

Phân lập và tinh chế cordycepin từ quả thể *Cordyceps militaris* nuôi trồng tại Việt Nam

Nguyễn Thanh Ngân^{1*}, Mạc Đình Hùng¹, Trần Văn Tuấn², Vũ Xuân Tạo³

¹Khoa Hoá học, Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, Đại học Quốc gia Hà Nội, 19 Lê Thánh Tông, phường Cửa Nam, Hà Nội, Việt Nam

²Phòng Thí nghiệm Trọng điểm Công nghệ Enzym và Protein, Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, Đại học Quốc gia Hà Nội, Việt Nam

334 Nguyễn Trãi, phường Thanh Xuân, Hà Nội, Việt Nam

³Viện Phát triển công nghệ tiên tiến, Viện Đổi mới sáng tạo Quốc gia, Bộ Khoa học và Công nghệ, Tòa nhà C6 Thanh Xuân Bắc, Phường Thanh Xuân, Hà Nội, Việt Nam

Ngày nhận bài 8/9/2025; ngày chuyển phản biện 10/9/2025; ngày nhận phản biện 19/9/2025; ngày chấp nhận đăng 26/9/2025

Tóm tắt:

Cordycepin (3'-deoxyadenosine) là hợp chất chính có hoạt tính sinh học được tìm thấy trong nấm dược liệu *Cordyceps militaris* (*C. militaris*). Dẫn xuất nucleoside này không chỉ được xem là chỉ thị hóa học quan trọng để đánh giá chất lượng và độ xác thực của các sản phẩm từ *C. militaris*, mà còn có tiềm năng ứng dụng đáng kể trong lĩnh vực dược phẩm. Tuy nhiên, các phương pháp tinh chế cordycepin được công bố trước đây thường có kỹ thuật phức tạp, tốn nhiều thời gian, chi phí cao và hiệu suất thấp. Nghiên cứu này đã xây dựng và tối ưu hoá một quy trình đơn giản và hiệu quả để phân lập và tinh chế cordycepin từ quả thể *C. militaris* nuôi cấy nhân tạo. Quy trình tối ưu này bao gồm sự kết hợp giữa chiết dung môi, sắc ký cột pha thường và loại bỏ tạp chất thông qua kết tủa chọn lọc. Cách tiếp cận tích hợp này cho phép thu hồi cordycepin với độ tinh khiết cao, đã được xác nhận bằng phổ cộng hưởng từ hạt nhân (NMR) và so sánh với dữ liệu tham khảo. Quy trình đạt hiệu suất phân lập đáng kể, đồng thời cho thấy tiềm năng cải thiện hiệu quả thu hồi cordycepin so với một số phương pháp đã được công bố trước đây. Quy trình của nhóm nghiên cứu mang lại giải pháp thực tiễn, có thể mở rộng quy mô và có tiềm năng ứng dụng trong phát triển dược phẩm từ hợp chất đầy hứa hẹn này.

Từ khóa: cordycepin, đồng trùng hạ thảo, sắc ký.

Chỉ số phân loại: 1.4, 2.8, 3.4

Isolation and purification of cordycepin from fruiting bodies of *Cordyceps militaris* cultivated in Vietnam

Thanh Ngan Nguyen^{1*}, Dinh Hung Mac¹, Van Tuan Tran², Xuan Tao Vu³

¹Faculty of Chemistry, VNU University of Science, 19 Le Thanh Tong Street, Cua Nam Ward, Hanoi, Vietnam

²National Key Laboratory of Enzyme and Protein Technology, VNU University of Science, 334 Nguyen Trai Street, Thanh Xuan Ward, Hanoi, Vietnam

³Institute for Advanced Technology Development, National Academy for Advanced Technology and Innovation, Ministry of Science and Technology, C6 Thanh Xuan Bac, Thanh Xuan Ward, Hanoi, Vietnam

Received 8 September 2025; revised 19 September 2025; accepted 26 September 2025

Abstract:

Cordycepin (3'-deoxyadenosine) is the major bioactive compound found in the medicinal fungus *Cordyceps militaris*. This nucleoside analog is not only considered an important chemical marker for evaluating the quality and authenticity of *C. militaris* products, but also possesses significant potential for pharmaceutical applications. However, previously reported methods for cordycepin purification tend to be technically complex, time-consuming, costly, and inefficient. This study successfully developed and optimized a simple and efficient procedure for the isolation and purification of cordycepin from artificially cultivated *C. militaris* fruiting bodies. The optimised protocol involves a combination of solvent extraction, normal-phase column chromatography, and impurity removal through selective precipitation. This integrated approach allows for the recovery of cordycepin with high purity, which was confirmed by nuclear magnetic resonance (NMR) spectroscopy and comparison with reference data. The optimized process provided a substantial isolation yield and demonstrated potential for improving cordycepin recovery compared with selected previously reported methods. Our protocol provides a practical and scalable solution with potential applications in the pharmaceutical development of this promising compound.

Keywords: chromatography, *Cordyceps militaris*, cordycepin.

Classification numbers: 1.4, 2.8, 3.4

*Tác giả liên hệ: Email: nguyenthannhan@hus.edu.vn

1. Đặt vấn đề

Đông trùng hạ thảo *Cordyceps militaris* là một trong những loại thảo dược bổ dưỡng nổi tiếng của y học cổ truyền Trung Quốc trong nhiều thế kỷ, chứa nhiều thành phần có hoạt tính sinh học có thể ứng dụng trong y học, sản phẩm chăm sóc sức khỏe, mỹ phẩm và các lĩnh vực khác [1]. Đông trùng hạ thảo có khoảng 400 loài, phân bố ở những nơi có khí hậu ẩm ướt và cận nhiệt đới [1]. Cho đến nay, *Cordyceps sinensis* và *C. militaris* là những loài nấm được nghiên cứu rộng rãi nhất. Trong khi *C. sinensis* có phạm vi phân bố tự nhiên rất hạn chế, đến nay vẫn khó khăn trong nuôi cấy ở điều kiện nhân tạo, thì *C. militaris* hiện đã được nuôi cấy thành công ở quy mô công nghiệp. Cả *C. militaris* và *C. sinensis* đều chứa các hợp chất có hoạt tính sinh học chính như polysaccharide, cordycepin, adenosine, ergosterol, D-mannitol, axit amin và các nucleoside khác [2, 3]. Trong số đó, cordycepin được coi là một trong những thành phần chuyển hóa thứ cấp có hoạt tính quan trọng của đông trùng hạ thảo. Cấu trúc của cordycepin được xác định là 3'-deoxyadenosine vào năm 1950 [4]. Cordycepin được tìm thấy trong cả phần quả thể và sợi nấm đông trùng hạ thảo, tuy nhiên hàm lượng thu được trong quả thể là vượt trội hơn hẳn so với sợi nấm [5]. Đáng chú ý, hàm lượng cordycepin trong *C. militaris* cao hơn *C. sinensis* từ 2 tới 10 lần, trong khi thành phần polysaccharide và axit amin có sự tương đồng lớn giữa hai loài này [6-10]. Do đó, *C. militaris* có thể thay thế *C. sinensis* trong nhiều ứng dụng dược lý, nhất là khi nguồn *C. sinensis* ngày càng khan hiếm và giá thành cao [9, 11].

