

# ĐỊNH TÍNH COUMARIN VÀ ĐÁNH GIÁ HIỆU QUẢ KHÁNG KHUẨN CỦA DỊCH CHIẾT TỪ MỘT SỐ LOÀI THỰC VẬT ĐỂ CHỮA BỆNH: KINH NGHIỆM CỦA NGƯỜI MƯỜNG Ở NHO QUAN, TỈNH NINH BÌNH

*Đinh Thị Lan Hương, Nguyễn Thị Phương, Lê Thị Thanh Hương Trịnh Ngọc Hoàng<sup>1</sup>,  
Đậu Bá Thìn<sup>2</sup> và Nguyễn Nghĩa Thìn<sup>3</sup>*

## ABSTRACT

*From 10 samples of medicinal plants of Muong ethnic in Quang Lac commune, Nho Quan district, Ninh Binh province is used as medicine, we have determined the presence of coumarin by both chromatography thin layer method and chemical reaction of lactone group. Experimental results showed that all most of the sample may contain coumarin components or derivatives of them. Next, extractive solution from 10 medicinal plants were evaluated antibacterial activity, the results show that 8/10 species have been resistant to all 4 pathogenic bacterial strains. Of these, two species of Zanthoxylum acanthopodium DC. and Pterolobium integrum Craib shown resistance is very strong.*

**Keywords:** *Coumarin, thin-layer chromatography, antibacterial*

**Title:** *Determining the coumatin and assensing the anti-bacterial activity of the extractive solution from some medicinal plants by Muong ethnic group based on the lacal people experience in Nho Quan, Ninh Binh province*

## TÓM TẮT

*Từ 10 mẫu cây thuốc được đồng bào dân tộc Mường xã Quang Lạc, huyện Nho Quan, tỉnh Ninh Bình sử dụng để làm thuốc, chúng tôi đã tiến hành định tính để xác định sự có mặt của coumarin bằng cả hai phương pháp sắc ký lớp mỏng và phản ứng hoá học của nhóm lacton. Kết quả cho thấy hầu hết các mẫu nghiên cứu đều có thể chứa coumarin hoặc dẫn xuất của chúng. Tiếp theo, dịch chiết từ 10 cây thuốc này được đánh giá khả năng kháng khuẩn, kết quả cho thấy 8/10 loài nghiên cứu đều có khả năng kháng lại đồng thời cả 4 loại vi khuẩn gây bệnh. Trong đó, hai loài Zanthoxylum acanthopodium DC. và Pterolobium integrum Craib thể hiện tính kháng rất rõ rệt.*

**Từ khóa:** *Coumarin, phương pháp sắc ký lớp mỏng, kháng khuẩn*

## 1 ĐẶT VẤN ĐỀ

Coumarin là một hợp chất thiên nhiên quan trọng, có tác dụng dược lý cao, được dùng làm thuốc chống đông máu. Ngoài ra, coumarin còn phòng chữa nhiều bệnh như: chống HIV, chống khối u, chống cao huyết áp, chống loạn nhịp tim, chống loãng xương, giảm đau, ngăn ngừa bệnh suyễn và sát trùng...[3]. Nhiều nghiên cứu khác nhau đã chỉ ra rằng coumarin có nhiều trong các loài thuộc họ Đậu (Fabaceae), họ Hoa tán (Apiaceae), họ Cam (Rutaceae) [3], [6]. Tính đến thời điểm hiện tại cũng đã có một số công bố về sàng lọc và đánh giá các hợp chất coumarin từ một số loài thực vật ở Việt Nam. Tiếp theo các nghiên cứu về hợp

<sup>1</sup> Đại học Khoa học - Đại học Thái Nguyên

<sup>2</sup> Đại học Hồng Đức

<sup>3</sup> Đại học Khoa học Tự nhiên - ĐHQG Hà Nội

chất thiên nhiên, chúng tôi tìm kiếm thêm những cây thuốc có chứa hợp chất coumarin và đánh giá hiệu quả kháng khuẩn của dịch chiết hợp chất này, nhằm cung cấp thông tin về nguồn nguyên liệu chứa coumarin, phục vụ cho việc chiết xuất và chế biến thuốc từ thực vật. Những cây thuốc trong nghiên cứu này được khai thác dựa trên kinh nghiệm bản địa của người Mường ở xã Quảng Lạc, huyện Nho Quan, tỉnh Ninh Bình.

