

Sử dụng dung môi xanh để chiết xuất Andrographolide từ xuyên tâm liên - *Andrographis paniculata*

Vũ Đức Cảnh¹, Châu Thị Huyền Ngọc², Trần Thị Thuỳ Linh²,
Nguyễn Thị Hoà², Lê Trọng Nhân^{2,*}

(1) Cục Quản lý Dược, Bộ Y tế

(2) Khoa Dược, Trường Đại học Y - Dược, Đại học Huế

Tóm tắt:

Đặt vấn đề: Sử dụng các dung môi xanh để chiết xuất hoạt chất từ dược liệu đang là xu thế mới của quá trình chiết xuất. Trong nghiên cứu này, các hệ dung môi xanh được phát triển để chiết xuất andrographolide từ xuyên tâm liên, đồng thời hoạt tính chống oxi hóa của các sản phẩm chiết xuất được so sánh. **Đối tượng và phương pháp nghiên cứu:** Các hệ dung môi sâu eutectic (deep eutectic solvents-DESS) khác nhau được tổng hợp. Sau đó, các DESS được sử dụng để chiết xuất andrographolide từ xuyên tâm liên. Hoạt tính chống oxi hóa của sản phẩm chiết xuất được thử theo phương pháp ức chế gốc tự do DPPH. **Kết quả:** Tổng số 48 tổ hợp DESS được thử nghiệm ban đầu và 16 DESS được lựa chọn cuối cùng để sử dụng chiết xuất. ChCl-Lac và ChCl-Act-H₂O là hai DESS cho hiệu suất chiết xuất andrographolide từ xuyên tâm liên cao nhất, với hiệu suất lần lượt là $2,34 \pm 0,11\%$ và $2,51 \pm 0,08\%$, cao hơn so với đối chứng được sử dụng MeOH ($2,12 \pm 0,02\%$) và EtOH ($2,14 \pm 0,07\%$). Hoạt tính chống oxi hóa của các chiết xuất tỉ lệ thuận với nồng độ andrographolide có trong dịch chiết, chiết xuất ChCl-Lac và ChCl-Act-H₂O cho thấy khả năng ức chế DPPH tốt nhất. **Kết luận:** Kết quả của nghiên cứu góp phần vào xây dựng quy trình chiết xuất bền vững đối với quá trình chiết xuất andrographolide từ xuyên tâm liên. Trong đó, hai hệ DESS ChCl-Lac và ChCl-Act-H₂O cho hiệu suất chiết xuất cao nhất andrographolide từ xuyên tâm liên.

Từ khóa: Andrographolide, xuyên tâm liên, chiết xuất xanh, deep eutectic solvents.

Using green solvents to extract Andrographolide from *Andrographis paniculata*

Vu Duc Canh¹, Chau Thi Huyen Ngoc², Tran Thi Thuy Linh²,
Nguyen Thi Hoa², Le Trong Nhan^{2,*}

(1) Drug Administration of Vietnam, Ministry of Health

(2) Faculty of Pharmacy, University of Medicine and Pharmacy, Hue University

Abstract

Background: Recent trends in the extraction of bioactive compounds from medicinal plants have largely focused on using green solvents. In this study, green solvents were developed for the extraction of andrographolide from *Andrographis paniculata*, and the antioxidant activity of the extracts was compared. **Materials and method:** Different deep eutectic solvents (DESSs) were synthesized. Then, the DESSs were used to extract andrographolide from *Andrographis paniculata*. The antioxidant activity of the extracts was evaluated using the DPPH free radical inhibition method. **Results:** A total of 48 combinations of deep eutectic solvents (DESSs) were initially tested, and eventually, 16 DESSs were selected for the extraction process. Among them, ChCl-Lac and ChCl-Act-H₂O exhibited the highest yields of andrographolide from *Andrographis paniculata*, with yields of $2.34 \pm 0.11\%$ and $2.51 \pm 0.08\%$, respectively. These yields were higher compared to those obtained using MeOH ($2.12 \pm 0.02\%$) and EtOH ($2.14 \pm 0.07\%$). The antioxidant activity of the extracts was found to be directly proportional to the concentration of andrographolide present. Notably, the extracts obtained using ChCl-Lac and ChCl-Act-H₂O demonstrated the most effective inhibition of DPPH radicals. **Conclusion:** The results of the study contributed to the development of a sustainable extraction procedure for andrographolide extraction from *Andrographis paniculata*. In which, two DESSs of ChCl-Lac and ChCl-Act-H₂O gave the highest andrographolide extraction efficiency from *Andrographis paniculata*.

Keywords: Andrographolide, *Andrographis paniculata*, green extract, deep eutectic solvents.

