

STUDY ON EXTRACTION, ISOLATION AND PURIFICATION OF ACID URSOLIC FROM COFFEE ARABICA LEAVES FOR REFERENCE STANDARD ESTABLISHMENT

NGO THI THANH DIEP^{1,✉}, LE NGUYEN QUY ANH², THAI GIA HAN¹, TRUONG VAN DAT¹

¹School of Pharmacy, University of Medicine and Pharmacy at Ho Chi Minh city

²Imexpharm Pharmaceutical Joint Stock Company

✉ Corresponding author: ngothithanhdiep@ump.edu.vn

Received September 29th, 2025; Accepted January 19th, 2026

Abstract: Currently, ursolic acid is found in many medicinal herbs and has been proven to have pharmacological activities, including anti-oxidation, anti-inflammation, antibacterial, antiviral, anti-diabetic, and anti-cancer effects. In the Vietnamese Pharmacopoeia V, ursolic acid is being used as a standard substance in the qualitative determination of some medicinal herbs such as *Ocimum tenuiflorum* L., *Cornus officinalis*, *Eriobotrya japonica*. Ursolic acid is also considered a marker for medicinal herbs such as *Nepeta stenantha*, *Guiera senegalensis*. To contribute to the standardization of medicinal herbs containing ursolic acid, it is necessary to use a standard substance of its with high purity. Currently, there is no ursolic acid standard substance available in Vietnam at a reasonable price. In this study, 1.08 g of ursolic acid was extracted, isolated and purified from 1 kg of dried arabica coffee leaves. The purified product structure was confirmed by spectroscopic methods (IR, HRMS, NMR) through comparison with the reference standard while the content determined by HPLC-PDA method reached 95.4%.

Keywords: ursolic acid, arabica coffee leaves, extraction, isolation, purification

NGHIÊN CỨU XÂY DỰNG QUY TRÌNH CHIẾT XUẤT, PHÂN LẬP VÀ TINH CHẾ ACID URSOLIC TỪ LÁ CÀ PHÊ ARABICA LÀM NGUYÊN LIỆU THIẾT LẬP CHẤT CHUẨN

NGÔ THỊ THANH DIỆP^{1,✉}, LÊ NGUYỄN QUÝ ANH², THÁI GIA HÂN¹, TRƯƠNG VĂN ĐẠT¹

¹Trường Dược, Đại học Y Dược Thành phố Hồ Chí Minh

²Công ty Cổ phần Dược phẩm Imexpharm

✉ Tác giả liên lạc: ngothithanhdiep@ump.edu.vn

Nhận bài ngày 29 tháng 9 năm 2025; Chấp nhận đăng ngày 19 tháng 1 năm 2026

Tóm tắt: Hiện nay, acid ursolic được tìm thấy trong rất nhiều dược liệu và được chứng minh có các công dụng như chống oxy hóa, kháng viêm, kháng khuẩn, kháng virus, ngừa tiểu đường, phòng ngừa và điều trị ung thư. Trong ĐBVN V, acid ursolic đang được sử dụng làm chất chuẩn trong định tính một số dược liệu như Hương nhu tía, Sơn thù, Tỳ bà diệp. Acid ursolic cũng được coi là chất marker cho một số dược liệu như *Nepeta stenantha*, *Guiera senegalensis*. Để góp phần tiêu chuẩn hóa các dược liệu có chứa acid ursolic, cần dùng chất chuẩn là acid ursolic có độ tinh khiết cao. Hiện trong nước vẫn chưa có sẵn chất chuẩn acid ursolic với giá thành hợp lý. Nghiên cứu đã chiết xuất, phân lập và tinh chế được 1,08 g acid ursolic từ 1 kg lá cà phê arabica khô. Cấu trúc sản phẩm được khẳng định bằng các phương pháp phổ nghiệm (IR, HRMS, NMR) khi so sánh với chuẩn và hàm lượng được xác định bằng phương pháp HPLC-PDA đạt 95,4%.

Từ khóa: acid ursolic, lá cà phê arabica, chiết xuất, phân lập, tinh chế

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Acid ursolic là một saponin triterpenoid được tìm thấy trong nhiều loại dược liệu và đã được chứng minh có nhiều tác dụng sinh học quan trọng như chống oxy hóa, kháng viêm, kháng khuẩn, kháng virus, phòng

ngừa và điều trị bệnh tiểu đường cũng như ung thư [1]. Acid ursolic thường được sử dụng như một chất đánh dấu (marker) trong kiểm nghiệm dược liệu, điển hình như trong các loại thảo dược như *Nepeta stenantha*, *Guiera senegalensis* [2, 3]. Trong ĐBVN V, acid ursolic

