

Chiết xuất và phục hồi triterpenoid từ Nữ trinh tử (*Ligustrum lucidum* W. T. Aiton) bằng dung môi eutectic sâu kỵ nước kết hợp nhựa hấp phụ dưới sự hỗ trợ siêu âm

Lê Trọng Nhân, Ngô Dương Tùng, Trần Thị Thùy Linh, Nguyễn Thị Hoài*
Khoa Dược, Trường Đại học Y - Dược, Đại học Huế

Tóm tắt

Đặt vấn đề: Sử dụng dung môi xanh để chiết xuất hoạt chất từ dược liệu đang là xu hướng của quá trình chiết xuất bền vững. **Mục tiêu:** Nghiên cứu này trình bày quy trình chiết xuất bền vững triterpenoid từ Nữ trinh tử dựa trên sự kết hợp của dung môi eutectic sâu kỵ nước và nhựa hấp phụ, dưới sự hỗ trợ siêu âm. **Đối tượng và phương pháp nghiên cứu:** Dung môi eutectic sâu kỵ nước dựa trên menthol và lauric acid được sàng lọc ban đầu. Các điều kiện chiết xuất đã được tối ưu hóa bằng phương pháp bề mặt đáp ứng. Triterpenoid được phục hồi từ dịch chiết bằng phương pháp chiết rắn-lỏng dựa trên nhựa hấp phụ. Khả năng tái sử dụng của các vật liệu ban đầu được đánh giá. **Kết quả:** Lauric acid - valeric acid là hệ dung môi xanh cho hiệu suất chiết xuất triterpenoid tốt nhất. Ở điều kiện tối ưu, hiệu suất chiết xuất triterpenoid đạt 15,17 mg/g. Hạt nhựa hấp phụ HPD-300 phục hồi được 98,91% triterpenoid từ dịch chiết và sản phẩm thu được chứa 53,95% triterpenoid. Dung môi và hạt nhựa đã được tái sử dụng thành công qua ba chu kỳ chiết xuất và phục hồi triterpenoid liên tục. **Kết luận:** Các kết quả của nghiên cứu đóng góp vào hiểu biết quy trình chiết xuất xanh triterpenoid từ Nữ trinh tử, nhằm hướng tới thay thế các dung môi hữu cơ độc hại bằng các dung môi xanh an toàn và thân thiện.

Từ khóa: triterpenoid, Nữ trinh tử, chiết xuất xanh, dung môi eutectic sâu kỵ nước.

Ultrasound-assisted extraction and recovery of triterpenoids from *Ligustrum lucidum* W. T. Aiton using hydrophobic deep eutectic solvents combined with macroporous resins

Le Trong Nhan, Ngo Duong Tung, Tran Thi Thuy Linh, Nguyen Thi Hoai*
Faculty of Pharmacy, University of Medicine and Pharmacy, Hue University

Abstract

Background: The application of green solvents in the extraction of bioactive compounds from medicinal plants has become a prominent approach in the development of sustainable extraction processes. **Objectives:** In this study, a sustainable extraction strategy for triterpenoids from *Ligustrum lucidum* is developed, employing hydrophobic deep eutectic solvents in combination with macroporous resins under ultrasound-assisted extraction. **Materials and method:** Hydrophobic deep eutectic solvents based on menthol and lauric acid were initially screened. Extraction conditions were optimized using response surface methodology. Triterpenoids were recovered from the extract using a solid-liquid extraction approach with macroporous resins. The reusability of the initial materials was also evaluated. **Results:** The lauric acid-valeric acid exhibited the highest extraction efficiency for triterpenoids. Under optimal conditions, the extraction yield reached 15.17 mg/g. The macroporous resin HPD-300 successfully recovered 98.91% of triterpenoids from the extract, yielding a product containing 53.95% triterpenoids. Both the solvent and the resin were effectively reused over three consecutive extraction and recovery cycles. **Conclusion:** These findings contribute to a better understanding of green extraction processes for triterpenoids from *Ligustrum lucidum*, aiming to replace hazardous organic solvents with safer and more environmentally friendly green solvents

Keywords: triterpenoid, *Ligustrum lucidum*, green extract, hydrophobic deep eutectic solvents

* Tác giả liên hệ: Nguyễn Thị Hoài; email: nthoai@hueuni.edu.vn
Ngày nhận bài: 25/05/2025; Ngày đồng ý đăng: 05/07/2025; Ngày xuất bản: 25/09/2025

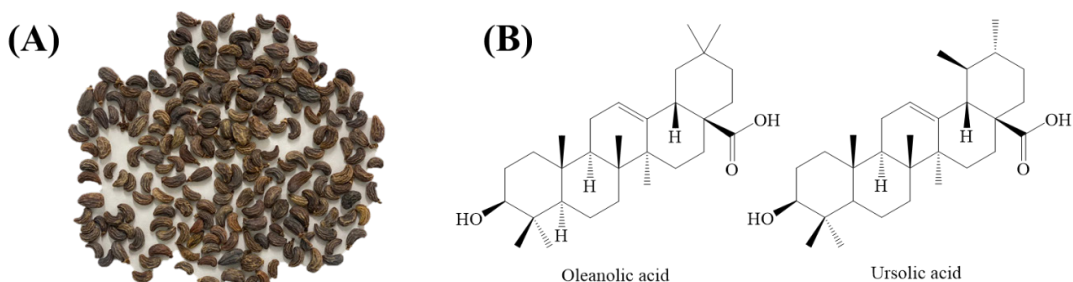
1. ĐẶT VẤN ĐỀ VÀ MỤC TIÊU

Chiết xuất hoạt chất từ dược liệu là một trong những bước quan trọng trong quá trình nghiên cứu và phát triển thuốc. Trong đó, việc lựa chọn dung môi là yếu tố quan trọng nhất. Dung môi thích hợp quyết định đến hiệu quả, độ tinh khiết cũng như giá trị ứng dụng của sản phẩm cuối cùng. Tuy nhiên, một lượng lớn dung môi hữu cơ độc hại, có nguồn gốc từ hóa thạch và dầu mỏ đang được sử dụng hàng năm trong các quy trình chiết xuất đã đặt ra một thách thức lớn đối với sự phát triển bền vững. Đứng trước những yêu cầu cấp bách trên, việc tìm kiếm và phát triển các dung môi xanh, an toàn và hiệu quả đang ngày càng được quan tâm [1].

Dung môi eutectic sâu (DESS) là một nhóm dung môi xanh được phát triển trong những năm gần đây, được hình thành từ chất cho liên kết hydrogen (HBD) và chất nhận liên kết hydrogen (HBA) với tỉ lệ xác định, tạo thành hỗn hợp có điểm nóng chảy thấp hơn các thành phần riêng lẻ, mang tính an toàn, khả năng phân hủy sinh học, không cháy nổ [2]. Trong đó, dung môi eutectic sâu kỵ nước (HDESSs), một phân nhóm quan trọng của DESSs, có khả năng chiết xuất chọn

lọc các hoạt chất kỵ nước do cấu trúc chứa các thành phần kỵ nước như acid, alcohol, muối ammonium chứa gốc alkyl dài, menthol, thymol. HDESSs được giới thiệu vào năm 2015 và đã cho thấy hiệu quả trong nhiều ứng dụng như xúc tác, điện hóa, tổng hợp hóa học, đặc biệt gần đây là trong lĩnh vực chiết xuất [3, 4].

