

NGHIÊN CỨU BẢO CHẾ HỆ CHẤT MANG NANO CHITOSAN-PEG CHỨA CÁC HOẠT CHẤT TỪ NẤM ĐÔNG TRÙNG HẠ THẢO (*Cordyceps militaris* Link)

Đỗ Thị Gấm^{1*}, Bá Thị Châm¹, Nguyễn Tiến Mạnh¹, Nguyễn Khắc Hưng², Phan Thị Lan Anh¹

¹Trung tâm Nghiên cứu phát triển công nghệ chế biến sau thu hoạch, Trung tâm Phát triển công nghệ cao - Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam,

²Công ty cổ phần đầu tư phát triển Công nghệ Sông Hồng Hà Nội

TÓM TẮT

Đông trùng hạ thảo (*Cordyceps* sp.) đã được sử dụng từ lâu trong y học cổ truyền tại nhiều quốc gia châu Á. Hiện nay, nhiều chủng nấm đã được nuôi trồng thành công trên môi trường giá thể tạo nguồn cung ổn định đồng thời giúp bảo tồn loài dược liệu quý trong tự nhiên. Công nghệ nano đã và đang được ứng dụng nhiều trong y học nhằm tăng hiệu quả dược lý của các thảo dược. Công trình đã thành công trong tách chiết hoạt chất từ quả thể nấm đông trùng hạ thảo (*C. militaris* Link NBRC 100741) theo quy trình chiết phân đoạn (ethanol 96°, ethanol 50°, nước) ở 55°C, thu được cao chiết có hàm lượng cordycepin khoảng 9,92 mg/g cao chiết, hàm lượng adenosine đạt 1,32 mg/g cao chiết, độ ẩm <11%. Phức hệ chất mang nano chitosan-PEG-ĐTHT đã được bảo chế thành công khi phối hợp chitosan/PEG ở tỷ lệ 70/30, nhiệt độ phản ứng 70°C, tốc độ khuấy 900 vòng/phút. Hiệu suất bao gói đạt 14,61% đối với cordycepin và 80,82% adenosine sau 24 giờ phản ứng.

Từ khóa: Nano; Đông trùng hạ thảo; Nano đông trùng hạ thảo; Nano chitosan-PEG; nano chitosan-PEG-ĐTHT.

Ngày nhận bài: 04/12/2019; **Ngày hoàn thiện:** 09/6/2020; **Ngày đăng:** 11/6/2020

STUDY ON THE PREPARATION OF NANOPARTICLES CHITOSAN-PEG ENCAPSULATE *Cordyceps militaris* Link EXTRACT

Do Thi Gam^{1*}, Ba Thi Cham¹, Nguyen Tien Manh¹, Nguyen Khac Hung², Phan Thi Lan Anh¹

¹Center for post-harvest processing research and development, Center for High Technology Development - Vietnam Academy of Science and Technology,

²Song hong hanoi investment development technology joint stock company

ABSTRACT

Cordyceps sp. has been used in traditional medicine for a long time in many Asia countries. Currently, many species of this family have been successfully cultivated on artificial medium to create a stable resources and help to preserve natural *Cordyceps*. Nanotechnology has been widely used in medicine to increase the pharmacological effectiveness of drugs. This study was successful in extracting the bioactive compounds from *C. militaris* Link NBRC 100741 fruiting bodies according to the fractional extraction procedure (ethanol 96°, ethanol 50°, water) at 55°C, resulted in a extract with cordycepin content at about 9.92 mg/g extract, adenosine content reach 1.32 mg/g extract, moisture <11%. Nanoparticles chitosan-PEG-Cordyceps extract were successfully prepared when combined chitosan and PEG at ratio 70/30, reaction temperature at 70°C, stirring speed at 900 rpm. Packaging efficiency reached 14.61% for cordycepin and 80.82% adenosine after 24 hours of reaction.

Keywords: Nano; *Cordyceps*; Nano cordyceps; Nano chitosan-PEG; Nano chitosan-PEG-Cordyceps

Received: 04/12/2019; **Revised:** 09/6/2020; **Published:** 11/6/2020

* Corresponding author. Email: honggam@htd.vast.vn

1. Giới thiệu

Nhiều loài thuộc nhóm nấm ký sinh trên côn trùng (*Cordyceps* sp) đã và đang được sử dụng trong y học cổ truyền do nhiều công dụng đối với sức khỏe con người như tăng cường miễn dịch, kháng khuẩn, hỗ trợ điều trị tim mạch, gây độc đối với tế bào ung thư. Trong các loài *Cordyceps* sp. đã được phát hiện, *Cordyceps militaris* và *Cordyceps sinensis* (hay còn có tên gọi là đông trùng hạ thảo) là hai loài được tập trung nghiên cứu nhiều hơn cả. Đặc biệt, nhiều nghiên cứu đã được thực hiện trên loài *C. militaris* do có khả năng nuôi cấy trong điều kiện nhân tạo; đồng thời chứa những hoạt chất tương đồng với loài *C. sinensis* trong tự nhiên như: cordycepin, adenosine và một số acid hữu cơ, polyscharide hữu ích [1].

