

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

DO THI NGOC LAN^{1,4}, PHAN TUNG LINH², NGUYEN TIEN DAT³,
TRINH VAN LAU⁴, LE QUANG THAO^{4, 5, ✉}

¹Drug Administration of Vietnam

²University of Science, Vietnam National 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 August 15th, 2023

Accepted January 16th, 2024

Abstract: Eurycomalactone (EUR), a quassinoid compound isolated from *Radix Eurycoma longifolia*, which were illustrated for anti-cancer, anti-inflammatory and anti-viral. This study has been developed an extraction and purification procedure of EUR 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 dichloromethane, eluted on silica column and crystallized in dichloromethane. Finally, the crystal was purified on C18 column to get EUR material. The EUR material, was identified by MS spectrometry, NMR, UV-VIS and IR spectroscopy, contained 98.53 % of eurycomalactone (C₁₉H₂₄O₈), which was calculated from volatile impurities (0.15 %), residue on ignition (0.041 %) and the total of related substances (1.28 %). It was concluded that the established procedure was suitable for producing EUR material for reference standard establishment.

Keywords: *Eurycoma longifolia*, eurycomalactone

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

ĐỖ THỊ NGỌC LAN^{1,4}, PHAN TÙNG LINH², NGUYỄN TIẾN ĐẠT³,
TRINH VĂN LẤU⁴, LÊ QUANG THẢO^{4, 5, ✉}

¹Cục Quản lý Dược, Bộ Y tế

²Trường Đại học Khoa học tự nhiên, Đại học Quốc gia Hà Nội

³Trung tâm Nghiên cứu và Chuyển giao công nghệ, 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 8 năm 2023

Chấp nhận đăng ngày 16 tháng 01 năm 2024

Tóm tắt: Eurycomalacton (EUR), một hợp chất thuộc nhóm quassinoid được phân lập được từ dược liệu Mật nhân (*Eurycoma longifolia* Jack) với các hoạt tính sinh học nổi bật là chống ung thư, chống viêm và kháng virus. Nghiên cứu này đã xây dựng được quy trình chiết xuất, phân lập và tinh chế EUR từ dược liệu 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 với dichloromethan. Phân đoạn dichloromethan được bay hơi loại dung môi, sau đó loại tạp trên cột pha thuận, tiếp tục kết tinh trong dichloromethan để tạo các tinh thể giàu EUR. Tinh thể giàu EUR sau đó được tinh chế trên sắc ký cột pha đảo C18 để thu được nguyên liệu EUR thiết lập chuẩn. Nguyên liệu EUR, được xác định bằng phổ MS, phổ NMR, UV-VIS, phổ IR, chứa 98,53 % eurycomalacton ($C_{19}H_{24}O_8$) được tính từ lượng tạp chất bay hơi (0,15 %), tro toàn phần (0,041 %) và tổng các tạp chất liên quan (1,28 %) 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*, eurycomalacton, Bách bệnh

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Cây Mật nhân hay còn gọi là cây Bách bệnh, cây Bá bệnh (*Eurycoma longifolia* Jack), họ Thanh thất (Simaroubaceae) là một trong những dược liệu quý, được sử dụng phổ biến ở Việt Nam. Theo Dược điển Việt Nam, rễ phơi khô của cây Mật nhân có tác 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. Ngoài ra, dược liệu này còn dùng để chữa cảm mạo, phát sốt, sốt rét, giải độc rượu, tẩy giun [1]. Nhiều hợp chất phân lập từ rễ cây này đã được chứng minh có hoạt tính sinh học quan trọng như kháng khuẩn, kháng nấm, chống ký sinh trùng, kháng viêm, chống oxy hóa, chống ung thư...[2].

