

STUDY ON EXTRACTION AND PURIFICATION OF SCOPOLETIN FROM *RADIX EURYCOMAE LONGIFOLIAE* FOR REFERENCE STANDARD ESTABLISHMENT

DO THI NGOC LAN^{1,4}, QUACH HA VAN², NGUYEN TIEN DAT³,
TRINH VAN LAU⁴, LE QUANG THAO^{4,5},✉

¹Drug Administration of Vietnam

²Institute of Pharmacy Training, Vietnam Military Medicinal University

³Center for High Technology Research and Development, VAST

⁴National Institute of Drug Quality Control

⁵Vietnam National University - University of Medicine and Pharmacy

✉Corresponding author: thaolq.vkn@gmail.com

Received March 15th, 2024

Accepted May 16th, 2024

Abstract: Scopoletin (SCOP) is a coumarin synthesized by diverse medicinal and edible plants, which plays a vital role as a therapeutic and chemopreventive agent in the treatment of a variety of diseases. SCOP was one of the major substances in *Radix Eurycomae longifoliae*, so which would be a potentially chemical marker for control quality of this herbal material. This study have been developed an extraction and purification procedure of SCOP for establishing its reference standard. In this procedure, the *Radix Eurycoma longifolia* powder was ultrasonically extracted with ethanol 50 % (v/v), and then ethanol was evaporated in vacuo to give water suspension. The suspension was successively partitioned with dichloromethan, eluted on silica column and crystallized by using the combination of dichloromethan and methanol at suitable ratios to obtain crystal. Finally, the crystal was purified on C18 column to get SCOP material. The SCOP material, was identified by MS spectrometry, NMR, UV-VIS, IR spectroscopy and melting point at 205,6 °C, contained 98.59 % of scopoletin (C₁₀H₈O₄), which was calculated form volatile impurities (0.0012 %), residue on ignition (0.013 %) and of related substances (1.41 %). It was concluded that the established procedure was suitable for producing SCOP material for standard references establishment.

Keywords: *Eurycoma longifolia*, scopoletin

NGHIÊN CỨU PHÂN LẬP, TINH CHẾ SCOPOLETIN TỪ DƯỢC LIỆU MẬT NHÂN (*RADIX EURYCOMAE LONGIFOLIAE*) LÀM NGUYÊN LIỆU THIẾT LẬP CHẤT CHUẨN

ĐỖ THỊ NGỌC LAN^{1,4}, QUÁCH HÀ VÂN², NGUYỄN TIẾN ĐẠT³,
TRINH VĂN LẬU⁴, LÊ QUANG THẢO^{4,5},✉

¹Cục Quản lý Dược, Bộ Y tế

²Viện Đào tạo Dược, Học viện Quân Y

³Trung tâm Nghiên cứu và Phát triển Công nghệ cao, Viện Hàn lâm KH&CN Việt Nam

⁴Viện Kiểm nghiệm thuốc Trung ương

⁵Đại học Y Dược - Đại học Quốc Gia Hà Nội

✉Tác giả liên hệ: thaolq.vkn@gmail.com

Nhận bài ngày 15 tháng 3 năm 2024

Chấp nhận đăng ngày 16 tháng 5 năm 2024

Tóm tắt: Scopoletin là một coumatin được tổng hợp từ nhiều loài thực vật và có nhiều hoạt tính sinh học quan trọng. SCOP cũng là một trong những thành phần chính của dược liệu Mật nhân (*Radix Eurycoma longifolia*), vì vậy đây là một hợp chất rất tiềm năng có thể sử dụng làm chất đánh dấu của dược liệu này. Nghiên cứu này đã xây dựng được quy trình chiết xuất, phân lập và tinh chế SCOP từ dược liệu Mật nhân phục vụ thiết lập chất chuẩn. Trong đó, bột dược liệu Mật nhân được chiết xuất siêu âm với ethanol 50 %, sau đó cô quay chân không loại ethanol, phân tán với nước và chiết xuất với dichloromethan. Phân đoạn dichloromethan được bay hơi loại dung môi, sau đó phân lập trên cột pha thuận, kết tinh với hỗn hợp của các dung môi dichloromethan và methanol ở các tỷ lệ thích hợp để tạo các tinh thể giàu SCOP. Tinh thể giàu SCOP sau đó được tinh chế trên sắc ký cột pha đảo C18 để thu được nguyên liệu SCOP thiết lập chuẩn. Nguyên liệu SCOP, được định tính bằng phổ phổ MS, phổ NMR, UV-VIS, phổ IR và nhiệt độ nóng chảy ở 205,6 °C, chứa 98,59 % scopoletin ($C_{10}H_8O_4$) được tính từ lượng tạp chất bay hơi (0,0012 %), tro toàn phần (0,013 %) và tạp chất liên quan (1,41 %) của nguyên liệu đã tinh chế. Do đó, nguyên liệu đã đáp ứng yêu cầu về độ tinh khiết để thiết lập chuẩn.

Từ khóa: *Eurycoma longifolia*, scopoletin, Bách bệnh, Mật nhân

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Cây Mật nhân (*Eurycoma longifolia* Jack), thuộc họ Thanh thất (Simaroubaceae), còn được dân gian gọi với một số tên khác như Bách bệnh hay Bá bệnh. Mật nhân với bộ phận dùng phổ biến là rễ phơi khô có công dụng bổ khí huyết, ôn tỳ thận, được sử dụng để điều trị các chứng khí huyết lưỡng hư, cơ thể yếu mệt, thiếu máu, ăn uống kém, khó tiêu, các bệnh tả, lỵ, các trường hợp sinh dục yếu, dương suy, tảo tiết. Bên cạnh đó, một số chứng bệnh như cảm mạo, phát sốt, sốt rét, giải độc rượu, tẩy giun cũng được nhân dân sử dụng dược liệu này để điều trị [1]. Đã có khoảng 100 hợp chất được phân lập từ rễ cây Mật nhân, trong đó có nhiều hợp chất có khả năng kháng khuẩn, kháng nấm, chống ký sinh trùng, kháng viêm, chống oxy hóa, chống ung thư...trên mô hình *in vitro* [2-5].

Cùng với eurycomalacton, 9-methoxycanthin-6-on, 14,15 β -dihydroxyklaineanon, scopoletin (SCOP) đã được xác định là hợp chất chính trong dược liệu Mật nhân do có nhiều hoạt tính sinh học quan trọng [6]. Hợp chất SCOP cũng đã được tìm thấy ở nhiều loại dược liệu khác nhau, vai trò của hợp chất này đã được nghiên cứu rất nhiều, điển hình như các tác dụng chống ung thư, chống viêm, hạ đường huyết, bảo vệ tim mạch, bảo vệ gan... [7, 8]. Hiện nay SCOP cũng đã được phân lập, tinh chế và thiết lập chuẩn để thương mại nhưng ở Việt Nam chưa có đơn vị nào sản xuất.