Nhiều nghiên cứu đã cho thấy cordycepin có công dụng gây độc đối với một số dòng tế bào ung thư, phòng chống ung thư di căn, kháng viêm hay kháng khuẩn [2], [3]. Nhằm tăng cường công dụng của hoạt chất, nhiều phương pháp dẫn truyền đã được nghiên cứu. Một trong những phương pháp được nghiên cứu nhiều trong thời gian gần đây là ứng dụng vật liệu nano trong dẫn truyền được chất.

Trong những năm gần đây, công nghệ nano cũng đã được ứng dụng để tạo bột nano đông trùng hạ thảo và các sản phẩm dạng nano từ đông trùng hạ thảo. Trên thế giới hiện đã có nhiều sáng chế về điều chế bột nano đông trùng hạ thảo từ nấm *C. militaris*. Tuy nhiên, phần lớn các sáng chế này dựa trên phương pháp phân tán (dispersion), còn gọi là kỹ thuật từ trên xuống (top-down) để tạo ra bột nano đông trùng có mã số CN103229994A, và CN101926461B.

Bên cạnh các phương pháp top-down, nano đông trùng hạ thảo còn có thể được điều chế thông qua việc tổng hợp các hệ chất mang kích thước nano. Năm 2018, Shashidhar và Manohar đã điều chế thành công phức hệ liposome đầu tiên để đóng gói các hoạt chất của nấm đông trùng hạ thảo *C. sinensis*

CS1197 thông qua phương pháp SC-GAS (Công nghệ siêu tới hạn) [4].

Với mục đích tạo ra nano đông trùng hạ thảo (ĐTHT) ứng dụng trong y học, nghiên cứu này được thực hiện nhằm khảo sát ảnh hưởng của quy trình tách chiết đến hiệu quả thu hồi hoạt chất và khả năng ứng dụng hệ chất mang chitosan-PEG trong đóng gói hoạt chất từ dịch chiết *C. militaris* Link NBRC 100741.

2. Phương pháp nghiên cứu

2.1. Vật liệu sử dụng

Bột nấm đông trùng hạ thảo *C. militaris* thu được từ nuôi cấy thể quả nấm trên môi trường giá thể ngũ cốc và nhộng tằm do Trung tâm Nghiên cứu phát triển công nghệ chế biến sau thu hoạch, Trung tâm Phát triển công nghệ cao nuôi trồng. Chủng nấm sử dụng là *C. militaris* NBRC 100741 được cung cấp bởi Trung tâm tài nguyên sinh vật thuộc Viện công nghệ và đánh giá quốc gia của Nhật Bản

2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Phương pháp chiết xuất

Cân chính xác khoảng 50 g bột ĐTHT đã nghiền mịn vào bình nón chiết xuất với dung môi thích hợp (ethanol 96°, ethanol 50°, nước) (1 g/ 20 ml dung môi) chiết siêu âm trong khoảng thời gian 30 phút, mỗi mẫu nghiên cứu được chiết 3 lần. Sau mỗi lần chiết, tiến hành lọc và thu các dịch chiết. Từ các dịch chiết thu được, tiến hành cô quay giảm áp suất để thu hồi cao chiết, cân xác định trọng lượng của cao chiết thu được.

Hàm lượng cao chiết (%) = ((Trọng lượng cao chiết thu nhận)/ 50)*100

2.2.2. Thí nghiệm đánh giá ảnh hưởng của nhiệt độ đến hiệu suất cao chiết nấm đông trùng hạ thảo

Thí nghiệm được thực hiện ở các điều kiện nhiệt độ chiết khác nhau như 25°C, 55°C, 65°C và 80°C; kết hợp với đánh siêu âm 3 lần (30 phút/lần). Thí nghiệm chỉ tiến hành trên một trong các hệ dung môi (ethanol 96°, ethanol 50° hoặc nước). Tiến hành cân xác

định trọng lượng của cao chiết, bán định lượng hàm lượng hoạt chất chính trong các mẫu cao thu được.

2.2.3. Phương pháp định tính hoạt chất trên bản mỏng TLC

Cao chiết thu được (4 μ l) tiến hành chạy sắc ký bản mỏng (Silica 60 F254_Merck Đức) để định tính sự xuất hiện của hoạt chất cordycepin và adenosine với chất chuẩn được cung cấp bởi hãng Sigma Aldrich. Hệ dung môi phân tách chloroform : methanol : nước, 65:15:1 (v/v/v).

Vết chất được quan sát dưới đèn UV ở bước sóng 254 nm và chụp ảnh với máy ảnh chuyên dụng. Ảnh thu được sử dụng cho xác định tương đối hàm lượng hoạt chất trên bản mỏng theo Johnsson và cộng sự [5] với phần mềm ImageJ (NIH) và Gelquant v.7.8 (biochemlabsolutions). Chất chuẩn cordycepin và adenosine được sử dụng làm đối chứng so sánh. Nồng độ chất chuẩn Cordycepin và Adenosine sử dụng trên bản mỏng lần lượt là 1,44 μ g và 1 μ g.

