

HOẠT TÍNH SINH HỌC CỦA DỊCH CHIẾT BẰNG METANOL TỪ MỘT SỐ LOÀI CÂY THUỘC CHI RAU RẪM (*POLYGONUM*) Ở TỈNH LÂM ĐỒNG

NGUYỄN THỊ DIỆU THUẦN, NGUYỄN HỮU TOÀN PHAN,
HOÀNG THỊ ĐỨC, NGUYỄN ĐÌNH TRUNG

Viện Sinh học Tây Nguyên

Nước ta có nguồn tài nguyên thực vật rất phong phú và đa dạng, trong đó các chi và các loài chứa hoạt chất sinh học có giá trị kinh tế rất lớn. Để góp phần nghiên cứu tác dụng chữa bệnh của các loài cây địa phương nhằm nâng cao giá trị của chúng, chúng tôi tiến hành thử hoạt tính kháng khuẩn, gây độc tế bào và chống oxy hóa của dịch chiết bằng metanol (MeOH) từ một số loài cây thuộc chi Rau răm (*Polygonum*), họ Rau răm (Polygonaceae) phân bố tại Đà Lạt, tỉnh Lâm Đồng.

I. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

1. Đối tượng

Chúng tôi tiến hành nghiên cứu dịch chiết MeOH từ 8 loài cây thuộc chi Rau răm (*Polygonum*) được thu hái tại thành phố Đà Lạt. Thời gian thu hái vào đầu mùa mưa (tháng 4). Thân và lá thu hái được sấy khô ở nhiệt độ 40°C. Với các ký hiệu: P1 - rau răm (*P. odoratum* Lour.), P2 - nghệ bún (*P. pesicaria* L.), P3 - thôm lôm (*P. chinensis* L.), P4 - thôm lôm gai (*P. perfoliatum* L.), P5 - nghệ cánh (*P. alatum* Buch.-Ham. ex D. Don), P6 - nghệ ồm (*P. strigosum* R. Br.), P7 - nghệ đông (*P. orientale* L.) và P8 - răm nước (*P. hydropiper* L.) [1-3, 5-7].

2. Phương pháp

a. Thử nghiệm hoạt tính kháng vi sinh vật kiểm định

Các kháng sinh kiểm định bao gồm: ampicilin đối với các vi khuẩn gram (+), tetraxilin đối với các vi khuẩn gram (-), nystatin đối với nấm sợi và nấm men. Các chủng vi sinh vật kiểm định: các vi khuẩn gram (-) là *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Pseudomonas*

aeruginosa (ATCC 25923); các vi khuẩn gram (+) là *Bacillus subtilis* (ATCC 27212), *Staphylococcus aureus*; nấm sợi là *Aspergillus niger*, *Fusarium oxysporum*; nấm men là *Candida albicans*, *Saccharomyces cerevisiae*.

b. Thử nghiệm hoạt tính chống oxy hóa trong hệ DPPH - antioxydant

Mẫu sấy khô được chiết bằng MeOH, cô thu hồi dung môi và cần thô thu được, được đem thử hoạt tính chống oxy hóa trong hệ DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl) - antioxydant. Dựa trên nguyên tắc 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) có khả năng tạo ra các gốc tự do bên trong dung dịch EtOH bão hòa. Khi cho các chất thử nghiệm vào hỗn hợp này, nếu chất có khả năng làm trung hòa hoặc bao vây các gốc tự do thì sẽ làm giảm cường độ hấp thụ ánh sáng của các gốc tự do DPPH. Khả năng chống oxy hóa được đánh giá thông qua giá trị hấp phụ ánh sáng của dịch thí nghiệm so với đối chứng khi đọc trên máy Elisa ở bước sóng 515 nm.

