

VIỆN KHOA HỌC VÀ CÔNG NGHỆ VIỆT NAM  
VIỆN HÓA HỌC CÁC HỢP CHẤT THIÊN NHIÊN

**BÁO CÁO TỔNG KẾT  
ĐỀ TÀI HỢP TÁC THEO NGHỊ ĐỊNH THƯ  
VIỆT NAM – CHLB ĐỨC**

**TÊN ĐỀ TÀI:**

***NGHIÊN CỨU KHẢ NĂNG SINH CÁC CHẤT HOẠT ĐỘNG SINH HỌC  
CỦA MỘT SỐ LOÀI NẤM LỚN THUỘC BASIDIOMYCETES PHÂN LẬP  
TỪ RỪNG MƯA NHIỆT ĐỚI BẮC VIỆT NAM.  
(2006- 2008)***

*Cơ quan chủ trì:* Viện Hóa học các hợp chất thiên nhiên

*Chủ nhiệm đề tài:* TS. Lê Mai Hương

**7408**

15/6/2009

**Hà Nội, 2008**

# MỤC LỤC

<b>MỤC LỤC</b>	2
<b>PHẦN I. MỘT SỐ THÔNG TIN CHUNG VỀ ĐỀ TÀI</b>	4
1.1. Thời gian thực hiện	205
1.2. Kinh phí được duyệt	5
1.3. Danh sách cán bộ tham gia thực hiện dự án	6
1.4. Xuất xứ thỏa thuận đã có với đối tác nước ngoài	256
<b>PHẦN II. NỘI DUNG KHOA HỌC VÀ CÔNG NGHỆ CỦA NHIỆM VỤ</b>	7
1. Tình hình nghiên cứu	7
1.1. Tình hình nghiên cứu ở trong nước	257
1.2. Tình hình nghiên cứu ở ngoài nước	257
2. Mục tiêu của Nhiệm vụ	258
3. Nội dung nghiên cứu	258
4. Dự kiến sản phẩm	259
<b>PHẦN III. NGUYÊN LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP THỰC HIỆN</b>	10
3.1. Môi trường	10
3.2. Phương pháp nghiên cứu	11
❖ Phương pháp đánh giá hoạt tính enzym	12
❖ Phương pháp phân tích đường khử	12
❖ Thử hoạt tính gây độc tế bào (cytotoxicity)	13
❖ Phương pháp thử hoạt tính chống ôxi hoá	13
❖ Các phương pháp tách chiết và xác định cấu trúc hoá học	13
❖ Phương pháp phân loại các chủng nấm lớn	14
❖ Phương pháp nghiên cứu trên động vật thực nghiệm	14
<b>PHẦN IV. KẾT QUẢ THỰC NGHIỆM VÀ THẢO LUẬN</b>	16
A. PHÂN LẬP CÁC CHỦNG NẤM LỚN	16
I. Quy trình phân lập nấm	16
II. Kết quả phân lập	17
MỘT SỐ HÌNH ẢNH MẪU QUẢ THỂ NẤM THU THẬP ĐƯỢC	20
1. Phân lập các chủng nấm lớn tại rừng QG Cúc Phương và rừng QG Cát Bà	20
2. Phân lập các chủng nấm lớn tại rừng Tuyên Quang (12 chủng)	25
B. QUY TRÌNH CHIẾT TÁCH SƠ BỘ VÀ KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU HOẠT TÍNH SINH HỌC	20
I. Nghiên cứu khả năng sinh enzym của các chủng nấm phân lập được	26
1. Quy trình tách và tinh sạch enzym	26
2. Kết quả thử hoạt tính enzym	28
2.1. Khảo sát sơ bộ hoạt tính enzym trên đĩa thạch	28
2.2. Khảo sát khả năng sinh enzym laccaza, mangan peroxidaza và lignin peroxidaza của một số chủng nấm lớn có hoạt tính enzym phân lập từ vườn quốc gia Cúc phương	30
2.3. Nghiên cứu sự sinh tổng hợp enzym của chủng CP8	312
II. Kết quả sàng lọc hoạt tính sinh chống ôxy hoá, hoạt tính kháng vi sinh vật kiểm định, hoạt tính gây độc tế bào	36
1. Quy trình chiết tách sơ bộ dịch lên men của các chủng nấm	36
2. Kết quả thử hoạt tính	37
2.1. Hoạt tính chống oxy hoá trên hệ DPPH	367
2.2. Hoạt kháng vi sinh vật kiểm định	41
2.3. Kết quả hoạt tính gây độc tế bào ung thư	49

<b>III. Nghiên cứu cấu trúc các hợp chất phân lập được từ chủng nấm MA10, HT và hoạt tính sinh học của chúng</b> .....	55
<b>3.1. Chủng nấm MA10</b> .....	55
3.1.1. Quy trình phân lập chất .....	55
3.1.2. Kết quả phân lập chất và xác định cấu trúc .....	55
<b>3.2. Chủng nấm Hàu thủ (HT)</b> .....	59
3.2.1. Phương pháp 1 .....	59
3.2.2. Phương pháp 2 .....	62
<b>3.3. Kết quả thử nghiệm hoạt tính sinh học in vitro của các chất phân lập</b> .....	67
3.3.1. Kết quả thử hoạt tính gây độc tế bào .....	67
3.3.2. Kết quả thử hoạt tính kháng vi sinh vật kiểm định .....	67
3.3.3. Kết quả thử hoạt tính chống ôxi hoá.....	68
<b>IV. Kết quả phân loại một số chủng nấm lớn có hoạt tính cao</b> .....	69
4.1. Xác định trình tự vùng ITS-rDNA của chủng nấm phân lập MA5 và MA27 .....	69
4.2. Kết quả phân loại chủng MA10.....	70
4.3. Kết quả phân loại chủng HT .....	71
4.4. Chủng CP8 .....	72
4.5. Các chủng được phân loại tại CHLB Đức .....	73
<b>C. SẢN XUẤT VÀ THỬ NGHIỆM CHẾ PHẨM</b> .....	73
<b>I. Kết quả Thử nghiệm in vivo tính an toàn và hiệu lực của chế phẩm HT1 trên động vật thực nghiệm</b> .....	74
<b>II. Kết quả nghiên cứu an toàn của chế phẩm HT1</b> .....	74
<b>III. Kết quả nghiên cứu tác dụng bảo vệ phóng xạ của chế phẩm HT1</b> .....	80
<b>IV. Tác dụng của HT1 đối với quá trình tạo máu</b> .....	80
<b>PHẦN V. KẾT LUẬN</b> .....	892
<b>PHẦN VI. DANH SÁCH CÁN BỘ ĐƯỢC ĐÀO TẠO THÔNG QUA DỰ ÁN</b> .....	896
<b>PHẦN VII. DANH MỤC CÁC SẢN PHẨM CỦA ĐỀ TÀI</b> .....	897
<b>TÀI LIỆU THAM KHẢO</b> .....	90

## PHẦN I. MỘT SỐ THÔNG TIN CHUNG VỀ ĐỀ TÀI

### Đặt vấn đề:

Nấm lớn là một trong số các vi sinh vật hoại sinh có thể sống trong nhiều môi trường sinh thái, chúng có vai trò rất lớn trong việc thúc đẩy tốc độ của chu trình tuần hoàn vật chất tự nhiên, khoáng hoá các chất hữu cơ, làm sạch môi trường sinh thái và tăng độ phì nhiêu cho đất. Sau xenlulo, lignin là thành phần sinh học khổng lồ trong sinh quyển và là chất liệu cơ bản hình thành các chất mùn, than bùn và than đá. Là hợp phần của các polymer thơm, là phần gắn kết và rắn chắc của thành tế bào và các khoang của thực vật. Sự phân giải sinh học các polyme rắn chắc lignin bởi nấm lớn là một quá trình đặc biệt quan trọng cả về lợi ích sinh thái và công nghệ sinh học, chẳng hạn ứng dụng trong công nghệ dệt nhuộm và giấy, cải thiện đất trồng trọt, xử lý nước thải, tổng hợp sinh hoá học. Vai trò phân giải chất hữu cơ của nấm, đặc biệt là sự phân giải ligno-xenluloza chủ yếu là do các enzym ngoại bào thuộc nhóm peroxidase, đặc trưng nhất cho các enzym này là laccase và lignin peroxidase (LiP), manganese peroxidase (MnP) và versatile peroxidase (VP) (Hakkata, 2001). Các loài nấm được nghiên cứu là *Phanerochaete chrysosporium*, *Trametes versicolor*, *Dichomitus squalens*, *Phlebia radiata*, *Heterobasidium annosum*, *Phellinus pini*, *Cyathus stercoreus*, *Ceriporiopsis subvermispora*, *Polyporus* đều thuộc nhóm Nấm mục trắng (white rot fungi) (Hofrichter, 2002, 2004).

ở Việt nam, nấm lớn đã được chú ý từ lâu. Từ việc thu hái nấm tự nhiên cho đến nuôi trồng, du nhập giống mới từ nước ngoài. Cùng với sự phát triển của khoa học kỹ thuật, trong khoảng 10 năm trở lại đây, đã bùng nổ xu hướng sử dụng các nấm dược liệu từ việc bổ xung nguồn dinh dưỡng nhằm tăng cường sức khoẻ và hệ miễn dịch, cho tới điều trị hỗ trợ phòng và chống các bệnh hiểm nghèo. Tác dụng dương tính của xu thế này làm nấm lớn nói chung và nấm dược liệu nói riêng ngày càng trở thành tâm điểm chú ý của các nhà khoa học trong nước. Trong số các công trình nghiên cứu về nấm lớn ở Việt nam, trước hết phải kể đến các công trình của GS., TSKH Trịnh Tam Kiệt đã nhiều năm nghiên cứu khá cặn kẽ về nấm lớn ở Việt nam, sự phân bố, phân loại, hình thái và tiềm năng nói chung. Tiếp theo là PGS., TS. Lê bá Dũng với các công trình nghiên cứu nấm vùng Tây nguyên. TS. Lê Xuân Thám với nấm dược liệu nuôi trồng và du nhập từ nước ngoài, GS., TS. Nguyễn Lân Dũng với các phương pháp nuôi trồng nấm ăn và nấm dược liệu. Gần đây nhất là dự án hợp tác giữa Việt nam và Hàn quốc “**Phát triển công nghệ sản xuất nấm dược liệu phục vụ tăng cường sức khoẻ**” của PGS., TS. Nguyễn Thị Chính, trường đại học khoa học tự nhiên. Tuy nhiên, trong dự án này cũng như hầu hết các nghiên cứu khác, mới chủ yếu tập trung vào phân tích thành phần dinh dưỡng, các phương pháp nuôi trồng và tổng kết các kết quả nghiên cứu của nước ngoài như Nhật bản, Hàn quốc, Trung quốc về khả năng điều trị một số bệnh của các đối tượng nấm dược liệu như Linh chi, Vân chi, nấm đầu khỉ ... mà chưa có một khảo sát nghiêm túc nào về thành phần về thành phần hoá học các chất có hoạt tính sinh học ở các nấm dược liệu nói riêng và ở các nấm lớn nói chung. Đặc biệt là, cho tới nay, ở Việt nam chưa có một công bố nào về nghiên cứu các enzym ngoại bào có khả năng phân giải các chất hữu cơ khó tan từ nấm lớn

Tất cả các kết quả nghiên cứu trong và ngoài nước đều cho thấy nấm lớn quả là nguồn các chất có hoạt tính sinh học mới và cũng là nguồn gen đa dạng sinh học mới đầy hứa hẹn (Kenmoku H, et al., 2002. Timm Ankea, et al, 2002). Với ý vọng từ rừng mưa nhiệt đới Việt nam, với thảm thực vật vô cùng phong phú, cũng sẽ cung cấp cho chúng ta một bộ sưu tập nấm quý giá với các khả năng tiềm ẩn chưa được khai phá.

**Tên đề tài:**

**Nghiên cứu khả năng sinh các chất hoạt động sinh học của một số loài nấm lớn thuộc Basidiomycetes phân lập từ rừng mưa nhiệt đới Bắc Việt nam.**

**Chủ nhiệm dự án phía Việt Nam: Lê Mai Hương**

*Học hàm, học vị, chuyên môn* : Phó giáo sư, Tiến sĩ Sinh học-chuyên ngành Vi sinh vật

*Chức danh khoa học*: Nghiên cứu viên chính, TS. Từ tháng 9/2005 được công nhận là thành viên hội đồng biên tập tạp chí Agricultural Chemistry & Biotechnology của Hàn quốc ( The Korean Society for Applied Biological Chemistry)

*Điện thoại cơ quan*: 844.8361899

*Điện thoại nhà riêng*: 8449716567

*Điện thoại di động*: 0936190907

*Email*: lehuong00@yahoo.com

*Địa chỉ cơ quan*: 18 đường Hoàng Quốc Việt, Cầu giấy, Hà nội, Việt nam

*Địa chỉ nhà riêng*: 55A phố Hàng chuối, Hà nội, Việt nam

**Cơ quan chủ trì phía Việt Nam :**

*Cơ quan chủ trì*: Viện Hoá học các Hợp chất thiên nhiên, Viện KH & CN Việt nam

*Địa chỉ*: 18 đường Hoàng Quốc Việt, Cầu giấy, Hà nội, Việt nam

*Điện thoại*: 844.8360830

*Fax*: 844.7564390

**Chủ nhiệm đối tác nước ngoài: Martin Hofrichter**

*Học hàm, học vị, chuyên môn* : Giáo sư, TS Habil

*Điện thoại cơ quan*: 493583771521

*Email*: hofrichter@ihi-zittau.de

**Cơ quan đối tác nước ngoài: Viện các trường đại học quốc tế- Trường đại học tổng hợp Zittau, CHLB Đức**

*Địa chỉ*: Internationales Hochschulinstitut Zittau Markt 2302763 Zittau, Germany

University of Applied Sciences Hochschule Zittau/Görlitz Theodor-Körner-allee 16, 02763 Zittau, Germany

*Điện thoại*: (03583)771521

*Fax*: (03583)771534

**1.1. Thời gian thực hiện:**

03 năm: Từ tháng 1/2006 đến tháng 12/2008

**1.2. Kinh phí được duyệt:**

Kinh phí được cấp: **950 triệu đồng**

### 1.3. Danh sách cán bộ tham gia thực hiện dự án:

TT	Họ và tên	Cơ quan công tác	Số tháng làm việc cho nhiệm vụ
<b>A</b>	<b>Phía Việt Nam</b>		
1	PGS.TS. Lê Mai Hương	Viện Hoá học các HCTN	30
2	GS.TS. Châu Văn Minh	nt	16
3	ThS. Trần Thị Như Hằng	nt	16
4	ThS. Trần Thị Hồng Hà	nt	16
5	ThS. Đỗ Hữu Nghị	nt	16
<b>B</b>	<b>Phía đối tác nước ngoài</b>		
1	GS. TS. Martin Hofrichter	<i>Trường đại học tổng hợp Zittau, CHLB Đức</i>	24
2	GS.TS. Roland Schubert	nt	12
3	Ulrike Schneider	nt	24
4	TS. Rene Ullrich	nt	12
5	TS. Christiane Liers	nt	12

### 1.4. Xuất xứ thỏa thuận đã có với đối tác nước ngoài:

- 📅 Thời gian ký kết thỏa thuận: 30/ 8/2005
- 📅 Cấp ký kết thỏa thuận: Viện hoá học các Hợp chất thiên nhiên và Viện các trường đại học Zittau.
- 📅 Các nội dung thỏa thuận chính:
  - Thỏa thuận về trao đổi và hợp tác khoa học giữa hai cơ quan là viện Hoá học các HCTN và viện các trường đại học zittau bao gồm: Tổ chức các chương trình nghiên cứu; tổ chức các chuyến thăm viếng trao đổi của lãnh đạo giữa hai bên; đào tạo cán bộ khoa học và trao đổi kỹ thuật, nguyên vật liệu xuất bản và các thông tin khoa học có liên quan; tổ chức hội thảo.
  - Trước mắt, trong thời gian 2005- 2008, hai bên cùng hợp tác thực hiện dự án:” *Nhận diện, khai thác và tinh chế các enzym mới và các chất có hoạt tính sinh học từ nấm lớn (Basidiomycetes) phân lập từ rừng mưa nhiệt đới phía Bắc Việt nam*”. Ban chủ nhiệm dự án phía Việt nam là TS. Lê Mai Hương và PGS., TS. Châu Văn Minh, phía Đức là GS., TS. Martin Hofrichter và GS., TS. Roland Schubert.
  - Thỏa thuận có hiệu lực trong thời hạn 5 năm tính từ ngày kí và sẽ xem xét gia hạn tiếp tục cho phù hợp với điều kiện tại thời điểm đó của từng bên trước ít nhất là 3 tháng trước khi thỏa thuận hết hiệu lực

## PHẦN II. NỘI DUNG KHOA HỌC VÀ CÔNG NGHỆ CỦA NHIỆM VỤ

### 1. Tình hình nghiên cứu

#### 1.1. Tình hình nghiên cứu ở trong nước

Viện hoá học các hợp chất thiên nhiên là một trong các cơ sở đi đầu trong lĩnh vực đánh giá hoạt tính sinh học các chất có nguồn gốc thiên nhiên, bao gồm cả các chất từ nấm.

Phòng thí nghiệm: Gồm 15 phòng thí nghiệm của các phòng chuyên môn với đầy đủ trang thiết bị đầu tay phục vụ nghiên cứu mới được nâng cấp thông qua dự án đầu tư chiều sâu “Nâng cấp trang thiết bị thí nghiệm Viện hoá học các hợp chất thiên nhiên năm 2001”.

Trang thiết bị chủ yếu:

Các thiết bị phục vụ công tác chiết tách và xác định cấu trúc (sắc ký lỏng kết nối khối phổ HPLC –MS, sắc ký khí kết nối khối phổ GC – MS, phổ hồng ngoại IR, phổ tử ngoại UV, phổ cộng hưởng từ hạt nhân NMR (PTN Trung tâm).

Trong lĩnh vực nghiên cứu các hợp chất có nguồn gốc thiên nhiên ở Việt nam, phòng thí nghiệm thử hoạt tính sinh học do TS Hương phụ trách là phòng thí nghiệm đầu tiên tiến hành các kĩ thuật đánh giá hoạt tính sinh học các chất có nguồn gốc thiên nhiên theo các kĩ thuật hiện đại với các trang thiết bị tiên tiến hiện đang được tiến hành tại các labo có tên tuổi trên thế giới, bao gồm các kĩ thuật : Hoạt tính kháng vi sinh vật kiểm định, hoạt tính gây độc tế bào trên các dòng tế bào ung thư người, hoạt tính chống oxy hoá, ... Trong vài năm trở lại đây, phòng tập trung vào nghiên cứu các chất có hoạt tính sinh y dược học từ nấm dược liệu như *Agaricus blazei*, *Lentinus edodes*, *Hericium erinaceus*, *Coriolus versicolor*. Hiện phòng Sinh học thực nghiệm đang chủ trì thực hiện một số đề tài có liên quan đến nấm nói chung và nấm dược liệu nói riêng.

#### 1.2. Tình hình nghiên cứu ở ngoài nước

Mặc dầu trong điều trị bệnh bằng các thảo dược có đề cập tới vai trò tăng cường miễn dịch của nấm lớn, cũng cần nói thêm về khả năng hình thành các chất có hoạt tính kháng sinh từ các nấm này. Có thể nói, nấm lớn là nguồn các chất kháng sinh vô cùng phong phú từ tự nhiên. Các glucan thành tế bào của nấm là các chất có khả năng kích thích miễn dịch, còn các chất trao đổi thứ cấp lại có khả năng diệt khuẩn và kháng vi rút mạnh. Thêm vào đó, chúng còn có khả năng kháng kí sinh trùng, bao gồm cả kí sinh trùng sốt rét *Plasmodium falciparum* (UK Biodiversity Group). Tác giả khác (Sway et al., 2000) cũng đã nghiên cứu về hoạt tính kháng khuẩn và kháng nấm của nấm ăn, thuộc nhóm agaricales cho thấy nấm sò (*Pleurotus ostreatus*) có khả năng kháng nấm Asp. Niger là một trong số 31 nấm đáng gờm nhất có thể gây bệnh phổi nhà nông. Yamabushitake (*Hericium erinaceus*) cũng có hoạt tính kháng nấm mốc *Aspergillus niger* và nấm men *Saccharomyces cerevisiae*. Ngoài ra, nấm này còn có hoạt tính trên dòng tế bào HeLa (Kenmoku H., et al., 2002). Bên cạnh các chất trao đổi phân tử nhỏ ngoại bào có hoạt tính mà các chất phân tử lớn cũng biểu hiện hoạt tính kháng vi sinh vật gây bệnh. Chẳng hạn polysaccharide lentinan từ nấm Hương

(*Lentinus edodes*) và schizophyllum nấm lỗ (*Schizophyllum commune*) cũng biểu hiện hoạt tính kháng nấm men gây bệnh *Candida albicans* và tụ cầu vàng *Staphylococcus aureus*. Lentinan còn có hoạt tính ức chế *Mycobacterium tuberculosis* và *Listeria monocytogenes*, trong khi đó chất chiết từ khuẩn ty nấm còn có hoạt tính kháng virus herpes virus type 1 (HSV-1). Thêm nữa, các polysaccharides như lentinan có thể kích thích hệ thần kinh và có hiệu quả trong điều trị Alzheimer (Mizuno, T., 1995). Còn các nghiên cứu khác trên nấm vân chi (*Trametes versicolor*) cũng ức chế *Candida albicans*. Một nghiên cứu khảo sát trên 13 bệnh nhân nữ bị bệnh nấm trên thì có kết quả tốt trên 12 người sau khi với nấm đông cô gà gỗ (*Grifola frondosa*). Tất cả các kết quả đều cho thấy nấm lớn quả là nguồn các chất có hoạt tính sinh học mới và cũng là nguồn gen đa dạng sinh học mới đầy hứa hẹn (Kenmoku H, et al., 2002. Timm Ankea, et al, 2002)

## **2. Mục tiêu của Nhiệm vụ**

- Góp phần tìm hiểu và bổ xung nguồn đa dạng lớn các nấm lớn phân bố ở vùng rừng mưa nhiệt đới Bắc Việt nam.
- Tìm kiếm, sàng lọc các chất có hoạt tính sinh học và các chất xúc tác sinh học mới phục vụ đời sống; nâng cao hiệu quả sử dụng thông qua các dữ liệu đánh giá về hoạt tính và cấu trúc một số chất có hoạt tính.
- Nâng cao trình độ, cập nhật kiến thức nghiên cứu khoa học của cán bộ thông qua trao đổi hợp tác với nước bạn. Tăng cường tiềm lực khoa học bao gồm cả cơ sở vật chất và thiết bị.

## **3. Nội dung nghiên cứu:**

### **Nội dung nghiên cứu trong nước**

- ❖ Phân lập các chủng nấm mới từ gỗ mục, các cành cây gãy và từ các thảm lá mục ở các địa điểm quần thể khác nhau của rừng mưa nhiệt đới Bắc Việt nam: Cúc phương (Ninh bình), Cát bà (Quảng ninh), Sapa (Lào cai).
- ❖ Lập bộ giống nấm và bảo tồn bao gồm các chủng phân lập có hoạt tính đáng chú ý (10-50 chủng) và 1-2 chủng mới du nhập từ nước bạn
- ❖ Sàng lọc sơ bộ hoạt tính enzym peroxidases phân giải lignin từ các nấm trong bộ sưu tập.
- ❖ Sàng lọc các chất có hoạt tính phục vụ y học từ dịch nuôi cấy các nấm sưu tập theo hướng kháng vi sinh vật kiểm định, kháng u, chống oxy hoá; Nghiên cứu hoá học các chất có hoạt tính theo định hướng hoạt tính sinh học
- ❖ Sản xuất 01 chế phẩm thực phẩm chức năng thử nghiệm trên động vật thực nghiệm
- ❖ Sản xuất và thử nghiệm 01 chế phẩm enzym thô trên hiện trường với qui mô nhỏ
- ❖ Đào tạo và xuất bản.

### **Nội dung và kế hoạch hợp tác với đối tác nước ngoài**

- ❖ Nhận dạng và xác định tên phân loại của các chủng nấm
- ❖ Sản xuất, tinh chế và các đặc tính của enzym haloperoxidases, laccases, arylalcohol oxidases và các peroxidases phân giải lignin các chủng có hoạt tính cao
- ❖ Phân lập và trình tự gen của các chủng nấm có hoạt tính tiêu biểu
- ❖ Tách chiết và nghiên cứu hoá học các chất có hoạt tính
- ❖ Thử nghiệm ứng dụng
- ❖ Đào tạo cán bộ và xuất bản

### **4. Dự kiến sản phẩm:**

- ❖ Bộ giống nấm thu thập và phân lập được ở vùng rừng núi phía Bắc Việt nam và lí lịch sinh thái
- ❖ Tên khoa học các chủng nấm phân loại được.
- ❖ Các dữ liệu về hoạt tính sinh học của các chủng nấm phân lập được: hoạt tính kháng sinh, gây độc tế bào, chống ôxy hoá...
- ❖ Tính chất hoá học các chất có hoạt tính bao gồm các dữ kiện về phổ, cấu trúc và các tính chất hoá lí khác.
- ❖ Chế phẩm enzym dạng thô
- ❖ Enzym tinh sạch
- ❖ Chế phẩm nấm thô có hoạt tính sinh học khác, chẳng hạn hoạt tính giảm cholesterol huyết trên chuột thí nghiệm
- ❖ Các chương trình xử lý số liệu và phân tích kết quả
- ❖ Công bố 5- 10 bài báo và báo cáo hội nghị, đào tạo NCS, thạc sĩ và sinh viên

### PHẦN III. NGUYÊN LIỆU VÀ CÁC PHƯƠNG PHÁP THỰC HIỆN

#### 3.1. Môi trường

❖ **Môi trường phân lập nấm:** Mẫu nấm được phân lập trên môi trường thạch malt 20% có thể bổ sung các chất kháng sinh kháng khuẩn hoặc kháng nấm trong các trường hợp cần thiết nếu mẫu phân lập có nguy cơ nhiễm nấm hoặc vi khuẩn cao. Các kháng sinh sử dụng là: Chloramphenicol, Penicillin, Streptomycin, Benomyl 50 g/l và Nystatin 40 g/l.

❖ **Môi trường nuôi cấy nấm:**

-Môi trường Khoai tây (g/l): Khoai tây 200; Đường 20; Thạch 15;

-MT Giá đỗ (g/l): Giá đỗ 1%; Đường 2%; Pepton 0,5%

-MT3 Cám gạo (g/l): Cám gạo 1%; Đường 2%; Pepton 0,5%.

-MT4 Bột cá (g/l): Bột cá nhạt 1%; Đường 2%; Pepton 0,5%.

-MT5 Bột ngô (g/l): Bột ngô 1%; Đường 2%; Pepton 0,5%.

-MT6 Đậu tương (g/l): Bột đậu 1%; Đường 2%; Pepton 0,5%.

Sáu loại MT trên được lọc thô bằng vải lọc sau đó đổ vào bình tam giác 250ml lượng dịch là 100ml tương ứng với từng loại MT.

-MT bổ sung vitamin: Khoai tây 1%; Đường 2%; Pepton 0,5%; vitamin B1 50mg/l; Vitamin B2 1mg/l; inozitol 50mg/l.

❖ **Môi trường thử hoạt tính enzym**

- Kirk [g/l]: Glucoza 20; 2,2' Dimetyl succinat 2,2;  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  2;  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0,5;  $\text{CaCl}_2$  0,1;  $\text{NH}_4\text{C}_4\text{H}_4\text{O}_6$  0,25; Cao nấm men 0,1; Agar: 20; pH=5.

- MT Malt [g/l]: mạch nha: 50; Soya-Pepton: 3; Agar: 20; pH=5,6-6.

- MT Đậu tương [g/l]: Đậu tương bột: 30; Agar: 20; pH=5,5.

- MT khoai tây [g/l]: Khoai tây: 200; Glucoza: 20; Agar: 15; pH=5,5.

- MT Cà chua: 400ml nước cà chua (200g cà chua gọt vỏ, bỏ hạt, bổ xung 200ml  $\text{H}_2\text{O}$  cất, xay nhỏ); Agar: 20g; bổ xung nước cất cho đủ 1000ml.

- MT Bột gỗ [g/l] : Bột gỗ: 30; Agar: 15; pH=5,5.

- Dung dịch khoáng:  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  1g; axit xitric: 2,5g

- MT thử hoạt tính Xenluloza: Dung dịch khoáng 200ml; 1g Na-CMC; 4g thạch.

- MT thử hoạt tính Amilaza: Tinh bột tan 2g; 200ml dung dịch khoáng; 4g thạch.

- MT thử khả năng khuếch tán của Enzyme phân giải Lignin: Môi trường Malt; chất chỉ thị ABTS [2,2'-azinobis(3-ethylthiazoline-6-sulfonate)]

- Mt thử hoạt tính phân giải lipid:  $\text{CaCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ : 0,001g; pepton: 5g; thạch: 15g; Tween 80: 10ml (bổ xung sau khi khử trùng)

- Các môi trường nuôi cấy và thử hoạt tính enzym: Nuôi cấy nấm trên 9 môi trường có các thành phần dinh dưỡng khác nhau có kí hiệu SH1- SH9 dựa trên môi trường cơ bản là môi trường Kirk (kí hiệu: K) [g/l]: Glucoza 20; 2,2' Dimetyl succinat 2,2;  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  2;  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0,5;  $\text{CaCl}_2$  0,1;  $\text{NH}_4\text{C}_4\text{H}_4\text{O}_6$  0,25; Cao nấm men 0,1; pH=5.

+ Môi trường SH1: K + 0,1mM  $\text{MnCl}_2$

+ Môi trường SH2: K + 0,2mM  $\text{MnCl}_2$

+ Môi trường SH3: K + 1,0mM  $\text{MnCl}_2$

+ Môi trường SH4: K + 2,0mM  $\text{MnCl}_2$

+ Môi trường SH5: K + 4,0mM  $\text{MnCl}_2$

+ Môi trường SH6: K + 10,0mM  $\text{MnCl}_2$

+ Môi trường SH7: K + 50ml Malt+10ml cà chua

+ Môi trường SH8: K + 30 ml cà chua+ 30ml  $\text{H}_2\text{O}$

❖ **Môi trường nuôi cấy và thử hoạt tính vi sinh vật theo phương pháp pha loãng liên tục trên phiên vi lượng 96 giếng.**

- MT (nuôi cấy vi khuẩn): Môi trường Eurgon Broth (Difco, Mỹ).
- MT thử hoạt tính nấm: Môi trường Mycophil (Difco, Mỹ).

❖ **Môi trường nuôi cấy các dòng tế bào ung thư:**

Môi trường MEME (Minineal Essential Medium with Eagle's salts) bổ sung 7-10% huyết thanh bê tươi, 1% dịch kháng sinh (PSF) và 1% NAA (Nonessential Amino Acid). Hoặc môi trường DMEM (Dulbecco's modified Minimum Essential Medium): 10% huyết thanh bê tươi, 1% dịch kháng sinh (PSF), 1% NAA.

Dịch kháng sinh PSF: 100 đơn vị/ml Penicilin G; 100µg/ml Streptomycin sulfate; 0,25µg/ml Amphotericin B

❖ **Môi trường nuôi cấy thử hoạt tính vi sinh vật trên thạch đĩa.**

- MT thạch thường (đối với vi khuẩn): Nước chiết thịt 50ml (cao thịt 2,5gam); Pepton 10 gam; NaCl 5 gam; Nước 1lit; Thạch 15g/l. Tiệt trùng ở 110 độ C, 30 phút
- MT Sabouroud (đối với nấm): Pepton 10 gam; Glucoza 30 gam; Thạch 15 gam; Nước 1 lít. Tiệt trùng 110° C/ 30 phút

### **3.2. Phương pháp nghiên cứu**

❖ **Phương pháp phân lập nấm lớn**

Phân lập từ mẫu quả thối:

Quả thối nấm được thu thập từ đất, cây gỗ, được giữ lạnh 4°C nếu chưa phân lập ngay. Quả thối được rửa sạch vài lần với nước máy và tráng bằng nước cất khử trùng, khử trùng bề mặt bằng cồn, cuối cùng rửa sạch cồn với nước cất. Dùng dao lam cắt gọt phần mô bên ngoài (gọt khoảng 2-3 lần với dao lam vô trùng) làm lộ lớp mô bên trong. Cắt những phần mô vô trùng này thành những mảnh có kích thước 5-10mm<sup>2</sup>. Cấy các mảnh mô này vào môi trường Malt (nếu cần có thể bổ sung kháng sinh), ủ trong bóng tối, ở nhiệt độ 25-27°C. Sau 24-72 giờ hệ sợi bắt đầu mọc. Tách hệ sợi nấm tinh khiết ra đĩa petri khác chứa môi trường Malt vô trùng.

**Bảo quản giống:** Khi khuẩn lạc được tạo thành, tiếp tục tách hệ sợi nấm sang ống thạch nghiêng chứa môi trường Thạch-Khoai tây-Pepton, để khoảng 12-15 ngày trong tủ ẩm đến khi thấy hệ sợi bao phủ hết bề mặt môi trường, khi đó đem cất các ống này vào tủ lạnh 4-10°C để giữ làm giống gốc hay giống cấp I.

Phân lập từ mẫu thảm lá, thân cây mục và đất:

Mẫu thảm lá mục rừng thường có chứa nhiều loại nấm và vi sinh vật. Mẫu được thu trong bình tam giác vô trùng, đặt nắp bông cẩn thận, mang về phòng thí nghiệm, việc phân lập tiến hành trong thời gian 24 giờ từ khi lấy mẫu. Mẫu cho vào bình nón vô trùng chứa nước cất vô trùng, lắc đều. Hút 1ml dung dịch mẫu trộn đều vào môi trường Malt trong hộp petri đã vô trùng, để tủ ẩm 25-27°C, sau vài ngày khi thấy hệ sợi mọc trên mặt môi trường ta tách hệ sợi nấm sang ống thạch nghiêng rồi bảo quản như trình bày ở trên.

### ❖ *Phương pháp đánh giá hoạt tính enzym*

- Phương pháp thử khả năng phân giải Tinh bột, Xenlulo, Lignin, protein, lipid, kitin, fucoidan:

Tiến hành đun cách thủy môi trường chứa 7 loại cơ chất cần phân giải, sau đó đổ môi trường ra đĩa petri, để nguội.

Xác định khả năng phân giải bằng phương pháp cấy khuẩn ty trực tiếp vào môi trường chứa cơ chất cần phân giải và nhỏ dịch vào môi trường bằng phương pháp đục lỗ thạch. Đối với các mẫu thử khả năng phân giải Tinh bột, Xenluloza, kitin và fucoidan nhuộm bằng dung dịch Lugol 15 phút, sau đó rửa bằng nước muối 1N. Đánh giá hoạt tính enzym bằng kích thước vòng phân giải.

Công thức pha dịch Lugol: Iốt tinh thể 1g; KI 2g; Nước cất 100-300 ml.

Mẫu thử protein thuốc nhuộm là TCA 5%,

- Phương pháp xác định enzym ngoại bào phân giải ligno-xenlulo trên: Nuôi cấy 9 chủng nấm phân lập được lên các đĩa petri với 6 loại môi trường khác nhau ở trên. Thu mẫu sau 7 ngày, mẫu được nghiền nhỏ và chiết bằng dung dịch đệm citrate (0,5M, pH=4,5), siêu âm 5 phút, sau đó ly tâm 10 phút-14000v/phút, thu lấy phần dịch trong bên trên để xác định hoạt độ enzym. Hoạt độ enzym lignin peroxidaza được xác định bằng phương pháp oxi hoá veratryl alcohol tại pH=3 ( $\epsilon_{310}=9,3\text{mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ) [6]. Mn peroxidaza được xác định trực tiếp bởi sự tạo thành phức  $\text{Mn}^{3+}$ -malonate, phản ứng được bắt đầu bằng việc bổ sung  $\text{H}_2\text{O}_2$  và tiếp theo là sự tăng độ hấp thụ tại bước sóng 270nm trong 2 phút. ( $\epsilon_{270}=11,59\text{mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ) [7]. Hoạt tính Laccaza được xác định bởi 2 chất Syring aldazine và ABTS ( $\epsilon_{420}=36\text{mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ) [8]. Tất cả hoạt tính enzym được biểu diễn bằng đơn vị U, 1 U là 1  $\mu\text{mol}$  cơ chất bị oxi hoá trong 1 phút.

- Phương pháp xác định Sự sinh tổng hợp enzyme của các chủng nấm phân lập trên môi trường dịch thể: Các chủng nấm phân lập được nuôi cấy trên các môi trường dịch thể thích hợp, lắc 100v/ph, ở  $24^\circ\text{C}$ , với dịch môi trường trong bình cầu 500ml: MT Kirk; MT Khoai tây, MT dịch cà chua, MT Đậu tương. Hoạt tính Laccaza được xác định qua sự oxy hóa 2,2'-Azinobis-(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonate) (ABTS) ở 420nm ( $E_{420}=36\text{mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ) (Eggert et al, 1996). Hoạt tính Mn peroxidaza và LiP được xác định qua sự tạo thành phức  $\text{Mn}^{3+}$ -malonat và vetraldehyt, phản ứng được bắt đầu khi thêm  $\text{H}_2\text{O}_2$  10mM (Wariishi et al, 1992 và Kirk et al, 1986). Enzym Aap được đo ở bước sóng 310nm (Varian, CHLB Đức) qua sự oxy hóa veratryl alcohol thành vetraldehyt ( $E_{310}=9,3\text{mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ), phản ứng được thực hiện ở pH 7,0 và bắt đầu phản ứng khi thêm  $\text{H}_2\text{O}_2$  100mM (Martin et al, 2004). Kết quả được tính theo đơn vị quốc tế (1U= $\mu\text{mol}$  phút<sup>-1</sup>).

- Xác định hoạt tính lignoperoxidase trên phiên 96 giếng: Sau quá trình nuôi cấy, phần sinh khối sẽ được lọc và đem đi sấy, 00 $\mu\text{l}$  dịch ABTS (0,25g/l). Cho phản ứng diễn ra 30 phút ta đem đo OD bước sóng 450nm. Đây là một phương pháp cho được kết quả nhanh, đáng tin cậy, tiết kiệm nguyên liệu và hoá chất.

- Phương pháp tách và tinh sạch enzym:

### ❖ *Phương pháp phân tích đường khử*

Macroassay cho đường khử:

*Chuẩn bị thuốc thử Nelson A (g/l):*  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ : 25;  $\text{KNaC}_4\text{H}_8\text{O}_6.4\text{H}_2\text{O}$ : 23;  $\text{NaHCO}_3$ : 20;  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ : 20.

*Chuẩn bị thuốc thử Nelson B:*

a.  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  15%; b.  $\text{H}_2\text{SO}_4$  : 1-2 giọt/100ml

Hỗn hợp Nelson A-B được trộn theo tỉ lệ 25:1 (v/v)

*Chuẩn bị thuốc thử Nelson C:*

Dung dịch 1:  $\text{NH}_4\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ : 33g;  $\text{H}_2\text{O}$ : 600ml; Dung dịch 2:  $\text{Na}_2\text{HAsO}_4$ : 9,4g;  $\text{H}_2\text{O}$ : 50ml. Trộn hai dung dịch 1 và 2 rồi thêm 42 ml  $\text{H}_2\text{SO}_4$  đậm đặc, định mức đủ 1 lít, đặt ở 37°C trong 1-2 ngày trước khi sử dụng.

*Tiến hành:* 250  $\mu\text{l}$  mẫu + 250  $\mu\text{l}$  Nelson A-B, đun cách thủy trong 10 phút, để nguội. Bổ sung 250  $\mu\text{l}$  Nelson C  $\rightarrow$  đo OD750nm.

Microassay cho đường khử:

xét nghiệm microassay cho đường khử là sự biến đổi của phản ứng Nelson Somogyi. Trong đĩa 96 giếng, 25 $\mu\text{l}$  mẫu và 25 $\mu\text{l}$  cơ chất tương ứng tan trong 0,1M đệm citrate pH 5, được cho vào mỗi giếng. Phiến nhựa được che phủ bởi tấm dính acetate và được ủ ở 40°C trong 24h. Sau khi ủ, 75 $\mu\text{l}$  tác nhân đồng Somogyi thêm vào, và mở giếng ra. Phiến sau đó ủ ở 80°C trong 30 phút trong bể ổn nhiệt. Sau khi làm mát nhanh phiến nhựa, 75 $\mu\text{l}$  chất arsenomolybdate được thêm vào, và các giếng được trộn kỹ bằng máy Vortex. Đọc màu bằng phản chiếu tại bước sóng 500nm bằng máy bước sóng song song Shimadzu. Đường cong chuẩn được dựng bằng cách dùng glucose tại nồng độ từ 100 đến 2000  $\mu\text{g/ml}$ .

#### ❖ *Phương pháp thử hoạt tính kháng vi sinh vật kiểm định (Antimicrobial activity).*

Hoạt tính kháng Vi sinh vật kiểm định được tiến hành để đánh giá hoạt tính kháng sinh của các mẫu chiết được thực hiện trên các phiến vi lượng 96 giếng theo phương pháp hiện đại của Vander Bergher và Vlietlinck (1991), và MCKane, L., & Kandel (1996).

#### ❖ *Thử hoạt tính gây độc tế bào (cytotoxicity)*

Theo phương pháp của Likhiwitayawuid và cs., 1993 đang được tiến hành tại viện nghiên cứu ung thư Quốc gia của Mỹ (NCI). Dựa trên phương pháp nuôi cấy tế bào ung thư invitro của các tác giả Geran và cs, 1972; Pezutto và cs., 1983 và Skehan và cs, 1990. Phương pháp này đã được phòng thí nghiệm thử hoạt tính sinh học viện hoá học các hợp chất thiên nhiên triển khai áp dụng từ năm 1996,.

#### ❖ *Phương pháp thử hoạt tính chống ôxi hoá*

Thử hoạt tính chống ôxi hoá theo phương pháp của Shela G., Olga, M. B., Elena, K., và cs (2003)

#### ❖ *Các phương pháp tách chiết và xác định cấu trúc hoá học*

Điểm nóng chảy được đo trên máy BOTIUS (Heiztisch Mikroskop) của Đức. Phổ khối bụi electron ESI-MS được đo trên máy Thermo Finnigan LCQ Advantage spectrometer. Phổ cộng hưởng từ hạt nhân  $^1\text{H}$ - (500MHz) và  $^{13}\text{C}$ - (125MHz) được ghi trên máy Bruker AM500 FT-NMR sử dụng TMS làm chất chuẩn nội. Sắc kí cột dùng silica gel Merck (Kieselgel 60, 70-230 mesh và 230-400 mesh), sắc kí lớp mỏng phân tích dùng bản  $\text{SiO}_2$  tráng sẵn trên đế nhôm của Merck, độ dày 0.2mm. Dung môi được cất lại và làm khan trước khi dùng.

### ***Sắc ký lớp mỏng (TLC)***

Sắc ký lớp mỏng được thực hiện trên bản mỏng tráng sẵn DC-Alufolien 60 F<sub>254</sub> (Merck 1,05715), RP<sub>18</sub> F<sub>254s</sub> (Merck). Phát hiện chất bằng đèn tử ngoại ở hai bước sóng 254 nm và 368 nm hoặc dùng thuốc thử là dung dịch H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 10% được phun đều lên bản mỏng, sấy khô rồi hơi nóng từ từ đến khi hiện màu.

### ***Sắc ký lớp mỏng điều chế***

Sắc ký lớp mỏng điều chế thực hiện trên bản mỏng tráng sẵn Silica gel 60G F<sub>254</sub> (Merck, ký hiệu 105875), phát hiện vết chất bằng đèn tử ngoại hai bước sóng 254 nm và 368 nm, hoặc cắt rìa bản mỏng để phun thuốc thử là dung dịch H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 10%, hơi nóng để phát hiện vết chất, ghép bản mỏng lại như cũ để xác định vùng chất, sau đó cạo lớp Silica gel có chất, giải hấp phụ thu được chất cần tinh chế.

### ***Sắc ký cột (CC)***

Sắc ký cột được tiến hành với chất hấp phụ là Silica gel pha thường và pha đảo. Silica gel pha thường có cỡ hạt là 0,040-0,063 mm (240-430 mesh). Silica gel pha đảo ODS hoặc YMC (30-50 µm, Fujisilisa Chemical Ltd.). Nhựa trao đổi ion Dianion HP-20 (Mitsubishi Chem, Ind, Co., Ltd.)

### ***Phổ cộng hưởng từ hạt nhân (NMR)***

Được đo trên máy Bruker DRX500 của Viện Hóa học, Viện Khoa học và Công nghệ Việt Nam.

### ***Phổ khối lượng (ESI-MS)***

Được đo trên máy LC-MSD Agilent 1200 Series (USA) của Viện Hóa học các Hợp chất Thiên nhiên, Viện Khoa học và Công nghệ Việt Nam.

## ***❖ Phương pháp phân loại các chủng nấm lớn***

- Nấm sau khi được phân lập, tiến hành nuôi cấy thu sinh khối.
- Tách chiết ADN theo phương pháp của Jonh Pikin 2003
- Kiểm tra ADN theo phương pháp điện di AND
- Tiến hành PCR, dung đoạn mồi ITS1/ITS4 và đoạn mồi NL1, NL2 của rARN 28S
  - + Trình tự đoạn mồi ITS1/ITS4:  
ITS1: 5'TCCGTAGGTGAACCTGGGG3'  
ITS4: 5'TCCTCCGCTTATTGATATGCATATGC3'
  - + Trình tự đoạn mồi NL1/NL4 của rARN 28S:  
NL1: 5'GCATATCAATAAGCGGAGGAAAAG3'  
NL4: 5'GGTCCGTGTTTCAAGACGG3'
- Điện di ADN
- Tinh sạch sản phẩm PCR bằng bộ kit của hãng QIAGEN
- Kiểm tra nồng độ và độ tinh sạch của sản phẩm PCR trên máy quang phổ
- Nhân AND sợi đơn cho sequence, theo phương pháp và hoá chất của hãng Apply Biosystem.
- Đọc trình tự ADN bằng máy sequence, theo phương pháp của hãng Apply Biosystem.

## ***❖ Phương pháp nghiên cứu trên động vật thực nghiệm***

### ***Tạo chế phẩm HT1 :***

Chúng tôi đã tạo chế phẩm HT1 ở dạng nước và bột bằng phương pháp chiết nóng dựa trên kết quả hoạt tính ở trên là phần hoạt tính nằm chủ yếu ở phần nước chiết trong nước nóng bằng phương pháp cổ truyền là sắc thuốc.

Chế phẩm HT1 dạng bột và dạng hỗn dịch, dùng đường uống, đạt yêu cầu về nguyên liệu cho động vật thí nghiệm. Khi dùng cho uống bằng sonde dạ dày

Các hóa chất và kit xét nghiệm đạt cấp độ phân tích.

Động vật thí nghiệm :

+ Thỏ trưởng thành, khỏe mạnh, trọng lượng  $2,0 \pm 0,2$  kg đạt tiêu chuẩn nghiên cứu.

+ Chuột nhắt trắng trọng lượng  $20,0 \pm 2,0$  g đạt tiêu chuẩn nghiên cứu.

Động vật thí nghiệm được nuôi dưỡng theo quy định trong phòng thí nghiệm chuyên dụng được lý 1 tuần trước khi làm thí nghiệm.

Phương pháp nghiên cứu :

Phương pháp của Abraham W.B.; Turner A. và theo quy định của WHO và Bộ Y tế về an toàn và hiệu lực của chế phẩm có nguồn gốc từ thiên nhiên

Phương pháp nghiên cứu an toàn của HT1 trên thực nghiệm

Chọn thỏ khỏe mạnh, trọng lượng  $2,0 \pm 0,2$  kg, chia làm 2 nhóm, mỗi nhóm 08 con.

+ Nhóm chứng : uống dung môi dùng để pha chế phẩm nghiên cứu, liều 1ml/1kg TLCT

+ Nhóm HT1 : uống HT1 các mức liều trong thể tích 1ml/1kg TLCT

Trong thời gian thí nghiệm, theo dõi chặt chẽ tình trạng chung, trọng lượng cơ thể ( hàng tuần ), kết quả sinh hoá, huyết học, tình trạng tim mạch, so sánh với nhóm chứng. Thời gian theo dõi trong 6 tuần

Lấy máu xét nghiệm các chỉ số sinh hóa, huyết học tại 3 thời điểm : xuất phát điểm, sau 3 tuần, sau 6 tuần nghiên cứu.

Phương pháp nghiên cứu bảo vệ phóng xạ của HT1

\* Phương pháp chiếu xạ: Theo phương pháp được mô tả bởi Gonchavenko E.N và Vasin MV

Chuột nhắt trắng (CNT) được chiếu xạ (CX) bằng tia gamma từ nguồn Cobalt-60 trên máy tại bộ môn – khoa Phóng xạ - Viện Quân y 103 – Học viện Quân y. Liều chiếu xạ từ 5,5 Gy đến 8,5 Gy tùy theo mục đích nghiên cứu của từng nhóm.

\* Nghiên cứu một số chỉ tiêu về máu và tạo máu.

- Đếm số lượng hồng cầu (HC), bạch cầu (BC), tiểu cầu (TC) máu ngoại vi trên các máy xét nghiệm tự động.

- Trọng lượng lách, hạch lympho, tuyến ức CNT ở các ngày thứ 2, 4, 9 sau chiếu xạ, được cân trên cân chính xác.

- Mô học của lách, hạch lympho, tuyến ức CNT được tiến hành tại khoa giải phẫu bệnh lý – Học viện Quân y.

**Xử lý kết quả :**

Các kết quả thu được, được xử lý theo phương pháp thống kê y sinh học, sử dụng phần mềm EXCEL để tính toán.

## PHẦN IV. KẾT QUẢ THỰC NGHIỆM VÀ THẢO LUẬN

### A. PHÂN LẬP CÁC CHỦNG NẤM LỚN

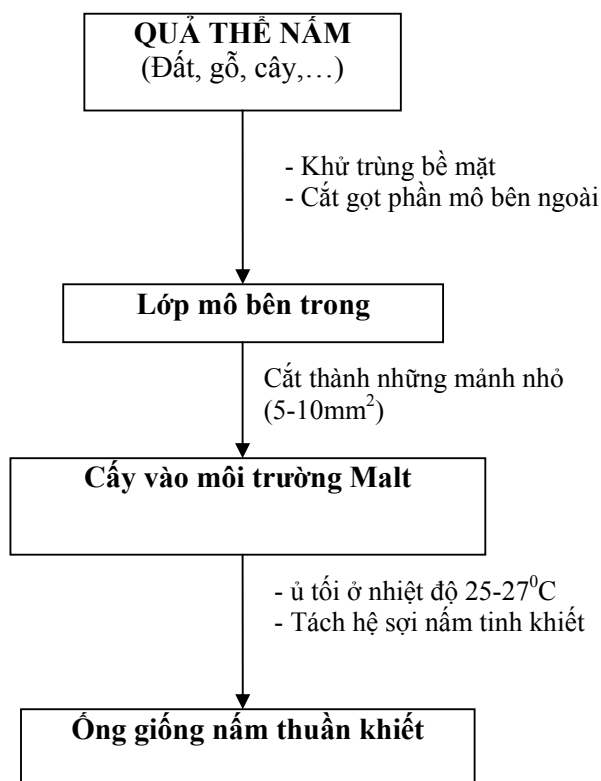
#### I. Quy trình phân lập nấm

Các mẫu được thu thập tại rừng quốc gia Cúc phương, Cát bà, Tuyên quang và một số vùng khác. Các mẫu được xử lý trước khi đem phân lập, sau đó cấy các mẫu này vào môi trường Malt (nếu cần có thể bổ sung kháng sinh), ủ trong bóng tối, ở nhiệt độ 25-27<sup>0</sup>C. Sau 24-72 giờ hệ sợi bắt đầu mọc. Tách hệ sợi nấm tinh khiết ra đĩa petri khác chứa môi trường Malt vô trùng.

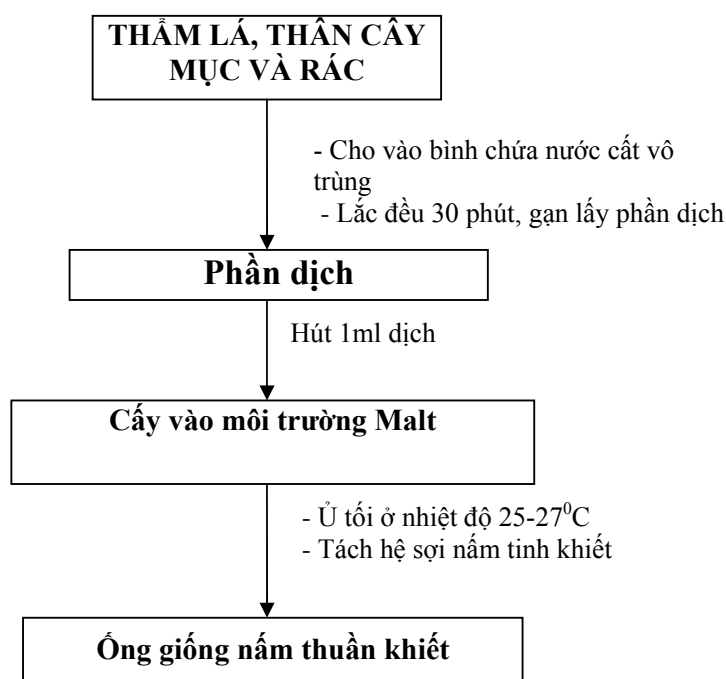
**Bảo quản giống:** Khi khuẩn lạc được tạo thành, tiếp tục tách hệ sợi nấm sang ống thạch nghiêng chứa môi trường Thạch-Khoai tây-Pepton, để khoảng 12-15 ngày trong tủ ấm đến khi thấy hệ sợi bao phủ hết bề mặt môi trường, khi đó đem cất các ống này vào tủ lạnh 4-10<sup>0</sup>C để giữ làm giống gốc hay giống cấp I.

Các quy trình phân lập được thể hiện ở các sơ đồ 1 và 2:

Sơ đồ 1: Quy trình phân lập từ mẫu quả thể nấm:



Sơ đồ 2: Quy trình phân lập từ mẫu thảm lá, thân cây mục và rác thải:



## II. Kết quả phân lập

Chúng tôi đã phân lập được tất cả 100 chủng nấm, trong đó 72 chủng được phân lập tại phòng Phòng Sinh học thực nghiệm – Viện Hoá học các HCTN và 28 chủng được phân lập tại CHLB Đức. Trong số 100 chủng thì có 57 chủng được phân loại tại CHLB Đức và hiện tại chúng tôi chỉ lưu giữ 42 chủng có hoạt tính cao và lý lịch rõ ràng. Kết quả được thể hiện ở bảng 1

**Bảng 1: Kết quả phân lập**

STT	KH chủng	Nguồn gốc	Tên phân loại	Tình trạng (đang lưu giữ)
1	MA6	Cát Bà	<i>Xylaria</i> sp.	
2	MA 1	Cát Bà	<i>Ganoderma</i> sp.	+
3	MA 3	Cát Bà	<i>Lepiota</i> sp.	
4	MA 7	Cát Bà	KXĐ	
5	MA 6a	Cát Bà	<i>Marasminus</i> sp.	+
6	MA 2	Cát Bà	<i>Schizophyllum commune</i>	+
7	MA 4	Cát Bà	<i>Cleroderma</i> sp.	
8	MA 24	Cúc Phương	<i>Xylaria polymorpha</i>	
9	MA 21	Cúc Phương	<i>Tremella</i> sp.	
10	MA 23	Cúc Phương	<i>Tremella</i> sp.	
11	MA 10	Cúc Phương	<i>Pyrrhoderma adamanticum</i>	+
12	MA 14	Cúc Phương	<i>Ganoderma</i> sp.	
13	MA 16	Cúc Phương	<i>Ganoderma</i> sp.	+

14	MA 26	Cúc Phương	<i>Ganoderma</i> sp.	+
15	MA 8	Cúc Phương	<i>Trametes hirsuta</i> (?)	
16	MA 8a [17]	Cúc Phương	<i>Trametes</i> spec.	+
17	MA 15	Cúc Phương	<i>Trametes</i> spec.	
18	MA 25	Cúc Phương	<i>Trametes gibbosa</i>	+
19	MA 27	Cúc Phương	KXD	
20	MA 9	Cúc Phương	KXD	
21	MA 11	Cúc Phương	KXD	
22	MA 12	Cúc Phương	KXD	
23	MA 13	Cúc Phương	KXD	
24	MA 20	Cúc Phương	KXD	
25	MA 19	Cúc Phương	<i>Lepiota</i> sp.	+
26	MA 22	Cúc Phương	<i>Chitocybe</i> sp.	
27	MA 18	Cúc Phương	<i>Favolaschia</i> sp.	+
28	CP3	Cúc Phương	KXD	
29	CP4	Cúc Phương	KXD	
30	CP6	Cúc Phương	KXD	
31	CP8	Cúc Phương	<i>Amanit enuifolia</i>	+
32	CP11	Cúc Phương	KXD	
33	CP15	Cúc Phương	KXD	
34	HL1	Cúc Phương	KXD	
35	HL2	Cúc Phương	KXD	
36	HL3	Cúc Phương	KXD	
37	H1	Cúc Phương	KXD	
38	MA5	Cúc Phương	KXD	
39	MA28	Cúc Phương	KXD	
40	HYTQ1	Tuyên Quang	KXD	
41	HYTQ2	Tuyên Quang	KXD	
42	PLTQ1	Tuyên Quang	KXD	
43	PLTQ2	Tuyên Quang	KXD	
44	PLTQ3	Tuyên Quang	KXD	
45	PLTQ4	Tuyên Quang	KXD	
46	PLTQ5	Tuyên Quang	KXD	
47	PLTQ13	Tuyên Quang	KXD	
48	PLTQ15	Tuyên Quang	KXD	
49	PLTQ16	Tuyên Quang	KXD	
50	PLTQ7	Tuyên Quang	KXD	
51	PLTQ	Tuyên Quang	KXD	
52	TQ071	Tuyên Quang	KXD	
53	Đ5	CHLB Đức	<i>Deadalea quereina</i> T064	+
54	Đ4	CHLB Đức	<i>Mycna epipterigia</i> K72	+
55	Đ10	CHLB Đức	<i>Kuchanevomyces mutabilis</i>	+
56	Đ11	CHLB Đức	<i>Garoderene applanatua</i>	+
57	Đ2	CHLB Đức	<i>Conocybe ricbewi</i> 138.63.117	+
58	Đ8	CHLB Đức	<i>Coprinus awiser</i> CBS680.70.117	+
59	Đ9	CHLB Đức	<i>Conocybe aberraus</i> CBS137.63.117	+

60	Đ1	CHLB Đức	<i>Agrocybe paludosa</i> 395.79	+
61	Đ7	CHLB Đức	<i>Panacolus acuminatus</i>	
62	Đ17	CHLB Đức	<i>Coprinus auregramitetus</i> CBS973	+
63	Đ6	CHLB Đức	<i>Phlebia trewanosa</i>	
64	Đ16	CHLB Đức	<i>Agrocybe paludosa</i> 395.79	+
65	Đ15	CHLB Đức	<i>Panacolus tinicola</i>	
66	Đ14	CHLB Đức	<i>Traemtes villosa</i>	+
67	Đ13	CHLB Đức	<i>Coprinus storquilinus</i>	
68	Đ12	CHLB Đức	<i>Psychromorbidus sp.</i> CBS209.89.117	+
69	75	CHLB Đức	<i>Collybia dryophila</i>	+
70	149	CHLB Đức	<i>Hyphocoma fascicurlave</i> Z4	+
71	286	CHLB Đức	<i>Pycnoporus cinnalarinus</i>	+
72	423	CHLB Đức	<i>Agaricus bispcius</i> C43	+
73	135	CHLB Đức	<i>Gloephyllum trabeum</i> 72	+
74	402	CHLB Đức	<i>Voloaviella gloiocephaller</i>	+
75	49	CHLB Đức	<i>Borist spez</i>	+
76	125	CHLB Đức	<i>Fomes fomentarius</i> DSMZ	+
77	300	CHLB Đức	<i>Stropharia tugosoanulatag</i>	+
78	264	CHLB Đức	<i>Pleurotus astreatus</i> Ly6	+
79	327	CHLB Đức	<i>Paxillus involutus</i> (Gramp)	
80	231	CHLB Đức	<i>Phanevochaete</i> <i>chrysosporium</i> DSMZ 1556	+
81	HT	PSH	<i>Hericium erinaceum</i> SH1	+
82	S42M	PSH	<i>Pleurotus sp.</i>	+
83	S24M	PSH	<i>Pleurotus sp.</i>	+
84	42M	PSH	KXĐ	
85	KCVF27	PSH	<i>Flammulina velutipes</i>	+
86	FV2	PSH	<i>Flammulina velutipes</i>	+
87	1M	PSH	<i>Flammulina velutipes</i>	+
88	VC4	PSH	<i>Trametes versicolor</i>	+
89	VC	PSH	<i>Coriolus versicolor</i>	+
90	72	PSH	KXĐ	
91	38M	PSH	KXĐ	
92	2	PSH	KXĐ	
93	CP072	PSH	KXĐ	
94	RTĐ1.2	PSH	KXĐ	
95	HĐ2	PSH	KXĐ	
96	NN	PSH	KXĐ	
97	L2	PSH	KXĐ	
98	Đ27	PSH	KXĐ	
99	MH2	Trung Quốc	KXĐ	
100	MH4	Trung Quốc	KXĐ	
<b>Tổng cộng</b>	<b>100</b>		<b>57</b>	<b>42</b>

## MỘT SỐ HÌNH ẢNH MẪU QUẢ THỂ NẤM THU THẬP ĐƯỢC

### 1. Phân lập các chủng nấm lớn tại rừng QG Cúc Phương và rừng QG Cát Bà:

Đã phân lập được 26 chủng thuộc 09 họ: Xylariaceae, Tremellaceae, Ganodermataceae, Polypoaceae, Agaricaceae, Tricholomataceae, Marasmiaceae, Hizophyllaceae và Lycopherdaceae.

#### Danh sách các chủng nấm lớn phân lập:

##### Lớp: Ascomycetes

Bộ: Xylariales

Họ: Xylariaceae

Giống: *Xylaria*

Loài: *Xylaria* sp. (*hypoxylon*?)

(6) Nấm quả thể nhỏ với bào tử đính màu trắng gỗ mục; hình dạng như gạc hươu (20.08.2006).



Bộ: Xylariales

Họ: Xylariaceae

Giống: *Xylaria*

Loài: *Xylaria polymorpha*

(24) Cuồng ngắn, mỏng dạng xoắn, màu đen, chùy giống hình ngón tay (bên trong màu trắng); mọc trên cây gỗ mục. Rừng QG Cúc Phương (24.08.2006)

##### Lớp: Basidiomycetes

Bộ: Tremellales

Họ: Tremellaceae

Giống: *Tremella*

Loài: *Tremella* sp. (*repanda*?)

(21, 23) Có gelatin, màu vàng nhạt, cấu trúc dạng màng và quả thể hình chén, mép quần, kích thước 1,5-1,8cm; mọc trên cây gỗ chết. Rừng QG Cúc Phương (24.08.2006).



Bộ: Polyporales

Họ: Ganodermataceae

Giống: *Ganoderma*

Loài: *Ganoderma* sp.

(1) Mũ màu đỏ vecni, bóng, phân vùng ở mức độ nhất định, cao 6-7cm, rộng khoảng 10cm, hình bán nguyệt, mọc trên cây gỗ chết, chưa xác định. Rừng QG Cát Bà (19.08.2006).



Bộ: Polyporales

Họ: Ganodermataceae

Giống: *Ganoderma*

Loài: *Ganoderma koningsbergii* (?)



(10) Bề mặt mũ nấm màu tối, không cuống; bề mặt cong mềm, màu nâu tối, mặt dưới màu nâu đỏ với lớp nhung trắng, sau khi cạo chuyển thành màu đỏ tối; cao 5,5cm, rộng 9,3cm; mọc trên cây gỗ cứng. Rừng QG Cúc Phương (24.08.2006).

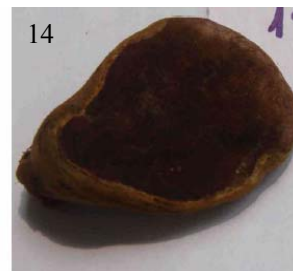
Bộ: Polyporales

Họ: Ganodermataceae

Giống: *Ganoderma*

Loài: *Ganoderma* sp.

(14) Mũ không cuống, dạng quả thận, màu nâu tối, có lớp nhung; mặt dưới màu nâu đỏ, tối, có nhung; cao 4,5cm, rộng 3,0cm, trên cây gỗ chết. Rừng QG Cúc Phương (24.08.2006).



Bộ: Polyporales

Họ: Ganodermataceae

Giống: *Ganoderma*

Loài: *Ganoderma* sp.

(16) Ống màu trắng nhạt, thô ráp, nhỏ. Rừng QG Cúc Phương (24.08.2006).

Bộ: Polyporales

Họ: Ganodermataceae

Giống: *Ganoderma*

Loài: *Ganoderma* sp.

(26) Quả thể có phần có màu đỏ, lớn, không cuống, các lỗ màu trắng lớn, nếu cào nhẹ lớp bề mặt mũ nấm tạo thành vết lằn; mũ nấm rộng 15,5cm, cao 9,0cm (25.08.2006).



Bộ: Polyporales

Họ: Polyporaceae

Giống: *Trametes*

Loài: *Trametes hirsuta* (?)

