

HOẠT TÍNH KHÁNG OXI HÓA, KHÁNG KHUẨN VÀ KHÁNG VIÊM *IN VITRO* CỦA CAO ETHANOL VÀ CÁC CAO PHÂN ĐOẠN CỦA CÂY BÓNG NƯỚC (*Impatiens balsamina* L.)

Trần Trung Dũng¹, Bùi Thế Vinh¹, Nguyễn Nhật Minh²
Đình Trường Sơn² và Nguyễn Văn Trí^{2*}

¹Đại học Quốc tế Hồng Bàng

²Trung tâm Sâm và Dược liệu TP. Hồ Chí Minh
(*Email: tri.nguyendhpt06@gmail.com)

Ngày nhận: 01/7/2022

Ngày phản biện: 22/8/2022

Ngày duyệt đăng: 20/9/2022

TÓM TẮT

Nghiên cứu nhằm khảo sát thành phần hóa thực vật, hoạt tính kháng oxi hóa, kháng viêm và kháng khuẩn *in vitro* của phần trên mặt đất loài Bóng nước (*Impatiens balsamina* L.). Cao ethanol và các cao phân đoạn Bóng nước được đánh giá hoạt tính kháng oxi hóa trên thử nghiệm đánh bắt gốc tự do DPPH và ABTS, hoạt tính kháng viêm được đánh giá trên hai thử nghiệm ức chế biến tính protein và ức chế enzym proteinase, hoạt tính kháng khuẩn bằng thử nghiệm khuếch tán trên đĩa thạch trên 4 chủng vi khuẩn *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* và *Salmonella typhimurium*. Kết quả khảo sát cho thấy Bóng nước có chứa nhiều nhóm chất thứ cấp quan trọng như chất béo, carotenoid, triterpenoid, coumarin, anthraglycosid, flavonoid, tannin, saponin, acid hữu cơ, hợp chất khử. Các cao Bóng nước thể hiện hoạt tính kháng oxi hóa mạnh trong đó cao ethyl acetat có hoạt tính tốt nhất, ức chế các gốc tự do DPPH và ABTS với giá trị IC_{50} lần lượt 14,1 $\mu\text{g/ml}$ và 8,6 $\mu\text{g/ml}$. Tương tự, trên thử nghiệm kháng viêm thông qua tác dụng ức chế biến tính protein và ức chế enzym proteinase, cao phân đoạn n-hexane và ethyl acetate ức chế điển hình trong các cao thử nghiệm, với giá trị IC_{50} trong khoảng 0,34 - 8,88 mg/ml. Các cao Bóng nước còn có khả năng ức chế tốt bốn chủng vi khuẩn thử nghiệm, trong đó cao ethyl acetate có hoạt tính ức chế tốt nhất với giá trị MIC 0,78 - 3,13 mg/ml. Cây Bóng nước có tiềm năng phát triển thành sản phẩm kháng viêm mãn tính.

Từ khóa: *Impatiens balsamina* L., kháng oxi hóa, kháng khuẩn, kháng viêm, thành phần hóa thực vật

Trích dẫn: Trần Trung Dũng, Bùi Thế Vinh, Nguyễn Nhật Minh, Đình Trường Sơn và Nguyễn Văn Trí, 2022. Hoạt tính kháng oxi hóa, kháng khuẩn và kháng viêm *in vitro* của cao ethanol và các cao phân đoạn của cây Bóng nước (*Impatiens balsamina* L.). Tạp chí Nghiên cứu khoa học và Phát triển kinh tế Trường Đại học Tây Đô. 16: 160-174.

*Ths. Nguyễn Văn Trí – Phòng Hóa Chế phẩm, Trung Tâm Sâm và Dược Liệu TP. Hồ Chí Minh

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Hiện nay, các vấn đề viêm nhiễm do vi khuẩn gây ra các bệnh lý ở ngoài da, đường tiêu hóa hay hô hấp rất thường gặp và có thể dẫn đến tình trạng nghiêm trọng hơn. Việc sử dụng các thuốc kháng viêm trong thời gian dài gây ra tác dụng phụ không mong muốn như rối loạn trên đường tiêu hóa, nguy cơ suy thận và biến cố trên tim mạch (Harrirforoosh et al., 2014). Lạm dụng các thuốc kháng sinh làm giảm sức đề kháng của cơ thể và gây ra tình trạng kháng kháng sinh (Currie et al., 2011). Việc tìm kiếm các chất kháng viêm, kháng khuẩn có nguồn gốc tự nhiên từ dược liệu là cần thiết.

Cây Bóng nước (*Impatiens balsamina* L.) là cây thân thảo, được trồng phổ biến làm cảnh ở Việt Nam. Lá, hoa và hạt Bóng nước cũng được sử dụng trong các bài thuốc cổ truyền dùng để chữa phong thấp, làm lành vết thương, mụn nhọt, côn trùng cắn. Toàn cây Bóng nước có chứa acid *p*-hydrobenzoic, acid gentisic, acid ferulic, acid sinapic, acid cafeic, scopolatin, 2-methoxy-1,4-napthoquinon; phần trên mặt đất có lawson, lawson methylether, quercetin; thân chứa kaempferol-3-*O*-glucosid, pelargonidin, cyanidin, delphinidin; hoa chứa cyanidin, delphinidin, pelargonidin, malvidin, quercetin, kaempferol, kaempferol-3-*O*-glucopyranosid (Đỗ Huy Bích, 2006). Dịch chiết và các hợp chất phân lập từ Bóng nước có tác dụng kháng oxi hóa, kháng nấm, kháng khuẩn, kháng viêm, kháng ung thư, chống dị ứng, chống phản

ứng phản vệ (Meenu et al., 2015; Singh et al., 2017). Từ các nghiên cứu trên thế giới cho thấy phần trên mặt đất cây Bóng nước được xem là nguồn dược liệu tiềm năng để sản xuất các chế phẩm hỗ trợ điều trị hoặc điều trị bệnh lý viêm nhiễm. Tuy nhiên ở Việt Nam các nghiên cứu hoạt tính sinh học loài cây này vẫn còn rất hạn chế.

