

KHẢO SÁT SƠ BỘ HOẠT TÍNH KHÁNG *HELICOBACTER PYLORI* VÀ THÀNH PHẦN HÓA HỌC CỦA CÂY RAU MƯƠNG (*LUDWIGIA HYSSOPIFOLIA* L.)

*Huỳnh Thị Thanh Thủy*¹, *Phan Hoàng Duy*², *Phạm Thành Trọng*², *Tạ Kiến Tường*³,
*Nguyễn Ngọc Quỳnh*³, *Nguyễn Thị Thu Trâm*^{3*}

1. Cục Hậu cần Quân khu 9, Cần Thơ

2. Trường Đại học Tây Đô

3. Trường Đại học Y Dược Cần Thơ

*Email: ntttram@ctump.edu.vn

TÓM TẮT

Đặt vấn đề: Cây rau muống *Ludwigia hyssopifolia* từ lâu được người dân vùng Đồng bằng sông Cửu Long, Việt Nam dùng trong điều trị nhiễm *Helicobacter pylori*. Tuy nhiên chưa có công bố nào về hoạt tính kháng *H. pylori* của loài cây này. **Mục tiêu nghiên cứu:** Đánh giá sơ bộ hoạt tính kháng *H. pylori* của các cao chiết và phân lập, xác định cấu trúc của các hợp chất từ cao chiết có hoạt tính. **Đối tượng và phương pháp nghiên cứu:** Năm cao chiết của cây rau muống *L. hyssopifolia* bao gồm cao n-hexane, chloroform, ethyl acetate, methanol và ethanol được đánh giá hoạt tính kháng *H. pylori* bằng phương pháp khuếch tán đĩa thạch. Sử dụng kỹ thuật sắc ký cột cố định để phân lập các hợp chất từ cao chiết. Cấu trúc hóa học của các hợp chất được xác định bằng phương pháp phổ cộng hưởng từ hạt nhân NMR và so sánh với dữ liệu phổ. **Kết quả:** Nghiên cứu cho thấy cả năm cao chiết đều có hoạt tính kháng *H. pylori* ở mức trung bình, trong đó cao methanol có hoạt tính ức chế mạnh nhất với đường kính $d = 17$ mm ở nồng độ 0,5 mg/đĩa. Khảo sát thành phần hóa học ban đầu của cao chiết methanol đã phân lập được 2 hợp chất là β -sitosterol (1) và 3-O- β -D-glucopyranosyl- β -sitosterol (2). **Kết luận:** Kết quả nghiên cứu bước đầu tạo cơ sở khoa học cho việc sử dụng cây rau muống trong điều trị nhiễm *H. pylori* trong dân gian.

Từ khóa: *Helicobacter pylori*, kháng khuẩn, khuếch tán đĩa thạch, *Ludwigia hyssopifolia*, sterol

ABSTRACT

INVESTIGATION OF ANTI-HELICOBACTER PYLORI ACTIVITY AND CHEMICAL CONSTITUENTS OF LUDWIGIA HYSSOPIFOLIA L.

Huynh Thi Thanh Thuy¹, Phan Hoang Duy², Pham Thanh Trong², Ta Kien Tuong³,
 Nguyen Ngoc Quynh¹, Nguyen Thi Thu Tram^{1*}

1. Logistics Department of Military Zone 9, Can Tho

2. Tay Do University

3. Can Tho University of Medicine and Pharmacy

Background: *Ludwigia hyssopifolia* was traditionally used so far for treatment of *Helicobacter pylori* in Mekong Delta region of Vietnam. **Objectives:** Preliminary evaluation of anti *H. pylori* activity of extracts and isolation of compounds in the active extract. **Material and methods:** In this study, the five extracts of *L. hyssopifolia* including n-hexane, chloroform, ethyl acetate, methanol and ethanol extracts were screened for anti *H. pylori* activity by disk diffusion method. Using column chromatography technique to isolate compounds. Their structures were elucidated by NMR spectroscopy and by comparison with literature data. **Results:** The results showed that all the five extracts displayed a moderate activity in which the methanol extract exhibited a stronger activity with the inhibition zone ($d=17$ mm) at the concentration of 0.5 mg/disk. Phytochemical study on the bioactive methanol extract led to the isolation of two known compounds as β -sitosterol (**1**) and 3-O- β -D-glucopyranosyl- β -sitosterol (**2**). **Conclusion:** The obtained results contribute to support experimental evidences for traditional use of *L. hyssopifolia* against *H. pylori* infection.

