

NGHIÊN CỨU ĐIỀU CHẾ HỆ NANO LIPOSOME BAO GÓI DỊCH CHIẾT NẤM *Cordyceps militaris* BẰNG PHƯƠNG PHÁP HYDRATE MÀNG

NGUYỄN QUỲNH DAO^{1,2}, NGUYỄN BÁ THANH^{1*}, TRẦN QUANG HIẾU^{2,3*}

¹*Viện Công nghệ Sinh học Thực phẩm, Trường Đại học Công nghiệp Tp.HCM, 12 Nguyễn Văn Bảo, Gò Vấp, Tp.HCM*

²*Khoa Công nghệ thực phẩm, Trường Đại học Công nghệ Sài Gòn, 180 Cao Lỗ, Q.8, Tp.HCM*

³*Ban Khoa học Cơ Bản, Trường Đại học Công nghệ Sài Gòn, 180 Cao Lỗ, Q.8, Tp.HCM*

*Tác giả liên hệ: thanhngba@iuh.edu.vn, hieu.tranquang@stu.edu.vn

DOIs: <https://www.doi.org/10.46242/jstiuh.v75i3.5452>

TÓM TẮT. Trong nghiên cứu này, một quy trình điều chế nano liposome bao bọc dịch chiết nấm *Cordyceps militaris* bằng phương pháp hydrat hóa màng đã được thực hiện. Dịch trích nấm được thu nhận bằng phương pháp trích ly có hỗ trợ siêu âm với nước làm dung môi và được bao gói trong hệ nano liposome. Các yếu tố ảnh hưởng đến hiệu quả bao gói và kích thước hạt của hệ thống nano đã được nghiên cứu. Các đặc tính của hệ nano được xác định bằng các kỹ thuật như Phân tán ánh sáng động (DLS), Kính hiển vi điện tử truyền qua (TEM) và Phân tích điện thế Zeta. Kết quả cho thấy nồng độ lecithin tối ưu là 1:40 (w/v), với hiệu quả bao bọc đối với các hợp chất hoạt tính ADE đạt $73,3 \pm 1,5\%$ và COR đạt $76,0 \pm 5,9\%$. Công suất đồng nhất hóa tối ưu được tìm thấy là 12.000 vòng/phút, với thời gian đồng nhất hóa là 10 phút. Hệ nano liposome thu được đạt kích thước hạt trung bình là $128,3 \pm 4,2$ nm, với thế Zeta là -24,5 mV. Những phát hiện của nghiên cứu này làm nổi bật tiềm năng đa dạng hóa các sản phẩm có nguồn gốc từ *Cordyceps militaris* để nâng cao giá trị của loại nấm dược liệu quý này.

Từ khóa: *Cordyceps militaris*, nano liposome, hydrate màng, bao gói

1. GIỚI THIỆU

Trong những năm gần đây, công nghệ nano đã mở ra nhiều hướng đi mới trong lĩnh vực dược phẩm và thực phẩm, đặc biệt trong việc cải thiện khả năng sinh khả dụng của các hoạt chất sinh học [1,2]. Trong số các công nghệ này, hệ thống nano liposome đã được chứng minh là một công nghệ nhiều tiềm năng nhờ khả năng bảo vệ và vận chuyển hiệu quả các hợp chất sinh học, từ đó nâng cao khả năng hấp thu vào cơ thể [3]. Nano liposome là những hạt nano có kích thước nhỏ hơn 200 nanomet, được cấu tạo từ phospholipid và có khả năng hình thành các màng lipid tương tự như màng tế bào sinh học. Nhờ đặc tính này, chúng có thể chứa các hoạt chất cả trong lòng (dịch bên trong) và trên bề mặt, giúp tăng cường khả năng vận chuyển và sinh khả dụng của chúng [4,5].

Nấm *Cordyceps militaris*, một loại nấm dược liệu quý hiếm, đã được sử dụng trong y học truyền thống ở nhiều quốc gia và đang thu hút sự quan tâm của cộng đồng nghiên cứu hiện đại. Các nghiên cứu trước đây đã chỉ ra rằng loại nấm này chứa nhiều hợp chất có lợi như polysaccharides, cordycepin và adenosine, có khả năng tăng cường hệ miễn dịch, chống viêm và ngăn chặn một số loại ung thư [6,7]. Tuy nhiên, việc hấp thu hiệu quả các hoạt chất này từ nấm còn gặp nhiều khó khăn do độ hòa tan thấp và tính không ổn định của chúng trong môi trường axit dạ dày. Do đó, việc ứng dụng công nghệ nano để cải thiện khả năng hấp thu và bảo quản các hoạt chất này là một giải pháp đầy tiềm năng. Đặc biệt, việc sử dụng nano liposome không chỉ giúp nâng cao khả năng sinh khả dụng mà còn mở ra nhiều cơ hội phát triển các sản phẩm chức năng và dược phẩm mới từ nguồn gốc tự nhiên.

Trong số các phương pháp điều chế nano liposome đã được sử dụng như phương pháp tiêm dung môi [8], phương pháp ép đùn [9], thì phương pháp hydrate màng, một kỹ thuật phổ biến trong điều chế nano liposome, có thể tạo ra các hạt liposome nhỏ gọn và đồng nhất [4,10]. Phương pháp này dựa trên nguyên lý khi các phospholipid được hòa tan trong dung môi hữu cơ và sau đó phân tán với dung dịch chứa hoạt chất cần bao bọc ở điều kiện thích hợp sẽ giúp các màng phospholipid tự sắp xếp thành các túi cầu liposome bao quanh hoạt chất. Quá trình này không chỉ bảo vệ hoạt chất mà còn tăng cường tính khả dụng sinh học của chúng khi vào cơ thể.

