

B GIÁO D C VÀ ÌO T O

B Y T

I H C Y D C THÀNH PH H CHÍ MINH

HÀ MINH HI N

NGHIÊN C U XÁC NH H P CH T PHENOL T
NH A VÀ V QU MÙ U
NG D NG TRONG KI M NGHI M

LU N ÁN TI NS D CH C

TP H Chí Minh- N m 2014

B GIÁO D C VÀ ÌAOT O

B YT

I H CYD C THÀNH PH H CHÍ MINH

HÀ MINH HI N

**NGHIÊN C U XÁC NH H P CH T PHENOL T
NH A VÀ V QU MÙ U
NG D NG TRONG KI M NGHI M**

Chuyên ngành: Ki m nghi m thu c

Mã s : 62.73.15.01

LU N ÁNTI NS D CH C

Ng i h ng d n khoa h c:

1. PGS.TS. Nguy n Kh c Qu nh C

2. TS. Nguy n V n Th

TP H Chí Minh- N m 2014

L I CAM OAN

Tôi xin cam oan đây là công trình nghiên
c u c a riêng tôi. Các s li u, k t qu nêu
trong lu n án là trung th c và ch a t ng c
ai công b trong b t k công trình nào khác.

Ha Minh Hiên

M C L C

	Trang
Trang ph bìa	i
L i cam oan	ii
M c l c	iii
Danh m c các ký hi u, các ch vi t t t	iv
Danh m c các b ng	vii
Danh m c các hình, bi u , s , th	ix
M U	1
CH NG 1: T NG QUAN TÀI LI U	4
1.1. S l c v cây Mù u	4
1.2. S l c v h p ch t phenol	13
1.3. Tình hình nghiên c u v h p ch t phenol t qu Mù u	16
1.4. M t s ph ng pháp phân tích h p ch t phenol t Mù u	19
1.5. M t s khái ni m v ch t chu n i chi u	21
CH NG 2: IT NG VÀ PH NG PHÁP NGHIÊN C U	26
2.1. it ng	26
2.2. Nguyên v t li u	26
2.3. Dung môi, hóa ch t và thi t b thí nghi m	27
2.4. Ph ng pháp nghiên c u	29
CH NG 3: K T QU NGHIÊN C U	41
3.1. Nghiên c u xác nh h p ch t phenol t nh a và v qu Mù u	41
3.2. Th tác d ng kháng khu n các cao chi t t nh a và v qu Mù u	44
3.3. Phân l p các h p ch t phenol t nh a và v qu Mù u	45
3.4. Xác nh c u trúc các h p ch t phenol phân l p c	48
3.5. Nghiên c u thi t l p ch t chu n i chi u	61

3.6.	Xây dựng và thẩm định phương pháp GC-MS xác định calophyllolid trong cao methanol chiết từ nhài Mù u (Phương pháp 1)	76
3.7.	Xây dựng và thẩm định phương pháp GC-MS xác định calophyllolid trong vỏ quế Mù u (Phương pháp 2)	83
3.8.	Xây dựng và thẩm định phương pháp HPLC-DAD định lượng calophyllolid trong chiết phẩm từ Mù u Inopilo	89

CHƯƠNG 4: BÀN LUẬN 96

4.1.	Chiết xuất hợp chất phenol từ nhài và vỏ quế Mù u	96
4.2.	Thẩm định kháng khuẩn các cao chiết từ nhài và vỏ quế Mù u	97
4.3.	Phân lập hợp chất phenol từ nhài và vỏ quế Mù u	97
4.4.	Xác định cấu trúc hợp chất phenol phân lập bằng phương pháp phổ nghiệm	98
4.5.	Xác định thành phần hợp chất phenol từ nhài và vỏ quế Mù u	102
4.6.	Thi nghiệm hợp chất chuẩn inchi u	106
4.7.	Các phương pháp ghép nối sắc ký-phổ nghiệm xác định hợp chất phenol trong nhài, vỏ quế Mù u và thuốc Mù u	108