Với mục tiêu nghiên cứu đánh giá hoạt tính kháng oxi hóa, kháng khuẩn và kháng viêm *in vitro* của một số cao chiết từ cây Bóng nước cần thiết được thực hiện, góp phần bổ sung thêm dữ liệu về loài cây này, là cơ sở cho các nghiên cứu tiếp theo.

2. ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Nguyên liệu

Phần trên mặt đất Bóng nước được thu hái ở Quận 12, TP. HCM vào tháng 03/2021. Dược liệu sau khi thu hái được loại bỏ tạp chất, phơi khô và xay nhỏ đến kích thước 2 mm. *Chiết xuất cao Bóng nước*: 3,0 kg bột dược liệu Bóng nước được chiết ngâm kiệt với ethanol 96% (tỉ lệ dược liệu - dung môi là 1:15), cô quay giảm áp dịch chiết ở 65 °C thu được 280 g cao ethanol. Cân 180 g cao ethanol chiết phân đoạn lần lượt với các dung môi *n*-hexane, ethyl acetate và *n*-butanol bão hòa nước, bay hơi các dịch chiết thu được 25,5 g cao *n*-hexane; 36,8 g cao ethyl acetate; 60,3 g cao *n*-butanol; 45,3 g cao nước.



Hình 1. Cây Bóng nước (*Impatiens balsamina* L.)

Hóa chất: Methanol, ethanol, *n*-hexane, ethyl acetate, *n*-butanol (Chemsol, Việt Nam).

Chất đối chiếu: acid ascorbic (Sigma-Aldrich), diclofenac natri (Sigma-Aldrich), aspirin (Sigma-Aldrich), amoxicillin (Công ty Cổ phần Dược phẩm DOMESCO).

Chủng vi khuẩn thử nghiệm: *Escherichia coli* (ATCC 25.922), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853), *Staphylococcus aureus* (ATCC 29.213) và *Salmonella typhimurium* (ATCC 39.183).

2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Khảo sát sơ bộ thành phần hóa thực vật của Bóng nước

Bột dược liệu Bóng nước 20 g được chiết lần lượt với các dung môi có độ phân cực tăng dần là diethyl ether, ethanol 96% và nước. Một phần dịch chiết ethanol và nước được tiến hành thủy phân với acid hydrochloric để xác định

các cấu trúc aglycol (Trần Hùng và cs., 2014).

2.2.2. Khảo sát hoạt tính kháng oxy hóa bằng thử nghiệm DPPH và ABTS

Thử nghiệm DPPH: Pha loãng các cao Bóng nước thành dãy nồng độ thích hợp, tiến hành hút 0,5 ml mỗi dịch thử vào các ống nghiệm, thêm 3,5 ml methanol và 0,5 ml dung dịch DPPH 0,6 mM. Lắc đều và để yên trong tối 30 phút. Tiến hành đo độ hấp thụ ở bước sóng hấp thụ 517 nm bằng máy đo quang phổ Beckman Coulter DU730 (Đức). Chất đối chiếu được sử dụng là acid ascorbic (Miliauskas et al., 2004).

Thử nghiệm ABTS: Pha loãng các cao Bóng nước thành dãy nồng độ thích hợp. Dung dịch ABTS⁺ được chuẩn bị bằng cách cho dung dịch ABTS 7 mM vào dung dịch potassium persulfate (K₂S₂O₈) 2,4 mM với thể tích bằng nhau rồi ủ dung dịch trong bóng tối 16 giờ, ở nhiệt độ phòng. Sau đó pha loãng methanol để thu được độ hấp thụ 0,706 ± 0,01 ở bước

sóng 734 nm. Tiến hành hút 1,0 ml dung dịch mẫu thử và 1,0 ml dung dịch ABTS⁺. Ủ hỗn hợp phản ứng ở nhiệt độ thường, tránh ánh sáng trong 7 phút, đo mật độ quang ở bước sóng 734 nm. Chất đối chiếu được sử dụng là acid ascorbic (Miliauskas et al., 2004).

Tính toán: Hoạt tính kháng oxi hóa (HTKO) được xác định bởi công thức $HTKO(\%) = [(OD_o - OD_t)/OD_o] \times 100$ (trong đó OD_o, OD_t lần lượt là mật độ quang mẫu trắng và mẫu thử). Xây dựng đường biểu diễn sự tương quan giữa HTKO (%) và nồng độ mẫu thử, từ đó suy ra giá trị IC₅₀ là nồng độ ức chế 50% gốc tự do DPPH/ABTS.

2.2.3. Khảo sát hoạt tính kháng viêm của cao tổng và cao phân đoạn

Ức chế biến tính protein: Pha loãng các cao Bóng nước trong DMSO 5% thành dãy nồng độ thích hợp, tiến hành hút 2,0 ml mỗi dịch thử vào các ống nghiệm; thêm 0,2 ml lòng trắng trứng gà tươi và 2,8 ml đệm PBS (pH = 6,4). Hỗn hợp được lắc đều và được ủ ở 37 °C ± 2 °C trong cách thủy 15 phút. Sau đó làm nóng ở 70 °C trong 5 phút ở trong cách thủy, làm nguội rồi tiến hành đo mật độ quang ở bước sóng 660 nm. Chất đối chiếu được sử dụng là diclofenac natri (Naz et al., 2004).

Ức chế enzym proteinase: Pha loãng các cao Bóng nước trong DMSO 5% thành dãy nồng độ thích hợp, tiến hành hút 0,5 ml mỗi dịch thử vào các ống ly tâm; thêm 0,03 mg trypsin và 0,5 ml đệm Tris-HCl 20 mM (pH 7,4). Hỗn hợp phản ứng được ủ ở 37 °C trong 5 phút, sau đó thêm 0,5 ml casein 0,8% vào và ủ hỗn

hợp trong 20 phút nữa. Sau khi kết thúc quá trình ủ, 1,0 ml acid percloric 70% được thêm vào để kết thúc phản ứng. Hỗn hợp được ly tâm và đo độ hấp thụ của phần nổi phía trên ở bước sóng 210 nm. Lượng tương đương thể tích dung dịch đệm Tris HCl 20 mM pH 7,4 được thay thế dung dịch thử sử dụng làm mẫu trắng. Chất đối chiếu được sử dụng là aspirin (Naz et al., 2004).

