

KHẢO SÁT TÁC DỤNG CHỐNG OXY HÓA CỦA MỘT SỐ CÂY HỌ FABACEAE

Phạm Đoàn Anh Ninh¹

TÓM TẮT

Mục tiêu: Khảo sát tác dụng chống oxy hóa của một số loại đậu quen thuộc trong họ Fabaceae. Đối tượng và phương pháp: Khảo sát trên bảy loại đậu: Đậu đen, đậu xanh, Đậu đỏ, Đậu nành, Đậu ván, Đậu phộng, Đậu trắng. Khảo sát thực hiện với dạng hạt khô của các loại đậu. Xác định hoạt tính chống oxy hóa (HTCO) bằng hai phương pháp DPPH¹ và FRAP², khảo sát trên bốn phân đoạn cao chiết: Cao dicloromethan (DCM), cao ethylacetat (EtOAc), cao cồn, cao nước cất. Kết quả: Cả hai phương pháp DPPH và FRAP đều cho kết quả khảo sát tương tự nhau, Đậu đỏ có HTCO cao hơn so với các loại đậu khác, phân đoạn cao cồn có HTCO mạnh nhất. Kết luận: Kết quả khảo sát cho thấy Đậu đen, Đậu đỏ, Đậu phộng đều có tác dụng chống oxy hóa mạnh, trong đó Đậu đỏ cả hai phương pháp đều cho kết quả rất cao.

Từ khóa: Hoạt tính chống oxy hóa (HTCO).

SURVEY ANTIOXIDANT ACTIVITIES OF PLANTS FABACEAE

ABSTRACT

Objective: Survey antioxidant activities of some familiar legumes in the family Fabaceae. Materials and methods: Seven types of tree seeds commonly: Vigna unguiculata (L.) Walp. subsp. cylindrica. (L.) Verdc.; Vigna radiata; Vigna angularis; Glycine max; Lablab purpureus; Arachis hypogea; Vigna unguiculata (L.) Walp. subsp. unguiculata. Surveys were done on dry seed of legumes. Total antioxidant activity is measured by two methods DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl) and FRAP (Ferric ion Reducing Antioxidant Power), on four segment extracts: DCM extract, EtOAc extract, ethanolic extract, water extract. Results: Both methods DPPH and FRAP were similar to the survey results. Total antioxidant activity of Vigna angularis is higher than other legumes, ethanolic extracts are the strongest. Conclusions: Survey results showed that Vigna unguiculata (L.) Walp. subsp. cylindrica. (L.) Verdc.; Vigna angularis; Arachis hypogea have strong antioxidant effects, but result of both methods showed that Vigna angularis is very high.

¹ Trường Cao đẳng Quân y 2

Người phản hồi (Corresponding): Phạm Đoàn Anh Ninh (ninh22010@gmail.com)

Ngày nhận bài: 28/7/2019, ngày phản biện: 07/8/2019

Ngày bài báo được đăng: 30/9/2019

Keywords: Antioxidant activities.

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Một số loại đậu quen thuộc trong họ Fabaceae từ lâu đã được sử dụng rộng rãi với vai trò làm lương thực và chữa một số bệnh thông thường trong y học cổ truyền. Trong số đó, đậu nành đã và đang được sử dụng rất rộng rãi với nhiều công dụng khác nhau như chữa rối loạn hormon sinh dục nữ, bổ sung calci... đặc biệt là tác dụng chống oxy hóa. Một số cây trong họ Đậu khác như đậu xanh, đậu đen, đậu đỏ, đậu ván trắng, đậu phộng... có hình dạng, thành phần hóa học, cách sử dụng trong đời sống gần giống như đậu nành. Tuy nhiên

các loại đậu đó có HTCO, một tác dụng mà rất được quan tâm hiện nay ở loại đậu nào có HTCO tốt nhất. Chúng tôi tiến hành nghiên cứu “Khảo sát tác dụng chống oxy hóa của một số cây họ Fabaceae tại Trường Cao đẳng Quân y 2” nhằm mục tiêu: Đánh giá tác dụng chống oxy hóa của một số cây họ Fabaceae.

2. ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP

2.1. Đối tượng

- Nguyên liệu:

Bảy loại hạt đậu sử dụng để nghiên cứu được ghi nhận trong Bảng 2.1

Bảng 2.1. Bảy loại đậu để sàng lọc tác dụng chống oxy hóa.

