

ĐẶC ĐIỂM THỰC VẬT HỌC VÀ TÁC DỤNG KHÁNG OXY HÓA IN VITRO TRÊN MÔ HÌNH QUÉT GỐC TỰ DO DPPH CỦA CAO CHIẾT HOA CÂY ĐẬU BIẾC (*Clitoria ternatea* L., Fabaceae) TẠI BẠC LIÊU

Lâm Thị Ngọc Giàu¹, Nguyễn Thị Thu Thúy² và Huỳnh Anh Duy²

¹Khoa Dược, Trường Cao đẳng Y tế Bạc Liêu

²Khoa Khoa học Tự nhiên, Trường Đại học Cần Thơ

*Tác giả liên hệ: huynhduyds@gmail.com

Lịch sử bài báo

Ngày nhận: 01/6/2021; Ngày nhận chỉnh sửa: 30/8/2021; Ngày duyệt đăng: 08/9/2021

Tóm tắt

Mục tiêu của đề tài nhằm khảo sát đặc điểm thực vật, sơ bộ thành phần hóa học và hoạt tính kháng oxy hóa của cao chiết ethanol 96% và cao chiết nước từ hoa cây Đậu biếc bằng việc phân tích mẫu vật đã định danh được hoa Đậu biếc thu hái tại Bạc Liêu chính là *Clitoria ternatea* L., Fabaceae. Ngoài ra, kết quả định tính cho thấy trong hoa cây Đậu biếc hiện diện các hợp chất hóa học: Anthocyanin, flavonoid, carotenoid, tinh dầu, triterpenoid tự do, tannin, saponin, acid hữu cơ, chất khử và hợp chất polyuronid. Bên cạnh đó, khả năng kháng oxy hóa in vitro được tiến hành bằng phương pháp sử dụng gốc tự do DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl), với chất chuẩn là vitamin C. Mẫu thử là cao ethanol 96% và cao nước của hoa cây Đậu biếc cho giá trị IC_{50} tương ứng là 362,94 $\mu\text{g/mL}$ và 297,39 $\mu\text{g/mL}$, mặc dù thấp hơn chất chuẩn vitamin C ($IC_{50} = 4,72 \mu\text{g/mL}$). Hiệu suất loại bỏ gốc tự do của cao ethanol 96% hoa Đậu biếc tỉ lệ thuận với nồng độ, khi nồng độ cao chiết tăng từ 100 đến 500 $\mu\text{g/mL}$ tương đương hiệu suất ức chế gốc tự do tăng từ 18,45% đến 66,31%. Đối với cao nước, hiệu suất ức chế gốc tự do tăng từ 24,83% đến 70,12% trong cùng dãy nồng độ thử nghiệm. Kết luận cao nước có khả năng quét gốc tự do DPPH tốt hơn cao ethanol 96%. Kết quả từ nghiên cứu cho thấy tiềm năng tác dụng sinh học của hoa Đậu biếc và tạo cơ sở khoa học cho các nghiên cứu và sử dụng tiếp theo.

Từ khóa: Hoa Đậu biếc, kháng oxy hóa, thử nghiệm DPPH, thực vật học.

PHARMACOGNOSY, PHYTOCHEMICAL STUDY AND *IN VITRO* ANTIOXIDANT ACTIVITY OF BUTTERFLY PEA FLOWERS (*Clitoria ternatea* L., Fabaceae) IN BAC LIEU

Lam Thi Ngoc Giau¹, Nguyen Thi Thu Thuy¹, and Huynh Anh Duy²

¹Pharmacy Department, Bac Lieu Medical College

²College of Natural Science, Can Tho University

*Corresponding author: huynhduyds@gmail.com

Article history

Received: 01/6/2021; Received in revised form: 30/8/2021; Accepted: 08/9/2021

Abstract

The study aims to determine the plant characteristics, preliminary chemical composition and *in vitro* antioxidant activity of ethanol 96% and aqueous extract of the flowers of Butterfly pea. By analyzing the specimen and consulting with the botanist, it was identified that the Butterfly pea was collected in Bac Lieu was *Clitoria ternatea* L., Fabaceae. In addition, qualitative results have shown that in the flowers of the Butterfly pea there is the presence of chemical compounds: Anthocyanine, flavonoids, carotenoids, essential oils, free triterpenoids, tannins, saponins, organic acids, reducing agents and polyuronid compounds. In addition, the *in vitro* antioxidant capacity was performed by the DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) free radical scavenging activity in comparison with vitamin C as standard. The test sample was at 96% ethanol extract and water extract of the Butterfly pea flowers showed IC_{50} values of 362.94 $\mu\text{g/mL}$ and 297.39 $\mu\text{g/mL}$, respectively, though lower than the standard vitamin C ($IC_{50} = 4.72 \mu\text{g/mL}$). In conclusion, the aqueous extract showed better antioxidant activity than ethanol 96% extract. The results proved that the Butterfly pea flowers had the potential biological activity to provide the basis for further applicants.

