

K
VIỆN KHOA HỌC VÀ CÔNG NGHỆ VIỆT NAM
VIỆN CÔNG NGHỆ SINH HỌC

BÁO CÁO TỔNG KẾT ĐỀ TÀI KC 04-17

**NGHIÊN CỨU CÁC GIẢI PHÁP CÔNG NGHỆ SINH
HỌC SẢN XUẤT CÁC CHẾ PHẨM Y SINH HỌC
ĐẶC THÙ ĐỂ BẢO VỆ SỨC KHOẺ NHÂN DÂN TỪ
NGUỒN TÀI NGUYÊN SINH VẬT VIỆT NAM**

Mã số: KC04- 17

Chủ nhiệm đề tài: PGS. TS. NGUYỄN THỊ NGỌC DAO

Nội dung:

CÁC SẢN PHẨM CỦA ĐỀ TÀI

Hà nội 12/ 2004

5429 - 10

28/8/05

MỤC LỤC

PHẦN 1: DANH MỤC CÁC SẢN PHẨM	Trang
A/ Các qui trình công nghệ	1- 247
B/ Các bài báo và báo cáo thuộc đề tài KC 04-17	248- 373
C/ Kết quả đào tạo	374- 395
D/ Các bằng sáng chế	396- 403
PHẦN 2: PHỤ LỤC	404
A/ Các giấy tờ kiểm nghiệm chất lượng sản phẩm	405- 472
B/ Các biên bản nghiệm thu một số nhánh đề tài	473- 488
C/ Các sản phẩm cụ thể	489- 497
D/ Một số hình ảnh hoạt động của đề tài	498- 518
E/ Ý kiến người sử dụng sản phẩm và Tình hình triển khai sản xuất một số chế phẩm của đề tài	519- 534

PHẦN I

DANH MỤC CÁC SẢN PHẨM

A/ CÁC QUY TRÌNH CÔNG NGHỆ

A/ CÁC QUY TRÌNH CÔNG NGHỆ

- CÁC QUY TRÌNH TÁCH CHIẾT TÍNH CHẾ HOẠT CHẤT TỪ ĐỘNG THỰC VẬT	Trang
1. Quy trình tách chiết phytoestrogen từ củ sắn dây Người chủ trì: TS. Đỗ Thị Hoa Viên	2
2. Quy trình tách chiết phytoestrogen từ đậu tương Người chủ trì: TS. Đỗ Thị Hoa Viên	10
3. Quy trình tách chiết polyphenol từ vỏ quả măng cụt Người chủ trì: PGS. TS. Nguyễn Thị Ngọc Dao	22
4. Quy trình tách chiết berberin từ cây hoàng liên gai, hoàng liên chân gà, hoàng bá và tổ chức nuôi cấy mô tế bào rễ hoàng liên gai Người thực hiện: PGS. TS. Nguyễn Thị Ngọc Dao	36
5. Quy trình thu nhận silymarin qui mô phòng thí nghiệm Người chủ trì: PGS. TS Lê Thị Lan Oanh	42
6. Quy trình chiết xuất và điều chế các sapogenin steroid của tât lê Việt nam Người chủ trì: TS. Phan Quốc Kinh	62
7. Quy trình thu nhận peptit kháng khuẩn từ thực vật Người chủ trì: GS. TSKH. Phạm Thị Trân Châu	70
8. Quy trình tinh sạch peptit của Hải long và Hải sâm Người chủ trì: GS. TSKH Nguyễn Tài Lương	75
9. Quy trình tách chiết enzym thủy phân fibrin từ loài giun đất Việt Nam. Người chủ trì: PGS. TS. Nguyễn Thị Ngọc Dao	83
II - CÁC QUY TRÌNH NGHIÊN CỨU TẠO PROTEIN TÁI TỔ HỢP	99

Báo cáo tổng kết đề tài KC 04-17

10. Quy trình tách dòng và biểu hiện gen mã hoá cho lumbrokinase từ loại giun quế <i>perionyx excavatus</i> Người chủ trì: TS. Đặng Diễm Hồng	100
11. Quy trình tách dòng gen mã hoá chất mang có ái lực với tế lympho ung thư máu Người chủ trì: TS. Lê Quang Huấn	124
12. Quy trình tách gen Melittin từ ong mật Người chủ trì: TS. Lê Quang Huấn	131
13. Quy trình thu nhận Melittin- carries để ứng dụng trong y học Người chủ trì: TS. Lê Quang Huấn	137
III - CÁC QUY TRÌNH CÔNG NGHỆ TẠO SẢN PHẨM	144
14. Quy trình nhân nhanh sinh khối mô hoàng liên (<i>berberidaceae</i>) bằng công nghệ tế bào thực vật Người chủ trì: BS. Đinh Thị Thu Hiền	145
15. Quy trình nhân nhanh cây giống hoàng liên gai Người chủ trì: BS. Đinh Thị Thu Hiền	154
16. Quy trình công nghệ tạo sinh khối cúc gai (<i>silybum marianum</i>) trồng ở Việt nam làm nguyên liệu sản xuất thuốc Người chủ trì: PGS. TS Lê Thị Lan Oanh	166
17. Quy trình sản xuất thuốc Uphaton Người chủ trì: ThS. Nguyễn Kim Dung, TS. Phan Quốc Kinh	178
18. Quy trình sản xuất thuốc Tribelus Người chủ trì: ThS. Nguyễn Kim Dung	183
19. Quy trình sản xuất thuốc Tiên dung Người chủ trì: ThS. Nguyễn Kim Dung	188
20. Quy trình công nghệ sản xuất bột thuốc Hagaton Người chủ trì: GS. TSKH Nguyễn Tài Lương	194

Báo cáo tổng kết đề tài KC 04-17

21. Quy trình sản xuất bột giun quế làm thuốc chống đông máu Người chủ trì: PGS. TS. Nguyễn Thị Ngọc Dao	217
22. Quy trình công nghệ sản xuất bột nấm tinh khiết Người chủ trì: GS. TSKH Trịnh Tam Kiệt	227
23. Quy trình công nghệ tạo sinh khối nấm dược liệu <i>Hericium erinaceum</i> Người chủ trì: TS. Nguyễn Hồng Hà	232

I/ CÁC QUY TRÌNH TÁCH CHIẾT TINH CHẾ HOẠT CHẤT TỪ ĐỘNG THỰC VẬT

QUY TRÌNH
TÁCH CHIẾT PHYTOESTROGEN TỪ
CỦ SẮN DÂY

NGƯỜI CHỦ TRÌ:: TS. ĐỖ THỊ HOA VIÊN

HÀ NỘI - 2004

1. MỞ ĐẦU

Sắn dây là một loài cây rất phổ biến ở Việt Nam và trên thế giới. Trong y học dân gian Việt Nam, sắn dây đã được coi là vị thuốc dùng một mình hoặc kết hợp với một số vị thuốc khác có thể phòng trị nhiều chứng bệnh rất hiệu quả. Gần đây, các nhà nghiên cứu còn phát hiện ra trong sắn dây, đặc biệt là sắn dây củ tròn có chứa các isoflavone có hoạt tính phytoestrogen. Các phytoestrogen có hoạt tính như hoặc môn estrogen trong cơ thể nữ nên rất quan trọng đối với phụ nữ ở thời kỳ tiền mãn kinh, giúp chống lại các triệu chứng có liên quan đến sự giảm đột ngột hoặc môn estrogen như loãng xương, trầm cảm, rối loạn tuần hoàn...đặc biệt các isoflavonoid có hoạt tính phytoestrogen này còn có vai trò trong việc ngăn ngừa các bệnh tim mạch, ung thư vú.v.v. Vì vậy chúng tôi cũng đã bước đầu khảo sát hoạt chất phytoestrogen trong củ sắn dây Việt Nam.

2. NGUYÊN LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1 Nguyên liệu

Củ của loài sắn dây *Pueraria thompsonii* Benth thuộc họ cánh bướm Fabaceae (Papilionaceae) của Việt Nam. Củ sắn dây sau khi thu hoạch được rửa sạch, thái thành từng lát mỏng, sau đó đem sấy ở nhiệt độ 80⁰C đến trọng lượng không đổi. Đem nghiền nhỏ sắn dây khô ở dạng lát thành bột, rây qua rây cho đồng đều rồi bảo quản bột thu được trong các túi P.E ở nơi khô mát và thoáng gió.

2.2 Các phương pháp nghiên cứu

Chiết xuất hỗn hợp isoflavonoid từ bột sắn dây khô: chiết xuất hỗn hợp isoflavonoid từ bột sắn dây khô bằng các dung môi hữu cơ thích hợp như etanol, ethyl acetat, cloroform với tỉ lệ là 100g bột sắn dây khô: 700 ml dung môi, thời gian ngâm mẫu ít nhất là 24 giờ. Sau khi thu chiết và cô đặc ta được cao có chứa hỗn hợp isoflavonoid có màu nâu đỏ.

Phương pháp sắc kí bản mỏng : được sử dụng để định tính, tách và tinh chế các isoflavonoid có trong sắn dây.

Phương pháp sắc kí lỏng cao áp: dựa vào phương pháp này có thể xác định cụ thể hàm lượng các isoflavonoid. Mẫu chuẩn được sử dụng là hỗn hợp isoflavonoid chiết xuất từ viên phytoest của Mỹ có chứa daidzein và genistein. Sau đó chúng tôi so sánh kết quả phân tích của dịch chiết với mẫu chuẩn dựa vào sắc kí đồ (thời gian lưu của các pic) và dựa vào phổ tử ngoại của các pic.

3. KẾT QUẢ

3.1. XÁC ĐỊNH ĐỘ ẨM NGUYÊN LIỆU bằng phương pháp sấy đến trọng lượng không đổi và phương pháp xác định độ ẩm nguyên liệu trên máy đo độ ẩm hồng ngoại (Moisture analyser, Adam AMB50). Mỗi thí nghiệm được tiến hành 3 lần, lấy kết quả trung bình.

Kết quả: độ ẩm của sản dây là: $W_{sd} = 66,07\%$

3.2. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU PHYTOESTROGEN TỪ SẢN DÂY

Sử dụng các phương pháp TN tương tự như đối với đậu tương, chúng tôi lần lượt tiến hành các nội dung nghiên cứu sau:

3.2.1. Chiết xuất và định lượng cao chứa hỗn hợp isoflavone

Bảng 2: kết quả xác định hàm lượng cao chứa hỗn hợp isoflavone và tinh bột theo %.

DM chiết Hàm lượng các SP thu được	Etanol 96%	Etylacetat	Cloroform	Nước
Khối lượng cao chứa hỗn hợp isoflavone (% nguyên liệu khô)	0,05	0,03	0,03	0,037

3.2.2. Xác định sự có mặt của các isoflavone trong sản dây

Sử dụng phương pháp sắc ký bản mỏng và sắc ký lỏng cao áp.

Mẫu chuẩn: viên Phyto-Est (Soya isoflavone của Mỹ)

3.2.3. So sánh mẫu chuẩn và hỗn hợp isoflavone chiết từ sản dây bằng etanol bằng phương pháp HPLC

Sử dụng sắc ký lỏng cao áp HPLC với mẫu chuẩn là hỗn hợp isoflavone chiết xuất từ viên phytoest của Mỹ có chứa daidzein và genistein và mẫu hỗn hợp isoflavone chiết từ sản dây bằng etanol 96°.

So sánh sắc ký đồ trong cùng một điều kiện thí nghiệm.

Bảng 3: So sánh kết quả HPLC của mẫu chuẩn và dịch chiết sản dây trong Et

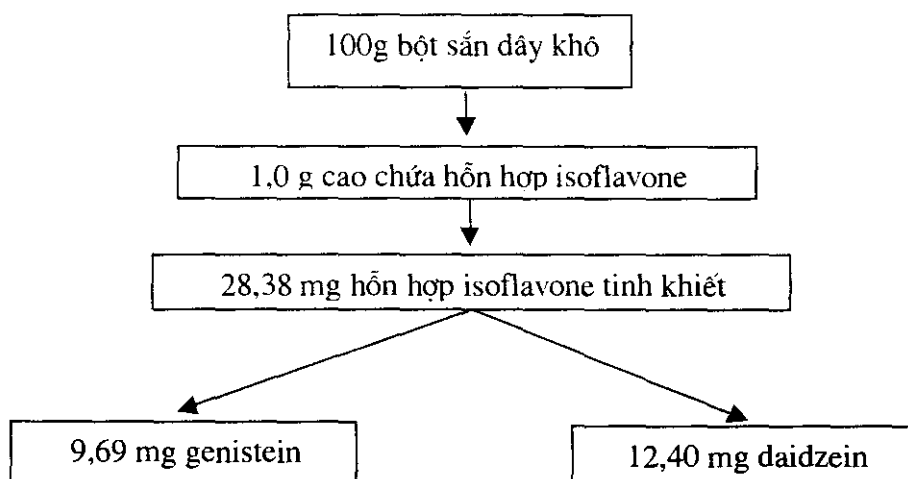
Mẫu thí nghiệm	Các peak trùng nhau về thời gian lưu	Peak 1		Peak 2	
		Thời gian lưu (phút)	Diện tích Peak (%)	Thời gian lưu (phút)	Diện tích Peak (%)
Mẫu chuẩn		1,56	67,25	1,84	9,83
Dịch chiết sản dây trong etanol		1,54	68,36	1,83	17,69

Tiến hành đo phổ tử ngoại với các peak 1, 2 với mẫu dịch chiết sản dây trong etanol được đỉnh hấp phụ cực đại của các peak này là 250, 262 nm. Các kết quả này trùng lặp với các kết quả nghiên cứu đã công bố về các phytoestrogen. Điều này cho phép bước đầu kết luận rằng trong hỗn hợp isoflavone thu được có các chất có hoạt tính phytoestrogen: daidzein phổ tử ngoại là 250 nm và genistein phổ tử ngoại là 262,5 nm

3.2.4. Tinh chế và định lượng hỗn hợp isoflavone có hoạt tính phytoestrogen bằng phương pháp SKLM điều chế

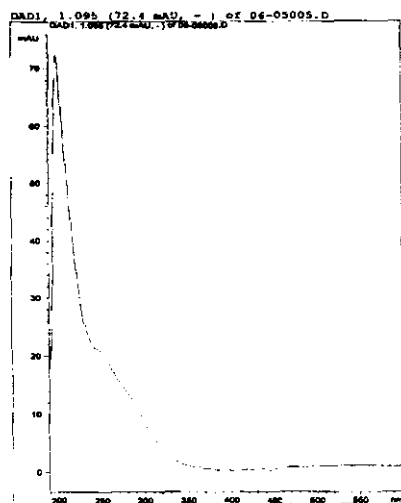
Xác định hàm lượng daidzein và genistein trong hỗn hợp isoflavone đã tinh chế bằng cân phân tích và phương pháp sắc ký lỏng cao áp

Sơ đồ biểu diễn kết quả chiết xuất Phytoestrogen từ sản dây



So sánh sắc ký đồ HPLC của mẫu chuẩn và hỗn hợp isoflavone chiết từ củ sắn dây

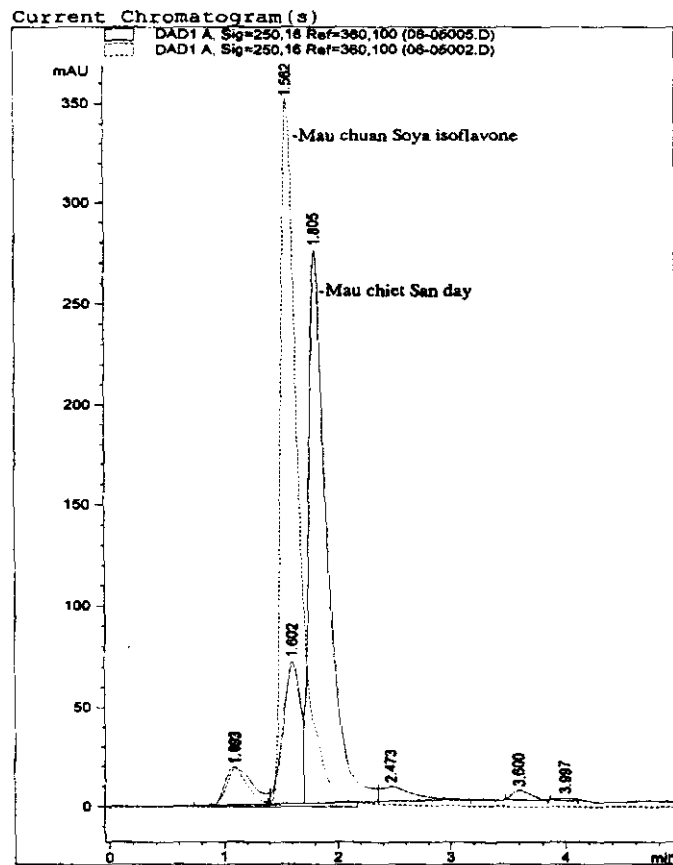
Print of window 39: DAD1. 1.095 (72.4 mAU, -) of 06-0504 Print of window 42: Original spectrum(a)



Instrument 1 5/6/02 2:00:05 PM Nguyen V DaPage 1 of 1

Instrument 1 5/6/02 1:59:34 PM Nguyen V DaPage 1 of 1

P1 Phổ UV của các isoflavone chiết xuất từ sắn dây



Instrument 1 5/6/02 2:25:56 PM Nguyen V DaPage 1 of 1

3.3. THỬ NGHIỆM SƠ BỘ ĐỘC TÍNH TRÊN ĐỐI TƯỢNG SINH HỌC

Thử nghiệm hỗn hợp isoflavone có hoạt tính phytoestrogen trên đối tượng chuột bạch, giới tính cái, 45 - 50 ngày tuổi, trọng lượng trung bình 20 g, đã trưởng thành về mặt sinh lý được tiến hành trong 20 ngày,

Nhóm thí nghiệm gồm 5 con được ký hiệu từ 1 đến 5, nhóm đối chứng gồm 5 con được ký hiệu từ 1' đến 5'. Hai nhóm này được nuôi trong điều kiện dinh dưỡng như nhau là 6g thức ăn/ngày, riêng nhóm thí nghiệm có sử dụng 100 mg cao chứa hỗn hợp isoflavone/ngày.

Bảng 8: Kết quả trọng lượng chuột trước và sau thí nghiệm

STT	nhóm thí nghiệm		nhóm đối chứng	
	Trọng lượng đầu (g)	Trọng lượng cuối (g)	Trọng lượng đầu (g)	Trọng lượng cuối (g)
1	19,9	25,2	19,7	25,2
2	20,1	25,3	19,9	25,3
3	19,8	25,1	20,2	26,5
4	20,2	26,1	20,3	26,1
5	20,3	26,2	20,2	26,4
Trung bình	20,06	25,58	20,06	25,7

Kết quả thí nghiệm cho thấy hai nhóm chuột thí nghiệm và chuột đối chứng đều lên cân và linh hoạt, không có biểu hiện bất thường. Toàn bộ chuột thí nghiệm và chuột đối chứng đã được mổ để quan sát các cơ quan nội tạng.

Phương pháp mổ: Dùng dao mổ rạch một đường từ ức đến hết phần bụng, mở phần bụng, dùng bông thấm hết máu và dịch. Quan sát màu sắc của các nội tạng và các khối u lạ (nếu có).

Kết quả quan sát:

- 5 chuột nhóm đối chứng có phủ tạng tươi hồng đều, không thấy có khối u lạ, không có chỗ nào bị thâm tím hay thương tổn.
- 5 chuột nhóm thí nghiệm khi mổ ra cũng có kết quả như nhóm đối chứng.

Trên cơ sở thí nghiệm có thể sơ bộ kết luận với liều 2 gam cao chứa hỗn hợp isoflavone trong 20 ngày không gây độc cấp tính đối với chuột.

4. KẾT LUẬN

Tiến hành nghiên cứu chiết xuất và xác định các isoflavone từ củ sắn dây *Pueraria thompsonii* Benth, chúng tôi đã nhận được các kết quả sau:

1. Độ ẩm nguyên liệu

$$w = 66,07 \%$$

2. Hàm lượng tinh bột trong nguyên liệu tươi

$$a = 9,56 \%$$

3. Hàm lượng cao chứa hỗn hợp isoflavone

Dung môi	Lượng cao chứa hỗn hợp isoflavone (% nguyên liệu khô)
Etanol	1 %
Ethylacetat	0,2 %
Cloroform	0,27
Nước	0,037 %

4. Trong 100 g bột sắn dây khô khi chiết bằng etanol thì thu được 1,0 gam cao chứa hỗn hợp isoflavone. Tinh chế cao này thì được 9,69 mg genistein và 12,4 mg daidzein.
5. Bằng kết quả sắc ký lỏng cao áp và đo diện tích các peak xác định được tỷ lệ phần trăm của hỗn hợp isoflavone trong nguyên liệu khô ban đầu là 0,01936% (genistein chiếm 0,00696%, daidzein chiếm 0,0124%)
6. Cao có chứa hỗn hợp isoflavone chiết xuất từ củ sắn dây không gây độc cấp tính đối với chuột thí nghiệm, chuột lên cân và linh hoạt, không có biểu hiện bất thường.



Ảnh 4: Hình ảnh cây sắn dây

QUY TRÌNH
TÁCH CHIẾT PHYTOESTROGEN TỪ
ĐẬU TƯƠNG

NGƯỜI CHỦ TRÌ:: TS. ĐỖ THỊ HOA VIÊN

HÀ NỘI - 2004

1. MỞ ĐẦU

Đậu tương không những là một sản phẩm thực phẩm có giá trị dinh dưỡng cao mà trong đậu tương còn có những hoạt chất sinh học quý giá. Ngày nay, các nhà khoa học trên thế giới đã xếp đậu tương là một trong những “thực phẩm chức năng”. Các điều tra về dịch tễ học cho thấy phụ nữ châu Á, đặc biệt là phụ nữ Nhật Bản có thói quen tiêu thụ nhiều sản phẩm đậu tương thì nguy cơ mắc các chứng bệnh tiền mãn kinh, loãng xương, ung thư vú... thấp hơn nhiều so với phụ nữ các châu lục khác trên thế giới. Một trong những hoạt chất quý góp phần tạo nên các chức năng phòng chữa bệnh của đậu tương là các isoflavone có hoạt tính estrogen, còn được gọi là các phytoestrogen.

Việt Nam sẵn có một nguồn đậu tương dồi dào, được sử dụng từ lâu trong đời sống hàng ngày bởi các sản phẩm quen thuộc như sữa đậu nành, đậu phụ, tào phớ, các thực phẩm chay... Để góp phần nghiên cứu khai thác các hoạt chất có hoạt tính sinh học cao trong đậu tương vào mục đích phòng chống bệnh tật, chúng tôi đã tiến hành nghiên cứu chiết xuất các phytoestrogen từ đậu tương, đậu tương nảy mầm và thử nghiệm hoạt tính của chúng trên động vật.

2. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU

2.1. Nghiên cứu nảy mầm đậu tương

Nảy mầm đậu tương là một biện pháp hữu hiệu để làm gia tăng hàm lượng protein, tăng chỉ số hòa tan của protein, acid amin, chất khoáng, enzym, các vitamin A, C, E... đặc biệt là tăng hàm lượng các isoflavone, và giảm một lượng lớn lipid, glucit, các thành phần phản dinh dưỡng, làm mất mùi ngái khó chịu.

Quy trình nảy mầm đậu tương gồm 4 giai đoạn: ngâm, rửa, ủ, tưới nước.

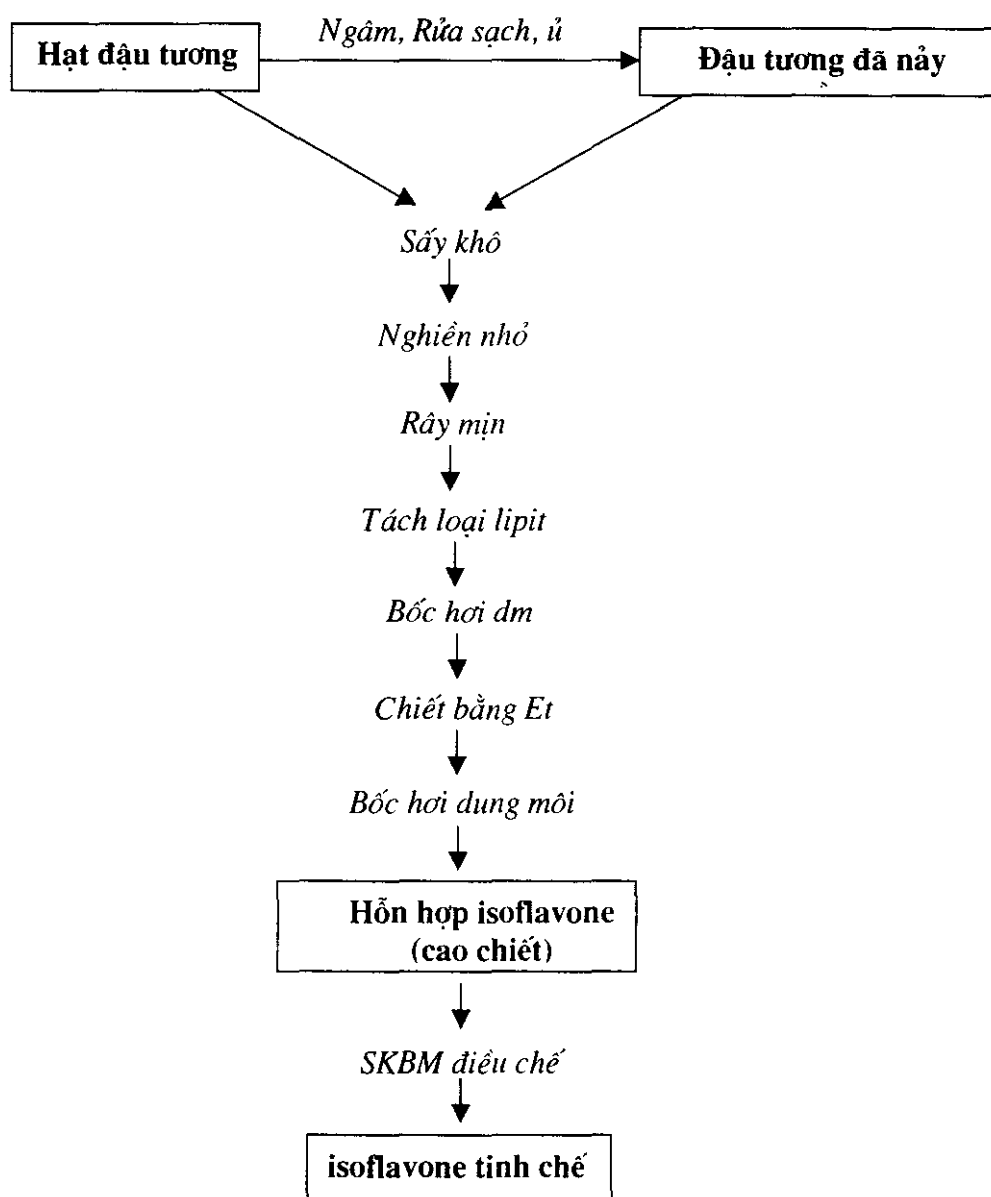
Chúng tôi đã tiến hành nảy mầm đậu tương ở các khoảng thời gian và nhiệt độ khác nhau và thấy rằng chế độ nảy mầm tối ưu của đậu tương để thu được hàm lượng hoạt chất cao nhất là:

$$T_{nm} = 72 \text{ h}$$

$$T^{\circ} \text{ opt} = 25^{\circ}\text{C}$$

QUY TRÌNH

CHIẾT XUẤT CAO CHỨA HỖN HỢP ISOFLAVONE VÀ TINH CHẾ HỖN HỢP ISOFLAVONE
TỪ HẠT ĐẬU TƯƠNG VÀ ĐẬU TƯƠNG NẤY MẦM:



2.2. Loại lipid khỏi bột đậu tương

Sử dụng hexane để loại lipid, chiết 3 lần, ở mỗi lần chiết: tỷ lệ NL : DM = 1:3. Tiến hành thí nghiệm 3 mẫu và lấy kết quả trung bình.

Kết quả: hàm lượng lipid trong đậu tương là: $Ldt = 14.49\%$

Hàm lượng lipid trong đậu tương nảy mầm là: $Ldtnm = 8\%$

2.3. Chiết hỗn hợp isoflavone từ đậu tương và đậu tương nảy mầm

Sử dụng 3 hệ dung môi Metylic 80%, Etylic 96%, nước cất (pH = 4.5).

Nguyên liệu: bột đậu tương và đậu tương nảy mầm (đã loại lipid)

Bảng 1: Cao chiết chứa hỗn hợp Isoflavone trong đậu tương

Lần TN	DM	Metanol 80%	Etanol 96%	Nước (pH=4.5)
		m1(g)	m2(g)	m3(g)
1		5.00	1.40	4.50
2		5.30	1.40	4.10
3		5.10	1.30	4.30
KQTB		5.13	1.37	4.30
		10.26	2.74	8.60

Bảng 2: Cao chiết chứa hỗn hợp Isoflavone trong đậu tương nảy mầm

Lần TN	DM	Metanol 80%	Etanol 96%	Nước (pH=4.5)
		m1'(g)	m2'(g)	m3'(g)
1		5.20	2.80	4.20
2		5.40	3.00	4.30
3		5.20	2.80	4.30
KQTB		10.52	5.74	8.54

Nhận xét:

1. **Lượng chất chiết được trong mỗi hệ dung môi có khác biệt đáng kể.**
Dung môi 1 (Metylic 80%): Lượng chất chiết được chiếm 10.26 % lượng mẫu thí nghiệm. Dung môi 2 (Etylic) chiết được 2.74 %, dung môi 3 (nước cất) chiết được 8.60%.
2. **Trên hai mẫu đối tượng thí nghiệm là bột đậu tương chưa nảy mầm và bột đậu tương đã nảy mầm, lượng chất chiết được xấp xỉ nhau. Nhưng với hệ dung môi Etylic 96% có sự chênh lệch đáng kể**

Phân tích bằng HPLC (so sánh với mẫu chuẩn Phyto-est) cho thấy hàm lượng isoflavone trong đậu tương nảy mầm cao hơn trong đậu tương chưa nảy mầm. Tuy lượng cao chiết nhận được trong dung môi Etanol thấp nhất nhưng hỗn hợp isoflavone thu được trong dung môi này tinh sạch nhất trong 3 dung môi đã sử dụng. Vì vậy chúng tôi đã chọn Etanol 96% làm dung môi để chiết hỗn hợp isoflavone dạng cao.

2.4. Phân tích định tính nhận biết sự có mặt của Isoflavone

- **Phản ứng màu với hơi kiềm Amoniac:**

Phản ứng cho kết quả dương tính

- **Phương pháp Sắc ký bản mỏng:**

Hệ dung môi chạy sắc ký: Cloroform: Etylic = 3:1

Sau khi chạy sắc ký, làm khô dung môi trong tủ sấy. Đặt bản sắc ký trong buồng Iod, sẽ có các vết màu hiện rõ, đo khoảng chạy Rf để xác định loại Isoflavone khi so sánh với các giá trị Rf tiêu chuẩn.

- **Phân tích định tính Isoflavone bằng sắc ký lỏng cao áp**

Mẫu chuẩn: viên Phyto-Est (Mỹ)

Hệ dung môi: Metanol tinh khiết/nước = 75/25

Nhận xét kết quả:

So sánh giữa sắc ký đồ mẫu chuẩn Soya Isoflavone (viên Phyto-Est) (dựa vào thời gian lưu) thì hai chất mong muốn tách (Genistein và Daidzein) dự đoán :

Genistein: Thời gian lưu $t = 1.564$ min

UV = 262.5 nm

Daidzein: Thời gian lưu $t = 1.837$ min

UV = 250 nm

2.5. Tinh chế Genistein và Daidzein bằng sắc ký bản mỏng

Với mong muốn bào chế được thuốc phục vụ cho con người, chúng tôi chọn mẫu 2 chiết bằng dung môi Etylic 96% để tinh chế, định lượng các cấu tử Isoflavone trong đậu tương với hai lý do: dung môi Etylic không gây độc cho người và Etylic là một dung môi tương đối rẻ trong điều kiện sản xuất công nghiệp.

- Mẫu TN: cao chiết Isoflavone đậu tương.
- 3 bản sắc ký bản mỏng kích thước 200*200, chất mang là Silicagel.
- Dung môi chạy sắc ký : Cloroform/Etylic = 3/1

Bảng 3 : Kết quả SKLM điều chế

M.10 ³ (mg)	M.10 ³ (mg)	ΔM	Vết 1		Vết 2	
			mg	Tỷ lệ %	mg	Tỷ lệ %
16.2964	15.7521	544.3	40.5	7.44	10	1.84

Ký hiệu : ΔM : Khối lượng mẫu đã đưa lên bản sắc ký

Vết 1: Hỗn hợp một số Isoflavone

Lấy đĩa chứa các tinh thể tách ra từ vết 1, hoà tan bằng dung môi Metylic, chuẩn bị chạy sắc ký HPLC để có thể nhận biết được các chất cũng như tỉ lệ phần trăm trong hỗn hợp tinh thể đã tách ra. Trên cơ sở đó cũng so sánh với sắc ký đồ của mẫu chuẩn Soya Isoflavone (viên Phyto-Est).

Kết quả chạy sắc ký HPLC như sau: Trên sắc ký đồ của mẫu phân tích có 3 pic, trong đó pic 1 (1.305) chưa xác định được, còn pic 2 và pic 3 dự đoán là Genistein và Daidzein với các đặc trưng sau:

Bảng 4: Đặc trưng của Sắc ký đồ HPLC của hỗn hợp isoflavone tinh chế

STT pic	Thời gian lưu (min)	Bề rộng pic (min)	Diện tích pic(mAU.s)	Chiều cao pic(mAU)	Tỷ lệ %
1	1.305	0.1462	1820.41	168.26	22.85
2	1.575	0.1287	5080.68	600.57	63.79
3	1.868	0.1484	1062.79	101.28	13.34

Đo phổ hấp phụ tử ngoại cực đại tương ứng với các pic:

pic 2 : UV = 261 nm.

pic 3 : UV=250.5 nm.

So sánh với sắc ký đồ của mẫu chuẩn Soya Isoflavone , chúng tôi thấy pic 2 và pic 3 trùng với các pic của mẫu chuẩn. Các pic 1 (1.105) và pic 4 (1.984) của mẫu chuẩn có thể là các cấu tử tá dược trong thuốc. Như vậy, dựa vào mẫu chuẩn so sánh, các đặc trưng trên sắc ký đồ, thời gian lưu, phổ hấp phụ tử ngoại, cho thấy sự có mặt của Genistein (pic 2) và Daidzein (pic 3).

2.6. Định lượng từng cấu tử isoflavone dựa trên cơ sở các đặc trưng của sắc ký đồ HPLC.

Sắc ký đồ HPLC của mẫu chuẩn (Phyto-Est)

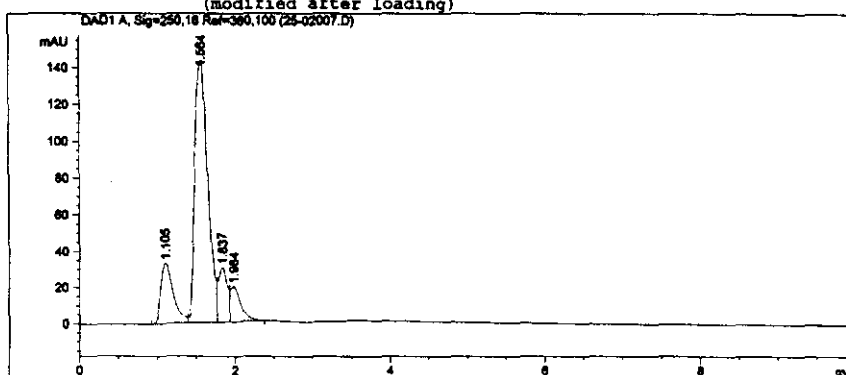
Data File D:\DATA\25-U2007.D

Sample Name: Soya isoflavonid

Mau Soya flavonid

=====

Injection Date : 2/25/02 9:55:49 AM
Sample Name : Soya isoflavonid Vial : 1
Acq. Operator : Nguyen Van Dat
Method : C:\HPCHEM\1\METHODS\DOC 1.M
Last changed : 2/25/02 10:07:20 AM by Nguyen Van Dat
(modified after loading)



Area Percent Report

=====

Sorted By : Signal
Multiplier : 1.0000
Dilution : 1.0000
Sample Amount : 5.00000 [ng/ul] (not used in calc.)

Signal 1: DAD1 A, Sig=250,16 Ref=360,100

Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area [mAU*s]	Height [mAU]	Area %
1	1.105	BV	0.1699	379.16736	33.54188	15.3060
2	1.564	VV	0.1934	1666.05090	143.56767	67.2539
3	1.837	VV	0.1338	243.55092	30.33497	9.8315
4	1.984	VB	0.1605	188.48447	19.57393	7.6086

Totals : 2477.25365 227.01846

Results obtained with enhanced integrator!

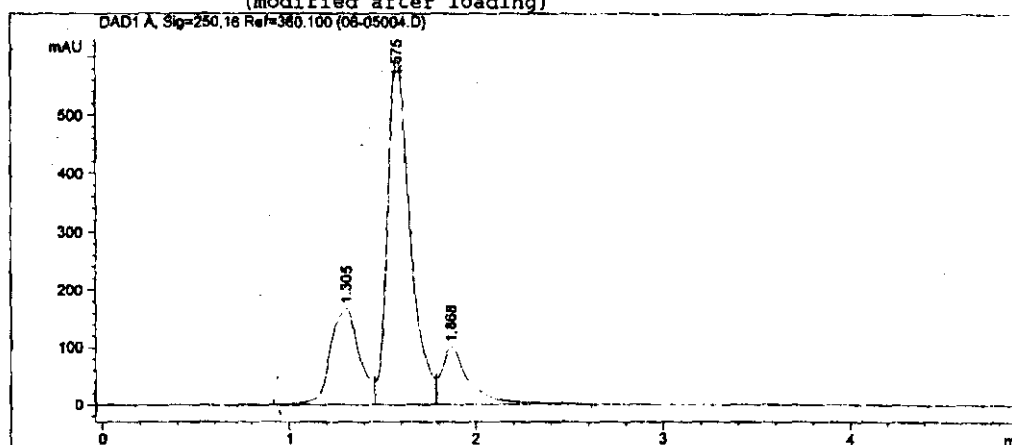
*** End of Report ***

Sắc ký đồ HPLC của hỗn hợp isoflavone chiết xuất từ đậu

mau chiet xuất bang etanol lan 2

=====

Injection Date : 5/6/02 1:41:30 PM
Sample Name : Dau tuong Vial : 1
Acq. Operator : Nguyen V Dat Le Thi Duc
Method : C:\HPCHEM\1\METHODS\DOC 1.M
Last changed : 5/6/02 1:45:39 PM by Nguyen V Dat Le Thi Duc
(modified after loading)



Area Percent Report

=====

Sorted By : Signal
Multiplier : 1.0000
Dilution : 1.0000
Sample Amount : 3.00000 [ng/ul] (not used in calc.)

Signal 1: DAD1 A, Sig=250,16 Ref=360,100

Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area [mAU*s]	Height [mAU]	Area %
1	1.305	BV	0.1462	1820.41968	168.26192	22.8584
2	1.575	VV	0.1287	5080.68994	600.57446	63.7964
3	1.868	VB	0.1484	1062.79980	101.28993	13.3452

Totals : 7963.90942 870.12631

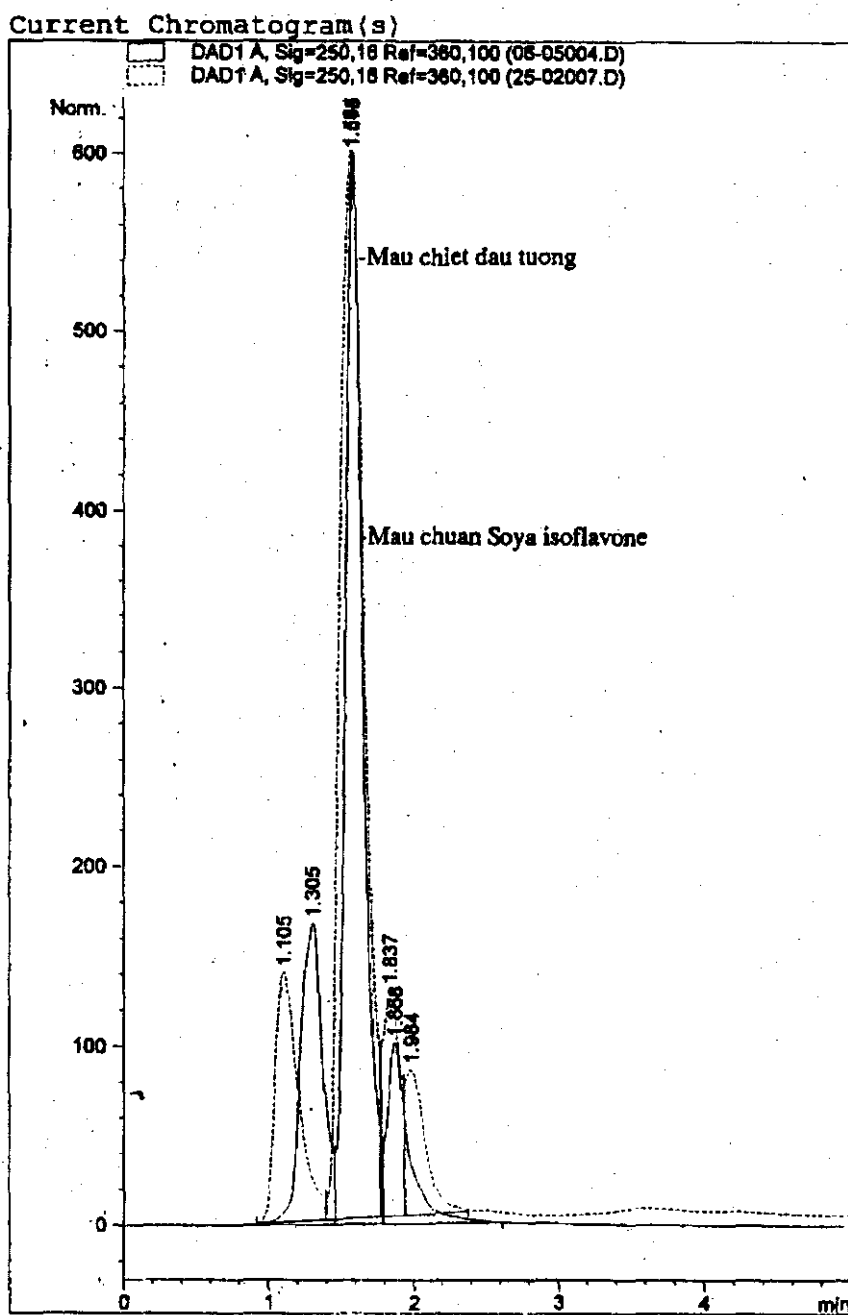
Results obtained with enhanced integrator!

=====

*** End of Report ***

Sắc ký đồ HPLC của mẫu chuẩn và hỗn hợp isoflavone chiết từ đậu tương

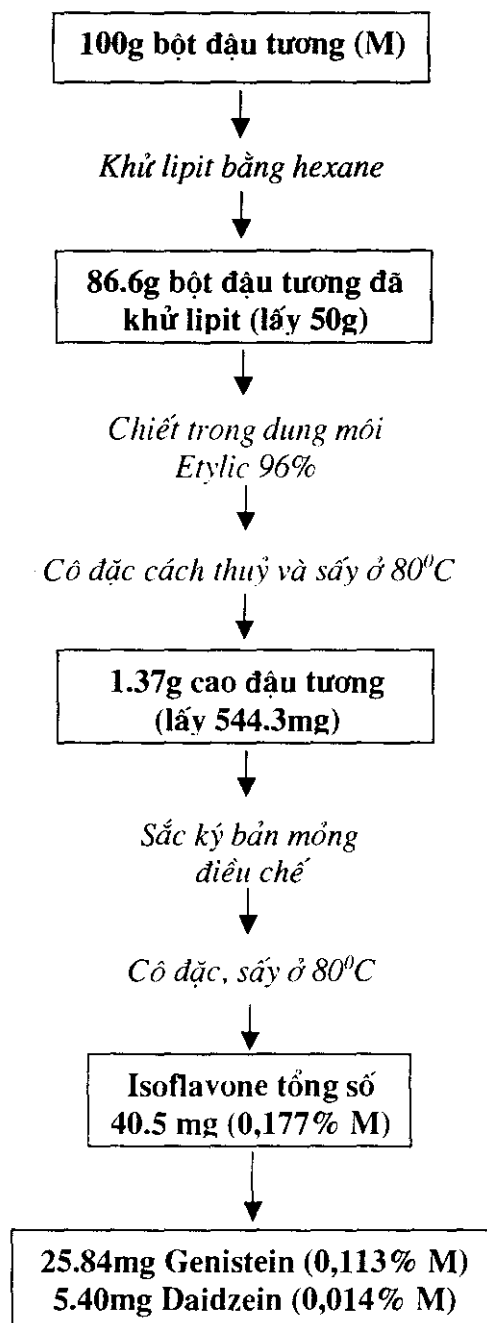
Print of window 38: Current Chromatogram(s)



Instrument 1 5/6/02 2:32:15 PM Nguyen V DaPage 1 of 1

QUY TRÌNH
TÁCH CHIẾT POLYPHENOL TỪ VỎ QUẢ
MĂNG CỤT

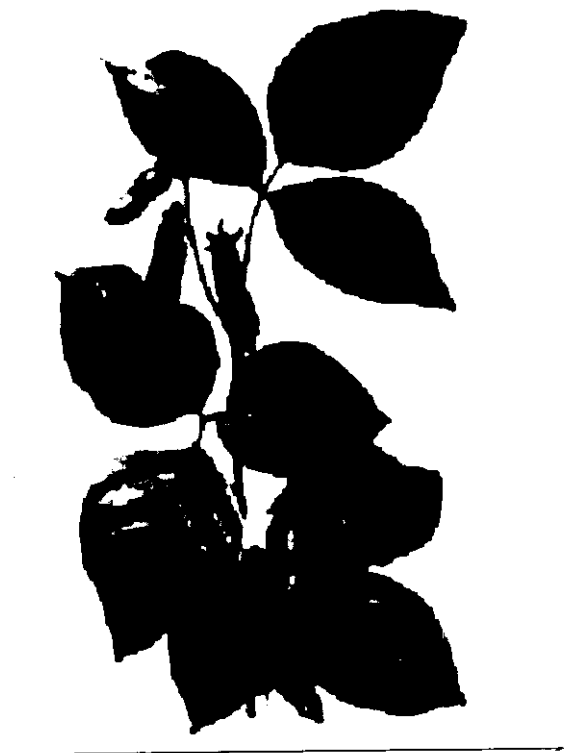
NGƯỜI CHỦ TRÌ: PGS. TS. NGUYỄN THỊ NGỌC DAO



3. KẾT LUẬN

1. Độ ẩm nguyên liệu $W = 13.5\%$
2. Hàm lượng lipid $L = 14.49\%$
3. Hàm lượng Genistein trong cao đậu tương chiết bằng Etylic là 4.750% .

4. Hàm lượng Genistein trong 100g bột đậu tương là: 0.113 %.
5. Hàm lượng Daidzein trong cao đậu tương chiết bằng Etlyic là 0.992 %.
6. Hàm lượng Daidzein trong 100g bột đậu tương là 0.014 %.
7. Hàm lượng Isoflavone tổng số trong cao đậu tương chiết bằng Etlyic là 7.44 %.
8. Hàm lượng Isoflavone tổng số trong 100g bột đậu tương là 0.177%.



Ảnh 5: Hình ảnh cây đậu tương

QUY TRÌNH
TÁCH CHIẾT POLYPHENOL TỪ VỎ QUẢ
MĂNG CỤT

NGƯỜI CHỦ TRÌ: PGS. TS. NGUYỄN THỊ NGỌC DAO

HÀ NỘI - 2004

Chuyên đề:

Nghiên cứu qui trình:

Tách chiết polyphenol từ dịch chiết vỏ quả măng cụt (*Garcinia mangostana* L.) và tác dụng của chúng lên vi khuẩn gây sâu răng *Streptococcus mutans*

MỞ ĐẦU

Cho đến nay fluo vẫn được xem là một tác nhân chống sâu răng có hiệu quả cao và được sử dụng rộng rãi trong các sản phẩm vệ sinh và bảo vệ răng miệng. Tác dụng của fluo bao gồm sự ức chế các quá trình sinh axit, hô hấp, hình thành biofilm của các vi khuẩn streptococcus và gia tăng sự nhạy cảm của tế bào vi khuẩn đối với tác dụng gây tổn thương bởi axit. Fluo cũng tác dụng như chất ức chế của enolase của quá trình phân giải đường [5], hay của catalase, enzym phân giải H_2O_2 , do đó làm cho cả vi khuẩn sinh và không sinh catalase trở nên nhạy cảm với tác dụng của H_2O_2 [15]. Tuy nhiên sử dụng các sản phẩm có nhiều fluo lâu ngày sẽ dẫn đến tình trạng nhiễm fluo [17]. Xu thế nghiên cứu hiện nay là tìm kiếm những hợp chất mới để có thể sử dụng kết hợp với fluo ở nồng độ thấp nhưng vẫn hiệu quả trong việc chống sâu răng. Theo hướng này một loạt những hợp chất có tác dụng diệt khuẩn như các axit yếu, chlorohexidine, triclosan, paraben... đã được nghiên cứu và từng bước đưa vào ứng dụng [1, 2, 15]. Ngoài ra một số hợp chất tự nhiên chiết xuất từ thực vật mà điển hình là nhóm polyphenol cũng đã được khảo sát và chúng tỏ ra có khả năng chống sâu răng [9, 10, 11, 12, 13].

Chuyên đề này trình bày những kết quả nghiên cứu của chúng tôi về qui trình tách chiết và tác dụng của hợp chất polyphenol từ vỏ quả măng cụt lên vi khuẩn gây sâu răng chủ yếu *Streptococcus mutans*.

Nguyên liệu và phương pháp nghiên cứu

Chủng vi sinh vật

Chủng vi sinh vật *Streptococcus mutans* GS-5 là quà tặng của GS. Robert E. Marquis, Đại học Rochester, New York, Hoa kỳ. Các chủng vi sinh vật dùng cho nghiên cứu được giữ và cấy chuyển hàng tuần lên môi trường thạch (tryptic soy agar - TSA) của hãng Difco.

Nguyên liệu thực vật

Vỏ quả măng cụt (MC) được sử dụng ở dạng tươi và khô. Nguyên liệu được chiết trong các dung môi: nước, etanol, chloroform, etylacetat (theo tỉ lệ 1 g nguyên liệu: 3 thể tích dung môi) bằng cách ngâm nguyên liệu nhiều giờ trong dung môi (chiết ngâm) và chiết hồi lưu bằng socklet.

Phương pháp nghiên cứu

Định tính và định lượng polyphenol tổng số trong mẫu nghiên cứu: Sử dụng $FeCl_3$ 5% và NaOH 10% để định tính sự có mặt của các hợp chất polyphenol trong mẫu nghiên cứu. Hàm lượng polyphenol tổng số trong mẫu nghiên cứu được xác định theo phương pháp Folin-Dennis lấy axit gallic làm chất chuẩn [8].

Đo sự sản xuất axit bằng thí nghiệm giảm pH trong môi trường dư thừa glucose: Các thí nghiệm đo sự sụt pH được tiến hành như được mô tả bởi Belli & cs [2] sử dụng máy đo pH MP225 Mettler Toledo.

Hô hấp của tế bào: Các thí nghiệm đo hô hấp của tế bào được tiến hành theo phương pháp của Cadwell & cs [3]. Dung dịch tế bào đã đạt độ bão hoà không khí và được dùng ngay để đo lượng O_2 tiêu thụ ở nhiệt độ phòng sử dụng máy đo O_2 , WTW OXI 330, Đức.

Tác dụng gây chết: Các thí nghiệm về tác dụng gây chết vi khuẩn được tiến hành như Phan & cs mô tả [14]. Trong đó, mật độ tế bào vi khuẩn ban đầu khoảng 10^9 tế bào/ml, được xử lý bằng các tác nhân cần khảo sát ở các khoảng thời gian khác nhau. Sau đó từ các mẫu lấy ra 0,1 ml, pha loãng ở các nồng độ khác nhau 10 lần, cấy trải trên đĩa thạch và nuôi cấy ở 37°C để tính số tế bào sống sót qua xử lý. Tác

dụng gây chết được biểu thị qua giá trị D là thời gian mà tại đó 90% quần thể tế bào vi khuẩn bị chết dưới tác dụng của một tác nhân cần khảo sát, ngoài ra còn được biểu thị bằng giá trị $\text{Log}N/\text{No}$, trong đó N là số tế bào sống sót tại thời điểm thu mẫu và No là số tế bào ban đầu. Theo cách biểu thị thì D chính là thời điểm có $\text{Log}N/\text{No} = -1$

Xác định hoạt tính enzym:

Hoạt tính của NADH oxidase được xác định ở 25°C theo phương pháp của Poole và Claiborne [16]. Một đơn vị hoạt tính NADH oxidase là lượng enzym xúc tác để oxi hoá 1 μmol NADH trong thời gian 1 phút ở điều kiện phản ứng.

Xác định hoạt tính vận chuyển đường qua hệ thống chuyển gốc photphat (phospho transferase system-PTS) theo phương pháp được mô tả bởi Belli & cs [2]. Trong đó photphoenolpyruvat làm chất cho glucose nhóm photphat và sản phẩm pyruvat tạo thành được định lượng bằng phản ứng với NADH khi có mặt enzym lactat dehydrogenase.

KẾT QUẢ

1. Qui trình tách chiết polyphenol từ vỏ quả măng cụt (*Garcinia mangostana* L.)

1.1. Định tính và định lượng polyphenol trong vỏ quả măng cụt (MC)

Kết quả chiết rút và định lượng polyphenol tổng số của MC được trình bày ở bảng 1 cho thấy dịch chiết MC đã cho phản ứng màu đặc trưng của các hợp chất polyphenol với các thuốc thử FeCl_3 5% và NaOH 10%. Hàm lượng polyphenol trong các dịch chiết bằng các dung môi khác nhau đạt từ 3,88% - 19,65% nguyên liệu, trong đó etanol tỏ ra là dung môi tốt nhất. Hàm lượng của polyphenol trong dịch chiết bằng chloroform sau đó chiết lại bằng etanol (chloroform $\rightarrow$ etanol) chỉ giảm đi khoảng 3%, còn hàm lượng polyphenol trong dịch chiết bằng etanol sau đó chiết lại bằng etylacetat giảm xuống khoảng 10%. Sử dụng phương pháp chiết bằng socklet cho hàm lượng polyphenol cao hơn so với phương pháp chiết ngâm. Tuy vậy sự khác nhau là không đáng kể. Để đơn giản hoá qui trình chiết, chúng tôi sử dụng phương pháp chiết ngâm cho tất cả các thí nghiệm về sau.

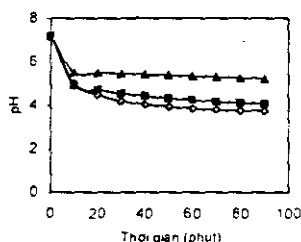
Bảng 1. Hàm lượng polyphenol trong vỏ quả măng cụt được chiết rút bằng các dung môi khác nhau

Phương pháp chiết	Dung môi	Polyphenol tổng số (%)	Phản ứng màu	
			FeCl_3 5%	NaOH 10%
Socklet	Etanol	19,65	Đen	Nâu
	Nước	14,30	Đen	Nâu
	Chloroform $\rightarrow$ Etanol	11,05	Đen	Nâu
	Etanol $\rightarrow$ Etylacetat	3,88	Đen	Nâu
Chiết ngâm	Etanol	15,30	Đen	Nâu

Như vậy có thể chỉ cần dùng etanol để tách chiết polyphenol tổng số từ MC. Có thể coi đây như một qui trình tách chiết polyphenol đơn giản để phục vụ cho các nghiên cứu sàng lọc các hợp chất polyphenol có khả năng kháng vi khuẩn sâu răng.

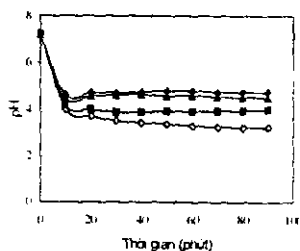
1.2. Tác dụng của dịch chiết MC lên sự làm giảm pH môi trường của vi khuẩn *S. mutans* GS-5.

Tính chất gây sâu răng của vi khuẩn trong mảng bám răng gắn liền với cơ chế sinh axit của chúng. Vì vậy hoạt tính ức chế sinh axit của vi khuẩn thường được xem là thí nghiệm khởi đầu trong khảo sát tác dụng bảo vệ răng của hợp chất quan tâm. Kết quả nghiên cứu khả năng ức chế sự giảm pH của các dịch chiết MC trong một số dung môi khác nhau theo phương pháp chiết ngâm đối với vi khuẩn gây sâu răng chủ yếu *S. mutans* trong môi trường dư thừa glucose được trình bày trong ở hình 1. Mức độ giảm pH phản ánh khả năng sản xuất axit của tế bào. Kết quả cho thấy mẫu kiểm tra có giá trị pH cuối cùng là 3,7 và dịch chiết MC trong H₂O và etanol đều có tác dụng ức chế sự giảm pH của *S. mutans* GS-5 với giá trị pH cuối cùng ở nồng độ dịch chiết 0,025% với dịch chiết bằng H₂O là 4,1 và với dịch chiết bằng etanol là 5,2. Như vậy dịch chiết trong etanol tỏ ra có tác dụng ức chế sự sinh axit của vi khuẩn mạnh hơn nhiều so với dịch chiết trong H₂O. Điều này chứng tỏ hoạt chất chính gây ức chế sự sinh axit của vi khuẩn hoà tan tốt trong etanol và vì thế chúng tôi đã sử dụng dịch chiết MC trong etanol trong các thí nghiệm tiếp theo.



Hình 1. Tác dụng của dịch chiết MC lên sự giảm pH bởi vi khuẩn

S. mutans GS-5. Đối chứng (◇), MC 0,025% trong H₂O (■), MC 0,025% trong etanol (▲)



Hình 2. Tác dụng của dịch chiết MC kết hợp với fluo lên sự giảm pH

bởi vi khuẩn *S. mutans* GS-5. Đối chứng (◇), MC 0,025% (■), NaF 0,25mM (▲), MC 0,025% + NaF 0,25mM (◆)

1.3. Tác dụng phối hợp của dịch chiết MC kết hợp với fluo lên sự làm giảm pH môi trường của *S. mutans* GS-5.

Trong thí nghiệm này chúng tôi đã sử dụng dịch chiết MC kết hợp với fluo dưới dạng muối NaF ở nồng độ 0,25 mM là nồng độ có mặt trong mảng bám răng khi dùng sản phẩm vệ sinh răng chứa fluo [6]. Kết quả trình bày ở hình 2 cho thấy mẫu kiểm tra có pH cuối cùng là 3,5, mẫu chứa MC 0,025% có pH cuối cùng là 4,1, còn với NaF 0,25 mM là 4,5. ở công thức kết hợp của cả dịch chiết MC 0,025% và 0,25 mM NaF có pH cuối cùng là 4,9, cao hơn giá trị pH khi dùng hai đối tượng này riêng rẽ. Điều này

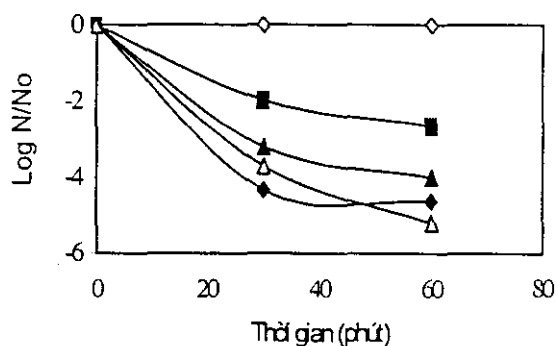
cũng chứng tỏ tác dụng cộng trong ức chế sự giảm pH của NaF và dịch chiết MC, tương tự như sự tác dụng tính cộng của fluo với indomethacin và một vài chất khác trong nghiên cứu của Belli & cs [2].

1.4. Tác dụng gây chết vi khuẩn của dịch chiết MC

Nhằm tìm hiểu hoạt tính diệt vi khuẩn gây sâu răng, chúng tôi đã tiến hành xử lý tế bào *S. mutans* GS-5 bằng dịch chiết MC ở các nồng độ khác nhau và sau đó xác định số tế bào sống sót còn lại. Kết quả trình bày ở hình 3 cho thấy dịch chiết MC có tác dụng diệt khuẩn rất rõ rệt ở các nồng độ rất thấp, từ 0,005% trở đi. Cụ thể, giá trị D (thời gian để có 90% quần thể tế bào bị giết chết, tương ứng với giá trị $\log N/N_0 = -1$) với nồng độ MC 0,005%; 0,01%; 0,025% và 0,05% tương ứng là 18 phút, 13 phút, 5 phút và 3 phút. ở nồng độ 0,01%, sau 30 phút xử lý có trên 99,9% quần thể tế bào bị giết chết.

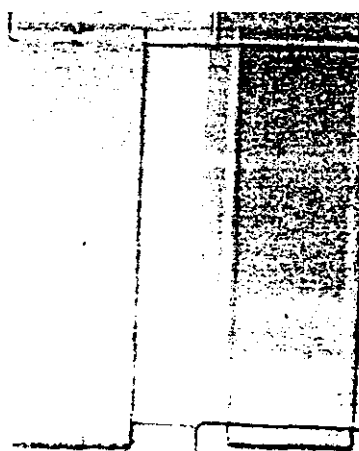
1.5. Ảnh hưởng của dịch chiết MC lên sự hình thành biofilm của *S. mutans* GS-5

Chúng tôi cũng đã khảo sát tác dụng của dịch chiết MC lên sự hình thành biofilm của *S. mutans* GS-5 trên bản kính. Kết quả ở hình 4 cho thấy ở mẫu đối chứng không có dịch chiết MC, biofilm hình thành bình thường, tạo ra một lớp vi khuẩn dày trên bản kính sau 6 ngày nuôi cấy (hình 4.A), trong khi đó dịch chiết MC 0,05% ức chế hoàn toàn sự hình thành biofilm của vi khuẩn này (hình 4.B).



Hình 3. Tác dụng gây chết của dịch chiết MC lên vi khuẩn

S. mutans GS-5. Đối chứng (◇), MC 0,005% (■), MC 0,01% (▲), MC 0,025% (△), MC 0,05% (◆).



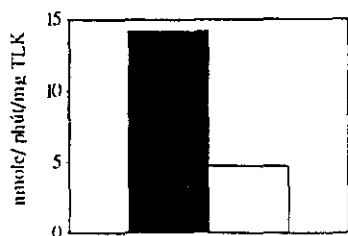
Hình 4: Tác dụng của dịch chiết MC lên sự hình thành biofilm

của *S. mutans* GS-5.

A: Đối chứng , B: Dịch chiết MC

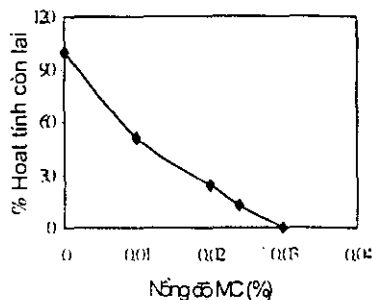
1.6. Ảnh hưởng của dịch chiết MC lên sự hô hấp của vi khuẩn *S. mutans* GS-5

Để tìm hiểu tác dụng của dịch chiết MC lên sự tiêu thụ oxy của *S. mutans*, chúng tôi đã tiến hành đo lượng oxy còn lại trong huyền dịch chứa vi khuẩn khi có mặt của dịch chiết MC trong môi trường dư thừa glucose, pH 7,0. Kết quả được trình bày ở hình 6. Chúng tôi thấy rằng dịch chiết MC ở nồng độ 0,025% ức chế trên 60% hoạt tính hô hấp của tế bào *S. mutans* GS-5.



Hình 5. ảnh hưởng của dịch chiết MC lên hô hấp của vi khuẩn

S. mutans GS-5. Đối chứng (■), MC 0,025% (□)



Hình 6. ảnh hưởng của dịch chiết MC lên hoạt tính NADH

oxidase của vi khuẩn *S. mutans* GS-5

1.7. Ảnh hưởng của MC lên hoạt tính của một số enzyme của vi khuẩn *S. mutans* GS-5

Enzym vận chuyển đường PTS

Kết quả ức chế sự sản xuất axit của *S. mutans* GS-5 bởi dịch chiết MC gợi ý khả năng tác dụng của loại dịch chiết này lên hệ thống PTS là hệ thống enzym vận chuyển đường chủ yếu của *S. mutans* [4]. Chúng tôi đã tiến hành nghiên cứu tác dụng của dịch chiết ở giới hạn nồng độ 0,05 – 0,1% thì thấy rằng dịch chiết MC chỉ ức chế một phần hoạt động của enzym này (số liệu chi tiết không nêu ở đây).

Enzym NADH oxidase

Kết quả nghiên cứu ảnh hưởng của dịch chiết MC lên hoạt tính enzym NADH oxidase ở hình 6 cho thấy dịch chiết MC ức chế rõ rệt hoạt động của enzym, ở nồng độ MC 0,01% enzym mất 50% hoạt tính và sự ức chế hoàn toàn xảy ra ở nồng độ MC 0,03%. NADH oxidase là enzym tiêu thụ oxi chủ yếu của *S. mutans* [7] nên kết quả này giải thích tại sao các dịch chiết MC lại ức chế sự hô hấp của tế bào vi khuẩn *S. mutans* GS-5.

Ngoài ra, chúng tôi phát hiện thấy dịch chiết MC cũng có tác dụng ức chế enzym catalase của chủng *S. aureus* H nhưng ở mức độ thấp hơn, phải cần đến 1,5% dịch chiết MC mới đạt đến mức ức chế 50% hoạt độ enzym.

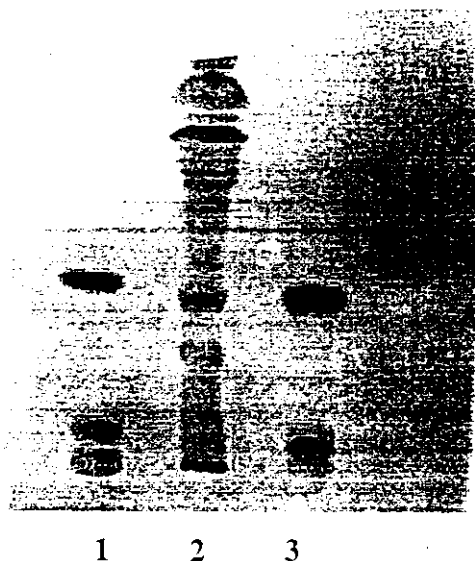
2. Quy trình tách chiết mangostine từ vỏ quả măng cụt (*Garcinia mangostana* L.)

Nhằm đi sâu tìm hiểu thành phần polyphenol nào của MC có tác dụng lên vi khuẩn sâu răng *S. mutans* GS-5 chúng tôi đã tiến hành phân tách thành phần MC trên sắc ký bản mỏng (SKLM), kiểm tra hoạt tính ức chế sự giảm pH của các thành phần tách được, phân tích cấu trúc các thành phần có hoạt tính sử dụng sắc ký khối phổ (MS) và cộng hưởng từ hạt nhân (NMR).

2.1. Tách các thành phần polyphenol MC trên SKLM

Thành phần polyphenol của MC được phân tích sử dụng SKLM trên silica gel trong các hệ dung môi khác nhau. Kết quả ở bảng 4.4 cho thấy trong số 6 hệ dung môi sắc ký đã sử dụng, hệ dung môi toluen: etyl axetat: axeton: axit formic (TEAF) với tỉ lệ 5:3:1:1 tỏ ra có khả năng tách tốt nhất. Trên sắc ký đồ (Hình 1) quan sát được 15 vạch có độ đậm, nhạt và màu sắc khác nhau, trong khi các hệ dung môi còn lại không tách được hay chỉ tách được 4 đến 5 vạch (Bảng 1). Các vạch sắc ký thu được đều có màu

vàng đến vàng nâu và đều có màu sắc đậm hơn khi xông hơi NH_3 hay phun thuốc thử TB, chứng tỏ chúng là các flavonoid (Bảng 2). Các vạch số 3, 4, 5, 8, 9, 10, 13, 14, 15 thể hiện đậm hơn các vạch còn lại. Đặc biệt vạch số 4 tương ứng với R_f 0,42 là vạch duy nhất có khả năng phát quang trong vùng tử ngoại. Ngoài ra khi so sánh với chất chuẩn catechin và epicatechin, MC cũng có vạch sắc ký với R_f tương ứng chứng tỏ MC cũng chứa những chất này.



Hình 1. Sắc ký đồ SKLM dịch chiết MC sử dụng hệ dung môi TEAF (5:3:1:1) 1. Catechin; 2. Dịch chiết MC; 3. Epicatechin

Bảng 1. Đặc điểm sắc ký đồ của polyphenol từ dịch chiết MC

TT T	Hệ dung môi	Số vạch tách được	Điều kiện phát hiện		
			AST	NH ₃	TB
1	Butanol: axit axetic: nước (4:1:5)	0	-	-	K
2	Butanol: axit axetic: nước (5:1:2,5)	0	-	-	K
3	Benzen: metanol (95:5)	4	+	++	++
4	Chloroform: etylacetat: metanol (1: 24: 4)	0	-	-	K
5	Toluen: etylacetat: aceton: axit formic -TEAF	5	+	++	K
6	(5:2:2:1) Toluen: etylacetat: aceton: axit formic -TEAF (5:3:1:1)	15	+	++	K

K: Không sử dụng ; +: Mức độ phản ứng với thuốc thử

Bảng 2. Thành phần polyphenol của MC phân tích bằng SKLM trong hệ dung môi TEAF

(5:3:1:1)

TT	R _f	Màu sắc
1	0,065	Nâu đen
2	0,270	Nâu đen
3	0,400	Vàng nâu
4	0,420	Vàng tươi
5	0,500	Vàng nhạt
6	0,560	Vàng cam mảnh
7	0,580	Vàng nâu mảnh
8	0,610	Vàng cam mờ
9	0,680	Vàng nâu đậm
10	0,700	Vàng tươi
11	0,730	Vàng nâu mờ
12	0,770	Vàng nâu đậm
13	0,800	Vàng tươi đậm
14	0,860	Vàng cam đậm
15	0,910	Vàng cam đậm

2.3. Hoạt tính ức chế sự sinh acid của vi khuẩn *Streptococcus mutans* GS-5 của các thành phần polyphenol MC

Streptococcus mutans và *Streptococcus sobrinus* là những tác nhân chính gây sâu răng ở người [9]. Tính chất gây sâu răng của vi khuẩn trong mảng bám răng gắn liền với cơ chế sinh acid của chúng. Vì vậy chúng tôi đã khảo sát ảnh hưởng của các thành phần polyphenol MC tách được trên SKLM lên sự giảm pH của dịch tế bào *S. mutans* GS-5. Các vạch sắc ký được giải hấp phụ bằng methanol. Sau khi li tâm, dịch trong thu được sẽ sử dụng để kiểm tra hoạt tính ức chế sự sinh acid của vi khuẩn *S. mutans* GS-5 trong môi trường dư thừa glucose. Giá trị pH cuối cùng của môi trường phản ánh khả năng sinh acid của vi khuẩn. Với những chủng chịu acid như *S. mutans* GS-5 giá trị pH cuối cùng thường nhỏ hơn 4,0.

Bảng 3. Khả năng ức chế sự sinh acid của vi khuẩn *S. mutans* GS-5 của các thành phần polyphenol dịch chiết MC

TT	R _f	Hoạt tính ức chế sự sinh acid
1	0,065	-
2	0,270	-
3	0,400	-
4	0,420	-
5	0,500	-
6	0,560	-
7	0,580	-
8	0,610	-
9	0,680	-
10	0,700	-
11	0,730	-
12	0,770	-
13	0,800	++
14	0,860	+++
15	0,910	+++

+: mức độ ức chế sự sinh acid

Kết quả thu được ở bảng trên cho thấy trong số 15 vạch được phát hiện thì chỉ có 3 vạch tương ứng với các R_f 0,80; R_f 0,86; R_f 0,91 là thể hiện hoạt tính ức chế sự sinh acid của vi khuẩn *S. mutans* GS-5 mạnh. Giá trị pH cuối cùng của vạch số 13 (R_f 0,80) là 4,5, của vạch số 14 (R_f 0,86) là 5,2 và của vạch số 15 (R_f 0,91) là 6,2 so với đối chứng là 3,8. Các vạch còn lại đều không thể hiện hay thể hiện rất yếu hoạt tính ức chế sự giảm pH (bảng 3). Điều này gợi ý những thành phần này đóng vai trò chính trong hoạt tính ức chế sự sinh acid ở *S. mutans* GS-5 của dịch chiết MC.

2.4. Xác định cấu trúc hoá học của thành phần MC 14 bằng sắc ký khối phổ (MS) và cộng hưởng từ hạt nhân (NMR)

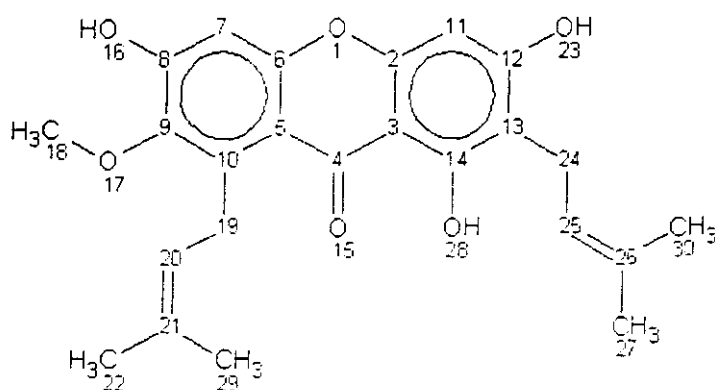
Các vạch sắc ký tương ứng với các thành phần MC14, 14, 15 được giải hấp phụ trong metanol và được kiểm tra độ sạch trên máy sắc ký khối phổ. Kết quả thu được cho thấy chỉ có thành phần MC13 và MC14 có độ sạch cao và có thể tiếp tục nghiên cứu cấu trúc hoá học. Sử dụng máy NMR để phân tích cấu trúc hai thành phần này dựa trên phổ ^1H , ^{13}C , HMQC và HMBC kết quả cho thấy chỉ có thành phần MC14 có thể thu được tất cả các phổ này (Bảng 4, 5) trong khi MC13 chỉ thu được phổ ^1H . Điều này chứng tỏ MC13 cần phải được tinh sạch tiếp. Các số liệu thu được ở bảcho phép xác định độ dịch chuyển của H và C cũng như những nhóm chức tham gia vào bộ khung carbon cho phép giải phổ của hợp chất MC13 với cấu trúc hoá học đặc trưng của các hợp chất xanthone với tên gọi là α - mangostin (hình 2).

Bảng 4. Phổ ^1H và ^{13}C của hợp chất MC13 đo trên máy NMR

Pos	Group	Chem.shif- ^1H (ppm)	Chem.shif- ^{13}C (ppm)
2	C		156.57
3	C		102.72
4	C=O		183.02
5	C		125.03
6	C		138.34
7	CH	6.63, 1H, s	103.67
8	C-OH		156.05
9	C		144.67
10	C		112.12
11	CH	6.19, 1H, s	93.14
12	C-OH		161.43
13	C		111.35
14	C-OH		163.49
18	O-CH ₃	3.72, 3H, s	61.26
19	CH ₂	4.01, 2H, d(J=5.6 Hz)	27.04
20	CH	5.19, 1H, d(J=5.6 Hz)	125.04
21	C		131.70
22	CH ₃	1.62, 3H, s	25.89
24	CH ₂	3.23, 2H, d(J=5.6 Hz)	22.14
25	CH	5.19, 1H, d(J=5.6 Hz)	123.81
26	C		131.61
27	CH ₃	1.63, 3H, s	25.91
29	CH ₃	1.74, 3H, s	17.86
30	CH ₃	1.78, 3H, s	18.26

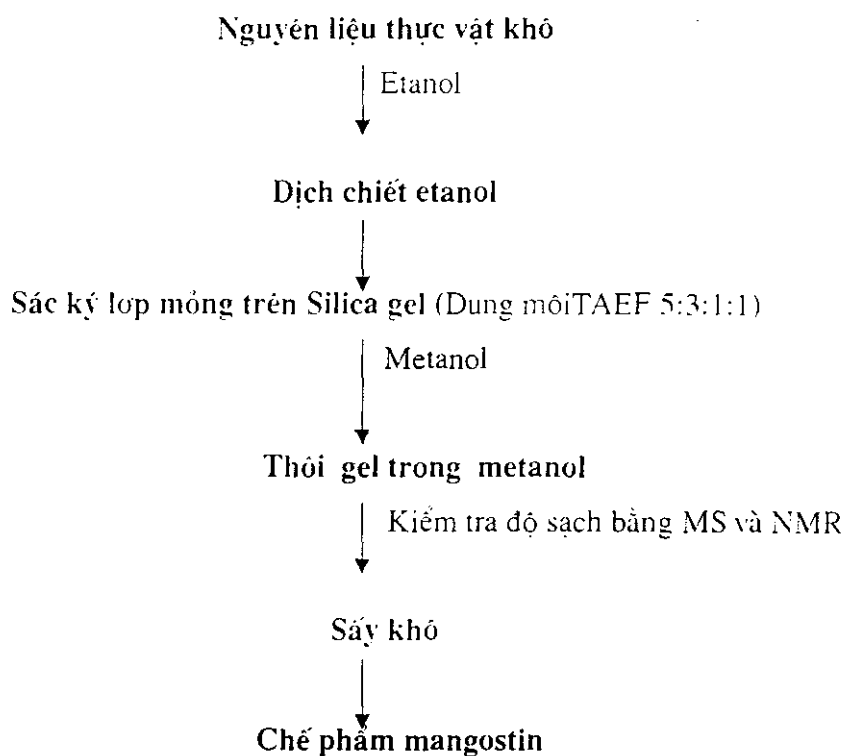
Bảng 5. Phổ HMQC và HMBC của hợp chất MC13 đo trên máy NMR

Pos-H	Pic-HMQC (ppm)	Pic-HMBC (ppm)
7	H7-C7(6.63-103.67)	H7-C9(6.63-144.67); H7-C8(6.63-156.05)
11	H11-C11(6.19-93.14)	H11-C13(6.19-111.35)
18	H18-C18(3.72-61.26)	H18-C9(3.72-144.67)
19	H19-C19(4.01-27.04)	H19-C6(4.01-138.34); H19-C10(4.01-112.12); H19-C9(4.01-144.67); H19-C21(4.01-131.70)
20	H20-C20(5.19-125.04)	H20-C22(5.19-25.89); H20-C29(5.19-17.86); H20-C10(5.19-112.12)
22	H22-C22(1.62-25.89)	H22-C20(1.62-125.04); H22-C21(1.62-131.70)
24	H24-C24(3.23-22.14)	H24-C12(3.23-161.43); H24-C14(3.23-163.49) H24-C13(3.23-111.35); H24-C25(3.23-123.81) H24-C26(3.23-131.61)
25	H25-C25(5.19-123.81)	H25-C13(5.19-111.35); H25-C27(5.19-25.91); H25-C30(5.19-18.26)



Hình 2 . Cấu trúc hoá học của α -Mangostin (1,3,6-Trihydroxy-7methoxy-2,8 di(3-ethyl-2-buten))

Qui trình tinh sạch Mangostin có thể tóm tắt trong sơ đồ sau



TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Almeida, C.E.B., Felicio, D.L., Galhardo, R.S., Cabral-Neto, J.B., Leitao, A.C. 1999. *Synergistic lethal effect between hydrogen peroxide and neocuproine (2,9-dimethyl 1,10-phenanthroline) in E.coli*. Mut. Res.-DNA Repair. 433(1): 59-66
2. Belli, W.A., Buckley, D.H. and Marquis, R.E. 1995. *Weak acid effects and fluoride inhibition of glycolysis Streptococcus mutans GS-5*. Can. J. Microbiol. 41:785-791.
3. Cardwell, C.E., Marquis, R.E. 1999. *Oxygen metabolism by Treponema denticola*. Oral. Microbiol.Immunol.14:66-72.
4. Cvitkovitch, D. G., Boyd, D.A., Thevenot, T. and Hamilton, I.R. 1995. Glucose transport by a mutant of *Streptococcus mutans* unable to accumulate sugars via the phosphoenolpyruvate phosphotransferase system. J. Bacteriol. 177, 2251-2258.
5. Curran, T.M., Buckley, D.H. and Marquis, R.E. 1994. *Quasi-irreversible inhibition of enolase of Streptococcus mutans by fluoride*. FEMS Microbiol. Lett. 119: 283-288.
6. Duckworth, R.M., Morgan, S.N., Murray, A.M. 1987. Fluoride in saliva and plaque following use of fluoride-containing mouthwashes. J. Dent. Res. 66: 1730-1734.
7. Gibson, C.M., Mallett, T.C., Caliborne, A., Caparon, M.G. 2000. *Contribution of NADH oxidase to aerobic metabolism of Streptococcus pyogenes*. J. Bacteriol 182:448-455
8. Gressman A. 1975. *The chemistry of phenolic compounds*. Acad. Pres, London
9. Hamilton-Miller, J.M.T. 2001. *Anti-cariogenic properties of tea (Camellia sinensis)* J. Med. Microbiol. 50: 299-302.
10. Đỗ Tất Lợi. 1986. *Những cây thuốc và vị thuốc Việt nam*. Nhà xuất bản Khoa học Kỹ Thuật
11. Limsong, J., Benzavongkulchai, E. 2001. *Inhibitory effect of some herbal extracts on adherence of Streptococci*. J. Dent. Res. 80:724
12. Makimura, M., Hirasawa, M., Kobayashi, K., Indo, J., Sakanaka, S. Taguchi, T., and Otake, S. 1993. *Inhibitory effects of tea catechins on collagenase activity*. J. Periodontol. 74: 630-636.
13. Middleton, E.Jr., Kadaswami, C. and Theoharides, T.C. 2000. *The effects of plant flavonoids on mammalian cells: implications for inflammation, heart disease and cancer*. Pharmacol. Rev. 52(4): 673-751
14. Phan, T.N., Krirsch, A.M. and Marquis, R.E. 2001. Selective sensitization of bacteria to peroxide damage associated with fluoride inhibition of catalase and pseudocatalase. Oral. Microbiol. Immunol. 16 : 28-33.
15. Phan, T.N., Nguyen, P.T.M., Abranches, J. and Marquis, R.E. 2002. *Fluoride and organic weak acids as respiration inhibitors for oral streptococci in acidified environments*. Oral. Microbiol. Immunol. 17: 119-124.
16. Poole L.B., Claiborne. A. (1986) *Interactions of pyridine nucleotide with redox forms of the flavin-containing NADH peroxidase form from Streptococcus faecalis*. J.Biol.Chem. 261:14525-14533
17. Richards, A.J. 1993. *Health effects of ingested fluoride*. National Academy Press Washington D.C. USA. pp. 22-49.

QUY TRÌNH

**TÁCH CHIẾT BERBERIN TỪ CÂY HOÀNG
LIÊN GAI, HOÀNG LIÊN CHÂN GÀ, HOÀNG
BÁ VÀ TỔ CHỨC NUÔI CẤY MÔ TẾ BÀO RỄ
HOÀNG LIÊN GAI**

NGƯỜI CHỦ TRÌ: PGS. TS. NGUYỄN THỊ NGỌC DAO

HÀ NỘI - 2004

Qui trình

Qui trình tách chiết berberin từ cây hoàng liên gai, hoàng liên chân gà, hoàng bá và tổ chức nuôi cấy mô tế bào rễ hoàng liên gai

Mở đầu

Berberin là một isoquinoline alkaloid được tìm thấy ở một số loại thực vật họ hoàng liên *Ranunculaceae*, hoàng liên gai *Berberidaceae*[1]. Berberin được sử dụng như một loại kháng sinh do khả năng kháng khuẩn rộng (cả gram âm và gram dương). Dân gian thường sử dụng dịch vắt hoặc nước sắc một số thực vật chứa berberin để phòng và chữa một số bệnh như đau mắt, viêm loét miệng lưỡi, sốt rét, viêm loét dạ dày, viêm đại tràng, nhiễm trùng đường tiêu hoá, kiết lỵ, chống nấm, và một số tác dụng khác như kích thích tiêu hoá, hạ huyết áp, phòng xơ vữa động mạch (1). Berberin đã được bào chế làm thuốc chữa lỵ ở Việt nam từ những năm 1960, dưới dạng chiết thô từ một số cây Hoàng liên, Hoàng bá mọc tự nhiên ở rừng Việt nam, Lào, Campuchia. Đến nay nguồn tự nhiên loại cây này đã phần nào cạn kiệt, một số cây chứa hàm lượng cao berberin như Hoàng liên chân gà, Hoàng liên gai đã được đưa vào sách đỏ của Việt nam (2). ở Nhật bản, từ những năm 1980 berberin đã được nghiên cứu, sản xuất công nghiệp tạo thương phẩm. Kỹ thuật nuôi cấy mô tế bào *Thalictrum rugosum* (nuôi cấy callus và nuôi cấy thể vắn) đã được nghiên cứu để nâng cao hiệu suất sản xuất Berberin. ở nước ta, theo tài liệu của Viện dược liệu tổng kết “*chương trình tạo nguồn nguyên liệu làm thuốc (KY 02)*” (1) cũng đề cập tới những nghiên cứu nuôi cấy mô hoàng liên cho hàm lượng berberin đạt 5-6%. Trong khuôn khổ đề tài nhà nước KC04-17, với mục tiêu ứng dụng CNSH trong chỉ định công nghệ nhân giống các cây thuốc quý của Việt nam, 1 nhánh đề tài đã tiến hành nghiên cứu kỹ thuật nuôi cấy mô tế bào cây Hoàng liên nhằm thu nhận berberin từ tế bào nuôi cấy, tạo được mô sẹo từ tế bào rễ cây Hoàng liên gai và đã tạo được hàng ngàn cây con từ mô sẹo (3).

Để đánh giá khả năng tạo berberin của tế bào nuôi cấy, chúng tôi đã tách chiết phân tích và so sánh hàm lượng berberin của mô nuôi cấy với các bộ phận của một số thực vật chứa berberin.

Nguyên liệu và phương pháp nghiên cứu

1. Nguyên liệu

Các cây Hoàng bá, Hoàng liên gai, Hoàng liên chân gà thu nhận ở Sa pa Lào cai và Yên Bái. Mô tế bào nuôi cấy làm tại phòng Công nghệ tế bào thực vật - Viện Công nghệ Sinh học.

2. Hoá chất

Axit acetic 2%, cồn 90°C, than hoạt tính, dung dịch NaCl bão hoà, metanol .. . Các dụng cụ và trang thiết bị của phòng Enzym học, phòng thí nghiệm trọng điểm công nghệ gen - Viện Công nghệ Sinh học(máy ly tâm lạnh, máy phá tế bào bằng siêu âm, máy lắc ổn nhiệt, tủ cấy vô trùng.. .)

3. Phương pháp

- Dùng phương pháp chiết cồn, tinh sạch qua 2 bước rửa bằng dung dịch NaCL bão hoà, hấp phụ than hoạt. Phá tế bào nuôi cấy bằng siêu âm 125 w trong 10 phút, ly tâm hoặc lọc lấy rửa tinh chế và làm khô.

4. Cách tiến hành

- Cây Hoàng liên gai được thu hái trong thời kỳ có quả chín (tháng 12). Hoàng bá chỉ lấy thân và rễ. Hoàng liên chân gà lấy lá và rễ loại nhỏ (1 năm tuổi) và củ khô to (3 đến 5 năm tuổi) do Trung tâm kiểm nghiệm dược phẩm Yên Bái cung cấp. Tế bào nuôi cấy gồm 2 loại : mô nuôi cấy khô và mô nuôi cấy tươi. - Các bộ phận cây gồm: lá, cành, rễ phơi khô, tán nhỏ riêng từng loại, mô nuôi cấy khô, tán nhỏ, mô tươi nghiền và phá tế bào bằng siêu âm. Chiết bằng acid acetic, kết tủa bằng natri clorua bão hoà. Hoà tan lại rửa trong cồn 90⁰ hoặc methanol, hấp phụ than hoạt rồi kết tủa lại 2 lần bằng dung dịch NaCL bão hoà. Thu được kết tủa là tinh thể berberin.

KẾT QUẢ

Thành phần hoá học của thân, rễ hoàng liên, hoàng bá(họ cam *Rutaceae*) chứa berberin (thành phần chính), palmatin, coptin, worenin và columbamin. Ngoài ra còn có alcaloid có nhân phenol và alcaloid không có nhân phenol. Hoàng bá còn chứa các alcaloid khác là magnoflorin, phellodendrin, jatrorrhizin và một số chất đắng khác.

Berberin là những tinh thể màu vàng, điểm nóng chảy 1450C, tan trong 22 phần nước ở 200C, tan trong ethanol, hơi tan trong clorophorm, benzen, không tan trong ether ethylic; UV max ở 265 ,243nm, pk 2,47.(a). Bằng phương pháp đã mô tả ở trên chúng tôi thu được tinh thể berberin màu vàng. Kết quả thu được ở bảng 1 cho thấy rễ hoàng liên chân gà có hàm lượng berberin cao nhất rồi đến rễ hoàng liên gai. Vỏ rễ hoàng bá cũng có nhưng ít hơn 2 loại trên.

Bảng 1: Hàm lượng Berberin (g%) ở 1 số thực vật

Tổ chức	Lá	Cành	Vỏ cành	Rễ	Vỏ rễ
Loại cây					
Hoàng liên gai	1,9	2,8	6,71		
Hoàng liên chân gà	2,28			7,8	
Hoàng bá			4,2		5,4

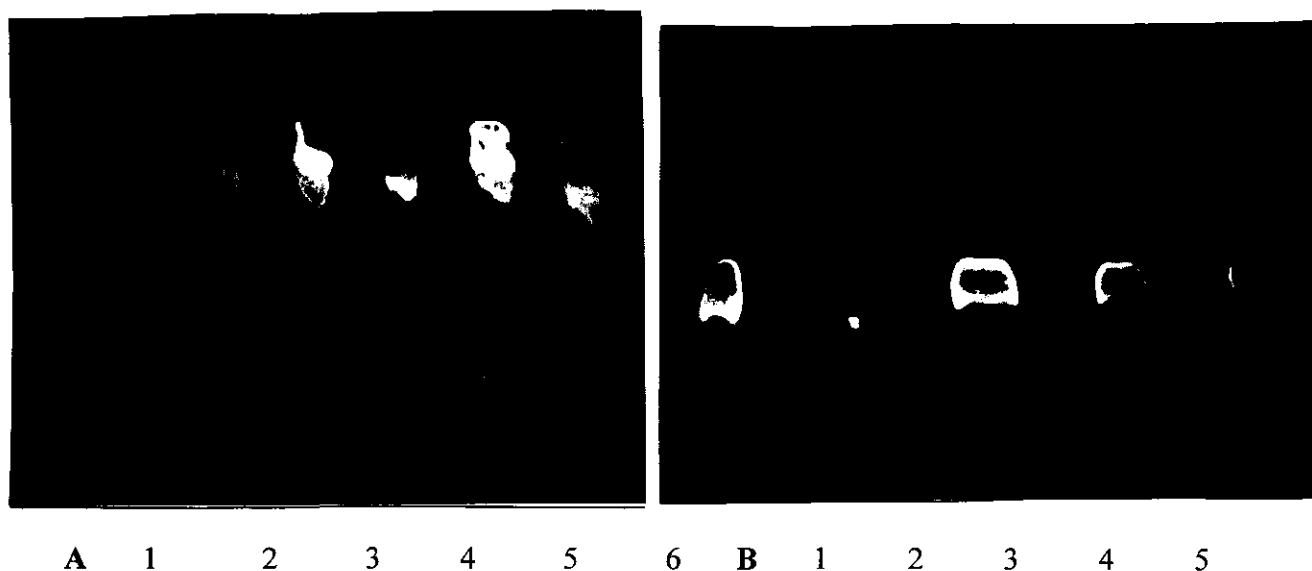
Chúng tôi cũng tiến hành tách chiết berberin từ tổ chức nuôi cấy mô, sử dụng phương pháp tinh sạch bằng cồn như đã làm với các tổ chức tự nhiên, kết quả cho thấy có thành phần của berberin nhưng hàm lượng rất thấp. Sau khi thay đổi một vài bước như: chiết bằng dung môi metanol, dùng siêu âm để phá vỡ tế bào trước khi chiết xuất, đã thu được hàm lượng berberin khá cao .

Bảng 2: Hàm lượng berberin từ tế bào nuôi cấy
(Tính theo g% trọng lượng khô và tươi)

Tổ chức	Mô khô	Mô tươi
Phương pháp		
Chiết bằng cồn ethanol	3	0.67
Siêu âm phá tế bào rồi chiết bằng cồn methanol	4,65	3,00

Bảng 2 cho thấy: hàm lượng berberin ở tế bào nuôi cấy mô tuy còn thấp hơn ở vỏ cành và vỏ rễ hoàng liên gai nhưng thu nhận dễ dàng hơn và tương tự với chất chuẩn.

Chúng tôi cũng thu được các kết quả rất tốt sau khi chạy sắc ký lớp mỏng trên các mô tươi và mô khô (hình 1)

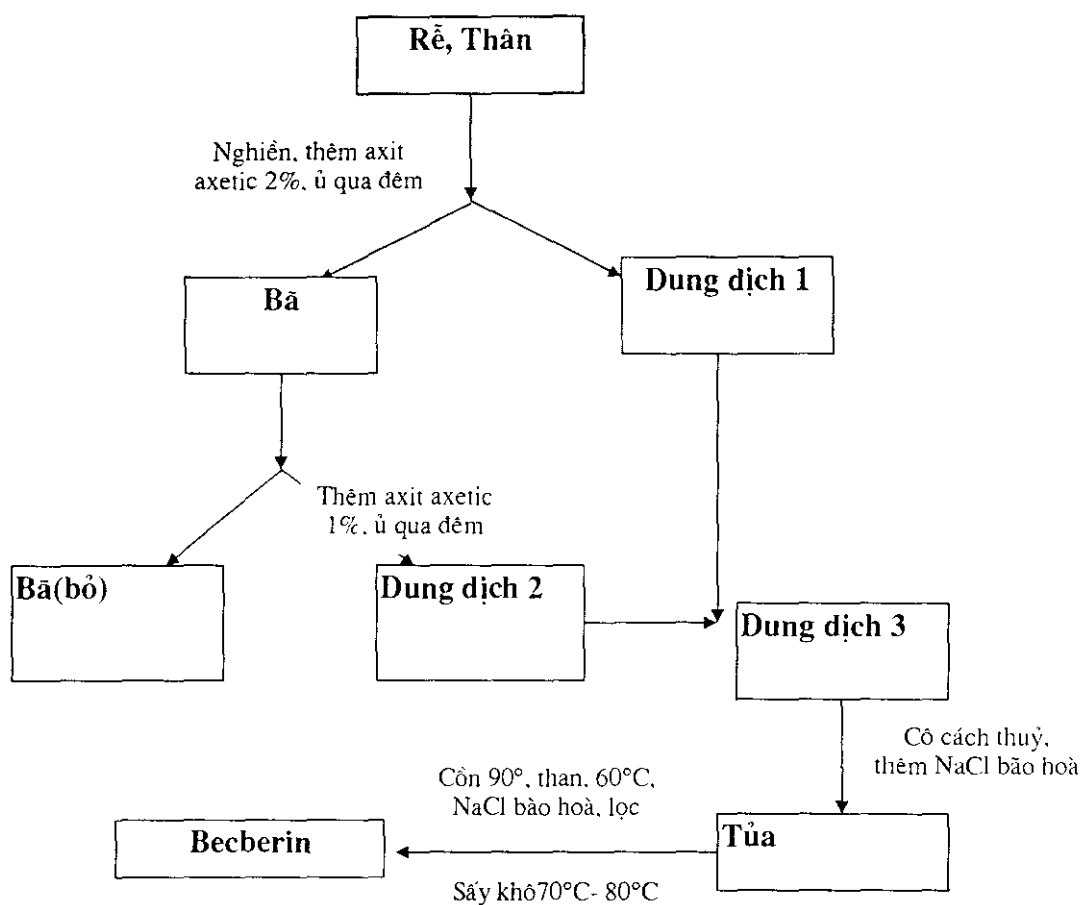


Hình 1:(A) Sắc ký lớp mỏng - cây Hoàng liên (SAPA); (B): Sắc ký lớp mỏng - nuôi cấy mô tế bào rễ hoàng liên gai

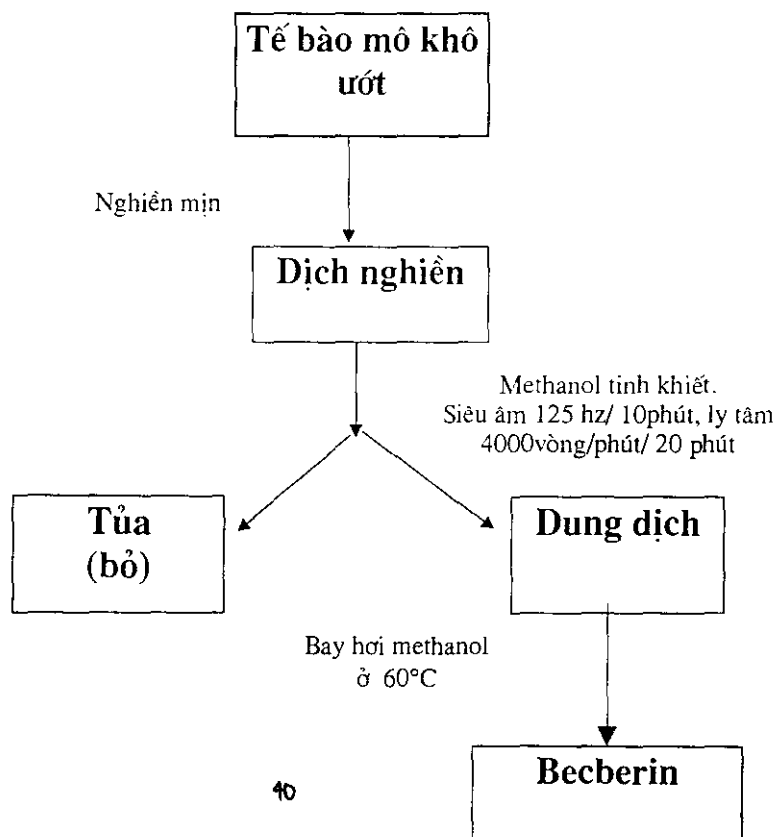
- A**
1. Chuẩn
 2. Rễ Hoàng liên chân gà(1- 2003)
 3. Rễ Hoàng liên Gai (12/ 2002)
 4. Rễ Hoàng liên Chân gà (12/ 2003)
 5. Hoàng Bá (3/ 2003)

- B**
1. Chuẩn
 2. Hoàng Bá
 3. Hoàng liên gai 1
 4. Hoàng liên Gai 2
 5. Hoàng liên gai 3

Quy trình tách chiết berberin từ rễ và thân Hoàng liên gai



Quy trình tách chiết berberin từ nuôi cấy mô tế bào



KẾT LUẬN

1. Bằng công nghệ nuôi cấy mô tế bào thực vật, từ tế bào rễ hoàng liên gai đã thu được tổ chức nuôi cấy có hàm lượng berberin khá cao. Hướng sản xuất berberin bằng kỹ thuật nuôi cấy mô tế bào là có thể thực hiện được
2. Có thể tách chiết, thu nhận berberin từ mô nuôi cấy tươi bằng phương pháp phá tế bào và chiết bằng dung môi thích hợp.
3. Cần tiếp tục nghiên cứu để hoàn thiện thêm công nghệ nuôi cấy mô và thu nhận sản phẩm cho hiệu xuất cao.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- 1/ Viện Dược liệu, chương trình tạo nguồn nguyên liệu làm thuốc KY02: “Tài nguyên cây thuốc Việt nam” 1993. NXB KH&KT, trang 497-508
- 2/ Bộ KHCN&MT: “Sách đỏ Việt nam” (phần thực vật), 1996
- 3/ Đinh Thị Thu Hiền, Nguyễn Thị Ngọc Dao, Lê Quang Huấn, Lê Trần Bình, Lê Thị Muội .2003.: “Nghiên cứu qui trình nhân nhanh sinh khối mô hoàng liên gai (*berberis wallichiana* DC) bằng công nghệ tế bào thực vật.” Báo cáo khoa học –Hội nghị công nghệ sinh học toàn quốc 2003, La thành-Hà nội, 16-17/12/2003, trang 10441047

QUY TRÌNH
THU NHẬN SILYMARIN
QUI MÔ PHÒNG THÍ NGHIỆM

NGƯỜI CHỦ TRÌ: PGS. TS LÊ THỊ LAN OANH

HÀ NỘI - 2004

I. MỞ ĐẦU

Cây cúc gai *Silybum marianum* thuộc họ Cúc Asteraceae là cây thảo 1-2 năm, ra hoa vào năm thứ 2, nguyên liệu dùng sản xuất thuốc là hạt, quả hoặc toàn cây. Cây phát triển chủ yếu ở châu Âu, châu Phi, Nam Mỹ, Trung và Đông á (1) .

Cây cúc gai đã được du nhập vào trồng ở Việt Nam đã lâu, hiện nay đang phát triển tốt tại các vùng cao có đất tốt và khí hậu mát mẻ như Tam Đảo, Sapa, Đà Lạt; lượng nguyên liệu khá lớn nhưng chưa được sử dụng làm nguyên liệu sản xuất thuốc.

Cúc gai cũng đã được dùng để chữa các bệnh sốt, hạ nhiệt, đau gan, viêm gan , viêm lá lách, sỏi mật, hoàng đản, ho lâu năm, thấp khớp...

Quả cúc gai là một trong số ít loại cây thuốc đặc biệt quan trọng được dùng phổ biến làm nguồn nguyên liệu để sản xuất các loại thuốc phòng chữa các loại bệnh gan thận giữ vai trò hàng đầu ở hầu hết các nước tiên tiến trên thế giới. Các chế phẩm Legalon, Silymarin, Carsyl, Silybor, Silymar , Sibectan, ... đang là những loại dược phẩm thương mại có giá trị rất lớn. Tác dụng dược lý của cúc gai là do tính chất bảo vệ gan của một nhóm chất mới có hoạt tính sinh học cao đó là các flavolignan Silymarin. Hoạt chất chính của *S. marianum* là Silymarin, một hỗn hợp gồm các flavonolignans (silybinin, isosilybinin, silychristin và silydianin). Chế phẩm này có tác dụng chữa rất nhiều các loại bệnh gan và thận khác nhau: viêm gan cấp và mạn tính, viêm gan virus, xơ gan, ung thư gan , chống các loại nhiễm độc gan thận, bảo vệ và phục hồi tế bào gan thận, nâng cao khả năng miễn dịch của cơ thể,... Các chế phẩm từ cúc gai cần thiết không những để chữa gan thận mà còn có tác dụng điều trị các bệnh khác nhau do tác động của các nhân tố bất thuận của môi trường lên cơ thể bao gồm các bệnh hiểm nghèo (6,7,8,9,10).

Cơ chế và hiệu quả tác dụng của các chế phẩm đã và đang được nghiên cứu trên mức độ phân tử ở người và động vật: cơ chế chống oxy hoá, chống oxy hoá lipid, nâng cao khả năng khử độc, chống lại sự giảm glutathion, kìm hãm sự tạo chất độc (leukotrienes) trong gan thông qua việc kìm hãm enzym lipoxigenase, nâng cao quá trình sinh tổng hợp protein, giảm hoạt tính của promoter gây ung thư, kìm hãm P450, tác động miễn dịch, giảm cholesterol...(12-17).

Đây là một cây thuốc rất có giá trị để điều trị các bệnh hiểm nghèo về gan thận là loại bệnh hiện đang phổ biến ở nước ta. Nhằm kế thừa các thành tựu nghiên cứu khoa học và tác dụng chữa bệnh của cúc gai ở các nước tiên tiến , việc khai thác phát triển sử dụng

cây cúc gai đã được di thực trồng ở Việt Nam để sản xuất các chế phẩm thuốc chữa bệnh gan thận trong nước tạo nguồn dược phẩm quý, mới, phong phú và rẻ tiền phục vụ, bảo vệ sức khoẻ cộng đồng là một việc rất cấp thiết

II. NGUYÊN LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

II.1. NGUYÊN LIỆU

Hạt cúc gai được dùng trong thí nghiệm có nguồn gốc từ hạt xin từ Viện Thực vật học, trường Đại học tổng hợp Karlsruhe CHLB Đức và hạt thu từ cây cúc gai trồng ở Sapa Việt Nam.

Lá, thân và quả cúc gai thu được từ cây cúc gai trồng thử nghiệm tại Hà Nội vào tháng 4-5 khi quả bắt đầu chín và lá đã ngả hơi vàng. Các bộ phận được thái lát, sấy ở nhiệt độ 60-70°C đến khô, tán bột.

II.2. PHƯƠNG PHÁP

+Nghiên cứu tỷ lệ nảy mầm hạt:

Hạt cúc gai được gieo trên giấy lọc bão hoà nước trong hộp Petri. Mỗi công thức nhắc lại 3 lần, mỗi lần gieo 100 hạt để trong tối hoàn toàn ở các nhiệt độ 15, 25 và 35°C. Tỷ lệ nảy mầm được theo dõi qua các thời điểm 3, 5 và 7 ngày.

+Định tính các nhóm chất hữu cơ trong các bộ phận cây bằng thuốc thử hoá học đặc hiệu (2, 4).

+Chiết rút hoạt chất nhóm flavonoid theo Talli có cải tiến với các dung môi khác nhau (3,4).

+Nghiên cứu thành phần hoá học bằng phương pháp sắc ký lớp mỏng SKLM, sắc ký lỏng cao áp HPLC với các hệ dung môi khác nhau (3).

+Nuôi cấy mô rễ, thân và lá để tạo sinh khối (11).

+Xác định hoạt tính sinh dược học: kháng khuẩn, chống oxy hoá, bảo vệ gan (5).

III. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

III.1. Nghiên cứu quy trình công nghệ tách chiết thu nhận hoạt chất Flavonoid Silymarin qui mô phòng thí nghiệm.

-Trồng để thu sinh khối và thu mua đủ nguyên liệu cúc gai (thân, lá và hạt) để thu nhận Silymarin.

III.1.1. Định lượng nhóm chất flavonoi.

Flavonoi được thu nhận theo phương pháp Talli và định lượng theo phương pháp cân trọng lượng khô.

-Tách chiết thu nhận phân đoạn flavolignan Silymarin từ các bộ phận của cây Cúc gai (lá, thân và hạt); các bộ phận đều chứa nhóm hoạt chất Silymarin nhưng với hàm lượng và thành phần khác nhau: Lá chứa 0,35%, quả chứa 0,78% và thân chứa 0,21% trọng lượng khô. Hàm lượng Silymarin trong hạt biến động theo quá trình chín của hạt: Hạt còn xanh- 1,73%, hạt chín tới-2,46% và hạt già dùng làm giống-2,21% trọng lượng khô (bảng 1 và 2).

Bảng 1. Hàm lượng flavonoi trong các bộ phận khác nhau của cúc gai.

Hàm lượng flavolignan (% chất khô)		Hàm lượng flavolignan (% chất khô)	
Lá	0,35	Hạt xanh	1,73
Thân	0,21	Hạt chín tới	2,46
Quả	0,78	Hạt làm giống	2,21
Hạt	2,40		

Bảng 2. Hàm lượng flavonoi và dầu trong hạt cúc gai

Nhóm chất	Cúc gai Đức	Cúc gai Việt Nam
Dầu	22,44%	21,55%
Flavonoi	3,95%	2,46%

Trong hạt cúc gai dầu chiếm lượng rất cao (21,55-22,44%), cần chú ý nghiên cứu để khai thác nguồn dầu thực vật phong phú này.

- Định tính thành phần Flavonoi bằng phương pháp SKLM trên Silicagel.

Dùng hệ dung môi: : Toluen: Etyl axetat : Axeton: acid Formic (5:2:2:1).

Các số liệu ở bảng 1, 3 và minh hoạ trên hình 1 và 2 cho thấy trong quá trình sinh trưởng, thành phần flavonoi của các bộ phận lá, thân, quả và hạt của cúc gai có biến đổi, tuy nhiên các băng hoạt chất có Rf khoảng 0,46; 0,55 và 0,58 vẫn tồn tại trong các bộ phận cây cúc gai và tích lũy nhiều nhất ở trong hạt.

So sánh phổ sắc ký lớp mỏng SKLM của flavonoid tách chiết từ hạt cúc gai VN, hạt cúc gai Đức và thuốc Carsil (Silymarin) của Bungary cho thấy các chế phẩm có phổ SKLM như nhau, chứng tỏ phân đoạn flavonoid mà chúng tôi nhận được chủ yếu là flavolignan Silymarin (6).

Như vậy cần chọn loại hạt chín tới để thu nhận Silymarin cho hàm lượng cao và thành phần không đổi.

Bảng 3. Đặc điểm các vết Flavonoid Silymarin

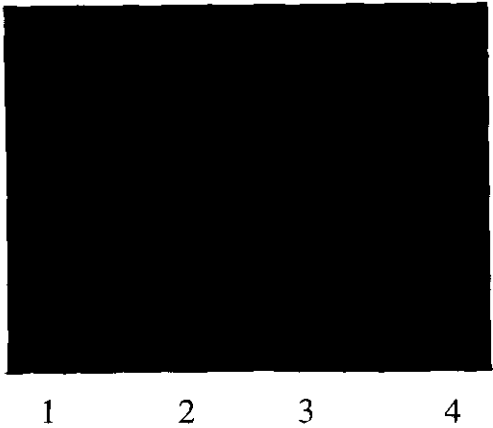
Vết	Giá trị R _f				
	Flavonoid cúc gai				Các vết chung
	Lá	Thân	Quả	Hạt	
1	0,10-vàng chanh				
2	0,23-vàng cam	0,30- vàng cam	0,33 - vàng	0,33- vàng	
3		0,33	0,36- vàng	0,36- vàng	0,36- vàng
4	0,45-vàng chanh	0,46-vàng chanh	0,45- vàng	0,46- vàng	0,46- vàng
5	0,54- vàng chanh	0,54-vàng chanh	0,55- vàng	0,55 - vàng	0,54- vàng
6	0,60- vàng chanh	0,60-vàng chanh	0,58- vàng	0,58- vàng	0,59- vàng



Hình 1. SKLM flavonoid của quả(1), thân (2) và lá (3) cúc gai.

III.1.2. Xây dựng qui trình thu nhận Silymarin qui mô phòng thí nghiệm.

- Đã chọn được hệ dung môi thích hợp và ít độc để tách chiết thu nhận Silymarin làm thuốc qui mô phòng thí nghiệm. Hiệu suất thu nhận chế phẩm này so với phương pháp phân tích định lượng: Phân tích định lượng Silymarin: 2,46%, theo qui trình quy mô 20 lit- 2,12% trọng lượng khô. Như vậy hiệu suất thu được Silymarin của quy trình là 87% so với phân tích định lượng.



Hình 2. SKLM chế phẩm flavonoit từ hạt cúc gai VN 1 (1), VN 2 (4), cúc gai Đức(2) và Silymarin Bungary(Carsil) (3).

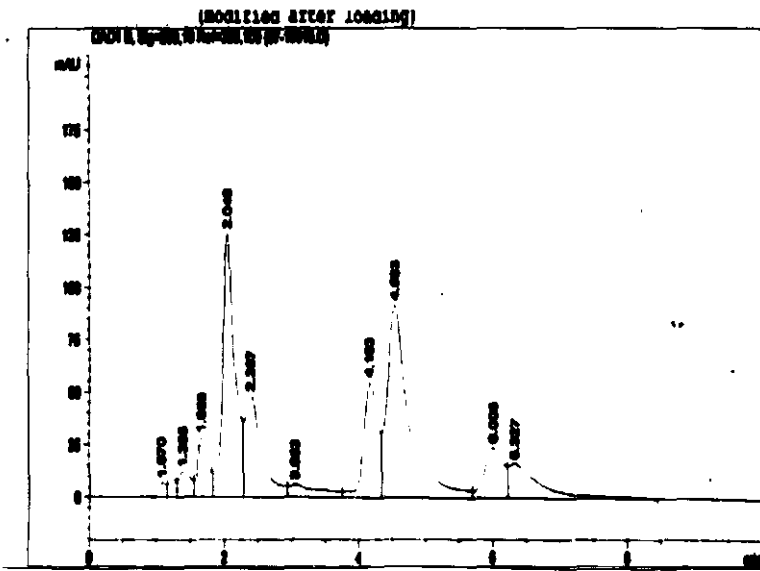
- Kết quả đã thu được 30 gam Silymarin tinh khiết. Kết quả phân tích trên SKLM cho 4 vết đậm có Rf (0,40; 0,46; 0,55 và 0,58) gần giống với giá trị Rf với 4 thành phần Carsil của Bungary làm chất chuẩn.

Chế phẩm Carsil và hai chế phẩm VN1 và VN2 tách chiết bằng 2 hệ dung môi khác nhau là metanol và etanol được phân tích thành phần trên máy HPLC.

Bảng 4. Kết quả phân tích trên máy HPLC .

Mẫu	pik 1	pik2	pik3	pik4	pik5	pik6
Carsil	21,8 %	11,6 %	11,4%	29,9%	6,6%	7,4%
Silymarin VN 1	17,3	44,9	2,7	7,8	7,7	12,9
Silymarin VN 2	17,4	38,0	5,8	7,2	4,7	7,2

Mẫu Silymarin của Bungary có 6 pik đặc trưng và chiếm tới 88,7% tổng số chế phẩm đưa vào phân tích, mẫu Silymarin thu được (từ hạt cúc gai VN1 và VN 2) của chúng tôi cũng có 6 pik tương tự và chiếm tới 93,3 - 81,2% tổng số mẫu đưa vào phân tích. Như vậy các thành phần chính của Silymarin thu được đều giống thành phần Silymarin dùng làm thuốc của Bungary và dung môi methanol cho hiệu quả thu nhận Silymarin cao hơn etanol.



Sorted By : Retention Time
Multiplier : 1.0000
Dilution : 1.0000
Sample Amount : 5.00000 [ng/ul] (not used)

Signal 1: DAD1 B, Sig=280,16 Ref=360,100

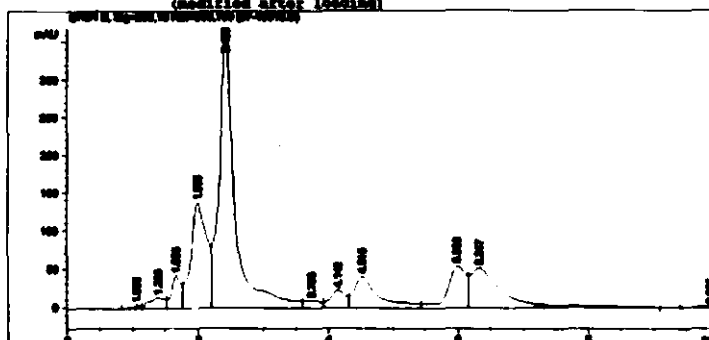
Peak #	RetTime [min]	Sig	Type	Area [mAU*s]	Height [mAU]	Area %
1	1.070	1	PV	51.85083	7.16060	0.7287
2	1.218	1	VV	68.76443	9.10147	0.9665
3	1.385	1	VV	151.05269	12.44434	2.1230
4	1.658	1	VV	294.57065	28.21999	4.1401
5	2.040	1	VV	1557.80981	125.63929	21.8946
6	2.397	1	VV	826.80365	48.18889	11.6205
7	3.053	1	VV	203.90816	6.16149	2.8659
8	4.163	1	VV	814.68158	54.86572	11.4501
9	4.533	1	VV	2131.62646	91.73463	29.9594
10	6.005	1	VV	473.22604	23.93524	6.6511
11	6.327	1	VB	528.94971	16.30755	7.4342
12	11.807	1	PB	11.81018	3.47051e-1	0.1660

Totals : 7115.05419 424.10630

Instrument 1 7/31/02 8:34:52 AM Nguyen V Dat - Le Thi Thu

Hình3. HPLC Silymarin Carsil (Bungary)

Injection Date : 7/31/02 8:26:44 AM
 Sample Name : CUC GAI 2 Vial : 1
 Acq. Operator : Nguyen V Dat - Le Thi Duc
 Acq. Method : C:\MSDCHEM\1\METHODS\MSDCHEM.M
 Last changed : 7/31/02 8:33:46 AM by Nguyen V Dat - Le Thi Duc
 (modified after loading)
 Analysis Method : C:\MSDCHEM\1\METHODS\MSDCHEM.M
 Last changed : 7/31/02 8:40:03 AM by Nguyen V Dat - Le Thi Duc
 (modified after loading)



Sorted By : Retention Time
 Multiplier : 1.0000
 Dilution : 1.0000
 Sample Amount : 5.00000 [ng/ul] (not used)

Signal 1: DAD1 B, Sig=280,16 Ref=360,100

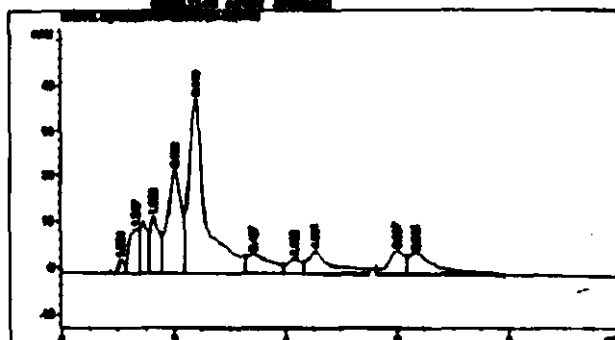
Peak #	RetTime [min]	Sig	Type	Area [mAU*s]	Height [mAU]	Area %
1	1.058	1	PV	30.50104	4.40571	0.2237
2	1.386	1	VV	238.33649	14.52148	1.7480
3	1.655	1	VV	409.94131	43.22157	3.0067
4	1.993	1	VV	2362.99805	138.95453	17.3311
5	2.423	1	VV	6129.20068	372.05634	44.9538
6	3.738	1	VV	182.95219	10.00818	1.3418
7	4.142	1	VV	371.94171	22.53165	2.7280
8	4.515	1	VV	1060.38318	40.66512	7.7772
9	5.986	1	VV	1046.80261	54.08890	7.6776
10	6.317	1	VB	1766.99585	51.30643	12.9598
11	9.865	1	PBA	34.38740	8.86959e-1	0.2522

Totals : 1.36344e4 752.64686

Instrument 1 7/31/02 8:41:10 AM Nguyen V Dat - Le Thi Duc

Hình 4. HPLC Silymarin vn 1 .

Injection Date : 7/25/02 8:00:00 AM Vial : 1
 Sample Name : GSC GSC 5
 Anal. Comment : Nguyen V Dat - Le Thi Thu
 Exp. Method : C:\Program Files\Agilent\ChemStation\MSD\MSD.D
 Exp. Name : 7/25/02 8:00:00 AM by Nguyen V Dat - Le Thi Thu
 Last changed : 7/25/02 8:00:00 AM by Nguyen V Dat - Le Thi Thu
 Analysis Method : C:\Program Files\Agilent\ChemStation\MSD\MSD.D
 Last changed : 7/25/02 8:00:00 AM by Nguyen V Dat - Le Thi Thu



Sorted By : Retention Time
 Multiplier : 1.0000
 Dilution : 1.0000
 Sample Amount : 5.00000 (ng/ul) not us

Signal 1: DAD1 B, Sig=280,16 Ref=360,100

Peak #	RetTime [min]	Sig	Type	Area [mAU*s]	Weight [mAU]	Area %
1	1.064	1	BV	21.08666	2.99590	0.9578
2	1.347	1	VV	112.67812	9.73601	5.1180
3	1.468	1	VV	110.29298	11.24586	5.0098
4	1.656	1	VV	130.40430	12.06366	5.9233
5	2.022	1	VV	362.18219	22.66496	17.3596
6	2.410	1	VV	837.30884	38.59663	38.1040
7	3.427	1	VV	127.31763	4.27075	6.1461
8	4.166	1	VV	59.38910	3.35220	2.0901
9	4.531	1	VB	158.42604	4.98400	7.1960
10	6.007	1	BV	104.45466	5.15978	4.7446
11	6.343	1	VB	157.98927	4.73841	7.1263

Totals : 2201.52978 119.81002

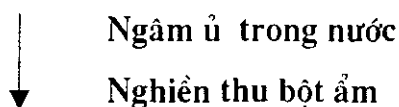
Instrument 1 7/31/02 8:57:41 AM Nguyen V Dat - Le Thi Thu

Hình 5. HPLC Silymarin VN 2

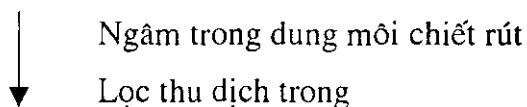
Tuy nhiên tỷ lệ các pik trong 3 mẫu có khác nhau. Thành phần pik 4 của Silymarin Bungary có hàm lượng cao nhất chiếm tới 29,9% trong khi đó pik này ở chế phẩm Silymarin VN 1 thu được chiếm có 7,8%, nhưng pik 2 chiếm tới 44,9% trong khi đó pik2 của Silymarin Bungary chỉ chiếm 11,6% và của chế phẩm Silymarin VN2 là 17,4 và 38,0% .

Quy trình chiết rút Silymarin

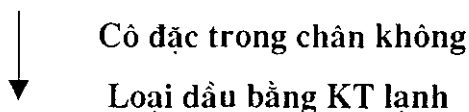
Hạt nguyên liệu



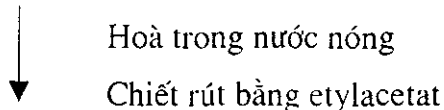
Bột nguyên liệu



Dịch trong



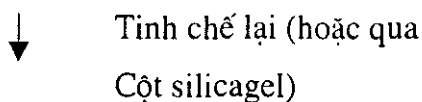
Cao đặc



Dịch chiết etylacetat



Bột Flavonoid



Chế phẩm Flavonoit (Silymarin)

Chế phẩm Silymarin cúc gai VN1 và VN 2 có thành phần tương đương nhau, như vậy có thể dùng cả 2 loại dung môi etanol và methanol được thí nghiệm để thu nhận Silymarin.

Việc thu nhận khối lượng Silymarin lớn trong quá trình sản xuất gặp một số trở ngại: việc nghiền hạt cúc gai rất khó vì hạt nhỏ, vỏ cứng và bóng; hơn nữa hàm lượng dầu rất cao làm cản trở quá trình đông khô, tinh chế chế phẩm đòi hỏi lượng dung môi loại chất béo lớn, giá thành cao.

Để giảm chi phí các dung môi và thời gian trong qui trình thu nhận Silymarin, chúng tôi đã nghiên cứu thử nghiệm cải tiến một số công đoạn trong quá trình chiết rút: Cải tiến việc nghiền ướt hạt nguyên liệu và dùng kỹ thuật làm lạnh trong giai đoạn loại dầu. Qui trình được cải tiến (so với qui trình cũ) được tổng quát trong bảng Quy trình chiết rút Silymarin đã giảm được thời gian nghiền mẫu, giảm dung môi ete petrol để loại dầu và thu được 30 gam chế phẩm Silymarin để thử nghiệm .

Với qui trình trên có thể thu nhận Silymarin với khối lượng lớn để sản xuất thuốc.

III.3. Thử nghiệm hoạt tính sinh dược học của chế phẩm Silymarin thu được.

III.3.1. Tác dụng chống oxy hoá.

Tác dụng chống oxy hoá của chế phẩm Silymarin được biểu hiện qua ảnh hưởng của chế phẩm lên hoạt tính các enzyme oxy hoá khử như peoxydaza và catalaza của 4 nhóm máu người.

III. 3.1.1. Ảnh hưởng của chế phẩm Silymarin lên hoạt tính Peroxydaza máu người.

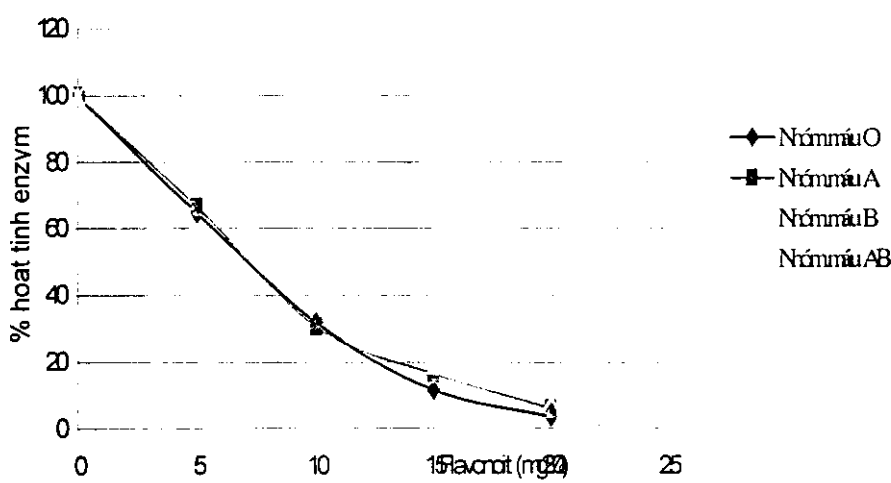
Vì Peroxydaza có vai trò quan trọng trong quá trình oxy hoá nên chúng tôi khảo sát khả năng kìm hãm của Flavonoit đối với hoạt độ của peroxydaza, từ đó có thể đánh giá khả năng chống oxy hoá của Flavonoit.

Chúng tôi sử dụng Indigocacmin làm chất chỉ thị. Hoạt tính peroxydaza được đánh giá bằng thời gian (giây) cần thiết để oxy hoá lượng Indigocacmin được chuyển hoá trước khi ngừng phản ứng nhờ sự chuyển màu của Indigocacmin từ màu xanh sang màu vàng.

Chế phẩm Silymarin ức chế rõ rệt hoạt tính peroxydaza huyết thanh của cả 4 nhóm máu người , với nồng độ 20mg% hoạt tính chỉ còn 3,5 %(nhóm O) đến 13,01%(nhóm B) (bảng 9 và đồ thị 1).

Bảng 10. Ảnh hưởng của Silymarin lên hoạt tính Peroxydaza huyết thanh .

Nồng độ chế phẩm (mg%)	Hoạt độ enzym							
	Nhóm máu O		Nhóm máu A		Nhóm máu B		Nhóm máu AB	
	T/gian (giây)	%	T/gian (giây)	%	T/gian (giây)	%	T/gian (giây)	%
0-ĐC	42	100,	120	100,	41	100,	110	100,
5,0	65	64,62	180	66,67	55	74,54	145	75,86
10,0	131	32,06	390	30,76	103	39,81	260	42,30
15,0	360	11,67	725	16,55	210	19,52	520	21,15
20,0	>1200	3,5	>2000	6,00	>315	13,01	>1200	9,17



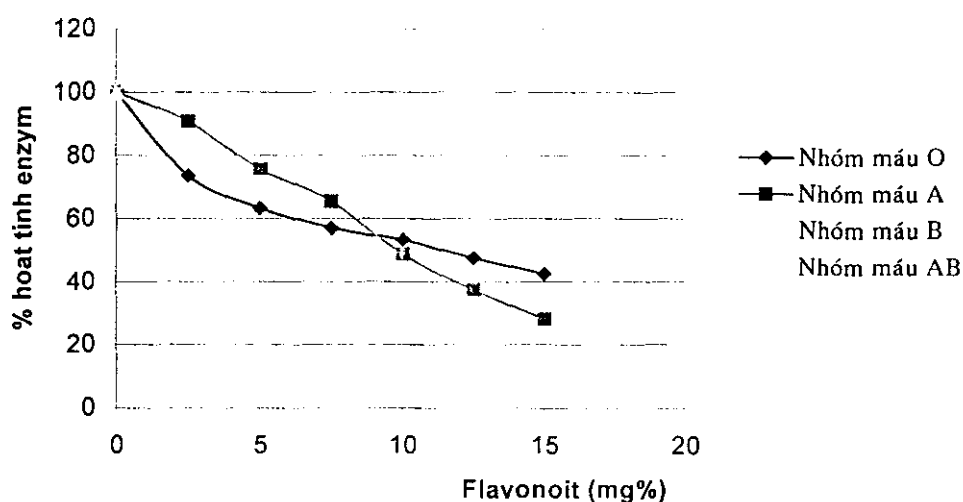
Đồ thị 1. Ảnh hưởng của Silymarin lên hoạt tính Peroxydaza máu người

III.3.1.2. Ảnh hưởng của chế phẩm Silymarin lên hoạt tính Catalaza máu người.

Catalaza là một enzym xúc tác phản ứng oxy hoá khử theo cơ chế tương tự peroxydaza. Catalaza có khả năng điều hoà nồng độ H_2O_2 tạo thành phức catalaza- H_2O_2 có khả năng phản ứng với chất oxy hoá tạo thành gốc tự do bền. Hoạt tính Catalaza được tính bằng lượng $KMnO_4$ tác dụng với lượng H_2O_2 còn lại sau phản ứng.

Bảng 11. Ảnh hưởng của Silymarin lên hoạt tính Catalaza máu người.

Nồng độ Silymarin(mg%)(mcg/ml)	Hoạt độ enzym (ml 0,1 $KMnO_4$ và %)							
	Nhóm máu O		Nhóm máu A		Nhóm máu B		Nhóm máu AB	
	ml	%	ml	%	ml	%	ml	%
0,0	8,1	100,0	11,0	100,0	0,3	100,0	0,3	100,0
2,5	11,0	73,63	12,0	91,66	0,95	31,58	1,0	30,00
5,0	12,8	63,26	14,5	75,86	1,45	20,69	1,5	20,00
7,5	14,2	57,04	16,8	65,48	1,8	16,66	2,1	14,28
10,0	15,2	53,28	22,5	48,89	2,3	13,04	3,2	9,37
15,0	18,9	42,85	38,7	28,42	3,2	9,37	4,1	7,31



Đồ thị 2. Ảnh hưởng của Silymarin lên hoạt tính Catalaza máu người.

Silymarin ức chế hoạt tính Catalaza của 2 nhóm máu A và O yếu hơn, với nồng độ 15mg% hoạt tính enzym còn 28,24 % với nhóm máu A, 42,85% với nhóm máu O; ức chế mạnh hơn đối với 2 nhóm B và AB: 9,37% với nhóm máu B và 7,31% với nhóm máu AB so với đối chứng (100%).

Chế phẩm Silymarin cúc gai có tác dụng ức chế 2 enzym peroxydaza và Catalaza rõ rệt, chứng tỏ chế phẩm có khả năng chống oxy hoá cao.

III.3.1.3. Ảnh hưởng của chế phẩm Silymarin lên hoạt tính Amylaza và Proteaza.

Để tạo các chế phẩm hỗn hợp thuốc chứa Silymarin và nghiên cứu ảnh hưởng của Silymarin lên các enzym tiêu hoá khi sử dụng thuốc chứa Silymarin, chúng tôi thử nghiệm tác dụng chế phẩm Silymarin lên hoạt tính của các enzym Proteaza và Amylaza của máu và Amylaza nước bọt. Silymarin hầu như không ảnh hưởng đến hoạt tính của các enzym này. Như vậy khi phối chế làm thuốc Silymarin sẽ không gây ảnh hưởng đến tiêu hoá của người. Tuy nhiên Silymarin ảnh hưởng rõ rệt đến hoạt tính proteinaza của papain đủ đủ (bảng 11).

Bảng 12. Ảnh hưởng của Silymarin lên hoạt tính proteinaza của Papain .

Nồng độ Silymarin (mg%)	Hoạt độ Papain	
	Tyrosin (mg)	% hoạt tính
0-ĐC	0,061 ± 0,003	100
10	0,093 ± 0,009	152,46
20	0,121 ± 0,003	198,36
40	0,169 ± 0,008	277,05

Silymarin của cúc gai hoạt hoá hoạt động thuỷ phân casein của papain rất mạnh với nồng độ 10-40mg%, Silymarin cúc gai tăng hoạt tính từ 52,46 - 177,05%. **Kết quả này mở ra triển vọng phối hợp hợp lý các chế phẩm Flavonoit chữa bệnh với các**

enzym tiêu hoá trong các chế phẩm thuốc thực phẩm mà hiện nay đang được quan tâm.

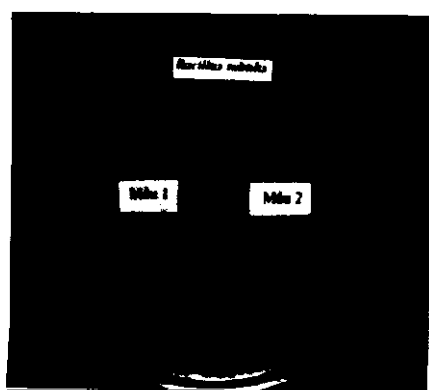
III.3. 2. Tác dụng kháng khuẩn.

Phương pháp đục lỗ và khuếch tán trên thạch được sử dụng để đánh giá khả năng kháng khuẩn của chế phẩm Silymarin. Khi dịch Silymarin khuếch tán trong thạch ,nếu có tác dụng kháng khuẩn sẽ làm ức chế sinh trưởng vi khuẩn đã được cấy thể hiện bằng vòng vô khuẩn nơi dịch chiết khuếch tán ra. Đánh giá kết quả dựa vào đường kính vòng vô khuẩn.

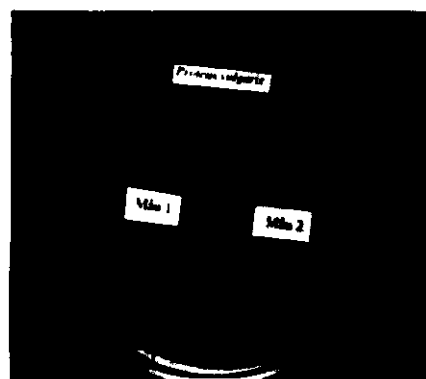
Bảng 13. Hoạt tính kháng khuẩn và nấm của chế phẩm Silymarin VN

Các vi sinh vật kiểm định	Vòng kháng khuẩn (mm)	
	Silymarin 1	Silymarin 2
<i>Eschericeae coli</i> (-)	16	18
<i>Proteus vulgaris</i> (-)	16	17
<i>Salmonella typhi</i> (-)	9	8
<i>Saccina lutea</i> (+)	17	17
<i>Bacillus subtilis</i> (+)	19	18
<i>Bacillus ceureus</i> (+)	21	22
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	11	17
<i>Aspergillus niger</i>	0	0

Kết quả trên bảng 13 và minh hoạ trong hình 13 và 14 cho thấy chế phẩm Silymarin có tác dụng với các vi khuẩn gram (-) , gram (+) và nấm *S. cerevisiae* thử nghiệm, không có tác dụng kháng nấm *A. niger*.



Hình 13. Vòng kháng khuẩn *B. subtilis* của Silymarin VN 1 và VN (2)



Hình 14. Vòng kháng khuẩn *P. vulgaris* của Silymarin VN(1) và VN (2)

Như vậy chế phẩm Silymarin có tác dụng kháng khuẩn rõ rệt, nhưng không có tác dụng kháng nấm mốc *A. niger*.

III.3.3. Tác dụng bảo vệ gan của các chế phẩm Silymarin.

Nguyên tắc chung là dùng tác nhân gây độc cho gan là CCL₄, sau đó sử dụng chế phẩm Silymarin để làm giảm các ảnh hưởng không tốt của CCL₄ lên các chỉ tiêu cần nghiên cứu là hoạt tính các enzym GOT và GPT, lên hàm lượng MDA của chuột thí nghiệm.

Thí nghiệm được tiến hành trên chuột nhắt trắng có trọng lượng 20-22g, mỗi lô 7 con, chia thành các lô như sau:

- 1 - Lô đối chứng sinh lý: tiêm dầu ôliu vào phúc mạc với liều 0,2ml/con/ ngày và uống nước cất ngày 10ml /kg cân nặng/ ngày.
- 2 - Lô đối chứng gây bệnh: Gây viêm gan bằng dung dịch CCL₄ 10% pha trong dầu ôliu. Tiêm phúc mạc 3 lần, tiêm lần trước cách lần sau 2 ngày với liều tiêm 0,2ml/ con/ ngày và uống nước như lô 1.
- 3 - Lô đối chứng gây bệnh và dùng thuốc Carsil (Silymarin) của Bungary: Tiêm CCL₄

(như lô 2) và song song cho uống thuốc với liều 10 mg/ ngày/ con., uống liền 7 ngày kể từ ngày gây bệnh.

-4-Lô đối chứng gây bệnh và dùng thuốc Chophytol (thuốc từ actiso) của Pháp: Tiến hành như lô 3, thay thế Carsyl bằng Chophytol với liều 10mg/con/ ngày.

-5- Lô gây bệnh và thử chế phẩm Silymarin : Gây bệnh như lô 2 và song song uống các chế phẩm thử nghiệm là chế phẩm Silymarin ở 3 liều lượng 2,5mg, 5,0 mg và 10mg / con/ ngày, uống liền 7 ngày.

Sau 7 ngày giết chuột, lấy máu chuột, ly tâm ở 4200 vòng phút/ 15 phút, lấy huyết thanh xác định hoạt độ các enzym GPT (Glutamate-Pyruvate transaminase) và GOT (Glutamate-oxaloacetate transaminase) là 2 enzym quan trọng trong trao đổi chất của gan.

Gan lấy ra được rửa sạch bằng nước muối sinh lý, thấm khô nước muối và cân trọng lượng. Thu dịch nghiền đồng thể của gan để xác định sự peroxy hoá lipid của gan qua hàm lượng malonic dialehyd (MDA) là một sản phẩm được tạo ra trong quá trình peroxy hoá lipid. (12-14)

Kết quả trong bảng 14 cho thấy:

- CCL4 gây độc cho gan rõ rệt : tăng tỷ lệ gan/cơ thể(6,31); tăng hoạt độ GOT(164,5%) và GPT (257,6%) so với ĐC sinh lý.

- Các chế phẩm thuốc điều trị bệnh gan Carsyl và Chophytol giữ trạng thái bình thường của gan: tỷ lệ gan/ cơ thể biến động từ 5,71 đến 5,78 gần giống ĐC sinh lý; GOT giảm còn 103-120% so với ĐC; GPT giảm còn 106-113% so với ĐC.

- Các chế phẩm thử nghiệm Silymarin VN có tác dụng bảo vệ gan rõ rệt: Giữ trạng thái gan bình thường: tỷ lệ gan/cơ thể ở mức 5,59 - 5,64; giảm hoạt độ GOT rõ rệt so với lô gây bệnh còn 122-150% và GPT còn 106-125% ở 3 nồng độ Silymarin. Như vậy tác dụng bảo vệ gan chuột khỏi bị nhiễm độc của Silymarin VN không kém các thuốc Carsil và Chophytol.

Bảng 14. Thử nghiệm tác dụng bảo vệ gan của chế phẩm Silymarin trên chuột

Lô	Công thức thí nghiệm	Trọng lượng chuột (gam)	Trọng lượng gan (gam)	Tỷ lệ gan/cơ thể	GOT (U/L)	So với ĐC	GPT (U/L)	So với ĐC
1	Đối chứng SL	23,73	1,40	5,89	155	100,0	59	100,0
2	Đ/C BL (CCL4)	22,33	1,41	6,31	255	164,5	152	257,6
3	Đ/C thuốc Carsyl 10mg/con	22,49	1,30	5,78	187	120,6	67	113,5
4	Đ/C thuốc Chophytol 10mg/con	22,93	1,31	5,71	160	103,2	63	106,7
5	Thử Silymarin							
	2,5 mg/con/ ngày	22,71	1,28	5,64	233	150,3	74	125,4
	5,0	21,12	1,18	5,59	210	135,5	65	110,1
	10,0	21,30	1,20	5,63	190	122,5	63	106,7

Bảng 15. Khả năng ức chế phản ứng peoxy hoá lipid của Silymarin cục gai trong dịch nghiền đồng thể tế bào gan chuột.

Lô TN	Công thức thí nghiệm	Hàm lượng MDA(nmol/ml)	% so với đối chứng
1	Đối chứng sinh lý	2,80 ± 0,06	100, 00
2	Đối chứng bệnh lý	3,76 ± 0,21	134,28
5	Chế phẩm Silymarin		
	5,0 mg/con/ngày	2,85 ± 0,21	101,78
	10,0 mg/con/ngày	2,73 ± 0,08	97,50

Kết quả thí nghiệm trong bảng 15 cho thấy chế phẩm Silymarin làm giảm mức độ peoxy hoá lipid rõ rệt thông qua việc làm giảm hàm lượng MDA từ 3,67 nmol/ml ở lô bệnh lý do CCL4 làm nhiễm độc gan xuống 2,85 nmol/ml ở lô cho uống 5 mg Silymarin/con/ngày và 2,73 nmol MDA/ml ở lô cho uống 10 mg Silymarin/con/ngày, gần đạt (97,5% so với đối chứng) hàm lượng 2,80 nmol MDA/ml ở lô đối chứng sinh lý. Các số liệu thu được cũng tương tự như các kết quả của nhiều tác giả khi thử nghiệm Silymarin trên chuột (12). Số liệu thu được chứng tỏ chế phẩm Silymarin có tác dụng bảo vệ gan và chống oxy hoá lipid đối với chuột thí nghiệm.

KẾT LUẬN

Quy trình thu nhận Silymarin với qui mô phòng thí 20 lít, thu được 30 gam Silymarin để thử nghiệm.

Quy trình nuôi cấy mô rễ và lá cúc gai thu sinh khối qui mô 20 lít, các mẫu mô nuôi cấy chứa 0,97% -1,25% Silymarin .

Chế phẩm Silymarin thu được có tác dụng kháng khuẩn, chống oxy hoá và bảo vệ gan rõ rệt.

Chế phẩm Silymarin thu được có tác dụng bảo vệ gan và chống oxy hoá lipid không kém gì chế phẩm Carsil của Bungary và Chopytol của Pháp, có thể sản xuất thuốc.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- 1.Võ Văn Chi.. Từ điển cây thuốc Việt Nam. NXB Y học, 2000, tr.339.
- 2.Phạm Thị Trân Châu, Nguyễn Quốc Khang, Đào Kim Nhung. Thực tập Sinh hoá. ĐHTH Hà Nội, 1997.
- 3.Đào Kim Nhung. Luận án PTS Khoa học sinh học, ĐHTH Hà Nội. 1996.
- 4.Nguyễn Văn đàn, Nguyễn Viết Tự. Phương pháp nghiên cứu hoá học cây thuốc . NXB Y học. 1985
- 5.Bladagarov C. T. XVM-Apn, 292-299, 1987

- 6.Carssil, a product with confirmed effectiveness in toxic, metabolic and degenerative diseases of the hepatic parenchyma, 2000, Sopharma, Bungaria.
- 7.Flora K, Hahn M, Rosen H, Benner K. 1999. Milk thistle (*S. marianum*) for the therapy of liver disease. *Am J Gastroenterol.* 94(2): 545-546.
- 8.Amirghofran Z, Azadbakht M, Karimi MH. 2000. Evaluation of the immunomodulatory effects of five herbal plants. *J. Ethnopharmacol.* 72(1-2):167-172.
- 9.Luper S. 1998. A review of plants used in the treatment of liver disease. *Altern Med Rev.* 3(6):410-421.
- 10.Syed AH et al. 2002. Contemporary role and future prospects of medicinal plants. *TelMedPak.*
- 11.Alikaridis F. 2000. Hairy roots *Silybum marianum* biosynthesis. *Fitoterapia*:379-384
- 12.Kurkin V.A, Lebedev A.A, Bulatova M.V. Antioxydantive properties of flavolignans *Silybum marianum*(L) Gaertn. Fruits. *Plant resources.* 2003 V.1. 89-93.
13. Lirussi F, Okolicsanyi L. Cytoprotection in the nineties: Experience with ursodeoxycholic acid and silymarin in chronic liver disease. *Acta Phys Hungarics* 1992;80:1–4.
14. Velussi M, Cernigo AM, Viezzoli L, et al. Silymarin reduces hyperinsulinemia, malondialdehyde levels and daily insulin need in cirrhotic diabetic patients. *Curr Ther Res* 1993;S3:S33–45.
15. Pares A, Planes R, Torres M, et al. Effects of silymarin in alcoholic patients with cirrhosis of the liver: results of a controlled, double-blind, randomized and multicenter trial. *J Hepatol* 1998;28:615–21.
16. Nassuato G, Iemmolo RN, et al. Effect of silibinin on biliary lipid composition. Experimental and clinical study. *J Hepatol* 1991;12:290–5.
17. Palasciano G, Portinascasa P, et al. The effect of silymarin on plasma levels of malondialdehyde in patients receiving long-term treatment with psychotropic drugs. *Curr Ther Res* 1994;S5:S37–45.

QUY TRÌNH
CHIẾT XUẤT VÀ ĐIỀU CHẾ CÁC SAPOGENIN
STEROID CỦA TẬT LÊ VIỆT NAM

NGƯỜI CHỦ TRÌ: TS. PHAN QUỐC KINH

HÀ NỘI - 2004

I. MỞ ĐẦU

Tật lê *Tribulus terrestris*. L còn gọi là cây yết hầu, cây gai ma vương là một dược liệu đã được sử dụng lâu đời ở Trung Quốc như một vị thuốc bổ, điều trị suy yếu hoạt động sinh dục cho nam giới. Y học cổ truyền Trung Hoa sử dụng quả Tật lê đã bỏ gai làm thuốc dưới tên Bạch tật lê. từ hàng trăm năm nay nước ta vẫn phải nhập Bạch tật lê từ Trung Quốc. Hàng năm nước ta nhập 25 tấn Bạch tật lê từ Trung Quốc.

Cây tật lê lại được sử dụng lâu đời ở các nước theo đạo Hồi xung quanh Địa Trung Hải, Hắc Hải và Ấn Độ Dương nhưng họ sử dụng toàn cây (trừ rễ) để làm thuốc cường dương.

Các nhà khoa học Bungari và Thổ Nhĩ Kỳ là những người đi đầu trong nghiên cứu tật lê. Lúc đầu các chế phẩm của tật lê (mà chủ yếu là các saponin steroid) được dùng làm thuốc phòng và xơ vữa động mạch rất phổ biến ở Đông Âu và Liên Xô cũ cũng như ở Trung Quốc. Sau đó đã phát hiện các bệnh nhân nam khi sử dụng tật lê thì hàm lượng sinh tổng hợp testosterone trong cơ thể được tăng lên 30% sau vài tuần.

Từ những năm 80 của thế kỷ trước, ở Bungari đã nghiên cứu sản xuất thành công chế phẩm tribestan từ cây tật lê để làm thuốc bổ, chống oxy hóa và nhất là điều trị suy yếu hoạt động sinh dục cho nam giới và còn được làm thuốc tăng trọng lượng cơ bắp và tăng sức khỏe cũng như làm mau chóng hồi phục sức khỏe cho các vận động viên thể dục thể thao. Vào các thập niên 90 thế kỷ trước, tribestan được sử dụng rộng rãi ở Mỹ, Canada, Anh, các nước Tây Âu khác cũng như ở Trung Quốc, Ấn Độ. Qua thực nghiệm tật lê còn có tác dụng làm tăng sinh tổng hợp nội tiết tố cho nữ và do vậy cũng được sử dụng cho cả phái nữ. Ở Mỹ còn sản xuất các chế phẩm phối hợp tật lê với dam dương hoắc và đinh lăng. Ở Ấn Độ thì phối hợp tật lê với cây *Withania somnifera*. Hãng Sopharma Bungari, năm 2001 đã xuất được 10 triệu đô la Mỹ Tribestan cho thị trường Bắc Mỹ.

Xuất phát từ những thành tựu đó của y học nước ngoài, chúng tôi đã phát hiện được nguồn dược liệu tật lê mọc hoang phong phú ở các tỉnh Bình Thuận, Ninh Thuận. Qua điều tra thực địa, chúng tôi còn biết rằng các lang y người Chăm ở Nam Trung Bộ từ lâu cũng đã dùng cây tật lê làm thuốc chữa viêm họng và thuốc cường dương. Ở chợ Phan Thiết có nhiều bà hàng lá bán cây tật lê đã phơi khô, chặt nhỏ.

Qua nghiên cứu sơ bộ, chúng tôi đã chiết xuất được các saponin steroid và sapogenin steroid của tât lê Việt Nam và so sánh với các hoạt chất của tribestan (Bungari) và Power men (Mỹ). Bước đầu đã nhận thấy các hoạt chất của tât lê Việt nam tương tự các hoạt chất của tât lê Bungari và tât lê Mỹ.

Bước đầu nghiên cứu hoạt chất sinh học của tât lê, chúng tôi cũng thu nhận được kết quả là tât lê Việt Nam có hoạt tính tăng cường sinh tổng hợp testosterone trong cơ thể nam giới. Vì vậy chúng tôi tiến hành nghiên cứu toàn diện về cây tât lê, chiết xuất saponin steroid tạo chế phẩm Uphton.

II. PHƯƠNG PHÁP

Nghiên cứu các qui trình chiết xuất cao Tât lê chứa các Saponin steroid

Dựa vào các qui trình của Bungari, Nga, Mỹ, Trung Quốc chúng tôi đã tiến hành tách chiết theo qui trình sau:

- Ngâm kiệt bằng cồn 40⁰ và cồn 60⁰
- Chiết bằng cồn nóng 60⁰
- Chiết bằng nước nóng sau đó chiết bằng chlorofoc rồi bằng n.butanol.

Dược liệu được sấy khô, xay nhỏ và chiết bằng dung môi với tỉ lệ 8:1 (với cồn) và 10:1 (với nước nóng).

III. KẾT QUẢ

- Chiết ngâm kiệt bằng cồn 40⁰ nhận được cao với hàm lượng 16.1%.
- Chiết ngâm kiệt bằng cồn 60⁰ nhận được cao với hàm lượng 15.8%.
- Chiết ngâm kiệt bằng cồn nóng 60⁰ nhận được cao với hàm lượng 16.4%.

Từ 100g cao (cồn 40⁰) chiết tách riêng được 15g hỗn hợp saponin steroid

Từ 100g cao (cồn 60⁰) chiết tách riêng được 16g hỗn hợp saponin steroid

Từ 100g cao (cồn 60⁰ sôi) chiết tách riêng được 16.5g hỗn hợp saponin steroid

Chiết bằng nước đun sôi nhận được cao với hàm lượng 20.3%

Từ 100g cao nước chiết tách riêng được 33g cao cồn 60⁰

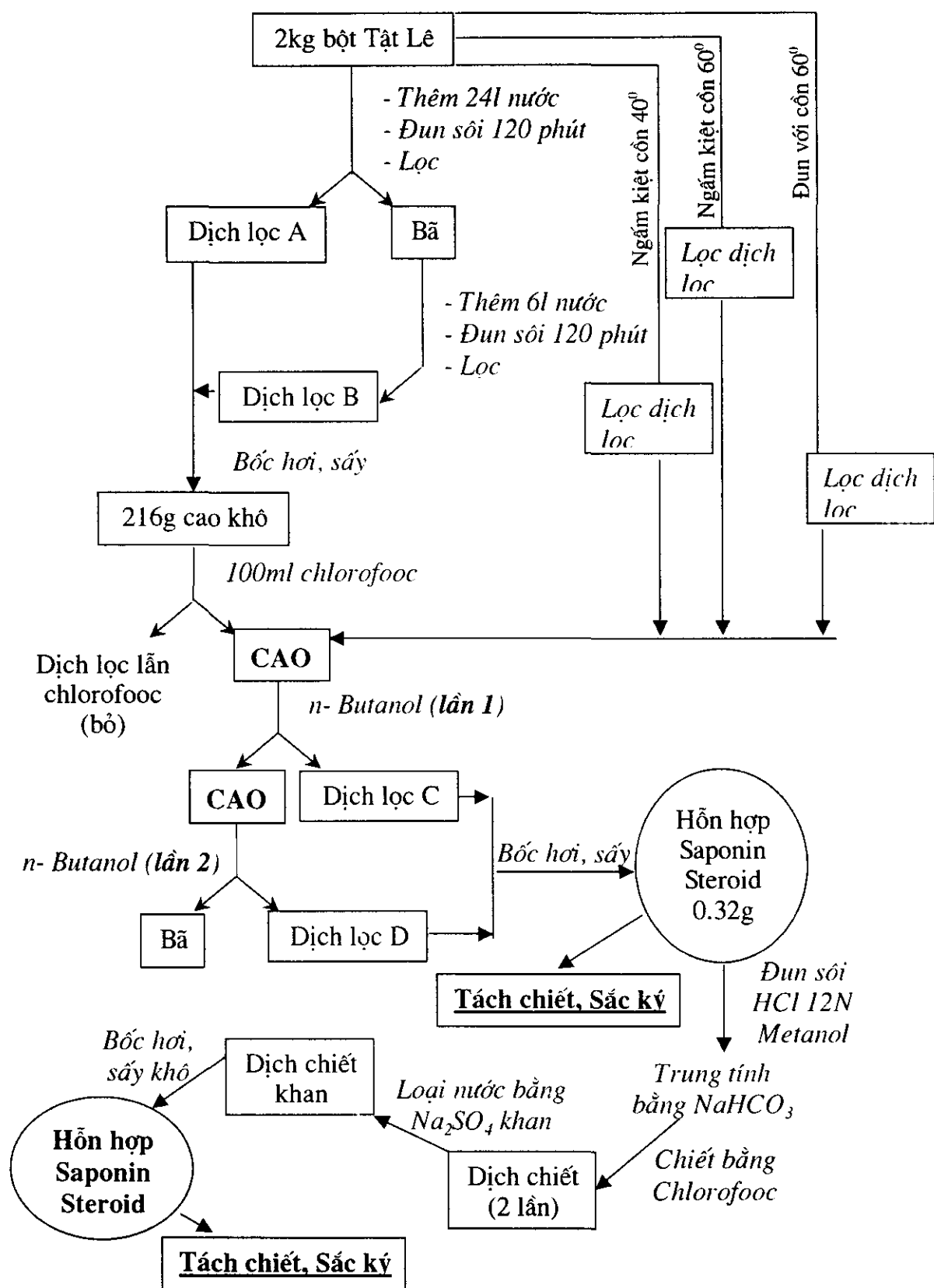
Từ 100g cao nước chiết tách riêng được 12g hỗn hợp saponin steroid

Từ 100g cao cồn 60⁰ (đi từ cao chiết bằng nước) tách riêng được 29g hỗn hợp các saponin steroid

Tổng số cao chiết được là 65kg để bào chế các dạng sản phẩm tiếp theo

Tiêu chuẩn Cao: độ ẩm < 5%, hàm lượng saponin steroid < 20%, sắc ký lớp mỏng trên Silicagel Merck

Sơ đồ tóm tắt các qui trình tách chiết Saponin và Sapogenin Steroid của tât lê



I. MỞ ĐẦU

Các quá trình phân giải protein đóng vai trò chìa khoá trong hầu hết các hoạt động sống của tế bào và cơ thể sinh vật. Do vậy, thông qua nghiên cứu PPI không những làm sáng tỏ được mối quan hệ giữa cấu trúc và chức năng của protein mà còn cho phép chúng ta hiểu được bản chất của nhiều hoạt động sống.

Các PPI là những protein làm giảm thuận nghịch hoạt độ của các proteaz. Proteaz tham gia vào nhiều quá trình sống quan trọng như hoạt hoá proenzim, prohoocmon, đông máu, thụ tinh, viêm, nhiễm, biến thái, quá trình tấn công của nấm mốc, vi khuẩn, virus (kể cả HIV) vào vật chủ ... Vì vậy PPI không chỉ điều hoà quá trình phân giải protein nội sinh mà còn có thể góp phần bảo vệ cơ thể, hạn chế tác dụng của các yếu tố gây bệnh, kìm hãm quá trình sinh trưởng phát triển của côn trùng, vi khuẩn v.v... Tuy nhiên, cần khẳng định tiềm năng ứng dụng to lớn của các PPI trong y học. Hàng loạt các bệnh như viêm tụy cấp, chảy máu, khí thũng phổi, dị ứng ... liên quan đến sự hoạt động không bình thường của các proteinaz. Do đó các PPI được sử dụng như những công cụ hữu hiệu trong các nghiên cứu y học.

TI họ bí (mướp đắng, gấc, bí ngô) được phát hiện từ lâu, nhưng do chúng có nhiều tính chất quý giá nên đã được quan tâm nghiên cứu nhiều. TI họ bí thuộc loại PPI có khối lượng phân tử thấp (3kDa) rất bền với nhiệt và các yếu tố hoá, lý, sinh khác, là mô hình tốt để tạo các phân tử mới có hoạt tính sinh học mới. Một số trong chúng có tác dụng ức chế yếu tố XII_a xúc tác cho phản ứng đầu tiên của quá trình đông máu và một số lại có tiềm năng ứng dụng khác. Hạt gấc thuộc loại giàu PPI nhất trong số các hạt thuộc họ bầu bí đã nghiên cứu [7]. Chính vì vậy chúng tôi đã đi sâu nghiên cứu đối tượng này.

2. NGUYÊN LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Nguyên liệu và hoá chất

- Các chủng vi sinh vật phân lập được từ mủ bòng, nấm men, đất.
- Pepton, cao thịt, thạch, casein, gelatin, tripxin của hãng Sigma (Mỹ)
- NaCl và Albumin huyết thanh bò của hãng Serva (Đức)
- Các hoá chất khác đều có độ tinh sạch phân tích.
- Chuột nhắt trắng dòng Swiss trưởng thành, không phân biệt giống, đạt tiêu chuẩn thí nghiệm, trọng lượng 24 ± 2 g. Được nuôi dưỡng theo qui định tại phòng thực nghiệm của Bộ môn Dược lý - HVQY

2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Phân lập vi khuẩn từ các nguồn khác nhau:

Lấy một vòng que cấy mũ bông (nấm men, đất) cho vào bình tam giác dung tích 250ml chứa 50ml môi trường thạch thường (đã thanh trùng). Lắc đều trên máy ổn nhiệt 220 vòng/phút, nhiệt độ 37°C trong 10 h sau đó dịch được pha loãng đến 10^{-3} . Nhỏ 100µl dịch đã pha loãng trên vào đĩa thạch có môi trường thạch thường và được gạt đều, để ở tủ ẩm 37°C, sau 24 giờ nhận được các khuẩn lạc riêng rẽ có màu sắc xanh, vàng... và các hình thái đặc trưng, cấy vào ống thạch nghiêng để giữ giống.

2.2.2. Phương pháp thử tác dụng của chế phẩm peptit đến sự sinh trưởng của các vi khuẩn

Môi trường thạch thường sau khi khử trùng để nguội 40-45°C. Trộn vi khuẩn kiểm định, rồi đổ ra đĩa peptri (khoảng 35ml/1 hộp) chờ đến khi thạch đông hoàn toàn, dùng khoan thạch khoan các lỗ, nhỏ 150µl chế phẩm vào các lỗ thạch, giữ ở 4°C trong 3 giờ, để tủ ẩm 37°C sau 24 giờ, quan sát vòng vô khuẩn.

2.2.3. Nghiên cứu độc tính cấp của peptit: theo phương pháp của Abrham W. B. và Turner A. [4, 5]

Chọn chuột nhắt trắng dòng Swiss trưởng thành, khoẻ mạnh, trọng lượng trung bình là 24 ± 2 g, chia làm 6 nhóm, mỗi nhóm 12 con. Thuốc nghiên cứu Peptit được tiêm phúc mạc với các mức liều tăng dần. Theo dõi tình trạng chung, tỉ lệ sống/chết trong từng nhóm. Sau khi cho uống thuốc, chuột được nuôi dưỡng và theo dõi chu đáo, cho ăn thức ăn tổng hợp, uống nước tự do. Thời gian theo dõi liên tục trong 72 giờ.

Trong các mức liều đem thử, khoảng cách giữa mức liều cao nhất chưa gây chết cho con chuột nào và mức liều thấp nhất gây chết 100% số chuột trong nhóm được sử dụng để tính toán. Tính toán theo phương pháp cải tiến Livschitz P. Z (1996). [3]

2.2.4. Nghiên cứu độc tính trường diễn của peptit: theo phương pháp của Abrham W.B. và theo qui định của WHO và Bộ Y tế về hiệu lực và an toàn chế phẩm có nguồn gốc từ thiên nhiên. [2, 4, 6]

Chọn chuột nhắt trắng khoẻ mạnh, trọng lượng 24 ± 2 g, chia làm 2 nhóm, mỗi nhóm 20 con. Nhóm I (nhóm đối chứng): tiêm phúc mạc dung dịch nước muối sinh lý 0,9% x 0,1ml/10g TLCT/ngày. Nhóm II: tiêm phúc mạc dung dịch peptit với liều 0,6 đơn vị /kg/ TLCT/ngày.

Trong thời gian thí nghiệm , theo dõi chặt chẽ tình trạng sức khoẻ chung, trọng lượng cơ thể, lượng thức ăn, nước uống tiêu thụ của từng nhóm. Thời gian theo dõi trong 4 tuần.

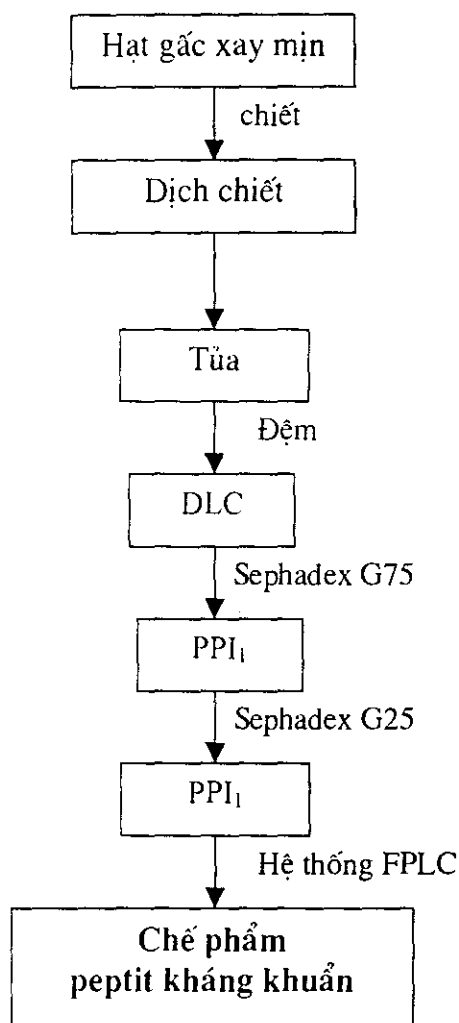
Kết thúc đợt thí nghiệm, lấy máu xét nghiệm các chỉ tiêu huyết học, sinh hoá đồng thời phẫu tích các tạng (gan, lách, thận) nghiên cứu về tổn thương mô bệnh học để đánh giá về ảnh hưởng của peptit trên động vật thực nghiệm khi dùng thuốc dài ngày.

3. KẾT QUẢ ĐẠT ĐƯỢC

3.1. Nghiên cứu và hoàn thiện qui trình sản xuất chế phẩm

Đã có qui trình thu nhận peptit kháng khuẩn, thu được 2g peptit ở dạng bột sau đông khô, có hoạt tính kháng khuẩn.

Qui trình thu nhận peptit kháng khuẩn



- (1) Hạt gấc khô bóc vỏ, nghiền mịn, loại bỏ lipid.
- (2) Chiết bằng dung dịch đệm axetat 0,02M, pH = 4,5. Ly tâm thu phần dịch trong (DLC).
- (3) Tách PPI bằng phương pháp sắc ký qua cột G-75, đệm Sorensen, pH=7,0.
- (4) Loại muối bằng a.axetic 0,005M bằng cột G-25.
- (5) PPI_I được tinh sạch bằng hệ thống FPLC (cột Momo S, đệm axetat natri 0,02M)
- (6) Đóng lọ, đông khô để thử nghiệm chế phẩm.

QUY TRÌNH
THU NHẬN PEPTIT KHÁNG KHUẨN TỪ
THỰC VẬT

NGƯỜI CHỦ TRÌ: GS. TSKH. PHẠM THỊ TRÂN CHÂU

HÀ NỘI - 2004



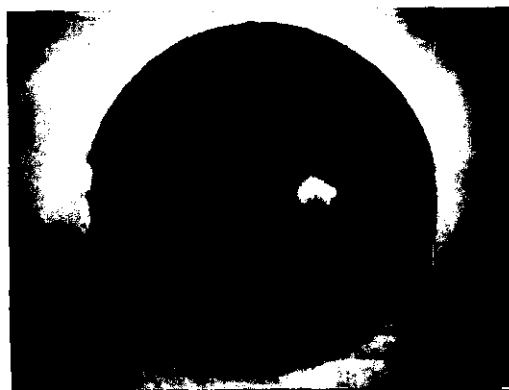
Ảnh 1. Chế phẩm peptit kháng khuẩn

3.2. Thử nghiệm tác dụng của chế phẩm peptit lên sự sinh trưởng của các vi sinh vật phân lập được:

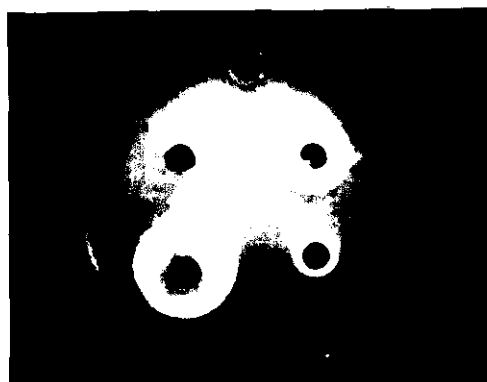
Đã thử nghiệm tác dụng của chế phẩm với 145 mẫu vi sinh vật phân lập từ mủ bồng, từ bánh men và từ đất. Kết quả cho thấy chế phẩm có tác dụng ức chế sinh trưởng 30 mẫu vi sinh vật trong đó có 4 mẫu xạ khuẩn phân lập từ đất, 6 mẫu nấm men, 14 mẫu vi khuẩn phân lập từ đất (chủ yếu là *Bacillus*), 6 mẫu vi khuẩn phân lập từ mủ bồng (3 mẫu *Pseudomonas*, 2 mẫu *Bacillus*, và *Staphylococcus aureus*). Kết quả cho thấy chế phẩm ức chế mạnh các proteinaz của *Pseudomonas aeruginosa*.

Đối với vi khuẩn *Pseudomonas* (vi khuẩn mủ xanh), *Staphylococcus* (tụ cầu vàng) là hai thủ phạm gây nên các bệnh nhiễm khuẩn có mủ xanh, vàng ở các vết thương, vết bỏng, đường hô hấp ... đặc biệt gây nhiễm trùng huyết dẫn đến tử vong cao, phần lớn chúng đã kháng một số chất kháng sinh. *Pseudomonas* là vi khuẩn có độc lực cao, các yếu tố gây độc chủ yếu là nội độc tố và ngoại độc tố [1]. Ngoại độc tố chính là proteinaz ngoại bào, chúng thường gây tổn thương tại chỗ, gây xuất huyết, hoại tử, gây tổn thương giác mạc và phá huỷ chất liên kết giữa các tế bào làm cho tế bào tan rã, giúp cho vi khuẩn xâm nhập và lan toả. Chính vì vậy, việc tìm ra các giải pháp điều trị trong đó có sử dụng các chất kháng khuẩn có nguồn gốc thực vật để kiểm và hiệu quả cũng là một vấn đề quan trọng.

Tiến hành thử nghiệm trên môi trường rắn (đĩa thạch) đã được trộn 2 loại vi khuẩn *Pseudomonas*, *Staphylococcus* và cho 2 đơn vị vào mỗi giếng sau 24^h ở 37°C thì xuất hiện các vòng kháng khuẩn.



