

Sàng lọc hoạt tính chống oxy hóa *in vitro* và phân lập chất từ hoa đậu biếc *Clitoria ternatea* L. (Fabaceae)

Võ Thị Bích Ngọc*, Đỗ Thị Anh Thư

Trường Đại học Quốc tế Hồng Bàng

TÓM TẮT

Đặt vấn đề: Hoa Đậu biếc (*Clitoria ternatea* L.) thuộc họ đậu Fabaceae có nguồn gốc từ Đông Nam Á, được biết đến là một loại dược liệu có những hoạt tính sinh học có lợi cho sức khỏe. Các nghiên cứu trước đây về tác dụng của hoa Đậu biếc như kháng khuẩn, kháng viêm, hạ đường huyết,... Mục tiêu nghiên cứu: Khảo sát hoạt tính chống oxy hóa của các cao chiết và chất phân lập. Phương pháp nghiên cứu: Khảo sát hoạt tính chống oxy hóa bằng phương pháp DPPH, phân lập chất tinh khiết bằng các phương pháp sắc ký. Kết quả: Phân tích chứng minh được cao ethyl acetate có hoạt tính mạnh nhất với HTCO% là 28.55%. Điều này cho thấy hoạt chất chính có tác dụng chống oxy hóa nằm trong phân đoạn ethyl acetate. Từ cao ethyl acetate, acid palmitic- đã được phân lập thành công bằng các phương pháp sắc ký. Thử nghiệm DPPH trên acid palmitic cho phản ứng âm tính với thuốc thử, vậy có thể kết luận sơ bộ chất acid palmitic không có tính chống oxy hóa. Kết luận: Mặc dù chất tinh khiết phân lập là acid palmitic không thể hiện hoạt tính chống oxy hóa, nhưng phân đoạn ethyl acetate lại cho thấy tiềm năng cao, mở ra hướng nghiên cứu thêm các hoạt chất chống oxy hóa từ hoa Đậu biếc.

Từ khoá: *Clitoria ternatea* L., thử nghiệm DPPH, chống oxy hóa

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Đậu biếc (*Clitoria ternatea*) là một loài thực vật thuộc họ Đậu (Fabaceae), được sử dụng rộng rãi trong y học cổ truyền với nhiều tác dụng dược lý quan trọng. Trong nhiều nền y học dân gian, đậu biếc được biết đến với công dụng cải thiện trí nhớ, giảm căng thẳng, chống viêm, bảo vệ gan và hỗ trợ làm đẹp da [1 - 3]. Ngày nay, các nghiên cứu khoa học đã xác nhận rằng những tác dụng này có liên quan đến sự hiện diện của các chất sinh học có giá trị trong cây, đặc biệt là các flavonoid, anthocyanin. Những chất này không chỉ mang lại tác dụng dược lý mà còn có tiềm năng lớn trong các ứng dụng liên quan đến mỹ phẩm và thực phẩm chức năng.

Một trong những đặc tính quan trọng nhất của đậu biếc là khả năng chống oxy hóa. Quá trình oxy hóa trong cơ thể có thể tạo ra các gốc tự do - những phân tử không ổn định có thể gây tổn thương tế bào, làm đẩy nhanh quá trình lão hóa và góp phần vào sự phát triển của nhiều bệnh lý nguy hiểm như bệnh tim mạch, tiểu đường, thoái hóa thần kinh và ung thư. Việc tìm kiếm và khai thác các nguồn chất

chống oxy hóa tự nhiên đang được quan tâm rộng rãi, đặc biệt trong lĩnh vực y học và mỹ phẩm. Trong đó, đậu biếc nổi bật nhờ hàm lượng cao các chất chống oxy hóa, giúp trung hòa gốc tự do, bảo vệ tế bào và cải thiện sức khỏe tổng thể [4].

Do đó, nghiên cứu này tập trung vào việc đánh giá hoạt tính chống oxy hóa của đậu biếc, đồng thời phân lập và xác định cấu trúc của các chất tinh khiết có khả năng chống oxy hóa. Kết quả thu được không chỉ giúp làm sáng tỏ giá trị dược liệu của đậu biếc mà còn mở ra hướng ứng dụng tiềm năng trong các sản phẩm chăm sóc sức khỏe và sắc đẹp.

