

THỬ NGHIỆM HOẠT TÍNH ESTROGEN CỦA MẦM HẠT ĐẬU NÀNH

Nguyễn Hoàng Linh*, Bùi Mỹ Linh*

TÓM TẮT

Mục tiêu: Hạt Đậu nành (*Glycine max*) là nguồn nguyên liệu chứa nhiều genistein, đây là một loại isoflavonoid có hoạt tính estrogen, được dùng như một liệu pháp hormon thay thế HRT (hormone replacement therapy). Những thử nghiệm dược lý đã chứng minh các flavonoid trong mầm hạt Đậu nành có thể hỗ trợ cho các trường hợp thiếu năng estradiol trên chuột thí nghiệm.

Đối tượng & phương pháp nghiên cứu: Thử nghiệm trên chuột nhắt trắng với test Elisa, Atswood và thử nghiệm khảo sát tác động của estradiol trên sự tăng trọng.

Kết quả: Thử nghiệm ELISA đã chứng minh rằng cho chuột nhắt trắng dùng bột mầm Đậu nành sau 15 ngày có tác dụng phục hồi sự giảm hàm lượng estradiol trên chuột bị giảm năng sinh dục, không thể hiện tác dụng kiểu estrogen trên chuột bình thường. Bằng thử nghiệm ATSWOOD cho thấy bột mầm Đậu nành làm tăng trọng lượng tử cung trên cả những chuột bình thường cũng như chuột gây giảm năng sinh dục do bị cắt bỏ hai noãn sào. Bên cạnh đó với thử nghiệm khảo sát tác động của estradiol trên sự tăng trọng có thể sơ bộ kết luận rằng bột mầm hạt Đậu nành có tác dụng làm giảm sự tăng trọng ở những chuột giảm năng sinh dục do cắt bỏ 2 noãn sào.

Kết luận: Qua kết quả có được bằng các thử nghiệm trên có thể khẳng định bột mầm hạt Đậu nành có tác dụng của một phytoestrogen.

Từ khóa: Hoạt tính estrogen, mầm hạt đậu nành, HRT, thử nghiệm ELISA, thử nghiệm Atswood, chuột bị giảm năng sinh dục, noãn sào chuột.

ABSTRACT

ESTROGENIC-ACTIVITY TESTS OF SOYABEAN SPROUT

Nguyen Hoang Linh, Bui My Linh *Y Hoc TP. Ho Chi Minh *Vol. 14 - Supplement of No 1-2010: 73 –

79

Introduction: Soyabean (*Glycine max*) is the main source of genistein extraction. This is an estrogenic-activity isoflavonoid, used as a HRT (hormone replacement therapy). Pharmacological tests revealed the flavonoids in Soyabean sprouts (S.S) can help in the deficient-estradiol cases on the tested mice.

Methods & Materials: Mice, Elisa test, Atswood test and the test of estradiol activity on the weight

Results: ELISA test proved that the utilization of S.S during 15 days only has the effect in recovery of estradiol on the estrogen-deficiency-induced mice, without the estrogenic-activity on the normal mice. ATSWOOD test showed the S.S is the evidence in uterus-weight increasing not only normal but also Besides, with the of the test mice , preliminarily conclusion the S.S have the action of decreased-weight in estrogen-deficiency-induced, ovariectomized mice.

Conclusion: The approved-results from above tests showed the S.S have the action of a phytoestrogen.

