

Bài báo nghiên cứu**NGHIÊN CỨU CHIẾT XUẤT, PHÂN LẬP AXIT URSOLIC
TỪ LÁ CÂY *ARALIA HIEPIANA* VÀ KHẢO SÁT ĐIỀU KIỆN ĐÓNG GÓI
VÀO HỆ TIỂU PHÂN NANO LIPID**

**Nguyễn Ngọc Thùy Trang¹, Nguyễn Hữu Toàn Phan²,
Nguyễn Thị Thu Hiền², Nguyễn Minh Hiệp^{1*}**

¹Trung tâm Công nghệ Bức xạ và Công nghệ Sinh học, Viện Nghiên cứu Hạt nhân, Việt Nam

²Viện nghiên cứu Khoa học Tây Nguyên, Việt Nam

*Tác giả liên hệ: Nguyễn Minh Hiệp – Email: jackminhhiiep@yahoo.com

Ngày nhận bài: 26-10-2021; ngày nhận bài sửa: 03-12-2021; ngày duyệt đăng: 11-12-2021

TÓM TẮT

Axit ursolic (UA) là một hoạt chất sinh học thiên nhiên, chiếm hàm lượng lớn trong cây *Aralia hiepiana* J.Wen & Lowry, loài đặc hữu ở vùng cao nguyên phía Tây Việt Nam. Tuy nhiên, việc ứng dụng UA trong thực tiễn gặp nhiều khó khăn do độ tan trong nước kém, chính vì vậy việc ứng dụng hệ tiểu phân nanolipid (NLC) giúp tăng khả năng hòa tan trong nước và độ sinh khả dụng của UA. Hệ tiểu phân nano lipid chứa axit ursolic (NLC-UA) đã được tổng hợp bằng cách sử dụng nguyên liệu rẻ tiền như lecithin đậu nành, Tween- 80, sáp ong (pha lipid rắn), dầu đậu nành (pha lipid lỏng). Hợp chất phân lập được xác định cấu trúc bằng các phương pháp hóa lý (phổ FTIR, ¹H-NMR, ¹³C-NMR, DEPT, HMBC) cho thấy UA đã được phân lập với độ tinh khiết cao. Ngoài ra, kết quả cũng đã cho thấy NLC-UA sử dụng 50% pha lipid lỏng là tối ưu nhất với kích thước hạt trung bình là $137,50 \pm 0,49$ nm, chỉ số phân tán (PDI) là $0,153 \pm 0,03$, hiệu suất đóng gói đạt $89,13 \pm 0,33\%$ và sức tải đạt $15,04 \pm 0,31$ %. Kết quả khảo sát độ bền cũng cho thấy hệ ổn định trong một thời gian dài lưu trữ. Từ đó cho thấy việc đóng gói vào hệ NLC sẽ giúp mở rộng tiềm năng ứng dụng thực tiễn cho UA trong lĩnh vực dược phẩm, y sinh.

Từ khóa: axit ursolic; *Aralia Hiepiana*; sáp ong; hệ tiểu phân nano lipid; dầu đậu nành

1. Giới thiệu

Aralia là chi thuộc họ *Araliaceae*, trong đó một số loài đã được sử dụng như trong y học cổ truyền để điều trị loét dạ dày, viêm gan, thấp khớp, viêm khớp, ung thư và các bệnh khác (Nguyen et al., 2018). Ngoài ra, các loài trong họ Nhân sâm (*Araliaceae*) này cũng thường có khả năng sinh tổng hợp và tích lũy các hợp chất triterpen saponin, các ginsenosid,

Cite this article as: Nguyen Ngoc Thuy Trang, Nguyen Huu Toan Phan, Nguyen Thi Thu Hien, & Nguyen Minh Hiep (2021). Extraction and isolation of ursolic acid from *Aralia Hiepiana* and preparation of ursolic acid-encapsulated nanostructured lipid carriers. *Ho Chi Minh City University of Education Journal of Science*, 18(12), 2255-2266.

đặc biệt là các vina-ginsenosid, cùng các polysaccharide, các flavonoid, tinh dầu và các hợp chất hữu cơ khác... (Nguyen et al., 2018) Loài *Aralia hiepihana* J.Wen & Lowry phân bố rộng rãi ở vùng cao nguyên phía Tây Việt Nam là loài đặc hữu của Việt Nam được phát hiện vào năm 2002. Kết quả nghiên cứu của Phan và cộng sự (2018) đã phân lập và xác định được cấu trúc của 5 hợp chất flavonoid là kaempferitrin (1), kaempferol 3-O- β -D-glucopyranosyl-7-O- α -L-rhamnopyranoside (2), kaempferol (3), quercetin (4) và apigetrin (5) từ chiết xuất methanol của lá *A.hiepihana* (Plunkett et al., 1997). Bên cạnh đó, các nghiên cứu thăm dò cho thấy trong lá còn có hàm lượng cao axit ursolic.

Axit ursolic (UA) là một hợp chất triterpene tự nhiên được tìm thấy trong nhiều loài thực vật khác nhau. Ngày nay, hoạt chất này đang ngày càng được quan tâm nghiên cứu bởi những lợi ích tuyệt vời mà nó mang lại như chống viêm, chống oxy hóa mạnh, ức chế tế bào ung thư... nhưng hơn hết là khả năng bảo vệ gan khỏi việc nhiễm mỡ không do bia rượu hoặc ngăn chặn sự di căn các tế bào ung thư đến gan (Xiong et al., 2003). Tuy nhiên, việc ứng dụng UA vào trong thực tiễn gặp nhiều khó khăn do tính kỵ nước dẫn đến độ phân tán trong nước kém và độ sinh khả dụng thấp, dễ bị loại thải ra khỏi cơ thể bởi cơ chế chuyển hóa đầu tiên ở gan... (Qiu et al., 2019).

