

HÀM LƯỢNG POLYPHENOL, FLAVONOID VÀ HOẠT TÍNH CHỐNG OXY HÓA CỦA CAO CHIẾT HOA ĐẬU BIẾC (*Clitoria ternatea* L.)

Trì Kim Ngọc*, Huỳnh Phạm Thanh Thảo, Nguyễn Ngọc Yên,
Trần Hạnh Dung và Phạm Thành Trọng
Trường Đại học Tây Đô
(*Email: tkngoc@tdu.edu.vn)

Ngày nhận: 23/8/2021

Ngày phản biện: 05/09/2021

Ngày duyệt đăng: 01/12/2021

TÓM TẮT

Đậu biếc (Clitoria ternatea L.) là loài cây địa phương được trồng nhiều ở các nước có khí hậu nhiệt đới, nóng ẩm nằm trong khu vực Đông Nam Á. Trong hoa Đậu biếc có chứa nhiều nhóm hợp chất tự nhiên như: Flavonoid, polyphenol, anthocyanin, mome inositol, pentanal, cyclohexen, acid acetic... Mục tiêu của nghiên cứu nhằm định lượng polyphenol, flavonoid, khảo sát hoạt tính ức chế tế bào ung thư gan và ung thư vú, hoạt tính chống oxy hóa của các cao chiết từ hoa Đậu biếc. Kết quả nghiên cứu cho thấy hàm lượng polyphenol được xác định bằng phương pháp Folin-Ciocalteu trong mẫu cao chiết từ dung môi ethanol 96% (E-CT: $17,84 \pm 0,40$ mg GA/g dược liệu khô) thấp hơn mẫu cao chiết nước (W-CT: $30,70 \pm 0,07$ mg GA/g dược liệu khô). Hàm lượng flavonoid được xác định bằng phương pháp tạo phức màu với $AlCl_3$ của cao chiết ethanol 96% (E-CT: $19,43 \pm 5,09$ mg QE/g dược liệu khô) cao hơn so với cao chiết nước (W-CT: $13,18 \pm 3,01$ mg QE/g dược liệu khô). Thử nghiệm SRB (Sulforhodamine B) cho thấy kết quả của cao chiết ethanol 96% và cao chiết nước đều không có khả năng gây độc đối với tế bào ung thư gan và tế bào ung thư vú. Sau khi thực hiện thử nghiệm loại gốc tự do DPPH ở bước sóng 517 nm cho thấy hoạt tính chống oxy hóa khá cao với các giá trị IC_{50} là: Cao chiết nước (W-CT: $IC_{50} = 17,02$ μ g/mL), cao chiết cồn (E-CT: $IC_{50} = 10,10$ μ g/mL). Phân tích bằng thống kê Pearson correlation cho kết quả hàm lượng flavonoid tỉ lệ thuận với khả năng kháng oxy hóa của các cao chiết.

Từ khóa: *Clitoria ternatea, chống oxy hóa, Đậu biếc, flavonoid, polyphenol, ức chế tế bào ung thư*

Trích dẫn: Trì Kim Ngọc, Huỳnh Phạm Thanh Thảo, Nguyễn Ngọc Yên, Trần Hạnh Dung và Phạm Thành Trọng, 2021. Hàm lượng polyphenol, flavonoid và hoạt tính chống oxy hóa của cao chiết hoa Đậu biếc (*Clitoria ternatea* L.). Tạp chí Nghiên cứu khoa học và Phát triển kinh tế Trường Đại học Tây Đô. 13: 241-254.

*Ths. Trì Kim Ngọc – Giảng viên Khoa Dược và Điều dưỡng, Trường Đại học Tây Đô

1. GIỚI THIỆU

Đậu biếc (*Clitoria ternatea* L.) là loài cây địa phương được trồng nhiều ở các nước có khí hậu nhiệt đới, nóng ẩm nằm trong khu vực Đông Nam Á. Ở nước ta, Đậu biếc có ở Quảng Ninh, Ninh Bình, Huế, Đà Nẵng, Khánh Hoà, Bình Thuận và đồng bằng sông Cửu Long. Do có màu sắc đẹp mắt, thu hút nên Đậu biếc được người dân trồng làm cây cảnh và sử dụng màu thực phẩm. Trong hoa Đậu biếc có chứa nhiều nhóm hợp chất tự nhiên như: Flavonoid, polyphenol, anthocyanin, mome inositol, pentanal, cyclohexen, acid acetic...(Terahara *et al.*, 1998; Kazuma *et al.*, 2003). Một số nghiên cứu cho thấy dịch chiết hoa Đậu biếc có rất nhiều hoạt tính dược lý như: Chống oxy hóa (Sittichai lamsaard, 2014), hạ đường huyết trên chuột bị đái tháo đường (Rajamanickam *et al.*, 2015), chống tế bào ung thư vú (Aker *et al.*, 2014), diệt bọt gây chống lại ấu trùng (Mathew *et al.*, 2009), ngăn ngừa béo phì (Võ Văn Chi, 2012), kháng các vi khuẩn: *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium*, *Klesiella pneumoniae*, *Pseudomonas aureginosa* (Niraj *et al.*, 2017) và ứng dụng trong sản xuất thực phẩm, dược mỹ phẩm (Pasukamonset *et al.*, 2016; Chusak *et al.*, 2018; Kamkaen *et al.*, 2009). Hoa Đậu biếc là nguồn nguyên liệu phong phú, dễ tìm và có nhiều tiềm năng nhưng cho đến nay các nghiên cứu trong nước về thành phần hóa học cũng như tác dụng sinh học của loài cây này còn khiêm tốn. Mục tiêu của nghiên cứu này nhằm định lượng polyphenol, flavonoid, khảo sát hoạt tính ức chế tế bào ung thư và hoạt tính chống

oxy hóa của các cao chiết từ hoa Đậu biếc.