(8) Mọc trên cây già, không cuống, giống vỏ sò, màu trắng với màu xanh nhạt ở giữa (rêu), có nhiều màu sắc theo từng phần, có lông, các ống xung quanh; cao 3,0-4,5cm, rộng 4,0-6,0cm, dày 0,5-1,0cm. Rừng QG Cúc Phương (24.08.2006).



Bộ: Polyporales

Họ: Polyporaceae

Giống: *Trametes*

Loài: *Trametes* sp.

(8a) [17?] Mọc trên cây gỗ già, hình bán nguyệt, giống vỏ sò, không cuống, màu trắng, không có lông, lỗ xung quanh kéo dài, cao 3,0-



4,5cm, rộng 4,0-7,0cm, dày 0,5-1,0cm. Rừng QG Cúc Phương (24.08.2006).



15



Bộ: Polyporales  
Họ: Polyporaceae  
Giống: *Trametes*  
Loài: *Trametes* sp.

(15) Mũ nấm màu nâu tối; rìa quăn, màu trắng, mỏng; mọc trên cây gỗ cứng. Rừng QG Cúc Phương (24.08.2006).

Bộ: Polyporales

Họ: Polyporaceae

Giống: *Trametes*

Loài: *Trametes gibbosa* (?)

(25) Quả thể lớn, màu nâu nhạt, nếu cào nhẹ sẽ chuyển từ màu nâu nhạt sang màu nâu đậm, các ống màu nâu, thân màu trắng; mọc trên cây gỗ chết. Rừng QG Cúc Phương (24.08.2006).



25

Bộ: Polyporales

Họ: Polyporaceae

(27) Bề mặt hơi cong, có nhung và màu nâu; mép màu vàng nhạt chuyển sang màu oliu, mặt dưới màu nâu xẫm, có nhung; cắt lát giống



27



*Gleophyllum* sp., thân màu nâu nhạt, các ống màu nâu xẫm. Rừng QG Cúc Phương (24.08.2006).

Bộ: Polyporales

Họ: Polyporaceae

(9) Cuống ở ngoài tâm, mọc trên gỗ, nhỏ, mỏng (0,2cm). Mũ nấm được phân vùng với các lỗ màu nâu và nhung, quả thể phẳng với



9



mép màu trắng nhạt; bề mặt phía dưới trắng, rộng 2,5-3,0cm, cuống cao 2,0cm, dài 0,7cm. Rừng QG Cúc Phương (24.08.2006).

Bộ: Polyporales

Họ: Polyporaceae

(11) Mọc trên nhánh cây gỗ cứng, có cuống, gần giống mẫu số 9; bề mặt mũ nấm màu da, mép gờ, mỏng, mặt dưới mũ nấm màu



11



trắng với các ống rất nhỏ, chiều cao 2,5cm, rộng 4,5cm, cuống dài 0,6cm. Rừng QG Cúc Phương (24.08.2006).



Bộ: Polyporales

Họ: Polyporaceae

(12) Quả thể nhỏ, không cuống, hình bán nguyệt hay quả thận hoặc giống hình quạt, có các ống màu trắng rất lớn; bề mặt mũ nấm trắng, mũ nấm cao 0,5-0,7cm, rộng 1,0-2,0cm, mọc trên cây gỗ cứng đã chết. Rừng QG Cúc Phương (24.08.2006).

Bộ: Polyporales

Họ: Polyporaceae

(13) Mũ nấm từ màu nâu sáng đến nâu tối, phẳng, hình bán nguyệt hoặc hình quạt, không cuống, mép chia thành nhiều phần. Mũ nấm theo đường thẳng đứng, màu da và màu trắng đục, mềm, cao 8,0cm, rộng 9,0cm, ống nhỏ và bao khắp. Mọc trên cây gỗ cứng, rừng QG Cúc Phương (24.08.2006).



Bộ: Polyporales

Họ: Polyporaceae

(20) Quả thể nhỏ, màu nâu sáng, giống với *Trametes* sp., bề mặt nhung với các lông màu sáng, bề mặt màu oliu và hơi nâu, mép quăn, cao 1,8cm, rộng 2,5cm, mọc trên cây gỗ chết. Rừng QG Cúc Phương (24.08.2006).



Bộ: Agaricales

Họ: Agaricaceae

Giống: *Lepiota* (?)

Loài: *Lepiota* sp.

(3) Màu trắng đục với vòng màu vàng quanh cuống, cuống cao 4cm, cuống màu nâu tới vàng nâu, phía trên cuống màu vàng sáng, vách không gắn với cuống; mũ nấm lồi, mũ nấm già có màu àng, giữa màu nâu, cuống rộng 1,5cm. Rừng Cát Bà (19.08.2006).

Bộ: Agaricales

Họ: Agaricaceae

Giống: *Lepiota* (?)

Loài: *Lepiota* sp.

(19) Mọc trong bụi cọ, mũ nấm được phủ lớp vảy màu nâu và màu be giữa các vảy; ở giữa lồi, cuống có màu nâu, dưới mũ



nấm 1cm có một vòng quanh cuống, thịt nấm có màu trắng hoặc nâu nếu chạm vào; vách không gắn, cao 5,5cm, mũ nấm rộng 4,5cm. Rừng QG Cúc Phương (24.08.2006).

Bộ: Agaricales

Họ: Tricholomataceae

(7) Mũ nấm hơi nâu, rộng 1,0-1,2cm, cao 0,5-0,7cm, hõm suông ở giữa, cuống mịn với màu mã não, phía trên màu nâu tối, đặc biệt ở quả thể nấm non, có lông, nhưng, phình to ở phía dưới; vách dính, bào tử trắng hay không màu; mọc trên rễ cây mọc (20.08.2006)



Bộ: Agaricales

Họ: Tricholomataceae

Giống: *Clitocybe*

Loài: *Clitocybe* sp.

(22) Có vách trên cuống, mũ giống cây rau mùi, cuống rộng, cao 3,2cm; mũ nấm màu trắng. Rừng QG Cúc Phương (24.08.2006).



Bộ: Agaricales

Họ: Marasmiaceae

Giống: *Marasmius*

Loài: *Marasmius* sp. (*candidus* ?)

(6a) “*Marasmius* trắng” với các mũ nấm và vách màu trắng, mọc trên thân hoặc cành lá; mũ nấm rất mỏng, trong, màu trắng tới vàng be, rộng 2,0cm; mép khía rõ, ở giữa có chấm nhỏ, vách phân nhánh hoặc lượn sóng, trắng; cuống màu xám nhạt, dài 1cm (20.08.2006).



Bộ: Agaricales

Họ: Marasmiaceae

Giống: *Favolaschia*

Loài: *Favolaschia* sp.

(18) Màu trắng khi non, khi già chuyển sang màu nâu hoặc nâu đỏ; vách dạng lược, cao 2,5cm, mũ nấm rộng 2,3cm. Rừng QG Cúc Phương (24.08.2006).



Bộ: Agaricales

Họ: Schizophyllaceae

Giống: *Schizophyllum*

Loài: *Schizophyllum commune* (?)

(2) Mọc trên nhánh cây gỗ cứng, quả thể màu trắng đến màu nâu sáng, cao 1-1,2cm, rộng 1,0cm. Cát Bà (19.08.2006).



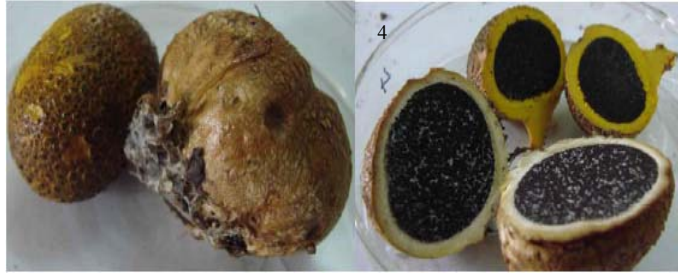
Bộ: Agaricales

Họ: Lycoperdaceae

Giống: *Scleroderma*

Loài: *Scleroderma* sp.

(4) Bề mặt màu vàng nâu, mặt cắt ngang có màu vàng sáng ở vòng ngoài; bào tử lớn, màu đen có các vân dạng cầm thạch màu trắng. Rừng Cát Bà (19.08.2006).



## 2. Phân lập các chủng nấm lớn tại rừng Tuyên Quang (12 chủng)



1. HYTQ2

2. PLTQ16

3. PLTQ4

4. PLTQ1

5. HYTQ1

6. PLTQ17

7. PLTQ5

8. PLTQ15

9. PLTQ10

10. PLTQ19

11. PLTQ2

12. PLTQ3

## B. QUY TRÌNH CHIẾT TÁCH SƠ BỘ VÀ KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU HOẠT TÍNH SINH HỌC

### I. Nghiên cứu khả năng sinh enzyme của các chủng nấm phân lập được

#### 1. Quy trình tách và tinh sạch enzyme

Kết tủa enzyme bằng dung môi phân cực: Mỗi enzyme có phương pháp tủa – tách chiết để thu được enzyme với độ sạch và hoạt tính cao là khác nhau. Chúng tôi tiến hành kết tủa với dung môi ethanol, axeton và muối sulfat amon ở nồng độ 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70 và 75 %. Sau khi pha các dung dịch nuôi cấy với các dung môi, tiến hành ly tâm lạnh với tốc độ 10.000 vòng/phút trong 10 phút, bỏ phần dịch trong, giữ lại phần cặn. Tiến hành đo hoạt tính enzyme trên phiên 96 giếng với ABTS để so sánh hoạt tính enzyme nhằm chọn ra chất kết tủa enzyme tốt nhất với nồng độ tối ưu nhất.

Tách enzyme trên cột sắc ký trao đổi ion và sắc ký lọc gel:

*Sắc ký trên cột DEAE-cellulose*:

Cột DEAE-cellulose có kích thước 1,5x10cm. Cân bằng cột bằng đệm phosphat 0,02M, pH 6,8. Lượng protein sau khi kết tủa bằng sulfat amon được đưa lên cột là 20mg. Quy trình đây được thực hiện theo gradient NaCl 0-1M tốc độ 40ml/giờ, thể tích 120ml.

*Sắc ký trên cột CM-cellulose*:

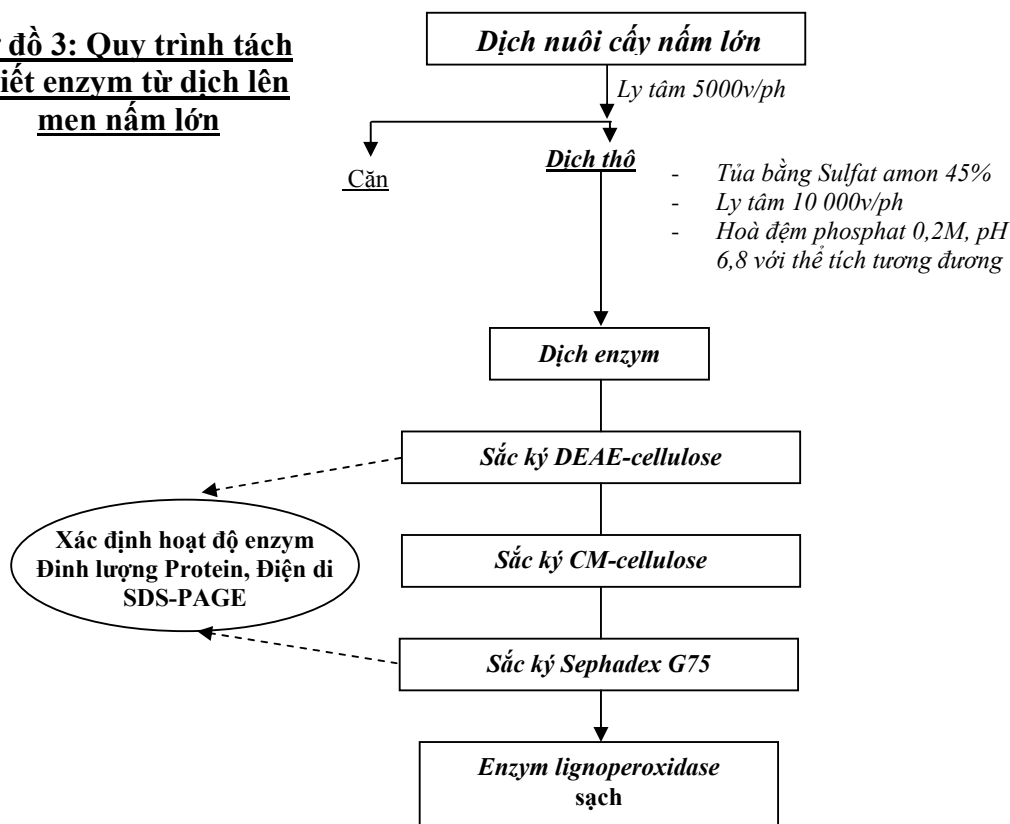
Các đỉnh thu được sau khi qua cột DEAE-cellulose được thu lại và xác định hoạt tính enzyme và hàm lượng protein theo phương pháp Lowry. Sau khi kiểm tra mức độ tinh sạch bằng điện di SDS-PAGE, các đỉnh có hoạt tính sẽ được đưa lên cột CM-cellulose 1,5x15cm. Quá trình sắc ký được thực hiện tương tự như đối với cột DEAE-cellulose.

*Sắc ký trên cột Sephadex G75*:

Sử dụng cột có kích thước 2,5x100cm và đệm thích hợp. Tổng thể tích ở đáy cột 260ml. Xác định hoạt độ enzyme và định lượng protein của các phân đoạn thu được. Đánh giá độ sạch của enzyme bằng cách chạy điện di SDS-PAGE theo mô tả của LAEMMLI.

Độ tinh sạch của enzyme được đánh giá bằng tỷ số giữa đơn vị hoạt động riêng của enzyme được tinh sạch so với hoạt động riêng của enzyme của enzyme trong dịch chiết thô. Quy trình tách chiết và tinh sạch enzyme được thể hiện ở sơ đồ 3:

**Sơ đồ 3: Quy trình tách chiết enzym từ dịch lên men nấm lớn**



## 2. Kết quả thử hoạt tính enzyme

### 2.1. Khảo sát sơ bộ hoạt tính enzyme trên đĩa thạch

Để sàng lọc sơ bộ khả năng sinh enzyme phân giải một số chất hữu cơ khó tan (xenluloza, lignin, tinh bột, lipit, kitin, protein, fucoidan) của các chủng nấm lớn, chúng tôi sử dụng phương pháp xác định định tính enzyme bằng phương pháp đục lỗ thạch và kết quả được đánh giá bằng kích thước đường kính vòng phân giải.

**Bảng 1. Hoạt tính enzyme trên đĩa thạch**

STT	K/h mẫu	Đường kính vòng phân giải (D-d, mm)						
		ligninaza	amilaza	xenlulaza	lipaza	kitinaza	proteaza	fucoidan
1	Đ4	0	0	25	0	5	0	0
2	Đ5	19	2	12	0	0	0	0
3	Đ7	0	7	0	0	0	0	0
4	Đ8	0	0	0	0	0	0	0
5	Đ9	0	0	0	0	0	0	0
6	Đ11	12	0	0	0	0	0	0
7	Đ13	0	0	10	0	5	0	0
8	Đ14	20	0	0	0	0	0	0
9	Đ15	0	0	0	0	0	0	0
10	Đ16	33	0	2	0	6	0	0

11	Đ17	0	0	8	0	2	0	0
12	Đ27	0	0	0	0	0	0	0
13	CP3	8,0	0	0	0	0	0	0
14	CP4	3,0	0	0	0	0	0	0
15	CP6	0	0	0	0	0	0	0
16	CP8	<b>26,5</b>	<b>25</b>	<b>35</b>	<b>0</b>	<b>19</b>	<b>0</b>	<b>0</b>
17	CP11	2,5	0	0	0	0	0	0
18	CP15	0	0	0	0	9	0	0
19	CP072	0	0	14	0	19	0	10
20	MA2	0	7	11	0	0	0	0
21	MA5	25	12	8	0	0	0	0
22	MA7	7	0	0	0	0	0	0
23	MA8a	0	0	0	0	0	0	0
24	MA9	0	0	0	0	0	0	0
25	MA10	<b>20</b>	<b>17</b>	<b>30</b>	<b>0</b>	<b>21</b>	<b>24</b>	<b>20</b>
26	MA15	10	0	15	0	0	0	0
27	MA25	30	0	0	0	0	0	0
28	MA27	15	0	0	0	0	0	0
29	MA 28	20	0	0	0	0	0	0
30	HT	0	0	0	0	15	0	0
31	264	<b>20</b>	<b>0</b>	<b>13</b>	<b>0</b>	<b>17</b>	<b>0</b>	<b>36</b>
32	231	0	13	0	0	0	0	0
33	423	0	0	0	0	0	5	0
34	75	0	0	19	0	0	29	0
35	300	<b>0</b>	<b>6</b>	<b>12</b>	<b>0</b>	<b>22</b>	<b>5</b>	<b>10</b>
36	125	<b>6</b>	<b>0</b>	<b>17</b>	<b>0</b>	<b>17</b>	<b>7</b>	<b>12</b>
37	135	0	8	16	0	0	7	0
38	286	<b>15</b>	<b>13</b>	<b>18</b>	<b>0</b>	<b>18</b>	<b>0</b>	<b>5</b>
39	TQ071	<b>17</b>	<b>8</b>	<b>21</b>	<b>0</b>	<b>19</b>	<b>0</b>	<b>11</b>
40	KC-VF27	0	12	15	2	0	2	5
41	KC-VF29	0	0	0	0	0	0	0
42	VC	<b>19</b>	<b>0</b>	<b>17</b>	<b>0</b>	<b>18</b>	<b>0</b>	<b>16</b>
43	VC4	<b>20</b>	<b>0</b>	<b>17</b>	<b>0</b>	<b>16</b>	<b>0</b>	<b>15</b>
44	MH2	0	15	17	0	11	0	0
45	MH4	12	0	0	0	10	0	0
46	1m	12	0	14	0	17	0	0
47	42m	16	0	0	0	0	0	10
48	38m	19	0	15	1	0	1	10
49	FV2	0	0	0	0	0	0	0
50	S-24m	0	0	0	0	0	0	0
51	S-42m	0	0	0	0	11	0	0

52	Agro	0	0	0	0	0	0	0
53	NHSH39	0	0	0	0	0	0	0
54	HĐ2	0	0	17	0	23	0	2
55	NB	0	0	9	0	0	3	0
56	HY2	0	0	20	2	0	3	0
57	PL	5	0	13	0	0	0	0
58	H1	3	0	17	0	0	12	8
59	HH2	0	0	13	0	0	12	10
60	PL7	8	0	11	0	18	0	9
61	PL13	0	0	17	0	5	0	12
62	PLTQ10	10	0	0	0	0	0	5

Kết quả cho thấy hầu hết các chủng đều biểu hiện hoạt tính phân giải với ít nhất 1 cơ chất, trong đó:

Có 15 chủng có hoạt tính phân giải 1 cơ chất

Có 10 chủng có hoạt tính phân giải 2 cơ chất

Có 14 chủng có hoạt tính phân giải 3 cơ chất

Có 13 chủng có hoạt tính phân giải từ 4 cơ chất trở lên

Các chủng có kí hiệu là MA10 và 264 biểu hiện hoạt tính enzym mạnh. Chủng MA10 có các hoạt tính ligninaza, amilaza, xenlulaza, kitinaza, proteaza, và hoạt tính phân giải fucoidan với đường kính vòng phân giải lần lượt là 20, 17, 30, 21, 24, và 20 mm. Chủng 264 thể hiện hoạt tính ligninaza, xenlulaza, kitinaza, và hoạt tính phân giải fucoidan, với đường kính vòng phân giải lần lượt là 20, 13, 17, và 36 mm.

## ***2.2. Khảo sát khả năng sinh enzym laccaza, mangan peroxidaza và lignin peroxidaza của một số chủng nấm lớn có hoạt tính enzym phân lập từ vườn quốc gia Cúc phương***

### ***\* Khả năng sinh enzym các chủng nấm phân lập trên các môi trường thạch***

Nuôi cấy 8 chủng nấm phân lập được lên các đĩa petri với 6 loại môi trường khác nhau ở trên. Thu mẫu sau 7 ngày. Xác định hoạt độ enzym lignin peroxidaza, Mn peroxidaza, Laccaza

***Bảng 2: Hoạt độ enzym laccaza***

Kí hiệu mẫu	Hoạt độ enzym laccaza (U/l)					
	Kirk	Mạch nha	Đậu tương	Khoai tây	Cà chua	Bột gỗ
MA5	-	97,1	8,69	161,0	167,4	0
MA7	10,01	-	-	-	196,42	35,59
CP8	28,98	9,8	<b>1884,0</b>	11,9	202,86	-
MA10	-	116,9	93,38	209,3	286,58	28,6
MA15	-	42,2	6,44	45,0	138,46	10,55
MA25	14,49	103,7	441,14	199,64	193,2	108,58

MA27	64,4	0	127,19	392,84	756,7	0
MA28	257,6	129,0	511,98	154,56	128,8	346,0

*Nhận xét:* Kết quả cho thấy các chủng nấm phân lập được đều sinh enzym laccaza, hoạt độ của enzym laccaza của các chủng CP8, MA25, MA27, MA28 là khá cao với mỗi loại môi trường nuôi cấy thích hợp. Tuy nhiên, hoạt tính enzym laccaza của chủng CP8 nuôi cấy trên môi trường Đậu tương là cao nhất, hoạt độ lên đến **1884,0 U/l**.

**Bảng 3: Hoạt độ enzym mangan peroxidaza**

Kí hiệu mẫu	Hoạt độ enzym mangan peroxidaza (U/l)					
	Kirk	Mạch nha	Đậu tương	Khoai tây	Cà chua	Bột gỗ
MA5	-	0	0	0	3,33	0
MA7	0	-	-	-	0	0
CP8	0	0	28,35	106,0	1,1	-
MA10	-	5,0	0	0	0	5,56
MA15	-	0	11,1	0	16,1	1,1
MA25	0	23,9	133,3	60,56	95	8,89
MA27	<b>145,0</b>	55,6	107,8	6,66	120,5	1,66
MA28	103,0	38,36	68,3	71,1	105,0	50,0

*Nhận xét:* Hoạt tính enzym Mn peroxidaza của các chủng nấm CP8, MA25, MA 27, MA28 cao hơn các chủng nấm còn lại. Chủng MA27 nuôi cấy trên môi trường kirk là cho hoạt tính tốt nhất , hoạt độ là **145,0 U/l**.

**Bảng 4: Hoạt độ enzym lignin peroxidaza**

Kí hiệu mẫu	Hoạt độ enzym lignin peroxidaza (U/l)					
	Kirk	Mạch nha	Đậu tương	Khoai tây	Cà chua	Bột gỗ
MA5	-	0	2,1	0	0	0
MA7	7,96	-	-	-	9,34	1,0
CP8	0	0	13,8	0	0	-
MA10	-	7,27	0,3	6,6	0	2,4
MA15	-	14,5	0	0	<b>33,2</b>	0
MA25	0	30,46	0	0	0	14,5
MA27	0	4,15	0	0	0	18,35
MA28	0	0	4,5	0	0	31,5

*Nhận xét:* Hoạt tính enzym lignin peroxidaza được sinh ra từ chủng nấm MA15 nuôi cấy trên môi trường Cà chua là cao nhất, hoạt độ là **33,2 U/l**.

**\* Sự sinh tổng hợp enzyme của các chủng nấm phân lập trên môi trường dịch thể:**

Các chủng nấm phân lập được nuôi cấy trên các môi trường dịch thể thích hợp, lắc 100v/ph, ở 24<sup>0</sup>C, với 200ml dịch môi trường trong bình cầu 500ml: môi trường

Kirk: D-glucose 10g/l, Sodium tartrate 2,3g/l, Basal III 100ml, pH đến 4,5; môi trường Khoai tây: khoai tây 200g/l, gluco 20g/l; môi trường dịch cà chua: 50:50(v/v), môi trường Đậu tương 30g/l.

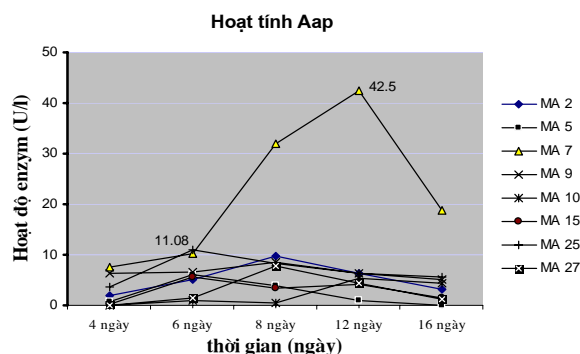
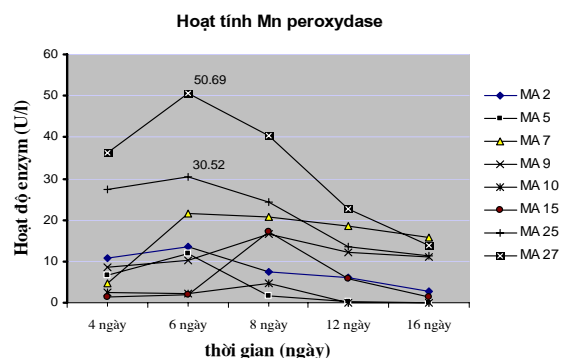
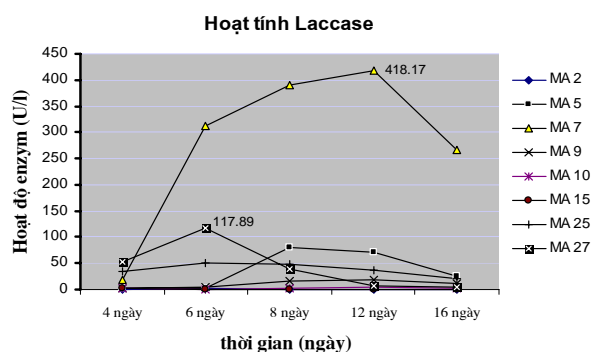


*Dịch nuôi cấy các chủng nấm phân lập*

Kết quả cho thấy, trong 08 chủng được nghiên cứu thì 03 chủng có kí hiệu MA7 và MA25 và MA27 là đáng chú ý. Chủng MA7 biểu hiện hoạt tính Laccase cao nhất sau 12 ngày nuôi cấy (418,17U/l) trên môi trường thích hợp là dịch cà chua, chủng MA25 cũng biểu hiện hoạt tính MnP tương đối cao nhưng thấp hơn so với MA27 sau 6 ngày nuôi cấy trên môi trường thích hợp là môi trường Kirk (50,69U/l). Sau khoảng 1 tuần nuôi cấy là thời gian tối ưu cho việc sinh enzyme MnP của cả MA25 và MA27. Enzyme Aap là một enzyme peroxidaza mới được Martin phát hiện từ nấm *Agrocybe aegerita* (nấm Trân Châu) có khả năng oxy hóa aryl alcohol, như veratryl và benzyl alcohol. Trong quá trình nghiên cứu, chúng tôi đã phát hiện khả năng sinh tổng hợp enzyme này ở chủng MA7 tuy nhiên hoạt tính chưa cao (42,5U/l), do vậy cần sự nghiên cứu tiếp theo về các điều kiện tối thích cho sự sinh tổng hợp enzyme này.

Từ các kết quả trên đây, chúng tôi đã lựa chọn các chủng nấm có hoạt tính enzyme quan tâm cho các nghiên cứu sâu hơn về sinh học phân tử phân loại.

### 2.3. Nghiên cứu sự sinh tổng hợp enzyme của chủng CP8

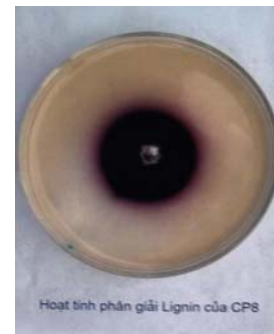


**Hoạt tính enzyme LiP, MnP và Aap của các chủng nấm phân lập trên môi trường dịch thể**

Sau khi xác định sơ bộ khả năng phân giải ligno-xellulo thông qua hoạt tính ligninaza của một số chủng có hoạt tính enzym tương đối cao, chúng tôi chọn ra chủng nấm CP8 để tiến hành tiếp tục nghiên cứu các điều kiện cho sự sinh tổng hợp ligninaza từ chủng CP8 và bước đầu tinh sạch, nghiên cứu các yếu tố ảnh hưởng đến hoạt động của enzym này.

***Kết quả nghiên cứu các điều kiện ảnh hưởng tới sự phát triển và sinh tổng hợp enzym ligninaza chủng nấm CP8***

Chúng tôi tiến hành nuôi cấy CP8 trên 6 môi trường nuôi cấy dịch thể khác nhau: Cà chua, Khoai tây, Giá đỗ, Nước chiết ngô, Đậu tương và Cám gạo. Sau thời gian nuôi cấy là 3 tuần ở 28<sup>0</sup>C chúng tôi kiểm tra sự tăng sinh khối và so sánh hoạt tính enzym ligninaza (OD<sub>450nm</sub>) với kết quả như sau:

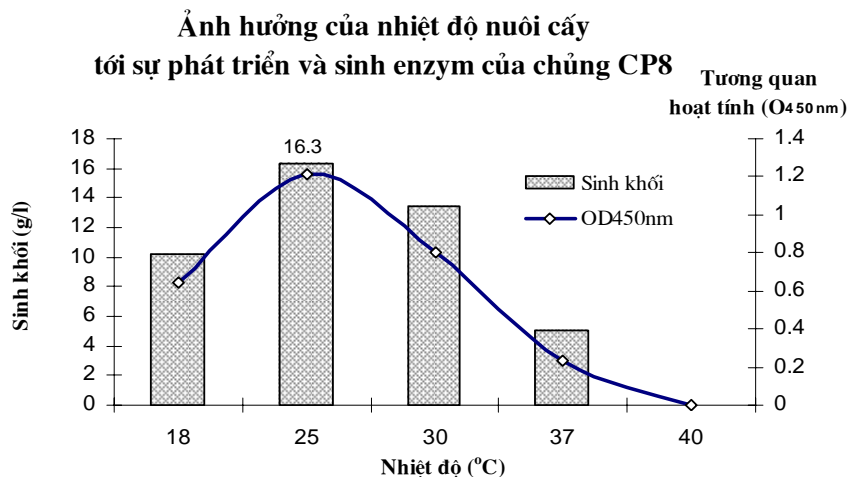


***Bảng 5: Sự phát triển và hoạt tính enzym của CP8 trên các môi trường nuôi cấy khác nhau***

Stt	Môi trường	Sinh khối (g/l)	Hoạt tính enzym OD <sub>450nm</sub>
1	Cà chua	15,28	1,307
2	Khoai tây	16,81	<b>1,829</b>
3	Giá đỗ	16,63	1,546
4	Nước chiết ngô	17,17	1,450
5	Đậu tương	<b>17,46</b>	1,651
6	Cám gạo	12,64	1,516

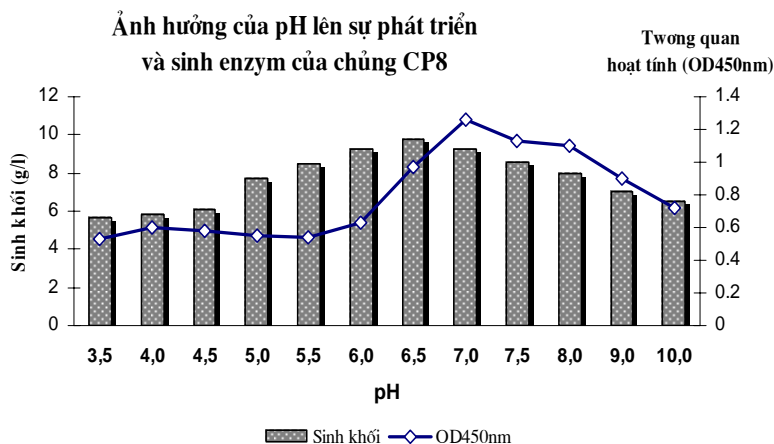
Môi trường Đậu tương là môi trường thích hợp nhất cho phát triển sinh khối nấm, sinh khối nấm đạt 17,46 g/l sau 3 tuần nuôi cấy, tuy nhiên môi trường Khoai Tây lại cho hoạt tính phân giải ligno-xenluloza tốt nhất, OD<sub>450nm</sub>=1,829.

Chủng CP8 được nuôi trên môi trường khoai tây, lắc 200v/ph, pH môi trường 6,5 và ở các dải nhiệt độ khác nhau, từ 18÷41<sup>0</sup>C để tìm ra nhiệt độ thích hợp cho quá trình phát triển và sinh tổng hợp enzym của chủng CP8.



Nhiệt độ thích hợp cho sự phát triển của CP8 là từ 18÷30°C, tối ưu là ở 25°C (sinh khối khô đạt 16,30 g/l sau 3 tuần nuôi cấy). Đây cũng là nhiệt độ thích hợp nhất cho sự sinh tổng hợp enzyme ligninaza, với nhiệt độ trên 37°C nấm hầu như không phát triển.

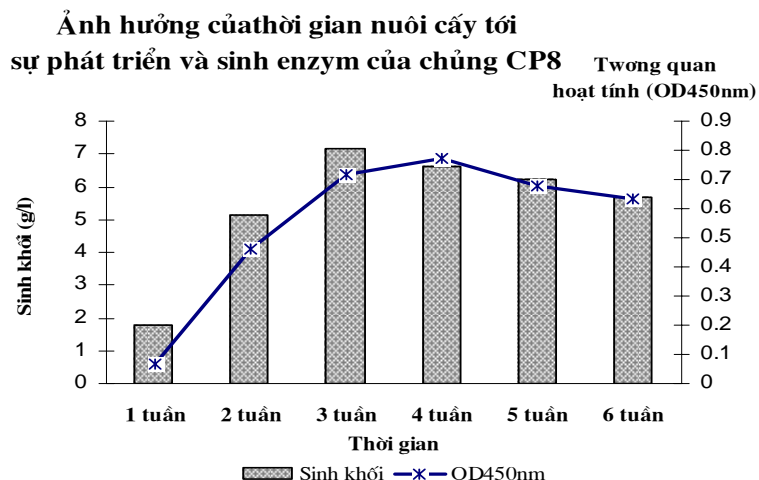
Cùng với nhiệt độ, pH môi trường là một yếu tố rất quan trọng trong các nghiên cứu vi sinh. Để tìm ra pH thích hợp nhất cho quá trình sinh tổng hợp enzyme ligninaza, chúng tôi tiến hành nuôi cấy chủng CP8 trên môi trường Khoai Tây dịch thể với giải pH từ 3,5 đến 10,0.



Kết quả trên cho thấy pH của môi trường ảnh hưởng không rõ rệt đến sự phát triển của CP8, tuy nhiên lại ảnh hưởng đáng kể tới khả năng sinh enzyme của chủng này. Sinh khối lớn nhất là ở pH=6,5, đạt 9,810 g/l và giảm dần khi pH càng axit hoặc càng bazơ, tuy nhiên sự thay đổi cũng không nhiều. Trong khi đó hoạt lực enzyme ligninaza đạt cực đại ở pH=7,0 và có sự giảm mạnh khi ở pH kiềm hay axit. Như vậy chủng CP8 có thể phát triển trong một khoảng pH tương đối rộng, từ pH=5,5 tới pH=8,0 song pH=7 là pH tối thích cho sự sinh tổng hợp enzyme phân giải ligno-xenluloza.

Kết quả nghiên cứu thời gian nuôi cấy cho thấy sinh khối nấm đạt mức cao nhất là sau 3 tuần nuôi cấy, sinh khối đạt 7,15 g/l sau đó không thay đổi nhiều. Sinh

khối có sự biến đổi rõ ràng nhất là tuần thứ 1 và tuần thứ 2, sau đó phát triển chậm. Hoạt tính enzym ligninaza của nấm CP8 đạt cực đại sau 4 tuần nuôi cấy.



### ***Kết tủa enzym ligninaza của chủng CP8 bằng dung môi hữu cơ***

Chúng tôi nghiên cứu phương pháp kết tủa enzym với muối trung tính là Sulfat amon -  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  và 2 dung môi thường được sử dụng nhất là Etanol và axeton. Dải nồng độ dung môi sử dụng là 40; 45; 50; 55; 60; 65; 70; 75%, ly tâm lạnh với tốc độ 10.000 v/ph trong 10 phút, thu phần cặn. Sau đó enzym sẽ được thử hoạt tính với dịch ABTS (2,2'-Azinobis-(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonate)). Kết quả được trình bày trong bảng 3.8

**Bảng 6: Hoạt tính ligninaza khi kết tủa bằng các dung môi hữu cơ**

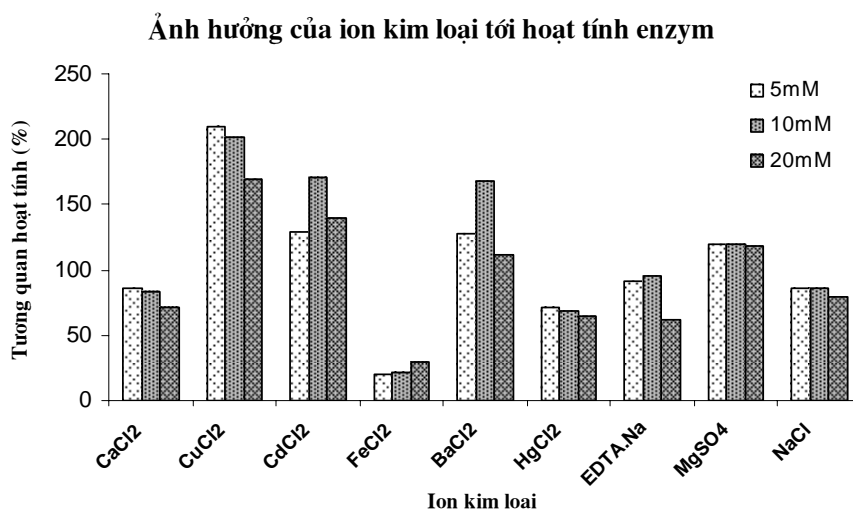
Stt	Nồng độ dung môi hữu cơ (%)	Hoạt tính Ligninaza (OD <sub>450nm</sub> )		
		ethanol	axeton	$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$
1	40	0,235	0,514	1,493
2	45	0,287	0,501	1,550
3	50	0,301	0,576	1,578
4	55	0,314	0,620	1,634
5	60	0,412	<b>0,684</b>	<b>1,823</b>
6	65	<b>0,432</b>	0,672	1,756
7	70	0,344	0,611	1,524
8	75	0,298	0,549	1,427

Dung môi etanol kết tủa enzym tốt nhất ở nồng độ 65%, trong khi đó cả dung môi Axeton và muối Sulfat amon đều tủa enzym tốt nhất ở nồng độ 60%. Tuy nhiên, muối Sulfat amon 60% thích hợp nhất cho sự kết tủa enzym, giá trị OD<sub>450nm</sub> đạt 1,823. Kết quả này cho thấy, nhược điểm của việc sử dụng dung môi hữu cơ trong kết tủa phân đoạn là dễ gây ức chế, bất hoạt enzym có thể đã thể hiện. Ngược lại, kết tủa với Sulfat amon lại cho kết quả rất tốt. Từ đây chúng tôi sử dụng phương pháp kết tủa

enzym ligninaza của chủng CP8 với muối Sulfat amon ở 60% nồng độ bão hoà để có được enzym tinh sạch hơn cho các nghiên cứu tiếp theo.

#### ***Ảnh hưởng của một số ion kim loại tới hoạt tính enzym ligninaza***

Để nghiên cứu ảnh hưởng của các ion kim loại tới khả năng phân giải ligno-xenluloza của enzym chủng CP8 chúng tôi bổ sung vào dịch enzym sau khi ly tâm với Sulfat amon ở 60% nồng độ bão hoà với các ion kim loại hóa trị 2 ở 3 nồng độ là 5, 10, 20 mM. Kết quả được tính theo % hoạt tính enzym so với đối chứng không bổ sung ion kim loại.



Từ kết quả trên cho thấy các ion Fe<sup>2+</sup> và Hg<sup>2+</sup> ức chế đáng kể hoạt động của enzym từ CP8. Đặc biệt là Fe<sup>2+</sup>, ngay từ nồng độ 5mM Fe<sup>2+</sup> đã làm giảm 80% hoạt độ enzyme, với Hg<sup>2+</sup> thì ở nồng độ cao hơn là 20mM. Các ion Cu<sup>2+</sup>, Cd<sup>2+</sup>, Ba<sup>2+</sup> và Mg<sup>2+</sup> đều có tác dụng kích hoạt enzyme. Đáng chú ý là ion Cu<sup>2+</sup> có tác dụng kích thích enzym mạnh nhất ở cả 3 nồng độ, gấp hơn 2 lần (209,4% ở nồng độ 5mM), mặc dù ion Cu<sup>2+</sup> được biết là độc với nhiều loại enzyme. Điều này có thể cho thấy trong cấu trúc của enzyme ligninaza của chủng CP8 có chứa ion Cu<sup>2+</sup>. Các dải nồng độ ion Cu<sup>2+</sup> từ 3mM÷25mM cũng đã được nghiên cứu và cho thấy nồng độ 5mM Cu<sup>2+</sup> là có tác dụng kích hoạt enzyme này mạnh nhất.

#### ***Kết luận phần nghiên cứu khả năng phân giải lingo-xelluloza của chủng CP8***

- Môi trường thích hợp cho nuôi cấy chủng CP8 cho quá trình sinh tổng hợp enzym phân giải ligno-xenluloza là môi trường Khoai tây. Điều kiện nuôi cấy thích hợp cho quá trình phát triển và sinh tổng hợp enzym là pH=7,0; nhiệt độ 250C, sau 4 tuần nuôi cấy.

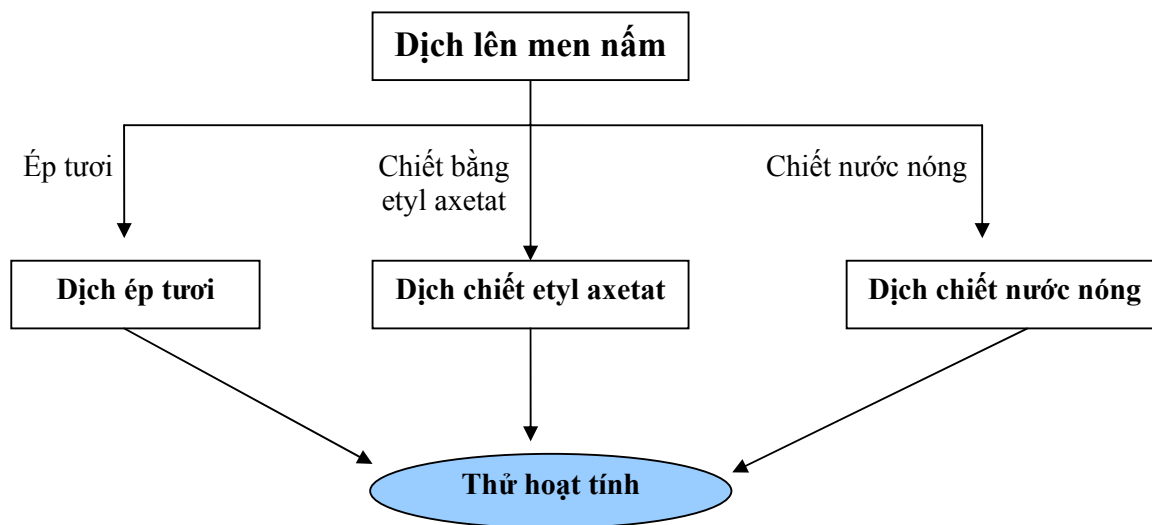
- Bước đầu tinh sạch enzyme liginaza từ chủng CP8 bằng phương pháp đơn giản là sử dụng Sulfat amon ở 60% nồng độ bão hoà, độ sạch đạt 1,75 lần, hiệu suất 53%.

- Enzym ligninaza của chủng CP8 bị kìm hãm bởi một số ion như: Ca<sup>2+</sup>, Fe<sup>2+</sup>, Hg<sup>2+</sup>, Na<sup>+</sup> và EDTA.Na đặc biệt là Fe<sup>2+</sup>. Trong khi đó enzym này lại được kích thích bởi một số ion như Cu<sup>2+</sup>, Cd<sup>2+</sup>, Ba<sup>2+</sup>, Mg<sup>2+</sup> - hoạt lực tăng trung bình từ 10 đến trên 105% , trong đó mạnh nhất là ion Cu<sup>2+</sup> (209,4%).

## II. Kết quả sàng lọc hoạt tính sinh chống ôxy hoá, hoạt tính kháng vi sinh vật kiểm định, hoạt tính gây độc tế bào

### 1. Quy trình chiết tách sơ bộ dịch lên men của các chủng nấm

Sau khi tham khảo một số các nghiên cứu trước đây về các phương pháp thu hoạt chất từ nấm lớn theo phương pháp cổ truyền và hiện đại, chúng tôi đã đưa ra quy trình chiết sơ bộ dịch lên men từ nấm lớn như sau:



### 2. Kết quả thử hoạt tính

#### 2.1. Hoạt tính chống oxy hoá trên hệ DPPH

##### 2.1.1. Quy trình thử hoạt tính chống ôxi hoá

Phản ứng dựa trên nguyên tắc 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) có khả năng tạo ra các gốc tự do bền trong dung dịch EtOH bão hoà. Khi cho các chất thử nghiệm vào hỗn hợp này, nếu chất có khả năng làm trung hoà hoặc bao vây các gốc tự do sẽ làm giảm cường độ hấp phụ ánh sáng của các gốc tự do DPPH. Hoạt tính chống ôxy hoá được đánh giá thông qua giá trị hấp phụ ánh sáng của dịch thí nghiệm so với đối chứng khi đọc trên máy Elisa ở bước sóng 515nm.

##### **Khả năng bắt các gốc tự do SC% (Scavenging capacity):**

Giá trị trung bình của SC% ở các nồng độ mẫu được đưa vào chương trình xử lý số liệu excel theo công thức:

$$SC\% = \left[ 100 - \frac{OD \text{ thí nghiệm} - OD \text{ mẫu trắng}}{OD \text{ chứng âm tính}} \times 100 \right] \pm \sigma$$

Độ lệch tiêu chuẩn  $\sigma$  tính theo công thức của Duncan như sau:

$$\sigma = \sqrt{\frac{\sum (x_i - \bar{x})^2}{n - 1}}$$

Các mẫu có biểu hiện hoạt tính ( $SC \geq 50\%$ ) sẽ được thử nghiệm bước 2 để tìm giá trị  $SC_{50}$

**Giá trị  $SC_{50}$  ( $\mu\text{g/ml}$ ):**

Mẫu được pha theo 5 thang nồng độ. Giá trị  $SC_{50}$  được xác định bằng chương trình table curve thông qua nồng độ chất thử và % hoạt động của chất thử mà ở đó 50% các gốc tự do tạo bởi DPPH được trung hoà bởi chất thử.

### 2.1.2. kết quả thử hoạt tính chống ôxi hoá

Dịch nuôi cấy nấm được chiết tách bằng các phương pháp khác nhau thử hoạt tính chống oxy hoá theo phương pháp của Shela G., Olga, M. B., Elena, K., và cs (2003).

**Bảng 7a: Kết quả hoạt tính chống oxy hoá của các dịch chiết etyl axetat**

Stt	Kí hiệu mẫu	SC%	$SC_{50}$ ( $\mu\text{g/ml}$ )	Kết quả
1	Chứng (+)	68,16 $\pm$ 0,2	26,64 $\mu\text{g/ml}$	Dương tính
2	Chứng (-)	0,0 $\pm$ 0,0	-	Âm tính
3	CP3	29,27 $\pm$ 1,9	-	Âm tính
4	CP4	52,65 $\pm$ 1,6	172,34 $\mu\text{g/ml}$	Dương tính
5	CP6	29,82 $\pm$ 0,3	-	Âm tính
6	CP8	28,07 $\pm$ 0,1	-	Âm tính
7	CP11	10,17 $\pm$ 1,3	-	Âm tính
8	CP15	34,93 $\pm$ 0,8	-	Âm tính
9	D5	20,18 $\pm$ 0,2	-	Âm tính
10	D11	28,80 $\pm$ 1,5	-	Âm tính
11	D13	15,58 $\pm$ 2,5	-	Âm tính
12	D14	38,07 $\pm$ 0,7	-	Âm tính
13	D16	12,29 $\pm$ 0,8	-	Âm tính
14	D17	31,46 $\pm$ 0,6	-	Âm tính
15	H1	39,61 $\pm$ 0,1	-	Âm tính
16	HL1	37,65 $\pm$ 5,9	-	Âm tính
17	HL3	10,55 $\pm$ 0,3	-	Âm tính
18	MA2	11,01 $\pm$ 0,8	-	Âm tính
19	MA5	25,14 $\pm$ 0,2	-	Âm tính
20	MA7	8,42 $\pm$ 1,1	-	Âm tính
21	MA9	50,69 $\pm$ 0,2	158,3 $\mu\text{g/ml}$	Dương tính
22	MA10	0,99 $\pm$ 0,0	-	Âm tính
23	MA11	0,23 $\pm$ 0,0	-	Âm tính
24	MA25	29,63 $\pm$ 0,3	-	Âm tính
25	MA27	35,69 $\pm$ 1,3	-	Âm tính
26	MA28	30,27 $\pm$ 0,2	-	Âm tính
27	38	7,4 $\pm$ 0,06	-	Âm tính
28	72	0,8 $\pm$ 0,0	-	Âm tính
29	75	40,0 $\pm$ 1,02	-	Âm tính
30	125	41,1 $\pm$ 0,5	-	Âm tính
31	135	11,1 $\pm$ 0,01	-	Âm tính
32	231	28,53 $\pm$ 0,7	-	Âm tính
33	264	28,22 $\pm$ 0,0	-	Âm tính
34	286	44,5 $\pm$ 0,0	-	Âm tính
35	402	43,9 $\pm$ 0,7	-	Âm tính
36	1M	10,2 $\pm$ 0,04	-	Âm tính
37	VC4	2,6 $\pm$ 0,00	-	Âm tính
38	42M	5,5 $\pm$ 0,0	-	Âm tính

39	<b>S42</b>	4,17±0,1	-	Âm tính
40	<b>HT</b>	38,2±0,07	-	Âm tính
41	<b>NB</b>	2,8±0,01	-	Âm tính
42	<b>CTD1.2</b>	5,6±0,02	-	Âm tính
43	<b>HD2</b>	10,6±0,05	-	Âm tính
44	<b>PLTQ</b>	1,15±0,01	-	Âm tính
45	<b>PLTQ7</b>	0,95±0,02	-	Âm tính
46	<b>PLTQ10</b>	<b>79,5±0,01</b>	<b>26,8</b>	<b>Dương tính</b>
47	<b>TQ071</b>	47,5±0,1	-	Âm tính
48	<b>HYTQ2</b>	22,2±0,05	-	Âm tính
50	<b>CP072</b>	28,6±0,5	-	Âm tính
51	<b>FV2</b>	10,2±0,04	-	Âm tính
52	<b>VC</b>	5,4±0,1	-	Âm tính
53	<b>LCR</b>	<b>71,4±0,9</b>	<b>44,9</b>	<b>Dương tính</b>
54	<b>NC</b>	<b>79,2±0,09</b>	<b>25,6</b>	<b>Dương tính</b>
55	<b>NN</b>	30,2±0,15	-	Âm tính
56	<b>HYTQ1</b>	22,6±0,5	-	Âm tính
57	<b>L2</b>	48,2±0,06	-	Âm tính

Kết quả trên cho thấy, trong 55 dịch chicuaretyl axetat của dịch lên men các chủng được thử nghiệm hoạt tính chống oxy hoá, thì 05 dịch chiết từ chủng có ký hiệu **MA9, CP4, PLTQ10, LCR và NC** có hoạt tính, giá trị SC<sub>50</sub> lần lượt là 158,3µg/ml, 172,34µg/ml, 28,6µg/ml, 44,9µg/ml và 25,6µg/ml.

**Bảng 7b: Kết quả hoạt tính chống oxy hoá của các dịch chiết nước nóng**

Stt	Kí hiệu mẫu	SC%	SC <sub>50</sub> (µg/ml)	Kết quả
1	<b>Chứng (+)</b>	68,16±0,2	<b>26,64</b>	<b>Dương tính</b>
2	<b>Chứng (-)</b>	0,0±0,0	-	Âm tính
3	<b>CP3</b>	32,7±0,9	-	Âm tính
4	<b>CP4</b>	<b>65,5±1,1</b>	<b>155,2</b>	<b>Dương tính</b>
5	<b>CP6</b>	19,82±0,3	-	Âm tính
6	<b>CP8</b>	22,0±0,01	-	Âm tính
7	<b>CP11</b>	16,5±0,3	-	Âm tính
8	<b>CP15</b>	25,1±0,08	-	Âm tính
9	<b>D5</b>	22,5±0,5	-	Âm tính
10	<b>D11</b>	36,7±1,2	-	Âm tính
11	<b>D13</b>	7,8±0,9	-	Âm tính
12	<b>D14</b>	45,3±0,4	-	Âm tính
13	<b>D16</b>	14,2±0,6	-	Âm tính
14	<b>D17</b>	21,6±0,9	-	Âm tính
15	<b>H1</b>	<b>51,3±0,15</b>	<b>198,2</b>	<b>Dương tính</b>
16	<b>HL1</b>	33,3±0,4	-	Âm tính
17	<b>HL3</b>	13,7±0,8	-	Âm tính
18	<b>MA2</b>	17,2±0,9	-	Âm tính
19	<b>MA5</b>	32,6±1,1	-	Âm tính
20	<b>MA7</b>	5,9±0,1	-	Âm tính
21	<b>MA9</b>	<b>55,7±0,09</b>	<b>153,8</b>	<b>Dương tính</b>
22	<b>MA10</b>	2,25±0,06	-	Âm tính
23	<b>MA11</b>	1,7±0,07	-	Âm tính
24	<b>MA25</b>	33,8±0,35	-	Âm tính

25	MA27	25,4±1,1	-	Âm tính
26	MA28	38,6±0,02	-	Âm tính
27	38	11,9±0,2	-	Âm tính
28	72	1,1±0,05	-	Âm tính
29	75	48,7±0,9	-	Âm tính
30	125	42,3±0,2	-	Âm tính
31	135	8,7±0,06	-	Âm tính
32	231	31,9±0,1	-	Âm tính
33	264	22,6±0,05	-	Âm tính
34	286	50,0±0,0	200	Dương tính
35	402	48,9±0,09	-	Âm tính
36	1M	16,2±0,5	-	Âm tính
37	VC4	5,6±0,1	-	Âm tính
38	42M	8,7±0,9	-	Âm tính
39	S42	3,2±0,1	-	Âm tính
40	HT	42,1±0,5	-	Âm tính
41	NB	1,8±0,0	-	Âm tính
42	CTD1.2	4,6±0,2	-	Âm tính
43	HD2	18,5±0,9	-	Âm tính
44	PLTQ	0,9±0,02	-	Âm tính
45	PLTQ7	1,95±0,0	-	Âm tính
46	PLTQ10	87,2±0,9	20,3	Dương tính
47	TQ071	57,5±0,5	186,7	Dương tính
48	HYTQ2	26,2±0,9	-	Âm tính
50	CP072	34,6±0,04	-	Âm tính
51	FV2	18,2±0,3	-	Âm tính
52	VC	7,9±0,11	-	Âm tính
53	LCR	76,5±0,04	39,7	Dương tính
54	NC	78,8±0,0	26,1	Dương tính
55	NN	22,8±0,3	-	Âm tính
56	HYTQ1	27,3±0,07	-	Âm tính
57	L2	58,6±0,5	189,5	Dương tính

Kết quả cho thấy, trong 55 dịch chiết nước nóng của các dịch lên men các chủng được thử nghiệm hoạt tính chống oxy hóa, thì 09 dịch chiết từ chủng có kí hiệu **CP4**, **H1**, **MA9**, **286**, **PLTQ10**, **TQ071**, **LCR**, **NC** và **L2** có hoạt tính, giá trị SC<sub>50</sub> lần lượt là 155,2µg/ml, 198,2µg/ml, 153,8µg/ml, 200µg/ml, 20,3µg/ml; 186,7µg/ml; 39,7µg/ml; 26,1µg/ml và 189,5 µg/ml.

**Bảng 7c: Kết quả hoạt tính chống oxy hóa của các dịch ép tươi**

Stt	Kí hiệu mẫu	SC%	SC <sub>50</sub> (µg/ml)	Kết quả
1	Chứng (+)	68,16±0,2	26,64	Dương tính
2	Chứng (-)	0,0±0,0	-	Âm tính
3	CP3	25,5±0,5	-	Âm tính
4	CP4	62,4±0,04	164,3	Dương tính
5	CP6	9,8±0,3	-	Âm tính
6	CP8	16,7±0,2	-	Âm tính
7	CP11	6,7±0,2	-	Âm tính
8	CP15	17,5±0,5	-	Âm tính

9	<b>D5</b>	17,4±0,7	-	Âm tính
10	<b>D11</b>	28,9±0,9	-	Âm tính
11	<b>D13</b>	17,3±0,2	-	Âm tính
12	<b>D14</b>	33,6±0,6	-	Âm tính
13	<b>D16</b>	7,9±0,5	-	Âm tính
14	<b>D17</b>	20,8±0,2	-	Âm tính
15	<b>H1</b>	48,5±0,4	-	Âm tính
16	<b>HL1</b>	33,3±0,4	-	Âm tính
17	<b>HL3</b>	13,7±0,8	-	Âm tính
18	<b>MA2</b>	17,2±0,9	-	Âm tính
19	<b>MA5</b>	32,6±1,1	-	Âm tính
20	<b>MA7</b>	5,9±0,1	-	Âm tính
21	<b>MA9</b>	47,3±0,5	-	Âm tính
22	<b>MA10</b>	2,5±0,0	-	Âm tính
23	<b>MA11</b>	7,5±0,1	-	Âm tính
24	<b>MA25</b>	23,8±0,2	-	Âm tính
25	<b>MA27</b>	18,9±0,1	-	Âm tính
26	<b>MA28</b>	22,4±0,4	-	Âm tính
27	<b>38</b>	11,3±0,5	-	Âm tính
28	<b>72</b>	2,3±0,01	-	Âm tính
29	<b>75</b>	35,6±0,6	-	Âm tính
30	<b>125</b>	38,9±0,2	-	Âm tính
31	<b>135</b>	7,2±0,0	-	Âm tính
32	<b>231</b>	20,3±0,5	-	Âm tính
33	<b>264</b>	12,7±0,8	-	Âm tính
34	<b>286</b>	30,4±0,02	-	Âm tính
35	<b>402</b>	38,9±0,9	-	Âm tính
36	<b>1M</b>	22,2±0,07	-	Âm tính
37	<b>VC4</b>	4,8±0,2	-	Âm tính
38	<b>42M</b>	5,3±0,03	-	Âm tính
39	<b>S42</b>	1,5±0,08	-	Âm tính
40	<b>HT</b>	30,7±0,9	-	Âm tính
41	<b>NB</b>	1,0±0,0	-	Âm tính
42	<b>CTD1.2</b>	4,6±0,2	-	Âm tính
43	<b>HD2</b>	8,5±0,3	-	Âm tính
44	<b>PLTQ</b>	0,97±0,1	-	Âm tính
45	<b>PLTQ7</b>	23,7±0,05	-	Âm tính
46	<b>PLTQ10</b>	<b>67,7±0,07</b>	<b>35,8</b>	Dương tính
47	<b>TQ071</b>	45,3±0,05	-	Âm tính
48	<b>HYTQ2</b>	16,2±0,9	-	Âm tính
50	<b>CP072</b>	22,9±0,5	-	Âm tính
51	<b>FV2</b>	13,5±0,2	-	Âm tính
52	<b>VC</b>	8,1±0,5	-	Âm tính
53	<b>LCR</b>	<b>63,5±0,9</b>	<b>59,8</b>	Dương tính
54	<b>NC</b>	<b>59,4±0,09</b>	<b>128,9</b>	Dương tính
55	<b>NN</b>	10,4±0,1	-	Âm tính
56	<b>HYTQ1</b>	15,5±0,3	-	Âm tính
57	<b>L2</b>	42,6±0,2	-	Âm tính

Kết quả trên cho thấy, trong 55 dịch chiết nước nóng của dịch lên men các chủng được thử nghiệm hoạt tính chống oxy hoá, thì 04 dịch chiết từ chủng có ký hiệu **CP4, PLTQ10, LCR, NC** có hoạt tính, giá trị SC<sub>50</sub> lần lượt là 164,3µg/ml, 35,8µg/ml, 59,8µg/ml, 128,9µg/ml.

## **2.2. Hoạt kháng vi sinh vật kiểm định**

### **2.2.1. Quy trình thử hoạt tính kháng vi sinh vật kiểm định**

Hoạt tính kháng Vi sinh vật kiểm định được tiến hành để đánh giá hoạt tính kháng sinh của các mẫu chiết được thực hiện trên các phiến vi lượng 96 giếng theo phương pháp hiện đại của Vander Bergher và Vlietlinck (1991), và MCKane, L., & Kandel (1996).

Kháng sinh kiểm định bao gồm: Ampixilin đối với vi khuẩn Gr(+), Tetracylin đối với vi khuẩn Gr(-), Nystatin đối với nấm sợi và nấm men.

Các bước tiến hành:

*Chuẩn bị vi sinh vật:* Bao gồm các chủng vi sinh vật kiểm định:

- Vi khuẩn Gr (-): *Escherichia coli* (ATCC 25922 )  
*Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 25923 )
- Vi khuẩn Gr (+): *Bacillus subtilis* (ATCC 27212 )  
*Staphylococcus aureus* (ATCC12222)
- Nấm sợi: *Aspergillus niger* (439) ; *Fusarium oxysporum* (M42)
- Nấm men: *Candida albicans*(ATCC 7754)  
*Saccharomyces cerevisiae*(SH 20)

*Chứng dương tính:*

- + Ampicilin cho vi khuẩn Gr(+)
- + Tetracylin cho vi khuẩn Gr(-)
- + Nystatin hoặc Amphotericin B cho nấm sợi và nấm men.

Kháng sinh pha trong DMSO100% với nồng độ thích hợp: Ampixilin: 50mM; Tetracylin: 10mM; Nystatin: 0.04mM

*Chứng âm tính:* Vi sinh vật kiểm định không trộn kháng sinh và chất thử

*Môi trường nuôi cấy vi sinh vật:* Saboraud Dextrose Broth (SDB)-Sigma cho nấm men và nấm mốc. Vi khuẩn trong môi trường Trypcase Soya Broth (TSB)-Sigma.

*Môi trường thí nghiệm:* Eugon Broth (Difco, Mỹ) cho vi khuẩn, Myco phil(Difco, Mỹ) cho nấm

*Tiến hành thí nghiệm:* Các chủng kiểm định được hoạt hoá và pha loãng tới nồng độ 0,5 đơn vị Mc Fland rồi tiến hành thí nghiệm.

*Đọc kết quả:*

Kết quả đọc sau khi ủ các phiến thí nghiệm trong tủ ấm 37<sup>0</sup>C/24 giờ cho vi khuẩn và 30<sup>0</sup>C/48 giờ đối với nấm sợi và nấm men.

Kết quả dương tính là nồng độ mà ở đó không có vi sinh vật phát triển. Khi nuôi cấy lại nồng độ này trên môi trường thạch đĩa để kiểm tra, có giá trị CFU< 5

*Nồng độ ức chế tối thiểu (MIC-Minimum Inhibitory concentration) của chất có hoạt tính:*

Các mẫu đã có hoạt tính được sàng lọc ban đầu được pha loãng theo các thang nồng độ thấp dần, từ (5- 10) thang nồng độ để tính giá trị nồng độ tối thiểu mà ở đó vi sinh vật bị ức chế phát triển gần như hoàn toàn.