Để bổ sung thêm nguồn chất chuẩn tại Việt Nam phục vụ kiểm tra dược liệu Mật nhân, dược liệu chứa SCOP và các sản phẩm liên quan, nghiên cứu được thực hiện nhằm xây dựng quy trình chiết xuất, phân lập và tinh chế hợp chất SCOP với hàm lượng đạt được không thấp hơn 95 % để làm nguyên liệu phục vụ thiết lập chuẩn.

2. THỰC NGHIỆM

2.1. Đối tượng nghiên cứu

Rễ cây Mật nhân (*Eurycoma longifolia* Jack.) được thu hái tại xã Đắk R'Măng, huyện Đắk Glong, tỉnh Đắk Nông vào tháng 5/2022. Mẫu rễ cây được phơi khô, nghiên cứu thành bột, được xác định có độ ẩm là 8,15 %.

2.2. Thiết bị, dụng cụ và hóa chất

Thiết bị: Các thiết bị đáp ứng yêu cầu ISO/IEC 17025, gồm: Máy lắc siêu âm ELMASONIC S100; cân phân tích Mettler Toledo (chính xác đến 0,01 mg), máy HPLC/DAD Shimadzu, máy HPLC/DAD Waters Acquity ARC, máy cô quay chân không Buchi, Lò nung Prolabo, máy TGA/DSC Mettler Toledo, máy LC/MS Xevo TQD Waters, máy đo nhiệt độ nóng chảy Buchi M565 (Buchi), (Viện Kiểm nghiệm thuốc Trung ương); máy cộng hưởng từ hạt nhân NMR – BRUKER – 600 MHz (Viện Hoá học - Viện Hàn lâm khoa học và công nghệ Việt Nam).

Dụng cụ: Bình định mức, pipet, cột sắc ký, ống đong, bình cầu cô quay...

Hóa chất, dung môi: Bân mỏng Silica gel G F254 (Merck, Đức), dichloromethan (Merck, Đức), methanol (Merck, Đức), acetonitril (Merck, Đức), n-hexan (Scharlau, Tây Ban Nha), acetone (Scharlau, Tây Ban Nha) và hạt pha thuận silica gel 60 (40-63 μ m – Merck, Đức).

2.3. Phương pháp nghiên cứu

2.3.1. Phương pháp chiết xuất, phân lập và tinh chế

Bột dược liệu được chiết xuất với hỗn hợp dung môi methanol hoặc ethanol và nước ở các tỷ lệ khác nhau. Dược phân lập trên cột sắc ký pha thuận hoặc pha đảo. Sau đó phân đoạn giàu hợp chất nghiên cứu được tinh chế bằng phương pháp kết tinh bằng dung môi thích hợp

hoặc/và phương pháp sắc ký để được hợp chất tinh khiết. Kiểm tra sự xuất hiện của SCOP ở các giai đoạn và độ tinh khiết của hợp chất tinh chế bằng phương pháp nêu ở Mục 2.3.2.

2.3.2. Phương pháp khẳng định cấu trúc hợp chất nghiên cứu

Hợp chất thu được sau khi tinh chế được sơ bộ kiểm tra độ tinh khiết trên máy HPLC Shimadzu LC-20A detector DAD đặt ở bước sóng 348 nm, sử dụng cột Phenomenex C18 (250 x 4,6 mm; 5 μ m). Chất phân tích được hòa trong methanol với hàm lượng khoảng 0,2 mg/ml. Tiêm 5 μ l vào hệ thống sắc ký, rửa giải bằng pha động là hỗn hợp acetonitril trong nước với tỷ lệ acetonitril tăng từ 10 % đến 50 % trong 30 phút.

Hợp chất nghiên cứu đảm bảo độ tinh khiết dự kiến bằng các phương pháp trên sẽ được xác định bộ dữ liệu nhận dạng bằng phương pháp quang phổ hồng ngoại, phổ UV-VIS, phổ cộng hưởng từ hạt nhân (NMR) và phổ khối (ESI-MS).

2.3.3. Phương pháp đánh giá một số chỉ tiêu chất lượng phục vụ xây dựng tiêu chuẩn nguyên liệu

* Phương pháp định tính

- Phổ UV-VIS: Trên sắc ký đồ của mẫu đối chiếu ở phần xác định tạp chất liên quan, phổ UV-VIS của pic chính phải cho các cực đại hấp thụ tại bước sóng 343 nm.

- Phổ hồng ngoại: Thử theo Dược điển Việt Nam V, Phụ lục 4.2 [1].

- Nhiệt độ nóng chảy: Mẫu thử được gia nhiệt từ 194 °C với tốc độ 1,0 °C/phút. Xác định điểm nóng chảy theo Phụ lục 6.7, Dược điển Việt Nam V [1].

* **Phương pháp xác định tạp chất bay hơi:** dùng phương pháp nhiệt trọng lực (TGA)

Tiến hành cân 5 – 10 mg mẫu thử cho vào cốc đo. Đặt chương trình gia nhiệt với tốc độ 10 °C/phút đến nhiệt độ 115 °C, duy trì ở nhiệt độ 115 °C trong 120 phút. Tính khối lượng giảm đi so với khối lượng ban đầu. Tiến hành trên 3 mẫu thử, kết quả hàm lượng tạp chất bay hơi trong 3 mẫu thử xác định giá trị trung bình.

* Phương pháp xác định tro toàn phần

Cân chính xác khoảng 0,5 g mẫu thử, xác định tạp vô cơ bằng phương pháp tro toàn phần (ĐVN V, Phụ lục 9.8, phương pháp 2) [1]. Tiến hành trên 2 mẫu thử, xác định giá trị trung bình.

* Phương pháp xác định tạp chất liên quan và độ tinh khiết sắc ký

- **Điều kiện sắc ký:** Mẫu nghiên cứu được phân tích trên hệ sắc ký lỏng Waters Acquity ARC với cột C18 (250 x 4,6 mm, 5 μ m), nhiệt độ cột 40 °C; rửa giải bằng acetonitril 30 % trong acid H₃PO₄ 0,1 % ở tốc độ dòng 1,0 ml/phút. Mẫu phân tích được tiêm vào hệ với thể tích 10 μ l và phân tích bởi DAD đặt ở bước sóng 210 nm. Thời gian phân tích mẫu gấp 5 lần thời gian lưu của pic chính.