## 2 NGUYÊN LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

### 2.1 Nguyên liệu

Từ các mẫu cây thuốc thu thập được tại xã Quảng Lạc, Nho Quan, Ninh Bình, chúng tôi tiến hành xác định tên khoa học theo phương pháp hình thái học so sánh kết hợp với kinh nghiệm của các chuyên gia về thực vật học và các bộ sách chuyên ngành của Võ Văn Chi (1996) [4], Phạm Hoàng Hộ (1999-2000) [7], Đỗ Tất Lợi (2005) [8] và bộ sách Danh lục các loài thực vật Việt Nam của Trung tâm nghiên cứu Tài nguyên và Môi trường - Đại học Quốc gia Hà Nội, Viện Sinh thái và Tài nguyên Sinh vật-Trung tâm Khoa học Tự nhiên và Công nghệ Quốc gia (2005) [9]. Đây là những bộ sách được sử dụng nhiều nhất trong việc định danh tên khoa học các loài thực vật Việt Nam hiện nay. Trên cơ sở đó chúng tôi đã lựa chọn ra 10 loài cây thuốc gồm: Đơn châu chấu (*Aralia armata* (Wall. ex G. Don) Seem) họ Ngũ gia bì (Araliaceae); Dây cam thảo (*Abrus precatorius* L.), Thóc lép (*Desmodium gangeticum* (L.) DC.); Vây rồng (*Desmodium styracifolium* (Osbeck) Merr.); Dực thùỳ nguyên (*Pterolobium integrum* Craib); Muồng lạc (*Senna tora* (L.) Roxb.) thuộc họ Đậu (Fabaceae); Chanh tây (*Citrus limon* (L.) Burm. f.), Ba chạc (*Euodio lepta* (Spreng.) Merr.), Chùm hôi trắng (*Murraya koenigii* (L.) Spreng.), Sên (*Zanthoxylum acanthopodium* DC.) thuộc họ Cam (Rutaceae).

Mẫu lá cây thuốc được thu hái tại thực địa vào tháng 5/2011 được xử lý tại phòng thí nghiệm Sinh học - Khoa Khoa học Sự sống - Trường Đại học Khoa học -Đại học Thái Nguyên.

Các chủng vi khuẩn chuẩn bao gồm: *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas aeruginosa* (Trực khuẩn mũ xanh), *Staphylococcus aureus* (Tụ cầu vàng) do Bộ môn Sinh học Thực nghiệm - Khoa Khoa học Sự sống - Trường Đại học Khoa học Thái Nguyên cung cấp được sử dụng trong nghiên cứu hoạt tính kháng khuẩn của dịch chiết chứa coumarin.

### 2.2 Phương pháp nghiên cứu

#### 2.2.1 Định tính coumarin

Tách chiết và định tính coumarin được thực hiện theo phương pháp nghiên cứu Nguyễn Thái An và cộng sự [1] nhưng có một số điều chỉnh cho phù hợp với đối tượng nghiên cứu.

Lá cây được sấy khô tán nhỏ thành dạng bột, chiết coumarin toàn phần bằng ethanol 90%, thay vì lắc trong khoảng 1 giờ, chúng tôi đã tiến hành lắc rung ở cường độ 200 vòng/phút trong 24 giờ để làm giảm độ nhớt của lá cây và tăng hàm lượng dịch, điều này rất quan trọng đối với các đối tượng trong nghiên cứu này. Sau đó tiến hành thu dịch chiết và đun cách thủy trong 15 phút để làm bay hơi

nước, dịch chiết còn lại (dịch chiết sơ bộ) được sử dụng để định tính coumarin và thử hoạt tính kháng khuẩn.

Định tính coumarin bằng phản ứng đóng mở vòng lacton: cho vào mỗi ống 0,5 ml dịch chiết, chia làm 2 nhóm, nhóm 1 bổ sung thêm 0,25 ml dung dịch NaOH 10%, đun cả hai nhóm dưới ngọn lửa đèn cồn đến sôi, thêm vào mỗi ống nghiệm của cả 2 nhóm 1 ml nước cất, acid hóa các dịch trong ống nghiệm của lô 1 bằng vài giọt HCl.