2. PHƯƠNG TIỆN VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Chuẩn bị nguyên liệu

Hoa Đậu biếc được thu hái tại phường Phú Thứ, quận Cái Răng, thành phố Cần Thơ vào tháng 9/2019. Nguyên liệu được định danh bằng cách quan sát hình thái thực vật, khảo sát vi học và so sánh với tài liệu phân loại thực vật (Võ Văn Chi, 2018).

Sau khi thu hái, hoa được rửa sạch, để ráo, sấy ở 40 - 55 °C cho đến khi xác định độ ẩm không quá 13,0% và tiến hành xay thành bột. Mẫu được lưu tại Bộ môn Dược liệu - Dược học cổ truyền, Khoa Dược – Điều dưỡng, Trường Đại học Tây Đô.

Khối lượng: 400 g hoa Đậu biếc khô (độ ẩm 10,4%).

2.2. Dung môi, hóa chất, thuốc thử

Ethanol 96%, nước cất (Việt Nam), Methanol (Trung Quốc), DPPH (Sigma), acid gallic (Sigma), quercetin (Sigma), thuốc thử Folin-Ciocalteu (Sigma), acarbose (USA), enzym α -glucosidase (Sigma), chất nền ρ -nitrophenyl- α -D-glucopyranosid (Sigma), acid ascorbic (Sigma), trichloroacetic acid (Sigma), sulforhodamin B 0,2% (Sigma), HEPES, L-glutaminamphotericin B, penicillin G, streptomycin, dung dịch đệm phosphat 0,1 M, acid formic, acid acetic, FeCl₃, AlCl₃, NaNO₂, Na₂CO₃, NaOH (Trung Quốc) và một số hóa chất thường dùng trong phòng thí nghiệm.

2.3. Điều chế cao ethanol 96% và cao nước

Bột hoa Đậu biếc được chiết với dung môi ethanol 96% ở nhiệt độ 60 °C trong 120 phút, sau đó lọc thu dịch chiết. Cho dung môi mới vào bình chứa và tiếp tục quá trình chiết cho đến khi thử dịch chiết âm tính với thuốc thử FeCl₃ 5%. Tổng lượng dịch chiết ethanol 96% thu được là 4 L. Cô quay dịch chiết dưới áp suất giảm ở 50 °C thu được cao ethanol 96% (E-CT). Tiến hành quy trình tương tự với dung môi là nước thu được cao nước (W-CT) (Nguyễn Kim Phi Phụng, 2007).

2.4. Định lượng polyphenol trong các cao chiết

Hàm lượng polyphenol được xác định bằng phương pháp Folin-Ciocalteu

Trong thành phần thuốc thử Folin-Ciocalteu có phức hợp phospho-wolfarm-phosphomolybdat. Phức hợp này sẽ bị khử bởi các hợp chất polyphenol tạo thành sản phẩm phản ứng có màu xanh dương, hấp thụ cực đại ở bước sóng 765 nm. Hàm lượng polyphenol có trong mẫu tỉ lệ thuận với cường độ mẫu và được tính theo acid gallic (Yadav *et al.*, 2011).

Dùng methanol pha loãng 2 mẫu cao chiết (E-CT, W-CT) thành các dung dịch có nồng độ 1000 µg/mL và chất chuẩn acid gallic thành các nồng độ 20, 40, 60, 80, 100, 120 µg/mL. Pha thuốc thử Folin-Ciocalteu 10% bằng nước cất.

Lần lượt lấy 1 mL mẫu cần định lượng hoặc dung dịch acid gallic chuẩn cho vào ống nghiệm cùng với 2,5 mL thuốc thử Folin-Ciocalteu 10%, lắc đều và để yên 5 phút. Thêm tiếp 2 mL Na₂CO₃ 2%, lắc

đều. Để yên trong tối 2 giờ, tiến hành đo độ hấp thụ quang phổ ở bước sóng 765 nm. Thí nghiệm được lặp lại 3 lần, giá trị hấp thụ quang phổ (Abs) được ghi nhận để tiến hành vẽ đường thẳng hiệu chuẩn xác định hàm lượng polyphenol toàn phần trong các mẫu cao chiết.

Hàm lượng polyphenol toàn phần chứa trong mẫu cao chiết được đo lường bằng hàm lượng acid gallic đương lượng (GA) và được tính bằng công thức:

$$P = \frac{a \times V}{m} \times N \times H$$

Trong đó:

P: Hàm lượng polyphenol toàn phần (mg GA/g dược liệu khô)

a: Giá trị x từ đường chuẩn với acid gallic (µg/mL)

V: Thể tích dịch chiết (mL)

m: Khối lượng cao chiết có trong thể tích (g)

N: Độ ẩm của cao chiết (%)

H: Hiệu suất chiết cao (%)

2.5. Định lượng flavonoid trong các cao chiết

Hàm lượng flavonoid được xác định bằng phương pháp tạo phức màu với AlCl₃. Dựa vào sự tương quan giữa độ hấp thụ quang phổ của quercetin chuẩn tại bước sóng 510 nm với nồng độ quercetin (µg/mL) tương ứng trong các điều kiện xác định (Marinova *et al.*, 2005).

Dùng methanol pha loãng 2 mẫu cao chiết (E-CT, W-CT) thành các dung dịch có nồng độ 1000 µg/mL và chất chuẩn

quercetin thành các nồng độ 10, 20, 40, 60, 80 µg/mL. Pha các thuốc thử NaNO₂ 5%, AlCl₃ 10%, NaOH 1M bằng nước cất. Cho vào bình định mức (đã có sẵn 4 mL nước cất) 1 mL mẫu cần định lượng hoặc dung dịch quercetin chuẩn. Thêm tiếp vào bình định mức 0,3 mL NaNO₂ 5%, lắc đều, để yên 5 phút. Cho thêm vào 0,3 mL AlCl₃ 10%, lắc đều để yên 6 phút. Cho tiếp vào 2 mL NaOH 1M, lắc đều, bổ sung nước cất vừa đủ 10 mL. Để yên trong tối 1 giờ, sau đó tiến hành đo độ hấp thụ quang phổ ở bước sóng 510 nm. Thí nghiệm được lặp lại 3 lần, giá trị hấp thụ quang phổ (Abs) được ghi nhận để tiến hành vẽ đường thẳng hiệu chuẩn xác định hàm lượng flavonoid toàn phần trong các mẫu cao chiết.