Keywords: antimicrobial, disk diffusion, *Helicobacter pylori*, *Ludwigia hyssopifolia*, sterol

I. ĐẶT VẤN ĐỀ

Cây rau muống (*Ludwigia hyssopifolia* L.) là loại dược liệu truyền thống được dùng trong điều trị nhiễm *Helicobacter pylori* ở Việt Nam, tuy nhiên việc sử dụng dược liệu này vẫn dựa trên kinh nghiệm dân gian, chưa có một cơ sở khoa học nào để xác định khả năng kháng *H. pylori* của loài cây này. Các nghiên cứu về cây rau muống vẫn còn nhiều hạn chế, chủ yếu là khảo sát thành phần hóa học và hoạt tính sinh học của các loại cao chiết khác nhau. Kết quả khảo sát thành phần hóa học cho thấy rau muống có chứa các hợp chất thuộc các nhóm flavonoid, steroid, alkaloid... Cụ thể các nghiên cứu đã phân lập và xác định cấu trúc là palmitic acid, isovanillin, β -sitosterol, stigmasterol-3-O- β -D-glucoside, oleanolic acid, gallic acid, 2,4,6-trihydroxybenzoic acid, ethyl gallate, ursolic acid [10]; kaempferol, ginsenoside Rb1 [12]; 6 β , 24-hydroxy tormentic acid [2 α , 3 β , 19 α , 6 β , 24-penta hydroxylurs-12-en-18-oic acid], xanthylein, (+) *trans*-decursidinol, β -sitosterol- β -D-glucopyranoside, 6 β ,23-hydroxy tormentic acid, 23-hydroxyl tormentic acid, 6 β -hydroxy tormentic acid [8]; ethyl gallate, vanillin, *trans-p*-hydroxy-ethyl cinnamate, ozoroalide, scopoletin, de-O-methyl-sioliplodin, syringaldehyde, 3,3'-dimethoxy-4,4'-dihydroxy-stilbene [13]. Một số nghiên cứu về hoạt tính sinh học cho thấy cao *n*-hexane có khả năng chống viêm 33,96%, trong khi đó giá trị này của cao ethyl acetate là 27,39% [9]. Hoạt tính kháng khuẩn của các cao chiết methanol từ các loài rau muống không thuần chủng có giá trị MIC từ 128 đến 512 μ g/ml [1]. Trong nghiên cứu này, hoạt tính kháng *H. pylori* của năm cao

chiết của cây rau mương được đánh giá bằng phương pháp chiết tán đĩa thạch. Ứng dụng các kỹ thuật sắc ký bước đầu đã phân lập được 2 hợp chất từ cao chiết có hoạt tính và xác định cấu trúc hóa học của các hợp chất bằng phương pháp phổ cộng hưởng từ hạt nhân NMR.

II. ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

1. Đối tượng nghiên cứu

Cây rau mương *Ludwigia hyssopifolia* L., thuộc họ Rau mương (Onagraceae), được thu hái tại thành phố Cần Thơ từ tháng 3 năm 2019 đến tháng 7 năm 2019, bộ phận dùng là toàn cây trên mặt đất, lúc cây đang ra hoa. Mẫu được định danh bởi Ts. Đặng Minh Quân, Bộ môn Sinh học, Khoa Sư Phạm, Trường Đại học Cần Thơ. Tiêu bản được lưu tại Bộ môn Hóa học, Khoa Khoa học Cơ Bản, Trường Đại học Y Dược Cần Thơ.

2. Phương pháp nghiên cứu

Nghiên cứu hoạt tính kháng *H. pylori*

- **Phương pháp xử lý mẫu:** Dược liệu sau khi thu hái được loại bỏ tạp chất, rửa sạch, sấy khô ở nhiệt độ 60°C, độ ẩm 5,9%, xay đến độ mịn thích hợp.