KẾT LUẬN VÀ KIẾN NGHỊ 110

DANH MỤC CÁC CÔNG TRÌNH NGHIÊN CỨU CỦA TÁC GIẢ

TÀI LIỆU THAM KHẢO

PHỤ LỤC

DANH MỤC CÁC KÝ HIỆU, CÁC CHỈ VIẾT TẮT

AMDIS	Automated Mass spectral Deconvolution and Identification System
<i>br</i>	nh dải rộng (broad)
CDCl ₃	Cloroform deuteri hóa
CD ₃ OD	Methanol deuteri hóa
¹³ C-NMR	Phân tích phổ cộng hưởng từ nhân carbon 13
COSY	COrrrelation SpectroscopY
<i>d</i>	nh đôi (doublet)
<i>dd</i>	nh đôi kép (doublet of doublets)
DAD	Detector dãy diod quang (Diode Array Detector)
DEPT	Distortionless Enhancement by Polarization Transfer
DMSO- <i>d</i> ₆	Dimethyl sulfoxid deuteri hóa
EI-MS	Phân tích phổ ion hóa bắn phá electron (Electron Impact Mass Spectrometry)
EMA	European Medicines Agency
ESI-MS	Phân tích phổ ion hóa phun mù electron (Electrospray Ionization-Mass Spectrometry)
EtOAc	Ethyl acetat
EtOH	Ethanol
EU	Liên minh châu Âu (European Union)
FDA	Cơ quan Thực phẩm và Dược phẩm Hoa Kỳ (Food and Drug Administration)
FHH	Forum for the Harmonization of Herbal Medicine

FTIR	H ñng ngo ì chuy ñ ì Fourier (Fourier Transform Infrared)
GC-MS	S ñc ký khí gñép kh ì ph ñ (Gas Chromatography- Mass Spectrometry)
HIV	Human Immunodeficiency Virus
HMBC	Heteronuclear Multiple Bond Coherence
¹ H-NMR	Ph ñc ñng h ñng t h ñt ñh ñn proton
HPLC	S ñc ký l ñng hi u ñng cao (High Performance Liquid Chromatography)
HSQC	Heteronuclear Single Quantum Coherence
HRESI-TOFMS	Ph ñ kh ì l ñng th ì gian bay-ion hóa phun mù electron ph ñn gi ì cao (High Resolution Electrospray Ionization-Time Of Flight Mass Spectrometry)
ICH	H ñ ñng qu c t v hòa h p (International Conference on Harmonization)
ICP-MS	Kh ì ph plasma c m ñng (Inductively Coupled Plasma- Mass Spectrometry)
IR	H ñng ngo ì (Infrared)
LC-MS	S ñc ký l ñng gñép kh ì ph ñ (Liquid Chromatography- Mass Spectrometry)
<i>m</i>	ñh ña (multiplet)
MDL	Gi ì h ñn ph ñt hi ñn ñh ñt (Minimum Detection Limit)
MeCN	Acetonitril
MeOH	Methanol
MIC	Ñ ñng c ch ñt ñ thi u (Minimum Inhibitory Concentration)
MRSA	<i>Staphylococcus aureus</i> ñh ñng methicilin (Methicillin-resistant <i>Staphylococcus aureus</i>)

MS	Phổ khối lượng (Mass spectrometry)
NIST	Viện Công nghệ và Tiêu chuẩn Quốc gia Hoa Kỳ (National Institute of Standards and Technology)
NMR	Cộng hưởng từ hạt nhân (Nuclear Magnetic Resonance)
P .	Phân rã
PLE	Chiết lỏng áp suất (Pressurized Liquid Extraction)
<i>q</i>	nhập bốn (quartet)
R_f	Hệ số di chuyển (Relative to front)
RSD	Độ lệch chuẩn tương đối (Relative Standard Deviation)
<i>s</i>	nhập một (singlet)
SD	Độ lệch chuẩn (Standard Deviation)
SIM	Giám sát ion chọn lọc (Selected Ion Monitoring)
<i>t</i>	nhập ba (triplet)
TGA	Phân tích nhiệt trọng lượng (Thermogravimetric Analysis)
TLC	Sắc ký lớp mỏng (Thin Layer Chromatography)
TMS	Tetramethyl silan
TT	Thuốc thử
tt/tt	Thử nghiệm/thử nghiệm
USP	Độc dược (United States Pharmacopoeia)
UV-Vis	Phổ tử ngoại-khả kiến (Ultraviolet-Visible)
VLC	Sắc ký lỏng chân không (Vacuum Liquid Chromatography)

WHO T  ch c Y t th gi i (World Health Organization)

