KHẢO SÁT TÁC DỤNG CHỐNG OXY HÓA *IN VITRO* CỦA CÁC PHÂN ĐOẠN POLYSACCARID TỪ NẤM THƯỢNG HOÀNG (*PHELLINUS LINTEUS* TENG, HYMENOCHAETACEAE)

*Lê Thị Anh Thi**, Trần Công Luận*,****, Lê Trần Minh Thảo*, Nguyễn Ngọc Chương*, Cổ Đức Trọng****

TÓM TẮT

***Mục tiêu**: Phellinus linteus là loại nấm dược liệu quý hiếm được coi là thượng phẩm bởi loại nấm này có chứa các hoạt chất có đặc tính chống khối u rất mạnh, phòng chống và hỗ trợ điều trị bệnh ung thư, giúp trẻ hóa cơ thể… Các loại nấm trong chi Phellinus đang rất được các nhà khoa học trên thế giới quan tâm. Trên thế giới, nhiều nhóm nghiên cứu đã kết hợp các phương pháp nghiên cứu y dược học hiện đại trong dược lý, miễn dịch, sinh học phân tử, dược lý tế bào và đã chứng minh được polysaccarid của nấm Thượng hoàng là một trong những thành phần có tác dụng chống oxy hóa. Hiện nay những nghiên cứu trong nước về hợp chất polysaccarid của nấm này vẫn còn rất ít. Vì vậy đề tài thực hiện với mục tiêu khảo sát tác dụng chống oxy hóa theo hướng quét gốc tự do của các phân đoạn polysaccarid chiết xuất từ nấm Thượng hoàng.*

***Đối tượng và phương pháp**: Nấm Thượng hoàng được cung cấp bởi Công ty TNHH Linh chi VINA. Chiết xuất và tinh sạch các phân đoạn polysaccarid bằng cột trao đổi ion resin DEAE-cellulose với các nồng độ muối NaCl tăng dần, kiểm tra bằng đo quang ở λ = 204 nm. Đánh giá hoạt tính chống oxy hóa của các phân đoạn này bằng phương pháp quét gốc tự do DPPH (in vitro).*

***Kết quả**: Giá trị IC_{50} của các mẫu polysaccarid A, B, B11, B16 lần lượt là: 284,19µg/ml; 220,44 µg/ml; 664,96 µg/ml; 194,76 µg/ml.*

***Kết luận**: Polysaccarid toàn phần và các phân đoạn polysaccarid chiết từ nấm Thượng hoàng có tác dụng chống oxy hóa theo hướng quét gốc tự do trong thử nghiệm DPPH.*

***Từ khóa**: Phellinus linteus, polysaccarid, chống oxy hóa.*

ABSTRACT

STUDY ON ANTIOXIDANT ACTIVITY OF POLYSACCHARIDE FRACTIONS OF PHELLINUS LINTEUS TENG, HYMENOCHAETACEAE

Le Thi Anh Thi, Tran Cong Luan, Le Tran Minh Thao, Nguyen Ngoc Chuong, Co Duc Trong

* Y Hoc TP. Ho Chi Minh * Supplement of Vol. 19 - No 5 - 2015: 100 - 104

***Objective**: Phellinus linteus, a rare medicinal fungus, contains the bioactive ingredients that have useful activities such as anti-tumor, prevention and treatment of cancer, rejuvenation. Besides, antioxidant effects of polysaccharides of Phellinus linteus have been evidenced. However, there are very few researches for polysaccharide compounds in Vietnam. The purpose of this study was to evaluate the antioxydant activity and the free radical scavenging effect of polysaccharide extracted from Phellinus linteus.*

***Methods**: Phellinus linteus was offered by Linh chi Vina Co, Ltd. Extraction and purification of polysaccharide fractions were carried out by exchanged ion resin DEAE-cellulose column. The free radical scavening effect on 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl radical tests of crude polysaccharide and polysaccharide*

* Khoa Y học cổ truyền- ĐH Y dược Tp.HCM
** Đại học Khoa học tự nhiên
*** Cty TNHH Linh chi Vina
**** ĐH Tây đô
Tác giả liên lạc: PGS. TS. Trần Công Luận *ĐT*: 0903671323 *Email*: congluan53@gmail.com

fractions were performed.

