

KHẢO SÁT HÀM LƯỢNG FLAVONOID TỔNG SỐ VÀ HOẠT TÍNH CHỐNG GỐC TỰ DO CỦA CAO CHIẾT TỪ MỘT SỐ LOẠI ĐẬU TRÊN THỊ TRƯỜNG VIỆT NAM

NGUYỄN THỊ THU THỦY ⁽¹⁾, ĐÀO NGUYỄN MẠNH ⁽¹⁾

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Flavonoid là nhóm hoạt chất thường gặp trong nhiều loại thực vật với nhiều hoạt tính sinh học quý như hoạt tính gây độc tế bào ung thư, kháng viêm, hoặc chống oxy hóa [1]. Nhiều nghiên cứu đã chỉ ra rằng, các flavonoid chiếm thành phần đáng kể trong các loại đậu, như vitexin và isovitexin trong đậu xanh (*Vigna radiata*) [2], myricetin 3-*O*-glucoside, quercetin 3-*O*-glucoside, kaempferol 3-*O*-(6"-malonyl) glucoside và kaempferol 3-*O*-(malonyl) glucoside trong đậu cove (*Phaseolus vulgaris*) [3], catechin-7-*O*-glucoside trong đậu đen (*Vigna unguiculata*) [4] và đậu đỏ (*Vigna angularis*) [5]. Bởi vậy, các loại đậu kể trên có thể là nguồn nguyên liệu sẵn có và quý giá để tạo các chế phẩm thiên nhiên giàu flavonoid với nhiều hoạt tính sinh học quý giá. Việc so sánh hàm lượng flavonoid tổng số cũng như khảo sát hoạt tính chống gốc tự do của cao chiết từ các loại đậu là việc làm cần thiết để lựa chọn chính xác các nguồn nguyên liệu cho việc tạo chế phẩm có chất lượng cao, ứng dụng trong y học và đời sống.

Trong nghiên cứu này, chúng tôi khảo sát hàm lượng flavonoid tổng số trong một số mẫu thuộc 4 loài phổ biến là đậu xanh (*Vigna radiata*), đậu cove (*Phaseolus vulgaris*), đậu đen (*Vigna unguiculata*) và đậu đỏ (*Vigna angularis*). Bên cạnh đó, hoạt tính chống gốc tự do DPPH của cao chiết từ các loại đậu cũng được khảo sát.

2. ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Thu thập và xử lý mẫu

23 mẫu đậu thuộc bốn loài đậu xanh (*Vigna radiata*) (mẫu GB1-GB5, hạt đậu xanh còn nguyên vỏ), đậu cove (*Phaseolus vulgaris*) (CV1-CV4, quả đậu trưởng thành, nguyên hạt), đậu đen (*Vigna unguiculata*) (BB1-BB4, hạt đậu đen nguyên vỏ) và đậu đỏ (*Vigna angularis*) (RB1-RB4, hạt đậu đỏ, nguyên vỏ) được thu thập tại một số chợ và một số siêu thị trên địa bàn thành phố Hà Nội. Các mẫu được mã hóa theo tên khoa học của loài và đánh số để phân biệt dựa theo nơi thu mua. Mẫu được thu với lượng tối thiểu là 100 g/mẫu, được sấy khô trong tủ sấy ở 55°C rồi nghiền thành bột và bảo quản ở -20°C cho tới khi sử dụng.

2.2. Phương pháp tạo cao chiết

Cân 10,00 ± 0,02 g bột mỗi loại đậu, chiết với 50 mL ethanol 96% trong bể rung siêu âm ở 50°C trong vòng 30 phút, sau đó ly tâm lấy dịch chiết. Phần bã được chiết lại thêm 2 lần với cùng điều kiện. Toàn bộ dịch chiết được gộp với nhau, cất loại hoàn toàn dung môi để thu được cao chiết. Hiệu suất chiết được trình bày trong Bảng 1.