Hàm lượng flavonoid toàn phần chứa trong mẫu cao chiết được đo lường bằng hàm lượng quercetin đương lượng (QE) và được tính bằng công thức:

$$F = \frac{c \times V}{m} \times N \times H$$

Trong đó:

F: Hàm lượng flavonoid toàn phần (mg QE/g dược liệu khô)

c: Giá trị x từ đường chuẩn với quercetin (µg/mL)

V: Thể tích dịch chiết (mL)

m: Khối lượng cao chiết có trong thể tích (g)

N: Độ ẩm của cao chiết (%)

H: Hiệu suất chiết cao (%)

2.6. Khảo sát hoạt tính ức chế tế bào ung thư

Khảo sát hoạt tính ức chế tế bào ung thư được thực hiện bằng thử nghiệm SRB (Sulforhodamine B). SRB là một thuốc nhuộm tích điện âm liên kết tĩnh điện được với các phân tích điện dương của protein. Lượng thuốc nhuộm liên kết phản ánh lượng protein tổng của tế bào. Trong thử nghiệm, tế bào được cố định, rửa và nhuộm với SRB. Sau đó SRB liên kết với protein tế bào được hòa tan tạo dung dịch trong suốt có màu hồng. Mật độ quang đo được của dung dịch tương quan với lượng protein tổng hay số lượng tế bào. Sự thay đổi lượng tế bào so với mẫu chứng phản ánh độc tính tế bào của chất nghiên cứu. Thí nghiệm được tiến hành tại phòng thí nghiệm Sinh học phân tử, Bộ môn Di truyền, trường ĐH Khoa Học Tự Nhiên trên 2 dòng tế bào ung thư gan Hep G2 và ung thư vú MCF-7 (USA).

Tế bào đơn được cấy trên những đĩa nuôi cấy 96 giếng với mật độ là 10⁴ tế bào/giếng, cấy trong môi trường E'MEM, HEPES (20 mM), amphotericin B (0,025 µg/mL), penicillin G (100 UI/mL), streptomycin (100 µg/mL), 10% huyết thanh nhau thai bò FBS và ủ ở 37 °C, 5% CO₂. Sau 24 giờ nuôi cấy, quần thể tế bào được ủ với chất khảo sát trong 48 giờ. Sau đó, protein tổng từ tế bào thử nghiệm được cố định bằng dung dịch trichloroacetic acid 50% lạnh và nhuộm với dung dịch sulforhodamin B 0,2%. Kết quả được đọc bằng máy ELISA reader ở hai bước sóng 492 nm và 620 nm. Các thí nghiệm được lặp lại ba lần và kết quả được trình bày dưới dạng giá trị trung bình ± độ lệch chuẩn.

Xử lý kết quả: Sau khi có giá trị mật độ quang ở bước sóng 492 nm và 620 nm (ký hiệu là OD₄₉₂ và OD₆₂₀):

- Tính giá trị OD = OD₄₉₂ - OD₆₂₀ (1)

- Tính OD₄₉₂ (hoặc OD₆₂₀) = OD_{tb} - OD_{blank} (2)

- Tính tỉ lệ (%) gây độc tế bào theo công thức:

$$\% I = \left(1 - \frac{OD_{TN}}{OD_C}\right) \times 100\%$$

Với:

- OD_{tb}: Giá trị OD của giếng có chứa tế bào

- OD_{blank}: Giá trị OD của giếng blank (không có tế bào)

- ODTN: Giá trị OD của mẫu thử tính từ công thức (1) và (2)

OD_C: Giá trị OD của mẫu chứng (control) tính từ công thức (1) và (2) IC₅₀ được xác định bằng cách sử dụng phần mềm Prism với phương pháp hồi quy không tuyến tính đa thông số và R² > 0,9.

2.7. Khảo sát hoạt tính chống oxy hóa

Hoạt tính chống oxy hóa được xác định bằng thử nghiệm với 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) (Kulisic *et al.*, 2004; Obeid *et al.*, 2005). DPPH là gốc tự do được dùng để thực hiện phản ứng mang tính chất sàng lọc hoạt tính chống oxy hóa (HTCO) của các chất nghiên cứu. Các mẫu cao và acid ascorbic được pha trong dung môi methanol với nồng độ là 20 µg/mL. 1 mL dung dịch mẫu thử được pha với 2 mL methanol và 1 mL dung dịch DPPH 0,5 nM trong methanol,

lắc đều và để yên trong tối 30 phút. Hoạt tính chống oxy hóa của các mẫu thử được thể hiện qua việc làm giảm màu của DPPH, được xác định bằng cách đo hỗn hợp dung dịch bằng máy hấp thụ quang phổ ở bước sóng 517 nm. Mẫu đối chứng được thực hiện bằng cách sử dụng 1 mL methanol thay thế cho dung dịch mẫu thử. Các mẫu được lặp lại 3 lần.

Hoạt tính chống oxy hóa HTCO (%) được tính theo công thức:

Trong đó:

$$HTCO(\%) = \frac{(OD_c - OD_t)}{OD_c} \times 100\%$$

OD_C: Mật độ quang của dung dịch đối chứng.