Hiện nay, hệ mang nano với những ưu điểm như giúp cải thiện độ tan (thực chất là tăng độ phân tán) cho hoạt chất, bảo vệ chúng trong các điều kiện bất lợi của môi trường, gia tăng khả năng hấp thụ vào cơ thể so với các hoạt chất ở dạng thô, điều khiển được tốc độ phóng thích của hoạt chất để kéo dài thời gian tác dụng... đã cho thấy được tiềm năng ứng dụng to lớn trong lĩnh vực y dược, mỹ phẩm (Lin et al., 2015). Trong đó, hệ tiểu phân nano lipid (NLC), thể hệ hai của hệ nano lipid dạng rắn (solid lipid nanoparticles), đang ngày càng chứng tỏ vai trò quan trọng của mình như một hệ vận chuyển thuốc đầy tiềm năng bởi các ưu điểm của nó như: giá thành nguyên vật liệu rẻ tiền, quy trình sản xuất đơn giản dẫn đến chi phí thấp và mang đầy đủ các ưu điểm của một hệ mang nano như đã nêu ở trên (Salvi và Pawar, 2019). Vì vậy, việc “đóng gói” UA vào trong hệ tiểu phân nano lipid hứa hẹn sẽ nâng cao độ sinh khả dụng so với dùng ở dạng thô, từ đó giúp giảm lượng dùng và giảm chi phí sử dụng.

Do đó, với mong muốn tạo ra một công thức chế phẩm UA được tách chiết, phân lập từ lá cây *Aralia hiepihana* J.Wen & Lowry, loài đặc hữu của tỉnh Lâm Đồng và có hiệu quả cao trong thực tiễn điều trị và hỗ trợ y tế. Đề tài “Nghiên cứu chiết xuất, phân lập UA từ lá cây *Aralia hiepihana* và khảo sát điều kiện đóng gói vào hệ tiểu phân nano lipid” đã được thực hiện. Đầu tiên, hoạt chất UA được chiết tách, phân lập từ cây *Aralia hiepihana* bằng các phương pháp chiết, sắc kí (sắc kí cột, sắc kí lớp mỏng) và hợp chất được kiểm tra cấu trúc bằng các phương pháp hóa lí (FTIR, $^1\text{H-NMR}$, DEPT, $^{13}\text{C-NMR}$, HMBC). Hệ tiểu phân nano “đóng gói” UA được tổng hợp bằng phương pháp đồng hóa mẫu ở nhiệt độ cao kết hợp với giảm kích thước bằng sóng siêu âm, với sáp ong và dầu đậu nành được sử dụng lần lượt

là lipid rắn và lipid lỏng ở các tỉ lệ (w/w) khác nhau. Cuối cùng, độ bền của công thức NLC tối ưu được đánh giá dựa vào sự thay đổi của kích thước hạt và thế zeta.

2. Vật liệu và phương pháp nghiên cứu

2.1. Vật liệu

Lá của *Aralia hiepiana* được thu hái tại Đà Lạt, Lâm Đồng, Việt Nam; được lưu giữ tại Thảo nguyên Viện Nghiên cứu Khoa học Tây Nguyên, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam. Lecithin đậu nành (Junsei Chemical, Tokyo, Nhật Bản) và Tween-80 (Samchun Pure Chemical, Hàn Quốc) được dùng làm chất hoạt động bề mặt. Sáp ong và dầu đậu nành (India Brand Equity Foundation, Ấn Độ) được sử dụng làm lipid dạng rắn và lipid dạng lỏng (ở nhiệt độ phòng) tương ứng. Tất cả các hóa chất khác thuộc cấp độ phân tích.

2.2. Tách chiết, phân lập và tinh chế UA từ lá cây *Aralia hiepiana*

Bột lá của *A. Hiepiana* (1,5 kg) được chiết xuất 3 lần với CH₃OH ở nhiệt độ phòng, dịch chiết được gom lại và thu hồi dung môi dưới áp suất thấp thu được 42 g cặn. Cặn này được tiến hành chiết phân đoạn với các dung môi có độ phân cực tăng dần, lần lượt là *n*-hexan, CHCl₃ và CH₃COOC₂H₅ để tạo ra các phân đoạn tương ứng *n*-hexan (H, 3,3 g), CHCl₃ (C, 4,8 g), CH₃COOC₂H₅ (E, 13,0 g), và lớp nước (W, 2L).

Dịch chiết E (13,0 g) được tách trên cột sắc kí silicagel, rửa giải bằng CHCl₃-CH₃OH (20:1 - 0:1, v/v) để thu được 6 phân đoạn E1-E6. Phân đoạn E2 (600 mg) được nạp vào cột silicagel giải hấp bằng CH₂Cl₂-axeton (6:1, v/v), thu được 4 phân đoạn, E2.1-E2.4. Phân đoạn E.2.2 (358 mg) được tinh chế qua cột sephadex LH-20 và giải hấp bằng hệ dung môi CH₃OH-H₂O (90:10, v/v) thu được 3 phân đoạn, E2.2.1- E2.2.3. Phân đoạn E2.2.3 (223 mg) tinh chế qua cột silicagel với dung môi CH₃OH.

2.3. Xác định cấu trúc hợp chất

Sắc kí lớp mỏng được thực hiện trên tấm silicagel 60 F254 (Merck, Đức) và tấm RP-18 F254S (Merck, Đức). Các hợp chất được hiển thị dưới bức xạ UV (254 nm và 365 nm) và bằng cách phun các tấm với H₂SO₄ 10% sau đó sấy nóng. Kết hợp với các dữ liệu phổ FTIR, các nhóm chức đặc trưng và các liên kết đặc trưng của UA được phân tích bằng thiết bị FT/IR-4600 (Jasco Inc., Nhật Bản) ở số sóng trong vùng 400-4000 cm⁻¹ với độ phân giải 2 cm⁻¹, ¹H-NMR (500 MHz), ¹³C-NMR (125 MHz), DEPT, HMBC (500MHz) được đo trên máy quang phổ Bruker AM500 FT-NMR (BRUKER Corporation, Hoa Kỳ). Phổ ion hóa tia điện – phổ khối lượng (ESI-MS) thu được từ hệ thống LC/MS tứ cực đơn dòng Agilent 1260 (Agilent Technologies Inc., Hoa Kỳ).