### **2.2.2. Kết quả thử hoạt tính kháng vi sinh vật kiểm định**

- Kết quả thử hoạt tính kháng vi sinh vật kiểm định đối với dịch chiết etyl axetat từ dịch lên men của 55 chủng nấm phân lập cho thấy: có 34 dịch chiết biểu hiện hoạt tính kháng ít nhất 1 vi sinh vật kiểm định. Có 8 dịch chiết kháng từ 3 vi sinh vật kiểm định trở lên, đó là các dịch chiết: **CP15, D5, MA25, MA26, 286, NB, HYTQ2, HT**. Trong đó, thể hiện hoạt tính mạnh nhất là dịch chiết **MA25**, kháng 05/8 chủng vi sinh vật kiểm định thử

- Kết quả thử hoạt tính kháng vi sinh vật kiểm định đối với dịch chiết nước nóng của các dịch lên men của 55 chủng nấm phân lập cho thấy: có 20 dịch chiết biểu hiện hoạt tính kháng ít nhất 1 vi sinh vật kiểm định. Có 7 dịch chiết kháng từ 3 vi sinh vật kiểm định trở lên, đó là các dịch chiết: **CP15, D5, MA25, 286, NB, HYTQ2, HT**. Trong đó, thể hiện hoạt tính mạnh nhất là dịch chiết **MA25** kháng 06/8 chủng vi sinh vật kiểm định thử

- Kết quả thử hoạt tính kháng vi sinh vật kiểm định đối với dịch chiết etyl axetat từ dịch lên men của 55 chủng nấm phân lập cho thấy: có 20 dịch ép biểu hiện hoạt tính kháng ít nhất 1 vi sinh vật kiểm định. Có 5 dịch chiết kháng từ 3 vi sinh vật kiểm định trở lên, đó là các dịch chiết: **D5, MA25, MA26, NB, HT**. Trong đó, thể hiện hoạt tính mạnh nhất là dịch chiết **MA25 và HT** kháng 05/8 chủng vi sinh vật kiểm định thử

**Bảng 8a: Hoạt tính kháng vi sinh vật kiểm định của các dịch chiết etyl axetat**

Stt	Kí hiệu mẫu	Nồng độ ức chế tối thiểu MIC ( $\mu\text{g/ml}$ )							
		Vi khuẩn Gr(-)		Vi khuẩn Gr(+)		Nấm mốc		Nấm men	
		<i>E. coli</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>B. subtilis</i>	<i>S. aureus</i>	<i>Asp. niger</i>	<i>F. oxysporum</i>	<i>S. cerevisiae</i>	<i>C. albicans</i>
1	CP3	(-)	(-)	(-)	(-)	200	(-)	(-)	(-)
2	CP4	(-)	(-)	(-)	(-)	200	(-)	200	(-)
3	CP6	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	200	(-)
4	CP8	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
5	CP11	200	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
6	CP15	(-)	200	(-)	200	(-)	(-)	200	(-)
7	D5	200	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	200	200
8	D11	200	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
9	D14	200	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
10	D16	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
11	D17	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
12	H1	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
13	HL1	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
14	HL3	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
15	HLQT	200	(-)	(-)	(-)	(-)	200	(-)	(-)
16	MA2	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	200	(-)	(-)
17	MA5	200	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
18	MA9	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
19	MA10	(-)	(-)	(-)	200	(-)	(-)	(-)	(-)
20	MA11	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
21	MA25	200	200	(-)	50	(-)	200	(-)	100
22	MA26	(-)	200	(-)	200	(-)	(-)	(-)	100
23	MA27	200	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
24	MA28	200	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
25	38	200	(-)	(-)	200	(-)	(-)	(-)	(-)

26	72	(-)	(-)	200	(-)	200	(-)	(-)	(-)
27	75	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
28	125	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
29	135	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
30	231	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
31	264	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
32	286	200	(-)	200	200	(-)	(-)	(-)	(-)
33	402	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
34	1M	(-)	(-)	200	(-)	200	(-)	(-)	(-)
35	VC4	(-)	(-)	200	(-)	200	(-)	(-)	(-)
36	42M	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
37	S42	(-)	(-)	(-)	100	(-)	(-)	(-)	(-)
38	NB	(-)	(-)	200	(-)	200	200	(-)	(-)
39	CTD1.2	(-)	(-)	200	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
40	H§2	(-)	(-)	(-)	200	(-)	200	(-)	(-)
41	PLTQ	(-)	(-)	200	(-)	200	(-)	(-)	(-)
42	PLTQ7	(-)	(-)	200	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
43	PLTQ10	(-)	(-)	200	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
44	TQ071	200	(-)	200	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
45	HYTQ2	200	(-)	200	(-)	200	(-)	(-)	(-)
46	CP072	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
47	VF27	200	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
48	FV2	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
49	VC	(-)	(-)	200	(-)	200	(-)	(-)	(-)
50	LCR	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
51	HT	200	200	(-)	50	(-)	100	(-)	(-)
52	NC	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
53	NN	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
54	HYTQ1	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
55	L2	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)

**Bảng 8b: Hoạt tính kháng vi sinh vật kiểm định của các dịch chiết nước nóng**

Stt	Kí hiệu mẫu	Nồng độ ức chế tối thiểu MIC ( $\mu\text{g/ml}$ )							
		Vi khuẩn Gr(-)		Vi khuẩn Gr(+)		Nấm mốc		Nấm men	
		<i>E. coli</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>B. subtilis</i>	<i>S. aureus</i>	<i>Asp. niger</i>	<i>F. oxysporum</i>	<i>S. cerevisiae</i>	<i>C. albicans</i>
56	CP3	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
57	CP4	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	200	(-)
58	CP6	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
59	CP8	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
60	CP11	200	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
61	CP15	(-)	200	(-)	(-)	200	(-)	200	(-)
62	D5	200	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	200	200
63	D11	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
64	D14	(-)	(-)	200	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
65	D16	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
66	D17	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
67	H1	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
68	HL1	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
69	HL3	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
70	HLQT	(-)	(-)	200	(-)	(-)	200	(-)	(-)
71	MA2	200	(-)	(-)	(-)	(-)	200	(-)	(-)
72	MA5	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
73	MA9	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
74	MA10	(-)	(-)	(-)	200	(-)	(-)	(-)	(-)
75	MA11	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
76	MA25	100	(-)	200	50	(-)	200	200	100
77	MA26	(-)	(-)	(-)	200	(-)	(-)	(-)	100
78	MA27	200	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
79	MA28	200	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
80	38	200	(-)	(-)	200	(-)	(-)	(-)	(-)
81	72	200	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	200	(-)

82	<b>75</b>	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
83	<b>125</b>	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
84	<b>135</b>	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
85	<b>231</b>	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
86	<b>264</b>	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
87	<b>286</b>	<b>200</b>	(-)	(-)	<b>200</b>	(-)	<b>200</b>	<b>200</b>	(-)
88	<b>402</b>	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
89	<b>1M</b>	(-)	(-)	(-)	(-)	<b>200</b>	(-)	(-)	(-)
90	<b>VC4</b>	(-)	(-)	<b>200</b>	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
91	<b>42M</b>	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
92	<b>S42</b>	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
93	<b>NB</b>	<b>200</b>	(-)	(-)	(-)	<b>200</b>	(-)	(-)	<b>200</b>
94	<b>CTD1.2</b>	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
95	<b>H§2</b>	<b>200</b>	(-)	(-)	(-)	(-)	<b>200</b>	(-)	(-)
96	<b>PLTQ</b>	(-)	(-)	(-)	(-)	<b>200</b>	(-)	(-)	(-)
97	<b>PLTQ7</b>	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
98	<b>PLTQ10</b>	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
99	<b>TQ071</b>	<b>200</b>	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
100	<b>HYTQ2</b>	<b>200</b>	(-)	<b>200</b>	(-)	(-)	(-)	<b>200</b>	(-)
101	<b>CP072</b>	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
102	<b>VF27</b>	<b>200</b>	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
103	<b>FV2</b>	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
104	<b>VC</b>	(-)	(-)	(-)	(-)	<b>200</b>	(-)	(-)	(-)
105	<b>LCR</b>	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
106	<b>HT</b>	(-)	<b>100</b>	<b>200</b>	(-)	(-)	<b>100</b>	<b>200</b>	(-)
107	<b>NC</b>	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
108	<b>NN</b>	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
109	<b>HYTQ1</b>	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
110	<b>L2</b>	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)

**Bảng 8c: Hoạt tính kháng vi sinh vật kiểm định của các dịch ép tươi**

Stt	Kí hiệu mẫu	Nồng độ ức chế tối thiểu MIC ( $\mu\text{g/ml}$ )							
		Vi khuẩn Gr(-)		Vi khuẩn Gr(+)		Nấm mốc		Nấm men	
		<i>E. coli</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>B. subtilis</i>	<i>S. aureus</i>	<i>Asp. niger</i>	<i>F. oxysporum</i>	<i>S. cerevisiae</i>	<i>C. albicans</i>
111	CP3	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
112	CP4	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	200	(-)
113	CP6	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	200	(-)
114	CP8	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
115	CP11	200	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
116	CP15	(-)	(-)	(-)	200	(-)	(-)	(-)	200
117	D5	(-)	(-)	(-)	200	(-)	(-)	200	200
118	D11	(-)	(-)	(-)	200	(-)	(-)	(-)	(-)
119	D14	(-)	(-)	200	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
120	D16	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
121	D17	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
122	H1	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
123	HL1	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
124	HL3	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
125	HLQT	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	200	(-)	(-)
126	MA2	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	200	(-)	(-)
127	MA5	200	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
128	MA9	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
129	MA10	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
130	MA11	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
131	MA25	(-)	200	(-)	100	200	200	(-)	100
132	MA26	(-)	200	(-)	200	(-)	200	(-)	(-)
133	MA27	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
134	MA28	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
135	38	(-)	(-)	(-)	200	(-)	(-)	(-)	(-)
136	72	(-)	200	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)

137	<b>75</b>	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
138	<b>125</b>	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
139	<b>135</b>	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
140	<b>231</b>	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
141	<b>264</b>	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
142	<b>286</b>	<b>200</b>	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	<b>200</b>	(-)
143	<b>402</b>	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
144	<b>1M</b>	(-)	(-)	<b>200</b>	(-)	<b>200</b>	(-)	(-)	(-)
145	<b>VC4</b>	(-)	(-)	<b>200</b>	(-)	<b>200</b>	(-)	(-)	(-)
146	<b>42M</b>	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
147	<b>S42</b>	(-)	(-)	(-)	<b>100</b>	(-)	(-)	(-)	(-)
148	<b>NB</b>	<b>200</b>	(-)	(-)	(-)	<b>100</b>	<b>200</b>	(-)	(-)
149	<b>CTD1.2</b>	<b>200</b>	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
150	<b>H§2</b>	(-)	(-)	(-)	<b>200</b>	(-)	<b>200</b>	(-)	(-)
151	<b>PLTQ</b>	(-)	(-)	(-)	(-)	<b>200</b>	(-)	(-)	(-)
152	<b>PLTQ7</b>	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
153	<b>PLTQ10</b>	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
154	<b>TQ071</b>	<b>200</b>	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
155	<b>HYTQ2</b>	(-)	(-)	<b>200</b>	(-)	<b>100</b>	(-)	(-)	(-)
156	<b>CP072</b>	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
157	<b>VF27</b>	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
158	<b>FV2</b>	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
159	<b>VC</b>	(-)	(-)	(-)	(-)	<b>200</b>	(-)	(-)	(-)
160	<b>LCR</b>	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
161	<b>HT</b>	<b>200</b>	<b>200</b>	(-)	<b>200</b>	<b>200</b>	<b>200</b>	(-)	(-)
162	<b>NC</b>	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
163	<b>NN</b>	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
164	<b>HYTQ1</b>	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
165	<b>L2</b>	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)

## **2.3. Kết quả hoạt tính gây độc tế bào ung thư**

### **2.3.1. Quy trình thử hoạt tính gây độc tế bào**

Theo phương pháp của Likhiwitayawuid và cs., 1993 đang được tiến hành tại viện nghiên cứu ung thư Quốc gia của Mỹ (NCI). Dựa trên phương pháp nuôi cấy tế bào ung thư invitro của các tác giả Geran và cs, 1972; Pezutto và cs., 1983 và Skehan và cs, 1990. Phương pháp này đã được phòng thí nghiệm thử hoạt tính sinh học viện hoá học các hợp chất thiên nhiên triển khai áp dụng từ năm 1996,.

#### **Dòng tế bào:**

Dòng Lu : Lung cancer - ung thư phổi

Dòng RD : ung thư màng tim - Rhabdosarcoma

Dòng Hep- G2: Hepatocellular carcinoma

Dòng tế bào được giữ trong Nitor lỏng, đánh thức và duy trì trong các môi trường dinh dưỡng MEME, Eagle hoặc DEME có bổ sung huyết thanh bê tươi 7-10%

Tế bào nuôi cấy trong các điều kiện tiêu chuẩn ( 5% CO<sub>2</sub>; độ ẩm 98%; nhiệt độ ổn định ở 37°C vô trùng tuyệt đối) cho phát triển tới pha phát triển cực đại (đạt 60-70%), thay môi trường sạch để hoạt hoá tế bào từ 18-24 giờ, lúc đó tế bào đã sẵn sàng để thực hiện thí nghiệm.

- Mẫu thí nghiệm:

Hoà mẫu thí nghiệm vào dung dịch DMSO 100% (4mg/ml) cho bước sàng lọc sơ bộ. Đối với mẫu chiết nước nóng hoặc dịch nuôi cấy tươi nhỏ thẳng vào phiến rồi trộn với tế bào

Pha 10 thang nồng độ cho bước 2 để tính giá trị IC<sub>50</sub>.

- Mẫu chứng: Dùng chất chuẩn có khả năng diệt tế bào, chẳng hạn; Elipitine hoặc Colchicine pha trong DMSO với nồng độ 0.01mM

Nhỏ vào mỗi giếng 10µl mẫu pha

- Tiến hành :

Tế bào được xử lý Trýpsin EDTA cho tách khỏi đáy bình. Hoà dung dịch huyền phù tế bào bằng môi trường sạch, rửa và đếm số lượng, pha tế bào nồng độ 3x10<sup>4</sup> tế bào/ml đối với dòng KB, 4x10<sup>4</sup> tế bào/ml đối với dòng FL.

Thêm vào các giếng đã có chất chuẩn bị sẵn ở trên 190 µl dung dịch huyền phù tế bào.

Phiến được ủ trong tủ CO<sub>2</sub> thêm 3 ngày.

- Kết thúc thí nghiệm:

Tế bào khi ủ 3 ngày được cố định bằng dung dịch TCA lạnh.

Rửa, để khô, nhuộm SRB 0,4% trong axit acetic 1% và rửa lại bằng axit acetic 1% để loại mẫu thừa; để khô, hoà lại bằng dung dịch đệm Tris base.

Đọc trên máy ELISA ở bước sóng 495-515nm

**Chú ý:** Luôn phải có phiến đối chứng OD (ngày 0) để làm đối chứng cho lượng tế bào ở thời điểm bắt đầu thí nghiệm. Về đối chứng âm: Giá trị OD của DMSO 10% để làm đối chứng cho giá trị của lượng tế bào khi kết thúc thí nghiệm. Cách cố định và nhuộm như trên.

#### **Sàng lọc sơ cấp tìm giá trị CS % (% Cell Survival):**

- Giá trị CS: là khả năng sống sót của tế bào ở nồng độ nào đó của chất thử tính theo % so với đối chứng, mẫu nào cho giá trị CS ≤ 50% ở nồng độ mẫu 20 µg/ml đối với mẫu thô và 4 µg/ml đối với mẫu tinh khiết được đánh giá là có hoạt

tính. Dựa trên kết quả đo được của chúng OD (ngày 0), DMSO 10% và so sánh với giá trị OD khi trộn mẫu để tìm giá trị CS(%) theo công thức:

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

CS % được tính toán theo công thức độ lệch tiêu chuẩn của Duncan lấy giá trị trung bình với độ lệch tiêu chuẩn  $\sigma$

$$\sigma = \sqrt{\frac{\sum (x_i - \bar{x})^2}{n - 1}}$$

Các mẫu có biểu hiện hoạt tính ( $CS_{50} < 50\% \pm \sigma$ ) sẽ được chọn ra để thử nghiệm bước 2 để tìm giá trị  $IC_{50}$

**Cách tính  $IC_{50}$ :** dùng giá trị  $CS_{50}$  của 10 thang nồng độ, dựa vào trương trình Table curve theo thang giá trị logarit của đường cong phát triển tế bào và nồng độ chất thử để tính giá trị  $IC_{50}$ . Công thức:  $1/y = a + b \ln X$

Trong đó Y: nồng độ chất thử

X: Giá trị CS (%)

### 2.3.2. Kết quả thử hoạt tính gây độc tế bào

**Bảng 9a: Kết quả hoạt tính gây độc tế bào của dịch chiết etyl axetat**

ST T	MẪU	Dòng tế bào (% Cell survival)			KẾT QUẢ
		Hep-G2	RD	Lu	
1	CP3	100,1±0,05	99,2±0,1	97,8±0,9	âm tính
2	CP4	100,0±0,7	97,9±0,2	96,3±0,5	âm tính
3	CP6	100,1±0,06	100,5±0,7	98,5±1,1	âm tính
4	CP8	85,0±0,5	75,0±0,2	83,3±1,0	âm tính
5	CP15	99,8±0,9	100,4±0,4	97,2±1,2	âm tính
6	D5	79,9±0,5	73,3±0,1	87,0±1,9	âm tính
7	D11	83,3±0,5	82,1±1,6	86,1±1,5	âm tính
8	D14	84,2±1,5	76,2±1,1	86,6±1,2	âm tính
9	D16	82,5±0,5	75,0±1,2	84,5±0,4	âm tính
10	D17	89,7±1,96	84,2±2,0	84,7±0,2	âm tính
11	H1	99,4±0,5	98,2±1,01	91,9±0,0	âm tính
12	HL1	98,2±1,1	99,5±0,5	92,4±0,9	âm tính
13	HL3	88,9±0,8	92,5±1,2	97,2±0,9	âm tính
14	MA2	93,6±2,5	82,0±1,5	95,4±0,5	âm tính
15	MA5	89,3±1,5	86,7±0,0	93,1±0,7	âm tính
16	MA9	83,8±1,0	68,0±1,0	96,9±0,3	âm tính
17	<b>MA10</b>	68,09±0,3	<b>26,5±1,0</b>	62,16±1,0	Dương tính với dòng RD
18	MA11	81,6±1,4	85,9±0,4	94,6±0,1	âm tính
19	MA25	60,7±1,1	86,8±0,1	84,3±1,4	âm tính
20	MA27	82,05±0,9	90,9±2,7	94,4±1,0	âm tính
21	MA28	79,06±0,5	96,3±2,1	85,6±0,8	âm tính
22	<b>38</b>	<b>43,9±0,5</b>	<b>39,8±0,5</b>	82,7±2,5	Dương tính với 2 dòng Hep-

					G2, RD
23	<b>72</b>	62,2±1,4	<b>28,9±0,2</b>	75,3±0,75	Dương tính với dòng RD
24	<b>75</b>	<b>9,1±0,35</b>	<b>0±0</b>	<b>39,9±0,15</b>	Dương tính với cả 3 dòng
25	<b>125</b>	51,3±0,5	<b>50,0±0,1</b>	85,9±1,3	Dương tính với dòng RD
26	135	58,8±1,5	55,76±0,1	66,7±0	âm tính
27	<b>231</b>	<b>35,4±0,4</b>	74,6±0,05	55,8±0,1	Dương tính với dòng Hep-G2
28	<b>264</b>	<b>8,3±0,2</b>	96,6±0,6	65,3±0,09	Dương tính với dòng Hep-G2
29	<b>286</b>	<b>1,73±0,5</b>	<b>0,0±0,0</b>	<b>25±1,01</b>	Dương tính với cả 3 dòng
30	<b>402</b>	<b>40±1,6</b>	<b>41,4±1,5</b>	<b>38,9±0,7</b>	Dương tính cả 3 dòng
31	1M	79,8±0,5	76,8±0,99	73,6±0,15	âm tính
32	<b>VC4</b>	<b>0,0±0,0</b>	<b>0,0±0,0</b>	<b>7,3±0,55</b>	Dương tính với cả 3 dòng
33	42M	62,5±1,4	51,1±0,35	91,9±0,6	âm tính
34	<b>S42</b>	<b>10,2±0,2</b>	<b>2,3±0,15</b>	58,5±1,37	Dương tính với 2 dòng Hep-G2, RD
35	<b>NB</b>	76,8±1,4	<b>38,0±0,5</b>	82,8±0,5	Dương tính với dòng RD
36	CTD1.2	67,0±0,1	66,3±0,35	76,8±0,5	âm tính
37	<b>HD2</b>	<b>10,23±0,1</b>	<b>0,0±0,0</b>	70,2±1,5	Dương tính với 2 dòng Hep-G2, RD
38	<b>PLTQ</b>	<b>30,5±1,06</b>	<b>18,3±1,26</b>	<b>48,6±0,75</b>	Dương tính với cả 3 dòng
39	<b>PLTQ7</b>	<b>0,0±0,0</b>	<b>0,0±0,0</b>	<b>11,9±0,75</b>	Dương tính với cả 3 dòng
40	<b>PLTQ10</b>	<b>22±0,7</b>	<b>1,5±0,3</b>	54,1±1,3	Dương tính với 2 dòng Hep-G2, RD
41	<b>TQ071</b>	<b>20,0±0,1</b>	<b>13,6±0,0</b>	64,7±0,9	Dương tính với 2 dòng Hep-G2, RD
42	<b>HYTQ2</b>	<b>0,0±0,0</b>	<b>0,0±0,0</b>	<b>16,4±0,25</b>	Dương tính với cả 3 dòng
43	<b>HT</b>	<b>40,5±0,1</b>	<b>42,8±1,2</b>	<b>12,2±0,5</b>	Dương tính với cả 3 dòng
44	CPO72	91,1±0,4	88,13±0,99	96,3±0,54	âm tính
45	<b>FV2</b>	57,3±0,7	<b>44,9±1,5</b>	82,1±0,5	Dương tính với dòng RD
46	VF27	85,1±1,4	64,8±0,15	95,2±1,01	âm tính
47	<b>LCR</b>	<b>30,6±0,2</b>	<b>30,3±0,5</b>	79,5±0,49	Dương tính với 2 dòng Hep-G2, RD
48	<b>VC</b>	<b>2,5±0,1</b>	<b>2,1±0,02</b>	<b>4,3±0,09</b>	Dương tính với cả 3 dòng
49	NC	92,7±0,4	72±0,6	75,9±0,7	âm tính
50	NN	93,9±0,5	99±0,4	100±0,08	âm tính
51	HYTQ1	77,1±0,99	68,3±0,3	100±0,5	âm tính
52	<b>L2</b>	<b>23,2±0,49</b>	<b>0±0</b>	<b>44,9±0,5</b>	Dương tính với cả 3 dòng

Kết quả thử với 52 dịch chiết etyl axetat từ dịch lên men 52 chủng nấm cho thấy: có 21 dịch chiết biểu hiện hoạt tính gây độc tế bào, trong đó: Có 7 dịch chiết biểu hiện hoạt tính gây độc tế bào đối với 1 dòng tế bào, 6 dịch chiết có khả năng gây độc đối với 2 dòng, 10 dịch chiết có khả năng gây độc đối với 3 dòng là: **75, 286, 402, PLTQ, PLTQ7, HYTQ2, HT, VC, VC4, L2.**

**Bảng 9b: Kết quả hoạt tính gây độc tế bào của dịch chiết nước nóng**

ST T	MẪU	Dòng tế bào (% Cell survival)			KẾT QUẢ
		Hep-G2	RD	Lu	
53	CP3	99,1±0,03	87,5±0,2	79,4±0,07	âm tính
54	CP4	80,6±0,5	77,8±0,6	76,4±0,5	âm tính
55	CP6	90,2±0,6	88,9±0,2	76,5±0,9	âm tính
56	<b>CP8</b>	57,5±0,2	<b>45,3±0,1</b>	72,1±0,5	Dương tính với dòng RD
57	CP15	55,3±0,09	60,7±0,5	72,0±0,2	âm tính
58	D5	52,7±0,9	60,6±0,1	74,2±1,1	âm tính
59	D11	77±0,2	67,8±0,7	78,3±0,4	âm tính
60	D14	77,9±0,6	68,4±0,9	76,5±1,0	âm tính
61	D16	72,5±0,5	66,6±1	79,1±0,7	âm tính
62	D17	89,7±1,6	84,2±0,09	74,7±0,25	âm tính
63	H1	80,4±0,5	69,2±1,01	73,9±0,09	âm tính
64	HL1	25±1,1	79,7±0,1	83,4±0,3	âm tính
65	HL3	75,3±0,6	69,4±1,1	75,5±0,4	âm tính
66	MA2	72,4±0,1	77,1±0,4	69,8±0,2	âm tính
67	<b>MA5</b>	<b>45,7±1,5</b>	66,2±0,06	73,0±0,5	Dương tính với dòng Hep-G2
68	MA9	63,8±1,0	<b>38,4±0,5</b>	76,9±0,9	Dương tính với dòng RD
69	<b>MA10</b>	<b>43,7±0,4</b>	<b>21,9±0,2</b>	58,7±0,5	Dương tính với 2 dòng Hep-G2, RD
70	MA11	77,4±0,6	82,7±0,2	94,5±0,7	âm tính
71	MA25	<b>40,6±0,3</b>	70±0,1	75,2±0,8	Dương tính với dòng Hep-G2
72	MA27	82,0±0,4	90,9±2,7	94,4±1,0	âm tính
73	MA28	67,9±0,2	77,3±1,1	78,9±0,5	âm tính
74	<b>38</b>	<b>32,6±0,2</b>	<b>25,7±1,1</b>	63,6±0,6	Dương tính với 2 dòng Hep-G2, RD
75	<b>72</b>	<b>50,0±0,02</b>	<b>28,9±0,2</b>	65,5±0,2	Dương tính với 2 dòng Hep-G2, RD
76	<b>75</b>	<b>4,5±0,2</b>	<b>0±0</b>	<b>22,2±0,1</b>	Dương tính với cả 3 dòng
77	<b>125</b>	<b>41,5±0,9</b>	<b>37,8±0,4</b>	62,9±0,7	Dương tính với 2 dòng Hep-G2, RD
78	135	55,0±0,5	<b>43,1±0,9</b>	57,5±0,7	Dương tính với dòng RD
79	<b>231</b>	<b>22,7±0,5</b>	67,4±0,5	62,4±0,3	Dương tính với dòng Hep-G2
80	<b>264</b>	<b>5,7±0,09</b>	78,4±0,2	50,9±0,02	Dương tính với dòng Hep-G2
81	<b>286</b>	<b>3,3±0,08</b>	<b>0,0±0,0</b>	<b>15,7±0,9</b>	Dương tính với cả 3 dòng
82	<b>402</b>	<b>20,5±0,6</b>	<b>36,8±0,8</b>	<b>25,7±0,2</b>	Dương tính cả 3 dòng
83	1M	67,9±0,1	60,2±0,9	65,1±0,1	âm tính
84	<b>VC4</b>	<b>0,0±0,0</b>	<b>0,0±0,0</b>	<b>0,0±0,0</b>	Dương tính với cả 3 dòng
85	42M	52,5±1,4	<b>43,8±0,5</b>	81,9±0,6	Dương tính với dòng RD
86	<b>S42</b>	<b>0,0±0,0</b>	<b>0,0±0,0</b>	<b>0,0±0,0</b>	Dương tính với cả 3 dòng
87	<b>NB</b>	66,8±1,0	<b>29,7±0,2</b>	72,8±0,9	Dương tính với dòng RD
88	CTD1.2	57,0±0,1	56,3±0,3	65,2±0,5	âm tính
89	<b>HD2</b>	<b>0,0±0,0</b>	<b>0,0±0,0</b>	58,5±0,5	Dương tính với 2 dòng Hep-G2, RD

90	<b>PLTQ</b>	<b>22,2±0,4</b>	<b>9,7±0,1</b>	<b>28,9±0,6</b>	Dương tính với cả 3 dòng
91	<b>PLTQ7</b>	<b>0,0±0,0</b>	<b>0,0±0,0</b>	<b>0,0±0,0</b>	Dương tính với cả 3 dòng
92	<b>PLTQ10</b>	<b>22±0,7</b>	<b>1,5±0,3</b>	<b>44,7±0,3</b>	Dương tính với cả 3 dòng
93	<b>TQ071</b>	<b>20,0±0,1</b>	<b>13,6±0,0</b>	<b>48,2±0,2</b>	Dương tính với cả 3 dòng
94	<b>HYTQ2</b>	<b>0,0±0,0</b>	<b>0,0±0,0</b>	<b>0,0±0,0</b>	Dương tính với cả 3 dòng
95	<b>HT</b>	<b>37,2±0,5</b>	<b>22,8±0,2</b>	<b>5,8±0,5</b>	Dương tính với cả 3 dòng
96	CPO72	91,1±0,4	88,13±0,99	96,3±0,54	âm tính
97	<b>FV2</b>	46,7±0,2	<b>39,5±0,5</b>	73,7±0,7	Dương tính với dòng RD
98	VF27	77,2±0,4	58,4±0,1	88,9±0,9	âm tính
99	<b>LCR</b>	<b>28,3±0,5</b>	<b>26,9±0,52</b>	55,5±0,4	Dương tính với 2 dòng Hep-G2, RD
100	<b>VC</b>	<b>0,0±0,0</b>	<b>0,0±0,0</b>	<b>0,0±0,0</b>	Dương tính với cả 3 dòng
101	NC	92,7±0,4	72±0,6	75,9±0,7	âm tính
102	NN	93,9±0,5	99±0,4	100±0,08	âm tính
103	HYTQ1	68,2±0,9	71,3±0,5	90,8±0,9	âm tính
104	<b>L2</b>	<b>22,3±0,5</b>	<b>0,0±0,0</b>	<b>36,5±0,2</b>	Dương tính với cả 3 dòng

Kết quả thử với 52 dịch chiết nước nóng từ dịch lên men 52 chủng nấm cho thấy: có 29 dịch chiết biểu hiện hoạt tính gây độc tế bào, trong đó: Có 10 dịch chiết biểu hiện hoạt tính gây độc tế bào đối với 1 dòng tế bào, 7 dịch chiết có khả năng gây độc đối với 2 dòng, 13 dịch chiết có khả năng gây độc đối với 3 dòng là: **75, 286, 402, VC4, S42, PLTQ, PLTQ7, PLTQ10, PLTQ71, HYTQ2, HT, VC, L2.**

**Bảng 9c: Kết quả hoạt tính gây độc tế bào của dịch ép tươi**

ST T	MẪU	Dòng tế bào (% Cell survival)			KẾT QUẢ
		Hep-G2	RD	Lu	
105	CP3	<b>22,5 ± 1,25</b>	<b>8,8 ± 0,4</b>	<b>33,1 ± 0,6</b>	âm tính
106	CP4	68,8 ± 0,05	<b>19,6 ± 1,7</b>	80,1 ± 1,2	Dương tính với dòng RD
107	CP6	65,7 ± 0,3	60,5 ± 0,2	66,2 ± 1,2	âm tính
108	CP8	57,6 ± 1,6	74,0 ± 0,4	62,3 ± 0,8	âm tính
109	CP15	<b>0,0 ± 0,0</b>	<b>3,3 ± 0,08</b>	<b>16,1 ± 0,2</b>	Dương tính với cả 3 dòng
110	D5	<b>30,8 ± 0,8</b>	<b>18,6 ± 1,1</b>	<b>50,0 ± 0,7</b>	Dương tính với cả 3 dòng
111	D11	<b>10,6 ± 0,1</b>	<b>18,4 ± 0,3</b>	<b>16,2 ± 1,1</b>	Dương tính với cả 3 dòng
112	D14	60,0 ± 0,2	83,5 ± 0,4	76,6 ± 0,6	âm tính
113	D16	60,7±1,1	86,8±0,1	84,3±1,4	âm tính
114	D17	65,9 ± 0,32	58,8 ± 0,5	60,6 ± 0,7	âm tính
115	H1	<b>0,0 ± 0,0</b>	<b>0,0 ± 0,0</b>	<b>30,6 ± 0,6</b>	Dương tính với cả 3 dòng
116	HL1	66,3 ± 0,3	78,2 ± 1,5	60,0 ± 0,4	âm tính
117	HL3	82,05±0,9	90,9±2,7	94,4±1,0	âm tính
118	MA2	79,06±0,5	96,3±2,1	85,6±0,8	âm tính
119	MA5	62,5±1,4	51,1±0,35	91,9±0,6	âm tính
120	MA9	70±0,9	55,7±0,6	61,8 ± 0,6	âm tính
121	<b>MA10</b>	<b>48,2±0,1</b>	<b>35,8±1,2</b>	<b>42,5±0,9</b>	Dương tính với cả 3 dòng
122	MA11	71,6±1,1	75,9±1,4	82,6±0,1	âm tính
123	<b>MA25</b>	<b>40,7±1,1</b>	<b>36,8±0,5</b>	77,9±0,4	Dương tính với 2 dòng Hep-G2, RD
124	MA27	82,05±0,9	90,9±2,7	94,4±1,0	âm tính

125	MA28	79,06±0,5	96,3±2,1	85,6±0,8	âm tính
126	<b>38</b>	<b>22,7±0,5</b>	<b>29,8±0,5</b>	75,5±0,5	Dương tính với 2 dòng Hep-G2, RD
127	<b>72</b>	<b>42,2±1,4</b>	<b>28,9±0,2</b>	75,3±0,75	Dương tính với 2 dòng Hep-G2, RD
128	<b>75</b>	<b>28,1±0,5</b>	<b>10,2±0,1</b>	<b>25,7±0,9</b>	Dương tính với cả 3 dòng
129	<b>125</b>	<b>41,3±0,3</b>	<b>30,5±0,5</b>	72,9±1,1	Dương tính với 2 dòng Hep-G2, RD
130	135	58,8±1,5	55,76±0,1	66,7±0	âm tính
131	<b>231</b>	<b>24,9±0,2</b>	56,6±0,5	<b>45,2±0,1</b>	Dương tính với 2 dòng Hep-G2, LU
132	264	58,3±0,2	96,6±0,6	65,3±0,09	âm tính
133	<b>286</b>	<b>0,0±0,0</b>	<b>0,0±0,0</b>	<b>0,0±0,0</b>	Dương tính với cả 3 dòng
134	<b>402</b>	<b>39,5±0,3</b>	<b>22,7±0,6</b>	<b>28,0±0,3</b>	Dương tính cả 3 dòng
135	1M	79,8±0,5	76,8±0,99	73,6±0,15	âm tính
136	<b>VC4</b>	<b>0,0±0,0</b>	<b>0,0±0,0</b>	<b>0,0±0,0</b>	Dương tính với cả 3 dòng
137	42M	62,5±1,4	51,1±0,35	91,9±0,6	âm tính
138	<b>S42</b>	<b>10,2±0,2</b>	<b>2,3±0,15</b>	<b>0,0±0,0</b>	Dương tính với cả 3 dòng
139	<b>NB</b>	76,8±1,4	68,0±0,5	82,8±0,5	âm tính
140	CTD1.2	67,0±0,1	66,3±0,35	76,8±0,5	âm tính
141	<b>HD2</b>	<b>15,7±0,1</b>	<b>10,0±0,07</b>	70,2±1,5	Dương tính với 2 dòng Hep-G2, RD
142	<b>PLTQ</b>	<b>25,3±0,6</b>	<b>12,9±1,1</b>	<b>37,3±0,7</b>	Dương tính với cả 3 dòng
143	<b>PLTQ7</b>	<b>0,0±0,0</b>	<b>0,0±0,0</b>	<b>0,0±0,0</b>	Dương tính với cả 3 dòng
144	<b>PLTQ10</b>	52,5±0,7	<b>1,5±0,3</b>	54,1±1,3	Dương tính với dòng RD
145	<b>TQ071</b>	<b>30,9±0,15</b>	<b>17,6±0,09</b>	65,0±0,3	Dương tính với 2 dòng Hep-G2, RD
146	<b>HYTQ2</b>	<b>0,0±0,0</b>	<b>0,0±0,0</b>	<b>0,0±0,0</b>	Dương tính với cả 3 dòng
147	<b>HT</b>	<b>22,5±0,1</b>	<b>22,8±1,2</b>	<b>12,2±0,5</b>	Dương tính với cả 3 dòng
148	CPO72	91,1±0,4	88,13±0,99	96,3±0,54	âm tính
149	<b>FV2</b>	52,2±0,2	<b>35,9±0,5</b>	70,7±0,7	Dương tính với dòng RD
150	VF27	85,1±1,4	64,8±0,15	95,2±1,01	âm tính
151	<b>LCR</b>	<b>42,5±0,25</b>	<b>47,8±1,1</b>	85,2±0,5	Dương tính với 2 dòng Hep-G2, RD
152	<b>VC</b>	<b>0,0±0,0</b>	<b>0,0±0,0</b>	<b>0,0±0,0</b>	Dương tính với cả 3 dòng
153	NC	88,2±0,2	64,7±0,9	77,3±0,2	âm tính
154	NN	87,5±0,9	100,0±0,0	100±0,0	âm tính
155	<b>HYTQ1</b>	65,2±0,5	<b>50,0±0,3</b>	78,9±0,2	Dương tính với dòng RD
156	<b>L2</b>	<b>36,5±0,2</b>	<b>11,5±0,7</b>	<b>22,8±0,09</b>	Dương tính với cả 3 dòng

Kết quả thử với 52 dịch chiết etyl axetat từ dịch lên men 52 chủng nấm cho thấy: có 30 dịch chiết biểu hiện hoạt tính gây độc tế bào, trong đó: Có 4 dịch chiết biểu hiện hoạt tính gây độc tế bào đối với 1 dòng tế bào, 9 dịch chiết có khả năng gây độc đối với 2 dòng, 17 dịch chiết có khả năng gây độc đối với 3 dòng là: **CP3, CP15, D5, D11, H1, MA10, 75, 286, 402, VC4, S42, PLTQ, PLTQ7, HYTQ2, HT, VC, L2**. Từ các kết quả thử hoạt tính thu được chúng tôi dự kiến lựa chọn 10 chủng có hoạt tính cao trên để nghiên cứu sâu về thành phần hoá học. Nhưng vì thời gian và kinh phí có hạn nên chúng tôi chỉ dừng lại với 3 chủng: **286, HT và MA10**.

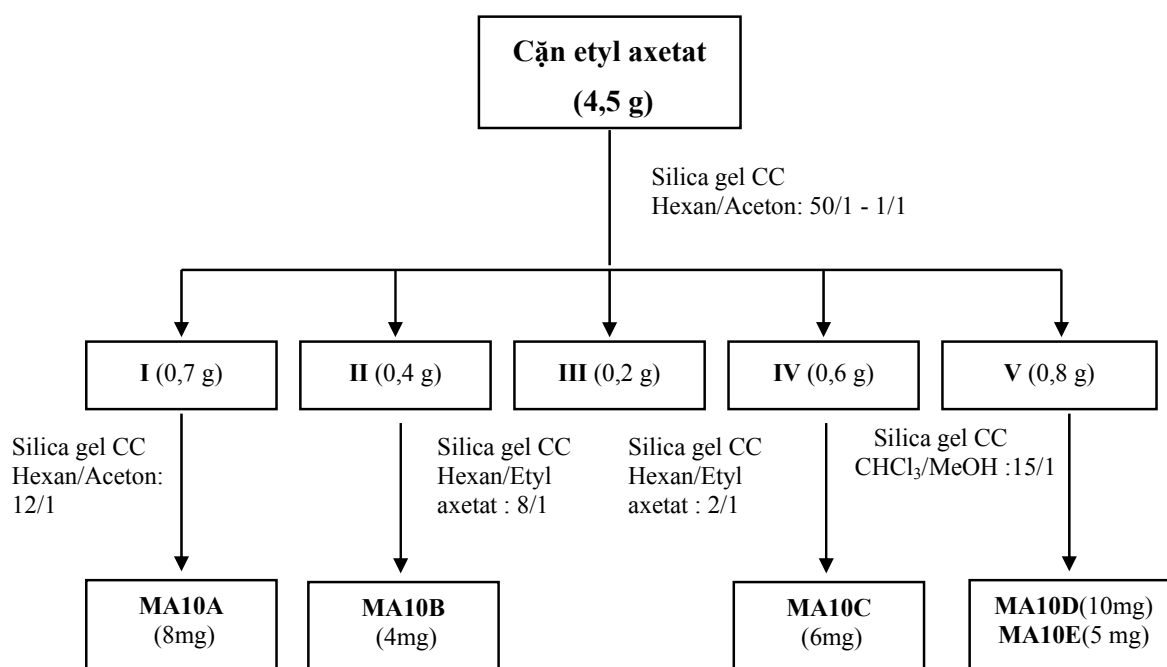
### III. Nghiên cứu cấu trúc các hợp chất phân lập được từ chủng nấm MA10, HT và hoạt tính sinh học của chúng

#### 3.1. Chủng nấm MA10

##### 3.1.1. Quy trình phân lập chất

Sau khi khảo sát hoạt tính sơ bộ chúng tôi thấy phần dịch chiết etyl axetat của chủng nấm MA10 biểu hiện hoạt tính, chúng tôi tiến hành phân lập chất từ phần dịch chiết đó bằng các phân đoạn trên bằng sắc ký cột lặp lại trên silica gel pha thường và pha đảo với các hệ dung môi thích hợp (sơ đồ 1 – phần phương pháp) thu được các hợp chất **MA10A** (8 mg), **MA10B** (4 mg), **MA10C** (6 mg), **MA10D** (10 mg) và **MA10E** (5 mg).

**Sơ đồ 1: Sơ đồ phân lập các hợp chất từ cặn etyl axetat của nấm MA10**



##### 3.1.2. Kết quả phân lập chất và xác định cấu trúc

Kết quả phân lập thu được các hợp chất **MA10A** (8 mg), **MA10B** (4 mg), **MA10C** (6 mg), **MA10D** (10 mg) và **MA10E** (5 mg).

##### a. Hợp chất MA10A - Ergosta-4,6,8(14),22-tetraen-3-one

Chất bột màu vàng, điểm chảy 114-115 °C, phổ khối lượng ESI-MS:  $m/z$  393,1  $[M+H]^+$ , ( $C_{28}H_{40}O$ ,  $M = 392$ ).

$^1H$ -NMR (500 MHz,  $CDCl_3$ )  $\delta_H$ : 2,03 (1H, m,  $H_a$ -1), 1,81 (1H, m,  $H_b$ -1), 2,55 (1H, m,  $H_a$ -2), 2,48 (1H, m,  $H_b$ -2), 5,73 (1H, s, H-4), 6,04 (1H, d,  $J = 9,5$  Hz, H-6), 6,61 (1H, d,  $J = 9,5$  Hz, H-7), 2,16 (1H, m, H-9), 1,71 (1H, m,  $H_a$ -11), 1,61 (1H, m,  $H_b$ -11), 2,09 (1H, m,  $H_a$ -12), 1,31 (1H, m,  $H_b$ -12), 2,47 (1H, m,  $H_a$ -15), 2,39 (1H, m,  $H_b$ -15), 1,82 (1H, m,  $H_a$ -16), 1,52 (1H, m,  $H_b$ -16), 1,26 (1H, m, H-17), 0,96 (3H, s, H-18), 1,00 (3H, s, H-19), 2,17 (1H, m, H-20), 1,06 (3H, d,  $J = 7,0$  Hz, H-21), 5,21 (1H, dd,  $J = 15,5, 7,5$  Hz, H-22), 5,26 (1H, dd,  $J = 15,5, 7,5$  Hz, H-23),

1,88 (1H, m, H-24), 1,49 (1H, m, H-25), 0,83 (3H, d,  $J = 7,0$  Hz, H-26), 0,86 (3H, d,  $J = 7,0$  Hz, H-27) và 0,93 (3H, d,  $J = 7,0$  Hz, H-28) ppm.

$^{13}\text{C}$ -NMR (125 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta_{\text{C}}$ : 34,18 (C-1), 34,14 (C-2), 199,43 (C-3), 123,04 (C-4), 164,33 (C-5), 124,50 (C-6), 133,98 (C-7), 124,45 (C-8), 44,38 (C-9), 36,79 (C-10), 19,02 (C-11), 35,64 (C-12), 44,02 (C-13), 156,05 (C-14), 25,38 (C-15), 27,71 (C-16), 55,76 (C-17), 18,97 (C-18), 16,67 (C-19), 39,27 (C-20), 21,24 (C-21), 135,02 (C-22), 132,58 (C-23), 42,90 (C-24), 33,11 (C-25), 19,67 (C-26), 19,99 (C-27) và 17,56 (C-28) ppm.

**b. Hợp chất MA10B - Ergosta-4,7,22-triene-3,6-dione.**

Chất kết tinh màu trắng, điểm chảy 176-177°C, phổ khối lượng ESI-MS:  $m/z$  599,2  $[\text{M} + \text{H}]^+$ ,  $m/z$  597,4  $[\text{M} - \text{H}]^-$  ( $\text{C}_{37}\text{H}_{58}\text{O}_6$ ,  $M = 598$ ).

$^1\text{H}$ -NMR (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta_{\text{H}}$ : 6,47 (1H, s, H-4), 5,98 (1H, t,  $J = 2,0$  Hz, H-7), 0,69 (3H, s, H-18), 1,30 (3H, s, H-19), 1,05 (3H, d,  $J = 7,0$  Hz, H-21), 5,17 (1H, dd,  $J = 15,0, 8,0$  Hz, H-22), 5,26 (1H, dd,  $J = 15,0, 7,5$  Hz, H-23), 0,85 (3H, d,  $J = 7,0$  Hz, H-26), 0,83 (3H, d,  $J = 7,0$  Hz, H-27) và 0,92 (3H, d,  $J = 7,0$  Hz, H-28) ppm.

$^{13}\text{C}$ -NMR (125 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta_{\text{C}}$ : 35,43 (C-1), 34,24 (C-2), 199,31 (C-3), 123,92 (C-4), 158,16 (C-5), 187,04 (C-6), 125,97 (C-7), 167,75 (C-8), 47,11 (C-9), 39,02 (C-10), 22,57 (C-11), 38,51 (C-12), 44,63 (C-13), 56,10 (C-14), 21,89 (C-15), 27,72 (C-16), 56,29 (C-17), 12,84 (C-18), 19,96 (C-19), 40,20 (C-20), 21,12 (C-21), 134,79 (C-22), 132,76 (C-23), 42,85 (C-24), 33,08 (C-25), 19,49 (C-26), 19,65 (C-27) và 17,59 (C-28) ppm.

**c. Hợp chất MA10C - Ergosterol peroxide.**

Chất tinh thể hình kim màu trắng, điểm chảy 182-184°C, phổ khối lượng ESI-MS:  $m/z$  451  $[\text{M} + \text{Na}]^+$ , 429  $[\text{M} + \text{H}]^+$ , ( $\text{C}_{28}\text{H}_{44}\text{O}_3$ ,  $M = 428$ ).

$^1\text{H}$ -NMR (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta_{\text{H}}$ : 1,71 (1H, m,  $\text{H}_a$ -1), 1,92 (1H, m,  $\text{H}_b$ -1), 1,55 (1H, m,  $\text{H}_a$ -2), 1,84 (1H, m,  $\text{H}_b$ -2), 3,97 (1H, m, H-3), 1,92 (1H, m,  $\text{H}_a$ -4), 2,10 (1H, m,  $\text{H}_b$ -4), 6,24 (1H, d,  $J = 8,5$  Hz, H-6), 6,50 (1H, d,  $J = 8,5$  Hz, H-7), 1,51 (1H, m, H-9), 1,24 (1H, m,  $\text{H}_a$ -11), 1,52 (1H, m,  $\text{H}_b$ -11), 1,25 (1H, m,  $\text{H}_a$ -12), 1,97 (1H, m,  $\text{H}_b$ -12), 1,58 (1H, m,  $\text{H}_a$ -14), 1,41 (1H, m,  $\text{H}_a$ -15), 1,60 (1H, m,  $\text{H}_b$ -15), 1,37 (1H, m, H-16), 1,76 (1H, m, H-16), 1,24 (1H, m, H-17), 0,82 (3H, s, H-18), 0,88 (3H, s, H-19), 2,17 (1H, m, H-20), 1,06 (3H, d,  $J = 7,0$  Hz, H-21), 5,14 (1H, dd,  $J = 8,0, 15,5$  Hz, H-22), 5,26 (1H, dd,  $J = 8,0, 15,5$  Hz, H-23), 1,86 (1H, m, H-24), 1,48 (1H, m, H-25), 0,82 (3H, d,  $J = 7,0$  Hz, H-26), 0,83 (3H, d,  $J = 7,0$  Hz, H-27) và 0,91 (3H, d,  $J = 6,5$  Hz, H-28) ppm.

$^{13}\text{C}$ -NMR (125 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta_{\text{C}}$ : 34,71 (C-1), 30,14 (C-2), 66,47 (C-3), 36,95 (C-4), 82,17 (C-5), 135,43 (C-6), 130,76 (C-7), 79,43 (C-8), 51,12 (C-9), 36,98 (C-10), 23,41 (C-11), 39,37 (C-12), 44,58 (C-13), 51,70 (C-14), 20,64 (C-15), 28,65 (C-16), 56,23 (C-17), 12,88 (C-18), 18,18 (C-19), 39,72 (C-20), 20,89 (C-21), 135,21 (C-22), 132,33 (C-23), 42,79 (C-24), 33,08 (C-25), 19,65 (C-26), 19,95 (C-27) và 17,57 (C-28) ppm.

**d. Hợp chất MA10D - Cerevisterol (Ergosta-7,22E-diene-3 $\beta$ ,5 $\beta$ ,6 $\beta$ -triol).**

Tinh thể hình kim màu trắng, điểm chảy 254-256°C, phổ khối lượng ESI-MS:  $m/z$  453,1  $[\text{M} + \text{Na}]^+$ , ( $\text{C}_{28}\text{H}_{46}\text{O}_3$ ,  $M = 430$ ).

$^1\text{H}$ -NMR (500 MHz,  $\text{MeOH} \& \text{CDCl}_3$ )  $\delta_{\text{H}}$ : 3,99 (1H, m, H-3), 5,31 (1H, t,  $J = 2,5$  Hz, H-7), 0,61 (3H, s, H-18), 1,06 (3H, s, H-19), 1,03 (3H, d, H-21), 5,18

(1H, dd,  $J = 15,3, 7,8$  Hz, H-22), 5,24 (1H, dd,  $J = 15,3, 6,9$ , H-23), 0,84 (3H, d,  $J = 7,0$ , H-26), 0,83 (3H, d,  $J = 7,0$ , H-27) và 0,93 (3H, d,  $J = 7,0$ , H-28).

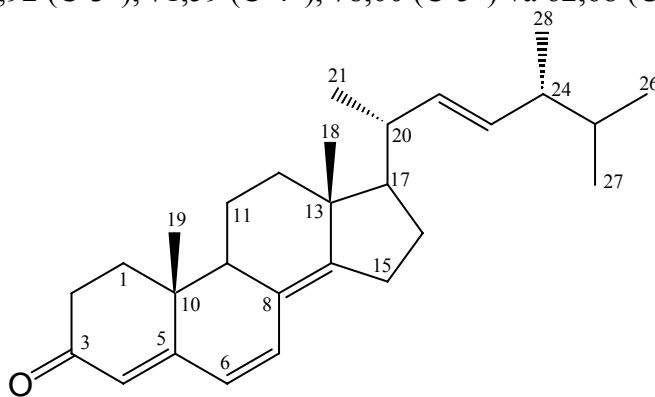
$^{13}\text{C}$ -NMR (125 MHz, MeOH &  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta_{\text{C}}$ : 32,63 (C-1), 30,29 (C-2), 67,13 (C-3), 39,13 (C-4), 75,77 (C-5), 73,00 (C-6), 117,35 (C-7), 143,24 (C-8), 43,02 (C-9), 36,86 (C-10), 21,81 (C-11), 38,27 (C-12), 43,50 (C-13), 54,57 (C-14), 22,74 (C-15), 27,77 (C-16), 55,84 (C-17), 12,04 (C-18), 18,14 (C-19), 40,25 (C-20), 20,88 (C-21), 135,32 (C-22), 131,93 (C-23), 42,67 (C-24), 32,91 (C-25), 19,71 (C-26), 19,40 (C-27) và 17,36 (C-28).

#### e. Hợp chất MA10E - Cerebroside B

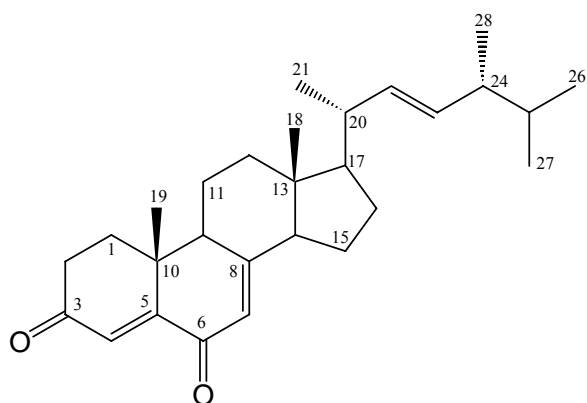
Chất bột màu trắng, điểm chảy 180-190°C, phổ khối lượng ESI-MS:  $m/z$  750,3  $[\text{M}+\text{Na}]^+$ , ( $\text{C}_{41}\text{H}_{77}\text{NO}_9$ ,  $M = 727$ ).

$^1\text{H}$ -NMR (500 MHz, MeOD)  $\delta_{\text{H}}$ : 1,71 (1H, m,  $\text{H}_{\text{a}}-1$ ), 1,92 (1H, m,  $\text{H}_{\text{b}}-1$ ), 1,55 (1H, m,  $\text{H}_{\text{a}}-2$ ), 1,84 (1H, m,  $\text{H}_{\text{b}}-2$ ), 3,97 (1H, m, H-3), 1,92 (1H, m,  $\text{H}_{\text{a}}-4$ ), 2,10 (1H, m,  $\text{H}_{\text{b}}-4$ ), 6,24 (1H, d,  $J = 8,5$  Hz, H-6), 6,50 (1H, d,  $J = 8,5$  Hz, H-7), 1,51 (1H, m, H-9), 1,24 (1H, m,  $\text{H}_{\text{a}}-11$ ), 1,52 (1H, m,  $\text{H}_{\text{b}}-11$ ), 1,25 (1H, m,  $\text{H}_{\text{a}}-12$ ), 1,97 (1H, m,  $\text{H}_{\text{b}}-12$ ), 1,58 (1H, m,  $\text{H}_{\text{a}}-14$ ), 1,41 (1H, m,  $\text{H}_{\text{a}}-15$ ), 1,60 (1H, m,  $\text{H}_{\text{b}}-15$ ), 1,37 (1H, m, H-16), 1,76 (1H, m, H-16), 1,24 (1H, m, H-17), 0,82 (3H, s, H-18), 0,88 (3H, s, H-19), 2,17 (1H, m, H-20), 1,06 (3H, d,  $J = 7,0$  Hz, H-21), 5,14 (1H, dd,  $J = 8,0, 15,5$  Hz, H-22), 5,26 (1H, dd,  $J = 8,0, 15,5$  Hz, H-23), 1,86 (1H, m, H-24), 1,48 (1H, m, H-25), 0,82 (3H, d,  $J = 7,0$  Hz, H-26), 0,83 (3H, d,  $J = 7,0$  Hz, H-27) và 0,91 (3H, d,  $J = 6,5$  Hz, H-28) ppm.

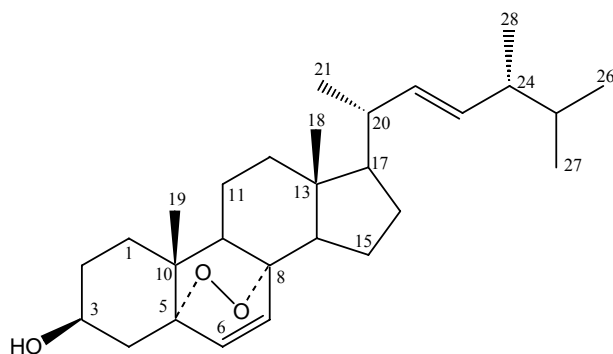
$^{13}\text{C}$ -NMR (125 MHz, MeOD)  $\delta_{\text{C}}$ : 69,74 (C-1), 54,60 (C-2), 73,10 (C-3), 131,11 (C-4), 134,66 (C-5), 33,08 (C-6), 28,68 (C-7), 124,82 (C-8), 136,79 (C-9), 40,77 (C-10), 29,11 (C-11), 30,38-30,83 (C-12-15), 38,08 (C-16), 23,74 (C-17), 14,46 (C-18), 16,12 (C-19), 177,21 (C-1'), 73,10 (C-2'), 35,88 (C-3'), 26,16 (C-4'), 30,38-30,83 (C-5'-13'), 33,08 (C-14'), 23,75 (C-15'), 14,46 (C-16'), 104,72 (C-1''), 75,00 (C-2''), 77,92 (C-3''), 71,59 (C-4''), 78,00 (C-5'') và 62,68 (C-6'') ppm.



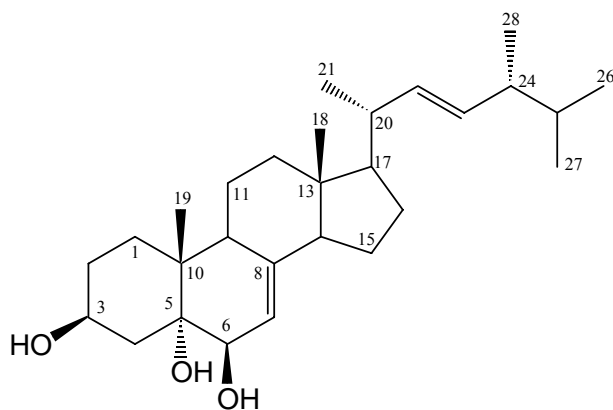
Hình 2.2.1.b. Cấu trúc hóa học của MA10A



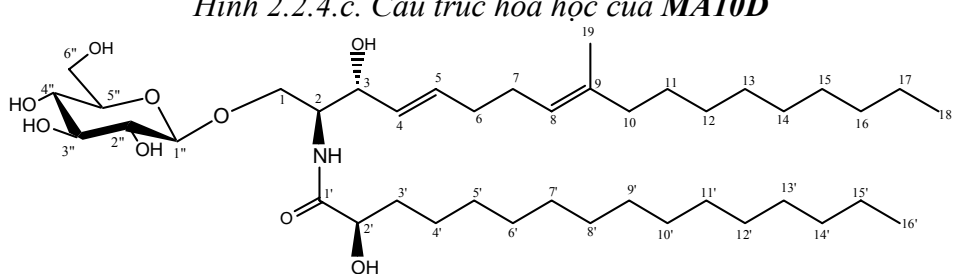
Hình 2.2.2.b. Cấu trúc hóa học của **MA10B**



Hình 2.2.3.b. Cấu trúc hóa học của **MA10C**



Hình 2.2.4.c. Cấu trúc hóa học của **MA10D**



Hình 2.2.5.b. Cấu trúc hóa học của **MA10E**

### 3.2. Chứng nấm *Hầu thủ* (HT)

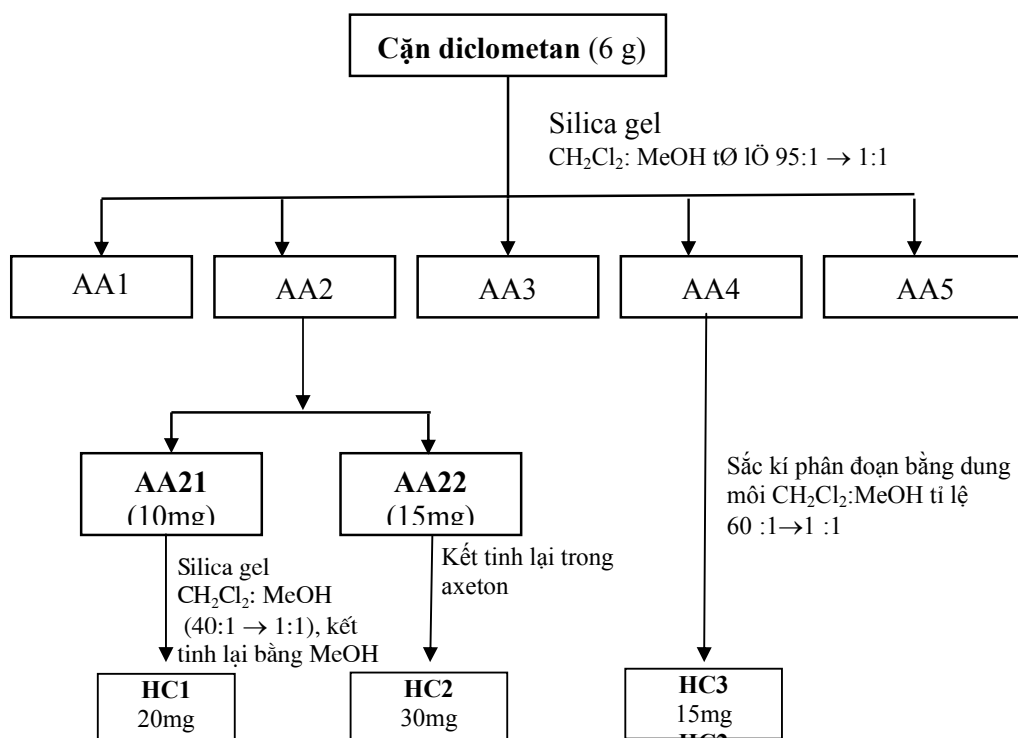
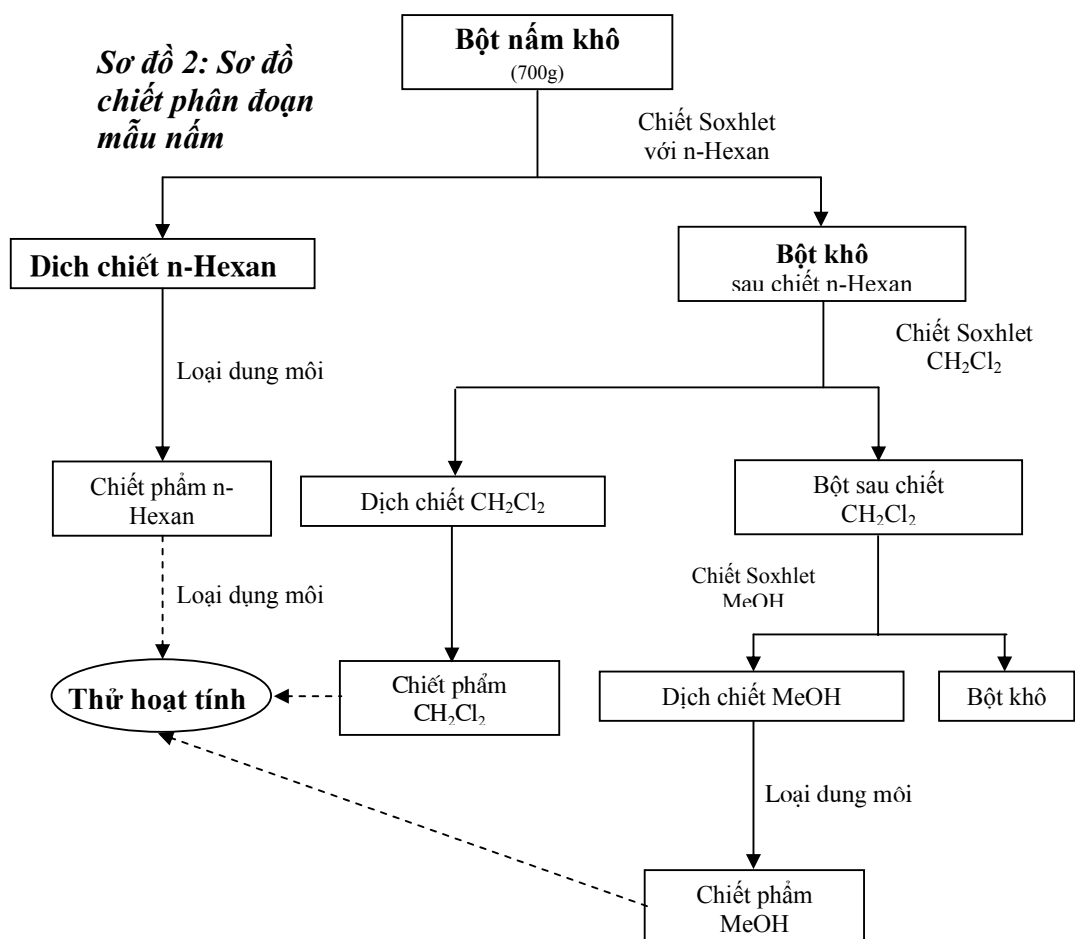
#### 3.2.1. Phương pháp 1

##### 3.2.1.1. Quy trình phân lập chất và xác định cấu trúc

Mẫu nấm hầu thủ Nhật Bản (700gam) được phơi và sấy khô ở 40°C, xay nhỏ và ngâm chiết lần lượt với các dung môi: *n*-hexan, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> và metanol. Các dịch chiết được loại dung môi dưới áp suất giảm thu được 4 gam cặn chiết *n*-hexan, 6 gam cặn chiết diclometan và 43 gam cặn chiết metanol.

Cặn chiết diclometan (6gam), sau khi thử hoạt tính độc tế bào cho phản ứng dương tính, được phân tách bằng sắc kí cột trên silica gel với hệ dung môi CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>: MeOH tỉ lệ 95:1 → 1:1 thu được 5 phân đoạn (AA1-AA5). Phân đoạn AA2 được phân tách tiếp bằng sắc kí cột với hệ dung môi *n*-hexan: EtOAc tỉ lệ 20:1-1:1 thu được hai phân đoạn chính AA21 và AA22. Phân đoạn AA21 được tinh chế lại bằng sắc kí cột nhanh với hệ dung môi CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>: MeOH (40:1 → 1:1) và kết tinh lại bằng metanol thu được hợp chất **1** (20mg). Hợp chất **2** (30mg) thu được từ phân đoạn AA22 bằng kết tinh lại trong axeton. Tiếp tục sắc kí phân đoạn AA4 bằng dung môi CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>:MeOH tỉ lệ 60:1 → 1:1 thu được hợp chất **3** (15mg).