Tính toán: Hoạt tính ức chế được xác định bởi công thức $IC(\%) = [OD_c - (OD_t - OD_{cx})]/OD_c \times 100$ (trong đó OD_c, OD_{cx}, OD_t lần lượt là mật độ quang mẫu chứng, mẫu trắng thử và mẫu thử). Xây dựng đường biểu diễn sự tương quan giữa IC(%) và nồng độ mẫu thử, từ đó suy ra nồng độ ức chế IC₅₀.

2.2.4. Khảo sát hoạt tính kháng khuẩn của cao tổng và cao phân đoạn

Xác định đường kính vòng kháng khuẩn: Các chủng vi khuẩn thử nghiệm sau khi hoạt hoá có mật độ $1 \times 10^6 - 1 \times 10^8$ CFU/ml được trải đều lên đĩa thạch Luria-Bertani (LB) bằng que trải vô trùng. Dùng dụng cụ đục lỗ thạch có đường kính 6 mm. Cho vào mỗi lỗ 100 µl dịch cao chiết thử nghiệm ở nồng độ 100 mg/ml pha trong DMSO 5%. Ủ các đĩa thạch ở 37 °C trong 24 giờ. Sự khuếch tán của cao chiết ra môi trường thạch sẽ ức chế sự tăng trưởng của các chủng vi sinh vật khảo sát tạo thành vòng kháng khuẩn xung quanh giếng thạch. Xác định đường kính vòng kháng khuẩn (mm) theo công thức $ĐKV = ĐKV_{mẫu thử} - ĐKV_{chứng âm}$. Kháng sinh amoxicillin nồng độ 50 µg/ml được sử dụng làm chứng dương. Chứng âm là DMSO 5% (John et al., 2012).

Xác định nồng độ ức chế tối thiểu sự phát triển của các chủng vi sinh vật khảo sát (MIC): Các mẫu cao chiết được phân tán trong DMSO 5% và pha loãng trong môi trường nuôi cấy để được các nồng độ 0,78 - 25 mg/ml. Chấm 1 µl huyền dịch các chủng vi khuẩn khảo sát có nồng độ khoảng 1×10^6 - 1×10^8 CFU/ml lên mặt đĩa thạch chứa chất thử nghiệm. Ủ các đĩa thạch ở 37 °C trong 24 giờ, quan sát đếm số lượng khuẩn lạc mọc trên đĩa thạch. MIC (mg/mL) là nồng độ cao thử nghiệm nhỏ nhất ngăn cản sự phát triển của vi khuẩn trên bản thạch được quan sát bằng mắt thường. Chứng dương là amoxicillin.

Chứng âm là DMSO 5% (John et al., 2012).

3. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU

3.1. Thành phần hóa thực vật của Bóng nước

Dịch chiết Bóng nước được định tính với các thuốc thử đặc trưng cho thấy Bóng nước chứa nhiều hợp chất quan trọng như chất béo, carotenoid, triterpenoid, coumarin, anthraglycosid, flavonoid, tannin, saponin, acid hữu cơ, hợp chất khử. Kết quả thành khảo sát được ghi nhận ở Bảng 1.

Bảng 1. Sơ bộ thành phần hóa thực vật của Bóng nước

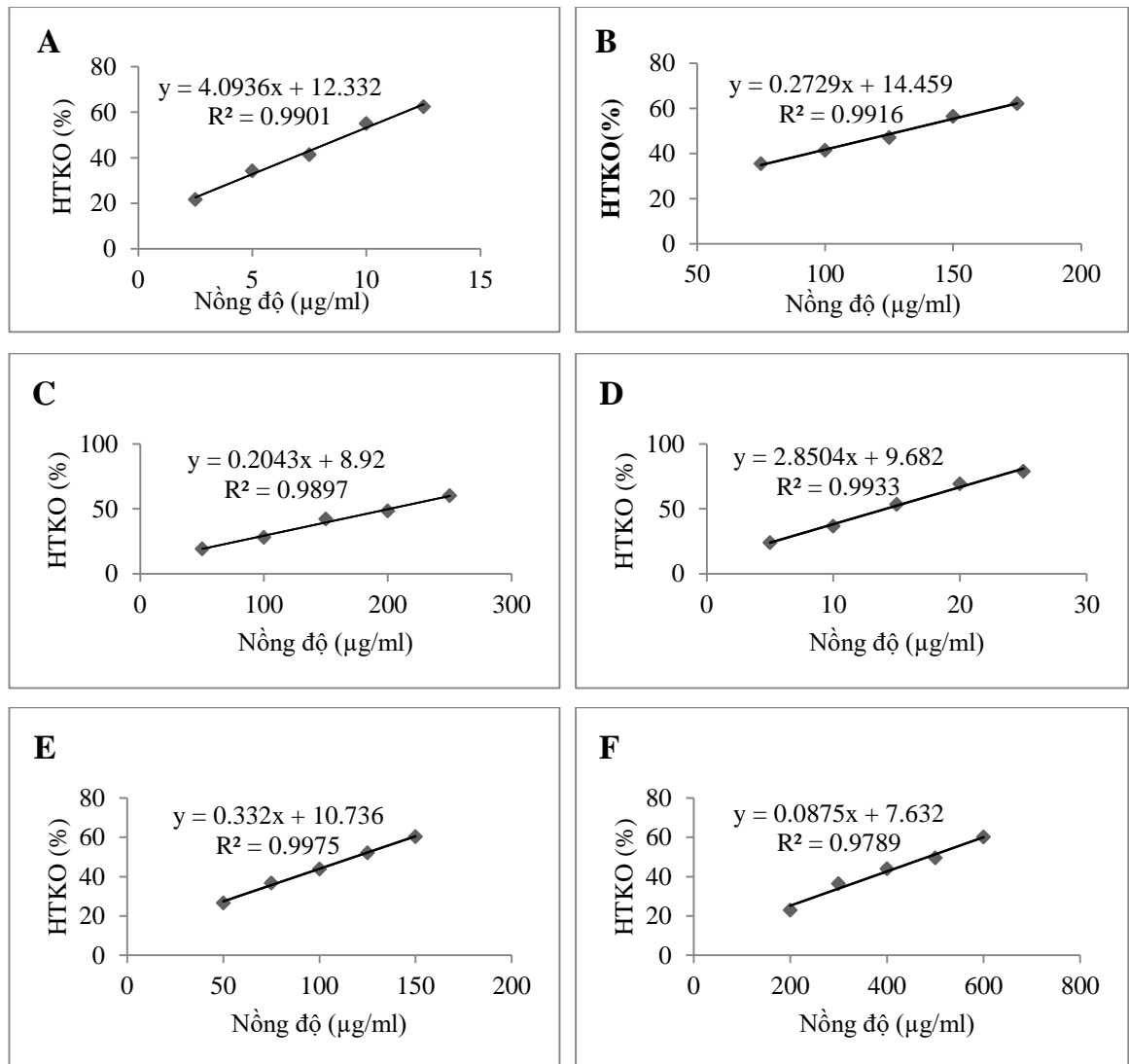
STT	Nhóm hợp chất	Thuốc thử	Cách phát hiện	Kết quả
1	Chất béo	Nhỏ dung dịch lên giấy	Vết trong mờ	+
2	Carotenoid	H ₂ SO ₄ đậm đặc	Vết màu xanh hoặc đỏ	+
3	Tinh dầu	Cẩn dịch chiết có mùi thơm	Có mùi thơm đặc trưng	-
4	Triterpenoid	Phản ứng Liebermann-Burchard	Có vòng ngăn cách màu tím	+
5	Alkaloid	Thuốc thử Dragendorff	Có kết tủa cam đến đỏ	-
6	Coumarin	Phát quang trong kiềm	Phát quang dưới đèn UV 365 nm	+
7	Antraglycosid	KOH 10%	Lớp kiềm có màu hồng đến đỏ	+
8	Flavonoid	Mg/HCl đậm đặc	Dung dịch chuyển sang hồng đến đỏ	+
9	Tannin	FeCl ₃ 5% Gelatin-muối	Kết tủa xanh đen Kết tủa trắng	+
10	Saponin	Phản ứng tạo bọt	Cột bọt bền 15 phút	+
11	Acid hữu cơ	Na ₂ CO ₃ tinh thể	Có bọt khí	+
12	Hợp chất khử	Phản ứng Fehling	Kết tủa màu đỏ gạch	+
13	Polyuronic	Pha loãng với cồn 90%	Kết tủa bông trắng	-