2.4. Tổng hợp hệ tiểu phân nano lipid chứa UA

NLC-UA được tổng hợp bằng phương pháp đồng hóa mẫu ở nhiệt độ cao kết hợp với giảm kích thước bằng sóng siêu âm. Cụ thể, các công thức được hiển thị trong Bảng 1, trong đó tỉ lệ dầu đậu nành (lipid lỏng) thay đổi từ 0 đến 100%. Pha lipid (dầu đậu nành và sáp

ong với các tỉ lệ khối lượng khác nhau) và UA được đun nóng đến 120 °C, sau đó khuấy nhẹ để hòa tan UA. Đồng thời, hỗn hợp lecithin và Tween-80 (1:1, w/w) được phân tán trong nước cất ở 85 °C trong 45 phút. Hỗn hợp chất hoạt động bề mặt và hỗn hợp lipid chứa UA được trộn lẫn vào nhau và đồng hóa bằng máy đồng hóa mẫu Ultra-Turrax® T 25 (IKA®-Werke, Staufen, Đức) ở 20.000 vòng/phút trong 5 phút. Sau đó, dùng sóng siêu âm để giảm kích thước hạt bằng máy VCX 750 ultrasonic processor (Sonics & Materials, Newtown, CT, Hoa Kỳ) ở 35 W trong 4 phút, ở 25 °C. Cuối cùng, dịch phân tán nano tạo thành được sẽ cho vào nước cất 4 °C theo tỉ lệ 1: 9 (v/v) khuấy ở 500 vòng/phút trong 15 phút để tạo thành hệ NLC-UA.

Bảng 1. Các công thức tổng hợp hệ NLC-UA

| Tỉ lệ lipid lỏng: lipid rắn (% w/w) | Pha lipid | | Chất hoạt động bề mặt | | UA (mg) | water (g) |
|-------------------------------------|--------------|-------------------|-----------------------|---------------|---------|-----------|
| | Sáp ong (mg) | Dầu đậu nành (mg) | Tween (mg) | Lecithin (mg) | | |
| 0% | 110 | 0 | 20 | 20 | 25 | 2,35 |
| 25% | 82,5 | 27,5 | 20 | 20 | 25 | 2,35 |
| 50% | 55 | 55 | 20 | 20 | 25 | 2,35 |
| 75% | 27,5 | 82,5 | 20 | 20 | 25 | 2,35 |
| 100% | 0 | 110 | 20 | 20 | 25 | 2,35 |

2.5. Xác định kích thước hạt và thế zeta

Kích thước hạt trung bình, chỉ số phân tán (PDI) và thế zeta của NLC-UA được xác định bằng thiết bị Zetasizer Nano (Malvern Instrument Ltd., Vương Quốc Anh). Cụ thể, dịch phân tán sau khi được tổng hợp sẽ được pha loãng 100 lần bằng nước cất. Phép đo được thực hiện ở 25 °C, góc đo là 173°.

2.6. Xác định hiệu suất đóng gói

Cho 1 mL dịch phân tán NLC-UA sau khi được tổng hợp vào cột silicagel. Sau đó, sử dụng hệ dung môi CH₂Cl₂-axeton (6:1, v/v) để rửa giải UA. Dung dịch hứng được (chỉ chứa UA không đóng gói) đem đi cô quay. Sau đó, hòa tan bằng methanol và hàm lượng UA được định lượng bằng sắc kí lỏng hiệu năng cao (HPLC) trên thiết bị Agilent 1200, cột C18 IB-SIL5 phenyl (5µm, 250 mm x4,6 mm), pha động là CH₃OH- H₂O (90:10, v/v), tốc độ dòng 0,5 mL/phút, bước sóng 214 nm. Hiệu suất đóng gói và sức tải được tính bằng công thức sau:

$$Hiệu\ suất\ đóng\ gói\ (%) = \frac{W_{tổng\ UA} - W_{UA\ không\ đóng\ gói}}{W_{tổng\ UA}} \times 100 \quad (1)$$

$$Sức\ tải\ (%) = \frac{W_{UA\ chứa\ trong\ NLC}}{W_{tổng\ lượng\ NLC-UA}} \times 100 \quad (2)$$

2.7. Quan sát hình thái NLC-UA bằng kính hiển vi điện tử truyền qua (TEM)

Dịch phân tán NLC-UA được nhỏ lên lưới đồng và phần dư được loại bỏ bằng giấy lọc. Sau đó, mẫu được rửa 1 lần bằng nước cất với thao tác như trên. Mẫu được để khô qua đêm và được chụp ảnh bằng kính hiển vi điện tử truyền qua (Jeol JEM 1010, Nhật Bản).

2.8. Khảo sát độ bền

Dịch phân tán NLC-UA tối ưu sau khi tổng hợp được xác định kích thước hạt và thế zeta bằng thiết bị Zetasizer Nano (Malvern Instrument Ltd., Vương Quốc Anh) như mục 2.5 ở các mốc thời gian 0, 2, 4, 6, 8, 10 giờ; 1, 2, 3 ngày, 1 tuần được bảo quản ở nhiệt độ phòng.

