THÀNH PHẦN HÓA HỌC VÀ HOẠT TÍNH ỨC CHẾ TỤ CẦU VÀNG (*Staphylococcus aureus*) CỦA CAO CHIẾT ETHANOL TỪ CÂY HOÀNG LIÊN Ô RÔ (*Mahonia nepalensis* DC.)

Trịnh Đình Khá[1*], Hà Thị Thanh Hoàn[1], Nguyễn Thị Thu Hiền[2]

[1]Trường Đại học Khoa học, Đại học Thái Nguyên
[2]Trường Đại học Nông lâm, Đại học Thái Nguyên

Email[*]: khatd@tnus.edu.vn

Ngày gửi bài: 26.11.2015 Ngày chấp nhận: 29.05.2016

TÓM TẮT

Đây là nghiên cứu về hoạt tính ức chế *Staphylococcus aureus* và thành phần hóa học của cao chiết *Mahonia nepalensis* DC. (*M. nepalensis*) tại Việt Nam. Trong nghiên cứu này, phân tích đặc điểm hóa sinh cho thấy sự hiện diện của alkaloid, tannin, flavonoid, saponin và terpenoid. Dịch chiết ethanol của *M. neplensis* đã được thử nghiệm hoạt tính kháng khuẩn chống lại *Staphylococcus aureus*. Sự sinh trưởng của chủng vi khuẩn thử nghiệm đã bị ức chế bởi nồng độ cao chiết khác nhau. Đường kính của vùng ức chế khác nhau 10-15 mm đối với nồng độ cao chiết từ 20-40 mg/ml. Giá trị MIC, IC_{50} và MBC lần lượt là 0,05; 4,17 và 21,67 mg/ml. Do đó cao chiết từ *M. nepalensis* có thể được sử dụng như một tác nhân chống *Staphylococcus* và là một tác nhân kháng khuẩn hứa hẹn.

Từ khóa: Cao chiết ethanol, hoạt tính ức chế, *Mahonia nepalensis* DC., Staphylococcus aureus.

Chemical Composition and *Staphylococcus aureus* Inhibitory Activity of the Ethanol Extract from *Mahonia nepalensis* DC.

ABSTRACT

An investigation was conducted to determine the chemical composition and inhibitory effect against *Staphylococcus aureus* of *Mahonia nepalensis* DC. (*M. nepalensis*) extract. Chemical analysis showed that the extract contained alkaloids, tannins, flavonoids, saponins and terpenoids. The growth of *Staphylococcus aureus* strain was inhibited by the different extract concentrations. The diameter of inhibition zones varied from 10 to 15 mm for the extract concentrations from 20-40 mg/ml. The MIC, IC50 and MBC values were 0.05; 4.17 and 21.67 mg/ml, respectively. It is, therefore, suggested that the extract from *M. nepalensis* could be used as an anti-*Staphylococcus* agent in particular and a promising antibacterial agent in general.

Keywords: *Chemical composition, extract, Mahonia nepalensis* DC*., Staphylococcus aureus,* inhibitory activity.

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Tụ cầu vàng (*Staphylococcus aureus*) là một trong những tác nhân chính gây ra tình trạng nhiễm trùng bệnh viện và nhiễm trùng trong cộng đồng (Lyon and Skurrayr, 1987). Tụ cầu vàng có thể sinh tổng hợp nhiều loại độc tố gây bệnh nguy hiểm như hội chứng sốc độc tố và hội chứng sốt tụ cầu (Dinges *et al.*, 2000). Sự xuất hiện của tụ cầu vàng kháng Methicillin (MRSA) là một trong những vấn đề nghiêm trọng nhất của y tế cộng đồng và y tế dự phòng ở các nước phát triển cũng như các nước đang phát triển. Bởi vì, nó không chỉ gây ra tỷ lệ nhiễm bệnh cao mà MRSA còn kháng hầu hết các loại kháng sinh trừ Teicoplanin và Vancomycin (Hwang *et al.*, 2002; Wang *et al.*, 2001). Nhiễm tụ cầu vàng có thể dẫn đến tình trạng nhiễm trùng nặng đối

với các vết thương, vết mổ và kéo dài thời gian điều trị của bệnh nhân.

