KHẢO SÁT TÁC DỤNG KHÁNG KHUẨN CỦA CÁC CAO CHIẾT TỪ CÂY THUỐC THƯỢNG (*PHAEANTHUS VIETNAMENSIS* BAN)

Trần Công Luận, Huỳnh Thị Ngọc Lan**, Bùi Thanh Phong*,*** , Đặng Ngọc Phái*****

TÓM TẮT

***Mục tiêu nghiên cứu**: Cây Thuốc Thượng (Phaeanthus vietnamensis Ban) được sử dụng như một thuốc chống nhiễm trùng trên vết thương rất tốt.Người ta dùng lá non, lấy nước nhỏ mắt chữa đau mắt đỏ, sưng tấy, tiêu chảy và các bệnh nhiễm khuẩn đường tiêu hóa người. Tuy nhiên, vì vậy, để góp phần làm sáng tỏ tác dụng sinh học liên quan, chúng tôi thực hiện đề tài "Khảo sát thành phần hóa học và tác dụng kháng khuẩn của cây Thuốc Thượng (Phaeanthus vietnamensis Ban)".*

***Đối tượng và phương pháp**: Các cao chiết từ cây Thuốc Thượng bao gồm cao cồn tổng, cao diethyl ether, cao chloroform, cao n-butanol, cao nước, alkaloid toàn phần. Khảo sát thành phần hóa học theo Dược Điển IV. Khảo sát hoạt tính kháng khuẩn theo phương pháp đục lỗ đĩa thạch và MIC.*

***Kết quả**: Cây Thuốc Thượng chứa chủ yếu alkaloid, triterpen, polyphenol.Giá trị MICcủa các mẫu alkaloid toàn phần (mg/ml) với các vi khuẩn E.coli, P.aeruginosa, Staphylococcus aureus ATCC 43300 (MRSA), Staphylococcus aureus ATCC 25953 (MSSA) lần lượt là 1,56; 3,125; 0,1953; 0,1953.Các giá trị về kết quả kháng khuẩn của cao tổng toàn phần trên bốn chủng vi sinh vật trên lần lượt là12,5; 12,5;12,5 và 6,25. Cao chloroform cho kết quả kháng khuẩn (mg/ml) trên bốn chủng vi sinh vật trên lần lượt là 6,25; 12,5; 3,125; 3,125. Cao n – butanol cho kết quả kháng khuẩn (mg/ml) trên bốn chủng vi sinh vật trên lần lượt là 6,25; 3,125; 3,125; 3,125.*

***Kết luận**: Hoạt tính kháng khuẩn của cây Thuốc Thượng khá cao, mạnh nhất là cao alkaloid toàn phần.*

***Từ khóa**: Thuốc Thượng, Phaeanthus vietnamensis, kháng khuẩn, alkaloid.*

ABSTRACT

STUDY ON THE CHEMICAL COMPOSITION AND ANTIMICROBIAL ACTIVITY OF PHAEANTHUS VIETNAMENSIS BAN.

Tran Cong Luan, Bui Thanh Phong , Huynh Thi Ngoc Lan, Dang Ngoc Phai

* Y Hoc TP. Ho Chi Minh * Supplement of Vol. 19 - No 5 - 2015: 165 - 168

***Objectives**: Phaeanthus vietnamensis Ban (Vietnamese's name: Thuoc Thuong) has been used as an effective antibacterial drug for treatment of wounds or skin diseases. The water extract of young leaves of this plant have been use for treatment of infected red eyes, swelling, diarrhea and gastrointestinal infections. However, there is no scientific data for ethnic usage. The aim of the study is to investigate the chemical components as well as the antibacterial activity of the total extract and fractionated extracts derived from Phaenathus vietnamensis.*

***Methods**: Phaeanthus vietnamensis extracts including alcohol total, diethyl ether, chloroform, n-butanol, water and total alkaloid. Survey chemical composition according Vietnamese pharmacopoeia IV. The antibacterial activity was carried out by the method of punching agar plates and MIC value.*

