

KHẢO SÁT VÀ ĐỊNH LƯỢNG MỘT SỐ HỢP CHẤT CÓ HOẠT TÍNH SINH HỌC TRONG NHUNG HƯƠNG SAO (*Cervus nippon* sp.)

Nguyễn Phan Cẩm Tú, Phạm Thị Mỹ Bình, Đào Minh Ý, Khuất Lê Uyên Vy,
Phạm Thị Ánh Hồng

Trường Đại học Khoa Học Tự nhiên, ĐHQG-HCM

(Bài nhận ngày 08 tháng 01 năm 2009, hoàn chỉnh sửa chữa ngày 24 tháng 04 năm 2010)

TÓM TẮT: Ở Việt Nam, việc nuôi hương để lấy nhung làm thuốc bổ đã phổ biến ở nhiều nơi. Tuy nhiên, việc đánh giá chất lượng của các loại nhung này thông qua thành phần hóa học của chúng chưa được quan tâm đúng mức. Vì vậy, chúng tôi tiến hành đề tài tách chiết protein và xác định thành phần hóa học trong nhung hương sao (*Cervus nippon* sp.) được nuôi tại Việt Nam, thu được kết quả như sau: Hàm lượng các chất khoáng vi lượng như Fe, Zn, Pb rất thấp. Hàm lượng tro, các chất khoáng đa lượng (như Ca, P) và collagen tăng dần từ phần đầu đến phần gốc của nhung hương. Ngược lại, hàm lượng đường hòa tan tổng số, đường khử, lipid, protein và glucosamin giảm dần từ phần đầu đến phần gốc. Kết quả chạy HPLC cho thấy nhung hương chứa 13 axit amin. Chúng tôi cũng đã phát hiện được các phân đoạn protein có trọng lượng phân tử thấp (≤ 10 kDa), là thành phần được xem là có hoạt tính sinh học.

Từ khóa: nhung hương, hợp chất có hoạt tính sinh học.

1. GIỚI THIỆU

Từ lâu, nhung hương đã được xem như một loại thuốc bổ quý và được sử dụng nhiều trong y học cổ truyền phương Đông. Người ta cho rằng nhung hương có thể tăng thêm sức mạnh của thân thể và cơ bắp, giảm bớt những triệu chứng của bệnh thấp khớp, cải thiện trí nhớ, tăng khả năng miễn dịch, tăng sức chịu đựng, chữa những vết loét, gãy xương, ảnh hưởng tốt đến huyết áp; cải thiện chứng thiếu máu, những thương tổn cột sống từ tai nạn xe cộ, cải thiện nghị lực, loãng xương và hỗ trợ trong những điều trị về ung thư [4].

Đầu thế kỷ thứ hai mươi, nhung hương lần đầu tiên được quan tâm bởi các nhà khoa học phương Tây, bắt đầu ở Nga vào năm 1930. Các nhà khoa học Nga đã chế tạo một loại dược phẩm từ nhung hương gọi là pantocrine có tác dụng làm tăng cường thể lực của cơ thể, tăng gấp đôi sự dẻo dai của bắp thịt và hệ thần kinh, làm lành vết thương sau khi giải phẫu và giúp đỡ trong khôi phục chấn thương cho bệnh nhân. Ở New Zealand, các nghiên cứu cũng cho thấy nhung hương có thể kích thích hệ thống miễn dịch, đẩy mạnh việc chữa lành vết thương và có khả năng tăng cường thể chất. Các nhà nghiên cứu Australia khẳng định rằng với các bệnh nhân bị viêm khớp, nhóm dùng viên nhung hương đạt được hiệu quả ngang hàng với nhóm dùng thuốc giảm đau mà không bị phản ứng phụ nào. Các thí nghiệm lâm sàng cũng

chứng tỏ các thành phần có trong nhung hương như phức hợp glycosaminoglycan-peptide, chondroitin sulfat, glucosamin sulfat rất công hiệu trong việc tạo chất nhờn cho khớp và làm giảm sự thoái hóa khớp [4, 7].