Trên thế giới đã có nhiều nghiên cứu sử dụng dịch chiết và hoạt chất từ cây dược liệu để ngăn ngừa và điều trị các bệnh truyền nhiễm. Cây dược liệu có chứa đa dạng các chất chuyển hóa thứ cấp như tannin, alkaloid, terpenoid, flavonoid,... và có đặc tính kháng khuẩn có thể được sử dụng thay thế kháng sinh một cách hiệu quả, rẻ tiền và an toàn trong điều trị các bệnh nhiễm trùng do vi khuẩn gây ra (Cowan, 1999). Cây Hoàng liên ô rô (*Mahonia nepalensis* DC.) (dân gian còn gọi là cây mật gấu) đã được người dân sử dụng trong điều trị bệnh nhiễm khuẩn và có tác dụng rất tốt trong việc điều trị các triệu chứng về bệnh dạ dày, rối loạn tiêu hoá, đường ruột, đau nhức xương khớp, tê thấp (Đỗ Tất Lợi, 2008). Cây Hoàng liên ô rô còn được sử dụng điều trị viêm gan vàng da. Gần đây, cây Hoàng liên ô rô được đề cập là có khả năng điều trị ung thư, tuy nhiên chưa có nghiên cứu hiện đại công bố về tác dụng này. Những tác dụng điều trị nhiễm khuẩn của cây Hoàng liên ô rô được người dân sử dụng cho thấy trong thân cây phải có những hoạt chất có khả năng ức chế các vi khuẩn gây bệnh. Những chất này có thể là các hợp chất thứ cấp được sinh tổng hợp và tích lỹ trong thân cây theo thời gian sinh trưởng. Trong bài báo này, chúng tôi trình bày kết quả khảo sát thành phần hóa học và hoạt tính ức chế tụ cầu vàng của của cao chiết ethanol từ cây Hoàng liên ô rô.

2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

2.1. Vật liệu và hóa chất

Thân cây Hoàng liên ô rô rô (*Mahonia nepalensis* DC.) có gỗ màu vàng được thu thập tại Huyện Quang Bình - tỉnh Hà Giang và được giám định gỗ tại trường Đại học Nông Lâm Thái Nguyên. Chủng tụ cầu vàng *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 do Viện Kiểm nghiệm - Bộ Y tế cung cấp. Các hóa chất tinh khiết (cao nấm men, peptone A, sodium chloride, ethanol, ampicillin) được cung cấp bởi các hãng có uy tín trên thế giới như Merck, Sigma.

2.2. Phương pháp

2.2.1. Chuẩn bị dịch chiết và cao chiết

Thân cây Hoàng liên ô rô được sấy khô đến khối lượng không đổi ở 70°C, nghiền thành bột mịn. Mẫu được trộn với dung môi ethanol theo tỷ lệ 1:5 (v/w) và được chiết theo phương pháp ngấm kiệt (Nguyễn Thượng Dong, 2006). Dịch chiết thu được tiến hành cô cất chân không bằng máy co quay Buchi - Thụy Sĩ và được cô cao trong tủ sấy chân không ở 50°C.

2.2.2. Phân tích thành phần hóa học của thân cây Hoàng liên ô rô

Theo phương pháp mô tả của Harborne (Harborne, 1978):

Test terpenoid:

Hòa tan cao chiết trong 0,5ml chloroform, thêm 0,5ml acetic acid và anhidrit, 2ml sunfuric acid đảo đều. Nếu xuất hiện màu đỏ hoặc hồng hoặc tím là phản ứng dương tính với terpenoid.

Test tannin:

Trộn 1ml dung dịch KOH 10% với 1ml dịch hòa tan cao chiết. Nếu mẫu thí nghiệm xuất hiện kết tủa màu trắng bẩn là do xuất hiện của tannin. Tiến hành ly tâm lạnh 10.000 vòng/phút thu tủa, hòa tan tủa trong 7ml nước cất, đun sôi trong 5 phút và thêm 2 giọt $FeCl_3$ 5% lắc đều. Nếu xuất hiện màu xanh đậm là có phản ứng dương với tannin.

