

NGHIÊN CỨU ẢNH HƯỞNG CỦA MỘT SỐ YẾU TỐ ĐẾN QUÁ TRÌNH CHIẾT XUẤT *CORDYCEPS MILITARIS* BẰNG DUNG MÔI ETHANOL

Lai Cẩm Hạo Điền*, Nguyễn Văn Chính**

TÓM TẮT

Title: Investigation of the effects of several factors on extracting cordyceps *militaris* using ethanol solvent

Từ khóa: *Cordyceps militaris*, Cordycepin, chiết xuất hỗ trợ siêu âm, ngấm kiệt, tối ưu hoá quy trình chiết xuất, sắc ký lỏng hiệu năng cao

Keywords: *Cordyceps militaris*, cordycepin, ultrasonic-assisted extraction (UAE), percolation, optimal extraction process, high-performance liquid chromatography (HPLC)

Lịch sử bài báo

Ngày nhận bài: 28/06/2025

Ngày nhận kết quả bình duyệt: 16/07/2025

Ngày chấp nhận đăng bài: 27/07/2025

Tác giả: *Trường Đại học Quốc Tế - Đại học Quốc gia TP. HCM;

**Trường Đại học Yersin Đà Lạt

*Email liên hệ: chinhhv@yersin.edu.vn

Đông trùng hạ thảo là một loại nấm ký sinh trên côn trùng từ lâu đã được biết đến ở khu vực Châu Á, *Cordyceps militaris* (*C. militaris*) ngày nay được sử dụng rộng rãi hơn so với *Cordyceps sinensis* (*C. sinensis*). Cordycepin là hoạt chất chính với nhiều hoạt tính sinh học có thể kể đến như khả năng kháng ung thư, kháng oxy hoá, kháng viêm và tăng cường miễn dịch. Nghiên cứu này được thực hiện nhằm tối ưu hóa các yếu tố ảnh hưởng đến quá trình chiết xuất cordycepin từ *C. militaris*. Nghiên cứu sử dụng 3 phương pháp chiết xuất bao gồm ngâm nóng (hot digestion), chiết xuất hỗ trợ siêu âm (ultrasonic-assisted extraction - UAE) và ngấm kiệt (percolation), đồng thời sử dụng mô hình tối ưu hóa Box-Behnken thông qua phần mềm Modde 5.0. Hàm lượng cordycepin được xác định bằng phương pháp sắc ký lỏng hiệu năng cao (HPLC). Kết quả cho thấy phương pháp ngâm nóng thu được hàm lượng cordycepin cao nhất (~8,47 mg/g) khi sử dụng dung môi ethanol 38,7%, thời gian 65 phút và nhiệt độ 70,5°C. Ngoài ra, kết quả so sánh giữa các loại nguyên liệu (loại 1, loại 2 và hạt) cũng chỉ ra rằng hàm lượng cordycepin trong hạt cao hơn vượt trội so với các nguyên liệu khác (hạt > loại 2 > loại 1; $23,64 \pm 0,04 > 8,28 \pm 0,11 > 4,18 \pm 0,06$ mg/g). Nghiên cứu này sẽ làm nền tảng cho việc công nghiệp hoá tiềm năng chiết xuất cordycepin từ *C. militaris* cũng như phân lập hoạt chất cordycepin với nhiều mục đích kinh doanh thương mại khác.

ABSTRACT

Cordyceps, a parasitic fungus that grows on insects, has long been recognized in Asia for its medicinal value. Among its species, *Cordyceps militaris* (*C. militaris*) is now more widely utilized than *Cordyceps sinensis* (*C. sinensis*). Cordycepin, the primary bioactive component of *C. militaris*, exhibits a range of pharmacological activities including anticancer, antioxidant, anti-inflammatory, and immunomodulatory effects. This study aimed to optimize the extraction parameters influencing the yield of cordycepin from *C. militaris*. Three extraction techniques were evaluated: hot digestion, ultrasonic-assisted extraction (UAE), and percolation, with optimization carried out using a Box-Behnken design implemented in Modde 5.0 software. The quantification of cordycepin was performed using high-performance liquid chromatography (HPLC). Results indicated that hot digestion yielded the highest cordycepin content (~8.47 mg/g) under optimal conditions of 38.7% ethanol, 65 minutes extraction time, and 70.5°C temperature. Furthermore, comparison among different raw materials (type 1, type 2, and spores) demonstrated that spores contained significantly higher cordycepin levels (spores > type 2 > type 1; $23.64 \pm 0.04 > 8.28 \pm 0.11 > 4.18 \pm 0.06$ mg/g, respectively). This study will lay the foundation for the potential industrialization of cordycepin extraction from *C. militaris* as well as the isolation of cordycepin for many other commercial purposes.

1. Đặt vấn đề

C. militaris là một loại nấm ký sinh trên cơ thể côn trùng, chứa hàm lượng cao các hợp chất hoạt tính sinh học với nhiều đặc tính sinh học có lợi, được ứng dụng rộng rãi trong y học. Loại nấm này đã được biết đến rộng rãi ở châu Á từ thời cổ đại, đặc biệt là trong y học cổ truyền Trung Hoa (Shweta et al., 2023). Cordycepin là hợp chất hoạt tính chính có trong *C. militaris*, với các tác dụng sinh học nổi bật như kháng ung thư, kháng oxy hóa, kháng viêm và tăng cường miễn dịch (Zhang et al., 2023).

Hiện nay, đã có nhiều nghiên cứu và thử nghiệm liên quan đến chiết xuất cordycepin từ *C. militaris* nhằm nâng cao giá trị của loại nấm này. Theo các tài liệu, *C. militaris* chứa hàm lượng cordycepin cao hơn so với *C. sinensis* (loại nấm ký sinh tự nhiên trên sâu non), đồng thời thời gian nuôi trồng ngắn hơn và điều kiện nuôi trồng cũng đơn giản hơn (Sở Khoa Học và Công Nghệ TPHCM, 2014). Do đó, *C. militaris* thường được chọn làm mẫu thử nghiệm trong các nghiên cứu chiết xuất cordycepin.

2. Tổng quan nghiên cứu, cơ sở lý thuyết và phương pháp nghiên cứu

2.1. Tổng quan nghiên cứu

Phần lớn các nghiên cứu về chiết xuất cordycepin từ *C. militaris* đều nhằm mục tiêu tối ưu hóa quy trình để thu được hàm lượng cordycepin cao nhất trong dịch chiết. Các nghiên cứu trước đây chủ yếu tập trung so sánh hiệu suất chiết giữa các phương pháp chiết xuất khác nhau, đặc biệt là phương pháp ngâm nóng và UAE.

Các nghiên cứu gần đây đã chuyển hướng sang khảo sát các yếu tố ảnh hưởng đến quá trình chiết xuất của từng phương pháp. Chẳng hạn, đối với phương pháp ngâm nóng, các yếu tố được xem xét bao gồm: nhiệt độ chiết, tỷ lệ dung môi, loại dung môi,

độ pH, nồng độ dung môi và thời gian ngâm. Trong khi đó, với phương pháp UAE, các yếu tố như tần số siêu âm, thời gian siêu âm, thời gian nghỉ giữa các chu kỳ siêu âm và số chu kỳ siêu âm được nghiên cứu kỹ lưỡng (Wang et al., 2014).