Hợp chất **1** thu được ở dạng tinh thể màu trắng, có đ.n.c 178-180°C. Phổ hồng ngoại cho đỉnh hấp thụ đặc trưng cho dao động hoá trị của nhóm hydroxyl (OH) ở 3400cm<sup>-1</sup> và của liên kết C-O-C ở 1050cm<sup>-1</sup>. Phổ khối bụi electron ESI-MS cho pic ion phân tử tại m/z 427 [M-H]<sup>+</sup> tương ứng với công thức phân tử C<sub>28</sub>H<sub>44</sub>O<sub>3</sub> và hoàn toàn phù hợp với kết quả của phổ NMR. Phổ <sup>13</sup>C-NMR xuất hiện tín hiệu của 28 nguyên tử cacbon đặc trưng cho khung sterol, bao gồm: 4 cacbon bậc bốn, 11 nhóm metin CH, 7 nhóm metylen CH<sub>2</sub> và 6 nhóm metyl CH<sub>3</sub>. Trong đó tín hiệu của hai nguyên tử cacbon bậc bốn liên kết với một cầu nối epidioxy ở δ<sub>C</sub>: 79.4ppm (C-8) và 82.2ppm (C-5) hoàn toàn phù hợp với tín hiệu đã được sắp xếp lại bởi phổ HMQC và HMBC của *Chau Van Minh và cộng sự (Chau Van Minh et al., 2004)*. Phổ <sup>1</sup>H-NMR cho các tín hiệu đặc trưng cho các liên kết đôi với hai duplet ở δ<sub>H</sub>: 6.24ppm (1H, d, J=7.5Hz, H-6); 6.51ppm (1H, d, J=7.5Hz, H-7) và hai duplet duplet ở δ<sub>H</sub>: 5.16ppm (1H, dd, J=7.5 và 14.5Hz, H-22); 5.22ppm (1H, dd, J=7.0 và 15.0Hz, H-23), ngoài ra còn tín hiệu của một multiplet ở δ<sub>H</sub> 3.96ppm (1H, m, H-3) với độ chuyển dịch của nguyên tử cacbon tại δ<sub>C</sub> 66.5ppm (C-3) khẳng định cho sự có mặt của nhóm OH liên kết với cacbon ở vị trí số 3 với cấu hình -3β-ol (*Sheu et al. 2000*). Qua việc phân tích phổ của hợp chất **1** và so sánh với tài liệu, chúng tôi đã nhận dạng được hợp chất **1** là 5,8-Epidioxy-5α, 8α-ergosta-6,22E-dien-3β-ol hay *ergosterol peroxide* đã được phân lập từ một loài nấm mục gỗ *Inonotus radiatus* (Kristi karlos & CS, 1989). Các dữ liệu phổ của hợp chất **1** hoàn toàn trùng hợp với tài liệu tham khảo (bảng III.4.11).



### 3.2.1.2. Kết quả phân lập chất và xác định cấu trúc

#### **5,8-Epidioxy-5 $\alpha$ , 8 $\alpha$ -ergosta-6,22E-dien-3 $\beta$ -ol (1)**

Tinh thể hình kim, màu trắng, đ.n.c 178-180°C,  $[\alpha]_D^{20}$  (CHCl<sub>3</sub>, c.0.8);

IR<sup>KBr</sup>  $\lambda_{\max}$  cm<sup>-1</sup>: 3400 (br, OH), 1050 (C-O-C). ESI-MS (m/z) 427 [M-H]<sup>+</sup> (C<sub>28</sub>H<sub>44</sub>O<sub>3</sub>). <sup>1</sup>H-NMR (500MHz, CDCl<sub>3</sub>): 1.90-1.95 (2H, m, H-1); 1.55-1.58 (2H, m, H-2); 3.96 (1H, m, H-3); 1.83-1.88 (2H, m, H-4); 6.24 (1H, d, J=7.5Hz, H-6); 6.51 (1H, d, J=7.5Hz, H-7); 1.67 (1H, m, H-9); 1.19-1.22 (2H, m, H-11), 1.42 (2H, m, H-12); 1.71 (1H, m, H-14); 1.42-1.48 (2H, m, H-15); 1.47-1.50 (2H, m, H-16); 1.26 (1H, m, H-17); 0.83 (3H, s, H-18); 0.88 (3H, s, H-19); 1.65 (1H, m, H-20); 1.00 (3H, d, J= 6.5Hz, H-21); 5.16 (1H, dd, J=7.5 và 14.5Hz, H-22); 5.22 (1H, dd, J= 7.0 và 15.0Hz, H-23); 2.09-2.11 (2H, m, H-24, H-25); 0.79 (3H, d, J=5.5Hz, H-26); 0.81 (3H, d, J= 5.5Hz, H-27); 0.92 (3H, d, J=6.0Hz, H-28). <sup>13</sup>C-NMR (125MHz, CDCl<sub>3</sub>) xem bảng III.3.11.

Hợp chất **2** phân lập được ở dạng tinh thể màu trắng, đ.n.c 168-169°C. Phổ <sup>13</sup>C-NMR cũng cho tín hiệu của các nguyên tử cacbon đặc trưng cho khung sterol-C<sub>28</sub> tương tự hợp chất **1**, tuy nhiên tín hiệu của hai nguyên tử cacbon bậc bốn trong hợp chất **2** tại  $\delta_C$  139.8ppm (C-5)/119.6 (C-6) và 141.3ppm (C-8)/116.3 (C-7) cho thấy sự có mặt của hai liên kết đôi trong vòng B. Điều này hoàn toàn phù hợp với các tín hiệu của phổ <sup>1</sup>H-NMR với  $\delta_H$ : 5.56ppm (1H, dd, J=3.0 và 5.0Hz, H-6) và 5.39ppm (1H, dd, J=3.0 và 5.0Hz, H-7); cùng với hai duplet duplet tại  $\delta_H$  5.18ppm (1H, dd, J=7.5 và 14.5Hz, H-22); 5.23ppm (1H, dd, J=7.0 và 15.0Hz, H-23); một multiplet ở  $\delta_H$  3.63ppm (1H, m, H-3) với  $\delta_C$  70.5ppm (C-3) đặc trưng cho -3 $\beta$ -ol. Chúng tôi nhận dạng được hợp chất **2** là ergosterol, dữ liệu phổ của nó trùng hợp với tài liệu tham khảo.

#### **Ergosterol (2)**

Tinh thể hình kim, màu trắng, đ.n.c 168-169°C,  $[\alpha]_D^{20}$  -132 (CHCl<sub>3</sub>, c.0.5);

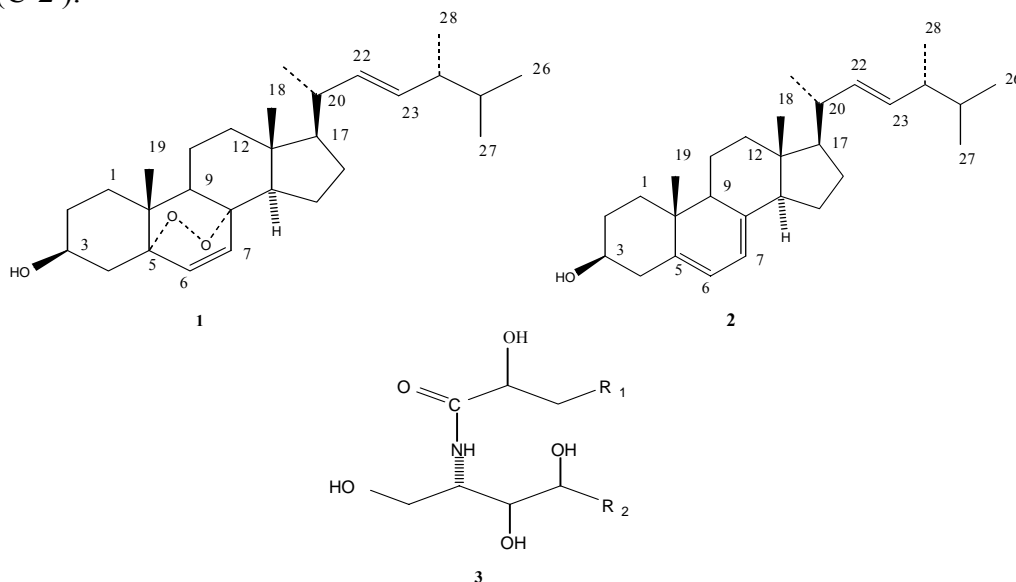
ESI-MS (m/z) 395 [M-H]<sup>+</sup> (C<sub>28</sub>H<sub>44</sub>O). <sup>1</sup>H-NMR (500MHz, CDCl<sub>3</sub>): 3.63 (1H, m, H-3); 5.56 (1H, dd, J=3.0 và 5.0Hz, H-6); 5.39 (1H, dd, J=3.0 và 5.0Hz, H-7); 0.63 (3H, s, H-18); 0.95 (3H, s, H-19); 1.03 (3H, d, J=8.0Hz, H-21); 5.18 (1H, dd, J=7.5 và 14.5Hz, H-22); 5.23 (1H, dd, J=7.0 và 15.0Hz, H-23); 0.78 (3H, d, J=6.0Hz, H-26); 0.79 (3H, d, J=6.0Hz, H-27); 0.92 (3H, d, J=6.0Hz, H-28). <sup>13</sup>C-NMR (125MHz, CDCl<sub>3</sub>). (bảng III.3.11)

Hợp chất **3** có dạng bột màu trắng, các dữ liệu phổ NMR của hợp chất này đặc trưng cho kiểu cấu trúc của hợp chất ceramide. Phổ <sup>1</sup>H-NMR cho tín hiệu của một duplet tại  $\delta_H$  7.49 (1H, d, J=9.0Hz) đặc trưng cho proton NH, tín hiệu của 4 proton carbinol tại  $\delta_H$  3.76 (1H, dd, J=4.5 và 11.5Hz, H-1a), 3.81 (1H, dd, J=4.5 và 11.5Hz, H-1b); 3.55 (1H, dd, J=2.5 và 3.5Hz, H-3); 3.54 (1H, m, H-4); và 4.05 (1H, dd, J=4.0 và 8.5Hz, H-2). Ngoài ra còn các tín hiệu của một singlet từ ở  $\delta_H$  1.29 và một triplet của hai nhóm CH<sub>3</sub> đầu mạch tại  $\delta_H$  0.88 (6H, t, J=6.5Hz) điển hình cho kiểu hợp chất ceramide với một nhánh là hidrocarbon no mạch dài và một nhánh là axit béo 2-hydroxy. Phổ <sup>13</sup>C-NMR cho tín hiệu của nhóm carbonyl tại  $\delta_C$  176.0ppm, tín hiệu của nguyên tử cacbon liên kết với nitơ ở  $\delta_C$  51.9ppm cùng với tín hiệu của 4 cacbon carbinol tại  $\delta_C$  61.4ppm (C-1); 75.8ppm (C-3); 72.6ppm (C-4) và 72.2ppm (C-2). Dữ liệu phổ của hợp chất này đã được so sánh với alomacrorrhiza A cho thấy hoàn toàn phù hợp với cấu trúc kiểu hợp chất ceramide.

Tuy nhiên, để nhận dạng chính xác cấu trúc của hợp chất này cần phải có thêm một vài nghiên cứu khác nữa. Vì hợp chất này không thể hiện hoạt tính độc tế bào do vậy chúng tôi không tiếp tục đi sâu nghiên cứu về cấu trúc và chỉ nhận dạng hợp chất **3** là một ceramide.

### Ceramide (**3**)

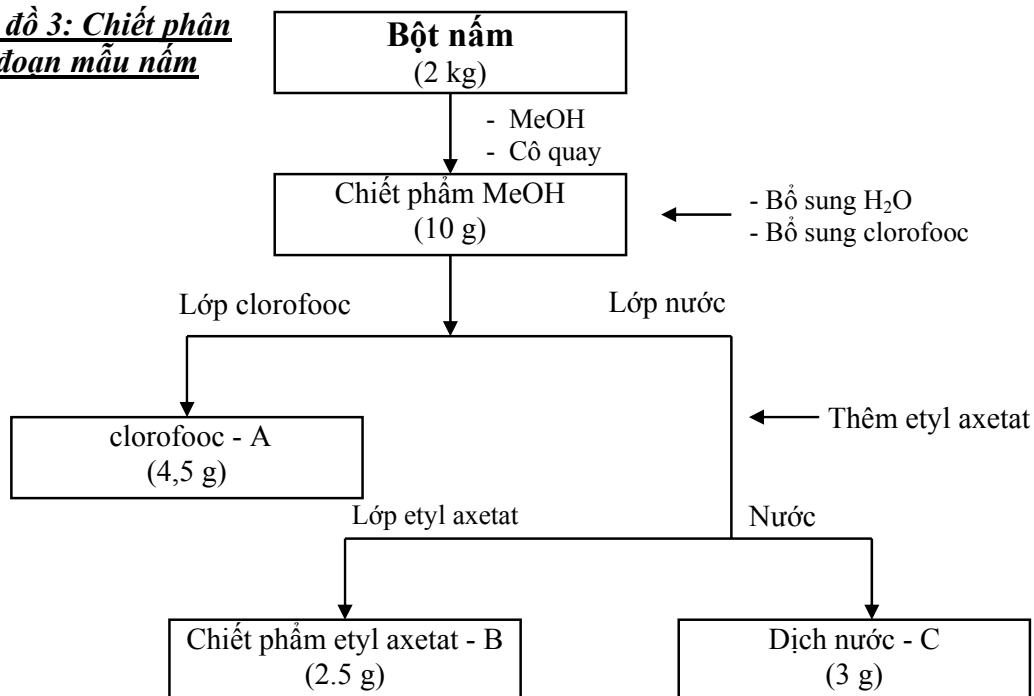
Chất bột màu trắng.  $^1\text{H-NMR}$  (500MHz,  $\text{CDCl}_3$ ): 3.76 (1H, dd,  $J=4.5$  và 11.5Hz, H-1a), 3.81 (1H, dd,  $J=4.5$  và 11.5Hz, H-1b); 4.11 (1H, dd,  $J=4.5$  và 8.5Hz, H-2); 3.55 (1H, dd,  $J=2.5$  và 3.5Hz, H-3); 3.54 (1H, m, H-4); 1.60 (2H, m, H-5); 4.05 (1H, dd,  $J=4.0$  và 8.5Hz, H-2'); 1.77 (1H, m, H-3a); 1.67 (1H, m, H-3b); 7.49 (1H, d,  $J=9.0\text{Hz}$ , NH); 0,88 (6H, t,  $J=6.5\text{Hz}$ ,  $\text{CH}_3$ ).  $^{13}\text{C-NMR}$  (125MHz,  $\text{CDCl}_3$ ): 61.4ppm (C-1); 51.9 (C-2); 75.8ppm (C-3); 72.6ppm (C-4); 176.0 (C=O, C-1') và 72.2 (C-2').



### 3.2.2. Phương pháp 2

#### 3.2.2.1. Quy trình phân lập và xác định cấu trúc

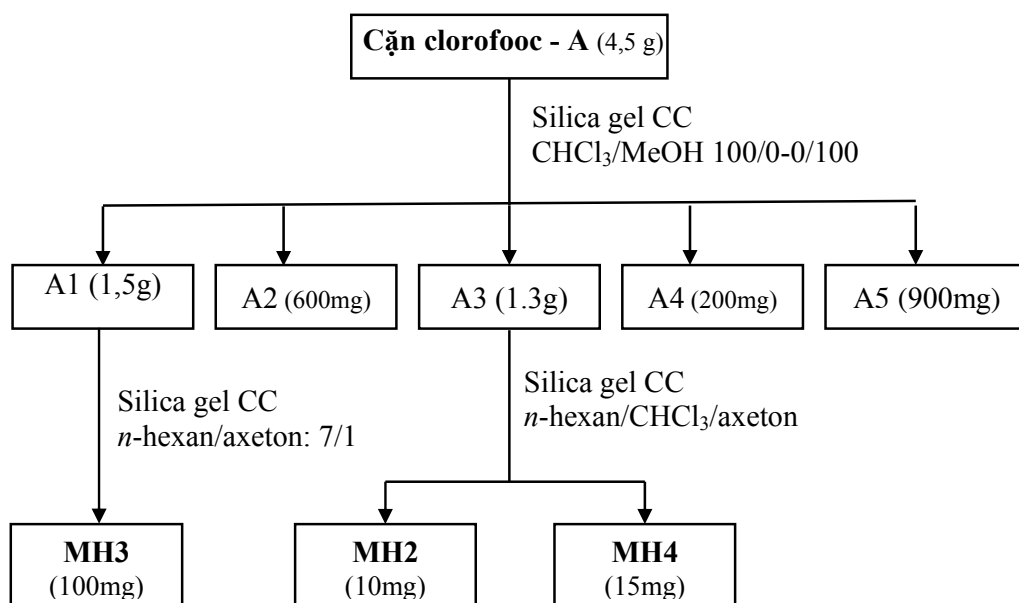
##### Sơ đồ 3: Chiết phân đoạn mẫu nấm



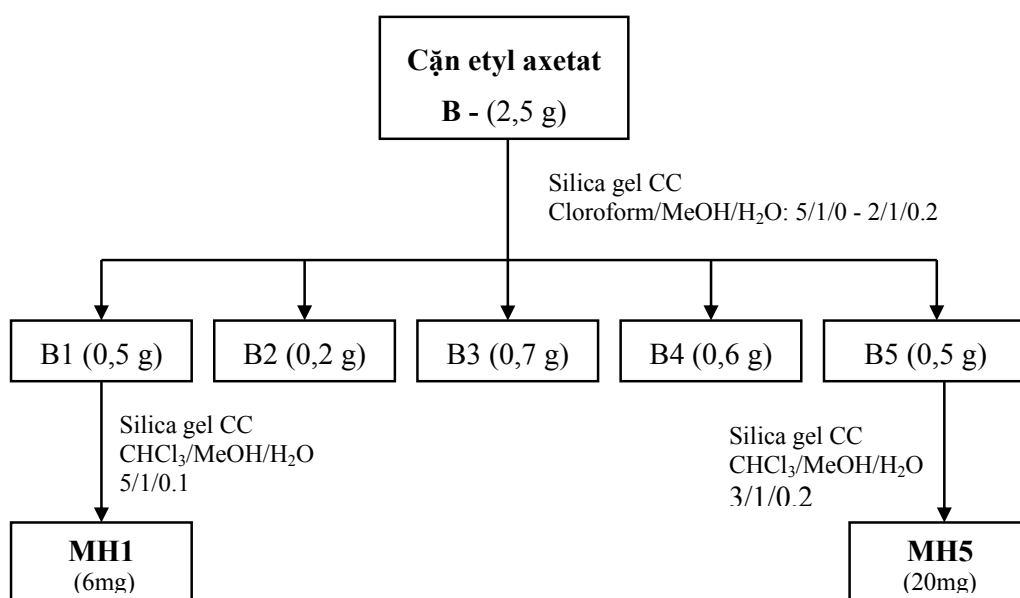
Phân lập các chất trong các phân đoạn trên bằng sắc ký cột lặp lại trên silica gel pha thường và pha đảo với các hệ dung môi thích hợp sơ đồ.

Cặn chiết chlorofooc được tiến hành phân lập bằng sắc ký cột lặp lại trên silica gel pha thường và pha đảo với các hệ dung môi thích hợp (sơ đồ 2) thu được các hợp chất **MH2** (10 mg), **MH3** (100 mg), và **MH4** (15 mg).

Cặn chiết etyl axetat cũng được tiến hành phân lập bằng sắc ký cột lặp lại trên silica gel pha thường và pha đảo với các hệ dung môi thích hợp (sơ đồ 4) thu được các hợp chất **MH1** (6 mg) và **MH5** (20 mg).



**Sơ đồ 4: Sơ đồ phân lập các hợp chất MH2 - MH4 từ nấm *Hericium erinaceum***



**Sơ đồ 5: Sơ đồ phân lập các hợp chất MH1 và MH5 từ nấm *Hericium erinaceum***

### 3.2.2.2. Kết quả phân lập chất và xác định cấu trúc

#### **Hợp chất MH1 - Cerebroside B.**

Chất bột màu trắng, điểm chảy 180-190°C, phổ khối lượng ESI-MS:  $m/z$  726,6  $[M-H]^+$ ,  $m/z$  750,5  $[M+Na]^+$ ,  $m/z$  728,3  $[M+H]^+$ ,  $m/z$  710,5  $[M-H_2O+H]^+$ ,  $m/z$  548,3  $[M\text{-glucose}+H]^+$  ( $C_{41}H_{77}NO_9$ ,  $M = 727$ ).

$^1H$ -NMR (500 MHz,  $CD_3OD$ ) 3,73 (1H,  $H_{a-1}$ ), 4,13 (1H,  $H_{b-1}$ ), 4,01 (1H, H-2), 4,16 (1H, H-3), 5,50 (1H, dd,  $J = 7,0, 15,5$  Hz, H-4), 5,76 (1H, dt,  $J = 15,5, 6,0$  Hz, H-5), 2,07 (2H, H-6), 2,10 (2H, H-7), 5,17 (1H, t,  $J = 7,0$  Hz, H-8), 2,00 (1H, H-10), 1,43 (1H, H-11), 1,31 (2H, H-16), 1,33 (2H, H-17), 0,92 (3H, t,  $J = 7,0$  Hz, H-18) 1,62 (3H, s, H-19), 4,01 (1H, H-2'), 1,57 (1H,  $H_{a-3'}$ ), 1,74 (1H,  $H_{b-3'}$ ), 1,44 (2H, H-4'), 1,31 (2H, H-14'), 1,33 (2H, H-15'), 0,92 (3H, t,  $J = 7,0$  Hz, H-16'), 4,29 (1H, d,  $J = 7,5$  Hz, H-1''), 3,22 (1H, H-2''), 3,37 (1H, H-3''), 3,31 (1H, H-4''), 3,30 (1H, H-5''), 3,69 (1H,  $H_{a-6''}$ ) và 3,89 (1H, dd,  $J = 2,0, 11,5$  Hz,  $H_{b-6''}$ ) ppm.

$^{13}C$ -NMR (125 MHz,  $CD_3OD$ ) 70,13 (t, C-1), 55,01 (d, C-2), 73,29 (d, C-3), 131,51 (d, C-4), 135,04 (d, C-5), 34,02 (t, C-6), 29,09 (t, C-7), 125,22 (d, C-8), 137,18 (s, C-9), 41,18 (t, C-10), 29,52 (t, C-11), 30,79-31,24 (t, C-12 đến 15), 33,49 (t, C-16), 24,15 (t, C-17), 14,86 (q, C-18), 16,53 (q, C-19), 177,60 (s, C-1'), 73,49 (d, C-2'), 36,28 (t, C-3'), 26,57 (t, C-4'), 30,79-31,24 (t, C-5' đến 13'), 33,49 (t, C-14'), 24, 15 (t, C-15'), 14,86 (q, C-16'), 105,13 (d, C-1''), 75,39 (d, C-2''), 78,31 (d, C-3''), 71,97 (d, C-4''), 78,38 (d, C-5'') và 63,08 (t, C-6'') ppm.

#### **Hợp chất MH2 - Hericenone D**

Chất kết tinh màu trắng, điểm chảy 41-43°C, phổ khối lượng ESI-MS:  $m/z$  599,2  $[M+H]^+$ ,  $m/z$  597,4  $[M-H]^-$  ( $C_{37}H_{58}O_6$ ,  $M = 598$ ).

$^1H$ -NMR (500 MHz,  $CDCl_3$ )  $\delta_H$ : 6,53 (1H, s, H-6), 5,32 (2H, s, H-7), 10,11 (1H, s, H-8), 3,91 (3H, s, H-9), 3,40 (2H, d,  $J = 7,5$  Hz, H-1'), 5,32 (1H, d,  $J = 7,5$  Hz, H-2'), 3,00 (2H, s, H-4'), 6,09 (1H, t,  $J = 1,0, 1,5$  Hz, H-6'), 1,84 (3H, d,  $J = 1,5$  Hz, H-8'), 2,12 (3H, d,  $J = 1,0$  Hz, H-9'), 1,78 (3H, d,  $J = 0,5$  Hz, H-10'), 2,33 (2H, d,  $J = 7,5$  Hz, H-2''), 1,62 (2H, m, H-3''), 1,25 (26H, m, H-4''-17''), 0,88 (3H, m, H-18'') và 12,37 (1H, s, OH) ppm.

$^{13}C$ -NMR (125 MHz,  $CDCl_3$ )  $\delta_C$ : 138,70 (s, C-1), 112,91 (s, C-2), 162,94 (s, C-3), 117,33 (s, C-4), 163,49 (s, C-5), 105,55 (d, C-6), 62,90 (t, C-7), 193,10 (d, C-8), 55,93 (q, C-9), 21,62 (t, C-1'), 126,27 (d, C-2'), 130,35 (s, C-3'), 55,55 (t, C-4'), 199,54 (s, C-5'), 122,85 (d, C-6'), 155,42 (s, C-7'), 27,66 (q, C-8'), 20,67 (q, C-9'), 16,41 (q, C-10'), 173,20 (s, C-1''), 34,25 (t, C-2''), 24,89 (t, C-3''), 29,13-31,94 (t, C-4''-17'') và 14,12 (q, C-18'') ppm.

#### **Hợp chất MH3 - Ergosterol**

Chất tinh thể hình kim màu trắng, điểm chảy 168°C, phổ khối lượng ESI-MS:  $m/z$  397,3  $[M+H]^+$  ( $C_{28}H_{44}O$ ,  $M = 396$ )

$^1H$ -NMR (500 MHz,  $CDCl_3$ )  $\delta_H$ : 1,25 (1H, m, H-1a), 1,75 (1H, m, H-1b), 1,50 (1H, m,  $H_{a-2}$ ), 1,78 (1H, m,  $H_{b-2}$ ), 3,63 (1H, m, H-3), 2,28 (2H, t,  $J = 13,5$  Hz, H-4), 5,56 (1H, dd,  $J = 2,0, 5,5$  Hz, H-6), 5,38 (1H, m, H-7), 1,97 (1H, m, H-9), 1,65 (1H, m, H-11), 1,34 (1H, m,  $H_{a-12}$ ), 1,90 (1H, m,  $H_{b-12}$ ), 1,92 (1H, m, H-14), 1,67 (1H, m, H-15), 1,28 (1H, m,  $H_{a-16}$ ), 1,74 (1H, m,  $H_{b-16}$ ), 1,25 (1H, m, H-17), 0,63 (3H, s, H-18), 0,95 (3H, s, H-19), 2,05 (1H, m, H-20), 1,03 (3H, d,  $J = 6,5$  Hz, H-21), 5,17 (1H, dd,  $J = 8,5, 15,5$  Hz, H-22), 5,22 (1H, dd,  $J = 8,5, 15,5$  Hz, H-23),

1,76 (1H, m, H-24), 1,38 (1H, m, H-25), 0,84 (3H, d,  $J = 6,5$  Hz, H-26), 0,82 (3H, d,  $J = 6,5$  Hz, H-27) và 0,91 (3H, d,  $J = 6,5$  Hz, H-28) ppm.

$^{13}\text{C}$ -NMR (125 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta_{\text{C}}$ : 38,39 (t, C-1), 32,02 (t, C-2), 70,47 (d, C-3), 40,83 (t, C-4), 141,36 (s, C-5), 119,60 (d, C-6), 116,30 (d, C-7), 139,80 (s, C-8), 46,27 (d, C-9), 37,04 (s, C-10), 21,13 (t, C-11), 39,11 (t, C-12), 42,41 (s, C-13), 54,57 (d, C-14), 23,01 (t, C-15), 28,29 (t, C-16), 55,76 (d, C-17), 12,06 (q, C-18), 16,30 (q, C-19), 40,82 (d, C-20), 21,11 (q, C-21), 135,60 (d, C-22), 131,99 (d, C-23), 42,85 (d, C-24), 33,10 (d, C-25), 19,66 (q, C-26), 19,96 (q, C-27) và 17,62 (q, C-28) ppm.

#### **Hợp chất MH4 - Ergosterol peroxide**

Chất tinh thể hình kim màu trắng, điểm chảy 181-183°C, phổ khối lượng ESI-MS:  $m/z$  429,3  $[\text{M} + \text{H}]^+$  ( $\text{C}_{28}\text{H}_{44}\text{O}_3$ ,  $\text{M} = 426$ ).

$^1\text{H}$ -NMR (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 1,56 (1H, m,  $\text{H}_a$ -1), 1,85 (1H, m,  $\text{H}_b$ -1), 1,72 (1H, m,  $\text{H}_a$ -2), 1,96 (1H, m,  $\text{H}_b$ -2), 3,97 (1H, m, H-3), 1,27 (1H, m,  $\text{H}_a$ -4), 1,97 (1H, m,  $\text{H}_b$ -4), 6,24 (1H, d,  $J = 8,5$  Hz, H-6), 6,50 (1H, d,  $J = 8,5$  Hz, H-7), 1,51 (1H, m, H-9), 1,41 (1H, m,  $\text{H}_a$ -11), 1,62 (1H, m,  $\text{H}_b$ -11), 1,55 (1H, m,  $\text{H}_a$ -12), 2,11 (1H, m,  $\text{H}_b$ -12), 1,58 (1H, m, H-14), 1,25 (1H, m,  $\text{H}_a$ -15), 1,53 (1H, m,  $\text{H}_b$ -15), 1,37 (1H, m,  $\text{H}_a$ -16), 1,78 (1H, m,  $\text{H}_b$ -16), 1,24 (1H, m, H-17), 0,86 (3H, s, H-18), 0,88 (3H, s, H-19), 2,03 (1H, m, H-20), 1,01 (3H, d,  $J = 7,0$  Hz, H-21), 5,14 (1H, dd,  $J = 8,5, 15,5$  Hz, H-22), 5,22 (1H, dd,  $J = 8,5, 15,5$  Hz, H-23), 1,87 (1H, m, H-24), 1,50 (1H, m, H-25), 0,88 (3H, d,  $J = 6,6$  Hz, H-26), 0,83 (3H, d,  $J = 6,5$  Hz, H-27) và 0,91 (3H, d,  $J = 6,5$  Hz, H-28) ppm

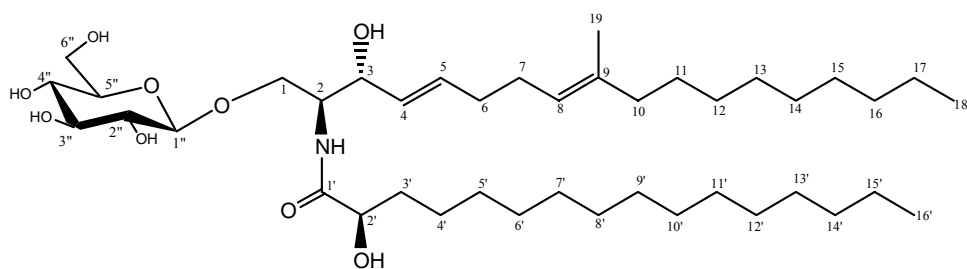
$^{13}\text{C}$ -NMR (125 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ): 30,09 (t, C-1), 34,71 (t, C-2), 66,49 (d, C-3), 39,37 (t, C-4), 82,17 (s, C-5), 135,22 (d, C-6), 130,75 (d, C-7), 79,44 (s, C-8), 51,12 (d, C-9), 36,99 (s, C-10), 20,64 (t, C-11), 39,91 (t, C-12), 44,58 (s, C-13), 51,70 (d, C-14), 23,42 (t, C-15), 28,65 (t, C-16), 56,23 (d, C-17), 12,88 (q, C-18), 18,18 (q, C-19), 39,73 (d, C-20), 20,89 (q, C-21), 135,44 (d, C-22), 132,33 (d, C-23), 42,79 (d, C-24), 33,08 (d, C-25), 19,65 (q, C-26), 19,96 (q, C-27), và 17,57 (q, C-28) ppm

#### **Hợp chất MH5 - $\delta$ -Adenosine**

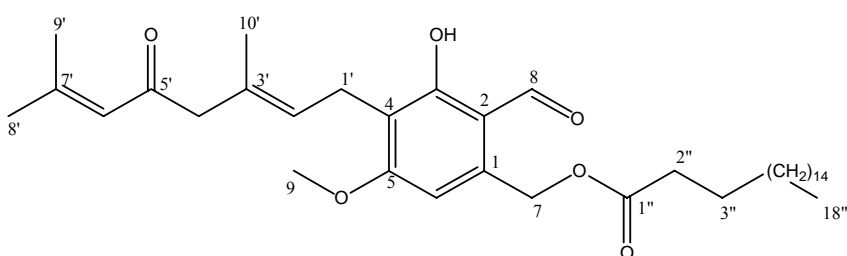
Chất tinh thể hình kim màu trắng, điểm chảy 234-235°C, phổ khối lượng ESI-MS:  $m/z$  267,8  $[\text{M} + \text{H}]^+$ , 289,8  $[\text{M} + \text{Na}]^+$  ( $\text{C}_{10}\text{H}_{13}\text{N}_5\text{O}_4$ ,  $\text{M} = 267$ ).

$^1\text{H}$ -NMR (500 MHz,  $\text{DMSO}-d_6$ )  $\delta_{\text{H}}$ : 8,14 (1H, s, H-2), 8,34 (1H, s, H-8), 5,88 (1H, d,  $J = 6,5$  Hz, H-1'), 4,61 (1H, dd,  $J = 4,0, 10,5$  Hz, H-2'), 4,15 (1H, br s, H-3') 3,97 (1H, dd,  $J = 3,5, 6,5$  Hz, H-4'), 3,57 (1H, m, H-5'a), 3,68 (1H, m, H-5'b), 7,32 (2H, s,  $\text{NH}_2$ ), 5,42 (1H, OH-2'), 5,17 (1H, d,  $J = 3,0$  Hz, OH-3') và 5,43 (1H, OH-5') ppm

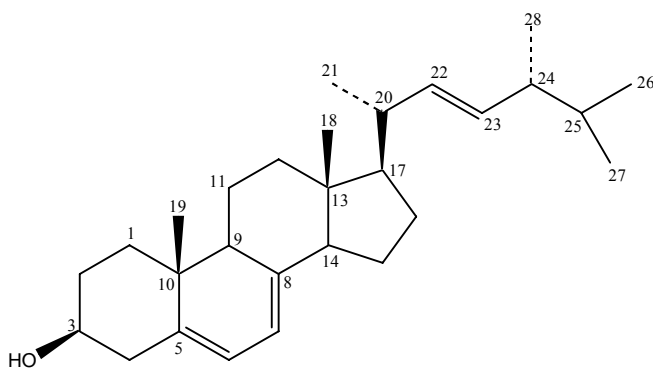
$^{13}\text{C}$ -NMR (125 MHz,  $\text{DMSO}-d_6$ )  $\delta_{\text{C}}$ : 152,41 (d, C-2), 149,08 (s, C-4), 119,37 (s, C-5), 156,17 (s, C-6), 139,95 (d, C-8), 87,95 (d, C-1'), 73,47 (d, C-2'), 70,68 (d, C-3'), 85,92 (d, C-4'), 61,69 (t, C-5') ppm.



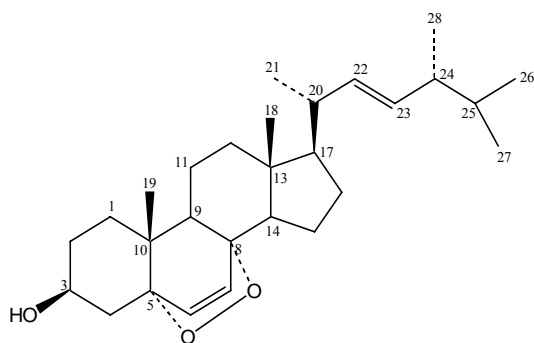
Hình. Cấu trúc hóa học của MH-1



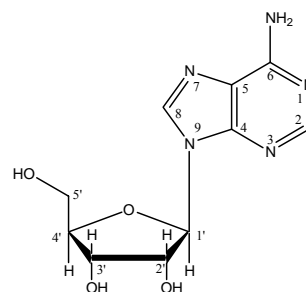
Hình. Cấu trúc hóa học của MH-2



Hình. Cấu trúc hóa học của MH-3



Hình. Cấu trúc hóa học của MH-4



Hình. Cấu trúc hóa học của MH-5

### 3.3. Kết quả thử nghiệm hoạt tính sinh học in vitro của các chất phân lập

#### 3.3.1. Kết quả thử hoạt tính gây độc tế bào

**Bảng 10: Hoạt tính các chất phân lập từ chủng MA10**

STT	Ký hiệu mẫu	Dòng tế bào Phần trăm sống sót (%)		Dòng tế bào Giá trị IC <sub>50</sub> (µg/ml)	
		Hep-G2	RD	Hep-G2	RD
1	DMSO	100 ± 0,0	100 ± 0,0		
2	Chứng (+)	<b>2,5 ± 1,07</b>	<b>2,0 ± 0,09</b>	<b>0,2</b>	<b>0,4</b>
3	MA10A	68,8±0,9	83,8±0,2	>5	>5
4	MA10B	91,8±0,5	86,4±1,5	>5	>5
5	MA10C	74,1±0,75	<b>18,3±1,3</b>	>5	<b>4,6</b>
6	MA10D	96,36±1,0	99,0±0,9	>5	>5

Kết quả cho thấy, hợp chất MA10C biểu hiện hoạt tính độc với dòng tế bào RD, giá trị IC<sub>50</sub> = **4,6 µg/ml**.

**Bảng 11: Hoạt tính các chất phân lập từ chủng Hàu thủ**

(Kết quả thử hoạt tính độc tế bào của các chất phân lập được từ dịch chiết diclometan của chủng Hàu thủ)

ST T	Ký hiệu mẫu	Dòng tế bào Phần trăm sống sót (%)			Dòng tế bào Giá trị IC <sub>50</sub> (µg/ml)		
		Hep-G2	FI	RD	Hep-G2	FI	RD
1	DMSO	100 ± 0,0	100 ± 0,0	100 ± 0,0			
2	Chứng (+)	2,5 ± 1,07	2,0 ± 0,09	2,3 ± 0,60	0,2	0,4	0,25
3	<b>HC1</b>	<b>8,98±1,5</b>	<b>5,25±0,07</b>	<b>6,2±0,5</b>	<b>6,25</b>	<b>7,5</b>	<b>6,8</b>
4	HC2	79,49±0,7	82,5±1,9	75,6±0,06	>10	>10	>10
5	HC3	76,8±3,4	72,6±2,1	80,6±2,5	>10	>10	>10
6	MH1	100,0±0,5	100,2±2,7	95,2±1,9	>10	>10	>10
7	MH2	84,0±1,7	83,3±2,5	81,9±1,0	>10	>10	>10
8	MH3	84,1±2,5	89,5±0,0	80,9±2,4	>10	>10	>10
9	<b>MH4</b>	<b>28,3±2,5</b>	<b>13,8±0,99</b>	<b>50,0±0,1</b>	<b>7,2</b>	<b>6,5</b>	<b>10,0</b>
10	MH5	94,0±1,9	86,2±0,4	100,0±0,0	>10	>10	>10

Kết quả cho thấy, **Chất1** và **MH4** biểu hiện hoạt tính độc tế bào cả 3 dòng tế bào thử. Ngoài ra, **Chất1** này còn được công bố là có độc tính với dòng tế bào ung thư gan HTC và ZHC, và ung thư màng tử cung 3T3, dòng tế bào ung thư bàng quang Wallker 256 và dòng ung thư tuyến vú người MCF-7 trong thử nghiệm *invitro* (Kristi karlos & CS,1989).

#### 3.3.2. Kết quả thử hoạt tính kháng vi sinh vật kiểm định

**Bảng 12: Hoạt tính kháng khuẩn, kháng nấm của các hợp chất**

Kí hiệu mẫu	Nồng độ ức chế tối thiểu MIC ( $\mu\text{g/ml}$ )							
	<i>E. coli</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>B. subtilis</i>	<i>S. aureus</i>	<i>A. niger</i>	<i>F. oxysporum</i>	<i>C. albicans</i>	<i>S. cerevisiae</i>
<i>MA10A</i>	(-)	(-)	(-)	<b>50</b>	(-)	(-)	(-)	(-)
<i>MA10B</i>	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
<i>MA10C</i>	(-)	(-)	(-)	<b>50</b>	(-)	(-)	(-)	(-)
<i>MA10D</i>	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
<i>HC1</i>	<b>100</b>	(-)	<b>100</b>	<b>100</b>	<b>100</b>	<b>100</b>	<b>100</b>	<b>100</b>
<i>HC2</i>	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
<i>HC3</i>	(-)	(-)	<b>100</b>	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
<i>MH1</i>	(-)	(-)	(-)	(-)	<b>50</b>	(-)	(-)	(-)
<i>MH2</i>	(-)	(-)	(-)	(-)	<b>50</b>	(-)	(-)	(-)
<i>MH3</i>	(-)	(-)	(-)	(-)	<b>100</b>	(-)	(-)	(-)
<i>MH4</i>	(-)	(-)	<b>100</b>	(-)	<b>50</b>	(-)	<b>100</b>	(-)
<i>MH5</i>	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)

Kết quả về hoạt tính kháng nấm kháng khuẩn cũng cho thấy **HC1** và **MH4** biểu hiện hoạt tính kháng vi sinh vật kiểm định khá tốt. **HC1** biểu hiện hoạt tính mạnh nhất, có khả năng kháng 7/8 vi sinh vật kiểm định. Hoạt tính kháng nấm kháng khuẩn từ chất ergosterol peroxide (**HC1**) này lần đầu tiên được công bố.

### 3.3.3. Kết quả thử hoạt tính chống ôxi hoá

**Bảng 13: Kết quả thử hoạt tính chống ôxi hoá**

Stt	Kí hiệu mẫu	SC%	Kết quả
1	<b>Chứng (+)</b>	<b>68,16<math>\pm</math>0,2</b>	<b>Dương tính</b>
2	<b>Chứng (-)</b>	0,0 $\pm$ 0,0	Âm tính
3	<i>MA10A</i>	4,27 $\pm$ 0,7	Âm tính
4	<i>MA10B</i>	2,18 $\pm$ 0,1	Âm tính
5	<i>MA10C</i>	0,69 $\pm$ 0,3	Âm tính
6	<i>MA10D</i>	2,9 $\pm$ 0,09	Âm tính
7	<i>HC1</i>	2,5 $\pm$ 0,05	Âm tính
8	<i>HC2</i>	3,67 $\pm$ 0,2	Âm tính
9	<i>HC3</i>	1,25 $\pm$ 0,06	Âm tính
10	<i>MH1</i>	0,95 $\pm$ 0,07	Âm tính
11	<i>MH2</i>	0,86 $\pm$ 0,1	Âm tính
12	<i>MH3</i>	1,18 $\pm$ 0,5	Âm tính
13	<i>MH4</i>	17,66 $\pm$ 0,3	Âm tính
14	<i>MH5</i>	0,73 $\pm$ 0,0	Âm tính

Kết quả về hoạt tính chống ôxi hoá cho thấy tất cả các mẫu thử đều không biểu hiện hoạt tính.

## IV. Kết quả phân loại một số chủng nấm lớn có hoạt tính cao

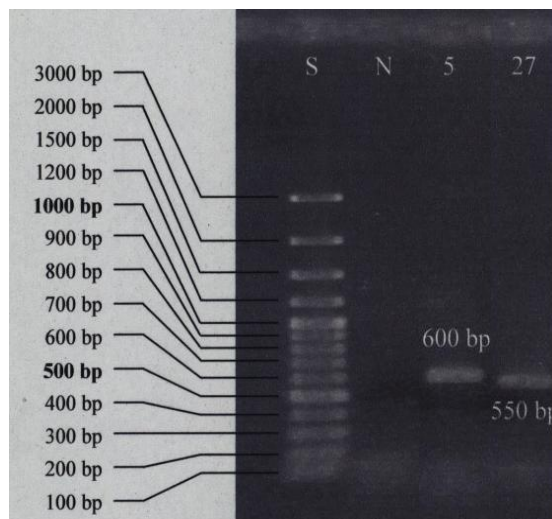
#### 4.1. Xác định trình tự vùng ITS-rDNA của chủng nấm phân lập MA5 và MA27

Ly trích DNA:

Nấm được nuôi trên môi trường PGA, phần khối sợi nấm được nghiền với nitor lỏng và ly trích AND với Puregene DNA Purification Kit (Gentra, USA).

Khuyếch đại vùng ITS1-5,8S-ITS2 của chủng MA5, MA27:

- Phản ứng PCR được thực hiện với các primer dùng để khuyếch đại vùng ITS1-5,8S-ITS2 của chủng MA27 là ITS1 (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3') và ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') (White et al., 1990) [White T. J., Bruns T., Lee S. DNA Taylor J., 1990. Amplication DNA direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for Phylogenetics. *Genetics DNA Evolution* (part 3), pp. 315-320.]. Hỗn hợp phản ứng cho PCR bao gồm: 2,5µl đệm Taq-polymerase 10x; 1,0µl mỗi primer ITS1 và ITS4; 5,0µl dNTP-mix; 7,0µl MgCl<sub>2</sub> 25mM; 0,2µl Taq-polymerase và 100ng DNA mẫu. Chu trình nhiệt cho phản ứng là: biến tính ban đầu ở 94°C trong 3 phút, ủ 65 °C/1 phút, giai đoạn kéo dài ở 72 °C/ 1 phút. Tiếp theo là 35 chu kỳ với giai đoạn biến tính 94 °C/30 giây, ủ 65 °C/ 30 giây và giai đoạn kéo dài 72 °C/ 1 phút và giai đoạn kéo dài cuối cùng ở 72 °C/5 phút. Sản phẩm PCR được kiểm tra bằng điện di trên gel agarose 1% trong đệm TBE 0,5x ở 55V, 500mA trong 2 giờ, sau đó nhuộm ethidium bromide, quan sát dưới đèn UV.



S- maker; N- Đối chứng  
5- ITS-rDNA chủng MA5; 27- chủng MA27

#### Điện di sản phẩm PCR vùng ITS-rDNA của chủng MA25 và MA27

Kết quả điện di sản phẩm PCR cho thấy vùng ITS-rDNA của chủng MA5 có kích thước là 600bp và MA27 có kích thước là 550bp.

- Sản phẩm PCR được biến nạp vào *E.coli* nhờ sử dụng Acceptor<sup>TM</sup> Vector kit (pSTBlue-1 vector, Novagen, USA).

Giải trình tự DNA và phân tích số liệu:

Thành phần phản ứng gồm: 10µl DNA khuôn, 2µl Cyanine-labelled primer, 3µl “A” mix, “C” mix, “G” mix, “T” mix, 1µl T7 DNA polymerase.

Quá trình giải trình tự chuỗi được thực hiện với máy đọc DNA ALFred (Amersham, USA) và phân tích số liệu bằng chương trình ALFexpress<sup>TM</sup>.

Từ các số liệu phân tích thu được, so sánh với cơ sở dữ liệu của NCBI và đặc điểm hình thái của chủng phân lập, chúng tôi kết luận chủng phân lập MA5 có thể là *Tricholoma* sp. và MA27 là *Cerrena unicolor*.

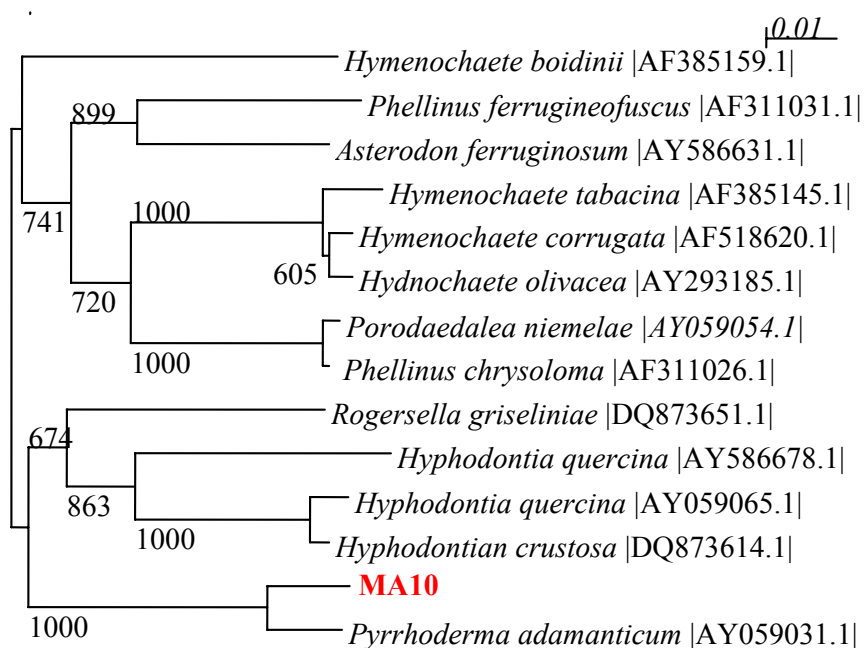
#### 4.2. Kết quả phân loại chủng MA10

##### Trình tự rADN đoạn D1D2 của chủng MA10:

TAACAAGGATTCCCCTAGTAAGTGCAGTGAAGCGGGAAAAGCTC  
AAATTTACAGGGATTCCCCTAGTACTGCGAAGCGGGAAAAGCTCAA  
ATTTAAAATCTCNGCAGCTTTGCTGTCCGAGTTGTAATCTGGAGAA  
GTGTTTTCCGTGTTGGACCGTGTACAAGTCTCTTGAATAGAGCGTC  
ATAGAGGGTGAGAATCCCGTCCATGACACGGACTACCAATACTTTG  
TGATACACTTTCTAAGAGTCGAGTTGTTTGGGAATGCAGCTCAAAA  
TGGGTGGTAAATTCCATCTAAAGCTAAATATTGGCGAGAGACCGAT  
AGCGAACAAGTACCGTGAGGGAAAGATGAAAAGCACTTTGGAAAG  
AGAGTTAAACAGTACGTGAAATTGTTGAAAGGGAAACGCTTGAAG  
TCAGTCGCGTCTTACTAGACTCAGCTTTGCTTCGGCTTAGTGTATTT  
CTAGTAGGACGGGTCAACATCAATTTTGGTCGGTGGAAAAAGGCTT  
GAGGAATGTGGCGTATCTTCGGGTACGTGTTATAGACTCTTGTGTGA  
TACACTGGCTGGGATTGAGGTCTGCAGCACGCCTTTATGGCCAGGG  
TTCGCCCATGTAACGTGCTTAGGATGTTGGCATAATGGCTTTAAGC  
GACCCGTCTTGGAAACACGGACCA.

Trình tự rADN đoạn D1D2 của chủng MA10 có độ tương đồng lớn nhất (đạt 87,5%) - 585/600) đối với loài *Pyrrhoderma adamanticum*.

##### Cây phân loại của chủng MA10 và của loài của họ hàng gần:



#### 4.3. Kết quả phân loại chủng HT

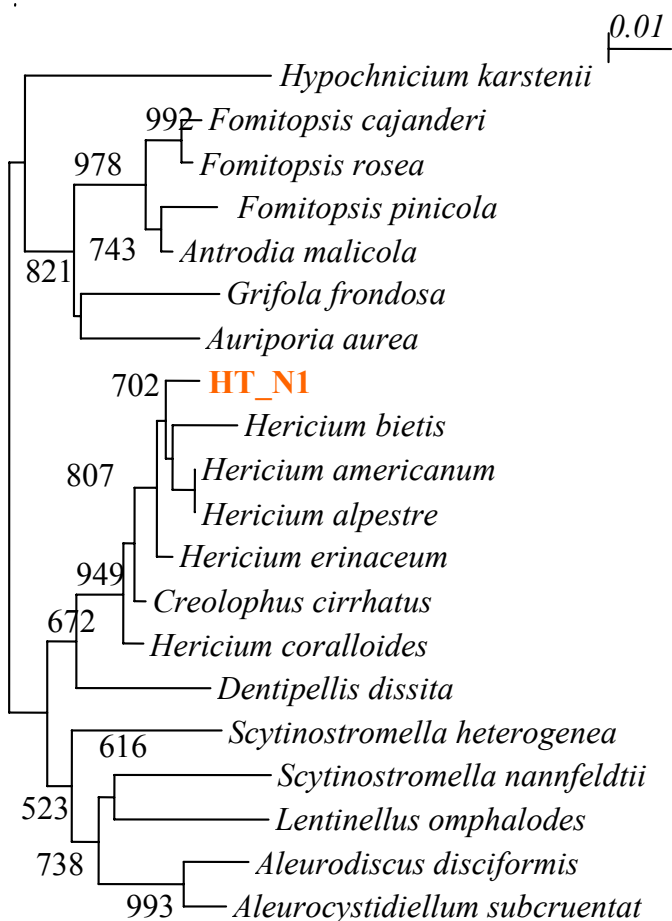
##### Kết quả phân loại:

Trình tự đoạn NL4 của chủng nấm: HT\_N1

AATAAGCGGAGGAAAAGAACTAACAAGGATTCCCCTAGTAACTGCGA  
GGAAGCGGGAAAAGCTCATATTTAAAATCTTCCGGTCTTTGGCCGTCCG  
AGTTGTAGTCTGGAGAAGTGCTTTCCGCGCTGGACCGTGTACAAGTCTC  
CTGGAATGGAGCGTCATAGAGGGTGAGAATCCCGTCTTTGACACGGACT  
ACCAAGTGCTCTGTGATGCGCTCTCAAAGAGTCGAGTTGTTTGGGAATGC  
AGCTCAAAATGGGTGGTGAATTCCATCTAAAGCTAAATATTGGCGAGAG  
ACCGATAGCGAACAAGTACCGTGAGGGAAAGATGAAAAGCACTTTGGA  
AAGAGAGTTAAACAGTACGTGAAATTGTTGAAAGGGAAACGCTTGAAG  
TCAGTCGCGTCCGCCAGAACTCAGCCTTGCAATCTTGCCTGGTGTACTTT  
CTGGTGGACGGGCCAGCATCANTTTCGACTGCCGGACAAGGGCTGGGG  
GAATGTGGCACCTTCGGGTGTGTTATAGCCCCAGTCGCATACGGTGGT  
TGGGATTGAGGAATTCAGCATGCCTTTATGGTCGGGGTTCGCCCACGTT  
CATGCTTAGATGCTGGCGTAATGGCTTTAAACGACCCGTCTTGGAACA  
CGGACCAAG

Trình tự đoạn gen 28S của chủng nấm Hầu thủ có 99% giống (594/600) với đoạn rARN 28S của nấm Hầu thủ *Hericium erinaceum*, 98% giống với *Hericium bietis*.

Mối quan hệ giữa HT và các chủng có quan hệ gần:



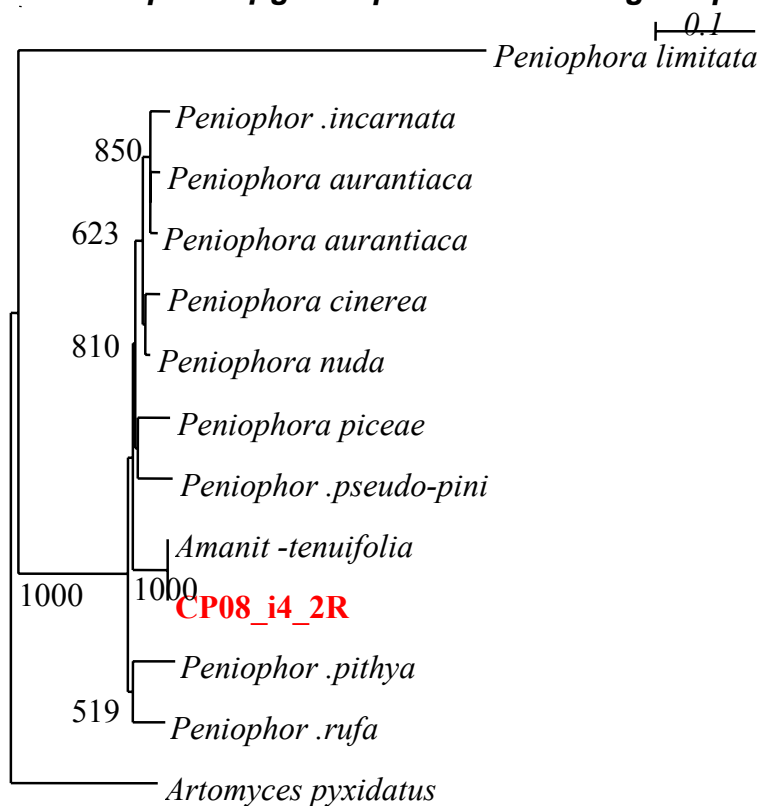
#### 4.4. Chủng CP8

> TRÌNH TỰ ĐOẠN ITS4 CỦA CHỦNG CP08:

```
TCCGTAGGTGAACCTGCGGAAGGATCATTAGCGAAGCGGAACGC
GCGTTCGGTACTGTAGCTGCCCAGCAATGGGATGTGCTCGTCTGGATGC
GTGTCCCTTCTCTATTCCACCCCACTGTGAACCAAGCGTGTGAGCCGAA
GAGAGATCGGAGGCTTGCATGCAACACTTAACATACCCCAATGAAGTAT
CAGAATGTACCTTGCGTTAACTCGCACAAATACAACCTTTCAACAACGGA
TCTCTTGGCTCTCGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAA
TGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACCTTGC
GCCCCTTGGCATTCCGAGGGGCACGCCTGTTTGAGTGTGCTGAACCTCCTC
CACTCCTCACCTTTTTTCGAAGGGTTGGTGAGCGGGATTTGGGAGCTTGC
GGGTCCCTGGCCGATCCGCTCTCCTTGAATGAATTAGCGAAGCCCTTTGC
GGCCTTGGTGTGATAGTCATCTACGCCTCGGCTTAGCGAACCTAATGGG
AGTCGCTTCTAACAGTCTCGCAAGGGACAACACATACCAACTTGACCTC
AAATC
```

Trình tự gen rARN ITS4 của chủng CP08 có 99,5% giống (597/600) với đoạn rARN 26S của nấm *Amanit tenuifolia*.

**Mối quan hệ giữa Cp08 và các chủng có quan hệ gần:**



#### 4.5. Các chủng được phân loại tại CHLB Đức

28 chủng được phân loại tại CHLB Đức

STT	Kí hiệu chủng	Tên phân loại
1	Đ5	<i>Deadalea quereina</i> T064
2	Đ4	<i>Mycna epipterigia</i> K72
3	Đ10	<i>Kuchanevomyces mutabilis</i>
4	Đ11	<i>Garoderene applanatua</i>
5	Đ2	<i>Conocybe ricbewi</i> 138.63.117
6	Đ8	<i>Coprinus awiser</i> CBS680.70.117
7	Đ9	<i>Conocybe aberraus</i> CBS137.63.117
8	Đ1	<i>Agrocybe paludosa</i> 395.79
9	Đ7	<i>Panacolus acuminatus</i>
10	Đ17	<i>Coprinus auregramitetus</i> CBS973
11	Đ6	<i>Phlebia trewanosa</i>
12	Đ16	<i>Agrocybe paludosa</i> 395.79
13	Đ15	<i>Panacolus tinicola</i>
14	Đ14	<i>Traemtes villosa</i>
15	Đ13	<i>Coprinus storquilinus</i>
16	Đ12	<i>Psychromorbidus</i> sp. CBS209.89.117
17	75	<i>Collybia dryophila</i>
18	149	<i>Hyphocoma fascicurlave</i> Z4
19	286	<i>Pycnopus cinnalarinus</i>
20	423	<i>Agaricus bispcius</i> C43
21	135	<i>Gloephyllum trabeum</i> 72
22	402	<i>Voloaviella gloiocephaller</i>
23	49	<i>Borist spez</i>
24	125	<i>Fomes fomentarius</i> DSMZ
25	300	<i>Stropharia tugosoanulatag</i>
26	264	<i>Pleurotus astreatus</i> Ly6
27	327	<i>Paxillus involutus</i> (Gramp)
28	231	<i>Phanevochaete chrysosporium</i> DSMZ 1556

#### C. SẢN XUẤT VÀ THỬ NGHIỆM CHẾ PHẨM

Từ các kết quả thu được trên, chúng tôi mạnh dạn tạo chế phẩm nấm Hàu từ HT1 với mục đích thăm dò khả năng phục hồi sức khỏe bệnh nhân ung thư sau điều trị xạ.

Xuất phát từ kết quả thử hoạt tính *in vitro* các chiết phẩm của nấm Hàu từ, chúng tôi đã định hướng tạo chế phẩm HT-1 từ nấm thành phẩm của cả hai con đường: nấm thành phẩm từ quả thể khô nuôi trồng và nấm thành phẩm là sinh khối sau lên men dịch thể chiết theo phương pháp cổ truyền trong nước nóng, cô đặc và bảo quản lạnh trước khi dùng.

## I. Kết quả Thử nghiệm *in vivo* tính an toàn và hiệu lực của chế phẩm HT1 trên động vật thực nghiệm

Những năm gần đây, các chế phẩm có nguồn gốc tự nhiên được nghiên cứu theo định hướng bảo vệ phóng xạ ngày càng phát triển. Các chế phẩm này có tác dụng làm tăng sức đề kháng của cơ thể sinh vật chống lại các tác nhân gây độc và chống phóng xạ, làm giảm thiểu tác động của bức xạ ion hóa, khôi phục hệ tạo máu, kích thích hệ miễn dịch cơ thể. Các chất này trước hết phải không gây độc cho cơ thể. Các hợp chất này được xếp vào nhóm các chất có tác dụng điều biến đáp ứng sinh học (Biological Response Modifier – BRM ). Việc sử dụng các chất BRM vào mục đích điều trị trong y học gọi là trị liệu sinh học (Biological Therapy). Trị liệu này ngày nay thường được sử dụng phối hợp với xạ trị và hóa trị liệu trong việc điều trị ung thư. Trong khuôn khổ các đề tài nghiên cứu cơ bản và ứng dụng, chúng tôi đã tách chiết, phân lập và điều chế được chế phẩm có nguồn gốc tự nhiên đặt tên là HT<sub>1</sub>. Việc nghiên cứu cơ bản về tính an toàn và hiệu lực bảo vệ phóng xạ của chế phẩm HT<sub>1</sub> là một trong những mục tiêu của đề tài này. Phần thử nghiệm *in vivo* được tiến hành tại bộ môn dược lý, Học viện quân y, Bộ quốc phòng. Sau đây là các kết quả đã thu được.

## II. Kết quả nghiên cứu an toàn của chế phẩm HT1

**Tác dụng của HT1 đối với trọng lượng cơ thể thỏ :**

Bảng 13 : Sự thay đổi trọng lượng cơ thể thỏ khi dùng HT1 trong 6 tuần ( n = 8 )

Nhóm NC Thời điểm		Nhóm chứng ( 1 )	Nhóm HT1 ( 2 )	p <sub>2-1</sub>
XPĐ	$\bar{x}$	2,08	2,10	> 0,05
	SD	0,20	0,25	
Tuần I	$\bar{x}$	2,12	2,04	> 0,05
	SD	0,19	0,23	
Tuần II	$\bar{x}$	2,12	2,06	> 0,05
	SD	0,14	0,29	
Tuần III	$\bar{x}$	2,16	2,12	> 0,05
	SD	0,15	0,26	
Tuần IV	$\bar{x}$	2,25	2,27	> 0,05
	SD	0,10	0,11	
Tuần V	$\bar{x}$	2,43	2,43	> 0,05
	SD	0,08	0,13	
Tuần VI	$\bar{x}$	2,52	2,53	> 0,05
	SD	0,09	0,13	
So sánh VI - I ( % )		tăng 21,15	tăng 20,47	
p <sub>VI-I</sub>		< 0,05	< 0,05	

\* *Nhận xét :*

- So với nhóm chứng, tại tất cả các thời điểm, trọng lượng cơ thể của nhóm thuốc thử biến đổi không có ý nghĩa thống kê ( $p > 0,05$ )

- so sánh riêng từng nhóm (chứng, thử), trọng lượng cơ thể thử ở tuần thứ 6 so với tuần thứ nhất sự khác biệt có ý nghĩa thống kê ( $p < 0,05$ ).

***Tác dụng của HT1 trên điện tim của thử khi dùng chế phẩm HT1 6 tuần:***

***Bảng 14 : Sự thay đổi tần số tim thử ( chu kỳ/phút ) ở đạo trình D<sub>II</sub> khi dùng HT1 ở các thời điểm XPĐ, 3 và 6 tuần ( n = 8 )***

Nhóm NC		Nhóm chứng ( 1 )	Nhóm HT1 ( 2 )	p <sub>2-1</sub>
Thời điểm				
XPĐ	$\bar{x}$	280,6	276,2	> 0,05
	SD	35	32,5	
Tuần III	$\bar{x}$	278,9	275,6	> 0,05
	SD	37	36,2	
Tuần VI	$\bar{x}$	280	273,9	> 0,05
	SD	32	37	
p <sub>VI - XPĐ</sub>		> 0,05	> 0,05	

\* *Nhận xét :*

- So với nhóm chứng, tại tất cả các thời điểm: xuất phát điểm, sau 3 tuần, sau 6 tuần trên các băng điện tim, đọc ở đạo trình D<sub>II</sub>, biên độ QRS của nhóm thử biến đổi không có ý nghĩa thống kê ( $p > 0,05$ )

- So sánh riêng từng nhóm (chứng, thử), tại các thời điểm, sự khác biệt cũng không có ý nghĩa thống kê ( $p > 0,05$ )

***Bảng 15 : Sự thay đổi biên độ sóng điện tim thử (mV) ở đạo trình D<sub>II</sub> khi dùng HT1 ở các thời điểm XPĐ, 3 và 6 tuần ( n = 8 )***

Nhóm NC		Nhóm chứng ( 1 )	Nhóm HT1 ( 2 )	p <sub>2-1</sub>
Thời điểm				
XPĐ	$\bar{x}$	3,40	3,42	> 0,05
	SD	0,25	0,27	
Tuần III	$\bar{x}$	3,37	3,38	> 0,05
	SD	0,36	0,30	
Tuần VI	$\bar{x}$	3,40	3,40	> 0,05
	SD	0,27	0,25	
p <sub>VI - XPĐ</sub>		> 0,05	> 0,05	

\* *Nhận xét :*

- So với nhóm chứng, tại tất cả các thời điểm: xuất phát điểm, sau 3 tuần, sau 6 tuần trên các băng điện tim, đọc ở đạo trình DII, biên độ QRS của nhóm thử biến đổi không có ý nghĩa thống kê ( $p > 0,05$ )

- so sánh riêng từng nhóm (chứng, thử), tại các thời điểm, sự khác biệt cũng không có ý nghĩa thống kê ( $p > 0,05$ )

**Bảng 16 : Sự xuất hiện sóng điện tim bệnh lý thử**

ở đạo trình D<sub>II</sub> khi dùng HT1 ở các thời điểm XPĐ, 3 và 6 tuần ( n = 8 )

Thời điểm \ Nhóm NC	Nhóm chứng ( 1 )	Nhóm HT1 ( 2 )
XPĐ	Không	Không
Tuần III	Không	Không
Tuần VI	Không	Không

\* *Nhận xét :*

Sau 6 tuần thí nghiệm, không thấy xuất hiện các sóng bệnh lý trên điện tim đồ thử các sóng bệnh lý trên điện tim đồ thử ở đạo trình D<sub>II</sub> ở cả 2 nhóm nghiên cứu tại tất cả các thời điểm khảo sát.

