

Thử nghiệm tạo chế phẩm có hoạt tính kháng oxy hóa từ *Spirulina platensis* và vàng nano

- Nguyễn Thị Mỹ Lan
- Nguyễn Thị Hoàng Quyên
- Đoàn Thị Mộng Thắm
- Lê Thị Thanh Loan
- Trần Trung Hiếu
- Lê Thị Mỹ Phước

Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, ĐHQG-HCM

- Đặng Văn Phú
- Nguyễn Quốc Hiến

Trung tâm Nghiên cứu và Triển khai Công nghệ Bức xạ TP. HCM

(Bài nhận ngày 12 tháng 12 năm 2014, nhận đăng ngày 12 tháng 08 năm 2015)

TÓM TẮT

Sự oxy hóa bên trong cơ thể liên quan đến quá trình sản sinh các gốc tự do, những gốc tự do này tăng quá mức sẽ làm hư hỏng các phân tử quan trọng như protein, DNA, và gây lão hóa sớm. Sự oxy hóa biểu hiện ở làn da dưới dạng các nếp nhăn, đốm tàn nhang và nhiều triệu chứng bệnh nghiêm trọng khác. Trong nghiên cứu này, các thử nghiệm hiệu ứng bắt gốc tự do bằng phương pháp ABTS với hỗn hợp dung dịch: sinh khối vi khuẩn lam *Spirulina platensis*, vàng nano (AuNP: 10 nm), vitamin C được thiết lập tạo chế phẩm kháng oxy hóa dạng paste nhằm góp phần đáp ứng nhu cầu về sản phẩm chăm sóc da có nguồn gốc thiên nhiên và kháng oxy hóa hiệu quả. Dịch paste với các thành phần trên

và chất làm dày polyvinyl pyrrolidone (PVP) được khử trùng bằng phương pháp chiếu xạ và kiểm tra các chỉ tiêu vi sinh vật. Kết quả cho thấy mỹ phẩm dạng paste với tỉ lệ phối trộn: 1000 ppm *S. platensis*, 10 ppm AuNP, và 10 ppm vitamin C có khả năng bắt gốc tự do cao, đạt hiệu suất 95 % sau 30 phút, và 100 % sau 120 phút. Với liều chiếu xạ 16 kGy cho kết quả khử trùng tốt nhất, không phát hiện vi sinh vật trong dịch paste. Như vậy, chế phẩm dạng paste kháng oxy hóa kết hợp ba thành phần chính là *S. platensis*, vàng nano, và vitamin C với chất làm dày PVP cho thấy có tiềm năng ứng dụng trong lĩnh vực mỹ phẩm, đặc biệt là làm trẻ hóa da mặt.

Từ khóa: Kháng oxy hóa, gốc tự do, *Spirulina*, vàng nano (AuNP), polyvinylpyrrolidone (PVP).

MỞ ĐẦU

Trong những năm gần đây, thuật ngữ “oxy hóa” và “gốc tự do” ngày càng phổ biến, đặc biệt trong

lĩnh vực mỹ phẩm chăm sóc da. Oxy hóa là một quá trình tự nhiên sản sinh các gốc tự do, luôn luôn

diễn ra và được điều hòa trong cơ thể. Tuy nhiên, các gốc tự do không ổn định và dễ hoạt động quá mức: mỗi gốc tự do có một electron tự do, do đó nó luôn có xu hướng thoát khỏi trạng thái này bằng cách gắn vào các phân tử kế cận kể cả những phân tử quan trọng và nhạy cảm như protein, chất béo, thậm chí là vật liệu di truyền DNA [3]. Ngay khi gắn vào các phân tử kế cận, các gốc tự do làm biến đổi các phân tử này thành gốc tự do và một hiệu ứng dây chuyền diễn ra vô hạn [1]. Nếu không ngăn chặn hiệu ứng này kịp thời sẽ dẫn đến các bệnh ung thư, bệnh mãn tính và sự lão hóa, bao gồm sự lão hóa của da, một trong những cơ quan thường xuyên tiếp xúc trực tiếp với các tác nhân gây hại như tia UV, gió, lạnh, các vi sinh vật và tác nhân gây ô nhiễm môi trường.