Eurycomalacton (EUR) là một quassinoid được phân lập từ dược liệu Mật nhân. Hoạt tính sinh học nổi bật của hợp chất này là chống ung thư, chống viêm và kháng virus. Trên các dòng tế bào ung thư trực tràng 25-L5, ung thư da (B16-BL6), tế bào ung thư lympho (LCC), tế bào ung thư phổi (A549) và tế bào ung thư vú (MCF-7), eurycomalacton cho thấy tác dụng ức chế mạnh nhất trong các quassinoid được phân lập từ dược liệu Mật nhân, tác dụng của eurycomalacton trên các dòng tế bào này còn mạnh hơn cả chứng dương doxorubicin và 5-fluorouracil [2]. Hiện nay EUR 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 loại chuẩn này.

Để bổ sung thêm nguồn chất chuẩn tại Việt Nam phục vụ kiểm tra dược liệu Mật nhân, dược liệu chứa EUR và các sản phẩm liên quan, nghiên cứu này tiến hành xây dựng quy trình phân lập và tinh chế hợp chất EUR với hàm lượng đạt không thấp hơn 95 % phục vụ thiết lập chất chuẩn trên.

2. THỰC NGHIỆM

2.1. Đối tượng và phương pháp nghiên cứu

Rễ cây Bá bệnh (*Eurycoma longifolia* Jack.) được thu hái tại xã Đắc R'Măng, huyện Đắc Glong, tỉnh Đắk Nông vào tháng 5/2022. Mẫu rễ cây được phơi khô, nghiền 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, 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 (Viện kiểm nghiệm thuốc Trung ương); máy cộng hưởng từ hạt nhân NMR – BRUKER – 600MHZ & 500MHZ (Viện Hoá học - Viện Hàn lâm khoa học và công nghệ Việt Nam).

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

Hóa chất, dung môi: Bản 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 µm – 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 với hỗn hợp methanol hoặc ethanol và nước với các tỷ lệ khác nhau. Sau đó được cô quay chân không loại dung môi. Tiếp tục loại tạp bằng phương pháp chiết lỏng/lỏng với các dung môi không đồng tan với độ phân cực khác nhau. Lựa chọn và tinh chế hợp chất nghiên cứu bằng phương pháp sắc ký lỏng pha thuận hoặc/và pha đảo kết hợp với kết tinh.

2.3.2. Phương pháp xác định cấu trúc các chất nghiên cứu

Hợp chất sau khi tinh chế được kiểm tra độ tinh khiết trên máy HPLC detector DAD đặt ở bước sóng 245 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, pha động là hỗn hợp acetonitril và nước tỷ lệ tăng từ 10 % đến 50 % trong 30 phút được duy trì ở tốc độ dòng 1,5 ml/phút.

Chất nghiên cứu đảm bảo độ tinh khiết dự kiến bằng các phương pháp trên sẽ được xác định cấu trúc và 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 thiết lập 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 tại khoảng 244 nm.

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

* Phương pháp xác định tạp chất bay hơi (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 (ĐDVN 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 25 % trong nước ở tốc độ dòng 1,0 ml/phút. Mẫu phân tích được tiêm vào hệ với thể tích 20 μ l và phân tích bởi DAD đặt ở bước sóng 210 nm. Thời gian phân tích mẫu gấp 3 lần thời gian lưu của pic chính.

- *Chuẩn bị mẫu*: Pha mẫu thử trong methanol để thu được dung dịch có nồng độ eurycomalacton chính xác khoảng 1,0 mg/ml. Mẫu đối chiếu là mẫu được pha loãng 100 lần từ mẫu thử trong methanol.

