

ĐÁNH GIÁ CHẤT LƯỢNG, HOẠT TÍNH KHÁNG OXY HÓA VÀ TÍNH AN TOÀN CỦA CAO CORDY-X TRÊN MÔ HÌNH NGUYÊN BÀO SỢI NGƯỜI VÀ ẤU TRÙNG TÔM NƯỚC MẶN *Artemia franciscana*

Nguyễn Minh Chánh, Nguyễn Đăng Khoa*,
Trần Thị Mai, Lê Anh Duy, Nguyễn Thị Liên Thương*

Viện Phát triển Ứng dụng, Trường Đại học Thủ Dầu Một, Bình Dương

*Email: nguyendangkhoa@tdmu.edu.vn; thuongntl@tdmu.edu.vn

Ngày nhận bài: 23/12/2023; Ngày chấp nhận đăng: 20/3/2024

TÓM TẮT

Ganoderma lucidum và *Cordyceps militaris* là hai loại nấm dược liệu quý có nhiều ứng dụng trong y học cổ truyền và y học hiện đại. Cùng với sự phát triển của việc nghiên cứu và nuôi trồng nấm, nhiều sản phẩm thương mại như thực phẩm chức năng, thực phẩm bảo vệ sức khỏe từ nấm dược liệu đã được sản xuất. Trong đó, sản phẩm cao nấm CORDY-X có thành phần chính là cao nấm đông trùng hạ thảo và cao nấm linh chi, được nghiên cứu và chuyên giao bởi Viện Phát triển Ứng dụng, Trường Đại học Thủ Dầu Một. Trong nghiên cứu này, nhóm tác giả đã đánh giá chỉ tiêu chất lượng của sản phẩm, xác định hàm lượng nucleoside bằng phương pháp sắc ký lỏng hiệu năng cao, đánh giá hoạt tính kháng oxy hóa bằng phương pháp bắt gốc tự do DPPH (2,2-Diphenyl-1 picrylhydrazyl) và kiểm tra độ an toàn của sản phẩm trên mô hình tế bào và ấu trùng tôm, *Artemia franciscana*. Kết quả cho thấy sản phẩm đạt các chỉ tiêu chất lượng. Hàm lượng adenosine và cordycepin được xác định tương ứng là 0,95 mg/g và 0,26 mg/g. Hoạt tính bắt gốc tự do DPPH đạt khoảng 27% tại nồng độ 250 µg/mL. Ngoài ra, sản phẩm không có thể hiện độc tính trên nguyên bào sợi người và trên *Artemia franciscana* tại nồng độ lần lượt 500 µg/mL và 1000 µg/mL. Kết quả nghiên cứu góp phần làm rõ thêm thông tin về dược chất, hoạt tính và độ an toàn của sản phẩm cao nấm dược liệu. Từ khóa: *Ganoderma lucidum*, *Cordyceps militaris*, khả năng kháng oxy hóa, độc tính tế bào, *Artemia franciscana*.

1. MỞ ĐẦU

Nhu cầu về nấm dược liệu cho các ngành thực phẩm chức năng và dược phẩm ngày càng tăng. Trong đó, nấm linh chi (*Ganoderma lucidum*) và nấm đông trùng hạ thảo (*Cordyceps militaris*) là hai loại nấm dược liệu quý đã được nuôi trồng và sử dụng rộng rãi ở Việt Nam và các nước châu Á khác như: Trung Quốc, Nhật Bản và Hàn Quốc v.v.

Ganoderma lucidum từ lâu được biết đến như một loại dược liệu quý, được sử dụng phổ biến ở Trung Quốc và các nước châu Á, giúp tăng sức khỏe và kéo dài tuổi thọ. Hiện nay, nấm linh chi vẫn tiếp tục được nghiên cứu, với nhiều tiềm năng dược liệu mới được phát hiện. Kết quả của các nghiên cứu hiện đại cho thấy hợp chất tự nhiên trong *G. lucidum* khá đa dạng bao gồm các nhóm như triterpenoid, polysaccharide, nucleoside, alkaloid, steroid, lacton và acid béo [1]. Các hợp chất này tạo nên các giá trị dược liệu quý của *G. lucidum* như chữa lành vết thương, chống oxy hóa, bảo vệ thần kinh và chống viêm [2-5]. Mặc dù nhu cầu nấm linh chi

ngày càng gia tăng, nhưng quá trình nuôi trồng đòi hỏi nhiều công sức và thời gian, nên sản lượng quả thể nấm linh chi vẫn chưa đáp ứng được nhu cầu của thị trường [6]. *Cordyceps militaris* là một loại nấm dược liệu đã được sử dụng trong y học cổ truyền với nhiều công dụng như kháng viêm, điều hòa miễn dịch, và hồi phục sức khỏe v.v. [7]. Những nghiên cứu của y học hiện đại cho thấy *C. militaris* có chứa nhiều hợp chất sinh học có giá trị cao như cordycepin, adenosine, acid codycepic, polysaccharide, carotenoid, amino acid thiết yếu, vitamin, các nguyên tố đa lượng và vi lượng [7].