Ảnh 2 . Ảnh hưởng của chế phẩm peptit lên sự sinh trưởng của *Pseudomonas*



Ảnh 3. Ảnh hưởng của chế phẩm peptit lên sự sinh trưởng của *Staphylococcus*

3.3. Nghiên cứu lựa chọn cách đưa thuốc vào động vật

- Để lựa chọn cách đưa thuốc vào động vật đã tiến hành các nghiên cứu sau:
- + Cho chuột uống thuốc và theo dõi sự biến đổi của peptit kháng khuẩn trong ống tiêu hoá của chuột, lấy dịch của từng đoạn ống tiêu hoá, sử dụng phương pháp điện di, sắc kí cột để phân tích.
 - + Tiêm peptit kháng khuẩn vào phúc mạc, khảo sát ảnh hưởng của thuốc đến tính thấm thành mạch.

Kết quả: sau 2 giờ cho uống dùng phương pháp điện di, lọc gel phân tích protein, hoạt độ ức chế proteinaz cho thấy: protein, TI của peptit kháng khuẩn còn lại trong 2 mẫu dịch dạ dày và dịch tá tràng vào khoảng 46-50% so với ban đầu.

Điều đó chứng tỏ peptit kháng khuẩn đã bị bất hoạt một phần trong hệ thống tiêu hoá. Tuy nhiên peptit này đã không tìm thấy trong dịch phúc mạc.

3.4. Đánh giá các thử nghiệm trên động vật:

- Chế phẩm có tác dụng ức chế phù viêm cấp, viêm mạn và các tác dụng giảm hơn 30% số cơn đau quặn (dùng theo đường tiêm) trên chuột thực nghiệm nhưng kém hơn thuốc chuẩn 8%. Tuy nhiên không có tác dụng giảm đau trên mô hình gây đau bằng phiến nóng.
- Chế phẩm có tác dụng ức chế tăng tính thấm thành mạch.
- Chế phẩm có tác dụng giảm trọng lượng u hạt trên mô hình gây u hạt thực nghiệm.

3.5. Nghiên cứu an toàn thuốc của chế phẩm peptit kháng khuẩn trên thực nghiệm

3.5.1. Nghiên cứu độc tính cấp của peptit

Liều độc tính cấp của peptit theo đường tiêm phúc mạc, trên chuột nhắt trắng là $LD_{50}=19,33 \pm 3,62$ đơn vị /kg TLCT với $p < 0,05$

Kết quả nghiên cứu độc tính cấp của peptit trên chuột nhắt trắng:

TT	Liều dùng (đơn vị/kg TLCT)	Số chuột thí nghiệm	Số chuột bị chết	Số chuột sống
1.	10,66	12	0	12
2.	33,32	12	2	10
3.	15,97	12	4	8
4.	18,64	12	5	7
5.	21,30	12	8	4
6.	23,96	12	10	2
7.	26,62	12	12	0

3.5.2. Độc tính bán trường diễn của peptit trên chuột nhắt trắng:

Kết quả nghiên cứu cho thấy khi dùng dài ngày với chuột nhắt trắng, chế phẩm peptit đã:

- + Không ảnh hưởng đến lượng thức ăn, nước uống tiêu thụ, lượng chất thải, tập tính động vật, trọng lượng cơ thể cũng như trọng lượng các cơ quan gan, thận, lách.
- + Không làm thay đổi các chỉ tiêu huyết học, không ảnh hưởng đến chức phận tạo máu.
- + Không làm ảnh hưởng đến một số chỉ tiêu hoá sinh: creatinin (chức năng thận), SGOT, SGPT (chức năng gan)

Như vậy peptit kháng khuẩn là một chế phẩm ít độc trên động vật thực nghiệm khi dùng dài ngày.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Nguyễn Đình Bảng, Phòng chống nhiễm khuẩn tại các cơ sở chữa bệnh, Ngoại khoa, Tổng hội y dược học Việt nam, 1991, 5: 27-31.
2. Bộ Y tế – Cộng hoà Xã hội Chủ nghĩa Việt Nam: Quy chế về nghiên cứu dược lý các thuốc y học cổ truyền dân tộc, 1996, QĐ 371/YT.
3. Nguyễn Xuân Phách và cs: Toán thống kê và tin học ứng dụng trong sinh – y – dược, Nhà xuất bản Quân đội Nhân dân, 1995.
4. Abrham W.B.: Techniques of animal and clinical toxicology, Med. Pub. Chicago, 1978, 55-68
5. Turner A. Scrèning methods in pharmacology, Academic Press, New York and London, 1965, pp 60-68
6. WHO: Research guidelines for evaluating the safety and efficacy of herbal medicines, Manila, Philipin, 1993, pp 35-41.
7. Phạm Tuấn Nghĩa, Phạm Thị Trân Châu. Sự biến đổi hoạt độ kìm hãm trypsin (TIA) ở quả và hạt mướp đắng (*Momordica charantia* L.) trong quá trình phát triển của chúng. Tạp chí Sinh học T9, No3, 1987, tr 12-16.

QUY TRÌNH
TINH SẠCH PEPTIT CỦA HẢI LONG VÀ
HẢI SÂM

NGƯỜI CHỦ TRÌ: GS. TSKH NGUYỄN TÀI LƯƠNG

HÀ NỘI - 2004

I. MỞ ĐẦU

Vai trò của dinh dưỡng đối với hoạt động của não bộ là rất lớn. Theo Santé Magazine / Tạp chí Thông tin KHKT Kinh tế Thế giới, N22, 6/ 2000/, não bộ tiêu thụ khoảng 25% khẩu phần năng lượng mỗi ngày, mô não không chịu được sự thiếu oxy chỉ trong vài giây, bởi lẽ các nơron là nơi oxy hoá sinh học cao nhất để giải phóng năng lượng cần thiết cho các hoạt động chức năng của não bộ. Nếu dinh dưỡng không đầy đủ hoặc mất cân đối, và máu không vận chuyển kịp thời oxy và các chất dinh dưỡng lên não thì ảnh hưởng xấu đến toàn bộ hoạt động của não.

Khi cơ thể thiếu chất dinh dưỡng, thần kinh mệt mỏi, đứng trước vài sự lựa chọn, thường chậm chạp và do dự, hoặc quyết định nhanh, nhưng với những cơ hội dễ lâm lẩn. Mức độ ảnh hưởng tùy thuộc vào cá thể và tính chất nghề nghiệp. Nhiều người ngồi văn phòng, đầu óc căng thẳng kéo dài dẫn đến mất ngủ, mắc chứng trầm uất, có khi uống đến 7-8 viên thuốc an thần mà vẫn không ngủ được ! Trong các trường hợp này rất cần bổ sung dinh dưỡng theo phương châm- chữa bệnh bằng ăn, tốt hơn bằng thuốc.

Đối với những người khoẻ mạnh, có chế độ làm việc và ăn uống hợp lý, bổ sung dinh dưỡng đầy đủ và rèn luyện tốt, sẽ thiên về sự cân bằng, thị giác tốt, phản xạ nhanh nhạy, chính xác, tư duy sáng tạo tốt, có hiệu năng tối đa giúp sự phân tích thông tin và sự quyết đoán nhanh chóng. Đây chính là mong muốn của đông đảo các cán bộ quản lý, sĩ quan quân đội và công an, cán bộ nghiên cứu và giảng dạy, sinh viên và học sinh, những người ngồi văn phòng làm việc nhiều với máy vi tính, các vận động viên (VĐV) thuộc các bộ môn cờ vua, bắn súng, võ thuật, thể dục nghệ thuật....

Xuất xứ từ tình hình trên, kế tục những kết quả đạt được của mình trong lĩnh vực nghiên cứu sản xuất các thực phẩm chức năng, chúng tôi nhận nhiệm vụ trong kế hoạch 2001-2004, thực hiện đề tài nhánh nghiên cứu tạo chế phẩm bổ sung dinh dưỡng từ nguồn tài nguyên động vật biển, nhằm chống mỏi mệt thần kinh ,cải thiện hoạt động của não bộ, trong đề tài KC04-17 do PGS.TS Nguyễn Thị Ngọc Dao làm chủ nhiệm. Đây là vấn đề hoàn toàn mới mẻ của CNSH.

III. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU.

Các mẫu động vật biển sau thu mua tại vùng biển miền Trung (Nha Trang-Khánh Hoà, Nghi Sơn - Thanh hoá) được bảo quản, xử lý lạnh và phân tích bằng các phương pháp hoá sinh hiện đại trong phòng thí nghiệm Viện CNSH:

1. Phân tích thành phần và hàm lượng các nguyên tố vi lượng trong thịt các loài động vật biển bằng phương pháp quang phổ hấp phụ nguyên tử hay nhiễu xạ huỳnh quang tia X.

2. Phân tích thành phần và hàm lượng các axit amin trong thịt các loài động vật biển bằng máy phân tích axit amin tự động HP Amino Quant Series II (Hewlett Packard).

3. Phân tích hàm lượng Carotenoid trong thịt các loài động vật biển bằng quang phổ tử ngoại.

4. Phân tích hàm lượng hormone steroid - testosterone trong thịt các động vật biển bằng phương pháp Miễn dịch enzym ELIZA, bộ kit chuẩn của hãng Biomerieux.

5. Đã ứng dụng kỹ thuật enzym và hoá sinh thu nhận và tinh sạch peptid, nghiên cứu các điều kiện tối ưu của quá trình thuỷ phân để chế biến thịt của động vật biển (hải sâm, hải long, cầu gai...) thành bột gốc "Hagaton" dễ tiêu hoá có giá trị dinh dưỡng cao và giàu hoạt chất sinh học. Phối hợp với XN Dược Trung ương 25 Tp HCM xây dựng công thức phối chế và quy trình công nghệ tạo viên nang Hagaton trên dây chuyền thiết bị hiện đại của Xí nghiệp. Thành phần viên nang Hagaton gồm bột gốc và các phụ gia. Các phụ gia gồm Vitamin B1, Vitamin B6, bột amidon, Lactose, Mg Stearat, Bột Tale, axit Benzoic)

6. Các mô hình thực nghiệm kiểm tra tác dụng y sinh học của chế phẩm được tiến hành trên động vật và người, cụ thể như sau:

A. Thực nghiệm trên động vật (50 chuột, 6 thỏ).

Lô đối chứng không dùng Hagaton.

Lô thí nghiệm cho ăn Hagaton với liều 100mg/kg thân trọng/ ngày, liên tục trong 20 ngày.

Các chỉ tiêu theo dõi gồm:

1. Tốc độ tăng trọng chuột.

2. Tác dụng tạo hồng cầu ở chuột.

3. Tác dụng lên các chỉ tiêu sinh học tinh trùng thỏ.

4. Phản xạ trí nhớ tự vệ - thực nghiệm chuột bơi trong mê cung Morris Water Maze dưới ảnh hưởng của chế phẩm..

5. Hàm lượng axit amin trong não chuột dưới ảnh hưởng của chế phẩm.

6. Hàm lượng ARN não và gan chuột dưới ảnh hưởng của chế phẩm

7. Hàm lượng NTVL trong não, cơ, gan chuột dưới ảnh hưởng của chế phẩm.

8. Các chỉ tiêu sinh học của huyết túc tam lý dưới ảnh hưởng của chế phẩm.

B. Thực nghiệm trên người:

Đã tiến hành nghiên cứu điện não đồ trên 30 học sinh (phối hợp với GS.TSKH Tạ Thuý Lan đại học Sư phạm Hà nội), 20 vận động viên dưới ảnh hưởng của chế phẩm Hagaton và một số chế phẩm khác, lứa tuổi 16- 20 tuổi, theo dõi các chỉ tiêu phản xạ đơn, phản xạ tự chọn, ĐNĐ, đánh giá khả năng trí tuệ bằng test Raven (phối hợp với Đại học Y Hà Nội và Đại học Sư phạm Vinh). Đo điện não đồ (ĐNĐ) trên máy Helli Neuros Kritt EE 212 của Cộng hoà Liên bang Đức.

IV. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU VỀ XÂY DỰNG QUY TRÌNH ENZYM THUỶ PHÂN ĐỂ SẢN XUẤT HAGATON.

a) Cơ sở lý luận định hướng của kỹ thuật thuỷ phân:

Mọi người đều biết rằng các sản phẩm thuỷ phân gồm hỗn hợp các axit amin thường được dùng có hiệu quả trong bổ sung dinh dưỡng cho các cơ thể non trẻ (lợn con cai sữa, trẻ em, người già...) khi mà hệ enzym trong bộ máy tiêu hoá chưa phát triển hoàn chỉnh hoặc hoạt độ enzym tiêu hoá bị suy thoái. Hỗn hợp các axit amin còn được dùng ở dạng dịch truyền cho bệnh nhân, khi bộ máy tiêu hoá hoạt động yếu, hoặc trong các trường hợp phẫu thuật, bệnh lý. Tuy nhiên, đối với cơ thể trưởng thành, trong điều kiện sinh lý bình thường, các chức năng tiêu hoá hoạt động tốt, thì vấn đề lý thú là tỷ lệ thành phần giữa các axit amin, các dipeptit, tripeptit, oligopeptit là rất quan trọng đối với khả năng hấp thu các chất qua màng ruột vào máu (Nguyễn Tài Lương, 1981). Những thành tựu mới của sinh lý tiêu hoá hấp thu đã khẳng định rằng hấp thu hỗn hợp các axit amin đã chuẩn bị sẵn không có hiệu quả cao so với hấp thu các axit amin được giải phóng trực tiếp khi các di-, tri-, oligopeptid khi chúng tiếp xúc với các enzym trên màng các tế bào niêm mạc ruột. Điều này được giải thích là trong hấp thu hỗn hợp các axit amin đã chuẩn bị sẵn thường xảy ra hiện tượng cạnh tranh giữa chúng để gắn nối với các trung tâm gắn nối trên bề mặt vật tải và làm giảm chậm tốc độ hấp thu. Còn các axit amin được giải phóng ra từ các di- tri-, oligopeptit khi tiếp xúc với enzym trên màng tế bào niêm mạc ruột, được chuyển trực tiếp từ enzym cho vật tải một cách có thứ tự, nhịp nhàng, không có hiện tượng cạnh tranh, nên đây chuyển tiêu hoá-hấp thu hoạt động có hiệu quả cao nhất.

Rõ ràng là tùy theo mục đích và tùy theo đối tượng sử dụng trong từng trường hợp cụ thể mà tạo ra các sản phẩm thuỷ phân thích hợp để cơ thể có thể hấp thu, đồng hoá tối ưu.

Trong công nghệ sản xuất chế phẩm, chúng tôi đã tiến hành nghiên cứu xây dựng quy trình thủy phân protein của các đối tượng động vật được chọn. Quá trình thủy phân cần được kiểm soát qua các thông số thủy phân để thu được kết quả mong muốn về chất lượng sản phẩm. Hiệu suất của thủy phân phụ thuộc vào nồng độ enzym / cơ chất, pH và vào thời gian và nhiệt độ thủy phân. Những vấn đề này, chúng tôi đã tìm được các thông số tối ưu trong thực nghiệm. *Đây là khâu bí mật của quy trình công nghệ của chúng tôi.*

Những năm gần đây người ta còn phát hiện thấy khi protein được đưa vào cơ thể người qua đường miệng, và trong quá trình thủy phân bởi các enzym đường dạ dày- ruột, xuất hiện một số các peptit có chuỗi ngắn và có trọng lượng phân tử thấp có thể tham gia vào việc kiểm tra kiểm soát một số chức năng của cơ thể. Đó là các peptit có hoạt tính sinh học. Việc tách chiết và thu nhận các peptid có hoạt tính sinh học cao là một việc làm cấp thiết giúp chúng ta phát hiện và khai thác, sử dụng hợp lý các chất có hoạt tính sinh học từ nguồn nguyên liệu của nước ta.

b. Quy trình tách chiết và thu nhận peptid từ hải sâm và hải long.

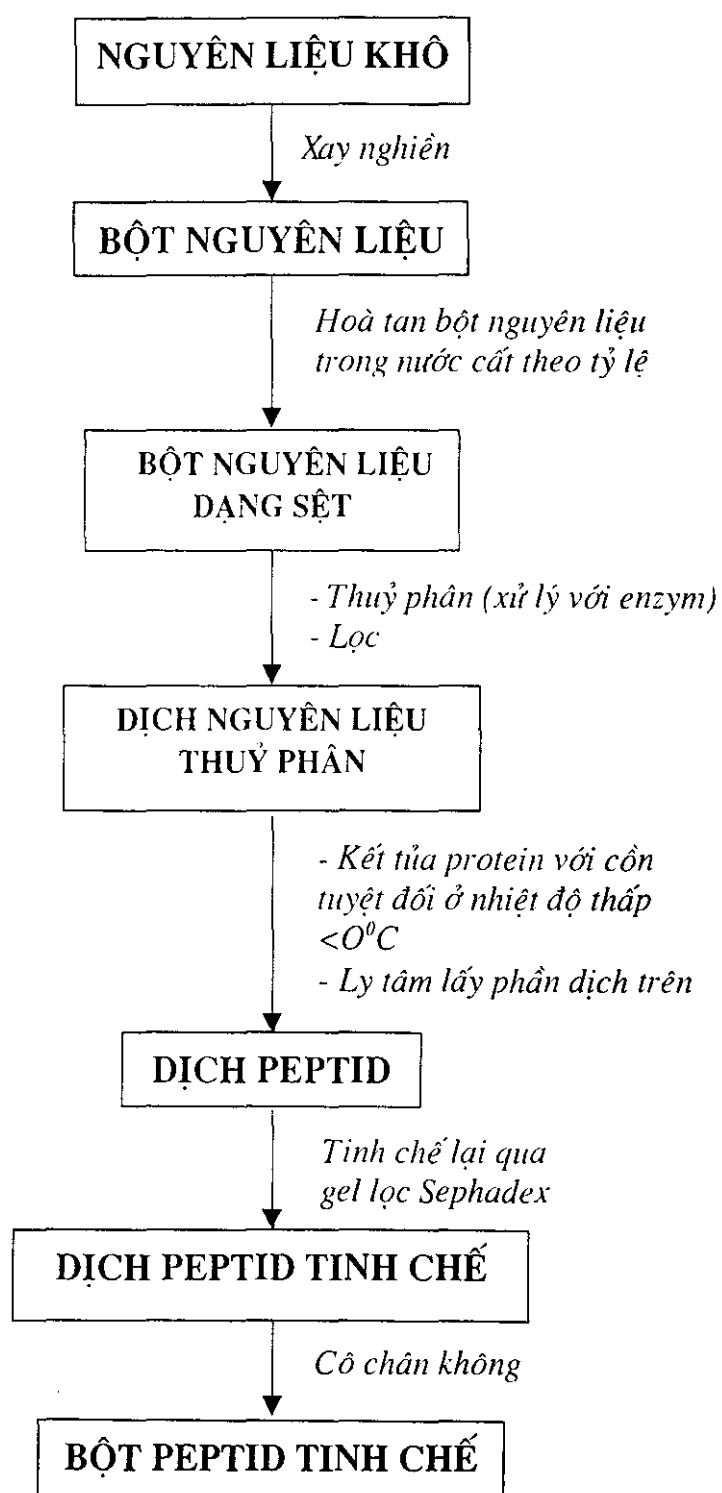
Để thu nhận peptid từ hải sâm và hải long phục vụ cho việc nghiên cứu khảo sát các peptid có hoạt tính sinh học chúng tôi tiến hành như sơ đồ 1.

Nguyên liệu (hải sâm hoặc hải long) được xay nghiền nhỏ. Hoà tan bột nguyên liệu trong nước cất theo tỷ lệ nhất định. Sau khi nhận được bột nguyên liệu ở dạng sền sệt thì chúng tôi tiến hành thủy phân bằng enzym. Các điều kiện thủy phân như lựa chọn enzym, nhiệt độ, thời gian, tỷ lệ enzym/cơ chất đã được tiến hành nhiều lần theo phương pháp quy hoạch thực nghiệm. Sau khi lọc, thu được dịch nguyên liệu thủy phân gồm các hỗn hợp peptid. Dịch nguyên liệu thủy phân được đưa vào môi trường thí nghiệm ở nhiệt độ thấp $< 0^{\circ}\text{C}$. Chuẩn bị một lượng cồn tuyệt đối theo tỷ lệ 2:1 so với dịch thủy phân và cũng đưa vào môi trường nhiệt độ thấp $< 0^{\circ}\text{C}$.

Kết tủa protein trong dịch thủy phân với cồn tuyệt đối ở nhiệt độ thấp $< 0^{\circ}\text{C}$ rồi ly tâm loại bỏ protein ở phần cặn dưới lấy phần dịch trên. Tinh chế dịch peptid qua gel lọc Sephadex ta thu được dịch peptid tinh chế. Cuối cùng qua quá trình cô chân không ta thu được bột peptid tinh chế.

Qui trình thu nhận, tinh sạch peptid của hải long, hải sâm được tiến hành theo sơ đồ sau:

Sơ đồ 1. Sơ đồ qui trình thu nhận, tinh sạch peptid của hải long, hải sâm



Trong nghiên cứu chúng tôi đã chọn các enzym papain được sản xuất trong nước của Nguyễn thị Ngọc Dao và cs,1995.

Thủy phân bằng enzym được ưa dùng hơn so với các phương pháp hoá học để tạo ra các dịch thủy phân dùng trong dinh dưỡng.

Thủy phân bằng enzym ưu việt hơn so với công nghệ thủy phân bằng axit, vì bằng axit có nhiều tạp chất, gây ảnh hưởng xấu đến sức khỏe, nếu axit không tinh khiết.

Thủy phân bằng enzym lại có thể tạo được thành phần các peptid và amino acid theo ý muốn nhờ khống chế các điều kiện của phản ứng thủy phân.

Ưu điểm của papain là có độ bền nhiệt và độ bền pH cao, lại hoạt động trong khoảng pH rộng từ 4,5-8,5. / Wasseman B.P. ,1998; Food Biotechnology/.

QUY TRÌNH
TÁCH CHIẾT ENZYM THUỶ PHÂN FIBRIN
TỪ LOÀI GIUN ĐẤT VIỆT NAM

NGƯỜI CHỦ TRÌ: PGS. TS. NGUYỄN THỊ NGỌC DAO

HÀ NỘI - 2004

I. MỞ ĐẦU

Bệnh tim mạch là một trong những nguyên nhân gây tử vong chính trên thế giới. Theo Tổ chức Y tế Thế giới (WHO), hàng năm có 17 triệu người trên toàn thế giới chết vì bệnh tim mạch, chiếm đến 40%, vượt xa nguyên nhân ung thư. Đây cũng là lý do nhập viện chính và là nguồn gốc của tình trạng tàn phế vĩnh viễn, là một gánh nặng kinh tế đáng kể lên xã hội. Hiện nay, bệnh tim mạch đang gia tăng trên toàn thế giới, đặc biệt ở những nước đang phát triển tại vùng Nam Á và Đông Nam Á nơi mà bệnh tim mạch đang gia tăng cùng với tốc độ công nghiệp hoá, đô thị hóa và những thay đổi trong lối sống. Bệnh tim mạch có nhiều thể khác nhau như: chứng tràn máu não, tăng huyết áp, xơ cứng động mạch... Nguyên nhân chủ yếu là do fibrin bị đóng cục gây tắc mạch và cản trở lưu thông máu. Vì vậy, việc làm tan cục máu đông đóng vai trò quan trọng trong việc điều trị bệnh tim mạch.

Trước đây, để điều trị bệnh nghẽn mạch người ta đều dựa vào việc sử dụng các chất kháng đông như heparin và coumarin. Tuy nhiên bệnh tắc nghẽn mạch cấp tính vẫn còn là nguyên nhân chính gây nên cái chết ở lứa tuổi trung niên và tuổi già. Ngày nay, người ta phát hiện ra rằng cách tốt nhất để điều trị bệnh nghẽn mạch là sử dụng enzyme thủy phân fibrin. Urokinase và chất hoạt hóa plasminogen được sử dụng rộng rãi trong việc xử lý tắc mạch. Tuy nhiên, chúng rất đắt và không hiệu quả khi uống qua đường miệng.

Từ xa xa, giun đất là một trong những vị thuốc dân tộc ở phương Đông và ngày nay đã được dược lý học hiện đại chứng minh có rất nhiều tác dụng, trong đó có tác dụng hạ huyết áp và cải thiện tuần hoàn não. Vào những năm 1920, các tác giả Nhật Bản đã phát hiện một enzyme có hoạt tính thủy phân fibrin cao từ giun đất *Lumbricus rubellus*, bao gồm 6 isozyme được đặt tên chung là Lumbrokinase. Các nhà khoa học Trung Quốc cũng tách chiết được enzyme có hoạt tính thủy phân fibrin cao từ loài giun *Esenia foetida*. Họ đã chứng minh được rằng các enzym này có thể hấp thụ qua thành ruột vào máu và hoạt hóa hệ thống thủy phân fibrin nội sinh nên có thể sử dụng làm thuốc uống thay thế một số thuốc chữa bệnh tim mạch rất đắt trên thị trường hiện nay như urokinase và chất hoạt hóa plasminogen.

Đến nay, enzyme thủy phân fibrin được khai thác từ rất nhiều nguồn khác nhau như: từ đĩa, nọc rắn, nấm, bèo tấm, vi khuẩn, giun đất. Tuy nguồn sinh vật để khai thác enzyme thủy phân fibrin là rất phong phú nhưng các nghiên cứu sử dụng các enzyme này làm thuốc chữa bệnh tim mạch còn chưa nhiều do những hạn chế về mặt thử nghiệm đó là ngoài tác dụng phân giải cục nghẽn trong mạch máu liệu nó còn có những tác dụng phụ hay còn độc tính khác hay không?

Tác dụng chữa bệnh của giun đất đã được chứng minh từ hàng ngàn năm nay trong những bài thuốc dân tộc ở phương Đông. Ở Trung Quốc giun đất được sử dụng

để ngăn ngừa và điều trị bệnh tim, bệnh não - mạch từ rất nhiều năm qua. Vì vậy nghiên cứu tách chiết và sử dụng enzyme thủy phân fibrin từ giun đất làm thuốc chữa bệnh tim mạch có những cơ sở để tin tưởng về mặt an toàn so với enzyme thủy phân fibrin từ các nguồn khác.

Việt Nam là nước có số lượng chủng loại giun đất rất cao, vì vậy chúng tôi đã tiến hành tìm kiếm nguồn giun có chứa enzyme tương tự lumbricinase với hy vọng nghiên cứu sản xuất thuốc chữa bệnh từ tài nguyên sẵn có trong nước để giảm bớt chi phí cho những bệnh nhân mắc bệnh tim mạch. Chúng tôi đã sàng lọc một số loài giun đất phổ biến có ở Việt nam. Sau đó, chúng tôi chọn ra loài giun có hoạt tính thủy phân fibrin cao nhất để nghiên cứu tinh chế enzym thủy phân fibrin làm cơ sở cho nghiên cứu ứng dụng.

II. ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP

II.1 Đối tượng

- 8 mẫu giun phổ biến ở một số tỉnh miền Bắc gồm có: *Pheretima manicata*, *Pheretima californica*, *Pheretima robusta*, *Pheretima morrisi* (Sapa), *Pheretima wui*, *Pheretima Posthuma*, *Pheretima aspergillum* (Hà nội), và *Perionyx excavatus* (Ba vì - Hà Tây).

II.2 Phương pháp

II.2.1 Tách chiết và tinh chế enzym thủy phân fibrin

Gồm các bước:

- Làm sạch giun đất
- Nghiền đồng thể
- Tinh sạch theo các bước:
- Kết tủa phân đoạn bằng $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 60% bão hòa.
- Qua các cột sắc ký: lọc gel trên cột Sephacryl S200, cột trao đổi ion DEAE-Cellulose và cột lọc gel Superdex G75.

II.2.2 Xác định hoạt tính thủy phân fibrin

Phương pháp xác định hoạt tính thủy phân fibrin được thực hiện theo Astrup và Mulerzt: ở mỗi đĩa petri (đường kính 9 cm) cho 10ml dung dịch fibrinogen (nồng độ 0.2%) được ngưng kết bằng 140 μl dung dịch thrombin có nồng độ 100UI/ml. Chú ý đặt đĩa cho phẳng và đổ dung dịch cho thật đều. Để ở nhiệt độ phòng trong 30 phút. Rỏ từng giọt dung dịch enzym lên bề mặt đĩa fibrin cách đều nhau, ủ ở 37°C trong 16h. Vùng phân giải fibrin sẽ xác định hoạt tính của enzym. Dùng plasmin của hãng Sigma làm enzym chuẩn.

II.2.3 Xác định trọng lượng phân tử enzym

Trọng lượng phân tử tương đối của enzyme tách chiết và độ tinh sạch của các dịch enzyme được đánh giá bằng phương pháp điện di trên gel polyacrylamide theo Laemmli [22].

II.2.4 Xác định các yếu tố ảnh hưởng đến hoạt tính enzym

III. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

III.1 Sàng lọc và tuyển chọn loài giun đất cho hoạt tính thủy phân fibrin cao

Sau khi phân loại, các mẫu giun được nghiền trong lạnh, rửa $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 60% và tinh sạch qua sắc ký lọc gel trên cột Sephadex G-0200, tốc độ chảy 12ml/h, thu 1.5ml/phân đoạn. Tất cả các phân đoạn được xác định hoạt tính thủy phân fibrin. Kết quả được thể hiện trên bảng 1.1.

Bảng 1.1: Hoạt tính thủy phân fibrin của các phân đoạn enzym ở 8 loài giun

Tên loài giun	Hoạt tính dịch nghiền (U/mg)	Hoạt tính sau rửa $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (U/mg)	Hoạt tính sau khi qua cột Sephadex (U/mg)
<i>Pheretima manicata</i>	19.81	32.86	50.51
<i>Pheretima californica</i>	3.07	7.84	33.66
<i>Pheretima robusta</i>	8.78	12.05	18.86
<i>Pheretima morrisi</i>	2.34	3.52	16.45
<i>Pheretima wui</i>	15.31	24.38	36.0
<i>Pheretima Posthuma</i>	9.55	16.61	20.44
<i>Pheretima morrisi</i>	4.5	9.1	18.6
<i>Pheretima aspergillum</i>	3	18.3	20.8
<i>Perionyx excavatus</i>	22	27.29	57.01

Kết quả cho thấy dịch nghiền của mẫu giun *Perionyx excavatus* và *Pheretima manicata* có hoạt tính cao nhất và gần bằng nhau. Phân đoạn có hoạt tính cao nhất của *Pheretima manicata* là phân đoạn thứ 17 còn của *Perionyx excavatus* là phân đoạn thứ 18. Cả 2 phân đoạn này có hoạt tính xấp xỉ nhau.

Trong các loài giun đã khảo sát, chúng tôi rất chú ý đến loài giun *Perionyx excavatus* do dịch chiết của nó có **hoạt tính thủy phân fibrin mạnh**. Hơn nữa đây là loài giun có hình thái và điều kiện sống tương đối giống với loài giun *Lumbricus*

rubellus, *Esenia foetida* mà các nhà nghiên cứu Nhật Bản, Trung Quốc, Hàn Quốc đã tách chiết enzyme lumbrokinase. Giun quế cũng là loài giun rất dễ nuôi và hiện đang được nuôi rộng rãi làm thức ăn cho gia cầm, gia súc ở Việt Nam. Loài giun này có những đặc điểm sau: Mình hơi dẹt, nhọn 2 đầu, màu đỏ hoặc huyết dụ, chiều dài khoảng 80 mm, thân ngang 1,2-2 mm, có 123 đốt.

Vì những lí do trên, chúng tôi đã tập trung nghiên cứu tách chiết, xác định các tính chất của enzym thủy phân fibrin từ loài giun này để làm cơ sở cho hướng nghiên cứu ứng dụng làm thuốc chữa bệnh tim mạch.

III.2 Tách chiết enzym thủy phân fibrin từ loài giun quế *P. excavatus*

Quá trình tách chiết được thực hiện theo các bước sau:

1. Chuẩn bị mẫu enzym thô

- Giun quế được rửa sạch và ngâm trong nước cất, sau 1-2 giờ thay nước (lặp lại 5 lần) cho giun thải hết chất cặn bã trong đường tiêu hóa. Chỉ những con giun còn sống mới được sử dụng.
- Giun được nghiền trong NaCl 0,9% bằng máy nghiền đồng thể sau đó ly tâm 20.000 v/ph, 60 phút ở 4°C, thu dịch trên. Dịch trên được đông khô và bảo quản trong tủ lạnh -84°C để dùng trong quá trình thí nghiệm. Khi tách chiết, bột giun đông khô được hòa trong đệm natri phosphate 50mM, pH 7,5.

2. Tủa phân đoạn bằng muối ammonium sulfate

Tủa phân đoạn amonium sulphate ở các nồng độ 35 đến 60% bão hòa. Sau khi ly tâm, tủa được hoà tan trong đệm natri photphat 0.05M, pH 7.5 (tất cả các bước được thực hiện ở 4°C). Dịch enzym thu được tiếp tục phân tách bằng cột Sephacryl S200.

3. Sắc ký lọc gel trên cột Sephacryl S200

Dịch enzyme được cho qua cột Sephacryl S200 có kích thước 2,6x60 cm được cân bằng trong đệm natri phosphate 50 mM, pH 7,5. Tốc độ dòng chảy 1 ml/phút chia thành 120 phân đoạn, mỗi phân đoạn 2 ml.

Các phân đoạn đều được xác định hoạt tính thủy phân fibrin và hàm lượng protein. **Đỉnh 2 trên sắc ký đồ hình 2.2 có hoạt tính riêng cao nhất, vì vậy tiếp tục được tinh sạch bằng cột DEAE cellulose.**

4. Phương pháp sắc ký trao đổi ion DEAE-cellulose

Dịch enzyme ở các đỉnh có hoạt tính cao trên sắc ký đồ Sephacryl S200 được đưa lên cột và rửa protein không hấp phụ bằng 2V cột bằng chính đệm trên. Phần hấp phụ lần lượt được đẩy khỏi cột bằng gradien nồng độ muối NaCl 0 ÷ 1 M trong đệm natri phosphate 50 mM, pH 7,5; tốc độ 0,5 ml/phút, thu 50 phân đoạn, thể tích mỗi phân đoạn 1 ml.

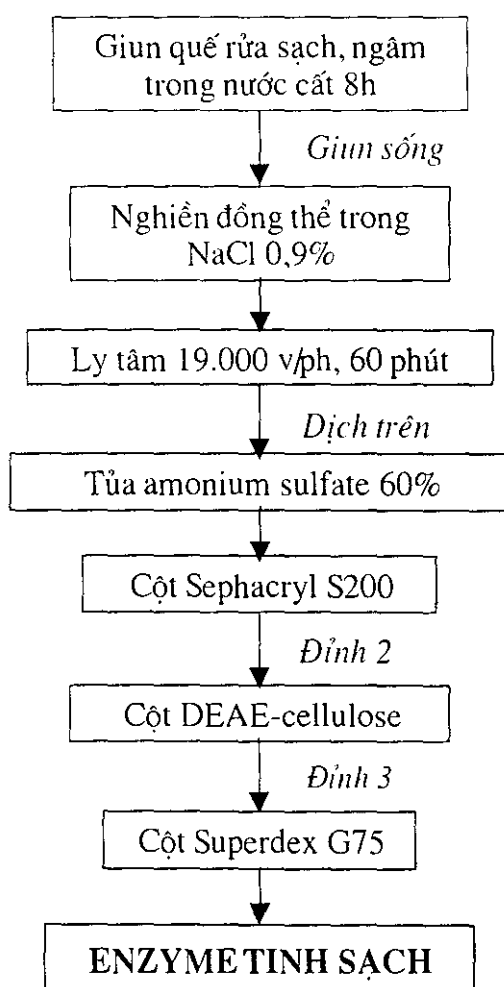
Các phân đoạn được xác định hoạt tính thủy phân fibrin và đánh giá độ tinh sạch bằng SDS-PAGE. Đỉnh 3 trên sắc ký đồ hình 2.3 có hoạt tính riêng cao nhất, vì vậy được tiếp tục tinh sạch bằng cột Superdex G75.

5. Sắc ký lọc gel Superdex G75

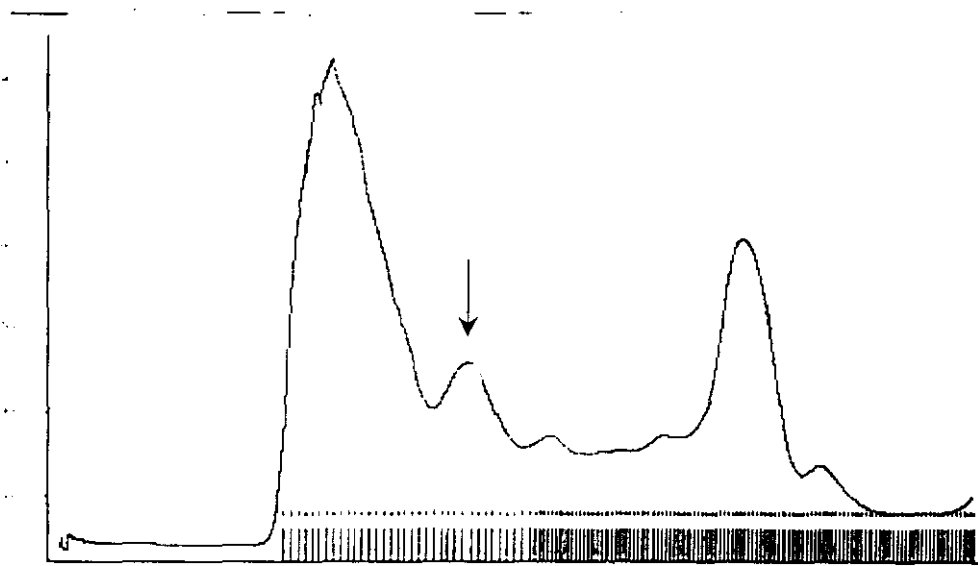
Sau khi đi qua cột DEAE, dịch enzyme ở những phân đoạn có hoạt tính thủy phân fibrin cao được tập hợp lại và đưa lên cột Superdex G75. Cột được cân bằng trong đệm natri phosphate 50 mM, pH 7,5, tốc độ dòng chảy 0,3 ml/phút, thu 50 phân đoạn, thể tích mỗi phân đoạn là 0,5 ml.

Chúng tôi đã đánh giá mức độ tinh sạch và xác định trọng lượng phân tử tương đối bằng phương pháp điện di trên gel polyacrylamide 12,5%, sử dụng maker protein của hãng Fermentas làm chuẩn. Điện di đồ hình 2.6 cho thấy enzyme thu được khá sạch. Đỉnh 1 có một vạch protein khoảng 34 kDa, đỉnh 2 có một vạch protein khoảng 28 kDa (Sắc ký đồ hình 2.6)

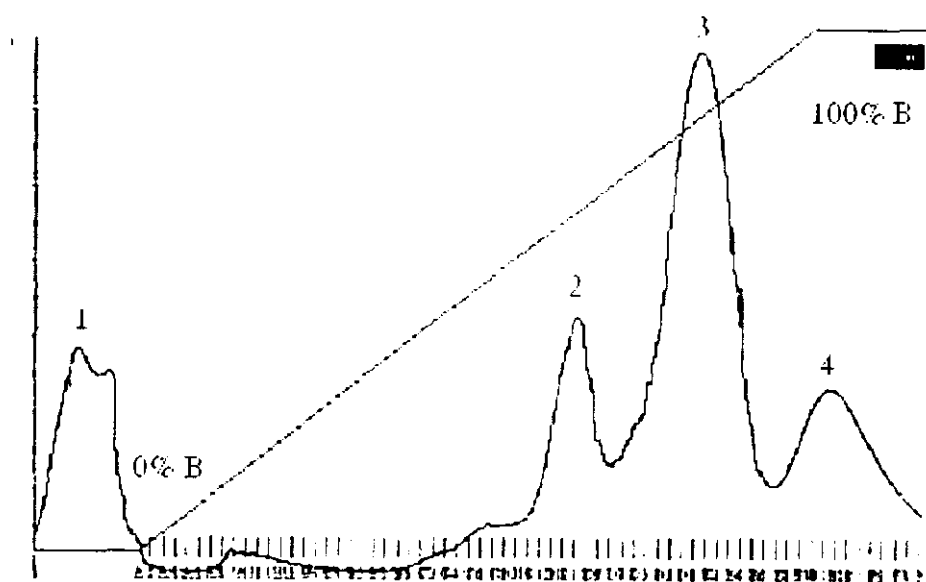
Quy trình tách chiết:



Hình 2.1. Quy trình tách chiết enzyme thủy phân fibrin



Hình 2.2. Sắc ký đồ trên cột Sephacryl S200.



Hình 2.3. Sắc ký đồ trên cột DEAE cellulose

kDa

116 →

66.2 →

45 →

35 →

25 →

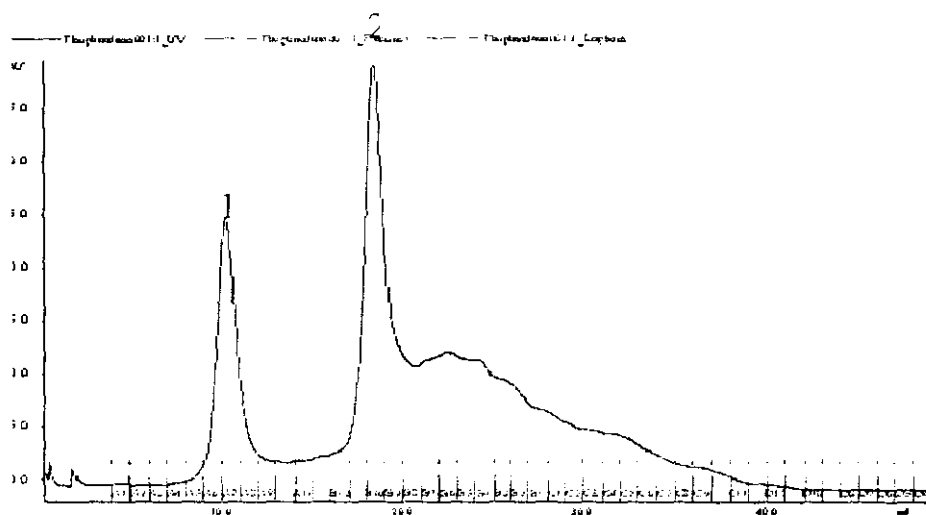
18.4 →

14.4 →



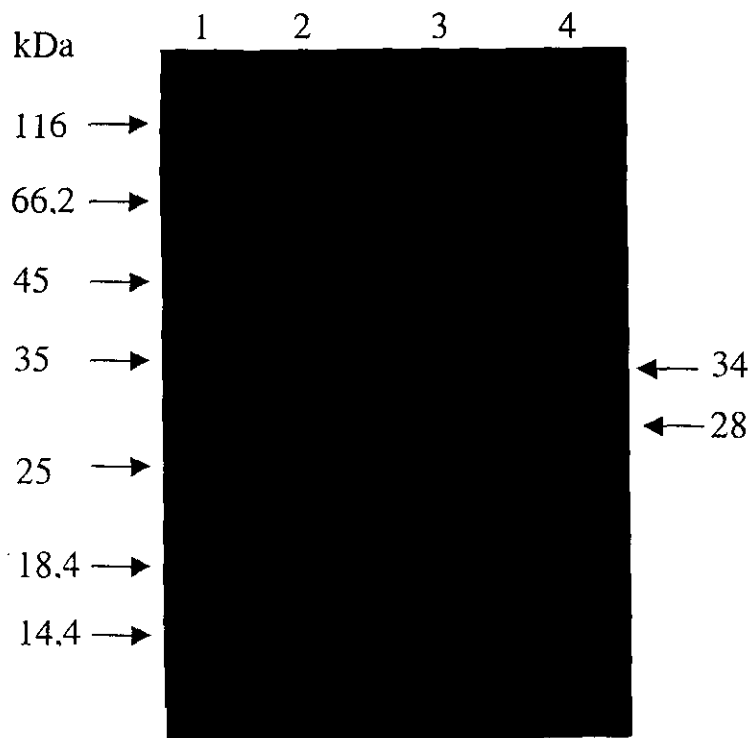
Hình 2.4. Điện di đồ các dịch protein.

- (1) Dịch thô; (2) Đỉnh 2 trên cột Sephacryl S200; (3) maker protein;
(2) (4) Đỉnh 2 trên cột DEAE-cellulose; (5) Đỉnh 3 trên cột DEAE-cellulose



Hình 2.5. Sắc ký đồ trên cột Superdex G75.

Từ dịch thô, qua 3 lần sắc ký, chúng tôi đã tinh sạch được 2 enzyme có trọng lượng phân tử khoảng 34 kDa và 28 kDa với hoạt tính riêng tương ứng là 271,3 UI và 126 UI.



Hình 2.6. Điện di đồ dịch enzyme tinh sạch.

(1) Maker protein; (2) Dịch enzyme đỉnh 2; (3) Dịch enzyme đỉnh 1; (4) Dịch enzyme trước khi chạy qua cột Superdex G75.

Bảng 2.1. Các bước tinh sạch enzyme thủy phân fibrin.

Các bước tinh sạch		Thể tích (ml)	Potein tổng (mg)	H. tính tổng (UI)	H. tính riêng (UI/m)	Độ tinh sạch	Hiệu suất (%)
Dịch thô		50	500	10250	20,5	1	100
Tủa ammonium sulfate 60%		6	153	8048	52,6	2,6	78
Sephacryl S200 (Đỉnh 2)		14	45,2	4457	98,6	4,8	43
DEAE-cellulose (Đỉnh 3)		10	19	3939	207,3	10,1	38
Superdex G75	Đỉnh 1	2	5,5	1492	271,3	13,2	26
	Đỉnh 2	2	9,3	1172	126	6,1	

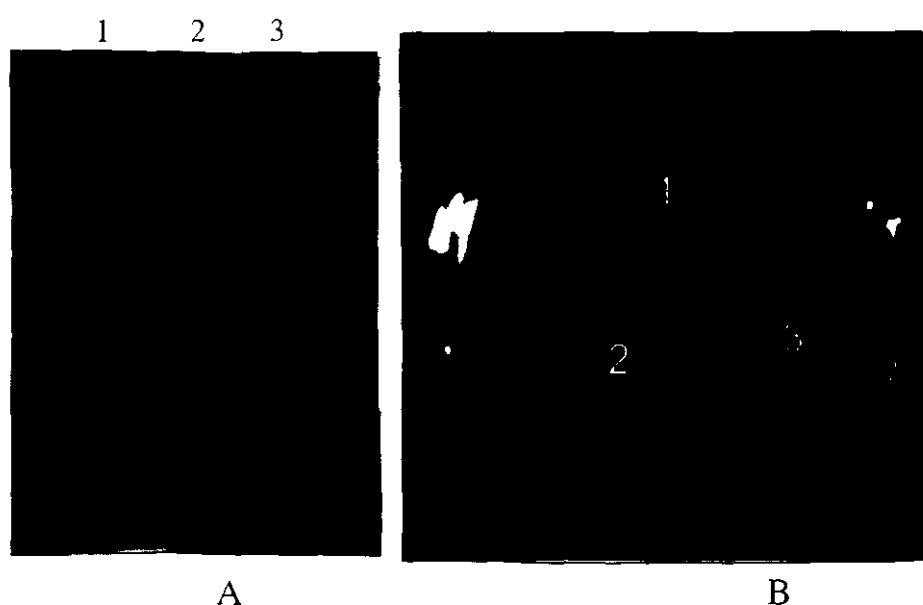
Chú thích: Hiệu suất tính theo hoạt tính

Như vậy, với quy trình tách chiết như trên chúng tôi đã thu được 2 enzym có trọng lượng phân tử 28 và 34 kDa tương ứng với các hoạt tính 126 và 271 UI. Hiệu suất tách chiết đạt 26%, độ sạch tăng 13,2 lần.

III.3 Xác định một số tính chất của enzym tách chiết

1. Khả năng phân cắt fibrinogen

Để kiểm tra khả năng phân cắt fibrinogen, 15 μ l dung dịch fibrinogen được ủ với 1 μ l dịch enzym ở 37°C. Sau 1 giờ, khả năng phân cắt của enzym được đánh giá bằng phương pháp điện di trên gel polyacrylamide 7.5% với mẫu đối chứng là dung dịch fibrinogen (Hình 2.7).



Hình 2.7. Điện di đồ sản phẩm thủy phân fibrinogen (A) và hoạt tính thủy phân fibrin (B) của enzym tinh sạch.

(1A) Dịch fibrinogen; (2A) Hỗn hợp enzym đỉnh 1 và fibrinogen sau khi ủ; (3,A) Hỗn hợp enzym đỉnh 2 và fibrinogen sau khi ủ; (1B) Hoạt tính của enzym đỉnh 2; (2B) Hoạt tính của enzym đỉnh 1 trên sắc ký đồ hình 3.8; (3B) Hoạt tính của dịch enzym qua cột superdex G75.

2. Thành phần amino acid

Mẫu enzym tinh sạch (đỉnh 1) và enzym ban đầu (dạng đông khô) được xác định thành phần amino acid bằng máy phân tích axit amin tự động HP Amino Quant Series II (Hewlett Packard) (Bảng 2.2). Enzym tinh sạch có thành phần amino acid tương đối khác với dịch enzym thô, và nhiều nhất là aspartic acid (17%). Theo Mihara và CS, thành phần amino acid của các lumbrokinase cũng chứa rất nhiều aspartic acid.

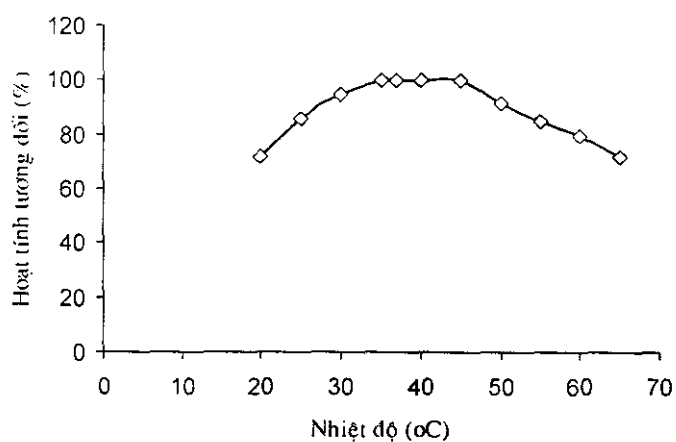
Bảng 2.2. Thành phần amino acid (%) của các mẫu enzyme.

ST T	Amino acid	Enzyme thô đông khô	Enzyme tinh sạch đỉnh 1
1	Alanine	6	7,5
2	Arginine	5,2	4,3
3	Aspartic acid	12	17
4	Cysteine + Cystine	2,6	5,4
5	Glutamic acid	14	7,5
6	Glycine	7,2	5,4
7	Histidine	1,5	3,2
8	Isoleucine	5,6	4,3
9	Leucine	7,3	6,5
10	Lysine	7,6	6,5
11	Methionine	2,3	1,1
12	Phenylalanine	3,4	5,4
13	Proline	3,2	3,2
14	Serine	4,9	6,5
15	Threonine	7,1	6,5
16	Tyrosine	4,8	4,3
17	Valine	5	5,4
Tổng số		100%	100%

3. Ảnh hưởng của nhiệt độ phản ứng đến hoạt tính

Mỗi enzyme có một nhiệt độ hoạt động tối ưu nhất định. Vì vậy để biết được enzyme thủy phân fibrin hoạt động tối ưu ở nhiệt độ nào, phản ứng (dịch enzyme trong đệm natri phosphate 50 mM, pH 7,5) được ủ trên đĩa fibrin ở các nhiệt độ khác nhau 20-60°C và đo diện tích vòng phản ứng sau 3 giờ ủ.

Khi nhiệt độ phản ứng

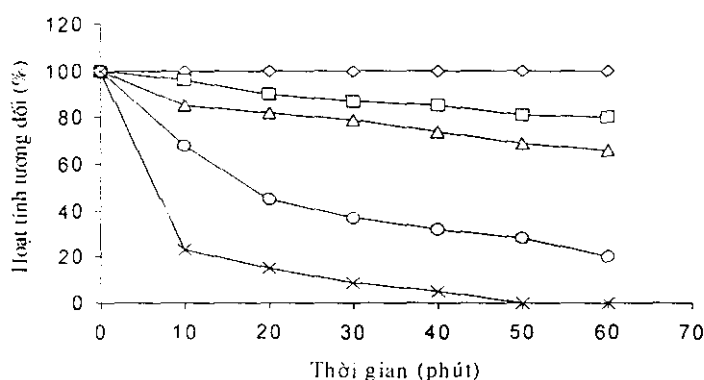


Hình 2.8. Ảnh hưởng của nhiệt độ phản ứng đến hoạt tính.

tăng từ 20°C lên 35°C thì hoạt tính thủy phân fibrin (thể hiện bằng diện tích vòng phản ứng) cũng tăng dần lên (Hình 2.8). Hoạt tính enzyme đạt cao nhất ở nhiệt độ 35°C đến 45°C (100%). Khi nhiệt độ tăng lên trên 45°C thì hoạt tính enzyme giảm dần xuống cho tới 65°C. So với hoạt tính ở nhiệt độ tối ưu, hoạt tính ở 65°C vẫn giữ được 72%. Như vậy, nhiệt độ hoạt động tối ưu của enzyme thủy phân fibrin này là 35-45°C.

4. Ảnh hưởng của nhiệt độ đến độ bền

Tính bền nhiệt rất quan trọng cho việc ứng dụng enzyme vào thực tế. Vì vậy, để nghiên cứu tính bền nhiệt của enzyme, dịch enzyme trong đệm phosphate 50 mM, pH 7,5 được ủ ở các nhiệt độ 40, 50, 60, 70, 80°C, trong các khoảng thời gian 10, 20, 30, 40, 50 và 60 phút. Hoạt tính còn lại được xác định bằng phương pháp đĩa fibrin sau 3 giờ ủ



Hình 2.9. Ảnh hưởng của nhiệt độ đến độ bền của enzyme.

◇: 40°C; □: 50°C; Δ: 60°C; ○: 70°C; *: 80°C.

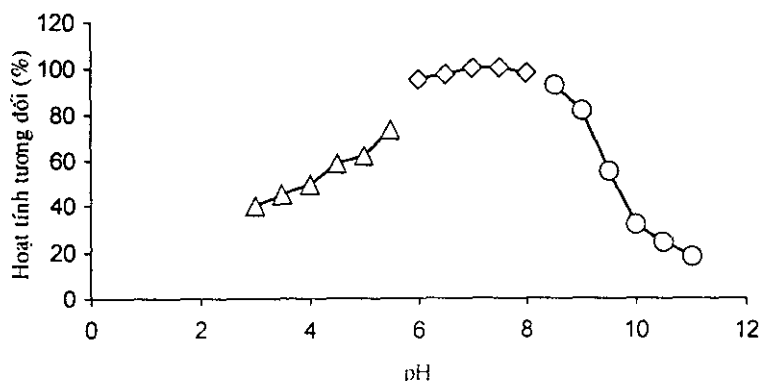
Ở nhiệt độ 40°C diện tích vòng phản ứng là cao nhất (100%) và không thay đổi với các khoảng thời gian trên (Hình 2.9). Ở nhiệt độ 50°C, 60°C hoạt tính enzyme có giảm dần và giảm nhanh hơn theo thời gian đối với nhiệt độ 60°C (còn 65% hoạt tính sau thời gian ủ 60 phút). Ở nhiệt độ 70°C, hoạt tính của enzyme vẫn còn 20% sau 60 phút ủ nhưng ở 80°C thì hoạt tính enzyme mất nhiều sau 30 phút (còn 9%) và mất hoàn toàn sau 50 phút.

Như vậy, so với các enzyme khác đã biết thì enzyme thủy phân fibrin tách từ loài giun quế tương đối bền với nhiệt độ.

5. Ảnh hưởng của pH đến hoạt tính

pH môi trường là một trong những yếu tố rất quan trọng ảnh hưởng đến hoạt tính của enzyme vì nó ảnh hưởng đến độ bền của protein enzyme. Để biết được enzyme hoạt động tốt ở môi trường pH nào, enzyme được pha vào các đệm 20 mM acetat (3-5,5), phosphate (5,5- 8), Tris-HCl (8,5-11). Sau khi để ổn định ở nhiệt độ phòng trong 30 phút, các dịch enzyme được nhỏ lên đĩa fibrin và ủ ở 37°C, sau 3 giờ đo vòng phản ứng. Mẫu đối chứng là các đệm không chứa enzyme với các giá trị pH tương ứng.

Khi tăng dần độ pH từ 3-5,5, hoạt tính enzyme tăng dần, còn khi tăng dần độ pH từ 9-11 thì hoạt tính enzyme giảm nhanh (Hình 2.10). Hoạt tính enzyme cao nhất trong khoảng pH 5,5-8,5. Như vậy enzyme hoạt động tối ưu trong khoảng pH khá rộng.

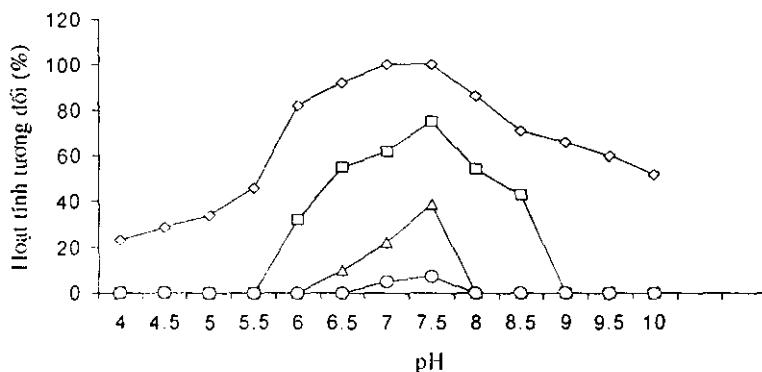


Hình 3.13. Ảnh hưởng của pH đến hoạt tính của enzyme.

Δ: 20 mM acetate (pH 3-5,5); ◇: 20 mM phosphate (pH 5,5- 8);
○: 20 mM Tris-HCl (pH 8,5-11).

6. Ảnh hưởng của pH đến độ bền của enzyme

Để nghiên cứu ảnh hưởng của pH đến độ bền của enzyme, dịch enzyme được pha vào các đệm trên với khoảng pH 4-10 rồi được ủ ở các nhiệt độ 50, 60, 70, 80°C trong 30 phút, sau đó các định enzyme được nhỏ lên đĩa fibrin và ủ phản ứng ở 37°C trong 3 giờ. Hoạt tính enzyme được thể hiện bằng diện tích vòng phản ứng.



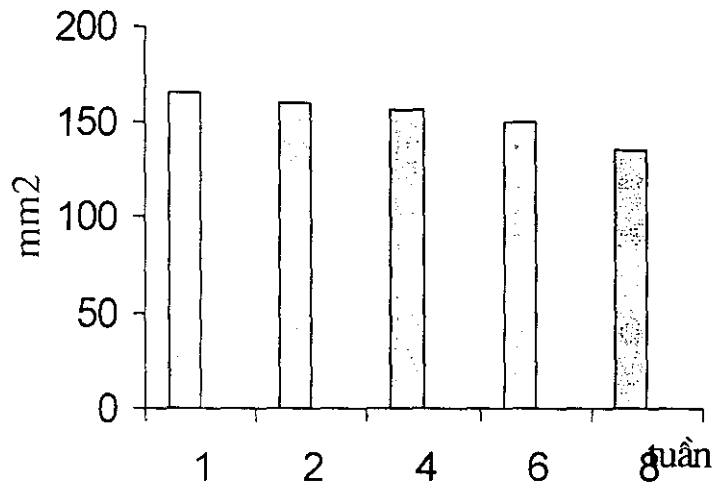
Hình 2.11. Ảnh hưởng của pH đến độ bền của enzyme.

◇: 50°C · □: 60°C · Δ: 70°C · ○: 80°C

Ở nhiệt độ 40°C, hoạt tính enzyme mạnh trong các khoảng pH tối ưu đã xác định ở trên và giảm dần ở ngoài khoảng pH này (Hình 2.11). Khi ủ ở 60°C thì hoạt tính enzyme chỉ còn lại ở các khoảng pH từ 6 đến 8,4, ở 70°C thì hoạt tính vẫn còn với pH 6,5-7,5, ở 80°C thì hoạt tính enzyme còn lại rất ít (7%) với pH trung tính và bị mất hoàn toàn với các khoảng pH kiềm và axit. Điều này chứng tỏ enzyme bền ở khoảng pH trung tính.

7. Ảnh hưởng của thời gian bảo quản đến hoạt tính của enzyme

Để theo dõi độ bền của enzyme theo thời gian bảo quản ở 4°C trong đệm natri phosphate pH 7,5, sau những khoảng thời gian nhất định, enzyme được lấy ra và nhỏ lên đĩa fibrin để ủ phản ứng. Sau 1, 2, 4 và 8 tuần bảo quản, hoạt tính enzyme giảm không đáng kể (Hình 2.12).



Hình 2.12. Độ bền của enzyme theo thời gian bảo quản.

Khi xác định hoạt tính chúng tôi nhận thấy: trên đĩa phản ứng, vòng phản ứng vẫn

tiếp tục rộng ra theo thời gian 1 ngày, 2 ngày, cho đến khi hết cơ chất trong đĩa (ở nhiệt độ phòng). Điều đó cũng nói lên rằng enzyme này khá bền.

8. Ảnh hưởng của ion kim loại đến hoạt tính

Để đánh giá ảnh hưởng của các ion kim loại đến hoạt tính thủy phân fibrin, dịch enzyme được thêm vào các ion kim loại khác nhau với nồng độ 2-10 mM ở nhiệt độ phòng trong 30 phút rồi xác định hoạt tính. Các kim loại được chia làm 2 nhóm: nhóm không kìm hãm và nhóm kìm hãm (Hình 2.13)

Kết quả cho thấy: Ion Ca^{2+} với nồng độ 2,5 mM không làm thay đổi hoạt tính của enzyme, ở nồng độ 10 mM hoạt tính enzyme tăng nhẹ (10%) (Hình 3.16). Các ion kim loại Mg^{2+} , Co^{2+} , Fe^{3+} , Ni^{2+} không ảnh hưởng tới hoạt tính enzyme. Các ion kim loại Pb^{2+} , Cu^{2+} và Zn^{2+} ức chế mạnh (hoạt tính còn 60-40%) ở các nồng độ 2-10 mM. Hg^{2+} ức chế hoạt tính enzyme mạnh nhất, hoạt tính còn 30-40% ở nồng độ 2,5 mM và ức chế hoàn toàn ở nồng độ 10 mM.

9. Ảnh hưởng của EDTA đến hoạt tính

Một trong những chất kìm hãm đặc hiệu đối với enzyme có nhóm ngoại mang ion kim loại là EDTA. Để nghiên cứu ảnh hưởng của EDTA đến hoạt tính của enzyme, dịch enzyme được bổ sung EDTA với các nồng độ khác nhau từ 5-20 mM. Kết quả thí nghiệm đã cho thấy hoạt tính thủy phân fibrin của enzyme không thay đổi so với ban đầu (dịch enzyme không được bổ sung EDTA) ở tất cả các nồng độ EDTA trong khoảng trên. Như vậy, EDTA không có tác dụng kìm hãm enzyme và enzyme thủy phân fibrin tách chiết được không thuộc nhóm enzyme có kim loại. Kết quả này cũng gợi ý rằng, chúng ta có thể bổ sung EDTA vào dịch enzyme trong quá trình tách chiết để ức chế các protease kim loại.

IV. KẾT LUẬN

1. Đã sàng lọc được một loài giun có hoạt tính thủy phân fibrin cao là loài giun quế, *perionyx excavatus*.
2. Đã xác định được quy trình thích hợp để tách chiết enzyme có hoạt tính thủy phân fibrin cao từ loài giun *Perionyx excavatus*.
3. Đã tách chiết được hai enzyme tách chiết được có trọng lượng phân tử là 34 và 28 kDa, tương ứng với các hoạt tính thủy phân fibrin là 271 và 126 UI
4. Đã xác định được một số tính chất của enzym tách chiết như: độ bền nhiệt, độ bền pH, ảnh hưởng của ion kim loại, ảnh hưởng của EDTA lên hoạt tính của enzym, thành phần axit amin, khả năng phân cắt fibrinogen.

II/ CÁC QUY TRÌNH NGHIÊN CỨU TẠO PROTEIN TÁI TỔ HỢP

QUY TRÌNH
TÁCH DÒNG VÀ BIỂU HIỆN GEN MÃ HOÁ
CHO LUMBROKINASE TỪ LOẠI GIUN QUẾ
PERIONYX EXCAVATUS

NGƯỜI CHỦ TRÌ: TS. ĐẶNG ĐIỂM HỒNG

HÀ NỘI - 2004

BÁO CÁO KẾT QUẢ

NGHIÊN CỨU CHUYÊN ĐỀ

Tách dòng và biểu hiện gen mã hoá Lumbrokinase từ loài giun Quế của Việt Nam (*Perionyx excavatus*)

Enzym Fibrinotic là enzym thuỷ phân fibrin - thành phần protein chính của cục máu. Các enzym có hoạt tính của fibrinotic như là urokinase và chất hoạt hoá plasminogen mô được dùng rộng rãi trong việc điều trị các bệnh liên quan đến chứng nghẽn mạch do fibrin bị đóng cục và tắc lại trong mạch máu (ví dụ xơ cứng động mạch, tăng huyết áp, tràn máu não...). Tuy nhiên những enzym này có giá thành rất cao và không hiệu quả khi dùng làm thuốc uống [6]. Năm 1991, Mihara và cộng sự đã tách chiết được một loại enzym mới có hoạt tính fibrinotic mạnh từ giun đất *Lumbricus rubellus* và được gọi là Lumbrokinase [5]. Lumbrokinase không những có hoạt tính thuỷ phân fibrin cao, bền với nhiệt và pH so với các loại enzym thuỷ phân fibrin khác mà còn có thể dùng ở dạng thuốc uống trực tiếp, vì lumbrokinase có thể hấp thụ từ ruột vào máu và hoạt hoá hệ thống fibrinolysis nội sinh. Ngoài ra, giá thành sản xuất thuốc từ lumbrokinase rẻ hơn rất nhiều với các loại enzym cùng loại khác.

Với những ưu điểm trên, hướng nghiên cứu khai thác và sử dụng enzym Lumbrokinase từ nguồn nguyên liệu tự nhiên sẵn có ở Việt Nam đã được tiến hành [3]. Tuy nhiên, tách chiết và tinh sạch Lumbrokinase từ giun đất rất khó khăn, hơn nữa là do loài giun *Lumbricus rubellus* không phân bố ở Việt Nam. Để khắc phục những khó khăn trên, hướng nghiên cứu tách chiết, làm sạch và xác định tính chất lý hoá của Lumbrokinase từ nguồn giun đất tự nhiên của Việt Nam đã và đang được thực hiện [4]. Bước đầu các tác giả đã thu được một số kết quả như: Xác định được hoạt tính

Lumbrokinase ở một số loài giun đất của Việt Nam trong đó hoạt tính của enzyme này cao nhất ở giun Quế (*Perionyx excavatus*). Song song với hướng này, một hướng nghiên cứu tách dòng và biểu hiện gen mã hóa cho Lumbrokinase từ giun Quế của Việt Nam nhằm mục đích tổng hợp enzym này theo con đường công nghệ sinh học cũng đang được chúng tôi tiến hành.

VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

Vật liệu:

Giun Quế, tên khoa học *Perionyx excavatus* thu tại Ba Vì - Hà Tây do Tiến sỹ Huỳnh Thị Kim Hối, Viện Sinh thái và Tài nguyên Sinh vật phân loại và định tên. Giun có màu đỏ, thân dài trung bình 8 cm, đường kính từ 1,2-2mm, sống ở cống rãnh, đồng phân ủ, đất mùn.

Phương pháp

Tách chiết ARN tổng số và tổng hợp cDNA từ giun Quế

Giun Quế (*Perionyx excavatus*) được loại bỏ hết phân và rửa sạch bằng nước cất khử trùng (DEPC 0,1%). Mẫu được nghiền trong nitơ lỏng, ARN tổng số được tách theo phương pháp có sử dụng Trizol. Thư viện cDNA được tổng hợp từ ARN tổng số bằng Super ScriptionTM First-Strand Synthesis system for RT-PCR Kit của hãng Invitrogen.

Nhân bản và tách dòng đoạn gen Lumbrokinase

Phản ứng PCR nhân đoạn gen mã hóa cho Lumbrokinase: 20 μ l (10XBuffer 2 μ l, dNTP mix 2,5mM 1,5 μ l, MgCl₂ 25mM 1,2 μ l, 1UI Taq polymerase, primer 2 μ l, cDNA 1 μ l, H₂O 12 μ l). Sử dụng các cặp mồi được thiết kế dựa trên mô tả của tác giả Sugimoto và cộng sự [7]

{ HL320F: 5'-CCCTGCAGAGATTGTCGGAATTGA-3'
{ HL320R: 5' CATGTTCGTTCTAGATGAGCAACGTTA-3'
{ HL321F: 5'-AGATTGTCGGAGGAATTGAAGCCAG-3'
{ HL322R: 5'-GCATGTTCGTTCTGCATGAGCAAC-3'
{ HL322F: 5'-ATGCGGTGTCAGCCAGTATTCAGATGC-3'
{ HL322R: 5'-GCATGTTCGTTCTGCATGAGCAAC-3'

Phản ứng được thực hiện theo chu trình nhiệt: Biến tính 94°C/3 phút tiếp theo lặp lại 35 chu kỳ (94°C/30 giây, 52°C/30 giây, 72°C/30 giây), bước cuối cùng 72°C/10 phút và giữ ở 4°C. Sản phẩm PCR được phân tách trên gel agarose 1,8% và quan sát dưới đèn tử ngoại sau đó được cắt và thôi qua cột SIGMA Gen EluteTM Agarose Spin Columns – USA.

PCR^(R) 2.1 được sử dụng làm vectơ tách dòng. Plasmid được tách theo phương pháp của Sambruck [6] và làm sạch bằng cột QIA prep

^(R)Miniprep (QIAGEN). Trình tự nucleotit được đọc bằng máy ABI PRISM 377, USA.

Thiết kế cặp mồi và vector dùng để biểu hiện đoạn gen Lumbrokinase ở *E. coli*

Chúng tôi sử dụng hệ vector pET21-a (+) (hình 1) cho việc biểu hiện đoạn gen Lumbrokinase ở *E.coli*. Với hệ vector này, Lumbrokinase tái tổ hợp sẽ được biểu hiện ra ở dạng protein dung hợp (fusion protein). Gen mã hoá cho Lumbrokinase được dính vào vector pET21-a(+) nhờ hai vị trí trong vùng cloning site là *NdeI* và *NotI*. Muốn thực hiện được việc dính gen vào vector, trước hết gen phải được nhân bản bằng PCR với cặp mồi biểu hiện Luexp được treo 2 vị trí cắt của *NdeI* và *NotI*, sử dụng vector tái tổ hợp có mang sản phẩm PCR có kích thước 733 bp với cặp mồi HL320F và HL320 R để làm khuôn.

Cặp mồi Luexp có trình tự như sau:

NdeI

┌──────────┐

Luexp F: GCATATGAGCAACGTTAAAGAGCAC

NotI

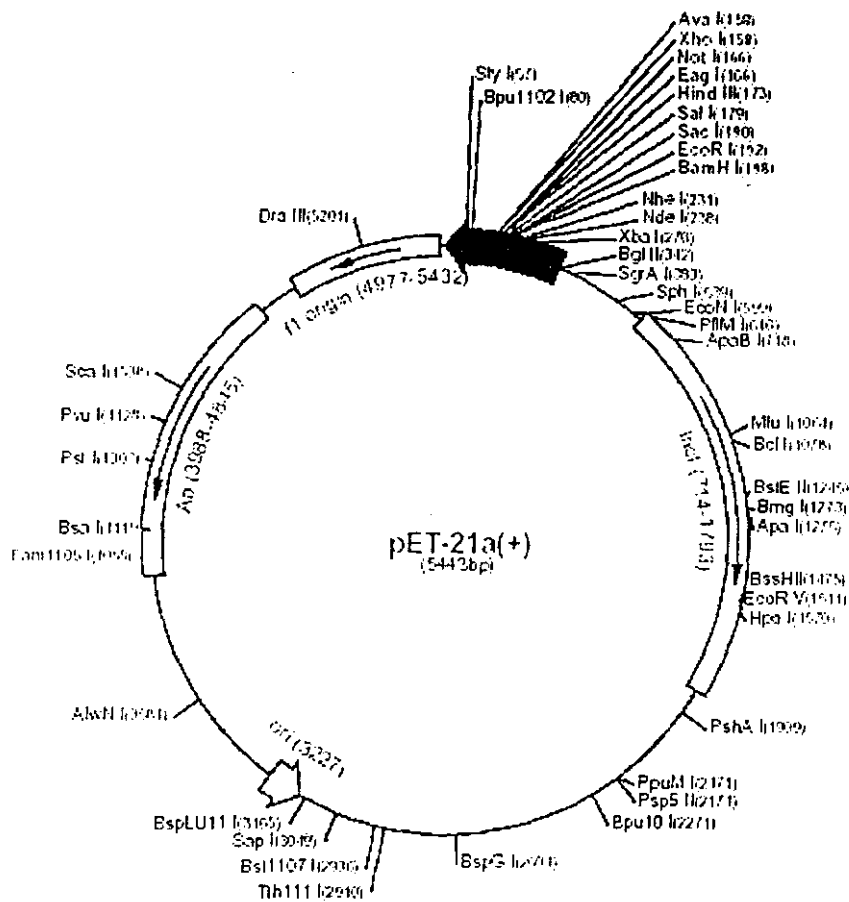
┌──────────┐

Luexp R: TGCGGCCGCCAGAGATTGTCGGAGGA

Phản ứng PCR với cặp mồi biểu hiện được tiến hành theo chu trình: Biến tính 94°C/3 phút tiếp theo lặp lại 35 chu kỳ (94°C/30 giây, 56°C/1 phút, 72°C/1 phút), bước cuối cùng 72°C/5 phút và giữ ở 4°C.

Sản phẩm PCR sau đó được gắn vào vector tách dòng PCR ^(R) 2.1. Plasmid được tách theo phương pháp của Sambrook [6] và làm sạch với cột QIA prep ^(R)Miniprep (QIAGEN). Trình tự nucleotit được đọc bằng máy ABI PRISM 377, USA. Sau khi so sánh với trình tự ban đầu, chọn ra vectơ tái tổ hợp có mang đoạn trình tự LUM để nhân lượng lớn. Vectơ tái tổ hợp sau khi được nhân lượng lớn rồi tiến hành cắt với *NdeI* và *NotI*. Vector pET21-a(+) cũng được tiến hành cắt đồng thời với 2 enzym giới hạn nêu trên. Sau khi cắt, sản phẩm PCR và vector sẽ được tinh sạch bằng phương pháp điện di trên gel agarose 1% rồi thu nhận lại vector và sản phẩm PCR đã cắt bằng cột SIGMA Gen Elute™ Agarose Spin Columns – USA. Kiểm tra sản phẩm PCR và vector đã cắt bằng điện di trên gel agarose sau đó gắn sản phẩm PCR (mang đoạn gen Lumbrokinase) vào vector biểu hiện nhờ T4-ligase của hãng New England Biolab. Quá trình gắn được tiến hành qua đêm ở 16 °C. Sản phẩm lai được biến nạp vào *E.coli* chủng DH5α để chọn vector tái tổ hợp mang gen Lumbrokinase. Vectơ tái tổ hợp được tách chiết lại từ các

chúng biến nạp, sau đó kiểm tra bằng cắt với các enzym giới hạn *NdeI* và *NotI*.



Hình 1: Bản đồ vector biểu hiện pET21-a(+)

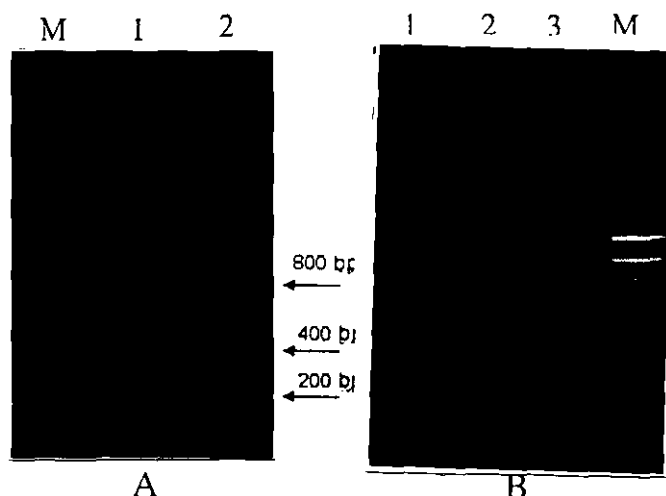
Biểu hiện gen Lumbrakinase với chủng *E.coli* BL21 (DE3) tái tổ hợp

Sau khi kiểm tra bằng cắt enzym giới hạn và bằng đọc trình tự trên máy ABI PRISM 377, USA với cặp mồi của T7 promotor, vector biểu hiện tái tổ hợp mang gen Lumbrakinase được biến nạp vào *E. coli* chủng BL21 (DE3). Để kiểm tra gen Lumbrakinase có được biểu hiện hay không, chúng tôi tiến hành cảm ứng bằng cách nuôi vi khuẩn tái tổ hợp trong 50ml môi trường LB lỏng có nồng độ Ampicillin cuối cùng là 100 μ M/ml cho tới khi OD₆₀₀ đạt 0.6-1.0, sau đó cảm ứng bằng IPTG với các nồng độ là 0.4; 0.6; 1.0 và 1.2 mM. Tế bào thu được sau 5h – 24h kể từ khi cảm ứng được hoà vào 100 μ l loading dye. Biến tính 15 phút ở 100°C. Chạy kiểm tra protein tái tổ hợp bằng điện di trên gel polyacrylamid nồng độ 12,6% theo phương pháp Laemmli [2].

KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Tách ARN tổng số, tổng hợp thư viện cDNA và nhân gen Lumbrokinase

Theo phương pháp mô tả ở trên chúng tôi đã tách được ARN tổng số từ giun Quế với các tiểu phần 28S, 18S và 5.8S (kết quả không chỉ ra ở đây). cDNA được tổng hợp theo SuperScript™ First-Strand Synthesis system for RT-PCR Kit của hãng Invitrogen sử dụng oligoT. Để nhân gen mã hoá cho Lumbrokinase chúng tôi đã sử dụng 3 cặp mồi mô tả ở trên. Sản phẩm PCR của 3 cặp mồi này có kích thước từ 200 đến 800bp. Trong đó bằng cặp mồi thứ nhất chúng tôi đã nhân được 3 băng có kích thước khoảng: 200, 400 và 800 bp (hình 2A). Các băng này được tách và làm sạch qua cột Gen Elute™ Agarose Spin Columns (hình 2B).



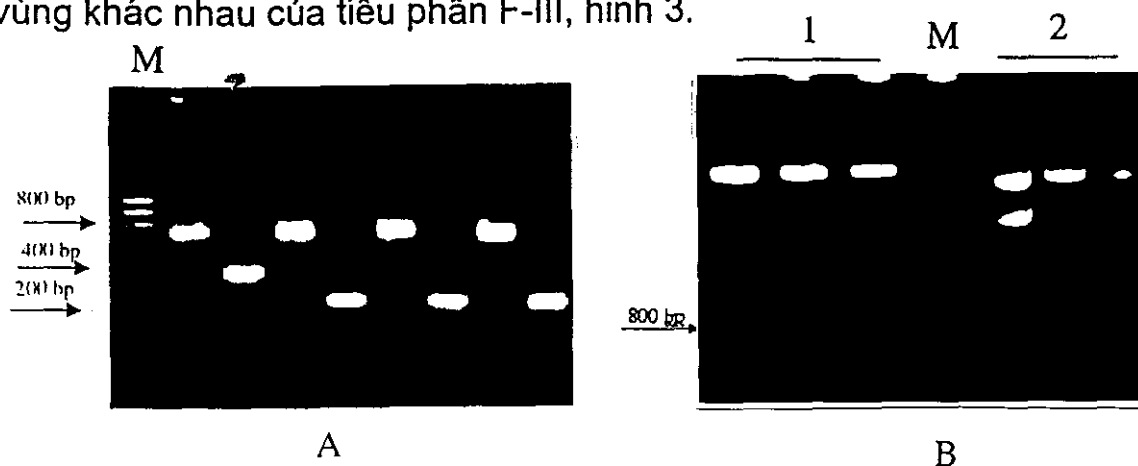
Hình 2: A: Sản phẩm PCR với cặp mồi HL320F- R từ cDNA; B: Sản phẩm PCR với kích thước khoảng 800, 400 và 200 bp sau khi qua cột Gen Elute™ Agarose Spin Columns

Tách dòng và đọc trình tự gen Lumbrokinase

Sản phẩm nhân từ 3 cặp mồi trên được gắn vào vector pCR®2.1. Plasmid sau khi được tách chiết, làm sạch, kiểm tra bằng chạy PCR (hình 3A) và bằng enzym cắt giới hạn *E.coRI* (hình 3B) chúng tôi tiến hành đọc trình tự trên máy ABI PRISM 377, USA.

Sau khi đọc trình tự các sản phẩm PCR từ 3 cặp mồi trên chúng tôi đã thu được 3 đoạn gen có kích thước: 733; 380; 187bp. Các trình tự này được so sánh với trình tự nucleotit mã hóa cho tiểu phần F-III Lumbrokinase của loài giun *Lumbricus rubellus* [Accession number AB045719] theo công bố của tác giả Mihara H và cộng sự [1, 2]. Kết quả cho thấy, đoạn gen có kích thước 733 bp phù hợp nhất về mặt lý thuyết với cặp mồi HL320 F-R đã được thiết kế (846 bp). Sản phẩm chúng tôi nhân được có sự tương đồng với trình tự của tác giả đã công bố là 49,38% (đối với đoạn 733 bp; hình 4A);

42,36% (380 bp, hình 4 B) và 41,17% (187 bp, hình 4C) và nằm trong các vùng khác nhau của tiểu phần F-III, hình 3.



Hình 3: (A): Chạy PCR kiểm tra các đoạn gen đã được gắn vào vectơ có kích thước khoảng 200, 400 và 800 bp. (B): Cắt kiểm tra đoạn gen có kích thước khoảng 800 nucleotit bằng enzyme cắt giới hạn E.coRI. 1: Vectơ sau khi cắt bằng enzym giới hạn; 2: Vectơ mang đoạn gen kích thước khoảng 800 nucleotit sau khi được làm sạch qua cột QIA prep^(R) Miniprep.

L. lutea F111 HL320	GT TACTTCTCGGCTCTTGCATCGGCTGGTAGCGGTCGGCTTTGCGCCAAACCACTGTCTCGTA	60
L. lutea F111 HL320	CCCGCGGTGGTCAATCGGCTGTACGCCAGTATTGAGATGCTGGCGACATCGAACTTCTCTCC	120
L. lutea F111 HL320	CGCAAAGATTTGTGGGAGGAATTAAGGCGAGACATACGAGTTTCCCATGGCAGGTGTGGT	180
L. lutea F111 HL320	CGGAAGGGAAGTCTTGTGATTGCCATTTTCTGGCGAGGTGCGCATCATCAACGATGTTGGT	240
L. lutea F111 HL320	TGTCCTGGCGTGGTCTACTGCATGCGGGAGAGAGCCCTGCCTGGTCTCATTCGTCGTGG	300
L. lutea F111 HL320	CGAGCAGCATAGCAAGCGCTGGAGTAGAGTACGTGAGACTCATGATGTTGATAGCATCTT	360
L. lutea F111 HL320	CGTCAACGAAACATAGCATCCCGTACACTAGAAAACCA-CGTTTCTGTGATCAACAGAC	420
L. lutea F111 HL320	CTATCGGTATCACCTTCCGACATCAACGTTGGACCAATCTGTGCTCCAGATCCGGCTAACG	480
L. lutea F111 HL320	AC TAC GTCTACCGTTAAGACCCAGTGTTC-CGGATCGGGAAGTATCAATTGAGC-----T	540
L. lutea F111 HL320	GCAATCTGCTGTCCCGGAGTTTTCGG-ATATGTTACATGAACATCAACGAGCAACGGCTT	600
L. lutea F111 HL320	CTCGGACGGCGTCTACACA-TCGGACAGTATCTAGCAGGATATGATCTGGCGCACAGACA	660
L. lutea F111 HL320	AGACTGGATGACGACAGAGATCCTGCAGGGTGACTCGCGCGGCCTTCTGAGCGTCA	720
L. lutea F111 HL320	ACCATCGCAGCGGAATCTTCACTTCGGCTGGCATTGTCTCTTCCGGAATTCCTTCCCGT	780
L. lutea F111 HL320	CTGGCTATCTCAGGAGTTTACTCCCGGCTCGGATTTCACTGCTGGATGGATCACCCAGACCA	840
L. lutea F111 HL320	TCACCAACAATTAACGACGATGGCGGACGAACATATAACGGAGTCTTATTACCTGCACT	900
L. lutea F111 HL320	TAACGTTGCTCACTGACAGCAACATGCACATTTCATCGGCTATAGGTCCACTAAACACAG	960
L. lutea F111 HL320	CATGGATGACATATGAGTTAAAAGTATCGTGGTGACACGAAATAAAAAATCTATCTACTGG	1020

HL320_380_-----CCCTCCAGAG---A 11
LumFIII CTACGCTCTACCGTAAGAGCCAGTGTTCCGGATGGGGAACATCAATTACGGTGGAAATCTG 540

HL320_380_ TTCTCGGAGGAATTGATCGCA---ATGTTGATCATT TTCTCGGAATGAGTCCAAACGAC 67
LumFIII CTGTGCGGCACTTTTCCGATATGTTACACTCAACATCACGACC-AACGCCCTTCTG-CGAC 598

HL320_380_ GAGAAAACTCGTTAGCATTAGTCAACTGCCCTCGAAATCACTCAGAACAGAACCTAGAC 127
LumFIII CCGCTCTACACATCGGACACTATCTACGACGATATGATCTGCCGCCACAGACAACACTGGG 658

HL320_380_ ATGATCCAAATAGGCTCGAACAATGTTTACACTGCCAACAGGTGAGGATTTAATA-GGC 186
LumFIII ATGACCGACAGAGACTCTGCCAGGGTGACTCGGGGGCCCTCTGAGCGTCAAGGATGGC 718

HL320_380_ ATTACATATCTATAACTATATATA--TATATCTATCAATCTATATGCATATATATATAC 244
LumFIII AGCGGAATCTTCAGTCTCGGTGGCATTCTGTCTTGGGAATTGGTTGGCCCTCTGGCTAT 778

HL320_380_ GTCTGTGCGTGCGTGCGTGCGTGCTGTGTGTGTGTTTGGCTTTGTGTGTGTGTTTATAT 304
LumFIII CCAGGAGTTTACTCCCGCGTCGATTTCATCTCGATCGATCACCAGACGATCACCAC 838

HL320_380_ GTCTGTGCTTCTGTGCGTGCTGTGCTT-TAACAGATTA--ATGGCATCCATGTAACGTTG 361
LumFIII AACTAAACCGACGATGGCCAGTCAACTATAACGGACTCTTATACCTGCAGTTAACGTTG 898

HL320_380_ CTCATCTAGAACGAACATG----- 380
LumFIII CTCATGCAGAACGAACATGCACITTCATCGCCTATAGGTCCAATAACACAGCATGGATG 958

B

HL320_187_-----CCC 3
LumFIII CCGCGGTGTTCAATGCGGTGTCAGCCAGTATTCAGATGCTGCGCATGGAACCTTCCTCC 120

HL320_187_ TGCAGAGATTGTCGGAGGAATTGAT-TAAAAAACTCAAAAATTGTGAATGGAATTGCGA 62
LumFIII CCGAAAGATTGTGGAGGAATTGAAAGCCAGACCATACGAGTTCCATGGCAGGTGTCCT 180

HL320_187_ TACTTATTAGATTAGNGATATATAATGTGATATGAAAAGTTGTTTGTATATTTTGA AAA 122
LumFIII CCGAAGGAAGTCTTCTGATTCCCATTTCTGCGGAGGTAGCATCATCAACGATCGTTGGGT 240

HL320_187_ TGTTTAAATATCAGGATTCTGTGTAGGTCTAA---CAGGTCTAACGTTGCTCATCTAGA 178
LumFIII TGTCTGCGCTGCTC-ACTGCATGCAAGGAGAGAGCCCTGCCCTGGTCTCATTTGGTCTG 299

HL320_187_ ACGAACATG----- 187
LumFIII CCGAGCAGATAGCAGCGCTGCGAGTACAGTACGTGAGACTCATGATGTTGATAGCATCT 359

C

Hình 4 So sánh trình tự nucleotit của các đoạn gen nhân được bằng cặp mỗi (HL320F – R) với đoạn gen mã hóa cho tiểu phần F-III Lumbrokinase [Acession number AB045719] của tác giả Mihara và cộng sự. A, B, C: Tương ứng với các đoạn gen có chiều dài 733, 380 và 187 bp.

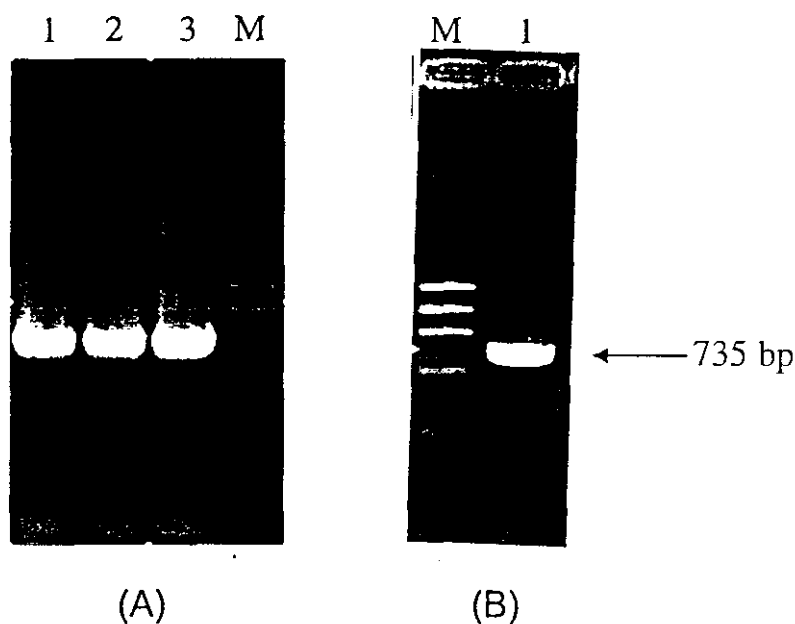
Với 3 cặp mỗi thiết kế chúng tôi đã nhân và tách dòng được những đoạn gen có độ tương đồng với tiểu phần F-III, tiểu phần biểu hiện hoạt tính Lumbrokinase cao nhất theo tác giả Mihara và cộng sự. Trong đó, đoạn gen được nhân bằng cặp mỗi HL320 F-R có chiều dài 733 bp tương đồng trong vùng từ nucleotit 117 đến 937 của tiểu phần FIII. Đoạn gen có chiều dài 380 và 178 nằm trong vùng 527 đến 909 bp và 117 đến 308 bp tương ứng trong tiểu phần FIII.

So với công bố của tác giả Mihara, đối tượng nghiên cứu của chúng tôi lại là loài giun Quế (*Perionyx excavatus*) của Việt Nam vì vậy đó có thể là nguyên nhân dẫn đến độ tương đồng không hoàn toàn giữa gen Lumbrokinase mà chúng tôi tách được so với gen đã công bố được tách từ loài giun *Lumbricus rubellus* của Nhật Bản. Nhưng kết quả ban đầu thu

được ở đây vẫn cho phép chúng tôi tiếp tục tách dòng và tìm điều kiện để biểu hiện đoạn gen mã hóa cho Lumbrokinase ở loài giun này.

Nhân bản đoạn gen Lumbrokinase bằng kỹ thuật PCR với cặp mồi biểu hiện

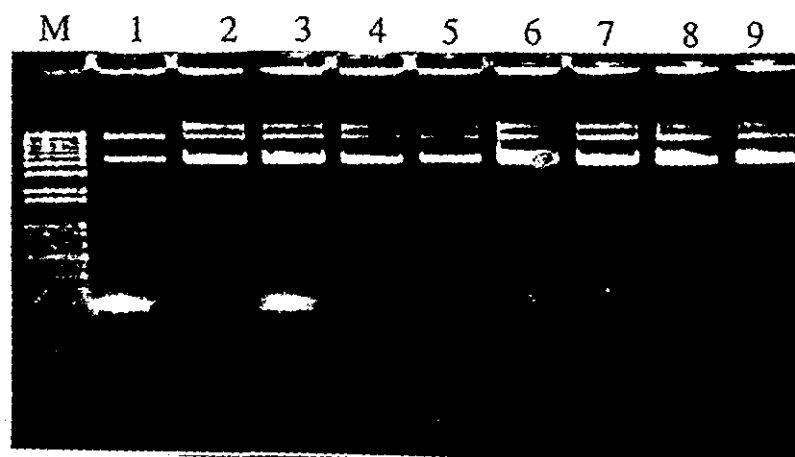
Với cặp mồi biểu hiện Luexp chúng tôi đã nhân lên được đoạn ADN khoảng 733 bp từ vector tách dòng có mang đoạn gen 733 bp của Lumbrokinase (hình 5A). Sản phẩm PCR nhân đoạn gen Lumbrokinase được tách và làm sạch qua cột Gen Elute™ Agarose Spin Columns (hình 5B).



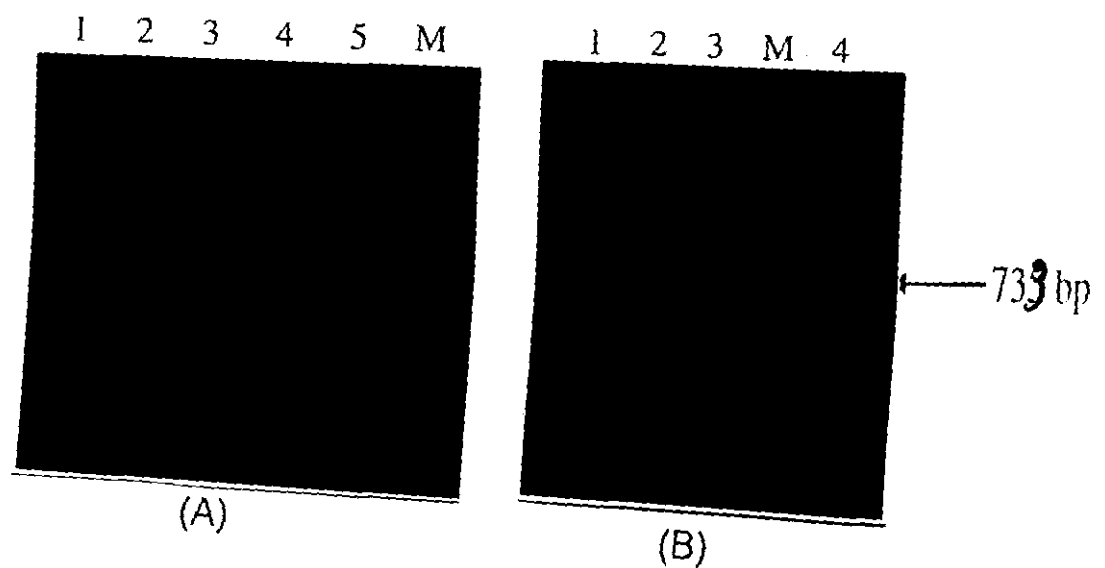
Hình 5: (A): Sản phẩm PCR với cặp mồi LuexpF- R từ vector tách dòng mang đoạn gen 733 bp; B: Sản phẩm PCR với kích thước khoảng 733 bp sau khi qua cột Gen Elute™ Agarose Spin Columns

Tách dòng và kiểm tra trình tự của gen Lumbrokinase

Để xác định chính xác trình tự đoạn gen Lumbrokinase được nhân từ cặp mồi biểu hiện không có gì thay đổi so với đoạn gen 733 bp ban đầu, chúng tôi tiến hành tách dòng theo TA-cloning kit. Vector pCR®2.1 sau khi gắn với sản phẩm PCR được biến nạp vào *E. coli* chủng DH5α. Plasmid sau khi được tách chiết, làm sạch (hình 6), kiểm tra bằng PCR-checking (hình 7A) và bằng enzym cắt giới hạn *E.coRI* (hình 7B) chúng tôi tiến hành đọc trình tự trên máy ABI PRISM 377, USA.



Hình 6: Điện di ADN plasmid trên gel agarose 1%. M: Marker 1Kb plus DNA ladder ; 1-9: các mẫu ADN plasmid tách từ các khuẩn lạc trắng trên môi trường chọn lọc



Hình 7: (A): Chạy PCR kiểm tra các khuẩn lạc có mang vectơ tái tổ hợp. M: Marker 1Kb plus DNA ladder; 1-5: các khuẩn lạc trắng trên môi trường chọn lọc. (B): Cắt kiểm tra đoạn gen có kích thước khoảng 733 nucleotit bằng enzyme cắt giới hạn E.coRI. 1: khuẩn lạc xanh; 2-3: các khuẩn lạc trắng mọc trên môi trường chọn lọc; 4: Vector tách dòng mang đoạn lumbrakinase có kích thước 735 bp

Sau khi đọc trình tự các sản phẩm PCR từ cặp mỗi biểu hiện Luexp, chúng tôi so sánh trình tự này với trình tự nucleotit mã hóa cho đoạn gen Lumbrakinase nhân với cặp mỗi HL320 F-R. Kết quả ở hình 8 cho thấy, đoạn gen nhân từ cặp mỗi biểu hiện có trình tự đúng như dự kiến. Như vậy, chúng tôi có thể khẳng định là đã nhân được đúng đoạn gen Lumbrakinase bằng cặp mỗi biểu hiện Luexp.

CLUSTAL X (1.81) multiple sequence alignment

```

TT-tach-dong      GCATATGAGCAACGTTAAAGAGCACAGCAAAAAGAAGATGCATCGCTGCAAGGTCTGCGG
TT-GOC            ----ATGAGCAACGTTAAAGAGCACAGCAAAAAGAAGATGCATCGCTGCAAGGTCTGCGG
                  *****

TT-tach-dong      AGATGCGTTTCAAACAATTGCTGATCTCGGTAATCACAAGAAAAGCACACATTCCAGAGA
TT-GOC            AGATGCGTTTCAAACAATTGCTGATCTCGGTAATCACAAGAAAAGCACACATTCCAGAGA
                  *****

TT-tach-dong      AAAGCGACACCAGTGCGTTGCTTGTGGTAAGATGTATCCGAAGCGCTCACTGCTGCTGGC
TT-GOC            AAAGCGACACCAGTGCGTTGCTTGTGGTAAGATGTATCCGAAGCGCTCACTGCTGCTGGC
                  *****

TT-tach-dong      ACACGAGCGATATCATACCGGGGAAACGCCATTCCACTGCCCTGTCTGTGAAAAGGTTT
TT-GOC            ACACGAGCGATATCATACCGGGGAAACGCCATTCCACTGCCCTGTCTGTGAAAAGGTTT
                  *****

TT-tach-dong      TGCCGCAAAACGGCGCTTGAGTCAGCACGTGATACTGCACAGGAGAGAACGCCTCTTTCA
TT-GOC            TGCCGCAAAACGGCGCTTGAGTCAGCACGTGATACTGCACAGGAGAGAACGCCTCTTTCA
                  *****

TT-tach-dong      GTGCAGCATGTGCGGCAAATTATTTGGCGATAAATTTCAACTCGTGCTGCACGAGAGGAT
TT-GOC            GTGCAGCATGTGCGGCAAATTATTTGGCGATAAATTTCAACTCGTGCTGCACGAGAGGAT
                  *****

TT-tach-dong      CCACACAGGCGAAAACCTGTTGCAATGTAGATTCTGTGAACGATTGTTTAGATGCAAAAGG
TT-GOC            CCACACAGGCGAAAACCTGTTGCAATGTAGATTCTGTGAACGATTGTTTAGATGCAAAAGG
                  *****

TT-tach-dong      TGACCTCACAGCGCACGAGAGAATCCACACCGGGGAAAAGCCATATAAATGCAACATTTG
TT-GOC            TGACCTCACAGCGCACGAGAGAATCCACACCGGGGAAAAGCCATATAAATGCAACATTTG
                  *****

TT-tach-dong      CTCTAAATCGTTTAAAGCTTTCGAGTTATTTGAAGCGTCACAGCATTACTCACACCGCTGA
TT-GOC            CTCTAAATCGTTTAAAGCTTTCGAGTTATTTGAAGCGTCACAGCATTACTCACACCGCTGA
                  *****

TT-tach-dong      CAGGCCACATCTCTGCCATGTTTGTGGAAAGTCTTTCAGAGACATGAAAGGTTTGCAGAT
TT-GOC            CAGGCCACATCTCTGCCATGTTTGTGGAAAGTCTTTCAGAGACATGAAAGGTTTGCAGAT
                  *****

TT-tach-dong      TCACGGCAGAGTTCACGGCAGAGAAAAATCGTATAAATGTCACTTGTGTAACAAGATGTA
TT-GOC            TCACGGCAGAGTTCACGGCAGAGAAAAATCGTATAAATGTCACTTGTGTAACAAGATGTA
                  *****

TT-tach-dong      TAGATCGAGACTCGGAGCTATCAACCACGTGAAATCTCAATTCCTCCGACAATCTCTGGC
TT-GOC            TAGATCGAGACTCGGAGCTATCAACCACGTGAAATCTCAATTCCTCCGACAATCTCTGGC
                  *****

TT-tach-dong      GGCCGCA
TT-GOC            GGG----
                  **

```

Hình 8: So sánh trình tự nucleotit của đoạn gen 733 bp nhân được bằng cặp mỗi (HL320F – R) với đoạn gen tương ứng được nhân bằng cặp mỗi biểu hiện Luexp.

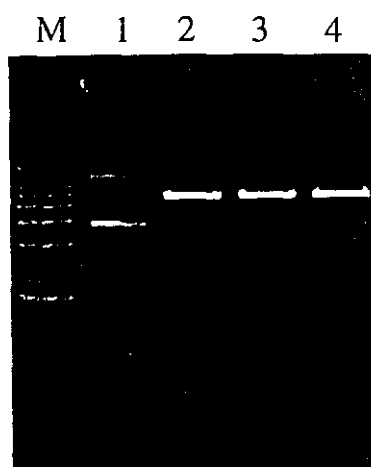
Biểu hiện gen Lumbrakinase với hệ vectơ pET 21a(+) ở *E. coli*

Trước tiên vector tách dòng mang đoạn gen Lumbrakinase được nhân với cặp mồi biểu hiện được cắt bằng 2 enzym cắt giới hạn *Nde*I và *Not*I. Kết quả kiểm tra sản phẩm cắt ADN plasmid với hai loại enzym giới hạn được trình bày trên hình 9. Trên ảnh điện di cho chúng tôi thấy rằng mẫu ADN plasmid sau khi cắt bằng hai enzym *Nde*I và *Not*I văng ra một băng có kích thước tương đương với sản phẩm PCR đã được nhân với cặp mồi biểu hiện. Điều này càng chứng tỏ rằng trình tự gen nhận được là chính xác.



Hình 9: (A): Điện di kiểm tra ADN plasmid tái tổ hợp cắt bằng hai enzym *Nde*I và *Not*I. M: Marker 1 kb; 1: ADN plasmid tái tổ hợp; 2: Sản phẩm cắt ADN plasmid tái tổ hợp bằng hai enzym *Nde*I và *Not*I.

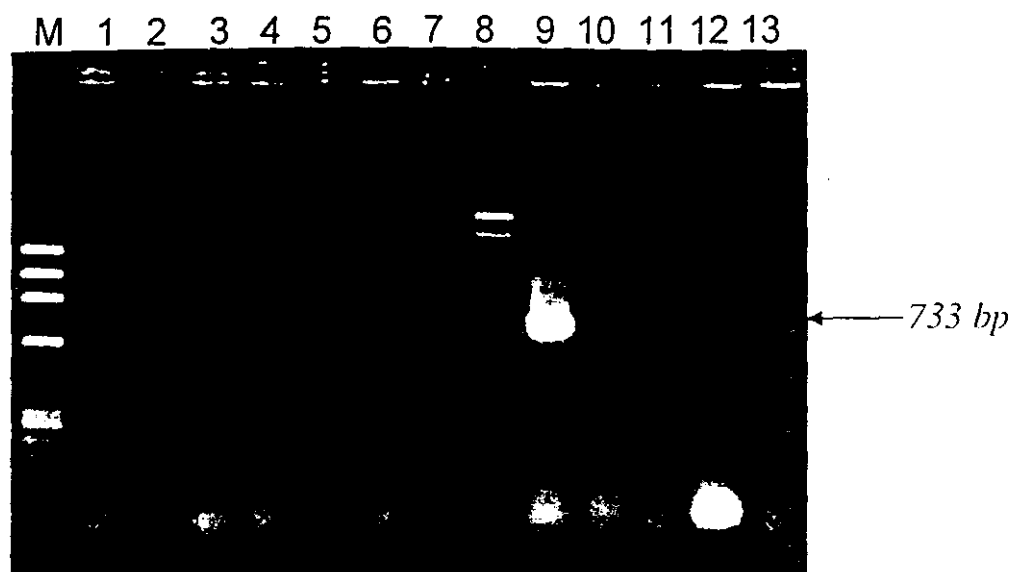
Vector biểu hiện pET21-a(+) cũng được chúng tôi tiến hành cắt đồng thời với 2 enzym giới hạn *Nde*I và *Not*I (hình 10). Sau đó, chúng tôi tiến hành lai giữa đoạn gen Lumbrakinase và vector biểu hiện tinh sạch đã có sẵn đầu treo của hai enzym giới hạn nêu trên với nhau và biến nạp vào chủng *E.coli* DH5 α .



Hình 10: Điện di kiểm tra vector biểu hiện cắt bằng hai enzym *Nde*I và *Not*I. M: Marker 1 Kb plus DNA ladder; 1: Vector biểu hiện pET21-a(+); 2: Vector biểu

hiện cắt bằng enzym giới hạn *Nde*I; 3: Vector biểu hiện cắt bằng enzym giới hạn *Not*I; 4: Vector biểu hiện cắt bằng hai enzym *Nde*I và *Not*I.

Để chọn lọc được các vectơ tái tổ hợp như mong muốn, trước hết chúng tôi chạy PCR-checking các khuẩn lạc với cặp mồi biểu hiện *Luexp* (hình 11).

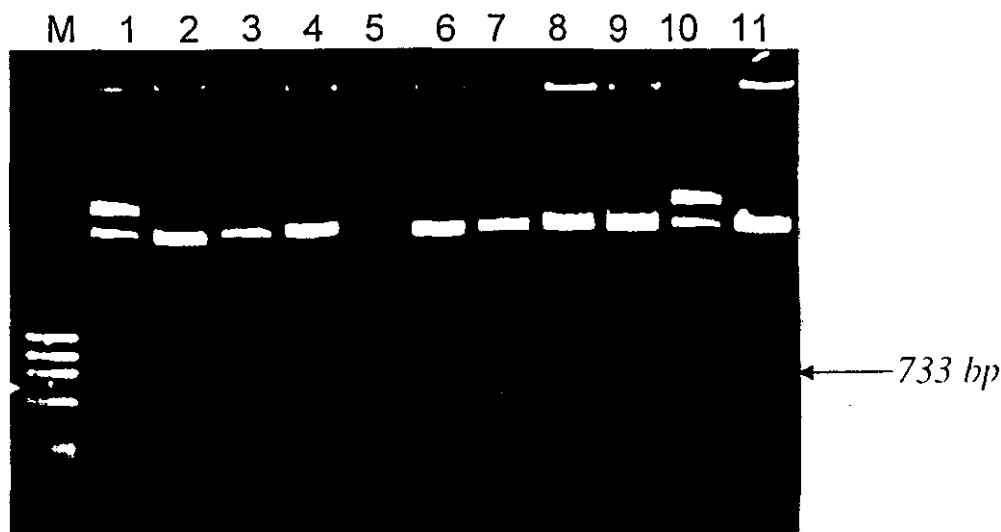


Hình 11: Chạy PCR kiểm tra các đoạn gen có kích thước khoảng 733 bp đã được gắn vào vector biểu hiện. M: Marker 1Kb plus DNA ladder; 1-13: các chủng biểu hiện trên môi trường chọn lọc.

Dựa vào kết quả trên hình 11 chúng tôi chọn lọc ra được 6 khuẩn lạc mang vectơ biểu hiện tái tổ hợp. Những khuẩn lạc mang vectơ biểu hiện sẽ được tách chiết plasmid và kiểm tra bằng các enzym giới hạn *Nde*I và *Not*I. Theo lý thuyết, khi cắt bằng 2 enzym này sẽ văng ra đoạn gen của Lumbrakinase với chiều dài 733 bp. Kết quả cắt enzym giới hạn được phản ánh trên hình 12.

Từ kết quả ở hình 12, ta chọn ra được khuẩn lạc số 9 mang vectơ biểu hiện tái tổ hợp chứa gen lumbrakinase. Chúng tôi tách chiết vectơ tái tổ hợp này, tinh sạch và đọc trình tự.

Kết quả cắt enzym giới hạn và đọc trình tự (hình 13) đã cho chúng tôi một kết luận chắc chắn rằng là đã gắn được đoạn gen mã hoá cho Lumbrakinase đúng chiều trong vectơ biểu hiện. Vectơ biểu hiện tái tổ hợp của dòng số 9 tiếp tục được biến nạp vào *E.coli* chủng BL21 (DE3) và cho biểu hiện để tạo ra Lumbrakinase tái tổ hợp ở dạng protein dung hợp.



Hình 12: Điện di kiểm tra ADN plasmid tái tổ hợp cắt bằng hai enzym NdeI và NotI. M: Marker ; 1 và 5: ADN plasmid tái tổ hợp số 9 và 10; 2, 6 và 9: Sản phẩm cắt ADN plasmid tái tổ hợp của chủng số 9, 10 và 1 với hai enzym NdeI và NotI; 3, 7 và 10: Sản phẩm cắt ADN plasmid tái tổ hợp của chủng số 9, 10 và 1 với NdeI và NotI; 4, 8 và 11: Sản phẩm cắt ADN plasmid tái tổ hợp của chủng số 9, 10 và 1 với NotI.

CLUSTAL X (1.81) multiple sequence alignment

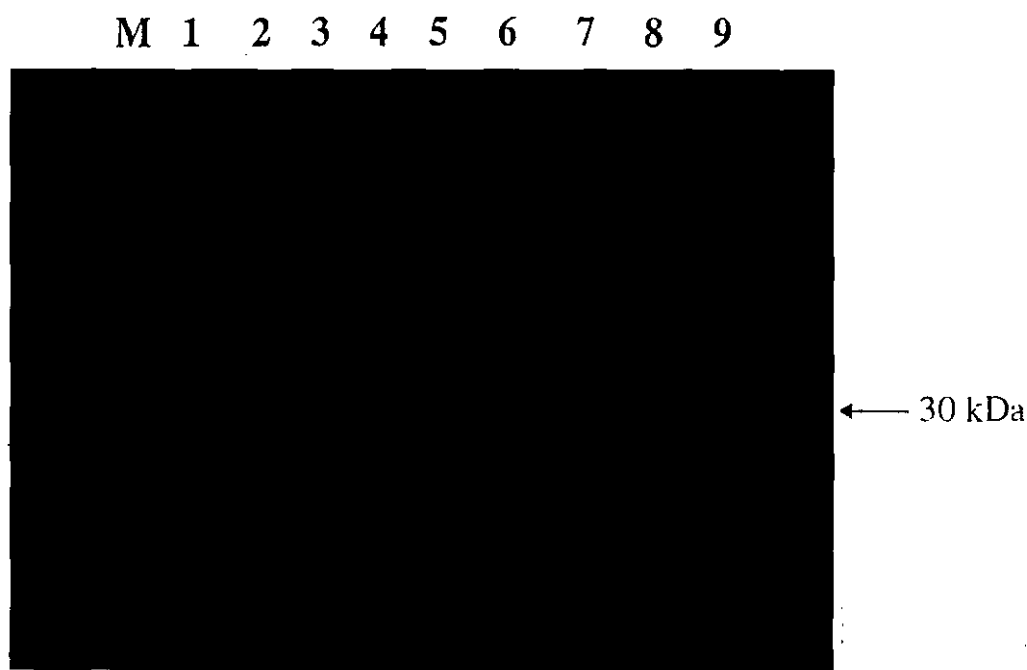
Trình-tu-tach-dong	GCATATGAGCAACGTTAAAGAGCACAGCAAAAAGAAGATGCATCGCTGCAAGGTCTGCGG
Trình-tu-bieu-hien	GCATATGAGCAACGTTAAAGAGCACAGCAAAAAGAAGATGCATCGCTGCAAGGTCTGCGG
Trình-tu-tach-dong	AGATGCGTTTCAAACAATTGCTGATCTCGGTAATCACAAGAAAAGCACACATTCCAGAGA
Trình-tu-bieu-hien	AGATGCGTTTCAAACAATTGCTGATCTCGGTAATCACAAGAAAAGCACACATTCCAGAGA
Trình-tu-tach-dong	AAAGCGACACCAAGTGCCTTGCTTGTGGTAAGATGTACCCGAAGCGCTCACTGCTGCTGGC
Trình-tu-bieu-hien	AAAGCGACACCAAGTGCCTTGCTTGTGGTAAGATGTACCCGAAGCGCTCACTGCTGCTGGC
Trình-tu-tach-dong	ACACGAGCGATATCATACCGGGGAAACGCCATTCCACTGCCCTGTCTGTGAAAAGGTTT
Trình-tu-bieu-hien	ACACGAGCGATATCATACCGGGGAAACGCCATTCCACTGCCCTGTCTGTGAAAAGGTTT
Trình-tu-tach-dong	TGCCGCAAAACGGCGCTTGAGTCAGCACGTGATACTGCACAGGAGAGAACGCCTCTTTCA
Trình-tu-bieu-hien	TGCCGCAAAACGGCGCTTGAGTCAGCACGTGATACTGCACAGGAGAGAACGCCTCTTTCA
Trình-tu-tach-dong	GTGCAGCATGTGCGGCAAATTATTTGGCGATAAATTTCAACTCGTGCTGCACGAGAGGAT
Trình-tu-bieu-hien	GTGCAGCATGTGCGGCAAATTATTTGGCGATAAATTTCAACTCGTGCTGCACGAGAGGAT
Trình-tu-tach-dong	CCACACAGGCGAAAACCTGTTGCAATGTAGATTCTGTGAACGATTGTTTAGATGCAAAGG
Trình-tu-bieu-hien	CCACACAGGCGAAAACCTGTTGCAATGTAGATTCTGTGAACGATTGTTTAGATGCAAAGG
Trình-tu-tach-dong	TGACCTCACAGCGCACGAGAGAATCCACACCGGGGAAAAGCCATTTAAATGCAACATTTG
Trình-tu-bieu-hien	TGACCTCACAGCGCACGAGAGAATCCACACCGGGGAAAAGCCATTTAAATGCAACATTTG
Trình-tu-tach-dong	CTCTAAATCGTTTAAAGCTTTCGAGTTATTTGAAGCGTCACAGCATTACTCACACCGCTGA
Trình-tu-bieu-hien	CTCTAAATCGTTTAAAGCTTTCGAGTTATTTGAAGCGTCACAGCATTACTCACACCGCTGA
Trình-tu-tach-dong	CAGGCCACATCTCTGCCATGTTTGTGGAAAGTCTTTTCAGAGACATGAAAGGCTTGCAGAT
Trình-tu-bieu-hien	CAGGCCACATCTCTGCCATGTTTGTGGAAAGTCTTTTCAGAGACATGAAAGGCTTGCAGAT
Trình-tu-tach-dong	TCACGGCAGAGTTTCACGGCAGAGAAAAATCGTATAAATGTCACTTGTGTACAAGATGTAT
Trình-tu-bieu-hien	TCACGGCAGAGTTTCACGGCAGAGAAAAATCGTATAAATGTCACTTGTGTACAAGATGTAT

Trình-tu-tach-dong	AGATCGAGACTCGGAGCTATCAACCACGTGNAATCTCAATTCCTCCGACAATCTCTGGCG
Trình-tu-bieu-hien	AGATCGAGACTCGGAGCTATCAACCACGTGNAATCTCAATTCCTCCGACAATCTCTGGCG

Trình-tu-tach-dong	GCCGCA
Trình-tu-bieu-hien	GCCGCA

Hình 13: So sánh trình tự nucleotit của sản phẩm PCR được nhân bằng cặp mồi biểu hiện Luexp với đoạn gen tương ứng được gắn trong vectơ biểu hiện pET 21 a (+).

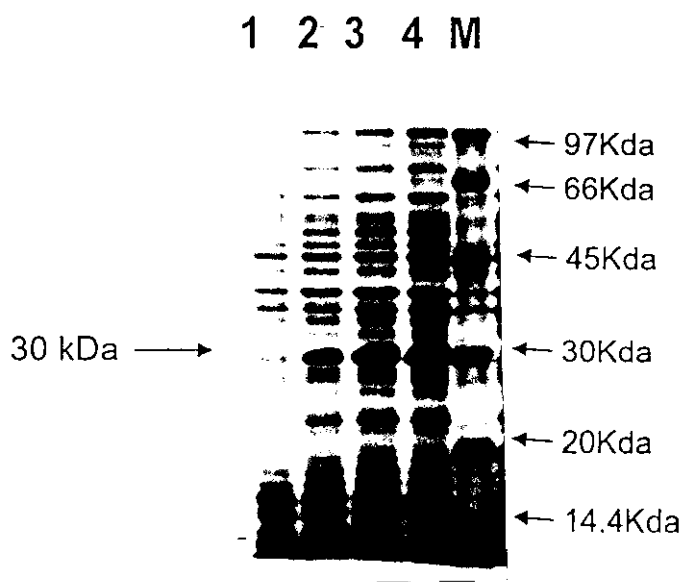
Quá trình biểu hiện protein được tiến hành trong môi trường LB có bổ xung Ampicillin và cảm ứng nhờ IPTG với các nồng độ cuối cùng là 0.4; 0.6; 1; và 1.2 mM với thời gian cảm ứng là 5 và 24 giờ. Kết quả điện di polyacrylamid của mẫu tế bào được thu nhận sau cảm ứng 5 và 24 giờ được thể hiện trên hình 14. Kết quả phản ánh trên hình 14 cho chúng tôi thấy rằng ở nồng độ IPTG cuối cùng là 0.6 mM với thời gian cảm ứng 24 giờ thì cho mức độ biểu hiện protein tái tổ hợp là mạnh nhất, tiếp sau đó là 0.4 mM, 1.0 mM và biểu hiện thấp nhất là ở nồng độ 1.2 mM.



Hình 14: Mức độ biểu hiện gen Lumbrokinase dạng protein liên kết ở E.coli BL21 (DE3) được kiểm tra bằng điện di trên gel polyacrylamid 12.6%. M: Marker protein (từ cao xuống thấp 94, 67, 43, 30, 20.1 và 14,4 kDa); Mẫu protein tổng số từ dòng số 9 được thu nhận ở 0 (giếng 1); và 5 giờ ở các nồng độ IPTG 1.2, 1.0, 0.6 và 0.4 (giếng 2, 3, 4 và 5); sau cảm ứng 24 giờ ở các nồng độ IPTG 1.2, 1.0, 0.6 và 0.4 (giếng 6, 7, 8 và 9).

Với kết quả trên, chúng tôi tiến hành xác định động học của quá trình cảm ứng biểu hiện ở nồng độ IPTG tối ưu là 0.6mM trong thời gian 0h, 2h, 4h, 6h cảm ứng. Kết quả được chỉ ra ở hình 15.

Kết quả ở hình 15 cho thấy, protein dung hợp được biểu hiện mạnh nhất ở nồng độ IPTG cuối cùng là 0.6mM trong thời gian cảm ứng là 6h.



Hình 15: Kết quả động học quá trình cảm ứng biểu hiện theo thời gian ở *E.coli* BL21 (DE3) mang vectơ biểu hiện pET 21 a (+)Lum. M: Marker protein trọng lượng phân tử thấp. Giếng 1, 2, 3, 4 là protein dung hợp thu được sau 0h, 2h, 4h, 6h cảm ứng với nồng độ IPTG là 0.6mM.

KẾT LUẬN

Chúng tôi đã tách dòng được đoạn gen mã hoá cho Lumbrokinase từ loài giun quế (*Perionyx excavatus*) của Việt Nam có kích thước 733, 380 và 187 bp.

Gen mã hoá cho Lumbrokinase đã được biểu hiện mạnh ở *E. coli* nhờ hệ vectơ pET21 a(+) với nồng độ cảm ứng cuối cùng của IPTG là 0.6mM trong khoảng 6 đến 24 giờ.

Lumbrokinase tái tổ hợp được biểu hiện ra dưới dạng protein dung hợp có trọng lượng phân tử tính từ gel polyacrylamid là 30 kDa tương ứng với gen có kích thước 733 bp đã tách dòng được.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Đỗ Văn Nhung, 1994. "Khu hệ giun đất Miền Tây Bắc Việt Nam". Luận án Tiến sỹ sinh học .

2. Laemmli U. K., 1970. Cleavage of structural protein during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-685.
3. Lê Văn Triển., 1995. "Khu hệ giun đất Miền Đông Bắc Việt Nam". Luận án Tiến sỹ sinh học
4. Lý Thị Bích Thủy, Nguyễn Trường Giang, Nguyễn Thị Ngọc Dao, 2002. "Hoạt tính thủy phân fibrin của enzyme tách từ một số loài giun đất Việt Nam". Báo cáo tổng kết đề tài năm 2002.
5. Mihara H., et al., 1991. " A novel fibrinolytic enzyme extracted from the earthworm, *Lumbricus rubellus*". *Jpn J. Physiol* 1991; 41 (3): 461-472
6. Nakajima, N., Mihara, H., ADN Sumi, H., 1993. "Characterization of potent fibrinolytic enzymes in Earthworm, *Lumbricus rubellus*". *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 57, 1726-1730.
7. Sambrook E.F., Fritsch E.F., Maniatis. T.1989. *Molecular Cloning*. 2th edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press.
8. Sugimoto, M., Nakajima, N., 2001. "Molecular cloning, sequencing, ADN expression of cDNA encoding serine protease with fibrinolytic activity from earthworm". *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 65 (7), 1575-1580.

Phân II

Đa hình đoạn gen ITS-1 ở 8 loài giun đất miền bắc Việt Nam

Lumbrokinase - enzym có hoạt tính thủy phân fibrin rất mạnh đã được các nhà khoa học Nhật Bản tách chiết từ loài giun đất *Lumbricus rubellus*. Tuy nhiên loài giun này chưa được phát hiện ở Việt Nam. Do vậy để chủ động nguồn nguyên liệu trong nghiên cứu và tách chiết lumbrokinase sẵn có từ trong nước, chúng tôi đã tiến hành khảo sát những loài giun của Việt Nam có mặt enzyme này. Hoạt tính enzyme Lumbrokinase đã được kiểm tra ở một số loài giun thu được từ các vùng sinh thái khác nhau (5). Ngoài ra mối quan hệ di truyền giữa những loài giun này cũng được chúng tôi xác định bằng cách đọc và so sánh trình tự nucleotit đoạn ITS-1 (Internal Transcribed Spacer 1) - đoạn gen nằm giữa 18S và 5,8 S rADN. Bằng cách này, chúng tôi hy vọng sẽ xác định được liệu sự có mặt của Lumbrokinase là phổ biến ở tất cả các loài giun đất hay là mang tính đặc hiệu đối với từng loài và mức độ biểu hiện hoạt tính enzym này có liên quan tới mối quan hệ di truyền giữa các loài giun trong nghiên cứu của chúng tôi hay không?.

I. NGUYÊN LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

Nguyên liệu

Các mẫu giun được thu thập từ 3 vùng sinh thái: Sapa, Ba Vì và Gia Lâm. Sau khi phân loại và định danh (Huỳnh Thị Kim Hối, Viện Sinh thái và Tài nguyên Sinh vật) các mẫu bao gồm 8 loài: *Pheretima posthuma*, *Pheretima morrisi* (Gia Lâm), *Perionyx excavatus* (Ba Vì, có nguồn gốc từ Mỹ), và các loài *Pheretima morrisi*, *Pheretima robusta*, *Pheretima wui*, *Pheretima californica*, *Pheretima manicata* được thu từ Sa Pa.

Phương pháp nghiên cứu

ADN tổng số của các loài giun được tách chiết theo phương pháp của Taylor (9). Đoạn ITS-1 được nhân bằng kỹ thuật PCR từ ADN tổng số với cặp mồi: ITS-1F và ITS-1R theo công bố trước đây (6). Tạo dòng phân tử ADN theo phương pháp đã công bố (6). Trình tự nucleotit của đoạn ITS-1 ở 8 mẫu giun được đọc trên máy tự động ABI PRISM 377 DNA Sequencer, sử dụng ABI PRISM Big Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit của hãng Perkin-Elmer. Dựa trên chương trình ClustalX Multiple

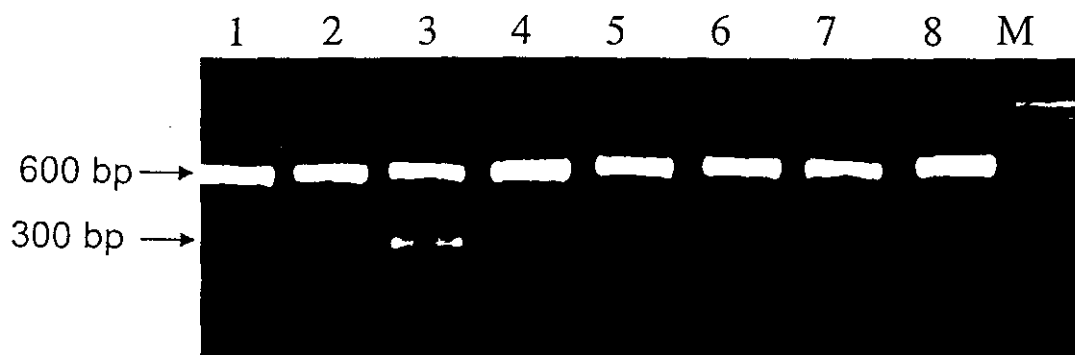
Sequence Alignment Program (version 1.81, June 2000) chúng tôi đã xây dựng cây phân loại của các loài giun nghiên cứu.

KẾT QUẢ

ADN tổng số của 8 loài giun tách được có chất lượng tốt, không bị đứt gãy, phù hợp cho việc nghiên cứu tách dòng gen tiếp sau (kết quả không chỉ ra ở đây).

PCR nhân đoạn ITS-1

Chúng tôi đã tiến hành nhân đoạn gen ITS-1 với cặp mồi đặc hiệu ITS-1F và ITS-1R. Sản phẩm PCR nhân đoạn gen ITS-1 ở cả 8 loài giun có kích thước khoảng 600 bp (hình 1). Kết quả này cũng phù hợp với các kết quả thu được ở các loài giun đất (Nematodes) đã được các tác giả khác công bố (10, 11, 12). Tuy nhiên trong số 8 mẫu giun phân tích, có 2 mẫu *Peryonix excavatus* (Ba Vi) và *Pheretima morrisi* (Sa Pa) ngoài sản phẩm chính có kích thước khoảng 600 bp còn xuất hiện một sản phẩm có kích thước khoảng 300 bp. Đây cũng có thể là một dạng đa hình của đoạn ITS-1 ở các loài giun đất mà chúng tôi nghiên cứu và cũng hoàn toàn phù hợp với các nghiên cứu của các tác giả khác trên thế giới với các loài giun đất khác nhau (10,11,12)



Hình 1. Sản phẩm PCR đoạn ITS-1 ở các loài giun phân tích

1. *Pheretima morrisi* GL; 2. *Pheretima wui*; 3. *Pheretima morrisi* SP; 4. *Pheretima posthuma*; 5. *Pheretima robusta*; 6. *Pheretima californica*; 7. *Pheretima manicata*; 8. *Peryonix excavatus*.

Chọn tạo dòng và đọc trình tự đoạn gen ITS-1

Sản phẩm PCR được gắn vào vector pCR®2.1 của hãng Invitrogen và biến nạp vào *E.coli* chủng DH5α. Sau khi chọn lọc, tách chiết và tinh sạch ADN plasmid chúng tôi đọc trình tự đoạn ITS-1 của cả 8 loài. Kết quả ở hình 2 cho thấy đoạn gen ITS-1 đọc được ở 8 loài giun đều có kích thước khoảng 600 nucleotit. Trong đó *Pheretima posthuma* (Gia lâm) có kích thước 580bp, *P. morrisi* (Gia Lâm) – 578 pb, *P. morrisi* (Sapa) – 587 bp, *P.*

robusta (SaPa) – 587 bp, *P. wui* (SaPa) – 575 bp, *P. californica* (Sa Pa) – 587 bp, *P. manicata* – 590 bp và *Perionyx excavatus* (Ba Vi) – 582 bp. So sánh trình tự đoạn gen ITS –1 của 8 loài giun nghiên cứu dựa vào phần mềm Clustal X đã được tiến hành (hình 2).

Kết quả đọc và so sánh trình tự cho thấy chiều dài đoạn ITS-1 của 8 loài giun nằm trong khoảng từ 575 đến 590 bp và có độ tương đồng 56,27%.

```

Pheretima_morrisi_SP_      TCCGTAGGTGAACCTGCGGAAGGATCATTACCGTAACGCTCGCTCGCTCG 50
Pheretima_wui              TCCGTAGGTGAACCTGCGGAAGGATCATTACCGTAACGCTCGCTCGCTCG 50
Pheretima_posthuma         TCCGTAGGTGAACCTGCGGAAGGATCATTACCGTAACGCTCGCTCGCTCG 50
Pheretima_morrisi_GL_      TCCGTAGGTGAACCTGCGGAAGGATCATTACCGTAACGCTCGCTCGCTCG 50
Pheretima_robusta          TCCGTAGGTGAACCTGCGGAAGGA-CATTACCGTAACGCTCGCTCGCTCG 49
Pheretima_carnifornica     TCCGTAGGTGAACCTGCGGAAGGATCATTACCGTAACGCTCGCTCGCTCG 50
Pheretima_manicata         TCCGTAGGTGAACCTGCGGAAGGATCATTACCGTAACGCTCGCTCGCTCG 50
Perionyx_excavatus         TCCGTAGGTGAACCTGCGGAAGGATCATTACCGGATTACAGCGATCGAC 50
*****

Pheretima_morrisi_SP_      GAAGGCTCGTCCGCCGGTGGGACGGCGAGCAGTTCAAACAGTGACGCAC 100
Pheretima_wui              GAAGGCTCGCCCGCGCGACGGGACGC--AGCAGTTCAAACAGAGT--CACAC 96
Pheretima_posthuma         GACGGTTCCGCCCGCGCGACGGGACGC--AGCAGTGCAAACAGTGAGTCAC 98
Pheretima_morrisi_GL_      GACGGTTCCGCCCGCGCGACGGGACGC--AGCAGTGCAAACAGTGAGTCAC 98
Pheretima_robusta          GACGGTTCCGCCCGCGCGTGGGACGC--AGCAGTGCAAACAGCGAGTCAC 97
Pheretima_carnifornica     GACGGCTCGCCCGCGCGGTGGGAAGC--AGCAGTGCAAACAGCGAGTCAC 98
Pheretima_manicata         GACGGCTCGCCCGCGCGACGGGACGC--AGCAGTGCAAACAGTGAGTCAC 98
Perionyx_excavatus         GATCGA-CTTCGGTTCGAGTCGAGACGGGATTATATGCAACAGACAG-CAC 98
*****

Pheretima_morrisi_SP_      AC----GGGAATCGAACGGCGCGCGG----TTCAACAAGCGTCCGGTCTCG 142
Pheretima_wui              AC----GGGAATCGAACGGCGCGCGG----TTCAACAAGCGTCCGGTCTCG 138
Pheretima_posthuma         ACA--CGGGAATCGAAGCGCGCGCGG----TTCAGCAAGCTTCCG-TCCCG 141
Pheretima_morrisi_GL_      ACA--CGGGAATCGAAGCGCGCGCGG----TTCAGCAAGCTTCCG-TCCCG 141
Pheretima_robusta          ACAATTGGGAATCGAAGCGCGCGCGG----TTCAGCAAGCGTCCGGTCTCG 143
Pheretima_carnifornica     ACATTTGGGAATCGAAGCGCGCGCGG----TTCAGCAAGCGTCCGGTCTCG 144
Pheretima_manicata         -----GGGAATCGAAGCGCGCGCGG----TTCAGCAAGCGTCCGGTCTCG 138
Perionyx_excavatus         AC----GGGAATCGAAGCGCGCGCGGTTTCTTCGATCGTCAAGCGCTCG 144
*****

Pheretima_morrisi_SP_      AAAGGACCGGACGGCGGTTCGACAGAAAGTACG-GCGCTGGCGTCCCGCTG 121
Pheretima_wui              AAAGGAC--GGACGGCGGTTCGACAGAAAG--ACG-ACCGTGGCGTCCCG-- 181
Pheretima_posthuma         AAAGGACGGGAAGGCGGTTCGACAGAAAGACGG--CCGTGACGTCTCTC-- 185
Pheretima_morrisi_GL_      AAAGGACCGGAAGGCGGTTCGACAGAAAGACGG--CCGTGACGTCTCTC-- 185
Pheretima_robusta          AAAGGACCGGACGGCGGTTCGACAGAAACATCG--GCCGCGGCGTCTTC-- 188
Pheretima_carnifornica     AAAGGACCGGCGGCGGTTCGACAGAAACATCG--GCCGCGGCGTCTTC-- 189
Pheretima_manicata         AAAGGACCGGACGGCGGTTCGACAGAAAGACGGCTGCTGGTCTCTCTC-- 185
Perionyx_excavatus         AAAGGGTTCCGGCGGCGGTTCGACAGCAGA--CCACGGTG----- 183
*****

Pheretima_morrisi_SP_      GACGTCTG-----CGGTGGAATCGATCGCGCGGCGCT-TACCACTGT 231
Pheretima_wui              GACGTCA-----CGGTGGAATCGATCGCGCGGCGCT-T-TACCACTGT 219
Pheretima_posthuma         GACGCCA-----CGGTAGAATCATTGCGCGGCGCT-TACCACTGT 225
Pheretima_morrisi_GL_      GACGCCA-----CGGTAGAATCATTGCGCGGCGCT-TACCACTGT 225
Pheretima_robusta          GACGTCTG-----CGGTGGAATCGAACGGCGGCGCT-TACCACTGT 228
Pheretima_carnifornica     GACGTCTG-----CGGTGGAATCGAACGGCGGCGCT-TACCACTGT 229
Pheretima_manicata         GTCGACGACGACGCGGCGGTGGAATCGC-TGGCGGCGCT-TACCACTGT 233
Perionyx_excavatus         -GTGTTG-----GATCGCGCGGACGCGGATCCGGTGT 214
*****

Pheretima_morrisi_SP_      CTATACGCAGTGGGTACCTGTCC-CGTTCCCGCC--CCGTGCGGTCTGGC 278
Pheretima_wui              CTAGACGCAGTGGGTACCTATTC-CGTTCCCGCC--CCGAGCGGTCTGGC 266
Pheretima_posthuma         CTCGACGCAGTGGGTACCTATTC-CGTTTGGCGCC--C-GTTCCG-CGGC 270
Pheretima_morrisi_GL_      CTCGACGCAGTGGGTACCTATTC-CGTTTGGCGCC--C-GTTCCG-CGGC 270
Pheretima_robusta          CTCGACGCAGTGGGTACCTGTCC-CGTTCCCGCC--C-GTTCCG-TGGC 273
Pheretima_carnifornica     CTCGACGCAGTGGGTACCTGTCC-CGTTCCCGCC--C-GTTCCG-TGGC 274
Pheretima_manicata         CTGGACGCAGTGGGTACCTGTCC-CGTTCTGCGCC--C-GTTCCG-CGGC 278
Perionyx_excavatus         C--GACGTTCCGGGTACCTGTCCGTGGCGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCG 262
*****

Pheretima_morrisi_SP_      GACGGGGA-GAGCATTGGCGGTGGCGGATCGTCTGGGATCCGA-TGC 326
Pheretima_wui              GACGGGGA-GAGCATTGGCGGTGGCGGATCGTCTGGGATCCGA-TGC 314
Pheretima_posthuma         GACGGGGA-GAGCATTGGCGGTGGCGGATCGTCTGGGATCCGA-TGT 318
Pheretima_morrisi_GL_      GACGGGGA-GAGCATTGGCGGTGGCGGATCGTCTGGGATCCGA-TGT 318
Pheretima_robusta          GACGGGGA-GAGCACTGGCGGTGGCGGAGCGTCTGGGATCCGA-TGT 321
Pheretima_carnifornica     GACGGGGAAGAGCATTGGCGGTGGCGGATCGTCTGGGATCCGA-TGT 323
Pheretima_manicata         GACGGGGA-GAGCATTGGCGGTGGCGGATCGTCTGGGATCCGA-TGT 326
Perionyx_excavatus         AGCTCGGGAGAGCAGGAGCGGTGGCGGATCGTCTGGGCGGTGGGAGCGC 312
*****

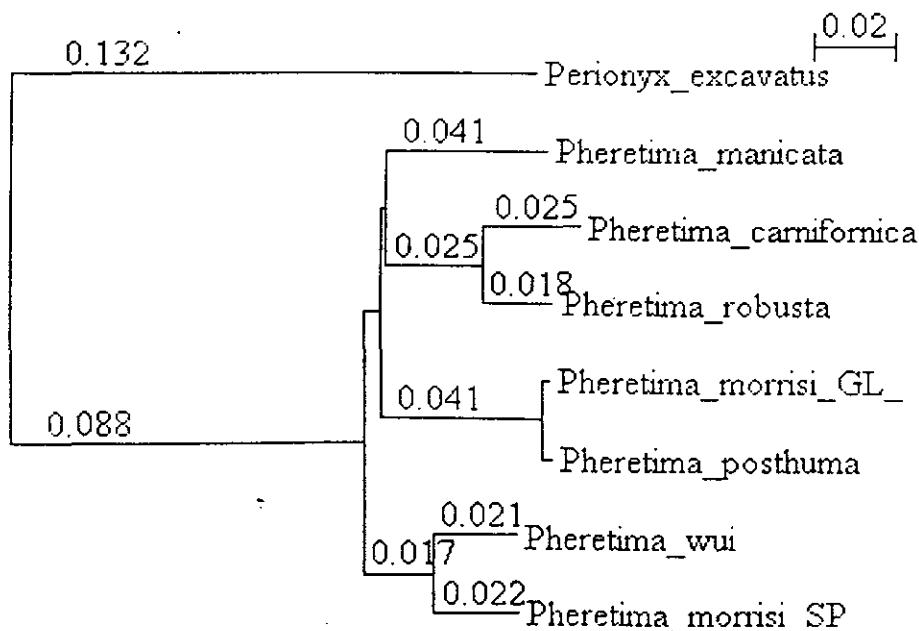
```


Pheretima_morrisoni_SP_	TTGTTTTTCTCAAACCTAATTTTC-----AAGACACCGAACGTTGGTGAA	462
Pheretima_wui	TTGTTTTTCTCAAACCTAATTTTC-----AAGACACCGAACGTTGGTGAA	450
Pheretima_posthuma	TCGTTTTTCTCAAAAACCTTATCTTTCT--CAAGACACCGAACGTTGGTGAA	457
Pheretima_morrisoni_GL_	TCGTTTTTCTCAAAAACCTTATCTTTCT--CAAGACACCGAACGTTGGTGAA	457
Pheretima_robusta	TCC-TTTTTTCTCAAACCTTTATTTT-----CGAGACACCGAACGTTGGTGAA	457
Pheretima_carnifornica	TCGGT-TTTTCTCAAACCTTTATTTT-----CGAGACACCGAACGTTGGTGAA	460
Pheretima_manicata	TCTTT-TTTTCTCAAACCTTTTCTTTTACGAGACACCGAACGTTGGTGAA	467
Perionyx_excavatus	TCGTTTTTCTG-----TTGTCACCT-----ACACCGAACGTTGGTGAA	449
	* *****	
Pheretima_morrisoni_SP_	C--GTTTCCAGTCTGGCCGTTG---CCGCTTCGGCGG--GTCTCG----	502
Pheretima_wui	C--GTTTCCAGTCTGGCCGTTG---CCGCTTCGGCGG--GTCTCG----	491
Pheretima_posthuma	C--GTTTCCAGTCTGGCCGTTG---CCGCTTCGGCGG--GTCTCG----	495
Pheretima_morrisoni_GL_	C--GTTTCCAGTCTGGCCGTTG---CCGCTTCGGCGG--GTCTCG----	495
Pheretima_robusta	C--GTTTCCAGTCTGGCCGTTG---CCGCTTCGGCGG--GTCTCG----	503
Pheretima_carnifornica	C--GTTTCCAGTCTGGCCGTTG---CCGCTTCGGCGG--GTCTCG----	503
Pheretima_manicata	C--GTAGCCAGTCTGACCGGTTG---CCGCTTCGGCGG--GTCTCA----	505
Perionyx_excavatus	CTGGCGTGTAGTGCTTCCTCGTCTGCTCTTCGACGTCGACGGAGGAGGA	499
Pheretima_morrisoni_SP_	CGACCGTCTTCGACGGAGAGACGAAACGTTGAAAAACACTCTTGGCCGGTG	552
Pheretima_wui	CGACCGTCTTCGAAAGGAGAGGCGAAGCTGAAAAACACTCTTGGCCGGTG	541
Pheretima_posthuma	CGACCGTCTTCGACGGAGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGG	545
Pheretima_morrisoni_GL_	CGACCGTCTTCGACGGAGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGG	544
Pheretima_robusta	CGACCGTCTTCGACGGAGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGG	552
Pheretima_carnifornica	CGACCGTCTTCGAAAGGAGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGG	553
Pheretima_manicata	CGACCGTCTTCGCTGGAGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGG	555
Perionyx_excavatus	GGACAGTCCGAATGCGGACAGACACTCTTGGAAA--CACTCTT--GGCCGGTG	547
	*** **	
Pheretima_morrisoni_SP_	GATCACTCGGTTCTGTCATCGATGAAGAAGCCGAGC	587
Pheretima_wui	GATCACTCGGTTCTG--GCATCGATGAAGAAGCCGAGC	575
Pheretima_posthuma	GATCACTCGGTTCTG--GCATCGATGAAGAAGCCGAGC	580
Pheretima_morrisoni_GL_	GATCACTCGGTTCTG--GCATCGATGAAGAAGCCGAGC	578
Pheretima_robusta	GATCACTCGGTTCTGTCATCGATGAAGAAGCCGAGC	587
Pheretima_carnifornica	GATCACTCGGTTCTG--GCATCGATGAAGAAGCCGAGC	587
Pheretima_manicata	GATCACTCGGTTCTGTCATCGATGAAGAAGCCGAGC	590
Perionyx_excavatus	GATCACTCGGTTCTGTCATCGATGAAGAAGCCGAGC	582

Hình 2: Trình tự nucleotit của đoạn ITS-1 ở 8 loài giun được nghiên cứu

Mối quan hệ giữa các loài giun

Kết quả xác định mối quan hệ di truyền giữa 8 loài giun phân tích được chỉ ra trên hình 3.



Hình 3: Mối quan hệ di truyền giữa 8 loài giun được nghiên cứu

Hình 3 cho thấy 8 loài giun phân tích được chia thành 2 nhánh chính. Nhánh 1 gồm *Perionyx excavatus* có hệ số di truyền là 0,132. Nhánh 2 thuộc chi *Pheretima* có hệ số di truyền 0,088 được chia thành 2 nhánh phụ lớn. Nhánh phụ thứ 1 gồm 5 loài *P. manicata* (0,041), *P. californica* (0,025); *P. robusta* (0,018); 2 loài *P. morrisi* GL và *P. posthuma* có cùng khoảng cách di truyền 0,41. Nhánh phụ thứ 2 gồm loài *P. wui* (0,021) và *P. morrisi* SP (0,022). Như vậy bằng cách so sánh trình tự nucleotit của đoạn gen ITS-1 chúng tôi đã xác định được mối quan hệ di truyền giữa 8 loài giun đất được nghiên cứu.

THẢO LUẬN

Rõ ràng là phân loại sinh học là một ngành khoa học có ý nghĩa thực tiễn rất lớn, nhờ vào kết quả của phân loại học người ta có thể xác định được những loài có cùng nguồn gốc hoặc có mối quan hệ di truyền gần gũi nhau. Kết quả thu được từ nhiều nghiên cứu cho thấy các loài có mối quan hệ càng gần gũi nhau về mặt di truyền sẽ có nhiều đặc điểm tương đồng không chỉ về mặt hình thái mà ở mức độ phân tử như ADN, hệ protein, enzym và các sản phẩm khác được tạo ra trong quá trình trao đổi chất. Điều này làm cơ sở cho việc tìm kiếm, lựa chọn và khai thác các loài sinh vật có mối quan hệ gần nhau, như là một biện pháp thay thế loài chuẩn ban đầu, đặc biệt đối với những loài quý hiếm hoặc phạm vi phân bố chúng phụ thuộc chặt chẽ vào điều kiện địa lý.

Nghiên cứu của tác giả Lý Thị Bích Thuỷ và CS. (5) về tách chiết Protein tổng số và xác định sơ bộ hoạt tính Lumbrokinase ở một số loài giun đất của Việt Nam theo phương pháp của Mihara (7, 8) đã cho thấy, hoạt tính Lumbrokinase ở Giun Quế (*Perionyx excavatus*) là cao nhất - 20,2 (UI/mg protein), sau đó đến loài *Pheretima posthuma* (Gia lâm), *P. wui* (Ba Vì), *P. morisi* (Gia Lâm) ở mức trung bình khoảng từ 14-15 (UI/mg protein). Các loài *P. posthuma* (Ba Vì), *P. morrisi* (Ba Vì) và *P. aspergillum* (Ba Vì) có hoạt tính thấp nằm trong khoảng 3-7 (UI/mg protein). Như vậy, hoạt tính Lumbrokinase biểu hiện lớn nhất ở loài *Peryonyx excavatus* và hoạt tính Lumbrokinase giữa các loài giun đất đã được nghiên cứu cũng phản ánh tương đồng như mối quan hệ di truyền giữa các loài thu được qua việc so sánh trình tự nucleotit của đoạn gen ITS-1. Tính đa hình của đoạn ITS-1 ở 8 loài giun thể hiện: 1/ 2 trên 8 loài giun có đoạn ITS-1 gồm 2 băng (300 và 600 bp), trong khi các loài còn lại chỉ có 1 băng 600 bp (Hình 1); 2/ kích thước đoạn ITS-1 của 8 loài giun thay đổi từ 575 đến 590 bp (hình 2); 3/ Sự khác biệt về mặt di truyền giữa 8 loài đạt đến 43,73%; 4/ So sánh trình tự đoạn ITS-1 có kích thước 271 bp của *Peryonyx excavatus* và 241 bp của *Pheretima morrisi* SP có độ tương đồng là 46,12% (kết quả không chỉ ra ở đây).

Kết quả thu được trong bài báo này sẽ giúp ích cho việc định hướng sử dụng các nguồn giun đất của miền Bắc Việt Nam trong việc khai thác nguồn Lumbrokinase phục vụ cho dược phẩm.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Viện chăn nuôi, Trung tâm nghiên cứu Dê và Thỏ Sơn Tây. Kỹ thuật nuôi giun đất. Tài liệu tập huấn cho nông dân do Đại sứ quán Anh tại Việt Nam tài trợ, Hà Tây-1999

2. Gooneratne R., Shaw W., Dalton P., 1999. "*Neurotoxicity measurments in earthworms*. S-44. The Fourth Princess Chulahorn International Science Congress Chemical in the 21st Century, 28 Nov. – 2. Dec., 1999, Bangkok, Thailand. p.90.

3. Huynh Kim Hoi. "*Ecological impact threshold of universal pesticide dose on earthworms in vegetable – growing areas*". The Fourth Princess Chulahorn International Science Congress Chemical in the 21st Century, 28 Nov. – 2. Dec., 1999, Bangkok, Thailand. Pa-5. P.273

4. Huỳnh Thị Kim Hối. "*Khu hệ giun đất phía nam miền Trung Việt Nam*". Luận án PTS. Khoa học sinh học, 1996.

5. Lý Thị Bích Thủy, Nguyễn Trường Giang, Nguyễn Thị Ngọc Dao, 2002. "*Hoạt tính thủy phân fibrin của enzyme tách từ một số loài giun đất Việt Nam*". Báo cáo tổng kết đề tài năm 2002.

6. Đặng Diễm Hồng, Hoàng Minh Hiền, Phạm Ngọc Sơn, Nguyễn Đức Bách, Nguyễn Văn Đồng. 2002. "*So sánh trình tự nucleotit của đoạn ITS-1 của một số loài tảo biến Việt Nam*". Tạp chí Khoa học và công nghệ. Tập 40, Số ĐB, 2002, trang 161-167.

7. Mihara H., et al., 1991. "*A novel fibrinolytic enzyme extracted from the earthworm, Lumbricus rubellus*". Jpn J. Physiol 1991; 41 (3): 461-472

8. Nakajima, N., Mihara, H., ADN Sumi, H., 1993. "*Characterization of potent fibrinolytic enzymes in Earthworm, Lumbricus rubellus*". Biosci. Biotechnol. Biochem., 57, 1726-1730.

9. Taylor, D.B., A.L. Szalanski, ADN R.D. Peterson II. 1996. "*Identification of screwworm soecies (Diptera Calliphoridae) by polymerase chain reaction- restriction fragment length polymorphism*". Med. Vet. Entomol. 10: 63-70.

10. Wang X., Bosselut N., Reynal B., Castagnone .C., Voisin R., Abad P. ADN Esmenjaud D., 2002. "*PCR identification of single individual of the longidorid nematodes Xiplinema Index, X. diversicaudatum ADN X. vuittenezi using specific primer from ribosomal gene*". Nematology, Volume 4, N-5, Issue Jul 2002. P. 627-629.

11. Power, T.O., T.C. Told, A.M. Burnell, P.C.B. Murray, C.c. Fleming, A.L. szalanski, B.a. Adams ADN T.S. Harris, 1997. "The internal transcribed

spacer region as a taxonomic marker for neamtodes. J. of Nematology 29: 441-450.

12. Szalanski,A.L., D.D. Sui, T.S. Harris, ADN T.O. Powers.1997. "Identification of cyst nematodes of agronomic ADN regulatory concern by PCR – RFLP of ITS-1. J. Nematol. 29: 255-267.

Hà nội, ngày 10 tháng 12 năm 2003

Chủ nhiệm đề tài nhánh

A handwritten signature in black ink, appearing to read "Đặng Diễm Hồng", with a long horizontal stroke extending to the right.

TS. Đặng Diễm Hồng

QUY TRÌNH
TÁCH ĐỒNG GEN MÃ HÓA CHẤT MANG CÓ ÁI LỰC
VỚI TẾ BÀO LYMPHO UNG THƯ MÁU

NGƯỜI CHỦ TRÌ: TS. LÊ QUANG HUẤN

HÀ NỘI - 2004

Sử dụng các kháng thể đơn dòng có bản chất của người ở dạng tái tổ hợp ngày càng được ưa chuộng do các ưu điểm của chúng so với các kháng thể đơn dòng và kháng thể đa dòng thông thường [Clackson và cs., 1994; Burton và cs., 1994; Rozemuller và cs., 2001; Roovers và cs., 2001]. Ví dụ, việc tạo kháng thể theo phương pháp thông thường đòi hỏi động vật thí nghiệm phải được kiểm soát chặt chẽ, trong khi đó việc tạo các kháng thể tái tổ hợp nhờ phage (gọi tắt là kháng thể phage) không cần tới động vật thí nghiệm. Hơn nữa việc sản xuất các kháng thể tái tổ hợp nhanh hơn rất nhiều so với phương pháp tạo kháng thể thông thường và các kháng thể phage có thể được tạo ra để kháng lại nhiều loại kháng nguyên. Theo phương pháp thông thường, nhiều kháng nguyên không có khả năng sinh kháng thể hoặc rất độc đối với cơ thể động vật do đó chúng không thể sử dụng để tạo kháng thể trong động vật thí nghiệm. Hơn nữa, việc điều chỉnh ái lực (chẳng hạn làm tăng ái lực và tính đặc hiệu) của các kháng thể phage rất đơn giản và khá nhanh. Và cuối cùng, một lượng lớn các kháng thể khác nhau kháng lại một kháng nguyên cụ thể có thể tạo ra trong một vòng sàng lọc.

Sử dụng kỹ thuật phage, các nhà khoa học đã tạo ra rất nhiều đoạn kháng thể đơn dòng có nguồn gốc từ người ở dạng tái tổ hợp có khả năng kháng lại một lượng lớn các loại kháng nguyên khác nhau, chẳng hạn ARN, các kháng nguyên protein khác nhau, các peptit, các proteoglycans...

Sau đây chúng tôi trình bày quy trình tách dòng gen chất mang có ái lực cao với tế bào lympho tách từ máu bệnh nhân ung thư dạng Hodgkin.

QUY TRÌNH TÁCH DÒNG CHẤT MANG CÓ ẢI LỰC VỚI TẾ BÀO LYMPHO UNG THƯ MÁU

Phương pháp tách lớp tế bào

1. Dùng pipet hút 300 μ l máu vào ependofd 1,5ml, sau đó cho 1,2ml dung dịch 3% gelatin, lắc đều. Đặt nghiêng 45⁰ trong tủ ấm 37⁰C, 20 phút, sau đó ủ 90⁰C trong 5 phút.
2. Hút 2/3 lớp dịch phía trên sang một ependofd mới, bổ sung lượng dung dịch Hanks tương đương, ly tâm 2000v/p, 5 phút. Hút bỏ dịch ly tâm.
3. Tế bào được rửa lại với dung dịch Hanks thêm vài lần. Sau đó tế bào được hoà trong 300 μ l dung dịch Hanks và được lọc qua lớp bông đã rửa trước với dung dịch Hanks.

Phương pháp sàng lọc phage

1. Các tế bào lympho sau khi tách lớp được rửa 3 lần với dung dịch PBS, sau đó tế bào được hoà lại trong PBS trong ống eppendof. Sau khi bổ sung dịch phage vào ống eppendof chứa tế bào lympho, ống dung dịch tế bào và dịch phage được lắc nhẹ nhàng 2 giờ ở nhiệt độ phòng.
2. Ly tâm 1000v/p trong 5 phút. Rửa tủa 15 lần bằng dung dịch 2% Skim milk pha trong PBS, rửa tiếp 15 lần với dung dịch PBS 1X để loại bỏ các phage không gắn kết với tế bào.
3. Các phage gắn kết với tế bào sau đó được giải hấp với 0,8ml 100mM Triethylamine để 10 phút ở nhiệt độ phòng, sau đó trung hoà ngay bằng 0,4ml Tris-HCL, pH=7,5. Ly tâm 10 000 vòng/phút, thời gian 10 phút. Thu dịch ly tâm.

Phương pháp tách ADN phage

1. Nuôi tế bào *E.coli* chủng TG1 chứa phagemid trong 500ml môi trường 2x TY có ampicillin (50 μ g/ml) cho tới khi OD₆₀₀ = 0,4.
2. Bổ sung 2,5ml chloramphenicol (34mg/ml trong ethanol), nuôi tiếp từ 12 giờ đến 16 giờ ở 37⁰C.
3. Ly tâm thu tế bào, hoà tế bào trong 100ml STE (0,1 M NaCl, 10mM Tris-HCL, pH=8, 1mMEDTA), sau đó ly tâm thu tế bào.

4. Tách ADN phagemid theo phương pháp tách chiết ADN plasmid thông thường, tuy nhiên trong khi phá tế bào có bổ sung dung dịch lysozim sao cho nồng độ cuối cùng là 1mg/ml.

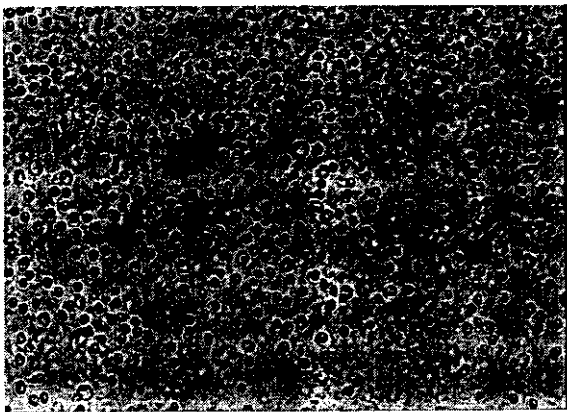
Phương pháp ELISA

1. Sử dụng 100µl dịch kháng thể phage vào mỗi giếng của khay thử 96 lỗ, phủ khay qua đêm ở nhiệt độ phòng.
2. Rửa khay 5 lần với PBS, làm khô trên giấy thấm. Bổ sung vào mỗi giếng 300 µl MPBS, ủ 2 giờ ở 37⁰C, rửa 5 lần với PBS, làm khô.
3. Thêm 200µl kháng thể 1 (mẫu huyết thanh bệnh phẩm vào mỗi giếng), ủ 90 phút ở nhiệt độ phòng. Rửa 5 lần với T-PBS (PBS+Tween 20), 5 lần với PBS.
4. Thêm 200µl kháng thể cộng hợp, để 90 phút ở nhiệt độ phòng. Rửa 5 lần với T-PBS (PBS+Tween 20), 5 lần với PBS.
5. Thêm vào mỗi giếng 100µl TMB, để 10 phút ở nhiệt độ phòng. Bổ sung 50µl H₂SO₄ 2N
6. Xác định độ hấp thụ tại bước sóng 450nm và 650nm.

THÍ DỤ VỀ TÁCH DÒNG GEN MÃ HÓA CHẤT MANG CÓ ÁI LỰC CAO VỚI TẾ BÀO LYMPHO TÁCH TỪ BỆNH NHÂN UNG THƯ DẠNG HODGKIN

Kết quả sàng lọc các phage

Từ mẫu máu bệnh phẩm, các tế bào lympho phân tách theo quy trình tách lớp tế bào (phân phương pháp) đã được kiểm tra trên kính hiển vi Olympus ta thấy các tế bào còn nguyên vẹn, đều nhau như hình sau:



Hình 1: *Các tế bào lympho tách từ máu bệnh nhân ung thư dạng Hodgkin*

Các tế bào lympho tách được đều nguyên vẹn không bị vỡ

Kết quả ELISA

Các phage với sự bộc lộ các đoạn kháng thể trên bề mặt được xác định hoạt tính ái lực các tế bào lympho tách từ máu bệnh ung thư dạng Hodgkin được kiểm tra bằng phản ứng ELISA(bảng 1).

Bảng 1: Kết quả xác định hoạt tính liên kết của kháng thể phage với các tế bào mang kháng nguyên đặc trưng cho bệnh ung thư máu dạng Hodgkin khi đo ở bước sóng 450nm

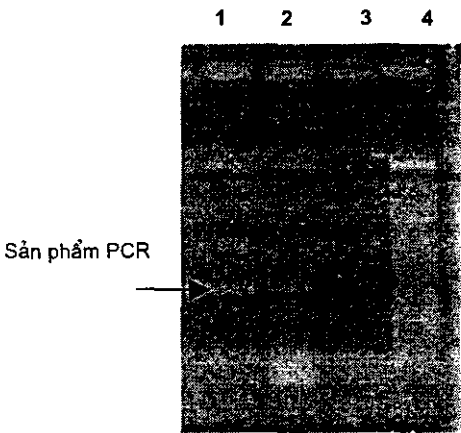
Measurement count: 1 Filter: 450		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
A				0.111	0.104	0.086	0.098	0.156	0.091	0.109	0.095
B				0.100	0.095	0.099	0.100	0.100	0.096	0.096	0.098
C				0.103	0.094	0.096	0.096	0.097	0.094	0.102	0.099
D				0.125	0.102	0.106	0.099	0.100	0.096	0.106	0.099
E				0.112	0.100	0.099	0.103	0.101	0.104	0.094	0.095
F				0.171	0.094	0.215	0.108	0.099	0.100	0.101	0.100
G				0.102	0.099	0.165	0.172	0.102	0.100	0.096	0.101
H				0.103	0.100	0.106	0.097	0.098	0.100	0.099	0.098

Tách dòng gen mã hoá kháng thể từ các hạt phage đã sàng lọc

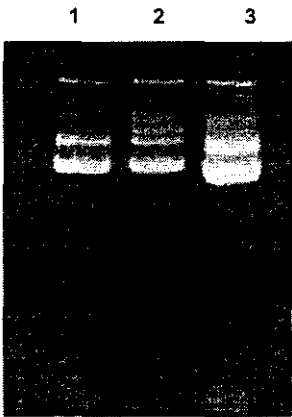
ADN phage được sử dụng làm khuôn để nhân bản đoạn gen mã hoá đoạn kháng thể bằng phản ứng PCR với cặp mồi LABF/LABR:

LABF: 5'-CAGGAAACAGCTATGAC-3' và LABR: 5'-GAATTTTCTGTATGAGG-3'

Kết quả nhân bản PCR đoạn gen mã hoá kháng thể khi kiểm tra bằng điện di trên gel agarose 1% (hình 2) và ADN plasmid (vector tách dòng pCR®2.1-TOPO) mang sản phẩm PCR (3).



Hình 2: Ảnh điện di sản phẩm PCR trên gel agarose 1%.



Hình 3: Ảnh điện di các DNA phagemid

- Giếng 1, 2 là các DNA phagemid từ giếng G6 và F5 tương ứng
- Giếng 3: vector không chứa các gen mã hoá các đoạn kháng thể.

Kết quả xác định trình tự gen mã hoá các kháng thể phage đã sàng lọc

Sản phẩm PCR nhận được khi sử dụng ADN phagemid của các hạt phage chọn lọc sau 4 vòng sàng lọc đã được xác định trình tự nucleotit như sau:

Trình tự nucleotit của phage trong giếng F5 gồm 504 nucleotit:

```
GCCCAGCCGGCCATGGCCCAGGTGCAGCCGGTGCAGTCTGGGGCTGAGGTGAAGAAGCC
TGGGGCCTCAGTGAAGGTTTCCTGCAAGGCATCTGGATACACCTACACCAGCTACTATA
TGCACTGGGTGCGACAGGCCCTGGACAAGGGCTTGAGTGGATGGGAATAATCAACTCG
AGTGGTGGAGGCGGTTCAAGGCGGAGGTGGCTCTGGCGGTAGTGCACCTCAGTCTGTGCT
GACGCAGCCGCCCTCAGTGTCTGCGGCCCCAGGACAGAAGGTCACCATCTCCTGCTCTG
GAAGCAGCTCCACATTGGGAATAATTATGTATCCTGGTACCAGCAGCTCCCAGGAACA
GCCCCCAAACCTCCTCATTTATGACAATAATAAGCGACCCTCATGGATTCTGACCGATT
CTCTGGCTCCAAGTCTGGCACGTCAGCCACCCTGGGCATCACCGGACTCCAGAATGGGG
ACGAGGGCCGATTATTAGTGCGGAACATGGGATAG
```

Khi dịch ra protein ta có trình tự của 168 amino acid như sau:

```
AQPAMAQVQVPVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTYTSYYMHWVRQAPGQGLEWMGIINS
SGGGSGGGSGGSALQSVLTQPPSVSAAPGQKVTISCSGSSSHIGNNYVSWYQQLPGT
APKLLIYDNNKRPSWIPDRFSGSKSGTSATLGITGLQNGDEGRLLVRNMG.
```

Xét theo trình tự amino acid thì 58 amino acid đầu tiên là vùng biến đổi của chuỗi nặng (VH), và 95 amino acid, từ vị trí 74 đến vị trí 168 là vùng biến đổi của chuỗi nhẹ. Hai vùng biến đổi của chuỗi nặng và chuỗi nhẹ được nối với nhau bằng đoạn polypeptide gồm các amino acid đặc trưng: GGGSGGGGS.

Trong khi đó trình tự nucleotit của các hạt phage nhận được từ giếng G6 có ái lực thấp hơn so với các hạt phage nhận được từ giếng F5 (bảng 1) ngắn hơn, chúng chỉ chứa vùng gen mã hoá cho trình tự nối và trình tự vùng biến đổi của chuỗi nhẹ (VL), cụ thể như sau:

Trình tự nucleotit của phage trong giếng G6 gồm 396 nucleotit:

```
CCCAGCCGGCCATGTGGTGGAGGCGGTTCAAGGCGGAGGTGGCTCTGGCGGTAGTGCAC
TGAGATTGTGATGACCCAGACTCCACTCTCCTCGCCTGTCACCCTTGGACAGCCGGCCT
CCATCTCCTTCAGGTCTAGTCAAAGCCTCGTACACAGTGATGGAAACACCTACTTGAGT
TGGCTTCAGCAGAGGCCAGGTCAGCCTCCAAGACTCCTAATTTATAAGGTTTCTAACCG
GTTCTCTGGGGTCCCAGACAGATTCAGTGGCAGTGGGGCAGGGACAGATTTCACTGA
AAATCAGCAGGGTGGAGGCTGAGGATGTTGGGGTTTATTACTGCATGCGAGGTACACAC
TGGCGCACGTTTCGGCCAAGGGACCAAGGTGGAAATCAAACGT
```

Khi dịch ra protein ta có trình tự của 132 amino acid như sau:

```
PSRPCGGGGSGGGSGGSALEIVMTQTPLSSPVTLGQPASISFRSSQSLVHSDGNTYLS
WLQQRPGQPPRLIYKVSNRFSGVDPDRFSGSGAGTDFTLKISRVEAEDVGVIYCMRGTH
WRTFGQGTKVEIKR
```

Amino acid từ vị trí số 6 đến vị trí 18 là trình tự của đoạn nối, còn amino acid từ vị trí thứ 19 đến vị trí 132 là trình tự vùng biến đổi của chuỗi nhẹ.

KẾT LUẬN

1. Kháng thể phage kháng lại các tế bào lympho tách từ bệnh nhân mắc bệnh ung thư máu dạng Hodgkin có thể thu nhận bằng cách sàng lọc trực tiếp trên tế bào lympho với quy trình đã nêu ở trên.
2. Các phage mang kháng thể có ái lực cao với các tế bào lympho tách từ máu bệnh nhân mắc bệnh Hodgkin's có thể kiểm tra bằng phản ứng ELISA.
3. Trình tự gen mã hoá cho kháng thể phage kháng lại các tế bào lympho tách từ bệnh nhân mắc bệnh Hodgkin's mà chúng tôi thu được có kích thước là 504 nucleotit mã hoá cho 168 amino acid đối với trường hợp phage mang cả 2 đoạn gen mã hoá cho vùng biến đổi của chuỗi nặng và chuỗi nhẹ.
4. Trường hợp phage chỉ mang gen mã hoá cho một chuỗi nhẹ và đoạn liên kết (G6) mà chúng tôi thu được có kích thước 396 nucleotit mã hoá cho 132 amino acid.

QUY TRÌNH
TÁCH GEN MELITTIN TỪ ONG MẬT

NGƯỜI CHỦ TRÌ: TS. LÊ QUANG HUẤN

HÀ NỘI - 2004

Khai thác nguồn dược liệu tự nhiên từ tài nguyên sinh vật Việt Nam là một trong những hướng ưu tiên của nhiều chương trình nghiên cứu khoa học nhằm đáp ứng nhu cầu thuốc chữa bệnh ngày một tăng. Đặc biệt đối với các loại thuốc đặc trị những bệnh hiểm nghèo như bệnh cúm, ho lao, sốt rét, ung thư, viêm màng não, viêm gan, AIDS...