***Results**: Phaeanthus vietnamensis contains mainly alkaloids, triterpenoids, and polyphenols. MIC value of the total alkaloid sample (mg/ml) with E. coli, P.aeruginosa, Staphylococcus aureus ATCC 43300 (MRSA), Staphylococcus aureus ATCC 25953 (MSSA) respectively 1.56, 3.125, 0.1953, 0.1953.MIC value of the total*

* Trung Tâm Sâm và Dược Liệu TP.HCM - Viện Dược Liệu ** Khoa Dược, Đại Học Y Dược TP.HCM
*** Đại học Bách Khoa TP.HCM **** Hội dược liệu TP. Đà Nẵng
Tác giả liên lạc: PGS.TS. Trần Công Luận *ĐT*: 0903671323 *Email*: congluan53@gmail.com

extracts sample (mg/ml) with E. coli, P. aeruginosa, Staphylococcus aureus ATCC 43300 (MRSA), Staphylococcusaureus ATCC 25953 (MSSA) respectively 12.5, 12.5,12.5, 6.25. MIC value of the chloroform extracts sample (mg/ml) with E. coli, P. aeruginosa, Staphylococcus aureus ATCC 43300 (MRSA), Staphylococcus aureus ATCC 25953 (MSSA) respectively 6.25, 12.5, 3.125, and 3.125. MIC value of the n – butanol extracts sample (mg/ml) with E. coli, P. aeruginosa, Staphylococcus aureus ATCC 43300 (MRSA), Staphylococcus aureus ATCC 25953 (MSSA) respectively 6.25, 3.125, 3.125, 3.125.

***Conclusion**: The antibacterial activity of this medicinal plant is quite high. Especially, total alkaloid showed highest activity.*

***Key words**: Thuoc Thuong, Phaeanthus vietnamensis, antibacterial activity, alkaloid.*

ĐẶT VẤN ĐỀ

Hiện nay vấn đề thảo dược được sử dụng nhiều trong điều trị các bệnh nhiễm khuẩn cho người càng được lưu ý. Bên cạnh tác dụng mạnh, ít gây tác dụng phụ, các thảo dược ít gây hiện tượng kháng thuốc hơn so với các kháng sinh (tổng hợp hay bán tổng hợp). Cây Thuốc Thượng (*Phaeanthus vietnamensis* Ban) từ lâu được đồng bào dân tộc sử dụng như một liều thuốc trong điều trị các bệnh nhiễm khuẩn, tiêu chảy và đắp vết thương phòng nhiễm trùng[7]. Có một số công trình nghiên cứu về nhóm alkaloid trong cây Thuốc Thượng cho thấy có một alkaloid có khả năng kháng khuẩn[9]. Tuy nhiên, thành phần hóa học cơ bản, dược tính của cây Thuốc Thượng vẫn chưa được nghiên cứu đầy đủ[5,9]. Vì vậy, nghiên cứu này nhằm làm rõ các nhóm hợp chất và khả năng kháng khuẩn của cây Thuốc Thượng.

ĐỐI TƯỢNG - PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

Đối tượng nghiên cứu

Cành và lá cây Thuốc Thượng (*Phaeanthus vietnamensis* Ban) được thu hái ở núi Bà Nà - Đà Nẵng. Mẫu được định danh và lưu mẫu tại Trung Tâm Sâm và Dược Liệu TP.HCM – Viện Dược Liệu.

Vật liệu nghiên cứu

Cồn 96%, môi trường NA, DMSO (dimethylsulfoxid) (Sigma,USA), diethyl ether, chloroform, ammoniac 25%, *n*-butanol, methanol (Trung Quốc).

Chủng vi sinh vật thử nghiệm: Gồm các chủng vi sinh vật chuẩn của ATCC lưu giữ tại bộ môn Vi Sinh – Kí Sinh (Khoa Dược – Đại học Y Dược TP.HCM): *Staphylococcus aureus* ATCC 25953 (MSSA), *Staphylococcus aureus* ATCC 43300 (MRSA), *Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853.