Trong các nghiên cứu trước đây, nhóm tác giả đã khảo sát các điều kiện nuôi cấy giúp tối ưu hiệu quả sinh học và hàm lượng dược chất của quả thể nấm *C. militaris* [8]. Các điều kiện chiết xuất quả thể nấm giàu cordycepin cũng được khảo sát [9]. Các nghiên cứu *in vitro* và *in vivo* bước đầu cũng cho thấy cao nấm *C. militaris* có công dụng đẩy nhanh quá trình phục hồi vết thương [10].

Dựa trên các kết quả nghiên cứu đã đạt được, Viện Phát triển Ứng dụng - Trường Đại học Thủ Dầu Một, nghiên cứu và chuyển giao cao nấm dược liệu CORDY-X cho công ty MHD Pharma sản xuất như một thực phẩm bổ sung. Sản phẩm cao nấm dược liệu là sự kết hợp giữa cao linh chi và cao đông trùng hạ thảo, bổ sung mật ong và maltose, được sản xuất theo số đăng ký: 8007/2019/ĐKSP. Trong đó, nguyên liệu nấm đông trùng hạ thảo và linh chi được trồng và chiết xuất theo công nghệ được chuyển giao từ Viện phát triển Ứng dụng, Trường Đại học Thủ Dầu Một.

Trong nghiên cứu này chúng tôi công bố các chỉ tiêu chất lượng đã đánh giá trong quá trình phát triển sản phẩm, xác định hàm lượng các nucleoside đặc trưng của *C. militaris* và *G. lucidum*, đánh giá hoạt tính kháng oxy hóa và độc tính của cao trên mô hình tế bào và ấu trùng tôm *Artemia*. Kết quả của nghiên cứu giúp làm rõ hơn các hoạt tính sinh học và tính an toàn của sản phẩm.

2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Vật liệu

Cao nấm CORDY-X là sản phẩm chuyển giao công nghệ của Viện Phát triển Ứng dụng, Đại học Thủ Dầu Một cho công ty cổ phần MHD Pharma.

Thuốc thử, môi trường và chất chuẩn: Folin-Ciocalteu, 2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH), DMEM/High glucose với L-glutamine, adenosine, cordycepin mua từ Sigma-Aldrich.

Nguyên bào sợi người được lưu giữ và nhân giống tại phòng thí nghiệm công nghệ tế bào ứng dụng, Viện Phát triển Ứng dụng, Đại học Thủ Dầu Một. *Artemia franciscana* có nguồn gốc Vĩnh Châu, Bạc Liêu, Việt Nam.

2.2. Kiểm hàm lượng kim loại nặng

Hàm lượng kim loại nặng theo tiêu chuẩn Việt Nam: Hàm lượng Chì (Pb), hàm lượng cadimi (Cd) và hàm lượng thủy ngân (Hg) được kiểm theo tiêu chuẩn ISO/IEC 17025 và TCVN 8126:2009, bằng phương pháp quang phổ hấp thụ nguyên tử.

2.3. Kiểm chỉ tiêu vi sinh

Các chỉ tiêu vi sinh theo tiêu chuẩn Việt Nam bao gồm: Tổng vi sinh vật hiếu khí (TCVN 4884-1:2015), Coliform (TCVN 6848:2007), tổng số nấm men, mốc (TCVN 8275-1:2010), *Escherichia coli* (TCVN 7934-2:2004), *Clostridium perfringens* (TCVN 5975:2010). Các chỉ tiêu được kiểm tra bằng phương pháp đếm khuẩn lạc.

2.4. Phương pháp phân tích adenosine và cordycepin

Hàm lượng adenosine và cordycepin trong sản phẩm được định lượng bằng phương pháp sắc ký lỏng hiệu năng cao (ultra-fast liquid chromatography_UFLC). Hệ thống sắc ký lỏng (Shimadzu UFLC Prominence, Kyoto, Japan) bao gồm: Bơm cao áp (LC-20A), cột sắc ký lỏng InertSustain C18 (5µm, 250 × 4,6 mm), đầu dò UV (SPD-20A). Quá trình phân tách được thực hiện dưới những điều kiện sau: Pha động bao gồm nước và methanol (tỷ lệ 80:20 v/v), quá trình giải hấp được thực hiện với tốc độ 1,0 mL/phút. Thể tích mẫu 20 µL, bước sóng 257 nm, nhiệt độ cột 40 °C, chất chuẩn được pha loãng và dựng đường chuẩn theo nồng độ từ 2-5 µg/mL.