Keywords: Butterfly pea flower, antioxidant activity, pharmacognosy, DPPH assay.

DOI: <https://doi.org/10.52714/dthu.11.2.2022.944>

Trích dẫn: Lâm Thị Ngọc Giàu, Nguyễn Thị Thu Thủy và Huỳnh Anh Duy. (2022). Đặc điểm thực vật học và tác dụng kháng oxy hóa *in vitro* trên mô hình quét gốc tự do DPPH của cao chiết hoa cây Đậu biếc (*Clitoria ternatea* L., Fabaceae) tại Bạc Liêu. *Tạp chí Khoa học Đại học Đồng Tháp*, 11(2), 98-105.

1. Đặt vấn đề

Cây Đậu biếc có tên khoa học là *Clitoria ternatea* L. thuộc họ Đậu (Fabaceae). Cây Đậu biếc (*Clitoria ternatea* L.) là loài dây leo mọc phổ biến ở khắp đất nước và từ lâu là thức uống quen thuộc mang lại sức khoẻ tốt cho cuộc sống người dân ở Bạc Liêu nói riêng và ở Việt Nam nói chung. Tất cả các bộ phận của cây Đậu biếc (rễ, hạt, lá) đều được sử dụng làm thuốc với tác dụng kháng khuẩn, điều trị hen suyễn, mất trí nhớ, nhuận tràng và lợi tiểu (Võ Văn Chi, 2012). Ngoài ra, nụ hoa Đậu biếc chứa hàm lượng anthocyanin và các flavonoid khác có tác dụng kháng oxy hóa rất cao (Kamkaen N., Wilkinson J., 2009). Tuy nhiên, chưa tìm thấy tài liệu ở Việt Nam công bố chi tiết về đặc điểm thực vật, định tính hóa học và tác dụng kháng oxy hóa của dược liệu này. Trên những cơ sở đó, nghiên cứu được tiến hành để khảo sát đặc điểm thực vật học, sơ bộ thành phần hóa học và tác dụng kháng oxy hóa in vitro của cây Đậu biếc thu hái tại địa bàn tỉnh Bạc Liêu.

2. Vật liệu và phương pháp nghiên cứu

2.1. Nguyên liệu

Hoa cây Đậu biếc được thu hái tại tỉnh Bạc Liêu vào tháng 10/2020, được định danh bằng cách so với các dữ liệu trong các tài liệu phân loại thực vật. Mẫu được phơi khô và xay thành dạng bột (1 kg). Mẫu được lưu tại Phòng Thực vật-Dược liệu, Khoa Dược-Xét nghiệm, Trường Cao đẳng Y tế Bạc Liêu.

2.2. Hóa chất

Dung môi chiết xuất: Chloroform, ethyl acetat, cồn 96%; Hóa chất và thuốc thử dùng trong phân tích sơ bộ thành phần hóa học; Các hóa chất, dung môi thuốc thử cho khảo sát kháng oxy hóa: DPPH, acid ascorbic 99% (Sigma).

2.3. Phương pháp nghiên cứu

2.3.1. Khảo sát thực vật học

Mô tả đặc điểm hình thái thực vật của cây, đối chiếu tài liệu và sơ bộ xác định loài cây cần khảo sát. Kiểm tra tên khoa học tương ứng với khóa tra trong tài liệu. Song song đó, tham khảo ý kiến của chuyên gia thực vật học để định danh tên khoa học chính xác của cây.