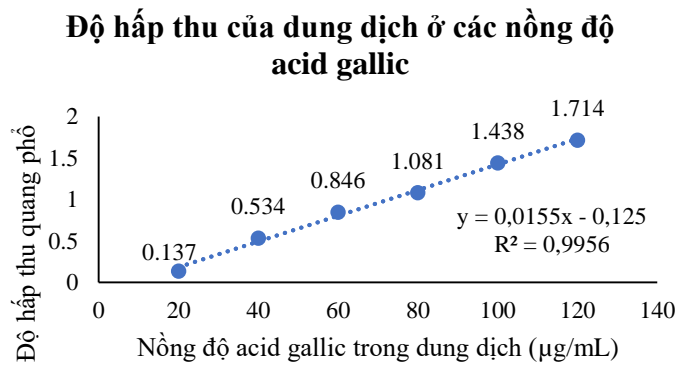
OD_T: Mật độ quang của dung dịch mẫu thử.

Từ dãy nồng độ mẫu thử đã pha và HTCO (%) tính toán được, phương trình hồi quy y = ax + b được xác định thể hiện mối tương quan giữa HTCO (%) (y) và nồng độ (x). IC₅₀ được xác định bằng cách thế y = 50 vào phương trình hồi quy. IC₅₀ mẫu thử có nồng độ càng thấp tức là mẫu thử có tác dụng loại bỏ gốc tự do càng mạnh.

3. KẾT QUẢ

3.1. Hàm lượng polyphenol toàn phần

Từ độ hấp thụ quang phổ và nồng độ chất chuẩn acid gallic, dựng được đường thẳng tuyến tính thể hiện sự tương quan giữa hàm lượng chất chuẩn và độ hấp thụ quang phổ của dung dịch. Kết quả thể hiện ở Hình 1.



Hình 1. Sự tương quan giữa hàm lượng acid gallic và độ hấp thu quang phổ của dung dịch

Từ phương trình đường thẳng tuyến tính của chất chuẩn acid gallic ($y = 0,0155x - 0,125$), thay giá trị độ hấp thu trung bình của các mẫu thử vào y, xác định được hàm lượng polyphenol có trong các mẫu cao chiết. Kết quả được thể hiện trong Bảng 1.

Bảng 1. Hàm lượng polyphenol trong các mẫu cao chiết

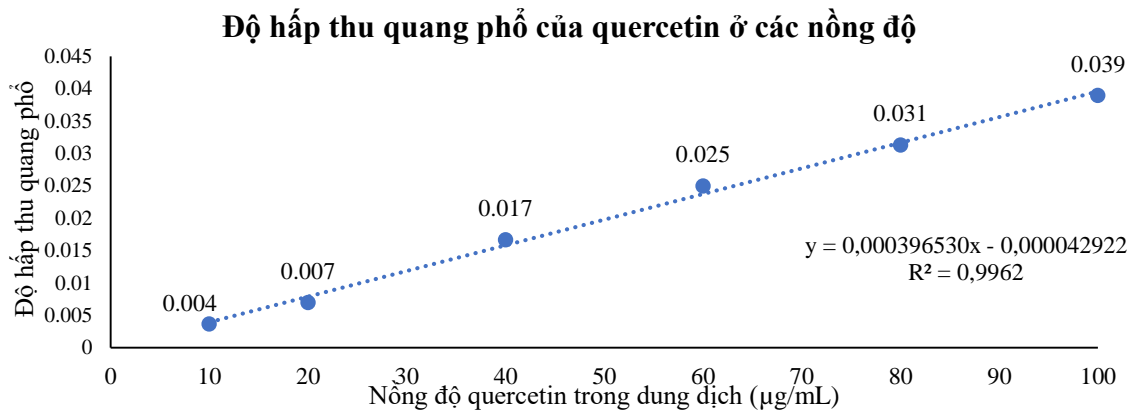
Mẫu	Hàm lượng polyphenol (mg GA/g dược liệu khô)
W-CT	$30,70 \pm 0,07^{(b)}$
E-CT	$17,84 \pm 0,40^{(a)}$

Trong cùng một cột, các số trung bình theo sau bởi một hoặc những chữ cái giống nhau thì khác biệt không có ý nghĩa thống kê ở mức ý nghĩa 5% bằng phép thử Tukey.

3.2. Hàm lượng flavonoid toàn phần

Từ độ hấp thu và nồng độ chất chuẩn quercetin, dựng được đường thẳng tuyến tính thể hiện sự tương quan giữa hàm lượng chất chuẩn và độ hấp thu quang phổ của dung dịch. Kết quả thể hiện ở Hình 2.

Từ phương trình đường thẳng tuyến tính của chất chuẩn quercetin ($y = 0,000396530x - 0,000042922$), thay giá trị độ hấp thu quang phổ trung bình của các mẫu thử vào y, xác định hàm lượng flavonoid có trong các mẫu cao chiết. Kết quả được thể hiện qua Bảng 2.



Hình 2. Sự tương quan giữa hàm lượng quercetin và độ hấp thu quang phổ của dung dịch

Bảng 2. Hàm lượng flavonoid trong các mẫu cao chiết

Mẫu	Hàm lượng flavonoid (mg QE/g dược liệu khô)
W-CT	13,18 ± 3,01 ^(d)
E-CT	19,43 ± 5,09 ^(c)

Trong cùng một cột, các số trung bình theo sau bởi một hoặc những chữ cái giống nhau thì khác biệt không có ý nghĩa thống kê ở mức ý nghĩa 5% bằng phép thử Tukey.

3.3. Hoạt tính ức chế tế bào ung thư

3.3.1. Tế bào ung thư gan Hep G2

Kết quả khảo sát hoạt tính ức chế tế bào ung thư gan Hep G2 và ung thư vú

MCF-7 của 2 mẫu cao E – CT và W – CT tại nồng độ 200 µg/mL thể hiện qua Bảng 3.

