diphenyltetrazolium bromide	
NF-kB	Nuclear Factor-kappa B	
NO	Nitric Oxide	
OD	Optical Density	
PAF	Platelet-Activating Factor	
PBS	Phosphate-buffered saline	Nước muối đệm photphat
PG	Prostaglandin	
ROS	Reactive Oxygen Species	
SK-LU-1	Human Lung Carcinoma	Tế bào ung thư phổi ở người
SRB	Sulforhodamine B	
TBUT		Tế bào ung thư
TCA	Trichloroacetic Acid	
TLC	Thin Layer Chromatography	Sắc ký lớp mỏng
TNF	Tumor Necrosis Factor	
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor	Yếu tố tăng trưởng nội mạc mạch máu

**DANH MỤC CÁC BẢNG**

<b>Bảng 1.1.</b> Mối quan hệ giữa các chất trung gian gây viêm và các triệu chứng viêm.....	4
<b>Bảng 3.1.</b> Khả năng ức chế sản sinh NO của các cao chiết từ mẫu Bảy lá một hoa.....	28
<b>Bảng 3.2.</b> Dữ liệu phổ 1D-NMR của hợp chất <b>PS1</b> .....	32
<b>Bảng 3.3.</b> Dữ liệu phổ 1D-NMR của hợp chất <b>PS2</b> .....	34
<b>Bảng 3.4.</b> Dữ liệu phổ 1D-NMR của hợp chất <b>PS3</b> .....	37
<b>Bảng 3.5.</b> Dữ liệu phổ 1D-NMR của hợp chất <b>PS4</b> .....	39
<b>Bảng 3.6.</b> Dữ liệu phổ 1D-NMR của hợp chất <b>PS5</b> .....	42
<b>Bảng 3.7.</b> Dữ liệu phổ 1D-NMR của hợp chất <b>PS6</b> .....	45
<b>Bảng 3.8.</b> Khả năng ức chế sản sinh NO của hai hợp chất <b>PS4</b> và <b>PS6</b> phân lập từ cao chiết BuOH của mẫu Bảy lá một hoa.....	49
<b>Bảng 3.9.</b> Kết quả đánh giá hoạt tính gây độc tế bào của các hợp chất phân lập được từ mẫu Bảy lá một hoa .....	49

## DANH MỤC CÁC HÌNH

<b>Hình 1.1.</b> Nguyên lý của phản ứng hóa học tạo thành và định lượng $\text{NO}_2^-$ từ sự phân hủy NO nhờ sử dụng hệ thống thuốc thử Griess.....	6
<b>Hình 1.2.</b> Các loài thuộc chi <i>Paris</i> tại Việt Nam.....	10
<b>Hình 1.3.</b> Một số hợp chất saponin steroid phân lập từ chi <i>Paris</i> .....	11
<b>Hình 1.4.</b> Một số hợp chất saponin triterpenoid phân lập từ chi <i>Paris</i> .....	12
<b>Hình 1.5.</b> Một số hợp chất flavonoid phân lập từ chi <i>Paris</i> .....	12
<b>Hình 1.6.</b> Một số hợp chất khác phân lập từ chi <i>Paris</i> .....	12
<b>Hình 1.7.</b> Các hợp chất Parisverticilloside A-M ( <b>45-57</b> ) .....	13
<b>Hình 1.8.</b> Cấu trúc hai hợp chất Parisveroside B ( <b>58</b> ) và 3-( $\beta$ -D-glucopyranosyloxymethyl)-2-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)-5-(3-hydroxypropyl)-7-methoxy-(2R,3S)-dihydrobenzofuran ( <b>59</b> ) .....	14
<b>Hình 2.1.</b> Thân rễ cây Bảy lá một hoa thu hái tại tỉnh Bắc Kạn .....	16
<b>Hình 3.1.</b> Khả năng ức chế sản sinh NO của các cao chiết từ mẫu Bảy lá một hoa ở nồng độ thử 100 $\mu\text{g/mL}$ .....	27
<b>Hình 3.2.</b> Kết quả đánh giá hoạt tính gây độc tế bào dưới tác động của các cao chiết từ mẫu Bảy lá một hoa sau 48h ủ mẫu với dải nồng độ 100-20-4-0.8 $\mu\text{g/mL}$ .....	29
<b>Hình 3.3.</b> Ảnh chụp tế bào HEK-293A dưới tác dụng của các loại cao ở nồng độ 100 $\mu\text{g/mL}$ .....	29
<b>Hình 3.4.</b> Ảnh chụp tế bào SK-LU-1 dưới tác dụng của các loại cao ở nồng độ 100 $\mu\text{g/mL}$ .....	29
<b>Hình 3.5.</b> Ảnh chụp tế bào HepG2 dưới tác dụng của các loại cao ở nồng độ 100 $\mu\text{g/mL}$ .....	30
<b>Hình 3.6.</b> Ảnh chụp tế bào LNCaP dưới tác dụng của các loại cao ở nồng độ 100 $\mu\text{g/mL}$ .....	30
<b>Hình 3.7.</b> Hợp chất <b>PS1</b> .....	31
<b>Hình 3.8.</b> Hợp chất <b>PS2</b> .....	34

<b>Hình 3.9.</b> Hợp chất <b>PS3</b> .....	36
<b>Hình 3.10.</b> Hợp chất <b>PS4</b> .....	39
<b>Hình 3.11.</b> Hợp chất <b>PS5</b> .....	42
<b>Hình 3.12.</b> Hợp chất <b>PS6</b> .....	44
<b>Hình 3.13.</b> Các hợp chất phân lập được từ mẫu Bảy lá một hoa (Bắc Kạn)..	47
<b>Hình 3.14.</b> Kết quả đánh giá hoạt tính ức chế sản sinh NO của các hợp chất phân lập từ mẫu Bảy lá một hoa ở nồng độ 100 $\mu$ M .....	48
<b>Hình 3.15.</b> Khả năng gây độc tế bào của bốn hợp chất thuộc nhóm saponin pennogenin <b>PS1</b> , <b>PS3</b> , <b>PS5</b> và <b>PS6</b> thông qua giá trị $IC_{50}$ .....	50
<b>Hình 3.16.</b> Ảnh chụp 4 loại tế bào dưới tác dụng của <b>PS1</b> ở nồng độ 4 $\mu$ M.	50
<b>Hình 3.17.</b> Ảnh chụp 4 loại tế bào dưới tác dụng của <b>PS3</b> ở nồng độ 4 $\mu$ M.	50
<b>Hình 3.18.</b> Ảnh chụp 4 loại tế bào dưới tác dụng của <b>PS6</b> ở nồng độ 100 $\mu$ M. .....	51
<b>Hình 3.19.</b> Khả năng gây độc tế bào của hai hợp chất <b>PS2</b> và <b>PS4</b> thông qua giá trị $IC_{50}$ .....	52
<b>Hình 3.20.</b> Ảnh chụp 4 loại tế bào dưới tác dụng của <b>PS2</b> ở nồng độ 20 $\mu$ M. .....	52
<b>Hình 3.21.</b> Ảnh chụp 4 loại tế bào dưới tác dụng của <b>PS4</b> ở nồng độ 20 $\mu$ M. .....	53

## MỞ ĐẦU

Viêm là phản ứng sinh lý của cơ thể kháng lại tác nhân gây hại như tác nhân vật lý, hóa học, ... Tùy theo diễn tiến của quá trình viêm, tình trạng viêm của cơ thể được chia ra thành viêm cấp tính và viêm mạn tính. Viêm cấp tính khi không được điều trị kịp thời, nó có thể chuyển biến và trở thành viêm mạn tính. Điều này sẽ gây hại cho cơ thể và làm gia tăng nguy cơ mắc ung thư [1].

Ung thư là nguyên nhân hàng đầu gây tử vong trên toàn cầu. Theo Tổ chức Y tế Thế giới (2020), đã có gần 10 triệu ca tử vong do căn bệnh này và ước tính có thể tăng lên 27 triệu ca mắc mới vào năm 2040 [2]. Điều đáng tiếc trong vài thập kỷ qua, việc điều trị ung thư không tiến triển nhanh như mong đợi, chỉ có 50% bệnh nhân được chẩn đoán có thể được điều trị và khỏi bệnh [3]. Kháng thuốc là nguyên nhân phổ biến dẫn đến điều trị ung thư thất bại [4]. Do đó, việc phát triển các loại thuốc chống ung thư mới có tầm quan trọng trong điều trị lâm sàng, trong đó các hợp chất từ tự nhiên được coi là nguồn quan trọng để phát triển các loại thuốc chống ung thư mới.

Khí hậu nhiệt đới ẩm gió mùa tại Việt Nam đã giúp cho hệ thực vật phát triển đa dạng, hiện có khoảng 12.000 loài thực vật thuộc 2.256 chi, 305 họ [5, 6]. Việc sử dụng cây thuốc trong phòng và điều trị bệnh trên cơ thể con người đóng vai trò quan trọng ở các nước đang phát triển, đặc biệt là ở châu Á và cả ở Việt Nam - nơi có nền y học cổ truyền lâu đời.

Chi *Paris* là chi thuốc quý được sử dụng từ lâu trong dân gian để chữa một số bệnh như chữa ho lao, ho lâu ngày, hen suyễn, sốt, sốt rét cơn, giải độc khi bị rắn cắn, mụn nhọt, viêm tuyến vú,... Chi *Paris* thuộc họ Melanthiaceae trong hệ thống phân loại Angiosperm Phylogeny Group IV (APG IV) (trước đây được công nhận là họ Liliaceae). Tính đến năm 2020, chi này gồm có 36 loài phân bố chủ yếu ở vùng ôn đới và vùng nhiệt đới của lục địa châu Á và châu Âu [7]. Các nghiên cứu gần đây đã phát hiện thêm các hoạt tính mới như chống ung thư [8], kháng viêm diệt khuẩn [9], tác dụng giảm đau và an thần [10], tác dụng điều hòa miễn dịch [11] của chi *Paris*.

Từ các cơ sở nêu trên, đề tài: **“Đánh giá hoạt tính kháng viêm và gây độc tế bào ung thư *in vitro* của một số hợp chất phân lập từ cây Bảy lá một**

hoa (*Paris* sp.) tại xã Bình Văn, huyện Chợ Mới, tỉnh Bắc Kạn” được đề xuất thực hiện.

**+** *Đối tượng và phạm vi nghiên cứu*

- Đối tượng nghiên cứu: Phần thân rễ cây Bảy lá một hoa (*Paris* sp.) được thu hái xã Bình Văn, huyện Chợ Mới, tỉnh Bắc Kạn.

- Phạm vi nghiên cứu:

+ Phân lập và xác định cấu trúc hóa học của một số hợp chất chính từ mẫu Bảy lá một hoa tại Bắc Kạn.

+ Sàng lọc, đánh giá hoạt tính ức chế NO định hướng kháng viêm và gây độc tế bào ung thư *in vitro* của các hợp chất sạch phân lập được.

**+** *Ý nghĩa khoa học và thực tiễn của đề tài nghiên cứu*

- Ý nghĩa khoa học: Cung cấp thông tin khoa học về quy trình chiết tách, xác định thành phần hóa học, hoạt tính sinh học của một số hợp chất phân lập được từ cây Bảy lá một hoa.

- Ý nghĩa thực tiễn:

+ Cung cấp dữ liệu khoa học tạo cơ sở cho các nghiên cứu trong tương lai về cây Bảy lá một hoa.

+ Định hướng cho những nghiên cứu mang tính ứng dụng về cây Bảy lá một hoa ở Việt Nam.

## CHƯƠNG 1. TỔNG QUAN NGHIÊN CỨU

### 1.1. BỆNH VIÊM VÀ CƠ SỞ KHOA HỌC CỦA PHƯƠNG PHÁP ĐƯỢC LỰA CHỌN ĐỂ ĐÁNH GIÁ HOẠT TÍNH KHÁNG VIÊM *IN VITRO*

#### 1.1.1. Bệnh viêm

Viêm là một quá trình đáp ứng bảo vệ cơ thể của hệ miễn dịch nhằm chống lại tác nhân gây bệnh bên trong hoặc bên ngoài [12]. Phản ứng viêm biểu hiện bằng sự thực bào tại chỗ, nhằm mục đích làm bất hoạt hoặc tiêu diệt các sinh vật xâm nhập, loại bỏ các chất gây kích ứng và tạo tiền đề cho việc sửa chữa mô. Quá trình viêm chủ yếu bao gồm sự tăng tính thấm thành mạch cũng như giải phóng các yếu tố hoạt hóa sinh học autacoid có nguồn gốc từ lipid, chẳng hạn như các phân tử tín hiệu eicosanoid hoặc yếu tố kích hoạt tiểu cầu PAF; peptide lớn, chẳng hạn như interleukin-1(IL-1); peptide nhỏ, chẳng hạn như bradykinin; và các amine, chẳng hạn như histamine hoặc 5-hydroxytryptamine từ các mô bị tổn thương và các tế bào di chuyển. Các phản ứng đó tạo thành mạng lưới hóa học phức tạp của phản ứng viêm và dẫn đến các biểu hiện lâm sàng và bệnh lý của tình trạng viêm [13].

Tình trạng viêm có thể chia thành ba loại dựa trên thời gian của quá trình phản ứng với tác nhân gây hại; viêm cấp tính xảy ra ngay sau tổn thương và kéo dài trong vài ngày, viêm mạn tính có thể kéo dài hàng tháng hoặc thậm chí nhiều năm khi tình trạng viêm cấp tính không thuyên giảm, giai đoạn bán cấp là giai đoạn chuyển từ viêm cấp sang viêm mạn kéo dài từ 2 đến 6 tuần [14].

Viêm cấp tính bắt đầu sau khi một tổn thương xảy ra, các chất trung gian gây viêm như các cytokine, các protein giai đoạn cấp tính và chemokine (cytokine hóa học) được tạo ra để thúc đẩy sự di chuyển của bạch cầu trung tính và đại thực bào đến khu vực bị viêm [15]. Những tế bào này là một phần của hệ thống miễn dịch bẩm sinh đóng vai trò tích cực trong giai đoạn viêm cấp tính. Nếu tình trạng viêm này không thuyên giảm sau sáu tuần, điều này sẽ dẫn đến tình trạng viêm cấp tính phát triển từ giai đoạn bán cấp đến dạng mạn tính với sự di chuyển của tế bào lympho T và tế bào plasma đến vị trí viêm. Nếu tình trạng này kéo dài mà không hồi phục thì mô sẽ bị tổn thương và xơ hóa.

Các loại tế bào như đại thực bào và bạch cầu đơn nhân đóng vai trò quan trọng trong cả giai đoạn viêm cấp và mạn tính [16].

Vậy nên viêm là phản ứng có lợi đối với cơ thể tuy nhiên nếu chuyển sang viêm mạn thì sẽ tiếp tục diễn ra sự tổn thương mô, giảm số lượng bạch cầu, hình thành các mô sợi không có lợi đối với cơ thể. Nhiều nghiên cứu cho thấy mối liên hệ giữa sự viêm mạn tính và nguy cơ ung thư thông qua yếu tố nhân kappa B (NF-kB: nuclear factor-kappa B) [17].

Bên cạnh đó, nitric oxide (NO) có thể đóng vai trò điều tiết trong hầu hết các giai đoạn phát triển của tình trạng viêm (Bảng 1.1). Đặc biệt, trong việc điều chỉnh các đặc tính gây viêm của nội mô và trong giai đoạn đầu của quá trình di chuyển tế bào viêm vào các vị trí viêm [13].

**Bảng 1.1.** Mối quan hệ giữa các chất trung gian gây viêm và các triệu chứng viêm [13]

<b>Triệu chứng viêm</b>	<b>Chất trung gian gây viêm</b>
Tính thấm thành mạch	Các amine hoạt mạch Bradykinin Các leukotriene C <sub>4</sub> , D <sub>4</sub> , E <sub>4</sub> Yếu tố kích hoạt tiểu cầu PAF Bổ thể (C3a và C5a) Chất P NO
Giãn mạch	NO PGI <sub>2</sub> , PGE <sub>1</sub> , PGE <sub>2</sub> , PGD <sub>2</sub> Hydro peroxide
Co mạch	Thromboxane A <sub>2</sub> , Các leukotriene C <sub>4</sub> , D <sub>4</sub> , E <sub>4</sub> Superoxide
Hóa ứng động và sự kết dính bạch cầu	Các chemokine LTB <sub>4</sub> , HETE, các lipoxin Bổ thể (C5a) Kháng nguyên vi khuẩn Superoxide



Đau	Bradykinin Các prostaglandin (PG) Superoxide
Sốt	IL-1; TNF (tumor necrosis factor); IL-6 Các prostaglandin
Tổn thương mô và nội mô	Các ROS (reactive oxygen species) Nitric oxide (iNOS) Enzyme từ lysosome

\*Những mối quan hệ này rất phức tạp và chỉ những tác động rõ ràng nhất mới được tóm tắt trong bảng này.

### 1.1.2. Cơ sở khoa học của phương pháp được lựa chọn để đánh giá hoạt tính kháng viêm *in vitro*

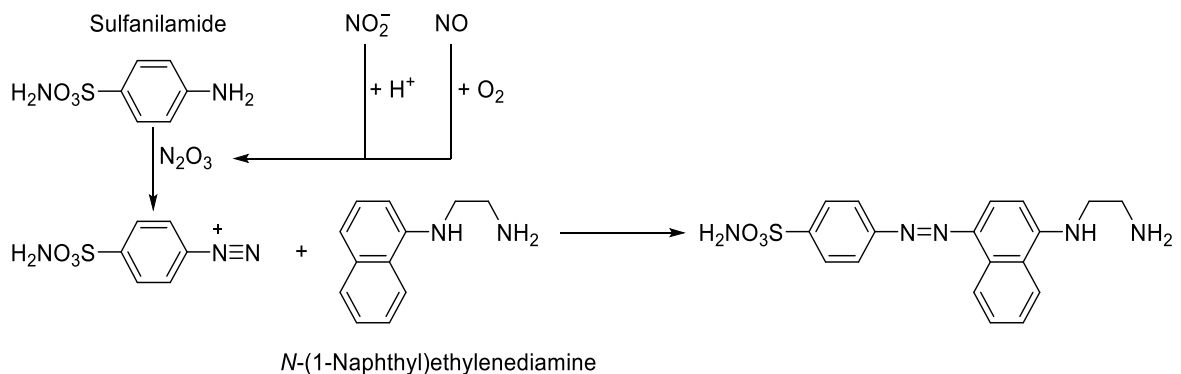
Đại thực bào (hay còn gọi là "macrophage") là một loại tế bào bạch cầu của hệ thống miễn dịch bẩm sinh (miễn dịch không đặc hiệu), và cũng là một loại trong nhóm tế bào trình diện kháng nguyên. Chúng thực bào và tiêu hóa mầm bệnh (tế bào ung thư, vi khuẩn, mảnh vụn tế bào, ...), quá trình này giúp bảo vệ cơ thể khỏi bị nhiễm trùng và bị thương [18].

Đại thực bào tham gia vào quá trình viêm mạn tính bằng cách sản xuất ra nhiều chất trung gian gây viêm khác nhau bao gồm cytokine, chemokine, interferon, lysozyme, protease, yếu tố tăng trưởng, eicosanoids và nitric oxide (NO) [19, 20]. Trong số đó, NO được tạo ra quá mức bởi một trong những enzym gây viêm, iNOS, do đó dẫn đến nhiều bệnh khác nhau, bao gồm hen suyễn, viêm khớp, bệnh đa xơ cứng, viêm đại tràng, bệnh vẩy nến, rối loạn thoái hóa thần kinh, phát triển khối u [21]. Vì vậy, việc tìm ra các chất ức chế tăng sản sinh NO trên mô hình đại thực bào là bước đầu của việc sàng lọc và đánh giá khoa học tiềm năng kháng viêm của mẫu cần nghiên cứu.

Với điều kiện hiện tại của phòng thí nghiệm và thời gian nghiên cứu hạn chế, tác giả đã tiến hành lựa chọn mô hình thử nghiệm sinh học: **“đánh giá khả năng ức chế Nitric Oxide (NO) trên mô hình tế bào RAW 264.7 được cảm ứng viêm bằng lipopolysaccharide (LPS)”**. Trong đó, tế bào RAW 264.7 là các đại thực bào, có được từ chuột bị gây u bởi Abelson virus gây bệnh bạch cầu cấp trên chuột BALB/c. Tế bào RAW 264.7 thường được sử dụng cho các

ngiên cứu *in vitro* và *in vivo* như một mô hình đại thực bào thích hợp. Chúng có khả năng ẩm bào (pinocytosis) và thực bào (phagocytosis). Khi kích thích bằng LPS, tế bào RAW 264.7 tăng sản xuất NO và tăng cường quá trình thực bào [22]. LPS là một thành phần của màng ngoài vi khuẩn Gram âm, là chất kích thích mạnh mẽ các tế bào đơn nhân và đại thực bào. LPS kích hoạt sự giải phóng dồi dào các cytokine từ đại thực bào bao gồm IL-1, IL-6 và TNF- $\alpha$ . Thụ thể bề mặt tế bào chính đối với LPS trên đại thực bào là CD14, một protein màng liên kết glycosyl-phosphatidylinositol 55-kDa [23].

Một trong số những phương thức xác định gián tiếp hàm lượng NO là thông qua phản ứng tạo màu từ các sản phẩm phân hủy chính của nó (nitrate). Thử nghiệm này dựa trên phản ứng diazotization (Griess, 1879), cụ thể: Dinitrogen trioxide phản ứng với sulfanilamide để tạo ra ion diazonium. Trong điều kiện axit (axit photphoric), ion này được kết hợp với N-1-naphthylethylenediamine dihydrochloride (NED) tạo thành sản phẩm azo có màu tím/đỏ tươi có khả năng hấp thụ ánh sáng mạnh ở bước sóng 540 nm [12].



**Hình 1.1.** Nguyên lý của phản ứng hóa học tạo thành và định lượng  $\text{NO}_2^-$  từ sự phân hủy NO nhờ sử dụng hệ thống thuốc thử Griess [24].

## 1.2. BỆNH UNG THƯ VÀ CƠ SỞ KHOA HỌC CỦA PHƯƠNG PHÁP ĐƯỢC LỰA CHỌN ĐỂ ĐÁNH GIÁ HOẠT TÍNH GÂY ĐỘC TẾ BÀO UNG THƯ *IN VITRO*

### 1.2.1. Giới thiệu chung về bệnh ung thư

Ung thư là nhóm các bệnh có mối quan hệ mật thiết đến sự phát triển bất thường của tế bào, có khả năng xâm lấn hoặc di căn sang nhiều bộ phận khác nhau của cơ thể [12].

Hiện nay, hóa trị vẫn là phương pháp điều trị chính cho nhiều loại ung thư khác nhau. Trên thực tế đã có sẵn một số loại thuốc chống ung thư tổng hợp, nhưng tác dụng phụ và sự kháng thuốc là những hạn chế lớn trong ứng dụng lâm sàng của nó. Hầu hết các loại thuốc hóa trị ung thư hiện đang được sử dụng đều có khả năng kháng thuốc, biểu hiện độc tính không chọn lọc đối với các tế bào bình thường và hạn chế bởi các tác dụng phụ. Do đó, việc điều trị ung thư hiệu quả và phát triển thuốc điều trị bệnh an toàn vẫn là một thách thức lâm sàng lớn. Mặt khác, từ xa xưa, thực vật luôn là nguồn dồi dào cung cấp các sản phẩm tự nhiên có hoạt tính sinh học và dược lý hữu hiệu, có thể đóng vai trò quan trọng để phát triển dược phẩm hoặc là nguồn cung cấp cấu trúc khuôn mẫu cho sự phát triển các dẫn xuất biến đổi có hoạt tính tăng cường và/hoặc giảm độc tính trong điều trị ung thư. Vì vậy, các loài thảo dược hiện đang thu hút sự chú ý như là nguồn thuốc chống ung thư tiềm năng được sử dụng rộng rãi do nguyên liệu sẵn có, giá cả phải chăng, và ít tác dụng phụ [12, 25].

### **1.2.2. Cơ sở khoa học của phương pháp được lựa chọn để đánh giá hoạt tính gây độc tế bào ung thư *in vitro***

Việc có thể nuôi cấy và duy trì sự tăng sinh của các TBUT trong điều kiện *in vitro* của các phòng thí nghiệm là một bước tiến quan trọng trong nghiên cứu và tìm kiếm các hợp chất chữa trị ung thư ở người. Để đánh giá tiềm năng hoạt tính chống ung thư của các hợp chất, một trong những phương pháp đầu tiên là đánh giá khả năng gây độc và ức chế sự phát triển của tế bào ung thư (TBUT) *in vitro*. Cụ thể là, các nhà nghiên cứu thường nuôi cấy TBUT *in vitro* thành mô hình nuôi cấy đơn lớp (2D) hoặc mô hình nuôi cấy spheroid (3D) [26].

Sau khi được phân lập và tạo dòng, các tế bào thường được nuôi cấy *in vitro* và phát triển thành dạng trôi nổi (ví dụ: tế bào u lympho, TBUT máu hay TBUT mô liên kết Sarcoma-180), dạng bám dính (ví dụ: TBUT biểu mô gan HepG2, TBUT cổ tử cung HeLa, TBUT vú MCF7, TBUT phổi H358, ...) hoặc cả 2 dạng (ví dụ: TBUT biểu mô phổi 3LL). Hầu hết các tế bào động vật đều có khả năng bám vào một cấu trúc trong mô liên kết như màng cơ bản (basement membrane) hoặc chất nền khoáng (như xương). Tế bào trong máu,

bạch huyết và các loại tế bào khác thường chỉ phát triển trong “huyền phù” [27-29].

Các TBUT (sau khi được rửa đông) sẽ được nuôi cấy đơn lớp 2D trong các chai nuôi cấy (culture flask) với môi trường nuôi cấy phù hợp và chúng sẽ được đưa vào trong tủ nuôi cấy ở 37°C với 5% CO<sub>2</sub>. Các loại thuốc nhuộm protein giúp xác định được liều đáp ứng giữa các dòng tế bào khác nhau với các nồng độ thuốc thử khác nhau [27].

Sử dụng mô hình nuôi cấy đơn lớp có nhiều ưu điểm như thời gian sàng lọc ngắn, cho phép thao tác cùng lúc với nhiều đích, nhiều hợp chất khác nhau và nhiều nồng độ. Tuy nhiên, mô hình này cũng có nhược điểm là không mô phỏng được điều kiện *in vivo* của cơ thể (do tương tác giữa TBUT với hợp chất chỉ theo một chiều, thiếu sự tương tác giữa TBUT với hệ miễn dịch cũng như của hệ miễn dịch với hợp chất) [27]. Với điều kiện hiện tại của phòng thí nghiệm và thời gian nghiên cứu ngắn, tác giả tiến hành lựa chọn mô hình nuôi cấy đơn lớp.

Hiện nay, hai phương pháp thử nghiệm sử dụng Sulforhodamine B (SRB) và MTT (3-(4, 5-dimethylthiazolyl)-2, 5 diphenyltetrazolium bromide) là phổ biến và đáng tin cậy trong việc đánh giá khả năng sống sót và khả năng phát triển của tế bào. Tế bào thường được sử dụng trên mô hình nuôi cấy đơn lớp như các dòng TBUT biểu mô dạng bám đáy, TBUT máu cấp tính dạng hỗn dịch. Bên cạnh đó, dòng tế bào thận gốc phôi ở người HEK-293A (human embryonic kidney cell) được sử dụng như một tế bào đối chứng để kiểm tra khả năng gây độc đối với tế bào bình thường [12].

- *Cơ sở phương pháp MTT đánh giá khả năng chống tăng sinh trên mô hình tế bào nuôi cấy dạng đơn lớp hoặc dạng hỗn dịch*

Phương pháp MTT (Mosmann, 1983): MTT tham gia phản ứng oxy hóa khử với enzyme dehydrogenase trong ty thể của tế bào sống tạo thành các formazan dạng tinh thể màu xanh tím. Có thể dùng một số dung môi hữu cơ phân tích (isopropanol hoặc DMSO) để vừa phá hủy màng tế bào và hòa tan formazan, sau đó đo mật độ quang ở bước sóng 540 nm. Mật độ quang đo được tỷ lệ thuận với số lượng tế bào sống có mặt trong các giếng nuôi cấy [30].

- Cơ sở phương pháp đánh giá khả năng gây độc trên tế bào nuôi cấy đơn lớp với thuốc nhuộm Sulforhodamine B (SRB)

Thử nghiệm SRB (Skehan et al., 1985) được Viện Ung thư Quốc gia Hoa Kỳ (NCI) công nhận là thử nghiệm độ độc tế bào chuẩn dùng để sàng lọc các hoạt chất có khả năng ức chế sự phát triển hoặc tiêu diệt TBUT trong điều kiện *in vitro*. Trong điều kiện axit nhẹ, SRB (thuốc nhuộm aminoxanthene màu hồng đậm với hai nhóm sulfonic) liên kết với axit amin trong các tế bào đã được cố định bởi trichloroacetic acid (TCA). Hàm lượng SRB liên kết được xác định dựa vào độ hấp phụ quang học bởi giá trị OD (optical density) - giá trị này tỷ lệ thuận với lượng SRB gắn với phân tử protein. Thử nghiệm SRB cũng có thể được sử dụng để đánh giá khả năng ức chế sự hình thành hay diệt cụm tế bào (colony assay) [12].

### 1.3. SƠ LƯỢC VỀ CHI *PARIS*

#### 1.3.1. Đặc điểm thực vật và phân bố của chi *Paris*

Chi *Paris* là cây thân thảo sống lâu năm, thân rễ ngắn, dài chừng 5-15 cm. Thân cây mọc thẳng, hình trụ, có thể cao tới 1 m. Giữa thân có một tầng lá mọc vòng gồm 4 đến 15 lá có gân lưới. Phiến lá dài khoảng 15-21 cm và rộng 4-8 cm với đầu phiến lá nhọn, hai mặt nhẵn, mặt dưới màu xanh nhạt, hoặc có màu tím nhạt. Hoa của loài *Paris* là hoa lưỡng tính, đơn độc phát triển ở đỉnh thân vào các tháng 2, 3, 4 dương lịch. Cuống hoa dài 15-30 cm. Mỗi hoa có các lá đài nhỏ màu xanh lá, dài khoảng 3-7 cm. Số cánh tràng bằng số lá đài. Nhụy màu tím đỏ, bầu thường 3 ngăn. Quả mọng hoặc quả nang, mở ở lưng ô. Các bộ phận trên mặt đất (thân, lá và hoa) sẽ rụng vào mỗi mùa đông và thân rễ dưới lòng đất tạo ra những chồi mới vào mùa xuân năm sau (hiện tượng ngủ đông). Quá trình này sẽ lặp đi lặp lại mỗi năm tạo thành vết sẹo trên thân rễ, dựa trên số vết sẹo này có thể dễ dàng ước tính được số tuổi gần đúng của cây. Cây thường ra hoa vào các tháng 10-11 [31, 32].



**Hình 1.2.** Các loài thuộc chi *Paris* tại Việt Nam [32]

Chi *Paris* thuộc họ Melanthiaceae trong hệ thống phân loại Angiosperm Phylogeny Group IV (APG IV) (trước đây được công nhận là họ Liliaceae). Tính đến năm 2020, chi này gồm có 36 loài phân bố chủ yếu ở vùng ôn đới và vùng nhiệt đới của lục địa châu Á và châu Âu [7]. Hầu hết các loài thuộc chi *Paris* đều phân bố giới hạn ở Đông Á (19 loài ở Trung Quốc) ngoại trừ *P. quadrifolia* ở châu Âu và *P. incompleta* ở Caucasian [33]. Ở Việt Nam, chi *Paris* phân bố rải rác ở một số tỉnh miền núi phía Bắc (Bắc Kạn, Lạng Sơn, Cao Bằng, Phú Thọ, Vĩnh Phúc, ...) và vùng núi cao Tây Nguyên - nơi có khí hậu mát, độ ẩm cao. Năm 2016, Nguyễn Quỳnh Nga và cộng sự đã ghi nhận ở nước ta chi *Paris* có 8 loài và 2 thứ bao gồm: *P. vietnamensis* (Takht.) H.Li, *P. dunniana* H.Lév., *P. cronquistii* (Takht.) H.Li., *P. fargesii* Franch., *P. caobangensis* Y.H.Ji, H.Li & Z.K.Zhou, *P. delavayi* Franch., *P. xichouensis* (H. Li) Y.H.Ji, H.Li & Z.K.Zhou, *P. polyphylla* Smith., *P. polyphylla* var. *chinensis* (Franch.) H.Hara, *P. polyphylla* var. *yunnanensis* (Franch.) Hand.Mazz. [34].

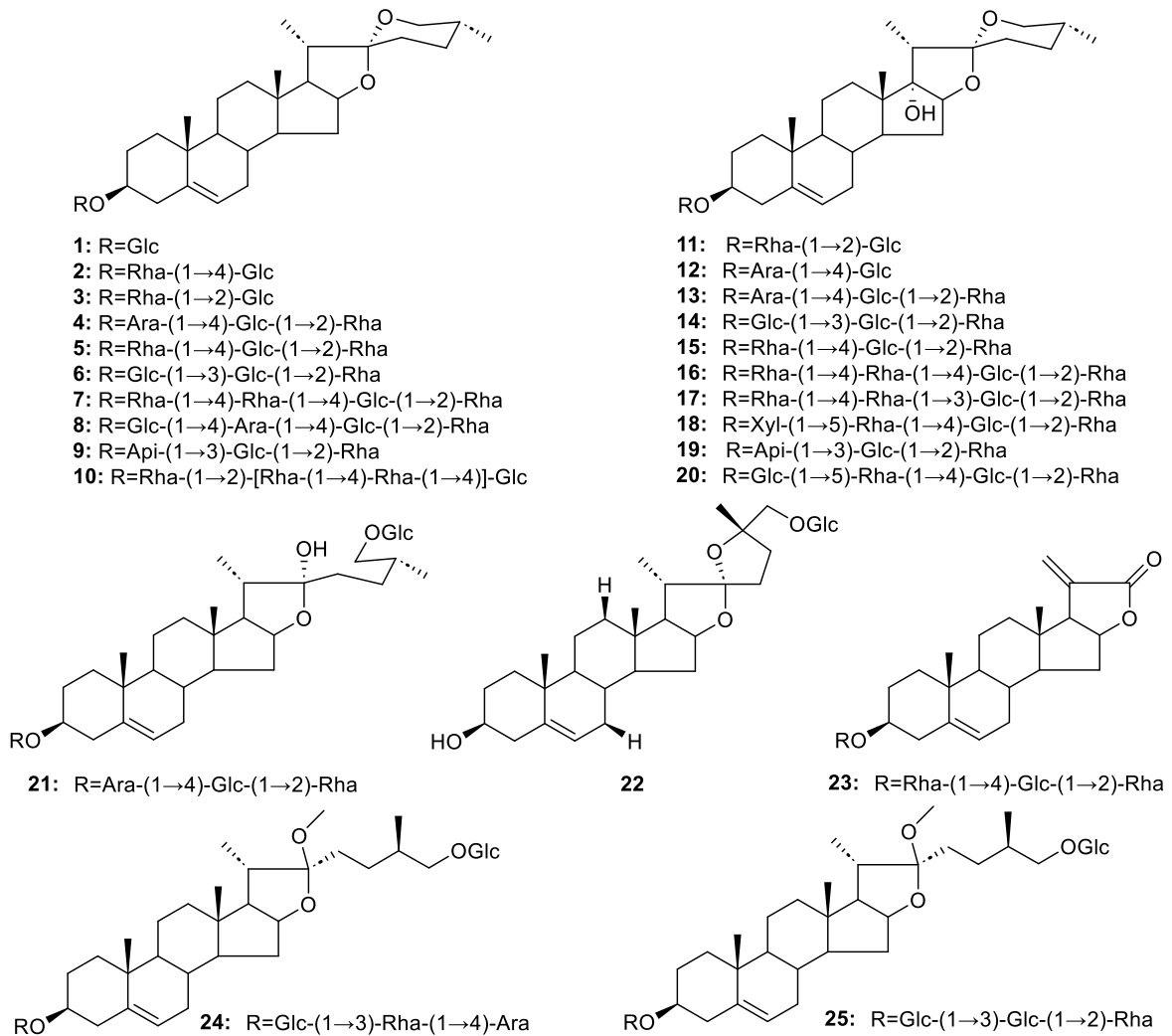
### 1.3.2. Ứng dụng của chi *Paris* trong y học cổ truyền

Trong nhiều thập kỷ, người ta đã chú ý đến việc ứng dụng các loài thuộc chi *Paris* trong y học cổ truyền bởi các đặc tính dược lý quan trọng của chúng. Trong y học cổ truyền ở Ấn Độ, thân rễ của *P. pollyphylla* Smith. được sử dụng để điều trị viêm da và ngực, chảy máu tử cung, chống rắn cắn, sưng cục bộ, vết loét [35]. Rhizoma Paridis (Chonglou) được sử dụng rộng rãi trong y học cổ truyền Trung Quốc để hạ sốt, giảm đau, giảm sưng tấy, cầm máu và điều trị các bệnh về máu. Ngoài ra, nó còn thể hiện nhiều tác động sinh học khác nhau trong

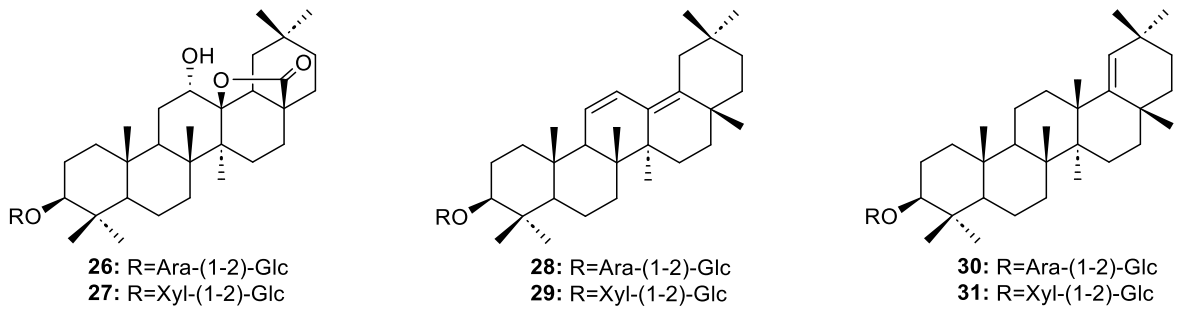
các bệnh về tim và mạch máu, các bệnh chống khả năng sinh sản (tăng cường diệt tinh trùng) và an thần [33].