Trong nghiên cứu này, chúng tôi đã điều chế thành công hệ nano liposome vi bao dịch nấm *Cordyceps militaris*. Các yếu tố ảnh hưởng đến hiệu suất vi bao và kích thước hạt đã được khảo sát đầy đủ.

Chúng tôi hy vọng rằng kết quả từ nghiên cứu này không chỉ cung cấp thêm thông tin tham khảo cho cộng đồng khoa học mà còn có thể ứng dụng thực tiễn trong cuộc sống. Những kết quả đạt được có thể mở ra hướng phát triển mới trong lĩnh vực công nghệ nano và thực phẩm chức năng, góp phần đa dạng hóa các sản phẩm từ nấm *Cordyceps militaris*.

2. NGUYÊN LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

2.1. Nguyên liệu, hoá chất và thiết bị

Nấm *Cordyceps militaris* có nguồn gốc từ công ty TNHH Đông Trùng Hạ Thảo Thiên Ân (Gò Công Tây, Tiền Giang, Việt Nam). Lecithin, Tween 80 được cung cấp bởi Macklin (Trung Quốc); dichloromethane, ethanol, diethyl eter, trolox, 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl có xuất xứ từ Sigma (Merck, Đức) và các hóa chất khác đạt tiêu chuẩn dùng trong phân tích.

Thiết bị được sử dụng bao gồm bể siêu âm Ultrasound CB S-100H (Đức), thiết bị đo điện thế bề mặt Zetasizer ZS90 (Malvern - Anh), máy đo kích thước hạt Horiba SZ-100 (Nhật Bản), thiết bị sắc ký lỏng hiệu năng cao UHPLC-MS/MS (Ultimate 3000, Thermo Fisher Scientific, Germany), màng thẩm tách (MWCO = 3,5 kDa - Canada) và một số thiết bị khác đạt tiêu chuẩn thí nghiệm.

2.2. Phương pháp điều chế

Quy trình trích ly dịch chiết Cordyceps militaris

Trong nghiên cứu này, dịch chiết từ bột nấm *Cordyceps militaris* được thu nhận bằng phương pháp trích ly có hỗ trợ siêu âm dạng bể (Ultrasound CB S-100H). Các thông số trích ly bao gồm: tỉ lệ nguyên liệu: nước là 1:20 (w/v), nhiệt độ 45°C, công suất siêu âm 300W và thời gian siêu âm 30 phút. Dịch chiết thu được sau đó được lọc qua giấy lọc 0,45 µm, đạt 3,5 độ Brix. Hàm lượng Adenosine (ADE) và Cordycepin (COR) trong dịch chiết được xác định bằng phương pháp UHPLC-MS/MS.

Quy trình điều chế hệ nano Liposome

Phương pháp này được thực hiện tham khảo từ Bangham [11]. Quy trình điều chế chung như sau: Cho 1,0 g lecithin (LC) hòa tan trong dung môi gồm 30 mL dichloromethane (DCM), sau khi hòa tan hoàn toàn cho vào bình cầu đáy tròn khô, tiến hành cô quay trong 2h ở tốc độ 100 vòng/phút để bay hơi dung môi hữu cơ tạo thành lớp màng đồng nhất trên thành trong của bình. Sau đó, thêm vào bình cầu 50 mL dịch chiết *Cordyceps militaris* (chứa 1,9 mg/mL ADE và 2,8 mg/mL COR và 1,5% Tween 80) có giá trị pH là 7,4 để phân tán lớp màng. Hỗn hợp dịch được chuyển vào cốc thủy tinh 100 mL rồi tiến hành đồng hóa bằng thiết bị IKA 25 ở tốc độ 10.000 vòng/phút trong thời gian 10 phút để làm giảm kích thước hệ. Cuối cùng, hỗn dịch nano được ly tâm ở tốc độ 4.000 vòng/phút, lọc qua giấy lọc 0,45 µm, phần dịch lọc là hệ nano liposome *Cordyceps militaris* (LCMs).

Ảnh hưởng của dung môi đến thời gian cô quay và độ đồng nhất của lớp màng được khảo sát với ba loại dung môi Chloroform, cồn 96° và Dichloromethane (DCM).

Các yếu tố ảnh hưởng đến hiệu suất vi bao và kích thước hạt tối ưu (D, nm) được khảo sát bao gồm tỷ lệ LC và DCM với các mức 1:20, 1:30, 1:40, và 1:50 (w/v); công suất đồng hóa của thiết bị được thử nghiệm ở các mức 8.000, 10.000, 12.000, 14.000, và 16.000 vòng/phút; và thời gian đồng hóa được khảo sát ở các mức 5, 10, 15, và 20 phút. Trong quá trình thử nghiệm, khi thay đổi một yếu tố, các yếu tố còn lại sẽ được giữ cố định nhằm xác định rõ tác động của từng yếu tố lên hiệu suất vi bao và kích thước hạt.

2.3. Xác định đặc tính của hệ nano

Đặc tính của hệ nano được xác định thông qua kích thước hạt, độ đa phân tán, hình thái hạt và thế Zeta. Kích thước hạt và độ đa phân tán được đo bằng phương pháp tán xạ ánh sáng động (Dynamic Light Scattering, DLS) trên thiết bị Horiba SZ-100 (Nhật Bản). Điện thế bề mặt các tiểu phân nano (thế Zeta) được đo trên thiết bị Zetasizer ZS90 (Malvern - Anh).

