

# NGHIÊN CỨU THÀNH PHẦN HOÁ HỌC VÀ TÁC DỤNG KHÁNG KHUẨN IN VITRO CỦA VỊ THUỐC BẠCH CẬP

*Luong Quang Anh\**

*Triệu Duy Diệt\**

## TÓM TẮT

Bạch cập là vị thuốc đ-ợc sử dụng nhiều theo kinh nghiệm dân gian. Chúng tôi tiến hành nghiên cứu thành phần hoá học và tác dụng kháng khuẩn của nó, kết quả b-ớc đầu cho thấy: trong Bạch cập có chứa chất nhầy, tinh dầu, flavonoid, phytosterol và đ-ờng khử; xác định đ-ợc flavonoid thuộc phân nhóm flavan bằng phổ tử ngoại với pick đặc tr-ng là  $\lambda_{max}$  bằng 277,5nm; dịch chiết n-ớc (3/1), Bạch cập có tác dụng khá mạnh đối với *E.coli* với MIC bằng 1/16, MBC bằng 1/8.

\*Từ khoá: Bạch cập; Thành phần hoá học; Tác dụng kháng khuẩn.

## STUDY OF CHEMICAL COMPOSITION AND ANTIBACTERIAL ACTIVITIES IN VITRO OF RHIROMA BLETILLAE

**Luong Quang Anh**

**Triệu Duy Diệt**

### SUMMARY

*The Rhizoma Bletillae is a drug for common using in folk. So we studied about chemical composition and antibacterial activities with primary results: there are musilages, essential oils, flavonoids, phytosterols and monosaccharids in Rhizoma Bletillae; we have defined that flavonoids is belong to flavan subtypes by UV spectrum with individual pick  $\lambda_{max}$  277.5nm; Rhizoma Bletillae's extractive solution (3/1) have fair effectiveness in *E.coli* with MIC 1/16, MBC 1/8.*

\*Key words: *Rhizoma Bletillae; Chemical composition; Antibacterial activities.*

### ĐẶT VẤN ĐỀ

Vị Bạch cập (*Rhizoma Bletillae*) là thân rễ phơi hay sấy khô của cây Bạch cập *Bletilla striata* (Thunb) Reichb.f, họ Lan (Orchidaceae), đ-ợc dùng để điều trị một số bệnh theo kinh nghiệm dân gian nh- chảy máu cam, nôn ra máu, đau mắt đỏ,

mụn nhọt s-ng tấy và bỏng lửa. Một số tác giả đã nghiên cứu trong vị Bạch cập có chất nhầy (khoảng 55%), một ít tinh dầu và các hoạt chất khác ch-a rõ [3, 4]. Tuy nhiên, thành phần hoá học và tác dụng kháng khuẩn của vị thuốc này vẫn ch-a có tài liệu nào đề cập một cách cụ thể.

---

\* Học viện Quân y

**Phản biện khoa học: GS.TS. Lê Bách Quang**

Với mục đích tìm hiểu sâu hơn về thành phần hoá học cũng như các tác dụng sinh học nói chung và tác dụng kháng khuẩn nói riêng, nhằm sử dụng Bạch cập trong công tác điều trị một cách khoa học hơn, chúng tôi tiến hành đề tài: *Nghiên cứu thành phần hoá học và tác dụng kháng khuẩn in vitro của vị thuốc Bạch cập* với mục tiêu:

- Xác định sơ bộ thành phần hoá học của vị thuốc Bạch cập.
- Đánh giá tác dụng kháng khuẩn in vitro của dịch chiết n-ớc vị Bạch cập.

## **ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU**

### **1. Nguyên vật liệu và trang thiết bị**

Vị Bạch cập nhập từ Trung Quốc (Rhizoma Bletillae), các dung môi và hoá chất đạt tiêu chuẩn tinh khiết do Bộ môn Dược học quân sự – Học viện Quân y cung cấp.

Trang thiết bị: máy đo phổ tử ngoại Cintra 40 (Australia), máy soi huỳnh quang, dụng cụ Soxhlet, tủ sấy, tủ hút, các thiết bị thí nghiệm khác đều đạt tiêu chuẩn Dược điển Việt Nam III.

Các chủng vi khuẩn: *Staphylococcus aureus* (ATCC 29123), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853), *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Bacillus subtilis* (ATCC 25213) do Bộ môn Vi sinh vật – Học viện Quân y cung cấp.

### **2. Phương pháp nghiên cứu.**

#### **2.1. Phương pháp nghiên cứu hoá học:**

\* Phân tích và định tính các nhóm hợp chất có trong vị Bạch cập bằng phản ứng hoá học theo phương pháp của trường Đại học Dược khoa Rumani [1].