λ_{\max} B c s  ng h p thu c c i

ν_{\max} S s  ng h p thu c c i

DANH MỤC CÁC BẢNG

Bảng số	Tên bảng	Trang
1.1.	Phân loại các hợp chất phenol theo Harborne	13
2.1.	Tiêu chuẩn chất lượng chất chuẩn ichiu theo WHO	37
2.2.	Các yếu tố và mức độ nhiễm khuẩn x lý m u	39
2.3.	Thi t k thí nghiệm ch n i u ki n x lý m u	39
3.1.	K t qu chi t xu th p ch t phenol t v qu Mù u b ng PLE và soxhlet	43
3.2.	K t qu th tác đ ng kháng khu n c a cao chi t t nh a và v qu Mù u	44
3.3.	B ng đ li u ph NMR c a h p ch t N_1 (CD_3OD và $DMSO-d_6$, máy 500 MHz)	49
3.4.	B ng đ li u ph NMR c a h p ch t N_2 (CD_3OD , máy 500 MHz)	51
3.5.	B ng đ li u ph NMR c a h p ch t N_3 ($CDCl_3$, máy 500 MHz)	54
3.6.	D li u dài liên k t tiêu bi u c a h p ch t N_3	56
3.7.	D li u dài và góc liên k t hydrogen c a h p ch t N_3	57
3.8.	B ng so sánh đ li u ph 1H -NMR và ^{13}C -NMR c a calophyllolid i u ch c v i tài li u tham kh o	64
3.9.	K t qu kh o sát % di n tích c a các t p ch t h u c t i m t s b c sóng	66
3.10.	Tính phù h p c a h th ng HPLC-DAD (n=6)	67
3.11.	K t qu kh o sát kho ng tuy n tính c a t p ch t 1 (1); calophyllolid (2); t p ch t 2 (3)	69
3.12.	K t qu kh o sát l p l i và chính xác trung gian c a ph ng pháp	70
3.13.	tính khi t calophyllolid trong quá trình óng l	71

3.14.	K t qu xác nh tinh khi t c a calophyllolid t i 3 phòng thí nghi m	72
3.15.	Kh o sát ch ng trình nhi t c t	76
3.16.	Tính phù h p c a h th ng GC-MS (n=6) trong ph ng pháp GC-MS (ph ng pháp 1)	78
3.17.	T ng quan gi a n ng và di n tích pic c a calophyllolid trong ph ng pháp GC-MS (ph ng pháp 1)	80
3.18.	K t qu kh o sát l p l i và chính xác trung gian c a ph ng pháp GC-MS (ph ng pháp 1)	81
3.19.	K t qu úng c a ph ng pháp GC-MS (ph ng pháp 1)	82
3.20.	Tính phù h p c a h th ng GC-MS (n=6) trong ph ng pháp GC-MS (ph ng pháp 1)	85
3.21.	T ng quan gi a n ng và di n tích pic c a calophyllolid trong ph ng pháp GC-MS (ph ng pháp 1)	85
3.22.	K t qu l p l i c a ph ng pháp GC-MS (ph ng pháp 2)	86
3.23.	K t qu úng c a ph ng pháp GC-MS (ph ng pháp 2)	87
3.24.	K t qu thí nghi m ch n i u ki n chu n b m u	90
3.25.	Tính phù h p c a h th ng HPLC-DAD (n=6)	90
3.26.	T ng quan gi a n ng và di n tích pic c a calophyllolid trong ph ng pháp HPLC-DAD	92
3.27.	K t qu l p l i và chính xác trung gian c a ph ng pháp HPLC-DAD	94
3.28.	K t qu úng c a ph ng pháp HPLC-DAD	95

DANH MỤC CÁC HÌNH, BIỂU ĐỒ, SƠ ĐỒ, THỰC NGHIỆM

Hình số	Tên hình, biểu đồ, sơ đồ, thực nghiệm	Trang
1.1.	Sơ đồ cây ánh giá chất chuẩn i chi u dùng cho nh l ng	25
2.1.	Sơ đồ quá trình ép d u và tách lo i nh a Mù u	26
2.2.	Sơ đồ ống kính vòng vô khu n	33
3.1.	Sơ đồ chi t xu t các h p ch t phenol t nh a Mù u b ng n-hexan	41
3.2.	Sơ đồ chi t xu t các h p ch t phenol t nh a Mù u b ng MeOH-n c	42
3.3.	Sơ đồ chi t xu t các h p ch t phenol t v qu Mù u b ng ph ng pháp PLE	42
3.4.	Sơ đồ chi t xu t các h p ch t phenol t v qu Mù u b ng ph ng pháp soxhlet	43
3.5.	Sơ đồ chi t xu t các h p ch t phenol t v qu Mù u b ng ph ng pháp ng m ki t	44
3.6.	Sơ đồ phân l p các h p ch t phenol t cao n-hexan nh a Mù u	45
3.7.	Sơ đồ phân l p các h p ch t phenol t cao methanol nh a Mù u	46
3.8.	Sơ đồ phân l p các h p ch t phenol t cao ethyl acetat v qu Mù u	46
3.9.	Sơ đồ ký TLC c a các h p ch t phân l p t nh a và v qu Mù u	47
3.10.	Công th c c u t o c a h p ch t N_1	49
3.11.	Công th c c u t o c a h p ch t N_2	51
3.12.	Sơ đồ phân m nh EI-MS c a h p ch t N_3	52
3.13.	C u trúc c a h p ch t N_3 (nh i u x tia X)	57
3.14.	Công th c c u t o c a h p ch t N_3	57