2.2.4. Định lượng cordycepin và adenosine theo phương pháp HPLC

Cao chiết ĐTHT được điều chỉnh về cùng 1 thể tích và được xác định hàm lượng cordycepin và Adenosine tại Trung tâm chứng nhận phù hợp (Quacert) thuộc Tổng cục tiêu chuẩn đo lường chất lượng theo phương pháp HD/HS1/138 và HD/HS1/073.

2.2.5. Phương pháp điều chế vỏ bao nanocapsule từ chitosan và PEG

Chuẩn bị dung dịch chitosan có độ deacetyl hóa 85% với nồng độ 0,35% w/v trong dung dịch acid acetic 1%. Dung dịch PEG 0,5% trong nước cất nóng. Dung dịch butyl cyacetylation (BCA) 1% trong nước cất nóng. Chuẩn bị chitosan và PEG phối hợp ở các tỷ lệ khác nhau 50/50; 60/40; 70/30; 80/20; 90/10 và khuấy với tốc độ 300, 500, 700, 900 vòng/phút ở nhiệt độ 40, 50, 60 và 70°C trong 30 phút, nhỏ từ từ 10 ml dung dịch BCA khuấy đều 15 phút. Hạ nhiệt độ xuống 15°C

(trong nước đá) tạo hạt nano khuấy trong 30 phút. Để về nhiệt độ phòng, ly tâm 16.000 vòng/phút trong 15 phút thu hạt nano, sấy khô và phân tích kích thước hạt.

2.2.6. Phương pháp tạo phức hệ nano chitosan-PEG-ĐTHT

Lấy 100 g bột nano polymer chitosan và PEG với kích thước hạt 50-120 nm, thêm vào 100 ml nước cất, gia nhiệt ở nhiệt độ 70°C. Nhỏ từ từ 100 ml cao chiết ĐTHT pha trong ethanol 96° ở nồng độ 25% (w/v). Dùng máy siêu âm cao tần siêu âm 20 phút, sau đó khuấy gia nhiệt 900 vòng/phút để dung môi bay hơi từ từ và hoạt chất kết tinh chậm dính vào lõi các hạt nano polymer. Khuấy 12 hoặc 24 giờ, dịch được lọc qua màng lọc kích thước lỗ 300 nm lấy dịch cô quay chân không loại nước, sấy khô thu được bột nano ĐTHT.

2.2.7. Phương pháp xác định hiệu quả bao gói hoạt chất ĐTHT của phức hệ nano chitosan-PEG

Lấy 10 g bột sản phẩm nano ĐTHT tiến hành chiết phân đoạn, thu cặn chiết tổng và cô quay giảm áp đến khối lượng không đổi ở 60°C. Hòa tan cặn trong 10 ml ethanol 96°. Mẫu đối chứng là dịch cao chiết ĐTHT 25% (w/v). Hiệu quả bao gói được xác định bằng tỷ lệ phần trăm giữa hàm lượng cordycepin, adenosine trong bột nano ĐTHT và cao dịch chiết 25%.

3. Kết quả và bàn luận

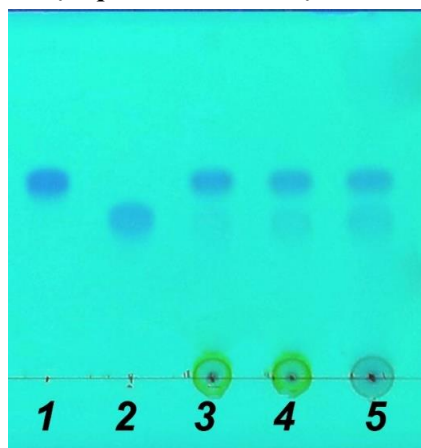
3.1. Kết quả khảo sát ảnh hưởng của dung môi đến hiệu quả tách chiết hoạt chất

Nhiều công bố cho biết để ly trích thành công cordycepin cần có sự hiện diện của dung môi phân cực trong dung dịch tách chiết. Do đó sử dụng các dung môi phân cực hoặc sự kết hợp giữa các dung môi có độ phân cực khác nhau là cần thiết để làm tăng hiệu quả tách chiết các chất phân cực [1], [6], [8]. Trong nghiên cứu này, các dung môi bao gồm ethanol 96°, ethanol 50° và nước cất được sử dụng trong tách chiết hoạt chất từ quả thể nuôi cấy trên môi trường nhân tạo của loài *C. militaris*. Quá

trình tách chiết được thực hiện ở nhiệt độ phòng (25°C) kết hợp với xử lý bằng sóng siêu âm trong 30 phút/lần (thí nghiệm lặp lại 03 lần). Hiệu suất cao chiết thu được lần lượt là 27,904%, 20,960% và 6,212% tương ứng với dung môi là nước cất, ethanol 50° và ethanol 96° (Bảng 1).