Khai thác và sử dụng các protein, peptit và các hợp chất phi protein... có hoạt tính sinh dược cao từ nguồn tài nguyên phong phú của Việt nam để điều chế các loại thuốc đặc trị góp phần chăm sóc và bảo vệ sức khỏe cộng đồng đang là một trong những hướng nghiên cứu được ưu tiên ở nhiều phòng thí nghiệm. Trong đó nhóm chất hoạt tính sinh học cao có bản chất protein như các protein ức chế ribosome (RIPs), các peptit có hoạt tính kháng khuẩn cao, các peptit độc hại tế bào (cytolytic peptides) được chú trọng hơn cả.

Tuy nhiên việc tách chiết melittin trực tiếp từ nọc ong đòi hỏi các thiết bị chuyên dụng, đắt tiền. Hơn nữa, melittin chỉ chiếm khoảng 40% tổng các chất có trong nọc ong mật nên hiện chưa có một quy trình tách chiết melittin có hiệu quả kinh tế. Vì vậy, việc tạo melittin tái tổ hợp bằng công nghệ gen là một hướng nghiên cứu có nhiều triển vọng đáp ứng đủ nhu cầu về melittin để điều chế các loại thuốc đặc trị.

Melittin, một cytolytic peptide được cấu tạo bởi 26 gốc ammino acid GIGAVLKVLTTGLPALISWIKRKRQQ. Theo kết quả nghiên cứu của nhiều tác giả trên thế giới melittin là một peptit làm tan tế bào (cytolytic peptide). Các nghiên cứu về sự tương tác của melittin với màng tế bào đã chứng minh rằng các phân tử melittin tập trung trên bề mặt màng và phá vỡ nhiều dạng màng tế bào kể cả màng liposome ở nồng độ rất thấp (nanomol).

Để thu nhận melittin tái tổ hợp và hướng peptide này tới các tế bào đích khi ứng dụng trong điều trị bệnh chúng tôi tiến hành nghiên cứu “Phân lập, tách dòng gen mã hoá cho melittin” cho các nghiên cứu tiếp theo. Sau đây chúng tôi trình bày tóm tắt quy trình thu nhận gen mã hóa melittin từ một số loài ong (ong mật, ong vàng) phân lập tại Hà Nội.

Dựa trên trình tự nucleotit mã hoá cho promelittin mà Vlasak và cộng sự (1983) đã công bố chúng tôi đã thiết kế cặp mồi để tách dòng gen mã hoá cho melittin từ ong vàng *Polistes sp* và ong mật *Apis mellifera*

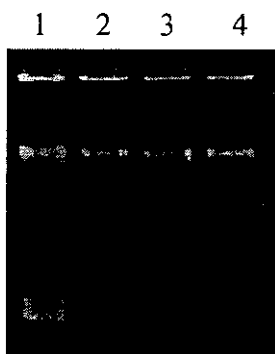
QUY TRÌNH TÁCH DÒNG GEN MELITTIN

1. Ong non và nhộng được thu nhận ở dạng tươi, làm lạnh ngay trong nitơ lỏng. Nghiền khoảng 200mg đến 1gam mẫu bằng cối chày sứ đã được làm lạnh trước.
2. Hoà mẫu đã nghiền trong 1,2 ml đệm chiết cho 100mg mẫu. (Đệm chiết có thành phần: 100mM NaCl + 10mM Tris-HCl, pH 8,0 + 25mM EDTA, pH 8,0 + 0.5% (w/v) SDS + 0.1 mg/ml proteinnase K).
3. Ủ mẫu nghiền ở 50⁰C, thời gian 2-5 giờ, lắc nhẹ.
4. Thêm một thể tích tương đương dung dịch chiết: phenol/chloroform/isoamyl alcohol (25:24:1). Ly tâm 5000vòng/phút.
5. Chuyển lớp trên vào ống Eppendorf mới, bổ sung 1/2 thể tích dung dịch 7,5 M ammonium acetate và 2 thể tích cồn 100% để -20⁰C từ 1 giờ tới qua đêm.
6. Ly tâm 10 000 vòng trên phút trong 10 phút, ở 4⁰C. Rửa mẫu ADN thu được trong 1ml cồn 70%, ly tâm thu mẫu, làm khô mẫu trong bốc cất 5-10 phút. Hoà mẫu ADN trong đệm TE nồng độ khoảng 1mg/ml.
7. Loại ARN bằng cách bổ sung 0.1% SDS và 1µg/ml DNase-free RNaza, ủ 1 giờ ở 37⁰C.
8. Nhân bản gen melittin bằng phản ứng PCR với ADN khuôn là ADN tổng số của ong vàng, ong mật với cặp mồi PrMF: 5'-ggaaggaag gaaggaagcg atcg-3' và PrMR: 5'-ccgactaacctgttgctcttacg-3'. Thành phần của phản ứng PCR như sau: 2,5 µl Taq Buffer 10X, 2,0µl 25 mM MgCl₂, 2,5µl 100 mM dNTP, 1,0 µl 10 µM Mỗi PRMF, 1,0 µl 10 µM Mỗi PRMR, 2,0µl 10ng/µl ADN, 0,4µl 5U/µl Taq ADN-polymeraza và 13,6µl nước khử ion.
9. Phản ứng PCR được tiến hành trong máy chu kỳ nhiệt GeneCyclerTM (Biorad) theo chương trình sau: 94⁰C 3 phút, 30 chu kỳ: (94⁰C 1 phút, 52⁰C 50 giây, 72⁰C 1 phút 30 giây), 72⁰C 5 phút.
10. Lấy 5 µl sản phẩm PCR để kiểm tra bằng điện di gel agarosa 1 %.
11. Gắn sản phẩm PCR vào vectơ tách dòng pCR®2.1 theo thành phần sau: 6 µl H₂O, 1 µl dung dịch đệm ligase 10x, 1 µl sản phẩm PCR, 1 µl vector pCR®2.1, 1 µl enzyme ligase. Hỗn hợp phản ứng được ủ ở nhiệt độ 12⁰C, thời gian 10-12 giờ.

12. Sản phẩm gắn sản phẩm PCR vào vectơ được biến nạp vào vi khuẩn *E. coli* chủng DH5 α .
13. Vi khuẩn biến nạp được nuôi qua đêm trên môi trường chứa ampicillin (nồng độ 100 μ l/ml), IPTG và X-gal.
14. Chọn các khuẩn lạc màu trắng để nuôi cấy trong 2ml môi trường LB ở 37 $^{\circ}$ C, thời gian 10-12 giờ.
15. Ly tâm 5000 vòng/phút thu nhận tế bào để tách DNA plasmid phục vụ cho việc xác định trình tự nucleotide của sản phẩm PCR.

Thí dụ về kết quả tách dòng gen melittin từ ong mật

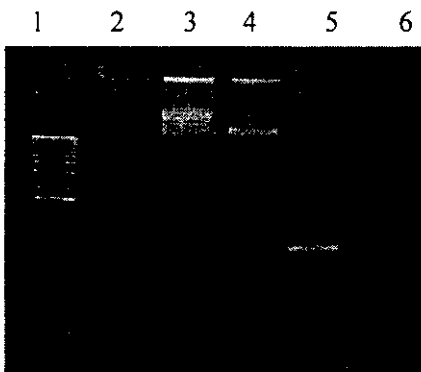
1. Kết quả tách ADN tổng số từ ong non khi sử dụng quy trình trên:



Ảnh điện di ADN tách từ ong non trên gel agarosa 1%

- Giếng 1: ADN tách từ ong non trước khi loại bỏ ARN
 Giếng 2: ADN tách từ nhộng ong trước khi loại bỏ ARN
 Giếng 3: ADN tách từ ong non sau khi loại bỏ ARN
 Giếng 4: ADN tách từ nhộng non sau khi loại bỏ ARN

2. Sản phẩm PCR được kiểm tra bằng điện di trên gel agarosa 1 %

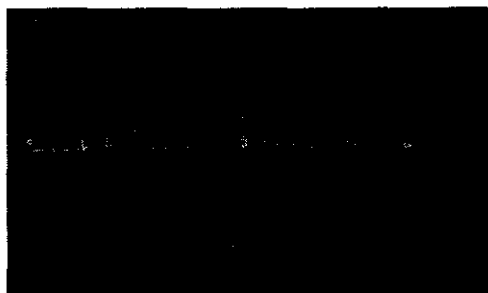


Hình 2: Điện di kiểm tra sản phẩm PCR

- Giếng 1: Marker ADN
 Giếng 2: Sản phẩm PCR (không có ADN khuôn)
 Giếng 6: Sản phẩm PCR có khuôn ADN ong vàng

3. Kết quả tách dòng gen melittin

1 2 3 4 5 6



Ảnh điện di kiểm tra ADN plasmit tái tổ hợp cắt bằng enzym giới hạn EcoRI.

Giếng 1-5: ADN plasmit cắt bằng enzym EcoRI

Giếng 6: Marker ADN

4. Kết quả xác định trình tự gen melittin

OMAT	-	GTACATTTCTTACATCTATGCGGCCCTGAACCAGAACCGGCACCGGAGG	-50
MATUMELI	-	GCCCCTGAACCGGAACCGGCACCAGAGC	-28
OMAT	-	CAGAGGCAGAGGCAGACGCGGAGGCAGTAAGTCGAAAAAGATTCCTATTT	-100
MATUMELI	-	CAGAGGCGGAGGCAGACGCGGAGGCAG-----	-56
OMAT	-	CCTTCTTACGATTCTTAATCTTCTCCTTAATCGTTAATAAGTTTTTCAGAG	-150
MATUMELI	-	-----	-56
OMAT	-	GACCTAAAGAAAAAACACATCGACCATATTTAATTGCCACGCTCATATC	-200
MATUMELI	-	-----	-56
OMAT	-	CATAGCAAAATTAACTTGGTCGCAATTCGATCGATTTTATAACGCGTGT	-250
MATUMELI	-	-----	-56
OMAT	-	GCGTGTTTTTCCTTCAGGATCCGGAAGCAGGGATTGGAGCAGTTCTCAA	-300
MATUMELI	-	-----TCCGGAAGCGGGAATTGGAGCAGTTCTGAAG	-87
OMAT	-	GTATTAACCACAGGATTGCCTGCCCTTATAAGTTGGATTAAACGTAAGAG	-350
MATUMELI	-	GTATTAACCACAGGATTGCCCGCCCTCATAAGTTGGATTAAACGTAAGAG	-137
OMAT	-	GCAACAGGGTTAGT	- 364
MATUMELI	-	GCAACAGGGTTAGT	-151

*OMAT: Trình tự nucleotit của sản phẩm PCR

*MATUMELI: Trình tự nucleotit mà Vlasak và cs đã công bố 1983.

KẾT LUẬN

1. Sản phẩm PCR được nhân bản từ ADN tổng số của ong vàng có kích thước là 242 bp và có sự tương đồng thấp (64,46%) khi so với trình tự gen mã hoá cho melittin đã được công bố trong Ngân hàng gen quốc tế.
2. Trình tự nucleotit đoạn ADN của sản phẩm PCR tách từ ong mật *Apis cerana* được xác định là 364bp và có sự tương đồng cao (92,72%) so với trình tự gen mã hoá cho melittin đã được công bố trong Ngân hàng gen quốc tế.
3. Trình tự nucleotit của phần mã hoá cho melittin trưởng thành không bị biến đổi sau quá trình dịch mã nghĩa là không có sự khác biệt giữa ADN genom và mARN và có thể nhân bản trực tiếp từ ADN genom của ong mật, *Apis cerana* cũng như từ ong vàng *Polistes sp.*
4. Gen mã hoá cho melittin trong ong mật *Apis cerana* được cấu tạo gồm 2 exon và 1 intron. Đoạn từ vị trí 22 đến vị trí 77 được giả thiết là đoạn khởi đầu (leader sequence), đoạn từ vị trí 78 đến vị trí 269 là đoạn intron và đoạn từ vị trí 270 đến vị trí 360 mã hoá cho melittin trưởng thành.
5. Các nucleotit khác biệt giữa sản phẩm PCR thu được với trình tự mà Vlasak và cộng sự đã công bố không làm thay đổi trình tự amino acid trong chuỗi polypeptit của melittin trưởng thành.

QUY TRÌNH
THU NHẬN MELITTIN - CARRIES ĐỂ ỨNG
DỤNG TRONG Y HỌC

NGƯỜI CHỦ TRÌ: TS. LÊ QUANG HUẤN

HÀ NỘI - 2004

QUY TRÌNH THU NHẬN MELITTIN-CARRIES ĐỂ ỨNG DỤNG TRONG Y HỌC

Một hướng nghiên cứu mới đang được nhiều phòng thí nghiệm trên thế giới quan tâm nghiên cứu là tạo ra các phân tử tái tổ hợp có bản chất protein với các chức năng mong muốn làm nguyên liệu cho việc điều chế các loại thuốc đặc trị các bệnh hiểm nghèo.

Phân tử protein mang hai đặc tính khác biệt nhau bao gồm đặc tính "dẫn đường" tức là đặc tính nhận biết và liên kết đặc hiệu với các tế bào đích chẳng hạn các tế bào vi khuẩn gây bệnh, các virus gây bệnh, các tế bào ung thư... và đặc tính ức chế hoặc làm tan tế bào đích. Thực hiện chức năng hướng tới tế bào đích hoặc là toàn bộ hoặc là một phần phân tử kháng thể kháng lại tế bào đích, còn đặc tính làm tan tế bào đích có thể là các chất đông vón phóng xạ, các enzyme, các độc tố tế bào, các peptit kháng khuẩn, các peptit làm tan tế bào....

Sau đây chúng tôi trình bày quy trình tạo phân tử tái tổ hợp với 2 chức năng: chức chuyên chở (carries) và chức năng làm tan tế bào. Chức năng chuyên chở được thực hiện bởi các đoạn kháng thể đơn dòng tái tổ hợp còn chức năng làm tan tế bào đích được thực hiện bởi peptide làm tan tế bào, melittin.

QUY TRÌNH THU NHẬN MELITTIN-CARRIES

1. Gen tái tổ hợp Carries-melittin được lắp ráp bằng sự liên kết gen mã hoá melittin và gen mã hoá chất mang carries (vùng biến đổi của kháng thể) theo mô hình sau:

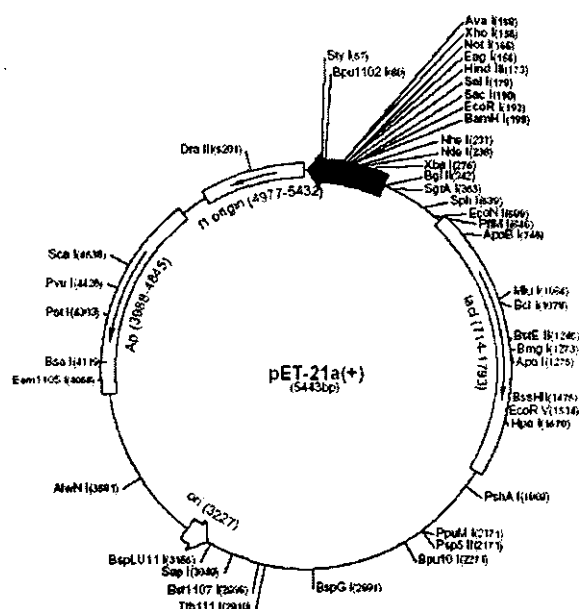
Nde I		BamH I	LRASGCGPEGI		Sac I		Xho I
CATATG...		GGATCC...			GAGCTC...		CTCGAG...
GTATAC...	VE-linker-VL	CCTAGG...	Linker		CTCGAG...	Melittin	GAGCTC... His-tag

2. Các cặp môi cần thiết để thiết lập các đoạn gen phục vụ cho việc lắp ráp gen tái tổ hợp được thiết kế và tổng hợp có trình tự như sau:

Tên mỗi	Thành phần mỗi	Tm	chiều dài
VH53F	5'- AGCCTGAGCATATGGGACACGACC-3'	68,4	24
VH53R	5'- GAGGATCCGCGGCCGCA-3'	64,2	17
Link53F	5'- GATCCTGCCTCCGGCTGTGGACCAGAAGA-3'	78,9	29
Link53R	5'- GCTCTTCTGGTCCACAGCCGGAGGCAG-3'	77,2	27
Mel53F	5'- TGAGCTCGGGATCGGAGCAGTTC-3'	69,5	23
Mel53R	5'- ACTCGAGCCCCTGTTGCCTCTGACG-3'	74,3	25
SeqVH	5'- GCCACCTCCGCCTGAACC-3'	64,2	18
SeqVL	5'- CTATGCGGCCCCATTCA-3'	52,7	17
SeqG3F	5'- CTGTCAATGCTGGCGGCGGC-3'	71,3	20

Gen tái tổ hợp sau khi lắp ráp được gắn vào vector pET-21(a) để biểu hiện trong *E.coli* BL21.

- Vector biểu hiện pET-21(a) của hãng Invitrogen với trình tự cắt gắn đa vị rất thuận lợi cho việc thiết kế vector để biểu hiện. Đây là vector thường được sử dụng ở các phòng nghiên cứu về sinh học phân tử để biểu hiện các gen tái tổ hợp trong tế bào vi khuẩn. Vector pET-21(a) có sơ đồ cấu tạo như sau:



4. Biến nạp gen mã hóa melittin-carries vào *E.coli* chủng BL21 theo quy trình biến nạp thông thường.
5. Biểu hiện của gen melittin-carries ở 37°C, trong máy lắc 220vòng/phút.
6. Bổ sung IPTG tới nồng độ sau cùng từ 0,4- 0,6 mM sau khi OD₆₀₀=0,6.
7. Sau khi cảm ứng 3 giờ, tế bào vi khuẩn được thu nhận bằng ly tâm và sắc ký ái lực trên cột Niken để thu nhận protein tái tổ hợp tinh sạch.
8. Kiểm tra sản phẩm protein tái tổ hợp trên gel polyacrylamid 12,5%.

THÍ DỤ VỀ THỰC HIỆN QUY TRÌNH THU NHẬN MELITTIN-CARRRIES

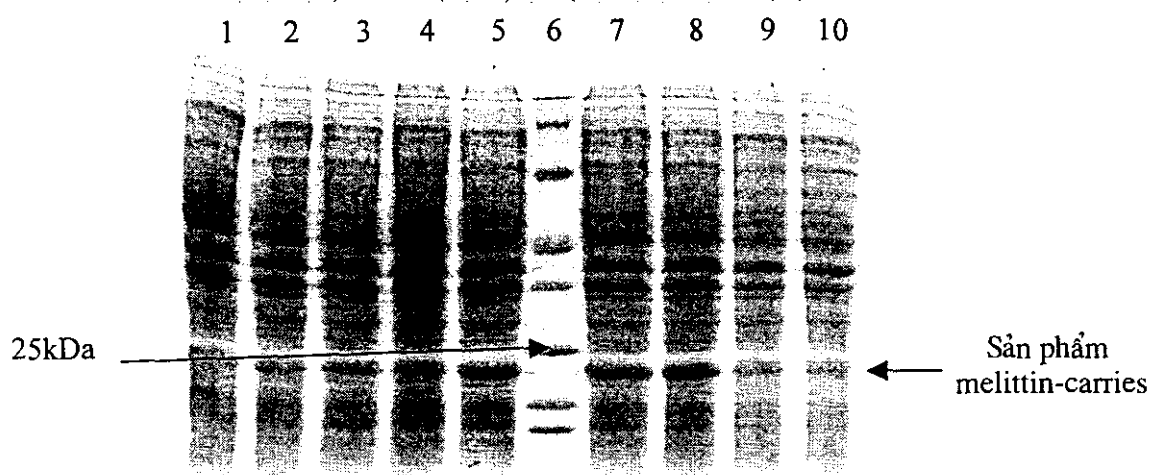
1. Sản phẩm lắp gen melittin và gen mã hóa chất mang có trình tự nucleotide như sau:

```
AGCCTGAGCA TATGGGACAC GACCGTGTAT TACTGTGCAA GAGCTGGGGC CAAGGTACCC
TGGTCACCGT CTCGAGTGGT GGAGGCGGTT CAGGCGGAGG TGGCTCTGGC GGTAGTGCAC
TTCAGTCTGC CCTGACTCAG CCTGCCTCCG TGTCTGGGTC TCCTGGACAG TCGATCACCA
TCTCCTGCAC TGGAACCAGC AGTGACGTTG GTGGTTATAA CTATGTCTCC TGGTACCAAC
AGCACCAGG CAAAGCCCCC AAATCATGA TTTATGAGGT CAGTAATCGG CCCTCAGGGG
TTTCTAATCG CTTCTCTGGC TCCAAGTCTG GCAACACGGC CTCCCTGACC ATCTCTGGGC
TCCAGGCTGA GGACGAGGCT GATTATTACT GCAGCTCATA TACAAGCAGC AGCACTATTG
TATTCGGCGG AGGGACCAAG CTGACCGTCC TAGGTGCGGC CGCGGATCCT GCCTCCGGCT
GTGGACCAGA AGAGCTCGGG ATCGGAGCAG TTCTCAAAGT ATTAACCACA GGATTGCCTG
CCCTTATAAG TTGGATTAAA CGTCAGAGGC AACAGGGGCT CGAGCACCAC CACCACCACC
ACTGA
```

Khi dịch sang trình tự protein ta có trình tự các amino acid như sau:

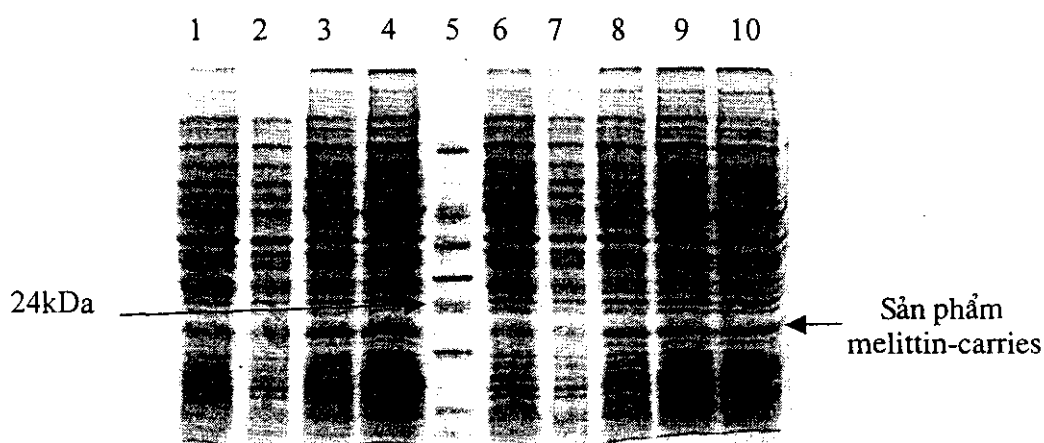
```
PEHMGHDRV LCKSWGQGT VTVSSGGGGS GGGSGGSAL QSALTQPASV SGSPGQSITI
SCTGTSSDVG GYNVSWYQQ HPGKAPKLM YEVSNRPSGV SNRFSGSKSG NTASLTISGL
QAEDEADYYC SSYTSSSTIV FGGGTKLTVL GAAADPASGC GPEELGIGAV LKVLTTGLPA
LISWIKRQRQ QGLEHHHHHH.
```

2. Kết quả điện di kiểm tra sản phẩm biểu hiện gen melittin-carries trong hệ biểu hiện prokaryote (vi khuẩn *E.coli* chủng BL21) như sau:



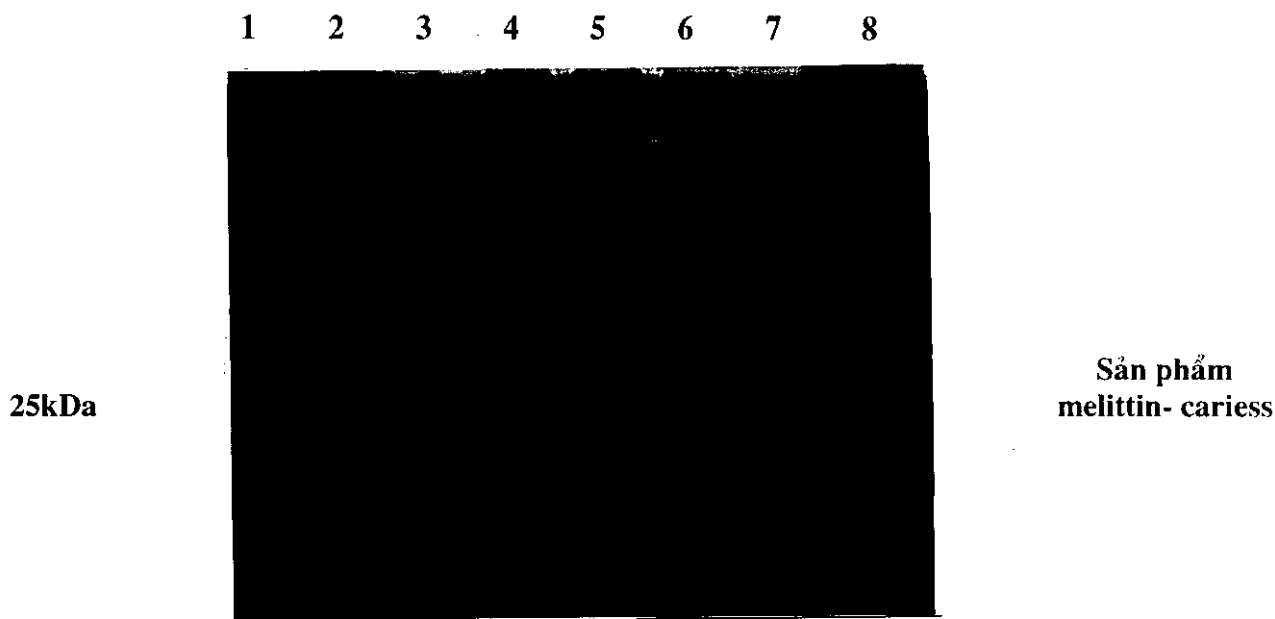
Hình 1: Ảnh điện di kiểm tra sự biểu hiện gen melittin-carries trên gel polyacrylamid

- 1, 2 - Mẫu Protein tách trước khi cảm ứng
- 3 - Mẫu Protein tách sau khi cảm ứng với IPTG (0,2mM/ml)
- 4 - Mẫu Protein tách sau khi cảm ứng với IPTG (0,3mM/ml)
- 5 - Mẫu Protein tách sau khi cảm ứng với IPTG (0,4mM/ml)
- 6 - Chỉ thị phân tử protein
- 7, 8 - Mẫu Protein tách sau khi cảm ứng với IPTG (0,6mM/ml)
- 9, 10 - Mẫu Protein tách sau khi cảm ứng với IPTG (0,7 và 0,8 mM/ml)



Hình 2: Ảnh điện di kiểm tra sự biểu hiện gen melittin-carries trên gel polyacrylamid

- 1, 2, 6, 7 - Mẫu Protein tách trước khi cảm ứng
- 3, 4, 8, 9, 10 - Mẫu Protein tách sau khi cảm ứng với IPTG (0,4-0,6 mM/ml)

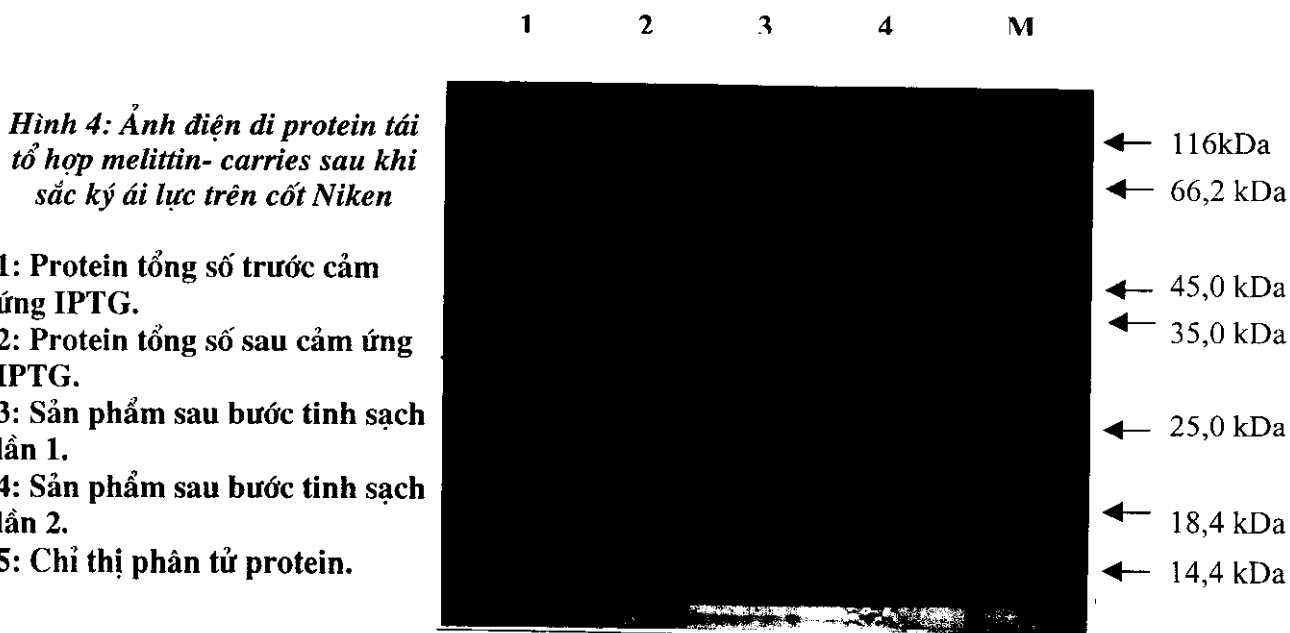


Hình 3: Ảnh điện di kiểm tra sự biểu hiện của melittin- carries trên gel polyacrylamid

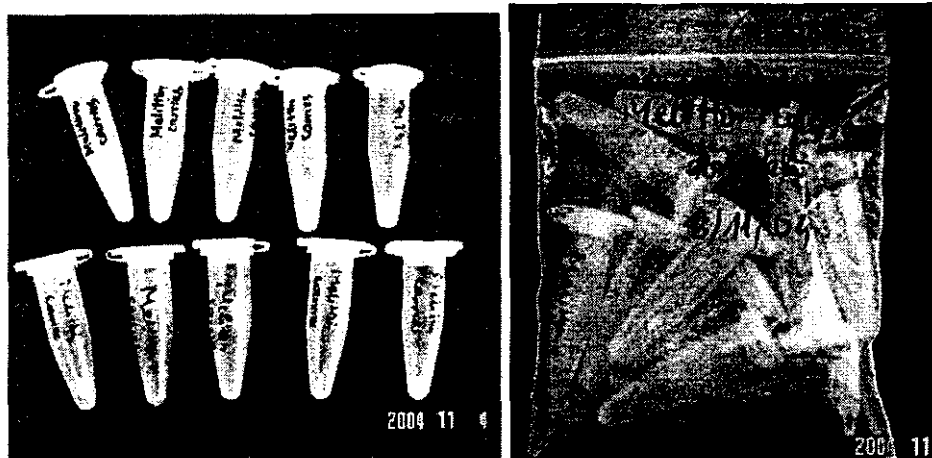
1,2: - Dịch protein tách trước khi cảm ứng

3: Chỉ thị phân tử protein

4,5,6,7,8: Dịch protein sau khi cảm ứng với IPTG (0,6 mM/ml)



Sản phẩm protein thu được sau bước tinh sạch lần thứ 2 được đông khô để sử dụng cho các nghiên cứu về hoạt tính tiếp theo.



Hình 5: Sản phẩm protein tái tổ hợp được đông khô

KẾT LUẬN VỀ QUY TRÌNH THU NHẬN MELITTIN-CARRRIES

1. Gen tái tổ hợp melittin-carries đã biểu hiện trong vi khuẩn *E.coli* chủng BL21.
2. Ngoài các yếu tố ảnh hưởng tới khả năng biểu hiện của gen như nhiệt độ, pH thì nồng độ chất cảm ứng IPTG thích hợp nhất là 0,4-0,6 mM.
3. Protein tái tổ hợp bước đầu được thu nhận bằng kỹ thuật điện di trên cột sắc ký ái lực có độ sạch cao (chỉ có 1 băng khi kiểm tra điện di trên gel polyacrylamide 12,5%).

III/ CÁC QUY TRÌNH CÔNG NGHỆ TẠO SẢN PHẨM

QUY TRÌNH
NHÂN NHANH SINH KHỐI MÔ HOÀNG LIÊN
(*BERBERIDACEAE*) BẰNG CÔNG NGHỆ TẾ
BÀO THỰC VẬT

NGƯỜI CHỦ TRÌ: BS. ĐINH THỊ THU HIỀN

QUI TRÌNH NHÂN NHANH SINH KHỐI MÔ

HOÀNG LIÊN GAI

(*Berberis wallichiana* DC)

Qui trình nhân nhanh sinh khối mô Hoàng liên gai (*Berberis wallichiana* DC) bằng công nghệ tế bào thực vật bao gồm các giai đoạn : thu mẫu, khử trùng, xác định cơ quan nuôi cấy, tìm nồng độ chất điều tiết sinh trưởng thích hợp cho việc phát sinh mô sẹo và nhân nhanh khối mô, thu hoạch sinh khối.

Các giai đoạn này đều được thực hiện trong phòng thí nghiệm như sau:

I. CHUẨN BỊ MÔI TRƯỜNG

Môi trường sử dụng trong qui trình nhân nhanh sinh khối là môi trường cơ bản nuôi cấy thân gỗ WPM theo Lloyd G và Mc Crown B (1980) gồm các thành phần trong bảng dưới đây :

ng chất

Hóa chất	Lượng hóa chất cho 1 lít MT	Lượng hóa chất cho 1 lít dung dịch mẹ	Lượng dung dịch mẹ lấy cho 1 lít MT
Muối đa lượng vô cơ (WPM I)			
NH ₄ NO ₃	400 mg	20,0 g	20 ml
MgSO ₄ .7H ₂ O	370 mg	18,5 g	
K ₂ SO ₄	990 mg	49,5 g	
KH ₂ PO ₄	170 mg	8,5 g	
Muối Canxi (WPM II)			
CaCl ₂ .2H ₂ O	96 mg	9,6 g	10 ml
Ca(NO ₃) ₂ .4H ₂ O	556 mg	55,6 g	
Muối vi lượng vô cơ (WPM III)			
H ₃ BO ₃	6,2 mg	620 mg	10 ml
CuSO ₄ .5H ₂ O	0,25 mg	25 mg	
MnSO ₄ .4H ₂ O	22,3 mg	2230 mg	
Zn SO ₄ .7H ₂ O	8,6 mg	860 mg	
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	0,25 mg	25 mg	
Sắt (WPM IV)			
Na ₂ EDTA.2H ₂ O	37,2 mg	3720 mg	10 ml
FeSO ₄ .7H ₂ O	27,8 mg	2780 mg	
Vitamin (WPM V)			
Pyridoxine.HCl	0,5 mg	50 mg	10 ml
Nicotinic acid	0,5 mg	50 mg	
Thiamin.HCl	1 mg	100 mg	
Glycine	2 mg	200 mg	
Myo-Inositol	100 mg	10.000 mg	

Ngoài ra còn có :

Saccaroza	30 g/l
Nước dừa	100ml/l
agar	8g/l

Và các chất điều tiết sinh trưởng với tỉ lệ thích hợp.

Chỉnh pH=5,8-6,0 bằng các dd NaOH 0,1N và HCl 0,1N

Các thành phần hóa chất dùng trong pha chế môi trường nuôi cấy được pha thành 5 dung dịch mẹ như sau :

- Dung dịch đa lượng (WPM I) : các muối khoáng chính (trừ các muối Canxi) được cân lượng như ở bảng trên. Hòa tan từng chất với nước cất rồi pha hỗn hợp lên thể tích 1 lít. Khi dùng để pha 1 lít môi trường thì lấy 20ml dung dịch này.
- Dung dịch các muối Canxi (WPM II): Cân lượng hóa chất như ở bảng trên, hòa tan từng chất với nước cất, pha hỗn hợp và lên thể tích 1 lít. Khi dùng pha 1 lít môi trường thì lấy 10ml dung dịch này.
- Dung dịch các muối vi lượng (WPM III): Cân lượng hóa chất như ở bảng trên, hòa tan từng chất với nước cất, pha hỗn hợp và lên thể tích 1 lít. Khi dùng pha 1 lít môi trường thì lấy 10ml dung dịch này.
- Dung dịch sắt (WPM IV): Cân và hòa tan hai lượng muối trên bằng nước cất nóng, vừa pha vừa đun nhẹ, lên thể tích 1 lít. Khi pha 1 lít môi trường thì lấy 10ml dung dịch này.
- Dung dịch Vitamin (WPM V): Thành phần gồm các muối HCl và Vitamin. Cân lượng các hóa chất như bảng trên, pha trong nước cất thành 1 lít.

Chú ý:

- Sử dụng nước cất hai lần để pha hóa chất.
- Sau pha phải lọc qua giấy lọc.
- Đựng trong lọ thủy tinh tối màu, nút mài, đã được rửa sạch, sấy khô.
- Dung dịch mẹ sau pha bảo quản trong tủ lạnh ở 4°C.
- Mỗi lọ đựng đựng phải có nhãn mác ghi rõ tên hóa chất, ngày pha, người pha, lượng sử dụng cho 1 một lít môi trường.

Môi trường khoáng cơ bản còn được bổ xung thêm các chất điều hòa sinh trưởng tùy theo từng mục đích nuôi cấy. Để kích thích tạo mô sẹo và nhân nhanh sinh khối cần phải bổ xung thêm 2,4D và BAP ở những nồng độ thích hợp.

Cách pha 100ml chất điều tiết sinh trưởng như sau:

- Cân 100mg BAP, cho vào cốc thủy tinh định mức 100ml, thêm dung dịch NaOH 0,1N (một lượng nhỏ), lắc đều cho tan hết BAP, sau đó thêm nước cất hai lần cho đến khi đủ 100ml. Ta được dung dịch BAP với nồng độ 1mg/1ml.
- Pha NAA tương tự như pha BAP
- Cân 100mg 2,4D, cho vào cốc thủy tinh định mức 100ml, thêm cồn tuyệt đối (lượng tương đối nhiều) lắc cho tan hết, sau đó thêm nước cất hai lần cho đến khi đủ 100ml. Ta được dung dịch 2,4D với nồng độ 1mg/1ml.

Chú ý:

- Dụng trong lọ thủy tinh tối màu, nút mài, đã rửa sạch, sấy khô. Ghi nhãn mác đầy đủ: tên hóa chất, ngày pha, người pha, hàm lượng.
- Bảo quản trong tủ lạnh ở 4°C.
- Phải sử dụng dụng cụ sạch khi lấy hóa chất để pha môi trường.
- Lọ dung dịch pha để quá lâu hoặc bị tủa phải bỏ, không sử dụng.

Tiến hành làm 1 lít môi trường nuôi cây mầm (GW):

- Chuẩn bị:
 - + Cân thạch 8g, đường saccharoza 20g.
 - + Nước dừa 100ml.
 - + Lấy hóa chất: Cho vào cốc thủy tinh định mức 100ml. Sau đó lấy tiếp vào các dung dịch mẹ WPM I 20ml, WPM II, III, IV, V mỗi thứ 10ml. Thêm chất điều tiết sinh trưởng 2,4D 0,1mg (tức 1/10 ml dung dịch đã pha sẵn), BAP 0,5mg (1/2 ml dung dịch đã pha), NAA 0,25mg (1/4ml dung dịch đã pha).
 - + 20 bình tam giác 250ml sạch.
 - Tiến hành:
 - + Lấy khoảng 400ml nước cất cho vào cốc đun 1 lít, cho thạch vào, đun trên bếp cho tan hết thạch. Sau đó cho tiếp đường, nước dừa, lượng dung dịch đã chuẩn bị, khuấy tan đều, thêm nước cất cho đủ 1 lít. Ta thu được 1 lít môi trường.
 - + Đo pH và chỉnh về pH=5,8 bằng các dung dịch NaOH 0,1N và HCl 0,1N.
 - + Chia lượng môi trường này vào 20 bình tam giác đã chuẩn bị.
 - + Nút các bình tam giác bằng bông không thấm nước đã được khử trùng, sấy khô, bọc nút giấy bên ngoài. Đánh dấu tên môi trường trên nút.
 - + Đem môi trường khử trùng trong nồi hấp ở 120°C trong thời gian 15 phút.
 - + Môi trường đã khử trùng cất trong phòng cấy, sử dụng trong vòng 2 tuần.
- * Tùy theo từng mục đích nuôi cấy mà ta làm môi trường với các công thức khác nhau. Trên đây là ví dụ 1 công thức môi trường dùng để nuôi mầm cây.

II. VẬT LIỆU NUÔI CẤY BAN ĐẦU:

Sử dụng quả Hoàng liên gai thu tại vùng núi Sapa vào khoảng tháng 10, 11, 12 hàng năm.

III. KHỬ TRÙNG MẪU ĐỂ ĐƯA VÀO NUÔI CẤY

- Chuẩn bị:

Dụng cụ:

- + Bình Pyrex 500ml đã khử trùng.
- + Nước cất đã khử trùng.
- + Giấy thấm đã khử trùng, sấy khô.
- + Panh mềm, kẹp cứng, dao cắt đã khử trùng.

Hóa chất:

- + Cồn tuyệt đối.
- + Dung dịch HgCl_2 1%.

Môi trường:

- + 1 lít môi trường nuôi cấy mầm.

- **Tiến hành:**

- + Quả Hoàng liên hái về còn tươi, rửa sạch với xà phòng dưới vòi nước, sau đó tráng lại bằng nước cất, đựng trong cốc sạch (khoảng 500 quả).
- + Sau đó các thao tác khử trùng mẫu được tiến hành trong box vô trùng, sử dụng dụng cụ vô trùng.
- + Quả được trút vào bình Pyrex 500ml, tráng cồn tuyệt đối trong 1 phút, rồi gạn hết cồn.
- + Cho tiếp 250ml dung dịch HgCl_2 1% vào, lắc rửa trong 20 phút. Sau đó gạn hết dung dịch khử trùng, dùng nước cất lắc rửa nhiều lần liên tiếp (khoảng 5-6 lần) ta thu được mẫu sạch.

IV. NUÔI CÂY MẦM

- Quả đã khử trùng đem tách lấy phôi, cấy vào trong môi trường nuôi cây mầm, mật độ 20 phôi/1 bình tam giác.
- Công thức môi trường nuôi phôi (GW): WPM cơ bản + đường saccarosa 2% + nước dừa 10% + thạch 0,8%, bổ xung các chất điều tiết sinh trưởng BAP 0,5mg/l, NAA 0,25mg/l, 2,4D 0,1 mg/l.
- Các bình mẫu được đặt trong phòng nuôi ở điều kiện $25^\circ\text{C} \pm 3^\circ\text{C}$, chu kì quang 16h/ngày, cường độ chiếu sáng 1500 ± 100 lux.
- Sau 2-3 tuần nuôi, cây mầm phát triển tốt, cao 1-2 cm có 2 lá mầm, rễ dài 1-2cm, có thể dùng làm nguyên liệu để tạo mô sẹo.

V. TẠO MÔ SẸO

- Nguyên liệu dùng để tạo mô sẹo là rễ của cây mầm, được cắt khúc dài 3-4mm, cấy vào môi trường kích thích tạo mô sẹo, khoảng 15 mẫu/1bình.
- Công thức môi trường kích thích tạo mô sẹo (D3): WPM cơ bản + đường saccarosa 3% + nước dừa 10% + thạch 0,8%, bổ xung chất điều tiết sinh trưởng là 2,4D 1,5mg/l, BAP 0,2 mg/l. pH môi trường = 5,8.
- Các bình mẫu được đặt trong buồng nuôi ở điều kiện tối, $25^\circ\text{C} \pm 3^\circ\text{C}$.
- Sau 3-4 tuần nuôi, tỷ lệ tạo được mô sẹo là 100%. Các khối mô có đường kính ≈ 1 cm chất lượng tốt (màu vàng tươi, không nhũn ướt, không chai cứng) được dùng làm nguyên liệu để tiếp tục nhân nhanh sinh khối.

VI. NHÂN NHANH SINH KHỐI

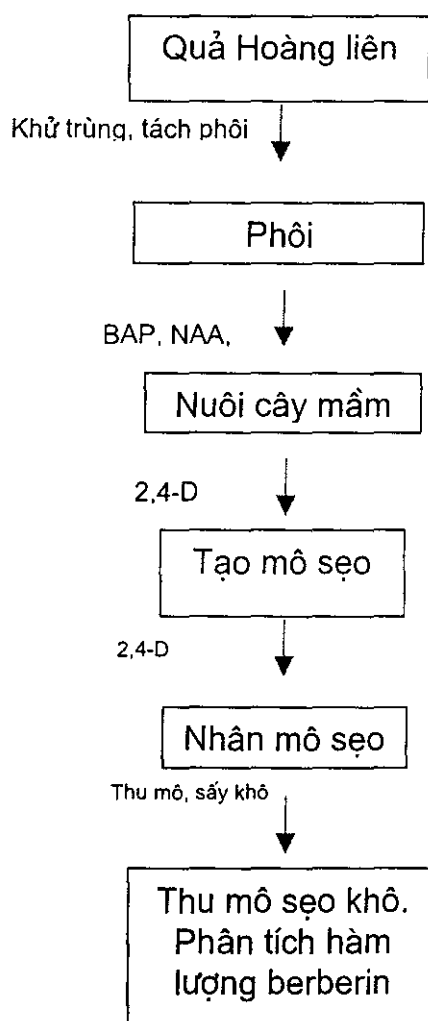
- Nguyên liệu dùng để nhân nhanh sinh khối là mô sẹo vừa tạo được từ rễ của cây mầm, cắt thành khối $3 \times 3 \times 3$ mm, cấy với mật độ 14-15 khối mô/1 bình.
- Công thức môi trường nhân nhanh mô sẹo (H3): WPM cơ bản + đường saccarosa 3% + nước dừa 10% + thạch 0,8%, bổ xung chất điều tiết sinh trưởng là 2,4D 0,3mg/l, BAP 0,3mg/l. pH môi trường = 5,8.

- Các bình mẫu được đặt trong buồng nuôi với điều kiện nhiệt độ là $25^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$, chu kỳ quang 16h/ngày, cường độ chiếu sáng 1500 ± 100 lux.
- Sau 3-4 tuần nuôi lượng sinh khối tăng 9-10 lần. Như vậy hệ số nhân đạt được là 10 lần sau 1 lần cấy chuyển với thời gian nuôi là 1 tháng.
- Mỗi bình tam giác 250ml (với 50ml môi trường) thu được khoảng 20g mô tươi.
- Với nguồn mô tạo ra từ rễ có thể dùng để nhân liên tục trong thời gian khoảng 1 năm.

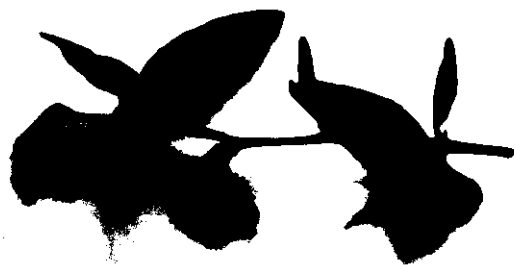
VII. THU MÔ

- Mô sẹo sau khi nhân được thu hoạch và làm khô ở nhiệt độ 60°C , bảo quản trong phòng khô mát, dùng làm nguyên liệu cho các thí nghiệm tiếp theo (phân tích hàm lượng berberin trong mô nuôi cấy, nghiên cứu sử dụng làm dược liệu,...).

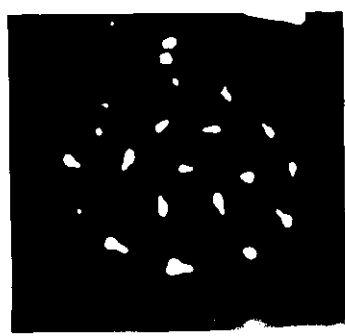
SƠ ĐỒ QUY TRÌNH NHÂN NHANH SINH KHỐI MÔ HOÀNG LIÊN GAI (*Berberis wallichiana* DC)



ẢNH MINH HỌA



Một đoạn cành mang quả của cây Hoàng liên gai (*Berberis wallichiana* DC)



A



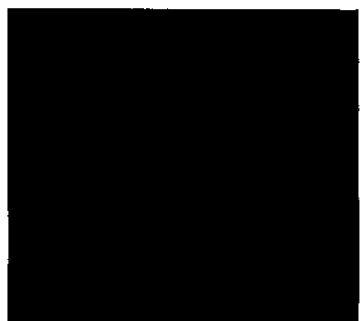
B



C

Các giai đoạn tạo mô sẹo

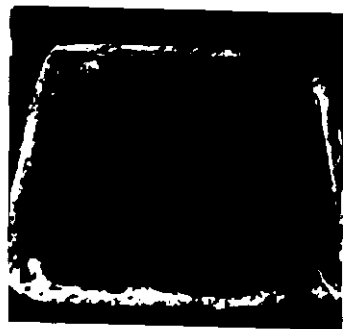
A- Phôi đưa vào môi trường nuôi cấy, B- Cây mầm sau 2 tuần nuôi cấy, C- Mô sẹo tạo được từ rễ sau 3 tuần nuôi cấy.



A



B



C

A, B: Mô sẹo nhân đại trà

C: Mô sẹo được thu hoạch

CHỮ VIẾT TẮT

MS	<i>Murashige và Skoog</i>
WMP	<i>Lloyd và McCrown</i>
NAA	<i>Naphthylacetic acid</i>
IAA	<i>Indolylacetic acid</i>
BAP	<i>6- Benzylaminopurin</i>
2,4-D	<i>2,4- Dichlorphenoxyacetic acid</i>
GA3	<i>Gibberellic acid</i>
Kin	<i>Kinetin</i>
IBA	<i>Indol butiric acid</i>

CÁC CÔNG THỨC MÔI TRƯỜNG SỬ DỤNG.

1. Môi trường GW: Nuôi cây mầm

WPM cơ bản + 2% đường Saccaroza + 8% thạch + 10% nước dừa.

Chất kích thích bổ xung: BAP 0,5 mg/l

NAA 0,25 mg/l

2,4 D 0,1 mg/l

2. Môi trường tạo mô sẹo:

WPM cơ bản + 3% đường Saccaroza + 8% thạch + 10% nước dừa.

Bổ xung: 2,4 D 1,5-1,8 mg/l

3. Môi trường nhân mô sẹo:

WPM cơ bản + 3% đường Saccaroza + 8% thạch + 10% nước dừa.

Bổ xung: 2,4D 0,3-0,5 mg/l

QUY TRÌNH
NHÂN NHANH CÂY GIỐNG HOÀNG LIÊN GAI

NGƯỜI CHỦ TRÌ: BS. ĐINH THỊ THU HIỀN

QUI TRÌNH NHÂN NHANH CÂY GIỐNG HOÀNG LIÊN GAI (*Berberis wallichiana* DC)

Qui trình nhân nhanh cây giống Hoàng liên gai (*Berberis wallichiana* DC) bằng công nghệ tế bào thực vật bao gồm các giai đoạn: thu mẫu, khử trùng, xác định cơ quan nuôi cấy, tìm nồng độ chất điều tiết sinh trưởng thích hợp cho việc phát sinh chồi, nhân nhanh chồi và tạo cây hoàn chỉnh.

Các giai đoạn này được thực hiện trong phòng thí nghiệm như sau:

I. CHUẨN BỊ MÔI TRƯỜNG

Môi trường sử dụng trong qui trình nhân nhanh sinh khối là môi trường cơ bản nuôi cấy thân gỗ WPM theo Lloyd G và Mc Crown B (1980) gồm các thành phần trong bảng dưới đây :

Hóa chất	Lượng hóa chất cho 1 lít MT	Lượng hóa chất cho 1 lít dung dịch mẹ	Lượng dung dịch mẹ lấy cho 1 lít MT
Muối đa lượng vô cơ (WPM I)			
NH ₄ NO ₃	400 mg	20,0 g	20 ml
MgSO ₄ .7H ₂ O	370 mg	18,5 g	
K ₂ SO ₄	990 mg	49,5 g	
KH ₂ PO ₄	170 mg	8,5 g	
Muối Canxi (WPM II)			
CaCl ₂ .2H ₂ O	96 mg	9,6 g	10 ml
Ca(NO ₃) ₂ .4H ₂ O	556 mg	55,6 g	
Muối vi lượng vô cơ (WPM III)			
H ₃ BO ₃	6,2 mg	620 mg	10 ml
CuSO ₄ .5H ₂ O	0,25 mg	25 mg	
MnSO ₄ .4H ₂ O	22,3 mg	2230 mg	
Zn SO ₄ .7H ₂ O	8,6 mg	860 mg	
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	0,25 mg	25 mg	
Sắt (WPM IV)			
Na ₂ EDTA.2H ₂ O	37,2 mg	3720 mg	10 ml
FeSO ₄ .7H ₂ O	27,8 mg	2780 mg	
Vitamin (WPM V)			
Pyridoxine.HCl	0,5 mg	50 mg	10 ml
Nicotinic acid	0,5 mg	50 mg	
Thiamin.HCl	1 mg	100 mg	
Glycine	2 mg	200 mg	
Myo-Inositol	100 mg	10.000 mg	

Ngoài ra còn có :

Saccaroza	30 g/l
Nước dừa	100ml/l
agar	8g/l

Và các chất điều tiết sinh trưởng với tỉ lệ thích hợp.

Chỉnh pH=5,8-6,0 bằng các dd NaOH 0,1N và HCl 0,1N

Các thành phần hóa chất dùng trong pha chế môi trường nuôi cấy được pha thành 5 dung dịch mẹ như sau :

- Dung dịch đa lượng (WPM I) : các muối khoáng chính (trừ các muối Canxi) được cân lượng như ở bảng trên. Hòa tan từng chất với nước cất rồi pha hỗn hợp lên thể tích 1 lít. Khi dùng để pha 1 lít môi trường thì lấy 20ml dung dịch này.
- Dung dịch các muối Canxi (WPM II): Cân lượng hóa chất như ở bảng trên, hòa tan từng chất với nước cất, pha hỗn hợp và lên thể tích 1 lít. Khi dùng pha 1 lít môi trường thì lấy 10ml dung dịch này.
- Dung dịch các muối vi lượng (WPM III): Cân lượng hóa chất như ở bảng trên, hòa tan từng chất với nước cất, pha hỗn hợp và lên thể tích 1 lít. Khi dùng pha 1 lít môi trường thì lấy 10ml dung dịch này.
- Dung dịch sắt (WPM IV): Cân và hòa tan hai lượng muối trên bằng nước cất nóng, vừa pha vừa đun nhẹ, lên thể tích 1 lít. Khi pha 1 lít môi trường thì lấy 10ml dung dịch này.
- Dung dịch Vitamin (WPM V): Thành phần gồm các muối HCl và Vitamin. Cân lượng các hóa chất như bảng trên, pha trong nước cất thành 1 lít.

Chú ý:

- Sử dụng nước cất hai lần để pha hóa chất.
- Sau pha phải lọc qua giấy lọc.
- Đựng trong lọ thủy tinh tối màu, nút mài, đã được rửa sạch, sấy khô.
- Dung dịch mẹ sau pha bảo quản trong tủ lạnh ở 4°C.
- Mỗi lọ đựng đựng phải có nhãn mác ghi rõ tên hóa chất, ngày pha, người pha, lượng sử dụng cho 1 một lít môi trường.

Môi trường khoáng cơ bản còn được bổ xung thêm các chất điều hòa sinh trưởng tùy theo từng mục đích nuôi cấy. Để kích thích tạo mô sẹo và nhân nhanh sinh khối cần phải bổ xung thêm 2,4D và BAP ở những nồng độ thích hợp.

Cách pha 100ml chất điều tiết sinh trưởng như sau:

- Cân 100mg BAP, cho vào cốc thủy tinh định mức 100ml, thêm dung dịch NaOH 0,1N (một lượng nhỏ), lắc đều cho tan hết BAP, sau đó thêm nước cất hai lần cho đến khi đủ 100ml. Ta được dung dịch BAP với nồng độ 1mg/1ml.
- Pha NAA tương tự như pha BAP
- Cân 100mg 2,4D, cho vào cốc thủy tinh định mức 100ml, thêm cồn tuyệt đối (lượng tương đối nhiều) lắc cho tan hết, sau đó thêm nước cất hai lần cho đến khi đủ 100ml. Ta được dung dịch 2,4D với nồng độ 1mg/1ml.

Chú ý:

- Dụng trong lọ thủy tinh tối màu, nút mài, đã rửa sạch, sấy khô. Ghi nhãn mác đầy đủ: tên hóa chất, ngày pha, người pha, hàm lượng.
- Bảo quản trong tủ lạnh ở 4°C.
- Phải sử dụng dụng cụ sạch khi lấy hóa chất để pha môi trường.
- Lọ dung dịch pha để quá lâu hoặc bị tù phải bỏ, không sử dụng.

Tiến hành làm 1 lít môi trường nuôi cây mầm (GW):

- Chuẩn bị:
 - + Cân thạch 8g, đường saccharoza 20g.
 - + Nước dừa 100ml.
 - + Lấy hóa chất: Cho vào cốc thủy tinh định mức 100ml. Sau đó lấy tiếp vào các dung dịch mẹ WPM I 20ml, WPM II, III, IV, V mỗi thứ 10ml. Thêm chất điều tiết sinh trưởng 2,4D 0,1mg (tức 1/10 ml dung dịch đã pha sẵn), BAP 0,5mg (1/2 ml dung dịch đã pha), NAA 0,25mg (1/4ml dung dịch đã pha).
 - + 20 bình tam giác 250ml sạch.
 - Tiến hành:
 - + Lấy khoảng 400ml nước cất cho vào cốc đun 1 lít, cho thạch vào, đun trên bếp cho tan hết thạch. Sau đó cho tiếp đường, nước dừa, lượng dung dịch đã chuẩn bị, khuấy tan đều, thêm nước cất cho đủ 1 lít. Ta thu được 1 lít môi trường.
 - + Đo pH và chỉnh về pH=5,8 bằng các dung dịch NaOH 0,1N và HCl 0,1N.
 - + Chia lượng môi trường này vào 20 bình tam giác đã chuẩn bị.
 - + Nút các bình tam giác bằng bông không thấm nước đã được khử trùng, sấy khô, bọc nút giấy bên ngoài. Đánh dấu tên môi trường trên nút.
 - + Đem môi trường khử trùng trong nồi hấp ở 120°C trong thời gian 15 phút.
 - + Môi trường đã khử trùng cất trong phòng cấy, sử dụng trong vòng 2 tuần.
- * Tùy theo từng mục đích nuôi cấy mà ta làm môi trường với các công thức khác nhau. Trên đây là ví dụ 1 công thức môi trường dùng để nuôi mầm cây.

II. VẬT LIỆU NUÔI CẤY BAN ĐẦU:

Sử dụng quả Hoàng liên gai thu tại vùng núi Sapa vào khoảng tháng 10, 11, 12 hàng năm.

III. KHỬ TRÙNG MẪU ĐỂ ĐƯA VÀO NUÔI CẤY

- Chuẩn bị:

Dụng cụ:

- + Bình Pyrex 500ml đã khử trùng.
- + Nước cất đã khử trùng.
- + Giấy thấm đã khử trùng, sấy khô.
- + Panh mềm, kẹp cứng, dao cấy đốt khử trùng.

Hóa chất:

- + Cồn tuyệt đối.
- + Dung dịch HgCl_2 1%.

Môi trường:

- + 1 lít môi trường nuôi cấy mầm.

- **Tiến hành:**

- + Quả Hoàng liên hái về còn tươi, rửa sạch với xà phòng dưới vòi nước, sau đó tráng lại bằng nước cất, đựng trong cốc sạch (khoảng 500 quả).
- + Sau đó các thao tác khử trùng mẫu được tiến hành trong box vô trùng, sử dụng dụng cụ vô trùng.
- + Quả được trút vào bình Pyrex 500ml, tráng cồn tuyệt đối trong 1 phút, rồi gạn hết cồn.
- + Cho tiếp 250ml dung dịch HgCl_2 1% vào, lắc rửa trong 20 phút. Sau đó gạn hết dung dịch khử trùng, dùng nước cất lắc rửa nhiều lần liên tiếp (khoảng 5-6 lần) ta thu được mẫu sạch.

IV. NUÔI CÂY MẦM

- Quả đã khử trùng đem tách lấy phôi, cấy vào trong môi trường nuôi cây mầm, mật độ 20 phôi/l bình tam giác.
- Công thức môi trường nuôi phôi (GW): WPM cơ bản + đường saccarosa 2% + nước dừa 10% + thạch 0,8%, bổ xung các chất điều tiết sinh trưởng BAP 0,5mg/l, NAA 0,25mg/l, 2,4D 0,1 mg/l.
- Các bình mẫu được đặt trong phòng nuôi ở điều kiện $25^\circ\text{C} \pm 3^\circ\text{C}$, chu kì quang 16h/ngày, cường độ chiếu sáng 1500 ± 100 lux.
- Sau 2-3 tuần nuôi, cây mầm phát triển tốt, cao 1-2 cm có 2 lá mầm, rễ dài 1-2cm, có thể dùng làm nguyên liệu để nhân nhanh cây.

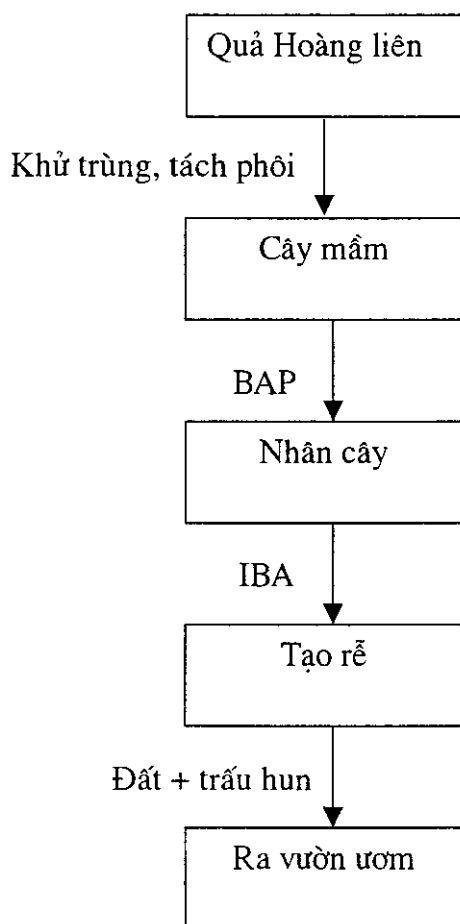
V. NHÂN CHỒI

- Nguyên liệu ban đầu là cây mầm. Cắt các chồi đỉnh của cây mầm, cấy chuyển liên tiếp vài ba lần vào môi trường nuôi cây mầm, mỗi lần cấy chuyển cách nhau 2-3 tuần cho mầm phát triển kéo dài.
- Sau đó cắt đoạn thân, mỗi đoạn 0,5cm, trên đó có các nách lá cấy chuyển vào môi trường nhân chồi. Mỗi bình cấy khoảng 15 đoạn thân.
- Công thức môi trường nhân chồi (HL): WPM cơ bản + đường saccarosa 2% + nước dừa 10% + thạch 0,8%, bổ xung chất điều tiết sinh trưởng là BAP 1,5 mg/l. pH môi trường = 5,8.
- Các bình mẫu được đặt trong buồng nuôi ở điều kiện $25^\circ\text{C} \pm 3^\circ\text{C}$, chu kì chiếu sáng 16h/ngày, cường độ chiếu sáng 1500 ± 100 lux
- Sau 7-10 ngày nuôi, các chồi nách xuất hiện và phát triển tốt. Hệ số nhân đạt 5-6 lần sau 1 tháng cấy chuyển.
- Các bình chồi này tiếp tục được nhân lên trong môi trường nhân chồi để đạt số lượng chồi cần thiết, sau đó chuyển sang giai đoạn tạo cây hoàn chỉnh.

VI. TẠO CÂY HOÀN CHỈNH

- Khi cây đạt độ dài khoảng 5cm, có 5-6 lá thì cấy chuyển sang môi trường tạo rễ với mật độ 10cây/1 bình.
- Công thức môi trường tạo rễ (B2): WPM cơ bản + đường saccaroza 2% + nước dừa 10% + thạch 0,8%, bổ xung chất điều tiết sinh trưởng là IBA 1mg/l. pH môi trường = 5,8.
- Các bình mẫu được đặt trong buồng nuôi với điều kiện nhiệt độ là $25^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$, chu kì quang 16h/ngày, cường độ chiếu sáng 1500 ± 100 lux.
- Sau 3-4 tuần nuôi cây đạt chiều cao 5-6cm, có 5-6 lá, bộ rễ phát triển hoàn chỉnh, trung bình 5-6 rễ/cây, rễ dài 1-2 cm, đủ tiêu chuẩn để đưa ra đất trồng.

SƠ ĐỒ QUY TRÌNH NHÂN NHANH CÂY GIỐNG HOÀNG LIÊN GAI (*Berberis wallichiana* DC)



CHỮ VIẾT TẮT

MS	<i>Murashige và Skoog</i>
WMP	<i>Lloyd và McCrown</i>
NAA	<i>Naphthylacetic acid</i>
IAA	<i>Indolylacetic acid</i>
BAP	<i>6- Benzylaminopurin</i>
2,4-D	<i>2,4- Dichlorphenoxyacetic acid</i>
GA3	<i>Gibberellic acid</i>
Kin	<i>Kinetin</i>
IBA	<i>Indol butiric acid</i>

CÁC CÔNG THỨC MÔI TRƯỜNG SỬ DỤNG.

1. Môi trường GW: Nuôi cây mầm

WPM cơ bản + 2% đường Saccaroza + 8% thạch + 10% nước dừa.

Chất kích thích bổ xung: BAP 0,5 mg/l

NAA 0,25 mg/l

2,4 D 0,1 mg/l

2. Môi trường nhân chồi:

WPM cơ bản + 2% đường Saccaroza + 8% thạch + 10% nước dừa.

Bổ xung: BAP 1,5 mg/l

3. Môi trường tạo rễ cho chồi:

WPM cơ bản + 2% đường Saccaroza + 8% thạch + 10% nước dừa.

Bổ xung: IBA 1,0 mg/l

QUI TRÌNH CÔNG NGHỆ SAU NUÔI CẤY MÔ (Nhân nhanh cây giống Hoàng liên gai)

Cây non sau giai đoạn tạo rễ đạt tiêu chuẩn của một cây hoàn chỉnh được đưa ra đất trồng.

Thời vụ ra cây: phải là mùa mát mẻ hoặc rét trong khoảng thời gian trước và sau tết âm lịch 2 tháng. Nhiệt độ 20-28°C, độ ẩm 80-85% là thích hợp nhất. Cây không chịu được nóng.

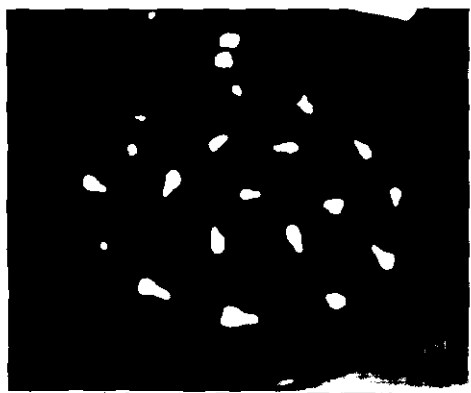
I. GIAI ĐOẠN NHÀ KÍNH

- Chuẩn bị cây: cây đạt tiêu chuẩn: cao 5-6cm, có 5-6 lá, 5-6 rễ dài 1-2cm là có thể đưa ra đất. Các bình cây được đưa ra khỏi phòng nuôi cấy để dưới ánh sáng tán xạ khoảng 1 tuần cho quen dần. Sau đó dùng panh mềm gấp cây ra khỏi bình, thả trong chậu nước sạch, rồi rửa agor bám trên rễ, để vào rổ thưa cho ráo nước rồi đem trồng.
- Chuẩn bị giá thể: Giá thể để trồng cây là đất màu được phơi nắng kĩ, đập tơi, trộn với trấu hun theo tỉ lệ 1:1. Sử dụng cốc nhựa mềm, đường kính 7-10cm, sâu 10cm để trồng cây.
- Cách trồng và chăm sóc:
Cho giá thể vào cốc đến 2/3 cốc, rồi đặt cây lên và đổ tiếp giá thể cho ngập hết rễ cây. Đặt các cốc đã trồng cây lên giá, phun tưới cho ẩm đất và ướt lá. Che phủ bằng nilon để giữ ẩm. Trên vòm nilon phải chọc thủng một số lỗ thoáng cho cây. Duy trì độ ẩm 80% bằng phun sương ngày 2-3 lần. Sau khoảng 2 tuần có thể bỏ vòm che và tưới giữ ẩm hàng ngày. Sau 1 tháng có thể cung cấp chất dinh dưỡng cho cây 2 tuần/1 lần bằng dung dịch môi trường WPM cơ bản pha loãng với tỷ lệ 1/10, phun ướt đều trên lá. Giai đoạn này kéo dài 1-2 tháng. Sau đó chuyển cây ra vườn ươm.

II. GIAI ĐOẠN VƯỜN ƯƠM.

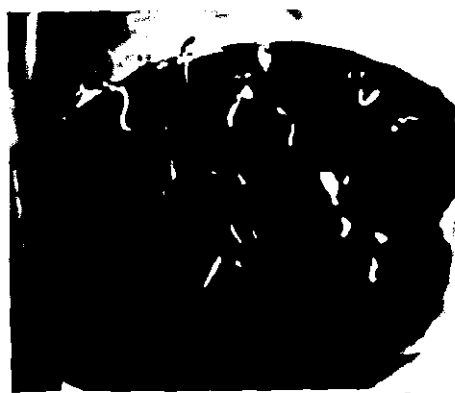
- Cây phải được đưa lên vườn ươm ở Tam Đảo là vùng có khí hậu mát mẻ, tương đối thích hợp.
- Giai đoạn này vườn ươm vẫn phải có mái che tránh mưa nắng trực tiếp.
- Các chậu cây được để tập trung, tưới ẩm hàng ngày. Bổ xung dinh dưỡng 2 tuần/lần như ở giai đoạn nhà kính.
- Sau hai tháng, cây cứng cáp, cao khoảng 20cm trở lên có thể đem trồng ở các triền đất quanh khu vực Tam Đảo.

ẢNH MINH HỌA



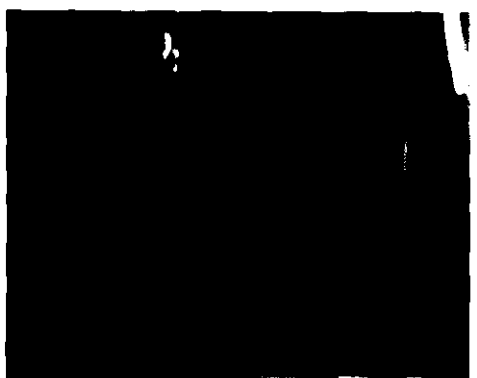
A

A- Phôi đưa vào môi trường nuôi cấy

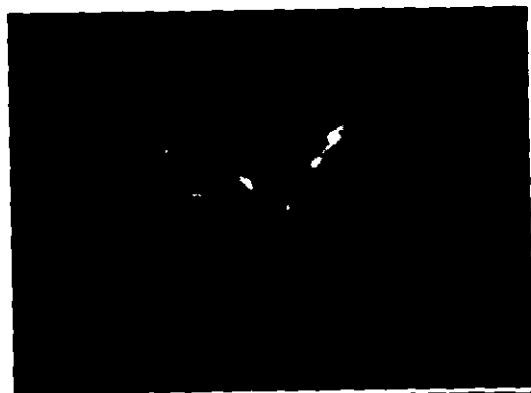


B

B- Cây mầm sau 2 tuần nuôi cấy



Các giai đoạn nhân chồi



Ảnh 1: Mầm nuôi cấy mô Hoàng liên



Ảnh 2: Cây con Hoàng liên



Ảnh 3: Cây Hoàng liên

QUY TRÌNH CÔNG NGHỆ
TẠO SINH KHỐI CÚC GAI (*SILYBUM*
***MARIANUM*) TRỒNG Ở VIỆT NAM LÀM**
NGUYÊN LIỆU SẢN XUẤT THUỐC

NGƯỜI CHỦ TRÌ: PGS. TS LÊ THỊ LAN OANH

I. MỞ ĐẦU

Cây cúc gai *Silybum marianum* thuộc họ Cúc Asteraceae là cây thảo 1-2 năm, ra hoa vào năm thứ 2, nguyên liệu dùng sản xuất thuốc là hạt, quả hoặc toàn cây. Cây phát triển chủ yếu ở châu Âu, châu Phi, Nam Mỹ, Trung và Đông á (1) .

Cây cúc gai đã được du nhập vào trồng ở Việt Nam đã lâu, hiện nay đang phát triển tốt tại các vùng cao có đất tốt và khí hậu mát mẻ như Tam Đảo, Sapa, Đà Lạt; lượng nguyên liệu khá lớn nhưng chưa được sử dụng làm nguyên liệu sản xuất thuốc.

Cúc gai cũng đã được dùng để chữa các bệnh sốt, hạ nhiệt, đau gan, viêm gan , viêm lá lách, sỏi mật, hoàng đản, ho lâu năm, thấp khớp...

Quả cúc gai là một trong số ít loại cây thuốc đặc biệt quan trọng được dùng phổ biến làm nguồn nguyên liệu để sản xuất các loại thuốc phòng chữa các loại bệnh gan thận giữ vai trò hàng đầu ở hầu hết các nước tiên tiến trên thế giới. Các chế phẩm Legalon, Silymarin, Carsyl, Silybor, Silymar , Sibectan, ... đang là những loại dược phẩm thương mại có giá trị rất lớn. Tác dụng dược lý của cúc gai là do tính chất bảo vệ gan của một nhóm chất mới có hoạt tính sinh học cao đó là các flavolignan Silymarin. Hoạt chất chính của *S. marianum* là Silymarin, một hỗn hợp gồm các flavonolignans (silybinin, isosilybinin, silychristin và silydianin). Chế phẩm này có tác dụng chữa rất nhiều các loại bệnh gan và thận khác nhau: viêm gan cấp và mạn tính, viêm gan virus, xơ gan, ung thư gan , chống các loại nhiễm độc gan thận, bảo vệ và phục hồi tế bào gan thận, nâng cao khả năng miễn dịch của cơ thể,... Các chế phẩm từ cúc gai cần thiết không những để chữa gan thận mà còn có tác dụng điều trị các bệnh khác nhau do tác động của các nhân tố bất thuận của môi trường lên cơ thể bao gồm các bệnh hiểm nghèo (6,7,8,9,10).

Cơ chế và hiệu quả tác dụng của các chế phẩm đã và đang được nghiên cứu trên mức độ phân tử ở người và động vật: cơ chế chống oxy hoá, chống oxy hoá lipid, nâng cao khả năng khử độc, chống lại sự giảm glutathion, kìm hãm sự tạo chất độc (leukotrienes) trong gan thông qua việc kìm hãm enzym lipoxigenase, nâng cao quá trình sinh tổng hợp protein, giảm hoạt tính của promoter gây ung thư, kìm hãm P450, tác động miễn dịch, giảm cholesterol...(12-17).

Đây là một cây thuốc rất có giá trị để điều trị các bệnh hiểm nghèo về gan thận là loại bệnh hiện đang phổ biến ở nước ta. Nhằm kế thừa các thành tựu nghiên cứu khoa học và tác dụng chữa bệnh của cúc gai ở các nước tiên tiến , việc khai thác phát triển sử dụng

cây cúc gai đã được di thực trồng ở Việt Nam để sản xuất các chế phẩm thuốc chữa bệnh gan thận trong nước tạo nguồn dược phẩm quý, mới, phong phú và rẻ tiền phục vụ, bảo vệ sức khoẻ cộng đồng là một việc rất cấp thiết

II. NGUYÊN LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

II.1. NGUYÊN LIỆU

Hạt cúc gai được dùng trong thí nghiệm có nguồn gốc từ hạt xin từ Viện Thực vật học, trường Đại học tổng hợp Karlsruhe CHLB Đức và hạt thu từ cây cúc gai trồng ở Sapa Việt Nam.

Lá, thân và quả cúc gai thu được từ cây cúc gai trồng thử nghiệm tại Hà Nội vào tháng 4-5 khi quả bắt đầu chín và lá đã ngả hơi vàng. Các bộ phận được thái lát, sấy ở nhiệt độ 60-70°C đến khô, tán bột.

II.2. PHƯƠNG PHÁP

+Nghiên cứu tỷ lệ nảy mầm hạt:

Hạt cúc gai được gieo trên giấy lọc bão hoà nước trong hộp Petri. Mỗi công thức nhắc lại 3 lần, mỗi lần gieo 100 hạt để trong tối hoàn toàn ở các nhiệt độ 15, 25 và 35°C. Tỷ lệ nảy mầm được theo dõi qua các thời điểm 3, 5 và 7 ngày.

+Định tính các nhóm chất hữu cơ trong các bộ phận cây bằng thuốc thử hoá học đặc hiệu (2, 4).

+Chiết rút hoạt chất nhóm flavonoid theo Talli có cải tiến với các dung môi khác nhau (3,4).

+Nghiên cứu thành phần hoá học bằng phương pháp sắc ký lớp mỏng SKLM, sắc ký lỏng cao áp HPLC với các hệ dung môi khác nhau (3).

+Nuôi cấy mô rễ, thân và lá để tạo sinh khối (11).

+Xác định hoạt tính sinh dược học: kháng khuẩn, chống oxy hoá, bảo vệ gan (5).

III. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

III.1. Nghiên cứu công nghệ nhân giống nguyên liệu ở các vùng sinh thái khác nhau và tạo sinh khối tế bào cúc gai.

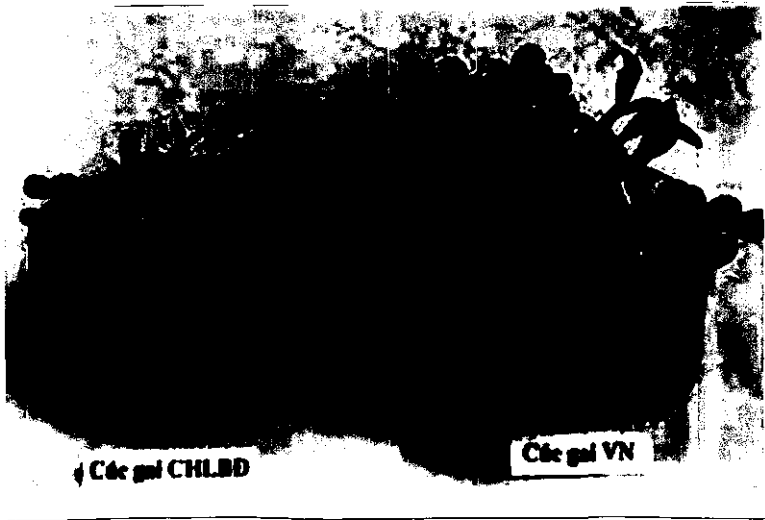
Để thực hiện các vấn đề được đặt ra, cần nghiên cứu cúc gai một cách hệ thống từ việc tạo giống và thu nguyên liệu bằng qui trình nhân giống trồng đại trà ở các vùng sinh thái thích hợp và nuôi cấy tạo sinh khối cúc gai trồng tại Việt Nam.

III.2.1 Sự nảy mầm hạt cúc gai.

Bước đầu chúng tôi tiến hành khảo sát sự nảy mầm của hạt cúc gai từ cây trồng ở Việt Nam đã được du nhập và trồng SaPa từ lâu, và xin từ CHLB Đức với mục đích để so sánh. Hạt cúc gai được sấy khô đạt độ ẩm 9-10% và tiến hành thí nghiệm. Hạt được gieo trên giấy lọc thấm nước cất trong hộp petri, mỗi công thức nhắc lại 3 lần, mỗi lần gieo 100 hạt, để trong tối ở các nhiệt độ 15, 25 và 35°C. Số hạt nảy mầm được theo dõi sau 3, 5 và 7 ngày. Kết quả được trình bày trong bảng 5.

Bảng 5. Ảnh hưởng của nhiệt độ đến thời gian nảy mầm của hạt cúc gai

Nhiệt độ-°C	Tỷ lệ nảy mầm (%) của hạt cúc gai					
	Sau 3 ngày		Sau 5 ngày		Sau 7 ngày	
	Cúc Đức	Cúc VN	Cúc Đức	Cúc VN	Cúc Đức	Cúc VN
15	12,25	10,53	45,84	30,71	56,64	47,83
25	40,14	26,53	61,25	37,44	78,93	63,34
35	38,65	25,72	58,83	35,83	71,84	58,03



Hình 6. Cây cúc gai từ hạt cúc gai Đức (1) và hạt cúc gai VN (2)

Nhiệt độ tối ưu khoảng 25°C, 78,93% hạt cúc gai Đức và 63,34% hạt cúc gai VN nảy mầm sau 7 ngày; Ở nhiệt độ 15°C và 35°C tỷ lệ nảy mầm thấp hơn. Như vậy nhiệt

độ đóng vai trò quan trọng trong quá trình nảy mầm hạt cúc gai. Tuy tỷ lệ nảy mầm của hạt cúc gai Đức cao hơn nhưng sinh trưởng lại chậm hơn cây cúc gai Việt Nam.

III.2.2. Thử nghiệm trồng Cúc gai.

Cúc gai đã được trồng tại Sapa trong nhiều năm qua do khí hậu thích hợp với loài cây ôn đới này và cho hàm lượng hoạt chất không kém cúc gai của CHLB Đức (bảng 2). Tuy nhiên nếu cây cúc gai phát triển được ở vùng đồng bằng thì việc thu nguyên liệu sẽ có nhiều thuận lợi hơn, vì thế chúng tôi đã thử nghiệm trồng cúc gai trong điều kiện đồng bằng ở Hà Nội tại Trung Văn và An Khánh Thường Tín. Kết quả thu được cho thấy cúc gai có thể trồng trong điều kiện khí hậu ở Hà Nội, cho hoa và quả ngay trong năm thứ 1. Thời vụ trồng thích hợp là từ tháng 10 năm trước đến tháng 5 năm sau. Vụ Đông Xuân của các năm 2001-2003 chúng tôi thử nghiệm trồng cúc gai trên diện tích 100m² tại Hà Nội và Sa Pa. Các số liệu về thời vụ, sản lượng và chất lượng có thể tổng kết như sau và trong các bảng 6,7.

+ Thời vụ gieo trồng:

Tại Sapa: Gieo vườn ươm: tháng 8-9 năm trước.

Trồng cây con: tháng 9-10 năm trước.

Thu hoạch quả: tháng 6-7 năm sau.

Tại Hà Nội: Gieo vườn ươm: tháng 10-11 năm trước.

Trồng cây con: tháng 11-12 năm trước.

Thu hoạch quả: tháng 5-6 năm sau.

Như vậy cây cúc gai trồng ở Hà Nội có thời vụ (9-10 tháng) ngắn hơn ở Sapa (10-11 tháng).

Bảng 6. Các chỉ tiêu sinh trưởng và năng suất của cúc gai trồng ở Hà Nội và Sapa.

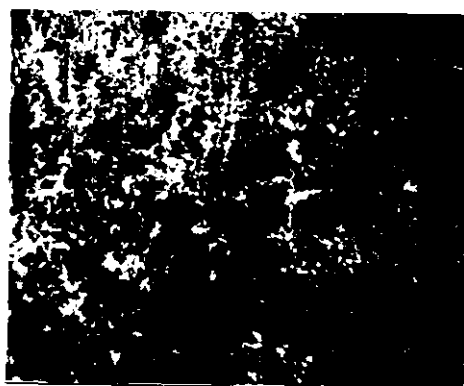
Số TT	Các chỉ tiêu	Hà Nội	Sapa
1	Chiều cao cây (cm)	118,2	135,7
2	Số hoa/cây (hoa)	7,4	7,5

3	Số quả hữu hiệu (quả)	4,8	4,9
4	Khối lượng quả/cây (gam)	28,7	29,8
5	Khối lượng hạt/cây (gam)	13,2	15,7
6	Năng suất hạt/sào Bắc bộ (kg)	10-12	11-13

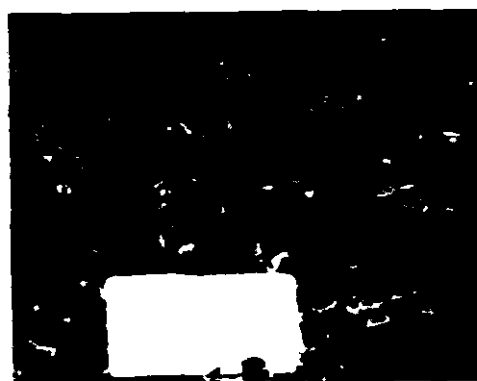
Bảng 7. Hàm lượng hoạt chất

Nhóm chất	Cúc gai trồng ở Hà Nội	Cúc gai trồng ở Sapa
Dầu	20,40%	21,50%
Flavonoit	2,55%	2,48%

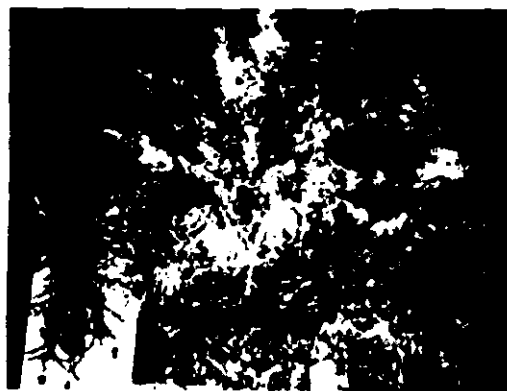
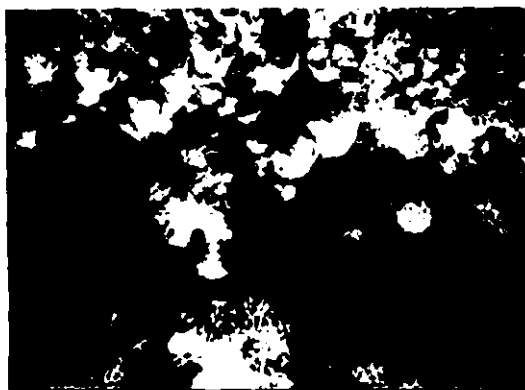
Các kết quả thu được cho thấy: cây cúc gai trồng ở Hà Nội và Sa Pa đều sinh trưởng và phát triển tốt, cho hạt ngay trong 1 năm trồng, cho năng suất hạt (10-13kg/ sào) và chất lượng hoạt chất Silymarin (2,48-2,55%) gần như nhau. Theo tài liệu nước ngoài thì hạt cúc gai trồng ở các vùng khí hậu khác nhau có hàm lượng Silymarin biến động từ 1,5% - 3,0% chất khô (7, 12). Các số liệu thu được bước đầu cho thấy có thể trồng đại trà cúc gai tại địa bàn các vùng đồng bằng để thu nguyên liệu sản xuất thuốc (cần lặp lại thí nghiệm trồng ở nhiều nơi).



Hình 8. Cây cúc gai trồng ở Sa Pa



Hình 9. Cây cúc gai trồng ở Thường Tín



Hình 10. Cây cúc gai đang phát triển(1) và đang ra hoa(2) trồng tại Trung văn, Hà Nội.

III.2.3. Thử nghiệm nuôi cấy mô tế bào Cúc gai.

Với tỷ lệ nảy mầm tốt chúng tôi tiến hành thử nghiệm nuôi cấy mô rễ và lá cúc gai tạo sinh khối tế bào trong phòng thí nghiệm. Bước đầu đã tìm được môi trường thích hợp cho nuôi cấy mô cúc gai và đã tạo được mô sẹo của các khối mô cho hai giống cúc gai của Đức và Việt Nam.

+Khử trùng hạt và cho nảy mầm:

Ngâm hạt và rửa nước cất 3 lần; lắc trong cồn 70% trong 1 phút, sau đó lắc trong nước giaven 50% trong 20 phút; rửa lại nước cất nóng ấm 3 lần; cấy hạt vào trong bình có chứa môi trường cho hạt nảy mầm. Kết quả 100% hạt nảy mầm, môi trường cho hạt nảy mầm tốt ký hiệu là T/2.

+Tạo mô sẹo từ cây cúc gai:

Sau khi hạt nảy mầm thành cây con hoàn chỉnh sau 4 tuần, chúng tôi tiếp tục cắt mảnh lá và mảnh rễ để đưa vào môi trường tạo mô sẹo là các môi trường cơ bản Murashige và Skoog có bổ sung thêm một số thành phần khác được ký hiệu là môi trường TMI và TMS. Sau thời gian 1 tháng bắt đầu hình thành mô sẹo. Nuôi cấy mô sẹo trong môi trường 141 và MSD2. Đối với lá môi trường thích hợp cho việc tạo mô sẹo có ký hiệu là **TM1**, đối với rễ là môi trường có ký hiệu **TMS**.

Sau khi mô sẹo đã được hình thành thì môi trường thích hợp cho việc nuôi cấy mô sẹo để tạo sinh khối là **141** và **MSD2** sau khi đã thử trên các môi trường điển hình khác

nhau. Những kết quả này được phản ánh rõ nét qua các ảnh chụp sau (hình 11,12,13,14,15). Kết quả sau thời gian nuôi cấy 2 tháng với thời gian cấy chuyển là 20 ngày thu được 155,5 gam khô sinh khối mô rễ và 100,4 gam khô sinh khối mô lá trên thể tích nuôi cấy khoảng 10 lít mỗi loại. Theo kết quả phân tích thì các mô nuôi cấy thu được từ lá và rễ đều chứa hoạt chất flavonoit, phenol và glucozit (bảng 8). Các kết quả định lượng Silymarin thô cho thấy hàm lượng Silymarin trong mô lá chiếm khoảng 0.97% và trong mô rễ là 1,25%.

Bằng phương pháp sắc ký lớp mỏng trên bột Silicagel G, chạy trong hệ dung môi: Toluen - Etylaxetat - Axeton - Acid Formic (5:2:2:1), chúng tôi đã phát hiện được sự phân bố của thành phần flavonoid trong dịch chiết các mẫu mô cúc gai, kết quả được tóm tắt trong trong bảng 9.

Bảng 8. Định tính hoạt chất mô tế bào cúc gai.

T T	Nhóm chất đặc trưng	Phản ứng	Mô lá	Mô rễ
1	Polyphenol	NaOH -10%	TM1- vàng đỏ (++++)	TM1- vàng đỏ (++++)
			TMS –vàng (++)	TMS- vàng (++)
	Flavonoid	Shinoda	TM1- hồng (+++)	TM1-hồng (++++)
			TMS- hồng nhạt (+)	TMS- hồng(++)
2	Glucozit	FeCl3 -5%	TM1-xanh đen (+++++)	TM1-xanh đen (+++++)
			TMS- xanh nâu (+++)	TMS-xanh vàng (++)
		Kele-Kilian	TM1-vạch nâu (+++++)	TM1-vạch nâu (++++)
			TMS-vạch nâu (+++)	TMS-vạch nâu (+++)

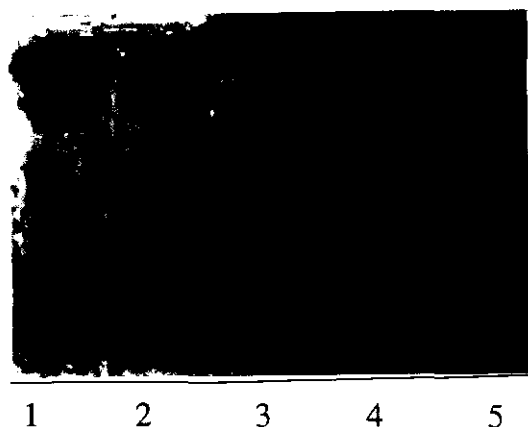
TM1, TMS là hai môi trường nuôi cấy. Dấu (+) chỉ mức độ đậm nhạt của các vết.

Bảng 9. Đặc trưng phân bố các hoạt chất của các mẫu Silymarin Cúc gai

Rf và đặc trưng thành phần flavonoid các mẫu mô Cúc gai				
Silymarin chuẩn	Mô lá - TM1	Mô lá - TMS	Mô rễ - TM1	Mô rễ - TMS
0,96	0,96-vàng chanh	0,96-vàng chanh	0,96- vàng	0,96- vàng
0,93				0,88-vàng
0,85	0,85-vàng chanh	0,87-vàng cam	0,85-vàng	0,84-vàng
0,76			0,75-vàng	0,77-vàng
0,65	0,68-vàng xanh	0,65-vàng chanh	0,65-vàng	0,65-vàng

Bằng phương pháp sắc ký lớp mỏng trên bột Silicagel G, chạy trong hệ dung môi: Toluen - Etylaxetat - Axeton - Acid Formic (5:2:2:1), chúng tôi đã phát hiện được sự phân bố của thành phần flavonoid trong dịch chiết các mẫu mô cúc gai, kết quả được tóm tắt trong bảng 9.

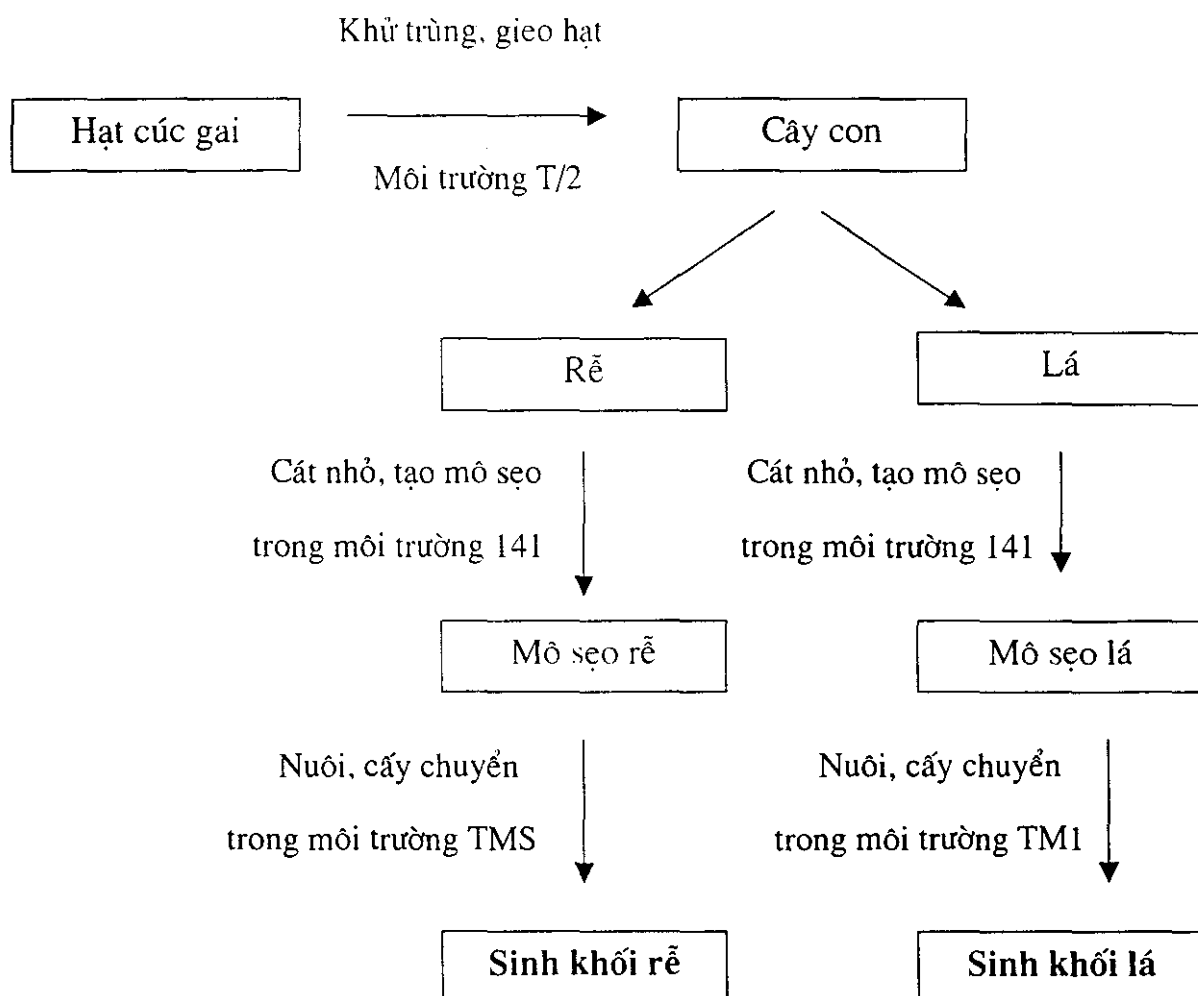
Các mô nuôi cấy có chứa các hoạt chất có Rf giống như thành phần hoạt chất Silymarin chuẩn, thành phần hoạt chất ở mô rễ trên môi trường TMS với 5 băng giống với chất chuẩn nhiều hơn ở mô lá với 3 băng ở cả hai môi trường nuôi cấy (hình 11).



Hình 11. Sắc ký đồ của SKLM các chế phẩm flavonoit chiết rút từ mô sẹo rễ(1), lá(2), và Silymarin từ mô sẹo rễ(3) và mô sẹo lá(4 và 5)

Các kết quả thu được của chúng tôi cũng tương đồng với các kết quả nuôi cấy mô rễ cây cúc gai đã được nhiễm chủng *A. rhizogene* của F.Alikaridis (11). Theo tác giả thì sinh khối mô rễ cúc gai thu được có chứa đầy đủ các thành phần flavonoit của Silymarin và hiệu suất thu được cao. Như vậy việc nuôi cấy mô tế bào cúc gai có thể là biện pháp hữu hiệu để thu nhận Silymarin chủ động trong các điều kiện khí hậu khác nhau không thích ứng với sinh trưởng và phát triển của cây cúc gai trồng đại trà.

Qui trình tổng quát thu nhận sinh khối tế bào cúc gai





Ảnh 6: Tạo mô sẹo từ rễ cây cúc gai



Ảnh 7: Tạo mô sẹo từ lá cây cúc gai trên môi trường 141



Ảnh 8: Mô sẹo từ rễ cây cúc gai trên môi trường 141



Ảnh 9: Cây con hoàn chỉnh



Ảnh 10: Tạo mô sẹo từ lá cây cúc gai trên môi trường MT1



Ảnh 11: Hình ảnh cây cúc gai

QUY TRÌNH
SẢN XUẤT THUỐC UPHATON

NGƯỜI CHỦ TRÌ: THS. NGUYỄN KIM DUNG
TS. PHAN QUỐC KINH

HÀ NỘI - 2004

QUY TRÌNH SẢN XUẤT THUỐC UPHATON

1. Mở đầu

Con người ngày càng muốn sống khỏe hơn, hạnh phúc hơn và sống lâu dài hơn. Từ xa xưa, loài người đã cố gắng đi tìm các phương thuốc trường thọ, các phương thuốc làm tăng cường sức khỏe. Các vận động viên thể dục thể thao thì mong muốn có những sản phẩm để nâng cao thể lực, nâng cao sức bền bỉ, nhanh chóng hồi phục sức khỏe mà cuối cùng là nâng cao thành tích, kỷ lục thi đấu.

Sự ra đời của các sản phẩm Doping mà hàng đầu là các steroid bán tổng hợp đã đưa lại nhiều thành tích tuyệt vời, siêu đẳng cho nhiều vận động viên, nhưng sau đó họ đã phải chịu tàn phế về cơ thể, vì phải trả giá cho sự huy động quá mức sức lực của mình cho các thành tích giả tạo. Vì vậy, việc sử dụng Doping đã bị nghiêm cấm triệt để. Nhằm nâng cao thành tích thi đấu cho các vận động viên thể dục thể thao, người ta lại quay về với cây cỏ mà trước hết là Sâm Triều Tiên, Sâm Mỹ, Đông trùng hạ thảo. Trong chục năm trở lại đây, các nhà khoa học Âu, Mỹ đã chú ý đến các sản phẩm từ cây Tật lê *Tribeches terrestris* có tác dụng nâng cao sức khỏe và thành tích thi đấu cho các vận động viên. Các sản phẩm Tribetan, Men's Power có chứa các saponin steroid của Tật lê được sử dụng rộng rãi cho nam giới [1], [2]. Không dừng lại ở đó, các nhà khoa học Anh, Mỹ lại còn phối hợp Tật lê với một số dược liệu khác như:

Geni X (Mỹ), gồm cao Tật lê, Dâm dương hoắc, Đinh lăng [3].

Testokisk (Anh), gồm Tật lê, dược liệu có chứa betaecdysteron...

Các sản phẩm này có tác dụng làm tăng sức lực, tăng sự bền bỉ, dẻo dai và làm tăng thành tích thi đấu cho các nam vận động viên thể dục thể thao.

Học tập các kinh nghiệm quý giá đó và dựa vào nguồn Tật lê mọc hoang với trữ lượng đáng kể ở bờ biển Nam Trung bộ, Xí nghiệp Dược phẩm Trung ương 25 đã được Bộ Y tế cho phép sản xuất thuốc Tribelus chứa cao Tật lê dùng cho nam giới và Xí nghiệp đã tiến hành nghiên cứu sản xuất viên nang Uphaton theo công thức của Geni X (Mỹ).

Đề tài nhỏ này nằm trong phạm vi đề tài nghiên cứu cấp Nhà nước quản lý KC04.17 do Viện Công nghệ sinh học Việt Nam làm cơ quan chủ trì đề tài và được thực hiện từ tháng 10/2001 đến tháng 10/2004.

Sau đây xin trình bày các bước nghiên cứu quy trình sản xuất viên nang Uphaton.

2. Quy trình sản xuất viên nang Uphaton

Như đã trình bày ở trên cao Tật lê và viên nang Tribelus có tác dụng kích thích sự sinh tổng hợp của các hocmon sinh dục của cả nam và nữ giới cụ thể là làm tăng hàm lượng testosterone trong cơ thể nam giới và làm tăng hàm lượng estradiol trong cơ thể nữ giới [4], [5], [6].

Nhằm mục đích tạo một chế phẩm có hoạt tính đặc trưng có nhiều tác dụng bổ ích cho nam giới, các nhà khoa học Mỹ đã nghiên cứu các sản phẩm Geni X gồm có các hoạt chất của Tật lê phối hợp với cao Dâm dương hoắc và cao rễ đinh lăng Geni X có hoạt tính cao và có hiệu lực làm tăng sức khoẻ và hoạt động sinh dục cho nam giới.

Ở Anh cũng đã sản xuất và sử dụng sản phẩm Testokick dùng cho các vận động viên nam để tăng sinh lực, tăng thành tích thi đấu: Testokick có chứa các taponin steroid của Tật lê và hoạt chất beta-ecdysterone có trong một số thực vật.

Geni X (Mỹ) Testo kick (Anh) đều là các sản phẩm bổ sung dinh dưỡng.

Nước ta có nhiều các dược liệu: dâm dương hoắc và đinh lăng. Vì vậy chúng tôi đã nghiên cứu sử dụng hai dược liệu này để bào chế Viên nang Uphaton tương tự như Geni X (Mỹ).

Dâm dương hoắc: *Epimedium maeranthum* còn gọi là dâm dương hoắc lá to. Dược liệu này được nhập từ Trung Quốc và mọc hoang ở Lào Cai. Bộ phận dùng là lá phơi khô.

Dâm dương hoắc là vị thuốc cổ truyền được sử dụng lâu đời ở Trung Quốc và ở Việt Nam.

Theo Tiêu Thụ Đức (Trung Quốc) dâm dương hoắc có tác dụng bổ thận dương và trị thấp khớp cụ thể được dùng để điều trị liệt dương dưới dạng kết hợp với tật lê, ba kích, nhục thung dung và toả dương. Liều dùng

dâm dương hoắc là 3-9g ngày. Ở Trung Quốc đã xác định dâm dương hoắc có tác dụng làm tăng quá trình tạo tinh trùng.

Đinh lăng: *Polyscias fruticosa* (Noto panax fruticosum)

Là cây được trồng phổ biến ở nước ta, lá được dùng làm rau sống, gói nem chua có tác dụng bổ, rễ đinh lăng có tác dụng tăng lực, bổ.

Viện Y học Quân sự Việt Nam từ năm 1961 đã xác định nước sắc rễ đinh lăng có tác dụng làm tăng sức dẻo dai của cơ thể.

Rễ đinh lăng được dùng trong sản xuất thuốc hoạt huyết dưỡng não và ích huyết bổ não dưới dạng phối hợp với cao lá ngân hạnh.

Ở Nhật và Hàn Quốc Y học cổ truyền sử dụng lá đinh lăng làm thuốc bổ.

Chưa có tài liệu nghiên cứu sâu về các hoạt chất của đinh lăng, mới sơ bộ xác định rễ đinh lăng có alkaloid, saponin, flavonoid v.v...

Bước đầu chúng tôi đã thu mua lá dâm dương hoắc ở Sapa, Lào Cai. Rễ đinh lăng ở làng Nghĩa Trai Hưng Yên để phối hợp với cao Tật lê nhằm bào chế viên nang Uphaton.

Trước hết chúng tôi đã thử tác dụng chống oxy hoá của Tật lê và Dâm dương hoắc kết quả đạt được xác định cả hai dược liệu này đều có tác dụng chống oxy hoá (anti oxidant) rõ rệt.

Thực nghiệm thử tác dụng chống oxy hoá được tiến hành như sau:

5. Kết quả nghiên cứu

Dựa vào các kinh nghiệm quý giá của Y học cổ truyền Việt Nam và Trung y cùng các thành tựu mới của dược học phương Tây trong sản xuất Genix và Testokick, chúng tôi đã nghiên cứu sản xuất sản phẩm bổ sung dinh dưỡng Viên nang Uphaton bao gồm cao Tật lê, cao Dâm dương hoắc và cao rễ đinh lăng. Ngoài việc thử các tác dụng dược lý của Tật lê, chúng tôi đã xác định dâm dương hoắc cũng có tác dụng chống oxy hoá rõ rệt.

Đã tiến hành sơ bộ thử lâm sàng và thử tuổi thọ của Uphaton.

Ở lâm sàng Uphaton có tác dụng bổ, tăng sinh lực cho nam giới: Thuốc không gây các phản ứng phụ.

Cục Quản lý Vệ sinh an toàn thực phẩm Bộ Y tế đã cho phép sản xuất và sử dụng Uphaton.

Trong 2 năm 2004/- 2004 Xí nghiệp Dược phẩm TW 25 đã sản xuất 500.000 viên nang để lưu hành trong nước và đang tiếp tục xin phép Bộ Y tế được sản xuất Uphaton dưới dạng thuốc. Các đối tác Nhật Bản đã nhập một số lượng nhỏ Uphaton để về giới thiệu ở thị trường Nhật.

Như vậy Uphaton là sản phẩm bổ sung dinh dưỡng dùng cho nam giới để:

Chống suy nhược cơ thể

Tăng sức đề kháng

Tăng cường thể lực cho các vận động viên thể thao chống lão hoá

Tăng cường khả năng lao động trí óc và chân tay, sản phẩm không độc và không gây các phản ứng phụ.

6. Kiến nghị

Xin được tiến hành dự án sản xuất thử Uphaton ở quy mô 2 triệu- 3 triệu viên nang, trên cơ sở đó xin phép sản xuất thuốc Uphaton.

Để thực hiện được việc đó cần nghiên cứu sâu hơn về hoạt chất và tác dụng của sâm dương hoắc và rễ đinh lăng và thử nghiệm lâm sàng với lượng 50-70 bệnh nhân.

7. Tài liệu tham khảo

1. Tomova M.R. et al

Planta medica 1978, 188-191

2. Gyulemetova et al

Die Phasmazie 1982, 37, 4.

3. Roger Libby

Journal of Longevity 1998, No8, 19-27

4. Nguyễn Kim Dung và các cộng sự

Thuốc cổ truyền dân tộc Chăm

Nhà xuất bản Y học Hà Nội 2000.

5. Phan Quốc Kinh

Thuốc nam chữa bệnh cho người nghèo ở nông thôn và miền núi

Nhà xuất bản Y học Hà Nội 2001.

6. Phan Quốc Kinh và các cộng sự

Hội nghị hoá học toàn quốc Hà Nội 2003

QUY TRÌNH
SẢN XUẤT THUỐC TRIBELUS

NGƯỜI CHỦ TRÌ: THS. NGUYỄN KIM DUNG

QUY TRÌNH SẢN XUẤT THUỐC TRIBELUS

1. Mở đầu

Thuốc tăng sinh lực, chống lão hoá từ cây Tật lê đã được sản xuất và lưu hành ở châu Âu và Bắc Mỹ từ hơn 20 năm gần đây. Đó là các sản phẩm "Power Men" của Mỹ, Tribestan của Bungari, Tribelus của Anh... Trung Quốc cũng đã sản xuất các thuốc bổ thận từ cây Tật lê [1], [2].

Dựa vào nguồn nguyên liệu Tật lê mọc hoang ở Bình Thuận và Ninh Thuận, Xí nghiệp Dược phẩm Trung ương 25 thành phố Hồ Chí Minh với sự hợp tác của Phòng Hoá hữu cơ sinh học Phân viện Công nghệ mới và Bảo vệ môi trường Bộ Quốc phòng đã tiến hành nghiên cứu sản xuất viên nang Tribelus [3].

Quy trình này gồm có 2 giai đoạn:

- Quy trình chiết cao Tật lê
- Quy trình bào chế viên nang Tribelus và các phần thử tác dụng dược lý, độc tính và lâm sàng Tribelus.

Sau đây trình bày chi tiết về các giai đoạn đó.

2. Quy trình sản xuất thuốc Tribelus

Bao gồm các phần:

- Nghiên cứu các quy trình chiết xuất cao tật lê chứa Saponia steroid.
- Điều chế các Saponia steroid của tật lê Việt Nam.
- Quy trình bào chế viên nang Tribelus.

Sau đây xin trình bày chi tiết các nội dung đó.

2.1. Nghiên cứu các quy trình chiết xuất cao Tật lê chứa các Saponin steroid.

Từ xa xưa, dược học cổ truyền của người Chăm đã sử dụng cây Tật lê *Tribulus terrestris* L để làm thuốc cường dương và điều trị viêm họng. Cây Tật lê khô được bày bán trong một số gian thuốc cổ truyền ở một số chợ thuốc tỉnh Ninh Thuận - Bình Thuận. Hạt Tật lê nhập từ Trung Quốc cũng được sử dụng rộng rãi trong y học cổ truyền Việt Nam để làm thuốc bổ cường dương.

2.1. Chiết cao Tật lê

Trên cơ sở nghiên cứu các dung môi để chiết xuất là cồn 40°, 60°, 80° và nước nóng, chúng tôi đã chọn phương pháp chiết xuất bằng cồn 60° bằng phương pháp ngâm kiệt. Trong điều kiện này các saponin steroid sẽ tan hết ở cồn 60°, còn các chất sáp, lipid sẽ không tan. Dùng cồn 80° thì sẽ lẫn nhiều sáp, lipid. Dùng cồn 40° cũng chiết được các saponin steroid nhưng còn kéo theo nhiều tạp chất khác.

Cụ thể tiến hành như sau:

Dược liệu: được thu hái ở Bình Thuận, Ninh Thuận. Thu hoạch vào tháng 3, 4 dương lịch, chỉ lấy phần trên mặt đất của cây, loại trừ rễ cây. Cây được chặt nhỏ từng đốt 2 - 3 cm, sau đó rửa và phơi khô.

Dược liệu được xay nhỏ thành bột rồi tiến hành ngâm kiệt với cồn 60° theo tỷ lệ: 1 kg dược liệu + 8 lít cồn 60°.

Dịch chiết được bốc hơi cho đến thành cao đặc.

Tiến hành định lượng saponin steroid từ cao đặc theo phương pháp đã ghi ở chuyên đề chiết xuất saponin steroid của cây Tật lê.

Hàm lượng saponin steroid trong cao này có $12\% \pm 1\%$ [4], [5].

Dùng cao này để bào chế viên nang Tribelus và các viên nang Uphaton, Tiên dung.



Tribelus terrestris L.

2.2. Quy trình bào chế viên nang Tribelus

Thành phần cho một viên nang:

Cao Tật lê	:	250 mg
Lactose	:	130 mg
Tinh bột sắn	:	140 mg
µg stearat	:	10 mg

Đóng vào nang màu xanh - trắng.

Trước hết cân các nguyên liệu, cân riêng từng thứ, đựng trong bao nilon gói chặt, ghi tên nguyên liệu, số lượng.

Trộn khô: Dùng máy trộn Cherry - Burrel rửa sạch, lau khô và cho dược liệu theo thứ tự:

Tinh bột sắn

Lactose

trộn đều 10 phút

cho tiếp cao Tật lê

trộn đều 15 phút

làm cốm

Đóng nang, dùng máy Elanco mâm inox loại số 0. Trọng lượng trung bình 530 mg/viên nang.

Ép vỉ 10 viên nang

hay cho vào lọ nhựa, lọ 30 và 60 viên nang

Kiểm nghiệm

Giao kho

5. Kết quả nghiên cứu

Định Lần đầu tiên ở Việt Nam, Xí nghiệp Dược phẩm Trung ương 25 đã được Cục Quản lý/Bộ Y tế cho phép sản xuất, lưu hành trong nước và xuất khẩu thuốc viên nang Tribelus với các công dụng sau:

Điều trị suy yếu sinh dục cho cả nam và nữ giới

Điều trị rối loạn cương dương cho nam giới

Điều trị lãnh cảm tình dục cho phụ nữ

Đã tiến hành chiết xuất cao Tật lê có chứa 12% saponin steroid bằng phương pháp ngâm kiệt với dung môi là cồn 60°. Đã bào chế viên nang, mỗi viên có chứa 250 mg cao Tật lê.

Đã xác định Tribelus có các hoạt tính như sau:

- Hoạt tính androgen như testosterone
- Hoạt tính esteogen như estradiol
- Không có độc tính
- Hoạt tính chống oxy hoá (anti oxidant)

và đã thử lâm sàng ở Viện Y học cổ truyền Hà Nội cho cả các bệnh nhân nam và nữ và kết quả là:

Tribelus có tác dụng tốt đối với nam giới rối loạn cương dương và có tác dụng tốt với nữ giới bị chứng lãnh cảm tình dục.

Thuốc không gây tác dụng phụ.

Tóm lại đã nghiên cứu từ khâu tìm kiếm, phát hiện, thu hái, trồng trọt nguyên liệu đến khâu sản xuất thuốc mới để phục vụ cho việc bảo vệ và nâng cao sức khoẻ cho cộng đồng.

Trong 2 năm 2003 - 2004 đã sản xuất được 2.000.000 nang Tribelus.

6. Tài liệu tham khảo

1. Tomova M. R et al
Palanta medica 1978, 188 - 191.
2. Gynlemetova et al
Die Pharmazie 1982, 37, 4.
3. Nguyễn Kim Dung và các cộng sự
Thuốc cổ truyền dân tộc Chăm
Nhà xuất bản Y học Hà Nội, 2000.
4. Phan Quốc Kinh Kéo dài tuổi thanh xuân
Nhà xuất bản Y học Hà Nội, 2000.
5. Phan Quốc Kinh và các cộng sự
Hội nghị Hoá học toàn quốc, Hà Nội, 2003.

QUY TRÌNH
SẢN XUẤT THUỐC TIÊN DUNG

NGƯỜI CHỦ TRÌ: THS. NGUYỄN KIM DUNG

HÀ NỘI - 2004

QUY TRÌNH SẢN XUẤT TIỀN DUNG

1. Mở đầu

Các sản phẩm chống lão hoá, chống oxy hoá, làm đẹp và kéo dài tuổi thọ cho nữ giới là những sản phẩm được tiêu dùng với sản lượng ngày càng tăng và các sản phẩm đó ngày càng phong phú, đa dạng và đặc sắc.

Y học cổ truyền phương Đông thường sử dụng Ích mẫu, Nhân trần, Đương quy, Tâm thất để làm tăng sức khoẻ, tăng sinh lực cho nữ giới. Cao gà ác (gà đen), nhung hươu, yến sào, nhân sâm, linh chi, ngọc trai cũng là những sản phẩm đem lại sự tươi trẻ, khoẻ mạnh cho nữ giới.

Y học hiện đại đã phát hiện estradiol, progesteron là các nội tiết tố sinh dục của phái nữ. Các nội tiết tố này đảm bảo cho quá trình xuất hiện kinh kỳ của nữ giới từ 10-12 tuổi cho đến 50-55 tuổi và đảm bảo cho sự phát triển thai nghén, nuôi con bú của phụ nữ.

Đến tuổi mãn kinh, hàm lượng estradiol và progesteron trong cơ thể phụ nữ giảm thiểu rõ rệt và đó là nguyên nhân gây ra chứng bốc hỏa, các rối loạn về thần kinh, tuần hoàn ở phụ nữ như tính khí thất thường, huyết áp cao, chứng loãng xương, đòn xương v.v...

Để khắc phục các triệu chứng đó, người ta sử dụng phương pháp thay thế nội tiết tố, tức là cung cấp một lượng nội tiết tố cần thiết cho phụ nữ cao tuổi và kết quả là chị em có cuộc sống tươi trẻ, khoẻ mạnh và sống lâu hơn. Gần đây các nhà khoa học lại còn phát hiện được các phytoestrogen, các isoflavonoid trong đậu tương, sắn dây, cỏ ba lá đỏ, thăng ma, ân châu có tác dụng như estrogen nhưng yếu hơn. Việc sử dụng các phytoestrogen cho nữ giới có tuổi đã đem lại những kết quả mỹ mãn: làm mất các triệu chứng bất lợi ở tuổi mãn kinh, phòng chống loãng xương lại còn phòng chống ung thư vú, buồng trứng.

Một biện pháp khác là sử dụng các cây cỏ có hoạt tính làm tăng các quý trình sinh tổng hợp trong cơ thể như Tật lê, củ mài *Villosa*, *Avena sativa*... cũng đem lại nhiều hiệu quả tốt đẹp [1], [2].

Đồng thời các sản phẩm Pregnenolon, DHEA (các tiền nội tiết tố sinh dục nữ) Vitamin E, Tiền Vitamin B5, beta caroten, sữa ong chúa, lô hội v.v... là những sản phẩm bổ sung dinh dưỡng đang được sử dụng rộng rãi cho phụ nữ trên thế giới.

Xuất phát từ những thành tựu trên và dựa vào nguồn cây cỏ phong phú và đa dạng của nước ta, chúng tôi đã nghiên cứu đưa vào sản xuất sản phẩm chống lão hoá, chống oxy hoá cho nữ giới bao gồm cao Tật lê có chứa các saponin steroid có tác dụng kích thích sinh động tổng LH và estradiol trong cơ thể [3], [4] Cao Sắn dây có chứa các phytoestrogen [5], kết hợp với Tam thất, Đương quy, Nhân trần, Câu kỳ tử là những dược liệu bồi bổ, tăng sinh lực, hoạt huyết điều hoà kinh nguyệt cho nữ giới. Sản phẩm này có tên là Tiên Dung - Tên của công chúa xinh đẹp con gái Vua Hùng thứ 18 đã cùng công chúa Tây Sa (bà tổ thuốc Nam theo truyền thuyết) lấy Chử Đồng Tử và lập nghiệp ở Hưng Yên bên bờ trái sông Hồng Hà.

2. Quy trình sản xuất Viên nang Tiên Dung

Như đã trình bày ở quy trình 1, các Saponin steroid của Tật lê có khả năng làm tăng quá trình sinh tổng hợp các nội tiết tố LH và estradiol ở nữ giới. Chúng tôi đã nghiên cứu phối hợp cao Tật lê với một số dược liệu sau nhằm sản xuất một sản phẩm bổ sung dinh dưỡng cho nữ giới.

Đương quy: *Angelica sinensis*

Là vị thuốc nhập của Trung Quốc có tác dụng bổ huyết, hoạt huyết và điều hoà kinh nguyệt. Phối hợp đương quy với sắn dây, hồng hoa có tác dụng hoạt huyết. Liều dùng hàng ngày từ 3-9g.

Tam thất: *Panax notoginseng*

Là vị thuốc nhập từ Trung Quốc và đã được trồng ở Lào cai. Tam thất có tác dụng bổ, nhất là bổ cho phụ nữ sau khi sinh đẻ. Nó có các hoạt chất tương tự như nhân sâm nên có tác dụng thích nghi sinh học. Tam thất còn có tác dụng điều trị các chứng xuất huyết như ho ra máu, tiểu tiện đại tiện ra máu, tử cung xuất huyết hay kinh nguyệt quá nhiều. Liều dùng hàng ngày từ 1-3 g.

Câu kỳ tử: *Lycium sinense* còn gọi là Kỳ tử

Được nhập từ Trung Quốc, hiện đã được trồng ở Việt Nam.

Trong quả này có caroten, Vitamin C là vị thuốc bổ toàn thân, chống lão hoá. Người lớn dùng 6-15 g/ngày.

Nhân trần: *Adenosma caeruleum*

Có nhiều ở nước ta, được dùng làm thuốc điều trị viêm gan, hoàng đản. Nó còn có tác dụng chống viêm, kháng sinh, thanh nhiệt, bí tiểu tiện thường dùng cho phụ nữ sau khi sinh để chống hồi phục cơ thể.

Ngày dùng 4-6 g.

Nhân dân ta còn dùng nhân trần để pha nước chè nhân trần uống hàng ngày.

Cát căn, sắn dây: *Pueraria thompsoni*

Là cây trồng rất phổ biến ở nước ta để làm bột thực phẩm sắn dây.

Y học cổ truyền dùng sắn dây để điều trị cảm, sốt, nhất là sốt cho trẻ em.

Người lớn ngày dùng 8-20 g.

Hoa sắn dây có tác dụng giải độc được dùng để chữa các chứng say rượu.

Gần đây các nhà khoa học đã xác định trong sắn dây có chứa các phytoestrogen là các isoflavonoid - genistein, daidzein... có tác dụng như estradiol nhưng yếu hơn. Các phytoestrogen hiện đang được sử dụng rộng rãi ở các nước tiên tiến để làm thuốc hay các sản phẩm bổ sung dinh dưỡng chống lão hoá cho nữ. Các phytoestrogen có các hoạt tính như sau:

- Có hoạt tính estrogen
- Dùng phòng các chứng bốc hỏa, huyết áp cao, tính khí thất thường cho phụ nữ ở tuổi mãn kinh.
- Phòng chống chứng loãng xương, dễ gãy xương.
- Phòng chống ung thư tuyến tiền liệt cho nam giới.
- Làm đẹp da cho nữ giới

Trong khuôn khổ đề tài KC 04.17. TS. Đỗ Hoa Viên và các cộng sự đã nghiên cứu các chất isoflavonoid của sắn dây.

5. Kết quả nghiên cứu

Trên cơ sở xác định cao Tật lê có tác dụng estrogen và có tác dụng chống lão hoá (antioxidant) chúng tôi đề nghị đã phối hợp cao tật lê với các dược liệu sau đây để nghiên cứu một sản phẩm đặc dụng cho nữ giới:

Đương quy có tác dụng bổ huyết, điều hoà kinh nguyệt.

Tam thất có tác dụng sinh thích nghi, cầm máu sản phụ.

Sản dây có tác dụng^Đestrogen, giải độc thanh nhiệt.

Câu kỳ tử có tác dụng bổ gan thận, sáng mắt.

Sản phẩm Tiên Dung này có các tác dụng:

Chống lão hoá cho nữ giới, làm da dẻ tươi trẻ mịn màng.

Tăng sức đề kháng, tăng khả năng miễn dịch cho cơ thể.

Tăng sinh lực cho nữ giới.

Bước đầu đã thử lâm sàng cho một số nữ giới và kết quả tăng sinh lực ở người dùng rất rõ rệt.

Xí nghiệp Dược phẩm TW 25 đã được Bộ Y tế cho phép sản xuất là lưu hành Tiên Dung dưới dạng sản phẩm bổ sung dinh dưỡng. Trong 2 năm 2003-2004 đã sản xuất được 300.000 viên nang Tiên Dung.

6. Kiến nghị

Trong thời gian tới sẽ tiếp tục nghiên cứu về tuổi thọ của Viên nang Tiên Dung và tiếp tục hoàn thiện thử lâm sàng để xin phép sản xuất Tiên Dung dưới dạng thuốc chống được lão hoá, tăng sinh lực cho nữ giới.

7. Tài liệu tham khảo

1. Tomova M.R. et al

Planta medica 1978, 188-191

2. Gyulemetova et al

Die Pharmazie 1982, 37, 4.

3. Nguyễn Kim Dung và các cộng sự

Thuốc cổ truyền dân tộc Chăm

Nhà xuất bản Y học Hà Nội 2000.

4. Phan Quốc Kinh

Thuốc nam chữa bệnh cho người nghèo ở nông thôn và miền núi

Nhà xuất bản Y học Hà Nội 2001.

5. Đỗ Hoa Viên và cộng sự

Hội nghị Công nghệ Sinh học toàn quốc, Hà Nội 2003.

TỔNG QUÁT KẾT QUẢ VÀ KIẾN NGHỊ

Trong 3 năm từ tháng 10-2001 đến tháng 10-2004 đề tài nhánh KC04.17.08 đã thực hiện có hiệu quả việc nghiên cứu đưa vào sản xuất các sản phẩm sau:

1. Thuốc Tribelus: đi từ khâu đầu khai thác nguyên liệu mọc hoang. Tật lê ở nước ta, lần đầu tiên đã nghiên cứu quy trình chiết xuất, quy trình bào chế, thử dược lý, độc tính, thử lâm sàng thuốc Tribelus và đã được Bộ Y tế cho phép sản xuất và lưu hành ở trong toàn quốc.

Quá trình nghiên cứu này là một quá trình khép kín đi từ nguyên liệu đến sản phẩm thuốc đòi hỏi phải đảm bảo chất lượng sản phẩm rất cao. Như vậy lần đầu tiên ở Việt Nam đã sản xuất được một sản phẩm thuốc chống lão hoá tương tự như các sản phẩm mới hiện đại đang được sử dụng rộng rãi ở Bắc Âu, Tây Âu...

2. Hai sản phẩm bổ sung dinh dưỡng dựa trên nền tảng là cao Tật lê và thêm các vị thuốc hữu ích để có Uphaton chuyên dùng cho nam giới và Tiên Dung chuyên dùng cho nữ giới.

Uphaton được nghiên cứu theo công thức của sản phẩm Genix của Mỹ sản xuất, còn Tiên Dung là sự kết hợp của cao Tật lê với một số vị thuốc cổ truyền và cao cát căn có chứa các phytoestrogen. Các sản phẩm này đã được phép sản xuất và lưu hành trong toàn quốc.

Trong 2 năm 2003-2004, Xí nghiệp Dược phẩm TW 25 đã sản xuất:

2.000.000 viên nang Tribelus

500.000 viên nang Uphaton

300.000 viên nang Tiên Dung

Một số nhỏ sản phẩm đã được xuất khẩu sang Châu Âu và sang Nhật.

Tóm lại, Đề tài nhánh đã thực hiện tốt các nhiệm vụ chỉ tiêu mà Đề tài KC 04.17 đã quy định.

Dựa vào các kết quả đó, Đề tài nhánh KC 04.17.08 xin kiến nghị.

QUY TRÌNH CÔNG NGHỆ
SẢN XUẤT BỘT THUỐC HAGATON

NGƯỜI CHỦ TRÌ: GS. TSKH NGUYỄN TÀI LƯƠNG

I. MỞ ĐẦU

Vai trò của dinh dưỡng đối với hoạt động của não bộ là rất lớn. Theo Santé Magazine / Tạp chí Thông tin KHKT Kinh tế Thế giới, N22, 6/ 2000/, não bộ tiêu thụ khoảng 25% khẩu phần năng lượng mỗi ngày, mô não không chịu được sự thiếu oxy chỉ trong vài giây, bởi lẽ các neuron là nơi oxy hoá sinh học cao nhất để giải phóng năng lượng cần thiết cho các hoạt động chức năng của não bộ. Nếu dinh dưỡng không đầy đủ hoặc mất cân đối, và máu không vận chuyển kịp thời oxy và các chất dinh dưỡng lên não thì ảnh hưởng xấu đến toàn bộ hoạt động của não.

Khi cơ thể thiếu chất dinh dưỡng, thần kinh mệt mỏi, đứng trước vài sự lựa chọn, thường chậm chạp và do dự, hoặc quyết định nhanh, nhưng với những cơ hội dễ lầm lẫn. Mức độ ảnh hưởng tùy thuộc vào cá thể và tính chất nghề nghiệp. Nhiều người ngồi văn phòng, đầu óc căng thẳng kéo dài dẫn đến mất ngủ, mắc chứng trầm uất, có khi uống đến 7-8 viên thuốc an thần mà vẫn không ngủ được ! Trong các trường hợp này rất cần bổ sung dinh dưỡng theo phương châm- chữa bệnh bằng ăn, tốt hơn bằng thuốc.

Đối với những người khoẻ mạnh, có chế độ làm việc và ăn uống hợp lý, bổ sung dinh dưỡng đầy đủ và rèn luyện tốt, sẽ thiên về sự cân bằng, thị giác tốt, phản xạ nhanh nhạy, chính xác, tư duy sáng tạo tốt, có hiệu năng tối đa giúp sự phân tích thông tin và sự quyết đoán nhanh chóng. Đây chính là mong muốn của đông đảo các cán bộ quản lý, sĩ quan quân đội và công an, cán bộ nghiên cứu và giảng dạy, sinh viên và học sinh, những người ngồi văn phòng làm việc nhiều với máy vi tính, các vận động viên (VĐV) thuộc các bộ môn cờ vua, bắn súng, võ thuật, thể dục nghệ thuật....

Xuất xứ từ tình hình trên, kế tục những kết quả đạt được của mình trong lĩnh vực nghiên cứu sản xuất các thực phẩm chức năng, chúng tôi nhận nhiệm vụ trong kế hoạch 2001-2004, thực hiện đề tài nhánh nghiên cứu tạo chế phẩm bổ sung dinh dưỡng từ nguồn tài nguyên động vật biển, nhằm chống mệt mỏi thần kinh ,cải thiện hoạt động của não bộ, trong đề tài KC04-17 do PGS.TS Nguyễn Thị Ngọc Dao làm chủ nhiệm. Đây là vấn đề hoàn toàn mới mẻ của CNSH.

III. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU.

Các mẫu động vật biển sau thu mua tại vùng biển miền Trung (Nha Trang-Khánh Hoà, Nghi Sơn - Thanh hoá) được bảo quản, xử lý lạnh và phân tích bằng các phương pháp hoá sinh hiện đại trong phòng thí nghiệm Viện CNSH:

1. Phân tích thành phần và hàm lượng các nguyên tố vi lượng trong thịt các loài động vật biển bằng phương pháp quang phổ hấp phụ nguyên tử hay nhiễu xạ huỳnh quang tia X.
2. Phân tích thành phần và hàm lượng các axit amin trong thịt các loài động vật biển bằng máy phân tích axit amin tự động HP Amino Quant Series II (Hewlett Packard).
3. Phân tích hàm lượng Carotenoid trong thịt các loài động vật biển bằng quang phổ tử ngoại.
4. Phân tích hàm lượng hormone steroid - testosterone trong thịt các động vật biển bằng phương pháp Miễn dịch enzym ELIZA, bộ kit chuẩn của hãng Biomerieux.
5. Đã ứng dụng kỹ thuật enzym và hoá sinh thu nhận và tinh sạch peptid, nghiên cứu các điều kiện tối ưu của quá trình thuỷ phân để chế biến thịt của động vật biển (hải sâm, hải long, câu gai...) thành bột gốc "Hagaton" dễ tiêu hoá có giá trị dinh dưỡng cao và giàu hoạt chất sinh học. Phối hợp với XN Dược Trung ương 25 Tp HCM xây dựng công thức phối chế và quy trình công nghệ tạo viên nang Hagaton trên dây chuyền thiết bị hiện đại của Xí nghiệp. Thành phần viên nang Hagaton gồm bột gốc và các phụ gia. Các phụ gia gồm Vitamin B1, Vitamin B6, bột amidon, Lactose, Mg Stearat, Bột Tale, axit Benzoic)
6. Các mô hình thực nghiệm kiểm tra tác dụng y sinh học của chế phẩm được tiến hành trên động vật và người, cụ thể như sau:
 - A. *Thực nghiệm trên động vật (50 chuột, 6 thỏ).*

Lô đối chứng không dùng Hagaton.

Lô thí nghiệm cho ăn Hagaton với liều 100mg/kg thân trọng/ ngày, liên tục trong 20 ngày.

Các chỉ tiêu theo dõi gồm:

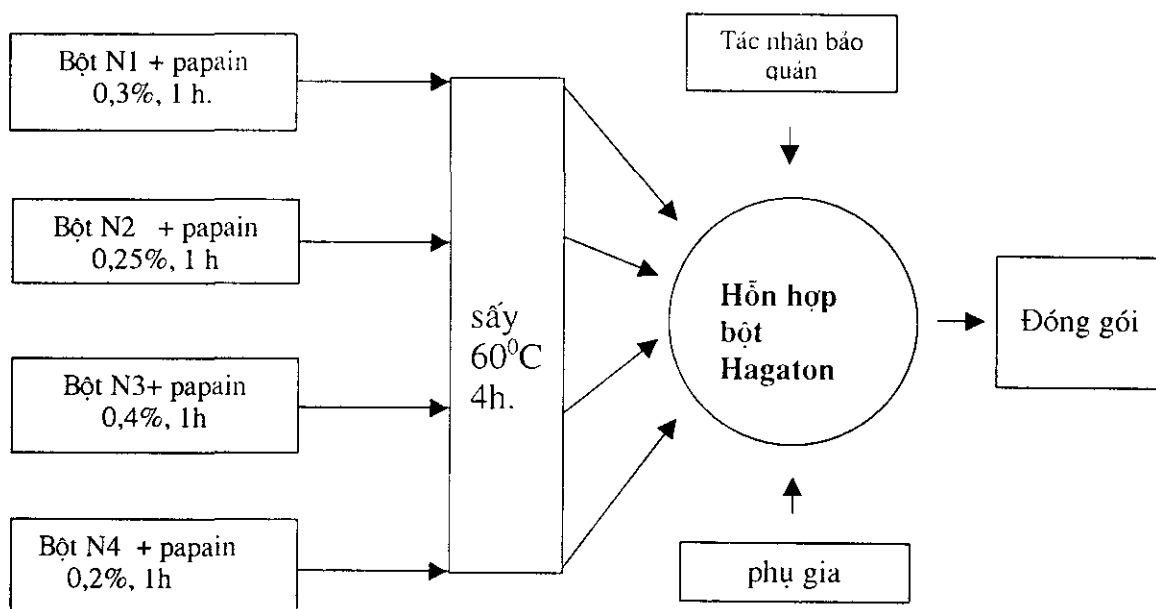
 1. Tốc độ tăng trọng chuột.
 2. Tác dụng tạo hồng cầu ở chuột.
 3. Tác dụng lên các chỉ tiêu sinh học tinh trùng thỏ.
 4. Phản xạ trí nhớ tự vệ - thực nghiệm chuột bơi trong mê cung Morris Water Maze dưới ảnh hưởng của chế phẩm..
 5. Hàm lượng axit amin trong não chuột dưới ảnh hưởng của chế phẩm.
 6. Hàm lượng ARN não và gan chuột dưới ảnh hưởng của chế phẩm
 7. Hàm lượng NTVL trong não, cơ, gan chuột dưới ảnh hưởng của chế phẩm.
 8. Các chỉ tiêu sinh học của huyết túc tam lý dưới ảnh hưởng của chế phẩm.

B. Thực nghiệm trên người:

Đã tiến hành nghiên cứu điện não đồ trên 30 học sinh (phối hợp với GS.TSKH Tạ Thuý Lan đại học Sư phạm Hà nội), 20 vận động viên dưới ảnh hưởng của chế phẩm Hagaton và một số chế phẩm khác, lứa tuổi 16- 20 tuổi, theo dõi các chỉ tiêu phản xạ đơn, phản xạ tự chọn, ĐNĐ, đánh giá khả năng trí tuệ bằng test Raven (phối hợp với Đại học Y Hà Nội và Đại học Sư phạm Vinh). Đo điện não đồ (ĐNĐ) trên máy Helli Neuros Kritt EE 212 của Cộng hoà Liên bang Đức.

IV. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU VÀ THẢO LUẬN

Quy trình công nghệ SX bột gốc Hagaton:



Chú thích: N1: Hải sâm 50%; N2- Cẩu gai 5%; N3 - Cá cơm 30% N4 -Hải long 15% .

1. Quy trình bảo quản bột gốc:

- + Đóng túi nilon đã thanh trùng
- + Để nơi khô mát
- +Tránh ánh nắng
- + Tránh nóng
- + Tránh ẩm
- + Chuyển đến xí nghiệp để bào chế với các dược liệu, phụ gia.

+ thời hạn sử dụng 12 tháng kể từ ngày SX , Ngày Sx và thười hạn sử dụng ghi trên nhãn sản phẩm.

2. Xây dựng tiêu chuẩn chất lượng bột nguyên liệu gốc hagaton.

(đã đăng ký tiêu chuẩn chất lượng “thực phẩm chức năng” trong nước với Bộ Y tế, Cục Vệ sinh an toàn thực phẩm.Tiêu chuẩn cơ sở số 01/2003/CNSH áp dụng cho sản phẩm: Bột Hagaton)

a. Các chỉ tiêu cảm quan:

Trạng thái ; bột khô mịn,toi, đồng nhất.

Màu nâu nhạt.

Mùi thơm đặc trưng

b. Các chỉ tiêu lý hoá:

Bảng 9. Các chỉ tiêu lý hoá của bột Hagaton

TT	Tên chỉ tiêu	đơn vị tính	Mức công bố
1	Độ ẩm	%	<10
2	Hàm lượng protein tổng số	%	>45
3	Hàm lượng axit amin tổng số	%	>44
4	Hàm lượng nitơ amin	%	>7
5	Hàm lượng Mn (vck)	Ppm	190-210
6	Hàm lượng Fe	Ppm	190-210
7	Hàm lượng Zn	Ppm	55-65
8	Hàm lượng Cu	Ppm	4-5

c. Hàm lượng kim loại nặng:

Bảng 10. Hàm lượng kim loại nặng trong bột Hagaton

TT	Tên chỉ tiêu	Đơn vị tính	Mức tối đa
1	A sen	Ppm	1
2	Chì	Ppm	2
3	Thủy ngân	Ppm	0,05
4	Cadimi	Ppm	1

d. Chỉ tiêu vi sinh vật :

Bảng 11 : Chỉ tiêu vi sinh vật của bột Hagaton

TT	Tên vi sinh	Đơn vị tính	Mức công bố
1	TSVKHK	vi khuẩn/g	$<10^2$
2	E. Coli	cffu/g	0
3	Coliform	cffu/g	<5
4	Cl.Perfringens	cffu/g	0
5	TSBTNM-M	bào tử/g	<10
6	S.Aureus	cffu/g	0
7	Samonella	cffu/25g	0

không có các độc tố làm ảnh hưởng đến sức khỏe người sử dụng.

3. Quy trình công nghệ sản xuất viên nang Hagaton:

a. Công thức cho 1 lô 100.000 viên:

- Bột gốc Hagaton.....20 kg
- Vitamin B1.....1kg
- Vitamin B6.....1 kg
- Bột amidon.....20kg
- Lactose.....12,500 kg
- Mg Stearat.....0,550kg
- Bột Tale.....0,550kg
- Axit Benzoic.....0,100kg

b. Chuẩn bị vệ sinh cơ sở sản xuất:

- Bật đèn cực tím trước khi sản xuất 30 phút và tắt trước khi vào phòng làm việc.
- Đặt máy hút ẩm đạt: độ ẩm ,60%.
- Nhiệt độ phòng : 18-22°C.

c. Pha chế :

- Cân, rây, trộn sơ bộ 9 theo nguyên tắc trộn bột kép) thứ tự các nguyên phụ liệu:

bột gốc, Lactose, axit Benzoic, Vitamin B1, Vitamin B6, bột Tale và một phần (2/3) bột mì, Mg Stearat. Kiểm nghiệm bán thành phẩm , dùng 1/3 bột mì còn lại để điều chỉnh khối lượng viên theo kết quả kiểm nghiệm hàm lượng của bột bán thành phẩm.

d. Vào nang :

Nang cứng số 0, hai đầu màu xanh. Khối lượng bột thuốc trong nang khoảng 550mg.

e. Lau nang: Trên máy.

f. Ép vỉ : ép vỉ nổi, loại bỏ các viên hỏng, méo và các vỉ hỏng.

g. Đóng gói : Vào hộp, đóng thùng : Kiểm tra kỹ số lượng. Ghi rõ tên người đóng gói và người kiểm soát trên phiếu đóng gói.

Công nghệ tạo viên nang Hagaton được tiến hành trên dây chuyền hiện đại của Xí nghiệp Dược phẩm Trung ương 25 Tp Hồ Chí Minh.

h. Tiêu chuẩn chất lượng và đặc điểm nguyên, phụ liệu :

Bảng 12. Tiêu chuẩn nguyên phụ liệu của viên nang Hagaton

Số TT	Tên nguyên, phụ liệu	Đạt tiêu chuẩn
1	Bột hagaton	đạt TC-08-A-072-99
2	Pyridoxine hydrochloride	đạt dược điển Anh BP 93
3	Lactose	đạt dược điển Anh BP 93
4	Tinh bột	đạt dược điển VN II,tập 3
5	Mg stearat	đạt dược điển VN II,tập 3
6	Bột tale	đạt dược điển VN II,tập 3
7	Axit benzoic	đạt dược điển VN II,tập 3
8	Thiamin hydrochloride hay Thiamin nitrat	đạt dược điển Anh BP 93 đạt dược điển Nhật JP XH

4. Kết quả sản xuất Hagaton :

+2002 Nghiên cứu thăm dò công thức thuỷ phân 4 nhóm nguyên liệu 45kg, sx thử trong phòng thí nghiệm phục vụ phân tích các chỉ tiêu cơ sở 15kg và nghiên cứu bảo quản với các điều kiện khác nhau trong phòng thí nghiệm 40 kg.

+2003 - Sản xuất thử để tạo viên nang Hagaton tham gia hội chợ Techmark (10/2003) giới thiệu sản phẩm và để phục vụ thử nghiệm trên động vật và người 30 kg, 25.000 viên nang.

Sản xuất phục vụ cho phân tích và phục vụ đăng ký hàng hoá với Bộ Y tế 15kg
+ 2004- sản xuất thử trong phòng thí nghiệm 20 kg để thử nghiệm, trong đó 5 kg gửi đến XN Dược Trung ương 25 để SX khoảng 25.000 viên nang phục vụ tiếp thị chào hàng.

Tổng số đã sản xuất 165 kg bột Hagaton .

5- Nghiên cứu tác dụng sinh học của chế phẩm Hagaton

a- Hagaton có tác dụng làm tăng trọng chuột nhắt trắng:

Bảng 13 : So sánh kết quả tăng trọng của chuột đối chứng (không uống Hagaton) và chuột thí nghiệm (được uống Hagaton) :

TT	Diễn giải	Đối chứng	Thí nghiệm	Ghi chú
1	sau 7 ngày	134,26%	145,41%	Quy ước trọng lượng ban đầu 100%
2	sau 14 ngày	154,13%	180,51%	nt
3	sau 21 ngày	176,74%	210,30%	nt

Qua bảng 13 ta thấy rất rõ lô chuột thí nghiệm (được uống Hagaton) có tốc độ tăng trọng cao hơn hẳn lô đối chứng (không được uống Hagaton) ở các thời điểm 7 ngày, 14 ngày và 21 ngày. Đến thời điểm 21 ngày, nếu lô đối chứng chỉ tăng được 176,74% thân trọng, thì lô thí nghiệm tăng được 210,30% thân trọng. Kết quả này khẳng định tác dụng tăng trọng của chế phẩm Hagaton.

b. Hagaton có tác dụng làm tăng số lượng hồng cầu và huyết sắc tố ở chuột:

Bảng 14 : Các chỉ số máu ngoại biên của chuột dưới ảnh hưởng của chế phẩm Hagaton.

Chỉ tiêu	Lô đối chứng		Lô thí nghiệm	
	ban đầu	sau 21 ngày	ban đầu	sau 21 ngày
Hồng cầu (triệu/ mm ³ máu)	3,7	4,52	3,7	5,8
Bạch cầu (nghìn/ mm ³ máu)	1,38	1,5	1,4	1,52
Huyết sắc tố (g%)	15	17	15	19,5

Qua bảng 14 cho thấy số lượng bạch cầu tăng không đáng kể (nằm trong giới hạn sinh lý bình thường), nhưng số lượng hồng cầu và hàm lượng huyết tố thì tăng lên khá rõ rệt. Thật vậy, số lượng hồng cầu trước thực nghiệm của 2 lô chuột là ngang nhau và bằng 3,7 triệu / 1mm³ máu; Sau 21 ngày thực nghiệm, số lượng hồng cầu lô đối chứng không được uống Hagaton, chỉ tăng được 4,52 tr./ 1mm³ máu, hàm lượng huyết sắc tố bằng 17g%, trong khi đó lô thí nghiệm được uống Hagaton có số lượng hồng cầu tăng cao hơn và bằng 5.8 triệu/ 1mm³ máu.và hàm lượng huyết sắc tố bằng 19,5g%. Các kết quả này khẳng định tác dụng kích thích tạo hồng cầu của chế phẩm Hagaton.

c. Hagaton ảnh hưởng tốt lên phẩm chất tinh dịch của thỏ đực sau 20 ngày sử dụng:

Bảng 15: Các chỉ tiêu sinh học tinh trùng ở thỏ đực dưới ảnh hưởng của chế phẩm Hagaton.

Chỉ tiêu	Trước bổ sung Hagaton	Sau 10 ngày bổ sung Hagaton	Sau 20 ngày bổ sung Hagaton
Lượng tinh (ml)	0.608 ± 0,052	0,710 ± 0,100	0,845 ± 0,065
Hoạt lực A%	65,160 ± 2.092	72,530 ± 2,409	74,270 ± 1,424
Nồng độ tinh trùng C (tr./ml)	278,500 ±15.882	290,500 ± 0.024	288,180 ± 8,480
Tổng số tinh trùng tiến thẳng V.A.C (tr./1 lần lấy tinh)	111,060 ±12.702	158.940 ± 17,268	167,950 ±16,805
Tỷ lệ tinh trùng kỳ hình %	19,750 ± 0.772	17,000 ± 0.691	18,640 ± 0,653
Tỷ lệ tinh trùng sống %	66,510 ±1.065	70,850 ±1.334	70,360 ± 0,897
Sức kháng (NaCl 1%)	2703,81 ± 94.26	2750,00 ± 62,30	2763,64 ± 91,00
pH tinh dịch	7,33 ± 0,12	6,63 ± 0,06	6,75 ± 0,05
Hoạt độ enzym LDH (phút)	18,13 ± 0,156	15,64 ± 0,38	16,25 ± 0,07

d. Nồng độ tinh trùng (C):

Nồng độ tinh trùng thỏ Newzealand white khá cao. Trước thí nghiệm bằng 278,500 triệu/ 1 ml (dao động từ 200 triệu đến 310 triệu/ 1 ml). Sau 10 ngày được bổ sung chế phẩm, hầu hết các thỏ thực nghiệm, nồng độ tinh trùng đều tăng lên rõ rệt, trung bình bằng 290,500 triệu/ 1 ml. Sau 20 ngày đạt 288,180 triệu/ 1 ml. (dao động từ 266,7 đến 326,7 triệu/ 1 ml).

Như vậy, dưới ảnh hưởng của chế phẩm Hagaton, nồng độ tinh trùng tăng lên trung bình 9,680 triệu/ 1 ml tinh dịch.

e. Hoạt lực tinh trùng (A):

Hoạt lực tinh trùng ở thỏ Newzealand white khá cao và dao động trong phạm vi khá rộng từ 33,33% đến 80% phụ thuộc vào cá thể. Trước thí nghiệm, hoạt lực trung bình của tinh trùng bằng 65,16%. Sau 10 ngày thí nghiệm bổ sung chế phẩm- 72,53%, Sau 20 ngày- 74,27%.

Như vậy dưới ảnh hưởng của chế phẩm Hagaton, hoạt lực tinh trùng thỏ tăng trung bình 9,11%.

f. Tổng số tinh trùng có hoạt lực tiến thẳng (V.A.C):

Tổng số tinh trùng có hoạt lực tiến thẳng phụ thuộc vào lượng tinh dịch và nồng độ tinh trùng. Ở thỏ nồng độ tinh trùng cao, nhưng lượng tinh dịch ít, nên V.A.C thấp. Kết quả nhận được của chúng tôi về tổng số tinh trùng có hoạt lực tiến thẳng cho thấy : ở thỏ Newzealand white, V.A.C trung bình trước thí nghiệm là 111,06 triệu / ml./ 1 lần lấy tinh (dao động từ 43,0 đến 264,5 triệu/ml). Sau 10 ngày thực nghiệm, thỏ được ăn thêm chế phẩm, 100% số thỏ đều có V.A.C cao hơn đối chứng và có trị số trung bình bằng 158,94 triệu/ 1 ml. Sau 20 ngày - 167,95 triệu/ 1 ml (dao động từ 65,9 đến 295,9 triệu/ 1 ml).

Như vậy dưới tác dụng của Hagaton, tổng số tinh trùng có hoạt lực tiến thẳng tăng lên trung bình là 56,89 triệu/1 ml/ 1 lần lấy tinh.

g. Tỷ lệ tinh trùng sống (Sg):

Trước thí nghiệm, kiểm tra tỷ lệ tinh trùng sống của 10 thỏ đực giống Newzealand white cho thấy tỷ lệ tinh trùng sống trung bình là 66,51% /1 lần lấy tinh. Sau 10 ngày thực nghiệm thỏ được ăn bổ sung chế phẩm, tỷ lệ tinh trùng sống tăng lên và bằng 70,85 %, sau 20 ngày - 70,36% tức tăng lên trung bình 3,85%.

Như vậy dưới tác dụng của Hagaton, tỷ lệ tinh trùng sống tăng lên trung bình là 3,85%.

h. Tỷ lệ tinh trùng kỳ hình (K):

Trước thí nghiệm, tỷ lệ tinh trùng kỳ hình ở thỏ Newzealand white bằng 19,75% (dao động từ 14% đến 24%). Dao động này phụ thuộc vào cá thể, bởi vì các yếu tố ảnh hưởng khác đã được khống chế trong điều kiện thực nghiệm như giống, tuổi, trọng lượng, khí hậu, nhiệt độ môi trường, khoảng cách lấy tinh .

Sau 10 ngày thực nghiệm, thỏ được ăn bổ sung chế phẩm Hagaton, tỷ lệ tinh trùng kỳ hình ở tất cả thỏ thí nghiệm có trị số trung bình là 17,%. Sau 20 ngày - 18,64% .

Như vậy dưới tác dụng của chế phẩm, tỷ lệ tinh trùng kỳ hình ở tất cả thỏ thí nghiệm giảm xuống trung bình là 1,11% đến 2,75% /1 lần lấy tinh.

i. Sức kháng (R) của tinh trùng thỏ đối với dung dịch NaCl 1%:

Sức kháng của tinh trùng đánh giá độ bền mạch nối P-NH₂ của cấu trúc nucleoproteid của nhân tinh trùng dưới tác động của anion Cl⁻ .Chỉ tiêu này phản ánh sức chống chịu của tinh trùng đối với áp lực thẩm thấu, với nhiệt độ môi trường

Trước thí nghiệm, trị số R trung bình của tinh trùng ở thỏ Newzealand white bằng 2703,81% / 1 lần lấy tinh. Sau 10 ngày dùng chế phẩm, sức kháng R của tinh trùng của chính những con thỏ này có trị số trung bình là 2750% / 1 lần lấy tinh (R tăng 46% /lần lấy tinh). Sau 20 ngày -2763,64%/ 1 lần lấy tinh (R tăng 59% / lần lấy tinh)

Có thể giải thích rằng có được các kết quả kể trên là do Hagaton đã cung cấp, bù đắp cho cơ thể động vật nguồn kẽm (Zn) hữu cơ (Zn là thành phần vi lượng chủ yếu có trong tinh trùng, cần cho sinh tổng hợp tinh trùng), và nguồn testosterone cao (Testosterone là hormone có tác dụng kích thích tạo tinh trùng, duy trì tính năng sinh dục, làm cho tính dục hằng hơn).

k. Hagaton có tác dụng tăng cường thể lực và giúp trí nhớ tốt hơn :

Kết quả thí nghiệm cho thấy đàn chuột thí nghiệm được uống Hagaton bơi trong mê cung Moris Water Maze, đã thực hiện phản xạ tự vệ nhanh, nhớ được vị trí phao cứu hộ và có thể lực tốt, nên đã bơi về đích với thời gian ngắn nhất so với đối chứng không dùng Hagaton.

Bảng 16- So sánh kết quả bơi của hai lô chuột đối chứng và thí nghiệm trong mê cung Moris Water Maze dưới ảnh hưởng của chế phẩm Hagaton.

Thời điểm	Nước(giấy) X _{đc}	%	Hagaton(giấy)X _{Hagaton}	%	X _{Hag.} /X _{đc} x.100%
ngày thứ 1	40,08± 3,18	100%	36,96 ±3,58	100%	92,21%
ngày thứ 2	25,83 ±3,18	64,45	18,29±3.13	49,48	70,81*

ngày thứ 3	15,17± 5,14	37,67	11.04 ±1,56	29,87	72,77*
ngày thứ 4	13,87± 3,43	34,60	8,06 ±1,32	21,81	58,11**
ngày thứ 5	11,50 ±2,42	28,69	5.05 ± 1,06	13,66	43,91**
Tổng	106,45±3,62		79,40 ±2,13		74,59%

(chú thích : * - $p < 0,05$; ** - $p < 0,001$). Hagaton giảm đáng kể thời gian bơi về đích của đàn chuột thí nghiệm.

Qua bảng thấy rõ là lô đối chứng để về đích, tổng số mất 106,45 giây, trong khi đó lô thí nghiệm chỉ mất 79.40 giây.

Như vậy, khi bơi trong mê cung đàn chuột thí nghiệm được uống Hagaton đã nhớ được vị trí của phao cứu hộ và đã bơi về đích sớm hơn (chỉ mất $79,40 \pm 2,13$ giây) so với đàn đối chứng chỉ được uống nước cất (mất $106,45 \pm 3,62$ giây) mới tới đích.

d. Hagaton có tác dụng làm tăng hàm lượng các axit amin trong mô não chuột thí nghiệm:

Bảng 17 - Hàm lượng axit amin trong mô não của chuột dưới ảnh hưởng của chế phẩm Hagaton (g%).

TT	Axit amin	Não chuột ĐC	Não chuột TN
1	Aspartic acid	5,43	5,49*
2	Glutamic acid	6,91	6,93*
3	Serine	2,41	2,36
4	Histidine	0,42	0,31
5	Glycine	3,37	3,26
6	Threonine	2,53	2,66**
7	Alanine	3,19	3,15
8	Arginine	3,51	3,45
9	Tyrosine	2,25	2,34**
10	Cysteine + Cystine	1,58	1,53
11	Valine	2,57	2,51
12	Methionine	1,47	1,40
13	Phenylalanine	2,44	2,46*
14	Isoleucine	2,10	2,17*
15	Leucine	4,56	4,58*

16	Lysine	3,18	3,20*
17	Proline	1,70	1,67

Nhờ máy phân tích axit amin tự động, chúng tôi đã phát hiện thấy ở mô não của chuột thí nghiệm các axit amin sau đây tuy tăng không đáng kể, nhưng có xu thế tăng cao hơn so với não chuột đối chứng:

Threonine tăng 13% (từ 2.53 đến 2.66g% vck)

Tyrosine tăng 9% (từ 2,25 đến 2,34 g% vck).

Isoleucine tăng 7% (từ 2,10 đến 2,17 g% vck).

Aspartic axit tăng 6% (từ 5.43 đến 5.49 g% vck)

Glutamic axit tăng 2% (từ 6.91 đến 6.93g% vck).

Lysine tăng 2% (từ 3,18 đến 3,20 g% vck)

Phenyllanine tăng 2% (từ 2.44 đến 2.46g% vck)

Leucine tăng 2% (từ 4.56 đến 4.58g% vck).

Điều này nói lên hiệu quả của Hagaton lên chuyển hoá protein trong mô não và giúp cho chuột thí nghiệm củng cố tốt các phản xạ, biến trí nhớ ngắn hạn thành trí nhớ dài hạn và bơi về đích sớm hơn trong mê cung Moris Water Maze.

Như vậy qua tham khảo các tài liệu khoa học với những phát hiện mới về sinh hoá não bộ cho thấy các protein giàu *Glu, Asp, Lys, Tyr* ... đều có liên quan đến trí nhớ và đến quá trình “ học tập”. Những phát hiện của chúng tôi về hàm lượng ưu việt của các axit amin Glu. Asp. Lys., Tyr....trong mô não chuột thí nghiệm được uống Hagaton so với chuột đối chứng (không được uống Hagaton) là những phát hiện rất lý thú trong thực nghiệm. Đặc biệt lý thú là phát hiện thấy 4 acid amin tăng cao hơn cả là Threonine tăng 13% và Tyrosine tăng 9%, Isoleucine tăng 7%, Aspartic acid tăng 6%. . Quá trình hình thành trí nhớ là sự hưng phấn dẫn đến sự thay đổi của ADN và đến quá trình tổng hợp protein. Phải chăng các axit amin này chính là nguyên liệu cho sinh tổng hợp các peptit trí nhớ hay các chất dẫn truyền thần kinh ? Những vấn đề lý thú về khoa học cơ bản có lẽ cần được nghiên cứu tiếp tục .

e . Hagaton có tác dụng làm tăng hàm lượng ARN trong mô não và gan:

Bảng 18. Hàm lượng ARN trong mô não và gan chuột được ăn

Hagaton.

TT	Tên mẫu	RNA tổng số		Độ ẩm
		mg/g TL tươi	mg/g TL khô	

1	Não chuột ĐC	0,190	0,964	80,28%
2	Não chuột TN	0,278	1,227	77,33%
3	Gan chuột ĐC	3,275	10,33	68,31%
4	Gan chuột TN	3,671	11,34	67,63%

Vấn đề không kém lý thú là trong thực nghiệm, chúng tôi còn phát hiện thấy hiện tượng tăng hàm lượng ARN trong não chuột thí nghiệm (1,227 mg/g vck), cao hơn rất rõ rệt so với đối chứng (0,964 mg/g vck) dưới ảnh hưởng của Hagaton. Có thể là việc tăng ARN trong mô não đã giúp đàn chuột thí nghiệm bơi trong mê cung và ghi nhớ được địa điểm phao cứu hộ và về đích sớm hơn. Đến ngày thứ 5 tập bơi, lô chuột thí nghiệm về đích chỉ mất $5,05 \pm 1,06$ s., trong khi đó lô đối chứng phải mất $11,50 \pm 2,42$ s./ $p < 0,001$ /.

Vai trò của RNA trong các hoạt động phản xạ, ghi nhớ và lưu giữ các thông tin của não bộ người và động vật đã được khẳng định trong các sách giáo khoa sinh lý học từ thế kỷ trước. *Tốc độ chuyển hoá của RNA* phụ thuộc vào hoạt động chức năng của các tổ chức mô thần kinh. RNA làm tăng tính hưng phấn của màng tế bào, tạo điều kiện dễ dàng cho việc dẫn truyền các xung thần kinh từ nơ ron này sang nơ ron khác trong thời gian phản xạ có điều kiện. Quá trình ghi nhớ là một quá trình phân tử trong các tế bào thần kinh, bao gồm cả sự trao đổi chất ở những khớp thần kinh. *Các phân tử RNA có chức năng mã hoá ký ức.*

Theo Nguyễn Xuân Thắng. 2003 /20/, một trong những vai trò quan trọng của axit nucleic là tham gia vào quá trình *hình thành trí nhớ và chuyển trí nhớ ngắn thành trí nhớ dài*. Cơ chế hình thành trí nhớ là các xung gây ra các biến đổi cả về số lượng và chất lượng của ADN, ARN và gây nên thay đổi cấu trúc của protein làm ảnh hưởng đến sự giải phóng các chất trung gian tương ứng ở xi náp - các khớp thần kinh.

Các dẫn liệu kể trên về vai trò sinh lý hoá sinh của RNA trong việc thực hiện các phản xạ có điều kiện và chuyển trí nhớ ngắn thành trí nhớ dài chính là cơ sở khoa học giải thích tại sao trong các thực nghiệm của chúng tôi đã trình bày ở trên, khi chuột bơi trong mê cung Moris Water Maze, đã thực hiện phản xạ tự vệ nhanh, nhớ tốt vị trí phao cứu hộ và bơi về đích với thời gian ngắn nhất so với lô chuột đối chứng không dùng Hagaton.

Như vậy, Hagaton có tác dụng giúp đàn chuột thí nghiệm hình thành và củng cố các phản xạ có điều kiện tốt hơn, tức là hình thành và lưu giữ trí nhớ tốt hơn so với đàn chuột đối chứng.

Có thể giả thiết rằng các hoạt chất trong Hagaton có tác dụng hoạt hoá các enzym, kích hoạt chuyển hoá RNA tham gia vào quá trình sinh tổng hợp protein và enzym; Những biến đổi của trao đổi protein có ảnh hưởng lên hoạt động của não bộ nói chung, trong đó có quá trình học tập và trí nhớ.

f. Hagaton có tác dụng làm tăng hàm lượng các nguyên tố vi lượng trong tổ chức mô não và cơ của chuột.

Bằng phương pháp hiện đại quang phổ hấp phụ nguyên tử, chúng tôi phát hiện thấy một hiện tượng khá lý thú là sau khi uống Hagaton, hàng loạt các NTVL có độ tập trung cao trong mô não và mô cơ của chuột thí nghiệm.(bảng 19).

Bảng 19: *Hàm lượng các nguyên tố vi lượng trong tổ chức mô não và cơ của chuột dưới ảnh hưởng của chế phẩm Hagaton.*

TT	lô chuột		Fe	Cu	Zn	Mn	Se
1	mô não	Đ C	52.05	14.99	43.77	2.75	0.63
			± 4,67	±1,74	±0,81	± 0,36	± 0,08
2	mô não	TN	87.79	15.04	48.12	4.58	0.67
			±20,3	± 2,23	± 5,71	± 1,01	± 0,09
3	mô cơ	ĐC	48.82	5.41	27.09	2.49	0.78
			±9.21	±1.16	±2.43	±0.52	±0,16
4	mô cơ	TN	71.50	5.59	34.45	3.03	0.87
			±18,33	±0,98	±4,04	±0,64	±0,08

Qua bảng 19 thấy rõ hàm lượng các nguyên tố vi lượng đều tăng lên trong mô não của chuột thí nghiệm, đặc biệt là các nguyên tố Mn, Fe, Zn rồi đến Cu, Se. Các nguyên tố này đều có trong Hagaton, liên quan đến hoạt động chức năng của não .

Thật vậy, Mn được mệnh danh là cái ỏn áp của não bộ. Người ta phát hiện thấy ở những bệnh nhân bị bệnh tâm thần phân liệt có hàm lượng Mn trong tóc thấp. Dùng Clorua mangan cho bệnh nhân uống, đa số các trường hợp khỏi bệnh. Một số tài liệu còn cho thấy Mn có vai trò điều chỉnh các hoạt động của các nhân xám dưới vỏ (P.K.James.1996) /7/.

Ở mức độ cơ thể. Fe là nguyên liệu tạo hồng cầu và là thành phần cấu trúc của nhiều enzym. Xitocrom là enzym chứa Fe và là thành phần của mạch hô hấp. Các enzym khác chứa Fe là catalaza, peroxydaza cũng có hemoproteit. Các enzym này giữ vai trò quan trọng trong hoạt động của các tế bào thần kinh. Chúng ta đều biết rằng não là nơi xảy ra quá trình oxy hoá sinh học cao nhất, do đó não sử dụng nhiều oxy cho hô hấp tế bào. Não chỉ chiếm 2-3% trọng lượng cơ thể, nhưng trong lúc nghỉ, não đã sử dụng đến 20-25% tổng lượng oxy mà cơ thể được cung cấp, khi hoạt động chức năng thì nhu cầu của não đối với oxy lớn hơn nhiều, tùy thuộc vào vùng não khác nhau.

Zn: Vai trò của Zn tham gia vào các hoạt động của hệ thần kinh trung ương thông qua các phản ứng enzym đã rõ. Zn giúp ổn định màng nơ ron, ngăn cản quá trình oxy hoá và làm giảm độc tính của Al và Cd đối với hệ TKTƯ. Do đó thiếu Zn dẫn đến các rối loạn thần kinh tâm thần. Nhiều tác giả thấy Zn huyết thanh giảm trong bệnh thiếu năng-tâm thần, rối loạn thần kinh chức năng / Hồ Tổng Tiến, 1999 /18/.

Vấn đề lý thú là theo Kenneth H.F. 1996 / 8/, Zn có vai trò rất quan trọng trong hoạt động của vỏ não, hệ limbic, các cột khổng lồ ở gian não, đặc biệt của hồi hải mã (hippocampus). *Thiếu Zn có thể gây rối loạn chức năng của những cấu trúc thần kinh này, đặc biệt là chức năng học tập, trí nhớ và cảm xúc* /Kenn.C, Gibb.E. 1986/9/.

Cu: Vai trò của đồng cũng được khẳng định đối với hoạt động chức năng của hệ thần kinh. Thoái hoá thần kinh trong bệnh Menkes do thiếu hụt Cu trong các cấu trúc thần kinh trung ương.

Vấn đề rất lý thú là từ đại học Tổng hợp Bang Michigan, Mỹ, tiến sỹ Gordus, 1976 /6/ phát hiện thấy trong tóc các học sinh giỏi toán luôn có hàm lượng Cu và Zn cao hơn các học sinh yếu kém. Ở bệnh nhân tâm thần trong tóc có hàm lượng Mn thấp.

Se : Trong thực nghiệm của chúng tôi, hàm lượng Se trong mô não tăng không nhiều (0,63- 0,67 mg/kg vck). Vai trò của Se là chống oxy hoá, khử các gốc tự do làm trẻ hoá tế bào.

Như vậy, từ các dẫn liệu trên và kết quả thực nghiệm của chúng tôi có thể giải thích là trong chế phẩm Hagaton giàu các nguyên tố Zn, Cu, Mn, Fe, và chúng đã thể hiện các tác dụng trực tiếp hay gián tiếp lên các quá trình thần kinh, cùng với quá trình điều hoà chuyển hoá axit nucleic, trao đổi protein, trong cơ thể

nói chung, trong mô não nói riêng đã giúp cho các đối tượng thí nghiệm củng cố và lưu giữ được phản xạ có điều kiện, có trí nhớ tốt hơn : Chuột bơi nhớ được phao cứu hộ trong mê cung . bơi về đích sớm hơn

g. Hagaton không ảnh hưởng lên độ dẫn điện và nhiệt độ của huyết tức tam lý của thỏ thí nghiệm.

Vì huyết tức tam lý có liên quan đến nhiều chức năng sinh lý trong cơ thể như tăng hồng cầu, bạch cầu, tăng hàm lượng các chất trung gian dẫn truyền thần kinh đặc biệt là của hệ phó giao cảm, gây biến đổi hoạt tính một số enzym tế bào gan và não vv, nên một câu hỏi đặt ra là Hagaton có ảnh hưởng gì lên huyết tức tam lý không ? Đây là một huyết được các nhà châm cứu Trung Quốc và Việt nam đánh giá rất cao “ một huyết kỳ diệu của cơ thể”.

Để đánh giá những biến đổi về chức năng của huyết này, đã sử dụng các phương pháp đo nhiệt độ và đo cường độ dòng điện qua huyết (độ thông điện) bằng các thiết bị của Nhật Thermometer và máy dò huyết Neurometer type Temp 60 và RB-65 củ Nhật, điện thế cố định là 12 volt) . Huyết này ở người nằm trên kinh Dương Minh vị ở chân, chỗ lõm giữa lồi củ trước xương chày và lồi đầu trên xương mác, còn xác định ở thỏ và chuột đã dựa vào Atlas của Plakhotin M.V,1966 kết hợp kiểm tra bằng máy dò huyết. Thực nghiệm này tiến hành tại Viện Y học Cổ truyền Việt nam .Kết quả nghiên cứu được trình bày trong bảng 20.