- **Chuẩn bị mẫu:** Pha mẫu thử trong methanol để thu được dung dịch có nồng độ scopoletin chính xác khoảng 0,25 mg/ml. Mẫu đối chiếu là mẫu được pha loãng 100 lần từ mẫu thử trong methanol.

- **Đánh giá kết quả:** Sắc ký đồ của dung dịch đối chiếu cho số đĩa lý thuyết không ít hơn 5000, hệ số kéo đuôi pic scopoletin không quá 2,0 và độ lặp lại diện tích của 6 lần tiêm lặp lại liên tiếp không quá 2,0 %. Tổng diện tích pic các tạp đơn không được quá 2 lần diện tích pic scopoletin của dung dịch đối chiếu (2,0 %).

Độ tinh khiết sắc ký (TKSK) được xác định bằng (100 - tổng tạp) (%), kl/kl). Hàm lượng scopoletin trong nguyên liệu, tính theo chế phẩm dạng nguyên trạng, được xác định bởi công thức sau:

$$HL_{(SCOP)} = \text{TKSK} \times [100 - (\text{tạp bay hơi} + \text{cắn sau nung})]/100$$

3. KẾT QUẢ VÀ BÀN LUẬN

3.1. Xây dựng quy trình chiết xuất, phân lập và tinh chế scopoletin từ dược liệu mật nhân

Chương trình chiết xuất được lựa chọn bằng cách lấy chính xác khoảng 2 g bột dược liệu vào các bình nón nút mài, thêm chính xác 50,0 ml các hỗn hợp dung môi khác nhau của methanol (MeOH)/ethanol (EtOH) với nước. Tiến hành chiết siêu âm với các điều kiện thời gian khác nhau. Kết quả cho thấy hệ dung môi EtOH 50 % và thời gian chiết siêu âm 60 phút cho ra số lượng hợp chất và tỷ lệ hợp chất với hàm lượng cao nhất trong các mẫu thử nghiệm, đánh giá thông qua số lượng tín hiệu pic và diện tích tương đối giữa các pic xuất hiện trên sắc ký đồ các mẫu sau khi chiết.

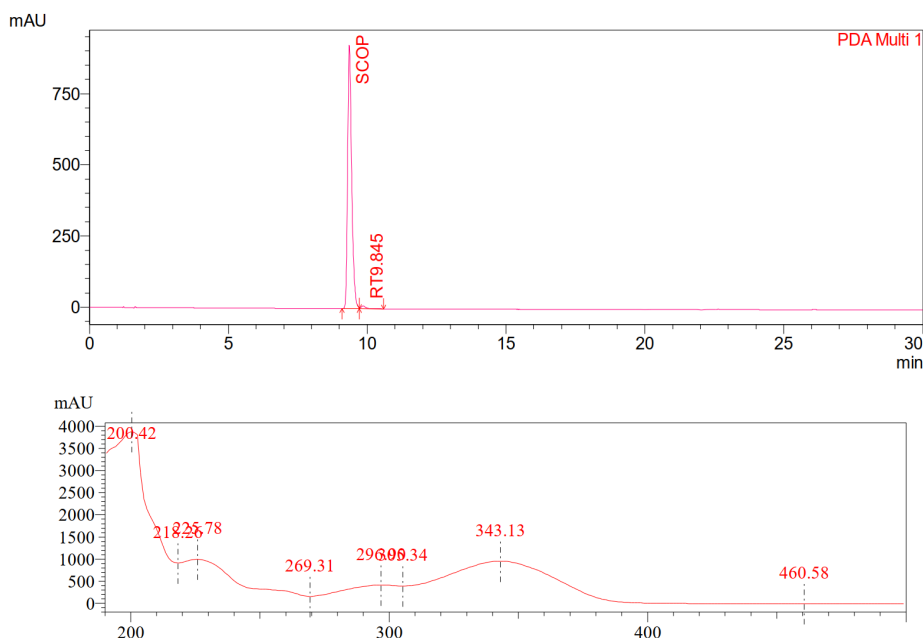
Ở quy mô phòng thí nghiệm, lựa chọn mẻ nghiên cứu cỡ 5 kg bột dược liệu. Tiến hành chiết siêu âm 3 lần, mỗi lần chiết 60 phút với 50 lít ethanol 50 %. Gộp dịch chiết, cô quay loại EtOH (đến khi còn khoảng 1/5 lượng dung môi ban đầu). Phân tán hỗn dịch thu được trong nước và chiết lỏng/lỏng với lần lượt với các dung môi dichloromethan (03 lần) và ethyl acetat (03 lần). Kiểm tra bằng HPLC, SCOP nằm ở phần chiết bằng dichloromethan. Gộp dịch chiết dichloromethan, cô quay loại dung môi thu được cần ELD.

Cần ELD được triển khai trên cột sắc ký pha thuận, với hạt nhồi là silica gel, sau đó lần lượt được rửa giải bằng các hệ dung môi dichloromethan – methanol với các tỷ lệ khác nhau, xác định được SCOP sẽ rửa giải bởi hệ dung môi ở tỷ lệ (20 : 1) – (10 : 1). Do đó, tiến hành loại tạp bằng hệ dung môi dichloromethan – methanol (30 : 1), sau đó rửa giải ở tỷ lệ (10 : 1), ở mỗi giai đoạn thể tích dung môi rửa giải gấp 5 lần thể tích cột, để thu được phân đoạn chứa hợp chất nghiên cứu.

Thử độ tan của SCOP trong một số dung môi thông dụng, nhận thấy rằng hợp chất này ít tan trong nước,

methanol và dichloromethan hơn so với trong acetone.

SCOP kết tinh dưới dạng hình kim trong methanol và nước. Do đó, chọn phân tán mẫu trong dichloromethan, loại bỏ phần tan trong dichloromethan. Cô quay chân không phần còn lại để loại dung môi. Phân tán cần trong 50 ml acetone, lặp lại 03 lần và gộp dịch trong. Tiếp tục thêm khoảng 30 ml nước vào phần acetone thu được, khuấy đều. Bay hơi acetone trong cách thủy ở 60 °C để tạo kết tinh giàu SCOP. Cuối cùng, tinh chế bằng sắc ký cột pha đảo, cô quay chân không loại dung môi để thu được mẫu SCOP tinh khiết (Hình 1).