Định tính coumarin bằng phương pháp sắc ký lớp mỏng: dùng bản mỏng Silica gel GF254 của hãng MERCK. Dịch chiết coumarin sơ bộ được chấm lên bản sắc kí và được nhúng vào hệ dung môi thích hợp, sau đó để khô tự nhiên soi dưới đèn UV bằng máy UV Transilluminator ở bước sóng 365 nm, quan sát khả năng phát huỳnh quang của Coumarin. Tiếp theo, coumarin được hiện màu bằng các thuốc nhuộm: I<sub>2</sub>/KI và KOH 0,5N trong ethanol.

### 2.2.2 Đánh giá khả năng kháng khuẩn của dịch chiết

Vi khuẩn được cấy trải nuôi ở môi trường thạch MPA trên đĩa Petri với độ dày 3-4 mm. Dịch chiết được tra vào đây giếng trên đĩa petri, cho vào tủ lạnh để dịch chiết khuếch tán ra bề mặt thạch sau 3 giờ nuôi vi khuẩn ở 30°C trong 24 giờ. Hoạt tính kháng khuẩn được đánh giá dựa trên kích thước vòng kháng tạo ra từ các giếng chứa dịch chiết khuếch tán trên đĩa thạch tính bằng mm.

## 3 KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

### 3.1 Định tính coumarin

#### 3.1.1 Định tính bằng các phản ứng đóng mở vòng lacton

Coumarin có vòng lacton, vòng này có khả năng bị mở để tạo ra muối dễ tan trong nước dưới tác dụng của kiềm, khi acid hóa vòng sẽ đóng trở lại. Tính chất này được sử dụng để định tính coumarin. Kết quả được thể hiện qua bảng 1.

**Bảng 1: Định tính Coumarin bằng phản ứng hóa học**

STT	Dịch chiết của cây thuốc	Phản ứng đóng mở vòng lacton
1	<i>Zanthoxylum acanthopodium</i> DC.	++
2	<i>Murraya koenigii</i> (L.) Spreng.	++
3	<i>Euodio leptia</i> (Spreng.) Merr.	+
4	<i>Citrus limon</i> (L.) Burm. f.	+
5	<i>Senna tora</i> (L.) Roxb.	+++
6	<i>Aralia armata</i> (Wall. ex G. Don) Seem	+
7	<i>Pterolobium integrum</i> Craib	+
8	<i>Desmosdium styracifolium</i> (Osbeck) Merr.	+++
9	<i>Abrus precatorius</i> L.	-
10	<i>Desmosdium gangeticum</i> (L.) DC.	++

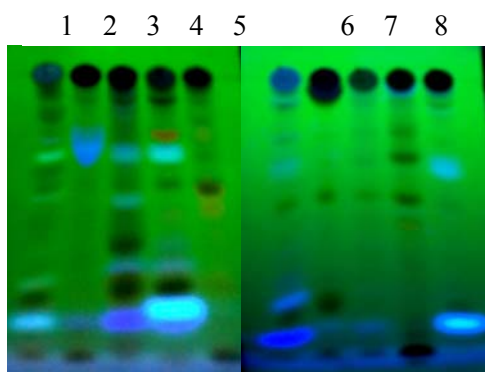
Ghi chú: +++ Phản ứng dương tính rất rõ, ++ Phản ứng dương tính rõ, + Phản ứng dương tính, - Phản ứng âm tính.

Từ kết quả phân tích khả năng đóng mở vòng của dịch chiết từ 10 mẫu cây thuốc nghiên cứu cho thấy rằng, ngoại trừ loài *Abrus precatorius* L. cho phản ứng âm tính thì tất cả các mẫu còn lại đều cho kết quả dương tính, rất có thể cả 9 mẫu này đều chứa thành phần coumarin hoặc dẫn xuất của nó trong đó, đáng chú ý nhất là

hai loài *Senna tora* (L.) Roxb. và *Desmosdium styracifolium* (Osbeck) Merr. cho phản ứng đóng mở vòng rất rõ rệt, các đối tượng còn lại cho phản ứng vừa và yếu.

### 3.1.2 Định tính Coumarin bằng phương pháp sắc ký lớp mỏng

Phương pháp sắc ký lớp mỏng thực hiện trên bản Silica gel GF254 hãng MERCK triển khai với 3 loại hệ dung môi là: Benzen:ethyl acetat (10:1), Benzen:ethyl acetat (8:3), Benzen:aceton (10:1). Sau nhiều thí nghiệm chúng tôi thấy rằng, hệ dung môi Benzen:aceton (10:1) có khả năng tách các hợp chất trong dịch chiết cao nhất, quan sát dưới ánh sáng thường và ánh sáng tử ngoại ở bước sóng 365 nm, sau đó hiện màu bằng các thuốc thử KOH và I<sub>2</sub>/KI chúng tôi đã thu được kết quả như trong hình 1 và bảng 2.