2.3.2. Khảo sát sơ bộ hóa thực vật

Thành phần hóa học có trong hoa cây Đậu biếc được định tính sơ bộ theo phương pháp Ciuley (Khoa Dược - Đại học Y Dược Thành phố Hồ Chí Minh,

2017). Tiến hành chiết xuất hỗn hợp các chất có trong nguyên liệu thực vật thành 3 phân đoạn theo độ phân cực tăng dần, lần lượt với các dung môi: Ether ethylic, ethanol (hay methanol) và nước. Xác định các nhóm hoạt chất trong từng dịch chiết bằng các phản ứng đặc trưng, bao gồm các thành phần: Chất béo, carotenoid, tinh dầu, triterpenoid tự do, alkaloid, coumarin, anthranoid, glycosid tim, anthocyanin, flavonoid, proanthocyanin, tannin, saponin, acid hữu cơ, chất khử, hợp chất polyuronid.

2.3.3. Khảo sát tác dụng kháng oxy hóa

Chuẩn bị dịch chiết

Cao ethanol (96%): Bột nguyên liệu hoa Đậu biếc sau khi loại béo được cho vào các túi nhỏ, sau đó cho vào bình thủy tinh ngâm với một lượng vừa đủ dung môi. Cách 24 giờ thu dịch chiết một lần, lặp lại 3 lần với lượng dung môi tương ứng là 1000-900-800 mL, dịch chiết được lọc qua giấy lọc, gom dịch chiết 3 lần đem cô quay thu hồi dung môi. Dung môi thu hồi được cho trở lại bình thủy tinh để tiếp tục chiết, tiếp tục thực hiện quá trình như thế vài lần cho đến khi chiết kiệt các chất từ mẫu nguyên liệu. Sau khi cô quay ta được dịch chiết cao cồn 96%.

Cao nước: Bột nguyên liệu được chiết với nước nóng khoảng 60°C, lặp lại 3 lần gom dịch chiết, áp dụng kỹ thuật đông khô chân không loại nước thu được cao nước dạng xốp màu tím đen.

Thử nghiệm tác dụng kháng oxy hóa in vitro trên mô hình DPPH

Mẫu thử là dung dịch cao chiết hoặc dung dịch chất đối chứng đã được chuẩn bị từ các dung dịch pha sẵn được cho vào ống eppendorf chứa sẵn dung môi với các thể tích khác nhau, các ống eppendorf đã được bọc kín để tránh ánh sáng, sau đó thêm 40 µl dung dịch DPPH nồng độ 1 mg/mL để thu được thể tích cuối là 1 mL. Hỗn hợp phản ứng được ủ trong tối ở nhiệt độ phòng trong 30 phút, sau đó hỗn hợp được đo mật độ quang (OD) ở bước sóng 517 nm. Acid ascorbic 99% (Sigma) được dùng làm chất đối chứng dương.

Tính IC_{50}

Vẽ đồ thị biểu diễn tỷ lệ phần trăm (%) khả năng kháng oxy hóa theo nồng độ (C) khảo sát của chất cần thử nghiệm bằng phần mềm MS Excel. Từ đồ thị, suy ra phương trình hồi quy $y = ax + b$. Sau đó, thay thế $y = 50$ và suy ra giá trị IC_{50} (µg/mL) cho các mẫu thử.

3. Kết quả và bàn luận

3.1. Đặc điểm thực vật học của hoa Đậu biếc

3.1.1. Khảo sát đặc điểm thực vật học

Cây thảo, thân leo, mọc thành đám lớn, phân nhiều nhánh. Thân có tiết diện tròn, màu xanh, có lông, có thể leo đến 5 m. Lá mọc đối xứng, kép lông chim lẻ gồm 5-7 lá chét, hình bầu dục, mép lá nguyên, cũng có lông tơ bao phủ và cuốn dài, bình thường cứ 1 lá to sẽ mọc ở giữa ngay ngọn, 5 lá chét còn lại sẽ mọc đối xứng nhau, mỗi lá có kích thước khoảng 4 cm.

Hoa đơn, mọc ở nách lá, kích thước lớn hơn 5 cm. Tràng hoa riêng biệt hình bướm hướng xuống dưới. Hoa Đậu biếc thường có mùi thơm dịu nhẹ đặc trưng, có 2 màu cơ bản là màu tím hoặc màu hồng nhưng phổ biến nhất là màu tím biếc, hoa Đậu biếc được phân thành 2 thứ (varieties): hoa cánh kép và hoa cánh đơn. Quả Đậu biếc thường dẹt, khi già chuyển dần từ màu xanh non sang màu nâu đậm, có chiều dài khoảng 5 - 7 cm, mỗi quả bên trong đều chứa từ 7 - 9 hạt. Hạt Đậu biếc thường có màu đen tuyền, bóng và có đốm nhỏ.