Triterpenoid là nhóm các hợp chất tự nhiên cấu thành từ sáu đơn vị isoprene và được chia thành nhiều phân nhóm khác nhau, bao gồm triterpenoid pentacyclic, tetracyclic, dammarane, cucurbitane. Triterpenoid thể hiện nhiều hoạt tính sinh học đa dạng như chống oxy hóa, chống viêm, hạ đường huyết, bảo vệ gan, kháng vi sinh vật, khả năng ức chế tế bào ung thư [5]. Với những đặc tính dược lý tiềm năng, việc khai thác nhóm hoạt chất này từ dược liệu có vai trò quan trọng trong việc phát triển các sản phẩm dược phẩm. Tuy nhiên, đặc tính kỵ nước vốn có của triterpenoid dẫn đến việc chiết xuất chúng từ sinh khối hiện nay đang sử dụng các dung môi hữu cơ độc hại như methanol, hexane, toluene, chloroform [6]. Chính vì vậy, cần có các quy trình tối ưu và hiệu quả để đảm bảo tính bền vững.



Hình 1. Nữ trinh tử (A) và cấu trúc hóa học của oleanolic acid, ursolic acid (B)

Nữ trinh tử (Hình 1A) là quả của cây Nữ trinh (*Ligustrum lucidum* W.T.Aiton), thuộc họ Oleaceae. Cây Nữ trinh phân bố rộng rãi ở Trung Quốc, Việt Nam và các nước Đông Á. Trong y học cổ truyền, Nữ trinh tử được sử dụng để điều trị chóng mặt, đau nhức ở eo và đầu gối, khí hư, ù tai, bạc tóc sớm, sốt do âm hư và thị lực mờ [7]. Các nghiên cứu hiện đại xác nhận vai trò điều hòa miễn dịch, chống ung thư, chống viêm, chống oxy hóa và chống loãng xương của Nữ trinh tử [7]. Thành phần hóa học của Nữ trinh tử đa dạng như flavonoid, phenolic acid, iridoid glycoside, saponin và đặc biệt triterpenoid, nổi bật với oleanolic acid (OA) và ursolic acid (UA) (Hình 1B) được tìm thấy hàm lượng cao [7]. Hàm lượng OA và UA trong Nữ trinh tử theo báo cáo trước đó lần lượt là 6,3 và 9,8 mg/g [8]. Quá trình chiết xuất triterpenoid từ Nữ trinh tử hiện nay chủ yếu dựa vào các dung môi hữu cơ [8] hoặc dung môi siêu tới hạn

[9]. Dù đã có những nỗ lực nhằm phát triển các quy trình bền vững, điển hình như ứng dụng hệ hai pha dựa trên DESSs để chiết xuất triterpenoid [10], song các nghiên cứu đầy đủ từ chiết xuất, phục hồi hoạt chất đến đánh giá khả năng tái sử dụng dung môi trong quá trình chiết xuất triterpenoid từ Nữ trinh tử vẫn chưa được nghiên cứu.

Nghiên cứu này trình bày một phương pháp bền vững để chiết xuất triterpenoid từ Nữ trinh tử. Các HDESSs khác nhau dựa trên menthol và lauric acid đã được đánh giá và quá trình chiết xuất được tối ưu hóa bằng phương pháp bề mặt đáp ứng (RSM). Sau đó, triterpenoid được phục hồi từ dịch chiết bằng phương pháp chiết rắn-lỏng (SLE) dựa trên các hạt nhựa hấp phụ macroporous (MRs). Cuối cùng, khả năng tái sử dụng HDESSs và MRs được đánh giá qua ba chu kỳ chiết xuất và phục hồi liên tục. Theo hiểu biết tốt nhất của chúng tôi, đây là báo cáo khoa học

toàn diện và đầy đủ đầu tiên trong việc sử dụng HDESS để chiết xuất và phục hồi triterpenoid từ Nữ trinh tử.

2. ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Đối tượng và hóa chất

Nữ trinh tử được thu mua tại Thừa Thiên Huế. Sau khi thu mẫu, dược liệu được rửa sạch, sấy khô ở 50°C. Mẫu được xay thành bột và đồng nhất bằng mắt lưới 0,71 mm. Bột dược liệu được bảo quản ở nơi thoáng mát để thực hiện các thí nghiệm chiết xuất.

Các chất chuẩn, bao gồm OA chuẩn ($\geq 95\%$, HPLC, số lô 117-39-5) và UA chuẩn ($\geq 94\%$, HPLC, số lô 207671-50-9) được mua tại Macklin Inc. (Quảng Châu, Trung Quốc). Các hóa chất, bao gồm acetic acid, propionic acid, lactic acid, valeric acid, pyruvic acid, octanoic acid, nonanoic acid, capric acid, lauric acid, thymol, menthol, camphor, ethanol, methanol, trifluoroacetic acid được mua tại Xilong Scientific (Quảng Đông, Trung Quốc) và Macklin Inc. (Quảng Châu, Trung Quốc). Các MRs, bao gồm HPD-300, HPD-400, DM-301, ADS-7, LSA-40, XAD-8, D-101, AB-8, HP-20 có nguồn gốc từ Supelco™

Analytical (Pennsylvania, Hoa Kỳ) và Zhengzhou Fulong New Material Technology Co., Ltd. (Trịnh Châu, Trung Quốc).

Quá trình chuẩn bị HDESS được thực hiện bằng máy khuấy từ gia nhiệt (Labnet, Mỹ). Quá trình chiết xuất được thực hiện bằng bể siêu âm (S 100 H, Elma, Đức, tần số siêu âm 37 kHz, công suất siêu âm hiệu dụng 150 W). Máy ly tâm (Zhengji, Trung Quốc) được áp dụng phân tách dịch chiết ra khỏi bã dược liệu. Nồng độ của OA và UA được định lượng bằng hệ thống sắc ký lỏng hiệu năng cao (HPLC) (Agilent 1260 Infinity II, Agilent Technologies, Hoa Kỳ). Các dịch chiết được cô đặc bằng máy cô quay (R-300, Buchi Labortechnik, Thụy Sĩ).

2.2. Chuẩn bị HDESS

HDESS được điều chế bằng cách phối trộn HBA với HBD ở tỉ lệ mol cụ thể (**Bảng 1**), sau đó được đun nóng và khuấy đều liên tục ở nhiệt độ nhỏ hơn 80°C trong vòng 2-4 giờ đến khi thu được chất lỏng đồng nhất và ổn định ở nhiệt độ phòng. Các HDESS được bảo quản trong lọ kín tránh ánh sáng để chuẩn bị cho các thí nghiệm chiết xuất [11].