(+): có; (-): không có

3.2. Hoạt tính kháng oxy hóa của cao Bóng nước trên thử nghiệm DPPH và ABTS

3.2.1. Thử nghiệm DPPH: Các cao Bóng nước sau khi được pha loãng ở các khoảng nồng độ phù hợp khi tiến hành

thử nghiệm hoạt tính kháng oxy hóa cho thấy khả năng trung hòa mạnh gốc tự do DPPH^{*}. Ở nồng độ càng cao, khả năng trung hòa gốc DPPH^{*} của các cao Bóng nước càng tăng lên. Mối tương quan giữa nồng độ cao thử nghiệm và hoạt tính kháng oxy hóa được thể hiện ở Hình 2.



Hình 2. Hoạt tính dập tắt gốc tự do DPPH của acid ascorbic và các cao Bóng nước. A: acid ascorbic, B: cao tổng ethanol, C: cao n-hexane, D: cao ethyl acetate, E: cao n-butanol, F: cao nước.

Mặt khác, nồng độ ức chế 50% gốc tự do IC₅₀ được xác định bằng cách ngoại suy từ đường biểu diễn hoạt tính theo nồng độ được ghi nhận trong Bảng 2, giá trị IC₅₀ càng thấp, hoạt tính kháng oxi hóa của cao thử nghiệm càng mạnh. Do đó, hoạt tính kháng oxi hóa các cao Bóng

nước tăng dần theo thứ tự cao nước < cao *n*-hexane < cao tổng ethanol < cao *n*-butanol < cao ethyl acetate. Cao ethyl acetate (IC₅₀ = 14,1 µg/ml) có hoạt tính kháng oxi hóa bằng 0,65 lần so với chất đối chiếu acid ascorbic (IC₅₀ = 9,2 µg/ml).

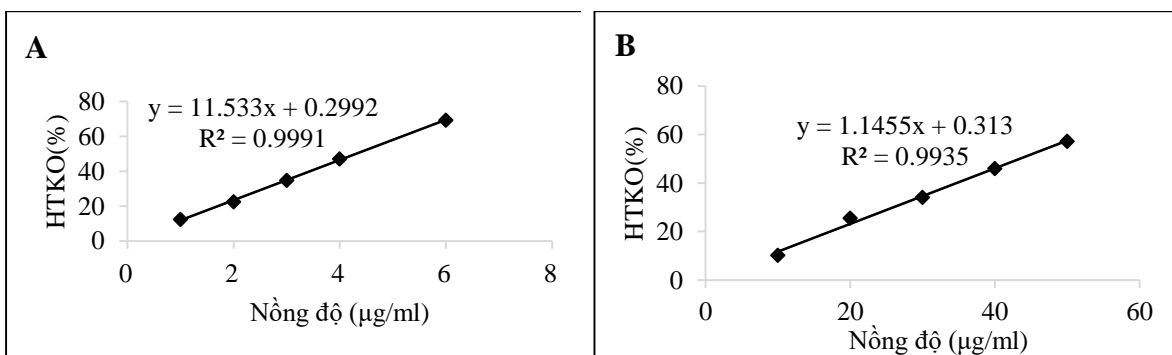
Bảng 2. Giá trị IC₅₀ của thử nghiệm DPPH