c. Thử nghiệm hoạt tính gây độc tế bào

Phương pháp Likhiwitayawuid: Sử dụng các dòng tế bào: KB (ung thư biểu mô), Fl (ung thư màng tử cung), RD (ung thư màng tim), Hep-G2 (ung thư gan). Tế bào được duy trì liên tục ở các điều kiện tiêu chuẩn. Sau khi tế bào được hoạt hóa phát triển đến pha log, sẽ được sử dụng để thử nghiệm với các chất thử đã được chuẩn bị sẵn ở 4-10 thang nồng độ khác nhau; thử nghiệm được lặp lại 3 lần trên phiên vi lượng 96 giếng. Phiên thử nghiệm bao gồm: tế bào cộng với môi trường nuôi cấy cộng với mẫu thử, được ủ trong tủ ấm ở các điều kiện CO₂/37°C/48-72h để tế bào tiếp tục phát triển. Sau đó lấy ra cố định tế bào, rửa, nhuộm tế bào và hòa lại bằng dung dịch chuẩn. Đọc kết quả trên máy đọc Elisa ở bước

sóng 495-515 nm. Giá trị IC₅₀ được tính trên chương trình Table Curve với giá trị logarit dựa trên giá trị dãy các thang nồng độ khác nhau của chất thử và giá trị OD đo được. Mẫu thô có IC₅₀ ≤ 20 µg/ml là có hoạt tính [4].

Phương pháp MTT: Sử dụng dòng tế bào ung thư vú MCF-7. Dựa vào hoạt động của những enzym dehydrogenaza ty thể trong các tế bào sống sẽ xúc tác chuyển cơ chất màu vàng tan trong nước MTT [3-(4,5 dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide] thành tinh thể formazan có màu xanh đen không tan được trong nước. Số lượng tinh thể formazan được đo bằng phương pháp đo mật độ quang OD ở bước sóng 570 nm. Chất so sánh được sử dụng là camptothecin. Khả năng gây độc tế bào ung thư MCF-7 của hợp chất được tính theo công thức:

$$H(\%) = \frac{O_{DC} - O_{TN}}{O_{DC}}$$

Ghi chú: H. tỷ lệ (%) gây độc tế bào của hợp chất; O_{DC}. giá trị OD của mẫu đối chứng (môi trường chứa DMSO); O_{TN}. giá trị OD của mẫu thí nghiệm (môi trường chứa hợp chất).

II. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

1. Thử nghiệm hoạt tính kháng vi sinh vật kiểm định

Mẫu thử được hòa tan trong DMSO 100%, với 4-10 thang nồng độ được pha loãng từ dịch gốc rồi nhỏ sang phôi vi lượng 96 giếng. Vi sinh vật kiểm định sau khi được hoạt hóa, được pha loãng bằng môi trường dinh dưỡng cho tới nồng độ tương đương 0,5 đơn vị McLand (khoảng 10⁸ vsv/ml). Để trong tủ ấm ở điều kiện 37°C/24h đối với vi khuẩn và 30°C/48h đối với nấm. Sau đó đọc kết quả và tính giá trị ức chế tối thiểu (MIC). Mẫu thô có MIC ≤ 200 µg/ml là có hoạt tính. Phương pháp thử này được tiến hành tại Phòng thí nghiệm hoạt tính sinh học của Viện Hóa học các hợp chất thiên nhiên. Kết quả nghiên cứu được trình bày trong bảng 1.

Kết quả cho thấy các mẫu thu hái được đều có hoạt tính kháng một số vi sinh vật kiểm định ở các mức độ khác nhau. Trong đó, dịch chiết MeOH từ cây nghệ đông (*P. orientale* L.) có hoạt tính kháng 4 vi sinh vật kiểm định, từ cây nghệ ốm (*P. strigosum* R. Br) có hoạt tính kháng 5 vi sinh vật kiểm định, từ cây răm nước (*P. hydropiper* L.) có hoạt tính kháng 6 vi sinh vật kiểm định. Đây là những dịch chiết có hoạt tính kháng vi sinh vật khá mạnh.

Bảng 1

Hoạt tính kháng vi sinh vật kiểm định

Ký hiệu mẫu	Nồng độ ức chế tối thiểu (MIC: µg/ml)							
	Vi khuẩn gram (-)		Vi khuẩn gram (+)		Nấm mốc		Nấm men	
	<i>E. coli</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>B. subtilis</i>	<i>S. aureus</i>	<i>A. niger</i>	<i>F. oxysporum</i>	<i>S. cerevisiae</i>	<i>C. albicans</i>
P1	(-)	(-)	(-)	100	(-)	(-)	(-)	200
P2	200	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	100	100
P3	(-)	(-)	(-)	200	(-)	(-)	(-)	200
P4	(-)	(-)	(-)	200	(-)	200	(-)	(-)
P5	200	(-)	(-)	200	(-)	(-)	(-)	(-)
P6	100	(-)	(-)	50	100	50	(-)	200
P7	(-)	(-)	100	100	100	50	(-)	(-)
P8	200	(-)	200	50	200	50	(-)	100

