

NHÂN GIỐNG *IN VITRO* CÂY BẮT RUỒI *DROSERA BURMANNI* VAHL ĐỂ THU NHẬN MỘT HỢP CHẤT QUINONE CÓ HOẠT TÍNH SINH HỌC

Quách Diễm Phương, Bùi Văn Lệ

Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, ĐHQG-HCM

(Bài nhận ngày 18 tháng 08 năm 2006, hoàn chỉnh sửa chữa ngày 15 tháng 03 năm 2007)

TÓM TẮT: Để nhân giống *in vitro* cây *Drosera burmanni* Vahl, hạt được khử trùng và nuôi cấy trên môi trường MS cơ bản có hàm lượng khoáng đa lượng giảm 1/2 (MS 1/2), bổ sung đường (30 g/l), than hoạt tính (1 g/l), Casein hydrosylate (100 mg/l) và pH 5,8. Đốt thân từ cây con *D. burmanni* Vahl được nuôi cấy trong môi trường MS 1/2 rắn và lỏng có bổ sung đường (30 g/l), than hoạt tính (1 g/l), Casein hydrosylate (100 mg/l). Hợp chất quinone được ly trích từ dịch chiết ethanol của bột cây. Các sinh trắc nghiệm được dùng để xác định hoạt tính của chất này. Xác định cấu trúc của hợp chất cô lập bằng các phương pháp: phổ khối MS, phổ hồng ngoại IR, phổ cộng hưởng từ hạt nhân 1 chiều $^1\text{H-NMR}$, $^{13}\text{C-NMR}$.

1. MỞ ĐẦU

Drosera (Droseraceae) là nhóm thực vật bắt mồi lớn nhất, bao gồm 170 loài trên toàn thế giới. Ở Việt Nam, hiện nay chỉ có 3 loài *Drosera* được tìm thấy: *Drosera peltata* J.E.Sm.var. *lunata* Clarke ex Hook. F, *Drosera indica* L., *Drosera burmanni* Vahl. *Drosera* là những loài thực vật mang nhiều đặc điểm khác lạ, đẹp mắt và có tiềm năng kinh tế to lớn trên thị trường hoa cảnh. Mặt khác, *Drosera* có tầm quan trọng to lớn ở giá trị dược tính của chúng. *Drosera* chứa các hợp chất quinone có nhiều tác dụng trị liệu khác nhau như kháng khuẩn, kháng nấm, chống ung thư, chống lao, viêm phổi, ho gà, ... Nhưng trong tự nhiên, quần thể thực vật thuộc họ Droseraceae ngày càng trở nên khan hiếm (chúng được liệt vào danh sách đỏ các thực vật bị đe dọa của Châu Âu), dẫn đến trở ngại khi sử dụng cây trong thiên nhiên làm nguồn cung cấp hợp chất có hoạt tính sinh học.

Trong bài này, chúng tôi nhân giống *in vitro* cây *Drosera burmanni* Vahl nhằm ly trích và nghiên cứu hợp chất quinone từ dịch chiết của cây [2,3].

2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

2.1. Vật liệu

- Hạt cây *Drosera burmanni* Vahl thu được từ khu du lịch sinh thái Bắc Bình, Bình Thuận.
- Môi trường nuôi cấy: môi trường muối khoáng cơ bản của Murashige và Skoog (1962) có hàm lượng khoáng đa lượng giảm 1/2 bổ sung đường (30 g/l), than hoạt tính (1 g/l), Casein hydrosylate (100 mg/l) và pH 5,8 (môi trường MS 1/2).
- Điều kiện nuôi cấy: chiếu sáng 16 giờ/ngày với cường độ 3000 lux, nhiệt độ 22-25°C.

2.2. Phương pháp

2.2.1. Khử trùng hạt

Trái chứa hạt được đem khử trùng trong dung dịch Javel với các nồng độ thay đổi, bổ sung 0.01% (v/v) Tween-20, trong thời gian 5, 10, 15, 20 phút, sau đó rửa lại bằng nước cất nhiều lần. Hạt tách khỏi trái được gieo trên môi trường MS 1/2. Hạt nảy mầm sau 3 tuần.