### 1.3.3. Một số thành phần hóa học chính của chi *Paris*

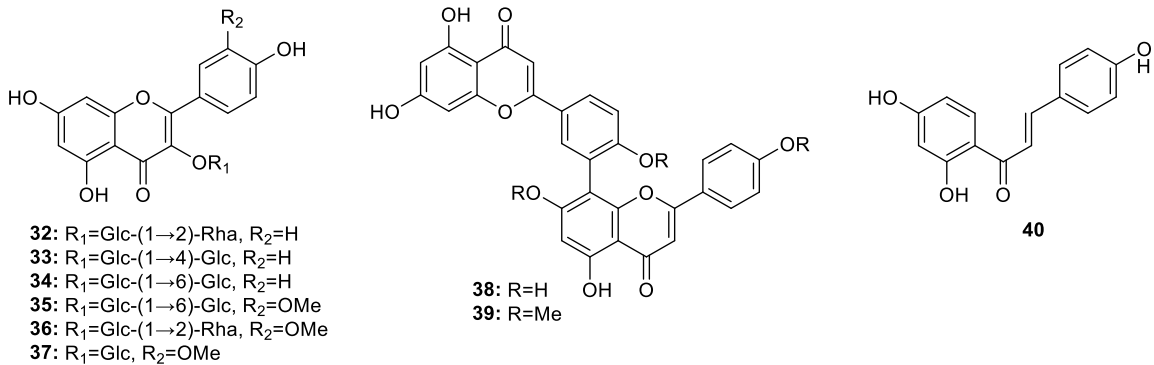
Lịch sử nghiên cứu hóa thực vật và dược lý học về chi *Paris* bắt đầu từ những năm 1960 [36]. Từ những năm 1960 đến năm 2010, hơn 90 chất chuyển hóa thứ cấp đã được phân lập từ chi *Paris*, bao gồm saponin steroid (nhóm chất chính), phytoecdysone, phytosterol, flavonoid và các chất chuyển hóa thứ cấp khác [36]. Cho đến năm 2021 đã có khoảng 323 hợp chất được phân lập và xác định từ chi *Paris* [37]. Các saponin này có khả năng giúp hạ cholesterol máu, kháng u (đặc biệt với một số dòng TBUT vú, dạ dày và phổi), kháng viêm mạnh, diệt khuẩn, ức chế các virus và ức chế ngưng tập tiểu cầu [38].



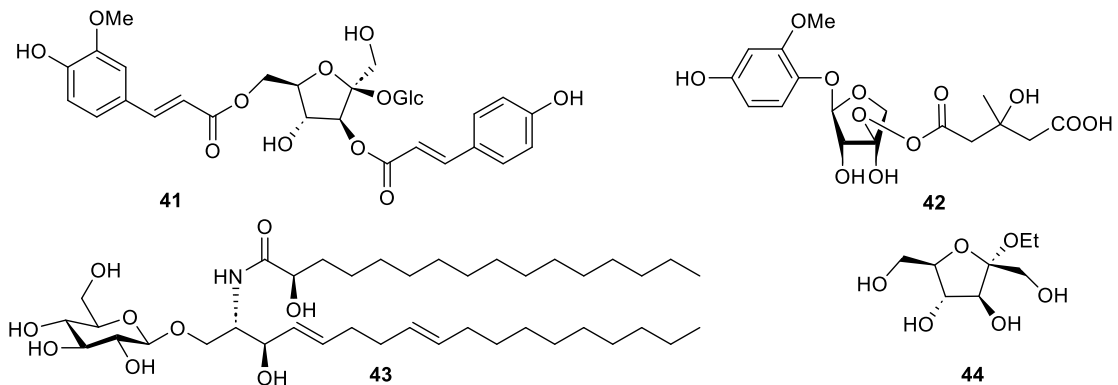
Hình 1.3. Một số hợp chất saponin steroid phân lập từ chi *Paris* [39]



**Hình 1.4.** Một số hợp chất saponin triterpenoid phân lập từ chi *Paris* [39]



**Hình 1.5.** Một số hợp chất flavonoid phân lập từ chi *Paris* [39]



**Hình 1.6.** Một số hợp chất khác phân lập từ chi *Paris* [39]

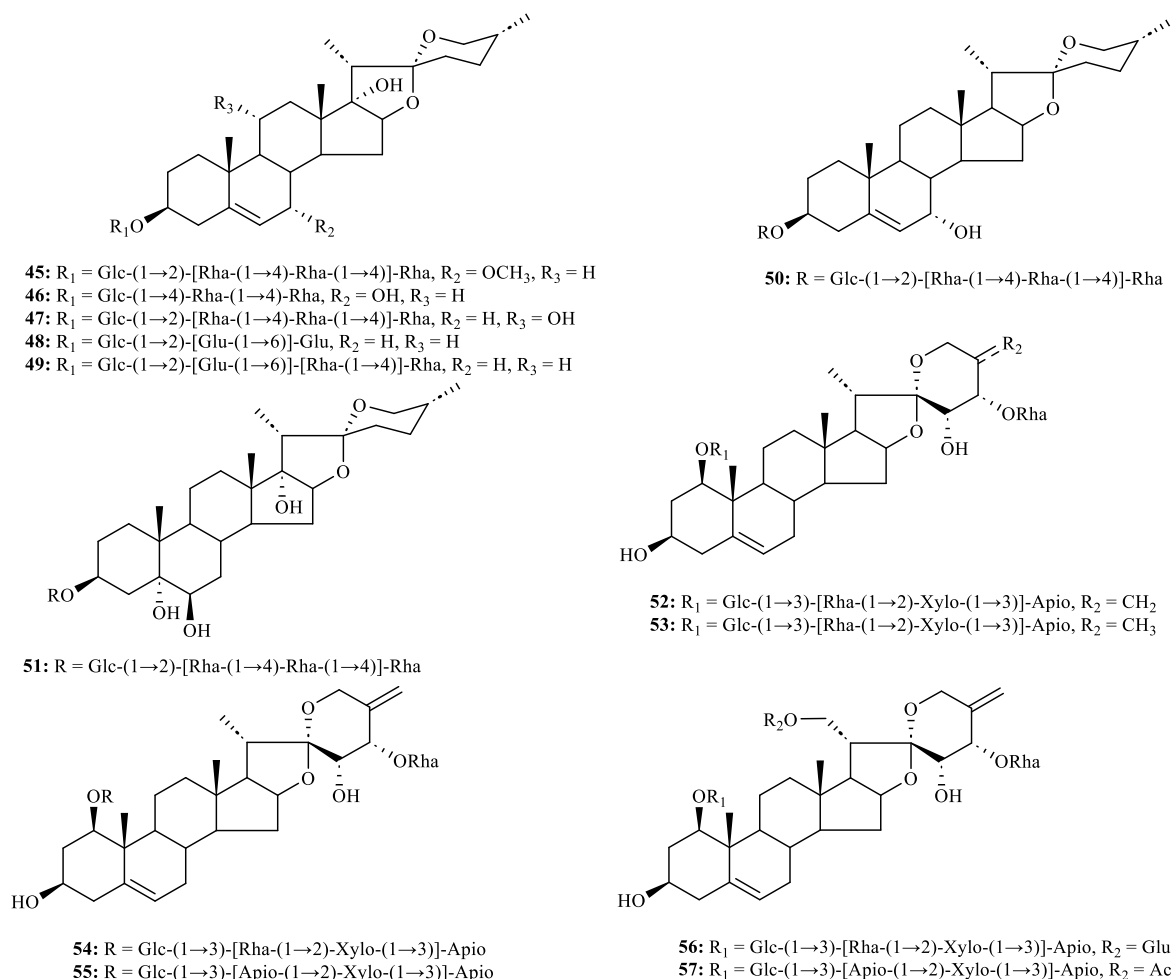
### 1.3.4. Một số hoạt tính sinh học của chi *Paris*

Trên nhiều công bố trước đây đã cho thấy chi *Paris* có nhiều hoạt tính sinh học nổi bật như chống ung thư, kháng viêm, điều hòa miễn dịch, cầm máu và tan máu, chống oxy hóa, kháng virus, kháng nấm, v.v. Trong phần tổng quan này, tác giả đề cập chủ yếu tới hai tác dụng kháng viêm và chống ung thư của các dịch chiết cũng như các hợp chất phân lập được từ chi *Paris*.

#### 1.3.4.1. Tác dụng kháng viêm

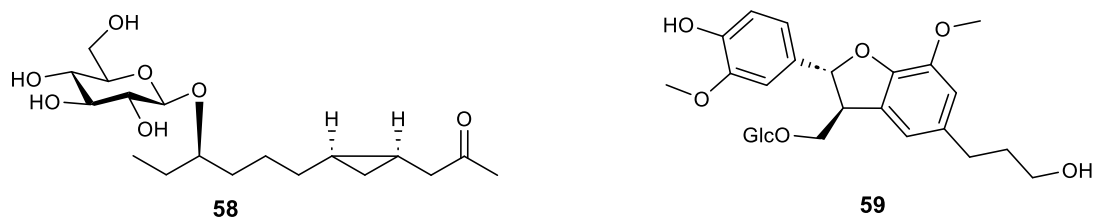


Năm 2023, cũng từ nghiên cứu về loài *P. verticillata*, Yan Liu và cộng sự đã phân lập được 13 hợp chất mới là Parisverticilloside A-M (45-57). Hoạt tính kháng viêm của tất cả các hợp chất được đánh giá trên mô hình ức chế sự giải phóng NO ở tế bào BV2 kích thích bằng LPS, với dexamethasone là đối chứng dương. Kết quả cho thấy, tất cả các hợp chất trên đều thể hiện hoạt tính kháng viêm tốt [40].



**Hình 1.7.** Các hợp chất Parisverticilloside A-M (45-57) [40]

Năm 2011, Ki Hyun Kim và cộng sự đã chỉ ra rằng hai hợp chất Parisveroside B (58) và 3-( $\beta$ -D-glucopyranosyloxymethyl)-2-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)-5-(3-hydroxypropyl)-7-methoxy-(2*R*,3*S*)-dihydrobenzofuran (59) được phân lập từ rễ cây *P. verticillata* đã ức chế đáng kể sự sản sinh NO với giá trị  $\text{IC}_{50}$  lần lượt là 74,8 và 60,5  $\mu\text{mol/L}$  [41].



**Hình 1.8.** Cấu trúc hai hợp chất Parisveroside B (58) và 3-( $\beta$ -D-glucopyranosyloxymethyl)-2-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)-5-(3-hydroxypropyl)-7-methoxy-(2R,3S)-dihydrobenzofuran (59) [41]

#### 1.3.4.2. Tác dụng chống ung thư

Trong y học cổ truyền Trung Quốc, một số loài thuộc chi *Paris* được sử dụng để điều trị ung thư như: *P. polyphylla* var. *yunnannsis* (chống ung thư) [42], *P. polyphylla* var. *chinenesis* (điều trị u não, ung thư phổi, bệnh bạch cầu, ung thư vú, ung thư hạch ác tính) [43-45], *P. polyphylla* var. *stenophylla* Franch (điều trị ung thư phụ khoa) [46], *P. polyphylla* Smith (ức chế sự tăng sinh tế bào và gây ra hiện tượng apoptosis của TBUT thực quản ECA109) [47], v.v.

Gần đây, một số saponin steroid chính đã được nghiên cứu trong một số thử nghiệm ngẫu nhiên có đối chứng để đánh giá tác dụng và cơ chế chủ yếu của chúng đối với hiệu quả chống ung thư. Trillin (1), một trong những chất thủy phân của 7, cho thấy độc tính tế bào tương tự đối với tế bào K562 với giá trị  $IC_{50}$  là 7.5  $\mu$ M [48]. Dioscin (7) có tác dụng ức chế tăng trưởng đối với các dòng tế bào ung thư bạch cầu nguyên bào tủy ở người HL-60 rất mạnh với giá trị  $IC_{50}$  là 7.5  $\mu$ M [49]. Paris saponin VII (16) có đặc tính chống ung thư cổ tử cung được quan sát thấy trong các dòng tế bào Hela [50]. Ngoài ra, 15 còn thể hiện hoạt tính độc tế bào u ác tính B16 của chuột [51]. Polyphyllin VII (24) là hoạt chất có tác dụng chống ung thư gan (HepG2) ở người [52]. Methyl protoneograccillin (25) được phát hiện có hoạt tính gây độc tế bào chống lại bệnh bạch cầu và 8 dòng tế bào khối u rắn có giá trị  $IC_{50}$  <100  $\mu$ M, đặc biệt có tác dụng chọn lọc đối với hai dòng ung thư bạch cầu (CCRF-CEM và RPMT-8226), một dòng ung thư ruột kết (KM12), hai dòng ung thư hệ thần kinh trung ương (CNS) (SF-539 và U251), một dòng ung thư hắc tố (M14) và một dòng ung thư vú (MDA-MB-435), với giá trị  $IC_{50}$  2.0  $\mu$ M [53]. Formosanin C (10), được phân lập từ *P. formosana* Hayata, gây ra hiện tượng apoptosis của tế bào HT-29 và làm chậm sự phát triển của ung thư gan MH134 được cấy dưới da

chuột ở nồng độ lên tới 2.5 mg/kg bằng cách kích hoạt caspase-2 [54]. Ngoài ra, hợp chất **10** còn cho thấy khả năng ức chế sự phát triển khối u và di căn phổi ở chuột T739 hiệu quả hơn nhiều so với cisplatin [55].

## CHƯƠNG 2. ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

### 2.1. ĐỐI TƯỢNG NGHIÊN CỨU

Thân rễ cây Bảy lá một hoa (BLMH) thu hái tại xã Bình Văn, huyện Chợ Mới, tỉnh Bắc Kạn vào tháng 5, tháng 6 năm 2023.



*Hình 2.1. Thân rễ cây Bảy lá một hoa thu hái tại tỉnh Bắc Kạn*

### 2.2. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

#### 2.2.1. Phương pháp điều chế các dịch chiết

Nguyên liệu thực vật phơi khô, tiến hành xay nhỏ sau đó được ngâm chiết với dung môi MeOH theo tỷ lệ 1:7 (m/v) với sự hỗ trợ của máy siêu âm, ở nhiệt độ 50°C, trong thời gian 3 giờ/ mẻ (tiến hành lặp lại ba lần). Dịch chiết MeOH sau đó được thu hồi, lọc bỏ tạp chất không tan bằng bông lọc và cô quay dưới áp suất giảm để loại bỏ dung môi thu được cao MeOH tương ứng. Phần chiết này sau đó được chiết với các dung môi theo độ phân cực tăng dần: *n*-hexan và diclometan cho các phần chiết tương ứng.

## 2.2.2. Các phương pháp nghiên cứu và cô lập các hợp chất [56]

### 2.2.2.1. Phương pháp chiết hai pha rắn-lỏng

Đầu tiên, bột cây khô sau khi được xử lý thô (làm sạch, phơi khô, nghiền mịn) được cho vào túi lọc và đưa vào thiết bị hỗ trợ rung siêu âm. Tiếp đó, thêm lượng methanol cần thiết để ngâm chiết bột dược liệu trong 3 giờ, ở 40 – 50°C. Dịch chiết thu được, tiến hành lọc thô bằng bông nhiều lần, sau đó lọc qua giấy lọc. Quy trình này được lặp lại 3 lần. Gộp toàn bộ dịch chiết sau đó tiến hành cất quay chân không để loại bỏ dung môi methanol, thu được cao chiết tổng (cao chiết MeOH).

### 2.2.2.2. Phương pháp chiết hai pha lỏng-lỏng

Dựa trên nguyên lý căn bản là sự phân bố khác nhau của chất tan giữa hai pha lỏng không trộn lẫn vào nhau. Cao chiết methanol được hòa vào lượng nước cất vừa đủ, sau đó tiến hành chiết lần lượt với các dung môi có độ phân cực tăng dần: *n*-hexan, dichloromethan, ethyl acetate, butanol. Các dịch chiết được gom lại, lọc và tiến hành cất quay chân không loại bỏ dung môi thu được các cặn chiết tương ứng.

### 2.2.2.3. Sắc ký lớp mỏng (TLC)

Sự phân tích sắc ký trên bản mỏng tráng silica gel là quá trình hấp phụ các hợp chất (phân tách theo độ phân cực tương tự như sắc kí cột). Dựa vào các giá trị  $R_f$  và màu sắc của các vệt chất trên sắc kí đồ TLC có thể đánh giá định tính số lượng cũng như xác định sơ bộ nhóm chất chính có trong đối tượng phân tích.

#### **Các bước thực hiện sắc ký lớp mỏng:**

- *Bước 1:* Chuẩn bị các dụng cụ cần thiết
  - + Ống vi quản ( $\varnothing$  1-2 mm): rửa lại bằng dung môi hữu cơ hòa tan các chất sau mỗi lần chấm các đối tượng phân tích khác nhau.
  - + Bản mỏng: bản mỏng thương mại (trắng trên nhôm hoặc kính), dùng bút chì vạch nhẹ nét xuất phát và mức tiền tuyến dung môi.
  - + Máy sấy.
  - + Mẫu phân tích: được hòa tan trong dung môi thích hợp (nồng độ khoảng 2-5%).

- *Bước 2:* Tiến hành đưa dung dịch mẫu lên bản mỏng bằng ống vi quản. Mỗi vết chấm chứa khoảng 10-12  $\mu\text{g}$  mẫu phân tích.
- *Bước 3:* Sấy nhẹ để dung môi bay đi khỏi vết chấm, sau đó nhúng vào bình khai triển chứa hệ dung môi giải ly thích hợp (lượng dung môi không được vượt quá vạch xuất phát).
- *Bước 4:* Sử dụng phương pháp vật lý (chiếu đèn UV<sub>254nm</sub> hoặc UV<sub>365 nm</sub>) hay phương pháp hóa học (dùng một số thuốc thử hiện màu: dung dịch H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 7-10%, Dragendorff (lớp chất alkaloid), ... sau đó hơi nóng ở 120°C).

#### 2.2.2.4. *Sắc ký cột hở (CC)*

Sắc ký cột thường (CC) được thực hiện dưới trọng lực của dung môi. Pha tĩnh là hạt hấp phụ (silica gel F<sub>254</sub>, silica gel RP<sub>18</sub> F<sub>254s</sub>, dianion LH-20, sephadex, ...) với các cỡ hạt tương đối (40-200  $\mu\text{m}$ ). Pha động là hệ dung môi hữu cơ *n*-hexane, dichloromethane, acetone, methanol, ethyl acetate.

##### *Các bước thực hiện sắc ký cột*

- *Bước 1:* Lựa chọn chất hấp phụ dựa trên khảo sát bằng sắc ký lớp mỏng trước đó.
- *Bước 2:* Chọn cột sắc ký có kích thước phù hợp với lượng mẫu phân tích sau khi đã tẩm một lượng nhỏ chất hấp phụ.
- *Bước 3:* Nhồi cột sắc ký (phương pháp nhồi cột ướt): lượng chất hấp phụ vừa đủ (thông thường sau khi đưa lên cột, chiều cao của chất hấp phụ chiếm khoảng 1/2 đến 2/3 chiều cao của cột) được khuấy đều thành dạng lỏng sệt trong dung môi phù hợp với độ phân cực gần với hệ dung môi sử dụng để rửa giải tránh bị nứt cột sau này. Pha tĩnh được khuấy đều trong dung môi nhồi cột cho tới khi hết bọt khí và nhồi vào cột sắc ký.
- *Bước 4:* Đưa mẫu (sau khi tẩm với lượng vừa đủ chất hấp phụ) lên cột sắc ký
- *Bước 5:* Triển khai sắc ký cột: tiến hành rửa giải bằng hệ dung môi được xác định dựa trên khảo sát TLC ở bước 1, tốc độ rửa giải khoảng 20 giọt/phút.
- *Bước 6:* Khảo sát sắc ký TLC để gom các phân đoạn có sắc ký đồ tương tự nhau, sau đó cất loại kiệt dung môi để thu được các nhóm phân đoạn.

### 2.2.2.5. Phương pháp TLC điều chế

Phương pháp này phân lập các chất trực tiếp trên bản mỏng (thường sử dụng bản mỏng kính). Đầu tiên, khảo sát mẫu phân tích trên TLC để tìm được hệ dung môi triển khai bản mỏng cho  $R_f$  các chất khác biệt nhau. Sau đó, dùng ống vi quản đưa dung dịch mẫu lên bản mỏng có chiều rộng 5-10 cm, triển khai dung môi, dựa vào  $R_f$  khác nhau của các chất, cạo lớp silica gel trên bản mỏng và rửa giải bằng metanol sẽ thu được chất cần phân tách. Phương pháp này chỉ áp dụng cho lượng mẫu ít và gặp khó khăn khi tách trên cột sắc ký.

## 2.2.3. Các phương pháp xác định cấu trúc hóa học của các hợp chất hữu cơ [56]

### 2.2.3.1. Phổ khối lượng (MS)

Phổ khối lượng dựa vào sự phân mảnh ion của phân tử chất nghiên cứu dưới sự bắn phá của một chùm các ion từ bên ngoài, kết quả cho ra các pic ion phân tử, từ đó có thể xác định được cơ chế phân mảnh và dựng được cấu trúc hóa học của các hợp chất. Một số phổ khối lượng được sử dụng phổ biến là:

- Phổ EI-MS (Electron Impact Ionization Mass Spectroscopy): dựa vào sự phân mảnh ion dưới tác dụng bắn phá của chùm electron (thông thường là 70 eV).
- Phổ ESI-MS (Electron Spray Impact Ionization Mass Spectroscopy): được thực hiện với năng lượng bắn phá thấp hơn nhiều so với phổ EI-MS. Do đó, dữ liệu phổ thu được chủ yếu là pic ion phân tử và các pic đặc trưng cho sự phá vỡ các liên kết có mức năng lượng thấp, dễ bị phá vỡ.

### 2.2.3.2. Phổ cộng hưởng từ hạt nhân (Nuclear Magnetic Resonance - NMR)

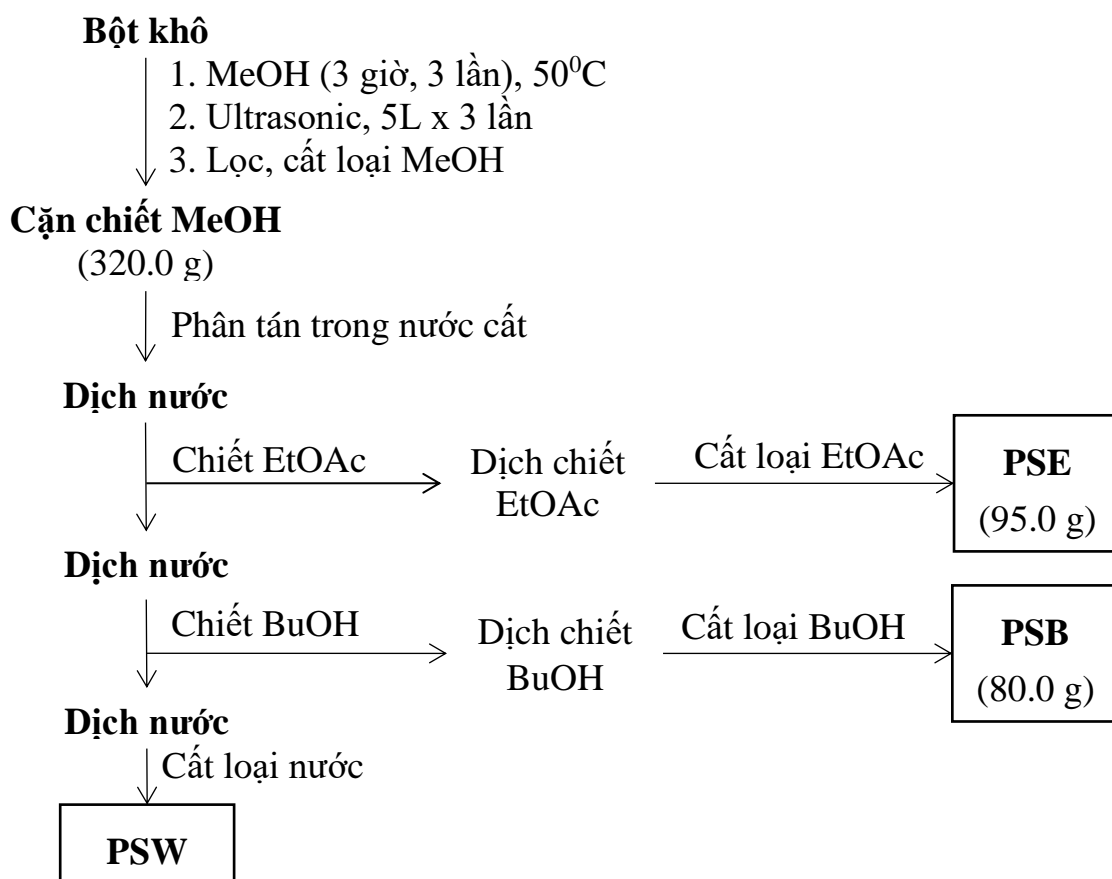
Phương pháp này đặc biệt có ý nghĩa đối với việc xác định các hợp chất hữu cơ. Cơ sở của phương pháp quang là dựa trên sự chênh lệch năng lượng của các spin hạt nhân (chuyển các hạt nhân từ trạng thái thường lên trạng thái kích thích) bởi từ trường của một nam châm vĩnh cửu. Tín hiệu sinh ra được ghi lại.

Trong đó, phổ cộng hưởng từ hạt nhân proton ( $^1\text{H-NMR}$ ) cho biết thông tin loại proton cùng số lượng của mỗi loại và phổ cộng hưởng từ hạt nhân cacbon-13 ( $^{13}\text{C-NMR}$ ) cho biết khung sườn cacbon. Trong phổ  $^1\text{H-NMR}$ , độ

dịch chuyển hóa học ( $\delta$ , ppm) và hằng số tương tác ( $J$ , Hz) là hai thông số quan trọng. Tetrametylsilan (TMS) là chất nội chuẩn cho phổ proton.

#### 2.2.4. Phân lập các hợp chất từ cây Bả lá một hoa

Phần thân rễ của mẫu BLMH (900.0 g) được tiến hành xay nhỏ, sau đó được chiết với dung môi MeOH theo tỷ lệ 1:7 (m/v) với sự hỗ trợ của máy siêu âm, ở nhiệt độ 50°C, trong thời gian 3 giờ/ mẻ (tiến hành lặp lại ba lần). Dịch chiết MeOH sau đó được thu hồi, lọc bỏ tạp chất không tan bằng bông lọc và cô quay dưới áp suất giảm để loại bỏ dung môi thu được (320.0 g) cao MeOH toàn phần. Cao MeOH toàn phần được phân tán trong 1L nước cất, sau đó tiến hành chiết phân bố lỏng - lỏng với các dung môi EtOAc và BuOH (3L x 3 lần). Các dịch chiết được cô quay dưới áp suất giảm ta thu được các cao chiết tương ứng là ethyl acetate (**PSE**, 95.0 g), butanol (**PSB**, 80.0 g) và cặn nước (**PSW**).



*Sơ đồ 2.1. Sơ đồ điều chế các cao chiết từ cây Bả lá một hoa*

Phân đoạn **PSB** (80.0 g) được tiến hành phân lập sử dụng sắc ký cột silica gel với dung môi rửa giải với các hệ dung môi có độ phân cực tăng dần theo tỷ lệ thể tích (MC:MeOH = 50:1 → 5:1, v/v; MC:MeOH:H<sub>2</sub>O = 5:1:0.1 → 1:1:0.1,

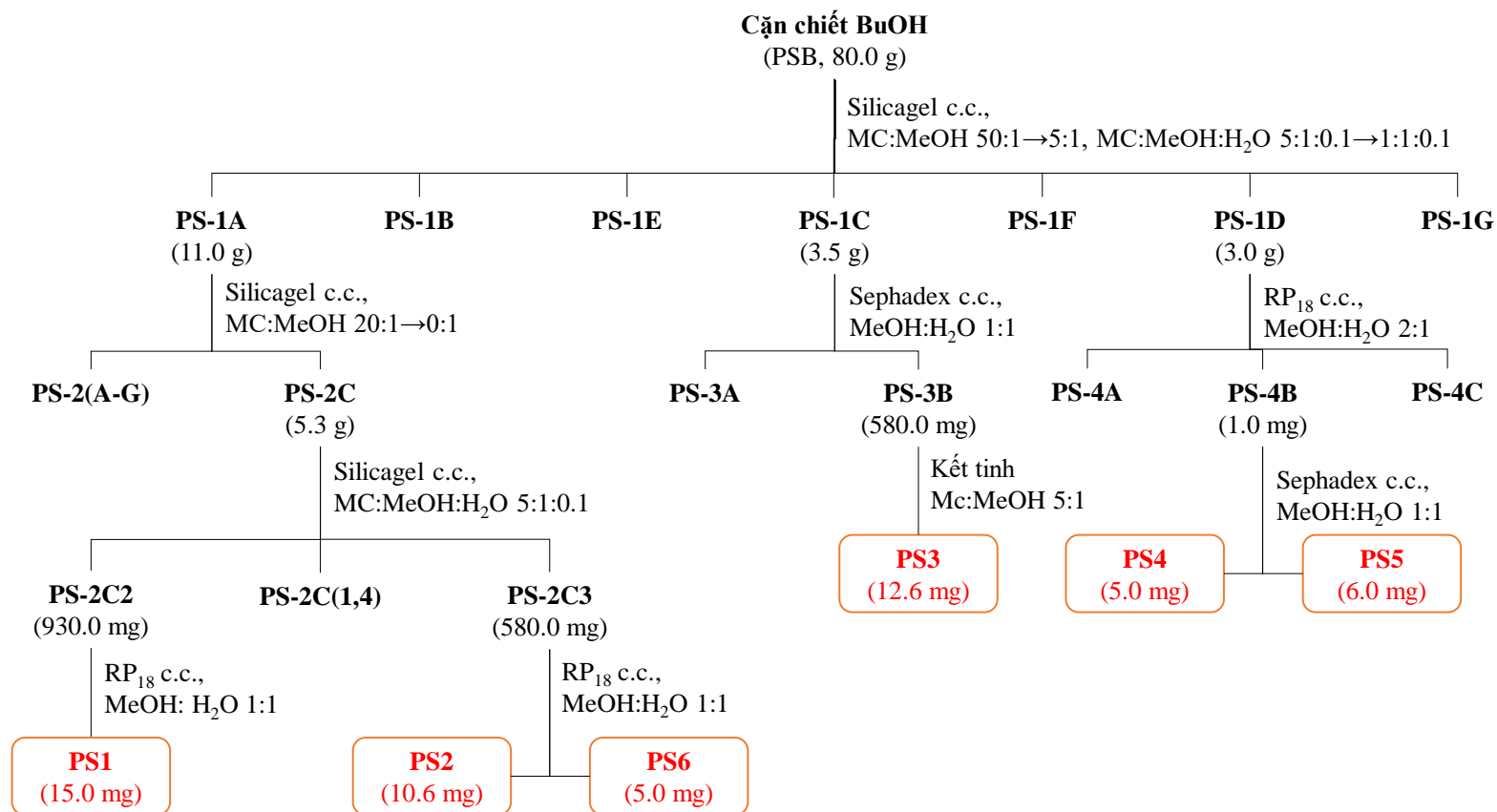


v/v/v), sau đó tiến hành phân tích trên sắc ký lớp mỏng (TLC) thu được 7 phân đoạn ký hiệu là (**PS-1A**→**PS-1G**).

Phân đoạn **PS-1A** (11.0 g) được đưa lên trên sắc ký cột silica gel sử dụng hệ dung môi rửa giải MC: MeOH có độ phân cực tăng dần theo tỷ lệ thể tích (20:1→0:1, v/v) thu được 6 phân đoạn ký hiệu là (PS-2A→PS-2G). dựa trên phân tích TLC. Phân đoạn PS-2C (5.3 g) tiếp tục được xử lý sắc ký cột silica gel với hệ pha động MC: MeOH: H<sub>2</sub>O (5:1:0.1, v/v/v) thu được 4 phân đoạn nhỏ (PS-2C1→PS-2C4). Từ phân đoạn PS-2C2 (930.0 mg) tiếp tục được tinh chế bằng sắc ký cột pha đảo RP<sub>18</sub> sử dụng hệ dung môi rửa giải MeOH: H<sub>2</sub>O (1:1, v/v) thu được hợp chất **PS1** (15.0 mg). Một cách tương tự, phân đoạn PS-2C3 (580.0 mg) được phân tách trên sắc ký cột pha đảo RP<sub>18</sub> với pha động MeOH: H<sub>2</sub>O (1:1, v/v) thu được hợp chất **PS2** (10.6 mg) và hợp chất **PS6** (5.0 mg).

Phân đoạn **PS-1C** (3.5 g) tiếp tục được xử lý sắc ký cột Sephadex-LH<sub>20</sub> sử dụng hệ pha động MC: MeOH (1:1, v/v) thu được hai phân đoạn (PS-3A và PS-3B). Phân đoạn PS-3B (1.0 g) được tinh chế bằng phương pháp kết tinh trong MC: MeOH (5:1, v/v) ở nhiệt độ phòng thu được hợp chất **PS3** (12.6 mg).

Từ phân đoạn **PS-1D** (3.0 g) được đưa lên cột sắc ký cột pha đảo RP<sub>18</sub> sử dụng hệ dung môi pha động MeOH: H<sub>2</sub>O (2:1, v/v) thu được 3 phân đoạn (PS-4A → PS-4C). Phân đoạn PS-4B (1.0 g) được tinh chế bằng sắc ký cột Sephadex-LH<sub>20</sub> với hệ dung môi pha động MeOH: H<sub>2</sub>O (1:1; v/v) ta thu được hợp chất sạch **PS4** (5.0 mg) và hợp chất **PS5** (6.0 mg).



*Sơ đồ 2.2. Sơ đồ phân lập các hợp chất sạch từ cao chiết BuOH của cây Bala laka (Bắc Kạn)*

### 2.2.5. Phương pháp đánh giá khả năng ức chế Nitric Oxide (NO) trên mô hình tế bào RAW 264.7 được cảm ứng viêm bằng lipopolysaccharide (LPS) [57]

- **Bước 1:** Đánh thức tế bào RAW 264.7 từ nitơ lỏng (Dòng tế bào RAW 264.7 do GS. TS. Domenico Delfino, Đại học Perugia, Italia cung cấp).

- **Bước 2:** Tế bào RAW 264.7 được nuôi trong môi trường DMEM (Dulbecco s Modified Eagle Medium) bổ sung 2 mM L-glutamine, 10 mM dung dịch đệm HEPES, 1 mM sodium pyruvate và 10% fetal bovine serum (FBS), để trong tủ ấm CO<sub>2</sub> ở điều kiện 37°C, 5% CO<sub>2</sub>. Sau 3-5 ngày, tùy theo tình trạng tế bào sau khi đánh thức, tế bào được cấy chuyển với tỉ lệ (1:3).

- **Bước 3:** Tế bào được cấy chuyển vào trong đĩa 96 giếng với mật độ  $2 \times 10^5$  tế bào/giếng, nuôi trong 24 giờ trong tủ ấm ở điều kiện 37°C, 5% CO<sub>2</sub>.

- **Bước 4:** Sau đó hút bỏ môi trường cũ và thay bằng môi trường mới DMEM không có FBS để trong 3 giờ.

- **Bước 5:** Tiếp theo, thay môi trường cũ bằng môi trường có chứa mẫu nghiên cứu ở các nồng độ khác nhau và ủ trong 2 giờ. Môi trường của một số giếng không chứa mẫu nghiên cứu mà chỉ có dung dịch pha mẫu được gọi là đối chứng âm. Đối chứng dương được sử dụng là Dexamethasone (Sigma) ở các nồng độ 100 µM, 20 µM, 4 µM và 0.8 µM.