2.4. Xác định hiệu suất vi bao

Hiệu suất vi bao hoá (EE%) được đánh giá theo phương pháp của Chen Wei-Ting và cộng sự [12]. Quy trình được thực hiện như sau: Cho 5,0 mL liposome vào túi thẩm tách (MWCO = 3,5 kDa) đã được buộc kín đầu một đầu bằng kẹp, sau đó buộc đầu còn lại. Cho túi thẩm tách vào becher thủy tinh có chứa

dung dịch đệm phosphate với pH = 7,4. Thể tích dung dịch đệm gấp 100 lần thể tích chế phẩm trong túi để đảm bảo túi ngập trong dung dịch đệm, để yên 24 giờ ở nhiệt độ phòng. Sau đó rút dung dịch bên ngoài túi thẩm tích rồi pha loãng đến nồng độ thích hợp. Hàm lượng ADE và COR được đo bằng phương pháp UHPLC-MS/MS

Hiệu suất vi bao được tính theo công thức (1):

$$EE(\%) = \frac{(Q_t - Q_d)}{Q_t} \times 100\% \quad (1)$$

Trong đó: Q_t là lượng chất được dùng để điều chế liposome và Q_d là lượng chất đo được trong dung dịch sau thẩm tách.

2.5. Xử lý số liệu

Giá trị được biểu thị dưới dạng kết quả trung bình $\pm$ độ lệch chuẩn. Mỗi thí nghiệm lặp lại ba lần và độ lệch chuẩn được tính toán bằng phần mềm Microsoft Excel. Phân tích ANOVA một chiều với mức độ tin cậy $p < 0,05$ và đồ thị được xử lý bằng phần mềm Origin 2024 bản Education.

3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Khảo sát dung môi hòa tan LC đến thời gian cô quay và độ đồng nhất của lớp màng

Dung môi DCM cho thời gian cô quay chỉ mất 20 phút, trong khi đó Chloroform cần tới 50 phút và còn 96° kéo dài lên đến 2 giờ. Điều này cho thấy rằng việc sử dụng DCM sẽ tiết kiệm được thời gian thực hiện. Sau khi cô quay, lớp màng lipid thu được từ dung môi DCM có độ đồng đều cao, điều này rất quan trọng cho việc đảm bảo tính ổn định và hiệu quả của hệ liposome trong các thí nghiệm sau. Do đó, dựa trên các kết quả khảo sát về khả năng hòa tan, thời gian cô quay và tính đồng nhất của dung dịch, dung môi DCM đã được lựa chọn cho các thí nghiệm tiếp theo trong nghiên cứu của chúng tôi. Việc sử dụng DCM không chỉ tối ưu hóa quá trình hòa tan lecithin mà còn góp phần nâng cao hiệu quả trong việc điều chế hệ liposome.

3.2. Ảnh hưởng của nồng độ LC đến hiệu suất bao gói và kích thước hạt.

Bảng 1. Ảnh hưởng của nồng độ LC đến hiệu suất bao gói và kích thước hạt

Tỉ lệ LC: DCM (w/v)	EE% $\pm$ SD		D $\pm$ SD (nm)
	ADE	COR	
1:20	68,7 $\pm$ 4,2 ^a	68,0 $\pm$ 8,1 ^x	198,3 $\pm$ 7,6 ^A
1:30	69,0 $\pm$ 7,9 ^a	71,3 $\pm$ 11,0 ^x	174,3 $\pm$ 12,1 ^B
1:40	73,3 $\pm$ 1,5 ^a	76,0 $\pm$ 5,9 ^x	137,7 $\pm$ 2,5 ^C
1:50	72,0 $\pm$ 7,2 ^a	77,3 $\pm$ 2,3 ^x	131,7 $\pm$ 2,9 ^C

Các ký tự khác nhau trong cùng một cột biểu diễn sự khác khác nhau có ý nghĩa ở mức độ tin cậy $p < 0,05$.

Nồng độ lecithin (LC) ảnh hưởng trực tiếp đến độ dày của lớp màng lipid trong quá trình cô quay. Một lớp màng quá dày có thể gây khó khăn cho quá trình hydrat hóa, dẫn đến việc hình thành các liposome với kích thước không đồng đều. Ngược lại, nếu lớp màng quá mỏng, liposome sẽ dễ bị phân tán dưới tác dụng của quá trình đồng hóa hoặc siêu âm, làm giảm hiệu quả vi bao. Do đó, việc xác định nồng độ LC tối ưu là rất quan trọng để đảm bảo tính ổn định và hiệu suất của hệ liposome. Kết quả đã được trình bày trong Bảng 1, cho thấy rằng hiệu suất vi bao (EE%) cho cả hoạt chất ADE và COR có sự thay đổi nhỏ khi tỉ lệ LC: DCM thay đổi. Cụ thể, giá trị hiệu suất vi bao của ADE dao động từ 68,7 $\pm$ 4,2% đến 73,3 $\pm$ 1,5%, trong khi đó COR dao động từ 68,0 $\pm$ 8,1% đến 76,0 $\pm$ 5,9%. Nhìn chung, ở tỉ lệ 1:40 thì hiệu suất bao gói đạt giá trị cao nhất. Tuy nhiên, kết quả phân tích ANOVA chỉ ra rằng sự khác biệt về hiệu suất vi bao của cả ADE và COR không đạt ý nghĩa thống kê ở mức $p < 0,05$, cho thấy rằng nồng độ LC có thể không ảnh hưởng lớn đến hiệu suất vi bao trong khoảng nồng độ thử nghiệm này.