Bảng 1. Các dung môi được sử dụng trong thí nghiệm sàng lọc dung môi

Loại dung môi	Dung môi	Viết tắt	Tỉ lệ mol:mol
Hữu cơ truyền thống	Methanol	MeOH	50, 100%
	Ethanol	EtOH	50, 100%
HDESS dựa trên menthol	Menthol-acetic acid	Men-AA (1:1)	1:1
	Menthol-lactic acid	Men-LA (1:1)	1:1
	Menthol-propionic acid	Men-PrA (1:1)	1:1
	Menthol-pyruvic acid	Men-PA (1:1)	1:1
	Menthol-valeric acid	Men-VA (1:1)	1:1
	Menthol-octanoic acid	Men-OA (1:1)	1:1
	Menthol-nonanoic acid	Men-NA (1:1)	1:1
	Menthol-decanoic acid	Men-DA (1:1)	1:1
	Menthol-lauric acid	Men-LaA (2:1)	2:1
	Menthol-camphor	Men-CP (1:1)	1:1
	Menthol-thymol	Men-TM (1:1)	1:1
HDESS dựa trên lauric acid	Lauric acid-valeric acid	LaA-VA (1:3)	1:3
	Lauric acid-octanoic acid	LaA-OA (1:3)	1:3
	Lauric acid-nonanoic acid	LaA-NA (1:3)	1:3
	Lauric acid-decanoic acid	LaA-DA (1:3)	1:3

2.3. Chiết xuất OA và UA

Quá trình sàng lọc dung môi được thực hiện dưới sự hỗ trợ chiết xuất siêu âm, với các điều kiện được áp dụng cố định trên các HDESS như sau: tỉ lệ lỏng-rắn là 20 mL/g, thời gian chiết xuất là 30 phút và

nhiệt độ chiết xuất là 50°C. Sau đó, hỗn hợp được ly tâm với tốc độ 4000 vòng/phút trong 5 phút để loại bỏ pha rắn. Dịch chiết được thu thập, sau đó được pha loãng bằng methanol và định lượng nồng độ OA và UA bằng HPLC.

2.4. Định lượng OA và UA bằng HPLC

Nồng độ của OA và UA trong mẫu được phân tích bằng hệ thống HPLC pha đảo. Quá trình phân tách được thực hiện bằng cột Eclipse XBD-C18 (4,6 × 250 mm (5,0 μm), Agilent Technologies). Pha động bao gồm methanol và dung dịch TFA 0,1% với tỉ lệ thể tích 90/10. Tốc độ dòng và bước sóng hấp thụ cực đại lần lượt là 0,6 mL/phút và 205 nm.

2.5. Tối ưu hóa quy trình chiết xuất

Đầu tiên, thí nghiệm ảnh hưởng một yếu tố tại một thời điểm (OFAT) được thực hiện nhằm đánh giá sự ảnh hưởng của các yếu tố lên hiệu suất chiết xuất. Các yếu tố bao gồm, tỉ lệ mol HBD: HBA (1, 2, 3, 4, 5, 6 mol/mol), tỉ lệ lỏng-rắn (10, 15, 20, 25, 30, 35 mL/g), thời gian chiết xuất (10, 20, 30, 40, 50, 60 phút), nhiệt độ chiết xuất (30, 40, 50, 60, 70°C). Sau đó, quá trình chiết xuất được tối ưu hóa hơn nữa bằng RSM dựa trên thiết kế Box-Behnken (BBD) với 29 thí nghiệm được thực hiện. Trong RSM, tỉ lệ HBD: HBA (1, 3, 5 mol/mol), tỉ lệ lỏng-rắn (15, 25, 35 mL/g), thời gian chiết xuất (10, 30, 50 phút), nhiệt độ chiết xuất (30, 50, 70°C) là biến độc lập tương ứng với các mức mã hóa -1, 0, +1. Trong khi hiệu suất chiết xuất triterpenoid là biến phụ thuộc.

2.6. Phục hồi triterpenoid

Triterpenoid (OA và UA) từ dịch chiết HDESSs được phục hồi bằng phương pháp SLE dựa trên MRs. Ban đầu, 10 g MRs được đóng vào cột (10 mm × 25 cm) và được tiến xử lý lần lượt với ethanol tuyệt đối, NaOH 5%, và HCl 5%, sau đó rửa bằng nước siêu tinh khiết cho đến khi đạt môi trường trung tính. Tiếp theo, 2 mL dịch chiết HDESSs thu được ở điều kiện tối ưu được cho qua cột. Cột được rửa với ethanol 60% để loại bỏ HDESSs. Cuối cùng, triterpenoid được rửa giải khỏi MRs bằng ethanol tuyệt đối, sau đó dung môi được loại bỏ bằng cô quay chân không để thu được sản phẩm giàu triterpenoid. Hiệu suất phục hồi và hàm lượng triterpenoid được sử dụng để đánh giá khả năng phục hồi của MRs. Hai thông số này được tính toán như sau:

$$\text{Hiệu suất phục hồi triterpenoid} = \frac{m_1}{m_0} \cdot 100\%$$

$$\text{Hàm lượng triterpenoid} = \frac{m_1}{m_2} \cdot 100\%$$

Trong đó, m_0 và m_1 lần lượt là khối lượng triterpenoid trước phục hồi và sau phục hồi; m_2 là khối lượng của sản phẩm giàu triterpenoid.

2.7. Tái chế HDESSs và MRs

Đối với quá trình tái chế HDESSs, dịch cặn của HDESSs rửa giải từ cột được cô quay chân không để loại bỏ ethanol, thu được HDESSs tái chế. HDESSs tái chế sau đó được sử dụng làm dung môi chiết xuất trong điều kiện tối ưu với dược liệu mới. Đối với quá trình tái chế MRs, cột được tái chế bằng cách

ngâm lần lượt với 5% NaOH và 5% HCl, sau đó rửa bằng nước siêu tinh khiết đến môi trường trung tính. Sau khi tái chế, các cột chứa MRs được sử dụng để phục hồi triterpenoid từ dịch chiết HDESSs. Khả năng tái chế của HDESSs và MRs được đánh giá qua ba chu kì chiết xuất và phục hồi liên tục bằng cách sử dụng HDESSs và MRs tái chế. Bốn thông số, bao gồm hiệu suất chiết xuất, hiệu suất phục hồi triterpenoid, hiệu suất phục hồi HDESSs, hàm lượng triterpenoid được theo dõi cẩn thận trong mỗi chu kì để đánh giá tiềm năng tái sử dụng HDESSs và MRs.

2.8. Phân tích dữ liệu

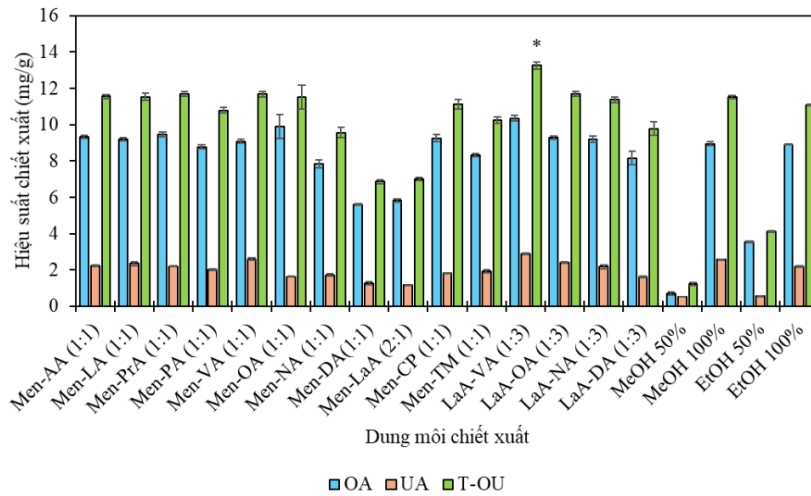
Tất cả các kết quả thí nghiệm được báo cáo dưới dạng giá trị trung bình kèm theo độ lệch chuẩn của ba lần lặp lại. Phân tích phương sai (ANOVA) được thực hiện bằng IBM SPSS Statistics 20, sau đó áp dụng Least Significant Difference (LSD) test để xác định sự khác biệt có ý nghĩa thống kê ở mức tin cậy 95% ($p < 0,05$). Các điều kiện tối ưu cho quá trình chiết xuất trong RSM được xác định bằng phần mềm Design-Expert (phiên bản 13.0, Stat-Ease Inc., Minnesota, Hoa Kỳ).