Phương pháp nghiên cứu

Xác định độ tro, độ ẩm của dược liệu

Theo Dược Điển Việt Nam IV[3].

Thu dịch chiết và khảo sát thành phần hóa học

Thu dịch chiết khảo sát thành phần hóa học: cân 25g cành và 25g lá Thuốc Thượng, chiết dược liệu theo phương pháp chiết hồi lưu lần lượt với ether ethylic, ethanol và nước thu lấy 3 loại dịch chiết. Riêng dịch chiết nước và ethanol có thêm thí nghiệm tạo dịch thủy phân. Các thuốc thử và thí nghiệm xác định các nhóm hợp chất theophương pháp của trường Đại học Rumani có cải tiến[1].

Chiết các cao chiết thử hoạt tính:

Chiết alkaloid toàn phần

100 g cành và lá được làm ẩm bằng amoniac 10% sau đó được chiết kiệt bằng $CHCl_3$. Acid hóa dịch chiết bằng HCl 2% và thu dịch nước. Kiềm hóa dịch nước bằng ammoniac 10%. Lắc dịch kiềm hóa với $CHCl_3$, cô cạn dịch $CHCl_3$ thu cắn alkaloid. Từ 100g dược liệu ta thu được 3,90 g alkaloid toàn phần.

Chiết cao cồn tổng và các cao phân đoạn

100g cành và láđược chiết ngấm kiệt bằng cồn 96%. Thu dịch cồn và côn thành dạng cao sệt. Hòa cao vào nước, lần lượt cho lắc phân đoạn với các dung môi là ether ethylic, chloroform, *n*-butanol. Kết quả thu lấy 4 loại cao chiết là ether ethylic, chloroform, *n*-butanol và cao nước còn lại. Từ 100g dược liệu ta thu được cao tổng, cao ether ethylic, cao chloroform, cao *n*-butanol và cao nước là 24,9 g; 7,358 g; 5,17 g; 4,8 g; 4,22 g. Các dịch chiết được cô đến cắn và hòa trong nước theo tỉ lệ 1: 1(w/v) hay 1:4 (w/v) để thử hoạt tính kháng khuẩn. Với các chất khó tan trong nước, thì thay thế nước bằng dung dịch DMSO 1%.

Khảo sát hoạt tính kháng vi sinh vật

Tiến hành bằng phương pháp khuếch tán trên đĩa thạch. Vi khuẩn thử nghiệm có mật độ 10^6 CFU/ml được trải trên đĩa thạch NA (Merck) bằng que bông vô trùng. Cho 100µl dịch cao chiết vào các lỗ đục có đường kính 10mm trên đĩa thạch đã trải vi sinh vật thử nghiệm tương ứng. Sự khuếch tán của các chất thử ra môi trường sẽ ức chế sự tăng trưởng của vi khuẩn tạo thành vòng vô khuẩn. Mỗi thí nghiệm được lặp lại 3 lần và lấy giá trị trung bình để xác định đường kính vòng ức chế.

Xác định nồng độ ức chế tối thiểu sự phát triển vi khuẩn

Bằng phương pháp pha loãng trên đĩa thạch. Chất thử ban đầu được pha loãng tỉ lệ 1:10 (w/v) với môi trường thạch NA. Sau đó pha theo dãy nồng độ từ cao đến thấp và cho vào đĩa môi trường NA theo tỉ lệ giảm dần ½. Chấm 1µL huyền dịch vi khuẩn chứa khoảng 10^4 CFU lên đĩa thạch có các nồng độ chất thử khác nhau[2]. Nồng độ ức chế tối thiểu vi khuẩn (MIC) được xác định ở đĩa môi trường có nồng độ chất thử thấp nhất mà ở đó các vi khuẩn bị ức chế phát triển, chỉ có 1 – 3 khuẩn lạc mọc.

KẾT QUẢ VÀ BÀN LUẬN

Độ ẩm và độ tro

Độ ẩm trung bình của lá là 5,5%, độ ẩm trung bình của cành là 6,0%.Độ tro toàn phần của lá là 6,72% và cành là 2,58%, độ tro không tan trong HCl của lá là 1,84% và cành là 0,72%. Tất cả các thông số về độ tro đều nằm trong giới hạn.