TT	Tên Việt Nam	Tên latin	Nguồn gốc	Ký hiệu
1	Đậu đen	Vigna unguiculata (L.) Walp. subsp. cylindrica. (L.) Verdc.	Đức Thọ Hà Tĩnh	Đ
2	Đậu xanh	Vigna radiata (L.) Wilezek.	Đức Thọ Hà Tĩnh	X
3	Đậu đỏ	Vigna angularis (Willd.) Ohwi et Ohashi.	Châu Thành An Giang	Đỏ
4	Đậu ván	Lablab purpureus (L.) Sweet.	Châu Thành An Giang	V
5	Đậu nành (Đậu tương)	Glycine max (L.) Merr.	Đức Thọ Hà Tĩnh	N
6	Đậu phộng (Lạc)	Arachis hypogea L.	Đức Thọ Hà Tĩnh	P
7	Đậu trắng	Vigna unguiculata (L.) Walp. subsp. unguiculata.	Đức Thọ Hà Tĩnh	T

Các hạt đậu được thu mua ngay sau khi thu hái, đã được phơi khô và không sử dụng chất bảo quản, xay nhỏ, rây qua rây.

- Hóa chất:

Dung môi chiết xuất: Ethanol

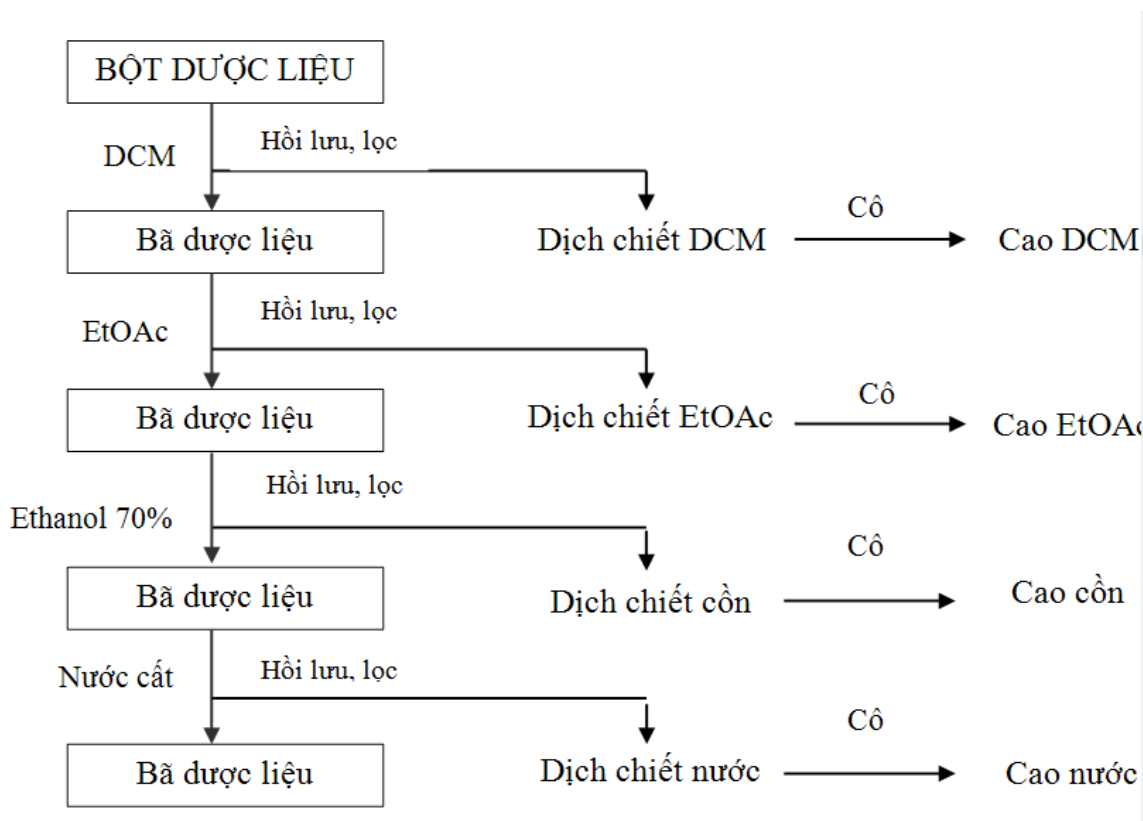
70%, nước cất loại dùng cho thực phẩm; Dicloromethan, ethyl acetat, loại PA (Trung Quốc).

