



Original Article

Extraction and Purification of 9-Methoxycanthin-6-One from *Radix Eurycomae Longifoliae* for Reference Standard Establishment

Do Thi Ngoc Lan^{1,3}, Nguyen Thi Truc Van², Le Quang Thao³,
Trinh Van Lau³, Nguyen Tien Dat^{4,*}

¹Drug Administration of Vietnam, Ministry of Health, Hanoi, Vietnam

²Institute of Drug Quality Control-Ho Chi Minh City, 200 Co Bac, District 1, Ho Chi Minh City, Vietnam

³National Institute of Drug Quality Control, 48 Hai Ba Trung, Hoan Kiem, Hanoi, Vietnam

⁴Center for High Technology Research and Development, Vietnam Academy of Science and Technology,
18 Hoang Quoc Viet, Cau Giay, Hanoi, Vietnam

Received 01 August 2024

Revised 19 August 2024; Accepted 10 September 2024

Abstract: 9-methoxycanthin-6-one (9MC6) is a canthin-6-one alkaloid isolated from *Radix Eurycomae longifoliae* with relatively large content. 9MC6 has been shown several important biological activities of this herbal material, including the ability to resist many different cancer cell lines such as breast, lung, colorectal, uterine, prostate, and ovarian cancer, and exhibit strong anti-inflammatory properties. Therefore, 9MC6 is a potential chemical marker for controlling the quality of this herbal material. This study presents the development of a procedure for the extraction and purification of 9MC6 to establish a reference standard. In this procedure, the *Radix Eurycomae longifoliae* powder was ultrasonically extracted with ethanol 50% (v/v), and then ethanol was evaporated in vacuo to give water suspension. The suspension was successfully partitioned with dichloromethane, eluted on a silica column, and crystallized by using the combination of dichloromethane, methanol, acetone, and water at suitable ratios to obtain the crystal. Finally, the crystal was purified on the C18 column to get 9MC6 material. The 9MC6 material, which was identified by MS spectrometry, NMR, UV-VIS, and IR spectroscopy, contained 99.21% of 9-methoxycanthin-6-one (C₁₅H₁₀N₂O₂), which was calculated from volatile impurities (0.0014%), residue on ignition (0.012%) and of related substances (0.78%). It was concluded that the established procedure was suitable for producing 9MC6 material for standard reference establishment.

Keywords: *Eurycoma longifolia*, 9-methoxycanthin-6-one.

* Corresponding author.

E-mail address: ntdat@chtd.vast.vn

<https://doi.org/10.25073/2588-1132/vnumps.4690>

Nghiên cứu phân lập và tinh chế 9-methoxycanthin-6-on từ dược liệu Mật nhân (*Radix Eurycomae longifoliae*) làm nguyên liệu thiết lập chất chuẩn

Đỗ Thị Ngọc Lan^{1,3}, Nguyễn Thị Trúc Vân², Lê Quang Thảo³,
Trịnh Văn Lâu³, Nguyễn Tiến Đạt^{4,*}

¹Cục Quản lý Dược, Bộ Y tế, 138A Giảng Võ, Ba Đình, Hà Nội, Việt Nam

²Viện Kiểm nghiệm thuốc Thành phố Hồ Chí Minh,
200 Cô Bắc, Quận 1, Thành phố Hồ Chí Minh, Việt Nam

³Viện Kiểm nghiệm thuốc Trung ương, 48 Hai Bà Trưng, Hoàn Kiếm, Hà Nội, Việt Nam

⁴Trung tâm Nghiên cứu và Phát triển Công nghệ cao, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam,
18 Hoàng Quốc Việt, Cầu Giấy, Hà Nội, Việt Nam

Nhận ngày 01 tháng 8 năm 2024

Chỉnh sửa ngày 18 tháng 8 năm 2024; Chấp nhận đăng ngày 10 tháng 9 năm 2024

Tóm tắt: 9-methoxycanthin-6-on (9MC6) là một alkaloid khung canthin-6-on được phân lập từ dược liệu Mật nhân (*Radix Eurycomae longifoliae*) với hàm lượng tương đối lớn. 9MC6 đã được chứng minh thể hiện các hoạt tính sinh học quan trọng của dược liệu Mật nhân bao gồm khả năng kháng lại nhiều dòng tế bào ung thư khác nhau như ung thư vú, phổi, trực tràng, tử cung, tuyến tiền liệt và buồng trứng; khả năng chống viêm tốt. Vì những đặc tính ấy, hợp chất 9MC6 được xem là một hợp chất rất tiềm năng có thể sử dụng làm chất đánh dấu của dược liệu Mật nhân. Nghiên cứu này đã xây dựng được quy trình chiết xuất, phân lập và tinh chế 9MC6 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, methanol, aceton và nước ở các tỷ lệ thích hợp để tạo các tinh thể giàu 9MC6. Tinh thể giàu 9MC6 sau đó được tinh chế trên sắc ký cột pha đảo C18 để thu được nguyên liệu 9MC6 thiết lập chuẩn. Nguyên liệu 9MC6 được định tính bằng phổ MS, phổ NMR, UV-VIS và phổ IR, chứa 99,21% 9MC6 ($C_{15}H_{10}N_2O_2$) được tính từ lượng tạp chất bay hơi (0,0014%), tro toàn phần (0,012%) và tạp chất liên quan (0,78%) 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*, 9MC6, Bách bệnh, Mật nhân.