Gần đây đã có nhiều nghiên cứu về thành phần và hiệu quả dược lý từ nhung hương. Các nhà khoa học phát hiện rằng toàn bộ phần protein tách chiết từ nhung hương chứa đựng những yếu tố giúp cho sự hình thành mạch. Các nghiên cứu trên những phân đoạn có trọng lượng phân tử thấp và trọng lượng phân tử cao của các protein này cho thấy phân đoạn có trọng lượng phân tử thấp (≤ 10 kDa) có hoạt tính tốt, có hiệu quả kích thích sự gia tăng những tế bào bên trong hay đẩy mạnh sự hình thành mạch, thậm chí cả sau khi xử lý ở 100°C trong 3 phút hoặc làm đông. Tóm lại việc nghiên cứu nhung hương là một lĩnh vực hấp dẫn đang thu hút nhiều nhà khoa học trên toàn thế giới [5].

Với nhu cầu về nhung hương ngày càng gia tăng, những nông trại nuôi hương ngày càng phát triển mạnh mẽ và trở thành một nền công nghiệp thay thế cho nền nông nghiệp chăn nuôi ở nhiều nơi trên thế giới như Bắc Mỹ, Châu Âu, và New Zealand. Việt Nam là nước duy nhất ở Đông Nam Á có nghề nuôi hương sao truyền thống lâu đời và đã tích lũy được nhiều kinh nghiệm và kỹ thuật nuôi hương sao. Hiện nay, nhung hương ở Việt Nam chỉ được sử dụng theo

phương pháp dân gian truyền thống: mang tán nghiền nhỏ, trộn ngâm mật ong, khi dùng lấy từng thìa nhỏ, hòa thêm nước ấm uống, cũng có thể ngâm rượu uống hàng ngày trước lúc đi ngủ hoặc chế biến kết hợp với một số vị thuốc khác. Việc đánh giá chất lượng của các loại nhung này thông qua thành phần hóa học của chúng chưa được quan tâm đúng mức. Vì vậy, chúng tôi tiến hành xác định hàm lượng các thành phần hóa học và các chất có hoạt tính sinh học của nhung hươu sao làm cơ sở khoa học chứng minh giá trị dinh dưỡng và dược liệu của nhung hươu sao Việt Nam (*Cervus nippon* sp.).

2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Vật liệu

Nhung (55 ngày tuổi) của hươu sao (6 tuổi, đã cho nhung 2 lần) *Cervus nippon* sp., được cắt từ trang trại của ông Nghiêm Xuân Tý (Cây số 4, đường Trại An, xã Bắc Sơn, huyện Thống Nhất, Đồng Nai).

Mẫu nhung tươi được cưa làm bốn phần: phần đầu, phần giữa, phần gốc và phần nhánh bên; mỗi phần được lột da bên ngoài, cân khối lượng, cưa nhỏ và xay nhuyễn, đông khô và bảo quản ở -20°C cho tới khi sử dụng [6].



Hình 1. Mẫu nhung hươu sau khi chia thành bốn phần và lột da

2.2. Phương pháp nghiên cứu

Các mẫu nhung đã đông khô được sử dụng để xác định các chỉ số về đường, lipid, glucosamin, thành phần protein, tro và khoáng (phần nhánh bên có khối lượng quá thấp nên không khảo sát).

2.2.1. Phương pháp xác định hàm lượng đường

- Xác định hàm lượng đường hòa tan tổng số theo phương pháp sử dụng phenol dựa trên

phản ứng màu đặc trưng của đường với sự hiện diện của H_2SO_4 [1].

- Xác định hàm lượng đường khử theo phương pháp DNS [3].

2.2.2. Phương pháp xác định hàm lượng lipid

- Xác định hàm lượng lipid bằng phương pháp Soxhlet [1].

2.2.3. Phương pháp xác định hàm lượng glucosamin

Theo phương pháp so màu của Elson - Morgan [3].

2.2.4. Phương pháp xác định thành phần protein

- Xác định đạm tổng số bằng phương pháp Kjeldahl [1], từ đó suy ra hàm lượng protein.

- Phương pháp phân tích thành phần protein:

+ Hàm lượng hydroxyprolin trong mẫu thủy giải được xác định theo phương pháp Neumann và Logan.

+ Hàm lượng collagen được tính bằng cách nhân lượng hydroxyprolin với 7 [6, 9, 10].

+ Các axit amin khác được xác định theo phương pháp sắc kí trao đổi ion và sắc kí lỏng cao áp (HPLC).