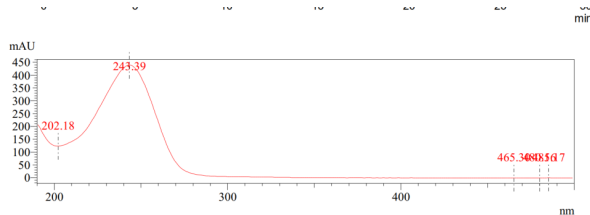
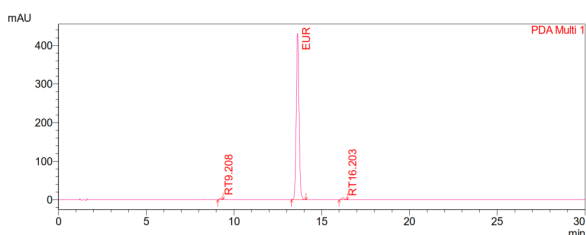
- *Đánh giá kết quả*: Sắc ký đồ của dung dịch đối chiếu cho số đĩa lý thuyết không ít hơn 2000, hệ số kéo đuôi pic eurycomalacton không quá 2,0 và độ lặp lại diện tích của 6 lần tiêm lặp lại liên tiếp không quá 2,0 %. Tổng diện tích pic các tạp đơn không được quá 3 lần diện tích pic dung dịch đối chiếu (3,0 %).

3. KẾT QUẢ VÀ BÀN LUẬN

3.1. Xây dựng quy trình chiết xuất và tinh chế

Quy trình chiết xuất, phân lập và tinh chế EUR được tiến hành ở giai đoạn chiết xuất song song với chiết xuất hợp chất scopoletin mà chúng tôi đã xây dựng trước đó [3]. Cụ thể là 5 kg bột dược liệu sẽ được chiết xuất với ethanol 50 %, bay hơi loại ethanol. Sau đó thêm nước và chiết với dichloromethan, thu lấy phần dịch dichloromethan. Cao chiết dichloromethan được loại tạp trên cột sắc ký lỏng pha thuận với tỷ lệ dichloromethan – methanol là 30 : 1. Phần chứa chất nghiên cứu được rửa giải khỏi cột bằng hỗn hợp hai dung môi trên với tỷ lệ 10 : 1.

Hợp chất EUR dễ tan trong dichloromethan hơn rất nhiều so với trong methanol và acetonitril. EUR kết tinh dưới dạng tinh thể hình khối lập phương trong methanol. Do đó, chọn phân tán mẫu trong dichloromethan để loại tạp, hỗn hợp dichloromethan – methanol để hòa tan mẫu và kết tinh bằng cách bay hơi trong cách thủy thu được các tinh thể khối lập phương EUR. Tiếp tục, tinh chế bằng sắc ký cột pha đảo để thu được mẫu tinh khiết (Hình 1).



Hình 1. Sắc ký đồ (phân tích ở bước sóng 245 nm) và phổ UV-VIS của hợp chất EUR nồng độ 0,2 mg/ml trong methanol

Quy trình chiết xuất, tinh chế hợp chất EUR được tiến hành lặp lại 03 lần với lượng bột dược liệu Mật nhân đầu vào khoảng 5 kg. Khối lượng nguyên liệu hợp chất EUR thu được lần lượt là 1315 mg, 1268 mg và 1406 mg. Theo nghiên cứu trước đó, hàm lượng EUR trong dược liệu là 0,0414 %, tính theo dược liệu khan [4], có thể quy đổi ra hiệu suất tương ứng của quá trình chiết là 68,4 %, 64,5 % và 72,1 %. Với quy trình sản xuất nguyên liệu làm chất chuẩn từ dược liệu, hiệu suất khoảng 65 % là khả thi để ứng dụng trong sản xuất chuẩn.

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

Bước 1: Chiết xuất EUR từ dược liệu Mật nhân

Lấy khoảng bột 5 kg dược liệu Mật nhân, chiết siêu âm 3 lần, mỗi lần với 50 lít ethanol 50 % ở nhiệt độ không quá 50 °C và thời gian siêu âm tổng mỗi lần là 60 phút. Gộp dịch chiết, cô quay chân không loại ethanol (đến thể tích còn khoảng 1/5 thể tích ban đầu). Bổ sung nước, chiết lỏng/lỏng đồng thể tích với dichloromethan, lặp lại 03 lần. Gộp dịch chiết, cô quay chân không loại dung môi thu được phân đoạn ELD.

