

Research Article

Optimization of adenosine và cordycepin extraction from cordyceps

Vu Kim Dung*, Nguyen Thi Hong Nhung, Nguyen Nhu Ngoc

College of forestry biotechnology, Vietnam national university of forestry, Hanoi, Vietnam

(Received: 26 Jun 2024; Revised: 31 Aug 2024; Accepted: 06 Sep 2024)

Abstract

Adenosine and cordycepin are bioactive compounds with health benefits. Therefore, both substances are often used to assess the quality of *Cordyceps* products. The optimization of the extraction conditions to determine adenosine and cordycepin from products containing *Cordyceps* (powder, extract, and capsule samples) were studied. The samples were prepared using an ultrasound-assisted extraction, the solvent was methanol and quantification of adenosine and cordycepin by HPLC-PDA. Optimization of adenosine and cordycepin extraction conditions by Response surface methodology using the Box-Behnken design, and by using design expert software. The experimental matrix includes 17 experiments of 3 investigation factors with the running range: material/solvent ratio (1:10-1:50 g/mL), methanol concentration (5-25%), ultrasound time (30-90 minutes). The results showed the optimal conditions for the extraction of adenosine and cordycepin for *Cordyceps* powder samples are the ratio of raw materials:solvent = 1:40 (g/mL), methanol concentration of 17.5% and ultrasound time is 70 minutes, the mean contents of adenosine and cordycepin were 24.15 and 330.78 mg/100g, the optimal methanol concentration for the extraction process is 15% for *Cordyceps* extract samples, those in their were: 158.30 and 1050.78 mg/100g, the most appropriate methanol concentration is 50% for *Cordyceps* capsule samples, while those in their were: 23.98 mg/100g and 213.21 mg/100g, relatively. This study provides an efficient analysis method to determine the optimal extraction conditions of adenosine and cordycepin from products containing *Cordyceps* that can be used as a basis for evaluating the quality of these products.

Keywords: adenosine, cordycepin, extraction, *Cordyceps*, optimization.

* Corresponding author: Vu Kim Dung (E-mail: dungvk@vnuf.edu.vn)

Doi: <https://doi.org/10.47866/2615-9252/vjfc.4363>

Tối ưu hóa điều kiện chiết xuất adenosine và cordycepin từ các sản phẩm chứa đông trùng hạ thảo

Vũ Kim Dung*, Nguyễn Thị Hồng Nhung, Nguyễn Như Ngọc

Viện Công nghệ sinh học Lâm nghiệp, Trường Đại học Lâm nghiệp, Hà Nội, Việt Nam

Tóm tắt

Adenosine và cordycepin là những hợp chất có hoạt tính sinh học có lợi cho sức khỏe. Vì vậy, chúng được sử dụng để đánh giá chất lượng Đông trùng hạ thảo. Nghiên cứu tối ưu hóa điều kiện chiết xuất để xác định hàm lượng adenosine và cordycepin từ sản phẩm chứa Đông trùng hạ thảo đã được thực hiện. Các mẫu chiết bằng dung môi kết hợp siêu âm, định lượng bằng phương pháp HPLC – PDA. Tối ưu hóa điều kiện tách chiết adenosine và cordycepin theo phương pháp bề mặt đáp ứng và quy hoạch Box-Benken bằng phần mềm Design-Expert. Ma trận thực nghiệm gồm 17 thí nghiệm của 3 yếu tố khảo sát: tỷ lệ nguyên liệu/dung môi (1:10-1:50 g/mL), nồng độ methanol (5-25%), thời gian siêu âm (30-90 phút). Điều kiện tối ưu mẫu bột là tỷ lệ nguyên liệu: dung môi = 1:40 (g/mL), nồng độ methanol 17,5% và thời gian siêu âm 70 phút; với mẫu cao: nồng độ methanol tối ưu 15%; với mẫu viên nang: nồng độ methanol thích hợp nhất 50%, hàm lượng adenosine và cordycepin thu được lần lượt là: 24,15 và 330,78 mg/100g; 158,30 và 1050,78 mg/100g; 23,98 và 213,20 mg/100g. Kết quả của nghiên cứu đã cung cấp một phương pháp chiết xuất hiệu quả nhằm xác định hàm lượng adenosine và cordycepin trong các sản phẩm thực phẩm bảo vệ sức khỏe chứa Đông trùng hạ thảo, có thể được sử dụng để đánh giá chất lượng các sản phẩm này hoặc chiết xuất adenosine và cordycepin.

Từ khóa: adenosine, cordycepin, chiết xuất, đông trùng hạ thảo, tối ưu hóa.

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Đông trùng hạ thảo (ĐTHT- *Cordyceps militaris*) là một trong hơn 350 loài nấm thuộc chi *Cordyceps*, họ Ascomycetes sống kí sinh trên cơ thể côn trùng. ĐTHT có chứa những hợp chất quý với hàm lượng cao như cordycepin, adenosine, polysaccharide, mannitol ... đã được minh chứng giá trị dược học và cơ chế tác động của các chất này ở cả mức độ phân tử, tế bào và lâm sàng [1-5]. Trong đó 2 hợp chất adenosine và cordycepin là những dược chất quan trọng quyết định giá trị dược học của ĐTHT, do đó hàm lượng adenosine và cordycepin là chỉ tiêu tiên quyết để đánh giá chất lượng của ĐTHT và các chế phẩm từ chúng [6-7]. Adenosine và cordycepin là hai dẫn xuất của adenine gắn với đường ribose, cordycepin (3'-deoxyadenosine) khác adenosine bởi thiếu 1 nhóm hydroxy ở vị trí 3' trên phân tử đường.