- Phương pháp tách chiết và phân đoạn protein:

+ Tách chiết protein toàn phần: Lấy 1g nhung hươu đã đông khô đem nghiền nhuyễn rồi ngâm vào trong 20 ml dung dịch đệm photphat. Khuấy hỗn hợp liên tục trong 1 giờ ở nhiệt độ phòng và lọc qua giấy Whatman GF/A. Ly tâm dịch lọc ở 11500 rpm trong 30 phút ở nhiệt độ 4°C . Dịch nổi được cho vào một becher nhỏ (50 ml) và bảo quản lạnh [5]. Kiểm tra các phân đoạn protein có trong nhung hươu bằng sắc ký lọc gel Sephadex và điện di SDS-PAGE.

+ Tách chiết protein có trọng lượng phân tử thấp: Lắc cẩn thận 1g nhung hươu đã nghiền nhỏ trong 10 ml nước cất 2 lần trong vòng 3 giờ ở nhiệt độ phòng. Hỗn hợp được ly tâm ở 2100 g trong 15 phút và thu lấy phần dịch nổi. Phần dịch nổi này được ly tâm 21000 g trong 15 phút, thu dịch nổi, sau đó làm lạnh ở 4°C . Thêm etanol lạnh (tuyệt đối) dần dần vào hỗn hợp và khuấy đều. Hỗn hợp được ly tâm tiếp ở 21000 g trong 30 phút ở 4°C để loại bỏ

những protein có trọng lượng phân tử cao. Phần dịch nổi được chuyển tới bình cầu để cô quay chân không sẽ thu nhận được protein có trọng lượng phân tử thấp [5]. Kiểm tra trọng lượng phân tử của protein vừa thu nhận được bằng phương pháp điện di SDS-PAGE.

- Xác định hàm lượng protein theo phương pháp Lowry.

2.2.5. Phương pháp xác định hàm lượng tro và các thành phần khoáng

2.2.5.1. Phương pháp xác định hàm lượng tro

Cân chính xác khoảng 0,5 g mẫu trong một chén sứ đã biết trọng lượng khô tuyệt đối. Thêm 5 giọt HNO₃ đậm đặc và 1-2 giọt H₂O₂ 30%, cho vào lò nung ở 500-550^oC cho đến khi nguyên liệu biến thành tro trắng. Lấy chén sứ ra, cho ngay vào bình hút ẩm, để nguội và cân chính xác. Lặp lại như trên cho đến khi trọng lượng không đổi. Tính tỷ lệ phần trăm hàm lượng tro có trong mẫu. [1]

2.2.5.2. Phương pháp xác định các thành phần khoáng

- **Canxi:** Định lượng canxi nhờ trầm hiện với (NH₄)₂C₂O₄ [2].

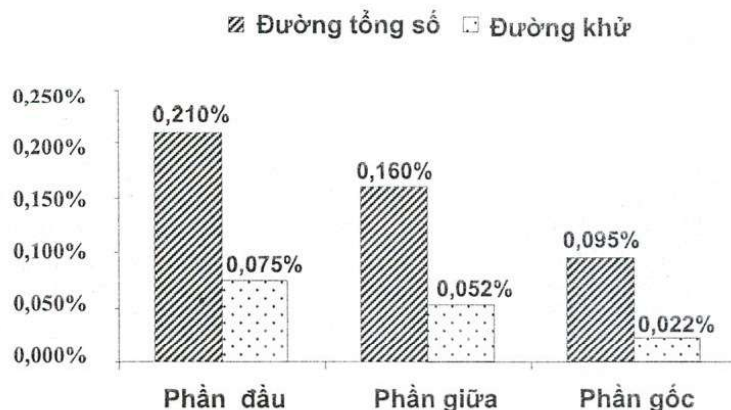
- **Photpho:** Dưới tác dụng của axit molybdic, photpho trở thành photpho molybdat có màu vàng. Chất này bị khử thành một hợp chất có màu xanh, cường độ màu tỉ lệ với hàm lượng photpho trong dung dịch [2].

- **Các thành phần khoáng vi lượng (chì, kẽm, sắt, selen):** Gửi mẫu đi phân tích tại Phòng thí nghiệm phân tích trung tâm (Trường Đại học Khoa học Tự nhiên – 227 Nguyễn Văn Cừ, Tp. HCM).