- **Bước 6:** Tiến hành kích thích sản sinh yếu tố NO bằng LPS nồng độ 10 µg/mL trong 24 giờ.

- **Bước 7:** Sau đó, hút 100 µL dịch nổi trong mỗi giếng sang đĩa 96 giếng mới và bổ sung 100 µL thuốc thử Griess reagent (gồm 50 µL of 1% (w/v) sulfanilamide trong 5% (v/v) phosphoric acid và 50 µL 0.1% (w/v) N-1-naphthylethylenediamine dihydrochloride pha trong nước).

- **Bước 8:** Ủ tiếp hỗn hợp trên ở nhiệt độ phòng trong 10 phút.

- **Bước 9:**

+ Sau đó, đo OD bằng máy microplate reader ở bước sóng 540 nm. Môi trường DMEM không có FBS được sử dụng làm giếng trắng (blank).

- + Hàm lượng nitrite của mỗi giếng được xác định dựa vào đường cong hàm lượng chuẩn  $\text{NaNO}_2$  và được so sánh % với mẫu chứng âm (LPS).
- + Khả năng ức chế sản sinh NO của mẫu được xác định bằng công thức:

$$\% \text{ Ức chế (\%)} = 100 - \frac{\text{OD}_{\text{mẫu}} - \text{OD}_{\text{blank}}}{\text{OD}_{\text{DMSO}} - \text{OD}_{\text{blank}}} * 100$$

- + Thí nghiệm được lặp lại 3 lần. Giá trị  $\text{IC}_{50}$  (nồng độ ức chế 50% sự hình thành NO) được tính toán bằng phần mềm máy tính TableCurve 2Dv4.

***Khả năng gây độc tế bào RAW 264.7 của mẫu nghiên cứu được xác định bằng thử nghiệm chống tăng sinh MTT trên mô hình nuôi cấy đơn lớp***

- + Đã 96 giếng sau khi hút dịch nổi sang giếng mới ở bước 7 được thêm vào mỗi giếng 90  $\mu\text{L}$  môi trường nuôi cấy và 10  $\mu\text{L}$  MTT (nồng độ cuối là 5 mg/mL)
- + Sau 4 giờ, hút bỏ môi trường, và cho vào mỗi giếng 50  $\mu\text{L}$  DMSO 100% để hòa tan tinh thể formazan.
- + Đo OD ở bước sóng 540 nm bằng máy ELISA Plate Reader (BioTek). Khả năng sống sót của tế bào RAW 264.7 trước tác dụng của mẫu nghiên cứu được xác định theo công thức:

$$\% \text{ sống sót} = \frac{\text{OD}_{\text{mẫu}} - \text{OD}_{\text{blank}}}{\text{OD}_{\text{DMSO}} - \text{OD}_{\text{blank}}} * 100$$

**2.2.6. Phương pháp đánh giá khả năng gây độc trên tế bào nuôi cấy đơn lớp bằng thuốc nhuộm Sulforhodamine B [58-62]**

- **Bước 1:** Đánh thức 4 dòng tế bào sau đây từ nơ lỏng (SK-LU-1: TBUT phổi ở người (human lung carcinoma); LNCaP: TBUT tiền liệt tuyến ở người (human prostate carcinoma); HepG2: TBUT gan ở người (human hepatocarcinoma); HEK-293A: Tế bào thận gốc phôi ở người (human embryonic kidney cells) do GS. TS. J. M. Pezzuto, Trường Đại học Long-Island, US và GS. Jeanette Maier, Trường Đại học Milan, Italia cung cấp).
- **Bước 2:** 4 dòng tế bào trên được nuôi cấy trong môi trường DMEM hoặc MEME (Minimum Essential Medium with Eagle salt), bổ sung thêm L-

glutamine, sodium pyruvat,  $\text{NaHCO}_3$ , kháng sinh penicillin/streptomycin, 10% FBS (huyết thanh bào thai bò), trypsin-EDTA (0.05%). Điều kiện nuôi cấy là trong tủ ấm  $\text{CO}_2$  ở điều kiện  $37^\circ\text{C}$ , 5%  $\text{CO}_2$ . Sau 3-5 ngày, tùy theo tình trạng tế bào sau khi đánh thức, tế bào được cấy chuyển với tỉ lệ (1:3).

- **Bước 3:** Lựa chọn chai nuôi cấy có tế bào đang ở pha log để tiến hành thí nghiệm. Đầu tiên hút bỏ môi trường cũ và tráng qua bề mặt chai bằng 5 mL PBS (nước muối đệm phosphate). Hút bỏ PBS và cho vào 1-2 mL Trypsin-EDTA để trong 5 phút ở  $37^\circ\text{C}$ .

- **Bước 4:** Dừng phản ứng Trypsin hóa bằng cách bổ sung 5 mL môi trường nuôi cấy tế bào (10% FBS) và dùng pipet hút lên, ấn xuống nhẹ nhàng để trộn đều tế bào. Hút hỗn dịch tế bào cho vào ống ly tâm 15 mL (hoặc 50 mL), rồi ly tâm trong 5 phút với tốc độ 1000 vòng/phút.

- **Bước 5:** Sau khi ly tâm xong, hút bỏ dịch nổi và thu cặn tế bào. Hòa lại cặn tế bào trong 5 mL môi trường nuôi cấy. Tiến hành đếm tế bào trong buồng đếm để điều chỉnh mật độ tế bào sao cho phù hợp trong thử nghiệm gây độc tế bào.

- **Bước 6:** Hòa tan mẫu nghiên cứu trong DMSO 100% để được stock có nồng độ ban đầu là 20 mM. Pha loãng stock trên bằng môi trường nuôi cấy tế bào (không có FBS) thành dãy có 4 nồng độ giảm dần trên đĩa 96 giếng sao cho trong mỗi giếng có 10  $\mu\text{L}$  mẫu nghiên cứu đã pha loãng. Sau đó bổ sung vào mỗi giếng 190  $\mu\text{L}$  dung dịch huyền phù tế bào có mật độ phù hợp ở bước 5. Giếng không có mẫu nghiên cứu nhưng có dung dịch huyền phù tế bào (190  $\mu\text{L}$ ) + DMSO 1% (10  $\mu\text{L}$ ) được sử dụng làm đối chứng ngày 0. Sau 1 giờ, tế bào trong giếng đối chứng ngày 0 được cố định với TCA 20% để thu số liệu ngày 0. Đĩa thí nghiệm được ủ trong tủ ấm  $37^\circ\text{C}$  trong 72 giờ.

- **Bước 7:** Sau 72 giờ, tế bào còn sống được cố định ở đáy giếng bằng TCA trong 1 giờ. Rửa tế bào dưới vòi nước, để khô, nhuộm màu trong 30 phút bằng SRB ở  $37^\circ\text{C}$ . Sau đó, hút bỏ SRB và rửa lại 3 lần bằng acetic acid, rồi để khô trong không khí ở nhiệt độ phòng.

- **Bước 8:** Cuối cùng, dùng 10 mM unbuffered Tris base để hòa tan lượng SRB đã bám và nhuộm các phân tử protein có trong tế bào, lắc nhẹ trong 10

phút rồi tiến hành đo OD ở bước sóng 540 nm bằng máy ELISA Plate Reader (BioTek).

+ Thí nghiệm được lặp lại 3 lần. Ellipticine ở các nồng độ 10; 2; 0.4; 0.08  $\mu\text{g}/\text{mL}$  được dùng làm chất đối chứng tham khảo. DMSO 1% được coi là đối chứng âm (với nồng độ cuối cùng ở trong giếng thử là 0.05%).

+ Giá trị CS (cell survival) là khả năng sống sót của tế bào khi ủ với mẫu nghiên cứu ở nồng độ nào đó, tính theo phần trăm so với đối chứng.

$$\text{CS}(\%) = \frac{\text{OD}_{\text{mẫu}} - \text{OD}_{\text{ngày 0}}}{\text{OD}_{\text{DMSO}} - \text{OD}_{\text{ngày 0}}} * 100$$

+ Phần trăm ức chế được tính là 100% trừ đi giá trị CS. Giá trị  $\text{IC}_{50}$  (nồng độ ức chế 50% sự phát triển) được tính toán nhờ phần mềm TableCurve 2Dv4.

+ Với tiêu chuẩn của NCI, cặn chiết được coi là có hoạt tính gây độc tế bào tốt khi có  $\text{IC}_{50} \leq 20 \mu\text{g}/\text{mL}$ , còn chất tinh khiết được coi là có hoạt tính gây độc tế bào tốt khi  $\text{IC}_{50} \leq 5 \mu\text{M}$  [61].

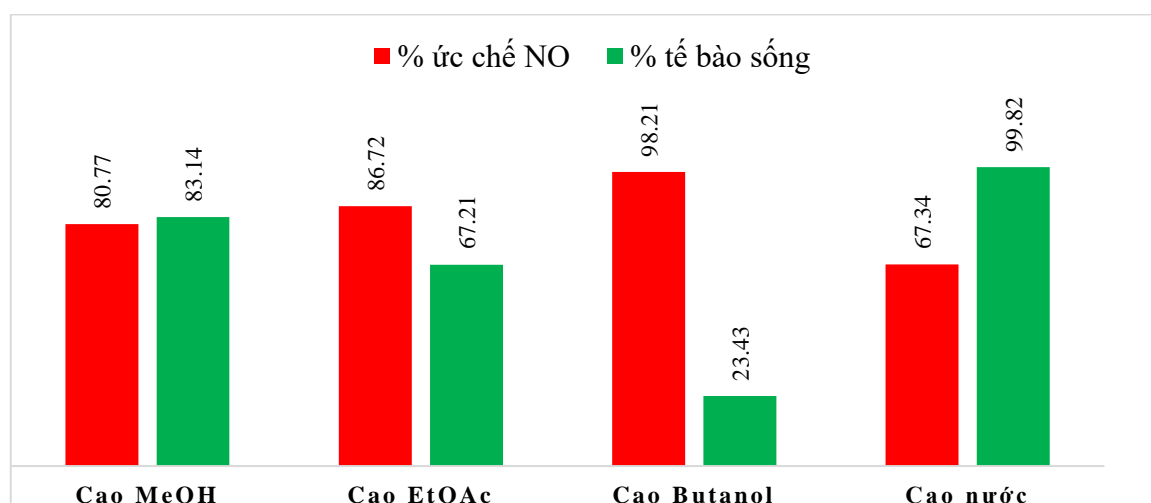
### CHƯƠNG 3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

#### 3.1. KẾT QUẢ SÀNG LỌC HOẠT TÍNH ỨC CHẾ SẢN SINH NO TRONG TẾ BÀO RAW 264.7 VÀ HOẠT TÍNH GÂY ĐỘC TẾ BÀO CỦA CÁC CAO CHIẾT TỪ MẪU BẢY LÁ MỘT HOA

##### 3.1.1. Kết quả sàng lọc hoạt tính ức chế sản sinh NO trong tế bào RAW 264.7 của các cao chiết từ mẫu Bảy lá một hoa

Nitric oxide (NO) là một phân tử tín hiệu có vai trò quan trọng đối với cơ chế bệnh sinh của phản ứng viêm và có liên quan với bệnh ung thư. Ngoài ra, NO được xem là chất trung gian chống viêm được sản sinh ở nhiều loại tế bào bao gồm đại thực bào, nguyên bào sợi hay tế bào gan. Sự sản sinh NO quá mức trong các trường hợp bệnh lý được xem là gây ra phản ứng viêm. NO được chuyển hoá và phóng thích vào các tế bào nội mô thông qua sự xúc tác của các enzyme Nitric oxide synthetase (NOS) khi chuyển đổi arginine thành citrulline và sản sinh ra NO thông qua quá trình viêm [63]. Phản ứng viêm của tế bào nếu không được điều trị có thể tiến triển thành viêm mãn tính [64]. Do đó, có thể sơ bộ đánh giá khả năng kháng viêm của mẫu cần nghiên cứu bằng việc đánh giá hoạt tính ức chế sản sinh NO trên tế bào RAW 264.7.

Tiến hành đánh giá sơ bộ khả năng ức chế sản sinh NO của các cao chiết từ mẫu BLMH (cao MeOH, cao EtOAc, cao Butanol, cao nước) ở nồng độ 100 µg/mL.



**Hình 3.1.** Khả năng ức chế sản sinh NO của các cao chiết từ mẫu Bảy lá một hoa ở nồng độ thử 100 µg/mL

Kết quả Hình 3.1 cho thấy cao MeOH, cao nước thể hiện hoạt tính ức chế sản sinh NO tốt và lượng tế bào sống cao (đều > 80%), các cao còn lại cho thấy lượng tế bào sống < 70% ở nồng độ 100 µg/mL nên chưa thể xác định được khả năng ức chế sản sinh NO của 2 cao đó không phải do tế bào chết gây ra. Tiếp tục thử nghiệm trên các nồng độ khác với cao MeOH và cao H<sub>2</sub>O để xác định IC<sub>50</sub>.

**Bảng 3.1.** Khả năng ức chế sản sinh NO của các cao chiết từ mẫu Bảy lá một hoa

Cao chiết	MeOH	H <sub>2</sub> O
IC <sub>50</sub>	50.36 ± 2.95 µg/mL	78.94 ± 2.32 µg/mL

Kết quả ở Bảng 3.1 cho thấy, cao chiết MeOH và cao H<sub>2</sub>O có tác dụng ức chế sản sinh NO giảm dần với giá trị IC<sub>50</sub> lần lượt là 50.36 ± 2.95 và 78.94 ± 2.32 µg/mL.

Như vậy, kết quả sàng lọc ban đầu này cho ưu tiên lựa chọn ra các cao chiết có hoạt tính ức chế sản sinh NO là cao MeOH và cặn nước từ mẫu BLMH thu được để tiếp tục phân lập các hợp chất sạch từ các cao chiết này nhằm tìm kiếm, phát hiện được các hợp chất tiềm năng kháng viêm.

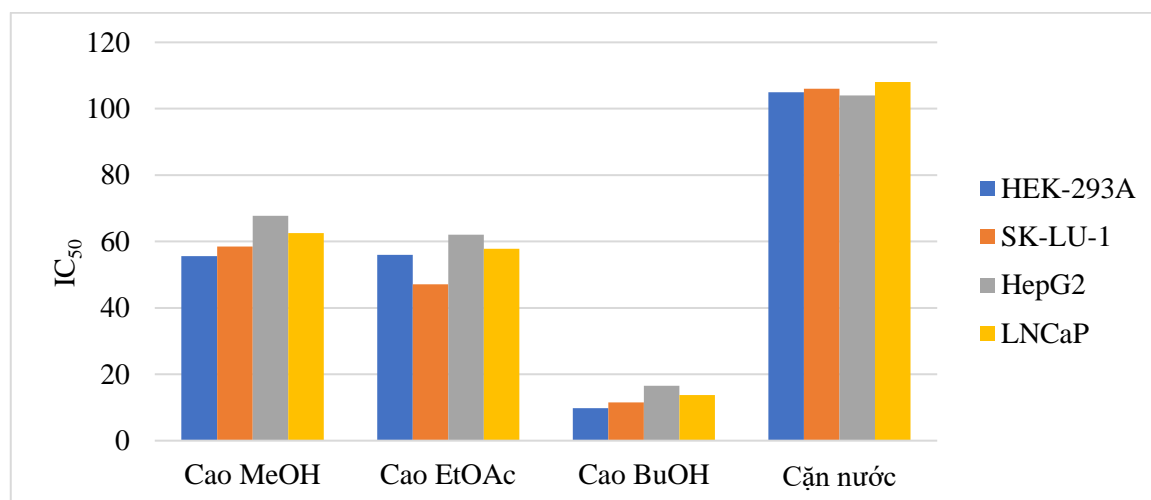
### 3.1.2. Kết quả sàng lọc hoạt tính gây độc trên một số dòng tế bào ung thư của các cao chiết từ mẫu Bảy lá một hoa

Ung thư là căn bệnh gây tử vong đứng thứ hai trên toàn thế giới. Việc điều trị ung thư bằng các phương pháp phẫu thuật, xạ trị, hóa trị, thuốc tây, ... không tiến triển nhanh như mong đợi và gây ra nhiều tác dụng phụ. Do đó, việc phát triển các loại thuốc chống ung thư mới từ các sản phẩm tự nhiên có tầm quan trọng trong điều trị lâm sàng.

Trong nghiên cứu này, hoạt tính gây độc tế bào *in vitro* từ các cao chiết của mẫu BLMH được thử nghiệm trên các dòng TBUT phổi ở người (SK-LU-1), TBUT tuyến tiền liệt ở người (LNCaP), TBUT gan ở người (HepG2) và tế bào thận gốc phôi ở người (HEK-293A) theo phương pháp thử hoạt tính gây độc tế bào *in vitro* được trình bày ở phần phương pháp (mục 2.2.6). Kết quả

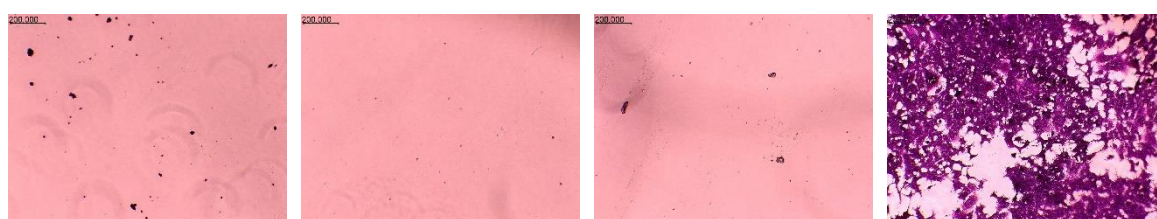


đánh giá hoạt tính gây độc tế bào của các mẫu thử được trình bày ở Hình dưới đây:



**Hình 3.2.** Kết quả đánh giá hoạt tính gây độc tế bào dưới tác động của các cao chiết từ mẫu Bắp lá một hoa sau 48h ủ mẫu với dải nồng độ 100-20-4-0.8  $\mu\text{g/mL}$

Kết quả trên cho thấy hầu hết các mẫu thử (trừ cao H<sub>2</sub>O có giá trị IC<sub>50</sub> > 100  $\mu\text{g/mL}$ ) đều thể hiện hoạt tính gây độc tế bào trên các dòng tế bào nghiên cứu với giá trị IC<sub>50</sub> từ 9.80 – 67.71  $\mu\text{g/mL}$ . Trong đó, theo tiêu chuẩn của NCI, cao chiết BuOH thể hiện hoạt tính gây độc tế bào tốt và mạnh nhất trên cả 4 dòng tế bào trong thử nghiệm (IC<sub>50</sub>  $\leq$  20  $\mu\text{g/mL}$ )



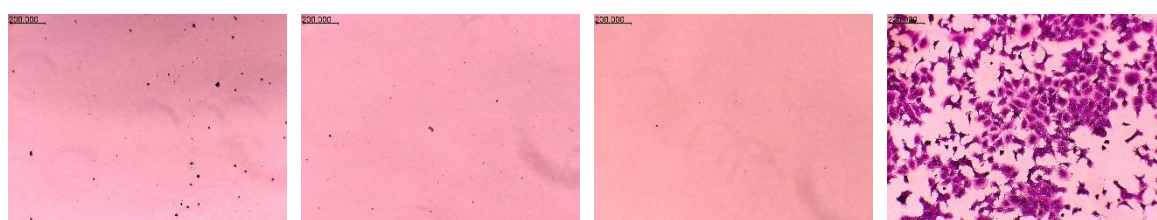
Cao MeOH

Cao EtOAc

Cao BuOH

Cao H<sub>2</sub>O

**Hình 3.3.** Ảnh chụp tế bào HEK-293A dưới tác dụng của các loại cao ở nồng độ 100  $\mu\text{g/mL}$ .



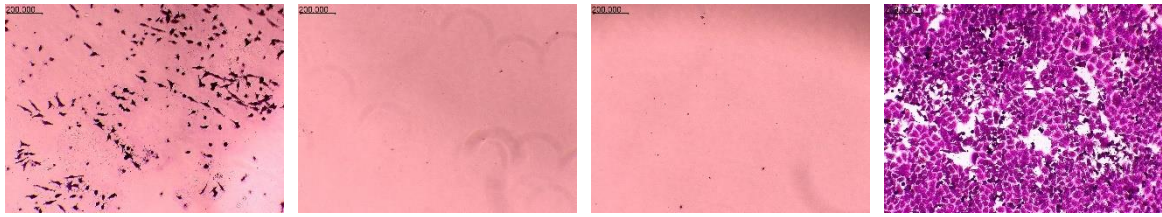
Cao MeOH

Cao EtOAc

Cao BuOH

Cao H<sub>2</sub>O

**Hình 3.4.** Ảnh chụp tế bào SK-LU-1 dưới tác dụng của các loại cao ở nồng độ 100  $\mu\text{g/mL}$ .



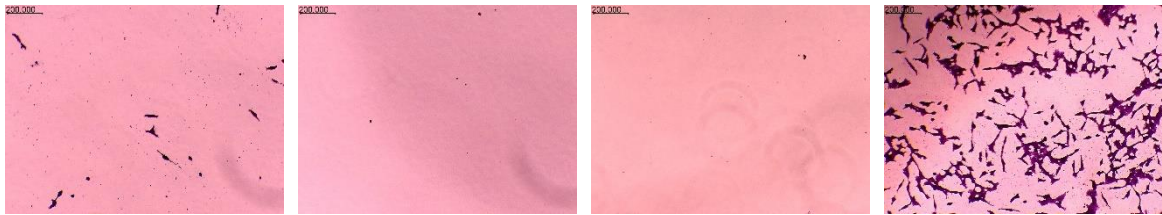
Cao MeOH

Cao EtOAc

Cao BuOH

Cao H<sub>2</sub>O

**Hình 3.5.** Ảnh chụp tế bào HepG2 dưới tác dụng của các loại cao ở nồng độ 100 µg/mL.



Cao MeOH

Cao EtOAc

Cao BuOH

Cao H<sub>2</sub>O

**Hình 3.6.** Ảnh chụp tế bào LNCaP dưới tác dụng của các loại cao ở nồng độ 100 µg/mL.

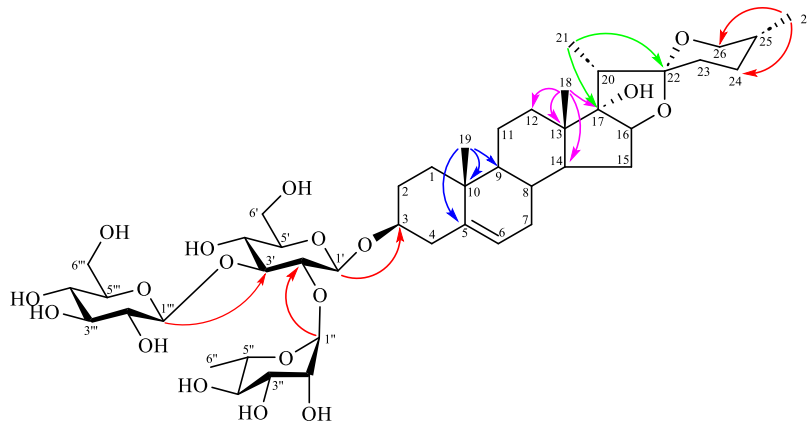
So sánh với một nghiên cứu năm 2021 của nhóm tác giả Lâm Bích Thảo về hoạt tính gây độc TBUT *in vitro* ở 2 mẫu BLMH ở Kon Tum và ở phía Bắc Việt Nam, nhận thấy có sự khác biệt giữa kết quả hoạt tính gây độc trên dòng tế bào HepG2: cao EtOAc thể hiện khả năng gây độc mạnh hơn cao BuOH ở cả 2 mẫu BLMH ở Kon Tum và phía Bắc [65].

Để giải thích cho sự khác biệt này và do thời gian nghiên cứu không dài, tác giả quyết định lựa chọn tập trung phân lập các hợp chất trong cao chiết BuOH của mẫu BLMH thu tại Bắc Kạn với mong muốn tìm ra các hoạt chất có tác dụng gây độc tế bào tốt.

### **3.2. KẾT QUẢ XÁC ĐỊNH CẤU TRÚC HÓA HỌC CỦA CÁC HỢP CHẤT PHÂN LẬP TỪ MẪU BẢY LÁ MỘT HOA**

Từ cao chiết BuOH của mẫu BLMH thu tại tỉnh Bắc Kạn, đã phân lập và xác định được cấu trúc hóa học của 06 hợp chất. Cấu trúc của các hợp chất này được xác định như sau:

#### **3.2.1. Hợp chất PS1: Pennogenin 3-O-β-D-glucopyranosyl-(1→2)[O-α-L-rhamnopyranosyl-(1→3)]-β-D-glucopyranoside**



**Hình 3.7. Hợp chất PS1**

Hợp chất **PS1** thu được dưới dạng tinh thể hình kim không màu. Từ dữ liệu phổ  $^1\text{H-NMR}$  chỉ ra 4 nhóm methyl tại  $\delta_{\text{H}}$  0.93 (3H, s, H-18), 1.06 (3H, s, H-19), 1.20 (3H, d,  $J = 7.2$  Hz, H-21), và 0.65 (3H, d,  $J = 5.4$  Hz, H-27); 1 tín hiệu olefin tại  $\delta_{\text{H}}$  5.30 (1H, s, H-6); cùng với 3 proton anome tại  $\delta_{\text{H}}$  4.89 (1H, m, H-1'), 6.30 (1H, s, H-1''), 5.05 (1H, d,  $J = 7.8$  Hz, H-1''') gợi ý sự hiện diện của 3 đơn vị đường.

Mặt khác, trên phổ  $^{13}\text{C-NMR}$  và HSQC chỉ ra 45 tín hiệu cacbon, trong đó 27 tín hiệu cacbon được gán cho một đơn vị aglycone và 18 tín hiệu cacbon cho ba đơn vị đường. Đơn vị aglycone được thiết lập bởi 9 nguyên tử cacbon methylen ở  $\delta_{\text{C}}$  37.5 (C-1), 30.0 (C-2), 38.6 (C-4), 121.8 (C-6), 20.9 (C-11), 32.0 (C-12), 31.7 (C-15), 32.0 (C-23), và 28.7 (C-24), cùng với 1 nhóm oxymethylene tại 66.6 (C-26); 3 nhóm cacbon methine tại  $\delta_{\text{C}}$  30.3 (C-8), 50.1 (C-9), và 53.0 (C-14); 2 oxymethine 78.2 (C-3), và 89.9 (C-16); 2 cacbon olefin tại  $\delta_{\text{C}}$  140.7 (C-5), và 121.8 (C-6); 2 cacbon bậc 4 liên kết trực tiếp với oxy tại  $\delta_{\text{C}}$  90.0 (C-17), và 109.8 (C-22); cùng với bốn tín hiệu cacbon methyl tại  $\delta_{\text{C}}$  17.1 (C-18), 19.4 (C-19), 9.6 (C-21) và 17.2 (C-27). Dữ liệu phổ HSQC còn chỉ ra 18 tín hiệu cacbon đặc trưng của vùng đường [ $\delta_{\text{C}}$  99.9 (C-1'), 76.9 (C-2'), 89.1 (C-3'), 69.5 (C-4'), 77.6 (C-5'), và 62.2 (C-6')] [104.4 (C-1'), 74.8 (C-2'), 78.5 (C-3'), 71.3 (C-4'), 77.7 (C-5'), 62.2 (C-6')] [102.0 (C-1'), 72.2 (C-2'), 72.5 (C-3'), 73.8 (C-4'), 69.4 (C-5'), và 18.6 (C-6')] gợi ý sự hiện diện của 3 đơn vị đường bao gồm 2 đơn vị glucose, và 1 đơn vị rhamnose. Cấu hình của các đơn vị đường được xác định thông qua hằng số  $J_{1'/2'} = 7.8$  Hz,  $J_{1''/2''} = 7.8$  Hz,  $J_{1'''/2'''} < 1.2$  Hz gợi ý 2 đơn vị đường glucose có cấu hình  $\beta$ , trong khi đơn vị đường rhamnose có cấu hình  $\alpha$ . Từ việc phân tích dữ liệu phổ ở trên, hợp

chất **PS1** được nhận định là một saponin spirostan khung diosgenin. Vị trí các đơn vị đường được xác định thông qua các tương tác HMBC từ  $\delta_{\text{H}}$  4.89 (H-1') đến C-3 (78.2) xác định đơn vị đường 1 đơn vị đường glucose liên kết với phần aglycon tại vị trí C-3; H-1'' (6.30) đến C-2' (76.9) xác nhận đơn vị đường rhamnose được thể tại vị trí C-2'; H-1''' (5.05) đến C-3' (89.1) đề xuất đơn vị đường glucose còn lại được thể tại vị trí C-3'. Kết hợp với tài liệu tham khảo [66], có thể kết luận hợp chất **PS1** là pennogenin 3-*O*- $\beta$ -D-glucopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 2)[*O*- $\alpha$ -L-rhamnopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 3)]- $\beta$ -D-glucopyranoside.

**Bảng 3.2.** Dữ liệu phổ 1D-NMR của hợp chất **PS1**

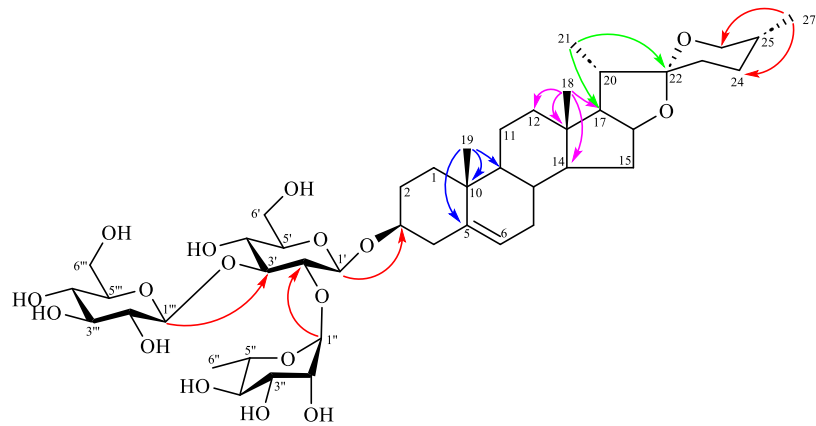
Vị trí C	TLTK [66]		PS1
	$\delta_{\text{C}}^{\text{a,b}}$	$\delta_{\text{C}}^{\text{a,b}}$	$\delta_{\text{H}}^{\text{a,c}}$ (mult, <i>J</i> in Hz)
1	37.5	37.5	1.68 (m)
2	30.0	30.0	1.58 (m)
3	78.4	78.2	3.89 (m)
4	38.6	38.6	2.72 (m)
5	140.7	140.7	-
6	121.8	121.8	5.30 (s)
7	32.4	32.3	1.91 (m)
8	30.4	30.3	1.58 (m)
9	50.2	50.1	1.90 (m)
10	37.1	37.1	-
11	20.9	20.9	1.58 (m) 1.48 (m)
12	32.0	32.0	2.12 (m) 1.51 (m)
13	45.1	45.0	-
14	53.0	53.0	2.06 (m)
15	31.8	31.7	1.60 (m) 1.48 (m)
16	90.0	89.9	4.44 (t, 6.6)
17	90.1	90.0	-
18	17.1	17.1	0.93 (s)

19	19.4	19.4	1.06 (s)
20	44.7	44.7	2.24 (d, 7.2)
21	9.7	9.6	1.20 (d, 7.2)
22	109.7	109.8	-
23	32.0	32.0	1.84 (m)
24	28.7	28.7	1.59 (m) 1.57 (m)
25	32.3	32.4	1.50 (m)
26	66.6	66.6	3.48 (d, 9.6)
27	17.2	17.2	0.65 (d, 5.4)
<b>3-OGlc</b>			
1'	99.9	99.9	4.89 (m)
2'	77.0	76.9	4.21 (m)
3'	89.5	89.1	4.15 (m)
4'	69.5	69.5	4.88 (m)
5'	77.6	77.6	3.80 (m)
6'	62.4	62.2	4.52 (m) 4.37 (m)
<b>2''-Rha</b>			
1''	102.1	102.0	6.30 (s)
2''	72.4	72.2	4.73 (s)
3''	72.7	72.5	4.52 (m)
4''	74.1	73.8	4.28 (t, 9.6)
5''	69.5	69.4	3.99 (m)
6''	18.6	18.6	1.71 (d, 6.0)
<b>3'''-Glc</b>			
1'''	104.5	104.4	5.05 (d, 7.8)
2'''	74.9	74.8	3.96 (m)
3'''	78.6	78.5	3.99 (m)
4'''	71.4	71.3	4.06 (t, 9.6)
5'''	77.8	77.7	4.15 (m)
6'''	62.4	62.2	4.24 (m)

---

<sup>a</sup> đo trong pyridine-*d*<sub>5</sub>, <sup>b</sup> đo ở 150 MHz, <sup>c</sup> đo ở 600 MHz.

### 3.2.2. Hợp chất PS2: Gracillin



**Hình 3.8.** Hợp chất **PS2**

Hợp chất **PS2** thu được dưới dạng tinh thể hình kim không màu (trong MeOH). So sánh dữ liệu phổ 1D-NMR của hai hợp chất **PS1** và **PS2** cho thấy sự tương đồng. Ngoại trừ, sự thiếu hụt 1 carbon bậc 4 liên kết với oxy, thay vào đó là sự hiện diện của một nhóm methine, gợi ý vị trí carbon C-17 bị mất đi 1 nhóm OH điều đó được chứng minh bằng sự thay đổi độ chuyển dịch hóa học từ vùng trường thấp tại  $\delta_C$  90.0 ppm (ở **PS1**) về vùng trường cao tại  $\delta_C$  62.5 ( trong **PS2**). Kết hợp so sánh dữ liệu phổ NMR với tài liệu phổ được báo cáo trước đây [67] đã xác định được **PS2** là gracillin.

**Bảng 3.3.** Dữ liệu phổ 1D-NMR của hợp chất **PS2**

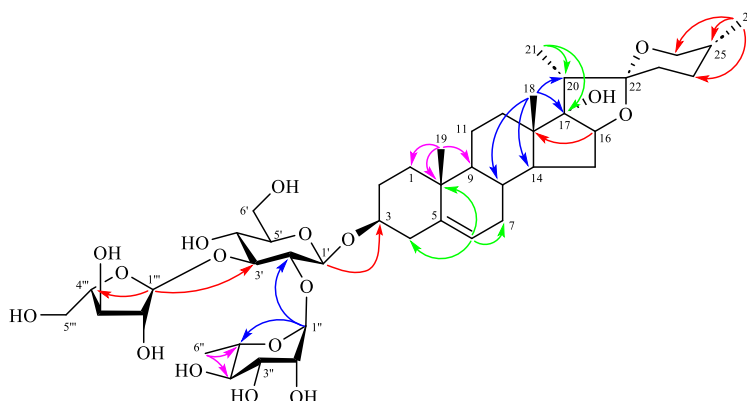
Vị trí C	TLTK [67]		PS1
	$\delta_C^{a,d}$	$\delta_C^{a,b}$	$\delta_H^{a,c}$ (mult, <i>J</i> in Hz)
1	37.5	37.2	1.66 (m) 0.91 (t, 10.8)
2	30.1	29.8	2.07 (d, 11.4) 1.91 (t, 6.6)
3	77.9	77.7	3.90 (m)
4	38.7	38.4	2.74 (d, 12.0) 2.66 (t, 11.4)
5	140.8	140.6	-
6	121.9	121.6	5.34 (s)
7	32.3	32.1	1.50 (m)
8	31.7	31.4	1.47 (m)

9	50.3	50.0	0.83 (m)
10	37.2	36.9	-
11	21.1	20.8	1.38 (m) 1.32 (m)
12	39.9	39.6	1.63 (m) 1.03 (m)
13	40.5	40.2	-
14	56.7	56.4	1.00 (m)
15	32.2	31.9	2.00 (m) 1.35 (m)
16	81.1	81.0	4.51 (m)
17	62.9	62.5	1.77 (t, 8.4)
18	16.3	16.1	0.78 (s)
19	19.4	19.2	1.00 (s)
20	42.0	41.7	1.91 (d, 6.6)
21	15.0	14.8	1.09 (d, 7.2)
22	109.2	109.2	-
23	31.8	31.5	1.65 (m)
24	29.3	29.0	1.53 (m)
25	30.6	30.3	1.50 (m)
26	66.9	66.7	3.54 (d, 10.8) 3.45 (d, 10.8)
27	17.3	17.1	0.65 (d, 5.4)
<b>3-O-Glc</b>			
1'	100.0	99.7	4.83 (m)
2'	77.0	77.0	4.11 (m)
3'	89.6	88.6	4.12 (m)
4'	69.6	69.3	4.85 (d, 7.2)
5'	77.7	77.3	3.79 (m)
6'	62.5	62.0	4.50 (d, 9.6) 4.37 (d, 12.0)
<b>2'-O-Rha</b>			

1''	102.2	101.8	6.22 (s)
2''	72.5	71.9	4.80 (s)
3''	72.8	72.2	4.49 (m)
4''	74.2	73.5	4.27 (t, 9.6)
5''	69.6	69.3	3.90 (m)
6''	18.7	18.4	1.69 (d, 6.0)
<b>3'-O-Glc</b>			
1'''	104.6	104.1	5.02 (d, 7.8)
2'''	75.0	74.5	3.91 (m)
3'''	78.6	77.8	4.15 (m)
4'''	71.5	71.1	4.00 (m)
5'''	78.7	78.2	3.98 (m)
6'''	62.5	62.0	4.15 (m)

<sup>a</sup> đo trong pyridine-*d*<sub>5</sub>, <sup>b</sup> đo ở 150 MHz, <sup>c</sup> đo ở 600 MHz, <sup>d</sup> đo ở 150 MHz.