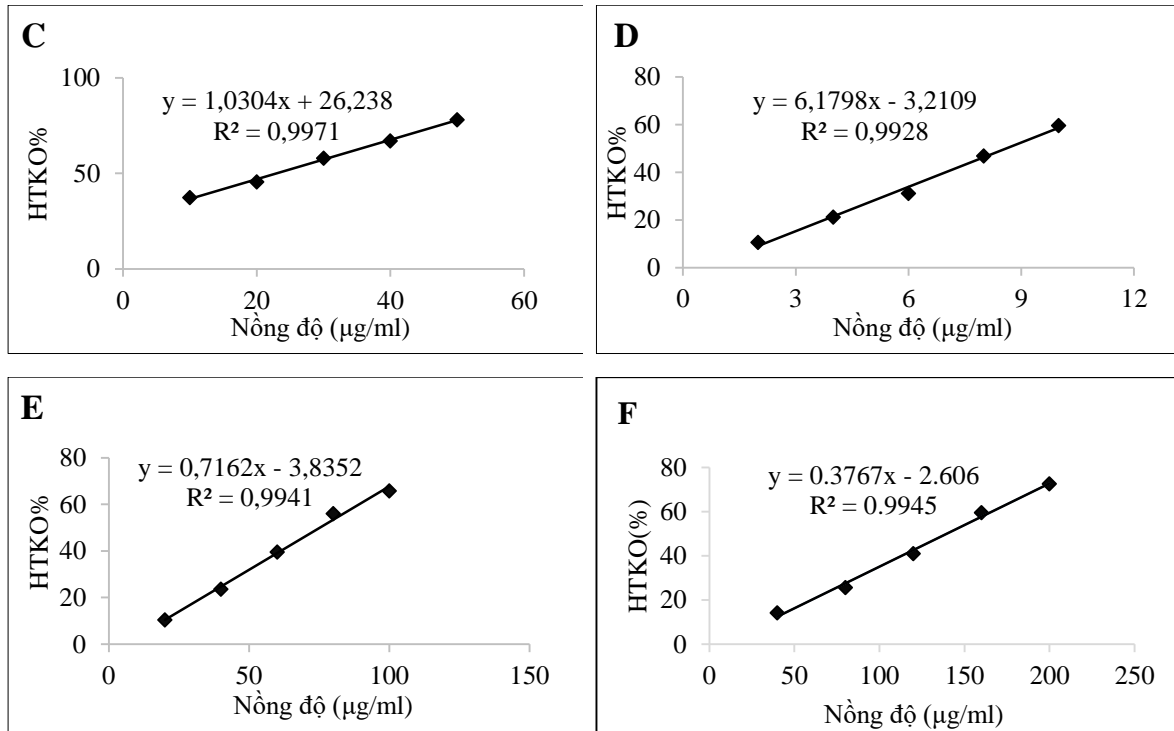
Mẫu thử	IC ₅₀ (µg/mL)
Cao ethanol	130,2
Cao <i>n</i> -hexane	201,1
Cao ethyl acetate	14,1
Cao <i>n</i> -butanol	118,3
Cao nước	484,2
Acid ascorbic	9,2

3.2.2. Thử nghiệm ABTS

Thử nghiệm kháng oxi hóa với ABTS, cao Bóng nước cũng có kết quả tương tự đối với thử nghiệm DPPH. Ở các khoảng

nồng độ phù hợp, cao Bóng nước đều thể hiện khả năng trung hòa các gốc tự do ABTS mạnh. Hoạt tính kháng oxi hóa phụ thuộc vào nồng độ cao thử nghiệm thể hiện ở các đường tuyến tính ở Hình 3.





Hình 3. Hoạt tính dập tắt gốc tự do ABTS của acid ascorbic và các cao Bông nước
A: acid ascorbic, **B:** cao tổng ethanol, **C:** cao n-hexane, **D:** cao ethyl acetate, **E:** cao n-butanol, **F:** cao nước

Dựa vào phương trình đường biểu diễn hoạt tính theo nồng độ ở Hình 3, suy ra nồng độ ức chế 50% gốc tự do ABTS^{•+} (IC₅₀) ở Bảng 4. Kết quả giá trị IC₅₀ cho thấy hiệu quả trung hòa gốc tự do ABTS của các cao Bông nước tăng dần theo thứ

tự cao nước < cao n-butanol < cao tổng ethanol < cao n-hexane < cao ethyl acetate. Trong đó, cao ethyl acetate (IC₅₀ = 8,6 µg/ml) có hoạt tính bằng 0,5 lần so với acid ascorbic (IC₅₀ = 4,3 µg/ml).

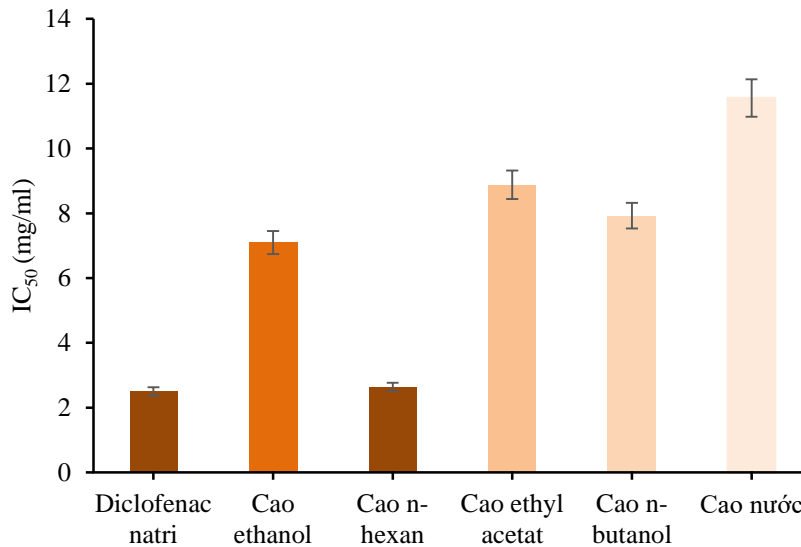
Bảng 4. Giá trị IC₅₀ trong thử nghiệm ABTS

Mẫu thử	IC ₅₀ (µg/mL)
Cao ethanol	43,4
Cao n-hexane	23,0
Cao ethyl acetate	8,6
Cao n-butanol	75,2
Cao nước	139,7
Acid ascorbic	4,3

3.3. Kết quả khảo sát hoạt tính kháng viêm của cây Bống nước

3.3.1. Hoạt tính ức chế biến tính protein

Hiệu quả ức chế biến tính protein trứng của cao chiết Bống nước được so sánh với chất đối chiếu diclofenac natri dựa vào giá trị IC_{50} kết quả được thể hiện qua hình sau:



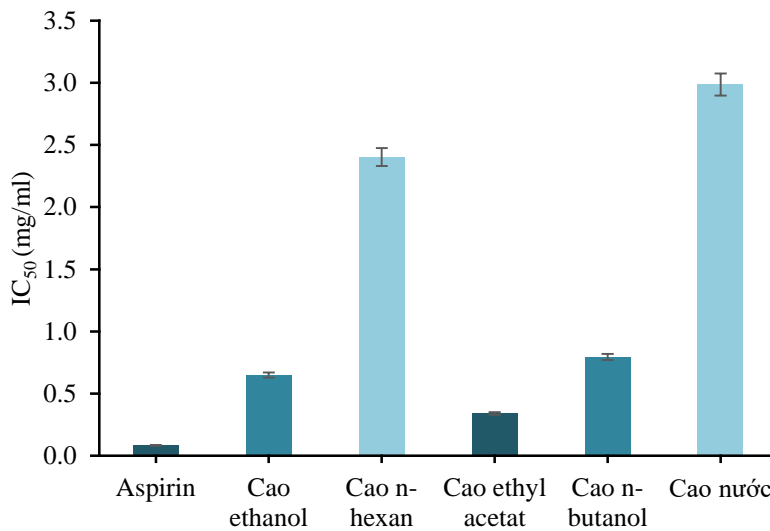
Hình 4. Giá trị IC_{50} hoạt tính ức chế biến tính protein của các cao Bống nước

Kết quả giá trị IC_{50} ở đồ thị Hình 4, thể hiện các cao Bống nước đều có khả năng ức chế sự biến tính albumin lòng trắng trứng. Phân đoạn *n*-hexane cho hiệu quả ức chế tốt nhất so với các phân đoạn còn lại ở khoảng nồng độ khảo sát, cao *n*-hexane có giá trị IC_{50} là 2,64 mg/mL, sau đó là cao tổng ethanol (IC_{50} = 7,10 mg/mL), cao *n*-butanol (IC_{50} = 7,93 mg/mL), cao ethyl acetate (IC_{50} = 8,88 mg/mL) và cao nước (IC_{50} = 11,56 mg/mL). Chất đối chứng diclofenac natri

ức chế biến tính albumin trứng với giá trị IC_{50} là 2,5 mg/ml.

3.3.2. Hoạt tính ức chế enzym proteinase

Các cao Bống nước được pha loãng có nồng độ trong khoảng 1 - 15 mg/ml và tiến hành thử nghiệm hoạt tính ức chế proteinase. Kết quả giá trị IC_{50} của các cao chiết Bống nước thử nghiệm được ghi nhận ở Hình 5.



Hình 5. Giá trị IC₅₀ hoạt tính ức chế enzyme proteinase của các cao chiết Bống nước

Tương tự, đối với thử nghiệm ức chế biến tính protein do nhiệt, các cao Bống nước đều có khả năng ức chế enzyme proteinase mạnh. Trong đó, cao ethyl acetate cho hiệu quả ức chế mạnh nhất so với các cao còn lại ở khoảng nồng độ khảo sát với IC₅₀ là 0,34 mg/mL, hoạt tính ức chế giảm dần theo thứ tự cao tổng ethanol (IC₅₀ = 0,65 mg/mL) > cao n-butanol (IC₅₀ = 0,79 mg/mL) > n-hexane (IC₅₀ = 2,40 mg/mL) và thấp nhất là cao nước (IC₅₀ = 2,99 mg/mL). Chất đối chứng aspirin có ức chế enzyme proteinase với IC₅₀ = 0,08 mg/ml.

3.4. Kết quả khả năng kháng khuẩn của cây Bống nước

3.4.1. Đường kính vòng kháng khuẩn

Khi định tính khả năng kháng khuẩn của các cao Bống nước trên 4 chủng *E. coli*, *P. aeruginosa*, *S. aureus* và *S. typhimurium* bằng phương pháp khuếch tán trên đĩa thạch cho kết quả khả quan. Các cao chiết ở nồng độ 100 mg/ml đều ức chế sự phát triển của 4 chủng vi khuẩn khảo sát với đường kính vòng kháng khuẩn từ 8 - 26 mm. Chứng dương amoxicillin ở nồng độ 50 µg/ml có đường kính vòng kháng khuẩn từ 19 - 29 mm, chứng âm (DMSO 5%) không có tác dụng kháng khuẩn (Bảng 5).

Bảng 5. Đường kính vòng kháng khuẩn của các cao Bóng nước

Mẫu thử	Đường kính vòng kháng khuẩn (mm)			
	<i>E. coli</i>	<i>P.aeruginosa</i>	<i>S. aureus</i>	<i>S. typhimurium</i>
Cao ethanol	13	12	15	17
Cao <i>n</i> -hexane	16	14	18	19
Cao ethyl acetate	18	15	25	26
Cao <i>n</i> -butanol	13	12	16	15
Cao nước	9	8	11	11
Amoxicillin	19	20	27	29
Chứng âm	-	-	-	-

“-”: không ức chế, đường kính vòng kháng khuẩn bao gồm đường kính lỗ thạch 6 mm

3.4.2. Nồng độ ức chế tối thiểu của các cao Bóng nước

Để xác định giá trị nồng độ ức chế tối thiểu (MIC), các cao Bóng nước được pha loãng trong môi trường thử nghiệm để thu được các mẫu thử có nồng độ trong khoảng 0,78 - 25 mg/ml. Kết quả thử nghiệm cho thấy, ngoại trừ cao nước (MIC > 25 mg/ml) các cao còn lại cao ethanol, cao *n*-hexane, cao ethyl acetate, cao *n*-butanol đều có MIC xác định trong khoảng nồng độ 0,78 - 25 mg/ml (Bảng

6). Trong đó hoạt tính ức chế giảm dần theo thứ tự cao ethyl acetate > cao *n*-hexane > cao *n*-butanol > cao tổng ethanol. Mặt khác, kết quả MIC còn thể hiện thể hiện tác động ức chế của cao Bóng nước các chủng vi khuẩn Gram dương (*S. aureus*, *S. typhimurium*) mạnh hơn các chủng Gram âm (*E. coli*, *P. aeruginosa*). Chứng dương amoxicillin ức chế 2 chủng *E. coli* và *P. aeruginosa* với MIC là 50 µg/ml và ức chế 2 chủng *S. aureus* và *S. typhimurium* với MIC là 25 µg/ml.