**Tác dụng của HT1 đến một số chỉ số huyết học trên thử khi dùng HT1 6 tuần :**

**Bảng 17 : Sự thay đổi số lượng hồng cầu (  $\times 10^{12}/l$  ) ở thử khi dùng HT1 ở các thời điểm XPĐ, 3 và 6 tuần ( n = 8 )**

Thời điểm \ Nhóm NC	Nhóm chứng ( 1 )	Nhóm HT1 ( 2 )	p <sub>2-1</sub>
XPĐ	$\bar{x}$	5,35	> 0,05
	SD	0,34	
Tuần III	$\bar{x}$	5,31	> 0,05
	SD	0,27	
Tuần VI	$\bar{x}$	5,25	> 0,05
	SD	0,34	
p <sub>VI-I</sub>		> 0,05	> 0,05

\* *Nhận xét :*

- So với nhóm chứng, tại tất cả các thời điểm, số lượng hồng cầu của nhóm thuốc thử biến đổi không có ý nghĩa thống kê ( $p > 0,05$ )

- So sánh riêng từng nhóm (chứng, thử), số lượng hồng cầu thử ở tuần thứ 6 so với tuần thứ nhất sự khác biệt không có ý nghĩa thống kê ( $p > 0,05$ ).

**Bảng 18 : Sự thay đổi hàm lượng hemoglobin ( g/l ) ở thỏ khi dùng HT1 ở các thời điểm XPĐ, 3 và 6 tuần ( n = 8 )**

Thời điểm \ Nhóm NC		Nhóm chứng ( 1 )	Nhóm HT1 ( 2 )	p <sub>2-1</sub>
XPĐ	$\bar{x}$	118,87	115,00	> 0,05
	SD	8,69	7,53	
Tuần III	$\bar{x}$	116,62	116,33	> 0,05
	SD	6,91	4,39	
Tuần VI	$\bar{x}$	119,00	116,89	> 0,05
	SD	9,80	4,99	
P <sub>VI-I</sub>		> 0,05	> 0,05	

\* *Nhận xét :*

- So với nhóm chứng, tại tất cả các thời điểm, hàm lượng Hemoglobin của nhóm thuốc thử biến đổi không có ý nghĩa thống kê (p> 0,05)
- So sánh riêng từng nhóm (chứng, thử), hàm lượng Hemoglobin của thỏ ở tuần thứ 6 so với tuần thứ nhất sự khác biệt không có ý nghĩa thống kê (p>0,05).

**Bảng 19: Sự thay đổi số lượng bạch cầu (  $\times 10^9/l$  ) ở thỏ khi dùng HT1 ở các thời điểm XPĐ, 3 và 6 tuần ( n = 8 )**

Thời điểm \ Nhóm NC		Nhóm chứng ( 1 )	Nhóm HT1 ( 2 )	p <sub>2-1</sub>
XPĐ	$\bar{x}$	8,20	9,22	> 0,05
	SD	1,49	3,34	
Tuần III	$\bar{x}$	8,32	9,08	> 0,05
	SD	1,18	0,90	
Tuần VI	$\bar{x}$	8,45	8,51	> 0,05
	SD	0,43	0,69	
P <sub>VI-I</sub>		> 0,05	> 0,05	

\* *Nhận xét :*

- So với nhóm chứng, tại tất cả các thời điểm, số lượng bạch cầu của nhóm thuốc thử biến đổi không có ý nghĩa thống kê (p> 0,05)

- so sánh riêng từng nhóm (chứng, thử), số lượng bạch cầu của thỏ ở tuần thứ 6 so với tuần thứ nhất sự khác biệt không có ý nghĩa thống kê ( $p > 0,05$ ).

**Bảng 20: Sự thay đổi số lượng tiểu cầu ( $\times 10^9/l$ ) ở thỏ khi dùng HT1 ở các thời điểm XPĐ, 3 và 6 tuần ( $n = 8$ )**

Nhóm NC Thời điểm		Nhóm chứng ( 1 )	Nhóm HT1 ( 2 )	$P_{2-1}$
XPĐ	$\bar{x}$	397,00	411,67	$> 0,05$
	SD	38,93	20,66	
Tuần III	$\bar{x}$	402,25	413,00	$> 0,05$
	SD	17,20	19,70	
Tuần VI	$\bar{x}$	405,75	415,00	$> 0,05$
	SD	5,31	12,05	
$P_{VI-I}$		$> 0,05$	$> 0,05$	

\* Nhận xét :

- So với nhóm chứng, tại tất cả các thời điểm, số lượng tiểu cầu của nhóm thuốc thử biến đổi không có ý nghĩa thống kê ( $p > 0,05$ )

- so sánh riêng từng nhóm (chứng, thử), số lượng tiểu cầu của thỏ ở tuần thứ 6 so với tuần thứ nhất sự khác biệt không có ý nghĩa thống kê ( $p > 0,05$ ).

**Tác dụng của HT1 đối với hoạt độ enzym SGOT, SGPT của thỏ :**

**Bảng 21: Sự thay đổi hoạt độ enzym SGOT của thỏ khi dùng HT1 ở các thời điểm XPĐ, 3 và 6 tuần ( $n = 8$ )**

Nhóm NC Thời điểm		Nhóm chứng ( 1 )	Nhóm HT1 ( 2 )	$P_{2-1}$
XPĐ	$\bar{x}$	74,64	67,98	$> 0,05$
	SD	9,29	11,86	
Tuần III	$\bar{x}$	76,4	77,44	$> 0,05$
	SD	10,49	12,71	
Tuần VI	$\bar{x}$	76,91	75,3	$> 0,05$
	SD	10,65	10,49	
$P_{VI-I}$		$> 0,05$	$> 0,05$	

\* Nhận xét :

- So với nhóm chứng, tại tất cả các thời điểm, hoạt độ enzym SGOT của nhóm thuốc thử biến đổi không có ý nghĩa thống kê ( $p > 0,05$ )
- so sánh riêng từng nhóm (chứng, thử), hoạt độ enzym SGOT của thử ở tuần thứ 6 so với tuần thứ nhất sự khác biệt không có ý nghĩa thống kê ( $p > 0,05$ ).

**Bảng 22: Sự thay đổi hoạt độ enzym SGPT của thử khi dùng HT1 ở các thời điểm XPĐ, 3 và 6 tuần (  $n = 8$  )**

Nhóm NC Thời điểm		Nhóm chứng ( 1 )	Nhóm HT1 ( 2 )	$p_{2-1}$
XPĐ	$\bar{x}$	89	93,76	$> 0,05$
	SD	14,65	17,16	
Tuần III	$\bar{x}$	88,47	81,65	$> 0,05$
	SD	9,36	18,97	
Tuần VI	$\bar{x}$	90,5	95,05	$> 0,05$
	SD	14,32	15,08	
$p_{VI-I}$		$> 0,05$	$> 0,05$	

\* *Nhận xét :*

- So với nhóm chứng, tại tất cả các thời điểm, hoạt độ enzym SGPT của nhóm thuốc thử biến đổi không có ý nghĩa thống kê ( $p > 0,05$ )
- so sánh riêng từng nhóm (chứng, thử), hoạt độ enzym SGPT của thử ở tuần thứ 6 so với tuần thứ nhất sự khác biệt không có ý nghĩa thống kê ( $p > 0,05$ ).

**Tác dụng HT1 đối với hàm lượng Creatinin của thử :**

**Bảng 23 : Sự thay đổi hàm lượng Creatinin của thử khi dùng HT1 ở các thời điểm XPĐ, 3 và 6 tuần (  $n = 8$  )**

Nhóm NC Thời điểm		Nhóm chứng ( 1 )	Nhóm HT1 ( 2 )	$p_{2-1}$
XPĐ	$\bar{x}$	100,11	102,99	$> 0,05$
	SD	6,08	14,39	
Tuần III	$\bar{x}$	95,22	98,32	$> 0,05$
	SD	9,47	8,14	
Tuần VI	$\bar{x}$	101,12	100,06	$> 0,05$
	SD	9,19	11,09	
$p_{VI-I}$		$> 0,05$	$> 0,05$	

\* *Nhận xét :*

- So với nhóm chứng, tại tất cả các thời điểm, hàm lượng Creatinin của nhóm thuốc thử biến đổi không có ý nghĩa thống kê ( $p > 0,05$ )

- so sánh riêng từng nhóm (chứng, thử), hàm lượng Creatinin của thỏ ở tuần thứ 6 so với tuần thứ nhất sự khác biệt không có ý nghĩa thống kê ( $p>0,05$ )

### III. Kết quả nghiên cứu tác dụng bảo vệ phóng xạ của chế phẩm HT1

**Tác dụng bảo vệ phóng xạ của HT1 qua các chỉ tiêu:**

- Thời gian sống trung bình
- tỷ lệ (%) sống sót
- hệ số bảo vệ ở, ã của các nhóm CNT

**Bảng 24: Tác dụng bảo vệ phóng xạ của HT<sub>1</sub> khi dùng 30 ngày liều 0,5g/kg/24h**

Nhóm NC Liều CX	Đối chứng chiếu xạ			Chiếu xạ + HT <sub>1</sub> 0,5g/kg			Hệ số bảo vệ	
	n	TGSTB (ngày)	% sống sót	n	TGSTB (ngày)	% sống sót	ở	ã
5,5	10	21,5	40	10	25,2	70	0,50	0,48
6,5	10	17,7	30	10	24,8	70	0,52	0,50
7,5	10	14,6	20	10	18,8	40	0,24	0,30
8,5	10	9,7	0	10	12,4	20	0,20	0,10

- Tính hệ số giảm liều của HT<sub>1</sub>:  $HSGL = 7,4/5,8 = 1,27$

### IV. Tác dụng của HT1 đối với quá trình tạo máu

Dưới tác dụng của bức xạ ion hoá, tủy xương, lách, đến rất nhạy cảm và bị tổn thương. Các tổn thương này thể hiện ở sự suy giảm số lượng tế bào hữu hình trong máu ngoại vi: Cả 3 loại tế bào hồng cầu, bạch cầu, tiểu cầu, đến giảm mạnh; phù hợp với đời sống của từng loại tế bào máu ngoại vi mà BC giảm mạnh nhất sau đó là TC và HC. Dưới tác dụng của HT1, sự biến đổi của số lượng tế bào máu ngoại vi được trình bày ở trên.

**Bảng 25: Số lượng tế bào ở nhóm CNT dưới tác dụng của chiếu xạ và chiếu xạ + HT1**

Thời điểm sau chiếu xạ	Số lượng HC ( $\times 10^{12/L}$ )		P
	Nhóm CX (n=10 )	CX + HT1 (n=10)	
Ngày thứ I	7,20 $\pm$ 0,80	7,50 $\pm$ 0,70	>0,05
Ngày thứ IV	6,6 $\pm$ 0,60	7,30 $\pm$ 0,40	<0,05
Ngày thứ IX	6,20 $\pm$ 0,50	7,10 $\pm$ 0,10	<0,05
	Số lượng BC ( $\times 10^9/L$ )		
	Nhóm CX (n=10 )	CX + HT1 (n=10)	
Ngày thứ I	1,50 $\pm$ 0,30	1,80 $\pm$ 0,30	>0,05
Ngày thứ IV	0,60 $\pm$ 0,20	1,3 $\pm$ 0,20	<0,05
Ngày thứ IX	0,88 $\pm$ 0,30	1,6 $\pm$ 0,40	<0,05
	Số lượng TC ( $\times 10^9/L$ )		
	Nhóm CX (n=10 )	CX + HT1 (n=10)	
Ngày thứ I	4,30 $\pm$ 0,20	4,90 $\pm$ 0,60	>0,05
Ngày thứ IV	3,80 $\pm$ 0,30	5,10 $\pm$ 0,70	<0,05
Ngày thứ IX	4,10 $\pm$ 0,30	4,80 $\pm$ 0,50	>0,05

Nhận xét: Số lượng các phần tử hữu hình của máu (HC,BC,TC) có sự thay đổi theo chiều hướng giống nhau , giảm mạnh ở ngày thứ nhất sau chiếu xạ. Đến ngày thứ IV, sự hồi phục ở nhóm có HT1 tốt hơn.Đến ngày thứ IX, sự hồi phục này càng tốt hơn.

## PHẦN V. KẾT LUẬN

**Sau quá trình thực hiện đề tài, chúng tôi thu được các kết quả sau:**

1. Đã tiến hành thu thập và phân lập được 100 chủng nấm lớn tại một số rừng phía Bắc Việt Nam.
2. Đã tiến hành lên men các chủng nấm phân lập được trong phòng thí nghiệm. Sơ bộ đánh giá hoạt tính enzyme phân giải một số hợp chất hữu cơ khó phân huỷ (lignin, tinh bột, xenluloza, lipit, kitin, protein, fucoidan) của 62 chủng nấm lớn. Trong đó có 9 chủng nấm biểu hiện khả năng sinh enzyme phân giải khá tốt nhiều hợp chất hữu cơ khác nhau (ít nhất 5 trong số 7 hợp chất thử)
4. Sơ bộ tách chiết được 165 chiết phẩm từ dịch lên men các chủng nấm và thử hoạt tính sinh học của các định chiết đó:
  - ❖ Trong số 165 dịch chiết được đánh giá hoạt tính chống ôxi hoá có 18 dịch chiết biểu hiện hoạt tính. Trong đó dịch chiết nước nóng PLTQ10 có hoạt tính mạnh nhất, giá trị  $SC_{50}=20,3\mu\text{g/ml}$ .
  - ❖ 165 dịch chiết được thử hoạt tính kháng vi sinh vật kiểm định có 20 dịch chiết thể hiện hoạt tính kháng 3 vi sinh vật kiểm định trở lên, trong đó MA25 chiết trong nước nóng là biểu hiện hoạt tính tốt nhất kháng được 6/8 VSVKD thử.
  - ❖ 156 dịch chiết thử khả năng gây độc tế bào có 43 dịch chiết thể hiện hoạt tính gây độc với 2 dòng tế bào trở lên.
3. Đã lựa chọn ra được 2 chủng có hoạt tính cao để khảo sát sâu hơn về thành phần hoá học: nấm Hàu thử *ericium erinaceum* SH1 và chủng MA10. Phân lập và xác định cấu trúc hoá học của 13 hợp chất từ 2 chủng đó và đã đánh giá hoạt tính sinh học, trong đó:
  - ❖ Hợp chất HC1 có khả năng kháng được 7/8 vi sinh vật kiểm định thử và biểu hiện hoạt tính gây độc với cả 3 dòng tế bào Hep-G2, Fl, RD với giá trị  $IC_{50}$  lần lượt là 6,25; 7,5; 6,8  $\mu\text{g/ml}$ .
  - ❖ Hợp chất MH3 có khả năng kháng được 3/8 vi sinh vật kiểm định thử và biểu hiện hoạt tính gây độc với cả 3 dòng tế bào Hep-G2, Fl, RD với giá trị  $IC_{50}$  lần lượt là 7,2; 6,5; 10  $\mu\text{g/ml}$ .
  - ❖ Hợp chất MA10C biểu hiện hoạt tính gây độc với dòng tế bào RD với giá trị  $IC_{50}$  lần lượt là 4,6  $\mu\text{g/ml}$  và có khả năng kháng được 1/8 vi sinh vật kiểm định thử
4. Tạo ra chế phẩm HT1 ở 2 dạng: nước và bột mịn từ chủng nấm Hàu thử. Đã thử nghiệm *in vivo* tại bộ môn dược lý, Học viện quân y, Bộ quốc phòng. Được kết luận :
  - ❖ Độ an toàn của chế phẩm HT1 thử nghiệm trên các nhóm thỏ dùng HT1: sau 6 tuần cho thấy chế phẩm HT1 an toàn ở nồng độ thuốc nghiên cứu
  - ❖ Chế phẩm thử nghiệm HT1 được đánh giá tác dụng bảo vệ phóng xạ trên thực nghiệm và cho kết quả dương tính rõ rệt

**Từ các kết quả thu được, đối chiếu với đề cương được duyệt chúng tôi nhận thấy:**

- ✚ So với đề cương được duyệt: đã thực hiện vượt quá nội dung
- ✚ Về mục tiêu: phù hợp với đề cương
- ✚ Về nội dung: thực hiện đúng các nội dung đã được duyệt và vượt mức đặt ra.
- ✚ Về tiến độ: đề tài được thực hiện đúng tiến độ
- ✚ Về thực chi các khoản (so với dự toán): nhìn chung phù hợp với kinh phí được duyệt

**Sản phẩm của đề tài: Dạng kết quả I, II**

<b>T T</b>	<b>Tên sản phẩm và chỉ tiêu chất lượng chủ yếu</b>	<b>Đơn vị đo</b>	<b>Dự kiến số lượng sản phẩm tạo ra</b>	<b>Sản phẩm đạt được</b>
1	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Qui trình phân lập nấm lớn từ đất</li> <li>- Qui trình phân lập nấm lớn từ cây mục và các nguồn khác</li> <li>- Qui trình tách các enzym từ nấm lớn</li> <li>- Qui trình tách các chất có hoạt tính kháng sinh từ nấm lớn</li> <li>- Qui trình tách các có hoạt tính kháng u từ nấm lớn</li> <li>- Qui trình tách chiết các chất có hoạt tính chống ôxy hoá từ nấm lớn</li> </ul>	Qui trình công nghệ	06 qui trình	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 02 quy trình phân lập nấm từ mẫu quả thể và quy trình phân lập nấm từ mẫu thân lá, thân cây mục và đất</li> <li>- 01 quy trình tách chiết và tinh sạch enzym từ nấm lớn</li> <li>- 01 qui trình chiết tách chất thô từ các dịch lên men nấm lớn</li> <li>- 01 qui trình tách các chất có hoạt tính kháng sinh từ nấm lớn</li> <li>- 01 qui trình tách các có hoạt tính kháng u từ nấm lớn</li> <li>- 01 qui trình tách chiết các chất có hoạt tính chống ôxy hoá từ nấm lớn</li> <li>- 03 quy trình tách chiết và phân lập chất từ nấm lớn</li> </ul>
2	Bộ giống nấm	Chủng giống	10-50 chủng	Phân lập được 100 chủng nấm lớn, hiện đang lưu giữ 42 chủng để nghiên cứu tiếp.
3	Bản đồ phân loại gen một số chủng nấm tiêu biểu	nt	10-50 chủng	Xác định trình tự gen của 57 chủng nấm
4	Các chất có hoạt tính sinh học cao	mg	3-5 chất mỗi chất 5-10mg	Phân lập được 13 chất từ nấm lớn (trong đó có 4 chất trùng nhau). Trong đó có 3 chất có hoạt tính cao, hàm lượng chất từ 5-100mg
5	Kết quả thử dược lý các chế phẩm		Tính an toàn hiệu lực của	Tạo ra chế phẩm thử nghiệm trên động vật . Kiểm tra độ an

			chế phẩm	toàn của chế phẩm và thử khả năng bảo vệ phóng xạ của chế phẩm cho kết quả tốt.
6	Chế phẩm có hoạt tính	kg	1-3 kg	Tạo ra được 3kg chế phẩm dạng rắn và 5lít dạng dịch.
7	Chế phẩm enzym	lít	5-10 lít	10 lít chế phẩm dạng dịch

### **Dạng kết quả III**

TT	Tên sản phẩm	Nội dung và sản phẩm đã đăng kí theo đề cương	Kết quả đã đạt được
1	Bảng số liệu, biểu đồ	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Các số liệu chủng nấm phân lập, hình thái phân loại.</li> <li>- Bảng kết quả hoạt tính</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Danh sách nấm phân lập được ở vùng rừng núi phía Bắc Việt nam và lí lịch sinh thái, 100 chủng</li> <li>- Xác định được tên của 57 chủng.</li> <li>- Bảng kết quả sàng lọc hoạt tính enzym của 62 chủng</li> <li>- Kết quả lên men tách chiết được 165 dịch chiết thô từ các dịch lên men của 55 chủng nấm lớn khác nhau</li> <li>- Bảng số liệu đánh giá hoạt tính kháng 8 vi sinh vật kiểm định của 165 dịch chiết</li> <li>- Bảng số liệu đánh giá hoạt tính chống oxi hoá của 165 dịch chiết</li> <li>- Bảng số liệu đánh giá hoạt tính gây độc tế bào của 156 dịch chiết</li> <li>- Bảng kết quả hoạt tính kháng VSVKD và hoạt tính gây độc tế bào của 13 chất sạch</li> <li>- Bảng kết quả hoạt tính chống oxi hoá của 13 chất sạch.</li> <li>- Các kết quả về nghiên cứu hóa học</li> </ul>
2	Chương trình máy tính	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Tính toán kết quả sàng lọc sinh học trên Table curve, exell và thống kê sinh học Student's test theo chương trình vi tính EPI-INFOR 6.0 của WHO</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Tính toán kết quả sàng lọc sinh học trên Table curve, exell và thống kê sinh học Student's test theo chương trình vi tính EPI-INFOR 6.0 của WHO</li> </ul>

3	Đào tạo	02TS, 02 ThS và cử nhân 07 lượt cán bộ trao đổi ( 07 đoàn vào, 07 đoàn ra)	- 02 TS tại CHLB Đức - 02 thạc sĩ - 04 sinh viên - 09 lượt CB KH Đức vào Việt nam - 09 lượt sang Đức trao đổi và học tập
4	Xuất bản, Tổng kết và viết báo cáo	Xuất bản: 5-7 bài báo và báo cáo hội nghị  -Báo cáo định kì, báo cáo tổng kết và hội thảo	- Đã đăng 6 bài báo trong nước, 2 bài tạp chí quốc tế, 1 bài đang gửi đăng tạp chí quốc tế - Tổ chức được 3 lần seminar tại Viện Hóa học các HCTN - Có báo cáo kết quả định kì - Đang hoàn thiện báo cáo tổng kết

### **KIẾN NGHỊ**

- Cho phép bảo vệ nghiệm thu đề tài theo đúng tiến độ thực hiện.  
Đề nghị cho tiếp tục mở đề tài theo hướng nghiên cứu tìm kiếm và ứng dụng các enzym phân giải các hoạt chất polymer tự nhiên có hoạt tính, có cấu trúc cao phân tử phức tạp thành các chất dễ hấp thụ và giữ nguyên hoặc tăng hoạt tính phục vụ đời sống.

## PHẦN VI. DANH SÁCH CÁN BỘ ĐƯỢC ĐÀO TẠO THÔNG QUA DỰ ÁN

### 1. Danh sách cán bộ sang Đức học tập và trao đổi:

stt	Họ tên	Trình độ được đào tạo	Thời gian
1	Lê Mai Hương	Trao đổi ngắn hạn:	6/2006, 12/2007, 10/2008
2	Đậu Hùng Anh	Tiến sĩ	2006- 2008
3	Đỗ Hữu Nghị	Tiến sĩ	2008-2010
4	Trần Thị Như Hằng	Thực tập ngắn hạn	2006
5	Trần Thị Hồng Hà	nt	nt
6	Đỗ Hữu Nghị	nt	nt
7	Nguyễn Xuân Cường	nt	2007

### 2. Danh sách cán bộ Đức vào Việt nam

stt	Họ tên	Mục đích	Thời gian
1	Martin Hofrichter	Trao đổi ngắn hạn	9/2005, 9/2007, 11/2008
2	Roland Schubert	nt	9/2005
3	Rene Ulrich	Thực tập	12/2006, 9/2007, 11/2008
4	Christina Lier	nt	12/ 2006
5	Andrei Mikhail	nt	nt

### 3. Danh sách cao học và sinh viên được đào tạo trong nước trong khuôn khổ dự án:

stt	Họ tên	Trình độ	Thời gian tốt nghiệp
1	Trần Thị Hồng Hà	Thạc sĩ	2006
2	Lê Thị Kim Dung	Đại học	2005
3	Vũ Văn Vượng	nt	2006
4	Vũ Trọng Hiếu	nt	nt
5	Nguyễn Văn Thực	nt	nt
6	Nguyễn Đình Luyện	nt	2008

## PHẦN VII. DANH MỤC CÁC SẢN PHẨM CỦA ĐỀ TÀI:

### Danh mục các bài báo đã đăng trong quá trình thực hiện đề tài:

1. Ullrich, R., Huong, L.M., Dung, N.L., Hofrichter, M. .2005. *Laccase from the medicinal mushroom Agaricus blazei*: production, purification and characterization. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, DOI 10.1007/s00253-004-1861-6, 67, 357-363.
2. Huong L. M., Ha L. M., Ha H. T., Hang T. N., Kiem P. V., 2005. The cytotoxic compounds derived from *Hericium erinaceum* (BULL. EX FR.) PERS. *Issues of Basic research in Life sciences, with direction in medicine and pharmacology*, Hanoi Medical University, pp. 570-573.
3. Ha T. H., Huong L. M., Toan M. N., Nguyet N. M., Minh C. V., 2005. Research on exoenzyme biosynthesis that degrade ligno-cellulose of *Agaricus blazei* Murill. *J. of Sci. and technol.* No. 6A, pp. 155-159.
4. Tran Thi Hong Ha , Le Mai Huong, Tran Thi Nhu Hang. Investigating the production of laccase, mangan peroxidase and lignin peroxidase of some Basidiomycetes isolated from Cucphuong national Park, 2007. *J. Science and Technology*. 45(1B). 238- 241.
5. Do Huu Nghi , Le Mai Huong, Vu Trong Hieu. Investigate the lignin-peroxidase biosynthesis from isolated Bisidiomycetous fungus, 2007. *J. Science and Technology*. 45(1B). 233- 237.
6. Tran Thi Hong Ha, Le Mai Huong, Tran Thi Nhu Hang, 2007. Investigating the bioactivities of *Hericium SH-1* cultured in the liquid media. *Issues of Basic research in Life sciences*. Hanoi publishing house of science and technical, pp. 268- 271.
7. Huong, L.M., Nghi, D.H., Ha, T. T. H., Hang, T.N., Chi, H.K., Toan, M.N., Cuong, N.X., Kiem, P.V. , Minh, CV., Ullrich, R. and Hofrichter, M.,2008. Ergosterol Peroxide, an Cytotoxic and Antibacterial Component Isolated from Fermented Broth of *Phellinus adamantinus*. *Đang gửi đăng*
8. Renenees Ullrich, Dau Hung Anh, Matthias Kinne, Martin Kluge, Christian Dolge, Mandy Starke, Christiane Liers, Katrin Schreibner, Do Huu Nghi, Le Mai Huong & Martin Hofrichter, Peroxygenase: New extra-cellular mushroom enzymes which oxygenate aromatic compounds, 2007. *International Workshop on Herbal Medicinal Plants and Traditional Herb Remedies*, pp.60 (Abstracts). Đăng trên Proceeding của hội nghị tháng 4, 2009.

## PHẦN VIII. BÁO CÁO SỬ DỤNG KINH PHÍ THỰC HIỆN ĐỀ TÀI

### 1. Các thiết bị mua sắm phục vụ đề tài:

- Mua 01 thiết bị lên men dung tích 3lít (Amar, Ấn Độ) từ nguồn Dự án
- Nhập 01 bình lên men dung tích 5 lít
- 01 bộ máy tính

### 2. Diễn giải thực chi các khoản (so với dự toán): phù hợp với kinh phí được duyệt

Mục	Nội dung chi	Tổng cộng	2006-2007	2008
<b>I</b>	<b>Khoản 1: Thuê khoán chuyên môn</b>	<b>177</b>	<b>133</b>	<b>44</b>
101	Thanh toán cá nhân	94,6	60,6	34
114	Thuê khác	82,4	72,4	10
<b>II</b>	<b>Khoản 2: Nguyên vật liệu, NL</b>	<b>301,9</b>	<b>227</b>	<b>74,9</b>
109	Điện nước	5	4	1,0
111	Điện thoại	8,9	6	2,9
110	Văn phòng phẩm	15,44	10,44	5,0
112	Hội nghị, hội thảo, kiểm tra và nghiệm thu đề tài	9,3	3,5	5,8
119	Dung môi hoá chất thí nghiệm	263,26	203,06	60,2
<b>III</b>	<b>Khoản 3:</b>	<b>170</b>	<b>170</b>	<b>0</b>
145	TSCĐ			
<b>IV</b>	<b>Khoản 4: chi khác ( QL cơ sở)</b>	<b>30</b>	<b>20</b>	<b>10</b>
<b>V</b>	<b>Khoản 5: HTQT</b>	<b>271,1</b>	<b>200</b>	<b>71,1</b>
115	Đoàn ra	165,617	133,15	32,467
116	Đoàn vào	95,733	57,6	38,133
113	Công tác phí	9,75	9,250	0,5
<b>Tổng cộng:</b>		<b>950</b>	<b>750</b>	<b>200</b>

**Cơ quan chủ quản**  
(Ký tên, đóng dấu)

Hà nội, ngày      tháng      năm  
**Chủ nhiệm**  
(Ký tên)

**Bộ Khoa học và Công nghệ**  
(Ký tên, đóng dấu)

**Cơ quan chủ trì**  
(Ký tên, đóng dấu)

## TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Bộ Y tế - Cộng hoà Xã hội Chủ nghĩa Việt Nam ( 1996 ) : *Quy định về nghiên cứu được lý các thuốc y học cổ truyền dân tộc, quyết định 371/BYT-QĐ.*
2. Nguyễn Xuân Phách và cs ( 1995 ) : *Toán thống kê và tin học ứng dụng trong sinh - y - dược.* NXB Quân đội Nhân dân.
3. Le Mai Huong, Phan Van Kiem, Do Huu Nghi, Nguyen Xuan Cuong, Tran Thi Hong Ha, and Chau Van Minh, Chemical constituents of the fungus *Hericium erinaceus* SH1, Tạp chí Hóa học, 2008.
4. Abate D., Abraham W, R., and Meyer H., Cytochalasins and phytotoxins from the fungus *Xylaria obovata*, Phytochemistry, 1997, 44(8), 1443-1448.
5. Abraham W.B. ( 1978 ) : *Techniques of animal and clinical toxicology. Med. Pub. Chicago, pp 55 - 68.*
6. Chobot V., Opletal L., Jahodar L., Patel A.V., Dacke C.G, and Blunder G., Ergosta-4,6,8,22-tetraen-3-one from the edible fungus *Pleurotus ostreatus*, Phytochemistry, 1997, 15(8), 1669-1671.
7. Denisa L. D., Weidong H., Norbert D. K., Monica H., and Joseph P., Phytochemistry, 2004, 65, 181-187.
8. Frederick Green III, Carol A. Clausen, and Terry L. Highley (1989) Adaptation of the Nelson-Somogyi Reducing-Sugar Assay to a Microassay Using Microtiter Plates. Analytical Biochemistry 182, 197-199.
9. Gonchavenko E.N, Deyev L.I., Kudryashov Yu.B. (1997) *The application of preparation of natural origin under condition of radioactive pollution and in experiment.* Radiat. Biol. 37 , 676-682
10. Hatakka, A, (2001), "Biodegradation of lignin", In: *Hofrichter, M., Steinbuchel, A. Editors Biopolymers. Vol. 1: Lignin, Humic Substances and Coal*, Wiley-VCH, Weinheim, Germany, pp. 80-129.
11. Hirotani M., Asaka I., Ino C., Furuya T., and Shiro M., Ganoderic acid derivatives and ergosta-4,7,22-triene-3,6-dione from *Ganoderma lucidum*, Phytochemistry, 1987, 26(10), 2797-2803.
12. Hofrichter M, Scheibner K, Bublitz F, Schneegaß I, Ziegenhagen D, Martens R, Fritzsche W. (1999), "Depolymerization of Straw lignin by manganese peroxidase from *Nematoloma frowardii* is accompanied by release of carbon dioxide". *Holz-forschung* 52, pp. 161-166.
13. Huong L.M, Hofrichter. M, (2004), "Investigation of special fungi (basidiomycetes) producing extracellular oxidoreductases (peroxidases, laccases), which are involved in the biodegradation of persistent natural and artificial molecules (lignin, humic substances, xenobiotic compounds)". *The DAAD visiting scientist report.*

14. Jannet H. B., Chaari A., Bakhrouf A., and Mighri Z., *Natural Product Research*, 2006, 20(3), 299-304.
15. L.John Goad, Toshihiro akihisa, 1997. *Analysis of sterol*, Blackie academy and Professional, Chapman and Hall.
16. Kang H. S., Choi J. H., Cho W. K., Park J. C., and Choi J. S., *Arch. Pharm. Res.*, 2004, 27(7), 742-750.
17. Kirk, T.K, Farrell RL. (1987), "Enzymatic "combustion": the microbial degradation of lignin". *Annu Rev microbiol* 41, pp. 465-505.
18. Kirk, T.K (1983) lignin biodegradation: impotance and historical research perspective, *in: Recent Advances in lignin Biodegradation research* (Hi-guchi, T., Chang, H.-m.,Kirk, T.K., Eds.), pp. I-II. Tokyo: Uni Publishers Co.,Ltd.
19. Kirk T.K, Croan S, Tien M, Murtagh E, Farell RL (1986) Production of multiple ligninaes by *Phanerochaete chrysosporium*: effect of selected growth conditions and use of a mutant strain. *Enzyme Microb Technol* 8: 27-32.
20. Kang H. S., Choi J. H., Cho W. K., Park J. C., and Choi J. S., *Arch. Pharm. Res.*, 2004, 27(7), 742-750.
21. Kawagishi H., Motoharu A., Kayoko S., Hideki S., Satoshi Y., Fumihiro O., Yukio I., Nobuo U. and Shoei F., *Phytochemistry*, 1993, 32(1), 175-178.
22. Kawagishi H., Ando M., Mizuno T., Yokota H. and Konishi S., *Agric. Biol. Chem.*, 1990, 54, 1329.
23. Kirsti Kahlos, L.Kangas, and R.Hiltunen, 1989. Ergosterol Peroxide, an active compound from *Inonotus radiatus* - *Planta Medica*, 55, 389-390.
24. Krugh, T.R., *Journal of American Chemical Society*, 1973, 95, 4761
25. Lee S.H., Shim S.H., Kim J.S., Yang S.S., Constituents from the fruiting bodies of *Ganoderma applanatum* and their aldose reductase inhibitory activity, *Arch. Pharm. Res.*, 2006, 29(6), 479-483.
26. Li K, He Y., *Zhongguo Zhong Yao Za Zhi*, 1999. Chemical studies on polysaccharides from mycelium of *Hericium erinaceum* (Bull.Ex Fr.) Pers. (Article in Chinese), 24 (12), 742-764.
27. Chau Van Minh, Phan Van Kiem, Le Mai Huong, Young Ho Kim, 2004. Cytotoxic constituents of *Diadema setosum* - *Arch. Pharm. Res*, Vol 27, No 7, 734-737.
28. Minh C. V., Kiem P. V., Huong L. M., and Kim Y. H., *Arch. Pharm. Res.*, 2004, 27(7), 734-737.
29. Nam K. S., Jo Y. S., Kim Y. H., Hyun J. W., and Kim H. W., *Life Sciences*, 2001, 69, 229-237.

30. Shimai T, Toyomasu T, Kato N, Sassa T., 2002. Erinacine Q, a new erinacine from *Hericium erinaceum*, and its biosynthetic route to erinacine C in the Basidiomycete. *Biosci Biotechnology. Biochem*, March, 66 (3), 571-575.
31. Sheu, H.J., Chang, K.C. and Duh, C. Y., 2000. A cytotoxic 5a, 8a-epidioxysterol from a soft coral *Simularia* species. *J. Nat. Prod.*, 63, 149-151.
32. Soubias O., Jolibois F., Massou S., Milon A. and Réat, *Biophysical Journal*, 2005, 89(2), 1120-1131.
33. Tan R. X. and Chen J. H., *Natural Products Report*, 2003, 20, 509-534
34. Timm Ankea, Udo Rabea, Peter Schua, Thomas Eizenherb, Monika Schrageb and Wolfgang Steglichb, 2002. *Studies on the Biosynthesis of Striatol – Type diterpenoids and the biological activity of Herical. Z. Naturforsch.* 75c, 263-271 Kenmoku H.
35. Nguyen Quyet Tien, Pham Hoang Ngoc, Pham Hong Minh, Phan Van Kiem, Chau Van Minh, 2004. *New ceramide from Alocasia macrorrhiza*. *Arch Pharm Res* Vol 27, No 10, 1020-1022.
36. Turner A. ( 1965 ) : *Screening methods in pharmacology*, Academic Press, NewYork and London, pp 60 - 68.
37. UK Biodiversity Group Tranche 2 Action Plans, February, 1999. *Plants and Fungi*, Tranche 2, Vol.III, 33.
38. Ulrike Lindequist, Timo H. J. Niedermeyer and Wolf-Dieter Julich., *eCAM*, 2005, 2(3), 285-299.
39. Vasin M.V.,Antipow V.V., Chemov G.A (1996) *Investigation of radioprotective effect of indraline on hematopoietic system in different species of animal*. *Radiat. Biol.* 36, 168-189
40. Wariishi H, Valli K, Gold MH (1992) Manganese (II) oxidation by manganese peroxidase from the basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*. *J Biol Chem* 33: 23688-23695.
41. Wolfenden BS, Willson RL (1982) Radical-cations as reference chromogens in kinetic studies of one-electron transfer reactions. *J Chem Soc Perkin Trans II*: 805-812.
42. WHO (1993): *Research guidelines for evaluating the safety and efficacy of herbal medicines*. Manila, Philipin, pp 35 - 41.
43. Wang X. Z., Wu Y. L., Jiang S. and Singh G., *Journal of Organic Chemistry*, 2000, 65(24), 8146-8151.
44. Y.V. Alexeeva, E.P. Ivanova, I.Y. Bakunina, T.N. Zvaygintseva and V.V. Mikailov (2002) Optimization of glycosidases production by *Pseudoalteromonas issachenkonii* KMM 3549. *Letters in Applied Microbiology* 2002, 35, 1-4.
45. Yue J. M., Chen S. N., Lin Z. W. and Sun H. D., *Phytochemistry*, 2001, 56, 801-806.
46. Zhan Z. J. and Yue J. M., *J. Nat. Prod.*, 2003, 66(7), 1013-1016.

# PHỤ LỤC

## MỘT SỐ HÌNH ẢNH VỀ ĐI THỰC ĐỊA LẤY MẪU VÀ NẤM LỚN Ở RỪNG PHÍA BẮC VIỆT NAM



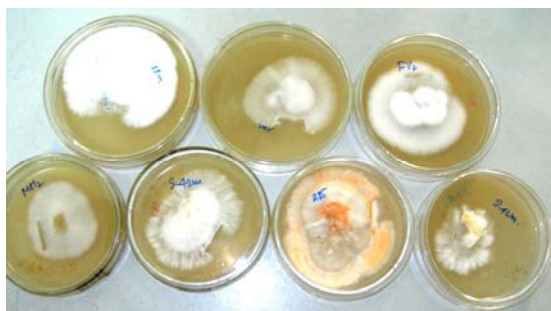






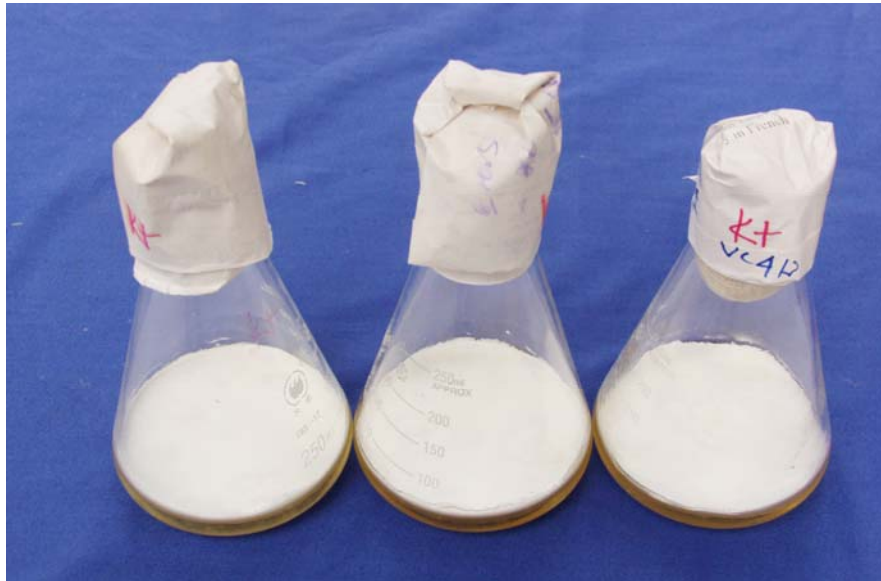


## MỘT SỐ HÌNH ẢNH VỀ NUÔI CẤY NẤM LỚN TRONG PHÒNG THÍ NGHIỆM

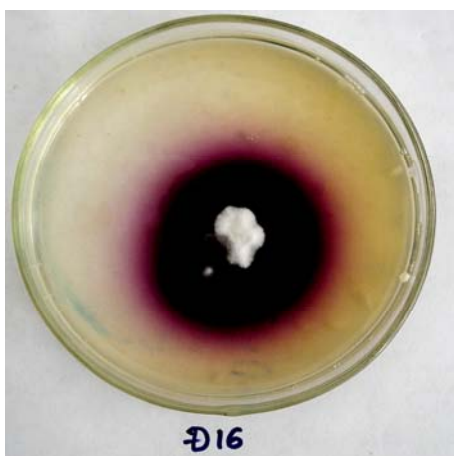


## HÌNH ẢNH CÁC CHỦNG NẤM NUÔI CẤY TRÊN MÔI TRƯỜNG RẮN (RƠM)

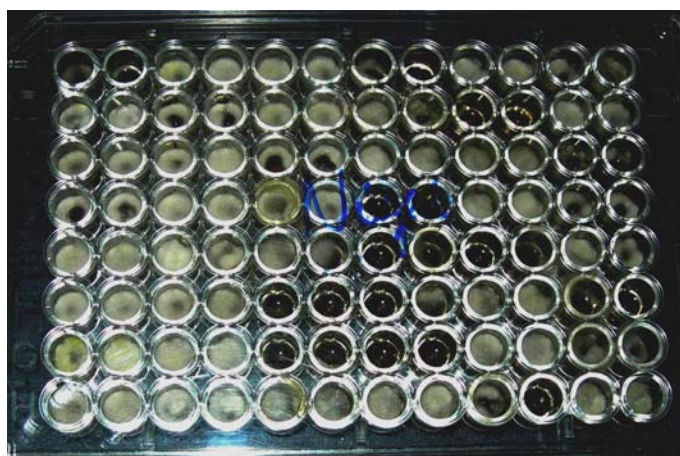




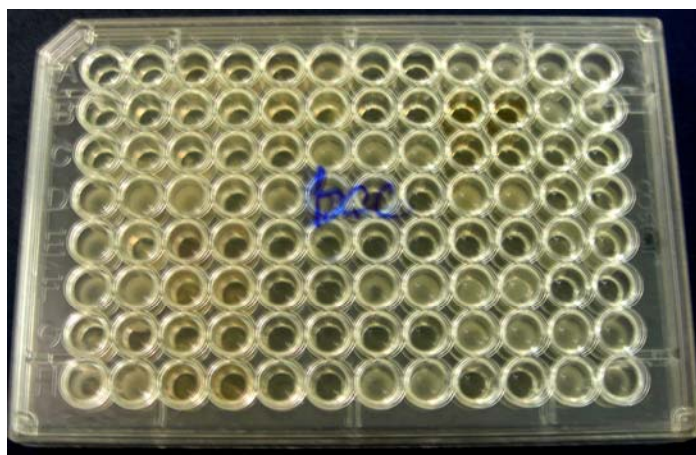
## MỘT SỐ HÌNH ẢNH VỀ THỬ HOẠT TÍNH TẠI PHÒNG SINH HỌC THỰC NGHIỆM



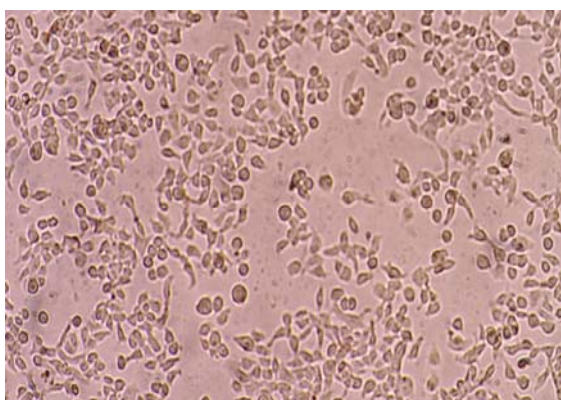
Thử khả năng sinh enzyme



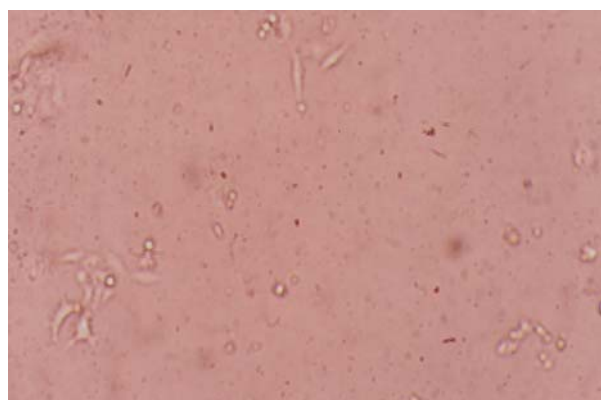
Thử Hoạt tính kháng VSVKD



Thử Hoạt tính kháng VSVKD

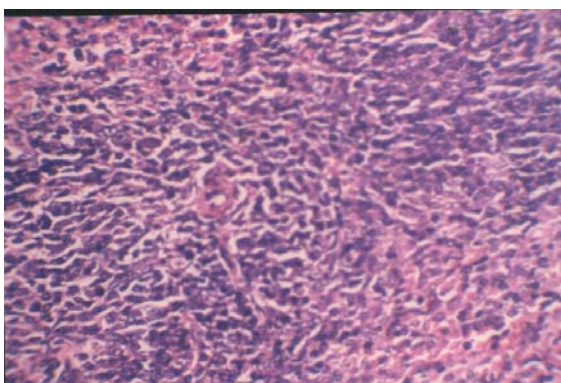


Thử hoạt tính gây độc tế bào – Đối chứng

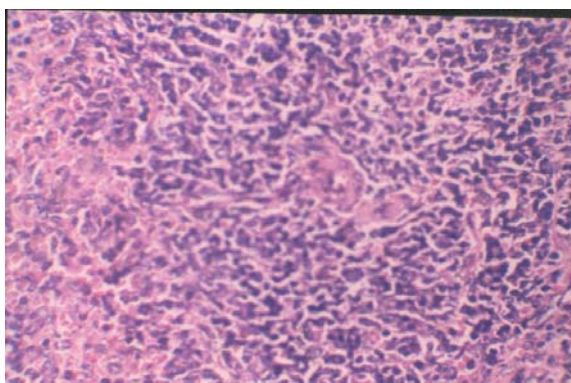


Thử hoạt tính gây độc tế bào – Mẫu có hoạt tính

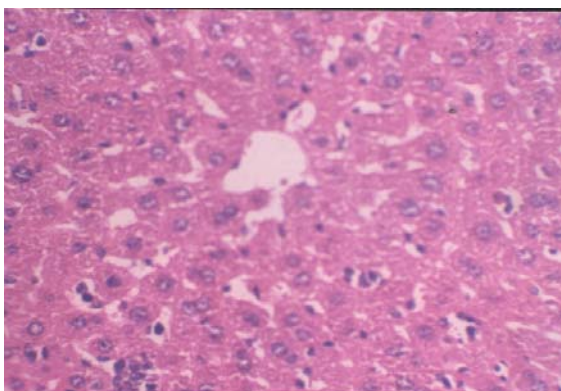
## KẾT QUẢ THỬ HOẠT TÍNH *IN VIVO* CÁC CHIẾT PHẨM CỦA NẤM HẦU THỦ



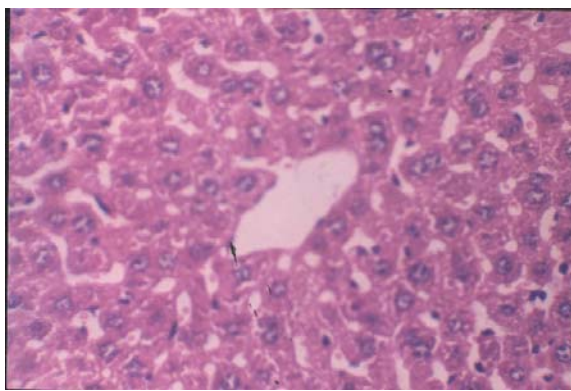
Lách nhóm chứng



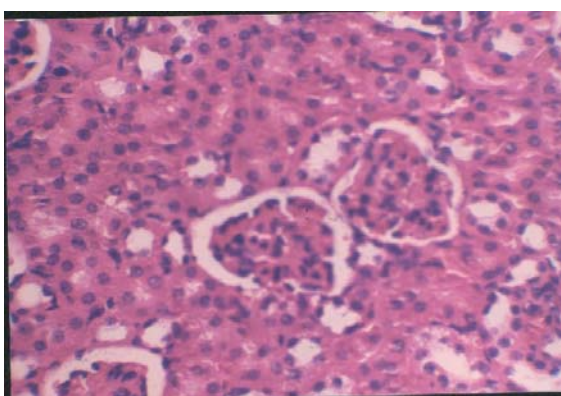
Lách nhóm thử



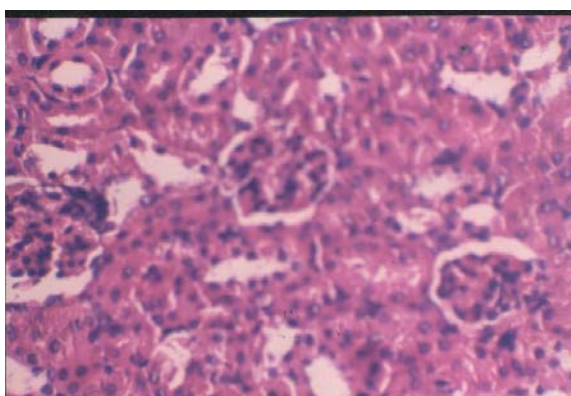
Gan nhóm chứng



Gan nhóm thử



Thận nhóm chứng



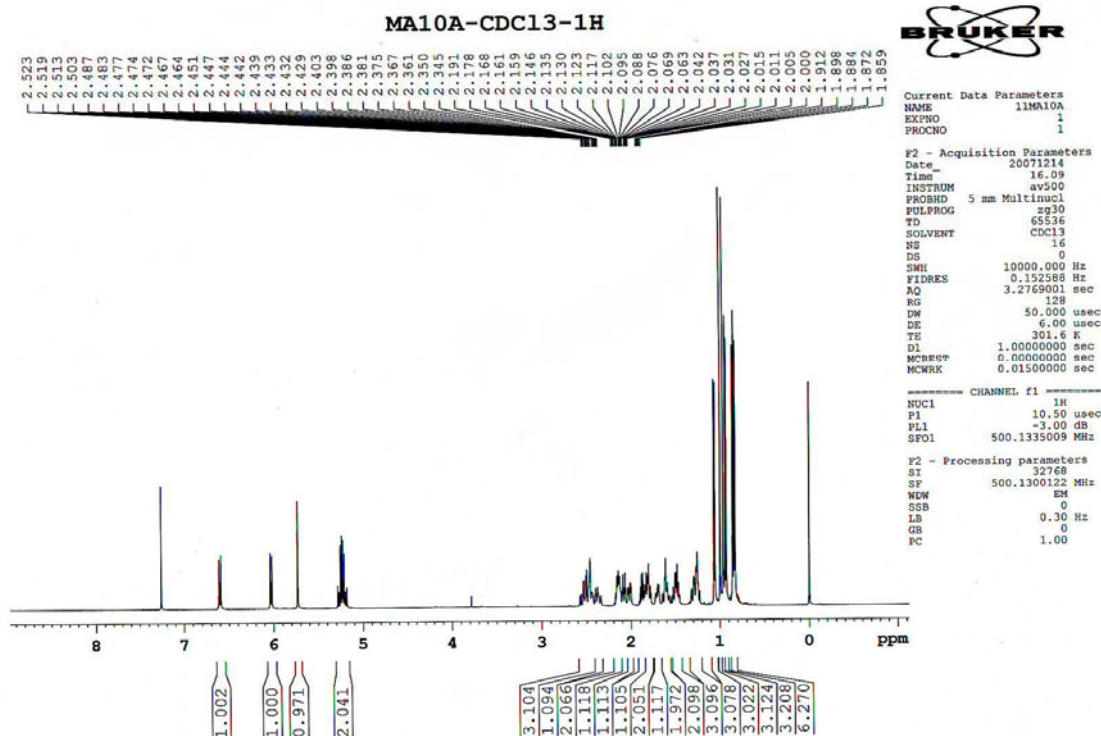
Thận nhóm thử

# DỮ LIỆU VÀ HÌNH ẢNH PHỔ CỦA MỘT SỐ HỢP CHẤT PHÂN LẬP TỪ CÁC CHỨNG MA10 VÀ HT

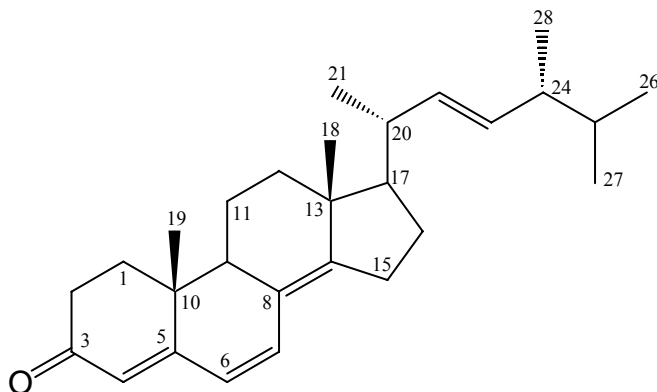
## I. CHỨNG MA10

### a. Hợp chất MA10A - Ergosta-4,6,8(14),22-tetraen-3-one

Hợp chất **MA10A** nhận được dưới dạng chất bột màu vàng với công thức phân tử là  $C_{28}H_{40}O$  được xác định bởi các dữ liệu phổ khối với píc ion  $[M+H]^+$  tại 393,1 cùng với các dữ liệu phổ  $^1H$ -,  $^{13}C$ - NMR và các phổ DEPT.



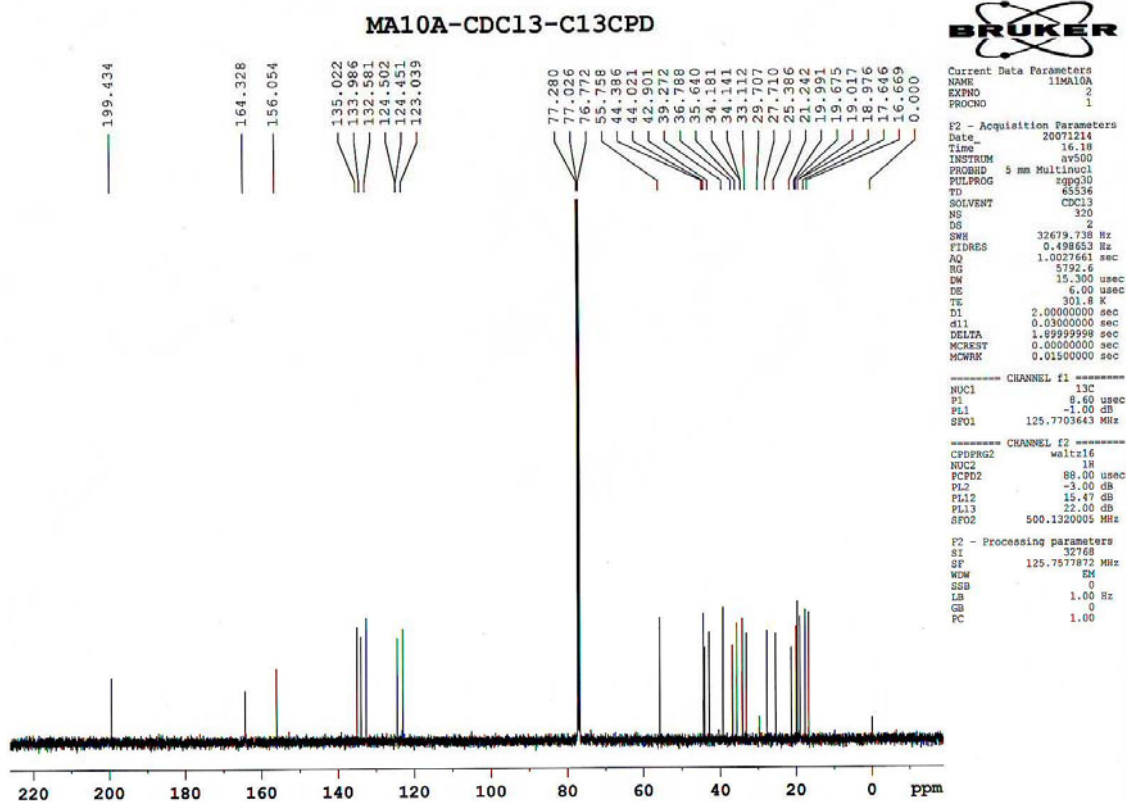
Hình 2.2.1.a. Phổ  $^1H$ -NMR của **MA10A**



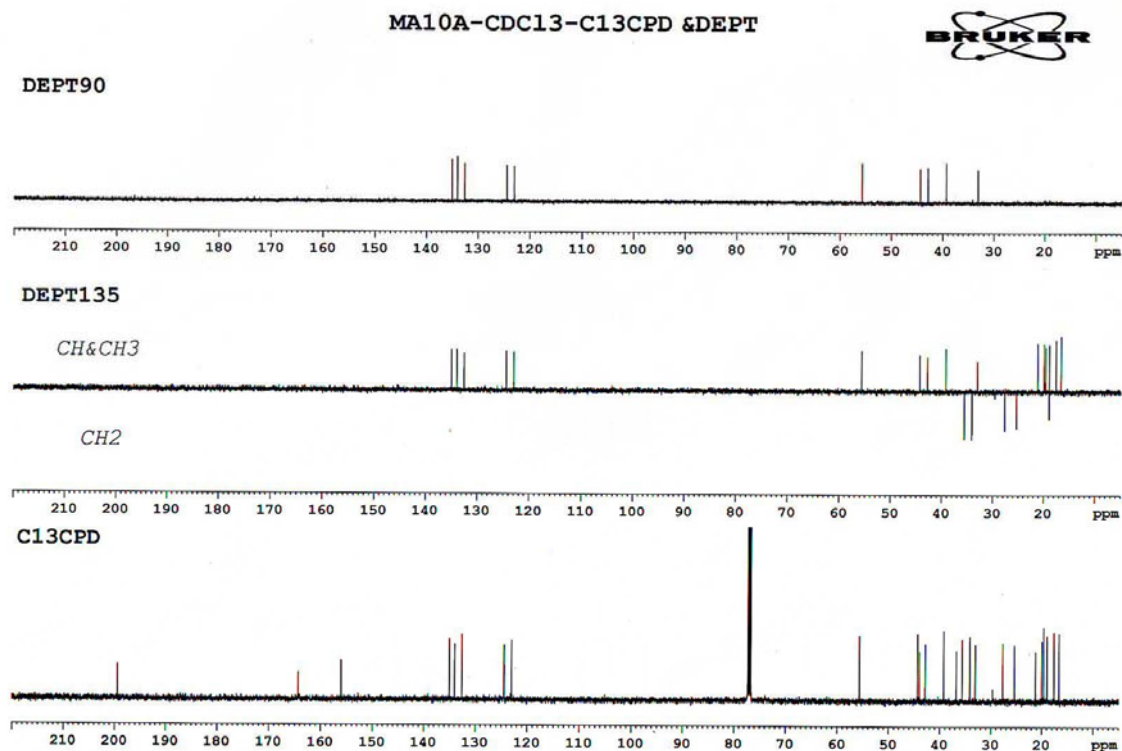
Hình 2.2.1.b. Cấu trúc hóa học của **MA10A**

Phổ cộng hưởng từ hạt nhân  $^1H$ -NMR của **MA10A** đặc trưng cho một hợp chất steroid. Trên phổ  $^1H$ -NMR của **MA10A** xuất hiện các tín hiệu đặc trưng của 1

proton olefin tại  $\delta_H$  5,73 ppm (1H, s, H-4), proton của nối đôi nội vòng bị thế 2 vị trí tại  $\delta_H$  6,06 ppm (1H, d,  $J = 9,5$  Hz, H-6) và 6,61 ppm (1H, d,  $J = 9,5$  Hz, H-7), các proton của nối đôi ngoại vòng có cấu hình *trans* tại  $\delta_H$  5,21 ppm (1H, dd,  $J = 15,5$ , 7,5 Hz, H-22) và 5,26 ppm (1H, dd,  $J = 15,5$ , 7,5 Hz, H-23) (cấu hình *trans* của nối đôi được xác định bởi hằng số tương tác lớn:  $J = 15,5$  Hz của các proton), của 2 nhóm methyl gắn với cacbon bậc 4 tại  $\delta_H$  0,96 ppm (3H, s, H-18) và 1,00 ppm (3H, s, H-19), 4 nhóm methyl bậc 3 tại  $\delta_H$  1,06 ppm (3H, d,  $J = 7,0$  Hz, H-21), 0,83 ppm (3H, d,  $J = 7,0$  Hz, H-26), 0,86 ppm (3H, d,  $J = 7,0$  Hz, H-27) và 0,93 ppm (3H, d,  $J = 7,0$  Hz, H-28). Sự xuất hiện các tín hiệu của 6 nhóm methyl trong đó có 2 nhóm methyl bậc 3 và 4 nhóm methyl bậc hai gợi ý có sự có mặt của một hợp chất steroid dạng ergosterol.



Hình 2.2.1.c. Phổ  $^{13}\text{C}$ -NMR của MA10A



Hình 2.2.1.d. Phổ  $^{13}\text{C}$ -NMR và các phổ DEPT của **MA10A**

Trên phổ  $^{13}\text{C}$ - NMR và các phổ DEPT xuất hiện các tín hiệu đặc trưng của khung ergosterol 28 cacbon với các tín hiệu phổ của 5 cacbon thế 2 của liên kết đôi tại  $\delta_{\text{C}}$  124,50 (C-6), 123,04 (C-4), 133,98 (C-7), 132,58 (C-23) và 135,02 (C-22), 3 cacbon olefin bậc 4 tại  $\delta_{\text{C}}$  124,45 (C-8), 156,05 (C-14) và 164,33 (C-5) và của nhóm cacbonyl tại  $\delta_{\text{C}}$  199,43 (C-3). Do đó **MA10A** có 1 nối đôi ngoại vòng và 4 nối đôi nội vòng và 1 nhóm cacbonyl. Ngoài ra còn có tín hiệu của 4 nhóm metin tại  $\delta_{\text{C}}$  39,27 (C-20), 33,11 (C-25), 55,76 (C-17) và 42,90 (C-20), 6 nhóm metyl tại  $\delta_{\text{C}}$  từ 16,67-21,24 ppm.

Để xác định giá trị phổ cộng hưởng từ hạt nhân proton gắn với các bon tương ứng, phổ cộng hưởng từ hạt nhân 2 chiều tương tác trực tiếp HSQC đã được tiến hành. Qua các tương tác trên phổ HSQC đã xác định được các liên kết C-H. Kết quả được chỉ ra ở bảng 1.