Bảng 3. Khả năng ức chế tế bào ung thư gan Hep G2 và ung thư vú MCF-7 của các mẫu cao chiết hoa Đậu biếc (%)

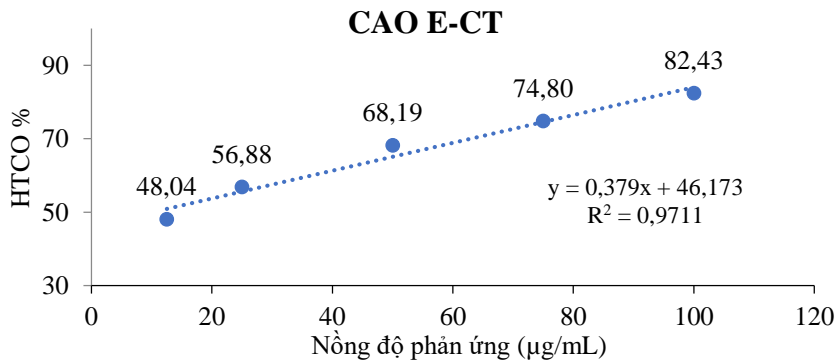
Cao chiết	Khả năng ức chế Hep G2	Khả năng ức chế MCF-7
E – CT	-5,94	5,48
W – CT	-6,77	4,10
Camptothecin	51,47	55,65

Dựa vào kết quả trên nhận thấy tại nồng độ 200 µg/mL hoa Đậu biếc không có hoạt tính ức chế tế bào ung thư gan Hep G2 và tế bào ung thư vú MCF-7 do tỷ lệ % ức chế quá thấp.

3.4. Hoạt tính chống oxy hóa

3.4.1. Hoạt tính chống oxy hóa của cao E-CT

Từ số liệu độ hấp thu quang phổ, tiến hành vẽ được đồ thị biểu diễn mối tương quan giữa nồng độ cao và phần trăm ức chế gốc tự do DPPH của cao E-CT.

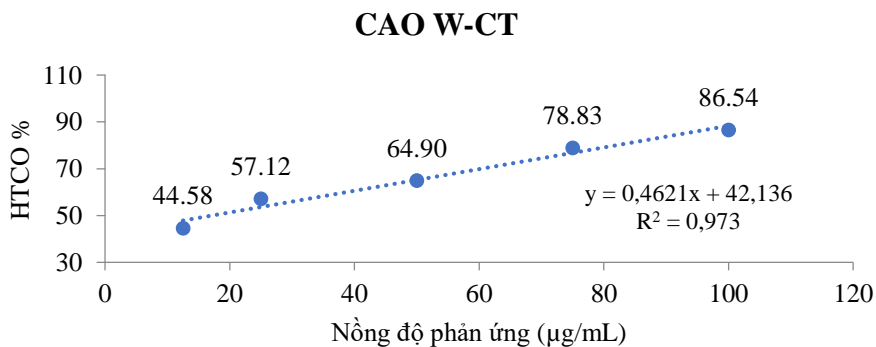


Hình 3. Đồ thị biểu diễn mối tương quan giữa nồng độ cao và phần trăm ức chế gốc tự do DPPH của cao E-CT

Dựa vào đồ thị, thay y = 50 suy ra giá trị IC₅₀ của cao E-CT là: IC₅₀ = 10,10 (µg/mL).

Từ số liệu độ hấp thu quang phổ, tiến hành vẽ được đồ thị biểu diễn mối tương quan giữa nồng độ cao và phần trăm ức chế gốc tự do DPPH của cao nước hoa Đậu biếc.

3.4.2. Hoạt tính chống oxy hóa của cao W-CT

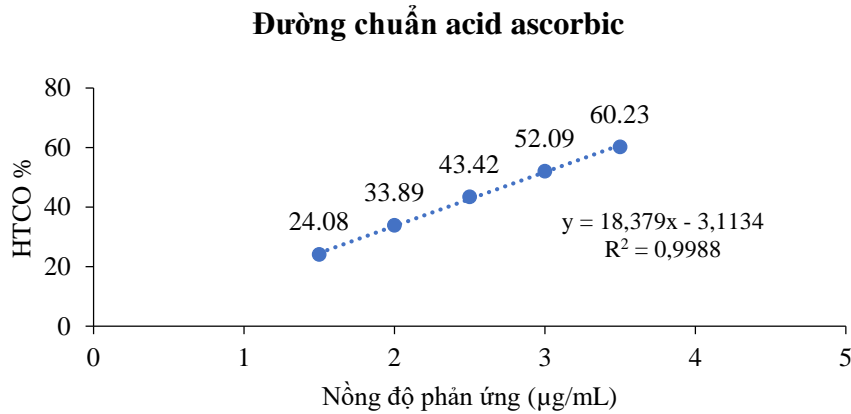


Hình 4. Đồ thị biểu diễn mối tương quan giữa nồng độ cao và phần trăm ức chế gốc tự do DPPH của cao W-CT

Dựa vào đồ thị, thay $y = 50$ suy ra giá trị IC_{50} của W-CT là: $IC_{50} = 17,02$ ($\mu\text{g/mL}$).

3.4.3. Hoạt tính chống oxy hóa của acid ascorbic

Từ số liệu độ hấp thu quang phổ, tiến hành dựng đường chuẩn acid ascorbic dựa vào phần trăm ức chế và nồng độ acid ascorbic.



Hình 5. Đồ thị biểu diễn sự tương quan giữa hoạt tính ức chế gốc tự do và nồng độ của acid ascorbic

Dựa vào đồ thị, thay $y = 50$ suy ra giá trị IC_{50} của cao acid ascorbic là: $IC_{50} = 2,89$ ($\mu\text{g/mL}$). Giá trị IC_{50} của các cao

chiết hoa Đậu biếc và acid ascorbic được thể hiện trong Bảng 4.

Bảng 4. Giá trị IC_{50} của các cao hoa Đậu biếc và acid ascorbic

Mẫu thử	Giá trị IC_{50} ($\mu\text{g/mL}$)
W-CT	17,02
E-CT	10,10
Acid ascorbic	2,89

Sự tương quan giữa hàm lượng polyphenol, flavonoid và giá trị IC_{50} hoạt tính chống oxy hóa của các cao chiết

được phân tích bằng thống kê Pearson correlation, kết quả được thể hiện trong Bảng 5.