Tác giả liên hệ: Lê Trọng Nhân; email: ltnhan@huemed-univ.edu.vn

Ngày nhận bài: 28/6/2023; Ngày đồng ý đăng: 10/9/2024; Ngày xuất bản: 25/9/2024

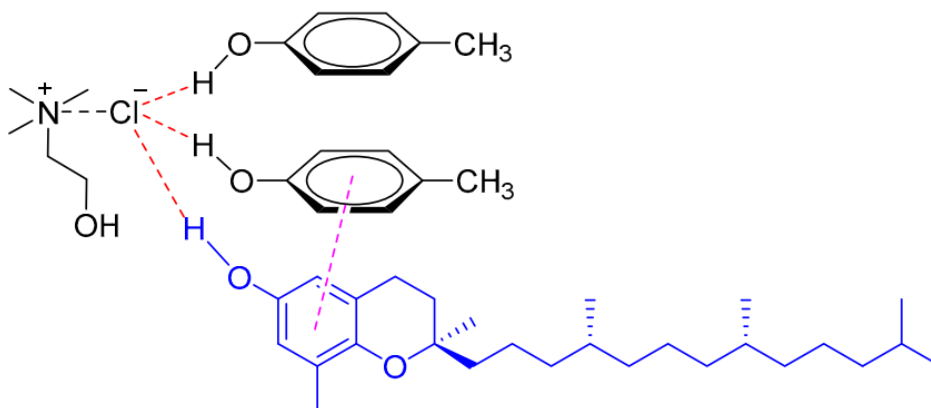
DOI: 10.34071/jmp.2024.5.3

1. ĐẶT VẤN ĐỀ VÀ MỤC TIÊU

Hóa học xanh (Green chemistry) được định nghĩa là “thiết kế các sản phẩm và quy trình hóa học nhằm giảm hoặc loại bỏ việc sử dụng hay tạo ra các chất độc hại”. Theo nghĩa này, dung môi hữu cơ là một thách thức lớn đối với hóa học xanh khi chúng thường độc hại, dễ bay hơi gây cháy nổ, góp phần gây ô nhiễm môi trường và nguy hiểm cho sức khỏe con người. Vì vậy, trong những năm gần đây, một kỹ thuật mới để chiết xuất các hợp chất có hoạt tính sinh học đã được phát triển do hiệu quả xanh cũng như chi phí thấp của phương pháp. Sử dụng dung môi sâu eutectic (deep eutectic solvents-DESs) là một trong những kỹ thuật thay thế tốt nhất cho các dung môi hữu cơ trong quá

trình chiết xuất. Đây là một kỹ thuật đơn giản, nhanh chóng, ít tốn kém, và điều đặc biệt là tính an toàn không độc hại của loại dung môi này [1].

DESs là một thể hệ dung môi mới, được tạo thành từ các chất rẻ tiền và dễ tìm kiếm: gồm một chất nhận liên kết hydrogen (hydrogen bond acceptor-HBA, ví dụ: choline chloride) và các chất cho liên kết hydro không tích điện (hydrogen bond donor-HBD, ví dụ: vitamin, amin, đường, rượu và axit cacboxylic...). Liên kết hydrogen được tạo thành chủ yếu trong DESs, trong đó ion chloride đóng vai trò kết nối giữa HBA và HBD [2]. Quá trình chiết xuất dựa trên các liên kết hydrogen hoặc tương tác π - π giữa hoạt chất và phức hợp được tạo thành (Hình 1) [3].



Hình 1. Tương tác của DESs với hoạt chất

Xuyên tâm liên, có tên khoa học là *Andrographis paniculata* (Burm. f.) Wall. ex Nees, là một loài thực vật thân thảo thuộc họ Na, phân bố rộng rãi ở các nước châu Á. Trong y học cổ truyền, xuyên tâm liên với đặc tính lạnh, đã được sử dụng rộng rãi trong các bài thuốc khác nhau để loại bỏ nhiệt và độc tố ra khỏi cơ thể [4]. Andrographolide là thành phần chính của xuyên tâm liên, có nhiều đặc tính dược lý đa dạng, bao gồm chống oxy hóa, chống viêm, kháng khuẩn, kháng virus, chống ung thư, chống béo phì, chống tiểu đường, sốt rét, bảo vệ gan... [4]. Gần đây nhất, andrographolide còn được báo cáo có khả năng ức chế virus SARS-CoV-2 [5]. Với những hoạt tính sinh học đáng chú ý, việc chiết xuất andrographolide từ xuyên tâm liên với hiệu suất cao là cần thiết.

Phương pháp chiết xuất là một trong những yếu tố quan trọng để bảo tồn đặc tính hóa lý cũng như đặc tính sinh học của hợp chất mục tiêu. Việc lựa chọn phương pháp chiết xuất phần lớn được xác định dựa vào bản chất của chất cần được chiết xuất. Quá trình chiết xuất luôn hướng đến yêu cầu đơn giản, nhanh chóng, hiệu suất cao, an toàn với môi trường và cho hiệu quả kinh tế. Các phương

pháp hiện nay thường được sử dụng để chiết xuất andrographolide từ xuyên tâm liên bao gồm: ngâm lạnh và ngâm nóng, chiết Soxhlet... Tuy nhiên, các phương pháp này có thể bị ảnh hưởng bởi nhiệt độ, thời gian chiết xuất kéo dài, sử dụng lượng thể tích lớn dung môi hữu cơ, cho hiệu suất thấp. Gần đây, nhiều kỹ thuật hiện đại đã được áp dụng để chiết xuất andrographolide, chẳng hạn sử dụng CO_2 siêu giới hạn, chiết xuất có hỗ trợ siêu âm và vi sóng... [6]

Trong nghiên cứu này, chúng tôi đã thiết lập một phương pháp chiết xuất xanh để chiết xuất andrographolide từ xuyên tâm liên bằng cách sử dụng các DESs. Đầu tiên, các DESs được sàng lọc với tỉ lệ HBD và HBA thích hợp. Sau đó, hiệu suất chiết xuất được khảo sát khi sử dụng các DESs so với dung môi hữu cơ. Ngoài ra, chúng tôi đã đánh giá hoạt tính chống oxy hóa của các dịch chiết thu được.

2. ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Đối tượng nghiên cứu

Xuyên tâm liên được thu mẫu tại huyện Hương Hóa, tỉnh Quảng Trị. Mẫu được làm khô (độ ẩm 6 - 8%), xay nhỏ và rây qua rây kích cỡ 0,71 mm, và

được bảo quản trong bình hút ẩm ở nhiệt độ phòng.