Hình 1. Sắc ký đồ (phân tích ở bước sóng 348 nm) và phổ UV-VIS của hợp chất SCOP nồng độ 0,2 mg/ml trong methanol

Áp dụng các bước đã tiến hành trên, tiến hành chiết xuất, phân lập và tinh chế SCOP lặp lại 03 lần với lượng bột dược liệu Mật nhân đầu vào khoảng 5 kg. Khối lượng nguyên liệu hợp chất SCOP thu được lần lượt là 825 mg, 788 mg và 855 mg. Theo nghiên cứu trước đó, hàm lượng SCOP trong dược liệu là 0,0352 %, tính theo dược liệu khan [9], có thể ước lượng hiệu suất của quá trình phân lập tinh chế là khoảng 50 % (hiệu suất thu được từ 3 lần chiết lần lượt 50,8 %, 47,5 % và 52,0 %) và tổng lượng nguyên liệu SCOP thu được là ~ 2,4 g.

Như vậy, quy trình chiết xuất, phân lập và tinh chế hợp chất SCOP từ dược liệu Mật nhân gồm các bước như sau:

Bước 1: Chiết xuất SCOP từ dược liệu Mật nhân

Lấy khoảng 5 kg bột dược liệu Mật nhân chiết 50 lít

ethanol 50 %, siêu âm 60 phút, tiến hành 3 lần. Gộp dịch chiết, cô quay loại EtOH đến khi còn khoảng 1/5 lượng dung môi ban đầu. Thêm nước đến khoảng 30 lít để phân tán, chiết lỏng/lỏng 3 lần với đồng lượng dichloromethan (tỷ lệ 1 : 1). Gộp dịch chiết pha dichloromethan, cô quay chân không loại dung môi thu được cần ELD.

Bước 2: Phân lập và tinh chế hợp chất SCOP

Cần ELD được triển khai trên cột sắc ký lỏng pha thuận, với hạt nhồi là silica gel, rửa giải loại tạp bằng hỗn hợp dung môi dichloromethan – methanol tỷ lệ (30 : 1), sau đó thu phân đoạn chứa SCOP bằng cách rửa giải với hỗn hợp hai dung môi trên ở tỷ lệ (10 : 1). Cô quay chân không loại dung môi, sau đó phân tán trong hỗn hợp dichloromethan – methanol tỷ lệ (20 : 1), loại bỏ phần dịch trong. Lặp lại

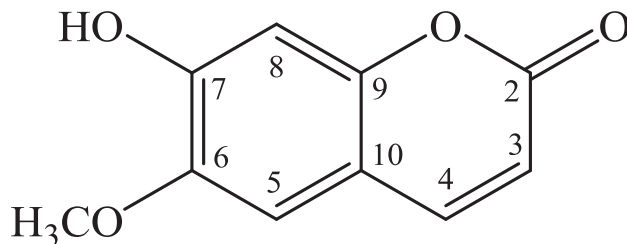
quá trình trên thêm 2 lần, phần cặn sau đó được bay hơi loại dung môi.

Tiếp tục thêm aceton vào phần cặn, phân tán đều, để lắng và thu phần dịch trong. Lặp lại quá trình trên thêm 2 lần, gộp các phần dịch trong. Thêm nước với thể tích khoảng 1/5 thể tích dịch thu được, khuấy đều. Bay hơi dung môi trong cách thủy ở 60 °C để tạo các tinh thể hình kim. Tinh chế tinh thể hình kim trên sắc ký cột pha đảo

hạt C18, rửa giải bằng hỗn hợp aceton trong nước ở nồng độ 15 %. Cò quay chân không loại dung môi thu được nguyên liệu SCOP.

3.2. Khẳng định cấu trúc hợp chất nghiên cứu

Hợp chất thu được dự kiến là SCOP thu được dưới dạng tinh thể hình kim, màu vàng nâu. SCOP có cấu trúc như ở Hình 2 [11].



Hình 2. Cấu trúc phân tử hợp chất scopoletin

Phổ khối của hợp chất SCOP cho tín hiệu của ion giả phân tử tại m/z 215,01 $[M+Na]^+$, phù hợp với khối lượng phân tử của hợp chất scopoletin ($C_{10}H_8O_4$, $M = 192$ g/mol).

Phổ 1H -NMR (MeOH, 600 MHz) δ_{ppm} : 3,93 (3H, s, H-OCH₃); 6,22 (1H, d, $J = 9,6$ Hz, H-3); 6,79 (1H, s, H-8); 7,13 (1H, s, H-5) và 7,88 (1H, d, $J = 9,6$ Hz, H-4).

Phổ ^{13}C -NMR (MeOH, 150 MHz) δ_{ppm} : 56,8 (C-OCH₃); 104,0 (C-8); 109,9 (C-5); 112,4 (C-10); 112,4 (C-3); 146,1 (C-4); 147,3 (C-6); 151,6 (C-9); 153,4 (C-7) và 164,1 (C-2).

So sánh dữ liệu phổ NMR của hợp chất tinh chế được với tài liệu tham khảo [10] có thể khẳng định sản

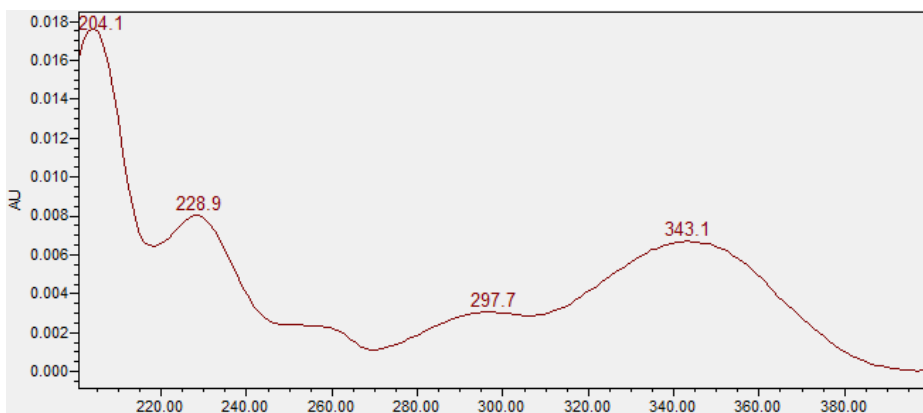
phẩm tinh chế được chính là scopoletin có cấu trúc như Hình 2.