Hóa chất dùng thử HTCO: 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) của Sigma, acid ascorbic, 2,4,6-tripyridin-s-triazin

(TPTZ) của Sigma, đệm acetat pH=3,6, sắt III clorid ngâm 6 phân tử nước của Merck, sắt II sulfat ngâm 7 phân tử nước của Tây Ban Nha, methanol (MeOH).

- Thăm dò quy trình chiết xuất hoạt chất tối ưu thu lấy cao chiết với 4 dung môi có độ phân cực tăng dần: DCM, EtOAc, cồn 70%, nước cất; với các thể tích dung môi khác nhau và thời gian chiết khác nhau (Sơ đồ 2.1.).

2.2. Phương pháp



Sơ đồ 2.1. Quy trình chiết cao cho sàng lọc tác dụng chống oxy hóa.

- Khảo sát xác định HTCO: Thử nghiệm invitro để sàng lọc các chất có HTCO [1]. Hai phương pháp DPPH và FRAP phù hợp với nhóm hoạt chất có tác dụng chống oxy hóa trong các loại đậu. Chất đối chiếu là acid ascorbic, một chất đã được chứng minh và sử dụng có HTCO mạnh [4].

Phương pháp DPPH [3][5]: Các chất nghiên cứu có tác dụng chống oxy hóa theo cơ chế dập tắt gốc tự do sẽ làm giảm màu của DPPH, xác định khả năng này bằng cách đo

quang ở bước sóng 517 nm. Chất đối chiếu là acid ascorbic.

Phương pháp FRAP [2][5]: Ở pH thấp, các chất chống oxy hóa sẽ khử ion sắt III trong phức chất ferric 2,4,6- tripyridin-s-triazin thành phức chất ferrous 2,4,6-tripyridin-s-triazin có màu xanh dương. Xác định khả năng này bằng cách đo độ hấp thụ của chất tạo thành là ferrous 2,4,6-tripyridin-s-triazin ở bước sóng 593 nm. Chất đối chiếu là acid ascorbic.

CÔNG TRÌNH NGHIÊN CỨU KHOA HỌC

3. KẾT QUẢ

3.1. Kết quả thăm dò qui trình chiết xuất

Dựa vào quy trình chiết ở sơ đồ.2.1, tiến hành thăm dò khối lượng mẫu, thể tích dung môi, số lần chiết và thời gian chiết. Kết quả ghi nhận trong bảng.

Bảng 3.2. Kết quả thăm dò qui trình chiết xuất hoạt chất.

		Qui trình 1		Qui trình 2			Qui trình 3			
Khối lượng mẫu		5 g		10 g			20 g			
Thể tích dung môi (ml), số lần chiết		50	30	30	100	50	50	200	100	100
Thời gian ngâm trước khi chiết		30 phút		60 phút			1 ngày			
Thời gian chiết hồi lưu mỗi lần		30 phút		30 phút			60 phút			
Cao phân đoạn	DCM	0,0565 g	1,13%	0,1157 g	1,16%	0,2404 g	1,2%			
	EtOAc	0,0102 g	0,2%	0,0226 g	0,23%	0,0473 g	0,24%			
	Ethanol 70%	0,4120 g	8,24%	1,1919 g	11,92%	2,3086 g	11,54%			
	Nước	0,1320 g	2,64%	0,3895 g	3,9%	0,5499 g	2,75%			

Từ kết quả thử nghiệm chúng tôi quyết định chọn quy trình 3 để chiết xuất, đồng thời thay đổi thời gian ngâm của dung môi cho phù hợp (chỉ áp dụng cho lần đầu), 2 lần chiết sau không ngâm mà chiết luôn.

DCM ngâm 1 ngày (24 giờ)

EtOAc ngâm 2 ngày (48 giờ)

Ethanol 70% ngâm 4 giờ

Nước ngâm 1 giờ.

Nhiệt độ chiết: DCM ở 75 °C, EtOAc ở 85 °C, ethanol ở 90 °C, nước ở 95 °C

Dịch chiết thu được ở 3 lần chiết sẽ gộp lại, cô thu hồi dung môi thu cao.

3.2. Kết quả chiết xuất thu cao toàn phần của bảy loại đậu

Bảng 3.3. Kết quả chiết xuất cao từ mẫu nghiên cứu (20 g/ mẫu khô).