2.5. Phương pháp kháng oxy hóa

Mẫu (0-250 µg/mL), hoặc nước cất (đối chứng âm) được cho phản ứng với DPPH 0,3 mM (37 °C, 30 phút), trong tối để kiểm tra khả năng bắt gốc tự do DPPH. Sau phản ứng, mẫu được đo quang phổ hấp thụ tại bước sóng 517 nm [11]. Khả năng bắt gốc tự do (%) được xác định theo công thức bên dưới:

$$\% \text{ Bắt giữ DPPH} = (\text{OD}_{\text{chứng âm}} - \text{OD}_{\text{mẫu}}) / \text{OD}_{\text{chứng âm}} \times 100\%$$

2.6. Phương pháp đánh giá độc tính tế bào

2.6.1. Nuôi cấy và chuẩn bị tế bào

Chuẩn bị tế bào: Nguyên bào sợi được nuôi cấy trong đĩa Petri 100 mm hoặc flask 75 cm² trong môi trường DMEM có nồng độ glucose cao, bổ sung L-glutamine, nhưng không bổ sung sodium pyruvate. Huyết thanh bào thai bò (FBS, Gibco) được bổ sung với nồng độ 10%, và kháng sinh streptomycin 100 mg/mL-penicilin 10.000 U/mL được bổ sung với nồng độ 1%. Tế bào được nuôi cấy trong tủ ủ (Esco CelCulture) ở nhiệt độ 37 °C và nồng độ CO₂ 5%.

Thu hoạch tế bào: Rửa tế bào với dung dịch đệm PBS 1X, sử dụng enzyme trypsin EDTA 0,25%, ủ 5 phút 37 °C, 5% CO₂ để tách tế bào ra khỏi bề mặt nuôi cấy. Bất hoạt trypsin EDTA bằng môi trường mới. Tế bào được thu hoạch bằng cách ly tâm ở 2000 rpm trong 5 phút.

2.6.2. Đánh giá độc tính tế bào của sản phẩm

Huyền phù tế bào (100 µL, mật độ 50.000 tế bào/mL) được phân phối theo 3 nhóm vào từng giếng trên đĩa 96 giếng, mỗi nhóm 6 giếng. Sau 24 giờ, tế bào sẽ được nuôi cấy trong 200 µL môi trường có bổ sung cao ở nồng độ 500 và 1000 µg/mL, và được tiếp tục nuôi trong 24 giờ và 48 giờ. Sau thời gian khảo sát, môi trường cũ được hút bỏ và thay thế bằng 200 µL môi trường mới không FBS, và 20 µL thuốc thử MTT (5 mg/mL), trong tối. Tế bào được ủ ở 37 °C, trong 2-4 giờ. Sau thời gian ủ, loại bỏ môi trường và bổ sung 100 µL DMSO và đo độ hấp thụ ở bước sóng 570 nm [10].

Tỉ lệ sống sót của tế bào được tính theo công thức bên dưới:

$$\text{Tỷ lệ sống (\%)} = \frac{A_t - A_b}{A_c - A_b} \times 100\%$$

A_t là OD mẫu tế bào thử nghiệm, A_b là OD mẫu trắng (DMSO), và A_c là OD mẫu tế bào đối chứng (không xử lý với corydy-X).

2.7. Phương pháp đánh giá độc tính trên ấu trùng tôm nước mặn *Artemia franciscana*

Ấu trùng tôm *Artemia franciscana* được ấp và nuôi theo điều kiện tương tự như công bố trước đây [12]. Trong đó, ấu trùng tôm *Artemia franciscana* Vĩnh Châu được ấp nở trong môi trường nước biển nhân tạo bằng cách hòa tan 38 g natri clorua trong nước cất (1 L), có sục khí và nguồn sáng liên tục, nhiệt độ nước 25-29 °C trong 48 giờ. Sau khi nở, ấu trùng (dạng nauplii

Đánh giá chất lượng, hoạt tính kháng oxy hóa và tính an toàn của cao cordy-X trên mô hình...

hoạt động) được chuyển qua môi trường mới. Mười ấu trùng nauplii được đặt trong một lọ nhỏ 5 mL, chứa 2 mL dung dịch nước biển nhân tạo và 1 mL mẫu ở nồng độ khảo sát. Thử nghiệm duy trì ở nhiệt độ phòng trong 24 giờ.

Tỷ lệ sống được tính theo công thức:

$$\text{Tỷ lệ sống (\%)} = \frac{S_t}{S_c} \times 100 \%$$

Trong đó: S_t là số lượng nauplii sống sót trong mẫu thử, và S_c là số lượng nauplii sống sót trong mẫu đối chứng

2.8. Phương pháp phân tích thống kê

Các phân tích được thực hiện ba lần, kết quả được tính trung bình. Các số liệu được thu thập và phân tích dữ liệu bằng phần mềm Statgraphics XV.I, phân tích ý nghĩa khác biệt bằng phương pháp phân tích phương sai (One-way ANOVA), $p < 0,05$ theo phép thử LSD.

3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Đánh giá chất lượng sản phẩm CORDY-X

Sản phẩm cao CORDY-X có cấu trúc sánh, dạng cao đặc, màu nâu đậm (Hình 1), cao có mùi thơm đặc trưng của đông trùng hạ thảo và nấm linh chi, không có mùi vị lạ.