Hiện nay, đã có nhiều nghiên cứu về sự oxy hóa và gốc tự do. Có rất nhiều sản phẩm chăm sóc da ra đời với nguyên tắc chung nhất là bổ sung những hợp chất có thể trung hòa gốc tự do trong cơ thể như vitamin E, vitamin C, vitamin A được tìm thấy ở thực vật, các chất khoáng như selen, kẽm... Trong số đó, vi khuẩn lam *Spirulina platensis* được quan tâm đặc biệt do có nhiều tính chất ưu việt như chứa protein thực vật phong phú (60 ~ 63 %, cao hơn so với cá hoặc thịt bò gấp 3 ~ 4 lần). Đặc biệt, protein trong *Spirulina* được cấu thành từ hơn 18 loại amino acid, trong đó có 8 amino acid thiết yếu. Bên cạnh đó, *Spirulina* còn là nguồn bổ sung nhiều loại vitamin như tiền vitamin A (beta-caroten), vitamin E, vitamin nhóm B (B1, B2, B6, B12, acid folic...) với hàm lượng vitamin B12 cao gấp đôi gan bò, lượng beta-caroten cao gấp 20 lần trong cà rốt, lượng vitamin E cao gấp trong mầm lúa mì. Thêm vào đó, *Spirulina* còn chứa nhiều dưỡng chất cần thiết cho cơ thể không gây dị ứng, đặc biệt là những chất có khả năng trung hòa gốc tự do, các hợp chất chống oxy hóa tự nhiên, giúp ngăn ngừa sự thoái hóa tế

bào và làm chậm quá trình lão hóa cơ thể như: phycocyanin, chlorophyll, beta-caroten, vitamin E ... đã góp phần làm cho *Spirulina* hoàn toàn khác biệt và độc nhất so với các loại thực phẩm thiên nhiên khác. Bên cạnh đó, vàng nano cũng đang có xu hướng mở rộng trong lĩnh vực mỹ phẩm vì nó có khả năng kháng oxy hóa rất tốt nên được bổ sung nhiều vào các mỹ phẩm dưỡng da cao cấp, làm sáng da, giảm các dấu hiệu lão hóa. Với những tiền đề vừa nêu, chế phẩm kết hợp hai thành phần: *Spirulina platensis* - Nano vàng và đồng thời bổ sung thêm vitamin C và polyvinylpyrrolidone được nghiên cứu nhằm góp phần tạo ra một loại mỹ phẩm làm chậm quá trình lão hóa, chăm sóc làn da khỏe mạnh có giá thành phù hợp cho mọi người.

Nghiên cứu này nhằm khảo sát tính kháng oxy hóa của các thành phần riêng lẻ (sinh khối khô *S. platensis*, keo vàng nano, vitamin C) nhờ khả năng bắt gốc tự do ABTS^{•+} từ đó tìm ra nồng độ phối trộn thích hợp; kết hợp các thành phần để chế tạo mỹ phẩm dưỡng da có khả năng kháng oxy hóa, hỗ trợ chức năng là vitamin C và chất làm dày là PVP.

VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

Đối tượng nghiên cứu và nguyên liệu

Sinh khối *Spirulina platensis* dạng bột của Bộ môn Công nghệ Sinh học Thực vật và Chuyển hóa sinh học, Khoa Sinh học, Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, ĐHQG-HCM. Các nghiên cứu sử dụng các hóa chất có độ tinh sạch cao để pha môi trường Zarrouk (1966) vô trùng nên sinh khối của *Spirulina* được sản xuất ổn định, có hiệu quả kinh tế và đạt được các tiêu chuẩn vi sinh và sinh hóa về chất lượng. Ngoài ra, chế phẩm với hai thành phần chính là

Spirulina platensis và vàng nano sau khi phối trộn còn được khử trùng bằng phương pháp chiếu xạ với liều 16 kGy.

Keo vàng nano nồng độ 15 mM, kích thước hạt trung bình 10 nm, là sản phẩm của Trung tâm Nghiên cứu và Triển khai Công nghệ Bức xạ, Tp.HCM.

Polyvinylpyrrolidone (PVP) K90, hãng BASF, Canada.

Vitamin C của hãng Biobasic Canada – Canada.

Các phương pháp thực nghiệm

Khảo sát hoạt tính kháng oxy hóa của các thành phần

Nghiệm thức A: Thử nghiệm hiệu ứng chống oxy hóa của sinh khối *S. platensis* ở các nồng độ 1000, 2000, 3000, 5000 ppm.

Nghiệm thức B: Thử nghiệm hiệu ứng chống oxy hóa của keo vàng nano ở các nồng độ 0; 10; 20, 30, 40, 50 ppm.