2. NGUYÊN LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Nguyên liệu

Tiến hành thu hái hoa Đậu biếc vào tháng 12/2024 tại Thành phố Hồ Chí Minh. Mẫu dược liệu được định danh với tên khoa học là *Clitoria ternatea* L. thuộc họ Đậu (Fabaceae). Hoa được phơi khô và xay thành bột mịn và hiện đang được lưu giữ tại Bộ môn Dược liệu, Khoa Dược, Trường Đại học Quốc tế Hồng Bàng.

Tác giả liên hệ: Võ Thị Bích Ngọc

Email: ngocvtb@hiu.vn

2.2. Hóa chất, thuốc thử

Aceton, n-hexan, ethyl acetate, acid acetic, ethanol, chloroform, nước cất, DPPH (Merck), acid ascorbic (Merck), vanilin (Merck), Silica gel cỡ hạt 40 - 63 (μm) và các hoá chất định tính khác.

2.3. Phương pháp nghiên cứu

2.3.1. Khảo sát hoạt tính chống oxy hóa của các cao chiết bằng phương pháp DPPH

Dung dịch DPPH: Pha dung dịch DPPH 0.5 mM trong methanol pha xong dùng ngay, đựng trong lọ thủy tinh màu.

Pha dung dịch đối chiếu acid ascorbic nồng độ: 18 $\mu\text{g/mL}$

trong MeOH để so sánh kết quả với mẫu thử.

Khảo sát hoạt tính đánh bắt gốc tự do DPPH của 3 mẫu cao: Toàn phần (TP), cloroform (CF), ethyl acetate (EA). Các mẫu cao được pha ở cùng nồng độ 900 $\mu\text{g/mL}$ trong methanol. Nếu mẫu khó tan, trợ tan bằng DMSO với tỷ lệ xác định.

Khảo sát động học: Xác định thời gian phản ứng giữa dung dịch thử và dung dịch DPPH đến khi xảy ra hoàn toàn, độ hấp thụ ổn định.

Mẫu đo: Thực hiện phản ứng trong lọ màu nâu.

Các phản ứng phải thực hiện ở chỗ tối, sau 30 phút đến khi ổn định thì đo quang ở bước sóng 517 nm.

Bảng 1. Cách pha mẫu đo của phương pháp DPPH

Ống	Dung dịch thử (mL)	Dung môi MeOH (mL)	Dung dịch DPPH (mL)
Trắng	0	4	0
Chứng	0	3.5	0.5
Thử	1	2.5	0.5

Tính toán kết quả: HTCO (Hoạt tính chống oxy hoá) của dung dịch thử được tính theo công thức:

$$\text{HTCO (\%)} = \frac{Abs_{chứng} - Abs_{thử}}{Abs_{chứng} - Abs_{trắng}} \times 100$$

Abs: Độ hấp thụ đo được ở 517 nm.

Chọn cao phân đoạn có hoạt tính chống oxy hóa mạnh nhất để tiến hành phân lập, xác định cấu trúc.

2.3.2. Phân lập, xác định cấu trúc và thử hoạt tính chống oxy hóa chất tinh khiết

Bột hoa Đậu biếc được chiết ngấm kiệt với cồn 70%, cô và thu hồi dung môi dưới áp suất giảm để thu được cao lỏng và chiết phân bố lỏng - lỏng lần lượt với các dung môi có độ phân cực tăng dần (chloroform, ethyl acetate và phần dịch nước còn lại), thu hồi dung môi, thu được các cao phân đoạn (PD) tương ứng. Phân lập các chất bằng sắc ký cột (SKC) cổ điển, sắc ký

rây phân tử... và tinh chế để thu được chất tinh khiết bằng cách kết tinh trong dung môi. Kiểm tra độ tinh khiết của chất phân lập bằng HPLC.

2.3.3. Xác định cấu trúc chất phân lập

Xác định cấu trúc các chất phân lập được dựa trên dữ liệu phổ MS, NMR và đối chiếu với dữ liệu phổ đã biết.

Phổ MS được đo trên máy LC-MS tại trung tâm nghiên cứu hóa học các chất tự nhiên, Khoa Hóa, Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, Đại học Quốc gia Thành phố Hồ Chí Minh. Tín hiệu được ghi nhận theo số khối (m/z) và cường độ tương đối (relative intensity).

