



PHÂN LẬP VÀ XÁC ĐỊNH HÀM LƯỢNG EURYCOMANONE TRONG CÂY MẬT NHÂN (*Eurycoma longifolia* J.) BẰNG SẮC KÝ LỎNG GHEP NỐI KHỐI PHỔ (LC-MS/MS)

Đoàn Mạnh Dũng^{1*}, Nguyễn Hữu Tùng², Hoàng Văn Trung³, Nguyễn Đình Luyện⁴

¹ Khoa Hóa học, Trường Đại học Khoa học, Đại học Huế

² Khoa Y Dược, Đại học Quốc gia Hà Nội

³ Viện Công nghệ Hóa, Sinh, Môi trường, Trường Đại học Vinh

⁴ Khoa Hóa học, Trường Đại học Sư phạm, Đại học Huế

Tóm tắt: Bằng các phương pháp sắc ký, chúng tôi phân lập được hợp chất eurycomanone từ cây mật nhân (*E. longifolia* J.). Cấu trúc của hợp chất này được xác định bằng các phương pháp phổ ¹H-NMR, ¹³C-NMR và ESI-MS. Hợp chất này được tinh sạch (độ tinh khiết trên 99,5%) bằng hệ thống sắc ký lỏng điều chế, và được sử dụng để làm chất chuẩn để phân tích hàm lượng eurycomanone trong các mẫu dược liệu mật nhân bằng sắc ký lỏng ghép nối khối phổ (LC-MS/MS). Chúng tôi xây dựng được chương trình sắc ký sử dụng hệ thống LC-MS/MS như sau: pha tĩnh cột sắc ký EC-C18 (100 × 2,1 mm; 2,7 μm), pha động: ACN (A) – nước chứa 0,1% HCOOH (B) trong thời gian 5 phút với tỉ lệ tăng từ 15% đến 60% A, tốc độ dòng 0,3 mL/phút, thể tích tiêm mẫu: 1 μL; nhiệt độ buồng cột: 35 °C; dung môi pha mẫu: MeOH:H₂O là 70:30 (v/v). Điều kiện khối phổ bao gồm nguồn ion hóa ESI, loại ion dương, nhiệt độ nguồn ion hóa là 300 °C, chế độ chạy MRM với ion sơ cấp *m/z* 409,1 và ion thứ cấp là *m/z* 391,0. Kết quả cho thấy hàm lượng eurycomanone cao nhất khi thu hái ở Bắc Giang (3,1336 ± 0,0005 mg/g), thấp nhất ở Đắk Nông (0,1716 ± 0,0001 mg/g). Hợp chất eurycomanone là thành phần hoạt chất chính và được coi là chất đặc trưng của mật nhân nói riêng và các loài *Eurycoma* nói chung.

Từ khóa: *Eurycoma longifolia*, eurycomanone, quassinoid, LC-MS/MS

1 Mở đầu

Cây mật nhân (*Eurycoma longifolia* J.) là một loài thực vật có hoa thuộc họ Simaroubaceae, phân bố chủ yếu ở Indonesia, Malaysia, Việt Nam, Campuchia, Myanmar, Lào và Thái Lan [1]. Theo y học cổ truyền, mật nhân có vị đắng, tính mát, có tác dụng thanh nhiệt, tiêu viêm, lợi thấp, lợi tiểu, thường dùng để chữa tiểu tiện ra máu, nhức mỏi, ăn không tiêu, đầy hơi, chướng bụng... Vỏ rễ cây mật nhân có vị rất đắng nên được sử dụng làm thuốc tẩy giun, trị sốt rét, kiết lỵ, ngộ độc, thuốc trị ghẻ lở... Dịch chiết từ rễ của mật nhân được sử dụng làm thuốc chữa rối loạn chức năng tình dục, lão hóa, sốt rét, ung thư, tiểu đường, lo âu, đau nhức, táo bón, hồi sức, sốt, tăng năng lượng, tăng sức mạnh, bệnh bạch cầu, loãng xương,

* Liên hệ: doanmanhdung151090@gmail.com

căng thẳng, giang mai... [2, 3]. Các nghiên cứu cho thấy cây mật nhân chứa các lớp chất có hoạt tính sinh học như quassinoid, alkaloid, triterpenoid, steroid... [4]. Eurycomanone là một quassinoid có hoạt tính sinh học cao được phân lập từ mật nhân. Hợp chất này vẫn chưa được tìm thấy ở các loài thực vật khác ngoài mật nhân và được coi là một hợp chất đánh dấu đặc trưng của mật nhân. Chính vì vậy, nghiên cứu xác định hàm lượng của eurycomanone trong cây mật nhân có ý nghĩa quan trọng trong việc xác định chất lượng dược liệu mật nhân.