cũng được sử dụng làm chất đối chiếu trong định tính một số dược liệu như Tỳ bà diệp, Sơn thù, Hương nhu tía [4]. Tuy nhiên, acid ursolic và acid oleanolic – hai hợp chất là đồng phân cấu tạo cùng thuộc nhóm saponin triterpenoid – thường xuất hiện đồng thời trong nhiều loài thực vật, trong đó acid oleanolic phổ biến hơn và thường có hàm lượng lớn hơn. Mặc dù, tại Việt Nam acid oleanolic đã được thiết lập làm chất đối chiếu tại Viện Kiểm nghiệm Thuốc TP.HCM và Viện Kiểm nghiệm thuốc Trung ương, nhưng acid ursolic vẫn chưa có trong danh mục chất đối chiếu chính thức tại các cơ sở này [5, 6]. Việc phân lập và tinh chế acid ursolic gặp nhiều khó khăn, do sự tương đồng cấu trúc với acid oleanolic, dẫn đến hiệu suất phân lập thấp. Do đó, việc lựa chọn nguyên liệu để chiết xuất và phân lập acid ursolic có độ tinh khiết cao để có thể thiết lập làm chất đối chiếu là rất cần thiết và có ý nghĩa thiết thực. Cà phê arabica (*coffee arabica*), có nguồn gốc từ các vùng nhiệt đới Đông Bắc Châu Phi, hiện đang được trồng rộng rãi trên toàn thế giới, bao gồm các quốc gia như Brazil, Colombia, Ethiopia và Việt Nam. Sau khi thu hoạch quả, lá cà phê arabica là một phụ phẩm có thể được khai thác mà không ảnh hưởng đến năng suất cây trồng. Theo tài liệu tham khảo [7] lá cà phê arabica chứa một lượng lớn acid ursolic, trong khi đó, hàm lượng acid oleanolic rất nhỏ, chỉ nằm trong giới hạn phát hiện. Điều này tạo điều kiện thuận lợi cho việc phân lập acid ursolic tinh khiết được dễ dàng hơn. Acid ursolic phân lập được có độ tinh khiết cao và hàm lượng trên 95%, có thể thiết lập làm chất đối chiếu.

2. THỰC NGHIỆM

2.1. Đối tượng nghiên cứu

Acid ursolic trong lá cà phê Arabica được thu hái tại tỉnh Lâm Đồng vào tháng 07/2024.

2.2. Thiết bị, dụng cụ, hóa chất, chất chuẩn

2.2.1. Thiết bị, dụng cụ

Hệ thống sắc ký lỏng hiệu năng cao Waters Alliance e2695 kết nối với đầu dò dây diod quang Water PDA 1998; máy quang phổ hồng ngoại Shimadzu IRAffinity-1S, máy phân tích khối phổ phân giải cao Agilent 6500 Series Q-TOF, máy quang phổ cộng hưởng từ hạt nhân NMR Bruker Advance II, máy đo nhiệt độ nóng chảy Stuart SMP-10, máy khuấy từ IKAC-Mag HS-10, cân phân tích Sartorius ENTRIS1241-1S, máy đo pH Melder Toledo S20. Bản mỏng silica gel 60 F₂₅₄ 20 x 20 cm Merck, silica gel 40 – 63 μm Merck. Các dụng cụ thủy tinh đạt yêu cầu về độ chính xác sử dụng trong phân tích.

2.2.2. Hóa chất, chất chuẩn

Methanol (MeOH), ethanol (EtOH), isopropanol, ethyl acetat (EtOAc), cloroform (Cf), acetonitril (ACN), acid formic (HCOOH), kali hydroxyd (KOH), acid hydrochloric

(HCl): các dung môi, hóa chất có độ tinh khiết phù hợp dùng cho phân tích hoặc sắc ký HPLC.

Chuẩn acid ursolic EP, EDQM CRS số lô: 30026F-67081, hàm lượng: 94,0% theo nguyên trạng.

2.3. Phương pháp nghiên cứu

2.3.1. Chiết xuất, phân lập và tinh chế acid ursolic

Lá cà phê arabica, phơi khô, xay đến bột thô. Chiết acid ursolic từ lá cà phê bằng isopropanol theo Kozlova và cộng sự [8] để thu được cao toàn phần. Cao toàn phần được loại chlorophyll và một số tạp màu bằng than hoạt tính, dịch sau khi khử màu được acid hóa đến pH 1 – 3 bằng HCl 10%, xuất hiện kết tủa. Để qua đêm ở nhiệt độ 5 – 8°C cho tủa lắng xuống, lọc thu tủa. Hòa tan tủa thu được bằng KOH 10% trong isopropanol. Để qua đêm ở nhiệt độ 5 – 8°C, loại bỏ cặn. Lặp lại bước chuyển pha acid – base. Cuối cùng thêm HCl 10% đến pH 7, lọc loại tủa. Bay hơi dịch lọc đến cặn. Cặn được hòa tan và kết tinh lại bằng EtOH tuyệt đối, thu được sản phẩm thô. Sản phẩm thô được tinh chế bằng sắc ký cột cố định với pha tĩnh là silica gel (cỡ hạt 40 – 63 μm), pha động là 100% Cf. Thực hiện nạp mẫu khô, tiến hành sắc ký và hứng từng phân đoạn đến khi thu được sản phẩm chỉ cho một vết duy nhất trên sắc ký lớp mỏng và trùng với vết của chuẩn đối chiếu. Gộp tất cả các ống có cùng sắc ký đồ, kết tinh lại trong EtOH để thu được sản phẩm tinh chế.