Phổ NMR đo trên máy Bruker 500. Mẫu được hòa tan trong dung môi là MeOH- d_4 hoặc DMSO- d_6 . Các mẫu được đo phổ ^{13}C -NMR, ^1H -NMR, DEPT, COSY, HSQC, HMBC, sử dụng TMS (tetramethylsilan) làm chất chuẩn nội.

3. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU

3.1. Khảo sát hoạt tính chống oxy hóa của các loại cao bằng phương pháp DPPH

Bảng 2. Kết quả thử nghiệm HTCO bằng phương pháp DPPH trên các mẫu cao

STT	Mẫu	Abs mẫu đo				HTCO (%)
		Lần 1	Lần 2	Lần 3	Trung bình	
1	Chứng	0.768	0.709	0.768	0.750	-
2	Cao EA	0.552	0.557	0.495	0.535	28.55%
3	Cao CF	0.606	0.613	0.598	0.606	19.06%
4	Cao TP	0.567	0.545	0.547	0.553	26.10%
5	Vit C	0.028	0.028	0.029	0.028	96.21%

Kết quả cho thấy trong ba mẫu cao, cao ethyl acetate có hoạt tính chống oxy hóa cao nhất (HTCO = 28.55%), tiếp theo là cao toàn phần (26.10%) và chloroform (19.06%). So với ascorbic acid (HTCO = 96.21%), các cao có hoạt tính thấp hơn đáng kể nhưng vẫn thể hiện tiềm năng, đặc biệt là phân đoạn EA.

3.2. Chiết xuất và phân lập

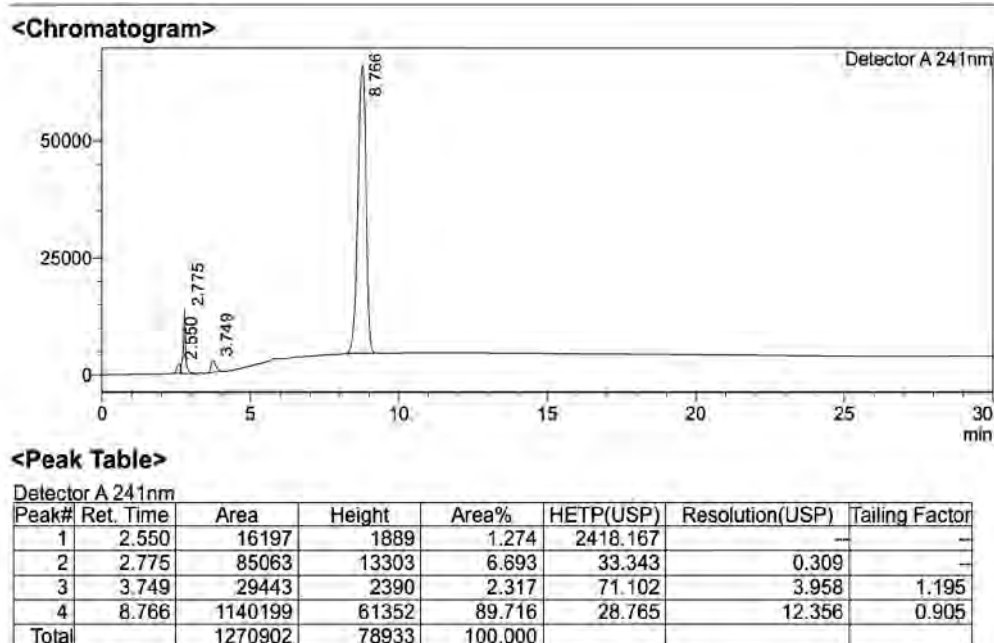
Hoa Đậu biếc (*Clitoria ternatea*) được sấy khô đến độ ẩm dưới 8%, xay thành bột mịn. Khoảng 4.1 kg hoa Đậu biếc được chiết xuất bằng cách ngâm trong ethanol 70% với tỷ lệ dược liệu - dung môi là 1:10 (g/mL) trong 24 giờ, ở nhiệt độ phòng. Sau đó dịch chiết được rút khỏi bình chứa, lọc qua bông, và được cô quay chân không thu hồi dung môi ở 40°C,

thu được cao toàn phần. Tiến hành lắc phân bố lần lượt với chloroform, ethyl acetate, cô quay thu hồi dung môi, thu được cao chloroform và cao ethyl acetate.