3.15.	Công thức cấu tạo của hợp chất N_4	59
3.16.	Phân tích UV-Vis (EtOH) của calophyllolid trong dung dịch	61
3.17.	Phân tích IR (KBr) của calophyllolid trong dung dịch	62
3.18.	Phân tích MS (EI-MS) của calophyllolid trong dung dịch	62
3.19.	Phân tích 1H -NMR ($CDCl_3$, 300 MHz) của calophyllolid trong dung dịch	63
3.20.	Phân tích ^{13}C -NMR ($CDCl_3$, 75 MHz) của calophyllolid trong dung dịch	63
3.21.	Phân tích UV và tính khi tích cực của calophyllolid trong dung dịch (1); tổng hợp (2) và tổng hợp (3)	68
3.22.	Phân tích 3D của calophyllolid trong dung dịch	68
3.23.	Thiết lập quan hệ liên hệ giữa các dung dịch calophyllolid và diện tích pic tổng hợp (1); calophyllolid (2); tổng hợp (3)	69
3.24.	Sơ ký HPLC-DAD của calophyllolid trong dung dịch (phát hiện 270 nm)	70
3.25.	Sơ ký xác định tổng hợp thực tế của chất 4-hydroxyxanthone	75
3.26.	Các mảnh ion đặc trưng của calophyllolid	77
3.27.	Thiết lập quan hệ liên hệ giữa dung dịch chuẩn (1), dung dịch mẫu (2) và diện tích pic của ion m/z 401	79
3.28.	Sơ ký GC-MS (Scan mode) của methanol nhả mù u	83
3.29.	Sơ ký GC-MS (Scan mode) của chất chiết bằng PLE từ quả mù u	88
3.30.	Sơ ký khảo sát tính đặc hiệu của phương pháp nhận diện calophyllolid trong mẫu mù u INOPILO	91
3.31.	Phân tích UV và tính khi tích cực của calophyllolid trong dung dịch mẫu mù u INOPILO	91
3.32.	Phân tích 3D của calophyllolid trong mẫu mù u INOPILO	91

- 3.33. S c ký HPLC c a m u th đ u Mù u INOPILO 91
- 3.34. th t ng quan gi a n ng các dung đ ch i chi u (1), dung đ ch m u th (2) và di n tích pic calophyllolid 93

M U

Cây Mù u có tên khoa học là *Calophyllum inophyllum* L. Clusiaceae còn gọi là H
ng, Khung tung, Khehyong, t lâu ã c nhân dân ta sử dụng các bộ phận khác
nhau như: hạt, dầu hạt, nhựa cây, rễ, lá chàm t s b nh. Có thể kể như: dầu ép
t hạt Mù u dùng chữa gh , nấm tóc và các bệnh v da nói chung, chữa viêm dây
thần kinh trong bệnh cùi, chng nhi m khu n v t th ng và bôi trị th p kh p [2].
T i n , toàn cây Mù u dùng làm thuốc chữa bệnh th p kh p và các bệnh ngoài
da. N c ép dùng làm thuốc tẩy x và dầu hạt c ng c ch nh dùng trị bệnh
th p kh p và các bệnh v da như: bệnh gh , bệnh herpes m ng tròn, bệnh da. V
cây dùng chữa xuất huyết nội và làm thuốc làm se. T i Buso và Papua New
Guinea, nhựa m t lá c pha loãng v i n c và dung dịch này c bôi lên m t
b kích ng. Ch t gôm làm thuốc gây nôn và thuốc tẩy x [9].

T ng quan v cây Mù u cho thấy có các thành phần hóa học thuộc nhóm coumarin,
xanthon, flavonoid, dẫn xuất chromanon, triterpen, steroid chữa trong nhi u bộ phận
khác nhau như: lá, quả, hạt, phần tiếp xúc v i không khí, v r , g . Trong ó các
h p ch t phenol thuộc nhóm coumarin, xanthon, flavonoid và neoflavonoid c
nghiên cứu có các tác dụng sinh học đáng kể như: kháng virus, kháng khuẩn, kháng
n m, kháng viêm, chng ung th , chng oxy hóa [9], [43]. C th các inophyllum B
và P có tác dụng ức chế HIV-1 Reverse Transcriptase và hoạt tính kháng HIV-1
trong môi trường nuôi cấy tế bào [21], học g n ây t i Pháp, các nhà khoa học ã
xác nh trong nhựa tách từ dầu Mù u trong Polynesia thuộc Pháp m t s
coumarin thuộc các h : inophyllum, calanolid, inocalophyllin và tamanolid trong ó
áng quan tâm nhất là calophyllolid, ch t có tác dụng ng n ch n ung th b ng cách
ức chế elastase [101]. Do có nhi u ch t có hoạt tính sinh học nh v y, các bộ phận
của cây Mù u là i t ng có tiềm năng rất lớn sử dụng làm thuốc và trong nghiên
c u phát hiện các thuốc làm thuốc.

