



Một số yếu tố ảnh hưởng đến hiệu suất chiết và hàm lượng hoạt chất trong cao của nấm *Cordyceps militaris*

SOME FACTORS AFFECTING THE EXTRACT PERFORMANCE AND HIGH ACTIVE CONTENTS OF *CORDYCEPS MILITARIS*

Trần Văn Thanh, Nguyễn Phương Dung, Đặng Thị Nga

Học viện Y Dược học cổ truyền Việt Nam

TÓM TẮT

Mục tiêu: Lựa chọn được nồng độ dung môi (ethanol) và nhiệt độ đảm bảo hiệu suất chiết và hàm lượng hoạt chất cao nhất trong cao chiết từ nấm *Cordyceps militaris*.

Phương pháp nghiên cứu: Chiết xuất nấm *Cordyceps militaris* bằng ethanol có sử dụng siêu âm; định lượng Adenosine và Cordycepin chiết từ nấm *Cordyceps militaris* bằng sắc ký lỏng hiệu năng cao (HPLC).

Kết quả: Chiết xuất nấm *cordyceps militaris* ở nhiệt độ phòng (25°C) bằng ethanol (EtOH) ở các nồng độ: 300; 600 và 900 cho hiệu suất chiết tương ứng là: 54,95 %; 42,23%; và 36,18%; hàm lượng hoạt chất adenosine trung bình: 1,2 mg/g; 0,24 mg/g và không xác định được; hàm lượng hoạt chất cordycepin trung bình (mg/g): 1,88 mg/g; 1,69 mg/g và 1,73 mg/g. Chiết trong EtOH 300 ở các nhiệt độ khác nhau: nhiệt độ phòng (25°C); 40°C; 60°C và 80°C cho hiệu suất chiết (%) tương ứng là: 53,4 %; 54,95 %; 52,35 %; 50,26%; hàm lượng hoạt chất adenosine trung bình: 1,13 mg/g; 1,2 mg/g; 0,78 mg/g; 0,65 mg/g; hàm lượng hoạt chất cordycepin trung bình: 1,81 mg/g; 1,88 mg/g; 1,91 mg/g; 2,1 mg/g.

Kết luận: Hiệu suất chiết và hàm lượng hoạt chất trong cao của nấm *cordyceps millitaris* chịu ảnh hưởng bởi nồng độ dung môi (ethanol) và nhiệt độ. Chiết bằng dung môi ethanol 30% rung siêu âm ở 40°C là điều kiện chiết tối ưu để thu được hiệu suất cao chiết và hàm lượng hoạt chất cao nhất.

Từ khóa: Adenosine, cordycepin, *Cordyceps millitaris*, hiệu suất chiết.

ABSTRACT

Aims: To choose solvent concentration (ethanol) and temperature for extraction to ensure highest efficiency and contents of active ingredients in the extract from *Cordyceps militaris* mushroom.

Methods: Extraction of *Cordyceps millitaris* with ethanol of different concentrations and at different temperatures; Adenosine and Cordycepin in the extracts were assayed by high performance liquid chromatography (HPLC).

Ngày nhận bài: 01/2/2022

Ngày phản biện: 4/2/2022

Ngày chấp nhận đăng: 22/2/2022



Results: Extraction of *Cordyceps militaris* mushroom by ethanol solvent (EtOH) at concentrations: 300; 600 and 900 gave the extraction efficiency: 54.95%; 42.23%; and 36.18% respectively; adenosine content: 1.2 mg/g; 0.24 mg/g and unidentified, respectively; average content of cordycepin (mg/g): 1.88 mg/g; 1.69 mg/g and 1.73 mg/g, respectively. Extraction in 300 EtOH at different temperature conditions: room temperature (25°C); 40°C; 60°C and 80°C give extraction efficiency (%) respectively: 53,4 %; 54,95 %; 52,35 %; 50,26%; average adenosine content: 1.13 mg/g; 1.2 mg/g; 0.78 mg/g; 0.65 mg/g, respectively; content of cordycepin: 1.81 mg/g; 1.88 mg/g; 1.91 mg/g; 2.1 mg/g, respectively.