Cordycepin đã được chứng minh là có khả năng ức chế sự phát triển của nhiều loại tế bào ung thư, bao gồm ung thư gan, ung thư vú, ung thư phổi, ung thư đại trực tràng bằng cách tác động vào con đường tín hiệu tế bào như MAPK/ERK, PI3K/Akt và kích hoạt quá trình chết theo chương trình (apoptosis) [1]. Không những vậy, cordycepin ức chế các cytokine gây viêm như TNF- α , IL-6 và IL-1 β ; hay có khả năng chống oxy hóa và ngăn ngừa các bệnh lý liên quan đến sự suy giảm chức năng tế bào, bao gồm bệnh tim mạch và tiểu đường [12]. Ngoài ra, dịch chiết ethanol giàu cordycepin của quả thể nấm *C. militaris* chủng *HL8* có khả năng ức chế các dòng ung thư ở người với giá trị IC_{50} trong khoảng 6,41-11,51 μ g/ml, khả năng kháng nấm da *Malassezia* ở nồng độ 7 mg/ml và kháng nấm *Penicillium digitatum* gây mốc hoa quả với nồng độ 1 mg/ml ở các thí nghiệm *in vitro* trước đó

[13]. Với các tác dụng dược lý kể trên, cordycepin được coi là hoạt chất quý giá, tuy nhiên nguồn cung còn hạn chế do giới hạn phân bố địa lý và hàm lượng cordycepin sinh tổng hợp từ tự nhiên không cao. Các nghiên cứu đã được thực hiện nhằm chọn lọc giống nấm và tối ưu các điều kiện nuôi cấy *C. militaris*, tuy nhiên hàm lượng cordycepin chỉ có thể đạt tới 14,43 mg/g quả thể khô [13-15].

Ngoài quả thể và sợi nấm thì một lượng lớn cordycepin cũng được tìm thấy trong cơ chất dùng để lên men nấm ở trạng thái rắn và dịch lên men chìm nấm *C. militaris* [16]. Theo đó, nhiều phương pháp chiết tách cordycepin từ những nguồn này đã được báo cáo, bao gồm chiết dung môi có hỗ trợ đánh sóng siêu âm hoặc vi sóng [17, 18], chiết áp suất [19], chiết Soxhlet và chiết hồi lưu [20]. Nhìn chung, các phương pháp này chủ yếu dựa trên việc chiết ngâm nên còn hạn chế: hiệu suất chiết thấp, cần lượng dung môi lớn và tiêu tốn nhiều năng lượng. Về mặt tinh chế, các phương pháp được báo cáo chủ yếu dựa trên sắc ký trao đổi ion [21], sắc ký hấp phụ [21], hoặc sắc ký hấp phụ kết hợp sắc ký trao đổi ion [22], chiết lỏng-lỏng kết hợp sắc ký cột thường và kết tinh lại [23]. Tuy nhiên, các kỹ thuật này thường có khả năng hấp phụ thấp, hiệu suất thu hồi kém và khó thu được sản phẩm tinh khiết, vì trong *C. militaris* thường chứa nhiều nucleotide và polysaccharide có tính chất phân cực tương tự cordycepin, khó loại bỏ hoàn toàn [24, 25]. Zhou và cs (2016) [26] đã thành công trong việc thu cordycepin tinh khiết cao bằng phương pháp sắc ký lỏng hiệu năng cao pha đảo (reversed-phase HPLC) ở quy mô bán chuẩn bị, nhưng phương pháp này đòi hỏi thiết bị chuyên dụng và chi phí sản xuất lớn. Đáng chú ý phương pháp sắc ký ngược dòng tốc độ cao đã được áp dụng để phân tách và tinh chế nhiều loại dược liệu, trong đó có cordycepin [24, 26-31]. Đây là một dạng kỹ thuật sắc ký phân vùng lỏng - lỏng không sử dụng chất nền hỗ trợ, cố định pha tĩnh lỏng bằng lực ly tâm, loại bỏ sự hấp phụ không thể đảo ngược của mẫu lên chất nền rắn được sử dụng trong cột sắc ký thông thường và có khả năng thu hồi mẫu tốt. Độ tinh khiết cao nhất của sản phẩm được báo cáo đạt tới 98,9% [32]. Tuy nhiên, kỹ thuật này chủ yếu phù hợp cho quy mô chuẩn bị vì nếu áp dụng trên lượng mẫu lớn thì lượng dung môi tiêu thụ tăng đáng kể, kéo theo chi phí xử lý dung môi sau tách chiết. Ngoài ra, không tồn tại công thức chuẩn cho việc lựa chọn hệ dung môi, do đó cần tiến hành khảo sát và tối ưu hóa

hiều tổ hợp dung môi hai pha để đạt hiệu quả mong muốn. Không những vậy, mẫu cần xử lý sơ bộ để loại tạp (ví dụ: chiết dung môi, sắc ký trao đổi ion, điều chỉnh pH) trước khi đưa vào sắc ký ngược dòng tốc độ cao, làm cho quy trình trở nên phức tạp và tốn thời gian hơn. Cũng bởi những khó khăn kể trên trong quá trình phân lập hoạt chất, cordycepin hiện đang được phân phối trên thị trường với giá rất cao (10 mg cordycepin tinh khiết $\geq 98\%$ có giá hơn 4,8 triệu VNĐ, theo Công ty Hoá chất Sigma Aldrich).

Nghiên cứu này đề xuất quy trình tối ưu để phân lập cordycepin từ quả thể nấm *C. militaris* cho hiệu suất và độ tinh khiết cao. Theo đó, cordycepin được tách chiết theo phương pháp sắc ký cột thường và rửa với dung môi phân cực để hoà tan tạp chất. Sản phẩm sau tinh chế được xác định độ tinh khiết bằng các phương pháp đo phổ hiện đại.