Test alkanoid:

Bổ sung 5ml HCl 1%vào 2ml dịch hòa tan cao chiết, khuấy từ từ, lọc thu dịch, thêm giọt thuốc thử mayer vào 1ml dịch lọc,lắc đều. Bổ sung nước tới 40ml, nếu mẫu thí nghiệm có xuất hiện vẩn đục chứng tỏ có alkanoid.

Test flavonoid:

Cho vào ống nghiệm 1ml dịch hòa tan cao chiết, thêm một mảnh nhỏ Mg vào dịch chiết, bổ sung từ từ HCl 10% lắc đều. Quan sát thí nghiệm trong 2 - 3 phút, nếu xuất hiện màu cam là của flavon, màu đỏ thẫm của flavonol, từ đỏ thẫm tới đỏ tươi là của flavonon.

Test saponin:

Cân 0,5g bột nguyên liệu hòa với 5ml nước cất, lắc đều. Đun trên ngọn lửa mạnh trong 2 phút nếu có bọt khí thoát ra chứng tỏ có saponin.

Test glycoside:

Cân 1g bột nguyên liệu vào hai cốc. Một cốc bổ sung 5ml axit sunfusic loãng, một cốc bổ sung nước. Đun nóng hai cốc trong 3 - 5 phút. Lọc dịch vào ống nghiệm có ghi nhãn. Kiềm hóa bằng NaOH 5% và đun nóng với thuốc thử felling trong 3 phút. Nếu thấy kết tủa màu đỏ trong dịch lọc axit mà không có trong dịch lọc của nước thì chứng tỏ có glycoside.

2.2.3. Xác định hoạt tính ức chế tụ cầu vàng

Chủng *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 được nuôi cấy trong môi trường LB ở 37°C đến nồng độ tế bào đạt 10^6 CFU/ml. Cấy trang 100µl dịch vi khuẩn trên đĩa petri có chứa 15 môi trường LB agar, sau đó đục các giếng thạch có đường kính 1cm. Cao chiết được hòa tan trong nước deion với các nồng độ khác nhau. Tiến hành nhỏ 100µl dịch cao chiết vào giếng và ủ 4°C để dịch khuếch tán vào thạch. Sau đó, đĩa nuôi vi khuẩn được nuôi ở nhiệt độ 37°C sau 24 giờ. Hoạt tính kháng khuẩn được xác định theo kích thước vòng vô khuẩn: D - d (mm), trong đó D là đường kính của vòng vô khuẩn, d là đường kính giếng thạch (Rubens et al., 2015). Nồng độ ức chế tối thiểu (MIC) và nồng độ diệt khuẩn tối thiểu (MBC) được xác định theo quy trình của NCCLS (NCCLS - National Committee for Clinical Laboratory Standards, 2002).

2.2.4. Xử lý số liệu

Các thí nghiệm được tiến hành lặp lại ít nhất 3 lần và được xử lý xác định các tham số thống kê bằng phần mềm Microsoft Excel 2010

3. KẾT QUẢ

3.1. Thành phần hóa học của cao chiết cây Hoàng liên ô rô

Thành phần các hợp chất hóa học là một trong những chỉ tiêu quan trọng để đánh giá tác dụng của dược liệu. Kết quả phân tích thành phần hóa học của thân cây Hoàng liên ô rô được thể hiện ở bảng 1.

Kết quả bảng 1 cho thấy, trong thân cây Hoàng liên ô rô có thành phần các hợp chất thứ cấp khá đa dạng. Trong đó, các hợp chất alkanoid, flavonoid và terpenoid chiếm tỷ lệ lớn. Sự đa dạng thành phần hợp chất thứ cấp có thể liên quan đến hoạt tính sinh học của cây Hoàng liên ô rô đã được người dân ứng dụng trong cuộc sống.

3.2. Hoạt tính ức chế tụ cầu vàng của cao chiết ethanol

Để xác định hoạt tính ức chế tụ cầu vàng của cao chiết ethanol cây Hoàng liên ô rô, cao chiết đã được hòa tan trong nước deion với nồng độ 20 - 40 mg/ml và được bổ sung vào giếng thử hoạt tính với hàm lượng 2 - 4 mg/giếng. Kết quả được thể hiện ở bảng 2 và hình 1.