2.3. Phương pháp đánh giá hàm lượng flavonoid tổng số

Hàm lượng flavonoid tổng số được xác định theo phương pháp của Chandra và cộng sự [6] với một số điều chỉnh. Chất chuẩn quercetin (Sigma-Aldrich, Hoa Kỳ) được pha trong ethanol 96% ở các nồng độ 10, 40, 80, 120, 160, 200 và 300 µg/mL. Trong khi đó, các mẫu cao chiết được pha trong ethanol 96% ở nồng độ 1 mg/mL. Thêm 100 µL dung dịch NaNO₂ 5% vào 500 µL mỗi dung dịch chất chuẩn quercetin hoặc dung dịch mẫu thử, trộn đều và để ở nhiệt độ phòng trong 5 phút, sau đó thêm tiếp 100 µL dung dịch AlCl₃ 10%, trộn đều và để ổn định ở nhiệt độ phòng trong 5 phút. Cuối cùng, thêm 500 µL NaOH 1M vào hỗn hợp phản ứng và ủ ở nhiệt độ phòng trong 15 phút. Chuyển các dung dịch sau phản ứng vào phiến 96 giếng và đo mật độ quang ở bước sóng 510 nm.

Hàm lượng flavonoid tổng số trong mỗi mẫu cao chiết được tính từ phương trình đường chuẩn quercetin theo công thức (1).

$$TFC = \frac{A_i - b}{a \times C_i} (1)$$

Với TFC là hàm lượng flavonoid tổng số của mẫu cao chiết, tính bằng milligram tương đương quercetin trên mỗi gram cao chiết (mg QE/g); A_i là mật độ quang trung bình của mẫu thử ở bước sóng 510 nm; a và b lần lượt là hệ số của phương trình đường chuẩn quercetin có dạng A = aC + b; C_i là nồng độ của mẫu thử (mg/mL).

2.4. Phương pháp đánh giá hoạt tính chống gốc tự do DPPH

Hoạt tính chống gốc tự do được thử nghiệm theo phương pháp đã được công bố trong các nghiên cứu trước đây [7] với một số điều chỉnh. Mẫu thử và DPPH (Alfa Aesar, Thermo Scientific, Hoa Kỳ) được pha loãng trong ethanol với nồng độ thích hợp. 20 µL mẫu thử được ủ với 200 µL dung dịch DPPH ở nhiệt độ 37°C trong 20 phút và đo trên máy ELISA ở bước sóng 517 nm. Chất đối chứng ascorbic (Sigma-Aldrich, Hoa Kỳ) được dùng để kiểm soát độ ổn định và đánh giá hoạt tính ức chế tương đương. Các phép thử được lặp lại 3 lần.

Phần trăm ức chế được tính theo công thức sau:

$$\% I = 100\% - [(OD_m) / (OD_{dc}) \times 100] \% (2)$$

- OD_m: Mật độ quang trung bình của mẫu thử (đã trừ đi mật độ quang của dung dịch cao chiết được pha loãng trong dung môi, không bao gồm thuốc thử, với cùng nồng độ).

- OD_{dc}: Mật độ quang trung bình của mẫu control (không có mẫu thử, chỉ có DPPH, coi như giá trị ức chế 0%)

Giá trị nồng độ ức chế trung bình (IC₅₀) được tính dựa trên đường chuẩn với %I của dải nồng độ thích hợp cho từng mẫu thử.

2.5. Phương pháp xử lý số liệu

Số liệu thí nghiệm được tổng hợp và tính toán trên phần mềm Microsoft Excel (Microsoft, Hoa Kỳ). Phân tích phương sai ANOVA với kiểm định Tukey's HSD được tiến hành trên phần mềm mã nguồn mở R.

3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Hiệu suất chiết và hàm lượng flavonoid tổng số của cao chiết từ một số loại đậu

Hàm lượng hoạt chất của cùng một loại nguyên liệu có thể giống hoặc khác nhau giữa các nhà cung cấp bởi các nguyên nhân như nơi trồng hay điều kiện bảo quản... Do đó, trong nghiên cứu này, chúng tôi thu các mẫu khác nhau của bốn loại đậu phổ biến là đậu xanh (*Vigna radiata*), đậu cove (*Phaseolus vulgaris*), đậu đen (*Vigna unguiculata*) và đậu đỏ (*Vigna angularis*) từ nhiều nhà cung cấp nhằm đánh giá mức độ khác biệt về hàm lượng hoạt chất của các mẫu nghiên cứu trong từng loại cũng như giữa các loại đậu với nhau. Sự khác biệt này được cho là có ý nghĩa thống kê dựa vào giá trị $p < 0,05$ trong kết quả phân tích ANOVA.