Bảng 6. Nồng độ ức chế tối thiểu (MIC) các cao Bóng nước

Mẫu thử	MIC (mg/ml)			
	<i>E. coli</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>S. aureus</i>	<i>S. typhimurium</i>
Cao ethanol	12,5	12,5	12,5	6,25
Cao <i>n</i> -hexane	3,13	6,25	1,56	1,56
Cao ethyl acetate	1,56	3,13	0,78	0,78
Cao <i>n</i> -butanol	6,25	6,25	3,13	3,13
Cao nước	> 25	> 25	> 25	> 25
Amoxicillin	0,05	0,05	0,025	0,025

4. THẢO LUẬN

Kết quả định tính sơ bộ bằng các phản ứng đặc trưng cho thấy phần trên mặt đất cây Bống nước chứa nhiều nhóm chất thứ cấp quan trọng như chất béo, carotenoid, triterpenoid, coumarin, anthraglycosid, flavonoid, tannin, saponin, acid hữu cơ, hợp chất khử. Nhiều nghiên cứu đã xác định cấu trúc của các hợp chất tinh khiết phân lập từ các bộ phận cây Bống nước thuộc các nhóm naphthoquinon như 2-hydroxy-1,4-naphthoquinon; 2-hydroxy-3-methoxy-1,4-naphthoquinon; 2,3-dihydroxy-1,4-naphthoquinon; 2,2'-methylenebis(3-hydroxy-1,4-naphtho-quinon); (2-hydroxyethyl)-1,4-naphtho-quinon; nhóm flavonoid như quercetin, kaempferol, dẫn suất quercetin-3-O-glucosid, kaempferol-3-O-glucosid và nhóm saponin như dẫn suất 26-O- β -D-glucopyranosid của hosenkol và dẫn suất 3-O- β -D-glucopyranosid của presapogenin. Các báo cáo sàng lọc hoạt tính *in vitro* của các hợp chất này cũng đã bước đầu chứng minh tác dụng kháng oxi hóa, kháng khuẩn, kháng viêm, kháng ung thư tương đối tốt (Meenu et al., 2015; Singh et al., 2017).

Bên cạnh đó, một số thử nghiệm hoạt tính kháng oxi hóa, kháng viêm, kháng khuẩn *in vitro* trên các cao ethanol và cao phân đoạn phần trên mặt đất của Bống nước thu hái tại Hồ Chí Minh cũng cho kết quả đáng quan tâm. Trên thử nghiệm kháng oxi hóa DPPH và ABTS, các cao Bống nước đều có khả năng trung hòa các gốc tự do DPPH \cdot và ABTS $^{+\cdot}$ với nồng độ ức chế 50% thấp so với acid ascorbic. Trong các cao chiết thử nghiệm, cao phân đoạn ethyl acetate thể hiện hoạt tính

kháng oxi hóa mạnh nhất với IC₅₀ là 14,1 μ g/ml và 8,6 μ g/ml lần lượt trên thử nghiệm DPPH và ABTS. Các cao Bống nước chứa nhiều hợp chất có các nhóm -OH liên kết với nhân thơm như hydroxy-1,4-naphthoquinon, các flavonol và các acid phenolic. Các hydro linh động trong nhóm -OH dễ dàng nhường đi để trung hòa các gốc tự do có hại, giúp kháng oxi hóa bảo vệ cơ thể.

Các cao Bống nước còn thể hiện hoạt tính kháng viêm mạnh trên 2 thử nghiệm ức chế biến tính protein và ức chế proteinase. Trong phản ứng viêm, các protein huyết tương đóng vai trò rất quan trọng bao gồm hệ thống bổ thể, hệ thống đông máu và hệ thống kinin. Các sản phẩm cuối của hệ thống bổ thể bao gồm C3a, C5a gây hóa hướng động bạch cầu và làm tế bào mast phóng các chất trung gian gây viêm. Hoạt động của enzym hệ thống kinin dẫn đến sản xuất bradykinin gây ra hiện tượng giãn mạch, tăng tính thấm thành mạch trong phản ứng viêm (Laurence et al., 2018). Mặt khác, ở điều kiện bình thường mô được bảo vệ bởi antiprotease (α_1 -macro-globulin, α_1 -antitrypsin). Khi viêm bạch cầu di chuyển đến vị trí viêm để thực hiện chức năng thực bào, trong cơ chế diệt khuẩn của bạch cầu có sự sản xuất ra acid hypochloro có tính diệt khuẩn, bất hoạt antiprotease, hoạt hóa các enzym collagenase, elastase tham gia vào quá trình phân hủy chất nền ngoại bào gây tổn thương mô liên kết (Phạm Hoàng Phiệt, 2004). Các cao Bống nước, đặc biệt là cao *n*-hexane và ethyl acetate được xem là nguồn chứa các 1,4-naphthoquinon và flavonoid có hoạt tính ức chế biến tính

protein rất tốt với IC_{50} trong khoảng 2,64 - 11,56 mg/ml so với thuốc đối chứng diclofenac natri ($IC_{50} = 2,50$ mg/ml). Tương đồng với kết quả này, các cao khảo sát cũng có hoạt tính ức chế enzym trypsin mạnh với IC_{50} trong khoảng 0,34 - 2,99 mg/ml so với đối chứng aspirin ($IC_{50} = 0,08$ mg/ml). Các 1,4-naphthoquinon phân lập từ cao phân đoạn ethyl acetate còn có hoạt tính ức chế chọn lọc cyclooxygenase-2 (COX-2), giảm tổng hợp prostaglandin H, đóng vai trò quan trọng ức chế các phản ứng viêm (Oku et al., 2002).