1. Mở đầu

Cây Bá bệnh (Mật nhân, Bách bệnh) có tên khoa học là *Eurycoma longifolia* Jack, họ Thanh

thất (Simaroubaceae) là một loại thảo dược truyền thống phân bố rộng rãi khắp nơi, nhưng nhiều nhất là ở khu vực Đông Nam Á và Việt Nam là một trong các nước có số lượng cá thể

* Tác giả liên hệ.

Địa chỉ email: ntdat@chtd.vast.vn

<https://doi.org/10.25073/2588-1132/vnumps.4690>

khá lớn [1, 2]. Bá bệnh được sử dụng trong các bài thuốc Y học cổ truyền nổi tiếng dùng để cải thiện sức khỏe nam giới cũng như bệnh sốt rét ở châu Á [2, 3], 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 [4]. Khoảng 100 hợp chất được phân lập từ rễ cây Bá bệnh, nhiều nghiên cứu đã cho thấy có nhiều hợp chất có hoạt tính sinh học như khả năng kháng khuẩn, kháng nấm, chống ký sinh trùng, kháng viêm, chống oxy hóa, chống ung thư,... [1, 5-7].

9MC6 là hợp chất chính trong nhóm alkaloid, một nhóm hợp chất chính của dược liệu Mật nhân, đã được nhiều nhà khoa học quan tâm nghiên cứu. Có thể nói 9MC6 là hợp chất đã đóng góp nhiều vào các tác dụng sinh học của dược liệu Mật nhân. Về tác dụng chống ung thư, 9MC6 được chứng minh là chống viêm và có khả năng kháng lại nhiều dòng ung thư khác nhau như ung thư vú (MCF-7), ung thư phổi (A549), trực tràng, tử cung, ung thư hắc tố, ung thư biểu bì, ung thư tuyến tiền liệt và ung thư buồng trứng [8-12]. Hiện nay 9MC6 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 9MC6 và các sản phẩm liên quan, nghiên cứu được thực hiện nhằm xây dựng quy trình phân lập và tinh chế hợp chất 9MC6 với hàm lượng 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 Đắk R'Măng, Đắk Glong, 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 MS 105 (độ chính xác 0,01 mg), máy HPLC Shimadzu detector DAD, máy HPLC Waters Acquity ARC detector DAD, máy cô quay chân không Buchi V-850, Lò nung Prolabo, máy TGA/DSC Mettler Toledo, máy LC/MS Xevo TQD Waters (độ phân giải của m/z là 0,01) và máy quang phổ hồng ngoại Thermo IS50 (độ phân giải 4 cm⁻¹) tại Viện kiểm nghiệm thuốc Trung ương; máy cộng hưởng từ hạt nhân NMR – BRUKER – 500MHZ (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: bản mỏng Silica gel G F254 (Merck, Đức), dichloromethan (Merck, Đức), methanol (Merck, Đức), acetonitril (Merck, Đức), n-hexan (Scharlau, Tây Ban Nha), aceton (Scharlau, Tây Ban Nha), hạt pha thuận silica gel 60 (40-63 μm – Merck, Đức), hạt pha đảo RP18 (10 μm – YMC, Nhật Bản).

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 phương pháp sắc ký để được hợp chất tinh khiết. Kiểm tra sự xuất hiện của 9MC6 ở các phân 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 các chất nghiên cứu

Các chất sau khi tinh chế sẽ 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 mẫu phân tích vào hệ thống sắc ký, pha động sử dụng là hỗn hợp acetonitril trong nước với tỷ lệ acetonitril tăng từ 10% đến 50% trong 30 phút (giúp đánh giá sơ bộ độ tinh khiết của mẫu nghiên cứu một cách nhanh chóng).

Chất nghiên cứu đảm bảo độ tinh khiết đã được kiểm tra bằng 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

i) 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 272 nm và 350 nm;

- Phổ hồng ngoại: thử theo Dược điển Việt Nam V (ĐĐVN V), Phụ lục 4.2 [4];

ii) 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 $^{\circ}$ C/phút đến nhiệt độ 115 $^{\circ}$ C, duy trì ở nhiệt độ 115 $^{\circ}$ 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.

iii) 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 (ĐĐVN V, Phụ lục 9.8, phương pháp 2) [4]. Tiến hành trên 2 mẫu thử, xác định giá trị trung bình,

iv) Phương pháp xác định tạp chất liên quan và độ tinh khiết sắc ký (TKSK)

- 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 $^{\circ}$ C; pha động là acetonitril 30% trong nước ở tốc độ dòng 1,5 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 3 lần thời gian lưu của pic chính;

- Chuẩn bị mẫu: pha mẫu thử trong methanol để thu được dung dịch có nồng độ 9MC6 chính xác khoảng 0,5 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 9MC6 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 dung dịch đối chiếu (2,0%).

3. Kết quả và bàn luận

3.1. Xây dựng quy trình chiết xuất và tinh chế

Chương trình chiết xuất được lựa chọn bằng cách lấy chính xác khoảng 2,0 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.