Hiệu suất chiết các mẫu đậu thuộc bốn loài phổ biến được trình bày trong Bảng 1. Kết quả phân tích cho thấy, không có sự khác biệt đáng kể về hiệu suất chiết giữa các mẫu thuộc bốn loài này ($p > 0,05$). Các loại đậu đều chứa một lượng đáng kể các hợp chất sơ cấp (protein, lipid, carbohydrat) cũng như nhiều hợp chất thứ cấp khác, do đó, hiệu suất tạo cao chiết tổng số có thể ít khác biệt giữa các loài trong nghiên cứu này.

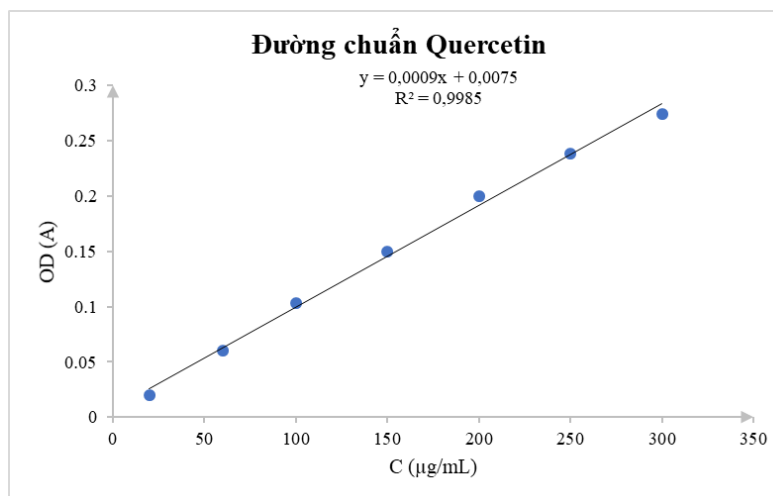
Bảng 1. Hiệu suất chiết và hàm lượng flavonoid của các cao chiết

STT	Mẫu	Tên khoa học	m _{cao chiết} (g)	H%	TFC *
1	GB1	<i>Vigna radiata</i>	0,904	9,04	19,69 ± 5,64
2	GB2		0,936	9,36	15,49 ± 3,42
3	GB3		1,009	10,09	8,33 ± 0,89
4	GB4		1,363	13,63	9,39 ± 0,59
5	GB5		1,390	13,90	20,43 ± 1,29
6	RB1	<i>Vigna angularis</i>	1,514	15,14	21,99 ± 6,08
7	RB2		1,586	15,86	5,74 ± 0,95
8	RB3		1,044	10,44	19,54 ± 0,86
9	RB4		1,375	13,75	11,35 ± 2,69
10	RB5		1,053	10,53	31,15 ± 3,32
11	RB6		0,805	8,05	31,80 ± 3,67
12	BB1	<i>Vigna unguiculata</i>	1,387	13,87	7,86 ± 0,07
13	BB2		1,341	13,41	3,28 ± 0,89
14	BB3		1,210	12,10	6,78 ± 0,08

STT	Mẫu	Tên khoa học	m _{cao chiết} (g)	H%	TFC *
15	BB4		1,454	14,54	0,62 ± 0,07
16	BB5		1,100	11,00	10,18 ± 2,91
17	BB6		1,546	15,46	1,03 ± 0,32
18	CV1	<i>Phaseolus vulgaris</i>	1,414	14,14	33,65 ± 3,85
19	CV2		1,437	14,37	45,51 ± 1,25
20	CV3		1,263	12,63	87,32 ± 4,83
21	CV4		0,956	9,56	102,2 ± 22,49
22	CV5		1,491	14,91	52,25 ± 4,96
23	CV6		1,098	10,98	52,73 ± 7,47

* TFC được thể hiện dưới dạng giá trị trung bình ± độ lệch chuẩn của ba lần lặp lại thí nghiệm, đơn vị tính mg QE/g cao chiết.