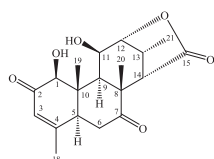
Bước 2: Phân lập và tinh chế EUR

Phân đoạn ELD được rửa giải trên cột silica gel qua hỗn hợp dung môi dichloromethan và methanol tỷ lệ lần lượt là (30 : 1) và (10 : 1), thu phân đoạn rửa giải ở tỷ lệ (10 : 1) được phân đoạn ELDA.

Phân đoạn ELDA được phân tán trong 100 ml hỗn hợp dichloromethan – methanol (20 : 1), gạn lấy phần dịch trong. Tiến hành lặp lại 03 lần, gộp các phần dịch trong, bay hơi trong cách thủy ở 50 °C, thu được các tinh thể hình khối lập phương. Rửa tinh thể bằng methanol, tinh chế trên sắc ký cột pha đảo hạt C18, pha động là acetone 20 % trong nước thu được hợp chất dự kiến là eurycomalacton (EUR).

3.2. Khẳng định cấu trúc các hợp chất nghiên cứu

Hợp chất EUR, thu được dưới dạng tinh thể hình khối màu trắng. Cấu trúc của hợp chất EUR được xây dựng thông qua phổ khối lượng, phổ NMR. Dữ liệu phổ ¹H-NMR và ¹³C-NMR của hợp chất này phù hợp với phổ của hợp chất eurycomalacton đã được xác định cấu trúc bởi tác giả Itokawa và cộng sự [5]. Qua đó, có thể khẳng định rằng hợp chất đang nghiên cứu chính là eurycomalacton (EUR).



Hình 2. Cấu trúc phân tử hợp chất eurycomalacton

Phổ khối lượng của hợp chất EUR cho tín hiệu của ion giả phân tử lại $m/z = 371,16$ $[M+Na]^+$ phù hợp với công thức phân tử của hợp chất eurycomalacton ($C_{19}H_{24}O_6$, $M = 348$ g/mol).

Phổ ¹H-NMR ($CDCl_3$) δ_{ppm} : 1,16 (3H, d, H-21); 1,25 (3H, s, H-19); 1,55 (3H, s, H-20); 1,87 (1H, d, $J = 3,6$ Hz, H-9); 1,94 (3H, s, H-18); 2,76 (1H, dd, $J = 4,8$ Hz, 15,6 Hz, H-6A); 2,81 (1H, dd, $J = 13,8$ Hz, 15,6 Hz, H-6B); 2,89 (1H, ddd, $J = 1,2$ Hz, 1,2 Hz, 7,2 Hz, H-13); 2,92 (1H, m, H-5); 2,95 (1H, d, $J = 1,2$ Hz, H-14); 4,04 (1H, s, H-1); 4,36 (1H, dd, $J = 1,2$ Hz, 4,8 Hz, H-12); 4,78 (1H, m, H-11) và 6,10 (1H, dd, $J = 1,8$ Hz, 3,0 Hz, H-3).

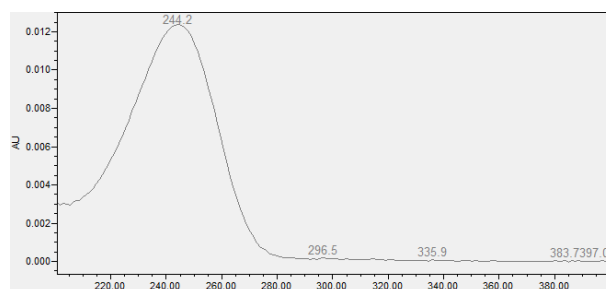
Phổ ¹³C-NMR ($CDCl_3$) δ_{ppm} : 12,1 (C-19); 16,6 (C-21); 21,9 (C-18); 23,6 (C-20); 32,3 (C-3); 36,2 (C-6); 46,9 (C-10); 49,0 (C-9); 49,3 (C-5); 51,1 (C-8); 52,9 (C-14); 69,8 (C-11); 81,2 (C-1); 83,1 (C-12); 124,4 (C-3); 162,2 (C-4); 176,2 (C-15); 197,4 (C-7) và 205,4 (C-7).