Trong quá trình chiết xuất, phân lập và tinh chế, tiến hành kiểm tra sự có mặt của acid ursolic bằng phương pháp sắc ký lớp mỏng pha thuận (sử dụng bản mỏng silica gel F₂₅₄- Merck với hệ dung môi khai triển là hỗn hợp Cf – MeOH tỷ lệ 9,5 : 0,5 (tt/tt). Phát hiện vết các chất sau quá trình sắc ký bằng cách quan sát dưới ánh sáng tử ngoại ở bước sóng 254 và 365 nm.

2.3.2. Thử tinh khiết sản phẩm sau tinh chế

Độ tinh khiết của sản phẩm sau tinh chế được kiểm tra bằng nhiệt độ nóng chảy (phương pháp phân tích nhiệt vi sai DSC), sắc ký lớp mỏng (SKLM) với ba hệ dung môi có năng lực rửa giải khác nhau, phát hiện vết bằng soi đèn UV ở bước sóng 365 nm và xác định bằng phương pháp HPLC-PDA quy về 100% diện tích pic.

SKLM: Ba hệ dung môi gồm Cf – MeOH (99 : 1), Cf – EtOAc (99 : 1), Cf – HCOOH (9,5 : 0,5).

HPLC-PDA: Cột Knauer C18 (250 x 4,6 mm; 5 μm), nhiệt độ cột 30°C, thể tích tiêm mẫu 10 μL, tốc độ dòng 1,0 mL/phút, bước sóng phát hiện 205 nm. Thử tinh khiết sản phẩm sau tinh chế theo chương trình rửa giải hai kênh dung môi, thời gian sắc ký 60 phút với pha động A là ACN hoặc MeOH và pha động B là H₂O theo chương trình gradient từ A – B (60 : 40) đến 100% A trong 30 phút, tiếp tục rửa giải bằng 100% A đến 60 phút.

2.3.3. Khẳng định cấu trúc acid ursolic

Sản phẩm sau khi tinh chế được khẳng định cấu trúc bằng các phương pháp phổ nghiệm. So sánh phổ IR, HRMS, NMR của sản phẩm sau tinh chế và chất chuẩn acid ursolic cũng như so sánh với các dữ liệu phổ của acid ursolic trong tài liệu tham khảo để khẳng định sản phẩm sau tinh chế là acid ursolic.

– Phổ IR: đo phổ hồng ngoại của chất tinh chế và chất chuẩn vùng từ 400 đến 4000 cm^{-1} .

– Phổ HRMS: xác định các mảnh tín hiệu thu được của mẫu sản phẩm tinh chế và mẫu chuẩn pha trong MeOH.

– Phổ NMR: các mẫu được hòa tan trong CD_3OD và đo phổ cộng hưởng từ ^1H và ^{13}C .

2.3.4. Xác định hàm lượng acid ursolic phân lập được bằng HPLC-PDA

2.3.4.1. Điều kiện sắc ký

Cột: Knauer C18 (250 mm x 4,6 mm x 5 μm)

Pha động: ACN và H_2O , theo chương trình rửa giải gradient dung môi trong Bảng 1.

Bảng 1: Chương trình sắc ký định lượng acid ursolic

Thời gian (phút)	ACN (% tt/tt)	H_2O (% tt/tt)
0	90	10
15	100	0
20	100	0
25	90	10

Tốc độ dòng: 1,0 mL/phút

Thể tích tiêm mẫu: 10 μL

Nhiệt độ cột: 30°C

Bước sóng phát hiện: 205 nm

2.3.4.2. Chuẩn bị mẫu

Dung dịch chuẩn gốc: Cân chính xác khoảng 25 mg chất chuẩn acid ursolic vào trong bình định mức 25 mL, thêm khoảng 20 mL MeOH, lắc siêu âm 15 phút, để nguội và thêm MeOH vừa đủ đến vạch, lắc đều.

Từ dung dịch chuẩn gốc pha loãng bằng MeOH để thu được các dung dịch chuẩn có nồng độ 200 $\mu\text{g/mL}$, 400 $\mu\text{g/mL}$, 600 $\mu\text{g/mL}$, 800 $\mu\text{g/mL}$.

Dung dịch thử: Cân chính xác khoảng 15 mg sản phẩm tinh chế acid ursolic vào trong bình định mức 25 mL, thêm khoảng 20 mL MeOH, lắc siêu âm 15 phút, để nguội và thêm MeOH vừa đủ đến vạch, lắc đều.