Các cao chiết thu được tiến hành chạy TLC sử dụng chất chuẩn là cordycepin và adenosine. Kết quả hình 1 nhận thấy các cao chiết đều có chứa hoạt chất cordycepin và adenosine. Trong đó, hàm lượng chất cordycepin trong các cao chiết lớn hơn so với adenosine và vết chất cordycepin ở cao chiết ethanol 96° đậm hơn so với cao chiết ethanol 50° và cao nước (hình 1). Bản TLC sau khi soi trên đèn UV ở bước sóng 254 nm và phân tích bằng phần mềm ImageJ và Gelquant cho thấy hàm lượng cordycepin ở cao chiết cồn 96°, 50° và nước lần lượt đạt 1,063; 0,936 và 0,942 µg (Hình 2).

3.2. Kết quả khảo sát ảnh hưởng của nhiệt độ đến hiệu quả tách chiết hoạt chất

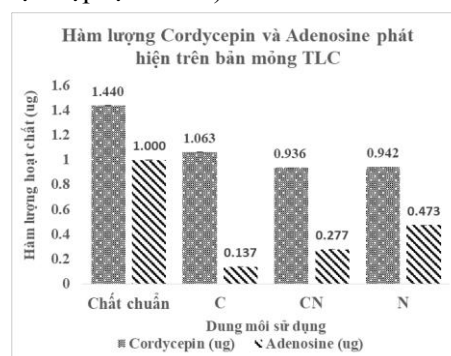


Hình 1. Kết quả sắc ký TLC mẫu dịch chiết đông trùng hạ thảo sử dụng các dung môi khác nhau. (1) Cordycepin chuẩn; (2) Adenosine chuẩn; (3) Cao chiết Ethanol 96°; (4) Cao chiết cồn 50°; (5) Cao chiết nước

Bảng 1. Hàm lượng cao chiết của nấm *C. militaris* ở các dung môi khác nhau

TT	Tên mẫu	Dung môi chiết	Hàm lượng cao chiết (%)
1	Mẫu 1-N	Nước	27,9042 ± 0,3604
2	Mẫu 2-CN	Ethanol 50°	20,960 ± 1,130
3	Mẫu 3-C	Ethanol 90°	6,2122 ± 0,5783

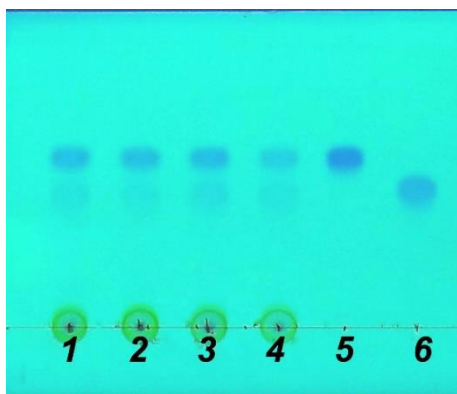
Trong quá trình tách chiết hoạt chất sử dụng dung môi, nhiệt độ có vai trò giúp tăng hòa tan cũng như khuếch tán của hoạt chất vào trong dung môi [6], [7]. Nhằm khảo sát ảnh hưởng của nhiệt độ đến quá trình tách chiết, 1g bột sinh khối *C. militaris* được chiết với ethanol 50° ở các nhiệt độ 25, 55, 65 và 85°C bằng phá siêu âm trong 30 phút/lần (thí nghiệm lặp lại 03 lần).



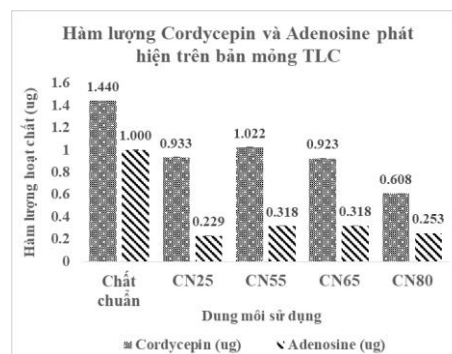
Hình 2. Kết quả định tính hàm lượng hoạt chất trên bản mỏng TLC của các dung môi ethanol 96° (C); ethanol 50° (CN) và nước (N). Đơn vị tính cordycepin và adenosine (µg/vết chất)

Kết quả thu nhận cho thấy, nhiệt độ càng cao, hàm lượng cordycepin và adenosine càng thấp (hình 3, 4). Hiệu quả tách chiết tốt nhất khi nhiệt độ sử dụng đạt 55°C với hàm lượng cordycepin ghi nhận trên sắc ký đồ là 1,022 µg và 0,318 µg adenosine.

Đoàn Thị Phương Thùy và cs (2018) cho thấy hiệu quả thu nhận cordycepin tốt nhất là ở 55°C và không có sự khác biệt khi nhiệt độ tách chiết lên đến 65°C [8]. Kết quả nhóm tác giả thu nhận được tương đồng với kết quả do nhóm tác giả Đoàn Thị Phương Thùy (2018) công bố khi đạt được hiệu quả tách chiết tốt nhất ở 55°C. Tuy nhiên, với mức nhiệt độ cao hơn 80°C, hiệu quả thu nhận cordycepin và adenosine đều thấp hơn so với ở nhiệt độ 55 và 65 °C.