Keywords: estrogenic-activity, Soyabean sprout, HRT, test ELISA, test ATSWOOD, estrogen-deficiency-induced mice, ovariectomized mice

ĐẶT VẤN ĐỀ

Liệu pháp hormon thay thế được dùng cho

những phụ nữ ở độ tuổi tiền mãn kinh và mãn kinh⁽²⁾ để hạn chế các rối loạn do thiếu

* Khoa Dược - Đại học Y Dược Tp. Hồ Chí Minh

Địa chỉ liên hệ: DS. Nguyễn Hoàng Linh

ĐT: 0974656271 Email: hoanglinhpharma@gmail.com

estrogen gây ra. Phytoestrogen từ hạt Đậu nành có hoạt tính tạo ra hormon nữ, giúp cho sự hoạt động của cơ thể do có thể gắn vào thụ thể estrogen giúp cơ thể sản sinh ra estradiol. Tác động này là do sự hiện diện của isoflavonoid có tên là genistein^{(4),(5)}. Trong hạt Đậu nành genistein ở dưới dạng glycosid là genistin tác động gắn kết vào các thụ thể rất hạn chế. Trong nghiên cứu này cho thấy những enzym có trong hạt Đậu nành này mầm sẽ thúc đẩy sự tạo thành estradiol trong chuột thử nghiệm đã được cắt bỏ hai noãn sào. Kết quả thực nghiệm được đánh giá bằng test Elisa và thử nghiệm Astwood.

ĐỐI TƯỢNG - PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

Nguyên vật liệu

Nguyên liệu dùng trong các thử nghiệm là bột định chuẩn mầm hạt Đậu nành⁽⁶⁾ do Công ty Nghiên cứu Sản xuất Dược liệu Miền Trung cung cấp. Bột mịn có màu vàng hơi xanh lá, vị nhạt hơi béo, mùi thơm. Độ ẩm 4,5 % (sản xuất ngày 25-03-2009, PKN số 4770909-HDV).

Thuốc đối chiếu dùng trong nghiên cứu là Progynova, hàm lượng 2 mg Estradiol valerate/viên (hãng Bayer Schering Pharma).

Bộ KIT Elisa của hãng Human (Đức). Máy đọc Elisa hiệu Biotek Elx 808 (USA)

Động vật thử nghiệm

Chuột nhắt trắng giống cái, chủng Swiss albino 5-6 tuần tuổi, thể trọng trung bình $22 \pm 2g$ do Viện vắc xin và sinh phẩm y tế Nha Trang cung cấp. Chuột được cho ăn uống bình thường và để ổn định ít nhất một tuần trước khi thử nghiệm.

Phương pháp nghiên cứu

Phương pháp chung

Chỉ tiêu để đánh giá hoạt tính estrogen là định lượng hàm lượng estradiol tự do trong mẫu huyết tương hay huyết thanh (test Elisa)^{(3),(1)} và khảo sát sự thay đổi của trọng lượng tử cung (test Astwood)⁽⁷⁾. Bên cạnh đó sự thay đổi

thể trọng của thuốc thử nghiệm trước và sau khi uống thuốc cũng được ghi nhận.

Việc đánh giá này được thực hiện trên 2 cơ địa: Động vật bình thường và động vật bị giảm chức năng sinh dục (cắt bỏ 2 noãn sào).

Khảo sát thời điểm nghiên cứu.

Liều cho uống: qua tham khảo và thử nghiệm cho thấy LD50 đường uống của mầm Đậu nành trên chuột nhắt trắng là 500 mg/kg, các liều thử nghiệm được chọn là 10 mg/kg và 50 mg/kg thể trọng. Bột được hòa trong nước cất và dầu olive. Liều uống của thuốc đối chiếu là 0,5 mg/kg thể trọng, pha trong dầu olive.

Tiến hành: Chuột được chia thành các lô, mỗi lô từ 10-15 con.

Chuột bình thường

- Lô chứng uống nước cất.
- Lô thử uống bột mầm Đậu nành liều 50 mg/kg.
- Lô đối chiếu uống Estradiol valerate.

Chuột gây giảm năng sinh dục tiến hành tương tự như lô chuột bình thường, nhưng lô thử có thêm liều 10 mg/kg.

Các chuột ở 2 lô được cho uống với thể tích là 10 mg/kg/ml. Thời gian cho uống là 15 ngày

vào buổi sáng trước khi cho ăn. Sau thời gian thử nghiệm, tiến hành xác định các chỉ tiêu sau:

- Hàm lượng estradiol trong huyết thanh pg/ml (test Elisa).
- Trọng lượng tử cung tính bằng g% (test Astwood).