Tiến hành sắc ký cột silica gel cao EA với hệ dung môi gradient CHCl_3 - MeOH (100:0 $\rightarrow$ 8:2) thu được 30 phân đoạn (EA 1-30). Phân đoạn EA 3-6 được tiến hành sắc ký cột silica gel hệ dung môi gradient n-hexan - EtOAc (100:0 $\rightarrow$ 93:7) thu được 5 phân đoạn (EA A1-5). Nhận thấy phân đoạn EA A2 trên sắc ký lớp mỏng cho 1 vết, tiến hành kiểm tra độ tinh khiết bằng HPLC đầu dò UV-Vis.

3.2.1. Kiểm tinh khiết chất mới phân lập

Kết quả kiểm tra tinh khiết bằng HPLC cho thấy chất đạt độ tinh khiết (89.716%). Chất này đặt tên



Hình 1. Sắc ký đồ phân đoạn EA A2

3.2.2. Xác định cấu trúc chất mới phân lập

Phổ UV của DBPDA1 đo trong MeOH cho $\lambda_{\max}$ ở 238.5 nm.

Phổ MS (m/z): 265.

Phổ NMR: Các phổ ^1H -NMR, ^{13}C -NMR, DEPT, HMBC, HSQC cho nhận định cấu trúc PD A1 như sau:

Phổ ^{13}C -NMR:

Cho thấy 14 tín hiệu cộng hưởng, trong đó tín hiệu có độ dời hoá học cao nhất tại 177.65 ppm là tín hiệu đặc trưng của nhóm carbonyl. Tín hiệu carbon tại 14.43 ppm đặc trưng cho nhóm methyl liên kết với carbon bão hoà. Kết hợp với phổ DEPT cho thấy các tín hiệu trong vùng 23 - 35 ppm đều là tín hiệu của nhóm methylen. Tín hiệu tại vị trí 30.76 ppm có

cường độ mạnh, cho thấy có hai tín hiệu methylen trùng nhau, tương tự cho vị trí 30.78 ppm.

Phổ ^1H -NMR:

Tín hiệu ở vùng trường cao 0.896 ppm dạng *triplet* có hằng số ghép $J = 7.2$ Hz với số tích phân là 3H, đặc trưng cho hydro của nhóm methyl (H_{16}) gắn với nhóm methylen (C_{15}). Tín hiệu có độ dời hoá học lớn nhất ở 2.268 ppm (2H, *t*, $J = 7.2$ Hz) cho thấy đây là tín hiệu của nhóm methylen (H_2) gắn với nhóm carbonyl (C_1), do đặc tính hút điện tử mạnh của nhóm carbonyl nên H trên carbon này bị giảm chắn, tín hiệu dời về vùng trường thấp. Tại 1.595 ppm có tín hiệu dạng *triplet* (2H, $J = 7.2$ Hz), tuy nhiên dạng triplet không rõ ràng do có hai vai ở hai

bên tín hiệu, có thể do dạng *triplet of triplet* tạo thành khi hydro này tương tác với hai nhóm methylen kế cận, tín hiệu ở vùng trường cao hơn các tín hiệu còn lại nên đây là hydro của nhóm methylen ở vị trí C₃. Các tín hiệu còn lại bị xen phủ với nhau tại vị trí 1.287 ppm - 1.331 ppm, là các tín hiệu đặc trưng của hydro liên kết với carbon lai hóa sp³ (carbon bão hòa).

Phổ DEPT:

Cho thấy tín hiệu ở 177.65 ppm là carbon bậc IV, tín hiệu ở 14.43 ppm là carbon methyl, các tín hiệu còn lại đều là carbon methylen.

Phổ HSQC:

Tín hiệu hydro tại 2.268 ppm, (2H, t, $J = 7.2$ Hz) tương tác với carbon tại 34.96 ppm, cho thấy đây là nhóm CH₂ gắn trực tiếp với nhóm carbonyl. Tín hiệu của nhóm methyl đầu mạch được xác nhận khi có sự tương tác của tín hiệu hydro tại 0.896 ppm, (3H, t, $J = 7.2$ Hz) và carbon tại 14.43 ppm.