3. KẾT QUẢ

3.1. Sàng lọc dung môi

Trong nghiên cứu này, HDESSs được lựa chọn làm dung môi chiết xuất triterpenoid dựa trên cơ sở độ phân cực thấp của HDESSs dễ dàng cải thiện độ tan của triterpenoid, từ đó nâng cao hiệu suất chiết xuất [12]. Chính vì vậy, 11 HDES dựa trên menthol và 4 HDESSs dựa trên lauric acid đã được thiết lập, song song với đó các dung môi hữu cơ truyền thống methanol và ethanol được lựa chọn làm dung môi đối chứng. Các điều kiện chiết xuất trong thí nghiệm sàng lọc dung môi được áp dụng nhất quán như sau: tỉ lệ lỏng-rắn (20 mL/g), thời gian chiết xuất là 30 phút và nhiệt độ chiết xuất là 50°C. Hiệu suất chiết xuất tổng của hai triterpenoid OA và UA (T-OU) được sử dụng để so sánh khả năng chiết xuất giữa các dung môi.

Kết quả hiệu suất chiết xuất được trình bày ở **Hình 2**. Nhìn chung, HDESSs dựa trên menthol cho hiệu suất chiết xuất từ OA từ 5,64 - 9,89 mg/g, UA từ 1,16 - 2,59 mg/g, T-OU từ 6,86 - 11,69 mg/g. Các kết quả tương ứng này quan sát được trên HDESSs dựa trên lauric acid lần lượt là 8,16 - 10,35 mg/g, 1,62 - 2,90 mg/g, 9,79 - 13,25 mg/g. Trong đó, lauric acid - valeric acid (LaA-VA) là HDESSs cho hiệu suất chiết triterpenoid lớn nhất, với hiệu suất chiết OA, UA và T-BOU lần lượt là 10,35 mg/g, 2,90 mg/g và 13,25 mg/g. So sánh với kết quả tốt nhất thu được từ dung môi hữu cơ (MeOH) lần lượt là 8,95 mg/g, 2,56 mg/g và 11,51 mg/g. Như vậy, LaA-VA được lựa chọn cho quá trình tối ưu hóa tiếp theo.

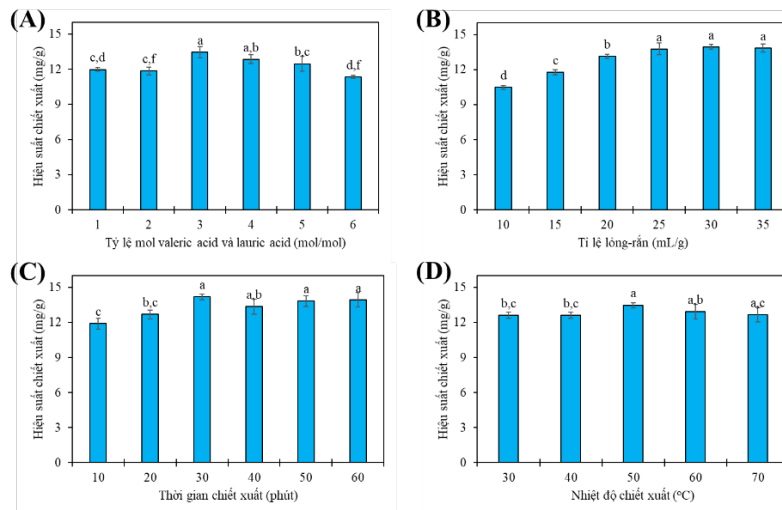


Hình 2. Hiệu suất chiết xuất triterpenoid từ Nữ trinh tử bằng HDEss và dung môi hữu cơ
 Chú thích: (*) Hiệu suất chiết xuất T-OU của LaA-VA khác biệt có ý nghĩa thống kê so với các dung môi còn lại ($p < 0,05$)

3.2. Tối ưu hóa quy trình chiết xuất

Đầu tiên, thí nghiệm OFAT được tiến hành để đánh giá sự ảnh hưởng của các yếu tố lên hiệu suất chiết xuất và kết quả được trình bày ở **Hình 3**. Đối với ảnh hưởng của tỉ lệ mol valeric acid và lauric acid (**Hình 3A**), khi tăng tỉ lệ mol từ 1 lên 3 mol/mol thì hiệu suất chiết xuất T-OU tăng từ 11,98 lên 13,45 mg/g ($p < 0,05$), tiếp tục tăng tỉ lệ mol từ 3 lên 6 thì hiệu suất chiết xuất giảm từ 13,45 xuống 11,36 mg/g. **Hình 3B** mô tả sự ảnh hưởng của tỉ lệ lỏng-rắn đến hiệu suất chiết xuất, kết quả cho thấy hiệu suất chiết xuất T-OU tăng từ 10,47 lên 13,77 mg/g

khi tăng tỉ lệ lỏng-rắn từ 10 lên 25 mL/g ($p < 0,05$), trong khi hiệu suất chiết xuất tăng không đáng kể ở tỉ lệ lỏng-rắn lớn hơn ($p > 0,05$). Ảnh hưởng của thời gian chiết xuất và nhiệt độ chiết xuất được mô tả tương ứng trong các **Hình 3C** và **3D**. Hiệu suất chiết xuất T-OU tăng dần khi kéo dài thời gian chiết xuất và đạt cực đại (14,18 mg/g) tại 30 phút, sau đó thay đổi không đáng kể ($p > 0,05$). Tương tự như vậy, hiệu suất chiết xuất T-OU tăng dần khi nhiệt độ chiết xuất tăng từ 30 lên 50°C, tiếp tục tăng nhiệt độ thì hiệu suất chiết xuất thay đổi không đáng kể ($p > 0,05$).



Hình 3. Ảnh hưởng của tỉ lệ mol valeric acid và lauric acid (A), tỉ lệ lỏng-rắn (B), thời gian chiết xuất (C) và nhiệt độ chiết xuất (D) lên hiệu suất chiết xuất T-OU từ Nữ trinh tử bằng HDEss
 Chú thích: trong cùng yếu tố ảnh hưởng, các chữ cái khác nhau biểu thị sự khác biệt có ý nghĩa thống kê ($p < 0,05$).

Để thấy rõ hơn ảnh hưởng của các yếu tố đến quá trình chiết xuất cũng như tác động đồng thời giữa các yếu tố lên hiệu suất chiết xuất triterpenoid, quá trình chiết xuất được tối ưu hóa hơn nữa bằng RSM. Kết quả 29 thí nghiệm theo BBD được trình bày ở **Bảng 2** và kết quả phân tích ANOVA của quá trình tối ưu hóa được trình bày ở **Bảng 3**. Giá trị của mô hình Fisher F-test là 39,79 ($p < 0,0001$) chứng tỏ mô hình thí nghiệm được thiết lập với ý nghĩa thống kê cao. Hơn nữa, giá trị không tương thích (lack of fit) của mô hình là 0,4387 ($> 0,05$) cho thấy không tương thích không đáng kể so với sai số thuần. Sự phù hợp chặt chẽ giữa dự đoán và thực nghiệm được

xác nhận dựa vào các giá trị R^2 đều lớn hơn 0,88. Phương trình hồi quy thể hiện sự phụ thuộc của hiệu suất chiết xuất vào các biến độc lập được trình bày dưới đây:

$$y = 2,94915 - 0,095258A + 0,066188B - 0,016319C - 0,002599D + 0,002495AB + 0,001173AC - 0,000308AD + 0,000154BC - 0,000282BD + 0,000127CD + 0,004129A^2 - 0,000873B^2 + 0,000045C^2 + 0,000088D^2.$$

Trong đó: y là hiệu suất chiết xuất T-OU (mg/g), A là tỉ lệ mol valeric acid và lauric acid (mol/mol), B là tỉ lệ lỏng-rắn (mL/g), C là thời gian chiết xuất (phút) và D là nhiệt độ chiết xuất ($^{\circ}\text{C}$).