2 Thực nghiệm

2.1 Thiết bị

Hệ thống sắc ký lỏng hiệu năng cao LC-MS/MS Agilent Technologies 6420 Triple Quad, hệ thống sắc ký lỏng hiệu năng cao (HPLC-DAD) Agilent 1290, cột sắc ký EC-C18 (100 × 2,1 mm; 2,7 μm), hệ thống sắc ký lỏng điều chế (Agilent 218 Purification System), cột sắc ký ZORBAX SB-C₁₈ (100 × 21,2 mm; 5,0 μm), máy đo năng suất quay cực Jasco DIP-360 digital polarimeter, máy đo điểm nóng chảy Stuart SMP3 (Sanyo, Nhật Bản). Phổ cộng hưởng từ hạt nhân được đo trên máy JEOL ECX 400 (Jeol, Nhật Bản), cột sắc ký các loại, cân phân tích OHAUS PA214 độ chính xác 0,0001 g, bể siêu âm, máy ly tâm Vortex, màng lọc 13 mm, 0,22 μm (PTFE).

2.2 Hóa chất

Các dung môi dùng trong chiết xuất, phân lập như ethanol (EtOH), methanol (MeOH), chloroform (CHCl₃), ethyl acetate (EtOAc), butanol (BuOH) đều đạt tiêu chuẩn công nghiệp và được chưng cất lại trước khi dùng. Dung môi dùng cho phân tích methanol (Merck, Đức), acetonitrile (Merck, Đức), nước cất, acid formic (Merck). Sắc ký cột (CC) sử dụng silica gel (Kieselgel 60, 70–230 mesh và 20–400 mesh, Merck), silica gel 60 RP-18 F254S (Merck, Darmstadt, Germany). Sắc ký lớp mỏng (TLC) sử dụng bản mỏng nhôm tráng sẵn silica gel 60 F254 (1.05554, Merck). Phát hiện chất bằng đèn tử ngoại ở hai bước sóng 254 nm và 365 nm hoặc dùng thuốc thử hơi I₂.

2.3 Nguyên liệu thực vật

Rễ mật nhân (*E. longifolia* J.) sử dụng để nghiên cứu chiết tách được thu hái tại Bắc Giang tháng 9/2016, các mẫu dùng để phân tích được thu hái tại Nghệ An, Đắk Nông, Hòa Bình, Vũng Tàu, Hà Giang. Người giám định khoa học là PGS. TS. Phương Thiện Thương, Khoa Hóa phân tích – Tiêu chuẩn, Viện Dược liệu. Tiêu bản của mẫu nghiên cứu được lưu tại Viện Dược liệu và Khoa Y Dược, Đại học Quốc gia Hà Nội.