Kỹ thuật định lượng Estradiol bằng test Elisa.

Nguyên tắc: Elisa là một kỹ thuật sinh hóa dựa trên nguyên lý chính là tính đặc hiệu của kháng nguyên (KN)-kháng thể (KT) dùng để phát hiện các kháng nguyên hay kháng thể (ở đây KN là estrogen, KT chính là KT của estrogen được đưa vào để phát hiện nồng độ estrogen trong mẫu) trong thử nghiệm này estrogen trong chuột nhắt là estradiol.

Kỹ thuật định lượng estradiol dựa trên sự tương tác cạnh tranh giữa estradiol và liên hợp enzym-hormon đối với số lượng giới hạn của các kháng thể kháng estradiol (trích tử thỏ) được cố định sẵn trong giếng của các bộ kit. Do đó lượng gắn của liên hợp enzym-hormon sẽ tỷ lệ nghịch với hàm lượng estradiol trong mẫu đo.

Sau khi ủ mẫu đo và liên hợp enzym-hormon trong các giếng của bộ kit, phần liên hợp enzym- hormon không gắn sẽ bị loại bỏ bằng dung dịch rửa. Sau khi cho chất nền màu xanh dương sẽ xuất hiện và màu này sẽ chuyển sang màu vàng sau khi cho dung dịch dừng phản ứng. Cường độ màu-đo bằng hệ thống máy Elisa tự động-là tỷ lệ nghịch với hàm lượng estradiol trong mẫu (dựa theo đường cong chuẩn estradiol ở các nồng độ tăng dần).

Mẫu máu lấy ở đuôi chuột, vào buổi sáng, được đem ly tâm, lấy phần huyết thanh cho vào ống đã chứa sẵn EDTA, tiến hành các bước cần thiết, đo bằng máy Elisa ở bước sóng 450 nm trong 30 phút.

Trong báo cáo này chúng tôi sử dụng phương pháp Elisa sandwich.

Phương pháp Astwood

Tác động estrogen của thuốc thử nghiệm được đánh giá qua sự thay đổi trọng lượng tử cung. Sau 15 ngày uống thuốc thử nghiệm ở 2 lô chuột (lô bình thường và lô cắt bỏ noãn sào), tiến hành tách mỡ tử cung, cân. Tính trọng lượng trung bình của tử cung theo g%.

Tính toán kết quả

Các số liệu được biểu thị bằng trị số trung bình $M \pm SEM$ (standard Error of the mean: sai số chuẩn của giá trị trung bình). Và sử lý thống kê dựa vào phép kiểm T-test với $P \leq 0,05$ hoặc phép kiểm ANOVA với $P \leq 0,05$.

KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU VÀ BÀN LUẬN

Xây dựng đường cong chuẩn của estradiol

Bảng 1. Độ hấp thu của các estradiol chuẩn có nồng độ tăng dần

Hàm lượng estradiol chuẩn (pg/ml)	Độ hấp thu
0	2,583
25	1,862
100	1,282
250	0,701
500	0,318
1000	0,161
2000	0,115

Dựa vào bảng này ta vẽ được đồ thị, kết quả đo được của những mẫu thử sẽ dựa trên đồ thị này.

Khảo sát hàm lượng Estradiol trong các lô thử nghiệm bằng kỹ thuật Elisa

Khảo sát thời điểm nghiên cứu.