Conclusion: The extraction efficiency and content of active ingredients in *Cordyceps militaris* extracts were influenced by solvent concentration (ethanol) and temperature. Extraction with 300 ethanol with ultrasonic vibration at 40°C is the optimal extraction condition to obtain the highest extraction efficiency and highest content of active ingredients.

Key word: Adenosine, cordycepin, *Cordyceps militaris*, extraction efficiency.

ĐẶT VẤN ĐỀ

Nấm *Cordyceps militaris* thuộc giới Nấm, chi Ascomycota, lớp Sordariomycetes, bộ Hypocreales, họ Cordycipitaceae, giống *Cordyceps* và loài *C. militaris* thường ký sinh trên bề mặt côn trùng giai đoạn nhộng vào mùa đông và hình thành quả thể vào mùa hè [2]. Thể quả nấm *Cordyceps militaris* có chứa: Protein; acid amin; các vitamin: A, B1, B6, B12, B3, các nguyên tố khoáng: Se; Zn; Cu; acid amin và một số hợp chất như: Adenosine, Cordycepin, polysaccharide, nucleosides (adenosine, inosine), sterols (ergosterol)..... có nhiều hoạt tính sinh học quan trọng như tác dụng tốt đối với: Tim mạch, gan, thận, hô hấp, thần kinh, miễn dịch..., ngoài ra còn có tác dụng bảo vệ và điều hòa miễn dịch, hạ đường huyết, chống oxy hóa, chống ung thư, chống virus, chống viêm và kháng khuẩn,... [5]. Trong những năm gần đây việc nghiên cứu về nấm *Cordyceps militaris* cũng như nghiên cứu phương pháp chiết các hợp chất có hoạt tính sinh học từ loài nấm này ngày càng được quan tâm. Vì vậy, đề tài nghiên cứu một số yếu tố ảnh hưởng trong quá trình chiết như nồng độ ethanol và nhiệt độ chiết để thu được hiệu suất chiết và hàm lượng hoạt chất cao nhất.

ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

Đối tượng nghiên cứu

Nguyên liệu: Nấm *Cordyceps militaris* dạng sợi phơi, sấy khô, được cung cấp bởi Viện di truyền nông nghiệp Việt Nam (năm 2020)

Dung môi, hóa chất: Acid citric, Adenosine chuẩn, Bisdemethoxycurcumin chuẩn (BDMC), Curcumin chuẩn, Cordycepin chuẩn, Demethoxycurcumin chuẩn (DMC), Ethanol, Methanol, Natri benzoat, Natri citrate dyhydrat, Natri metabisulfit, Natri saccharin, Poly sorbate 80 (Tween 80), Nước cất.

Phương pháp nghiên cứu

Xử lý mẫu:

Chọn dung môi chiết là ethanol, nghiền nhỏ mẫu nấm *C. militaris*, cân chính xác 1g cho vào các ống ống ly tâm 50mL. Lần lượt cho dung môi gồm: 30°; 60° và 90°. Chiết xuất bằng cách rung siêu âm trong 30 phút. Đem ly tâm rồi chuyển dịch chiết vào bình định mức 100mL. Chiết 3 lần cho kiệt hoạt chất, định mức bằng dung môi chiết vừa đủ 100mL, lọc dịch chiết qua giấy lọc.

Đánh giá ảnh hưởng của nồng độ dung môi (Ethanol) đến hiệu suất chiết và hàm lượng hoạt chất trong cao

Lấy khoảng 2mL dịch chiết đem định lượng



Adenosine bằng HPLC. Phần dịch chiết còn lại đem cô cho bay hơi hết dung môi rồi sấy đến khối lượng không đổi ở 50°C thu được cao khô lần lượt ký hiệu là CE₃, CE₆, CE₉. Cân khối lượng cao và tính hiệu suất cao theo từng loại dung môi chiết xuất theo công thức:

$$\text{Hiệu suất cao chiết (\%)} = (\text{m cao khô} / \text{m mẫu}) \times 100 \%$$

$$\text{Hàm lượng cao chiết (\%)} = ((\text{Khối lượng cao chiết thu nhận}) / 1\text{g}) \times 100 \%$$

Đánh giá ảnh hưởng của nhiệt độ chiết đến hiệu suất chiết và hàm lượng hoạt chất trong cao

Chiết xuất được thực hiện ở các nhiệt độ khác nhau: nhiệt độ phòng, 40°C, 60°C và 80°C.