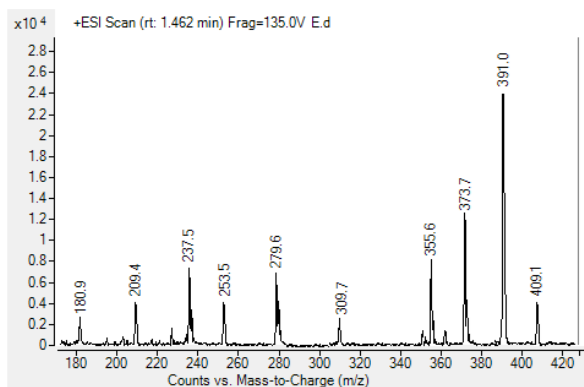
2.4 Chiết xuất và phân lập

Mẫu rễ mật nhân *E. longifolia* (400 g) sau khi rửa sạch, phơi khô, thái nhỏ được ngâm chiết kỹ bằng ethanol 95% (4 × 1500 mL) sử dụng thiết bị chiết siêu âm ở 40 °C trong 4 giờ. Các dịch chiết ethanol được lọc qua giấy lọc, gom lại và cất loại dung môi dưới áp suất giảm; thu được 12,5 g cao chiết tổng ethanol. Lấy 12,5 g cao chiết hòa tan trong nước cất (250 mL) và chiết phân bố lần lượt với EtOAc và BuOH (3 × 250 mL). Các dịch chiết phân đoạn được cất loại dung môi dưới áp suất giảm để thu được các phân đoạn tương ứng gồm cao EtOAc (3,2 g) và cao BuOH (3,8 g). Cao EtOAc được tiến hành phân lập bằng sắc ký sử dụng cột nhồi silica gel (50 mm × 300 mm) với hệ dung môi rửa giải CHCl₃:MeOH (15:1, v/v) và thu được 7 phân đoạn ký hiệu là F1~F7. Từ phân đoạn F5 (510 mg), tiến hành sắc ký cột pha đảo C₁₈ (20 mm × 400 mm) với hệ pha động MeOH:H₂O (1:2, v/v) sau đó kết tinh lại bằng MeOH và thu được eurycomanone (bột trắng, 35 mg). Hợp chất này được tinh chế (độ tinh khiết >99,5%) bằng hệ thống sắc ký lỏng điều chế (Agilent 218 Purification System) ở điều kiện: pha tĩnh là cột sắc ký ZORBAX SB-C₁₈ (100 × 21,2 mm; 5,0 μm); pha động là hỗn hợp MeOH (A):nước (B) trong thời gian 5 phút với tỉ lệ 50:50 (v/v); tốc độ dòng 15,0 mL/phút; thể tích tiêm mẫu 100,0 μL; dung môi pha mẫu: MeOH-H₂O (50:50, v/v).

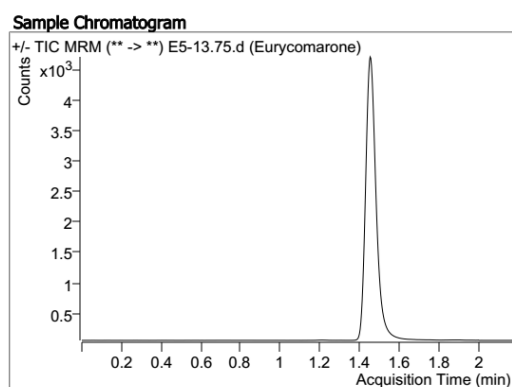
Eurycomanone: Bột màu trắng, mp 254–255 °C, $[\alpha]_D^{25} +26$ (c 0,30, MeOH); ESI-MS: m/z 409,1 [M+H]⁺; ¹H-NMR (CD₃OD, 400 MHz): δ 6,01 (1H, s, H-3), 5,50 (1H, s, H-21a), 5,39 (1H, s, H-21b), 4,77 (1H, s, H-7), 4,68 (1H, s, H-15), 4,26 (1H, s, H-1), 3,92 (1H, s, H-12), 3,84 (1H, d, J = 9,6 Hz, H-20a), 3,68 (1H, d, J = 9,6 Hz, H-20b), 3,02 (1H, s, H-5), 2,95 (1H, s, H-9), 2,30 (1H, m, H-6a), 2,10 (1H, m, H-6b), 1,98 (3H, s, H-19), 1,15 (3H, s, H-19); ¹³C-NMR (CD₃OD, 100 MHz): δ 84,3 (C-1), 198,8 (C-2), 125,9 (C-3), 165,2 (C-4), 42,8 (C-5), 26,1 (C-6), 71,7 (C-7), 53,1 (C-8), 48,0 (C-9), 46,5 (C-10), 109,2 (C-11), 80,8 (C-12), 146,1 (C-13), 79,3 (C-14), 77,1 (C-15), 174,5 (C-16), 22,9 (C-18), 10,1 (C-19), 68,0 (C-20), 121,5 (C-21).

2.5 Điều kiện, các thông số tối ưu cho phân tích

Trên cơ sở phân tích tài liệu [5, 6] và khảo sát về thành phần pha động, tỷ lệ dung môi, tốc độ dòng, chúng tôi xây dựng được chương trình sắc ký sử dụng hệ thống LC-MS/MS Agilent Technologies 6420 Triple Quad như sau: pha tĩnh cột sắc ký EC-C₁₈ (100 × 2,1 mm, 2,7 μm); pha động: ACN (A) – nước chứa 0,1% HCOOH (B) trong thời gian 5 phút với tỉ lệ tăng từ 15% đến 60% A; tốc độ dòng 0,3 mL/phút; thể tích tiêm mẫu: 1,0 μL; nhiệt độ buồng cột: 35 °C; dung môi pha mẫu: MeOH:H₂O = 70:30 (v/v). Điều kiện khối phổ bao gồm nguồn ion hóa ESI; loại ion dương; nhiệt độ nguồn ion hóa là 300 °C; chế độ chạy MRM với ion sơ cấp m/z 409,1 và ion thứ cấp m/z 391,0.