### 3.2.3. Hợp chất PS3: Paris saponin H



**Hình 3.9.** Hợp chất *PS3*

Hợp chất **PS3** thu được dưới dạng bột rắn, màu trắng. So sánh dữ liệu phổ 1D-NMR của hai hợp chất **PS1** và **PS3** cho thấy sự tương đồng, ngoại trừ sự thiếu hụt 1 nhóm methine của đơn vị đường. Phổ <sup>13</sup>C-NMR, HSQC của hợp chất **PS3** xuất hiện tín hiệu của 44 cacbon trong đó có 27 cacbon thuộc khung sterol và 17 cacbon của 3 phân tử đường (gồm 2 phân tử đường 6 cacbon và 1 phân tử đường có 5 cacbon). Các đơn vị đường được xác định là glucopyranose (100.0, 77.6, 77.2, 76.2, 77.6, và 62.4), rhamnopyranose (101.6, 72.4, 71.9, 73.6, 69.2, và 18.3), và arabinofuranose (109.4, 82.4, 77.6, 86.1, và 61.3). Vị



trí các đơn vị đường được khẳng định trên phổ HMBC thông qua các tương tác từ H-1' ( $\delta_H$  4.89) đến C-3 ( $\delta_C$  78.1) xác định đơn vị đường glucose được đặt tại vị trí C-3 của aglycon; H-1'' ( $\delta_H$  6.22) đến C-2' ( $\delta_C$  77.7) xác định vị trí của rhamnose tại C-2' của glucose; và H-1''' ( $\delta_H$  5.88) đến C-3'' ( $\delta_C$  72.6) xác định vị trí của arabinose tại C-3'' của glucose. Kết hợp với các dữ liệu được công bố trong tài liệu tham khảo [68], hợp chất **PS3** được xác định là paris saponin H.

**Bảng 3.4.** Dữ liệu phổ 1D-NMR của hợp chất **PS3**

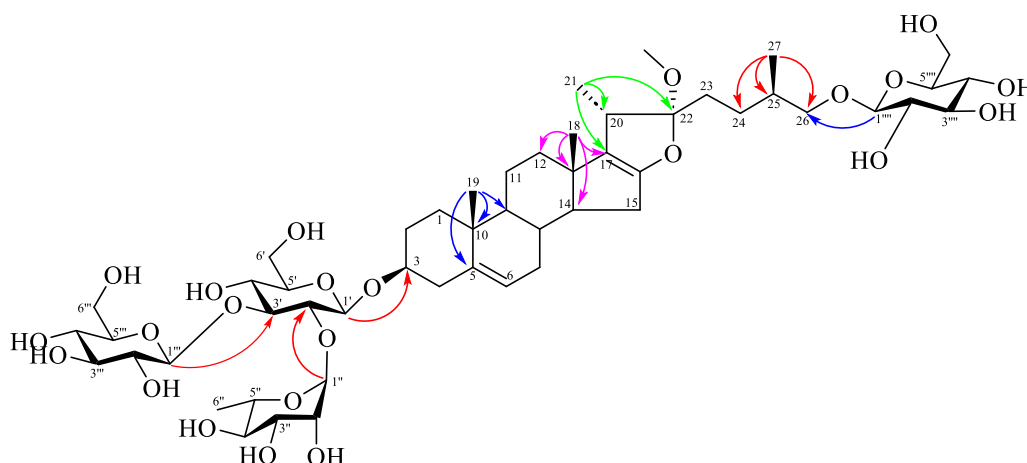
C	TLTK [68]	PS3	
	$\delta_C^{a,b}$ (ppm)	$\delta_C^{a,d}$ (ppm)	$\delta_H^{a,c}$ (ppm)
<b>1</b>	37.4	37.5	1.72 (m)
			1.68 (m)
<b>2</b>	30.0	30.1	2.14 (td, 12.6, 2.4)
			1.83 (d, 12.6)
<b>3</b>	78.2	78.1	3.82 (m)
<b>4</b>	38.8	38.9	2.73 (m)
<b>5</b>	140.7	140.7	-
<b>6</b>	121.6	121.8	5.27 (d, 4.8)
<b>7</b>	32.2	32.3	1.91 (m)
<b>8</b>	31.6	31.8	2.22 (m)
<b>9</b>	50.1	50.2	0.95 (m)
<b>10</b>	37.0	37.1	-
<b>11</b>	20.8	20.9	1.60 (m)
			1.49 (m)
<b>12</b>	37.0	37.0	1.70 (m)
			0.97 (m)
<b>13</b>	45.0	45.1	-
<b>14</b>	52.9	53.0	2.07 (m)
<b>15</b>	32.2	32.4	1.88 (m)
			1.58 (m)
<b>16</b>	89.9	89.9	4.44 (t, 6.6)
<b>17</b>	90.1	90.0	-
<b>18</b>	17.1	17.1	0.93 (s)

<b>19</b>	19.3	19.4	1.06 (s)
<b>20</b>	44.7	44.7	2.25 (q, 7.2)
<b>21</b>	9.3	9.7	1.20 (d, 7.2)
<b>22</b>	109.8	109.8	-
<b>23</b>	32.0	32.0	1.88 (m) 1.51 (m)
<b>24</b>	28.6	28.7	1.59 (m)
<b>25</b>	30.3	30.4	1.59 (m)
<b>26</b>	66.7	66.7	3.48 (d, 6.0)
<b>27</b>	17.2	17.2	0.66 (d, 6.0)
<b>3-O-Glc</b>			
<b>1'</b>	100.0	100.1	4.89 (m)
<b>2'</b>	77.6	77.7	4.82 (m)
<b>3'</b>	77.2	77.2	4.28 (m)
<b>4'</b>	76.2	76.6	3.74 (dt, 9.6, 1.2)
<b>5'</b>	77.6	77.7	4.82 (m)
<b>6'</b>	62.4	62.4	4.24 (m) 4.11 (m)
<b>2'-O-Rha</b>			
<b>1''</b>	101.6	101.8	6.22 (s)
<b>2''</b>	72.4	72.3	4.74 (d, 1.8)
<b>3''</b>	71.9	72.6	4.56 (dd, 9.6, 3.6)
<b>4''</b>	73.6	74.0	4.32 (m)
<b>5''</b>	69.2	69.4	4.28 (m)
<b>6''</b>	18.3	18.6	1.73 (d, 6.6)
<b>3'-O-Ara</b>			
<b>1'''</b>	109.4	109.6	5.88 (d, 1.2)
<b>2'''</b>	82.4	82.6	4.83 (m)
<b>3'''</b>	77.6	77.5	4.81 (m)
<b>4'''</b>	86.1	86.5	4.83 (m)
<b>5'''</b>	61.3	61.3	4.24 (m) 4.16 (m)

---

<sup>a</sup> đo trong pyridine-*d*<sub>5</sub>, <sup>b</sup> đo ở 150 MHz, <sup>c</sup> đo ở 600 MHz, <sup>d</sup> đo ở 150 MHz.

### 3.2.4. Hợp chất PS4: Methyl protograccillin



**Hình 3.10.** Hợp chất **PS4**

Hợp chất **PS4** thu được dưới dạng bột màu trắng. So sánh dữ liệu phổ 1D-NMR kết hợp phân tích phổ HSQC, và HMBC cho thấy sự tương đồng giữa hai hợp chất **PS4** và **PS2**, ngoại trừ sự hiện diện 1 nhóm methoxy được đặt tại C-22 (112.6); cùng với sự xuất hiện của một đơn vị đường glucoside đặt tại vị trí C-26 (74.9). Kết hợp với tài liệu tham khảo [69], hợp chất **PS4** được xác định là methyl protograccillin.

**Bảng 3.5.** Dữ liệu phổ 1D-NMR của hợp chất **PS4**

C	TLTM [69]		PS4
	$\delta_C^a$ (ppm)	$\delta_C^{a,b}$ (ppm)	$\delta_H^{a,c}$ (ppm)
<b>1</b>	37.5	37.3	1.96 (m)
			1.68 (m)
<b>2</b>	30.1	29.9	2.08 (d, 10.8)
			1.85 (m)
<b>3</b>	77.9	78.4	3.91 (m)
<b>4</b>	38.8	38.6	2.76 (d, 9.6)
			2.69 (t, 12.0)
<b>5</b>	140.9	140.7	-
<b>6</b>	121.8	121.7	5.33 (s)
<b>7</b>	32.4	32.2	1.81 (m)
			1.51 (m)
<b>8</b>	31.7	31.5	1.51 (m)

<b>9</b>	50.4	50.1	0.85 (m)
<b>10</b>	37.2	37.0	-
<b>11</b>	21.1	20.9	1.38 (m)
<b>12</b>	39.8	39.6	1.95 (m) 1.36 (m)
<b>13</b>	40.8	40.7	-
<b>14</b>	56.6	56.4	1.04 (m)
<b>15</b>	32.2	32.0	1.95 (m) 1.36 (m)
<b>16</b>	81.3	81.2	4.43 (m)
<b>17</b>	64.2	64.0	1.71 (d, 6.0)
<b>18</b>	16.3	16.1	0.78 (s)
<b>19</b>	19.4	19.2	1.01 (s)
<b>20</b>	40.5	40.3	2.18 (t, 6.0)
<b>21</b>	16.3	16.1	1.15 (d, 7.2)
<b>22</b>	112.7	112.6	-
<b>23</b>	30.8	30.6	1.97 (m) 1.73 (m)
<b>24</b>	28.2	28.0	1.73 (m) 1.31 (m)
<b>25</b>	34.3	34.0	1.86 (m)
<b>26</b>	75.2	74.9	3.91 (m) 3.55 (m)
<b>27</b>	17.2	17.0	0.96 (d, 6.6)
<b>-OCH<sub>3</sub></b>	47.3	47.2	3.24 (s)
<b>3-O-Glc</b>			
<b>1'</b>	100.1	99.8	4.87 (m)
<b>2'</b>	77.1	77.0	4.14 (m)
<b>3'</b>	89.5	88.9	4.15 (m)
<b>4'</b>	69.6	69.4	3.93 (m)
<b>5'</b>	77.9	78.2	4.21 (m)
<b>6'</b>	62.5	62.2	4.33 (m) 4.18 (m)

**2'-O-Rha**

<b>1''</b>	102.2	102.0	6.29 (s)
<b>2''</b>	72.5	72.1	4.04 (t, 9.6)
<b>3''</b>	72.8	72.4	4.14 (m)
<b>4''</b>	74.1	73.7	4.26 (m)
<b>5''</b>	69.5	69.4	3.98 (m)
<b>6''</b>	18.7	18.5	1.70 (d, 6.0)

**3'-O-Glc**

<b>1'''</b>	104.5	104.3	5.04 (d, 7.8)
<b>2'''</b>	75.0	74.7	3.95 (m)
<b>3'''</b>	78.5	78.2	4.21 (m)
<b>4'''</b>	71.8	71.3	4.00 (m)
<b>5'''</b>	77.9	77.7	3.93 (m)
<b>6'''</b>	62.5	62.2	4.33 (m)
			4.18 (m)

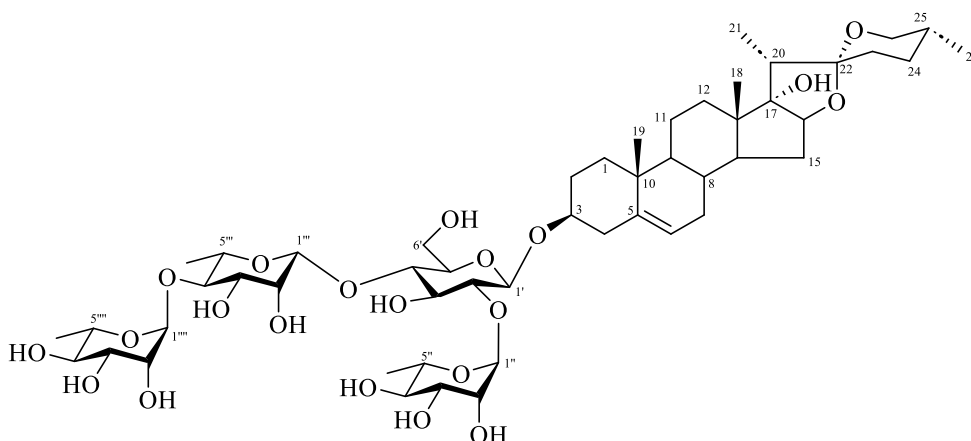
**26-O-Glc**

<b>1''''</b>	105.0	104.6	4.77 (d, 7.2)
<b>2''''</b>	75.2	75.1	3.91 (m)
<b>3''''</b>	78.5	78.2	4.21 (m)
<b>4''''</b>	71.8	71.5	4.15 (m)
<b>5''''</b>	78.6	78.0	3.91 (m)
<b>6''''</b>	63.0	62.6	4.50 (m)
			4.28 (m)

---

<sup>a</sup> đo trong pyridine-*d*<sub>5</sub>, <sup>b</sup> đo ở 150 MHz, <sup>c</sup> đo ở 600 MHz.

### 3.2.5. Hợp chất PS5: Paris saponin VII



**Hình 3.11.** Hợp chất PS5

Hợp chất **PS5** thu được dưới dạng tinh thể hình kim, không màu. Kết quả phân tích phổ 1D-NMR cho thấy phần phổ aglycon của hợp chất **PS5** tương đồng với hợp chất **PS1**. Từ đó cho phép ta dự đoán **PS5** là một saponin spirostan, kết hợp phân tích dữ liệu phổ 1D-NMR với HSQC cho thấy sự hiện diện của 4 đơn vị đường thể hiện qua các tín hiệu đặc trưng tại vị trí anome, các đơn vị đường này bao gồm 1 đơn vị glucose tại  $\delta_H$  5.02 (H-1', d,  $J = 7.2$  Hz)/  $\delta_C$  100.1 (C-1'), cùng với 3 đơn vị đường rhamnose tại  $\delta_H$  6.25 (H-1'', s)/ 102.74 (C-1''), 6.23 (H-1''', s)/ 103.87 (C-1'''), và 6.16 (H-1''', s)/ 102.76 (C-1'''). Phân tích phổ HMBC của hợp chất **PS5** thể hiện các tương tác từ H-1' đến C-3, H-1'' đến C-2', H-1''' đến C-4', H-1'''' đến C-4''' xác nhận đơn vị đường glucose được đặt tại vị trí C-3 của phần alycon, đơn vị đường rhamnose1 đặt tại vị trí C-2', 2 đơn vị đường rhamnose còn lại liên kết với nhau qua vị trí C-1''''/C-4''' và cùng đặt tại vị trí C-4' của đơn vị đường glucose. Kết hợp với dữ liệu phổ đã công bố trong tài liệu tham khảo [66], hợp chất **PS5** là pennogenin-3-*O*- $\alpha$ -L-rhamnopyranonsyl-(1 $\rightarrow$ 4)- $\alpha$ -L-rhamnopyranonsyl-(1 $\rightarrow$ 4)-[ $\alpha$ -L-rhamnopyranonsyl-(1 $\rightarrow$ 2)]- $\beta$ -D-glucopyranoside còn gọi là paris saponin VII.

**Bảng 3.6.** Dữ liệu phổ 1D-NMR của hợp chất PS5

C	TLTK [66]		PS5
	$\delta_C^{a,b}$	$\delta_C^{a,b}$	$\delta_H^{a,c}$ (mult, $J$ in Hz)
1	38.1	37.3	

2	30.7	29.9	
3	78.2	78.3	
4	39.5	38.7	
5	141.3	140.6	-
6	122.4	121.7	5.70 (s)
7	33.0	32.2	
8	31.0	30.2	
9	50.8	50.0	
10	37.7	37.0	-
11	21.5	20.7	
12	32.7	31.8	
13	45.7	44.9	-
14	53.6	52.8	
15	32.9	32.1	
16	90.6	89.7	
17	90.7	90.0	-
18	17.7	16.9	0.90 (s)
19	20.0	19.2	1.01 (s)
20	45.3	44.6	2.24 (d, 7.2)
21	10.4	9.5	1.19 (d, 7.2)
22	110.4	109.8	-
23	32.4	31.6	
24	29.4	24.9	
25	30.7	28.6	
26	67.3	66.6	3.58 (d, 7.2)
27	17.9	17.1	0.63 (d, 5.4)
<b>3-O-Glc</b>			
1'	100.9	100.1	5.02 (d, 7.2)
2'	78.6	78.3	
3'	78.3	77.7	
4'	78.5	78.0	
5'	77.5	77.3	
6'	61.7	61.0	

**2'-O-Rha**

1''	102.7	102.0	6.25 (s)
2''	73.1	72.0	
3''	73.4	72.4	
4''	74.6	76.6	
5''	68.9	68.2	
6''	19.2	18.4	1.71 (d, 6.6)

**3'-O-Rha**

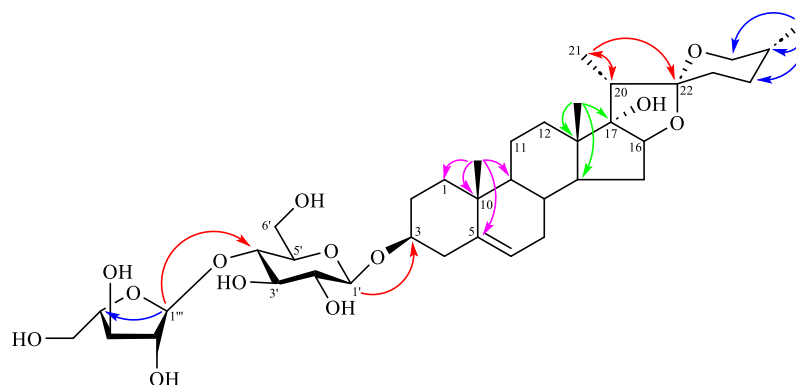
1'''	103.9	104.2	6.23 (s)
2'''	73.8	73.5	
3'''	73.5	72.8	
4'''	81.0	80.0	
5'''	71.0	70.1	
6'''	19.0	18.1	1.18 (d, 7.2)

**4'''-O-Rha**

1''''	102.8	102.0	6.16 (s)
2''''	73.2	72.1	
3''''	73.4	72.4	
4''''	74.7	73.6	
5''''	70.1	69.4	
6''''	19.5	18.6	1.16 (d, 7.2)

<sup>a</sup> đo trong pyridine-*d*<sub>5</sub>, <sup>b</sup> đo ở 150 MHz, <sup>c</sup> đo ở 600 MHz.

### 3.2.6. Hợp chất PS6: Pennogenin-3-O- $\alpha$ -L-arabinosyl-(1 $\rightarrow$ 4)- $\beta$ -D-glucopyranoside



**Hình 3.12.** Hợp chất PS6



Hợp chất **PS6** thu được dưới dạng bột vô định hình màu trắng. So sánh dữ liệu phổ  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  - NMR của hai hợp chất **PS6** và **PS3** rất giống nhau, ngoại trừ sự vắng mặt các tín hiệu của một đơn vị đường rhamnose trên hợp chất **PS6** điều này được khẳng định dựa trên phổ  $^{13}\text{C}$  và phổ HMBC. Kết hợp với so sánh tài liệu tham khảo, hợp chất **PS6** được xác định là pennogenin-3-*O*- $\alpha$ -L-arabinosyl-(1 $\rightarrow$ 4)- $\beta$ -D-glucopyranoside.

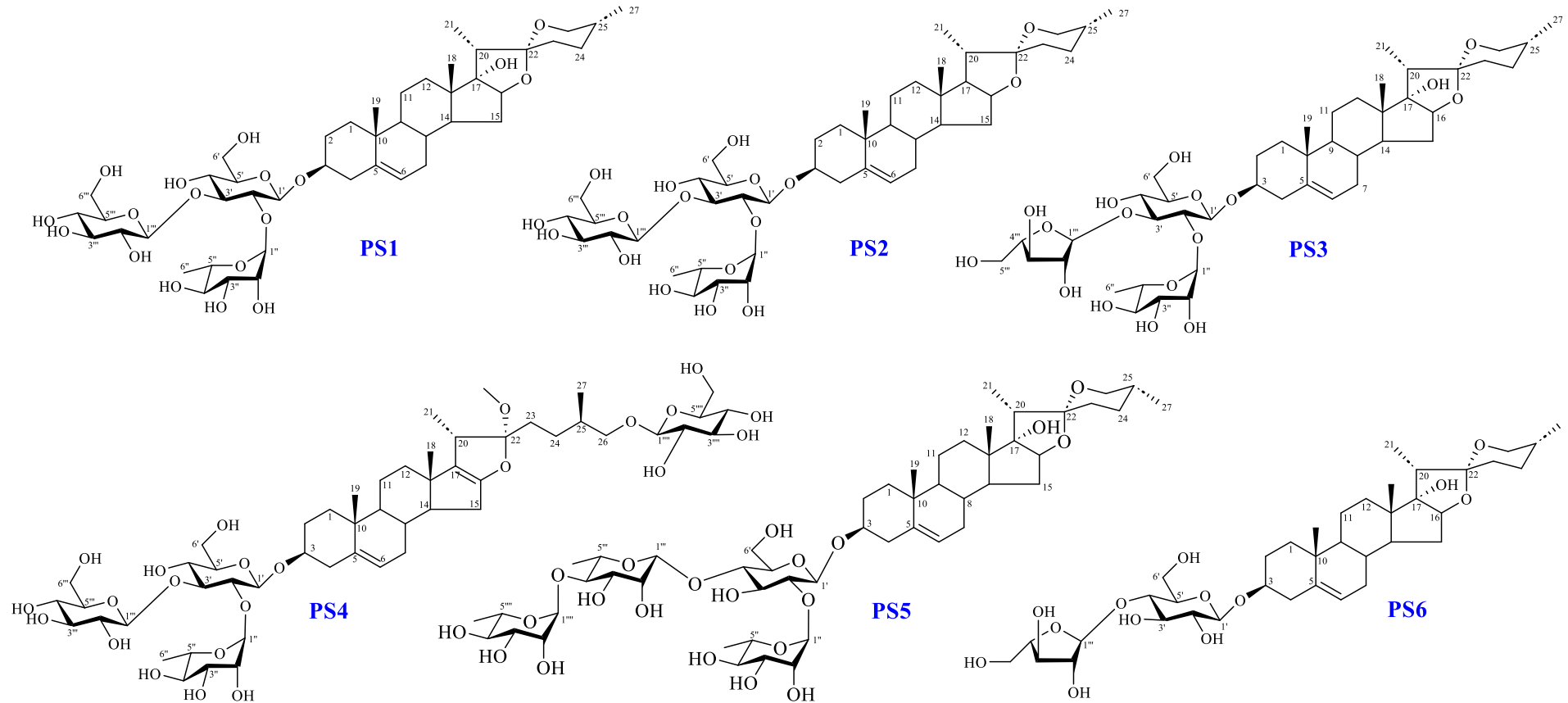
**Bảng 3.7.** Dữ liệu phổ 1D-NMR của hợp chất **PS6**

C	PS3		PS6	
	$\delta_{\text{C}}^{\text{a}}$ (ppm)	$\delta_{\text{C}}$ (ppm)	$\delta_{\text{H}}^{\text{b}}$ (ppm)	
<b>1</b>	37.5	37.4	1.68 (m)	0.91 (m)
<b>2</b>	30.1	30.0	2.03 (m)	1.66 (m)
<b>3</b>	78.1	78.1	3.79 (m)	
<b>4</b>	38.9	39.2	2.65 (dt, 10.5, 2.5)	2.42 (t, 10.5)
<b>5</b>	140.7	140.8	-	
<b>6</b>	121.8	121.7	5.26 (d, 5.0)	
<b>7</b>	32.3	32.3	1.87 (m)	
<b>8</b>	31.8	31.6	2.18 (m)	
<b>9</b>	50.2	50.1	0.90 (m)	
<b>10</b>	37.1	36.9	-	
<b>11</b>	20.9	20.9	1.52 (m)	1.47 (m)
<b>12</b>	37.0	37.0	1.68 (m)	0.91 (m)
<b>13</b>	45.1	45.0	-	
<b>14</b>	53.0	52.9	2.00 (m)	
<b>15</b>	32.4	32.2	1.69 (m)	1.48 (m)
<b>16</b>	89.9	89.8	4.43 (t, 6.5)	
<b>17</b>	90.0	90.0	-	
<b>18</b>	17.1	17.0	0.92 (s)	
<b>19</b>	19.4	19.3	0.90 (s)	

<b>20</b>	44.7	44.7	2.23 (q, 7.0)
<b>21</b>	9.7	9.6	1.20 (d, 7.0)
<b>22</b>	109.8	109.8	-
<b>23</b>	32.0	32.0	1.72 (m) 1.51 (m)
<b>24</b>	28.7	28.7	1.55 (m)
<b>25</b>	30.4	30.3	1.71 (m)
<b>26</b>	66.7	66.6	3.48 (m)
<b>27</b>	17.2	17.2	0.65 (d, 6.0)
<b>3-O-Glc</b>			
<b>1'</b>	100.1	102.3	4.92 (m)
<b>2'</b>	77.7	78.3	4.77 (m)
<b>3'</b>	77.2	76.4	4.30 (m)
<b>4'</b>	76.6	76.4	4.30 (m)
<b>5'</b>	77.7	76.8	3.78 (m)
<b>6'</b>	62.4	62.5	4.23 (d, 9.5) 4.11 (dd, 12.0, 5.0)
<b>4'-O-Ara</b>			
<b>1''</b>	109.6	109.3	5.96 (d, 2.0)
<b>2''</b>	82.6	82.6	4.85 (m)
<b>3''</b>	77.5	74.9	3.97 (m)
<b>4''</b>	86.5	86.6	4.92 (m)
<b>5''</b>	61.3	61.4	4.25 (m) 4.22 (m)

---

<sup>a</sup> đo trong pyridine-*d*<sub>5</sub>, <sup>b</sup> đo ở 150 MHz, <sup>c</sup> đo ở 600 MHz.

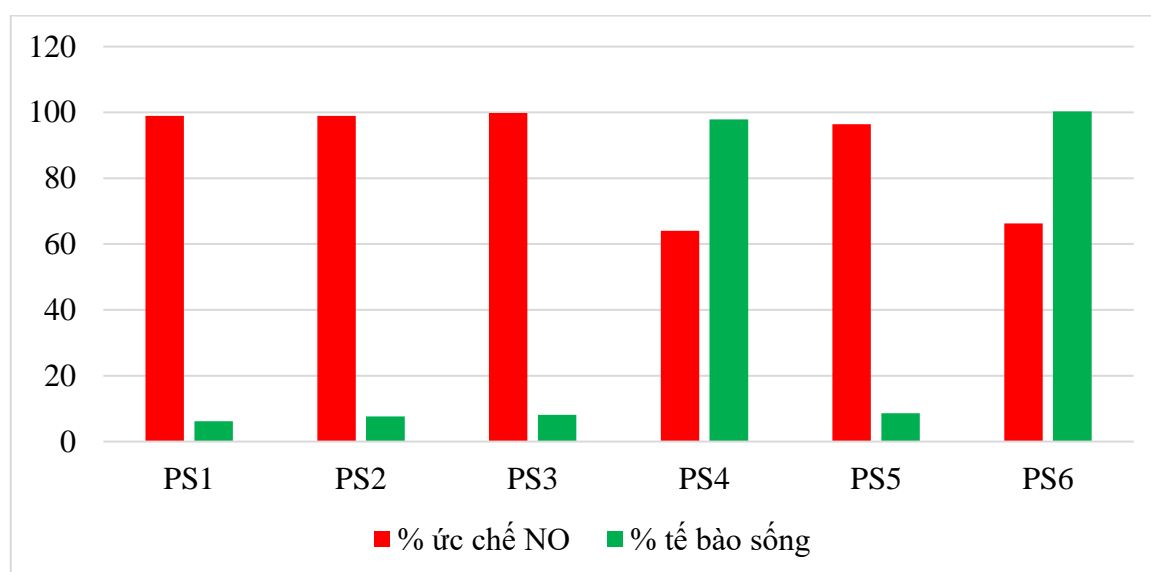


*Hình 3.13. Các hợp chất phân lập được từ mẫu Bảy lá một hoa (Bắc Kạn)*

## 3.2. KẾT QUẢ ĐÁNH GIÁ HOẠT TÍNH ỨC CHẾ SẢN SINH NO ĐỊNH HƯỚNG KHÁNG VIÊM VÀ GÂY ĐỘC TẾ BÀO CỦA CÁC HỢP CHẤT PHÂN LẬP TỪ MẪU BẢY LÁ MỘT HOA

### 3.3.1. Kết quả đánh giá hoạt tính ức chế sản sinh NO định hướng kháng viêm của các hợp chất được phân lập từ cao chiết BuOH của mẫu Bảy lá một hoa

Hoạt tính ức chế sản sinh NO của các hợp chất phân lập được từ cao chiết BuOH của loài BLMH được đánh giá qua mô hình tế bào RAW 264.7 (được kích thích bởi LPS).



**Hình 3.14.** Kết quả đánh giá hoạt tính ức chế sản sinh NO của các hợp chất phân lập từ mẫu Bảy lá một hoa ở nồng độ 100 µM

Để đánh giá hoạt tính ức chế sản sinh NO của các hợp chất trên dòng tế bào RAW 264.7, đầu tiên cần xác định nồng độ các hợp chất có thể sử dụng mà không gây ảnh hưởng đến sức sống của tế bào này. Dựa trên kết quả được thể hiện trong (Hình 3.14), nhận thấy hai hợp chất **PS4**, **PS6** thể hiện hoạt tính ức chế sản sinh NO tốt và ít gây độc tế bào RAW 264.7 ở nồng độ 100 µM. Do đó, hai hợp chất này được tiếp tục thử nghiệm ở các dải nồng độ khác nhau (20 µM, 4 µM, 0.8 µM) để xác định giá trị IC<sub>50</sub>. Các hợp chất còn lại có tỉ lệ tế bào sống thấp (đều < 10%) nên chưa thể xác định được kết quả ức chế sản sinh NO không phải do tế bào chết gây ra.

**Bảng 3.8.** Khả năng ức chế sản sinh NO của hai hợp chất **PS4** và **PS6** phân lập từ cao chiết BuOH của mẫu Bảy lá một hoa

Nồng độ ( $\mu\text{M}$ )	% ức chế NO		
	PS4	PS6	Dexamethasone
100	64.05 $\pm$ 0.97	66.31 $\pm$ 1.58	84.94 $\pm$ 2.41
20	15.15 $\pm$ 0.97	13.59 $\pm$ 1.02	54.96 $\pm$ 1.18
4	7.85 $\pm$ 0.75	10.92 $\pm$ 0.83	40.55 $\pm$ 1.02
0.8	3.95 $\pm$ 0.23	4.97 $\pm$ 0.33	30.26 $\pm$ 0.69
<b>IC<sub>50</sub></b>	<b>77.39 <math>\pm</math> 2.15</b>	<b>78.45 <math>\pm</math> 2.83</b>	<b>12.61 <math>\pm</math> 1.28</b>

Kết quả nghiên cứu cho thấy giá trị IC<sub>50</sub> của hai hợp chất **PS4** và **PS6** lần lượt là 77.39  $\pm$  2.15 và 78.45  $\pm$  2.83  $\mu\text{M}$ . So sánh giá trị IC<sub>50</sub> chỉ ra rằng hai hợp chất **PS4** và **PS6** có tác dụng ức chế yếu sự sản sinh ra NO trong tế bào RAW 264.7 (kích thích bởi LPS) so với chất đối chứng dương dexamethasone (IC<sub>50</sub> = 12.61  $\pm$  1.28  $\mu\text{M}$ ). Dexamethasone được thử nghiệm ở dải nồng độ 100-20-4-0.8  $\mu\text{M}$  và hoạt động ổn định trong thí nghiệm. Một nghiên cứu năm 2016 của Yi Zhang và cộng sự cũng đã báo cáo về tác dụng ức chế yếu sự sản sinh NO ở tế bào RAW 264.7 (kích thích bằng LPS) của hợp chất **PS4** (Methyl protogracillin) [70].

### 3.3.2. Kết quả đánh giá hoạt tính ức chế một số dòng tế bào ung thư của các hợp chất được phân lập từ cao chiết BuOH của mẫu Bảy lá một hoa

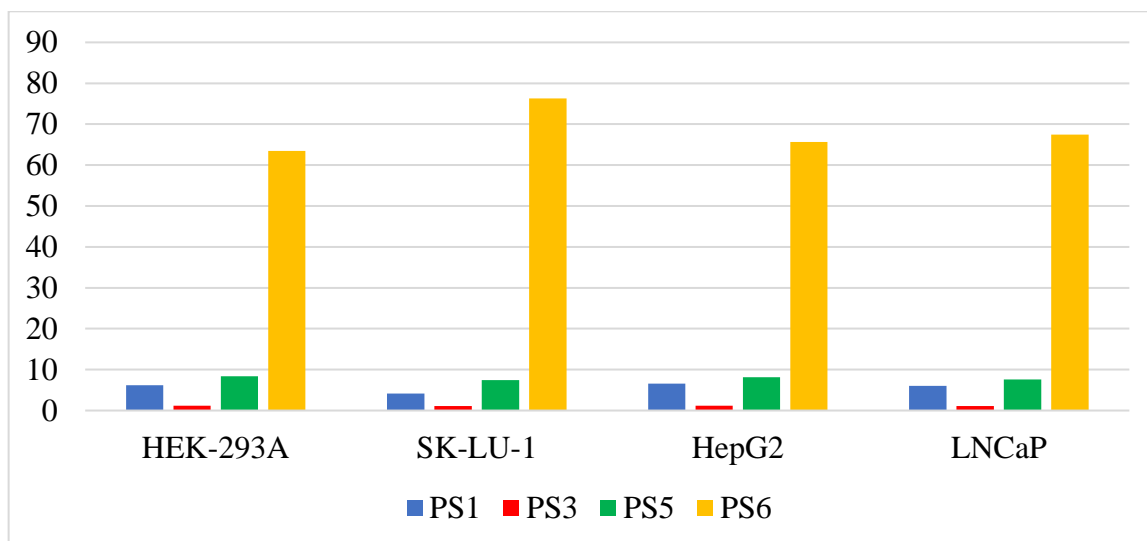
Kết quả IC<sub>50</sub> của các hợp chất sạch phân lập từ cao chiết Butanol của mẫu BLMH trên các dòng TBUT SK-LU-1, HepG2, LNCaP và tế bào thận gốc phôi ở người HEK-293A cho thấy năm hợp chất (**PS1-PS5**) có tác dụng gây độc mạnh hơn, hợp chất **PS6** cho tác dụng gây độc yếu hơn (Bảng 3.9).

**Bảng 3.9.** Kết quả đánh giá hoạt tính gây độc tế bào của các hợp chất phân lập được từ mẫu Bảy lá một hoa

Mẫu thử	IC <sub>50</sub> ( $\mu\text{M}$ )			
	HEK-293A	SK-LU-1	HepG2	LNCaP
PS1	6.17 $\pm$ 0.20	4.18 $\pm$ 0.15	6.61 $\pm$ 0.32	6.02 $\pm$ 0.11
PS2	1.21 $\pm$ 0.02	1.17 $\pm$ 0.02	1.20 $\pm$ 0.01	1.18 $\pm$ 0.01
PS3	1.14 $\pm$ 0.01	1.09 $\pm$ 0.01	1.15 $\pm$ 0.02	1.08 $\pm$ 0.02
PS4	10.64 $\pm$ 0.22	13.30 $\pm$ 0.84	23.64 $\pm$ 0.93	17.83 $\pm$ 1.20

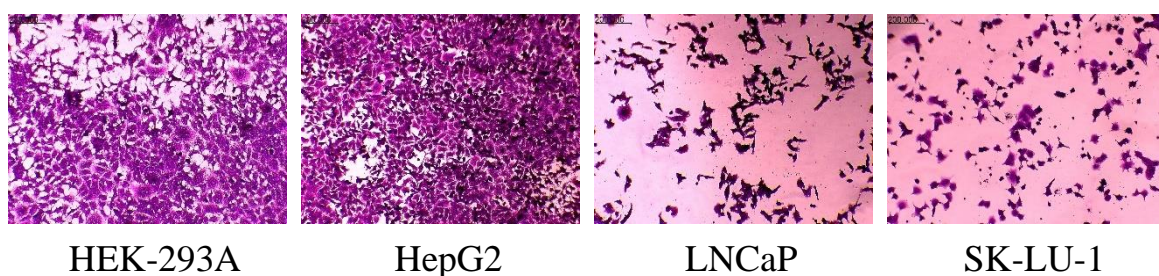
PS5	$8.37 \pm 0.34$	$7.40 \pm 0.31$	$8.12 \pm 0.32$	$7.59 \pm 0.13$
PS6	$63.48 \pm 3.53$	$76.32 \pm 3.34$	$65.68 \pm 2.10$	$67.46 \pm 1.89$

Kết quả trên cho thấy tất cả các mẫu thử nghiệm đều thể hiện hoạt tính ức chế sự phát triển của các dòng TBUT nghiên cứu với giá trị  $IC_{50}$  từ 1.08 – 76.32  $\mu$ M. Theo tiêu chuẩn của NCI, 2 hợp chất **PS2** và **PS3** có hoạt tính gây độc tế bào rất mạnh ( $IC_{50} \leq 5 \mu$ M).