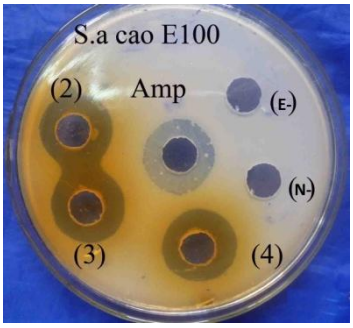
Kết quả bảng 2 cho thấy, cao chiết ethanol cây Hoàng liên ô rô có hoạt tính ức chế mạnh tụ cầu vàng. Khi tăng nồng độ cao chiết từ 2 - 4 mg/giếng thử hoạt tính thì hoạt tính ức chế tăng lên với vòng ức chế dao động trong khoảng 10-15mm. So sánh với đối chứng dương (kháng sinh ampicillin) cho thấy, hoạt tính ức chế tụ cầu vàng của 3 mg cao chiết tương đương với 10mg kháng sinh ampicillin.

Bảng 1. Kết quả phân tích thành phần hóa học của thân cây Hoàng liên ô rô

Thành phần hóa học	Alkanoid	Flavonoid	Glycosid	Terpenoid	Tannin	Saponin
Đánh giá	++	++	+	+++	+	+

Bảng 2. Hoạt tính ức chế tụ cầu vàng của cao chiết ethanol cây Hoàng liên ô rô

Cao chiết (mg/giếng)	2	3	4	Ampicillin (10 mg/giếng)	Ethanol	Nước deion
Hoạt tính ức chế ((D-d) mm)	10 ± 0,5	11 ± 0,6	15 ± 0,4	11 ± 0,5	0	0

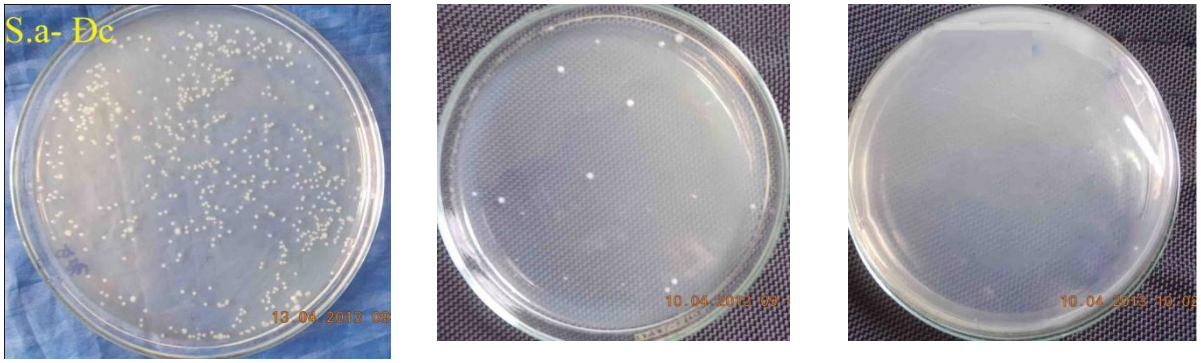


Hình 1. Hoạt tính ức chế tụ cầu vàng của các nồng độ cao chiết khác nhau

Ghi chú: 2: 2mg cao chiết/giếng; 3: 3mg cao chiết/giếng; 4: 4mg cao chiết/giếng; Amp: 10mg ampicillin/giếng; E-: Đối chứng âm ethanol; N-: Đối chứng âm nước deion

Bảng 3. Giá trị (MIC, MBC và IC_{50}) của cao chiết ethanol cây Hoàng liên ô rô

Giá trị	MIC	IC_{50}	MBC
Nồng độ cao chiết (mg/ml)	0,05 ± 0,001	4,17 ± 0,023	21,67 ± 0,078



(A) (B) (C)

Hình 2. Sự sinh trưởng của *Staphylococcus aureus* ở những nồng độ cao chiết ethanol khác nhau của cây Hoàng liên ô rô

Ghi chú: A: 0% (đối chứng); B: 15 mg/ml; C: 21,67 mg/ml (MBC)

3.3. Nồng độ ức chế tối thiểu và nồng độ diệt khuẩn tối thiểu

Để xác định nồng độ ức chế tối thiểu (MIC), nồng độ diệt khuẩn tối thiểu (MBC) và nông độ ức chế 50% (IC_{50}), cao chiết ethanol cây Hoàng liên ô rô được bổ sung vào môi trường nuôi cấy chủng *Staphylococcus aureus* (có mật độ ban đầu: 10^6 CFU/ml) với nồng độ khác nhau từ 1,66 - 21,67 mg/ml theo phương pháp của NCCLS (National Committee for Clinical Laboratory Standards). Kết quả được thể hiện ở bảng 3 và hình 2.