Mẫu dược liệu được lưu tại phòng Thực vật -

Dược liệu, Trường Cao đẳng Y tế Bạc Liêu. Phân tích đặc điểm hình thái của rễ, thân, lá và hoa, quả, hạt; quan sát đặc điểm giải phẫu của các bộ phận trên, có sự so sánh và đối chiếu với các công bố về đặc điểm thực vật, tên khoa học của một số loài thuộc chi *Clitoria* của bảng mô tả ghi trong các tài liệu phân loại thực vật. Song song đó, dưới sự giám định của TS. Đặng Văn Sơn, Viện sinh học nhiệt đới, Thành phố Hồ Chí Minh, định danh dược mẫu tiêu bản Hoa Đậu biếc thu hái tại tỉnh Bạc Liêu là loài *Clitoria ternatea*, họ Đậu (Fabaceae).

3.1.2. Phân biệt 02 thứ (varieties) Đậu biếc tại Bạc Liêu

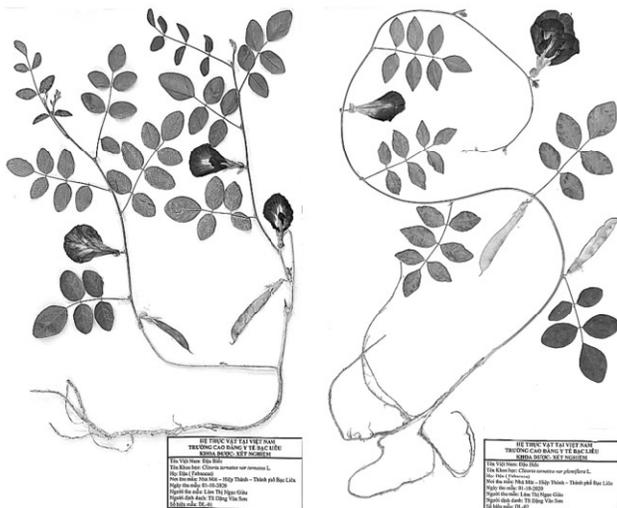
Một điểm đáng chú ý nữa là, theo các tài liệu, loài *Clitoria ternatea* gồm 2 thứ (varieties) là *Clitoria ternatea var ternatea* (Hoa Đậu biếc cánh đơn) và *Clitoria ternatea var pleniflora* (Hoa Đậu biếc cánh kép). Vì vậy, nghiên cứu tiếp tục phân biệt hai thứ này dựa trên sự khác biệt cấu tạo hoa. Kết quả cho thấy mọc phổ biến và được sử dụng nhiều tại địa bàn tỉnh Bạc Liêu là thứ *Clitoria ternatea var pleniflora* (Hoa Đậu biếc cánh kép). Kết quả được trình bày trong Bảng 1.

Bảng 1. Bảng phân biệt hai thứ (varieties) hoa Đậu biếc

Các bộ phận	<i>Clitoria ternatea var ternatea</i> (Đậu biếc cánh đơn)	<i>Clitoria ternatea var pleniflora</i> (Đậu biếc cánh kép)
Tràng hoa	Cánh hoa 5, có màu trắng hoặc xanh, tiền khai hoa bướm (cờ) với cánh hoa lớn nhất nằm ở phía sau phủ bên ngoài, cánh thìa nhỏ hơn và nằm trong	Cánh hoa 5, có màu xanh lam nhiều cánh cờ lớn xoắn lại, ở giữa có đốm màu trắng ngà
Bộ nhị	10, 9 nhị dính thành một ống hình lòng máng xê phía sau, nhị thứ 10 rời tự do	10 nhị, rời nhau
Bầu	Bầu trên, nhiều noãn, 1 ô và đầu nhụy có lông	Bầu trên, nhiều noãn, 1 ô và đầu nhụy có lông
Hạt	Không nội nhũ	Không nội nhũ