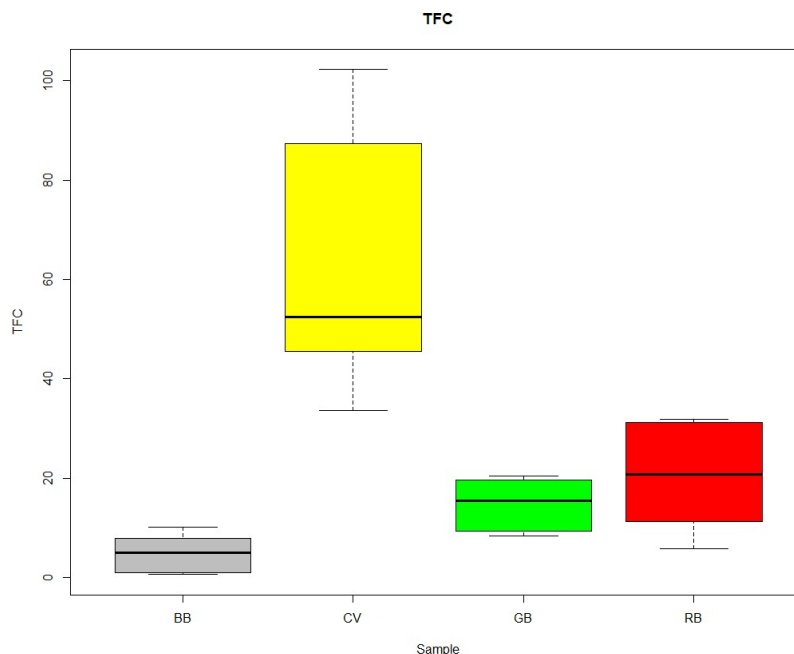
Đường chuẩn quercetin có phương trình $y = 0,0009x + 0,0075$ với hệ số tương quan $R^2 = 0,9985$ đảm bảo độ tuyến tính cho việc định lượng flavonoid tổng số trong các mẫu nghiên cứu.



Hình 1. Đường chuẩn quercetin

Kết quả đánh giá hàm lượng flavonoid tổng số của 23 mẫu thuộc bốn loại đậu được thể hiện trên Bảng 1. Hàm lượng flavonoid trong cao chiết năm mẫu đậu đen (*Vigna radiata*) dao động từ 8 đến 20 mg QE/ g. Trong khi đó, hàm lượng flavonoid tổng số của cao chiết từ các mẫu đậu đỏ dao động từ 5 đến 32 mg QE/ g. Sáu mẫu cao chiết đậu xanh (*Vigna unguiculata*) có hàm lượng flavonoid tổng số dao động từ 0,6 đến 10 mg QE/g, trong khi các mẫu cao chiết từ đậu cove (*Phaseolus vulgaris*) chứa hàm lượng flavonoid tổng số từ 33 đến 102 mg QE/g. Từ các số liệu trên, kết hợp với biểu đồ Hình 2 và kết quả phân tích phương sai ANOVA, có thể thấy, hàm

lượng flavonoid trong cao chiết xuất từ đậu cove cao hơn một cách đáng kể và có ý nghĩa thống kê ($p < 0,05$) so với hàm lượng flavonoid trong cao chiết từ ba loại đậu còn lại. Trong khi đó, chênh lệch hàm lượng flavonoids giữa cao chiết của đậu xanh (*Vigna radiata*) đậu đen (*Vigna unguiculata*) và đậu đỏ (*Vigna angularis*) là không có ý nghĩa thống kê ($p > 0,05$).



Hình 2. Biểu đồ hộp so sánh hàm lượng flavonoid tổng số (TFC) của bốn nhóm mẫu: đậu đen (BB), đậu cove (CV), đậu xanh (GB), đậu đỏ (RB)

Bởi hiệu suất chiết giữa các mẫu là không có nhiều khác biệt, có thể thấy, đậu cove là nguồn nguyên liệu tốt hơn ba loại đậu còn lại trong việc tạo cao chiết giàu thành phần flavonoid.