Bảng 3 cho thấy, cao chiết ethanol của cây Hoàng liên ô rô có khả năng ức chế mạnh tụ cầu vàng với nồng độ ức chế tối thiểu là 0,05 mg/ml và nồng độ diệt khuẩn tối thiểu là 21,67 mg/ml. Nồng độ 4,17 mg/ml cao chiết đã ức chế 50% sự phát triển của tụ cầu vàng.

4. THẢO LUẬN

Tụ cầu vàng có thể gây nhiều bệnh nhiễm khuẩn, trong đó có một số bệnh rất nặng và có thể gây tử vong nếu không được phát hiện sớm

và điều trị tích cực như: nhiễm trùng huyết, viêm màng não mủ,... (Dinges *et al.*, 2000; Lyon and Skurrayr, 1987). Ngoài việc gây nhiễm trùng và là tác nhân gây nhiễm trùng bệnh viện, tụ cầu vàng còn có khả năng gây ngộ độc thực phẩm do độc tố của chúng. Tuy nhiên, tụ cầu vàng kháng lại nhiều loại kháng sinh thông dụng, đặc biệt kháng lại kháng sinh methicilin (Wang *et al.*, 2001). Do đó, việc phòng và chống tụ cầu vàng gặp nhiều trở ngại, khó khăn.

Kết quả phân tích cho thấy, cao chiết ethanol cây Hoàng liên ô rô có khả năng ức chế, kìm hãm và tiêu diệt tụ cầu vàng. Hoạt tính ức chế tụ cầu vàng của 3 mg cao chiết tương đương với 10mg kháng sinh ampicilin. Những nghiên cứu trước đây cho thấy, ở nồng độ 250 mg/ml của cao chiết ethanol từ cây *Thymus kotochyanus* chỉ kháng được tụ cầu vàng với vòng vô khuẩn là 16,5 mm, còn cây *Sinapis arvensis* ở nồng độ 125 mg/ml cao chiết ethanol chỉ kháng được tụ cầu vàng với vòng vô khuẩn là 9 mm (Al-Younis and Abdullah, 2009). Ở nồng độ 10 mg/ml cao chiết ethanol cây *Hyptis martiusii* Benth cho hoạt tính ức chế tụ cầu vàng với vòng vô khuẩn 15mm (Coutinho *et al.*, 2008). Như vậy, hoạt tính ức chế tụ cầu vàng của cao chiết ethanol cây Hoàng liên ô rô bằng hoặc cao hơn so với các cao chiết ethanol của một số loài thực vật khác nhưng nồng độ cao chiết thấp hơn.

Nồng độ ức chế tối thiểu (MIC) và nồng độ diệt khuẩn tối thiểu của cao chiết ethanol cây Hoàng liên ô rô là 0,05 và 21,67 mg/ml thấp hơn so với một số nghiên cứu hoạt tính ức chế tụ cầu vàng của cao chiết ethanol một số loài thực vật đã công bố. Coutinho *et al.* (2008) đã nghiên cứu hoạt tính ức chế tụ cầu vàng của cao chiết ethanol cây *Hyptis martiusii* Benth đã xác định được MIC và MBC lần lượt là 256 và 512 mg/ml. MIC và MBC của cao chiết ethanol cây *Cassia tora* đối với chủng *Staphylococcus aureus* kháng Methicillin là 62,5 và 125 mg/ml (Elakkia and Venkatesalu, 2014). Như vậy, cao chiết ethanol cây Hoàng liên ô rô có hoạt tính ức chế tụ cầu vàng mạnh. Cao chiết ethanol cây Hoàng liên ô rô có thể được sử dụng như một trong những tác nhân chống lại tụ cầu vàng hiệu quả.