Tổng thể, các nghiên cứu đều nhấn mạnh hiệu quả vượt trội của phương pháp UAE trong chiết xuất cordycepin, nhờ vào khả năng tiết kiệm thời gian, giảm lượng dung môi sử dụng và mang lại hiệu suất chiết xuất rất cao. Tuy nhiên, vẫn chưa có nghiên cứu nào thực hiện việc chiết xuất cordycepin bằng phương pháp ngâm kiệt.

Do đó, nghiên cứu này sẽ khảo sát hiệu suất chiết xuất của ba phương pháp: ngâm nóng, UAE và ngâm kiệt, với các yếu tố được xem xét bao gồm: nồng độ dung môi, nhiệt độ, thời gian và tỷ lệ mẫu/dung môi, trên chủng *C. militaris* loại 2. Các dịch chiết sau đó sẽ được phân tích bằng phương pháp HPLC. Dựa trên kết quả phân tích HPLC để định lượng hàm lượng cordycepin trong các mẫu chiết từ ba phương pháp kể trên, lựa chọn phương pháp mang lại kết quả tốt nhất để tiếp tục chiết xuất trên ba loại mẫu nguyên liệu khác nhau (loại 1, loại 2 và hạt), từ đó xác định mẫu nguyên liệu cho hàm lượng cordycepin cao nhất.

2.2. Cơ sở lý thuyết

2.2.1. Đông trùng hạ thảo

Đông trùng hạ thảo là một loại nấm ký sinh trên côn trùng, trong đó phần thể quả và sợi nấm (stroma) phát triển từ xác ấu trùng của côn trùng. Nấm chủ yếu sống ký sinh trên phần đầu của ấu trùng loài ngài đặc biệt *Hepialus armoricanus* Oberthur (thuộc bộ Cánh vẩy – Lepidoptera). Loài nấm này thuộc ngành Ascomycetes và đã được biết đến rộng rãi trong y học cổ truyền Trung Quốc suốt hơn 300 năm qua (Ashraf et al., 2020).

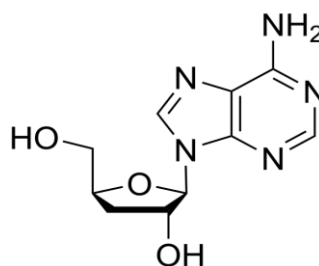
Hiện nay, đông trùng hạ thảo phổ biến được chia thành hai loại chính: *C. sinensis*, loại nổi tiếng lâu đời, mọc tự nhiên trong môi trường hoang dã; và *C. militaris*, loại được nuôi cấy nhân tạo. Trong đó, *C. militaris* hiện đang được sử dụng rộng rãi hơn. Theo nghiên cứu của Chou và cộng sự, trong bài báo “Current progress regarding *Cordyceps militaris*, its metabolite function, and its production”, lượng cordycepin thu được từ *C. militaris* cao hơn so với *C. sinensis* (Chou et al., 2024). Bên cạnh đó, *C. militaris* có quy trình nuôi trồng đơn giản hơn và thời gian ngắn hơn đáng kể (tối đa 2 tháng) trong khi *C. sinensis* có thể mất đến vài năm để phát triển trong môi trường tự nhiên. Nhờ những ưu điểm như hàm lượng cordycepin cao, thời gian nuôi trồng ngắn, và điều kiện nuôi trồng đơn giản, *C. militaris* đã được ứng dụng rộng rãi trong thị trường dược liệu và các sản phẩm thực phẩm bảo vệ sức khỏe. Ngoài ra, ở Trung Quốc, *C. sinensis* đã được xếp vào danh sách loài có nguy cơ tuyệt chủng do bị khai thác quá mức và sản lượng suy giảm nghiêm trọng vì nhu cầu thị trường quá cao. Do đó, các nhà khoa học về công nghiệp dược đã tìm kiếm một nguồn dược liệu thay thế có thể sản xuất đại trà, và *C. militaris* đã chính thức trở thành giải pháp thay thế lý tưởng nhờ vào những lợi thế vượt trội.

2.2.2. *Cordyceps militaris*

Định nghĩa

C. militaris là một loại nấm thuộc họ Cordycipitaceae, chi *Cordyceps*. Loại nấm này ký sinh trên côn trùng, đặc biệt là bướm và ấu trùng sâu bướm. Thể quả của *C. militaris* có màu cam tươi, chiều dài dao động từ 3-10 cm. Phần đỉnh thể quả thường có các đốm cam sáng nổi bật, và toàn bộ thể quả mọc ra từ xác của ấu trùng hoặc nhộng (Thương et al., 2016).

Thành phần hoạt chất



Hình 1. Cấu trúc hóa học của cordycepin

Cordycepin (3'-deoxyadenosine): Có tác dụng chống ung thư nhờ khả năng ức chế sự phát triển của tế bào ung thư; kháng viêm thông qua việc ức chế các cytokine (một trong những yếu tố gây viêm). Ngoài ra, cordycepin còn có khả năng ức chế sự phát triển của một số vi khuẩn và nấm gây bệnh, cũng như sở hữu đặc tính kháng oxy hóa (Zhang et al., 2023).

Adenosine: Hoạt chất này giữ vai trò quan trọng trong nhiều quá trình sinh lý như điều hòa nhịp tim, bảo vệ tế bào thần kinh (Zhang et al., 2023).

Các phân tích hóa học cho thấy sinh khối của *C. militaris* chứa từ 17 đến 19 loại acid amin khác nhau, D-mannitol và nhiều nguyên tố vi lượng. Bên cạnh đó, *C. militaris* còn chứa nhiều vitamin như vitamin B12, vitamin A, vitamin C, vitamin B2, vitamin E, vitamin K, cùng với protein và chất béo (Sở Khoa Học và Công Nghệ TPHCM, 2014).

Ứng dụng

Với nhiều hoạt chất có lợi, đặc biệt là cordycepin – một hoạt chất có nhiều công dụng trong việc cải thiện sức khỏe và hỗ trợ điều trị bệnh, *C. militaris* hiện đang rất được ưa chuộng và được tìm kiếm rộng rãi. Loại nấm này thường được sử dụng trong các sản phẩm như thực phẩm chức năng, thảo dược, hay là thành phần trong các loại thuốc điều trị nhiều bệnh lý nguy hiểm.

C. militaris được tiếp thị và phân phối tới người tiêu dùng thông qua nhiều hình thức đa dạng, bao gồm: nấm khô, nấm tươi,

ứng dụng trong mỹ phẩm, pha trà uống, hoặc kết hợp trong các loại thực phẩm và đồ uống nhằm tăng hiệu quả dinh dưỡng.