Trong thử nghiệm hoạt tính kháng khuẩn bằng phương pháp khuếch tán trên đĩa thạch, ở nồng độ 0,78 - 25 mg/ml các cao Bóng nước ức chế tốt 4 chủng vi khuẩn thử nghiệm *E. coli*, *P. aeruginosa*, *S. aureus*, *S. typhimurium*. Đây là các chủng vi khuẩn gây bệnh thường gặp ở người, *E. coli* là trực khuẩn Gram âm gây bệnh tiêu chảy, nhiễm trùng đường ruột, tiết niệu; *P. aeruginosa* là trực khuẩn Gram âm gây nhiễm trùng đường ruột, tiết niệu, tấn công vết thương gây nhiễm trùng huyết; *S. aureus* là cầu khuẩn Gram dương gây viêm phổi, nhiễm trùng máu, gây áp se, nhiễm trùng da, *S. typhimurium* là trực khuẩn Gram dương gây bệnh thương hàn. Kết quả giá trị MIC trong thử nghiệm cho thấy, các cao Bóng nước ức chế tốt các chủng vi khuẩn Gram dương điển hình hơn các chủng Gram âm, trong đó cao ethyl acetate thể hiện hoạt tính tốt nhất so với các cao còn lại với MIC trong khoảng 0,78 - 3,13 mg/ml.

5. KẾT LUẬN

Cây Bóng nước là dược liệu quý chứa nhiều nhóm hợp chất có hoạt tính sinh học mạnh, đặc trưng là các 1,4-naphthoquinon và flavonoid. Các cao chiết xuất từ phần trên mặt đất Bóng nước thể hiện tác dụng kháng oxi hóa, kháng viêm, kháng khuẩn điển hình có tiềm năng ứng dụng để sản xuất các chế phẩm kháng viêm, thay thế các chất kháng viêm tổng hợp, có tính an toàn cao và phù hợp để hỗ trợ điều trị các bệnh lý viêm mãn tính.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLInstituteInstitute. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. 31th Edition, M100-ed31.
2. Currie J., Lin W., Zhang W., 2011. Patient knowledge and antibiotic abuse: Evidence from an audit study in China. Journal of Health Economics, vol.30: 933-949.
3. Đỗ Huy Bích, 2006. Cây thuốc và động vật làm thuốc ở Việt Nam. Nhà Xuất Bản Khoa học Kỹ thuật. Hà Nội, Tập 1, tr: 229-231.
4. Đỗ Tất Lợi, 2004. Những cây thuốc và vị thuốc Việt Nam. Nhà Xuất Bản Y Học. Hà Nội, tr: 556-557.
5. Harirforoosh S., Asghar W., Jamali F., 2014. Adverse Effects of Nonsteroidal Antiinflammatory Drugs: An Update of Gastrointestinal, Cardiovascular and Renal Complications. Journal of Pharmacy & Pharmaceutical Sciences, vol.16: 821-847.

6. John S.A., Koperuncholan M., 2012. Antibacterial Activities of various solvent extracts from *Impatiens balsamina*. International Journal of Pharma and Bio Sciences, vol.3: 401-406.
7. Laurence L.B, Björn C.K, Randa H.D., 2018. Goodman and Gilman's the pharmacological basis of therapeutics. New York: McGraw-Hill, 1549, 1361-1373.
8. Meenu B., Neeraja E.D., Greeshma R., Alexeyena V., 2015. *Impatiens balsamina*: an overview. Journal of Chemical and Pharmaceutical Research, vol.7:16-21.
9. Miliauskas G., Venskutonis P.R., Van Beek T.A., 2004. Screening of radical scavenging activity of some medicinal and aromatic plant extracts. Food Chemistry, vol.85: 231-237.
10. Naz R., Ayub H., Nawaz S., 2017. Antimicrobial activity, toxicity and anti-inflammatory potential of methanolic extracts of four ethnomedicinal plant species from Punjab, Pakistan. BMC Complementary and Alternative Medicine, vol.17: 1-13.
11. Oku H., Ishiguro K., 2002. Cyclooxygenase-2 inhibitory 1,4-naphthoquinones from *Impatiens balsamina* L. Biological and Pharmaceutical Bulletin, vol.25: 658-660.
12. Phạm Hoàng Phiệt, 2004. Miễn dịch sinh lý bệnh. Nhà Xuất Bản Y học. TP. Hồ Chí Minh, tr: 176-188.
13. Singh P., Singh R., Sati N., Ahluwalia V., Sati O.P., 2017. Phytochemical and pharmacological significance of genus: *Impatiens*. International Journal Life-Sciences Scientist Research, vol.3: 868-881.
14. Trần Hùng, 2014. Phương pháp nghiên cứu dược liệu. Bộ Môn Dược liệu - Trường Đại học Y Dược, TP.HCM, tr. 25-41.

ANTIOXIDANT, ANTIBACTERIAL, AND ANTI-INFLAMMATORY ACTIVITIES OF THE ETHANOL EXTRACT AND FRACTIONS FROM *IMPATIENS BALSAMINA* L.

Tran Trung Dung¹, Bui The Vinh¹, Nguyen Nhat Minh²
Dinh Truong Son² and Nguyen Van Tri^{2*}

¹*Hong Bang International University*

²*Ho Chi Minh City Research Center of Ginseng and Medicinal Materials*

(*Email: tri.nguyendhpt06@gmail.com)

ABSTRACT

The aim of this study was preliminary phytochemicals identification and in vitro examination of antioxidant, antibacterial, and anti-inflammatory activities of the aerial part of Impatiens balsamina L. The crude extract and its fractions of I. balsamina investigated the antioxidant activity by DPPH and ABTS free radical scavenging assays. The anti-inflammatory activity was evaluated on protein denaturation and proteinase enzyme inhibition tests. The antibacterial activity was studied on Escherichia coli, Pseudomonas aeruginosa, Staphylococcus aureus, and Salmonella typhimurium by using agar disc diffusion test. The results showed that I. balsamina contained fats, carotenoids, triterpenoids, coumarins, anthraglycosides, flavonoids, tannins, saponins, organic acids, and reducing compounds. The I. balsamina extracts showed strong antioxidant activity, in which ethyl acetate extract had the highest activity with IC₅₀ values of 14.1 µg/ml (DPPH test), and 8.6 µg/ml (ABTS test). Similarly, on the protein denaturation and proteinase enzyme inhibition assays, ethyl acetate extract was the strongest inhibitor with IC₅₀ values of 0.34 - 8.88 mg/ml. The I. balsamina extract markedly inhibited 4 strains of bacteria, in which ethyl acetate extract had the best inhibitory activity with MIC values of 0.78 - 3.13 mg/ml. Impatiens balsamina has the potential candidate to develop a chronic anti-inflammatory product.

Keywords: *Impatiens balsamina, antioxidant, antibacterial, anti-inflammatory, phytochemical components*