Hình 1. Phổ ESI-MS của hợp chất eurycomanone



Hình 2. Sắc ký đồ của eurycomanone

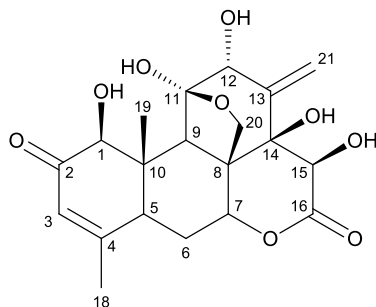
2.6 Chuẩn bị mẫu phân tích

Cân chính xác một lượng rễ mật nhân sau khi đã được nghiền nhỏ (0,03–0,04 g), thêm 20 ml hỗn hợp MeOH:H₂O = 70:30 (v/v) rồi tiến hành chiết siêu âm ở 40 °C trong 2 giờ; thu được dịch chiết (lặp lại 3 lần). Cô quay dịch chiết thu được dưới áp suất thấp rồi định mức bằng hỗn hợp MeOH:H₂O = 70:30 (v/v) trong bình định mức 100 mL. Sau đó, lọc qua màng 0,22 μm và bơm vào hệ thống LC-MS/MS [7].

3 Kết quả và thảo luận

3.1 Xác định cấu trúc

Hợp chất được phân lập dưới dạng bột màu trắng với nhiệt độ nóng chảy khoảng 254–255 °C. Phổ ¹H-NMR và ¹³C-NMR cho thấy nó có cấu trúc của một C₂₀-quassinoid. Phổ ¹H-NMR cho thấy tín hiệu của 2 nhóm methyl tại δ 1,98 (s, H-18) và 1,15 (s, H-19); 2 proton của nhóm oxymethylene (–CH₂O–) được xác định lần lượt bởi các tín hiệu cộng hưởng tại δ 3,84 (1H, d, J = 9,6 Hz, H-20a) và 3,68 (1H, d, J = 9,6 Hz, H-20b); 4 proton của nhóm oxymethine tại δ 4,77 (1H, s, H-7), 4,68 (1H, s, H-15), 4,26 (1H, s, H-1) và 3,92 (1H, s, H-12); một proton olefinic tại δ 6,01 (1H, s, H-3). Trên phổ ¹³C-NMR và DEPT xuất hiện các tín hiệu của 20 carbon. Trong đó, hai nhóm carbonyl tại δ 174,5 (C-16) và 198,8 (C-2), bốn carbon olefinic tại δ 125,9 (C-3), 165,2 (C-4), 146,1 (C-13) và 121,5 (C-21); một carbon acetal tại δ 109,2 (C-11); năm carbon mang oxi tại δ 84,3 (C-1), 71,7 (C-7), 80,8 (C-12), 79,3 (C-14) và 77,1 (C-15); hai carbon methyl tại δ 22,9 (C-18) và 10,1 (C-19). Trên phổ khối lượng ESI-MS xuất hiện tín hiệu tại m/z 409,1 phù hợp với ion giả phân tử [M+H]⁺ của C₂₀H₂₄O₄ (M = 408). Các phân tích nêu trên cùng với sự phù hợp hoàn toàn về số liệu phổ NMR của hợp chất phân lập được so với các số liệu tương ứng đã được công bố [8] cho phép xác định cấu trúc hóa học của hợp chất phân lập được là eurycomanone, thành phần hoạt chất chính trong cây *E. longifolia*.