3.KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1.Hàm lượng đường

Hàm lượng đường hòa tan tổng số và đường khử cao nhất ở phần đầu, giảm dần và thấp nhất ở phần gốc, được biểu diễn như trên hình 2.



Hình 2. Đồ thị biểu diễn hàm lượng đường hòa tan tổng số và đường khử trong ba phần của nhung

3.2.Hàm lượng lipid

Hàm lượng lipid tổng số ở phần đầu là 3,77%, phần giữa là 1,4% và ở phần gốc là 0,85%.

3.3.Hàm lượng glucosamin

Nhung hươu được xử lý bằng HCl 4 N, ở 100^oC trong 15 giờ [7, 8]. Sau đó, tiến hành xác định hàm lượng glucosamin theo phương pháp Elson - Morgan thu được kết quả như sau: hàm lượng glucosamin cao nhất ở phần đầu

(1,16%), giảm dần ở phần giữa (0,67%) và thấp nhất ở phần gốc (0,49%).

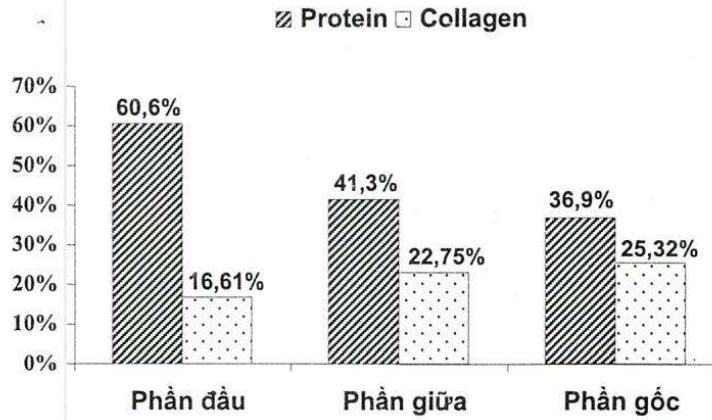
3.4.Thành phần protein

3.4.1. Hàm lượng protein thô và collagen

Sử dụng phương pháp Kjeldahl để xác định hàm lượng đạm tổng số, từ đó suy ra lượng protein tổng. Xác định hàm lượng collagen thông qua hàm lượng hydroxyprolin [6, 9, 10]. Kết quả cho thấy hàm lượng protein trong nhung hươu khá cao. Tỷ lệ protein cao

nhất ở phần đầu và thấp nhất ở phần gốc, tỷ lệ collagen thấp nhất ở phần đầu và cao nhất ở

phần gốc được biểu diễn như trên hình 3.



Hình 3. Đồ thị biểu diễn hàm lượng protein và collagen trong ba phần của nhung hươu

3.4.2. Thành phần axit amin

Kết quả phân tích thành phần axit amin của nhung hươu bằng phương pháp HPLC đã xác định được hàm lượng của 13 axit amin:

- 7 axit amin thiết yếu: leucin, methionin, lysin, histidin, isoleucin, arginin, phenylalanin

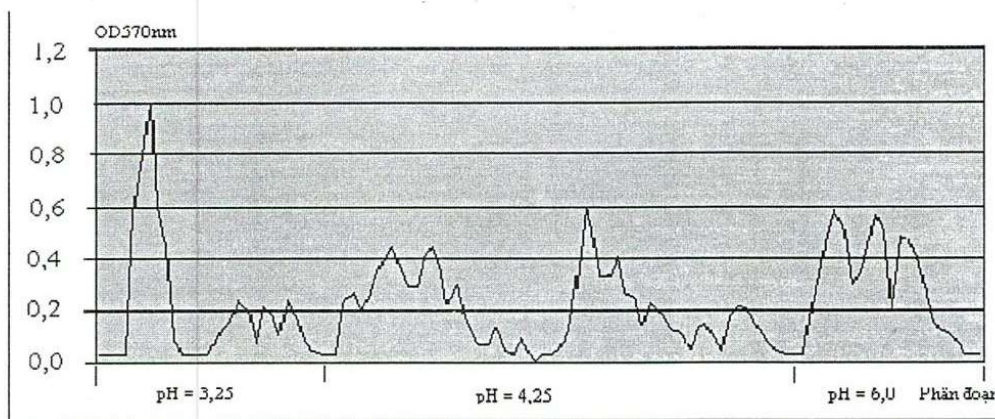
- 6 axit amin không thiết yếu: axit aspartic, axit glutamic, serin, glycin, alanin, tyrosin.