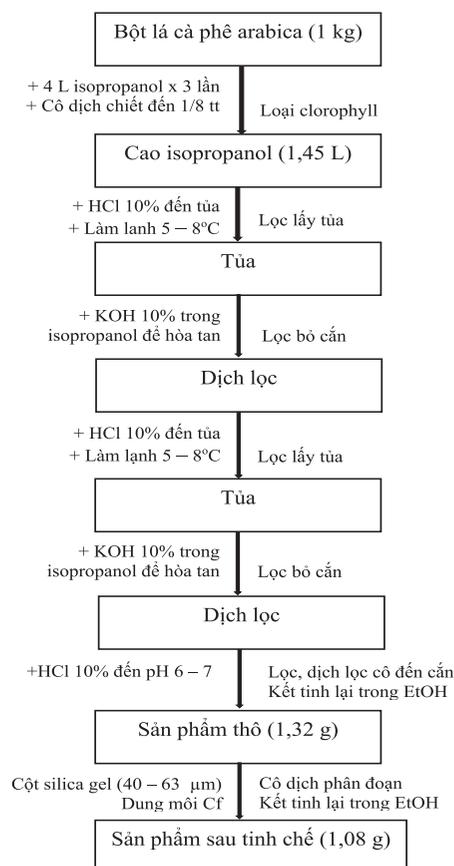
Quy trình định lượng acid ursolic bằng phương pháp HPLC-PDA được thẩm định các chỉ tiêu độ thích hợp hệ thống, độ đặc hiệu, khoảng tuyến tính, độ đúng, độ chính xác. Quá trình thẩm định tuân theo Hướng dẫn thẩm định phương pháp phân tích của Bộ y tế được trình bày trong Phụ lục 1 - Thông tư 32/2018/TT - BYT.

3. KẾT QUẢ VÀ BÀN LUẬN

3.1. Chiết xuất, phân lập và tinh chế acid ursolic

1 kg bột thô lá cà phê arabica (mất khối lượng do làm khô 9,6%) được chiết trong bình chiết bằng phương pháp ngâm lạnh 3 lần, mỗi lần 24 giờ bằng isopropanol với tỉ lệ 1 : 4 (kl : tt). Toàn bộ dịch chiết được gộp lại và cho bay hơi dung môi đến tỉ lệ 1 : 8 (tt : tt) thu được cao toàn phần. Cao toàn phần được khử màu bằng than hoạt tính để loại một số tạp và chlorophyll, thu được cao isopropanol. Thêm HCl 10% vào cao isopropanol đến pH 1 – 3 để acid ursolic tủa lại, để qua đêm ở nhiệt độ 5 – 8°C để tủa lắng xuống, lọc thu tủa. Tủa được hòa tan với KOH 10% trong isopropanol, loại bỏ phần cặn không tan. Phần dịch lọc thu được tiếp tục quá trình chuyển pha acid – base như trên thêm 1 lần nữa. Cuối cùng, thêm HCl 10% đến pH 7, loại tủa. Dịch thu được cho bay hơi dung môi đến gần khô và kết tinh lại bằng EtOH thu được sản phẩm thô màu trắng ngà (1,32 g). Sản phẩm thô được tinh chế bằng sắc ký cột, dung môi là Cf, thu được 1,08 g sản phẩm sau tinh chế có màu trắng.

Quy trình phân lập và tinh chế acid ursolic từ lá cà phê arabica được thể hiện trong Sơ đồ 1.



Sơ đồ 1. Quy trình chiết xuất, phân lập và tinh chế acid ursolic từ lá cà phê arabica

3.2. Thử tinh khiết sản phẩm sau tinh chế

Nhiệt độ nóng chảy của sản phẩm sau tinh chế xác định bằng DSC là 286,7°C, phù hợp với nhiệt độ nóng chảy của acid ursolic trong tài liệu tham khảo [9] là 285 – 288°C. Độ tinh khiết của sản phẩm tinh chế tính bằng DSC là 99,1%.

SKLM: Sản phẩm sau tinh chế cho 1 vết duy nhất khi tiến hành SKLM trên 3 hệ dung môi, có giá trị R_f tương đương với chất chuẩn acid ursolic.