Hình 3. Kết quả sắc ký TLC mẫu dịch chiết đông trùng hạ thảo ở (1) 25°C; (2) 55°C; (3) 65°C và (4) 85°C. (5) cordycepin chuẩn; (6) adenosine chuẩn



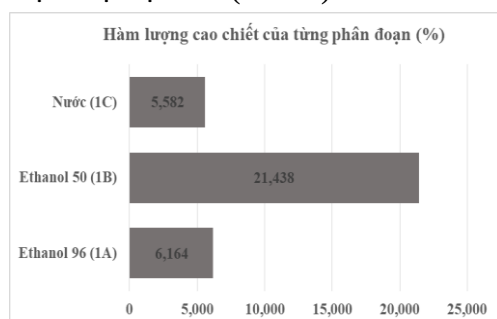
Hình 4. Kết quả định tính hàm lượng hoạt chất trên bản mỏng TLC của dịch chiết tại 25°C (CN25); 55°C (CN55); 65°C (CN65) và 85°C (CN85). Đơn vị tính cordycepin và adenosine (µg/vết chất).

Bảng 2. Kết quả xác định hàm lượng cordycepin và adenosine trong các phân đoạn cao chiết

Phân đoạn chiết	Hàm lượng cordycepin các phân đoạn (mg/ 100 g sinh khối)	Hàm lượng adenosine các phân đoạn (mg/100 g sinh khối)
Ethanol 96° (1A)	101,0	1,52
Ethanol 50° (1B)	167,0	6,33
Nước (1C)	61,0	36,0
Tổng hàm lượng hoạt chất (mg/100 g)	329,0	43,85

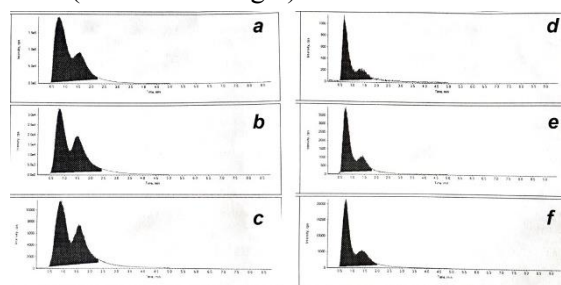
3.3. Kết quả đánh giá hiệu quả thu nhận hoạt chất của quy trình tách chiết

Kết hợp các kết quả thu nhận được cho thấy, phát hiện cả hai hoạt chất cordycepin và adenosine ở cả 03 loại dung môi là ethanol 96°; ethanol 50° và nước. Ngoài ra, nhiệt độ cho hiệu quả tách chiết tốt nhất ở 55°C. Do đó, để đảm bảo hiệu quả thu nhận hoạt chất, cordycepin và adenosine được thu nhận theo phương pháp chiết phân đoạn kết hợp phá mẫu bằng siêu âm với hệ dung môi sử dụng lần lượt là ethanol 96°, ethanol 50° và nước cất tại nhiệt độ 55°C (Hình 7).



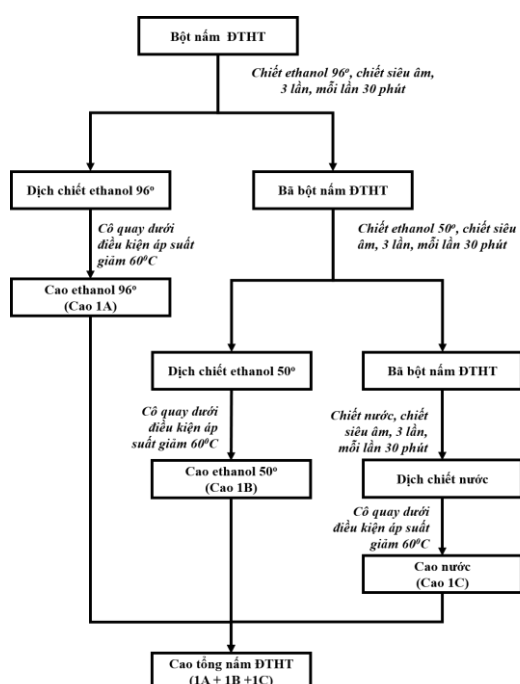
Hình 5. Kết quả xác định hàm lượng cao chiết của các phân đoạn ethanol 96° (1A); ethanol 50° (1B) và nước (1C)

Bằng phương pháp HPLC, tổng hàm lượng hoạt chất cordycepin và adenosine trong các cao chiết các phân đoạn lần lượt là 329 mg/100 g sinh khối và 43,85 mg/100 g sinh khối (Hình 6 và Bảng 2).