T i Việt Nam, Mù u khai thác bằng cách p qu b v , l y h t ép dầu. Tinh chế
dầu thô bằng cách lọc i nh a thu c dầu Mù u để dùng. Nhựa lọc ra khi tinh

ch đ u Mù u và v qu Mù u Vi t nam ch a c nghiên c u s đ ng. Đ u Mù u c dùng riêng ho c ph i h p v i các đ c li u khác s đ ng r ng rãi tr b ng, viêm loét da, làm mau lành các v t th ng...

V m t tiêu chu n hóa thì ch tiêu nh tính đ u Mù u theo đ c i n Vi t Nam 4 ch a c hi u và không đ th c hi n do ch a có đ u Mù u chu n ho c ch t chu n i chi u [1]. Các đ c i n: Hoa k 2012, Anh 2013, châu Âu 7.0, Nh t 2006, Qu c t 4, Trung qu c 2010 u ch a th y có chuyên lu n v các b ph n dùng c ng nh các ch ph m t đ c li u Mù u.

Tiêu chu n c s c a đ u Mù u c ng nh các ch ph m t đ u Mù u này tuy ã có nh ng ch a áp ng v i các nguyên t c, tiêu chu n th c hành t t s n xu t thu c i v i c s s n xu t thu c t đ c li u c a t ch c Y t th gi i (GMP-WHO) [121] mà B Y t ã a ra l trình áp đ ng k t ngày 01/01/2014 vì không có ch tiêu xác nh thành ph n có ho t tính ho c ch t i m ch do thi u ch t chu n i chi u và ph ng pháp phân tích, ki m nghi m tin c y.

T i Vi t nam, ngoài công trình c a tác gi Tr n Thanh Th o v phân l p và xác nh c u trúc c a calophyllolid t h t cây Mù u m c t i Vi t Nam [5], có r t ít công trình nghiên c u xác nh h p ch t phenol t nh a lo i b khi tinh ch đ u Mù u c ng nh v qu Mù u.

Vì v y, tài:

“Nghiên c u xác nh h p ch t phenol t nh a và v qu Mù u ng đ ng trong ki m nghi m” c th c hi n v i các m c tiêu nghiên c u c th sau:

- Nghiên c u xác nh h p ch t phenol t nh a và v qu Mù u m c Vi t Nam b ng m t s k thu t s c ký và ph nghi m ch n ch t i m ch dùng trong ki m nghi m nguyên li u và ch ph m t đ c li u Mù u.
- Nghiên c u thi t l p 01 ch t chu n i chi u nh tính và 01 dùng cho nh l ng trong s các h p ch t phenol phân l p c.
- ng đ ng ch t chu n i chi u ã thi t l p ki m nghi m nguyên li u và ch ph m t đ c li u Mù u.

từ các mục tiêu trên, chúng tôi đã tiến hành các nội dung sau đây:

- Xây dựng quy trình chiết xuất mêtaxylphenol từ nhựa và vỏ quế Mù u.
- Phân lập, tinh chế và xác định cấu trúc mêtaxylphenol từ nhựa và vỏ quế Mù u.
- Xây dựng bộ dữ liệu nền tảng chất chuẩn i-chi u, các chỉ tiêu chất lượng và phương pháp phân tích đánh giá chất lượng của chất chuẩn i-chi u.
- Xây dựng và thẩm định mêtaxylphenol phương pháp xác định hàm lượng trong ki m nghiệm nguyên liệu và chất phẩm dược liệu Mù u.

Việc nghiên cứu xác định các hợp chất phenol và lượng trong ki m nghiệm này cần nhằm mở ra triển vọng khai thác, tận thu bằng cách xác định giá trị của nhựa và vỏ quế là những phụ phẩm xem là phế phẩm trong quá trình sản xuất dầu Mù u dược dụng.

CHƯƠNG 1

TỔNG QUAN

1.1. S L C V CÂY MÙ U

Theo hệ thống phân loại thực vật Takhtajan và Phạm Hoàng Hộ, cây Mù u thuộc chi *Calophyllum* họ Clusiaceae. Chi này có nhiều loài, riêng Việt Nam đã xác định được 11 loài gồm: *inophyllum*, *dongnaiensis*, *thorelii*, *soulatrii*, *balansae*, *saigonense*, *dryobalanoides*, *pisiferum*, *tetrapterum*, *membranaceum*, *harmandii*. Mù u thuộc loài *inophyllum* [9].

Tên khoa học: *Calophyllum inophyllum* L. họ B a (Clusiaceae)

Tên khác: H ồng, Khung tung, Khehyong, Alexander Laurel, Laurel Wood, Laurier d'Alexandrie [2], [9].