Bảng 20: Độ thông điện và nhiệt độ của huyết tức tam lý của thỏ trước và sau khi uống Hagaton.

Thời điểm xác định	Độ thông điện (μ A)	Nhiệt độ C ⁰
Trước thí nghiệm	93,83 $\pm$ 7.39	37,61 $\pm$ 0,16
Sau thí nghiệm	100.50 $\pm$ 5.75	37,80 $\pm$ 0,18
(X sau/ X trước)x100%	107.11%	100,51%

Qua bảng 20 cho thấy ở thỏ trước và sau thí nghiệm uống Hagaton, độ thông điện của huyết tức tam lý của chúng tăng lên không đáng kể (7.11%), còn nhiệt độ của huyết này hầu như không thay đổi (0.51%)

Các kết quả tương tự nhận được trên chuột nhắt trắng.

Bảng 21- Độ thông điện và nhiệt độ của huyết tức tam lý của chuột trước và sau khi uống Hagaton.

Chỉ tiêu	Độ dẫn điện (μA)		Nhiệt độ C ⁰	
	phải	trái	phải	trái
X s/Xt.100%	95,49% TN.	95,38% TN	99,83% TN.	99,89 TN.
p>0,05	96,71%ĐC	96,70% ĐC	99,86% ĐC	99,84% ĐC

Sự chênh lệch của các số liệu nhận được về độ thông điện và nhiệt độ của huyết túc tam lý giữa lô đối chứng và lô thí nghiệm không đảm bảo xác xuất thống kê.

Như vậy có thể khẳng định rằng Hagaton không ảnh hưởng lên các đặc điểm sinh học (độ dẫn điện và nhiệt độ) của huyết túc tam lý của chuột thí nghiệm . Có lẽ chỉ trong các trường hợp bệnh lý của cơ thể, và với các tác nhân kích thích trực tiếp đủ mạnh lên huyết này (châm, bấm, day, điện châm, thủy châm, chiếu tia laser vv...) mới có thể tạo ra được các sung thần kinh thông qua hệ thần kinh trung ương và thần kinh ngoại biên và kéo theo những biến đổi về hệ nội tiết và miễn dịch làm tăng cường các chức năng trong cơ thể .

h. Hasaton có tác dụng cải thiện tốt khả năng hoạt động trí tuệ của học sinh và vđv.. Điều này được thể hiện khá rõ nét qua sự thay đổi sóng anpha thủy chẩm và sóng theta vùng trán. Cụ thể là biên độ của sóng anpha thủy chẩm và sóng theta thủy trán tăng đáng kể theo xu hướng hoàn chỉnh hoá hình ảnh điện não đồ trong độ tuổi.

Bảng 22 . Các chỉ số điện não của nhịp anpha thủy chẩm của học sinh.

Đối tượng	n	Tần số dd/Hz	Biên độ μV	Chỉ số (%)
Trước uống thuốc	30	9.33	90,67	64,6
Sau uống thuốc	30	9.27	104	66,63
Chênh lệch		0.06	13,33	2,03

Qua bảng trên cho thấy biên độ sóng anpha tăng 13,33 μV , chỉ số anpha có tăng lên 2,03%.

Bảng 23 : Các chỉ số điện não vùng trán của nhịp theta ở học sinh

Đối tượng	n	Tần số d đ/Hz	Biên độ	Chỉ số (%)
Nhóm đối chứng	30	6,65	48.5	18,73
Nhóm thí nghiệm	30	6,25	44	18,87
Sự chênh lệch		0.4	4,5	0,04

Qua bảng trên cho thấy chỉ số theta (%) của học sinh nhóm đối chứng là 18,73%, thấp hơn chỉ số này của nhóm thí nghiệm (18,87%). Chỉ số theta vùng trán của nhóm thí nghiệm cao hơn so với nhóm đối chứng là 0,04%.

Các kết quả này phù hợp với các quan điểm của Tạ Thuý Lan, Võ văn Toàn, 1993 /10/.Trần thị Cúc, 1998/4/. Theo các tác giả trên thì mức độ hoàn chỉnh hoá hình ảnh điện não đồ phụ thuộc vào năng lực trí tuệ của học sinh ở độ tuổi 8-12 tuổi. Có lẽ do năng lực trí tuệ tăng, nên hoạt động theta thùy trán cũng thay đổi. Nhiều tác giả cho rằng *nhịp theta có nguồn gốc phát sinh từ hồi hải mã (hypocampus), đặc trưng cho hoạt động sáng tạo của não bộ* (Nauta, 1972/14/, Orlov và cs. 1979/15/ vv...). Chính vì vậy, có thể coi sự thay đổi chỉ số điện não đồ của học sinh thuộc nhóm thí nghiệm có liên quan mật thiết với tăng năng lực trí tuệ. Điều này thể hiện rõ qua kết quả làm bài kiểm tra cuối đợt.

Các kết quả nhận được kể trên, phù hợp với các kết quả nhận được của chúng tôi khi nghiên cứu ảnh hưởng của Hải sâm, Rabiton, Hagaton lên các chỉ tiêu tests Raven, phản xạ đơn, phản xạ lựa chọn, lỗi tín hiệu điện tử, tốc độ dẫn truyền thần kinh và ĐNĐ ở vận động viên (phối hợp với Bộ môn Sinh lý đại học Y Hà nội và Khoa sinh, Đại học Sư phạm Vinh) . Đo chỉ số thông minh IQ của nhóm 20 VĐV Nghệ An cho thấy trước khi dùng thuốc $42,5 \pm 1,6$, sau 2 tháng dùng Hagaton chỉ số IQ là $45,00 \pm 1,1$.Rõ ràng hoạt động của não bộ của VĐV được cải thiện tốt hơn dưới tác dụng của Hagaton.

Nghiên cứu chỉ số thông minh (IQ) trên các đối tượng vận động viên tại Trường đại học Sư phạm Vinh cho thấy có điểm test Raven sau 2 tháng dùng chế phẩm cao hơn rõ rệt so với đối chứng (bảng 24).

Bảng 24 - ảnh hưởng của chế phẩm thức ăn chức năng lên chỉ số thông minh (IQ) ở vận động viên.

Thời gian	Trước khi dùng thuốc	Sau 2 tháng dùng thuốc	Ghi chú
Chỉ số thông minh (IQ)	$42,5 \pm 1,6$	$45,0 \pm 1,1$	Hagaton
Chỉ số thông minh (IQ)	$43,4 \pm 1,4$	$45,4 \pm 0,62$	Rabiton

Các kết quả nhận được về tác dụng tốt của chế phẩm lên hoạt động chức năng của hệ thần kinh trung ương và cải thiện tốt khả năng trí tuệ của học sinh và VĐV là do các chế phẩm này đã :

1) Cung cấp cho cơ thể sản phẩm giàu, *lysine, phenylalanine, tyrosine, axit glutamic, asparaginic* . Vai trò sinh học của lysine đã rõ -giữ vị trí quan trọng trong quá trình trao đổi chất, sinh tổng hợp huyết sắc tố, axit nucleic, thúc đẩy hình thành mô xương, ảnh hưởng dương tính lên chức năng tiêu hoá và các quá trình thần kinh. Phenylalanine và tyrosine lại là tiền chất của các chất dẫn truyền thần kinh catecholamine là dopamin và noradrenalin. Chúng kích thích hormone tăng trưởng, đẩy mạnh hoạt động của hệ miễn dịch. Các axit amin này còn giúp ích trong điều trị một vài chứng suy nhược.

Trong thực nghiệm của chúng tôi đã phát hiện thấy một số các axit amin như *Glutamic axit, Asparaginic, Lysine, Tyrosine* tăng lên trong mô não chuột thí nghiệm . Rất có thể các axit amin kể trên tham gia vào sinh tổng hợp các "peptid trí nhớ". Bởi vì các protein giàu *Glutamic axit, Asparaginic, Lysine, Tyrosine* ... đều có liên quan đến trí nhớ và đến quá trình " học tập. Chuột thí nghiệm bơi trong mê cung nhớ được vị trí phao cứu hộ và về đích sớm hơn so với chuột đối chứng không được uống Hagaton.

2) Cung cấp thêm cho cơ thể sản phẩm dinh dưỡng giàu sắt (*Fe*) dưới dạng liên kết hữu cơ. Fe là nguyên tố tạo hồng cầu và thúc đẩy quá trình sinh tổng hợp hemoglobin, do đó đảm bảo tốt cho việc cung cấp O_2 cho não đáp ứng các phản ứng năng lượng của não, góp phần cải thiện tốt hoạt động của trung ương thần kinh.

3). Cung cấp thêm cho cơ thể sản phẩm dinh dưỡng giàu kẽm (*Zn*) và đồng (*Cu*).Vai trò sinh học của hai nguyên tố này có liên quan đến chức năng thần kinh đã được chứng minh. Theo công bố của Tiến sỹ Gordus từ trường đại học Michigan của Mỹ . 1979, ở những sinh viên giỏi toán, trong tóc của chúng bao giờ cũng có hàm lượng Zn và Cu cao hơn các sinh viên yếu kém.

4) Cung cấp cho cơ thể sản phẩm giàu Selen (*Se*). Se được mệnh danh là " kẻ săn lùng các gốc tự do " trong cơ thể để khử chúng. Se là một trong các antioxidant mạnh nhất có tác dụng chống các stress về tâm lý, bảo vệ hoạt động của hệ thần kinh và tim mạch.

5) Cung cấp thêm cho cơ thể một hàm lượng nhất định hormone testosterone. Hàm lượng testosterone trong thịt hải sâm, cầu gai, cao hơn so với thịt gia súc gia

câm. Những nghiên cứu mới đã chứng minh vai trò quan trọng của testosterone lên các quá trình thần kinh. Giáo sư Baulieu và cs (1995) chứng minh rằng testosterone cũng được các tế bào trung ương thần kinh của cả nam và nữ sản xuất ra một lượng nhỏ, để điều khiển các tập tính. Testosterone còn được các tế bào Schwann của vỏ myelin bao quanh các sợi thần kinh sản xuất ra, có nhiệm vụ sửa chữa các trục trặc trên đường dẫn truyền các xung thần kinh, đảm bảo cho các phản xạ được nhanh nhạy và chính xác. Khi vỏ myelin bị tổn thương hay bị phá huỷ thì làm mất khả năng tư duy, nhất là thương tổn ở vùng phụ trách trí nhớ ngắn hạn và mất khả năng lập kế hoạch, tiên đoán. Nhà nghiên cứu Mỹ Andy Organ, 2003, tiến hành thí nghiệm lý thú tại Carolina về tác động của stress đối với binh sỹ trong các tình huống bị bắt, bị giam và bị tra tấn. Tác giả phát hiện thấy ở tất cả đối tượng thí nghiệm, đặc biệt là lính đặc nhiệm thuộc lực lượng mũ nổi xanh, đã tiết ra nhiều chất hormone chống stress, giúp não tự trấn an mình. Những binh sỹ tiết ra ít hormone chống stress, là những người tỏ ra sợ hãi, luống cuống nhiều nhất trong thí nghiệm. Vấn đề cần làm rõ là bản chất của hormone này là neuropeptid, và có liên quan gì với testosterone, với selenium? Phát hiện này thôi thúc các nhà khoa học tìm kiếm các chất nhằm khắc phục sự sợ hãi và chống stress phục vụ thể thao và lực lượng vũ trang.

6) Gần đây, BS Nguyễn Thành Đồng, 2003 /5/ (Quân Y Viện 103, Hà Đông) trong luận văn Tiến sỹ Y học của mình, đã phát hiện thêm một tác dụng mới của chế phẩm hải sâm: Có tác dụng *phòng chống nhiễm độc thuốc bảo vệ thực vật*- nhóm Carbamat (chất này gây tổn thương gan, thận, tinh hoàn, làm giảm chức năng tạo máu, suy giảm chức năng của trục đồi thị- tuyến yên- tuyến sinh dục, gây biến đổi hoạt tính điện não, ảnh hưởng lên hình ảnh giải phẫu bệnh của hệ thống thần kinh) . Ngoài tác dụng tăng tạo máu, tăng trọng, còn có tác dụng rút ngắn thời gian phản xạ tự vệ tránh nóng, rút ngắn thời gian tiềm tàng của phản xạ có điều kiện so với nhóm đối chứng .

V. kết luận.

1. Đã điều tra , sàng lọc được các đối tượng động vật biển chủ yếu gồm **hải sâm, cầu gai, cá cơm, hải long** làm nguyên liệu chế biến để khai thác các nguồn chất có hoạt tính sinh học liên quan đến chuyển hoá não, các quá trình thần kinh nói riêng và của toàn bộ cơ thể nói chung gồm 5 NTVL (*Fe, Cu, Zn, Mn, Se*), các axit amin như *lysine, phenylalanine, tyrosine, axit glutamic, asparaginic* và các hoạt chất sinh học khác như *testosterone, carotenoid*.

2. Đã xây dựng được quy trình công nghệ sản xuất và có được sản phẩm cụ thể (khoảng 85 kg bột Hagaton và 75.000 viên nang Hagaton để phục vụ nghiên cứu ứng dụng triển khai, kiểm nghiệm, đăng ký và tiếp thị vv...
3. Đã nghiên cứu chứng minh 10 tác dụng tác dụng y sinh học của chế phẩm trên động vật và người (học sinh và vận động viên) như sinh trưởng, sinh sản, tạo máu, cải thiện tốt như trí nhớ, phản xạ nhanh nhạy tăng các axit amin liên quan đến trí nhớ, tăng hàm lượng ARN và các NTVL trong mô não, các vận động viên thực hiện các phản xạ đơn và phản xạ tự chọn tốt hơn, có điểm Test Raven đánh giá trí tuệ cao hơn, và có điện não đồ (ĐNĐ) ưu việt hơn vv...
4. Đã làm xong các thủ tục đăng ký chất lượng hàng hoá với Bộ Y tế, với Cục Vệ sinh An toàn Thực phẩm và đã được giấy chứng nhận cho phép lưu hành sản phẩm. Đã kịp thời tham gia và giới thiệu sản phẩm tại Chợ Techmark của Bộ KH-CN tổ chức tháng 12/2003 tại Hà Nội.

Tài liệu tham khảo

1. Đỗ Hồng Anh, 1990 - *Bảng hướng dẫn sử dụng test Raven. Lược dịch N-T, 1990.*
2. Đàm Trung Bảo, Hoàng tích Huyền, Phạm Nguyên Vinh, 1999- *Chất chống oxy hoá. NXB Y học Hà nội, 1999.*
3. Baulieu và cs, 1995. *Tạp chí TTKHKTKT Thế giới, N49 (7-12-1995)-Hormone trong thần kinh*
4. Trần thị Cúc, Tạ Thuý Lan, 1996 - *Đặc điểm năng lực trí tuệ của học sinh phổ thông trung học ở Huế. Thông báo Khoa học và giáo dục, Đại học Sư phạm Huế, N9, 1996.*
5. Nguyễn Thành Đồng , 2003 - *Nghiên cứu ảnh hưởng của Fenobucarb và tác dụng bảo vệ của hải sâm lên một số chỉ số sinh học ở động vật thực nghiệm. Luận án Tiến sỹ Y học. Hà nội, 2003.*
6. Gordus , 1979 - *Tạp chí TTKHKTKT Thế giới, N20-21, 1979. Dùng tóc để chẩn đoán bệnh.*
7. P.K.James, 1996- *Disorders of magnesium metabolism. Harrison's 1996, 14th ed. 2, 2263-2266*
8. Kenneth H.F, 1996- *Disturbances in trace elements. In Harrison's 1996, 14th ed. inter.edition, 1, 489-492.*
9. Kenn.C, Gibb.E. 1986- *The role of zinc in te senile dementia. Brit.J. Psy. 1986, 149 (8) , 221-223..*

10. Tạ thuý Lan, Võ Văn Toàn, 1993 - *Bước đầu thăm dò khả năng hoạt động trí tuệ của học sinh cấp 1 Hà nội. Hội nghị Khoa học các trường đại học Sư phạm toàn quốc, Cửa lò, 5-1993.*
11. Đỗ Tất Lợi, 1991, *Những cây thuốc và vị thuốc Việt nam. Nhà xuất bản Khoa học và kỹ thuật, Hà nội, 1991.*
12. Tạ thị Ly Luân, 1997- *Nghiên cứu hàm lượng protein khoáng trong thức ăn thường dùng tại một số vùng có bệnh bướu cổ địa phương miền núi phía Bắc Việt Nam. Luận án Tiến sĩ Sinh học, Hà nội 1997.*
13. Nguyễn Tài Lương và cs. 2001- *Ứng dụng công nghệ sinh học sản xuất các chế phẩm thực phẩm- thuốc cho vận động viên. Hội thảo Quốc tế về Sinh học, V2, t.297-284, Hà nội, 2001*
14. Nauta W, 1972 - *Neural assosiations of the frontal cortex . Acta Neur. Exp. V32, p 125, 1972.*
15. Orlov.A.A, Pirogov A.A, Shefer V.I, 1979- *Số sánh đặc trưng hoạt tính các neuron vùng trán và vỏ vận động . Tạp chí Sinh lý học, T 65, tr.1727-1733, M.1979 (tiếng Nga).*
- 16.. Andy Organ, 2003 - *Dùng được phẩm đặc biệt phục vụ quân đội. Theo Splegel. TT. An ninh thế giới. N104 (338).10-7-2003.*
17. Takacs S, Tatar A, 1991- *Trace elements in the ivironment and in human organs: analysis according to domocile and sex. Z.Gesante.Hyg. 1991.37(2),53-55.*
18. Hồ Tống Tiến, 1999- *Nghiên cứu hàm lượng một số nguyên tố vi lượng trong tóc người bình thường và bệnh nhân tâm thần phân liệt ở miền Nam Việt Nam. Hà nội 1999.*
19. Ngô Chí Thành, 1998- *Muốn trường thọ hãy ăn kiến. Đại Đoàn Kết, 9-5-1998.*
20. Nguyễn Xuân Thắng, 2003 - *Hoá sinh được lý phân tử. NXB Khoa học và Kỹ thuật, Hà nội, 2003.*
21. Bách khoa dinh dưỡng, 2002- *Hội dinh dưỡng học Thượng Hải. Người dịch Nguyễn Trung Thuấn, Phạm thị Thu, NXB Phụ nữ, Hà nội, 2002.*

QUY TRÌNH
SẢN XUẤT BỘT GIUN QUẾ LÀM THUỐC
CHỐNG ĐÔNG MÁU

NGƯỜI CHỦ TRÌ: PGS. TS. NGUYỄN THỊ NGỌC DAO

I. GIUN ĐẤT - TÁC DỤNG CHỮA BỆNH VÀ ỨNG DỤNG LÀM THUỐC

I.1 Tác dụng chữa bệnh của giun đất

Theo dược lý học hiện đại, giun đất có các tác dụng:

1. *Tác dụng hạ huyết áp*: Người ta đã dùng dịch chiết hoặc bột khô giun đất để nghiên cứu trên mô hình gây tăng huyết áp thực nghiệm ở chuột cống, chuột nhắt trắng và mèo, nhận thấy gây hạ huyết áp rõ rệt thông qua cơ chế tác động trực tiếp lên trung khu thần kinh phía trên tủy sống dẫn tới hiện tượng giãn mạch và làm hạ áp lực máu.
2. *Tác dụng đối với cơ trơn*: Những thí nghiệm trên phổi chuột nhắt trắng và thỏ đã cho thấy giun đất có tác dụng làm giãn phế quản, điều này giải thích vì sao người xưa đã dùng giun đất để chữa bệnh hen suyễn. Còn ở mạch máu, nghiên cứu trên tai thỏ của các nhà y học Nhật lại cho thấy tác dụng trực tiếp làm cho mạch máu co thắt; tác dụng thông qua trung khu thần kinh thì lại làm mạch máu giãn ra.
3. *Tác dụng giải nhiệt*: Trên mô hình thực nghiệm gây sốt nhiễm khuẩn ở thỏ, người ta đã chứng minh giun đất có tác dụng giảm sốt rõ rệt. Điều này hoàn toàn phù hợp với y học cổ cho rằng giun đất có công hiệu trừ đại nhiệt. Cơ thể hạ sốt chủ yếu là do tác động trực tiếp lên trung khu điều hòa thân nhiệt ở não với hiệu quả làm gia tăng quá trình thải nhiệt.
4. *Tác dụng trấn tĩnh, chống co giật*: Người ta nhận thấy tác dụng này khi nghiên cứu trên chuột nhắt trắng và thỏ xuất từ nhận định của cổ nhân cho rằng giun đất có tác dụng tức phong, đặc biệt trong những trường hợp sốt cao gây co giật.
5. *Tác dụng cải thiện tuần hoàn não*: Viện y học dân tộc quân đội đã dùng thuốc MD, một chế phẩm từ giun đất để điều trị cho những bệnh nhân có hội chứng thiếu năng tuần hoàn não. Kết quả cho thấy giun đất có tác dụng cải thiện chức năng não và tuần hoàn máu não một cách rõ rệt; thể hiện trên lâm sàng và các chỉ tiêu cận lâm sàng nh điện não, lu huyết não.

Ngoài ra, giun đất còn có tác dụng kháng histamine, làm giảm sự ngưng kết các tiểu cầu, giảm độ nhớt máu, gây tan huyết mạch và có chứa các hoạt chất - hoạt hóa hệ miễn dịch.

I.2 Nghiên cứu ứng dụng giun đất làm thuốc ở Việt Nam và trên thế giới.

1. Trên thế giới

Trên thế giới, đã có 2 sản phẩm thuốc chữa bệnh tim mạch từ giun đất là lumbriko và boluoke. Ở Trung Quốc, Hàn Quốc, Nhật Bản, người ta sản xuất thuốc

uống Lumbriko từ giun đất *Lumbricus rubellus*. Sau khi nuôi giun và thử hoạt tính hòa tan fibrin cao, họ đông khô enzyme lumbrokinase và chiết globulin miễn dịch từ sữa non. Sau đó, trộn những enzyme này với globulin miễn dịch theo tỷ lệ 1:1 và bọc chúng trong một vỏ nang. Sản phẩm này có tác dụng hòa tan cục máu nghẽn một cách an toàn trong mạch máu và không có tác dụng phụ cũng như ảnh hưởng xấu đối với sức khỏe.

Bolouke Là một sản phẩm mà trong thành phần có chứa bột giun đất *Lumbricus rubellus*, có thể hòa tan các cục máu mà không có nguy cơ gây xuất huyết. Các nghiên cứu lâm sàng đã chỉ ra rằng các bệnh nhân sử dụng sản phẩm này trong một tháng thì bệnh được cải thiện đáng kể. Bolouke rất an toàn, hiệu quả và dễ mua. Ngoài ra nó còn khắc phục được những ảnh hưởng bất lợi của sự chảy máu vì có một ái lực cao đối với fibrin. Chế phẩm này có tác dụng tốt trong việc ngăn ngừa và điều trị bệnh thiếu máu não mạch cục bộ. Bolouke có thể được áp dụng rộng rãi trong việc điều trị bệnh nhồi máu cơ tim, nhồi máu phổi, di chứng và mù loà do tắc mạch.

Từ năm 1990, bệnh viện Xuanwu của Trường Y Jiangxi Medical College đã nghiên cứu phản ứng lâm sàng và đặc tính đông máu của 453 bệnh nhân bị bệnh thiếu máu não. Kết quả chỉ ra rằng thuốc có hiệu quả cao với 93% bệnh nhân.

2. Ở Việt Nam

Ở Việt Nam, giun đất đã được sử dụng để chữa bệnh, nhất là để điều trị bệnh cảm hàn, sốt rét. Trước đây dạng thông dụng là sao tẩm và phơi khô (có trường hợp dùng giun sống), ngày nay đã cải tiến dọi dạng tán nhỏ và đóng vào viên nang như Doragon (sản phẩm của xí nghiệp dộc Đồng Tháp), Cao Địa Long (Viện Y học Cổ truyền) từ các loài giun *Pheretima aspergillum* và *Megascholecidae asoergillum*. Tác dụng của các loại thuốc này là để tăng cường và bồi bổ sức khỏe cho những người ốm yếu, điều trị tăng huyết áp, cha có hóng khai thác các hoạt chất sinh học từ giun đất. Vì vậy hóng nghiên cứu sử dụng hoạt tính thủy phân từ giun đất làm thuốc chữa bệnh tim mạch của chúng tôi là một vấn đề rất mới mẻ và có thể nói là đầu tiên ở Việt Nam.

II. PHƯƠNG PHÁP

II.1 Tạo chế bột giun làm thuốc:

Yêu cầu: Bột giun làm thuốc phải giữ được hoạt tính thủy phân fibrin cao.

II.2 Thử tác dụng của chế phẩm bột thuốc lên thỏ

- Thỏ thí nghiệm: Thỏ thuần chủng có trọng lượng trung bình 2,5 kg/con do viện Vệ sinh Dịch tễ cung cấp hàng tháng.

- Vị trí gây tắc mạch máu: tai thỏ

a) Gây nghẽn mạch máu thỏ

- Bằng tác nhân vật lý: Dùng một vật cứng tác động vào tai thỏ để tạo các cục máu do bị bầm dập.
- Bằng tác nhân hóa học: sử dụng vitamin K tiêm trực tiếp vào tĩnh mạch rìa tai thỏ với liều lượng 1 ml/con để tạo các cục máu đông.

b) Đánh giá tác dụng của thuốc

Sau khi gây tổn thương mạch máu bằng các tác nhân vật lý và hóa học, thỏ được chia làm 2 lô: lô không điều trị và lô được điều trị bằng cách cho uống chế phẩm (bột giun được hòa với nước muối sinh lý 0,9% theo tỉ lệ 1:2) với liều lượng 2 ml/ngày trong 5 ngày, lặp lại 4 đợt và đánh giá các chỉ số trung bình của động vật trước và sau thí nghiệm, bao gồm: hồng cầu (số lượng, huyết sắc tố, hematocrit), bạch cầu (số lượng, bạch cầu trung tính, bạch cầu ái toan + ái kiềm monocyte, lymphocyte), tiểu cầu.

III. KẾT QUẢ

III.1 Qui trình tạo chế phẩm bột giun làm thuốc

Theo những nghiên cứu của các tác giả Nhật Bản thì enzyme thủy phân fibrin từ giun đất có một đặc điểm rất quan trọng là có thể hấp thụ qua thành ruột vào máu. Khi ở trong máu, enzyme này có hoạt tính thủy phân fibrin như plasmin (enzyme thủy phân fibrin của cơ thể) và ngoài ra còn có tác dụng hoạt hóa hệ thống thủy phân fibrin của mô. Chính vì vậy, enzyme này có thể sử dụng làm thuốc uống.

Trên thế giới, đã có các thuốc chữa bệnh tim mạch như Lumbiko, Boluoke có thành phần từ bột giun đất *L. rubellus* được sử dụng dưới dạng thuốc uống rất có hiệu quả. Theo Mihara và CS, loài giun này có hoạt tính thủy phân fibrin là 100 U/g khối lượng ẩm. Còn theo nghiên cứu của chúng tôi, loài giun *P. escavatus* cũng có hoạt tính thủy phân fibrin tương đối cao và tương đương với loài giun trên (96 U/g khối lượng ẩm). Quá trình nghiên cứu và tách chiết (chương 2) đã cho thấy, enzyme thủy phân fibrin tách chiết được từ loài giun quế có hoạt tính khá cao so với lumbricinase tách chiết từ loài *L. rubellus* và tương đối bền với nhiệt độ. Vì vậy chúng tôi cũng nghiên cứu quy trình sản xuất bột giun *Pe. escavatus* để làm thuốc.

Qua một quá trình nghiên cứu, chúng tôi chọn được một quy trình sản xuất bột thuốc từ giun đất như sau:



Hình 2.1: Quy trình sản xuất bột giun làm thuốc

Một yêu cầu quan trọng đối với bột giun sử dụng làm thuốc có tác dụng chống đông máu là phải giữ được hoạt tính của enzyme thủy phân fibrin. Qua nghiên cứu chúng tôi chọn ra được một quy trình sản xuất bột giun đáp ứng được yêu cầu đó (quy trình trên hình 3.1). Bột giun có hoạt tính thủy phân fibrin là 300 U/g (hình 3.2). **Bột giun đã được thử độc tính cấp tính (làm tại Viện Kiểm nghiệm - Bộ Y tế) là không có độc tính.**



Hình 2.2. Hoạt tính của bột giun quế (1)

Bảng 2.1. Bảng so sánh thành phần các nguyên tố vi lượng của bột giun với một số sản phẩm khác

STT	Tên mẫu	Cu PPm	Fe PPm	Zn PPm	Mn PPm	K PPm	Ca PPm
1	Giun quế	73.6	751.2	125.7	52.3	3808.4	2708.9
2	Doragon	16	-	8.42	-	0.36%	-
3	Tam thất	45.5	390.7	39.3	40.4	4675.5	959.7
4	Hải sâm	62	197.55	21.9	-	-	-
5	Rắn biển	36.2	351.23	137.63	45.8	-	-
6	Rùa	24.3	116.6	174.56	44.0	-	-

Bảng 2.2 Thành phần axit amin của bột giun

STT	Axit amin	Bột giun
1	Aspartic acid	5.68
2	Glutamic acid	7.00
3	Serine	2.10
4	Histidine	0.40
5	Glycine	3.28
6	Threonine	3.33
7	Alanin	2.98
8	Arginine	2.20
9	Tyrosine	2.21
10	Cysteine + Cystine	0.96
11	Valine	2.33
12	Methionine	1.01
13	Phenylalanine	1.67
14	Isoleucine	2.56
15	Leucine	3.49
16	Lysine	2.88
17	Proline	1.31
	Tổng số	45.39

Như vậy, bột rất giàu các axit amin axit và các axit amin không thay thế. Nhìn chung hàm lượng các yếu tố vi lượng tương đối cao so với các sản phẩm phân tích

III.2 Thử tác dụng của bột giun trên động vật thực nghiệm

Để thử nghiệm tác dụng chống đông máu của bột thuốc, thí nghiệm được thực hiện trên thỏ thuần chủng do Viện Vệ sinh Dịch tễ cung cấp. Tai thỏ được chọn làm vị trí gây tắc nghẽn mạch máu do các mạch máu ở vị trí này lộ rõ, có thể quan sát được dưới ánh sáng đèn những nơi bị bầm dập và các cục máu đông.

Sau khi gây tắc nghẽn mạch máu bằng tác nhân vật lý (dùng một vật cứng đánh vào tai thỏ) và tác nhân hóa học (tiêm vitamin K) để tạo cục máu đông, thỏ được chia làm 2 lô: lô đối chứng (không uống chế phẩm) và lô thí nghiệm (được uống chế phẩm) (Bảng 3.7, 3.8 và 3.9).

Sau 72 giờ hệ thống kháng đông trong cơ thể thỏ chưa làm tan hết các vệt tụ máu (Bảng 3.7). ở thỏ được uống chế phẩm, các vệt tụ máu đã tan hết sau 72 giờ. Như vậy, thuốc đã có tác dụng thúc đẩy quá trình kháng đông ở thỏ.

Bảng 3.7. Tác dụng của chế phẩm về mặt quan sát lâm sàng

Xử lý	Sau 24 h	Sau 48 h	Sau 72 h
Tiêm vitamin K	Khám tai thấy nổi cộm thành vệt, giờ lên ánh sáng thấy một số vệt tụ máu màu đỏ.	Cục to chưa tan. Vệt tụ máu đỏ khoảng 1,5 cm	Cục chưa tan. Vệt tụ máu đỏ đã tan đi một phần.
Tiêm vitamin K và uống chế phẩm	Khám tai thấy nổi cộm, giờ lên ánh sáng nhìn thấy vệt tụ máu màu đỏ.	Không thấy cục nữa, chỉ thấy dây hơn so với bình thường. Vệt tụ máu đỏ nhỏ khoảng 1 cm.	Tai vẫn còn hơi dây. Vệt tụ máu đỏ đã tan hết.

Với thỏ bị tổn thương bởi tác động vật lý, số lượng hồng cầu, bạch cầu, tiểu cầu đều tăng lên duy chỉ có tế bào lymphocyte là giảm do bị ảnh hưởng thay đổi bệnh lý (Bảng 3.8), nhng sau 5 ngày số lượng hồng cầu, bạch cầu, tiểu cầu trở lại gần với mức bình thường, tế bào lymphocyte tăng để tạo miễn dịch chống lại sự tổn thương. ở lô được điều trị, sau 5 ngày, chỉ số hồng cầu và tiểu cầu tăng rõ rệt, chứng tỏ chế phẩm đã có tác dụng làm tan sự bầm dập, chống lại sự đông máu.

Bảng 3.8. Sự thay đổi các chỉ tiêu sinh hóa ở thỏ bị tác động vật lý

Lô thí nghiệm	Hồng cầu			Bạch cầu				Tiểu cầu
	SL	HST	He	SL	BCTT	BCA	LYM	
<i>Đối chứng</i>	4,98	111	33,6	6,5	34,2	14,3	51,5	220
<i>Bị tổn thương</i>	6,12	126	38,4	8,7	43,4	14,7	41,9	349
<i>Bị tổn thương sau 5 ngày</i>	4,93	109	34,5	8,3	22,7	15,6	56,7	269
<i>Bị tổn thương và uống chế phẩm sau 5 ngày</i>	6,03	124	37,8	9,7	45,6	11,7	42,7	493

Chú thích: HC: hồng cầu; BC: bạch cầu; TC: tiểu cầu; SL: số lượng; He: hematocrit; HST: huyết sắc tố; BCTT: bạch cầu trung tính; BCA: bạch cầu ái toan và bạch cầu ái kiềm; LYM: lymphocyte.

Với hồng cầu: Khi tiêm vitamin K số lượng hồng cầu bị giảm sau 24 h nhng sau 48, 72 h lại tăng lên quá mức bình thường. Khi được điều trị bằng chế phẩm, số lượng hồng cầu trở lại gần với mức bình thường.

Với hematocrit: Sau 24 h tiêm vitamin K hàm lượng bị giảm vì vitamin K gây nên trạng thái thiếu máu. Khi được uống chế phẩm cũng sau 24 h, hàm lượng này cao hơn và trở lại gần như mức bình thường.

Bảng 3.9. Sự thay đổi các chỉ tiêu sinh hóa ở thỏ bị tác động hóa học không cho uống thuốc và có uống thuốc giun quế.

Các chỉ tiêu sinh lý sinh hóa	Nhóm	Mẫu lấy sau			
		0 h	24 h	48 h	72 h
Số lượng Hồng cầu ($\times 10^{12}/l$)	VK	4,98	4,12	5,11	5,64
	VK+UT	4,98	4,41	4,50	4,64
Huyết sắc tố (g/l)	VK	111	87	114	114
	VK+UT	111	96	103	104
Hematocrit (%)	VK	33,6	27,3	31,1	34,5
	VK+UT	33,6	30,0	30,9	32,1
Số lượng Bạch cầu ($\times 10^9/l$)	VK	6,5	6,7	7,2	6,9
	VK+UT	6,5	9,2	9,3	7,8
Bạch cầu trung tính (%)	VK	34,2	40,5	44,7	45,5
	VK+UT	34,2	30,7	28,7	30,9
Bạch cầu ái toan, ái kiềm và monocyte (%)	VK	14,3	9,9	10,3	8,9
	VK+UT	14,3	11,7	12,6	14,4
Lymphocyte (%)	VK	51,5	49,6	45,0	45,6
	VK+UT	51,5	57,6	58,7	54,7
Tiểu cầu ($\times 10^9/l$)	VK	220	184	289	303
	VK+UT	220	231	285	266

Chú thích: VK: Thỏ tiêm vitamin K, không cho uống thuốc; VK+UT: Thỏ tiêm vitamin K nhng được uống thuốc.

Với bạch cầu: Sau khi thở được uống chế phẩm, số lượng bạch cầu đã tăng lên để tạo miễn dịch chống lại sự tổn thương. Tuy số lượng bạch cầu tăng nhưng bạch cầu trung tính giảm để chống lại sự đông vón do tiêm vitamin K. Bạch cầu ái toan ái kiềm có tác dụng sản sinh ra heparin để chống lại sự đông máu, khi tiêm vitamin K chỉ số này giảm đi nên lượng heparin sản sinh ra không đủ để chống lại sự đông máu, nhưng khi được uống chế phẩm lượng bạch cầu này tăng lên đến mức bình thường để chống lại sự đông máu.

Với tiểu cầu: Chức năng chính của tiểu cầu là tham gia vào quá trình đông máu của cơ thể. Tiểu cầu vỡ giải phóng thromboplastin là một yếu tố tham gia vào quá trình đông máu. Khi tiêm vitamin K, do máu bị đông vón thành cục nên tiểu cầu giảm đột ngột (184) so với bình thường (220), nhưng khi uống chế phẩm chỉ số này tăng lên là 231, chứng tỏ chế phẩm này có tác dụng thực sự trong quá trình làm tan cục huyết khối.

Các kết quả trên đây cho thấy chế phẩm bột thuốc có tác dụng làm tan cục huyết khối trên thỏ thực nghiệm khi mạch máu bị tổn thương. Để khẳng định thêm tác dụng của chế phẩm này cần tiếp tục làm thêm một số chỉ tiêu huyết học nữa như huyết áp, độ nhớt của máu, hàm lượng fibrin.

IV. KẾT LUẬN

1. Đã tạo được một quy trình sản xuất bột thuốc từ loài giun quế với nhiệt độ sấy 60-65°C. Bột giun đã được kiểm nghiệm là không có độc tính, giàu các nguyên tố vi lượng. Hoạt tính thủy phân fibrin của bột là 300 U/g khô.
2. Đã thử nghiệm bước đầu tác dụng chống đông máu trên động vật là thỏ thực nghiệm và nhận thấy bột thuốc có tác dụng trong việc làm tan cục máu đông.

QUI TRÌNH CÔNG NGHỆ
SẢN XUẤT BỘT NẤM TINH KHIẾT

NGƯỜI CHỦ TRÌ: GS. TSKH TRỊNH TAM KIẾT

HÀ NỘI - 2004

1. MỞ ĐẦU

Cho tới nay đã có hàng chục nghìn các chất có hoạt tính sinh học đã được chỉ ra, riêng nấm và vi khuẩn đã có tới hơn 20.000 chất được công bố. Đặc biệt, trong các thập niên gần đây tỷ trọng nghiên cứu cũng như các chất mới được công bố ở nấm chiếm tỷ lệ ngày càng lớn hơn so với vi khuẩn trước kia (chủ yếu là xạ khuẩn. Trong số 2000 loài nấm không gây độc cho sức khỏe con người thì khoảng 1000 loài nấm chứa các chất có hoạt tính sinh học quý có thể dùng làm dược liệu. Nhiều trung tâm nghiên cứu sinh y được hàng đầu trên thế giới hiện nay được đặc biệt quan tâm và đẩy mạnh nghiên cứu các chất có khả năng chống ung thư, chống HIV, tăng cường khả năng miễn dịch của cơ thể, chữa các bệnh tim mạch, tiết niệu... từ nấm bậc cao, đặc biệt là các loài nấm nhiệt đới.

Trong danh mục được công bố năm 2001, khoảng 1250 loài nấm lớn đã được xác định trên lãnh thổ Việt Nam. Trong khuôn khổ dự án hợp tác với CHLB Đức “Nghiên cứu các chất có hoạt tính sinh học ở Nấm lớn Việt Nam”, gần 100 loài nấm lớn đã được nghiên cứu, khoảng 50 chất đã được xác định ở mức độ cấu trúc phân tử, trong đó có khoảng 25 chất có cấu trúc mới cho khoa học đã được xác định. Một số hoạt chất được khảo nghiệm cho thấy có khả năng ứng dụng trong việc điều trị và tăng cường sức khỏe con người.

Trong các loài nấm ăn và nấm dược liệu quý được nhân dân các nước Đông Á, người da đỏ và cả người Châu Âu sử dụng thì nấm Maitake (nấm Múa, nấm Gà gồ) và Phục Linh có ý nghĩa đặc biệt quan trọng. Từ xa xưa cả hai loài nấm này được coi là thực phẩm và dược phẩm quý. Các nghiên cứu về nấm học, sinh thái phân bố trong thiên nhiên, nghiên cứu đặc điểm sinh học trong phòng thí nghiệm nhằm đề xuất công nghệ thu nhận sinh khối và quả thể, nghiên cứu các chất có hoạt tính sinh học của chúng cũng như khả năng điều trị bệnh đã được tiến hành ở một số nước Đông á và Âu Mỹ.

Vì vậy việc nghiên cứu nấm Maitake và Phục Linh nhằm đề xuất các phương pháp công nghệ để tạo sinh khối và sản xuất chế phẩm từ hai loài nấm này là một đòi hỏi bức thiết.

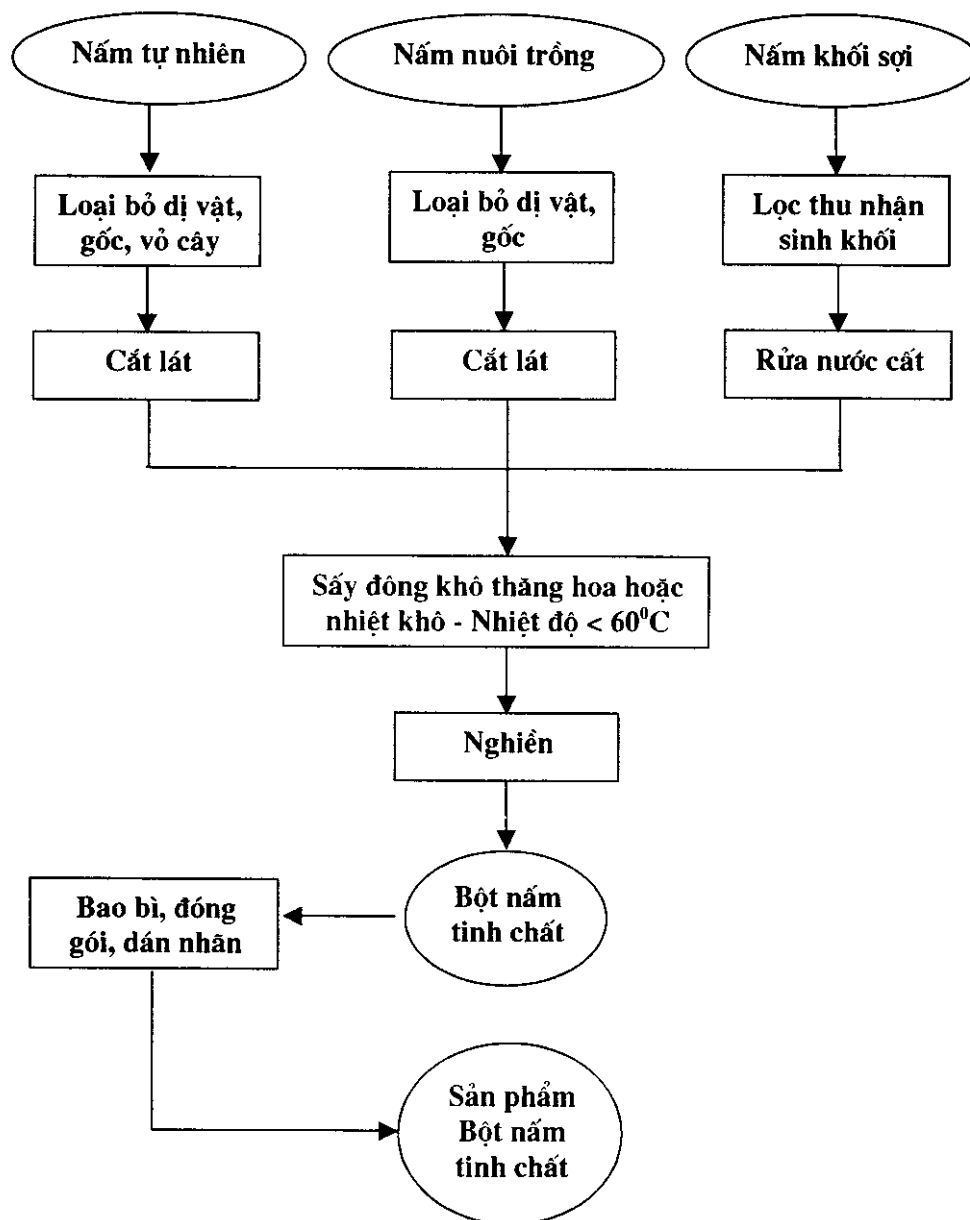
2. PHƯƠNG PHÁP

Các phương pháp nghiên cứu nấm học (Kiệt, 1981, 1996), Ryvarden (1996) và hóa các hợp chất tự nhiên (Graefe và cộng sự, 2001) đã được sử dụng.

3. KẾT QUẢ

Đã có được một quy trình công nghệ sản xuất bột nấm tinh chất, như sau:

QUY TRÌNH CÔNG NGHỆ SẢN XUẤT BỘT NẤM TINH CHẤT



- Đã sản xuất 60 kg bột nấm tinh chất tạo chế phẩm thử nghiệm sinh học và trên 30 người tình nguyện (công trình kết hợp với xí nghiệp dược phẩm Jena-Cộng hòa Liên Bang Đức. Kết quả thử nghiệm cho thấy: bột nấm có tác dụng chống oxy hóa, chống viêm, chống lão hóa. Sẽ sử dụng để tạo mỹ phẩm dưỡng da chống nhăn.

- Đã nhận được bằng sáng chế cho việc áp dụng hoạt chất Lanostanen của nấm Phục Linh với công thức I và II (bằng sáng chế kèm theo) để tạo thành thuốc điều trị bệnh và làm mỹ phẩm. được cấp 8/5/2003 tại CHLB Đức.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. R.L. Gilbertson and L. Ryvarden. 1987. north American Polypores. Oslo.
2. U. Graefe and other (2001), "*Colossolactones, new triterpenoid metabolites from a Vietnamese mushroom, Ganoderma colossum*". J. nat. Products (USA), 64, 236-239.
3. A. Inoue, N. Kodama and N. Nanba (2002), "*Effect of Maitake (Grifolia frondosa) D. fraction on the control of the T lymph Node th.1/Th.2 proportion*", Biol. Pharm. Bull. 25(4) 536-540.
4. J. Lelley (1997), *Die Heilkraft der Pilze*, (S. 113-115).
5. Ohno N, Adachi Y, Suzuki I, Oikawa S, Sato K, Ohsawa M, Yadomae T (1986), "*Antitumor activity of a beta-1,3- glucan obtained from liquid cultured mycelium of Grifola frondosa*". J Pharmacobiodyn. 9(10): 861-864.
6. R. Ryverden & R. L. Gilertson. 1993: *European polypores. Part 1. Oslo Norway*
7. Schwantes H. O. und Salttler, P. W., (1971), "*Methoden zur Messung der Wachstumsgeschwindigkeit von Pilzmycelien*". Oberhess. Naturwiss. Zeitschr. 38: 5-18.
8. Takeyama T, Suzuki I, Ohno N, Oikawa S, Sato K, Ohasawa M, Yahomae T (1988), "*Distribution of grifolan NMF-5N (I/B), a chemically modified antitumor beta glucan in mice*" J Pharamacobiodyn. 11(6): 381-385.
9. Takeyama T, Suzuki I, Ohno N, Oikawa S, Sato K, Ohasawa M, Yahomae T (1987), "*Host- mediated antitumor effect of grifolan NMF-5N, a polysaccharide obatined from Grifola frondosa*: J Pharamacobiodyn, 10(11): 644-651.
10. Trịnh Tam Kiệt (1981), *Nấm lớn ở Việt Nam*, Nxb Khoa học, hà Nội.
11. Trịnh tam kiệt. 1996. Danh mục nấm lớn của Việt nam. Hà nội. NXBNN.
12. T.T.Kiet. 1998. Preliminary checklist of macrofungi of Vietnam. Feddes Repertorium 109.3-4:257-277. Berlin.

13. T.T.Kiet, S. Heinze, A. Haerrte and U. Graefe. 2001. Occurences of triterpenoid in a Vietnamese species of *Wolfiporia cocos*. Pros. Intern. Biol. Conf. Hanoi.
14. Trịnh Tam Kiệt và các tác giả. 2001. Danh mục nấm Việt Nam, trong “Danh mục thực vật Việt Nam”, từ trang 51 đến trang 393. Nhà xuất bản nông nghiệp Hà Nội.
15. L. Ryvarden. 1991. Genera of Polypores. Oslo.
16. Tai, T. et al. Phytochemistry 1992, 31, 2548.
17. Tai, T. et al. Phytochemistry 1995, 40, 225
18. S.C. Teng. 1996. Fungi of China. NewYork

QUI TRÌNH CÔNG NGHỆ
TẠO SINH KHỐI NẤM DƯỢC LIỆU
HERICIUM ERINACEUM

NGƯỜI CHỦ TRÌ: TS. NGUYỄN HỒNG HÀ

1. GIỚI THIỆU CHUNG

1.1. Tên đề tài: “Nghiên cứu quy trình công nghệ tạo sinh khối nấm được liệu *Hericium erinaceum*”.

1.2. Chủ nhiệm đề tài nhánh: TS. Nguyễn Hồng Hà

1.3. Cơ quan chủ trì thực hiện: Phòng Di truyền vi sinh vật - Viện CNSH

1.4. Thời gian thực hiện: tháng 10/2001 - 10/2003

Nấm *H. erinaceum* được phân bố rộng rãi ở các vùng lãnh thổ Nhật Bản, Trung Quốc, loại nấm này được nghiên cứu và nuôi trồng thành công từ những năm 1960 (Cheng - 1960, Xu và Li- 1984) và hiện nay đang phát triển mạnh ở Trung Quốc, Nhật Bản, Đài Loan. Ở Việt Nam đã bắt gặp *H. erinaceum* từ những năm 1977 trên các cây thuộc nhóm gỗ sồi, dẻ (Lê Văn Liễu 1977). Hiện nay nấm *H. erinaceum* đã được nhiều tác giả nuôi trồng nhưng sản lượng nấm chưa nhiều, nguồn gốc chủng giống và được tính của chúng chưa rõ ràng hoặc công bố đầy đủ. Nhằm góp phần giải quyết nguồn nguyên liệu cho điều chế thuốc phục vụ tiêu dùng chúng tôi tập trung xây dựng công nghệ đơn giản để có thể đảm bảo nguồn nguyên liệu thường xuyên cung cấp cho thị trường được liệu. Đây là vấn đề có ý nghĩa lớn và thiết thực bởi vì:

Nấm *H. erinaceum* là một loại nấm vừa ăn vừa làm thuốc có giá trị dinh dưỡng cao, giàu protein, axit amin, bao gồm cả axit amin không thay thế. Theo phân tích của Sở Thực phẩm Bắc Kinh thì 100g nấm *H. erinaceum* chứa 26,3 g protein; 4,2 g lipid; 44,9 g hidrat cacbon, 6,4 g xenlulô thô; 10,2 g nước; 856 mg photpho (P), 18 mg sắt (Fe); 2 mg canci (Ca); 0,69 mg B₁; 1,89 mg vitamin B₂ và nhiệt lượng là 323 kilo calo.

Nấm *H. erinaceum* có tác dụng chữa trị tốt bệnh loét dạ dày và thương vị, ngoài ra cũng có tác dụng hỗ trợ phòng chống một số bệnh như tim mạch, không làm xơ cứng động mạch, giảm cholesterol trong máu, điều trị khối u và một số bệnh khác.

Các hợp chất tách chiết được từ nấm như C₁₈H₃₂O₅, YA-2, Hericenone A (C₁₉H₂₂O₅) và Hericenone B (C₂₇H₃₄NO₄) cho thấy có hoạt tính axit YA-2 có tính chất tăng thực bào Hella cells (tế bào ung thư gan) khá rõ rệt. Nấm *H. erinaceum* còn có tác dụng xúc tiến sinh tổng hợp yếu tố tăng cường thần kinh

(NGF) điều này liên quan đến khả năng điều trị bệnh lú lẫn Alzheimer theo phương pháp trắc nghiệm sinh học (bioassay).

1.5. Mục tiêu của đề tài

- Thu thập, tuyển chọn chủng *H. erinaceum* làm nguồn vật liệu khởi đầu.

- Lựa chọn công nghệ sản xuất áp dụng cho chủng giống *H. erinaceum*, tối ưu một bước môi trường nhân giống đạt được hiệu suất sinh học (40 – 50% trong điều kiện Việt Nam) và cho lượng sinh khối quả thể và khuẩn ty cao.

- Xây dựng kỹ thuật chuẩn bị dịch chiết mô & Phát hiện hoạt chất có được tính mong muốn

2. TÌNH HÌNH THỰC HIỆN ĐỀ TÀI

2.1. Nghiên cứu cơ bản và tuyển chọn giống nấm

Từ Bộ sưu tập các giống nấm ăn và nấm dược liệu của đơn vị khởi đầu xây dựng từ những năm 80 đã tuyển chọn được một số chủng có dược tính và phát triển mạnh trong điều kiện nguyên vật liệu và khí hậu Việt Nam.

Chúng phân lập ký hiệu *H. erinaceum* TT và giống nấm nguồn gốc nước ngoài *H. erinaceum* Bill là những chủng phá gỗ mạnh có thể mọc ở cây gỗ mục. Quả thể nấm thông thường có dạng hình cầu hoặc bán cầu. Đôi khi lớn hơn, kích thước mũ từ 10 - 20 cm. Ban đầu quả thể hình thành các trụ tròn phía trên bắt đầu phân chia thành chùm như hoa súp nơ màu trắng, sau ít ngày các tua phát triển thành tua dài rủ xuống. Quả thể có hình đầu với nhiều sợi hình răng mọc thẳng lên trông giống như đầu hổ (Lion's Mane).

Vị trí phân loại của nấm giống:

Loài : *Hericium erinaceum*

Chi : *Hericium*

Họ : *Hericioideae*

Lớp phụ : *Hymenomycetidae*

Lớp : *Hymenomycetes*

Ngành phụ : *Basidiomycotina*

Ngành : *Eumycota*

Giới : *Mycota*

2.2. Kiểm tra đặc điểm phát triển trên một số môi trường và giá thể

Kết quả cho thấy môi trường Malt thích hợp nhất cho sinh trưởng và phát triển của nấm *H. erinaceum* TT. Khuẩn ty phát triển đều, trắng; hệ sợi phát triển kiểu xoáy ốc thành khuẩn lạc tròn; khuẩn ty dừng phát triển sau khoảng 14 ngày. (mức độ phát triển trung bình khoảng 4,5mm/ ngày), sau ít ngày chuyển sang màu vàng chanh. Bào tử đám màu trắng, hình trứng hoặc hình trụ. Kích thước bào tử từ 5,5 μ m - 7 μ m.

Những môi trường đã được sử dụng

+ Thạch Malt

+ Thạch Saboroud

- + Thạch khoai tây
- + Thạch Czapek
- + Thạch LX

2.3. Lựa chọn thông số, môi trường nhân giống để phù hợp với công nghệ sản xuất trên môi trường đặc và môi trường lỏng cho sinh khối khuẩn ty

2.3.1 Ảnh hưởng của pH tới sự phát triển của *H. erinaceum* TT

pH môi trường là yếu tố quan trọng đối với sinh khối và tạo thành quả thể. Kết quả đo đường kính khuẩn lạc sau 13 ngày nuôi cấy được trình bày trên bảng 1 cho thấy *H. erinaceum* là loại nấm ưa axit trong phạm vi pH = 4-5 sợi nấm phát triển thích hợp nhất.

Bảng 1. Ảnh hưởng của pH tới sự phát triển của *H. erinaceum* TT

pH Ngày	Đường kính khuẩn lạc (mm)					
	3	3,5	4	4,5	5	6
1	3,5	5	6	8	7	5
3	9	10	10	17	14	8
5	17	18	20	27	24	15
7	28	32	33	38	35	27
9	39	40	42	0	46	37
11	48	51	52	61	62	49
13	57	59	63	78	74	60

2.3.2. Ảnh hưởng của nhiệt độ tới sự phát triển của *H. erinaceum* TT

Nấm *H. erinaceum* TT ưa nhiệt độ 19 - 22°C, tuy vậy chúng vẫn phát triển ở 22 - 28°C nhưng ở trên 28°C sự phát triển sẽ bị dừng lại .

Bảng 2. Ảnh hưởng của nhiệt độ và tới sự phát triển của *H. erinaceum* TT

t°C Ngày	Đường kính khuẩn lạc (mm)					
	10	15	20	22	25	28
1	1	3	5	5	4	2
3	7	5	13	12	13	5
5	11	9	20	20	20	8
7	18	25	31	32	35	15
9	22	27	40	45	40	18
11	28	35	59	58	52	23
13	33	50	78	76	61	27

2.3.3. Ảnh hưởng của N tới sự phát triển của *H. erinaceum* TT

Nguồn Nitơ thường dùng là urê, sulfat đạm, photphat amôn, pepton, khô đậu, khô lạc,...

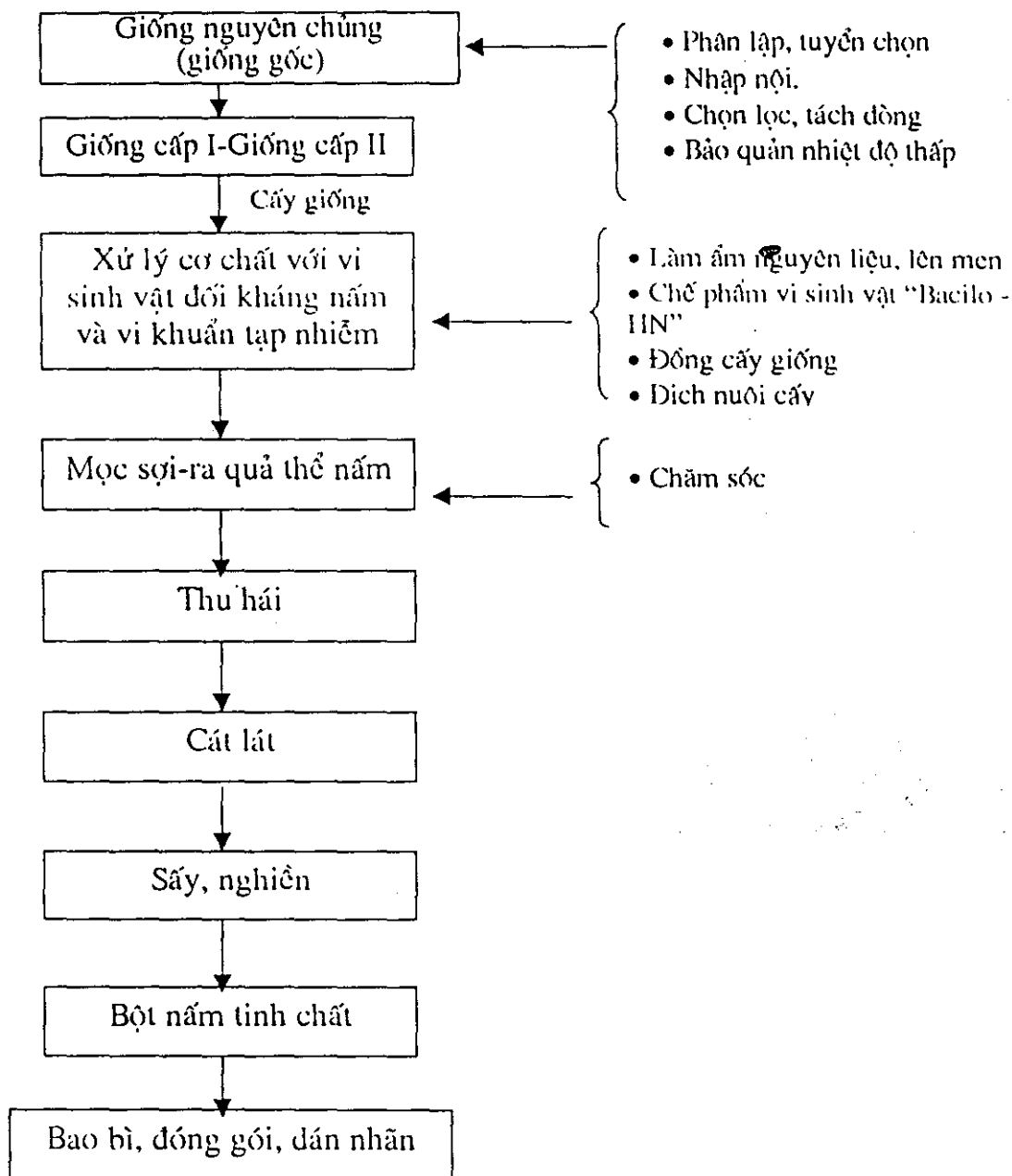
Bổ sung các muối này còn có tác dụng ổn định pH thích hợp. Bột đậu tương trong thí nghiệm này được dùng thay cho pepton với tỷ lệ 0,5% - 1%.

Bảng 3. Ảnh hưởng của bột đậu tương tới sự phát triển của *H. erinaceum* TT

Ngày	Nồng độ	Đường kính khuẩn lạc (mm)			
	Đối chứng	0,1	0,5	1	
1	3	5	7	6	
3	9	13	17	14	
5	19	25	30	27	
7	29	39	45	43	
9	45	55	60	61	
11	61	70	75	76	
13	69	75	79	82	

2.3.4. Quy trình công nghệ sản xuất bột nấm *H. erinaceum* TT

Sơ đồ 1. quy trình và công nghệ sản xuất bột nấm *H. erinaceum* TT



Kết hợp với các phương pháp nuôi cấy, đánh giá tốc độ sinh trưởng và phát triển hệ sợi của nấm *Hericeum* trong các môi trường và giá thể nuôi trồng khác nhau sao cho hiệu suất sinh học đạt được cao nhất. Cụ thể:

a/. Môi trường giống cấp I: môi trường nuôi cấy thuần khiết

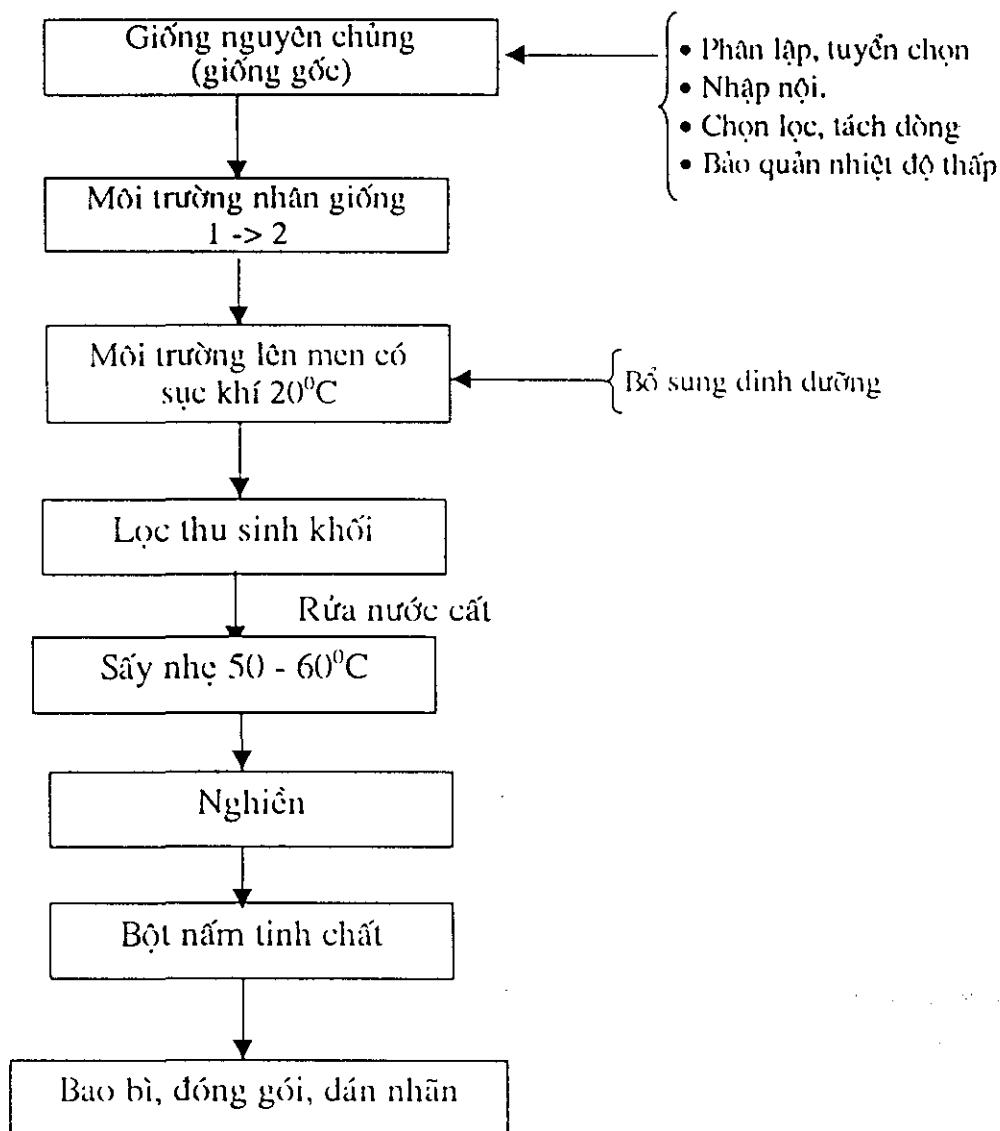
b/. Môi trường nhân giống cấp II, III: môi trường hạt ngũ cốc bổ sung phụ gia

c/. Giá thể nuôi trồng: nguyên liệu là các loại mùn cưa có bổ sung dinh dưỡng - nhiệt độ 18 - 22°C là thích hợp (tối ưu). Thu hoạch 2 lần / đợt nuôi trồng.

2.3.5. Ảnh hưởng của thời gian nuôi cấy tới sự phát triển sinh khối khuẩn ty của *H. erinaceum* TT

Thực nghiệm thu sinh khối khuẩn ty trong bình thủy tinh trên máy lắc quy mô phòng thí nghiệm và trên hệ thống lên men 10 l có cấp khí, thời gian nuôi cấy là 10 - 14 ngày, kết quả cho thấy lượng sinh khối khô có thể thu hồi bằng phương pháp lọc có công đoạn sấy khô sợi ở 50 - 60 °C trong 18 - 24 giờ đến khi trọng lượng không đổi được 25 - 36g/l trong những điều kiện lựa chọn. Những kết quả trên đây là cơ sở để thu được lượng sinh khối lớn hơn vào thời gian sắp tới.

Sơ đồ 2. Quy trình và công nghệ sản xuất bột khuẩn ty nấm *H. erinaceum* TT



Hoạt tính gây độc tế bào ung thư trong chất chiết bột quả thể nấm

Đánh giá hoạt tính gây độc tế bào theo phương pháp của Likhiwitayawuid et al (1993) đang được tiến hành tại viện nghiên cứu ung thư Quốc gia của Mỹ (NCI) (3) Dòng Hep - G2 (Heptonema carcinoma - ung thư gan). Dòng F1 (Fibril sarcoma of uteus - ung thư màng tử cung). R.D (Rhabdosarcoma - ung thư màng tim) có nguồn gốc chung từ trung tâm bảo tàng giống của Mỹ (ATTC). Chúng tôi tiến hành thử nghiệm tại Phòng Thử nghiệm hoạt tính sinh học (Bioassay lab.), Viện Hóa học các Hợp chất thiên nhiên, Viện Khoa học và Công nghệ Việt Nam.

Kết quả cho thấy: Khả năng sống sót của tế bào Hep -2 tính theo % so với đối chứng là:

$21,63 \pm 2,1$ (dòng Hep -2)

Như vậy mẫu *H. erinaceum* TT cho giá trị $ED \leq 50\%$ ở nồng độ 17,85 mg/ml đối với mẫu thô nên được đánh giá là có hoạt tính kìm hãm phát triển tế bào ung thư (dương tính 1 dòng) khi nuôi cấy invitro. Dựa vào tác dụng được lý của loài *H. erinaceum* chúng tôi chọn các nhóm có hoạt chất chính làm đối tượng để khảo sát và so sánh.

Nhóm hoạt chất bồi dưỡng cơ thể: hàm lượng axit amin trong bột quả thể nấm

Thành phần, hàm lượng axit amin được xác định trên máy phân tích tự động H.P - amino Quat series II. Kết quả cho thấy: Nấm *H. erinaceum* là nấm tương đối giàu và câu đối về thành phần dinh dưỡng. Hàm lượng axit amin tổng số là 11,83 g axit amin/100g mẫu.

So sánh với 1 loại nấm được liệu khác cùng phân tích cho thấy hàm lượng axit amin tổng số của *H. erinaceum* cao gấp 1,5 lần (xem kết quả phân tích mẫu ngày 18/10/2004 do Phòng Hóa sinh Protein thực hiện).

Hoạt tính kháng VSV kiểm định. Chất chiết *H. erinaceum* TT ở nồng độ 89,25 mg/ml không thể hiện hoạt tính kháng khuẩn như một số nấm được liệu khác (Bảng 5)

Bảng 5. Hoạt tính kháng VSV kiểm định của bột quả thể nấm *H. erinaceum* (*)

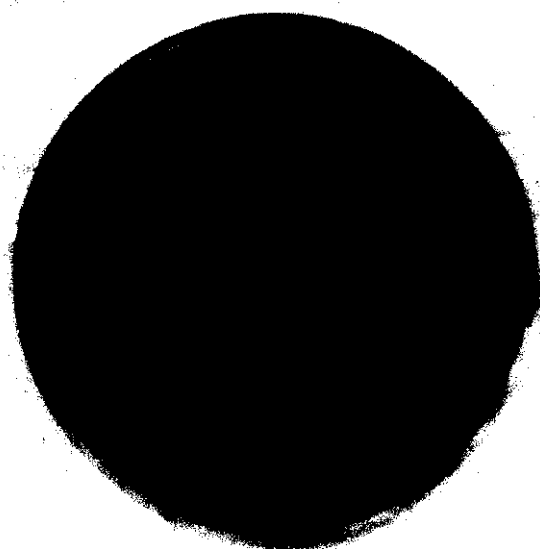
Kí hiệu chất chiết	Hoạt tính kháng VSV							
	Vi khuẩn Gr (-)		Vi khuẩn Gr (+)		Nấm mốc		Nấm men	
	<i>E. coli</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>B. subtilis</i>	<i>S. aureus</i>	<i>ASP. Niger</i>	<i>F. oxysporum</i>	<i>C. albicans</i>	<i>S. cerevisiae</i>
<i>H. erinaceum</i>	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)

Chú thích. (*): Kết quả do Phòng Thử nghiệm hoạt tính sinh học (Bioassay Lab.), Viện Hoá học các hợp chất tự nhiên, Viện KH và CN Việt Nam thực hiện

Có thể kết luận *H. erinaceum* có hoạt tính đặc hiệu đối với tế bào ung thư gan người (dòng Hep -2).



Ảnh 1. Bột khuẩn ty *H. erinaceum* TT



Ảnh 2. Hoạt lực phân giải CMC của chủng *H. erinaceum* TT xác định theo phương pháp cấy chấm điểm

2.3.7. Xây dựng kỹ thuật chuẩn bị dịch chiết khuẩn ty phát hiện hoạt chất được tính

Bảng 4. Hoạt tính kìm hãm tế bào ung thư (gián tiếp)

Chủng nấm đã có trong bộ sưu tập	Hoạt tính kìm hãm tế bào sử dụng trong test ung thư
DNL1	++++
TKN 1	+++
TBN 2	++
TBL 1	++
QK 2	++
TL 3	++
<i>H. erinaceum</i> TT	++
<i>H. erinaceum</i> Bill	++

Đã xây dựng được phương pháp chiết xuất hoạt chất sinh học từ mô sinh dưỡng nấm. Phát hiện hoạt tính ức chế phát triển dòng tế bào chẩn đoán hoạt tính dùng sử dụng trong kìm hãm tế bào ung thư (Bảng 4).

Kết quả bảng 4: Ngoài 2 *H. erinaceum* một số chủng nấm khác cũng có hoạt lực mạnh kìm hãm dòng tế bào dùng trong chẩn đoán hoạt tính kìm hãm tế bào ung thư. Ở chủng *H. erinaceum* TT và *H. erinaceum* Bill cũng cho kết quả tương tự nhưng hoạt lực yếu hơn. Từ những nghiên cứu này cho thấy khả năng có thể nuôi trồng phát triển nguồn tài nguyên dược liệu quý từ khuẩn ty nấm dược liệu khác, có nguồn gốc phân lập rõ ràng và không giới hạn trong phạm vi loài *H. erinaceum*.

3. KẾT LUẬN

1. Đã tuyển chọn được chủng *H. erinaceum* TT, *H. erinaceum* Bill và một số chủng nấm khác do các tác giả phân lập trong nước có hoạt tính sinh học mong muốn trong đó một số có dược tính quý có thể sử dụng làm dược liệu.

Các chủng nấm này hiện đang được bảo quản trong điều kiện phòng thí nghiệm để có giống phục vụ nghiên cứu triển khai rộng.

2. Bước đầu xây dựng được công nghệ sản xuất nguồn dược liệu từ nấm. *H. erinaceum* TT đạt hiệu suất sinh học là: 28-30 % (250-300 g quả thể nấm/ 1kg cơ chất khô) và lượng sinh khối khuẩn ty tích lũy ở quy mô phòng thí nghiệm đạt: 12-15 g/l.

Sản phẩm thu được và chỉ tiêu đề ra 40 kg bột nấm *H. erinaceum* TT đều có hoạt tính sinh học và đặc biệt là dược tính quý như mong muốn (có mẫu kèm theo).

3. Đã xây dựng được qui trình chiết xuất hoạt chất có dược tính quý (ức chế 3 dòng tế bào ung thư) từ mô nấm để tiếp tục nâng cao hiệu suất và phát hiện các dược tính mới.

4. PHƯƠNG HƯỚNG NGHIÊN CỨU TRONG THỜI GIAN TỚI

Nâng cao hoạt tính kìm hãm tế bào ung thư của nấm *H. erinaceum*

Triển khai trồng *H. erinaceum* để thu quả thể và sinh khối theo hướng làm nguồn dược liệu quý sử dụng trong nước và phục vụ việc chăm sóc sức khỏe cho nhân dân.

Hà Nội, ngày 20 tháng 3 năm 2003

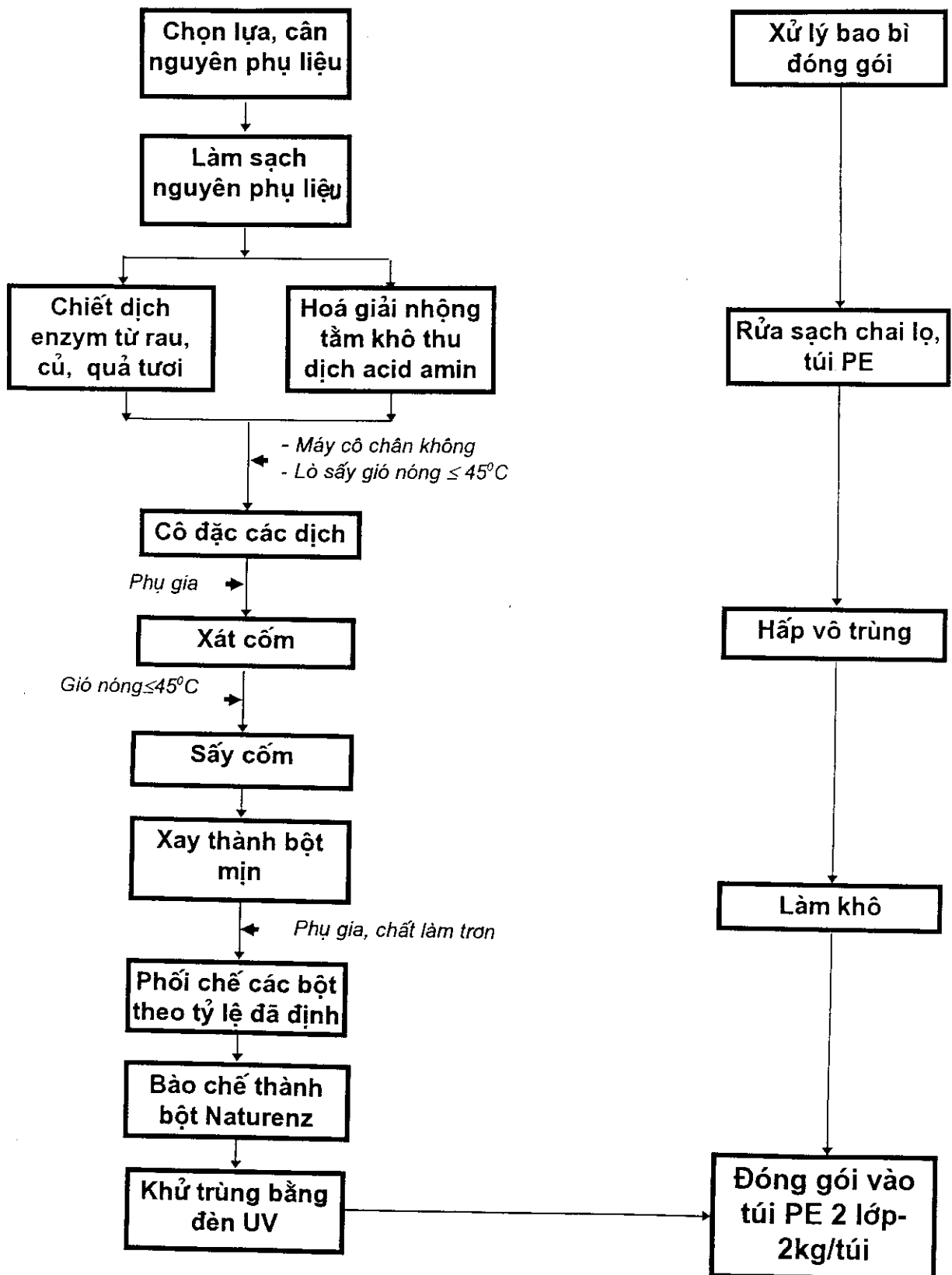
Chủ nhiệm đề tài nhánh

TS. Nguyễn Hồng Hà

SƠ ĐỒ QUI TRÌNH SẢN XUẤT BỘT THUỐC
NATURENZ

NGƯỜI CHỦ TRÌ: PGS.TS. NGUYỄN THỊ NGỌC DAO

SƠ ĐỒ QUY TRÌNH SẢN XUẤT BỘT NATURENZ



B/ CÁC BÀI BÁO VÀ BÁO CÁO

CÁC BÀI BÁO VÀ BÁO CÁO

I/ CÁC BÀI BÁO TRONG NƯỚC	Trang
1. Đinh Thị Thu Hiền, Nguyễn Thị Ngọc Dao, Lê Quang Huấn, Lê Thị Muội, Lê Trần Bình (2003). Nghiên cứu qui trình nhân nhanh sinh khối mô Hoàng Liên gai (<i>berberis wallichiana</i> DC) bằng công nghệ tế bào thực vật. Báo cáo khoa học tại Hội nghị CNSH toàn quốc 2003, Hà Nội, 1044-1047.	254-257
2. Lê Thị Lan Oanh, Lê Thị Việt Hồng, Hoa Thị Hằng, Nguyễn Thị Ngọc Dao, Nguyễn Quốc Khang, Nguyễn Thị Hồng Gấm, Phan Quốc Kinh (2003). Thu nhận và khảo sát một số đặc điểm sinh dược học của flavonoid từ cây cúc gai <i>Silybum marianum</i> di thực vào Việt Nam. Báo cáo khoa học tại Hội nghị CNSH toàn quốc 2003, Hà Nội, 1029-1033.	258-262
3. Nguyễn Thị Hồng Gấm, Nguyễn Quốc Khang, Lê Thị Lan Oanh, Nguyễn Thị Tố Nga, Nguyễn Thị Ngọc Dao. Nghiên cứu qui trình thu nhận Silymarin và tạo sinh khối tế bào cây cúc gai <i>Silybum marianum</i> trồng ở Việt Nam. Tạp chí Di truyền và ứng dụng. 4(2003), 25-31.	263-269
4. Phan Quốc Kinh, Đỗ Hoa Viên, Lê Minh Châu (2003). Nghiên cứu chiết xuất và tinh chế isoflavonoid có hoạt tính estrogen trong củ sắn dây <i>Pueraria thompsonii</i> Benth. Tạp chí Khoa học và Công nghệ 41(2), 10-16.	270-275
5. Đỗ Thị Hoa Viên, Vũ Thị Thu Huyền (2003). Nghiên cứu <i>in vivo</i> tác dụng nội tiết kiểu estrogen của cao chiết isoflavone từ hạt đậu tương Việt Nam <i>Glycine max</i> . Báo cáo khoa học, Hội nghị Công nghệ Sinh học toàn quốc, Hà nội, 573-575.	276-278
6. Nguyễn Thị Mai Phương, Phan Tuấn Nghĩa, Đặng Minh Phương, Nguyễn Thị Ngọc Dao, 2003. Tác dụng của Polyphenol của dịch chiết	279-282

Báo cáo tổng kết đề tài KC 04-17

vỏ quả măng cụt (<i>Garcinia mangostana</i> L.) lên vi khuẩn sâu răng <i>Streptococcus mutans</i> . Báo cáo khoa học hội nghị toàn quốc lần thứ 2, nghiên cứu cơ bản trong Sinh học, Nông nghiệp, Y học, Huế, 983-986.	
7. Nguyễn Thị Mai Phương, Phan Tuấn Nghĩa, Nguyễn Thị Ngọc Dao, Đỗ Ngọc Liên (2004). Thành phần Polyphenol của vỏ quả măng cụt (<i>Garcinia mangostana</i> L.) và tác dụng ức chế sự sinh acid của vi khuẩn <i>Streptococcus mutans</i> GS-5. Tạp chí Dược học, số 338, 18-20.	283-285
8. Nguyễn Thị Mai Phương, Nguyễn Thị Ngọc Dao (2003). Tác dụng của dịch chiết lá chè xanh lên vi khuẩn sâu răng <i>Streptococcus mutans</i>. Tạp chí Dược liệu, tập 8, số 4/2003. 110-114.	286-290
9. Đỗ Thị Tuyên, Hoàng Công Minh, Nguyễn Thị Ngọc Dao, 2003. Nghiên cứu sự biến đổi của hệ thống Cytochrome trong gan chuột nhiễm độc Yperit, nhiên liệu lỏng tên lửa, carbon tetrachloride và tác dụng bảo vệ của thuốc phòng. Tạp chí Công nghệ Sinh học 1(2): 169-175.	291-297
10. Nguyễn Thị Ngọc Dao, Đỗ Thị Tuyên, Hoàng Đình Cầu, 2003. Tác dụng của một số chế phẩm tự nhiên Naturenz lên sức khỏe bệnh nhân bị phơi nhiễm với chất da cam/dioxin. Tạp chí Y học 5(2003): 34-37.	298-301
11. Trần Mạnh Hùng, Lê Thái Hằng, Nguyễn Thị Ngọc Dao, Trần Thị Mỹ Linh (2003). Kết quả điều trị một số cựu chiến binh Quận Thanh Xuân bị nhiễm chất diệt cỏ trong chiến tranh (AO/DiOXIN) bằng thuốc Naturenz. Báo cáo khoa học, Hội nghị Công nghệ Sinh học Toàn quốc 2003, Hà Nội, 1056-1059.	302-305
12. Đỗ Thị Tuyên, Lê Thị Lan Oanh, Đào Thị Mai Anh, Nguyễn Thị Ngọc Dao. Nghiên cứu ảnh hưởng của Silymarin lên hệ thống enzym Cytochrom P₄₅₀ ở gan thỏ thuần chủng New Zealand white. Báo cáo khoa học, Hội nghị Công nghệ Sinh học Toàn quốc 2003, Hà Nội, 472-475.	306-309

Báo cáo tổng kết đề tài KC 04-17

13. Đỗ Thị Tuyên, Nguyễn Hữu Khoa, Nguyễn Thị Ngọc Dao (2004). Nghiên cứu khả năng chống oxy hóa của dịch chiết lá Neem ở gan chuột bị nhiễm độc CCl₄ . Báo cáo khoa học hội nghị toàn quốc 2004, nghiên cứu cơ bản trong khoa học sự sống định hướng y dược học, Hà nội, Tr 355-358.	310-313
14. Đỗ Thị Tuyên, Phan Quốc Kinh, Lê Thị Thùy Dương, Nguyễn Thị Ngọc Dao (2004). Ảnh hưởng của cao chiết từ quả bứa (Garcinia cambogia) lên các enzym chống oxy hóa ở gan chuột bị nhiễm độc CCl₄ mãn tính . Tạp chí dược học số 12(2004), 10-13.	314-317
15. Đỗ Thị Tuyên, Đào Thị Mai Anh, Nguyễn Thị Ngọc Dao (2004). Ảnh hưởng của Silymarin lên hoạt tính microsomal cytochromes P450 ở gan thỏ . Tạp chí Công nghệ sinh học 2(1): 57-64.	318-325
16. Nguyễn Tài Lương, Nguyễn thị Ty, Nguyễn thị Vĩnh, 2003. Kết quả nghiên cứu hàm lượng carotenoid tổng số trong thịt một số loài thủy động vật ở Việt Nam . Những vấn đề nghiên cứu cơ bản trong khoa học sự sống, 489-491.	326-328
17. Nguyễn thị Vĩnh, Nguyễn Tài Lương và cs. 2003. Hiệu quả của các chế phẩm thức ăn chức năng lên một số chỉ tiêu sinh lý thần kinh của học sinh và vận động viên . Tuyển tập Hội nghị CNSH toàn quốc. tr. 491-496. Hà nội, 2003.	329-334
18. Nguyễn Tài Lương, Nguyễn thị Ty, Nguyễn thị Vĩnh, 2003. Hàm lượng axit amin trong cơ một số động vật thân mềm . Những vấn đề nghiên cứu cơ bản trong khoa học sự sống, 492-494.	335-337
19. Lý Thị Bích Thủy, Nguyễn Trường Giang, Nguyễn Thị Ngọc Dao, 2003. Hoạt tính thủy phân fibrin của enzym tách từ một số loài giun đất Việt Nam . Báo cáo khoa học hội nghị toàn quốc lần thứ 2, nghiên cứu cơ bản trong Sinh học, Nông nghiệp, Y học, Huế, Tr 531-534.	338-340
20. Lý Thị Bích Thủy, Nguyễn Thị Ngọc Dao, 2003. Tách chiết enzym	341-343

Báo cáo tổng kết đề tài KC 04-17

có hoạt tính thủy phân fibrin từ loài giun quế, <i>Perionyx excavatus</i> . Báo cáo khoa học hội nghị toàn quốc 2004, nghiên cứu cơ bản trong khoa học sự sống định hướng y dược học, Hà nội, Tr 173-176.	
21. Đặng Diễm Hồng, Luyện Quốc Hải, Ngô Thị Hoài Thu, Trần Văn Khánh, Lê Quang Huấn, Nguyễn Thị Ngọc Dao, Nguyễn Đức Bách, Huỳnh Thị Kim Hối, Nguyễn Văn Đồng (2003). Đa hình đoạn gen ITS-1 ở 8 loài giun đất miền Bắc Việt Nam. Hội nghị Công nghệ Sinh học toàn quốc 2003, Hà Nội, 727-731.	344-348
22. Nguyễn Đức Bách, Luyện Quốc Hải, Ngô Thị Hoài Thu, Lê Quang Huấn, Nguyễn Thị Ngọc Dao, Đặng Diễm Hồng, Nguyễn Văn Đồng (2003). Tách dòng gen mã hóa enzym Lumbrokinase từ loài giun quế của Việt Nam, <i>Perionyx excavatus</i> . Hội nghị Công nghệ Sinh học toàn quốc 2003, Hà Nội, 590-593.	349-352
23. Trịnh Tam Kiệt. Nghiên cứu chi nấm Wolfiporia RYV và Gilbin ở Việt Nam. Tạp chí Di truyền học và ứng dụng, Chuyên san Công nghệ Sinh học. 60-63.	353-355
II/ CÁC BÁO CÁO HỘI NGHỊ KHOA HỌC QUỐC TẾ	
24. Do Thi Hoa Vien, Phan Quoc Kinh, (2003). Study on extraction and purification of isoflavones from Vietnam soybean <i>Glycine max</i> . Proceedings of the 8 th Asean food conference, Hanoi, Vietnam, 345-348.	356-359
25. Nguyen thi Ngoc Dao, Do thi Tuyen, Tran Van Khanh, Do Thi Hong Cam, Le Thi Thuy Duong, Ly Thi Bich Thuy, Ta Kim Thach, Hoang Thi Thanh, Tran Manh Hung, Nguyen Thi Cuc, Hoang Dinh Cau. Effects of Naturenz - a natural compound on the health of patients exposed to A.O/Dioxin. Viet nam - United states scientific conference on human health and environmental effects of agent orange/dioxin. March 3-6/3/2002, Hanoi, Vietnam, 556-563.	360-370
26. Hoang Thu Ha, Nguyen Hoai Ha, Phan Thi Ha, Nguyen lan Dung,	371-373

Báo cáo tổng kết đề tài KC 04-17

Pham van Ty and Pham Thi Tran Chau. Inhibiting effect of protein proteinase inhibitor on bacteria isolated from burns pus. 4 th Asia-Pacific Biotechnology Congress and 30 th Annual Philippine Society for microbiology, Inc. (PSM) Convention. At the Waterfront Cebu City Hotel, Cebu City, Philippines from May 16-18, 2001. Abstract p. 42.	

4.P.2

NGHIÊN CỨU QUI TRÌNH NHÂN NHANH SINH KHỐI MÔ HOÀNG LIÊN GAI (*BERBERIS WALLICHIANA* DC) BẰNG CÔNG NGHỆ TẾ BÀO THỰC VẬT

Đinh Thị Thu Hiền, Nguyễn Thị Ngọc Dao,
Lê Quang Huấn, Lê Thị Muội, Lê Trần Bình
Viện Công nghệ Sinh học, Trung tâm KHTN&CNQG

ĐẶT VẤN ĐỀ

Berberin là một alkaloid thực vật có hoạt tính kháng khuẩn mạnh, ít độc, từ lâu đã được biết đến và được sử dụng trong y học cổ truyền của Trung Quốc, Ấn Độ cũng như ở Việt Nam để điều trị các bệnh như: tiêu chảy, lỵ, viêm dạ dày, đau mắt đỏ, đau mắt hột... rất hiệu quả [1]. Ngoài ra, berberin còn có tác dụng chữa các ung nhọt, mẩn ngứa ngoài da, kiện vị, chống loét đường tiêu hoá, có tác dụng hạ huyết áp, hạ nhiệt, ... [2-7, 9]. Berberin được dùng rộng rãi và phổ biến vì hiệu quả điều trị cao, lại ít độc, dễ sử dụng.

Berberin có hàm lượng khác nhau trong nhiều loài cây. Riêng ở Việt Nam có các loài Hoàng liên là những cây có chứa tỉ lệ berberin vào loại cao nhất trong số các loài có chứa berberin (3% - 7% trong củ, rễ). Cây Hoàng liên gai mọc hoang dại, phân bố chủ yếu ở các vùng núi cao phía bắc Việt Nam, trên dãy Hoàng Liên Sơn (Sapa - Lào Cai), ở độ cao từ 1200-2500m, sau 3-5 năm tuổi mới được thu hái [1]. Đã từ lâu chưa có sự quan tâm trồng trọt mà chủ yếu khai thác sử dụng nên hiện nay nguồn dược liệu này hầu như đã cạn kiệt. Hoàng liên đã được xếp trong danh mục Sách Đỏ Việt Nam (*Phần thực vật*) thuộc loại cây quý hiếm, cấm buôn bán và khai thác [8]. Hiện nay, nhu cầu sử dụng trong nước và xuất khẩu là rất lớn, xuất phát từ thực tiễn đó chúng tôi đã nghiên cứu quy trình nhân nhanh sinh khối mô Hoàng liên gai (*Berberis*) bằng công nghệ tế bào thực vật nhằm tạo nguồn dược liệu nhân tạo thay thế cho nguồn dược liệu tự nhiên đang ngày càng khan hiếm. Công nghệ tế bào thực vật có thể được áp dụng để nuôi thu sinh khối thay cho việc trồng trọt [10]. Đối tượng Hoàng liên gai cũng được các nhà nghiên cứu Nhật Bản quan tâm [11]. Sử dụng kỹ thuật nuôi cấy mô không chỉ rút ngắn thời gian sinh trưởng mà còn khắc phục được các yêu cầu khắt khe về điều kiện môi trường của vùng núi cao như nhiệt độ, độ ẩm... đối với cây Hoàng liên và đây cũng là một phương pháp tạo nguyên liệu sản xuất berberin có tiềm năng và hiệu quả kinh tế cao. Bài báo này giới thiệu những kết quả ban đầu trong việc tạo mô sẹo và nuôi cấy sinh khối Hoàng liên gai *Berberis wallichiana* DC.

NGUYÊN LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

Vật liệu thực vật

Quả Hoàng liên gai (*Berberis wallichiana* DC - thuộc họ Berberidaceae) được thu tại vùng núi Sapa thuộc dãy Hoàng Liên Sơn từ tháng 8 đến tháng 12 các năm 2001 và 2002. Quả xanh sau khi thu được khử trùng và đưa vào môi trường nuôi cấy. Quả già sau khi thu được làm khô, bảo quản ở nhiệt độ lạnh để dùng dần.

Khử trùng mẫu

Quả Hoàng Liên tươi được rửa sạch bằng nước xà phòng, tráng lại bằng nước cất. Sau đó được đưa vào thao tác trong box cấy vô trùng. Dùng dung dịch HgCl_2 1% lắc rửa hạt trong vòng 10 - 15 phút, sau đó tráng lại nhiều lần bằng nước cất vô trùng, ta thu được quả sạch. Bóc vỏ quả, tách hạt, lấy phôi đưa vào nuôi vô trùng.

Môi trường nuôi cấy

Bảng 1. Thành phần môi trường WPM và MS

Thành phần môi trường	Môi trường MS (mg/l)	Môi trường WPM (mg/l)
Đa lượng		
NH_4NO_3	1 650	400
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	440	96
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	370	370
K_2SO_4		990
KH_2PO_4	170	170
$\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$		556
KNO_3	1 900	
Vi lượng		
H_3BO_3	6,2	6,2
$\text{Na}_2\text{EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	37,2	37,2
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0,025	0,25
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	27,8	27,8
$\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	22,3	22,3
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	8,6	8,6
KI	0,83	
$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0,25	0,25
$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0,025	
Vitamin		
myo-Inositol	100	100
Pyridoxine-HCl	0,5	0,5
Glycine	2,0	2,0
Nicotinic Acid	0,5	0,5
Thiamine-HCl	0,1	1,0

Sử dụng môi trường MS (Murashige và Skoog, 1962) và môi trường WPM (Lloyd và McCrown, 1980) cơ bản (bảng 1) có bổ sung 3% đường sacaroza, 0,8% thạch, 10% nước dừa. Các chất điều hoà sinh trưởng sử dụng 2,4-D (2,4- Dichlorphenoxyacetic acid), BAP (6- Benzylaminopurin), NAA (Naphthylacetic acid), IAA (Indolyacetic acid), GA3 (Gibberellic acid). Môi trường có pH trong khoảng 5,6-5,8. Khử trùng ở 121°C, 125kPa, thời gian 15 phút.

Điều kiện nuôi cấy

Các mẫu thực vật trong quá trình nuôi cấy được giữ trong phòng nuôi ở các điều kiện nhiệt độ và ánh sáng tự động (nhiệt độ $25 \pm 3^\circ\text{C}$, chu kỳ quang 16 giờ/ ngày, cường độ chiếu sáng 1500 ± 100 lux).

KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU VÀ THẢO LUẬN

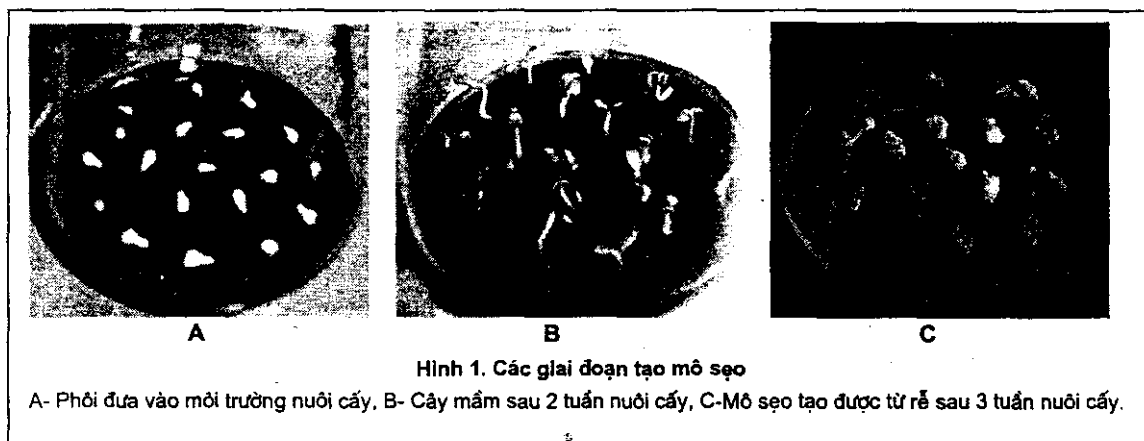
Khử trùng mẫu và đưa vào nuôi vô trùng

Quả Hoàng Liên tươi sau khi khử trùng theo phương pháp đã trình bày ở trên, chúng tôi thu được mẫu sạch với tỉ lệ khoảng 80% phôi đưa vào nuôi cấy.

Nuôi cấy phôi

Sử dụng môi trường MS hoặc WPM cơ bản (bảng 1) có bổ sung 10% đường Sacaroza, 10% nước dừa, 0,8% thạch và các chất điều hoà sinh trưởng 2,4-D 0,1mg/ml, BAP 0,5mg/l, NAA 0,25 mg/l.

Với công thức môi trường trên, sau 2 tuần nuôi cấy, cây mầm phát triển tốt (hình 1), cao 1 - 2cm, có 2 lá mầm, rễ dài 1 - 2 cm có thể dùng làm nguyên liệu để tạo mô sẹo.



Tạo mô sẹo

Cây mầm được phân tách để tạo các dòng mô sẹo riêng biệt từ thân, rễ, lá. Thân và rễ được cắt khúc dài 3 - 4 mm, lá cắt mảnh vuông 2x2mm, sau đó được đặt vào môi trường tạo mô sẹo. Môi trường tạo mô sẹo là môi trường MS hoặc WPM cơ bản + 3% đường Sacaroza + 10% nước dừa + 0,8% thạch có bổ xung chất kích thích tạo mô sẹo là 2,4D, hoặc IAA, hoặc GA3.

Sử dụng các môi trường cơ bản MS và WPM, chúng tôi nhận thấy rằng môi trường WPM cho kết quả tạo mô sẹo tốt hơn khi sử dụng môi trường MS do vậy chúng tôi chọn môi trường WPM trong nghiên cứu tạo mô sẹo. Với môi trường cơ bản WPM có bổ sung 3% đường, 10% nước dừa, 0,8% thạch, sử dụng chất kích thích sinh trưởng là IAA hoặc GA3 khả năng tạo mô sẹo kém hiệu quả, nhưng nếu bổ sung 2,4D với nồng độ từ 1 - 2mg/l khả năng tạo mô sẹo đạt hiệu quả cao hơn: kết quả tạo mô sẹo từ thân sau 4 tuần nuôi cấy là khoảng 70%, từ rễ khoảng 80%. Nồng độ 2,4-D dưới 1mg/l không tạo được mô sẹo, còn trên 2mg/l mô sẹo phồng, nhũn ướt và kém chất lượng (bảng 2). pH môi trường nuôi cấy tạo mô sẹo tốt nhất là trong khoảng 5,6 - 5,8.

Cùng thời gian và điều kiện nuôi cấy nhưng mô sẹo tạo được từ các phần mô khác nhau thì số lượng mô sẹo và chất lượng mô sẹo thu được cũng rất khác nhau: mô sẹo tạo từ lá có số lượng ít và chất lượng kém, mô sẹo tạo được từ rễ có chất lượng tốt nhất và có khả năng phát triển nhanh (hình 2), mô sẹo tạo trực tiếp từ phôi thì khả năng tạo mô sẹo nhanh, đồng đều nhưng chất lượng kém, nhũn, ướt, tương nước, thường chết sau những lần cấy chuyển tiếp theo.

Đánh giá kết quả tạo mô sẹo dựa vào: (i) **Số lượng**: số mô sẹo tạo được/toàn bộ số mảnh mẫu đặt vào môi trường tạo mô. (ii) **Chất lượng**: Mô tạo được phải có màu vàng tươi, tơi, xốp, không thâm, không tương ướt, không chai cứng và biểu lộ hoạt tính berberine trong dịch chiết.

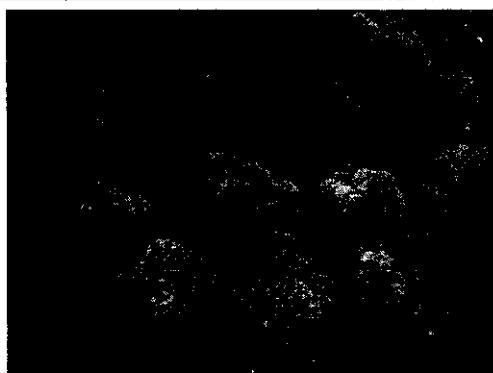
Mô tạo ra có chất lượng tốt được sử dụng làm nguyên liệu để tiếp tục nhân nhanh sinh khối.

Nhân nhanh mô sẹo

Với công thức môi trường tạo mô sẹo giảm dần lượng 2,4D ta có môi trường nhân mô sẹo. WPM + 3% đường Sacarosa + 10% nước dừa + 0,8% thạch có bổ xung 2,4D từ 0,8 – 0,3mg/l. Có thể bổ xung thêm BAP với hàm lượng 0,2 – 0,4mg/l cùng với 2,4D; Khối lượng mô tăng gấp 8 – 10 lần sau 4 – 6 tuần nuôi. Mỗi bình Δ 250ml nuôi cấy (50ml môi trường) thu được khoảng 20g mô tươi (hình 2).

Bảng 2. Ảnh hưởng của các chất điều hoà sinh trưởng lên khả năng tạo mô sẹo của *Berberis wallichiana* DC

Chất điều hoà sinh trưởng	Nồng độ (mg/l)														
	0,005	0,01	0,1	0,2	0,4	0,6	0,8	1,0	1,2	1,4	1,5	1,6	1,8	2,0	
GA3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
IAA	-	-	-	-	-	-	-	-	±	±	±	±	-	-	
2,4-D	-	-	-	-	-	-	+	++	++	++	++	++	++	++	
Chú thích:															
-	Mô sẹo không hình thành								+	Mô sẹo hình thành ít					
±	Mô sẹo nhỏ, nhũn ợt, thâm chết sau thời gian ngắn								++	Mô sẹo có chất lượng tốt					



A



B

Hình 2. Kết quả nhân mô sẹo *Berberis wallichiana* DC:
 A- Mô sẹo nhân sau 4 tuần tuổi, B- Mô sẹo đã được nhân đại trà

Từ những kết quả nhận được nêu trên chúng tôi đề xuất quy trình tạo và nhân mô sẹo cây Hoàng liên *Berberis wallichiana* DC có thể tóm tắt như sau:

KẾT LUẬN

Xác định được điều kiện môi trường thích hợp để nuôi phôi tạo cây mầm *Berberis wallichiana* DC, đảm bảo cho việc tạo mô sẹo. Trong môi trường WPM có bổ sung 3% đường Sacarosa, 10% nước dừa, 0,8% thạch, 1 – 2 mg/l 2,4-D mô sẹo tạo được từ thân sau 4 tuần nuôi cấy là khoảng 70% và từ rễ khoảng 80%.

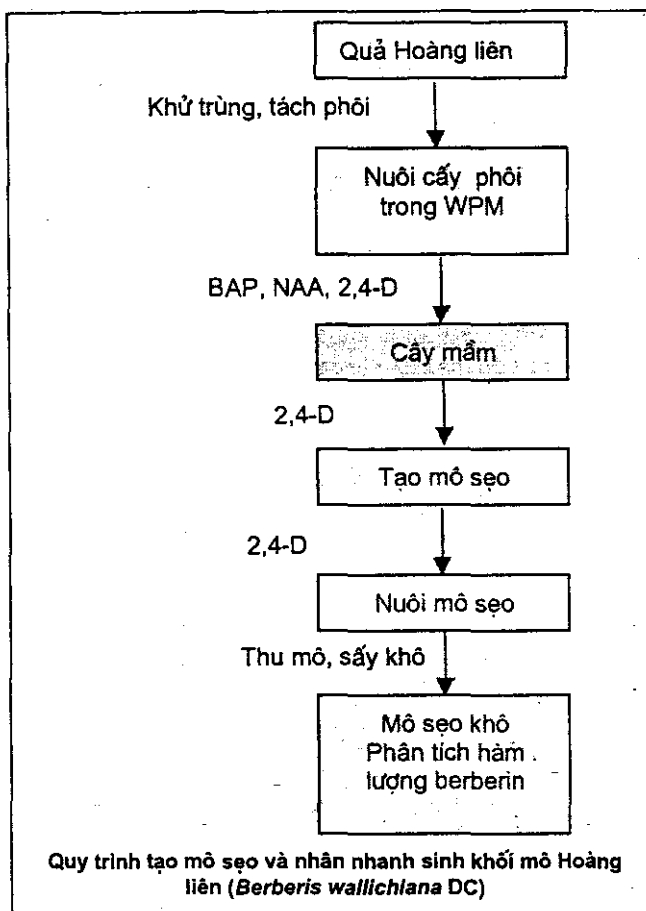
Trong các dòng mô tạo được từ thân, rễ, lá ban đầu: mô sẹo tạo được từ lá phát triển chậm và chất lượng kém, mô sẹo tạo được từ rễ có chất lượng tốt nhất và có khả năng phát triển nhanh. Mô sẹo tạo trực tiếp từ phôi thì khả năng tạo mô sẹo nhanh, đồng đều nhưng chất lượng kém, nhũn, ớt, trương nước, thường chết sau những lần cấy chuyển tiếp theo.

Xây dựng được quy trình nhân nhanh sinh khối mô Hoàng Liên dùng làm nguyên liệu để tách chiết thu nhận chất berberin ở quy mô phòng thí nghiệm. Trong môi trường WPM có bổ sung 3% đường Sacarosa, 10% nước dừa, 0,8% thạch, 2,4-D với nồng độ giảm dần từ 0,8mg/l tới 0,3mg/l mô sẹo đạt hệ số nhân gấp 8–10 lần sau 4–6 tuần nuôi. Mỗi bình Δ 250ml nuôi cấy (50ml môi trường) thu được khoảng 20g mô tươi.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Đỗ Tất Lợi, 2001, Cây thuốc và vị thuốc Việt Nam, Nhà xuất bản Y học.

2. Amin AH, Subbaiah TV, Abbasi KM. Berberine sulfate: antimicrobial activity, bioassay, and mode of action. *Can J Microbiol* 1969; 15:1067-1076.
3. Sack RB, Froehlich JL. Berberine inhibits intestinal secretory response of *Vibrio cholerae* and *Escherichia coli* enterotoxins. *Infect Immun* 1982;35:471-475.
4. Mahajan VM, Sharma A, Rattan A. Antimycotic activity of berberine sulphate: An alkaloid from an Indian medicinal herb. *Sabouraudia* 1982;20:79-81.
5. Nakamoto K, Sadamori S, Hamada T. Effects of crude drugs and berberine hydrochloride on the activities of fungi. *J Prosthet Dent* 1990;64:691-694.
6. Vennerstrom JL, Lovelace JK, Waits VB, et al. Berberine derivatives as antileishmanial drugs. *Antimicrob Agents Chemother* 1990;34:918-921.
7. Gudima SO, Memelova LV, Borodulin VB, et al. Kinetic analysis of interaction of human immunodeficiency virus reverse transcriptase with alkaloids. *Mol Biol (Mosk)* 1994;28:1308-1314.
8. Bộ KHCN và MT, 1996, Sách Đỏ Việt Nam (*Phần thực vật*)
9. Lloyd G. and McCown B, 1980, Combined Proceedings of the International Plant Propagators Society. 30, 421-427.
10. Lê Trần Bình, Lê Thị Muội 1998, phân lập gen và chọn dòng chống chịu ngoại cảnh bất lợi ở cây lúa. Nhà xuất bản Đại học Quốc Gia Hà Nội.
11. Ikeda, T., (1991), In "Plant Cell Culture in Japan". Eds. Komamine, A., Misawa, M., DiCosmo, F., p.45-57. CMC Co., Tokyo, Japan.



SUMMARY

STUDY OF RAPID BERBERIS CALLUS CULTURE BY USING PLANT CELL TECHNOLOGY

Dinh Thị Thu Hiền, Nguyễn Thị Ngọc Dao
 Lê Quang Huan, Lê Trần Bình, Lê Thị Muội
Institute of Biotechnology, NCST

In WPM medium with 3% sucrose, 10% coconut juice, 0.8% agar, 1-2 mg/l 2,4D callus generated from the trunk and root after 4 weeks of culturing was about 70% and 80% respectively. Different callus which originated from different primary tissue differed in their quality and quantity: Callus generated from leaves have very low quantity and quantity while callus generated from root had the best quality and the ability to grow quickly. Callus generated directly from embryo had rapid and synchronized ability of developing, but they do not have good quality. The callus appears to be soft, wet and swelling, and they often die after in the subsequent culture. When the concentration of 2,4D was reduced to 0.3mg/l the callus was remained and developed very well. The callus mass increased 8-10 times after 4-8 weeks of culturing. 20 g fresh callus was obtained in each 250ml triangular container with 50 ml medium. The protocol of rapid berberis callus culture has been built in a laboratory condition.

4.0.7

THU NHẬN VÀ KHẢO SÁT MỘT SỐ ĐẶC ĐIỂM SINH DƯỢC HỌC CỦA FLAVONOIT TỪ CÂY CÚC GAI *SILYBUM* *MARIANUM* DI THỰC VÀO VIỆT NAM

Lê Thị Lan Oanh, Lê Thị Việt Hồng, Hoa Thị Hằng, Nguyễn Thị Ngọc Dao
Viện Công nghệ Sinh học, Trung tâm KHTN&CNQG
Nguyễn Quốc Khang, Nguyễn Thị Hồng Gấm
Trường Đại học Khoa học tự nhiên, ĐHQGHN
Phan Quốc Kinh
Liên hiệp KHSX công nghệ mới

ĐẶT VẤN ĐỀ

Cây cúc gai *Silybum marianum* thuộc họ Cúc Asteraceae là cây thảo 1-2 năm, thường ra hoa vào năm thứ 2; nguyên liệu dùng sản xuất thuốc là hạt quả hoặc toàn cây. Cây phát triển chủ yếu ở châu Âu, châu Phi, Nam Mỹ, Trung và Đông á (1).

Cây cúc gai đã được du nhập vào trồng ở Việt Nam đã lâu, hiện nay đang phát triển tốt tại các vùng cao có đất tốt và khí hậu mát mẻ: Tam Đảo, Sapa, lượng nguyên liệu khá lớn.

Cây cúc gai là một trong một số loại cây thuốc đặc biệt quan trọng được dùng làm nguồn nguyên liệu sản xuất các loại thuốc phòng chữa các loại bệnh gan thận giữ vai trò hàng đầu ở hầu hết các nước tiến tiến trên thế giới. Các chế phẩm Silyman, Silibo, Sibectan, Carsil... đang là những loại dược phẩm thương mại có giá trị.

Tác dụng dược lý của cúc gai là do tính chất bảo vệ gan của nhóm chất mới có hoạt tính sinh học là Silymarin, một hỗn hợp gồm các flavonolignans (Silibinin, Isosilibinin, Silichristin và Silidianin). Chế phẩm này có tác dụng chữa rất nhiều các loại bệnh gan và thận khác nhau: viêm gan cấp và mạn tính, viêm gan virus, xơ gan, ung thư gan, chống các loại nhiễm độc gan thận, bảo vệ tế bào gan thận, nâng cao khả năng miễn dịch của cơ thể, phục hồi tế bào gan thận...

Cơ chế và hiệu quả tác dụng của các chế phẩm đã và đang được nghiên cứu trên mức độ phân tử ở người và động vật: cơ chế anti oxydation, chống oxy hoá lipid, nâng cao khả năng khử độc, chống lại sự giảm glutathion, kìm hãm sự tạo chất độc (leukotrienes) trong gan thông qua việc kìm hãm enzym lipoxigenase, nâng cao quá trình sinh tổng hợp protein, giảm hoạt tính của promoter gây ung thư, kìm hãm P450, tác động miễn dịch, giảm cholesterol...

Đây là một cây thuốc rất có giá trị để điều trị các bệnh hiểm nghèo về gan thận là loại bệnh hiện đang phổ biến ở nước ta. Do đó việc khai thác phát triển sử dụng cây cúc gai đã được di thực trồng ở Việt Nam để sản xuất các chế phẩm thuốc chữa bệnh gan thận trong nước tạo nguồn dược phẩm quý, mới, phong phú và rẻ tiền phục vụ, bảo vệ sức khỏe cộng đồng là một vấn đề đang được quan tâm và rất cấp thiết.

Trong bài báo này chúng tôi đề cập tới một số nghiên cứu bước đầu về cây cúc gai trồng ở Việt Nam, các flavonoit và hoạt tính sinh dược học của chúng.

NGUYÊN LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

Nguyên liệu nghiên cứu

Hạt cúc gai được dùng trong thí nghiệm có nguồn gốc từ hạt thu được từ cây cúc gai trồng ở CHLB Đức và cây trồng ở Sapa, Hà Nội. Lá, thân và quả cúc gai thu được từ cây cúc gai trồng thử nghiệm tại Hà Nội vào tháng 4-5 khi quả bắt đầu chín và lá đã ngả hơi vàng. Các bộ phận được thái lát, sấy ở nhiệt độ 60-70°C đến khô, tán bột.

Huyết thanh các nhóm máu A, B, O và AB, do khoa Huyết học, Bệnh viện Bạch mai cung cấp.

Các chủng vi sinh vật, nấm: là các giống chuẩn Quốc tế, được lưu giữ tại Phòng Vi sinh, Viện Công nghệ Sinh học.

Các hoá chất khác được dùng dưới dạng sạch phân tích của các hãng Sigma, Merck,...

Phương pháp nghiên cứu

Chiết rút flavonoid bằng ethanol theo phương pháp chưng cất trên máy Soxhlet và thu nhận và định lượng hoạt chất theo phương pháp Talli.

Định tính các nhóm chất hữu cơ trong các bộ phận cây bằng thuốc thử hoá học đặc hiệu.

Các phương pháp xác định hoạt tính enzym theo các điều mô tả trong thực tập Sinh hoá (2)

Sắc ký lỏng cao áp (HPLC) và sắc ký lớp mỏng trên giấy Silicagel 60 F245 của Đức.

KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Việc nghiên cứu phát triển cây cúc gai đã được di thực vào Việt Nam và tạo các sản phẩm thuốc mới trên cơ sở nguyên liệu cúc gai trồng ở điều kiện trong nước là một vấn đề đang được quan tâm và cấp thiết.

Để thực hiện các vấn đề được đặt ra, cần nghiên cứu thành phần flavonoid Silymarin của hạt cúc gai trồng tại Việt Nam, qui trình công nghệ chiết rút các chất có hoạt tính và tác dụng sinh dược học của chúng.

Định tính và định lượng hoạt chất Flavonoid của cây cúc gai

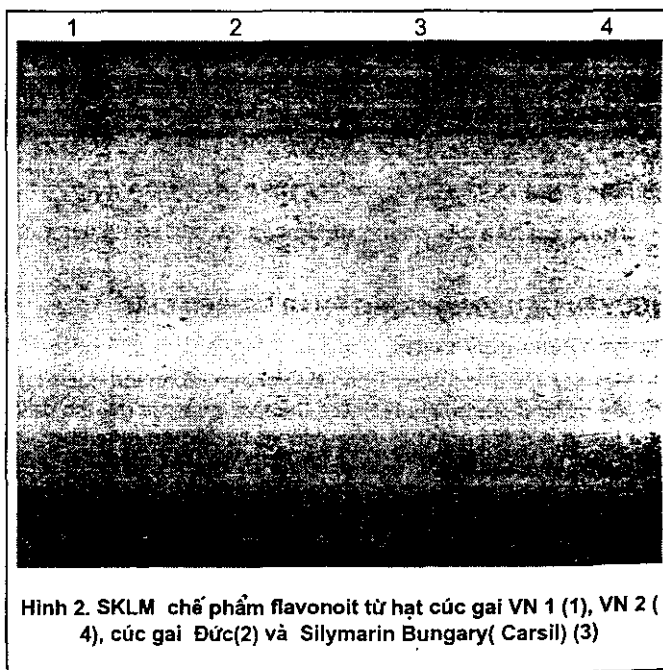
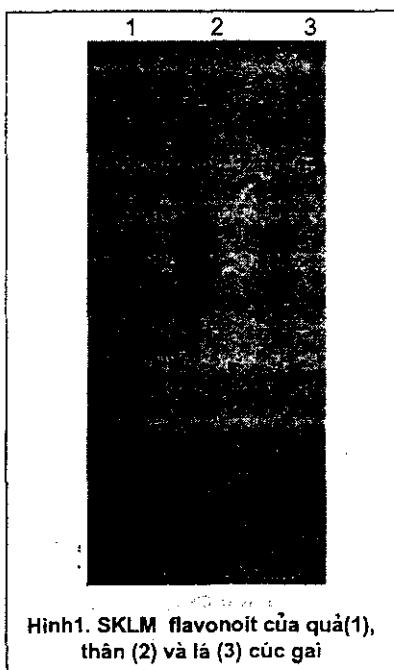
Flavonoid được thu nhận theo phương pháp Talli và định lượng theo phương pháp cân trọng lượng khô. Kết quả thu nhận phân đoạn flavolignan từ các bộ phận của cây cúc gai (lá, thân và hạt) cho thấy các bộ phận đều chứa nhóm hoạt chất flavonoid nhưng với hàm lượng và thành phần khác nhau: lá chứa 0,35%, quả chứa 0,78% và thân chứa 0,21% trọng lượng khô. Hàm lượng flavonoid trong hạt biến động theo quá trình chín của hạt: Hạt còn xanh- 1,73%, hạt chín tới-2,46% và hạt già dùng làm giống-2,21% trọng lượng khô. Hạt cúc gai Đức chứa 2,95% và hạt cúc gai Việt nam chứa 2,46% flavonoid.

Trong hạt cúc gai dầu chiếm lượng rất cao (21,55-22,44%), cần chú ý nghiên cứu để khai thác nguồn dầu thực vật phong phú này.

Định tính thành phần Flavonoid của các mẫu thu được bằng phương pháp SKLM trên Silicagel với hệ dung môi: Toluen: Etyl axetat: Axeton: acid Formic (5:2:2:1).

Kết quả SKLM cho thấy trong quá trình sinh trưởng, thành phần flavonoid của các bộ phận lá, thân, quả và hạt của cúc gai có biến đổi, tuy nhiên các băng hoạt chất có Rf khoảng 0,46; 0,55 và 0,58 vẫn tồn tại trong các bộ phận cây cúc gai và tích lũy nhiều nhất ở trong hạt (hình1).

So sánh phổ SKLM của flavonoid tách chiết từ hạt cúc gai VN, hạt cúc gai Đức và thuốc Carsil (Silymarin) của Bungary cho thấy các chế phẩm có phổ SKLM như nhau, chúng tổ phân đoạn flavonoid mà chúng tôi nhận được chủ yếu là flavolignan Silymarin và loại hạt cúc gai chín tới dùng để thu nhận Silymarin cho hàm lượng cao (2,46%) và thành phần không đổi.



Xây dựng qui trình thu nhận Silymarin qui mô phòng thí nghiệm

Với các kết quả thu được chúng tôi đã dùng hạt cúc gai chín tới làm nguyên liệu thu nhận Silymarin. Đã chọn được hệ dung môi thích hợp và ít độc để tách chiết thu nhận Silymarin. Hiệu suất thu Silymarin của quy trình là 87% so với phân tích định lượng trên máy Soxhlet.

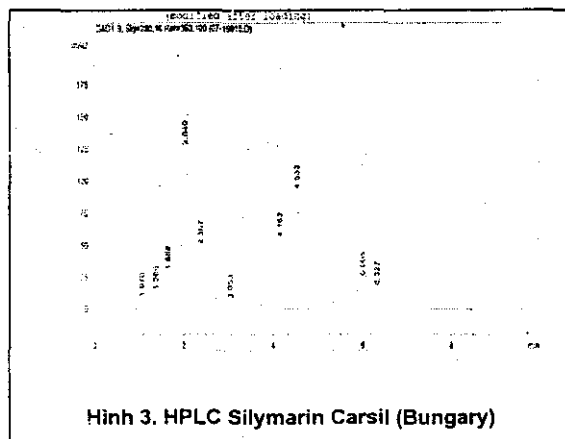
Đã thu được chế phẩm Silymarin tinh khiết. Kết quả phân tích trên SKLM cho 4 vết đậm có R_f (0,40; 0,46; 0,55 và 0,58) gần giống với giá trị R_f với 4 thành phần Carsil của Bungary làm chất chuẩn (hình 2).

Chế phẩm Carsil và hai chế phẩm VN1 và VN2 bằng 2 hệ dung môi khác nhau được phân tích thành phần trên máy HPLC.

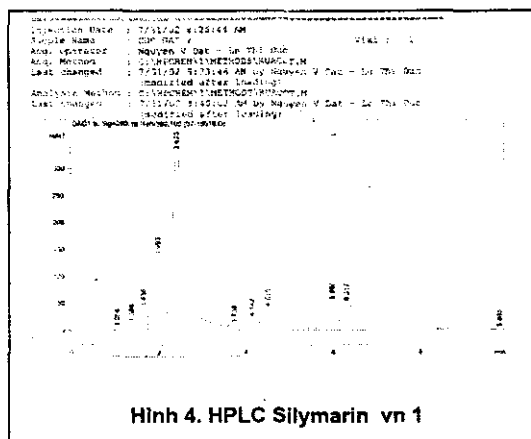
Mẫu Silymarin của Bungary có 6 đỉnh đặc trưng và chiếm tới 88,7% tổng số chế phẩm đưa vào phân tích, mẫu Silymarin thu được (từ hạt Cúc gai VN1 và VN 2) của chúng tôi cũng có 6 đỉnh tương tự và chiếm tới 93,3 - 81,2% tổng số mẫu đưa vào phân tích. Như vậy các thành phần chính của Silymarin thu được từ các mẫu của chúng tôi đều giống thành phần Silymarin dùng làm thuốc của Bungary.

Tuy nhiên tỷ lệ các đỉnh trong 3 mẫu có khác nhau. Thành phần đỉnh 4 của Silymarin Bungary có hàm lượng cao nhất chiếm tới 29,9%, trong khi đó đỉnh này ở chế phẩm Silymarin VN 1 thu được chiếm có 7,8%, nhưng đỉnh 2 chiếm tới 44,9%, còn đỉnh 2 của Silymarin Bungary chỉ chiếm 11,6% và của chế phẩm Silymarin VN2 là 17,4 và 38,0%.

Bảng 4. Kết quả phân tích trên máy HPLC						
Mẫu	pik 1	pik2	pik3	pik4	pik5	pik6
Carsil	21,8 %	11,6 %	11,4%	29,9%	6,6%	7,4%
Silymarin VN 1	17,3	44,9	12,9	7,8	7,7	2,7
Silymarin VN 2	17,4	38,0	7,2	7,2	4,7	5,8



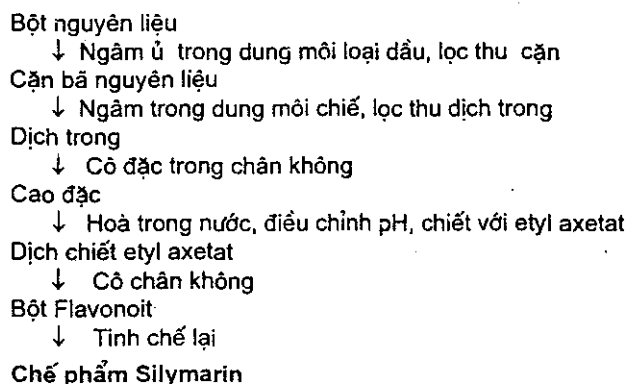
Hình 3. HPLC Silymarin Carsil (Bungary)



Hình 4. HPLC Silymarin vn 1

Các thành phần chính của Silymarin thu được đều giống thành phần Silymarin dùng làm thuốc của Bungary. Chế phẩm Silymarin cúc gai VN1 và VN 2 có thành phần tương đương nhau, như vậy có thể dùng cả 2 loại dung môi được thí nghiệm để thu nhận Silymarin.

Qui trình thu nhận silymarin có thể trình bày tổng quát trong sơ đồ sau



Thử nghiệm hoạt tính sinh dược học

Tác dụng chống oxy hoá qua nghiên cứu ảnh hưởng của chế phẩm Silymarin lên hoạt tính các enzyme oxy hoá như peroxydaza và catalaza của máu người.

Ảnh hưởng chế phẩm Silymarin VN lên hoạt tính enzyme peroxydaza máu người.

Chế phẩm silymarin ức chế rõ rệt hoạt tính peroxydaza máu của cả 4 nhóm máu, với nồng độ 20mg% hoạt tính chỉ còn 3,5 % (nhóm O) đến 13,01% (nhóm B) (bảng 5).

Ảnh hưởng của các chế phẩm lên hoạt tính enzym Catalaza máu người

Catalaza là một enzym xúc tác phản ứng oxy hoá khử theo cơ chế tương tự peroxydaza.

Bảng 5. Ảnh hưởng của chế phẩm Silymarin VN lên hoạt động của Peroxydaza máu người								
Nồng độ chế phẩm (mg%)	Hoạt tính enzym							
	Nhóm máu O		Nhóm máu A		Nhóm máu B		Nhóm máu AB	
	T/gian (giây)	%	T/gian (giây)	%	T/gian (giây)	%	T/gian (giây)	%
0-ĐC	42	100,	120	100,	41	100,	110	100,
5,0	65	64,62	180	66,67	55	74,54	145	75,86
10,0	131	32,06	390	30,76	103	39,81	260	42,30
15,0	360	11,67	725	16,55	210	19,52	520	21,15
20,0	>1200	3,5	>2000	6,00	>315	13,01	>1200	9,17

Bảng 6. ảnh hưởng của Silymarin VN lên hoạt động của enzym Catalaza của máu người								
Nồng độ Silymarin(mg%)	Hoạt độ enzym (ml 0,1 KMnO ₄ và %)							
	Nhóm máu O		Nhóm máu A		Nhóm máu B		Nhóm máu AB	
	ml	%	ml	%	ml	%	ml	%
0,0	8,1	100,0	11,0	100,0	0,3	100,0	0,3	100,0
2,5	11,0	73,63	12,0	91,66	0,95	31,58	1,0	30,00
5,0	12,8	63,26	14,5	75,86	1,45	20,69	1,5	20,00
7,5	14,2	57,04	16,8	65,48	1,8	16,66	2,1	14,28
10,0	15,2	53,28	22,5	48,89	2,3	13,04	3,2	9,37
15,0	18,9	42,85	38,7	28,42	3,2	9,37	4,1	7,31

Catalaza có khả năng điều hoà nồng độ H₂O₂ tạo thành phức catalaza- H₂O₂ có khả năng phản ứng với chất oxy hoá tạo thành gốc tự do bền.

Silymarin ức chế hoạt tính catalaza của 2 nhóm máu A và O yếu hơn, với nồng độ 15mg% hoạt tính enzym còn 28,24 % với nhóm máu A, 42,85% với nhóm máu O; ức chế mạnh hơn đối với 2 nhóm B và AB: 9,37% với nhóm máu B và 7,31% với nhóm máu AB so với đối chứng (100%). Như vậy chế phẩm Silymarin cúc gai có tác dụng chống oxy hoá rất cao.

Để tạo các chế phẩm hỗn hợp làm thuốc chúng tôi thử nghiệm tác dụng chế phẩm Silymarin lên hoạt tính của các enzym proteaza và amylaza của máu và amylaza nước bọt. Silymarin hầu như không ảnh hưởng đến hoạt tính của các enzym này. Như vậy khi phối chế làm thuốc Silymarin sẽ không gây ảnh hưởng đến tiêu hoá của người. Tuy nhiên Silymarin ảnh hưởng đến hoạt tính proteinaza của papain đủ. Silymarin cúc gai hoạt hoá hoạt động thủy phân casein của papain rất mạnh với nồng độ 10-40mg%, Flavonoit cúc gai làm tăng hoạt tính từ 52,46 – 177,05%. Kết quả này mở ra triển vọng phối hợp hợp lý các chế phẩm Flavonoit chữa bệnh với các enzym tiêu hoá trong các chế phẩm thuốc thực phẩm mà hiện nay đang được quan tâm.

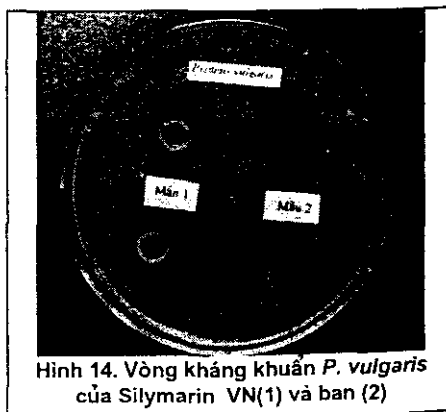
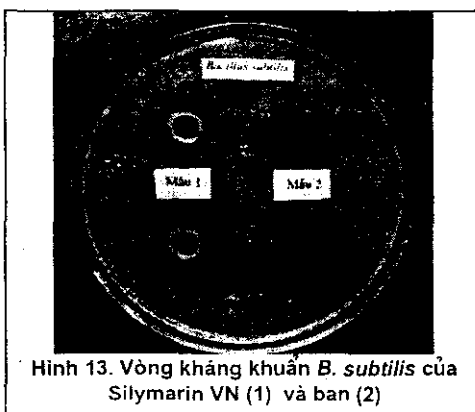
Hoạt tính kháng khuẩn

Flavonoit Silymarin của cúc gai có tác dụng kháng khuẩn rõ rệt, nhưng không có tác dụng kháng nấm mốc *A. niger*.

Như vậy chế phẩm flavolignan

Bảng 8. Hoạt tính kháng khuẩn và nấm của Silymarin VN

Các vi sinh vật kiểm định	Vòng kháng khuẩn (mm)
	Silymarin
<i>Escherichiae coli</i>	16
<i>Proteus vulgaris</i>	16
<i>Bacillus subtilis</i>	19
<i>Saccina lutea</i>	17
<i>Saccharomycescerevisiae</i>	11
<i>Aspergillus niger</i>	0



Silymarin từ hạt cúc gai trồng ở Việt Nam có thành phần giống như Silymarin của hạt cúc gai trồng ở CHLB Đức và thuốc Carsil của Bungary. Chế phẩm Silymarin thu được có hoạt tính chống oxy hoá và kháng khuẩn cao.

KẾT LUẬN.

1. Hàm lượng flavonoit ở các bộ phận lá thân quả hạt cây cúc gai khác nhau, cao nhất là ở hạt chín tới (2,46%) là nguồn nguyên liệu để thu nhận hoạt chất flavonoit.
2. Kết quả SKLM và HPLC của các mẫu flavonoit cúc gai trồng ở Việt Nam, CHLB Đức và thuốc điều trị các bệnh về gan Carsil (Silymarin) của Bungary có 6 thành phần tương đồng nhau - đều là thành phần chính của flavolignan- Silymarin.
3. Chế phẩm Silymarin thu được kim hãm mạnh hoạt động của các enzym oxy hoá là catalaza và peroxydaza trong huyết thanh 4 nhóm máu người.
4. Chế phẩm Silymarin có tính kháng khuẩn cao, nhưng không có tính kháng nấm *Aspergillus niger*.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Võ Văn Chi, 2000. *Từ điển cây thuốc Việt Nam*. NXB Y học, tr.339.
2. Phạm Thị Trân Châu, Nguyễn Quốc Khang, Đào Kim Nhung, 1977. *Thực tập Sinh hoá*, Đại học Tổng hợp Hà nội.
3. *Carsil, a product with confirmed effectiveness in toxic, metabolic and degenerative diseases of the hepatic parenchyma*, 2000. Sopharma, Bungaria.
4. Flora K, Hahn M, Rosen H, Benner K, 1999. *Milk thistle (S. marianum) for the therapy of liver disease*. Am J Gastroenterol. 94(2): 545-546.
5. Amirghofran Z, Azadbakht M, Karimi MH, 2000. *Evaluation of the immunomodulatory effects of five herbal plants*. J. Ethnopharmacol. 72(1-2):167-172.
6. Luper S, 1998. *A review of plants used in the treatment of liver disease*. Altern Med Rev. 3(6):410-421.
7. Syed AH et al, 2002. *Contemporary role and future prospects of medicinal plants*. TelMedPak.

SUMMARY

EXTRACTION AND SOME BIOCHEMICAL CHARACTERISTICS OF FLAVONOIT FROM *SILYBUM MARIANUM* GROWN IN VIETNAM

Le Thi Lan Oanh, Le Thi Viet Hong, Hoa Thi Hang, Nguyen Thi Ngoc Dao
Institute of Biotechnology, NCST
 Nguyen Quoc Khang, Nguyen Thi Hong Gam
Hanoi University of Science
 Phan Quoc Kinh
Naw TECSPRO

The extraction procedure and some biological pharmaceutical characteristics of flavolignans Silymarin from *Silybum marianum* grown in Vietnam were investigated. The results of specific quantitative reactions and quality determination indicated the ripe fruits has the highest content of the flavonoit (2,46%).

The TLC and HPLC investigations showed that the obtained flavonoid Silymarin preparation contained 6 components expressed by 6 spots on TLC and 4 peaks on HPLC diagrams as Hungarian hepatoprotective drug Carsil.

The flavonoid preparation had high ability to inhibit the catalase and peroxydase activities of 4 human blood groups (O, A, B and AB). The flavonoid Silymarin solution revealed high antibacterial action to *E. coli*, *P. vulgaris*, *B. subtilis* and *S. cerevisiae*, but did not to fungus *A. niger*.

SUMMARY

Sex determination in pig by dna amplification

In vitro fertilization programs in animal husbandry, especially for cattle, are in the first phase of development in Viet Nam. These programs required the establishment of many methods including sex determination of embryos for further implantation. We set up a PCR-based protocol for sex determination in domestic pigs as models for further applications.

Genomic DNA was extracted from hepatocytes, leucocytes, oocytes and spermatozoa by the Boom method. Leucocytes gave the best quality DNA. P1/P3Y primer pair (Pailhoux & cs, 1997) was used in the amplification reaction to distinguish male from female. DNA from male samples gave a band of 166 bp, absent from female samples. The primer pair P1-5EZ/P2-3EZ (Aasen & cs, 1990) gave a band of 445 bp (for female) and 447 bp (for male), indistinguished by agarose gel electrophoresis. These primers were used as a control of the PCR reaction efficiency.

Using these two primer pairs, multiplex PCR performed in five males gave two amplicons and in female samples gave one amplicon with expected sizes. These results showed that the protocol is suitable for sex determination in pigs and could be developed for further applications in animal breeding.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank E. Pailhoux for his helpful advice.

TÓM TẮT

Chúng tôi tiến hành tách chiết DNA từ gan, bạch cầu, trứng và tinh trùng heo bằng phương pháp Boom và nhân bản bằng PCR. Kết quả tốt nhất được ghi nhận với DNA tách từ bạch cầu. Chúng tôi sử dụng hai cặp mồi cho phản ứng PCR. Cặp P1/P3Y cho phép phân biệt cá thể đực và cái, chỉ ở cá thể đực mới xuất hiện một vạch sản phẩm PCR có kích thước 166 bp. Cặp mồi P1-5EZ/P2-3EZ được dùng để kiểm tra hiệu quả nhân bản. Kết quả áp dụng quy trình trên 05 cá thể đực và 05 cá thể cái cho thấy quy trình có thể sử dụng cho việc xác định giới tính ở heo cũng như có thể được triển khai ứng dụng cho công tác nhân giống vật nuôi.

Người thẩm định nội dung khoa học: Lê Đình Lương

NGHIÊN CỨU QUI TRÌNH CÔNG NGHỆ THU NHẬN SILYMARIN VÀ TẠO SINH KHỐI TẾ BÀO TỪ CÚC GAI (SILYBUM MARIANUM) TRỒNG Ở VIỆT NAM.

Nguyễn Thị Hồng Gấm, Nguyễn Quốc Khang
Khoa Sinh học – Trường Đại học Khoa học Tự nhiên – Hà nội
Lê Thị Lan Oanh, Nguyễn Thị Tố Nga, Nguyễn Thị Ngọc Dao
Viện Công nghệ Sinh học, Hà nội

I. ĐẶT VẤN ĐỀ.

Cây Cúc gai (*Silybum marianum*) thuộc họ Cúc *Asteraceae*, là cây thảo 1-2 năm, ra hoa vào năm thứ 2, nguyên liệu dùng sản xuất thuốc là hạt quả hoặc toàn cây. Cây phát triển chủ yếu ở châu Âu, châu Phi, Nam Mỹ, Trung và Đông Á.

Đây là một cây thuốc có giá trị cao, để điều trị các bệnh hiểm nghèo về gan thận, hiện đang phổ biến ở nước ta. Do đó việc khai thác phát triển sử dụng cây Cúc gai đã được di thực trồng ở Việt Nam để sản xuất các chế phẩm thuốc chữa bệnh gan thận trong nước tạo nguồn dược phẩm quý, mới, phong phú và rẻ tiền phục vụ bảo vệ sức khoẻ cộng đồng là một vấn đề đang được quan tâm và rất cấp thiết.

Cây cúc gai đã được du nhập vào trồng ở Việt Nam từ lâu, hiện nay đang phát triển tốt tại các vùng cao có đất tốt và khí hậu mát mẻ như: Tam Đảo, Sapa,...; lượng dược liệu này nhu cầu ngày càng gia tăng. Do đó chúng tôi thực hiện đề tài



Hình 1. Cây Cúc gai đang phát triển

2.2. Phương pháp nghiên cứu:

- Nghiên cứu tỷ lệ nảy mầm hạt. Hạt Cúc gai được gieo trên giấy lọc bão hoà nước trong hộp Petri. Mỗi công thức nhắc lại 3 lần, mỗi lần gieo 100 hạt để trong tối hoàn toàn và ở các nhiệt độ 15, 25 và 35°C. Tỷ lệ nảy mầm được theo dõi qua các thời điểm 3, 5 và 7 ngày.

- Định tính các nhóm chất hữu cơ trong các bộ phận cây bằng các phương pháp hoá lý thông thường và thuốc thử hoá học đặc hiệu.

- Chiết rút phân đoạn flavonoid theo phương pháp Talli.

- Nghiên cứu thành phần hoá học bằng phương pháp sắc ký lớp mỏng (SKLM), sắc ký lỏng cao áp (HPLC)....

Nuôi cấy mô rễ, thân và lá để tạo sinh khối.

III. KẾT QUẢ VÀ BÀN LUẬN

nêu trên, nhằm góp phần phát triển, mở rộng và làm phong phú nguồn dược liệu của đất nước.

II. ĐỐI TƯỢNG VÀ

PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU:

2.1. Đối tượng:

- Hạt Cúc gai được dùng trong thí nghiệm có nguồn gốc từ cây Cúc gai trồng ở Cộng hoà liên bang Đức (CHLB Đ) và cây trồng ở Sapa Việt Nam. Hạt được sấy khô.

- Lá, thân và quả Cúc gai thu được từ cây Cúc gai trồng thử nghiệm tại Hà Nội vào tháng 4-5 khi quả bắt đầu chín và lá đã ngả hơi vàng. Các bộ phận được thái lát, sấy ở nhiệt độ dưới 60°C đến khô và nghiền nhỏ thành bột mịn.

- Các hoá chất khác dùng dưới dạng sạch phân tích (pa.) của các hãng Sigma và Merk.



Hình 2. Cây Cúc gai đang ra hoa

3.1. Nghiên cứu công nghệ nhân giống nguyên liệu ở các vùng sinh thái khác nhau và công nghệ tạo sinh khối tế bào Cúc gai:

Để thực hiện các vấn đề đặt ra, cần nghiên cứu Cúc gai một cách hệ thống từ việc tạo giống và nguyên liệu bằng qui trình nhân giống trồng đại trà ở các vùng sinh thái thích hợp và nuôi cấy tạo sinh khối đến nghiên cứu thành phần hoá học Cúc gai trồng tại Việt Nam, qui trình công nghệ chiết rút các chất có hoạt tính và sản xuất các chế phẩm thuốc để thử nghiệm. Qua nhiều thăm dò, thử nghiệm, chúng tôi đã thành công qui trình công nghệ, tóm tắt như sau:

3.1.1. Sự nảy mầm hạt Cúc gai.

Bước đầu chúng tôi tiến hành khảo sát sự nảy mầm của hạt Cúc gai từ cây trồng ở Việt nam (VN) và ở Cộng hoà liên bang Đức (Đức).

Hạt cúc gai được sấy khô đạt độ ẩm 9-10% và tiến hành thí nghiệm. Hạt được gieo trên giấy lọc thấm nước cất trong hộp petri, mỗi công thức nhắc lại 3 lần, mỗi lần gieo 100 hạt, để trong tối

và ở các nhiệt độ 15, 25 và 35°C. Số hạt nảy mầm được theo dõi sau 3, 5 và 7 ngày. Kết quả trình bày trong bảng 1.

Bảng 1. Ảnh hưởng của nhiệt độ đến thời gian nảy mầm của hạt Cúc gai

Nhiệt độ- °C	Tỷ lệ nảy mầm (%) của hạt Cúc gai					
	Sau 3 ngày		Sau 5 ngày		Sau 7 ngày	
	Cúc Đức	Cúc VN	Cúc Đức	Cúc VN	Cúc Đức	Cúc VN
15	12,25	10,53	45,84	30,71	56,64	47,83
25	40,14	26,53	61,25	37,44	78,93	63,34
35	38,65	25,72	58,83	35,83	71,84	58,03

Nhiệt độ tối ưu khoảng 25°C, hạt Cúc gai Đức nảy mầm sau 7 ngày, như vậy nhiệt độ đóng vai trò quan trọng trong quá trình nảy mầm hạt Cúc

gai. Các hạt Cúc gai sau nảy mầm được nhân trong các chậu thí nghiệm và phát triển bình thường như đã trình bày ở hình 3 dưới đây:



Hình 3. Cây Cúc gai từ hạt Cúc gai Đức (1) và hạt Cúc gai VN (2)

3.1.2. Thử nghiệm trồng Cúc gai.

Cúc gai đã được trồng tại Sapa trong nhiều năm qua do khí hậu thích hợp với loài cây ôn đới này và cho hàm lượng hoạt chất không kém Cúc gai của (CHLB Đ).

Chúng tôi thử nghiệm trồng Cúc gai trong điều kiện đồng bằng tại Hà Nội, ở ngoại thành Hà Nội trên diện tích vườn 50m² và tại Trung Tâm Giống cây thuốc thuộc Viện Dược liệu, cũng đã thử nghiệm trồng Cúc gai tại An Khánh, Thường Tín cho thấy Cúc gai có thể trồng trong điều kiện khí hậu ở Hà Nội, cho hoa và quả trong năm thứ 1. Tuy nhiên cần xác định thời vụ trồng

thích hợp là từ tháng 10 năm trước đến tháng 5 năm sau vào vụ Thu Đông, cần phân tích đánh giá sản lượng, hàm lượng và chất lượng thuốc của hạt Cúc gai trồng trong những điều kiện trên trong năm 2002. Hiện nay chúng tôi đã cho trồng thử nghiệm lại đồng thời tại Sapa và tại Trung tâm Cây thuốc, cây Cúc gai đã được gần 3 tháng tuổi. cây sinh trưởng tốt.(hình 1 và 2).

3.2. Thử nghiệm nuôi cấy mô tế bào.

Với độ nảy mầm tốt chúng tôi tiến hành nuôi cấy mô rễ Cúc gai tạo sinh khối tế bào trong phòng thí nghiệm. Hiện nay mới bắt đầu thực

hiện nội dung trên, đã thử nghiệm cho hạt cúc gai nảy mầm trong điều kiện vô trùng và thử nuôi cấy mô lá, thân và rễ. Bước đầu đã tìm được môi trường thích hợp và đã tạo được mô sẹo của các khối mô trên cho 2 giống Cúc gai của Đức và Việt Nam. Quá trình tạo mô sẹo diễn ra qua các bước sau:

3.2.1. Các bước khử trùng hạt và nảy mầm:

Kết quả của bước này trải qua các công đoạn sau:

- Ngâm hạt và rửa nước cất 3 lần
- Lắc trong ethanol 70% trong thời gian 1 phút, sau đó lắc trong nước gia ven 50% trong thời gian 20 phút
- Rửa lại nước cất nóng ấm 3 lần
- Cuối cùng cấy hạt vào trong bình có chứa môi trường cho hạt nảy mầm.

Thành công là:

- + Hạt nảy mầm đạt kết quả 100%



Hình 4. Tạo mô sẹo từ thân cây Cúc gai



Hình 5. Mô sẹo từ lá cây Cúc gai trên môi trường 141



Hình 6. Mô sẹo từ rễ cây Cúc gai trên môi trường 141



Hình 7. Tạo mô sẹo từ lá Cúc gai trên môi trường MT1

+ Môi trường cho hạt nảy chồi tốt ký hiệu là T/2

3.2.2. Tạo mô sẹo từ lá và rễ của cây cúc gai

Có thể tóm tắt như sau:

- Sau khi hạt nảy mầm thành cây con hoàn chỉnh, chúng tôi tiếp tục cắt mảnh lá và mảnh rễ để đưa vào môi trường tạo mô sẹo.

- Sau thời gian 1 tháng bắt đầu hình thành mô sẹo

- Đối với lá môi trường thích hợp cho việc tạo mô sẹo có ký hiệu là: TM1, đối với rễ là môi trường có ký hiệu TMS

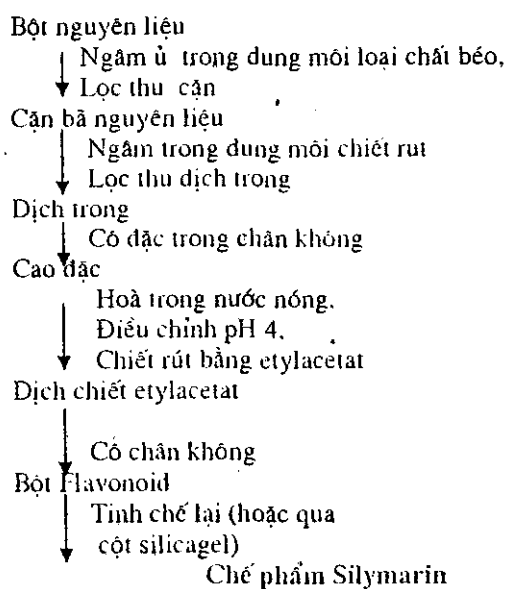
- Sau khi mô sẹo đã được hình thành, sau nhiều thăm dò và thử nghiệm trên các môi trường khác nhau điển hình thì môi trường phù hợp cho việc nuôi cấy mô sẹo là 141 và MSD2. Những kết quả này được phản ánh rõ nét qua các ảnh chụp sau.



Hình 8. Nuôi mô sẹo từ lá Cúc gai trên môi trường MT1

3.3. Xây dựng qui trình thu nhận Silymarin qui mô phòng thí nghiệm:

Qui trình thu nhận silymarin từ hạt cây Cúc gai có thể trình bày tổng quát trong sơ đồ sau:



Đã chọn được hệ dung môi thích hợp và ít độc để chiết rút thu nhận Silymarin làm thuốc qui mô phòng thí nghiệm. Hiệu suất thu nhận chế phẩm này so với phương pháp phân tích định lượng. Qui trình này với quy mô Pilot 20 lít- có hàm lượng 2.12% trọng lượng khô. Như vậy hiệu

suất thu được Silymarin của quy trình là 87% so với phân tích định lượng.

Kết quả đã thu được 20 gam Silymarin tinh khiết. Kết quả phân tích trên SKLM cho 4 vết đậm trên sắc ký đồ có Rf (0,40; 0,46; 0,55 và

0.58) gần giống với giá trị R_f của 4 thành phần Silymarin của Bungary làm chất chuẩn.

Chế phẩm Carsil và hai chế phẩm VN1 và VN2 tách chiết bằng 2 hệ dung môi khác nhau được phân tích thành phần trên máy HPLC.

Bảng 4. Kết quả phân tích trên máy HPLC.

Mẫu phân tích	peak 1	peak2	peak3	peak4	peak5	peak6
Silymarin Bungary	21.8 %	11.6%	11.4%	29,9%	6,6%	7,4%
Mẫu Silymarin VN 1	17.3	44.9	2,7	7,8	7,7	12.9
Mẫu Silymarin VN 2	17.4	38.0	5,8	7,2	4,7	7,2

Mẫu Silymarin của Bungary có 6 peak đặc trưng và chiếm tới 88,7% tổng số chế phẩm đưa vào phân tích, mẫu Silymarin thu được (từ hạt Cúc gai VN1 và VN 2) của chúng tôi cũng có 6 peak tương tự và chiếm tới 93,3 - 81,2% tổng số mẫu đưa vào phân tích. *Như vậy các thành phần chính của Silymarin thu được từ các mẫu của chúng tôi đều giống thành phần Silymarin dùng làm thuốc của Bungary.*

Tuy nhiên tỷ lệ các peak trong 3 mẫu có khác nhau. Thành phần peak 4 của Silymarin Bungary có hàm lượng cao nhất chiếm tới 29,9%, trong khi đó peak này ở chế phẩm Silymarin VN 1 thu được chiếm có 7,8%, nhưng peak 2 chiếm tới 44,9%, còn peak 2 của Silymarin Bungary chỉ chiếm 11,6% và của chế phẩm Silymarin VN2 là 17,4 và 38,0%.

Thành phần Silymarin Cúc gai VN 1 và VN 2 có thành phần tương đương nhau, như vậy có thể dùng cả 2 loại dung môi được thí nghiệm để thu nhận Silymarin. Chúng tôi đang tiến hành để tách từng peak và phân tích thành phần hoá học và tính chất của chúng, trong các công trình tiếp sau.

IV. KẾT LUẬN

1. Đã nghiên cứu sự nảy mầm hạt Cúc gai từ hạt đã sấy khô dưới 60°C, còn 9-10% ẩm độ. Sau đó khử trùng và đưa vào môi trường nảy mầm thích hợp (T/2). Kết quả hạt nảy mầm đạt 63,34 – 78,93% ở 25°C, sau 7 ngày.
2. Đã thành công qui trình tạo mô sẹo từ lá, thân và rễ Cúc gai trong các môi trường khác nhau là: lá và thân trong môi trường thích hợp là TM1 và cho rễ là môi trường là TMS
- Đồng thời cũng đã lựa chọn được môi trường thích hợp để nuôi mô sẹo phát triển thành cây là 141 và MSD2.
3. Tiến hành qui trình sản xuất cây Cúc gai thành công trên thực địa trong điều kiện môi trường có nhiệt độ cao ở Hà nội

4. Xây dựng qui trình thu nhận Silymarin từ cây Cúc gai qua các bước: Bọt nguyên liệu → Loại chất béo → Chiết rút bằng etylacetat → Đuổi dung môi → Tinh chế lại → Chế phẩm Silymarin. Chế phẩm thu được có hiệu xuất khai thác cao và chất lượng tốt tương tự Silymarin của Bungary, được phân tích bằng sắc ký lớp mỏng (SKLM) và sắc ký lỏng cao áp (HPLC).

TÀI LIỆU THAM KHẢO:

1. Phạm Thị Trân Châu, Nguyễn Quốc Khang, Đào Kim Nhung (1977)- Thực tập Sinh hoá. Đại học Tổng hợp Hà nội.
2. Đào Kim Nhung (1996)- Luận án PTS. Khoa Sinh học, ĐHTH Hà nội.
3. Võ Văn Chi (2000)- Từ điển cây thuốc Việt nam. NXB Y-học Hà nội, tr. 339
4. Carsil, a product with confirmed effectiveness in toxic, metabolic and degenerative diseases of the hepatic parenchyma, 2000, Sopharma, Bungary.
5. Flora K., Hahn M. Rosen H, Benner K. (1999)- Milk thistle (S. marianum) for the therapy of liver diseases. Am. J. Gastroenterol. 94 (2), 545 – 546.
6. Amirghofran Z., Azadbakht M., Karimii MH (2000). Evaluation of the immunomodulatory effects of five herbal plants. J. Ethnopharmacol. 72 (1-2), 167-172.
7. Luper S. (1998)- A review of plants used in the treatment of liver disease. Altern Med. Rev 3 (6), 410-421.
8. Syed AH: Et al. (2002). Contemporary role and future prospects of medicinal plants. TelMedPak.
9. Alikaridis F. (2000)- Hairy root's Silybum marianum biosynthesis. Fitoterapia, 379 – 384.

SUMMARY:

*Study on extraction procedure of flavolignans silymarin and production of biomass from milk thistle *sylibum marianum* grown in viet nam.*

Germination process of the dried under 60°C seeds from milk thistle (*Silybum marianum*) growing in Vietnam was investigated. The results showed that 63,34 – 78,93% of the seeds were germinated at 25°C after 7 days.

The procedure of callus culture of leaves, stem and roots in different mediums was completed. The suitable medium for leaves and stem callus formation was TM1, and for root callus formation was TMS. The mediums 141 and MSD2 were suitable for plant formation from callus.

The production of milk thistle in field was carried out. Milk thistle could grow in higher temperature condition of Hanoi.

The 20 litre volume extraction procedure of flavolignans Silymarin from the plant was done with two solvent systems (VN1 and VN2) with following steps: Material powder → lipid removal → ethylacetat extraction → solvent evaporation → refinement → Silymarin preparation.

The obtained bioactive preparation had good quantity with 2,12% per dry weight and quality as Silymarin drug of Bulgaria (Carsil) analyzed by High Performance Liquid Chromatography (HPLC) and Think Layer Chromatography (TLC) techniques.

The components Silymarin from VN1 and VN2 are similar, so both solvents can be used to obtain Silymarin.

The obtained preparation Silymarin should be a promising component of a drug using for treatment of liver diseases.

Người thẩm định nội dung khoa học: PGS. Trịnh Đình Đạt.

ĐẶC TÍNH SINH HỌC CỦA MỘT SỐ CHỦNG *AZOTOBACTER*

Ngô Tự Thành, Vũ Thị Minh Đức
Trường Đại học Khoa học Tự nhiên Hà Nội

Nguyễn Thu Hà, Nguyễn Ngọc Quyền
Viện Khoa học Kỹ thuật Nông nghiệp Việt Nam

Hiệu quả tốt của việc xử lý hạt bằng huyền dịch *Azotobacter* trước khi gieo trồng đã được ghi nhận từ lâu [8]. Sở dĩ như vậy là do *Azotobacter* có khả năng cố định nitơ, tiết vào môi trường các vitamin, axit amin cũng như các chất kích thích sinh trưởng thực vật (axit indol axetic, gibberelic) [5, 8].

Gần đây một số tác giả [4, 6] đã phân lập, tinh chế và mô tả một số đặc tính của enzym từ *Azotobacter* sp. GD1 có khả năng phân giải 2,4, 6 – trichlorophenol (một hợp chất độc, gây kích thích, tác nhân gây ung thư, nguy hiểm đối với môi trường sống). Nghiên cứu này nhằm vào các

đặc tính sinh học của một số chủng *Azotobacter* mới phân lập, có so sánh với *A. chroococcum* AT19 nhập nội.

I. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

Vì sinh vật: *Azotobacter chroococcum* AT19 nhập nội được sử dụng làm chủng đối chứng. Các chủng *Azotobacter* được phân lập từ đất của các vùng chuyên canh rau màu, trên môi trường Burk. Việc phân lập được tiến hành với hai lô đất: lô được giữ nguyên độ ẩm ban đầu và lô được hong khô ở nhiệt độ phòng rồi nghiền mịn.

NGHIÊN CỨU CHIẾT XUẤT VÀ TINH CHẾ ISOFLAVONOID CÓ HOẠT TÍNH ESTROGEN TRONG CỦ Sắn DÂY *PUERARIA THOMPSONII* BENTH*

PHAN QUỐC KINH, ĐỖ HOA VIÊN, LÊ MINH CHÂU

I. MỞ ĐẦU

Sắn dây là một loài cây rất phổ biến ở Việt Nam và trên thế giới. Trong y học dân gian Việt Nam, sắn dây đã được coi là vị thuốc dùng một mình hoặc kết hợp với một số vị thuốc khác có thể phòng trị nhiều chứng bệnh rất hiệu quả. Gần đây, các nhà nghiên cứu còn phát hiện ra trong sắn dây, đặc biệt là sắn dây củ tròn có chứa các isoflavonoid có hoạt tính phytoestrogen. Các phytoestrogen có hoạt tính như hoặc môn estrogen trong cơ thể nữ nên rất quan trọng đối với phụ nữ ở thời kì tiền mãn kinh, giúp chống lại các triệu chứng có liên quan đến sự giảm đột ngột hoặc môn estrogen như loãng xương, trầm cảm, rối loạn tuần hoàn... đặc biệt các isoflavonoid có hoạt tính phytoestrogen này còn có vai trò trong việc ngăn ngừa các bệnh tim mạch, ung thư vú v.v.

Trong bài báo này, chúng tôi sẽ trình bày kết quả nghiên cứu các isoflavonoid có hoạt tính phytoestrogen trong củ sắn dây Việt Nam.

II. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

1. Nguyên liệu

Củ của loài sắn dây *Pueraria thompsonii* Benth thuộc họ *Cánh bướm Fabaceae* (*Papilionaceae*) quả Việt Nam. Củ sắn dây sau khi thu hoạch được rửa sạch, thái thành từng lát mỏng, sau đó đem sấy ở nhiệt độ 80°C đến trọng lượng không đổi. Đem nghiền nhỏ sắn dây khô ở dạng lát thành bột, rây qua rây cho đồng đều rồi bảo quản bột thu được trong các túi P.E ở nơi khô mát và thoáng gió.

2. Các phương pháp nghiên cứu

Chiết xuất hỗn hợp isoflavonoid từ bột sắn dây khô: chiết xuất hỗn hợp isoflavonoid từ bột sắn dây khô bằng các dung môi hữu cơ thích hợp như etanol, ethylacetat, cloroform với tỉ lệ là 100 gam bột sắn dây khô: 700 ml dung môi, thời gian ngâm mẫu ít nhất là 24 giờ. Sau khi thu dịch chiết và cô đặc ta được cao có chứa hỗn hợp isoflavonoid có màu nâu đỏ.

Phương pháp sắc kí bản mỏng (Thin Layer Chromatography): phương pháp này được sử dụng để định tính, tách và tinh chế các isoflavonoid có trong sắn dây.

Phương pháp sắc kí lỏng cao áp (High Performance Liquid Chromatography - HPLC): dựa vào phương pháp này có thể xác định cụ thể hàm lượng các isoflavonoid. Mẫu chuẩn được sử dụng là hỗn hợp isoflavonoid chiết xuất từ viên phytoest của Mỹ có chứa daidzein và genistein. Sau đó chúng tôi so sánh kết quả phân tích của dịch chiết với mẫu chuẩn dựa vào sắc kí đồ (thời gian lưu của các pic) và dựa vào phổ tử ngoại của các pic.

* Nghiên cứu được thực hiện với sự hỗ trợ kinh phí của Đề tài KHCN KC.04-17

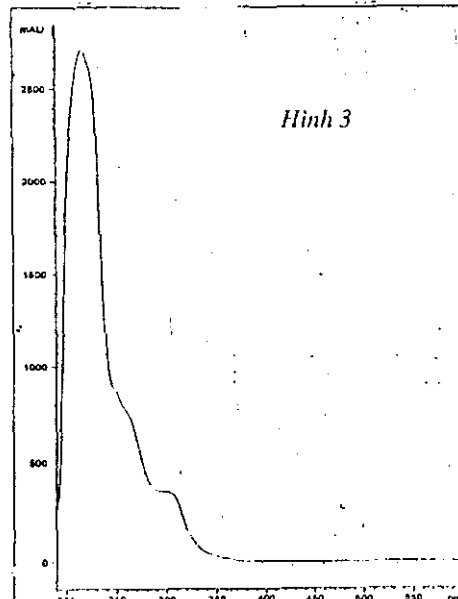
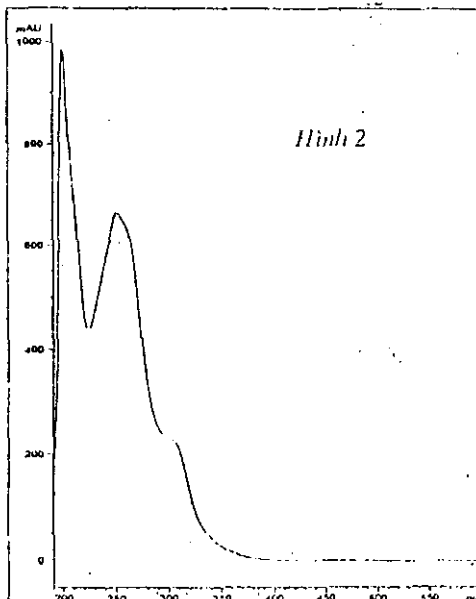
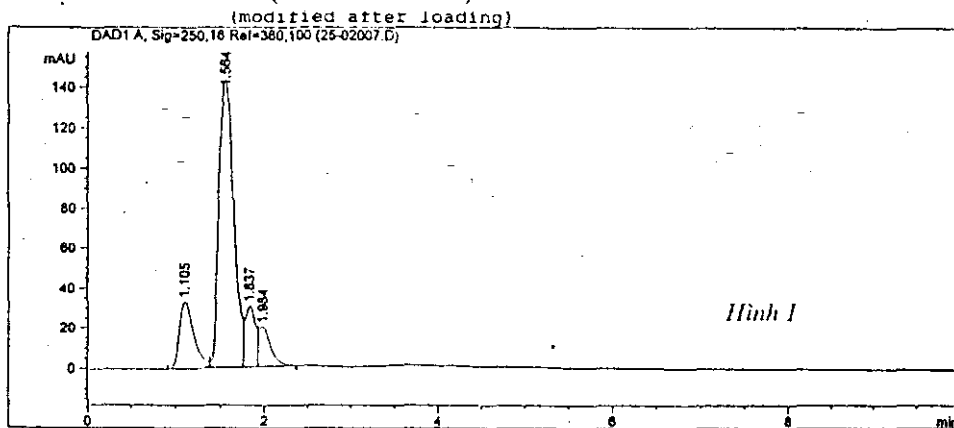
III. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

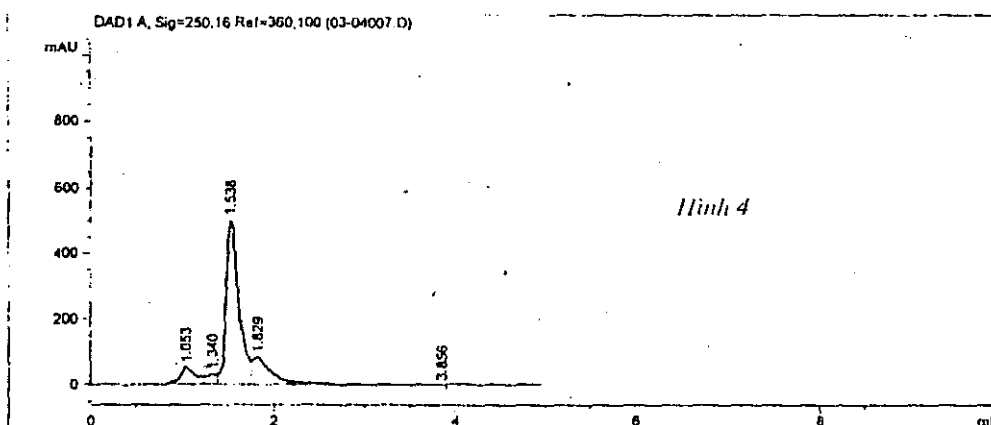
1. Phân tích định tính các isoflavonoid có trong sản dây

Trước tiên, chúng tôi tiến hành phân tích định tính sơ bộ bằng sắc kí bản mỏng. Sử dụng bản mỏng Silicagel F₂₅₄ (Merck), hệ dung môi EtOH-CHCl₃ tỉ lệ 1: 3 với mẫu chuẩn là hỗn hợp isoflavonoid chiết xuất từ viên phytoest của Mỹ có chứa daidzein và genistein và mẫu thí nghiệm chứa hỗn hợp isoflavonoid chiết từ sản dây bằng ethylacetat.

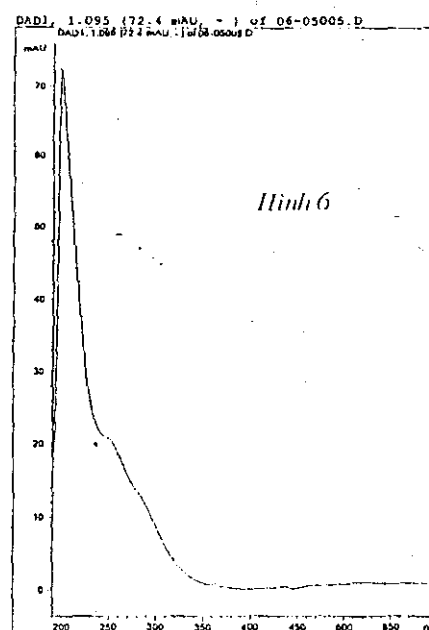
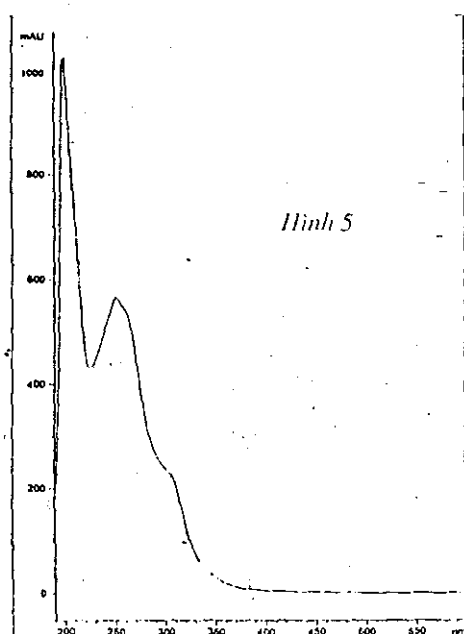
So sánh kết quả sắc kí bản mỏng của mẫu chuẩn và mẫu thí nghiệm trên sắc kí đồ thì thấy có 2 vết có cùng giá trị R_f, đó là vết 1 có R_f₁ = 0,22, và vết 2 có R_f₂ = 0,44. Chúng tôi sơ bộ kết luận trong mẫu isoflavonoid chiết từ sản dây bằng ethylacetat có chứa daidzein và genistein.

Tiếp tục tiến hành phân tích định tính bằng sắc kí lỏng cao áp (HPLC) với mẫu chuẩn là hỗn hợp isoflavonoid chiết xuất từ viên phytoest của Mỹ có chứa daidzein và genistein và mẫu thí nghiệm là hỗn hợp isoflavonoid chiết từ sản dây bằng ethylacetat. Lượng mẫu chuẩn và mẫu thí nghiệm được tiêm vào hệ thống HPLC là 10 µl, lưu lượng pha động là 0,7 ml/phút. Thành phần các chất trong mẫu chuẩn và hỗn hợp isoflavonoid trong sản dây được xác định bằng sắc kí lỏng cao áp thể hiện ở các sắc kí đồ (hình 1 và hình 4).