2. Thử nghiệm hoạt tính chống oxy hóa trong hệ DPPH - Antioxydant

Mẫu sấy khô được chiết bằng dung môi

MeOH; cô thu hồi dung môi và căn thô thu được đem thử hoạt tính chống oxy hóa trong hệ DPPH (1, 1 - diphenyl - 2 - picrylhydrazyl) -

antioxydant. Phương pháp thử này được tiến hành tại Phòng thí nghiệm hoạt tính sinh học của Viện Hóa học các hợp chất thiên nhiên. Kết quả được trình bày trong bảng 2.

Bảng 2

Hoạt tính chống oxy hóa của dịch chiết MeOH từ các mẫu P1-P5

Ký hiệu mẫu	SC (%)	SC ₅₀ (µg/ml)	Kết quả
Chứng (+)	68,02 ± 0,1	25,33	Dương tính
Chứng (-) DMSO/EtOH	0,00 ± 0,0	-	Âm tính
P1	58,57 ± 0,3	107,43	Dương tính
P2	50,52 ± 0,1	165,42	Dương tính
P3	61,90 ± 0,8	83,58	Dương tính
P4	68,93 ± 0,5	55,16	Dương tính
P5	68,58 ± 0,8	86,40	Dương tính

Dựa trên kết quả thử hoạt tính chống oxy hóa trong hệ DPPH của 5 loài thuộc chi Rau răm (*Polygonum*) cho thấy, chúng đều có hoạt tính chống oxy hóa mạnh.

3. Thử nghiệm hoạt tính gây độc tế bào

Mẫu sấy khô được chiết bằng dung môi MeOH; cô thu hồi dung môi và cần thô thu được đem thử hoạt tính gây độc tế bào theo phương pháp của Likhiwitayawuid và phương pháp

MTT. Các phương pháp thử này được tiến hành tại Phòng thí nghiệm hoạt tính sinh học - Viện Hóa học các hợp chất thiên nhiên và Phòng thí nghiệm Sinh học phân tử - Trường đại học Khoa học tự nhiên, Đại học Quốc gia Thành phố Hồ Chí Minh. Kết quả được trình bày trong bảng 3 và bảng 4.

Kết quả trên cho thấy, không có dịch chiết MeOH toàn phần nào từ các loài P1-P5 có hoạt tính gây độc tế bào.

Bảng 3

Hoạt tính gây độc tế bào của dịch chiết MeOH từ các mẫu P1-P5 theo phương pháp Likhiwitayawuid

Ký hiệu mẫu	Tỷ lệ (%) tế bào còn sống trên các dòng tế bào			Kết luận
	Hep-G2	RD	Fl	
DMSO	100,0 ± 0,0	100,0 ± 0,0	100,0 ± 0,0	
Chứng (+)	2,05 ± 0,0	1,2 ± 0,06	2,5 ± 0,7	
P1	91,5 ± 0,9	75,1 ± 1,2	83,3 ± 1,5	Âm tính
P2	90,2 ± 1,15	78,5 ± 1,5	92,6 ± 1,9	Âm tính
P3	88,1 ± 0,2	83,6 ± 0,1	85,2 ± 1,8	Âm tính
P4	97,1 ± 0,6	81,5 ± 0,7	89,8 ± 1,4	Âm tính
P5	76,4 ± 1,3	75,2 ± 1,4	98,1 ± 2,8	Âm tính

Bảng 4

Tỷ lệ (%) gây độc tế bào của các mẫu P6-P8 trên dòng tế bào MCF-7

Ký hiệu mẫu	Nồng độ 100 ppm			Nồng độ 10 ppm		
	TB	STD	H%	TB	STD	H%
P6	0,610	0,040	6,654	0,691	0,023	-5,843
P7	0,651	0,024	0,270	0,748	0,039	-14,477
P8	0,552	0,038	15,442	0,703	0,049	-7,655

Ghi chú: TB. giá trị trung bình của mật độ quang; STD. độ lệch chuẩn; H%. phần trăm gây độc tế bào.