Nghiệm thức C: Thử nghiệm hiệu ứng chống oxy hóa của vitamin C ở các nồng độ 10, 15, 20, 25 ppm.

Nghiệm thức D: Thử nghiệm hiệu ứng chống oxy hóa của hỗn hợp thành phần mỹ phẩm nhằm mục đích kiểm tra tính tương tác của thành phần trong hỗn hợp. Tiến hành 3 thí nghiệm thử khả năng bắt gốc oxy hóa của các thành phần ở những nồng độ khác nhau.

Tạo mỹ phẩm dạng paste với phương pháp khử trùng chiếu xạ

Kết hợp các thành phần theo tỉ lệ tối ưu và tiết kiệm nhất từ nghiệm thức D.

Kiểm tra số lượng vi sinh vật ban đầu và tiến hành chiếu xạ ở các liều xạ khác nhau để tìm ra liều xạ khử trùng phù hợp.

Bảng 1. Thành phần hỗn hợp thí nghiệm thử hoạt tính kháng oxy hóa khi kết hợp 3 thành phần *S. platensis*, keo vàng nano và vitamin C.

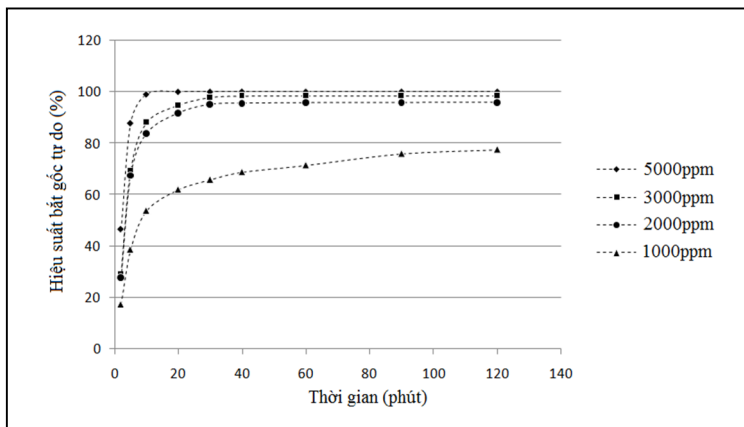
	<i>S. platensis</i> (ppm)	Keo vàng nano (ppm)	Vitamin C (ppm)
Nghiệm thức D1			
Mẫu 1	5000	0	25
Mẫu 2	5000	500	0
Mẫu 3	0	50	25
Mẫu 4	5000	50	25
Nghiệm thức D2			
Mẫu 1	3000	0	20
Mẫu 2	3000	40	0
Mẫu 3	0	40	20
Mẫu 4	3000	40	20
Nghiệm thức D3			
Mẫu 1	1000	0	10
Mẫu 2	1000	10	0
Mẫu 3	0	10	10
Mẫu 4	1000	10	10

KẾT QUẢ-THẢO LUẬN**Khảo sát hiệu ứng chống oxy hóa theo nồng độ và thời gian bằng phương pháp đo khả năng bắt gốc tự do ABTS^{•+}**

Thí nghiệm kiểm tra khả năng kháng oxy hóa được tiến hành theo 4 nghiệm thức về khả năng

Nghiệm thức A:

bắt gốc tự do của: (A) Sinh khối vi khuẩn lam *S. platensis* (Hình 1); (B) Keo vàng nano (Hình 2); (C) Vitamin C (Hình 3); và (D) các thành phần hỗn hợp (Hình 4)



Hình 1. Đồ thị ảnh hưởng của nồng độ sinh khối vi khuẩn lam *S. platensis* đến hiệu suất bắt gốc tự do ABTS^{•+} theo thời gian phản ứng.