- **Chiết xuất:** Cân 100 g bột dược liệu, tiến hành chiết kiệt có hỗ trợ siêu âm với 1 lít methanol ở 40°C. Cô quay thu hồi dung môi dưới áp suất giảm thu được cao methanol toàn phần (4,85 g). Việc điều chế các cao chiết có độ phân cực khác nhau để khảo sát hoạt tính được thực hiện bằng phương pháp chiết pha rắn lần lượt với các dung môi *n*-hexane, chloroform, ethyl acetate [3]. Lọc dịch chiết qua bông và cô quay thu hồi dung môi dưới áp suất giảm thu được cao chiết tương ứng với khối lượng lần lượt 0,82; 1,63 và 1,67 g. Cao ethanol (3,5 g) thu được bằng cách chiết ngâm dầm 100 g bột dược liệu với 1 lít ethanol.

- **Đánh giá hoạt tính kháng *H. pylori*:** hoạt tính kháng *H. pylori* của năm cao chiết được thực hiện dựa trên phương pháp khuếch tán đĩa thạch. Thiết kế thí nghiệm: cao chiết khô được hòa tan vào dung môi DMSO để thu được dung dịch có nồng độ 0,5 mg/ml, tương tự chất chứng dương (amoxicillin và metronidazole) cũng được hòa tan với dung môi DMSO thu được dung dịch có nồng độ 0,05 mg/ml. Nhỏ các dung dịch mẫu lên khoanh giấy thấm đường kính 6 mm, các khoanh giấy được đặt lên đĩa đã cấy vi khuẩn *H. pylori* rồi ủ trong điều kiện vi hiếu khí ở 37°C. Kết quả vòng kháng khuẩn được quan sát sau 5 ngày. Thử nghiệm thực hiện tại Bộ môn Sinh học, Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, Đại học Quốc gia Hà Nội [5].

Nghiên cứu thành phần hóa học

Phương pháp chiết xuất, phân lập các hợp chất: sắc ký cột với silica gel pha thuận (40-63 μ m, Kieselgel 60, Merck, Darmstadt, Germany). Theo dõi các phân đoạn bằng sắc ký lớp mỏng (Kieselgel 60F₂₅₄ plates (Merck, Darmstadt, Germany)). Phát hiện chất bằng đèn tử ngoại ở hai bước sóng 254 nm và 365 nm và thuốc thử vanillin (bao gồm 1% vanillin trong ethanol tuyệt đối và dung dịch H₂SO₄ 5% trong ethanol tuyệt đối, v/v 1:1)

Phương pháp xác định cấu trúc hợp chất: cấu trúc các hợp chất phân lập được dựa trên các thông số vật lý, phương pháp phổ cộng hưởng từ hạt nhân NMR [4] và so sánh dữ liệu phổ thu được với các dữ liệu phổ đã công bố. Phổ cộng hưởng từ hạt nhân được đo trên máy Bruker DMX 500, tại Viện Hóa học - Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam.

III. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU

3.1. Nghiên cứu hoạt tính kháng *H. pylori*

Năm cao chiết của cây rau mương, bao gồm cao *n*-hexane, chloroform, ethyl acetate, methanol và ethanol được sàng học hoạt tính ức chế vi khuẩn *H. pylori* ở nồng độ 0,5 mg/đĩa (Hình 1).



Hình 1: Kết quả kháng *H. pylori* của năm cao chiết từ cây rau mương

Kết quả cho thấy cả năm cao chiết đều có hoạt tính kháng khuẩn trung bình với đường kính vòng vô khuẩn từ 11 đến 17 mm. Trong đó cao methanol có hoạt tính ức chế cao nhất ($d = 17$ mm (Bảng 1).

Bảng 1. Đường kính vòng vô khuẩn của các mẫu thử nghiệm

Mẫu	Đường kính vòng vô khuẩn (mm)
<i>n</i> -Hexane (H) ^a	11
Chloroform (C) ^a	13
Ethyl acetate (EA) ^a	14
Methanol (M) ^a	17
Ethanol (E) ^a	12
Amoxicillin ^b	8
Metronidazole ^b	8

^a 0,5 mg/đĩa, ^b 0,05 mg/đĩa

3.2. Nghiên cứu thành phần hóa học

Từ kết quả đánh giá sơ bộ hoạt tính kháng *H. pylori*, cao methanol được lựa chọn để khảo sát thành phần hóa học nhằm tìm hiểu các hoạt chất có trong cao này.