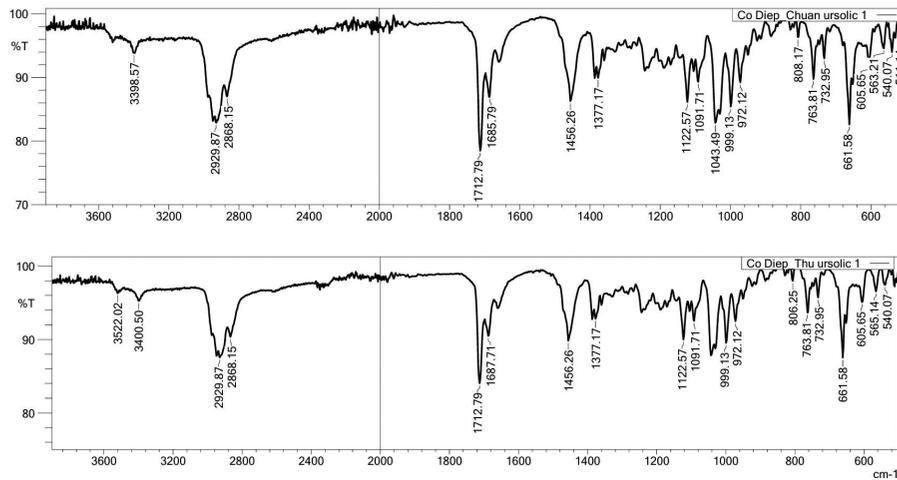
Độ tinh khiết tính bằng HPLC theo phương pháp chuẩn hóa diện tích pic với hệ pha động ACN – H₂O và MeOH – H₂O lần lượt là 97,6%, 96,4%.

Như vậy, có thể kết luận sản phẩm tinh chế có độ tinh khiết cao.

3.3. Khẳng định cấu trúc của acid ursolic

Trong phân định lượng acid ursolic sau tinh chế, sắc ký đồ của mẫu thử cho pic chính có thời gian lưu (11,806 phút) và phổ UV tương ứng với thời gian lưu (11,770 phút) và phổ UV của pic chính trên sắc ký đồ mẫu chuẩn. Các pic acid ursolic trong mẫu thử và mẫu chuẩn đều đạt độ tinh khiết pic (purity angle nhỏ hơn purity threshold).

Phổ hồng ngoại của sản phẩm sau tinh chế có hình dạng và các đỉnh đặc trưng hoàn toàn phù hợp với phổ IR của chất chuẩn acid ursolic, độ trùng lặp phổ 98,51%, trên 90%. Phổ ATR-FTIR (ν_{max} , cm⁻¹): 3522 (OH, alcol); 3401 (OH, acid carboxylic) 2930 – 2868 (CH₂, CH₃); 1713 (C=O, acid carboxylic); 1043 (C–O, alcohol/carboxylic) – **Hình 1**.

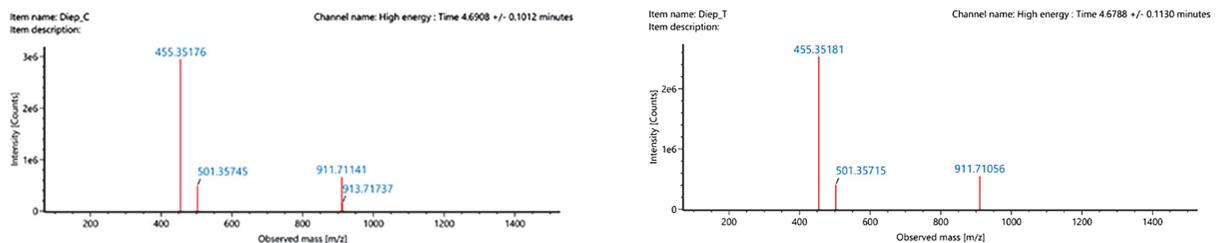


Hình 1. Phổ ATR-FTIR của chuẩn acid ursolic và sản phẩm sau tinh chế

Phổ HRMS-ESI(-) (m/z) của chuẩn acid ursolic ghi nhận mảnh chính $[M-H]^- = 455,3518$ (sai số khối $\Delta m = 1,10$ ppm so với $[M-H]^-$ lý thuyết = 455,3513).

Phổ HRMS-ESI(-) (m/z) của sản phẩm tinh chế ghi nhận mảnh chính $[M-H]^- = 455,3518$ (sai số khối $\Delta m = 1,10$ ppm so với $[M-H]^-$ lý thuyết = 455,3513).

Kết quả thu được thể hiện trên **Hình 2**.



Chuẩn acid ursolic

Sản phẩm tinh chế

Hình 2. Phổ HRMS-ESI(-) của sản phẩm tinh chế và chuẩn acid ursolic

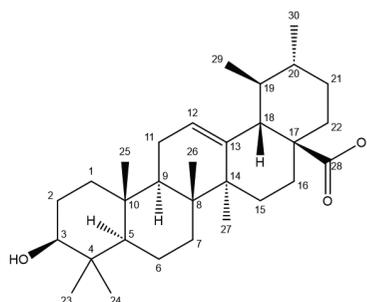
Kết quả HRMS cho thấy phổ khối của sản phẩm sau tinh chế có độ tương đồng cao với phổ của chất chuẩn acid ursolic, đồng thời phù hợp với giá trị lý thuyết của acid ursolic có công thức phân tử C₃₀H₄₈O₃, khối lượng phân tử 456,70 g/mol.