Tiến hành đo phổ tử ngoại các pic có cùng thời gian lưu của mẫu chuẩn (hình 2 và hình 3) và mẫu thí nghiệm (hình 5 và hình 6) được đỉnh hấp thụ cực đại của các pic này là 250, 262 nm. Các kết quả này trùng với các kết quả nghiên cứu đã công bố về các phytoestrogen. Điều này cho phép kết luận rằng trong hỗn hợp isoflavonoid thu được có các chất có hoạt tính phytoestrogen: daidzein phổ tử ngoại là 250 nm và genistein phổ tử ngoại là 262 nm.



2. Tinh chế và định lượng hỗn hợp isoflavonoid có hoạt tính phytoestrogen

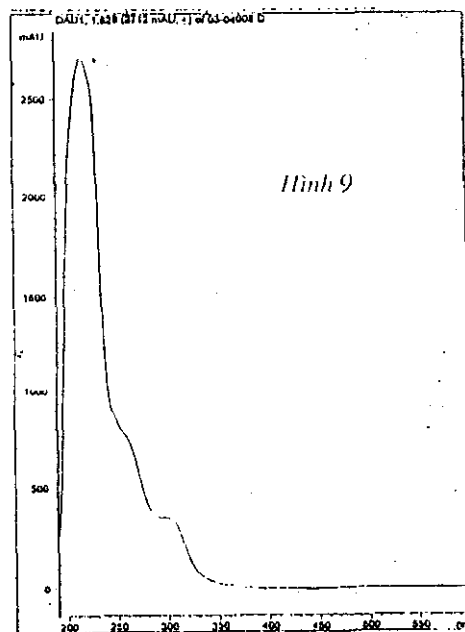
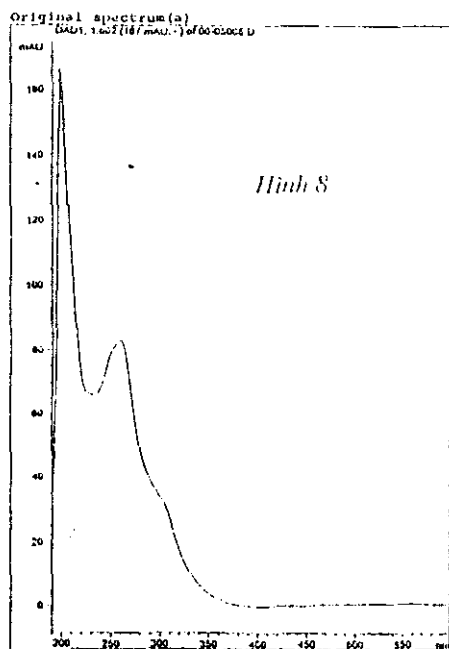
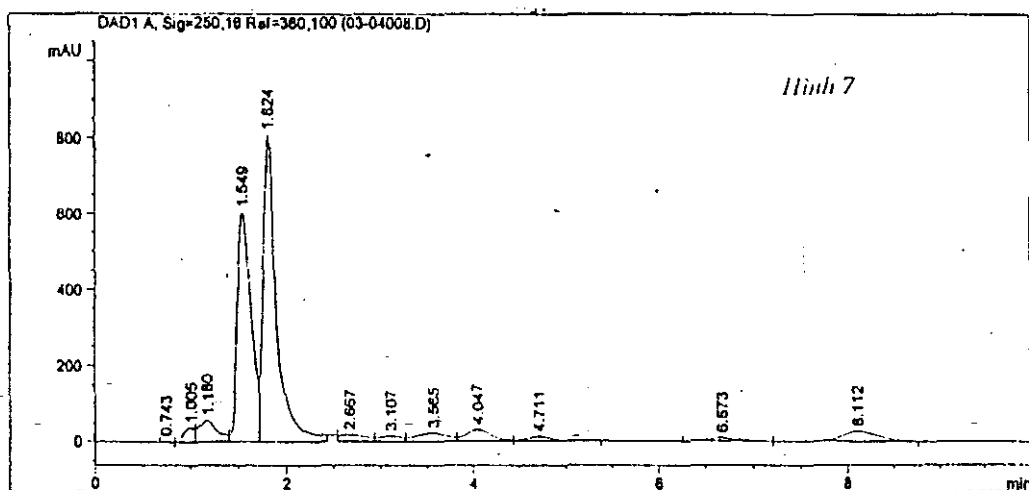
Tiến hành sắc kí điều chế sử dụng bản mỏng Silicagel F₂₅₄ (Merck) với cao chứa hỗn hợp isoflavonoid chiết từ sản dây bằng dung môi ethylacetat, hệ dung môi EtOH- CHCl₃ tỉ lệ 1: 3.

Sau khi làm khô bản sắc kí cất lấy phần bản mỏng có chứa các thành phần isoflavonoid như đã phân tích định tính ở trên trong viên phytoest, hòa tan lại trong ethylacetat rồi bốc hơi dung môi sẽ thu được hỗn hợp isoflavonoid tinh chế.

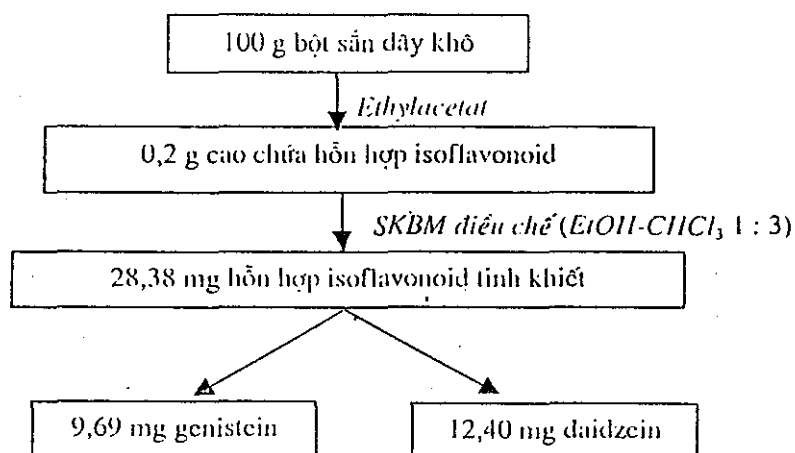
Tiến hành phân tích định lượng bằng sắc kí lỏng cao áp (HPLC) với mẫu hỗn hợp isoflavonoid tinh chế. Thành phần các isoflavonoid trong sản dây được xác định bằng sắc kí lỏng

cao áp thể hiện ở sắc kí đồ (hình 7). Phổ tử ngoại của 2 pic chính trên sắc kí đồ này được thể hiện ở hình 8 và hình 9, đỉnh hấp thụ cực đại của các pic này là 250 nm và 262 nm. Đối chiếu với kết quả phân tích định tính bằng HPLC ở trên thì pic 1 tương ứng với daidzein và pic 2 tương ứng với genistein.

Căn cứ vào kết quả phân tích định lượng bằng HPLC, chúng tôi kết luận trong mẫu isoflavonoid tinh chế có chứa 43,69% daidzein và 34,14% genistein.



3. Kết quả chiết xuất và tinh chế các phytoestrogen được tóm tắt theo sơ đồ sau



III. KẾT LUẬN

1. Trong 100 g bột sắn dây khô khi chiết bằng ethylacetat thì thu được 0,2 gam cao chứa hỗn hợp isoflavonoid tương đương với 0,2% khối lượng bột khô ban đầu.

2. Tinh chế 0,2 gam cao chứa hỗn hợp isoflavonoid thì thu được 28,38 mg hỗn hợp isoflavonoid tinh chế (chiếm 14,19% khối lượng cao), trong đó có 12,4 mg daidzein (chiếm 6,2%) và 9,69 mg genistein (chiếm 4,85%).

3. Tỷ lệ phần trăm của hỗn hợp isoflavonoid tinh chế trong nguyên liệu khô ban đầu là 0,028% (trong đó genistein chiếm 0,01%, daidzein chiếm 0,012%).

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Nguyễn Thiện Luân, Lê Doãn Diên, Phan Quốc Kinh - Các chất bổ sung dinh dưỡng, Ngành Khoa học công nghệ mới của thế kỉ 21, Nhà xuất bản Nông Nghiệp, Hà Nội 2001.
2. Đỗ Tất Lợi - Những cây thuốc và vị thuốc Việt Nam, Nhà xuất bản Khoa học Kỹ thuật, Hà Nội, 1999.
3. Nguyễn Thiện Luân, Lê Doãn Diên, Phan Quốc Kinh - Các loại thực phẩm - thuốc và thực phẩm chức năng ở Việt Nam, Nhà xuất bản Nông nghiệp Hà Nội, 1997.
4. Phan Quốc Kinh - Kéo dài tuổi thanh xuân, Nhà xuất bản Y học Hà Nội, 2000.
5. Ronald Klatz, Robert Gloldman - Total health, 19 (5) (1999) 27- 31.
6. Phan Quốc Kinh và các cộng sự - Lý thuyết Hóa dược, Đại học Dược Hà Nội, 1998.
7. Graham L. Patrick - An introduction to Medicinal chemistry, Oxford University press 2001.
8. William O. Foye - Principle of Medicinal chemistry, Baltimore, 1995.
9. V. Schulz - Rational phytotherapy Springer, 1997.
10. Đái Duy Ban - Lương thực thực phẩm trong phòng chống ung thư, Nhà xuất bản Hà Nội, 2001.
11. Võ Văn Chi - Từ điển cây thuốc Việt Nam, Nhà xuất bản Y học Hà Nội 1996.
12. Lucinda G. Miller - Herbal Medicinals, The Harword Herbal Press, 1998.
13. Nguyễn Duy Cương, Nguyễn Hữu Quỳnh - Từ điển Bách khoa Dược học, Nhà xuất bản Từ điển Bách khoa Hà Nội, 1998.
14. Ngô Văn Thu và cộng sự - Bài giảng dược liệu, Tập 1, Trường đại học Dược, 1998.

15. Chemical composition of pueria mirifica herb (Các hợp chất hoá học của pueria mirifica), Medical Plant Research Institute Department of Medical Science Ministry of Public Health, Thailand. <http://thai.pueraria.com>.

SUMMARY

RESEARCHES ON THE EXTRACTION AND PURIFICATION OF ISOFLAVONOIDS IN *PUERARIA THOMPSONII* BENTH

There are two isoflavonoids were determined in *Pueraria thompsonii* Benth of Vietnam: they are daidzein and genistein. They are phytoestrogen, their affect are like estrogen hormone from mammal.

Địa chỉ:

Nhận bài ngày 12 tháng 4 năm 2002

Phan Quốc Kinh, Liên hiệp KHK-T và CN mới.

Đỗ Hoa Viên, Lê Minh Châu,

Viện Công nghệ sinh học và CNTP, Đại học Bách khoa Hà Nội.

2.0.18

NGHIÊN CỨU *IN VIVO* TÁC DỤNG NỘI TIẾT KIỂU ESTROGEN CỦA CAO CHIẾT ISOFLAVONE TỪ HẠT ĐẬU TƯƠNG VIỆT NAM GLYCINE MAX

Đỗ thị Hoa Viên, Vũ Thị Thu Huyền
Viện CNSH&CNTP, Đại học Bách khoa Hà Nội

ĐẶT VẤN ĐỀ

Đậu tương không những là một sản phẩm thực phẩm có giá trị dinh dưỡng cao mà trong đậu tương còn có những hoạt chất sinh học quý giá. Ngày nay, các nhà khoa học trên thế giới đã xếp đậu tương là một trong những "thực phẩm chức năng". Các điều tra về dịch tễ học cho thấy phụ nữ châu Á, đặc biệt là phụ nữ Nhật bản có thói quen tiêu thụ nhiều sản phẩm đậu tương thì nguy cơ mắc các chứng bệnh tiền mãn kinh, loãng xương, ung thư vú... thấp hơn nhiều so với phụ nữ các châu lục khác trên thế giới. Một trong những hoạt chất quý góp phần tạo nên các chức năng phòng chữa bệnh của đậu tương là các isoflavone có hoạt tính estrogen, còn được gọi là các phytoestrogen.

Việt Nam sẵn có một nguồn đậu tương dồi dào, được sử dụng từ lâu trong đời sống hàng ngày bởi các sản phẩm quen thuộc như sữa đậu nành, đậu phụ, tào phớ, các thực phẩm chay... Để góp phần nghiên cứu khai thác các hoạt chất có hoạt tính sinh học cao trong đậu tương vào mục đích phòng chống bệnh tật, chúng tôi đã tiến hành nghiên cứu chiết xuất các phytoestrogen từ đậu tương, đậu tương nảy mầm và thử nghiệm hoạt tính của chúng trên động vật.

NGUYÊN LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

Nguyên liệu là cao chiết đậu tương nảy mầm sau 72h có chứa 7,74% hỗn hợp isoflavone.

Mục đích thử nghiệm: Xem có tác dụng nội tiết kiểu estrogen trên động vật thí nghiệm khi cho uống cao chiết không?

Đối tượng thử nghiệm: 60 con chuột nhắt cái trắng, mỗi con có trọng lượng từ 16-18g. Chuột khỏe mạnh, lông mượt, mắt hồng, đuôi hồng rõ tĩnh mạch.

Dụng cụ, hoá chất:

Dụng cụ: kính hiển vi để soi tế bào, lam kính, que tre để lấy tế bào, giấy đo pH, thuốc đánh dấu chuột, kim tiêm, bàn mổ, pince, kéo, bông...

Hoá chất: Dung dịch chuẩn EDP (Estradiol-dipropionat), thuốc nhuộm giem sa, cồn 90°, nước cất...

Phương pháp: Tiến hành theo phương pháp Allen – Doisy:

Bước 1: Cố định chuột nằm sấp trên bàn mổ.

Bước 2: Cắt bỏ 2 buồng trứng. Thủ thuật được tiến hành ở vùng hông. Cắt xong buồng trứng, tiến hành khâu 2 lớp, lớp cơ rồi đến lớp da.

Bước 3: Sau khi cắt bỏ 2 buồng trứng, chuột được nghỉ 15 ngày. Đến ngày thứ 16, kiểm tra và bỏ đi những con còn sót lại buồng trứng.

Bước 4: Chia chuột thành 3 lô thí nghiệm:

+ Lô chuẩn: Tiêm EDP với liều lượng 0,5mg/1 con/1 lần (tiêm dưới da bụng)

+ Lô chứng: cho uống nước cất

+ Lô thử: Chuột được cho uống với liều lượng 25mg cao chiết/1 con/1 ngày, trong 6 ngày liền. Ngày nào cũng kiểm tra tế bào âm đạo, pH âm đạo để theo dõi sự xuất hiện các tế bào sừng.

KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Tiến hành thử nghiệm theo phương pháp Allen-Doisy trên chuột nhắt cái trắng đã cắt bỏ 2 buồng trứng.

Các chỉ tiêu quan sát là:

1. Tế bào âm đạo:

Tiêu bản dương tính: là những tế bào sùng hóa toàn bộ trên tiêu bản.

Tiêu bản âm tính: không có tế bào sùng, chỉ có bạch cầu và 1 ít tế bào nhân trên tiêu bản.

2. pH âm đạo:

Theo dõi sự biến đổi của pH âm đạo dưới tác dụng của cao chiết.

Kết quả thử nghiệm được ghi lại trong bảng sau:

Kết quả thử nghiệm tác dụng nội tiết kiểu estrogen của cao chiết isoflavone từ đậu tương trên chuột nhắt cái trắng						
Lô chuột thử nghiệm	pH âm đạo		Số ngày có TB sùng	Số lượng chuột có TB sùng	Tỷ lệ % chuột có TB sùng	Ghi chú
	Trước 0	Sau 0				
Lô chuẩn (tiêm EDP)	6,6	6,4	6/6	20/20	100%	TB sùng xuất hiện từ ngày thứ 1→6
Lô chứng (uống nước cất)	6,5	6,8	1/6	2/11	18%	TB sùng xuất hiện rất ít vào ngày thứ 6, chỉ có TB nhân và bạch cầu
Lô thử (uống cao chiết)	7,0	6,5	5/6	18/23	78%	TB sùng xuất hiện từ ngày thứ 2→6
(TB: tế bào, 0: điều trị)						

Từ những hình ảnh quan sát được trên các tiêu bản và số liệu thu được ở bảng trên, chúng tôi rút ra một số nhận xét như sau:

+ ở lô chuột được tiêm dung dịch chuẩn EDP, kết quả kiểm tra tế bào âm đạo cho thấy: các TB sùng xuất hiện từ ngày thứ nhất đến ngày thứ 6 trên 100% số chuột thử nghiệm.

+ ở lô chuột chỉ uống nước cất: hầu như không có tế bào sùng, chỉ có tế bào nhân và bạch cầu. Các tiêu bản được xem là âm tính.

+ ở lô chuột được uống cao chiết: các TB sùng bắt đầu xuất hiện từ ngày thứ 2 đến ngày thứ 6 trên 78% số chuột thử nghiệm.

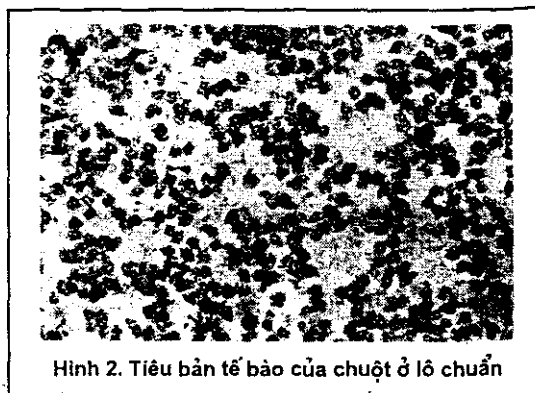
+ pH môi trường âm đạo của các lô chuột hầu như không bị ảnh hưởng trong suốt thời gian thử nghiệm.

Như vậy, thử nghiệm tác dụng nội tiết kiểu estrogen của cao chiết isoflavone từ hạt đậu tương nảy mầm cho kết quả dương tính. Kết quả nghiên cứu khác của chúng tôi cho thấy hàm lượng isoflavone của đậu tương nảy mầm chỉ cao hơn của đậu tương chưa nảy mầm 1 ít. Theo kết quả thử nghiệm ở Phòng Đông y thực nghiệm, Viện Y học cổ truyền Việt Nam thì ở 1 số đối tượng nghiên cứu khác có chứa phytoestrogen, chẳng hạn như cỏ ba lá, liều thử nghiệm của cao chiết isoflavone thường phải cao gấp đôi (50mg/1con/ngày) thì mới cho kết quả dương tính như của cao chiết isoflavone từ đậu tương. Vậy chúng ta có thể thấy rằng hoạt tính phytoestrogen của đậu tương và đặc biệt là của đậu tương nảy mầm là khá cao. Điều này hoàn toàn phù hợp với 1 số kết quả nghiên cứu được công bố trong thời gian gần đây trên thế giới. Hiện nay trên thị trường Mỹ đã có bán sản phẩm bổ sung dinh dưỡng Phyto-Est mà thành phần chủ yếu là hỗn hợp Phytoestrogen (isoflavone) chiết xuất từ hạt đậu tương. Ở Việt Nam, Đề tài KHCN cấp Nhà nước KC04-17 (2001-2004) đã kết hợp với Công ty Dược phẩm TW 25 sản xuất sản phẩm bổ sung dinh dưỡng Tiên Dung, chứa chủ yếu hỗn hợp Phytoestrogen từ một số dược liệu của Việt Nam. Sản phẩm đang được thử nghiệm lâm sàng và hy vọng sẽ sớm được xuất hiện trên thị trường.

Sau đây là một số hình ảnh theo dõi sự xuất hiện tế bào sùng ở các lô chuột thử nghiệm:



Hình 1. Tiêu bản tế bào của chuột ở lô chứng



Hình 2. Tiêu bản tế bào của chuột ở lô chuẩn

KẾT LUẬN

Kết quả nghiên cứu cho phép chúng tôi rút ra một số kết luận như sau:

Cao chiết isoflavone từ hạt đậu tương nảy mầm có hoạt tính nội tiết tố nữ Estrogen trên chuột nhắt cái trắng với liều uống 25mg/con/ngày.

Hỗn hợp isoflavone (phytoestrogen) chiết xuất từ đậu tương có hoạt tính Estrogen khá cao.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Lê Đức Trình, 1998. *Hooc môn*. Nxb Y học.
2. Phan Quốc Kinh, 2000. *Kéo dài tuổi thanh xuân*. Nxb Y học Hà Nội.
3. Graham, T.L., 2000. *The biosynthesis and distribution of phytoestrogens and their roles in plant defense, signal transduction and cell-to-cell signaling*. J. Medicinal Food 2, 93-97.
4. Ronald Klatz, 2000. *The soybean solution to aging*, Magazine Total Health, Vol. 19, No.5.
5. [Http://www.soyfoods.com/symposium](http://www.soyfoods.com/symposium)



Hình 3. Tiêu bản tế bào của chuột ở lộ tử

SUMMARY

**RESEARCH IN VIVO ON THE ESTROGEN ACTIVITY
OF ISOFLAVONE EXTRACT FROM VIETNAM SOYBEAN GLYCINE MAX**

Do Thi Hoa Vien, Vu Thi Thu Huyen

Institute of Biotechnology and food technology, Hanoi University of Technology.

Soybean is a traditional food of population in Vietnam and Asia. Soybean not only is a food having high nutritive value but also containing valuable biocompounds. One of them is isoflavones as daidzein, genistein... By test in vivo, we concluded that isoflavone extract from germinated soybean having the estrogen activity on white female mice at the oral dose of 25mg/mouse/day. Experimental results also showed that isoflavone extract from soybean *Glycine Max* have high estrogen activity.

TÁC DỤNG CỦA POLYPHENOL CỦA DỊCH CHIẾT VỎ QUẢ MĂNG CỤT (*GARCINIA MANGOSTANA* L.) LÊN VI KHUẨN SÂU RĂNG *STREPTOCOCCUS MUTANS*

Nguyễn Thị Mai Phương, Nguyễn Thị Ngọc Dao
Viện Công nghệ Sinh học, Trung tâm KHTN&CNQG
Phan Tuấn Nghĩa, Đặng Minh Phương
Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, ĐHQG Hà Nội

ĐẶT VẤN ĐỀ

Cho đến nay fluo vẫn được xem là một tác nhân chống sâu răng có hiệu quả cao và được sử dụng rộng rãi trong các sản phẩm vệ sinh và bảo vệ răng miệng. Tác dụng của fluo bao gồm sự ức chế các quá trình sinh axit, hô hấp, hình thành biofilm của các vi khuẩn streptococcus và gia tăng sự nhạy cảm của tế bào vi khuẩn đối với tác dụng gây tổn thương bởi axit. Fluo cũng tác dụng như chất ức chế của enolase của quá trình phân giải đường [5], hay của catalase, enzym phân giải H_2O_2 , do đó làm cho cả vi khuẩn sinh và không sinh catalase trở nên nhạy cảm với tác dụng của H_2O_2 [15]. Tuy nhiên sử dụng các sản phẩm có nhiều fluo lâu ngày sẽ dẫn đến tình trạng nhiễm fluo [17]. Xu thế nghiên cứu hiện nay là tìm kiếm những hợp chất mới để có thể sử dụng kết hợp với fluo ở nồng độ thấp nhưng vẫn hiệu quả trong việc chống sâu răng. Theo hướng này một loạt những hợp chất có tác dụng diệt khuẩn như các axit yếu, chlorohexidine, triclosan, paraben... đã được nghiên cứu và từng bước đưa vào ứng dụng [1, 2, 15]. Ngoài ra một số hợp chất tự nhiên chiết xuất từ thực vật mà điển hình là nhóm polyphenol cũng đã được khảo sát và chứng tỏ ra có khả năng chống sâu răng [9, 10, 11, 12, 13].

Bài báo này trình bày những kết quả nghiên cứu của chúng tôi về tác dụng của dịch chiết vỏ quả măng cụt, chứa các hợp chất polyphenol lên vi khuẩn gây sâu răng chủ yếu *Streptococcus mutans*.

NGUYÊN LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

Chủng vi sinh vật

Chủng vi sinh vật *Streptococcus mutans* GS-5 là quà tặng của GS. Robert E. Marquis, Đại học Rochester, New York, Hoa kỳ. Các chủng vi sinh vật dùng cho nghiên cứu được giữ và cấy chuyển hàng tuần lên môi trường thạch (tryptic soy agar - TSA) của hãng Difco.

Nguyên liệu thực vật

Vỏ quả măng cụt (MC) được sử dụng ở dạng tươi và khô. Nguyên liệu được chiết trong các dung môi: nước, etanol, chloroform, etylacetat (theo tỉ lệ 1 g nguyên liệu: 3 thể tích dung môi) bằng cách ngâm nguyên liệu nhiều giờ trong dung môi (chiết ngâm) và chiết hồi lưu bằng socklet.

Phương pháp nghiên cứu

Định tính và định lượng polyphenol tổng số trong mẫu nghiên cứu: Sử dụng $FeCl_3$ 5% và NaOH 10% để định tính sự có mặt của các hợp chất polyphenol trong mẫu nghiên cứu. Hàm lượng polyphenol tổng số trong mẫu nghiên cứu được xác định theo phương pháp Folin-Dennis lấy axit gallic làm chất chuẩn [8].

Đo sự sản xuất axit bằng thí nghiệm giảm pH trong môi trường dư thừa glucose: Các thí nghiệm đo sự sụt pH được tiến hành như được mô tả bởi Belli & cs [2] sử dụng máy đo pH MP225 Mettler Toledo.

Hô hấp của tế bào: Các thí nghiệm đo hô hấp của tế bào được tiến hành theo phương pháp của Cadwell & cs [3]. Dung dịch tế bào đã đạt độ bão hoà không khí và được dùng ngay để đo lượng O_2 tiêu thụ ở nhiệt độ phòng sử dụng máy đo O_2 , WTW OXI 330, Đức.

Tác dụng gây chết: Các thí nghiệm về tác dụng gây chết vi khuẩn được tiến hành như Phan & cs mô tả [14]. Trong đó, mật độ tế bào vi khuẩn ban đầu khoảng 10^9 tế bào/ml, được xử lý bằng các tác nhân cần khảo sát ở các khoảng thời gian khác nhau. Sau đó từ các mẫu lấy ra 0,1 ml, pha loãng ở các nồng độ khác nhau 10 lần, cấy trải trên đĩa thạch và nuôi cấy ở 37°C để tính số tế bào sống sót qua xử lý. Tác dụng gây chết được biểu thị qua giá trị D là thời gian mà tại đó 90% quần thể tế bào vi khuẩn bị chết dưới tác dụng của một tác nhân cần khảo sát, ngoài ra còn được biểu thị bằng giá trị LogN/No, trong đó N là số tế bào sống sót tại thời điểm thu mẫu và No là số tế bào ban đầu. Theo cách biểu thị thì D chính là thời điểm có LogN/No = -1.

Xác định hoạt tính enzym: Hoạt tính của NADH oxidase được xác định ở 25°C theo phương pháp của Poole và Claiborne [16]. Một đơn vị hoạt tính NADH oxidase là lượng enzym xúc tác để oxy hoá 1 μmol NADH trong thời gian 1 phút ở điều kiện phản ứng.

Xác định hoạt tính vận chuyển đường qua hệ thống chuyển gốc photphat (phospho transferase system-PTS) theo phương pháp được mô tả bởi Belli & cs [2]. Trong đó photphoenolpyruvat làm chất cho glucose nhóm photphat và sản phẩm pyruvat tạo thành được định lượng bằng phản ứng với NADH khi có mặt enzym lactat dehydrogenase.

KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Định tính và định lượng polyphenol trong vỏ quả măng cụt (MC)

Kết quả chiết rút và định lượng polyphenol tổng số của MC được trình bày ở bảng 1 cho thấy dịch chiết MC đã cho phản ứng màu đặc trưng của các hợp chất polyphenol với các thuốc thử FeCl_3 5% và NaOH 10%. Hàm lượng polyphenol trong các dịch chiết bằng các dung môi khác nhau đạt từ 3,88% - 19,65% nguyên liệu, trong đó etanol tỏ ra là dung môi tốt nhất. Hàm lượng của polyphenol trong dịch chiết bằng chloroform sau đó chiết lại bằng etanol (chloroform $\rightarrow$ etanol) chỉ giảm đi khoảng 3%, còn hàm lượng polyphenol trong dịch chiết bằng etanol sau đó chiết lại bằng etylacetat giảm xuống khoảng 10%. Sử dụng phương pháp chiết bằng socklet cho hàm lượng polyphenol cao hơn so với phương pháp chiết ngâm. Tuy vậy sự khác nhau là không đáng kể. Để đơn giản hoá qui trình chiết, chúng tôi sử dụng phương pháp chiết ngâm cho tất cả các thí nghiệm về sau.

Tác dụng của dịch chiết MC lên sự làm giảm pH môi trường của vi khuẩn *S. mutans* GS-5

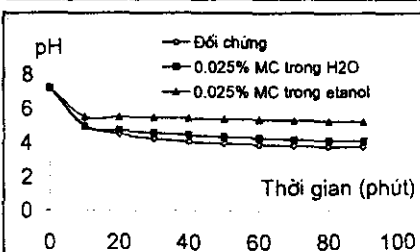
Tính chất gây sâu răng của vi khuẩn trong mảng bám răng gắn liền với cơ chế sinh axit của chúng. Vì vậy hoạt tính ức chế sinh axit của vi khuẩn thường được xem là thí nghiệm khởi đầu trong khảo sát tác dụng bảo vệ răng của hợp chất quan tâm. Kết quả nghiên cứu khả năng ức chế sự giảm pH của các dịch chiết MC trong một số dung môi khác nhau theo phương pháp chiết ngâm đối với vi khuẩn gây sâu răng chủ yếu *S. mutans* trong môi trường dư thừa glucose được trình bày trong ở hình 1. Mức độ giảm pH phản ánh khả năng sản xuất axit của tế bào. Kết quả cho thấy mẫu kiểm tra có giá trị pH cuối cùng là 3,7 và dịch chiết MC trong H_2O và etanol đều có tác dụng ức chế sự giảm pH của *S. mutans* GS-5 với giá trị pH cuối cùng ở nồng độ dịch chiết 0,025% với dịch chiết bằng H_2O là 4,1 và với dịch chiết bằng etanol là 5,2. Như vậy dịch chiết trong etanol tỏ ra có tác dụng ức chế sự sinh axit của vi khuẩn mạnh hơn nhiều so với dịch chiết trong H_2O . Điều này chứng tỏ hoạt chất chính gây ức chế sự sinh axit của vi khuẩn hoà tan tốt trong etanol và vì thế chúng tôi đã sử dụng dịch chiết MC trong etanol trong các thí nghiệm tiếp theo.

Tác dụng phối hợp của dịch chiết MC kết hợp với fluo lên sự làm giảm pH môi trường của *S. mutans* GS-5

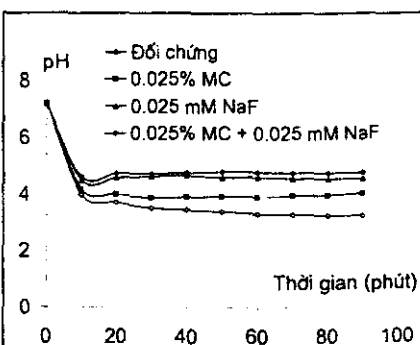
Trong thí nghiệm này chúng tôi đã sử dụng dịch chiết MC kết hợp với fluo dưới dạng muối NaF ở nồng độ 0,25 mM là nồng độ có mặt trong mảng bám răng khi dùng sản phẩm vệ sinh răng chứa fluo [6]. Kết quả trình bày ở hình 2 cho thấy mẫu kiểm tra có pH cuối cùng là 3,5, mẫu chứa MC 0,025% có pH cuối cùng là 4,1, còn với NaF 0,25 mM là 4,5. Ở công thức kết hợp của cả dịch chiết MC 0,025% và 0,25 mM NaF có pH cuối cùng là 4,9, cao hơn giá trị pH khi dùng hai đối tượng này riêng rẽ. Điều này cũng chứng tỏ tác dụng cộng trong ức chế sự giảm pH của NaF và dịch chiết MC, tương tự như sự tác dụng tính cộng của fluo với indomethacin và một vài chất khác trong nghiên cứu của Belli & cs [2].

Bảng 1. Hàm lượng polyphenol trong vỏ quả măng cụt được chiết rút bằng các dung môi khác nhau

Phương pháp chiết	Dung môi	Polyphenol tổng số (%)	Phản ứng màu	
			FeCl_3 5%	NaOH 10%
- Socklet	Etanol	19,65	Đen	Nâu
	Nước	14,30	Đen	Nâu
	Chloroform $\rightarrow$ Etanol	11,05	Đen	Nâu
	Etanol $\rightarrow$ Etylacetat	3,88	Đen	Nâu
Chiết ngâm	Etanol	15,30	Đen	Nâu



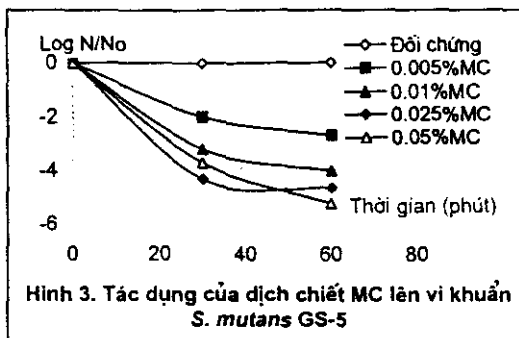
Hình 1. Tác dụng của dịch chiết MC lên sự giảm pH bởi vi khuẩn *S. mutans* GS-5



Hình 2. Tác dụng của dịch chiết MC kết hợp với fluo lên sự giảm pH bởi vi khuẩn *S. mutans* GS-5

Tác dụng gây chết vi khuẩn của dịch chiết MC

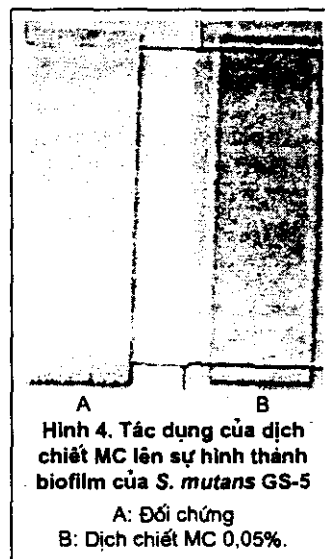
Nhằm tìm hiểu hoạt tính diệt vi khuẩn gây sâu răng, chúng tôi đã tiến hành xử lý tế bào *S. mutans* GS-5 bằng dịch chiết MC ở các nồng độ khác nhau và sau đó xác định số tế bào sống sót còn lại. Kết quả trình bày ở hình 3 cho thấy dịch chiết MC có tác dụng diệt khuẩn rất rõ rệt ở các nồng độ rất thấp, từ 0,005% trở đi. Cụ thể, giá trị D (thời gian để có 90% quần thể tế bào bị giết chết, tương ứng với giá trị $\log N/N_0 = -1$) với nồng độ MC 0,005%; 0,01%; 0,025% và 0,05% tương ứng là 18 phút, 13 phút, 5 phút và 3 phút. Ở nồng độ 0,01%, sau 30 phút xử lý có trên 99,9% quần thể tế bào bị giết chết.



Hình 3. Tác dụng của dịch chiết MC lên vi khuẩn *S. mutans* GS-5

Ảnh hưởng của dịch chiết MC lên sự hình thành biofilm của *S. mutans* GS-5

Chúng tôi cũng đã khảo sát tác dụng của dịch chiết MC lên sự hình thành biofilm của *S. mutans* GS-5 trên bản kính. Kết quả ở hình 4 cho thấy ở mẫu đối chứng không có dịch chiết MC, biofilm hình thành bình thường, tạo ra một lớp vi khuẩn dày trên bản kính sau 6 ngày nuôi cấy (hình 4.A), trong khi đó dịch chiết MC 0,05% ức chế hoàn toàn sự hình thành biofilm của vi khuẩn này (hình 4.B).

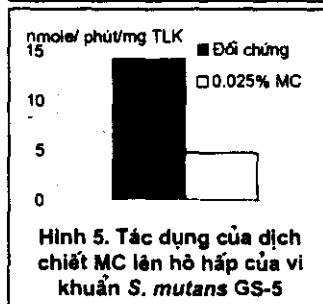


Hình 4. Tác dụng của dịch chiết MC lên sự hình thành biofilm của *S. mutans* GS-5

A: Đối chứng
B: Dịch chiết MC 0,05%.

Ảnh hưởng của dịch chiết MC lên sự hô hấp của vi khuẩn *S. mutans* GS-5

Để tìm hiểu tác dụng của dịch chiết MC lên sự tiêu thụ oxi của *S. mutans*, chúng tôi đã tiến hành đo lượng oxi còn lại trong huyền dịch chứa vi khuẩn khi có mặt của dịch chiết MC trong môi trường dư thừa glucose, pH 7,0. Kết quả được trình bày ở hình 5. Chúng tôi thấy rằng dịch chiết MC ở nồng độ 0,025% ức chế trên 60% hoạt tính hô hấp của tế bào *S. mutans* GS-5.



Hình 5. Tác dụng của dịch chiết MC lên hô hấp của vi khuẩn *S. mutans* GS-5

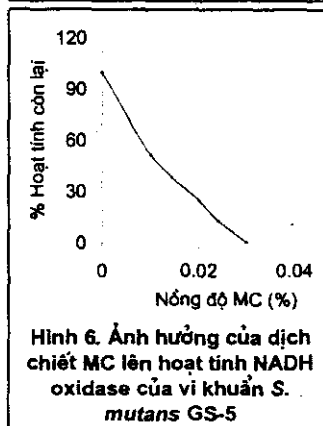
Ảnh hưởng của MC lên hoạt tính của một số enzyme của vi khuẩn *S. mutans* GS-5**Enzym vận chuyển đường PTS**

Kết quả ức chế sự sản xuất axit của *S. mutans* GS-5 bởi dịch chiết MC gợi ý khả năng tác dụng của loại dịch chiết này lên hệ thống PTS là hệ thống enzym vận chuyển đường chủ yếu của *S. mutans* [4]. Chúng tôi đã tiến hành nghiên cứu tác dụng của dịch chiết ở giới hạn nồng độ 0,05 – 0,1% thì thấy rằng dịch chiết MC không ức chế hoạt động của enzym này (số liệu chi tiết không nêu ở đây).

Enzym NADH oxidase

Kết quả nghiên cứu ảnh hưởng của dịch chiết MC lên hoạt tính enzym NADH oxidase ở hình 6 cho thấy dịch chiết MC ức chế rõ rệt hoạt động của enzym, ở nồng độ MC 0,01% enzym mất 50% hoạt tính và sự ức chế hoàn toàn xảy ra ở nồng độ MC 0,03%. NADH oxidase là enzym tiêu thụ oxi chủ yếu của *S. mutans* [7] nên kết quả này giải thích tại sao các dịch chiết MC lại ức chế sự hô hấp của tế bào vi khuẩn *S. mutans* GS-5.

Ngoài ra, chúng tôi phát hiện thấy dịch chiết MC cũng có tác dụng ức chế enzym catalase của chủng *S. aureus* H nhưng ở mức độ thấp hơn, phải cần đến 1,5% dịch chiết MC mới đạt đến mức ức chế 50% hoạt độ enzym.



Hình 6. Ảnh hưởng của dịch chiết MC lên hoạt tính NADH oxidase của vi khuẩn *S. mutans* GS-5

THẢO LUẬN

Đã có rất nhiều công trình điều tra và nghiên cứu về các polyphenol ở thực vật [12,13], tuy vậy đây là công trình đầu tiên điều tra về hàm lượng polyphenol trong vỏ quả măng cụt cũng như tìm hiểu tác dụng kháng vi

khuẩn của nó. Kết quả khẳng định phân đoạn hoà tan trong etanol là có hoạt tính ức chế sự sinh axit của *S. mutans* GS-5 tốt nhất. Đồng thời với các tính chất này, dịch chiết MC còn có khả năng ức chế quá trình hô hấp, sự hình thành biofilm và giết chết tế bào vi khuẩn. Sự ức chế hoạt động NADH oxidase của *S. mutans* GS-5 đã giải thích cho hoạt tính ức chế quá trình hô hấp, nhưng dịch chiết MC không ức chế hoạt tính của hệ thống enzym vận chuyển đường PTS của vi khuẩn này. Tác dụng của dịch chiết MC lên sự hình thành biofilm của *S. mutans* GS-5 là một phát hiện có ứng dụng thực tiễn tốt, bởi vì có nhiều hợp chất có hoạt tính kháng khuẩn ở dạng huyền dịch nhưng không có tác dụng với các tế bào ở dạng biofilm-dạng mô phỏng của mảng bám răng. Kết luận chính rút ra qua nghiên cứu này là dịch chiết MC có hoạt tính kháng vi khuẩn sâu răng cao và có tiềm năng sử dụng để phát triển các sản phẩm bảo vệ răng. Tuy vậy, cơ chế chi tiết về tác dụng của dịch chiết MC lên các quá trình hình thành biofilm, sự sinh axit cũng như giết chết tế bào *S. mutans* là vấn đề cần được tiếp tục làm sáng tỏ.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Almeida, C.E.B., Felicio, D.L., Galhardo, R.S., Cabral-Neto, J.B., Leitao, A.C., 1999. Synergistic lethal effect between hydrogen peroxide and neocuproine (2,9-dimethyl 1,10-phenanthroline) in *E.coli*. Mut. Res.-DNA Repair. 433(1): 59-66.
2. Belli, W.A., Buckley, D.H. and Marquis, R.E., 1995. Weak acid effects and fluoride inhibition of glycolysis *Streptococcus mutans* GS-5. Can. J. Microbiol. 41:785-791.
3. Cardwell, C.E., Marquis, R.E., 1999. Oxygen metabolism by *Treponema denticola*. Oral. Microbiol. Immunol. 14:66-72.
4. Cvikovitch, D. G., Boyd, D.A., Thevenot, T. and Hamilton, I.R., 1995. Glucose transport by a mutant of *Streptococcus mutans* unable to accumulate sugars via the phosphoenolpyruvate phosphotransferase system. J. Bacteriol. 177, 2251-2258.
5. Curran, T.M., Buckley, D.H. and Marquis, R.E., 1994. Quasi-irreversible inhibition of enolase of *Streptococcus mutans* by fluoride. FEMS Microbiol. Lett. 119: 283-288.
6. Duckworth, R.M., Morgan, S.N., Murray, A.M., 1987. Fluoride in saliva and plaque following use of fluoride-containing mouthwashes. J. Dent. Res. 66: 1730-1734.
7. Gibson, C.M., Mallett, T.C., Caliborne, A., Caparon, M.G., 2000. Contribution of NADH oxidase to aerobic metabolism of *Streptococcus pyogenes*. J. Bacteriol 182:448-455
8. Gressman A, 1975. The chemistry of phenolic compounds. Acad. Pres, London
9. Hamilton-Miller, J.M.T., 2001. Anti-cariogenic properties of tea (*Camellia sinensis*) J. Med. Microbiol. 50: 299-302.
10. Đỗ Tất Lợi, 1986. Những cây thuốc và vị thuốc Việt Nam. Nxb Khoa học Kỹ Thuật
11. Limsong, J., Benzavongkulchai, E., 2001. Inhibitory effect of some herbal extracts on adherence of *Streptococci*. J. Dent. Res. 80:724
12. Makimura, M., Hirasawa, M., Kobayashi, K., Indo, J., Sakanaka, S. Taguchi, T., and Otake, S., 1993. Inhibitory effects of tea catechins on collagenase activity. J. Periodontol. 74: 630-636.
13. Middleton, E.Jr., Kadaswami, C. and Theoharides, T.C., 2000. The effects of plant flavonoids on mammalian cells: implications for inflammation, heart disease and cancer. Pharmacol. Rev. 52(4): 673-751
14. Phan, T.N., Krirsch, A.M. and Marquis, R.E., 2001. Selective sensitization of bacteria to peroxide damage associated with fluoride inhibition of catalase and pseudocatalase. Oral. Microbiol. Immunol. 16 : 28-33.
15. Phan, T.N., Nguyen, P.T.M., Abranches, J. and Marquis, R.E., 2002. Fluoride and organic weak acids as respiration inhibitors for oral streptococci in acidified environments. Oral. Microbiol. Immunol. 17: 119-124.
16. Pool L.B., Claiborne, A., 1986. Interactions of pyridine nucleotide with redox forms of the flavin-containing NADH peroxidase form from *Streptococcus faecalis*. J.Biol.Chem. 261:14525-14533
17. Richards, A.J., 1993. Health effects of ingested fluoride. National Academy Press Washington D.C. USA, pp. 22-49.

SUMMARY

EFFECTS OF POLYPHENOLS FROM THE PEEL OF MANGOSTEEN (*GARCINA MANGOSTANA* L.) ON THE DENTAL CARIES PATHOGEN *STREPTOCOCCUS MUTANS*

Nguyen Thi Mai Phuong, Nguyen Thi Ngoc Dao
Institute of Biotechnology, NCST
Phan Tuan Nghia, Dang Minh Phuong
University of Natural Sciences, VNU, HN

The polyphenol content in the ethanol extract of the peel of mangosteen (MC) was about 14% of dry weight. The MC extract exhibited an inhibitory effect on glycolysis, biofilm formation, respiration by *S. mutans* GS-5 and was lethal for the cells at a concentration of as low as 0.01% with a D value (the time to kill 90% of the bacterial population) of 18 min, and killing effect was much higher at increased concentrations of the extract. The MC extract did not inhibit PTS activity of the cells, however, it inhibited NADH oxidase activity of the organism with 50% inhibition at a concentration of 0.01%. The obtained results suggest that polyphenols from the peel of mangosteen could have a potential use for development of dental health care products.

9. Dorfman, R.I. (1975), Steroid hormones, Elsevier Publishing company, Inc-NY, 7-8.

10. Emmens C. W. (1950), Hormon Assay, Academic Pres Inc. Publishers, NY, 316-424.

11. Hines, G. A., S.A. Watts (1992), "Sex steroid levels in the testes, Ovaries, and pyloric caeca during gametogenesis in the sea star *Asterias vulgaris*", Gen. Comp. Endocrinol., 87, 451-460.

12. Jayle, M. F. (1961), Analyse des steroïdes hormonaux, Mason et Cie éditeurs, Paris, 75-80.

13. Schoenmakers, H.J.N. (1979), "Invitro biosynthesis of steroids from cholesterol by the ovaries and pyloric caeca

of the starfish *Asterias rubens*", Comp. Bioch. Physiol., 63B, 179-184.

14. Varaksin, A.A. (1989), "Presence of estradiol in embryos and larva of the sea urchin *Strongylocentrotus intermedius*", Zh. Evol. Biokhim. Fiziol., 25(1), 128-129.

15. Voogt, P.A., S.J. Dieleman (1984), "Progesteron and estrogene levels in the gonads and pyloric caeca of the male sea star *Asterias rubens*: a comparison with the corresponding levels in the female sea star", Comp. Bioch. Physiol., 79A, 4, 635-639.

16. Voogt, P.A. et al. (1987), "Effects of Cd and Zn on steroid metabolism and steroid level in the sea star *Asterias rubens* L.", Comp. Biochem. Physiol. C., 86 (1): 83-89.

THÀNH PHẦN POLYPHENOL CỦA VỎ QUẢ MĂNG CỤT (*Garcinia mangostana* L.) VÀ TÁC DỤNG ỨC CHẾ SỰ SINH ACID CỦA VI KHUẨN *Streptococcus mutans* GS-5

NGUYỄN THỊ MAI PHƯƠNG¹ - PHAN TUẤN NGHĨA²

NGUYỄN THỊ NGỌC DAO¹ - ĐỖ NGỌC LIÊN²

¹Viện Công nghệ Sinh học, Trung tâm KHTN và CNQG

²Khoa Sinh học, Trường đại học KHTN, Đại học Quốc gia Hà Nội

I. MỞ ĐẦU

Các hợp chất polyphenol từ lâu đã thu hút được sự chú ý của các nhà nghiên cứu do những tính chất sinh học đặc biệt của nó [1]. Các hợp chất này có khả năng kháng khuẩn, chống oxy hoá, kìm hãm sự phát triển của các tế bào ung thư... vì vậy đã được nghiên cứu và sử dụng nhiều trong y học và dược học [3, 4, 7, 10]. Gần đây đã có một số nghiên cứu về tác dụng chống sâu răng của dịch chiết chè xanh (*Camellia sinensis* O. Kuntze.) và các dịch chiết thực vật khác [2, 5, 6, 8]. Tuy nhiên các nghiên cứu này chỉ có tính chất khởi đầu. Cơ chế tác dụng của chúng vẫn còn chưa sáng tỏ.

Các nghiên cứu gần đây của chúng tôi đã cho thấy polyphenol trong dịch chiết vỏ quả măng cụt (MC) có khả năng ức chế hàng loạt quá trình sinh lý của vi khuẩn *Streptococcus mutans* trên mảng bám răng. Một số nghiên cứu về thành phần polyphenol của MC đã phát hiện có chứa các hợp chất tanin, xanthone, mangostin [7]. Tuy vậy vai trò sinh học của các chất này chưa được nghiên cứu đầy đủ. Bài báo này trình bày các nghiên cứu phân tích thành phần polyphenol trong MC và những ảnh hưởng của chúng lên khả năng sinh acid của vi khuẩn sâu răng *Streptococcus mutans* GS-5 với mục đích tìm xem thành phần polyphenol nào của MC có tác dụng lên vi khuẩn sâu răng *S. mutans* GS-5.

II. NGUYÊN LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

1. Chuồng vi sinh vật

Chuồng vi sinh vật *Streptococcus mutans* GS-5, là quà tặng của GS. Robert E. Marquis, Đại học Tổng hợp Rochester, New York, Hoa kỳ. Chuồng vi khuẩn được giữ và cấy chuyển hàng tuần lên môi trường tryptic soy agar (TSA) của hãng Difco.

2. Nguyên liệu thực vật

Mẫu thực vật được sử dụng ở dạng tươi và khô. Nguyên liệu được chiết trong ethanol.

3. Phương pháp nghiên cứu

a. Tách các hợp chất polyphenol bằng phương pháp sắc ký lớp mỏng (SKLM)

Chất hấp thụ silicagel G, kích thước bản kính 7x13 cm, sử dụng hệ dung môi phân tích gồm:

Chloroform: ethylacetate:methanol (1: 24: 4)

n-butanol : acid acetic: nước (4:1:5)

n-butanol : acid acetic: nước (5:1: 2,5)

Benzen: methanol (95:5)

Toluen: ethylacetat: aceton: acid formic (TEAF) (5:2:2:1)

Toluen: ethylacetat: aceton: acid formic (TEAF) (5:3:1:1)

Màu sắc các vạch được quan sát dưới ánh sáng thường (AST), xông hơi NH₃ và phun thuốc thử tetrazol benzidic (TB). Các vạch sắc ký được giải hấp phụ bằng

• Nghiên cứu - Kỹ thuật

methanol và được đo quang phổ hấp thụ tử ngoại trong dải sóng từ 200 - 400nm trên máy quang phổ 8452A Diode array Spectrophotometer, Mỹ.

b. Sự giảm pH trong quá trình đường phân

Các thí nghiệm đo sự giảm pH được tiến hành như Curran và cộng sự đã mô tả [1]. Tế bào được rửa 2 lần với dung dịch muối KCl 50 mM, MgCl₂ 1 mM rồi hoà trở lại trong dung dịch muối này để đạt mật độ khoảng 2 mg trọng lượng khô tế bào/ml. pH của dịch tế bào được chỉnh đến 7,2 với KOH 1M, sau đó glucose 1% được thêm vào. Sự sụt pH do sự sinh acid trong quá trình đường phân sẽ được theo dõi sử dụng máy đo pH MP225 Mettler Toledo.

III. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

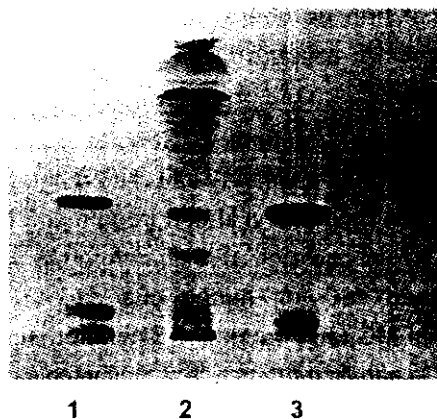
1. Tách các thành phần polyphenol MC trên SKLM

Thành phần polyphenol của MC được phân tích sử dụng SKLM trên silicagel trong các hệ dung môi khác nhau. Kết quả ở bảng 1 cho thấy trong số 6 hệ dung môi sắc ký đã sử dụng, hệ dung môi TEAF (5:3:1:1) tỏ ra có khả năng tách tốt nhất. Trên sắc ký đồ (Hình 1) quan sát được 15 vạch có độ đậm, nhạt và màu sắc khác nhau, trong khi các hệ dung môi còn lại không tách được hay chỉ tách được 4 đến 5 vạch (Bảng 1). Các vạch sắc ký thu được đều có màu vàng đến vàng nâu và đều có màu sắc đậm hơn khi xông hơi NH₃ hay phun thuốc thử TB, chứng tỏ chúng là các flavonoid (Bảng 2). Các vạch số 3, 4, 5, 8, 9, 10, 13, 14, 15 thể hiện đậm hơn các vạch còn lại. Đặc biệt vạch số 4 tương ứng với R_f 0,42 là vạch duy nhất có khả năng phát quang trong vùng tử ngoại. Ngoài ra khi so sánh với chất chuẩn catechin và epicatechin, MC cũng có vạch sắc ký với R_f tương ứng chứng tỏ MC cũng chứa những chất này.

Bảng 1. Đặc điểm sắc ký đồ của polyphenol từ dịch chiết MC

TT	Hệ dung môi	Số vạch tách được	Điều kiện phát hiện		
			AST	NH ₃	TB
1	Butanol: acid acetic: nước (4:1:5)	0	-	-	K
2	Butanol: acid acetic: nước (5:1:5)	0	-	-	K
3	Benzen: methanol (95:5)	4	+	++	++
4	Chloroform: ethylacetate: methanol (1:24:4)	0	-	-	K
5	Toluen: ethylacetat: aceton: acid formic - TEAF (5:2:1)	5	+	++	K
6	Toluen: ethylacetat: aceton: acid formic - TEAF (5:3:1:1)	15	+	++	K

K Không sử dụng. + Mức độ phản ứng với thuốc thử



Hình 1. Sắc ký đồ SKLM dịch chiết MC sử dụng hệ dung môi TEAF (5:3:1:1)

1. Catechin; 2. Dịch chiết MC; 3. Epicatechin

Bảng 2. Thành phần polyphenol của MC phân tích bằng SKLM trong hệ dung môi TEAF (5:3:1:1)

TT	R _f	Màu sắc
1	0,065	Nâu đen
2	0,270	Nâu đen
3	0,400	Vàng nâu
4	0,420	Vàng tươi
5	0,500	Vàng nhạt
6	0,560	Vàng cam mảnh
7	0,580	Vàng nâu mảnh
8	0,610	Vàng cam mờ
9	0,680	Vàng nâu đậm
10	0,700	Vàng tươi
11	0,730	Vàng nâu mờ
12	0,770	Vàng nâu đậm
13	0,800	Vàng tươi đậm
14	0,860	Vàng cam đậm
15	0,910	Vàng cam đậm

2. Quang phổ tử ngoại của các vạch SKLM trong hệ dung môi TEAF (5:3:1:1)

Các vạch sắc ký được giải hấp phụ trong methanol và được đo quang phổ tử ngoại trong dải sóng 200-400nm. Kết quả thu được ở bảng 3 cho thấy hầu hết các vạch đều có 1 đỉnh hấp thụ nằm trong vùng tử ngoại đặc trưng cho khung cơ bản của flavonoid.

Bảng 3. Quang phổ hấp thụ tử ngoại của các thành phần MC

TT	R _f	Đỉnh hấp thụ (nm)
1	0,065	288
2	0,270	290
3	0,400	286 vai 388
4	0,420	432
5	0,500	290 vai 308
6	0,560	290 vai 312
7	0,580	290 vai 314
8	0,610	312
9	0,680	314
10	0,700	316
11	0,730	314
12	0,770	300
13	0,800	306
14	0,860	310
15	0,910	300

• Nghiên cứu - Kỹ thuật

3. Hoạt tính ức chế sự sinh acid của vi khuẩn *Streptococcus mutans* GS-5 của các thành phần polyphenol MC

Streptococcus mutans và *Streptococcus sobrinus* là những tác nhân chính gây sâu răng ở người [9]. Tính chất gây sâu răng của vi khuẩn trong mảng bám răng gắn liền với cơ chế sinh acid của chúng. Vì vậy chúng tôi đã khảo sát ảnh hưởng của các thành phần polyphenol MC tách được trên SKLM lên sự giảm pH của dịch tế bào *S. mutans* GS-5. Các vạch sắc ký được giải hấp phụ bằng methanol. Sau khi ly tâm, dịch trong thu được sẽ sử dụng để kiểm tra hoạt tính ức chế sự sinh acid của vi khuẩn *S. mutans* GS-5 trong môi trường dư thừa glucose. Giá trị pH cuối cùng của môi trường phản ánh khả năng sinh acid của vi khuẩn. Với những chủng chịu acid như *S. mutans* GS-5 giá trị pH cuối cùng thường nhỏ hơn 4,0.

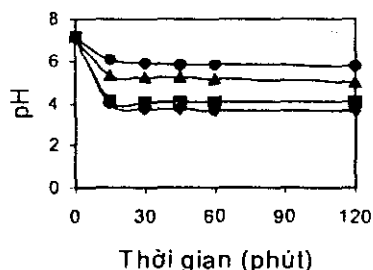
Bảng 4. Khả năng ức chế sự sinh acid của vi khuẩn *S. mutans* GS-5 của các thành phần polyphenol dịch chiết MC

TT	R _f	Hoạt tính ức chế sự sinh acid
1	0,065	-
2	0,270	-
3	0,400	-
4	0,420	-
5	0,500	-
6	0,560	-
7	0,580	-
8	0,610	-
9	0,680	-
10	0,700	-
11	0,730	-
12	0,770	-
13	0,800	++
14	0,860	+++
15	0,910	+++

++: mức độ ức chế sự sinh acid

Kết quả thu được ở bảng 4 cho thấy trong số 15 vạch được phát hiện thì chỉ có 3 vạch tương ứng với các R_f 0,80; R_f 0,86; R_f 0,91 là thể hiện hoạt tính ức chế sự sinh acid của vi khuẩn *S. mutans* GS-5 mạnh. Giá trị pH cuối cùng của vạch số 13 (R_f 0,80) là 4,5, của vạch số 14 (R_f 0,86) là 5,2 và của vạch số 15 (R_f 0,91) là 6,2 so với đối chứng là 3,8 (Hình 2).

Các vạch còn lại đều không thể hiện hay thể hiện rất yếu hoạt tính ức chế sự giảm pH. Điều này gợi ý những thành phần này đóng vai trò chính trong hoạt tính ức chế sự sinh acid ở *S. mutans* GS-5 của dịch chiết MC. Các thí nghiệm tiếp theo nhằm tinh sạch, xác định cấu trúc của các thành phần này đang được tiến hành.



Hình 2. Ảnh hưởng của các vạch sắc ký có R_f 0,80; R_f 0,86; R_f 0,91 lên sự sinh acid của vi khuẩn *S. mutans* GS-5. (♦) Đối chứng; (■) R_f 0,80; (▲) R_f 0,86; (●) R_f 0,91

IV. KẾT LUẬN

Sử dụng SKLM trên silicagel đã tách được 15 vạch flavonoid trong dịch chiết MC.

Các thành phần flavonoid tương ứng với các R_f 0,80; R_f 0,86 và R_f 0,91 có khả năng ức chế mạnh sự sinh acid của vi khuẩn *S. mutans* GS-5.

Summary

Using thin layer chromatography and a solvent system containing toluen:ethyl acetate:aceton:formic acid (TEAF) with ratio 5:3:1:1 we isolated 15 bands of flavonoids from the peel of mangosteen (*Garcinia mangostana* L.). The bands showed the specific colours and specific UV spectrum for carbon skeleton of flavonoid compounds. The bands corresponding with R_f 0,68; R_f 0,77; R_f 0,80; R_f 0,86; R_f 0,91 had stronger colour compared to the other bands. Only the band with R_f 0,42 could excite under the UV light. Three bands corresponding to R_f 0,80; R_f 0,86 and R_f 0,91 exhibited strongly the inhibition activity of acid production by *Streptococcus mutans* GS-5 in excess glucose media. The final pH value of *Streptococcus mutans* GS-5 suspension for these bands were 4.5, 5.2 and 6.2, respectively, compared to 3.9 of the control. The obtained results suggest that inhibition activity of acid production by *Streptococcus mutans* GS-5 of MC extract seems to relate to these three bands. Their structure and action mechanism are under examination.

Tài liệu tham khảo

- Curran, T.M., Buckley, D.H. and Marquis, R.E. 1994. Quasi-irreversible inhibition of enolase of *Streptococcus mutans* by fluoride. FEMS Microbiol. Lett. 119: 283-288.
- Hamilton-Miller, J.M.T. 2001. Anti-cariogenic properties of tea (*Camellia sinensis* L.) J. Med. Microbiol. 50: 299-302.
- Hoàng Thanh Hương, Hà Việt Hải, Nguyễn Danh Thục. 1999. Nghiên cứu khả năng kháng khuẩn (in vitro) của flavonoid trong lá một số loài Clerodendron thuộc họ Cỏ roi ngựa (Verbenaceae) của Việt Nam. Tạp chí Dược học. Số 9: 12-14
- Nguyễn Quốc Khang, Nguyễn Thanh Hải, Trương Văn Như. 1997. Tách chiết và thu nhận một vài thành phần flavonoid từ cây thanh hao hoa vàng (*Artemisia annua* L.). Tạp chí Dược học. Số 6: 10-13
- Nguyễn Quốc Khang, Nguyễn Đức Bách. 2002. Thăm dò phương pháp chiết rút thành phần hợp chất tự nhiên từ cây cối xay (*Abutilon indicum* L.) Tạp chí Dược học Số 2: 10-13.

Tạp chí Dược liệu, tập 8, số 4/2003 (trang 110-114)

TÁC DỤNG CỦA DỊCH CHIẾT LÁ CHÈ XANH LÊN VI KHUẨN SÂU RĂNG *STREPTOCOCCUS MUTANS*

Nguyễn Thị Mai Phương, Nguyễn Thị Ngọc Dao
Viện Công nghệ Sinh học, Trung tâm KHTN & CNQG
(Nhận bài ngày 7 tháng 5 năm 2003)

Summary

Effects of *Camellia sinensis* Leaf Extract on Dental Caries Causing *Streptococcus mutans*

Green tea (*Camellia sinensis* L.) leaves contain as high as 26% polyphenols on dry basis. Their ethanol extract (CX) showed inhibition of glycolysis, biofilm formation and respiration of the dental caries causing *Streptococcus mutans*. At concentration of 0.05%, CX suppressed about 30% oxygen consumption in glucose excessive medium and totally inhibited NADH oxidase activity of the bacteria. At concentration of 0.05%, the extract also killed the bacteria with D value of about 13 min. Combination of 0.025% CX and 0.25mM NaF blocked pH drop during glycolysis while combination of 0.05% CX with 0.02% H₂O₂ and 0.002% FeSO₄ did not augment killing of the bacteria. The results suggest that polyphenols from green tea leaves can inhibit the adherence of *S. mutans* in vitro, and may be useful for controlling dental caries.

Key words: *Camellia sinensis* L., Polyphenols, *Streptococcus mutans*, Dental Caries.

I. Mở đầu

Cho đến nay, fluor vẫn là một tác nhân chống sâu răng có hiệu quả cao và được sử dụng rộng rãi trong các sản phẩm vệ sinh và bảo vệ răng miệng. Tuy nhiên, tình trạng nhiễm fluor (fluorosis) [14] đã dẫn đến việc cần thiết phải tìm kiếm những hợp chất mới để có thể sử dụng kết hợp với fluor ở nồng độ thấp nhưng vẫn hiệu quả trong việc chống sâu răng. Theo hướng này, một loạt những hợp chất có tác dụng diệt khuẩn như các acid yếu, chlorohexidin, triclosan, paraben... đã được nghiên cứu. Ngoài ra, một số hợp chất tự nhiên được chiết xuất từ thực vật như sanguinarin, tanin, eucalyptol... cũng đã được khảo sát và có khả năng chống sâu răng [9].

Trong các dịch chiết thực vật, nhóm hợp chất polyphenol được đặc biệt quan tâm. Các hợp chất này, điển hình là các flavonoid, có tác dụng như những tác nhân kháng khuẩn, chống oxy hoá, một số khác có tác dụng ức chế quá trình phân bào của các dòng tế bào ung thư [11]. Gần đây, một số tác giả đã nghiên cứu tác dụng chống sâu răng của polyphenol trong chè xanh (*Camellia sinensis* L.)

[7,10], nhưng cơ chế tác dụng của chúng vẫn chưa được nghiên cứu sâu. Việt Nam có một số bài thuốc chữa sâu răng bằng dịch chiết thực vật được lưu truyền trong dân gian. Tuy vậy, hiệu quả cũng như cơ chế tác dụng của chúng vẫn chưa được đánh giá đầy đủ.

Để góp phần làm sáng tỏ cơ chế chống sâu răng của chè xanh, chúng tôi đã khảo sát một cách toàn diện ảnh hưởng của dịch chiết này đối với vi khuẩn *Streptococcus mutans*, một trong những chủng chủ yếu gây sâu răng ở người.

II. Nguyên liệu và phương pháp nghiên cứu

1. Chủng vi sinh vật

Chủng *Streptococcus mutans* GS-5, lấy từ phòng thí nghiệm của GS. Robert E. Marquis, Đại học Tổng hợp Rochester, New York, Hoa Kỳ, được giữ và cấy chuyển hàng tuần lên môi trường thạch (tryptic soy agar -TSA) của hãng Difco.

2. Nguyên liệu thực vật

Lá chè xanh tươi và khô được chiết trong các dung môi khác nhau là nước, ethanol, cloroform và

ethyl acetat bằng phương pháp ngâm kiệt và Soxhlet.

3. Phương pháp nghiên cứu

a. *Định tính và định lượng polyphenol toàn phần:* Polyphenol được định tính bằng FeCl_3 5% và NaOH 10% và định lượng theo phương pháp Folin-Dennis lấy acid gallic làm chất chuẩn [6].

b. *Xác định pH trong quá trình đường phân:* Các thí nghiệm đo sự giảm pH trong quá trình đường phân được tiến hành như Belli & cs mô tả [1] trên máy đo pH MP225 Mettler Toledo.

c. *Hô hấp của tế bào:* Cường độ hô hấp của tế bào được đo theo phương pháp của Caldwell & cs [2]. Dung dịch tế bào bão hoà không khí được dùng ngay để đo lượng O_2 tiêu thụ ở nhiệt độ phòng trên máy đo O_2 , WTW OXI 330, Đức.

d. *Tác dụng gây chết:* Các thí nghiệm về tác dụng gây chết được tiến hành như Phan & cs mô tả [12]. Kết quả được biểu thị bằng giá trị D (là thời gian mà 90% tế bào vi khuẩn bị chết dưới tác dụng của tác nhân cần khảo sát). Ngoài ra, còn được tính bằng giá trị LogN/No , trong đó N là số tế bào sống sót ở thời điểm thu mẫu và No là số tế bào ban đầu. Như vậy, D chính là thời điểm có $\text{LogN}/\text{No} = -1$.

e. *Hoạt tính enzym:* Dịch chiết tế bào được chuẩn bị theo phương pháp của Phan & cs [12]. Hoạt tính của NADH oxidase được xác định ở 25°C theo phương pháp của Poole và Claiborne [13]. Một đơn vị hoạt tính NADH oxidase là lượng enzym xúc tác để oxy hoá 10 mol NADH trong 1 phút ở điều kiện phản ứng.

f. *Tạo biofilm:* Biofilm của *S. mutans* hình thành trên lam kính thủy tinh được tiến hành như Curran & cs [4] đã mô tả.

III. Kết quả

1. Ảnh hưởng của phương pháp và dung môi chiết đến hàm lượng và hoạt tính của polyphenol

Polyphenol trong chè xanh có vai trò chủ yếu trong việc chống sâu răng [8]. Phương pháp chiết và dung môi chiết có ảnh hưởng khá lớn đến hoạt tính của các chất này, vì vậy, chúng tôi đã dùng phương pháp ngâm kiệt và Soxhlet với các dung môi khác nhau để so sánh. Phản ứng định tính đặc trưng của polyphenol được thử với FeCl_3 5% và NaOH 10%. Kết quả được trình bày ở bảng 1.

Bảng 1 cho thấy phương pháp Soxhlet cho hàm lượng polyphenol cao hơn phương pháp ngâm kiệt. Xét riêng phương pháp ngâm kiệt, nước và ethanol là những dung môi tốt nhất.

Bảng 1. Hàm lượng polyphenol trong lá CX chiết bằng các phương pháp và dung môi khác nhau

Phương pháp chiết	Dung môi	Phản ứng với FeCl_3 5%	Phản ứng với NaOH 10%	Polyphenol toàn phần (%)	Hoạt tính ức chế giảm pH
Soxhlet	Ethanol	Đen	Nâu	26.04	++
	Nước	Đen	Nâu	27.78	+
	Cloroform → Ethanol	Đen	Nâu	12.09	+
	Ethanol → Ethylacetat	Đen	Nâu	7.9	+
Ngâm kiệt	Ethanol	Đen	Nâu	15.9	+++

Nhưng xét về hoạt tính thì phương pháp chiết ngâm kiệt, đặc biệt là với dung môi ethanol, lại có hoạt tính ức chế sự đường phân (thể hiện ở ức chế giảm pH) của vi khuẩn *S. mutans* cao hơn. Khả năng ức chế sự giảm pH của dịch chiết thực vật đối với vi khuẩn *S. mutans* trong môi trường dư thừa glucose thường được sử dụng để kiểm tra hoạt tính kháng khuẩn của dịch chiết. Tuy phương pháp Soxhlet cho hàm lượng polyphenol cao hơn nhưng hoạt tính yếu hơn phương pháp ngâm kiệt do polyphenol đã bị phân huỷ hoặc polyme hoá dưới

tác dụng của nhiệt trong quá trình chiết.

Dựa trên các kết quả này, chúng tôi đã sử dụng dịch chiết ngâm kiệt của CX trong ethanol cho các thí nghiệm tiếp theo.

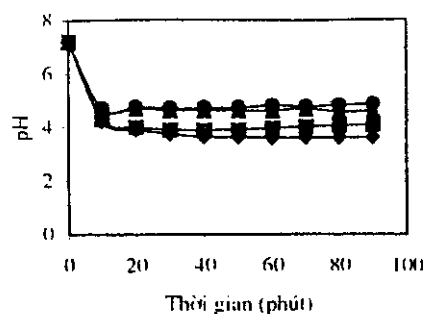
2. Tác dụng tăng cường ức chế sự đường phân của CX kết hợp với fluor

Thí nghiệm này nhằm mục đích kiểm tra khả năng tăng cường ức chế sự giảm pH trong dịch tế bào *S. mutans* của CX khi kết hợp với NaF 0,25

mM, nồng độ thấp hơn khoảng 100 lần so với nồng độ hiện đang được sử dụng trong thuốc đánh răng và cũng là nồng độ fluor được tìm thấy trong mảng bám răng. Tốc độ giảm pH phản ánh khả năng sản xuất acid của tế bào, giá trị pH cuối cùng của dịch tế bào phản ánh khả năng chống chịu acid. Đối với những chủng có khả năng chống chịu acid như *S. mutans*, giá trị pH cuối cùng thường là dưới 4,0. Kết quả đáng chú ý là công thức kết hợp CX 0,025% + NaF 0,25mM đã có tác dụng tăng cường ức chế sự giảm pH trong quá trình đường phân (hình 1). Kết quả này sẽ là những gợi ý có ý nghĩa cho việc cải thiện các sản phẩm vệ sinh răng miệng.

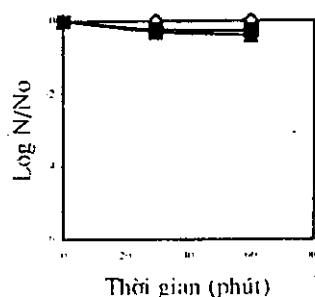
3. Tác dụng gây chết vi khuẩn của CX

Trong thí nghiệm này, tế bào được tiếp xúc trực tiếp với dịch chiết ở những nồng độ khác nhau. Hình 2 cho thấy dịch chiết có tác dụng gây chết vi khuẩn *S. mutans* và khả năng diệt khuẩn tăng dần

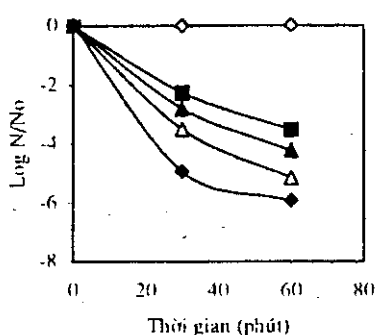


Hình 1. Tác dụng tăng cường ức chế đường phân của CX kết hợp với fluor. Đối chứng (♦), CX 0,025% (■), NaF 0,25mM (□), CX+NaF (●)

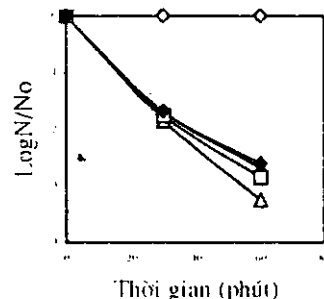
khi nồng độ các chất nghiên cứu tăng. Giá trị D đạt khoảng 13 phút đối với dịch chiết CX 0,05%. Kết hợp dịch chiết với các ion có khả năng chuyển đổi như Fe_2^+ và H_2O_2 không làm tăng khả năng diệt khuẩn (hình 2A, 2B, 2C).



A



B



C

Hình 2. Tác dụng gây chết vi khuẩn của CX

A. Đối chứng (♦), H_2O_2 0,02% (■), $FeSO_4$ 0,002% (▲); B. Đối chứng (♦), CX 0,005% (■), CX 0,01% (▲), CX 0,025% (△), CX 0,05% (◆); C. Đối chứng (♦), CX 0,005% (△), CX 0,005%+Fe (▲), CX 0,005%+ H_2O_2 (□), CX 0,005% + $FeSO_4$ + H_2O_2 (◆).

4. Ảnh hưởng của dịch chiết CX lên sự hình thành biofilm của *S. mutans*

Biofilm một lớp của *S. mutans* đều hình thành sau 6 ngày ở cả mẫu đối chứng và mẫu có 0,05% CX (ảnh 1). Tuy nhiên, ở mẫu CX sự hình thành biofilm bị ức chế một phần so với đối chứng (hình 3). Kết quả này gợi ý về vai trò ứng dụng của dịch chiết CX trong việc làm giảm sự hình thành mảng bám răng.

5. Ảnh hưởng của CX lên hô hấp của *S. mutans*

Trong môi trường dư thừa glucose, ở pH 7,0, CX đã ức chế quá trình tiêu thụ oxy của tế bào *S. mutans*. Ở nồng độ 0,025%, CX ức chế đến 30% sự tiêu thụ oxy của tế bào (hình 4). Có lẽ các dịch chiết này đã ức chế NADH oxidase - là enzym đóng vai trò quan trọng trong quá trình hô hấp của tế bào.

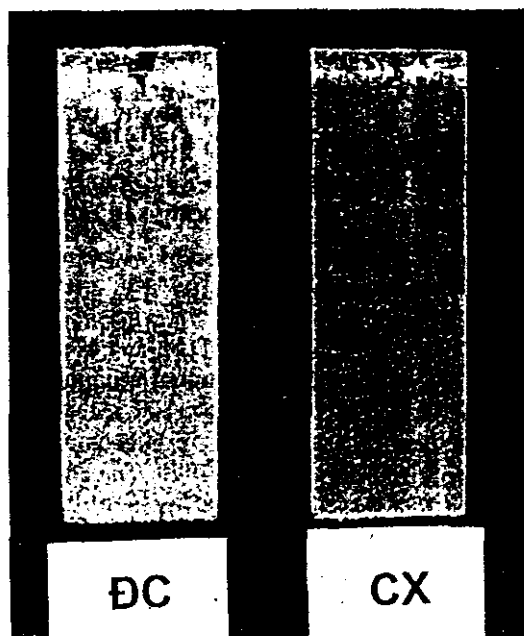
6. Ảnh hưởng của CX lên hoạt tính enzym NADH oxidase của vi khuẩn *S. mutans*

Để kiểm tra ảnh hưởng của dịch chiết CX đến

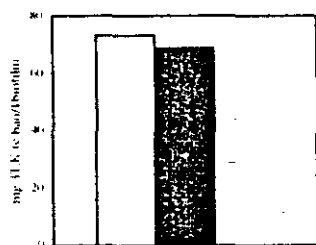
NADH oxidase, chúng tôi đã đo hoạt tính enzym này của *S. mutans* ở các nồng độ dịch chiết khác nhau. Kết quả ở hình 5 cho thấy ở nồng độ 0.05%, dịch chiết CX ức chế hoàn toàn hoạt tính của NADH oxidase. Kết quả này giải thích tại sao dịch chiết CX lại ức chế sự hô hấp của *S. mutans*.

IV. Thảo luận

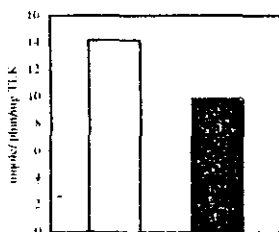
Các nghiên cứu trên đây cho thấy dịch chiết CX có tác dụng ức chế một số quá trình sinh lý, sinh hoá như quá trình đường phân hoá và sinh acid của *S. mutans*. Có lẽ các chất có trong dịch chiết đã đi qua được màng tế bào như một số acid yếu khác [1] và tác động đến một số enzym tham gia vào quá trình đường phân. Các nghiên cứu tiếp theo cần tập trung vào việc kiểm tra ảnh hưởng của CX lên một số enzym tham gia vào quá trình này như lactat dehydro genase, enolase, glyceraldehyd dehydrogenase và đặc biệt là những enzym có vai trò quan trọng trong quá trình vận chuyển đường, nằm trên màng tế bào như PTS và ATPase để kháng



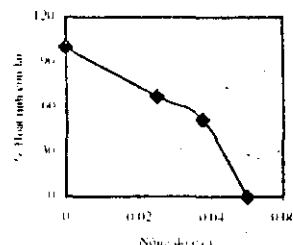
Ảnh 1. Sự hình thành biofilm của *S. mutans* trong sự có mặt của dịch chiết CX



Hình 3. Ảnh hưởng của CX lên sự phát triển của vi khuẩn *S. mutans* trên biofilm. Đối chứng (□), CX 0.025% (■)



Hình 4. Ảnh hưởng của CX lên hô hấp của vi khuẩn *S. mutans*. Đối chứng (□), CX 0.025% (■)



Hình 5. Ảnh hưởng của CX lên hoạt tính enzym NADH oxidase của vi khuẩn *S. mutans*.

định giả thiết này. Tác dụng ức chế một phần sự tạo biofilm gợi ý dịch chiết có thể đã ức chế hoạt tính của enzym glucosyltransferase, là enzym có vai trò quan trọng trong việc hình thành các polyme ngoại bào, điều kiện quan trọng để tạo thành biofilm của vi khuẩn [3]. Như vậy, ảnh hưởng của dịch chiết CX lên enzym này cần được kiểm tra để chứng minh vai trò của nó trong việc ức chế sự hình thành mảng bám răng. CX có tác dụng gây chết khá mạnh đối với *S. mutans*, nhưng khi kết hợp với các ion có khả năng chuyển đổi như Fe_2^+ và H_2O_2 với mục đích tăng tác dụng diệt khuẩn lại cho kết quả âm tính. Điều này có thể giải thích một phần là do dịch chiết CX chứa một hàm lượng rất lớn tanin, khoảng 30% [8]. Ngoài tác dụng kháng khuẩn, tanin còn có thể liên kết với rất

nhiều hợp chất khác, kể cả các nguyên tố vi lượng. Ở đây, có thể tanin đã kết hợp với Fe_2^+ và H_2O_2 làm biến đổi tính chất và làm giảm tác dụng sinh học của dịch chiết. Dịch chiết CX kết hợp với fluor ở nồng độ thấp đã ức chế sự sinh acid của vi khuẩn. Điều này có ý nghĩa ứng dụng cao để cải thiện các sản phẩm vệ sinh răng miệng.

Ở những chủng vi khuẩn gây bệnh đường miệng như *S. mutans* hay *S. sobrinus*, khả năng hô hấp liên quan chủ yếu đến hai hệ thống enzym NADH oxidase sinh H_2O_2 (Nox-1) và sinh H_2O (Nox-2) [5]. Các số liệu thu được về khả năng ức chế NADH oxidase trên đây gợi ý CX ức chế khá mạnh cả Nox-1 và Nox-2. Điều này cũng giải thích vì sao dịch chiết CX lại có tác dụng ức chế quá

trình hô hấp của vi khuẩn. Tóm lại, cơ chế kháng khuẩn của CX đối với *S. mutans* có thể do ức chế quá trình đường phân, hoạt tính NADH oxidase và hô hấp, hạn chế sự hình thành mảng bám răng và gây chết. Các nghiên cứu sâu hơn về tác động của dịch chiết này lên các enzym khác đang được tiến hành để khẳng định vai trò chống sâu răng của chè xanh.

V. Kết luận

Polyphenol trong lá chè xanh có tác dụng ức chế một số quá trình sinh lý, sinh hoá của vi khuẩn *S. mutans* trên mảng bám răng. Tuy vậy, cơ chế tác động của chúng là phức tạp và cần được tiếp tục nghiên cứu.

Tài liệu tham khảo

- 1). Belli, W.A., Buckley, D.H. and Marquis, R.E. 1995. *Can. J. Microbiol.* 41:785-791; 2). Cardwell, C.E., Marquis, R.E. 1999. *Oral. Microbiol. Immunol.* 14: 66-72; 3). Cox, S.D., Lassiter, M.O., Taylor, K.G. and Doyle, R.J. 1994. *FEMS Microbiol. Lett.* 123:331-334; 4). Curran, T.M., Buckley, D.H. and Marquis, R.E. 1994. *FEMS Microbiol. Lett.* 119: 283-288; 5). Gibson, C.M., Mallett, T.C., Caliborne, A., Caparon, M.G. 2000. *J. Bacteriol.* 182:448-455; 6). Gressman A. 1975. *The chemistry of phenolic compounds*. Acad. Press, London; 7). Hamilton-Miller, J.M.T. 2001. *J. Med. Microbiol.* 50: 299-302; 8). Đỗ Tất Lợi. 1986. Những cây thuốc và vị thuốc Việt Nam. Nhà xuất bản Khoa học Kỹ Thuật; 9). Limsong, J., Benzavongkulchai, E. 2001. *J. Dent. Res.* 80:724; 10). Makimura, M., Hirasawa, M., Kobayashi, K., Indo, J., Sakanaka, S., Taguchi, T., and Otake, S. 1993. *J. Periodontol.* 74: 630-636; 11). Middleton, E.Jr., Kadaswami, C. and Theoharides, T.C. 2000. *Pharmacol. Rev.* 52(4): 673-751; 12). Phan, T.N., Nguyen, P.T.M., Abranches, J. and Marquis, R.E. 2002. *Oral. Microbiol. Immunol.* 17: 119-124; 13). Pool LB, Claiborne (1986). *J. Biol. Chem.* 261:14525-14533; 14). Richards, A.J. 1993. *Health effects of ingested fluorride*. National Academy Press Washington D.C. USA. pp. 22-49.

Tạp chí Dược liệu, tập 8, số 4/2003 (trang 114-118)

NGHIÊN CỨU TÁC DỤNG CHỐNG STRESS VÀ CHỐNG OXY HOÁ CỦA CÂY CHÂN CHIM LEO

Nguyễn Thị Thu Hương, Nguyễn Lê Ngọc Thi, Hoàng Thị Mận, Trần Công Luận

Trung tâm Sâm & Dược liệu Tp. HCM, Viện Dược liệu

(Nhận bài ngày 14 tháng 3 năm 2003)

Summary

Studies on Antistress and Antioxidant Effects of *Schefflera elliptica* (Blume) Harms. Araliaceae

Ethanol extracts of leaves and bark of *Schefflera elliptica* have antistress effect at the oral doses of 167 mg/kg and 158 mg/kg, respectively. Both extracts possess in vitro antioxidant activity at concentrations of 50-100 µg/ml. Saponins fractionated from bark are active in antioxidation at concentrations of 5-25 µg/ml. These findings suggest that the bark seems to induce stronger effect than the leaf and that saponins may be the active components in the antioxidant activity.

Key words: *Schefflera elliptica*, Bark, Leaf, Antistress Effect, Antioxidant Activity.

I. Đặt vấn đề

Việc nghiên cứu sàng lọc các cây thuốc họ Nhân sâm (Araliaceae) có tác dụng chống stress và tăng lực được thực hiện bởi Trung tâm Sâm & Dược liệu Tp. HCM cho thấy đa số các cây

thuộc chi *Schefflera* đã thể hiện các tác dụng này khá rõ [1]. *S. octophylla* hoặc *S. leucantha* đã được nghiên cứu nhiều về thành phần hoá học và tác dụng dược lý [2] trong khi đó, loài *S. elliptica* (Chân chim leo, chân chim

NGHIÊN CỨU SỰ BIẾN ĐỔI CỦA HỆ THỐNG CYTOCHROME TRONG GAN CHUỘT NHIỄM ĐỘC YPERIT, NHIÊN LIỆU LỎNG TÊN LỬA, CARBON TETRACHLORIDE VÀ TÁC DỤNG BẢO VỆ CỦA THUỐC PHÒNG

Đỗ Thị Tuyên¹, Hoàng Công Minh²,
Nguyễn Thị Ngọc Dao¹

¹Viện Công nghệ Sinh học

²Học Viện Quân y

TÓM TẮT

Cytochrome P₄₅₀ (cytP₄₅₀) là một hemoprotein nhóm b tham gia trong quá trình oxy hóa của các loại thuốc và steroid. CytP₄₅₀ là một enzyme gắn màng nằm chủ yếu ở microsome trên màng lưới nội nguyên sinh và màng phía trong ty lạp thể. Hệ thống enzyme này nằm ở màng với tỷ lệ 1 reductase: 20 - 40 cytP₄₅₀: 3500 phospholipid. CytP₄₅₀ chuyển hóa thuốc và chất lạ phân bố ở tất cả các cơ quan của cơ thể nhưng tập trung nhiều nhất ở microsome gan. Dưới tác dụng của cytP₄₅₀, các chất độc, chất gây ung thư bị chuyển hóa trở thành những chất ít độc hoặc không độc, dễ dàng đào thải ra ngoài cơ thể, giúp cho cơ thể tránh được nguy cơ ngộ độc. Các chất yperit, nhiên liệu lỏng tên lửa (NLLTL) và carbon tetrachloride (CCl₄) đều có đặc tính chung là tạo ra hàng loạt các gốc tự do phá hủy các tổ chức tế bào và làm tổn thương đến các chức năng gan. Trong nghiên cứu của chúng tôi, các chất độc dùng để gây nhiễm độc thực nghiệm bằng 3 cách khác nhau: Yperit gây nhiễm bằng đường ngấm qua da, NLLTL gây nhiễm qua đường hô hấp và CCl₄ gây nhiễm qua đường uống. Kết quả thu được đã cho thấy: Hàm lượng cytP₄₅₀ ở cả 3 nhóm đều giảm mạnh so với nhóm đối chứng: Yperit giảm 29,3% ($p < 0,05$), NLLTL giảm 26,53% ($p < 0,001$) và CCl₄ giảm 81,56% ($p < 0,01$). Trong khi đó hàm lượng cytochrome b5 còn giảm mạnh hơn đặc biệt là ở nhóm NLLTL giảm 64,45% ($p < 0,001$). Hoạt độ aniline hydroxylase, hoạt độ peroxidase tăng ở nhóm có sử dụng NLLTL tăng 138,79% so với nhóm đối chứng và giảm ở cả hai nhóm gây nhiễm độc yperit và CCl₄. Trong khi đó hoạt độ cytP₄₅₀ reductase đều giảm đặc biệt là nhóm NLLTL giảm 39,11%. Hai thuốc phòng mà chúng tôi lựa chọn trong nghiên cứu này là dịch chiết giàu peroxidase + catalase, L - cystine + methionine và Naturenz (hỗn hợp các enzyme oxidase và các chất chống oxy hóa tự nhiên) đã cải thiện được chức năng gan giúp cho gan phục hồi sau nhiễm độc.

Từ khóa: Aniline hydroxylase, cytP₄₅₀, cytP₄₂₀, Naturenz, yperit

MỞ ĐẦU

Cytochrome P₄₅₀ (cytP₄₅₀) là một terminal oxidase của hệ monooxygenase có

trong hầu hết các tế bào sinh vật tham gia vào quá trình oxy hóa khử của cơ thể. Chúng có vai trò quan trọng trong quá trình khử độc, xúc tác hàng loạt các cơ chất có

cấu trúc rất khác nhau như steroid, thuốc, acid béo và các chất lạ đối với cơ thể... Việc nghiên cứu sự biến đổi hệ thống cytP_{450} gồm (cytP_{450} , cytP_{450} - reductase - NADPH (CPR), cytochrome b_5 (cytb_5)...) trong nhiễm độc thực nghiệm có ý nghĩa trong việc tìm hiểu tác động và mức độ độc hại lên cơ thể, sự đáp ứng của cơ thể khi bị nhiễm độc, trên cơ sở đó đánh giá tác dụng bảo vệ của một số chất có hoạt tính sinh học.

Trong nghiên cứu của chúng tôi, các chất độc dùng để gây nhiễm độc thực nghiệm gồm 3 loại chất và gây độc bằng 3 cách khác nhau:

- Yperit gây nhiễm bằng đường-ngấm qua da.
- Nhiên liệu lỏng tên lửa (NLLTL) gây nhiễm qua đường hô hấp.
- Carbon tetrachloride (CCl_4) gây nhiễm qua đường uống.

Các chất độc này có đặc tính chung là có thể năng oxy hóa cao. Trong quá trình chuyển hóa chúng tạo ra hàng loạt gốc tự do làm tổn thương nặng nề các đại phân tử của cơ thể như protein, enzyme, nucleoprotein, lipoprotein... Vì vậy, để phòng và chống độc cho cơ thể, các chất bảo vệ phải là những chất có khả năng chống oxy hóa, tăng đào thải các chất độc ra khỏi cơ thể.

ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

Đối tượng

Chuột nhắt trắng đực dòng Swiss trưởng thành do Ban chăn nuôi động vật thí nghiệm Học Viện Quân y và Viện Vệ sinh Dịch tễ Trung ương cung cấp.

Tiến hành thí nghiệm

Tổng số bao gồm 18 chuột nhắt trắng khỏe mạnh gây nhiễm độc yperit, 27 chuột gây nhiễm độc CCl_4 và 80 chuột gây nhiễm độc NLLTL. Với mỗi loại chất độc động vật thí nghiệm được chia thành 4 lô:

- Lô đối chứng: Ăn uống bình thường (ĐC).
- Lô gây độc không uống thuốc phòng (TN1).
- Lô gây độc có uống thuốc phòng 1 (TN2).
- Lô gây độc có uống thuốc phòng 2 (TN3).

Riêng nhóm gây nhiễm độc yperit chia thành 2 lô (lô đối chứng (ĐC) và lô gây độc không uống thuốc phòng (TN1)).

- Thuốc phòng được dùng là dịch chiết giàu peroxidase + catalase, L - cystine + methionine hoặc Naturenz (hỗn hợp các enzyme oxidase và các chất chống oxy hóa tự nhiên do Viện Công nghệ Sinh học nghiên cứu chế tạo). Hóa chất được cung cấp từ hãng Sigma.

- Các thí nghiệm được tiến hành với các máy móc trang thiết bị tại Phòng thí nghiệm trọng điểm Công nghệ gen - Viện Công nghệ Sinh học và Học Viện Quân y.

- Các phương pháp: Định lượng protein (Lowry *et al.*, 1951), cytochrome P_{450} (cytP_{450}), cytochrome P_{420} (cytP_{420}) (Omura, Sato, 1964), cytochrome b_5 (cytb_5) (Strittmatter *et al.*, 1978), xác định hoạt độ aniline hydroxylase (AH) (Bogaards *et al.*, 2000), cytP_{450} - reductase - NADPH (CPR) (Lu, West, 1972).

Tiến hành gây độc thực nghiệm

Thực hiện tại Khoa Độc học, Học Viện Quân y.

Gây nhiễm độc yperit

- Chuột nhắt trắng được cố định trên giá. Dùng kéo cong cắt lông chuột ở vùng lưng với diện tích $1,5 \text{ cm}^2$ sao cho bộc lộ được da chuột và tránh không làm rách hoặc xước da.

- Chuột đã cắt lông cho vào tủ thông gió. Dùng dụng cụ chuyên dùng lấy dung dịch yperit nhỏ trực tiếp lên vùng da hở đã cắt lông với liều lượng 0,1 mg/chuột. Chuột để nằm yên trên giá cố định 15 phút để cho

chất độc ngấm vào cơ thể rồi mới thả vào chuồng nuôi.

Gây nhiễm độc NLLTL cho động vật bằng đường thở

- Liều lượng chất O = 60 - 80 mg /m³ không khí.
- Chất Γ = 80 - 100 mg /m³ không khí.

Gây nhiễm độc bằng carbon tetrachloride (CCl₄)

Chuột nhắt trắng được gây nhiễm độc với CCl₄ trong hai tuần cho uống liên tiếp với liều lượng như sau:

- Tuần 1: Cho uống hỗn dịch CCl₄/dầu ăn = 1/6 (0,1 ml/1 kg TT/ngày).
- Tuần 2: Cho uống hỗn dịch CCl₄/dầu ăn = 1/5 (0,1 ml/1 kg TT/ngày).

Trong quá trình thực nghiệm lô đối chứng và lô thí nghiệm đều được nuôi dưỡng cùng một chế độ, điều kiện như nhau.

Thử nghiệm tác dụng phòng độc bằng thuốc phòng

- Chuột được uống thuốc phòng Naturenz và dịch chiết peroxidase cùng lúc với quá trình gây nhiễm độc: Naturenz liều lượng 1 viên

0,25 g/con/ngày. Dịch chiết peroxidase 0,5 ml/con/ngày.

KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU

Ảnh hưởng của yperit, NLLTL và CCl₄ lên hệ thống cytP₄₅₀ của động vật nhiễm độc thực nghiệm

Trong bài báo này chúng tôi tập trung vào hệ thống cytP₄₅₀ bao gồm (cytP₄₅₀, cytb₅, CPR)... để nghiên cứu sự biến đổi hàm lượng và hoạt độ của hệ thống cytP₄₅₀ trên cơ sở đó đánh giá tác hại của chất độc và ảnh hưởng của thuốc phòng lên các enzyme của hệ thống cytP₄₅₀.

Biến đổi hàm lượng cytP₄₅₀ ở gan chuột nhiễm độc yperit, NLLTL và CCl₄

Bảng 1 cho thấy hàm lượng cytP₄₅₀ ở cả 3 nhóm nhiễm độc yperit, NLLTL và CCl₄ không có thuốc phòng giảm mạnh so với nhóm đối chứng. Nhóm nhiễm độc yperit giảm 29,3% so với nhóm đối chứng có ý nghĩa thống kê p < 0,05. Nhóm nhiễm độc NLLTL giảm 26,53% so với nhóm đối chứng có ý nghĩa thống kê p < 0,001. Nhóm nhiễm độc CCl₄ giảm 81,56% so với nhóm đối chứng có ý nghĩa thống kê p < 0,01.

Bảng 1. Hàm lượng cytP₄₅₀ ở gan chuột nhiễm độc yperit, NLLTL và CCl₄ so với nhóm đối chứng

STT	Yperit		NLLTL		CCl ₄	
	$\bar{X}$ ($\mu\text{mol/mg protein}$)	Tỷ lệ (%)	$\bar{X}$ ($\mu\text{mol/mg protein}$)	Tỷ lệ (%)	$\bar{X}$ ($\mu\text{mol/mg protein}$)	Tỷ lệ (%)
ĐC	0,58		0,49		0,51	
TN1	0,41	↓29,3	0,36	↓26,5	0,094	↓81,5
TN2			0,45	↓8,16	0,204	↓60,0
TN3			0,51	↑4,08	0,282	↓44,7

Nhóm có uống thuốc phòng 1 và thuốc phòng 2 có sự phục hồi rõ rệt đặc biệt là

nhóm gây nhiễm độc NLLTL, hàm lượng cytP₄₅₀ tăng ngang bằng so với nhóm đối

chúng và tăng cao hơn so với nhóm gây độc không uống thuốc phòng (TN1) có ý nghĩa thống kê $p < 0,001$. Nhóm gây nhiễm độc CCl_4 có dùng thuốc phòng 1 và thuốc phòng 2 cũng thấy có sự phục hồi so với nhóm gây nhiễm độc không dùng thuốc phòng (TN1)

có ý nghĩa thống kê $p < 0,01$ (nhóm TN2) và $p < 0,05$ (nhóm TN3). Như vậy, hàm lượng cytP_{450} ở chuột gây nhiễm độc NLLTL và CCl_4 khi dùng thuốc phòng 1 và thuốc phòng 2 đều có tác dụng hạn chế từ 20% -30% sự giảm hàm lượng của enzyme cytP_{450} .

Bảng 2. Hàm lượng cytb_5 ở gan chuột nhiễm độc yperit, NLLTL và CCl_4 so với nhóm đối chứng

STT	Yperit		NLLTL		CCl_4	
	$\bar{X}$ $\mu\text{mol/mg protein}$	Tỷ lệ (%)	$\bar{X}$ $\mu\text{mol/mg protein}$	Tỷ lệ (%)	$\bar{X}$ $\mu\text{mol/mg protein}$	Tỷ lệ (%)
ĐC	1,21		1,66		1,572	
TN1	0,86	↓28,92	0,59	↓64,45	1,255	↓20,16
TN2			2,61	↑57,22	1,615	↑2,73
TN3			2,08	↑25,3	2,054	↑30,66

Biến đổi hàm lượng cytb_5 ở gan chuột nhiễm độc yperit, NLLTL và CCl_4

Trên bảng 2, hàm lượng cytb_5 ở gan chuột nhiễm độc yperit so với nhóm đối chứng giảm 28,92% có ý nghĩa thống kê với $p < 0,01$. Hàm lượng cytb_5 ở gan chuột nhiễm độc NLLTL so với nhóm đối chứng giảm 64,45% có ý nghĩa thống kê với $p < 0,001$. Hàm lượng cytb_5 ở gan chuột nhiễm độc CCl_4 so với nhóm đối chứng giảm 20,16% có ý nghĩa thống kê với $p < 0,001$.

Hàm lượng cytb_5 ở gan chuột nhiễm độc có dùng thuốc phòng 1 và 2 đều tăng lên so với nhóm đối chứng và có ý nghĩa thống kê với $p < 0,01$.

Sự giảm hàm lượng cytP_{450} và cytb_5 cũng đã được nhiều tác giả khác quan sát thấy trong những thí nghiệm gây độc thực nghiệm một số chất độc khác nhau (Nguyễn Thị Ngọc Dao *et al.*, 1997). Sự suy giảm hàm lượng các cytP_{450} , cytb_5 ở cả 3 chất độc yperit, NLLTL và CCl_4 có thể là do ức chế

tổng hợp enzyme (ức chế cả tổng hợp protein enzyme và tổng hợp hem).

Ảnh hưởng của yperit, NLLTL và CCl_4 lên hoạt độ xúc tác của hệ thống cytP_{450} của động vật nhiễm độc thực nghiệm

Xác định hoạt độ aniline hydroxylase ở gan chuột nhiễm độc yperit, NLLTL và CCl_4

Trong bảng 3, hoạt độ AH ở gan chuột nhiễm độc yperit, NLLTL đều tăng đặc biệt là nhiễm độc NLLTL tăng 2,4 lần so với nhóm đối chứng và có ý nghĩa thống kê với $p < 0,001$, còn nhiễm độc CCl_4 thì hoạt độ AH lại giảm so với đối chứng (giảm 7,13%). Điều này có thể giải thích là khi bị nhiễm các chất độc khác nhau thì có sự đáp ứng khác nhau có chất gây tăng hoạt độ cytP_{450} có chất lại ức chế hệ thống cytP_{450} (Nguyễn Thị Ngọc Dao *et al.*, 1997; Đỗ Thị Tuyên *et al.*, 2001; Okey, 1990; Omura, Sato, 1964).

Bảng 3. Hoạt độ AH ở gan chuột nhiễm độc yperit, NLLTL và CCl₄ so với nhóm đối chứng

STT	Yperit		NLLTL		CCl ₄	
	$\bar{X}$ $\mu\text{mol/mg protein}$	Tỷ lệ (%)	$\bar{X}$ $\mu\text{mol/mg protein}$	Tỷ lệ (%)	$\bar{X}$ $\mu\text{mol/mg protein}$	Tỷ lệ (%)
ĐC	1,22		1,83		1,332	
TN1	1,66	↑36,06	4,37	↑138,79	1,237	↓7,13
TN2			2,03	↑10,93	0,830	↓37,68
TN3			2,16	↑18,03	0,884	↓33,63

Xác định hoạt độ *cytP₄₅₀-reductase-NADPH (CPR)* ở gan chuột nhiễm độc yperit, NLLTL và CCl₄

Hoạt độ CPR ở gan chuột nhiễm độc yperit, NLLTL và CCl₄ đều giảm so với nhóm đối chứng có ý nghĩa thống kê $p < 0,001$. Khi dùng thuốc phòng 1 và 2 hoạt độ CPR đều tăng so với nhóm nhiễm độc: Nhóm nhiễm độc NLLTL tăng 37,8% (thuốc phòng 1), tăng 1,8% (thuốc phòng 2), nhóm nhiễm độc CCl₄ tăng 45,2% (thuốc phòng 1) và tăng 36,2% (thuốc phòng 2). Như vậy là thuốc phòng 1 và 2 hạn chế được tác hại của chất độc đặc biệt ở nhóm nhiễm độc CCl₄ có sự tăng ngang bằng với nhóm đối chứng (tăng 3,04%). Một trong những vấn đề mà chúng tôi quan tâm là tìm ra

những chất có nguồn gốc tự nhiên không độc hại có tác dụng bảo vệ cơ thể chống hiện tượng nhiễm độc, nhằm bảo vệ sức khỏe cho những người tiếp xúc với những hóa chất độc này. Nguyên tắc lựa chọn thuốc phòng của chúng tôi là dựa vào những biến đổi có thể xảy ra khi cơ thể nhiễm các tác nhân oxy hóa mạnh làm tăng tạo nhiều gốc tự do, phá vỡ các cấu trúc màng quan trọng của cơ thể. Do vậy, một hợp chất giàu peroxidase từ thực vật đã được chọn làm thuốc phòng 2 và những amino acid chứa nhiều gốc -SH có tác dụng bảo vệ gan được chọn làm thuốc phòng 1. Các số liệu nghiên cứu của chúng tôi cho thấy cả 2 thuốc phòng đều có tác dụng hạn chế làm giảm tác hại của chất độc.

Bảng 4. Hoạt độ CPR ở gan chuột nhiễm độc yperit, NLLTL và CCl₄ so với nhóm đối chứng

STT	Yperit		NLLTL		CCl ₄	
	$\bar{X}$ $\mu\text{mol/mg protein}$	Tỷ lệ (%)	$\bar{X}$ $\mu\text{mol/mg protein}$	Tỷ lệ (%)	$\bar{X}$ $\mu\text{mol/mg protein}$	Tỷ lệ (%)
ĐC	8,18		21,15		6,89	
TN1	6,04	↓26,16	13,09	↓38,11	4,89	↓29,02
TN2			18,04	↓14,7	7,1	↑3,04
TN3			13,33	↓36,97	6,66	↓3,34

KẾT LUẬN

Ở chuột bị nhiễm độc yperit, NLLTL và CCl_4 có sự giảm hàm lượng cytP_{450} , cyt_{b5} , giảm hoạt độ CPR và tăng hoạt tính đặc hiệu của cytP_{450} biểu hiện qua hoạt độ aniline hydroxylase.

Các chất phòng giàu peroxidase và Naturenz (hỗn hợp các enzyme oxidase và các chất chống oxy hóa tự nhiên) có tác dụng hạn chế phần nào tác hại của các chất độc NLLTL và CCl_4 . Công trình nghiên cứu này chính là cơ sở khoa học để chúng tôi có thể tiếp tục nghiên cứu thử nghiệm các chất chống oxy hóa trong phòng và chống nhiễm độc hóa chất có tính oxy hóa mạnh.

Lời cảm ơn: Công trình được hoàn thành với sự hỗ trợ kinh phí của đề tài thuộc Chương trình Nghiên cứu cơ bản trong Khoa học Tự nhiên ngành Khoa học sự sống.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

Bogaards JJP, Bertrand M, Jackson P, Oudshoorn MJ, Weaver RJ, Bladeren PJ, Van, Walther B (2000) Determining the best animal model for human cytochrome P_{450} activities: A comparison of mouse,

rat, rabbit, dog, micropig, monkey and man. *Xenobiotica* 30(12): 1131-1152.

Nguyễn Thị Ngọc Dao, Đỗ Thị Tuyền, Hoàng Văn Huân (1997) Sự biến đổi hàm lượng của một số cytochrome trong gan và phổi động vật gây nhiễm độc thực nghiệm. *Kỷ yếu Viện Công nghệ Sinh học*. Nhà xuất bản Khoa học và Kỹ thuật, Hà Nội: 499-503.

Đỗ Thị Tuyền, Nguyễn Thái Biêng, Nguyễn Thị Ngọc Dao (2001) Nghiên cứu ảnh hưởng của Rotundin sulfat lên cytochrome P_{450} trên chuột nhắt trắng bình thường và nhiễm độc CCl_4 . *Kỷ yếu Viện Công nghệ Sinh học*. Nhà xuất bản Khoa học và Kỹ thuật, Hà Nội: 253-260.

Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Raddall RJ (1951) Protein measurement with the folin phenol reagent. *J Bio Chem* 193(1): 263-275.

Lu Y, West S (1972) Reconstituted liver microsomal enzyme system that hydroxylates drugs, other foreign compounds, and endogenous substrates 3 properties of the reconstituted 3, 4- benzopyrene hydroxylase system. *Mol Pharmacol* 8: 490-500.

Okey AB (1990) Enzyme induction in the cytochrome P_{450} system. *Pharmac Ther* 45: 241-298.

Omura T, Sato R (1964) The carbon monoxide - binding pigment of liver microsomes I. Evidence for its hemoprotein nature. *J Bio Chem* 239: 2370-2379.

Srittmatter P, Fleming P, Connors M, Corcoran D (1978) purification of cytochrome b_5 . *Methods enzymol* 52: 97-101.

STUDYING ON CHANGES OF LIVER CYTOCHROME SYSTEM IN ANIMALS INTOXICATED BY YPERIT, ROCKET LIQUID-FUEL, CARBON TETRACHLORIDE AND THE EFFECT OF PROTECTIVE COMPOUNDS

Do Thi Tuyen¹, Hoang Cong Minh²,
Nguyen Thi Ngoc Dao^{1,*}

¹Institute of Biotechnology

²Military Medical Institute

SUMMARY

The cytochromes P_{450} (or more properly, the heme - thiolate $\text{P}_{450\text{hs}}$) are a superfamily of heme - containing proteins that catalyze the metabolism of many lipophilic endogenous substances (steroids, fatty acids fat - soluble vitamins,

* Author for correspondence: Tel: 04. 7563159, E-mail: nddao@ibt.ac.vn

prostaglandins, leukotrienes and thromboxanes) and exogenous compounds. It has been proposed that the function of P_{450} s (and other "drug - metabolizing" enzymes) is to regulate the state concentrations of endogenous ligands-modulated transcription of genes involved in growth, differentiation and maintaining homeostasis. The aim of the study was to evaluate the effect of three different toxics (rocket liquid - fuel, yperit, carbon tetrachloride) on the liver cytochromes P_{450} - dependent monooxygenase system - in white mouse (Swiss). In these animals, yperit was treated by soak into skin, rocket liquid - fuel - by respiratory way and CCl_4 - by drink. In this paper, the decreasing of cytochromes P_{450} content (namely, yperit, and CCl_4 : 29,3%, 26,53% and 81,56%, respectively) cytochrome b5 content (special, rocket liquid - fuel group: 64,45%) and cytochrome P_{450} reductase activity (special, rocket liquid - fuel group: 39,11%) in liver of intoxicated animals by these toxics have been observed. (Except for liver cytochromes P_{450} activities: For aniline hydroxylase activity - it was increased 138,79% as compared with control ones. Two protective compounds (extracted peroxidase, catalase - natural enzymes, antioxidants amino acids: L - cystine, methionine...) can inhibit the decrease of liver cytochromes P_{450} enzyme system in intoxicated animals comparing with control. The hepatoprotective effects of two protective compounds were similar regarding to the prevention of liver damage. This is the scientific base to continue our research on these compounds which will keep the body from various damage caused by chemicals and free radicals.

Key words: *Aniline hydroxylase, $cytP_{450}$, $cytP_{420}$, Naturenz, yperit*

Ngày nhận bài: 23. 07. 2003, ngày nhận đăng: 29. 12. 2003

TÁC DỤNG CỦA MỘT SỐ CHẾ PHẨM TỰ NHIÊN NATURENZ LÊN SỨC KHỎE BỆNH NHÂN BỊ PHƠI NHIỄM VỚI CHẤT DA CAM/DIOXIN

Nguyễn Thị Ngọc Dao¹, Đỗ Thị Tuyền¹
Hoàng Đình Cầu²

SUMMARY

Effects of Naturenz - A natural compound on the health of patients exposed to A.O/Dioxin

Naturenz is a mixture of plant oxidase, protease enzymes natural anti - oxidants, amino acids and some of vitamine. It has been used for therapy on dioxin exposed patients. They are examined clinical symptoms, biochemical, physiological and hemological parameters before and after the administration of Naturenz. The results showed that this preparation can improve the health of patients. A increasing of SH - group, of total hem content and of anilin hydroxylase activity in blood, a decreasing of urine urobilinogen are observed in these patients after treating.

Từ khoá : Naturenz, cytochrom_{p450}, anilin hydroxylase, A.O/dioxin.

ĐẶT VẤN ĐỀ

Ô nhiễm môi trường hiện nay là vấn đề thu hút sự quan tâm của toàn thể nhân loại. Trong đó có sự ô nhiễm bởi các chất hoá học độc hại như thuốc trừ sâu, thuốc kích thích sinh trưởng, thuốc diệt cỏ, kể cả dioxin tồn lưu sau chiến tranh. Những chất này ảnh hưởng nghiêm trọng tới sức khỏe con người cũng như nhiều sinh vật khác trên trái đất (8,9). Ngoài những biện pháp giảm thiểu sự ô

nhiễm của môi trường sống, việc tìm ra một hợp chất tự nhiên mà hợp chất này có thể được dùng như một thuốc giải độc, chống oxy hoá, để nâng cao sức khỏe hoặc hạn chế bớt phần nào tác hại của chất độc là mục tiêu của nhiều nghiên cứu (1,3).

Với mục đích này, chúng tôi đã chuẩn bị một hợp chất tự nhiên có chứa các enzym thực vật : β -caroten, SH- acid amin và các vitamin. Sau khi thử trên động vật thực nghiệm và người tình nguyện, chúng tôi nghiên cứu ảnh hưởng có lợi của một số hợp chất tự nhiên lên sức khỏe người bị nhiễm A.O/dioxin thông qua sự biến đổi những chỉ số sinh học và lâm sàng trước và sau khi điều trị.

VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

1. Đối tượng :

Tiến hành nghiên cứu trên 119 bệnh nhân bị phơi nhiễm với chất da cam/dioxin (theo xác định của uỷ ban 10 - 80 trong quá trình lập hồ sơ theo dõi và quản lý).

2. Hoá chất : Các hoá chất được cung cấp từ hãng Sigma gồm các kit xác định hoạt tính LDH, GOT, GPT, Bilirun... Chế phẩm Naturenz - hỗn hợp các enzym oxidase và các chất chống oxy hoá tự nhiên do phòng enzym học - Viện công nghệ sinh học nghiên cứu sản xuất, được bào chế dưới dạng viên nén

1. Viện công nghệ sinh học, 2. Uỷ ban 10 - 80

0,25g (tại Bộ môn bào chế Đại học Dược Hà Nội).

Các máy móc tiến hành là của Phòng công nghệ gen - Phòng thí nghiệm trọng điểm của Viện Công nghệ sinh học. Máy phân tích sinh hoá tự động được sử dụng là của labo Trung tâm - Đại học Y Hà nội và Bệnh viện Bạch Mai.

3. Các phương pháp định lượng

Định lượng protein theo Lowry (1951). Định lượng Hem toàn phần theo Falk (1964) (7). Xác định hàm lượng SH theo Ellmann (5). Các phương pháp hoá sinh khác như định lượng LDH, GPT, GOT, Bilirubin (2), phân tích máu tự động với kit chuẩn đã được sử dụng để xác định các thông số sinh lý hoá sinh của bệnh nhân ở máu và nước tiểu.

4. Phương pháp nghiên cứu

- Tiến hành lấy mẫu lần 1 : Bệnh nhân chưa dùng chế phẩm Naturenz.

Lấy máu tĩnh mạch buổi sáng chống đông bằng EDTA 0,05M.

Lấy nước tiểu tươi để định lượng Urobilinogen

- Tiến hành lấy mẫu lần 2 : Máu và nước tiểu bệnh nhân sau khi dùng chế phẩm Naturenz 2g/ngày/liên tục trong 3-6 tháng, ở giữa giai đoạn điều trị có những thời gian nghỉ 1-2 tuần.

KẾT QUẢ VÀ BÀN LUẬN

Những thay đổi về triệu chứng lâm sàng cho thấy thuốc có tác dụng khá tốt. Với mục đích tìm hiểu tác dụng của chế phẩm tự nhiên Naturenz lên hệ thống enzym khử độc của cơ thể, chúng tôi đã quan sát những biến đổi của một số thông số hoá sinh có liên quan đến sự nhiễm độc, hàm lượng gốc SH tự do, hàm lượng Hem toàn phần, các enzym của gan...

Bảng 1 : Các thông số sinh hoá và lý sinh trong máu của bệnh nhân trước và sau khi điều trị bằng chế phẩm Naturenz.

Các chỉ số	Trước điều trị (n = 71)	Sau điều trị (n = 48)	p
Protein toàn phần (BT 65 - 82g/l)	72,51 ± 4,817	79,39 ± 5,26	< 0,05
Cholesterol (BT 3,9 - 5,2 mmol/l)	5,567 ± 0,971	5,43 ± 1,07	0,506
LDH (<480 U/l)	352,48 ± 287,25	239,48 ± 62,317	<0,05
Bilirubin toàn phần (BT 17 µmol/l)	7,7 ± 7,70	9,046 ± 5,49	0,201
Bilirubin trực tiếp (BT 12,7 µmol/l)	5,05 ± 5,05	5,01 ± 2,15	0,91
Urobilinogen huyết thanh	0,20 ± 0,20	0,24 ± 0,14	0,1
Urobilinogen nước tiểu	48/71 bn (+)	24/48b/n (-)	
SGOT (nam <25U/l, nữ <2,2 U/l)	21,6 ± 1,07	23,7 ± 1,23	
SGPT (nam <29 U/l, nữ < 2,2U/l)	16,7 ± 3,1	18,1 ± 1,23	
Anilin Hydroxylase (µmol/mgprotein)	0,17 ± 0,012	0,21 ± 0,015	<0,05
SH máu (µmol/mgprotein)	0,17 ± 0,012	0,21 ± 0,015	<0,05

Sh huyết thanh ($\mu\text{mol/mgprotein}$)	$0,067 \pm 0,017$	$0,074 \pm 0,015$	$<0,05$
Hem toàn phần ($\mu\text{mol/mgprotein}$)	$0,0046 \pm 0,0012$	$0,0071 \pm 0,0012$	$<0,05$

Trong nghiên cứu này, hàm lượng SH, hàm lượng hem toàn phần và hoạt tính anilin hydroxylase tăng sau khi điều trị bằng Naturenz (từ $0,17 \mu\text{mol/mg}$) protein tăng lên $0,21 \mu\text{mol/mgprotein}$, từ $0,0046 \mu\text{mol/mgprotein}$ tăng lên $0,0071 \mu\text{mol/mgprotein}$ và từ $0,003 \mu\text{mol/mgprotein}$ tăng lên $0,075 \mu\text{mol/mgprotein}$). Kết quả này cũng phù hợp với nhiều nghiên cứu thực nghiệm trên thỏ và chuột khi gây nhiễm độc với nhiều loại hoá chất khác nhau (1,3,6). Điều này có thể lý giải rằng chế phẩm Naturenz có chứa các enzym (protease, esterase, oxidase) và các chất chống oxy hoá tự nhiên nên tạo ra các "chất bẫy" khi đưa vào cơ thể. Do đó nó sẽ giảm được một phần nào tác hại của chất độc và cải thiện sức khỏe.

Thành phần các tế bào trong máu: hồng cầu, bạch cầu, tiểu cầu và tỷ lệ huyết sắc tố hầu như thay đổi không đáng kể (bảng 2). Riêng với những thông số hoá sinh liên quan đến chức năng gan như SGOT, SGPT, bilirubin máu có thay đổi nhưng vẫn ở trong giới hạn bình thường (bảng 1). Chúng tôi quan sát các thông số này vì gan có chức năng rất quan trọng là tham gia chính vào quá trình khử độc của cơ thể. (Đặc biệt chỉ số urobilinogen nước tiểu có sự biến đổi khá rõ (trước điều trị có 48/71 trường hợp dương tính, sau điều trị bằng Naturenz có 24/28 trường hợp trở về âm tính), số liệu này cho thấy chế phẩm có sự cải thiện rõ rệt đến sức khỏe của bệnh nhân - 85,91% số bệnh nhân đã bỏ lại thành số bình thường, không còn urobilinogen trong nước tiểu).

Chức năng tạo huyết được cải thiện đáng kể, nhiều thay đổi có ý nghĩa thống kê như số lượng, thể tích và tâm phân bố hồng cầu tăng. Đặc biệt bạch cầu ái toan và bạch cầu mono thường tăng trong nhiễm độc hoá chất, kết quả sau khi điều trị bằng Naturenz đã giảm rõ rệt so với trước khi điều trị. Tác dụng của chế phẩm cũng được chứng minh trên các triệu chứng về lâm sàng như bệnh nhân ăn ngủ được, tăng cân, nhất là đối với các triệu chứng ngoài da: giảm mẩn ngứa, da mềm và sáng lên, lâu tái phát hơn so với không điều trị...

KẾT LUẬN

Chế phẩm Naturenz là một hỗn hợp các enzym thực vật (protease, esterase, oxidase) và các chất chống oxy hoá tự nhiên, các acid amin và các vitamin. Nó có tác dụng làm tăng hàm lượng nhóm - SH tự do, hàm lượng hem toàn phần, hoạt tính anilin hydroxylase trong máu và huyết thanh của bệnh nhân nhiễm độc dioxin. Các chỉ số sinh lý hoá sinh thông thường khác như protein toàn phần, SGOT, SGPT, LDH và hàm lượng bilirubin toàn phần trong máu, lượng urobilinogen nước tiểu cũng cho thấy Naturenz có tác dụng cải thiện chức năng gan, giúp nâng cao sức khỏe cho người bệnh.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Nguyễn Thị Ngọc Dao, 1981. Luận án Phó tiến sĩ khoa học trang 3 - 26.

2. Vũ Đình Vinh, Đặng Hạnh phúc, Đỗ Đình Hồ. 1974. Kỹ thuật Y sinh hoá. Trường Đại học quân y.
3. Allan B, Okey, David S. Riddick and patricia A. Harper. 1994.
4. The Ah receptor : Mediator of the toxicity of 2,3,7,8 - tetrachlorodibenzi - p - dioxin (TCDD) and related compounds. Toxicology Letters 70.pp. 1-22.
5. Ellmann G. L 1959. Arch. Bioche. Biophys. Vol. 82. Pp. 7- - 77.
6. Falk J. G. And Harry V. Gelbon. 1992.
7. Role of hymen cytochromes - p₄₅₀ in the metabolic activation of chemical carcinogens and toxins. Procc. 1st Arkansas Toxicology symposium. Dec. 1992. Pp. 165 - 183.
8. Falk, J.E. 1964. Porphyrin and metalo porphyrins. Ed Elsevier publishing company, Amsterdam. London. New Tork.
9. Lyakhovic V.V. et al. 1987. Dioxin 1987. Program II University of Nevada. Iashgas. Pp. 153 - 154.
10. Skori M. Mathuros R. Somsak R. Jutamaad S. Jisnuson S. 1999. Health effects of food contamination by PCBs and Dioxins. "International centre for environmental and industrial toxicology (ICEIT)" Chulahorn research institute. Natural. Bangkok, Thailand. Vol.9. No. 401.

4.P.5

KẾT QUẢ ĐIỀU TRỊ MỘT SỐ CỤ CHIẾN BINH QUÂN THANH XUÂN BỊ NHIỄM CHẤT DIỆT CỎ TRONG CHIẾN TRANH (AO/DIOXIN) BẰNG THUỐC NATURENZ

Trần Mạnh Hùng, Lê Thái Hằng

Ban 10-80, Bộ Y tế

Nguyễn Thị Ngọc Dao

Viện Công nghệ Sinh học, Trung tâm KHTN&CNQG

Trần Thị Mỹ Linh

Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, ĐHQGHN

ĐẶT VẤN ĐỀ

Dioxin (2,3,7,8 -Tetra Chloro Dibenzo para Dioxin) được hình thành trong quá trình sản xuất chất da cam, là chất độc sinh thái, rất bền vững, có tính độc cao đối với sức khỏe con người khi bị phơi nhiễm. Nhiều công trình nghiên cứu dịch tễ học lâm sàng của Việt Nam đã đề cập đến tác hại lâu dài của Dioxin, ngoài tác nhân gây ung thư, nhiều tác giả đã nêu ra các hội chứng liên quan đến Dioxin như: Suy giảm miễn dịch và lão hóa sớm, suy giảm hoạt động của hệ thống các tuyến nội tiết, suy giảm hoạt động của hệ thần kinh¹ (trong đó có suy giảm tuần hoàn não), suy giảm hệ thống men, các vitamin (VTM B1, C, A...), thương tổn các tế bào mầm và các gen, ở cả 2 giới, gây các tai biến sinh sản (tỷ lệ dị tật bẩm sinh cao ở thế hệ con và cháu) đặc biệt là tật nứt gai đốt sống đã được công bố².

Trong nghiên cứu về chuyển hóa và cơ chế bệnh sinh của Dioxin, nhiều công trình nghiên cứu lâm sàng và thực nghiệm đã đề cập tới quá trình Dioxin thâm nhập vào tế bào sinh các kháng thể (tự miễn)^{3,4}. ...Nhiều tác giả cũng nhận thấy là lượng gốc tự do tăng cao trong các cá thể bị phơi nhiễm đã gây ảnh hưởng nặng nề tới các màng sinh học, các đại phân tử quan trọng của cơ thể⁵.

Từ cơ sở trên, Viện Công nghệ Sinh học-TTKHTN&CNQG, trong nhiều năm qua đã nghiên cứu theo hướng tìm và khai thác các hoạt chất tự nhiên từ động thực vật để làm thuốc điều trị, với hy vọng làm giảm gánh nặng cho cơ thể bị phơi nhiễm².

Naturenz là một trong những chế phẩm đã được đưa vào thử nghiệm lâm sàng từ những năm 1999, song số lượng thử nghiệm còn chưa nhiều. Để góp phần tìm hiểu đầy đủ hơn tác dụng của thuốc, chúng tôi trình bày trong báo cáo này những nhận xét về kết quả điều trị bệnh nhân là cựu chiến binh chiến trường B (CCB-B) có tiếp xúc với CĐHH trong chiến tranh. Những cựu chiến binh này đều tiếp xúc trực tiếp trong thời gian khá dài ở vùng bị rải chất diệt cỏ và sau khi trở về miền Bắc họ đều có những vấn đề về sức khỏe.

Phương pháp và cách tiến hành điều trị đều dựa theo cách làm và theo dõi, tuyển chọn bệnh nhân như một số tác giả trước đây đã thực hiện để làm giàu thêm số liệu nghiên cứu

VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

1 – Thuốc là chế phẩm Naturenz : được bào chế dạng viên dập 0,25g hoặc viên nang nặng 0,3g của Phòng Enzym học, Viện Công nghệ Sinh học.

2 – Bệnh nhân tuyển chọn là cựu chiến binh quân Thanh xuân đã sống ở vùng bị rải CĐHH trong chiến tranh, hiện đang có bệnh mãn tính nằm trong nhóm bệnh có liên quan đến chất Da cam mà IOM Hoa Kỳ đã nêu³.

3 – Tiến hành:

Khám thực thể và làm bệnh án chi tiết cho bệnh nhân. Các cán bộ nghiên cứu là Bs nội khoa, với sự cộng tác của các GS, BS chuyên khoa đầu ngành của Viện da liễu, thần kinh, nội tiết,... Tiến hành xây dựng tiêu chuẩn đánh giá lâm sàng, nội dung các bản hướng dẫn chuyên môn.

Đối với bệnh nhân: phổ biến yêu cầu, nội quy trong quá trình điều trị, hướng dẫn cách dùng thuốc, chế độ kiêng kỵ và cách ghi chép nhận xét các triệu chứng chủ quan khi dùng thuốc vào phiếu hướng dẫn của nhóm nghiên cứu. Trong quá trình điều trị Naturenz không dùng các thuốc khác

4 – Làm xét nghiệm máu, nước tiểu, để đánh giá trước và sau đợt điều trị.

5 – Thời gian áp dụng điều trị 3 – 6 tháng (chia 2 đợt cách nhau 2 tuần).

KẾT QUẢ

Dưới đây là số liệu của 37 bệnh nhân được dùng thuốc Naturenz đều (trong gần 60 bệnh nhân tham gia) theo đúng quy định với liều từ 4 đến 6 viên/ngày trong 2 đợt và theo dõi liên tục trong 6 tháng tại Ban 10-80 (từ tháng 6/2002 đến tháng 12/2002), kết hợp làm các xét nghiệm cơ bản trước và sau điều trị.

1. Tuổi của bệnh nhân tham gia điều trị :

Tuổi	40-49	50-59	60-69	> 70	Cộng	Tỷ lệ
Nam	4	15	9	3	31	83,8%
Nữ	3	3			6	16,2%
	7	19	9	3	37	100%

2. Thời gian tiếp xúc chất diệt cỏ :

Số năm	1-2	3-4	5-6	7-8	9-10	11-13
Số người	4	14	6	6	3	4
Tỷ lệ%	10,81	37,84	16,22	16,22	8,1	10,81

3. Tai biến sinh sản của nhóm nghiên cứu

st	Các tiêu chí	Nhóm điều trị
1	Số người (CCB-B) tham gia	37
2	Số nhân khẩu trong các hộ CCB-B	179
4	Tổng số lần có thai của vợ các CCB	141
5	Số lần xảy thai	23
5	Số lần thai chết lưu (cả chữa trứng)	21
6	Số con bị Di tật bẩm sinh (DTBS) còn sống	21
7	Số con bị Di tật bẩm sinh đã chết	5
8	Tai biến sinh sản (% so với số lần có thai)	44 (31,2%)
9	Số lần đẻ con bình thường (% so với lần có thai)	71 (50,4%)
10	Tai biến sinh sản và DTBS (% so với số lần có thai)	70 (49,6%)
11	Sinh con bị DTBS so với tổng số lần có thai	26 (18,4%)
12	Tỷ lệ sinh con DTBS so với số hộ	26 (70,2%)

4. Xét nghiệm huyết học

Thông số	Bệnh nhân (n = 37)	
	Trước khi điều trị	Sau khi điều trị
Hồng cầu	4,36 ± 0,67	4,35 ± 0,62
Bạch cầu	5206 ± 1997	5514 ± 1782
BC neutrophil	63,94 ± 8,73	61,39 ± 6,45
Lymphocyte	30,71 ± 6,92	33,09 ± 0,02

5. Xét nghiệm hoá sinh: men gan

Men gan	Trước điều trị	Sau điều trị
SGOT	23,45 ± 11,14	25,48 ± 7,02
SGPT	25,2 ± 21,77	25,6 ± 12,41

6. Mô hình bệnh của bệnh nhân (so sánh trước và sau khi điều trị):

Tên bệnh	Số bệnh mắc trước điều trị	Số bệnh mắc sau điều trị	Hiệu quả điều trị tốt so với trước khi điều trị
Hệ thần kinh	19	5	14
SNTK	11		11
Tai biến mạch máu não	2	2	
Thiếu năng tuần hoàn não	2		2
Thần kinh toạ	3	3	
Rối loạn tiền đình	1		1
Bệnh ngoài da	27	6	21
Vảy nến toàn thân	2	2	
Mẩn ngứa ngoài da	11		11
RL dính đồng móng tay chân	1		1
Sạm da, da dày	2		2
Tóc rụng	3		3
Bạch biến da	2	2	
U ngoài da	1		1
Nấm da đầu	3		3
Sùi da tai	2	2	
Cơ quan thị giác	1	1	
Teo gai thị 2 bên, đục thủy tinh thể	1	1	
Hệ tiêu hoá	21	7	14
Viêm đại tràng	3		3
Viêm loét hành tá tràng	9	2	7
Tỉ	2	2	
Táo bón	4		4
Viêm gan	3	3	
Hệ tuần hoàn	15	8	7
Cao huyết áp	6	4	2
Huyết áp thấp	4	3	1
Rối loạn dẫn truyền tim	3		3
Thiếu năng vành	2	1	1
Hệ hô hấp	7	2	5
Viêm họng mãn	1		1
Viêm mũi dị ứng	2		2
Viêm xoang mãn	2	2	
Viêm phế quản mãn	2		2
Nội tiết	3	3	
Đái tháo nhạt	1	1	
Đái tháo đường	1	1	
Phù không rõ nguyên nhân	1	1	
Cơ xương khớp	13	10	3
Thấp khớp mạn	6	3	3
Vôi hoá cột sống	5	5	
Viêm đa khớp dạng thấp	2	2	
Hệ sinh dục - tiết niệu	10	2	8
Nước tiểu đục	2		2
Đau lưng	5		5
Nấm da bìu	1		1
Sỏi thận	2	2	
Chấn thương	1	1	
Chấn thương đầu để lại di chứng rối loạn thần kinh	1	1	
Cộng	117	45	72

NHẬN XÉT

Gần 40 bệnh nhân được dùng thuốc Naturenz với liều từ 4 đến 6 viên tương đương 1-1,5 gam/ngày trong 2 đợt và theo dõi trong 6 tháng tại Ban 10-80 (từ tháng 6/2002 đến tháng 12/2002), kết hợp làm các xét nghiệm cơ bản trước và sau điều trị.

A - Tình trạng chung bệnh nhân

Bệnh nhân đều là những CCB đã chiến đấu ở chiến trường miền Nam và có tiếp xúc với CĐHH lâu năm: người ít nhất là 1 năm, người lâu nhất 13 năm, trung bình trong nhóm là 5,3 năm.

Sau khi trở về miền Bắc mới lập gia đình, những gia đình này có tỷ lệ tai biến sinh sản trên tổng số lần có thai rất cao (31,2%).

Tỷ lệ sinh con dị tật bẩm sinh trên tổng số lần có thai là 18,4%, Bình quân con bị DTBS trên số hộ chiếm tới 72,2%

Tình trạng sức khỏe trước khi điều trị tỷ lệ bệnh tật cao, mắc nhiều bệnh mãn tính (trung bình 3,1 bệnh/1 người). Những bệnh mãn tính có tỷ lệ cao là: viêm da mãn tính, mẩn ngứa dị ứng, vảy nến, SNTK, viêm TK ngoại biên, cao huyết áp, viêm dạ dày tá tràng, viêm đại tràng

Sau điều trị số lượng bệnh giảm (bình quân còn 1,6 bệnh / 1 người).

B – Về lâm sàng

Thuốc có tác dụng tốt nhất với bệnh ngoài da (viêm da dạng dị ứng, sạm da), Trước khi điều trị 27 người mắc thì sau điều trị 20 người đã đỡ hoặc khỏi bệnh

Những bệnh của đường tiêu hoá sau điều trị đa số thuyên giảm như bệnh viêm đại tràng, táo bón gần như khỏi không còn triệu chứng lâm sàng.

Bệnh nhân bị "Hội chứng suy nhược thần kinh" có sự tiến bộ rõ rệt, bệnh nhân ăn ngủ tốt

KẾT LUẬN

Thuốc không độc, không gây tác dụng phụ trên 100% số bệnh nhân tham gia .

Thuốc có tác dụng tốt đối với một số nhóm bệnh, đặc biệt bệnh ngoài da (dạng viêm da dị ứng), Hội chứng suy nhược thần kinh (SNTK), viêm đại tràng mãn, tác dụng toàn thân như ăn ngủ tốt, bệnh nhân lên cân

Các chỉ số xét nghiệm trong nhóm nghiên cứu này không thấy thay đổi có ý nghĩa thống kê

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Chất diệt cỏ trong chiến tranh tác hại lâu dài đối với con người và thiên nhiên
2. Báo cáo Hội thảo Quốc tế lần thứ II - tháng 11/1993, Hà nội
3. Report of the Australian Expert Committee into the possible connections between exposure to Herbicides in Vietnam and Spina Bifida in children of Vietnam Veterans – 1996
4. Le CIM-10 code, OMS -1993. Vol.1, pp 858
5. Dioxin 2000 – 20th International Symposium on Halogenated Environmental Organic Pollutants and Persistent Organic Pollutants (POPs)- Monterey, Canifornia, USA.Vol. 48. Editor and Publisher : Dr Michael S. Denison, University of California, Davis, CA,USA.
6. Veterans and Agent Orange, UPDATE 2000. Committee to Review the Health Effects in
7. Vietnam Veterans of Exposure to Herbicides, Division of Health Promotion and Disease Prevention INSTITUTE OF MEDICINE, National academy Press April, WASHINGTON, D.C. 2001

SUMMARY

THE THERAPY RESULTS OF SOME VETERANS WHO EXPOSED TO DIOXIN IN THE WAR LIVING IN THANH XUAN DISTRICTS BY "NATURENZ"

Tran Manh Hung, Le Thai Hang
10-80 Division Ministry of Health
Nguyen Thi Ngoc Dao
Institute of Biotechnology, NCST
Tran Thị My Linh
Hanoi National University

37 army veterans exposed to Dioxin living in Ha noi Thanh xuan District were treated by Naturenz-a natural enzyme and antioxidant compound (product of Institute of Biotechnology-NCST) in a duration of 6 months. These patients have been tested the biochemical parameters, clinical symptoms before and after therapy. The results showed that Naturenz can improve health situation of patients after using 1-1,5 gramm Natrenz per day for 3-6 months (with 2 weeks break) .The best results were recognized by disease groups following: Dermatosis, Nervous system, Digestion system. Most of patients have deeper sleeping and increasing of body weight. This natural enzymes compound hasn't any bad action for health.

2.0.9

NGHIÊN CỨU ẢNH HƯỞNG CỦA SILYMARIN LÊN HỆ THỐNG ENZYM CYTOCHROM P₄₅₀ Ở GAN THỎ THUẦN CHỦNG *NEW ZEALAND WHITE*

Đỗ Thị Tuyên, Lê Thị Lan Oanh, Nguyễn Thị Ngọc Dao

Viện Công nghệ Sinh học, Trung tâm KHTN&CNQG

Đào Thị Mai Anh

Trường Đại học Dược Hà Nội

ĐẶT VẤN ĐỀ

Bệnh viêm gan là một trong những loại bệnh nguy hiểm đang phát triển trên toàn cầu. Bệnh viêm gan siêu vi B là bệnh gan phổ biến nhất, khoảng 5% dân số thế giới có mang loại virus này. Hàng năm, trên thế giới có khoảng 1 triệu người chết vì xơ gan và ung thư gan. Vì vậy việc tìm ra các loại dược liệu có sẵn trong thiên nhiên để phòng trừ căn bệnh này đang được quan tâm rất nhiều. Các chế phẩm thuốc từ nguồn dược liệu này ít gây phản ứng phụ và có tác dụng chống oxy hoá rất cao, nâng cao khả năng miễn dịch, bảo vệ và phục hồi các tế bào bị tổn thương.

Silymarin được chiết xuất từ cây cúc gai (*Silybum marianum*) đã được nghiên cứu nhiều do silymarin có khả năng chống oxy hoá và tăng cường chức năng khử độc của gan. Ở Đức, silymarin đã được đưa vào thuốc để điều trị cho những bệnh nhân bị viêm gan mãn tính. Nhiều nghiên cứu đã cho rằng silymarin có những dấu hiệu bảo vệ và phục hồi chức năng gan [3, 9].

Dựa trên cấu trúc hoá học thì silymarin có thể là cơ chất của hệ thống enzym cytP₄₅₀. Chính vì vậy để hiểu rõ hơn về cơ chế tác động và chuyển hoá của silymarin qua gan như thế nào. Chúng tôi tiến hành nghiên cứu ảnh hưởng của silymarin lên hệ thống cytP₄₅₀ ở gan thỏ thuần chủng *New Zealand White*.

NGUYÊN LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU**Nguyên liệu**

- Thỏ trắng đực thuần chủng *New Zealand White* do trung tâm nghiên cứu dê thỏ Ba Vì cung cấp, trọng lượng trung bình từ 2,2- 2,5kg.

- Silymarin tinh khiết là chế phẩm được cung cấp từ đề tài nhánh của đề tài cấp nhà nước KC04- 17.

Hoá chất và trang thiết bị

- Các hoá chất cần thiết cho thí nghiệm như: NaCl 0,9%, đệm NaP 0,1M pH 7,4, dithionit, NADH, cytochrom C, NADPH, anilin, phenol, KCN, đệm Tris acetat 0,2M pH 8,0, đệm Tris HCl 0,2M pH 7,7, natriphenobarbital...

- Các kit chuẩn để làm các chỉ tiêu về enzym GOT và GPT

- Các máy móc tiến hành của phòng thí nghiệm trọng điểm Công nghệ Gen của Viện Công nghệ Sinh học: máy nghiền đồng thể (homogenisator), máy ly tâm lạnh (Sorvall RC 26 plus (Mỹ)), máy phá tế bào bằng siêu âm (sonicator) (hãng Misonic- Mỹ), quang phổ hồng tử ngoại hai chùm tia: Shi madzu spectrum UV probe (Nhật), hệ thống tạo khí CO₂ từ hút...

Phương pháp nghiên cứu**Phương pháp gây phản ứng tổng hợp**

- Gây tổng hợp cảm ứng enzym theo phương pháp thông thường: trong 5 ngày liên tiếp, tiêm bắp đối với natriphenobarbital (NaPB) liều lượng 50mg/kgthể trọng, uống đối với silymarin liều lượng 50mg/1kgthể trọng (silymarin được hoà vào 0,5 ml 0,5% carboxymethyl cellulose sau đó thêm nước đến nồng độ cần thiết).

- Tiến hành vào một thời điểm nhất định là 8 giờ sáng

- Lô đối chứng tiêm nước muối sinh lý 0,9%.

- 24 giờ sau liều tiêm hoặc uống cuối cùng thì tiến hành mổ lấy nhanh gan để tách chiết enzym. Thỏ nhịn ăn một ngày trước khi mổ.

Các phương pháp định lượng

- Xác định hàm lượng cytb₅ theo phương pháp Schenkman (1973) [8] - sử dụng NADH làm chất khử.
- Định lượng cytp₄₅₀ theo Omura và Sato (1964 -1967) phương pháp quang phổ phân biệt dựa vào trạng thái khử so với trạng thái oxy hoá có sự khử CO [7].
- Xác định hoạt độ anilin hydroxylase theo phương pháp của Imai và cộng sự (1974) có cải tiến [5].
- Xác định hoạt độ của cytp₄₅₀ reductase theo Lu và West (1972) [4].
- Xác định hoạt độ của peroxidase có sử dụng tetra methyl benzidin làm cơ chất (theo sự cải tiến của PGS. TS. Nguyễn Thị Ngọc Dao) [1].
- Các kết quả thu được đều được xử lý thống kê bằng các hàm AVERAGE (trung bình), STDEV (phương sai), TTEST (so sánh hai trung bình)... của phần mềm Excel 2000.

KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Chúng tôi tiến hành lấy huyết thanh để xác định các nồng độ enzyme GOT và GPT. Kết quả đã chỉ ra rằng: các enzyme GOT và GPT ở nhóm gây cảm ứng tổng hợp silymarin không thay đổi so với nhóm đối chứng điều đó chứng tỏ silymarin không gây tổn thương đến tế bào gan. Điều này cũng phù hợp với một số nghiên cứu của các nhà khoa học trên thế giới và silymarin đã được đưa vào thuốc để điều trị cho các bệnh nhân bị viêm gan mãn tính [9].

Hoạt độ anilin hydroxylase ở gan thỏ

Kết quả ở bảng 1 cho thấy hoạt độ anilin hydroxylase ở nhóm có dùng natriphenobarbital và silymarin đều tăng rất cao so với nhóm đối chứng. Hoạt độ anilin hydroxylase tăng 122,39% ở nhóm gây cảm ứng tổng hợp natriphenobarbital so với nhóm đối chứng và 24,4% ở nhóm gây cảm ứng tổng hợp bởi silymarin so với nhóm đối chứng. Theo một số nhà nghiên cứu thì khi tiêm một liều lượng natriphenobarbital vào chuột, thấy hoạt tính của hệ thống cytp₄₅₀ tăng hàng chục lần.

Trong nghiên cứu của chúng tôi, với mục đích dùng natriphenobarbital làm nhóm đối chứng, thỏ được gây cảm ứng tổng hợp bằng natriphenobarbital hoạt độ anilin hydroxylase tăng 122,39% so với nhóm đối chứng. Điều đó có nghĩa là natriphenobarbital đã tổng hợp cảm ứng isozym của hệ thống cytp₄₅₀. Như vậy natriphenobarbital đã cảm ứng tổng hợp ra isozym ở hệ thống cytp₄₅₀ và tổng hợp ra isozym thứ 2 [1]. Khi thỏ được gây cảm ứng tổng hợp bởi silymarin, hoạt độ của anilin hydroxylase tăng 24,4% so với nhóm đối chứng, sự thay đổi này có ý nghĩa thống kê ($p < 0,05$).

Hoạt độ cytochrom P₄₅₀ reductase

Thành phần thứ 2 của hệ thống cytp₄₅₀ là một flavoprotein thường được gọi là NADPH- cytp₄₅₀ reductase hay cytochrom P₄₅₀- reductase [8]. Chức năng của enzyme này là chuyển điện tử từ NADPH đến cytp₄₅₀. Hoạt tính của cytp₄₅₀- reductase thường được đo bằng sự khử của các chất nhận điện tử như cytochrom C hoặc đo trực tiếp bằng sự khử của cytp₄₅₀. Kết quả thu được ở bảng 2 cho thấy hoạt độ của cytp₄₅₀- reductase tăng 158,5% ở nhóm được gây cảm ứng tổng hợp bằng natriphenobarbital và tăng 80,03% ở nhóm silymarin so với nhóm đối chứng, sự thay đổi này có ý nghĩa thống kê $p < 0,05$. Rõ ràng silymarin có ảnh hưởng rõ rệt làm tăng hoạt độ của cytp₄₅₀- reductase, tức là làm tăng hoạt độ của hệ thống cytp₄₅₀. Kết quả này cũng phù hợp với kết quả thu được ở bảng 1. Hoạt độ enzyme anilin hydroxylase được tính theo hàm lượng p- aminophenol tạo thành từ anilin. Phản ứng oxy hoá anilin được xúc tác bởi cytp₄₅₀, cytc, cytp₄₅₀- reductase. Khi hàm lượng và hoạt độ cytp₄₅₀- reductase tăng sẽ làm tăng hoạt tính enzyme anilin hydroxylase và làm cho phản ứng oxy hoá anilin diễn ra nhanh hơn và làm tăng hàm lượng p- aminophenol được tạo thành.

Hàm lượng cytp₄₅₀ ở gan thỏ

Kết quả bảng 3 cho thấy, hàm lượng cytp₄₅₀ ở nhóm được gây cảm ứng

Bảng 1. Hoạt độ anilin hydroxylase ở gan thỏ của nhóm thí nghiệm so với nhóm đối chứng

Nhóm nghiên cứu	n	Hoạt độ anilin hydroxylase X $\pm$ SD (μ mol/mgpr)	tỉ lệ (%)	P
Đối chứng	5	1,5 $\pm$ 0,65	100	
Natriphenobarbital	5	3,34 $\pm$ 0,76	222,39	< 0,01
Silymarin	5	1,87 $\pm$ 0,03	124,4	< 0,05

Bảng 2. Hoạt độ cytochrom P₄₅₀ reductase ở gan thỏ của nhóm thí nghiệm so với nhóm đối chứng

Nhóm nghiên cứu	n	Hoạt độ cytochrom P ₄₅₀ X $\pm$ SD (μ mol/mgpr)	Tỉ lệ (%)	P
Đối chứng	5	8,62 $\pm$ 2,06	100	
Natriphenobarbital	5	22,29 $\pm$ 2,65	258,5	< 0,01
Silymarin	5	15,52 $\pm$ 2,19	180,03	< 0,05

Bảng 3. Hàm lượng cytp₄₅₀ ở gan thỏ của nhóm thí nghiệm so với nhóm đối chứng

Nhóm nghiên cứu	n	Hàm lượng cytp ₄₅₀ X $\pm$ SD (η mol/mgpr)	tỉ lệ (%)	P
Đối chứng	5	8,85 $\pm$ 0,7	100	
Natriphenobarbital	5	15,8 $\pm$ 1,58	178,53	< 0,05
Silymarin	5	8,55 $\pm$ 0,7	96,61	> 0,05

natriphenobarbital tăng 78,53% so với nhóm đối chứng và sự thay đổi này có ý nghĩa thống kê với $p < 0,05$. Điều này phù hợp với một số nhà nghiên cứu cho rằng natriphenobarbital gây cảm ứng tổng hợp isozyim số 2 của hệ thống cytP₄₅₀. Khi gây cảm ứng tổng hợp bằng silymarin thì hàm lượng của cytP₄₅₀ lại không tăng mà gần như không có gì thay đổi so với nhóm đối chứng.

Hàm lượng cytb₅ ở gan thỏ

Kết quả bảng 4 đã cho thấy khi dùng silymarin gây cảm ứng hàm lượng cytb₅ giảm 8,01% so với nhóm đối chứng nhưng sự thay đổi này không có ý nghĩa thống kê với $p > 0,05$. Cytb₅ có bản chất là một hemoprotein, là một thành phần luôn đi kèm với hệ thống cytP₄₅₀ và có vai trò

quan trọng trong quá trình khử độc của cơ thể. Nó là chất cạnh tranh với cytP₄₅₀ reductase hoặc là chất gây hiệu ứng (effector) có tác dụng kiểm soát quá trình chuyển hoá các xenobiotic. Do đó, song song với việc xác định hàm lượng các cytP₄₅₀, chúng tôi tiến hành định lượng cytb₅. Nguyên nhân làm giảm hàm lượng cytb₅ ở gan thỏ được gây cảm ứng bởi silymarin có thể do ức chế tổng hợp enzym (cả ức chế tổng hợp protein và tổng hợp hem). Các phương pháp định lượng đều đưa vào trạng thái khử và oxy hoá sắt nằm trong phân tử cytochrom. Vì vậy cần phải tiến hành nghiên cứu thêm cả sự tổng hợp protein-enzym và tổng hợp Hem để tìm nguyên nhân suy giảm hàm lượng cytb₅.

Hoạt độ peroxidase ở gan thỏ

Kết quả bảng 5 cho thấy hoạt độ peroxidase ở nhóm gây cảm ứng tổng hợp natriphenobarbital và silymarin đều tăng hơn 20% so với nhóm đối chứng. Điều này có thể giải thích là khi cơ thể được đưa một lượng natriphenobarbital hay silymarin (xenobiotic) do đó cơ thể đối phó bằng cách tăng cường các cơ chế bảo vệ mà một trong các cơ chế đó là tăng tổng hợp hoặc tăng cường hoạt động của các enzym khử độc để chống lại các chất lạ xâm nhập vào cơ thể.

KẾT LUẬN

Silymarin là một dược liệu được dùng làm thuốc để chữa trị các bệnh viêm gan mãn tính. Do đó để hiểu rõ cơ chế tác động của chúng lên hệ thống enzym khử độc của gan là một việc hết sức cần thiết. Trong bài báo này, chúng tôi tiến hành nghiên cứu ảnh hưởng của silymarin lên hệ thống enzym cytochrom P₄₅₀ trên gan thỏ thuần chủng và kết quả cho thấy hoạt độ của hệ thống cytP₄₅₀ (hoạt độ anilin hydroxylase, hoạt độ cytP₄₅₀ reductase, hoạt độ peroxidase) tăng sau khi được gây cảm ứng tổng hợp bởi natriphenobarbital và silymarin. Tuy nhiên hàm lượng cytP₄₅₀ không thay đổi, hàm lượng cytb₅ giảm ở nhóm gây cảm ứng bởi silymarin. Như vậy, silymarin được gây cảm ứng bằng đường uống đã làm tăng khả năng khử độc của gan thông qua tăng khả năng hoạt động của hệ thống cytP₄₅₀.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Nguyễn Thị Ngọc Dao, 1981. *Biến đổi chọn lọc hoá học Cytochrom - P450 bằng Fluoresceinisothiocyanidz*. Luận án phó tiến sĩ khoa học, Berlin.
2. Hoàng Thái Biền, 2002. *Nghiên cứu ảnh hưởng của rotundin sulfat lên hệ thống enzym cytP₄₅₀ ở động vật thực nghiệm*. Luận văn Thạc sĩ y học, Bộ Giáo dục và Đào tạo Bộ Quốc phòng.
3. Liliana F and Victor PA, 1997. *Comparative effects of colchicine and silymarin on CCl₄- chronic liver damage in rats*. Arch. Med. research. Vol 28. No. 1, pp. 11-17.
4. Lu AYH and West S, 1972. *Molecular pharmacol.* Vol. 6. pp. 201-209.
5. Imai Y and Sato R, 1974. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* Vol. 60. pp. 8.
6. Omura T and Sato R, 1967. *Methods in enzymology*. Vol 10. pp 555.
7. Rita B, 2002. *Cytochromes P₄₅₀ systems: classification and reaction mechanisms*, FEBS Advanced course 2002. Cytochrom P₄₅₀ systems: from structure to application. Kranjska, Slovenia, pp 1-6.
8. Shenkman, J. B. et al. 1973. *Drug metabol. Dispos.* Vol. 1. pp. 111.
9. Zuber R, Modriansky M, Dvorak Z, 2002. *Effect of silybin and its congeners on human liver microsomal cytochrom P₄₅₀ activities*. Phytother Res 2002, Nov; 16(7): 632-638.

SUMMARY

STUDY OF THE EFFECT OF SILYMARIN ON CYTOCHROME P₄₅₀ ENZYME SYSTEM IN
NEW ZEALAND WHITE RABBIT LIVER

Do Thi Tuyen, Le Thi Lan Oanh, Nguyen Thi Ngoc Dao
Institute of Biotechnology, NCST
Dao Thi Mai Anh
Ha noi College of Pharmacy

Silymarin - a medicine extracted from *Silybum marianum*- is, nowadays, generally used for chronic liver damage in Germany. Our study focuses on its effect on cytP₄₅₀, the body most important detoxification enzyme system. Experiment was carried out in *New Zealand white* rabbit liver. The results showed that activities of cyt P₄₅₀ system (including activities of anilin hydroxylase) as well as the activity of peroxidase in Silymarin induced group increased higher than the controls while the concentrations of cytP₄₅₀ and cytb₅ were unchanged or lower. Thus, we think that Silymarin may induce cytP₄₅₀ reductase (CPR), the second important factor of cytP₄₅₀ system and by this way it could protect hepatic cells as well as improve their functions.

(This work was supported from the KC04- 17 national project)

Nghiên cứu khả năng chống oxy hoá của dịch chiết lá Neem ở gan chuột bị nhiễm độc CCl_4

Đỗ Thị Tuyền*, Nguyễn Hữu Khoa, Nguyễn Thị Ngọc Dao
Viện Công nghệ Sinh học, Viện KH&CNVN

MỞ ĐẦU

Cây neem (*Azadirachta indica*) thuộc họ Xoan Meliaceae, bộ Cam Rutales có nguồn gốc từ Ấn Độ. Năm 1981 cây neem được GS. Lâm Công Định nhập về Việt Nam và đem trồng ở vùng Ninh Phước, Ninh Thuận. Hiện nay nhiều công trình nghiên cứu đã cho thấy cây neem có nhiều hoạt tính sinh học quan trọng như kháng khuẩn, kháng nấm, chống viêm, điều hoà miễn dịch, chống oxy hoá. Dịch chiết bằng nước lá neem có thể ức chế sự phát triển khối u ác tính từ tế bào vảy niêm mạc miệng, khối u này phát triển là nhờ chất 7, 12-dimethylbenzanthracene (DMBA) cảm ứng, về mặt cơ chế phản ứng nó liên quan đến quá trình điều hoà hệ thống cơ chất- enzyme glutathione, GR, GPx. Dịch chiết lá neem cũng kiểm chế tốc độ phản ứng peroxide hoá lipid và tăng cường hoạt tính các enzyme giải độc và chống oxy hoá trong tế bào gan, dạ dày [1,2].

Bhanwra và cộng sự [1] thấy dịch chiết lá neem bằng nước có thể bảo vệ gan chuột tránh bị hoại tử do cảm ứng paracetamol. Hiện nay trên thị trường đã có bán một số sản phẩm từ cây neem như: oil neem, organic neem tea, Organic neem leaf capsules [1]. Mặt khác, dịch chiết lá neem còn ngăn ngừa sự phá huỷ gan do hàm lượng và hoạt tính các enzyme aspartat- alanin- aminotransferase và γ -glutamyl transpeptidase tăng mạnh. Hoạt tính chống oxy hoá của dịch chiết hạt neem cũng được giải thích *in vivo* trong quá trình nảy mầm của hạt khi nó làm giảm hoạt tính lipooxygenase là enzyme cảm ứng quá trình peroxide hoá lipide. Một chất chống oxy hoá đã được phân lập từ hạt neem và có khả năng ức chế hiệu quả các lipooxygenase ở thực vật [3].

Các nghiên cứu trên chứng tỏ dịch chiết lá neem có khả năng "bẫy" các gốc tự do, ức chế có hiệu quả quá trình peroxy hoá lipide trên cơ thể động vật bị nhiễm độc. Việc đánh giá khả năng chống oxy hoá của dịch chiết lá neem trên động vật bị nhiễm độc CCl_4 là một mô hình đánh giá tác dụng chống độc, chống oxy hóa có hiệu quả và khá đơn giản, phổ biến. Nghiên cứu này góp phần làm rõ hơn tác dụng sinh lý học của lá neem một dược liệu quý có thể mọc tốt ở các tỉnh phía nam nước ta.

NGUYÊN LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

Nguyên liệu

Chuột nhắt trắng đực dòng Swiss trưởng thành, từ 4-5 tuần tuổi, khoẻ mạnh, có trọng lượng 22 ± 2 gam được cung cấp từ Ban chăn nuôi, Học viện Quân y Hà Nội. Lá neem được thu hái ở Châu Đốc năm 2003.

Các hóa chất cần thiết cho thí nghiệm như: horseradish peroxidase (HPO) chuẩn, thiobarbituric acid (TBA) tetramethyl benzidin (TMB), NaCl, Na_2HPO_4 , KH_2PO_4 , K_2HPO_4 , NaH_2PO_4 , tris base, pyridin, n- butanol, xanthine oxidase, xanthine, cytochromC, superoxide dismutase chuẩn, NaOH được cung cấp từ hãng Sigma.

* Email: dothituyen2003@yahoo.com; Tel:04 7563159

Động vật thực nghiệm được phân nhóm một cách ngẫu nhiên thành 4 nhóm: nhóm đối chứng uống dịch sinh lý NaCl 0,9%, nhóm gây độc uống CCl_4 , nhóm gây độc uống CCl_4 + dịch chiết lá neem, nhóm uống dịch chiết lá neem.

Tiến hành gây độc thực nghiệm: Gây nhiễm độc bằng cacbon tetrachloride (CCl_4): Chuột nhắt trắng được gây nhiễm độc với CCl_4 trong 7 ngày cho uống liên tiếp với liều lượng CCl_4 /dầu ăn = 1/6 (0,1ml/10g thể trọng/ ngày). Trong quá trình thực nghiệm nhóm chứng và nhóm thí nghiệm đều được nuôi dưỡng cùng một chế độ, điều kiện như nhau.

Thử nghiệm tác dụng của dịch chiết lá neem: Chuột được uống dịch chiết lá neem sau khi gây nhiễm độc với liều lượng (80mg/10g thể trọng/ ngày) liên tiếp trong 7 ngày.

Phương pháp nghiên cứu

Quy trình tách chiết: Lá neem được nghiền trong nước, siêu âm trên máy sonier branson 250, tần số 15Hz mỗi lần 60 giây trong 10 phút. Sau đó dịch nghiền được ly tâm 5000 vòng/phút trong 20 phút trên máy Sorvall RC 26 plus (Mỹ). Dịch chiết lá neem thu được tiến hành cho chuột uống.

Hàm lượng protein được xác định theo phương pháp của Lowry và cộng sự (1951) [6]. Hoạt độ peroxidase được xác định theo phương pháp sử dụng TMB làm cơ chất có cải tiến. Hàm lượng MDA được xác định theo phương pháp của Ohkasawa và cộng sự (1979) [7]. Hoạt độ enzym SOD được xác định theo phương pháp của McCord và cộng sự (1969) [4].

Xử lý số liệu: Số liệu được xử lý bằng chương trình xử lý thống kê y, sinh học trên phần mềm Excel 2000.

KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Chất chống oxy hoá (antioxidant) là một trong những hệ thống nội sinh quan trọng và có vai trò khử các chất oxy hoá và gốc tự do gây hại đến tế bào. Chính hệ thống bảo vệ này đã ngăn cản quá trình tạo ra nhiều gốc oxy hoạt động và cản trở những quá trình phân giải oxy hoá bất lợi. Trong những năm gần đây có nhiều ý kiến cho rằng các gốc tự do dư thừa được sinh ra trong cơ thể do ô nhiễm môi trường, nhiễm độc... là nguyên nhân gây ra một số các căn bệnh hiểm nghèo như ung thư phổi, ung thư gan, sơ vữa động mạch hay bệnh tim... Để phát hiện và theo dõi nguy cơ của các căn bệnh này người ta dựa vào các thông số nhằm đánh giá khả năng chống oxy hoá của cơ thể: như đo hoạt độ các enzym chống oxy hoá SOD, peroxidase và sự peroxy hoá lipide, GPx, TAS...

Trong nghiên cứu này chúng tôi theo dõi 3 chỉ số là: hoạt độ enzyme peroxidase, hoạt độ enzyme SOD và hàm lượng MDA. Kết quả ở bảng 1 cho thấy ở nhóm chuột nhiễm độc CCl_4 hàm lượng MDA tăng 98% so với nhóm đối chứng (với $p < 0,001$) điều này cho thấy peroxy hoá lipide diễn ra rất mạnh trong tế bào, nhất là ở gan những động vật bị nhiễm độc. Sự peroxy hoá lipide tạo ra rất nhiều các gốc tự do phá hoại tế bào. Đó cũng là lý do tại sao ở nhóm chuột gây nhiễm độc CCl_4 hình ảnh đại thể của gan bị viêm nhiễm nặng, gan bạc trắng và xốp... Kết quả nghiên cứu của chúng tôi phù hợp với tác giả [5]. Các nhóm chuột nhiễm độc được bảo vệ bằng dịch chiết lá neem thì hàm lượng MDA đã giảm so với nhóm nhiễm độc CCl_4 là 6% và tăng 86% so với nhóm đối chứng ($p < 0,001$). Nhóm chuột dùng dịch chiết lá neem thì hàm lượng MDA giảm 46% so với nhóm đối chứng ($p < 0,001$). Đỗ Minh Quang và cộng sự (2003) thấy hàm lượng MDA ở gan chuột giảm 29% khi cho uống viên nang Linh chi. Tác giả trên cũng đã quan sát thấy hàm lượng MDA giảm 34- 45% khi cho chuột uống chế phẩm từ actisô. Như vậy là dịch chiết lá neem đã hạn chế được sự peroxy hóa lipide có ý nghĩa thống kê ở gan chuột nhiễm độc và không nhiễm độc CCl_4 .

Peroxidase là enzyme chống oxy hoá quan trọng đối với cơ thể. Sự thay đổi hàm lượng và hoạt độ các enzym chống oxy hoá, trong đó có peroxidase là cách thức tự cân bằng nội bào nhằm đáp ứng lại tác động của các chất nội sinh hoặc ngoại sinh trong cơ thể. Các chất này có thể cảm ứng tổng hợp enzyme, làm tăng hoạt độ hoặc có thể ức chế tổng hợp enzyme, làm giảm hoạt độ.

* Email: hntinh@hntinh.com Tel: +84 91 123 4567

Trong bài báo này chúng tôi chỉ nghiên cứu hoạt độ peroxidase ở gan (mà không xác định hàm lượng). Vì bản thân cơ thể cũng có một số pseudoperoxidase (hemoglobin, myoglobin) có hoạt tính như peroxidase ngay cả catalase cũng là enzym xúc tác chuyển hoá H_2O_2 thành nước và nhiều chất khác có ảnh hưởng đến hoạt độ enzym peroxidase. Kết quả ở bảng 1 cho thấy hoạt độ peroxidase ở nhóm uống dịch chiết lá neem tăng 37% so với nhóm đối chứng ($p < 0,05$) trong khi đó ở nhóm uống CCl_4 tăng 58%, nhóm uống CCl_4 + dịch chiết lá neem tăng 89% ($p < 0,05$).

Như vậy là dịch chiết lá neem làm tăng hoạt độ enzym peroxidase trong khi hàm lượng MDA lại giảm. Khả năng chống oxy hóa của lá neem biểu hiện qua sự làm giảm hàm lượng MDA và tăng hoạt độ peroxidase ở gan chuột (Hình 1).

Bhanwra và cộng sự [1] cũng nhận thấy dịch chiết lá neem bằng nước có thể bảo vệ gan chuột tránh bị hoại tử do cảm ứng paracetamol [1]. Tuy nhiên Szymonik và cộng sự (2003) nghiên cứu trên chuột

nhất đực dòng Wistar bị nhiễm độc CCl_4 lại cho thấy hoạt độ peroxidase thay đổi không có ý nghĩa thống kê. Kết quả này khác với kết quả thí nghiệm của chúng tôi cũng có thể là do tác giả trên tiến hành ở thời gian nhiễm độc thực nghiệm ngắn (1-3 ngày) và liều lượng độc thấp (0,5ml/kg thể trọng) [8].

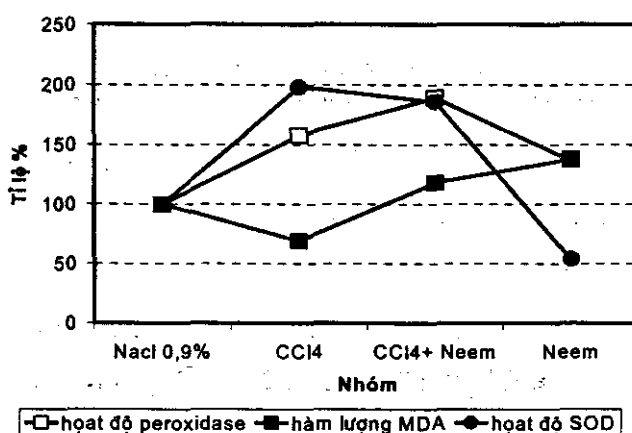
Dựa theo nguyên lý "bẫy" các gốc tự do O_2^- của enzym SOD chúng tôi tiến hành nghiên cứu hoạt độ của enzym SOD khi cho uống dịch chiết lá neem. Kết quả đã chứng tỏ nhóm chuột uống dịch chiết lá neem thì hoạt độ enzym SOD tăng hơn 38 % so với nhóm đối chứng ($p < 0,001$). Trong khi đó ở nhóm chuột uống CCl_4 thì hoạt độ enzym SOD giảm 69% so với nhóm đối chứng ($p < 0,05$). Nguyễn Thị Xuyên và cộng sự (2002) khi nghiên cứu trạng thái chống oxy hóa ở người cũng thấy hoạt độ enzym SOD tăng ở nhóm người có dùng thuốc chống oxy hóa cigelton.

KẾT LUẬN

Dịch chiết lá neem đã hạn chế được việc tạo các gốc tự do ở động vật nhiễm độc CCl_4 thông qua sự biến đổi một số enzym chống oxy hóa (antioxidant). Sự tăng hoạt độ enzym peroxidase, enzym SOD và sự giảm hàm lượng MDA ở các nhóm chuột được uống dịch chiết lá neem có ý nghĩa thống kê đã phân nào chứng tỏ được hoạt tính chống oxy hóa và có khả năng dọn sạch các gốc tự do của lá neem giúp cho cơ thể hồi phục sau khi bị nhiễm độc.

Bảng 1. Hoạt độ enzyme peroxidase, enzyme SOD và hàm lượng MDA trên gan chuột

Nhóm nghiên cứu	Peroxidase (X ± SD) ($\mu M/mgpr$)	SOD (UI/mgpr) (X ± SD)	MDA (X ± SD)* 10^{-5} (mol/mgpr)
NaCl 0,9% (n=19)	0,019 ± 0,001	14,1 ± 2,3	0,042 ± 0,001
CCl_4 (n=11)	0,030 ± 0,009 ($p < 0,05$)	9,76 ± 2,1 ($p < 0,05$)	0,083 ± 0,024 ($p < 0,001$)
CCl_4 + neem (n=10)	0,036 ± 0,016 ($p < 0,05$)	16,6 ± 3,74 ($p < 0,001$)	0,078 ± 0,005 ($p < 0,001$)
Neem (n=17)	0,026 ± 0,009 ($p < 0,05$)	19,5 ± 3,1 ($p < 0,001$)	0,022 ± 0,005 ($p < 0,001$)



Hình 1. Sự biến đổi tỉ lệ % hoạt độ enzyme peroxidase SOD và hàm lượng MDA ở gan chuột

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Bhanwra, S., J. Singh, P.E. Khosla, 2000. Effect of *Azadirachta indica* (Neem) leaf aqueous extract on paracetamol- induced liver damage in rats. *Indian Journal of physiological pharmacology*. 44(1): 64- 68.
2. Bisway K, I. Chattopadhyay, R.K., Banerjee, U. Bandyopadhyay, 2002. Biological activities and medicinal properties of neem (*Azadirachta indica*). *Current science* 82(11): 1336- 1345.
3. Chattopadhyay R.R., 2003. Possible mechanism of hepatoprotective activity of *Azadirachta indica* leaves on hepatotoxicity induced by antitubercular drugs in rats. *Indian Journal of pharmacology*;35; 177- 180.
4. J.M. McCord and Fridovich I., 1969. Superoxide dismutase an enzymic function for erythrocuprein (Hemocuprein). *The Journal of Biological chemistry* 244(22): 6049- 6055.
5. Lee J.Y., S.H. Lee, H.J. Kim, J.M. Ha, J.H. Lee, B.J Ha, 2004. The preventive inhibition of chondroitin sulfate against the CCl₄ induced oxidative stress of subcellular level. *Arch, Pharm, Res*, 27(3); 340- 345.
6. Lowry O.H., N.J. Rosebrough, A.L. Farr, R.J. Randall, 1951. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J Biochem* 193(1): 263- 275.
7. Ohkawa H, N. Ohishi, K. Yagi, 1979. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal. Biochem*, 95(2): 351- 358.
8. Szymonik L.S., G. Czechowska, Z.M. Strycka, M. Slomka, A. Madro, K. Celinski, M. Wielosz, 2003. Catalase, superoxide dismutase, and glutathione peroxidase activities in various rat tissues after carbon tetrachloride intoxication. *J. Hepatobiliary Pancreat Surg*. 10(4): 309- 315.