Đáng chú ý, kích thước trung bình của liposome lại cho thấy sự thay đổi đáng kể theo các tỉ lệ LC:DCM khác nhau. Cụ thể, khi nồng độ LC giảm dần, kích thước hạt có xu hướng giảm theo. Ở tỉ lệ 1:20, kích thước hạt trung bình đạt 198,3 $\pm$ 7,6 nm, giảm xuống còn 174,3 $\pm$ 12,1 nm ở tỉ lệ 1:30, và tiếp tục giảm xuống còn 135,7 $\pm$ 2,5 nm ở tỉ lệ 1:40. Khi nồng độ LC đạt 1:50, kích thước hạt gần như không có sự khác

biệt về mặt thống kê. Sự gia tăng kích thước liposome ở nồng độ LC cao có thể được giải thích bằng việc lớp màng lipid quá dày cản trở quá trình hydrat hóa, dẫn đến sự tăng kích thước của các hạt liposome. Dựa trên kết quả nghiên cứu, nồng độ LC 1:40 (w/v) được xác định là nồng độ tối ưu cho các nghiên cứu tiếp theo. Sự ảnh hưởng của nồng độ LC đến kích thước hạt cũng được các tác giả khác báo cáo trước đây [1,4,13].

3.3 . Ảnh hưởng của công suất đồng hóa đến hiệu suất bao gói và kích thước hạt

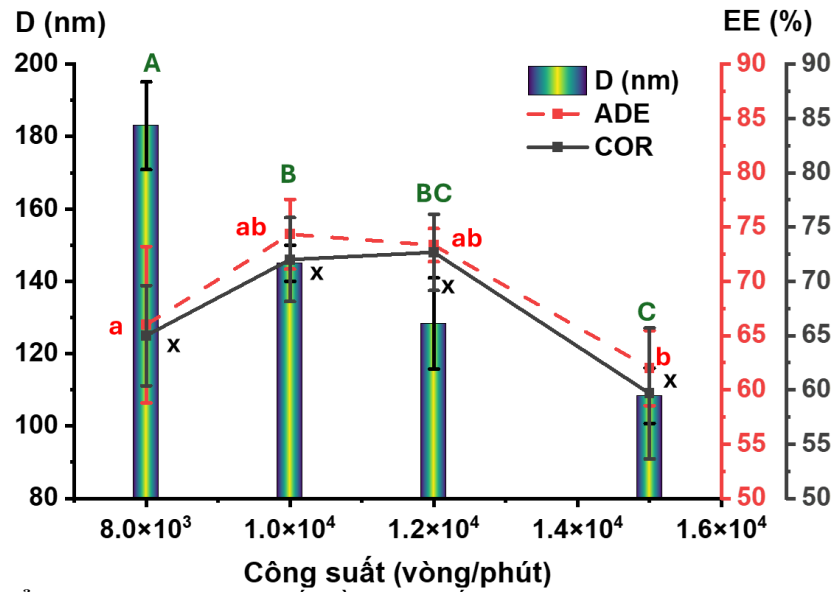
Trong quá trình phân tán bằng kỹ thuật đồng hóa, kích thước của hệ liposome bị ảnh hưởng đáng kể bởi công suất của thiết bị [14]. Để đánh giá tác động này, chúng tôi đã thực hiện thí nghiệm với các công suất đồng hóa khác nhau và ghi nhận hiệu suất vi bao cũng như kích thước hạt của liposome. Hình 1 minh họa mối quan hệ giữa công suất đồng hóa và các đặc tính của hệ nano. Kết quả cho thấy, ở tốc độ 8.000 vòng/phút, hiệu suất vi bao của hoạt chất ADE đạt $66,0 \pm 7,2\%$, trong khi của COR đạt $65,0 \pm 4,6\%$. Khi tăng công suất, hiệu suất vi bao có xu hướng tăng lên và ổn định xung quanh mức 72-74%. Tuy nhiên, khi công suất được nâng lên đến 15.000 vòng/phút, chúng tôi nhận thấy rằng hiệu suất vi bao bắt đầu giảm. Hiện tượng này có thể giải thích rằng công suất cao gây ra lực cắt mạnh, có thể làm phá vỡ cấu trúc lipid của liposome, dẫn đến sự giải phóng ADE, COR ra môi trường nước. Hiện tượng này cũng đã được một số các nghiên cứu trước đây đề cập [15,16].

Mặt khác, kích thước hạt có xu hướng giảm mạnh khi công suất đồng hóa gia tăng. Cụ thể, tại tốc độ 8.000 vòng/phút, kích thước hạt trung bình đạt $183,0 \pm 12,1$ nm, và giá trị này giảm nhanh xuống còn $145,0 \pm 5,0$ nm ở tốc độ 10.000 vòng/phút. Phân tích ANOVA cho thấy rằng công suất 12.000 vòng/phút là mức tối ưu, khi vừa đảm bảo hiệu suất vi bao đạt giá trị cao nhất, vừa tạo ra kích thước hạt trong khoảng mong muốn cho sự đồng nhất và ổn định. Với những kết quả này, công suất 12.000 vòng/phút đã được chọn làm thông số tối ưu cho các thí nghiệm tiếp theo.