1.1.1. Mô tả cây, bộ phận dùng, phân bố

Cây Mù u có thân gỗ lớn, có thể cao đến 20 m, đường kính 80 cm, tán xanh lục, có màu xanh nhạt. Lá lớn, mọc đối, phiến nguyên, hình trứng, láng và dày. Hoa trắng pha vàng cam, thơm, tập thành chùm 6-10 hoa, nách lá, đơn cành (Hình PL 1.1). Quả có nhân cứng, tròn, đường kính khoảng 2,5 cm, mặt hạt, có mầm lớn, chấu nhiều dầu, không phơi khô [2] (Hình PL 1.2).

Bộ phận dùng: toàn cây, hạt, lá, vỏ cây. Thu hoạch quả tươi vào lúc cây 7-10 năm tuổi, quả chín rụng rồi phơi khô cho nhiều dầu như hạt. Hạt dùng tươi hay ép dầu. Nhựa cây, rễ và lá thu hái quanh năm, phơi khô hay tán bột [2].

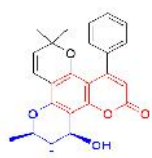
Mù u phân bố rộng rãi tại Thái Lan, Malaysia và Lào, Campuchia, Philippin, Indonesia và một số nơi ở Nam Thái Bình Dương. Ngoài ra cây còn mọc một số tỉnh miền nam Trung Quốc, Nhật Bản và các biển đảo [10].

Việt Nam, phân bố chủ yếu ở các vùng núi thấp thuộc các tỉnh miền Bắc, miền Trung, miền Đông và Tây Nam Bộ như: Quảng Ninh, Hải Phòng, tỉnh Quảng Bình, Phan Thiết, Vĩnh Long, Tiền Giang, Thành phố Hồ Chí Minh, Bà Rịa Vũng Tàu.... Cây thường mọc ven rừng kín, rừng thứ sinh và rừng các loại. Ở Nam Bộ, Mù u mọc dọc theo các bờ kênh rạch cao. Cây mọc hoang thường gặp ở những vùng đất cát gần biển [6], [10].

1.1.2. Hợp chất phenol trong các bộ phận của cây Mù u

Các hợp chất phenol đã biết trong cây Mù u chủ yếu thuộc 3 nhóm: coumarin, xanthon và chromanon.

Các coumarin đã biết trong các bộ phận khác nhau của cây Mù u



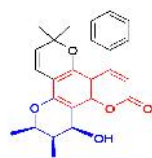
1

Inophyllum B
H t, Lá [53]



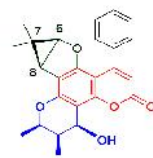
2

Soulattrolid
H t [53]



3

Inophyllum A
Lá [21]



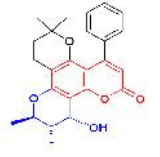
4

Inophyllum G2
Lá [21]



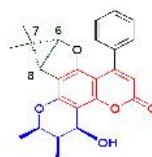
5

Inophyllum D
Lá [21]



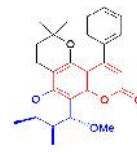
6

Inophyllum P
Lá [21]



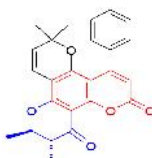
7

Inophyllum G1
Lá [21]



8

12-Methoxy-
inophyllum D
H t [52]



9

Inophyllum C
H t, Lá [53]



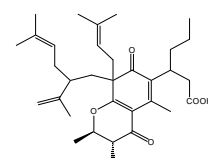
10

Inophyllolid
H t [51]



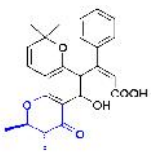
11

Inophyllum E
H t, Lá [53]



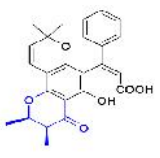
12

Inocalophyllin B
H t [38]



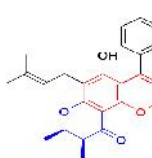
13

Acid calophylllic
H t, Lá [21]



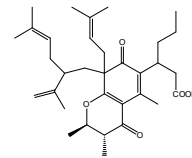
14

Acid iso-calophylllic
Lá [21]



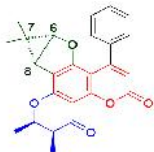
15

Calocoumarin A
Lá [63], [86]



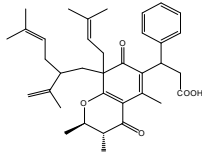
16

Inocalophyllin B
methyl ester
H t [38]



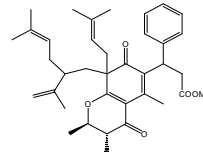
17

Calocoumarin C
Lá [63], [86]