Bảng 5. Tương quan giữa hàm lượng polyphenol, flavonoid và giá trị IC₅₀ hoạt tính chống oxy hóa của các cao chiết thông qua thống kê Pearson correlation

Hệ số tương quan Pearson (r)	Flavonoid	Polyphenol	IC ₅₀
Flavonoid	1	-1,000**	-1,000**
Polyphenol	-1,000**	1	1,000**
IC ₅₀	-1,000**	1,000**	1

** Tương quan có ý nghĩa thống kê ở mức ý nghĩa 0,01

4. THẢO LUẬN

Kết quả định lượng các mẫu cao chiết hoa Đậu biếc cho thấy hàm lượng polyphenol trong mẫu cao chiết từ dung môi ethanol 96% (*E-CT*: $17,84 \pm 0,40$ mg GA/g dược liệu khô) thấp hơn gần 2 lần mẫu cao chiết nước (*W-CT*: $30,70 \pm 0,07$ mg GA/g dược liệu khô). Tuy nhiên hàm lượng flavonoid ở cao chiết ethanol 96% (*E-CT*: $19,43 \pm 5,09$ mg QE/g dược liệu khô) cao hơn cao chiết nước (*W-CT*: $13,18 \pm 3,01$ mg QE/g dược liệu khô) 1,5 lần. Một nghiên cứu có thể tham khảo về định lượng polyphenol và flavonoid toàn phần, thực hiện đối với cao chiết hoa Đậu biếc với dung môi là ethanol 40%, 50% và nước cất, được chiết xuất bằng cả hai phương pháp ngâm lạnh và dùng sóng siêu âm. Kết quả cho thấy lượng polyphenol toàn phần và flavonoid toàn phần ở cao cồn cao hơn cao nước (Srichaikul, 2018). Quá trình càng nhiều bước tương ứng với kết quả có độ nhạy và chọn lọc cao, tuy nhiên cũng tăng sai số trong quá trình thao tác. Quá trình chiết cũng góp phần ảnh hưởng đến kết quả phân tích hàm lượng polyphenol và flavonoid. Các dung môi chiết thường được sử dụng là cồn (ethanol và methanol), acetone, diethyl ete và ethyl acetat. Tuy nhiên, không thể chiết hoàn toàn acid phenolic (acid benzoic, acid

cinnamic) bằng dung môi hữu cơ nguyên chất, hỗn hợp cồn hay acetone (Stalikas *et al.*, 2007). Không những vậy, phương pháp chiết cũng là một yếu tố quan trọng trong khảo sát định lượng một hợp chất. Khảo sát của Yung *et al.*, 2010, thực hiện chiết nóng *Centella asiatica* ở 90 °C cho thấy rằng hàm lượng polyphenol toàn phần cao hơn phương pháp ngâm lạnh nhưng lại ảnh hưởng đến độ pH của dịch chiết, dẫn đến rút ngắn thời gian bảo quản mẫu. Phương pháp dùng sóng siêu âm có mang lại hữu ích hơn hai phương pháp nêu trên khi rút ngắn thời gian chiết cũng như lượng dung môi tiêu thụ cần thiết, cách tiến hành đơn giản và chi phí công nghệ thấp. Tuy nhiên phương pháp này có một nhược điểm chính là khi sử dụng năng lượng siêu âm trên 20 kHz có thể ảnh hưởng đến tính chất hóa học của các hợp chất thông qua sự hình thành của các gốc tự do (Azwanida, 2015; Yung *et al.*, 2010; Yingngam *et al.*, 2014).

Theo kết quả thì cao chiết ethanol 96% và cao chiết nước đều không thể hiện hoạt tính gây độc tế bào ung thư gan Hep G2 và tế bào ung thư vú MCF-7. Điều này tương đồng với nghiên cứu của Neda *et al.*, (2013) về độc tính của hoa Đậu biếc các dòng tế bào ung thư trong đó có Hep G2 và MCF-7 ở cao chiết nước và methanol được chiết xuất bằng phương

pháp ngâm lạnh, thực hiện khảo sát hoạt tính kháng ung thư bằng phương pháp MTT. Cao còn gần như không ảnh hưởng tới sự tăng trưởng của tế bào ung thư gan Hep G2 khi giá trị IC_{50} khá cao (với $IC_{50} = 5214,1 \mu\text{g/mL}$) và kể cả đối với các dòng tế bào ung thư CaOV3, HeLa cũng không có sự ức chế (Neda *et al.*, 2013). Tuy nhiên, ở nghiên cứu của Rajan *et al.*, 2011 chứng minh rằng cao chiết petroleum ether của Đậu biếc có khả năng gây độc dòng tế bào ung thư gan Hep G2 khi khảo sát bằng phương pháp MTT (Rajan *et al.*, 2011).

Trong nghiên cứu này, hoạt tính chống oxy khá cao của các mẫu cao chiết với các giá trị IC_{50} thu được là: W-CT (17,02 $\mu\text{g/mL}$) và E-CT (10,10 $\mu\text{g/mL}$) cao hơn so với giá trị IC_{50} của acid ascorbic ($IC_{50} = 2,89 \mu\text{g/mL}$). Do đó hoạt tính kháng oxy hoá của cao nước thấp hơn khoảng 5,88 lần và cao cồn thấp hơn khoảng 3,29 lần so với acid ascorbic. Tuy nhiên với giá trị IC_{50} 17,02 $\mu\text{g/mL}$ (W-CT) và 10,10 $\mu\text{g/mL}$ (E-CT) cũng chứng minh được hoa Đậu biếc có hoạt tính chống oxy hoá cao. Phù hợp với kết quả nghiên cứu của Sitthichai lamsaard (2014) tại Thái Lan về hoạt tính chống oxy hoá của hoa Đậu biếc, với giá trị IC_{50} của dịch chiết nước ($84,15 \pm 15 \mu\text{g/mL}$) cao hơn giá trị IC_{50} của acid ascorbic ($5,34 \pm 0,09 \mu\text{g/mL}$) nên hoạt tính chống oxy hoá của dịch chiết nước thấp hơn acid ascorbic khoảng 15,75 lần (Sitthichai lamsaard, 2014). Kết quả của sự khác biệt này có thể do một số yếu tố ảnh hưởng đến hoạt chất trong cây như khí hậu, thổ nhưỡng hoặc có thể do điều kiện thực nghiệm khác nhau...