2.2. Hóa chất sử dụng

Andrographolide chuẩn 98% (Sigma-Aldrich, Mỹ), choline chloride 99% (Acros organics, Mỹ), ethylene glycol, glycerol, propylene glycol, citric acid, lactic acid, acetic acid, formic acid, oxalic acid, tartaric acid, glucose, sorbitol, sucrose, maltose, xylose, fructose, acetamide, (Xilong Scientific, Trung Quốc), DPPH (Sigma-Aldrich, Mỹ).

2.3. Chuẩn bị DESs

Các DESs được chuẩn bị bằng cách trộn choline chloride (ChCl) và các chất HBD ở tỉ lệ mol xác định (Bảng 1) và đun nóng ở nhiệt độ nhỏ hơn 100°C trong khoảng từ 2 - 4 giờ, kết hợp khuấy liên tục để thu được chất lỏng đồng nhất ổn định. Sau đó để nguội các DESs ở nhiệt độ phòng trong vòng 24 giờ. Các dung môi được bảo quản trong lọ kín và giữ trong bình hút ẩm [2].

Bảng 1. Các DESs thử nghiệm

STT	Viết tắt	HBD	Tỉ lệ mol khảo sát	Tỉ lệ mol lựa chọn
1	ChCl-Eth	Ethylene glycol	2:1, 1:1, 1:2	1:2
2	ChCl-Gly	Glycerol	2:1, 1:1, 1:2	1:2
3	ChCl-Pro	Propylene glycol	2:1, 1:1, 1:2	1:2
4	ChCl-Sor-H ₂ O	Sorbitol – Nước	1:2:0, 1:2:1, 2:2:1	2:2:1
5	ChCl-Cit-H ₂ O	Citric acid – Nước	1:2:0, 1:1:0, 1:1:1	1:1:1
6	ChCl-Lac	Lactic acid	2:1, 1:1, 1:2	1:2
7	ChCl-Ace	Acetic acid	2:1, 1:1, 1:2	1:2
8	ChCl-For	Formic acid	2:1, 1:1, 1:2	1:2
9	ChCl-Oxa-H ₂ O	Oxalic acid – Nước	1:2:0, 1:1:0, 1:1:1	1:1:1
10	ChCl-Tar-H ₂ O	Tartaric – Nước	1:2:0, 1:1:0, 1:1:1	1:1:1
11	ChCl-Glu-H ₂ O	Glucose – Nước	1:2:0, 1:1:0, 1:1:1	1:1:1
12	ChCl-Suc-H ₂ O	Sucrose – Nước	1:2:0, 1:1:0, 1:1:1	1:1:1
13	ChCl-Mal-H ₂ O	Maltose – Nước	1:2:0, 1:1:0, 1:1:1	1:1:1
14	ChCl-Xyl-H ₂ O	Xylose – Nước	1:2:0, 1:1:0, 1:1:1	1:1:1
15	ChCl-Fru-H ₂ O	Fructose – Nước	1:2:0, 1:2:1, 2:2:1	2:2:1
16	ChCl-Act-H ₂ O	Acetamide – Nước	1:2:0, 1:1:0, 1:2:1	1:2:1

2.4. Chiết xuất andrographolide từ xuyên tâm liên

Bột xuyên tâm liên (0,5 gam) được chiết với mỗi 5 mL các DESs chứa 30% nước cất. Dung môi đối chứng được sử dụng là ethanol (EtOH) và methanol (MeOH). Xuyên tâm liên được chiết với các dung môi ở nhiệt độ phòng, có khuấy đều liên tục trong vòng 60 phút bằng máy khuấy từ gia nhiệt (AccuPlate™, Labnet, Mỹ). Sau đó, ly tâm hỗn hợp thu được ở tốc độ 4000 vòng/phút trong 10 phút để loại bỏ chất rắn bằng máy ly tâm (Zenith LC-04S, Jiangsu Zhengji, Trung Quốc). Dịch chiết được pha loãng bằng methanol, lọc qua màng lọc thân nước polytetrafluoroethylene 0,45 µm (Whatman plc., Buckinghamshire, United Kingdom) và định lượng andrographolide có trong dịch chiết bằng HPLC. Mỗi thí nghiệm chiết xuất được lặp lại ba lần. Hiệu suất chiết xuất được tính theo công thức sau:

$$\text{Hiệu suất chiết xuất} = \frac{m_{\text{Andrographolide}}}{m_{\text{DL}}} \cdot 100\%$$

Trong đó: $m_{\text{Andrographolide}}$ là khối lượng andrographolide có trong dịch chiết dung môi xanh thu được, m_{DL} là khối lượng dược liệu trong quá trình chiết xuất.

2.5. Chuẩn bị dung dịch chuẩn

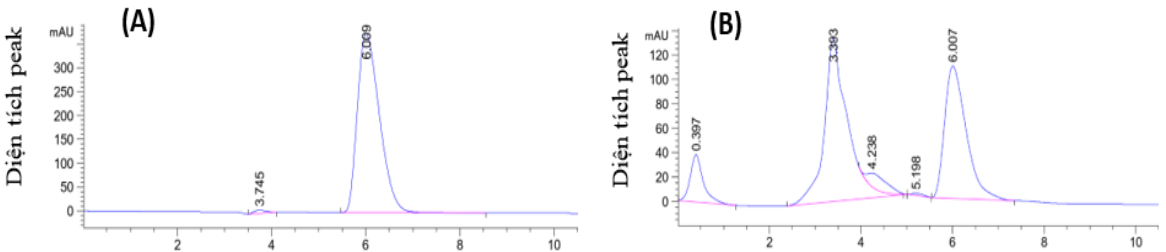
Dung dịch chuẩn gốc là andrographolide chuẩn được hòa tan trong methanol ở nồng độ 1000 µg/mL. Một dãy các dung dịch chuẩn andrographolide ở các nồng độ khác nhau 100, 200, 400, 600, 800 µg/mL được pha từ dung dịch chuẩn gốc.