***Results**: IC_{50} values of polysaccharide A, B, B11 and B16 were 284.19 μg/ml, 220.44 μg/ml, 664.96 μg/ml and 194.76 μg/ml, respectively.*

***Conclusion**: Crude polysaccharide and polysaccharide fractions extracted from Phellinus linteus had antioxidant effects.*

***Key words**: Phellinus linteus, polysaccharide, antioxidant activity.*

ĐẶT VẤN ĐỀ

Phellinus linteus là loại nấm dược liệu quý hiếm được coi là thượng phẩm bởi loại nấm này có chứa các hoạt chất có đặc tính chống khối u rất mạnh, phòng chống và hỗ trợ điều trị bệnh ung thư, giúp trẻ hóa cơ thể[3,5,7]. Hợp chất polysaccarid trong nấm Thượng Hoàng có hoạt tính chống khối u cao nhất trong các loại nấm do có khả năng kích thích miễn dịch và kìm hãm sự sinh sản của tế bào khối u[1,2,4]. Tuy nhiên, hiện nay những nghiên cứu trong nước về hợp chất polysaccarid của nấm này vẫn còn rất ít. Chính vì vậy, đề tài "Khảo sát tác dụng chống oxy hóa của các phân đoạn polysaccaride từ nấm Thượng hoàng (*Phellinus linteus* Teng)" được thực hiện với mục tiêu khảo sát hoạt tính chống oxy hóa *in vitro* của các phân đoạn polysaccharide từ nấm Thượng hoàng bằng thử nghiệm 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH).

ĐỐI TƯỢNG - PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

Đối tượng nghiên cứu

Nấm Thượng hoàng được cung cấp bởi Công ty TNHH Linh chi VINA. Mẫu được định danh và lưu trữ tại Trung tâm Sâm và Dược liệu TP Hồ Chí Minh. Nguyên liệu xay nhỏ, bảo quản nơi khô mát và được chiết xuất theo sơ đồ 1.

Vật liệu nghiên cứu

Cồn 96%, muối ăn (NaCl), màn bán thấm cho phép các chất có trọng lượng phân tử thấp (đường monose, lipid, muối khoáng, acid amin…) đi qua, resin DEAE-cellulose, 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (Sigma, Mỹ), MeOH (Trung Quốc), acid ascorbic (Vitamin C) (Merck, Đức). Phương pháp xác định khả năng quét gốc tự do (thử nghiệm DPPH)

Dung dịch DPPH

Pha dung dịch DPPH 0,6 mM trong methanol (MeOH) 70% bằng cách hòa tan 5,915 mg DPPH vào 17,5 ml MeOH cho vào bình định mức sau đó thêm nước cho đủ 25 ml.

Mẫu thử

Cân chính xác 10 mg mẫu khô, thêm một ít nước vào hòa tan cho vào bình định mức 10 ml rồi thêm nước đến vạch được dung dịch mẫu có nồng độ 1000 μg/ml. Các mẫu thử được tiến hành nghiên cứu ở trong ngưỡng 9 nồng độ từ 10 đến 700 μg/ml (các mẫu thử pha trong nước). Tương tự với mẫu chứng dương ở trong khoảng 7 nồng độ từ 10 đến 40 μg/ml. 0,5 ml mẫu thử hay mẫu chứng dương ở các nồng độ khảo sát được cho phản ứng với 0,5 ml dung dịch DPPH. Thêm MeOH 70% vừa đủ 4 ml. Ống chứng: 0,5 ml DPPH thêm vào 3,5 ml MeOH 70%. Lắc đều, hỗn hợp sau khi pha được để ở nhiệt độ phòng 30 phút. Đo quang ở bước sóng λ = 516 nm.