STT	Mẫu dược liệu	Cao chiết được bằng các dung môi (gam)			
		DCM	EtOAc	Ethanol 70%	Nước cất
1	Đ	0,346	0,1228	3,0199	0,6275
2	X	0,436	0,0462	2,3086	1,1582
3	Đỏ	0,55	0,0543	2,7204	0,7192
4	V	0,3222	0,163	2,3844	0,9608
5	N	3,8872	0,1389	3,271	1,0551
6	P	12,9063	0,1009	1,5656	1,5973
7	T	0,3609	0,189	2,629	0,9448

Cao còn cho lượng cao chiết cao nhất do còn là dung môi rất phân cực, dễ dàng thấm vào dược liệu, có thể hòa tan được rất nhiều

chất đặc biệt là những chất phân cực trung bình và phân cực mạnh.

3.3. Kết quả khảo sát HTCO bằng phương pháp DPPH

Pha dung dịch thử, hòa tan cao chiết vào MeOH nồng độ 1 mg/ ml.

3.3.1. Thực nghiệm

Pha thuốc thử DPPH nồng độ 0,2 mM/ MeOH, pha dùng ngay.

Pha mẫu đo: Thực hiện phản ứng trong ống nghiệm theo bảng 3.4, thực hiện ở chỗ tối, sau 30 phút đến khi ổn định thì đo quang ở bước sóng 517 nm.

Bảng 3.4. Cách pha mẫu đo của phương pháp DPPH.

Ống	Dung dịch thử (ml)	Dung dịch MeOH (ml)	Dung dịch DPPH (ml)
Trắng	0	4	0
Chứng	0	2	2
Thử	2	0	2

Tính kết quả: HTCO của dung dịch thử được tính theo công thức

$$HTCO(\%) = [(Abs_{chứng} - Abs_{thử}) / (Abs_{chứng} - Abs_{trắng})] \times 100$$

Abs: độ hấp thu đo được ở 517 nm.

Pha dung dịch đối chiếu acid ascorbic nồng độ: 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20 µg/ ml trong MeOH để xác định IC₅₀¹ và so sánh kết quả với mẫu thử.

3.3.2. Kết quả thử HTCO của các mẫu thử theo phương pháp DPPH

Bảng 3.5. Kết quả thử nghiệm HTCO bằng phương pháp DPPH.

STT	Mẫu dược liệu (1 mg/ ml)	HTCO (%)			
		Cao D	Cao E	Cao C	Cao N
1	Đ	8,91	16,23	80,38	17,22
2	X	23,16	14,00	58,48	7,63
3	Đỏ	17,83	50,71	79,40	83,37
4	V	9,77	23,78	19,05	0,12
5	N	10,08	12,78	41,38	0,13
6	P	9,07	16,87	83,37	0,66
7	T	22,64	23,24	25,81	0,14
Acid ascorbic 20 mg/ ml			94,57%		

Ghi chú: Cao D = cao DCM, cao E = cao EtOAc, cao C = cao cồn 70%, cao N = cao nước.

Nhận xét: Những cao có HTCO > 50% là có tác dụng chống oxy hóa → Cao E mẫu Đỏ, cao C mẫu Đ, Đỏ, P, cao N mẫu Đỏ.

Những cao có HTCO > 70% có tác dụng chống oxy hóa mạnh → cao C mẫu Đ, Đỏ, P, cao N mẫu Đỏ.

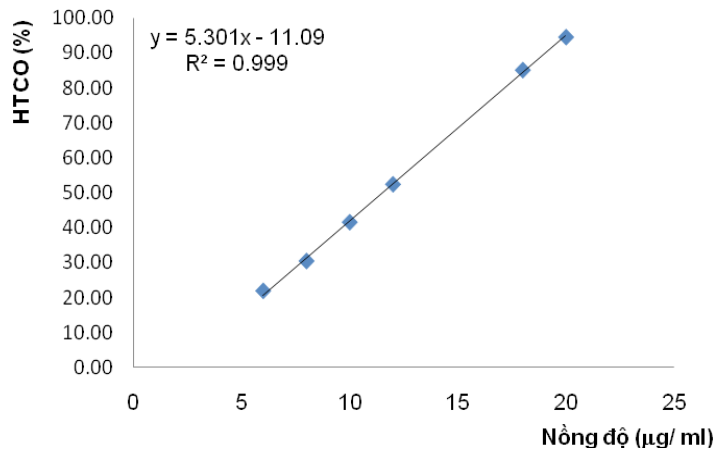
¹ IC₅₀: Nồng độ mẫu thử làm giảm 50% lượng gốc DPPH – tức là mẫu thử có HTCO 50%

3.3.3. Kết quả so sánh các mẫu cao có HTCO mạnh với acid ascorbic

Bảng 3.6. Kết quả giai mẫu

tính IC₅₀ của acid ascorbic.