Hình 3. Cấu trúc hóa học của Eurycomanone

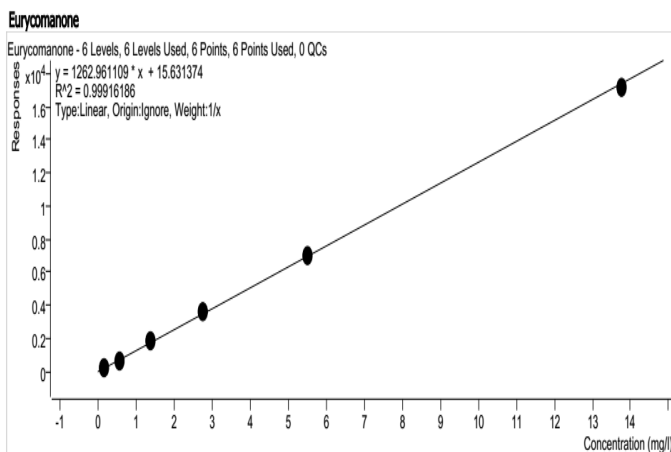
3.2 Đánh giá phương pháp phân tích

a. Kiểm tra độ tinh khiết

Sử dụng phương pháp tổng diện tích peak để tính toán độ tinh khiết của mẫu phân tích. Tiến hành sắc ký theo chương trình trên, phân tích các peak phụ (tạp chất) trên sắc ký đồ và tính độ tinh khiết bằng hệ thống sắc ký lỏng hiệu năng cao (HPLC-DAD) Agilent 1290. Kết quả cho thấy eurycomanone tinh chế được có độ tinh khiết cao (>99,5%) phù hợp làm chất chuẩn phân tích và chất chuẩn đối chiếu. Các peak phụ (tạp chất) đều tách rõ ràng khỏi peak chất phân tích.

b. Tính đặc hiệu

Tiến hành sắc ký các loại mẫu trắng và mẫu phân tích eurycomanone theo chương trình khảo sát trên, ghi lại sắc ký đồ, xác định thời gian lưu của peak eurycomanone trong sắc ký đồ. Kết quả cho thấy trên sắc ký đồ của dung môi pha mẫu không xuất hiện peak ở trong khoảng thời gian lưu của eurycomanone ($t_R = 1,454$ phút). Vì vậy, phương pháp phân tích eurycomanone xây dựng được có độ đặc hiệu cao.



Hình 4. Đồ thị biểu diễn đường chuẩn của eurycomanone

c. Tính thích hợp của hệ thống

Tiến hành phân tích lần lượt một dung dịch chuẩn của eurycomanone, lặp lại sáu lần, ghi lại các sắc ký đồ và xác định giá trị thời gian lưu, diện tích peak. Kết quả cho thấy độ lệch chuẩn tương đối của các thông số đều thấp hơn 1%. Điều đó cho thấy các điều kiện sắc ký đã lựa chọn và hệ thống sắc ký LC-MS/MS sử dụng là ổn định và phù hợp cho phép phân tích định tính và định lượng eurycomanone trong các mẫu cây mật nhân.

d. Độ tuyến tính

Chuẩn bị các dung dịch chuẩn có nồng độ 0,1–14 µg/mL (ppm) bằng cách pha loãng từ dung dịch chuẩn gốc ban đầu với các hệ số pha loãng khác nhau. Tiến hành sắc ký các dung dịch chuẩn (mỗi dung dịch thực hiện ba lần), ghi lại sắc ký đồ và xác định diện tích peak tương ứng. Xác định phương trình hồi quy tuyến tính, hệ số tương quan tuyến tính giữa nồng độ chất phân tích và diện tích peak tương ứng trên sắc ký đồ bằng phương pháp bình phương tối thiểu. Kết quả phương trình hồi quy tuyến tính thu được có hệ số xác định và hệ số tương quan rất cao, độ tuyến tính chặt, khoảng tuyến tính rộng.

e. Giới hạn phát hiện và giới hạn định lượng

Giới hạn phát hiện: tiến hành pha loãng mẫu phân tích eurycomanone đến khi tín hiệu của chất phân tích trên sắc ký đồ thu được có tỷ lệ S/N (chiều cao tín hiệu/nhiều) đạt khoảng 2–3. Nồng độ xác định được là giới hạn phát hiện (LOD) của phương pháp ứng với từng chất. Giới hạn định lượng (LOQ) của phương pháp được xác định dựa trên giới hạn phát hiện: $LOQ = 3,3 \times LOD$. Kết quả phân tích cho thấy phương pháp có giới hạn phát hiện với eurycomanone là 0,1 ppb tương ứng có giới hạn định lượng lần lượt là 0,4 ppb.