Kết quả hàm lượng flavonoid và IC_{50} tương quan nghịch có ý nghĩa thống kê nghĩa là trong dược liệu hàm lượng flavonoid càng tăng thì IC_{50} càng giảm đồng thời khả năng chống oxy hóa càng cao; hay hàm lượng flavonoid tỉ lệ thuận với khả năng kháng oxy hóa. Điều này phù hợp với các nghiên cứu trước đây về mối liên quan giữa cấu trúc của các flavonoid và tác dụng chống oxy hóa (Trần Thành Đạo và *cs.*, 2019). Mặc khác trong nghiên cứu này, kết quả hàm lượng flavonoid và polyphenol không thể hiện tương quan thuận cho thấy ảnh hưởng của các loại dung môi lên hiệu quả chiết xuất. Dung môi ethanol có khuynh hướng chiết được nhiều flavonoid trong khi dung môi nước phù hợp với các hợp chất polyphenol. Điều này được giải thích: Flavonoid chỉ là một trong các nhóm chất polyphenol, ngoài ra các hợp chất polyphenol trong cây còn có các tannin, acid phenolic... rất phân cực (Elmas Özeke, 1999).

Đề nghị tiếp tục sử dụng các mẫu cao chiết để khảo sát các hoạt tính sinh học khác như: Kháng viêm, kháng khuẩn, kháng nấm. Hướng tới điều chế cao phân đoạn, sản xuất trà, mỹ phẩm, thực phẩm chức năng từ hoa Đậu biếc để nâng cao giá trị sử dụng của dược liệu này.

5. KẾT LUẬN

Nghiên cứu cho thấy trong hoa Đậu biếc (*Clitoria ternatea* L.) có chứa hàm lượng lớn polyphenol và flavonoid. Hàm lượng polyphenol trong mẫu cao chiết từ dung môi ethanol 96% thấp hơn mẫu cao chiết nước. Hàm lượng flavonoid của cao

chiết ethanol 96% cao hơn cao chiết nước.

Các mẫu cao chiết không thể hiện khả năng ức chế tế bào ung thư gan Hep G2 và tế bào ung thư vú MCF-7. Tuy nhiên, kết quả từ các mẫu cao chiết cho thấy hoạt tính chống oxy hóa của hoa Đậu biếc là khá cao. Hàm lượng flavonoid tỉ lệ thuận với khả năng kháng oxy hóa của các cao chiết.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Akter R., Uddin S. J., Grice I. D. and Tiralongo E., 2014. Cytotoxic activity screening of Bangladeshi medicinal plant extracts. *Journal of Natural Medicines*. Vol. 68(1).p. 246-252.
2. Azwanida N. N., 2015. A review on the extraction methods use in medicinal plants, principle, strength and limitation. *Med Aromat Plants*. Vol.4(196).p. 2167-0412.
3. Chusak C., Henry C., Chantarasinlapin P., Techasukthavorn V. and Adisakwattana S., 2018. Influence of *Clitoria ternatea* flower extract on the in vitro enzymatic digestibility of starch and its application in bread. *Foods* 7:102. doi: 10.3390/foods7070102.
4. Chusak C., Thilavech T., Henry C. J. and Adisakwattana S., 2018. Acute effect of *Clitoria ternatea* flower beverage on glycemic response and antioxidant capacity in healthy subjects: a randomized crossover trial. *BMC Complement. Altern. Med.* 18:6. doi: 10.1186/s12906-017-2075-7.
5. Escher G. B., Marques M. B., Carmo M. A. V., Azevedo L., Furtado M. M., Sant'Ana A. S. and Oh W. Y., 2019. *Clitoria ternatea* L. petal bioactive compounds display antioxidant, antihemolytic and antihypertensive effects, inhibit α -amylase and α -glucosidase activities and reduce human LDL cholesterol and DNA induced oxidation. *Food Research International*. Vol. (128). p.108763.
6. HuaQiang Dong, Mei Li, Feng Zhu, Fu Lai Liu, Jian Bo Huang, 2012. Inhibitory potential of trilobatin from *Lithocarpus polystachyus* Rehd against α -glucosidase and α -amylase linked to type 2 diabetes. *Food Chemistry*. 130.p.261–266.
7. Kamkaen N. và Wilkinson J., 2009. Các hoạt động chống oxy hóa của chiết xuất cánh hoa *Clitoria ternatea* L. và gel mắt. *Nghiên cứu tế bào học*. 23 (11).p.1624 – 1625, 2832.
8. Kazuma K., 2003. Malonylated flavonol glycosides from the petals of *Clitoria ternatea*. *Phytochemistry*. Vol. 62 (2). p. 229–237.
9. Marinova D., Ribarova F. and Atanassova M., 2005. Total phenolics and total flavonoids in Bulgarian fruits and vegetables. *Journal of the University of Chemical Technology and Metallurgy*. Vol. 40. p. 255-260.
10. Mathew N., Anitha M. G., Bala T. S. L., Sivakumar S. M., Narmadha R. and Kalyanasundaram M, 2009. Larvicidal activity of *Saraca indica*, *Nyctanthes arbor-tristis*, and *Clitoria*

ternatea extracts against three mosquito vector species. Parasitology research. Vol. 104(5). p. 1017-1025.

11. Nguyễn Kim Phi Phụng, 2007. Phương pháp cô lập hợp chất hữu cơ. NXB Đại học Quốc gia TP Hồ Chí Minh, tr 28-33, 181-200.