3.3. Xây dựng tiêu chuẩn nguyên liệu SCOP phục vụ thiết lập chuẩn

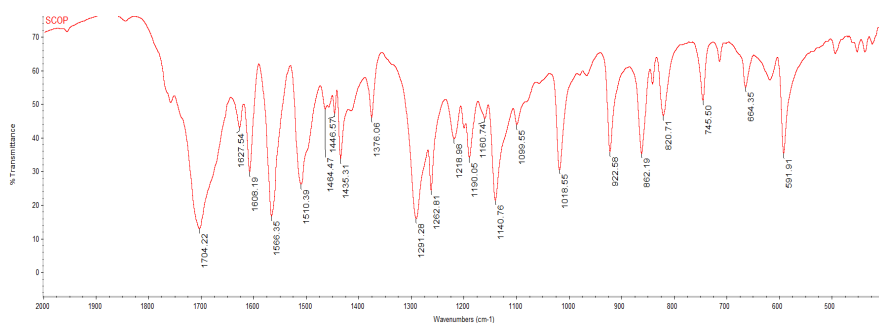
Sản phẩm tinh chế sau khi được khẳng định cấu trúc, tiếp tục được đánh giá các chỉ tiêu định tính bằng phổ hồng ngoại, phổ UV-VIS và điểm nóng chảy; tạp chất bay hơi; lượng cặn sau nung và tạp chất liên quan...

3.3.1. Định tính

Phổ UV-VIS thu được từ sắc ký đồ của dung dịch đối chiếu phân tử Tạp chất liên quan và phổ IR của hợp chất SCOP được thể hiện ở Hình 3 và Hình 4.



Hình 3. Phổ UV-VIS của hợp chất SCOP thu được từ sắc ký đồ mẫu đối chiếu phân tử Tạp chất liên quan



Hình 4. Phổ IR của hợp chất SCOP đo bằng chế độ truyền qua

Điểm nóng chảy của nguyên liệu SCOP là 205,6 °C, phù hợp với tài liệu của nghiên cứu trước đó đã công bố (từ 204 °C đến 206 °C) [8]. Trong Dược điển Việt Nam V, nhiệt độ nóng chảy của các nguyên liệu được dao động trong khoảng từ 2 – 4 °C [1], kết hợp tài liệu tham khảo trên [8] đưa ra mức giới hạn nhiệt độ nóng chảy của nguyên liệu scopoletin đã tinh chế là 203 °C đến 207 °C.

3.3.2. Tạp chất bay hơi

Tiến hành trên 3 mẫu thử, kết quả hàm lượng tạp chất bay hơi trung bình trong 3 mẫu thử là 0,0012 % (0,0011 %; 0,0012 % và 0,0012 %). Từ đó đưa ra giới hạn cho phép của tạp chất bay hơi với nguyên liệu SCOP là không lớn hơn 0,2 %.

3.3.3. Phương pháp xác định tro toàn phần

Tiến hành trên 2 mẫu thử, khối lượng mẫu thử chính xác khoảng 0,5 g. Kết quả hàm lượng tạp chất vô cơ mẫu thử là 0,013 % (tính từ hàm lượng trung bình hai mẫu thử là 0,012 % và 0,014 %). Từ đó đưa ra giới hạn cho phép

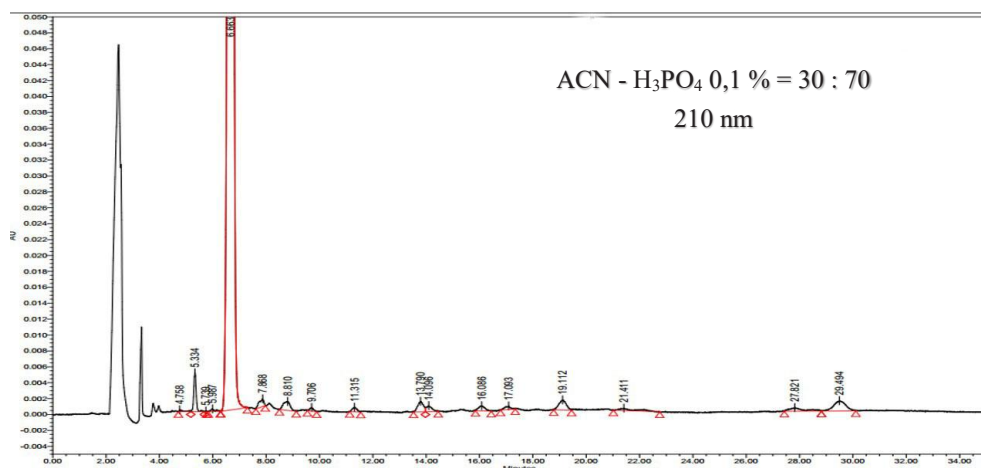
của tạp chất vô cơ với nguyên liệu SCOP là không lớn hơn 0,1 %.

3.3.4. Xây dựng và thẩm định phương pháp xác định tạp chất liên quan

3.3.4.1. Xây dựng phương pháp

Hợp chất SCOP được tinh chế ở cột pha đảo, hạt nhồi C18, pha động là aceton 15 % trong nước, do đó một số chương trình sắc ký lỏng pha đảo được khảo sát xây dựng quy trình xác định tạp chất liên quan của hợp chất SCOP. Sau khi khảo sát một số điều kiện sắc ký, lựa chọn điều kiện sắc ký ở mục 2.3.3 cho các pic tạp đã tách khỏi pic chính. Với điều kiện pha động này, phân tích mẫu ở bước sóng 210 nm cho tổng tạp nhiều hơn khi phân tích ở 227 nm, do đó bước sóng chọn để phân tích là 210 nm.

Ngoài ra, vì thời gian lưu của pic chính là khoảng 6,5 phút và có tạp chất xuất hiện ở thời điểm 29,5 phút, do đó thời gian chạy mẫu sẽ được cài đặt gấp 5 lần thời gian lưu của pic chính (Hình 5).

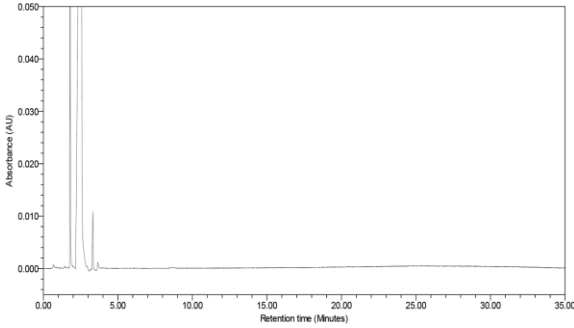


Hình 5. Sắc ký đồ khảo sát phương pháp phân tích tạp chất liên quan của hợp chất SCOP