2.2.2. Tǎng sinh *D. burmanni* Vahl

Cây con sau khi nảy mầm, được cắt đốt và nuôi cấy trong môi trường MS 1/2 rắn (bổ sung 7 g/l agar) và lỏng (không bổ sung agar). Cây trong môi trường lỏng được lắc 120 vòng/ phút trong cùng điều kiện nuôi cấy.

2.2.3. Ly trích và cô lập hợp chất

Toàn cây tươi đem sấy khô ở 50°C, xay nhuyễn được bột cây khô. Ngâm đậm bột cây khô trong ethanol ở nhiệt độ phòng, sau ít nhất 24 giờ đem lọc thu dịch lọc và cô quay chân không thu được cao ethanol. Từ cao ethanol tiến hành cô lập hợp chất bằng phương pháp sắc ký cột silica gel và tinh chế bằng sắc ký bản mỏng.

Để nhận biết sự hiện diện của hợp chất quinone, các phân đoạn thu được từ phương pháp sắc ký cột được chấm lên bản mỏng sắc ký, mỗi vết 10 µl, song song với chất đối chiếu 2-methyl-5-hydroxy-1,4-naphthoquinone. Giải ly bản sắc ký với hệ dung môi eter dầu hòa: benzen (3:7), vị trí các vết được quan sát dưới đèn UV 254 nm hay phun bản với thuốc thử Borntraeger 5% KOH trong methanol (để thấy vết hóa đỏ).

2.2.4. Khảo sát hoạt tính sinh học của hợp chất cô lập

Khảo sát tác dụng kháng khuẩn: dùng ethanol để hòa tan và tẩm 50 µg hợp chất cô lập được trên mỗi đĩa giấy vô trùng (đường kính 6 mm). Thực hiện cùng với 2 mẫu đối chứng là nước cất vô trùng và ethanol với cùng thể tích dùng để tẩm hợp chất trên mỗi đĩa giấy. Các đĩa giấy được đặt trên các đĩa petri môi trường LB đã trải các chủng vi khuẩn: *Bacillus subtilis*, *Bacillus pumilus*, *Sarcina lutea* (gram dương); *Escherichia coli*, *Salmonella typhi*, *Shigella* spp. (gram âm). Đường kính vòng kháng khuẩn được quan sát sau 24 giờ ủ ở 37°C.

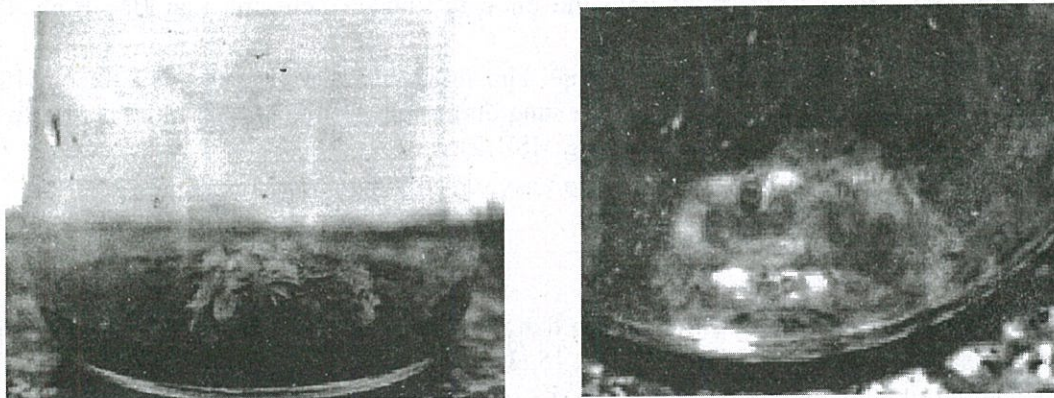
2.2.5. Xác định cấu trúc của hợp chất cô lập

Cấu trúc hóa học của hợp chất cô lập được xác định bằng các phương pháp: phổ khối MS, phổ hồng ngoại IR, phổ cộng hưởng từ hạt nhân 1 chiều ¹H-NMR, ¹³C-NMR.