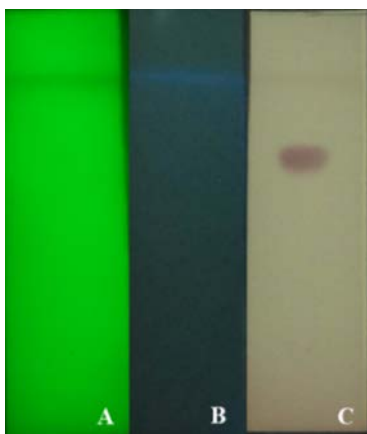
2.9. Phương pháp xử lý số liệu

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. Các đồ thị được vẽ bằng phần mềm SigmaPlot version 12.0.

3. Kết quả và thảo luận

3.1. Xác định cấu trúc của hợp chất

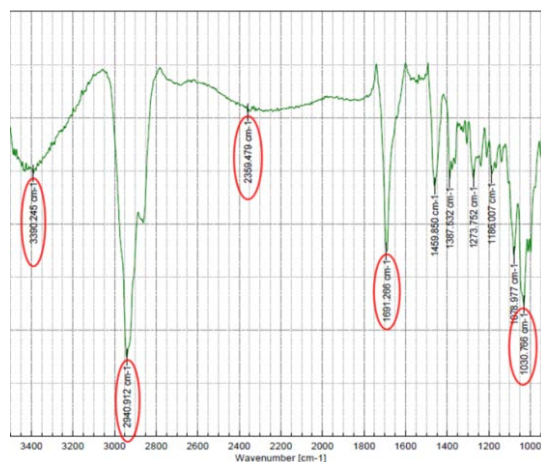
Kết quả ở Hình 2 cho thấy, hợp chất phân lập được đều không hấp thụ bước sóng ngắn 254 nm (Hình 1A) và bước sóng dài 365 nm (Hình 1B), điều này cho thấy sự hiện diện của khung triterpene trong hợp chất. Ngoài ra, kiểm tra độ sạch của hợp chất phân lập khi phun tấm silicagel với H_2SO_4 10% và sấy nóng thì xuất hiện chấm màu hồng tím và không bị kéo đuôi (Hình 1C). Điều này chứng tỏ chất phân lập được không bị nhiễm tạp chất khác, đủ điều kiện để tiến hành đo phổ FTIR, 1H -NMR, ^{13}C -NMR, HMBC.



Hình 1. Hình ảnh sắc ký lớp mỏng của hợp chất phân lập (A) ở bước sóng 254 nm, (B) ở bước sóng 365 nm và (C) sau khi phun lên H_2SO_4 10% và sấy nóng

Sau khi phân lập thu được chất bột màu trắng, tiến hành phân tích phổ khối lượng (ESI-MS) cho kết quả: m/z 457,2 $[M+H]^+$, m/z 455,3 $[M-H]^-$, tương ứng với công thức phân tử $C_{30}H_{48}O_3$.

Phổ phổ hồng ngoại chuyển đổi Fourier (FTIR) của chất phân lập (Hình 2) xuất hiện các peak ở 3390, 2940, 1691, 1031 cm^{-1} lần lượt tương ứng cho dao động của nhóm -OH, dao động C-H của nhóm alkyl, dao động của nhóm C=O và dao động C-O.

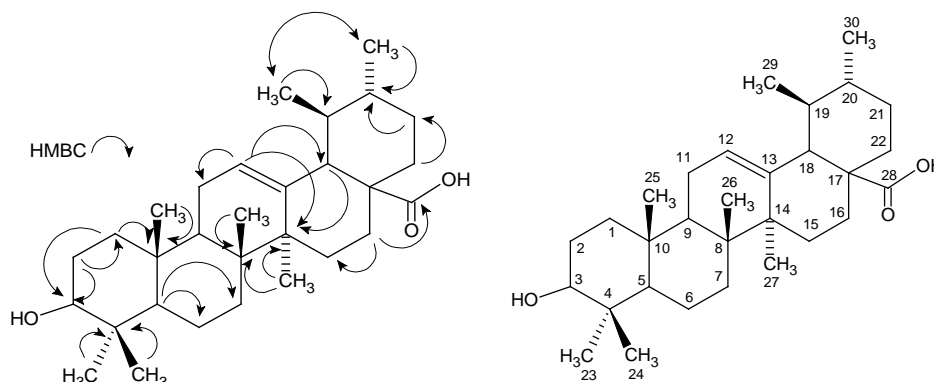


Hình 2. Phổ hồng ngoại chuyển đổi Fourier (FTIR)

Ngoài ra, kết quả phổ ^1H NMR cho thấy chất phân lập mang đặc trưng của một triterpen khung ursane với sự xuất hiện tín hiệu của 7 nhóm methyl tại [δ_{H} 1,17 (s, H-23), 0,94 (s, H-24), 0,80 (s, H-25), 0,96 (s, H-26), 1,15 (s, H-27), 0,95 (d, $J = 6,5$ Hz, H-29), 0,89 (d, $J = 6,0$ Hz, H-30)], đồng thời xuất hiện tín hiệu của một nối đôi tại [δ_{H} 5,42 (t, $J = 4,0$ Hz, H-12)], và tín hiệu của một nhóm methine gắn với OH tại vị trí [δ_{H} 3,40 dd, $J = 9,0, 7,1$ Hz, H-3)]. Phổ ^{13}C NMR kết hợp phổ DEPT cho thấy tín hiệu của 7 nhóm CH, 9 nhóm CH_2 , 7 nhóm CH_3 và 7 C bậc bốn. Phổ ^{13}C NMR xác nhận sự có mặt của một nhóm carbonyl tại δ_{C} 179,87 (C-28), hai olefin carbon của nối đôi C-12/C-13 tại δ_{C} 125,43 (C-12) và δ_{C} 138,91 (C-13) và một oxymethine carbon tại δ_{C} 77,93 (C-3). Từ thông tin các phổ cho thấy những tín hiệu đặc trưng của khung ursane-12-en.