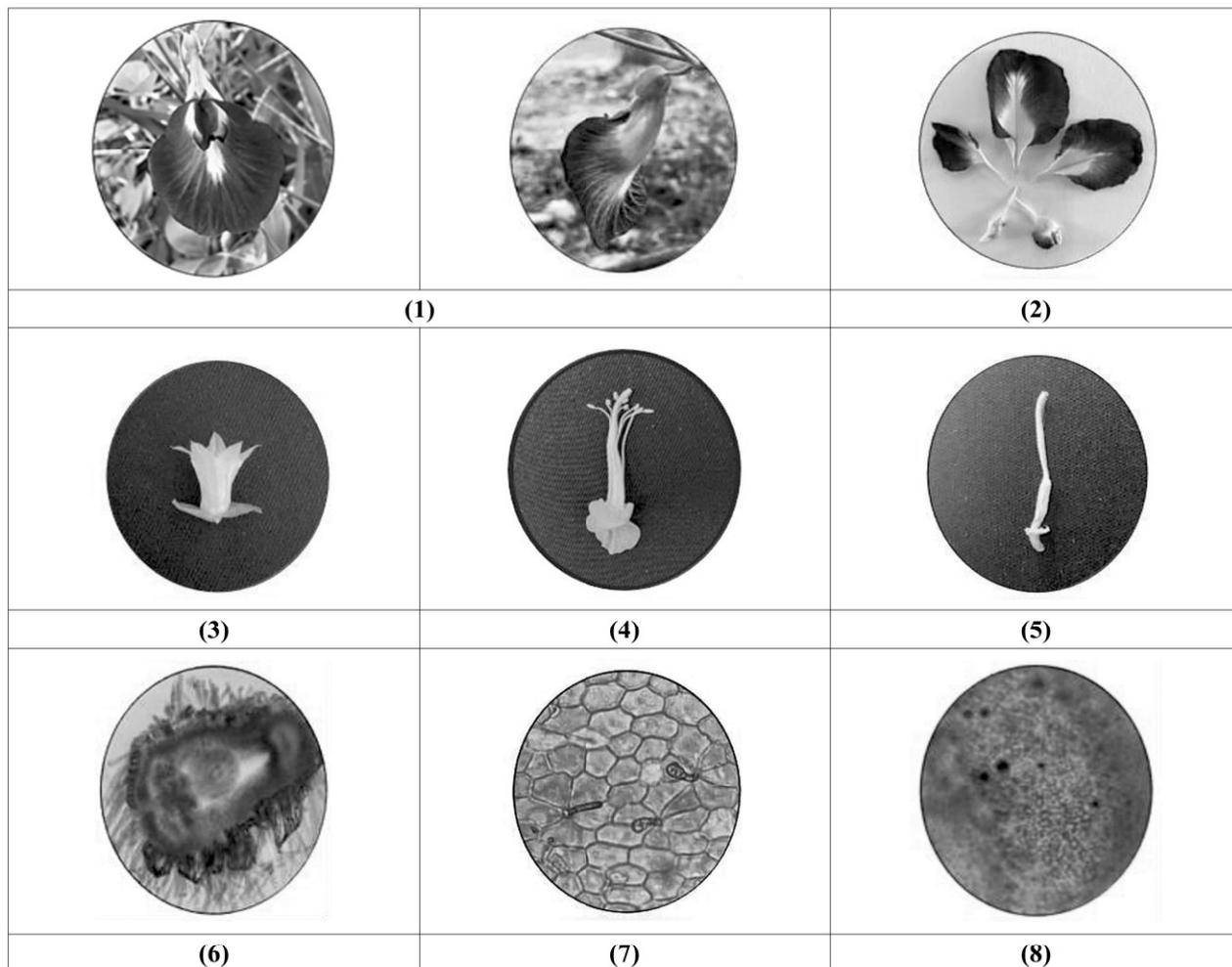
Mẫu tiêu bản khô của hai thứ *Clitoria ternatea var ternatea* (Đậu biếc cánh đơn) và *Clitoria ternatea var pleniflora* (Đậu biếc cánh kép) được lưu tại Bộ môn Dược liệu, Trường Cao đẳng Y tế Bạc Liêu, thể hiện trong Hình 1.

Ngoài ra, các kết quả phân tích các đặc điểm thực vật của hai thứ của loài *Clitoria ternatea* được trình bày trong cụm Hình 2 và Hình 3.