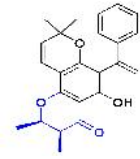
18

Inocalophyllin A
H t [38]



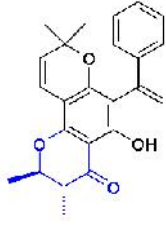
19

Inocalophyllin A
methyl ester
H t [38]



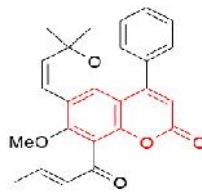
20

Iso-Inophynon
Lá [16]



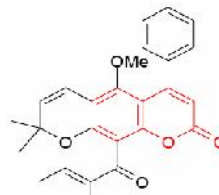
21

Inophynon
Lá [16]



22

Calophyllolid
H t, Lá
[43], [51], [96], [123]



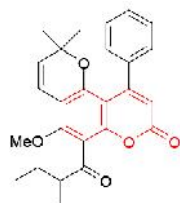
23

Apetalolid
H t, Lá [64]



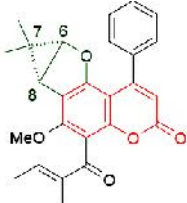
24

Calaustralin
H t [22]



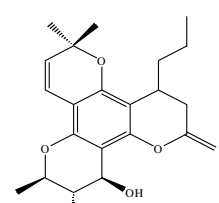
25

Ponnalid E
H t [98]



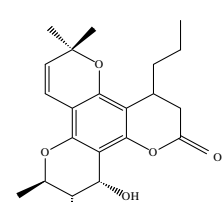
26

Calocoumarin B
Lá [63], [86]



27

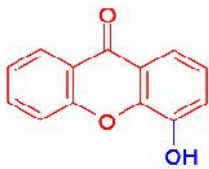
Calanolid A
Qu [31], [101]



28

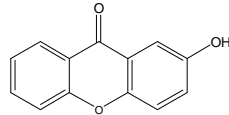
Calanolid B
Qu [31], [101]

Các xanthon ã bi t trong các b ph n khác nhau c a cây Mù u



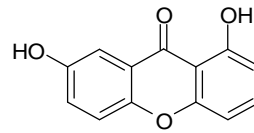
29

4-hydroxyxanthon
V r [39], [80]



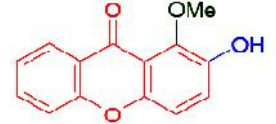
30

2-hydroxyxanthon
Cành con [49]



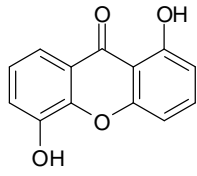
31

1,7-dihydroxyxanthon
(Euxanthon)
G [68], [99]



32

2-hydroxy-1-
methoxyxanthon
V r [80]



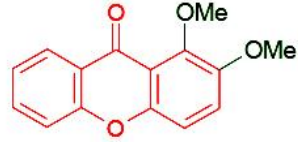
33

1,5-dihydroxyxanthon
V r [39], [79]



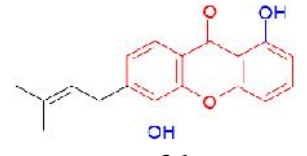
34

1-hydroxy-2-
methoxyxanthon
V r [80]



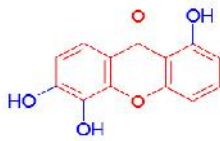
35

1,2-dimethoxyxanthon
V r [80]



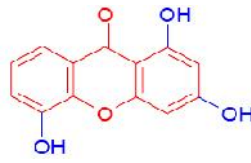
36

Calophyllin B
G [68], [69], [99]



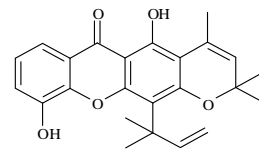
37

1,5,6-trihydroxyxanthon
(Mesuaxanthon B)
Lõi g [68], [99]



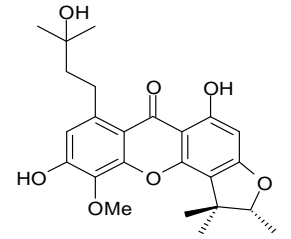
38

1,3,5-trihydroxyxanthon
R [79]



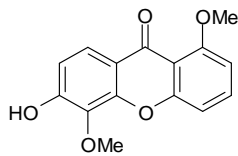
39

Inoaxanthon
V r [123]



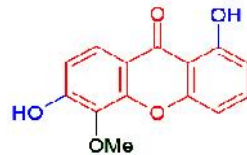
40

Caloxanthon N
Cành con [49]



41

6-hydroxy-1,5-
dimethoxyxanthon
R [81]