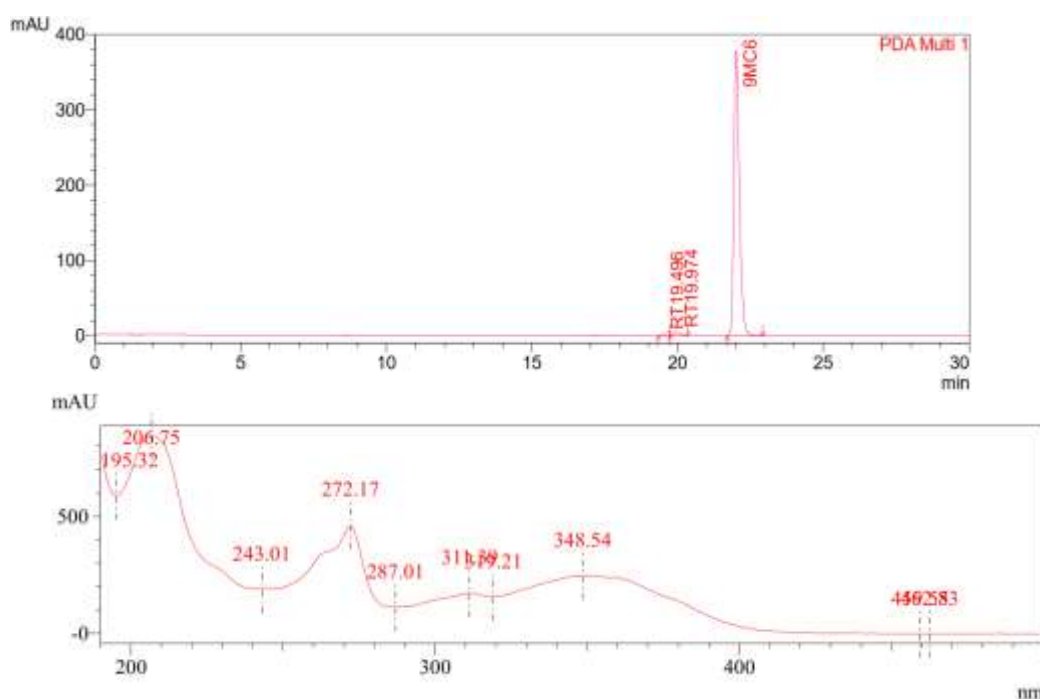
Ở quy mô phòng thí nghiệm, lựa chọn mẻ nghiên cứu cỡ 5 kg bột dược liệu. Tiến hành chiết 3 lần x 60 phút x 50 lít ethanol 50%. Gộp dịch chiết, cô quay loại EtOH (đến khi còn khoảng 1/5 lượng dung môi ban đầu). Phân tán hỗn dịch thu được trong nước và chiết lỏng/lỏng với dichloromethan và ethyl acetat. Kiểm tra các pha sau khi chiết, kết quả cho thấy 9MC6 xuất hiện trong pha dichloromethan. Cô quay chân không loại dung môi pha dichloromethan thu được phân đoạn chứa 9MC6, ký hiệu là ELD.

Phần ELD được triển khai trên cột sắc ký lỏng 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, qua đó xác định được 9MC6 sẽ rửa giải bởi hệ dung môi ở tỷ lệ (20:1) và (10:1). Theo đó, loại tạp bằng rửa giải ở tỷ lệ dichloromethan – methanol (30:1), sau đó rửa giải ở tỷ lệ (10:1) để thu được phân đoạn chứa hợp chất nghiên cứu.

Hợp chất 9MC6 dễ tan trong dichloromethan, dễ tan trong acetone, ít tan trong methanol, acetonitril và hợp chất này kết tinh dưới dạng tinh thể hình kim trong methanol. Do đó, chọn

phân tán mẫu trong dichloromethan trong methanol tỷ lệ cao (20:1) để loại bớt tạp chất phân cực, hỗn hợp acetone – methanol (20:1) để hòa tan mẫu và kết tinh. Bay hơi acetone trong cách thủy ở 60 °C các tinh thể hình kim dần hình thành đó là 9MC6. Khi qua trình kết tinh kết thúc, rửa tinh thể hình kim bằng methanol. Cuối cùng, 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 348 nm) và phổ UV-VIS của hợp chất 9MC6 nồng độ 0,2 mg/ml trong methanol.

Quy trình chiết xuất, tinh chế hợp chất 9MC6 được tiến hành lặp lại ba lần với lượng bột dược liệu Mật nhân đầu vào khoảng 5 kg. Khối lượng nguyên liệu hợp chất 9MC6 thu được lần lượt là 844 mg, 873 mg và 825 mg. Theo nghiên cứu trước đó, hàm lượng 9MC6 trong dược liệu là 0,0289%, tính theo dược liệu khan [13], có thể ước lượng hiệu suất của quá trình phân lập tinh chế là khoảng 63% (hiệu suất thu được từ 3 lần chiết lần lượt 63,3%, 64,1% và 61,1%) và tổng lượng nguyên liệu 9MC6 thu được là ~2,6 g.