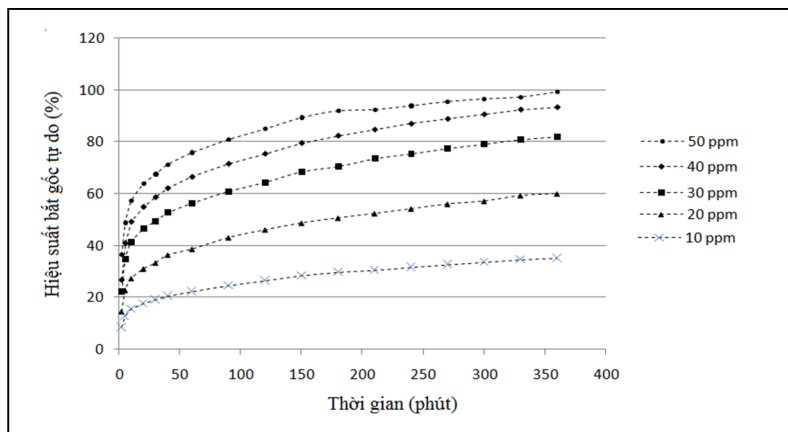
Sinh khối *S. platensis* với thành phần dồi dào chất kháng oxy hóa (Bảng 2) có khả năng bắt gốc tự do rất tốt ở các nồng độ thấp (1000, 2000, 3000 và 5000 ppm). Phản ứng bắt gốc tự do xảy ra hoàn toàn sau 10 phút ở nồng độ 5000 ppm. Ở 4000 ppm và 3000 ppm đạt hiệu suất 100 % sau 20 phút. Nồng độ 2000 ppm, phản ứng đạt hiệu suất 90 % sau 20 phút và 96 % sau 120 phút. Và ở 1000 ppm,

phản ứng đạt hiệu suất 78 % sau 120 phút. Kết quả cho thấy thành phần của sinh khối *S. platensis* có khả năng kháng oxy hóa tốt, hiệu suất phụ thuộc vào nồng độ và thời gian, phù hợp với công trình của Colla và cộng sự đã công bố về xác định khả năng kháng oxy hóa của *S. platensis* bằng phương pháp Scavenging potential [2].

Bảng 2. Các thành phần chính của *S. platensis*

1.Thành phần cơ bản (% trong 100 g sinh khối)	
Protein	65 %
Khoáng	7 %
Carbonhydrate	5 %
Protein và amino acid	[3] %
2.Thành phần kháng oxy hóa (mg trong 100 g sinh khối)	
Selen	0,01
Vitamin E	15,0
Beta-caroten	17000,0
Biotin	0,0005
Riboflavin	0,4
Thiamin	0,35

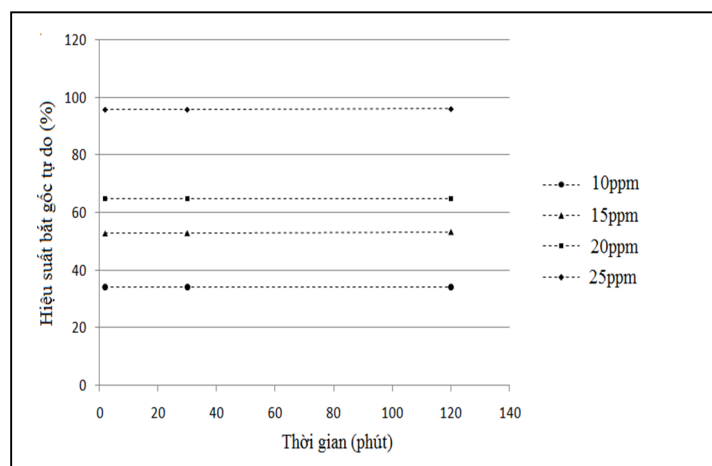
Nghiem thức B:



Hình 2. Đồ thị ảnh hưởng của nồng độ keo vàng nano đến hiệu suất bắt gốc tự do ABTS^{•+} theo thời gian

Khả năng bắt gốc tự do của keo vàng nano ở các nồng độ khác nhau cho thấy khả năng kháng oxy hóa cao nhất đối với vàng nano có nồng độ cao nhất (50 ppm), hiệu suất giảm dần khi nồng độ giảm dần. Một điểm chung của phản ứng ở tất cả các nồng độ là hiệu suất phản ứng tăng đều theo thời gian. Sau 360 phút phản ứng, hiệu suất đạt được của keo vàng nano ở 10 ppm, 20 ppm, 30