Hình 1. Thực phẩm bảo vệ sức khỏe cao CORDY-X sản phẩm chuyển giao khoa học công nghệ giữa Đại học Thủ Dầu Một và công ty dược phẩm MHD Pharma, Số đăng ký: 8007/2019/ĐKSP

Trong quá trình phát triển mẫu cao được pha loãng để kiểm tra các chỉ tiêu vi sinh, kim loại nặng. Kết quả được trình bày ở Bảng 1.

Bảng 1. Kết quả kiểm tra chất lượng sản phẩm cao CORDY-X

Nhóm	Chỉ tiêu thử nghiệm	Kết quả	Đơn vị	Phương pháp
Vi sinh	Tổng số vi sinh vật hiếu khí	100	CFU/g	TCVN 4884-1:2015
	Coliform	Không phát hiện	CFU/g	TCVN 6848:2007
	<i>Escherichia coli</i>	Không phát hiện	CFU/g	TCVN 7934-2:2004
	<i>Clostridium perfringens</i>	Không phát hiện	/25g	TCVN 5975:2010
	Tổng số nấm men, mốc	<10	CFU/g	TCVN 8275-1:2010
Kim loại nặng	Hàm lượng Chì (Pb)	Không phát hiện	mg/kg	TCVN 8126:2009
	Hàm lượng Cadimi (Cd)	0,061	mg/kg	TCVN 8126:2009
	Hàm lượng Thủy ngân (Hg)	Không phát hiện	mg/kg	TCVN 8126:2009

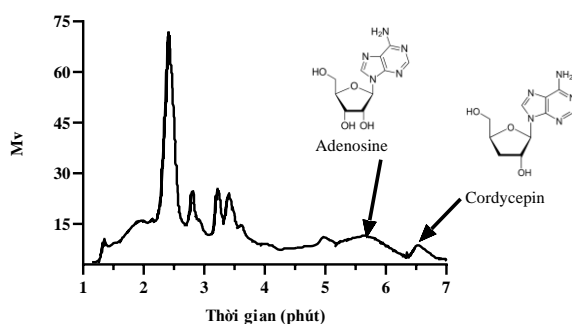
Kết quả kiểm tra vi sinh được thực hiện theo tiêu chuẩn Việt Nam (TCVN), kết quả cho thấy các chỉ tiêu kiểm tra đều đạt theo quy định. Trong đó, không phát hiện sự có mặt của vi khuẩn Coliform, *E. coli* và *C. perfringens*. Tổng vi sinh vật hiếu khí (Total viable count, TVC) là 100 CFU/g, và tổng men mốc nhỏ hơn 10 CFU/g.

Kết quả kiểm tra hàm lượng kim loại nặng theo công bố: Hàm lượng Chì (chuẩn cao nhất 3 mg/kg) và hàm lượng thủy ngân (chuẩn cao nhất 0,1 mg/kg) đều có kết quả không phát hiện, hàm lượng Cadimi (Cd) chỉ 0,061 mg/kg, rất thấp so với chuẩn cao nhất 1 mg/kg.

Từ các kết quả trên, nhận thấy cao CORDY-X có chỉ tiêu vi sinh và kim loại nặng đạt tiêu chuẩn chất lượng. Để xác định thêm thành phần các dược chất khác trong cao, chúng tôi tiến hành phân tích hàm lượng các nucleosides quan trọng như adenosine và cordycepin.

3.2. Định lượng hoạt chất Adenosine và Cordycepin

Adenosine và cordycepin là hai hợp chất nucleoside quan trọng và đặc trưng cho cao *C. militaris* và cao *G. lucidum* [5, 13].



Hình 2. Sắc ký đồ của cao CORDY-X

Hàm lượng adenosine và cordycepin được xác định bằng phương pháp sắc ký lỏng hiệu năng cao. Dựa trên thời gian lưu của chất chuẩn và nghiên cứu trước đây trong cùng điều kiện thí nghiệm [10], peak của adenosin xuất hiện sau 5,6 phút và peak của cordycepin có thời gian lưu khoảng 6,5 phút (Hình 2). Nồng độ tương ứng của adenosin và cordycepin là 0,95 mg/g và 0,26 mg/g (Bảng 2).

Ngoài ảnh hưởng của phương pháp chiết xuất, chất lượng của cao còn bị ảnh hưởng bởi nguồn nguyên liệu. Trong đó, đông trùng hạ thảo được nuôi trồng theo quy trình nghiên cứu tại Đại học Thủ Dầu Một, cho hàm lượng adenosine và cordycepin cao [8]. Ngoài ra, quy trình chiết sử dụng dung môi an toàn cho thực phẩm, với chế độ chiết được tối ưu [9].