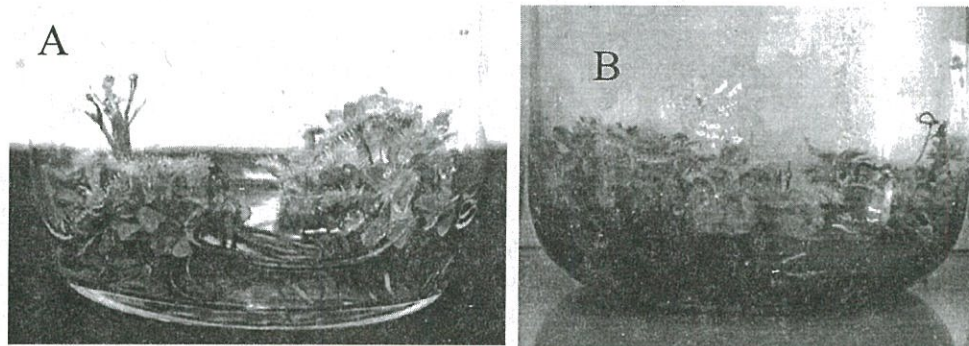
3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Khử trùng hạt *Drosera burmanni* Vahl

Hạt cây *Drosera burmanni* Vahl khử trùng thành công với dung dịch: Javel 10% (v/v) + Tween-20 (0,01%) trong thời gian 10 phút, tạo được 94,09% hạt vô trùng (bảng 1). Hạt nảy mầm sau 3 tuần gieo trên môi trường MS 1/2. Cây mầm được dùng làm nguyên liệu nuôi cấy *in vitro*. (hình 1)



Hình 1. Hạt nảy mầm sau 3 tuần nuôi cấy



Hình 2. Sự phát triển của *Drosera burmanni* Vahl trong môi trường MS 1/2 lỏng và MS 1/2 rắn.

A: MS 1/2 lỏng; B: MS 1/2 rắn

Bảng 1. Tỷ lệ hạt nảy mầm (% ± SE) sau 4 tuần khử trùng

Nồng độ Javel (% v/v)	Thời gian (phút)			
	5	10	15	20
5	6,99 ± 5,68	10,42 ± 4,79	25,07 ± 6,93	11,96 ± 4,91
10	40,32 ± 8,19	94,09 ± 6,45	37,37 ± 9,42	4,84 ± 5,58
15	58,81 ± 11,89	27,60 ± 9,15	12,46 ± 4,47	0,00 ± 0,00
20	25,64 ± 6,21	13,91 ± 6,20	1,05 ± 2,35	0,00 ± 0,00

3.2. Tăng sinh *D. burmanni* Vahl

Drosera burmanni Vahl có khả năng sống trong môi trường lỏng. Kết quả cho thấy khi nuôi cây trong môi trường lỏng (không có agar), 100% mẫu cây đều còn sống, lá tăng trưởng xanh tốt và tạo nhiều chồi. Tỷ lệ chồi/ mẫu cây ở môi trường lỏng cao hơn trong môi trường rắn (bảng 2), như vậy môi trường lỏng đã cải thiện khả năng nhân chồi của *Drosera burmanni* Vahl.

Bảng 2. So sánh khả năng sống của cây trong môi trường MS 1/2 lỏng và rắn.