Bảng 2. Kết quả BBD liên quan đến hiệu suất chiết xuất triterpenoid bằng HDESS

STT	A	B	C	D	Hiệu suất chiết xuất (mg/g)		
					OA	UA	T-OU
1	3	35	30	70	11,62	2,75	14,36
2	3	25	30	50	10,21	2,93	13,14
3	1	35	30	50	11,41	2,51	13,92
4	3	25	30	50	10,29	2,91	13,20
5	1	15	30	50	9,21	2,38	11,60
6	1	25	30	70	11,01	2,82	13,83
7	3	25	30	50	10,69	3,02	13,71
8	3	35	30	30	11,32	3,37	14,69
9	3	15	50	50	8,80	2,39	11,19
10	3	15	30	70	9,21	2,81	12,02
11	1	25	10	50	10,71	2,70	13,41
12	3	25	30	50	10,57	2,66	13,22
13	5	15	30	50	8,68	2,41	11,09
14	5	25	30	70	10,77	3,24	14,01
15	3	15	30	30	8,49	2,30	10,79
16	5	25	10	50	10,57	2,66	13,22
17	1	25	50	50	10,30	2,88	13,18
18	1	25	30	30	10,93	2,35	13,29
19	3	35	10	50	11,47	2,71	14,17
20	3	35	50	50	11,58	2,71	14,29
21	5	35	30	50	11,74	3,12	14,86
22	3	25	50	70	11,87	2,69	14,56
23	3	25	10	70	10,79	3,04	13,82
24	3	25	10	30	11,14	2,52	13,65
25	3	15	10	50	9,63	2,29	11,92
26	3	25	30	50	10,39	2,98	13,37
27	3	25	50	30	9,96	2,92	12,88
28	5	25	50	50	11,65	2,73	14,38
29	5	25	30	30	11,14	2,69	13,83

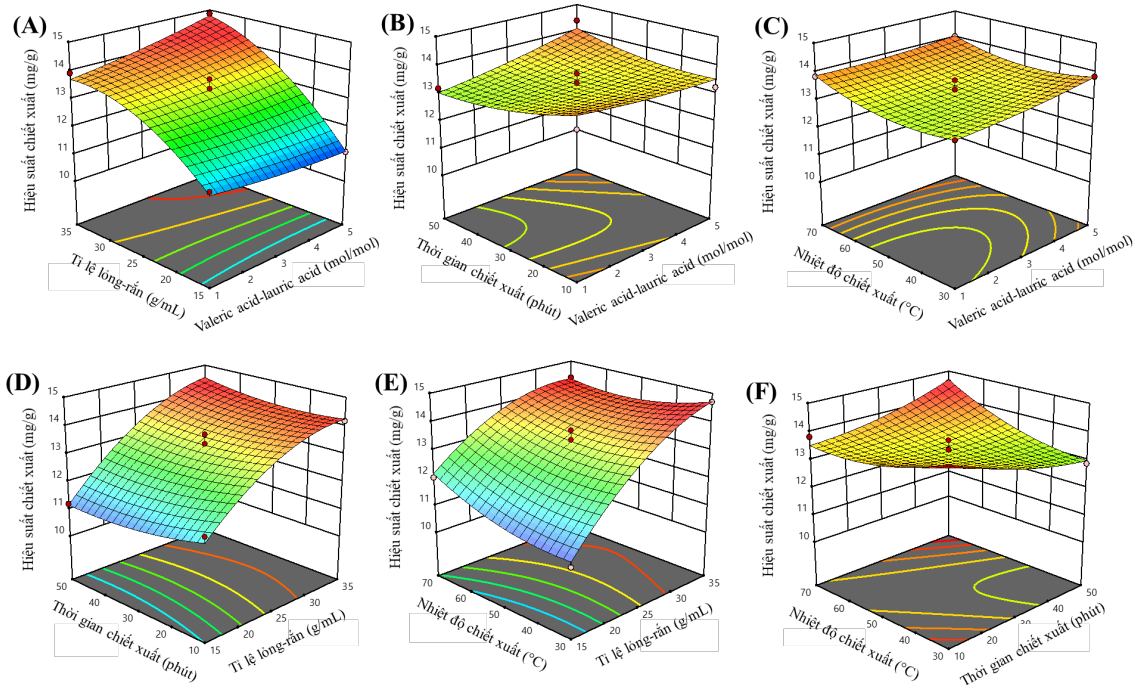
Chú thích: A: tỉ lệ mol valeric acid và lauric acid (mol/mol), B: tỉ lệ lỏng-rắn (mL/g), C: thời gian chiết xuất (phút); D: nhiệt độ chiết xuất ($^{\circ}\text{C}$); OA: oleanolic acid; UA: ursolic acid; T-OU: tổng oleanolic acid và ursolic acid.

Bảng 3. Kết quả phân tích phương sai ANOVA của quá trình chiết xuất triterpenoid

Nguồn (Source)	Tổng bình phương (Sum of Squares)	Độ bậc tự do (df)	Trung bình bình phương (Mean Square)	Giá trị F (F-value)	Giá trị p (p-value)	
Mô hình (Model)	0,6550	14	0,0468	39,79	< 0,0001	significant
A	0,0066	1	0,0066	5,61	0,0328	
B	0,5072	1	0,5072	431,27	< 0,0001	
C	0,0001	1	0,0001	0,0466	0,8321	
D	0,0197	1	0,0197	16,75	0,0011	
AB	0,0100	1	0,0100	8,47	0,0114	
AC	0,0088	1	0,0088	7,49	0,0161	
AD	0,0006	1	0,0006	0,5146	0,4849	
BC	0,0038	1	0,0038	3,23	0,0938	
BD	0,0127	1	0,0127	10,81	0,0054	
CD	0,0104	1	0,0104	8,84	0,0101	
A ²	0,0018	1	0,0018	1,50	0,2402	
B ²	0,0494	1	0,0494	42,03	< 0,0001	
C ²	0,0021	1	0,0021	1,76	0,2057	
D ²	0,0080	1	0,0080	6,79	0,0208	
Số dư (Residual)	0,0165	14	0,0012			
Không phù hợp (Lack of Fit)	0,0125	10	0,0013	1,28	0,4387	not significant
Sai số thuần (Pure Error)	0,0039	4	0,0010			
Cor Total	0,6715	28				
R ² = 0,9755		R ² adj = 0,9510		R ² pred = 0,8833		

Biểu đồ bề mặt đáp ứng (**Hình 4**) biểu diễn sự tương tác giữa các biến độc lập, cũng như ảnh hưởng đồng thời của các biến độc lập lên hiệu suất chiết xuất. Các bề mặt có độ nghiêng khác nhau sẽ ảnh hưởng đến hiệu suất chiết xuất khác nhau, phần này sẽ được làm rõ ở phần bàn luận. Từ dữ liệu của quá trình tối ưu hóa theo RSM, các điều kiện tối ưu

được xác định như sau: tỉ lệ mol valeric acid và lauric acid là 5 mol/mol, tỉ lệ lỏng-rắn là 35 mL/g, thời gian chiết xuất là 42 phút và nhiệt độ chiết xuất là 35°C. Hiệu suất chiết T-OU trong điều kiện tối ưu được xác định là $15,17 \pm 0,06$ mg/g. Sự khác biệt giữa kết quả thực nghiệm và kết quả dự đoán không có ý nghĩa thống kê ($p > 0,05$).