2.6. Định lượng andrographolide bằng HPLC

Các mẫu được phân tích bằng hệ thống HPLC pha đảo (Agilent Technologies Co. Ltd., California, USA), bao gồm một máy tiêm mẫu tự động, một máy bơm, một máy dò DPA và bộ điều khiển nhiệt độ của cột. Sự phân tách sắc ký được thực hiện

trên cột Eclipse XBD-C18 (4,6 mm × 150 mm, 5 μm, Agilent Technologies, USA). Pha động được sử dụng là methanol và nước (65/35, thể tích/thể tích). Tốc độ dòng là 1,0 mL/phút. Bước sóng phát hiện là 223

nm. Thời gian lưu: andrographolide chuẩn là 6,009 phút và andrographolide trong mẫu thử (hệ ChCl-Eth) là 6,007 phút (**Hình 2**).



Hình 2. Sắc kí đồ của andrographolide chuẩn (A) và dung dịch mẫu thử (B)

2.7. Hoạt tính chống oxi hóa DPPH

Hoạt tính chống oxi hóa được xác định theo phương pháp trung hòa gốc tự do DPPH dựa trên nguyên tắc: DPPH là một gốc tự do bền, dung dịch có màu tím, bước sóng cực đại hấp thụ tại 517 nm; các chất có khả năng chống oxi hóa sẽ trung hòa gốc DPPH, làm giảm nồng độ DPPH, màu dung dịch sẽ chuyển từ tím sang vàng. Cụ thể, hòa tan DPPH trong MeOH để được nồng độ 100 μM. Mẫu thử là dung dịch được tạo thành khi trộn 100 μL mỗi dịch chiết với 3,9 mL dung dịch DPPH. Mẫu đối chứng được sử dụng là hỗn hợp của 100 μL DESs với 3,9 mL dung dịch DPPH. Các dung dịch được lắc đều bằng máy vortex và ủ ở nhiệt độ phòng trong vòng 30 phút trong điều kiện không có ánh sáng. Độ hấp thụ của hỗn hợp xác định ở bước sóng 517 nm [7]. Đối chứng được sử dụng là dung dịch quercetin ở nồng độ 500

μg/mL. Giá trị phần trăm ức chế tính theo công thức:

$$I = \frac{A_{ch} - A_t}{A_{ch}} \cdot 100\%$$

Trong đó: A_{ch} là độ hấp thụ của mẫu đối chứng
 A_t là độ hấp thụ của mẫu thử.

2.8. Phân tích dữ liệu

Các giá trị trung bình, sai số có được tính toán trong Excel 2010. Xử lý số liệu theo phương pháp thống kê dựa trên phần mềm SPSS. Giá trị $p < 0,05$ là được xem là sự khác biệt có ý nghĩa thống kê.

3. KẾT QUẢ

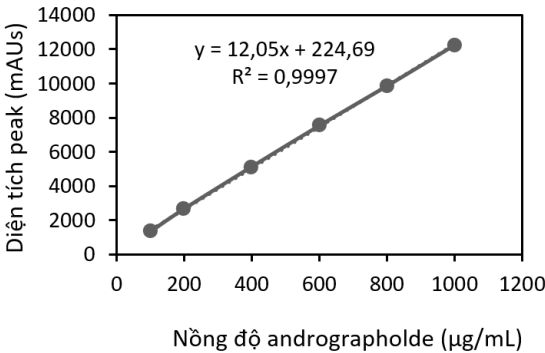
3.1. Đường chuẩn Andrographolide

Nồng độ thử nghiệm và diện tích peak của các dung dịch andrographolide chuẩn được biểu thị trong **Bảng 2**.

Bảng 2. Diện tích peak của các dung dịch andrographolide chuẩn

Nồng độ (μg/mL)	100	200	400	600	800	1000
Diện tích peak (mAU)	1328,28	2660,13	5122,60	7522,78	9833,49	12223,83

Từ các giá trị thu được, xây dựng đường chuẩn andrographolide ở **Hình 3**. Phương trình đường chuẩn: $y = 12,05x + 224,69$, trong đó y là diện tích peak và x là nồng độ andrographolide (μg/mL).