Cách tính kết quả

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

$$HTCO(\%) = \frac{(ODc - ODt)}{ODc} \times 100$$

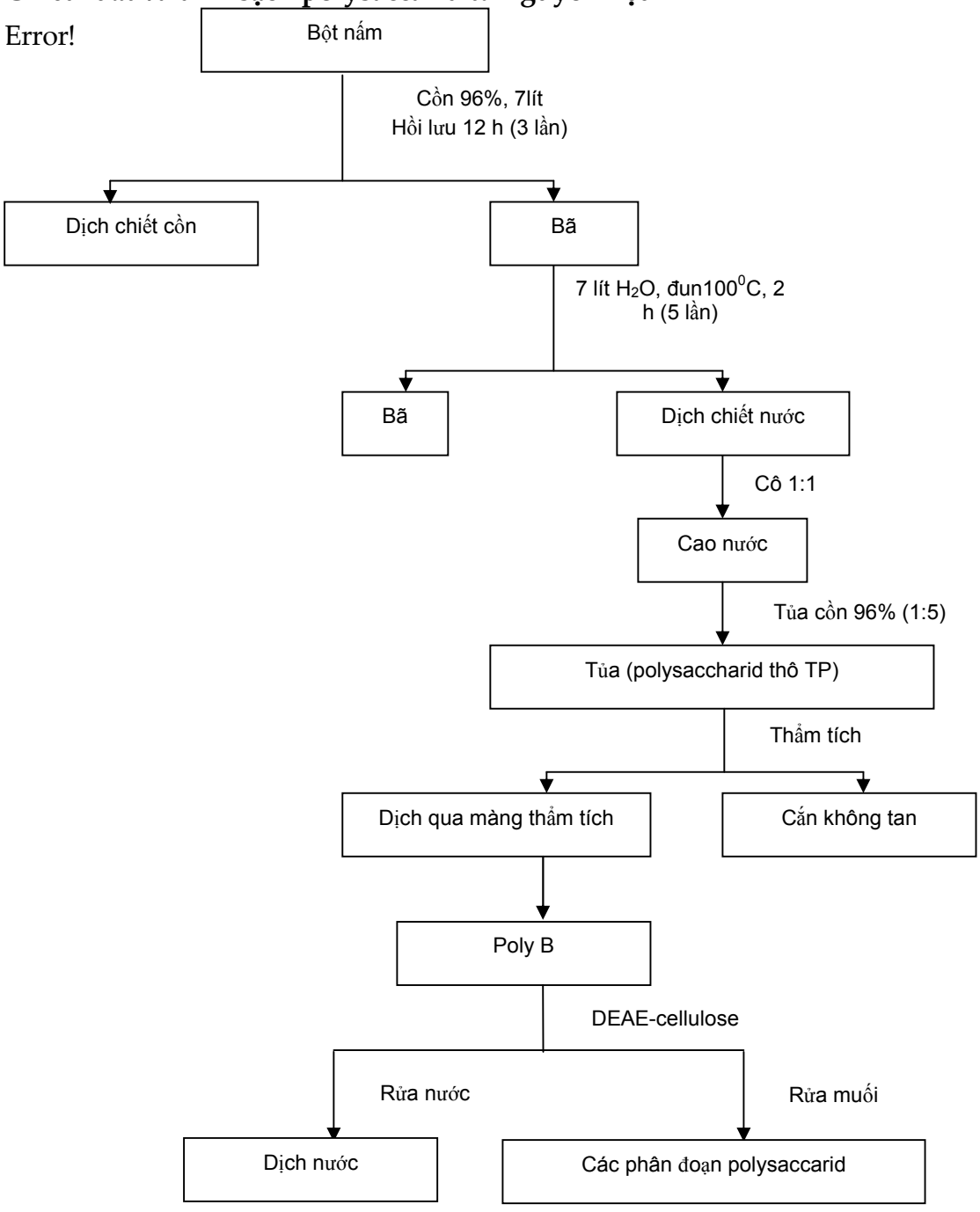
Trong đó: OD_c: Mật độ quang của dung dịch DPPH và MeOH. OD_t: Mật độ quang của DPPH và mẫu thử.

Từ HTCO (%) và nồng độ mẫu dựng được đường chuẩn. Dựa vào đường chuẩn tính được IC_{50} (khả năng đánh bắt 50% DPPH của mẫu). Giá trị IC_{50} càng thấp tương ứng với HTCO càng cao và ngược lại.

Các số liệu kết quả thử nghiệm được biểu thị trung bình của 3 lần đo khác nhau.

Chiết xuất và tinh sạch polysaccarid từ nguyên liệu[4,6]

Error!