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

Các hợp chất sau khi khẳng định được cấu trúc, tiếp tục được đánh giá các chỉ tiêu định tính bằng phổ hồng ngoại và phổ UV-VIS; tạp chất bay hơi; lượng cặn sau nung và tạp chất liên quan để phục vụ thiết lập chuẩn.

3.3.1. Định tính

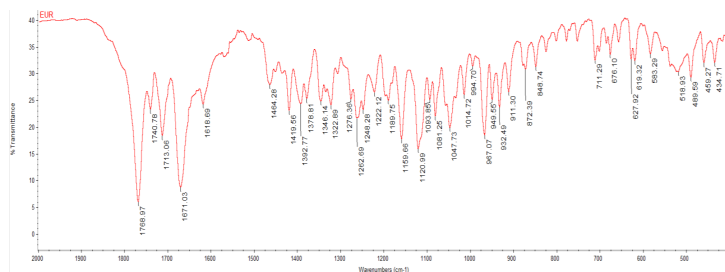
Phổ UV-VIS thu được từ sắc ký đồ của dung dịch đối chiếu phân thử Tạp chất liên quan và phổ IR của hợp chất EUR được thể hiện ở Hình 3 và Hình 4.



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

3.3.2. Tạp chất bay hơi

Tiến hành trên 3 mẫu thử, kết quả hàm lượng tạp chất bay hơi trong 3 mẫu thử là 0,16 %; 0,15 % và 0,15 %. Từ đó đưa ra giới hạn cho phép của tạp chất bay hơi với nguyên liệu EUR là không lớn hơn 0,3 %.



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

3.3.3. Phương pháp xác định tro toàn phần

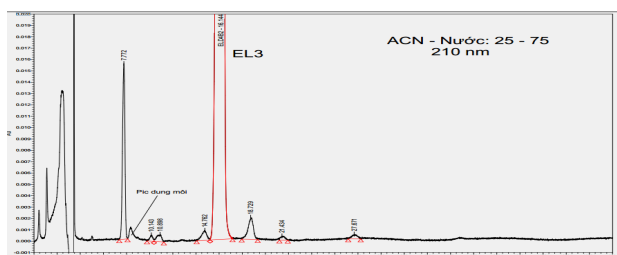
Tiến hành trên 2 mẫu thử, khối lượng mẫu thử chính xác khoảng 0,5 g. Kết quả hàm lượng tạp chất vô cơ trong 2 mẫu thử là 0,043 % và 0,039 %. Từ đó đưa ra giới hạn cho phép của tạp chất vô cơ với nguyên liệu EUR là không lớn hơn 0,1 %.

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 EUR được tinh chế ở cột pha đảo, hạt nhồi C18, pha động là aceton 20 % 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 EUR. 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, khi phân tích ở bước sóng 210 nm thì diện tích pic chính chiếm 98,72 % tổng diện tích các pic. Vì vậy lựa chọn phân tích mẫu ở bước sóng 210 nm.

Khi rửa giải bằng acetonitril ở cả hai trường hợp, pic phụ đều xuất hiện ở trước thời điểm gấp 3 lần thời gian lưu của pic chính. Do đó, thời gian phân tích mẫu cần đặt ở khoảng gấp 3 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 EUR

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 khắc nghiệt, gồm các mẫu riêng biệt với lượng chính xác khoảng 10 mg nguyên liệu EUR trong các bình định mức 10 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 EUR tương tự nhưng được đặt vào tủ sấy ở 105 °C trong 5 giờ.