2. Vật liệu và phương pháp nghiên cứu

2.1. Nguyên liệu, hóa chất, thiết bị nghiên cứu

Nguyên liệu: Nấm đông trùng hạ thảo (*C. militaris*) được tối ưu nuôi cấy cho hàm lượng cordycepin cao bởi một thành viên nhóm tác giả tại Viện Phát triển công nghệ tiên tiến, Viện Đổi mới sáng tạo Quốc gia. Hàm lượng cordycepin trong quả thể nấm *C. militaris* ban đầu đạt 23,18 mg, được xác định trên hệ thống HPLC theo T.X. Vu và cs (2024) [13]: Quả thể nấm *C. militaris* tươi được sấy khô trên thiết bị sấy thăng hoa ở -40°C tới khi độ ẩm đạt 5%. Mẫu quả thể nấm đã nghiền nhỏ và lọc qua rây được chiết hồi lưu với methanol 80% trong 30 phút. Dịch chiết được lọc qua màng cellulose acetate $0,45\ \mu\text{m}$ để sử dụng cho phân tích HPLC. Hệ thống HPLC sử dụng trong phân tích (Hãng Shimadzu, Nhật Bản) gồm: bơm LC 20AD, bộ tiêm mẫu tự động SIL20A HT, Detector SPD 20A. Sử dụng cột C18 (Agilent) với kích thước cột là $250 \times 4,6\ \text{mm}$ và kích thước hạt $5\ \mu\text{m}$. Tốc độ rửa giải là $0,5\ \text{ml/phút}$, pha động gồm dung môi nước và acetonitril. Nhiệt độ lò cột được đặt ở 25°C . Detector UV được đặt quan sát tại bước sóng $260\ \text{nm}$.

Hóa chất: Các dung môi dichloromethane (CH_2Cl_2), methanol (MeOH), chloroform (CHCl_3) dùng để chiết thu cordycepin thô từ cao chiết quả thể nấm *C. militaris* và kết tủa cordycepin từ hỗn hợp chứa tạp chất.

Thiết bị nghiên cứu: Phổ cộng hưởng từ hạt nhân $^1\text{H-NMR}$ (500 MHz), $^{13}\text{C-NMR}$ (125 MHz) đo trên máy Bruker Avance-500 tại Khoa Hóa học, Trường Đại học

Khoa học Tự nhiên, Đại học Quốc gia Hà Nội. Dung môi khử proton được sử dụng là DMSO-d_6 , chất nội chuẩn là tetramethylsilane (TMS) cho $^1\text{H-NMR}$ và tín hiệu dung môi cho $^{13}\text{C-NMR}$. Cho khoảng 5 mg mẫu vào ống phễu có chứa 0,6 ml DMSO-d_6 . Sắc ký lớp mỏng được thực hiện trên bản mỏng tráng sẵn DC-Aluofolien 60 F245 (Merck 1,05715). Phát hiện vết chất bằng đèn tử ngoại ở bước sóng $254\ \text{nm}$. Sắc ký cột được tiến hành với chất hấp phụ là silicagel Merck, pha thường, cỡ hạt $0,040\text{-}0,063\ \text{mm}$ (240-430 mesh).

2.2. Quy trình chiết và tinh chế cordycepin từ nấm *C. militaris*

Quy trình xử lý mẫu và chiết xuất: 100 g quả thể đông khô của nấm đông trùng hạ thảo *C. militaris* sau khi nghiền nhỏ được ngâm chiết trong 1 l MeOH ở nhiệt độ phòng trong 3 ngày. Dịch chiết được lọc qua giấy lọc, phần cặn tiếp tục ngâm thêm hai lần nữa với MeOH theo quy trình trên. Dịch lọc gộp lại đem cô quay thu được 17,455 g cao chiết MeOH.

Quy trình phân lập cordycepin thô: Từ cao chiết MeOH, tiến hành sắc ký cột silica gel với hệ dung môi rửa giải $\text{CH}_2\text{Cl}_2\text{:MeOH}$ (9:1, v/v) thu được 6 phân đoạn, ký hiệu F1-F6. Khảo sát sơ bộ bằng sắc ký bản mỏng, đối chiếu với chất chuẩn cordycepin đã xác định được hợp chất này có mặt trong F6. Thu lấy phân đoạn F6, cô quay dưới áp suất giảm thu được chất rắn màu vàng nhạt (3,263 g).

Quy trình tinh chế cordycepin: Làm sạch hợp chất F6 bằng cách hoà phần chất rắn này với hệ dung môi $\text{CHCl}_3\text{:MeOH}$ (1:1, v/v) thu được kết tủa màu trắng, ký hiệu là F6.1 (0,424 g) và phần dịch lọc màu vàng nâu, ký hiệu là F6.2.