Khảo sát thành phần hóa học

Mẫu lá và cành đều có sự hiện diện của alkaloid, tinh dầu, polyphenol,triterpenoid tự do, triterpenoid thủy phân, chất khử,acid hữu cơ.

Khảo sát hoạt tính kháng vi sinh vật

***Bảng 1**. Đường kính vòng kháng khuẩn trung bình của các cao kháng khuẩn (mm)*

	***E.coli* ATCC 25922**	***P.aeruginosa* ATCC 27853**	***S.aureus* ATCC 25953 (MSSA)**	***S.aureus* ATCC 43300 (MRSA)**
Cao tổng (1:4)	16,83 ± 0,75	16,5 ± 0,55	15,17 ± 0,75	16,83 ± 0,41
Cao alkaloid (1:4)	26,33± 0,52	24,33 ± 0,52	27,5 ± 0,84	27,67 ± 0,82
Cao ether (1:1)	0	0	0	0
Cao chloroform (1:4)	18 ± 0,55	15 ± 0,55	19 ± 0,84	15 ± 0,89
Cao n-butanol (1:4)	15,17 ± 0,98	13 ± 0,00	13 ± 0,41	10 ± 0,00
Cao nước (1:1)	13,33 ± 0,82	13,33 ± 0,52	15,17 ± 0,41	12,83 ± 0,75
Nước cất	0	0	0	0
DMSO	0	0	0	0
Cephaclor (30µg/đĩa)	26± 0,52	-	36 ± 0,46	34 ± 0,50
Gentamicin (10µg/đĩa)	-	22 ± 0,48	-	-

Ghi chú: E.coli ATCC 25922, S.aureus ATCC 25953 (MSSA) và S.aureus ATCC 43300 (MRSA) sử dụng chứng dương là Cephaclor ở nồng độ 30 µg/đĩa. P.aeruginosa ATCC 27853 sử dụng chứng dương là Gentamicin ở nồng độ 10 µg/đĩa.

Kết quả kháng khuẩn cho thấy các cao chiết của cây Thuốc Thượng đều có khả năng kháng khuẩn tốt. Điều này phù hợp với kinh nghiệm thực tế trong dân gian sử dụng Thuốc Thượng

làm một vị thuốc điều trị các bệnh như tiêu chảy và chống nhiễm trùng vết thương.

Cao alkaloid toàn phần cho hiệu quả kháng khuẩn cao nhất trên các chủng vi khuẩn Gram (+) và Gram (-). Ở nồng độ khảo sát, alkaloid toàn phần cho đường kính vòng kháng khuẩn tương đương với các chứng dương. Điều này cho thấy khả năng kháng khuẩn của cây Thuốc Thượng có thể do nhóm alkaloid có trong cây. Cao chloroform có hiệu quả mạnh thứ hai, vì thành phần alkaloid trong phân đoạn này chiếm chủ yếu. Cao cồn tổng có hoạt tính kháng khuẩn tương tự như cao chloroform, trong khi các cao n-butanol và cao nước thể hiện hoạt tính kháng khuẩn yếu hơn và hầu như không có tính kháng khuẩn trong cao ether.

Xác định nồng độ ức chế tối thiểu sự phát triển vi khuẩn

Bảng 2. *Nồng độ ức chế tối thiểu các vi khuẩn của các cao (mg/mL)*

Vi khuẩn / MIC(mg/mL)	*E.coli*	*P.aeruginosa*	*MSSA*	*MRSA*
Cao tổng	12,5	12,5	6,25	12,5
Alkaloid tổng	1,56	3,125	0,1953	0,3906
Cao chlorofrom	6,25	12,5	3,125	3,125
Cao n-butanol	6,25	3,125	3,125	3,125
Cephaclor	0,0156	-	0,0156	0,0006
Gentamicin	-	0,0031	-	-

Các kết quả khảo sát MIC được ghi trong Bảng 2 cho thấy khả năng kháng khuẩn mạnh nhất là ở cao alkaloid toàn phần, rồi đến cao chloroformvà cao *n*-butanol. Cao tổngcho kết quả kháng khuẩn yếu nhất. Đặc biệt, các cao chiết đều có tác dụng kháng khuẩn mạnh trên các chủng vi khuẩn kháng methicillin như MRSA và chủng nhạy methicillin như MSSA.