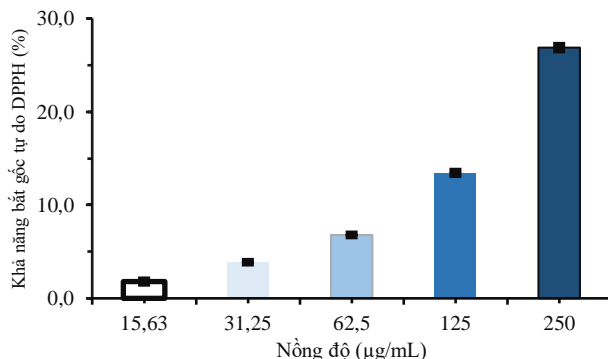
Bảng 2. Hàm lượng adenosine và cordycepin trong cao CORDY-X

Thành phần	Nồng độ (mg/g)
Adenosine	0,95 ± 0,00
Cordycepin	0,26 ± 0,00

Hàm lượng các hoạt chất là yếu tố được quan tâm trong sản phẩm thực phẩm bổ sung. Trong đó, adenosine có tác dụng điều chỉnh các kích thích thần kinh thông qua giảm giải phóng các acid amin kích thích như aspartate và glutamate [14] hoặc bảo vệ tim mạch và điều trị chống lại bệnh suy tim mãn tính [15]. Cordycepin cũng cho thấy nhiều tác dụng dược lý như ức chế tế bào bạch cầu [16]. Đặc biệt, cordycepin có khả năng ức chế biểu hiện của gen của một số loại virus như virus cảm cúm, virus bại liệt [17] và virus SARS-CoV-19 (ức chế 65 % gene E và gen 42% gene N) [18].

3.3. Hoạt tính kháng oxy hóa

Hoạt tính kháng oxy hóa của cao được kiểm tra bằng phương pháp bắt gốc tự do DPPH. Kết quả cho thấy phần trăm bắt gốc tự do phụ thuộc vào nồng độ. Tại 15,63 $\mu\text{g/mL}$, cao chỉ thể hiện khoảng 1,8% hoạt tính bắt gốc tự do DPPH, hoạt tính tăng lên khoảng 27% tại nồng độ 250 $\mu\text{g/mL}$ (Hình 3).

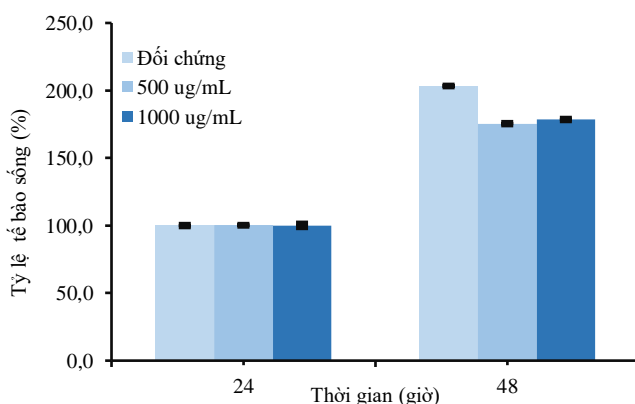


Hình 3. Hoạt tính bắt gốc tự do DPPH của cao CORDY-X

Nhiều nghiên cứu cho thấy, các polysaccharide và phenolic là thành phần chính có hoạt tính kháng oxy hóa trong cao chiết *C. militaris* và *G. lucidum* [19, 20]. Jing và cộng sự (2015) đã ghi nhận kết quả các polysaccharide được chiết từ quả thể *C. militaris* có khả năng bắt 50% gốc tự do DPPH ở nồng độ 104-285 $\mu\text{g/mL}$ [21]. Cao chiết methanol của quả thể *G. lucidum* cũng có khả năng bắt khoảng 52,6% gốc tự do hydroxyl (OH^\cdot) ở nồng độ 16 mg/mL [19]. Trong một nghiên cứu khác, nhóm tác giả đã đánh giá khả năng kháng oxy hóa của cao trên nguyên bào sợi người, kết quả cho thấy cao có khả năng bảo vệ tế bào bị stress oxy hóa gây ra bởi H_2O_2 [22].

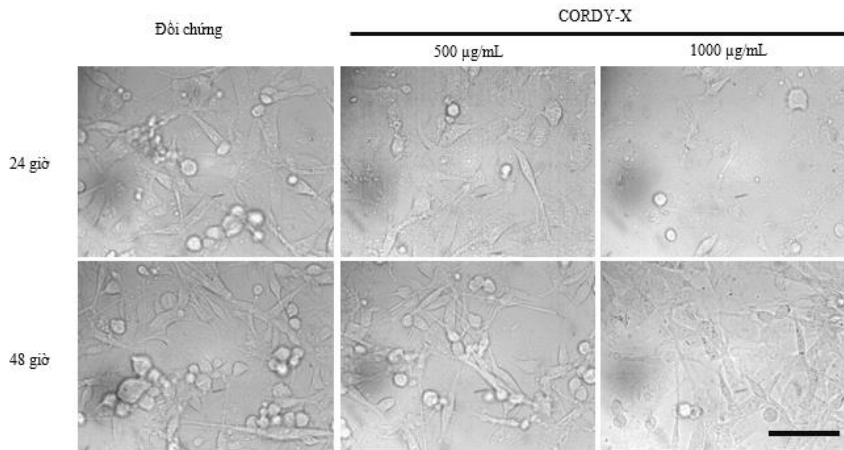
3.4. Độc tính trên tế bào nguyên bào sợi

Trong nghiên cứu trước đó, sản phẩm đã được kiểm tra độc tính và cho kết quả an toàn trên nguyên bào sợi người ở nồng độ 0-320 $\mu\text{g/mL}$ [22]. Tại nghiên cứu này, sản phẩm được đánh giá độc tính trên hai nồng độ cao hơn, 500 $\mu\text{g/mL}$ và 1000 $\mu\text{g/mL}$, trong 24 giờ và 48 giờ. Kết quả thử nghiệm cho thấy, sản phẩm không gây độc cho tế bào ở hai nồng độ kiểm, tỷ lệ tế bào sống đều đạt 100% sau 24 giờ (Hình 4). Tế bào duy trì hình thái khỏe mạnh đặc trưng của nguyên bào sợi (Hình 5).