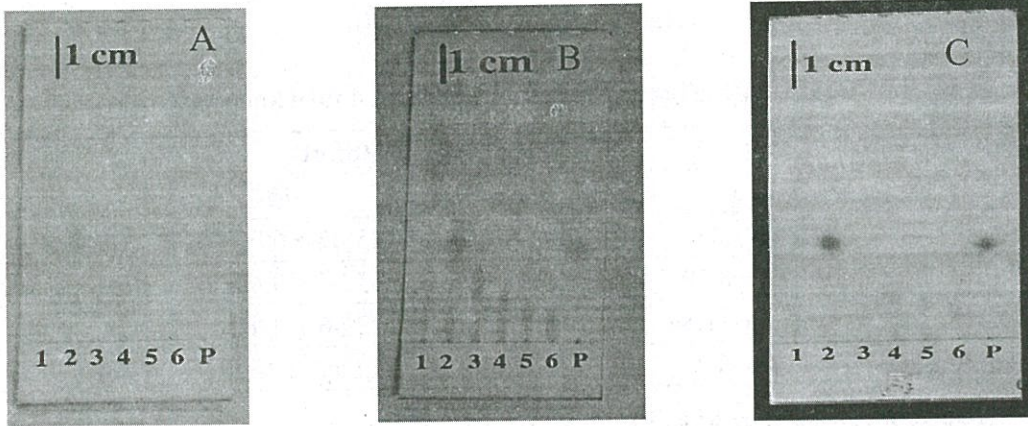
Môi trường	MS 1/2 lỏng	MS 1/2 rắn
Chỉ tiêu so sánh		
Số chồi/mẫu cây	3,18 ± 0,68	2,06 ± 0,36
Tình trạng mẫu cây	- Lá xanh tốt - Thời gian cây tăng trưởng nhanh - Cây ra rễ khỏe và nhanh hơn	- Lá xanh tốt - Thời gian cây tăng trưởng chậm hơn - Cây ra rễ bình thường, thời gian lâu hơn

3.3. Ly trích và cô lập hợp chất quinone

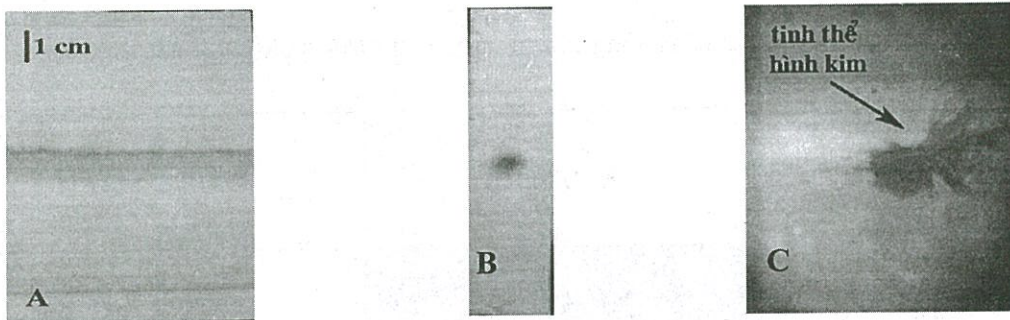
Cao thô ethanol dùng để thực hiện sắc ký cột với các đơn dung môi eter dầu hòa, benzen, chloroform, ethyl acetate và cô quay thu hồi dung môi được nhiều phân đoạn. Mỗi phân đoạn được giải ly trên sắc ký bản mỏng cùng với chất đối chiếu (2-methyl-5-hydroxy-1,4-naphthoquinone) và hiện hình với thuốc thử 5% KOH trong methanol.

Trên bản sắc ký giải ly với hệ dung môi eter dầu hòa: benzen (3:7), chỉ có phân đoạn thứ 2 trong phân đoạn cao benzen có 1 vệt màu vàng cam, tròn, đậm nét, với $R_f = 0,33$. Sau khi cho hiện hình với thuốc thử Borntraeger 5% KOH trong methanol, vệt này chuyển thành màu đỏ (hình 3). Phân đoạn này được chọn để tinh chế hợp chất quinone.

Hợp chất được tinh chế nhiều lần bằng sắc ký điều chế bằng dung môi cloroform cho đến khi sản phẩm thu được chỉ còn một vệt tròn rõ khi kiểm tra bằng sắc ký bản mỏng. Hợp chất cô lập được kết tinh lại trong chloroform có dạng tinh thể hình kim màu cam đỏ (hình 4).