Ngoài ra, kết quả đo phổ $^1\text{H-NMR}$ và $^{13}\text{C-NMR}$ của chuẩn acid ursolic và sản phẩm tinh chế cũng cho kết quả trùng khớp và các giá trị này cũng phù hợp với dữ liệu phổ NMR của acid ursolic trong tài liệu tham khảo [10]. Các thông số đặc trưng như sau:

$^1\text{H-NMR}$ (CD_3OD , 600 MHz): 0,74 – 0,78 (4H, m, H_3 -24 và H-5); 0,85 (3H, s, H-26); 0,89 (3H, d, $J = 6,4$ Hz, H_3 -29); 0,96 – 0,98 (9H, m, H_3 -23 và H_3 -25 và H_3 -30); 1,12 (3H, s, H_3 -27); 1,92 (2H, dd, $J = 3,6$ và 12,4 Hz, H_2 -11); 2,04 (1H, td, $J = 4,2$ và 9,2 Hz, H-16); 2,21 (1H, d, $J = 11,2$ Hz, H-18); 3,16 (1H, dd, $J = 4,8$ và 11,2 Hz, H-3); 5,23 (1H, t, $J = 3,6$ Hz, H-12) ppm.

$^{13}\text{C-NMR}$ (CD_3OD , 150 MHz): 16,0 (C25) 16,4 (C24); 17,6 (C29); 17,8 (C26); 19,5 (C6); 21,6 (C30); 24,1 (C27); 24,4 (C11); 25,3 (C16); 27,9 (C2); 28,8 (C23); 29,2 (C15); 31,8 (C21); 34,3 (C7); 38,1 (C10); 38,1 (C22); 39,8 (C4); 40,0 (C1); 40,4 (C20); 40,4 (C19); 40,8 (C8); 43,2 (C14); 49,0 (C17); 49,0 (C9); 54,4 (C18) 56,7 (C5); 79,7 (C3); 126,9 (C12); 139,6 (C13); 181,6 (C28) ppm.

Dựa vào các dữ liệu phổ IR, HRMS, $^1\text{H-NMR}$ và $^{13}\text{C-NMR}$ đo được, có thể khẳng định sản phẩm tinh chế chính là acid ursolic, có công thức phân tử $\text{C}_{30}\text{H}_{48}\text{O}_3$ và công thức cấu tạo trong **Hình 3**.



Hình 3. Công thức cấu tạo của acid ursolic

3.4. Xác định hàm lượng acid ursolic sau tinh chế

Tiến hành thẩm định quy trình định lượng acid ursolic theo điều kiện sắc ký đã nêu ở mục 2.3.4 để xác định hàm lượng acid ursolic sau tinh chế dựa trên giá trị hàm lượng đã biết của chuẩn. Kết quả thẩm định quy trình như sau:

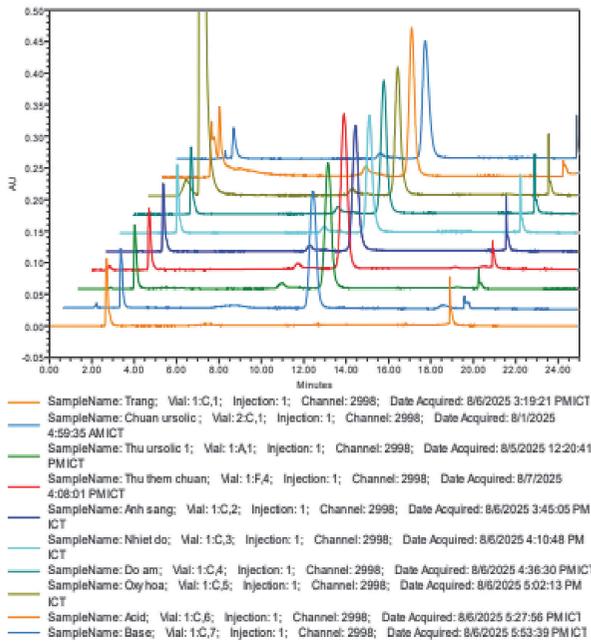
3.4.1. Độ thích hợp hệ thống:

Độ thích hợp hệ thống được xác định bằng cách tiêm lặp lại 6 lần dung dịch mẫu chuẩn acid ursolic có nồng độ khoảng 600 $\mu\text{g/mL}$. Kết quả thu được cho thấy RSD của các thông số thời gian lưu (t_R), diện tích pic (S), đều nhỏ hơn 2%. Hệ số kéo đuôi (T) của pic acid ursolic nằm trong khoảng 0,8 – 1,5. Số đĩa lý thuyết đạt trên 7000. Kết quả được thể hiện trong **Bảng 2**. Như vậy quy trình đạt yêu cầu về độ thích hợp hệ thống.