Qua khảo sát cho thấy thời điểm thích hợp cho uống là 3 tuần kể từ khi cắt 2 noãn sào. Khi đó hàm lượng estradiol nằm dưới giới hạn bình thường nhưng chưa giảm đến tối thiểu (bảng 2)

Bảng 2. Hàm lượng estradiol ở chuột bình thường và chuột cắt 2 noãn sào sau 2, 3 và 5 tuần

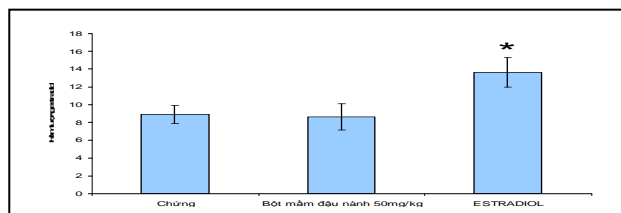
Lô chuột thử nghiệm N = 10-13	Hàm lượng estradiol(pg/ml)
Bình thường	8,911 \pm 1,045
Cắt 2 noãn sào sau 2 tuần	9,223 \pm 0,423
Cắt 2 noãn sào sau 3 tuần	5,617 \pm 1,082*
Cắt 2 noãn sào sau 5 tuần	2,830 \pm 0,702*

$P < 0,05$ so với chuột bình thường

Nhận xét

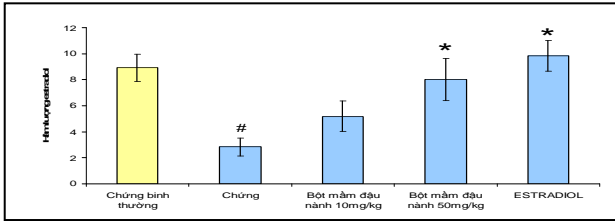
Kết quả được thể hiện trên bảng cho thấy hàm lượng estradiol sau 2 tuần của chuột cắt noãn sào và chuột bình thường không có sự khác biệt đạt ý nghĩa thống kê.

Sau 3 tuần cắt noãn sào hàm lượng estradiol đã giảm đi gần như phân nửa, đạt ý nghĩa thống kê so với chuột bình thường.



Hàm lượng estradiol của các lô chuột bị gây giảm năng sinh dục

Thử nghiệm được tiến hành trên lô chuột bình thường và chuột giảm năng sinh dục, kết quả được thể hiện ở hình 1.



Hình 1. Đồ thị biểu diễn hàm lượng estradiol của các lô chuột bị gây giảm năng sinh dục

Nhận xét

Hàm lượng estradiol của lô chúng cắt 2 noãn sào giảm đạt ý nghĩa thống kê so với lô chúng bình thường, chúng tỏ mô hình nghiên cứu gây giảm năng sinh dục đạt.

- Hàm lượng estradiol của lô uống thuốc đối chiếu estradiol valerate liều 0,5 mg/kg cao hơn so với hàm lượng estradiol của lô chúng, đạt ý nghĩa thống kê ở độ tin cậy 95%.
- Hàm lượng estradiol của lô uống bột mầm Đậu nành liều 10 mg/kg cao hơn so với hàm lượng estradiol của lô chúng nhưng chưa đạt ý nghĩa thống kê ở độ tin cậy 95%. Hàm lượng estradiol của lô uống bột mầm Đậu nành liều 50 mg/kg cao hơn so với hàm lượng estradiol của lô chúng đạt ý nghĩa thống kê ở độ tin cậy 95%. Do đó, sơ bộ kết luận rằng bột mầm Đậu nành ở liều uống 50 mg/kg sau 15 ngày có tác dụng phục hồi sự giảm hàm lượng estradiol trong những con chuột giảm năng sinh dục do bị cắt 2 noãn sào.

Hàm lượng estradiol của các lô chuột bình thường

Mục đích của thử nghiệm này là nhằm khẳng định xem sự tác động gián tiếp của bột mầm Đậu nành có làm gia tăng hàm lượng estradiol trong máu của thú thử nghiệm bình thường hay không. Kết quả được thể hiện ở hình 2.