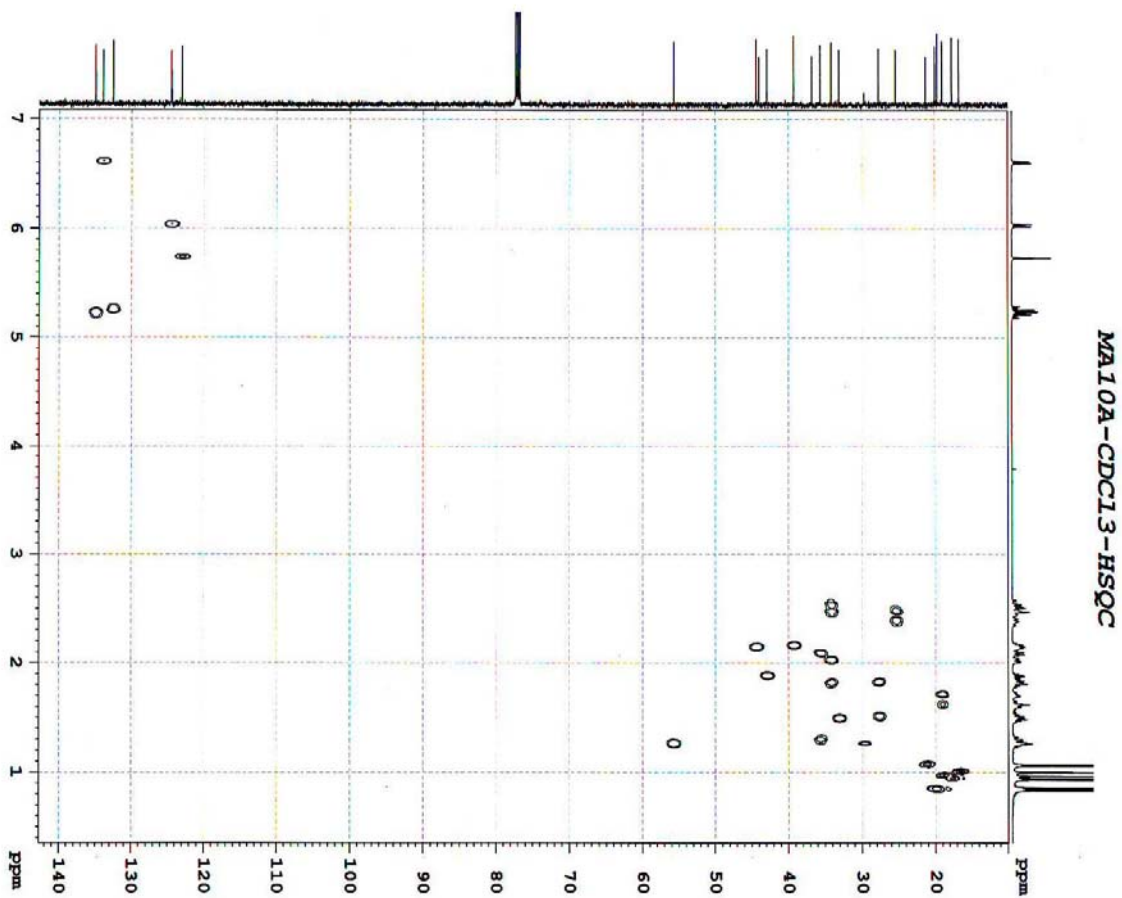
Bảng 1: Kết quả phổ NMR của **MA10A**

C	$\delta_{\text{C}}^{\text{a}}$ [1]	$\delta_{\text{C}}^{\text{a, b}}$	$\delta_{\text{H}}^{\text{a, c}}$ mul, (J in Hz)	HMBC (H to C)
1	34,2	34,18	2,03 m/1,81 m	
2	34,2	34,14	2,55 m/2,48 m	3
3	199,5	199,43	-	
4	123,0	123,04	5,73 s	2, 6, 10
5	164,3	164,33	-	
6	124,5	124,50	6,04 d (9,5)	4, 5, 8, 10
7	134,0	133,98	6,61 d (9,5)	5, 9, 14
8	124,4	124,45	-	

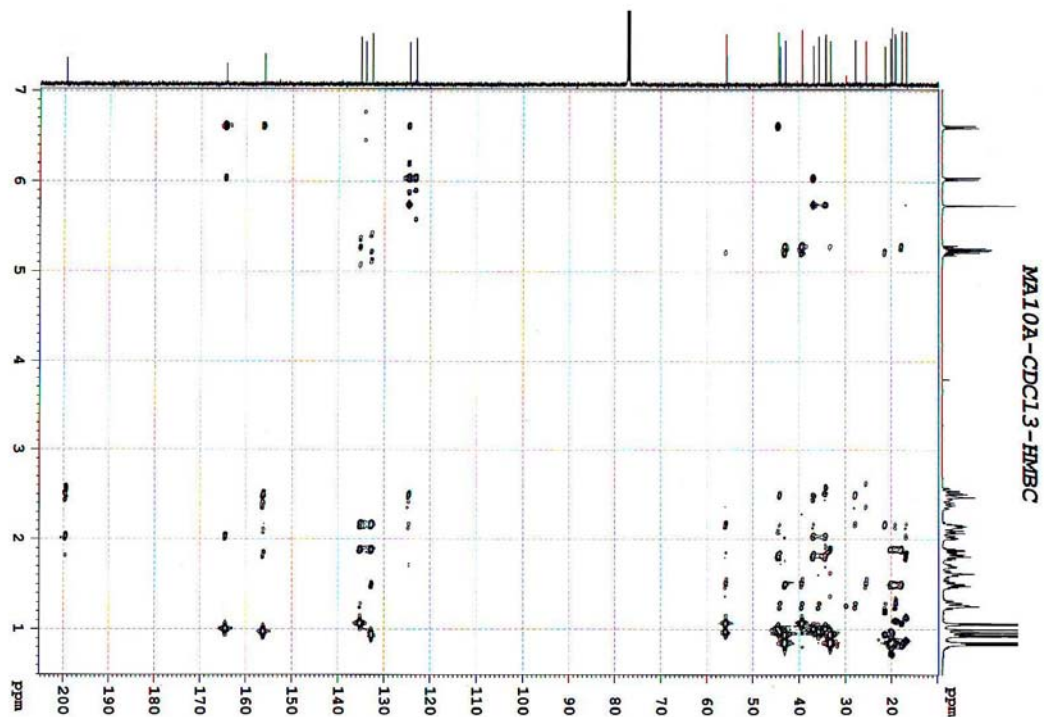
9	44,3	44,38	2,16 m	
10	36,8	36,79	-	
11	19,0	19,02	1,71 m/1,61 m	
12	35,6	35,64	2,09 m/1,31 m	
13	44,0	44,02	-	
14	156,1	156,05	-	
15	25,4	25,38	2,47 m/2,39 m	8, 14
16	27,7	27,71	1,82 m/1,52 m	17
17	55,7	55,76	1,26 m	
18	19,0	18,97	0,96 s	12, 13, 14, 17
19	16,7	16,67	1,00 s	1, 5, 9, 10
20	39,3	39,27	2,17 m	17, 22, 23
21	21,2	21,24	1,06 d (7,0)	17, 20, 22
22	135,0	135,02	5,21 dd (15,5, 7,5)	21, 24
23	132,6	132,58	5,26 dd (15,5, 7,5)	21, 24, 25
24	42,9	42,90	1,88 m	22, 23
25	33,1	33,11	1,49 m	23
26	19,7	19,67	0,83 d (7,0)	24, 25, 27
27	20,0	19,99	0,86 d (7,0)	24, 25, 26
28	17,7	17,56	0,93 d (7,0)	23, 24, 25

<sup>a</sup>recorded in CDCl<sub>3</sub>, <sup>b</sup>125 MHz, <sup>c</sup>500 MHz

Để xác định các vị trí nhóm thế và kiểm tra các giá trị độ dịch chuyển hoá học của các vị trí, phổ HMBC đã được đo. Trên phổ HMBC, nhóm 2 nhóm methyl được khẳng định tại vị trí C-18 và C-19 bởi tương tác HMBC của proton H-18,  $\delta_H$  0,96 với C-12( $\delta_C$  35,64), C-13( $\delta_C$  44,02), C-17( $\delta_C$  55,76), C-14( $\delta_C$  156,05) và của proton H-19,  $\delta_H$  1,00 với C-1( $\delta_C$  34,18), C-5( $\delta_C$  164,33), C-9( $\delta_C$  44,38), C-10( $\delta_C$  36,79). Vị trí của 3 nhóm methyl còn lại cũng được khẳng định vị trí qua các tương tác trên phổ HMBC : proton H-21 với C-17, C-20, C-22, proton H-26 với C-24, C-25, C-27, proton H-27 với C-24, C-25, C-26 và proton H-28 với C-23, C-24, C-25.

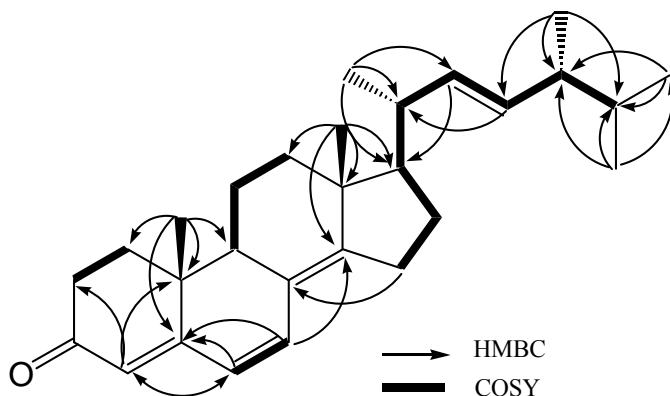


Hình 2.2.1.e. Phổ HSQC của MA10A

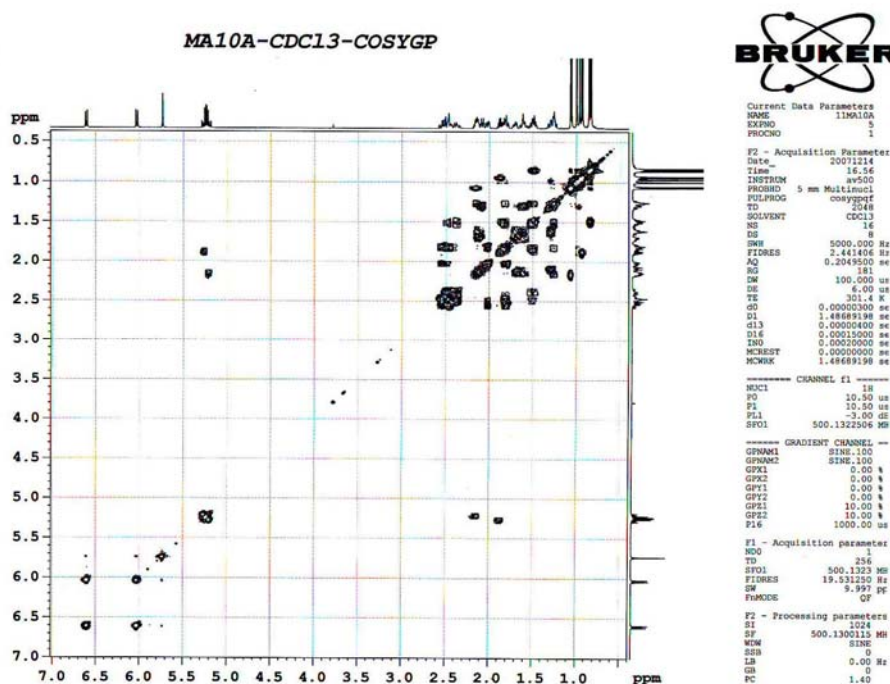


Hình 2.2.1.f. Phổ HMBC của **MA10A**

Tiến hành đo phổ COSY của **MA10A** xác định được các tương tác của proton đính trên các nguyên tử cacbon cạnh nhau, do đó xác định được các liên kết C(1)-C(2), C(6)-C(7), C(9)-C(11)-C(12), C(15)-C(16)-C(17)-C(20)-C(22)-C(23)-C(24)-C(25) như hình 2.2.1.g.



Hình 2.2.1.g. Tương tác HMBC và COSY của **MA10A**

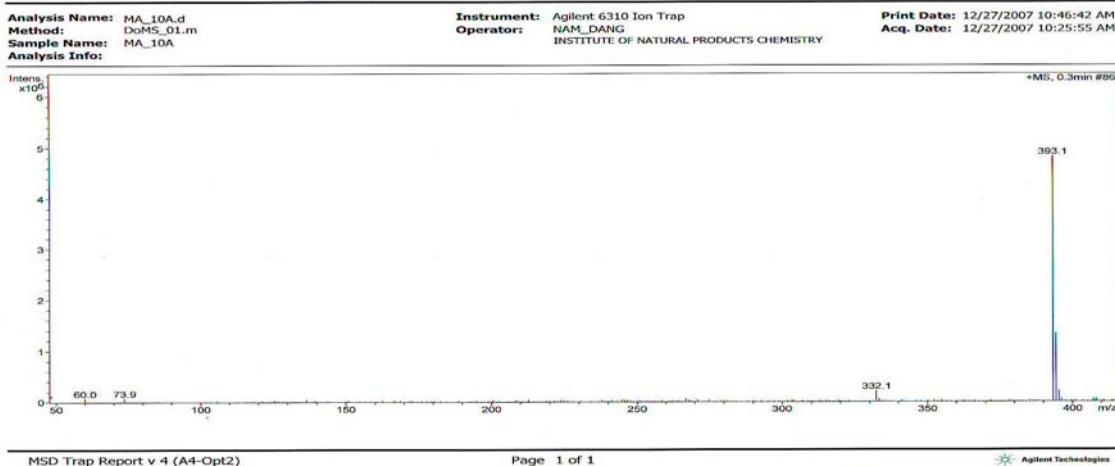


Hình 2.2.1.h. Phổ COSY của **MA10A**

Các kết quả phân tích nêu trên kết hợp với các dữ kiện phổ khối lượng cho phép khẳng định hợp chất **MA10A** là Ergosta-4,6,8(14),22-tetraen-3-one. Đem so sánh các dữ kiện phổ của **MA10A** với Ergosta-4,6,8(14),22-tetraen-3-one [1] (bảng 1) cho thấy sự trùng khớp hoàn toàn về các giá trị phổ tương ứng. Hợp chất này đã được tìm thấy trước đó từ nấm *Pleurotus ostreatus*, *Scleroderma polyrhizum* và

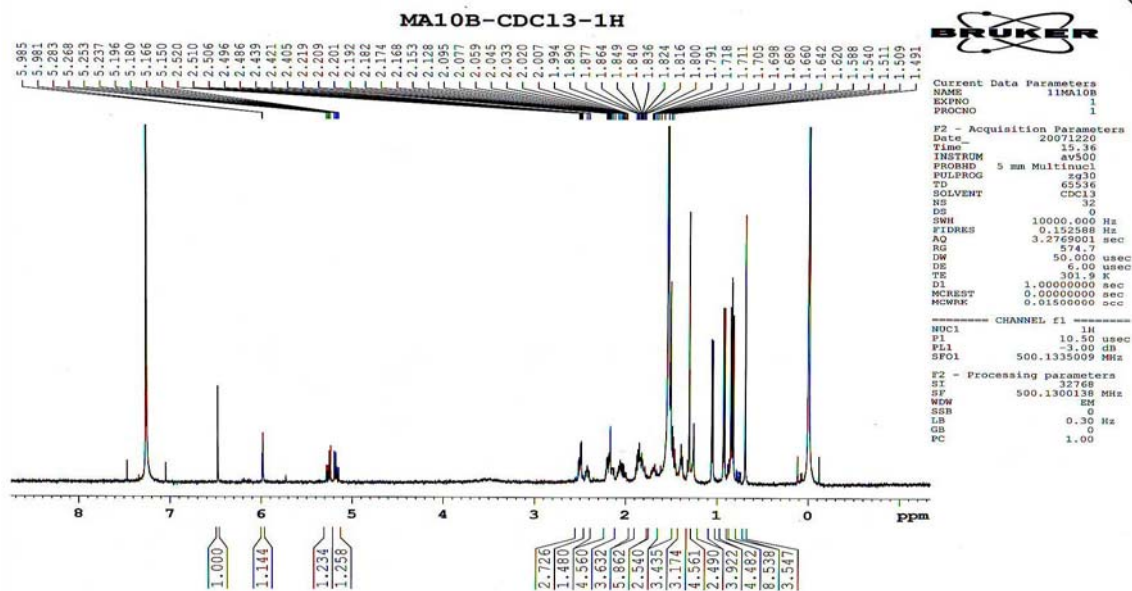
*Acremonium coenophialu*. Tuy nhiên, đây là lần đầu tiên hợp chất này được phân lập từ loài *Pyrrhoderma adamanticum*.

#### Display Report - Selected Window Selected Analysis

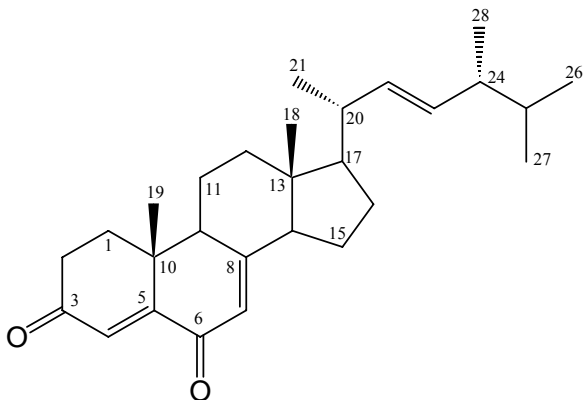


Hình 2.2.2.i. Phổ ESI-MS của MA10A

#### b. Hợp chất MA10B- Ergosta-4,7,22-triene-3,6-dione

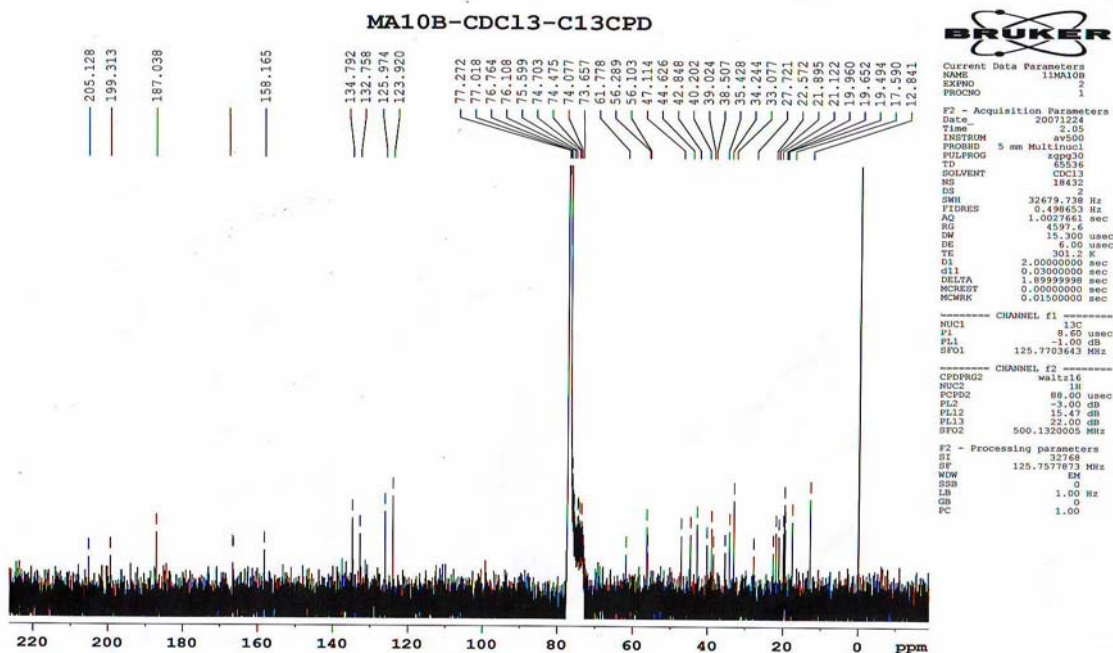


Hình 2.2.2.a. Phổ <sup>1</sup>H-NMR của MA10B

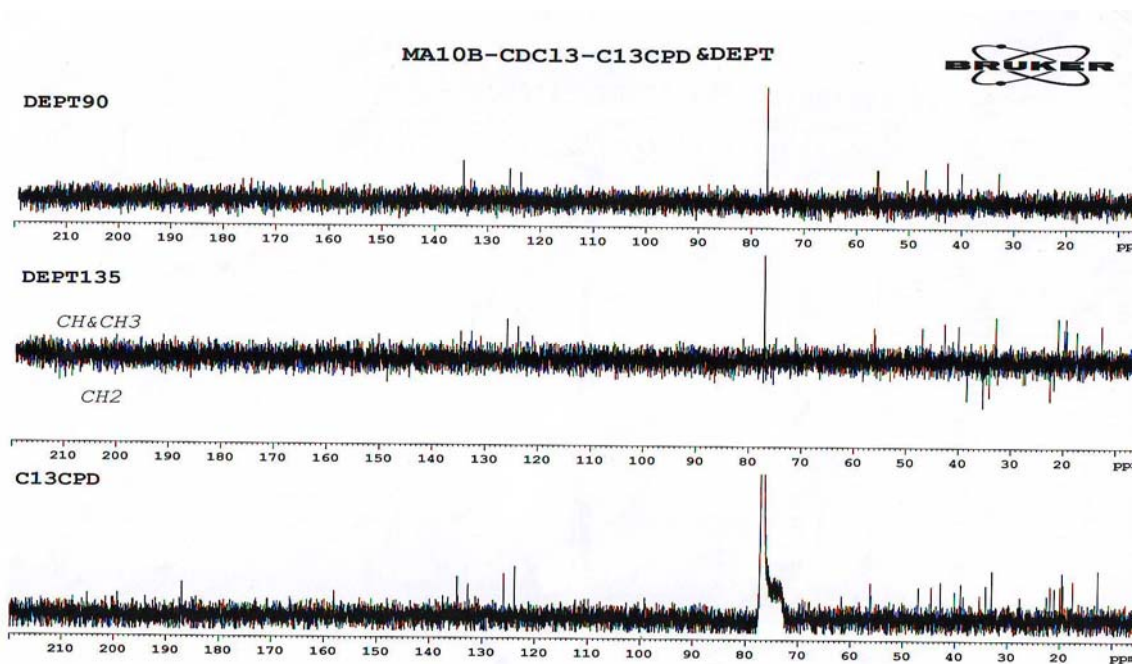


Hình 2.2.2.b. Cấu trúc hóa học của **MA10B**

Phổ cộng hưởng từ hạt nhân  $^1\text{H}$ -NMR của **MA10B** gần giống của **MA10A**, đặc trưng cho khung ergosterol. Trên phổ  $^1\text{H}$ -NMR của **MA10B** mất đi tín hiệu 2 proton của nối đôi nội vòng khi so với **MA10A**, thay vào đó là 1 proton olefin biệt lập  $\delta_{\text{H}}$  5,98 ppm (1H, d,  $J = 2$  Hz, H-7). Trên phổ  $^1\text{H}$ -NMR của **MA10B** cũng xuất hiện các tín hiệu đặc trưng của 1 proton olefin biệt lập tại  $\delta_{\text{H}}$  6,47 ppm (1H, s, H-4), 2 proton của nối đôi ngoại vòng có cấu hình *trans* tại  $\delta_{\text{H}}$  5,18 ppm (1H, dd,  $J = 15,0, 8,0$  Hz, H-22) và 5,26 ppm (1H, dd,  $J = 15,0, 7,5$  Hz, H-23), 2 nhóm methyl bậc 4 tại  $\delta_{\text{H}}$  0,69 ppm (3H, s, H-18) và 1,30 ppm (3H, s, H-19), của 4 nhóm methyl gắn với nhóm CH tại  $\delta_{\text{H}}$  1,05 ppm (3H, d,  $J = 7,0$  Hz, H-21), 0,83 ppm (3H, d,  $J = 7,0$  Hz, H-26), 0,85 ppm (3H, d,  $J = 7,0$  Hz, H-27) và 0,92 ppm (3H, d,  $J = 7,0$  Hz, H-28).



Hình 2.2.2.c. Phổ  $^{13}\text{C}$ -NMR của **MA10B**



Hình 2.2.2.d. Phổ DEPT của **MA10B**

Trên phổ  $^{13}\text{C}$ - NMR và các phổ DEPT xuất hiện các tín hiệu đặc trưng của một khung ergosterol có 2 nối đôi trong vòng và 2 nhóm cacbonyl với các tín hiệu đặc trưng của 2 nhóm cacbonyl tại  $\delta_{\text{C}}$  199,31 (C-3) và 187,04 (C-6), 5 cacbon thế 2 của liên kết đôi tại  $\delta_{\text{C}}$  123,92 (C-4), 125,97 (C-7), 134,79 (C-22) và 132,76 (C-23), 2 cacbon olefin bậc 4 tại  $\delta_{\text{C}}$  158,16 (C-5) và 167,75 (C-8). Các dữ kiện phổ còn lại gần giống với **MA10A**, nhất là phần mạch nhánh.

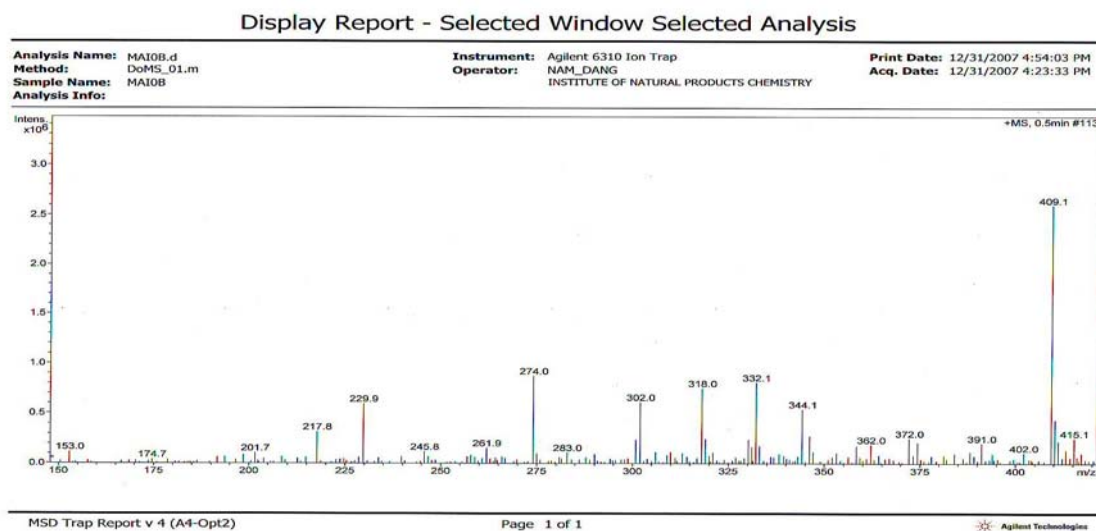
Bảng 2: Kết quả phổ NMR của **MA10B**

C	$\delta_{\text{C}}^{\text{a}}$ [2]	$\delta_{\text{C}}^{\text{a, b}}$	$\delta_{\text{H}}^{\text{a, b}}$ mul, (J in Hz)
1	35,4	35,43	
2	34,3	34,24	
3	199,3	199,31	
4	123,9	123,92	6,47 s
5	158,2	158,16	
6	187,0	187,04	
7	126,0	125,97	5,98 d (2,0)
8	167,7	167,75	
9	47,1	47,11	
10	39,1	39,02	
11	22,6	22,57	
12	38,5	38,51	
13	44,6	44,63	
14	56,1	56,10	
15	21,9	21,89	
16	27,7	27,72	
17	56,3	56,29	
18	12,8	12,84	0,69 s
19	19,7	19,65	1,30 s

20	40,2	40,20	
21	21,1	21,12	1,05 d (7,0)
22	134,8	134,79	5,17 dd (15,0, 8,0)
23	132,8	132,76	5,26 dd (15,0, 7,5)
24	42,9	42,85	
25	33,1	33,08	
26	19,5	19,49	0,85 d (7,0)
27	20,0	19,96	0,83 d (7,0)
28	17,6	17,59	0,92 d (7,0)

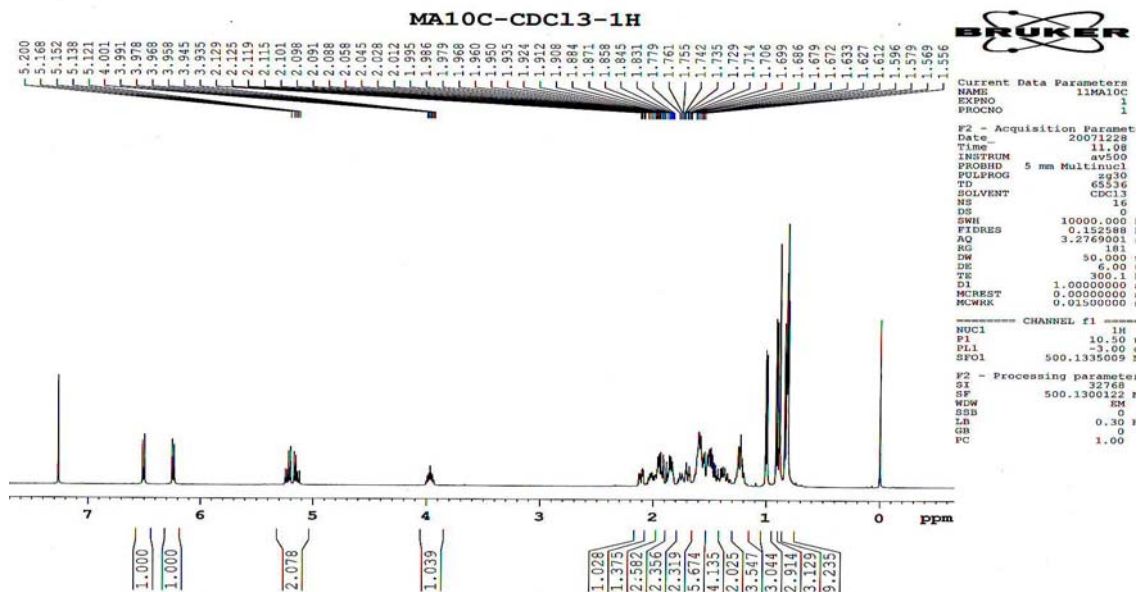
<sup>a</sup>recorded in CDCl<sub>3</sub>, <sup>b</sup>125 MHz, <sup>c</sup>500 MHz

Các kết quả phân tích nêu trên được đem so sánh với các dữ kiện phổ của hợp chất Ergosta-4,7,22-triene-3,6-dione [2] (bảng 2) và sự trùng khớp hoàn toàn về các giá trị phổ tương ứng kết hợp với các dữ kiện phổ khối lượng cho phép khẳng định hợp chất **MA10B** là Ergosta-4,7,22-triene-3,6-dione, hợp chất này đã được tìm thấy trước đó từ nấm *Ganoderma lucidum* [2]. Tuy nhiên, đây là lần đầu tiên hợp chất này được phân lập từ loài *Pyrrhoderma adamanticum*.



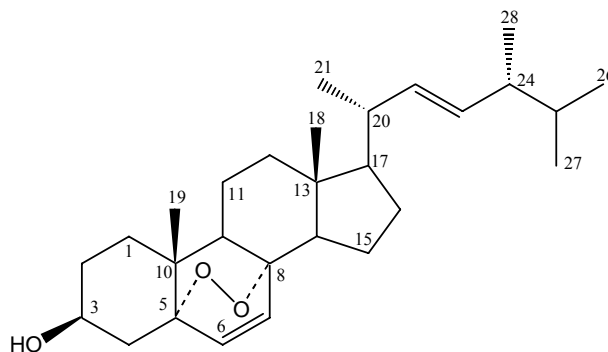
Hình 2.2.2.e. Phổ EI-MS của **MA10B**

### c. Hợp chất MA10C- Ergosterol peroxide



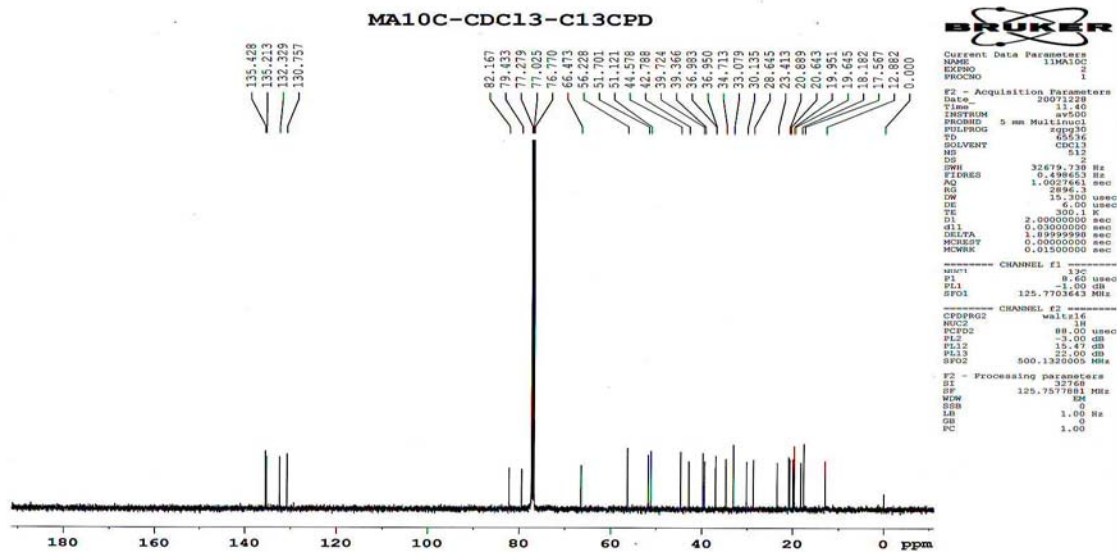
Hình 2.2.3.a. Phổ  $^1\text{H}$ -NMR của **MA10C**

Phổ cộng hưởng từ hạt nhân  $^1\text{H}$ -NMR của **MA10C** khá giống của **MA10A**, đặc trưng cho khung ergosterol. Nhưng trên phổ của **MA10C** mất đi tín hiệu của 1 proton olefin cô lập ở vị trí 4, thay vào đó xuất hiện thêm tín hiệu của 1 nhóm metilen.

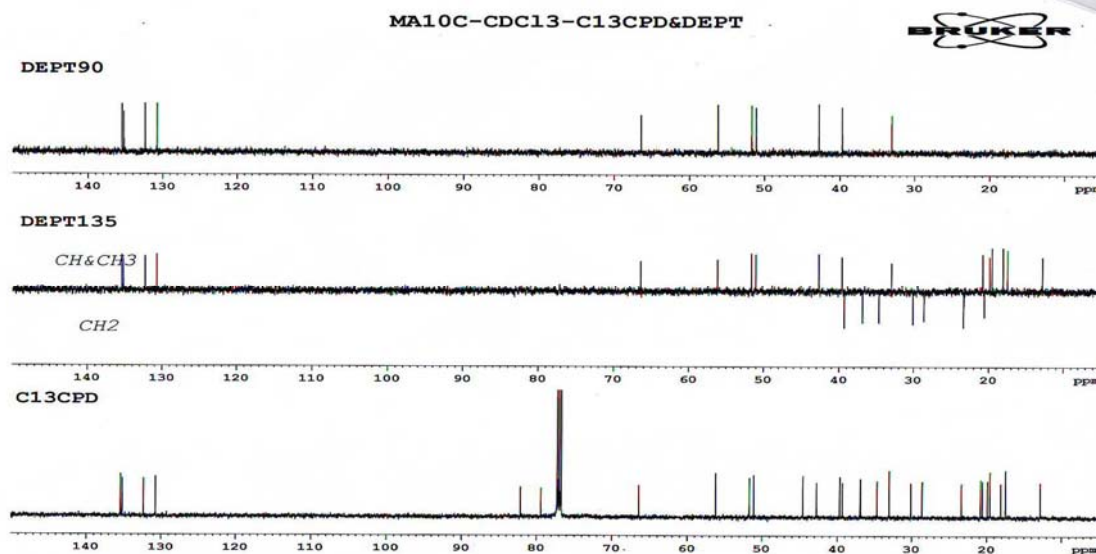


Hình 2.2.3.b. Cấu trúc hóa học của **MA10C**

Trên phổ  $^1\text{H}$ -NMR của **MA10C** cũng xuất hiện các tín hiệu đặc trưng của 2 proton của nối đôi nội vòng tại  $\delta_{\text{H}}$  6,24 ppm (1H, d,  $J = 8,5$  Hz, H-6) và 6,50 ppm (1H, d,  $J = 8,5$  Hz, H-7), 2 proton của nối đôi ngoại vòng có cấu hình *trans* tại  $\delta_{\text{H}}$  5,14 ppm (1H, dd,  $J = 15,5, 8,0$  Hz, H-22) và 5,26 ppm (1H, dd,  $J = 15,5, 8,0$  Hz, H-23), của 2 nhóm methyl bậc 4 tại  $\delta_{\text{H}}$  0,82 ppm (3H, s, H-18) và 0,88 ppm (3H, s, H-19), của 4 nhóm methyl bậc 3 tại  $\delta_{\text{H}}$  1,06 ppm (3H, d,  $J = 7,0$  Hz, H-21), 0,82 ppm (3H, d,  $J = 7,0$  Hz, H-26), 0,83 ppm (3H, d,  $J = 7,0$  Hz, H-27) và 0,91 ppm (3H, d,  $J = 7,0$  Hz, H-28).



Hình 2.2.3.c. Phổ <sup>13</sup>C-NMR của MA10C



Hình 2.2.3.d. Phổ DEPT của MA10C

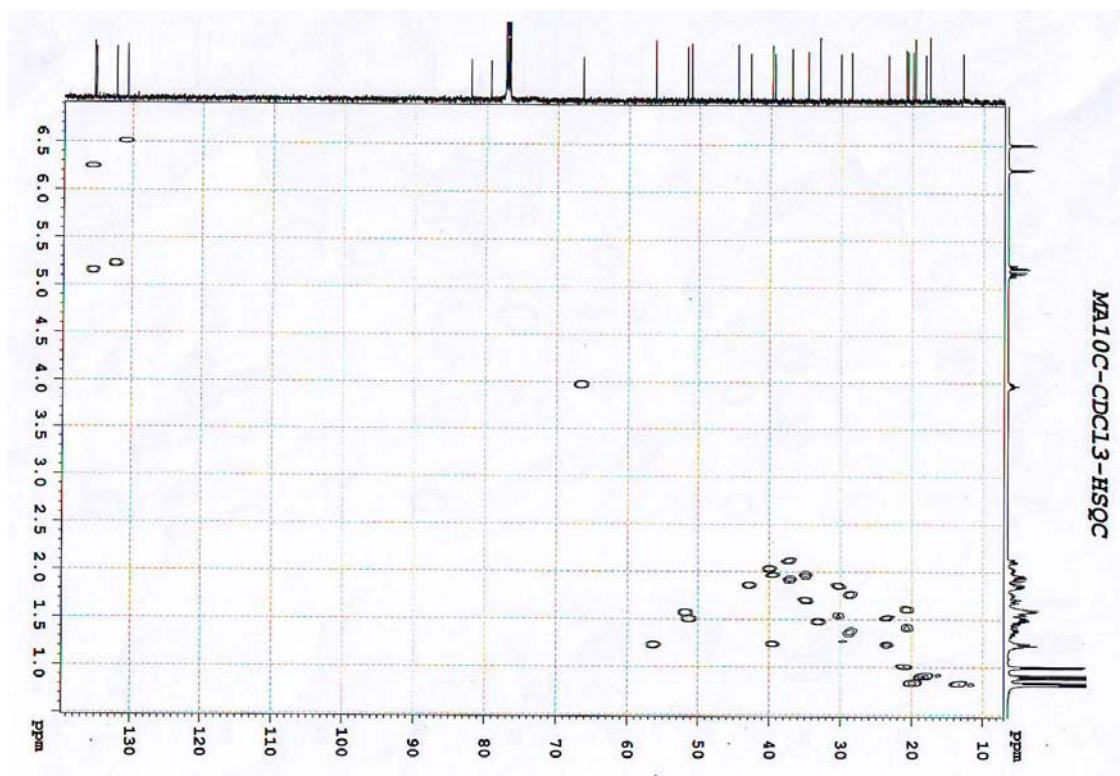
Các dữ kiện phổ <sup>13</sup>C- NMR của MA10C gần giống MA10A, nhất là phần mạch nhánh. Trên phổ của MA10C xuất hiện tín hiệu đặc trưng của 1 cacbon bậc 3 liên kết với oxi tại  $\delta_c$  66,47 ppm thay cho nhóm carbonyl ở vị trí 3 của MA10A. Ngoài ra còn xuất hiện các tín hiệu của 2 cacbon bậc 4 liên kết với oxi tại  $\delta_c$  82,17 ppm (C-5) và 79,43 ppm (C-8), điều này gợi ý cho ta về một cầu peroxide giữa chúng. Trên phổ <sup>13</sup>C- NMR và các phổ DEPT cũng xuất hiện các tín hiệu đặc trưng của 4 cacbon thế 2 của liên kết đôi tại  $\delta_c$  135,43 (C-6), 130,76 (C-7), 135,21 (C-22) và 132,33 (C-23), của 5 nhóm metin tại  $\delta_c$  51,70 (C-14), 56,23 (C-17), 39,72 (C-20), 42,79 (C-24) và 33,08 (C-25) và của 6 nhóm methyl tại  $\delta_c$  từ 12,88-23,41 ppm.

Bảng 3: Kết quả phổ NMR của MA10C

C	$\delta_c^a$ [3]	$\delta_c^{a,b}$	$\delta_H^{a,c}$ mul, (J in Hz)	HMBC (H to C)
1	34,9	34,71	1,92 m/1,71 m	3

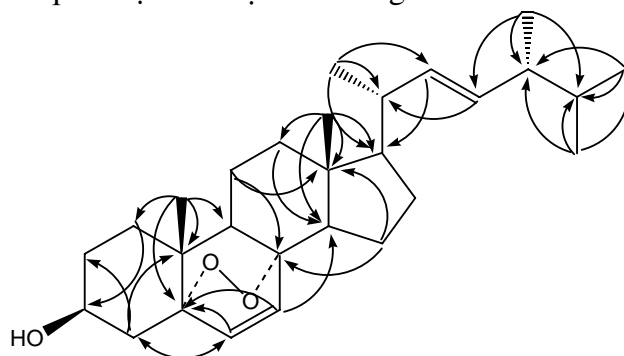
2	30,4	30,14	1,84 m/1,55 m	3
3	66,7	66,47	3,97 m	
4	37,2	36,95	2,10m/1,92 m	2, 6, 10
5	82,4	82,17	-	
6	135,7	135,43	6,24 d (8,5)	4, 5, 8, 10
7	131,0	130,76	6,50 d (8,5)	5, 9, 14
8	79,7	79,43	-	
9	51,4	51,12	1,51 m	
10	37,2	36,98	-	
11	23,6	23,41	1,52 m/1,24 m	8,13
12	39,6	39,37	1,97 m/1,25 m	14
13	44,8	44,58	-	
14	51,9	51,70	1,58 m	
15	20,9	20,64	1,60 m/1,41 m	13
16	28,9	28,65	1,76 m/1,37 m	
17	56,5	56,23	1,24 m	
18	13,1	12,88	0,82 s	12, 13, 14, 17
19	18,4	18,18	0,88 s	1, 5, 9, 10
20	40,0	39,72	2,17 m	17, 22, 23
21	21,1	20,89	1,06 d (7,0)	17, 20, 22
22	135,4	135,21	5,14 dd (15,0, 8,0)	21, 24
23	132,6	132,33	5,26 dd (15,0, 8,0)	21, 24, 25
24	43,0	42,79	1,86 m	22, 23
25	33,3	33,08	1,48 m	23
26	19,9	19,65	0,82 d (7,0)	24, 25, 27
27	20,2	19,95	0,83 d (7,0)	24, 25, 26
28	17,8	17,57	0,91 d (6,5)	23, 24, 25

<sup>a</sup>recorded in CDCl<sub>3</sub>, <sup>b</sup>125 MHz, <sup>c</sup>500 MHz

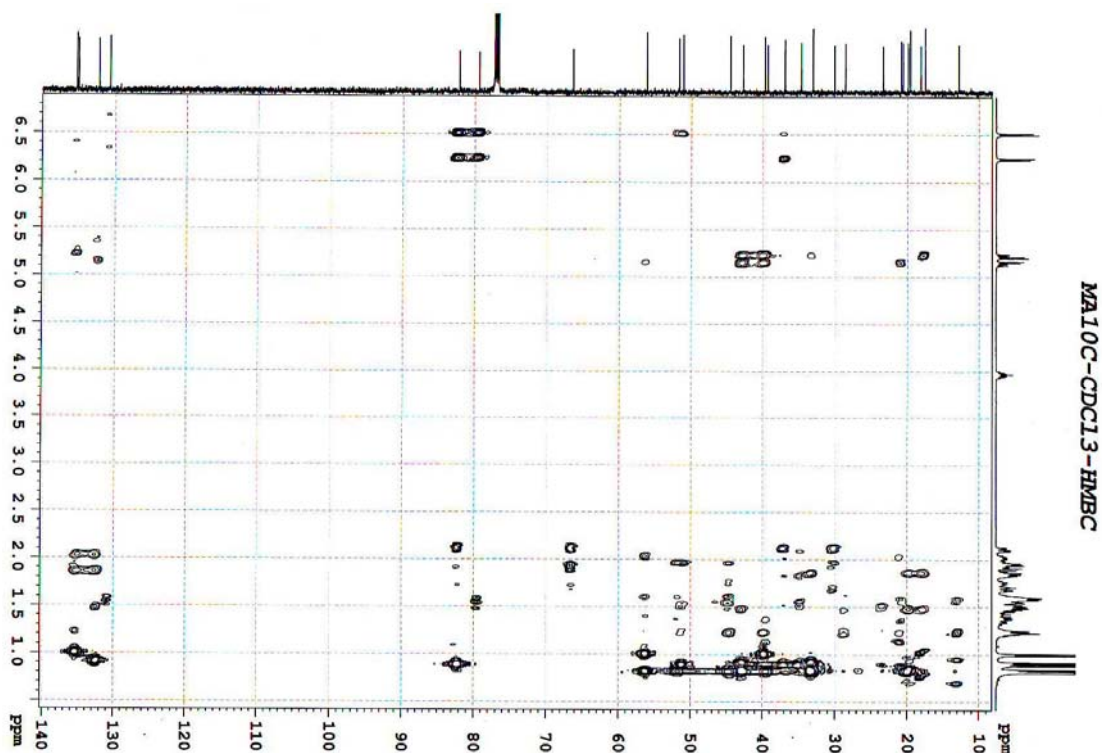


Hình 2.2.3.e. Phổ HSQC của **MA10C**

Để xác định các vị trí nhóm thế và kiểm tra các giá trị độ dịch chuyển hoá học của các vị trí, phổ HSQC và HMBC đã được đo. Qua các tương tác trên phổ HSQC xác định được các liên kết C-H của **MA10C**. Trên phổ HMBC, 2 nhóm methyl được khẳng định tại vị trí C-18 và C-19 bởi tương tác HMBC của H-18,  $\delta_H$  0,96 với C-12( $\delta_C$  39,37), C-13( $\delta_C$  44,58), C-17( $\delta_C$  56,23), C-14( $\delta_C$  51,70) và của H-19,  $\delta_H$  1,00 với C-1( $\delta_C$  34,71), C-5( $\delta_C$  82,17), C-9( $\delta_C$  51,12), C-10( $\delta_C$  36,98). Vị trí của 3 nhóm methyl còn lại trên mạch nhánh cũng được khẳng định vị trí qua các tương tác trên phổ HMBC. Kết quả được thể hiện trên bảng 3.



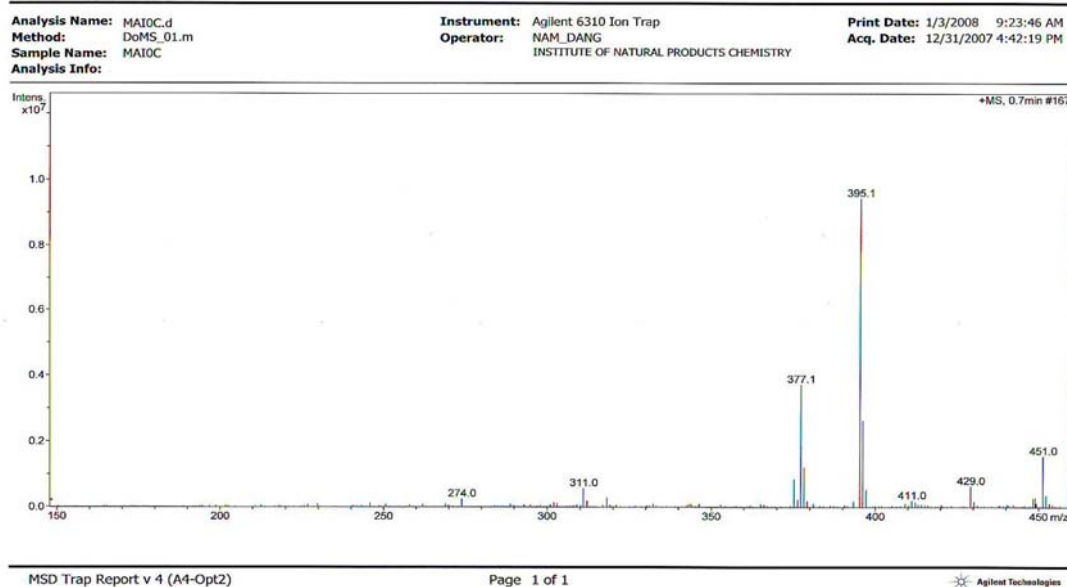
Hình 2.2.3.f. Tương tác HMBC của **MA10C**



Hình 2.2.3.g. Phổ HMBC của **MA10C**

Các kết quả phân tích nêu trên được kết hợp với các dữ kiện phổ khối lượng cho phép khẳng định hợp chất **MA10C** là Ergosterol peroxide. Dem so sánh với các dữ kiện phổ của hợp chất Ergosterol peroxide [3] cho thấy sự trùng khớp hoàn toàn về các giá trị phổ tương ứng. Hợp chất này đã được tìm thấy phổ biến từ các loài nấm. Ergosterol peroxide có hoạt tính chống ung thư và khuẩn lao.

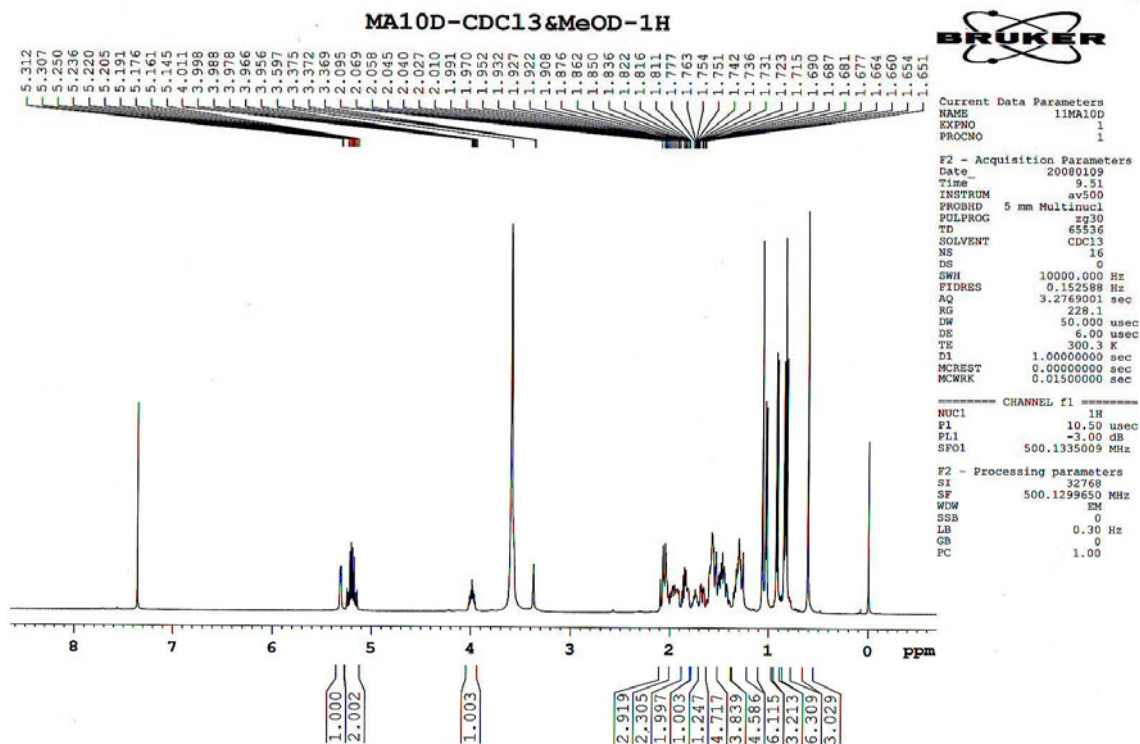
Display Report - Selected Window Selected Analysis



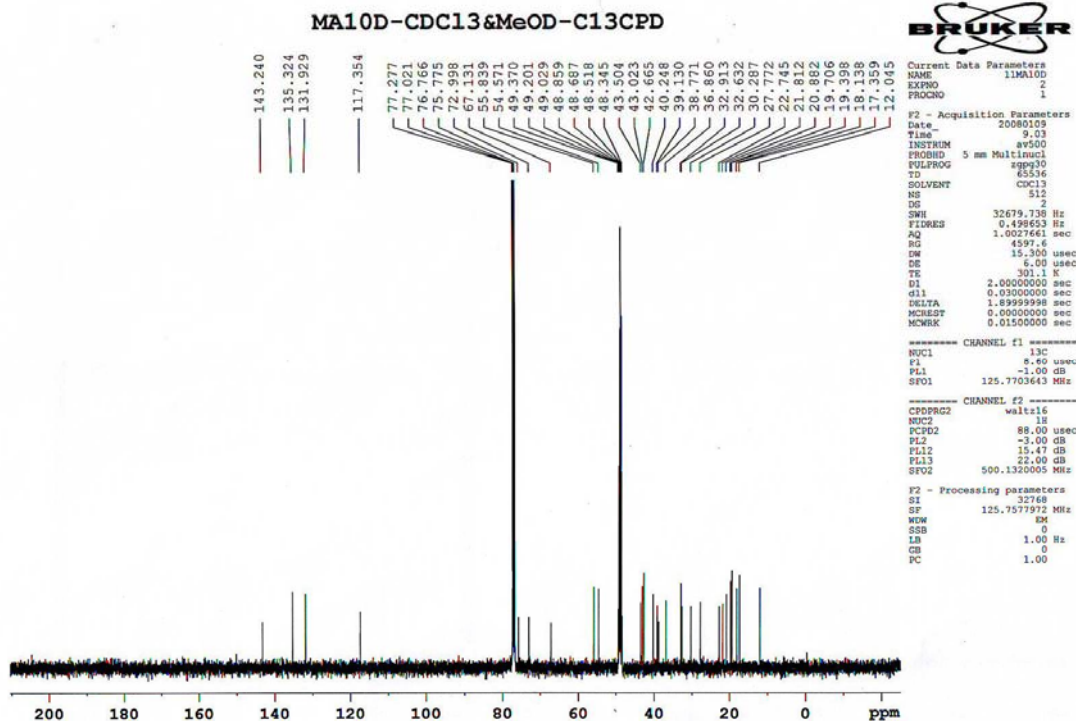
Hình 2.2.3.h. Phổ EI-MS của **MA10C**

**d. Hợp chất MA10D- Cerevisterol (Ergosta-7,22E-diene-3 $\beta$ ,5 $\alpha$ ,6 $\beta$ -triol)**

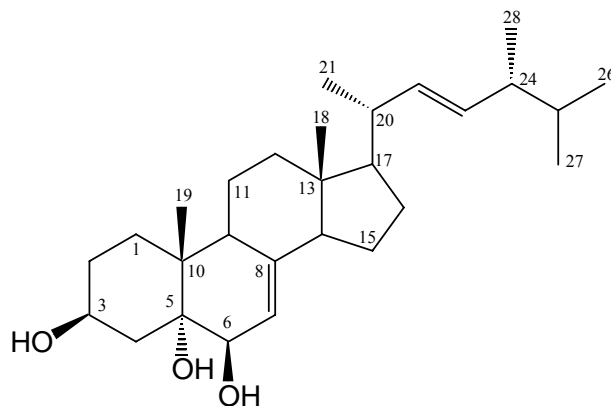
Phổ cộng hưởng từ hạt nhân  $^1\text{H}$ -NMR của **MA10D** gần giống **MA10C**, đặc trưng cho khung ergosterol. Trên phổ  $^1\text{H}$ -NMR của **MA10D** mất đi các tín hiệu của 2 proton của nối đôi nội vòng, chỉ còn 1 proton olefin biệt lập tại  $\delta_{\text{H}}$  5,31 ppm (1H, t,  $J = 2,5$  Hz, H-7). Giống như **MA10C**, **MA10D** cũng có 2 proton của nối đôi ngoại vòng có cấu hình *trans* tại  $\delta_{\text{H}}$  5,18 ppm (1H, dd,  $J = 15,3, 7,8$  Hz, H-22) và 5,24 ppm (1H, dd,  $J = 15,3, 7,0$  Hz, H-23), của 2 nhóm methyl bậc 4 tại  $\delta_{\text{H}}$  0,61 ppm (3H, s, H-18) và 1,06 ppm (3H, s, H-19), của 4 nhóm methyl bậc 3 tại  $\delta_{\text{H}}$  1,03 ppm (3H, d,  $J = 7,0$  Hz, H-21), 0,83 ppm (3H, d,  $J = 7,0$  Hz, H-26), 0,84 ppm (3H, d,  $J = 7,0$  Hz, H-27) và 0,93 ppm (3H, d,  $J = 7,0$  Hz, H-28).



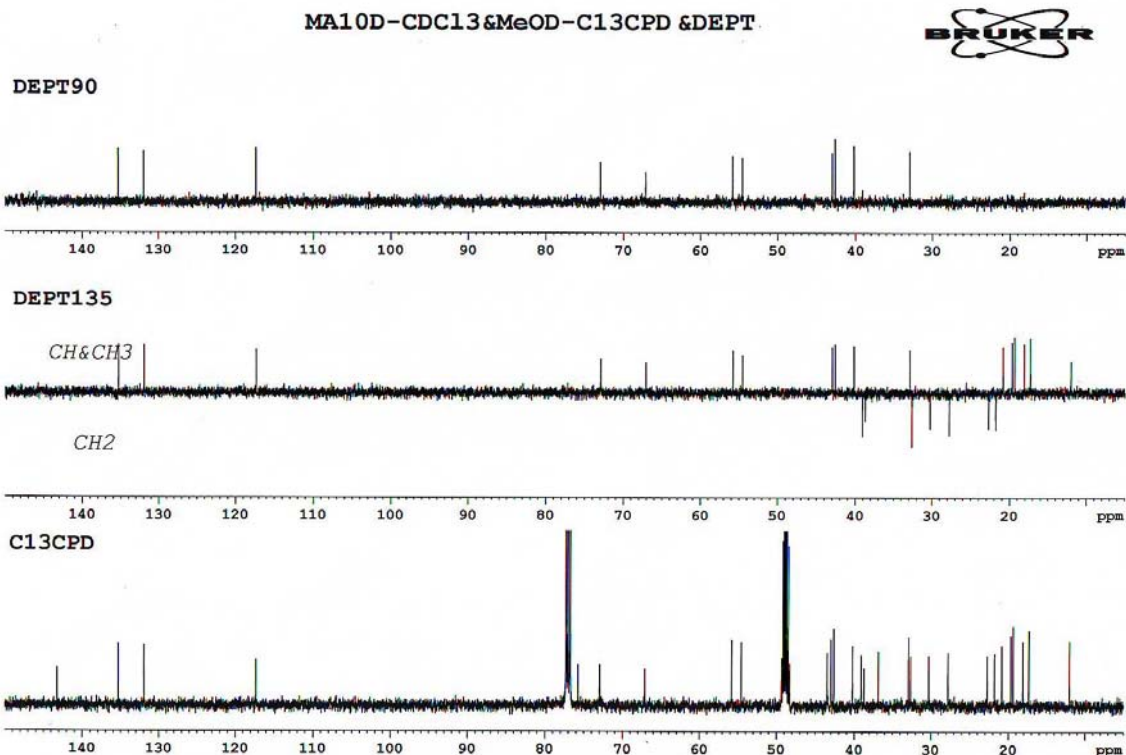
Hình 2.2.4.a. Phổ  $^1\text{H}$ -NMR của **MA10D**



Hình 2.2.4.b. Phổ  $^{13}\text{C}$ -NMR của MA10D



Hình 2.2.4.c. Cấu trúc hóa học của MA10D



Hình 2.2.4.c. Phổ DEPT của **MA10D**

Phổ  $^{13}\text{C}$ - NMR và các phổ DEPT của **MA10D** tương đối giống **MA10C**, thay vì cacbon olefin ở C-6 và cacbon bậc 4 gần với oxi ở C-8 của **MA10C** là cacbon liên kết với oxi ở C-6 và cacbon bậc 4 olefin ở C-8. Trên phổ  $^{13}\text{C}$ - NMR và các phổ DEPT của **MA10D** cũng xuất hiện các tín hiệu đặc trưng của 3 cacbon thế 2 của liên kết đôi tại  $\delta_{\text{C}}$  117,35 (C-7), 135,32 (H-22) và 131,93 (H-23, cacbon olefin bậc 3 tại  $\delta_{\text{C}}$  67,13 (C-3) và 73,00 (C-6), 1 cacbon olefin bậc 4 tại  $\delta_{\text{C}}$  75,77 (C-5) và của 6 methyl  $\delta_{\text{C}}$  từ 12,88-23,41 ppm.

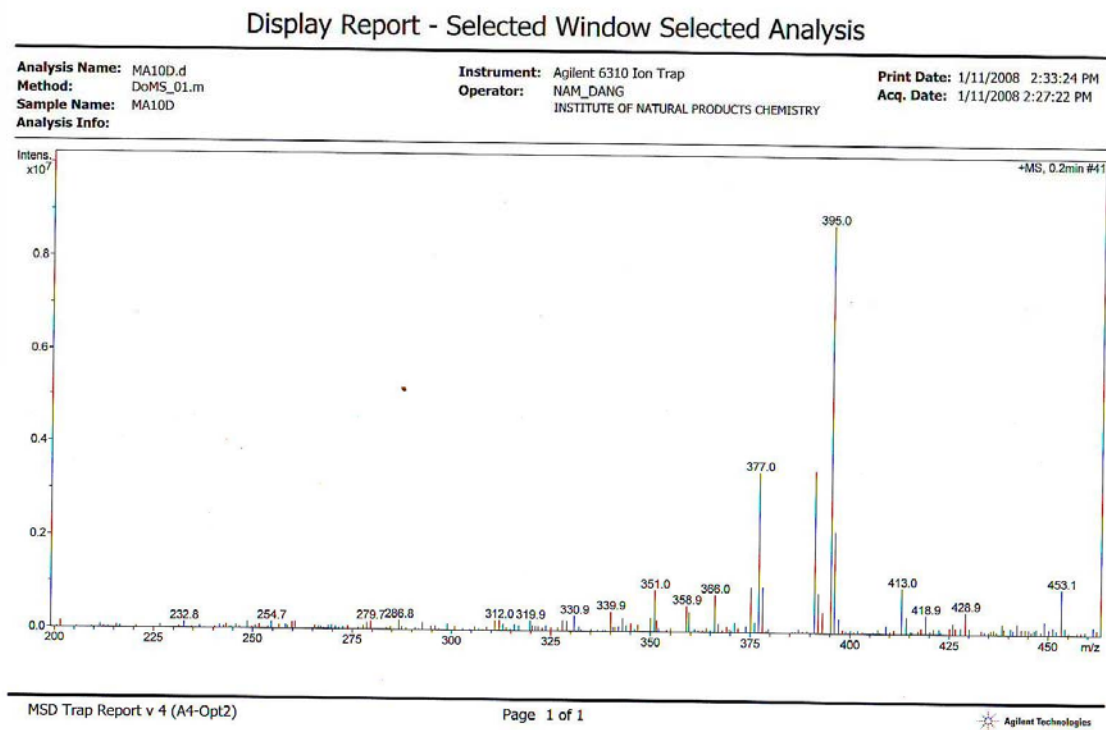
Bảng 4: Kết quả phổ NMR của **MA10D**

C	$\delta_{\text{C}}^{\text{a}}$ [4]	$\delta_{\text{C}}^{\text{a, b}}$	$\delta_{\text{H}}^{\text{a, b}}$ mul, (J in Hz)
1	33,0	32,63	3,99 m
2	30,4	30,29	
3	67,3	67,13	
4	39,2	39,13	
5	75,9	75,77	
6	73,1	73,00	5,31 t (2,5)
7	117,4	117,35	
8	143,5	143,24	
9	43,2	43,02	
10	37,0	36,86	
11	21,9	21,81	
12	38,9	38,27	

13	43,6	43,50	
14	54,7	54,57	
15	22,8	22,74	
16	27,9	27,77	
17	55,9	55,84	
18	12,2	12,04	0,61 s
19	18,4	18,14	1,06 s
20	40,6	40,25	
21	21,0	20,88	1,03 d (7,0)
22	135,4	135,32	5,18 dd (15,3, 7,8)
23	132,0	131,93	5,24 dd (15,3, 7,0)
24	42,7	42,67	
25	32,8	32,91	
26	19,8	19,71	0,84 d (7,0)
27	19,5	19,40	0,83 d (7,0)
28	17,5	17,36	0,93 d (7,0)

<sup>a</sup>recorded in  $CDCl_3 + CD_3OD$ , <sup>b</sup>125 MHz, <sup>c</sup>500 MHz

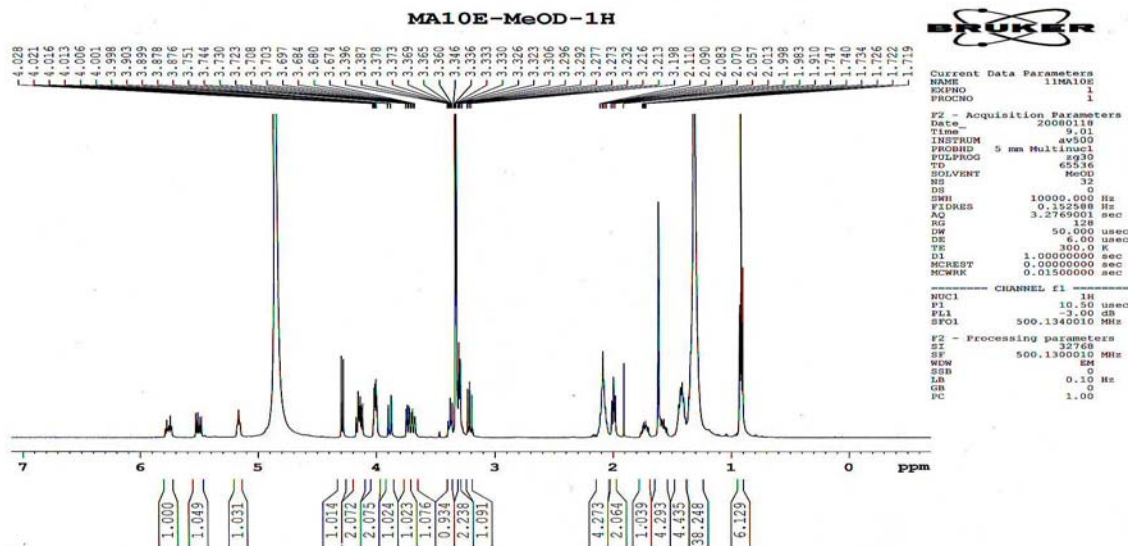
Các kết quả phân tích nêu trên được đem so sánh với các dữ kiện phổ của hợp chất Cerevisterol [4] và sự trùng khớp hoàn toàn về các giá trị phổ tương ứng kết hợp với các dữ kiện phổ khối lượng cho phép khẳng định hợp chất **MA10D** là Cerevisterol (Ergosta-7,22E-diene-3 $\beta$ ,5 $\alpha$ ,6 $\beta$ -triol). Hợp chất này đã được tìm thấy trước đây từ các loài nấm *Ganoderma applanatum*[4]. Cerevisterol có hoạt tính kháng proteaza HIV.