\* Định tính các nhóm hợp chất chính trong vị Bạch cập bằng sắc kí lớp mỏng.

\* Chuẩn bị bản mỏng: cân 1,5g silicagel G của Viện Kiểm nghiệm (Bộ Y tế), thêm 4,5ml n-ớc cất, nghiền trộn đều trong cối thuỷ tinh rồi tráng lên tấm kính 20 x 5 cm (đã đ-ợc rửa sạch, sấy khô). Bản mỏng để yên trên bàn phẳng cho bốc hơi hết dung môi ở nhiệt độ phòng thí nghiệm, sấy ở 110°C trong 60 phút, sau đó sử dụng ngay.

\* Định tính flavonoid:

Chất thử: dịch chiết cồn của bột Bạch cập, thu hồi cồn, hoà tan trong n-ớc nóng và lọc; chiết bằng ethyl acetat, bốc hơi ethyl acetat, hoà tan lắng cặn trong 2ml cồn 90<sup>0</sup> đ-ợc dịch chấm sắc ký. Hệ dung môi: ethyl acetat – acid formic – H<sub>2</sub>O (8:1:1). Thuốc thử hiện màu: dung dịch AlCl<sub>3</sub> 2% trong methanol. Sau khi phun xong, sấy ở 110°C cho đến khi hiện màu.

*\* Định tính phytosterol:*

Chất thử: dịch chiết ether bột Bạch cập cô cạn, hoà tan lỏng cạn bằng 2ml cồn 90<sup>0</sup>. Hệ dung môi: chloroform – acetone (8:2). Thuốc thử hiện màu: dung dịch H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 20%. Sau khi phun xong sấy ở 110<sup>0</sup>C đến khi hiện màu.

*\* Định tính tinh dầu:*

Chất thử: dịch chiết ether bột Bạch cập. Hệ dung môi: ether dầu – ether ethylic (95:5). Thuốc thử hiện màu: dung dịch vanilin – H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> mới pha (2g vanilin + 1g H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> pha thành 100ml với ethanol 96<sup>0</sup>). Sấy ở 110<sup>0</sup>C tới khi xuất hiện màu.

*\* Tinh chế flavonoid theo phương pháp sắc ký lớp chế hoá:*

\* Chiết xuất: cân 10g Bạch cập đã nghiền thành bột. Chiết bằng ethanol 90<sup>0</sup> trong dụng cụ Soxhlet, đun liên tục trong 1 giờ thu được dịch chiết cồn. Thu hồi cồn, hoà tan cạn trong 20ml n-ớc nóng. Lọc nóng, chiết bằng ethyl acetat 2 lần, mỗi lần sử dụng 20ml ethyl acetat thu được dịch chiết ethyl acetat. Thu hồi ethyl acetat, cạn còn lại được hoà tan trong 5ml ethanol 90<sup>0</sup> được dịch chiết dùng để chấm sắc ký.

*\* Tinh chế flavonoid:*

Dùng các bản mỏng silicagel G có độ dày 0,5 – 1,0 ml với kích thước 20 x 20cm đã hoạt hoá ở 110<sup>0</sup>C trong 1 giờ. Chấm dịch chiết thành vết dài cách đáy 2cm. Chạy sắc ký với hệ dung môi: ethyl acetat – acid formic – H<sub>2</sub>O (8:1:1). Sau khi chạy sắc ký xong để khô rồi cạo lấy vết. Tiến hành nh- vậy với 5 bản. Lấy bột silicagel có chứa vết flavonoid, chiết flavonoid bằng ethanol 90<sup>0</sup>. Tiến hành đo phổ tử ngoại dịch chiết ethanol 90<sup>0</sup> của flavonoid.

**2.2. Phương pháp nghiên cứu tác dụng kháng khuẩn:**

*\* Tiến hành kháng sinh đồ định tính theo phương pháp khuếch tán trong thạch:*

Thuốc thử là dịch chiết n-ớc (3/1) Bạch cập. Lấy 3 đĩa thạch có độ dày 0,6 – 0,8cm, tiến hành đục lỗ tại trung tâm của đĩa thạch, đường kính lỗ 0,8cm, sâu 0,4cm. Bốn chủng vi khuẩn nghiên cứu được làm thành hỗn dịch 10<sup>8</sup> tế bào/ml n-ớc muối sinh lý, dùng tăm bông cấy lỏng đều lên mặt đĩa thạch đã đục lỗ (mỗi chủng cấy vào một đĩa thạch).