Phổ HMBC xác nhận các mảnh cấu trúc của hợp chất thông qua các tín hiệu tương tác từ C-4 (δ_{C} 39,03)/H-23 (1,17 s), H-24 (0,94 s), H-3 [3,40 dd, ($J = 9,0, 7,0$)], H-1 (1,46 m, 0,87 m), tương tác H-12 [5,42 t, ($J = 4,0$)]/C-11 (δ_{C} 23,35), C-14 (δ_{C} 42,21), C-9 (δ_{C} 47,77), C-18 (δ_{C} 53,26) tương tác giữa H-29/C-19 và tương tác giữa H-16, H-18/C-28 (δ_{C} 179,87), xác nhận các mảnh cấu trúc quan trọng của hợp chất mục tiêu.

Kết hợp thông tin các phổ và so sánh với dữ liệu công bố (Nguyen et al., 2020) có thể kết luận hợp chất này là UA với cấu trúc như Hình 3.



Hình 3. Cấu trúc hóa học của hợp chất

Bảng 2. Giá trị phổ NMR của hợp chất được phân lập và hợp chất tham khảo

| Vị trí | * δ_C | $\delta_C^{a,b}$ | DEPT | $\delta_H^{a,c}$ (J = Hz) | HMBC (H→C) |
|--------|--------------|------------------|-----------------|------------------------------|---|
| 1 | 39,2 | 38,84 | CH ₂ | 1,46 (m), 0,87 (m) | 10, 4, 3, 5 |
| 2 | 28,2 | 27,52 | CH ₂ | 1,80 (m), 1,77 (m) | 1, 3, ,4, 10 |
| 3 | 78,2 | 77,93 | CH | 3,40 (dd, 9,0, 7,0) | 23, 24, 4 |
| 4 | 39,6 | 39,03 | C | | |
| 5 | 55,9 | 55,57 | CH | 0,76 (d, 11,5) | 15, 24, 6, 23, 7, 10, 1 24, 26, 11, 10, 8, 4, 5, |
| 6 | 18,8 | 18,48 | CH ₂ | 1,51 (m), 1,28 (m) | 23,9 |
| 7 | 33,7 | 33,28 | CH ₂ | 1,49 (m), 1,27 (m) | 26, 11, 8, 5, 9 |
| 8 | 40,1 | 39,68 | C | | |
| 9 | 48,1 | 47,77 | CH | 1,54 (m) | 26, 11, 8, 14 |
| 10 | 37,5 | 36,97 | C | | |
| 11 | 23,7 | 23,35 | CH ₂ | 1,90 (m), 1,88 (m) | 8, 9, 12, 13 |
| 12 | 125,7 | 125,43 | CH | 5,42 (t, 4,0) | 11,14,17, 9, 18 |
| 13 | 139,3 | 138,91 | C | | |
| 14 | 42,6 | 42,21 | C | | |
| 15 | 28,8 | 28,38 | CH ₂ | 2,23 (m), 1,14 (m) | 14, 27, 13, 17 |
| 16 | 25,0 | 24,58 | CH ₂ | 2,05 (m), 1,93 (m) | 15, 17, 28, 14, 18 |
| 17 | 48,1 | 47,82 | C | | |
| 18 | 53,6 | 53,26 | CH | 2,54 (d, 11,5) | 29, 16, 8, 14, 17, 12, 28 |
| 19 | 39,5 | 39,2 | CH | 1,4 (m) | 29, 30, 20, 17, 18 |
| 20 | 39,4 | 39,09 | CH | 0,94 (m) | 18 |
| 21 | 31,1 | 30,76 | CH ₂ | 1,42 (m), 1,32 (m) | 20, 17 |
| 22 | 37,4 | 37,13 | CH ₂ | 1,86 (m), 1,85 (m) | 16, 21, 18, 28, 20 |
| 23 | 28,8 | 28,54 | CH ₃ | 1,17 (s) | 4, 5 |
| 24 | 16,5 | 16,3 | CH ₃ | 0,94 (s) | 23, 3, 5, 4 |
| 25 | 15,7 | 15,37 | CH ₃ | 0,80 (s) | 10, 1, 9, 5 |

| | | | | | |
|----|-------|--------|-----------------|----------|------------|
| 26 | 17,5 | 17,23 | CH ₃ | 0,96 (s) | 7, 14, 9 |
| 27 | 24,0 | 23,64 | CH ₃ | 1,15 (s) | 13, 14, 15 |
| 28 | 179,7 | 179,87 | C | | |
| 29 | 17,5 | 17,2 | CH ₃ | 0,95 (s) | 17 |
| 30 | 21,4 | 21,13 | CH ₃ | 0,89 (s) | 20, 21 |

*Số liệu ¹³C NMR của acid ursolic (Nguyen et al., 2020) ^aĐo trong CD₃OD, ^b125 MHz, ^c500 MHz

3.2. Sự hình thành hệ tiểu phân nano lipid

Trong khi UA dạng thô phân tán rất kém trong nước (Hình 4A), thì UA được đóng gói trong NLC lại phân tán rất tốt (Hình 4B). Nguyên nhân là do UA thô có độ tan trong nước kém (0,102 µg/mL) (Cục bảo vệ môi trường Hoa Kỳ, 2009), nhưng khi được đóng gói trong hệ tiểu phân nano lipid đã làm tăng độ tan (thực chất là tăng độ phân tán) vì lúc này, các phân tử UA đã được gói trong NLC với các phân tử hoạt động bề mặt (Tween 80 và lecithin) có đầu ưa nước hướng ra ngoài.