g. Độ đúng

Độ đúng của phương pháp phân tích eurycomanone bất kỳ được xác định thông qua độ thu hồi (Recovery) theo công thức:

$$Re\ v(\%) = \frac{C_2 - C_1}{C_0} \times 100$$

trong đó, C_0 là nồng độ chất phân tích được thêm vào trong mẫu thật; C_1 là nồng độ chất phân tích trong mẫu thật; C_2 là nồng độ chất phân tích trong mẫu thật đã được thêm chuẩn. Độ thu hồi của phương pháp cũng được xác định bằng cách tiến hành xử lý lần lượt các mẫu phân tích (lặp lại 3 lần) theo quy trình ở mục 2.6 rồi thêm chuẩn là 0,5 mg phân tích ba lần lặp lại, tính kết quả trung bình. Kết quả độ thu hồi của phương pháp được nêu ra ở Bảng 1.

Bảng 1. Kết quả đánh giá độ đúng của phương pháp xác định eurycomanone trong mẫu mật nhân

Mẫu	Nồng độ eurycomanone trong mẫu (mg)	Nồng độ eurycomanone thêm vào mẫu (mg)	Nồng độ eurycomanone sau khi thêm vào mẫu (mg)	Độ thu hồi, % (Rev, %)
Vũng Tàu	1,8533	0,5	2,3397	97,28
Đắk Nông	0,1715	0,5	0,6738	100,45
Hòa Bình	0,8014	0,5	1,3012	99,95
Nghệ An	0,2740	0,5	0,7706	99,32
Bắc Giang	3,1331	0,5	3,626	98,58
Hà Giang	0,9292	0,5	1,4424	102,64

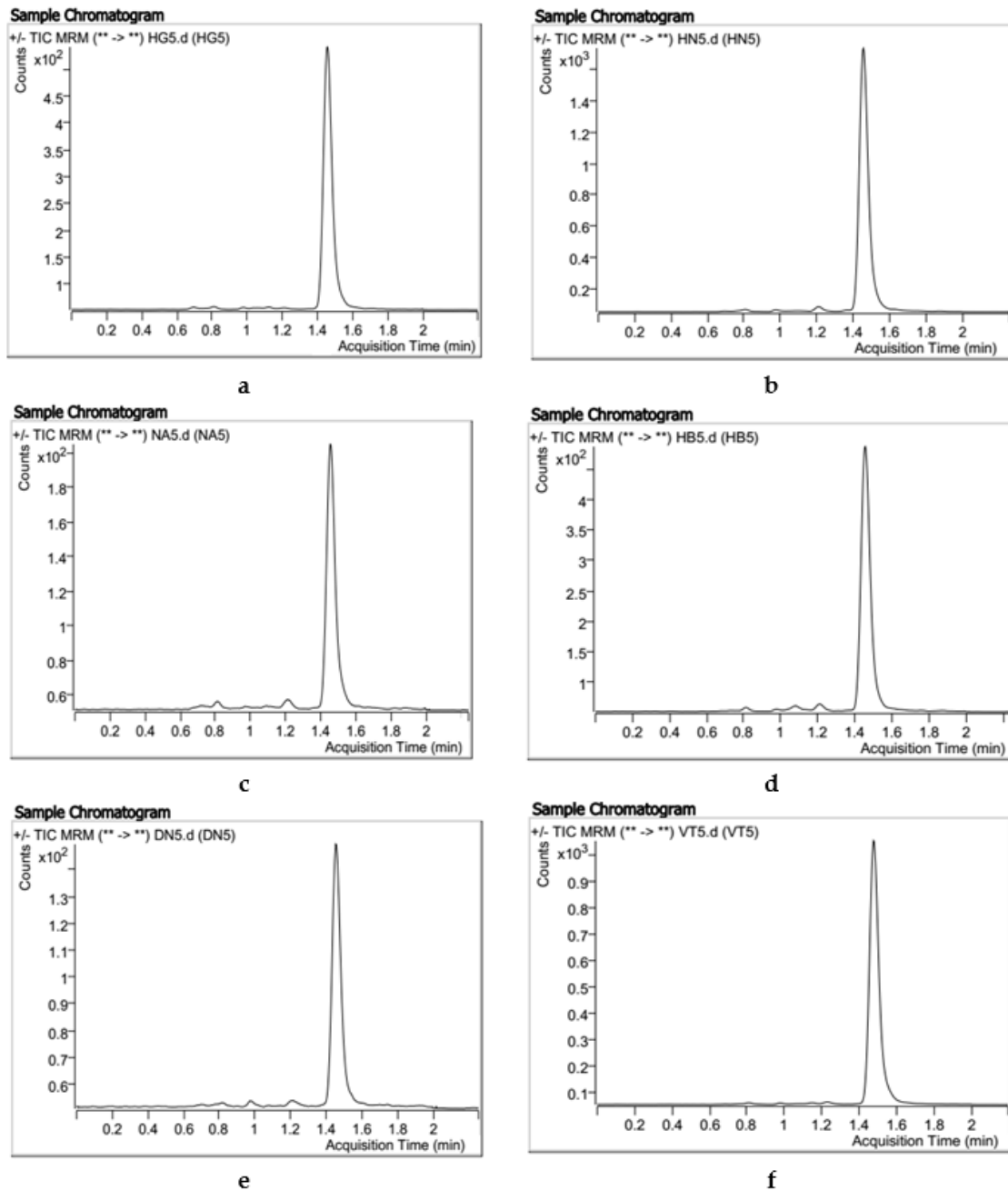
Kết quả tính toán ở Bảng 1 cho thấy, phương pháp xác định hàm lượng eurycomanone có độ thu hồi lần lượt đạt từ 97,28 đến 102,64%, phù hợp yêu cầu của AOAC. Vậy, phương pháp LC-MS/MS đạt được độ đúng tốt, nên có thể áp dụng để phân tích eurycomanone trong mẫu cây mật nhân.