Kết quả được trình bày trên bảng 1.

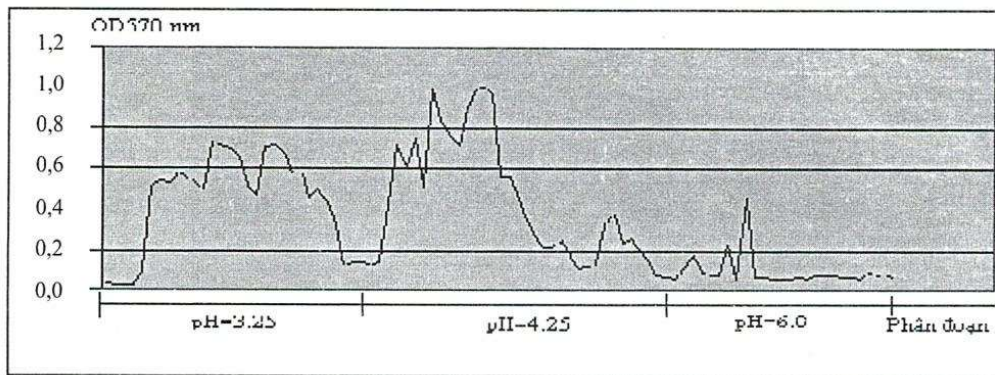
Bảng 1. Hàm lượng các axit amin trong mẫu nhung hươu thủy giải

Axit amin	Axit Aspartic	Axit Glutamic		Histidin	Glycin	Arginin	Alanin
Hàm lượng (mg/l)	26,97	231,48		62,80	1709,92	564,94	591,18
Axit amin	Phenylalanin	Serin	Tyrosin	Isoleucin	Leucin	Lysin	Methionin
Hàm lượng (mg/l)	159,01	408,84	76,32	46,61	283,41	412,15	42,13

Ở đây do điều kiện thủy phân là HCl 6 N nên tryptophan bị phân hủy, không xác định được.



Hình 4. Sự biến thiên của các phân đoạn khi chạy axit amin chuẩn qua cột sắc kí trao đổi ion



Hình 5. Sự biến thiên của các phân đoạn khi chạy mẫu nhung hươu qua cột sắc kí trao đổi ion

Dùng phương pháp sắc ký trao đổi ion, chúng tôi đã định tính được 14 axit amin (hình 4, 5).

Hình 4 cho thấy dung dịch axit amin chuẩn gồm 18 axit amin. Sau khi cho chạy qua cột nhựa trao đổi ion thu được 18 đỉnh:

pH= 3,25: có 4 đỉnh, tương ứng với 4 axit amin: axit aspartic, axit glutamic, threonin và serin.

pH= 4,25: có 11 đỉnh, tương ứng với 11 axit amin: glycin, alanin, prolin, leucin, cystein, valin, methionin, isoleucin, tyrosin, phenylalanin và tryptophan.

pH= 6,0: có 3 đỉnh, tương ứng với 3 axit amin: histidin, lysin, và arginin

Dựa vào sự rửa giải ở các giá trị pH nhất định, ta suy ra thứ tự rửa giải các axit amin trong đồ thị ở hình 5 như sau:

Ở pH=3,25: ta thu được 4 đỉnh, tương ứng với 4 axit amin: axit aspartic, axit glutamic, threonin và serin.

Ở pH= 4,25: ta thu được 7 đỉnh, tương ứng với 7 axit amin, ở đây do điều kiện thủy giải

bằng HCl 6 N nên các axit amin bị mất là tryptophan, cystein... Các axit amin được rửa giải khỏi cột là: glycin, alanin, leucin, valin, isoleucin, tyrosin và phenylalanin.

Ở pH= 6,0: ta thu được 3 đỉnh, tương ứng với 3 axit amin: histidin, lysin và arginin.