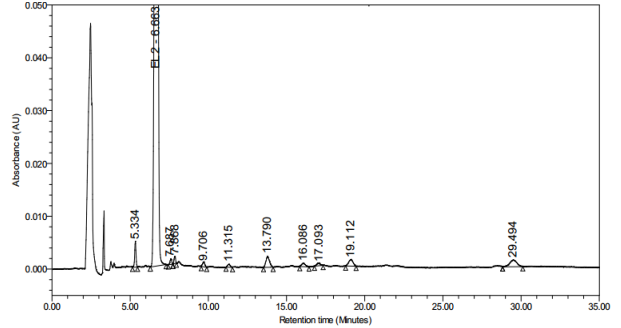
3.3.4.2. Thẩm định độ đặc hiệu của phương pháp

Chuẩn bị mẫu trắng (dung môi pha mẫu – methanol), mẫu thử theo quy trình phân tích. Các mẫu được phân hủy ở điều kiện khác nhau, gồm các mẫu riêng biệt với lượng chính xác khoảng 12,5 mg nguyên liệu SCOP trong các bình định mức 50 ml khác nhau, thêm vào các bình

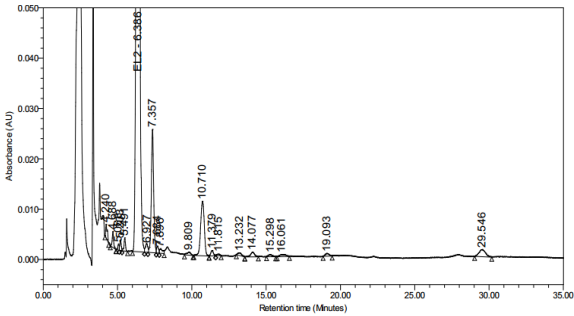
lượng riêng biệt gồm 1 ml HCl 5N, 1 ml NaOH 5N và 1 ml H₂O₂ đậm đặc, sau đó đặt trong cách thủy ở 80 °C trong 60 phút, để nguội và thêm methanol vừa đủ thể tích. Mẫu phân hủy bằng nhiệt độ được chuẩn bị với lượng nguyên liệu SCOP tương tự nhưng được đặt vào tủ sấy ở 105 °C trong 5 giờ.



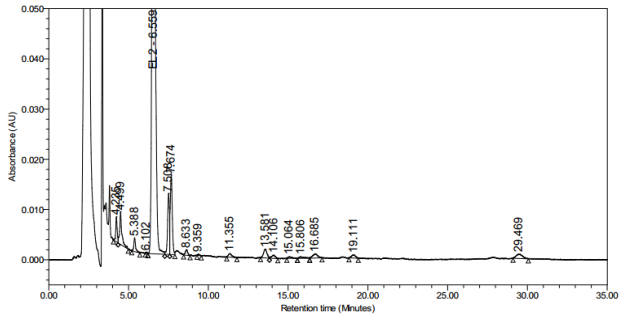
A. Dung dịch mẫu trắng



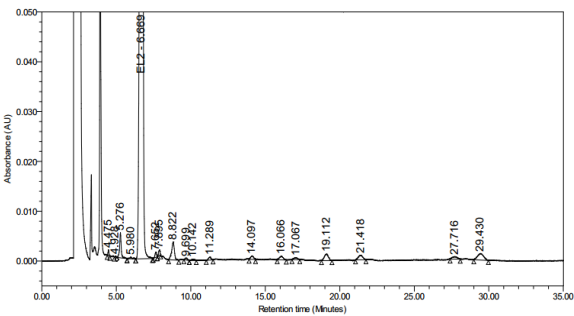
B. Dung dịch thử



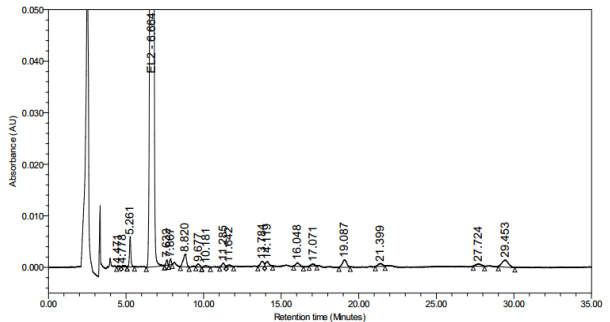
C. Mẫu phân hủy bằng HCl 5N



D. Mẫu phân hủy bằng base



E. Mẫu phân hủy bằng H₂O₂



F. Mẫu phân hủy bằng nhiệt độ

Hình 6. Kết quả đánh giá độ đặc hiệu của phương pháp (pic ký hiệu EL2 là tín hiệu của hợp chất SCOP)

Kết quả thẩm định cho thấy mẫu trắng không cho pic chính ở khoảng thời gian sau 4 phút, các mẫu bị phân hủy ở các điều kiện khác nhau đều cho khá nhiều tạp chất và tạp gần nhất đã tách khỏi pic chính (độ phân giải tối thiểu là $2,25 > 1,5$), các pic chính trên các điều kiện phân hủy đều đạt yêu cầu về độ tinh

khiết. Như vậy phương pháp đã xây dựng đạt yêu cầu về độ đặc hiệu.

3.3.4.3. Độ thích hợp hệ thống

Pha loãng 100 lần mẫu thử (là mẫu thử được chuẩn bị ở phần thử độ đặc hiệu, Mục 3.3.4.2), tìm lặp lại 06 lần

liên tiếp vào hệ thống sắc ký, ghi lại sắc ký đồ. RSD thời gian lưu là 0,09 % (<1,0 %), của diện tích pic là 1,21 % (< 2,0 %), hệ số kéo đuôi từ 0,93 – 0,96 (< 2,0) và số đĩa lý thuyết từ 8048 – 8762 (>5000). Như vậy chương trình sắc ký đã xây dựng đạt yêu cầu về độ thích hợp hệ thống.

3.3.4.4. Giới hạn phát hiện và giới hạn định lượng

Pha loãng dần dung dịch thử, tiêm vào hệ thống sắc ký. Tại nồng độ ~ 0,063 µg/ml, pic SCOP trên sắc ký đồ có tỷ số signal/noise (S/N) ≈ 3,14. Tiêm lặp lại 06 lần, độ lặp lại của diện tích pic là RSD = 7,3 % và S/N từ 3,08 – 3,22 đạt các yêu cầu đặt ra. Như vậy giới hạn phát hiện của phương pháp là 0,063 µg/ml, từ đó suy ra giới hạn định lượng của phương pháp là 0,21 µg/ml.