Chiết xuất cao methanol

Từ 2,0 kg bột toàn cây rau mương được chiết kiệt với 1 lít methanol có hỗ trợ siêu âm ở 40°C, loại dung môi thu được 99,98 g cao toàn phần.

Phân lập hợp chất từ cao methanol

Tiến hành sắc ký cột với silica gel pha thuận trên 5 g cao methanol. Theo dõi các phân đoạn bằng sắc ký lớp mỏng. Giải ly bằng hệ dung môi chloroform : methanol với tỉ lệ methanol tăng dần thu được lần lượt hợp chất **(1)** (23 mg) và hợp chất **(2)** (9 mg).

Hợp chất (1): Dạng bột màu trắng; ¹H-NMR (CDCl₃, 500 MHz) δ_H ppm 5,35 (1H, brs, H-6), 3,52 (1H, m, H-3), 0,68 (3H, s, H-18), 1,01 (3H, s, H-19), 0,93 (3H, d, 6.5, H-

21), 0,82 (3H, *d*, 6,5, H-26), 0,84 (3H, *d*, 6,5, H-27), 0,85 (3H, *t*, 7,0, H-29); ^{13}C -NMR (CDCl_3 , 125 MHz) δ_{C} ppm 37,3 (C-1), 31,7 (C-2), 71,8 (C-3), 42,3 (C-4), 140,8 (C-5), 121,7 (C-6), 31,9 (C-7), 31,8 (C-8), 50,2 (C-9), 36,5 (C-10), 21,1 (C-11), 39,8 (C-12), 42,2 (C-13), 56,1 (C-14), 24,3 (C-15), 28,3 (C-16), 56,8 (C-17), 11,9 (C-18), 19,4 (C-19), 36,2 (C-20), 18,8 (C-21), 33,9 (C-22), 26,1 (C-23), 45,9 (C-24), 29,2 (C-25), 19,8 (C-26), 19,1 (C-27), 23,1 (C-28), 12,0 (C-29).

Hợp chất (2): Dạng bột màu trắng; ^1H -NMR (CDCl_3 &MeOD, 500 MHz) δ_{H} ppm 5,37 (1H, *brs*, H-6), 0,64 (3H, *s*, H-18), 0,95 (3H, *s*, H-19), 0,89 (3H, *d*, 6,0, H-21), 0,80 (3H, *d*, 7,0, H-26), 0,82 (3H, *d*, 7,0, H-27), 0,98 (3H, *s*, H-29), 4,42 (1H, *d*, 7,5, H-1'), 3,86 (1H, *dd*, 12,0, 3,5 Hz, H-6'a), 3,78 (1H, *dd*, 12,0, 3,5 Hz, H-6'b); ^{13}C -NMR (CDCl_3 &MeOD, 125 MHz) δ_{C} ppm 37,2 (C-1), 29,1 (C-2), 76,4 (C-3), 39,7 (C-4), 140,2 (C-5), 122,1 (C-6), 31,9 (C-7), 31,8 (C-8), 50,1 (C-9), 36,7 (C-10), 21,1 (C-11), 38,7 (C-12), 42,3 (C-13), 56,7 (C-14), 24,2 (C-15), 26,0 (C-16), 56,2 (C-17), 11,8 (C-18), 19,2 (C-19), 36,1 (C-20), 18,9 (C-21), 33,9 (C-22), 24,22 (C-23), 45,8 (C-24), 28,2 (C-25), 18,7 (C-26), 19,7 (C-27), 23,0 (C-28), 11,9 (C-29), 101,1 (C-1'), 76,9 (C-2'), 73,5 (C-3'), 70,1 (C-4'), 76,9 (C-5'), 61,8 (C-6').