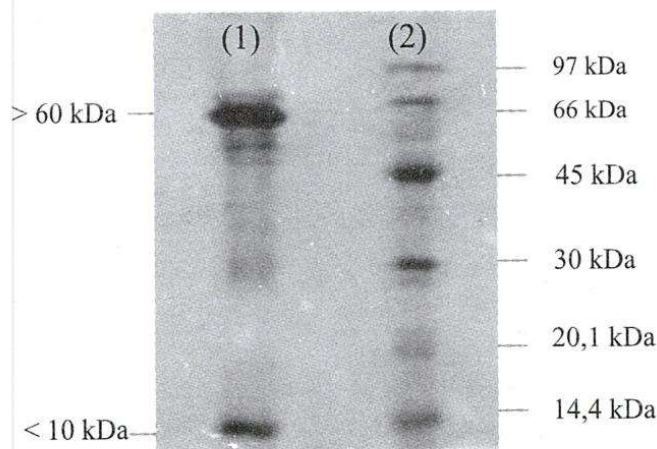
3.4.3. Tách chiết và phân đoạn protein của nhung hươu sao

3.4.3.1. Tách chiết protein

Lấy 1g nhung hươu đã đông khô đem xử lý để tách chiết protein toàn phần. Hàm lượng protein tách chiết toàn phần (trong 1 g) là 4,5625 mg. Hàm lượng protein có trọng lượng phân tử thấp (trong 1 g) là 2,5625 mg.

3.4.3.2. Các phân đoạn protein của nhung hươu sao

- Kết quả chạy điện di SDS – PAGE cho thấy protein tách chiết toàn phần chứa nhiều phân đoạn khác nhau, trong đó tập trung nằm trong khoảng trên 60 kDa (trọng lượng phân tử cao) và khoảng 10 kDa (trọng lượng phân tử thấp) (hình 6).

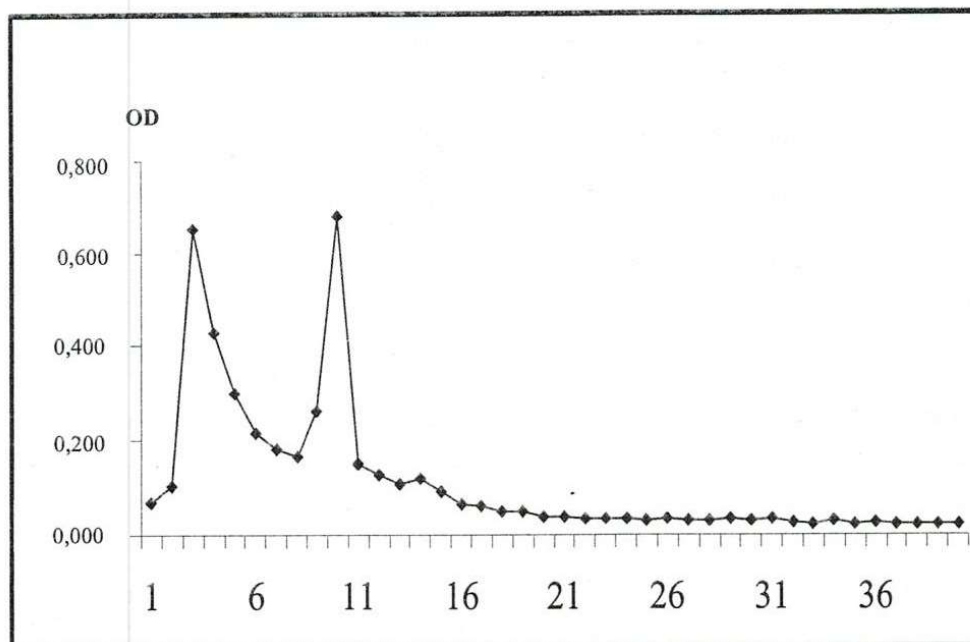


(1) Protein toàn phần của nhung hươu sao
 (2) Thang trọng lượng phân tử protein chuẩn

Hình 6. Kết quả điện di SDS-PAGE của mẫu Protein toàn phần của nhung hươu sao

- Tiến hành sắc ký lọc gel protein toàn phần để thu nhận hai phân đoạn chính. Kết quả thu được hai đỉnh ứng với hai phân đoạn chạy điện di. Đỉnh 1 tương ứng với phân đoạn có trọng lượng phân tử cao và đỉnh 2 tương ứng