2.2.3. Các yếu tố ảnh hưởng đến hiệu quả chiết xuất

Nồng độ dung môi chiết xuất

Trong các nghiên cứu trước đây, nồng độ ethanol (EtOH) tối ưu đã được xác định như sau: Hiệu suất chiết cordycepin cao nhất đạt được ở nồng độ EtOH 60% và bắt đầu giảm khi nồng độ EtOH tăng cao hơn (Wang et al., 2014); tuy nhiên, vào năm 2022, một nghiên cứu của khác chỉ ra rằng hiệu suất chiết cordycepin cao nhất đạt được khi sử dụng EtOH 70% ($1,10 \pm 0,095$ g/kg cordycepin/quả thể), trong khi hiệu suất chiết ở EtOH 60% lại không cao bằng ($0,98 \pm 0,046$ g/kg cordycepin/quả thể) (Thương et al., 2022). Để làm rõ yếu tố nồng độ EtOH, nghiên cứu này sẽ tiến hành thí nghiệm với năm nồng độ EtOH khác nhau, cụ thể là 30, 40, 50, 60 và 70%.

Nhiệt độ chiết xuất

Vào năm 2014, nghiên cứu có tựa đề “Tối ưu hóa phương pháp chiết xuất hỗ trợ bằng siêu âm cordycepin từ *Cordyceps militaris* bằng thiết kế thí nghiệm trực giao” của Hsiu-Ju Wang và cộng sự cho thấy rằng hàm lượng cordycepin thu được tăng lên khi nhiệt độ chiết xuất tăng từ 0°C đến 60°C (Wang et al., 2014). Tuy nhiên, nghiên cứu này không trình bày quy trình cụ thể và dữ liệu chưa rõ ràng. Do đó, nghiên cứu sẽ tiến hành khảo sát quá trình chiết xuất ở dải nhiệt độ từ 40°C đến 80°C.

Thời gian chiết xuất

Tương tự như yếu tố nhiệt độ, Hsiu-Ju Wang và cộng sự đã chứng minh rằng hàm lượng cordycepin cao nhất thu được khi thời gian chiết xuất tăng đến 60 phút, và bắt đầu giảm khi tăng lên 90 phút. Wang giải thích rằng “các hợp chất hoạt tính sẽ không hòa tan thêm khi độ hòa tan của các hợp chất hòa tan đạt đến giới hạn bão hòa cùng với sự gia

tăng thời gian chiết xuất, trong khi sự hao hụt cordycepin lại tăng lên do độ nhớt của dung dịch chiết xuất tăng theo thời gian” và kết luận rằng thời gian chiết xuất không nên vượt quá 70 phút (Wang et al., 2014). Tuy nhiên, vào năm 2022, Nguyễn Thị Liên Thương trong bài báo “Khảo sát quá trình chiết xuất quả thể *Cordyceps militaris* để tối ưu hàm lượng cordycepin” cho biết hiệu suất chiết xuất cao nhất đạt được ở 120 phút khi khảo sát từ 30 đến 120 phút (Thương et al., 2022). Hiệu suất này khoảng 6,974 g/kg (cordycepin/quả thể khô), kết quả tương tự nghiên cứu của Đoàn Thị Phương Thùy và cộng sự (2018) với khoảng 6,95 g/kg (cordycepin/quả thể khô). Do đó, Nghiên cứu này sẽ khảo sát quá trình tối ưu với các mốc thời gian chiết xuất khác nhau từ 50 phút đến 90 phút.

Tỷ lệ mẫu/dung môi

Trong các nghiên cứu gần đây, cụ thể là nghiên cứu về ảnh hưởng của điều kiện chiết xuất của Đoàn Thị Phương Thùy (2018) và nghiên cứu về chiết xuất chọn lọc cordycepin từ *C. militaris* của Chayanid Sornchaithawatwong (2020), hầu hết các nhà nghiên cứu đều sử dụng tỷ lệ mẫu/nguyên liệu so với dung môi là 1/50 (g/ml). Việc thay đổi tỷ lệ này có thể ảnh hưởng trực tiếp đến hiệu quả chiết xuất cordycepin từ *C. militaris*, do đó nghiên cứu sẽ khảo sát thêm các tỷ lệ mẫu/dung môi khác nhau.

2.3. Phương pháp nghiên cứu

2.3.1. Lựa chọn phương pháp chiết xuất

Mẫu nguyên liệu *C. militaris* được nuôi trồng tại Công ty Năm Nguyên Long (Đà Lạt). Gồm 3 loại mẫu khác nhau:

C. militaris loại 1: nấm phát triển to, đẹp, dùng cho mục đích thương mại.

C. militaris loại 2: nấm nhỏ hơn, thưa hơn, dùng để chế biến phụ phẩm.

C. militaris hạt: phần nền của nấm (cơ sở nấm).

Nghiên cứu sử dụng ba phương pháp: ngâm nóng, UAE và ngâm kiệt trên cùng một loại nguyên liệu (*C. militaris* loại 2). Các phương pháp này sẽ được áp dụng kết hợp với các yếu tố ảnh hưởng đến quá trình chiết xuất để tiến hành so sánh.

Sau khi thu được dịch chiết từ ba phương pháp trên, tiến hành phân tích bằng phương pháp HPLC nhằm xác định phương pháp nào cho hàm lượng cordycepin cao nhất. Tiếp tục sử dụng phương pháp hiệu quả nhất để so sánh mẫu nguyên liệu nào cho hàm lượng cordycepin cao nhất.

Phương pháp UAE: cân 0,3 g nguyên liệu cho vào bình định mức 50 ml, thêm 15 ml dung môi EtOH 40%. Dung dịch được siêu âm ở nhiệt độ 60°C trong 60 phút. Hỗn hợp sau đó được lọc qua giấy lọc để loại bỏ cặn bã. Dịch chiết được cô đặc ở 85°C. (Lưu ý: Nhiệt độ quá 90°C có thể làm mất hoạt chất).

Phương pháp ngâm nóng: cân 0,3 g nguyên liệu vào bình định mức 50ml, thêm 15ml dung môi EtOH 40%. Dung dịch được ngâm đun trong bể cách thủy ở nhiệt độ 60°C trong 60 phút. Sau đó hỗn hợp được lọc qua giấy lọc và dịch chiết được cô đặc ở 85°C.

Phương pháp ngâm kiệt: chuẩn bị mô hình chiết ngâm kiệt với 1,0 g nguyên liệu và 50 ml dung môi EtOH 40%. Ngâm trong 24 giờ rồi bắt đầu chiết rút dịch chiết. Dịch chiết được cô đặc ở 85°C.

Hiệu suất chiết thu được dựa trên khối lượng nguyên liệu thô được tính như sau:

$$H\% = \frac{m_{\text{cao sau cô}}}{[m_{\text{nguyên liệu}} * (100\% - \text{độ ẩm}\%) * 100\%]}$$

Kết quả khảo sát sơ bộ sẽ được đưa vào mô hình Box – Behnken và tiếp tục khảo sát ở phạm vi thấp hơn dựa trên phần mềm Modde 5.0. Hàm lượng cordycepin thu được trong dịch chiết được xác định bằng phương pháp HPLC.