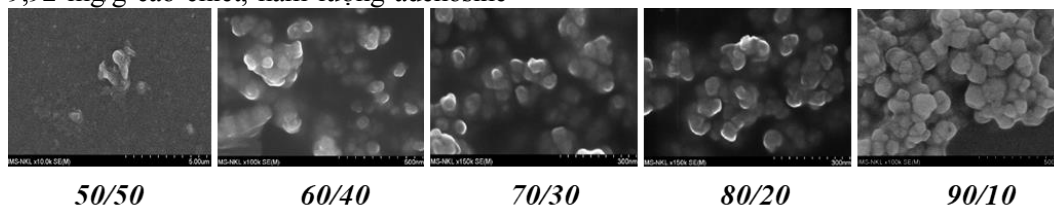
Hình 6. Sắc ký đồ HPLC xác định hàm lượng Cordycepin (a, b, c) và Adenosine (d, e, f) trong các phân đoạn cao chiết ethanol 96° (a, c); ethanol 50° (b, e) và nước (c, f).

Kết quả này được tương đương với kết quả nghiên cứu của Đoàn Thị Phương Thủy và cộng sự (2018) đã cho biết hàm lượng cordycepin trên hệ sợi nấm phát triển trên cơ chất nhộng tương ứng là 3,419 mg/g (tương đương 341,9 mg/100 g sinh khối) [8]. Các kết quả thu nhận cho thấy, quy trình chiết phân đoạn thu được hiệu suất 33,184 g cao chiết/ 100 g bột sinh khối



Hình 7. Quy trình chiết phân đoạn thu cao nấm DTHT từ quả thể nuôi cấy nhân tạo loài *C. militaris* Link NBRC100741

nấm DTHT với hàm lượng cordycepin thu được đạt 9,92 mg/g cao chiết, hàm lượng adenosine



Hình 8. Hình ảnh vật liệu nano chitosan-PEG ở các tỷ lệ phối hợp polymer khác nhau quan sát dưới kính hiển vi điện tử quét trường phát xạ (FE-SEM)

3.4.2. Kết quả đánh giá ảnh hưởng của tốc độ khuấy đến kích thước vật liệu

Kết quả khảo sát ảnh hưởng của tốc độ khuấy đến kích thước vật liệu thu nhận được thể hiện ở hình 9. Kết quả cho thấy, tốc độ khuấy phù hợp nhất là ở tốc độ 900

đạt 1,32 mg/g cao chiết, độ ẩm < 11%. Cao chiết thu nhận theo quy trình chiết phân đoạn trên được sử dụng để tạo bột kích thước nano chứa chiết xuất từ nấm đông trùng hạ thảo với vật liệu chitosan-PEG.

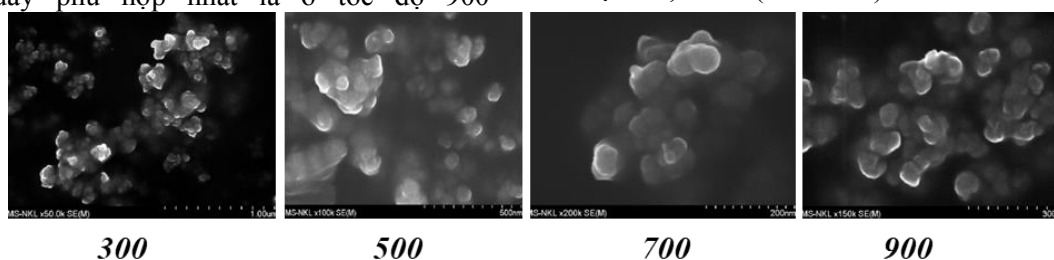
3.4. Kết quả tạo phức hệ nano chitosan-PEG

3.4.1. Kết quả đánh giá ảnh hưởng của tỷ lệ phối hợp chitosan và PEG đến kích thước vật liệu

Trong nghiên cứu này, chitosan và PEG được sử dụng trong tổng hợp nên hạt kích thước nano để bao gói hoạt chất chiết xuất từ quả thể loài *C. militaris*. Tỷ lệ các loại polymer sử dụng trong tổng hợp ảnh hưởng đến kích thước vật liệu thu được. Kết quả khảo sát ảnh hưởng của tỷ lệ phối hợp chitosan/PEG được thể hiện ở hình 8 và hình 11A.

Kết quả khảo sát cho thấy tỷ lệ phối hợp phù hợp cho tổng hợp vật liệu nano chitosan-PEG là 70% chitosan kết hợp 30% PEG. Tỷ lệ phối hợp này tiếp tục được sử dụng trong các thí nghiệm đánh giá ảnh hưởng của nhiệt độ và tốc độ khuấy đến kích thước hạt nano.

vòng/phút. Ở tốc độ khuấy từ 300-700 vòng/phút, kích thước hạt vật liệu dao động từ 181,84 đến 365,33 nm. Trong khi đó, ở tốc độ 900 vòng/phút, hạt vật liệu đạt kích thước từ 80-120 nm, kích thước hạt trung bình đạt 110,56 nm (Hình 11B).