Như vậy, quy trình chiết xuất, phân lập và tinh chế hợp chất 9MC6 từ dược liệu Mật nhân gồm các bước như sau:

Bước 1: chiết xuất 9MC6 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 ba 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 ba lần với đồng lượng dichloromethan (tỷ lệ 1:1). Gộp dịch chiết pha dichloromethan, cô quay chân không loại dung môi thu được cặn ELD.

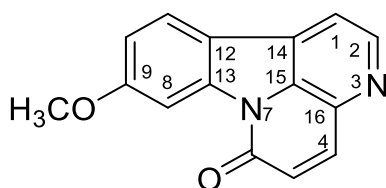
Bước 2: phân lập và tinh chế hợp chất 9MC6.

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 dicloromethan – methanol tỷ lệ (30:1), sau đó rửa giải với hỗn hợp hai dung môi trên ở tỷ lệ (10:1). Cô quay chân không loại dung môi, phân tán trong hỗn hợp dichloromethan – methanol tỷ lệ (20:1), gạn lấy phần dịch trong. Lặp lại quá trình trên thêm hai lần, gộp dịch các phần dịch trong, cho bay hơi trong cách thủy ở 50 °C cho đến khi dừng xuất hiện kết tinh hình lập phương. Thêm methanol rửa để loại bỏ phần kết tinh, lấy phần hỗn dịch. Cô quay chân không phần hỗn dịch loại dung môi thu được phần cần khô.

Tiếp tục thêm hỗn hợp aceton – methanol (20:1) vào phần cần, phân tán đều, để lắng và thu phần dịch trong. Lặp lại quá trình trên thêm hai lần, gộp các phần dịch trong. Tiếp tục cho bay hơi phần dịch trong thu được trong cách thủy ở 60 °C, các tinh thể hình kim dần hình thành. Rửa tinh thể hình kim bằng methanol, tinh chế trên cột sắc ký lỏng pha đảo C18, rửa giải bằng aceton 25%, thu được hợp chất 9MC6 tinh khiết.

3.2. Khẳng định cấu trúc các hợp chất nghiên cứu



Hình 2. Cấu trúc phân tử hợp chất 9-methoxy-canthin-6-on.

Hợp chất thu được dự kiến là 9MC6 được kết tinh trong nước và methanol dưới dạng tinh thể

hình kim, màu vàng nâu. Phổ khối của hợp chất 9MC6 cho tín hiệu của ion giả phân tử tại $m/z = 251,01 [M+H]^+$.

Phổ ^1H-NMR (DMSO- d_6 , 500 MHz) δ_{ppm} : 3,88 (3H, s, H-OCH₃); 6,87 (1H, d, $J = 9,5$ Hz, H-5); 7,04 (1H, d, $J = 8,5$ Hz, H-10); 7,84 (1H, s, H-8); 8,01 (1H, d, $J = 8,5$ Hz, H-11); 8,01 (1H, d, $J = 10,0$ Hz, H-4); 8,08 (1H, d, $J = 5,0$ Hz, H-1); 8,69 (1H, d, $J = 5,0$ Hz, H-2)

Phổ $^{13}C-NMR$ (DMSO- d_6 , 500 MHz) δ_{ppm} : 55,7 (C-OCH₃); 100,7 (C-8); 113,0 (C-10); 116,2 (C-1); 116,8 (C-12); 124,2 (C-11); 128,0 (C-5); 129,3 (C-14); 131,6 (C-15); 135,1 (C-16); 139,9 (C-4); 140,1 (C-13); 145,8 (C-2); 158,8 (C-6); 161,6 (C-9).

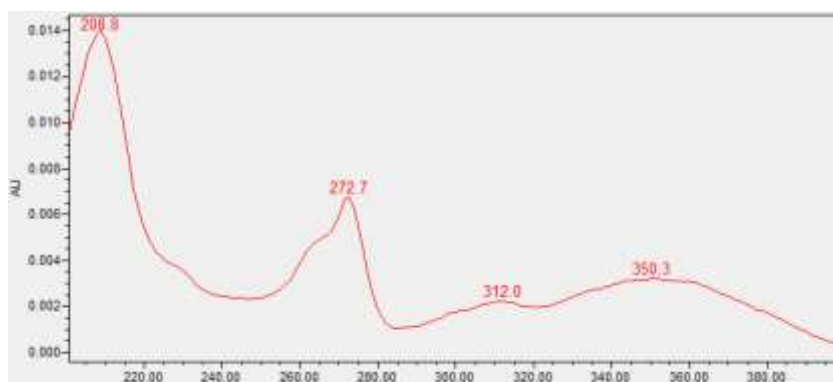
So sánh dữ liệu phổ NMR của hợp chất tinh chế được với tài liệu tham khảo [8] có thể khẳng định sản phẩm tinh chế được chính là 9MC6 có cấu trúc như Hình 2.