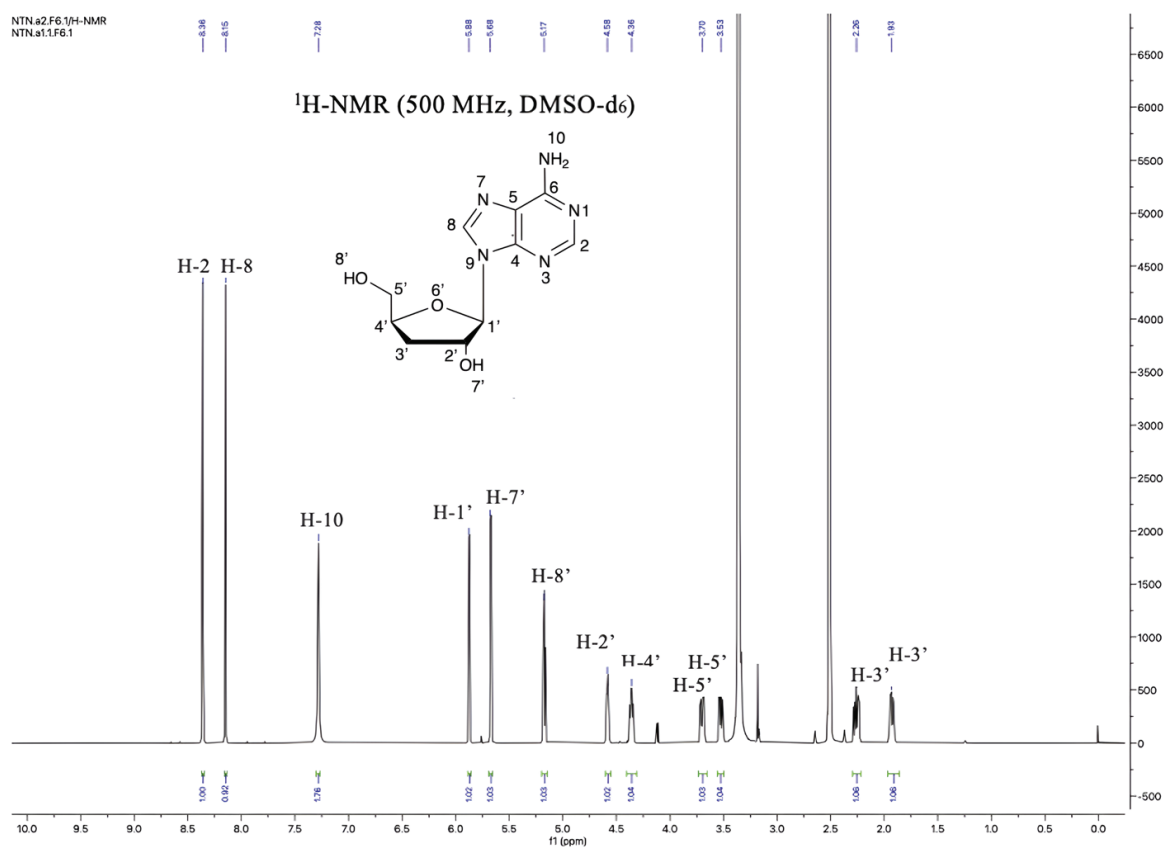
3. Kết quả và bàn luận

3.1. Dữ liệu phổ

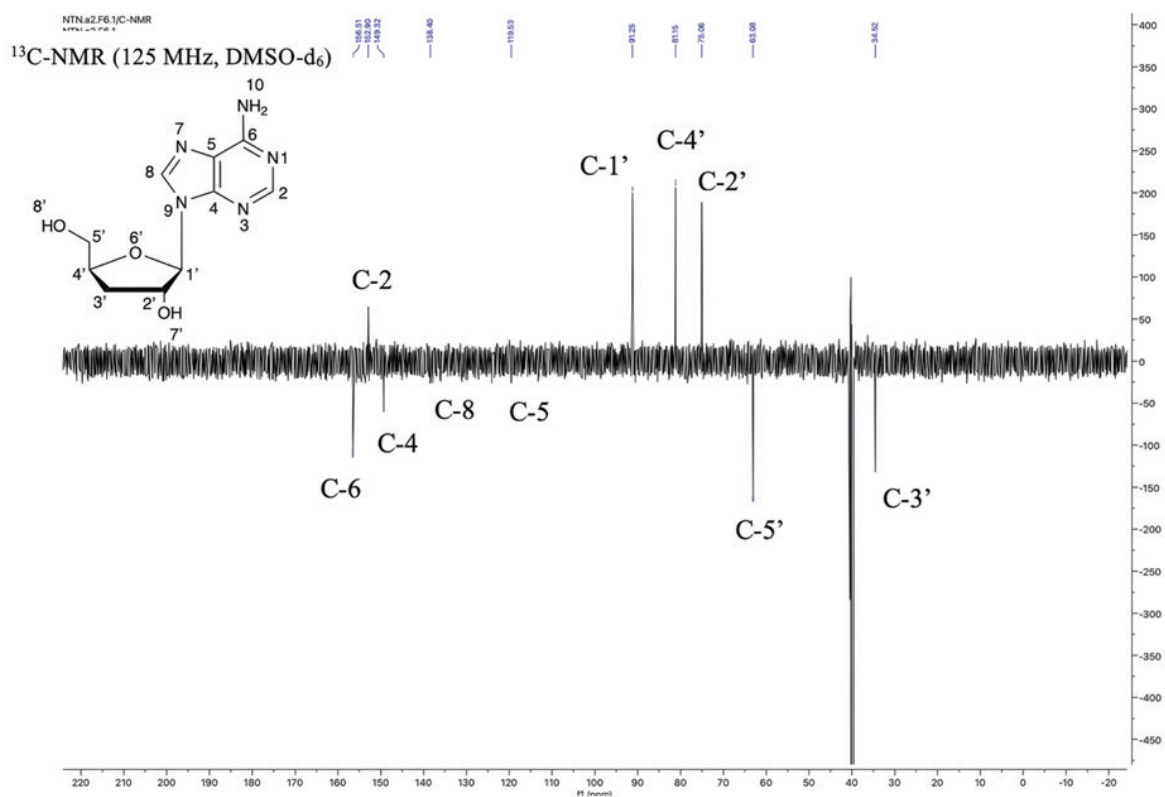
Hợp chất F6.1: Dạng bột màu trắng, tan tốt trong DMSO, dữ liệu phổ $^1\text{H-NMR}$ và $^{13}\text{C-NMR}$ thu được như hình 1 và hình 2:

$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, DMSO) δ 8,36 (s, 1H), 8,15 (s, 1H), 7,28 (s, 2H), 5,88 (d, $J=2,4\ \text{Hz}$, 1H), 5,68 (d, $J=4,3\ \text{Hz}$, 1H), 5,17 (dd, $J=6,1, 5,1\ \text{Hz}$, 1H), 4,62-4,55 (m, 1H), 4,36 (ddd, $J=9,7, 6,8, 3,6\ \text{Hz}$, 1H), 3,70 (ddd, $J=12,0, 5,2, 3,3\ \text{Hz}$, 1H), 3,53 (ddd, $J=12,0, 6,1, 3,9\ \text{Hz}$, 1H), 2,26 (ddd, $J=13,1, 8,6, 5,8\ \text{Hz}$, 1H), 1,93 (ddd, $J=13,0, 6,3, 3,3\ \text{z}$, 1H).

$^{13}\text{C-NMR}$ (125 MHz, DMSO) δ 156,51, 152,90, 149,32, 138,40, 119,53, 91,25, 81,15, 75,06, 63,08, 34,52.



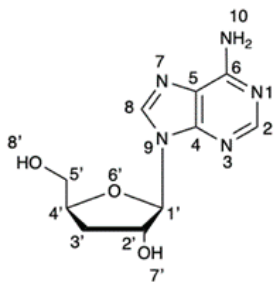
Hình 1. Phổ $^1\text{H-NMR}$ của hợp chất F6.1.



Hình 2. Phổ $^{13}\text{C-NMR}$ của hợp chất F6.1.