* Công trình có sự hỗ trợ của Chương trình NCCB trong KHTN. Các tác giả xin cảm ơn PGS.TS. Đỗ Khắc Hiếu đã đọc và góp ý cho bản thảo.

SUMMARY

Effect of *azadirachta indica* (Neem) leaf extract on rats liver enzymes antioxidant activity

Do Thi Tuyen, Nguyen Huu Khoa, Nguyen Thi Ngoc Dao
Institute of Biotechnology, VAST

Neem (*Azadirachta indica* A. Juss) is perhaps the most useful traditional medicinal plant in India. Many studies revealed that the water soluble portion of alcoholic extract of neem leaves possessed significant antihyperglycemic, hypotensive, antiserotonin, antiinflammatory and hepatoprotective activity.

The present study investigated the effect of neem leaf extract on rats liver enzymes antioxidant activity. Treatment neem leaf extract (dose: 80mg/10g body weight/ day) significantly increased enzymes antioxidant activity. In which enzyme SOD activity increased 38% in comparison to the native controls and increased 99% comparing with CCl₄ group ($p < 0.001$). Enzyme peroxidase activity increased 58% ($p < 0.001$) at CCl₄ group and 89% in CCl₄+ neem group.

On the other hand, MDA content reduced 46% on treatment neem leaf extract group. CCl₄ + neem group increased 86% comparing with control ones and CCl₄ group increased 98% ($p < 0.001$). So, neem leaf extract significantly protection and improvement the hepatotoxic damage induced by CCl₄ in rats.

ẢNH HƯỞNG CỦA CAO CHIẾT TỪ QUẢ BỨA (*Garcinia cambogia*) LÊN CÁC ENZYM CHỐNG OXY HÓA Ở GAN CHUỘT BỊ NHIỄM ĐỘC CCl_4 MÃN TÍNH

ĐỖ THỊ TUYỀN¹ - PHAN QUỐC KINH²

LÊ THỊ THUỶ DƯƠNG¹ - NGUYỄN THỊ NGỌC DAO¹

¹ Viện Công nghệ Sinh học

² Liên hiệp khoa học sản xuất và công nghệ mới

I. ĐẶT VẤN ĐỀ

Do môi trường có rất nhiều các tác nhân độc hại như: thuốc trừ sâu, các loại bụi, kim loại nặng "khí quyển" ... làm tăng các gốc tự do và làm giảm các chất chống oxy hoá dẫn đến việc phát sinh các bệnh như: tim mạch, đái tháo đường, ung thư và làm tăng quá trình lão hoá nên xu hướng nghiên cứu về gốc tự do của oxy, các chất chống oxy hoá trong cơ thể ngày càng phát triển mạnh. Để giúp có thể phòng chống các bệnh có liên quan đến gốc tự do thì có thể cần được bổ sung thêm một số các chất chống oxy hoá (antioxidant). Các chất chống oxy hoá có khả năng chuyển hoá các gốc oxygen tự do để tạo thành sản phẩm cuối cùng là H_2O và phân cắt phản ứng chuỗi ở giai đoạn kết thúc của quá trình peroxy hoá lipid

Cây bứa (*Garcinia cambogia*) thuộc họ Bứa *Clusiaceae*, bộ Chè *Theales* có tác dụng điều trị một số bệnh như mẩn ngứa, dị ứng, ho ra máu [1], chứng khó tiêu mãn tính, bệnh thấp khớp, đau bụng, cầm máu [3, 4, 11] và chứa hàm lượng vitamin C, acid hữu cơ hydroxycitric (HCA) có khả năng gây bất hoạt ATP-citrate lyase là enzym có vai trò quan trọng đối với quá trình tổng hợp các chất béo trong tế bào chất. Từ quả bứa các hãng dược phẩm đã sản xuất một số thuốc được bán rộng rãi trên thị trường: *Garcinia pure-extract*, *Citrimax*, *Citrin*, *Garcinia* (lipid control) [11]. Ở Việt Nam, những hiểu biết về cây bứa còn nhiều hạn chế, nên cần nghiên cứu sâu hơn để có cơ sở khoa học và phương hướng cho việc sử dụng bứa vào mục đích phòng và chữa bệnh một cách có hiệu quả nhất. Vì vậy, chúng tôi đã tiến hành khảo sát và nghiên cứu về cơ chế chống oxy hoá của cao chiết quả bứa trên chuột nhắt trắng nhiễm độc CCl_4 mãn tính.

II. NGUYÊN LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

1. Nguyên liệu

a/ Chuột nhắt trắng đực dòng Swiss trưởng thành, từ 4-5 tuần tuổi, khoẻ mạnh, có trọng lượng 23 ± 2 gam, số lượng 120 con được cung cấp từ Ban chăn nuôi, Học Viện Quân y Hà Nội.

b/ Hóa chất: Thiobarbituric acid (TBA), SDS, K_2HPO_4 , NaH_2PO_4 , tris HCl, pyridin, n- butanol, NaOH, xanthin oxidase, xanthine, cytochrom C... được cung cấp từ hãng Sigma.

c/ Quả bứa: Quả bứa ở giai đoạn trưởng thành được thu hái ở Châu Đốc, tỉnh An Giang. Mẫu được thái mỏng, sấy khô ở 60°C , nghiền nhỏ, bảo quản kín trong túi ni lông.

2. Phương pháp nghiên cứu

a/ Quy trình chiết mẫu: lấy 200g quả bứa khô nghiền trong 800ml dung dịch Na_2CO_3 10% nghiền mịn. Dịch nghiền được ly tâm 5000 vòng/phút trong 20 phút bằng máy Sorvall RC 26 plus (Mỹ) thu được 480ml dịch (acid hydroxycitric và các acid hữu cơ khác sẽ chuyển sang dạng muối natri hoà tan trong nước). Dịch lọc lại được acid hoá bằng acid acetic 10% cho đến khi đạt pH= 4 (trong điều kiện này acid hydroxycitric sẽ ở dạng acid). Bốc hơi bằng cách đun cách thuỷ cho đến khô, thu được cao. Cao này được chiết 2 lần mỗi lần 400ml cồn 90° (vì natri acetat không tan trong cồn cao độ nên loại được natri acetat). Lọc, bốc hơi cồn trên nồi cách thuỷ, thu được 20,8g cao có chứa acid.

b. Chuẩn bị mẫu: Cân chính xác 8,5 g cao chiết quả bứa, đưa vào bình định mức 10 ml, thêm nước cất vừa đủ đến 10 ml, lắc mạnh, được hỗn dịch cao chiết quả bứa. Làm 2 lần để có 20ml đủ cho chuột uống trong quá trình thí nghiệm.

c. Tiến hành phân nhóm động vật : Chuột thí nghiệm được phân nhóm một cách ngẫu nhiên thành 4 nhóm:

● Nghiên cứu - Kỹ thuật

- Nhóm đối chứng uống dung dịch NaCl 0,9%.

- Nhóm gây độc uống CCl_4 [6]: trong 7 ngày: 2 ngày đầu uống CCl_4 với tỷ lệ CCl_4 / dầu ăn = 1/7. 5 ngày sau uống CCl_4 với tỷ lệ CCl_4 / dầu ăn = 1/6. Liều lượng 0,1ml/10g thể trọng/ ngày.

- Nhóm gây độc uống CCl_4 + cao chiết quả bứa: sau khi gây độc bằng CCl_4 trong 7 ngày, chuột được uống cao chiết quả bứa với liều lượng 0,1ml/10g thể trọng/ ngày (tương ứng với 85mg/10g thể trọng/ ngày), liên tiếp trong 7 ngày. (Chúng tôi đã khảo sát ở một số nồng độ cao chiết quả bứa và thấy rằng ở nồng độ 80 mg - 100 mg cao / 10g thể trọng / ngày là có hiệu quả. Do đó chúng tôi sử dụng ở nồng độ 85mg để có hiệu quả cao nhất vừa tiết kiệm được nguyên liệu).

- Nhóm uống cao chiết quả bứa: chuột uống cao chiết quả bứa với liều lượng 0,1ml/10g thể trọng/ ngày.

Trong quá trình thí nghiệm nhóm chứng và nhóm thí nghiệm đều được nuôi dưỡng cùng một chế độ, điều kiện như nhau, hàng ngày theo dõi, ghi chép diễn biến, cân trọng lượng. Các động vật thí nghiệm đều được cho uống thuốc vào buổi sáng, vào một giờ nhất định

d/ Xác định các thông số

Trọng lượng cơ thể: chuột hàng ngày được theo dõi trọng lượng cân của từng con trong từng lô. Trọng lượng gan: động vật nhịn ăn 24 giờ trước khi lấy mẫu, giết động vật bằng cách cắt đầu nhanh, mổ lấy nhanh gan và cân trọng lượng gan [6]. Hàm lượng protein được xác định theo phương pháp của Lowry và cộng sự (1951) [7]. Hàm lượng MDA được xác định theo phương pháp của Okasawa và cộng sự (1979) [10], hoạt độ enzym SOD được xác định theo phương pháp của McCord (1969) [9].

III. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

1. Trọng lượng cơ thể và trọng lượng gan

Quan sát nhóm chuột gây độc CCl_4 sau 7 ngày gây độc thấy chuột trở lên chậm chạp, lông không mượt, lờ đờ. Trong khi đó nhóm có bổ sung cao chiết quả bứa thì chuột trở lên linh hoạt và lông mượt hơn. Kết quả ở bảng 1 cho thấy: trọng lượng cơ thể chuột (ở ngày cuối của thí nghiệm) giảm ở lô nhiễm độc CCl_4 20,5% phù hợp với các tác giả nghiên cứu mô hình gây nhiễm độc CCl_4 trên chuột nhắt trắng [2, 5, 6].

Bảng 1. Trọng lượng cơ thể và trọng lượng gan ở các nhóm chuột nghiên cứu

Nhóm Nghiên cứu	Trọng lượng cơ thể		Trọng lượng gan	
	($\bar{X} \pm \text{SD}$) (g)	Tỉ lệ %	($\bar{X} \pm \text{SD}$) (g)	Tỉ lệ %
NaCl 0,9% (n=35)	25,4 $\pm$ 0,8	100	1,2 $\pm$ 0,02	100
CCl_4 (n= 36)	20,2 $\pm$ 2,5*	79,5	2,6 $\pm$ 0,018**	216,6
CCl_4 + bứa (n= 34)	17,6 $\pm$ 0,9**	69,5	1,9 $\pm$ 0,034*	158,3
Bứa (n= 32)	22 $\pm$ 1,2**	86,6	1,0 $\pm$ 0,028*	83,3

*: có ý nghĩa thống kê $p < 0,05$ so với nhóm đối chứng

**: có ý nghĩa thống kê $p < 0,001$ so với nhóm đối chứng

Khi nhóm chuột nhiễm độc CCl_4 được bổ sung cao chiết quả bứa thì trọng lượng giảm xuống 30,5%. Theo một số các tài liệu trên thế giới đã công bố dịch chiết quả bứa là một trong những chất gây giảm trọng lượng ở cơ thể chuột, vì trong quả bứa có chứa một acid hydroxycitric có tác dụng giảm béo [4]. Trong khi đó nhóm uống cao chiết bứa thì trọng lượng giảm 13,4%. Tuy nhiên để có kết luận chính xác chúng tôi sẽ tiếp tục nghiên cứu sâu hơn theo hướng này.

Trọng lượng gan tăng 116% ở nhóm chuột bị nhiễm độc. Nguyên nhân trọng lượng gan tăng là do khi bị nhiễm độc CCl_4 , dưới tác dụng của CYP2E1, CCl_4 dễ dàng tạo thành các gốc chlorine tự do có khả năng oxy hóa mạnh, từ đó gây tổn thương gan dẫn đến rối loạn các quá trình chuyển hóa ở gan, gây hoại tử gan, và gan bị thâm nhiễm mỡ, phù nề, ứ nước. Sau khi được bổ sung thêm cao chiết quả bứa thì hình ảnh đại thể của gan được cải thiện rõ ràng (hình 1). Gan không còn hiện tượng phù nề, viêm nhiễm và gan gần như trở về trạng thái bình thường. Nhóm có uống CCl_4 + cao chiết quả bứa trọng lượng gan giảm xuống 58,3% so với nhóm bị nhiễm độc bởi CCl_4 . Như vậy cao chiết quả bứa là một chất chống oxy hóa tốt, cải thiện được chức năng gan giúp gan hồi phục khi gan bị nhiễm độc CCl_4 .

Hình 1: Hình ảnh đại thể của gan trong các nhóm chuột nghiên cứu:



1. Gan chuột uống NaCl 0,9%
2. Gan chuột uống CCl_4
3. Gan chuột uống CCl_4 + dịch quả bứa

● Nghiên cứu - Kỹ thuật

2. Hoạt độ các enzym chống oxy hóa và hàm lượng MDA

Bảng 2 cho thấy hoạt độ enzym SOD giảm 30% so với nhóm đối chứng. Nguyên nhân là do khi chuột bị nhiễm độc thì các tế bào gan bị viêm nhiễm dẫn đến hoại tử và sản sinh rất nhiều các gốc tự do. Nhóm chuột gây độc CCl_4 có uống thêm cao chiết quả bứa đã có chiều hướng tăng 11% so với nhóm đối chứng. Và nhóm uống cao chiết quả bứa tăng 117%. Điều này chứng tỏ dịch chiết quả bứa có hoạt tính chống oxy hóa và khả năng dọn sạch các gốc tự do oxy gen hoạt động ($\text{O}_2^{\cdot-}$)

Bảng 2. Sự biến đổi hoạt độ enzym SOD và hàm lượng MDA ở các nhóm chuột nghiên cứu

Nhóm Nghiên cứu	Hoạt độ SOD		Hàm lượng MDA	
	$(\bar{X} \pm \text{SD})$ (U/mgpr)	Tỉ lệ %	$(\bar{X} \pm \text{SD}) \cdot 10^{-5}$ (mol/mgpr)	Tỉ lệ %
NaCl 0,9% (n=35)	14,1 $\pm$ 2,3	100	0,042 $\pm$ 0,01	100
CCl_4 (n=36)	9,8 $\pm$ 2,1*	70	0,083 $\pm$ 0,002**	198
CCl_4 + bứa (n=34)	15,7 $\pm$ 3,8*	111	0,068 $\pm$ 0,0028**	162
Bứa (n=32)	30,6 $\pm$ 2,5**	217	0,029 $\pm$ 0,001*	69

*: có ý nghĩa thống kê $p < 0,05$ so với nhóm uống CCl_4 .

**: có ý nghĩa thống kê $p < 0,001$ so với nhóm đối chứng

Mahendran và cộng sự (2001) khi nghiên cứu trên chuột nhắt trắng cho thấy hoạt độ SOD tăng ở nhóm chuột uống ethanol 18% + dịch chiết quả bứa là 106% so với nhóm uống ethanol 18%.

MDA (malondialdehyde) là một trong những sản phẩm cuối cùng của quá trình peroxy hóa lipid được cảm ứng bởi các gốc tự do. Để đánh giá quá trình peroxy hóa diễn ra mạnh hay yếu, có thể thông qua xác định hàm lượng sản phẩm hình thành từ quá trình này như MDA. Từ đó đánh giá được mối tương quan giữa các gốc oxygen tự do và enzym chống oxy hóa trong cơ thể [10,12]. Hàm lượng MDA ở nhóm nhiễm độc CCl_4 tăng lên so với nhóm đối chứng 98% với $p < 0,001$. Điều này cho thấy phản ứng peroxy hóa lipid diễn ra mạnh trong tế bào gan. Nhóm uống CCl_4 + cao chiết quả bứa hàm lượng MDA tăng hơn so với nhóm đối chứng là 62% nhưng lại giảm hơn so với nhóm nhiễm độc CCl_4 là 36%. Sự giảm hàm lượng MDA ở các nhóm có uống cao chiết quả bứa so với nhóm đối chứng đều có ý nghĩa thống kê ($p < 0,001$).

Manhendran và cộng sự (2001) đã nghiên cứu

trên chuột nhắt trắng được gây cảm ứng tổng hợp bằng ethanol 18% trong 45 ngày kết quả cho thấy hàm lượng lipid peroxide (MDA) tăng 86% so với nhóm đối chứng và khi điều trị kết hợp dịch chiết quả bứa trên chuột nhắt trắng cũng thấy hàm lượng MDA tăng 4% so với nhóm đối chứng và giảm 60% so với nhóm gây cảm ứng bằng ethanol 18%. Như vậy là trên mô hình nhiễm độc CCl_4 chúng tôi cũng thu được những kết quả rất khả quan về khả năng chống oxy hóa của cao chiết quả bứa. Mặc dù sự giảm hàm lượng MDA ở nhóm có bổ sung cao chiết quả bứa giảm được 36% so với nhóm nhiễm độc CCl_4 nhưng sự giảm này có ý nghĩa thống kê.

IV. KẾT LUẬN

Với mục đích xác định ảnh hưởng của cao chiết quả bứa lên các enzym chống oxy hóa ở gan chuột bị nhiễm độc CCl_4 mãn tính, trong bài báo này chúng tôi dùng cao chiết quả bứa với liều 85mg/ 10g thể trọng cho chuột uống trong 7 ngày liên tiếp. Kết quả đã chỉ ra rằng hoạt độ SOD tăng 11% so với nhóm đối chứng và tăng 41% so với nhóm nhiễm độc. Hàm lượng MDA giảm 36% so với nhóm nhiễm độc. Kết quả nghiên cứu này là những căn cứ quan trọng để tiếp tục nghiên cứu sử dụng quả bứa làm thuốc.

Summary

To determine the effect of *G. cambogia* fruit extract on CCl_4 induced liver rats, in the report, *G. cambogia* (dose: 85 mg/10g weight body) given for 7 days on the chronic CCl_4 liver damage were studied. *G. cambogia* treatment completely prevented all the damaged- changes observed in CCl_4 - chronic rats. Treatment *G. cambogia* extract enzyme SOD activity significantly increased 11% comparing with CCl_4 treatment rats and 30% with control ones. The imbalance in lipid metabolism could be the reason for increase in lipide peroxidation. When rats were treated with *G. cambogia*, the showed that there were significantly inhibited the rise in (MDA) lipide peroxidase and weight loss, which is evident from the improved antioxidant status. The present study is an attempt to elucidate the antiperoxidative property of *G. cambogia* CCl_4 induced damage liver in rats and its effically to inhibit lipid peroxidation.

Tài liệu tham khảo

1. Đỗ Tất Lợi. Những cây thuốc và vị thuốc Việt Nam. Nhà xuất bản y học, 2001, trang 125.

2. Đào Kim Nhung, Phùng Đức Hữu, 2002. Khảo sát một số đặc điểm hoá sinh học của flavonoid chiết xuất từ cây *Hibiscus sabdariffa* Linn. Di thực vào Việt Nam. Hội nghị Hoá sinh y Dược học Việt Nam. Hoá sinh y Dược năm 2002. Trang 108- 117

3. Asha Sarah Koshy and N. R. Vijayalakshmi, 2001. *Impact of certain flavonoids on lipid profiles- potential action of Garcinia cambogia flavonoids*. Phytother. Res. 15, 395- 400.

4. Jena BS, Jayaprakasha GK, Singh RP, Sakariah KK (2002). *Chemistry and biochemistry of (-)- hydroxycitric acid from Garcinia*. J. Agric. Food Chem 50 (1): 10- 22.

5. Lee JY, Lee SH, Kim HJ, Ha JM, Lee S H, Lee JH, ha BJ (2004). *The preventive inhibition of chondroitin sulfate against the CCl₄- induced oxidative stress of subcellular level*. Arch. Pharm. Res 27(3), 340- 345.

6. Liliana Favari and Victor Perez- Alvarez (1997). *Comparative effects of colchicine and silymarin on CCl₄- chronic liver damage in rats*. Archives of medical research. Vol 28, No.1. pp.11-17.

7. Lowry O H, Rosebrough N J, Farr AL, Randall RJ (1951). *Protein measurement with the folin phenol reagent*. J Biochem 193(1): 263- 275.

8. Mahendran P, Shyamala Devi (2001). *The modulating effect of Garcinia cambogia extract on ethanol induced peroxidative damage in rats*. Indian Journal of pharmacology 33: 87-91.

9. McCord J.M. and Fridovich I., 1969. *Superoxide dismutase an enzymic function for erythrocuprein (Hemocuprein)*. The Journal of Biological chemistry. 244(22): 6049- 6055.

10. Ohkawa H, Ohishi N, Yagi K, 1979. *Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction*. Anal. Biochem, 95(2): 351- 358.

11. Soni M.G, Burdock G. A, Preuss H. G, Stohs S.J, Ohia S.E, Bagchi D, 2004. *Safety assessment of (-)- hydroxycitric acid and super citrimax, a novel calcium/ potassium salt*. Food and chemical toxicology 42, 1513- 1529.

12. Szymonik LS, Czechowska G, Stryeckaz M, Slomka M, Madro A, Celinski K, Wielosz M (2003). *Catalase, superoxide dismutase and glutathione peroxidase activities in various rat tissues after carbon tetrachloride intoxication*. J. Hepatobiliary Pancreat surg 10(4): 309- 315.

NGHIÊN CỨU ẢNH HƯỞNG...

(Tiếp theo trang 18)

với được chất, tăng sinh khả dụng của thuốc nhỏ mắt [1, 2, 6].

Nói chung, chất sát khuẩn thường là những chất hoạt động hóa học mạnh và có những ảnh hưởng không tốt đối với cơ thể sống. Do vậy trong thuốc nhỏ mắt chỉ sử dụng chất sát khuẩn ở nồng độ tối thiểu đủ để đảm bảo vô khuẩn cho chế phẩm kết hợp với kỹ thuật bào chế vô khuẩn.

V. KẾT LUẬN

Từ kết quả nghiên cứu thu được đã trình bày ở trên, có thể rút ra kết luận sau:

1. Ở pH 5,5 hệ đệm acetat, citrat và phosphat ảnh hưởng lớn đến độ ổn định của dung dịch thuốc nhỏ mắt có vitamin B₅. Với hệ đệm borat hay dung dịch acid boric 1,9% ở pH 5,5 dung dịch thuốc nhỏ mắt vitamin B₅ có độ ổn định cao nhất trong cùng điều kiện nghiên cứu.

2. Dung dịch thuốc nhỏ mắt có vitamin B₅ ổn định khi dùng chất chống oxy hóa dinatri edetat 0,02%, phối hợp thêm natri metabisulfid với nồng độ 0,1% - 0,3% không làm tăng độ ổn định của chế phẩm.

3. Chất sát khuẩn benzalkonium clorid và chlorobutanol không ảnh hưởng đến độ ổn định của dung dịch thuốc nhỏ mắt có vitamin B₅. Nhưng benzalkonium clorid thích hợp hơn chlorobutanol vì không thấm qua nhựa PE, hiệu lực kháng khuẩn tăng lên khi có mặt dinatri edetat và làm tăng sinh khả dụng của thuốc.

Tài liệu tham khảo

1. Trường Đại học Dược Hà Nội (2002), Kỹ thuật bào chế và sinh dược học các dạng thuốc, Tập 1, Nhà Xuất bản Y học, Hà Nội, Tr. 179-203.

2. Trường Đại học Dược Hà Nội (2003) - Bộ môn Bào chế, Sinh dược học bào chế (Tài liệu đào tạo sau đại học), tr 55 - 73.

3. Vidal Việt Nam 2002, Tr. 536.

4. International Conference on Harmonisation (ICH) - Harmonised Tripartite Guideline (1993), Stability Testing of New Drug Substances and Products.

5. ICH Harmonised Tripartite Guideline (1996), Photostability Testing of New Drug Substances and Products.

6. Arthur H. Kibbe (2000), Handbook of Pharmaceutical Excipients, London, pp. 33-35, 121-128, 191-194, 490-497.

7. WHO Technical Report Series N° 863 (1996), WHO Guideline on Stability Testing of Pharmaceutical Products containing well-established drug substances in conventional dosage form, pp. 65-80.

ẢNH HƯỞNG CỦA SILYMARIN LÊN HOẠT TÍNH MICROSOMAL CYTOCHROMES P450 Ở GAN THỎ

Đỗ Thị Tuyên¹, Đào Thị Mai Anh², Nguyễn Thị Ngọc Dao¹

¹Viện Công nghệ Sinh học

²Trường Đại học Dược Hà Nội

TÓM TẮT

Dịch chiết cây cúc gai [*Silybum marianum* (L.) Gaertn. (Họ. *Asteraceae*)] silymarin là một hỗn hợp các chất flavonolignan có hoạt tính sinh học như silybin (50 - 70%), silycristin, silydianin và các chất khác giống như flavonolignan. Đã từ lâu, silymarin được dùng để điều trị cho các bệnh nhân bị viêm gan và đã được khuyến cáo là rất an toàn. Các thành phần chính của cây cúc gai như silymarin, silybin đã được các tác giả trên thế giới nghiên cứu rất sâu về sự ảnh hưởng có lợi của chúng trên hệ thống enzyme chuyển hóa ở gan, đặc biệt là hệ thống enzyme cytochrome P450 (P450). Tuy nhiên, ở Việt nam thì hầu như vẫn chưa có một nghiên cứu nào về ảnh hưởng của silymarin lên hệ thống P450. Trong bài báo này, chúng tôi đã thử nghiệm ảnh hưởng của silymarin lên hoạt tính của hệ thống P450 trong dịch microsome đã tinh sạch. Hoạt độ P450 (hoạt tính aniline hydroxylase) ở dịch microsome ở lô thử uống silymarin so với lô đối chứng âm tiêm dung dịch nước muối sinh lý tăng 33,5% nhưng chỉ bằng 38% so với lô đối chứng dương tiêm sodium phenobarbital. Mặt khác, hàm lượng P450 ở lô thử uống silymarin đã tăng lên 23% so với lô thử tiêm dung dịch nước muối sinh lý nhưng chỉ bằng 62% so với lô thử tiêm sodium phenobarbital. Dịch enzyme P450 sau khi tinh sạch đã được điện di trên gel polyacrylamide (PAGE) để kiểm tra độ tinh sạch. Kết quả cho thấy, sản phẩm P450 sau khi tinh sạch cho 4 băng protein chính có trọng lượng phân tử từ khoảng 49 kDa đến 55 kDa. Đây cũng chính là khoảng trọng lượng phân tử của các P450.

Từ khóa: Dịch chiết cây cúc gai silymarin, hoạt tính aniline hydroxylase, microsomal P450 gan thỏ, sodium phenobarbital

MỞ ĐẦU

Silymarin được chiết xuất từ cây cúc gai *Silybum marianum* thuộc họ Cúc *Asteraceae*. Silybin là một đồng phân chính của hỗn hợp silymarin, thành phần này chiếm khoảng 50 - 70% của dịch chiết từ cây cúc gai. Hỗn hợp silymarin còn chứa rất nhiều flavonolignan khác như: silydianin, silycristin và isosilybin cùng với một vài flavonoid khác như taxifolin (Nielsen *et al.*, 1998).

Ở Đức, silymarin đã được đưa vào thuốc để điều trị cho những bệnh nhân bị viêm gan, một số dược phẩm có giá trị đã được bán trên thị trường như: silyman, silibo, sibectan (Luper, 1998).

Các nhà khoa học trên thế giới đã chứng minh hỗn hợp của cây cúc gai có khả năng kháng khuẩn, chống viêm, tăng khả năng miễn dịch, chữa bệnh gan, chống sự peroxy hóa lipid và ảnh hưởng đến việc "bẫy" các gốc tự do (Flora *et al.*, 1998).

Khả năng chống oxy hóa có thể được giải thích bằng hai cơ chế: (1) Chống oxy hóa trực tiếp bằng ảnh hưởng chống oxy hóa và "bẫy" các gốc tự do trên màng lipid của tế bào; (2) Cơ chế gián tiếp bằng việc điều khiển hoạt tính của hệ thống enzyme P450.

Tuy nhiên, việc nghiên cứu về hoạt tính của hệ thống enzyme P450 cùng với các flavonoid khác nhau đã chứng tỏ rằng ảnh hưởng của các hợp chất này có thể là khác nhau (Obermeier *et al.*, 1995; Nielsen *et al.*, 1998).

NGUYÊN LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

Nguyên vật liệu

Thỏ trắng đực thuần chủng do Trung tâm Nghiên cứu Dê Thỏ, Ba Vì cung cấp (chủng *New Zealand White*), hai tháng tuổi, trọng lượng trung bình từ 2,2 - 2,5 kg.

Các hóa chất như silymarin, NaCl, Na_2HPO_4 , NaH_2PO_4 , Na cholate, dithionite, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, NADPH, aniline, phenol, sodium phenobarbital (NaPB) được cung cấp từ hãng Sigma (Mỹ).

Gây cảm ứng tổng hợp P450

Gây cảm ứng tổng hợp enzyme được tiến hành theo phương pháp thông thường. Thỏ được tiêm với NaPB liều lượng 50 mg/kg trọng lượng và cho uống đối với silymarin 50 mg/kg trọng lượng vào một thời điểm nhất định trong ngày và liên tục trong 5 ngày. Lô đối chứng âm được tiêm nước muối sinh lý 0,9%, 24 giờ sau liều tiêm hoặc uống cuối cùng thì tiến hành mổ lấy nhanh gan ra để tách chiết enzyme. Cho thỏ nhịn ăn 1 ngày trước khi mổ. Ba nhóm thỏ thí nghiệm đều được nuôi dưỡng theo đúng quy trình do Trung tâm Nghiên cứu Dê Thỏ, Ba Vì cung cấp,

hàng ngày được cân kiểm tra để theo dõi sự biến đổi trọng lượng.

Xác định hàm lượng protein

Hàm lượng protein được xác định theo phương pháp của Lowry và cộng sự (1951).

SDS-PAGE

Điện di biến tính protein SDS-PAGE (10% polyacrylamide) được tiến hành theo phương pháp của Laemmli (1970).

Xác định hoạt tính aniline hydroxylase

Hoạt tính aniline hydroxylase được xác định theo phương pháp của Bogaards và cộng sự (2000).

Xác định hàm lượng P450

Hàm lượng P450 được xác định theo phương pháp của Omura và Sato (1964) dựa vào quang phổ chênh lệch CO. P450 ở dạng kết hợp với CO có đỉnh hấp thụ ở bước sóng $\lambda = 450 \text{ nm}$ (Hình 1). Hàm lượng P450 được tính toán dựa vào hệ số $\epsilon_{450/490} = 91 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

Chuẩn bị mẫu microsomal P450

Giết thỏ bằng cách cắt bỏ đầu, mổ lấy nhanh gan ra, cho ngay vào 0,15 M KCl + 2 mM EDTA lạnh để rửa. Sau khi thấm khô, gan được loại bỏ những nang sán, xơ rồi cân. Sau đó dùng kéo cắt nhỏ gan, rửa vài lần cho hết máu và catalase. Gan được nghiền trong máy nghiền đồng thể với đệm 0,1 M Tris acetate + 1 mM EDTA + 20% glycerine pH 7,4. Tỷ lệ gan trong đệm nghiền là 1/2 (g/ml). Tất cả các bước trên đều phải tiến hành trong điều kiện lạnh 0 - 4°C. Sau đó đem ly tâm với 8000 vòng/phút trong 10 phút ở 4°C (Sorvall RC 26 Plus, Mỹ); bỏ rửa lấy

dịch. Dịch này lại ly tâm tiếp ở 12000 vòng/phút trong 20 phút. Lớp lipid ở trên được hút ra. Dịch ly tâm sau khi loại tủa lại được ly tâm ở 105000 xg (33000 vòng/phút trong 60 phút (Sorvall Ultra Pro 80, Mỹ) thu lấy tủa. Rửa tủa, ly tâm lần 2 với tốc độ 33000 vòng/phút trong 60 phút ở 4°C. Hòa tan tủa trong đệm 0,01 M Tris acetate + 1 mM EDTA + 20% glycerine pH 7,4 sao cho nồng độ đạt 30 mg protein/ml.

Tinh sạch enzyme P450

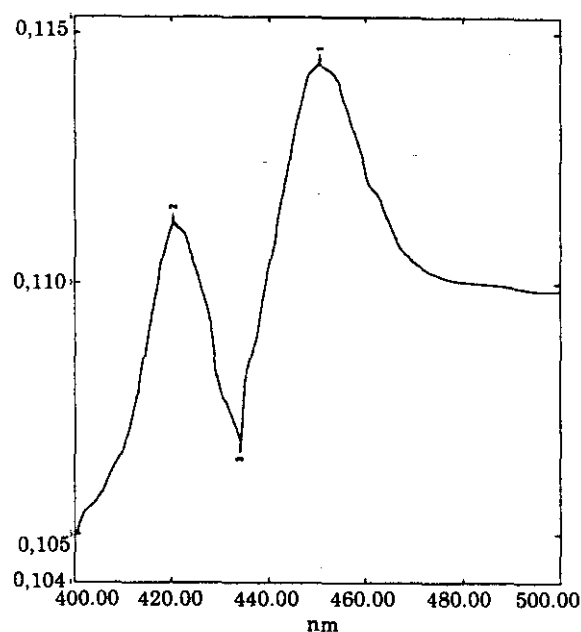
Phá màng microsome và kết tủa phân đoạn bằng $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ở 2 phân đoạn: Phân đoạn I với nồng độ ammonium sulfate 0 - 37%. Ly tâm 16000 vòng/phút trong 20 phút, loại tủa. Dịch ly tâm được kết tủa phân đoạn II với nồng độ 38 - 50%. Sau khi ly tâm như giai đoạn I, lấy tủa hòa tan lại trong đệm KP 0,1 M pH 7,4 chứa 20% glycerine + 2 mM EDTA và thẩm tích trong túi bán thấm với đệm trên trong 10 - 12 giờ (qua đêm). Sau khi ly tâm bỏ cặn, dịch ly tâm được kết tủa phân đoạn lần 2, cũng qua hai phân đoạn như trên. Tủa của phân đoạn 38 - 50% được hòa tan lại trong đệm KP 0,1 M pH 7,4 chứa 20% glycerine và thẩm tích qua đêm. Cuối cùng dịch trong túi thẩm tích được ly tâm bỏ cặn. Dung dịch thu được có màu đỏ nâu và trong suốt, được bảo quản ở -80°C. Một phần dung dịch được dùng để làm các phản ứng đánh giá.

KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Hàm lượng P450 trong gan thỏ

Kết quả cho thấy hàm lượng P450 ở dịch microsome đều cao hơn so với dịch nghiền đồng thể (Hình 2). Đặc biệt, ở nhóm gây tổng hợp cảm ứng bằng silymarin hàm lượng cao hơn 44% so với dịch nghiền đồng thể. Với mục đích dùng

nhóm NaBP làm nhóm đối chứng dương chúng tôi nhận thấy hàm lượng P450 tăng cao ở mẫu dịch nghiền so với nhóm đối chứng (tăng 78,5%) đặc biệt là ở mẫu microsome hàm lượng P450 tăng mạnh gấp hai lần so với đối chứng. Điều này phù hợp với lý thuyết do NaPB là chất cảm ứng tổng hợp của hệ thống P450 và cụ thể là tổng hợp cảm ứng hệ isozyme số 2 (Giuseppe *et al.*, 1994). Trong thí nghiệm này, ảnh hưởng của silymarin lên hàm lượng P450 là có thay đổi ở dịch microsome (44%) mặc dù ở dịch nghiền đồng thể hàm lượng này không có gì thay đổi so với nhóm đối chứng. Liệu silymarin có cảm ứng sự tổng hợp hệ thống P450 hay không?

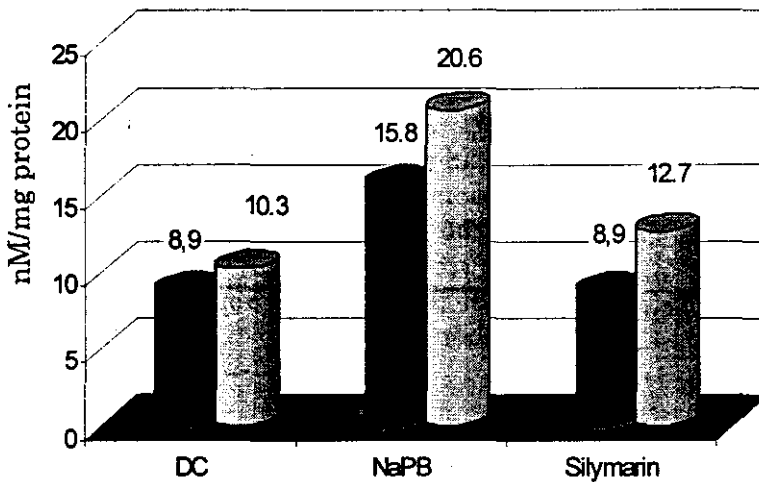


Hình 1. Phổ hấp thụ của dịch nghiền gan có 2 đỉnh hấp thụ ở 420 nm và 450 nm.

Tiếp theo chúng tôi nghiên cứu sự biến đổi trọng lượng của gan thỏ (Bảng 1). Trọng lượng gan ở nhóm thỏ uống silymarin tăng 4% so với nhóm đối chứng

âm và giảm 25% so với nhóm đối chứng dương. Theo một số tài liệu cho thấy, silymarin có chức năng cải thiện tế bào gan và giúp gan phục hồi sau nhiễm độc (Liliana, Perez-Alvarez, 1997). Hàm

lượng P450 tổng số ở nhóm thử uống silymarin tăng 0,3% so với nhóm đối chứng trong khi đó ở nhóm thử tiêm NaPB tăng gấp 3,6 lần so với nhóm đối chứng (Bảng 1).



Hình 2. Hàm lượng P450 của dịch microsome so với dịch nghiền đồng thể ở các lô thử thí nghiệm. DC: Nhóm thử đối chứng âm tiêm NaCl 0,9%; NaPB: Nhóm thử đối chứng dương tiêm NaBP; Silymarin: Nhóm thử uống silymarin.

■ : Dịch nghiền đồng thể;
▨ : Dịch microsome.

Bảng 1. Trọng lượng gan, hàm lượng P450 và P450 tổng số ở dịch microsome gan thử.

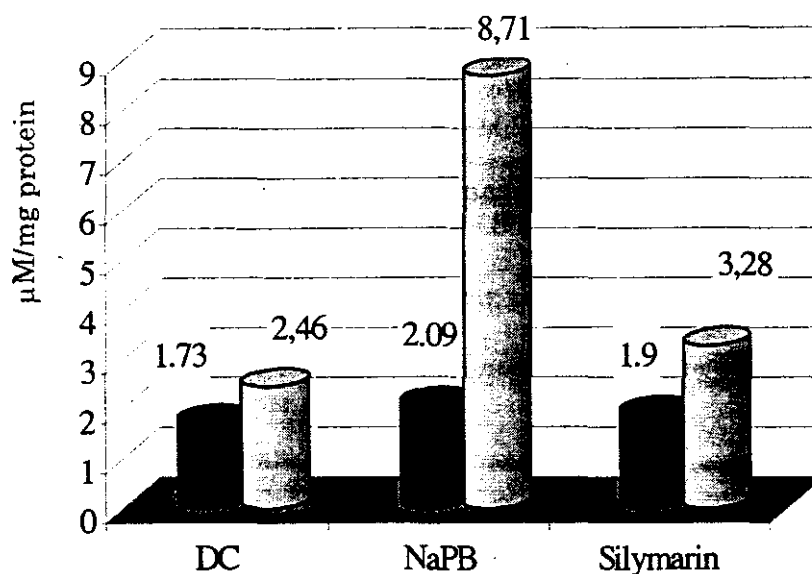
Nhóm	Trọng lượng gan $\bar{X} \pm SD$ (g)	Hàm lượng P450 $\bar{X} \pm SD$ (nM/mg protein)	Hàm lượng P450 tổng số $\bar{X} \pm SD$ (nM)
DC (n = 5)	50,2 ± 1,38	10,3 ± 0,52	276,04 ± 1,72
NaPB (n = 5)	63 ± 0,28	20,6 ± 1,75	1007,34 ± 3,81
Silymarin (n = 5)	52,25 ± 1,26	12,7 ± 0,68	276,86 ± 1,12

Hoạt tính P450 (aniline hydroxylase)

Hoạt tính aniline hydroxylase của dịch microsome tăng rất cao so với dịch nghiền (Hình 3). Ở lô đối chứng hoạt độ aniline hydroxylase tăng 42% so với dịch nghiền. Còn dịch microsome ở nhóm gây cảm ứng tổng hợp bởi NaBP tăng 317% so với dịch nghiền đồng thể. Giuseppe và cộng sự (1994) đã chứng minh rằng khi tiêm một lượng NaPB vào thì hoạt độ P450 ở chuột

tăng hàng vạn lần.

Trong thí nghiệm của chúng tôi khi tiêm NaBP vào thử thì thấy hoạt tính aniline hydroxylase tăng gấp 3 lần có thể là do khi tiêm một liều lượng NaPB khác nhau thì ảnh hưởng là khác nhau. Mặt khác, có thể là lượng mẫu của chúng tôi còn quá nhỏ do đó cần phải làm thêm các thí nghiệm với số lượng mẫu lớn hơn để có kết luận chính xác.

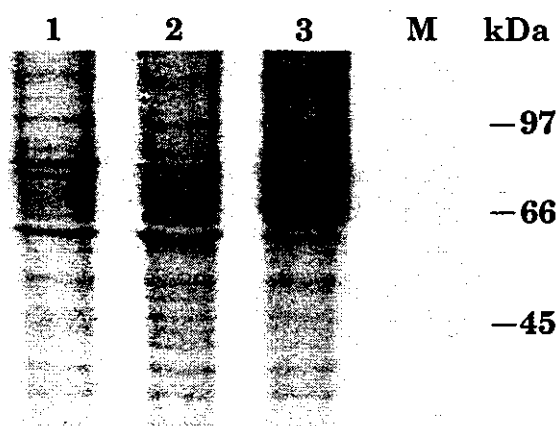


Hình 3. Hoạt độ aniline hydroxylase của dịch microsome so với dịch nghiền đồng thể. DC: Nhóm thử đối chứng âm tiêm NaCl 0,9%; NaPB: Nhóm thử đối chứng dương tiêm sodiumphenobarbital; Silymarin: Nhóm thử uống silymarin. ■: Dịch nghiền đồng thể; ▨: Dịch microsome

Nhóm gây cảm ứng tổng hợp bởi silymarin ở dịch microsome tăng 73% so với mẫu ở dịch nghiền. Theo tác giả Zuber và cộng sự (2002) khi nghiên cứu ảnh hưởng của silybin lên hoạt độ đặc hiệu của CYP2D1 và CYP3A4 thì thấy hoạt độ đặc hiệu của chúng giảm. Trong bài báo này, chúng tôi chỉ xác định hoạt độ chung của P450 dựa vào hoạt độ aniline hydroxylase, cũng có thể trong hoạt độ chung này có một số hoạt độ riêng của từng isozyme tăng nhưng cũng có một số hoạt độ đặc hiệu của các isozyme khác lại giảm (Obermeier *et al.*, 1995; Nielsen *et al.*, 1998). Mặt khác, cảm ứng tổng hợp enzyme chính là cảm ứng tổng hợp protein, khi có mặt của các chất cảm ứng. Đó cũng là lý do tại sao khi các chất này vào cơ thể nó đã tác động lên hệ thống P450 và làm tăng hoạt tính của enzyme, cơ chế có thể do tăng tổng hợp một số các isozyme của hệ thống P450.

Tinh sạch P450

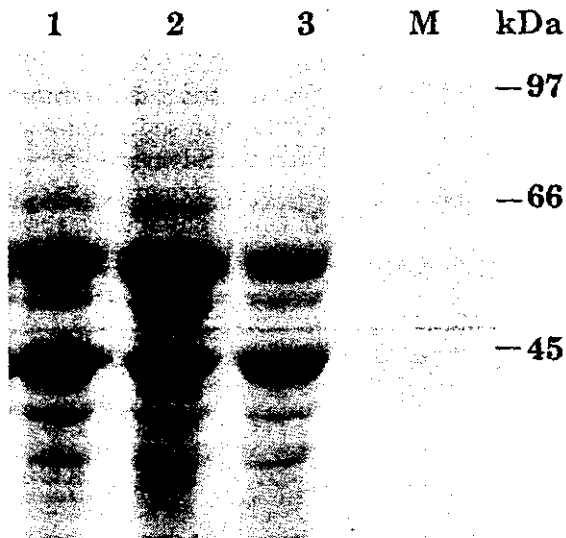
Sau khi các mẫu ở dịch nghiền (Hình 4) và dịch microsome đã được thử hoạt



Hình 4. Điện di đồ SDS-PAGE của các dịch nghiền đồng thể nhuộm Coomassie Brilliant Blue R250. M: Marker; 1: NaCl 0,9%; 2: NaPB (50 mg/kg trọng lượng); 3: Silymarin (50 mg/kg trọng lượng).

tính và xác định hàm lượng P450 chúng tôi tiếp tục tách chiết và tinh sạch P450. Điện di biến tính SDS-PAGE (10% polyacrylamide) dịch microsome và dịch P450 đã tinh sạch cho thấy có nhiều băng protein ở dịch microsome đặc biệt tập trung hai băng đậm trong khoảng 45 kDa đến 66 kDa (Hình 5). Dịch microsome này

chúng tôi đã tiến hành thử hoạt tính P450 và thấy tăng rất cao (Hình 3). Điều này chứng tỏ chúng tôi thu được dịch microsome là rất tinh sạch.

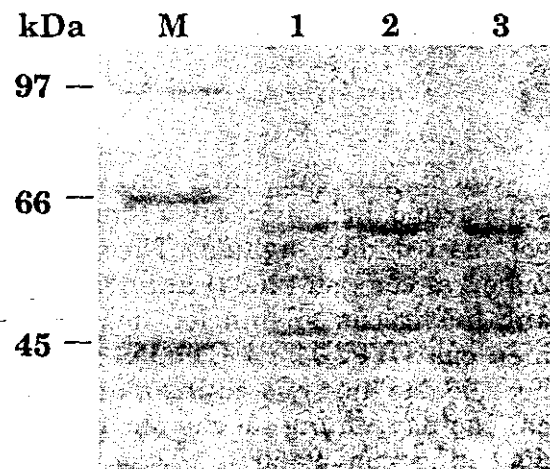


Hình 5. Điện di đồ SDS-PAGE (10% polyacrylamide) của các dịch microsome P450 nhuộm Coomassie Brilliant Blue R250. M: Marker; 1: NaCl 0,9%K; 2: NaPB (50 mg/kg trọng lượng); 3: Silymarin (50 mg/kg trọng lượng).

Sau khi đã thu được dịch tinh sạch P450 chúng tôi tiếp tục xác định hoạt tính của dịch tinh sạch so với dịch microsome và dịch nghiền. Kết quả chỉ ra rằng, dịch

tinh sạch P450 thu được vẫn còn hoạt tính và hoạt tính khá cao (Bảng 2).

Đặc biệt, trong dịch enzyme P450 tinh sạch (Hình 6) chúng tôi thấy xuất hiện 4 băng protein ở cả mẫu đối chứng và mẫu gây cảm ứng tổng hợp bởi silymarin và NaPB. Mẫu gây cảm ứng bởi silymarin và NaPB có 2 băng đậm hơn tương ứng với băng protein có trọng lượng phân tử xấp xỉ 49 kDa và 55 kDa tương đương với vị trí của hai isozyme P450 là isozyme thứ (LM₂ = 48,7 kDa) và isozyme thứ 4 (LM₄ = 55,3 kDa).



Hình 6. Điện di đồ SDS-PAGE (10% polyacrylamide) của các mẫu P450 đã tinh sạch nhuộm Coomassie Brilliant Blue R 250. M: Marker; 1: NaCl 0,9%; 2: NaPB (50 mg/kg trọng lượng); 3: Silymarin (50 mg/kg trọng lượng).

Bảng 2. Hoạt tính aniline hydroxylase ở dịch nghiền dịch microsome và dịch tinh sạch ở gan thỏ.

Nhóm	Dịch nghiền $\bar{X} \pm SD$ ($\mu\text{M}/\text{mg protein}$)	Dịch microsome $\bar{X} \pm SD$ ($\mu\text{M}/\text{mg protein}$)	Dịch tinh sạch P450 $\bar{X} \pm SD$ ($\mu\text{M}/\text{mg protein}$)
DC	$1,73 \pm 0,65$	$2,457 \pm 0,28$	$1,31 \pm 0,2$
NaPB	$2,09 \pm 0,76$	$8,71 \pm 0,63$	$7,47 \pm 0,15$
Silymarin	$1,9 \pm 0,03$	$3,279 \pm 0,52$	$2,783 \pm 0,18$

KẾT LUẬN

Tinh sạch microsome và P450 là khâu rất quan trọng để có thể nghiên cứu khả năng tác động của các chất lên hệ enzyme P450 cũng như xác định isozyme đặc hiệu chuyển hóa một cơ chất xác định. Kết quả thu được cho thấy, hoạt tính và hàm lượng của P450 ở dịch microsome của hai nhóm gây cảm ứng bởi silymarin và NaPB tăng lên so với dịch nghiền đồng thể. Silymarin được gây cảm ứng bằng đường uống đã làm tăng khả năng khử độc của gan thông qua tăng khả năng hoạt động của hệ thống P450.

Kết quả điện di biến tính trên gel polyacrylamide 10% xuất hiện 4 băng trong đó có 2 băng đậm tương ứng với băng protein có trọng lượng phân tử xấp xỉ 49 kDa và 55 kDa tương đương với vị trí của hai isozyme P450 là isozyme thứ 2 ($LM_2 = 48,7$ kDa) và isozyme thứ 4 ($LM_4 = 55,3$ kDa) đối với cả 2 mẫu được gây cảm ứng bởi silymarin và NaPB.

Lời cảm ơn: Công trình được thực hiện với sự hỗ trợ kinh phí của Đề tài cấp Nhà nước KC-04-17.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

Bogaards JJP, Bertrand M, Jackson P, Oudshoorn MJ, Weaver RJ, van Bladeren PJ, Walther B (2000) Determining the best animal model for human cytochrome P450 activities: A comparison of mouse, rat, rabbit, dog, micropig, monkey and man.

Xenobiotica 30(12): 1131-1152.

Flora K, Hahn M, Rosen H, Benner K (1998) Milk thistle (*Silybum marianum*) for the therapy of liver disease. *Am J Gastroenterol* 93: 139-143.

Giuseppe C, Edwards M, Elizabeth A, Shephard, Phillips R (1994) Induction by phenobarbital of CYP2B gene expression in primary rat hepatocytes and in rat hepatoma cell line. Cytochrome P450. 8th International Conference. Ed Lechner MC John Libbey Eurotext, Paris: 587-590.

Laemmli UK (1970) Cleavage of structural protein during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-685.

Liliana F, Perez-Alvarez V (1997) Comparative effects of colchicine and silymarin on CCl₄- chronic liver damage in rats. *Arch Med Res* 28(1): 11-17.

Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ (1951) Protein measurement with the folin phenol reagent. *J Biochem* 193(1): 263-275.

Luper S (1998) A review of plants used in the treatment of liver disease. *Altern Med Rev* 3(6): 410-421.

Nielsen SE, Breinholt V, Justesen U, Cornett C, Dragsted LO (1998) In vitro biotransformation of flavonoids by rat liver microsomes. *Xenobiotica* 28: 389-401.

Obermeier MT, White RE, Yang CS (1995) Effects of bioflavonoids on hepatic P450 activities. *Xenobiotica* 25: 575-584.

Omura T, Sato R (1964) The carbon monoxide-binding pigment of liver microsomes I. Evidence for its hemoprotein nature. *J Biol Chem* 239: 2370-2379.

Zuber R, Modriansky M, Dvorak Z, Rohovsky P, Ulrichova J, Simanek V, Anzenbacher P (2002) Effect of silybin and its congeners on human liver microsomal cytochrome P450 activities. *Phytother Res* 16(7): 632-638.

EFFECT OF SILYMARIN ON RABBIT LIVER MICROSOMAL CYTOCHROMES P450 ACTIVITIES

Do Thi Tuyen¹, Dao Thi Mai Anh², Nguyen Thi Ngoc Dao^{1,*}

¹*Institute of Biotechnology*

²*Hanoi College of Pharmacy*

SUMMARY

Milk thistle [*Silybum marianum* (L.) Gaertn (Fam. *Asteraceae*)] is known to contain a number of flavonolignans, compounds that are produced in plants by radical coupling of a flavonoid and a phenylpropanoid. Milk thistle extract is one of the most commonly used nontraditional therapies, particularly in Germany. Silymarin was first isolated from an extract of milk thistle fruit some three decades ago. Silymarin is known to be composed of mainly silybin (about 50 - 70%), but also contains silychristin, silydianin and other closely related flavonolignans. Silymarin has been used to treat liver diseases for hundreds of years. Although regarded as safe, many of the extract constituents remain thus far untested for their possible effects on liver biotransformation enzymes, especially P450. In this report, we evaluated the effect of silymarin on the activity of liver microsomal P450. Treatment with silymarin (dose: 50 mg/kg body weight) significantly increased the P450 activity (aniline hydroxylase activity) and P450 content. Aniline hydroxylase activity increased 33% in comparison to the negative control. On the other hand, the microsomal P450 contents increased 44% comparing with the negative control. SDS-PAGE of the purified P450 preparation showed four major bands from 49.0 kDa to 55.0 kDa which could correspond to the positions of P450 LM₂ (MW: 48.7 kDa) and P450 LM₄ (55.3 kDa).

Key words: *Aniline hydroxylase activity, milk thistle, rabbit liver microsomal P450, silymarin, sodium phenobarbital*

* Author for correspondence: Tel: 04. 7563159; E-mail: nndao@ibt.ac.vn

KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU HÀM LƯỢNG CAROTENOID TỔNG SỐ TRONG THỊT MỘT SỐ LOÀI THỦY ĐỘNG VẬT Ở VIỆT NAM*

Nguyễn Tài Lương, Nguyễn Thị Ty, Nguyễn Thị Vĩnh
Viện Công nghệ Sinh học, Trung tâm KHTN & CNQG

ĐẶT VẤN ĐỀ

Đến nay các công trình nghiên cứu về carotenoid thực vật đã có nhiều tài liệu, song nghiên cứu về carotenoid động vật còn rất khiêm tốn. Theo công bố của các nhà khoa học Nhật bản Tsushima M và cs, 1998 đã tách được carotenoid từ thịt hải sâm *Cucumaria japonica* của biển Nhật bản. Nhiệm vụ của nhóm nghiên cứu chúng tôi trong chương trình nghiên cứu cơ bản là nghiên cứu tìm kiếm các nguồn giàu carotenoid từ tài nguyên thủy động vật.

Vai trò sinh lý hoá sinh của Carotenoid đã rõ. Các carotenoid trong thực phẩm được gọi là các tiền vitamin A (provitamin A), trong quá trình hấp thu được các tế bào niêm mạc ruột tổng hợp thành vitamin A và được tích lũy trong cơ thể.

Vitamin A, và tiền sinh tố A (caroten) có vai trò quan trọng trong sự tăng trưởng tế bào, chống oxy hoá, chống lão hoá, chúng tham gia vào quá trình hình thành mô, xương, tăng chức năng hoạt động của màng bảo vệ của niêm mạc và da, giúp trẻ em mau lớn, người lớn khoẻ trẻ lâu. Thiếu Vitamin A sẽ suy yếu miễn dịch, dễ bị vô số bệnh nhiễm trùng, bị quáng gà, tiến tới viêm kết mạc, khô mắt, loét giác mạc, mù mắt, sùng hoá da. Trẻ em thiếu vitamin A sẽ bị suy dinh dưỡng protein (Phan Đức Bình, 2002)

Có nhiều dạng carotenoid, song chỉ có beta caroten có hoạt tính sinh học cao nhất và vào cơ thể thì beta caroten được chuyển hoá tạo thành 2 phân tử vitamin A. Alpha caroten hay gamma caroten khi vào cơ thể tạo thành một phân tử vitamin A. Các carotenoid khác như lycopene (có nhiều trong cà chua, dưa hấu) khi vào cơ thể không có khả năng tạo thành vitamin A. Vấn đề quan trọng là trong trường hợp cơ thể chưa cần sử dụng nhiều vitamin A, thì các carotenoid được giữ lại trong cơ thể ở dạng dự trữ. Dự trữ caroten ít độc hơn vitamin A trong trường hợp quá dư thừa trong cơ thể (Nguyễn Thiện Luân, Lê Doãn Diên, Phan Quốc Kinh, 1997).

Trong bài báo này chúng tôi trình bày kết quả nghiên cứu điều tra hàm lượng carotenoid tổng số ở một số loài thủy động vật ở Việt Nam.

ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

Nghiên cứu tìm hiểu phát hiện nguồn carotenoid tổng số trong các mẫu cơ động vật trưởng thành như ngao- *Meretrix sp.*, hào- *Crasostrea*, sò huyết- *Anadara granosa*, gân trai- *Tendon of Oyster* (lấy từ vùng biển Nghi Sơn Thanh hoá), ốc nhồi- *Large edible snail*, hến- *Corbicula sp.*, trai đồng- *Alodonta eliptical* Hens, cua đồng- *Somaniathelphusa sinensis*, cá rô - *Anabas testudineus*, Lươn-swamp- eel (lấy tại khu vực Tứ Liêm ngoại thành Hà nội).

Các mẫu được nghiền, chiết và xử lý theo phương pháp của Vũ Đình Vinh, Đỗ Đình Hồ (Kỹ thuật Y sinh hoá, Trường Đại học Y Hà nội) và đo ở bước sóng 450nm trên máy Quang phổ tử ngoại UV-8452 đặt tại Viện CNSH.

KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU VÀ THẢO LUẬN

Các kết quả nghiên cứu phân tích hàm lượng carotenoid tổng số trong các mẫu thịt thủy động vật được trình bày trong bảng 1.

Qua bảng 1 cho thấy trong thịt động vật có hàm lượng carotenoid khác nhau tùy theo loài. Theo thứ tự giảm dần về hàm lượng carotenoid trong thịt các loài động vật đã nghiên cứu có thể sắp xếp như sau:

Cua đồng (28,36mg%) > hào (9,64mg%) > ngao (4,23 mg%) > cá rô (3,05mg%) > sò huyết (2,84 mg%) > hến (2,32mg%) > trai đồng (2,12mg%) > gân trai (2,04 mg%) > Hải long (1,20 mg%) > cá cơm (1,15mg%) = lươn (1,13 mg%).

Để có thể hình dung sự phong phú của các nguồn carotenoid động vật, chúng ta hãy so sánh với hàm lượng caroten trong củ cà rốt (3,63 mg%). Từ kết quả trên cho phép rút ra nhận xét sau:

Hàm lượng carotenoid trong cua đồng và hào biển là cao nhất, gấp 3-8 lần so với cà rốt.

* Đề tài thuộc chương trình NCCB trong khoa học tự nhiên, mã số 622901

Hàm lượng carotenoid trong thịt ngao và cá rô tương đương với cà rốt.

Hàm lượng carotenoid trong sò huyết bằng 78% hàm lượng carotenoid trong cà rốt.

Hàm lượng carotenoid trong thịt của trai, hến chiếm khoảng 60% hàm lượng carotenoid của củ cà rốt.

Hàm lượng carotenoid trong thịt cá cơm và lươn nước ngọt tương đương nhau (1,13- 1,15 mg% vck) và bằng 31% hàm lượng carotenoid trong cà rốt.

Như vậy, lần đầu tiên chúng tôi đã phát hiện thấy cua đồng và hào rất giàu carotenoid tổng số, các nguồn động vật nhuyễn thể của biển như hàu, ngao, sò huyết có nguồn carotenoid tương đương hay cao gấp 2,5 lần so với hàm lượng carotenoid trong củ cà rốt.

Các kết quả này mở ra những nghiên cứu tiếp theo phục vụ cho các mục tiêu khai thác và ứng dụng nguồn carotenoid động vật trong công nghiệp chế biến thực phẩm và phục vụ y tế.

Vai trò sinh học và tác dụng của carotenoid đã rõ. Những công trình nghiên cứu ở Mỹ, Anh, Nhật, Pháp, Phần lan, Balan vv... đã chứng minh mối liên hệ giữa nguồn thực phẩm giàu vitamin A và beta caroten với tỷ lệ thấp mắc các bệnh ung thư khí quản, phổi, màng trong dạ con, cổ tử cung, tuyến tiền liệt, trực tràng, manh tràng, dạ dày... Nồng độ beta caroten thấp trong huyết tương có liên quan đến nguy cơ gây ung thư. Còn nồng độ vitamin E và beta caroten trong máu thấp sẽ làm tăng nguy cơ bị đục thủy tinh thể (Đàm Trung Bảo, Hoàng Tích Huyền, Phạm Nguyên Vinh, 1999).

Theo khuyến nghị của WHO việc sản xuất các vitamin A, D, E, C đang được quan tâm hàng đầu. Hiện nay trên toàn thế giới có 200 triệu trẻ em dưới 5 tuổi thiếu vitamin A. Thiếu vitamin A sẽ dẫn tới mù mắt và có thể chết, còn thiếu ở mức vừa phải dẫn tới suy giảm miễn dịch và làm tăng các bệnh thông thường như tiêu chảy, sởi dễ dẫn tới tử vong hơn. Theo Tạp chí Thông tin KHKT thế giới N30, 27-7-1995, ở Indonêxia cho trẻ em 2 lần/năm uống vitamin A liều cao đã giảm được tỷ lệ tử vong xuống 1/3.

Vitamin A và caroten còn là các antioxidants khá mạnh, chúng sản lũng các gốc tự do trong cơ thể và vô hiệu hoá chúng, bảo vệ màng tế bào và phòng ngừa nhiều bệnh tật khác nhau ở con người, thậm chí ngăn ngừa sự hình thành các khối u.

KẾT LUẬN

1. Theo thứ tự giảm dần về hàm lượng carotenoid trong thịt các loài động vật đã nghiên cứu có thể sắp xếp :

Cua đồng (28,36mg%) > hào (9,64mg%) > ngao (4,23 mg%) > cá rô (3,05mg%) > sò huyết (2,84 mg%) > hến (2,32mg%) > trai đồng (2,12mg%) > gân trai (2,04 mg%) > Hải long (1,20 mg%) > cá cơm (1,15mg%) = lươn (1,13 mg%).

2. Các kết quả cụ thể về các nguồn nguyên liệu giàu carotenoid đã phát hiện ở trên đã tạo cơ sở khoa học cho nhóm nghiên cứu chúng tôi ứng dụng chúng để làm chế phẩm thực phẩm thuốc phục vụ y tế.

Bảng 1. Hàm lượng protein tan và carotenoid tổng số trong thịt một số loài thủy động vật

TT	Mẫu nghiên cứu	Protein tan g%	Carotenoid mg%
1	Hải long	4,50	1,20
2	Cá cơm	6,40	1,15
3	Sò huyết	5,00	2,84
4	Ngao	13,60	4,23
5	Hào	6,00	9,64
6	Gân trai	2,60	2,04
7	Trai đồng	5,10	2,12
8	Hến	7,00	2,32
9	Cua đồng	13,40	28,36
10	Cá rô	6,20	3,05
11	Lươn	6,40	1,13
12	Cà rốt	-	3,63

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Đàm Trung Bảo, Hoàng Tích Huyền, Phạm Nguyên Vinh, 1999. *Chất chống oxy hoá để phòng chống bệnh tật và chống lão hoá*. Nxb Y học, Hà nội.
2. Phan Đức Bình, 2002. *Vitamin dinh dưỡng và sức khoẻ*. Tạp chí Thuốc & Sức khoẻ, số 214 (15-6-2002, p 30).
3. Nguyễn thiện Luân, Lê Doãn Diên, Phan Quốc Kinh, 1997. *Các loại thực phẩm thuốc và thực phẩm chức năng ở Việt nam*. Nxb Nông nghiệp, Hà nội.
4. Nguyễn Tài Lương và cs, 2001. *Ứng dụng CNSH và kinh nghiệm y học dân tộc tạo chế phẩm thực phẩm thuốc cho vận động viên*. Hội thảo Quốc tế Sinh học, Liên hiệp các hội KHKT Việt nam, Hà nội 2-5/7/2001, p279-284.
5. Kỹ thuật Y sinh hoá, Hoá sinh lâm sàng, Bộ Y tế, 1998.
6. Tsushima M, Fujiwara Y, Matsuno T., 1998. *Novel marine di-Z-carotenoid: Cucumariaxanthins A, B, C from the sea cucumber Cucumaria Japonica*. J. of natural products. Coden JNPRDF. USA. ISSN. DA, 1996. Vol. 59, pp 30-34.
7. Tạp chí Thông tin KHKT thế giới N30, 27-7-1995.

SUMMARY

THE CONTENT OF CAROTENOID IN MEAT OF SOME AQUATIC ANIMAL SPECIES

Nguyen Tai Luong, Nguyen Thi Ty, Nguyen Thi Vinh
Institute of Biotechnology, NCST

The carotenoid contents in meat of some aquatic animal species are distributed in the following order:

Somaniathelphusa sinensis (28,36mg%) > *Crasostrea*, (9,64mg%) > *Meretrix sp.*, (4,23 mg%) > *Anabas testudineus* (3,05mg%) > *Anadura granosa* (2,84 mg%) > *Corbicula sp.* (2,32mg%) > *Anodonta elyptical* Hend (2,12mg%) > *Tendon of Oyester* (2,04 mg%) > *Sea dragon- Hypocampus hytryx* Kaup (1,20 mg%) > *Long -Jawed anchovy, Anchoviella* (1,15mg%) = *swamp- eel* (1,13 mg%).

Our results contributed scientific basis to the experiences of traditional medicine and the modern industry of "Food and Drug" using meat of some aquatic animals and its products for the medicine purpose.

2.P.1

**HIỆU QUẢ CỦA CÁC CHẾ PHẨM THỨC ĂN CHỨC NĂNG
(FUNCTIONAL FOOD) LÊN MỘT SỐ CHỈ TIÊU SINH LÝ THẦN
KINH CỦA HỌC SINH VÀ VẬN ĐỘNG VIÊN**

Nguyễn Thị Vĩnh, Nguyễn Tài Lương, Đoàn Việt Bình,
Nguyễn Huy Nam, Nguyễn Kim Dung
Viện Công nghệ sinh học, Trung tâm KHTN&CNQG
Tạ Thuý Lan
Đại học Sư phạm Hà Nội
Nguyễn Thị Hiền, Hoàng Thị Ái Khuê
Đại học Sư phạm Vinh

ĐẶT VẤN ĐỀ

Từ những nghiên cứu cơ bản đã dẫn tới giải pháp công nghệ enzym, chúng tôi đã tạo được một số chế phẩm thức ăn chức năng (functional food) nhằm tăng cường thể lực cho vận động viên và lực lượng vũ trang nước ta, từ nguồn tài nguyên động vật phong phú và quý của biển Việt nam (hải sâm, cầu gai, rần biển, trai...). Các chế phẩm này được bào chế trên dây truyền hiện đại của các xí nghiệp dược phẩm trong nước (Biopha, Traphaco, Xí nghiệp dược phẩm Trung ương 25). Các sản phẩm này an toàn, không có nội độc tố. Nghiên cứu tác dụng lâm sàng tại Bệnh viện Bạch Mai, Hà Nội, trên 60 bệnh nhân hen phế quản, suy nhược cơ thể, Luput ban đỏ hệ thống, GS.TSKH Nguyễn Năng An - Chủ nhiệm khoa dị ứng lâm sàng đã kết luận "Các chế phẩm có tác dụng tăng thể lực chung và hồi phục sức khoẻ như các loại thuốc bổ, trong tất cả các trường hợp chưa thấy có tác dụng phụ gì xảy ra". Nhờ sự giúp đỡ của Viện Khoa học TĐTT và Trường đại học TĐTT quốc gia, các chế phẩm được đưa vào ứng dụng với những kết quả khích lệ trên các đối tượng vận động viên (VĐV). Một trong những VĐV bị loại thải do sức khoẻ, sau một tháng dùng chế phẩm hải sâm, đã phục hồi nhanh sức khoẻ và được tái tuyển chọn vào đội tuyển quốc gia; Các chế phẩm đã góp phần phục hồi nhanh và vượt mức một số chỉ tiêu sinh lý, hoá sinh cơ thể VĐV trong quá trình luyện tập và thi đấu, nhiều VĐV đoạt giải quốc gia và quốc tế.

Những nghiên cứu cơ bản sâu về tác dụng mới của các chế phẩm đang được tiếp tục, đặc biệt chú trọng đến các tác dụng lên hệ thần kinh trung ương.

Theo Santé Magazine - Tạp chí Thông tin KHKT Kinh tế Thế giới, N22, 6/2000 - thì não bộ tiêu thụ khoảng 25% khẩu phần năng lượng mỗi ngày. Nếu dinh dưỡng không đầy đủ, mất cân đối thì ảnh hưởng không tốt đến hoạt động của não bộ.

Trong điều kiện lao động đòi hỏi nhiều đến trương lực của não bộ, nhu cầu của não đối với các chất dinh dưỡng tăng lên, đặc biệt đối với các chất đặc thù, cần thiết cho các quá trình thần kinh. Nghiên cứu những vấn đề này có giá trị khoa học và thực tiễn rất lớn, đang lôi cuốn nhiều phòng thí nghiệm y sinh học trong và ngoài nước

Khi cơ thể thiếu chất dinh dưỡng, thần kinh mệt mỏi, đứng trước vài sự lựa chọn, thường chậm chạp và do dự, hoặc quyết định nhanh, nhưng với những cơ hội dễ lẩn lộn. Còn đối với những người khoẻ mạnh, dinh dưỡng đầy đủ và rèn luyện tốt, sẽ thiên về sự cân bằng, vừa có hiệu năng tối đa giúp sự phân tích thông tin và sự quyết đoán nhanh chóng.

Trong bài báo này, trình bày các kết quả nghiên cứu tác dụng của các chế phẩm Hải sâm, Rabiton, Hagaton lên một số chỉ tiêu sinh lý thần kinh của học sinh phổ thông trung học và vận động viên TĐTT.

ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

Nghiên cứu tiến hành trên 60 học sinh khối lớp 4 Trường PTCS Đoàn Kết thị xã Hà Đông, tỉnh Hà Tây; Học sinh chia làm 2 nhóm: 30 em thuộc nhóm đối chứng, 30 em thuộc nhóm thí nghiệm.

Bước 1: Tiến hành ghi điện não đồ (ĐNĐ) của 60 em lúc chưa dùng hải sâm và kiểm tra đánh giá năng lực trí tuệ bằng test Raven.

Bước 2: Nhóm thí nghiệm cho uống hải sâm trong thời gian 2 tháng, sau đó ghi điện não đồ lần thứ 2 để đánh giá sự khác biệt trước và sau khi uống hải sâm.

Bước 3: Cho học sinh làm bài kiểm tra chất lượng để đánh giá sự khác biệt giữa học sinh được uống hải sâm và học sinh không được uống hải sâm.

Đã tiến hành nghiên cứu trên 20 vận động viên dưới ảnh hưởng của chế phẩm Rabiton, Hagaton, lúa tuổi 16- 20 tuổi, theo dõi các chỉ tiêu phản xạ đơn, phản xạ tự chọn, ĐNĐ, đánh giá khả năng trí tuệ bằng test Raven (phối hợp với Đại học Y Hà Nội và Đại học Sư phạm Vinh).

Đo điện não đồ (ĐNĐ) trên máy Helli Neuros Kritt EE 212 của Cộng hoà Liên bang Đức.

KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU

Nghiên cứu khả năng hoạt động trí tuệ của học sinh

Qua bảng 1 có thể thấy điểm test Raven trung bình của học sinh nhóm đối chứng (34,8), cao hơn so với điểm test của học sinh thuộc nhóm thí nghiệm (28,89). Sự chênh lệch điểm test Raven trung bình giữa 2 nhóm bằng 5,91 điểm ($p < 0,05$) chứng tỏ sự khác biệt có ý nghĩa thống kê.

Sự chênh lệch này là ngẫu nhiên vì việc lựa chọn các em để thí nghiệm dùng thuốc bổ hải sâm phụ thuộc vào sự đăng ký và đồng ý của phụ huynh. Như vậy, nhóm đối chứng có điểm test Raven cao hơn nhóm thí nghiệm (là nhóm sẽ được uống hải sâm).

Hình ảnh điện não đồ của học sinh trước khi uống hải sâm.

Chúng tôi đã ghi điện não đồ (ĐNĐ) vùng trán và vùng chẩm của học sinh 2 nhóm trước khi tiến hành cho uống hải sâm. Các kết quả được trình bày trong bảng 2, 3.

Kết quả nghiên cứu cho thấy năng lực trí tuệ của học sinh phụ thuộc rất nhiều vào mức độ hoàn chỉnh hình ảnh ĐNĐ. Trước hết, nó phụ thuộc vào nhịp trội tại thùy chẩm và thùy trán. Vì lý do này, chúng tôi đã nghiên cứu các chỉ số cơ bản của nhịp anpha thùy chẩm và nhịp theta thùy trán.

Qua bảng 2 cho thấy, tần số nhịp anpha trung bình của nhóm đối chứng là 9,26 đd/Hz và của nhóm thí nghiệm là 9,33 đd/Hz. Sự chênh lệch về mặt tần số nhịp anpha tại vùng chẩm giữa nhóm thí nghiệm và nhóm đối chứng là 0,07 đd/Hz. Khác với tần số, biên độ của nhịp anpha của nhóm đối chứng là 92,0 μ V và của nhóm thí nghiệm- 90,67 μ V. Biên độ sóng anpha của nhóm đối chứng cao hơn so với biên độ của nhóm thí nghiệm là 1,33 μ V.

Cũng giống như tần số, chỉ số anpha (%) của học sinh thuộc nhóm thí nghiệm cao hơn so với nhóm đối chứng. Chỉ số nhịp anpha của nhóm đối chứng là 63,8% và của nhóm thí nghiệm 64,6%. Sự chênh lệch về chỉ số anpha (%) giữa nhóm thí nghiệm và nhóm đối chứng là 0,8%.

Qua bảng 3 cho thấy tần số của nhịp theta vùng trán ở học sinh thuộc nhóm đối chứng là 6,65

đd/Hz và của nhóm thí nghiệm là 6,25 đd/Hz. Như vậy, tần số nhịp theta vùng trán của học sinh thuộc nhóm đối chứng cao hơn nhóm thí nghiệm là 0,4 đd/Hz.

Biên độ nhịp theta của nhóm đối chứng là 48,5 μ V và của nhóm thí nghiệm là 44,00 μ V. Như vậy là biên độ của nhịp theta của nhóm đối chứng cao hơn nhóm thí nghiệm là 4,5 μ V ($p < 0,05$), chứng tỏ sự khác biệt có ý nghĩa thống kê.

Chỉ số theta (%) của học sinh nhóm đối chứng là 18,73%, thấp hơn chỉ số này của nhóm thí nghiệm (18,87%). Chỉ số theta vùng trán của nhóm thí nghiệm cao hơn so với nhóm đối chứng là 0,04%.

Sự thay đổi điện não đồ của học sinh sau khi uống thuốc

Đánh giá nhịp anpha vùng chẩm của học sinh trước và sau khi uống thuốc.

Nhìn vào bảng 4 ta thấy nhịp anpha vùng chẩm của học sinh trước và sau khi uống hải

Bảng 1. So sánh khả năng hoạt động trí tuệ của học sinh nhóm đối chứng và nhóm thí nghiệm.

Đối tượng	n	Điểm test Raven trung bình
Nhóm đối chứng	30	34,8
Nhóm thí nghiệm	30	28,89
Sự chênh lệch		5,91

Bảng 2. Các chỉ số điện não vùng chẩm của nhịp anpha

Đối tượng	n	Tần số đd/Hz	Biên độ μ V	Chỉ số (%)
Nhóm đối chứng	30	9,26	92,00	63,8
Nhóm thực nghiệm	30	9,33	90,67	64,6
Sự chênh lệch		0,07	61,33	0,8

Bảng 3. Các chỉ số điện não vùng trán của nhịp theta

Đối tượng	n	Tần số đd/Hz	Biên độ	Chỉ số (%)
Nhóm đối chứng	30	6,65	48,5	18,73
Nhóm thí nghiệm	30	6,25	44	18,87
Sự chênh lệch		0,4	4,5	0,04

Bảng 4. Các chỉ số điện não của nhịp anpha của học sinh trước và sau khi uống hải sâm

Đối tượng	n	Tần số đd/Hz	Biên độ μ V	Chỉ số (%)
Trước uống thuốc	30	9,33	90,67	64,6
Sau uống thuốc	30	9,27	104	66,63
Chênh lệch		0,06	13,33	2,03

sâm có sự khác biệt. Trước khi uống hải sâm, tần số anpha của học sinh nhóm thí nghiệm là 9,33 đd/Hz, sau khi uống hải sâm là 9,27 đd/Hz. Tần số anpha có giảm đi 0,06 đd/Hz sau khi uống hải sâm.

Khác với tần số, biên độ của nhịp anpha trước khi uống hải sâm là 90,67 μ V. Sau khi uống hải sâm biên độ tăng lên bằng 104,0 μ V. Như vậy là sau khi uống hải sâm biên độ của nhịp anpha tăng lên 13,33 μ V. Chỉ số anpha thay đổi rõ nét sau khi uống hải sâm. Kết quả cụ thể là: Trước khi uống hải sâm chỉ số nhịp anpha là 64,6%, sau khi uống hải sâm là 66,63%. Như vậy là sau khi uống hải sâm chỉ số anpha có tăng lên 2,03%.

Sự thay đổi nhịp theta vùng trán của học sinh sau khi uống hải sâm

Qua bảng 5 ta thấy, tần số của nhịp theta trước khi uống hải sâm là 6,25 đd/Hz và sau khi uống hải sâm là 6,28 đd/Hz. Như vậy, sau khi uống hải sâm tần số của nhịp theta có tăng 0,03 đd/Hz. Sự chênh lệch này là không đáng kể.

Những thay đổi về mặt biên độ của nhịp theta thể hiện khá rõ nét. Biên độ nhịp theta trước khi uống hải sâm là 44,00 μ V. Sau khi uống hải sâm biên độ tăng lên và bằng 71,83 μ V. Như vậy, sau khi uống hải sâm biên độ của nhịp theta tăng lên 27,83 μ V.

Cuối cùng là chỉ số của nhịp theta (%), trước khi học sinh uống hải sâm là 18,87% và sau khi uống hải sâm là 17,86%. Như vậy, sau khi uống hải sâm chỉ số nhịp theta giảm 1,01%.

Kết quả học tập của học sinh được uống hải sâm và học sinh không được uống hải sâm:

Sau khi cho học sinh uống hải sâm và ghi điện não đồ lần thứ hai, để tìm sự khác biệt về hình ảnh điện não đồ của học sinh trước và sau khi uống hải sâm, chúng tôi đã tiến hành kiểm tra chất lượng học tập của các em. Để bài cho tất cả các em thuộc nhóm đối chứng và nhóm thí nghiệm

giống nhau. Kết quả trình bày ở bảng 6.

Qua bảng 6 ta thấy chế phẩm hải sâm đã làm thay đổi khả năng học tập của học sinh khá rõ nét. Điểm trung bình của bài kiểm tra của học sinh được uống hải sâm là 8,13 điểm, trong khi đó ở học sinh không được uống hải sâm là 3,86 điểm. Như vậy, điểm trung bình của học sinh được uống hải sâm cao hơn hẳn so với học sinh không được uống hải sâm. Sự chênh lệch về điểm trung bình giữa hai nhóm là 4,27 điểm (mặc dù ban đầu khả năng hoạt động trí tuệ của các em thuộc nhóm đối chứng cao hơn so với các em thuộc nhóm thí nghiệm).

Các kết quả tương tự nhận được đối với chế phẩm Rabiton, Hagaton trong thực nghiệm trên các đối tượng vận động viên điển kinh và bơi lội. Các chế phẩm này có tác dụng cải thiện tốt các chỉ tiêu tâm lý, điện tim, hoạt động thần kinh, xử lý tốt các tình huống (xem bảng 7, 8).

Nghiên cứu chỉ số thông minh (IQ) trên các đối tượng vận động viên tại Trường đại học Sư phạm Vinh cho thấy có điểm test Raven sau 2 tháng dùng chế phẩm cao hơn rõ rệt so với đối chứng (bảng 7).

Bảng 5. Các chỉ số điện não của nhịp theta của học sinh trước và sau khi uống hải sâm

Đối tượng	n	Tần số đ d/Hz	Biên độ μ V	Chỉ số (%)
Trước uống thuốc	30	6,25	44,00	18,87
Sau uống thuốc	30	6,28	71,83	17,86
Chênh lệch		0,03	27,83	1,01

Bảng 6. Điểm kiểm tra của học sinh được uống thuốc và không được uống thuốc

Đối tượng	n	Điểm kiểm tra trung bình
Nhóm HS được uống thuốc	30	8,13
Nhóm HS không được uống thuốc	30	3,86
Sự chênh lệch		4,27

Bảng 7. Ảnh hưởng của chế phẩm thức ăn chức năng lên chỉ số thông minh (IQ) ở vận động viên.

Thời gian	Trước khi dùng thuốc	Sau 2 tháng dùng thuốc	Ghi chú
Chỉ số thông minh (IQ)	42,5 $\pm$ 1,6	45,0 $\pm$ 1,1	Hagaton
Chỉ số thông minh (IQ)	43,4 $\pm$ 1,4	45,4 $\pm$ 0,62	Rabiton

Bảng 8. Các chỉ tiêu phản xạ của VĐV bơi lội dưới ảnh hưởng của chế phẩm Rabiton

Chỉ tiêu và đối tượng nghiên cứu		Trước 2 tháng	Sau 2 tháng	Kết quả Sau 2 tháng tập luyện
Nhóm đối chứng không dùng Rabiton				
Phản xạ đơn	Nam	208,13	198,90	nhANH 48ms
	Nữ	217,77	199,77	nhANH 18ms
Phản xạ tự chọn	Nam	290,61	279,29	nhANH 11ms
	Nữ	289,46	256,40	nhANH 33ms
Kiểm tra lỗi tín hiệu (điện tử)	Nam	5,88%	9,80%	68% mắc bẫy
	Nữ	0%	8,82%	100% mắc bẫy
Nhóm thí nghiệm dùng Rabiton				
Phản xạ đơn	Nam	208,40	195,04	nhANH 13ms
	Nữ	202,64	200,41	nhANH 2ms
Phản xạ tự chọn	Nam	292,87	228,61	nhANH 64ms
	Nữ	251,86	270,71	chẬM 19ms
Kiểm tra lỗi tín hiệu (điện tử)	Nam	9,41%	1,18%	87% không mắc bẫy
	Nữ	3,92%	0%	100% không mắc bẫy

Các huấn luyện viên Trường đại học sư phạm Vinh nhận xét: "Các vận động viên có cảm giác thoải mái hơn, ăn ngủ tốt hơn, tăng khả năng chịu đựng đối với tập luyện kéo dài, quá trình hồi phục mệt mỏi nhanh hơn. Đầu óc sáng khoái, nhanh nhẹn, hoạt bát, xống xáo hơn. Chưa thấy tác dụng phụ".

THẢO LUẬN

Kết quả nghiên cứu cho thấy, chế phẩm hải sâm đã có tác dụng cải thiện tốt khả năng hoạt động trí tuệ của học sinh. Điều này được thể hiện khá rõ nét qua sự thay đổi sóng anpha thùy chẩm và sóng theta vùng trán. Cụ thể là biên độ của sóng anpha thùy chẩm và sóng theta thùy trán tăng đáng kể theo xu hướng hoàn chỉnh hoá hình ảnh điện não đồ trong độ tuổi. Kết quả này phù hợp với các quan điểm của Tạ Thuý Lan, Võ văn Toàn, 1993, Trần thị Cúc, 1998. Các tác giả này cho rằng mức độ hoàn chỉnh hoá hình ảnh điện não đồ phụ thuộc vào năng lực trí tuệ của học sinh ở độ tuổi 8-12 tuổi. Có lẽ do năng lực trí tuệ tăng, nên hoạt động theta thùy trán cũng thay đổi đáng kể. Nhiều tác giả cho rằng *nhịp theta có nguồn gốc phát sinh từ hồi hải mã (hippocampus), đặc trưng cho hoạt động sáng tạo của não bộ* (Nauta, 1972. Kosmal, 1978. Orlov và cs. 1979 vv...). Chính vì vậy, có thể coi sự thay đổi chỉ số điện não đồ của học sinh thuộc nhóm thí nghiệm có liên quan mật thiết với tăng năng lực trí tuệ. Điều này thể hiện rõ qua kết quả làm bài kiểm tra cuối đợt.

Các kết quả nhận được kể trên, phù hợp với các kết quả nhận được của chúng tôi khi nghiên cứu ảnh hưởng của Hải sâm, Rabinon, Hagaton lên các chỉ tiêu tests Raven, phản xạ đơn, phản xạ lựa chọn, lỗi tín hiệu điện tử, tốc độ dẫn truyền thần kinh và ĐNĐ ở vận động viên (phối hợp với Bộ môn Sinh lý đại học Y Hà nội và Khoa sinh, Đại học Sư phạm Vinh).

Sở dĩ các chế phẩm kể trên có tác dụng tốt lên hoạt động chức năng của hệ thần kinh trung ương và cải thiện tốt khả năng trí tuệ của học sinh và VĐV là do các chế phẩm này đã:

1) Cung cấp cho cơ thể sản phẩm giàu *lysine, phenylalanine, tyrosine*. Vai trò sinh học của lysine đã rõ - giữ vị trí quan trọng trong quá trình trao đổi chất, sinh tổng hợp huyết sắc tố, axit nucleic, thúc đẩy hình thành mô xương, ảnh hưởng dương tính lên chức năng tiêu hoá và các quá trình thần kinh. Phenylalanine và tyrosine lại là tiền chất của các chất dẫn truyền thần kinh catecholamine là dopamin và noradrenalin. Chúng kích thích hormone tăng trưởng, đẩy mạnh hoạt động của hệ miễn dịch. Các axit amin này còn giúp ích trong điều trị một vài chứng suy nhược.

2) Cung cấp thêm cho cơ thể sản phẩm giàu sắt (Fe) dưới dạng liên kết hữu cơ. Fe là nguyên tố tạo hồng cầu và thúc đẩy quá trình sinh tổng hợp hemoglobin, do đó đảm bảo tốt cho việc cung cấp O₂ cho não đáp ứng các phản ứng năng lượng của não, góp phần cải thiện tốt hoạt động của trung ương thần kinh.

3) Cung cấp thêm cho cơ thể sản phẩm dinh dưỡng giàu kẽm (Zn) và đồng (Cu). Vai trò sinh học của hai nguyên tố này có liên quan đến chức năng thần kinh đã được chứng minh. Theo công bố của Tiến sỹ Gordus từ trường đại học Michigan của Mỹ, 1979, ở những sinh viên giỏi toán, trong tóc của chúng bao giờ cũng có hàm lượng Zn và Cu cao hơn các sinh viên yếu kém.

4) Cung cấp cho cơ thể sản phẩm giàu Selen (Se). Se được mệnh danh là "kẻ săn lùng các gốc tự do" trong cơ thể để khử chúng. Se là một trong các antioxidant mạnh nhất có tác dụng chống các stress về tâm lý, bảo vệ hoạt động của hệ thần kinh và tim mạch.

5) Cung cấp thêm cho cơ thể một hàm lượng nhất định *hormone testosterone*. Hàm lượng testosterone trong thịt hải sâm, cầu gai, rắn biển, cao hơn so với thịt gia súc gia cầm. Những nghiên cứu mới đã chứng minh vai trò quan trọng của testosterone lên các quá trình thần kinh. Giáo sư Baulieu và cs. (1995) chứng minh rằng testosterone cũng được các tế bào trung ương thần kinh của cả nam và nữ sản xuất ra một lượng nhỏ, để điều khiển các tập tính. Testosterone còn được các tế bào Schwann của vỏ myelin bao quanh các sợi thần kinh sản xuất ra, có nhiệm vụ sửa chữa các trục trặc trên đường dẫn truyền các xung thần kinh, đảm bảo cho các phản xạ được nhanh nhạy và chính xác. Khi vỏ myelin bị tổn thương hay bị phá huỷ thì làm mất khả năng tư duy, nhất là thương tổn ở vùng phụ trách trí nhớ ngắn hạn và mất khả năng lập kế hoạch, tiên đoán. Nhà nghiên cứu Mỹ, Andy Organ (2003), tiến hành thí nghiệm lý thú tại Carolina về tác động của stress đối với binh sỹ trong các tình huống bị bắt, bị giam và bị tra tấn. Tác giả phát hiện thấy ở tất cả đối tượng thí nghiệm, đặc biệt là lính đặc nhiệm thuộc lực lượng mũ nổi xanh, đã tiết ra nhiều chất hormone chống stress, giúp não tự trấn an mình. Những binh sỹ tiết ra ít hormone chống stress, là những người tỏ ra sợ hãi, luống cuống nhiều nhất trong thí nghiệm. Vấn đề cần làm rõ là bản chất của hormone này là neuropeptid, và có liên quan gì với testosterone, với selenium? Phát hiện này thôi thúc các nhà khoa học tìm kiếm các chất nhằm khắc phục sự sợ hãi và chống stress phục vụ thể thao và lực lượng vũ trang.

6) Gần đây, BS Nguyễn Thành Đông (Quân Y Viện 103, Hà Đông) trong luận văn Tiến sỹ Y học của mình (2003), đã phát hiện thêm một tác dụng mới của chế phẩm hải sâm. Chế phẩm viên nang hải sâm có tác dụng *phòng chống nhiễm độc thuốc bảo vệ thực vật* - nhóm Carbamat (chất này gây tổn thương gan, thận, tinh hoàn, làm giảm chức năng tạo máu, suy giảm chức năng của trục đồi thị - tuyến yên - tuyến sinh

duc, gây biến đổi hoạt tính điện não, ảnh hưởng lên hình ảnh giải phẫu bệnh của hệ thống thần kinh). Bằng thực nghiệm trên chuột, tác giả đã chứng minh hải sâm với liều 60mg/con/ngày uống liên tục 60 ngày, ngoài tác dụng tăng tạo máu, tăng trọng, còn có tác dụng rút ngắn thời gian phản xạ tự vệ tránh nóng, rút ngắn thời gian tiềm tàng của phản xạ có điều kiện so với nhóm đối chứng bị nhiễm Fenobucarb không được uống hải sâm.

KẾT LUẬN

1. Sự thay đổi rõ nét nhất dưới ảnh hưởng của hải sâm được thể hiện qua tăng biên độ sóng anpha thùy chẩm và sóng theta thùy trán. Biên độ và sóng anpha thùy chẩm trước và sau khi uống hải sâm tương ứng 90,67 μ V và 104 μ V. Biên độ sóng theta thùy trán cũng thay đổi như vậy và tương ứng 44 μ V và 71,83 μ V.
2. Chỉ số của nhịp anpha vùng chẩm và nhịp theta vùng trán thay đổi đáng kể. Chỉ số của nhịp anpha vùng chẩm thay đổi theo chiều hướng tăng (trước khi uống hải sâm-64,6%, sau khi uống hải sâm- 66,63%). Chỉ số của nhịp theta vùng trán cũng có sự thay đổi nhưng theo chiều hướng giảm (các chỉ số trước và sau khi uống hải sâm tương ứng là 18,87% và 17,86%).
3. Sau một tháng thực nghiệm, kiểm tra kết quả học tập của học sinh cho thấy điểm kiểm tra của các em được uống hải sâm tăng vượt so với các em không được uống hải sâm, mặc dù ban đầu chỉ số Raven của các em thuộc nhóm đối chứng cao hơn so với các em thuộc nhóm thí nghiệm.
4. Điểm test Raven ở vận động viên, sau 2 tháng dùng chế phẩm, cao hơn rõ rệt so với đối chứng không dùng chế phẩm.
5. Kiểm tra lỗi tín hiệu (điện tử) ở vận động viên bơi lội cho thấy nhóm dùng chế phẩm Rabiton có 13% nam và 0% nữ mắc lỗi tín hiệu điện tử, trong khi đó ở nhóm đối chứng tỷ lệ đó là 68% nam và 100% nữ.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Đỗ Hồng Anh, 1990. *Bảng hướng dẫn sử dụng test Raven*. Lược dịch.
2. Baulieu và cs, 1995. *Tạp chí TTKHKTKT Thế giới*. N49 (7-12-1995)-Hormone trong thần kinh.
3. Trần thị Cúc, Tạ Thủy Lan, 1996. *Đặc điểm năng lực trí tuệ của học sinh phổ thông trung học ở Huế*. Thông báo Khoa học và giáo dục, Đại học Sư phạm Huế, N9.
4. Nguyễn Thành Đồng, 2003. *Nghiên cứu ảnh hưởng của Fenobucarb và tác dụng bảo vệ của hải sâm lên một số chỉ số sinh học ở động vật thực nghiệm*. Luận án Tiến sĩ Y học, Hà Nội.
5. Gordus, 1979. *Tạp chí TTKHKTKT Thế giới*. N20-21. Dùng tốc để chẩn đoán bệnh.
6. Tạ Thủy Lan, Võ Văn Toàn, 1993. *Bước đầu thăm dò khả năng hoạt động trí tuệ của học sinh cấp 1 Hà Nội*. Hội nghị Khoa học các trường đại học Sư phạm toàn quốc. Cửa lò, 5-1993.
7. Đỗ Tất Lợi, 1991. *Những cây thuốc và vị thuốc Việt Nam*. Nhà xuất bản Khoa học và kỹ thuật, Hà Nội.
8. Nguyễn Tài Lương và cs, 2001. *Ứng dụng công nghệ sinh học sản xuất các chế phẩm thực phẩm - thuốc cho vận động viên*. Hội thảo Quốc tế về Sinh học, V2, t.297-284, Hà Nội.
9. Nauta W, 1972. *Neural associations of the frontal cortex*. Acta Neur. Exp. V32, p 125.
10. Orlov AA, Pirogov AA, Shefer VI, 1979. *So sánh đặc trưng hoạt tính các neuron vùng trán và vỏ vận động*. Tạp chí Sinh lý học, T 65, tr.1727-1733 (tiếng Nga).
11. Andy O, 2003. *Dùng được phẩm đặc biệt phục vụ quân đội*. Theo Spiegel. TT. An ninh thế giới. N104 (338), 10-7-2003.

SUMMARY

EFFECTS OF BIOPREPARATIONS HAI SAM, RABITON, HAGATON ON SOME NEUROPHYSIOLOGICAL DATA OF PRIMARY SCHOOL CHILDREN AND SPORTSMEN

Nguyen Thi Vinh, Nguyen Tai Luong Doan Viet Binh,
 Nguyen Huy Nam, Nguyen Kim Dung
Institute of Biotechnology, NCST
 Ta Thủy Lan
 Nguyen Thi Hien, Hoang Thi Ai Khue

We tried to apply enzyme technology and traditional medical experience to create a new product using sea cucumber, sea- urchin and sea snake, which we can find a lot in Vietnam sea. We discovered that there is a high content of non-replaceable amino acid (lysine, proline), of microelements (iron, zinc, and selenium) and of hormone steroid (testosterone) in sea cucumber, sea- urchin, especially in sea snake meat.

The technology to produce Hai sam capsule (from sea cucumber), Rabiton capsule (from sea snake) and Hagaton capsule (from sea- urchin and sea cucumber) are produced at Traphaco Company, Hanoi City, and Central pharmaceutical factory N25, Ho Chi Minh City.

The neurophysiological effects of Hai sam, Rabiton and Hagaton on the primary school children and sportsmen we investigated. The results are as follows:

1. Using Hai sam with a dose of 3 capsules /day and continuous for 2 months increased the amplitude and index of alpha wave of occipital lobe but of frontal lobe only the amplitude of theta wave increased.
2. The examined results of school- children were better in the using Hai sam group than the control.
3. After two months using Rabiton, Hagaton 1, the Raven test degree of sportsmen were higher than the control.
4. Determination of the mistake of electronic signals for the swimmers showed that: The proportions of mistake in the using Hai sam group were 13% for sportsmen and 0% for sportswomen but in the control group were 68% for sportsmen and 100% for sportswomen.

HÀM LƯỢNG AXIT AMIN TRONG CƠ MỘT SỐ ĐỘNG VẬT THÂN MỀM

Nguyễn Tài Lương, , Nguyễn Thị Ty, Nguyễn Thị Vĩnh
Viện Công nghệ Sinh học, Trung tâm KHTN&CNQG

ĐẶT VẤN ĐỀ

Ngành thủy sản là ngành KTKT quan trọng, trong những năm qua đã góp phần tăng nhanh kim ngạch xuất khẩu và đóng góp cho nhà nước hàng nghìn tỷ đồng. Riêng 2001, các mặt hàng thủy sản xuất khẩu đạt 1800 triệu USD.

Việc đầu tư các yếu tố KHCN nghiên cứu nuôi trồng thủy sản và đánh giá chất lượng các mặt hàng thủy sản có ý nghĩa rất lớn trong việc mở rộng cạnh tranh thị phần.

Hiện nay những nghiên cứu về đánh giá chất lượng thủy sản sau thu hoạch là một lĩnh vực rất bức xúc, cần được đẩy mạnh, nhất là sau khi hiệp định thương mại Việt Mỹ có hiệu lực.

Nghiên cứu về các thành phần axit amin trong thịt và trong các sản phẩm khác của thủy động vật còn giúp tạo cơ sở khoa học cho kỹ thuật nuôi trồng thủy sản năng suất cao. Những kiến thức cơ bản về sinh hoá thủy sản còn giữ vai trò quan trọng trong công nghiệp chế biến thực phẩm và công nghiệp dược. Biển không chỉ là kho protein mà còn là một kho thuốc quý vô tận.

Trong bài báo này chúng tôi trình bày một số kết quả về nghiên cứu về thành phần và hàm lượng các axit amin trong thịt một số loài động vật thân mềm sống trong môi trường biển và nước ngọt.

ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

Đối tượng nghiên cứu gồm các loài nhuyễn thể trưởng thành như: Nghêu (*Meretrix sp.*), sò huyết (*Anadara granosa*), hàu (*Crasostrea*), gân trai (*Tendon of Oyster*), ốc tù và (*Trumphet-shell*), trai đồng (*Anodonta eliptical* Hend), hến nước ngọt (*Corbicula sp.*) ốc nhồi (*Large edible snail*).

Các mẫu nhuyễn thể nước ngọt lấy ở vùng Từ Liêm, Hà nội. Các mẫu nhuyễn thể biển lấy từ vùng biển Nha Trang. Mẫu gân trai (*Tendon of Oyster*) lấy từ vùng biển Nghi sơn, Thanh hoá. Đây là sản phẩm đắt giá đang được khách hàng người Đài Loan ưa chuộng.

Định lượng các axit amin trong thịt của các động vật kể trên nhờ máy phân tích axit amin tự động HP-Amino Quant Series II (Hewlett Packard) đặt tại Viện CNSH.

KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU VÀ THẢO LUẬN

Kết quả nghiên cứu về thành phần và hàm lượng các axit amin trong cơ một số loài động vật thân mềm được trình bày trong bảng 1.

TT	axit amin	Sò huyết	Nghêu	Hàu	Gân trai	Ốc tù và	Ốc nhồi nước ngọt	Trai nước ngọt	Hến nước ngọt
1	Leu.+Isoleu.	4,87	4,74	4,95	6,48	5,23	3,97	5,12	3,75
2	Phenilalanine	1,27	1,25	1,44	0,95	1,57	0,98	1,05	4,14
3	Valine	1,47	1,41	1,71	1,19	1,92	1,33	0,72	3,14
4	Methionine	1,41	1,17	1,52	1,18	1,37	0,95	0,95	4,93
5	Tyrosine	1,75	1,51	1,71	1,17	1,78	1,07	1,29	2,39
6	Proline	1,02	1,14	1,94	0,61	1,57	1,30	1,35	2,44
7	Alanine	2,24	2,60	1,88	2,07	3,74	2,08	1,84	5,83
8	Glycine	3,98	3,41	3,00	2,78	3,67	3,18	1,20	5,12
9	Serine	2,27	2,17	2,27	1,68	2,54	1,93	1,70	1,49
10	Glu.+Threo.	8,08	6,98	6,30	7,20	9,60	6,88	5,41	12,11
11	Aspar. acid	5,14	4,93	5,24	4,08	4,93	4,35	2,75	2,24
12	Arg.+ His.	5,51	4,50	4,53	4,50	6,00	3,99	3,57	13,90
13	Lysine	5,67	5,06	5,02	3,99	5,21	2,92	1,63	13,00

Qua bảng 1 cho thấy những nổi trội về các axit amin không thay thế trong thịt một số loài nhuyễn thể:

Leucine và Isoleucine

Theo thứ tự giảm dần về hàm lượng leucine, isoleucine trong cơ của các loài thân mềm có thể sắp xếp như sau: gân trai (6,48%) > ốc tù và (5,23%) > trai nước ngọt (5,12%) > hàu (4,95%) > sò huyết (4,87%) > nghêu (4,74%).

Hàm lượng leucine, isoleucine ở hến, ốc nhồi thấp hơn cả (3,75%- 3,97%).

Leucine là axit amin cần thiết cho sinh tổng hợp protein cơ bắp, chống mỏi mệt cơ bắp, cần cho hoạt động của tuyến tụy (tuyến tiêu hoá quan trọng của người), và cho tuần hoàn máu.

Isoleucine - cần cho sinh tổng hợp glucogen và các xetonic, thiếu axit amin này thì cơ thể sút cân nhanh

Phenilalanine

Hàm lượng phenilalanine trong thịt động vật thân mềm dao động từ 0,95% (gân trai) đến 4,14% (hến).

Hàm lượng phenilalanine ở động vật nước ngọt cao nhất ở hến (4,14%). Ở động vật biển cao nhất ở hàu và ốc tù và (1,57%); Còn ở sò huyết và nghêu có hàm lượng gần tương đương nhau (1,27%- 1,25%). Phenilalanin là tiền chất của các dẫn truyền thần kinh catecholamin là dopamin và noradrenalin. Chúng kích thích hoocmôn tăng trưởng, đẩy mạnh hoạt động của hệ miễn dịch.

Valine

Hàm lượng valine cao nhất ở hến (3,14%) rồi đến ốc tù và (1,92%), thấp hơn là hàu, sò huyết, nghêu (1,41%- 1,71%). Như vậy, hàm lượng valine ở hến cao gấp đôi so với hàu, sò huyết và nghêu.

Vai trò của valine đã rõ: valine ảnh hưởng đến hoạt động của tuyến tụy, thiếu axit amin này trong thức ăn sẽ bị rối loạn phối hợp các chuyển động và hoạt động cơ bắp yếu đi.

Methionine

Hàm lượng methionine trong thịt nhuyễn thể biến dao động trong giới hạn từ 1,18% đến 1,52%. Trong đó có 2 loài có hàm lượng methionine cao nhất là hến (4,93%) và hàu (1,52%). Hàm lượng methionine trong thịt hến cao gấp 3,2 - 3,5 lần so với hàm lượng axit amin này trong thịt các loài nhuyễn thể biển.

Methionine tham gia vào các quá trình sinh tổng hợp cholin, adrenaline, creatine, vitamin B12, axit folic và làm tăng đồng hoá lipid.

Lysine

Hàm lượng lysine trong sò huyết, nghêu, hàu, ốc tù và là cao và tương đương nhau (dao động từ 5,02% đến 5,56%). Vấn đề lý thú là trong hến nước ngọt có hàm lượng lysine cao gấp đôi so với các đối tượng kể trên (13,00%).

Lysine giữ vai trò quan trọng trong sinh tổng hợp hemoglobin - là sắc tố màu đỏ của máu. Lysine cần cho các chức năng tiêu hoá, thần kinh, tạo mô xương. Thiếu axit amin này trong thức ăn thì cơ thể sút cân nhanh, kém ăn, thiếu máu.

Arginine, Histidine

Hàm lượng arginine, histidine ở sò huyết (5,51%) và ốc tù và (6,00%) cao hơn so với nghêu, hàu, gân trai (4,50- 4,53%). Hàm lượng các axit amin này ở hến nước ngọt (13,90%) nhiều hơn 2 lần so với các đối tượng trên.

Vai trò sinh học của arginine là tham gia giải độc amoniac, tổng hợp urê. Vấn đề lý thú là arginine tham gia vào quá trình tạo enzym hialuronidaza của tinh trùng. Enzym này có chức năng xuyên thủng màng trứng đảm bảo khả năng thụ thai cao.

Trong cơ thể histidine được tạo thành histamine. Chất này cùng với adrenaline điều hoà trương lực của mạch máu, điều hoà huyết áp.

Trong số các axit amin thay thế ở các loài thân mềm, đã phát hiện thấy hàm lượng glutamic axit và Threonine khá cao trong cơ của sò huyết, ốc tù và (8,08%- 9,60%), đặc biệt ở hến có hàm lượng axit glutamic cao nhất (12,11%). Điều này giúp chúng ta hiểu tại sao nước luộc hến ngọt nhất trong số các loài nhuyễn thể. Axit glutamic cần cho hoạt động thần kinh và người Nhật mệnh danh cho axit amin này là "huyết thanh của trí tuệ". Chúng tôi còn phát hiện thấy hàm lượng proline cao nhất ở 2 đối tượng ốc tù và (1,57%) và ở hến (2,44%). Vai trò của proline đối với động vật chưa rõ, nhưng đối với thực vật thì axit amin này có tác dụng làm tăng sức chống chịu của cơ thể trong các điều kiện khắc nghiệt của môi trường.

Vai trò của các axit amin không thay thế (axit amin mà cơ thể không tự tổng hợp được) là rất lớn. Thiếu một hoặc vài axit amin không thay thế thì không thể sinh tổng hợp protein được. Trong thức ăn nếu thiếu axit amin hoặc mất cân đối axit amin, thì cơ thể vẫn tồn tại nhờ nguồn dự trữ hoặc cải tạo protein kém quan trọng thành protein quan trọng hơn. Trong điều kiện đói thì sức sống và năng suất bị giảm sút. Vì vậy mà

hàm lượng các axit amin không thay thế và tỷ lệ giữa chúng trong phân tử protein là một tiêu chuẩn quan trọng để đánh giá chất lượng protein. Kết quả nhận được của chúng tôi về sự phong phú các axit amin không thay thế trong thịt các loài nhuyễn thể nói chung và ưu thế của từng loài nói riêng đối với từng axit amin không thay thế, đã chứng minh tính ưu việt của thịt của các loài động vật thân mềm. Đó là các loại thực phẩm- thuốc quý. Thí dụ: Người lao động cần tăng cường các chức năng tiêu hoá, tuần hoàn và chống mỏi mệt cơ bắp thì nên ăn gân trai, ốc tù và, trai nước ngọt, hàu, sò huyết, nghêu, vì chúng là những nguồn bổ sung leucine và isoleucine lý tưởng nhất. Muốn ăn ngon, ngủ tốt, cơ thể không sụt cân, xương phát triển tốt và chống thiếu máu thì nên ăn sò huyết, nghêu, hàu, ốc tù và, đặc biệt nên ăn hến nước ngọt, bởi lẽ trong thịt chúng có hàm lượng lysine khá cao. Hến, sò huyết, ốc tù và giàu arginine là axit amin cần cho tạo tinh trùng và giúp tỷ lệ thụ thai cao vv... Như vậy các bác sỹ có thể sử dụng các kết quả này để cân đối dinh dưỡng về axit amin cho người khỏe, người bệnh trong từng trường hợp cụ thể. Các nhà kỹ thuật chế biến thức ăn công nghiệp dùng trong nuôi trồng thủy sản có thể tham khảo tài liệu cơ bản này làm cơ sở cho việc cân đối protein, axit amin theo nhu cầu của từng đối tượng. Những kết quả nhận được còn góp phần tạo cơ sở khoa học cho việc đánh giá chất lượng các mặt hàng thủy sản phục vụ tiêu dùng và xuất khẩu.

KẾT LUẬN

1. Hàm lượng leucine, isoleucine cao nhất ở gân trai (6,48%), ốc tù và (5,23%) và ở trai nước ngọt (5,12%).
2. Hàm lượng phenylalanine cao nhất ở hến (4,14%), rồi đến ốc tù và (1,57%) và nghêu (1,44%).
3. Hàm lượng methionine cao ở hàu và sò huyết (1,41%- 1,52%), đặc biệt cao ở hến (4,93%).
4. Hàm lượng valine cao ở ốc tù và (1,92%) và hàu (1,71%), đặc biệt cao ở hến (3,14%).
5. Hàm lượng arginine, histidine cao ở ốc tù và (6%), sò huyết (5,51%), cao nhất ở hến (13,90%).
6. Hàm lượng lysine cao ở sò huyết, nghêu, hàu, ốc tù và (5,02%-5,67%), cao nhất ở hến (13%).

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Đỗ Tất Lợi, 1991. *Những cây thuốc và vị thuốc Việt nam*. Nxb KH&KT, Hà nội.
2. Nguyễn Tài Lương và cs, 2001. *Ứng dụng công nghệ sinh học sản xuất các chế phẩm thực phẩm- thuốc cho vận động viên*. Hội thảo Quốc tế về Sinh học, Hà nội. V2, t.297-284.
3. *Ngành thủy sản và các biện pháp khôi phục xuất khẩu*, 5/6/2002. Báo Hà nội mới, N 11969.

SUMMARY

THE CONTENT OF AMINO ACID IN MEAT OF MOLLUSKS

Nguyen Tai Luong, Nguyen Thi Ty, Nguyen Thi Vinh
Institute of Biotechnology, NCST

We have determined the amino acid contents in the meat of some species of mollusks such as *Anadara granosa*, *Meretrix* sp., *Crasostrea*, Tendon of Oyster, Trumpet-shell, *Sinanodonta elliptica*, *Corbicula* sp., Large edible snail.

The results showed that:

1. The muscles of the Trumpets shell, *Anodonta eliptical* Hend and Tendon of Oyster are rich in leucine and isoleucine. (5.12-6.48%)
2. The muscles of the *Corbicula* sp., Trumpet-shell, *Crasostrea* are rich in phenylalanine (1.44- 4.14%)
3. The muscles of the *Crasostrea*, *Anadara granosa*, and especially of *Corbicula* sp. are rich in methionine (1.41- 4.93%).
4. The muscles of the Trumpet shell, *Crasostrea* and especially of *Corbicula* sp. are rich in valine (1.71-3.14%).
5. The muscles of the *Anadara granosa*, Trumpet-shell and especially of *Corbicula* sp. are rich in arginine and histidine (5.50-13.90%).
6. The muscles of the *Anadara granosa*, *Meretrix* sp., *Crasostrea*, Trumpet-shell, especially of *Corbicula* sp. are rich in lysine (5.02-13.00%).

HOẠT TÍNH THỦY PHÂN FIBRIN CỦA ENZYM TÁCH TỪ MỘT SỐ LOÀI GIUN ĐẤT VIỆT NAM

Lý Thị Bích Thủy, Nguyễn Trường Giang, Nguyễn Thị Ngọc Dao
Viện Công nghệ Sinh học, Trung tâm KHTN&CNQG

ĐẶT VẤN ĐỀ

Bệnh tim mạch là một trong những bệnh có tỷ lệ người mắc bệnh và tử vong cao nhất ở Việt Nam cũng như trên thế giới. Các thể khác nhau của bệnh bao gồm: chứng tràn máu não, tăng huyết áp, xơ cứng động mạch. Nguyên nhân chủ yếu là do fibrin bị đông cục gây tắc mạch và cản trở lưu thông máu. Vì vậy, việc làm tan cục máu đông đóng vai trò quan trọng trong việc điều trị bệnh tim mạch.

Enzym thủy phân fibrin như Urokinase và chất hoạt hoá plasminogen được sử dụng rộng rãi trong việc xử lý tắc mạch. Tuy nhiên, chúng rất đắt và không hiệu quả khi uống qua đường miệng. Vào những năm 1920, các tác giả Nhật Bản đã phát hiện một enzym có hoạt tính thủy phân fibrin cao từ giun đất, *lumbricus rubellus*, bao gồm 6 isoenzym được đặt tên chung là Lumbrokinase. Họ đã chỉ ra rằng những enzym này có thể được sử dụng làm thuốc uống vì nó có thể được hấp thụ từ ruột vào máu và hoạt hoá hệ thống thủy phân fibrin nội sinh.

Việt Nam là nước có số lượng chủng loại giun đất rất cao, vì vậy chúng tôi tiến hành tìm kiếm nguồn giun có chứa enzym *lumbrokinase* với hy vọng nghiên cứu sản xuất thuốc chữa bệnh từ tài nguyên sẵn có của Việt Nam. Bước đầu chúng tôi đã khảo sát hoạt tính thủy phân fibrin của một số loài giun phổ biến có ở miền Bắc Việt Nam.

PHƯƠNG PHÁP

Đối tượng

9 mẫu giun thu thập ở Hà Nội, Thường Tín, Sapa, Ba Vì (miền Bắc) đã được Gs. Thái Trần Bái (ĐHSPHN) và TS. Huỳnh Thị Kim Hồi (viện Sinh thái và Tài nguyên Sinh vật) phân loại.

Quá trình tách chiết enzym từ giun đất

Enzym được tách chiết sơ bộ theo qui trình sau:

Giun đất rửa sạch, ngâm trong nước cất cho thải hết chất cặn bã trong đường tiêu hoá, sau đó nghiền trong cát thủy tinh với đệm Natriphosphate 0.05M, pH 7.4 và ly tâm 13000 vòng trong 15 phút để thu dịch trên. Dịch trên được tủa protein bằng amoniumsulfate 60% và ly tâm 13000 vòng trong 15 phút, thu tủa. Rửa tủa nhẹ nhàng 2 lần bằng nước cất, rồi hoà tan lại trong đệm trên. Ly tâm 13000 vòng trong 10 phút, loại bỏ phần không tan. Dịch enzym thu được qua sắc ký lọc gel sephadex G200, tốc độ chảy 12ml/h; 1.5ml/phân đoạn

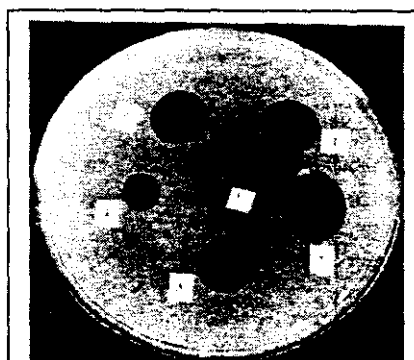
Tách fibrinogen từ máu bò

Phương pháp của Astrup và Darling đã được cải tiến như sau:

Máu bò được thu được chống đông bằng 0.1 thể tích Kalioxalat 2.5%, ly tâm thu huyết tương. Tủa 2 lần bằng amoniumsulfate. Thu tủa bằng ly tâm và rửa tủa bằng nước cất. Fibrinogen được hoà tan trong đệm diethyl barbiturat 0.05M, pH 7.8. Ly tâm nhanh để loại bỏ phần không tan. Quá trình được thực hiện ở +4°C.

Xác định hoạt tính thủy phân fibrin

Ở mỗi đĩa petri đường kính 10cm cho 10ml dung dịch fibrinogen (nồng độ 0.2%) được đông tụ bằng 15µl dung dịch thrombin có nồng độ 100UI/ml. Chú ý đặt đĩa phẳng và đổ dung dịch thật đều. Để ở nhiệt độ phòng trong 30 phút. Rỏ từng giọt dung dịch enzym lên bề mặt đĩa fibrin cách đều nhau, ủ ở 37°C trong 16h. Vùng phân giải fibrin sẽ xác định hoạt tính của enzym. Dùng plasmin của hãng Sigma làm enzym chuẩn.



Ảnh 1. Hoạt tính thủy phân fibrin
C: plasmin chuẩn; 1,2,3,4,5 là hoạt tính enzym tách từ một số loài giun đất

KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Qua khảo sát hoạt tính thủy phân fibrin của các loài giun trên chúng tôi có bảng 1.

Trên bảng là hoạt tính thủy phân fibrin ở mỗi giai đoạn của quá trình tách chiết và phân đoạn có hoạt tính cao nhất của mỗi mẫu giun. Kết quả cho thấy sau mỗi giai đoạn tách chiết, hoạt tính riêng

Tên loài giun	Hoạt tính dịch nghiền (CU/mg)	Hoạt tính sau tủa $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (CU/mg)	Hoạt tính sau khi qua cột Sephadex (CU/mg)
<i>Pheretima manicata</i>	19.81	32.86	50.51
<i>Pheretima californica</i>	3.07	7.84	33.66
<i>Pheretima robusta</i>	8.78	12.05	18.86
<i>Pheretima morrisi</i>	2.34	3.52	16.45
<i>Pheretima wui</i>	15.31	24.38	36.0
<i>Pheretima Posthuma</i>	9.55	16.61	20.44
<i>Pheretima morrisi</i>	4.5	9.1	18.6
<i>Pheretima aspergillum</i>	3	18.3	20.8
<i>Perionyx excavatus</i>	22	27.29	57.01

của các mẫu enzyme đều tăng. Hoạt tính dịch nghiền của mẫu giun *Perionyx excavatus* và *Pheretima manicata* xấp xỉ bằng nhau. Phân đoạn có hoạt tính cao nhất của *Pheretima manicata* là phân đoạn thứ 17 còn của *Perionyx excavatus* là phân đoạn thứ 18. Cả 2 phân đoạn này có hoạt tính xấp xỉ nhau và là phân đoạn có hoạt tính cao nhất trong bảng trên.

Trong các loài giun đã khảo sát, chúng tôi rất chú ý đến loài giun *Perionyx excavatus* vì những ưu điểm của nó như: hoạt tính thủy phân fibrin cao, sức sống tốt, dễ tách chiết và hiện được nuôi rất rộng rãi ở Việt Nam. Chúng tôi đã tiến hành thí nghiệm theo dõi độ bền của dịch enzyme tách chiết được từ loài giun này đối với nhiệt độ và thời gian bảo quản và nhận thấy rằng dịch enzyme này khá bền.

Các mẫu được xử lý ở các nhiệt độ khác nhau trong thời gian 60 phút rồi xác định hoạt tính. Kết quả được thể hiện ở hình 1 (hoạt tính thủy phân được tính theo diện tích vòng phản ứng).

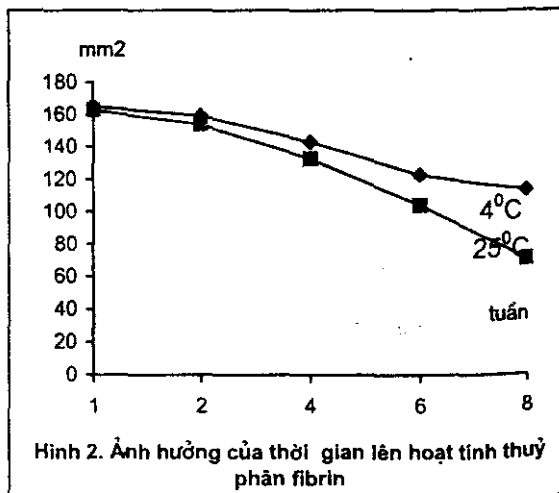
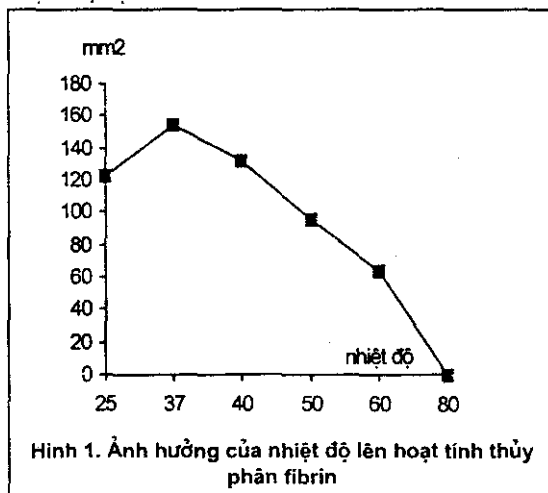
Hình 1 cho thấy hoạt tính của enzyme cao nhất ở trong khoảng 30-40°C. Ở 60°C hoạt tính vẫn còn. Khi xử lý ở 80°C thì sau 60 phút dịch enzyme mới mất hoạt tính. Như vậy enzyme này khá bền với nhiệt.

Hình 2 cho thấy, trong 1 tuần, 2 tuần, 4 tuần, 8 tuần bảo quản: Hoạt tính của enzyme bị giảm không đáng kể nhất là với mẫu được bảo quản ở 4°C. Mẫu được để ở nhiệt độ phòng hoạt tính giảm đi không nhiều so với mẫu được bảo quản ở +4°C và trong suốt thời gian đó. Khi xác định hoạt tính chúng tôi nhận thấy: trên đĩa phản ứng, vòng phản ứng vẫn tiếp tục rộng ra theo thời gian 1 ngày, 2 ngày, cho đến khi gần hết cơ chất trong đĩa (ở nhiệt độ phòng). Điều đó cũng nói lên rằng enzyme này khá bền với nhiệt.

KẾT LUẬN

Từ những kết quả thí nghiệm trên, chúng tôi thấy enzyme tách từ loài giun *perionyx excavatus* có thể hiện những tính chất tương tự của lumbrokinase như: có hoạt tính thủy phân fibrin mạnh, độ bền nhiệt cao và nhất là giữ được hoạt tính ổn định trong một thời gian dài.

Tuy nhiên để khẳng định enzyme đó có phải là lumbrokinase hay không thì còn phải xem xét đến rất nhiều tính chất khác như: cơ chất đặc hiệu, chất kim hãm, hoạt hoá và phản ứng miễn dịch đặc hiệu. Nghiên cứu để tinh sạch và xác định đầy đủ hơn các đặc tính cũng như gen mã hoá cho enzyme này đang được tiếp tục.



TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Manabu Sugimoto and Nobuyoshi Nakajima, 2001. *Molecular Cloning, Sequencing, and Expression of cDNA Encoding Serine protease with Fibrinolytic Activity from Earthworm*. Biosci. Biotech. Biochem., 65(7). 1575-1580.
2. Hisashi Mihara, Hiroyuki Sumi, Tomoyuki Yoneta, Hideaki Mizumoto, Ryuzo Ikeda, Masao Seiki and Masugi Maruyama, 1991. *A Novel Fibrinolytic Enzyme Extracted from the Earthworm, Lumbricus rubellus*. Japanese Journal of physiology 41, 461- 472.
3. Nobuyoshi nakajima, Hisashi mihara and Hiroyuki Sumi, 1993. *Characterization of potent Fibrinolytic enzymes in Earthworm, Lumbricus rubellus*. Biosci. Biotechnol. Biochem., 57(10). 1721-1730.
4. Nobuyoshi nakajima, Manabu sugimoto, Kohji ishihara, Kaoru nakamura and Hiroki Hamada, 1999. *Futher characterization of Earthworm serine proteases: Cleavage Specificity againts peptide substrates and on Autolysis..* Biosci. Biotechnol. Biochem., 63(11). 2031-2033.
5. T. astrup and S. Mullertz, 1951. Arch. Biosci. Biochem. Biophys, 40. 346- 351.
6. Nobuyoshi nakajima, Kohji ishihara, Manabu sugimoto, Hiroyuki sumi, Katsuhiko mikuni and Hiroki Hamada, 1996. *Chemical Modification of Earthworm Fibrinolytic enzymes with Human Serum Albumin Fragment and Characterization of the protease as a Therapeutic enzyme*. Biosci. Biotech. Biochem, 60(2). 293- 300.
7. Wonkeukkim, Keehyun chol, Yongtaek Kim, Hyunghwan park, yangyoon choi, Yoonsoo Lee, Hoonil Oh, Ikboo Kwon, and Shinyoung Lee, 1996. *Purification and characterization of a fibrinolytic enzyme produced from Bacillus sp. Strain CK 11-4 screened from chungkook- jang*. Applied and environmental microbiology. July 1996. p. 2482-2488.

SUMMARY

FIBRINOLYTIC ACTIVITY OF ENZYMES EXTRACTED
FROM SOME EARTHWORMS LIVING IN VIETNAM

Ly T. Bich Thuy, Nguyen Truong Giang, Nguyen T. Ngoc Dao
Institute of Biotechnology, NCST

We examined fibrinolytic activity of enzymes extracted from 9 earthworm species of Vietnam and found that some of them showed high fibrinolytic activity. Among these studied species, we most interested in *Perionyx excavatus* because of the highest fibrinolytic enzyme activity. Moreover, the enzyme extracted from this species were heat-stable and broad pH range. Based on the initial results, the enzymes were thought to have characteristics like lumbrokinase's. Now, we are purifying, futher studying and doing clinical test on the enzym extracted from *Perionyx excavatus* to confirm the result.

Tách chiết enzyme có hoạt tính thủy phân fibrin từ loài giun quế, *Perionyx escavatus*

Lý Thị Bích Thủy*, Nguyễn Thị Ngọc Dao
Viện Công nghệ Sinh học, Viện KH&CNVN

MỞ ĐẦU

Từ xa xưa, giun đất là một trong những vị thuốc dân tộc ở phương Đông và ngày nay đã được Dược lý học hiện đại chứng minh có rất nhiều tác dụng, trong đó có tác dụng hạ huyết áp và cải thiện tuần hoàn não. Các nhà khoa học Trung quốc và Nhật bản đã tách chiết được enzyme có hoạt tính thủy phân fibrin cao từ loài giun *Esenia foetida* và *Lumbricus rubellus*, đặt tên là lumbrokinase. Họ đã chứng minh được rằng enzyme này có thể sử dụng làm thuốc uống thay thế một số thuốc chữa bệnh tim mạch rất đắt trên thị trường hiện nay như urokinase và chất hoạt hoá plasminogen.

Việt Nam là nước có số lượng chủng loại giun đất rất cao, vì vậy chúng tôi đã tiến hành tìm kiếm nguồn giun có chứa enzyme tương tự lumbrokinase với hy vọng nghiên cứu sản xuất thuốc chữa bệnh từ tài nguyên sẵn có trong nước. Bước đầu chúng tôi đã khảo sát hoạt tính thủy phân fibrin của 8 loài giun phổ biến có ở miền Bắc Việt Nam [1] và chọn được loài có hoạt tính thủy phân fibrin cao nhất là loài giun quế *Perionyx escavatus*. Chúng tôi đã tách chiết được enzyme có trọng lượng phân tử khoảng 28 kDa và hoạt tính thủy phân fibrin cao (123IU) từ loài giun này.

NGUYÊN LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

Đối tượng

Loài giun quế *Perionyx escavatus* thu được ở Ba Vì - Hà Tây đã được GS. Thái Trần Bái (ĐHSPHN) và TS. Huỳnh Thị Kim Hối (Viện Sinh thái và Tài nguyên Sinh vật) phân loại.

Hóa chất

Plasmin, thrombin của hãng Sigma, fibrinogen (tự tách từ máu bò) [1] và một số hóa chất khác của hãng Fluka.

Phương pháp

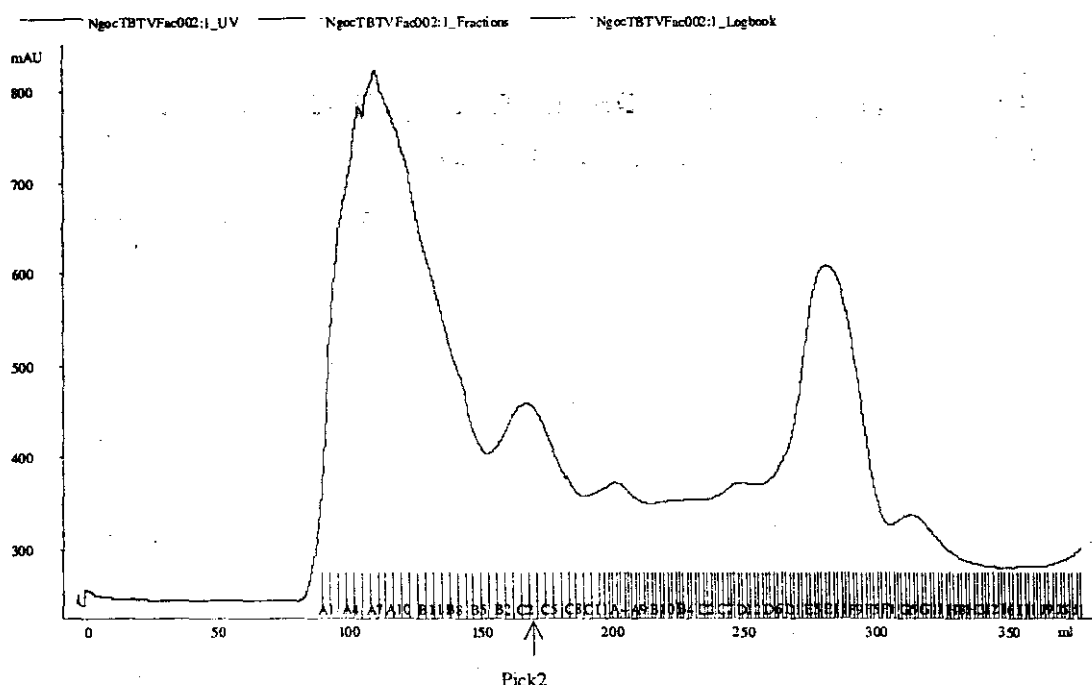
Hoạt tính được xác định theo phương pháp của ASTRUP và MUIERTZ (1952), sử dụng plasmin làm chuẩn [2]

Nồng độ protein được xác định theo phương pháp của Bradford (1976).

Xác định trọng lượng phân tử và đánh giá quá trình tinh sạch theo phương pháp điện di trên gel SDS-PAGE 12.5% của Laemmli (1970).

Tách chiết enzyme được tiến hành theo các bước sau: Giun đất rửa sạch, ngâm trong nước cất cho thải hết chất cặn bã trong đường tiêu hoá. Nghiền đồng thể trong NaCl 0,9%. Ly tâm 19000 rpm, 60 phút, thu dịch trên. Dịch trên được rửa bằng $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 60% bão hoà, ly tâm 10000 rpm thu rửa. Hòa tan rửa trong đệm Natriphosphat 0,02M, pH 7 và cho qua cột lọc gel Sephacryl S200. Mẫu được phân đoạn tiếp bằng cột DEAE - cellulose.

* E-mail: nndao@ibt.ac.vn; Tel: 7563159 – 7568260



Hình 1. Sắc ký đồ trên cột sephacryl S-200

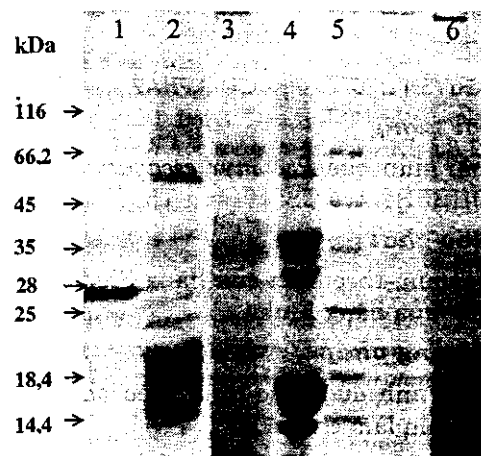
KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Dịch giun đất thu được sau khi nghiền đồng thể và tủa bằng $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 60% bão hòa được cho qua cột lọc gel Sephacryl S200 26/60, tốc độ dòng chảy 0,5 ml/phút, thu 100 phân đoạn.

Kết quả thử hoạt tính các phân đoạn cho thấy phân đoạn từ 25 đến 30 có hoạt tính riêng cao nhất (43,3 IU/mg protein) tương ứng với pick 2 trên sắc ký đồ hình 1. Pick 1 có hàm lượng protein rất cao nhưng không có hoạt tính, đây là pick có màu đỏ của hemoglobin máu giun. Pick 2 sau đó được phân đoạn tiếp bằng cột DEAE-cellulose được cân bằng với đệm Natriphosphat 0,02 M, pH 7, tốc độ dòng chảy 0,5 ml/phút, gradient nồng độ muối từ 0 đến 1 M NaCl, thu 100 phân đoạn.

Sau khi qua cột DEAE, chúng tôi thu được 2 pick có hoạt tính thủy phân fibrin. Trong đó, Pick có hoạt tính cao (123,1IU) thuộc phân đoạn 40, tương ứng khoảng 75% dung dịch đệm 1M NaCl. Pick có hoạt tính nhỏ hơn (40 IU) thuộc phân đoạn 50 tương ứng khoảng 90% dung dịch đệm 1M NaCl.

Chúng tôi đã đánh giá mức độ tinh sạch và xác định trọng lượng phân tử tương đối của enzyme tách chiết bằng phương pháp điện di protein trên gel polyacrylamid 12,5%, sử dụng Maker protein của hãng Fermentas làm chuẩn (hình 2 và bảng 1). Kết quả cho thấy pick có hoạt tính cao (123,1IU) có một vạch protein rất đậm có trọng lượng phân tử khoảng 28 kDa. Đây cũng là kết quả phù hợp với thí nghiệm thẩm độ trọng lượng phân tử của enzym có



Hình 2. Điện di đồ các dịch protein

1: pick có hoạt tính cao trên sắc ký đồ DEAE, 2:: pick có hoạt tính thấp hơn trên sắc ký đồ DEAE, 3: dịch trước khi chạy qua cột DEAE (pick 2 trên sắc ký đồ Sephacryl), 4: pick 1 trên sắc ký đồ Sephacryl, 5: Maker protein, 6: Dịch trước khi chạy qua cột Sephacryl

Bảng 1. Hoạt tính thủy phân fibrin qua các giai đoạn tách chiết

Giai đoạn	Protein tổng số (mg)	Hoạt tính tổng số (IU)	Hoạt tính riêng (IU/mg)	Độ tinh sạch	Hiệu suất
Dịch chiết thô	29.3	440	15	1	100
Sau Tủa $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	16.7	431	25,8	1,7	98
Qua cột Sephacryl S200 (pick 2)	8.3	361	43,3	2,9	82
Qua cột DEAE-cellulose (pick có hoạt tính cao)	1.5	185	123,1	8,2	42

hoạt tính thủy phân fibrin bằng phương pháp điện di không biến tính mà chúng tôi đã thực hiện trong quá trình khảo sát hoạt tính.

Nhận xét: Sau khi tinh sạch qua hai lần sắc ký, hàm lượng protein giảm 19,5 lần nhưng hoạt tính riêng tăng hơn 8 lần và vì vậy độ sạch tương ứng tăng lên 8 lần. Hiệu suất khai thác đạt 42%. Trên điện di đồ hình 2 cột 1, dịch enzyme thu được tương đối sạch.

KẾT LUẬN

Chúng tôi đã tinh sạch được enzyme có hoạt tính thủy phân fibrin cao từ loài giun quế *Perionyx excavatus*. Quá trình tinh sạch qua 2 lần sắc ký như trên đã thu được enzyme có trọng lượng phân tử khoảng 28kDa và hoạt tính thủy phân là 123,1IU/mg protein.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Lý Thị Bích Thủy, Nguyễn Trường Giang, Nguyễn Thị Ngọc Dao, 2003. Hoạt tính thủy phân fibrin của enzyme tách từ một số loài giun đất Việt Nam. *Những vấn đề nghiên cứu cơ bản trong khoa học sự sống*, Báo cáo khoa học Hội nghị toàn quốc lần thứ 2, Huế 25-26/7/2003: 531-534
2. T. Astrup and S. Mullertz, 1951. *Arch. Biosci. Biochem. Biophys*, 40. 346 - 351.

* Công trình có sự hỗ trợ của chương trình NCCB trong KHTN. Các tác giả xin cảm ơn PGS.TS. Đỗ Khắc Hiếu đã đọc và góp ý kiến cho bản thảo.

SUMMARY

Purification of fibrinolytic enzyme from a species of earthworm, *Perionyx excavatus*

Ly Thi Bich Thuy, Nguyen Thi Ngoc Dao
Institute of Biotechnology, VAST

Earthworms (*Perionyx excavatus*) were washed to remove attached mud and then were left to evacuate casts from their alimentary tract in distilled water. The living earthworms were homogenized in 0.9% NaCl. Homogenate was centrifuged at 19000 rpm/min for one hour. The supernatant obtained was salted out with a 60% saturation of ammonium sulfate. The resultant precipitate was dissolved in 0.02 M sodium phosphate buffer, pH 6. After being subjected on Sephacryl S200 gel filtration column and then further fractionated by column chromatography on DEAE cellulose, a strong fibrinolytic enzyme was obtained. The particular activity was 123IU/mg and its molecular weight was about 28 kDa.

3A.P.22

ĐA HÌNH ĐOẠN GEN ITS-1 Ở 8 LOÀI GIUN ĐẤT MIỀN BẮC VIỆT NAM

Đặng Diễm Hồng, Luyện Quốc Hải, Ngô Thị Hoài Thu, Trần Văn Khánh,
Lê Quang Huân, Nguyễn Thị Ngọc Dao, Nguyễn Đức Bách
Viện Công nghệ Sinh học, Trung tâm KHTN&CNQG
Huỳnh Thị Kim Hối
Viện sinh thái và tài nguyên sinh vật, Trung tâm KHTN&CNQG
Nguyễn Văn Đồng
Viện Di truyền Nông nghiệp, Bộ NN và PTNT

ĐẶT VẤN ĐỀ

Giun đất có vai trò rất quan trọng trong việc làm tơi xốp, thoáng khí, giữ độ ẩm cho đất và tham gia làm sạch môi trường. Giun đất còn là loại thức ăn cho vật nuôi, làm thực phẩm cho người và thuốc chữa bệnh. Phân giun cũng là loại phân hữu cơ rất tốt, làm chỉ thị môi trường về tính chất đất. Về mặt tiến hóa, giun giữ một vị trí quan trọng trong quá trình tiến hóa của động vật từ nước lên cạn (1, 2, 3, 4). Trên thế giới, giun đất được nuôi chính thức từ những năm 1950, ở Việt Nam người ta đã chọn ra 7 loài trong đó loài giun Quế (còn gọi là giun đỏ) (1) được nuôi nhiều nhất do tốc độ sinh sản nhanh và khả năng thích nghi cao với môi trường.

Khi nghiên cứu loài giun đất *Lumbricus rubellus* các nhà khoa học Nhật Bản thấy loài giun này có enzym Lumbrokinase - một enzym có hoạt tính thủy phân fibrin rất mạnh đã được nghiên cứu và sử dụng để điều trị những bệnh nghẽn mạch do máu đông (7, 8). Lumbrokinase rất khác biệt với các enzyme thủy phân fibrin đã được biết trước đó (ví dụ như Urokinase) về hoạt tính riêng, độ bền nhiệt, pH... Hoạt tính thủy phân fibrin trung bình của nó khoảng 100 CU (plasmin units) hoặc 250 IU (urokinase units)/g giun tươi. Trọng lượng phân tử và điểm đẳng điện của nó vào khoảng 20,000 kDa và 3,4 tương ứng. Để nghiên cứu và chủ động sử dụng enzym này chúng tôi đã tìm kiếm loài giun *Lumbricus rubellus* tuy nhiên chúng không phân bố ở Việt Nam. Vì vậy chúng tôi đã tiến hành khảo sát những loài giun của Việt Nam có mặt enzyme này để chủ động nguồn nguyên liệu tự nhiên sẵn có trong nước. Hoạt tính enzyme Lumbrokinase đã được kiểm tra ở một số loài giun thu được từ các vùng sinh thái khác nhau (5). Mối quan hệ di truyền giữa những loài giun này cũng được xác định bằng cách đọc và so sánh trình tự nucleotit đoạn ITS-1 (Internal Transcribed Spacer 1) - đoạn gen nằm giữa 18S và 5,8 S rADN. Đồng thời chúng tôi cũng tiến hành nghiên cứu về tách dòng và biểu hiện gen mã hoá cho Lumbrokinase từ các loài giun đất của Việt nam. Bằng cách này, chúng tôi hy vọng sẽ xác định được liệu sự có mặt của enzym Lumbrokinase là phổ biến ở các loài giun đất hay là mang tính đặc hiệu loài và mức độ biểu hiện hoạt tính enzym này có liên quan tới mối quan hệ di truyền giữa các loài giun trong nghiên cứu của chúng tôi hay không?

Trong phạm vi bài báo này chúng tôi xin trình bày kết quả nghiên cứu sự đa hình đoạn gen ITS-1 ở 8 loài giun đất của miền Bắc Việt Nam nhằm xác định mối quan hệ di truyền giữa 8 loài giun này.

VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

Vật liệu

Các mẫu giun được thu thập từ 3 vùng sinh thái khác nhau: Sapa, Ba Vì và Gia Lâm. Sau khi phân loại và định danh (Huỳnh Thị Kim Hối, Viện Sinh thái và Tài nguyên Sinh vật) các mẫu bao gồm 8 loài: *Pheretima posthuma*, *Pheretima morrisi* (Gia Lâm), *Perionyx excavatus* (Ba Vì, có nguồn gốc từ Mỹ), còn các loài *Pheretima morrisi*, *Pheretima robusta*, *Pheretima wui*, *Pheretima carnifonica*, *Pheretima manicata* được thu từ Sa Pa.

Phương pháp nghiên cứu

ADN tổng số của các loài giun được tách chiết theo phương pháp của Taylor (9). Đoạn ITS-1 được nhân bằng kỹ thuật PCR từ ADN tổng số với cặp mồi: ITS-1F và ITS-1R theo công bố trước đây (6). Tạo dòng phân tử ADN theo phương pháp đã công bố (6). Trình tự nucleotit của đoạn ITS-1 ở 8 mẫu giun được đọc trên máy tự động ABI PRISM 377 DNA Sequencer, sử dụng ABI PRISM Big Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit của hãng Perkin-Elmer. Dựa trên chương trình ClustalX Multiple Sequence

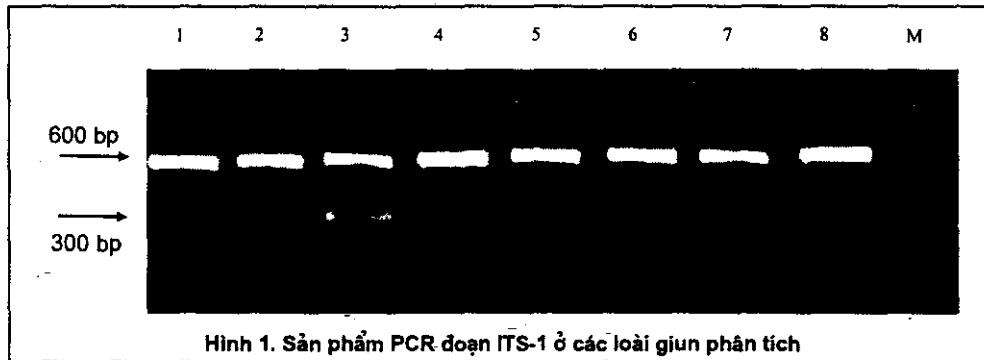
Alignment Program (version 1.81, June 2000) chúng tôi đã xây dựng cây phân loại của các loài giun nghiên cứu.

KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

ADN tổng số của 8 loài giun tách được có chất lượng tốt, không bị đứt gãy, phù hợp cho việc nghiên cứu tách dòng gen tiếp sau (kết quả không chỉ ra ở đây).

Chạy PCR nhân đoạn ITS-1

Với cặp mồi đặc hiệu ITS -1F và ITS -1R chúng tôi đã tiến hành nhân đoạn gen ITS-1. Sản phẩm PCR của đoạn gen ITS-1 ở cả 8 loài giun với kích thước khoảng 600 bp được chỉ ra trên hình 1. Độ dài đoạn ITS-1 thu được phù hợp với các nghiên cứu về tính đa hình đoạn ITS-1 ở các loài giun đất (Nematodes) đã được các tác giả khác công bố (10, 11, 12). Trong số 8 mẫu giun phân tích, có 2 mẫu *Peryonx excavatus* (Ba Vi) và *Pheretima morrisi* (Sa Pa,) ngoài sản phẩm chính có kích thước khoảng 600 bp còn xuất hiện một sản phẩm có kích thước khoảng 300 bp. Đây cũng có thể là một dạng đa hình của đoạn ITS-1 ở các loài giun đất mà chúng tôi nghiên cứu và cũng hoàn toàn phù hợp với kết quả nghiên cứu của các tác giả khác trên thế giới với các loài giun đất khác nhau (10,11,12)



Chú thích: 1. *Pheretima morrisi* GL; 2. *Pheretima wui*; 3. *Pheretima morrisi* SP; 4. *Pheretima posthuma*; 5. *Pheretima robusta*; 6. *Pheretima carnifonica*; 7. *Pheretima manicata*; 8. *Peryonx excavatus*.

Chọn tạo dòng và đọc trình tự đoạn gen ITS-1

Sản phẩm PCR được gắn vào vector pCR®2.1 của hãng Invitrogen và biến nạp vào E.coli chủng DH5α. Sau khi tách chiết và tinh sạch ADN plasmid chúng tôi đọc trình tự đoạn ITS-1. Kết quả đọc cho thấy các đoạn ITS-1 đọc được ở 8 loài giun đều có kích thước khoảng 600 nucleotit. Trong đó *Pheretima posthuma* (Gia Lâm) có kích thước 580bp, *P. morrisi* (Gia Lâm) – 578 pb, *P. morrisi* (SaPa) – 587 bp, *P. robusta* (SaPa) – 587 bp, *P. wui* (SaPa) – 575 bp, *P. carnifonica* (Sa Pa)– 587 bp, *P. manicata* – 590 bp và *Perionyx excavatus* (Ba Vi) – 582 bp. Các trình tự nucleotid của đoạn gen ITS -1 này được xử lý theo chương trình Clustal X và được trình bày trong hình 2.

<i>Pheretima_morrisi_SP_</i>	TCCGTAGGTGAACCTGCGGAAGGATCATTACCGTAACGCTCGCTCGCTCG 50
<i>Pheretima_wui</i>	TCCGTAGGTGAACCTGCGGAAGGATCATTACCGTAACGCTCGCTCGCTCG 50
<i>Pheretima_posthuma</i>	TCCGTAGGTGAACCTGCGGAAGGATCATTACCGTAACGCTCGCTCGCTCG 50
<i>Pheretima_morrisi_GL_</i>	TCCGTAGGTGAACCTGCGGAAGGATCATTACCGTAACGCTCGCTCGCTCG 50
<i>Pheretima_robusta</i>	TCCGTAGGTGAACCTGCGGAAGGA-CATTACCGTAACGCTCGCTCGCTCG 49
<i>Pheretima_carnifonica</i>	TCCGTAGGTGAACCTGCGGAAGGATCATTACCGTAACGCTCGCTCGCTCG 50
<i>Pheretima_manicata</i>	TCCGTAGGTGAACCTGCGGAAGGATCATTACCGTAACGCTCGCTCGCTCG 50
<i>Perionyx_excavatus</i>	TCCGTAGGTGAACCTGCGGAAGGATCATTACCGGATTACAGCGATCGAC 50

<i>Pheretima_morrisi_SP_</i>	GAAGGCTCGTCGCGCGGTGCGACGCGCAGCAGTTCAAACAGTGACGCAC 100
<i>Pheretima_wui</i>	GAAGGCTCGCCCGCCGACGCGACGC--AGCAGTTCAAACGAGT--CACAC 96
<i>Pheretima_posthuma</i>	GACGGTTCCGCCGCGGACGCGACGC--AGCAGTGCAACGAGTGAGTCAC 98
<i>Pheretima_morrisi_GL_</i>	GACGGTTCCGCCGCGGACGCGACGC--AGCAGTGCAACGAGTGAGTCAC 98
<i>Pheretima_robusta</i>	GACGGTTCCGCCGCGGTCGCGACGC--AGCAGTGCAACGAGTGAGTCAC 97
<i>Pheretima_carnifonica</i>	GACGGCTCGCCCGCGGTGCGAAGC--AGCAGTGCAACGAGTGAGTCAC 98
<i>Pheretima_manicata</i>	GACGGCTCGCCCGCGGACGCGACGC--AGCAGTGCAACGAGTGAGTCAC 98
<i>Perionyx_excavatus</i>	GATCGA-CTTCGGTCGAGTCGAGACGCGATTATATGCACACGACAG-CAC 98
	** *

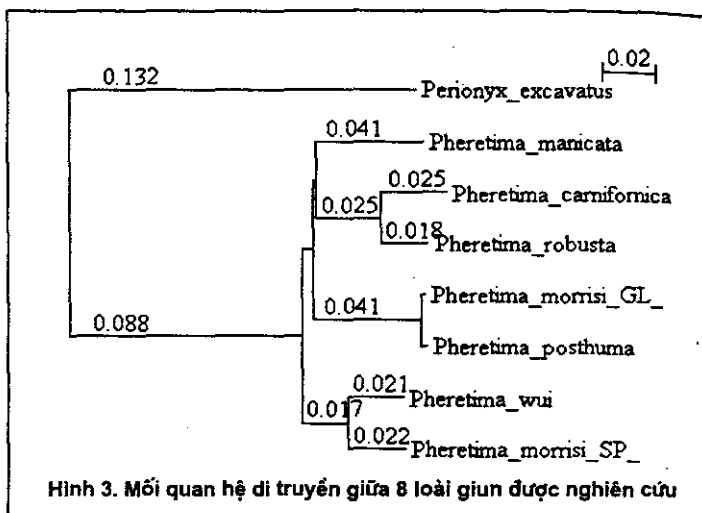
Hình 2. Trình tự nucleotit của đoạn gen ITS-1 của 8 loài giun được nghiên cứu

Kết quả đọc và so sánh trình tự cho thấy chiều dài đoạn ITS-1 của 8 loài giun nằm trong khoảng từ 575 đến 590 bp và có độ tương đồng 56,27%.

Mối quan hệ giữa các loài giun

Kết quả xác định mối quan hệ di truyền giữa 8 loài giun phân tích được chỉ ra trên hình 3.

Hình 3 cho thấy 8 loài giun phân tích được chia thành 2 nhánh chính. Nhánh 1 gồm *Perionyx excavatus* có hệ số di truyền là 0,132. Nhánh 2 thuộc chi *Pheretima* có hệ số di truyền 0,088 được chia thành 2 nhánh phụ lớn. Nhánh phụ thứ 1 gồm 5 loài *P. manicata* (0,041), *P. carnifonica* (0,025); *P. robusta* (0,018); 2 loài *P. morrisi* GL và *P. posthuma* có cùng khoảng cách di truyền 0,41. Nhánh phụ thứ 2 gồm loài *P. wui* (0,021) và *P. morrisi* SP (0,022). Như vậy bằng cách so sánh trình tự nucleotit của đoạn gen ITS-1 chúng tôi đã xác định được mối quan hệ di truyền giữa 8 loài giun đất được nghiên cứu.



THẢO LUẬN

Rõ ràng là phân loại sinh học là một ngành khoa học có ý nghĩa thực tiễn rất lớn, nhờ vào kết quả của phân loại học người ta có thể xác định được những loài có cùng nguồn gốc hoặc có mối quan hệ di truyền gần gũi nhau. Kết quả thu được từ nhiều nghiên cứu cho thấy các loài có mối quan hệ càng gần gũi nhau về mặt di truyền sẽ có nhiều đặc điểm tương đồng không chỉ về mặt hình thái mà ở mức độ phân tử như ADN, hệ protein, enzym và các sản phẩm khác được tạo ra trong quá trình trao đổi chất. Điều này làm cơ sở cho việc tìm kiếm, lựa chọn và khai thác các loài sinh vật có mối quan hệ gần nhau, như là một biện pháp thay thế loài chuẩn ban đầu, đặc biệt đối với những loài quý hiếm hoặc phạm vi phân bố chúng phụ thuộc chặt chẽ vào điều kiện địa lý.

Nghiên cứu của tác giả Lý Thị Bích Thủy và CS. (5) về tách chiết Protein tổng số và xác định sơ bộ hoạt tính Lumbrokinase ở một số loài giun đất của Việt Nam theo phương pháp của Mihara (7, 8) đã cho thấy, hoạt tính Lumbrokinase ở Giun Quế (*Perionyx excavatus*) là cao nhất - 20,2 (U/mg protein), sau đó đến loài *Pheretima posthuma* (Gia Lâm), *P. wui* (Ba Vì), *P. morisi* (Gia Lâm) ở mức trung bình khoảng từ 14-15 (U/mg protein). Các loài *P. posthuma* (Ba Vì), *P. morrisi* (Ba Vì) và *P. aspergillum* (Ba Vì) có hoạt tính thấp nằm trong khoảng 3-7 (U/mg protein). Như vậy, hoạt tính Lumbrokinase biểu hiện lớn nhất ở loài *Peryonx excavatus* và hoạt tính Lumbrokinase giữa các loài giun đất đã được nghiên cứu cũng phản ánh tương đồng như mối quan hệ di truyền giữa các loài thu được qua việc so sánh trình tự nucleotit của đoạn gen ITS-1. Tính đa hình của đoạn ITS-1 ở 8 loài giun thể hiện: 1/ 2 trên 8 loài giun có đoạn ITS-1 gồm 2 băng (300 và 600 bp), trong khi các loài còn lại chỉ có 1 băng 600 bp (hình 1); 2/ kích thước đoạn ITS-1 của 8 loài giun thay đổi từ 575 đến 590 bp (hình 2); 3/ Sự khác biệt về mặt di truyền giữa 8 loài đạt đến 43,73%; 4/ So sánh trình tự đoạn ITS-1 có kích thước 271 bp của *Peryonx excavatus* và 241 bp của *Pheretima morrisi* SP có độ tương đồng là 46,12% (kết quả không chỉ ra ở đây).

Kết quả thu được trong bài báo này sẽ giúp ích cho việc định hướng sử dụng các nguồn giun đất của miền Bắc Việt Nam trong việc khai thác nguồn Lumbrokinase phục vụ cho được phẩm.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Viện chăn nuôi, Trung tâm nghiên cứu Dê và Thỏ Sơn Tây. *Kỹ thuật nuôi giun đất*. Tài liệu tập huấn cho nông dân do Đại sứ quán Anh tại Việt Nam tài trợ, Hà Tây-1999
2. Gooneratne R., Shaw W., Dalton P., 1999. *Neurotoxicity measurements in earthworms*. S-44. The Fourth Princess Chulabhorn International Science Congress Chemical in the 21st Century, 28 Nov. - 2. Dec., 1999, Bangkok, Thailand. p.90.
3. Huỳnh Kim Hoi. *Ecological impact threshold of universal pesticide dose on earthworms in vegetable - growing areas*. The Fourth Princess Chulabhorn International Science Congress Chemical in the 21st Century, 28 Nov. - 2. Dec., 1999, Bangkok, Thailand. Pa-5. P.273
4. Huỳnh Thị Kim Hối. *Khu hệ giun đất phía nam miền Trung Việt Nam*. Luận án PTS. Khoa học sinh học, 1996.

5. Lý Thị Bích Thủy, Nguyễn Trường Giang, Nguyễn Thị Ngọc Dao, 2002. Hoạt tính thủy phân fibrin của enzyme tách từ một số loài giun đất Việt Nam. Báo cáo tổng kết đề tài năm 2002.
6. Đặng Diễm Hồng, Hoàng Minh Hiền, Phạm Ngọc Sơn, Nguyễn Đức bach, Nguyễn Văn Đồng. 2002. So sánh trình tự nucleotit của đoạn ITS-1 của một số loài tảo biển Việt Nam. Tạp chí Khoa học và công nghệ. Tập 40, Số ĐB, 2002, trang 161-167.
7. Mihara H., et al., 1991. A novel fibrinolytic enzyme extracted from the earthworm, *Lumbricus rubellus*. Jpn J. Physiol 1991; 41 (3): 461-472
8. Nakajima, N., Mihara, H., and Sumi, H., 1993. Characterization of potent fibrinolytic enzymes in Earthworm, *Lumbricus rubellus*. Biosci. Biotechnol. Biochem., 57, 1726-1730.
9. Taylor, D.B., A.L. Szalanski, and R.D. Peterson II. 1996. "Identification of screwworm species (Diptera Calliphoridae) by polymerase chain reaction- restriction fragment length polymorphism". Med. Vet. Entomol. 10: 63-70.
10. Wang X., Bosselut N., Reynal B., Castagnone C., Voisin R., Abad P. and Esmejaud D., 2002. "PCR identification of single individual of the longidorid nematodes *Xipinema Index*, *X. diversicaudatum* and *X. vuittenzei* using specific primer from ribosomal gene". Nematology, Volume 4, N-5, Issue Jul 2002.P. 627-629.
11. Power, T.O., T.C. Told, A.M. Burnell, P.C.B. Murray, C.c. Fleming, A.L. szalanski, B.a. Adams and T.S. Harris, 1997. The internal transcribed spacer region as a taxonomic marker for neamtodes. J. of Nematology 29: 441-450.
12. Szalanski, A.L., D.D. Sui, T.S. Harris, and T.O. Powers. 1997. Identification of cyst nematodes of agronomic and regulatory concern by PCR – RFLP of ITS-1. J. Nematol. 29: 255-267.

SUMMARY

**GENETIC VARIATION OF ITS-1 OF 8 EARTHWORM SPECIES, COLLECTED
FROM NORTH OF VIETNAM**

**Dang Diem Hong, Luyen Quoc Hai, Ngo Thi Hoai Thu, Tran Van Khanh,
Le Quang Huan, Nguyen Thi Ngoc Dao, Nguyen Duc Bach
Institute of Biotechnology, NCST
Huynh Thi Kim Hoi
Institute of Ecology and Biological Resources, NCST
Nguyen Van Dong
Agricultural Genetic Institute, Ministry of Agriculture and Rural Development S.R. Vietnam**

In this paper we presented the analysis of the nuclear ribosomal DNA first Internal transcribed spacer (ITS-1) sequences from 8 earthworm species, collected from North of Vietnam (Sa Pa, Ba Vi and Gia Lam). Genetic variation in ITS-1 sequence within 8 earthworm species was studied. Ribosomal DNA ITS-1 sequences from this species revealed polymorphic sites. The length of ITS-1 sequence varied from 575 to 590 bp among studied species. In which, *Pheretima posthuma* (Gia Lam) is 580bp, *P. morrisi* (Gia Lam) - 578bp, *P. morrisi* (SaPa) - 587bp, *P. robusta* (SaPa) - 587bp, *P. wui* (SaPa) - 575bp, *P. carnifonica* (Sa Pa) - 587bp, *P. manicata* - 590bp and *Perionyx excavatus* (Ba Vi) - 582bp. The obtained results showed that the similarity of eight species was 56.27% and they were divided into 2 groups, *Perionyx excavatus* was in an exclusive group and other species belong to *Pheretima* genus were classified into other one. The length of the second ITS-1 sequence in *Perionyx excavatus* and *Pheretima morrisi* SP is 271 bp and 241 bp, respectively. These results are similar to the analysis of Lumbrokinase activity. Our results in this paper suggested that ITS-1 has proved very useful tool to analyze of phylogenetic relationships among closely related earthworm species. And the classification recommended us to choose which kind of earthworm species are suitable species for extraction of Lumbrokinase from natural resource.

3A.O.2

TÁCH DÒNG GEN MÃ HOÁ ENZYM LUMBROKINASE TỪ LOÀI GIUN QUẾ CỦA VIỆT NAM (*PERIONYX EXCAVATUS*)

Nguyễn Đức Bách, Luyện Quốc Hải, Ngô Thị Hoài Thu,
Lê Quang Huân, Nguyễn Thị Ngọc Dao, Đặng Diễm Hồng
Viện Công nghệ Sinh học, Trung tâm KHTN và CNQG
Nguyễn Văn Đồng
Viện Di truyền Nông nghiệp, Bộ NN&PTNT

ĐẶT VẤN ĐỀ

Các bệnh liên quan đến tim mạch như xơ cứng động mạch, tăng huyết áp, tràn máu não... là một trong những nguy cơ cao nhất dẫn đến tử vong ở Việt Nam cũng như trên thế giới. Trong đó chứng nghẽn mạch do fibrin bị đông cục và bị tắc lại trong mạch máu một thời gian, làm cản trở sự lưu thông máu là một bệnh rất phổ biến, đặc biệt ở người cao tuổi. Vì vậy, việc làm tan cục máu đông đóng một vai trò quan trọng trong điều trị một số bệnh tim mạch.

Vào đầu những năm 90 các nhà khoa học Nhật Bản đã chiết xuất được một enzym mới có hoạt tính thủy phân fibrin mạnh từ một loài giun đất *Lumbricus rubellus* và được gọi là Lumbrokinase thuộc họ proteinase serin có 3 tiểu phần: F-I, F-II và F-III. Tiểu phần thứ nhất được chia nhỏ thành F-I-0, F-I-1 và F-I-2, tiểu phần thứ ba được chia thành F-III-1 và F-III-2. Các tác giả đã chứng minh rằng tiểu phần F-1 có hoạt tính giống như enzym-chymotrypsin, tiểu phần F-III có hoạt tính enzym trypsin, trong khi đó tiểu phần F-II không giống chymotrypsin mà cũng không giống trypsin. Khi xác định trình tự axit amin của các tiểu phần này đã cho thấy chúng chứa nhiều asparagine và aspartic nhưng lại ít gốc proline hoặc lysin so với các enzym serin khác [4]. Lumbrokinase rất khác biệt với các enzym thủy phân fibrin đã được biết trước đó ví dụ như Urokinase về hoạt tính, độ bền nhiệt và pH. Hoạt tính thủy phân fibrin trung bình của nó khoảng 100CU (plasmin units) hoặc 250 IU (urokinase units) /g trọng lượng tươi. Khối lượng phân tử trung bình và điểm đẳng điện của nó vào khoảng 20 KDa và 3,4, tương ứng [4,5].

Với những đặc tính của Lumbrokinase như trên, hướng nghiên cứu khai thác và sử dụng enzym Lumbrokinase từ nguồn nguyên liệu tự nhiên đã được tiến hành [3], tuy nhiên có một số hạn chế là do việc tách chiết và tinh sạch Lumbrokinase từ *Lumbricus rubellus* rất khó khăn, hơn nữa loài giun này lại không phân bố ở Việt Nam. Để khắc phục những khó khăn trên, hướng nghiên cứu tách chiết, làm sạch và xác định tính chất lý hoá của Lumbrokinase từ nguồn giun đất tự nhiên của Việt Nam đã và đang được thực hiện [3]. Bước đầu các tác giả đã thu được một số kết quả như: Xác định được hoạt tính Lumbrokinase ở một số loài giun đất của Việt Nam trong đó hoạt tính của enzyme này cao nhất ở giun Quế (*Perionyx excavatus*). Song song với hướng này, một hướng nghiên cứu tách dòng và biểu hiện gen mã hóa cho Lumbrokinase từ giun Quế của Việt Nam nhằm mục đích tổng hợp enzym này theo con đường công nghệ sinh học cũng đang được tiến hành.

Vì vậy, trong bài báo này chúng tôi trình bày các kết quả bước đầu nghiên cứu phân lập và tách dòng gen mã hoá cho Lumbrokinase từ giun Quế *Perionyx excavatus* của Việt Nam [1,2].

VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

Vật liệu

Giun Quế, tên khoa học *Perionyx excavatus* thu tại Ba Vi-Hà Tây do Tiến sỹ Huỳnh Thị Kim Hồi, Viện Sinh thái và tài nguyên sinh vật phân loại và định tên. Giun có màu đỏ, thân dài trung bình 8 cm, đường kính từ 1,2 - 2mm, sống ở cống rãnh, đồng phân ủ, đất mùn.

Để phân lập được gen mã hóa cho Lumbrokinase, chúng tôi đã thiết kế 3 cặp mồi (HL320F- R, HL321F-R, HL322 F - R) dựa trên mô tả của tác giả Mihara và cộng sự [7] nhằm thăm dò khả năng nhân các tiểu phần gen Lumbrokinase của giun Quế ở Việt Nam.

Phương pháp

Mẫu giun Quế (*Perionyx excavatus*) được loại bỏ hết phân và rửa sạch bằng nước cất khử trùng (DEPC 0,1%). Mẫu được nghiền trong nitơ lỏng, ARN tổng số được tách theo phương pháp có sử dụng Trizol. Thư viện cDNA được tổng hợp từ ARN tổng số bằng Super Script™ First-Strand Synthesis system for RT-PCR Kit của hãng Invitrogen. PCR^(R) 2.1 được sử dụng làm Vector tách dòng. Plasmid được tách theo phương

pháp của Sambrock [6] và làm sạch với cột QIA prep ^(R)Miniprep (QIAGEN). Trình tự nucleotit được đọc bằng máy ABM PRISM 377, USA.

Phản ứng PCR nhân đoạn gen mã hóa cho Lumbrakinase: 20 μ l (10XBuffer 2 μ l, dNTP mix 2,5mM 1,5 μ l, MgCl₂ 25mM 1,2 μ l, 1U Taq polymerase, primer 2 μ l, cDNA 1 μ l, H₂O 12 μ l). Phản ứng được thực hiện theo chu trình nhiệt: Biến tính 94°C/3 phút tiếp theo lặp lại 35 chu kỳ (94°C/30 giây, 52°C/30 giây, 72°C/30 giây), bước cuối cùng 72°C/10 phút và giữ ở 4°C. Sản phẩm PCR được phân tách trên gel agarose 1,8% và quan sát dưới đèn tử ngoại sau đó được cắt và thôi qua cột SIGMA Gen Elute™ Agarose Spin Columns – USA.

KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

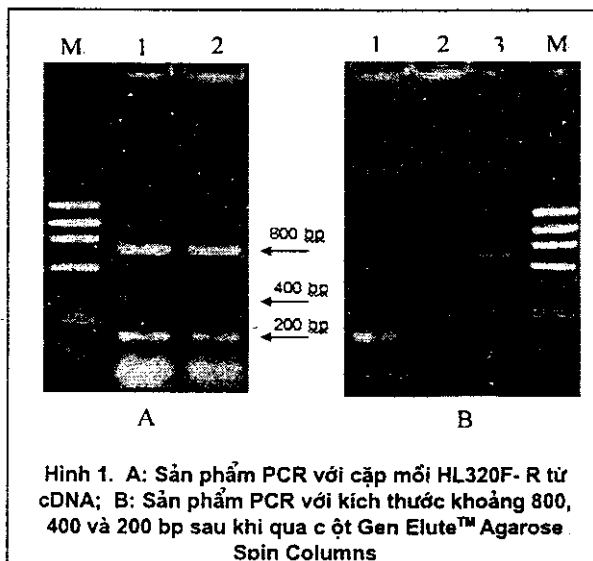
Tách ARN tổng số, tổng hợp thư viện cDNA và nhân gen Lumbrakinase

Theo phương pháp mô tả ở trên chúng tôi đã tách được ARN tổng số từ giun Quế với các tiểu phần 28S, 18S và 5.8S (Kết quả không chỉ ra ở đây). cDNA được tổng hợp theo SuperScript™First-Strand Synthesis system for RT-PCR Kit của hãng Invitrogen sử dụng oligoT. Để nhân gen mã hoá cho Lumbrakinase chúng tôi đã sử dụng 3 cặp mỗi mô tả ở trên. Sản phẩm PCR của 3 cặp mỗi này có kích thước từ 200 đến 800bp. Trong đó bằng cặp mỗi thứ nhất chúng tôi đã nhân được 3 băng có kích thước khoảng: 200, 400 và 800 bp (hình 1A). Các băng này được tách và làm sạch qua cột Gen Elute™ Agarose Spin Columns (hình 1B)

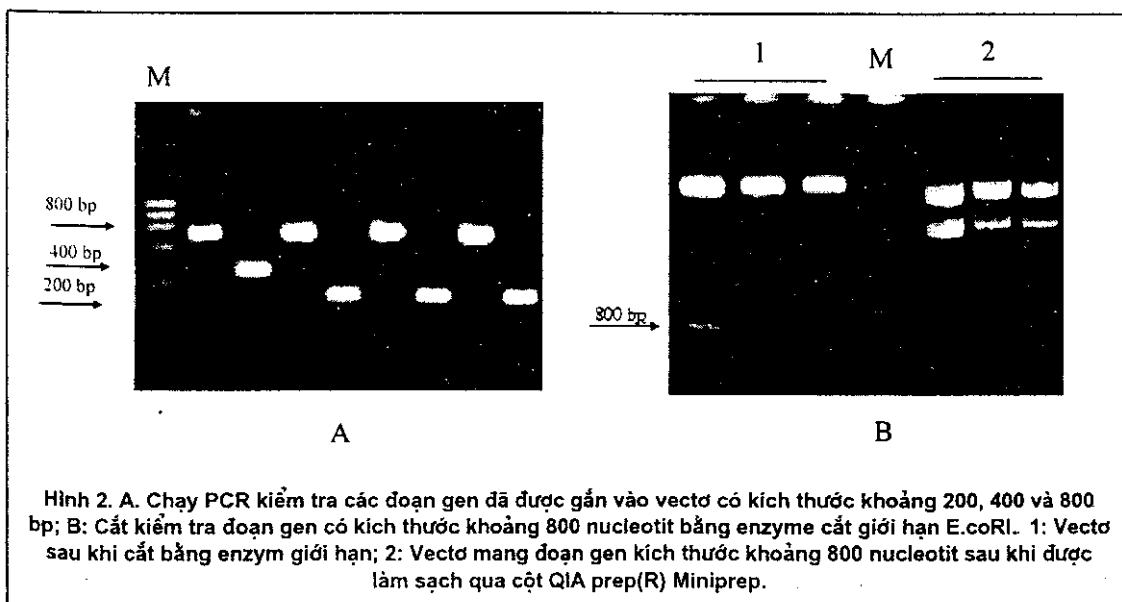
Tách dòng và đọc trình tự gen Lumbrakinase

Sản phẩm nhân từ 3 cặp mỗi trên được gắn vào vector pCR®2.1. Plasmid sau khi được tách chiết, làm sạch, kiểm tra bằng chạy PCR (Hình 2A) và bằng enzyme cắt giới hạn E.coRI (Hình 2 B) chúng tôi tiến hành đọc trình tự trên máy ABM PRISM 377, USA.