2.3.2. Tối ưu hoá các yếu tố bằng phần mềm Modde 5.0

Nghiên cứu tiến hành khảo sát ba yếu tố điều kiện bao gồm: nhiệt độ, nồng độ dung môi và thời gian chiết xuất. Nghiên cứu này tối ưu hóa các yếu tố bằng phần mềm Modde 5.0 với mô hình Box – Behnken. Modde 5.0 là phần mềm chuyên dùng để tối ưu hóa các yếu tố ảnh hưởng trong quy trình.

2.3.3. Phân tích HPLC hàm lượng cordycepin

Dung môi là hỗn hợp EtOH – nước.

Hệ thống HPLC sử dụng là UHPLC Thermo Scientific Ultimate 3000, trang bị detector DAD và TSQ Fortis. Cột sắc ký là BDS Hypersil C18 (150x2.1 mm, 3µm). Tốc độ dòng chảy: 0,1 ml/phút. Bước sóng: 260 nm. Dung môi: 1% acid formic trong nước (A) và 1% acid formic trong acetonitrile (B).

Cordycepin chuẩn (CAS: 73-03-0), độ tinh khiết gần 98%, mua từ công ty Sigma Aldrich (Mỹ).

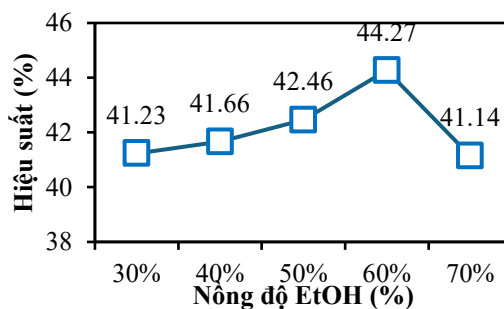
3. Kết quả nghiên cứu

3.1. Kết quả khảo sát sơ bộ

3.1.1. Kết quả khảo sát bằng phương pháp UAE

Kết quả khảo sát nồng độ dung môi EtOH

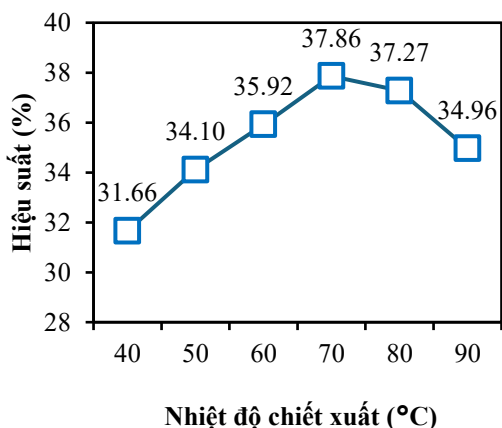
Kết quả khảo sát nồng độ dung môi EtOH (Hình 2) cho thấy hiệu suất thu được cao nhất là 44,27% khi sử dụng dung môi EtOH 60%.



Hình 2. Biểu đồ mối quan hệ giữa hiệu suất và nồng độ EtOH (UAE)

Kết quả khảo sát nhiệt độ chiết xuất

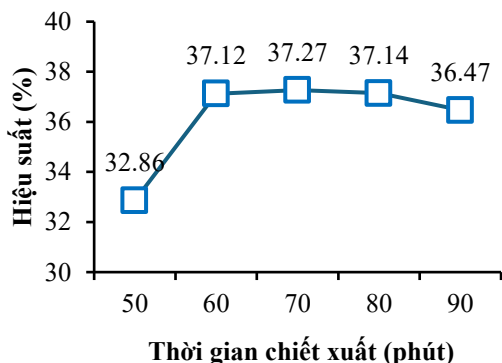
Kết quả khảo sát nhiệt độ chiết xuất (Hình 3) cho thấy khi sử dụng phương pháp UAE với dung môi EtOH 60% trong 60 phút, hiệu suất chiết cao nhất đạt được ở nhiệt độ 60°C. Khi nhiệt độ tăng vượt quá 60°C, hiệu suất có xu hướng giảm nhưng không đáng kể.



Hình 3. Biểu đồ mối quan hệ giữa hiệu suất và nhiệt độ chiết xuất (UAE)

Kết quả khảo sát thời gian chiết xuất

Kết quả khảo sát về thời gian chiết xuất (Hình 4) cho thấy hiệu suất cao nhất đạt được khi thời gian siêu âm là 60 phút. Khi kéo dài thời gian siêu âm hơn nữa, hiệu suất lại giảm. Nguyên nhân có thể do sau khi đạt đỉnh ở 60 phút, việc tiếp tục siêu âm có thể gây phân hủy và bay hơi các hợp chất có hoạt tính trong dung dịch chiết.

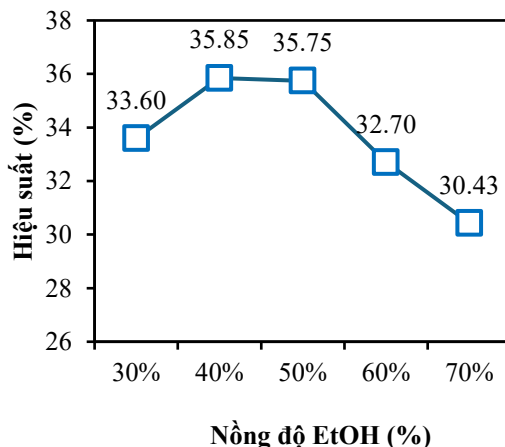


Hình 4. Biểu đồ mối quan hệ giữa hiệu suất và thời gian chiết xuất (UAE)

3.1.2. Kết quả khảo sát bằng phương pháp ngâm nóng

Kết quả khảo sát nồng độ dung môi EtOH

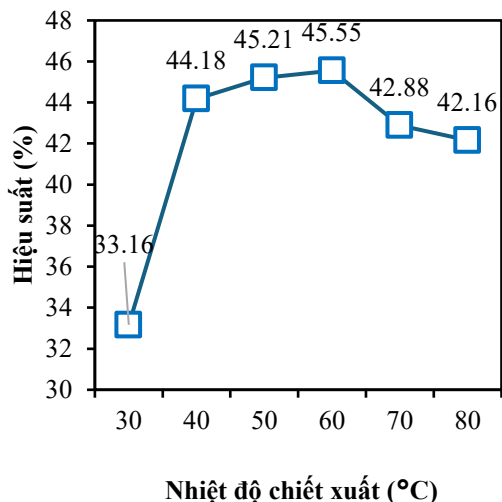
Kết quả khảo sát (Hình 5) cho thấy phương pháp ngâm nóng đạt hiệu suất chiết cao nhất khi sử dụng dung môi EtOH 40%. Khi nồng độ EtOH tăng cao hơn, hiệu suất giảm đáng kể. Điều này cho thấy trong phương pháp ngâm nóng, nguyên liệu hòa tan tốt hơn trong môi trường có hàm lượng nước cao (phân cực hơn). Tuy nhiên, hiệu suất chiết thu được vẫn thấp hơn đáng kể so với phương pháp UAE.