Chờ cho đến khi mặt thạch khô thì nhỏ thuốc thử vào các lỗ (đã được đánh dấu ở mặt sau của đĩa) sao cho thuốc thử vừa bằng miệng lỗ, không trào ra ngoài. Sau đó ủ ở 37<sup>0</sup>C/24 giờ. Sau 24 giờ xem xung quanh lỗ chứa thuốc có tạo vòng vô khuẩn hay không, nếu có thì đo đường kính vòng vô khuẩn để so sánh hoạt tính kháng khuẩn của thuốc đối với các chủng vi khuẩn khác nhau.

*\* Tiến hành kháng sinh đồ định lượng theo phương pháp pha loãng:*

Thuốc thử là dịch chiết n-ớc 3/1 Bạch cập. Pha hỗn dịch vi khuẩn 10<sup>8</sup> tế bào/ml. Sau đó pha loãng thuốc thử theo nồng độ giảm dần từ 1/2, 1/4, 1/8, 1/16, 1/32 trong các ống canh thang. Cho vào mỗi ống trên 0,1 ml hỗn dịch vi khuẩn 10<sup>8</sup> tế bào/ml, trộn đều. Ủ

ấm 37<sup>0</sup>C/ 2giờ, 6 giờ và 24giờ. ở các thời điểm đó, dùng que cấy lấy hỗn dịch từ các nồng độ, cấy lên các đĩa thạch. Để ủ ấm 37<sup>0</sup>C/24 giờ, đọc kết quả: đếm số l- ồng khuẩn lạc mọc trên thạch; ở nồng độ kháng sinh pha loãng thấp nhất khi cấy lại trên thạch không có vi khuẩn mọc thì đó là nồng độ diệt khuẩn tối thiểu (MBC); nồng độ ức chế tối thiểu (MIC) đ- ợc tính ở ống có nồng độ lớn hơn nồng độ diệt khuẩn tối thiểu 1 bậc pha loãng.

## KẾT QUẢ VÀ BÀN LUẬN

### 1. Kết quả nghiên cứu thành phần hoá học.

#### 1.1. Kết quả định tính sơ bộ thành phần hoá học:

*Bảng 1:* Tóm tắt kết quả định tính các nhóm hợp chất trong vị Bạch cập.

TÊN NHÓM CHẤT	PHẢN ỨNG ĐỊNH TÍNH	KẾT QUẢ	KẾT LUẬN SƠ BỘ
Antraquinon	Với dung dịch KOH 10%	-	Không có
Flavonoid	Cyanidin	+	Có
Chất béo	Vết dầu béo trên giấy	-	Không có
Alcaloid	TT chung của alcaloid	-	Không có
Tinh dầu	Cận có mùi thơm	++	Có
Caroten	H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> đậm đặc	-	Không có
Phytosterol	Liebermann	+	Có
Tanin	Với dung dịch FeCl <sub>3</sub> + Na acetat	-	Không có
Acid hữu cơ	Với Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	-	Không có
Đ- ờng khử	Fehling A, B	++	Có
Anthocyanozid	H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> đậm đặc NaOH	-	Không có
Protid	Acid nitric đặc	-	Không có
Chất nhầy	Chì acetat	++	Có

\* Bạch cập có các hợp chất sau: chất nhầy, flavonoid, phytosterol, tinh dầu và đường khử. Ngoài chất nhầy, tinh dầu và đường khử đã được các tài liệu nói đến [3, 4], chúng tôi đã phát hiện thêm sự có mặt của flavonoid và phytosterol trong vị Bạch cập bằng các phản ứng rất đặc trưng của các nhóm hợp chất này: ở flavonoid là phản ứng cyanidin, ở phytosterol là phản ứng Liebermann.

### **1.2. Kết quả định tính flavonoid, phytosterol và tinh dầu bằng sắc ký lớp mỏng:**

Chạy sắc ký lớp mỏng flavonoid (với chiều cao chạy 12,7 cm): kết quả trên sắc ký đồ chỉ xuất hiện 1 vết màu vàng duy nhất (màu đặc trưng của flavonoid) có  $R_f \times 100 = 74$ . Ngoài flavonoid chỉ có 1 chất duy nhất, với mục đích nghiên cứu sâu về flavonoid (một nhóm có rất nhiều tác dụng sinh học được ứng dụng trong y dược học) chúng tôi tạm gọi tên là  $F_1$  và tiến hành tinh chế  $F_1$ .