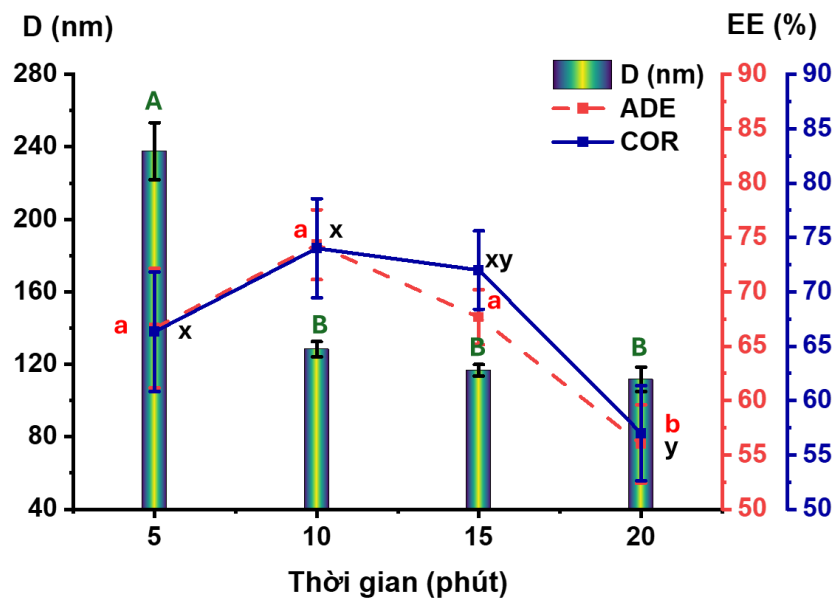
3.4. Ảnh hưởng của thời gian đồng hóa đến hiệu suất bao gói và kích thước hạt

Thời gian đồng hóa là một yếu tố quan trọng ảnh hưởng đến hiệu suất vi bao và kích thước của LCMs nói riêng và hệ nano lỏng nói chung [17,18]. Để khảo sát ảnh hưởng này, chúng tôi đã thực hiện thí nghiệm với thời gian đồng hóa khác nhau, từ 5 đến 20 phút, tại công suất ổn định 12.000 vòng/phút. Dữ liệu thu được thể hiện trong đồ thị Hình 2. Kết quả cho thấy rằng hiệu suất vi bao (EE%) của hoạt chất ADE biến động theo thời gian đồng hóa. Cụ thể, ở thời gian 5 phút, hiệu suất vi bao đạt $66,7 \pm 5,5\%$ và gia tăng lên $74,3 \pm 3,2\%$ tại thời gian 10 phút. Tuy nhiên, sau đó, hiệu suất giảm xuống còn $67,7 \pm 2,5\%$ ở 15 phút và giảm mạnh còn $56,0 \pm 3,6\%$ ở 20 phút. Sự gia tăng hiệu suất ở thời gian 10 phút có thể giải thích bởi việc đồng hóa đủ lâu để nâng cao sự phân tán đều của lecithin, từ đó cải thiện khả năng vi bao của hoạt chất. Ngược lại, sự giảm hiệu suất ở thời gian 15 và 20 phút có thể là do tác động của thời gian lâu dẫn đến khả năng phân hủy cấu trúc lipid và làm giảm hiệu quả vi bao. Đối với hoạt chất COR, hiệu suất vi bao cũng có sự biến động tương tự. Tại thời gian 5 phút, hiệu suất vi bao đạt $66,3 \pm 5,5\%$, và tăng lên $74,0 \pm 7,5\%$ ở 10 phút. Sau thời gian đạt điểm tối đa này, hiệu suất giảm xuống còn $72,0 \pm 3,6\%$ tại 15 phút và giảm còn $57,0 \pm 4,4\%$ tại 20 phút. Điều này cho thấy rằng thời gian đồng hóa lý tưởng cho hoạt chất COR cũng tương đương với hoạt chất ADE là 10 phút.