Hình 4. Tỷ lệ sống của nguyên bào sợi khi được nuôi trong môi trường chứa cao CORDY-X

Sau 48 giờ thử nghiệm, tỷ lệ sống tế bào giảm nhẹ 10-15% so với mẫu đối chứng (Hình 4). Tuy nhiên, mật độ tế bào vẫn tăng lên và hình thái vẫn duy trì khỏe mạnh, đặc trưng cho nguyên bào sợi (Hình 5).



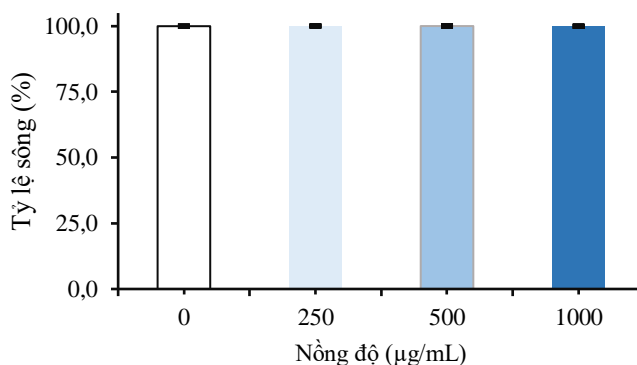
Hình 5. Nguyên bào sợi người khi nuôi cấy trong môi trường chứa cao CORDY-X sau 24 giờ và 48 giờ, tỷ lệ 100 µm.

Như vậy, sản phẩm không gây độc cho nguyên bào sợi người ở nồng độ 500 và 1000 µg/mL sau 24 giờ và 48 giờ nuôi cấy.

3.5. Độc tính trên mô hình ấu trùng tôm *Artemia franciscana*

Ấu trùng tôm *Artemia franciscana* được xem là một công cụ hữu ích cho việc khảo sát độc tính, vì tính kinh tế và hạn chế các khía cạnh đạo đức so với thử nghiệm trên động vật. Ngoài ra, kết quả độc tính trên ấu trùng tôm thông qua giá trị LC_{50} có mối tương quan với độc tính thử nghiệm trên *in vivo* [23].

Độc tính của cao CORDY-X được đánh giá trên mô hình ấu trùng tôm nước mặn *Artemia franciscana*. Ấu trùng sau khi ấp nở 48 giờ được cho vào dung dịch chứa cao dược liệu với nồng độ thử từ 250 µg/mL đến 1000 µg/mL (Hình 6).



Hình 6. Tỷ lệ sống của ấu trùng tôm *Artemia franciscana* khi được nuôi trong môi trường chứa cao CORDY-X

Kết quả cho thấy, cao CORDY-X với nồng độ 250-1000 µg/mL không biểu hiện độc tính trên ấu trùng tôm sau 24 giờ thử nghiệm. Tỷ lệ sống mẫu thử và mẫu đối chứng không có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê, ấu trùng bơi và hoạt động bình thường.

4. KẾT LUẬN

Nghiên cứu đã đánh giá được các chỉ tiêu chất lượng, hàm lượng dược chất, hoạt tính kháng oxy hóa, và tính an toàn của sản phẩm cao nấm dược liệu CORDY-X. Trong đó, sản phẩm đạt các chỉ tiêu kiểm nghiệm về vi sinh và kim loại nặng. Hàm lượng của các nucleoside quan trọng bao gồm adenosine và cordycepin lần lượt 0,95 mg/g và 0,26 mg/g. Sản phẩm có khả năng bắt 27% gốc tự do DPPH tại nồng độ 250 µg/mL. Sản phẩm không có thể hiện độc tính trên nguyên bào sợi người và trên ấu trùng tôm *Artemia franciscana* tại nồng độ lần lượt 500 µg/mL và 1000 µg/mL. Kết quả nghiên cứu góp phần cung cấp thêm thông tin về chất lượng và hoạt tính của sản phẩm.