3.2. Hoạt tính chống gốc tự do DPPH của cao chiết từ một số loại đậu

Trong nghiên cứu này, bên cạnh việc xác định hàm lượng flavonoid tổng số, chúng tôi cũng đánh giá hoạt tính chống gốc tự do DPPH của các cao chiết từ các loại đậu đã thu thập. Kết quả được trình bày trong Bảng 2.

Bảng 2. Hoạt tính chống gốc tự do DPPH của các cao chiết

STT	Mẫu	Tên khoa học	DPPH IC ₅₀ (µg/mL)*
1	GB1	<i>Vigna radiata</i>	40,81 ± 2,04
2	GB2		46,21 ± 1,02
3	GB3		69,64 ± 6,03
4	GB4		67,18 ± 1,26

STT	Mẫu	Tên khoa học	DPPH IC ₅₀ (μg/mL)*
5	GB5		39,99 ± 6,36
6	RB1	<i>Vigna angularis</i>	38,36 ± 2,93
7	RB2		86,66 ± 9,15
8	RB3		40,98 ± 0,66
9	RB4		53,13 ± 9,13
10	RB5		30,95 ± 8,01
11	RB6		30,53 ± 7,46
12	BB1	<i>Vigna unguiculata</i>	60,81 ± 0,12
13	BB2		75,04 ± 1,17
14	BB3		63,65 ± 5,03
15	BB4		106,84 ± 2,42
16	BB5		55,48 ± 11,05
17	BB6		94,79 ± 3,53
18	CV1	<i>Phaseolus vulgaris</i>	76,18 ± 13,42
19	CV2		30,12 ± 11,91
20	CV3		16,47 ± 2,04
21	CV4		12,38 ± 0,34
22	CV5		14,33 ± 2,03
23	CV6		20,07 ± 3,37
Acid ascobic [#]			18.85 ± 2.11

* IC₅₀ được thể hiện dưới dạng giá trị trung bình ± độ lệch chuẩn của ba lần lặp lại thí nghiệm; # Chất đối chứng dương.

Nhìn chung, các mẫu cao chiết từ bốn loại đậu đều thể hiện hoạt tính thu dọn gốc tự do DPPH ở các mức độ khác nhau. Kết quả phân tích phương sai ANOVA cho thấy, giá trị IC₅₀ của cao chiết từ các mẫu đậu cove (*Phaseolus vulgaris*) thấp hơn một cách có ý nghĩa thống kê ($p < 0,05$) so với các mẫu còn lại, trong khi giá trị này của các mẫu cao chiết từ đậu xanh (*Vigna radiata*) đậu đen (*Vigna unguiculata*) và đậu đỏ (*Vigna angularis*) không có sự khác biệt đáng kể ($p > 0,05$). Xu hướng này phù hợp với kết quả định lượng flavonoid tổng số trong các mẫu thí nghiệm. Đáng chú ý, ba mẫu cao chiết CV3, CV4, và CV5 thể hiện hoạt tính mạnh hơn (giá trị IC₅₀ thấp hơn) chất đối chứng dương là acid ascobic. Đây cũng là ba mẫu có hàm lượng flavonoid tổng số cao nhất. Các mẫu có hàm lượng flavonoid cao hơn thường thể hiện hoạt tính chống gốc tự do DPPH mạnh hơn bởi các hợp chất flavonoid, với cấu trúc chứa một hay nhiều nhóm phenol, chúng thường thể hiện hoạt tính chống gốc tự do, chống oxy mạnh.