Hình 2. Đồ thị biểu diễn hàm lượng estradiol của các lô chuột bình thường

Nhận xét

- Hàm lượng estradiol của lô chuột bình thường uống thuốc đối chiếu estradiol valerate liều 0,5 mg/kg cao hơn so với hàm lượng estradiol của lô chúng, đạt ý nghĩa thống kê ở độ tin cậy 95%.
- Hàm lượng estradiol của lô uống bột mầm Đậu nành liều 50 mg/kg không khác nhau đạt ý nghĩa thống kê so với hàm lượng estradiol của lô chúng. Do đó, phối hợp với kết quả ở phần

Chúng tôi kết luận rằng bột mầm Đậu nành ở liều uống 50 mg/kg sau 15 ngày chỉ có tác dụng phục hồi sự giảm hàm lượng estradiol trong những chuột bị giảm năng sinh dục, không thể hiện tác dụng kiểu estrogen trên chuột bình thường.

Khảo sát tác động của estradiol trên sự tăng trọng

Sự thay đổi trọng lượng của các thú thử nghiệm bình thường

Kết quả thử nghiệm được trình bày ở bảng 3.

Bảng 3. Thay đổi (%) trọng lượng so với ban đầu ở chuột bị giảm năng sinh dục

	Lô thử nghiệm N = 10-15	Liều cho uống (mg/kg)	Trọng lượng so với ban đầu(%)
Chuột bình thường	Chủng		10,743 ± 2,762
	Chủng		35.037 ± 4.148#
Chuột cắt bỏ 2 noãn sào	Bột mầm Đậu nành	10	29.222 ± 6.052
	Bột mầm Đậu nành	50	17.204 ± 6.654*
	ESTRADIOL	0,5	2.974± 2.091*

Nhận xét

Thay đổi trọng lượng so với ban đầu (%) của lô chúng cắt 2 noãn sào tăng đạt ý nghĩa thống kê so với lô chúng bình thường, chúng tỏ mô hình nghiên cứu gây giảm năng sinh dục đạt.

- Thay đổi trọng lượng so với ban đầu của lô uống thuốc đối chiếu estradiol valerate liều 0,5 mg/kg nhỏ hơn so thay đổi trọng lượng so với ban đầu của lô chúng, đạt ý nghĩa thống kê ở độ tin cậy 95%.

- Thay đổi trọng lượng so với ban đầu của lô uống bột mầm Đậu nành liều 10 mg/kg thấp hơn so với thay đổi trọng lượng so với ban đầu của lô chứng nhưng chưa đạt ý nghĩa thống kê ở độ tin cậy 95%. Thay đổi trọng lượng so với ban đầu của lô uống bột mầm Đậu nành liều 50 mg/kg thấp hơn so với thay đổi trọng lượng so với ban đầu của lô chứng đạt ý nghĩa thống kê ở độ tin cậy 95%. Do đó, sơ bộ kết luận rằng bột mầm Đậu nành ở liều uống 50 mg/kg sau 15 ngày có tác dụng giảm sự tăng trọng ở những con chuột giảm năng sinh dục do bị cắt 2 noãn sào.

Sự thay đổi trọng lượng so với ban đầu của các thú thử nghiệm bị giảm năng sinh dục

Kết quả thử nghiệm được trình bày ở bảng 4.

Bảng 4. Thay đổi (%) trọng lượng so với ban đầu ở chuột bình thường

	Lô thử nghiệm N = 10-15	Liều cho uống(mg/kg)	Trọng lượng so với ban đầu (%)
Chuột bình thường	Chứng		10,743 ± 2,762
	Bột mầm Đậu nành	50	14,576 ± 2,061
	Estradiol	0,5	6,891 ± 3,307