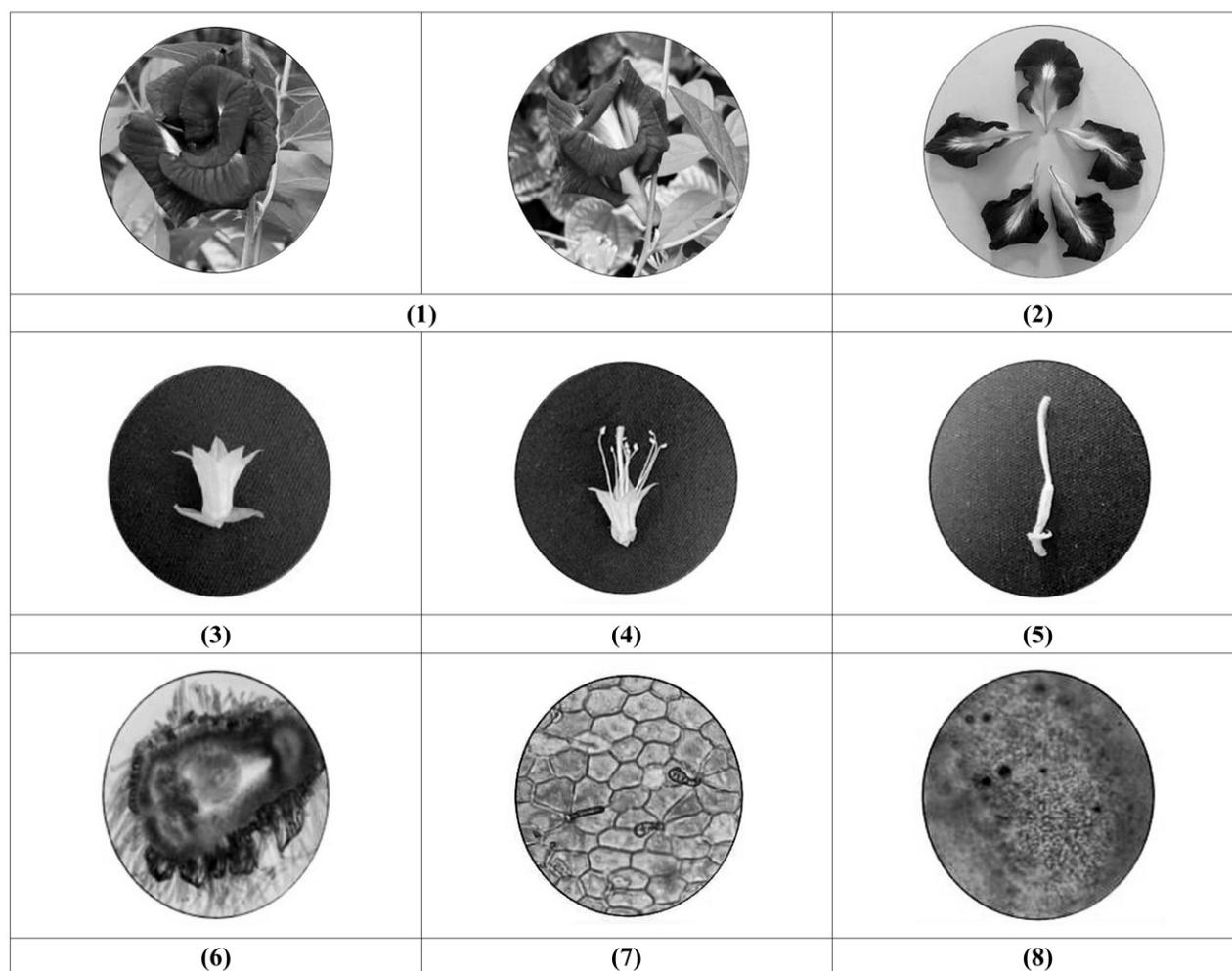


(*Clitoria ternatea* var. *ternatea* (cánh đơn) *Clitoria ternatea* var. *pleniflora* (cánh kép)

Hình 1. Mẫu tiêu bản khô



Hình 2. Giải phẫu học hoa Đậu biếc, thứ *Clitoria ternatea* var. *ternatea*
 (1) Hoa cánh đơn; (2) Cánh hoa; (3) Đài hoa; (4) Bộ nhị; (5) Bộ nhụy; (6) Bầu;
 (7) Mảnh biểu bì cánh hoa; (8) Bao phấn



Hình 3. Giải phẫu học hoa Đậu biếc, thứ *Clitoria ternatea* var *pleniflora*
 (1) Hoa cánh kép; (2) Cánh hoa; (3) Đài hoa; (4) Bộ nhị; (5) Bộ nhụy; (6) Bầu;
 (7) Mảnh biểu bì cánh hoa; (8) Bao phấn

3.2. Khảo sát sơ bộ hóa thực vật

Hoa cây Đậu biếc có chứa các hợp chất: Anthocyanin, flavonoid, carotenoid, tinh dầu, triterpenoid tự do, tannin, saponin, acid hữu cơ,

chất khử và hợp chất polyuronid, đặc biệt ghi nhận có khá nhiều anthocyanidin, một nhóm chất có tác dụng kháng oxy hóa. Kết quả định tính được trình bày ở Bảng 2.