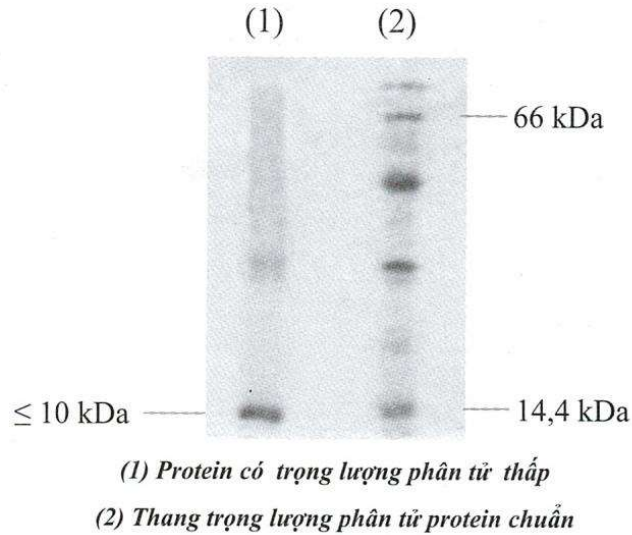
với phân đoạn có trọng lượng phân tử thấp (hình 7).



Hình 7. Giá trị OD₂₈₀ của các phân đoạn sau khi qua cột sắc ký lọc gel

- Chạy điện di SDS – PAGE đỉnh 2 của sắc ký lọc gel Sephadex là phân đoạn có trọng

lượng phân tử thấp (≤ 10 kDa) được xem là có hoạt tính sinh học (hình 8) [5].

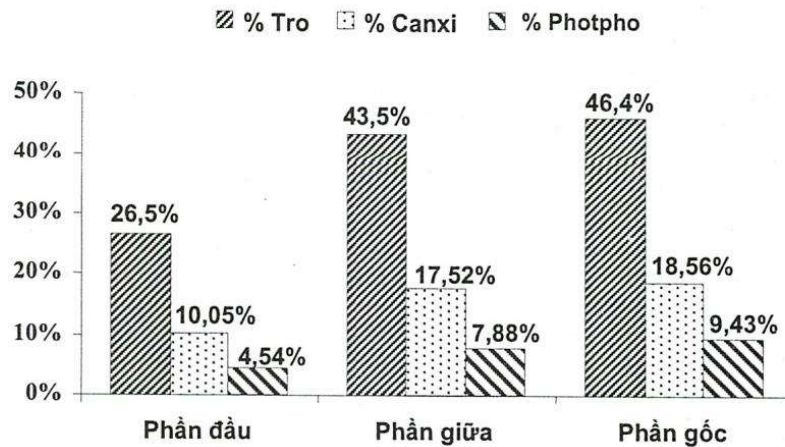


Hình 8. Kết quả điện di SDS-PAGE của mẫu protein có trọng lượng phân tử thấp

3.5. Hàm lượng tro và các thành phần khoáng

3.5.1. Hàm lượng tro và khoáng đa lượng: Kết quả cho thấy hàm lượng tro và

khoáng đa lượng thấp nhất ở phần đầu, tăng dần và cao nhất ở phần gốc được biểu diễn như trên hình 9.



Hình 9. Đồ thị biểu diễn tỷ lệ phần trăm hàm lượng tro, canxi, photpho trong ba phần của nhung hươu

3.5.2. Hàm lượng khoáng vi lượng: Mẫu được gửi đi xác định ở Trung tâm phân tích trường Đại học Khoa học Tự nhiên Tp. Hồ Chí

Minh. Kết quả hàm lượng khoáng vi lượng trong nhung hươu được trình bày ở bảng 2.

Bảng 2. Hàm lượng các thành phần khoáng vi lượng trong ba phần của nhung hươu

	Phần đầu	Phần giữa	Phần gốc
Fe (mg/kg trọng lượng khô)	91,006	110,518	115,321
Zn (mg/kg trọng lượng khô)	24,751	53,880	6,812
Pb (mg/kg trọng lượng khô)	0,586	0,736	0,561

Kết quả mà chúng tôi đạt được là một trong những cơ sở khoa học để lý giải cho xu hướng hóa xương từ gốc lên ngọn của nhung hươu. Phần gốc chứa nhiều khoáng vô cơ và ít chất hữu cơ nên cứng. Phần đầu chứa nhiều hợp chất hữu cơ và ít khoáng vô cơ nên mềm hơn. Bên cạnh đó, chúng tôi cũng so sánh hàm lượng lipid tổng số, tro tổng số, khoáng đa lượng tổng số trên nhung hươu sao *Cervus nippon* sp. ở Việt Nam với kết quả nghiên cứu trên nhung hươu *Cervus elaphus* của Sunwoo và cộng sự [6] và thấy rằng hàm lượng lipid tổng số trong nhung hươu *Cervus nippon* sp. thấp hơn trong nhung hươu *Cervus elaphus* còn

hàm lượng tro và khoáng đa lượng tổng số trong nhung hươu *Cervus nippon* sp. cao hơn trong nhung hươu *Cervus elaphus*.