Đối với tinh dầu, trên sắc ký đồ hiện 3 vết với  $R_f \times 100$  lần lượt bằng 11, 27, 27 có màu từ xanh tím đến xanh lam (chiều cao chạy 12,8 cm). Điều này chứng minh tinh dầu trong Bạch cập có 3 chất. Kết quả chạy sắc ký lớp mỏng phytosterol (chiều cao chạy là 12,2 cm): trên sắc ký đồ hiện 5 vết màu tím với các  $R_f \times 100$  tương ứng là 24, 40, 58, 84, 93 chứng tỏ nhóm phytosterol có 5 chất. Hiện tại chúng tôi chưa thể phân lập và tinh chế được các chất này.

### **1.3. Kết quả tinh chế flavonoid $F_1$ bằng sắc ký lớp chế hoá:**

Phổ tử ngoại chất  $F_1$  được thể hiện ở hình 2

Trên hình ảnh phổ nhận thấy  $F_1$  tinh khiết và có 2 peak là  $\lambda_{\max 1} = 211,8$  nm và  $\lambda_{\max 2} = 277,5$  nm, đây là đỉnh hấp thụ đặc trưng của flavonoid thuộc phân nhóm flavan. Cấu trúc của  $F_1$  phải xác định ở các nghiên cứu sâu hơn (phổ cộng hưởng từ hạt nhân, khối phổ).

## **2. Kết quả nghiên cứu tác dụng kháng khuẩn.**

### **2.1. Kháng sinh đồ định tính:**

Cấy kiểm tra định tính với 4 chủng vi khuẩn trên, đường kính đục lỗ 9 mm. Sau 24 giờ đo đường kính vòng vô khuẩn (d) được kết quả như sau: *S.aureus* d=âm tính, *P.aeruginosa* d=1mm, *E.coli* d=36mm, *B.subtilis* d=14mm.

Như vậy dịch chiết nước 3/1 Bạch cập có tác dụng khá mạnh với *E.coli*, tác dụng trung bình với *B.subtilis*, tác dụng yếu với *P.aeruginosa* và không có tác dụng với *S.aureus*.

### **2.2. Kháng sinh đồ định lượng:**

Tiến hành xác định chỉ số MIC và MBC đối với 3 chủng: *E.coli*, *P.aeruginosa*, *B.subtilis*. Nhận thấy chỉ xác định được 2 chỉ số trên ở *E.coli*, kết quả thể hiện ở hình 4.



Sau 2 giờ tiếp xúc với thuốc, vi khuẩn không giảm ở tất cả các nồng độ. Sau 6 giờ tiếp xúc với thuốc, vi khuẩn có giảm ở các nồng độ 1/1, 1/2, 1/4, 1/8, 1/16, không giảm ở nồng độ 1/32. Sau 24 giờ tiếp xúc với thuốc, vi khuẩn không mọc ở các nồng độ 1/1, 1/2, 1/4, 1/8, ở nồng độ 1/16 có 1 khuẩn lạc, ở nồng độ 1/32 vi khuẩn không giảm. Từ đó cho kết quả MIC = 1/16, MBC = 1/8 đối với *E.coli* đối tác dụng của dịch chiết n- ớc (3/1) Bạch cập.

### KẾT LUẬN

- Trong vị Bạch cập nghiên cứu có chất nhầy, flavonoid (1 chất có  $R_f \times 100 = 74$ ), phytosterol (5 chất có  $R_f \times 100$  tương ứng là 24, 40, 58, 84, 93), tinh dầu (3 chất có  $R_f \times 100$  tương ứng là 11, 18, 27).

- Flavonoid trong vị Bạch cập thuộc phân nhóm flavan có 2 pick là  $\lambda_{\max 1} = 211,8$  nm và  $\lambda_{\max 2} = 277,5$  nm.

- Dịch chiết n- ớc (3/1) của vị Bạch cập có tác dụng khá mạnh đối với *E.coli* với MIC = 1/16, MBC = 1/8 ; có tác dụng trung bình với *B.subtilis*, có tác dụng yếu với *P.aeruginosa* và không có tác dụng đối với *S.aureus*.

### TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Bộ môn Dược học quân sự – HVQY. Thực tập dược liệu dùng cho chuyên khoa I, 1986.
2. Bộ Y tế. Dược điển Việt Nam III, NXB Y học, 2002.
3. Võ Văn Chi. Từ điển cây thuốc Việt Nam, NXB Y học, 1997, tr 15-16.
4. Đỗ Tất Lợi. Những cây thuốc và vị thuốc Việt Nam, NXB Y học, 1999, tr 749-750.
5. Viện Kiểm nghiệm – Bộ Y tế. Tập huấn kỹ thuật kiểm nghiệm thuốc bằng phương pháp sắc ký lớp mỏng và vi sinh vật, 1996.
6. L. Jurd, T.A. Geissmann. The chemistry of flavonoid compounds, Pergamon Press, London, 1962.