Hình 5. Biểu đồ mối quan hệ giữa hiệu suất và nồng độ EtOH (ngâm nóng)

Kết quả khảo sát nhiệt độ chiết xuất

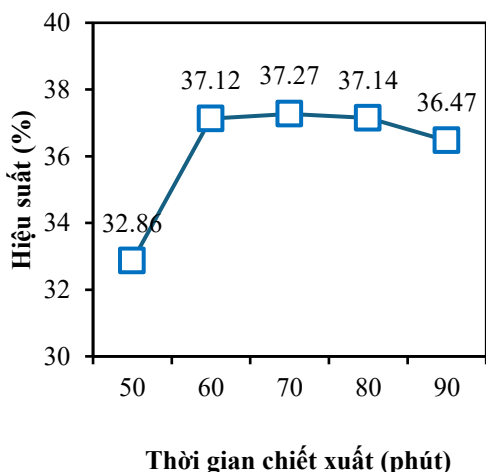
Kết quả khảo sát nhiệt độ (Hình 6) cho thấy ngâm nóng trong 60 phút ở 70°C cho hiệu suất chiết cao nhất. Khi nhiệt độ tiếp tục tăng, hiệu suất chiết giảm dần, cho thấy rằng nhiệt độ quá cao có thể ảnh hưởng đến các hoạt chất trong dịch chiết, khiến chúng bay hơi cùng với EtOH.



Hình 6. Biểu đồ mối quan hệ giữa hiệu suất và nhiệt độ chiết xuất (ngâm nóng)

Kết quả khảo sát thời gian chiết xuất

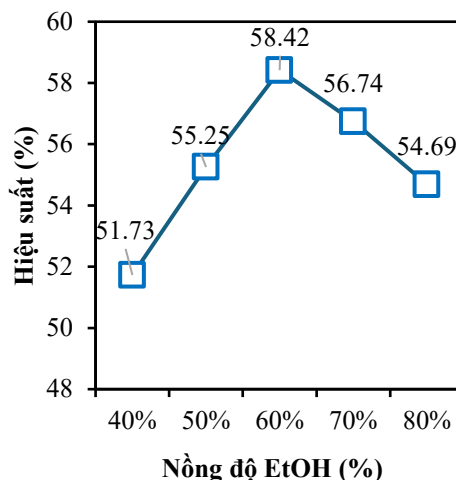
Kết quả khảo sát thời gian chiết xuất được thể hiện ở (Hình 7), hiệu suất đạt mức tối ưu tại thời điểm 60 phút. Khi thời gian tăng lên 70 phút, hiệu suất có cải thiện nhẹ nhưng không đáng kể. Tuy nhiên, ở 80 phút, hiệu suất bắt đầu giảm. Do đó, để tối ưu hóa hiệu quả, tiết kiệm thời gian, dung môi và chi phí, phương pháp ngâm nóng cho kết quả tốt nhất ở thời gian 60 phút.



Hình 7. Biểu đồ mối quan hệ giữa hiệu suất và thời gian chiết xuất (ngâm nóng)

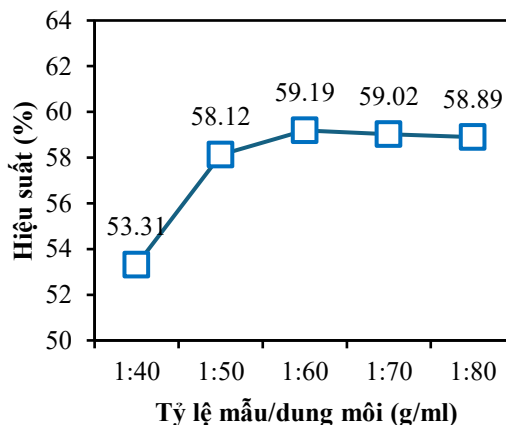
3.1.3. Phương pháp ngâm kiệt

Kết quả khảo sát nồng độ dung môi EtOH Kết quả ở (Hình 8) cho thấy tương tự



như phương pháp UAE, dung môi mang lại hiệu suất chiết xuất tốt nhất là EtOH 60%. Khi nồng độ dung môi tiếp tục tăng cao hơn, hiệu suất chiết giảm đáng kể.

Hình 8. Biểu đồ mối quan hệ giữa hiệu



suất và nồng độ EtOH (ngâm kiệt)

Kết quả khảo sát tỷ lệ mẫu/dung môi

Tại tỷ lệ 1:60 (g/ml), hiệu suất đạt mức cao nhất. Khi thể tích dung môi tiếp tục tăng, hiệu suất có thay đổi nhưng không đáng kể (Hình 9).

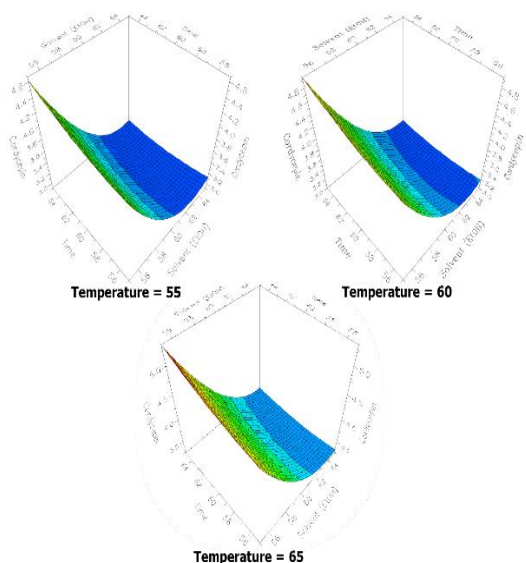
Hình 9. Biểu đồ mối quan hệ giữa hiệu suất và tỷ lệ mẫu/dung môi (ngâm kiệt)

3.2. Kết quả tối ưu hóa điều kiện chiết xuất cordycepin**3.2.1. Kết quả tối ưu hóa bằng phương pháp UAE****Bảng 1.** Hàm lượng cordycepin với mô hình Box-Behnken bằng phương pháp UAE

STT	Mã TN	Dung môi	Thời gian (phút)	Nhiệt độ (°C)	Cordycepin (mg/g)	Độ lệch chuẩn (n=3)
1	--0	EtOH 55%	55	60	4,49	0,04
2	-0-	EtOH 55%	60	55	4,40	0,05
3	-0+	EtOH 55%	60	65	5,06	0,12
4	--0	EtOH 55%	65	60	4,94	0,02
5	0--	EtOH 60%	55	55	3,21	0,01
6	0+-	EtOH 60%	55	65	3,61	0,08
7	000	EtOH 60%	60	60	3,39	0,02
8	000	EtOH 60%	60	60	3,27	0,08
9	000	EtOH 60%	60	60	3,39	0,13
10	0+-	EtOH 60%	65	55	3,25	0,03
11	0++	EtOH 60%	65	65	3,76	0,04
12	+0-	EtOH 65%	55	60	3,18	0,01
13	+0-	EtOH 65%	60	55	2,96	0,01
14	+0+	EtOH 65%	60	65	3,2	0,04
15	++0	EtOH 65%	65	60	3,14	0,06

Điều này được thể hiện rõ hơn trong mô hình bề mặt phản ứng 4D (Hình 10), phản ánh tác động của các yếu tố lên hàm lượng cordycepin.