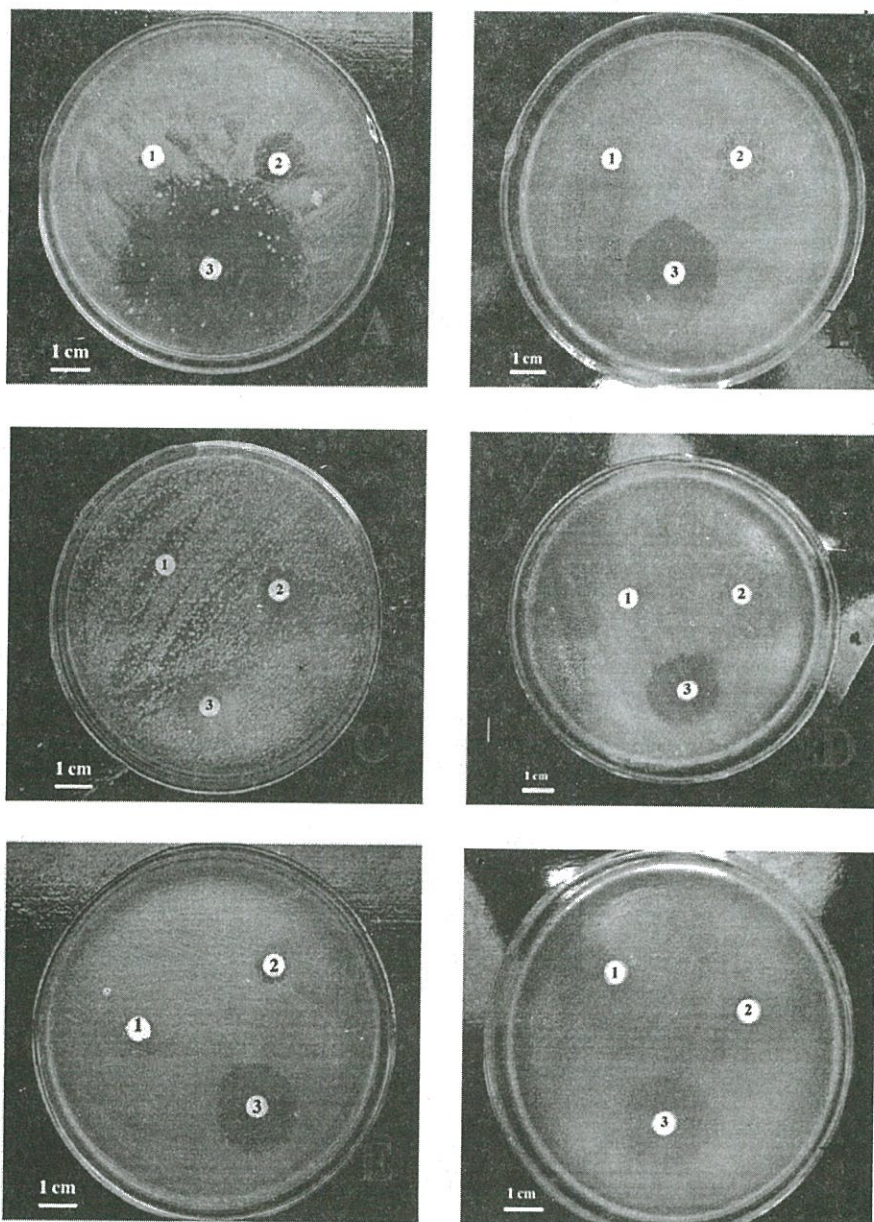
Hình 3. Sắc ký bản mỏng: quan sát bằng mắt thường (A), quan sát dưới đèn UV (B), phun xịt bản mỏng bằng thuốc thử Borntraeger (C); 1, 2, 3, 4, 5, 6: các phân đoạn trong phân đoạn cao benzen; P: chất đối chiếu



Hình 4. Sắc ký điều chế: A: Bản sắc ký điều chế; B: kiểm tra độ tinh sạch của hợp chất; C: tinh thể của hợp chất

3.4. Khảo sát hoạt tính sinh học của hợp chất quinone đã cô lập

Hợp chất đã cô lập thể hiện tính kháng với 6 chủng vi khuẩn thử nghiệm gồm 3 chủng gram âm, 3 chủng gram dương (đường kính vòng kháng khuẩn từ 12- 35 mm). Trong đó, hợp chất có khả năng kháng khuẩn mạnh nhất đối với chủng *Escherichia coli* (hình 5).