Adenosine và cordycepin được tách chiết từ quả thể ĐTHT bằng một số phương pháp như: sử dụng siêu âm kết hợp enzyme [8], siêu âm kết hợp nhiệt độ [9,10], dùng ethanol trích ly [11]. Khi chiết xuất cordycepin từ *C. militaris* ở quy mô lớn, tác giả Nguyen Ngoc Quy và cộng sự cho rằng điều kiện chiết cordycepin thích hợp là 70°C, trong 120 phút, hàm lượng cordycepin thu được 2938,97 µg/g [12]. Với adenosine, điều kiện chiết xuất thích hợp là phương pháp ngâm dầm, dung môi trích ly ethanol 60%, tỷ lệ rắn/lỏng 100/10 (mg/mL),

thời gian trích ly 4 giờ, nhiệt độ 80°C [11]. Trịnh Đắc Hoành cho rằng có thể chiết xuất đồng thời adenosine và cordycepin từ ĐTHT với điều kiện trích ly thích hợp là: chiết bằng ethanol–nước tỷ lệ 1:1 (3 lần) ở nhiệt độ 60°C, thời gian 120 phút, tỷ lệ nguyên liệu: dung môi là 10:1 (mL/g), kết hợp rung siêu âm (400 W, tần số 50 kHz) [13]. Với chân đế nấm sau khi thu hoạch, nhóm tác giả Nguyen Tien Thanh và cộng sự cho rằng với điều kiện trích ly: dung môi ethanol 50%, nhiệt độ 65°C, thời gian 6 giờ, tỷ lệ rắn: lỏng là 100:1, cũng vẫn có thể chiết xuất đồng thời 2 chất trên với hàm lượng adenosine 213 µg/g, cordycepin 410 µg/g [9].

Trong khi đó, từ các mẫu quả thể và hệ sợi của *C. militaris*, Jungwon Choi và cộng sự đã sử dụng các dung môi chứa 20%, 40%, 60% và 100% EtOH để chiết xuất cordycepin dưới điều kiện nhiệt độ 70°C, trong 5 giờ và kết hợp với siêu âm sau đó định lượng trên hệ thống HPLC Waters (Mỹ) [5]. Kết quả cho thấy hàm lượng cordycepin cao nhất khi chiết bằng EtOH 100% với quả thể và EtOH 60% với hệ sợi. Khi chiết bằng nước, hàm lượng cordycepin thấp nhất (chỉ đạt 50% so với chiết bằng EtOH). Vu Xuan Tao và cộng sự tách chiết cordycepin và adenosine từ nấm *Cordyceps cicardae* BG01 bằng nước hoặc ethanol 30% ở nhiệt độ 70°C trong 20 giờ. Kết quả cho thấy cordycepin và adenosine trong quả thể cao hơn 3–4 lần so với hệ sợi [14].

Như vậy, các công trình nghiên cứu về việc tách chiết các hợp chất cordycepin, adenosine được thực hiện với đơn các yếu tố ảnh hưởng đến quá trình tách chiết như: thời gian, loại dung môi, nồng độ dung môi, tỷ lệ nguyên liệu: dung môi, nhiệt độ, phương pháp chiết ... Bên cạnh đó, với mỗi loại chế phẩm (bột, cao, viên nén...) cần có quy trình tách chiết khác nhau. Mục đích của bài nghiên cứu là nhằm tối ưu các yếu tố ảnh hưởng đến hiệu quả tách chiết adenosine và cordycepin nhằm định lượng các hợp chất này trong các sản phẩm thực phẩm bảo vệ sức khỏe từ ĐTHT. Do phạm vi của bài báo nên các nghiên cứu về độ tin cậy, độ chính xác của phương pháp không được trình bày ở đây.

2. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Vật liệu

Mẫu bột thô được xay từ quả thể nấm ĐTHT (*Cordyceps militaris*) được nuôi cấy trong phòng thí nghiệm Công nghệ Vi sinh – Hóa sinh, Viện công nghệ sinh học Lâm nghiệp, Đại học Lâm nghiệp. Mẫu cao khô và cao đặc, viên nang cứng được thu thập từ các nhà thuốc ở huyện Chương Mỹ, Hà Nội. Cao ĐTHT thành phần chứa chiết xuất Đông trùng hạ thảo, tỏi đen/linh chi, mật ong, đường. Viên nang cứng thành phần chứa bột Đông trùng hạ thảo, isoflavon, collagen, *Ginkgo biloba*, magnesi stearat, tinh bột, talc, natri benzoate.

Chất chuẩn Adenosine, Cordycepin (Sigma), dung môi chiết methanol, ethanol (Merk). Hệ thống thiết bị HPLC (Shimadzu LC – 2030C 3D Plus), cột: Shimpack GIST C18 (250x4,6 mm, 5 µm); thiết bị siêu âm Bandelin Sonopuls (Đức)...

2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Khảo sát các yếu tố ảnh hưởng đến chiết xuất adenosine và cordycepin trong mẫu bột ĐTHT

Quá trình tách chiết adenosine và cordycepin được thực hiện theo phương pháp [5, 7, 10]. Cân 10 g bột (độ ẩm 6%, kích thước 0,5-1 mm), chiết xuất bằng nước cất 100°C, ethanol

60% và methanol 30% với tỷ lệ nguyên liệu/dung môi là 1/10 theo 3 phương pháp: hâm trong 30 phút ở 100°C; siêu âm trong 30 phút ở mức năng lượng 25% và ngâm dầm trong 4 giờ. Ly tâm tốc độ 6000 vòng/phút, tiếp tục lọc dịch qua màng 0,45 μm , dịch chiết được phân tích hàm lượng adenosine và cordycepin trên hệ thống HPLC-PDA.