4. KẾT LUẬN

Qua nghiên cứu này, chúng tôi đã đánh giá hàm lượng flavonoid và hoạt tính chống gốc tự do DPPH của cao chiết của 23 mẫu thuộc 4 loại đậu phổ biến là đậu xanh (*Vigna radiata*) đậu đen (*Vigna unguiculata*), đậu đỏ (*Vigna angularis*) và đậu cove (*Phaseolus vulgaris*). Các mẫu cao chiết từ đậu cove có hàm lượng flavonoid cao hơn các mẫu cao chiết từ ba loại đậu còn lại. Khả năng chống gốc tự do DPPH của các cao chiết từ đậu cove cũng tốt hơn các mẫu cao chiết khác và thể hiện hoạt tính tương đương hoặc tốt hơn đối chứng dương acid ascorbic. Kết quả này cho thấy, đậu cove có thể là một nguồn nguyên liệu tiềm năng để sản xuất các chế phẩm giàu hàm lượng flavonoid với nhiều hoạt tính sinh học quý phục vụ y học và đời sống.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Wang T. Y., Li Q., Bi K. S., *Bioactive flavonoids in medicinal plants: Structure, activity and biological fate*, Asian Journal of Pharmaceutical Sciences, 2018, **13**(1):12-23.
2. Yao Y., Cheng X. Z., Ren G. X., *Contents of D-chiro-Inositol, Vitexin, and Isovitexin in Various Varieties of mung bean and its products*, Agricultural Sciences in China, 2011, **10**(11):1710-1715.
3. Lin L. Z., Harnly J. M., Pastor-Corrales M. S., Luthria D. L., *The polyphenolic profiles of common bean (Phaseolus vulgaris L.)*, Food chemistry, 2008, **107**(1):399-410.
4. Awika J. M., Duodu K. G., *Bioactive polyphenols and peptides in cowpea (Vigna unguiculata) and their health promoting properties: A review*, Journal of Functional Foods, 2017, **38**:686-697.
5. Ha T. J., Park J. E., Lee K. S., Seo W. D., Song S. B., Lee M. H., Kim S., Kim J. I., Oh E., Pae S. B., Kwak D. Y., Lee J. H., *Identification of anthocyanin compositions in black seed coated Korean adzuki bean (Vigna angularis) by NMR and UPLC-Q-Orbitrap-MS/MS and screening for their antioxidant properties using different solvent systems*, Food Chemistry, 2021, **346**:128882.
6. Chandra S., Khan S., Avula B., Lata H., Yang M. H., ElSohly M. A., Khan I. A., *Assessment of total phenolic and flavonoid content, antioxidant properties, and yield of aeroponically and conventionally grown leafy vegetables and fruit crops: A comparative study*, Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine, 2014, **2014**:253875.
7. Phuong T. T., Nguyen D. S., Tran M. N., Tran M. H., Nguyen H. D., Nguyen D. T., Bae K. H., Oh W. K., *Antioxidant activity and principles of Vietnam bitter tea Ilex kudingcha*, Food Chemistry, 2009, **113**:139-145.

SUMMARY

TOTAL FLAVONOID CONTENT AND FREE RADICAL SCAVENGING ACTIVITY OF EXTRACTS FROM SEVERAL TYPES OF BEANS ON THE MARKET IN VIETNAM

Total flavonoid content and DPPH free radical scavenging activity of extracts from four types of bean, such as *Vigna radiata*, *Vigna angularis*, *Vigna unguiculata*, and *Phaseolus vulgaris*, in the market have been evaluated. The extracts from *Phaseolus vulgaris* had significantly higher flavonoid contents than the three other ones and showed a considerable free radical scavenging effect.

Keywords: *Vigna radiata*, *Vigna angularis*, *Vigna unguiculata*, *Phaseolus vulgaris*, flavonoid, DPPH, antioxidant.

Nhận bài ngày 24 tháng 6 năm 2022

Phản biện xong ngày 01 tháng 9 năm 2022

Hoàn thiện ngày 04 tháng 01 năm 2023

⁽¹⁾ Viện Y sinh Nhiệt đới, Trung tâm Nhiệt đới Việt - Nga

⁽²⁾ Học viện Khoa học và Công nghệ, Viện Hàn lâm KH&CN Việt Nam

Liên hệ: Nguyễn Thị Thu Thủy

Viện Y sinh Nhiệt đới, Trung tâm Nhiệt đới Việt - Nga

Số 63 Nguyễn Văn Huyền, Nghĩa Đô, Cầu Giấy, Hà Nội

Điện thoại: 0987556168; Email: ntthuy.vietnga@gmail.com