Phổ ^1H -NMR của hợp chất F6.1 cho thấy, hai tín hiệu δ_{H} 8,36 ppm (s, 1H) và 8,15 ppm (s, 1H) là các tín hiệu singlet đặc trưng cho proton ở vị trí C-2 và C-8 của vòng purine. Vị trí này thường có độ dịch chuyển hóa học lớn do ảnh hưởng của hệ vòng thơm. Trong đó, proton H-2 vì bị ảnh hưởng khử che chắn mạnh từ hai nitơ kế cận (N-1 và N-3) trong vòng pyrimidine, nên tương ứng với tín hiệu δ 8,36 ppm, còn H-8 ở δ 8,15 ppm chỉ nằm cạnh N-7 (có tính hút electron) và N-9 (nối glycosidic với đường, hút electron yếu hơn), nên hiệu ứng khử che chắn tổng thể nhỏ hơn, dẫn tới tín hiệu dịch chuyển hóa học thấp hơn H-2. Sự có mặt của hai proton từ nhóm amino ($-\text{NH}_2$) gắn vào vòng purine đặc trưng bởi tín hiệu tại δ_{H} 7,28 ppm (s, 2H). Sự xuất hiện của một phân tử đường ribose cũng được xác định trên phổ ^1H -NMR bởi tín hiệu proton anomer tại δ_{H} 5,88 (d, $J=2,4$ Hz, 1H), giá trị $J=2,4$ Hz phù hợp với cấu hình β . Các tín hiệu proton tại δ_{H} 5,68 ppm (d, $J=4,3$ Hz, 1H) và δ_{H} 5,17 ppm (dd, $J=6,1, 5,1$ Hz, 1H) đặc trưng cho nhóm hydroxyl lần lượt gắn với C-7' và C-8'. Tín hiệu ở δ_{H} 4,62-4,55 (m, 1H) và 4,36 (ddt, $J=9,7, 6,8, 3,6$ Hz, 1H) lần lượt là 2 proton gắn với C-2' và C-4' của đường ribose, do gần với nguyên tử oxy âm điện nên dịch chuyển về vùng trường cao. Cặp tín hiệu δ_{H} 3,70 và 3,53 là 2 proton cùng gắn với C-5' của đường ribose, carbon này gắn trực tiếp với nhóm hydroxyl nên cho tín hiệu proton cộng hưởng ở vùng trường thấp hơn so với 2 proton δ_{H} 2,26 (ddd, $J=13,1, 8,6, 5,8$ Hz, 1H) và δ_{H} 1,93 (ddd, $J=13,0, 6,3, 3,3$ Hz, 1H) cùng gắn với C-3'.

Phổ ^{13}C -NMR cho thấy, sự xuất hiện tín hiệu của 10 carbon trong đó có 3 carbon không liên kết trực tiếp với hydro tại δ_{C} 119,53 (C-5); 149,32 (C-4); 156,51 (C-6). Ngoài ra, có sự xuất hiện của 5 nhóm methine ($-\text{CH}$) tại δ_{C} 75,06 (C-2'); 81,15 (C-4'); 91,25 (C-1'); 138,40 (C-8); 152,90 (C-2) và hai tín hiệu δ_{C} 34,52 (C-3'), 63,08 (C-5') đặc trưng của 2 nhóm methylene ($-\text{CH}_2$). Các tín hiệu này là phù hợp với dữ liệu đã quan sát thấy trên phổ ^1H -NMR với 5 nguyên tử carbon vùng trường cao của đường ribose và các tín hiệu vùng trường thấp thuộc về vòng thơm purine.



Hình 3. Cấu trúc hoá học của hợp chất F6.1.

Từ những dữ kiện phổ NMR và đối chiếu với tài liệu tham khảo cho phép xác định cấu trúc hoá học của hợp chất F6.1 (hình 3) tương đồng với hợp chất cordycepin đã được phân lập từ đông trùng hạ thảo [33] (bảng 1).

Bảng 1. So sánh dữ liệu phổ NMR của hợp chất F6.1 và cordycepin theo tài liệu [33].

Vị trí	$\delta_{\text{C}}^{\#}$	δ_{C} (ppm)	$\delta_{\text{H}}^{\#}$	δ_{H} (J, Hz)	Quy kết
2	152,4	152,90	8,35 (s)	8,36 (s)	
4	148,9	149,32	-	-	
5	119,1	119,53	-	-	
6	156,0	156,51	-	-	
8	139,0	138,40	8,14 (s)	8,15 (s)	
10			7,28 (s)	7,28 (s)	$-\text{NH}_2$
1'	90,8	91,25	5,87 (d, 2,4)	5,88 (d, 2,4)	
2'	74,5	75,06	4,59 (m)	4,58 (m)	
3'	34,1	34,52	2,26 (m) 1,96 (m)	2,26 (ddd, 13,1, 8,6, 5,8) 1,93 (ddd, 13,0, 6,3, 3,3)	
4'	80,6	81,15	4,35 (m)	4,36 (ddt, 9,7, 6,8, 3,6)	
5'	62,6	63,08	3,67 (m) 3,53 (m)	3,70 (ddd, 12,0, 5,2, 3,3) 3,53 (ddd, 12,0, 6,1, 3,9)	
7'				5,68 (d, 4,3)	$-\text{OH}$
8'				5,17 (dd, 6,1, 5,1)	$-\text{OH}$

$^{\#}\delta_{\text{C}}$ và $^{\#}\delta_{\text{H}}$ của cordycepin [33], đo trong $\text{DMSO}-d_6$

3.2. Kết quả tinh chế cordycepin

Các phương pháp sắc ký đã được sử dụng để chiết tách cordycepin bao gồm: sắc ký silica gel, sắc ký hấp phụ, sắc ký loại trừ kích thước. Tuy nhiên, đây chỉ là bước tiền xử lý, thực tế cần thêm các bước làm tinh chế (ví dụ, sắc ký trao đổi ion, sắc ký cột pha đảo, sắc ký polyamide, sắc ký ngược dòng tốc độ cao, kết tinh lại, rửa kết tủa) để thu được sản phẩm tinh khiết. Gần đây, một nhóm nghiên cứu tại Nhật Bản đã công bố quy trình phân lập cordycepin từ quả thể của *C. militaris* bằng phương pháp chiết phân bố lỏng - lỏng kết hợp sắc ký cột thường và kết tinh để thu sản phẩm có độ tinh khiết cao [23]. Theo đó, các phân đoạn có chứa hợp chất mong muốn sau khi sắc ký cột được hoà trong hệ dung môi $\text{CHCl}_3:\text{MeOH}$ (1:1, v/v). Dịch lọc thu được đem cô quay dưới áp suất giảm thu được phần rắn thô, sau đó thực hiện kết tinh với hệ dung môi $\text{EtOAc}:\text{MeOH}$ (3:7, v/v). Tinh thể thu được đem rửa với dung môi chứa CHCl_3 , ethyl acetate (EtOAc) và MeOH (6:2:2, v/v/v) để loại tạp chất.