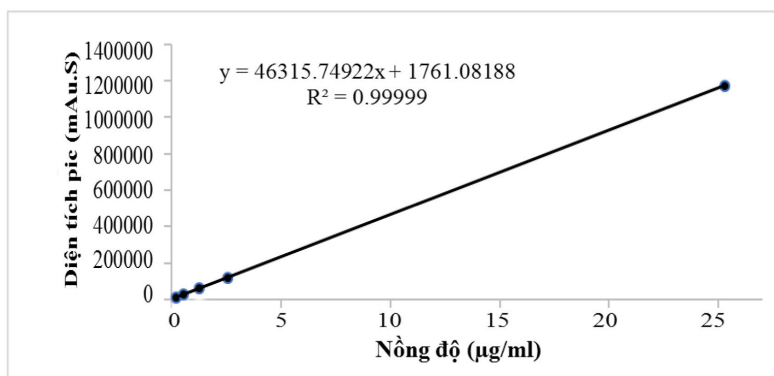
3.3.4.5. Độ tuyến tính và khoảng làm việc của phương pháp

Chuẩn bị và phân tích theo quy trình dãy dung dịch SCOP trong methanol có nồng độ từ LOQ đến nồng độ 10 % so với nồng độ mẫu thử. Tiến hành sắc ký các dung dịch trên theo quy trình, ghi lại sắc ký đồ và diện tích pic các mẫu. Xác định phương trình hồi quy tuyến tính, hệ số tương quan tuyến tính giữa nồng độ chất chuẩn có trong mẫu và đáp ứng pic thu được trên sắc ký đồ bằng phương pháp bình phương tối thiểu.

Kết quả đánh giá độ tuyến tính của phương pháp xác định tạp chất liên quan của hợp chất SCOP được thể hiện ở Bảng 1 và Hình 7.

Bảng 1. Độ thu hồi của hợp chất SCOP ở các mức nồng độ thử nghiệm

Dung dịch thử	C1	C2	C3	C4	C5
Nồng độ gốc (µg/ml)	0,205	0,510	1,26	2,53	25,28
Diện tích pic (mAu.S)	11414	25983	61270	116896	1172757
Nồng độ thu hồi (µg/ml)	0,208	0,523	1,28	2,49	25,28
Độ thu hồi (%)	101,68	102,55	101,97	98,26	100,01
Tham chiếu (%) [11]	95-105	95-105	97-103	97-103	98-102



Hình 7. Tương quan tuyến tính giữa nồng độ hợp chất SCOP và diện tích pic sắc ký của các dung dịch

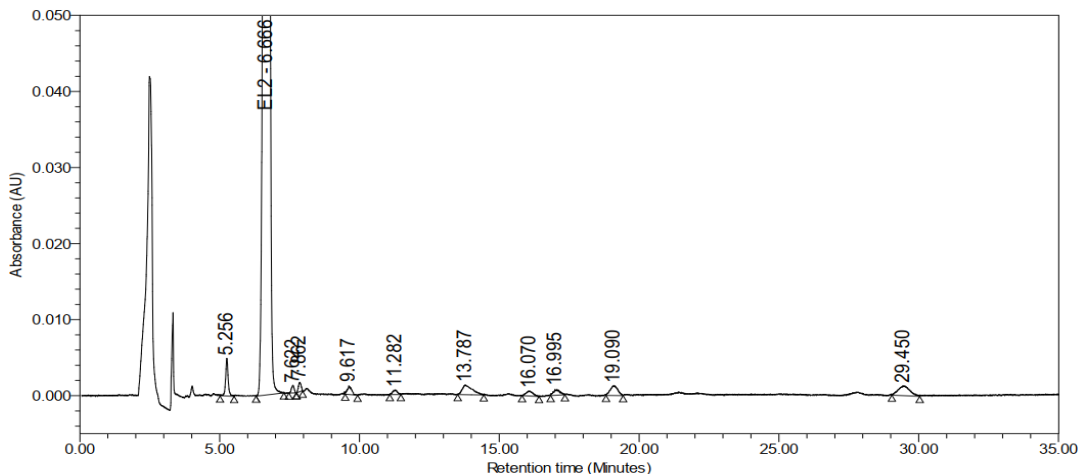
Tại các mức nồng độ từ 0,205 µg/ml (giá trị LOQ, ~ 0,01 % nồng độ dung dịch thử) đến nồng độ 25,28 µg/ml (~ 10 % nồng độ dung dịch thử) cho giá trị độ tuyến tính tốt với ($R \sim 1,000$) và độ thu hồi nằm trong giới hạn tham chiếu của AOAC [11].

Như vậy phương pháp đã xây dựng đáp ứng các yêu cầu về độ tuyến tính để xác định lượng tạp chất liên quan của hợp chất SCOP. Khoảng xác định của phương pháp là từ 0,01 % đến 10 % nồng độ mẫu thử, phù hợp để xác định

hàm lượng tạp chất liên quan của mẫu SCOP (với yêu cầu lượng tạp chất không quá 2,0 %).

3.3.4.6. Độ lặp lại và độ chính xác trung gian

Tiến hành chuẩn bị và phân tích mẫu theo quy trình, thực hiện bởi 2 kiểm nghiệm viên (KNV) và 2 ngày khác nhau: Mẫu trắng (dung môi pha mẫu methanol), 06 dung dịch thử SCOP có nồng độ chính xác khoảng 0,25 mg/ml trong methanol và 06 dung dịch đối chiếu được pha loãng từ dung dịch thử tương ứng.



Hình 8. Sắc ký đồ mẫu Thử 1 do kiểm nghiệm viên 1 thực hiện

Tính hàm lượng từng tạp và tổng tạp thu được dựa vào % diện tích pic so với diện tích pic của các dung dịch đối chiếu (pha loãng từ dung dịch thử tương ứng). Đồng thời xác định giá trị độ tinh khiết sắc ký

(TKSK). Đánh giá độ lặp lại của phương pháp được thực hiện bởi kiểm nghiệm viên 2 và của cả 2 kiểm nghiệm viên trong 2 ngày khác nhau. Kết quả thể hiện ở Bảng 2.

Bảng 2. Độ lặp lại và độ chính xác trung gia của quy trình xác định tạp chất liên quan của hợp chất SCOP thực hiện bởi 2 kiểm nghiệm viên

HL (%) \ Thử		Thử						Trung bình	RSD (%)
		1	2	3	4	5	6		
KNV1	TKSK	98,58	98,60	98,56	98,62	98,59	98,61	98,59	0,02
	$\Sigma_{\text{tạp}}$	1,42	1,40	1,44	1,38	1,41	1,39	1,41	1,54
KNV2	TKSK	98,56	98,62	98,62	98,60	98,62	98,62	98,61	0,02
	$\Sigma_{\text{tạp}}$	1,44	1,38	1,38	1,40	1,38	1,38	1,39	1,74
TKSK: TB (n = 12): 98,60 %					Tổng tạp: TB (n = 12): 1,40 %				
RSD (%) (n = 12): 0,02 %					RSD (%) (n = 12): 1,64 %				

Đối với kết quả thực hiện bởi 2 kiểm nghiệm viên, độ lệch chuẩn tương đối RSD (%) hàm lượng TKSK của mỗi KNV (n = 6) là 0,02 % (< 2,0 %), của cả 2 KNV (n = 12) là 0,02 % (< 2,0 %), đáp ứng yêu cầu về độ lặp lại; độ lệch chuẩn tương đối RSD (%) tổng hàm lượng TCLQ của mỗi KNV (n = 6) là 1,54 % và 1,74 % (< 5,0 %); của cả 2 KNV (n = 12) là 1,64 % (< 5,0 %).