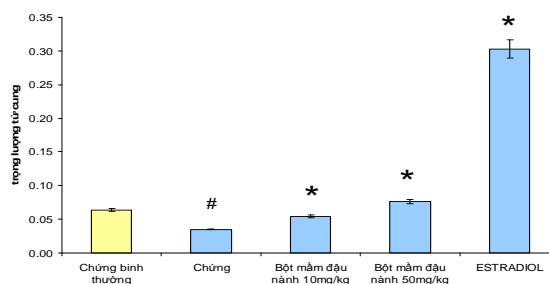
Nhận xét

- Thay đổi trọng lượng so với ban đầu (%) của lô chuột bình thường uống thuốc đối chiếu estradiol valerate liều 0,5 mg/kg thấp hơn so với thay đổi trọng lượng so với ban đầu của lô chứng, nhưng chưa đạt ý nghĩa thống kê ở độ tin cậy 95%.
- Thay đổi trọng lượng so với ban đầu của lô uống bột mầm Đậu nành liều 50 mg/kg không khác nhau đạt ý nghĩa thống kê so với thay đổi trọng lượng so với ban đầu. Kết hợp với kết quả ở bảng 3, chúng tôi kết luận rằng bột mầm Đậu nành ở liều uống 50 mg/kg sau 15 ngày chỉ có tác dụng làm giảm trọng lượng cơ thể trong những chuột bị giảm năng sinh dục, không thể hiện tác dụng này trên chuột bình thường.

Khảo sát tác động của estradiol bằng phương pháp Astwood.

Trọng lượng tử cung của các thú thử nghiệm gây giảm năng sinh dục

Kết quả thử nghiệm được trình bày ở hình 3.



Hình 3. Đồ thị biểu diễn sự thay đổi trọng lượng tử cung của các lô chuột gây giảm năng sinh dục

Nhận xét

Trọng lượng tử cung của lô chứng cắt 2 noãn sào giảm đạt ý nghĩa thống kê so với lô chứng bình thường, chứng tỏ mô hình nghiên cứu gây giảm năng sinh dục đạt.

- Trọng lượng tử cung của lô uống thuốc đối chiếu estradiol valerate liều 0,5 mg/kg cao hơn so với trọng lượng tử cung của lô chứng, đạt ý nghĩa thống kê ở độ tin cậy 95%.
- Trọng lượng tử cung của lô uống bột mầm Đậu nành liều 10mg/kg và liều 50 mg/kg cao hơn so với trọng lượng tử cung của lô chứng đạt ý nghĩa thống kê ở độ tin cậy 95%. Do đó, sơ bộ kết luận rằng bột mầm Đậu nành ở liều uống 10-50 mg/kg sau 15 ngày có tác dụng phục hồi sự giảm trọng lượng tử cung trong những con chuột giảm năng sinh dục do bị cắt 2 noãn sào.

Trọng lượng tử cung của các thú thử nghiệm bình thường

Kết quả được trình bày ở bảng 5.

Bảng 5. Trọng lượng tử cung của các lô chuột bình thường

	Lô thử nghiệm N = 10-15	Liều cho uống (mg/kg)	Trọng lượng tử cung (g%)
Chuột bình thường	Chứng		0,064 ± 0,002
	Bột mầm Đậu nành	50	0,142 ± 0,016*





Estradiol	0,5	0,502 ± 0,021*
-----------	-----	----------------




* P < 0,05 so với lô chứng tương ứng

Nhận xét

- Trọng lượng tử cung của lô uống thuốc đối chiếu Estradiol valerate liều 0,5 mg/kg cao hơn so với trọng lượng tử cung của lô chứng, đạt ý nghĩa thống kê ở độ tin cậy 95%.
- Trọng lượng tử cung của lô uống bột mầm

Đậu nành liều 50 mg/kg cao hơn so với trọng lượng tử cung của lô chứng đạt ý nghĩa thống kê ở độ tin cậy 95%. Do đó, phối hợp với kết quả ở hình 3, chúng tôi kết luận rằng bột mầm Đậu nành ở liều uống 10-50 mg/kg sau 15 ngày có tác dụng kiểu estrogen trên cả hai cơ địa bình thường và cơ địa giảm năng sinh dục do bị cắt 2 noãn sào.