Dịch chiết, cao chiết thực vật có hoạt tính ức chế sự sinh trưởng của vi khuẩn là do có chứa các chất có hoạt tính sinh học. Các chất có hoạt tính kháng khuẩn mạnh có bản chất hóa học chủ yếu thuộc nhóm alkanoid, flavonoid và terpenoid (Cowan, 1999; Al-Younis and Abdullah, 2009). Trong thân cây Hoàng liên ô rô có thành phần hóa học chủ yếu là các hợp chất thuộc nhóm terpenoid, alkanoid, flavonoid (Bảng 1). Kết quả này có thể giải thích cho hoạt tính ức chế mạnh tụ cầu vàng của cao chiết ethanol từ thân cây Hoàng liên ô rô.

5. KẾT LUẬN

Thành phần hóa học của thân cây Hoàng liên ô rô có nhiều các hợp chất thứ cấp alkaloid, tannin, flavonoid, saponin và terpenoid. Các hoạt chất nhóm terpenoid, alkanoid và flavonoid chiếm tỷ lệ lớn. Cao chiết ethanol của cây Hoàng liên ô rô có hoạt tính ức chế *Staphylococcus aureus* mạnh. Đường kính của vùng ức chế khác nhau 10 - 15mm đối với nồng độ cao chiết từ 20 - 40 mg/ml. Giá trị MIC, IC_{50} và MBC là 0,05; 4,17; 21,67 mg/ml. Cao chiết ethanol cây Hoàng liên ô rô có thể được sử dụng là tác nhân chống lại tụ cầu vàng.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

Al-Younis N. K. and Abdullah A. F. (2009). Isolation and antibacterial evaluation of plant extracts from some medicinal plants in Kurdistan region. J Duhok Univ., 12: 250-255.

Coutinho H. D. M., Costa J. G. M., Siqueira-Júnior J. P., Lima E. O. (2008). In vitro anti-staphylococcal activity of Hyptis martiusii Benth against methicillin-resistant Staphylococcus aureus-MRSA strains. Brazilian Journal of Pharmacognosy, 18: 670-675.

Cowan M. M. (1999). Plants products as antimicrobial agents. Clin Microbiol Rev., 12: 564- 582.

Dinges M. M., Orwin P. M. and Schlivert P. M. (2000). Exotoxins of Staphylococcus aureus. Clin Microbiol Rev., 13: 16-34.

Nguyễn Thượng Dong (2006). Nghiên cứu thuốc từ thảo dược. Nhà xuất bản Khoa học và Kỹ thuật, Hà Nội.

Elakkia S. A. and Venkatesalu V. (2014). Anti-MRSA activity of different extracts of selected Cassia

species. International Journal of Pharmaceutical and Clinical Science, 4: 11-17.

Harborne J. B. (1978). Phytochemical methods (3rd ed.). Chapman and Hall, London.

Hwang F. L., Jan S. L., Chen P. Y., Chi C. S., Wang T. M., Fu Y. C., Tsai C. R. and Chang Y. (2002). Left ventricular dysfunction in children with fulminant Enterovirus 71 infecton: An avaluation of the clnical course. Clin Infect Dis., 34: 1020-1024.

Đỗ Tất Lợi (2008). Những cây thuốc và vị thuốc Việt Nam. Nhà xuất bản Y học, Hà Nội.

Lyon B. and Skurrayr R. (1987). Antimicrobial resistance of Staphylococcus aureus. Genetic basis Microbiol Rev., 51: 88-134.

NCCLS-National Committee for Clinical Laboratory Standards (2002). Performance standards for antimicrobial disk susceptibility tests. document M100-S12, Pennsylvania.

Rubens D. M., Constantin O. O., Moevi A. A., Nathalie G. K., Daouda T., David N. J., Mireille D. and Joseph D. A. (2015). Anti Staphylococcus aureus activity of the aqueous extract and hexanic fraction of Thonningia sanguinea (Cote ivoire). International Journal of Pharmacognosy and Phytochemical Research, 7: 301-306.

Wang J. T., Chang S. T. and Ko W. J. (2001). A hospital acquired outbreak of Methicillin - resistant Staphylococcus aureus infection initiated by a surgeon carrier. J Hos Infec., 47: 104-109.