Hình 3. Đường chuẩn andrographolide

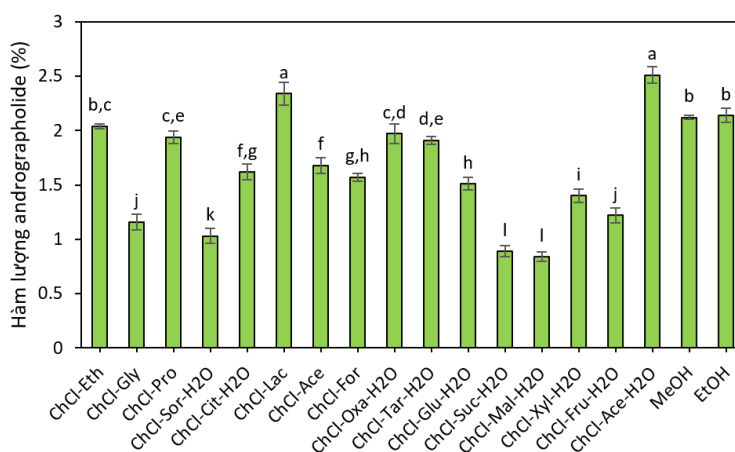
3.2. Chuẩn bị các DESs

Để chuẩn bị các DESs, HBA và một số HBD được lựa chọn từ các nguyên liệu rẻ tiền và có sẵn trong phòng thí nghiệm. Trong nghiên cứu này, bốn nhóm HBD (alcohol, carboxylic acid, glucit và amide) được sử dụng kết hợp với HBA (ChCl) để điều chế các DESs. Tổng số 48 tổ hợp DESs đã được thử nghiệm ban đầu và 16 DESs được lựa chọn cuối cùng để sử dụng chiết xuất. Các DESs được lựa chọn trên nguyên tắc là chất lỏng trong suốt và ổn định trong quá trình bảo quản (**Bảng 1**). Trong quá trình chuẩn bị, chúng tôi nhận thấy rằng trạng thái của HBD đóng một vai trò quan trọng trong quá trình hình thành và ổn định của DESs. Các DESs dễ dàng tổng hợp và ít nhớt hơn khi HBD ở trạng thái lỏng (ví dụ: ethylene glycol, glycerol, propylene glycol, lactic acid, acetic acid, formic acid). Trong khi đó, cần phải bổ sung nước đối với một số DES mà HBD ở trạng thái rắn (ví dụ: sorbitol, tartaric acid, glucose,

sucrose, maltose, xylose, fructose, acetamide). Chúng tôi cũng phát hiện ra rằng tỷ lệ HBA và HBD khác nhau có thể ảnh hưởng đến quá trình tổng hợp và tính ổn định của DESs. Ví dụ, khi ChCl đun nóng với glycerol theo tỉ lệ mol 2:1, 1:1, 1:2, thì chất lỏng thu được chỉ trong suốt với tỉ lệ mol 1:2.

3.3. Hiệu suất chiết xuất andrographolide từ xuyên tâm liên

Thành phần của DESs ảnh hưởng đáng kể đến hoạt tính hóa lý của dung môi, như độ phân cực, độ nhớt, khả năng hòa tan các chất. Điều này ảnh hưởng trực tiếp đến hiệu suất chiết xuất các hợp chất mục tiêu [8]. Nhằm lựa chọn được DESs phù hợp, 16 DESs được sử dụng để khảo sát khả năng chiết xuất andrographolide từ xuyên tâm liên. Hàm lượng andrographolide được chiết xuất từ 16 dung môi này so với 2 dung môi hữu cơ là MeOH và EtOH thể hiện trong **Hình 4**.



Hình 4. Hiệu suất chiết andrographolide từ xuyên tâm liên với các DESs và dung môi hữu cơ. Các chữ cái trên đầu mỗi cột biểu thị so sánh sự khác biệt thống kê về hiệu suất chiết xuất của các hệ dung môi, trong đó các chữ cái khác nhau thể hiện sự khác biệt có ý nghĩa ($p < 0,05$), các chữ cái giống nhau thể hiện sự khác biệt không có ý nghĩa ($p > 0,05$).

Hàm lượng andrographolide chiết xuất từ xuyên tâm liên khi sử dụng các DESs có giá trị từ 0,84 - 2,51% (**Hình 4**). Nhìn chung, các DESs mà thành phần chứa các acid và alcohol như ethylene glycol, propylene glycol, lactic acid, oxalic acid, tartaric acid cho hiệu suất chiết tốt hơn, hàm lượng andrographolide dao động trong khoảng 1,91 - 2,34%. Trong khi đó, các DESs chứa các đường cho hiệu quả chiết xuất kém với hàm lượng andrographolide từ 0,84 - 1,51%. Kết quả nghiên cứu đã chỉ ra rằng, hai DESs là choline chloride-lactic acid (ChCl-Lac) và choline chloride-acetamide-nước (ChCl-Act-H₂O) có khả năng chiết xuất andrographolide từ xuyên tâm liên tốt nhất với hiệu suất tương ứng là $2,34 \pm 0,11\%$ và $2,51 \pm 0,08\%$ ($p > 0,05$), cao hơn so với đối chứng được sử dụng

MeOH ($2,12 \pm 0,02\%$) và EtOH ($2,14 \pm 0,07\%$) ($p < 0,05$).

3.4. Hoạt tính chống oxi hóa

Nồng độ của andrographolide trong dịch chiết và hoạt tính chống oxi hóa của các dịch chiết andrographolide từ xuyên tâm liên khi sử dụng các DESs, MeOH và EtOH được thể hiện ở **Hình 6**. Phần trăm ức chế của các dịch chiết có giá trị từ 19,80 đến 65,28%. Nhìn chung, khả năng ức chế của các dịch chiết tỉ lệ thuận với hàm lượng andrographolide trong dịch chiết. Các DESs chứa alcohol và acid như propylene glycol, citric acid, lactic acid, tartaric acid, glucose, acetamide có khả năng ức chế cao hơn 50%. Trong khi đó, các hệ dung môi như ChCl-Gly, ChCl-Sor-H₂O, ChCl-Suc-H₂O, ChCl-Mal-H₂O có

phần trăm ức chế DPPH nhỏ hơn 30%. Hệ dung môi ChCl-Lac và ChCl-Act-H₂O có khả năng ức chế DPPH tốt nhất với phần trăm ức chế lần lượt là 63,50 ± 0,27 và 65,28 ± 0,66%, so với dung môi hữu cơ đối chứng MeOH và EtOH, ức chế 60,03 ± 0,75 và 56,45 ± 0,78% tương ứng.