Sau khi đọc trình tự các sản phẩm PCR từ 3 cặp mỗi trên chúng tôi đã thu được 3 đoạn gen có kích thước: 733; 380; 187bp. Các trình tự này được so sánh với trình tự nucleotit mã hóa cho tiểu phần F-III Lumbrakinase của loài giun *Lumbricus rubellus* [Accession number AB045719] theo công bố của tác giả Mihara H và cộng sự [1, 2]. Kết quả cho thấy, đoạn gen có kích thước 733 bp phù hợp nhất về mặt lý



Hình 1. A: Sản phẩm PCR với cặp mỗi HL320F- R từ cDNA; B: Sản phẩm PCR với kích thước khoảng 800, 400 và 200 bp sau khi qua cột Gen Elute™ Agarose Spin Columns



Hình 2. A: Chạy PCR kiểm tra các đoạn gen đã được gắn vào vectơ có kích thước khoảng 200, 400 và 800 bp; B: Cắt kiểm tra đoạn gen có kích thước khoảng 800 nucleotit bằng enzyme cắt giới hạn E.coRI. 1: Vectơ sau khi cắt bằng enzyme giới hạn; 2: Vectơ mang đoạn gen kích thước khoảng 800 nucleotit sau khi được làm sạch qua cột QIA prep(R) Miniprep.

Với 3 cặp mồi thiết kế chúng tôi đã nhân và tách dòng được những đoạn gen có độ tương đồng với tiểu phần F-III, tiểu phần biểu hiện hoạt tính Lumbrokinase cao nhất theo tác giả Mihara và cộng sự. Trong đó, đoạn gen được nhân bằng cặp mồi HL320 F-R có chiều dài 733 bp tương đồng trong vùng từ nucleotit 117 đến 937 của tiểu phần FIII. Đoạn gen có chiều dài 380 và 178 nằm trong vùng 527 đến 909 bp và 117 đến 308 bp tương ứng trong tiểu phần FIII.

So với công bố của tác giả Mihara, đối tượng nghiên cứu của chúng tôi lại là loài giun Quế (*Perionyx excavatus*) của Việt Nam vì vậy đó có thể là nguyên nhân dẫn đến độ tương đồng không hoàn toàn giữa gen Lumbrokinase mà chúng tôi tách được so với gen đã công bố của tác giả trên được tách từ giun *Lumbricus rubellus* của Nhật Bản. Nhưng kết quả ban đầu thu được ở đây vẫn cho phép chúng tôi tiếp tục tách dòng và tìm điều kiện để biểu hiện đoạn gen mã hóa cho Lumbrokinase ở loài giun này.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Đỗ Văn Nhung, 1994. Khu hệ giun đất Miền Tây Bắc Việt Nam. Luận án Tiến sĩ sinh học.
2. Lê Văn Triễn, 1995. Khu hệ giun đất Miền Đông Bắc Việt Nam. Luận án Tiến sĩ sinh học.
3. Lý Thị Bích Thủy, Nguyễn Trường Giang, Nguyễn Thị Ngọc Dao, 2002. Hoạt tính thủy phân fibrin của enzyme tách từ một số loài giun đất Việt Nam. Báo cáo tổng kết đề tài năm 2002.
4. Mihara H., et al., 1991. A novel fibrinolytic enzyme extracted from the earthworm, *Lumbricus rubellus*. Jpn J. Physiol 1991; 41 (3): 461-472
5. Nakajima, N., Mihara, H., and Sumi, H., 1993. Characterization of potent fibrinolytic enzymes in Earthworm, *Lumbricus rubellus*. Biosci. Biotechnol. Biochem., 57, 1726-1730.
6. Sambrook E.F., Fritsch E.F., Maniatis. T. 1989. Molecular Cloning. 2nd edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press.
7. Sugimoto, M., and Nakajima, N., 2001. Molecular cloning, sequencing, and expression of cDNA encoding serine protease with fibrinolytic activity from earthworm. Biosci. Biotechnol. Biochem., 65 (7), 1575-1580.

SUMMARY

CLONING GENE ENCODING FOR LUMBROKINASE FROM VIETNAMESE EARTHWORM (*PERIONYX EXCAVATUS*)

Nguyen Duc Bach, Luyen Quoc Hai, Ngo Thi Hoai Thu,
Le Quang Huan, Nguyen Thi Ngoc Dao, Dang Diem Hong
Institute of Biotechnology, NCST
Nguyen Van Dong

Agricultural Genetic Institute, Ministry of Agricultural and Rural Development S.R. Vietnam

Lumbrokinase, an enzyme isolated from an earthworm *Lumbricus rubellus*, has a high fibrinolytic activity. It can hydrolysis blood clots that cause some serious blood diseases. With own characteristics, Lumbrokinase used to treat and prevent clotting of blood. But the matter rising is *Lumbricus rubellus* does not distribute in Vietnam. Therefore, we have screened and analyzed Lumbrokinase from series of Vietnamese earthworm species. The obtained results showed Lumbrokinase found in some species and the highest hydrolysis fibrinogen activity was in *Perionyx excavatus*, a very popular species in Vietnam. In this paper, we presented initial results in isolation and cloning gene encoding for Lumbrokinase from *Perionyx excavatus* in orders to biosynthesis this enzyme. From isolated mRNA we synthesized cDNA and amplified fragments by using three pairs of specific primers (HL320F-R; HL321F-R; HL322R-F). After cloning, PCR products were sequenced. Three sequences 733, 380 and 187bp amplified by HL320 F-R revealed homology with LumF-III, subunit having the highest fibrinolytic activity of Lumbrokinase. These result suggested that HL320R-F could be a suitable primers for cloning and expressing Lumbrokinase from *Perionyx excavatus*.

TÓM TẮT

Nghiên cứu chi Nấm trắng khổng lồ Macrocybe Pegler & Lodge mới được tìm thấy cho khu hệ Nấm lớn của Việt Nam

Cho tới nay, 66 loài của 20 chi thuộc họ *Tricholomataceae* đã được ghi nhận cho khu hệ Nấm lớn của Việt Nam. Tuy vậy chi *Macrocybe* còn chưa được nhắc tới. Thông qua các kết quả nghiên cứu của mình, chỉ nấm mới *Macrocybe* và hai loài *Macrocybe giganteum* và hai loài *Macrocybe crassa* được ghi nhận cho khu hệ Nấm lớn ở Việt Nam.

Người thẩm định nội dung khoa học: GS.TS. Bùi Xuân Đồng

NGHIÊN CỨU CHI NẤM *WOLFIPORIA* RYV. & GILBIN Ở VIỆT NAM

Trịnh Tam Kiệt

Trung tâm Công nghệ Sinh học - Đại học Quốc gia, Hà Nội

Cho tới nay, khoảng hơn 2000 loài nấm đã được ghi nhận cho khu hệ nấm Việt Nam (Kiệt và các tác giả, 2001), trong đó có hơn 1000 loài nấm lớn (macro fungi). Trong số các loài nấm lớn thì chi *Wolfiporia* có ý nghĩa khoa học và thực tiễn hết sức độc đáo. *Wolfiporia* được nhân dân các nước Đông Nam á, đặc biệt là Trung Quốc, hàn Quốc Việt Nam sử dụng từ lâu đời với tên Đông y là Phục Linh. Người dân da đỏ châu Mỹ cũng sử dụng loại nấm này từ lâu với tên "tuckahoe" làm thực phẩm. Thực ra đây chỉ là dạng hạch nấm (sclerotium) vô tính sống dưới mặt đất chứa các chất dự trữ của nấm Phục linh.

Những nghiên cứu của chúng tôi trong bài báo này nhằm cung cấp những dẫn liệu làm sáng tỏ hơn về loài nấm độc đáo này của Việt Nam, một taxon nấm còn chưa được ghi nhận và mô tả cho khu hệ Nấm Việt Nam.

TƯ LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

Các mẫu nấm tươi được thu hoạch tại Sapa - Phanxipang và các vùng rừng tại Lai Châu (giáp với Vân Nam Trung Quốc), Quảng Ninh và Đà Lạt Lâm Đồng. Các mẫu nấm được sấy khô, đông khô thăng hoa và bảo quản tại Bộ mẫu giống gốc nấm, ĐHQG Hà Nội. Việc nghiên cứu các đặc điểm hiển vi, nuôi cấy thuần khiết và nghiên cứu các hợp chất tự

nhiên của Phục linh được tiến hành theo các phương pháp của Ryvarden & Gilbn (1987), Graefe (1998)...

Mô tả chi *Wolfiporia*

Mycotaxon 19:141, 1984

Quả thể hàng năm bám sát vào giá thể. Mặt ống nấm đầu tiên màu trắng, sau trở nên có màu đất son khi trưởng thành và già, 2-5 (6) ống trong 1mm, lớp ống hầu như không màu, dày tới 2mm. Hệ thống sợi gồm 2 loại sợi, bao gồm sợi nguyên thủy có vách mỏng và sợi nguyên thủy vách dày, có vách ngăn đơn giản, sợi bên màng dày, không có vách ngăn trên các đám hình chùy có tiểu bính. Đám bào tử hình elip tới hình trụ, trong suốt. Gây nên mục nâu dạng thối ở cây lá kim và lá rộng. Có hai loài phân bố ở Bắc Mỹ và Đông Á.

Wolfiporia là một chi tách biệt của *Poriales* được đặc trưng bởi hệ sợi nấm bao gồm hai loại sợi trong đó sợi nguyên thủy không có khoá, hệ sợi nấm vẫn có kích thước lớn và gây nên mục nâu dạng thối.

Các loài: Đây là một chi nhỏ, chỉ mới ghi nhận được 2 loài *Wolfiporia dilatophila* Ryv. & Gilbn. được đặc trưng bởi ống nấm có miệng tròn đều, 3-5 ống trong 1mm và bào tử hình ellip, 4-5µm chiều dài, mới gặp ở Bắc Mỹ và loài *Wolfiporia cocos* có miệng ống cắt góc, 1-3 ống trong 1mm, bào tử hầu như hình trụ 8-11µm chiều dài, có khu phân bố Bắc Mỹ và Đông Á.

Mô tả loài chuẩn

Wolfiporia cocos (Schw.) Ryv. & Gilbn.
Mycotaxon 19:141, 1984.

- *Sclerotium cocos* Schw., Naturf. Ges. Leipzig Schrift. 1:56, 1822.
- *Pachyma cocos* Fr. Syst. Myc. 2:242, 1823.
- *Pachyma hoelen* Sacc., Syll. Fung. 8:908, 1889.
- *Poria cocos* (Schw.) Wolf, J. Elisha Mitchell, Sci. Soc. 38:134, 1922.

Quả thể giả một năm, ban đầu dạng những miếng tròn, sau chúng vẫn hợp với nhau và vươn rộng ra bám vào vào quả thể, 3-8mm chiều dày, đầu tiên màu trắng sau trở nên có màu đất son, có sắc thái nâu hồng khi già hoặc bị khô đi. Ống nấm có màu đất son sáng có sắc thái da bò đến hồng da bò, có 1-2 (3) ống trong 1mm; lỗ có góc dạng đa giác thay đổi, lớp ống màu da bò nhạt, liên tục với lớp mô phía dưới, dày 2mm; mép ống mỏng rách, hữu thụ hay bất thụ, rộng, phủ lông, màu thất lung da bò; lớp mép ống có màu crem tới hồng da bò nhạt, dạng sợi đến bản, dày 1-2mm.

Hệ thống sợi: gồm 2 loại sợi. Sợi nguyên thủy màng mỏng đến màng dày, có vách ngăn đơn giản, phân nhánh, 3-14µm đường kính (đôi khi ở lớp mô phía dưới lớp ống sợi vụn nhiều, đạt kích thước 20µm đường kính). Sợi bên thường dày màng hơn, đơn độc (ít phân nhánh) 3-8µm đường kính, không có liệt bào nhưng quan sát thấy dạng liệt bào hình thoi. Giả hình chủy có 4 tiểu bình.

Giá bào tử: hình trụ, trong suốt, nhẵn, kích thước (7) 8-11x3-4µm.

Dạng gây mục: gây nên mục nâu dạng thoi cũng như mục gốc của cây lá kim và lá rộng (đặc biệt là *Populus*).

Đặc điểm nuôi cấy: Hệ sợi nấm mọc tốt trên môi trường malt-agar, tạo nên khuẩn lạc dạng sợi bông (với khuẩn ty không khí rất phát triển), đầu tiên màu trắng sau chuyển sang màu phấn hồng, có sắc thái nâu, trong điều kiện tối ưu, sự mọc của sợi đạt tới tốc độ rất lớn, tới 400µm/h.

Khi quan sát dưới kính hiển vi, sợi nấm được tạo thành chủ yếu từ các sợi nấm phân nhánh mạnh, có vách ngăn đơn giản (không có khoá) kích thước 5-8 µm đường kính. Sợi nấm có khi chứa đầy nội chất và phân chia thành những tế bào có kích thước ngắn, khảm các chất trên màng ngoài; không hình thành quả thể thành

thực trong nuôi cấy trên môi trường thạch, chỉ hình thành mô sẹo dạng bám sát vào thành thủy tinh, màu nâu tối.

Sự phân tính của *Wolfiporia cocos* còn chưa được làm sáng tỏ.

Hạch nấm: *Wolfiporia cocos* hình thành nên hạch nấm (*Sclerotium*) có kích thước lớn ở dưới đất gọi là phục linh (Đông Á) và tuckahoe (Bắc Mỹ), quan sát thấy rõ ràng có mối quan hệ với hệ sợi nấm ở bên trong rễ cây, thường nằm dưới mặt đất. Hạch nấm có dạng hình cầu hay dạng củ, phân thủy nhiều hay ít, có kích thước đạt 10-30cm đường kính; mềm khi tươi, trở nên cứng rắn khi khô với vỏ màu nâu đen nhạt. Khi quan sát dưới kính hiển vi chúng được cấu trúc từ các tế bào dạng củ, khối đa diện hoặc dạng cầu có kích thước lớn từ 8-18 (20)µm đường kính, trong chứa đầy các chất dự trữ. Quả thể thường hình thành trên hạch nấm, nếu chúng được nuôi cấy trong khoang ẩm.

Phân bố: Trong tự nhiên *Wolfiporia cocos* cũng hình thành quả thể trên cây chết đứng hoặc cây đã đổ gãy, không có liên quan gì tới dạng hạch nấm. Dạng hạch nấm có thể tìm thấy trong các lớp đất ở phía dưới, gần liền với rễ thông có tuổi thọ tương đối cao. Nấm được ghi nhận ở Sapa - Phanxipang, Lai Châu, Quảng Ninh, Lâm Đồng, Trung Quốc, Nhật Bản và Bắc Mỹ.

BÀN LUẬN

Wolfiporia cocos gây nên tổn thất, làm mục gỗ ở Bắc Mỹ, đặc biệt là thông (*Pinus*) và *Populus* (tuý gỗ). Sự phân bố của chúng có liên quan mật thiết với các cây chủ. Đây là một loài nấm được liệu đã được nhân dân Đông Á sử dụng từ lâu đời để điều trị nhiều bệnh hiểm nghèo và có giá trị bổ dưỡng. Những sản phẩm trao đổi chất của *Wolfiporia cocos* có thể tìm thấy được thông qua các tài liệu của Tai và cộng sự từ năm của Đài Loan (1992, 1995), và Trịnh Tam Kiệt, Graefe cùng các tác giả khác (2001) từ năm của Việt Nam khi nghiên cứu hạch nấm.

Bằng các phương pháp nghiên cứu các hợp chất tự nhiên như sắc ký lỏng cao áp, khối phổ và cộng hưởng từ hạt nhân ba hợp chất triterpenoid chủ yếu của hạch nấm *W. cocos* của Việt Nam đã được xác định: 3-hydroxy-lanosta-7.9(11)-triên-21-oiic axit (1), poricoic

axit A (2), 3-O-acetyl-tumulosic axit (3). Cả ba hợp chất trên đều không có độc tính với cơ thể người và khả năng kìm hãm steroid 3-dehydrogenaza (như là một enzym gây viêm nhiễm nguy hiểm) đã được chỉ ra khá cao, khẳng định tác dụng dược lý quý báu của chúng trong việc bào chế các thuốc chống viêm nhiễm đường tiêu hoá và mỹ phẩm dưỡng da.

Như vậy vị trí của *Wolfiporia cocos* trải qua các chặng đường phát triển lịch sử của Nấm học rất biến động. *Sclerotium cocos* lần đầu tiên được Schweinitz công bố và mô tả (1822) chủ yếu cho dạng hạch nấm. Ngay sau đó Fries đề nghị tên *Pachyma cocos* (1823) và Saccado đề nghị tên *Pachyma hoelen* (1889) cho chính loài nấm trên. Mãi tới khi nghiên cứu quả thể thành thực Wolf (1922) mới đề nghị tên khoa học *Poria cocos* cho loài nấm này và được nhiều tác giả thừa nhận. Ginn và Lowe (1983) đã chuyển *Poria cocos* là synonym với *Daedalea extensa* Pk. và đưa ra danh pháp mới với tên *Macrohyporia extensa*. Tuy nhiên mẫu chuẩn của *D. extensa* lại không tìm thấy các dạng sinh sản hữu tính (giả và giả bào tử) nên không thể coi chúng là dạng hữu thụ của *Poria cocos* được. Những nghiên cứu kỹ lưỡng của Ryvarden và Gilbertson về hệ thống sợi nấm gồm hai loại sợi, trong đó sợi nguyên thủy không có khoá, sợi nấm có kích thước lớn uốn lượn, gây mục nâu dạng thối và các sản phẩm

trao đổi chất thứ cấp đặc trưng cho thấy *Wolfiporia cocos* là một taxon riêng biệt. Đây là một nhóm nấm có ý nghĩa khoa học và thực tiễn rõ rệt, cần được nghiên cứu kỹ lưỡng hơn.

TÀI LIỆU THAM KHẢO CHÍNH

1. R. L. Gilbertson and L. Ryvarden. 1987. North American Polypores. Oslo.
2. Trịnh Tam Kiệt. 1996. Danh lục nấm lớn của Việt Nam. Hà Nội. NXBNN.
3. T.T. Kiet, S. Heinze, A. Haerite and U. Graefe. 2001. Occurences of triterpenoid in a Vietnamese species of *Wolfiporia cocos*. Pros. intern. biol. Conf. Hanoi.
4. T.T. Kiet. 1998. Preliminary checklist of macrofungi of Vietnam. Feddes Repertorium 109.3-4:257-277. Berlin.
5. Trịnh Tam Kiệt và các tác giả. 2001. Danh lục nấm Việt Nam, trong "Danh lục thực vật Việt Nam", từ trang 51 đến trang 393. Nhà xuất bản Nông nghiệp Hà Nội.
6. L. Ryvarden. 1991. Genera of Polypores. Oslo.
7. Tai, T. et. al. Phytochemistry 1992. 31. 2548
8. Tai, T. et. al. Phytochemistry 1995. 40. 225.
9. S.C. Teng. 1996. Fungi of China. New York.

TÓM TẮT

Studies on the genus Wolfiporia in Vietnam

The fungi *Wolfiporia cocos* is used in Asian folk medicine for treatment of various diseases. The taxonomical position, the main morphological and ecological characteristics as well as the main natural products of this new record taxon for the Vietnamese fungi flora are reported.

Người thẩm định nội dung khoa học: GS.TS. Bùi Xuân Đồng

STUDY ON EXTRACTION AND PURIFICATION OF ISOFLAVONES FROM VIETNAM SOYBEAN *GLYCINE MAX*

Do Thi Hoa Vien

*Institute of Biological and Food Technology, Hanoi University of Technology,
1 Dai Co Viet, Hanoi, Vietnam, hoavien@hotmail.com*

Phan Quoc Kinh

*Corporation of Science and Production by New Technology
6 Lang Ha, Hanoi, Vietnam, lannampharm@hn.vnn.vn*

Abstract: Using Mogal 92 petrol obtain defatted soybean flour, then extracting this flour with 60% (v/v) ethanol, at 70°C for 15 hours, we obtained 1.4% soybean plaster containing isoflavones. By preparative thin layer chromatography method, 0.18% purified isoflavones from soybean plaster was obtained. We have quantitatively and qualitatively analysed phytoestrogens in purified isoflavones by HPLC using American Phyto-Est capsule (containing genistein and daidzein as two main isoflavones) as standard sample. The result of our study showed that soybean contains 0.113% genistein and 0.014% daidzein.

Keywords: daidzein, genistein, isoflavone, phytoestrogen, soybean.

I. INTRODUCTION

Since a long time ago, traditional foods from soybean, such as tofu, soy milk, vegetarian foods were processed in Vietnam and Asiatic countries. Recently, scientists have discovered that soybean is not only rich in protein, balanced on nutrition, but also contain many bioactive compounds, so that soybean is considered as one kind of functional foods. One group of bioactive compounds soybean is isoflavones which having estrogen activities, named phytoestrogens. Phytoestrogens appear to have both estrogenic and anti-estrogenic effects depending on the concentration of circulating endogenous estrogens and the quantity of estrogen receptors. They can prevent and treat osteoporosis, kidney and heart disease, cancer and other symptoms associated with menopausal women such as sleep disorder, anxiety, depression, headache, lumbago and bone pain.

In this paper, we study on the process of extraction of isoflavones from soybean and make a quantitative and qualitative analysis of the principal phytoestrogens as daidzein and genistein of Vietnamese soybean *Glycine max*.

II. MATERIALS AND METHODS

Soybean was selected, dried and crushed to soy flour. Soy flour was defatted by using Mogal 92 petrol, in following ratio (Soy flour: Mogal 92 = 1:3 w/v). EtOH 96% was selected in three tested solvents: MeOH 80%, EtOH 96% and H₂O (pH 4.5) for extracting isoflavones from defatted soy flour.

Condensation and drying of ethanolic extract from defatted soy flour to obtain isoflavone plaster. The qualitative analysis of phytoestrogens in isoflavone plaster was made by colorable detectable reagent (NH₄) and Thin layer chromatography method (TLC) (Silica gel 60 F₂₅₄, Merck, CHCl₃: EtOH = 1:3). The Preparative thin layer chromatography method to purifying isoflavones from soybean plaster (Silica gel 60 F₂₅₄, Merck; CHCl₃: EtOH = 1:3). Quantitative and qualitative analysis of phytoestrogens from purified isoflavones by HPLC was made by using American Phyto-Est capsule as standard sample (MeOH: H₂O = 75:25, solvent of sample: MeOH 80%).

III. RESULTS AND DISCUSSION

3.1 Ethanolic extract from defatted soy flour contains 2.74% of isoflavone plaster (comparative with soy flour). We also examine the ethanolic extract from germinative soy flour. The results showed that the content of isoflavone plaster from germinative soy flour (5.74%) was higher than from soy flour (2.74%).

3.2 Qualitative analysis of phytoestrogens in isoflavone plaster from defatted soy flour by colorable detectable reagent NH_3 and on TLC (Silica gel 60 F_{254} , Merck; CHCl_3 : EtOH = 1:3) gave positive results.

3.3 Purifying the phytoestrogens from isoflavone plaster by preparative TLC (Silica gel 60 F_{254} , Merck; CHCl_3 : EtOH = 1:3), we obtain 7.44% of the purified phytoestrogens (comparative with the isoflavone plaster) and 0.18% of the purified phytoestrogens (comparative with the soy flour).

3.4 Qualitatively and quantitatively analysis of the purified phytoestrogens by HPLC, by using American Phyto-Est capsule as standard sample (MeOH : H_2O = 75:25, solvent for dissolve sample; MeOH 80%).

Comparison of HPLC chromatograph and UV spectra of the tested sample and Phyto-est capsule (fig. 1, fig. 2, fig. 3 and fig. 4) showed that the tested sample and the Phyto-est capsule have two peaks that have the same RetTime. There are:

Genistein: RetTime = 1.564 min, and

Daidzein: RetTime = 1.837 min

The HPLC chromatograph data of purified phytoestrogens (fig. 3) also showed that: the purified phytoestrogens contains three compounds, two of them are genistein with 63.79% and daidzein with 13.34%. Another compound with 22.85% (RetTime = 1.305) is still not determined. The HPLC chromatograph of Phyto-est capsule (fig. 2) had four peaks, two main peaks of which them are genistein and daidzein.

3.5. Process of extraction and purification of phytoestrogens from soy flour is represented as follows

Soy flour (F) → Defatted soy flour (86.6% F) (by Mogal 92 petrol) → Extracted in EtOH 96% (40:60, w/v at 70°C, for 15h) → Evaporated and dried at 80°C → Soy plaster containing isoflavones (I) (1.37% F) → Purified phytoestrogens by Preparative TLC (Silica gel 60 F_{254} , Merck; CHCl_3 : EtOH = 1:3) → Evaporated and dried at 80°C → Total phytoestrogens (P) (7.74% I ≈ 0.18% F) → Genistein (63.79% P ≈ 4.75% I ≈ 0.113% F) and Daidzein (13.34% P ≈ 0.99% I ≈ 0.014% P) (analysed by HPLC using American Phyto-Est capsule as standard sample).

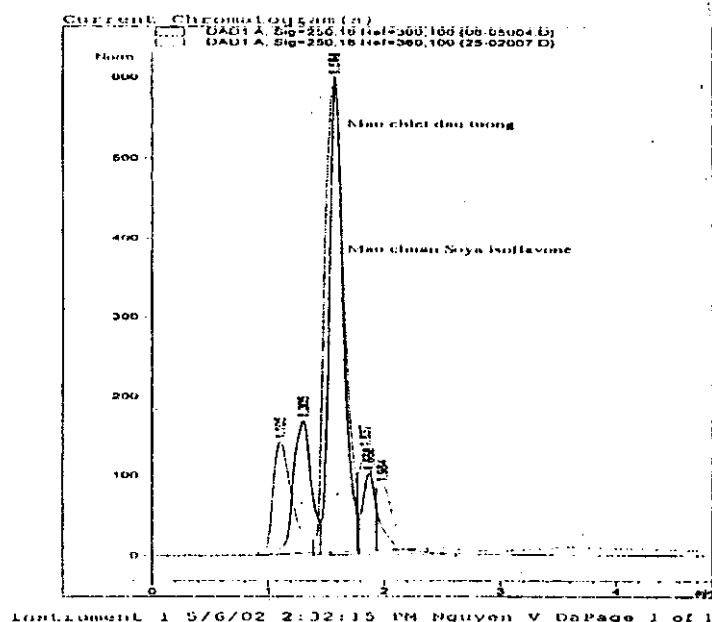
Vietnam belongs to the soybean producing countries, so research and exploitation of bioactive substances for production of functional foods or nutritional supplements is of interest to researchers.

IV. CONCLUSION

The study's results are summarized as follows:

- The content of soy plaster, extracted by ethanol, is 2.74% (compared to soy flour).
- The content of total phytoestrogens compare with the soy plaster, extracted by ethanol, is 7.44%; (compared with soy flour's 0.18%).
- The content of genistein compared with the soy plaster, extracted by ethanol, is 4.75%;
- The content of daidzein compared with the soy plaster, extracted by ethanol, is 0.99%; (compare with soy flour's 0.014%).

PRINT OF WINDOW 38: CURRENT CHROMATOGRAM (S)



Area Percent Report

Sorted By : Signal
Multiplier : 1.0000
Dilution : 1.0000
Sample Amount : 3.00000 [ng/ul] (not used in calc.)

Signal 1: DAD1 A, Sig=250,16 Ref=360,100,

Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area [mAU*s]	Height [mAU]	Area %
1	1.305	BV	0.1462	1820.41968	160.26192	22.8584
2	1.575	VV	0.1287	5080.68994	600.57446	63.7964
3	1.868	VB	0.1484	1062.79980	101.28993	13.3452

Totals : 7963.90942 870.12631

Results obtained with enhanced integrator!

*** End of Report ***

mau chiet xuat bang etanol lan 2

Injection Date : 5/6/02 1:41:30 PM
Sample Name : Dau tuong Vial : 1
Acq. Operator : Nguyen V Dat Le Thi Duc
Method : C:\HPCHEM\1\METHODS\DOC 1.M
Last changed : 5/6/02 1:45:39 PM by Nguyen V Dat Le Thi Duc
(modified after loading)

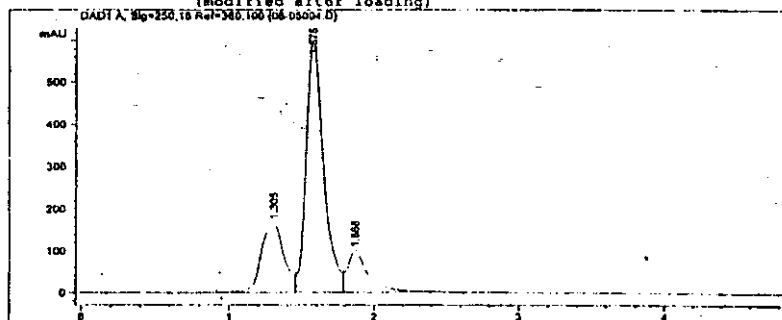


Fig. 2 HPLC chromatograph of Phyto-est capsule

Data File D:\DATA\25-02007.D

Sample Name: Soya isoflavonid

Mau Soya flavonid

Injection Date : 2/25/02 9:55:49 AM
Sample Name : Soya isoflavonid Vial : 1
Acq. Operator : Nguyen Van Dat
Method : C:\HPCHEM\1\METHODS\DOC 1.M
Last changed : 2/25/02 10:07:20 AM by Nguyen Van Dat
(modified after loading)

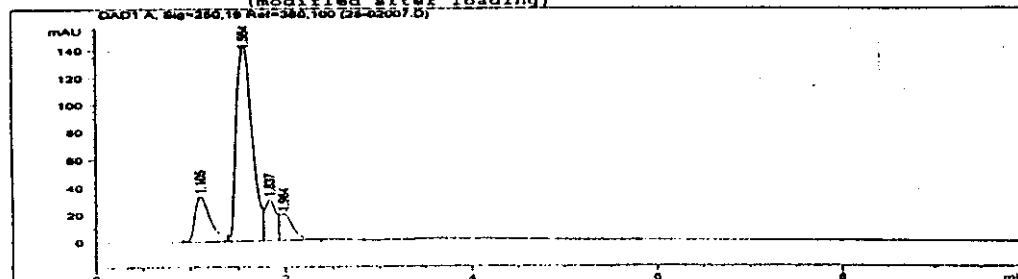


Fig. 3 HPLC chromatograph of purified phytoestrogens from soybean

Print of window 39: DAD1, 1.575 (1230 mAU, -) of 06-0500

Print of window 39: DAD1, 1.869 (191 mAU, -) of 06-0500

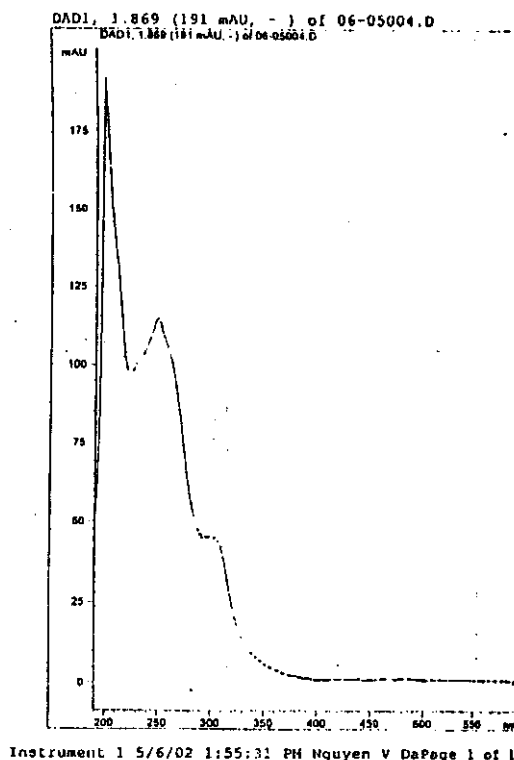
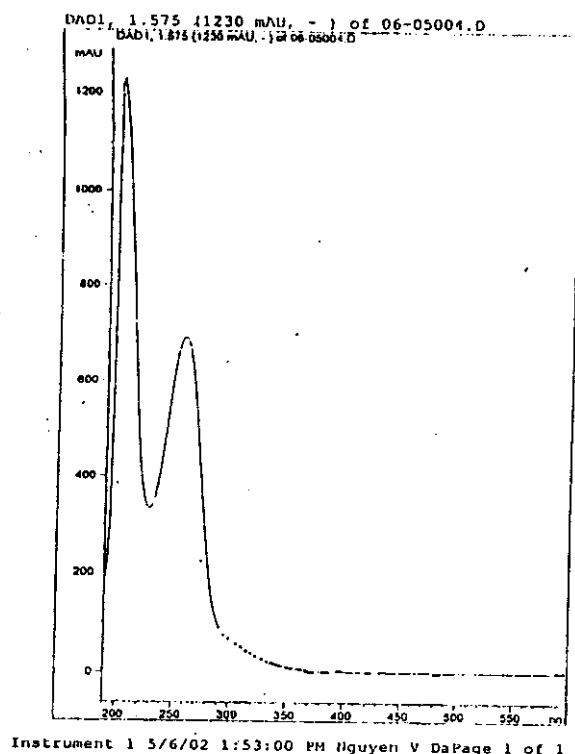


Figure 4. UV spectra of genistein and daidzein presenting in purified phytoestrogens

Acknowledgements: We are grateful to Prof. Dr. Sc. Le Van Nhung for his support to our subject. We also would like thank Assoc. Prof. Dr. Nguyen Thi Ngoc Dao – Chief of the National Project KC04-17 for her help in this study.

REFERENCES

14. American Soybean Association (ASA), (1999). Soyfoods and the prevention and treatment of chronic disease. ASA Europe, Belgium.
15. Dang Hanh Phuc, (2002). Isoflavone in soybean. *Vietnamese magazine of health and life* 120.
16. Le Duc Trinh, (1998). *Hocmon*. Medicinal publisher, Hanoi.
17. Le Ngoc Tu and al., (1997). *Industrial Biochemistry*. Science and technical publisher, Hanoi.
18. Nguyen Thien Luan, Le Doan Dien and Phan Quoc Kinh, (2001). *Nutritional Supplements – A New Field of Science of XXI century*. Agricultural publisher, Hanoi.
19. Pagliacci M. C., et al., (1994). Growth-inhibitory effects of the natural phytoestrogen genistein in MCF-7 human breast cancer. *Eur. J. Cancer* 10, 25-30.
20. Ronald Klatz, Robert Gloldman, (2000). The soybean solution to aging. *Magazine of total health* 5, Vol. 19, 27-31.
21. Serena Landini, Madge Y. Graham, Terence L. Graham, (2003). Lactofen induces isoflavone accumulation and glyceollin elicitation competency in soybean. *Phytochemistry* 62, 865-874.
22. Yong Soon Choi, Bung Hoon Lee, Jong Hwa Kim, Nam Soo Kim, (2000). Concentration of phytoestrogen in soybean and soybean product in Korea. *J. of Sc. of Food and Agriculture*, 45-50.



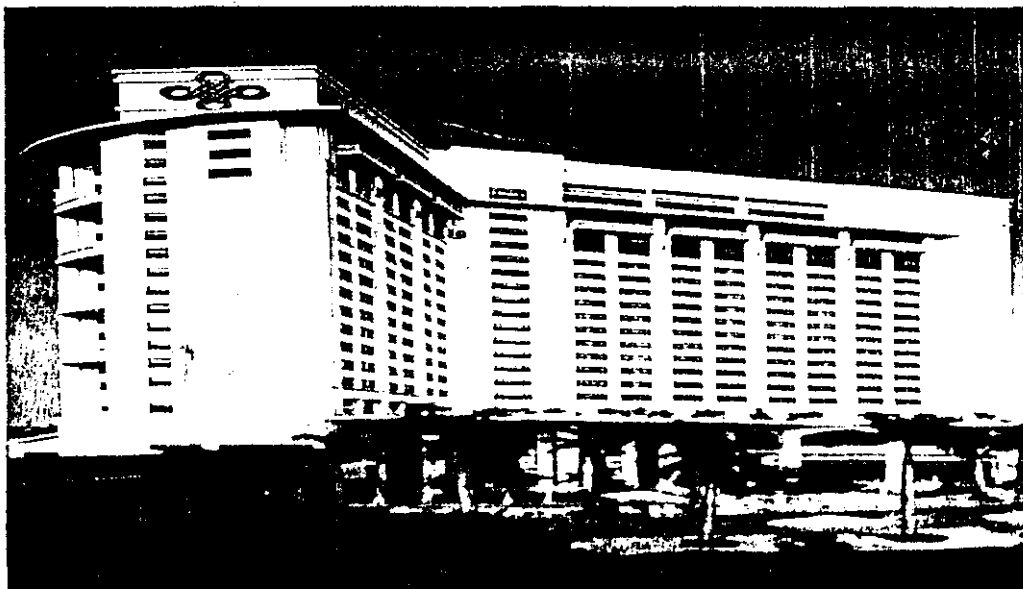
BÁO CÁO TOÀN VĂN CÁC CÔNG TRÌNH KHOA HỌC TẠI HỘI NGHỊ KHOA HỌC VIỆT - MỸ VỀ DIOXIN PROCEEDING REPORTS

**HỘI NGHỊ KHOA HỌC VIỆT - MỸ VỀ ẢNH HƯỞNG CỦA
CHẤT ĐỘC DA CAM / DIOXIN
LÊN SỨC KHỎE CON NGƯỜI VÀ MÔI TRƯỜNG**

3 - 6 / 3 / 2002, Hà Nội, Việt Nam
Khách sạn Daewoo, 360 Kim Mã, Ba Đình, Hà Nội.

**VIET NAM - UNITED STATES SCIENTIFIC CONFERENCE
ON HUMAN HEALTH AND ENVIRONMENTAL EFFECTS
OF AGENT ORANGE / DIOXIN.**

March 3 - 6 / 3 / 2002, Ha Noi, Viet Nam
Daewoo Hotel, 360 Kim Ma, Ba Dinh, Ha Noi.



15h30 - 15h45

Sự sử dụng chất độc da cam tại những khu vực có căn cứ quân sự của Mỹ và đường nhiễm của TCDD vào cơ thể con người ở miền Nam Việt nam.

Dr. Wayne Dwemychuk,
Hatfield, Canada

15h45 - 16h00

Mối liên quan giữa phơi nhiễm chất AO/Dioxin với các tai biến sinh sản và dị tật bẩm sinh tại A Luoi.

BS. Trần Mạnh Hùng.

16h00 - 16h15

Điều tra tình hình sức khỏe và bệnh tật ở một số cộng đồng sống tại khu vực bị phơi nhiễm.

TS. Nguyễn Quốc Ân, VN

PGS. TS. Rumark.V.S

16h15 - 16h30

Nghiên cứu chế phẩm Naturen đối với những đối tượng bị phơi nhiễm chất AO/Dioxin

TS. Nguyễn Ngọc Giao, VN

Thứ Ba ngày 5/3/2002

Phiên 3: Ung Thư

Chủ trì:

GS. Paolo Toniolo, USA

GS. Nguyễn Sào Trung, Việt Nam

10h30 - 10h55

Báo cáo về ung thư số 1

GS. Paolo Toniolo, Đại Học Newyork,
USA

15h30 - 15h45

Aerial applications of Agent orange vs. Military installations - Patterns of Human exposure to TCDD in Sounthern Viet Nam.

Dr. Wayne Dwemychuk,
Hatfield, Canada

15h45 - 16h00

The association between AO/ Dioxin exposure and health reproductive failures and birth defeects in A Luoi.

Dr. Tran Manh Hung, VN.

16h00 - 16h15

Survey on health adverses of inhabitants living in AO/Dioxin exposed areas.

Dr. Nguyen Quoc An, VN

Dr. Rumark.V.S

16h15 - 16h30

Study in Naturen usage with people exposed with AO/Dioxin.

Dr. Nguyen Ngoc Giao, VN

Tuesday March 5, 2002

Session 3: Cancer

Chairs

Prof. Paolo Toniolo, USA

Prof. Nguyen Sao Trung, Vietnam

10h30 - 10h55

Speaker CA1

Prof. Paolo Toniolo, Newyork
University, USA

EFFECTS OF NATURENZ - A NATURAL COMPOUND ON THE HEALTH OF PATIENTS EXPOSED TO A.O / DIOXIN

Nguyen Thi Ngoc Dao¹, Do Thi Tuyen¹, Tran Van Khanh¹, Do Thi Hong Cam¹, Le thi Thuy Duong¹, Ly Thi Bich Thuy¹, Ta Kim Thach¹, Hoang Thi Thanh¹, Tran Manh Hung², Nguyen Thi Cuc², Hoang Dinh Cau².

1. Institute of Biotechnology - NCST

2. 10-80 National Committee.

SUMMARY

Naturenz is a mixture of plant oxidase, protease enzymes, natural antioxidants, amino acids and some of vitamins. It has been used for therapy on dioxin exposed patients. They are examined clinical symptoms, biochemical, physiological and hemological parameters before and after the administration of naturenz. The results showed that this preparation can improve the health of patients. An increasing of SH- group, of total hem content and of anilin hydroxylase activity in blood, a decreasing of urine urobilinogen are observed in these patients after treating.

EFFECTS OF NATURENZ - A NATURAL COMPOUND ON THE HEALTH OF PATIENTS EXPOSED TO A.O / DIOXIN

Nguyen Thi Ngoc Dao¹, Do Thi Tuyen¹, Tran Van Khanh¹, Do Thi Hong Cam¹, Le thi Thuy Duong¹, Ly Thi Bich Thuy¹, Ta Kim Thach¹, Hoang Thi Thanh¹, Tran Manh Hung², Nguyen Thi Cuc², Hoang Dinh Cau².

1. Institute of Biotechnology - NCST
2. 10-80 National Committee.

INTRODUCTION.

Environmental pollution is problem attracting attention of many people on the world. In which the pollution by chemical toxics (pesticide, herbicide, hormone, Dioxin...) is also the big problem for health of human. Beside the methods to minimize pollution, the finding out a natural compound that can be used as detoxicates medicine, anti-oxidants, to recover health or restricted damage of poisonous substance being the aim of many studies [3, 8, 11].

For this purpose, we have prepared a natural compound containing some plant enzymes, β -caroten, SH-acidamin and vitamins. After testing on the experimental animal and the volunteer, we have observed the effects of a natural compound on the health of patients exposed to A.O / Dioxin through changes of physiological and clinical parameters before and after treating.

MATERIALS AND METHOD.

1. Object.

119 A.O/Dioxin exposed patients were chosen by colleagues of 10-80 committee.

Vein - blood were collected before breakfast in the morning.

2. Chemical, materials and machines.

- Pyridine; dithionite; 0,2 M NaP - buffer pH 8,0; 0,9% NaCl solution; 5,5 Dithio-bis (2 nitro benzoic acid). 0,1 M Tris- HCl buffer pH 7,4 contains 0,25 M sucrose, quantitative Kits LDH, GOT, GPP, Bilirubin... and some other common chemicals (supplied by Enzyme department).

- Hewlett parkard 4452 A diode array spectrophotometer, 722 spectrophotometer, centrifuge machine, ultrafiltration, other common tools in Labo.

- Naturenz preparation is a mix of plant oxidases, protease enzymes and natural anti - oxidants (product of IBT).

3. quantitative methods.

- Protein quantitative: According to Lowry methods and et al. 1951 (2).
- Total Hem content: According to Falk 1964 (7).
- SH- group content quantitative: According to Ellmann (5).
- LDH, GPT, GOT, bilirubin have been examd by using the standard kits (automatic analysers) (2).

RESULTS AND DISCUSSION.

TABLE 1: BIOCHEMICAL AND PHYSIOLOGICAL PARAMETERS IN BLOOD OF PATIENTS BEFORE AND AFTER TREATING BY NATURENZ PREPARATION.

Indexs	Before treating (n = 71)	After treating (n = 48)	P
Total protein (65 - 82 g/l)	72,51 ± 4,817	79,39 ± 5,26	< 0,05
Cholesterol (3,9 - 5,2 mmol/l)	5,567 ± 0,971	5,43 ± 1,07	0,506
LDH (< 480 U/l)	352,48 ± 287,25	239,48 ± 62,317	< 0,05
Total Bilirubin (17 µmol/l)	12,71 ± 4,5	14,01 ± 6,8	0,436
Indirect Blirubin (12,7 µmol/l)	7,7 ± 7,70	9,046 ± 5,49	0,201
Direct Bilirubin (4,3 µmol/l)	5,05 ± 5,05	5,01 ± 2,15	0,91
Serum urobilinogen	0,20 ± 0,20	0,24 ± 0,14	0,1
Urine urobilinogen	48/71 patients (+)	24/28 patients (-)	

SGOT (female < 25 U/l, male < 2,2 U/l)	21,6 ± 1,07	23,7 ± 1,23	
SGPT (female > 29 U/l, male > 2,2 U/l)	16,7 ± 3,1	18,1 ± 3,7	
Anilin Hydroxylase (μmol/mgprotein)	0,063 ± 0,017	0,075 ± 0,019	< 0,05
Blood SH content (μmol/mgprotein)	0,17 ± 0,012	0,21 ± 0,015	< 0,05
Serum SH content (μmol/mgprotein)	0,067 ± 0,017	0,074 ± 0,015	< 0,05
Total Hem (μmol/mgprotein)	0,046 ± 0,0012	0,0071 ± 0,0012	< 0,05

In this study, SH- group content, total hem and anilin hydroxylase activity increased after treating by Naturenz (from 0,17 mmol/mgprotein to 0,21 mmol/mgprotein and from 0,0046 mmol/mgprotein to 0,0071 mmol /mgprotein and from 0,063 mmol/mgprotein up to 0,075 mmol/mgprotein). This is suitable with results of experiments on intoxicated animals (rabbit and mouse) of others chemical toxics [1.11]. It is possible, that Naturenz preparation containing enzymes oxidase and anti-oxidants, which are "trap substance" for free radical. So that it made decreasing a part of damage of toxics improve health.

TABLE 2: HEMATOLOGY INDEXES OF DIOXIN EXPOSED PATIENTS BEFORE AND AFTER TREATING BY NATURENZ PREPARATION.

Index	Before treating (n = 71)	After treating (n = 48)	P
WBC lymphocytex (5 - 10.10 ⁹)	6,29 ± 1,51	6,78 ± 1,68	0,102
RBC Red blood (400 - 600.10 ¹²)	4,63 ± 0,52	4,89 ± 0,52	< 0,05

HGB Haemachromes (120 - 150 g/l)	15,05 ± 1,91	14,72 ± 317	0,37
HCT Ratio of red blood Vol. (35 - 45%)	42,1 ± 3,53	43,45 ± 2,88	< 0,05
MCV Average of red blood Vol. (80 - 95fl)	91,29 ± 7,11	89,39 ± 6,98	0,15
MCH Average of red blood Hb content 28 - 32 pg	32,64 ± 3,89	30,09	< 0,05
MCHC Average of Hb Conc./saturated (320 - 360 g/l)	35,75 ± 3,22	33,89 ± 1,12	< 0,05
PLT Spherula 200 - 500.10 ⁹ g/l	470,5 ± 275,48	253,68 ± 128,0	< 0,05
WSCR % Lympho leucocyte 20 - 30%	31,63 ± 7,54	28,20 ± 10,94	0,11
Basophilic leucocyte and mono (0 - 10%)	11,2 ± 4,4	7,0 ± 1,2	< 0,05
WLCR % Neutrophilic leucocyte: 50 - 70%	68,4 ± 7,54	71,04 ± 10,05	0,19
RDWCV Level of blood distribution < 50fl	13,75 ± 2,19	13,9 ± 0,78	< 0,05
PDW Level of blood distribution: 10 - 15Fl	9,14 ± 1,13	10,61 ± 1,45	< 0,05
MPV Average of spherula Vol.: 8 - 12Fl	8,48 ± 0,72	9,81 ± 0,91	< 0,05

There were no significant variation of red-blood, leucocyte, spherula, hematocrit values. The some parameters of hepatic function as: SGOT, SGPT and bilirubin of blood have been changed but not over the normal value after treating (from 21,6 U/l to 23,7 U/l and from 16,7 U/l up to 18,1 U/l and 12,71 mmol/l to 14,01 mmol/l) (table 1).

We have observed these parameters because of liver function has an important role in the detoxication progress of the body [4,6,9]. Specially, urine urobilinogen

index clearly improved (85,71% came into normal without urobilinogen in urine). This preparation showed good effects on clinical symptoms of patients: increasing body weight, appetite, decreasing of pathological symptoms of the derma: decreasing rash, clearly skin (table 4).

TABLE 3: DISEASE MODEL OF WAR VATERANS BEFORE TREATING.

Nº	Diseases	Patients	Ratio
1.	Dermatosis	129	82
2.	Nervous system of disease	128	81
3.	Digestion system of disease	99	63
4.	Cardiac system of disease	71	45
5.	Gonial bone system of disease	61	38
6.	Respiration system of disease	45	28
7.	Aural - nasal - guttural system of disease	25	16
8.	Urinary - Sexual system of disease	23	14
9.	Benign tumour, skin tumour	12	7
10.	Endocrine system of disease	5	3

Observations after 6 month treated of 119 patients, we estimated on two clinical levels:

1. The good results: All clinical symptoms disappered or decrease from 75% to 100%.
2. The good results: All clinical symptoms disappered or decrease from 50% to 75%.

TABLE 4: APPRECIATE THE CLINICAL RESULTS.

Disease	Patients	Good	Better	Ratio (%)
1. Dermatosises				
- Alergic dermatitis	76	34	32	87 %
- Melanotic derma	63	26	31	90 %
- Neule - rash	25	11	0	76%
- Melanosis	5	1	4	20%
- Lupus	3	0	1	33%
- Psoriasis	5	1	4	100%
- Crack inflammition, nail disease	7	3		57%
- Neurectoderm	11	5		82%

2. Nervous system				
- Nervous depression	90	28	437	79%
- Disturb the nerves	16	1	2	50%
- Sciatica	7	2		57%
- Spermatorrhoea	1			
- Parkinson	1			
3. Digestion system				
- Large intestine inflammation, colitis	32	14	9	72%
- Ulcerative stomach	13	1	3	30%
- hepatitis and bile	6	1	2	50%
- Bradypepsia	43	22	13	81%
3. Skeletal system				
- Dorsal column pain	54	4	18	41%
- Rheumatism	48	5	14	39%
4. Aural - nasal - guttural, tooth				
- Toothache	5	0	1	20 %
- Chronic sinusitis	3	0	2	67 %
- Hemorrhagic fang	18	4	6	55 %
5. Cardiovascular				
- Hypertonic	29	5	10	52 %
- Chest pain, neurocardiac disturb	19	3	7	53 %
- Hypotonic	17	2	5	41 %
6. Respiration				
- Broncho - pneumonia, asthma	26	3	5	31 %

TABLE 5: HEALTHILY (INCREASING WEIGHT) AFTER USING PREPARATION).

Weight increasing (kg)	Patients (105)	Ratio (%)
1	20	19
2	24	22,8
3	22	20,9
4	6	5,7
5	13	12,3
6	3	2,8

Conclusion.

Naturenz is a mixture of plant - protease, oxidase enzymes, natural anti - oxidants, amino acids and some of vitamins. It has been used for experimental therapy on dioxin exposed patients. They are examined clinical symptoms, biochemical and hematological parameters of blood before and after the administration of naturenz. The results showed that this preparation can improve the health of patients. A increasing of SH- group, total hem content, anilin hydroxylase activity in whole blood and serum, a decreasing of urine urobilinogen, a improving of hepatic function are observed in these patients after treating.

REFERENCE:

1. Nguyen Thi Ngoc Dao, 1981.
"PhD dissertation". Tr. 3-26.
2. Vu Dinh Vinh, Dang Hanh Phuc, Do Dinh Ho, 1974.
Biochemical and medical analysis methods.
Medical institute of Hanoi.
3. Allan B. Okey, David S. Riddick and Patricia A. Harper, 1994.
The Ah receptor: Mediator of the toxicity of 2,3,7,8 - tetrachlorodibenzo - p - dioxin (TCDD) and related compounds.
Toxicology Letters 70. pp. 1-22.
4. Archakov A. I. And Kirill N. Deglyarenko, 1994.
Cytochrome - P₄₅₀ Proc 8th International Conference. Ed. M. C.
Kehner John Libbey Eurotext, Paris. pp. 15-22.
5. Ellmann G. L 1959.
Arch. Biochem. Biophys. Vol. 82. pp. 70-77.
6. Falk J. G. and Harry V. Gelboin, 1992.
Role of human cytochromes - P₄₅₀ in the metabolic activation of chemical carcinogens and toxins. Proc, 1st Arkansas Toxicology symposium. Dec. 1992. pp. 165-183.
7. Falk, J. E. 1964.
Porphyrin and metallo porphyrins.
Ed. Elsevier Publishing company, Amsterdam, London, New York.

8. Lyakhovic V. V. et al. 1987.

Dioxin 1987. Program II University of Nevada, Las Vegas. pp. 153-154

9. Skori M, Mathuros R, Somsak, Jutamaad S, Jisnusun S. 1999.

Health effects of food contamination by PCBs and Dioxins.

"International centre for environmental and industrial toxicology (ICEIT)".
Chulalongkorn research institute. Natural. Bangkok, Thailand. Vol. 9. No. 401.

10. Yasush Yamazoe et al. 1994.

Cytochrome P₄₅₀. Biochemistry. Biophysics and Molecular biology. Ed.
M. C. Lechner JL. pp. 39 - 96.

11. T. Das, A. Roy choudhury, A. Sharma and G. Talukder. 1996.

Effects of crude garlic extracts on mouse chromosomes in vivo.

Fd chem. Toxic. Vol. 34. No. 1. pp. 43 - 47.

12. Seok Joong Kim, Daeseok Han, Kwang Deog Moon and Joon Shick Fhee.
1995.

Measurement of Superoxide dismutase - like activity of Natural antioxidant.
Biocsi. Biotech. Biochem. 59. 59 (5) 822 - 826.

Key works.

Naturenz, anilin hydroxylase, A. O/dioxin, cytochrome P450-

4th Asia-Pacific Microbiology Congress
& 30th Annual Philippine Society
for Microbiology, Inc. (PSM)
Convention

Microbial Biotechnology in the Asia-Pacific Region: Prospects and Challenges for the 21st Century

16-18 May 2001
Waterfront Cebu City Hotel
Lanang, Cebu City
Philippines



Organized by
PHILIPPINE SOCIETY FOR MICROBIOLOGY, INC. (PSM)
In cooperation with
PROCTER & GAMBLE PHILS. INC.



Philippine Society for Microbiology, Inc.

awards this

Certificate of Appreciation

to

**H.T. HA, N.H. Ha, P.T. Ha, N.L. Dung, P.V. Ty
and P.T.T. Chau**

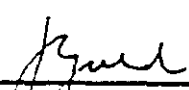
for presenting a poster entitled

Inhibiting Effect of Protein Proteinase Inhibitor on Bacteria Isolated from Burn Pus

**4th Asia-Pacific Biotechnology Congress
and 30th Annual Philippine Society for Microbiology, Inc. (PSM) Convention
with the theme**

"Microbial Biotechnology in the Asia-Pacific Region: Prospects and Challenges for the 21st Century"
at the Waterfront Cebu City Hotel, Cebu City, Philippines from May 16 - 18, 2001

Given this 18th day of May, 2001


ROSARIO G. MONSALUD, Ph.D.
Corresponding Secretary


LOURDES M. TAPAY, Ph.D.
President

removed and the bacteria on the skin are harvested 2 hours after inoculation using the Williamson-Kligman scrub technique to determine the number of surviving bacteria. The RFI has been used to demonstrate that an antibacterial product containing TCC (3,4,4'-trichlorocarbanilide) can more effectively control the growth of *S. aureus* compared to a non-antibacterial product. Results of a clinical study demonstrate that regular bathing with an antibacterial product can a) significantly reduce the number of *S. aureus* on the skin, b) prevent the skin colonization of these bacteria, and c) improve the skin condition of patients with atopic dermatitis. Thus, residual bacterial efficacy of antibacterial cleansing products has potential health benefits, and can play an important role in promotion of public health and hygiene.

CHARACTERIZATION OF A BIOSURFACTANT FROM A BENZENE-TOLERANT *RHODOCOCOCCUS* STRAIN

LOTIS D. ESCOBIN¹, Elizabeth C. Bugante¹ and Ma. Luz E. Page¹

¹Ateneo de Manila University, Quezon City, Philippines

²National Institute of Molecular Biology and Biotechnology (BIOTECH),

U.P. Los Baños, College, Laguna 4031, Philippines

³Department of Inland Water Research UFZ, Centre for Environmental Research
Leipzig-Halle, Brückstrasse 3A, 39114, Magdeburg, Germany

A benzene-tolerant *Rhodococcus* strain was grown on different carbon sources to determine biosurfactant production and activity, and to characterize the surface-active component of the cell. The highest biomass of 8.83 g/L was obtained when *Rhodococcus* sp. was grown in Phosphate Ammonium Salts (PAS) with benzene and mannitol.

Biosurfactant production was not observed when the organism was grown solely in benzene; however, it was produced when mannitol was used as a carbon source. The surface-active compound of *Rhodococcus* sp. 33 is hypothesized to be cell-bound since no surfactant was detected in the supernatant. Cultures of the bacterium were treated with chloroform/methanol to extract the surface-active component.

The biosurfactant properties of the cell extract were determined. Surface tensiometry revealed that the extract had a surface tension of 32-40 mN/m² which was comparable to microorganisms known to produce biosurfactants and an emulsion index of 48.8% compared to 60% of Triton N-101, a synthetic surfactant.

Chemical analysis of the crude cell extract revealed that one of the components was a carbohydrate. This was confirmed by ¹³Nuclear Magnetic Resonance (NMR) analysis, which elucidated an anomeric compound with signals corresponding to a sugar and also the presence of methylene groups.

INHIBITING EFFECT OF PROTEIN PROTEINASE INHIBITOR ON BACTERIA ISOLATED FROM BURNS PUS

HOANG THU HA, Nguyen Hoai Ha, Phan Thi Ha, Nguyen Lan Dung,
Pham Van Ty and Pham Thi Tran Chau

Center of Biotechnology, Vietnam National University, Hanoi, Vietnam

The results of our previous studies showed that protein protease inhibitor (PPI) isolated from cow's lung (designated as AT-04) has antibacterial and skin regenerating effects in superficial burn injuries (Grade II and III) equivalent to silver sulfadiazine 1%. However as AT-04 is very expensive, the present study aims at finding another PPI which should be cheaper to replace AT-04 with the hope of finding novel antibacterial drug. Momosertatin (M) is a preparation composed of certain PPIs isolated from the seeds of *Momordica cochinchinensis* with lower price. Three out of these PPIs were studied in terms of molecular structure, out of which 2 PPIs have cyclic structure.

Burn pus was taken from heat burn Grades II and III not yet treated patients. From this burn pus 15 different microorganism samples were isolated which differ in colony characteristics and cell morphology (electronic microscope photo). Six samples were identified in terms of genus. Three belong to the *Pseudomonas* genus, two to the *Bacillus* and one was *Staphylococcus aureus*. All the culture media of these samples had gelatinolytic activity (GA) and were inhibited under the action of Momosertatin, which strongly inhibited the growth of *Pseudomonas*, *Staphylococcus* and some other bacteria.

C/ KẾT QUẢ ĐÀO TẠO

C/ KẾT QUẢ ĐÀO TẠO

STT	Họ và tên	Giáo viên hướng dẫn	Năm bảo vệ
I	Tiến sĩ		
1	Nguyễn Thị Mai Phương	PGS. TS. Nguyễn Thị Ngọc Dao GS. TS. Đỗ Ngọc Liên	2005
2	Đỗ Thị Tuyên	PGS. TS. Nguyễn Thị Ngọc Dao TS. Quyền Đình Thi	2005
3	Đoàn Việt Bình	GS. TSKH. Nguyễn Tài Lương	2003
4	Lê Thị Liên	GS.TS. R. Verpoorte (Đại học Leiden -Hà Lan) và TS. Phan Quốc Kinh	2005
5	Phan Hà	Phạm Thị Trân Châu	2005
II	Thạc sĩ		
1	Nguyễn Thái Biêng	PGS. TS. Nguyễn Thị Ngọc Dao	2002
2	Lý Thị Bích Thủy	PGS. TS. Nguyễn Thị Ngọc Dao	2004
3	Nguyễn Thị Tố Nga	PGS. TS. Nguyễn Thị Ngọc Dao	2005
4	Lê Thị Việt Hồng	PGS. TS. Lê Thị Lan Oanh	2003
5	Vũ Thị Bích Hương	TS. Lê Quang Huân	2006
6	Nguyễn Thị Hồng Gấm	PGS. TS. Lê Thị Lan Oanh	2006
III	Cử nhân, kỹ sư		
1	Trần Anh Tuấn	TS. Đặng Diễm Hồng	2004
2	Nguyễn Hữu Khoa	PGS. TS. Nguyễn Thị Ngọc Dao	2004
3	Trần Thị Thu Phương	TS. Đỗ Thị Hoa Viên TS. Phan Quốc Kinh	2002
4	Lê Minh Châu	TS. Đỗ Thị Hoa Viên TS. Phan Quốc Kinh	2002
5	Vũ Thị Thu Huyền	TS. Đỗ Thị Hoa Viên	2003

Báo cáo tổng kết đề tài KC 04-17

		TS. Phan Quốc Kinh	
6	Nguyễn Thị Hồng Gấm	GS. TS. Nguyễn Quốc Khang PGS. TS. Lê Thị Lan Oanh	2003
7	Nguyễn Quang Vinh	GS. TSKH. Trịnh Tam Kiệt	2004
8	Bùi Thị Hồng Nhung	TS. Lê Quang Huấn	2004
9	Lê Anh Minh	TS. Đỗ Thị Hoa Viên	2003
10	Nguyễn Xuân Tài	BS. Đinh Thị Thu Hiền	2004

BỘ GIÁO DỤC VÀ ĐÀO TẠO

VIỆN KHOA HỌC VÀ CÔNG NGHỆ VIỆT NAM

VIỆN CÔNG NGHỆ SINH HỌC

NGUYỄN THỊ MAI PHƯƠNG

NGHIÊN CỨU ẢNH HƯỞNG CỦA MỘT SỐ CHẤT OXI HOÁ
LÊN CÁC QUÁ TRÌNH SINH LÝ VÀ SINH HOÁ CỦA VI
KHUẨN GÂY SÂU RĂNG *STREPTOCOCCUS MUTANS*

LUẬN ÁN TIẾN SĨ SINH HỌC

HÀ NỘI, 2005

Số 209 /CNSH-QĐ

Hà nội ngày 16 tháng 9 năm 2002

QUYẾT ĐỊNH CỦA VIỆN TRƯỞNG
VIỆN CÔNG NGHỆ SINH HỌC
về việc công nhận tập thể hướng dẫn và đề tài luận án
nghiên cứu sinh năm 2002

VIỆN TRƯỞNG VIỆN CÔNG NGHỆ SINH HỌC

- Căn cứ vào quyết định số 164/QĐ-QLKH ngày 5/7/1976 của Bộ Đại học và Trung học Chuyên nghiệp nay là Bộ Giáo dục và Đào tạo giao nhiệm vụ đào tạo trên đại học trong nước cho Viện Sinh vật nay là Viện Công nghệ Sinh học và quyết định số 152/VKH ngày 17/4/1978 của Viện khoa học Việt nam giao nhiệm vụ tuyển chọn và đào tạo NCS cho Viện Sinh vật nay là Viện Công nghệ Sinh học.
- Căn cứ vào quy chế tuyển sinh sau đại học của Bộ Giáo dục và Đào tạo năm 2000.
- Căn cứ quyết định công nhận 07 NCS năm 2002 ngày 5/9/2002 của Bộ Giáo dục và Đào tạo cho Viện Công nghệ Sinh học.

QUYẾT ĐỊNH

Điều 1. Công nhận tập thể hướng dẫn NCS cho Thạc sỹ Nguyễn Thị Mai Phương là:

1. PGS.TS. Nguyễn Thị Ngọc Dao- hướng dẫn chính
2. PGS. TS. Đỗ Ngọc Liên - hướng dẫn phụ

- Đề tài: " Nghiên cứu ảnh hưởng của một số chất oxy hoá lên các quá trình sinh lý và sinh hoá của vi khuẩn *Streptococcus mutans* trên mảng bám răng "

Chuyên ngành: Hoá sinh

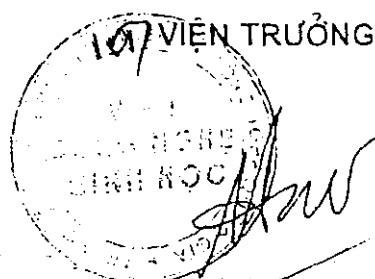
Mã số: 1.05.10

Hình thức đào tạo: không tập trung (3 năm)

Điều 2. Cán bộ hướng dẫn và NCS có tên trên chịu trách nhiệm thi hành quyết định này.

Nơi nhận:

- Như trên
- Lưu



PHÓ VIỆN TRƯỞNG

Trương Năm Hải

Số 208 /CNSH-QĐ

Hà nội ngày 16 tháng 9 năm 2002

**QUYẾT ĐỊNH CỦA VIỆN TRƯỞNG
VIỆN CÔNG NGHỆ SINH HỌC**
về việc công nhận tập thể hướng dẫn và đề tài luận án
nghiên cứu sinh năm 2002

VIỆN TRƯỞNG VIỆN CÔNG NGHỆ SINH HỌC

- Căn cứ vào quyết định số 164/QĐ-QLKH ngày 5/7/1976 của Bộ Đại học và Trung học Chuyên nghiệp nay là Bộ Giáo dục và Đào tạo giao nhiệm vụ đào tạo trên đại học trong nước cho Viện Sinh vật nay là Viện Công nghệ Sinh học và quyết định số 152/VKH ngày 17/4/1978 của Viện khoa học Việt nam giao nhiệm vụ tuyển chọn và đào tạo NCS cho Viện Sinh vật nay là Viện Công nghệ Sinh học.
- Căn cứ vào quy chế tuyển sinh sau đại học của Bộ Giáo dục và Đào tạo năm 2000.
- Căn cứ quyết định công nhận 07 NCS năm 2002 ngày 5/9/2002 của Bộ Giáo dục và Đào tạo cho Viện Công nghệ Sinh học.

QUYẾT ĐỊNH

Điều 1. Công nhận tập thể hướng dẫn NCS cho Thạc sỹ Đỗ Thị Tuyên là:

1. PGS.TS. Nguyễn Thị Ngọc Dao - hướng dẫn chính

2. TS. Quyền Đình Thi - hướng dẫn phụ

Đề tài: “ Nghiên cứu thực nghiệm về sự đáp ứng của enzyme
cytochrome-P450 đối với một số chất tự nhiên chống oxy hoá ”

Chuyên ngành: Hoá sinh

Mã số: 1.05.10

Hình thức đào tạo: không tập trung (3 năm)

Điều 2. Cán bộ hướng dẫn và NCS có tên trên chịu trách nhiệm thi hành quyết định này.

Nơi nhận:

- Như trên
- Lưu

KÝ VIỆN TRƯỞNG

PHÓ VIỆN TRƯỞNG

Trương Văn Hải

BỘ GIÁO DỤC VÀ ĐÀO TẠO

TRUNG TÂM KHOA HỌC TỰ NHIÊN
VÀ CÔNG NGHỆ QUỐC GIA

VIỆN CÔNG NGHỆ SINH HỌC

ĐOÀN VIỆT BÌNH

**NGHIÊN CỨU SỰ PHÂN BỐ, TÍCH LŨY
CÁC NGUYÊN TỐ VI LƯỢNG Ở MỘT SỐ LOÀI ĐỘNG VẬT
THEO BẬC THANG TIẾN HOÁ**

**Chuyên ngành: Sinh Lý Động vật
Mã số : 1.05.16**

LUẬN ÁN TIẾN SĨ SINH HỌC

Người hướng dẫn khoa học: GS.TSKH Nguyễn Tài Lương

HÀ NỘI - 2003

SOCIALIST REPUBLIC OF VIETNAM

Independence - Freedom - Happiness

THE MINISTER OF EDUCATION AND TRAINING

On the Recommendation of the National Thesis Examination Committee
for the Doctoral Dissertations
held at the Institute of Biotechnology

HAS CONFERRED UPON

Mr. Doan Viet Binh

Born *05/08/1955* in *Nam Dinh*

THE DEGREE OF
DOCTOR OF PHILOSOPHY

In Biology

Given under the seal of the Ministry of Education and Training
this Seventeenth day of November 2003



**BẢN SAO
COPY**

CỘNG HÒA XÃ HỘI CHỦ NGHĨA VIỆT NAM

Độc lập - Tự do - Hạnh phúc

BỘ TRƯỞNG BỘ GIÁO DỤC VÀ ĐÀO TẠO

Căn cứ đề nghị của Hội đồng chấm luận án tiến sĩ cấp nhà nước

họp ngày 05 tháng 06 năm 2003
tại Viện Công nghệ Sinh học

CÔNG NHẬN HỌC VỊ VÀ CẤP BẰNG

TIẾN SĨ

SINH HỌC

CHỨNG NHẬN
SAO ĐÚNG BẢN CHÍNH
NGÀY: 20-05-2004
SỐ 444 QUYỀN 05

Chợong *Đoàn Việt Bình*

Sinh ngày *05/08/1955* tại *Nam Định*

Hà Nội, ngày 17 tháng 11 năm 2003

BỘ TRƯỞNG BỘ GIÁO DỤC VÀ ĐÀO TẠO



CÔNG CHỨNG VIÊN

Nguyễn Quang Phấn

Số bằng: 02796



Universiteit Leiden

Institute of Biology Leiden

Prof. dr. Rob Verpoorte

Section Metabolomics, Department of Pharmacognosy

Phone: (+31)71-5274528

Email: Verpoort@Chem.leidenuniv.nl

To: The 322 Project

Ministry of Education and Training, S.R. Vietnam

Subject: letter of Recommendation for Scholarship.

Leiden, 16 August, 2004

Ms **Le thi Lien** is currently a Ph.D. student in Leiden University, The Netherlands. She is doing research on "**The chemical composition and uses of *Tribulus terrestris* L. (zycophylaceae)**" under my supervision. This type of research is not only important for Vietnam but it is also important to the world for applying the traditional medicine plant to the humanity.

Ms **Lien** is a highly motivated, hard working and dedicated student. I am very happy to recommend and support her in applying for financial assistance. I hope she will be granted a scholarship to carry out her research in the Netherlands.

Please do not hesitate to request further information about Ms Lien if needed.

Yours Sincerely

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'Rob Verpoorte'.

Prof. Dr. Rob Verpoorte

Head Department of Pharmacognosy

IBL, Leiden University

Trung tâm phát triển Hoá sinh
Số 8 Láng Hạ- Hà Nội
Số 14/ QĐ

CỘNG HOÀ XÃ HỘI CHỦ NGHĨA VIỆT NAM
Độc lập - Tự do - Hạnh phúc

Hà Nội, ngày 16/7/2003.

GIÁM ĐỐC

Trung tâm phát triển Hóa sinh Việt Nam.

- Căn cứ Quyết định số 166/STH – QĐ của chủ tịch Hội các ngành sinh học Việt Nam ngày 24 tháng 12 năm 1992 về việc thành lập Trung tâm phát triển Hóa sinh Việt Nam .
- Theo đề nghị của Chánh văn phòng Trung tâm phát triển Hóa sinh Việt Nam.

QUYẾT ĐỊNH

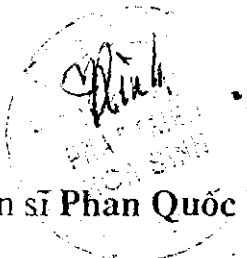
- **Điều 1:** Cử Thạc sĩ Lê Thị Liên cán bộ phòng Hóa hữu cơ sinh học được đi học Tiến sĩ sinh ở Đại học quốc gia Leiden Hà Lan trong 4 năm từ tháng 11 năm 2003 đến cuối năm 2007.
- **Điều 2:** Sau khi bảo vệ xong luận án Tiến sĩ ở Leiden Hà Lan, bà Lê Thị Liên phải tiếp tục công tác tại phòng Hóa hữu cơ sinh học của Trung tâm phát triển Hóa sinh tại 8- Láng Hạ- Hà Nội.
- **Điều 3:** Chánh văn phòng phòng Hóa hữu cơ sinh học và bà Lê Thị Liên có trách nhiệm thi hành quyết định này.

Ban giám đốc

Trung tâm phát triển Hóa sinh Việt Nam

Nơi gửi:

- Đại sứ quán Vương quốc Hà Lan tại Việt Nam.
- Đương sự.
- Lưu trữ văn phòng.


Tiến sĩ Phan Quốc Kinh

Ngày 9 tháng 10 năm 2001

QUYẾT ĐỊNH CỦA GIÁM ĐỐC HỌC VIỆN QUÂN Y

*V/v cho phép làm đề tài và công nhận
cán bộ hướng dẫn cho học viên Cao học*

GIÁM ĐỐC HỌC VIỆN QUÂN Y

- Căn cứ quyết định số 93/TTg ngày 02/03/1979 của Thủ tướng Chính phủ giao nhiệm vụ đào tạo trên đại học cho Học viện Quân y;
- Căn cứ Quy chế đào tạo Sau đại học ban hành theo quyết định số 18/2000/QĐ-BGD&ĐT ngày 08/06/2000 của Bộ Giáo dục và Đào tạo;
- Theo đề nghị của đồng chí Trưởng phòng Đào tạo;

QUYẾT ĐỊNH

Điều 1: Đồng ý cho: BS Nguyễn Thái Biêng

Học viên Cao học khoá: 2000 – 2002

Chuyên ngành : Sinh Hoá

Thực hiện đề tài tốt nghiệp Cao học:

*“Nghiên cứu ảnh hưởng của Rotundin sulfat lên hệ thống enzym
Cytochrom-P₄₅₀ ở động vật thực nghiệm.”*

Hướng dẫn khoa học:

PGS.TS Nguyễn Thị Ngọc Dao – Viện CNSH

PGS.TS Bạch Vọng Hải - HVQY

Điều 2: Các đồng chí Trưởng phòng Đào tạo, cán bộ hướng dẫn khoa học cho học viên và học viên Nguyễn Thái Biêng chịu trách nhiệm thi hành quyết định này.

Phía

K/ GIÁM ĐỐC HỌC VIỆN QUÂN Y
PHÓ GIÁM ĐỐC

Nơi nhận:

- Giáo viên HD
- Bộ môn
- Lưu BM, Ban ĐH
- ĐM, In 05 b /11



Nơi trả

PGS.TS *Nguyễn Thị Ngọc Dao*

BỘ GIÁO DỤC VÀ ĐÀO TẠO
TRƯỜNG ĐẠI HỌC BÁCH KHOA HÀ NỘI

LÝ THỊ BÍCH THỦY

NGHIÊN CỨU ENZYME CÓ HOẠT TÍNH
THỦY PHÂN FIBRIN TỪ LOÀI GIUN QUẾ

Perionyx excavatus

Chuyên ngành: Công nghệ Sinh học

LUẬN VĂN THẠC SĨ CÔNG NGHỆ SINH HỌC

NGƯỜI HƯỚNG DẪN KHOA HỌC:
PGS. TS. NGUYỄN THỊ NGỌC DAO

HÀ NỘI - 2004

BỘ GIÁO DỤC
VÀ ĐÀO TẠO

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

NGUYỄN THỊ TỔNG

NGHIÊN CỨU PHƯƠNG PHÁP NUÔI CẤY TẾ BÀO MÔ
SẸO CÂY CÚC GAI ĐỂ THU HOẠT CHẤT VÀ THỬ
NGHIỆM TRÊN ĐỘNG VẬT VỀ TÁC DỤNG BẢO VỆ
GAN, CHỐNG OXY HÓA CỦA SILYMARIN TỪ CÚC GAI

LUẬN VĂN THẠC SĨ SINH HỌC

Chuyên ngành : Hoá sinh học

Mã số : 1.05.10

NGƯỜI HƯỚNG DẪN:

PGS. TS NGUYỄN THỊ NGỌC DAO

HÀ NỘI – 2005

**BỘ GIÁO DỤC VÀ ĐÀO TẠO
VIỆN SINH THÁI & TÀI NGUYÊN SINH VẬT**

Lê Thị Việt Hồng

**NGHIÊN CỨU QUI TRÌNH CHIẾT RÚT VÀ MỘT
SỐ HOẠT TÍNH SINH DƯỢC HỌC CỦA FLAVONOID
TRONG HẠT CÚC GAI VÀ CÂY NỌC SỎI**

Chuyên ngành: Hoá sinh học

Mã số: 01 - 05 - 10

LUẬN VĂN THẠC SĨ SINH HỌC

**Người hướng dẫn khoa học:
PGS. TS. Lê Thị Lan Oanh**

Hà Nội - 2003

BỘ GIÁO DỤC
VÀ ĐÀO TẠO

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

VŨ THỊ BÍCH HƯỜNG

NGHIÊN CỨU TẠO PHÂN TỬ TÁI TỔ HỢP HAI CHỨC
NĂNG: MELITTIN-CARRIERS BẰNG KỸ THUẬT SINH
HỌC PHÂN TỬ

LUẬN VĂN THẠC SỸ SINH HỌC

Chuyên ngành : Hoá sinh học

Mã số : 1.05.10

NGƯỜI HƯỚNG DẪN:
TS. LÊ QUANG HUẤN

HÀ NỘI - 2005

NHIỆM VỤ LÀM LUẬN VĂN TỐT NGHIỆP

Họ và tên sinh viên: **TRẦN ANH TUẤN**

Ngành: Công nghệ Sinh học. Khóa: 44

Viện Công nghệ Sinh học và Công nghệ Thực phẩm.

1. Tên đề tài:

Tách dòng gen mã hóa cho enzym Lumbrokinase từ loài giun Quế (*Perionyx Excavatus*) của Việt Nam.

2. Nội dung:

- Tách chiết ARN tổng số từ loài giun Quế *Perionyx Excavatus* của Việt Nam.
- Tổng hợp thư viện cDNA từ ARN tổng số.
- Tìm điều kiện tối ưu cho phản ứng PCR để nhân gen Lumbrokinase.
- Tách dòng gen mã hóa cho enzym Lumbrokinase.
- Đọc trình tự đoạn gen trên.

3. Giáo viên hướng dẫn:

1. *Họ và tên* : **Đặng Thị Thu**

Cơ quan: Viện Công nghệ Sinh học và Công nghệ Thực phẩm.

2. *Họ và tên* : **Đặng Diễm Hồng**

Cơ quan: Phòng Công nghệ Tảo.Viện Công nghệ Sinh học –Viện Khoa học và Công nghệ Việt Nam.

4. Ngày giao nhiệm vụ: 15/ 02/ 04.

ĐẠI HỌC QUỐC GIA HÀ NỘI
ĐẠI HỌC KHOA HỌC TỰ NHIÊN
KHOA SINH HỌC

Nguyễn Hữu Khoa

**NGHIÊN CỨU HOẠT ĐỘ PEROXIDASE VÀ
HÀM LƯỢNG MDA CỦA GAN CHUỘT SWR
DƯỚI TÁC DỤNG CỦA MỘT SỐ
DỊCH CHIẾT THẢO DƯỢC**

KHÓA LUẬN TỐT NGHIỆP HỆ ĐẠI HỌC CHÍNH QUY

Ngành: Sinh Học

Chuyên ngành: Hóa Sinh Học

**Cán bộ hướng dẫn: PGS. TS. Nguyễn Thị Ngọc Dao
PGS. TS. Nguyễn Văn Mùi**

Hà Nội – 6/2004

TRƯỜNG ĐẠI HỌC BÁCH KHOA HÀ NỘI
VIỆN CÔNG NGHỆ SINH HỌC VÀ CÔNG NGHỆ THỰC PHẨM
BỘ MÔN VI SINH VÀ KỸ THUẬT DI TRUYỀN



ĐỒ ÁN TỐT NGHIỆP

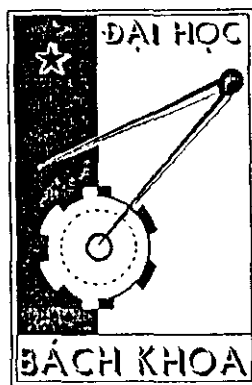
**ĐỀ TÀI: GÓP PHẦN NGHIÊN CỨU CÁC ISOFLAVONE CÓ
HOẠT TÍNH PHYTOESTROGEN TỪ HẠT ĐẬU TƯƠNG
(GLYCINE MAX)**

Giáo viên hướng dẫn: **TS. Phan Quốc Kinh**
TS. Đỗ Thị Hoa Viên

Sinh viên thực hiện : **Trần Thị Thu Phương**
Lớp : **CNSH-K42**

HÀ NỘI 5 - 2002

TRƯỜNG ĐẠI HỌC BÁCH KHOA HÀ NỘI
VIỆN CÔNG NGHỆ SINH HỌC VÀ THỰC PHẨM
BỘ MÔN VI SINH VÀ KỸ THUẬT DI TRUYỀN



ĐỒ ÁN TỐT NGHIỆP

ĐỀ TÀI:

BUƯỚC ĐẦU NGHIÊN CỨU CÁC ISOFLAVONOID
CÓ HOẠT TÍNH PHYTOESTROGEN TRONG
CỦ SẮN DÂY *PUERARIA THOMPSONII* BENTH

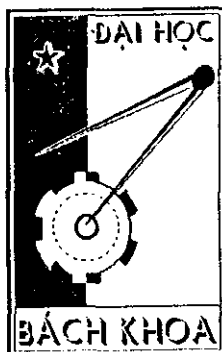
Giáo viên hướng dẫn : TS. Phan Quốc Kinh
TS. Đỗ Thị Hoa Viên

Sinh viên : Lê Minh Châu

Lớp : CNSH K42

Hà Nội - 5/2002

TRƯỜNG ĐẠI HỌC BÁCH KHOA HÀ NỘI
VIỆN CÔNG NGHỆ SINH HỌC VÀ CÔNG NGHỆ THỰC PHẨM
BỘ MÔN VI SINH VÀ KỸ THUẬT DI TRUYỀN



ĐỒ ÁN TỐT NGHIỆP

ĐỀ TÀI:

CHIẾT XUẤT CAO CHỨA HỖN HỢP ISOFLAVONES CÓ HOẠT TÍNH
PHYTOESTROGEN TỪ HẠT ĐẬU TƯƠNG NẢY MẮM VÀ THỬ NGHIỆM
DƯỢC LÝ CAO CHIẾT ĐƯỢC TRÊN CƠ THỂ CHUỘT CÁI TRẮNG

<i>Giáo viên hướng dẫn</i>	: TS. ĐỖ THỊ HOA VIÊN
<i>Sinh viên thực hiện</i>	: VŨ THỊ THU HUYỀN
<i>Lớp</i>	: CNSH A - K43



HÀ NỘI 5 – 2003

ĐẠI HỌC QUỐC GIA HÀ NỘI
TRƯỜNG ĐẠI HỌC KHOA HỌC TỰ NHIÊN
KHOA SINH HỌC
--- oOo ---

Nguyễn Thị Hồng Gấm

NGHIÊN CỨU KHAI THÁC,
TÍNH CHẤT LÝ HÓA VÀ SINH DƯỢC HỌC CỦA
CÁC FLAVONOID Ở CÂY CÚC GAI VÀ CÂY BAN

KHÓA LUẬN TỐT NGHIỆP HỆ ĐẠI HỌC CHÍNH QUY
Ngành: Công nghệ Sinh học

Cán bộ hướng dẫn: GS. TS Nguyễn Quốc Khang
PGS. TS Lê Lan Oanh

Hà Nội - 2003

VIỆN ĐẠI HỌC MỞ HÀ NỘI
KHOA CÔNG NGHỆ SINH HỌC

-----*-----

BUI THI HONG NHUNG

*TÁCH DÒNG VÀ XÁC ĐỊNH TRÌNH TỰ ĐOẠN GEN MÃ HOÁ
KHÁNG THỂ KHÁNG TẾ BÀO LYMPHO TÁCH TỪ MÁU BỆNH
NHÂN MẮC BỆNH HODGKIN'S (HD).*

Giáo viên hướng dẫn:

TS. Lê Quang Huấn

Hà Nội - 2004

ĐẠI HỌC QUỐC GIA HÀ NỘI
TRƯỜNG ĐẠI HỌC KHOA HỌC TỰ NHIÊN
KHOA SINH HỌC



Nguyễn Xuân Tài

**XÂY DỰNG QUY TRÌNH NUÔI SINH KHỐI TẾ BÀO VÀ
NHÂN GIỐNG INVITRO CÂY HOÀNG LIÊN GAI
(*BERBERIS WALLICHIANA* DC)**

KHOÁ LUẬN TỐT NGHIỆP ĐẠI HỌC HỆ CHÍNH QUY

Ngành: Sinh lý thực vật

Cán bộ hướng dẫn: GS.TS. Vũ Văn Vụ
BS. Đinh Thị Thu Hiền

Hà Nội- 2004

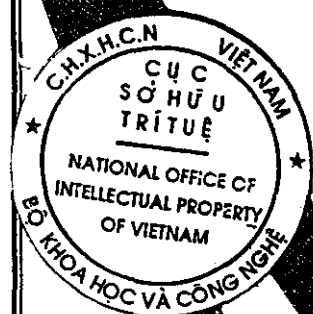
D/ CÁC BẰNG SÁNG CHẾ



CỘNG HOÀ XÃ HỘI CHỦ NGHĨA VIỆT NAM
BỘ KHOA HỌC VÀ CÔNG NGHỆ
CỤC SỞ HỮU TRÍ TUỆ

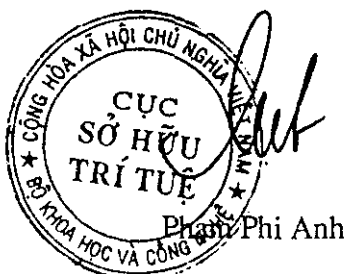
BẰNG ĐỘC QUYỀN
SÁNG CHẾ
Số: 4972

Tên Sáng chế: CHẾ PHẨM TIÊU GIẢM ĐỘC NATURENZ DÙNG CHO NGƯỜI BỊ
NHIỄM ĐỘC HOÁ CHẤT MÃN TÍNH, SUY GIẢM SỨC ĐỀ KHÁNG
Chủ Bằng độc quyền: VIỆN CÔNG NGHỆ SINH HỌC - TTKHTN VÀ CNQG (VN)
18 Hoàng Quốc Việt, Cầu Giấy, Hà Nội
Tác giả: Nguyễn Thị Ngọc Dao (VN)
Số đơn: 1-2003-00584
Ngày nộp đơn: 03.07.2003
Số điểm yêu cầu bảo hộ: 01 Số trang mô tả: 16
Cấp theo Quyết định số: A5711/QĐ-ĐK, ngày: 07.06.2005
Có hiệu lực từ ngày cấp đến hết 20 năm tính từ ngày nộp đơn.



1-0004972

KT. CỤC TRƯỞNG
CỤC SỞ HỮU TRÍ TUỆ
PHÓ CỤC TRƯỞNG



MỘT SỐ LƯU Ý VỀ HIỆU LỰC CỦA BẰNG ĐỘC QUYỀN

1. Bằng độc quyền sáng chế (Bằng độc quyền) này được cấp dựa trên cơ sở pháp lý sau đây:
 - Các Điều 781, 782 và 788 Bộ luật Dân sự được Quốc hội nước CHXHCN Việt Nam thông qua ngày 28.10.1995 và có hiệu lực từ ngày 01.07.1996 (Bộ luật Dân sự);
 - Các Điều 4, 9, 15, 18, 23 và 26 Nghị định số 63/CP ngày 24.10.1996 của Chính phủ quy định chi tiết về sở hữu công nghiệp, được sửa đổi, bổ sung theo Nghị định số 06/2001/NĐ-CP ngày 01.02.2001 của Chính phủ (Nghị định 63/CP);
 - Thông tư số 30/2003/TT-BKHCN ngày 05.11.2003 của Bộ Khoa học và Công nghệ hướng dẫn thực hiện các thủ tục xác lập quyền sở hữu công nghiệp đối với sáng chế/giải pháp hữu ích (Thông tư 30/2003/TT-BKHCN).
2. Trong thời hạn hiệu lực, Chủ Bằng độc quyền có quyền sở hữu đối với sáng chế, cụ thể là:
 - (i) độc quyền sử dụng sáng chế;
 - (ii) có quyền chuyển giao quyền sở hữu hoặc chuyển giao quyền sử dụng sáng chế; và
 - (iii) có quyền yêu cầu các cơ quan Nhà nước có thẩm quyền xử lý người xâm phạm các quyền nói trên của mình (Điều 794, 796 Bộ luật Dân sự, các Điều 34, 35, 36, 37 Nghị định 63/CP).
3. Trong thời gian kể từ ngày đơn yêu cầu cấp Bằng độc quyền sáng chế được công bố trên Công báo Sở hữu công nghiệp đến ngày cấp Bằng độc quyền, nếu có người thứ ba bắt đầu tiến hành sử dụng giải pháp kỹ thuật đồng nhất với sáng chế mô tả trong Bằng độc quyền thì người nộp đơn có quyền thông báo về việc nộp đơn yêu cầu cấp Bằng độc quyền cho người sử dụng đó biết. Nếu đã được thông báo mà người sử dụng vẫn tiếp tục sử dụng sáng chế thì sau khi được cấp Bằng độc quyền, Chủ Bằng độc quyền có quyền yêu cầu người đã sử dụng sáng chế đền bù một khoản tiền tương đương với khoản thanh toán cho việc chuyển giao quyền sử dụng sáng chế trong khoảng thời gian tương ứng (Điều 10 Nghị định 63/CP).
4. Chủ Bằng độc quyền có nghĩa vụ:
 - (i) trả thù lao cho tác giả nếu tác giả không phải là Chủ Bằng độc quyền và nếu giữa Chủ Bằng độc quyền và tác giả không có thoả thuận khác (Điều 798 Bộ luật Dân sự);
 - (ii) nộp lệ phí duy trì hiệu lực hàng năm; nếu không nộp khoản lệ phí này, Bằng độc quyền sẽ bị đình chỉ hiệu lực (Điều 798 và 793 Bộ luật Dân sự, Điều 28 và 45 Nghị định 63/CP);
 - (iii) phải sử dụng hoặc chuyển giao để sử dụng sáng chế phù hợp với yêu cầu phát triển kinh tế, xã hội của đất nước, nếu không thực hiện nghĩa vụ này mà không có lý do chính đáng, Chủ Bằng độc quyền có thể bị bắt buộc chuyển giao quyền sử dụng cho người khác theo Quyết định của Bộ trưởng Bộ Khoa học, Công nghệ và Môi trường (nay là Bộ Khoa học và Công nghệ) (Điều 798 Bộ luật Dân sự và Điều 51 Nghị định 63/CP).
5. Bằng độc quyền có thể bị huỷ bỏ hiệu lực (toàn phần hoặc một phần) nếu bị người thứ ba chứng minh rằng:
 - (i) Chủ Bằng độc quyền không có quyền nộp đơn yêu cầu cấp Bằng độc quyền và cũng không được thụ hưởng quyền nộp đơn một cách hợp pháp; hoặc
 - (ii) sáng chế không đáp ứng tiêu chuẩn bảo hộ (Điều 792 Bộ luật Dân sự và Điều 29 Nghị định 63/CP).
6. Bằng độc quyền có thể được khôi phục hiệu lực nếu sau thời hạn sáu tháng nhưng không muộn hơn mười hai tháng tính từ ngày hết kỳ hạn hiệu lực, Chủ Bằng độc quyền nộp lệ phí duy trì hiệu lực, lệ phí khôi phục hiệu lực và Bằng độc quyền chưa bị đình chỉ hiệu lực theo yêu cầu của người thứ ba (Điểm 73 Thông tư 30/2003/TT-BKHCN).



①9 BUNDESREPUBLIK
DEUTSCHLAND



DEUTSCHES
PATENT- UND
MARKENAMT

⑫ **Offenlegungsschrift**
⑩ **DE 101 51 649 A 1**

⑤1 Int. Cl.⁷:
A 61 K 31/575
A 61 K 31/57
A 61 K 35/84

②1 Aktenzeichen: 101 51 649.5
②2 Anmeldetag: 11. 10. 2001
④3 Offenlegungstag: 8. 5. 2003

①1 Anmelder:
Elsner, Peter, Prof.Dr., 07743 Jena, DE;
Friedrich-Schiller-Universität Jena, 07743 Jena, DE;
Hans-Knöll-Institut für Naturstoff-Forschung e.V.,
07745 Jena, DE

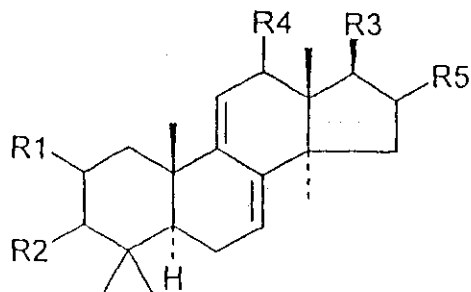
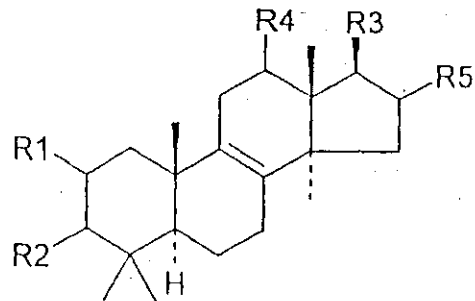
①2 Erfinder:
Härtl, Albert, Dr., 07747 Jena, DE; Schlegel, Brigitte,
Dr., 07743 Jena, DE; Berg, Albrecht, Dr., 07929
Saalburg, DE; Gräfe, Udo, Prof. Dr., 07745 Jena, DE;
Kiet, Trinh Tam, Prof. Dr., Hanoi, VN; Elsner, Peter,
Prof. Dr.med., 07743 Jena, DE; Fuchs, Silke,
Dr.med., 07745 Jena, DE; Schliemann-Willers,
Sybille, Dr.med., 07751 Cospeda, DE

Die folgenden Angaben sind den vom Anmelder eingereichten Unterlagen entnommen

Rechercheantrag gem. Paragraph 43 Abs. 1 Satz PatG ist gestellt

⑤4 Verwendung von Lanostanen als Inhibitoren von 3 α -Hydroxysteroid-Dehydrogenase und Cyclooxygenasen

⑤7 Die Erfindung betrifft die Verwendung von pilzlichen Lanostanen der allgemeinen Formeln I und II als Inhibitoren von 3 α -Hydroxysteroid-Dehydrogenase und Cyclooxygenasen-I und -II, die als Schlüsselenzyme der Inflammationskaskade bekannt sind. Weiterhin betrifft die Erfindung die Verwendung von pilzlichen Lanostanen der allgemeinen Formeln I und II als Einzelsubstanzen oder Gemische von Einzelsubstanzen als Bestandteil von Arzneimitteln und Zubereitungen zur Behandlung von Krankheitszuständen, an deren Entstehung und Pathogenese die 3 α -Hydroxysteroid-Dehydrogenase und die Cyclooxygenasen-I und -II beteiligt sind, sowie von Kosmetika und Gesundheitspflegemitteln.



DE 101 51 649 A 1

[0001] Inflammatorische Prozesse bilden bekanntermaßen die Ursache für viele Erkrankungen (z. B. Arthritis, Atherosklerose, Allergien, Schmerz). Sie werden in zunehmendem Maße auch mit Altern und neurodegenerativen Veränderungen in Verbindung gebracht. Daher bemüht man sich weiter intensiv um die Aufklärung der genetischen und biochemischen Grundlagen der in Inflammationen involvierten Bestandteile regulatorischer Kaskaden, die als Targets für spezifisch angreifende antiinflammatorische Wirkstoffe und damit als Mittel zur Bekämpfung von Krankheiten geeignet sind. 3 α -Hydroxysteroid-Dehydrogenasen (HSD) sowie Isoenzyme der Cyclooxygenasen, wie z. B. Cyclooxygenase-I (Cox-1) und Cyclooxygenase-II (Cox-2), wurden als Schlüsselenzyme der Inflammationskaskade erkannt. 3 α -Hydroxysteroid-Dehydrogenase (HSD) vermittelt den Abbau körpereigener, antiinflammatorisch und immunsuppressiv wirksamer Glucocorticoide (Penning, T. M.: Inhibition of 5 β -Dihydrocortisone reduction in rat liver cytosol: a rapid spectrophotometric screen for nonsteroidal antiinflammatory drug potency. J. Pharm. Sci. 74, 651–654, 1985). Inhibitoren dieses Enzyms sind von Interesse, da sie den Cortisolabbau verzögern und damit Entzündungen hemmen. Die Cyclooxygenasen I und II katalysieren die Umwandlung von Arachidonsäure zu Prostaglandinen, die starke Entzündungsmediatoren sind. Die verschiedenen Gewebe zeichnen sich durch die Anwesenheit von Isoenzymen der Cyclooxygenasen aus. So enthalten auch Hirnzellen Cyclooxygenase-II, deren Beteiligung an der Entstehung der gefürchteten Alzheimerschen Erkrankung und am Parkinson-Syndrom diskutiert wird (P. L. McGeer: Cyclooxygenase-Inhibitors. Drugs and Aging 2000, 17, 1-1; P. Teismann, B. Ferger: Inhibition of Cyclooxygenase Isoenzymes Cox-1 and Cox-2 Provide Neuroprotection in the MPTP-mouse model of Parkinson's disease. Synapse 39, 167–174, 2001; L. J. Craft: Clinical experience with specific Cox-2-inhibitors in Arthritis. Current Pharmacol. Design 6, 1725–1736, 2000; P. Needleman, P. T. Manning: Osteoarthritis and cartilage 7, 367–370, 1999).

[0002] Es sind bereits Inhibitoren von HSD sowie von Cox-1 und Cox-2 bekannt und zu therapeutischen und anderen Anwendungen gebracht worden. Ihr Anwendungsbereich betrifft sowohl die Behandlung akuter Erkrankungen als auch die Prävention entzündlicher Prozesse und die Gesundheitspflege. Die bereits in der Anwendung befindlichen HSD- und COX-Inhibitoren zeichnen sich durch eine Reihe von Nachteilen aus, wie ungenügende Wirksamkeit, unvorteilhafte pharmakologische Eigenschaften und insbesondere starke Nebenwirkungen. Daher besteht die Aufgabe, nach neuen wirksamen Inhibitoren der HSD, COX-1 und COX-2 zu suchen, die diese Nebenwirkungen nicht aufweisen bzw. als Leitstrukturen für die Entwicklung neuer antiinflammatorischer Mittel, Gesundheitspflegemittel und Kosmetika geeignet sind.

[0003] Diese Aufgabe wird erfindungsgemäß dadurch gelöst, daß pilzliche Lanostane, wie sie in Fruchtkörpern oder Myzelien von *Poria cocos*, *Daedalea quercina*, *Polyporus betulinus*, *Hypholoma fasciculare*, *Hebeloma senesens* und *Ganoderma lucidum* vorkommen und die durch den Fachmann bekannte Extraktions- und Isolierungsverfahren gewonnen werden, als Einzelsubstanzen oder als Gemische als Inhibitoren der 3 α -Hydroxysteroid-Dehydrogenase (HSD) sowie der Cyclooxygenasen-I (Cox-1) und -II (Cox-2) und für die Herstellung von Arzneimitteln, Gesundheitspflegemitteln und Kosmetika eingesetzt werden.

[0004] Aus Skerotien des Ascomyceten *Poria cocos* (*Wolfiporia cocos*) wurden bereits Lanostane der allgemeinen Formeln I und II isoliert und strukturell aufgeklärt (T. Tai et al. Phytochemistry 40, 225–231, 1995). Ebenso sind die Quercininsäuren aus dem Basidiomyceten *Daedalea quercina*, die Fasciculole und Fasciculinsäuren aus *Hypholoma fasciculare*, die Hebelomasäuren aus *Hebeloma senesens*, die Polyporensäuren aus *Betulinus polyporus* und die Ganoderic Acids aus *Ganoderma lucidum* bekannt (H: Laatsch, Antibase, Database of Bioactive Microbial Products, Chemical Concepts Heidelberg, 2000; Chapman and Hall Database of Natural Compounds on CD ROM, Edition 2001, Chapman Hall).

[0005] Nicht bekannt ist jedoch bisher die Wirksamkeit von Verbindungen der allgemeinen Formeln I und II als Inhibitoren von HSD, COX-1 und COX-2. Die Verwendung von Pilzbestandteilen, wie z. B. solcher des Ascomyceten *Poria cocos* oder des Basidiomyceten *Ganoderma lucidum* als Bestandteil diverser medizinisch und kosmetisch wirksamen Zubereitungen wurde bereits in Patenten beansprucht, ohne daß diese Ansprüche durch festgestellte biochemische Interaktionen von Inhaltsstoffen mit krankheitsrelevanten Targets begründet wurden. Beispielsweise wird *Poria cocos* mit der Ausnahme eines Patentes (siehe z. B. Maybeck, A. und Bonte, F., US-Pat No. 5.716.800, PCT/FR 94/00.786; 27.12. 1995, "Anti-acne composition containing a *Poria cocos* Wolfextract") in native (nichtextrahierter) Form in variablem Mischungsverhältnis mit zahlreichen pflanzlichen Naturprodukten zur Anwendung gebracht (siehe z. B. Murad, H., US-Pat. 5.804.168; 8.9.1998; Pharmaceutical compositions and methods for protecting and treating sun damaged skin"). Diese Patente sind daher im Falle der vorliegenden Erfindung nicht relevant. Für die anderen oben genannten Pilzinhaltsstoffe konnten keine Wirkungen deren Anwendung als Inhibitoren der HSD und der Cyclooxygenasen betreffende Patente ermittelt werden.

[0006] Es wurde überraschend gefunden, daß pilzliche Lanostane vom Typ I und II

Abb. 1

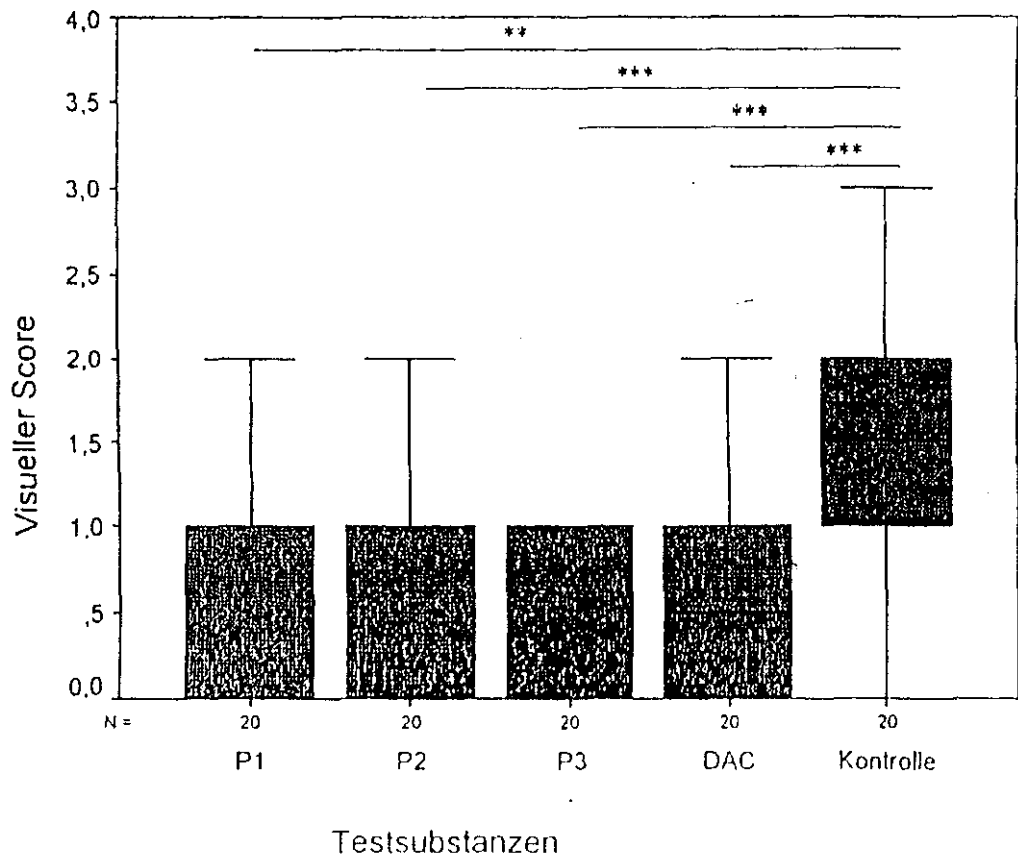


Abb. 1: Boxplots der visuellen Scores am Tag 5

Legende

P1: Poria Cocos 0,1g ad 100,0g DAC Creme (0,1%)

P2: Poria Cocos 1,0g ad 100,0g DAC Creme (1%)

P3: Poria Cocos 5,0g ad 50,0g DAC Creme (10%)

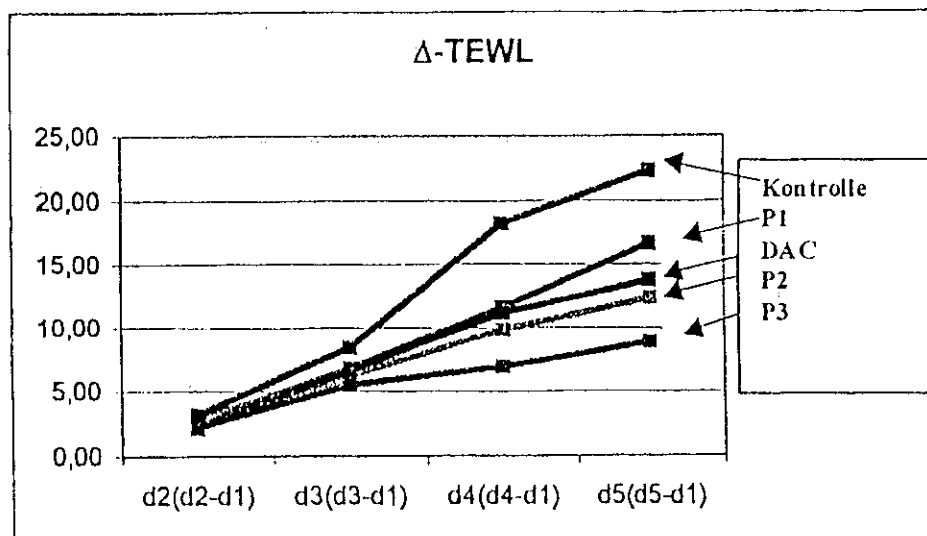
DAC Basiscreme als wirkstofffreie Kontrolle

Kontrolle: unbehandeltes Kontrollfeld

n.s. =nicht signifikant

* $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$

Abb. 3

**Legende**

P1: Poria Cocos 0,1g ad 100,0g DAC Creme (0,1%)

P2: Poria Cocos 1,0g ad 100,0g DAC Creme (1%)

P3: Poria Cocos 5,0g ad 50,0g DAC Creme (10%)

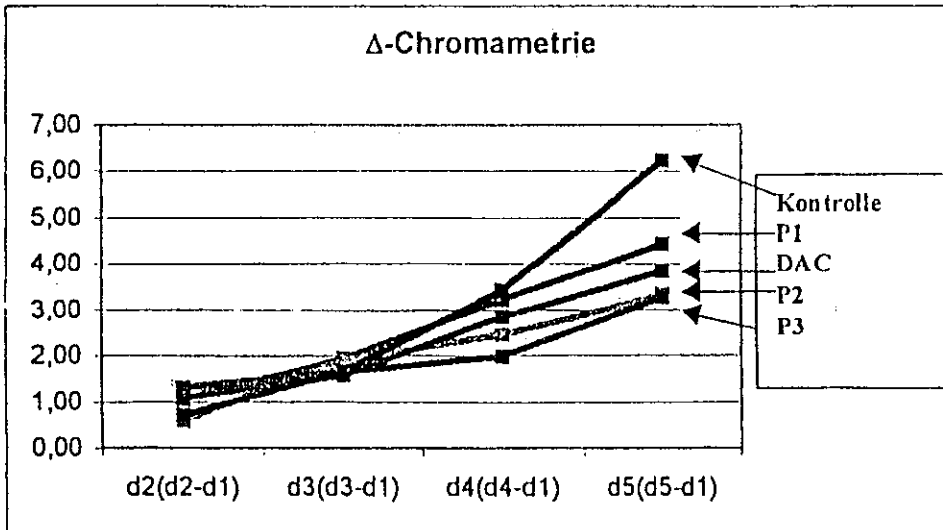
DAC Basiscreme als wirkstofffreie Kontrolle

Kontrolle: unbehandeltes Kontrollfeld

n.s. =nicht signifikant

* $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$

Abb. 2



Legende

P1: Poria Cocos 0,1g ad 100,0g DAC Creme (0,1%)

P2: Poria Cocos 1,0g ad 100,0g DAC Creme (1%)

P3: Poria Cocos 5,0g ad 50,0g DAC Creme (10%)

DAC Basiscreme als wirkstofffreie Kontrolle

Kontrolle: unbehandeltes Kontrollfeld

n.s. = nicht signifikant

* $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$

PHẦN 2

PHỤ LỤC

A/ CÁC GIẤY TỜ KIỂM NGHIỆM CHẤT LƯỢNG SẢN PHẨM



BỘ Y TẾ
VIỆN KIỂM NGHIỆM

48 Hai Bà Trưng - Hà Nội
ĐT: 8.252791 - Fax: 8.256911

CỘNG HÒA XÃ HỘI CHỦ NGHĨA VIỆT NAM
Độc lập - Tự do - Hạnh phúc

PHIẾU KIỂM NGHIỆM

Số: 387 TCH

(Kết quả kiểm nghiệm chỉ có giá trị với mẫu đem thử)

Mẫu để kiểm nghiệm: Bột Naturenz

Nơi sản xuất: Viện Công nghệ sinh học

Số lô, hạn dùng: 16072001

Người và nơi gửi mẫu: Nt

Yêu cầu KN (ghi rõ nội dung, số, ngày, tháng, năm của công văn hay giấy tờ kèm theo):

KTCL, Xét duyệt TC.

Ngày, tháng, năm nhận mẫu: 21/10/01

Số đăng ký KN: 31TCH 633

Người nhận mẫu:

Đỗ Thanh

Thử theo:

TCCS

Tình trạng mẫu khi nhận và mở niêm phong để kiểm nghiệm:

Chế phẩm đóng trong 2 lần túi PE hàn kín. Trong túi có nhãn in rõ ràng.

YÊU CẦU	KẾT QUẢ
1. Tính chất : Phải đạt theo qui định.	Đạt
2. Định tính : Chế phẩm phải cho phép thử định tính của Acid amin, Muối đẳng và Hoạt tính Protease.	Đúng
3. Thử tính khiết :	
- Arsenic : Không quá 0,0002%.	Đạt
- Kim loại nặng : Không quá 0,0005%	Đạt
- Trosulfat : Không quá 15,0%	Đạt (9,2%)
- Mất khối lượng do làm khô : Không quá 10,0%.	Đạt 7,5%)
4. Độ mịn : Phải đạt theo quy định.	Đạt
5. Định lượng :	
- Nitơ toàn phần : Không dưới 1,5% tính theo chế phẩm khan.	Đạt (2,50%)
- Nitơ amin : Không ít hơn 0,8% tính theo chế phẩm khan.	Đạt (2,15%)
6. Giới hạn nhiễm khuẩn : Phải đạt theo yêu cầu qui định.	Đạt

Kết luận: 1- Nhất trí với tiêu chuẩn cơ sở.

2- Mẫu thử đạt yêu cầu kiểm tra chất lượng theo tiêu chuẩn cơ sở.

Hà nội, ngày 12 tháng 8 năm 2002

VIỆN TRƯỞNG

(Signature)



CỘNG HOÀ XÃ HỘI CHỦ NGHĨA VIỆT NAM
BỘ KHOA HỌC VÀ CÔNG NGHỆ
CỤC SỞ HỮU CÔNG NGHIỆP

GIẤY CHỨNG NHẬN ĐĂNG KÝ NHÃN HIỆU HÀNG HÓA

Số: 44669

Chủ Giấy chứng nhận: XÍ NGHIỆP DƯỢC PHẨM TRUNG ƯƠNG 25.

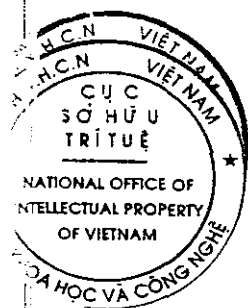
120 Hai Bà Trưng, quận 1, thành phố Hồ Chí Minh.

Số đơn: 4-2001-04143

Ngày nộp đơn hợp lệ: 11.09.2001

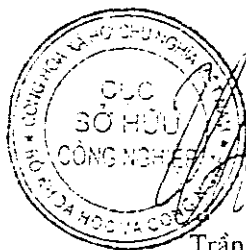
Ngày ưu tiên: 11.09.2001

Đã được cấp theo Quyết định số: 5159/QĐ-ĐK Ngày: 30.12.2002
Có hiệu lực từ ngày cấp đến hết 10 năm tính từ ngày nộp đơn hợp lệ (có thể gia hạn)



K.T. CỤC TRƯỞNG
CỤC SỞ HỮU CÔNG NGHIỆP

Phó Cục trưởng

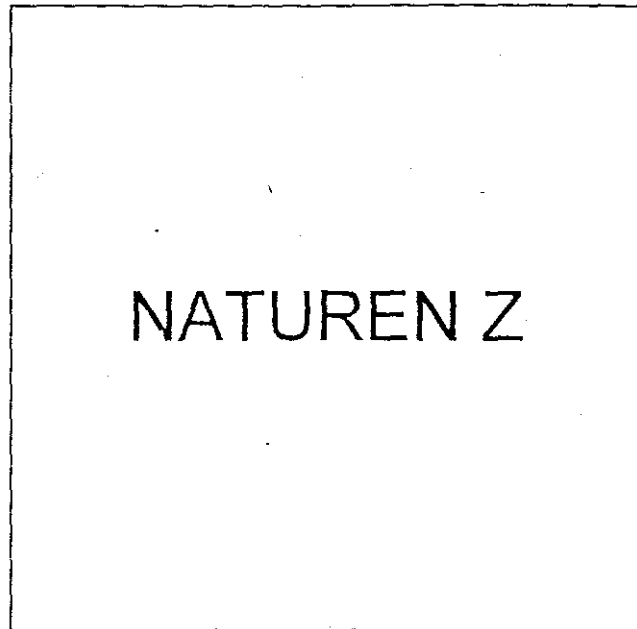


Trần Việt Hùng

Nội dung bảo hộ

GCNĐK NHHH Số: 44669

-Mẫu nhãn hiệu:



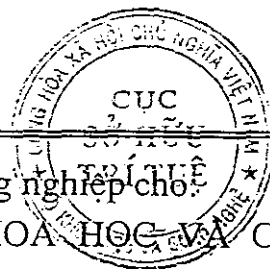
Danh mục hàng hoá, dịch vụ (xếp theo phân loại quốc tế):

hóm 05: Các sản phẩm dược.

Nội dung khác:

hãn hiệu được bảo hộ tổng thể. Không bảo hộ riêng "Z".

SỬA ĐỔI, GIA HẠN



- Chuyển giao quyền sở hữu đối tượng sở hữu công nghiệp cho:
VIỆN CÔNG NGHỆ SINH HỌC - VIỆN KHOA HỌC VÀ CÔNG
NGHỆ VIỆT NAM
18 Hoàng Quốc Việt, quận Cầu Giấy, Tp. Hà Nội.
(Theo Quyết định số: 322/QĐ-PCQL, ngày: 31.5.2004).

BỘ Y TẾ
CỤC QUẢN LÝ CHẤT LƯỢNG
VỆ SINH AN TOÀN THỰC PHẨM

CỘNG HÒA XÃ HỘI CHỦ NGHĨA VIỆT NAM
Độc lập – Tự do – Hạnh phúc

PHIẾU TIẾP NHẬN
HỒ SƠ CÔNG BỐ TIÊU CHUẨN CHẤT LƯỢNG, VỆ SINH, AN TOÀN THỰC PHẨM
6627/2004/CBTC-YT

Cục quản lý chất lượng vệ sinh an toàn thực phẩm đã tiếp nhận:

Bản công bố tiêu chuẩn chất lượng thực phẩm số: 0104.CNSH

Cho sản phẩm: **Thực phẩm bổ sung: Naturenz** (TCCS: 04-CNSH-01-02)

Của doanh nghiệp: Viện Công nghệ Sinh học.

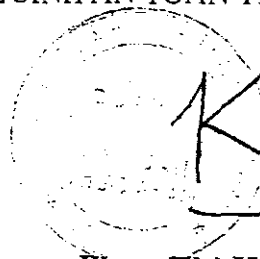
Địa chỉ: 18 Đường Hoàng Quốc Việt, Quận Cầu Giấy, Hà Nội.

Tel: 04 7564691 Fax: 04 8363144 E-mail: nndao@ibt.ac.vn

Xác nhận việc công bố trên được thực hiện theo đúng quy định hiện hành.

Hà Nội, ngày 15 tháng 4 năm 2004

CỤC TRƯỞNG
CỤC QUẢN LÝ CHẤT LƯỢNG
VỆ SINH AN TOÀN THỰC PHẨM


Kim
Phan Thị Kim

VIỆN KHOA HỌC VÀ CN VIỆT NAM	TIÊU CHUẨN CƠ SỞ	SỐ TIÊU CHUẨN: 04-CNSH-01-02
VIỆN CÔNG NGHỆ SINH HỌC	Thực phẩm bổ sung: NATURENZ	Có hiệu lực từ Ngày 06 tháng 04 năm 2004

(Ban hành kèm theo Quyết định số: 126/QĐ-CNSH ngày 06 tháng 04 năm 2004 của Viện trưởng VIỆN CÔNG NGHỆ SINH HỌC).

Tiêu chuẩn này áp dụng cho sản phẩm:

Thực phẩm bổ sung: NATURENZ

I. Yêu cầu kỹ thuật:

1. Các chỉ tiêu cảm quan:

- Trạng thái cảm quan: Dạng bột khô tơi, đồng nhất
- Màu sắc: màu vàng
- Mùi vị: Mùi thơm của đậm và tinh dầu tòi, vị ngọt hơi chua, chất, mặn

2. Các chỉ tiêu lý hoá:

STT	TÊN CHỈ TIÊU	ĐƠN VỊ TÍNH	MỨC CÔNG BỐ
1	Hàm lượng Nitơ toàn phần	%	> 1,5
2	Hàm lượng Nitơ axit amin	%	> 0,8
3	Độ mịn (qua dây số 355 DDVNIII)	%	> 95
4	Hàm lượng tro sunfat	%	< 15
5	Độ ẩm	%	< 10
6	Mất khối lượng do làm khô	%	< 10

3. Các chỉ tiêu kim loại nặng:

STT	TÊN CHỈ TIÊU	ĐƠN VỊ TÍNH	MỨC CÔNG BỐ
1	Arsenic	%	< 0,0002
2	Tổng hàm lượng kim loại nặng	%	< 0,0005

4. Các chỉ tiêu vi sinh vật:

TT	Tên chỉ tiêu	Đơn vị tính	Mức tối đa
1	TSVKHK	cfu/g	10 ⁴
2	E.coli	con/g	0
3	Staphylococcus aureus	con/g	0

4	Tổng số bào tử nấm men. – mốc	cfu/g	100

5. Các chỉ tiêu Dư lượng thuốc bảo vệ thực vật và kháng sinh: phù hợp với quy định 867 của Bộ Y tế

II. Nguyên liệu và phụ gia thực phẩm được sử dụng trong chế biến thực phẩm:
Các enzym protease, Oxidase, β -Caroten, Alixin, hỗn hợp các axit amin ở dạng tự nhiên từ nhựa quả đu đủ, cao khô củ cải, mướp đắng, bột gạo, bột tỏi, bột nhộng tằm khô.

III. Thời hạn sử dụng và quy cách bao gói:

1. *Thời hạn sử dụng*: 36 tháng kể từ ngày sản xuất, hạn sử dụng và ngày sản xuất in trên bao bì

2. *Quy cách bao gói*: khối lượng tịnh: 0,3gam/viên, viên nang.

IV. Hướng dẫn sử dụng và bảo quản:

1. *Hướng dẫn sử dụng*: Người lớn 1-2 gam/ngày, chia làm 2 lần. Trẻ em dưới 15 tuổi 1gam/ngày. Có thể dùng liên tục 1 tháng sau đó nghỉ 1 tuần. Không dùng sản phẩm có cồn khi đang dùng sản phẩm này

2. *Bảo quản*: nơi thoáng, mát, khô ráo, tránh ánh nắng trực tiếp

* *Chú ý*: sản phẩm này không có tác dụng thay thế thuốc chữa bệnh

VI. Quy trình sản xuất: (đính kèm)



Phạm Công Hoạt

DỰ THẢO NHÂN

1. *Tên sản phẩm*: Thực phẩm bổ sung : NATURENZ

2. *Thành phần cấu tạo*: Các enzym protease, Oxidase, β -Caroten, Alixin, hỗn hợp các axit amin ở dạng tự nhiên từ nhựa quả đu đủ, cao khô củ cải, mướp đắng, bột gạo, bột tỏi, bột nhộng tằm khô.

3. *Chỉ tiêu chất lượng chủ yếu*:

STT	TÊN CHỈ TIÊU	ĐƠN VỊ TÍNH	MỨC CÔNG BỐ
1	Hàm lượng Nitơ toàn phần	%	> 1,5
2	Hàm lượng Nitơ axit amin	%	> 0,8
3	Độ mịn (qua dây số 355 DDVNIII)	%	> 95

4. *Khối lượng tịnh* : 0,3 gam/viên, viên nang .

5. *Hạn dùng* : 36 tháng kể từ ngày sản xuất, hạn sử dụng và ngày sản xuất in trên bao bì.

6. *Tác dụng, hướng dẫn sử dụng và bảo quản* :

6.1. *Tác dụng* : Tăng cường tiêu hoá, hỗ trợ chức năng tiêu giảm độc của gan.

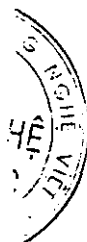
6.2. *Hướng dẫn sử dụng*: Dùng cho mọi lứa tuổi đặc biệt người già kèm ăn mất ngủ. Người lớn 1 – 2 gam/ngày, chia làm 2 lần. trẻ em dưới 15 tuổi 1 gam/ngày. Có thể dùng liên tục 1 tháng sau đó nghỉ 1 tuần. Không dùng sản phẩm có cồn khi đang dùng sản phẩm này.

6.3. *Bảo quản* : Nơi thoáng mát, khô ráo, tránh ánh nắng trực tiếp.

* *Chú ý* : Sản phẩm này không có tác dụng thay thế thuốc chữa bệnh.

7. *Nhà sản xuất* : Viện Công nghệ Sinh học – 18 Đường Hoàng Quốc Việt – Cầu Giấy – Hà Nội

TRƯỞNG PHÒNG QLTH



BỘ Y TẾ
CỤC QUẢN LÝ CHẤT LƯỢNG
VỆ SINH AN TOÀN THỰC PHẨM

CỘNG HÒA XÃ HỘI CHỦ NGHĨA VIỆT NAM
Độc lập - Tự do - Hạnh phúc

PHIẾU TIẾP NHẬN

HỒ SƠ CÔNG BỐ TIÊU CHUẨN CHẤT LƯỢNG, VỆ SINH, AN TOÀN THỰC PHẨM
3897/2003/CBTC-YT

Cục Quản lý chất lượng vệ sinh an toàn thực phẩm đã tiếp nhận:

Bản công bố tiêu chuẩn chất lượng thực phẩm số: 01/2003

Cho sản phẩm: Bột Hagaton (TCCS: 01/2003/CNSH)

Của doanh nghiệp: Viện Công nghệ sinh học

Địa chỉ: 18 Hoàng Quốc Việt, Quận Cầu Giấy, Thành phố Hà Nội

Tel: 04 7564691

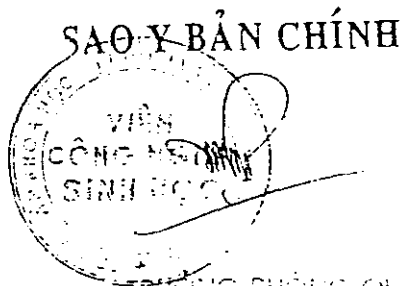
Fax: 04 8363144

E-mail:

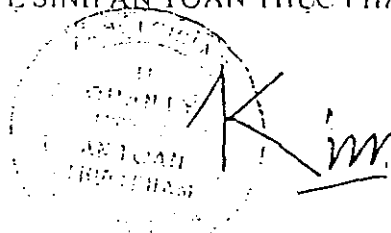
Xác nhận việc công bố trên được thực hiện theo đúng quy định hiện hành.

Hà Nội, ngày 19 tháng 8 năm 2003

CỤC TRƯỞNG
CỤC QUẢN LÝ CHẤT LƯỢNG
VỆ SINH AN TOÀN THỰC PHẨM



TRƯỞNG CHIẾN LƯỢC QUỐC TẾ
Phạm Văn Hoạt



Phan Thị Kim

HAGATON

Thực phẩm-thuốc tăng lực

dùng cho người lao động trí óc và vận động viên các bộ môn cờ vua, bắn súng.

Trong điều kiện lao động đòi hỏi nhiều đến trương lực của não bộ, nhu cầu của não đối với các chất dinh dưỡng và các hoạt chất sinh học đặc thù tăng lên.

- Hagaton có thành phần chính là bột hải sâm, cấu gai thủy phân bằng công nghệ enzym. Cung cấp cho cơ thể sản phẩm giàu peptit, axit amin. *Lysine* tăng sinh tổng hợp huyết sắc tố, axit nucleic, thúc đẩy hình thành mô xương, kích thích chức năng tiêu hoá, hấp thu và cân cho các quá trình thần kinh. *Phenylalanine* và *tyrosine* là tiền chất của các chất dẫn truyền thần kinh catecholamine là dopamin và noradrenalin. Các axit amin này còn có tác dụng chống suy nhược cơ thể.

- Hagaton cung cấp cho cơ thể sản phẩm giàu nguyên tố vi lượng dưới dạng liên kết hữu cơ. Fe là nguyên tố tạo hồng cầu, đảm bảo tốt cho việc cung cấp O_2 cho não đáp ứng các phản ứng năng lượng. Zn làm tăng khả năng hoạt động của thị giác, giúp ổn định màng nơ ron của vỏ não và hệ limbic. Mn điều chỉnh các hoạt động của các nhân xám dưới vỏ não, ổn định thần kinh. Se là antioxidant mạnh chống các stress về tâm lý, bảo vệ hoạt động của hệ thần kinh và tim mạch.

- Hagaton làm tăng hàm lượng ARN trong não, giúp hình thành và củng cố các phản xạ có điều kiện, chuyển trí nhớ ngắn thành trí nhớ dài; làm tăng biên độ nhịp theta của điện não vùng trán ($P<0.05$). Nhịp theta có nguồn gốc phát sinh từ hồi hải mã (hippocampus), đặc trưng cho hoạt động sáng tạo của não bộ.

Các Vitamin B_1 , B_6 góp phần làm tăng chuyển hoá, và tăng tác dụng của thuốc.

- Hagaton là kết quả nghiên cứu của đề tài nhánh cấp Nhà nước KC04-17 do GS.TSKH Nguyễn Tài Lương thuộc Viện Công nghệ Sinh học chủ trì. Sản phẩm được Xi nghiệp Dược phẩm Trung ương 25, Tp.Hồ Chí Minh sản xuất trên dây truyền hiện đại.

*Trình bày: Hộp 2 vỉ x 15 viên nang

*Thành phần: (cho 1 viên)

Bột hải sâm, cấu gai thủy phân.....200mg

Vitamin B_1 10mg.

Vitamin B_6 10mg.

Tá dược (Amidon, Lactose, Magnesi Stearat, Talc, Axit Benzoic, Nasaccharin...vd 1 viên

* Tác dụng: Tăng hấp thu, tạo máu, chuyển hoá năng lượng, bổ trợ hoạt động của não bộ. Phục hồi nhanh sức khoẻ.

* Chỉ định :Dùng cho người lao động trí óc, làm việc nhiều với máy vi tính, vận động viên bộ môn cờ vua, bắn súng...

* Liều dùng: Ngày 2-3 lần, mỗi lần 1 viên. Hoặc theo chỉ dẫn của Bác sĩ.

* Chống chỉ định: Không dùng cho trẻ em.

* Tiêu chuẩn : Bột Hagaton (TCCS 01/2003/CNSH); 3897/2003/ CBTC- YT

* Bảo quản : Nơi khô mát, tránh ánh sáng.

* Hạn dùng: 24 tháng kể từ ngày sản xuất.

Thuốc không độc, không gây tác dụng phụ, tác dụng không mong muốn

VIỆN CÔNG NGHỆ SINH HỌC-TRUNG TÂM KHTN&CNQG

XÍ NGHIỆP DƯỢC PHẨM TRUNG ƯƠNG 25

120 Hai Bà Trưng, Q1.Tp Hồ Chí Minh

Tel. 08. 8223049

Fax (84.8) 8296291

Email : duocphamtw25@hcm.vnn.vn

TRUNG TÂM KHOA HỌC TỰ NHIÊN VÀ CÔNG NGHỆ QUỐC GIA VIỆN CÔNG NGHỆ SINH HỌC	TIÊU CHUẨN CƠ SỞ BỘT HAGATON	Số TC: 01/2003/CNSH Có hiệu lực từ ngày 20 tháng 6 năm 2003

(Ban hành kèm theo Quyết định số ngày 20 tháng 8 năm 2003
của Viện trưởng Viện Công nghệ sinh học)
Tiêu chuẩn này áp dụng cho sản phẩm: **Bột Hagaton**

I. YÊU CẦU KỸ THUẬT

1. Các chỉ tiêu cảm quan:

- Trạng thái: dạng bột khô mịn, tơi, đồng nhất
- Màu sắc: màu nâu nhạt
- Mùi, vị: thơm đặc trưng.

2. Các chỉ tiêu lý hoá:

TT	Tên chỉ tiêu	Đơn vị tính	Mức công bố
1	Độ ẩm	%	< 10
2	Hàm lượng Protein tổng số	%	> 45
3	Hàm lượng axit amin tổng số	%	> 44
4	Hàm lượng nitơ axit amin	%	> 7
5	Hàm lượng Mangan (tính theo chất khô)	ppm	190 - 210
6	Hàm lượng sắt (tính theo chất khô)	ppm	190 - 210
7	Hàm lượng Kẽm (tính theo chất khô)	ppm	55 - 65
8	Hàm lượng đồng (tính theo chất khô)	ppm	4 - 5

3. Hàm lượng kim loại nặng:

TT	Tên chỉ tiêu	Đơn vị tính	Mức tối đa
1	Asen	ppm	1
2	Chì	ppm	2
5	Thủy ngân	ppm	0.05
6	Cadimi	ppm	1

Chỉ tiêu vi sinh vật:

TT	Tên chất	Đơn vị tính	Mức công bố
1	TSVKHK	vi khuẩn/g	$< 10^2$
3	E.Coli	cfu/g	0
4	Coliform	cfu/g	< 5
5	Cl.Perfringens	cfu/g	0
6	TSBTNM-M	bào tử/g	< 10
7	S. Aureus	cfu/g	0
8	Samonella	cfu/25g	0

Không có các độc tố ảnh hưởng đến sức khỏe người sử dụng.

II. THÀNH PHẦN CẤU TẠO

Thịt Hải sâm (gồm 4 loài ăn được: *Holothuria scabra*, *Actinopyga echinites*, *holothuria* sp, *Bohahchia graffei*), Cầu gai *Echinoidea* (dùng phần thịt và trứng), Enzyme papain, nước cất.

III. THỜI HẠN SỬ DỤNG

Thời hạn sử dụng: 12 tháng kể từ ngày sản xuất. Ngày sản xuất và hạn sử dụng ghi trên nhãn sản phẩm.

IV. HƯỚNG DẪN SỬ DỤNG VÀ BẢO QUẢN

1. Tác dụng:

- Bồi bổ sức khỏe.
- Hỗ trợ các quá trình: tạo máu, cải thiện hoạt động não bộ, sinh tổng hợp Protein.
- Chống mệt mỏi cơ bắp
- Sản phẩm thích hợp cho người lao động nặng, vận động viên trong quá trình vận động.

2. Hướng dẫn sử dụng:

Sử dụng làm nguyên liệu quý để sản xuất các thực phẩm chức năng, hoặc bổ sung vào các sản phẩm thực phẩm thông thường.

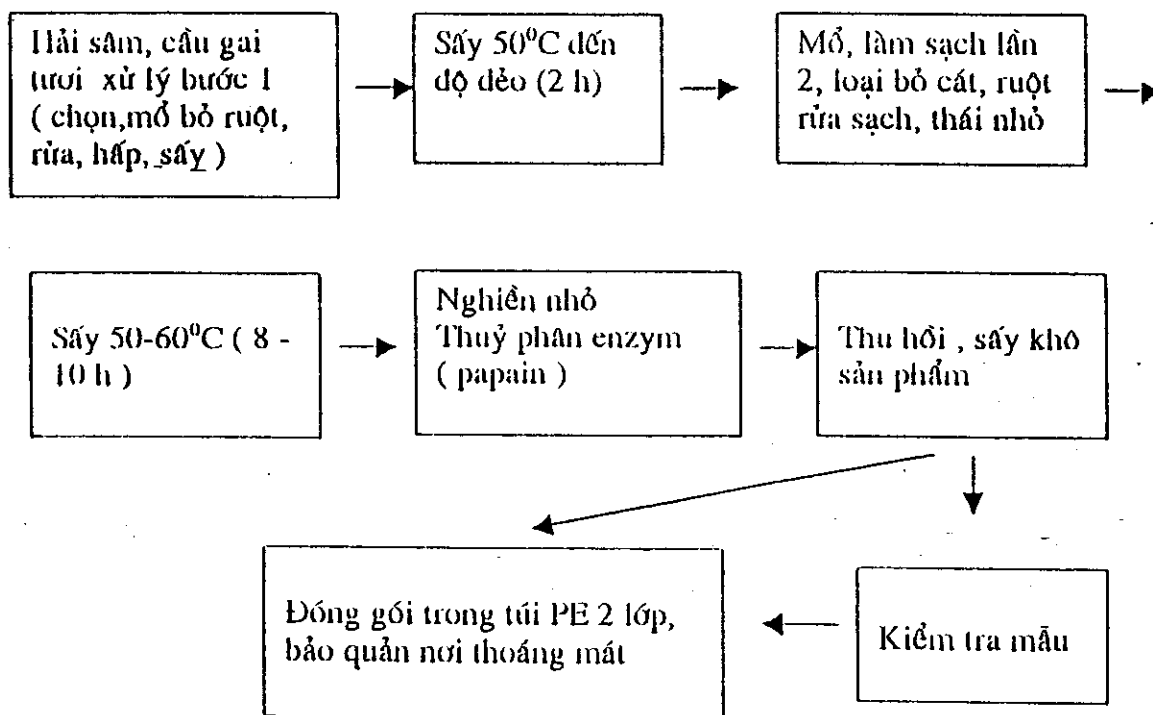
3. Bảo quản:

Nơi khô mát, tránh ánh nắng mặt trời.

IV. QUY CÁCH BAO GÓI

- Đóng các loại : 100g, 200g, 300g, 500g, 1kg đến 5kg.
- sản phẩm được đóng trong túi PE.

V. QUY TRÌNH SẢN XUẤT



Hà Nội, ngày tháng năm 2003

VIỆN TRƯỞNG
VIỆN CÔNG NGHỆ
SINH HỌC
PHO VIỆN TRƯỞNG
Trương Văn Hải

CỘNG HÒA XÃ HỘI CHỦ NGHĨA VIỆT NAM
Độc lập - Tự do - Hạnh phúc

BẢN CÔNG BỐ TIÊU CHUẨN CHẤT LƯỢNG THỰC PHẨM

Số: 01/2003

Doanh nghiệp: Viện Công nghệ sinh học

Địa chỉ: 18 Hoàng Quốc Việt, Cầu Giấy, Hà Nội.

Điện thoại:

Fax:

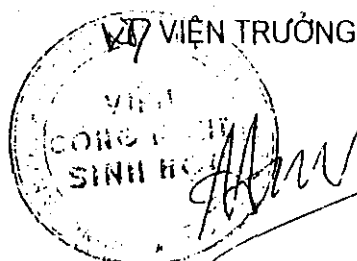
CÔNG BỐ

Tiêu chuẩn cơ sở số: 01/2003/CNSH

Áp dụng cho sản phẩm: BỘT HAGATON

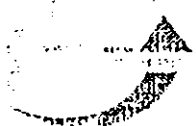
Chúng tôi cam kết sản xuất, kinh doanh sản phẩm thực phẩm theo đúng tiêu chuẩn cơ sở đã công bố trên đây và chịu hoàn toàn trách nhiệm trước người tiêu dùng và cơ quan quản lý Nhà nước về những vi phạm đối với những tiêu chuẩn chất lượng đã công bố.

Hà Nội, ngày tháng năm 2003



PHÓ VIỆN TRƯỞNG

Trương Năm Hải



CHỢ CÔNG NGHỆ VÀ THIẾT BỊ VIỆT NAM

TECHMART VIETNAM

HÀ NỘI, 13-15/10/2003

PHIẾU ĐĂNG KÝ THAM GIA

CHỢ CÔNG NGHỆ VÀ THIẾT BỊ VIỆT NAM

Kính gửi : Ban Tổ chức

Đơn vị đăng ký : Phòng Hợp tác Protein, Viện Công nghệ Sinh học

Địa chỉ : 18, đường Hoàng Quốc Việt, Cầu Giấy, Hà Nội

Điện thoại : 7564.071 Fax : Email : nt.huong@netnam.vn

Theo các thông tin mà chúng tôi đã được cung cấp về kế hoạch tổ chức Chợ Công nghệ và Thiết bị Việt Nam (TechMart Vietnam), chúng tôi xin thông báo chính thức như sau:

1. Chúng tôi muốn:

☐ Đăng ký tham dự Techmart ảo

☒ Đăng ký tham dự "Chợ Công nghệ và Thiết bị Việt Nam 2003", được tổ chức tại Trung tâm Hội chợ Triển lãm Việt Nam vào tháng 10/2003. Chúng tôi muốn chào bán, trưng bày thực tế các CN/TB sau:

TT	Tên Công nghệ/Thiết bị	Kích thước	Điện (KW/Phase)
1	3 loại bột Thắc phẩm - thức ăn: Hắc sấm, Rabatton, Hagatton		
2	Các viên nang tăng lực từ các loại bột trên		

2. Kinh phí tham gia:

Ngân một gian hàng tiêu chuẩn 6m² (3m x 2m) được hỗ trợ từ Ban Tổ chức, chúng tôi cần thêm:

- Điện thoại : 4 máy

- Ghế : 4 chiếc

- Máy tính : máy

- Bàn : 1 chiếc

- Đường mạng Internet : đường

- Đèn : 4 bóng

3. Người đại diện cho đơn vị chúng tôi để trực tiếp liên hệ và làm việc với Ban tổ chức kể từ ngày hôm nay là : Ông (Bà) :

Chức vụ :

Điện thoại : Fax : Các quyết định của Ông (bà) có tên

trên cũng chính là quyết định của đơn vị chúng tôi trong các hoạt động tham gia TechMart Vietnam 2003.

Chữ xin in tại đây

(Signature)
63.75KH Nguyễn Tài Lương

Ngày tháng năm

Đại diện đơn vị (ký tên, đóng dấu)

ĐÓNG DẤU

Phiên diễn xong xin vui lòng gửi về địa chỉ sau hoặc liên hệ để biết thêm chi tiết

VĂN PHÒNG THƯỜNG TRỰC TECHMART VIETNAM

Trung tâm Thông tin Khoa học và Công nghệ Quốc gia

P. 301, 24 Lý Thường Kiệt, Hà Nội

ĐT: 04.9342945

Fax: 04.9349127

E-mail: techmart@vista.gov.vn

Website: www.vista.gov.vn

(Hạn gửi form: trước 15/08/2003)



CHỢ CÔNG NGHỆ VÀ THIẾT BỊ VIỆT NAM TECHMART VIETNAM

PHIẾU ĐĂNG KÝ GIỚI THIỆU CÔNG NGHỆ, THIẾT BỊ CHÀO BÁN

Mã số:
(do đơn vị xử lý ght)

1. Tên Công nghệ/Thiết bị (CN/TB): *Thức ăn - Chế biến (Bột Hải Sản, Bột Rabbiton, Bột Hagaton) và các viên nang tăng lực cho rùa biển và các loài vật hoang dã.*

2. Mô tả quy trình CN/TB: (xin gửi kèm sơ đồ quy trình công nghệ/ảnh nếu có)
Bột Thức Hải Sản, bột Rabbiton, viên nang... được thực hiện bằng công nghệ enzym. Các viên nang tăng lực Hagaton, Rabbiton, Hagaton được sản xuất theo công nghệ hiện đại của các xí nghiệp Dược phẩm tại Hà Nội và TP. Hồ Chí Minh.

- Công suất (tính theo ca):
- Tiêu chuẩn đạt được: ☒ TCVN ☐ TC nước ngoài
- Các chỉ tiêu kinh tế - kỹ thuật khác:

3. Các lĩnh vực có thể áp dụng CN/TB: *Các loại bột này là nguyên liệu chế biến các sản phẩm thực phẩm, các loại thức ăn cho rùa biển và các loài vật hoang dã. Các loại thức ăn cho rùa biển được chế biến theo công nghệ hiện đại của các xí nghiệp Dược phẩm tại Hà Nội và TP. Hồ Chí Minh. Viên nang tăng lực, bột tăng lực, bột tăng lực...*

4. Ưu điểm của CN/TB: (Ghi rõ ưu điểm của TB/CN so với ngoại nhập)
*- Sản phẩm đạt chuẩn chất lượng cao, hàm lượng dinh dưỡng cao.
- Rẻ hơn 6-10 lần so với các sản phẩm nhập ngoại (Mỹ, Nam Hàn...)
- Nhiều viên nang viên nang có hiệu quả đạt được chất lượng cao.*

5. Mức độ phát triển của CN/TB:
☒ Đã sử dụng để sản xuất thử (quy mô pilot);
☒ Đã sử dụng để sản xuất ở quy mô công nghiệp;
☒ Đang thương mại hoá

6. Bản quyền:

- Đã được đăng ký bản quyền chưa? ☐ Đã đăng ký ☒ Chưa đăng ký

• Nếu đã đăng ký:

- ☐ Nhãn hiệu thương mại ☐ Kiểu dáng công nghiệp ☐ Patent

Số đăng ký:

Ngày/tháng/năm đăng ký:

Thời hạn có hiệu lực:

7. Các giải thưởng đã được nhận:

Vි-phi

Năm:

2001
2001

(Giải thưởng tại KH-CN Việt Nam, 2001).

8. Yêu cầu kỹ thuật trong vận hành, lắp đặt:

Nhân lực:

trong đó kỹ sư KTV:

Công nhân:

Năng lượng: Điện

Khí đốt, dầu

Nhà xưởng, đất đai

m²

Nguyên liệu:

9. Phương thức chuyển giao CN/TB:

Chuyển giao: ☒ Patent ☐ Bí quyết ☐ License ☐ Đào tạo

☐ Chia khoả trao tay

☒ Theo thoả thuận của khách hàng

10. Hình thức cung cấp CN/TB:

☒ Bán trực tiếp theo hợp đồng ☒ Theo đơn đặt hàng

☐ Qua tổng đại lý ☐ Đại lý độc quyền ☐ Đại lý bán lẻ

☐ Qua điểm tiếp thị SP/DV KH-CN tại 24 Lý Thường Kiệt, Hà Nội

11. Chào giá tham khảo:

- Giá bán công nghệ $2,5^k$ / 1 kg bột gốc.
- Giá bán máy móc thiết bị:
- Phí đào tạo:
- Phí chuyển giao bí quyết:
- Phí tư vấn kỹ thuật:
- Chi tiết khác:

12. Thời gian và hình thức bảo hành:

12 tháng.

Bảo hành nơi KH mua.

13. Xuất xứ của CN/TB

☒ Là kết quả đề tài nghiên cứu của đơn vị:

☒ Đề tài cấp Nhà nước

☐ Đề tài cấp Bộ

☐ Đề tài cấp cơ sở

☐ Là kết quả của việc chuyển giao CN từ nước ngoài vào

☐ Là kết quả của việc sao chép mẫu các thiết bị của nước ngoài

☐ Do đơn vị nghiên cứu chế tạo

14. Mức độ hoàn thiện và độ tin cậy của CN/TB:

• CN/TB được hoàn thiện từ năm 2002

• CN/TB đã được bán/chuyển giao cho cơ sở sản xuất HQ Bã SX HLT.

STT Tên cơ sở sản xuất sử dụng CN/TB Ngày bán/chuyển giao CN/TB

1. Xí nghiệp Đạm Biopha TP HCM 7-498

2. Xí nghiệp Đạm Trại ương 25 TP HCM 7-2003

3. Công ty Đạm Trại Kalo H&H 6-2003

• Tổng doanh thu từ TB/CN (tính đến tháng 5/2003) là tỷ đồng

15. Nhung thông tin khác (nếu chưa có trong biểu mẫu):

Công ty Đạm Trại Kalo đang SX phẩm Seagames 22
mở đầu 100.000 vnd tính đến 8/2003.

16. Đơn vị chào bán CN/TB:

• Tên đơn vị Phòng Đạm Sản Protein, Viện Công nghệ Sinh học

• Địa chỉ 48, đường Hoàng Quốc Việt, Cầu Giấy, Hà Nội

• Điện thoại 7564 071 Fax:

Email ntluong@hetnam.vn

• Người đại diện GS.BS.NS Nguyễn Tài Lương

Chức vụ Nghiên cứu viên cao cấp

(Hạn gửi form: Trước 15/08/2003)

Ngày .. tháng .. năm ..

Đại diện cơ quan (ký tên và đóng dấu)


Nguyễn Tài Lương

Phiếu điền xong xin vui lòng gửi về địa chỉ sau hoặc liên hệ để biết thêm chi tiết:

VĂN PHÒNG THƯỜNG TRỰC TECHMART VIETNAM

Trung tâm Thông tin Khoa học và Công nghệ Quốc gia

P. 301, 24 Lý Thường Kiệt, Hà Nội

ĐT: 04.9342945

Fax: 04.9349127

Email: techmart@vista.gov.vn

Website: www.vista.gov.vn

Đa đơn vị và đa lĩnh vực

- Chỉ số phân loại (spen)

- Từ khóa:

TRUNG TÂM KHOA HỌC TỰ NHIÊN VÀ CÔNG NGHỆ
QUỐC GIA

PHIẾU GIỚI THIỆU
SẢN PHẨM VÀ CÔNG NGHỆ ĐÃ ĐƯỢC ỨNG DỤNG VÀO THỰC TIỄN

Mã số:

Trung tâm Ngành Viện STT SP Thời gian đăng ký

- 1- Tên sản phẩm/công nghệ (SP/CN): Các chế phẩm thực phẩm-Thuốc
HẢI SÂM, KALITON, HAGETON tăng lực cho vận động viên,
lạc bộ, vũ trang, người lao động... từ nguồn tài nguyên
sinh vật biển Việt Nam.
- 2- Tính năng sử dụng của sản phẩm/công nghệ
 - Tăng tạo máu. Kích hoạt enzyme LDH chống mỡ thừa, thoát ruột, đau khớp.
 - Tăng sản sinh tổng hợp protein, tiết glycogen, chuyển hoá N, P.
 - Tăng sinh miễn dịch, chống oxy hoá, vô hiệu hoá kim loại độc và
thuốc trừ sâu (lactamit) loại trừ dị thể.
 - Phòng xạ thân kinh mạch, nhầy.
 - Tiêu chuẩn đạt được: TCVN ☒ TCVN ☐
 - Các giải thưởng, KHCN đã nhận: Giải thưởng Quốc gia Vi Fotec
Giải cho các Công nghệ ưu tiên.
- 3- Các lĩnh vực có thể áp dụng SP/CN:
 - Các Xí nghiệp Dệt, các Xí nghiệp chế biến lương thực, thực phẩm và Quê ở
có thể sử dụng để phổ biến SX các loại thực phẩm thuốc tăng lực.
 - Ứng dụng cho vận động viên thể thao, Quân đội, Công an,
công nhân và người lao động.
- 4- Từ khoá: Thuốc phẩm-Thuốc, tăng lực, Hải sâm, Kaliton, Hageton,
Vận động viên, lực lượng vũ trang, Công nhân lao động.
- 5- Ưu điểm của SP/CN: (phải rõ ưu điểm của SP/CN so với nhập ngoại)
 - Nguyên liệu từ nguồn tài nguyên sinh học biển có tính bền vững.
 - SX trên dây chuyền hiện đại.
 - Re³ hơn 6-10 lần so với chế phẩm nhập ngoại của Mỹ, Nam Hàn,
Trung Quốc, ...
 - Nhiều vận động viên Việt Nam đã sử dụng, đạt huy chương vàng
hay thi đấu khác vực và quốc tế.

6- Mức độ phát triển của SP/CN

- ☒ Đã sử dụng để sản xuất ở quy mô Pilot
☒ Đã sử dụng để sản xuất ở quy mô công nghiệp
☐ Đã thương mại hoá

7- Bản quyền:

Dăng ký bản quyền: ☐ Đã đăng ký ☐ Chưa đăng ký *Đang đăng ký*

Nếu đã đăng ký:

☒ Nhãn hiệu thương mại ☐ Kiểu dáng công nghiệp ☐ Patent

Số đăng ký:

Ngày tháng năm đăng ký:

Thời hạn có hiệu lực:

8- Mô tả chi tiết sản phẩm và quy trình công nghệ (Sơ đồ quy trình công nghệ, ảnh minh chứng) : *Bếp mẫu nấu hạt, khô, mịn tơi nhừ, mức thơm đặc trưng. Đóng gói bằng túi PE 2 lớp kín (500-1000g). Túi bao bì có nhãn ghi: 1X, 2X, 3X, thời gian bảo hành 12 tháng.*
Sơ đồ quy trình công nghệ và ảnh minh chứng (xem phụ lục kèm theo).

9- Yêu cầu kỹ thuật trong vận hành lắp đặt:

Nhân lực ☐ trong đó KS, KTV: ☐ Công nhân
Năng lượng điện ☐ Khí đốt, dầu
Nhà xưởng, đất đai ☐ m²
Nguyên, nhiên liệu.

10- Phương thức chuyển giao SP/CN:

Chuyển giao ☒ Patent ☐ Bí quyết ☐ License ☐ Đào tạo
☐ Chia khoá trao tay ☒ Theo thoả thuận của khách hàng

11- Hình thức cung cấp SP/CN:

☒ Bán theo hợp đồng ☒ Theo đơn đặt hàng
☐ Qua đại lý ☐ Đại lý độc quyền.
☐ Qua tiếp thị

12- Giá cả:

- Giá bán SP/CN
- Giá thiết bị, máy móc
- Phí đào tạo
- Phí chuyển giao
- Phí tư vấn kỹ thuật
- Khác

2,5 triệu / 1 kg.

13- Thời gian và hình thức bảo hành SP/CN:

12 tháng

Bảo quan? nội thất, mát

14- SP/CN đã được chuyển giao/ bán cho khách hàng. Hợp tác sản xuất (nếu có):

Số TT	Tên cơ sở sử dụng SP/CN	Ngày chuyển giao/ bán	Địa chỉ
1	Xí nghiệp Dược phẩm Biopha	16-7-1998	90, Hùng Vương, P3, Q5, TP HCM
2	Công ty Dược Tânphaco	25-6-2003	75, Yết Kiêu, Ba Đình, Hà Nội
3	Xí nghiệp Dược Trung ương 25	31-7-2003	120, Khai Bà Trưng, Q1, TP HCM
4			
5			

- Tổng doanh thu:

15- Những thông tin khác, Công ty Dược Tânphaco ủy quyền liên lạc này
sản xuất các viên nang tây bắc cho Viện nghiên cứu thực nghiệm 22
từ tháng 8/2003.

16- Đơn vị chuyển giao SP/CN:

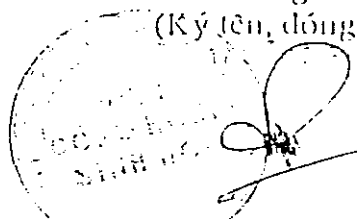
- Tên đơn vị: Phòng Hóa sinh Protein, Viện Công nghệ Sinh học
- Địa chỉ: 18, đường Hoàng Quốc Việt, Cầu Giấy, Hà Nội
- Điện thoại: 7.564.071 Fax: Email: ntluong@netnam.vn
- Người đại diện (ký tên): Nguyễn Tài Lương Chức vụ: GS.TSKH, nghiên cứu viên cao cấp.

(Chữ ký)

.....ngày tháng năm

Thủ trưởng cơ quan
(Ký tên, đóng dấu)

BNG OLTH



(Chữ ký)

BỘ Y TẾ
CỤC QUẢN LÝ CHẤT LƯỢNG
VỆ SINH AN TOÀN THỰC PHẨM

CỘNG HÒA XÃ HỘI CHỦ NGHĨA VIỆT NAM
Độc lập - Tự do - Hạnh phúc

PHIẾU TIẾP NHẬN

HỒ SƠ CÔNG BỐ TIÊU CHUẨN CHẤT LƯỢNG, VỆ SINH, AN TOÀN THỰC PHẨM
4763/2003/CBTC-YT

Cục Quản lý chất lượng vệ sinh an toàn thực phẩm đã tiếp nhận:

Bản công bố tiêu chuẩn chất lượng thực phẩm số: 14-03/CBTC/XNDPTW25

Cho sản phẩm: Viên nang Uphaton (TCCS: 14-03/XNDPTW25)

Của doanh nghiệp: Xí nghiệp Dược phẩm Trung ương 25

Địa chỉ: 120 Hai Bà Trưng, Quận 1, TP. Hồ Chí Minh

Tel: 08 8223049

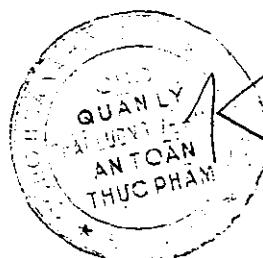
Fax: 08 8295691

E-mail:

Xác nhận việc công bố trên được thực hiện theo đúng quy định hiện hành.

Hà Nội, ngày 28 tháng 12 năm 2003

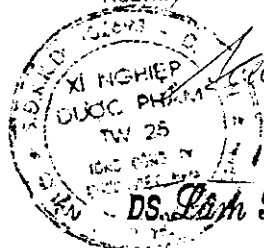
CỤC TRƯỞNG
CỤC QUẢN LÝ CHẤT LƯỢNG
VỆ SINH AN TOÀN THỰC PHẨM



Phan Thị Kim

SAO Y BẢN CHÍNH

Ngày 9 tháng 2 năm 2004



DS. Lê Bạch Vân

THỬ ĐỘC TÍNH CẤP DIỄN
CỦA THUỐC VIÊN NANG UPHATON
DO XÍ NGHIỆP DƯỢC PHẨM TRUNG ƯƠNG 25 SẢN XUẤT

Chỉ đạo đề tài : Ds. Lê Ngọc Bền

Thực hiện : Ds. Nguyễn Thị Trà My

Ds. Võ Thành Danh

1.- PHƯƠNG PHÁP THỰC NGHIỆM :

1.1.- PHƯƠNG PHÁP CHUNG

1.1.1.- Súc vật thí nghiệm :

- Chuột nhắt trắng thuộc chủng Mus musculus khỏe mạnh, không dị tật.
- Số lượng n = 20 con.

- Trọng lượng $P = 20 \pm 2$ gr/con $\rightarrow \begin{cases} 10 \text{ con} : 18 \text{ gr} \\ 10 \text{ con} : 19 \text{ gr} \end{cases}$

1.1.2.- Thời điểm uống thuốc :

Buổi sáng lúc 8 giờ 35 phút, khi chuột còn đói.

1.1.3.- Đánh giá kết quả :

Dựa vào những phản ứng toàn ứng hay bất ứng, trạng thái chung của chuột sau khi uống thuốc.

1.2.- PHƯƠNG PHÁP THỰC HIỆN :

1.2.1.- Mục đích :

Thăm dò độc tính của thuốc qua quan sát các phản ứng của chuột sau khi uống thuốc. Xác định phân suất tử vong (nếu có). Xác định liều LD₅₀.

1.2.2.- Phương pháp :

★ Nguyên tắc :

- Cho chuột thử nghiệm uống cùng liều thuốc, chuột được nuôi và thử trong cùng điều kiện hoàn toàn giống nhau.
- Ở các mốc thời gian, ta ghi lại các biểu hiện của chuột. Đến đủ thời gian (48 giờ) cho thử nghiệm độc tính cấp diễn thì kết thúc thử nghiệm.

★ Thuốc khảo sát :

- Chế phẩm "**THUỐC UPHATON**" của Xí nghiệp Dược phẩm Trung ương 25 sản xuất.

SAO Y BẢN CHÍNH

Ngày... tháng... năm 200...

...

...

...

...

★ **Công thức** : Cho 01 viên nang 589 mg .

- Bạch Tật Lê 3500mg (tương ứng 350mg dịch trích tinh Bạch Tật Lê)
- Dâm Dương hoắc 700mg (tương ứng 70mg dịch trích tinh Dâm Dương hoắc).
- Rễ Đinh Lăng 700mg (tương ứng 70mg dịch trích tinh rễ Đinh Lăng).
- Cát Cẩn 60mg
- Tá dược vừa đủ.

★ **Chỉ định** :

- UPHATON là thực phẩm dinh dưỡng, chống suy nhược cơ thể, tăng sức đề kháng, tăng cường thể lực cho các vận động viên thể thao, chống lão hóa, tăng cường khả năng lao động trí óc và chân tay.

★ **Liều dùng** :

- Ngày uống 03 - 06 viên chia làm 3 lần hoặc theo chỉ định của Bác sĩ.

★ **Đóng gói** :

- Chai : 60 viên nang.

★ **Bảo quản** :

- Nơi khô mát, tránh ánh sáng.

★ **Thời gian bảo hành** : 24 tháng kể từ ngày sản xuất.

★ **Đường thử nghiệm** :

- Cho chuột uống bằng kim đầu tã, đưa thẳng vào dạ dày, bơm thuốc vào lúc đói.

★ **Liều thử nghiệm** :

- Cho uống thuốc khảo sát "UPHATON" trên lô chuột thử nghiệm với cùng một liều là 19mg bột/con chuột thử (liều điều trị tối đa). Tiến hành quan sát lô chuột thử trong suốt thời gian thực nghiệm.

★ **Thời gian thử nghiệm** :

- Theo dõi chuột trong 48 giờ sau khi uống.

★ **Chỉ tiêu quan sát** :

- Ghi các phản ứng và hoạt động của chuột sau khi uống thuốc.
- Nếu có chuột chết, mổ bụng quan sát nội tạng.
- Xác định phân suất tử vong (nếu có).

1.2.3.- Nhận xét :

- Sau khi uống : Chuột gãi mõm, chạy nhanh.
- Sau 5 phút : Trạng thái vận động bình thường.
- Sau 10 phút : Chuột đứng yên tiếp tục gãi mõm.
- Sau 15 phút : Một số chuột chúi mõm xuống trấu.
- Sau 20 phút : Đứng yên từng nhóm, trạng thái thức.
- Sau 30 phút : Một số đứng yên, một số bám trên lưới.
- Sau 45 phút : Lô chuột ngủ hoàn toàn, thành từng nhóm.
- Sau 1 giờ : Lô chuột ở trạng thái ngủ.
- Sau 24 giờ : Lô chuột thử tiểu nhiều, sinh hoạt bình thường.
- Sau 48 giờ : Sinh hoạt bình thường, tiểu nhiều.

2.- KẾT QUẢ THỬ NGHIỆM :

- Với liều thử nghiệm trên, chuột không có phản ứng gì đặc biệt. Không có tử vong sau 48 giờ theo dõi.
- Thuốc khảo sát không gây độc tính cấp.

3.- DÒ LIỀU LD₅₀.

3.1.- SỨC VẬT THÍ NGHIỆM :

- Chuột nhất trắng thuộc chủng Mus musculus khỏe mạnh, không dị tật.
- Số lượng n = 20 con.
- Trọng lượng $P = 20 \pm 2$ gr/con $\rightarrow$

{	• 12 con : 19 gr.
	• 08 con : 18 gr.

3.2.- PHƯƠNG PHÁP THỰC HIỆN :

- Chia lô chuột thử ra thành từng nhóm, cho từng nhóm lô chuột thử nghiệm uống thuốc khảo sát "UPHATON" với liều tăng dần từ 47mg/con - 95mg/con - 142mg/con - 237mg/con tới liều tối đa có thể uống là 475mg/con (01 viên). Theo dõi lô chuột, thử theo thời gian thực nghiệm quy định, không thấy xuất hiện "hiện tượng tử vong" ở các nhóm chuột của lô.

3.3.- KẾT LUẬN :

Chế phẩm **UPHATON** của Xí nghiệp Dược phẩm Trung ương 25 không có liều LD₅₀.

TP. Hồ Chí Minh, ngày 04 tháng 05 năm 2004

TỔ KIỂM NGHIỆM



Ds. Võ Thành Danh

Sở Y Tế
Thành phố Hồ Chí Minh
BV. Y HỌC CỔ TRUYỀN

CỘNG HÒA XÃ HỘI CHỦ NGHĨA VIỆT NAM
Độc lập - Tự do - Hạnh phúc

TP. Hồ Chí Minh, ngày 05 tháng 05 năm 2004

**KẾT LUẬN CỦA HỘI ĐỒNG KHOA HỌC CÔNG NGHỆ
BỆNH VIỆN Y HỌC CỔ TRUYỀN TP. HỒ CHÍ MINH
VỀ CÔNG TRÌNH NGHIÊN CỨU THỰC NGHIỆM
CHẾ PHẨM UPHATON ĐIỀU TRỊ SUY NHƯỢC CƠ THỂ
DO XÍ NGHIỆP DƯỢC PHẨM TRUNG ƯƠNG 25 SẢN XUẤT**

Hội đồng khoa học công nghệ Bệnh viện Y học cổ truyền TP. Hồ Chí Minh cho tiến hành nghiên cứu thực nghiệm chế phẩm Uphaton điều trị suy nhược cơ thể của Xí nghiệp Dược phẩm Trung ương 25 sản xuất trong thời gian từ ngày 20 tháng 04 năm 2004 đến ngày 04 tháng 05 năm 2004.

Chịu trách nhiệm thực hiện :

- DS. NGUYỄN THỊ TRÀ MY
- DS. VÕ THÀNH DANH

Qua nghiệm thu công trình nghiên cứu Hội đồng Khoa học công nghệ Bệnh viện Y học cổ truyền có những nhận xét sau :

- Với liều thử nghiệm trên, chuột không phản ứng gì đặc biệt, không có tử vong sau 48 giờ theo dõi.
- Thuốc khảo sát không gây độc cấp tính.
- Chế phẩm UPHATON của Xí nghiệp dược phẩm Trung ương 25 sản xuất không có liều LD₅₀.

CHỦ TỊCH HỘI ĐỒNG KHCN BỆNH VIỆN
Y HỌC
CỔ TRUYỀN



Ds. Lê Ngọc Bền

TỔNG CÔNG TY DƯỢC VIỆT NAM - BỘ Y TẾ	TIÊU CHUẨN CƠ SỞ	Số TC : 14-03 XNDPTW25
XÍ NGHIỆP DƯỢC PHẨM TW25 120 Hai Bà Trưng - Q 1 - TP.HCM	VIÊN NANG UPHATON 500mg	Có hiệu lực từ : 29 / 11 / 2003

(Ban hành kèm theo quyết định số 14-03/CBTC/XNDPTW25 của Giám đốc Xí nghiệp Dược phẩm TW 25). Tiêu chuẩn này áp dụng cho sản phẩm viên nang UPHATON 500mg. Là thực phẩm dinh dưỡng, chống suy nhược cơ thể, tăng sức đề kháng, tăng cường thể lực cho các vận động viên thể thao, chống lão hóa, tăng cường khả năng lao động trí óc và chân tay.

Không dùng cho trẻ em dưới 16 tuổi

I. YÊU CẦU KỸ THUẬT:

1.1/- Chỉ tiêu cảm quan :

Mẫu dạng viên nang số 0 ,hai đầu màu đỏ nâu, trong chứa bột màu xanh xám,thơm mùi đặc trưng của dược liệu.

1.2 / - Định tính.