			
Tử cung chuột cắt 2 noãn sào uống nước cất	Tử cung chuột cắt 2 noãn sào uống bột mầm Đậu nành 10 mg/kg	Tử cung chuột cắt 2 noãn sào uống estradiol	Tử cung chuột cắt 2 noãn sào uống bột mầm Đậu nành 50 mg/kg

		
Tử cung chuột bình thường uống nước cất	Tử cung chuột bình thường uống bột mầm Đậu nành 50 mg/kg	Tử cung chuột bình thường uống thuốc đối chiếu Estradiol valerate

Hình 4. Hình minh họa sự khác biệt của khối lượng tử cung ở chuột thử nghiệm với các điều kiện thử khác nhau

KẾT LUẬN VÀ KIẾN NGHỊ

Kết luận

Qua các kết quả nghiên cứu được trình bày có thể đi đến những kết luận sau:

- Đây là lần đầu tiên phương pháp Elisa được dùng để đánh giá tác động in vivo qua việc xác định hàm lượng estradiol sản sinh gián tiếp qua việc sử dụng bột mầm hạt Đậu nành. Kết quả cho thấy đối với hàm lượng estradiol

trong huyết thanh bột mầm hạt Đậu nành ở liều uống 50 mg/kg sau 15 ngày chỉ có tác dụng phục hồi sự giảm hàm lượng estradiol trong những chuột bị giảm năng sinh dục, không thể hiện tác dụng kiểu estrogen trên chuột bình thường.

- Đối với sự thay đổi trọng lượng tử cung, bột mầm Đậu nành có tác dụng làm phát triển tử cung trên cả những chuột bình thường cũng như chuột gây giảm năng sinh dục. Tác dụng

này thể hiện trên cả 2 liều cho uống 10 mg/kg và 50 mg/kg. Bột mầm Đậu nành có tác dụng kiểu estrogen trên cả hai cơ địa bình thường và cơ địa giảm năng sinh dục do bị cắt 2 noãn sào.

- Sơ bộ kết luận rằng bột mầm Đậu nành ở liều uống 50 mg/kg sau 15 ngày có tác dụng giảm sự tăng trọng ở những con chuột giảm năng sinh dục do bị cắt 2 noãn sào.

Qua kết quả có được bằng thử nghiệm Elisa và Atswood có thể khẳng định bột mầm hạt Đậu nành có tác dụng của một phytoestrogen.

Kiến nghị

Nếu đề tài được tiếp tục, chúng tôi xin đề nghị thực hiện tiếp những phần sau:

- Thực hiện phần khảo sát hóa học cho được liệu nghiên cứu là bột sẩy phun mầm Đậu nành do Công ty nghiên cứu và sản xuất Dược liệu miền Trung sản xuất.
- Chiết xuất chất chuẩn, xây dựng quy trình tiêu chuẩn hóa dược liệu.
- Sản xuất thành chế phẩm phục vụ nhu cầu hỗ trợ sức khỏe, trị bệnh,...

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Engvall E, Perlman P-Enzym-linked immunosorbent assay (ELISA). Quantitative assay of immunoglobulin G-Immunochemistry 8 (9): 871-4.
2. Huntley AL et al-Soy for the treatment of perimenopausal symptoms-a systematic review. Maturitas-2004; 47:1-9
3. Lequin R (2005) - Enzym immunoassay (EIA)/enzym-linked immunosorbent assay (ELISA) - Clinical Chemistry 51 (12): 2415-8.
4. Nguyễn Văn Tuấn-Phytoestrogen và sức khỏe con người-Vietsciences, 06-2006.
5. Tâm Diệu-Đậu nành nguồn dinh dưỡng tuyệt hảo-Nhà xuất bản Hoa Sen Westminster-1998, tr. 1-3.
6. Viện Dược liệu-Cây thuốc và động vật làm thuốc ở Việt Nam, tập I-Nhà xuất bản Khoa học và Kỹ thuật-2004-tr. 271-273.
7. Viện Dược liệu-Phương pháp nghiên cứu tác dụng dược lý của thuốc từ dược thảo-chương 18: Phương pháp nghiên cứu dược lý thuốc có tác dụng nội tiết sinh dục (GS. Đoàn Thị Nhu), NXB Y học, 2005, tr. 209-213.