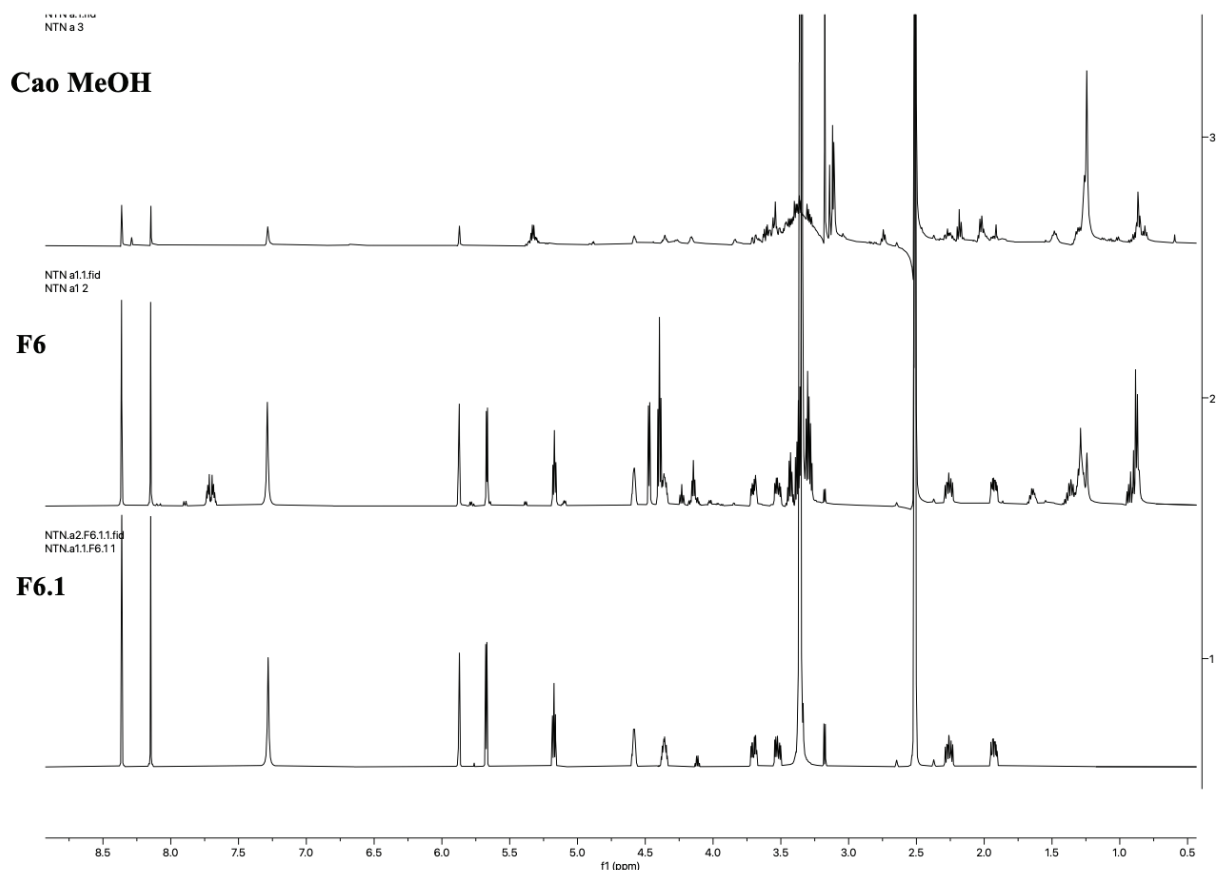
Trong thí nghiệm của chúng tôi, phần rắn sau khi sắc ký cột silica gel chỉ hoà tan một phần trong hệ dung môi $\text{CHCl}_3:\text{MeOH}$ (1:1, v/v). Sau khi lọc thu được phần rắn có màu trắng, phân tích bằng phổ $^1\text{H-NMR}$ và $^{13}\text{C-NMR}$ cho dữ liệu phù hợp với hợp chất cordycepin theo Z.G. Chen và cs (2013) [33]. Sự khác biệt giữa thực nghiệm và báo cáo trước đó có thể được giải thích dựa vào độ tan của cordycepin. Thông thường, độ tan của cordycepin ở 25°C là khoảng 7 mg/ml [34]. Khi nhiệt độ giảm, độ tan cũng giảm dần. Nếu nồng độ cordycepin trong dung dịch vượt quá giới hạn hòa tan thì tinh thể sẽ xuất hiện. Như vậy, độ tan của cordycepin là rất ít nên có thể dùng hệ dung môi $\text{CHCl}_3:\text{MeOH}$ với tỷ lệ chọn lọc để rửa sạch kết tủa. Khi đó, một phần cordycepin tan trong dung dịch rửa cũng sẽ bị rửa trôi, nhưng bù lại, độ tinh khiết của sản phẩm sẽ tăng lên. Bên cạnh đó, nếu mẫu ban đầu chưa được xử lý kỹ thì các polysaccharide, protein, và tạp chất khác tồn tại trong mẫu cũng sẽ ảnh hưởng tới sự sắp xếp mạng lưới tinh thể và độ tan của cordycepin. Do đó, phần lớn cordycepin có thể không kết tinh bình thường mà hoà tan vào dịch rửa [35].

Phương pháp kết tủa để tăng độ tinh khiết của sản phẩm đã được chứng minh tính hiệu quả bằng cách đối chiếu dữ liệu phổ $^1\text{H-NMR}$ của cao chiết MeOH, hợp chất

F6 và F6.1 (hình 4). Có thể quan sát thấy, các peak tạp chất ở cao chiết MeOH ban đầu đã được loại bỏ hiệu quả sau bước sắc ký cột thường (thể hiện trên phổ $^1\text{H-NMR}$ của hợp chất F6) và đặc biệt sau bước kết tủa, đã thu được cordycepin chứa rất ít tạp chất. Đặc biệt, tín hiệu tại δH 5,68 (d, $J=4,3$ Hz, 1H) đặc trưng cho nhóm hydroxyl gắn với C-2' chỉ quan sát được trên phổ proton của hợp chất F6 và F6.1, nhưng không xuất hiện trên phổ proton của cao chiết MeOH. Điều này có thể giải thích rằng, hàm lượng cordycepin sau quá trình chiết và tinh chế đã được làm giàu so với trong cao chiết lần đầu, các tạp chất cũng được loại bỏ hiệu quả khi đối chiếu phổ proton của hợp chất F6 và F6.1, chứng minh tính hiệu quả của quá trình làm sạch sản phẩm thông qua một bước rửa kết tủa.

3.3. Kết quả hiệu suất phân lập và thu hồi

Theo kết quả đo HPLC, hàm lượng cordycepin tính trên mẫu quả thể khô kiệt ban đầu là 23,18 mg/g, tức là trong 100 g mẫu quả thể khô ban đầu có chứa 2,318 g cordycepin. Mặt khác, thông qua sắc ký cột thường kết hợp loại bỏ tạp chất bằng phương pháp rửa kết tủa, lượng cordycepin tinh khiết thu được là 0,424 g. Như vậy, hiệu suất thu hồi đạt 18,29%. Bên cạnh đó, quy trình phân lập và tinh chế đạt hiệu suất thu hồi cordycepin



Hình 4. So sánh phổ $^1\text{H-NMR}$ của cao chiết MeOH, hợp chất F6 và F6.1 theo thứ tự từ trên xuống dưới.