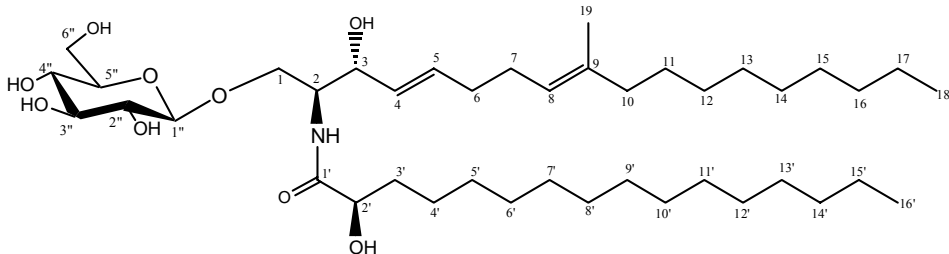
Hình 2.2.4.e. Phổ EI-MS của **MA10D**

#### e. Hợp chất MA10E - Cerebroside B

Hợp chất **MA10E** nhận được dưới dạng chất bột màu trắng với công thức phân tử là  $C_{41}H_{77}NO_9$ , được xác định bởi các dữ liệu phổ khối với píc ion  $[M+Na]^+$  tại 750,3 cùng với các dữ liệu phổ  $^1H$ -,  $^{13}C$ - NMR và các phổ DEPT.

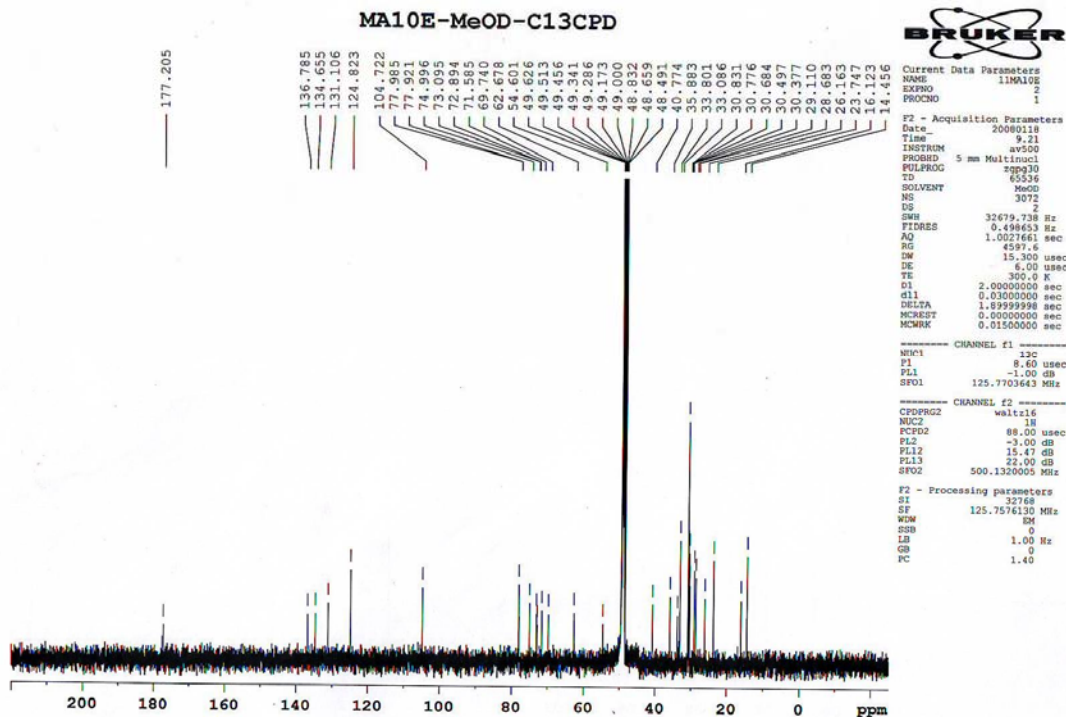


Hình 2.2.5.a. Phổ  $^1H$ -NMR của **MA10E**



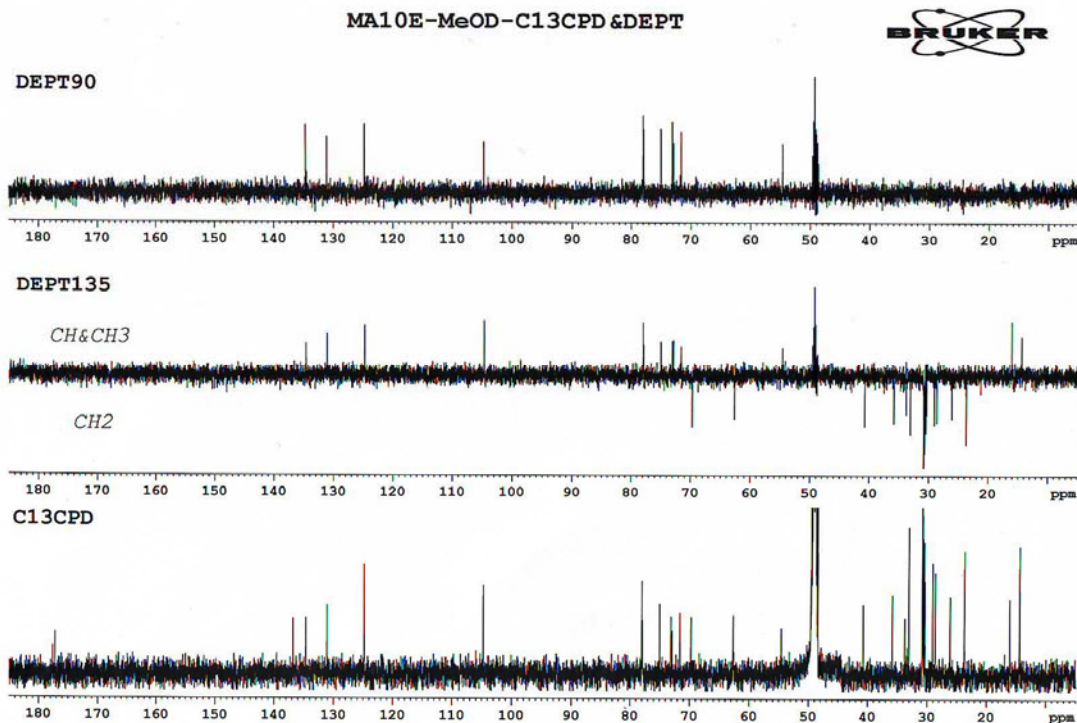
Hình 2.2.5.b. Cấu trúc hóa học của **MA10E**

Trên phổ  $^1H$ -NMR xuất hiện các tín hiệu đặc trưng của một glycosphingolipid với 3 nhóm methyl tại  $\delta_H$  0,92 (6H, t,  $J = 7,0$  Hz) và 1,62 (3H, s), tín hiệu bị che lấp của hai mạch hydrocacbon no dài tại  $\delta_H$  1,31 (42H, brs), một proton gắn với carbon anome tại  $\delta_H$  4,29 (1H, d,  $J = 8,0$  Hz).



**Hình 2.2.5.C. Phổ  $^{13}\text{C}$ -NMR của MA10E**

Trên phổ  $^{13}\text{C}$ -NMR xuất các hiện tín hiệu của một cacbon gắn với nitơ tại  $\delta_{\text{C}}$  54,60; 3 nhóm metyl tại  $\delta_{\text{C}}$  16,12 và 14,46 (x2); 4 cacbon olefin tại  $\delta_{\text{C}}$  136,79, 134,66, 131,11 và 124,82; 2 cacbon gắn với oxy tại  $\delta_{\text{C}}$  73,10 (x2), Thêm vào đó, 6 tín hiệu của một phân tử đường  $\beta$ -D-glucopyranoside xuất hiện tại  $\delta_{\text{C}}$  104,72 (C-1''), 78,00 (C-5''), 77,92 (C-3''), 75,00 (C-2''), 71,59 (C-4'') và 62,68 (C-6'').



#### Hình 2.2.5.d. Phổ DEPT của **MA10E**

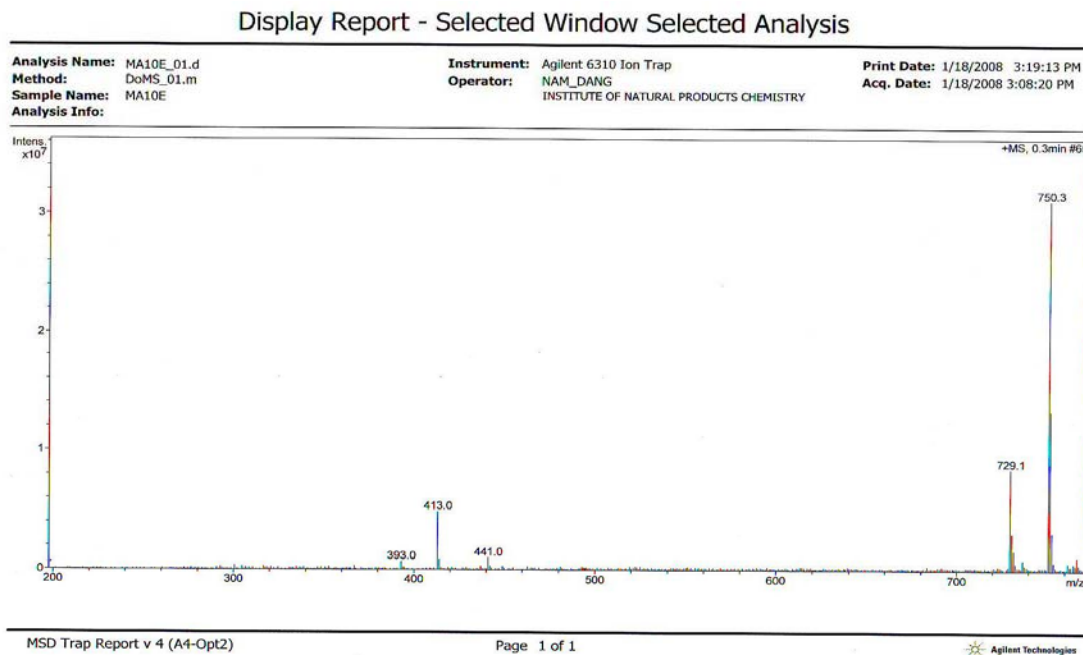
Các kết quả phân tích nêu trên được so sánh với các dữ kiện phổ của hợp chất Cerebroside B [5] và catacerebroside A[6] và thấy sự trùng khớp hoàn toàn về các giá trị phổ tương ứng. Cùng với khối lượng phân tử của **MA10E** là  $M=727$  đã được xác định bằng phổ khối lượng tại  $m/z$  750,3  $[M+Na]^+$  (Hình 2,2,1,f), cấu trúc của nó được xác định là 1-O- $\beta$ -D-glucopyranosyl-(2*S*,3*R*,4*E*,8*E*)-2-[(2*R*)-2-hydroxyhexadecanoylamino]-9-methyl-4,8-octadeca-diene-1,3-diol hay Cerebroside B. Hợp chất này đã được phân lập từ các loài *Pachybasium* sp., *Clitocybe* sp. và *Schizophyllum commune*. Hợp chất này cũng đã được chúng tôi phân lập từ nấm hươu thủ *Hericium erinaceus* [7]. Tuy nhiên, đây là lần đầu tiên nó được phân lập từ loài *Pyrrhoderma adamanticum*. Theo tài liệu đã công bố, hợp chất này kích thích sự biệt hóa tế bào, tăng cường sự hình thành quả thể ở nấm và có hoạt tính kháng một số chủng nấm.

Bảng 5: Kết quả phổ NMR của **MA10E**

C	$\delta_H^a$ [7]	$\delta_C^{a,b}$	$\delta_H^{a,c}$ mul, (J in Hz)
1	70,13	69,74	1,92 m/1,71 m
2	55,01	54,60	1,84 m/1,55 m
3	73,29	73,10	3,97 m
4	131,51	131,11	2,10m/1,92 m
5	135,04	134,66	-
6	34,02	33,08	6,24 d (8,5)
7	29,09	28,68	6,50 d (8,5)
8	125,22	124,82	-
9	137,18	136,79	1,51 m
10	41,18	40,77	-
11	29,52	29,11	1,52 m/1,24 m
12-15	30,79-31,24		
16	33,49	33,08	-
17	24,15	23,74	1,58 m
18	14,86	14,46	1,60 m/1,41 m
19	16,53	16,12	1,76 m/1,37 m
1'	177,60	177,21	1,24 m
2'	73,49	73,10	0,82 s
3'	36,28	35,88	0,88 s
4'	26,57	26,16	2,17 m
5-13'	30,79-31,24		
14'	33,49	33,08	5,14 dd (15,0, 8,0)
15'	24,15	23,75	5,26 dd (15,0, 8,0)
16'	14,86	14,46	1,86 m
1''	105,13	104,72	1,48 m
2''	75,39	75,00	0,82 d (7,0)
3''	78,31	77,92	0,83 d (7,0)

4"	71,97	71,59	0,82 d (7,0)
5"	78,38	78,00	0,83 d (7,0)
6"	63,08	62,68	0,91 d (6,5)

<sup>a</sup>recorded in MeOD, <sup>b</sup>125 MHz, <sup>c</sup>500 MHz



*Hình 2.2.5.e. Phổ ESI-MS của MA10E*

**Bảng IV.3.11. Dữ liệu phổ <sup>13</sup>C-NMR của hợp chất 1 và 2 (chủng HT)**

STT	Hợp chất 1 (CDCl <sub>3</sub> , 125MHz)	Tài liệu [1,2] (CDCl <sub>3</sub> , 125MHz)	Hợp chất 2 (CDCl <sub>3</sub> , 125MHz)	Tài liệu [3] (CDCl <sub>3</sub> , 125MHz)
1	39.3	39.5	38.4	38.3
2	30.1	30.1	32.0	31.7
3	66.5	66.5	70.5	70.0
4	34.7	36.8	40.8	40.5
5	82.2	82.1	139.8	139.3
6	135.4	135.4	119.6	119.5
7	130.8	130.8	116.3	115.9
8	79.4	79.5	141.3	140.7
9	51.1	51.1	46.3	46.2
10	36.9	36.9	37.1	37.0
11	20.6	20.6	21.1	21.1
12	36.9	39.5	39.1	39.1
13	44.6	44.7	42.8	42.7
14	51.7	51.6	54.6	54.4
15	23.4	23.4	23.0	23.6
16	28.6	28.2	28.3	28.2
17	56.2	56.4	55.8	55.7

18	12.9	12.9	12.1	12.1
19	18.2	18.7	16.3	16.3
20	39.7	39.7	40.4	40.2
21	19.6	19.6	21.1	21.1
22	132.3	132.3	132.0	131.5
23	135.2	135.2	135.6	135.0
24	42.8	42.8	42.8	42.7
25	33.1	33.0	33.1	33.0
26	19.9	19.9	20.0	19.9
27	20.9	20.7	19.6	19.6
28	17.6	17.5	17.6	17.6

## II. CHỨNG HẦU THỦ (Phương pháp 1)

### Hàng số vật lý và dữ kiện phổ của các hợp chất

#### 2.1.a. Hợp chất MH1 - Cerebroside B.

Chất bột màu trắng, điểm chảy 180-190°C, phổ khối lượng ESI-MS:  $m/z$  726,6  $[M-H]^+$ ,  $m/z$  750,5  $[M+Na]^+$ ,  $m/z$  728,3  $[M+H]^+$ ,  $m/z$  710,5  $[M-H_2O+H]^+$ ,  $m/z$  548,3  $[M-glucose+H]^+$  ( $C_{41}H_{77}NO_9$ ,  $M = 727$ ).

$^1H$ -NMR (500 MHz,  $CD_3OD$ ) 3,73 (1H,  $H_a-1$ ), 4,13 (1H,  $H_b-1$ ), 4,01 (1H, H-2), 4,16 (1H, H-3), 5,50 (1H, dd,  $J = 7,0, 15,5$  Hz, H-4), 5,76 (1H, dt,  $J = 15,5, 6,0$  Hz, H-5), 2,07 (2H, H-6), 2,10 (2H, H-7), 5,17 (1H, t,  $J = 7,0$  Hz, H-8), 2,00 (1H, H-10), 1,43 (1H, H-11), 1,31 (2H, H-16), 1,33 (2H, H-17), 0,92 (3H, t,  $J = 7,0$  Hz, H-18) 1,62 (3H, s, H-19), 4,01 (1H, H-2'), 1,57 (1H,  $H_a-3'$ ), 1,74 (1H,  $H_b-3'$ ), 1,44 (2H, H-4'), 1,31 (2H, H-14'), 1,33 (2H, H-15'), 0,92 (3H, t,  $J = 7,0$  Hz, H-16'), 4,29 (1H, d,  $J = 7,5$  Hz, H-1''), 3,22 (1H, H-2''), 3,37 (1H, H-3''), 3,31 (1H, H-4''), 3,30 (1H, H-5''), 3,69 (1H,  $H_a-6''$ ) và 3,89 (1H, dd,  $J = 2,0, 11,5$  Hz,  $H_b-6''$ ) ppm.

$^{13}C$ -NMR (125 MHz,  $CD_3OD$ ) 70,13 (t, C-1), 55,01 (d, C-2), 73,29 (d, C-3), 131,51 (d, C-4), 135,04 (d, C-5), 34,02 (t, C-6), 29,09 (t, C-7), 125,22 (d, C-8), 137,18 (s, C-9), 41,18 (t, C-10), 29,52 (t, C-11), 30,79-31,24 (t, C-12 đến 15), 33,49 (t, C-16), 24,15 (t, C-17), 14,86 (q, C-18), 16,53 (q, C-19), 177,60 (s, C-1'), 73,49 (d, C-2'), 36,28 (t, C-3'), 26,57 (t, C-4'), 30,79-31,24 (t, C-5' đến 13'), 33,49 (t, C-14'), 24, 15 (t, C-15'), 14,86 (q, C-16'), 105,13 (d, C-1''), 75,39 (d, C-2''), 78,31 (d, C-3''), 71,97 (d, C-4''), 78,38 (d, C-5'') và 63,08 (t, C-6'') ppm.

#### 2.1.b. Hợp chất MH2 - Hericenone D

Chất kết tinh màu trắng, điểm chảy 41-43°C, phổ khối lượng ESI-MS:  $m/z$  599,2  $[M + H]^+$ ,  $m/z$  597,4  $[M - H]^-$  ( $C_{37}H_{58}O_6$ ,  $M = 598$ ).

$^1H$ -NMR (500 MHz,  $CDCl_3$ )  $\delta_H$ : 6,53 (1H, s, H-6), 5,32 (2H, s, H-7), 10,11 (1H, s, H-8), 3,91 (3H, s, H-9), 3,40 (2H, d,  $J = 7,5$  Hz, H-1'), 5,32 (1H, d,  $J = 7,5$  Hz, H-2'), 3,00 (2H, s, H-4'), 6,09 (1H, t,  $J = 1,0, 1,5$  Hz, H-6'), 1,84 (3H, d,  $J = 1,5$  Hz, H-8'), 2,12 (3H, d,  $J = 1,0$  Hz, H-9'), 1,78 (3H, d,  $J = 0,5$  Hz, H-10'), 2,33 (2H, d,  $J = 7,5$  Hz, H-2''), 1,62 (2H, m, H-3''), 1,25 (26H, m, H-4''-17''), 0,88 (3H, m, H-18'') và 12,37 (1H, s, OH) ppm.

$^{13}\text{C}$ -NMR (125 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta_{\text{C}}$ : 138,70 (s, C-1), 112,91 (s, C-2), 162,94 (s, C-3), 117,33 (s, C-4), 163,49 (s, C-5), 105,55 (d, C-6), 62,90 (t, C-7), 193,10 (d, C-8), 55,93 (q, C-9), 21,62 (t, C-1'), 126,27 (d, C-2'), 130,35 (s, C-3'), 55,55 (t, C-4'), 199,54 (s, C-5'), 122,85 (d, C-6'), 155,42 (s, C-7'), 27,66 (q, C-8'), 20,67 (q, C-9'), 16,41 (q, C-10'), 173,20 (s, C-1''), 34,25 (t, C-2''), 24,89 (t, C-3''), 29,13-31,94 (t, C-4''-17'') và 14,12(q, C-18'') ppm.

### 2.1.c. Hợp chất MH3 - Ergosterol

Chất tinh thể hình kim màu trắng, điểm chảy 168°C, phổ khối lượng ESI-MS:  $m/z$  397,3  $[\text{M} + \text{H}]^+$  ( $\text{C}_{28}\text{H}_{44}\text{O}$ ,  $\text{M} = 396$ )

$^1\text{H}$ -NMR (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta_{\text{H}}$ : 1,25 (1H, m, H-1a), 1,75 (1H, m, H-1b), 1,50 (1H, m, H<sub>a</sub>-2), 1,78 (1H, m, H<sub>b</sub>-2), 3,63 (1H, m, H-3), 2,28 (2H, t,  $J = 13,5$  Hz, H-4), 5,56 (1H, dd,  $J = 2,0, 5,5$  Hz, H-6), 5,38 (1H, m, H-7), 1,97 (1H, m, H-9), 1,65 (1H, m, H-11), 1,34 (1H, m, H<sub>a</sub>-12), 1,90 (1H, m, H<sub>b</sub>-12), 1,92 (1H, m, H-14), 1,67 (1H, m, H-15), 1,28 (1H, m, H<sub>a</sub>-16), 1,74 (1H, m, H<sub>b</sub>-16), 1,25 (1H, m, H-17), 0,63 (3H, s, H-18), 0,95 (3H, s, H-19), 2,05 (1H, m, H-20), 1,03 (3H, d,  $J = 6,5$  Hz, H-21), 5,17 (1H, dd,  $J = 8,5, 15,5$  Hz, H-22), 5,22 (1H, dd,  $J = 8,5, 15,5$  Hz, H-23), 1,76 (1H, m, H-24), 1,38 (1H, m, H-25), 0,84 (3H, d,  $J = 6,5$  Hz, H-26), 0,82 (3H, d,  $J = 6,5$  Hz, H-27) và 0,91 (3H, d,  $J = 6,5$  Hz, H-28) ppm.

$^{13}\text{C}$ -NMR (125 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta_{\text{C}}$ : 38,39 (t, C-1), 32,02 (t, C-2), 70,47 (d, C-3), 40,83 (t, C-4), 141,36 (s, C-5), 119,60 (d, C-6), 116,30 (d, C-7), 139,80 (s, C-8), 46,27 (d, C-9), 37,04 (s, C-10), 21,13 (t, C-11), 39,11 (t, C-12), 42,41 (s, C-13), 54,57 (d, C-14), 23,01 (t, C-15), 28,29 (t, C-16), 55,76 (d, C-17), 12,06 (q, C-18), 16,30 (q, C-19), 40,82 (d, C-20), 21,11 (q, C-21), 135,60 (d, C-22), 131,99 (d, C-23), 42,85 (d, C-24), 33,10 (d, C-25), 19,66 (q, C-26), 19,96 (q, C-27) và 17,62 (q, C-28) ppm.

### 2.1.d. Hợp chất MH4 - Ergosterol peroxide

Chất tinh thể hình kim màu trắng, điểm chảy 181-183°C, phổ khối lượng ESI-MS:  $m/z$  429,3  $[\text{M} + \text{H}]^+$  ( $\text{C}_{28}\text{H}_{44}\text{O}_3$ ,  $\text{M} = 426$ ).

$^1\text{H}$ -NMR (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 1,56 (1H, m, H<sub>a</sub>-1), 1,85 (1H, m, H<sub>b</sub>-1), 1,72 (1H, m, H<sub>a</sub>-2), 1,96 (1H, m, H<sub>b</sub>-2), 3,97 (1H, m, H-3), 1,27 (1H, m, H<sub>a</sub>-4), 1,97 (1H, m, H<sub>b</sub>-4), 6,24 (1H, d,  $J = 8,5$  Hz, H-6), 6,50 (1H, d,  $J = 8,5$  Hz, H-7), 1,51 (1H, m, H-9), 1,41 (1H, m, H<sub>a</sub>-11), 1,62 (1H, m, H<sub>b</sub>-11), 1,55 (1H, m, H<sub>a</sub>-12), 2,11 (1H, m, H<sub>b</sub>-12), 1,58 (1H, m, H-14), 1,25 (1H, m, H<sub>a</sub>-15), 1,53 (1H, m, H<sub>b</sub>-15), 1,37 (1H, m, H<sub>a</sub>-16), 1,78 (1H, m, H<sub>b</sub>-16), 1,24 (1H, m, H-17), 0,86 (3H, s, H-18), 0,88 (3H, s, H-19), 2,03 (1H, m, H-20), 1,01 (3H, d,  $J = 7,0$  Hz, H-21), 5,14 (1H, dd,  $J = 8,5, 15,5$  Hz, H-22), 5,22 (1H, dd,  $J = 8,5, 15,5$  Hz, H-23), 1,87 (1H, m, H-24), 1,50 (1H, m, H-25), 0,88 (3H, d,  $J = 6,6$  Hz, H-26), 0,83 (3H, d,  $J = 6,5$  Hz, H-27) và 0,91 (3H, d,  $J = 6,5$  Hz, H-28) ppm.

$^{13}\text{C}$ -NMR (125 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ): 30,09 (t, C-1), 34,71 (t, C-2), 66,49 (d, C-3), 39,37 (t, C-4), 82,17 (s, C-5), 135,22 (d, C-6), 130,75 (d, C-7), 79,44 (s, C-8), 51,12 (d, C-9), 36,99 (s, C-10), 20,64 (t, C-11), 39,91 (t, C-12), 44,58 (s, C-13), 51,70 (d, C-14), 23,42 (t, C-15), 28,65 (t, C-16), 56,23 (d, C-17), 12,88 (q, C-18), 18,18 (q, C-19), 39,73 (d, C-20), 20,89 (q, C-21), 135,44 (d, C-22), 132,33 (d, C-23), 42,79 (d, C-24), 33,08 (d, C-25), 19,65 (q, C-26), 19,96 (q, C-27), và 17,57 (q, C-28) ppm.

### 2.1.e. Hợp chất MH5 - $\beta$ -Adenosine

Chất tinh thể hình kim màu trắng, điểm chảy 234-235°C, phổ khối lượng ESI-MS:  $m/z$  267,8  $[M + H]^+$ , 289,8  $[M + Na]^+$  ( $C_{10}H_{13}N_5O_4$ ,  $M = 267$ ).

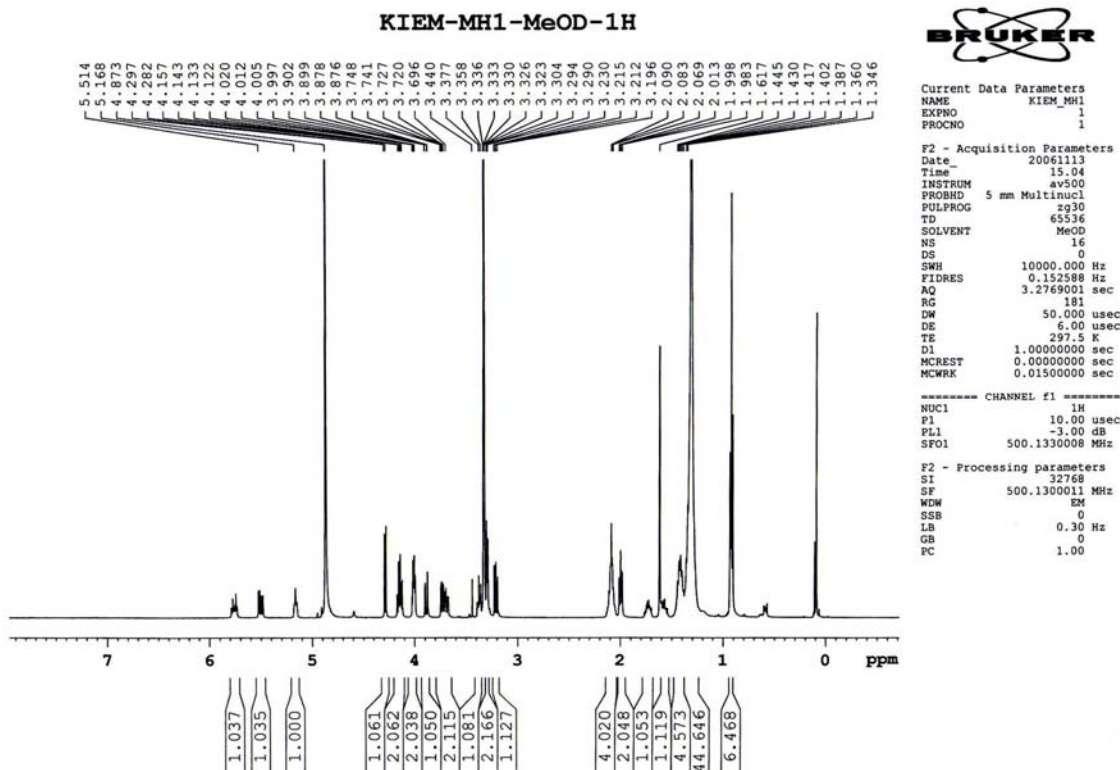
$^1H$ -NMR (500 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta_H$ : 8,14 (1H, s, H-2), 8,34 (1H, s, H-8), 5,88 (1H, d,  $J = 6,5$  Hz, H-1'), 4,61 (1H, dd,  $J = 4,0, 10,5$ , H-2'), 4,15 (1H, br s, H-3') 3,97 (1H, dd,  $J = 3,5, 6,5$  Hz, H-4'), 3,57 (1H, m, H-5'a), 3,68 (1H, m, H-5'b), 7,32 (2H, s,  $NH_2$ ), 5,42 (1H, OH-2'), 5,17 (1H, d,  $J = 3,0$ , OH-3') và 5,43 (1H, OH-5') ppm

$^{13}C$ -NMR (125 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta_C$ : 152,41 (d, C-2), 149,08 (s, C-4), 119,37 (s, C-5), 156,17 (s, C-6), 139,95 (d, C-8), 87,95 (d, C-1'), 73,47 (d, C-2'), 70,68 (d, C-3'), 85,92 (d, C-4'), 61,69 (t, C-5') ppm.

## Xác định cấu trúc hóa học của các chất.

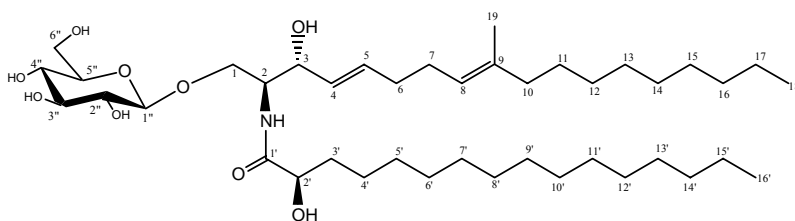
### 2.2.1. Hợp chất MH1 - Cerebroside B.

Hợp chất MH1 nhận được dưới dạng chất bột màu trắng với công thức phân tử là  $C_{41}H_{77}NO_9$  được xác định bởi các dữ liệu phổ khối với pic ion  $[M+Na]^+$  tại 750,5,  $[M+H]^+$  tại 728,3 và  $[M-H]^+$  tại 726,6 cùng với các dữ liệu phổ  $^1H$ -,  $^{13}C$ - NMR và các phổ DEPT.

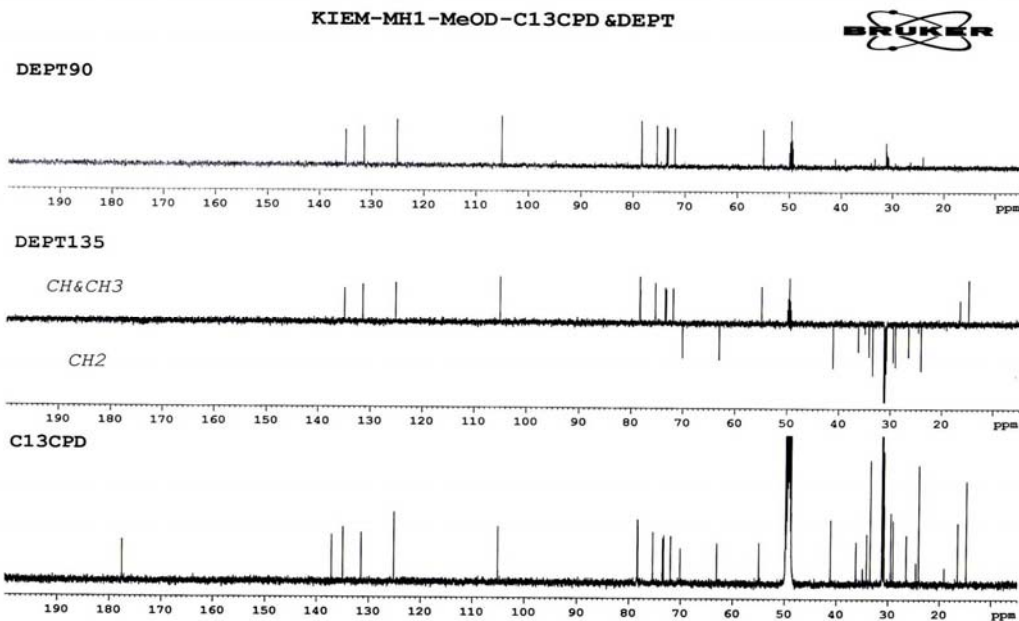


Hình 2.2.1.a. Phổ  $^1H$ -NMR của MH1

Trên phổ  $^1H$ -NMR xuất hiện các tín hiệu đặc trưng của một glycosphingolipid với 3 nhóm methyl tại  $\delta_H$  0,92 (6H, t,  $J = 7.0$  Hz) và 1,62 (3H, s), tín hiệu bị che lấp của hai mạch hydrocarbon no dài tại  $\delta_H$  1,31 (44H, brs), một proton gắn với carbon anome tại  $\delta_H$  4,29 (1H, d,  $J = 7,5$  Hz).

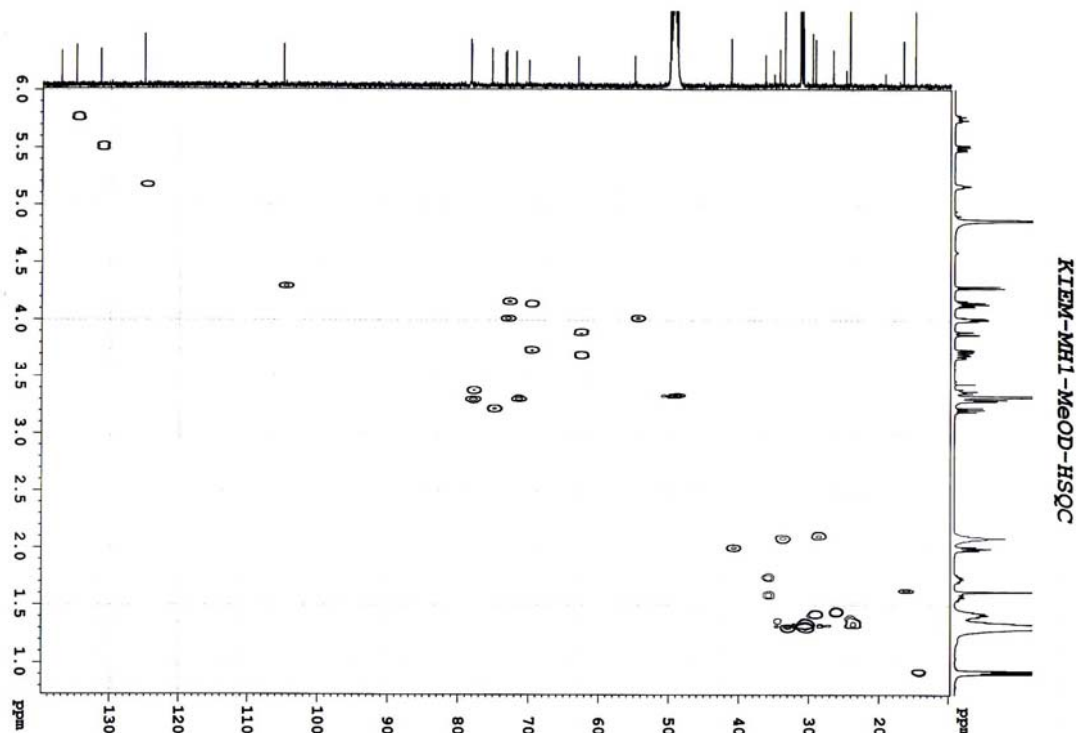


Hình 2.2.1.b. Cấu trúc hóa học của MH1



Hình 2.2.1.c. Phổ  $^{13}\text{C}$ -NMR và các phổ DEPT của MH1

Trên phổ  $^{13}\text{C}$ -NMR xuất các hiện tín hiệu của một cacbon gắn với nitơ tại  $\delta_{\text{C}}$  55,01; 3 nhóm methyl tại  $\delta_{\text{C}}$  16,53 và 14,86 (x2); 4 cacbon olefin tại  $\delta_{\text{C}}$  137,18, 135,04, 131,51 và 125,22; 2 cacbon gắn với oxy tại  $\delta_{\text{C}}$  73,49 và 73,29. Thêm vào đó, 6 tín hiệu của một phân tử đường  $\beta$ -D-glucopyranoside xuất hiện tại  $\delta_{\text{C}}$  105,13 (C-1''), 78,38 (C-5''), 78,31 (C-3''), 75,39 (C-2''), 71,97 (C-4'') và 63,08 (C6'').



Hình 2.2.1.d. Phổ HSQC của MH1

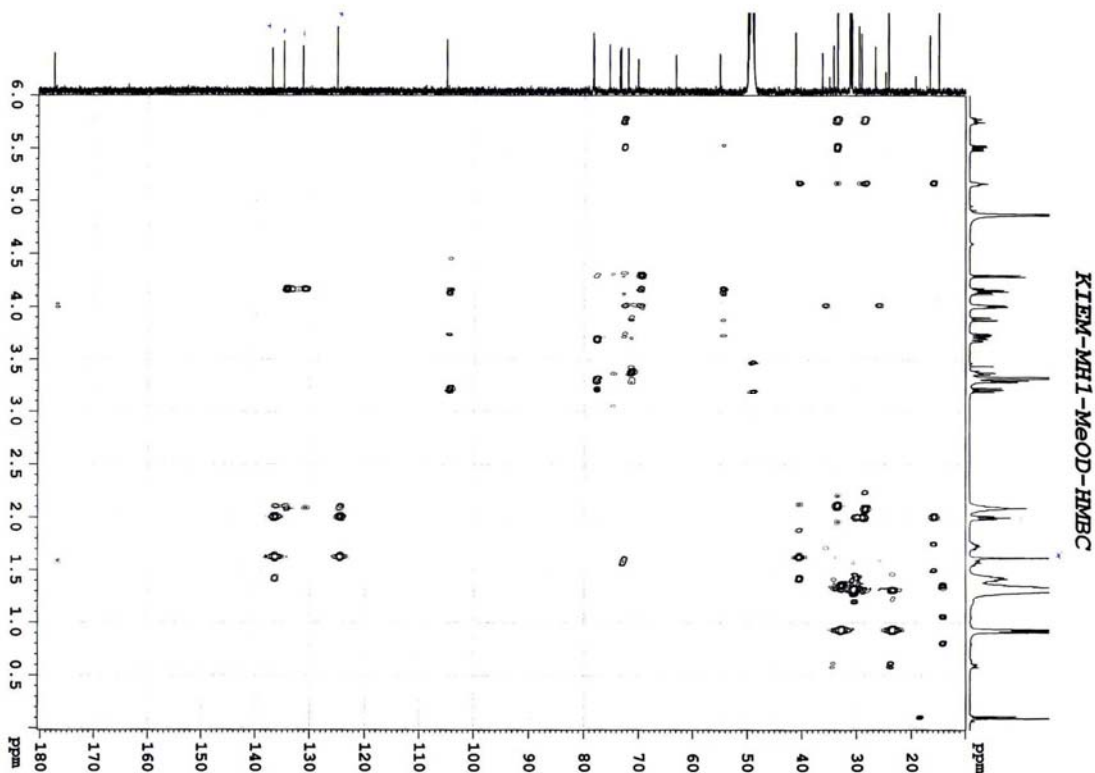
Trên phổ HMBC xuất hiện tương tác của pic proton anome tại  $\delta_H$  4,29 (1H, d,  $J=7,5$  Hz) với cacbon metylen ở  $\delta_C$  70,13 (C-1). Tín hiệu singlet tại vị trí  $\delta_H$  1,62 cho phép khẳng định có một nhóm methyl phải được gắn vào một trong 2 liên kết đôi. Cấu hình *trans* của nối đôi ở vị trí 4-5 được xác định bởi hằng số tương tác vicinal lớn ( $J_{4-5} = 11.5$  Hz). Theo các tài liệu đã công bố [1, 2], các cerebroside từ nấm thường chứa: đường glucose, bazơ sphingoid là (4*E*,8*E*)-9-methyl-4,8-sphingadienine và axit béo chứa nhóm hydroxyl tại vị trí cacbon số 2 với độ dài mạch từ 14-18 cacbon hay từ 22-26 cacbon. Các phân tích chi tiết phổ  $^1H$ -,  $^{13}C$ -NMR, Dept và các tương tác trên phổ HMBC (bảng 1) khẳng định sự có mặt của đường glucose, bazơ sphingoid là (4*E*,8*E*)-9-methyl-4,8-sphingadienine và axit béo chứa nhóm hydroxyl tại vị trí cacbon số 2.

*Bảng 1: Kết quả phổ NMR của MHI*

C	$\delta_C^{*,a}$ [3]	$\delta_C^{#,b}$ [4]	$\delta_C^{b,c}$	$\delta_H^{c,d}$ (J, Hz)	HMBC (H→C)
1	70,1 t	70,3 t	70,13 t	3,73/4,13	C-2, 1'
2	54,5 d	55,1 d	55,01 d	4,01	C-1, 3
3	72,3 d	73,4 d	73,29 d	4,16	C-1, 2, 4, 5
4	131,8 d	131,6 d	131,51 d	5,50 (dd, 7,0, 15,5)	C-2, 3, 6
5	132,3 d	135,1 d	135,04 d	5,76 (dt, 15,5, 6,0)	C-3, 6, 7
6	33,0 t	34,9 t	34,02 t	2,07	C-5, 7
7	28,1 t	29,2 t	29,09 t	2,10	C-6, 8
8	124,1 d	125,3 d	125,22 d	5,17 (t, 7,0)	C-6, 7, 10, 19
9	136,0 s	137,3 s	137,18 s	-	
10	39,9 t	41,3 t	41,18 t	2,00	C-8, 9, 11, 19
11	29,5-29,9 t	29,5 t	29,52 t	1,43	
12-15	29,5-29,9 t	30,8-31,4 t	30,79-31,24 t		
16	32,0 t	33,6 t	33,49 t	1,31	
17	22,9 t	24,2 t	24,15 t	1,33	
18	14,2 q	15,0 q	14,86 q	0,92 (t, 7,0)	C-16, 17
19	16,0 q	16,7 q	16,53 q	1,62 (s)	C-8, 9, 10
1'	-	177,7 s	177,60 s	-	
2'	72,4 d	73,6 d	73,49 d	4,01	C-1', 3', 4'
3'	35,6 t	36,4 t	36,28 t	1,57/1,74	C-1'
4'	25,8 t	26,7 t	26,57 t	1,44	

5'-13'	29,5-29,9 t	-	30,79-31,24 t		
14'	32,0 t	33,6 t (C-22')	33,49 t	1,31	
15'	22,9 t	24,2 t (C-23')	24,15 t	1,33	
16'	14,2 q	15,0 q (C-24')	14,86 q	0,92 (t, 7,0)	C-14', 15'
1''	105,6 d	105,2 d	105,13 d	4,29 (d, 7,5)	C-1
2''	75,0 d	75,5 d	75,39 d	3,22	C-1''
3''	78,4 d	78,5 d	78,31 d	3,37	
4''	71,4 d	72,0 d	71,97 d	3,31	
5''	78,5 d	78,5 d	78,38 d	3,30	
6''	62,6 t	63,2 t	63,08 t	3,69/3,89 (dd, 2,0, 11,5)	

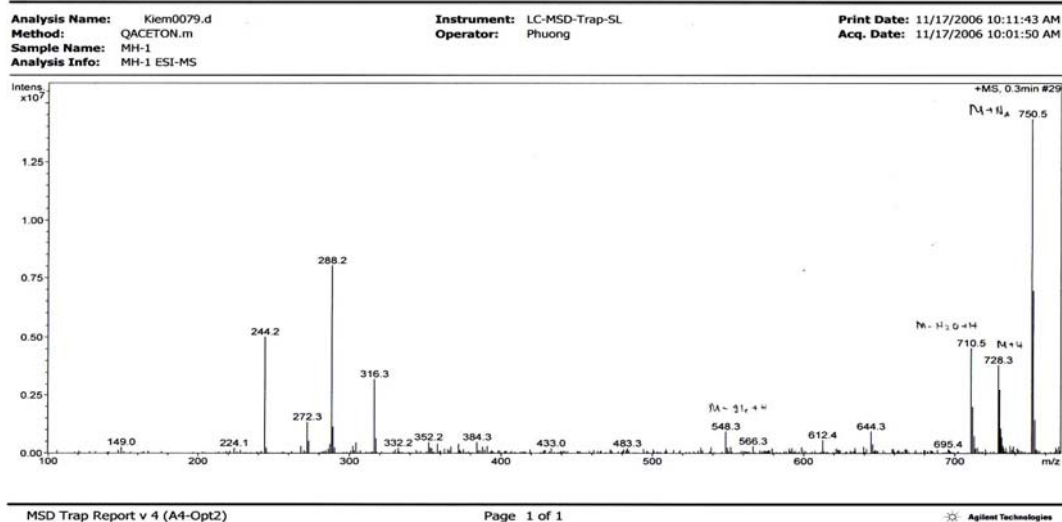
\*số liệu NMR của cerebroside B, #số liệu NMR của catacerebroside A, <sup>a</sup>đo trong piridin-d<sub>5</sub>, <sup>b</sup>đo trong MeOD-d<sub>4</sub>, <sup>c</sup>125 MHz, <sup>d</sup>500 MHz



Hình 2.2.1.e. Phổ HMBC của MH1

Bằng các phân tích đã nêu, dữ liệu phổ  $^{13}\text{C}$ -NMR của MH1 được so sánh trực tiếp với các số liệu đã được công bố của hợp chất Cerebroside B [3] và cho thấy sự trùng khớp. Tuy nhiên ở một vài vị trí có sự khác biệt đáng kể, đặc biệt ở vị trí C-5 đã thay đổi gần 2 ppm từ  $\delta_{\text{C}}$  135,04 sang 132,3. Tuy nhiên điều này có thể được giải thích là do sự thay đổi dung môi đo phổ từ metanol sang piridin. Để khẳng định điều này số liệu  $^{13}\text{C}$ -NMR của MH1 được so sánh lại với một hợp chất có cấu trúc tương tự và cũng được đo trong dung môi metanol thì cho thấy sự trùng khớp hoàn toàn [4]. Cùng với khối lượng phân tử của MH1 là  $M=727$  đã được xác định bằng phổ khối lượng (Hình 2.2.1.f), cấu trúc của nó được xác định là 1-O- $\beta$ -D-glucopyranosyl-(2*S*,3*R*,4*E*,8*E*)-2-[(2*R*)-2-hydroxyhexadecanoylami-no]-9-methyl-4,8-octadecadiene-1,3-diol được gọi tên là Cerebroside B. Hợp chất này đã được phân lập từ các loài *Pachybasium* sp., *Clitocybe* sp. và *Schizophyllum commune*, tuy nhiên đây là lần đầu tiên nó được phân lập từ các loài *Hericium*. Theo tài liệu đã công bố, hợp chất này kích thích sự biệt hóa tế bào, tăng cường sự hình thành quả thể ở nấm và có hoạt tính kháng một số chủng nấm.

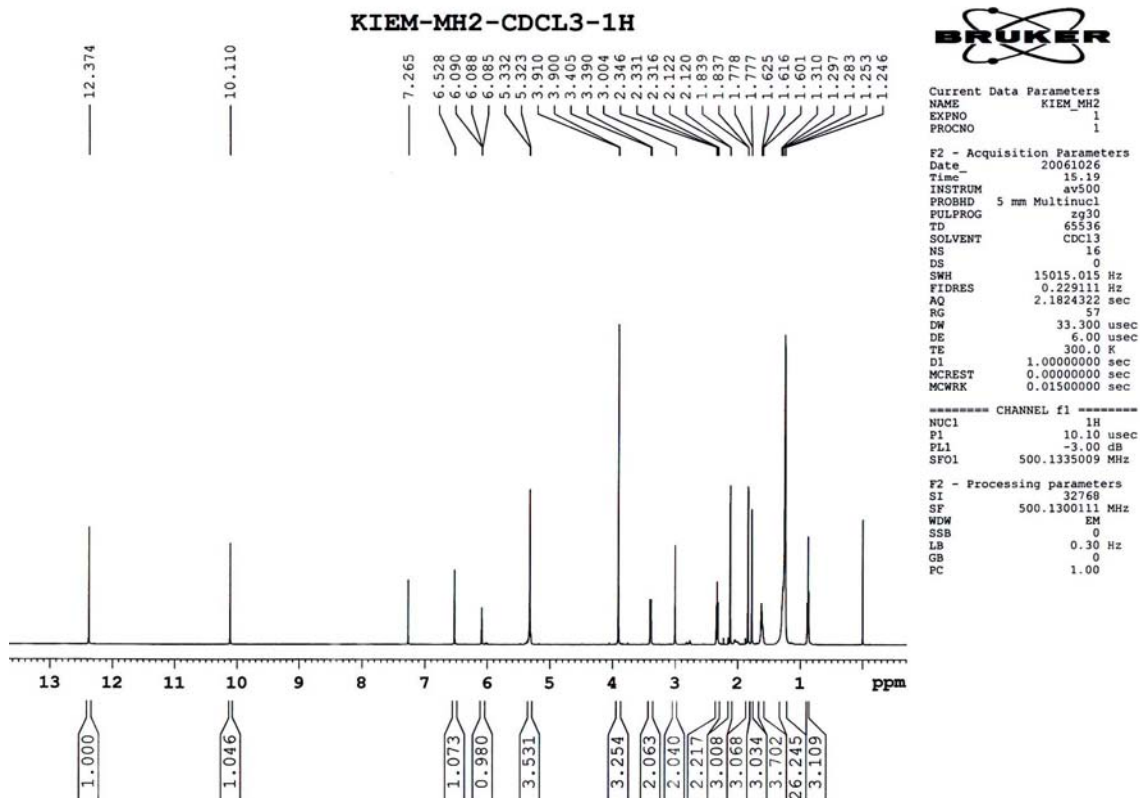
## Display Report - Selected Window Selected Analysis

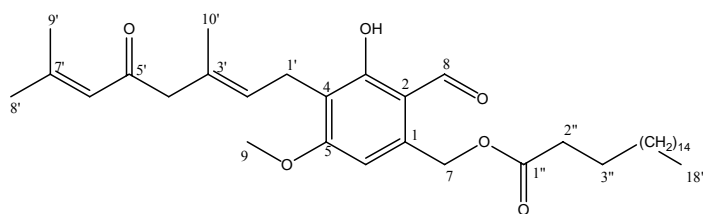


Hình 2.2.1 f. Phổ ESI-MS của MH1

## 2.2.2. Hợp chất MH2 - Hericenone D

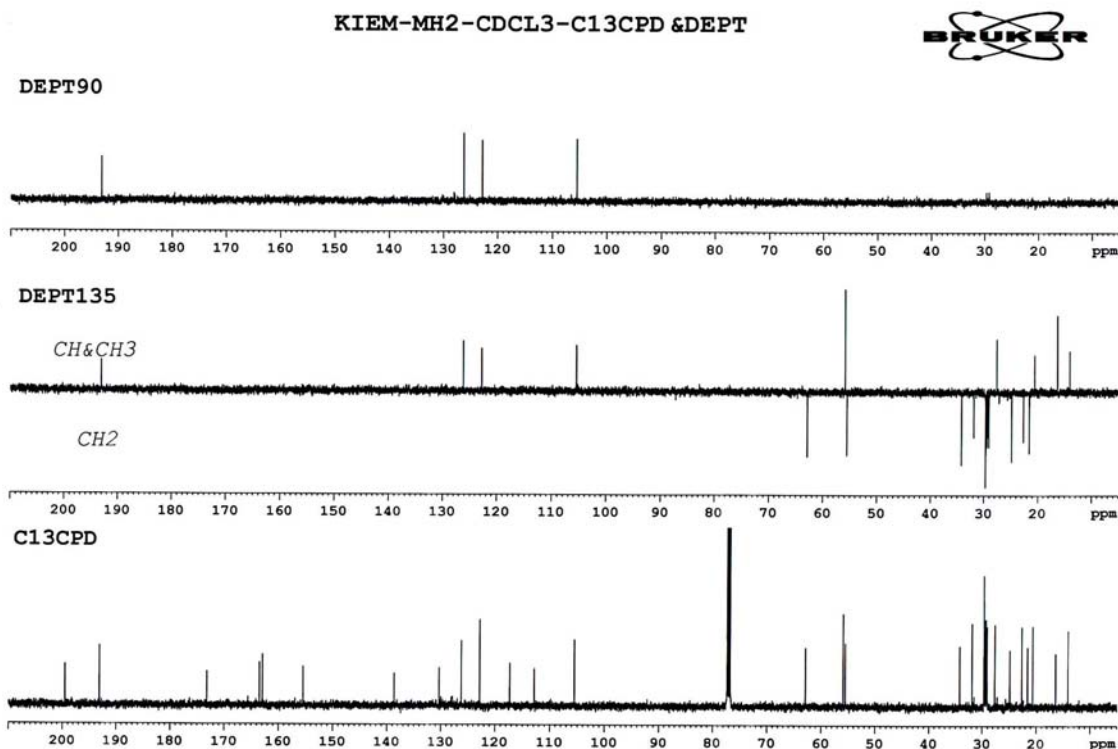
Hợp chất MH2 nhận được dưới dạng dầu không màu với công thức phân tử là  $C_{37}H_{58}O_6$  được xác định bởi các dữ liệu phổ khối với pic ion  $[M+H]^+$  tại 599,2 và  $[M-H]^+$  tại 597,4 cùng với các dữ liệu phổ  $^1H$ -,  $^{13}C$ - NMR và các phổ DEPT.

Hình 2.2.2.a. Phổ  $^1H$ -NMR của MH2



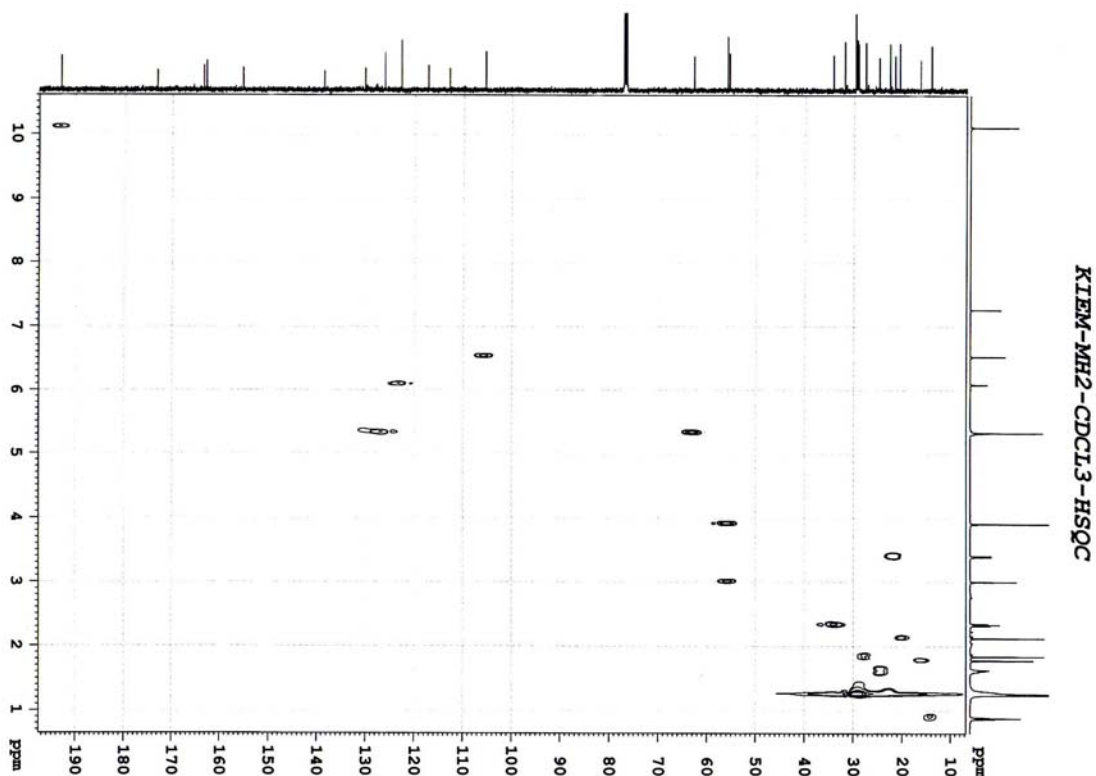
Hình 2.2.2.b. Cấu trúc hóa học của MH2

Trên phổ  $^1\text{H}$ -NMR của MH2 xuất hiện các tín hiệu đặc trưng của 1 proton vòng thơm tại  $\delta_{\text{H}}$  6,53 (1H, s), một proton của nhóm hydroxyl, một nhóm formyl và một nhóm metoxi đều gắn vào vòng thơm tại  $\delta_{\text{H}}$  12,37 (1H, s), 10,11 (1H, s) và 3,92 (3H, s), hai tín hiệu của 2 liên kết đôi đều bị thế ba vị trí tại  $\delta_{\text{H}}$  5,32 (1H, d,  $J = 7,5\text{Hz}$ ) và 6,09 (1H, t,  $J = 1,5\text{Hz}$ ), 3 nhóm methyl tại  $\delta_{\text{H}}$  0,88 (3H, m), 1,84 (3H, d,  $J = 1,5\text{Hz}$ ) và 2,12 (3H, d,  $J = 1,0\text{Hz}$ ) và các tín hiệu bị che lấp của mạch hydrocarbon no dài tại  $\delta_{\text{H}}$  1,25 (26H, m).



Hình 2.2.2.c. Phổ  $^{13}\text{C}$ -NMR và các phổ DEPT của MH2

Trên phổ  $^{13}\text{C}$ -NMR và các phổ DEPT xuất hiện các tín hiệu đặc trưng của một vòng thơm tại  $\delta_{\text{C}}$  105,55, 112,91, 117,33, 138,70, 162,94 và 163,49; một nhóm formyl tại  $\delta_{\text{C}}$  193,10; một nhóm metoxy tại  $\delta_{\text{C}}$  55,93, hai liên kết đôi đều thế 3 tại  $\delta_{\text{C}}$  126,27 (CH), 122,85 (CH), 130,35 (C) và 155,42 (C); một cacbon cacboxylat tại  $\delta_{\text{C}}$  173,20; 3 nhóm methyl tại  $\delta_{\text{C}}$  14,12, 20,67 và 27,66; các tín hiệu  $\text{CH}_2$  của mạch hydrocarbon no dài tại  $\delta_{\text{C}}$  22,70-31,94.



Hình 2.2.2.d. Phổ HSQC của MH2

Để xác định chính xác định độ dịch chuyển hoá học tương ứng của cacbon và proton, phổ HSQC đã được đo và các giá trị của chúng được đưa ra chi tiết trên bảng 2.

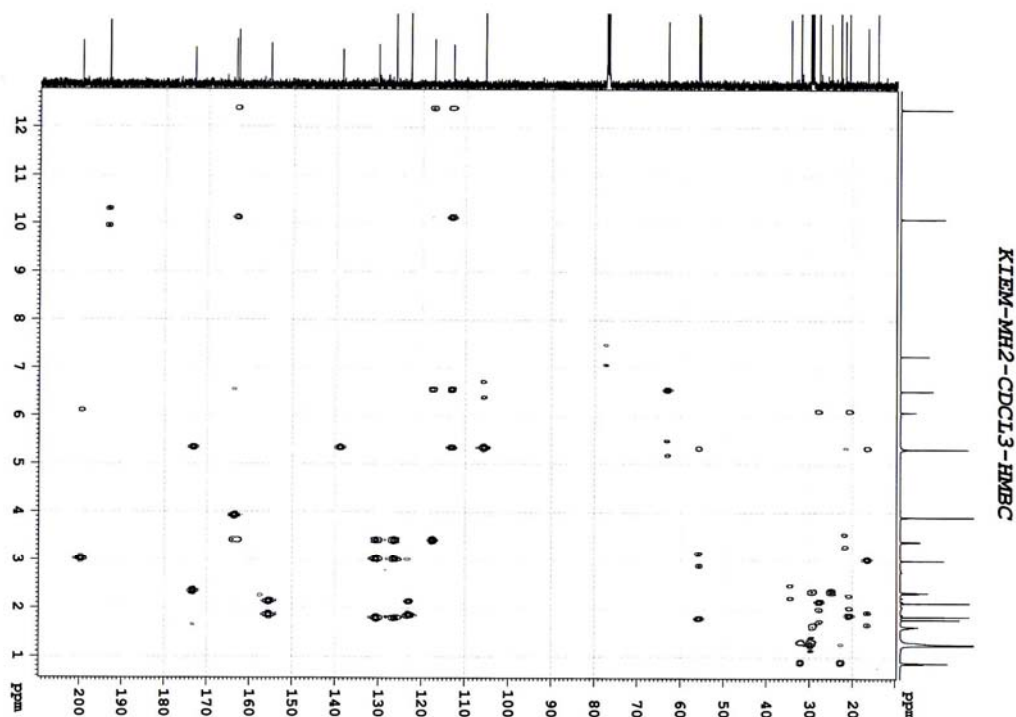
Bảng 2: Kết quả phổ NMR của MH2

C	$\delta_C^{*,a}$ [5]	$\delta_C^{a,b}$	$\delta_H^{a,c}$ (J, Hz)	HMBC (H $\rightarrow$ C)
1	138,7 s	138,70 s	-	
2	112,9 s	112,91 s	-	
3	162,9 s	162,94 s	-	
4	117,3 s	117,33 s	-	
5	163,5 s	163,49 s	-	
6	105,6 d	105,55 d	6,53 (s)	C-2, 4, 7
7	62,9 t	62,90 t	5,32 (s)	C-1, 2, 6, 1''
8	193,1 d	193,10 d	10,11 (s)	C-2, 3
9	55,9 q	55,93 q	3,91 (s)	C-5
1'	21,6 t	21,62 t	3,40 (d, 7,5)	C-3, 4, 5, 2', 3'
2'	126,3 d	126,27 d	5,32 (d, 7,5)	C-4, 2', 4', 10'
3'	130,3 s	130,35 s	-	

4'	55,6 t	55,55 t	3,00 (s)	C-2', 5', 6', 10'
5'	199,5 s	199,54 s	-	
6'	122,8 d	122,85 d	6,09 (t, 1,0, 1,5 )	C-5', 8', 9'
7'	155,5 s	155,42 s	-	
8'	27,7 q	27,66 q	1,84 (d, 1,5)	C-6', 7', 9'
9'	20,7 q	20,67 q	2,12 (d, 1,0)	C-6', 7', 8'
10'	16,4 q	16,41 q	1,78 (d, 0,5)	C-2', 3', 4'
1''	173,2 s	173,20 s	-	
2''	34,2 t	34,25 t	2,33 (t, 7,5)	C-1'', 3''
3''	24,9 t	24,89 t	1,62 (m)	
18''	14,3 q	14,12q	0,88 (m)	
OH			12,37 (s)	C-2, 3, 4
	31,9 t	31,94 t		
	29,7 t	29,70 t		
	29,7 t	29,70 t		
	29,7 t	29,70 t		
	29,7 t	29,70 t		
	29,7 t	29,68 t		
4''-17''	29,7 t	29,65 t	1,25 (m)	
	29,6 t	29,60 t		
	29,4 t	29,45 t		
	29,4 t	29,37 t		
	29,2 t	29,23 t		
	29,1 t	29,13 t		
	24,9 t	24,89 t		
	22,7 t	22,70 t		

\*số liệu NMR của hericenone D, <sup>a</sup>đo trong CDCl<sub>3</sub>, <sup>b</sup>125 MHz, <sup>c</sup>500 MHz

Để xác định các vị trí nhóm thế và kiểm tra các giá trị độ dịch chuyển hoá học của các vị trí, phổ HMBC đã được đo. Trên phổ HMBC, nhóm OH được khẳng định tại vị trí C-3 bởi tương tác HMBC của H (OH,  $\delta$  12,37) với C-2 ( $\delta$  112,91), C-3 ( $\delta$  162,94) và C-4 ( $\delta$  117,33), nhóm metoxy ở vị trí C-5 bởi tương tác của proton H-9 ( $\delta$  3,91) với C-5 ( $\delta$  163,49). Bằng các phân tích tương tự cho phép khâu nối các giá trị phổ, dự đoán cấu trúc hóa học của MH2 như được chỉ ra ở Hình 2.2.2.a và chi tiết được đưa ra trên bảng 2.