Bảng 2: Kết quả khảo sát độ thích hợp hệ thống

STT	Thời gian lưu (phút)	Diện tích pic acid ursolic (mAu.s)	Hệ số kéo đuôi	Số đĩa lý thuyết
1	11,77	4084236	1,1	7037
2	11,79	4074980	1,1	7439
3	11,78	4054624	1,1	7476
4	11,80	4036424	1,1	7475
5	11,81	4063514	1,1	7301
6	11,82	4059216	1,1	7107
RSD (%)	0,16	0,41		

3.4.2. Độ đặc hiệu: Kết quả khảo sát độ đặc hiệu (**Hình 4**) cho thấy sắc ký đồ của mẫu thử cho pic chính có thời gian lưu (11,81 phút) và phổ UV tương ứng với thời gian lưu (11,77 phút) và phổ UV của pic chính trên sắc ký đồ mẫu chuẩn, các pic acid ursolic trong mẫu thử và mẫu chuẩn đều đạt độ tinh khiết pic. Sắc ký đồ mẫu trắng không xuất hiện pic có thời gian lưu tương đương với thời gian lưu của pic acid ursolic trong sắc ký đồ mẫu chuẩn và mẫu thử. Sắc ký đồ các mẫu phân hủy hầu như không thấy xuất hiện các pic phân hủy và các pic trên sắc ký đồ tách hoàn toàn với pic acid ursolic. Pic acid ursolic trong mẫu thử và mẫu chuẩn có cùng thời gian lưu, có phổ UV-Vis tại thời gian lưu tương đồng và pic đạt độ tinh khiết theo phổ UV-Vis. Sắc ký đồ của mẫu thử thêm chuẩn cũng chỉ xuất hiện pic có cùng thời gian lưu với pic acid ursolic chuẩn, đồng thời diện tích pic tăng lên. Như vậy, quy trình đạt yêu cầu về độ đặc hiệu.



Hình 4. Kết quả khảo sát độ đặc hiệu

3.4.3. Khoảng tuyến tính: Tiến hành với dãy dung dịch chuẩn acid ursolic có nồng độ khoảng 200 – 1000 µg/mL. Kết quả cho thấy có sự tương quan tuyến tính chặt chẽ

giữa nồng độ và diện tích pic acid ursolic. Kết quả thể hiện trên **Bảng 3**.

Bảng 3. Kết quả khảo sát khoảng tuyến tính

Nồng độ acid ursolic (µg/mL)	Diện tích pic acid ursolic (mAu.s)
189,88	1192218
379,76	2426185
569,64	3624266
759,52	4900330
949,40	6129395

Phương trình tuyến tính của nồng độ theo diện tích pic: $y = 6503,3x - 50071;$
 $R^2 = 0,9999$

3.4.4. Độ đúng

Chuẩn bị các mẫu thử thêm chuẩn acid ursolic ở các mức nồng độ khoảng 10%, 20% và 30% so với nồng độ định lượng và triển khai sắc ký. Độ thu hồi của acid ursolic trong các mẫu thêm chuẩn đều nằm trong khoảng gần với 100% của lượng thêm vào cho thấy quy trình có độ đúng cao. Kết quả khảo sát độ đúng thể hiện trong **Bảng 4**.

Bảng 4. Kết quả khảo sát độ đúng

Mức chuẩn thêm vào	Lượng chuẩn acid ursolic thêm vào (µg)	Diện tích pic mẫu thử (mAu.s)	Diện tích pic mẫu thử thêm chuẩn (mAu.s)	Lượng acid ursolic thu hồi (µg)	% thu hồi	Trung bình (%)	RSD (%)
10%	56,96	4028195	4394340	56,30	98,84	100,28	1,25
	56,96	4028195	4402148	57,50	100,94		
	56,96	4028195	4402567	57,57	101,06		
20%	113,93	4028195	4777914	115,28	101,19	100,26	0,83
	113,93	4028195	4769016	113,91	99,99		
	113,93	4028195	4766111	113,47	99,60		
30%	170,89	4028195	5146907	172,02	100,66	100,93	0,24
	170,89	4028195	5150625	172,59	101,00		
	170,89	4028195	5152115	172,82	101,13		

3.4.5. Độ chính xác:

Độ chính xác được đánh giá qua chỉ tiêu độ lặp lại và độ chính xác trung gian. Độ lặp lại được thực hiện với 6 mẫu thử riêng biệt được chuẩn bị ở khoảng nồng độ 600 µg/mL, tiến hành sắc ký theo điều kiện trên. Độ chính xác trung gian được thực hiện giống như độ lặp lại nhưng khác ngày. Kết quả được trình bày trong **Bảng 5**.

Bảng 5. Kết quả khảo sát độ chính xác

Ngày 1		Ngày 2	
STT	Hàm lượng acid ursolic (%)	STT	Hàm lượng acid ursolic (%)
1	94,16	1	94,60
2	95,82	2	94,33
3	95,65	3	95,73
4	96,45	4	95,10
5	95,73	5	95,92
6	95,64	6	95,58
Hàm lượng trung bình (n = 6): 95,57%; RSD: 0,79%		Hàm lượng trung bình (n = 6): 95,21%; RSD: 0,68%	
Kết quả độ chính xác trung gian (n = 12): Hàm lượng trung bình 95,39%; RSD 0,73%			

Độ lệch chuẩn tương đối RSD (%) của mỗi dãy số liệu về hàm lượng của acid ursolic (n = 6) và của cả 2 dãy số liệu (n = 12) đều nhỏ hơn 2% cho thấy quy trình có độ chính xác cao.