0,424%, cao hơn đáng kể so với các quy trình đã được báo cáo trước đây, bao gồm phương pháp sắc ký cột kết hợp kết tinh lại (0,04%) [23] và phương pháp kết hợp sắc ký lỏng siêu tới hạn với sắc ký ngược dòng tốc độ cao (0,18%) [36]. Tuy nhiên, cũng cần lưu ý rằng chất lượng quả thể ban đầu (bao gồm giống nấm, môi trường nuôi cấy, giai đoạn sinh trưởng) có ảnh hưởng tới khả năng sinh tổng hợp cordycepin, và từ đó ảnh hưởng tới hiệu suất thu hồi sản phẩm.

4. Kết luận

Nghiên cứu này đã cải tiến quy trình phân lập và tinh chế cordycepin từ quả thể nấm *C. militaris*, hướng tới nâng cao hiệu suất thu hồi và độ tinh khiết của sản phẩm. Khác với các nghiên cứu trước đây chủ yếu tập trung vào tối ưu hóa các điều kiện chiết tách và định lượng cordycepin trong dịch chiết, quy trình hiện tại hướng đến thu nhận trực tiếp cordycepin ở dạng rắn thông qua sự kết hợp có hệ thống giữa các bước chiết dung môi, sắc ký cột làm giàu phân đoạn chứa cordycepin và các bước tinh chế tiếp theo. Quy trình đạt hiệu suất thu hồi 0,424% và tạo ra sản phẩm có độ tinh khiết cao, được xác nhận bằng phổ $^1\text{H-NMR}$ và $^{13}\text{C-NMR}$. Quy trình có tiềm năng ứng dụng trên quy mô lớn đối với nhiều hợp chất tự nhiên khác. Bên cạnh đó, nghiên cứu đề xuất cần tiếp tục đánh giá hoạt tính sinh học của cordycepin phân lập, làm cơ sở cho việc phát triển các hợp chất dẫn đường trong tổng hợp dược phẩm.

LỜI CẢM ƠN

Nghiên cứu này được tài trợ bởi đề tài mã số TN.24.07 của Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, Đại học Quốc gia Hà Nội. Nhóm tác giả xin trân trọng cảm ơn.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] S.Y. Yoon, S.J. Park, Y.J. Park (2018), "The anticancer properties of cordycepin and their underlying mechanisms", *International Journal of Molecular Sciences*, **19**(10), DOI: 10.3390/ijms19103027.
- [2] K.J. Jędrejko, J. Lazur, B. Muszyńska (2021), "Cordyceps militaris: An overview of its chemical constituents in relation to biological activity", *Foods*, **10**(11), DOI: 10.3390/foods10112634.
- [3] L.U. Maľučká, A. Uhrinová, P. Lysinová (2022), "Medicinal mushrooms *Ophiocordyceps sinensis* and *Cordyceps militaris*", *Ceska a Slovenska Farmacie: Casopis Ceske Farmaceuticke Spolecnosti a Slovenske Farmaceuticke Spolecnosti*, **71**(6), pp.259-265.
- [4] K.G. Cunningham, W. Manson, F.S. Spring, et al. (1950), "Cordycepin, a metabolic product isolated from cultures of *Cordyceps militaris* (Linn.) Link", *Nature*, **166**, DOI: 10.1038/166949a0.

- [5] T.N.H. Lai (2024), "Nutritional and medicinal value of cultivated *Cordyceps militaris*", *Vietnam National University of Agriculture*, <https://vnua.edu.vn/tin-tuc-su-kien/nguyen-cuu-khoa-hoc/gia-tri-dinh-duong-va-duoc-lieu-cua-dong-trung-ha-thao-nuoi-trong-cordyceps-militaris-55631>, accessed 20 November 2024 (in Vietnamese).

- [6] L. Huang, Q.Z. Li, Y. Chen, et al. (2009), "Determination and analysis of cordycepin and adenosine in the products of *Cordyceps* spp.", *African Journal of Microbiology Research*, **3**(12), pp.957-961.

- [7] K. Yue, M. Ye, Z. Zhou, et al. (2013), "The genus *Cordyceps*: A chemical and pharmacological review", *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, **65**(4), pp.474-493, DOI: 10.1111/j.2042-7158.2012.01601.x.

- [8] H. Zhang, H.M. Zhang, L. Han, et al. (2014), "Cultivation technique of selenium-enriched *Cordyceps militaris*", *Applied Mechanics and Materials*, **522-524**, pp.1147-1150, DOI: 10.4028/www.scientific.net/AMM.522-524.1147.

- [9] Y. Liu, K. Xiao, Z. Wang, et al. (2021), "Comparison of metabolism substances in *Cordyceps sinensis* and *Cordyceps militaris* cultivated with tussah pupa based on LC-MS", *Journal of Food Biochemistry*, **45**(6), DOI: 10.1111/jfbc.13735.

- [10] V.K. Kondapalli, A. Malaviya (2024), "Comparison of cultivated *Cordyceps militaris* and wild *Ophiocordyceps sinensis* using high-performance thin-layer chromatography", *Research Journal of Biotechnology*, **19**(12), pp.163-170, DOI: 10.25303/1912rjbt1630170.

- [11] A.T. Anyu, W.H. Zhang, Q.H. Xu (2021), "Cultivated Cordyceps: A tale of two treasured mushrooms", *Chinese Medicine and Culture*, **4**(4), pp.221-227, DOI: 10.4103/CMAC.CMAC_41_21.

- [12] H.S. Tuli, S.S. Sandhu, A.K. Sharma (2014), "Pharmacological and therapeutic potential of *Cordyceps* with special reference to *Cordycepin*", *3 Biotech*, **4**(1), pp.1-12, DOI: 10.1007/s13205-013-0121-9.

- [13] T.X. Vu, T.B. Tran, H.H. Vu, et al. (2024), "Ethanol extract from fruiting bodies of *Cordyceps militaris* HL8 exhibits cytotoxic activities against cancer cells, skin pathogenic yeasts, and postharvest pathogen *Penicillium digitatum*", *Archives of Microbiology*, **206**(3), DOI: 10.1007/s00203-024-03833-8.

- [14] T.T. Thy (2019), "Study on solid medium to increase cordycepin and adenosine content of *Cordyceps militaris* mushroom", *Can Tho University Journal of Science*, **55**(Special Issue: Biotechnology), pp.27-33, DOI: 10.22144/ctu.jsi.2019.040 (in Vietnamese).

- [15] K.Y. Huynh, B.T. Le, T.Y. Vu, et al. (2024), "Evaluation of cordycepin and adenosine content of *Cordyceps militaris* cultivated on organic medium", *Journal of Industry and Trade*, <https://tapchicongthuong.vn/danh-gia-ham-luong-cordycepin-va-adenosin-cua-cordyceps-militaris-nuoi-trong-tren-moi-truong-huu-co-122258.htm>, accessed 10 October 2024 (in Vietnamese).