Phổ HMBC:

Tín hiệu hydro tại 2.268 ppm và 1.595 ppm có tương tác với carbon tại 177.65 ppm (C₁), chứng tỏ đây là hai nhóm methylen liền kề nhóm carbonyl, carbon 34.96 ppm có độ dời hoá học cao hơn carbon 26.10 ppm, do đó carbon 34.96 ppm (C₂) liên kết trực tiếp với nhóm carbonyl, tiếp theo là carbon 26.10 ppm (C₃).

Tín hiệu hydro của nhóm methyl (C₁₆) có tương tác với carbon tại 23.73 ppm và 33.07 ppm, chứng tỏ đây là hai nhóm methylen kế cận của nhóm methyl đầu mạch, carbon 23.73 ppm có sự chắn từ trường tốt hơn nên đây là carbon kế cận nhóm methyl (C₁₅), còn lại carbon 33.07 ppm là carbon C₁₄.

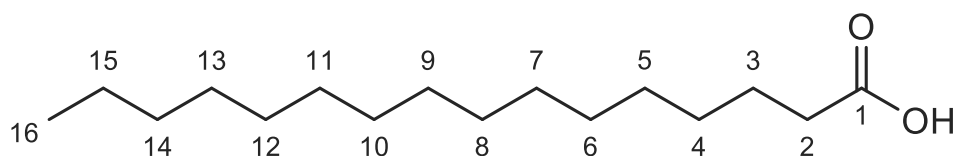
Kết hợp với phổ khối lượng ($m/z = 265$), xác định khối lượng phân tử chất DBPDA1 là 256 g/mol, phù hợp với công thức của palmitic acid.

Bảng 3. Dữ liệu phổ ¹H-NMR và ¹³C-NMR của mẫu DBPDA1

Vị trí	DBPDA1		Acid palmitic [5]	
	¹ H	¹³ C	¹ H	¹³ C
1	-	177.65	-	177.30
2	2.268, t (2H, $j = 7.2$ Hz)	34.96	2.23	36.10
3	1.595, t (2H, $j = 7.2$ Hz)	26.10	1.56	24.80
4	1.287, br s	30.25	1.29	29.70
5	1.287, br s	30.43	1.29	29.70
6	1.287, br s	30.61	1.29	29.70
7	1.287, br s	30.71	1.29	29.70
8	1.287, br s	30.76	1.29	29.70
9	1.287, br s	30.78	1.29	29.70
10	1.287, br s	30.78	1.29	29.70
11	1.287, br s	30.79	1.29	29.70
12	1.287, br s	30.76	1.29	29.70
13	1.287, br s	30.47	1.29	29.70
14	1.287, br s	33.07	1.29	31.90
15	1.319, m	23.73	1.33	22.80
16	0.896, t (3H, $j = 7.2$ Hz)	14.43	0.96	14.10

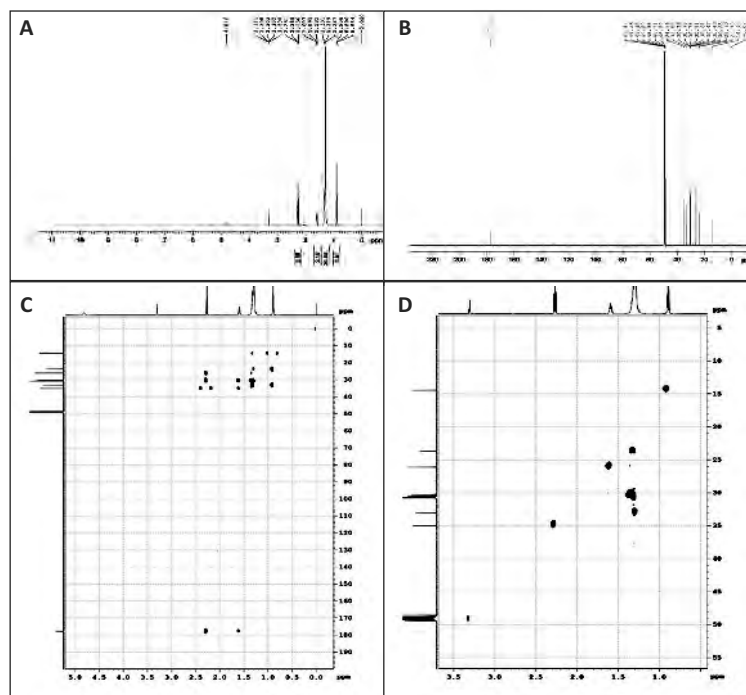
Chú thích: t: Triplet - đỉnh ba, m: Multiplet - đỉnh đa, br s: Broad singlet - đỉnh đơn rộng