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 khắc nghiệt đều cho khá nhiều tạp chất và tạp gần nhất đã tách khỏi pic chính (độ phân giải tối thiểu là 2,68 > 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

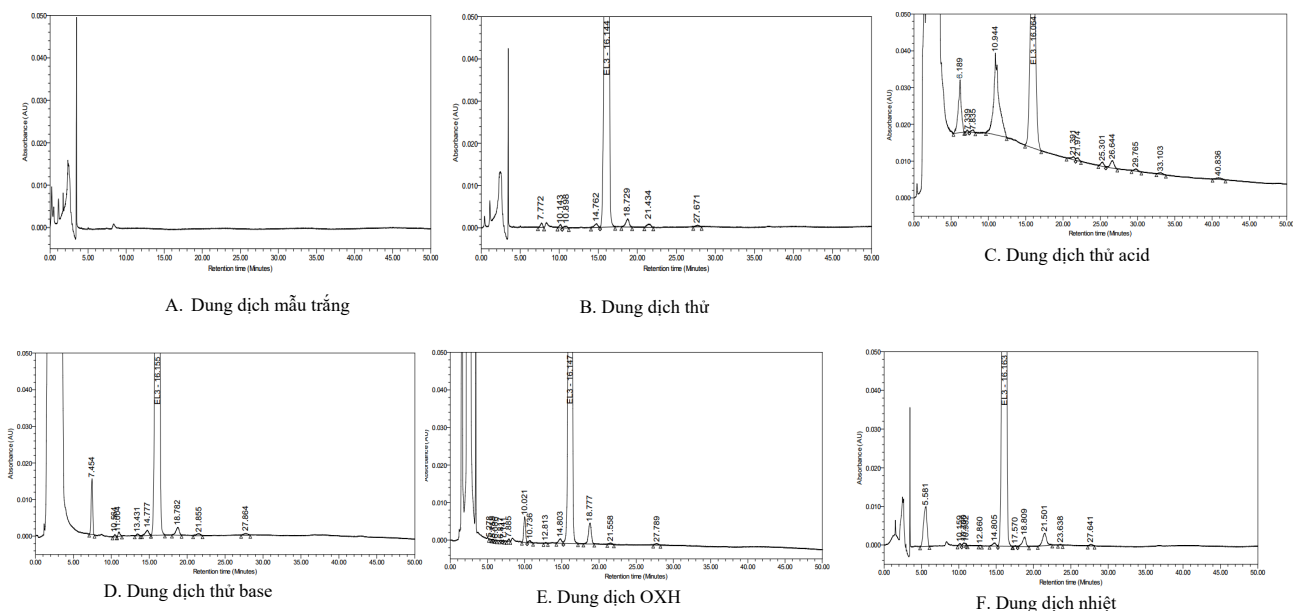
Pha loãng 100 lần mẫu thử ở phần đánh giá độ đặc hiệu, tiêm lặp lại 06 lần liên tiếp vào hệ thống sắc ký, ghi lại sắc ký đồ. RSD thời gian lưu là 0,23 % (<1,0 %), của diện tích pic là 1,33 % (<2,0 %), hệ số kéo đuôi từ 0,90 – 0,92 (<2,0 %) và số đĩa lý thuyết từ 8079 – 8366 (>2000). Như vậy chương trình 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 ~ 0,50 µg/ml, pic EUR trên sắc ký đồ có tỷ số signal/noise (S/N) ≈ 3,22. Tiêm lặp lại 06 lần, độ lặp lại của diện tích pic là RSD = 5,25 % và S/N từ 3,08 – 3,75 đạt các yêu cầu đặt ra. Như vậy giới hạn phát hiện của phương pháp là 0,50 µg/ml, từ đó suy ra giới hạn định lượng của phương pháp là 1,65 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 EUR 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



Hình 6. Sắc ký đồ các mẫu thử độ đặc hiệu EUR

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 EUR được thể hiện ở Bảng 1.