3.3. Xây dựng tiêu chuẩn nguyên liệu 9MC6 phục vụ thiết lập chuẩn

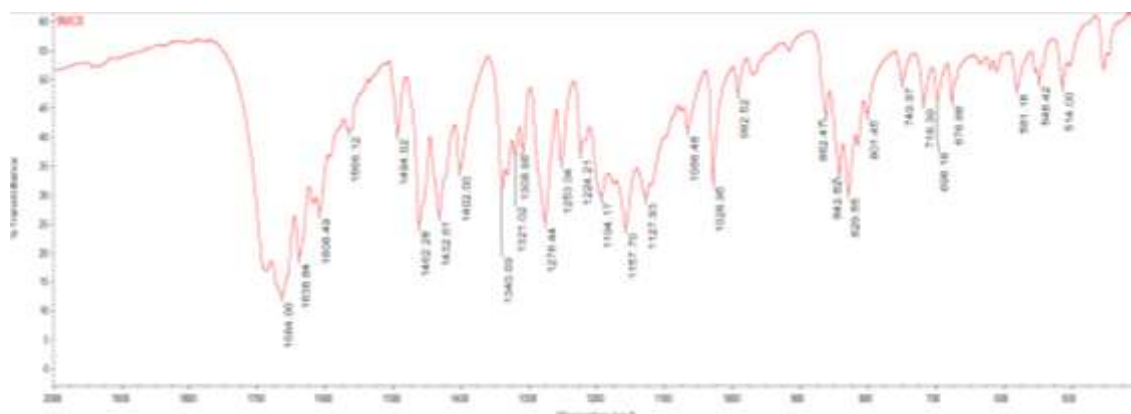
Các hợp chất sau khi khẳng định được cấu trúc, tiếp tục được đánh giá các chỉ tiêu định tính bằng phổ hồng ngoại, phổ UV-VIS; tạp chất bay hơi, lượng cần sau nung và tạp chất liên quan để phục vụ thiết lập chuẩn.

3.3.1. Định tính

Phổ UV-VIS thu được từ sắc ký đồ của dung dịch đối chiếu phần thử Tạp chất liên quan và phổ IR của hợp chất 9MC6 được thể hiện ở Hình 3 và Hình 4.



Hình 3. Phổ UV-VIS của hợp chất 9MC6 thu được từ sắc ký đồ mẫu đối chiếu phần thử Tạp chất liên quan.



Hình 4. Phổ IR của hợp chất 9MC6 đo bằng chế độ truyền qua.

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 0,0016%; 0,0012% và 0,0013%. Từ đó đưa ra giới hạn cho phép của tạp chất bay hơi với nguyên liệu 9MC6 là không lớn hơn 0,2%.

3.3.3. Phương pháp xác định tro toàn phần

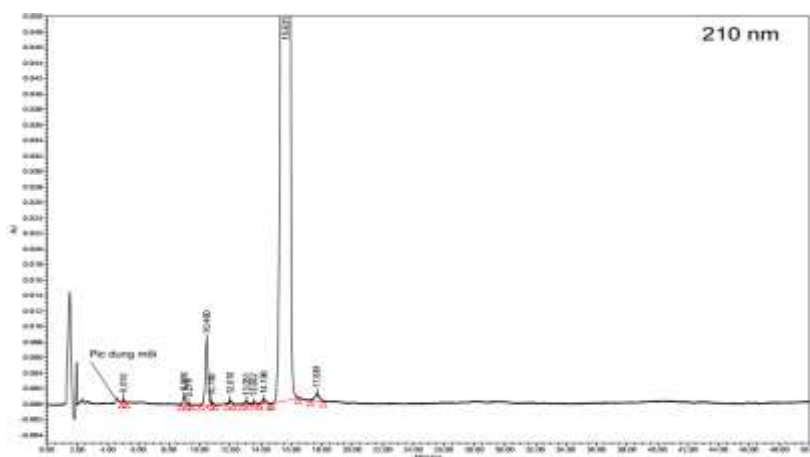
Tiến hành trên 2 mẫu thử, khối lượng mẫu thử chính xác khoảng 0,5 g. Kết quả hàm lượng tạp chất vô cơ trong 2 mẫu thử là 0,010% và 0,013%. Từ đó đưa ra giới hạn cho phép của tạp chất vô cơ với nguyên liệu 9MC6 là không lớn hơn 0,1%.

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 9MC6 được tinh chế ở cột pha đảo, hạt nhồi C18, pha động là aceton 25% 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 9MC6. 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 272 nm thì diện tích pic chính chiếm 99,63%, tổng diện tích các pic; còn khi phân tích ở bước sóng 210 nm thì diện tích pic chính chiếm 99,35% tổng diện tích các pic. Vì vậy lựa chọn phân tích mẫu ở bước sóng 210 nm.

Vì các 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 50 phút (gấp 3 lần thời gian lưu của pic chính) (Hình 5).

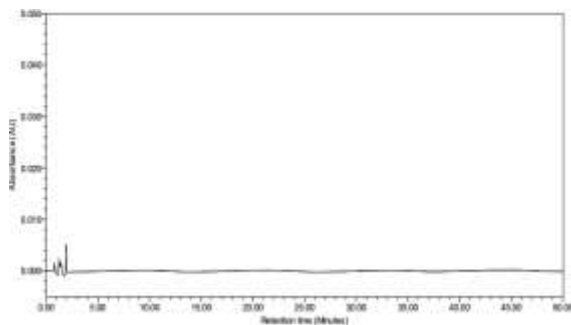


Hình 5. Sắc ký đồ khảo sát phương pháp phân tích tạp chất liên quan của hợp chất 9MC6.