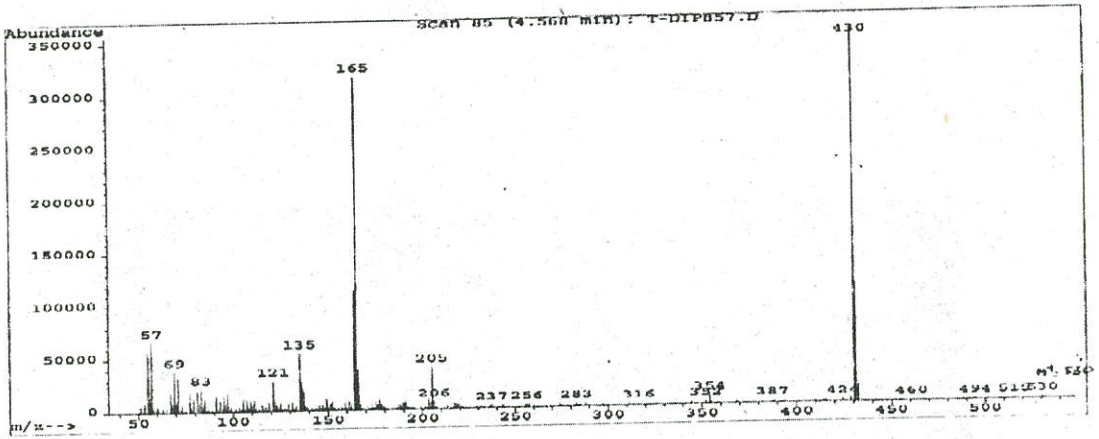


Hình 5. Vòng kháng khuẩn do tác dụng của hợp chất cô lập được trên 6 chủng vi khuẩn thử nghiệm

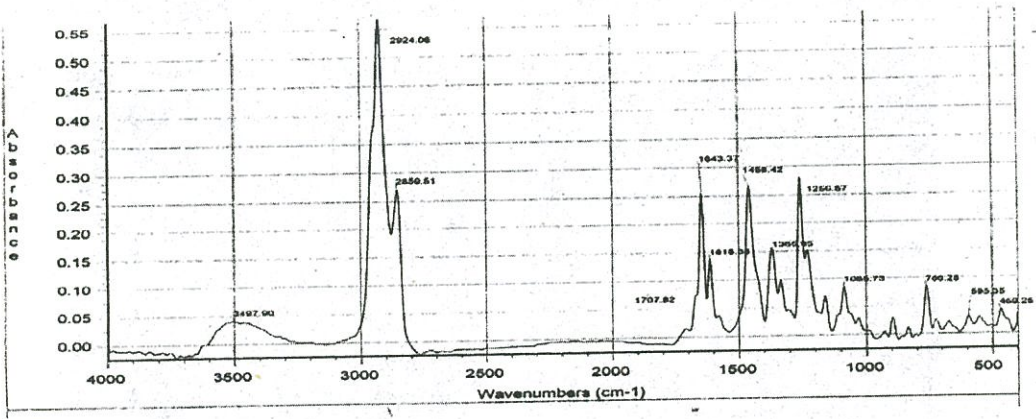
A: *Escherichia coli*; B: *Salmonella typhi*; C: *Shigella* spp.