Nồng độ µg/ml	HTCO (%)
20	94,57
18	85,13
12	52,36
10	41,50
8	30,36
6	21,81



Hình 3.1. Đồ thị biểu diễn sự tương quan giữa HTCO với nồng độ acid ascorbic.

Bảng 3.7. Kết quả xác định IC₅₀ các mẫu theo phương pháp DPPH.

Mẫu	Phương trình hồi quy	R ²	IC ₅₀ (µg/ml)
A. ascorbic	y = 5,301x - 11,09	0,999	11,52
Cao N mẫu Đỏ	y = 0,076x + 1,801	0,995	634,20
Cao C mẫu Đỏ	y = 0,070x + 15,96	0,952	486,29
Cao C mẫu P	y = 0,081x + 7,329	0,980	526,80
Cao C mẫu Đ	y = 0,064x + 18,67	0,953	489,53

Nhận xét: So sánh IC₅₀ cho thấy mẫu CĐỏ, CĐ có IC₅₀ thấp hơn, tức là có HTCO mạnh hơn so với các mẫu khác. Tuy nhiên HTCO của hai mẫu này vẫn còn thấp hơn nhiều so với chất đối chiếu acid ascorbic, nhưng vì là cao chiết dược liệu trong khi acid ascorbic là hóa chất nên điều này rất phù hợp.

3.3.4. Kết quả khảo sát HTCO bằng phương pháp DPPH

- Phân đoạn cao còn của các dược liệu thường cho HTCO mạnh hơn so với cao DCM, cao EtOAc, cao nước. Trong các cao còn thì cao của đậu đỏ và đậu phộng cho

HTCO mạnh hơn các mẫu khác.

- Trong 7 loại hạt đậu thì cả 3 cao phân đoạn của đậu đỏ đều có HTCO mạnh hơn so với các loại khác.

3.4. Kết quả khảo sát HTCO bằng phương pháp FRAP

3.4.1. Thực nghiệm

- Pha đệm acetat 0,3 M pH = 3,6 (1), thuốc thử TPTZ 10 mM (2), sắt III clorid 20 mM (3).

Pha dung dịch đối chiếu acid ascorbic nồng độ 100 µg/ml trong MeOH.

Thuốc thử FRAP: Là hỗn hợp các dung dịch (1):(2):(3) theo tỷ lệ 10:1:1.

Pha mẫu đo: Thực hiện phản ứng trong ống nghiệm

Bảng 3.8. Cách pha mẫu đo của phương pháp FRAP.

Ống	DD thử (ml)	Thuốc thử FRAP (ml)	DD acid ascorbic 100 µg/ml (ml)
Trắng	0	3,1	0
Đối chiếu	0	3	0,1
Thử	0,1	3	0

Các phản ứng phải thực hiện ở 37 °C trong nồi cách thủy, sau 30 phút khi phản ứng ổn định thì đo quang ở 593 nm.

độ: 0, 50, 100, 125, 250, 400, 500 µg/ml. Sau đó cho phản ứng với thuốc thử TPTZ, để ở 37 °C trong nồi cách thủy, sau 30 phút đo quang ở 593 nm.