Bảng 3. Nồng độ andrographolide trong dịch chiết xuyên tâm liên và phần trăm ức chế DPPH khi sử dụng các DESs làm dung môi chiết xuất

STT	Viết tắt	Nồng độ andrographolide (mg/mL)	Phần trăm ức chế (%)
1	ChCl-Eth	2,04 ± 0,02 ^{b,c}	49,78 ± 0,33 ⁱ
2	ChCl-Gly	1,16 ± 0,07 ⁱ	26,79 ± 0,40 ⁿ
3	ChCl-Pro	1,94 ± 0,06 ^{c,e}	58,27 ± 0,72 ^d
4	ChCl-Sor-H ₂ O	1,03 ± 0,07 ^k	22,05 ± 0,23 ^o
5	ChCl-Cit-H ₂ O	1,62 ± 0,07 ^{f,g}	51,63 ± 0,31 ^h
6	ChCl-Lac	2,34 ± 0,11 ^a	63,50 ± 0,27 ^b
7	ChCl-Ace	1,68 ± 0,07 ^f	37,12 ± 0,38 ^m
8	ChCl-For	1,57 ± 0,04 ^{g,h}	46,97 ± 0,40 ^j
9	ChCl-Oxa-H ₂ O	1,97 ± 0,09 ^{c,d}	46,63 ± 0,49 ^j
10	ChCl-Tar-H ₂ O	1,91 ± 0,04 ^{d,e}	56,44 ± 0,62 ^f
11	ChCl-Glu-H ₂ O	1,51 ± 0,06 ^h	54,32 ± 0,72 ^g
12	ChCl-Suc-H ₂ O	0,86 ± 0,05 ^l	19,80 ± 0,18 ^p
13	ChCl-Mal-H ₂ O	0,84 ± 0,04 ^l	27,45 ± 0,23 ⁿ
14	ChCl-Xyl-H ₂ O	1,40 ± 0,06 ⁱ	41,44 ± 0,19 ^l
15	ChCl-Fru-H ₂ O	1,22 ± 0,07 ^j	44,09 ± 0,30 ^k
16	ChCl-Act-H ₂ O	2,51 ± 0,08 ^a	65,28 ± 0,66 ^a
17	MeOH	2,11 ± 0,02 ^b	60,03 ± 0,75 ^c
18	EtOH	2,14 ± 0,07 ^b	56,45 ± 0,78 ^f
19	Quercetin	0,50 ± 0,00 ^m	57,37 ± 0,51 ^e

Các chữ cái bên cạnh giá trị trung bình biểu thị so sánh sự khác biệt thống kê về nồng độ andrographolide và phần trăm ức chế DPPH của các hệ dung môi. Trong cùng một cột, các số trung bình theo sau bởi chữ cái khác nhau thì sự khác biệt có ý nghĩa thống kê ($p < 0,05$), các số trung bình theo sau bởi chữ cái giống nhau thì sự khác biệt không có ý nghĩa thống kê ($p > 0,05$).

4. BÀN LUẬN

Phương pháp chiết xuất đóng một vai trò quan trọng trong quá trình chiết xuất hoạt chất từ dược liệu. Phương pháp chiết xuất được lựa chọn thường đạt hiệu suất cao, đơn giản, nhanh chóng, an toàn và hiệu quả về mặt kinh tế [6]. Nhiều nghiên cứu đã tập trung vào việc tìm kiếm các dung môi phù hợp cũng như các kỹ thuật khác nhau để chiết xuất andrographolide từ xuyên tâm liên với hiệu suất tốt nhất. Satyanshu và cộng sự [9] đã so sánh khả năng chiết xuất andrographolide từ xuyên tâm liên bằng chiết xuất chất lỏng sử dụng CO₂ siêu tới hạn (SFE) với các phương pháp như ngâm, chiết Soxhlet, chiết xuất dưới sự hỗ trợ của vi sóng, chiết xuất dưới sự hỗ trợ của siêu âm khi sử dụng methanol và nước làm dung môi. Nghiên cứu này đã chỉ ra rằng hiệu

suất chiết xuất thu được khác nhau khi sử dụng các phương pháp và dung môi khác nhau, trong đó phương pháp SFE cho hiệu suất chiết xuất tốt nhất (132 µg/g). Andri và cộng sự [10] đã chỉ ra rằng ảnh hưởng của dung môi chiết xuất đến hiệu suất chiết andrographolide từ xuyên tâm liên, kết quả nghiên cứu cho thấy methanol được coi là dung môi tốt nhất trong quá trình chiết xuất này. Avanigadda cũng báo cáo dung môi methanol cho hiệu quả chiết xuất tốt nhất andrographolide từ xuyên tâm liên [11].

Có khoảng 50% thuốc được sử dụng trong lâm sàng có nguồn gốc từ tự nhiên. Cấu trúc các hợp chất từ tự nhiên là rất phức tạp, nên khó tổng hợp bằng con đường hóa dược. Vì vậy, chiết xuất từ tự nhiên là sự lựa chọn khả thi. Việc phát triển các dung môi xanh có độc tính và chi phí thấp là một vấn đề then

chất đối với ngành công nghiệp dược phẩm. Ngày nay, các dung môi hữu cơ thông thường, ví dụ như methanol, alcohol, chloroform, ethyl acetate được sử dụng rộng rãi để chiết xuất các hợp chất tự nhiên có hoạt tính sinh học từ dược liệu. Tuy nhiên, việc tiêu thụ một lượng lớn các dung môi hữu cơ dễ bay hơi và nguy hiểm này có thể góp phần vào ô nhiễm môi trường và để lại dư lượng dung môi không thể chấp nhận được trong dịch chiết [12]. Kể từ khi được giới thiệu bởi Abbott và cộng sự vào năm 2003, DESs nổi lên như một loại dung môi xanh và bền vững mới. Các thành phần ban đầu của DESs đều tồn tại trong tự nhiên nên DESs thân thiện với môi trường, ngoài ra DESs có chi phí thấp, an toàn, vì vậy DESs là lựa chọn thay thế linh hoạt cho các dung môi hữu cơ thông thường trong quá trình chiết [12].