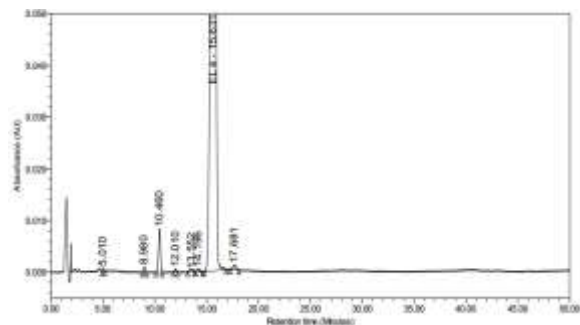
3.3.4.2. Thẩm định độ đặc hiệu của phương pháp Chuẩn bị mẫu trắng (dung môi pha mẫu – methanol), mẫu thử theo quy trình phân tích. Các mẫu được phân hủy ở điều kiện khắc nghiệt, gồm các mẫu riêng biệt với lượng chính xác khoảng 10 mg nguyên liệu 9MC6 trong các bình định mức 20 ml khác nhau, thêm vào 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 9MC6

tương tự nhưng được đặt vào tủ sấy ở 105 °C trong 5 giờ.

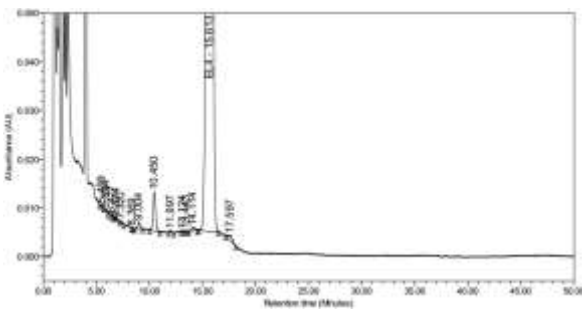
Kết quả thẩm định cho thấy mẫu trắng không cho pic chính ở khoảng thời gian sau 4 phút, các mẫu bị phân hủy ở các điều kiện khắc nghiệt đều cho khá nhiều tạp chất và tạp gần nhất đã tách khỏi pic chính (độ phân giải tối thiểu là 2,23 > 1,5), các pic chính trên các điều kiện phân hủy đều đạt yêu cầu về độ tinh khiết. Như vậy phương pháp đã xây dựng đạt yêu cầu về độ đặc hiệu.



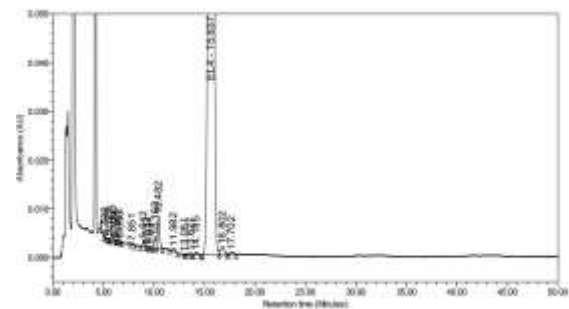
A. Dung dịch mẫu trắng.



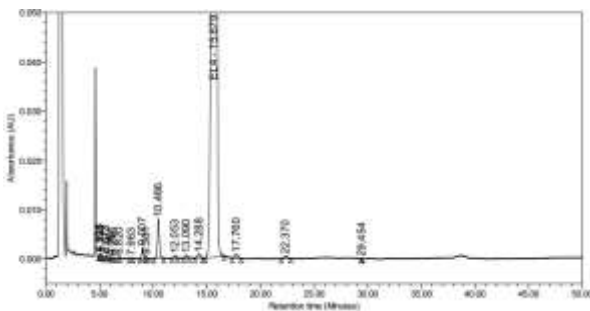
B. Dung dịch thử.



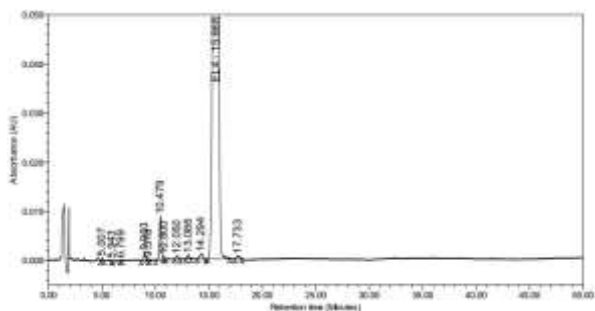
C. Dung dịch thử acid.



D. Dung dịch thử base.



E. Dung dịch OXH.



F. Dung dịch nhiệt.

Hình 6. Sắc ký đồ các mẫu thử độ đặc hiệu 9MC6.

3.3.4.3. Độ thích hợp hệ thống

Hút và pha loãng 1,0 ml dung dịch thử (được chuẩn bị ở phần đánh giá độ đặc hiệu) trong vữa đủ 100,0 ml với methanol, tiến hành tiêm lặp lại 06 lần vào hệ thống sắc ký, ghi lại sắc ký đồ. RSD thời gian lưu là 0,1% (<1,0%), của diện tích pic là 0,3% (< 2,0%), hệ số kéo đuôi từ 0,97–1,00 (< 2,0%) và số đĩa lý thuyết từ 15669 – 15923 (>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 ~ 0,125 µg/ml, pic 9MC6 trên sắc ký đồ có tỷ số signal/noise (S/N) ≈ 3,28. Tiêm lặp lại 06 lần, độ lặp lại của diện tích pic là RSD = 2,94% và S/N từ 3,05 – 3,44 đạt các yêu cầu đặt ra. Như vậy giới hạn phát

hiện của phương pháp là 0,125 µg/ml, từ đó suy ra giới hạn định lượng của phương pháp là 0,413 µg/ml.