Khi nồng độ EtOH giảm xuống còn 55%, hàm lượng cordycepin liên tục tăng. Ngược lại, khi nồng độ EtOH tăng lên, hàm lượng cordycepin lại giảm. Ngoài ra, khi thời gian siêu âm tiếp tục tăng, hàm lượng cordycepin có xu hướng tiếp tục tăng thêm. Khi nhiệt độ tiếp tục tăng, hàm lượng cordycepin có khả năng cũng sẽ tăng theo.



Hình 10. Mô hình bề mặt đáp ứng 4D của các yếu tố (UAE)

Kết quả dự đoán từ công cụ Prediction Optimizer trong phần mềm Modde 5.0 (Bảng 2), vẫn chưa thể kết luận được các thông số tối ưu cho phương pháp UAE, vì khi các yếu tố tiếp tục thay đổi, hàm lượng cordycepin vẫn có khả năng tiếp tục tăng.

Từ các kết quả trên, có thể thấy rằng việc sử dụng dung môi EtOH với nồng độ thấp hơn cho hiệu quả chiết cordycepin

tốt hơn. Ngoài ra, nếu tiếp tục tăng thời gian và nhiệt độ trong phương pháp UAE, hàm lượng cordycepin có thể tiếp tục tăng. Tuy nhiên, như đã bàn luận trước đó, kết quả cho thấy hàm lượng cordycepin trong dịch chiết không có mối tương quan rõ ràng với hiệu suất chiết thu được.

Mặc dù vậy, phương pháp UAE vẫn cần được cân nhắc sử dụng cho chiết xuất cordycepin do các yếu tố như: lượng dung môi sử dụng, mức tiêu thụ năng lượng và yêu cầu về thiết bị. Phương pháp UAE đòi hỏi thiết bị chuyên dụng như bể siêu âm, và nếu tiếp tục tăng thời gian và nhiệt độ, điều đầu tiên chúng ta phải đối mặt là chi phí và tiêu thụ điện năng tăng đáng kể. Hơn nữa, hàm lượng cordycepin thu được cũng có thể không cao bằng so với phương pháp ngâm nóng.

Bảng 2. Các thông số tối ưu dự đoán bởi phần mềm Modde 5.0 (UAE)

STT	EtOH (%)	Thời gian chiết (phút)	Nhiệt độ chiết (°C)	Cordycepin (mg/g)
1	55,0438	64,9989	64,9954	5,314
2	64,9924	55,0004	64,9999	3,3146
3	55,0448	62,4987	64,9171	5,1426
4	55,0190	64,9996	61,7486	5,0597
5	55,0032	65	61,523	5,0477
6	55,1592	64,9998	64,9998	5,2673

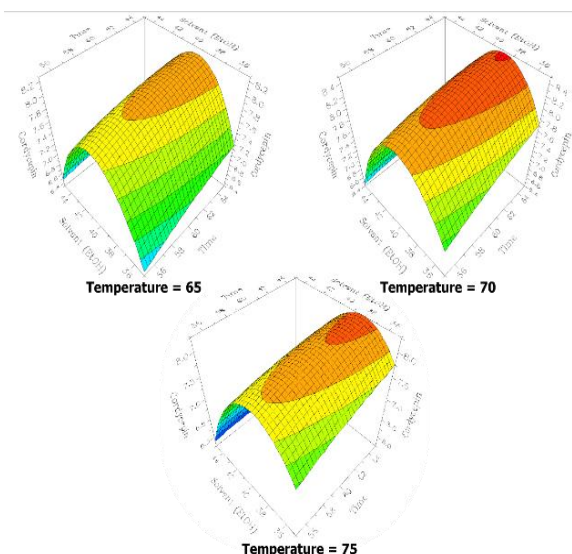
3.2.2. Kết quả tối ưu hóa bằng phương pháp ngâm nóng

Bảng 3. Hàm lượng cordycepin với mô hình Box-Behnken bằng phương pháp ngâm nóng

STT	Mã TN	Dung môi	Thời gian (phút)	Nhiệt độ (°C)	Cordycepin (mg/g)	Độ lệch chuẩn (n=3)
1	--0	EtOH 35%	55	70	6,83	0,00
2	-0-	EtOH 35%	60	65	7,11	0,04
3	-0+	EtOH 35%	60	75	7,55	0,06
4	++0	EtOH 35%	65	70	7,62	0,11
5	0--	EtOH 40%	55	65	7,71	0,16
6	0+-	EtOH 40%	55	75	7,94	0,11
7	000	EtOH 40%	60	70	8,23	0,12
8	000	EtOH 40%	60	70	8,35	0,16
9	000	EtOH 40%	60	70	8,28	0,11
10	0+-	EtOH 40%	65	65	8,01	0,07
11	0++	EtOH 40%	65	75	8,15	0,12
12	+0-	EtOH 45%	55	70	6,54	0,15
13	+0-	EtOH 45%	60	65	6,52	0,1
14	+0+	EtOH 45%	60	75	5,7	0,14
15	+++	EtOH 45%	65	70	6,65	0,14

Khi nồng độ EtOH vào khoảng 38,7%, hàm lượng cordycepin đạt mức cao nhất (~8,47 mg/g) (Bảng 4). Khi nồng độ EtOH tăng cao hơn, hàm lượng cordycepin có xu hướng giảm. Do đó, cần có sự cân bằng giữa hiệu suất chiết và lượng tạp chất có trong dịch chiết. Khi thời gian chiết tăng, hàm lượng cordycepin cũng tăng theo. Tuy nhiên, sau khi đạt đến 63 phút, mức tăng không còn đáng kể. Tương tự, khi nhiệt độ tăng, hàm lượng cordycepin cũng tăng. Tuy nhiên, cần lưu ý rằng nếu nhiệt độ quá cao có thể ảnh hưởng đến các hợp chất hoạt tính trong dịch chiết. Trước đó, khi khảo sát hiệu suất chiết, phương pháp UAE cho kết quả cao hơn phương pháp ngâm nóng. Tuy nhiên, với kết quả định lượng hàm lượng cordycepin hiện tại, phương pháp ngâm nóng lại cho kết quả

cao hơn rõ rệt, đặc biệt là khi sử dụng dung môi có nồng độ EtOH thấp hơn (Hình 11).