2.2.2. Tối ưu hóa các điều kiện tách chiết adenosine và cordycepin trong mẫu bột ĐTHT

Tối ưu hóa điều kiện tách chiết adenosine và cordycepin theo phương pháp bề mặt đáp ứng và quy hoạch Box-Benken, sử dụng phần mềm Design-Expert. Ma trận thực nghiệm bao gồm 17 thí nghiệm với khoảng dao động của 3 yếu tố khảo sát là: tỷ lệ nguyên liệu/dung môi (1:10-1:50 g/mL), nồng độ methanol (5-25%), thời gian siêu âm (30-90 phút). Quá trình chiết xuất được chia làm 3 lần, siêu âm ở nhiệt độ 25°C (ổn định nhiệt độ bằng bể ổn nhiệt), dịch chiết được gộp lại, ly tâm và lọc dịch qua màng 0,45 μm , tiếp đó dịch chiết được phân tích hàm lượng adenosine và cordycepin.

2.2.3. Phương pháp tách chiết adenosine và cordycepin từ cao và viên nang ĐTHT

Các mẫu cao dạng bột khô, cao đặc: cân 1 g mẫu, bổ sung 100 mL dung môi chiết với nồng độ methanol 0, 15, 30, 45%. Sau đó ủ ở nhiệt độ 50°C trong 10 phút, ly tâm 6000 vòng/phút trong 10 phút. Mẫu viên nang: cân 1 g mẫu đã nghiền mịn, bổ sung 30 mL dung môi chiết với nồng độ methanol 0, 25, 50, 75%, siêu âm trong thời gian 15 phút ở mức năng lượng 25%. Tiếp đó ly tâm ở 6000 vòng/phút trong 10 phút. Thu dịch và lặp lại 3 lần. Gộp dịch chiết và lọc qua màng 0,45 μm và định lượng hàm lượng adenosine và cordycepin trên hệ thống HPLC theo phương pháp của H. Lei và Nguyễn Thành Đạt [7, 15].

2.2.4. Định lượng adenosine và cordycepin bằng phương pháp sắc ký lỏng hiệu năng cao HPLC

Phương pháp HPLC được thực hiện trong thiết bị HPLC Shimadzu LC – 2030C 3D Plus duy trì ở nhiệt độ 30°C và cột Shimpack GIST C18 (250x4,6 mm, 5 μm) theo phương pháp của Lei Huang, Li Jiamin, Nguyễn Thành Đạt và cộng sự [7, 15-16]. Pha động là hỗn hợp: pha A (nước), pha B (methanol 100%). Tốc độ dòng 1 mL/phút và thể tích tiêm 10 μL . Thời gian phân tích 30 phút với gradient: 0 phút, 3% B; 5 phút, 3% B; 20 phút, 25% B; 25 phút, 25% B; 30 phút, 3%B. Bước sóng phát hiện ở 260 nm.

2.2.5. Phương pháp thu thập và xử lý số liệu

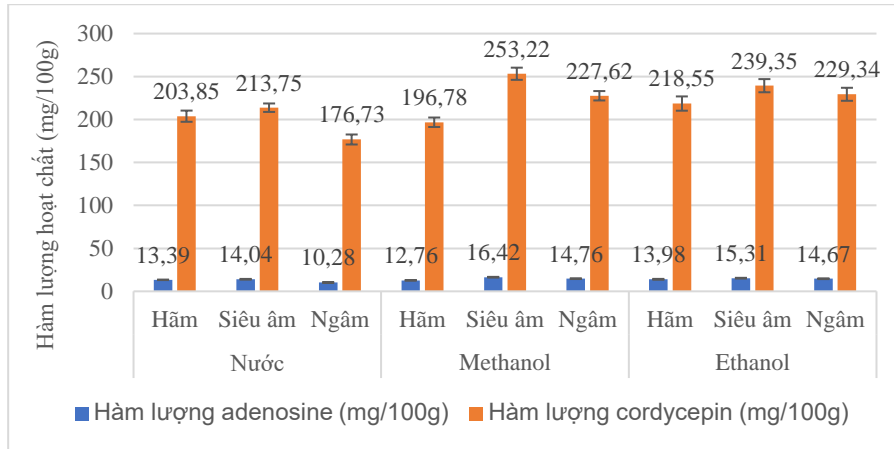
Thí nghiệm được bố trí với 3 lần lặp, số liệu được thu thập và xử lý bằng phần mềm Excel và Design-Expert version 11 (State-Ease, Inc., Minneapolis, Mỹ).

3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Kết quả khảo sát các yếu tố ảnh hưởng đến quá trình chiết xuất adenosine và cordycepin trong mẫu bột ĐTHT

Các tài liệu công bố gần đây cho thấy sử dụng nước hoặc ethanol đều có khả năng chiết xuất adenosine và cordycepin từ ĐTHT [5, 11, 14], tuy nhiên nhằm xác định chính xác hàm lượng hoạt chất này trong các sản phẩm chứa ĐTHT cần nghiên cứu điều kiện tách chiết tối đa chúng từ nguyên liệu. Do vậy, nghiên cứu tách chiết adenosine và cordycepin được khảo sát bằng 3 dung môi: nước cất nóng (100°C), ethanol 60%, methanol 30% với phương pháp: hâm trong 30 phút, siêu âm trong 30 phút và ngâm trong 4 giờ. Dịch chiết được phân tích trên

HPLC, kết quả thu được biểu diễn ở Hình 1 cho thấy hàm lượng adenosine và cordycepin tăng dần với loại dung môi tương ứng: nước nóng < ethanol < methanol. Dung môi methanol kết hợp siêu âm cho hàm lượng adenosine và cordycepin cao hơn hẳn nước nóng (chiết bằng nước nóng đạt ~ 80% so với chiết bằng methanol). Kết quả thu được tương tự như báo cáo của Jungwon Choi và cộng sự. Các tác giả cho rằng khi chiết bằng nước, hàm lượng cordycepin thấp nhất (chỉ đạt 50% so với chiết bằng EtOH) [5].