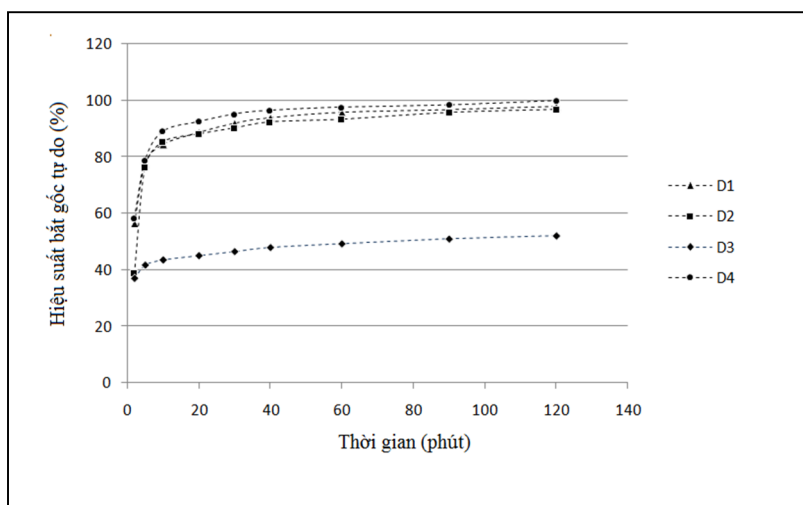
ppm, 40 ppm, 50 ppm lần lượt là 35 %, 60 %, 82 %, 93 %, 99 %. Kết quả này tương tự với đường biểu diễn hiệu suất bắt gốc tự do của keo vàng nano kích thước 10 nm trong công bố của Nguyễn Ngọc Duy và cộng sự [4]. Như vậy, khả năng kháng oxy hóa của keo vàng nano cho thấy phụ thuộc vào nồng độ và thời gian.

Nghiem thức C:

Hình 3. Đồ thị ảnh hưởng của nồng độ vitamin C đến hiệu suất bắt gốc tự do ABTS^{•+} theo thời gian phản ứng.

Vitamin C là chất có khả năng kháng oxy hóa rất tốt. Do đó, để kiểm tra khả năng bắt gốc tự do, các mẫu được khảo sát với nồng độ thấp (10, 15, 20 và 25 ppm). Phản ứng nhanh, đạt hiệu suất tương ứng là 34 %, 53 %, 65 %, 96 % và hầu như không đổi theo thời gian (biểu đồ phản ứng theo

thời gian gần như là đường thẳng nằm ngang ở tất cả các nồng độ). Kết quả cho thấy phản ứng bắt gốc tự do của vitamin C phụ thuộc vào nồng độ trong dung dịch phản ứng, đạt bão hòa ngay khi phản ứng xảy ra, không phụ thuộc vào thời gian.

Nghiem thức D:

Hình 4: Biểu đồ ảnh hưởng các thành phần hỗn hợp đến hiệu suất bắt gốc tự do ABTS^{•+} theo thời gian phản ứng. (D1: *S. platensis* 1000 ppm + vitamin C 10 ppm; D2: *S. Platensis* 1000 ppm + keo vàng nano 10 ppm; D3: Keo vàng nano 10 ppm + vitamin C 10 ppm; D4: *S. Platensis* 1000 ppm + keo vàng nano 10 ppm + vitamin C 10 ppm).

Nghiệm thức này phối hợp các thành phần ở nghiệm thức A, B, C để kiểm tra sự cộng hợp tính kháng oxy hóa của các thành phần. Tiến hành phối trộn các thành phần với nồng độ có hiệu suất bắt gốc tự do cao nhất: *S. platensis*: (5000 ppm), keo vàng nano (50 ppm), vitamin C (25 ppm) (Thí nghiệm D1). Tuy nhiên, hỗn hợp với 3 thành phần này có hiệu suất bắt gốc tự do quá cao, phản ứng xảy ra ngay lập tức nên không thể ghi nhận kết quả bằng máy đo UV-vis. Do đó, nồng độ các thành phần được giảm theo nghiệm thức: *S. Platensis* (2000 ppm), keo vàng nano (20 ppm), vitamin C (20 ppm) (Thí nghiệm D2) và phản ứng cũng xảy ra ngay lập tức, không ghi nhận được kết quả. Khi tiến hành thí nghiệm với

nồng độ các thành phần nhỏ nhất [*S. platensis*: 1000 ppm, AuNP (10 ppm), vitamin C (10 ppm)], kết quả được ghi nhận ở Hình 4.