**Hình 1: Hình ảnh sắc ký lớp mỏng dưới ánh sáng tử ngoại bước sóng 365 nm của các mẫu nghiên cứu**

Chú thích: 1. Sên - *Zanthoxylum acanthopodium*, 2. Chùm hôi trắng - *Murraya koenigii*, 3. Ba chạc - *Euodio leptia*, 4. Chanh tây - *Citrus limon*, 5. Muồng lạc - *Senna tora*, 6. Đơn châu chấu - *Aralia armata*, 7. Dục thủy nguyên - *Pterolobium integrum*, 8. Vây rồng - *Desmosdium styracifolium*, 9. Dây cam thảo - *Abrus*, 10. Thóc lép - *Desmosdium gangeticum precatorius*

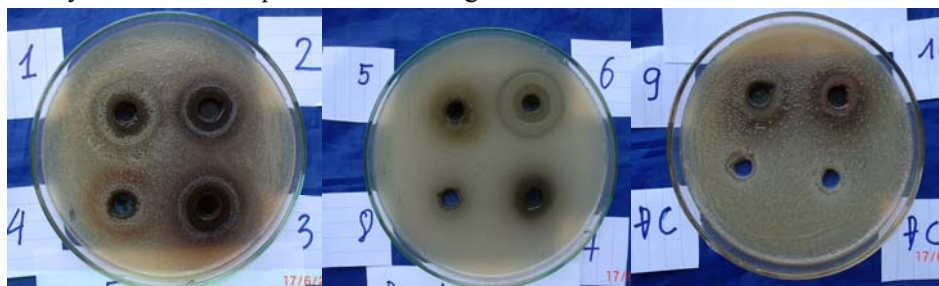
Kết quả ở bảng 2 cho thấy, các băng vạch xuất hiện có sự khác nhau về số lượng giữa các mẫu ở cùng một điều kiện hiện băng. Bên cạnh đó, sự khác biệt này cũng thể hiện ngay trong từng mẫu ở các điều kiện hiện băng khác nhau. Điểm đáng chú ý ở đây là mặc dù phản ứng đóng mở vòng lacton rõ rệt nhưng loài Vây rồng (*Desmosdium styracifolium* (Osbeck) Merr.) không phải là loài có số băng hiện nhiều nhất cả dưới ánh sáng thường và ánh sáng tử ngoại. Trong khi đó, Dây cam thảo (*Abrus precatorius* L.) âm tính với phản ứng đóng mở vòng lacton lại có 9 băng hiện màu dưới ánh sáng thường và 8 băng xuất hiện dưới ánh sáng tử ngoại, 4 băng với thuốc nhuộm KOH và 6 băng với thuốc nhuộm I<sub>2</sub>/KI. Như vậy, với những kết quả định tính bằng cả phản ứng đóng mở vòng lacton và sắc ký lớp mỏng cho thấy rằng, không phải tất cả các chất phát quang dưới tia UV hoặc hiện màu bởi thuốc thử KOH hoặc I<sub>2</sub>/KI đều thuộc nhóm coumarin. Tuy nhiên, có thể sơ bộ kết luận rằng những mẫu dương tính với phản ứng đóng mở vòng lacton và xuất hiện các băng với ánh sáng tử ngoại và các thuốc hiện màu rất có thể chứa các coumarin hoặc dẫn xuất khác nhau của hợp chất này, đây là tiền đề để chúng tôi tiếp tục có những nghiên cứu sâu hơn nhằm tách chiết, tinh sạch và định lượng chúng.