4. KẾT LUẬN VÀ BÀN LUẬN

Nghiên cứu đã xây dựng được quy trình chiết xuất, phân lập và tinh chế acid ursolic có từ nguồn nguyên liệu

đồi dào, rẻ tiền là lá cà phê arabica. Các dung môi, hóa chất dùng trong chiết xuất, phân lập đều thông dụng, dễ kiếm. Kết quả từ 1 kg lá cà phê arabica khô, sau chiết xuất, phân lập và tinh chế thu được 1,08 g sản phẩm sau tinh chế dạng bột màu trắng. Bằng các phương pháp phổ nghiệm (IR, MS, NMR) sản phẩm tinh chế được khẳng định chính là acid ursolic. Sản phẩm acid ursolic thu được từ nghiên cứu có hàm lượng 95,4% tính bằng phương pháp HPLC-PDA so sánh với chuẩn, cao hơn cả của chuẩn EP của EDQM (94,0%). Như vậy hoàn toàn có thể sử dụng kết quả của nghiên cứu này ở quy mô phòng thí nghiệm để chủ động nguồn nguyên liệu acid ursolic cho thiết lập chất chuẩn, làm giàu cho ngân hàng chất đối chiếu Quốc gia cũng như phục vụ thiết thực cho công tác nghiên cứu các dược liệu chứa acid ursolic.

Các kết quả thẩm định cho thấy quy trình định lượng acid ursolic có độ đặc hiệu tốt, khoảng tuyến tính xây dựng có sự tương quan chặt chẽ giữa nồng độ và diện tích pic acid ursolic; độ chính xác cao và độ đúng có tỷ lệ thu hồi nằm trong khoảng 98 – 102%. Quy trình này có thể sử dụng để xác định hàm lượng acid ursolic trong các mẫu nguyên liệu (khi có chuẩn).

LỜI CẢM ƠN

Nghiên cứu được nhận kinh phí tài trợ từ Đại học Y Dược Thành phố Hồ Chí Minh theo hợp đồng số 195/2024/HĐ-ĐHYD.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Khwaza V, Aderibigbe BA. Potential Pharmacological Properties of Triterpene Derivatives of Ursolic Acid. *Molecules*. 2024 Jan;29(16):3884.
2. Parvez MK, Alam P, Arbab AH, Al-Dosari MS, Alhowiriny TA, Alqasoumi SI. Analysis of antioxidative and antiviral biomarkers β -amyrin, β -sitosterol, lupeol, ursolic acid in *Guiera senegalensis* leaves extract by validated HPTLC methods. *Saudi Pharmaceutical Journal*. 2018 Jul 1;26(5):685–93.
3. Yenigün S, Başar Y, İpek Y, Behçet L, Özen T, Demirtaş İ. Determination of antioxidant, DNA protection, enzyme inhibition potential and molecular docking studies of a biomarker ursolic acid in *Nepeta* species. *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics*. 2024 Jul 23;42(11):5799–816.
4. Bộ Y Tế. Dược điển Việt Nam. 5th ed. Vol 2. Nhà xuất bản Y học Hà Nội; 2017: 1202-1204, 1318-1319, 1365-1366.
5. Chất chuẩn - Chất đối chiếu - Viện Kiểm nghiệm Thuốc Thành phố Hồ Chí Minh. [cited 2025 Aug 12]. <https://vienkiemnghiem.gov.vn/chat-chuan-doi-chieu/>.
6. Chất chuẩn - Chất đối chiếu - Viện Kiểm nghiệm Thuốc Trung Ương. [cited 2025 Aug 12]. <https://nidqc.gov.vn/tim-kiem-chat-chuan>.
7. Jäger S, Trojan H, Kopp T, Laszczyk MN, Scheffler A. Pentacyclic Triterpene Distribution in Various Plants – Rich Sources for a New Group of Multi-Potent Plant Extracts. *Molecules*. 2009 Jun;14(6):2016–31.
8. METHOD OF URSOLIC ACID PRODUCTION [Internet]. Patenton. [cited 2025 Sep 9]. Available from: <https://patenton.ru/patent/RU2329048C1/en>
9. PubChem. (+)-Ursolic Acid [Internet]. [cited 2025 Sep 9]. Available from: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/64945>
10. Nam VV, Hue NT, Hang PT, Hue VT, Thanh LN, Nhiem NX, et al. TRITERPENES FROM THE STEMS AND LEAVES OF *MYXOPYRUM SMLACIFOLIUM* (WALL.) BLUME. 1. 2022;28(4):01–01.