Hình 1. Ảnh hưởng của dung môi và phương pháp chiết đến hàm lượng adenosine và cordycepin trong bột ĐTHT

Adenosine và cordycepin là phân tử có tính phân cực, để trích ly chúng cần dung môi phân cực trong dung dịch tách chiết. Tuy nhiên, hiệu quả tách chiết còn phụ thuộc vào sự tương tác của dung môi với các thành phần khác của nguyên liệu. Vì thế, sự kết hợp giữa các dung môi có độ phân cực khác nhau là cần thiết để làm tăng hiệu quả tách chiết [10]. Các dung môi tách chiết được sử dụng trong thí nghiệm này là những dung môi có độ phân cực giảm dần theo thứ tự: nước, ethanol, methanol. Khi dung môi hữu cơ là methanol với phương pháp siêu âm hiệu quả tách chiết đạt cao nhất.

3.2. Tối ưu hóa các điều kiện tách chiết adenosine và cordycepin từ bột ĐTHT

Từ kết quả khảo sát 5 yếu tố ảnh hưởng đến hiệu suất chiết xuất adenosine và cordycepin bao gồm tỷ lệ nguyên liệu/dung môi (NL/DM); nồng độ methanol, công suất, nhiệt độ và thời gian siêu âm (kết quả không chỉ ra ở đây) nhận thấy tỷ lệ nguyên liệu/dung môi; nồng độ methanol và thời gian siêu âm có ảnh hưởng lớn nhất đến hiệu suất tách chiết adenosine và cordycepin. Với tỷ lệ nguyên liệu/dung môi 1:10-1:50; nồng độ methanol 5-25%; thời gian siêu âm 30-90 phút; công suất 25%; nhiệt độ 25°C adenosine và cordycepin thu được cao nhất (21,82 mg/100g và 288,24 mg/100g). Các khoảng giá trị khác cho lượng adenosine và cordycepin thấp hơn. Như vậy, khoảng hoạt động tương ứng của các thông số khảo sát để tối ưu hóa hàm lượng adenosine và cordycepin bao gồm: tỷ lệ nguyên liệu/dung môi 1:10-1:50; nồng độ methanol 5-25% và thời gian từ 30-90 phút.

Ảnh hưởng đồng thời của 3 yếu tố tỷ lệ nguyên liệu/dung môi (X_1), nồng độ methanol (X_2), thời gian siêu âm (X_3) được xác định theo phương pháp quy hoạch thực nghiệm bậc hai để tối ưu điều kiện tách chiết adenosine và cordycepin. Kết quả thí nghiệm được thể hiện ở Bảng 1.

Bảng 1. Ma trận thực nghiệm quá trình chiết xuất adenosine và cordycepin

TN	Tỷ lệ NL:DM (g/mL)	Nồng độ methanol (%)	Thời gian (phút)	Hàm lượng adenosine (mg/100g)	Hàm lượng cordycepin (mg/100g)
1	1:10	5	60	14,03	210,45
2	1:50	5	60	16,15	242,25
3	1:10	25	60	11,57	173,55
4	1:50	25	60	21,60	324,00
5	1:10	15	30	13,81	207,15
6	1:50	15	30	19,89	278,46
7	1:10	15	90	16,82	252,30
8	1:50	15	90	20,20	282,80
9	1:30	5	30	18,06	261,87
10	1:30	25	30	14,98	224,70
11	1:30	5	90	15,20	228,00
12	1:30	25	90	22,06	308,84
13	1:30	15	60	24,10	330,40
14	1:30	15	60	23,68	314,47
15	1:30	15	60	24,19	301,34
16	1:30	15	60	24,06	312,78
17	1:30	15	60	23,18	327,84

Kết quả phân tích phương sai của mô hình tối ưu bằng phần mềm DX13 trình bày trong Hình 2 cho thấy cả 3 yếu tố tỷ lệ nguyên liệu/dung môi, nồng độ methanol và thời gian đều có ảnh hưởng lớn đến quá trình chiết xuất adenosine và cordycepin từ bột ĐTHT. Giá trị F của mô hình là 124,59; $p < 0,0001$ (với adenosine) và 20,83; $p = 0,0003$ ($p < 0,05$) cho thấy dạng mô hình đã được lựa chọn đúng. Giá trị p của “Không tương thích” là 0,2475 (với adenosine) và 0,2699 (với cordycepin) ($p > 0,05$) cho thấy mô hình này tương hợp với thực nghiệm. Giá trị p của X_1X_2 , $X_2X_3 < 0,05$, chỉ có X_1X_3 (với cordycepin) $> 0,05$ nên sự đồng tác động của yếu tố tỷ lệ nguyên liệu/ dung môi với nồng độ methanol và thời gian ảnh hưởng mạnh tới quá trình chiết xuất adenosine và cordycepin từ bột ĐTHT.