Với sự tồn tại của các alkaloid, triterpenoid cao tổng cây Thuốc Thượng có khả năng kháng khuẩn tương đối. Điều này phù hợp với các nghiên cứu của các tác giả S.Maji và cộng sự[8].

Trong thực tế, khả năng cầm máu và kháng khuẩn của cây Thuốc Thượng có thể do sự tác động hiệp đồng của các hợp chất có trong cây. Với sự có mặt của polyphenol có thể góp phần làm bền thành mạch, chống chảy máu dưới da, các triterpenoid cũng góp phần vào các hoạt động chuyển hóa, kháng khuẩn… Do vậy việc ứng dụng Thuốc Thượng như một dược liệu kháng khuẩn cần được nghiên cứu kỹ và sâu rộng hơn về mặt hóa học, đặc biệt là nhóm alkaloid[4,6].

KẾT LUẬN

Xác định được thành phần hóa học chính của cây Thuốc Thượng là các hợp chất alkaloid và polyphenol, triterpenoid. Đây là các hợp chất có vai trò quan trọng trong dược học. Các cao chiết từ cây Thuốc Thượng đều có khả năng kháng khuẩn cao trừ cao ether, qua đó làm rõ cơ sở khoa học của việc sử dụng cây Thuốc Thượng như là một loại dược liệu kháng khuẩn.

Đây là cơ sở để tiếp tục khảo sát thêm các hợp chất alkaloid trong cây Thuốc Thượng và phân lập thêm các alkaloid. Bên cạnh đó, khảo sát hoạt tính kháng khuẩn và kháng ung thư của các alkaloid cũng như các hợp chất hóa học khác có hàm lượng cao trong cây Thuốc Thượng.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Bộ môn dược liệu – Trường Đại học Y dược TP. HCM (2006). *Giáo trình Phương pháp nghiên cứu dược liệu*.
2. Bộ môn Vi Sinh Trường Đại Học Y Dược TP.HCM. (2013). *Giáo trình thực tập vi sinh*.
3. Bộ Y tế (2009). *Dược điển Việt Nam IV*.
4. Đái Duy Ban (2008). *Các hợp chất thiên nhiên có hoạt tính sinh học phòng chống một số bệnh cho người và vật nuôi*. Nhà xuất bản Khoa học tự nhiên và công nghệ.
5. Nguyen Thi Nghia, Valka I., Weigl E., Simanek V., Cortes D., Cave A. (1991) "Alkaloids from leaves of Phaeanthus vietnamensis". *Fitoterapia;* 62(4):315-318.
6. Nguyễn Thượng Dong (2006). *Nghiên cứu thuốc từ thảo dược*. Nhà xuất bản khoa học và kỹ thuật.
7. Nguyễn Tiến Bân (2007) *Sách đỏ Việt Nam – Phần II: Thực Vật*. Nhà xuất bản Khoa Học Tự Nhiên và Công Nghệ
8. Maji S, Dandapat P, Ojha D, et al (2010). "In vitro antimicrobial potenyialities of different solvent extracts of ethnomedicinal plants against clinically isolated human pathogens", *Journal of Phytology;* 2(4):57–64.
9. Sedmera P, Nghia NT, et al (1990) "A new bisbenzylisoquinoline alkaloid from *Phaeanthus vietnamensis* and its antibacterial activity". *Heterocycles (Tokyo);* 30(1): 205-210.

Ngày nhận bài báo: *27/02/2015*

Ngày phản biện nhận xét bài báo: *15/05/2015*

Ngày bài báo được đăng: *08/09/2015*