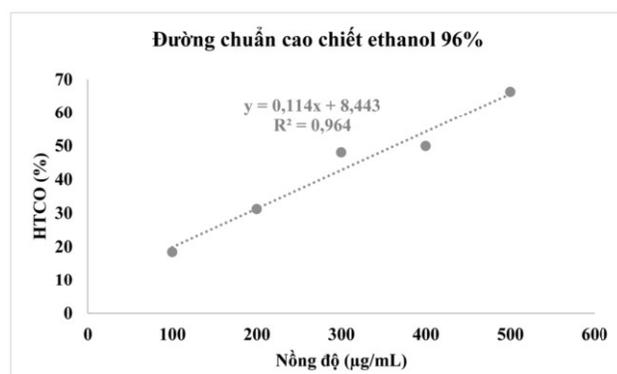
Bảng 2. Kết quả phân tích sơ bộ thành phần hóa thực vật Hoa Đậu biếc

Nhóm hợp chất	Thuốc thử/ Phản ứng	Kết quả định tính trên các dịch chiết			Kết quả chung
		Dịch ether	Dịch cồn 96%	Dịch nước	
Chất béo	Mờ giấy lọc	-			Không có
Carotenoid	Carr-Price	+			Có ít
Tinh dầu	Có mùi thơm	+			Có ít
Triterpenoid tự do	Liebermann-Burchard	+			Có ít
Alkaloid	Thuốc thử Dragendorff	-	-	-	Không có
Coumarin	Phát quang/kiềm	-	-		Không có

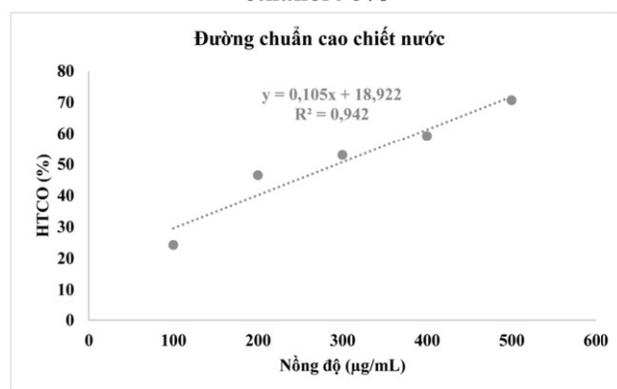
Anthranoid	KOH 10%	-	-	-	Không có
Glycosid tim	TT vòng lacton		-	-	Không có
	TT đường 2-desoxy		-	-	
Anthocyanin	HCl/ KOH		++	+++	Có nhiều
Flavonoid	Mg/HCl _{dd}		+++	++	Có nhiều
Proanthocyanin	HCl/t ^o		+	+	Có ít
Tannin	Dd FeCl ₃		+	+	Có ít
	Dd gelatin muối		+	+	
Saponin	Liebermann-Burchard				Có ít
	Lắc mạnh/nước		+	+	
Acid hữu cơ	Na ₂ CO ₃		+	+	Có ít
Chất khử	TT Fehling		+	+	Có ít
Hợp chất polyuronid	Pha loãng/ cồn			+	Có ít

3.3. Tác dụng kháng oxy hóa *in vitro*

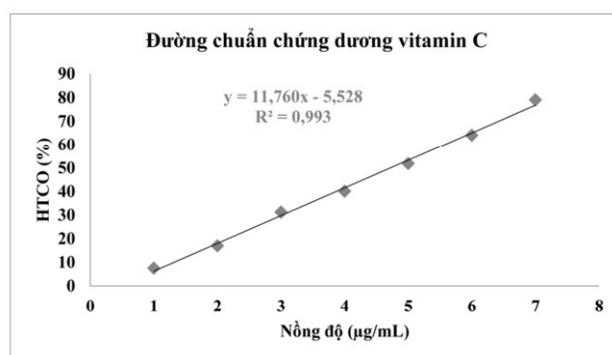
Kết quả về tác dụng kháng oxy hóa các cao chiết cồn 96%, cao nước của hoa cây Đậu biếc và chứng dương acid ascorbic được thể hiện lần lượt qua các Hình 4, Hình 5 và Hình 6.