Kết quả trên cho thấy các mẫu P6, P7, P8 có hoạt tính gây độc tế bào thấp ở nồng độ 100 ppm và không có hoạt tính gây độc tế bào ở nồng độ 10 ppm.

III. KẾT LUẬN

1. Đã xác định được dịch chiết MeOH từ các cây rau răm (*P. odoratum* Lour.), nghề bún (*P. pesicaria* L.), thồm lôm (*P. chinensis* L.), thồm lôm gai (*P. perfoliatum* L.), nghề cánh (*P. alatum* Buch.-Ham. ex D. Don) có hoạt tính chống oxy hóa mạnh.

2. Dịch chiết từ các mẫu đều có hoạt tính kháng vi sinh vật kiểm định, trong đó dịch chiết MeOH từ cây nghề đông (*P. orientale* L.) kháng 4 vi sinh vật kiểm định, từ cây nghề ốm (*P. strigosum* R. Br.) kháng 5 vi sinh vật kiểm định, từ cây răm nước (*P. hydropiper* L.) kháng 6 vi sinh vật kiểm định.

Như vậy, dịch chiết MeOH từ 8 loài cây thuộc chi Rau răm (*Polygonum*) ở Lâm Đồng có hoạt tính chống oxy hóa và hoạt tính kháng vi sinh vật kiểm định mạnh; điều này phù hợp với

y học cổ truyền thường dùng chúng để trị các vết thương ngoài da [1, 2, 5].

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. **Nguyễn Thọ Biên**, 1996: Cây thuốc Lâm Đồng: 66-70, 230-231. Sở Y tế Lâm Đồng.
2. **Võ Văn Chi**, 1996: 200 cây thuốc thông dụng: 207. Nxb. Tổng hợp Đồng Tháp.
3. **Phạm Hoàng Hộ**, 1999: Cây cỏ Việt Nam, quyển I: 743-749, Nxb. Trẻ, tp. Hồ Chí Minh.
4. **Likhitwitayawuid et al.**, 1993: J. Nat. Prod., 56: 30-38.
5. **Đỗ Tất Lợi**, 2004: Những cây thuốc và vị thuốc Việt Nam: 111-119, 283, 547. Nxb. Y học, Hà Nội.
6. **Xingzhong Sun et al.**, 2000: J. Nat. Prod., 63: 1094-1097.
7. **Lê Thị Xuân, D. D. Soejarto**, 2008: Tuyển chọn những cây thuốc của cộng đồng người Mường ở Cúc Phương: 258. Nxb. Khoa học tự nhiên và Công nghệ, Hà Nội.

BIO-ACTIVITIES OF THE METHANOL EXTRACTS FROM SOME SPECIES BELONGING TO THE GENUS *POLYGONUM* IN LAM DONG PROVINCE

NGUYEN THI DIEU THUAN, NGUYEN HUU TOAN PHAN,
HOANG THI ĐỨC, NGUYEN DINH TRUNG

SUMMARY

The methanol extracts from the aerial parts of eight species (*Polygonum odoratum* Lour., *P. pesicaria* L., *P. chinensis* L., *P. perfoliatum* L., *P. alatum* Buch.-Ham. ex D. Don, *P. strigosum* R. Br., *P. orientale* L., *P. hydropiper* L.) collected in Lam Dong province were submitted to bio-tests in order to evaluate the antibacterial, antioxidant and cytotoxic effects. All of these extracts had antimicrobial activities, especially *P. strigosum* R. Br. could resist to *E. coli*, *S. aureus*, *F. oxysporum*, *A. niger* and *S. cerevisiae*; *P. orientale* L. could resist to *S. aureus*, *B. subtilis*, *F. oxysporum* and *A. niger*; *P. hydropiper* could resist *E. coli*, *S. aureus*, *B. subtilis*, *F. oxysporum*, *A. niger* and *S. cerevisiae*. As far as DPPH test, the MeOH extracts from *P. chinensis* L., *P. perfoliatum* L. and *P. alatum* Buch.-Ham. ex D. Don were found to be the most active extracts. The MeOH extracts from these eight species had antioxidant and antimicrobial activities, therefore they had been used to cure the skin disease in the traditional medicine.

Ngày nhận bài: 16-12-2008