IV. BÀN LUẬN

4.1. Hoạt tính kháng *H. pylori*

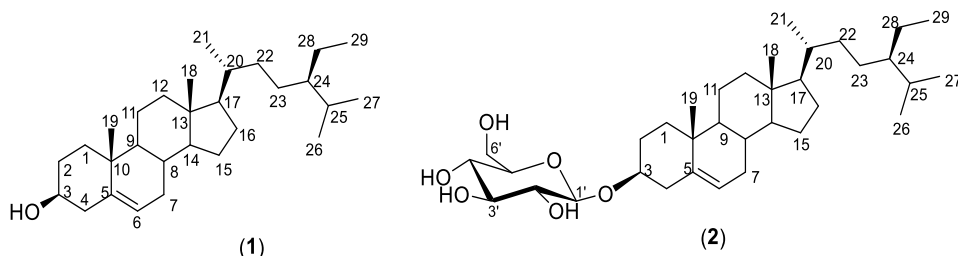
Kết quả khảo sát cho thấy năm cao chiết từ cây rau mương đều kháng *H. pylori* với đường kính vòng vô khuẩn từ 11 -17 mm. Trong khi đó, hai chất chứng dương ở nồng độ thấp hơn 10 lần có đường kính vòng vô khuẩn là 8 mm. Nghiên cứu của Trung và cs (2018), đánh giá hoạt tính kháng *H. pylori* của 30 cây thảo dược Việt Nam, kết quả cho thấy có 10/30 cây có khả năng kháng *H. pylori* với đường kính vòng vô khuẩn từ 12 – 42 mm ở nồng độ 4 mg/đĩa (cao gấp 8 lần so nồng độ thử nghiệm trong nghiên cứu này) [5]. Theo nghiên cứu của Laura và cs (2010), kết quả đánh giá hoạt tính kháng *H. pylori* của 7 cây thuốc cổ truyền điều trị rối loạn dạ dày ở Brazil cho thấy đường kính vòng vô khuẩn đạt từ 7-10 mm ở cùng nồng độ khảo sát với nghiên cứu này (0,5 mg/đĩa) [7]. So với các nghiên cứu trước đây, các cao chiết của cây rau mương trong nghiên cứu này có hiệu quả ức chế tốt hơn đối với *H. pylori*, trong đó cao methanol đạt hiệu quả cao nhất.

4.2. Thành phần hóa học

- **Hợp chất (1):** Phổ ^1H -NMR cho thấy sáu tín hiệu của các nhóm methyl ở vùng trường cao, cùng với các tín hiệu ở δ_{H} ppm 5,35 (1H, *brs*, H-6) và 3,52 (1H, *m*, H-3) giúp dự đoán khung sterol. Phổ ^{13}C -NMR cho thấy các tín hiệu ở δ_{C} ppm 121,7 và 140,8 đặc trưng cho nối đôi ở C-5 và C-6 của β -sitosterol. So sánh với dữ liệu phổ thu được với hợp chất β -sitosterol, chúng tôi thấy có sự tương đồng nên đề nghị cấu trúc hợp chất (1) là β -sitosterol [2]. Hợp chất này đã được đánh giá có khả năng bảo vệ dạ dày và hoạt tính kháng khuẩn đáng kể chống lại *H. pylori* [6], [11].

- **Hợp chất (2):** Dữ liệu phổ ^1H -NMR và ^{13}C -NMR cho thấy có sự tương đồng về cấu trúc khung sterol với hợp chất (1). Trên phổ ^{13}C -NMR xuất hiện sáu tín hiệu đặc trưng của đơn vị đường glucose tại δ_{C} ppm 101,1 (C-1'), 76,9 (C-2'), 73,5 (C-3'), 70,1 (C-4'), 76,9 (C-5') và 61,8 (C-6'). So sánh dữ liệu phổ cho thấy hợp chất (2) hoàn toàn phù hợp với hợp chất 3-O- β -D-glucopyranosyl- β -sitosterol [2]. Đây là dạng glycoside của β -sitosterol có khả năng hòa tan dễ dàng hơn, chất này cũng được đánh giá có khả năng bảo vệ dạ dày và kháng

H. pylori [6], [11].



Hình 2: Cấu trúc của hợp chất (1) và (2)

V. KẾT LUẬN

Kết quả sàng lọc ban đầu nghiên cứu hoạt tính kháng *H. pylori* cho thấy, ở nồng độ 0,5 mg/đĩa, năm cao chiết của cây rau mương có hoạt tính kháng *H. pylori* với đường kính vòng vô khuẩn từ 11-17 mm, trong đó cao chiết methanol có vòng vô khuẩn cao nhất là 17 mm. Từ cao chiết methanol, áp dụng kỹ thuật sắc ký cột silica gel pha thuận, bước đầu đã phân lập và xác định được cấu trúc của hai chất là β -sitosterol (1) và 3-O- β -D-glucopyranosyl- β -sitosterol (2).