Hình 4. Tác dụng kháng oxy hóa của cao chiết ethanol 96%



Hình 5. Tác dụng kháng oxy hóa của cao chiết nước



Hình 6. Tác dụng kháng oxy hóa của acid ascorbic (vitamin C)

Tác dụng loại bỏ gốc tự do của cao hoa cây Đậu biếc được xác định thông qua giá trị IC₅₀ được trình bày trong Bảng 3. Các mẫu có giá trị IC₅₀ càng nhỏ, hoạt tính kháng oxy hóa càng tốt.

Bảng 3. Phương trình hồi quy tuyến tính và giá trị IC₅₀

Mẫu	Phương trình hồi quy tuyến tính	IC ₅₀ (µg/mL)
Vitamin C	$y = 11,760x - 5,528$ ($R^2 = 0,993$)	4,72
Cao chiết ethanol (96%)	$y = 0,114x + 8,443$ ($R^2 = 0,964$)	362,94
Cao chiết nước	$y = 0,105x + 18,922$ ($R^2 = 0,942$)	297,39

Tác dụng kháng oxy bằng phương pháp DPPH của cao ethanol (96%) và cao nước hoa Đậu biếc có khả năng trung hòa gốc tự do DPPH với giá trị IC₅₀

tương ứng là 362,94 $\mu\text{g}/\text{mL}$ và 297,39 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Kết quả cho thấy rằng cao chiết nước có khả năng kháng oxy hóa, loại bỏ gốc tự do tốt hơn cao ethanol 96%, mặc dù vẫn thấp hơn chứng dương acid ascorbic. Vitamin C ức chế gốc tự do tốt hơn cao ethanol 96% gấp 77 lần và 63 lần đối với cao nước. Đây là một kết quả tiềm năng để minh chứng việc sử dụng dược liệu này có tác dụng kháng oxy hóa theo kinh nghiệm dân gian. Với kết quả trên cho thấy dược liệu hoa Đậu biếc cho tác dụng kháng oxy hóa đã biết từ lâu nay. Đây là mô hình sàng lọc kinh điển ban đầu, kết quả này giúp định hướng sâu hơn và có ý nghĩa hơn giúp nâng cao giá trị sử dụng dược liệu hoa Đậu biếc.

4. Kết luận

Nghiên cứu đã phân tích được đặc điểm thực vật học, định danh chính thức cho loài và thứ của Hoa đậu biếc tại Bạc Liêu. Ngoài ra, tác dụng kháng oxy hóa *in vitro* trên mô hình quét gốc tự do DPPH bước đầu đã góp phần sàng lọc và chứng minh tác dụng sinh học của loài thực vật này.

Lời cảm ơn

Đề tài được thực hiện dưới sự hỗ trợ của Trường Cao đẳng Y tế Bạc Liêu và Sở Khoa học và Công nghệ tỉnh Bạc Liêu.

Tài liệu tham khảo

- Bộ môn Dược liệu. (2017). *Giáo trình phương pháp nghiên cứu dược liệu*, Khoa Dược - Đại học Y Dược Thành phố Hồ Chí Minh.
- Kamkaen N., Wilkinson J. (2009). The antioxidant activity of Clitoria ternatea flower petal extracts and eye gel. *Phytotherapy Research*, 23(11), 1624-1625.
- Kumar S., Bhat K. (2011). In-vitro cytotoxic activity studies of Clitoria ternatea linn flower extracts, *Int J. Pharma Sci. Rev Res.*, 6, 120-121.
- Phrueksanan W., Yibchok-anun S., Adisakwattana S. (2014). Protection of Clitoria ternatea flower petal extract against free radical-induced hemolysis and oxidative damage in canine erythrocytes. *Research in veterinary science*, 97(2), 357-363.
- Võ Văn Chi. (2012). *Từ điển cây thuốc Việt Nam*, Hà Nội; NXB Y học. Tập 1, 883-885.