Hình 2.2.2.e. Phổ HMBC của MH2

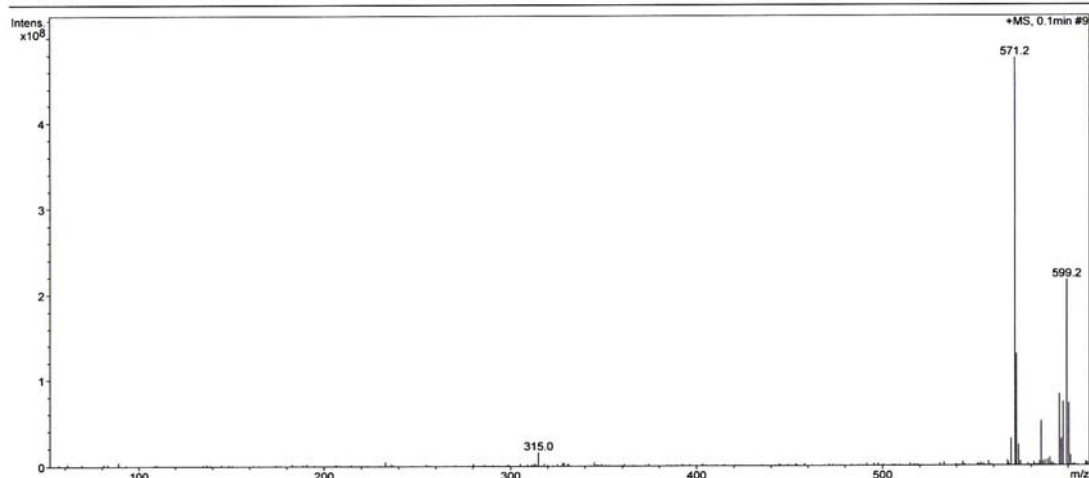
Các kết quả phân tích nêu trên được đem so sánh với các dữ kiện phổ của hợp chất Hericenone D [5] và sự trùng khớp hoàn toàn về các giá trị phổ tương ứng kết hợp với các dữ kiện phổ khối lượng cho phép khẳng định hợp chất MH2 là Hericenone D. Hợp chất này đã được tìm thấy trước đó từ nấm *Hericeum erinaceus* và thể hiện hoạt tính kích thích mạnh sự tổng hợp nhân tố kích thích sự phát triển của tế bào thần kinh [5, 6].

#### Display Report - Selected Window Selected Analysis

Analysis Name: KIEM0074.d  
Method: Quang06.m  
Sample Name: MH-2  
Analysis Info: MH-2 APCI-MS

Instrument: LC-MSD-Trap-SL  
Operator: Phuong

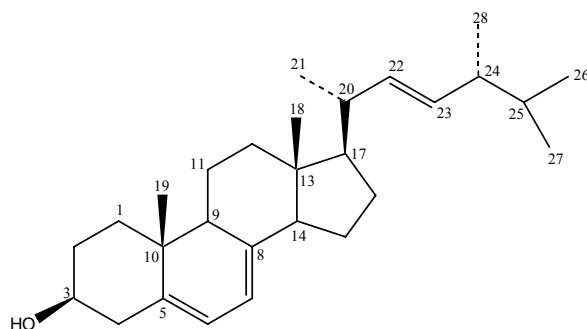
Print Date: 10/31/2006 1:56:08 PM  
Acq. Date: 10/31/2006 1:28:21 PM



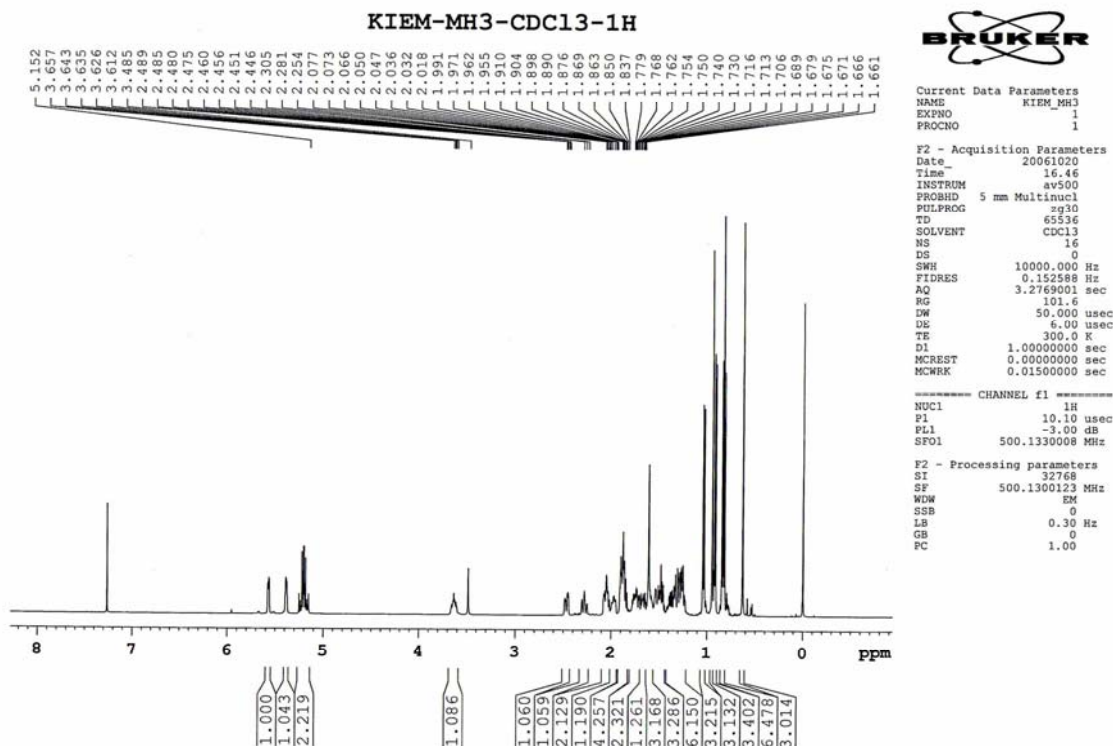
### Hình 2.2.2.f. Phổ ESI-MS của MH2

### 2.2.3. Hợp chất MH3 - Ergosterol.

Hợp chất MH3 nhận được dưới dạng tinh thể hình kim màu trắng. Phổ  $^1\text{H}$ -NMR của nó đặc trưng cho một steroid trong đó xuất hiện các tín hiệu đặc trưng của một cacbon nối với nhóm  $-\text{OH}$  tại  $\delta_{\text{H}}$  3,63 (1H, m, H-3), hai liên kết đôi bị thế 3 vị trí tại  $\delta_{\text{H}}$  5,56 (dd,  $J = 2,0$  và  $5,5$  Hz) và 5,38 (m), một liên kết đôi ngoại vòng bị thế 2 vị trí tại  $\delta_{\text{H}}$  5,17 (1H, dd,  $J = 8,5$ ,  $15,5$  Hz, H-22) và 5,22 (1H, dd,  $J = 8,5$  và  $15,5$  Hz, H-23), sáu nhóm methyl tại  $\delta_{\text{H}}$  0,63 (s), 0,82 (d,  $J = 6,5$  Hz), 0,84 (d,  $J = 6,5$  Hz), 0,91 (d,  $J = 6,5$  Hz), 0,95 (s) và 1,03 (d,  $J = 6,5$  Hz).



Hình 2.2.3.a. Cấu trúc hóa học của MH-3



Hình 2.2.3.b. Phổ  $^1\text{H}$ -NMR của MH-3

Phổ  $^{13}\text{C}$ -NMR của HM3 xuất hiện các tín hiệu đặc trưng của một steroid có 28 cacbon. Trong đó một nhóm oximetin được khẳng định tại  $\delta$  70,47 (d), hai nối đôi bị

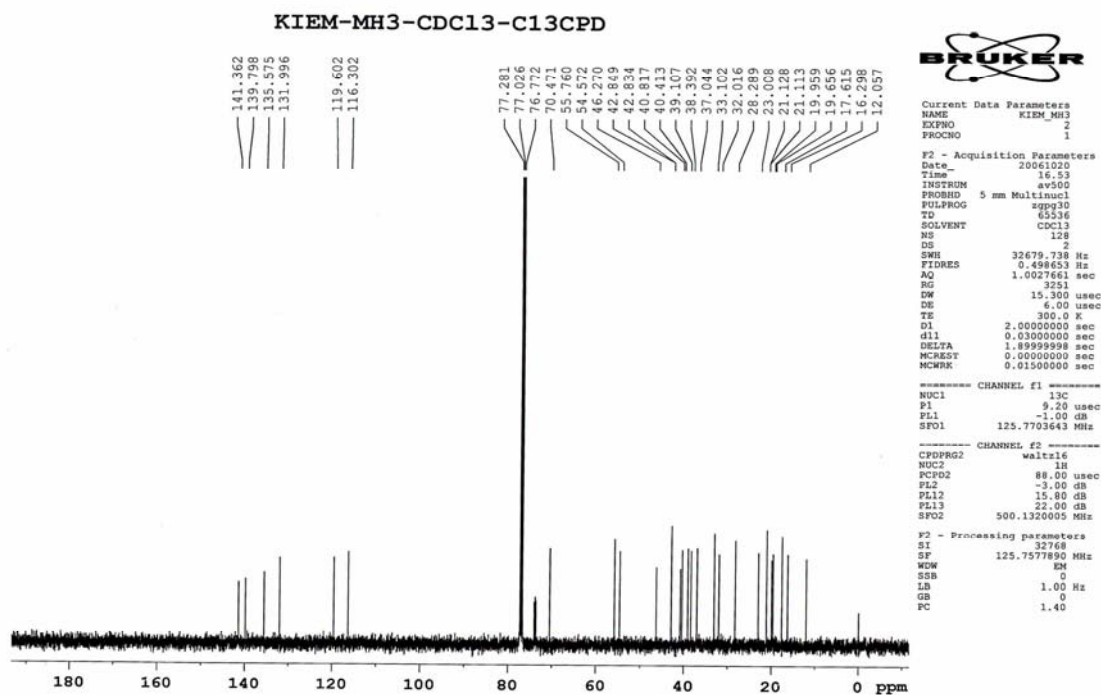
thế 3 vị trí tại  $\delta$  141,36 (s, C-5)/119,60 (d, C-6) và 117,30 (d, C-7)/139,80 (s), một nối đôi ngoại vòng tại  $\delta$  135,60 (d, C-22)/131,99 (C-23), và 6 nhóm metyl tại  $\delta$  12,06 (q, C-18), 16,30 (q, C-19), 21,11 (q, C-21), 17,76 (q, C-26), 19,65 (q, C-27) và 19,96 (q, C-26) (Bảng 3 và Hình 2.2.3.c).

*Bảng 3: Kết quả phổ NMR của MH3*

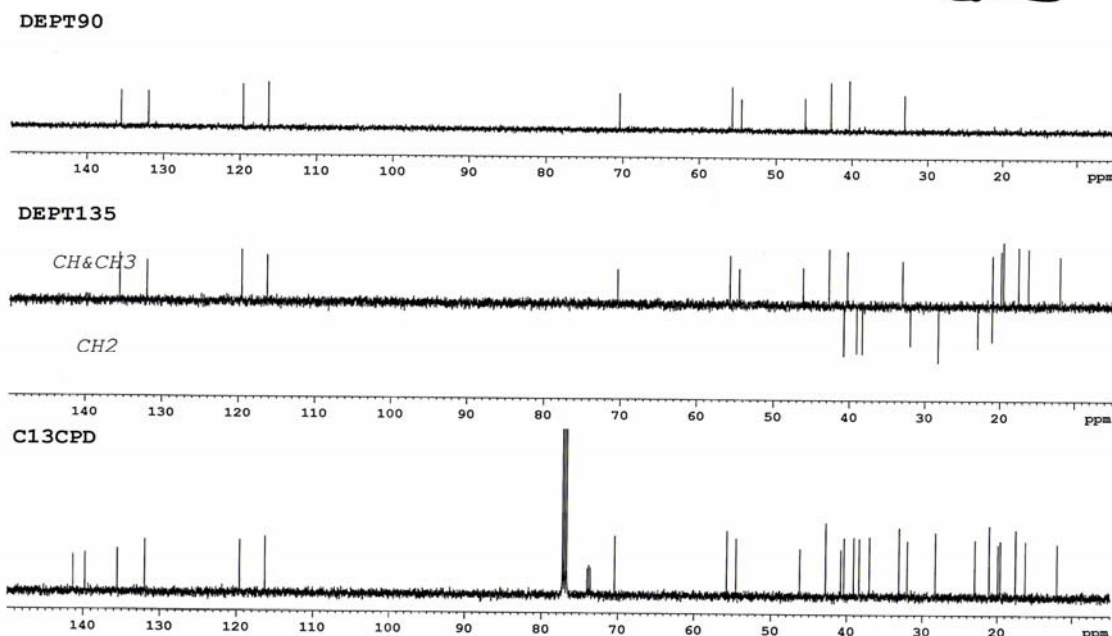
C	$\delta_C$ [7]	$\delta_C^{a,b}$	$\delta_H^{a,c}$ (multiplicity, J in Hz)
1	38,32 t	38,39 t	1,25 m 1,75 m
2	31,15 t	32,02 t	1,50 m 1,78 m
3	69,11 d	70,47 d	3,63 m
4	40,46 t	40,83 t	2,28 (t, 13,5)
5	141,18 s	141,36 s	-
6	119,05 d	119,60 d	5,56 (dd, 2,0, 5,5)
7	117,05 d	116,30 d	5,38 m
8	139,20 s	139,80 s	-
9	45,97 d	46,27 d	1,97m
10	36,97 s	37,04 s	-
11	20,81 t	21,13 t	1,65 m
12	39,35 t	39,11 t	1,34 m 1,90 m
13	42,48 s	42,41 s	-
14	54,41 d	54,57 d	1,92 m
15	23,19 t	23,01 t	1,67 m
16	28,29 t	28,29 t	1,28 m 1,74 m
17	55,67 d	55,76 d	1,25 m
18	12,02 q	12,06 q	0,63 s
19	15,65 q	16,30 q	0,95 s
20	40,97 d	40,82 d	2,05 m
21	21,51 q	21,11 q	1,03 (d, 6,5)
22	135,71 d	135,60 d	5,17 (1H, dd, J=8,5, 15,5Hz)
23	131,84 d	131,99 d	5,22 (1H, dd, J=8,5, 15,5Hz)

24	43,23 d	42,85 d	1,76 m
25	32,85 d	33,10 d	1,38 m
26	19,44 q	19,66 q	0,84 (d, J=6,5 Hz)
27	21,51 q	19,96 q	0,82 (d, J=6,5 Hz)
28	17,76 q	17,62 q	0,91 (d, J=6,5 Hz)

<sup>a</sup>đo trong CDCl<sub>3</sub>, <sup>b</sup>125 MHz, <sup>c</sup>500MHz



Hình 2.2.3.c. Phổ <sup>13</sup>C-NMR của MH-3

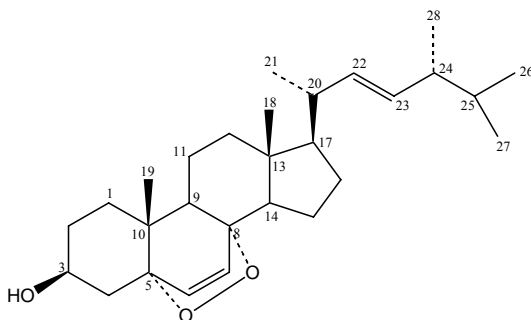


Hình 2.2.3.d. Phổ  $^{13}\text{C}$ -NMR và các phổ DEPT của MH-3

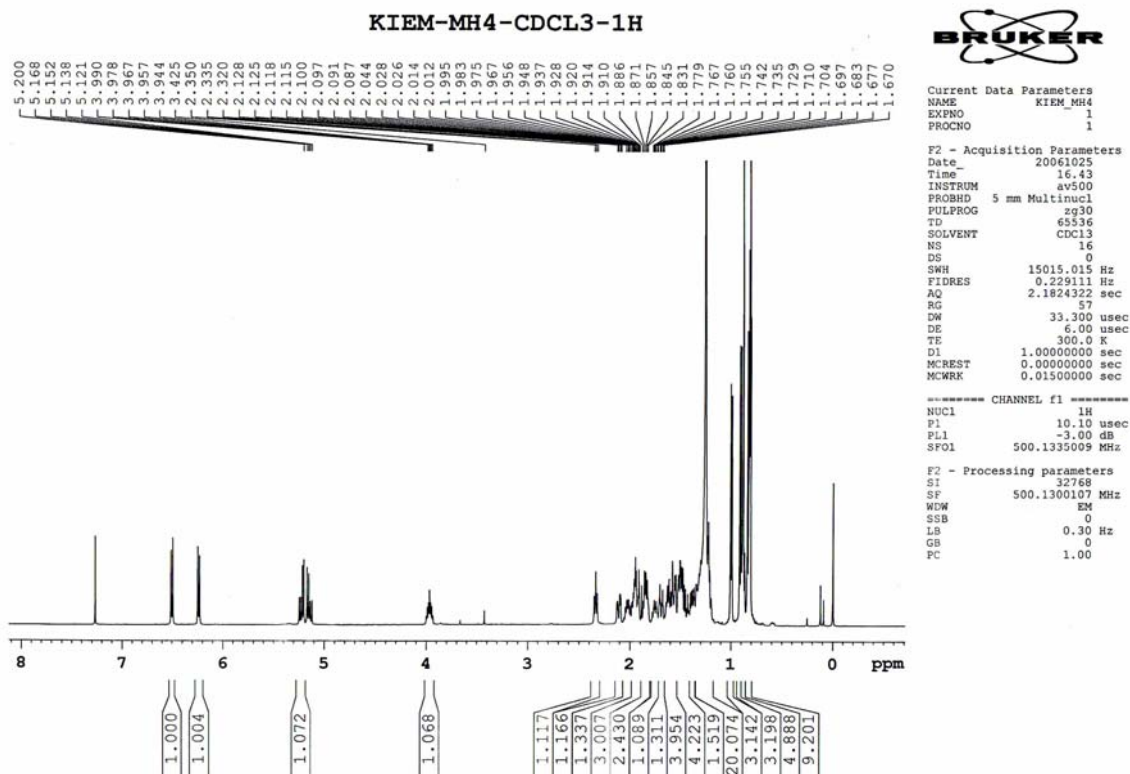
Độ chuyển dịch hóa học và dạng pic đa vạch tại  $\delta_{\text{H}}$  3,63 (1H, m, H-3) đặc trưng cho cấu hình  $\alpha$  của proton H-3 tương ứng với cấu hình  $\beta$  của nhóm OH tại vị trí này [8]. Nối đôi ngoại vòng được xác định ở dạng *trans* bởi giá trị hằng số tương tác lớn ( $J = 15,5$  Hz). Cùng với sự xuất hiện của 6 nhóm methyl, 2 nối đôi nội vòng đều bị thế 3 vị trí gợi ý tới hợp chất ergosterol, một steroid khá phổ biến trong thiên nhiên. Từ tất cả các phân tích đã nêu, giá trị phổ  $^{13}\text{C}$ -NMR của MH3 được mang so sánh với các giá trị đã được công bố của ergosterol [13]. Sự phù hợp hoàn toàn ở các vị trí tương ứng cho phép khẳng định hợp chất MH-3 chính là ergosterol.

#### 4. Hợp chất MH4 - Ergosterol peroxide

Hợp chất MH4 cũng nhận được dưới dạng tinh thể hình kim màu trắng. Công thức phân tử là  $\text{C}_{28}\text{H}_{44}\text{O}_3$  được xác định bởi các dữ liệu phổ khối với pic ion  $[\text{M}+\text{H}]^+$  tại 429,2 cùng với các dữ liệu phổ  $^1\text{H}$ -,  $^{13}\text{C}$ -NMR và các phổ DEPT.

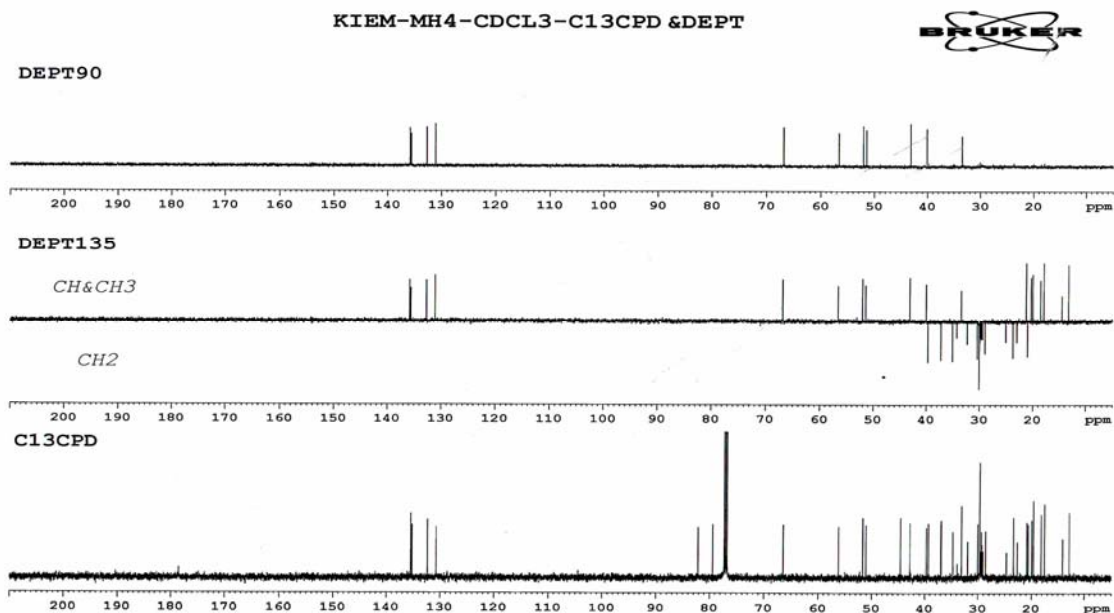


Hình 2.2.4.a. Cấu trúc hóa học của MH-4



Hình 2.2.4.b. Phổ  $^1\text{H}$ -NMR của MH-4

Phổ  $^1\text{H}$  và  $^{13}\text{C}$ -NMR của MH4 rất tương tự như của MH3 ngoại trừ sự mất đi 2 tín hiệu cacbon của nối đôi và thay vào đó là sự xuất hiện 2 tín hiệu của các cacbon bậc bốn liên kết trực tiếp với nguyên tử oxy ở vùng trường thấp tại  $\delta$  79,44 (s) và 82,17 (s). Điều này gợi ý tới sự xuất hiện của một cầu peroxide và MH4 là một dạng dẫn xuất của MH3.



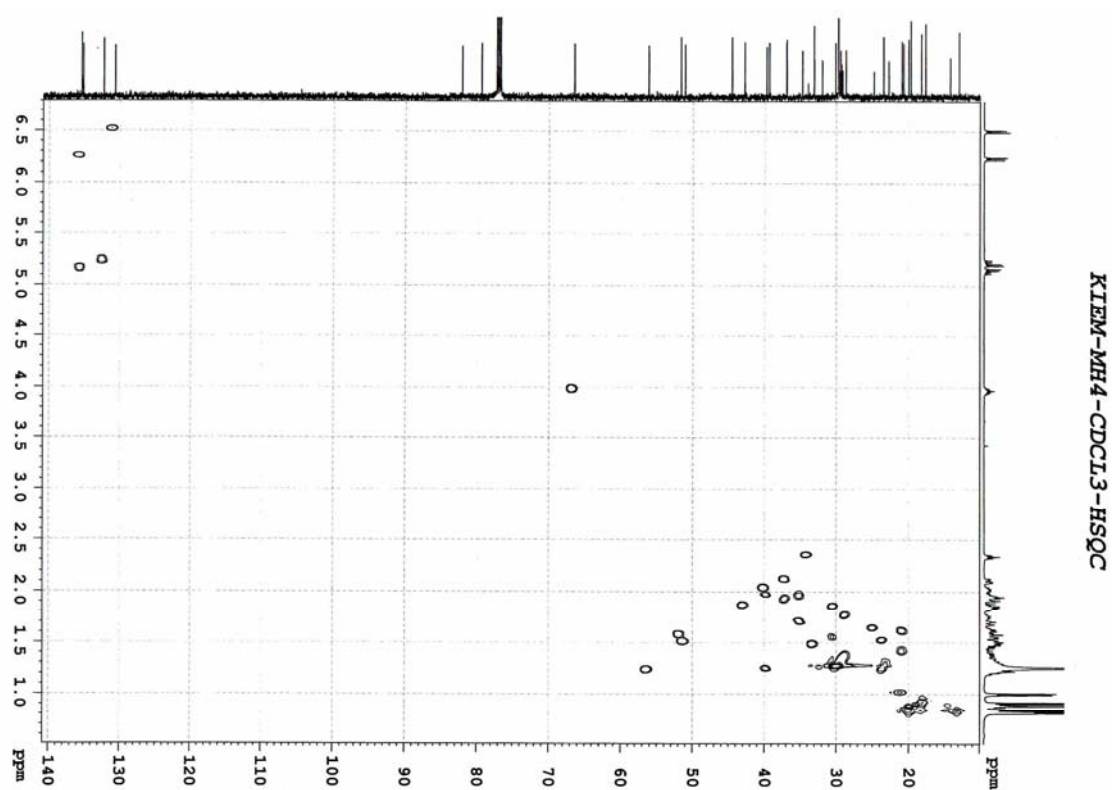
Hình 2.2.4.c. Phổ  $^{13}\text{C}$ -NMR và các phổ DEPT của MH-4

Bảng 4. Giá trị phổ NMR của MH4

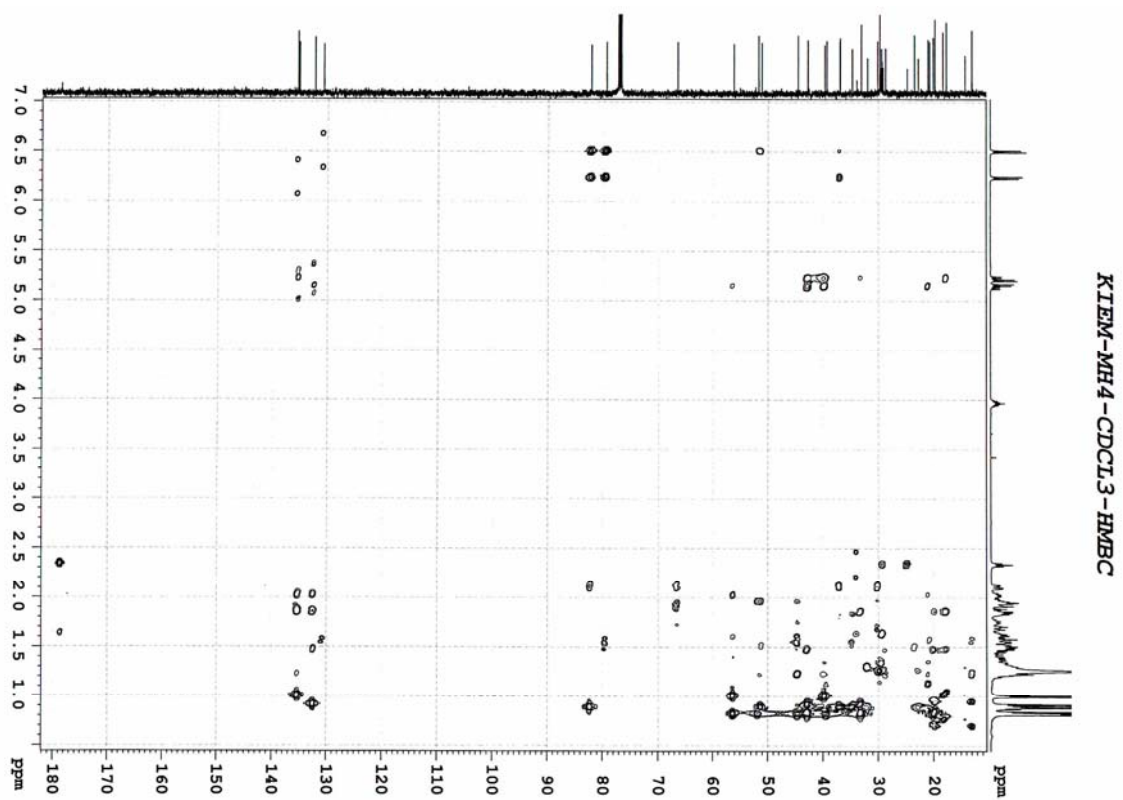
C	$\delta_{\text{C}}$ [9]	$\delta_{\text{C}}^{\text{a, b}}$	$\delta_{\text{H}}^{\text{a, c}}$ (multiplicity, J in Hz)	HMBC (H→C)
1	30,20 t	30,09 t	1,56 (m) 1,85 (m)	
2	34,77 t	34,71 t	1,72 (m) 1,96 (m)	
3	66,47 d	66,49 d	3,97 (m)	
4	39,44 t	39,37 t	1,27 (m) 1,97 (m)	
5	82,15 s	82,17 s	-	
6	135,22 d	135,22 d	6,24 (d, 8,5)	C-5, 8, 10
7	130,77 d	130,75 d	6,50 (d, 8,5)	C-5, 8, 9, 10
8	79,42 s	79,44 s	-	
9	51,25 d	51,12 d	1,51 (m)	
10	37,03 s	36,99 s	-	
11	20,66 t	20,64 t	1,41 (m) 1,62 (m)	
12	37,03 t	39,91 t	1,55 (m) 2,11 (m)	
13	44,61 s	44,58 s	-	
14	51,76 d	51,70 d	1,58 (m)	
15	23,44 t	23,42 t	1,25 (m) 1,53 (m)	
16	28,59 t	28,65 t	1,37 (m) 1,78 (m)	
17	56,33 d	56,23 d	1,24 (m)	
18	12,90 q	12,88 q	0,86 (m)	
19	18,18 q	18,18 q	0,88 (m)	
20	39,64 d	39,73 d	2,03 (m)	
21	20,90 q	20,89 q	1,01 (d, 7,0)	C-17, 20, 22
22	135,45 d	135,44 d	5,14 (dd, 8,5,	C-20, 21, 24

			15,5)	
23	132,39 d	132,33 d	5,22 (dd, 8,5, 15,5)	C-20, 24, 28
24	42,82 d	42,79 d	1,87 (m)	
25	33,11 d	33,08 d	1,50 (m)	
26	19,64 q	19,65 q	0,88 (d, 6,5)	
27	19,93 q	19,96 q	0,83 (d, 6,5)	
28	17,56 q	17,57 q	0,91 (d, 6,5)	

<sup>a</sup>đo trong CDCl<sub>3</sub>, <sup>b</sup>125 Mhz, <sup>c</sup>500MHz



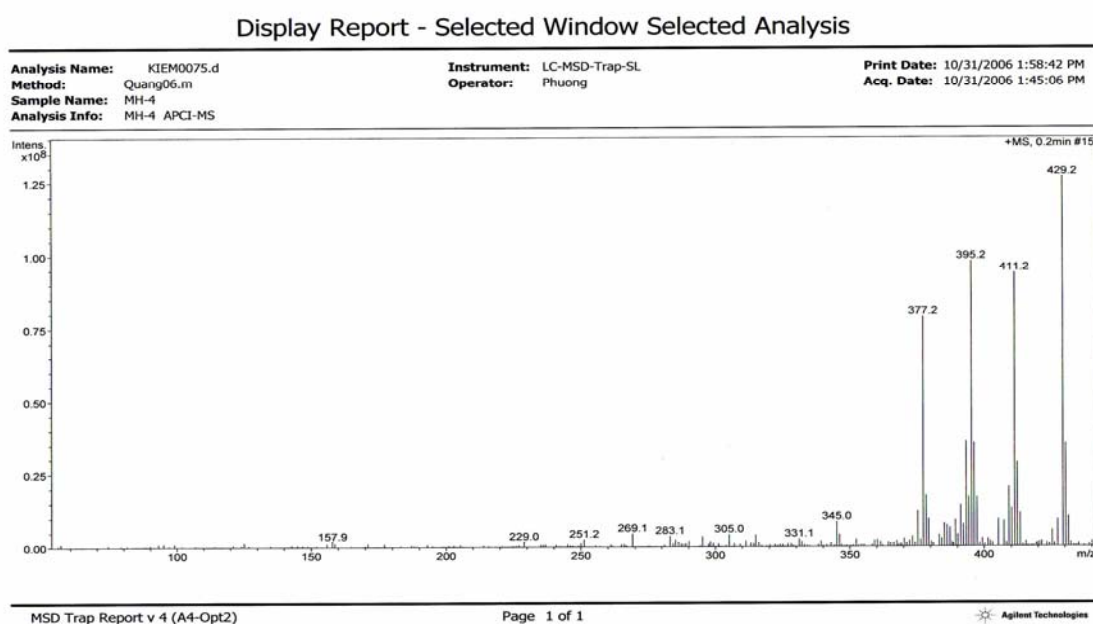
Hình 2.2.4.d. Phổ HSQC của MH-4



Hình 2.2.4.e. Phổ HMBC của MH-4

Từ tất cả các phân tích đã nêu, các số liệu phổ  $^{13}\text{C}$ -NMR của MH4 được mang so sánh với các số liệu đã được công bố của hợp chất ergosterol peroxide [9], sự trùng khớp hoàn toàn tại các giá trị tương ứng cho phép khẳng định cấu trúc hóa học của MH4 là 5 $\alpha$ ,8 $\alpha$ -epidioxyergosta-6,22-dien-3 $\beta$ -ol (egosterol peroxide). Ngoài ra điều này còn một lần nữa được khẳng định bởi các tương tác trên phổ cộng hưởng từ hạt nhân hai chiều HMBC (Bảng 4 và Hình 2.2.4.e).

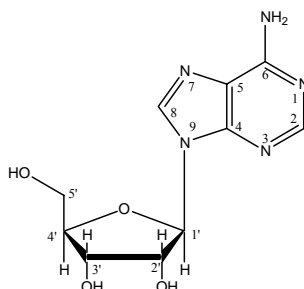
Theo các tài liệu đã công bố, hợp chất này thể hiện hoạt tính kháng *Escherichia coli* và *Salmonella typhimurium* (với giá trị  $\text{IC}_{50}$  tương ứng là 350 và 500  $\mu\text{g/ml}$ ) [10], chống dị ứng [11]. Ngoài ra hợp chất này còn thể hiện hoạt tính gây độc tế bào đối với các dòng tế bào ung thư dạ dày (SNU-1), ung thư gan (SNU-354), ung thư trực tràng và sarcoma-180 chuột với giá trị nồng độ ức chế tối thiểu ( $\text{IC}_{50}$ ) tương ứng là 18,7, 158,2, 84,6 và 74,1  $\mu\text{g/ml}$  [12].



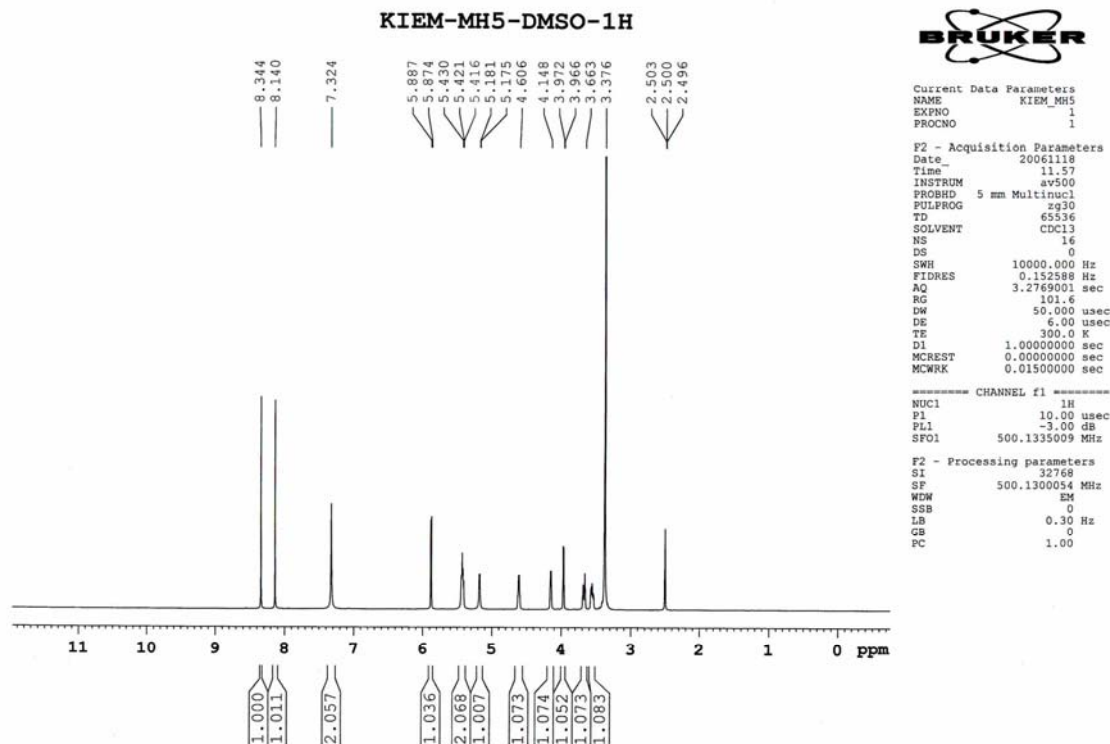
Hình 2.2.4.f. Phổ ESI-MS của MH-4

### 2.2.5. Hợp chất MH5 - $\beta$ -Adenosine

Hợp chất MH5 nhận được dưới dạng tinh thể hình kim màu trắng. Công thức phân tử của nó được xác định là  $\text{C}_{10}\text{H}_{13}\text{N}_5\text{O}_4$  dựa trên kết quả phổ khối lượng ESI-MS (tại  $m/z$  267,8  $[\text{M}+\text{H}]^+$  và 289,8  $[\text{M}+\text{Na}]^+$ ) và phổ cộng hưởng từ hạt nhân ( $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ -NMR và DEPT).



Hình 2.2.5.a. Cấu trúc hóa học của MH-5



Hình 2.2.5.b. Phổ  $^1\text{H}$ -NMR của MH-5

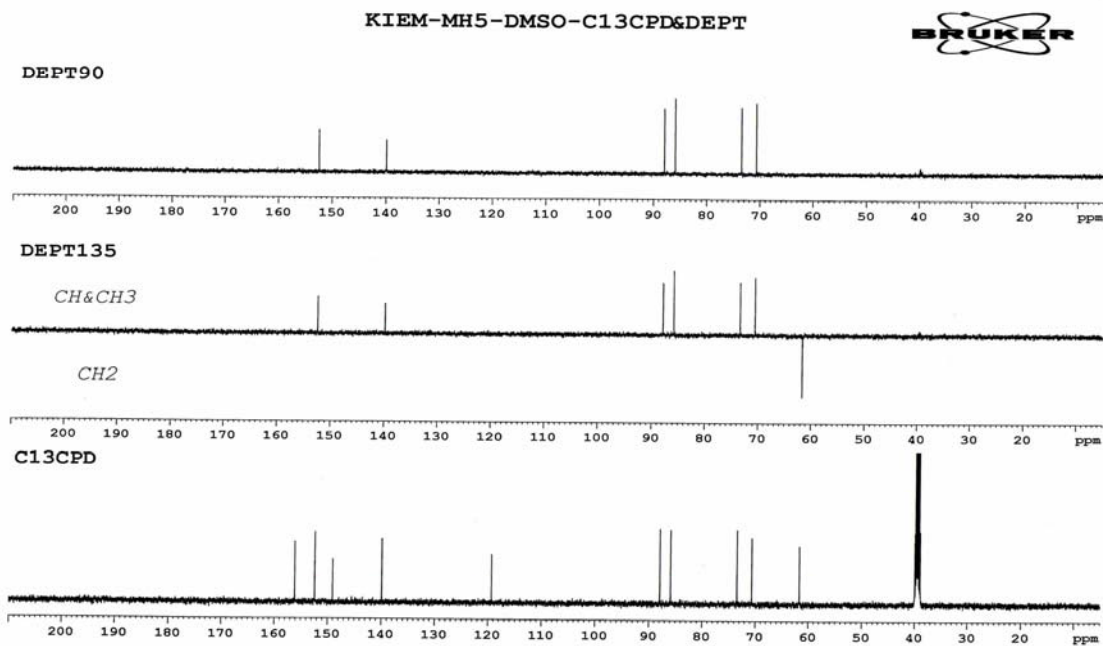
Trên phổ  $^1\text{H}$ -NMR của MH5 xuất hiện các tín hiệu đặc trưng của một đơn vị đường  $\beta$ -D-Ribofuranosyl tại  $\delta$  5,88 (d,  $J = 6,5$  Hz, H-1'), 4,61 (dd,  $J = 4,0$  và  $10,5$  Hz, H-2'), 4,15 (br s, H-3'), 3,97 (dd,  $J = 3,5$  và  $6,5$  Hz, H-4'), 3,57 (m, H<sub>a</sub>-5') và 3,68 (m, H<sub>b</sub>-5').

Bảng 5. Kết quả phổ NMR của MH5

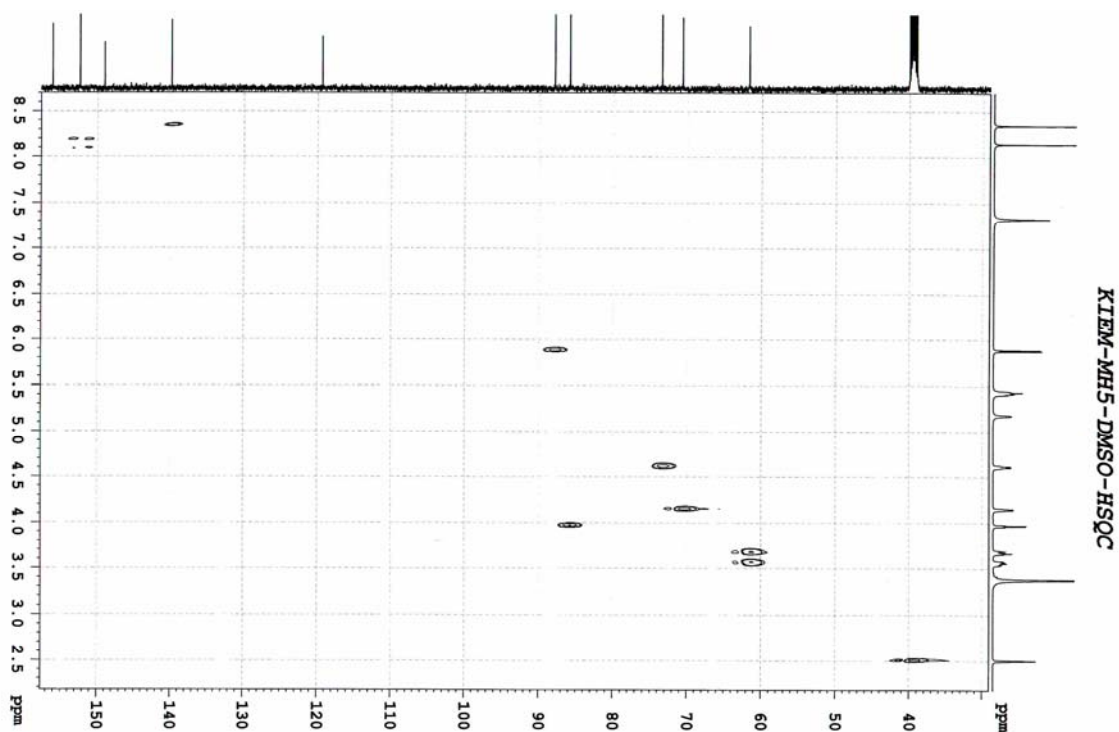
C	$\delta_{\text{C}}$ [13]	$\delta_{\text{C}}^{\text{a, b}}$	$\delta_{\text{H}}^{\text{a, c}}$ (multiplicity, J in Hz)	HMBC (H $\rightarrow$ C)
2	152,5 d	152,41 d	8,14 (s)	C-4, 6
4	149,1 s	149,08 s	-	
5	119,4 s	119,37 s	-	
6	156,2 s	156,17 s	-	
8	140,0 d	139,95 d	8,34 (s)	C-4, 5
1'	88,1 d	87,95 d	5,88 (d, 6,5)	C-4, 8, 2'
2'	73,6 d	73,47 d	4,61 (dd, 4,0, 10,5)	
3'	70,8 d	70,68 d	4,15 (br s)	
4'	86,1 d	85,92 d	3,97 (dd, 3,5, 6,5)	
5'	61,8 t	61,69 t	3,57 (m)	

			3,68 (m)	
NH2	-	-	7,32 (s)	C-5
OH-2'	-	-	5,42 *	
OH-3'	-	-	5,17 (d, 3,0)	
OH-5'	-	-	5,43 *	

<sup>a</sup>đo trong DMSO, <sup>b</sup>125 Mhz, <sup>c</sup>500MHz

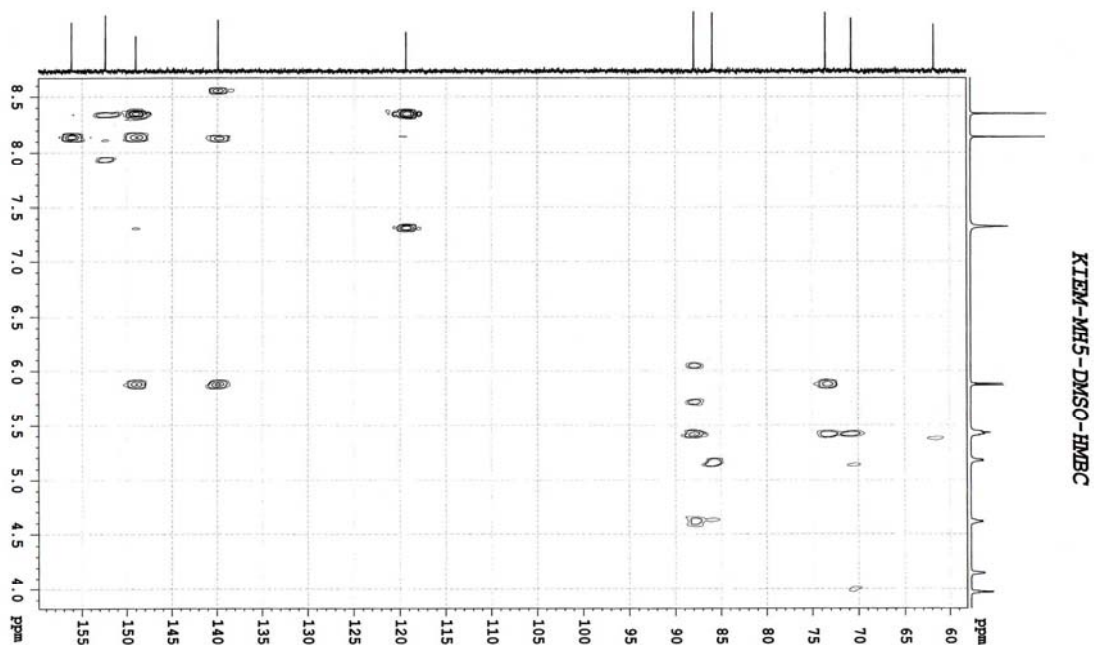


Hình 2.2.5.c. Phổ <sup>13</sup>C-NMR và các phổ DEPT của MH-5



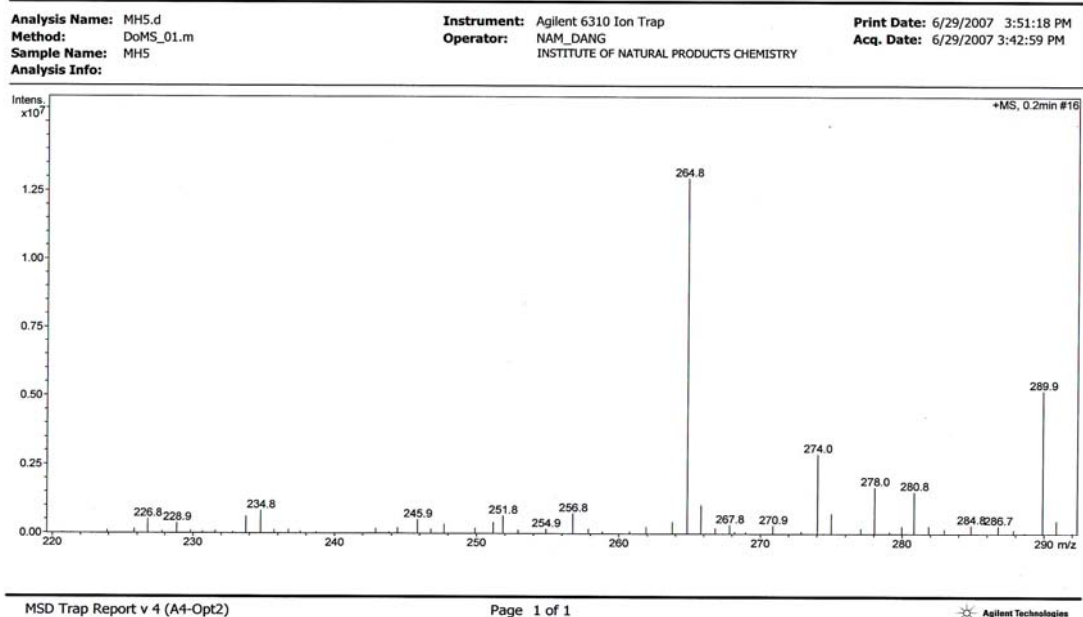
Hình 2.2.5.d. Phổ HSQC của MH-5

Trên phổ  $^{13}\text{C}$ -NMR xuất hiện các tín hiệu của 10 cacbon với 3 C, 6 CH và 1  $\text{CH}_2$ . Trong đó, các tín hiệu của 1 đơn vị đường  $\beta$ -D-Ribofuranosyl được khẳng định tại  $\delta$  87,95 (d, C-1'), 73,47 (d, C-2'), 70,68 (d, C-3'), 85,92 (d, C-4') và 61,69 (t, C-5') [14].



Hình 2.2.5.e. Phổ HSQC của MH-5

# Display Report - Selected Window Selected Analysis



*Hình 2.2.5.f. Phổ ESI-MS của MH-5*

Từ các phân tích đã nêu trên, số liệu phổ  $^{13}\text{C}$ -NMR của MH5 được mang so sánh với các giá trị đã công bố của hợp chất  $\beta$ -Adenosine [13]. Sự phù hợp hoàn toàn ở các giá trị tương ứng cho phép khẳng định cấu trúc hóa học của MH5 là 9- $\beta$ -D-Ribofuranosyladenine hay  $\beta$ -Adenosine. Điều này một lần nữa được khẳng định bởi các tương tác trên phổ cộng hưởng từ hạt nhân hai chiều HMBC (Bảng 5 và Hình 2.2.5.e).

### III. CHỨNG HẦU THỦ (Phương pháp 2)

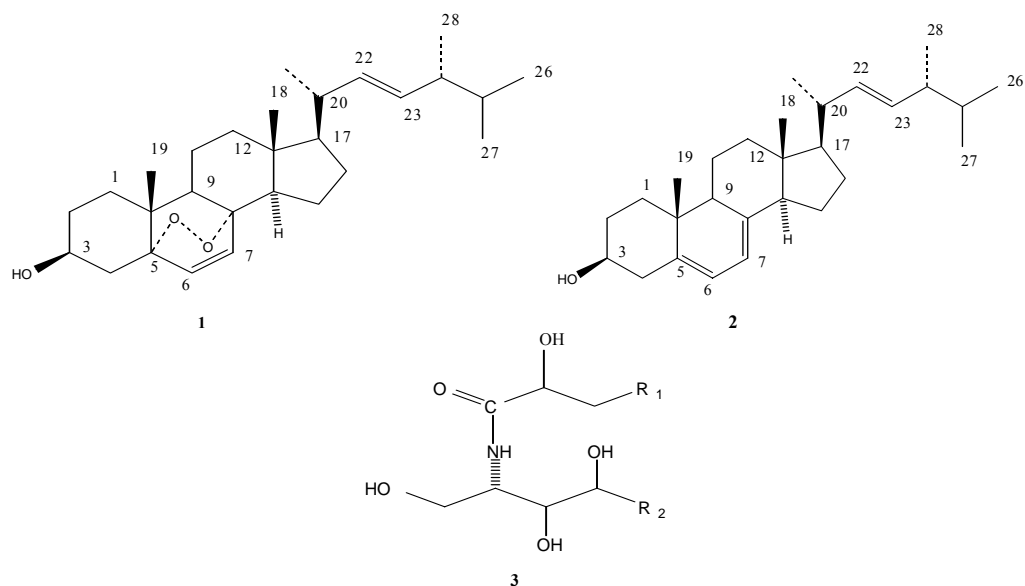
Bằng sắc kí cột nhiều lần với chất hấp phụ silica gel và các hệ dung môi rửa giải khác nhau chúng tôi đã thu được ba hợp chất từ dịch chiết diclometan của *H.erinaceum*.

Hợp chất **1** thu được ở dạng tinh thể màu trắng, có đ.n.c 178-180<sup>0</sup>C. Phổ hồng ngoại cho đỉnh hấp thụ đặc trưng cho dao động hoá trị của nhóm hydroxyl (OH) ở 3400cm<sup>-1</sup> và của liên kết C-O-C ở 1050cm<sup>-1</sup>. Phổ khối bụi electron ESI-MS cho pic ion phân tử tại m/z 427 [M-H]<sup>+</sup> tương ứng với công thức phân tử C<sub>28</sub>H<sub>44</sub>O<sub>3</sub> và hoàn toàn phù hợp với kết quả của phổ NMR. Phổ <sup>13</sup>C-NMR xuất hiện tín hiệu của 28 nguyên tử cacbon đặc trưng cho khung sterol, bao gồm: 4 cacbon bậc bốn, 11 nhóm metin CH, 7 nhóm metylen CH<sub>2</sub> và 6 nhóm metyl CH<sub>3</sub>. Trong đó tín hiệu của hai nguyên tử cacbon bậc bốn liên kết với một cầu nối epidioxy ở δ<sub>C</sub>: 79.4ppm (C-8) và 82.2ppm (C-5) hoàn toàn phù hợp với tín hiệu đã được sắp xếp lại bởi phổ HMQC và HMBC của *Chau Van Minh và cộng sự (Chau Van Minh et al., 2004)*. Phổ <sup>1</sup>H-NMR cho các tín hiệu đặc trưng cho các liên kết đôi với hai duplet ở δ<sub>H</sub>: 6.24ppm (1H, d, J=7.5Hz, H-6); 6.51ppm (1H, d, J=7.5Hz, H-7) và hai duplet duplet ở δ<sub>H</sub>: 5.16ppm (1H, dd, J=7.5 và 14.5Hz, H-22); 5.22ppm (1H, dd, J=7.0 và 15.0Hz, H-23), ngoài ra còn tín hiệu của một multiplet ở δ<sub>H</sub> 3.96ppm (1H, m, H-3) với độ chuyển dịch của nguyên tử cacbon tại δ<sub>C</sub> 66.5ppm (C-3) khẳng định cho sự có mặt của nhóm OH liên kết với cacbon ở vị trí số 3 với cấu hình -3β-ol (*Sheu et al. 2000*). Qua việc phân tích phổ của hợp chất **1** và so sánh với tài liệu, chúng tôi đã nhận dạng được hợp chất **1** là *5,8-Epidioxy-5α, 8α-ergosta-6,22E-dien-3β-ol* hay *ergosterol peroxide* đã được phân lập từ một loài nấm mục gỗ *Inonotus radiatus* (Kristi karlos & CS,1989). Các dữ liệu phổ của hợp chất **1** hoàn toàn trùng hợp với tài liệu tham khảo (bảng III.4.11).

#### **5,8-Epidioxy-5α, 8α-ergosta-6,22E-dien-3β-ol (1)**

Tinh thể hình kim, màu trắng, đ.n.c 178-180<sup>0</sup>C, [α]<sub>D</sub><sup>0</sup>-29 (CHCl<sub>3</sub>, c.0.8);

IR<sup>KBr</sup> λ<sub>max</sub> cm<sup>-1</sup>: 3400 (br, OH), 1050 (C-O-C). ESI-MS (m/z) 427 [M-H]<sup>+</sup> (C<sub>28</sub>H<sub>44</sub>O<sub>3</sub>). <sup>1</sup>H-NMR (500MHz, CDCl<sub>3</sub>): 1.90-1.95 (2H, m, H-1); 1.55-1.58 (2H, m, H-2); 3.96 (1H, m, H-3); 1.83-1.88 (2H, m, H-4); 6.24 (1H, d, J=7.5Hz, H-6); 6.51 (1H, d, J=7.5Hz, H-7); 1.67 (1H, m, H-9); 1.19-1.22 (2H, m, H-11), 1.42 (2H, m, H-12); 1.71(1H, m, H-14); 1.42-1.48 (2H, m, H-15); 1.47-1.50 (2H, m, H-16); 1.26 (1H, m, H-17); 0.83 (3H, s, H-18); 0.88 (3H, s, H-19); 1.65 (1H, m, H-20); 1.00 (3H, d, J= 6.5Hz, H-21); 5.16 (1H, dd, J=7.5 và 14.5Hz, H-22); 5.22 (1H, dd, J= 7.0 và 15.0Hz, H-23); 2.09-2.11 (2H, m, H-24, H-25); 0.79 (3H, d, J=5.5Hz, H-26); 0.81 (3H, d, J= 5.5Hz, H-27); 0.92 (3H, d, J=6.0Hz, H-28). <sup>13</sup>C-NMR (125MHz, CDCl<sub>3</sub>) xem bảng III.3.11.



**Bảng IV.3.11. Dữ liệu phổ  $^{13}\text{C}$ -NMR của hợp chất 1 và 2**

STT	Hợp chất 1 ( $\text{CDCl}_3$ , 125MHz)	Tài liệu [1,2] ( $\text{CDCl}_3$ , 125MHz)	Hợp chất 2 ( $\text{CDCl}_3$ , 125MHz)	Tài liệu [3] ( $\text{CDCl}_3$ , 125MHz)
1	39.3	39.5	38.4	38.3
2	30.1	30.1	32.0	31.7
3	66.5	66.5	70.5	70.0
4	34.7	36.8	40.8	40.5
5	82.2	82.1	139.8	139.3
6	135.4	135.4	119.6	119.5
7	130.8	130.8	116.3	115.9
8	79.4	79.5	141.3	140.7
9	51.1	51.1	46.3	46.2
10	36.9	36.9	37.1	37.0
11	20.6	20.6	21.1	21.1
12	36.9	39.5	39.1	39.1
13	44.6	44.7	42.8	42.7
14	51.7	51.6	54.6	54.4
15	23.4	23.4	23.0	23.6
16	28.6	28.2	28.3	28.2
17	56.2	56.4	55.8	55.7
18	12.9	12.9	12.1	12.1
19	18.2	18.7	16.3	16.3
20	39.7	39.7	40.4	40.2
21	19.6	19.6	21.1	21.1
22	132.3	132.3	132.0	131.5
23	135.2	135.2	135.6	135.0
24	42.8	42.8	42.8	42.7
25	33.1	33.0	33.1	33.0

26	19.9	19.9	20.0	19.9
27	20.9	20.7	19.6	19.6
28	17.6	17.5	17.6	17.6

Hợp chất **2** phân lập được ở dạng tinh thể màu trắng, đ.n.c 168-169°C. Phổ  $^{13}\text{C}$ -NMR cũng cho tín hiệu của các nguyên tử cacbon đặc trưng cho khung sterol- $\text{C}_{28}$  tương tự hợp chất **1**, tuy nhiên tín hiệu của hai nguyên tử cacbon bậc bốn trong hợp chất **2** tại  $\delta_{\text{C}}$  139.8ppm (C-5)/119.6 (C-6) và 141.3ppm (C-8)/116.3 (C-7) cho thấy sự có mặt của hai liên kết đôi trong vòng B. Điều này hoàn toàn phù hợp với các tín hiệu của phổ  $^1\text{H}$ -NMR với  $\delta_{\text{H}}$ : 5.56ppm (1H, dd,  $J=3.0$  và  $5.0\text{Hz}$ , H-6) và 5.39ppm (1H, dd,  $J=3.0$  và  $5.0\text{Hz}$ , H-7); cùng với hai duplet duplet tại  $\delta_{\text{H}}$  5.18ppm (1H, dd,  $J=7.5$  và  $14.5\text{Hz}$ , H-22); 5.23ppm (1H, dd,  $J=7.0$  và  $15.0\text{Hz}$ , H-23); một multiplet ở  $\delta_{\text{H}}$  3.63ppm (1H, m, H-3) với  $\delta_{\text{C}}$  70.5ppm (C-3) đặc trưng cho  $-\beta\text{-ol}$ . Chúng tôi nhận dạng được hợp chất **2** là ergosterol, dữ liệu phổ của nó trùng hợp với tài liệu tham khảo.

### **Ergosterol (2)**

Tinh thể hình kim, màu trắng, đ.n.c 168-169°C,  $[\alpha]_{\text{D}}^{20} -132$  ( $\text{CHCl}_3$ , c.0.5);

ESI-MS ( $m/z$ ) 395  $[\text{M}-\text{H}]^+$  ( $\text{C}_{28}\text{H}_{44}\text{O}$ ).  $^1\text{H}$ -NMR (500MHz,  $\text{CDCl}_3$ ): 3.63 (1H, m, H-3); 5.56 (1H, dd,  $J=3.0$  và  $5.0\text{Hz}$ , H-6); 5.39 (1H, dd,  $J=3.0$  và  $5.0\text{Hz}$ , H-7); 0.63 (3H, s, H-18); 0.95 (3H, s, H-19); 1.03 (3H, d,  $J=8.0\text{Hz}$ , H-21); 5.18 (1H, dd,  $J=7.5$  và  $14.5\text{Hz}$ , H-22); 5.23 (1H, dd,  $J=7.0$  và  $15.0\text{Hz}$ , H-23); 0.78 (3H, d,  $J=6.0\text{Hz}$ , H-26); 0.79 (3H, d,  $J=6.0\text{Hz}$ , H-27); 0.92 (3H, d,  $J=6.0\text{Hz}$ , H-28).  $^{13}\text{C}$ -NMR (125MHz,  $\text{CDCl}_3$ ). (bảng III.3.11)

Hợp chất **3** có dạng bột màu trắng, các dữ liệu phổ NMR của hợp chất này đặc trưng cho kiểu cấu trúc của hợp chất ceramide. Phổ  $^1\text{H}$ -NMR cho tín hiệu của một duplet tại  $\delta_{\text{H}}$  7.49 (1H, d,  $J=9.0\text{Hz}$ ) đặc trưng cho proton NH, tín hiệu của 4 proton carbinol tại  $\delta_{\text{H}}$  3.76 (1H, dd,  $J=4.5$  và  $11.5\text{Hz}$ , H-1a), 3.81 (1H, dd,  $J=4.5$  và  $11.5\text{Hz}$ , H-1b); 3.55 (1H, dd,  $J=2.5$  và  $3.5\text{Hz}$ , H-3); 3.54 (1H, m, H-4); và 4.05 (1H, dd,  $J=4.0$  và  $8.5\text{Hz}$ , H-2'). Ngoài ra còn các tín hiệu của một singlet từ ở  $\delta_{\text{H}}$  1.29 và một triplet của hai nhóm  $\text{CH}_3$  đầu mạch tại  $\delta_{\text{H}}$  0.88 (6H, t,  $J=6.5\text{Hz}$ ) điển hình cho kiểu hợp chất ceramide với một nhánh là hidrocarbon no mạch dài và một nhánh là axit béo 2-hydroxy. Phổ  $^{13}\text{C}$ -NMR cho tín hiệu của nhóm carbonyl tại  $\delta_{\text{C}}$  176.0ppm, tín hiệu của nguyên tử cacbon liên kết với nitơ ở  $\delta_{\text{C}}$  51.9ppm cùng với tín hiệu của 4 cacbon carbinol tại  $\delta_{\text{C}}$  61.4ppm (C-1); 75.8ppm (C-3); 72.6ppm (C-4) và 72.2ppm (C-2'). Dữ liệu phổ của hợp chất này đã được so sánh với alomacrorrhiza A cho thấy hoàn toàn phù hợp với cấu trúc kiểu hợp chất ceramide. Tuy nhiên, để nhận dạng chính xác cấu trúc của hợp chất này cần phải có thêm một vài nghiên cứu khác nữa. Vì hợp chất này không thể hiện hoạt tính độc tế bào do vậy chúng tôi không tiếp tục đi sâu nghiên cứu về cấu trúc và chỉ nhận dạng hợp chất **3** là một ceramide.

### **Ceramide (3)**

Chất bột màu trắng.  $^1\text{H}$ -NMR (500MHz,  $\text{CDCl}_3$ ): 3.76 (1H, dd,  $J=4.5$  và  $11.5\text{Hz}$ , H-1a), 3.81 (1H, dd,  $J=4.5$  và  $11.5\text{Hz}$ , H-1b); 4.11 (1H, dd,  $J=4.5$  và  $8.5\text{Hz}$ , H-2); 3.55 (1H, dd,  $J=2.5$  và  $3.5\text{Hz}$ , H-3); 3.54 (1H, m, H-4); 1.60 (2H, m, H-5); 4.05 (1H, dd,  $J=4.0$  và  $8.5\text{Hz}$ , H-2'); 1.77 (1H, m, H-3a); 1.67 (1H, m, H-3b); 7.49 (1H, d,  $J=9.0\text{Hz}$ , NH); 0.88 (6H, t,  $J=6.5\text{Hz}$ ,  $\text{CH}_3$ ).  $^{13}\text{C}$ -NMR (125MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):

61.4ppm (C-1); 51.9 (C-2); 75.8ppm (C-3); 72.6ppm (C-4); 176.0 (C=O, C-1') và 72.2 (C-2').