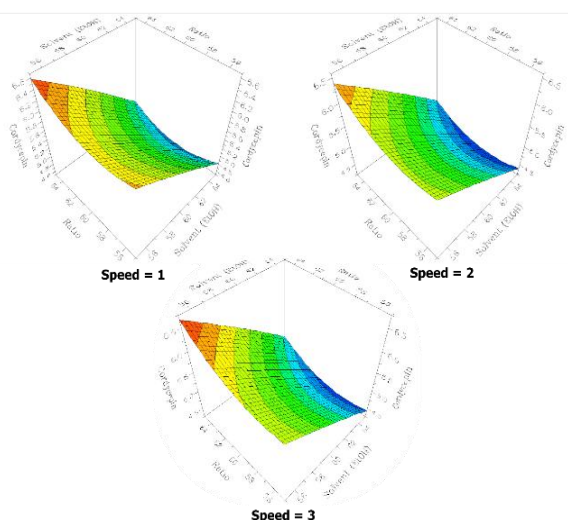
Hình 11. Mô hình bề mặt đáp ứng 4D của các yếu tố (n)

Kết quả dự đoán từ công cụ Prediction Optimizer trong phần mềm Modde 5.0 (Bảng 4), các điều kiện chiết xuất tối ưu cho phương pháp ngâm nóng được xác định là: nồng độ EtOH: 38,7%; thời gian chiết xuất: 65 phút; nhiệt độ chiết xuất: 70,5°C. Các thông số này được lựa chọn nhằm tối ưu hóa hàm lượng cordycepin trong dịch chiết, đồng thời đảm bảo hiệu quả về mặt chi phí và thời gian trong quá trình sản xuất.

Bảng 4. Các thông số tối ưu dự đoán bởi phần mềm Modde 5.0 (ngâm nóng)

STT	EtOH (%)	Thời gian chiết (phút)	Nhiệt độ chiết (°C)	Cordycepin (mg/g)
1	38,7373	64,9982	70,5127	8,4703
2	38,7218	64,999	70,5103	8,4703
3	38,7442	64,9993	70,5607	8,4703
4	38,7722	64,9925	70,4857	8,4701

3.2.3. Kết quả tối ưu hóa bằng phương pháp ngâm kiệt



Hình 12. Mô hình bề mặt đáp ứng 4D của các yếu tố (ngâm kiệt)

Tương tự như kết quả của hai phương pháp trước, nồng độ EtOH càng thấp thì kết quả thu được càng tốt (Hình 12). Nồng độ tối ưu có thể nằm ở khoảng 38,7%, như đã được chỉ ra trong phương pháp ngâm nóng. Việc tăng nồng độ EtOH chỉ làm giảm hàm lượng cordycepin thu được. Khi tỷ lệ dung môi/nguyên liệu (ml/g) tiếp tục tăng, hàm lượng Cordycepin có xu hướng tăng thêm. Tuy nhiên, khi tốc độ rút dịch chiết thay đổi, hàm lượng cordycepin không thay đổi đáng kể. Dựa trên kết quả dự đoán từ công cụ Prediction Optimizer trong phần mềm Modde 5.0 (Bảng 5), tương tự như phương pháp UAE, vẫn chưa thể xác định được thông số tối ưu cho phương pháp ngâm kiệt.

Mặc dù phương pháp ngâm kiệt có ưu điểm là dễ triển khai và có thể áp dụng ở quy mô công nghiệp, tuy nhiên so với phương pháp ngâm nóng, thời gian thực hiện dài hơn, lượng dung môi sử dụng không được tối ưu, và hàm lượng cordycepin thu được cũng thấp hơn đáng kể.

Vì vậy, xét về tổng thể hiệu quả chiết xuất, tiết kiệm chi phí và thời gian, phương pháp ngâm nóng vẫn chiếm ưu thế hơn.

Bảng 5. Các thông số tối ưu dự đoán bởi phần mềm Modde 5.0 (ngâm kiệt)

STT	EtOH (%)	Tỷ lệ dung môi/được chiết (ml/g)	Tốc độ rút dịch chiết (phút)	Cordycepin (mg/g)
1	55	55	3	5,9142
2	55	55,0016	1,977	5,8372
3	55	65	1	6,5842
4	55	63,4313	2,9999	6,3874

3.3. Kết quả hàm lượng Cordycepin trong các loại nguyên liệu khác nhau

Kết quả hàm lượng cordycepin trong các loại *C. militaris* khác nhau được trình bày ở (Bảng 6), sử dụng phương pháp ngâm nóng với các yếu tố được giữ ổn định như sau: dung môi EtOH 40%; thời gian: 60 phút; nhiệt độ: 70°C.

Bảng 6. Hàm lượng cordycepin trong các loại mẫu nguyên liệu khác nhau

Mẫu	Cordycepin (mg/g)
<i>C. militaris</i> loại 1	4,18 ± 0,06
<i>C. militaris</i> loại 2	8,28 ± 0,11
<i>C. militaris</i> hạt	23,64 ± 0,04

Kết quả cho thấy phần hạt nấm (để) có hàm lượng cordycepin cao nhất (23,64 ± 0,04 mg/g) so với các mẫu còn lại, trong khi *C. militaris* loại 1 – vốn được nuôi trồng theo tiêu chuẩn thương mại cao – lại có hàm lượng thấp nhất (4,18 ± 0,06 mg/g).

Điều này cho thấy rằng mặc dù *C. militaris* loại 1 đạt chuẩn về mặt hình dáng và mục đích thương mại, nhưng lại không có hàm lượng hoạt chất cordycepin cao nhất. Tuy nhiên, mẫu này vẫn có thể chứa các hoạt chất sinh học có lợi khác ở nồng độ cao hơn, chẳng hạn như Adenosine, polysaccharides, hoặc các hợp chất sinh học khác.

4. Kết luận và bàn luận

Phương pháp ngâm nóng là phương pháp cho kết quả chiết xuất cordycepin cao nhất (~8,47 mg/g) từ *C. militaris* loại 2, so với hai phương pháp UAE và ngấm kiệt. Tuy nhiên, hiệu suất chiết (tức

lượng chất khô thu được sau chiết xuất từ nguyên liệu khô ban đầu) của phương pháp này lại thấp nhất trong ba phương pháp. Ngược lại, phương pháp UAE và ngấm kiệt cho hiệu suất chiết cao hơn đáng kể, nhưng hàm lượng cordycepin trong dịch chiết lại thấp hơn. Điều này cho thấy rằng: hiệu suất chiết thu được nhiều không đồng nghĩa với hàm lượng cordycepin cao; lượng chất rắn cao có thể đến từ các hợp chất khác như Adenosine, Polysaccharides, v.v. Ngoài ra, phương pháp ngâm nóng cũng có nhiều lợi thế hơn so với UAE và ngấm kiệt, cụ thể: tiết kiệm năng lượng, không yêu cầu thiết bị chuyên dụng như bể siêu âm, tiêu tốn ít dung môi hơn UAE, thời gian thực hiện ngắn hơn nhiều so với ngấm kiệt. Tóm lại, phương pháp ngâm nóng không chỉ hiệu quả về mặt hàm lượng cordycepin, mà còn tối ưu về chi phí, thiết bị và thời gian vận hành.