D: *Bacillus pumilus*; E: *Bacillus subtilis*; F: *Sarcina lutea*

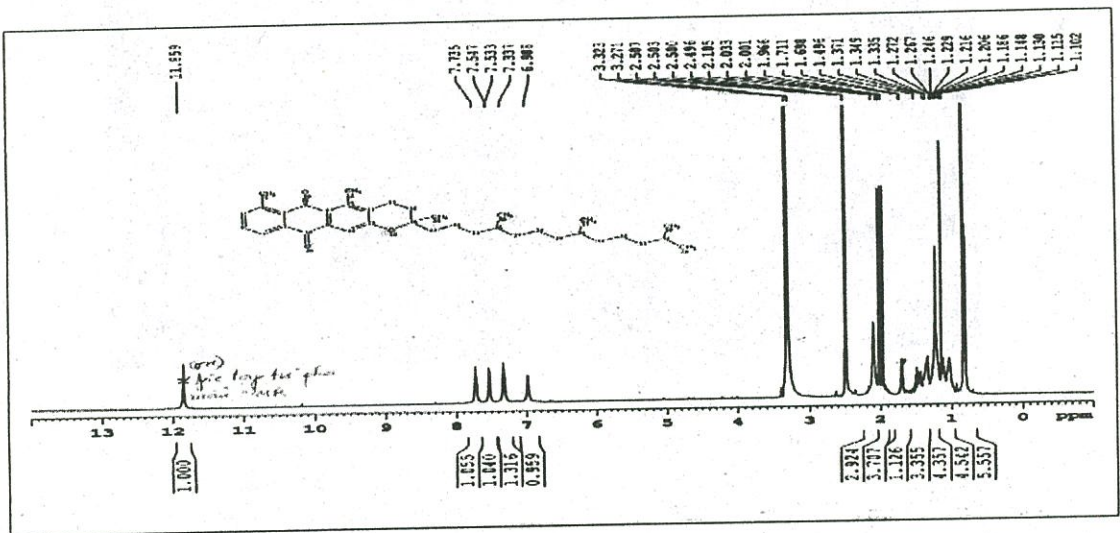
1: Đối chứng nước vô trùng; 2: Đối chứng ethanol; 3: Hợp chất khảo sát