A	Source	Sum of Squares	df	Mean Square	F-value	p-value	
	Model	285.68	9	31.74	124.59	< 0.0001	significant
	A-Tỷ lệ NL/DM	58.37	1	58.37	229.12	< 0.0001	
	B-Nồng độ methanol	5.73	1	5.73	22.49	0.0021	
	C-Thời gian	7.11	1	7.11	27.89	0.0011	
	AB	15.64	1	15.64	61.39	0.0001	
	AC	1.82	1	1.82	7.15	0.0318	
	BC	24.70	1	24.70	96.95	< 0.0001	
	A ²	65.69	1	65.69	257.82	< 0.0001	
	B ²	69.23	1	69.23	271.71	< 0.0001	
	C ²	20.61	1	20.61	80.88	< 0.0001	
	Residual	1.78	7	0.2548			
	Lack of Fit	1.08	3	0.3613	2.07	0.2475	not significant
	Pure Error	0.6997	4	0.1749			
	Cor Total	287.46	16				

B	Source	Sum of Squares	df	Mean Square	F-value	p-value	
	Model	36828.48	9	4092.05	20.83	0.0003	significant
	A-Tỷ lệ NL/DM	10086.26	1	10086.26	51.35	0.0002	
	B-Nồng độ Meth	979.47	1	979.47	4.99	0.0607	
	C-Thời gian	1244.01	1	1244.01	6.33	0.0400	
	AB	3519.46	1	3519.46	17.92	0.0039	
	AC	416.36	1	416.36	2.12	0.1887	
	BC	3481.59	1	3481.59	17.73	0.0040	
	A ²	6817.67	1	6817.67	34.71	0.0006	
	B ²	6590.86	1	6590.86	33.56	0.0007	
	C ²	2028.50	1	2028.50	10.33	0.0148	
	Residual	1374.92	7	196.42			
	Lack of Fit	809.07	3	269.69	1.91	0.2699	not significant
	Pure Error	565.84	4	141.46			
	Cor Total	38203.40	16				

Hình 2. Kết quả phân tích phương sai ANOVA của mô hình: adenosine (A) và cordycepin (B) từ bột ĐTHT

Phương trình hồi quy biểu diễn hàm lượng adenosine (Ya) và cordycepin (Yc) mô tả ảnh hưởng của các yếu tố như sau:

$$Y_a = +23,84 + 2,70 \cdot X_1 + 0,845 \cdot X_2 + 0,95 \cdot X_3 + 1,98 \cdot X_1 X_2 - 0,68 \cdot X_1 X_3 + 2,48 \cdot X_2 X_3 - 3,95 X_1^2 - 4,05 X_2^2 - 2,21 \cdot X_3^2.$$

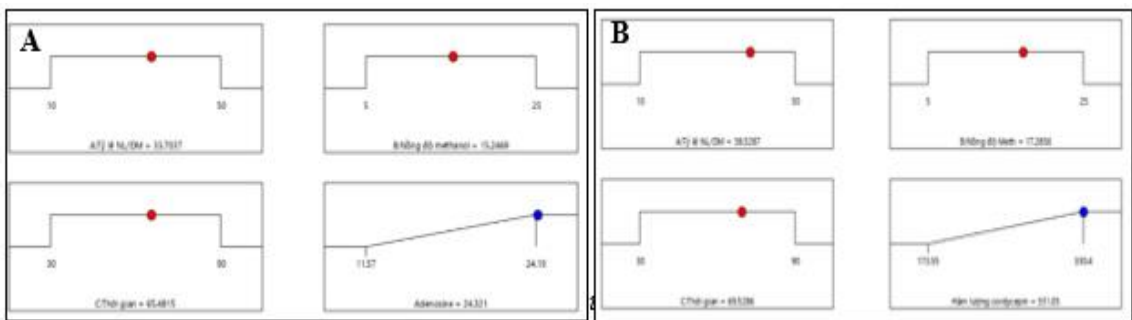
$$Y_c = +317,37 + 35,51 \cdot X_1 + 11,06 \cdot X_2 + 12,47 \cdot X_3 + 29,66 \cdot X_1 X_2 - 10,20 \cdot X_1 X_3 + 29,50 \cdot X_2 X_3 - 40,24 X_1^2 - 39,56 X_2^2 - 21,95 \cdot X_3^2$$

Phương trình hồi quy cho thấy trong các hệ số b_1, b_2, b_3 (thể hiện tác động độc lập của từng yếu tố X_1, X_2, X_3) giá trị tuyệt đối của b_1 (2,70 và 35,51) là lớn nhất. Điều này chứng tỏ tỷ lệ NL/DM ảnh hưởng lớn nhất đến quá trình chiết xuất adenosine và cordycepin. Ngược lại, giá trị tuyệt đối của b_2 (0,85 và 11,06) nhỏ nhất, cho thấy sự ảnh hưởng của nồng độ methanol tác động ít hơn các yếu tố còn lại tới hàm mục tiêu. Khi đánh giá sự tác động đồng thời giữa các yếu tố, giá trị tuyệt đối của b_{23} (2,48 và 29,50) lớn nhất, chứng tỏ sự tương tác giữa thời gian siêu âm và nồng độ methanol có ảnh hưởng mạnh tới quá trình chiết xuất adenosine và cordycepin từ bột ĐTHT.

Sử dụng phương pháp hàm kỳ vọng để tối ưu hóa hàm lượng adenosine và cordycepin thu được sau quá trình chiết xuất bằng phần mềm Design Expert. Kết quả Hình 3 cho thấy điều kiện tối ưu theo tính toán của adenosine và cordycepin khác nhau. Với adenosine, phương án tốt nhất là tỷ lệ 1: 33,70 (g/mL), nồng độ methanol 15,30% và thời gian siêu âm 65,50 phút, hàm lượng adenosine tính toán đạt 24,32 mg/100g. Trong khi đó, hàm lượng cordycepin tính toán đạt 331,05 mg/100g ở điều kiện tỷ lệ 1: 38,50 (g/mL), nồng độ methanol 17,30% và thời gian siêu âm 69,50 phút.