STT	Tên chỉ tiêu	Phương pháp
01	Bạch tật lê , Dâm dương hoắc , Đinh lăng	ĐDVN III

1.3/- Các chỉ tiêu lý hóa :

TT	Tên chỉ tiêu	Đơn vị tính	Mức cộng bố	Phương pháp
1	Hàm lượng chất hòa tan	% chất khô	≥ 20	TCVN 5610 - 91
2	Hàm lượng chất xơ	% chất khô	≤ 8	TCVN 5103-90
3	Hàm lượng tro tổng số	% chất khô	≤ 30	TK. TCVN 7038 - 2002
4	Hàm lượng tro không tan trong HCL	% chất khô	≤ 6	TK. TCVN 5484 - 2002
5	Độ ẩm	% khối lượng	≤ 8	ĐDVN III

1.4/- Các chỉ tiêu vi sinh :

STT	Tên chỉ tiêu	Đơn vị tính	Mức tối đa	Phương pháp
1	TSVKHK	kl/g	10 ⁴	PP.3 QTTN/140-91
2	Coliforms	kl/g	10	PP.3 QTTN/140-91
3	E. Coli	kl/g	0	PP.3 QTTN/140-91
4	Cl. perfringens	kl/g	0	PP.3 QTTN/140-91
5	Streptococcus faecalis	kl/g	0	PP.3 QTTN/140-91
6	Staphylococcus aureus	kl/g	0	PP.3 QTTN/140-91
7	TSB TNM	kl/g	10 ²	PP.3 QTTN/140-91

SAO Y BẢN CHÍNH

Ngày... tháng... năm 2004

TỔNG CÔNG TY
DƯỢC VIỆT NAM

5/- Hàm lượng kim loại nặng :

TT	Tên chỉ tiêu	Đơn vị tính	Mức tối đa	Phương pháp
1	Asen	ppm	1	TK. AOAC 936-15
2	Chì	ppm	5	TK. AOAC 985 - 01
3	Đồng	ppm	20	TK. AOAC 985-01
4	Thiếc	ppm	40	TK. AOAC 985-01
5	Kẽm	ppm	40	TK. AOAC 985-01
6	Thủy ngân	ppm	2	TK. AOAC 971-21
7	Cadimi	ppm	1	TK. AOAC 985-01
8	Antimon	ppm	1	TK. AOAC 986-15

- Độ tan rã, độ đồng đều khối lượng :

TT	Tên chỉ tiêu	Đơn vị tính	Mức tối đa	Phương pháp
1	Độ tan rã	Phút	30	ĐDVN III
2	Độ đồng đều khối lượng	mg	$\pm 7.5\%$	ĐDVN III

NGUYÊN LIỆU VÀ PHỤ GIA THỰC PHẨM

CHỨC NĂNG	TÊN NGUYÊN LIỆU
Nguyên liệu chính	Bạch tật lê, Dâm dương hoắc, Rễ đinh lăng.
Chất phụ gia	Magnesi stearat, Magnesi cacbonat

THỜI HẠN SỬ DỤNG

02 năm kể từ ngày sản xuất. Ngày sản xuất và hạn sử dụng ghi ở trên hộp.

TÁC DỤNG - HƯỚNG DẪN SỬ DỤNG - BẢO QUẢN - VẬN CHUYỂN

1-Tác dụng :

- Sản phẩm viên nang UPHATON 500 mg có tác dụng :

Là thực phẩm dinh dưỡng, chống suy nhược cơ thể, tăng sức đề kháng, tăng cường thể lực cho vận động viên thể thao, chống lão hoá, tăng cường khả năng lao động trí óc và chân tay.

Không dùng cho trẻ em dưới 16 tuổi.

2-Liều dùng :

1-2 viên lần, ngày 3 lần, hoặc theo chỉ định của bác sĩ.

3 Bảo quản :

Kho chứa thực phẩm dinh dưỡng và các kho trung chuyển phải cao ráo sạch sẽ. Thực phẩm dinh dưỡng được xếp riêng từng loại và không để lẫn với các hàng hóa khác.

4 Phương tiện vận chuyển :

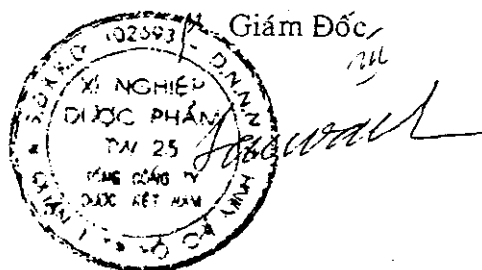
Phải sạch sẽ, che được mưa, nắng, đảm bảo thực phẩm dinh dưỡng tuyệt đối không có mùi lạ. Khi bốc dỡ phải nhẹ nhàng không để hộp thực phẩm bị biến dạng.

V. GHI NHÃN VÀ BAO GÓI

1. Ghi nhãn :

- Có nhãn bằng tiếng Việt tuân thủ quy chế hàng hóa lưu thông trong nước và hàng hóa xuất khẩu, nhập khẩu ban hành theo quyết định số 178/1999/QĐ-TTg ngày 30/8/1999 của Thủ tướng Chính phủ và thông tư số 15/2000/BYT-TT ngày 30/6/2000 của Bộ Y tế.
- Trên nhãn có ghi :
 - + Tên sản phẩm. Tên cơ sở sản xuất.
 - + Địa chỉ cơ sở sản xuất. Thành phần.
 - + Số lượng. Hướng dẫn sử dụng.
 - + Số ĐKCL. Sản xuất theo TCCS.
 - + Ngày sản xuất. Thời hạn sử dụng
- 2. **Bao gói :**
 - chai 60 viên
 - 4 vỉ x 15 viên

TP. Hồ Chí Minh ngày 29 tháng 11 năm 2003



DS. Lâm Bạch vân

TỔNG CÔNG TY DƯỢC VIỆT NAM
XÍ NGHIỆP DƯỢC PHẨM TW 25
Phòng Kiểm Nghiệm - GLP -

CỘNG HÒA XÃ HỘI CHỦ NGHĨA VIỆT NAM
Độc Lập-Tự Do-Hạnh Phúc.

Klg: Ca giao

PHIẾU KIỂM NGHIỆM

Số 037/2002 /NC

-Tên mẫu thử : Viên nang UPHATON
-Đặc điểm : Viên 15 viên
-Nơi gửi : Phòng NC
-Yêu cầu thử : KTCL
-Tiêu chuẩn áp dụng : 08-Z₂₅- 34 - 02

Số sản xuất : 010602
Ngày nhận : 15.06.2002
Ngày làm : 15.06.2002
Từ thùng số: đến
Hạn dùng : 06/2004

YÊU CẦU (TIÊU CHUẨN)	KẾT QUẢ
I.- Tính chất : Viên nang hai đầu màu đỏ' nâu, bên trong chứa bột màu xanh xám, bột có mùi thơm. -Độ đồng đều khối lượng : Khối lượng trung bình : Khối lượng từng viên : $\pm 7,5\%$ so với KLTB Độ tan rã : Không quá 30 phút II.- Định tính : Bạch tạt lê Dâm dương hoắc Rễ Đinh lăng III.-Độ nhiễm khuẩn : Theo yêu cầu qui định	Đạt 566,1 mg $\pm 2\%$ 20 phút Đúng Đúng Đúng Đạt
NHẬN XÉT : ĐẠT YÊU CẦU	
KẾT LUẬN : THUỐC ĐẠT TIÊU CHUẨN	

TP.KIỂM NGHIỆM

Nguyễn Bích Vân

Ch.N. Nguyễn Bích Vân

Ngày 21 tháng 06 năm 2002

KT.Giám Đốc

Rhế.Giám Đốc



Đã kiểm tra Bạch Vân

Ký. Cơ Giao - Trung Tâm KHTN và CNQG

TIÊU CHUẨN CƠ SỞ

Tổng công ty dược Việt Nam Xí Nghiệp Dược Phẩm TW 25	Viên nang UPHATON	08-Z ₂₅ - 34- 02 Có hiệu lực từ 23/06/2002 .

1.- YÊU CẦU KỸ THUẬT :**1.1.- Công thức điều chế cho 1 viên :**

Bạch tật lê	Ba nghìn năm trăm miligam <i>Tương ứng 350mg dịch chiết</i>	3500mg
Dâm dương hoắc	Tám trăm miligam <i>Tương ứng 80mg dịch chiết</i>	800mg
Rễ Đinh lăng	Bảy trăm miligam <i>Tương ứng 70mg dịch chiết</i>	700mg
Magnesi carbonat	Sáu mươi miligam	60mg
Magnesi stearat	Mười miligam	10mg

1.2.- Nguyên liệu :

Bạch tật lê (<i>Tribulus Terrestris</i> L)	Đạt TCCS.
Dâm dương hoắc (<i>Herba Epimedii</i>)	Đạt ĐĐVN III
Rễ Đinh lăng (<i>Radix Polysciacis</i>)	Đạt ĐĐVN I, tập 2
Magnesi carbonat	Đạt ĐĐVN III
Magnesi stearat	Đạt ĐĐVN III

1.3.- Chất lượng thành phẩm :

1.3.1.- Tính chất : Viên nang hai đầu màu đỏ nâu, bên trong chứa bột màu xanh xám, bột có mùi thơm.

1.3.2.- Độ đồng đều khối lượng : $\pm 7,5\%$ so với khối lượng trung bình của bột thuốc chứa trong nang.

1.3.3.- Độ tan rã: Không quá 30 phút.

1.3.4.- Mất khối lượng do sấy khô : Không quá 9%.

1.3.5.- Định tính : Bạch tật lê, Dâm dương hoắc, Đinh lăng.

1.3.6.- Độ nhiễm khuẩn :

-Tổng số vi khuẩn hiếu khí sống lại được không quá 50.000 CFU/gam

-Tổng số nấm mốc, nấm men không quá 500 CFU/gam .

-Không được có *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella* và *Escherichia coli*.

2.- PHƯƠNG PHÁP THỬ :

2.1.- Tính chất : Bằng cảm quan, chế phẩm phải đạt các yêu cầu đã nêu.

2.2.- Độ đồng đều khối lượng: } Thử theo chuyên luận của "viên nang"

2.3.- Độ tan rã: } ĐĐVN III

2.4.- Mất khối lượng do sấy khô :

Lấy chính xác khoảng 1g chế phẩm; tiến hành theo phụ lục 5.16, ĐĐVN III (Xác định mất khối lượng do làm khô). Sấy ở 100°C trong 4 giờ.

2.5.- Định tính :

2.5.1.- Bạch tật lê

- Dung dịch mẫu thử : Lấy một lượng bột thuốc tương ứng với 4 viên, thêm 30ml ethanol 96° và 10ml dung dịch kali hydroxyd 10% trong ethanol 96°, đun hồi lưu cách thủy trong 2 giờ. Để nguội, lọc qua bông. Trung hòa dịch lọc với acid acetic 25% đến pH = 7 - 8. Bốc hơi dịch lọc trên cách thủy đến khô. Chiết cân bằng cloroform 2 lần mỗi lần 15ml. Tập trung các dịch chiết cloroform lọc qua giấy lọc và cô trên cách thủy đến cạn. Cẩn thu được chiết lại bằng ethanol tuyệt đối 3 lần mỗi lần 3ml. Lọc dịch chiết qua giấy lọc, bốc hơi dịch lọc trên cách thủy đến cạn. Thêm vào cặn 1ml ethanol tuyệt đối để chấm sắc ký.

- Dung dịch mẫu đối chiếu : Lấy 15g bột Bạch tật lê thô. Tiến hành tương tự giống mẫu thử, bắt đầu từ "thêm 30ml ethanol 96° và 10ml dung dịch kali hydroxyd 10% trong ethanol 96° ... để chấm sắc ký".

Trên bản mỏng Silicagel G, đã được hoạt hóa ở 100 - 105°C trong 1 giờ, chấm riêng rẽ 10µl các dung dịch mẫu thử và mẫu đối chiếu tại hai điểm A và B. Tiến hành sắc ký lớp mỏng theo ĐĐVN III - phụ lục 4.4, với hệ dung môi: Cloroform - methanol (95:5). Sau khi triển khai được khoảng 13 - 14cm, lấy bản mỏng ra, để khô ở nhiệt độ phòng, hơi hơi Iod bão hòa đến khi hiện rõ vết.

Kết quả : Mẫu thử phải có các vết cùng màu sắc và cùng Rf với các vết của mẫu đối chiếu.

2.5.2.- Dâm dương hoắc :

- Dung dịch mẫu thử : Lấy một lượng bột thuốc tương ứng với 3 viên, thêm 20ml ethanol, ngâm nóng trong 30 phút, lọc, cô cách thủy dịch lọc đến khô. Hòa tan cặn trong 1ml methanol để chấm sắc ký.

- Dung dịch mẫu đối chiếu : Lấy 2g bột Dâm dương hoắc. Tiến hành như mẫu thử bắt đầu từ "thêm 20ml ethanol ... chấm sắc ký".

Trên bản mỏng Silicagel HF 254 có độ dày 0,25mm, đã được hoạt hóa ở 100° - 105°C trong 1 giờ, chấm riêng rẽ 10µl các dung dịch mẫu thử và mẫu đối chiếu tại hai điểm A và B. Tiến hành sắc ký lớp mỏng theo ĐĐVN III - phụ lục 4.4 với hệ dung môi: Ethyl acetat - butanol - acid formic - nước (10 : 1 : 1 : 1). Sau khi triển khai được khoảng 13 - 14cm, lấy bản mỏng ra, để khô ở nhiệt độ phòng. Phun thuốc thử nhôm clorid 10% trong ethanol.

TIÊU CHUẨN CƠ SỞ

Tổng Công Ty Dược Việt Nam XÍ NGHIỆP DƯỢC PHẨM TW.25	Viên nang TRIBELUS	08 - Z ₂₅ - 156 - 99
		Có hiệu lực từ

Ban hành theo quyết định ban hành số 156 - 99/ XNDPTW.25/TC

Viên nang Tribelus là viên nang cứng có chứa 250^{mg} Cao đặc Tật Lê Herba Tribulus Terrestris.

1.- Yêu cầu kỹ thuật:

1.1.- Công thức pha chế:

- Cao đặc Tật Lê	Hai trăm năm mươi miligam	250 ^{mg}
- Lactose	] vừa đủ	1 nang
- Tinh bột sắn		
- Magnesi Stearat		
- Nang rỗng số "O" - xanh lá - không màu		

1.2.- Nguyên liệu:

- Cao đặc Tật Lê đạt tiêu chuẩn cơ sở
- Lactose đạt tiêu chuẩn BP.93
- Tinh bột sắn đạt tiêu chuẩn ĐDVN
- Magnesi Stearat đạt tiêu chuẩn ĐDVN

1.3.- Yêu cầu chất lượng:

1.3.1- Tính chất:

Viên nang cứng số O, một đầu trong suốt, một đầu xanh lá, hai nửa nang lỏng khít vào nhau, không xước rách hoặc bẹp đầu, trong chứa bột thuốc màu trắng đục.

1.3.2- Độ đồng đều khối lượng: Khối lượng trung bình bột thuốc trong nang $\pm 7,5\%$

1.3.3- Độ tan rã: Không quá 30 phút

1.3.4- Giảm khối lượng do sấy khô: Không quá 8%

1.3.5- Định tính: Phải có sự hiện diện của Tật Lê.

1.3.6- Giới hạn vi khuẩn:

- Tổng số vi khuẩn hiếu khí sống lại được không quá 50.000/ gam.
- Tổng số nấm mốc, nấm men không quá 500/ gam.
- Không được có Staphylococcus aureus, Pseudomonas aeruginosa, Salmonella typhi và Escherichia Coli.

2.- Phương pháp thử:

2.1- Tính chất: Bằng cảm quan chế phẩm phải đạt các yêu cầu nêu trên.

2.2- Độ đồng đều khối lượng] Thử theo chuyên luận "Thuốc nang"

2.3- Độ tan rã:] ĐDVN II tập 3.

2.4- Giảm khối lượng do sấy khô:

Cân 1g chế phẩm sấy ở áp suất thường nhiệt độ 70°C tới khối lượng không đổi.

2.5- Định tính:

2.5.1- Thuốc thử:

- Bân mỏng Silicagel G 7 x 20^{cm} hoạt hóa ở 100 - 105°C/ 1 giờ
- Ethanol 96°

SAO Y BAN CHINH

Ngày.....tháng.....năm 200.....

TW 25

- Acid acetic 25% (TT)
- Cloroform (TT)
- Ethanol tuyệt đối (TT)
- Dung dịch Kali hydroxyd 10% trong Ethanol 96°
- Cao Tật lệ
- Dung môi triển khai: Cloroform - Methanol, tỉ lệ (95: 5)

2.5.2- Tiến hành:

- Dung dịch mẫu thử:

Lấy bột thuốc của 5 nang, thêm 30^{ml} Ethanol 96° và 10^{ml} dung dịch Kali hydroxyd 10% trong ethanol 96°, đun hồi lưu cách thủy trong 2 giờ. Để nguội, lọc qua bông. Trung hòa dịch lọc với acid acetic 25% đến pH = 7 - 8. Bốc hơi dịch lọc trên cách thủy tới khô. Chiết cạn bằng Cloroform 2 lần mỗi lần 15^{ml}. Tập trung các dịch chiết lọc qua giấy lọc và cô trên cách thủy tới cạn. Cẩn thu được chiết lại bằng Ethanol tuyệt đối 3 lần mỗi lần 3^{ml}. Lọc dịch chiết qua giấy lọc. Bốc hơi dịch lọc trên cách thủy tới cạn. Thêm vào cặn 1^{ml} Ethanol tuyệt đối để hòa tan, gạn phần trong để chấm sắc ký.

- Dung dịch mẫu đối chiếu:

Lấy 1g Cao đặc Tật lệ tiến hành tương tự như đối với dung dịch mẫu thử, bắt đầu từ "thêm 30^{ml} Ethanol 96° và 10^{ml} Kali hydroxyd 10% trong Ethanol 96° ..."

Chấm 5 μ l dung dịch mẫu thử và 5 μ l dung dịch mẫu đối chiếu lên bản mỏng. Triển khai sắc ký trong hệ dung môi Cloroform - Methanol tỉ lệ (95: 5). Cho dung môi chạy khoảng 15^{cm}, lấy bản mỏng ra để khô ở nhiệt độ phòng. Hơ hơi Iod đến khi hiện rõ vết. Mẫu thử phải cho vết cùng màu và R_f với mẫu đối chiếu.

2.6- Giới hạn vi khuẩn: Thử theo phụ lục 8.3 - ĐDVN II tập 3.

3- Đóng gói - Bảo quản - Hạn dùng:

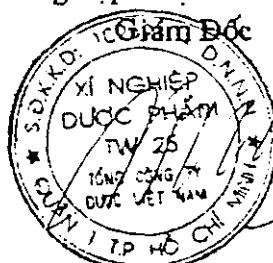
- Đóng chai 60 viên hoặc ép vỉ nhôm, mỗi vỉ 10 viên.
- Nhãn đúng qui chế
- Bảo quản: Nơi khô mát
- Hạn dùng: 24 tháng

TP. HCM ngày 29 tháng 01 năm 1999

Xí Nghiệp Dược Phẩm TW25

Người viết TC

Trưởng Phòng KCS



DS. Bùi Thị Ninh

DS. Bùi Thị Ninh

DS. Nguyễn Kim Dung

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Dược điển Việt Nam II tập 3
- Những cây thuốc và vị thuốc Việt Nam của GS. Đỗ Tất Lợi
- Từ điển cây thuốc Việt Nam của PTS. Võ Văn Chi

BỘ Y TẾ
CỤC QUẢN LÝ DƯỢC VIỆT NAM
Số: 22 /2001/QĐ-QLD

CỘNG HÒA XÃ HỘI CHỦ NGHĨA VIỆT NAM
Độc lập - Tự do - Hạnh phúc
-----T250
Hà Nội, ngày 1 tháng 6 năm 2001

**QUYẾT ĐỊNH CỦA CỤC TRƯỞNG
CỤC QUẢN LÝ DƯỢC VIỆT NAM**
Về việc cho phép sản xuất và lưu hành thuốc trong nước

**CỤC TRƯỞNG
CỤC QUẢN LÝ DƯỢC VIỆT NAM**

- Căn cứ Quyết định số 547/TTg, ngày 13/8/1996 của Thủ tướng Chính phủ về việc thành lập Cục Quản lý Dược Việt Nam trực thuộc Bộ Y tế;
- Căn cứ quyết định số 1593/BYT-QĐ, ngày 23/9/1996 của Bộ trưởng Bộ Y tế quy định về tổ chức bộ máy của Cục Quản lý Dược Việt Nam;
- Căn cứ Quyết định 1203/BYT-QĐ, ngày 11/7/1996 của Bộ trưởng Bộ Y tế ban hành Quy chế đăng ký thuốc;
- Theo đề nghị của Hội đồng xét duyệt thuốc Bộ Y tế họp ngày 16/5/2001.

QUYẾT ĐỊNH

Điều 1: Công bố đợt 67 các loại thuốc được lưu hành trên thị trường cả nước gồm 370 (Ba trăm bảy mươi) tên thuốc (có danh mục kèm theo).

Điều 2: Các đơn vị có thuốc được lưu hành trong cả nước phải in số đăng ký đã được cấp lên nhãn và phải chấp hành đúng các quy chế có liên quan tới việc sản xuất và lưu hành thuốc. Các số đăng ký có ký hiệu: VNA, VNB, VND có giá trị 05 năm kể từ ngày cấp. Các số đăng ký có ký hiệu: NC-H06-02 có giá trị 01 năm kể từ ngày cấp. Các số đăng ký có ký hiệu: NC-H06-04 có giá trị 03 năm kể từ ngày cấp. Các số đăng ký có ký hiệu H01 có giá trị đến 31/12/2001. Các số đăng ký có ký hiệu H02 có giá trị đến 31/12/2002. Các số đăng ký có ký hiệu V-H06-02 có giá trị 01 năm kể từ ngày cấp.

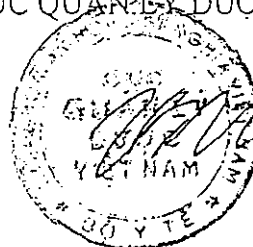
Điều 3: Quyết định này có hiệu lực kể từ ngày ký.

Điều 4: Giám đốc Sở Y tế các tỉnh, thành phố và thủ trưởng các đơn vị có thuốc được lưu hành chịu trách nhiệm thi hành quyết định này.

Nơi nhận:

- Thanh tra Bộ Y tế,
- Viện KN, Phân viện KN,
- Tổng công ty Dược Việt Nam,
- Sở Y tế các tỉnh, thành phố,
- Các đơn vị có thuốc được lưu hành,
- Cục Quản y- Bộ Quốc phòng,
- Cục Y tế - Bộ Công an,
- Sở Y tế - Bộ GTVT,
- Vụ Pháp chế - Bộ Y tế,
- Vụ Điều trị - Bộ Y tế,
- Vụ Y học cổ truyền - Bộ Y tế,
- Các bệnh viện, viện có giường bệnh trực thuộc Bộ Y tế,
- Lưu Cục QLD (2 bản).

**CỤC TRƯỞNG
CỤC QUẢN LÝ DƯỢC VIỆT NAM**



TS. Nguyễn Vi Ninh

SAO Y BẢN CHÍNH

Ngày... tháng... năm 2001

ĐS. Lâm. Rach. G.

STT	Tên thuốc, hàm lượng	Quy cách đóng gói	Tiêu chuẩn	Tuổi thọ	Số đăng ký
313	Linh chi - tam thất (Cao linh chi, Bột tam thất)	Hộp 1 chai 100 viên nang	TC	24	VNA-4220-01
314	Metronidazole 500mg (Metronidazol)	Chai 100ml dịch truyền	TC	36	VNA-4221-01
315	Nystatin 500 000 IU (Nystatin)-Đăng ký lại	Hộp 2 vỉ x 8 viên nén bao đường	TC	36	VNA-4222-01
316	Ofloxacin 200mg (Ofloxacin)-Đăng ký lại	Hộp 1 vỉ x 10 viên; Hộp 10 vỉ x 10 viên nén bao phim	TC	36	VNA-4223-01
317	Paracetamol 500mg (Paracetamol)-Đăng ký lại	Hộp 10 vỉ x 10 viên; Hộp 10 vỉ x 20 viên nén	D ĐVN	36	VNA-4224-01
318	Rodilar (Dextromethorphan)-Đăng ký lại	Hộp 10 vỉ x 10 viên nén bao đường	TC	24	VNA-4225-01

90 Xí nghiệp dược phẩm trung ương 25

120 - Hai Bà Trưng - Quận 1- TP. Hồ Chí Minh

319	Paracetamol 500mg (Paracetamol)-Đăng ký lại	Hộp 10 vỉ x 10 viên nén	TC	36	VNA-4226-01
320	Rhinex - 0,05% (Naphazolin)-Đăng ký lại	Hộp 1 lọ x 15ml thuốc nhỏ mũi	TC	24	VNA-4227-01
321	Rượu Quina G (Vò Canh ki na vàng)-Đăng ký lại	Hộp 1 chai x 350ml rượu thuốc	TC	24	VNA-4228-01
322	Sâm long nhãn (Nhân sâm, Đảng sâm, Đương quy, Hoàng kỳ, Bạch truật, Long nhãn, Năm linh chi)	Hộp 2 vỉ x 15 viên; Hộp 1 chai x 30, 60 viên bao đường	TC	24	VNA-4229-01
323	Seroga (Tâm sen, Táo nhân, Thiên ma, Củ bình vôi)	Hộp 2 vỉ x 10 viên; Hộp 50, 100 viên bao đường	TC	24	VNA-4230-01
324	Tribelus (Bạch tật lê)	Hộp 4 vỉ x 15 viên; Hộp 1 chai x 30, 60 viên nang	TC	24	VNA-4231-01

TỔNG CÔNG TY DƯỢC VIỆT NAM - BỘ Y TẾ	TIÊU CHUẨN CƠ SỞ	Số TC : 11-03 KNOPTW25
XÍ NGHIỆP DƯỢC PHẨM TW25 120 Hai Bà Trưng - Q.1 - TP.HCM	VIÊN NANG TIỀN DUNG 500mg	Có hiệu lực từ : 29 / 11 / 2003

(Ban hành kèm theo quyết định số 13-03/CBTC/XNEPTW25 của Giám đốc Xí nghiệp Dược phẩm TW 25). Tiêu chuẩn này áp dụng cho sản phẩm viên nang TIỀN DUNG 500mg. Là thực phẩm bổ dưỡng, chống lão hoá ở nữ giới, làm da dễ tươi trẻ mịn màng, tăng sức đề kháng, tăng khả năng miễn dịch cho cơ thể, tăng sinh lực cho nữ giới.

Không dùng cho trẻ em dưới 16 tuổi.

I. YÊU CẦU KỸ THUẬT:

1.1/- Chỉ tiêu cảm quan :

Mẫu dạng viên nang số 0, hai đầu xanh lá đậm, trong chứa bột màu ngà vàng, hơi mùi đặc trưng của dược liệu.

1.2 / - Định tính.

STT	Tên chỉ tiêu	Phương pháp
01	Phải có sự hiện diện của Nhân trần, Đường qui, Tam thất Bạch tật lệ.	DEVN III

1.3 /- Các chỉ tiêu lý hóa :

TT	Tên chỉ tiêu	Đơn vị tính	Mức cộng bố	Phương pháp
1	Hàm lượng chất hòa tan	% chất khô	≥ 70	TCVN 5613-91
2	Hàm lượng chất xơ	% chất khô	≤ 4	TCVN 5103-90
3	Hàm lượng tro tổng số	% chất khô	≤ 10	TK TCVN 7038 - 2002
4	Hàm lượng tro không tan trong HCL	% chất khô	≤ 2	TK TCVN 5484 - 2002
5	Độ ẩm	% khối lượng	≤ 8	DEVN III

1.4/- Các chỉ tiêu vi sinh :

TT	Tên chỉ tiêu	Đơn vị tính	Mức tối đa	Phương pháp
1	TSVKHK	kl/g	10^4	PP.3 QTTN/140-91
2	Coliforms	kl/g	10	PP.3 QTTN/140-91
3	E. Coli	kl/g	0	PP.3 QTTN/140-91
4	Cl. perfringens	kl/g	0	PP.3 QTTN/140-91
5	Streptococcus faecalis	kl/g	0	PP.3 QTTN/140-91
6	Staphylococcus aureus	kl/g	0	PP.3 QTTN/140-91
7	TSBTNM-M	kl/g	10^2	PP.3 QTTN/140-91

1.5/- Hàm lượng kim loại nặng :

SAO Y BẢN CHÍNH
Ngày... tháng... năm 200..

1.5/- Hàm lượng kim loại nặng :

TT	Tên chỉ tiêu	Đơn vị tính	Mức tối đa	Phương pháp
1	Asen	ppm		TK. AOAC 986- 15
2	Chì	ppm	5	TK. AOAC 986 - 15
3	Đồng	ppm	20	TK. AOAC 985-01
4	Thiếc	ppm	40	TK. AOAC 985-01
5	Kẽm	ppm	40	TK. AOAC 985-01
6	Thủy ngân	ppm	2	TK. AOAC 971-21
7	Cadimi	ppm	1	TK. AOAC 985-01
8	Antimon	ppm		TK. AOAC 986-15

1.6/- Độ tan rã, độ đồng đều khối lượng :

TT	Tên chỉ tiêu	Đơn vị tính	Mức tối đa	Phương pháp
1	Độ tan rã	Phút	30	ĐENVN III
2	Độ đồng đều khối lượng	mg	$\pm 7.5\%$	ĐENVN III

II.. NGUYÊN LIỆU VÀ PHỤ GIA THỰC PHẨM

CHỨC NĂNG	TÊN NGUYÊN LIỆU
Nguyên liệu chính	Nhân trần , đường qui , tam thất , bạch tật lê
Chất phụ gia	Magnesi stearat , Magnesi cacborat

III. THỜI HẠN SỬ DỤNG

02 năm kể từ ngày sản xuất. Ngày sản xuất và hạn sử dụng ghi ở trên hộp.

IV. TÁC DỤNG - HƯỚNG DẪN SỬ DỤNG - BẢO QUẢN - VẬN CHUYỂN

1-Tác dụng :

- Sản phẩm viên nang TIỀN DUNG 500 mg có tác dụng :

Là thực phẩm bổ dưỡng chống lão hóa ở nữ giới, làm da trẻ tươi trẻ mịn màng, tăng sức đề kháng, tăng khả năng miễn dịch cho cơ thể, tăng sinh lực cho nữ giới.

Không dùng cho trẻ em dưới 16 tuổi

2-Liều dùng :

1-2 viên lần, ngày 3 lần, hoặc theo chỉ định của bác sĩ.

3 Bảo quản :

Kho chứa thực phẩm dinh dưỡng và các kho trung chuyển phải cao ráo sạch sẽ. Thực phẩm dinh dưỡng được xếp riêng từng loại và không để lẫn với các hàng hóa khác.

4 Phương tiện vận chuyển :

Phải sạch sẽ, che được mưa, nắng, đảm bảo thực phẩm dinh dưỡng tuyệt đối không có mùi lạ. Khi bốc dỡ phải nhẹ nhàng không để hộp thực phẩm bị biến dạng.

V. GHI NHÃN VÀ BAO GÓI

1. Ghi nhãn :

- Có nhãn bằng tiếng Việt tuân thủ quy chế hàng hóa lưu thông trong nước và hàng hóa xuất khẩu, nhập khẩu ban hành theo quyết định số 173/1999/QĐ-TTg ngày

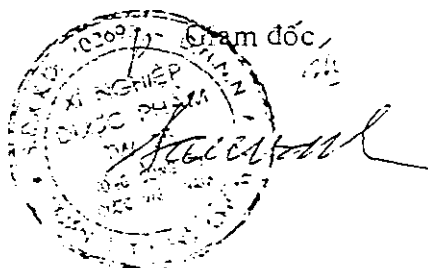
30/8/1999 của Thủ tướng Chính phủ và thông tư số 15/2000, BYT-TT ngày 30/6/2000 của Bộ Y tế.

- Trên nhãn có ghi :
 - + Tên sản phẩm. Tên cơ sở sản xuất.
 - + Địa chỉ cơ sở sản xuất. Thành phần.
 - + Số lượng. Hướng dẫn sử dụng.
 - + Số ĐKCL. Sản xuất theo TCCS.
 - + Ngày sản xuất. Thời hạn sử dụng

2. Bao gói :

- Sản phẩm viên nang **TIÊN DUNG** 500 mg, đóng trong chai nhựa 60 viên mỗi chai đóng trong một hộp giấy.

TP. Hồ Chí Minh ngày 29 tháng 11 năm 2003



DS. Lâm Bạch Tân

BỘ Y TẾ
CỤC QUẢN LÝ CHẤT LƯỢNG
VỆ SINH AN TOÀN THỰC PHẨM

CỘNG HOÀ XÃ HỘI CHỦ NGHĨA VIỆT NAM
Độc lập - Tự do - Hạnh phúc

PHIẾU TIẾP NHẬN

HỒ SƠ CÔNG BỐ TIÊU CHUẨN CHẤT LƯỢNG, VỆ SINH, AN TOÀN THỰC PHẨM
4762/2003/CBTC-YT

Cục Quản lý chất lượng vệ sinh an toàn thực phẩm đã tiếp nhận:

Bản công bố tiêu chuẩn chất lượng thực phẩm số: 13-03/CBTC/XNDPTW25

Cho sản phẩm: Viên nang Tiên Dung (TCCS: 13-03/XNDPTW25)

Của doanh nghiệp: Xí nghiệp Dược phẩm Trung ương 25

Địa chỉ: 120 Hai Bà Trưng, Quận 1, TP. Hồ Chí Minh

Tel: 08 8223049

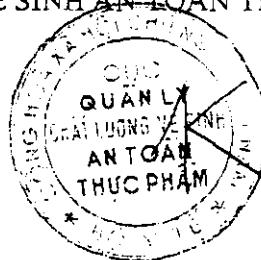
Fax: 08 8295691

E-mail:

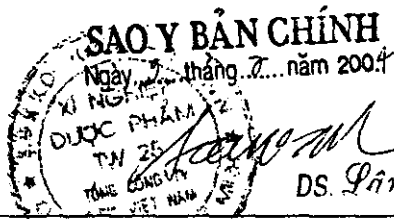
Xác nhận việc công bố trên được thực hiện theo đúng quy định hiện hành.

Hà Nội, ngày 28 tháng 4 năm 2003

CỤC TRƯỞNG
CỤC QUẢN LÝ CHẤT LƯỢNG
VỆ SINH AN TOÀN THỰC PHẨM



Phan Thị Kim



DS. Lâm Bạch Tân

**SỞ Y TẾ TP HỒ CHÍ MINH
BỆNH VIỆN Y HỌC CỔ TRUYỀN**

**KHẢO SÁT TÁC DỤNG DƯỠNG DA CHỐNG LÃO HOÁ
TĂNG SINH LỰC CỦA CHẾ PHẨM**

TIỀN DUNG

DO XÍ NGHIỆP DƯỢC PHẨM TW 25 SẢN XUẤT

**CHỈ ĐẠO ĐỀ TÀI: BS . PHẠM KHÁNH BIÊN
THỰC HIỆN: BS .HUỖNH THỊ KIM OANH**

SAO Y BẢN CHÍNH
ngày... tháng... năm 2004

[Signature]

20 Năm Bạch Tuyền

I /. ĐẶT VẤN ĐỀ :

Phụ nữ chúng ta ai cũng muốn có làn da đẹp, tươi trẻ, sáng sủa, mịn màng.

Nếu có sức khỏe, có sinh lực, ăn ngủ được làn da cũng khỏe mạnh, tươi tắn và trẻ trung. Da khô, nhăn nheo do quá trình lão hóa tế bào da, cũng có thể ít uống nước, thiếu sinh tố cũng làm da khô kém mịn màng. Người ta thấy phổ biến nhất là Vitamin A tức Retinol, có trong các loại rau trái màu xanh, vàng, dầu cá, trứng. Có chức năng chống oxy hóa tế bào.

Khi bị lão hoá da thì mặt da xuất hiện đốm nâu, tàn nhang, nếp nhăn, tăng sừng do ánh sáng, sần nám, mất sự hồng hào. Có những yếu tố gây lão hóa da như :

A/- NHỮNG YẾU TỐ GÂY LÃO HÓA NỘI SINH :

Do gen di truyền, trọng lực, thay đổi nội tiết, có thai , bệnh lý khác như tuyến giáp, sinh dục thần kinh, teo bì và hạ bì, những yếu tố này gây ra : giảm hệ mạch máu ở da, da teo mỏng, số lượng tế bào ở bì giảm, giảm sợi đàn hồi, giảm chức năng đàn hồi cơ học, nám.

B/- NHỮNG YẾU TỐ GÂY LÃO HÓA NGOẠI SINH :

Ảnh hưởng bên ngoài như gió bụi, hóa chất, tia cực tím. Trong đó phơi nắng sẽ gây lão hóa rất nhanh.

Những yếu tố này gây rối loạn sự phát triển bình thường của thượng bì, làm da khô, nám, tăng sừng. Tăng tạo melanocyte gây đốm nâu da, tăng sắc tố. Mất sợi collagen làm giảm độ căng và độ đàn hồi, tạo nếp nhăn, giảm hệ mạch máu và collagen nâng đỡ da, gây xuất huyết, u mạch ở người già, rối loạn hệ mạch ở da và mô dưới da, làm mất màu sắc hồng hào, da ngả màu vàng.

Phụ nữ độ tuổi từ 35 trở lên thường thấy có những vết nám trên mặt, nếp nhăn da có thể là nỗi lo lắng của nhiều phụ nữ .

Hiện nay cũng đã có nhiều công trình nghiên cứu ra các loại cream như Retin A, Vitamin E kết hợp chất giữ ẩm bôi da có tác dụng làm mỏng thượng bì, giảm tạo melanin, tăng tế bào Langerhan điều trị lão hóa da do ánh sáng. Cải thiện nếp nhăn, giảm nám, cải thiện tăng sừng do ánh sáng, lột màu đốm nâu, tàn nhang. Nhưng có nhiều tác dụng phụ như khô da, tăng nhạy cảm ánh sáng, đỏ da, ngứa. Người ta cũng sử dụng tia Laser, điều trị các tổn thương sắc tố như tàn nhang, dát cà phê sữa, nhăn da, dẫn mạch da và rối loạn sắc tố ... nhưng kỹ thuật khá phức tạp.

Cũng có một số thuốc tân dược sử dụng trên thị trường chữa sạm da như L-cystine... nhưng có tác dụng phụ như buồn nôn, tiêu chảy, khát nước, đau bụng.

Viên nang **TIÊN DUNG** của Xí nghiệp Dược phẩm Trung ương 25 sản xuất liệu có đem lại hiệu quả dưỡng da hay không, có bị tác dụng phụ hay không, là điều chúng tôi quan tâm nghiên cứu.

IV/- MỤC TIÊU NGHIÊN CỨU :

A.- MỤC TIÊU TỔNG QUÁT.

Khảo sát tác dụng dưỡng da làm đẹp da mặt và tăng sinh lực của chế phẩm Tiên Dung .

B. MỤC TIÊU CHUYÊN BIỆT.

- Khảo sát tác dụng dưỡng da làm đẹp da mặt, tăng sinh lực của chế phẩm Tiên Dung .
- Ghi nhận tác dụng ngoại ý của chế phẩm Tiên Dung .

III/- PHƯƠNG TIỆN VÀ PHƯƠNG PHÁP :

A.PHƯƠNG TIỆN :

Giới thiệu chế phẩm Tiên Dung.

a. ĐẶC ĐIỂM THÀNH PHẨM :

Viên nang 2 đầu màu xanh lá đậm số 0 trong chứa bột màu vàng nhạt bột có mùi thơm dược liệu, trọng lượng trình bày viên 500 mg.

★ Mỗi viên chứa :

• Nhân trần	1000mg tương ứng cao Nhân trần	100mg
• Đương qui	1000mg tương ứng cao Đương qui	100mg
• Cát căn	1000mg tương ứng cao Cát căn	100mg
• Tam thất	500mg tương ứng cao Tam thất	50mg
• Bạch tật lê	500mg tương ứng cao Bạch tật lê	50mg
• Câu kỷ tử	500mg tương ứng cao Câu kỷ tử	50mg
• Magnesi Cacbonat		45mg
• Magnesi Stearat		5mg

Viên thành phẩm phải đạt tiêu chuẩn cơ sở .

- **Chỉ định** : Chống lão hoá ở nữ giới, làm da dễ tươi trẻ mịn màng, tăng sinh lực.
 - **Chống chỉ định** : Không dùng cho trẻ em dưới 16 tuổi.
 - **Liều dùng** : Ngày uống 3 lần, mỗi lần 1-2 viên, hoặc theo chỉ định Bác sĩ.
 - **Bảo quản** : Nơi khô mát, tránh ánh sáng.
 - **Thời gian bảo hành** : 24 tháng kể từ ngày sản xuất .
- Trình bày : Chai 60 viên

b. ĐẶC ĐIỂM NGUYÊN LIỆU :

STT	Tên nguyên liệu	Đạt tiêu chuẩn
1	Nhân trần (<i>Herba adenosmastis caerulei</i>)	ĐOVN III
2	Đương qui (<i>Radix Angelicae sinensis</i>)	ĐOVN III
3	Cát căn (<i>Pueraria thomsonii</i>)	ĐOVN III
4	Tam thất (<i>Radix Notoginseng</i>)	ĐOVN III
5	Bạch tật lê (<i>Tribulus Terrestris</i>)	ĐOVN III
6	Câu kỷ tử (<i>Fructus Lycii</i>)	ĐOVN III
7	Magnesi cabonat	BP.98
8	Magnesi Stearat	BP.98

c. ĐẶC ĐIỂM DƯỢC LIỆU :

1/- NHÂN TRẦN : (*Herba adenosmastis caeruleum*)

- Cây Nhân Trần Việt Nam tên khoa học : *Adenosma caeruleum* R.Br
- Thuộc họ : Hoa mõm chó (*Scrophulariaceae*)
- Thành phần hoá học : Có tinh dầu mùi xineol hoạt chất của tinh dầu khuynh diệp.
- Tác dụng dược lý : Chưa có ai nghiên cứu tác dụng thông mật của nhân trần Việt Nam.
- Công dụng và liều dùng : Nhân trần vị đắng, tính bình, hơi hàn vào kinh bàng quang. Có tác dụng thanh nhiệt, lợi thấp, dùng chữa thân thể nóng, da vàng người vàng, tiểu tiện không tốt.

Trong nhân dân, nhân trần dùng cho phụ nữ sau khi sanh để giúp cho ăn ngon cơm, chóng hồi phục cơ thể. Còn dùng làm thuốc chữa sốt, ra mồ hôi thông tiểu tiện, chữa bệnh vàng da, bệnh gan.

Ngày dùng 4 - 6g có khi tới 20g dưới dạng thuốc sắc, xirô, thuốc pha hay thuốc viên.

2/. ĐƯƠNG QUI : (*Radix angelica sinensis*).

Còn gọi là Tần qui , Vân qui

- Tên khoa học : *Angelica sinensis*
- Thuộc họ : Hoa tán (*Umbelliferae*)
- Thành phần hóa học : Trong Đương qui có tinh dầu tỷ lệ 0.2 % tinh dầu có tỷ trọng 0.955 ở 15°C màu vàng sẫm trong, tỷ lệ axit tự do trong tinh dầu chiếm 40 % trong tinh dầu chủ yếu là n-butyliden- phtalit $C_{12}H_{12}O_2$ và n-valerophenon O-cacboxy-axit $C_{12}H_{14}O_3$, ngoài ra có là n-butyl-phtalit $C_{12}H_{14}O_2$, Beganen $C_{12}H_{18}O_4$, sesquiterpen, safrola và một ít vitamin B₁₂.

-Tác dụng dược lý :

★ Tác dụng trên tử cung và các cơ trơn : kích thích và ức chế.

Đương qui có 2 thành phần : tan trong nước, không bay hơi, có tính thể có tác dụng hưng phấn tử cung làm cho sự co bóp tăng mạnh.

Thành phần bốc hơi có tác dụng ức chế cơ tử cung làm cho tử cung dẫn nghỉ.

Nếu muốn làm cho nó co bóp thì sắc thuốc có đương qui lâu để trừ bỏ bớt phần bay hơi và ngược lại.

★ Tác dụng trên hiện tượng thiếu vitamin E.

★ Tác dụng trên trung khu thần kinh: Trấn tĩnh hoạt động của đại não.

★ Tác dụng trên huyết áp và hô hấp : tinh dầu có tác dụng hạ áp, nhưng thành phần không bay hơi của đương qui có tác dụng co cơ trơn mạch máu làm huyết áp tăng.

★ Tác dụng trên cơ tim : giống tác dụng quinidin.

★ Tác dụng kháng sinh : có tác dụng đối với trực trùng lỵ và tụ cầu trùng.

- **Công dụng và liều dùng :** Vị ngọt cay tính ôn, vào 3 kinh tâm can tỳ có tác dụng bổ huyết hoạt huyết nhuận táo hoạt trường, điều huyết, thông kinh .

Đương qui là một vị thuốc rất phổ thông trong Đông y, nó là đầu vị trong thuốc chữa bệnh phụ nữ, đồng thời được dùng nhiều trong đơn thuốc bổ và trị bệnh khác.

Chủ yếu dùng chữa kinh nguyệt không đều, có kinh đau bụng.

Làm thuốc bổ chữa thiếu máu chân tay đau nhức và lạnh.

Liều dùng : 6-15g dưới dạng thuốc sắc hoặc dưới dạng thuốc rượu.

3/. CÁT CĂN : (Radix Pueraria)

Còn gọi là sắn dây, cam cát căn, phấn cát căn, củ sắn dây.

- **Tên khoa học :** Pueraria thomsoni Benth.

- **Thuộc họ :** Cánh bướm(Papilionaceae).

Là rễ phơi hay sấy khô của cây sắn dây, cát là sắn, căn là rễ, vì vị thuốc là rễ một loại sắn.

- **Thành phần hoá học :** Trong sắn dây có tinh bột với tỷ lệ 12-15%, trong sắn dây có tìm thấy chất saponozit (viện y học Bắc Kinh), còn thấy Puerarin là một flavonozit .

- Công dụng và liều dùng : Cát căn có vị ngọt cay, tính bình vào 2 kinh tỳ và vị, có tác dụng giải cơ thoái nhiệt sinh tân chỉ khát. Hoa sắc dây giải độc .

Dùng chữa biểu chứng miệng khát, đầu nhức tiết tả lỵ ra máu, đầu chấn.

Cát căn là một vị thuốc chữa sốt, làm cho ra mồ hôi, chữa bệnh sốt khát nước, nhức đầu, lỵ ra máu.

- Liều dùng : 8 - 20g dạng thuốc sắc dùng riêng hoặc phối hợp với các vị thuốc khác.

Bột sắc dây pha nước uống cho mát giải nhiệt hoặc dùng trong việc chế thuốc viên vì nó có tính chất giúp cho viên dính đồng thời lại dễ tan ra để thuốc nhanh tác dụng.

4/. SÂM TAM THẤT : (Radix Notoginseng)

Còn có tên kim bất hoán, nhân sâm tam thất, sâm tam thất .

- Tên khoa học : Panax pseudo ginseng Wall.

Thuộc họ ngũ gia bì (Araliaceae).

Tam thất là rễ phơi khô của cây tam thất. Tên kim bất hoán (vàng không đổi) có nghĩa là vị thuốc rất quý ,vàng không đổi được .

-Thành phần hoá học : Có hai chất saponin : arasaponin A và arasaponin B.

✧ Arasaponin A($C_{30} H_{52} O_{10}$) là một chất bột dễ tan trong rượu metylic, etylic và amilic, hơi tan trong nước, không tan trong ête và acetone.

✧ Arasaponin B ($C_{22} H_{38} O_{10}$) cũng là một chất bột dễ tan trong nước và rượu metylic hơi tan trong rượu metylic 100⁰ và rượu amylic .

- Tác dụng dược lý : Ít độc, không thấy có sự thay đổi rõ rệt đối với huyết áp với tim và hô hấp .

- Công dụng và liều dùng : Vị ngọt hơi đắng tính ôn vào hai kinh can và vị có tác dụng hành ứ cầm máu tiêu thũng, dùng chữa thổ huyết máu cam. Lỵ ra máu để xong máu hôi không sạch ung thũng, bị đòn tổn thương liều dùng 4 - 8g dưới dạng thuốc sắc hoặc thuốc bột, dùng ngoài có tác dụng cầm máu tại chỗ.

5/. BẠCH TẬT LÊ : (Tribulus Terrestris)

Còn gọi là tật lê, gai ma vương, thích tật lê, gai sấu, gai trống, gai yết hầu.

- Tên khoa học : Tribulus Terrestris

- Thuộc họ : Tật lê (Zygophyllaceae).

Bạch tật lê là quả chín phơi hay sấy khô của cây tật lê. Vì quả có gai, giẫm phải thường sinh bệnh thối thịt như bị ma quỷ cho nên còn có tên gai ma vương.

- **Thành phần hóa học** : Trong quả chứa 0,001% ancaloit, 3,5% chất béo, một ít tinh dầu chất nhựa và có nhiều nitrat, chất phylloerythrin, tanin, flavonozit, rất nhiều saponin trong đó có Diosgenin, gitogenin và clorogenin.

- **Công dụng và liều dùng** : Theo tài liệu cổ tật lê có vị đắng tính ôn vào hai kinh can và phế có tác dụng bình can tức phong thấp, hành huyết dùng chữa các bệnh nhức đầu, mắt đỏ nhiều nước mắt phong ngứa, tích tụ, tắc sữa. Những người huyết hư khí yếu không dùng được. Hiện nay bạch tật lê thường dùng chữa đau mắt, nhức vùng mắt, chảy nước mắt ngoài ra còn dùng thuốc bổ thận, trị đau lưng, tinh dịch không bền gây yếu chảy máu cam, ly, súc miệng chữa loét miệng, còn dùng chữa kinh nguyệt không đều, đau bụng kinh.

- **Liều dùng** : 12 -16 g dưới dạng thuốc sắc.

6/. **CÂU KỶ TỬ** : (Fructus Lycii)

Còn gọi là câu khởi, khởi tử, địa cốt tử.

- **Tên khoa học** : Lycium Sinense Mill.

- **Thuộc họ** : Cà (solanaceae).

Kỷ tử hay khởi tử là quả chín phơi hay sấy khô của cây khởi tử Lycium sinense.

- **Thành phần hoá học** : Trong kỷ tử có chừng 0,09% chất betain $C_5H_{14}O_2N$ Theo Tử Quốc Quân và Triệu Thủ Huấn trong 100g quả có 3,96mg caroten, 150mg canxi, 6,7mg P, 3,4 mg sắt, 3mg vitamin C, 1,7mg axit nicotini, 0,23mg amon sunfat.

Theo một tác giả khác (Ibraghimôv) trong kỷ tử có lyxi, cholin, betain 2,2% chất béo và 4,6% chất protein, axit Xyanhydric và có thể có atropin.

- **Công dụng và liều dùng** : Kỷ tử có vị ngọt tính bình vào 3 kinh phế, can, thận, có tác dụng bổ can thận, nhuận phế táo, mạnh gân cốt, dùng chữa chân tay yếu mỏi, mắt mờ, di mộng tinh và được coi là vị thuốc bổ toàn thân dùng trong các bệnh đái đường (phối hợp với các vị thuốc khác) ho, viêm phổi mệt nhọc gây yếu, bổ tinh khí, giữ cho người trẻ lâu.

- **Liều dùng** : 6 - 15g dưới dạng thuốc sắc hoặc rượu thuốc.

B. **PHƯƠNG PHÁP** :

1/- **Thiết kế nghiên cứu** :

Phương pháp nghiên cứu mở, không đối chứng.

2/- Đối tượng :

- Chọn ngẫu nhiên 60 bệnh nhân nữ từ 17 tuổi đến 60 tuổi
- Có triệu chứng ở mặt như vết nám, thâm, mụn, sần nhăn, khô da.
- Ghi nhận triệu chứng cơ năng đi kèm theo như ăn ngủ kém, mệt mỏi, kinh nguyệt không đều, người hay nóng.
- Không kèm theo bệnh lý khác.

3/- Cách tiến hành :

- Lập hồ sơ bệnh án, phiếu theo dõi triệu chứng lâm sàng trước, trong và sau điều trị .
- Theo dõi sinh hiệu : Mạch ,huyết áp, nhiệt độ, cân nặng, chu kỳ kinh.
- Quan sát triệu chứng trên mặt như vết nám, thâm, mụn viêm, sần nhăn, khô da, chấm điểm theo thang điểm qui ước vào phiếu theo dõi sau mỗi đợt tái khám.
- Xét nghiệm : Số lượng hồng cầu trước và sau điều trị .

4/- Tiêu chuẩn chọn bệnh :

- Tất cả chị em phụ nữ từ 17 tuổi đến 60 tuổi.
- Có triệu chứng ở mặt như vết nám, thâm, mụn, sần da, khô da .
- Ghi nhận triệu chứng cơ năng đi kèm theo như ăn ngủ kém, mệt mỏi, kinh nguyệt không đều, đau lưng, người hay nóng .

5/- Cách dùng thuốc :

- Không sử dụng mỹ phẩm, kem bôi, thuốc bôi lên mặt trong thời gian dùng thuốc.
- Tránh tiếp xúc trực tiếp với ánh nắng.

Dùng thuốc : 2 viên x 3 lần trong ngày liên tục uống trong 2 tháng.

Cấp thuốc mỗi đợt 10 ngày hết thuốc tái khám.

6/- Chế độ ăn và chăm sóc :

- Không nên ăn đồ nóng, chất kích thích.
- Nên ăn nhiều rau, trái cây, uống nhiều nước tránh táo bón.
- Tâm lý : Tránh stress, lo âu.

7/- Kế hoạch theo dõi :

- Thời gian sau 2 tháng dùng thuốc kết thúc theo dõi. Uống thuốc 10 ngày tái khám 1 lần.
- Đối với các triệu chứng ở da mặt bệnh nhân tự chấm điểm theo thang điểm 10 qui ước .

- Nội dung theo dõi : Giảm triệu chứng về da như giảm nám, da mặt tươi nhuận, bớt khô da, giảm vết thâm mụn.
- Giảm triệu chứng đi kèm như ăn ngủ khá tốt , đỡ hoặc hết mệt mỏi, kinh nguyệt điều hoà, bớt đau lưng, người bớt nóng.
- Các triệu chứng đánh giá theo thang điểm 10 là trước điều trị và điểm giảm dần là triệu chứng cải thiện đến điểm 0 là tốt .

8/- Tổng kết đánh giá :

- (a) Đánh giá tác động của thuốc trên : Sinh hiệu cơ thể, chu kỳ kinh, cân nặng và các triệu chứng đi kèm như giảm mệt mỏi, ăn ngủ được, bớt đau lưng, người bớt nóng trước và sau điều trị.
- (b) Đánh giá kết quả dựa vào xét nghiệm máu: Số lượng hồng cầu.
- (c) Đánh giá kết quả điều trị của thuốc dựa trên các triệu chứng lâm sàng ở mặt : Nám, vết thâm, mụn viêm, sần nhẵn, khô da chia làm 5 mức độ :
 - Tốt : Triệu chứng lâm sàng cải thiện hoặc giảm từ 80% đến 100%.
 - Khá : Triệu chứng lâm sàng cải thiện hoặc giảm từ 60% đến 79%.
 - Trung bình : Triệu chứng lâm sàng cải thiện hoặc giảm từ 40% đến 59%.
 - Không kết quả : Triệu chứng lâm sàng không cải thiện hoặc cải thiện rất ít dưới 40%.
 - Xấu : Bệnh nhân bỏ điều trị, hoặc thuốc tác dụng phụ nhiều.

Thang điểm qui ước :

Lúc vào :

Có triệu chứng ở mặt cho 10 điểm.

Sau mỗi đợt : Qui ước điểm giảm dần đến 0 điểm là tốt nhất.

- Triệu chứng giảm 80 đến 100% cho điểm 2 hoặc 1 hoặc 0 điểm.
- Triệu chứng giảm 60 đến 79% cho điểm 4 hoặc 3 điểm.
- Triệu chứng giảm 40 đến 59% cho điểm 6 hoặc 5 điểm.
- Triệu chứng giảm dưới 40% cho điểm 9 hoặc 8 hoặc 7 điểm.
- Triệu chứng hoàn toàn không giảm, hoặc bỏ điều trị do tác dụng phụ của thuốc cho điểm 10.
- Xử lý và phân tích thống kê số liệu dựa vào phần mềm SPSS.

IV/- KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU :

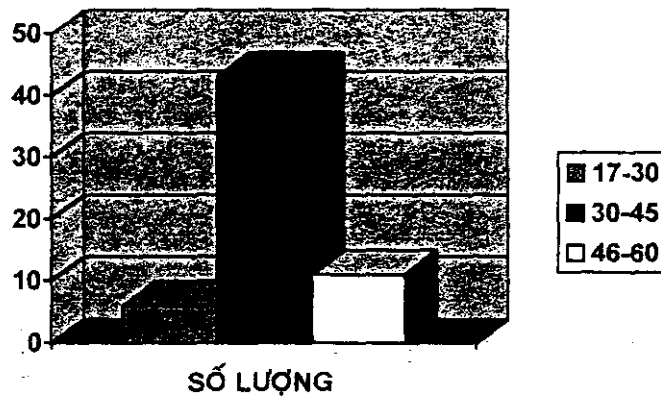
Tổng số bệnh nhân nghiên cứu : 60 bệnh nhân nữ.

1.- Phân bố theo tuổi :

Bảng 1

Tuổi	Số lượng	Tỷ lệ %
17 - 30	6	10
30 - 45	43	71,67
46 - 60	11	18,33
Tổng số :	60	100

Biểu đồ 1 : Số lượng bệnh nhân phân bố theo tuổi.



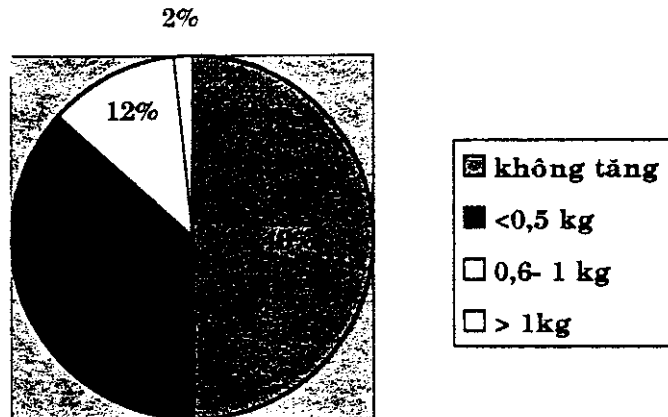
Nhận xét : Đa số bệnh nhân nghiên cứu có triệu chứng về da tập trung ở tuổi từ 30-45 tuổi.

2.- Tác động trên cân nặng sau dùng thuốc.

Bảng 2 :

Tăng cân	Số lượng	Tỷ lệ %
Không tăng	30	50
≤ 0,5 kg	22	36,66
0,6 -1kg	7	11,67
>1 kg	1	1,67
Tổng số :	60	100

Biểu đồ 2 : Tỷ lệ thay đổi cân nặng sau khi dùng thuốc.



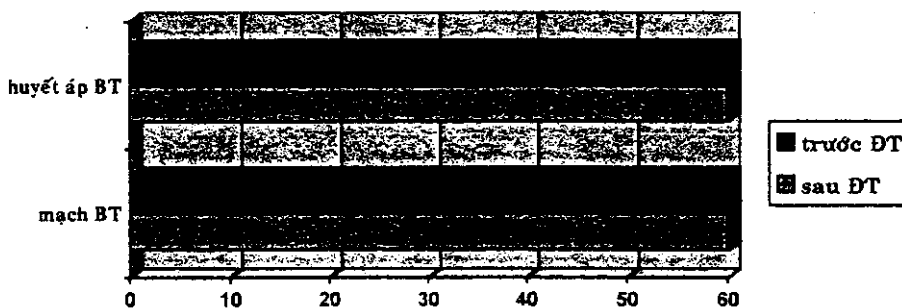
Nhận xét : 48,33% phụ nữ dùng thuốc có tăng cân <1 kg, 1,67% còn lại tăng cân $\geq$ 1 kg sau điều trị .

3.- Tác động lên Mạch, huyết áp sau điều trị .

Bảng 3 :

Triệu chứng	Trước ĐT		Sau ĐT	
	SL	%	SL	%
Mạch bình thường(70-85 l/phút)	60	100	60	100
HA bình thường (max 13-10,min7- 6cm Hg)	60	100	60	100

Biểu 3 : Số lượng BN có mạch huyết áp bình thường trước và sau điều trị



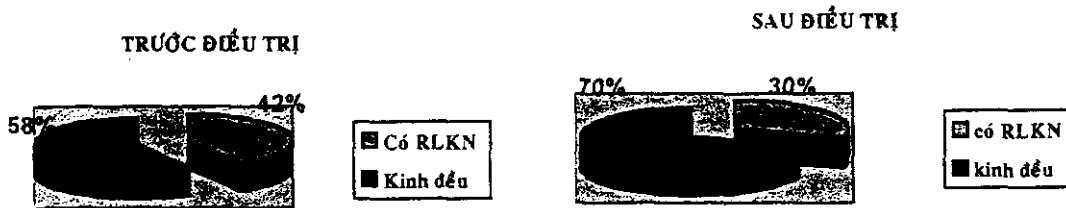
Nhận xét : 100% bệnh nhân không rối loạn mạch, huyết áp sau điều trị .

4.- Tác động lên chu kỳ kinh nguyệt.

Bảng 4 :

Triệu chứng kinh nguyệt	Trước ĐT		Sau ĐT	
	SL	TL %	SL	TL %
Có rối loạn kinh nguyệt	25	42	18	30
Kinh đều	35	58	42	70
Tổng số	60	100	60	100

Biểu đồ 4 : Tỷ lệ % bệnh nhân về chu kỳ kinh trước và sau điều trị.



Nhận xét : Sau điều trị kinh nguyệt có tỷ lệ điều hoà thêm 12%.

5.- Thay đổi số lượng hồng cầu .

Bảng 5 :

Trước điều trị	Sau điều trị	p
$(4.2183 \pm 0.2563) \cdot 10^{12} / l$	$(4,4915 \pm 0.3651) \cdot 10^{12} / l$	< 0,001
	t = 6,803	

Nhận xét : Số lượng hồng cầu tăng sau dùng thuốc có ý nghĩa thống kê.

6.- Tác động lên triệu chứng lâm sàng trên da mặt.

Bảng 6 :

STT	TRIỆU CHỨNG	Trước ĐT (điểm)	Sau ĐT (điểm)	T	P
1	Nám (n = 48)	10	$4,6 \pm 1,5$	23,866	0,000
2	Vết thâm (n=26)	10	$2,9 \pm 1$	35,917	0,000
3	Mụn viêm (n= 18)	10	$2,1 \pm 0,5$	64,595	0,000
4	Sần nhân(n=38)	10	$4,3 \pm 1,6$	21,158	0,000
5	Khô da (n=48)	10	$3,8 \pm 1,7$	24,522	0,000

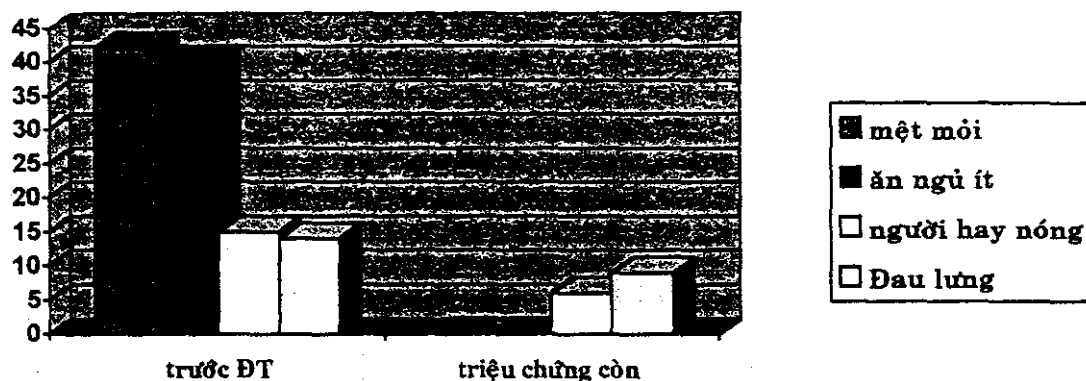
Các triệu chứng lâm sàng trên da mặt đều giảm có ý nghĩa thống kê.

7.- Tác động lên các triệu chứng toàn thân khác.

Bảng 7 :

Số thứ tự	Triệu chứng	Số lượng bệnh nhân Trước điều trị	Số lượng bệnh nhân giảm triệu chứng Sau điều trị	Tỉ lệ % bệnh nhân giảm triệu chứng Sau điều trị
1	Mệt mỏi	42	42	100
2	Ăn ngủ ít	40	40	100
3	Người hay nóng	15	9	60
4	Đau lưng	14	5	35,71

Biểu đồ 5 : Triệu chứng cơ năng trước và sau điều trị.



Nhận xét : Các triệu chứng cơ năng giảm khá tốt.

8.- Ghi nhận tác dụng phụ của thuốc.

Bảng 8 :

STT	Triệu chứng	Trước ĐT	Sau ĐT	Tỉ lệ %
1	Táo bón	0	0	0
2	Cảm giác nóng mặt	0	1	1,66
3	Dị ứng ngứa	0	0	0

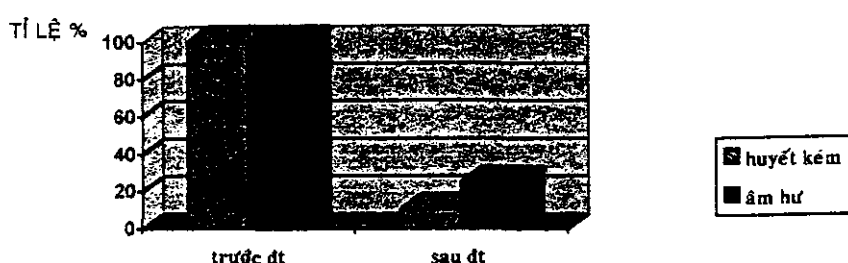
Nhận xét : Tác dụng phụ của thuốc không đáng kể.

9.- Đánh giá hiệu quả trên thể bệnh YHCT.

Bảng 9 :

Thể bệnh	Trước ĐT		Sau ĐT có hiệu quả	
Huyết kém	48	100%	43	89,58%
Âm hư	12	100%	9	75%

Biểu đồ 6 : Hiệu quả thuốc theo YHCT trước và sau điều trị.



Nhận xét : Triệu chứng bệnh theo YHCT giảm nhiều sau điều trị.

Thể huyết kém điều trị hiệu quả 89,58%. Thể âm hư điều trị hiệu quả 75%.

V/- NHẬN XÉT VÀ BÀN LUẬN :

- Phần lớn các chị em có triệu chứng lão hóa da chủ yếu ở độ tuổi từ 30-45 tuổi (bảng 1), trong đó lão hóa da mặt là biểu hiện sớm nhất như : nám khô da, có nếp nhăn, quầng thâm, mụn thâm ...

- Cùng với các triệu chứng ở da mặt, triệu chứng toàn thân đi kèm như mệt mỏi ăn ngủ ít (bảng 6), kinh nguyệt không điều hòa (bảng 4) ảnh hưởng đến sức khỏe toàn thân. Từ đó ảnh hưởng đến công tác, làm việc mau mệt và kém hiệu quả ...

- Khảo sát về, tác dụng dưỡng da chống lão hóa tăng sinh lực của cơ thể ở nữ giới của chế phẩm Tiên Dung, chúng ta thấy :

1/- Hiệu quả tác dụng trên tác triệu chứng cơ năng.

Tiên Dung có tác dụng điều hòa kinh nguyệt, điều hòa khí huyết ở bệnh nhân có triệu chứng rối loạn kinh nguyệt. (Bảng 4)

Tiên Dung có tác dụng giúp cho bệnh nhân ăn ngủ được, tăng cân người khỏe hơn, bớt mệt mỏi đó là hiệu quả về mặt tăng cường sinh lực cho nữ giới . (Bảng 2,6).

2 /- Hiệu quả tác dụng trên các triệu chứng cận lâm sàng.

Tiên Dung có tác dụng làm tăng số lượng hồng cầu rõ rệt, bổ huyết giúp da hồng hào. (Bảng 5)

Tiên Dung có tác dụng trên da mặt làm mờ vết thâm nám, mụn, khô da cụ thể trong phiếu theo dõi cho bệnh nhân tự chấm điểm qui ước hiệu quả tốt (Bảng 6). Tất cả bệnh nhân tham gia nghiên cứu đều là nữ,

nhưng qua công thức bài thuốc chúng tôi thiết nghĩ nếu nam giới có da mặt nám, sạm, khô không tươi nhuận cũng có thể dùng được.

VI.- KẾT LUẬN :

Qua nghiên cứu khảo sát tác dụng dưỡng da chống lão hóa, tăng sinh lực ở nữ giới của chế phẩm Tiên Dung do xí nghiệp dược phẩm Trung ương 25 sản xuất.

Thuốc có tác dụng tốt, trong điều trị nám sạm da, mụn thâm, tăng sinh lực, giúp làn da tươi trẻ, mịn màng. Hiệu quả điều trị rõ rệt.

Sử dụng an toàn, không gây ra tác dụng phụ, không độc.

Không xảy ra tai biến điều trị trong suốt quá trình nghiên cứu.

THỬ ĐỘC TÍNH CẤP DIỄN CỦA THUỐC TIỀN DUNG

DO XI NGHIỆP DƯỢC PHẨM TRUNG ƯƠNG 25 SẢN XUẤT

Chỉ đạo đề tài : Ds.Lê Ngọc Bền

Thực hiện : Ds.Nguyễn Thị Trà My

Ds.Võ Thành Danh

1.- PHƯƠNG PHÁP THỰC NGHIỆM :

1.1.- PHƯƠNG PHÁP CHUNG

1.1.1.- Súc vật thí nghiệm :

- Chuột nhắt trắng thuộc chủng Mus musculus khỏe mạnh, không dị tật.

- Số lượng $n = 20$ con.

- Trọng lượng $P = 20 \pm 2$ gr/con $\rightarrow$

4 con	:	18 gr.
6 con	:	19 gr
9 con	:	20 gr
1 con	:	21 gr

1.1.2.- Thời điểm uống thuốc :

Buổi sáng lúc 8 giờ 35 phút, khi chuột còn đói.

1.1.3.- Đánh giá kết quả :

Dựa vào những phản ứng toàn ứng hay bất ứng, trạng thái chung của chuột sau khi uống thuốc.

1.2.- PHƯƠNG PHÁP THỰC HIỆN :

1.2.1.- Mục đích :

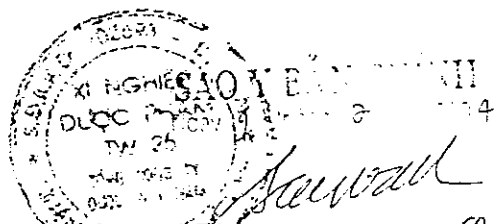
Thăm dò độc tính của thuốc qua quan sát các phản ứng của chuột sau khi uống thuốc. Xác định phân suất tử vong (nếu có). Xác định liều LD_{50} .

1.2.2.- Phương pháp :

*** Nguyên tắc :**

- Cho chuột thử nghiệm uống cùng liều thuốc, chuột được nuôi và thử trong cùng điều kiện hoàn toàn giống nhau.

- Ở các mốc thời gian, ta ghi lại các biểu hiện của chuột. Đến đủ thời gian (48 giờ) cho thử nghiệm độc tính cấp diễn thì kết thúc thử nghiệm.



★ Thuốc khảo sát :

Chế phẩm “THUỐC VIÊN NANG TIÊN DUNG” của Xí nghiệp Dược phẩm Trung ương 25 sản xuất.

★ Công thức : Cho 01 viên nang.

• Nhân trần	1000mg tương ứng cao Nhân trần	100mg
• Đương qui	1000mg tương ứng cao Đương qui	100mg
• Cát căn	1000mg tương ứng cao Cát căn	100mg
• Tam thất	500mg tương ứng cao Tam thất	50mg
• Bạch tật lê	500mg tương ứng cao Bạch tật lê	50mg
• Câu kỷ tử	500mg tương ứng cao Câu kỷ tử	50mg
• Magnesi Cacbonat		45mg
• Magnesi Stearat		5mg

★ Chỉ định :

- Chống lão hóa ở nữ giới, da dễ tươi trẻ mịn màng.
- Tăng khả năng miễn dịch cơ thể, tăng sinh lực cho nữ giới.

★ Liều dùng :

- Ngày uống 03 lần : mỗi lần 1 – 2 viên theo chỉ dẫn của Bác sĩ.

★ Chống chỉ định :

- Không dùng cho trẻ em dưới 16 tuổi.

★ Đóng gói : Chai 60 viên.

★ Bảo quản : Nơi khô mát, tránh ánh sáng.

★ Bảo hành : 24 tháng kể từ ngày sản xuất.

★ Đường thử nghiệm :

- Cho chuột uống bằng kim đầu tã, đưa thẳng vào dạ dày, bơm thuốc vào lúc đói.

★ Liều thử nghiệm :

- Cho uống thuốc khảo sát “Viên nang Tiên Dung” trên lô chuột thử nghiệm với cùng một liều là : $19,6 \text{ mg/ con}$ chuột thử (liều điều trị tối đa). Tiến hành quan sát lô chuột thử trong suốt thời gian thực nghiệm .

★ Thời gian thử nghiệm :

- Theo dõi chuột trong 48 giờ sau khi uống.

★ Chỉ tiêu quan sát :

- Ghi các phản ứng và hoạt động của chuột sau khi uống thuốc.
- Nếu có chuột chết, mổ bụng quan sát nội tạng.
- Xác định phân suất tử vong (nếu có).

1.2.3.- Nhận xét :

- Sau khi uống : Chuột gãi mõm, chạy nhanh.
- Sau 5 phút : Trạng thái vận động bình thường.
- Sau 10 phút : Chuột đứng nên tiếp tục gãi mõm.
- Sau 15 phút : Một số chuột chúi mõm xuống trấu.
- Sau 20 phút : Đứng yên từng nhóm : trạng thái thức.
- Sau 30 phút : Một số đứng yên, một nhóm leo bám lên lưới.
- Sau 45 phút : Lô chuột ngủ hoàn toàn, thành từng nhóm.
- Sau 1 giờ : Lô chuột ở trạng thái ngủ.
- Sau 24 giờ : Lô chuột thử tiểu nhiều, sinh hoạt bình thường.
- Sau 48 giờ : Sinh hoạt bình thường, tiểu nhiều.

2.- KẾT QUẢ THỬ NGHIỆM :

- Với liều thử nghiệm trên, chuột không có phản ứng gì đặc biệt. Không có tử vong sau 48 giờ theo dõi.
- Thuốc khảo sát không gây độc tính cấp : ở liều chỉ định.

3.- DÒ LIỀU LD₅₀.

3.1.- SÚC VẬT THÍ NGHIỆM :

- Chuột nhắt trắng thuộc chủng Mus musculus khỏe mạnh, không dị tật.
- Số lượng n = 20 con.
- Trọng lượng $P = 20 \pm 2$ gr/con $\rightarrow \begin{cases} 02 \text{ con : } 19 \text{ gr} \\ 18 \text{ con : } 20 \text{ gr} \end{cases}$

3.2.- PHƯƠNG PHÁP THỰC HIỆN :

- Chia lô chuột thử ra thành từng nhóm, cho từng nhóm lô chuột thử nghiệm uống thuốc khảo sát “Viên nang Tiên Dung” với liều tăng dần từ 49 mg/con - 98 mg/con - 147 mg/con - 245 mg/con tới liều tối đa có thể cho uống được là 500 mg/con. Theo dõi lô chuột, thử theo thời gian thực nghiệm qui định, không thấy xuất hiện “hiện tượng tử vong” ở các nhóm chuột của lô.

3.3.- KẾT LUẬN :

Chế phẩm “VIÊN NANG TIÊN DUNG” của Xí nghiệp Dược phẩm TW.25” không có liều LD₅₀.

TP. Hồ Chí Minh, ngày 9 tháng 12 năm 2002

TỔ KIỂM NGHIỆM



DS. VÕ THÀNH DANH

SỞ Y TẾ
Thành Phố Hồ Chí Minh
BV. Y HỌC CỔ TRUYỀN

CỘNG HÒA XÃ HỘI CHỦ NGHĨA VIỆT NAM
Độc Lập – Tự Do – Hạnh Phúc

TP. Hồ Chí Minh, ngày 16 tháng 5 năm 2003

**KẾT LUẬN CỦA HỘI ĐỒNG CÔNG NGHỆ
BỆNH VIỆN Y HỌC CỔ TRUYỀN TP. HỒ CHÍ MINH
VỀ CÔNG TRÌNH NGHIÊN CỨU THỰC NGHIỆM
DƯỢC LÝ VÀ LÂM SÀNG VIÊN NANG TIÊN DUNG
DO XÍ NGHIỆP DƯỢC PHẨM TRUNG ƯƠNG 25 SẢN XUẤT**

Hội đồng Khoa học Công nghệ Bệnh viện Y học cổ truyền Thành phố Hồ Chí Minh cho tiến hành nghiên cứu thực nghiệm và lâm sàng chế phẩm **TIÊN DUNG** khảo sát tác dụng dưỡng da chống lão hóa, tăng sinh lực của Xí nghiệp dược phẩm Trung ương 25 sản xuất. Thời gian nghiên cứu từ ngày 09 tháng 12 năm 2002 đến ngày 12 tháng 05 năm 2003.

Chịu trách nhiệm thực hiện :

1/- Lâm sàng : - BS. Huỳnh Thị Kim Oanh

2/- Thực nghiệm : - DS. Nguyễn Thị Trà My
- DS. Võ Thành Danh

3/- Cận lâm sàng : - BS. Nguyễn Thị Lan Phương

Qua nghiệm thu công trình chúng tôi có những nhận xét sau :

1.- Thuốc đảm bảo tính an toàn quy định.

- Thuốc không độc, không gây phản ứng có hại trên các nghiên cứu thực nghiệm, lâm sàng và cận lâm sàng.

2.- Với liều dùng : Lần uống 2 viên, ngày uống 3 lần sau bữa ăn, liên tục trong 2 tháng. Thuốc có tác dụng dưỡng da mặt, chống lão hóa, tăng sinh lực cho nữ giới, cải thiện các triệu chứng nám, sạm da, mụn thâm, giúp làn da tươi trẻ mịn màng.

CHỦ TỊCH HỘI ĐỒNG KHCN BỆNH VIỆN
Y HỌC
CỔ TRUYỀN
THÀNH PHỐ HỒ CHÍ MINH

DS. LÊ NGỌC BÈN

KẾT QUẢ PHÂN TÍCH MẪU

Đơn vị gửi mẫu: Bà Nguyễn Thị Ngọc Dao- Phòng enzym học
Chỉ tiêu phân tích: Hàm lượng axit amin tổng số
Kết quả phân tích : (đơn vị tính: % [g axit amin/ 100g mẫu khô])

STT	Axit amin	Bột giun đông khô (10/2003)	Bột giun sấy đợt 1 (10/2003)	Bột giun sấy đợt 2 (3/2004)
1	Aspartic acid	5.96	4.07	5.68
2	Glutamic acid	6.78	7.62	7.00
3	Serine	2.40	1.39	2.10
4	Histidine	0.71	0.80	0.40
5	Glycine	3.50	3.33	3.28
6	Threonine	3.45	2.98	3.33
7	Alanin	2.93	3.01	2.98
8	Arginine	2.53	1.45	2.20
9	Tyrosine	2.34	2.25	2.21
10	Cysteine + Cystine	1.26	0.87	0.96
11	Valine	2.41	2.62	2.33
12	Methionine	1.13	1.06	1.01
13	Phenylalanine	1.63	1.73	1.67
14	Isoleucine	2.74	3.12	2.56
15	Leucine	3.54	4.06	3.49
16	Lysine	3.67	2.12	2.88
17	Proline	1.57	1.34	1.31
	Tổng số	48.55	43.82	45.39

Hà Nội, ngày 6 tháng 4 năm 2004

Phụ trách phân tích



Nguyễn Thị Ty



BỘ Y TẾ
VIỆN KIỂM NGHIỆM

48 Hai Bà Trưng - Hà Nội
ĐT: 8.252791 - Fax: 8.256911

CỘNG HÒA XÃ HỘI CHỦ NGHĨA VIỆT NAM

Độc lập - Tự do - Hạnh phúc



PHIẾU PHÂN TÍCH

Số: 615

VILAS 087

(Kết quả kiểm nghiệm chỉ có giá trị với mẫu đem thử)

Mẫu để kiểm nghiệm:

Bột ENZYME LUMBROKINASE

Nơi sản xuất:

Viện Công nghệ Sinh học

Số lô, hạn dùng:

Lô SX: 04/2004

Số ĐK:

Người và nơi gửi mẫu:

Viện Công nghệ Sinh học

Yêu cầu KN (ghi rõ nội dung, số ngày, tháng, năm của công văn hay giấy tờ kèm theo)

Thử độc tính cấp theo hợp đồng số 10 HD/VKN-VCNSH ngày 15/9/2004

Ngày, tháng, năm nhận mẫu: 28/9/2004

Số đăng ký KN: 34G 669

Người nhận mẫu:

ĐS. Nguyễn Sĩ Được

Thử theo:

1- Phương pháp thử độc tính cấp của thuốc - Nhà Xuất bản Y học, 1996

2- Principles and Methods of Toxicology- A. Wallace Hayes, 1994.

Tình trạng mẫu khi nhận và mở niêm phong để kiểm nghiệm:

Mẫu gửi tới ở dạng bột thô màu nâu nhạt, mùi đặc biệt, đóng gói trong tuýp nhựa cứng nút kín, 10 g/ tuýp. Nhân dán trên tuýp ghi tên mẫu thử và số lô: 04/ 2004.

YÊU CẦU & KẾT QUẢ

Động vật thí nghiệm:

Chuột nhắt trắng cả hai giống khoẻ mạnh, đạt tiêu chuẩn thí nghiệm, chuột cân nặng $20g \pm 2g$;

Thực nghiệm và kết quả:

Mẫu thử: Nghiền mẫu thử thành bột mịn, trộn với nước cất để được hỗn dịch có chứa lượng mẫu thử là 0,40 gam/ ml. Chuẩn bị ngay trước khi thí nghiệm, khuấy trộn đều hỗn dịch mỗi khi lấy cho chuột uống.

Tiến hành :

Chuột được nhịn ăn 15 giờ trước khi thí nghiệm, nước uống bình thường. Cho chuột uống bằng kim cong đầu tù, đưa dịch thử vào thẳng dạ dày chuột. Thăm dò các liều gây độc trên động vật thí nghiệm.

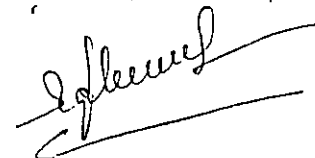
Dựa trên kết quả thăm dò, thí nghiệm tiến hành trên 60 chuột, chia làm 6 nhóm, một nhóm chứng dùng nước cất và 5 nhóm thử. Các nhóm thử cho uống hỗn dịch mẫu thử đã chuẩn bị ở trên từ 1- 3 lần trong ngày, cách nhau 3 giờ. Hai nhóm cho uống một lần tới thể tích tối đa chuột có thể chịu đựng được (0,4 - 0,5 ml/10g chuột). Theo dõi chuột 5 ngày sau khi cho uống.

KẾT QUẢ PHÂN TÍCH VI LƯỢNG TRONG MỘT SỐ MẪU SINH HỌC

Người thực hiện: Nguyễn Huy Nam
 Phương pháp phân tích: Huỳnh quang tia X

STT	Tên mẫu	Cu PPm	Fe PPm	Zn PPm	Mn PPm	K PPm	Ca PPm	Cr PPm	Ge PPm	Br PPm	Rb PPm	Sr PPm	Y PPm	Zr PPm	Nb PPm	Mo PPm	Pb PPm
1	Giun Quế	73.6	751.2	125.7	52.3	3808.4	2708.9	50.5	3.74	7.95	4.44	18.4	0.50	0.39	0.26	0.28	7.61
2	Tam thất	45.5	390.7	39.3	40.4	4675.5	959.7	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
3	Hải sâm	62	197.55	21.9	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
4	Rắn biển	36.2	351.23	137.63	45.8	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
5	Rùa	24.3	116.6	174.56	44.0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Hà Nội 15/05/04



Nguyễn Huy Nam.

VIỆN CÔNG NGHỆ SINH HỌC
Phòng Hoá sinh Protein
ĐT : 7561903

CỘNG HOÀ XÃ HỘI CHỦ NGHĨA VIỆT NAM
Độc lập - Tự do - Hạnh phúc

KẾT QUẢ PHÂN TÍCH MẪU

Đơn vị gửi mẫu: Bà Nguyễn Thị Hồng Hà - Viện CNSH

Số lượng mẫu: 02

Chỉ tiêu phân tích: Hàm lượng acid amin tổng số.

Kết quả phân tích: (đơn vị tính : % [g acid amin / 100g mẫu])

Stt	Acid amin	Cor.V.1 (%)	H.L.1 (%)
1	Aspartic acid	0.97	1.38
2	Glutamic acid	1.00	1.81
3	Serine	0.40	0.54
4	Histidine	0.35	0.44
5	Glycine	0.33	0.51
6	Threonine	0.43	0.60
7	Alanine	0.54	0.85
8	Arginine	0.56	0.84
9	Tyrosine	0.22	0.41
10	Cysteine+ Cystine	0.47	0.56
11	Valine	0.42	0.59
12	Methionine	0.11	0.17
13	Phenylalanine	0.41	0.55
14	Isoleucine	0.31	0.45
15	Leucine	0.64	0.97
16	Lysine	0.27	0.48
17	Proline	0.47	0.68
	Tổng số	7.90	11.83

Hà nội , ngày 18 tháng 10 năm 2004

Phụ trách phân tích,

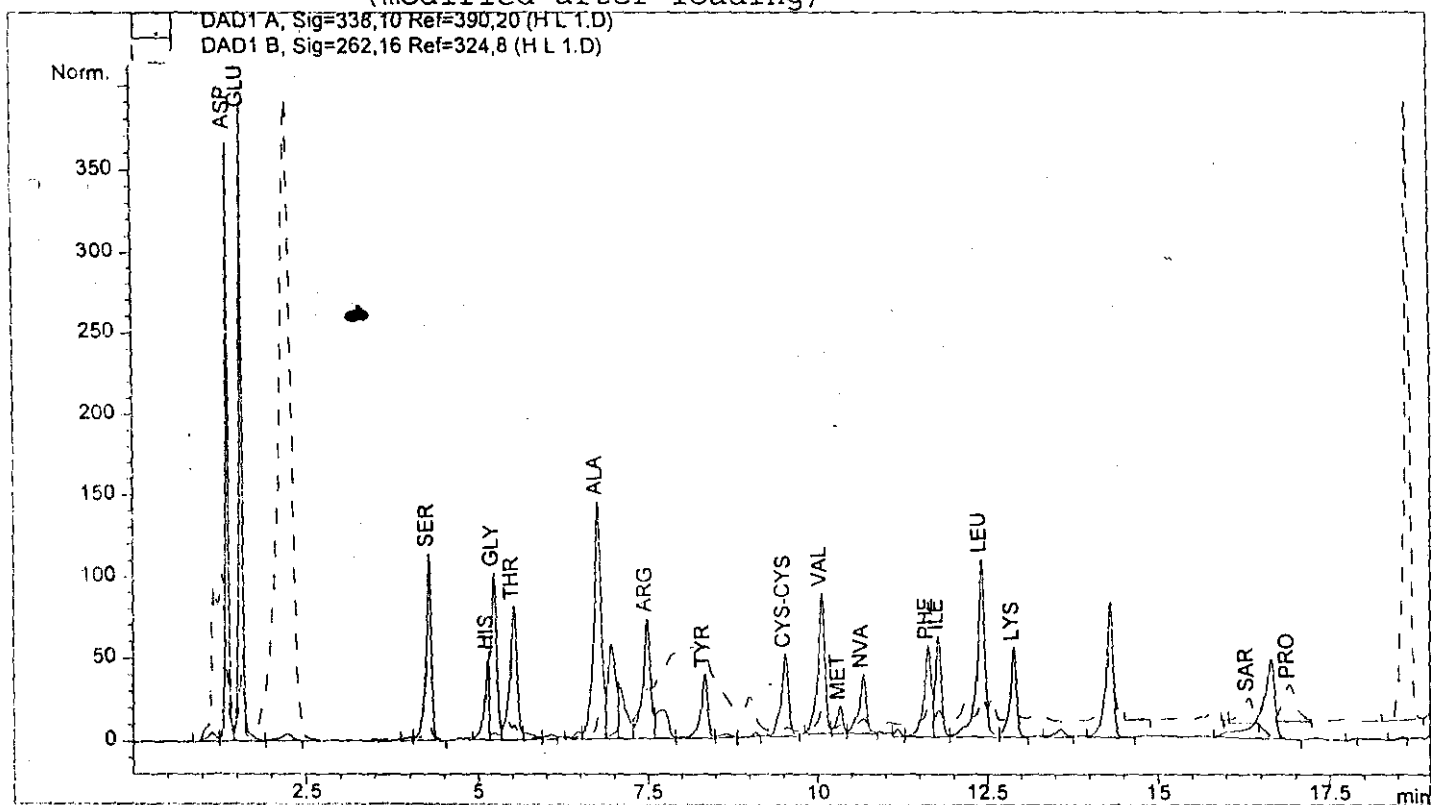


Nguyễn Thị Ty

=====

Injection Date : 10/14/04 5:57:53 PM Seq. Line : 14
Sample Name : H.L.1 Vial : 16
Acq. Operator : Le thanh Hai Inj : 1
 Inj Volume : Inj_prog

Acq. Method : C:\HPCHEM\1\METHODS\DEFAA.M
Last changed : 10/21/00 11:13:05 AM by Le thanh Hai
Analysis Method : C:\HPCHEM\1\METHODS\CHUAN11.M
Last changed : 10/14/04 6:03:15 PM by Le thanh Hai
(modified after loading)



=====

Internal Standard Report

=====

Sorted By : Signal
Calib. Data Modified : 10/14/04 6:03:05 PM
Multiplier : 1.0000
Dilution : 1.0000
Sample Amount : 1.00000 [pmol] (not used in calc.)

Sample ISTD Information:

ISTD ISTD Amount Name
[pmol]

1	250.00000	NVA
2	250.00000	SAR

Signal 1: DAD1 A, Sig=338,10 Ref=390,20

RetTime [min]	Type	Area [mAU*s]	Amt/Area ratio	Amount [pmol]	Grp	Name
1.367	VV	536.38068	1.55443	1390.07591		ASP
1.575	VV	700.77136	1.40532	1641.89367		GLU
4.294	VV	339.49548	1.22207	691.71004		SER
5.161	MM	126.63503	1.34247	283.43529		HIS

RetTime [min]	Type	Area [mAU*s]	Amt/Area ratio	Amount [pmol]	Grp	Name
5.242	MM	319.60907	1.68904	900.02379		GLY
5.534	VV	326.06906	1.23493	671.34730		THR
6.762	VV	617.04572	1.24146	1277.16124		ALA
7.494	VV	319.60883	1.21681	648.39050		ARG
8.342	VV	153.72798	1.17287	300.60615		TYR
9.528	BV	211.39511	1.76922	623.54918		CYS-CYS
10.066	MM	340.72769	1.18606	673.76563		VAL
10.332	MM	58.11866	1.54147	149.36408		MET
10.678	MM I	149.94969	1.00000	250.00000		NVA
11.632	VV	227.36252	1.16978	443.42352		PHE
11.784	VV	201.87567	1.35755	456.91308		ILE
12.422	VV	479.09970	1.23661	987.76302		LEU
12.898	VV	198.22470	1.05680	349.25644		LYS

Totals without ISTD(s) : 1.14887e4

Signal 2: DAD1 B, Sig=262,16 Ref=324,8

RetTime [min]	Type	Area [mAU*s]	Amt/Area ratio	Amount [pmol]	Grp	Name
16.321	MM I	168.76746	1.00000	250.00000		SAR
16.912	MM	294.68289	1.81650	792.94224		PRO

Totals without ISTD(s) : 792.94224

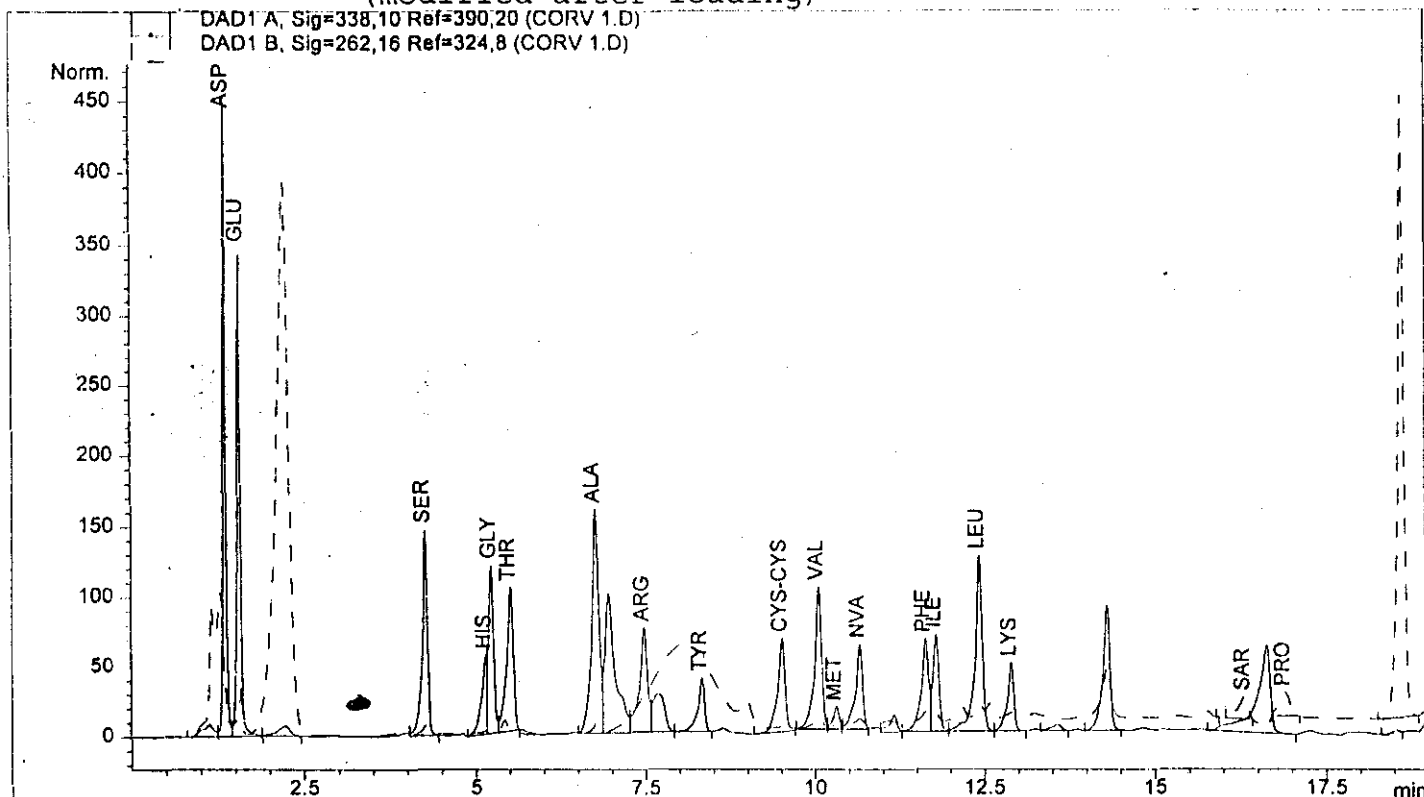
Results obtained with standard integrator!

1 Warnings or Errors :

Warning : Calibration warnings (see calibration table listing)

*** End of Report ***

=====
Injection Date : 10/14/04 5:21:20 PM Seq. Line : 13
Sample Name : Cor.V.1 Vial : 15
Acq. Operator : Le thanh Hai Inj : 1
Inj Volume : Inj prog
Acq. Method : C:\HPCHEM\1\METHODS\DEFAA.M
Last changed : 10/21/00 11:13:05 AM by Le thanh Hai
Analysis Method : C:\HPCHEM\1\METHODS\CHUAN11.M
Last changed : 10/14/04 6:03:15 PM by Le thanh Hai
(modified after loading)



=====
Internal Standard Report
=====

Sorted By : Signal
Calib. Data Modified : 10/14/04 6:03:05 PM
Multiplier : 1.0000
Dilution : 1.0000
Sample Amount : 1.00000 [pmol] (not used in calc.)

Sample ISTD Information:

ISTD ISTD Amount Name
[pmol]

1 250.00000 NVA
2 250.00000 SAR

Signal 1: DAD1 A, Sig=338,10 Ref=390,20

RetTime [min]	Type	Area [mAU*s]	Amt/Area ratio	Amount [pmol]	Grp	Name
1.366	VV	385.87219	1.54176	1033.74608		ASP
1.578	VV	370.81119	1.41058	908.87820		GLU
4.277	VV	243.16005	1.22028	515.59393		SER
5.161	PV	97.38680	1.33880	226.55269		HIS

RetTime [min]	Type	Area [mAU*s]	Amt/Area ratio	Amount [pmol]	Grp	Name
5.237	VV	199.24525	1.69568	587.06631		GLY
5.524	VV	228.59048	1.23330	489.86968		THR
6.773	VV	377.79099	1.24236	815.55398		ALA
7.487	VV	203.68794	1.21501	430.03218		ARG
8.339	VV	85.83467	1.11977	167.01099		TYR
9.522	MM	170.37775	1.76821	523.48053		CYS-CYS
10.065	MM	234.28311	1.19051	484.65136		VAL
10.325	MM	32.18655	1.77815	99.44841		MET
10.671	MM I	143.87500	1.00000	250.00000		NVA
11.639	VV	163.77693	1.17910	335.54994		PHE
11.796	VV	135.14764	1.36533	320.62652		ILE
12.438	VV	302.41565	1.24315	653.25436		LEU
12.905	VV	104.44306	1.09376	198.49845		LYS

Totals without ISTD(s) : 7789.81360

Signal 2: DAD1 B, Sig=262,16 Ref=324,8

RetTime [min]	Type	Area [mAU*s]	Amt/Area ratio	Amount [pmol]	Grp	Name
16.316	MM I	162.35211	1.00000	250.00000		SAR
16.900	MM	199.28795	1.77468	544.60678		PRO

Totals without ISTD(s) : 544.60678

Results obtained with standard integrator!

1 Warnings or Errors :

Warning : Calibration warnings (see calibration table listing)

*** End of Report ***

**B/ CÁC BIÊN BẢN NGHIỆM THU MỘT
SỐ NHÁNH ĐỀ TÀI**

Hà nội, ngày 24 tháng 12 năm 2004

QUYẾT ĐỊNH

CỦA GIÁM ĐỐC TRUNG TÂM CÔNG NGHỆ SINH HỌC

Về việc thành lập Hội đồng nghiệm thu cấp cơ sở đề tài nhánh của đề tài KC 04-17.

GIÁM ĐỐC TRUNG TÂM CÔNG NGHỆ SINH HỌC

- Căn cứ vào quyết định số 13/2004/QĐ-BKHCN ngày 28/5/2004 của Bộ trưởng Bộ KH-CN về việc ban hành Quy định đánh giá nghiệm thu các đề tài KHCN cấp Nhà nước.
- Căn cứ vào quy chế làm việc của Trung tâm Công nghệ Sinh học-Đại học Quốc gia Hà nội.
- Căn cứ quyết định số 282/QĐ ngày 20 tháng 6 năm 1980 của Chủ nhiệm Ủy ban Khoa học và Kỹ thuật Nhà nước (nay là Bộ Khoa học và Công nghệ) về "Thể thức đánh giá và nghiệm thu các công trình nghiên cứu khoa học kỹ thuật".
- Theo đề nghị của các Ông (Bà) Trưởng phòng Hành chính tổng hợp. Chủ nhiệm đề tài.

QUYẾT ĐỊNH

Điều 1. Thành lập Hội đồng khoa học nghiệm thu cấp cơ sở đề tài nhánh mã số: KC 04-17(04) "Nghiên cứu qui trình thu nhận peptit kháng khuẩn từ thực vật". Do GS.TSKH Phạm Thị Trần Châu -Trung tâm Công nghệ Sinh học - Đại học Quốc gia Hà nội chủ trì, gồm 7 thành viên (có danh sách kèm theo).

Điều 2. Hội đồng có nhiệm vụ đánh giá kết quả nghiên cứu của đề tài theo Quy định của Bộ KH-CN đã ban hành.

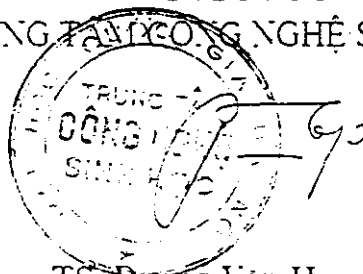
Hội đồng tự giải thể sau khi hoàn thành nhiệm vụ.

Điều 3. Ông (Bà) Chủ nhiệm đề tài nhánh của đề tài KC 04-17(04) cùng các Ông (Bà) có tên trong Hội đồng chịu trách nhiệm thi hành quyết định này.

Nơi nhận:

- TS. Dương Văn Hợp
- Các Ủy viên Hội đồng
- Chủ nhiệm đề tài
- Lưu văn thư

GIÁM ĐỐC
TRUNG TÂM CÔNG NGHỆ SINH HỌC

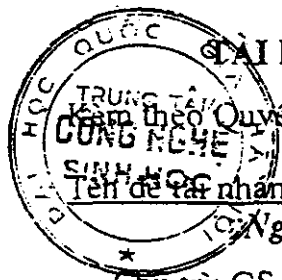


TS. Dương Văn Hợp

DANH SÁCH

THÀNH VIÊN HỘI ĐỒNG KHOA HỌC NGHIỆM THU CẤP CƠ SỞ ĐỀ

ĐẠI NHÁNH CỦA ĐỀ TÀI CẤP NHÀ NƯỚC MÃ SỐ: KC 04-17



Kiểm theo Quyết định số 106/CNSH, ngày 24...tháng 12...năm 2004

Tên đề tài nhánh:

Nghiên cứu qui trình thu nhận peptit kháng khuẩn từ thực vật

Chủ trì: GS.TSKH Phạm Thị Trân Châu.

Trung tâm Công nghệ Sinh học, Đại học Quốc gia Hà nội.

TT	Họ và tên, Học hàm	Đơn vị công tác	Chức danh trong Hội đồng
1.	TS. Dương Văn Hợp	Bảo tàng giống chuẩn vi sinh vật học. Trung tâm CNSH. ĐHQG Hà nội.	Chủ tịch
2.	PGS.TS Nguyễn Ngọc Hiến	Khoa Vi sinh. Học viện Quản Y	Phản biện I
3.	TS. Phan Quốc Kinh	Liên hiệp Khoa học sản xuất Công nghệ mới.	Phản biện II
4.	TS. Nguyễn Huỳnh Minh Quyền	Viện Di truyền Nông nghiệp Việt nam	Thư ký
5.	GS.TS Nguyễn Văn Nguyên	Trung tâm độc học, Học viện Quản Y	Ủy viên
6.	GS.TS Đỗ Ngọc Liên	Phòng Y sinh-Trung tâm Sinh học phân tử Tế bào, ĐHKHTN. ĐHQG Hà nội.	Ủy viên
7.	TS. Đàm Bạch Dương	Bộ Khoa học Công nghệ và Môi trường	Ủy viên

BIÊN BẢN NGHIỆM THU ĐỀ TÀI NHÁNH

1. Tên đề tài: "Nghiên cứu qui trình thu nhận peptit kháng khuẩn từ thực vật"

Mã số: KC-04-17(04)

Thời gian thực hiện: 10/2001 đến tháng 10/2004

Chủ trì đề tài nhánh: GS.TSKH Phạm Thị Trần Châu

Cơ quan chủ trì đề tài nhánh:

Trung tâm Công nghệ Sinh học, Đại học Quốc gia Hà nội.

2. Quyết định thành lập Hội đồng cấp cơ sở:

QĐ số: 106./CNSH –QĐ. ngày 24. tháng 12. năm 2004.

3. Ngày họp Hội đồng: 28./12. năm 2004.

Địa điểm: Trung tâm Công nghệ Sinh học, Đại học Quốc gia Hà nội.

4. Số thành viên của Hội đồng theo quyết định: 07.

- Số thành viên có mặt: 06.

- Số thành viên vắng mặt: 01.

5. Đại diện cơ quan chủ trì đề tài nhánh: TS. Dương Văn Hợp, Giám đốc.

6. Nhận xét đánh giá của các thành viên trong Hội đồng:

- Phản biện 1: PGS.TS ^{tiếng} Nguyễn Ngọc Hiền, Khoa Vi sinh, Học viện Quân Y: Đề tài đã thu được bài bản, hướng nghiên cứu rất tốt, mang tính ý thức cao. Mang đến tin cậy các đặc điểm là song nghi, tái chiết. Các thủ nghiệm được tiến hành trên một trăm mẫu vi khuẩn khác nhau, trên đồng vật thực nghiệm việc tách sạch chế phẩm có tính kháng khuẩn, chứng minh rằng thực nghiệm là bước tiến quan trọng của hướng nghiên cứu phục vụ y học.
- Phản biện 2: TS. Phan Quốc Kinh, Liên hiệp Khoa học sản xuất Công nghệ mới: Đề tài là hướng nghiên cứu mới, có kết quả tốt. Chế phẩm đề tài có khả năng diệt vi khuẩn, nhện, trứng sâu, diệt là từ cuối vảy và vi khuẩn môi trường. Kết quả của đề tài mở ra quá trình điều chế bên vảy tuyến của Việt Nam nơi nguồn gen thực vật rất phong phú và đặc sắc.
- TS. Dương Văn Hợp, Bảo tàng giống chuẩn vi sinh vật học, Trung tâm CNSH.ĐHQG Hà nội: Đề tài có ý nghĩa khoa học, thực tiễn, tài nguyên trong nước, hướng chế phẩm tiến triển là rất lớn. Có 3 kết quả chính trên nhiều chế phẩm thực nghiệm, có tính kháng khuẩn, chứng minh an toàn sinh học, đặc biệt là thu được độc cấp và bảo quản được.

ĐẠI HỌC QUỐC GIA HÀ NỘI
Trung tâm Công nghệ Sinh học

===000===

Số: 49 /CNSH

CỘNG HÒA XÃ HỘI CHỦ NGHĨA VIỆT NAM
Độc lập - Tự do - Hạnh phúc

===000===

Hà nội, ngày 10 tháng 12 năm 2004

QUYẾT ĐỊNH CỦA GIÁM ĐỐC TRUNG TÂM CÔNG NGHỆ SINH HỌC

Về việc thành lập Hội đồng nghiệm thu cấp cơ sở đề tài nhánh của đề tài KC.04-17

GIÁM ĐỐC TRUNG TÂM CÔNG NGHỆ SINH HỌC

- Căn cứ quyết định số 32/TCCB ngày 16 /1 /1996 về việc thành lập Trung tâm Công nghệ Sinh học - Đại học Quốc gia Hà nội;
- Căn cứ Quyết định số 361/TCCB ngày 08 tháng 7 năm 1996 của Giám đốc Đại học quốc gia Hà nội ban hành Điều lệ tổ chức và hoạt động của Trung tâm Công nghệ Sinh học;
- Căn cứ quyết định số 282/QĐ ngày 20 tháng 6 năm 1980 của Chủ nhiệm Ủy ban Khoa học và Kỹ thuật Nhà nước (nay là Bộ Khoa học và Công nghệ) về "Thể thức đánh giá và nghiệm thu các công trình nghiên cứu khoa học kỹ thuật";
- Theo đề nghị của Các Ông(Bà) Trưởng phòng Tài vụ, Trưởng phòng Hành chính Tổng hợp.

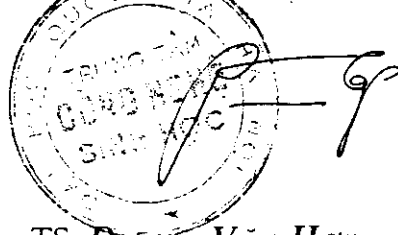
QUYẾT ĐỊNH

Điều 1: Thành lập Hội đồng Khoa học nghiệm thu cấp cơ sở đề tài nhánh của đề tài cấp Nhà nước mã số: KC.04-17" Nghiên cứu đặc điểm sinh học các nhóm hoạt chất và đề xuất công nghệ sản xuất chế phẩm y sinh học từ nấm Maitake và Phục linh " của GS.TSKH. Trịnh Tam Kiệt Trung tâm Công nghệ Sinh học, Đại học Quốc gia Hà Nội chủ trì, gồm 7 thành viên (có danh sách kèm theo).

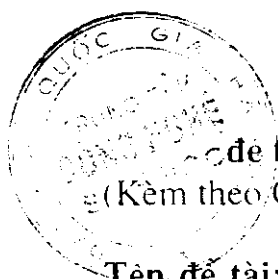
Điều 2: Hội đồng có nhiệm vụ đánh giá, kết luận đề nghiệm thu kết quả nghiên cứu của đề tài và tự giải thể sau khi hoàn thành nhiệm vụ.

Điều 3: Các Ông(Bà) Trưởng phòng Tài vụ, Trưởng phòng Hành chính Tổng hợp và các thành viên trong Hội đồng có trách nhiệm thi hành quyết định này.

GIÁM ĐỐC
TRUNG TÂM CÔNG NGHỆ SINH HỌC



TS. Dương Văn Hợp



DANH SÁCH

Thành viên Hội đồng nghiệm thu cấp cơ sở

đề tài nhánh của đề tài cấp Nhà nước, mã số KC.04-17

(Kèm theo Quyết định số 99 /CNSH, ngày 10 tháng 12 năm 2004)

Tên đề tài: Nghiên cứu đặc điểm sinh học các nhóm hoạt chất và đề xuất công nghệ sản xuất chế phẩm y sinh học từ nấm Maitake và Phục linh

Chủ trì: GS.TSKH. Trịnh Tam Kiệt

Trung tâm Công nghệ Sinh học, Đại học Quốc gia Hà nội

1. GS.TSKH. Dương Đức Tiên, Trung tâm Công nghệ Sinh học	Chủ tịch
2. GS.TS. Bùi Xuân Đông, Trường ĐH Dược Hà nội	UV, Phan biên l
3. TS. Phạm Quang Thu, Viện khoa học lâm nghiệp Việt nam	UV, Phan biên
4. GS. Nguyễn Thành Đạt, Trường ĐH Sư phạm Hà nội	Ủy viên
5- GS. Phạm Quang Thọ, Bộ Nông nghiệp và Phát triển Nông thôn	Ủy viên
6. TS. Dương Văn Hợp, Trung tâm Công nghệ Sinh học	Ủy viên
7- TS. Đàm Bạch Dương, Bộ Khoa học CN&MT	UV thu ký

(Danh sách gồm có 7 người)

BIÊN BẢN HỌP HỘI ĐỒNG

NGHIỆM THU CẤP CƠ SỞ ĐỀ TÀI NHÁNH CỦA ĐỀ TÀI CẤP NHÀ NƯỚC MÃ SỐ: KC.04-17

1. **Tên đề tài** Nghiên cứu đặc điểm sinh học các nhóm hoạt chất và đề xuất công nghệ sản xuất chế phẩm y sinh học từ nấm Maitake và Phục linh

2. **Mã số**

3. **Chủ trì** GS TSKH. Trịnh Tâm Kiệt

4. **Quyết định thành lập Hội đồng Khoa học** nghiệm thu đề tài số ngày
tháng năm 2004

5. **Ngày họp Hội đồng**

6. **Danh sách các thành viên của Hội đồng:**

1. GS TSKH Dương Đức Tiên, TTCNBH	Chủ tịch HĐ
2. TS. Đàm Bạch Dương, B5 KH&CN	UV Thư ký
3. GS. TS Bùi Xuân Đông, ĐH Dược Hà Nội	UV phản biện 1
4. TS. Phạm Quang Thu, Viện KH Lâm nghiệp	UV phản biện 2
5. GS. Nguyễn Thanh Đạt, Đại học sư phạm	Ủy viên
6. GS. Phạm Quang Thu, B5 NN & PTNT	Ủy viên
7. TS. Dương Văn Hợp, TTCNBH	Ủy viên

a. Có mặt: 07.... người

b. Vắng mặt: 0..... người

01
02.....

7. **Người trình bày báo cáo:**

Họ và tên: GS. TSKH. Trịnh Tâm Kiệt

8. **Kết quả đánh giá**

Số phiếu phát ra: 07

Số phiếu hợp lệ: 07

Kết quả bỏ phiếu (ghi số phiếu đánh giá theo các mức sau):

Tốt 07 Khá 0 Đạt 0 Không đạt 0

9. Kết luận của Chủ tịch Hội đồng

a. Về tính khoa học và công nghệ của công trình nghiên cứu:

Đề tài được thực hiện nghiêm túc, ... ra gồm đây để các cấp ...
hệ muốn tiếp ... tránh chất lượng ... thủ nghiệm thu được các kết quả ...
Đề tài đã đạt các tiêu chuẩn ... B. Hoa ... và ...

b. Khả năng triển khai và ứng dụng vào thực tiễn:

Đề tài đã ... ra ... khả năng phát triển ... tiếp ... phục vụ ... các ...
... tiếp ... một năm ... tạo ... liên ... đây được ...

c. Hiệu quả kinh tế - xã hội:

Mức ... các ... phát ... triển ... các ... tiếp ... tiếp ...
Khả năng ... duy ... tiếp ... đây được ... một năm ...

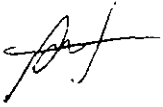
d. Về kết quả bỏ phiếu (xoá những cụm từ không cần thiết)

Tốt ~~7/7~~ Khá ~~Đạt~~ Không đạt

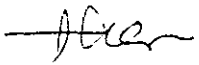
10. Kiến nghị của Hội đồng:

Đề nghị tiếp tục nghiên cứu tạo tiếng tự nhiên hơn trong dạy học

Thư ký Hội đồng


Đàm Bạch Dung

Chủ tịch Hội đồng


Duong Duc Tien

Hà Nội, ngày 23 tháng 12 năm 2004

Số 358/QĐ - CNSH

**QUYẾT ĐỊNH CỦA VIỆN TRƯỞNG
VIỆN CÔNG NGHỆ SINH HỌC**
về việc thành lập Hội đồng nghiệm thu cấp cơ sở
để tài nhánh cấp Nhà nước

**VIỆN TRƯỞNG
VIỆN CÔNG NGHỆ SINH HỌC**

Căn cứ Quyết định số 21/KHCNQG-QĐ ngày 19 tháng 06 năm 1993 của Giám đốc Trung tâm Khoa học Tự nhiên và Công nghệ Quốc gia, nay là Chủ tịch Viện Khoa học và Công nghệ Việt Nam qui định nhiệm vụ, quyền hạn và tổ chức bộ máy của Viện Công nghệ sinh học;

Căn cứ Công văn số 1368/KHCNQG-KHTC ngày 03/12/1999 của Giám đốc Trung tâm KHTN&CNQG về việc hướng dẫn thủ tục nghiệm thu đề tài khoa học công nghệ cấp Trung tâm, nay là Viện Khoa học và Công nghệ Việt Nam;

Xét đề nghị của Trưởng phòng Quản lý tổng hợp,

QUYẾT ĐỊNH

Điều 1: Thành lập Hội đồng cấp cơ sở nghiệm thu đề tài nhánh cấp Nhà nước:

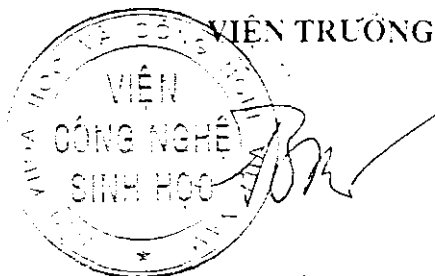
“Thu nhận phân tử tái tổ hợp melittin-carries để ứng dụng trong y học”, do TS. Lê Quang Huấn chủ nhiệm, thuộc đề tài KC 04-17 do PGS. TS. Nguyễn Thị Ngọc Dao chủ trì (danh sách kèm theo Quyết định này).

Điều 2: Cử PGS. TS. Phan Văn Chi làm Chủ tịch Hội đồng. Hội đồng có nhiệm vụ xem xét đánh giá đề tài theo thang điểm hướng dẫn (phiếu đánh giá kết quả thực hiện đề tài nghiên cứu khoa học kèm theo) và tự giải thể sau khi hoàn thành nhiệm vụ.

Điều 3: Trưởng phòng Quản lý tổng hợp, Chủ tịch Hội đồng và các thành viên Hội đồng chịu trách nhiệm thi hành Quyết định này. *MB*

Nơi nhận:

- Như điều 3
- Lưu đề tài, VT.



Lê Trần Bình

DANH SÁCH HỘI ĐỒNG NGHIỆM THU CẤP CƠ SỞ ĐỀ TÀI NHÁNH CẤP NHÀ NƯỚC

Thu nhận phân tử tái tổ hợp melittin-carries để ứng dụng trong y học

(Kèm theo Quyết định số 358/QĐ- CNSH ngày 23 tháng 12 năm 2004)

1	PGS. TS. Phan Văn Chi	Viện Công nghệ sinh học	Chủ tịch Hội đồng
2	TS. Lê Thanh Hoà	Viện Công nghệ sinh học	Phản biện 1
3	PGS. TS. Đỗ Khắc Hiếu	Viện Công nghệ sinh học	Phản biện 2
4	PGS. TS. Nông Văn Hải	Viện Công nghệ sinh học	Ủy viên
5	PGS. TS. Trương Nam Hải	Viện Công nghệ sinh học	Ủy viên
6	TS. Nguyễn Trung Chính	Bệnh viện Quân đội TW 108	Ủy viên
7	TS. Đinh Duy Kháng	Viện Công nghệ sinh học	Ủy viên – Viện ký



Hà Nội, ngày 28 tháng 12 năm 2004

**BIÊN BẢN HỌP HỘI ĐỒNG NGHIỆM THU CẤP CƠ SỞ ĐỀ TÀI NHÁNH CỦA ĐỀ
TÀI NHÀ NƯỚC (MÃ SỐ KC-04-17)**

1. **Tên đề tài nhánh:** Thu nhận cytolytic peptide melittin tái tổ hợp để ứng dụng trong y học
2. Mã số: KC-04-17-04
3. Chủ trì đề tài nhánh: TS. Lê Quang Huấn
4. Quyết định thành lập Hội đồng khoa học nghiệm thu đề tài nhánh: Quyết định số 358/QĐ-CNSH, ngày 23 tháng 12 năm 2004 của Viện trưởng Viện Công nghệ sinh học.
5. Ngày họp Hội đồng: 28 tháng 12 năm 2004, tại Hội trường Viện CNSH
6. Danh sách thành viên Hội đồng theo quyết định:

PGS.TS. Phan Văn Chi,

Viên CNSH

Chủ tịch Hội đồng

TS. Lê Thanh Hoà,

Viên CNSH

Phản biên 1

PGS.TS. Đỗ Khắc Hiếu,

Viên CNSH

Phản biên 2

PGS.TS. Nông Văn Hải,

Viên CNSH

Ủy viên

PGS.TS. Trương Nam Hải,

Viên CNSH

Ủy viên

TS. Nguyễn Trung Chính,

Bệnh Viên Quân đội TW 108

Ủy viên

TS. Đinh Duy Kháng,

Viên CNSH

Ủy viên thư ký

Số thành viên có mặt:

Số thành viên vắng mặt:

Sau
mặt (b' g'ui' p'hi'au' a' d'au' x'et')

- ## 7. Kết quả đánh giá

Số phiếu phát ra:

Số phiếu thu về:

Kết quả bỏ phiếu:

Đạt: *Đạt* phiếu

Không đạt: phiếu

- ### 8. Kết luận của Hội đồng:

- Đã hoàn thành các nội dung theo yêu cầu của đề tài, bao gồm:

- Đã tạo dòng, xác định trình tự và phân tích đoạn gen mã hóa melitin từ ong mật.
- Đã tạo dòng được gen mã hóa kháng thể kháng lại tế bào lympho từ ngân hàng phage.
- Đã tạo được kháng thể kháng lại các kháng nguyên ung thư của tế bào lympho bằng phương pháp phage display.
- Đã tạo được phân tử melitin-Carriers tái tổ hợp bằng việc gắn gen mã hoá melitin với kháng thể kháng kháng nguyên ung thư của tế bào lymphoma và cho biểu hiện ở *E. coli*.
- Các phương pháp nghiên cứu là hiện đại như nhân dòng, xác định trình tự, nghiên cứu biểu hiện gen, thiết kế Melitin_Carrier và biểu hiện để thu nhận protein tái tổ hợp, phage display v...
- Như vậy so với nhiệm vụ được giao, đề tài đã hoàn thành tốt các yêu cầu đề ra.
- Các bước tiếp theo:
- Phải khẳng định được protein tái tổ hợp bằng các thử nghiệm chắc chắn hơn.

Chủ tịch Hội đồng

Thư ký Hội đồng

Phan Văn Chi

Đinh Duy Khang

Số: 93/QĐ-ĐH BK-CN/STP

Hà Nội, ngày 01 tháng 11 năm 2004

QUYẾT ĐỊNH

**của Viện trưởng Viện CN Sinh học và CN Thực phẩm,
Trường Đại học Bách khoa Hà Nội**

(v/v: thành lập Hội đồng cơ sở đánh giá đề tài nhánh cấp nhà nước)

Điều 1: Căn cứ theo quy trình đánh giá nghiệm thu đề tài nhánh thuộc đề tài khoa học công nghệ cấp nhà nước. Viện trưởng Viện Công nghệ Sinh học và Công nghệ Thực phẩm, Trường đại học Bách khoa Hà Nội quyết định: thành lập Hội đồng đánh giá đề tài nhánh KC-04-17-06 thuộc đề tài KC-04-17 do TS. Đỗ Thị Hoa Viên, CBGD của Viện chủ trì.

Hội đồng gồm các thành viên sau:

1. GS. TSKH. Lê Văn Nhung	Viện CNSH & CNTP, ĐH Bách khoa HN.	Chủ tịch Hội đồng
2. PGS. TS. Phạm Công Thành	Viện CNSH & CNTP, ĐH Bách khoa HN.	Thư ký Hội đồng
3. PGS. Lê Ngọc Tú	Viện CNSH & CNTP, ĐH Bách khoa HN.	Ủy viên Hội đồng
4. TS. Phan Quốc Kinh	TT nghiên cứu Hóa sinh, Liên hiệp KH & CN mới	Ủy viên Hội đồng
5. PGS. TS. Hà Huy Kế	Cục Hóa sinh, Tổng cục KT, Bộ CA.	Ủy viên Hội đồng

Điều 2: Hội đồng có trách nhiệm họp và đánh giá đề tài nhánh theo quy định hiện hành của Bộ Khoa học và Công nghệ.

Viện CN Sinh học và CN Thực phẩm

VIỆN TRƯỞNG
GS.TS. Hoàng Đình Học

**BIÊN BẢN ĐÁNH GIÁ CƠ SỞ
KẾT QUẢ ĐỀ TÀI NHÁNH CẤP NHÀ NƯỚC**

(Kèm theo Quyết định 93/QĐ-ĐHBK-CNSHTP ngày 01/11/2004
của Viện trưởng Viện CN Sinh học & CN Thực phẩm, Đại học Bách khoa HN)

A. Những thông tin chung

1. Đề tài nhánh:

Nghiên cứu phytoestrogen từ đậu tương và củ sắn dây Việt Nam để ứng dụng sản xuất sản phẩm chống lão hóa.

Mã số: KC-04-17-06

Chủ trì đề tài nhánh: TS. Đỗ Thị Hoa Viên

2. Quyết định thành lập Hội đồng

Quyết định 93/QĐ-ĐHBK-CNSHTP ngày 01/11/2004 của Viện trưởng Viện CN Sinh học & CN Thực phẩm, Đại học Bách khoa Hà Nội.

3. Địa điểm và thời gian họp Hội đồng

Tại P.210, C4, Đại học Bách khoa, vào 14h30, ngày 03/11/2004

4. Số thành viên Hội đồng có mặt trên tổng số thành viên: 5/5

B. Nội dung làm việc của Hội đồng

1. Hội đồng đánh giá cơ sở đã nghe chủ trì đề tài nhánh báo cáo về nội dung và kết quả nghiên cứu.

3. Hội đồng thảo luận, nhận xét, đánh giá về kết quả đã đạt được, về tính mới, tính khoa học và ý nghĩa ứng dụng thực tiễn của Đề tài nhánh

3. Hội đồng đã bỏ phiếu nhận xét và đánh giá kết quả Đề tài nhánh.

4. Kết luận của Hội đồng

4.1. Tổng hợp ý kiến nhận xét: Đề tài đã tiến hành nghiêm túc, đã hoàn thành tốt các nhiệm vụ của một đề tài nhánh thuộc đề tài KH & CN cấp nhà nước. Nội dung nghiên cứu là mới ở Việt Nam. Phương pháp nghiên cứu đảm bảo tính khoa học, kết quả đáng tin cậy. Báo cáo tổng kết đầy đủ, rõ ràng và khoa học. Đề tài có ý nghĩa thực tiễn trong việc sản xuất sản phẩm chống lão hóa cho nữ giới và đã phối hợp với Cty Dược phẩm TW 25 để bước đầu sản xuất sản phẩm “Tiên Dung”.

4.2/ Kết quả bỏ phiếu đánh giá:

Đạt: 5 phiếu

Không đạt: 0 phiếu

THU KÝ HỘI ĐỒNG
(Họ, tên và chữ ký)



PGS. TS. Phạm Công Thành

CHỦ TỊCH HỘI ĐỒNG
(Họ, tên và chữ ký)



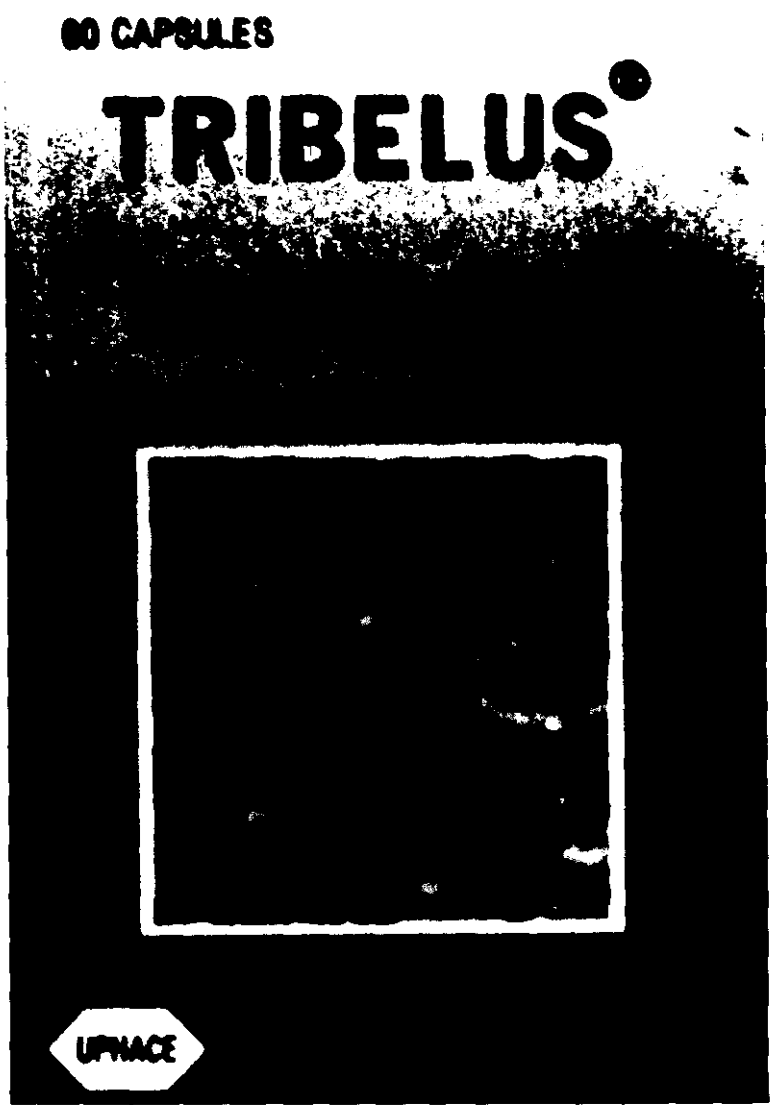
GS. TSKH. Lê Văn Nhung

C/ CÁC SẢN PHẨM CỤ THỂ

(liệt kê các sản phẩm và một số hình ảnh)

- 1- Tribelus
- 2- Uphaton
- 3- Tiên dung
- 4- Hagaton
- 5- Naturenz
- 6- Silymarin
- 7- Lumbrokinase
- 8- Peptid kháng khuẩn
- 9- Bột nấm phục linh tinh khiết
- 10- Nấm thuốc *Hericium erinaceum*
- 11- 3000 cây hoàng liên con từ nuôi cấy mô
- 12- Sinh khối tế bào hoàng liên
- 13- Sinh khối tế bào cúc gai

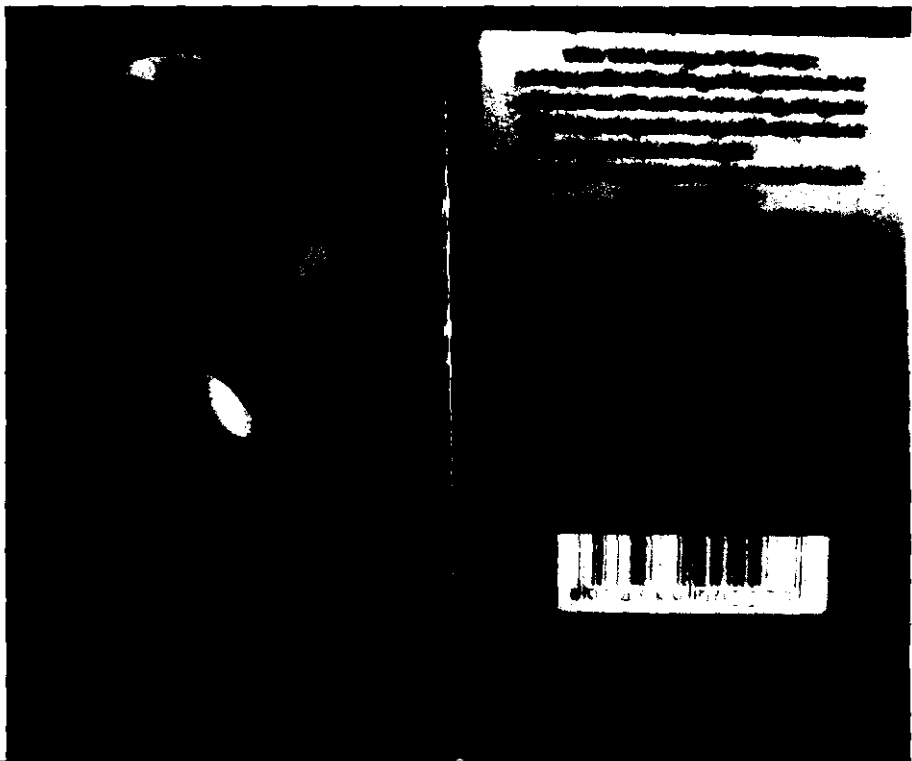
MỘT SỐ HÌNH ẢNH CỦA SẢN PHẨM



Ảnh 17. Viên nang thuốc Tribelus



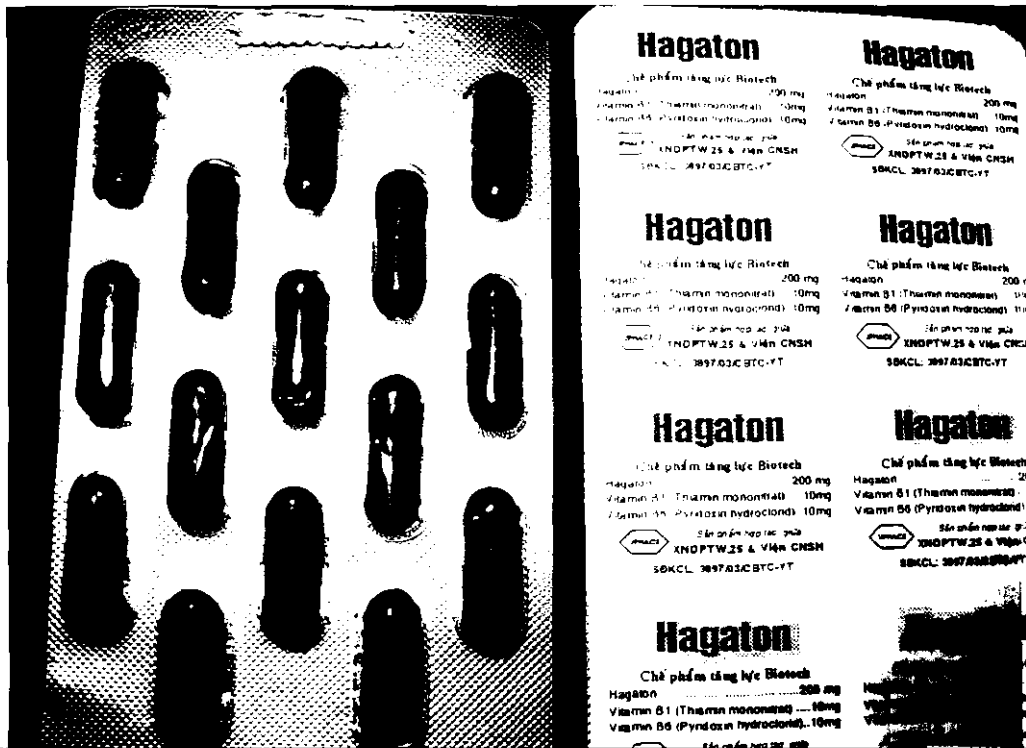
Ảnh 18. Viên thuốc nang uphaton



Ảnh 19. Viên nang Tiên dung



Ảnh 29. Bột hagaton



Ảnh 30. Viên nang Hagaton

**E/ Ý KIẾN NGƯỜI SỬ DỤNG SẢN PHẨM
VÀ TÌNH HÌNH TRIỂN KHAI SẢN XUẤT
MỘT SỐ CHẾ PHẨM CỦA ĐỀ TÀI**

From: dnangluong <dangluong@hcm.fpt.vn>
 To: ntluong@netnam.vn <ntluong@netnam.vn>
 Date: Monday, November 03, 2003 6:47 PM
 Subject: Thu hoi thong tin

Kinh gui : GS. NGUYEN TAI LUONG .

Kinh thua Ong,

Toi la NGUYEN DANG LUONG, hien dang cong tac tai Phan Vien vat ly tai Tp. HCM - thuoc Trung tam KH TN & CN Quoc gia . Hon mot nam truoc day, qua bao chi toi duoc biet toi hai loai san pham : HASATON va RABITON nhung tai Sai Gon chung toi khong lam sao tim duoc cho mua . Nay, nhan dip don vi chung toi co tham du TECH MARK 2003 va anh em co cam ve mot cuon gioi thieu cac san pham tham gia Tech Mark va toi co duoc dia chi nay .

Xin Ong vui long cho chung toi biet :

- tai Sai Gon chung toi co the mua nhung san pham HASATON, RABITON va HAGATON o dia chi nao ?
- San pham HAGATON la loai san pham co nguon goc tu nguyen lieu gi ?
- Gia ban va cach dung, tinh nang cua tung loai (HASATON, RABITON, HAGATON) ?

Neu o Sai Gon chua co dia chi nao ban cac loai che pham ke tren thi lieu chung toi co the mua bang cach : gui tien (qua buu dien) toi Quy don vi va cung qua buu dien ma chung toi co the nhan buu pham tai Sai Gon duoc khong ?

Kinh chuc GS. dat nhieu thanh tuu moi .

Kinh Ong

NGUYEN DANG LUONG

From: dnangluong <dangluong@hcm.fpt.vn>
To: ntluong@netnam.vn <ntluong@netnam.vn>
Date: Sunday, November 09, 2003 6:28 PM
Subject: Thu cam on

Kính gửi GS. NGUYEN TAI LUONG ,

Xin trân thành cảm ơn Ông, sáng nay (09/11/2003) tôi đã nhận được thuốc do Ông gửi theo đường bưu điện EMS vào Tp. HCM .

Một lần nữa xin cảm ơn Ông nhiều vì nhiệt tình giúp đỡ mà Ông đã giành cho tôi . Rất mong sớm có ngày được gặp mặt để có thể tâm sự nhiều . Nhận đây, tôi cũng xin được thông báo cùng Ông đôi chút về cá nhân mình : tôi năm nay cũng đã 68 tuổi rồi . Sau khi nghỉ hưu tôi đã trở về làm việc tại Phan viện vật lý tại Tp.HCM được mười mấy năm nay . Từ năm 1986, tôi đã là người đầu tiên tại VN làm thiết bị OZONE - vì tôi là dân CONG NGHE HOA HOC ; nhưng thời đó có chế độ bao cấp còn quá nặng nề nên tôi đã không thể "nhức nhích" được . Mãi tới 1993 , Nhà nước "thoảng" hơn và tôi mới có dịp phát triển lại công nghệ ozone . Nhưng tiếc rằng khi DUOC LAM thì tuổi đã cao và sức cũng yếu nên không có thể "bon chen"... với lớp trẻ trên THUONG TRUONG được . Hiện tôi đang thực thi, triển khai một số đề tài cho các địa phương phía Nam và cũng đang gắng sức tiếp tục làm một số Patents , gọi là ... BAO DAP CHO DOI . Thực lòng khi thấy ai đó, ở đâu đó có người như Ông làm được những lợi ích cho mảnh đất quê hương còn nghèo đói, gian nan, vất vả này là tôi hết sức TAM DAC và kính trọng . Kính mong Ông hiểu và thông cảm cho tâm sự của tôi .

Kính chúc Ông luôn đạt được nhiều thành tựu mới, nhiều sức khỏe và toàn gia hạnh phúc, có nhiều thành đạt trong cuộc sống .

NGUYEN DANG LUONG

CỘNG HOÀ XÃ HỘI CHỦ NGHĨA VIỆT NAM
Độc lập - Tự do - Hạnh phúc

Kính gửi: **THƯỢNG TƯỚNG ĐẶNG VŨ HIỆP**
 CHỦ TỊCH HỘI NẠN NHÂN CDDC – DIOXIN VIỆT NAM

Đầu thư kính chúc ông mạnh khỏe và hạnh phúc, luôn thu được nhiều thành quả trong công tác.

Tên tôi là : **Nguyễn Văn Khoa** - 60 tuổi

Hiện ở: 346 Đường Ngô Gia Tự – Phường Đức Giang – Quận Long Biên – Thành phố Hà Nội.

Là cựu chiến binh tham gia chiến trường miền Nam 5 năm (1965 – 1969 + 1972) đã bị giải hoá học trực tiếp 2 lần ở B45 và ASO – A Lưới Thừa Thiên Huế, B3 Tây Nguyên viết thư lên Giám đốc Quỹ bảo trợ Nạn nhân chất độc da cam đề nghị một việc như sau:

Thưa Ông Chủ tịch Hội NNCDDC – Dioxin Việt Nam! điều đầu tiên tôi khẳng định là nếu tôi và anh Tấn, anh Thịnh không được sự phát hiện của Uỷ ban 10 – 80 nay là Ben 10 – 80 thuộc Bộ y tế cho uống thuốc NATUREN2 của Phòng ENZIN Học – Viện công nghệ sinh học Quốc gia do Phó giáo sư - Tiến sĩ Ngọc Dao làm chủ đề tài sản xuất từ năm 1998 thì chúng tôi đến nay có lẽ đã được Diêm Vương mời về vài năm nay rồi.

Thưa Ông Chủ tịch Hội NNCDDC – Dioxin Việt Nam! Thuộc trên thời kỳ đầu 1998. Chắc là kinh phí có nhiều nên thuốc sản xuất ra điều trị một lúc hơn 100 CCB ở UB10 – 80 cũ. Sau này do kinh phí ít nên chỉ điều trị từ 25 đến 35 CCB. Hiện nay là 25 CCB được Ban 10 – 80 đang điều trị từ 12/2004.

Thuộc trên tôi được uống các đợt 01/1998 đến 03/2000 hết thuốc.

Tháng 9/2000 đến tháng 01/2001 hết thuốc.

Tháng 6/2002 đến tháng 12/2002 hết thuốc và 20/12/2004 tôi lại được uống thuốc tiếp đến nay.

Tất cả hàng trăm các CCB được uống thuốc trên được tăng cân, tăng sức khỏe, hết ngứa. Điển hình như anh Tấn (ở xã Phụng Chân – Chân Mỹ – Hà Tây). Đây là Bí thư Đảng uỷ xã bị bệnh tật do nhiễm chất độc da cam quật (không thuốc gì uống khỏi) phải xin nghỉ làm việc ở xã: Anh hoàn toàn không ngủ được, vô hồn sức khỏe suy kiệt, người dờ dẩn thất thần điển hình của bệnh thần kinh. Sau hơn 01 năm uống thuốc trên đã khoẻ mạnh tinh táo và điều đáng mừng tháng 6 năm 2002 anh lại làm việc ở UBND xã Thụy Chân với cương vị Chủ tịch MTTQ cho đến nay.

Hai con tôi được uống thuốc cũng đỡ ngứa đã ngủ được – trước các cháu thức nhiều, không ngủ được.

Đã số lúc CCB (trừ các trường hợp bị dị dạng, dị tật nặng) sức khỏe giảm sút, thần kinh suy nhược yếu, nổi ngứa, đau cơ, chảy nước ở đầu mắt ngủ mà được uống thuốc trên là kết quả rất tốt (quả 3 người và 2 cháu con của tôi làm minh chứng).

(Xin lưu ý những bệnh nhân đã điều trị và uống thuốc tây y nhiều năm ở các bệnh viện mà không khỏi).

Dù với mức độ đáp ứng thuốc của các CCB được UB 10 – 80 điều trị có khác nhau, nhưng tất cả đều khỏe hơn, ăn uống, ngủ tốt hơn so với trước khi chưa được uống thuốc.

Thưa Ông Chủ tịch Hội NNCĐDC – Dioxin Việt Nam! Thuốc uống tốt như vậy nhưng không có kinh phí để sản xuất. Bằng sự nỗ lực của Giáo sư - tiến sĩ Ngọc Dao cùng CBCNV Phòng ENZIN Học – Viện công nghệ sinh học Quốc gia đã cấp cho UB 10 – 80 đợt thuốc 20/12/2004 điều trị cho 25 CCB trong 6 tháng, có nghĩa là đến tháng 6/2005 thì hết thuốc về phần các bác sĩ Hùng, Cúc, Hằng và tất cả các cán bộ ở ủy ban 10-80 rất tâm huyết, nhiệt tình chữa chạy cho các CCB nhưng do cơ sở điều trị chật hẹp, trang thiết bị thiếu, thuốc men thiếu, nên cũng đành bó tay.

Thưa Ông Chủ tịch Hội NNCĐDC – Dioxin Việt Nam! Qua một số trường hợp tôi nêu ở trên với cương vị là giám đốc quỹ bảo trợ nạn nhân chất độc da cam. Tôi đề nghị Ông xem xét cung cấp kinh phí từ quỹ của nạn nhân chất độc da cam cho Ủy Ban 10-80, Phòng Enzin Học - Viện sinh học Công nghệ Quốc gia sinh học do Phó giáo sư - Tiến sĩ Ngọc Dao để sản xuất theo 3 hướng:

1. Sản xuất thuốc để cấp cho Ban 10-80 điều trị cho nạn nhân chất độc da cam.

2. Cấp một khoản kinh phí cho Viện sinh học sản xuất ra thuốc bán theo giá bảo toàn vốn không lấy lãi để các đối tượng nạn nhân chất độc da cam trên toàn quốc được tiếp cận với thuốc. Nếu được như vậy tôi thấy nó còn cần thiết hơn là thỉnh thoảng chúng ta trợ cấp 100 – 200 – 300 nghìn đồng một nạn nhân.

3. Cấp kinh phí đầu tư mở rộng cơ sở điều trị của Ban 10-80.

Về Ban 10-80 bộ phận bác sĩ Hùng cần mở rộng cơ sở khám và điều trị cho các nạn nhân chất độc da cam hơn bây giờ. Vì dù có nhiệt tình tâm huyết đến mấy mà cơ sở thuốc và cơ sở thiếu thốn chật hẹp cũng không thể điều trị cho các nạn nhân chất độc da cam được tốt.

Thưa Ông Chủ tịch Hội NNCĐDC – Dioxin Việt Nam! Trên đây là những đề nghị của tôi. Rất mong Ông giám đốc quan tâm xem xét về vấn đề này, theo tôi thấy là rất thiết thực, vì chỉ thiếu kinh phí, cơ sở điều trị chật hẹp mà các anh chị bác sĩ Hùng và Cúc, Hằng ở Ban 10-80 và bác sĩ Ngọc Dao những người điều trị và sản xuất ra thuốc của chúng ta cần chữa cho đồng đội phải bó tay.

Lần nữa xin ông lưu ý nghiên cứu cung cấp kinh phí cho 2 nơi trên, vì đó là rất thiết thực.

Xin chúc ông mạnh khỏe hạnh phúc!

Ngày 1... tháng 2 năm 2005

Kính thư

ĐT của TS Ngọc Dao : 04.7563159

ĐT của B/s Hùng Ban 10-80 : 04.5583759

CỘNG HOÀ XÃ HỘI CHỦ NGHĨA VIỆT NAM
Độc lập - Tự do - Hạnh phúc

Kính gửi: ỦY BAN CHÍNH SÁCH CỦA QUỐC HỘI
NƯỚC CỘNG HÒA XHCN VIỆT NAM

Đồng kính gửi: BÀ NGUYỄN THỊ HẰNG – BỘ TRƯỞNG BỘ LĐTBXH

Tên tôi là : Nguyễn Văn Khoa

Hiện ở: 346 Đường Ngô Gia Tự – Phường Đức Giang – Quận Long Biên –
Thành phố Hà Nội.

Cựu chiến binh tham gia chiến trường miền Nam từ 1965 – 1969 + 1972) tại các mặt trận B45 - Thừa Thiên Huế - B3 Tây Nguyên cùng tập thể Đ.Đ.Đ.Đ. d/c CCB đang điều trị ở Ban 10-80 cùng ký tên gửi đơn lên Ủy ban chính sách của Quốc hội và Bà Bộ trưởng Bộ LĐTBXH đề nghị một việc như sau:

Cuộc kháng chiến chống Mỹ đã trôi qua ngót 30 năm, màu xanh đã lấp kín những hố bom, cây cối lại đâm chồi và nở hoa ... Quá khứ chiến tranh chìm dần cũng là lẽ thường. Thế nhưng có những vết thương chẳng chịu chìm vào quên lãng. Nó không phải là vết thương do bom đạn trên thân thể người chiến sỹ đeo đẳng họ từ ngày trở về, để tiếp tục tàn phá nhiều gia đình. Nó không chỉ găm nhăm tàn phá thân thể những người từng trực tiếp ở chiến trường mà còn ảnh hưởng nghiêm trọng đến những đứa con của họ. Đó là di chứng do chất độc hoá học Mỹ đã sử dụng trong chiến tranh Việt Nam. Một cuộc chiến tranh tàn khốc nhất thế kỷ 20 của nhân loại mà Chính phủ Mỹ đã gây ra cho dân tộc ta.

Chính vì những lẽ trên Đảng và Nhà nước đã lấy ngày 10-8 ngày Chính phủ Mỹ cho quân đội giải chất độc của họ, giải hoá học Đioxin xuống Miền Nam để thành lập uỷ ban 10-80 Uỷ ban điều tra hậu quả chiến tranh hoá học đầu tiên của Việt Nam và chính Uỷ ban 10-80 bắt đầu tập hợp các CCB bị nhiễm chất độc hoá học điều trị từ năm 1997 cho đến nay (ngày nay là Ban 10-80 – Thuộc Bộ Y tế).

Công lao của Ủy ban 10-80 của Cố giáo sư Lê Cao Đài, giáo sư Hoàng Đình Cầu, bác sĩ trưởng ban 10-80 Hùng, bác sĩ Hằng, bác sĩ Cúc và GS – TS Ngọc Dao – Viện Công nghệ sinh học Quốc gia là hết sức to lớn về nhiều phương diện. Tổ cáo tội ác chiến tranh hoá học của Mỹ với thế giới.

- Kết hợp với GS – TS Ngọc Dao ở Phòng ENZIN Học – Viện công nghệ sinh học Quốc gia nghiên cứu ra thuốc NATURENZ thuốc của Việt Nam 100% chữa trị cho các CCB bị nhiễm hoá học từ 01/1998 đến nay, thuốc NATURENZ đã đem lại kết quả rất tốt như: Các CCB bị lở loét, sạm da, chảy nước, da bóc dần ra như bóc giấy, thâm đen, đầu chảy nước, rụng tóc, mặt mày sưng, phù nề .Uống vào khỏi, hết ngứa 100%. Đặc biệt các CCB bị chứng đau đầu thần kinh suy giảm, mất ngủ, ù tai uống khỏi 100%.

Trong số này điển hình là Anh Tấn (ở xã Phong Châu – Chương Mỹ – Hà Tây) thân kinh suy nhược cũng đã là người vô hồn, phải nghỉ công tác với cương vị là Phó Chủ tịch xã được UB 10-80 chăm sóc, cho uống thuốc 01 năm, nay anh đã khỏi và tiếp tục công tác trở lại từ tháng 6/2002.

- Bản thân tôi người lở loét, đầu chảy nước, sạm da, u cục nhiều, rụng hết tóc – uống vào giảm đi 7 kg nước, hết ngứa, lở loét (xin lưu ý tất cả những trường hợp trên đều đã qua sử dụng thuốc tây y của các bệnh viện nhiều năm nhưng không khỏi).

Tất cả các CCB được điều trị ở UB 10-80 đều khoẻ hơn, tốt hơn lại làm việc có ích cho đời như vậy. Thuốc có tác dụng nâng đỡ cơ thể, bảo vệ gan để cơ thể đẩy lùi bệnh tật.

Thuốc NATURENZ tốt như vậy nhưng thiếu vì không có kinh phí sản xuất. Các cơ sở thăm khám điều trị của Ban 10-80 thì thật là thiếu thốn (không thể gọi là cơ sở khám và điều trị được). Theo tất cả các CCB nghĩ nên mở rộng cơ sở, trang thiết bị điều trị cho Ban 10-80 và cần thiết lập một số buồng bệnh để có những bệnh nhân cần phải theo dõi khi các bác sĩ ở đây thấy cần.

Thuốc thì thiếu, cơ sở vật chất trong phòng khám theo dõi của Ban 10-80 thì thiếu thốn. Dù lòng nhiệt tình của bác sĩ Hùng, B/s Hằng, b/s Cúc, GS-TS Ngọc Dao cùng tập thể CBCNV của họ cũng đành bó tay.

Thưa Ủy ban chính sách của Quốc hội và Bộ trưởng! Thực tế chúng ta có thiếu kinh phí đâu? chỉ vì chúng ta đầu tư không đúng chỗ, chúng ta có quỹ “bảo trợ các nạn nhân chất độc da cam” hàng trăm tỉ đồng do đồng bào cả nước, các đoàn thể nước ngoài ủng hộ. Tại sao không lấy để cấp cho Phòng ENZIN học - Học viện sinh học công nghệ Quốc gia để sản xuất thuốc cấp cho Ban 10-80 để mở rộng cơ sở khám, mua thuốc, mua trang thiết bị ... mở rộng thành trung tâm điều trị và điều tra hậu quả chất độc da cam.

Thưa Ủy ban chính sách của Quốc hội và Bà Bộ trưởng!

Đảng và Nhà nước ta đã ban hành nhiều chính sách hỗ trợ từ năm 2000 đến nay với những nạn nhân chất độc da cam. Tất cả những chính sách này chúng tôi đều thấy chưa hợp lý. Ai cũng có thể nhận thấy họ là những người đang bị hậu quả chiến tranh hoá học đeo bám và huỷ hoại cơ thể dần. Không thể đem họ ra để so sánh với bất cứ một sự mất mát nào trong chiến tranh.

Vậy chúng tôi tập thể những CCB đang điều trị ở Ban 10-850 đề xuất và kiến nghị một số vấn đề sau:

1. Về mặt Nhà nước chúng tôi xin mượn ý của TS Lê Kế Sơn – Giám đốc Quỹ bảo trợ nạn nhân chất độc da cam, trong bài: “Bàn về bằng chứng hậu quả chiến tranh hoá học”, “Điều quan trọng nhất là người ta có dám chịu trách nhiệm về hậu quả đó và thành tâm giúp đỡ những người bệnh, những đứa trẻ dị tật dù chỉ nghĩ là nạn nhân của chất độc da cam hay không?...” vì tất cả các chiến sĩ theo tiếng gọi của Tổ quốc, của Đảng vào chiến trường tức là đã vào vùng bị nhiễm độc. Xét cho các đối tượng tham gia kháng chiến bị nhiễm hoá học được hưởng trợ cấp theo dạng xếp loại như các đ/c

thương binh (vì nhiễm chất độc Diôxin là một dạng vết thương, không có vết thương) theo tình trạng bệnh tật.

2. Lấy quỹ bảo trợ nạn nhân chất độc da cam để cấp cho cơ sở sản xuất thuốc (Phòng ENZIN học – Viện công nghệ sinh học) để sản xuất thuốc điều trị cho các nạn nhân chất độc da cam.

- Cấp kinh phí cho Ban 10-80 để mua sắm trang thiết bị, mở rộng cơ sở điều trị thành một trung tâm theo dõi các bệnh do Diôxin gây ra.

3. Hãy để cho Ban 10 – 80 tách ra độc lập như hội UB 10-80 là cơ quan chuyên trách điều tra về hậu quả chiến tranh hoá học. Vì chúng ta có quỹ bảo trợ NNCDDC, có Hội những NNCDDC thì tại sao chúng ta không có một uỷ ban độc lập như UB 10-80 cũ để Uỷ ban làm việc như một ngành độc.

UB 10-80, bạn bè quốc tế 5 châu biết đến rất nhiều, UB10-80 trước đây được các đoàn quốc tế thăm và cùng hợp tác nghiên cứu về hậu quả chiến tranh hoá học.

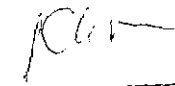
Thưa Uỷ ban chính sách của Quốc hội và Bà Bộ trưởng!

Trên đây là những ý kiến đóng góp. Mong rằng Uỷ ban chính sách Quốc hội và Bà Bộ trưởng xem xét và quan tâm, giúp đỡ cấp kinh phí phát triển UB 10-80, phát triển sản xuất thuốc – là giúp những nạn nhân chất độc da cam chúng tôi trên toàn quốc.

Chúng tôi xin chân thành cảm ơn !

Ngày 3... tháng 2, năm 2005

Kính thư


Ng. Văn Kien

ĐT của TS Ngọc Dao : 04.7563159

ĐT của B/s Hùng Ban 10-80 : 04.5583759

Hẹn Bệnh nhân đến khám lại vào sáng ngày 17/3/2005
(Đề nghị Bệnh nhân viết tổng kết điều trị từ khi bắt đầu dùng thuốc)

THEO DÕI DIỄN BIẾN CỦA QUÁ TRÌNH DÙNG NATURENZE

Những nội dung gợi ý dưới đây bệnh nhân ghi chép chi tiết và tự đánh giá ở mức độ như đã hướng dẫn cho các lần vào các khổ giấy. Trong khi dùng Naturenz không nên dùng các thuốc khác. Trong trường hợp đặc biệt phải có ý kiến của bác sỹ điều trị, phải ghi chép đầy đủ tên thuốc, liều lượng và thời gian sử dụng.

- 1- Bệnh ngoài da: Mẩn ngứa nổi mề đay, lở loét, u cục, bài tiết mủ hôi, sạm da, vảy nến, vết sẹo...
- 2- Bệnh thân : Phù, đầy ỉt, đau lưng, đầy rít, đầy bụng, nước tiểu đục...
- 3- Bệnh cơ quan sinh dục:
Khí hư, đau bụng kinh, rối loạn kinh nguyệt, lạnh hoặc vô cảm tình dục....
- 4- Bệnh tim mạch: Hoa mắt chóng mặt, đánh trống ngực, huyết áp cao, thấp....
- 5- Bệnh hô hấp: Ho khác dờm, khó thở kiểu hen suyễn....
- 6- Bệnh thần kinh: Nhức đầu, tê bại chi, rối loạn cảm giác ngoài da, tê bì hoặc kiến bò, mất ngủ, ngủ mê.
- 7- Bệnh khớp: Xung khớp, đau mỏi cơ khớp các chi, đau lưng, đau cột sống các loại...
- 8- Bệnh cơ quan tiêu hoá:
Đầy bụng khó tiêu, chán ăn, ợi bụng, ỉa lỏng, phân nát, có máu mũi, đau họng...
- 9- Bệnh khu vực tại mũi họng:
Hội miệng, chảy máu chân răng, ù tai, chảy nước mũi, đau họng....
- 10- Các bệnh hoặc các triệu chứng khác mà chúng tôi chưa nêu ở trên mà bệnh nhân thấy cũng có, cần ghi chi tiết vào bản nhận xét của mình.

Trước khi ghi nhận xét nên đọc kỹ những điều gợi ý trên để tự đánh giá tác dụng của thuốc tránh bỏ sót.

Lịch trình ghi:

Mỗi tuần ghi nhận xét 1 lần đánh giá toàn bộ những triệu chứng hoặc bệnh mà mình có sau khi uống Naturenze các triệu chứng tăng giảm ra sao. Để tránh trùng lặp từ những tuần sau trở đi những điều giống nhau chỉ cần ghi "như tuần 1 hoặc 2,3 ...". Nhưng những triệu chứng mới xuất hiện chỉ ghi chi tiết dù là nhỏ xuất hiện như thế nào? trong bao lâu? Những triệu chứng mất (khỏi) phải ghi rõ thời gian.

Liều dùng: Uống 8 7/ ngày, chia 2 lần và uống thuốc sau các bữa ăn.

Kết thúc đợt dùng Naturenze bệnh nhân tự đánh giá theo đúng cảm tính của mình đối với từng loại bệnh mà mình đã mắc được chữa bằng Naturenze với các mức độ sau:

A- Khỏi hoàn toàn cho những bệnh gì

B- Khỏi một phần : 25%, 50%, 75%, cho những bệnh gì

Cuối cùng là ý kiến và đề nghị các nhân qua đợt dùng Naturenze.

Khi cần liên hệ với các số điện thoại :

Ban 10-80 : 5583759 (trong giờ hành chính) Bs : Cúc-Thịnh-Nhu

Hoặc PGS.TS Ngọc Dao 7563159

Phụng Cầu Ngày 16.3.2005.

Tên tôi là Nguyễn Kim Tân ở xã Thung Châu - Huyện Chương Mỹ - Tỉnh Hà Tây.
Tôi sinh ngày tháng 6-1965. và tôi Nguyễn Tháng 10-1965 và tôi Tây Nguyên Phức Viên
và tôi hững tháng 11-1975. Thời gian trong gia đình tôi ở Tây Nguyên.
Và tôi là 10 năm 1 tháng.

Từ ngày phục viên về địa phương
Sức khỏe của tôi ngày càng giảm sút. Do mắc phải
các chứng bệnh như:

- Thường bị đau đầu - chóng mặt - mất ngủ, hay ngủ mê
- Luôn luôn lo lắng e dè khi phải đi bị đau lưng lâu
- Thường bị chảy máu chân răng - Răng lung lay đau răng lâu
- Tôi luôn bị đau và đau khớp gối - đau khớp
- Mất thính giác từ nhiều năm nay thì nói chuyện
- Những khi phải lao động nặng thì tôi mệt mỏi Thở hổn hển
nhiều nước mắt - Ngực Xương lồng cấn thì bị
Sợ hãi rất nhiều - Thuyết gì Thở Thấp thì bị hổn hển
- Ngực đau khi đi xe đạp hoặc khi đi bộ thì đau

Sau một thời gian đi về Bệnh 10-80 Cho tôi đi
hàng Thuốc NaturRenze.

Sức khỏe của tôi dần dần phục hồi:

- Ăn uống thấy ngon miệng hơn trước
- Ngủ đã ngon giấc hơn, ngủ yên hơn và ít mộng mị hơn
- Thì nói đã dần dần hồi phục.
- Luôn luôn răng bị đau nay đã không đau răng nữa
- Thấy chảy máu chân răng nữa
- Chứng rụng tóc gần hết còn Xương khớp vẫn sưng đau
- Hay bị đau khớp

Chóng mặt ngủ - Ngủ hay mê - Chứng chảy máu chân răng có khi khi ngủ
Chứng rụng tóc đã dần dần hồi phục. Bệnh đau lưng cũng đã dần
mình nữa - Chứng đau khớp, nước tiểu đã không thấy xấu nữa.

Còn các chứng bệnh về mắt - tai - thuyết gì Thở Thấp và đau tức ngực
tôi vẫn không thấy giảm - Tôi nói đã hồi phục lại gần như trước

Tôi xin Cháu Khôi Cầu ở Bà Sĩ Hùng - Bà Sĩ Các Ủy Viên Bệnh 10-80
và tôi là Ông Giao Tài ở xã Thôn NaturRenze

~~DT. 558.1194~~
558.1194.

- 12, loét, Hắc hắc mụn nhọt - gù mủ không còn nữa
da người sống da trắng thêm, bớt mụn lại rất lâu
nhiều; quả hạt hơi bự tưng, mềnh mạt - như mụn chảy ra
chưa lặn. 7 đũa, đau cả da ~~đang~~ trong 5 tuần liền
ngay đó rất nhiều, ra hạt nhều trăn, nhều trăn sưng hồng bở thối mưng

- Cái vết thương, vết mổ trước đây cũng thấy sưng đau, đỏ đỏ này c còn nữa, như sau đó như bên trong
khô và liền lại để trước 60-70% lành tất các vết thương.

xin cảm ơn từ chú và thầy thuốc đã cho
chúng tôi sức khỏe.

Jr.

Sau thời gian dài ứng thuốc
cơ thể có thay đổi sau đây.

Họ tên: Hoàng Kim Bấy
Số nhà 4 Ngõ 81/30 Phố Đức Giang - Phường
Đức Giang Long Biên, 102 nội
Điện thoại 04.6558836.

- Bệnh ngứa da: Trước ứng thuốc ngứa toàn thân
đặc biệt ở mông ngứa nổi lên như hạt tằm, gai chấy
nước nhày dính, đến nay giảm dần 70%. Da sạm
đen nâu đã bạc dần 30%.

- Bệnh tim mạch: Trước từng cơn hoạt động nhiều
như đau tức ngực, hoa mắt chóng mặt khi đứng lên gập
khống hoặc nằm yên lặng lên trái rất đau, mê sảng đến
nay đã giảm nhiều hơn 60%.

- Bệnh ho hấp: Trước thời tiết lạnh ho nhiều

- Bệnh thần kinh: Các triệu chứng ở cột sống
và tứ chi còn đau, đứng lên ngồi xuống còn phải
chống vào đầu gối lên lên dưới giảm dần 50%.

- Bệnh tiêu hóa: Mất tốt và nhàn nhã trước,
phân còn rất.

- Bệnh tai mũi họng: Ở vòm họng. Họng tai bị
chảy nước mũi liên tục, họng bị đau, hơi miệng
gồm dần 60%.

* Tóm lại: Trước ứng thuốc cơ thể có quau, tôi
thấy cơ thể khỏe lên, da dẻ mềm mại. Mất được ngủ
thức. Mong được ứng thuốc dài hơn.

Ngày 16/3/05
Bệnh nhân.

Trần Cao Nhũ
858-8930

Trần Nhân Kiệt

Trước khi dùng thuốc Naturocra tôi ya
- Lở da xuất hiện một bờ n mở n có n như đi kh
Chị tôi Naturocra - 12-2001 từ từ thấy
- Có hiện tượng ngứa khắp tất cả n một là do
vết da như thế này - vết da trên chân trái. hết y
- Tim mạch : 8 mmHg trong lồng 158/100. ít thấy
lên một chỗ một như khở kia. hiện tại 144/90
- Thận kinh. Nổi da khi thời tiết thay đổi gần
như một chỗ đau như đau - Ngủ rất khó ngủ
- Phấn khắp gần 6 ló da rất ngứa - ngứa th
đẹp xỏ tất - tập thể chi lại vẩy da. thời gian
trên đây đau.

- Có cơn ngứa lúc - tất
- Bệnh tại mũi họng : Một lần bị mũi cấp do cơn
tại trên da chảy máu và đau một n thấy rất ngứa
ngay một bờ da mà chỉ ở hai mũi da thấy d
thời tiết. Đây là thời tiết thay đổi cũng thấy d
- Đau một chỗ hay chảy da một chỗ da
đau khác gần như cơn ngứa da.

Kết luận :
- Đau như đau gần
- Như như khắp gần
- Mũi
- Bọng da trên da
và gần hết thấy gần

Ngủ dậy thấy ngứa khắp thân, đau ở
cổ họng sưng một chỗ - ít ngứa.

16/8/05
Người bị bệnh


Phái Công kết luận xét đúng thuộc Na-Ju-zen.
của Nguyễn - Tắt - Hồng số: 5185597.

Địa chỉ: 985 Ngã 75 - Ngõ Linh Quang, phường
Văn Chương - Quận Đống Đa - Thành phố Hà Nội.

I Bảng Ngăn dæ: Nhìn chung không chuyển biến nhiều lần
- giữ nguyên các vật ngĩa không rõ ra, ít phát triển
gần vào ra vậy - ở hai bên thời điểm rõ rệt.

II Bảng thêm và bớt số dæ: Rất tốt. không có biến liên q.

III Bảng phân loại - liên lạc: Rất tốt. không có biến liên q.

IV Bảng thêm bớt: Vẫn còn đau đầu, nhưng ít hơn lúc
chưa dùng thuốc. Các rối loạn cảm giác ngoài da, to to
kém bỏ bớt & giảm 25%

V Bảng kiểm: Đau mỗi các chi - đau cột sống - các loại
có giảm & giảm 95%.

VI Các Bảng khác: Nhìn chung - Rất tốt. nhất là các biến
về phân loại - đi ngoài, tốt, thuốc không có chuyển
biến rõ rệt.

Hà Nội ngày 15.3.2005.

J. H. H.

Nguyễn - Tắt - Hồng.

Bộ Y tế
BAN 10-80

CỘNG HOÀ XÃ HỘI CHỦ NGHĨA VIỆT NAM
Độc lập- Tự do- Hạnh phúc

GIẤY BIÊN NHẬN

Để thực hiện đề tài: “Đánh giá tác dụng khử độc của chế phẩm sinh học TGD trên những cựu chiến binh bị nhiễm chất độc hoá học màu da cam trong chiến tranh Việt nam”

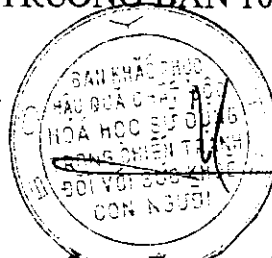
Phòng Enzym học Viện Công nghệ sinh học có chuyển giao cho chúng tôi chế phẩm TGD (tên riêng tạm thời là Naturenz) tổng số lượng theo các đợt như sau:

- Năm 1998:	46.920 viên 250 mg đóng lọ
- Năm 1999:	81.120 viên 250 mg đóng lọ
- Năm 2002:	20.000 viên 250mg bao phim
- Năm 2004:	7.200 viên 250 mg bao phim

Tổng cộng: 155.240 viên 250mg

Hà nội ngày 24 tháng 2 năm 2005

TRƯỞNG BAN 10-80



TRẦN MẠNH HÙNG

**BẢNG : TÌNH HÌNH TRIỂN KHAI SẢN XUẤT MỘT SỐ CHẾ PHẨM CỦA ĐỀ
TÀI ĐÃ ĐƯỢC PHÉP LƯU HÀNH TRONG CẢ NƯỚC**

TÊN CHẾ PHẨM	ĐƠN VỊ	SỐ LƯỢNG	GIÁ ĐƠN VỊ (đồng)	THÀNH TIỀN (triệu đồng)	NƠI SẢN XUẤT
UPHATON	Viên nang 0.5g	12 triệu	900	10800	XNDFTW25
TRIBELUS	Viên nang 0.5g	10 triệu	1.100	11000	XNDFTW25
TIỀN DUNG	Viên nang 0.5g	8 triệu	700	5600	XNDFTW25
NATURENZ	Viên nang 0.5g	36 nghìn	1000	36	CTTNHH Dược phẩm Đại y Hà nội Mephar-Co.LTD Viện CNSH
	Viên dập 0.5g	47.52 nghìn	500	23.76	
	Kg bột	50	300.000	15	
HAGATON	Kg bột	165	2 triệu	330	Viện CNSH
	Viên nang 0.2g	75.000	300	22.5	XNDFTW25