12. Niraj Kumar Singh, Jeetendra Kumar Gupta, Kamal Shah, 2017. A review on *Clitoria ternatea* (Linn): Chemistry and Pharmacology. OMICS Group eBooks.

13. Elmas Özeker, 1999. Phenolic compounds and their importance. Journal of AARI. Vol.9(2). p. 114-124.

14. Pasukamonset P., Kwon O. and Adisakwattana S., 2016. Alginate-based encapsulation of polyphenols from *Clitoria ternatea* petal flower extract enhances stability and biological activity under simulated gastrointestinal conditions. Food Hydrocolloids. Vol. 61. p. 772-779.

15. Rajamanickam M., Kalaivanan P. and Sivagnanam I., 2015. Evaluation of anti-oxidant and anti-diabetic activity of flower extract of *Clitoria ternatea* L. J Appl Pharm Sci. Vol.5(8). p.131-8.

16. Rajan M. S. D., Vijaya T. and Thenmozhi D. V., 2011. *In vitro* cytotoxic activity of *Clitoria ternatea*. International Journal of Universal Pharmacy and Life Sciences. Vol. 1(1). p. 19-28.

17. Sitthichai Iamsaard, Jaturon Burawat, Pipatpong Kanla, Supatcharee Arun, Wannisa Sukhorum, Bungorn Sripanidkulchai, Nongnut Uabundit,

Jintanaporn Wattathorn, Wiphawi Hipkaeo, Duriya Fongmoon, Hisatake Kondo, 2014. Antioxydant activity and protective effect of *Clitoria ternatea* flower extract on testicular damage induced by ketoconazole in rats. Journal of Zhejiang University-Science B. Vol. 15(6). p. 548-555.

18. Srichaikul B., 2018. Ultrasonication extraction, bioactivity, antioxidant activity, total flavonoid, total phenolic and antioxidant of *Clitoria ternatea* Linn flower extract for anti-aging drinks. Pharmacognosy Magazine. Vol.14(56). p. 322.

19. Stalikas C. D., 2007. Extraction, separation, and detection methods for phenolic acids and flavonoids. Journal of Separation Science. Vol. 30(18). p. 3268-3295.

20. Terahara N., Toki K., Saito N., Honda T., Matsui T. and Osajima Y., 1998. Eight new anthocyanins, ternatins C1-C5 and D3 and preternatins A3 and C4 from young *Clitoria ternatea* flowers. Journal of Natural Products. Vol. 61(11). p. 1361.

21. Trần Thành Đạo, Vũ Thúy Tuyên, Thái Khắc Minh, 2019. Tổng hợp và khảo sát hoạt tính chống oxy hóa của một số dẫn chất flavonoid. Tạp chí Y Học Thành Phố Hồ Chí Minh. Tập 23, số 2. Trang 153-161.

22. Võ Văn Chi, 2012. Từ điển cây thuốc Việt Nam. NXB Y học, tập 2, tr. 152 – 152.

23. Võ Văn Chi, 2018. Từ điển cây thuốc Việt Nam, tập I. Nhà xuất bản Y học. tr. 613-614.

24. Yadav R. N. S. and Agarwala M., 2011. Phytochemical analysis of some medicinal plants. Journal of Phytology. Vol 3. p. 10-14.

25. Yingngam B., Monschein M. and Brantner, A., 2014. Ultrasound-assisted extraction of phenolic compounds from *Cratoxylum formosum* ssp. *formosum*

leaves using central composite design and evaluation of its protective ability against H₂O₂-induced cell death. Asian Pacific Journal of Tropical Medicinm. Vol. 7. p.S497-S505.

26. Yung O. H., Maskat M. Y. and Mustapha W. A. W., 2010. Effect of extraction on polyphenol content, antioxidant activity and pH in pegaga (*Centella asiatica*) extract. Sains MalaMalays. Vol. 39(5). p. 747-752.

CONTENT OF POLYPHENOL, FLAVONOID AND ANTIOXIDANT ACTIVITIES OF *Clitoria ternatea* L.

Tri Kim Ngoc*, Huynh Pham Thanh Thao, Nguyen Ngoc Yen,
Tram Hanh Dung and Pham Thanh Trong

Tay Do University

(*Email: tkngoc@tdu.edu.vn)

ABSTRACT

Butterfly pea (Clitoria ternatea L.) is a local plant grown in tropical and humid countries in Southeast Asia. Clitoria ternatea L. flowers contain natural compounds such as: Flavonoids, polyphenols, anthocyanins, mome inositol, pentanal, cyclohexene, acetic acid... The objectives of this study were to quantify the content of polyphenol, flavonoid, the inhibition of cancer cells, and antioxidant activity of the extracts from Clitoria ternatea L. flowers. Results showed that polyphenol content determined by Folin-Ciocalteu method in the extracts from ethanol solvents 96% (E-CT: 17.84 ± 0.40 mg GA/g dried herb) was lower than water extract (W-CT: 30.70 ± 0.07 mg GA/g dried herb). Flavonoid content determined by colorimetric method with AlCl₃ of ethanol 96% extract (E-CT: 19.43 ± 5.09 mg QE/g dried herb) was higher than the water extract (W-CT: 13.18 ± 3.01 mg QE/g dried herb). The SRB test (Sulforhodamine B) resulted in being non-toxic to liver or breast cancer cells in both ethanol 96% extract and water extract. DPPH free radical scavenging test at 517 nm showed quite high antioxidant activity with IC₅₀ values: Water extract (W-CT: IC₅₀ = 17.02 µg/mL), alcohol extract (E-CT: IC₅₀ = 10.10 µg/mL). Pearson correlation statistical analysis showed that the flavonoid content was proportional to the antioxidant capacity of the extracts.

Keywords: *Clitoria ternatea*, antioxidant, butterfly pea, flavonoids, polyphenols, inhibition cancer cells