3.3 Phân tích eurycomanone trong mẫu cây mật nhân

Hàm lượng eurycomanone trong các mẫu dược liệu mật nhân được xác định với các điều kiện tối ưu và theo phương pháp đường chuẩn đã xây dựng ở mục 2.5 và 2.6. Áp dụng đường chuẩn hồi quy tuyến tính xây dựng được và phương pháp nội suy để phân tích hàm lượng eurycomanone trong các mẫu dược liệu. Các kết quả nghiên cứu (Bảng 2) cho thấy phương pháp LC-MS/MS có độ lặp lại tương đối tốt ($RSD < 1\%$) khi phân tích các mẫu cây mật nhân. Như vậy, phương pháp phân tích có độ lặp lại cao, phù hợp để xác định eurycomanone trong mẫu dược liệu mật nhân.

Bảng 2. Kết quả phân tích hàm lượng eurycomanone

Mẫu	Hàm lượng eurycomanone đo được, mg/g					1/2.RSD _H (%)
	Lần 1	Lần 2	Lần 3	Trung bình ± SD	RSD (%)	
Vũng Tàu	1,8533	1,8534	1,8533	1,8533±0,0001	0,002	2,6
Đắk Nông	0,1716	0,1716	0,1715	0,1716±0,0001	0,035	3,7
Hòa Bình	0,8015	0,8016	0,8014	0,8015±0,0001	0,003	2,9
Nghệ An	0,2739	0,2738	0,2740	0,2739±0,0001	0,008	3,4
Bắc Giang	3,1336	3,1341	3,1331	3,1336±0,0005	0,014	2,4
Hà Giang	0,9292	0,9291	0,9292	0,9291±0,0001	0,009	2,9



Hình 5. Sắc ký đồ của các mẫu phân tích từ các địa phương: a. Hà Giang; b. Bắc Giang; c. Nghệ An; d. Hòa Bình; e. Đắk Nông; g. Vũng Tàu

4 Kết luận

Bằng các phương pháp sắc ký, chúng tôi phân lập được hợp chất eurycomanone từ cây mật nhân (*E. longifolia* J.). Cấu trúc của hợp chất này được xác định dựa trên cơ sở các số liệu phổ cộng hưởng từ hạt nhân $^1\text{H-NMR}$, $^{13}\text{C-NMR}$ và phổ khối lượng ESI-MS. Hợp chất này được tinh chế (độ tinh khiết >99,5%) bằng hệ thống sắc ký lỏng điều chế (Agilent 218 Purification System) và được sử dụng để làm chất chuẩn phân tích hàm lượng eurycomanone trong các mẫu dược liệu mật nhân bằng phương pháp sắc ký lỏng ghép nối khối phổ (LC-MS/MS). Kết quả cho thấy hàm lượng eurycomanone cao nhất từ mẫu mật nhân Bắc Giang ($3,1336 \pm 0,0005$ mg/g); thấp nhất là từ mẫu mật nhân Đắk Nông ($0,1716 \pm 0,0001$ mg/g). Cần tiếp tục nghiên cứu phân lập và xác định hàm lượng các hợp chất có hoạt tính sinh học khác từ cây mật nhân để cung cấp thông tin khoa học đầy đủ nhất cho dược liệu này.