Do cordycepin chiếm hàm lượng cao hơn trong ĐTHT, là chất có hoạt tính dược liệu được quan tâm hơn [3, 12] và điều kiện chiết cũng thay đổi không lớn nên để thuận lợi trong quá trình chiết tách đồng thời cả 2 chất, lựa chọn điều kiện chiết như sau: tỷ lệ nguyên liệu: dung môi = 1: 38,50 (g/mL), nồng độ methanol 17,30% và thời gian siêu âm 69,50 phút.

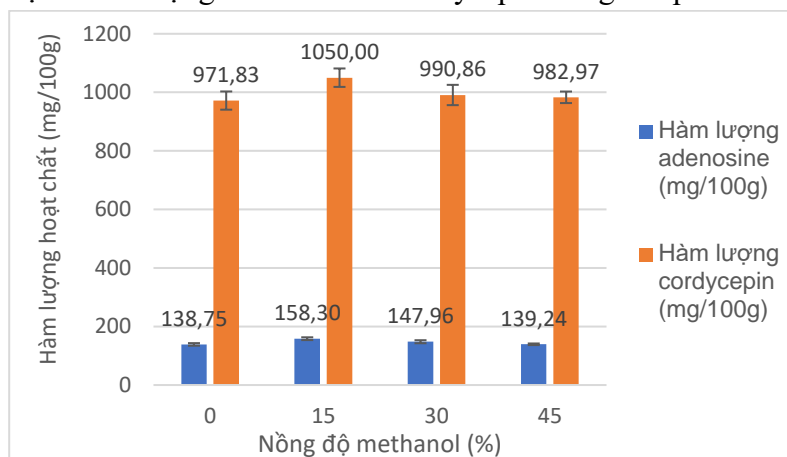
Thực nghiệm tại điều kiện tỷ lệ nguyên liệu: dung môi = 1: 40 (g/mL), nồng độ methanol 17,50% và thời gian siêu âm 70 phút, thí nghiệm thực hiện 3 lần. Hàm lượng adenosine và cordycepin thu được 24,15 mg/100g và 330,78 mg/100g nằm trong khoảng dự đoán của phương pháp quy hoạch bậc hai Box – Behnken nên mô hình có độ tương thích cao với thực tế. Do vậy, có thể sử dụng các điều kiện tối ưu để nghiên cứu chiết xuất adenosine và cordycepin từ mẫu bột ĐTHT nhằm định lượng chúng (tỷ lệ nguyên liệu: dung môi = 1:40 (g/mL), nồng độ methanol 17,5% và thời gian siêu âm 70 phút).



Hình 3. Hàm kỳ vọng và điều kiện tối ưu chiết xuất adenosine và cordycepin từ bột ĐTHT

3.3. Điều kiện tách chiết adenosine và cordycepin từ cao ĐTHT

Đây là mẫu dạng bột mịn, lỏng, hoặc sệt chứa ĐTHT (hoặc bổ sung một số loại cao dược liệu khác: tỏi đen, linh chi ...) và các loại tá dược như mật ong, đường... [15]. Do vậy, với mẫu cao ĐTHT (thành phần khác với mẫu bột ĐTHT) cần nghiên cứu điều kiện chiết xuất nhằm xác định hàm lượng adenosine và cordycepin trong sản phẩm.



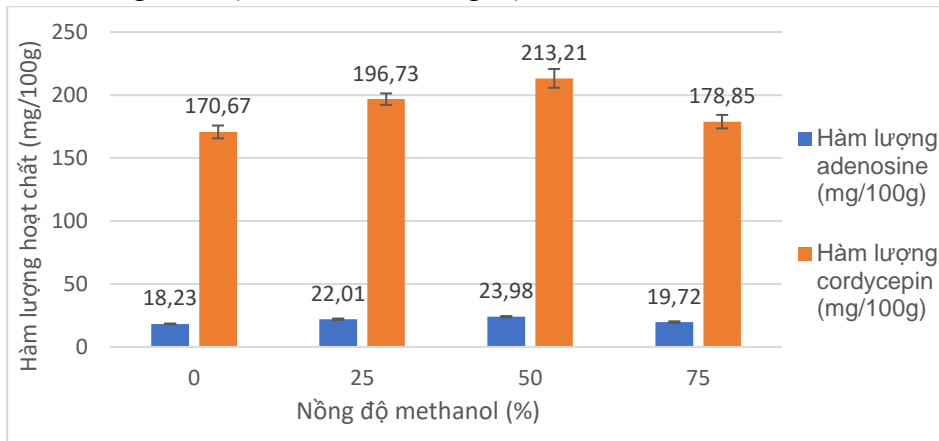
Hình 4. Ảnh hưởng của nồng độ methanol đến quá trình chiết adenosine và cordycepin từ cao ĐTHT

Dung môi có tác dụng thẩm thấu vào trong mẫu, hòa tan và khuếch tán các hợp chất hữu cơ trong mẫu ra ngoài. Khảo sát dung môi nhằm tiến hành chọn ra loại dung môi và nồng độ thích hợp cho quá trình trích ly. Tham khảo một số tài liệu [15, 17], tiến hành chiết xuất adenosine và cordycepin bằng các dung môi hữu cơ là hỗn hợp methanol/nước với nồng độ methanol 0-45%, tỷ lệ nguyên liệu: dung môi là 1:100, nồng độ methanol 0-45% bằng phương pháp ngâm ở nhiệt độ 50°C trong 10 phút. Kết quả phân tích được biểu diễn trên Hình 4 cho thấy hiệu quả chiết adenosine và cordycepin cao hơn khi sử dụng dung môi methanol/nước với nồng độ methanol 15%. Kết quả này là do trong hợp chất adenosine và cordycepin có các nhóm OH phân cực sẽ tương tác tốt với những hợp chất phân cực. Khi tăng hàm lượng hữu cơ thì sự tương tác giữa adenosine và cordycepin với hỗn hợp dung môi tăng. Tuy nhiên, nếu hàm lượng hữu cơ tăng quá cao, đồng nghĩa với việc giảm độ phân cực của hỗn hợp dung môi. Khi độ phân cực dung môi giảm làm hạn chế sự lôi kéo adenosine và cordycepin của dung môi [11].