Như vậy quy trình phân tích tạp chất đạt yêu cầu về độ đặc hiệu, độ thích hợp của hệ thống sắc ký, độ tuyến tính, giới hạn phát hiện, giới hạn định lượng và độ lặp lại, phù

hợp để xác định giới hạn tạp chất trong nguyên liệu SCOP.

3.3.5. Hàm lượng scopoletin trong nguyên liệu đã tinh chế

Từ kết quả về độ tinh khiết sắc ký (do sự khác nhau về kết quả phân tích giữa hai KNV khác nhau không có ý nghĩa thống kê nên lấy từ giá trị độ lặp lại của phương pháp thực hiện bởi KNV1), tạp chất bay hơi và tro toàn phần của nguyên liệu đã tinh chế, hàm lượng scopoletin ($C_{10}H_8O_4$) được tính như sau:

$X (\%) = 98,60 \% * [100 - (0,0012 + 0,013)]/100 = 98,59 \%$.

3.3.6. Tiêu chuẩn nguyên liệu scopoletin sử dụng để thiết lập chuẩn

a) **Tính chất:** Bột kết tinh màu vàng nâu.

b) **Định tính:**

- **Phổ hấp thụ tử ngoại – khả kiến (UV-VIS):** Trong khoảng bước sóng từ 200 – 400 nm, có đỉnh hấp thụ cực đại ở 343 nm.

- **Phổ hồng ngoại (IR):** Phổ hồng ngoại của mẫu thử phải tương ứng với phổ hồng ngoại của mẫu chuẩn.

- **Nhiệt độ nóng chảy:** 203 °C – 207 °C.

c) **Mất khối lượng do làm khô:** Không quá 0,2 %.

d) **Cẩn sau nung:** Không quá 0,1 %.

e) **Tạp chất liên quan:** Tổng tạp không lớn hơn 2,0 %.

f) **Độ tinh khiết sắc ký:** Không nhỏ hơn 98,0 %.

4. KẾT LUẬN

Nghiên cứu này đã xây dựng được quy trình phân lập và tinh chế hợp chất scopoletin với hiệu suất khoảng 50 %, phù hợp với quy mô để sản xuất nguyên liệu scopoletin phục vụ thiết lập chuẩn ở phòng thí nghiệm. Nguyên liệu sau tinh chế đã được xác định các chỉ tiêu định tính bằng phổ UV-VIS, phổ IR, nhiệt độ nóng chảy, đồng thời đã được xác định các chỉ tiêu về tạp chất bay hơi, tro toàn phần và độ tinh khiết sắc ký. Lượng nguyên liệu SCOP sau tinh chế là khoảng 2,4 g với hàm lượng SCOP đạt 98,59 % tính theo chế phẩm ở dạng nguyên trạng và đáp ứng được yêu cầu về nguyên liệu để thiết lập chuẩn theo mục tiêu đã đặt ra (> 95 %).

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Hội đồng Dược điển Việt Nam, 2019, *Dược điển Việt Nam V*, Nhà xuất bản Y học, Hà Nội.
- Thu H.E., Hussain Z., Mohamed I.N., Shuid A.N., 2018, Recent Advances in Antibacterial, Antiprotozoal and Antifungal Trends of *Eurycoma longifolia*: A Review of Therapeutic Implications and Future Prospects, *Current drug targets*, 19(14), pp. 1657-71.
- Thu H.E., Hussain Z., Mohamed I.N., Shuid A.N., 2018, *Eurycoma longifolia*, A Potential Phytomedicine for the Treatment of Cancer: Evidence of p53-mediated Apoptosis in Cancerous Cells, *Current drug targets*, 19(10), pp. 1109-26.
- Bhat R., Karim A.A., 2010, Tongkat Ali (*Eurycoma longifolia* Jack): a review on its ethnobotany and pharmacological importance, *Fitoterapia*, 81(7), pp. 669-79.
- Rehman S.U., Choe K., Yoo H.H., 2016, Review on a Traditional Herbal Medicine, *Eurycoma longifolia* Jack (Tongkat Ali): Its Traditional Uses, Chemistry, Evidence-Based Pharmacology and Toxicology, *Molecules* (Basel, Switzerland), 21(3), pp. 331.
- Chan K.L., Choo C.Y., Morita H., Itokawa H., 1998, High performance liquid chromatography in phytochemical analysis of *Eurycoma longifolia*, *Planta medica*, 64(8), pp. 741-5.
- Parama D., Girisa S., Khatoon E., Kumar A., Alqahtani M.S., Abbas M., et al., 2022, An overview of the pharmacological activities of scopoletin against different chronic diseases, *Pharmacological research*, 179, pp. 106202.
- Gao X.Y., Li X.Y., Zhang C.Y., Bai C.Y., 2024, *Scopoletin: a review of its pharmacology, pharmacokinetics, and toxicity*, *Frontiers in pharmacology*, 15, pp. 1268464.
- Đỗ Thị Ngọc Lan, Nguyễn Thị Hằng, Nguyễn Tiến Đạt, Lê Quang Thảo, 2023, Xây dựng phương pháp định lượng đồng thời 4 chất 14,15β-dihydroxyklaineanon, scopoletin, eurycomalacton và 9-methoxycanthin-6-on trong cây Bá bệnh (*Radix Eurycoma longifolia*), *Tạp chí Kiểm nghiệm thuốc*, 21(80), pp. 27-31.
- Wu Y.B., Zheng C.J., Qin L.P., Sun L.N., Han T., Jiao L., et al., 2009, Antiosteoporotic activity of anthraquinones from *Morinda officinalis* on osteoblasts and osteoclasts, *Molecules* (Basel, Switzerland), 14(1), pp. 573-83.
- AOAC, 2016, *AOAC Official Methods of Analysis in Appendix F: Guidelines for Standard Method Performance Requirements*.