Nghiên cứu này tập trung vào việc phát triển dung môi thay thế cho dung môi hữu cơ trong quá trình chiết xuất andrographolide từ xuyên tâm liên. Kết quả cho thấy các dung môi ChCl-Lac và ChCl-Act-H₂O cho hiệu suất tốt nhất, với hiệu suất chiết xuất lần lượt là $2,34 \pm 0,11$ và $2,51 \pm 0,08\%$, cao hơn so với dung môi hữu cơ MeOH ($2,12 \pm 0,02\%$) và EtOH ($2,14 \pm 0,07\%$). Jukrapun và cộng sự đã báo cáo các DESs gồm choline chloride: citric acid và proline: citric acid cho thấy hiệu quả chiết xuất tốt nhất nhất andrographolide từ xuyên tâm liên, tuy nhiên các DESs này cho thấy hiệu suất chỉ bằng 63,48 và 64,49% so với MeOH làm dung môi đối chứng [13]. Trong khi đó, các DESs được sử dụng trong nghiên cứu này đã cho thấy hiệu suất chiết xuất gấp 110,38 - 118,40% so với MeOH. DESs nếu được thiết kế phù hợp sẽ là một dung môi xanh tiềm năng thay thế dung môi hữu cơ truyền thống. Tương tác π - π và liên kết hydrogen giữa andrographolide và DESs được cho đã cải thiện độ tan từ đó tăng cường hiệu suất chiết xuất [14]. Hiệu suất chiết xuất thu được từ các DESs trong thí nghiệm này vượt trội hơn so với các DESs được công bố trước đây như choline chloride: citric acid và proline: citric acid, nguyên nhân có thể được giải thích bởi vì tính chất của các DESs phụ thuộc vào thành phần cấu thành của nó. Các DESs với thành phần khác nhau sẽ cho hiệu suất chiết xuất khác nhau [14].

Andrographolide được biết đến với các hoạt tính sinh học tiềm năng, bao gồm chống oxy hóa, chống viêm, kháng khuẩn, kháng virus, chống ung thư, chống béo phì, chống tiểu đường, sốt rét, bảo vệ gan [4]. Trong nghiên cứu này, hoạt tính chống oxy hóa của dịch chiết xuyên tâm liên khi chiết xuất bằng các DESs, MeOH, EtOH đã được so sánh. Khả năng chống oxy hóa của các chiết xuất khác nhau đã được quan sát, điều này có thể được giải thích bởi

hàm lượng khác nhau của hoạt chất thu được khi sử dụng các dung môi chiết xuất khác nhau. Sự tương đồng về kết quả này đã được ghi nhận trong công bố trước đây, khi sử dụng các dung môi chiết xuất như MeOH, EtOH, nước, acetone [15]. Hơn nữa, chiết xuất MeOH và EtOH cho nồng độ andrographolide lần lượt là 2,11 và 2,14 mg/mL, trong khi khả năng ức chế DPPH tương ứng là 60,03 và 56,45%. Điều này có thể giải thích bởi sự thành phần hóa học khác nhau thu được ngoài andrographolide của hai chiết xuất này. Đặc biệt, khả năng ức chế gốc tự do DPPH tỉ lệ thuận với nồng độ của andrographolide trong dịch chiết, qua đó thấy rằng có thể andrographolide chịu trách nhiệm chính gây ra hoạt tính chống oxy hóa.

Tóm lại, nghiên cứu này đã phát triển các hệ dung môi xanh bền vững nhằm chiết xuất andrographolide từ xuyên tâm liên và đồng thời so sánh khả năng chống oxy hóa của các chiết xuất thu được. Ban đầu, kết quả đã chỉ ra rằng ChCl-Lac và ChCl-Act-H₂O là những DESs tiềm năng để chiết xuất andrographolide từ xuyên tâm liên, với hiệu suất chiết xuất vượt trội hơn so với các dung môi hữu cơ truyền thống như MeOH và EtOH. Kết quả nghiên cứu này mở ra định hướng các nghiên cứu tiếp theo như tối ưu hóa quy trình chiết xuất, phục hồi hợp chất đích từ dung dịch chiết, đánh giá khả năng tái sử dụng dung môi.

5. KẾT LUẬN

Nghiên cứu phát triển quy trình chiết xuất andrographolide từ xuyên tâm liên. Từ các dung môi xanh, kết quả sàng lọc 48 tổ hợp DESs được thử nghiệm ban đầu và 16 DESs được lựa chọn cuối cùng để sử dụng chiết xuất. Sàng lọc với các DESs cho thấy ChCl-Lac và ChCl-Act-H₂O là hai DESs cho hiệu suất chiết xuất andrographolide từ xuyên tâm liên cao nhất, với hiệu suất lần lượt là $2,34 \pm 0,11$ và $2,51 \pm 0,08\%$, sự khác biệt về hiệu suất chiết xuất của hai DESs này là không đáng kể ($p > 0,05$). Các DESs đều cho hiệu suất chiết xuất cao hơn so với các dung môi truyền thống ($p > 0,05$), bao gồm MeOH ($2,12 \pm 0,02\%$) và EtOH ($2,14 \pm 0,07\%$). Hoạt tính chống oxy hóa của các dịch chiết xuyên tâm liên khi sử dụng các DESs khác nhau tỉ lệ thuận với nồng độ andrographolide có trong chiết xuất. Các chiết xuất ChCl-Lac và ChCl-Act-H₂O cho thấy khả năng chống oxy hóa tốt nhất, phần trăm ức chế lần lượt là $63,50 \pm 0,27$ và $65,28 \pm 0,66\%$.

Lời cảm ơn: Công trình được thực hiện với sự hỗ trợ kinh phí của Đại học Huế (Mã số: DHH2022-04-169) và Nhóm nghiên cứu mạnh Đại học Huế (Mã số NCM.DHH.2023.01).