Lời cảm ơn: Nghiên cứu này được tài trợ bởi Trường Đại học Thủ Dầu Một trong đề tài mã số DT.21.2-043.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Boh, B., Berovic, M., Zhang, J. and Zhi-Bin, L. - *Ganoderma lucidum* and its pharmaceutically active compounds. *Biotechnology annual review* **13** (2007) 265-301. [https://doi.org/10.1016/S1387-2656\(07\)13010-6](https://doi.org/10.1016/S1387-2656(07)13010-6).
2. Lu, S.Y., Peng, X.R., Dong, J.R., Yan, H., Kong, Q.H., Shi, Q.Q., Li, D.S., Zhou, L., Li, Z.R. and Qiu, M.H. - Aromatic constituents from *Ganoderma lucidum* and their neuroprotective and anti-inflammatory activities. *Fitoterapia* **134** (2019) 58-64. <https://doi.org/10.1016/j.fitote.2019.01.013>.
3. Ho, Y., Yeung, J., Chiu, P., Tang, W., Lin, Z., Man, R. and Lau, C. - *Ganoderma lucidum* polysaccharide peptide reduced the production of proinflammatory cytokines in activated rheumatoid synovial fibroblast. *Molecular cellular biochemistry* **301** (1) (2007) 173-179. <https://doi.org/10.1007/s11010-006-9409-y>.
4. Gupta, A., Kirar, V., Keshri, G.K., Gola, S., Yadav, A., Negi, P.S. and Misra, K. - Wound healing activity of an aqueous extract of the Lingzhi or Reishi medicinal mushroom *Ganoderma lucidum* (higher Basidiomycetes). *International journal of medicinal mushrooms* **16** (4) (2014). <https://doi.org/10.1615/intjmedmushrooms.v16.i4.50>.
5. Cheng, P.G., Phan, C.W., Sabaratnam, V., Abdullah, N., Abdulla, M.A. and Kuppusamy, U.R. - Polysaccharides-rich extract of *Ganoderma lucidum* (MA Curtis: Fr.) P. Karst accelerates wound healing in streptozotocin-induced diabetic rats. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine* (2013). <https://doi.org/10.1155/2013/671252>.
6. Sudheer, S., Alzorqi, I., Manickam, S. and Ali, A. - Bioactive compounds of the wonder medicinal mushroom "*Ganoderma lucidum*". *Bioactive Molecules in Food* (2019) 1863-1893. https://doi.org/10.1007/978-3-319-78030-6_45.
7. Das, S.K., Masuda, M., Sakurai, A. and Sakakibara, M. - Medicinal uses of the mushroom *Cordyceps militaris*: current state and prospects. *Fitoterapia* **81** (8) (2010) 961-968. <https://doi.org/10.1016/j.fitote.2010.07.010>.
8. Nguyễn Thái Thanh Ngân, Đỗ Thành Nhân, Lê Anh Duy, Nguyễn Đăng Khoa, Nguyễn Thị Liên Thương - Khảo sát hiệu suất sinh học và hàm lượng Cordycepin, Adenosine trong *Cordyceps militaris* theo thời gian nuôi cấy. Hội nghị Năm học Toàn quốc lần thứ 4 (2022). <https://doi.org/10.15625/vap.2022.0133>.
9. Nguyễn Thị Liên Thương, Lý Hà My, Nguyễn Minh Chánh, Nguyễn Đăng Khoa - Khảo sát quy trình chiết quả thể nấm đông trùng hạ thảo cho hàm lượng