**Bảng 2: Sự xuất hiện các băng vạch của các 10 loài cây thuốc trên bản sắc ký lớp mỏng**

Dịch chiết	Hệ dung môi	Ánh sáng thường	Ánh sáng tử ngoại 365 nm	Hiện màu bằng KOH	Hiện màu bằng I <sub>2</sub> /KI
<i>Zanthoxylum acanthopodium</i> DC.		7 băng	11 băng	5 băng	5 băng
<i>Murraya koenigii</i> (L.) Spreng.		5 băng	4 băng	1 băng	2 băng
<i>Euodio leptota</i> (Spreng.) Merr.		8 băng	8 băng	3 băng	4 băng
<i>Citrus limon</i> (L.) Burm. f.		9 băng	7 băng	6 băng	5 băng
<i>Senna tora</i> (L.) Roxb.		9 băng	6 băng	5 băng	8 băng
<i>Aralia armata</i> (Wall. ex G. Don) Seem		7 băng	8 băng	5 băng	5 băng
<i>Pterolobium integrum</i> Craib		8 băng	5 băng	4 băng	4 băng
<i>Desmosdium styracifolium</i> (Osbeck Merr.		5 băng	6 băng	2 băng	3 băng
<i>Abrus precatorius</i> L.		9 băng	8 băng	4 băng	6 băng
<i>Desmosdium gangeticum</i> (L.) DC.		4 băng	5 băng	2 băng	3 băng

**3.2 Kiểm tra hoạt tính kháng vi sinh vật kiểm định của dịch chiết**

Vi khuẩn *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* là tác nhân gây bệnh phổ biến ở người như các bệnh về đường ruột, ngộ độc thực phẩm, nhiễm trùng huyết, nhiễm trùng đường tiết niệu, da và mô, suy giảm hệ miễn dịch,...[5]. Dịch chiết sơ bộ của các cây thuốc có chứa nhóm chất coumarin và một số thành phần khác được chúng tôi thử nghiệm để đánh giá hiệu quả kháng lại 4 loại vi khuẩn này bằng phương pháp tạo vòng kháng khuẩn trên đĩa thạch. Kết quả kháng khuẩn của dịch chiết từ các loài thực vật này được thể hiện qua Hình 2 và bảng 3:



*Escherichia coli*

*Bacillus subtilis*

*Pseudomonas aeruginosa*

**Hình 2: Khả năng kháng vi khuẩn gây bệnh của dịch chiết cây thuốc**

Chú thích: 1. Ba chạc - *Euodio leptota* , 2. Dục thùi nguyên - *Pterolobium integrum*, 3. Chùm hôi trắng - *Murraya koenigii*, 4. Dây cam thảo - *Abrus precatorius*, 5. Chanh tây - *Citrus limon*, 6. Sên - *Zanthoxylum acanthopodium* , 7. Đơn châu châu - *Aralia armata* , 8. Vây rồng - *Desmosdium styracifolium* , 9. Muồng lạc - *Senna tora*, 10. Thóc lép - *Desmosdium gangeticum*, ĐC: Đối chứng

Kết quả phân tích khả năng đối kháng vi sinh vật gây bệnh ở Bảng 3 cho thấy, có tới 8/10 loài cây thuốc trong nghiên cứu này đều có khả năng kháng lại đồng thời 4 loại vi sinh vật gây bệnh. Tuy nhiên, dễ dàng nhận thấy rằng khả năng kháng lại mỗi loại vi sinh vật nêu trên giữa các cây thuốc khác nhau là khác nhau. Đồng thời cũng thấy rằng, tác động của dịch chiết từ cùng một cây thuốc lên từng loại vi sinh vật thử nghiệm cũng không giống nhau.

**Bảng 3: Khả năng đối kháng của dịch chiết đối với 4 chủng vi khuẩn**

Dịch chiết của cây thuốc	Hoạt tính kháng khuẩn			
	<i>Escherichia coli</i>	<i>Bacillus subtilis</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
<i>Zanthoxylum acanthopodium</i> DC.	17,5 ± 0,7	18,5 ± 0,7	18,5 ± 0,2	17 ± 0, 2
<i>Murraya koenigii</i> (L.) Spreng.	16 ± 0	22,5 ± 0,7	17 ± 0,6	17,5 ± 0,7
<i>Euodio leptia</i> (Spreng.) Merr.	14 ± 0,2	19 ± 0,3	15,5 ± 0,2	13 ± 0,4
<i>Citrus limon</i> (L.) Burm. f.	13 ± 0,6	14 ± 0,2	14,5 ± 0,7	14,5 ± 0,7
<i>Senna tora</i> (L.) Roxb.	17 ± 0	11 ± 0	14 ± 0,5	16 ± 0
<i>Aralia armata</i> (Wall. ex G. Don) Seem	13,3 ± 0,6	13 ± 0	16,5 ± 0,7	14 ± 0,3
<i>Pterolobium integrum</i> Craib	16,5 ± 0,7	17,5 ± 0,7	18 ± 0,3	17 ± 0,3
<i>Desmosdium styracifolium</i> (Osbeck) Merr.	-	-	-	-
<i>Abrus precatorius</i> L.	12 ± 0,9	17 ± 0,5	15 ± 0,2	14 ± 0,5
<i>Desmosdium gangeticum</i> (L.) DC.	-	18 ± 0	13,5 ± 0,3	14 ± 0
Đối chứng	-	-	-	-