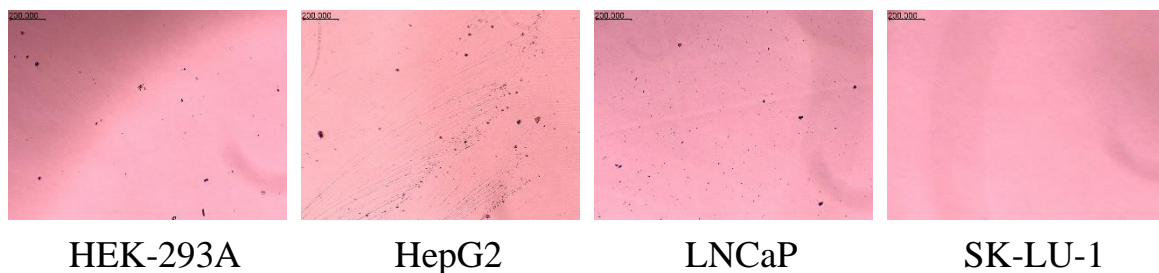


**Hình 3.15.** Khả năng gây độc tế bào của bốn hợp chất thuộc nhóm saponin pennogenin **PS1**, **PS3**, **PS5** và **PS6** thông qua giá trị  $IC_{50}$

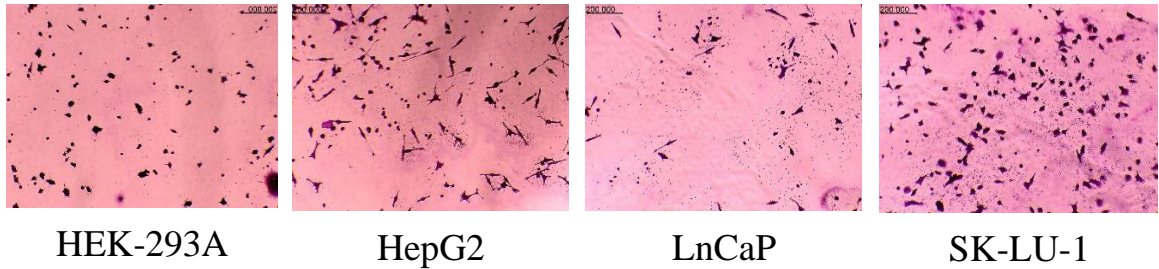
Biểu đồ trên cho thấy các hợp chất saponin pennogenin có từ 3 gốc đường trở lên (**PS1**, **PS3** và **PS5**) cho hoạt tính gây độc tế bào cao hơn rất nhiều.



**Hình 3.16.** Ảnh chụp 4 loại tế bào dưới tác dụng của **PS1** ở nồng độ 4  $\mu$ M.



**Hình 3.17.** Ảnh chụp 4 loại tế bào dưới tác dụng của **PS3** ở nồng độ 4  $\mu$ M.



**Hình 3.18.** Ảnh chụp 4 loại tế bào dưới tác dụng của **PS6** ở nồng độ  $100 \mu\text{M}$ .

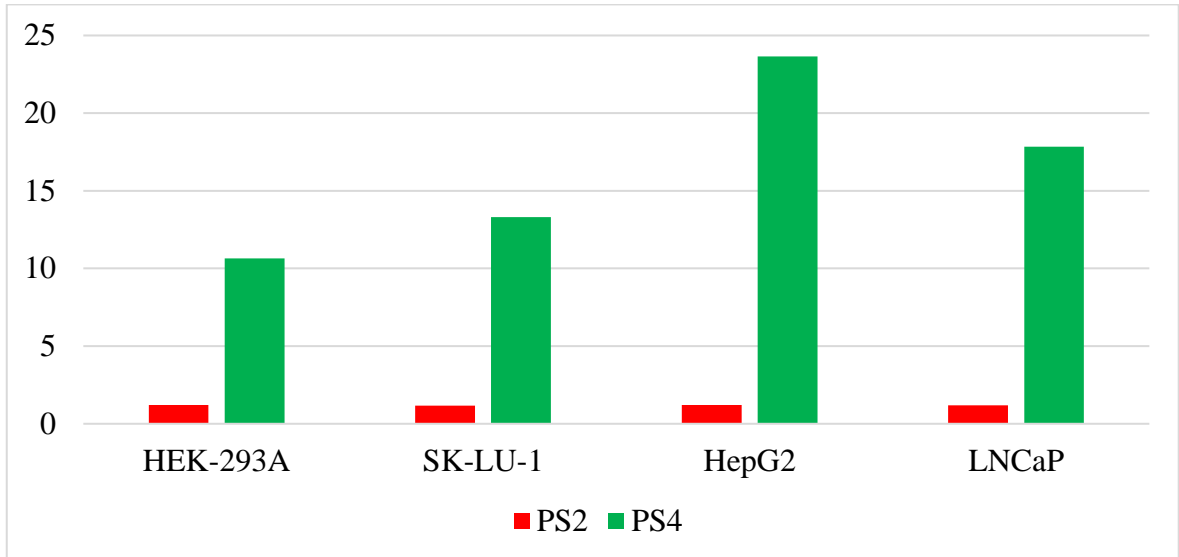
Trong các nghiên cứu trước đây, các hợp chất **PS1**, **PS3** và **PS5** đã được thử nghiệm tác dụng gây độc tế bào trên một số dòng TBUT.

Pennogenin 3-*O*- $\beta$ -D-glucopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 2)[*O*- $\alpha$ -L-rhamnopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 3)]- $\beta$ -D-glucopyranoside (hợp chất **PS1**) được phân lập lần đầu tiên từ thân rễ của *P. vietnamensis* (Takht.) H.Li. Saponin này thể hiện hoạt tính chống ung thư mạnh với giá trị  $\text{IC}_{50}$  dao động từ 0,5 đến 5,1 mg/mL trên các TBUT bạch cầu cấp tính ở người dòng HL-60. Mặt khác, phân tích sâu hơn trên tế bào L1210 chỉ ra rằng hợp chất này gây ra hiện tượng apoptosis phụ thuộc vào nồng độ và thời gian ( $\text{EC}_{50} = 5 \mu\text{M}$ ). Ngoài ra, nó cũng đã được phân lập từ *P. polyphylla* var. *yunnanensis*, cho thấy hoạt tính gây độc mạnh cho TBUT gan dòng HepG2 với giá trị  $\text{IC}_{50}$  là  $2.25 \mu\text{g/mL}$ , sử dụng hydroxycamptothecin làm đối chứng dương ( $\text{IC}_{50} = 2.15 \mu\text{g/mL}$ ) [71].

Một nghiên cứu năm 2012 chỉ ra rằng *P. fargesii* var. *brevipetala* (PFB) chứa thành phần chính là pennogenyl saponin và một lượng nhỏ saponin diosgenin. Tổng hàm lượng saponin phát hiện trong PFB dao động từ 9.12 mg/g đến 85.33 mg/g. Ngoài ra, paris saponin H (hợp chất **PS3**), saponin chiếm ưu thế của PFB (>50%), đã được đánh giá hoạt tính gây độc tế bào *in vitro* trên các dòng tế bào HepG2, A549, RPE và L929 với đối chứng dương Cisplatin. PSH cho thấy hoạt tính gây độc tế bào đáng chú ý trên các tế bào A549 với giá trị  $\text{IC}_{50}$  là  $1.53 \pm 0.08 \mu\text{g/mL}$  Ngoài ra trên tế bào HepG2, giá trị  $\text{IC}_{50}$  là  $5.93 \pm 0.22 \mu\text{g/mL}$  [72].

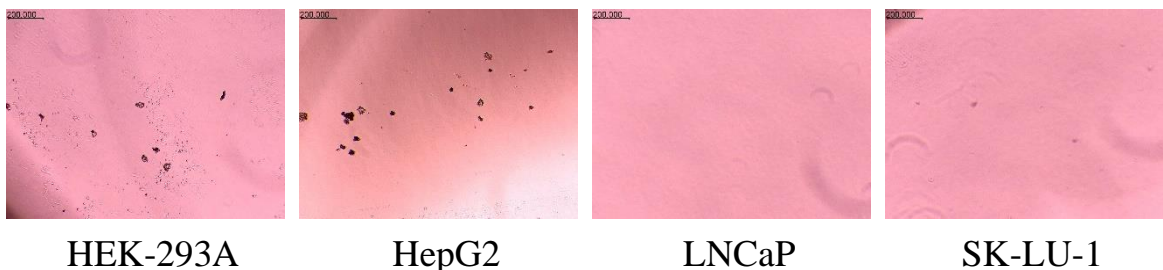
Paris saponin VII (PSVII) (hợp chất **PS5**), còn được gọi là Chonglou saponin VII, là một saponin steroid được phân lập từ thân rễ của *P. polyphylla* [73]. PSVII đã được báo cáo là có tác dụng ngăn chặn sự phát triển của một số loại ung thư như ung thư đại trực tràng [74], ung thư cổ tử cung [75], ung thư phổi [76], ung thư xương ác tính [77]. Năm 2021, Ying Liu và cộng sự đã

ngiên cứu tác động của PSVII lên TBUT vú ở người và các cơ chế chống ung thư của nó. Các nhà nghiên cứu đã chứng minh rằng nồng độ PSVII ức chế sự tăng sinh của các dòng tế bào MDA-MB-231, MDA-MB-436 và MCF-7 với các giá trị  $IC_{50}$  lần lượt là 3.16, 3.45 và 2.86  $\mu$ M [78].



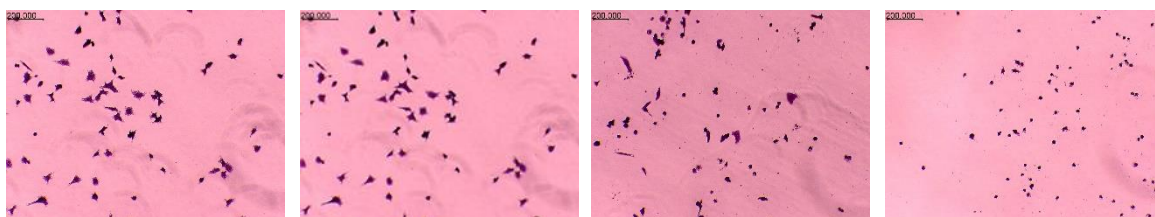
**Hình 3.19.** Khả năng gây độc tế bào của hai hợp chất **PS2** và **PS4** thông qua giá trị  $IC_{50}$

Biểu đồ so sánh khả năng gây độc bốn dòng tế bào của hai hợp chất (Hình 3.19) đã chỉ ra rằng hợp chất **PS2** có hoạt tính mạnh hơn rất nhiều lần hợp chất **PS4**. Kết quả này tương đồng với một nghiên cứu của Ke Hu và cộng sự vào năm 2003 trên nhiều loại TBUT ở người (bệnh bạch cầu, ung thư buồng trứng, ung thư thận, ung thư vú,...) [53]. Điều này chứng tỏ, vòng F rất quan trọng đối với tính chọn lọc giữa saponin spirostanol (**PS2**) và saponin furostanol (**PS4**).



**Hình 3.20.** Ảnh chụp 4 loại tế bào dưới tác dụng của **PS2** ở nồng độ 20  $\mu$ M.





HEK-293A

HepG2

LNCaP

SK-LU-1

**Hình 3.21.** Ảnh chụp 4 loại tế bào dưới tác dụng của **PS4** ở nồng độ  $20 \mu\text{M}$ .

Tham khảo các nghiên cứu trước đây, năm 2019, gracillin (hợp chất **PS2**) - một saponin steroid được tìm thấy trong mẫu thân rễ của cả 2 thứ *P. polyphylla* var. *yunnanensis* và *P. polyphylla* var. *chinensis* đã được thử nghiệm và xác nhận là có khả năng ức chế sự phát triển của nhiều loại TBUT ở người, bao gồm cả những dòng mang tính kháng hóa trị hoặc thuốc nhắm mục tiêu EGFR, bằng cách gây ra apoptosis. Cụ thể là các dòng TBUT khác nhau có nguồn gốc từ phổi hoặc các cơ quan khác như tuyến tiền liệt: DU145, LNCaP, PC3; hầu họng: FADU; đại trực tràng: HCT-15, HCT116, HT-29, LS174T, RKO; gan: Huh7, Hep3B, và các TBUT mang khả năng kháng thuốc hóa trị paclitaxel (H226B/R, H460/R, SK-MES-1/R và DU145/R), thuốc nhắm mục tiêu EGFR gefitinib (PC9/GR), hoặc erlotinib (PC9/ER). Các nhà nghiên cứu đã chứng minh rằng gracillin làm suy giảm hoạt động liên quan đến sự sản sinh năng lượng trong tế bào qua trung gian ty thể bằng cách ngăn chặn quá trình tổng hợp ATP và tạo ra các loại oxy phản ứng ROS. Cũng trong nghiên cứu đó, gracillin cho thấy khả năng ngăn chặn một cách hiệu quả quá trình hình thành khối u phổi do đột biến gen KRAS và sự phát triển của các khối u xenograft có nguồn gốc từ các dòng tế bào hoặc mô của bệnh nhân. Gracillin không gây biểu hiện đặc điểm sinh lý bệnh rõ ràng nào ở chuột. Do đó, gracillin có tiềm năng trở thành thuốc chống ung thư nhắm mục tiêu phức hợp II [79].

Như vậy tổng kết lại, phần cao chiết BuOH của mẫu BLMH thu được tại Bắc Kạn rất giàu các saponin có hoạt tính gây độc TBUT rất tốt, nên cao BuOH có hoạt tính ức chế sự phát triển của bốn dòng tế bào mạnh nhất trong 4 loại cao chiết từ mẫu BLMH được nghiên cứu.

## KẾT LUẬN VÀ KIẾN NGHỊ

### KẾT LUẬN

1. Đã sàng lọc các hoạt tính ức chế NO định hướng kháng viêm và gây độc tế bào từ các cao chiết của loài Bảy lá một hoa thu ở xã Bình Văn, huyện Chợ Mới, tỉnh Bắc Kạn.

- Cao chiết MeOH có hoạt tính ức chế sản sinh NO mạnh hơn so với cao H<sub>2</sub>O, hai cao chiết EtOAc và cao chiết BuOH chưa thể hiện hoạt tính ở các nồng độ thử nghiệm.

- Cao chiết BuOH có hoạt tính ức chế sự phát triển của bốn dòng tế bào mạnh hơn cao chiết MeOH và cao chiết EtOAc, cao chiết H<sub>2</sub>O chưa thể hiện hoạt tính ở các nồng độ thử nghiệm.

2. Đã phân lập và xác định cấu trúc hóa học của sáu hợp chất phân lập được từ mẫu Bảy lá một hoa: pennogenin 3-*O*-β-D-glucopyranosyl-(1→2)[*O*-α-L-rhamnopyranosyl-(1→3)]-β-D-glucopyranoside (**PS1**), gracillin (**PS2**), paris saponin H (**PS3**), methyl protogracillin (**PS4**), paris saponin VII (**PS5**), pennogenin-3-*O*-α-L-arabinosyl-(1→4)-β-D-glucopyranoside (**PS6**).

3. Đã đánh giá hoạt tính ức chế sản sinh NO của một số hợp chất phân lập được từ mẫu Bảy lá một hoa.

- Hai hợp chất methyl protogracillin (**PS4**) và pennogenin-3-*O*-α-L-arabinosyl-(1→4)-β-D-glucopyranoside (**PS6**) có tác dụng ức chế yếu sự sản sinh NO trong tế bào RAW 264.7 kích thích bởi LPS với giá trị IC<sub>50</sub> lần lượt là 77.39 ± 2.15 và 78.45 ± 2.83 μM.

4. Đã đánh giá hoạt tính gây độc tế bào trên dòng tế bào ung thư SK-LU-1, HepG2, LNCaP của một số hợp chất phân lập được từ mẫu Bảy lá một hoa.

- Tất cả các mẫu thử nghiệm đều thể hiện hoạt tính ức chế sự phát triển của các dòng tế bào ung thư nghiên cứu với giá trị IC<sub>50</sub> từ 1.08 – 76.32 μM. Trong đó, hai hợp chất gracillin (**PS2**), paris saponin H (**PS3**) thể hiện hoạt tính gây độc tế bào ung thư rất mạnh. Tiếp đó, ba hợp chất pennogenin 3-*O*-β-D-glucopyranosyl-(1→2)[*O*-α-L-rhamnopyranosyl-(1→3)]-β-D-glucopyranoside (**PS1**), methyl protogracillin (**PS4**), paris saponin VII (**PS5**) thể hiện hoạt tính gây độc đáng kể. Cuối cùng, hợp chất pennogenin-3-*O*-α-L-arabinosyl-

(1→4)- $\beta$ -D-glucopyranoside (**PS6**) cho thấy khả năng gây độc tế bào trung bình yếu.

## **KIẾN NGHỊ**

Từ các kết quả nghiên cứu thu được trong đề tài, tác giả kiến nghị:

- Hai hợp chất gracillin (**PS2**) và paris saponin H (**PS3**) cho thấy khả năng ức chế rất mạnh sự phát triển của tế bào ung thư (SK-LU-1, HepG2, LNCaP), tuy nhiên, hai hợp chất này đồng thời cũng tiêu diệt cả tế bào thường (HEK-293A). Vì vậy, cần có những nghiên cứu sâu hơn về việc kết hợp với các chất mang (VD: liposome, ...) để hoạt chất tác động hướng đích vào tế bào ung thư nhằm định hướng ứng dụng lâm sàng.

- Qua quá trình phân lập, nhận thấy mẫu Bảy lá một hoa thu được tại xã Bình Văn, huyện Chợ Mới, tỉnh Bắc Kạn có hàm lượng saponin cao tập trung ở phần cao chiết Butanol, các saponin có hoạt tính gây độc tế bào ung thư rất tốt chiếm ưu thế. Cần có nghiên cứu định lượng (có thể sử dụng hệ thống sắc ký lỏng hiệu năng cao – HPLC, ...) và định danh loài chính xác để xây dựng kế hoạch bảo tồn và phát triển vùng trồng nguồn dược liệu này.

**TÀI LIỆU THAM KHẢO**

1. Balkwill F., Mantovani A., 2001, Inflammation and cancer: back to Virchow? *The lancet*. 357(9255): pp. 539-545.
2. Wild C., Weiderpass E., Stewart B.W., *World cancer report: cancer research for cancer prevention*. 2020: International Agency for Research on Cancer.
3. Arends J., 2010, Metabolism in cancer patients. *Anticancer research*. 30(5): pp. 1863-1868.
4. Kumar R., Chaudhary K., Gupta S., Singh H., Kumar S., Gautam A., Kapoor P., Raghava G.P., 2013, CancerDR: cancer drug resistance database. *Scientific reports*. 3(1): pp. 1445.
5. Võ Văn Chi, *Từ điển cây thuốc Việt Nam*. 2012, Thành phố Hồ Chí Minh: Tập 1, 2, Nhà xuất bản Y học.
6. Đỗ Huy Bích và các tác giả, *Danh lục cây thuốc Việt Nam*. 2016, Hà Nội: Nhà xuất bản Khoa học và Kỹ thuật.
7. Wang J., Li D., Ni W., Qin X.J., Liu H., Yu L.L., Qiao X., Ji Y.H., He L., Nian S.H., 2020, Molecular networking uncovers steroidal saponins of Paris tengchongensis. *Fitoterapia*. 145: pp. 104629.
8. Wang Y., Gao W., Liu X., Zuo Y., Chen H., Duan H., 2006, Anti-tumor constituents from Paris polyphylla. *Asian J Tradit Med*. 1(1): pp. 7-10.
9. Qin X.J., Sun D.J., Ni W., Chen C.X., Hua Y., He L., Liu H.Y., 2012, Steroidal saponins with antimicrobial activity from stems and leaves of Paris polyphylla var. yunnanensis. *Steroids*. 77(12): pp. 1242-1248.
10. Wang Y.Z., Li P., 2018, Effect of cultivation years on saponins in Paris Polyphylla var. yunnanensis using ultra-high liquid chromatography–tandem mass spectrometry and Fourier transform infrared spectroscopy. *Plant Growth Regulation*. 84: pp. 373-381.
11. Hwang S.J., Lin H.C., Chang C.F., Lee F.Y., Lu C.W., Hsia H.C., Wang S.S., Lee S.D., Tsai Y.T., Lo K.J., 1992, A randomized controlled trial

- comparing octreotide and vasopressin in the control of acute esophageal variceal bleeding. *Journal of hepatology*. 16(3): pp. 320-325.
12. Đỗ Thị Thảo Đ.T.P., Nguyễn Thị Cúc, Nguyễn Thị Nga, Triệu Hà Phương, *Giới thiệu một số thử nghiệm sinh học sử dụng tế bào động vật nuôi cấy in vitro để nghiên cứu các hoạt tính tiềm năng*. 2021, Nhà xuất bản Khoa học tự nhiên và Công nghệ.
  13. Guzik T., Korbut R., Adamek-Guzik T., 2003, Nitric oxide and superoxide in inflammation. *J physiol pharmacol*. 54(4): pp. 469-487.
  14. Sharma S., Hashmi M., Alhajjaj M., 2021, StatPearls [Internet] StatPearls Publishing. *Treasure Island* : Aug. 4.
  15. Germolec D.R., Shipkowski K.A., Frawley R.P., Evans E., protocols, 2018, Markers of inflammation. *Immunotoxicity testing: Methods*: pp. 57-79.
  16. Hannoodee S., Nasuruddin D.N., 2020, Acute inflammatory response.
  17. Hanahan D., Weinberg R.A., 2011, Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*. 144(5): pp. 646-674.
  18. Nagatoshi F., Kazuo K., 2005, Macrophages in inflammation. *Current Drug Targets-Inflammation Allergy*. 4(3): pp. 281-286.
  19. Groweiss A., Shmueli U., Kashman Y., 1983, Marine toxins of *Latrunculia magnifica*. *The Journal of Organic Chemistry*. 48(20): pp. 3512-3516.
  20. Perry N.B., Blunt J.W., McCombs J.D., Munro M.H., 1986, Discorhabdin C, a highly cytotoxic pigment from a sponge of the genus *Latrunculia*. *The Journal of Organic Chemistry*. 51(26): pp. 5476-5478.
  21. Ford J., Capon R.J., 2000, Discorhabdin R: a new antibacterial pyrroloiminoquinone from two latrunculiid marine sponges, *Latrunculia* sp. and *Negombata* sp. *Journal of Natural Products*. 63(11): pp. 1527-1528.
  22. Taciak B., Białasek M., Braniewska A., Sas Z., Sawicka P., Kiraga Ł., Rygiel T., Król M., 2018, Evaluation of phenotypic and functional

- stability of RAW 264.7 cell line through serial passages. *PloS one*. 13(6): pp. e0198943.
23. Meng F., Lowell C.A., 1997, Lipopolysaccharide (LPS)-induced macrophage activation and signal transduction in the absence of Src-family kinases Hck, Fgr, and Lyn. *The Journal of experimental medicine*. 185(9): pp. 1661-1670.
  24. Leath C., Kendrick J., Numnum T., Straughn J., Rocconi R., Sfakianos G., Lang J., 2006, Outcomes of gynecologic oncology patients admitted to the intensive care unit following surgery: a university teaching hospital experience. *International Journal of Gynecologic Cancer*. 16(5).
  25. Jain S., Dwivedi J., Jain P.K., Satpathy S., Patra A., 2016, Medicinal plants for treatment of cancer: A brief review. *Pharmacognosy Journal*. 8(2).
  26. Hurt J., Richardson D., Seamon L., Fowler J., Copeland L.J., Cohn D., Eisenhauer E., Salani R., O'Malley D.M., 2009, Sustained progression-free survival with weekly paclitaxel and bevacizumab in recurrent ovarian cancer. *Gynecologic oncology*. 115(3): pp. 396-400.
  27. Teicher B.A., *Anticancer drug development guide: preclinical screening, clinical trials, and approval*. 2013: Springer Science & Business Media.
  28. Freshney R.I., *Culture of animal cells: a manual of basic technique*. Springer.
  29. Masters J.R., Palsson B., *Cancer Cell Lines Part 1: Cancer Cell Lines*. Vol. 1. 1999: Springer Science & Business Media.
  30. Mosmann T., 1983, Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of immunological methods*. 65(1-2): pp. 55-63.
  31. Đỗ T.L., *Những cây thuốc và vị thuốc Việt Nam*. 2013: Hồng Đức.

32. Ji Y., *A monograph of Paris (Melanthiaceae): Morphology, biology, systematics and taxonomy*. 2020: Springer Nature.
33. Ji Y., Fritsch P.W., Li H., Xiao T., Zhou Z., 2006, Phylogeny and classification of Paris (Melanthiaceae) inferred from DNA sequence data. *Annals of botany*. 98(1): pp. 245-256.
34. Nga N.Q., Huyen P.T., Van Truong P., Van Toan H., 2016, Taxonomy of the genus Paris L.(Melanthiaceae) in Vietnam. *Academia Journal of Biology*. 38(3): pp. 333-339.
35. Gupta D.D., Mishra S., Verma S.S., Shekher A., Rai V., Awasthee N., Das T.J., Paul D., Das S.K., Tag H., 2021, Evaluation of antioxidant, anti-inflammatory and anticancer activities of diosgenin enriched Paris polyphylla rhizome extract of Indian Himalayan landraces. *Journal of Ethnopharmacology*. 270: pp. 113842.
36. Zhang J.Y., Wang Y.Z., Zhao Y.L., Yang S.B., Zuo Z.T., Yang M.Q., Zhang J., Yang W.Z., Yang T.-M., Jin H., 2011, Phytochemicals and bioactivities of Paris species. *Journal of Asian Natural Products Research*. 13(7): pp. 670-681.
37. Ding Y.G., Zhao Y.L., Zhang J., Zuo Z.T., Zhang Q.Z., Wang Y.Z., 2021, The traditional uses, phytochemistry, and pharmacological properties of Paris L.(Liliaceae): A review. *Journal of Ethnopharmacology*. 278: pp. 114293.
38. Nguyen T., Nguyen Q., Tran N., Nguyen T., Ninh T., Doan T., Le T., Nguyen N., 2018, Morphological Characteristics and DNA Barcodes of Paris vietnamensis (Takht.) H. Li in Vietnam. *Vietnam Journal of Agricultural Sciences*. 16: pp. 282-289.
39. Wei J.C., Gao W.Y., Yan X.D., Wang Y., Jing S.S., Xiao P.G., 2014, Chemical constituents of plants from the genus Paris. *Chemistry biodiversity*. 11(9): pp. 1277-1297.
40. Liu Y., Bi Y., Bai J.T., Wang S.Y., Wu J.T., Jiang Y.K., Jiang P., Pan J., Guan W., Kuang H.X., 2024, Steroidal saponins from the roots of Paris

verticillata and their anti-proliferative and anti-inflammatory activities. *Phytochemistry*. 218: pp. 113941.

41. Kim K.H., Lee K.H., Kim H.K., Moon E., Kim S.H., Kim S.Y., Kim K.R., Lee K.R., 2011, Antineuroinflammatory constituents from the root extract of *Paris verticillata*. *Canadian Journal of Chemistry*. 89(4): pp. 441-445.
42. Su C., Wei S., 1983, Study of antitumor effect of total saponins and polysaccharides from *Paris yunnanensis*. *J Dalian Med Univ*. 5: pp. 1.
43. Li Y., Gu J.F., Zou X., Wu J., Zhang M.H., Jiang J., Qin D., Zhou J.Y., Liu B.X.Z., Zhu Y.T., 2013, The anti-lung cancer activities of steroidal saponins of *P. polyphylla* Smith var. *chinensis* (Franch.) Hara through enhanced immunostimulation in experimental Lewis tumor-bearing C57BL/6 mice and induction of apoptosis in the A549 cell line. *Molecules*. 18(10): pp. 12916-12936.
44. Mimaki Y., Kuroda M., Obata Y., Sashida Y., Kitahara M., Yasuda A., Naoi N., Xu Z.W., Li M.R., Lao A.N., 2000, Steroidal saponins from the rhizomes of *Paris polyphylla* var. *chinensis* and their cytotoxic activity on HL-60 cells. *Natural Product Letters*. 14(5): pp. 357-364.
45. Duyen N.T., Vinh L.B., Phong N.V., Khoi N.M., Long P.Q., Hien T.T., Dat N.T., Lee K.Y., 2022, Steroid glycosides isolated from *Paris polyphylla* var. *chinensis* aerial parts and paris saponin II induces G1/S-phase MCF-7 cell cycle arrest. *Carbohydrate Research*. 519: pp. 108613.
46. Yin H., Zhang H., 2010, Resource survey and pharmacognosy research on Yi medicine" MaBu. *Chin J Ethnomed Ethnopharm*. 19: pp. 17.
47. Li F.R., Jiao P., Yao S.T., Sang H., Qin S.C., Zhang W., Zhang Y.B., Gao L.L., 2012, *Paris polyphylla* Smith extract induces apoptosis and activates cancer suppressor gene connexin26 expression. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*. 13(1): pp. 205-209.
48. Liu M.J., Wang Z., Ju Y., Zhou J.b., Wang Y., Wong R.N.S., 2004, The mitotic-arresting and apoptosis-inducing effects of diosgenyl saponins



- on human leukemia cell lines. *Biological Pharmaceutical Bulletin*. 27(7): pp. 1059-1065.
49. Wang Z., Zhou J., Ju Y., ZHANG H., LIU M., LI X., 2001, Effects of two saponins extracted from the polygonatum Zanlanscianense pamp on the human leukemia (HL-60) cells. *Biological Pharmaceutical Bulletin*. 24(2): pp. 159-162.
  50. Zhang W., Zhang D., Ma X., Liu Z., Li F., Wu D., 2014, Paris saponin VII suppressed the growth of human cervical cancer Hela cells. *European journal of medical research*. 19(1): pp. 1-7.
  51. Huang X., Gao W., Man S., Gao Y., Huang L., Liu C., 2010, Structure-activity relationship study of twelve compounds from Paris polyphylla Smith var. pubescens. *Latin American Journal of Pharmacy*. 29.
  52. Zhang Chao Z.C., Jia XueJing J.X., Bao JiaoLin B.J., Chen ShengHui C.S., Wang Kai W.K., Zhang YuLin Z.Y., Li Peng L.P., Wan JianBo W.J., Su HuanXing S.H., Wang YiTao W.Y., 2016, Polyphyllin VII induces apoptosis in HepG2 cells through ROS-mediated mitochondrial dysfunction and MAPK pathways.
  53. Hu K., Yao X., 2003, The cytotoxicity of methyl protoneogracillin (NSC-698793) and gracillin (NSC-698787), two steroidal saponins from the rhizomes of Dioscorea collettii var. hypoglauca, against human cancer cells in vitro. *Phytotherapy Research*. 17(6): pp. 620-626.
  54. Lee J.C., Su C.L., Chen L.L., Won S.J., 2009, Formosanin C-induced apoptosis requires activation of caspase-2 and change of mitochondrial membrane potential. *Cancer science*. 100(3): pp. 503-513.
  55. Man S., Gao W., Zhang Y., Liu Z., Yan L., Huang L., Liu C., Therapy, 2011, Formosanin C-inhibited pulmonary metastasis through repression of matrix metalloproteinases on mouse lung adenocarcinoma. *Cancer Biology*. 11(6): pp. 592-598.
  56. Phụng N.K.P., *Phương pháp cô lập hợp chất hữu cơ*. 2007.
  57. Cheenpracha S., Park E.J., Rostama B., Pezzuto J.M., Chang L.C., 2010, Inhibition of nitric oxide (NO) production in lipopolysaccharide (LPS)-

- activated murine macrophage RAW 264.7 cells by the norsesiterpene peroxide, epimuqubilin A. *Marine drugs*. 8(3): pp. 429-437.
58. Skehan P., Storeng R., Scudiero D., Monks A., McMahon J., Vistica D., Warren J.T., Bokesch H., Kenney S., Boyd M.R., 1990, New colorimetric cytotoxicity assay for anticancer-drug screening. *JNCI: Journal of the National Cancer Institute*. 82(13): pp. 1107-1112.
59. Shoemaker R.H., Scudiero D.A., Melillo G., Currens M.J., Monks A.P., Rabow A.A., Covell D.G., Sausville E.A., 2002, Application of high-throughput, molecular-targeted screening to anticancer drug discovery. *Current topics in medicinal chemistry*. 2(3): pp. 229-246.
60. Monks A., Scudiero D., Skehan P., Shoemaker R., Paull K., Vistica D., Hose C., Langley J., Cronise P., Vaigro-Wolff A., 1991, Feasibility of a high-flux anticancer drug screen using a diverse panel of cultured human tumor cell lines. *JNCI: Journal of the National Cancer Institute*. 83(11): pp. 757-766.
61. Hughes J.P., Rees S., Kalindjian S.B., Philpott K.L., 2011, Principles of early drug discovery. *British journal of pharmacology*. 162(6): pp. 1239-1249.
62. Alley M.C., Scudiero D.A., Monks A., Hursey M.L., Czerwinski M.J., Fine D.L., Abbott B.J., Mayo J.G., Shoemaker R.H., Boyd M.R., 1988, Feasibility of drug screening with panels of human tumor cell lines using a microculture tetrazolium assay. *Cancer research*. 48(3): pp. 589-601.
63. Sharma J., Al-Omran A., Parvathy S., 2007, Role of nitric oxide in inflammatory diseases. *Inflammopharmacology*. 15: pp. 252-259.
64. Gaestel M., Kotlyarov A., Kracht M., 2009, Targeting innate immunity protein kinase signalling in inflammation. *Nature Reviews Drug Discovery*. 8(6): pp. 480-499.
65. Lâm B.T., Lý H.T., Nguyễn V.T., Lê V.M., Nguyễn N.M., 2021, So sánh hàm lượng saponin, hoạt tính kháng khuẩn và độc tế bào ung thư của loài bầy lá một hoa (*Paris polyphylla* Var. *Yunnanensis*) ở Kon Tum và bầy lá

một hoa (*Paris polyphylla* Var. *Chinensis*) ở phía bắc, Việt Nam. *Tạp chí Y học TP. Hồ Chí Minh*.

66. Chen Y.S., He Y., Chen C., Zeng Y., Xue D., Wen F.Y., Wang L., Zhang H., Du J.R., 2014, Growth inhibition by pennogenyl saponins from *Rhizoma paridis* on hepatoma xenografts in nude mice. *Steroids*. 83: pp. 39-44.
67. Shim S.H., Lee S.Y., Kim J.S., Son K.H., Kang S.S., 2005, Norditerpenoid alkaloids and other components from the processed tubers of *Aconitum carmichaeli*. *Archives of pharmacal research*. 28: pp. 1239-1243.
68. Miyamura M., Nakano K., Nohara T., Tomimatsu T., Kawasaki T., 1982, Steroid saponins from *Paris polyphylla* Sm.-supplement. *Chemical Pharmaceutical Bulletin*. 30(2): pp. 712-718.
69. Hu K., Dong A., Yao X., Kobayashi H., Iwasaki S., 1997, Antineoplastic agents II: four furostanol glycosides from rhizomes of *Dioscorea collettii* var. *hypoglauca*. *Planta medica*. 63(02): pp. 161-165.
70. Zhang Y., Yu H.Y., Chao L.P., Qu L., Ruan J.Y., Liu Y.X., Dong Y.Z., Han L.F., Wang T., 2016, Anti-inflammatory steroids from the rhizomes of *Dioscorea septemloba* Thunb. *Steroids*. 112: pp. 95-102.
71. Luo X.F., Lei F., He Y., Pei S.C., Hai L., Qian S., Wu Y., 2012, The synthesis of pennogenin 3-O- $\beta$ -d-glucopyranosyl-(1 $\rightarrow$  3)-[ $\alpha$ -l-rhamnopyranosyl-(1 $\rightarrow$  2)]- $\beta$ -d-glucopyranoside. *Journal of Asian natural products research*. 14(4): pp. 314-321.
72. Wen F., Yin H., Chen C., Liu X., Xue D., Chen T., He J., Zhang H., 2012, Chemical characteristics of saponins from *Paris fargesii* var. *brevipetala* and cytotoxic activity of its main ingredient, paris saponin H. *Fitoterapia*. 83(4): pp. 627-635.
73. Tang G.E., Niu Y.X., Li Y., Wu C.Y., Wang X.Y., Zhang J., 2020, Paris saponin VII enhanced the sensitivity of HepG2/ADR cells to ADR via modulation of PI3K/AKT/MAPK signaling pathway. *The Kaohsiung Journal of Medical Sciences*. 36(2): pp. 98-106.