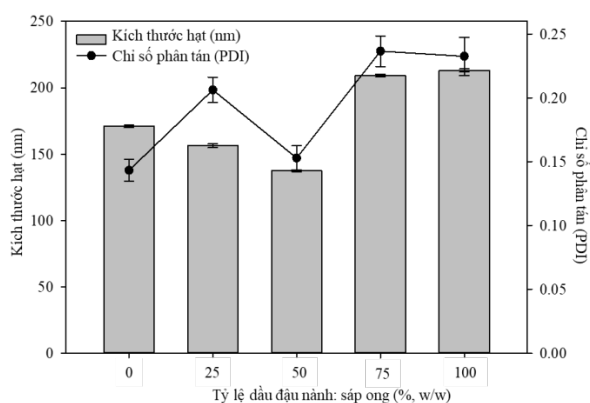
Hình 4. Độ phân tán trong nước của (A) UA dạng thô, (B) NLC-UA sau 24 giờ

3.3. Kết quả phân tích các đặc điểm của hệ NLC-UA

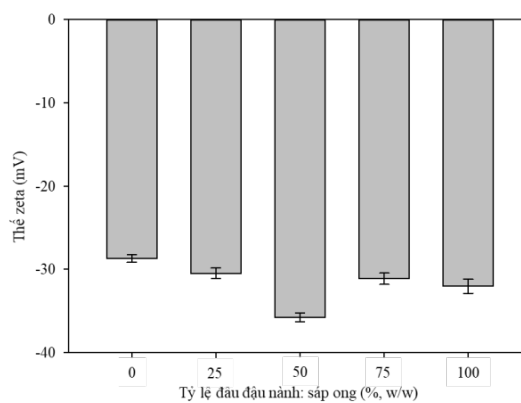
Kết quả ở Hình 5 cho thấy, khi tăng tỉ lệ dầu đậu nành (lipid lỏng) trong hỗn hợp lipid sẽ ảnh hưởng đến các thông số đặc trưng của hệ NLC. Cụ thể, sự hiện diện của lipid lỏng với tỉ lệ 25% làm cho kích thước hạt giảm từ 213,11 nm xuống 171,03 nm so với hệ chỉ dùng 100% sáp ong (lipid rắn). Điều này là do dầu đậu nành có độ nhớt thấp hơn so với sáp ong khi ở dạng lỏng, khi độ nhớt thấp hơn sẽ giúp cho các hạt nano thô dễ dàng giảm kích thước hơn dưới tác dụng của các lực phân tán và tác động của sóng siêu âm trong quá trình điều chế. Khi tỉ lệ lipid lỏng 50%, hệ NLC đạt kích thước hạt nhỏ nhất (137,50 nm) và chỉ số phân tán gần như thấp nhất (0,15). Bên cạnh đó, việc gia tăng tỉ lệ lipid lên 75% và 100% lại làm gia tăng kích thước hạt lên 209,11 nm và 213,11 nm và chỉ số phân tán cũng tăng lên, gấp 1,6 lần so với công thức NLC 50% lipid lỏng. Điều này là do ngoài việc phụ thuộc vào độ nhớt của lipid (ở điều kiện lỏng) thì các thông số đặc điểm về kích thước hạt và chỉ

số phân tán của hệ nano còn chủ yếu dựa vào sự phù hợp giữa giá trị RHLB (required hydrophilic lipophilic balance) của hỗn hợp lipid (sáp ong và dầu đậu nành) và giá trị HLB (hydrophilic lipophilic balance) của lecithin đậu nành và Tween 80 (giữ cố định ở tỉ lệ 1:1, w/w). Theo nghiên cứu của Nguyen và cộng sự (2012), thông số kích thước hạt, chỉ số phân tán của hệ NLC đạt giá trị tối ưu khi giá trị HLB của chất hoạt động bề mặt tiệm cận với giá trị RHLB của pha lipid (Nguyen et al., 2012).

Như thể hiện trong Hình 6, khi tỉ lệ pha lipid lỏng tăng từ 0% tới 100% (w/w) thì thế zeta của NLC-UA có xu hướng tăng dần từ -28,7 mV lên -32,03 mV, đối với công thức sử dụng 50% pha lipid lỏng thì cho thế zeta cao nhất (-35,8). Điều này được giải thích bởi khi kích thước hạt nhỏ hơn dẫn đến mật độ điện tích bề mặt cao hơn (Nguyen et al., 2012). Ngoài ra, thế zeta càng cao thể hiện điện tích bề mặt (ở lớp trao đổi) càng lớn, giúp hạn chế sự kết hợp giữa các hạt nhỏ thành hạt có kích thước to hơn dựa vào cơ chế đẩy tĩnh điện, kết quả là dịch phân tán nano sẽ có độ bền cao hơn (Duracher et al., 1998). Cụ thể, nghiên cứu của Mitri và cộng sự cũng cho thấy rằng giá trị tuyệt đối của thế zeta lớn hơn 30 mV là điều kiện lí tưởng để các hạt đẩy nhau tránh kết tụ (Salvi & Pawar, 2019). Ngoài ra, thế zeta mang giá trị điện tích âm là do sự phân li của axit béo trong NLC (Subramaniam et al., 2020). Ảnh hưởng của UA lên thế zeta của hệ là không đáng kể vì bản chất không ion của nó (Subramaniam et al., 2020).