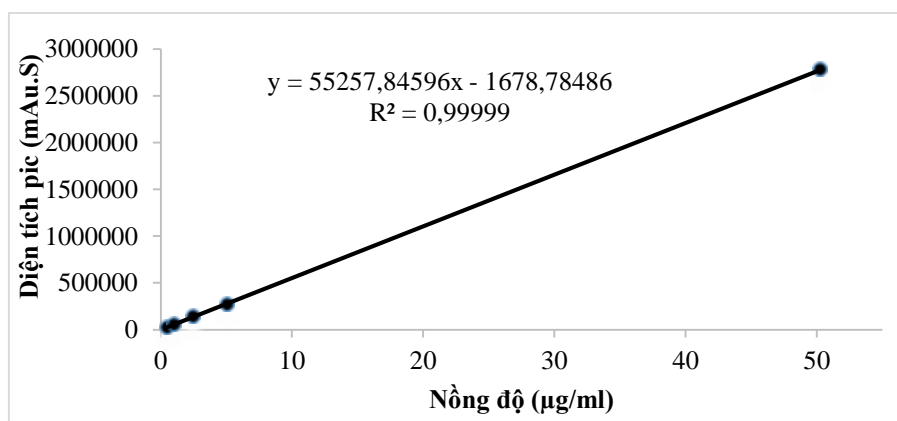
3.3.4.5. Độ tuyến tính và khoảng làm việc của phương pháp

Chuẩn bị và phân tích theo quy trình dãy dung dịch 9MC6 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 9MC6 được thể hiện ở Bảng 1 và Hình 9.

Bảng 1. Độ thu hồi của hợp chất 9MC6 ở các mức nồng độ thử nghiệm

Dung dịch thử	C1	C2	C3	C4	C5
Nồng độ gốc (µg/ml)	0,504	1,05	2,48	5,05	50,3
Diện tích pic (mAu.s)	27148	56886	138405	272489	2778110
Nồng độ thu hồi (µg/ml)	0,522	1,060	2,54	4,96	50,31
Độ thu hồi (%)	103,52	100,94	102,22	98,25	100,01
Tham chiếu (%) [14]	95-105	97-103	97-103	97-103	98-102



Hình 7. Tương quan tuyến tính giữa nồng độ hợp chất 9MC6 và diện tích pic sắc ký của các dung dịch.

Tại các mức nồng độ từ 0,504 µg/ml (giá trị LOQ) đến nồng độ 50,3 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 [14].

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 9MC6. Khoảng xác định của phương pháp là từ 0,02% đến 10% hàm lượng mẫu thử, phù hợp để xác định hàm

lượng tạp chất liên quan của mẫu 9MC6 (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 9MC6 có nồng độ chính xác khoảng 0,5 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 TSKK. Đánh giá độ lặp lại của phương pháp được thực hiện bởi KNV 2 và của cả KNV trong

2 ngày khác nhau. Kết quả thể hiện ở Bảng 2 và Bảng 3.

Đối với kết quả thực hiện bởi KNV, độ lệch chuẩn tương đối RSD (%) hàm lượng TSKK của mỗi KNV (n = 6) lần lượt 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 2,12% và 0,98% (< 5,0%); của cả 2 KNV (n = 12) là 2,15% (< 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 9MC6.

Bảng 2. Độ lặp lại và độ chính xác trung gian của quy trình xác định tạp chất liên quan của hợp chất 9MC6 thực hiện bởi 2 KNV

HL (%) \ Thử		1	2	3	4	5	6	Trung bình	RSD (%)
		KNV1	TKSK	99,23	99,23	99,20	99,19	99,20	99,21
$\sum_{\text{tạp}}$	0,77		0,77	0,80	0,81	0,80	0,79	0,79	2,12
KNV2	TKSK	99,23	99,23	99,24	99,24	99,23	99,22	99,23	0,01
	$\sum_{\text{tạp}}$	0,77	0,77	0,76	0,76	0,77	0,78	0,77	0,98
TKSK: TB (n = 12): 99,22%					Tổng tạp: TB (n = 12): 0,78%				
RSD (%) (n = 12): 0,02%					RSD (%) (n = 12): 2,15%				

3.3.5. Hàm lượng 9-methoxycanthin-6-on trong nguyên liệu đã tinh chế

Từ kết quả về độ TSKK (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 9MC6 được tính như sau:

$$X (\%) = 99,22\% * [100 - (0,0014 + 0,012)]/100 = 99,21\%.$$

3.3.6. Tiêu chuẩn nguyên liệu 9-methoxycanthin-6-on sử dụng để thiết lập chuẩn

i) Tính chất: bột kết tinh màu vàng;

ii) 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 272 nm và 350 nm;