Đây là lần đầu tiên báo cáo nghiên cứu về hoạt tính kháng *H. pylori* và thành phần hóa học của cây rau mương mọc tại Đồng Bằng sông Cửu Long.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Huỳnh Kim Diệu, Lê Thị Loan Em (2011), Sự thuần chủng và hoạt tính kháng khuẩn của cây sống đời (*Kalanchoe pinnata*) và cây rau mương (*Ludwigia hyssopifolia*) ở Đồng bằng sông Cửu Long, *Tạp chí Khoa học*, 17b, tr. 289-296.
2. Do Tien Lam, Pham Minh Quan, Vu Thi Thu Le, Nguyen Thi Hong Van, Cam Thi Inh et al (2018), Terpene compounds isolated from *Callicarpa macrophylla* in Viet Nam, *Vietnam Journal of Science and Technology*, 56 (4A), tr. 213-220.
3. Nguyễn Thị Kim Phụng (2007), *Phương pháp cô lập hợp chất hữu cơ*, NXB Đại học Quốc gia thành phố Hồ Chí Minh, tr. 151-206.
4. Nguyễn Thị Thu Trâm, Nguyễn Thanh Bình, Nguyễn Phúc Đảm (2018), *Kỹ thuật cộng hưởng từ hạt nhân NMR từ thực nghiệm đến cấu trúc*, NXB Khoa học kỹ thuật.
5. Đỗ Thị Thanh Trung, Phạm Thị Vui, Nguyễn Huyền Trang, Phạm Vinh Hoa, Nguyễn Thị Thanh Thi và cs (2018), Đánh giá khả năng ức chế vi khuẩn *Helicobacter pylori* của một số dịch chiết thảo dược Việt Nam, *Tạp chí Khoa học và Công nghệ Việt Nam*, tập 60 (7) 2018, tr. 23-27.
6. Baker D (2020), Plants against *Helicobacter pylori* to combat resistance: An ethnopharmacology review, *Biotechnology Report*, 26 e00470.
7. Cogo L, Monteiro C, Miguel M, Miguel O, Cunico M et al. (2010), Anti-*Helicobacter pylori* activity of plant extracts traditionally used for the treatment of gastrointestinal disorders, *Brazilian Journal of Microbiology*, 41, pp. 304-309.
8. Rao A, Merugu R, Atthapu T (2013), A new triterpen from *Ludwigia hyssopifolia* (G. Don) exell, *International of Chem Tech Research*, Vol.5 (1), pp. 342-346.
9. Das B, Kundu J, Bachar S, Kundu J (2014), Anti-inflammatory, analgesic and diuretic activity of *Ludwigia hyssopifolia* Linn, *Arch Med Biomed Res*. 1(4), pp. 139-146.
10. Lu, R. et al (2009), Study of chemical composition in *Ludwigia hyssopifolia*, *Zhongcaoyao* (2009), 40(9), pp. 1372-1374.
11. Tovey F, Capanoglu D, Langley G, Herniman J, Bor S et al (2011), Dietary phytosterols protective against peptic ulceration, *Gastroenterology Research*, 4(4), pp. 149-156.

12. Wei J, Lu R, Zhou Y (2011), Chemical constituent of *Ludwigia hyssofolia*, Shizhen Guoyao, 22(2), pp. 321-322.
13. Zhang J, Liu C, Wei J, Li B, Zhan X et al (2019), Cytotoxic compounds from *Ludwigia hyssofolia*, *Natural Product Communications*, 14(9), pp. 1-8.

(Ngày nhận bài: 17/08/2020 - Ngày duyệt đăng: 17/09/2020)