Tài liệu tham khảo

1. Đỗ Huy Bích (2004), *Cây thuốc và động vật làm thuốc ở Việt Nam*, Nxb. Khoa học và Kỹ thuật, Hà Nội.
2. Võ Văn Chi (2012), *Từ điển cây thuốc Việt Nam (Bộ mới)*, Nxb. Y học, Hà Nội.
3. Phạm Hoàng Hộ (1992), *Cây cỏ Việt Nam*, Nxb. Trẻ, Hà Nội.
4. Shaheed U. R., Kevin C., Hye H. Y. (2016), Review on a Traditional Herbal Medicine, *Eurycoma longifolia* Jack (Tongkat Ali): Its Traditional uses, chemistry, evidence-based pharmacology and toxicology, *Molecules*, 21, 331.
5. Jun H., Ying F., Ouyang H.Z., Bin Y, Chang Y. X., Pan G. X., Dong G. Y., Wang T., Gao X. M. (2013), A sensitive LC-MS/MS method for simultaneous determination of six flavonoids in rat plasma: Application to a pharmacokinetic study of total flavonoids from mulberry leaves, *J. Pharma. Biomed. Analys.*, 84, 189–195.
6. Rehman S. U., Choi M. S., Han Y. H., Kim I. S., Kim S. H., Piao X. L., Yoo H. H. (2016), Determination of eurycomanone in rat plasma using hydrophilic interaction liquid chromatography-tandem mass spectrometry for pharmacokinetic study, *Biomed Chromatogr.*, 31(4).
7. Elhag H. E. E. A., Sulaiman A. Z., Ajit A. (2016), A review on the extraction methods of extracts and phytochemicals from *Eurycoma longifolia* (Tongkat ali Jack), *The national conference for postgraduate research 2016, Universiti Malaysia Pahang*.
8. Tung N. H., Uto T., Hai N. T., Li G., Shoyama Y. (2017), Quassinoids from the root of *Eurycoma longifolia* and their antiproliferative activity on human cancer cell lines, *Pharmacogn Mag.*, 13(51), 459–462.

ISOLATION AND QUANTITY DETERMINATION OF EURYCOMANONE FROM *Eurycoma longifolia* BY LIQUID CHROMATOGRAPHY-MASS SPECTROMETRY (LC-MS/MS)

Doan Manh Dung¹, Nguyen Huu Tung², Hoang Van Trung³, Nguyen Dinh Luyen⁴

¹ Faculty of Chemistry, University of sciences, Hue University

² School of Medicine and Pharmacy, Vietnam National University, Hanoi

³ School of biochemical technology environment, Vinh University

⁴ Faculty of Chemistry, University of education, Hue University

Abstract. Using chromatography methods, we isolated the principal compound *eurycomanone* from *Eurycoma longifolia* J. Its chemical structure was determined on the basis of spectroscopic data (¹H-NMR, ¹³C-NMR, and ESI-MS). This compound was purified (purity >99.5%) using the Agilent 218 purification system. The compound was used as a standard for analyzing eurycomanone in six samples. The liquid chromatography-mass-spectroscopy/mass spectroscopy system was used (LC-MS/MS). The conditions are as follows: chromatography column EC-C₁₈ (100 × 2.1 mm, 2.7 μm); the mobile phase consisted of acetonitrile (A) and 0.1% formic acid aqueous solution (B); the gradient elution of 15–60% A at 0–5 min; the flow rate at 0.3 mL·min⁻¹; the sample injection volume at 1 μL; the column temperature at 35 °C; solvent: Me:H₂O = 70:30. The MS conditions are as follows: ESI ion source; positive ions; ionization source temperature: 300 °C; precursor-product ion pairs for multiple-reaction monitoring were m/z 409.1 → 391.0. The results showed that Bac Giang *Eurycoma longifolia* J. has the highest eurycomanone content (3.1336 ± 0.0005 mg/g); meanwhile, Dack Nong *Eurycoma longifolia* J. has the lowest (0.1716 ± 0.0001 mg/g).

Keywords: *Eurycoma longifolia*, eurycomanone, quassinoid, LC-MS/MS