3.4. Điều kiện tách chiết adenosine và cordycepin từ viên nang ĐTHT

Đây là mẫu dạng bột mịn chứa ĐTHT, một số dược liệu khác như ba kích, khổ sâm, linh chi, hồng sâm ... và các loại tá dược như tinh bột, đường, chất làm dày, chất chống đông vón, isoflavone, collagen ... [15]. Với thành phần mẫu phức tạp và qua khảo sát các tài liệu cho thấy với mẫu dạng viên nang cứng cần chiết xuất adenosine và cordycepin bằng methanol với nồng độ cao hơn từ bột và cao ĐTHT, chiết bằng siêu âm. Do vậy, tiến hành chiết xuất bằng các dung môi hữu cơ như: hỗn hợp methanol/nước với các tỷ lệ 0-75%, tỷ lệ nguyên liệu: dung môi là 1:30 bằng phương pháp siêu âm trong 15 phút. Kết quả phân tích HPLC được biểu diễn trên Hình 5 cho thấy với mẫu viên nang, hiệu quả chiết adenosine và cordycepin cao hơn khi sử dụng dung môi methanol/nước với nồng độ methanol 50%. Kết

quả này có thể do nồng độ methanol 50% đã tạo ra một hệ dung môi có thể hòa tan tốt adenosine và cordycepin trong mẫu mà lại hạn chế một số tạp chất không phân cực và một số tạp chất tan trong nước (muối vô cơ, đường...).



Hình 5. Ảnh hưởng của nồng độ methanol đến quá trình chiết adenosine và cordycepin từ viên nang ĐTHT

Kết quả nghiên cứu tương tự với các công bố về hàm lượng các chất này trong các sản phẩm viên nang chứa ĐTHT trên thị trường. Trong nghiên cứu xác định hàm lượng adenosin và cordycepin trong thực phẩm bảo vệ sức khỏe lưu hành trên thị trường Hà Nội, Nguyễn Thành Đạt và cộng sự cũng sử dụng phương pháp chiết siêu âm với methanol 50% kết quả cho thấy trong số 12 mẫu viên nang chứa ĐTHT, có 02 mẫu không có adenosine và cordycepin, các mẫu còn lại chứa adenosine từ 57,38-915,00 $\mu\text{g/g}$, cordycepin 6,23-1287,00 $\mu\text{g/g}$ [15]. Nghiên cứu của Chutvirasakul Bo và cộng sự, xác định hai chất này có trong thuốc thô, cao chiết và các sản phẩm từ ĐTHT trong đó hàm lượng adenosine 1,13-11,30 $\mu\text{g/mL}$ và cordycepin 0,28-2,79 $\mu\text{g/mL}$ [18]. Khi phân tích các sản phẩm chức năng chứa ĐTHT có mặt trên thị trường ở Trung Quốc và Thái Lan, định lượng hai nucleoside này bằng phương pháp HPLC, hàm lượng adenosine trong khoảng: 0,83-1,62 mg/g và 13,00-405,39 mg/g; hàm lượng hàm lượng cordycepin trong khoảng: 605-1299 mg/g, 4,00-1454,60 mg/g với các mẫu quả thể khô, viên nang, nước ĐTHT [19].

4. KẾT LUẬN

Bài báo đã xác định được các thông số tối ưu cho quá trình tách chiết adenosine và cordycepin từ ĐTHT bằng methanol kết hợp siêu âm. Các mẫu bột từ ĐTHT, điều kiện tối ưu cho quá trình chiết là: tỷ lệ nguyên liệu:dung môi = 1:40 (g/mL), nồng độ methanol 17,5% và thời gian siêu âm 70 phút, hàm lượng adenosine và cordycepin thu được là 24,15 và 330,78 mg/100g. Với các mẫu cao ĐTHT, nồng độ methanol 15% (v/v), tỷ lệ nguyên liệu/dung môi 1/100, ngâm ở nhiệt độ 50°C trong 10 phút, hàm lượng adenosine và cordycepin: 158,30 và 1050,78 mg/100g. Với mẫu viên nang, nồng độ methanol thích hợp nhất là 50% (v/v), hàm lượng adenosine và cordycepin: 23,98 và 213,21 mg/100g. Kết quả thu được là cơ sở để xây dựng quy trình tách chiết nhằm định lượng adenosine và cordycepin từ các sản phẩm chứa ĐTHT.