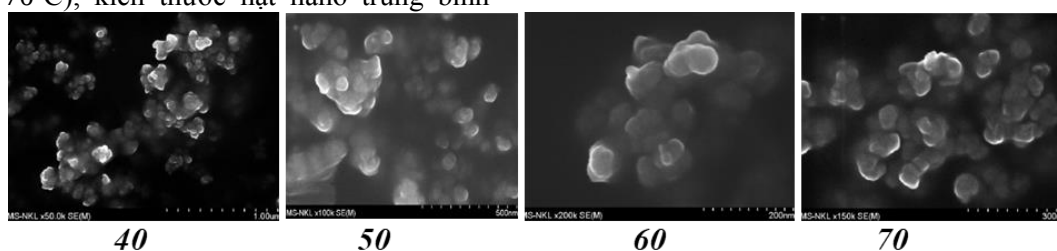


Hình 9. Hình ảnh vật liệu nano chitosan-PEG ở tốc độ khuấy khác nhau (300; 500; 700 và 900 vòng/phút) quan sát dưới kính hiển vi điện tử quét trường phát xạ (FE-SEM)

3.4.3. Kết quả đánh giá ảnh hưởng của nhiệt độ đến kích thước vật liệu

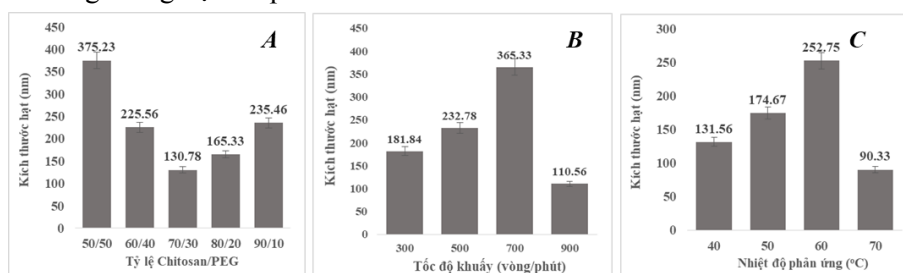
Bên cạnh tỷ lệ phối hợp các polymer và tốc độ khuấy sử dụng, nhiệt độ phản ứng cũng có ảnh hưởng lớn đến kích thước vật liệu nano. Ở các nhiệt độ phản ứng (40, 50, 60 và 70°C), kích thước hạt nano trung bình

dao động từ 90,33 nm đến 252,75 nm. Nhiệt độ phản ứng phù hợp nhất đối với quá trình tổng hợp vật liệu nano từ chitosan và PEG là 70°C, với kích thước hạt dao động từ 45-120 nm (kích thước trung bình là 90,33 nm, hình 10 và hình 11C).



Hình 10. Hình ảnh vật liệu nano chitosan-PEG ở các nhiệt độ phản ứng khác nhau (40; 50; 60 và 70°C) quan sát dưới kính hiển vi điện tử quét trường phát xạ (FE-SEM)

Như vậy, kết quả khảo sát cho thấy, tỷ lệ phối hợp phù hợp giữa chitosan và PEG là 70/30, tốc độ khuấy 900 vòng/phút, nhiệt độ phản ứng 70°C cho kích thước hạt nano 50-75 nm. Hạt nano tổng hợp được theo điều kiện trên được sử dụng cho thí nghiệm tạo phức hệ nano chitosan-PEG-cao chiết ĐTHT trong thí nghiệm tiếp theo.



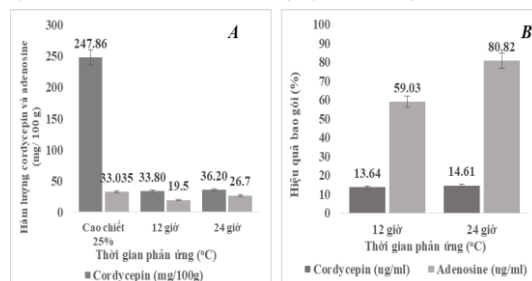
Hình 11. Kết quả xác định kích thước hạt chitosan-PEG ở các tỷ lệ phối hợp chitosan/PEG khác nhau (A), tốc độ khuấy khác nhau (B) và nhiệt độ phản ứng khác nhau (C)

3.5. Kết quả đánh giá hiệu quả đóng gói các hoạt chất từ đông trùng hạ thảo bằng phức hệ chitosan-PEG

Thời gian phản ứng đã được khảo sát nhằm lựa chọn thời gian phản ứng cho hàm lượng cao chiết ĐTHT được bao gói là cao nhất. Cao chiết tổng ĐTHT thu được theo quy trình chiết phân đoạn được pha loãng đến nồng độ 25% (w/v). 100 ml dịch cao chiết 25% (tổng hàm lượng cordycepin xấp xỉ 247 mg, adenosine xấp xỉ 33,035 mg) được sử dụng cho tổng hợp 100 g bột nano ĐTHT.