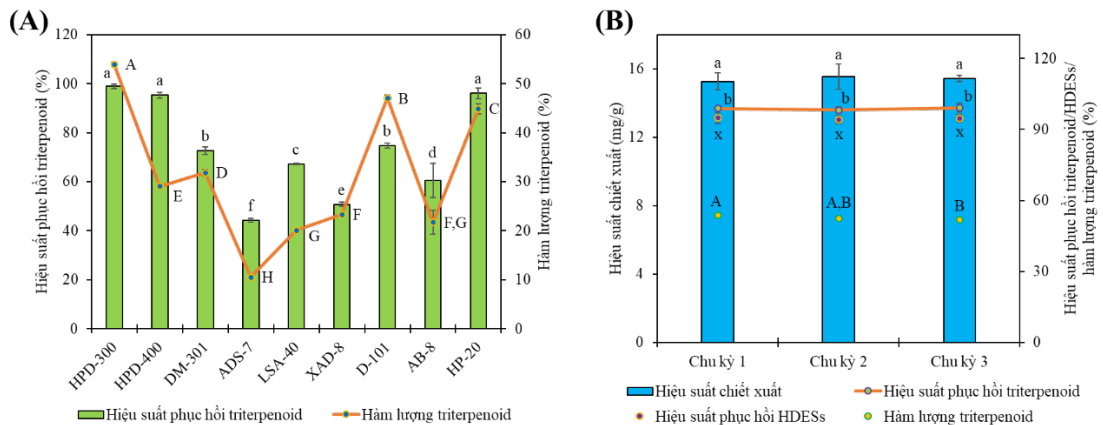


Hình 4. Biểu đồ bề mặt đáp ứng của quá trình chiết xuất triterpenoid từ Nữ trinh tử bằng HDESS

3.3. Phục hồi triterpenoid từ dịch chiết HDESS

Phương pháp SLE dựa trên các MRs được áp dụng để phục hồi triterpenoid (OA và UA) từ dịch chiết HDESS của Nữ trinh tử. Các MRs với các cấu trúc hóa học và độ phân cực khác nhau được áp dụng, bao gồm HPD-300, HPD-400, DM-301, ADS-7, LSA-40, XAD-8, D-101, AB-8 và HP-20. Hai thông số: hiệu suất phục hồi triterpenoid, hàm lượng triterpenoid được

sử dụng để đánh giá hiệu quả của các MRs. Như kết quả được trình bày ở **Hình 5A**, hiệu suất phục hồi triterpenoid đạt từ 44,17 đến 98,91%. Xét hàm lượng triterpenoid, các sản phẩm thu được chứa 10,51 đến 53,95% triterpenoid. Trong đó, HPD-300 là MRs tiềm năng nhất, đã phục hồi được 98,91% triterpenoid từ dịch chiết HDESS, thu được sản phẩm chứa 53,95% triterpenoid.



Hình 5. Khả năng phục hồi triterpenoid từ dịch chiết HDESS bằng các MRs khác nhau (A) và khả năng tái sử dụng HDESS và MRs theo ba chu kỳ chiết xuất và phục hồi triterpenoid liên tục (B)

Chú thích: trong cùng một loại biểu đồ, các chữ cái khác nhau biểu thị sự khác biệt có ý nghĩa thống kê ($p < 0,05$)

3.4. Tái sử dụng HDESSs và MRs

Trong các quá trình chiết xuất, việc thu hồi và tái sử dụng các vật liệu ban đầu là hai điều kiện cần thiết để hướng tới sự phát triển bền vững. Trong nghiên cứu này, HDESSs cho thấy tiềm năng để chiết xuất triterpenoid, ngoài ra MRs đã được áp dụng để phục hồi triterpenoid từ dịch chiết thu được. Xa hơn nữa, khả năng tái chế của HDESSs và MRs đã được theo dõi cẩn thận qua ba chu kỳ chiết xuất và phục hồi liên tục, được đánh giá qua bốn thông số chính: hiệu suất chiết xuất, hiệu suất phục hồi triterpenoid, hiệu suất phục hồi HDESSs và hàm lượng triterpenoid. Như kết quả được minh họa trong **Hình 5B**, sự ổn định của các dữ liệu đã được quan sát. Cụ thể, LaA-VA và HPD-300 tái sinh đã mang lại hiệu suất chiết xuất T-OU từ 15,27 đến 15,55 mg/g, hiệu suất phục hồi triterpenoid từ 98,25 đến 99,15%, hiệu suất phục hồi HDESSs từ 94,17 đến 94,83%, hàm lượng triterpenoid từ 51,92 đến 53,60%.

4. BÀN LUẬN

Hiệu suất chiết xuất của một dung môi bị ảnh hưởng bởi nhiều yếu tố như độ phân cực của dung môi, độ nhớt của dung môi. Ngoài ra, các liên kết và tương tác như liên kết hydrogen, tương tác van der Waals giữa dung môi và hoạt chất, giữa dung môi và dược liệu đóng vai trò quan trọng đối với quá trình chiết xuất [11]. Trong nghiên cứu này, các HDESSs của menthol và lauric acid đã được sử dụng để chiết xuất triterpenoid từ Nữ trinh tử. Có thể thấy rằng, nhiều HDESSs như Men-AA, Men-LA, Men-PrA, Men-VA, Men-OA, Men-CP, LaA-VA, LaA-OA, LaA-NA, cho hiệu suất chiết xuất lớn hơn hoặc tương đương so với methanol và ethanol. Điều này cũng cổ tương tác kỵ nước giữa HDESSs và triterpenoid ảnh hưởng đáng kể đến hiệu suất chiết xuất. Các phát hiện này phù hợp với các báo cáo trước đây cho rằng các HDESSs đã chiết xuất tốt các triterpenoid như ursolic acid, oleanolic acid, betulinic acid từ các nguồn dược liệu khác nhau [13–15]. Ngoài ra, độ dài chuỗi carbon trong thành phần HDESSs cũng ảnh hưởng đáng kể đến hiệu suất chiết xuất. Cụ thể, cùng một HBA, các HDESSs chứa thành phần HBD với chuỗi carbon ngắn hoặc trung bình như acetic acid, lactic acid, propionic acid, valeric acid quan sát thấy hiệu suất chiết xuất lớn hơn so với HBD có chuỗi carbon dài như nonanoic acid, decanoic acid, camphor, thymol. Khi tăng độ dài chuỗi carbon quá mức sẽ gây ra sự không tương thích về độ phân cực của dung môi và hợp chất đích, đồng thời làm tăng độ nhớt của dung môi, những điều này sẽ ảnh hưởng tiêu cực đến quá trình chiết xuất.