Định lượng hàm lượng hoạt chất chính (adenosine và cordycepin) trong dịch chiết hoặc trong cao chiết bằng phương pháp HPLC. Điều kiện sắc ký: Cột C18 Phenomenex (4,6 mm × 250 mm, 5 μm); tốc độ dòng: 0,8 mL/phút; thể tích tiêm mẫu: 10 μL. Detector PDA, tại bước sóng 259 nm. Dung môi pha động: Methanol: H₂O tỷ lệ 50:50.

- *Mẫu chuẩn Adenosine và Cordycepin:*

+ **Adenosine:** Cân chính xác 15,2mg chất chuẩn Adenosine, hòa tan vào bình định mức 25 mL với Methanol để được dung dịch chuẩn gốc

nồng độ 608ppm (dung dịch A). Sau đó pha loãng dung dịch A thành dãy chuẩn có nồng độ: loãng 10, 20, 100, 200, 1000, 2000 lần.

+ **Cordycepin:** Cân chính xác 9,925mg chất chuẩn Cordycepin, hoà tan vào bình định mức 25mL với Methanol được dung dịch chuẩn gốc nồng độ 397mg (dung dịch B). Sau đó pha loãng dung dịch B thành dãy chuẩn có nồng độ: loãng 5; 10, 50, 100, 500 lần.

Sau khi pha dung dịch chuẩn thành dãy chuẩn, đem định lượng và xác định diện tích peak ở bước sóng 260nm.

- *Mẫu thử:* Dùng bơm tiêm 3mL lấy khoảng 1,5mL dịch chiết lọc qua đầu lọc tiêm cỡ 0,45 μm, cho vào vial rồi đem định lượng Adenosine và Cordycepin bằng phương pháp HPLC với chất chuẩn Adenosine và Cordycepin.

KẾT QUẢ

Đánh giá ảnh hưởng của nồng độ dung môi (Ethanol) và đến hiệu suất chiết và hàm lượng hoạt chất trong cao

Ảnh hưởng của nồng độ dung môi đến hiệu suất chiết

Khối lượng cao chiết thu được và hiệu suất chiết là giá trị trung bình sau 2 lần thực hiện như sau:

Bảng 1. Ảnh hưởng của dung môi đến hiệu suất chiết xuất

Mẫu cao khô	Dung môi	Khối lượng cao chiết (g)	Hiệu suất cao chiết (%)	Hiệu suất chiết TB (%)
CE3	Ethanol 300	0,5495	54,95	54,95
		0,5494	54,94	
CE6	Ethanol 600	0,4162	41,62	42,23
		0,4283	42,83	
CE9	Ethanol 900	0,3624	36,24	36,18
		0,3612	36,	

Từ kết quả trên cho thấy ở nhiệt độ phòng chiết xuất nấm Cordyceps militaris bằng dung môi EtOH 300 cho hiệu suất chiết lớn nhất (54,95%)

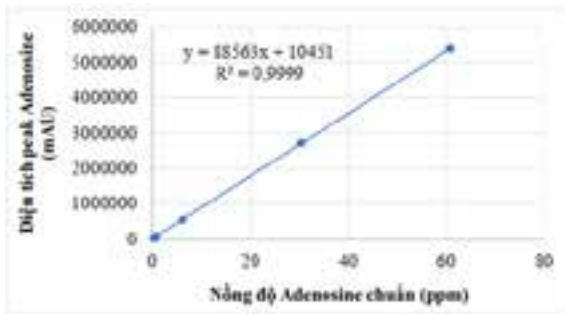
Ảnh hưởng của nồng độ dung môi đến hàm lượng hoạt chất trong cao

- Mẫu chuẩn: Định lượng và xác định diện tích peak ở bước sóng 260 nm được bảng giá trị như sau:

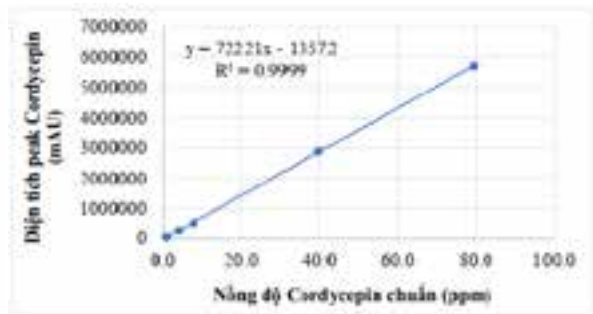
Bảng 2. Bảng giá trị diện tích peak Adenosine và Cordycepin chuẩn ở các nồng độ khác nhau

Adenosine chuẩn				Cordycepin chuẩn			
Độ pha loãng	C chuẩn (ppm)	Diện tích peak	C thực (ppm)	Độ pha loãng	C chuẩn (ppm)	Diện tích peak	C thực (ppm)
10	60,8	5384674	60,68	5	79,4	5707615	79,2
20	30,4	2725358	30,66	10	39,7	2885003	40,1
100	6,08	540490	5,98	50	7,94	533328	7,57
1000	0,608	61542	0,577	100	3,97	274216	3,98
2000	0,304	36404	0,29	500	0,794	51011	0,894

Từ giá trị diện tích peak và nồng độ chuẩn, xây dựng được đường chuẩn của Adenosine và Cordycepin như sau:



Hình 1. Đồ thị đường chuẩn Adenosine



Hình 2. Đồ thị đường chuẩn Cordycepin

Từ các dữ kiện của đường chuẩn ta thấy: diện tích peak của Adenosine và Cordycepin tuyến tính trong khoảng nồng độ:

Adenosine: 0,304 ppm ÷ 60,8 ppm với hệ số hồi quy tuyến tính $R^2 = 0,9999 > 0,995$.

Cordycepin: 0,794 ppm ÷ 79,4 ppm với hệ số

hồi quy tuyến tính $R^2 = 0,9999 > 0,995$.

- *Mẫu nấm Cordyceps militaris (mẫu thử):*

Định lượng và xác định diện tích peak các mẫu thử ở bước sóng 260nm. Kết quả định lượng thể hiện qua bảng sau:

Bảng 3. Ảnh hưởng của nồng độ dung môi đến hàm lượng hoạt chất

Dung môi	Khối lượng mẫu (g)	Hàm lượng Adenosine (mg/g)	Hàm lượng Adenosine TB (mg/g)	Hàm lượng Cordycepin (mg/g)	Hàm lượng Cordycepin TB (mg/g)
Ethanol 300	1,0009	1,17	1,2	1,87	1,88
	1,0071	1,22		1,90	



Ethanol 600	1,0040	0,24	0,24	1,68	1,69
	1,0027	0,24		1,7	
Ethanol 900	1,0028	-	-	1,68	1,73
	1,0087	-		1,79	

Ghi chú: (-) không chiết được chất phân tích

Từ kết quả cho thấy chiết bằng dung môi Ethanol 300 (tỷ lệ 100:1) ở nhiệt độ phòng thu được cao chiết có hiệu suất cao nhất (54,95 %); hàm lượng hoạt chất cũng cao nhất: Adenosine (1,2 mg/g) và Cordycepin (1,88 mg/g). Từ đó lựa chọn dung môi EtOH 300 cho khảo sát tiếp theo.