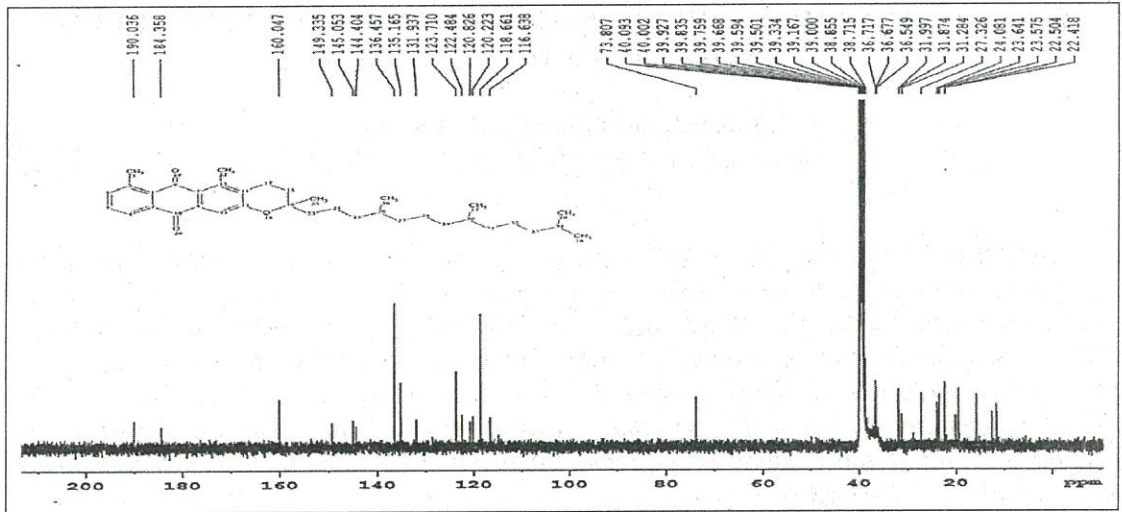
Hình 6a. Kết quả phổ MS



Hình 6b. Kết quả phổ IR



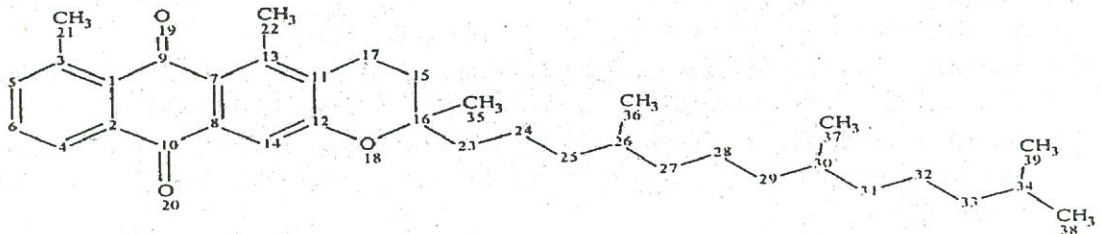
Hình 6c. Kết quả phổ DMSO- 1H



Hình 6d. Kết quả phổ DMSO- C13CPD

3.5. Xác định cấu trúc của hợp chất quinone cô lập được

Kết quả kết hợp phổ khối MS, phổ hồng ngoại IR, phổ cộng hưởng từ hạt nhân 1H-NMR, 13C-NMR, cho biết hợp chất cô lập được thuộc nhóm anthraquinone có khối lượng phân tử M= 530 với công thức phân tử là C₃₆H₅₀O₃:



4. KẾT LUẬN

- Nồng độ khử trùng hạt *Drosera burmanni* Vahl thích hợp là 10% (v/v) Javel, bổ sung 0.01% (v/v) Tween-20, trong thời gian 10 phút.
- Cây *D. burmanni* Vahl phát triển tốt cả trong môi trường MS 1/2 rắn và lỏng. Nuôi cấy lỏng góp phần cải thiện khả năng nhân giống cây.
- Hợp chất cô lập được xác định là hợp chất thuộc nhóm anthraquinone, chưa từng được công bố có trong các loài *Drosera* từ trước đến nay.
- Hợp chất được đánh giá là có hoạt tính sinh học với tác dụng kháng khuẩn cao.

ISOLATING A BIOACTIVE QUINONE FROM *IN VITRO* CULTURED *DROSERA BURMANNI* VAHL

Quach Diem Phuong, Bui Van Le
University of Natural Sciences, VNU-HCM

ABSTRACT: To establish *in vitro* cultivation of *Drosera burmanni* Vahl, sterilized seeds were germinated on MS basal medium but decreasing of 1/2 macro salts content (MS 1/2) supplemented with saccharose (30 g/l), activated carbon (1 g/l), Casein hydrosylate (100 mg/l) at pH 5.8. Stem node of *D. burmanni* Vahl were cultured on MS 1/2 medium (solid and liquid) with saccharose (30 g/l), activated carbon (1 g/l), Casein hydrosylate (100 mg/l) at pH 5.8. A quinone compound was isolated from ethanol extract of dry plants. Bioassays were used to detect the activities of this compound. A quinone compound was identified by mass spectrum, IR spectrum and ^1H -, ^{13}C -NMR spectrum.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1]. Quách Ngô Diễm Phương. *Khảo sát hợp chất Naphthoquinone có hoạt tính sinh học được tách chiết từ cây bắt ruồi Drosera indica L. nuôi cấy in vitro*. Luận văn thạc sĩ sinh học (2006).
- [2]. Jayaram K., Prasad M.N.V. *Rapidly in vitro multiplied Drosera as reliable source for plumbagin bioprospection*. Current science, vol 89, 447- 448 (2005)
- [3]. Marczak L., Kawiak A., Lojkowska E., Stobiecki M., *Secondary Metabolites in in vitro Cultured Plants of the Genus Drosera*. Phytochem. Anal. 16, 143-149 (2005).
- [4]. Nguyễn Kim Phi Phụng. *Các phương pháp nhận danh, trích ly và cô lập các hợp chất hữu cơ*. Giáo trình cao học chuyên ngành Hóa hữu cơ, ĐH Khoa học Tự nhiên, TP. HCM (2001).