Đối với quá trình tối ưu hóa, việc tăng tỉ lệ valeric

acid và lauric acid từ 1 lên 3 mol/mol có thể đã điều chỉnh độ phân cực của HDESSs phù hợp với OA và UA, do đó làm gia tăng hiệu suất chiết xuất. Tuy nhiên, khi thành phần lauric acid trong HDESSs quá lớn sẽ làm tăng độ nhớt của dung môi, do đó làm giảm sự truyền khối và giảm hiệu suất chiết xuất [5]. Khi tỉ lệ lỏng-rắn tăng thì hiệu suất chiết xuất tăng (**Hình 3B**), bởi vì sự gia tăng thể tích dung môi đã tăng cường chênh lệch gradient nồng độ, do đó cải thiện quá trình khuếch tán của hoạt chất, điều này có lợi cho quá trình chiết xuất. Tuy nhiên, thể tích dung môi quá mức không chỉ gây lãng phí dung môi mà còn tăng cường quá trình chiết xuất các tạp chất, làm giảm chất lượng của sản phẩm thu được [5]. Đối với thời gian chiết xuất và nhiệt độ chiết xuất, quy luật chung rõ ràng cho hai yếu tố này là hiệu suất chiết xuất tăng dần theo thời gian và nhiệt độ. Các phân tử sinh học thường có kích thước phân tử nhỏ nên nhanh chóng được chiết ra khỏi sinh khối, việc gia tăng thời gian chiết xuất không những ảnh hưởng đến hiệu quả kinh tế mà còn tăng cường quá trình chiết xuất tạp chất chuyển hóa sơ cấp có kích thước lớn. Nhiệt độ cao làm giảm độ nhớt của dung môi, tăng cường khả năng hòa tan của hoạt chất, do đó cải thiện hiệu suất chiết xuất. Tuy nhiên, nhiệt độ quá cao có thể làm suy giảm hay biến tính cấu trúc hóa học của các hoạt chất. Chính vì vậy, thời gian và nhiệt độ chiết xuất phù hợp là yếu tố quan trọng trong chiết xuất [11]. Quá trình tối ưu hóa bằng RSM cho thấy, các biến độc lập (A, B, D), cặp tương tác (AB, AC, BD, CD), biến bậc hai (B^2 , D^2) ảnh hưởng đáng kể đến hiệu suất chiết xuất. Tương tác đồng thời của các yếu tố đến hiệu suất chiết xuất được thể hiện ở **Hình 4**. Cụ thể, **Hình 4A** mô tả tương tác đồng thời của tỉ lệ lỏng-rắn và tỉ lệ valeric acid-lauric acid đến hiệu suất chiết xuất triterpenoid từ Nữ trinh tử, cho thấy hiệu suất chiết xuất tăng mạnh khi tăng đồng thời cả tỉ lệ lỏng-rắn và tỉ lệ valeric acid-lauric acid. Quy luật tương tự cũng được quan sát đối với cặp tương tác thời gian chiết xuất và tỉ lệ lỏng-rắn (**Hình 4D**), nhiệt độ chiết xuất và tỉ lệ lỏng-rắn (**Hình 4E**). Trong khi đó, hiệu suất chiết xuất tăng nhẹ khi tăng nhiệt độ chiết xuất và tỉ lệ valeric acid-lauric acid (**Hình 4C**). Ngoài ra, hiệu suất chiết xuất giảm nhẹ sau đó tăng dần khi tăng đồng thời các cặp tương tác thời gian chiết xuất và tỉ lệ valeric acid-lauric acid (**Hình 4B**), thời gian chiết xuất và nhiệt độ chiết xuất (**Hình 4F**). Tuy nhiên, mức độ ảnh hưởng kết hợp của các cặp tương tác lên hiệu suất chiết xuất là khác nhau, như được chỉ ra bởi các giá trị p của các cặp tương tác (**Bảng 3**).

Hiệu quả phục hồi triterpenoid phụ thuộc chủ yếu vào tương tác giữa dung môi và hoạt chất, hoạt chất và MRs, dung môi và MRs. Trong đó, các đặc

tính lý hóa như độ phân cực, kích thước hạt, đường kính lỗ trung bình của MRs ảnh hưởng trực tiếp đến hiệu suất phục hồi [11]. Trong nghiên cứu này, các MRs kém phân cực như HPD-300, HP-20, HPD-400 cho hiệu suất phục hồi triterpenoid tốt nhất (lớn hơn 90%), trong khi đó MRs phân cực như ADS-7 mang lại hiệu suất phục hồi không đáng kể (44,17%). Sự khác biệt này có thể là do quy luật “like dissolves like”, nghĩa là các chất kém phân cực như triterpenoid nhanh chóng được hấp phụ bởi các MRs kém phân cực [16]. Dung môi rửa giải ảnh hưởng đáng kể đến hiệu suất phục hồi và hàm lượng triterpenoid trong sản phẩm thu được. Ở đây, việc rửa giải HDESSs không thể phục hồi bằng nước vì đặc tính kỵ nước vốn có của nhóm dung môi này. Do đó, ethanol 60% đã được lựa chọn làm dung môi rửa giải HDESSs. Nồng độ của ethanol rửa giải HDESSs đã được lựa chọn để đảm bảo tại đó ethanol có khả năng hòa tan tốt nhất đối với HDESSs và kém nhất đối với triterpenoid. Xa hơn nữa, các MRs và HDESSs đã cho thấy khả năng tái chế qua ba chu kỳ chiết xuất và phục hồi liên tục, điều này củng cố tính khả thi của quy trình trong ứng dụng thực tiễn và hướng tới phát triển quy trình chiết xuất bền vững. Mặc dù việc sử dụng NaOH, HCl và ethanol trong quá trình phục hồi và tái chế có thể gây ra những mối lo ngại, nhưng đây là quy trình phục hồi hiệu quả nhất tại thời điểm hiện tại. Trong bối cảnh này, quá trình phục hồi và tái chế nên được coi là khía cạnh quan trọng cho các nghiên cứu trong tương lai.

Tổng quan một số tài liệu liên quan đến việc chiết xuất xanh triterpenoid từ sinh khối, Nuno và cộng sự đã sử dụng HDESSs của menthol-thymol (1:2) để chiết xuất triterpenic acid từ *Eucalyptus globulus* [14]. Các DESs bao gồm choline chloride-malic acid (1:1) và choline chloride-lactic acid (1:3) đã chứng tỏ hiệu suất chiết xuất vượt trội cho triterpen saponin từ *Aralia elata* var. *mandshurica* [17]. Lei và các cộng sự đã chứng minh rằng choline chloride-levulinic acid là dung môi tiềm năng để chiết xuất triterpenoid từ lá *Celtis sinensis* [18]. Hơn nữa, 1-butyl-3-methylimidazolium bromide đã được sử dụng để chiết xuất triterpenoid từ *Inonotus obliquus* [19]. Hay nghiên cứu trước đây của chúng tôi báo cáo rằng dung môi gốc sinh học (pentane-1,2-diol

và hexane-1,2-diol) là các dung môi xanh tiềm năng để chiết xuất betulonic acid từ *Tetracera scandens* [11]. Tương tự, DESs của choline chloride-lactic acid hiệu quả khi chiết xuất triterpenoid từ *Diospyros kaki* [5]. Trong nghiên cứu này, một quy trình bền vững dựa trên sự kết hợp giữa HDESSs và MRs, cùng sự hỗ trợ siêu âm đã được phát triển thành công để chiết xuất triterpenoid từ Nữ trinh tử. Tuy nhiên, các nghiên cứu sâu hơn, chẳng hạn như đánh giá hoạt tính sinh học của triterpenoid thu được cũng như làm sáng tỏ các cơ chế chi phối quá trình chiết xuất, cần được thực hiện nhằm hoàn thiện bức tranh tổng thể và cung cấp cơ sở khoa học vững chắc cho việc ứng dụng kết quả nghiên cứu vào thực tiễn.