Đánh giá ảnh hưởng của nhiệt độ đến hiệu suất

Bảng 4. Ảnh hưởng của nhiệt độ đến hiệu suất chiết

Nhiệt độ chiết	Khối lượng cao chiết (g)	Hiệu suất cao chiết (%)	Hiệu suất chiết TB (%)
25°C	0,5332	0,5332	53,40
	0,5348	0,5348	
40°C	0,5495	0,5495	54,95
	0,5494	0,5494	
60°C	0,5246	0,5246	52,35
	0,5224	0,5224	
80°C	0,5018	0,5019	50,26
	0,5033	0,5033	

Từ kết quả cho thấy chiết nấm bằng dung môi EtOH 30⁰ ở 40°C cho hiệu suất chiết cao nhất. Từ kết quả khảo sát ở trên, xác định được dung môi và nhiệt độ tối ưu cho quá trình chiết xuất nấm *Cordyceps militaris*

Ảnh hưởng của nhiệt độ đến hàm lượng hoạt chất trong cao

Hàm lượng hoạt chất là kết quả trung bình của 2 lần định lượng:

Bảng 5. Ảnh hưởng của nhiệt độ đến hàm lượng hoạt chất

Nhiệt độ	Khối lượng nấm (g)	Hàm lượng Adenosine TB		Hàm lượng Cordycepin TB)	
		(%)	(mg/g)	(%)	(mg/g)
25°C	1,0032	1,13	1,13	1,85	1,81
	1,1598	1,12		1,77	
40°C	1,0032	1,17	1,2	1,87	1,88
	1,0094	1,22		1,90	



60°C	1,0010	0,77	0,78	1,93	1,91
	1,0075	0,78		1,88	
80°C	1,0698	0,64	0,65	2,12	2,1
	1,0023	0,66		2,07	

Từ những kết quả trên cho thấy, quy trình chiết xuất nấm *Cordyceps militaris* chịu ảnh hưởng bởi nhiệt độ chiết. Ở 60°C và 80°C thu được hàm lượng Cordycepin cao hơn chiết ở 40°C, tuy nhiên hiệu suất chiết và hàm lượng Adenosine lại thấp hơn. Ở nhiệt độ 40°C thu được khối lượng cao chiết lớn nhất là 0,5495 g với hàm lượng Adenosine cao nhất (1,2 mg/g). Do vậy có thể lựa chọn Ethanol 30° rung siêu âm ở 40 °C là điều kiện chiết tối ưu để thu được hiệu suất cao chiết và hàm lượng hoạt chất lớn nhất.

BÀN LUẬN

Ảnh hưởng của nồng độ dung môi (Ethanol) đến hiệu suất chiết và hàm lượng hoạt chất trong cao

Chiết nấm *Cordyceps militaris* bằng dung môi Ethanol ở các nồng độ khác nhau. Mặc dù tính chất của MeOH và EtOH tương tự nhau, nhưng chọn EtOH làm dung môi chiết vì EtOH có thể pha chế dung dịch uống và ít gây độc hại. Bảng 1 và bảng 3 cho thấy dung môi EtOH 30° thu được cao chiết có hiệu suất (54,95%) và hàm lượng hoạt chất cao nhất: Adenosine (1,2 mg/g) và Cordycepin (1,88 mg/g). Khi tăng nồng độ EtOH lên 60° và hiệu 90% thì hiệu suất chiết và hàm lượng hoạt chất giảm. Do Adenosine có các nhóm OH phân cực và EtOH 30% là dung môi phân cực mạnh hơn, tương tác tốt với những hợp chất phân cực nên chiết được nhiều Adenosine. Khi tăng nồng độ EtOH thì tương tác giữa Adenosine và hỗn hợp dung môi cũng tăng lên, nhưng nếu tăng cao thì sẽ làm giảm độ phân cực của hỗn hợp dung môi, giảm hiệu suất chiết

Adenosine. Vì vậy EtOH 30° là dung môi phù hợp cho quá trình chiết xuất nấm *Cordyceps militaris*.

Lê Thị Huyền Trang (2017) và cs đã nghiên cứu quy trình chiết xuất Adenosine và Cordycepin từ ĐTHT bằng phương pháp siêu âm với dung môi chiết là nước [3]. Chang-Liang YAO (2019) chiết xuất Adenosine trong Đông trùng hạ thảo bằng nước nóng ở 75°C và áp suất 150 bar trong 3 phút, định lượng bằng HPLC, cho hàm lượng Adenosine lần lượt là 0,24% và 0,94% [4].