Trong số 8 mẫu có tính kháng với đồng thời cả 4 chủng vi sinh vật thì đáng chú ý nhất là dịch chiết từ cây Sên (*Zanthoxylum acanthopodium* DC.) và Dục thù nguyên (*Pterolobium integrum* Craib), chúng có khả năng kháng tương đối rõ rệt và đồng đều với tất cả các chủng vi khuẩn này với đường kính vòng kháng dao động từ 17,5-18,5 mm. Bên cạnh đó, Chùm hôi trắng (*Murraya koenigii* (L.) Spreng.) cho thấy chúng có khả năng đối kháng rất mạnh với vi khuẩn *Bacillus subtilis* với đường kính vòng kháng là 22,5 mm.

Như vậy, các mẫu vật thu được ở thực địa đều có khả năng kháng khuẩn tương đối tốt. Điều này phần nào phù hợp với việc người dân tộc Mường nơi đây thường sử dụng các loài Ba chạc (*Euodio leptia* (Spreng.) Merr.), Dục thù nguyên (*Pterolobium integrum* Craib), Chùm hôi trắng (*Murraya koenigii* (L.) Spreng.) chữa các bệnh viêm nhiễm ngoài da, lở đầu mụn nhọt, ngứa,... ở trẻ em mà nguyên nhân chính của các bệnh này có thể là do vi khuẩn gây ra.

#### 4 KẾT LUẬN

Kết quả nghiên cứu đã cho thấy 9/10 cây thuốc dùng trong nghiên cứu của người Mường ở Nho Quan-Ninh Bình đều dương tính với phản ứng đóng mớ vòng lacton.

Kết quả sắc ký bản mỏng cho thấy sự đa hình về các băng vạch giữa các mẫu nghiên cứu và hầu hết các mẫu nghiên cứu đều có thể chứa coumarin hoặc dẫn xuất của chúng.

Có 8/10 mẫu thực vật nghiên cứu đều có khả năng kháng lại đồng thời cả 4 loại vi khuẩn gây bệnh, trong đó, hai loài *Zanthoxylum acanthopodium* DC. và *Pterolobium integrum* Craib thể hiện tính kháng rất rõ rệt.

## TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Bộ Giáo dục và Đào tạo, Bộ Y tế, Viện Dược liệu (2006). Nghiên cứu thuốc từ thảo dược. Giáo trình sau đại học. Nhà xuất bản Khoa học và Kỹ thuật, Hà Nội.
- 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, Hà Nội.
- Đỗ Tất Lợi (2005). Những cây thuốc và vị thuốc Việt Nam (in lần thứ 13). Nhà xuất bản Y học, Hà Nội.
- Nguyễn Thái An, Bùi Thế Hùng, Trường Đại học Dược Hà Nội (6/2008). *Nghiên cứu thành phần Flavonoid và Coumarin của các vị thuốc trong phương tiêu giao tán*, Tạp chí Dược học, 368 (48), 37- 40.
- Nguyễn Thị Chính, Trương Thị Hòa (2005). Vi sinh vật Y học. Nhà xuất bản Đại học Quốc gia Hà Nội
- Nguyễn Văn Đán, Ngô Ngọc Khuyển (1999). Hợp chất thiên nhiên dùng làm thuốc. Nhà xuất bản Y học, Hà Nội.
- Phạm Hoàng Hộ (1999 - 2000). Cây cỏ Việt Nam. Nhà xuất bản Trẻ Tp Hồ Chí Minh.
- Trung tâm Nghiên cứu Tài nguyên và Môi trường - Đại học Quốc gia Hà Nội, Viện Sinh thái và Tài nguyên Sinh vật - Trung tâm Khoa học Tự nhiên và Công nghệ Quốc gia (2001 - 2005). Danh lục các loài thực vật Việt Nam, tập 1 – 3. Nhà xuất bản Nông nghiệp, Hà Nội.
- Võ Văn Chi (1996). Từ điển cây thuốc Việt Nam. Nhà xuất bản Y học, Hà Nội.