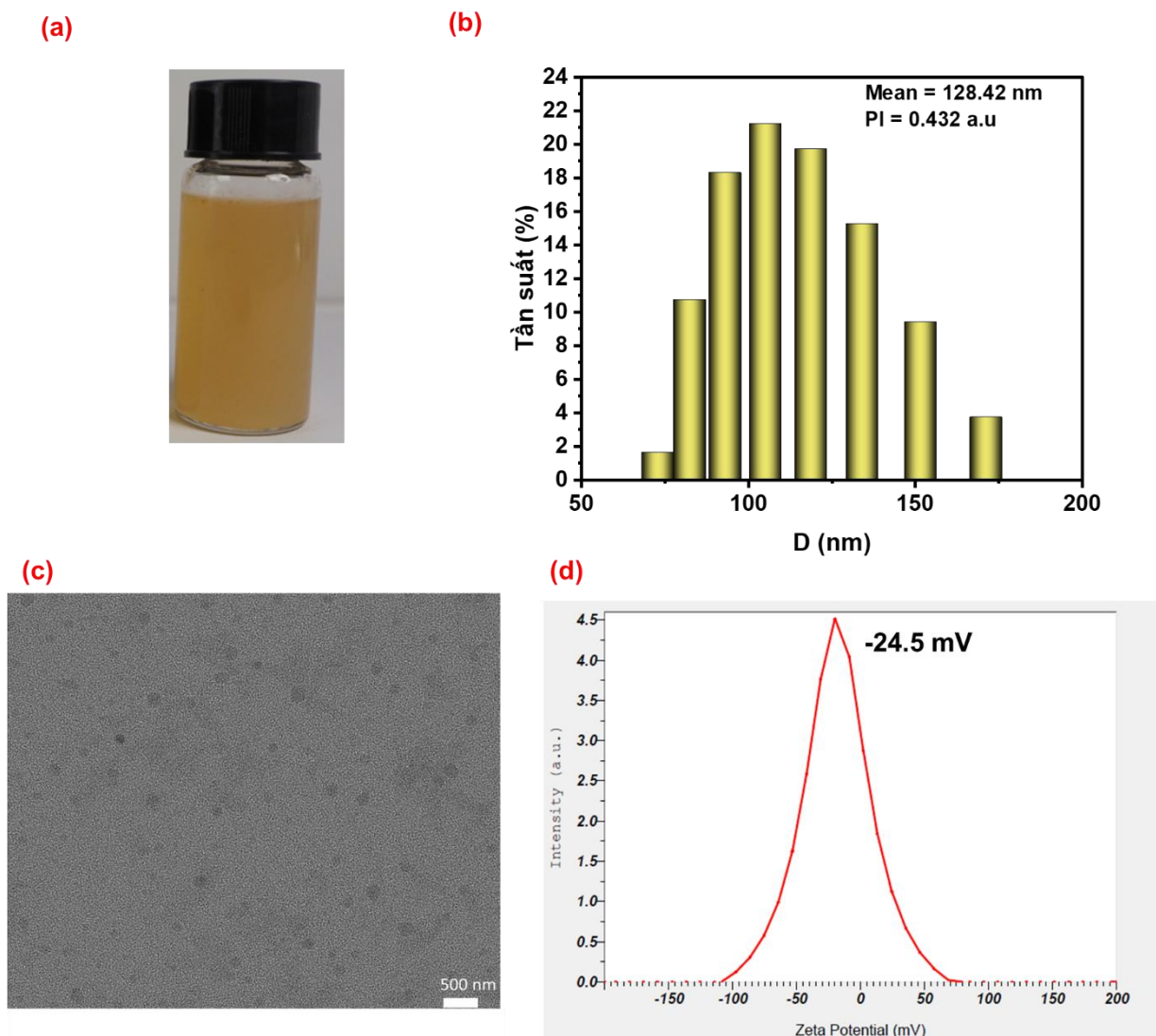
Kích thước hạt cũng cho thấy sự thay đổi rõ rệt theo thời gian đồng hóa. Cụ thể, kích thước hạt trung bình ở 5 phút là $237,7 \pm 15,7$ nm, sau đó giảm xuống còn $128,3 \pm 4,2$ nm tại 10 phút, thể hiện sự phân tán tốt hơn của hệ LCMs. Kích thước này tiếp tục giảm nhẹ xuống $116,7 \pm 3,2$ nm ở 15 phút và giảm nhẹ xuống $111,7 \pm 6,7$ nm tại 20 phút. Sự giảm kích thước hạt song song với sự gia tăng hiệu suất vi bao ở 10 phút cho thấy rằng việc tối ưu hóa thời gian đồng hóa có thể giúp ổn định cấu trúc của liposome. Trên cơ sở những dữ liệu nhận được kết hợp với phân tích ANOVA, thời gian đồng hóa tối ưu cho việc điều chế LCMs là 10 phút.



Hình 1. Ảnh hưởng của công suất đồng hóa đến kích thước hạt trung bình và hiệu suất vi bao. Các kí tự khác nhau biểu diễn sự khác khác nhau có ý nghĩa ở mức độ tin cậy $p < 0,05$



Hình 2. Ảnh hưởng của thời gian đồng hóa đến kích thước và hiệu suất vi bao. Các kí tự khác nhau biểu diễn sự khác khác nhau có ý nghĩa ở mức độ tin cậy $p < 0,05$



Hình 3. Một số đặc tính của hệ LCMs điều chế bằng phương pháp hydrate màng: (a): Hình chụp mẫu LCMs, (b): giản đồ phân bố kích thước hạt đo bằng kỹ thuật DLS, (c): ảnh TEM hệ LCMs và (d): thế Zeta của hệ.

3.5. Một số đặc tính của hệ nano Liposome

Hệ nano LCMs sau khi được tổng hợp theo điều kiện tối ưu có trạng thái đồng nhất, không tách lớp, không có dấu hiệu kết tụ (Hình 3a). Kích thước của hệ nano này phân bố trong khoảng từ 80 đến 150 nm, kích thước trung bình là 128,42 nm (Hình 3b). Chỉ số PI của hệ cũng được xác định với giá trị 0,432 a.u cho thấy rằng hệ có độ phân tán đồng đều [19]. Hình thái của hệ được đo bằng TEM ở Hình 3c cho thấy các hạt nano Liposome có dạng hình cầu và kích thước cũng phù hợp với số liệu đo bằng phương pháp DLS. Một giá trị nữa để đánh giá đặc tính của hệ nano là thế Zeta. Giá trị thế Zeta phản ánh cân bằng điện tích của các phần tử mang điện trong dung dịch và được sử dụng để làm chỉ số về độ ổn định phân tán. Điện thế zeta lớn dự đoán sự phân tán ổn định hơn và ngược lại. Trong thực nghiệm, hệ phân tán nano có giá trị tuyệt đối của thế zeta giữa 30 và 60 mV sẽ tạo sự ổn định tĩnh điện học nhờ lực đẩy giữa các tiểu phân nano tích điện cùng dấu. Nếu giá trị này từ 5 đến 15 mV sẽ giới hạn độ bền vững của hệ phân tán và thế zeta từ 3 đến 5 mV thường xuất hiện các hiện tượng không bền [20].

Thế zeta của hệ nano liposome là -24.5 mV biểu diễn ở hình 2d cho thấy sự ổn định cao của hệ. Theo một số nghiên cứu, khi giá trị của thế zeta khi thể hiện là “âm” thì hệ nano liposome sẽ bền hơn [20–22]. Các hạt nano với cấu trúc lipid thường có thế zeta âm do sự hiện diện của thành phần phospholipid

như phosphatidyl choline [23]. Một số nghiên cứu khác cho thấy khi hệ nano dựa trên cơ sở lipid, chẳng hạn như các hạt nano lipid rắn (SLNs) và các chất mang lipid có cấu trúc nano (NLCs) thì có thể hình thành thể zeta âm để tăng cường sự hấp thụ và ổn định của hệ [21,24]. Ngoài ra, sự tương tác giữa các ion và giao diện lipid - nước có thể dẫn đến những thay đổi thể zeta của các túi phospholipid, dẫn đến sự hình thành điện tích bề mặt âm trong một số điều kiện nhất định [25].