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

iii) Mật khối lượng do làm khô: không quá 0,2%;

iv) Cặn sau nung: không quá 0,1%;

v) Tạp chất liên quan: tổng tạp không lớn hơn 2,0%;

vi) Độ tinh TSKK: không nhỏ hơn 98,0%;

4. Kết luận

Nghiên cứu này đã xây dựng được quy trình phân lập và tinh chế hợp chất 9MC6 với hiệu suất khoảng 63%, phù hợp với quy mô để sản xuất nguyên liệu 9MC6 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 TSKK. Nguyên liệu sau tinh chế có khối lượng khoảng 2,6 g với hàm lượng

là 99,21% 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

- [1] S. U. Rehman, K. Choe, H. H. Yoo, Review on a Traditional Herbal Medicine, *Eurycoma longifolia* Jack (Tongkat Ali): Its Traditional Uses, Chemistry, Evidence-Based Pharmacology and Toxicology, *Molecules*, Vol. 21, No. 3, 2016, pp. 331, <https://doi.org/10.3390/molecules21030331>
- [2] D. H. Bich, *Medicinal Plants and Animals in Vietnam*, Science and Technics Publisher, Hanoi, 2017 (in Vietnamese).
- [3] N. V. Than, *Vietnamese Medicinal Plants and Remedies*, Vol. I, Medical Publisher, Hanoi, 2021 (in Vietnamese).
- [4] Ministry of Health, *Vietnamese Pharmacopoeia V*, Medical Publisher, Hanoi, 2017 (in Vietnamese).
- [5] H. E. Thu, Z. Hussain, I. N. Mohamed, A. N. Shuid, Recent Advances in Antibacterial, Antiprotozoal and Antifungal Trends of *Eurycoma longifolia*: A Review of Therapeutic Implications and Future Prospects, *Current Drug Targets*, Vol. 19, No. 14, 2018, pp. 1657-1671, <https://doi.org/10.2174/1389450119666180219123815>.
- [6] H. E. Thu, Z. Hussain, I. N. Mohamed, A. N. Shuid, *Eurycoma longifolia*, A Potential Phytomedicine for the Treatment of Cancer: Evidence of p53-mediated Apoptosis in Cancerous Cells, *Current Drug Targets*, Vol. 19, No. 10, 2018, pp. 1109-1126, <https://doi.org/10.2174/1389450118666170718151913>.
- [7] R. Bhat, A. A. Karim, Tongkat Ali (*Eurycoma longifolia* Jack): A Review on its Ethnobotany and Pharmacological Importance, *Fitoterapia*, Vol. 81, No. 7, 2010, pp. 669-679, <https://doi.org/10.1016/j.fitote.2010.04.006>.
- [8] L. B. Kardono, C. K. Angerhofer, S. Tsauri, K. Padmawinata, J. M. Pezzuto, A. D. Kinghorn, Cytotoxic and Antimalarial Constituents of the Roots of *Eurycoma longifolia*, *Journal of Natural Products*, Vol. 54, No. 5, 1991, pp. 1360-1367, <https://doi.org/10.1021/np50077a020>.
- [9] P. C. Kuo, L. S. Shi, A. G. Damu, C. R. Su, C. H. Huang, C. H. Ke, J. B. Wu, A. J. Lin, K. F. Bastow, K. H. Lee, T. S. Wu, Cytotoxic and Antimalarial Beta-Carboline Alkaloids from the Roots of *Eurycoma longifolia*, *Journal of Natural Products*, Vol. 66, No. 10, 2003, pp. 1324-1327, <https://doi.org/10.1021/np030277n>.
- [10] M. Y. Nurhanan, L. P. A. Hawariah, A. M. Ilham, M. A. M. Shukri, Cytotoxic Effects of the Root Extracts of *Eurycoma longifolia* Jack, *Phytotherapy Research*, Vol. 19, No. 11, 2005, pp. 994-996, <https://doi.org/10.1002/ptr.1759>.
- [11] P. S. Park, N. X. Nhiem, P. V. Kiem, C. V. Minh, B. H. Tai, N. Kim, H. H. Yoo, J. H. Song, H. J. Ko, S. H. Kim, Five New Quassinoids and Cytotoxic Constituents from the Roots of *Eurycoma longifolia*. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, Vol. 24, No. 16, 2014, pp. 3835-3840, <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2014.06.058>.
- [12] P. C. Kuo, A. G. Damu, K. H. Lee, T. S. Wu, Cytotoxic and Antimalarial Constituents from the Roots of *Eurycoma longifolia*, *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, Vol. 12, No. 3, 2004, pp. 537-544, <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2003.11.017>.
- [13] D. T. N. Lan, N. T. Hang, N. T. Dat, L. Q. Thao, Method for Simultaneous Quantification of Four Constituents in *Eurycoma longifolia* Radix, *Journal of Drug Quality Control*, Vol. 21, No. 80, 2023, pp. 27-31 (in Vietnamese).
- [14] AOAC, *AOAC Official Methods of Analysis in Appendix F: Guidelines for Standard Method Performance Requirements*, 2016, https://www.aoac.org/wp-content/uploads/2019/08/zapp_f.pdf (accessed on: July 1st, 2024).