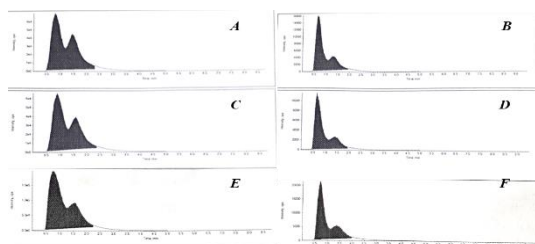
Sắc ký đồ HPLC cho thấy đều phát hiện được hai hoạt chất cordycepin và adenosine trong hai mẫu bột nano ĐTHT được bao gói ở hai

điều kiện khác nhau (Hình 13). Điều kiện sau 24 giờ phản ứng cho hiệu quả bao gói cordycepin cao hơn so với 12 giờ phản ứng (14,61% so với 13,64%) (Hình 12).



Hình 12. (A) Kết quả HPLC xác định hàm lượng cordycepin và adenosin có trong dịch cao chiết ĐTHT (25%) và trong 100 g bột nano ĐTHT khi điều chế ở thời gian 12 giờ và 24 giờ phản ứng. (B)

Hiệu quả bao gói hoạt chất từ cao chiết ĐHTT của phức hệ chitosan-PEG (%) được xác định gián tiếp qua phần trăm hàm lượng cordycepin, adenosine trong mẫu bột nano ĐHTT và dịch chiết 25% (w/v). Như vậy có thể thấy, nano ĐHTT đã được bào chế thành công dựa trên phương pháp bao gói hoạt chất bằng phức hệ hạt nano chitosan-PEG với hiệu suất bao gói đạt đến 14,61% đối với cordycepin và 80,82% đối với adenosine sau 24 giờ phản ứng (Hình 12).



Hình 13. Sắc ký đồ HPLC xác định hàm lượng Cordycepin (A, C, E) và Adenosine (B, D, F) trong bột nano ĐHTT sau 24 giờ bao gói (A, B), sau 12 giờ bao gói (C, D) và dịch chiết ĐHTT 25% (E, F)

4. Kết luận

Đã khảo sát thành công quy trình tách chiết phân đoạn hoạt chất từ quả thể nấm ĐHTT loài *C. militaris* NBRC 100741 với hàm lượng cordycepin đạt 329 mg/100 g sinh khối và adenosine đạt 43,85 mg/100 g sinh khối. Công trình đã bào chế thành công hệ chất mang nano chitosan-PEG với hiệu suất bao gói cordycepin khoảng 14,61% và 80,82% adenosine.

Lời cảm ơn

Nhóm tác giả xin chân thành cảm ơn “Nghiên cứu chế tạo hệ chất mang nano chitosan-PEG chứa các chiết xuất từ nấm đông trùng hạ thảo (*Cordyceps militaris* Link)” mã số HTD.CS.07/19 đã tài trợ thực hiện nghiên cứu này.

TÀI LIỆU THAM KHẢO/ REFERENCES

- [1]. H. Hur, “Chemical ingredients of *Cordyceps militaris*,” *Mycobiology*, vol. 36, no. 4, p. 233, 2008.
- [2]. H. Tuli, A. Sharma, S. Sandhu, and D. Kashyap, “Cordycepin: A bioactive metabolite with therapeutic potential,” *Life Sci.*, vol. 93, no. 23, pp. 863-869, Nov. 2013.
- [3]. D. Lee, W. Y. Lee, K. Jung, Y. D. Kwon, D. Kim, G. S. Hwang, C. E. Kim, S. Lee, and K. S. Kang, “The inhibitory effect of Cordycepin on the proliferation of MCF-7 breast cancer cells, and its mechanism: An investigation using network pharmacology-based analysis,” *Biomolecules*, vol. 9, no. 9, p. 407, Aug. 2019.
- [4]. G. Shashidhar, and B. Manohar, “Nanocharacterization of liposomes for the encapsulation of water soluble compounds from *Cordyceps sinensis* CS1197 by a supercritical gas anti-solvent technique,” *RSC Adv.*, vol. 8, no. 60, pp. 34634-34649, 2018.
- [5]. R. Johnsson, G. Träff, M. Sundén, and U. Ellervik, “Evaluation of quantitative thin layer chromatography using staining reagents,” *J. Chromatogr. A*, vol. 1164, no. 1-2, pp. 298-305, Sep. 2007.
- [6]. G. Spigno, L. Tramelli, and D. De Faveri, “Effects of extraction time, temperature and solvent on concentration and antioxidant activity of grape marc phenolics,” *J. Food Eng.*, vol. 81, no. 1, pp. 200-208, Jul. 2007.
- [7]. A. Mokrani, and K. Madani, “Effect of solvent, time and temperature on the extraction of phenolic compounds and antioxidant capacity of peach (*Prunus persica* L.) fruit,” *Sep. Purif. Technol.*, vol. 162, pp. 68-76, Apr. 2016.
- [8]. T. P. T. Doan, T. N. A. Tran, and T. M. Nguyen, “Study on the effects of extraction conditions on the extraction efficiency of cordycepin from *Cordyceps militaris* Linn. Link,” *Journal of Science Ho Chi Minh City open University*, vol. 61, no. 4, pp. 13-20, 2018.