4.KẾT LUẬN

Các kết quả chúng tôi đạt được là những thông tin đầu tiên liên quan đến thành phần hóa học và các hợp chất có hoạt tính sinh học trong nhung hươu sao Việt Nam (cụ thể là ở tỉnh Đồng Nai) để làm cơ sở cho việc đánh giá chất lượng và đề ra hướng sử dụng nhung hươu sao có hiệu quả.

SURVEY AND DETERMINE BIOLOGICALLY ACTIVE COMPOSITIONS OF VELVET ANTLER (*Cervus nippon* sp.)

Nguyen Phan Cam Tu, Pham Thi My Binh, Dao Minh Y, Khuat Le Uyen Vy,
Pham Thi Anh Hong
University of Sciences, VNU-HCM

ABSTRACT: *In Viet Nam, raising deer for collecting velvet antler becomes popular. However, qualitative analyses of them by chemical compositions are rare. Thus, we determine chemical contents and biologically active compounds to give a scientific foundation which supports the nutrient values and medicine of Velvet antler (Cervus nippon sp.). The results show that micro mineral contents such as Fe, Zn, and Pb are very low. The contents of ash, macro-mineral (for example, Ca, P), collagens increased downward from the upper to the base of Velvet antler. In contract, those of total sugars, reducing sugars, lipid, protein, glucosamine decreased downward from the the upper to the base. There are 13 amino acids in Velvet antler (accomplished by HPLC). We also have found the present of low molecular weight fractions (≤ 10 kDa) that are considered a biologically active compound.*

Key word: velvet antler, biologically active composition.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1].Lâm Thị Kim Châu, Văn Đức Chín, Ngô Đại Nghiệp. *Thực tập lớn sinh hóa*. Nhà xuất bản Đại Học Quốc Gia Tp. Hồ Chí Minh, (2004).
- [2].Phạm Thị Ánh Hồng, Trần Mỹ Quan, Nguyễn Thị Huyền, Nguyễn Quang Tâm. *Thực tập Sinh hóa cơ sở*. Nhà xuất bản Đại học Quốc gia Tp. Hồ Chí Minh, (2004).
- [3].Nguyễn Đức Lượng, Cao Cường. *Thí nghiệm công nghệ sinh học, tập 1: Thí nghiệm hóa sinh học*. Nhà xuất bản Đại học Quốc gia Tp. Hồ Chí Minh, (2003).
- [4].Chris Tuckwell. *Velvet antler – a summary of the literature on health benefits*. Rural Industries Research and Development Corporation, (2003).
- [5].James & Wells. *Deer Antler extract for promoting angiogenesis*. International Publication number WO 2004/106372 A1, (2004).
- [6].Jeong S. Sim Hoon H. Sunwoo, Takuo Nakano, and Robert J. Hudson. *Chemical Composition of Antlers from Wapiti (Cervus elaphus)*. Department of Agricultural, Food and Nutritional Science, University of Alberta, Edmonton, Alberta T6G 2P5, Canada, (1995).
- [7].Julia Einbinder and Maxwell Schubert. *Separation of chondroitin sulfate from Cartilage*. Department of Chemistry and

the study group on Rheumatic diseases, New York University College of Medicine, New York, (1950).

- [8].Norman F. Boas. *Method for the determination of Hexosamines in tissues*. The National Institute of Arthritis and Metabolic Diseases, National Institutes of Health, United States Public Health Service, Bethesda, Maryland, (1953).

[9].Robert e. Neuman and Milan k logan. *The determination of hydroxyproline*. From the Department of Biological Chemistry, College of Medicine, University of Cincinnati, Cincinnati, (1949).

- [10].Stegemann,H.&Stalder,K.. *Determination of hydroxyproline*. Clin. Chim. Acta. 18: 267-273, (1967).