4. KẾT LUẬN

Nghiên cứu này đã thành công trong việc điều chế hệ nano liposome vi bao dịch chiết từ nấm *Cordyceps militaris* bằng phương pháp hydrate màng. Kết quả cho thấy việc áp dụng kỹ thuật đồng hóa đã giúp chế tạo hệ liposome kích thước nano một cách hiệu quả. Các yếu tố ảnh hưởng đến hiệu suất vi bao và kích thước hạt của hệ lipid đã được khảo sát đầy đủ, trong đó điều kiện tối ưu được xác định là tỷ lệ LC: DCM 1:40 (v/v), tốc độ đồng hóa 12.000 vòng/phút và thời gian đồng hóa 10 phút. Hệ nano đạt hiệu suất bao gói của các hoạt chất ADE và COR lần lượt là $73,3 \pm 1,5\%$ và $76,0 \pm 5,9\%$; kích thước trung bình khoảng $128,3 \pm 4,2$ nm và thể zeta là $-24,5$ mV, cho thấy độ ổn định cao của hệ liposome. Những kết quả này mở ra hướng đi mới trong việc phát triển và đa dạng hóa sản phẩm từ nấm *Cordyceps militaris*, góp phần nâng cao giá trị kinh tế cũng như lợi ích sức khỏe của loại dược liệu này.

Lời cảm ơn: Tập thể tác giả chân thành cảm ơn Sở Khoa học và Công nghệ Tỉnh Tiền Giang đã tài trợ kinh phí cho nghiên cứu này thông qua đề tài mã số ĐTCN03/24.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] Singh, Preparation, characterization, and in vitro release study of albendazole-encapsulated nanosize liposomes, Int J Nanomedicine (2010) 101. <https://doi.org/10.2147/IJN.S8030>.
- [2] Q.H. Tran, T.T.H. Thuy, T.T.T. Nguyen, Fabrication of a narrow size nano curcuminoid emulsion by combining phase inversion temperature and ultrasonication: Preparation and bioactivity, New Journal of Chemistry 45 (2021) 9658–9667. <https://doi.org/10.1039/d1nj01241j>.
- [3] R. Eugster, P. Luciani, Liposomes: Bridging the gap from lab to pharmaceuticals, Curr Opin Colloid Interface Sci 75 (2025) 101875. <https://doi.org/10.1016/j.cocis.2024.101875>.
- [4] J. Sabin, G. Prieto, J.M. Ruso, R. Hidalgo-Álvarez, F. Sarmiento, Size and stability of liposomes: A possible role of hydration and osmotic forces, The European Physical Journal E 20 (2006) 401–408. <https://doi.org/10.1140/epje/i2006-10029-9>.
- [5] H. He, Y. Lu, J. Qi, Q. Zhu, Z. Chen, W. Wu, Adapting liposomes for oral drug delivery, Acta Pharm Sin B 9 (2019) 36–48. <https://doi.org/10.1016/j.apsb.2018.06.005>.
- [6] H.S. Tuli, S.S. Sandhu, A.K. Sharma, Pharmacological and therapeutic potential of Cordyceps with special reference to Cordycepin, 3 Biotech 4 (2014) 1–12. <https://doi.org/10.1007/s13205-013-0121-9>.
- [7] K. Yue, M. Ye, Z. Zhou, W. Sun, X. Lin, The genus *Cordyceps*: a chemical and pharmacological review, Journal of Pharmacy and Pharmacology 65 (2013) 474–493. <https://doi.org/10.1111/j.2042-7158.2012.01601.x>.
- [8] C. Corciulo, C.M. Castro, T. Coughlin, S. Jacob, Z. Li, D. Fenyö, D.B. Rifkin, O.D. Kennedy, B.N. Cronstein, Intraarticular injection of liposomal adenosine reduces cartilage damage in established murine and rat models of osteoarthritis, Sci Rep 10 (2020) 13477. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-68302-w>.
- [9] E. Jaradat, E. Weaver, A. Meziane, D.A. Lamprou, Microfluidics Technology for the Design and Formulation of Nanomedicines, Nanomaterials 11 (2021) 3440. <https://doi.org/10.3390/nano11123440>.
- [10] K.B. Khot, G. Gopan, A. Bandiwadkar, J. Jose, Current advancements related to phytobioactive compounds based liposomal delivery for neurodegenerative diseases, Ageing Res Rev 83 (2023) 101806. <https://doi.org/10.1016/j.arr.2022.101806>.