Sơ đồ 1. *Quy trình chiết xuất và tinh sạch polysaccarid*

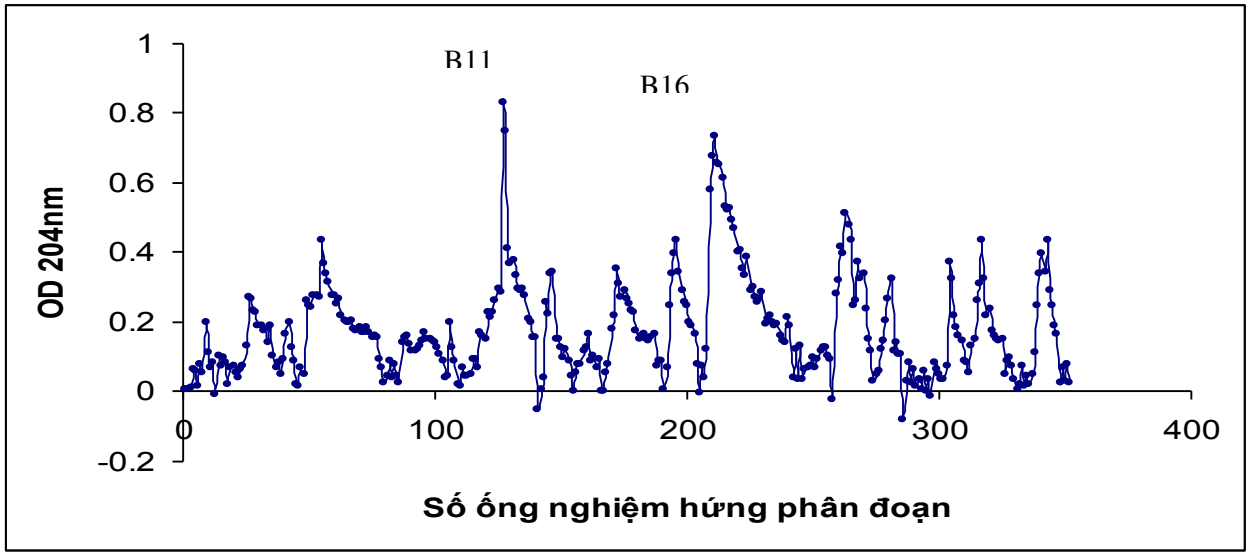
KẾT QUẢ - BÀN LUẬN

Chiết xuất và tinh sạch polysaccarid từ nguyên liệu

Kết quả chiết polysaccarid thô toàn phần (polysaccarid A) từ 700 g nguyên liệu ban đầu là 25,04 g, hiệu suất chiết 3,58%.

Kết quả tinh sạch polysaccarid thô toàn phần sau thẩm tích thu được 0,44 g cắn không tan trong nước, hay các loại dung môi khác. Dịch còn lại tiến hành đông khô thu được 8,64 g (polysaccarid B).

Tiến hành rửa giải polysaccarid B trên cột trao đổi ion DEAE-cellulose với các nồng độ muối NaCl tăng dần, cô quay, thẩm tích loại muối, đông khô chân không thu được 23 phân đoạn. Trong đó các phân đoạn polysaccarid B5 (5,0 mg), B7 (6,3 mg), B11 (9,1 mg) ở nồng độ muối 0,22 M, B12 (7,0 mg), B14 (5,6 mg), B15 (6,8 mg), B16 (12 mg) ở nồng độ muối 0,3 M, B18 (8,0 mg), B19 (4,0 mg), B21 (3,2 mg), B22 (8,0 mg), B23 (6,1 mg) có độ hấp thu tử ngoại ở 204 nm đạt trị số cao (Hình 1).



Hình1: *Đồ thị các phân đoạn rửa giải ở nồng độ muối NaCl 0 - 1M*

Kết quả thử nghiệm DPPH *in vitro*

Vì lượng mẫu các phân đoạn polysaccarid thu được qua sắc kí cột trao đổi anion DEAE-cellulose khá ít, chỉ có phân đoạn polysaccarid B11 và B16 là nhiều nhất. Do vậy, chúng tôi chỉ tiến hành các thí nghiệm khảo sát tác dụng chống oxy hóa bằng thử nghiệm DPPH ở các phân đoạn polysaccarid A, polysaccarid B, polysaccarid B11 và polysaccarid B16.

Bảng 4: *Hoạt tính chống oxy hóa in vitro của các mẫu polysaccarid chiết từ nấm Thượng hoàng so với vitamin C*

Nồng độ µg/ml	Polysaccarid A		Polysaccarid B		Polysaccarid B11		Poysaccarid B16		Vitamin C	
	OD trung bình	HTCO %	OD trung bình	HTCO %	OD trung bình	HTCO %	OD trung bình	HTCO %	OD trung bình	HTCO %
1000	-	-	-	-	0,281	59,53	-	-	-	-
800	-	-	-	-	0,319	54,12	-	-	-	-
600	0,147	80,05	0,134	83,25	0,359	48,42	0,086	87,59	-	-
500	0,165	77,59	0,127	82,21	-	-	0,093	86,63	-	-
400	0,210	71,43	0,160	80,01	0,432	37,98	0,107	84,62	-	-
300	0,318	56,73	0,277	65,46	-	-	0,155	77,73	-	-
200	0,456	37,87	0,354	55,81	0,521	25,14	0,297	57,33	-	-
100	0,562	23,58	0,577	28,09	0,597	14,17	0,454	34,82	-	-
50	0,656	10,75	0,695	10,66	0,625	10,11	0,587	15,61	-	-