74. Li Y., Sun Y., Fan L., Zhang F., Meng J., Han J., Guo X., Zhang D., Zhang R., Yue Z., 2014, Paris saponin VII inhibits growth of colorectal cancer cells through Ras signaling pathway. *Biochemical pharmacology*. 88(2): pp. 150-157.
75. Zhang W., Zhang D., Ma X., Liu Z., Li F., Wu D.J.E.j.o.m.r., 2014, Paris saponin VII suppressed the growth of human cervical cancer Hela cells. 19: pp. 1-7.
76. Fan L., Li Y., Sun Y., Han J., Yue Z., Meng J., Zhang X., Zhang F., Mei Q., 2015, Paris saponin VII inhibits the migration and invasion in human A549 lung cancer cells. *Phytotherapy Research*. 29(9): pp. 1366-1372.
77. Cheng G., Gao F., Sun X., Bi H., Zhu Y., 2016, Paris saponin VII suppresses osteosarcoma cell migration and invasion by inhibiting MMP-2/9 production via the p38 MAPK signaling pathway. *Molecular Medicine Reports*. 14(4): pp. 3199-3205.
78. Xiang Y.c., Peng P., Liu X.w., Jin X., Shen J., Zhang T., Zhang L., Wan F., Ren Y.l., Yu Q.q., 2022, Paris saponin VII, a Hippo pathway activator, induces autophagy and exhibits therapeutic potential against human breast cancer cells. *Acta Pharmacologica Sinica*. 43(6): pp. 1568-1580.
79. Min H.Y., Jang H.J., Park K.H., Hyun S.Y., Park S.J., Kim J.H., Son J., Kang S.S., Lee H.Y., disease, 2019, The natural compound gracillin exerts potent antitumor activity by targeting mitochondrial complex II. *Cell death*. 10(11): pp. 810.



**PHỤ LỤC**

<b>I. Phụ lục phổ hợp chất PS1 .....</b>	<b>PL3</b>
I.1.    Phổ $^1\text{H-NMR}$ của hợp chất <b>PS1</b> .....	<b>PL3</b>
I.2.    Phổ $^{13}\text{C-NMR}$ của hợp chất <b>PS1</b> .....	<b>PL3</b>
I.3.    Phổ HMBC của hợp chất <b>PS1</b> .....	<b>PL4</b>
I.4.    Phổ HSQC của hợp chất <b>PS1</b> .....	<b>PL4</b>
<b>II. Phụ lục phổ hợp chất PS2 .....</b>	<b>PL5</b>
II.1.   Phổ $^1\text{H-NMR}$ của hợp chất <b>PS2</b> .....	<b>PL5</b>
II.2.   Phổ $^{13}\text{C-NMR}$ của hợp chất <b>PS2</b> .....	<b>PL5</b>
II.3.   Phổ HMBC của hợp chất <b>PS2</b> .....	<b>PL6</b>
II.4.   Phổ HSQC của hợp chất <b>PS2</b> .....	<b>PL6</b>
<b>III. Phụ lục phổ hợp chất PS3 .....</b>	<b>PL7</b>
III.1.  Phổ $^1\text{H-NMR}$ của hợp chất <b>PS3</b> .....	<b>PL7</b>
III.2.  Phổ $^{13}\text{C-NMR}$ của hợp chất <b>PS3</b> .....	<b>PL7</b>
III.3.  Phổ HMBC của hợp chất <b>PS3</b> .....	<b>PL8</b>
III.4.  Phổ HSQC của hợp chất <b>PS3</b> .....	<b>PL8</b>
<b>IV. Phụ lục phổ hợp chất PS4 .....</b>	<b>PL9</b>
IV.1.  Phổ $^1\text{H-NMR}$ của hợp chất <b>PS4</b> .....	<b>PL9</b>
IV.2.  Phổ $^{13}\text{C-NMR}$ của hợp chất <b>PS4</b> .....	<b>PL9</b>
IV.3.  Phổ HMBC của hợp chất <b>PS4</b> .....	<b>PL10</b>
IV.4.  Phổ HSQC của hợp chất <b>PS4</b> .....	<b>PL10</b>
<b>V. Phụ lục phổ hợp chất PS5 .....</b>	<b>PL11</b>
V.1.  Phổ $^1\text{H-NMR}$ của hợp chất <b>PS5</b> .....	<b>PL11</b>
V.2.  Phổ $^{13}\text{C-NMR}$ của hợp chất <b>PS5</b> .....	<b>PL11</b>
<b>VI. Phụ lục phổ hợp chất PS6 .....</b>	<b>PL12</b>
VI.1.  Phổ $^1\text{H-NMR}$ của hợp chất <b>PS6</b> .....	<b>PL12</b>
VI.2.  Phổ $^{13}\text{C-NMR}$ của hợp chất <b>PS6</b> .....	<b>PL12</b>

VI.3. Phổ HMBC của hợp chất **PS6**..... **PL13**

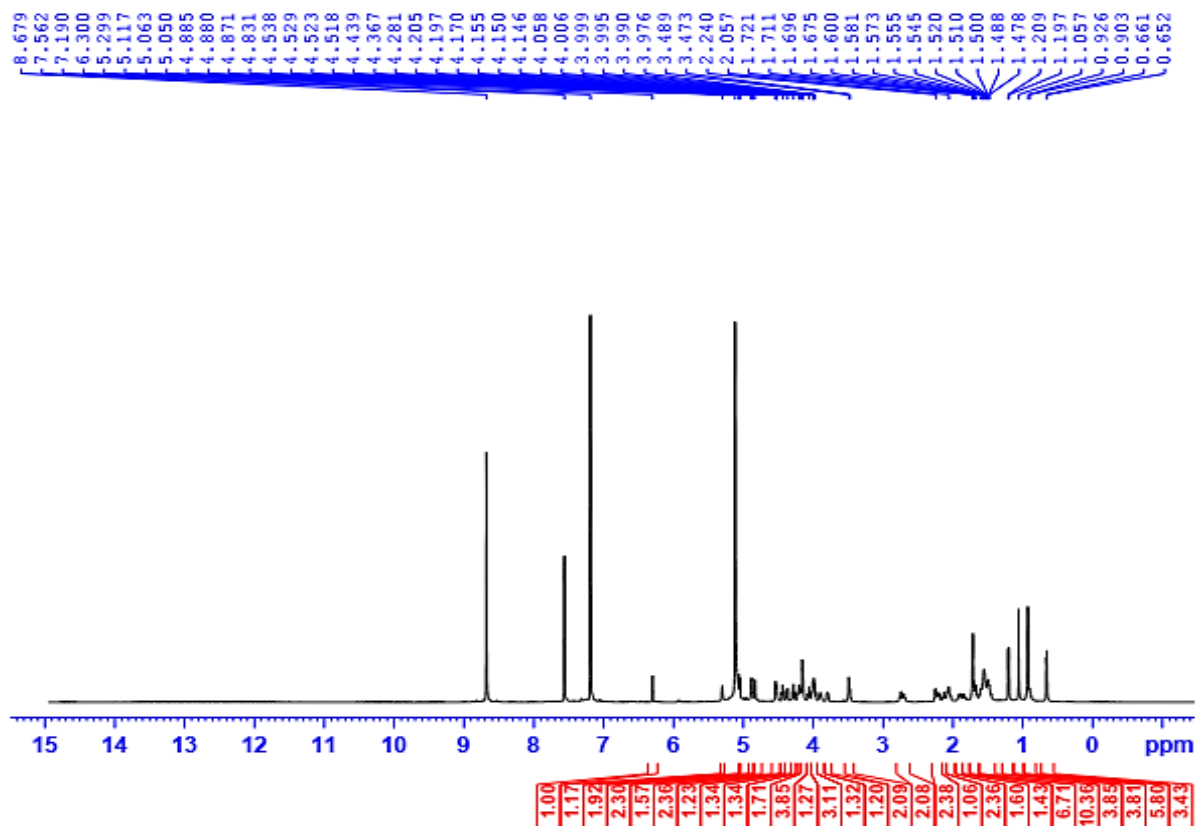
VI.4. Phổ HSQC của hợp chất **PS6**..... **PL13**

**VII. Phụ lục kết quả thử nghiệm hoạt tính ức chế sản sinh Nitric Oxide (NO) ..... PL14**

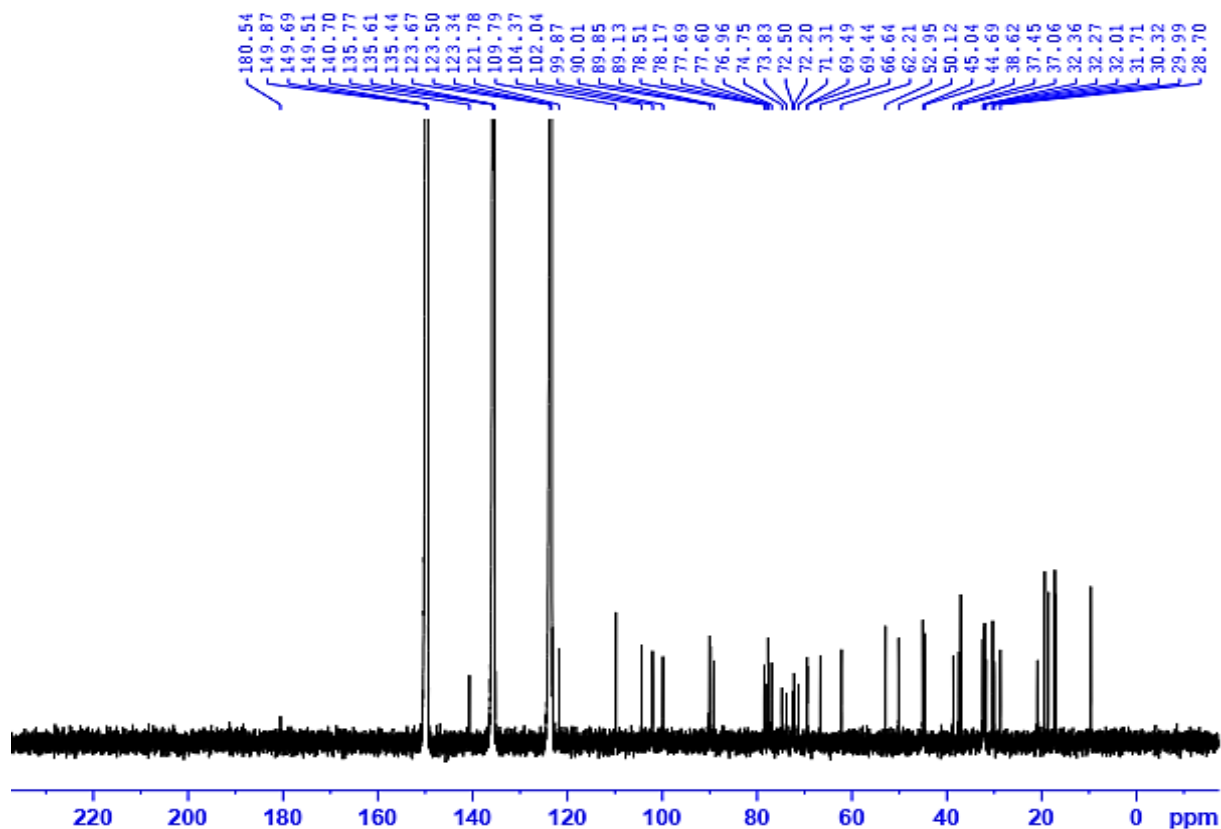
**VIII. Phụ lục kết quả thử hoạt tính gây độc tế bào *in vitro* ..... PL15**

## I. Phụ lục phổ hợp chất PS1

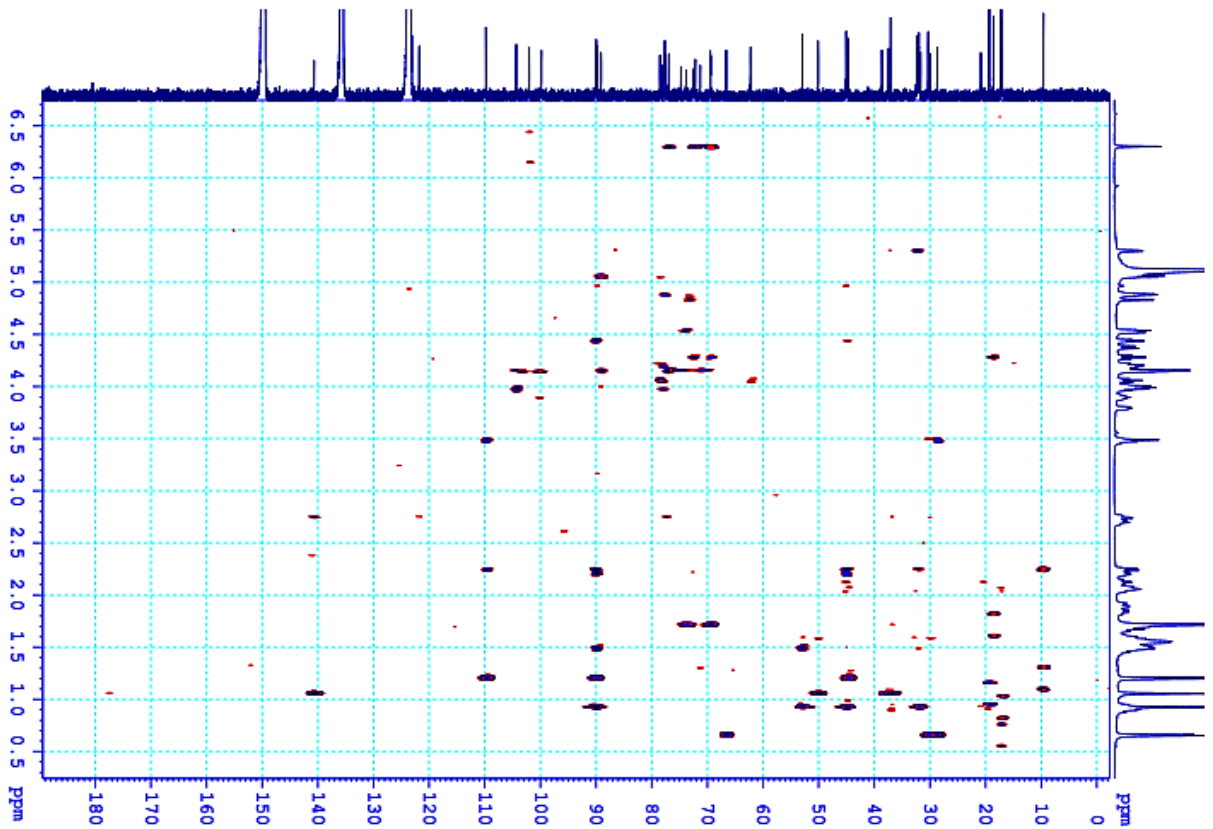
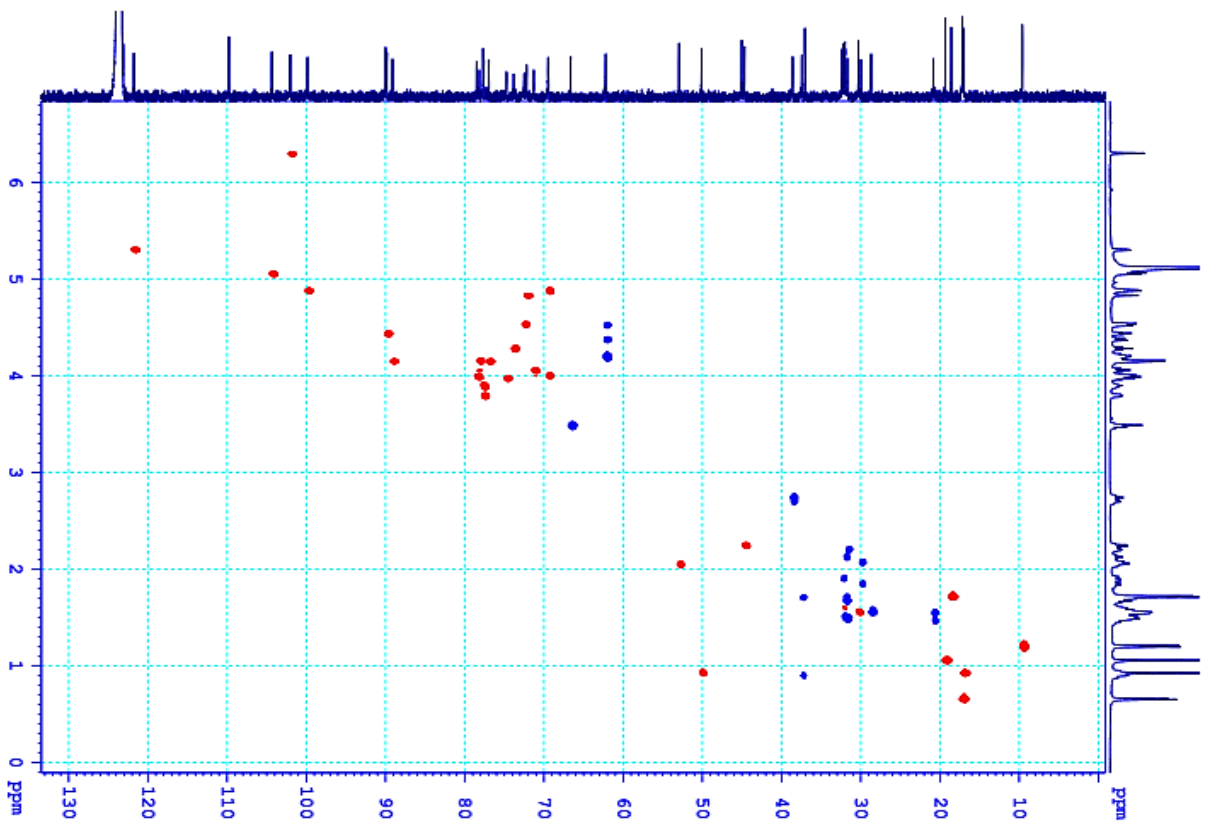
### I.1. Phổ $^1\text{H-NMR}$ của hợp chất PS1



### I.2. Phổ $^{13}\text{C-NMR}$ của hợp chất PS1

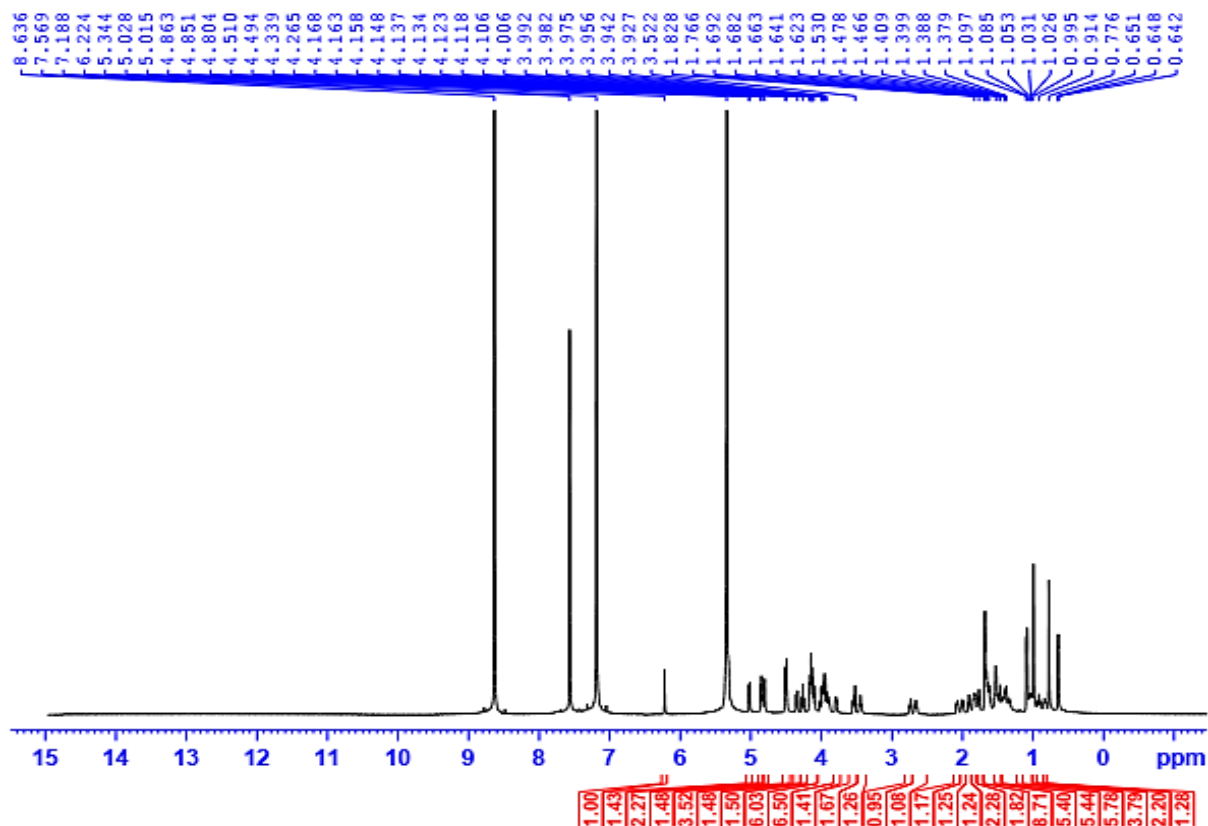




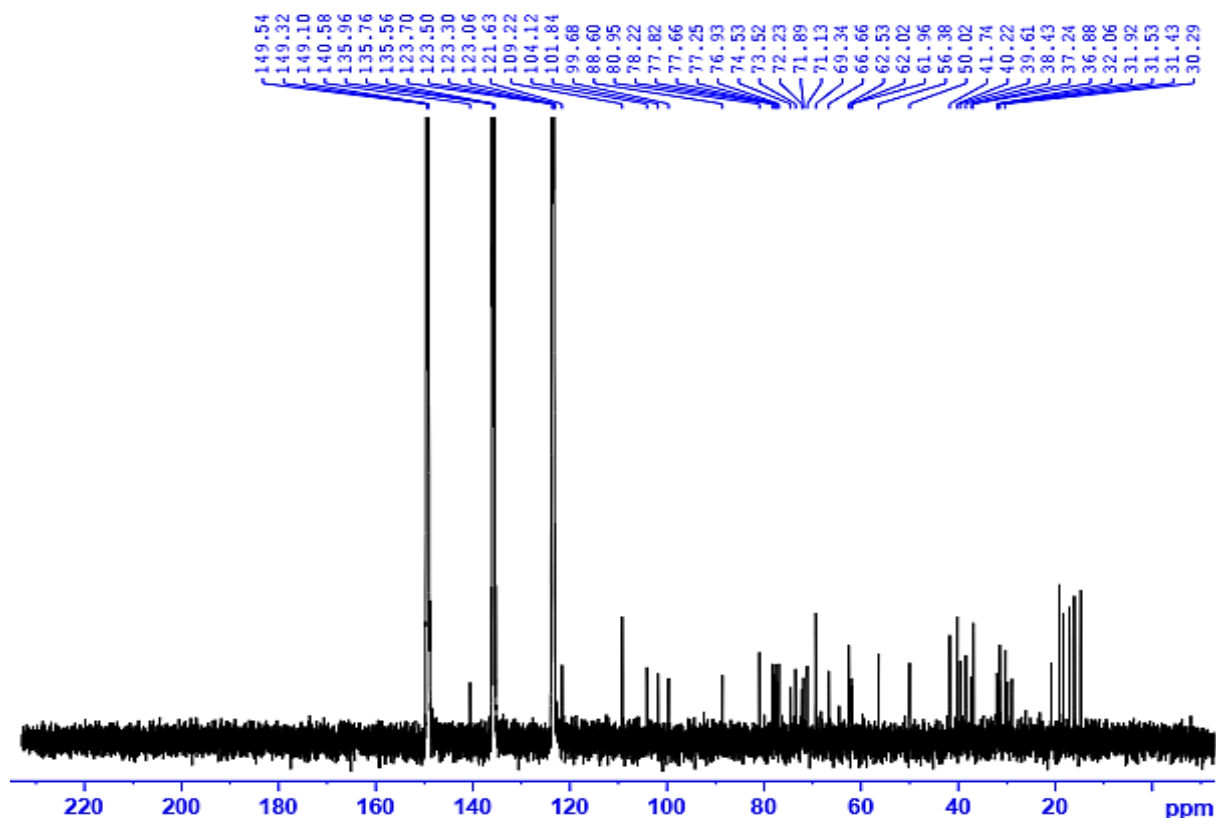
I.3. Phổ HMBC của hợp chất **PS1**I.4. Phổ HSQC của hợp chất **PS1**

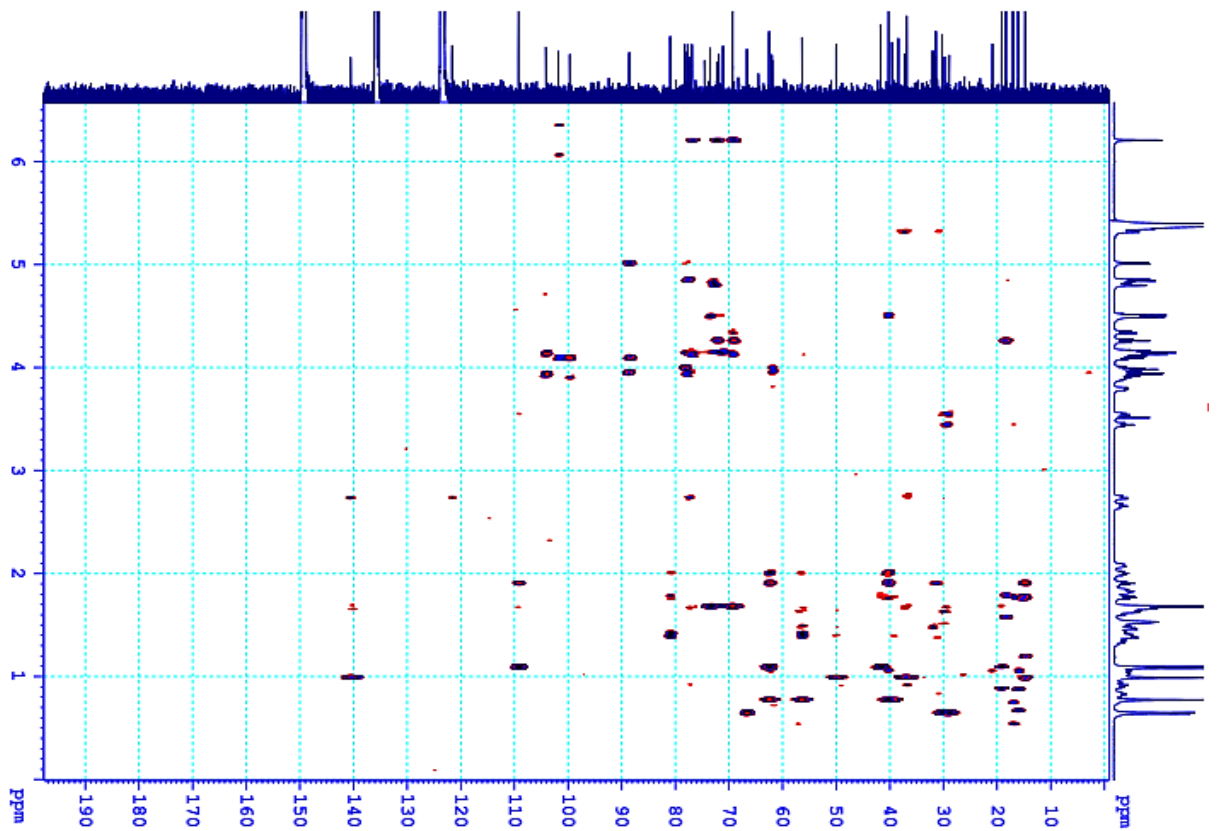
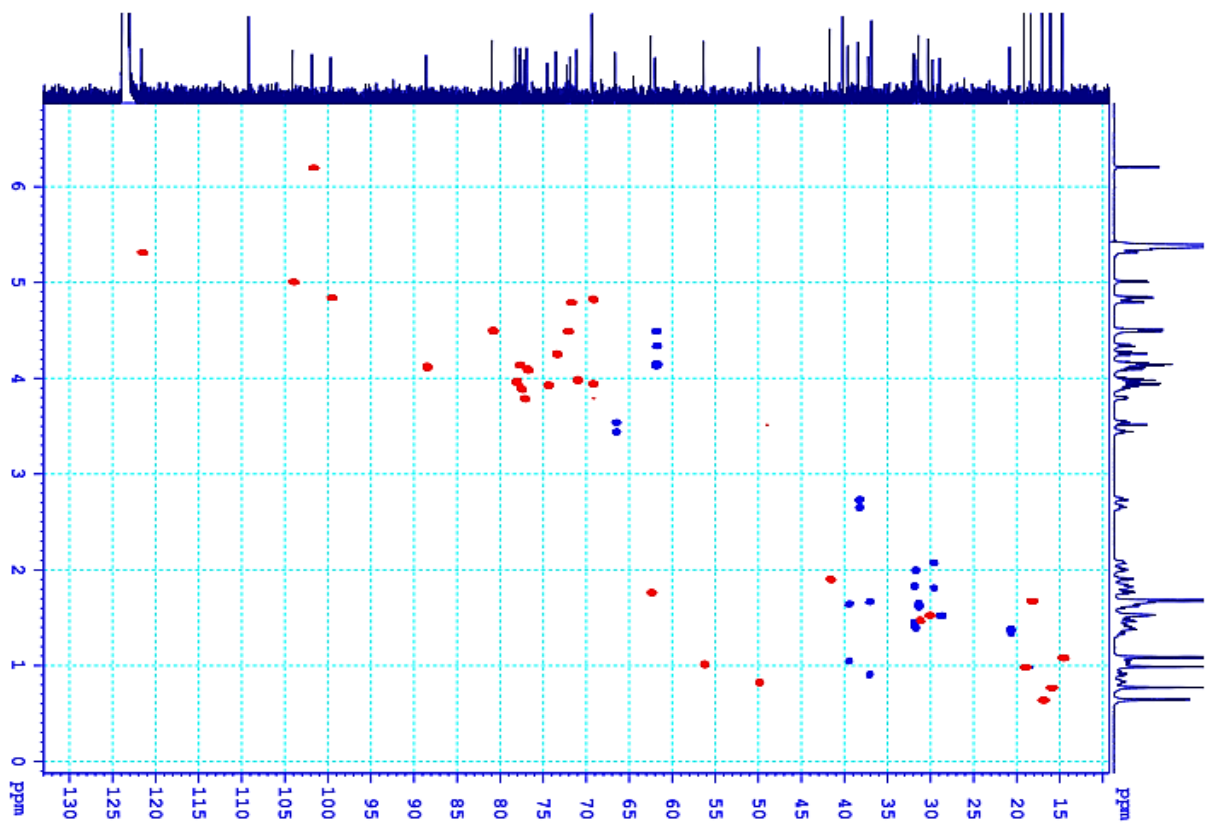
## II. Phụ lục phổ hợp chất PS2

### II.1. Phổ $^1\text{H-NMR}$ của hợp chất PS2



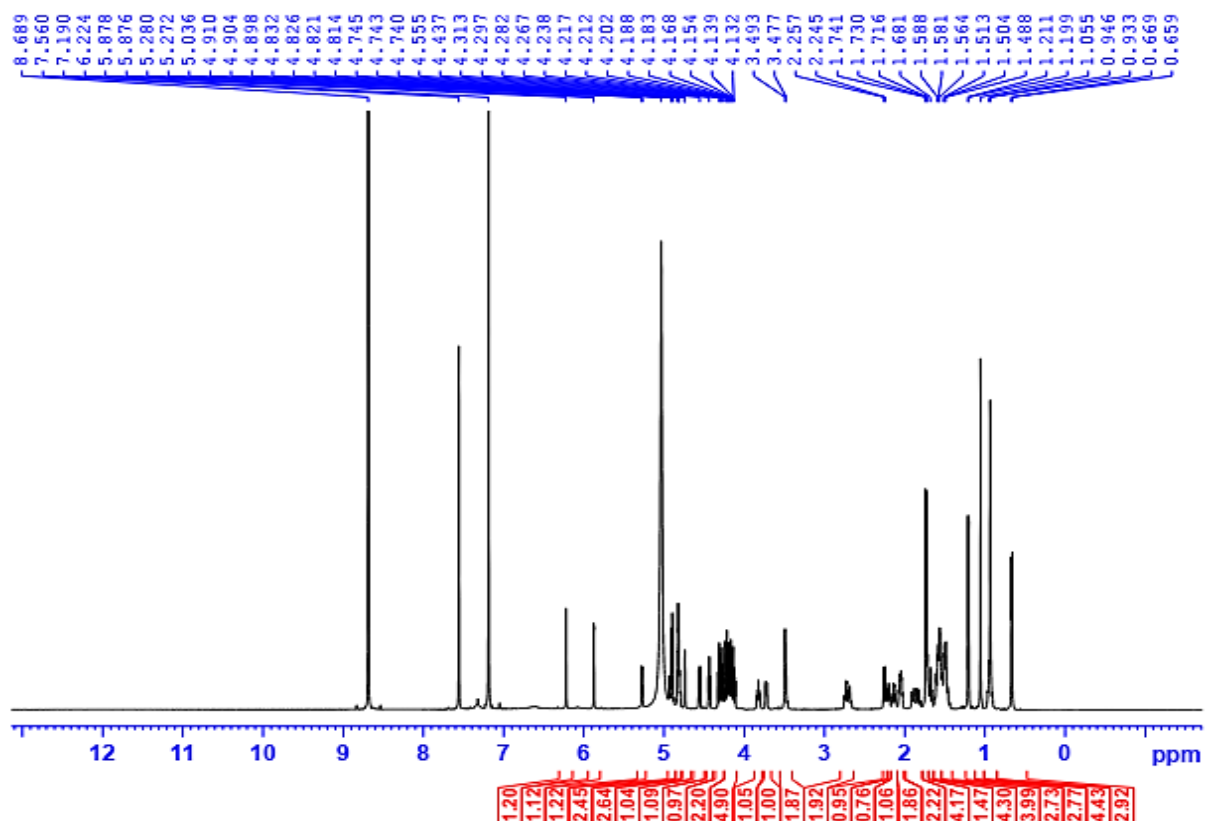
### II.2. Phổ $^{13}\text{C-NMR}$ của hợp chất PS2



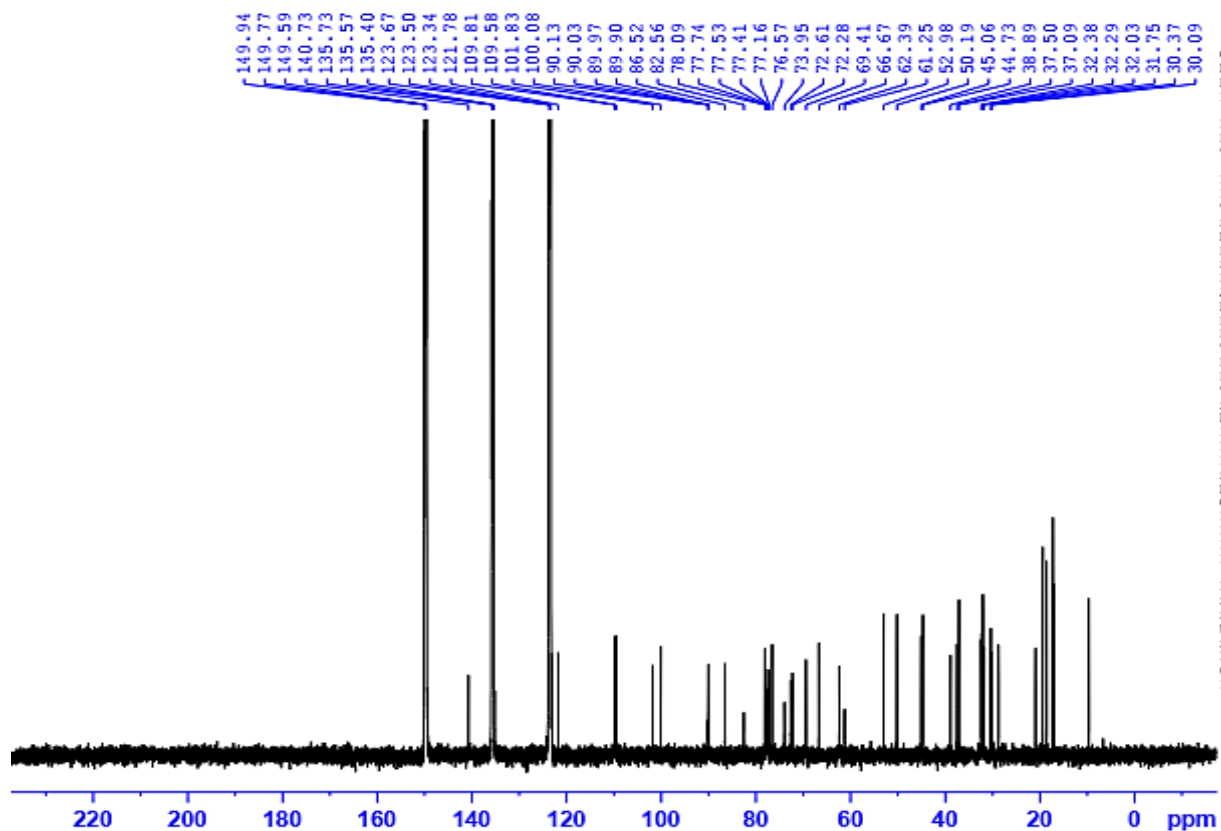
II.3. Phổ HMBC của hợp chất **PS2**II.4. Phổ HSQC của hợp chất **PS2**