- [11] T.T. Duong, A. Isomäki, U. Paaver, I. Laidmäe, A. Tõnisoo, T.T.H. Yen, K. Kogermann, A. Raal, J. Heinämäki, T.-M.-H. Pham, Nanoformulation and evaluation of oral berberine-loaded liposomes, *Molecules* 26 (2021) 2591.
- [12] W.-T. Chen, Y.-L. Kuo, C.-H. Chen, H.-T. Wu, H.-W. Chen, W.-P. Fang, Improving the stability and bioactivity of curcumin using chitosan-coated liposomes through a combination mode of high-pressure processing, *Lwt* 168 (2022) 113946.
- [13] Z.T. Rushmi, N. Akter, R.J. Mow, M. Afroz, M. Kazi, M. de Matas, M. Rahman, M.H. Shariare, The impact of formulation attributes and process parameters on black seed oil loaded liposomes and their performance in animal models of analgesia, *Saudi Pharmaceutical Journal* 25 (2017) 404–412. <https://doi.org/10.1016/j.jsps.2016.09.011>.
- [14] H. Thi Thanh Thuy, P. Thi Kim Ngoc, N.T. Thi Thanh, H. Thi Thanh Truc, N. Van Hai, T. Quang Hieu, COMPARISON OF CURCUMIN NANOEMULSION DROPS SIZE BETWEEN HOMINIZATION AND ULTRASONICATION SUPPORTING, 2019.
- [15] T.T.T.L.T.V.T. Lê Thanh Diễm, Ảnh hưởng của những thông số kỹ thuật trong phương pháp hydrat hóa màng phim lipid lên kích thước tiểu phân liposome piroxicam, *Tạp Chí Khoa Học và Công Nghệ Việt Nam* 21 (2017).
- [16] Y. Tang, A. Zhou, S. Zhou, J. Ruan, C. Qian, C. Wu, L. Ye, Preparation of VC nanoliposomes by high pressure homogenization: Process optimization and evaluation of efficacy, transdermal absorption, and stability, *Heliyon* 10 (2024) e29516. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2024.e29516>.
- [17] J.D. Beltrán, L. Ricaurte, K.B. Estrada, M.X. Quintanilla-Carvajal, Effect of homogenization methods on the physical stability of nutrition grade nanoliposomes used for encapsulating high oleic palm oil, *LWT* 118 (2020) 108801. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2019.108801>.
- [18] Q.H. Tran, T.T. Le Thi, T.C. Nguyen, T.V. Tran, Q.T. Le, T.T. Luu, V.P. Dinh, Facile synthesis of novel nanocurcuminoids–sacha inchi oil using the phase inversion temperature method: Characterization and antioxidant activity, *J Food Process Preserv* 45 (2021). <https://doi.org/10.1111/jfpp.15402>.
- [19] K. Tai, M. Rappolt, L. Mao, Y. Gao, F. Yuan, Stability and release performance of curcumin-loaded liposomes with varying content of hydrogenated phospholipids, *Food Chem* 326 (2020) 126973.
- [20] R. Shah, D. Eldridge, E. Palombo, I. Harding, Optimisation and stability assessment of solid lipid nanoparticles using particle size and zeta potential., *Journal of Physical Science* 25 (2014).
- [21] L. Li, H. Wang, J. Ye, Y. Chen, R. Wang, D. Jin, Y. Liu, Mechanism study on nanoparticle negative surface charge modification by ascorbyl palmitate and its improvement of tumor targeting ability, *Molecules* 27 (2022) 4408.
- [22] T.M. Taylor, S. Gaysinsky, P.M. Davidson, B.D. Bruce, J. Weiss, Characterization of antimicrobial-bearing liposomes by ζ -potential, vesicle size, and encapsulation efficiency, *Food Biophys* 2 (2007) 1–9.
- [23] M. Socaciu, Z. Diaconeasa, C. Socaciu, Simple and fast procedure to incorporate doxorubicine in small unilamellar liposomes: Effects on liposome size and zeta potential, *Studia UBB Chemia* 64 (2019) 181–192.
- [24] L. Benedini, S. Antollini, M.L. Fanani, S. Palma, P. Messina, P. Schulz, Study of the influence of ascorbyl palmitate and amiodarone in the stability of unilamellar liposomes, *Mol Membr Biol* 31 (2014) 85–94.
- [25] A. Wolde-Kidan, R.R. Netz, Interplay of interfacial viscosity, specific-ion, and impurity adsorption determines zeta potentials of phospholipid membranes, *Langmuir* 37 (2021) 8463–8473.

A STUDY OF FORMULATION AND CHARACTERIZATION OF NANO LIPOSOMES FROM *Cordyceps militaris* EXTRACTS USING MEMBRANE HYDRATION

NGUYEN QUYNH DAO^{1,2}, NGUYEN BA THANH^{1*}, TRAN QUANG HIEU^{2,3*}

¹ Institute of Biotechnology and Food Technology, Industrial University of Ho Chi Minh City

² Faculty of Food Technology -Saigon Technology University

³ Basic Sciences Department-Saigon Technology University

*Corresponding authors: thanhngba@iuh.edu.vn, hieu.tranquang@stu.edu.vn

Abstract. In this study, a simple procedure for the preparation of nano liposomes encapsulating extracts from *Cordyceps militaris* using the membrane hydration method was performed. The extraction of the mushroom extract was carried out using an ultrasound-assisted method with water as the solvent, and the extract was encapsulated using nano liposomes made from lecithin. Several factors influencing encapsulation efficiency and particle size of the nano system were investigated. The characteristics of the nano system were determined using techniques such as Dynamic Light Scattering (DLS), Transmission Electron Microscopy (TEM), and Zeta potential analysis. Results indicated that the optimal lecithin concentration was 1:40 (w/v), with encapsulation efficiencies for the active compounds ADE reaching $73.3 \pm 1.5\%$ and COR reaching $76.0 \pm 5.9\%$. The optimal homogenization power was found to be 12,000 rpm, with a homogenization time of 10 minutes. The resulting nano liposome system achieved an average particle size of 128.3 ± 4.2 nm, with a Zeta potential of -24.5 mV. The findings of this study highlight the potential for diversifying products derived from *Cordyceps militaris* to enhance the value of this precious medicinal mushroom.

Keywords: *Cordyceps militaris*, nano liposome, membrane hydration, encapsulation

Ngày nhận bài: 22/4/2025
Ngày nhận đăng: 23/5/2025