Nồng độ µg/ml	Polysaccarid A		Polysaccarid B		Polysaccarid B11		Poysaccarid B16		Vitamin C	
	OD trung bình	HTCO %	OD trung bình	HTCO %	OD trung bình	HTCO %	OD trung bình	HTCO %	OD trung bình	HTCO %
40	-	-	-	-	-	-	-	-	0,239	69,78
35	-	-	-	-	-	-	-	-	0,302	61,82
30	-	-	-	-	-	-	-	-	0,380	51,96
25	-	-	-	-	-	-	-	-	0,485	38,68
20	-	-	-	-	-	-	-	-	0,553	30,09
15	-	-	-	-	-	-	-	-	0,633	19,98
10	0,694	5,58	-	-	-	-	-	-	0,672	15,04
0	0,735	0	0,735	0	0,696	0	0,696	0	0,791	0

Nhận xét và bàn luận

Qua các thông số của bảng trên, vẽ vào phần mềm Excel ta có phương trình tuyến tính hoạt tính chống oxy hóa như sau:

Polysaccarid A: y = 0,1548x + 6,0066 (R^2 = 0,9835).

Polysaccarid B: y = 0,1919x + 7,6970 (R^2 = 0,9497).

Phân đoạn polysaccarid B11: y = 0,0598x + 10,235 (R^2 = 0,9645).

Phân đoạn polysaccarid B16: y = 0,1972x + 12,605 (R^2 = 0,9511).

Vitanin C: y = 7,7081x – 7,1249 (R^2 = 0,9913).

Từ đó suy ra được IC_{50} của các mẫu polysaccarid A, B, B11, B16 lần lượt là: 284,19 µg/ml; 220,44 µg/ml; 664,96 µg/ml; 194,76 µg/ml và vitamin C là 7,41 µg/ml.

Phân đoạn polysaccarid B16 có IC_{50} thấp nhất tương ứng với khả năng chống oxy hóa cao nhất so với các phân đoạn polysaccarid A, B và B11. Tuy nhiên hoạt tính chống oxy hóa của các mẫu polysaccarid yếu hơn hoạt chất đối chiếu dương vitamin C.

KẾT LUẬN

Polysaccarid toàn phần và các phân đoạn polysaccarid chiết từ nấm Thượng hoàng có tác dụng chống oxy hóa *in vitro* theo hướng quét gốc tự do trong thử nghiệm DPPH.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Chen CY, Kim SH, Zhu T (2008). "A medicinal mushroom: *Phellinus linteus*". *Current medicinal chemistry*. 15:1330-1335.
2. Inoue M, Kojima K, Mizukami H, Nagatsu A, Ohno T (2008). "Phellifuropyranone A: A new furopyranone compound isolated from fruit bodies of wild *Phellinus linteus*". *Chem. Pharm. Bull*. 56 (2):173-175.
3. Jiménez-Medina E, Berruguilla E, Romero I, Algarra I, Collado A, Garrido F, and Garcia-Lora A (2008). "The immunomodulator PSK induces *in vitro* cytotoxic activity in tumour cell lines *via* arrest of cell cycle and induction of apoptosis". *BMC Cancer*, 8:78.
4. Kim GY, Lee JD, Lee SJ, Park HS (2003). "Purification and characterization of acidic proteo-heteroglycan from the fruiting body of *Phellinus linteus* (Berk. & M.A. Curtis) Teng". *Bioresource Technology* 89:81-87.
5. Kim GY, Roh SI, Park SK, Ahn SC, Oh YH, Lee JD, Park YM (2003). "Alleviation of experimental septic shock in mice by acidic polisaccharide isolated from the medicinal mushroom *Phellinus linteus*". *Biol.Pharm.Bull;* 26(10):1418-1423.
6. Liu YF, Tang QJ, Yang Y, Ye LB, Zhang JS (2009)."Structural analysis of a bioactive polysaccaride PISP1 from the medicinal mushroom *Phellinus igniarius"*. *Biosci.Biotechnol.Biochem*; 73(1):13-139.
7. Mau JL, Lin HC, Chen CC (2002). "Antioxidant properties of several medicinal mushrooms". *J. Agri Food Chem*; 50 (21):6072-6077.

Ngày nhận bài báo: *27/02/2015*

Ngày phản biện nhận xét bài báo: *18/05/2015*

Ngày bài báo được đăng: *08/09/2015*