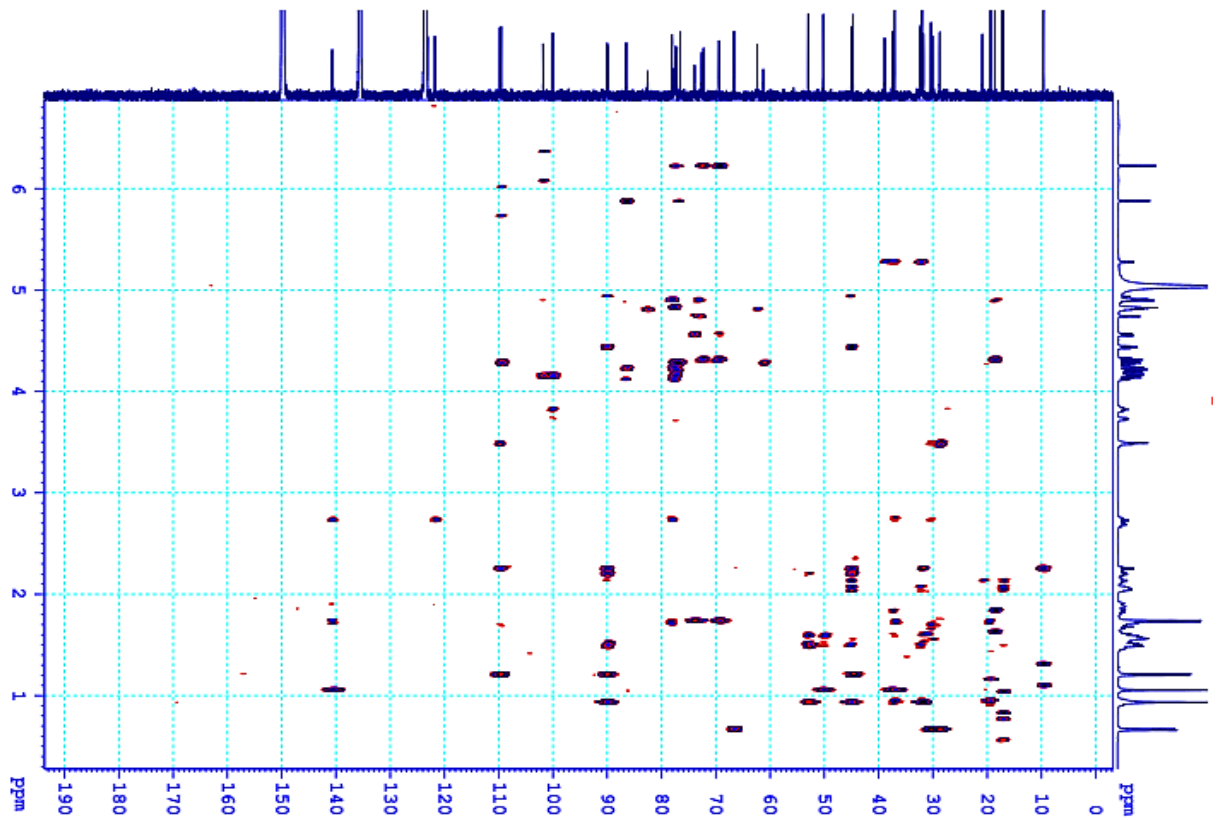
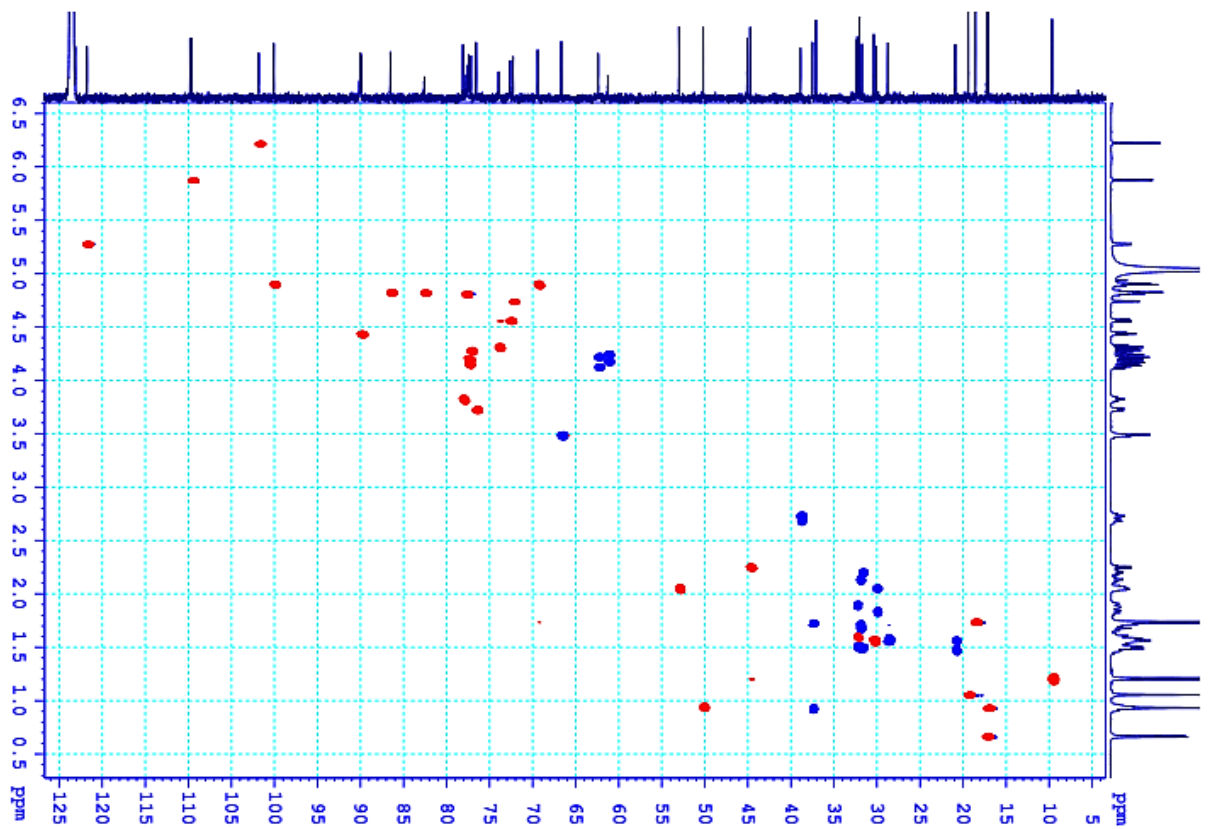
### III. Phụ lục phổ hợp chất PS3

#### III.1. Phổ $^1\text{H-NMR}$ của hợp chất PS3



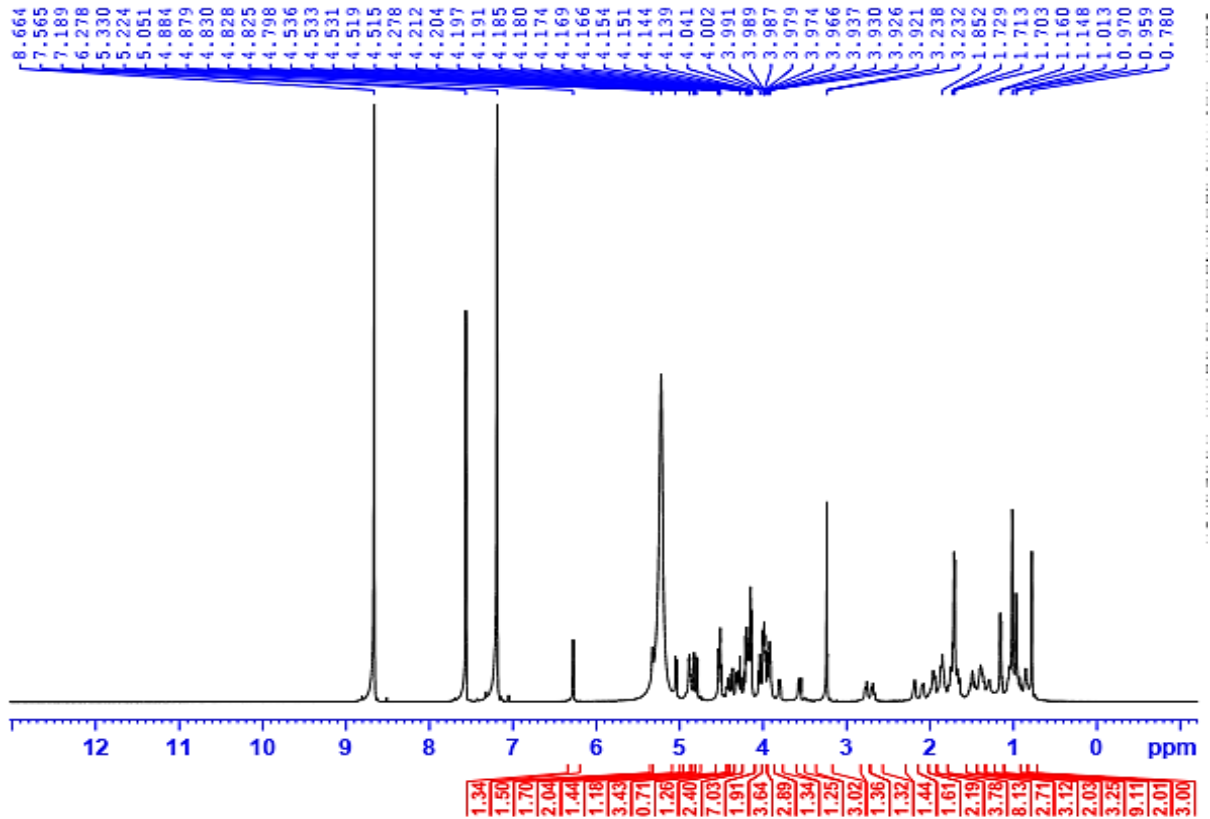
#### III.2. Phổ $^{13}\text{C-NMR}$ của hợp chất PS3



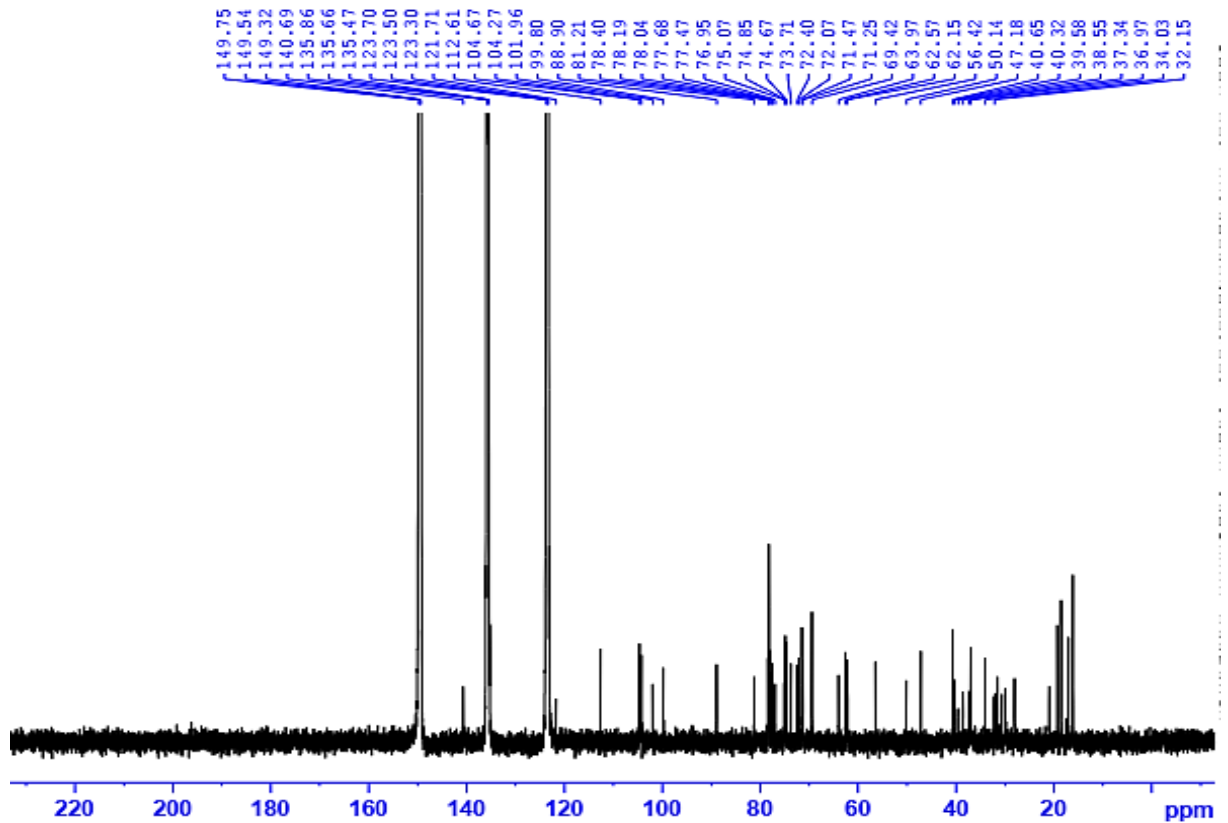
III.3. Phổ HMBC của hợp chất **PS3**III.4. Phổ HSQC của hợp chất **PS3**

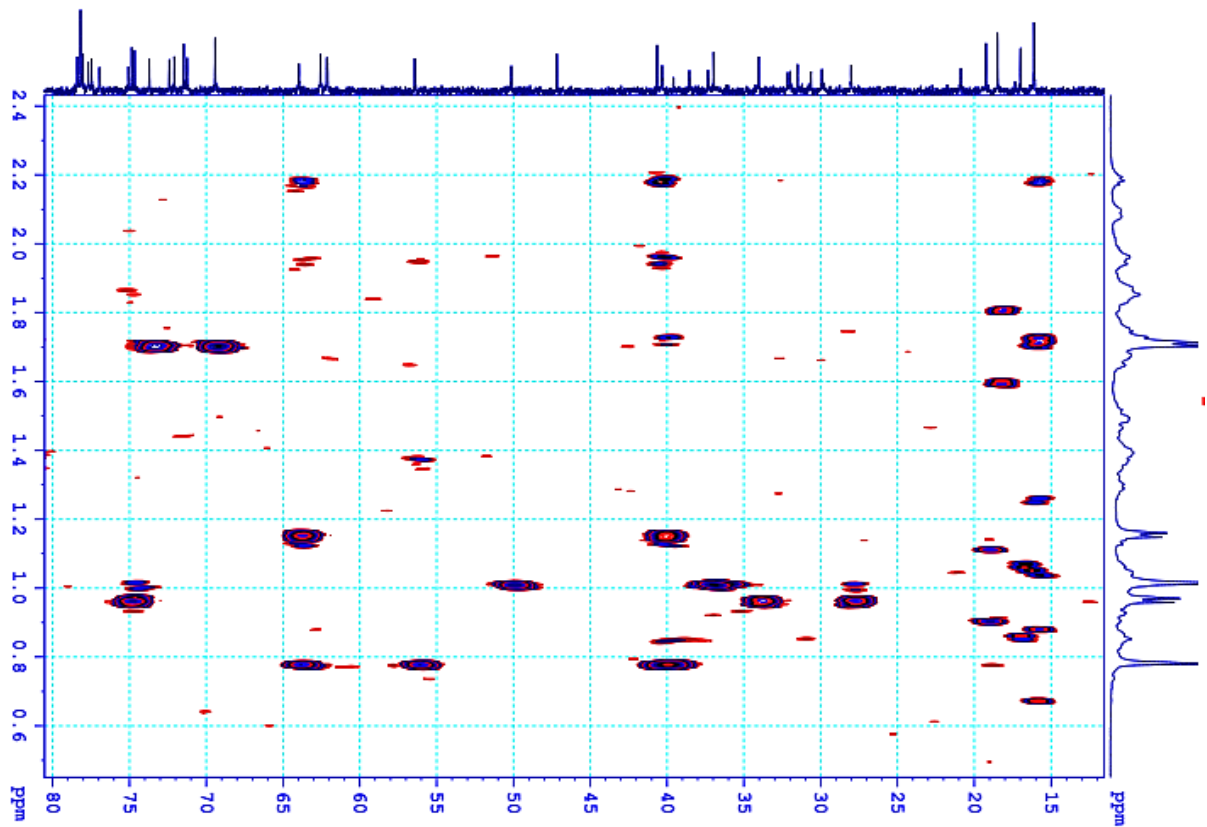
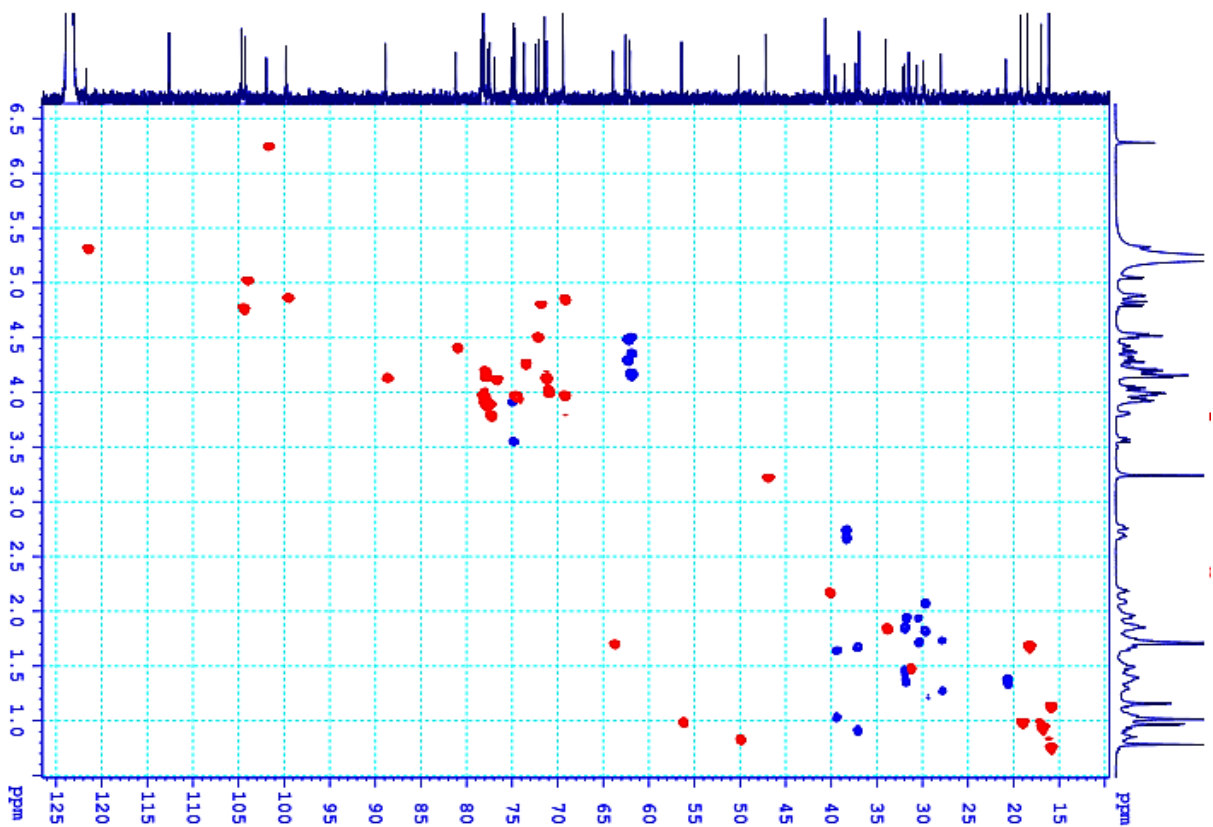
## IV. Phụ lục phổ hợp chất PS4

### IV.1. Phổ $^1\text{H-NMR}$ của hợp chất PS4



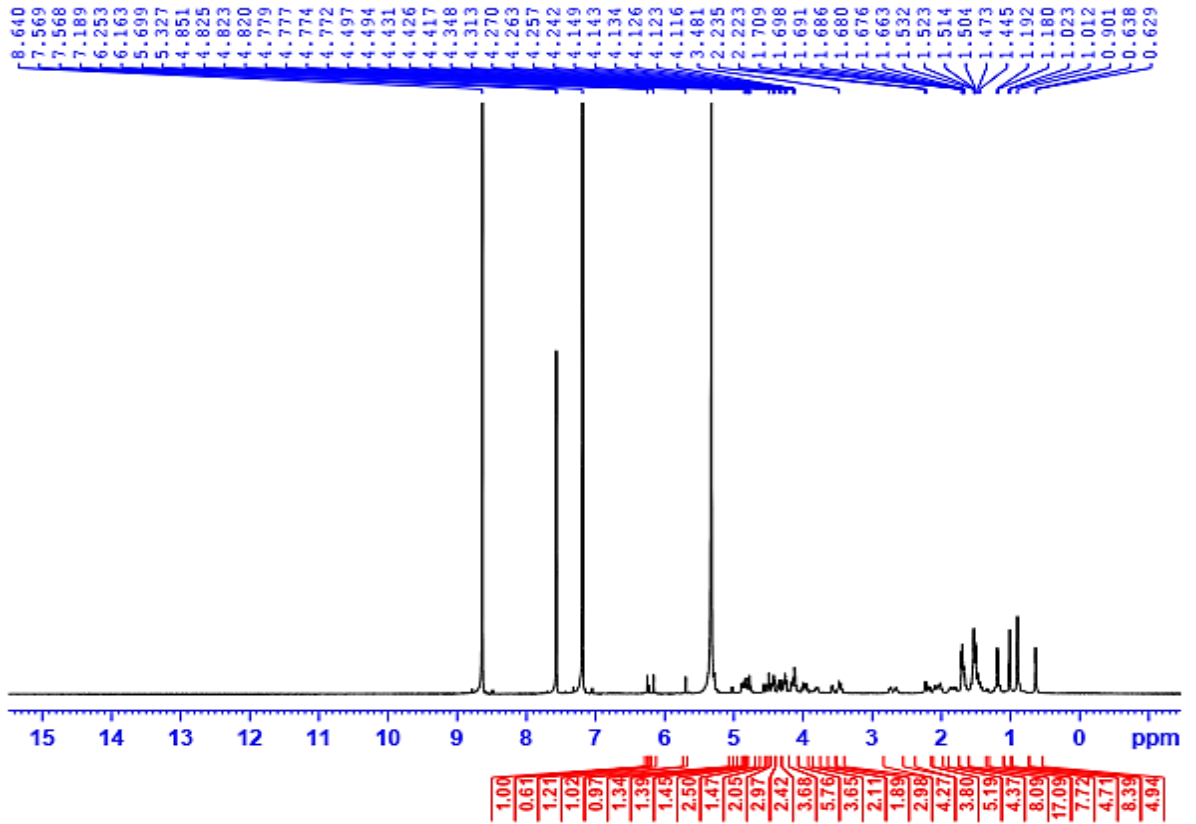
### IV.2. Phổ $^{13}\text{C-NMR}$ của hợp chất PS4



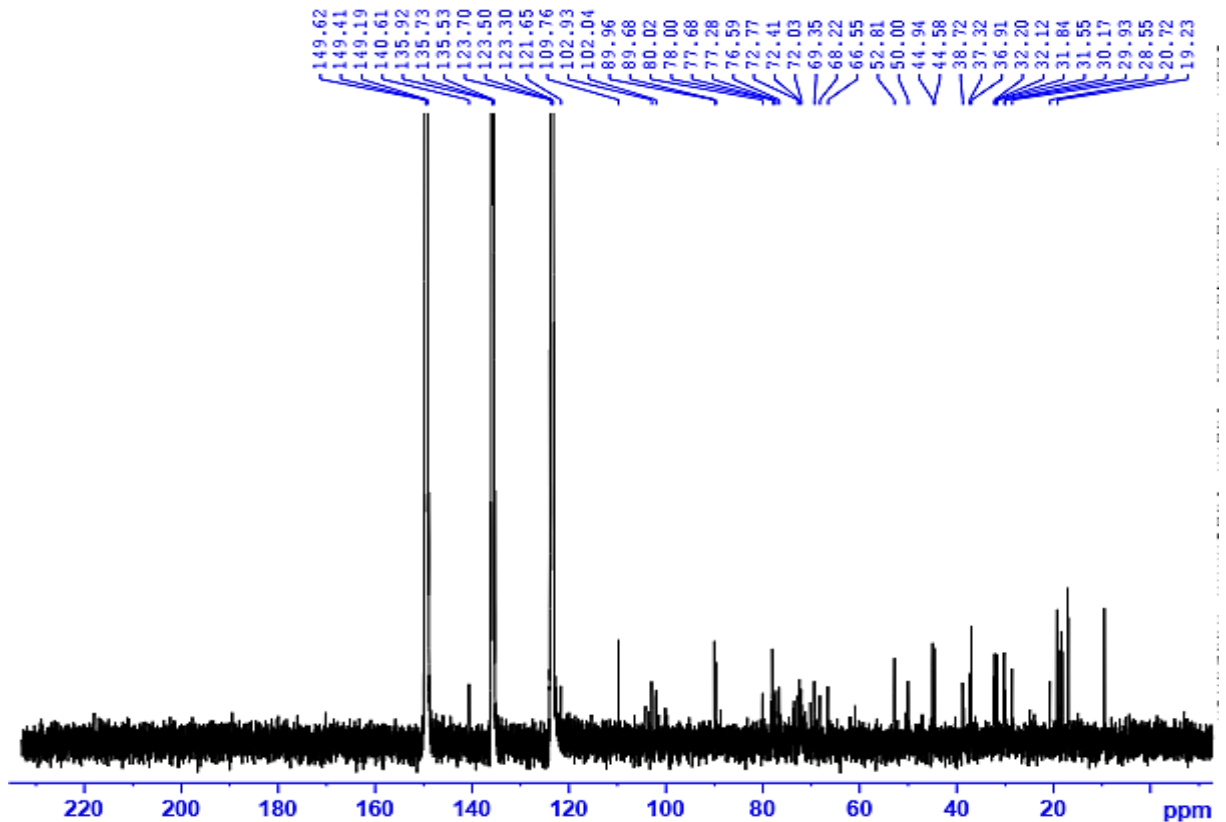
IV.3. Phổ HMBC của hợp chất **PS4**IV.4. Phổ HSQC của hợp chất **PS4**

V. Phụ lục phổ hợp chất PS5

V.1. Phổ  $^1\text{H-NMR}$  của hợp chất PS5



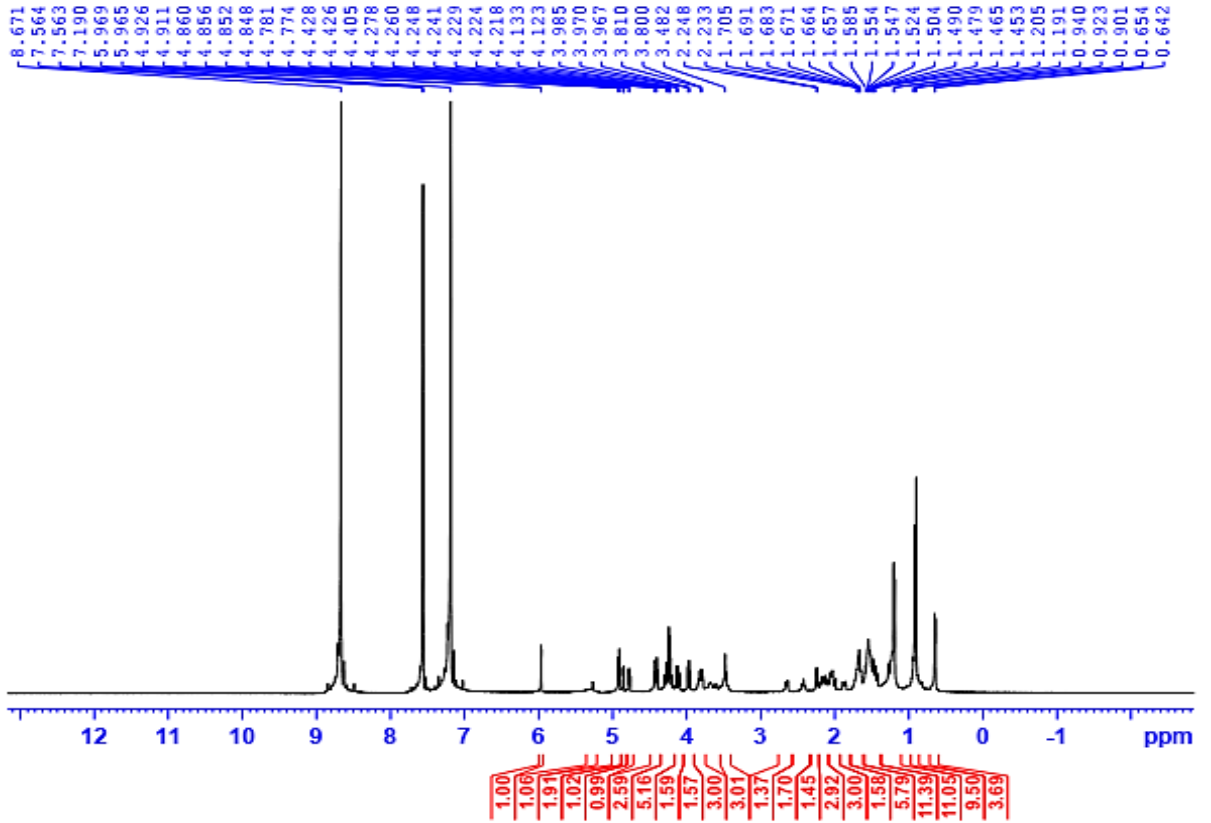
V.2. Phổ  $^{13}\text{C-NMR}$  của hợp chất PS5



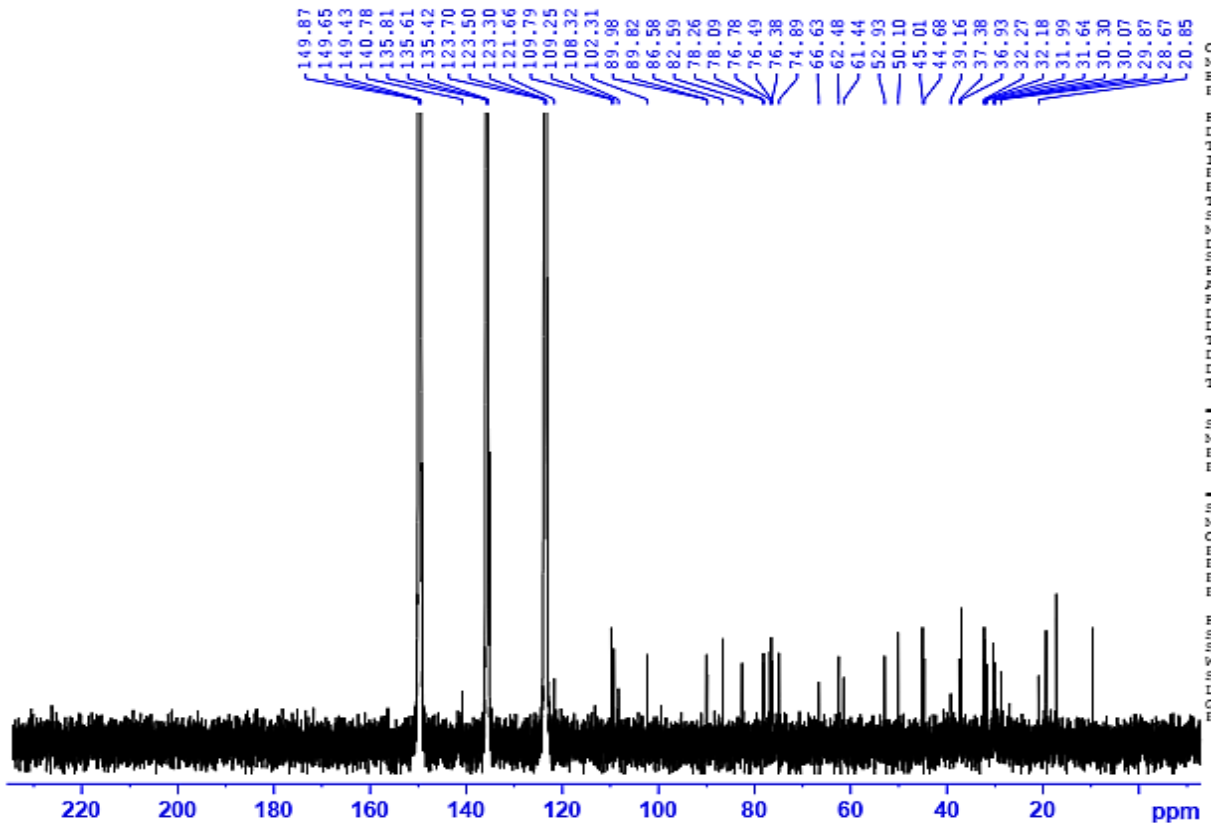


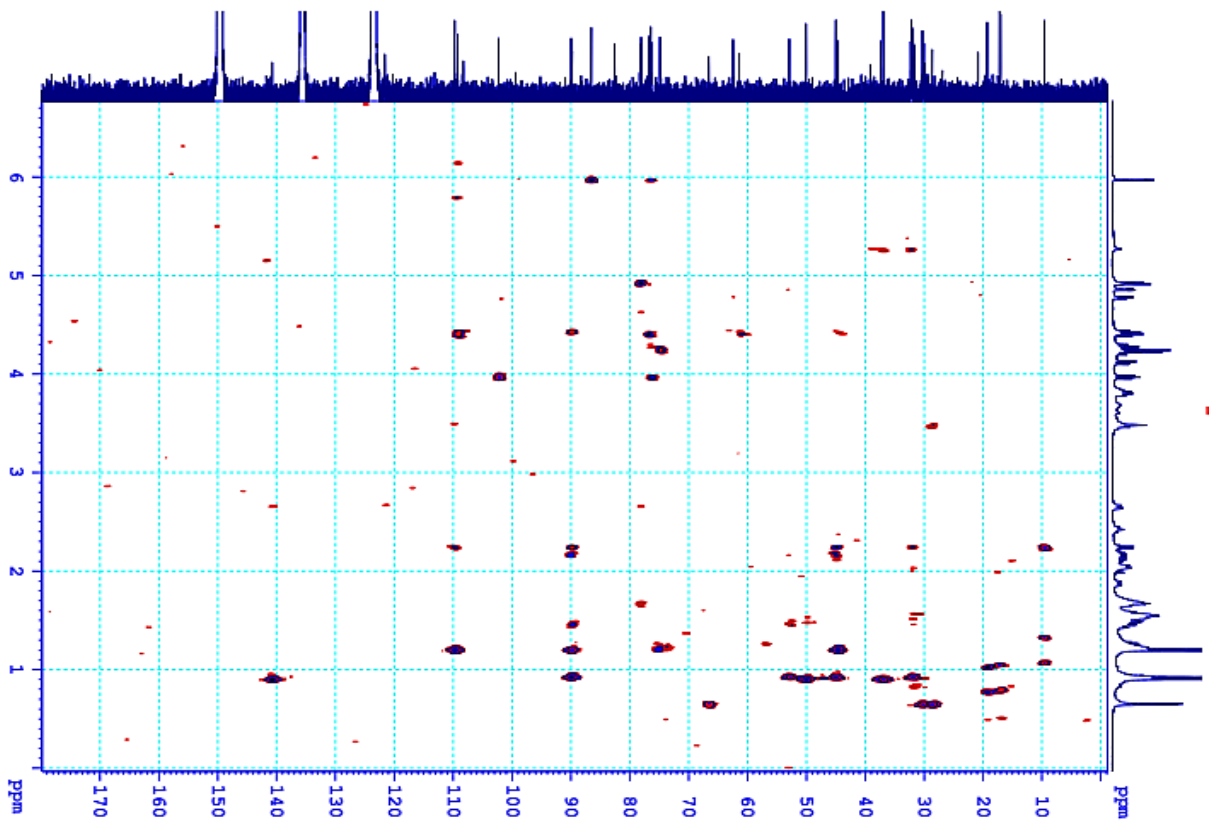
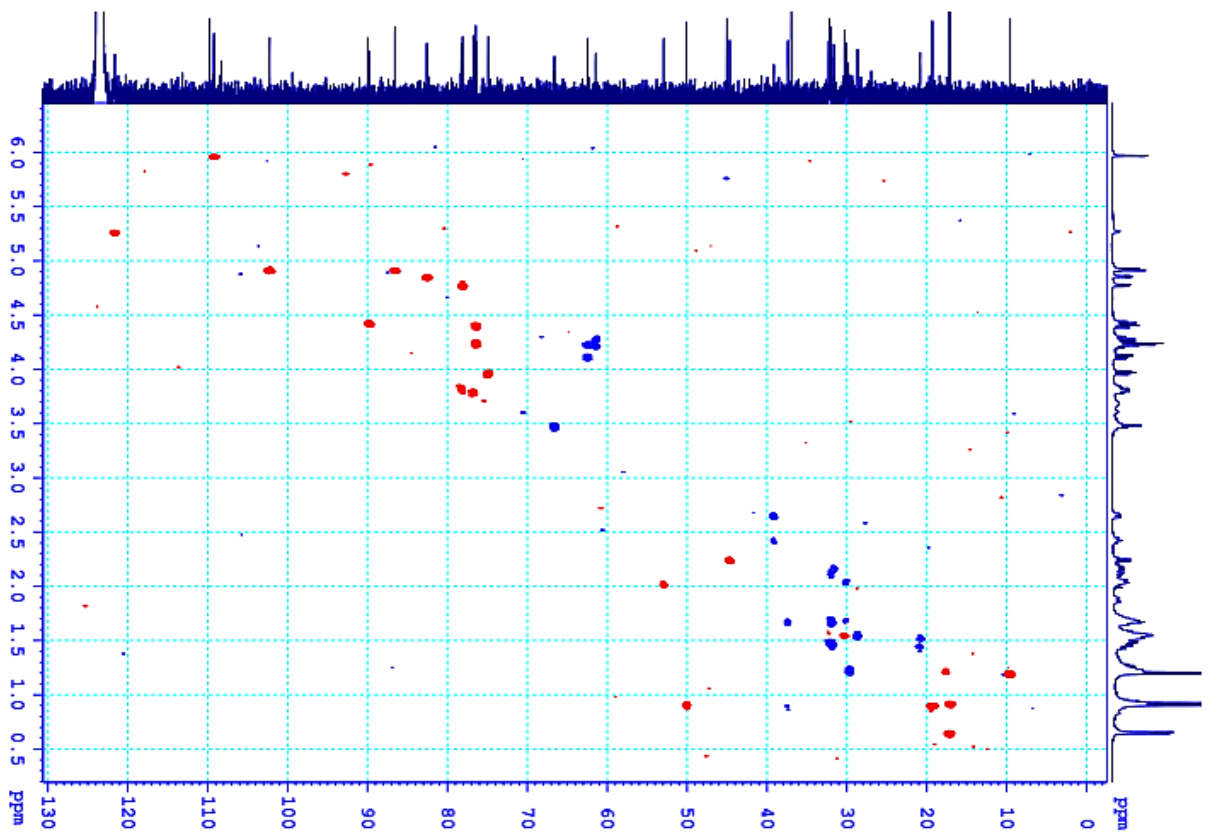
## VI. Phụ lục phổ hợp chất PS6