Hình 5. Kết quả kích thước hạt (nm) và độ phân tán (PDI)



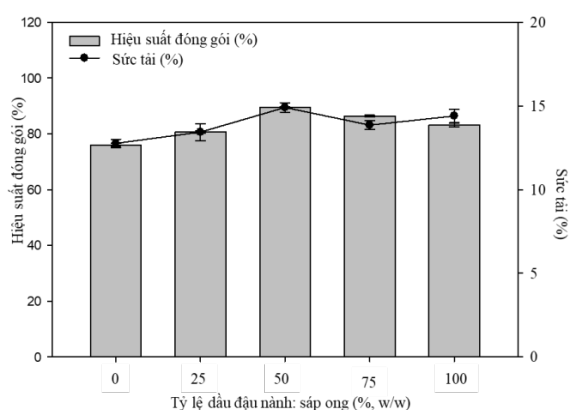
Hình 6. Tương quan giữa thế zeta (mV) với tỉ lệ dầu đậu nành: sáp ong (w/w)

3.4. Kết quả xác định hiệu suất đóng gói và sức tải

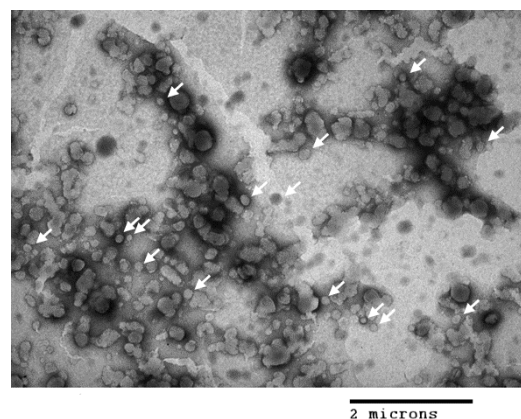
Ảnh hưởng giữa tỉ lệ dầu đậu nành và sáp ong với hiệu suất đóng gói và sức tải của hệ NLC-UA cũng được thể hiện trong Hình 7. Trong thí nghiệm này, UA được sử dụng với lượng cố định (1%, w/w) và giữ nguyên trong mọi thí nghiệm. Khi tăng dần lượng lipid lỏng trong hỗn hợp lipid từ 0 đến 100% (w/w) dẫn đến hiệu suất đóng gói tăng lên (từ 76,45% đến 89,13%). Bên cạnh đó, sức tải tương ứng cũng tăng lên từ 12,76% đến 15,04% khi tăng

tỉ lệ lipid lỏng đến 50%. Điều này có thể được giải thích bằng hai nguyên nhân chính. Đầu tiên, khả năng hòa tan của UA trong lipid lỏng cao hơn trong lipid rắn (Nahak et al., 2016). Thứ hai, sự kết hợp của pha lipid lỏng làm xáo trộn mạnh trật tự tinh thể của pha lipid rắn, do đó, mở ra nhiều khoảng không gian hơn trong khoang hạt nano để chứa các phân tử thành phần hoạt tính (UA) và dẫn đến nâng cao sức tải (Agrawal et al., 2010).

Ngoài ra, hình dạng của NLC-UA cũng được xác định bằng ảnh chụp dưới kính hiển vi điện tử truyền qua (TEM). Kết quả cho thấy NLC-UA sau khi tổng hợp có dạng hình cầu và oval; đạt kích thước nano như Hình 8.



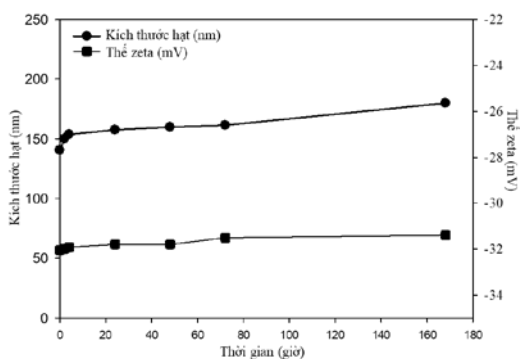
Hình 7. Tương quan giữa hiệu suất đóng gói và sức tải với tỉ lệ dầu đậu nành: sáp ong (w/w)



Hình 8. Ảnh chụp NLC-UA dưới kính hiển vi điện tử truyền qua (TEM)

3.5. Khảo sát độ bền của hệ

Đối với các công thức chỉ sử dụng sáp ong, công thức sử dụng 50% dầu đậu nành thì kích thước hạt chỉ tăng lên 22,26% so với ban đầu (từ 140,51 nm lên 180 nm) sau 168 giờ. Ngoài ra, thế zeta của công thức hệ NLC-UA với 50% pha lipid lỏng cũng thay đổi không đáng kể tăng từ -35 mV lên -33,9 mV. Điều này cho thấy sự ổn định của dịch phân tán, đáp ứng được các yêu cầu của hệ mang nano về độ bền



Hình 9. Khảo sát độ bền thông qua kích thước hạt và thế zeta

4. Kết luận

UA đã được chiết tách và phân lập thành công từ lá cây *Aralia Hiepihana* ở phân đoạn $\text{CH}_3\text{COOC}_2\text{H}_5$ với hệ dung môi giải hấp là CH_2Cl_2 -axeton (6:1, v/v). Đồng thời, NLC-UA đã được tổng hợp thành công bằng cách sử dụng nguyên liệu rẻ tiền như lecithin đậu nành, Tween- 80, sáp ong (pha lipid rắn), dầu đậu nành (pha lipid lỏng). Các kết quả phân tích các đặc điểm của hệ cũng cho thấy công thức sử dụng 50% dầu đậu nành (pha lipid lỏng) là tối ưu nhất với kích thước hạt trung bình là $137,50 \pm 0,49$ nm, chỉ số phân tán (PDI) là $0,15 \pm 0,03$, hiệu suất đóng gói cao đạt $89,13 \pm 0,33\%$ và sức tải $15,04 \pm 0,31$ %. Ngoài ra, hệ NLC-UA cũng cho thấy có độ bền cao. Từ đó cho thấy, việc đóng gói vào hệ NLC sẽ giúp mở rộng tiềm năng ứng dụng thực tiễn cho UA trong lĩnh vực dược phẩm, y sinh.