5. KẾT LUẬN

Nghiên cứu này đã phát triển một quy trình bền vững để chiết xuất và phục hồi triterpenoid từ Nữ trinh tử, trong đó HDESSs của LaA-Val là dung môi tiềm năng nhất. Điều kiện chiết xuất được xác định theo RSM bao gồm: tỉ lệ valeric acid và lauric acid là 5 mol/mol, tỉ lệ lỏng-rắn là 35 mL/g, thời gian chiết xuất là 42 phút và nhiệt độ chiết xuất là 35°C. Hiệu suất chiết T-OU đạt 15,17 mg/g. HPD-300 là MRs có khả năng phục hồi triterpenoid tốt nhất từ dịch chiết HDESSs của Nữ trinh tử. Hiệu suất phục hồi đạt 98,91% và hàm lượng triterpenoid đạt 53,95%. Cả HDESSs và MRs đã được tái sử dụng thành công cho mục đích chiết xuất và phục hồi qua ba chu kỳ liên tục. Những kết quả đạt được trong nghiên cứu này góp phần cung cấp những kiến thức hiểu biết về việc sử dụng dung môi xanh để chiết xuất triterpenoid từ Nữ trinh tử, từ đó tạo tiền đề cho các nghiên cứu xa hơn nữa để hoàn thiện quy trình toàn diện và ở quy mô lớn hơn trong tương lai.

Lời cảm ơn: Công trình được thực hiện với sự hỗ trợ kinh phí của Đại học Huế (Mã số: DHH2023-04-203) và Nhóm nghiên cứu mạnh Đại học Huế (Mã số NCM.DHH.2023.01). Lê Trọng Nhân được tài trợ bởi Chương trình học bổng đào tạo thạc sĩ, tiến sĩ trong nước của Quỹ Đổi mới sáng tạo Vingroup (VINIF), mã số VINIF.2024.TS.062.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Patrice Didion Y, Gijsbert Tjalsma T, Su Z, Malankowska M, Pinelo M. What is next? the greener future of solid liquid extraction of biobased compounds: Novel techniques and solvents overpower traditional ones. Sep Purif Technol. 2023;320:124147.
2. Le NT, Hoang NT, Van VTT, Nguyen TPD, Chau NHT,

Le NTN, et al. Extraction of curcumin from turmeric residue (*Curcuma longa* L.) using deep eutectic solvents and surfactant solvents. Anal Methods. 2022;14:850–8.

3. Wang L, Hu Y, Guo G, Li J, Fang X, Zhao L. Enhanced and green extraction betulin from *Celtis sinensis* leaves using hydrophobic deep eutectic solvent. Biomass Convers

Biorefinery. 2024;14:9321–31.

4. Nekkaa A, Benaissa A, Lalaouna AED, Mutelet F, Canabady-Rochelle L. Optimization of ultrasound-assisted deep eutectic solvent extraction of polyphenols from *Rhamnus alaternus* for their antioxidant activity. Biomass Convers Biorefinery. 2025;15:3599–615.

5. Le NT, Van Nguyen H, Le GQ, Hoang THX, Nguyen KV, Ho DV, et al. Eco-friendly extraction and recovery of triterpenoids from persimmon leaves (*Diospyros kaki* L.f.) using ultrasound-assisted deep eutectic solvents and macroporous resins. Anal Methods. 2025;17:1567–78.

6. Lima AMB, Siani AC, Nakamura MJ, D'Avila LA. Selective and cost effective protocol to separate bioactive triterpene acids from plant matrices using alkalized ethanol: Application to leaves of Myrtaceae species. Pharmacogn Mag. 2015;11:470–6.

7. Gao L, Li C, Wang Z, Liu X, You Y, Wei H, et al. Ligustri Lucidi Fructus as a traditional Chinese medicine: a review of its phytochemistry and pharmacology. Nat Prod Res. 2015;29:493–510.

8. Xia E-Q, Yu Y-Y, Xu X-R, Deng G-F, Guo Y-J, Li H-B. Ultrasound-assisted extraction of oleanolic acid and ursolic acid from *Ligustrum lucidum* Ait. Ultrason Sonochem. 2012;19:772–6.

9. Wang J, Shan A, Liu T, Zhang C, Zhang Z. In vitro immunomodulatory effects of an oleanolic acid-enriched extract of *Ligustrum lucidum* fruit (*Ligustrum lucidum* supercritical CO₂ extract) on piglet immunocytes. Int Immunopharmacol 2012;14:758–63.

10. Lu Z, Chen Y, Tang X, Gao J, He F, Zhang X, et al. Simultaneous and selective extraction of different polarity bioactive substances from Ligustri Lucidi Fructus based on a designable biphasic deep eutectic solvent. J Clean Prod. 2024;449:141791.

11. Le NT, Nguyen LT, Thi Nguyen NA, Nguyen HT. Unlocking the potential of bio-based solvents for sustainable triterpenoid extraction: a case study on

betulinic acid from *Tetracera scandens* (L.) Merr. Sep Purif Technol. 2025;370:133196.

12. Cao J, Su E. Hydrophobic deep eutectic solvents: the new generation of green solvents for diversified and colorful applications in green chemistry. J Clean Prod. 2021;314:127965.

13. Li H, Liu Y, Guo S, Shi M, Qin S, Zeng C. Extraction of Ursolic Acid from Apple Peel with Hydrophobic Deep Eutectic Solvents: Comparison between Response Surface Methodology and Artificial Neural Networks. Foods. 2023;12:310.

14. Silva NHCS, Morais ES, Freire CSR, Freire MG, Silvestre AJD. Extraction of high value triterpenic acids from *Eucalyptus globulus* biomass using hydrophobic deep eutectic solvents. Molecules. 2020;25:1–11.

15. Huang L, Guo Y, Jin T, Yan K, Liu X, He S, et al. Extraction of triterpene acids from loquat leaves via a novel hydrophobic deep eutectic solvent screened by COSMO-SAC model. J Clean Prod. 2023;427:139274.

16. Le NT, Ho HTT, Duong TD, Le TT, Nguyen QP, Nguyen TNT, et al. Optimization of ultrasonic-assisted extraction and purification of flavonoids from *Sophora japonica* L. with macroporous resins. Sep Sci Technol. 2024;59:419–35.

17. Petrochenko AA, Orlova A, Frolova N, Serebryakov EB, Soboleva A, Flisyuk E V., et al. Natural Deep Eutectic Solvents for the Extraction of Triterpene Saponins from *Aralia elata* var. *mandshurica* (Rupr. & Maxim.) J. Wen. Molecules. 2023;28:3614.

18. Wang L, Cao S, Guo G, Hu Y, Li J, Fang X, et al. Simultaneous extraction of total polyphenols and triterpenes from leaves of *Celtis sinensis* by deep eutectic solvent hybrid system combined with response surface methodology. New J Chem. 2022;46:22581–92.

19. Wang Y, Guo L, Liu C, Zhang Y, Li S. Total Triterpenoid Extraction from *Inonotus obliquus* Using Ionic Liquids and Separation of Potential Lactate Dehydrogenase Inhibitors via Ultrafiltration High-Speed Countercurrent Chromatography. Molecules. 2021;26:2467.