- Cordycepin tối ưu. Tạp chí Khoa học Đại học Thủ Dầu Một **1** (56) (2022). <https://doi.org/10.37550/tdmu.VJS/2022.01.271>.
10. Nguyen, L.T.T., Vo, T.H., Nguyen, D.K., Nguyen, M.C. and Le, U.C.N. - Effects of *Cordyceps militaris* extract and its mixture with silica nanoparticles on burn wound healing on mouse model. Journal of Drug Delivery Science and Technology **67** (2022) 102901. <https://doi.org/10.1016/j.jddst.2021.102901>.
 11. Brand Williams, W., Cuvelier, M.E. and Berset, C. - Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. LWT-Food science and Technology **28** (1) (1995) 25-30. [https://doi.org/10.1016/S0023-6438\(95\)80008-5](https://doi.org/10.1016/S0023-6438(95)80008-5).
 12. Naidu, J.R., Ismail, R. and Sasidharan, S.- Acute oral toxicity and brine shrimp lethality of methanol extract of *Mentha Spicata* L (Lamiaceae). Tropical Journal of Pharmaceutical Research **13** (1) (2014) 101-107. <https://doi.org/10.4314/tjpr.v13i1.15>.
 13. Fan, H., Li, S., Xiang, J., Lai, C., Yang, F., Gao, J. and Wang, Y. - Qualitative and quantitative determination of nucleosides, bases and their analogues in natural and cultured Cordyceps by pressurized liquid extraction and high performance liquid chromatography-electrospray ionization tandem mass spectrometry (HPLC-ESI-MS/MS). Analytica Chimica Acta **567** (2) (2006) 218-228. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2006.03.032>.
 14. Corradetti, R., Conte, G.L., Moroni, F., Passani, M.B. and Pepeu, G. - Adenosine decreases aspartate and glutamate release from rat hippocampal slices. European Journal of Pharmacology **104** (1-2) (1984) 19-26. [https://doi.org/10.1016/0014-2999\(84\)90364-9](https://doi.org/10.1016/0014-2999(84)90364-9).
 15. Kitakaze, M. and Hori, M. - Adenosine therapy: a new approach to chronic heart failure. Expert Opinion on Investigational Drugs **9** (11) (2000) 2519-2535. <https://doi.org/10.1517/13543784.9.11.2519>.
 16. Kodama, E.N., McCaffrey, R.P., Yusa, K. and Mitsuya, H. - Antileukemic activity and mechanism of action of cordycepin against terminal deoxynucleotidyl transferase-positive (TdT+) leukemic cells. Biochemical pharmacology **59** (3) (2000) 273-281. [https://doi.org/10.1016/S0006-2952\(99\)00325-1](https://doi.org/10.1016/S0006-2952(99)00325-1).
 17. Kaij a Kamb, M., Amoros, M. and Girre, L. - Search for new antiviral agents of plant origin. Pharmaceutica acta Helvetiae **67** (5-6) (1992) 130-147.
 18. Verma, A.K. and Aggarwal, R. - Repurposing potential of FDA-approved and investigational drugs for COVID-19 targeting SARS-CoV-2 spike and main protease and validation by machine learning algorithm. Chemical biology drug design **97** (4) (2021) 836-853. <https://doi.org/10.1111/cbdd.13812>.
 19. Mau, J.L., Lin, H.C. and Chen, C.C. - Antioxidant properties of several medicinal mushrooms. Journal of Agricultural and Food Chemistry **50** (21) (2002) 6072-6077. <https://doi.org/10.1021/jf0201273>.
 20. Yu, H.M., Wang, B.S., Huang, S.C. and Duh, P.D. - Comparison of protective effects between cultured *Cordyceps militaris* and natural Cordyceps sinensis against oxidative damage. Journal of Agricultural and Food Chemistry **54** (8) (2006) 3132-3138. <https://doi.org/10.1021/jf053111w>.
 21. Jing, Y., Zhu, J., Liu, T., Bi, S., Hu, X., Chen, Z., Song, L., Lv, W. and Yu, R. - Structural characterization and biological activities of a novel polysaccharide from cultured *Cordyceps militaris* and its sulfated derivative. Journal of Agricultural and Food Chemistry **63** (13) (2015) 3464-3471. <https://doi.org/10.1021/jf505915t>.
 22. Nguyen, K.D., Nguyen, C.M., Le, D.A., Huynh, H.T., Tran, M.T., Truong, A.T., Nguyen, T.H., Vu, D.C. and Nguyen, L.-T.T. - The mixture of *Ganoderma lucidum* and *Cordyceps militaris*: Chemical compositions and protective effects against oxidative

stress. Journal of Agriculture and Food Research (2024) 101045. <https://doi.org/10.1016/j.jafr.2024.101045>.

23. Hamidi, M.R., Jovanova, B. and Panovska, T.K.,- Toxicological evaluation of the plant products using Brine Shrimp (*Artemia salina* L.) model. Macedonian pharmaceutical bulletin **60** (1) (2014). <https://doi.org/10.33320/maced.pharm.bull.2014.60.01.002>.

ABSTRACT

EVALUATION OF QUALITY, ANTIOXIDANT ACTIVITY, AND TOXICITY OF CORDY-X EXTRACT ON HUMAN FIBROBLAST CELLS AND THE BRINE SHRIMP *Artemia franciscana*

Nguyen Minh Chanh, Nguyen Dang Khoa*,

Tran Thi Mai, Le Anh Duy, Nguyen Thi Lien Thuong*

Institute of Applied Technology, Thu Dau Mot University, Binh Duong Province

*Email: nguyendangkhoa@tdmu.edu.vn; thuongntl@tdmu.edu.vn

Ganoderma lucidum and *Cordyceps militaris* are two major medicinal mushrooms with long-term usage in traditional and modern medicine. Along with the development of the research and cultivation of medicinal mushrooms, numerous commercial products, such as functional and supplemented foods, have been produced. Among them, the CORDY-X mushroom extract is the product that has the main ingredients of *C. militaris* and *G. lucidum* mushroom extracts. The Institute of Applied Technology, Thu Dau Mot University researched and transferred this product. In this study, we evaluated the product's quality standards, quantified major bioactive compounds, adenosine, and cordycepin, by the UPLC method, determined the antioxidant activity against DPPH free radicals, and assessed cytotoxicity on human fibroblast cells and toxicity on *Artemia franciscana* shrimp. The results showed that the product meets quality standards. The adenosine and cordycepin contents were 0.95 mg/g and 0.26 mg/g, respectively. The product scavenged 27% of DPPH free radicals at a 250 µg/mL concentration. The product is not toxic to human fibroblasts or to *Artemia franciscana* at concentrations of 500 µg/mL and 1000 µg/mL. The findings clarify some pharmaceutical ingredients, antioxidant activity, and the safety level of pharmaceutical herbal products.

Keywords: *Ganoderma lucidum*, *Cordyceps militaris*, antioxidant activities, cytotoxicity, *Artemia franciscana*.