Xác định DBPDA1 là acid palmitic.



palmitic acid

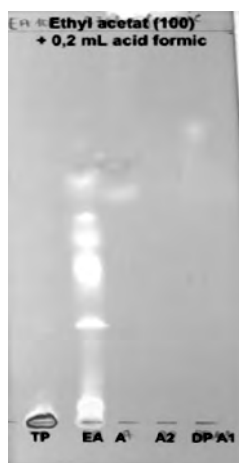
Hình 2. Palmitic acid



Hình 3. Các phổ NMR của DBPDA1

A: Phổ ^1H NMR; B: Phổ ^{13}C NMR; C: Phổ HBMIC; D: Phổ HSQC

3.2.3. Khảo sát hoạt tính chống oxy hóa chất tinh khiết
 Với 5 cao thử gồm cao toàn phần (cao TP), cao ethyl acetate (cao EA), DBPDA1. Các mẫu được chấm đồng lượng trên bản mỏng silicagel. Dung môi khai triển là ethyl acetate (100) + 0.2 mL acid formic. Phát hiện bằng dung dịch DPPH/ MeOH (0.5 mM). Phản ứng để trong tối trong 30 phút.



Hình 4. Sắc ký đồ hoạt tính chống oxy hoá của chất tinh khiết trên bản mỏng

Nhận xét: Qua sắc ký đồ Hình 3 cho thấy chất DBPDA1 có phản ứng âm tính với TT DPPH vậy có thể kết luận sơ bộ chất DP A1 không có tính chống oxy hoá.

4. BÀN LUẬN

Kết quả cho thấy hoạt tính chống oxy hoá của cao ethyl acetate thể hiện rất rõ bằng thử nghiệm DPPH.

Theo một số tài liệu cho thấy phân đoạn ethyl acetate chứa nhiều thành phần như flavonoid, là chất có khả năng chống oxy hoá mạnh [6].

Acid palmitic - chất phân lập từ hoa Đậu biếc không cho thấy tác dụng chống oxy hoá. Các công trình nghiên cứu khác cũng cho thấy sự hiện diện của chất này trong hoa Đậu biếc [7]. Mặc dù chất phân lập không thể hiện hoạt tính chống oxy hoá, nhưng phân đoạn ethyl acetate là một phân đoạn rất tiềm năng để phân lập nhiều chất có tác dụng chống oxy hoá.

Kết quả cho thấy phân đoạn ethyl acetate (EA) từ hoa Đậu biếc có hoạt tính chống oxy hóa rõ rệt qua thử nghiệm DPPH. Điều này phù hợp với tài liệu [6], trong đó phân đoạn EA giàu flavonoid và polyphenol - những chất có khả năng bắt gốc tự do mạnh. Tuy nhiên, chất được phân lập lại là acid palmitic - một acid béo bão hòa không có nhóm hydroxyl hay vòng thơm, nên không có khả năng chống oxy hóa, điều này cũng đã được khẳng định trong nghiên cứu của Prevc và cộng sự [8]. Sự hiện diện của acid palmitic trong hoa Đậu biếc đã được ghi nhận ở các nghiên cứu trước đó [7], nhưng không được xem là thành phần có hoạt tính chính.

Sự không tương đồng giữa hoạt tính mạnh của phân đoạn EA và tính chất không chống oxy hóa của acid palmitic cho thấy chất này không đại diện cho thành phần hoạt tính chính. Có thể các flavonoid, polyphenol hoặc anthocyanin vẫn còn trong phân đoạn nhưng chưa được phân lập do

giới hạn về kỹ thuật hoặc điều kiện sắc ký chưa tối ưu. Theo [6] và [7], các anthocyanin như ternatin cũng là chất đặc trưng của hoa Đậu biếc và có hoạt tính chống oxy hóa cao nhưng thường tan tốt trong dung môi phân cực mạnh hơn ethyl acetate.