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. M.W. Nam, J. Zhao, M.S. Lee, J.H. Jeong, J. Lee, Enhanced extraction of bioactive natural products using tailor-made deep eutectic solvents: application to flavonoid extraction from *Flos sophorae*, *Green Chemistry*, 17 (2015) 1718–1727. <http://dx.doi.org/10.1039/c4gc01556h>.
2. B.Y. Zhao, P. Xu, F.X. Yang, H. Wu, M.H. Zong, W.Y. Lou, Biocompatible Deep Eutectic Solvents Based on Choline Chloride: Characterization and Application to the Extraction of Rutin from *Sophora japonica*, *ACS Sustainable Chemistry and Engineering*, 3 (2015) 2746–2755. <https://doi.org/10.1021/acssuschemeng.5b00619>.
3. J. Chen, Y. Li, X. Wang, W. Liu, Application of deep eutectic solvents in food analysis: A review, *Molecules*, 24 (2019) 4594. <https://doi.org/10.3390/molecules24244594>.
4. Y. Dai, S.R. Chen, L. Chai, J. Zhao, Y. Wang, Y. Wang, Overview of pharmacological activities of *Andrographis paniculata* and its major compound andrographolide, *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 59 (2019) S17–S29. <https://doi.org/10.1080/10408398.2018.1501657>.
5. K. Sa-Ngiamsumtorn, A. Suksatu, Y. Pewkliang, P. Thongsri, P. Kanjanasirirat, S. Manopwisedjaroen, S. Charoensutthivarakul, P. Wongtrakongate, S. Pitiporn, J. Chaopreecha, S. Kongsomros, K. Jearawuttanakul, W. Wannalo, P. Khemawoot, S. Chutipongtanate, S. Borwornpinyo, A. Thitithanyanont, S. Hongeng, Anti-SARS-CoV-2 Activity of *Andrographis paniculata* Extract and Its Major Component Andrographolide in Human Lung Epithelial Cells and Cytotoxicity Evaluation in Major Organ Cell Representatives, *Journal of Natural Products*, 84 (2021) 1261–1270. <https://doi.org/10.1021/acs.jnatprod.0c01324>.
6. A.C. Kumoro, M. Hasan, H. Singh, Extraction of Andrographolide from *Andrographis paniculata* Dried Leaves Using Supercritical CO₂ and Ethanol Mixture, *Industrial and Engineering Chemistry Research*, 58 (2019) 742–751. <https://doi.org/10.1021/acs.iecr.8b02243>.
7. C.B.T. Pal, G.C. Jadeja, Deep eutectic solvent-based extraction of polyphenolic antioxidants from onion (*Allium cepa* L.) peel, *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 99 (2019) 1969–1979. <https://doi.org/10.1002/jsfa.9395>.
8. X. Peng, M.H. Duan, X.H. Yao, Y.H. Zhang, C.J. Zhao, Y.G. Zu, Y.J. Fu, Green extraction of five target phenolic acids from *Lonicerae japonicae* Flos with deep eutectic solvent, *Separation and Purification Technology*, 157 (2016) 249–257. <https://doi.org/10.1016/j.seppur.2015.10.065>.
9. S. Kumar, T. Dhanani, S. Shah, Extraction of Three Bioactive Diterpenoids from *Andrographis paniculata*: Effect of the Extraction Techniques on Extract Composition and Quantification of Three Andrographolides Using High-Performance Liquid Chromatography, *Journal of Chromatographic Science*, 52 (2014) 1043–1050. <https://doi.org/10.1093/chromsci/bmt157>.
10. A.C. Kumoro, M. Hasan, H. Singh, Effects of solvent properties on the Soxhlet extraction of diterpenoid lactones from *Andrographis paniculata* leaves, *ScienceAsia*, 35 (2009) 306–309. <https://doi.org/10.2306/scienceasia1513-1874.2009.35.306>.
11. S. Avanigadda, M. Vangalapati, Studies of Andrographolide Extraction from *Andrographis paniculata*, *International Journal of Chemical, Environmental and Pharmaceutical Research*, 1 (2010) 32–36.
12. L. Duan, L.L. Dou, L. Guo, P. Li, E.H. Liu, Comprehensive Evaluation of Deep Eutectic Solvents in Extraction of Bioactive Natural Products, *ACS Sustainable Chemistry and Engineering*, 4 (2016) 2405–2411. <https://doi.org/10.1021/acssuschemeng.6b00091>.
13. J. Komaikul, S. Ruangdachsuwan, D. Wanlayaporn, S. Palabodeewat, S. Punyahathaikul, T. Churod, R. Choonong, T. Kitisripanya, Effect of andrographolide and deep eutectic solvent extracts of *Andrographis paniculata* on human coronavirus organ culture 43 (HCoV-OC43), *Phytomedicine*, 112 (2023) 154708. <https://doi.org/10.1016/j.phymed.2023.154708>.
14. Y. Patrice Didion, T. Gijsbert Tjalsma, Z. Su, M. Malankowska, M. Pinelo, What is next? the greener future of solid liquid extraction of biobased compounds: Novel techniques and solvents overpower traditional ones, *Separation and Purification Technology*, 320 (2023) 124147. <https://doi.org/10.1016/j.seppur.2023.124147>.
15. N.T.T. Hà, L.P. Hồng Thủy, N.V. Thanh, N.T.T. Hằng, Đ.V. Cường, N.V. Cường, N.H. Thái, Khảo sát hàm lượng polyphenol, hoạt tính chống oxy hóa và kháng khuẩn trên vi khuẩn *Escherichia coli* ATCC 25922 của một số loài thảo dược, *Tạp Chí Khoa Học Nông Nghiệp Việt Nam*, 19 (2021) 1628–1639.