Tất cả các mẫu thử đều cho hiệu suất bắt gốc tự do cao ($\geq 50\%$): các mẫu D1, D2, D4 sau 120 phút phản ứng có hiệu suất lần lượt là 97 %, 98 % và 100 %; mẫu D3 có hiệu suất thấp nhất (50

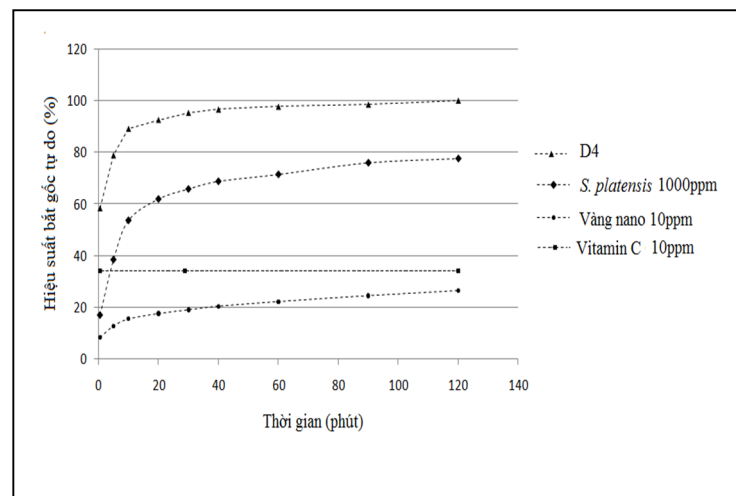
So sánh khả năng bắt gốc tự do mẫu D4 với từng thành phần riêng lẻ

Hình 5. Đồ thị ảnh hưởng của mẫu D4 và các thành phần riêng lẻ theo thời gian phản ứng

Kết quả Hình 5 cho thấy khi kết hợp 3 thành phần với nhau, khả năng bắt gốc tự do tăng lên rất nhiều. Ở phút thứ 30 của phản ứng, mẫu D4 có hiệu suất là 95 % so với *S. platensis* là 65 %, vitamin C là 34 %, vàng nano là 19 %. Ở phút 120, mẫu D4 có hiệu suất phản ứng là 100 % so với *S. platensis* là 78 % (tăng 22 %), vàng nano là 27 % (tăng 73 %), vitamin C là 34 %.

Bảng 3. Mật độ vi sinh vật (CFU/g) trong dịch paste được phát hiện bằng phương pháp chiếu xạ trên các môi trường.

Liều xạ (kGy)	Môi trường		
	PGA	Hansen	Cao thịt - pepton



% sau 120 phút phản ứng). Điều đó chứng tỏ khả năng tương tác kháng oxy hóa tốt của *S.*

platensis với 2 thành phần còn lại. Ngoài ra, vitamin C và vàng nano kết hợp cũng làm tăng khả năng bắt gốc tự do so với từng thành phần riêng lẻ nhưng không quá cao (Nghiệm thức B và C). Như vậy, khi kết hợp 3 thành phần với nhau cho hiệu suất bắt gốc tự do cao và nhanh nhất.

Xác định độ nhiễm vi sinh vật của dịch paste (*S. platensis*, vitamin C và vàng nano) sau khi chiếu xạ

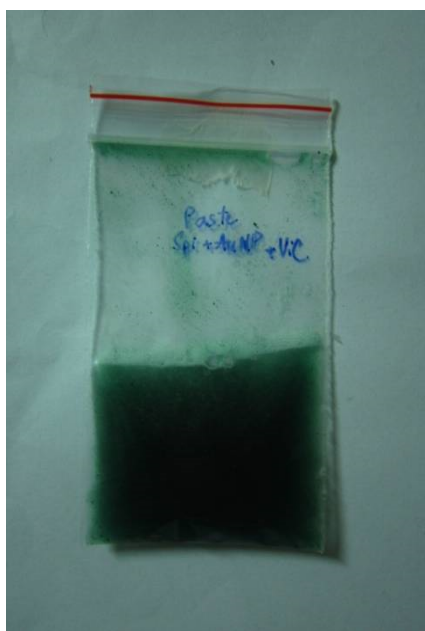
Sự nhiễm vi sinh vật thường xảy ra trong quá trình rửa để loại kiềm và thu nhận sinh khối *S. platensis*. Do đó, các dịch paste được khử trùng bằng phương pháp chiếu xạ ở các liều khác nhau (Bảng 3) để giảm thiểu sự nhiễm vi sinh vật.