- Tính toán kết quả: $\Delta Abs = Abs_{thử} - Abs_{trắng}$

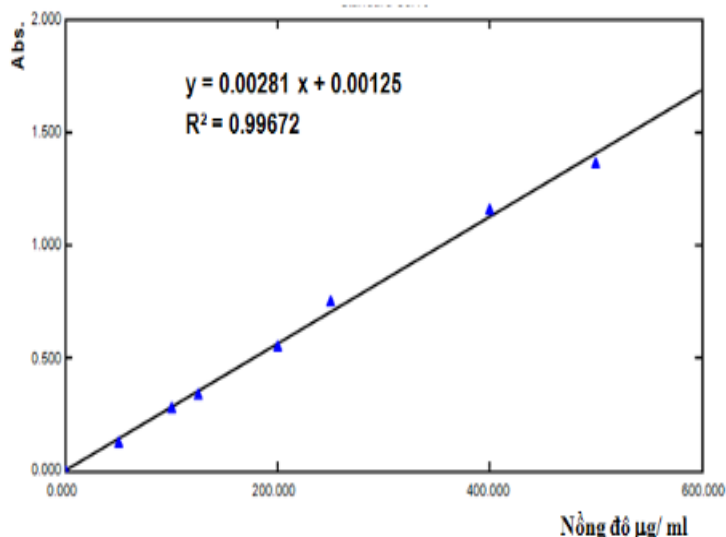
Đường chuẩn có dạng $y = ax + b$ thể $y = \Delta Abs$ tính ra x là số µg/ml ion Fe^{2+} - TPTZ tương đương với HCO của dung dịch thử.

- Xây dựng đường chuẩn: Pha dung dịch chuẩn sắt II sulfat ngâm nước các nồng

3.4.2. Kết quả xây dựng đường chuẩn của phức Sắt II – TPTZ

Bảng 3.9. Kết quả giai mẫu xây dựng đường chuẩn Sắt II-TPTZ.

Nồng độ mẫu chuẩn (µg/ml)	Abs đo ở 593 nm
0	0,000
50	0,127
100	0,283
125	0,341
200	0,552
250	0,752
400	1,160
500	1,367



Hình 3.2. Đường chuẩn của phức Sắt II - TPTZ phương pháp FRAP.

CÔNG TRÌNH NGHIÊN CỨU KHOA HỌC

3.4.3. Kết quả thử HTCO của các mẫu theo phương pháp FRAP

Bảng 3.10. Kết quả thử nghiệm HTCO bằng phương pháp FRAP.

STT	Mẫu dược liệu (1 mg/ ml)	HTCO ($\mu\text{g Fe}^{2+}/ \text{ml}$)			
		Cao D	Cao E	Cao C	Cao N
1	Đ	17,35	44,04	220,68	52,76
2	X	12,64	54,16	108,29	30,21
3	Đỏ	51,21	74,82	313,62	74,43
4	V	34,80	58,34	78,10	29,45
5	N	42,62	61,57	113,01	39,37
6	P	28,86	43,53	117,88	28,31
7	T	28,16	42,84	98,67	34,60

Ghi chú: Cao D = cao DCM, cao E = cao EtOAc, cao C = cao còn 70%, cao N = cao nước.

Nhận xét: Những cao có HTCO > 100 $\mu\text{g Fe}^{2+}/ \text{ml}$ là có tác dụng chống oxy hóa trung bình. → Cao C mẫu Đ, X, Đỏ, N, P.

Những cao có HTCO > 200 $\mu\text{g Fe}^{2+}/ \text{ml}$ là có tác dụng chống oxy hóa mạnh → Cao C mẫu Đ, Đỏ.

3.4.4. Kết quả so sánh các mẫu cao có HTCO mạnh với acid ascorbic

Dung dịch acid ascorbic 100 $\mu\text{g}/ \text{ml}$ có $\Delta\text{Abs} = 0,54$, thay vào phương trình

$$y = 0,00281x + 0,00125 \rightarrow x = 191,73 \mu\text{g}/ \text{ml}$$

ion Fe^{2+} - TPTZ tương đương với HTCO của dung dịch acid ascorbic 100 $\mu\text{g}/ \text{ml}$.

Từ kết quả của bảng 3.10, so sánh cao C mẫu Đỏ có HTCO cao nhất với dung dịch acid ascorbic có cùng nồng độ.

Cao C mẫu Đỏ (1mg/ ml):
HTCO = 313,62 $\mu\text{g Fe}^{2+}/ \text{ml}$

Acid ascorbic (1 mg/ ml):
HTCO = 1917,3 $\mu\text{g Fe}^{2+}/ \text{ml}$

Nhận xét: Acid ascorbic có tác dụng

chống oxy hóa mạnh hơn nhiều so với cao còn đậu đỏ và các loại đậu khác. Kết quả này rất phù hợp với thực tế, do acid ascorbic là hóa chất tinh khiết nên tan tốt và phân tán đều trong dung môi, trong khi đó cao dược liệu là dạng cô đặc của dịch chiết nên khi hòa tan trong dung môi hơi khó tan, vì vậy sự phân tán hoạt chất trong dung môi cũng có thể không đồng đều làm cho khả năng phản ứng không hoàn toàn, mật độ quang đo được từ các mẫu không cao.