### VI.1. Phổ $^1\text{H-NMR}$ của hợp chất PS6



### VI.2. Phổ $^{13}\text{C-NMR}$ của hợp chất PS6



VI.3. Phổ HMBC của hợp chất **PS6**VI.4. Phổ HSQC của hợp chất **PS6**

### VII. Phụ lục kết quả thử nghiệm hoạt tính ức chế sản sinh Nitric Oxide (NO)

Nồng độ ( $\mu\text{g/mL}$ )	EA tổng				MeOH			
	% ức chế NO		% tế bào sống		% ức chế NO		% tế bào sống	
	TB	SD	TB	SD	TB	SD	TB	SD
100	86.72	1.31	67.21	3.56	80.77	2.52	83.14	3.56
20	14.24	1.03	97.39	1.85	26.75	1.51	99.91	2.40
4	5.18	0.29			8.56	0.65		
0,8	2.21	0.15			4.15	0.35		
IC <sub>50</sub>	NA		-		50.36 $\pm$ 2.95		-	
Nồng độ ( $\mu\text{g/mL}$ )	Butanol				H <sub>2</sub> O			
	% ức chế NO		% tế bào sống		% ức chế NO		% tế bào sống	
	TB	SD	TB	SD	TB	SD	TB	SD
100	98.21	2.52	23.43	0.94	67.34	1.56	99.82	2.96
20	22.58	1.32	85.10	1.80	10.97	0.83	99.42	1.03
4	12.46	1.23			6.80	0.50		
0,8	8.39	0.38			2.83	0.28		
IC <sub>50</sub>	NA		-		78.94 $\pm$ 2.32		-	
Nồng độ ( $\mu\text{M}$ )	PS1				PS2			
	% ức chế NO		% tế bào sống		% ức chế NO		% tế bào sống	
	TB	SD	TB	SD	TB	SD	TB	SD
100	98.96	2.72	6.21	1.00	98.96	1.69	7.62	0.25
20	93.10	2.17	31.42	1.52	98.75	1.12	10.83	0.13
4	7.94	0.86			13.17	1.10		
0,8	4.49	0.24			5.12	0.45		
IC <sub>50</sub>	NA		-		NA		-	
Nồng độ ( $\mu\text{M}$ )	PS3				PS4			
	% ức chế NO		% tế bào sống		% ức chế NO		% tế bào sống	
	TB	SD	TB	SD	TB	SD	TB	SD
100	99.78	2.36	8.10	0.22	64.05	0.97	97.85	1.46
20	76.39	1.45	49.57	1.23	15.15	0.97	98.12	1.59
4	8.82	0.91	86.82	2.95	7.85	0.75		
0,8	1.61	0.15			3.95	0.23		
IC <sub>50</sub>	NA		-		77.39 $\pm$ 2.15		-	

Nồng độ ( $\mu\text{M}$ )	PS5				PS6			
	% ức chế NO		% tế bào sống		% ức chế NO		% tế bào sống	
	TB	SD	TB	SD	TB	SD	TB	SD
100	96.45	2.24	8.63	0.56	66.31	1.58	100.26	1.11
20	66.35	1.65	60.14	2.19	13.59	1.02	101.22	0.17
4	16.61	1.24	78.49	1.99	10.92	0.83		
0,8	1.38	0.12			4.97	0.33		
IC <sub>50</sub>	NA		-		78.45 $\pm$ 2.83		-	
Nồng độ ( $\mu\text{M}$ )	Dexamethasone							
	% ức chế NO		% ức chế NO					
	TB	SD	TB	SD				
100	84.94	2.41	92.39	3.61				
20	54.96	1.18	97.67	1.52				
4	40.55	1.02						
0,8	30.26	0.69						
IC <sub>50</sub>	12.61 $\pm$ 1.28							

**Ghi chú:** - Các mẫu **bôi vàng** cho thấy lượng tế bào sống <80% ở những nồng độ thử này. Do vậy % ức chế NO ở những nồng độ này KHÔNG được sử dụng để tính IC<sub>50</sub>. **Dexamethasone** được thử nghiệm ở dải nồng độ 100-20-4-0.8  $\mu\text{M}$ .

- NO: not available

### VIII. Phụ lục kết quả thử hoạt tính gây độc tế bào *in vitro*

Nồng độ ( $\mu\text{M}$ )	PS1							
	HEK-293A		SK-LU-1		HepG2		LNCaP	
	%ƯC	SD	%ƯC	SD	%ƯC	SD	%ƯC	SD
100	101.66	1.93	104.96	2.61	101.30	2.26	102.85	2.14
20	91.93	1.51	94.79	1.72	91.48	2.18	93.13	1.28
4	27.48	1.07	44.45	1.20	28.52	0.86	29.91	1.17
0.8	12.56	0.23	16.39	0.54	7.36	0.54	10.33	0.90
IC <sub>50</sub>	6.17 $\pm$ 0.20		4.18 $\pm$ 0.15		6.61 $\pm$ 0.32		6.02 $\pm$ 0.11	
Nồng độ ( $\mu\text{M}$ )	PS2							
	HEK-293A		SK-LU-1		HepG2		LNCaP	
	%ƯC	SD	%ƯC	SD	%ƯC	SD	%ƯC	SD
100	102.04	2.81	105.27	2.22	101.34	2.10	103.04	2.38
20	100.35	1.18	102.18	2.34	100.60	1.08	100.19	1.27

4	95.25	1.84	94.69	2.05	94.86	2.11	96.64	1.78
0.8	5.55	0.38	9.23	0.93	6.20	0.26	7.53	0.32
<b>IC<sub>50</sub></b>	<b>1.21±0.02</b>		<b>1.17±0.02</b>		<b>1.20±0.01</b>		<b>1.18±0.01</b>	
<b>Nồng độ (μM)</b>	<b>PS3</b>							
	<b>HEK-293A</b>		<b>SK-LU-1</b>		<b>HepG2</b>		<b>LNCaP</b>	
	<b>%ƯC</b>	<b>SD</b>	<b>%ƯC</b>	<b>SD</b>	<b>%ƯC</b>	<b>SD</b>	<b>%ƯC</b>	<b>SD</b>
100	101.68	2.24	105.71	3.15	101.30	3.07	102.76	2.21
20	100.58	2.10	101.05	2.26	100.54	2.04	100.10	2.35
4	92.44	1.21	94.40	1.45	91.44	1.07	95.82	2.30
0.8	13.83	0.57	18.50	0.91	13.07	1.62	19.82	1.78
<b>IC<sub>50</sub></b>	<b>1.14±0.01</b>		<b>1.09±0.01</b>		<b>1.15±0.02</b>		<b>1.08±0.02</b>	
<b>Nồng độ (μM)</b>	<b>PS4</b>							
	<b>HEK-293A</b>		<b>SK-LU-1</b>		<b>HepG2</b>		<b>LNCaP</b>	
	<b>%ƯC</b>	<b>SD</b>	<b>%ƯC</b>	<b>SD</b>	<b>%ƯC</b>	<b>SD</b>	<b>%ƯC</b>	<b>SD</b>
100	101.81	2.76	100.13	3.06	88.92	2.61	92.57	4.35
20	85.06	1.51	76.24	2.57	53.66	1.34	65.05	2.55
4	6.30	0.34	4.95	0.37	6.84	0.34	5.24	0.36
0.8	-4.45	0.30	2.23	0.17	1.53	0.14	2.45	0.23
<b>IC<sub>50</sub></b>	<b>10.64±0.22</b>		<b>13.30±0.84</b>		<b>23.64±0.93</b>		<b>17.83±1.20</b>	
<b>Nồng độ (μM)</b>	<b>PS5</b>							
	<b>HEK-293A</b>		<b>SK-LU-1</b>		<b>HepG2</b>		<b>LNCaP</b>	
	<b>%ƯC</b>	<b>SD</b>	<b>%ƯC</b>	<b>SD</b>	<b>%ƯC</b>	<b>SD</b>	<b>%ƯC</b>	<b>SD</b>
100	102.44	3.27	106.10	3.21	101.56	3.13	102.15	2.39
20	90.42	2.13	90.61	2.32	91.63	2.13	100.79	1.09
4	15.98	1.30	19.92	0.96	17.93	1.31	10.35	0.31
0.8	1.54	0.14	5.59	0.26	1.37	0.07	6.20	0.27
<b>IC<sub>50</sub></b>	<b>8.37±0.34</b>		<b>7.40±0.31</b>		<b>8.12±0.32</b>		<b>7.59±0.13</b>	
<b>Nồng độ (μM)</b>	<b>PS6</b>							
	<b>HEK-293A</b>		<b>SK-LU-1</b>		<b>HepG2</b>		<b>LNCaP</b>	
	<b>%ƯC</b>	<b>SD</b>	<b>%ƯC</b>	<b>SD</b>	<b>%ƯC</b>	<b>SD</b>	<b>%ƯC</b>	<b>SD</b>
100	83.98	2.29	66.47	2.10	85.62	1.19	86.97	2.31
20	16.91	1.58	15.92	1.12	11.39	1.08	9.83	0.63
4	11.43	1.17	9.50	0.79	6.72	0.57	6.33	0.31
0.8	6.46	0.49	7.54	0.26	-0.45	0.03	-0.43	0.03
<b>IC<sub>50</sub></b>	<b>63.48±3.53</b>		<b>76.32±3.34</b>		<b>65.68±2.10</b>		<b>67.46±1.89</b>	
<b>Nồng độ (μg/mL)</b>	<b>EA tổng</b>							
	<b>HEK-293A</b>		<b>SK-LU-1</b>		<b>HepG2</b>		<b>LNCaP</b>	
	<b>%ƯC</b>	<b>SD</b>	<b>%ƯC</b>	<b>SD</b>	<b>%ƯC</b>	<b>SD</b>	<b>%ƯC</b>	<b>SD</b>
100	102.62	2.11	106.15	3.37	101.68	2.06	101.92	2.49

20	14.19	1.37	21.55	1.59	11.26	1.00	10.79	0.86
4	4.40	0.22	2.86	0.22	6.04	0.36	2.31	0.24
0.8	0.22	0.04	1.44	0.18	2.25	0.12	-4.45	0.45
<b>IC<sub>50</sub></b>	<b>55.98±2.29</b>		<b>47.06±2.37</b>		<b>62.06±2.14</b>		<b>57.79±1.75</b>	
<b>Nồng độ (µg/mL)</b>	<b>MeOH tổng</b>							
	<b>HEK-293A</b>		<b>SK-LU-1</b>		<b>HepG2</b>		<b>LNCaP</b>	
	<b>%ƯC</b>	<b>SD</b>	<b>%ƯC</b>	<b>SD</b>	<b>%ƯC</b>	<b>SD</b>	<b>%ƯC</b>	<b>SD</b>
100	91.85	2.36	94.47	2.87	82.63	2.49	87.37	1.67
20	19.82	1.20	14.54	1.48	11.50	1.00	12.36	1.22
4	8.66	0.83	3.96	0.29	5.66	0.47	2.24	0.16
0.8	6.42	0.34	1.19	0.13	1.27	0.06	-1.02	0.13
<b>IC<sub>50</sub></b>	<b>55.55±2.42</b>		<b>58.45±3.30</b>		<b>67.71±2.58</b>		<b>62.56±2.20</b>	
<b>Nồng độ (µg/mL)</b>	<b>H<sub>2</sub>O tổng</b>							
	<b>HEK-293A</b>		<b>SK-LU-1</b>		<b>HepG2</b>		<b>LNCaP</b>	
	<b>%ƯC</b>	<b>SD</b>	<b>%ƯC</b>	<b>SD</b>	<b>%ƯC</b>	<b>SD</b>	<b>%ƯC</b>	<b>SD</b>
100	8.22	0.79	16.35	1.41	13.53	1.35	14.43	1.04
20	4.99	0.26	4.83	0.36	10.83	0.53	6.56	0.54
4	3.24	0.19	2.07	0.28	7.30	0.55	3.57	0.27
0.8	1.56	0.14	-1.32	0.12	5.36	0.24	-3.97	0.17
<b>IC<sub>50</sub></b>	<b>&gt;100</b>		<b>&gt;100</b>		<b>&gt;100</b>		<b>&gt;100</b>	
<b>Nồng độ (µg/mL)</b>	<b>BuOH tổng</b>							
	<b>HEK-293A</b>		<b>SK-LU-1</b>		<b>HepG2</b>		<b>LNCaP</b>	
	<b>%ƯC</b>	<b>SD</b>	<b>%ƯC</b>	<b>SD</b>	<b>%ƯC</b>	<b>SD</b>	<b>%ƯC</b>	<b>SD</b>
100	100.28	3.48	98.38	2.51	100.22	3.02	100.26	3.32
20	84.93	1.09	80.04	1.17	61.34	2.31	69.42	1.32
4	10.70	0.65	8.35	0.77	13.33	1.06	12.18	1.10
0.8	1.91	0.19	3.50	0.36	3.66	0.19	5.00	0.47
<b>IC<sub>50</sub></b>	<b>9.80±0.39</b>		<b>11.49±0.48</b>		<b>16.52±1.29</b>		<b>13.74±0.74</b>	
<b>Nồng độ (µg/mL)</b>	<b>Ellipticine</b>							
	<b>HEK-293A</b>		<b>SK-LU-1</b>		<b>HepG2</b>		<b>LNCaP</b>	
	<b>%ƯC</b>	<b>SD</b>	<b>%ƯC</b>	<b>SD</b>	<b>%ƯC</b>	<b>SD</b>	<b>%ƯC</b>	<b>SD</b>
10	101.07	2.11	92.93	1.55	98.12	2.21	102.22	1.91
2	89.09	1.02	81.26	1.19	82.54	1.58	86.89	1.85
0.4	52.81	1.06	51.88	1.02	51.19	1.23	51.95	1.32
0.08	24.12	1.12	22.36	0.85	21.62	1.29	23.23	0.94
<b>IC<sub>50</sub></b>	<b>0.33±0.02</b>		<b>0.40±0.02</b>		<b>0.34±0.04</b>		<b>0.31±0.02</b>	

Ghi chú: Chất đối chứng dương Ellipticine hoạt động ổn định trong thí nghiệm.

Số: 314/QĐ-HVKHCN

Hà Nội, ngày 08 tháng 04 năm 2024

**QUYẾT ĐỊNH**  
**Về việc thành lập Hội đồng đánh giá luận văn thạc sĩ**

**GIÁM ĐỐC**  
**HỌC VIỆN KHOA HỌC VÀ CÔNG NGHỆ**

Căn cứ Quyết định số 303/QĐ-VHL ngày 01/03/2023 của Chủ tịch Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam về việc ban hành Quy chế tổ chức và hoạt động của Học viện Khoa học và Công nghệ;

Căn cứ Thông tư số 23/2021/TT-BGDĐT ngày 30/08/2021 của Bộ trưởng Bộ Giáo dục và Đào tạo về việc ban hành Quy chế đào tạo trình độ thạc sĩ;

Căn cứ Quyết định số 1966/QĐ-HVKHCN ngày 28/12/2021 của Giám đốc Học viện Khoa học và Công nghệ về việc ban hành Quy chế đào tạo trình độ thạc sĩ;

Căn cứ Quyết định số 896/QĐ-HVKHCN ngày 25/05/2022 của Giám đốc Học viện Khoa học và Công nghệ về việc công nhận học viên cao học trúng tuyển đợt 1 năm 2022;

Căn cứ Quyết định số 1086/QĐ-HVKHCN ngày 02/10/2023 của Giám đốc Học viện Khoa học và Công nghệ về việc công nhận đề tài và cử người hướng dẫn luận văn thạc sĩ;

Xét đề nghị của Trưởng khoa Khoa Công nghệ sinh học, Trưởng phòng Đào tạo.

**QUYẾT ĐỊNH:**

**Điều 1.** Thành lập Hội đồng đánh giá luận văn thạc sĩ cho học viên Đỗ Thị Thu Hiền với đề tài: “Đánh giá hoạt tính kháng viêm và gây độc tế bào ung thư *in vitro* của một số hợp chất phân lập từ cây Bảy lá một hoa (*Paris sp.*) tại xã Bình Văn, huyện Chợ Mới, tỉnh Bắc Kạn.”.

Ngành: Sinh học thực nghiệm

Mã số: 8 42 01 14

Danh sách thành viên Hội đồng đánh giá luận văn kèm theo Quyết định này.

**Điều 2.** Hội đồng có trách nhiệm đánh giá luận văn thạc sĩ theo đúng quy chế hiện hành của Bộ Giáo dục và Đào tạo, Học viện Khoa học và Công nghệ. Quyết định này có hiệu lực trong thời hạn tối đa 60 ngày làm việc kể từ ngày ký.

Hội đồng tự giải thể sau khi hoàn thành nhiệm vụ.

**Điều 3.** Trưởng phòng Tổ chức - Hành chính và Truyền thông, Trưởng phòng Đào tạo, Trưởng phòng Kế toán, Trưởng Khoa Công nghệ sinh học, các thành viên có tên trong danh sách Hội đồng và học viên cao học có tên tại Điều 1 chịu trách nhiệm thi hành Quyết định này./.

**Nơi nhận:**

- Như Điều 3;
- Lưu hồ sơ học viên;
- Lưu: VT, ĐT, MT.14.

**GIÁM ĐỐC**



**GS.TS. Vũ Đình Lâm**

# DANH SÁCH HỘI ĐỒNG ĐÁNH GIÁ LUẬN VĂN THẠC SĨ

(Kèm theo Quyết định số 314/QĐ-HVKHCN ngày 08/04/2024 của Giám đốc Học viện Khoa học và Công nghệ)



Cho luận văn của học viên: Đỗ Thị Thu Hiền

Tên đề tài: Đánh giá hoạt tính kháng viêm và gây độc tế bào ung thư *in vitro* của một số hợp chất phân lập từ cây Báy lá một hoa (*Paris sp.*) tại xã Bình Vã huyện Chợ Mới, tỉnh Bắc Kạn.

Ngành: Sinh học thực nghiệm

Mã số: 8 42 01 14

Người hướng dẫn: 1. PGS. TS. Đỗ Thị Thảo

- Viện Công nghệ sinh học, Viện Hàn lâm KHCNVN

2. PGS.TS. Hoàng Lê Tuấn Anh

- Trung tâm Nghiên cứu và Phát triển Công nghệ cao, Viện Hàn lâm KHCNVN

TT	Họ và tên, học hàm, học vị	Chuyên ngành	Cơ quan công tác	Trách nhiệm
1.	GS.TS. Chu Hoàng Hà	Công nghệ sinh học	Viện Công nghệ sinh học, Viện Hàn lâm KHCNVN	Chủ tịch
2.	PGS.TS. Vũ Đình Hoàng	Hóa hữu cơ	Trường Hóa và Khoa học Sự sống, Đại học Bách Khoa Hà Nội	Phản biện
3.	TS. Nguyễn Trung Nam	Miễn dịch học	Viện Công nghệ sinh học, Viện Hàn lâm KHCNVN	Phản biện
4.	TS. Đinh Thị Thu Hằng	Hóa sinh học	Học viện Khoa học và Công nghệ, Viện Hàn lâm KHCNVN	Ủy viên
5.	TS. Trần Hồng Quang	Hóa dược	Viện Hóa sinh biển, Viện Hàn lâm KHCNVN	Ủy viên

(Hội đồng gồm 05 thành viên)./.

KHOA  
HỌC VIỆN

BIÊN

Thư

đốc Học v

văn thạc s

Tên

*in vitro* của r

Văn, huyệ

Ngày

Mã

Hôn

Học viện

viên:

1. C

2. T

3. P

4. T

5. T

Thà

đã có bản

giá luận v

1. Đại diện

2. Chủ tịch

3. Thư ký

4. Học viên

5. Phản biện

..Đỗ..C

..Cần..H

..Lâm..V

..Chi..L

.....



Hà Nội, ngày 15 tháng 05 năm 2024

## BIÊN BẢN HỌP HỘI ĐỒNG ĐÁNH GIÁ LUẬN VĂN THẠC SĨ

Thực hiện Quyết định số: 314/QĐ-HVKHCN ngày 08/04/2024 của Giám đốc Học viện Khoa học và Công nghệ về việc thành lập Hội đồng đánh giá luận văn thạc sĩ của học viên Đỗ Thị Thu Hiền

Tên đề tài: Đánh giá hoạt tính kháng viêm và gây độc tế bào ung thư *in vitro* của một số hợp chất phân lập từ cây Bảy lá một hoa (*Paris sp.*) tại xã Bình Văn, huyện Chợ Mới, tỉnh Bắc Kạn

Ngành/Chuyên ngành: Sinh học thực nghiệm

Mã số: 8 42 01 14

Hôm nay, ngày 15/05/2024 Hội đồng đã họp tại phòng họp 1710, A28, Học viện Khoa học và Công nghệ vào lúc 14 giờ 00, Hội đồng gồm 05 thành viên:

- |                           |                   |
|---------------------------|-------------------|
| 1. GS.TS. Chu Hoàng Hà    | Chủ tịch hội đồng |
| 2. TS. Đinh Thị Thu Hằng  | Thư ký hội đồng   |
| 3. PGS. TS. Vũ Đình Hoàng | Phản biện 1       |
| 4. TS. Nguyễn Trung Nam   | Phản biện 2       |
| 5. TS. Trần Hồng Quang    | Ủy viên hội đồng  |

Thành viên vắng mặt: .....D..... (Phản biện hoặc ủy viên, đã có bản nhận xét đồng ý cho phép học viên được bảo vệ trước Hội đồng đánh giá luận văn thạc sĩ).

### NỘI DUNG LÀM VIỆC

- Đại diện cơ sở đào tạo đọc quyết định thành lập Hội đồng đánh giá luận văn
- Chủ tịch Hội đồng, điều khiển phiên họp
- Thư ký HĐ, đọc lí lịch khoa học và bảng điểm của học viên
- Học viên trình bày luận văn trước Hội đồng

5. Phản biện 1: *Đáp ứng yêu cầu luận văn thạc sĩ*  
*...Nên có những thảo luận về b/l...mô; ss. v/v... Các nghiên cứu khác*  
*...Cần hỏi;... vì sao... ở... trong... nghiên cứu... chưa được... xác định loại*  
*...Lưu ý... pho?... Carbo... s... p... th... nhất... sử dụng thuật ngữ*  
*...Chú ý/loại.....*

6. Phản biện 2: Nên lưu ý về đối tượng và phương pháp nghiên cứu. Các số liệu nên được xử lý thống kê để thấy được sự sai lệch như ảnh chụp khác nhau của thí nghiệm về sự sống, chết. Chu p. B. chưa có đủ phòng thí nghiệm vật chất.

7. Học viên trả lời: nào đi xác định...  
Đáp ứng yêu cầu

8. Các thành viên HĐ và những người tham dự nêu câu hỏi

TS. Trần Hồng Quang: Cần xác định rõ về bài, từ khoa, lý tại sao chọn B. thành lập hoạt chất, làm rõ ca hiện CC, MC, nên chuyển pha 1D, thành Petro & Carbon

9. Học viên trả lời

10. Hội đồng họp kín và cho điểm

- Hội đồng bầu ban kiểm phiếu gồm 3 thành viên:
  - Trưởng ban: ... TS. Nguyễn Trung Nam
  - Ủy viên: ... TS. Trần Hồng Quang
  - Ủy viên: ... TS. Đinh Lê Lê Hoàng

- Kết quả kiểm phiếu như sau:
  - Số phiếu phát ra: ... 0.5
  - Số phiếu thu về: ... 0.5
  - Tổng số điểm: ... 43.7
  - Điểm trung bình: ... 8.7

Diễn  
Tổ  
- Kết luận  
+ Luận  
+ Tính  
Đề

11. Chủ trì  
các nội dung  
Nội  
Luận

Buổi họp

THƯ KÝ

Hoàng  
Đinh Lê

Điểm thưởng công trình công bố:.....0.....

Tổng điểm đánh giá luận văn và thưởng công trình công bố:....8,7.....

- Kết luận của Hội đồng:

+ Luận văn .....Đạt..... (đạt/không đạt yêu cầu)

+ Tính không trùng lặp nội dung và tên đề tài với các công trình công bố:

.....Đề tài không trùng lặp.....

11. Chủ tịch Hội đồng, công bố kết quả, yêu cầu học viên chỉnh sửa luận văn với các nội dung sau:

.....Nội dung và hình thức đáp ứng yêu cầu của m.s.t.....  
.....luận văn theo si. Sinh học thực nghiệm.....

Buổi họp đã kết thúc vào 16.. giờ 45..phút, ngày 15/05/2024

Hà Nội, ngày 15 tháng 05 năm 2024



THƯ KÝ HỘI ĐỒNG

CHỦ TỊCH HỘI ĐỒNG

*[Handwritten signature]*

*[Handwritten signature]*

Đinh Chi Chu Hằng

Chu Công Thành

XÁC NHẬN CỦA CƠ SỞ ĐÀO TẠO

GIÁM ĐỐC



Vũ Đình Lâm

**BẢN NHẬN XÉT PHẢN BIỆN LUẬN VĂN THẠC SĨ**

Họ và tên người phản biện: Vũ Đình Hoàng

Học hàm, học vị: PGS. TS

Chuyên ngành: Hoá hữu cơ – Hoá hợp chất thiên nhiên

Cơ quan công tác: Trường Hoá và Khoa học Sự sống – Đại học Bách khoa Hà Nội

Họ và tên học viên: Đỗ Thị Thu Hiền

Tên đề tài: Đánh giá hoạt tính kháng viêm và gây độc tế bào ung thư in vitro của một số hợp chất phân lập từ cây bảy lá một hoa (*Paris sp.*) tại xã Bình Văn, huyện Chợ Mới, tỉnh Bắc Kạn.

Chuyên ngành: Sinh học thực nghiệm

Mã số: 8420114

**NỘI DUNG NHẬN XÉT**

1. Tính cấp thiết, tính thời sự, ý nghĩa khoa học và thực tiễn của đề tài luận văn:

Chi *Paris* là chi thuốc quý, được sử dụng lâu đời trong y học dân gian. Chi có thành phần hoá học và hoạt tính sinh học phong phú, được các nhà khoa học quan tâm nghiên cứu. Cây bảy lá một hoa thuộc chi này, cũng đang được quan tâm nghiên cứu trong và ngoài nước. Đề tài thạc sĩ “Đánh giá hoạt tính kháng viêm và gây độc tế bào ung thư in vitro của một số hợp chất phân lập từ cây bảy lá một hoa (*Paris sp.*) tại xã Bình Văn, huyện Chợ Mới, tỉnh Bắc Kạn.” có tính khoa học và thực tiễn.

2. Sự không trùng lặp của đề tài nghiên cứu so với các công trình khoa học, luận văn đã công bố ở trong và ngoài nước; tính trung thực, rõ ràng và đầy đủ trong trích dẫn tài liệu tham khảo:

Đề tài nghiên cứu không trùng lặp với các công trình khoa học, luận văn đã công bố ở trong và ngoài nước; Các tài liệu tham khảo trong luận văn là trung thực, rõ ràng và tương đối đầy đủ, cập nhật.

3. Sự phù hợp giữa tên đề tài với nội dung nghiên cứu cũng như với chuyên ngành và mã số đào tạo:

Tên đề tài phù hợp với nội dung nghiên cứu, với chuyên ngành sinh học thực nghiệm, và với mã số đào tạo 8420114.

4. Độ tin cậy và tính hiện đại của phương pháp nghiên cứu đã sử dụng để hoàn thành luận văn:

Để thực hiện nghiên cứu, tác giả đã sử dụng các phương pháp nghiên cứu hiện đại, tin cậy khoa học, bao gồm các phương pháp chiết tách hợp chất thiên nhiên, các phương pháp phổ xác định cấu trúc hợp chất, và các phương pháp thử nghiệm hoạt tính sinh học kháng viêm và gây độc tế bào đối với các chất phân lập.

5. Kết quả nghiên cứu của luận văn:

- Đã phân lập được 6 hợp chất từ mẫu báy lá một hoa.
- Đã xác định cấu trúc hoá học của 6 chất phân lập.
- Đã tiến hành thử nghiệm hoạt tính kháng viêm qua hoạt tính ức chế sản sinh NO và gây độc tế bào của các cặn chiết và các hợp chất phân lập được. Kết quả cho thấy có hai hợp chất có hoạt tính ức chế sản sinh NO yếu, và các chất thử nghiệm đều có hoạt tính gây độc tế bào ung thư.

6. Đóng góp mới của luận văn:

Tác giả cần làm rõ, các chất phân lập được đã từng được báo cáo từ loài thực vật này chưa, và các chất này đã từng được khảo sát hoạt tính kháng viêm chưa. Nếu đó là lần đầu được báo cáo thì cần nêu rõ trong kết luận.

7. Những hạn chế, thiếu sót của luận văn về nội dung và hình thức:

Luận văn có nội dung khoa học đáp ứng yêu cầu luận văn thạc sĩ. Quyển được trình bày rõ ràng, bố cục hợp lý.

Một số câu hỏi và góp ý:

- Vì sao đối tượng nghiên cứu chưa được xác định tên loài cụ thể? Trong tư liệu thì cây này có tên khoa học là *Paris polyphylla var. chinensis* Franchet?
- Kiểm tra lại tần số máy đo phổ NMR của một số hợp chất.
- Các kết quả nghiên cứu trên có những điểm nào mới và khác với 1 số công bố về nghiên cứu cây báy lá một hoa?

8. Nếu tác giả chưa viết bài báo khoa học thì nội dung của luận văn có thể được viết thành các bài báo để gửi đăng trên tạp chí khoa học, sách chuyên ngành hoặc tuyển tập công trình hội nghị khoa học cấp quốc gia, quốc tế hay không?

Luận văn có nội dung khoa học tốt, có thể đăng báo hoặc báo cáo hội thảo.

9. Kết luận chung (khẳng định mức độ đáp ứng các yêu cầu đối với một luận văn Thạc sĩ; luận văn có thể đưa ra bảo vệ để nhận học vị Thạc sĩ được hay không?):

- Luận văn đáp ứng các yêu cầu về nội dung và hình thức đối với một luận văn
- Luận văn có thể đưa ra bảo vệ để nhận học vị Thạc sĩ

Hà Nội, ngày 12 tháng 5 năm 2024

Người phản biện  
(Ký, ghi rõ họ tên)



Lưu ý:

- Nhận xét được làm thành 02 bản, có chữ ký của người nhận xét và gửi về phòng Đào tạo 02 ngày trước buổi bảo vệ.
- Địa chỉ liên hệ: Nguyễn Thị Thanh Ngân phòng Đào tạo, Học viện Khoa học và Công nghệ, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam. 18 Hoàng Quốc Việt, Cầu Giấy, Hà Nội. ĐT: 0989322368

Họ và tên  
Chức danh  
Cơ quan c  
Họ và tên  
Tên đề tài  
in.vitn  
Chuyên n

1. Tính cá

Đề

cho

đang

.....

2. Sự kh  
đã công b  
liệu tham

Đề

t.n.v.

.....

3. Sự ph  
mã số đà

Đề

về

.....

.....

.....

.....

.....

BẢN NHẬN XÉT PHẢN BIỆN LUẬN VĂN THẠC SĨ

Họ và tên người nhận xét: Nguyễn Trung Nam ..... Học hàm, học vị: TIẾN SĨ  
Chức danh trong Hội đồng: UV PB  
Cơ quan công tác: Viện Công nghệ sinh học  
Họ và tên học viên: Đỗ Thị Thu Hiền  
Tên đề tài: Đánh giá hoạt động của vi khuẩn gây đờ TBUT  
in vitro của một số hợp chất phức tạp từ cây PLMN  
Chuyên ngành: Sinh học thực nghiệm. Mã số: 8 42 01 14 Bài Kạn.

NỘI DUNG NHẬN XÉT

1. Tính cấp thiết, tính thời sự, ý nghĩa khoa học và thực tiễn của đề tài luận văn:

Đề tài có ý nghĩa khoa học và thực tiễn luận văn cho kết quả tìm hiểu về NO, và gây đờ với một số dòng tế bào ung thư nghiên cứu.

2. Sự không trùng lặp của đề tài nghiên cứu so với các công trình khoa học, luận văn đã công bố ở trong và ngoài nước; tính trung thực, rõ ràng và đầy đủ trong trích dẫn tài liệu tham khảo:

Đề tài không trùng lặp với các công trình công bố trước đây.

3. Sự phù hợp giữa tên đề tài với nội dung nghiên cứu cũng như với chuyên ngành và mã số đào tạo:

Đề tài luận văn phù hợp và nổi bật nghiên cứu về chuyên ngành về mã số đào tạo.

**BẢN GIẢI TRÌNH CHỈNH SỬA LUẬN VĂN  
THEO KẾT LUẬN CỦA HỘI ĐỒNG ĐÁNH GIÁ LUẬN VĂN THẠC SĨ**

Họ tên học viên: Đỗ Thị Thu Hiền

Lớp: BIO-2022A

Tên đề tài luận văn: Đánh giá hoạt tính kháng viêm và gây độc tế bào ung thư *in vitro* của một số hợp chất phân lập từ cây Bầy lá một hoa (*Paris sp.*) tại xã Bình Văn, huyện Chợ Mới, tỉnh Bắc Kạn

Ngành: Sinh học thực nghiệm

Mã số: 8 42 01 14

Người hướng dẫn khoa học 1: PGS. TS. Đỗ Thị Thảo

Người hướng dẫn khoa học 2: PGS. TS. Hoàng Lê Tuấn Anh

Ngày bảo vệ luận văn: 14h ngày 15/05/2024

Căn cứ biên bản họp hội đồng đánh giá luận văn thạc sĩ, học viên đã chỉnh sửa luận văn như sau:

STT	Nội dung đề nghị bổ sung, chỉnh sửa	Nội dung đã bổ sung, chỉnh sửa
1	Thiếu tên tạp chí ở phần tài liệu tham khảo, cần chỉnh sửa lại đúng theo định dạng của Học viện.	Đã chỉnh sửa
2	Bỏ mục 2.3. Hóa chất và thiết bị trong Chương 2. Đối tượng và phương pháp nghiên cứu	Đã bỏ
3	Sửa Bảng 3.1 (Bỏ 2 cột giá trị IC <sub>50</sub> của cao EtOAc và cao BuOH không xác định)	Đã chỉnh sửa
4	Sửa Bảng 3.3, Bảng 3.4, Bảng 3.5, Bảng 3.6, Bảng 3.7 ( <sup>1</sup> H đo 600 MHz, <sup>13</sup> C đo ở 150 MHz)	Đã chỉnh sửa
5	Bổ sung tài liệu tham khảo của phần phương pháp phân lập hợp chất	Đã bổ sung

Hà Nội, ngày 22 tháng 05 năm 2024

CHỦ TỊCH HỘI ĐỒNG

TẬP THỂ HƯỚNG DẪN

HỌC VIÊN

GS.TS. Chu Hoàng Hà

PGS.TS. Đỗ Thị Thảo

PGS.TS. Hoàng Lê  
Tuấn Anh

Đỗ Thị Thu Hiền

XÁC NHẬN CỦA CƠ SỞ ĐÀO TẠO



Nguyễn Thị Trung