- [16] L. Wang, H. Yan, B. Zeng, et al. (2022), "Research progress on cordycepin synthesis and methods for enhancement of cordycepin production in *Cordyceps militaris*", *Bioengineering*, **9**(2), DOI: 10.3390/bioengineering9020069.
- [17] J. Song, C. Liu, D. Li, et al. (2007), "Optimization of cordycepin extraction from cultured *Cordyceps militaris* by HPLC-DAD coupled with uniform design", *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*, **82**(12), pp.1122-1126, DOI: 10.1002/jctb.1784.
- [18] T.P.T. Doan, T.N.A. Tran, T.M. Nguyen (2018), "Study on the effect of extraction conditions on the extraction efficiency of cordycepin from *Cordyceps militaris* Linn. Link", *Ho Chi Minh City Open University Journal of Science*, **13**(1), pp.106-115, DOI: 10.46223/HCMCOUJS.tech.vi.13.1.795.2018 (in Vietnamese).
- [19] F.Q. Yang, S.P. Li (2008), "Effects of sample preparation methods on the quantification of nucleosides in natural and cultured *Cordyceps*", *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, **48**(1), pp.231-235, DOI: 10.1016/j.jpba.2008.05.012.
- [20] H. Ni, X.H. Zhou, H.H. Li, et al. (2009), "Column chromatographic extraction and preparation of cordycepin from *Cordyceps militaris* waste medium", *Journal of Chromatography B*, **877**(22), pp.2135-2141, DOI: 10.1016/j.jchromb.2009.06.009.
- [21] W. Zhang, B. Li, X. Dong, et al. (2017), "Enzyme-assisted extraction of cordycepin and adenosine from cultured *Cordyceps militaris* and purification by macroporous resin column chromatography", *Separation Science and Technology*, **52**(8), pp.1350-1358, DOI: 10.1080/01496395.2017.1287736.
- [22] Z. Jing, T. Tuernisan, Z. Zhong, et al. (2019), "Separation and purification of cordycepin by macroporous resin coupled with KB - 2 microsphere column chromatography", *Acta Edulis Fungi*, **35**(02), pp.65-71, DOI: 10.16488/j.cnki.1005-9873.2019.02.010.
- [23] N.V. Quan, Y. Iuchi, L.H. Anh, et al. (2022), "Simple isolation of cordycepin from *Cordyceps militaris* by dual-normal phase column chromatography and its potential for making kombucha functional products", *Separations*, **9**(10), DOI: 10.3390/separations9100290.
- [24] X. Zhou, Z. Gong, Y. Su, et al. (2009), "Two-step purification of cordycepin from *Cordyceps militaris* by high-speed counter-current chromatography", *Journal of Chromatography B*, **877**(17-18), pp.1751-1757, DOI: 10.1016/j.jchromb.2009.04.033.
- [25] Z. Hu, J. Wang, L. Jin, et al. (2022), "Preparation, characterization and anti-complementary activity of three novel polysaccharides from *Cordyceps militaris*", *Polymers*, **14**(21), pp.4636, DOI: 10.3390/polym14214636 (in Chinese).
- [26] X. Zhou, G. Cai, Y. He et al. (2016), "Separation of Cordycepin from *Cordyceps militaris* fermentation supernatant using preparative HPLC and evaluation of its antibacterial activity as an NAD+-dependent DNA ligase inhibitor". *Experimental and Therapeutic Medicine*, **12**(3), pp.1812-1816, DOI: 10.3892/etm.2016.3536.
- [27] D. He, Y. Huang, A. Ayupbek, et al. (2010), "Separation and purification of flavonoids from black currant leaves by high-speed countercurrent chromatography and preparative HPLC", *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*, **33**(5), pp.615-628, DOI: 10.1080/10826071003608447.
- [28] L. Niu, Z. Xie, T. Cai, et al. (2011), "Preparative isolation of alkaloids from *Corydalis bungeana* Turcz. by high-speed counter-current chromatography using stepwise elution", *Journal of Separation Science*, **34**(9), pp.987-994, DOI: 10.1002/jssc.201000785.
- [29] H. Li, Y. Zhang, Q. Liu, et al. (2016), "Preparative separation of phenolic compounds from *Chimonanthus praecox* flowers by high-speed counter-current chromatography using a stepwise elution mode", *Molecules (Basel, Switzerland)*, **21**(8), DOI: 10.3390/molecules21081016.
- [30] L. Fang, H. Zhang, J. Zhou, et al. (2018), "Rapid screening and preparative isolation of antioxidants from *Alpinia officinarum* hance using HSCCC coupled with DPPH-HPLC assay and evaluation of their antioxidant activities", *Journal of Analytical Methods in Chemistry*, **2018**, DOI: 10.1155/2018/3158293.
- [31] F. Yang, Y. Qi, W. Liu, et al. (2019), "Separation of five flavonoids from aerial parts of *Salvia miltiorrhiza* Bunge using HSCCC and their antioxidant activities", *Molecules*, **24**(19), DOI: 10.3390/molecules24193448.
- [32] X. Huichun, Y. Liang, D. Lao, et al. (2011), "Preparative separation of high-purity cordycepin from *Cordyceps militaris* (L.) Link by high-speed counter current chromatography", *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*, **34**(7), pp.491-499, DOI: 10.1080/10826076.2011.556965.
- [33] Z.G. Chen, D.N. Zhang, L. Cao, et al. (2013), "Highly efficient and regioselective acylation of pharmacologically interesting cordycepin catalyzed by lipase in the eco-friendly solvent 2-methyltetrahydrofuran", *Bioresource Technology*, **133**, pp.82-86, DOI: 10.1016/j.biortech.2013.01.117.
- [34] M. Masuda, M. Hatashita, S. Fujihara, et al. (2015), "Simple and efficient isolation of cordycepin from culture broth of a *Cordyceps militaris* mutant", *Journal of Bioscience and Bioengineering*, **120**(6), pp.732-735, DOI: 10.1016/j.jbiosc.2015.04.008.
- [35] P. Liu, J. Ma, R. Liang, et al. (2023), "Development of an efficient method for separation and purification of cordycepin from liquid fermentation of *Cordyceps militaris* and analysis of cordycepin antitumor activity", *Heliyon*, **9**(3), DOI: 10.1016/j.heliyon.2023.e14184.
- [36] J.Y. Ling, G.Y. Zhang, J.Q. Lin, et al. (2009), "Supercritical fluid extraction of cordycepin and adenosine from *Cordyceps kyushuensis* and purification by high-speed counter-current chromatography", *Separation and Purification Technology*, **66**(3), pp.625-629, DOI: 10.1016/j.seppur.2008.12.022.