Ở đây đề tài đã khảo sát dung môi chiết xuất Ethanol với các nồng độ khác nhau. Kết quả khảo sát này làm đa dạng hoá các phương pháp chiết xuất nấm *Cordyceps militaris*, góp thêm một lựa chọn dung môi dùng để chiết xuất nấm hiệu quả.

Ảnh hưởng của nhiệt độ đến hiệu suất chiết và hàm lượng hoạt chất trong cao

Kết quả bảng 4 và bảng 5 cho thấy chiết nấm *Cordyceps militaris* bằng phương pháp rung siêu âm ở 40°C cho hàm lượng Adenosine và Cordycepin cao nhất. Vì khi chiết ở nhiệt độ phòng (nhiệt độ thấp) làm giảm sự trương nở, làm dung môi thấm chậm vào cấu trúc bên trong nấm. Còn 60°C và 80°C thì nhiệt độ khá cao, làm cho Adenosine dễ bị phân huỷ, đồng thời dịch chiết lẫn nhiều tạp và giảm hiệu suất chiết.

Nguyễn Thị Thu Hà (2020) khảo sát quy trình chiết Adenosine trong ĐTHT với điều kiện tối ưu: dung môi Ethanol 60°, tỷ lệ rắn lỏng 100/10 (mg/mL) trong 4 giờ ở 80 °C với hiệu suất cao khô đạt 54,8% và hàm lượng Adenosine là 537,7 mg/kg [1]

Kết quả nghiên cứu chúng tôi khi sử dụng dung môi chiết EtOH 30°, thời gian chiết ngắn hơn



(30 phút, chiết 3 lần) với nhiệt độ thấp hơn (siêu âm 40°C), thu được hàm lượng Adenosine (1,2 mg/g), cao hơn so với đề tài trước đó. Đồng thời sử dụng dung môi EtOH 30⁰ sản xuất trong quy mô công nghiệp sẽ tiết kiệm chi phí hơn.

KẾT LUẬN VÀ ĐỀ XUẤT

Hiệu suất chiết và hàm lượng hoạt chất trong cao của nấm *Cordyceps militaris* chịu ảnh hưởng

bởi một số yếu tố, trong đó có nồng độ dung môi và nhiệt độ chiết. Chiết bằng dung môi ethanol 30⁰ rung siêu âm ở 40°C là điều kiện chiết tối ưu để thu được hiệu suất cao chiết và hàm lượng hoạt chất cao nhất.

Để cải thiện hiệu suất chiết nấm *Cordyceps militaris* cần khảo sát ở quy mô chiết xuất lớn hơn các yếu tố ảnh hưởng như: thời gian chiết, số lần chiết, tỷ lệ dung môi/ dược liệu.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Nguyễn Thị Thu Hà, Nguyễn Ngọc Trai, Nguyễn Thiện Thảo (2020). “Nghiên cứu quy trình ly trích và xác định hàm lượng Adenosine trong cao ethanol của đông trùng hạ thảo (*Cordyceps militaris*) bằng HPLC-PDA”, Tạp chí Công thương.
2. Nguyễn Thị Liên Thương, Trịnh Diệp Phương Danh, Nguyễn Văn Hiệp (2016). *Nấm đông trùng hạ thảo Cordyceps militaris: Đặc điểm sinh học, giá trị dược liệu và các yếu tố ảnh hưởng đến quá trình nuôi nấm*, Tạp chí khoa học Trường Đại học Cần Thơ, 9-22.
3. Lê Thị Huyền Trang và cộng sự (2017). “Nghiên cứu xây dựng quy trình chiết xuất adenosin và cordycepin từ đông trùng hạ thảo nuôi cấy (*Cordyceps militaris*)”, Tạp chí Dược học, 57 (4).
4. Chang-Liang YAO, Zheng-Ming QIAN (2019). “Profiling and identification of aqueous extract of *Cordyceps sinensis* by ultra-high performance liquid chromatography tandem quadrupole-orbitrap mass spectrometry”, Chinese Journal of Natural Medicines, 17 (8); 631-640
5. H. S. Tuli, S. S. Sandhu, A. K. Sharma (2014). “Pharmacological and therapeutic potential of *Cordyceps* with special reference to *Cordycepin*”, 3 Biotech, 1-12.