- ❖ **Tuyên bố về quyền lợi:** Các tác giả xác nhận hoàn toàn không có xung đột về quyền lợi.
- ❖ **Lời cảm ơn:** Chúng tôi xin gửi lời cảm ơn đến Trung tâm Công nghệ Bức xạ và Công nghệ Sinh học, Viện Nghiên cứu Hạt nhân; Viện Nghiên cứu Khoa học Tây Nguyên đã tạo điều kiện giúp đỡ nghiên cứu để hoàn thành đề tài.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Agrawal, Y., Petkar, K.C., & Sawant, K. K. (2010). Development, evaluation and clinical studies of acitretin loaded nanostructured lipid carriers for topical treatment of psoriasis. *International Journal of Pharmaceutics*, 401(1-2), 93-102.
- Duracher, D., Sauzedde, F., Elai'ssari, A., Pichot, C., & Nabzar, L. (1998). Cationic aminocontaining N-isopropyl-acrylamide-styrene copolymer particles: 2-surface and colloidal characteristics. *Colloid and Polymer Science*, 276, 920-929.
- Lin, Y. S., Lee, M. Y., Yang, C. H., & Huang, K. S. (2015). Active targeted drug delivery for microbes using nano-carriers. *Current Topics in Medicinal Chemistry*, 15(15), 1525-1531.
- Nahak, P., Karmakar, G., Chettri, P., Roy, B., Guha, P., Besra, S. E., & Panda (2016). A. K.influence of lipid core material on physicochemical characteristics of an ursolic acid-loaded nanostructured lipid carrier: An attempt to enhance anticancer activity. *Langmuir*, 32(38), 9816-9825.
- Nguyen, M. H., Hwang, I. C., Park, J. W., & Park, H. J. (2012). Enhanced payload and photo-protection for pesticides using nanostructured lipid carriers with corn oil as liquid lipid. *Journal of Microencapsulation*, 29(6), 1-9.
- Nguyen, H. T. P., Nguyen, T. D. T., Nguyen, T. T. H., Tran, M. H., & Pham, V. H. (2018). Flavonoids from the leaves of *Aralia Hiepihana*. *Journal of Science and Technology*, 56(4A), 259-265.
- Nguyen, T. T. H., Nguyen, H. H. D., Nguyen, T. D. T., Tran, T. N. H., Pham, V. H., & Nguyen, H. T. P. (2020). Chemical constituents of the leaves of *Aralia hiepihana*. *Quest Journals*, 6, 1-5.
- Plunkett, G. M., Soltis, D. E., & Soltis, P. S. (1997). Clarification of the relationship between Apiaceae and Araliaceae based on MATK and RBCL sequence data. *American Journal of Botany*, 84(4), 565.

- Qiu, L., Zhao, X., Zu, Y., Zhang, Y., Liu, Y., Wu, W., & Li, Y. (2019). Ursolic acid nanoparticles for oral delivery prepared by emulsion solvent evaporation method: characterization, in vitro evaluation of radical scavenging activity and bioavailability. *Artificial Cells, Nanomedicine, and Biotechnology*, 47(1), 610-621.
- Salvi, V. R., & Pawar, P. (2019). Nanostructured lipid carriers (NLC) system: A novel drug targeting carrier. *Journal Of Drug Delivery Science*, 51, 255-267.
- Salvi, V. R., & Pawar, P. (2019). Nanostructured lipid carriers (NLC) system: A novel drug targeting carrier. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, 51, 255-267.
- Subramaniam, B., Siddik, Z. H., & Nagoor, N. H. (2020). Optimization of nanostructured lipid carriers: understanding the types, designs, and parameters in the process of formulations. *Journal of Nanoparticle Research*, 22(6).
- US EPA; Estimation Program Interface (EPI) Suite. Ver. 4.0. Jan, 2009. Available from, as of Feb 4, 2009.
- Xiong, X., Chen, W., Cui, J., Yi, Y., Zhang, Z., & Li, K. (2003). Effects of ursolic acid on liver-protection and bile secretion. *National Library Of Medicine*, 26(8), 578-581.

EXTRACTION AND ISOLATION OF URSOLIC ACID FROM *ARALIA HIEPIANA* AND PREPARATION OF URSOLIC ACID-ENCAPSULATED NANOSTRUCTURED LIPID CARRIERS

Nguyen Ngoc Thuy Trang¹, Nguyen Huu Toan Phan²,
Nguyen Thi Thu Hien², Nguyen Minh Hiep^{1*}

¹Center Of Radiation Technology and Biotechnology, Nuclear Research Institute, Vietnam

²Tay Nguyen Institute for Scientific Research, Vietnam

*Corresponding author: Nguyen Minh Hiep – Email: jackminhhiep@yahoo.com

Received: October 26, 2021; Revised: December 03, 2021; Accepted: December 11, 2021

ABSTRACT

Ursolic acid (UA) is bioactivity that is a predominant component in *Aralia hiepiana* J.Wen & Lowry, which was distributed widely in the western highlands of Vietnam. However, the application of UA faces many difficulties because of its poor solubility in water. So nanostructured lipid carrier (NLC) is an approach to increasing the water solubility and bioavailability of UA. Ursolic acid-encapsulated nanostructured lipid carrier (NLC-UA) has been prepared from inexpensive materials such as soy lecithin, Tween-80, beeswax (solid lipid phase), or soybean oil (liquid lipid phase). The results of this physical-chemical analysis (FTIR, ¹H-NMR, ¹³C-NMR DEPT, HMBC) of the isolated compound indicated that UA was successfully isolated with high purity. In addition, NLC-UA formulation using 50% soybean oil (liquid lipid phase) was the most optimal with an average particle size of 137.50 ± 0.49 nm, dispersion index (PDI) of 0.153 ± 0.03 , encapsulation efficiency of $89.13 \pm 0.33\%$, and payload of $15.04 \pm 0.31\%$. The stability study also shows that the nanosystem was stable for a long time under storage conditions. The findings of this study also imply that by being encapsulated into NLC, the potential to be widely applied in the pharmaceutical and biomedical fields of UA could be improved.

Keywords: acid ursolic; *Aralia Hiepiana*; beeswax; nanostructured lipid carriers; soybean oil