Việc chiết xuất cordycepin bằng phương pháp ngâm nóng đạt hiệu quả tối ưu (~8,47 mg/g) khi sử dụng: dung môi EtOH 38,7%, thời gian chiết: 65 phút, nhiệt độ chiết: 70,5°C. Đây là tổ hợp điều kiện được xác định là tối ưu dựa trên các khảo sát và dự đoán từ công cụ Prediction Optimizer trong phần mềm Modde 5.0, cho phép đạt được hàm lượng Cordycepin cao nhất từ *C. militaris*.

Kết quả định lượng cordycepin bằng phương pháp HPLC trên ba loại mẫu: *C. militaris* loại 1, loại 2 và hạt chỉ ra rằng mặc dù loại 1 là sản phẩm được tuyển chọn kỹ lưỡng và có giá trị kinh tế cao nhất, nhưng không phải là loại chứa hàm lượng cordycepin cao nhất. Cụ thể, hạt

chứa cordycepin cao nhất: $23,64 \pm 0,04$ mg/g, loại 2 đứng thứ hai: $8,28 \pm 0,11$ mg/g (dù hình thái và kích thước không tối ưu như loại 1), loại 1 có hàm lượng thấp nhất: $4,18 \pm 0,06$ mg/g. Kết quả này cho thấy giá trị kinh tế hoặc ngoại hình sản phẩm không phản ánh trực tiếp hàm lượng hoạt chất cordycepin bên trong. Điều này mở ra hướng nghiên cứu sâu hơn về mối liên hệ giữa nguồn gốc giống, điều kiện nuôi trồng và chất lượng dược tính thực tế.

Nghiên cứu này sẽ đặt nền móng cho khả năng công nghiệp hóa quy trình chiết xuất cordycepin từ Đông trùng hạ thảo *C. militaris* nuôi cấy nhân tạo, đồng thời mở ra tiềm năng tách chiết cordycepin để phục vụ nhiều mục đích thương mại khác trong tương lai.

Ngoài các phân tích về hiệu suất và hàm lượng cordycepin ở các phương pháp chiết xuất khác nhau, nghiên cứu này còn mang lại nhiều ý nghĩa thực tiễn, đặc biệt đối với các lĩnh vực ứng dụng như công nghiệp thực phẩm chức năng và dược phẩm. Cordycepin, hoạt chất chính đã được chứng minh có nhiều hoạt tính sinh học quan trọng như kháng ung thư, kháng viêm, chống oxy hoá và tăng cường miễn dịch. Việc xác định được phương pháp chiết xuất hiệu quả, ổn định và tiết kiệm như ngâm nóng giúp mở ra khả năng ứng dụng quy mô công nghiệp mà không cần trang thiết bị phức tạp, từ đó giảm chi phí đầu tư ban đầu cho doanh nghiệp.

Đặc biệt, phát hiện rằng phần nguyên liệu “hạt” có hàm lượng cordycepin vượt trội so với phần quả thể (dù không đạt chuẩn hình thái thương mại) cho thấy tiềm năng tận dụng nguyên liệu phụ phẩm hoặc phế phẩm trong quá trình sản xuất nấm. Điều này vừa tối ưu hóa chi phí nguyên liệu, vừa góp phần giảm lãng phí trong sản xuất, đồng thời tạo ra nguồn nguyên liệu dược liệu mới có giá trị kinh tế cao. Đây là hướng đi đầy hứa hẹn cho các cơ sở sản xuất thực phẩm chức năng, thường gặp khó khăn về chi phí nguyên liệu và chuẩn hóa hoạt chất.

Trong lĩnh vực dược phẩm, quy trình chiết xuất được tối ưu hóa không chỉ phục vụ mục đích định lượng cordycepin mà còn có thể mở rộng ứng dụng trong quy trình phân lập, tinh chế và phát triển nguyên liệu dược phẩm đạt chuẩn.

Từ góc độ chuyển giao công nghệ, kết quả nghiên cứu này có thể là tiền đề để xây dựng quy trình chiết xuất tiêu chuẩn hoá theo hướng GMP cho các cơ sở sản xuất dược liệu hoặc thực phẩm chức năng. Hơn nữa, phương pháp tiếp cận tối ưu hoá bằng mô hình Box-Behnken và phần mềm Modde 5.0 hoàn toàn có thể nhân rộng áp dụng cho các loại dược liệu khác, giúp nâng cao hiệu quả nghiên cứu và phát triển sản phẩm từ nguồn gốc tự nhiên tại Việt Nam.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Ashraf, S. A., et al (2020). Cordycepin for Health and Wellbeing: A Potent Bioactive Metabolite of an Entomopathogenic Medicinal Fungus Cordyceps with Its Nutraceutical and Therapeutic Potential. *Molecules*, 25(12), 2735. <https://doi.org/10.3390/molecules25122735>
- Chou, Y. C., et al (2024). Current Progress Regarding Cordyceps militaris, Its Metabolite Function, and Its Production. *Applied Sciences*, 14(11), 4610. <https://doi.org/10.3390/app14114610>
- Đoàn Thị Phương Thùy và cộng sự (2018). Nghiên cứu ảnh hưởng của điều kiện tách chiết đến hiệu quả thu nhận hoạt chất cordycepin từ nhộng trùng thảo (*Cordyceps militaris* Linn. Link). *Tạp chí Khoa học Đại học Mở Thành phố Hồ Chí Minh*, 13(1), 106-115. <https://doi.org/10.46223/HCMCOUJS.tech.vi.13.1.795.2018>
- Sở Khoa học và Công nghệ TP HCM (2014). Phân tích xu hướng công nghệ năm 2014.* Retrieved May 19, 2025, from <https://dost.hochiminhcity.gov.vn/bao-cau-khoa-hoc-va-cong-nghe/phan-tich-xu-huong-cong-nghe-nam-2014/>
- Shweta ., et al (2023). A brief review on the medicinal uses of *Cordyceps militaris*. *Pharmacological Research - Modern Chinese Medicine*, 7, 100228. <https://doi.org/10.1016/j.prmcm.2023.100228>
- Sornchaithawatwong, C., et al. (2022). Selective extraction of cordycepin from *Cordyceps militaris* – optimisation, kinetics and equilibrium studies. *Indian Chemical Engineer*, 64(1), 1–13. <https://doi.org/10.1080/00194506.2020.1776163>
- Thương N. T. L., Hiệp N. V., & Danh T. D. P. (2016). Năm đông trùng hạ thảo *Cordyceps militaris*: Đặc điểm sinh học, giá trị dược liệu và các yếu tố ảnh hưởng đến quá trình nuôi trồng nấm. *Tạp chí Khoa học Đại học Cần Thơ*, 44. <https://doi.org/10.22144/ctu.jvn.2016.460>
- Thương N. T. L., và cộng sự (2022). 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).
- Wang, H. J., et al (2014). Optimization of Ultrasonic-Assisted Extraction of Cordycepin from *Cordyceps militaris* Using Orthogonal Experimental Design. *Molecules*, 19(12). <https://doi.org/10.3390/molecules191220808>
- Zhang, D., et al (2023). Antimicrobial, antioxidant, anti-inflammatory, and cytotoxic activities of *Cordyceps militaris* spent substrate. *PLOS ONE*, 18(9), e0291363. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0291363>