LỜI CẢM ƠN

Công trình được thực hiện với sự hỗ trợ kinh phí của đề tài “Nghiên cứu kỹ thuật tách chiết và định lượng một số hợp chất từ dược liệu trên hệ thống HPLC-PDA”.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1]. H. J. Wang, M. C. Pan, C. K. Chang, S. W. Chang, C. W. Hsieh, “Optimization of ultrasonic-assisted extraction of cordycepin from *Cordyceps militaris* using orthogonal Experimental Design,” *Molecules*, vol 19, no 12, pp. 20808-20820, 2014.
- [2]. R. R. Paterson, “Cordyceps: a traditional Chinese medicine and another fungal therapeutic biofactory?” *Phytochemistry*, vol 69, no 7, pp. 1469-1495, 2008.
- [3]. H. S. Tuli, A. K. Sharma, S. S. Sandhu, D. Kashyap, “Cordycepin: a bioactive metabolite with therapeutic potential,” *Life Science*, vol 93, no 23, pp. 863-869, 2013.
- [4]. M. S. Choi, S. M. Moon, S. A. Lee, B. R. Park, J. S. Kim, D. K. Kim, Y. H. Kim, C. S. Kim, “Adenosine induces intrinsic apoptosis via the PI3K/Akt/mTOR signaling pathway in human pharyngeal squamous carcinoma FaDu cells,” *Oncology letters*, vol 15, no 5, pp. 6489-6496, 2018.
- [5]. C. Jungwon, A. P. Leo, K. Baekjun, N. Jaekyu, L. Sanghyun, “Quantitative analysis of cordycepin in *Cordyceps militaris* under different extraction methods,” *Journal of Applied Biological Chemistry*, vol 64, no 2, pp. 153-158, 2021.
- [6]. S. K. Das, M. Masuda, A. Sakurai, M. Sakakibara, “Medicinal uses of the mushroom *Cordyceps militaris*: current state and prospects,” *Fitoterapia*, vol 81, no 8, pp. 961-968, 2010.
- [7]. H. Lei, L. Qizhang, C. Yiyuan, W. Xuefei, Z. Xuanwei, “Determination and analysis of cordycepin and adenosine in the products of *Cordyceps spp.*,” *African Journal of Microbiology Research*, vol 3, no 12, pp. 957-961, 2009.
- [8]. Thanh Vuong Hoai, Phuc Nguyen Cao, My Phan Le Thao, Tran Dat Do, Nam Hoang Minh, Huynh Ky Phuong Ha, Phong Mai Thanh, Hieu Nguyen Huu, “Ultrasound-assisted enzymatic extraction of adenosine from Vietnamese *Cordyceps militaris* and bioactivity analysis of the extract,” *Journal of Chemistry*, pp. 1-10, 2020.
- [9]. Nguyen Tien Thanh, Le Thi Lan Chi, Do Thi Thu Ha, La Thi Quynh Nhu, Tran Thi Phuong Thao, Truong Quoc Phong, Khuat Huu Thanh, “Extraction of adenosine and cordycepin from spent solid medium of *Cordyceps militaris* culture,” *Vietnam journal of science and technology*, vol 56, no 4A, pp. 221 – 228, 2018.
- [10]. Doan Thi Phuong Thuy, Tran Thi Ngoc Anh, Nguyen Thi, “Study on the effects of extraction conditions on the extraction efficiency of cordycepin from *Cordyceps*”

- militaris Linn. Link,” *Ho Chi Minh City Open University Journal of Science*, vol 13, no 1, pp. 93 – 102, 2018.
- [11]. Nguyen Thi Thu Ha, Nguyen Ngoc Trai, Nguyen Thien, “Research on the extraction process and determination of Adenosine content in ethanol extract of cordyceps militaris by HPLC-PDA,” *Vietnam trade and industry review*, vol 9, pp. 370-376, 2020.
- [12]. Nguyen Ngoc Quy, Pham Tri Nhut, Tran Thi Yen Nhi, Nguyen Minh Tien, Duong Dinh Chung, Le Van Thanh, Than Thi Minh Phuong, “Effect of Time and Temperature on the Extraction of *Cordyceps militaris* in Pilot Scale,” *IOP Conf. Series: Materials Science and Engineering* 1092 (012079), pp. 1 – 8, 2021.
- [13]. Trinh Dac Hoanh, Vu Duy Nhan, Vu Van Dung, Nguyen Thi Nhan, Luu Van Chinh, Vu Thi Ha, Le Mai Huong, Tran Hong Ha, Nguyen Duc, “Research on extraction and biological activity of Adenosine, Cordycepin from *Cordyceps militaris* mushroom,” *Vietnam Journal of Chemistry*, vol 6E, no 57, 2019.
- [14]. Vu Xuan Tao, Tran Bao Tram, Tran Van Tuan, “Optimal production of cordycepin and adenosine from *Cordyceps cicadae* BG01 and impacts of the total extract on blood biochemical of swiss white mice,” *National Conference on Biotechnology 2020*, pp. 510-514, 2020
- [15]. Nguyen Thanh Dat, Nguyen Thi Hong Hanh, Dam Thi Thu, Nguyen Van Hieu, Lai Thi Phuong, Duong The, “Determination of Adenosine and Cordycepin content in health supplement circulating on the Hanoi market,” *Vietnamese Journal of Food Control*, vol 5, no 2, pp. 390 – 401, 2022.
- [16]. L. Jiamin, G. Minyi, L. Y. Py, “Effects of cooking on the contents of adenosine and cordycepin in *Cordyceps militaris*,” *Procedia Engineering*, vol 102, no 1, pp. 485 – 485, 2015. DO- 10.1016/j.proeng.2015.01.195.
- [17]. Tran Van Thanh, Nguyen Phuong Dung, Dang Thi Nga, “Some factors affecting the extract performance and high active contents of *Cordyceps militaris*,” *Vietnamese Journal of Traditional Medicine*, vol 1, no 42, pp. 27 – 33, 2022.
- [18]. B. Chutvirasakul, W. Jongmeesuk, P. Tirasomboonsiri, N. Sansandee, T. Sarin, “Stability indicating method to determine bioactive nucleosides in crude drugs, extracts, and products from *Cordyceps sinensis* and *Cordyceps militaris*,” *Thai Journal of Pharmaceutical Sciences*, vol 41, no 1, pp. 52-60, 2017.
- [19]. N. Chernthong, S. Noisakul, A. Saraphanchotiwitthaya, P. Sripalakit, “Validation and application of HPLC method for determination of cordycepin and adenosine in dietary supplements,” *Asia-Pacific Journal of Science and Technology*, vol 27, no 06, pp. 1 - 9, 2022.