0	$1,75.10^5$	3.10^4	$1,07.10^7$
8	2.10^4	KPH	3.10^4
16	KPH	KPH	KPH
20	KPH	KPH	KPH

KPH: không phát hiện, PGA: potato glucose agar

Dịch paste khi chưa chiếu xạ bị nhiễm vi sinh vật với mật độ cao, đặc biệt là vi khuẩn hiếu khí ($1,07.10^7$). Ở liều xạ 8 kGy, chỉ làm giảm mật độ nấm mốc trên môi trường PGA và vi khuẩn

hiếu khí trên môi trường cao thịt – pepton. Ở liều xạ 16 kGy và 20 kGy thì hoàn toàn không có vi sinh vật nhiễm nào được ghi nhận trong dịch paste.



Hình 6. Dịch paste với thành phần *S. platensis* 1000 ppm, keo vàng nano 10 ppm, vitamin C 10 ppm và PVP 15 % sau khi chiếu xạ 16kGy.

KẾT LUẬN

Vi tảo *S. platensis* có hiệu suất bắt gốc tự do hoàn toàn ở nồng độ 5000 ppm sau 10 phút. Keo vàng nano có khả năng bắt gốc tự do với hiệu suất

cao nhất ở nồng độ 50 ppm sau 360 phút. Trong khi đó vitamin C cho phản ứng bắt gốc tự do rất nhanh ở nồng độ 10 ppm.

Sự kết hợp 3 thành phần *S. platensis*, keo vàng nano và vitamin C ở mẫu D4 (*S. platensis* 1000 ppm + keo vàng nano 10 ppm + vitamin C 10 ppm) cho hiệu quả bắt gốc tự do hoàn toàn sau 120 phút phản ứng và cao hơn hẳn so với từng thành phần riêng lẻ.

Hỗn hợp dịch paste hoàn toàn vô trùng ở liều chiếu xạ 16 kGy.

Sự kết hợp *S. platensis* với keo vàng nano và vitamin C cho thấy khả năng ứng dụng tạo mỹ phẩm dưỡng da dạng paste.

Study on the antioxidant cosmetic preparation from *Spirulina platensis* and gold nanoparticles

- Nguyen Thi My Lan
- Nguyen Thi Hoang Quyen
- Doan Thi Mong Tham
- Le Thi Thanh Loan
- Tran Trung Hieu
- Le Thi My Phuoc

University of Science, VNU-HCM

- Dang Van Phu
- Nguyen Quoc Hien

Research and Development Center for Radiation Technology HCM

ABSTRACT

Oxidation can generate free radicals which damage important molecules including lipids, proteins, and nucleic acid, and causes premature aging. The oxidation of skin cells manifests as wrinkles, freckles and many other serious symptoms. To develop natural products with high antioxidant ability for skin care, we developed mixtures of Spirulina platensis biomass, gold nanoparticles (AuNP: 10 nm) and vitamin C at different ratios. The antioxidant activity of the mixtures was measured by ABTS (2,2'-azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) diammonium salt) assay. The mixture of S. platensis (1000 ppm), AuNP (10 ppm), and vitamin C (10 ppm) showed excellent

antioxidant activity with 95 % efficiency after 30 minutes and 100 % efficiency after 120 minutes under the reaction conditions. The combination of the mixture and the polyvinylpyrrolidone (PVP) binder was sterilized by gamma Co-60 radiation. The sterilization dose of 16 kGy was selected due to the absence of aerobic microorganisms in the antioxidant cosmetic preparation. Thus, the cosmetic preparation in paste form containing three main components of S. platensis, gold nanoparticles, and vitamin C combined with PVP binder has a potential applications in the field of cosmetics, especially for facial skin rejuvenation.

Keywords: Antioxidation, free radicals, *Spirulina*, gold nanoparticles, polyvinylpyrrolidone (PVP).

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1]. M.S. Brever, Natural antioxidants: sources, compounds, mechanisms of action, and potential applications, Comprehensive reviews in food science and food safety, 222 (2011).
- [2]. L.M. Colla, E.B. Furlong, J.V.A Costa, Antioxidant properties of *Spirulina* (*Arthrospira*) *platensis* cultivated under different temperatures and nitrogen regimes, *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 50, 3-4 (2007).
- [3]. T. Grune, B.Catalgol, T. Jung, Protein oxidation and aging, *Wiley series in protein and peptide science*, 1-3 (2012).
- [4]. N.N. Duy, D.X. Du, D.V. Phu, L.A. Quoc, B.D. Du, N.Q. Hien, Synthesis of gold nanoparticles with seed enlargement size by α -irradiation and investigation of antioxidant activity, *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 636-638 (2013).