Tóm lại, dù chất phân lập không có hoạt tính, nhưng phân đoạn EA vẫn là nguồn tiềm năng cho việc phân lập các chất chống oxy hóa mạnh. Các nghiên cứu tiếp theo cần tối ưu hóa quy trình chiết và sắc ký, đồng thời ứng dụng các kỹ thuật phân tích hiện đại

để phát hiện và cô lập hiệu quả hơn các chất đích.

5. KẾT LUẬN

Nghiên cứu đã đánh giá được hoạt tính chống oxy hóa của các phân đoạn chiết xuất từ hoa Đậu biếc và phân lập thành công palmitic acid từ phân đoạn ethyl acetat. Tuy chất này không thể hiện khả năng chống oxy hóa qua thử nghiệm DPPH, nhưng phân đoạn ethyl acetat vẫn cho thấy tiềm năng đáng kể, mở ra hướng tiếp tục nghiên cứu và phân lập các chất có hoạt tính sinh học từ loài cây này.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

[1] V. Chi, *Từ điển cây thuốc Việt Nam*. Nhà xuất bản y học, 2012.

[2] P. K. Mukherjee, Kumar, et al., "The Ayurvedic medicine *Clitoria ternatea*-From traditional use to scientific assessment," *Journal of Ethnopharmacology*, vol. 120, no. 3, pp. 68-83, 2008.

[3] A. E. Al-Snaf, "Pharmacological importance of *Clitoria ternatea* - A review," *IOSR Journal Of Pharmacy*, vol. 6, no. 3, pp. 68-83, 2016.

[4] M. I. Arshad Mehmood, Lei Zhao et al, "Impact of ultrasound and conventional extraction techniques on bioactive compounds and biological activities of blue butterfly pea flower (*Clitoria ternatea* L.)," *Ultrasonics Sonochemistry*, vol. 51, pp. 12-19, 2019.

[5] J. S. Bulama, S. M. Dangoggo, et al, "Isolation and Characterization of Palmitic Acid from Ethyl

Acetate Extract of Root Bark of *Terminalia Glaucescens*," *Chemistry and materials*, vol. 6, no. 140-143, 2014.

[6] Y. D. L. W. Utami, S. N. F. Setiawibowo, E. S. Sunarsih, F. Wulandari, and E. Rohana, "Antidiabetic and antioxidant activity of *Clitoria ternatea* flower extracts and fractions on blood glucose and MDA in rats induced by alloxan," *Pharm Educ*, vol. 24, no. 6, pp. 21-27, 2024.

[7] L. Y. Jeyaraj EJ, Choo WS., "Extraction methods of butterfly pea (*Clitoria ternatea*) flower and biological activities of its phytochemicals," *J Food Sci Technol*, vol. 58, no. 6, pp. 2054-2067, 2021.

[8] Tjaša Prevc, Nataša Šegatin, Nataša Poklar Ulrih, Blaž Cigić "DPPH assay of vegetable oils and model antioxidants in protic and aprotic solvents", *Talanta*, 109, 13-19; 2013.

In vitro antioxidant activity screening and isolation of compounds from *Clitoria ternatea* L. (Fabaceae) flowers

Vo Thi Bich Ngoc, Do Thi Anh Thu

ABSTRACT

Introduction: *Clitoria ternatea* L. belongs to the legume family Fabaceae, originating from Southeast Asia, and is known as a medicinal herb with biological activities beneficial to health. **Objective:** To investigate the antioxidant activity of extracts and isolated substances. **Methods:** To investigate the antioxidant activity by the DPPH method, to isolate pure substances by chromatographic methods. **Results:** The analysis proved that ethyl acetate extract had the strongest activity with HTCO% of 28.55%. This shows that the ethyl acetate fraction is the main active ingredient with antioxidant effects. From the ethyl acetate extract, chromatographic methods successfully isolated palmitic acid. The DPPH test on palmitic acid gave a negative reaction with the reagent, so it can be preliminarily concluded that palmitic acid does not have antioxidant properties. **Conclusion:** Although the isolated pure substance palmitic acid did not show antioxidant activity, the ethyl acetate fraction showed high potential, opening up further research directions for antioxidant activities from *Clitoria ternatea* flowers.

Keywords: *Clitoria ternatea* L., DPPH test, antioxidant

Received: 06/5/2025

Revised: 17/5/2025

Accepted for publication: 20/5/2025