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

Dung dịch thử	C1	C2	C3	C4	C5
Nồng độ gốc ($\mu\text{g/ml}$)	1,61	2,06	5,07	10,12	100,14
Diện tích pic (mAu.S)	12720	17287	50380	101887	1046474
Nồng độ thu hồi ($\mu\text{g/ml}$)	1,583	2,019	5,17	10,08	100,14
Độ thu hồi (%)	98,32	98,01	101,97	99,60	100,00
Tham chiếu (%) [6]	97-103	97-103	97-103	98-102	98-102

Tại các mức nồng độ từ 1,65 $\mu\text{g/ml}$ (giá trị LOQ) đến nồng độ 100,14 $\mu\text{g/ml}$ ($\sim 10\%$ 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 [6].

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 EUR. Khoảng xác định của phương pháp là từ 0,16 % đến 10 % hàm lượng mẫu thử, phù hợp để xác định hàm lượng tạp chất liên quan của mẫu EUR (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 EUR có nồng độ chính xác khoảng 1,0 mg/ml trong methanol và 06 dung dịch đối chiếu được pha loãng từ dung dịch thử tương ứng.

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 gian của quy trình xác định tạp chất liên quan của hợp chất EUR thực hiện bởi 2 kiểm nghiệm viên

Thử HL (%)		1	2	3	4	5	6	Trung bình	RSD (%)
KNV1	TKSK	98,70	98,70	98,72	98,67	98,72	98,72	98,71	0,02
	Σ_{tap}	1,30	1,30	1,28	1,33	1,28	1,28	1,29	1,52
KNV2	TKSK	98,71	98,71	98,73	98,72	98,71	98,72	98,72	0,01
	Σ_{tap}	1,29	1,29	1,27	1,28	1,29	1,28	1,28	0,63
TKSK: TB (n = 12): 98,72 % RSD (%) (n = 12): 0,02 %					Tổng tap: TB (n = 12): 1,29 % RSD (%) (n = 12): 1,21 %				

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 % và 0,01 % (< 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 1,52 % và 0,63 % (< 5,0 %); của cả 2 KNV (n = 12) là 1,21 % (< 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 EUR.

3.3.5. Hàm lượng eurycomalacton trong nguyên liệu đã tinh chế

Từ kết quả về độ tinh khiết sắc ký (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 eurycomalacton được tính như sau:

$$X(\%) = 98,72\% \cdot [100 - (0,15 + 0,041)]/100 = 98,53\%.$$

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

a) **Tính chất:** Bột kết tinh màu trắng.

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 244 nm.

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

c) **Mất khối lượng do làm khô:** Không quá 0,3 %.

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 eurycomalacton với hiệu suất khoảng 65 %, phù hợp với quy mô để sản xuất nguyên liệu eurycomalacton 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, đồng thời đã được xác định các chỉ tiêu về tạp chất bay hơi, tro toàn phần và độ tinh khiết sắc ký. Nguyên liệu sau tinh chế có hàm lượng là 98,53 % 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*, Hà Nội, Nhà xuất bản Y học.
- Rehman S.U., Choe K., and 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*, **21**(3), pp. 331.
- Đỗ Thị Ngọc Lan và cộng sự, (2024), Nghiên cứu phân lập và tinh chế scopoletin từ dược liệu Mật nhân (*Radix Eurycomae longifoliae*), *Tạp chí Kiểm nghiệm Dược và Mỹ phẩm*, **22**(1), tr. 36-45.
- Đỗ Thị Ngọc Lan và cộng sự, (2023), Xây dựng phương pháp định lượng đồng thời 4 chất trong cây Bá bệnh (*Radix Eurycoma longifolia*), *Tạp chí Kiểm nghiệm thuốc*, **21**(80), tr. 27-31.
- Itokawa H., et al. (1992), Cytotoxic quassinoids and tirucallane-type triterpenes from the woods of *Eurycoma longifolia*, *Chemical Pharmaceutical Bulletin*, **40**(4): pp. 1053-1055.
- AOAC (2016), *AOAC Official Methods of Analysis in Appendix F: Guidelines for Standard Method Performance Requirements*.