3.4.5. Kết quả khảo sát HTCO bằng phương pháp FRAP

Phân đoạn cao còn của các dược liệu cho HTCO mạnh hơn so với cao DCM, cao EtOAc, cao nước. Trong các cao còn thì cao của đậu đỏ, đậu phộng, đậu đen, đậu xanh, đậu nành cho HTCO mạnh hơn các loại đậu khác.

Trong 7 loại hạt đậu thì Đậu đỏ có phân đoạn cao còn có HTCO mạnh hơn hẳn so với các loại khác.

4. BÀN LUẬN

Các loại đậu mà chúng ta ăn hàng ngày và coi nó như thực phẩm bình thường thì thực ra chúng còn có những tác dụng khác,

đặc biệt là tác dụng chống oxy hóa do nhóm flavonoid thường có trong những loại đậu. Tuy nhiên ở Việt Nam, mới chỉ có những nghiên cứu tập trung vào hạt đậu nành, hạt đậu xanh, trên thế giới thì có nhiều nghiên cứu về đậu xanh, đậu đen, đậu nành và cả đậu đỏ.

Đề tài đã đóng góp trong việc sàng lọc tác dụng chống oxy hóa của 7 loại đậu mà chúng ta hay ăn, qua đó đã đưa ra kết luận đậu đỏ là loại đậu có tác dụng chống oxy hóa mạnh hơn những loại đậu khác. Điều này có thể giúp cho người dân có hướng sử dụng các loại đậu sao cho có lợi cho sức khỏe và đề tài cũng giúp ta hiểu rõ tại sao người Nhật coi đậu đỏ là loại đậu quan trọng thứ 2 sau đậu nành [6][7]. Kết quả sàng lọc cũng cho thấy, ngoài đậu đỏ thì đậu đen, đậu phộng cũng có tác dụng chống oxy hóa. Trong các phân đoạn cao chiết thì cao còn của các loại đậu có tác dụng chống oxy hóa mạnh hơn các phân đoạn cao khác.

KẾT LUẬN

Trong 7 loại đậu thông dụng là đậu xanh, đậu đen, đậu đỏ, đậu nành, đậu phộng, đậu ván, đậu trắng thì đậu đỏ có tác dụng chống oxy hóa mạnh nhất (HTCO của cao E = 50,71%, cao C = 79,40%, cao N = 83,37%), đậu đen, đậu phộng tác dụng chống oxy hóa cũng cao nhưng chỉ ở cao còn, trong khi đậu ván hầu như không có tác dụng này.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Trần Phi Hoàng Yên, Trần Thành Đạo (2009), Khảo sát tác động chống oxy hóa in vitro một số dẫn chất flavonoid vai trò những nhóm OH trong tác động chống oxy

hóa của dẫn chất flavon, Tạp chí Y học TP. HCM tập 13, phụ bản số 1, tr 164 – 168.

2. Cao D. et als. (2011), “Antioxydant Properties of the Mung Bean Flavonoids on Alleviating Heat Stress”, PLoS ONE, 6(6), pp. 1-9.

3. Dejian Huang, Boxin Ou and Ronald L. Prior (2005), The Chemistry behind Antioxidant Capacity Assays, Journal of Agricultural and Food Chemistry 53, pp. 1841-1856.

4. Jan Muselík et als. (2007), Measurement of Antioxidant Activity of Wine Catechins, Procyanidin, Anthocyanins and Pyranoanthocyanins, International Journal of Molecular Sciences 8, pp, 797-809.

5. Jing Wang et als. (2007), Free radical and reactive oxygen species scavenging activities of peanut skins extract, Food Chemistry 104, pp. 242-250.

6. Mukai Y. and Sato S. (2009), Polyphenol-containing azuki bean (*Vigna angularis*) extract attenuates blood pressure elevation and modulates nitric oxide synthase and caveolin-1 expressions in rats with hypertension, Nutrition, Metabolism & Cardiovascular Diseases 19, pp. 491-497.

7. Yuuka Mukai, Shin Sato (2011), Polyphenol-containing azuki bean (*Vigna angularis*) seed coats attenuate vascular oxydative stress and inflammation in spontaneously hypertensive rats. The Journal of Nutritional Biochemistry, vol. 22(1), pp.16-21.