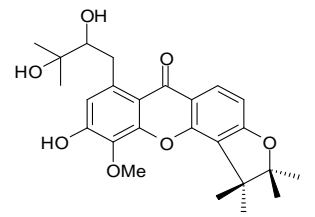
42

1,6-dihydroxy-5-
methoxyxanthon
(Buchanaxanthon)
R [79], [99]



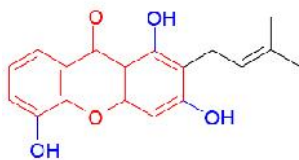
43

Caloxanthon C
V r [80]



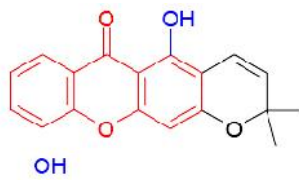
44

Caloxanthon O
Cành con [50]



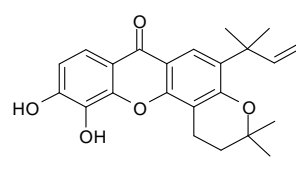
45

2-(3-methylbut-2-enyl)
1,3,5-trihydroxy xanthon
Lõi g [66]



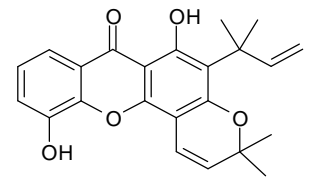
46

6-Deoxyjacareubin
Lõi g , v thân,
V r [36], [66], [80]



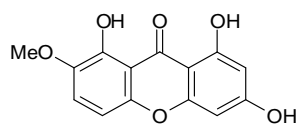
47

Inophyllin B
V r [40]



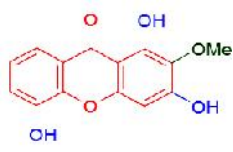
48

Inophyllin A
V r [54]



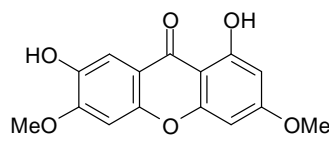
49

1,3,8-trihydroxy-7-methoxyxanthon
R [81]



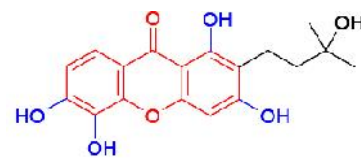
50

1,3,5-trihydroxy-2-methoxyxanthon
R [79], [81]



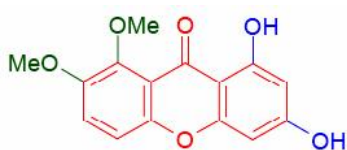
51

1,3-dihydroxy-7,8-dimethoxyxanthon
V r [80]



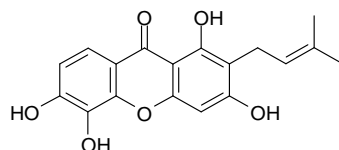
52

2-(3-hydroxy-3-methylbutyl)-1,3,5,6-tetrahydroxy
Lõi thân [88], [102]



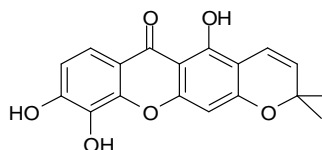
53

1,3-dihydroxy-7,8-dimethoxyxanthon
V r [80]



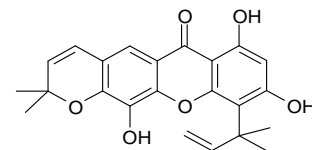
54

2-(3-methylbut-2-enyl)-1,3,5,6-tetrahydroxyxanthon
R [66], [81]



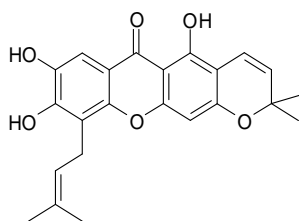
55

Jacareubin
R , lõi thân [88], [108], [66], [69], [81]



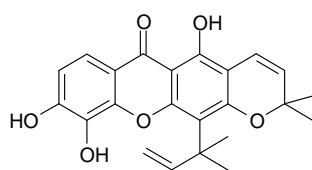
56

1,3,5-Trihydroxy-6,6'-dimethylpyrano (2',3':6,7)-4-(1,1-dimethylprop-2-enyl)-xanthon
Lõi thân [88]



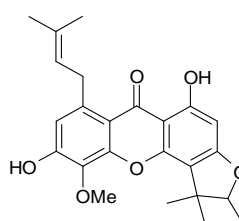
57

Caloxanthon A
V r [79]



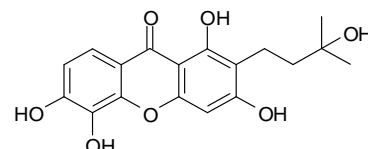
58

Macluraxanthon
V r [39], [79], [88]



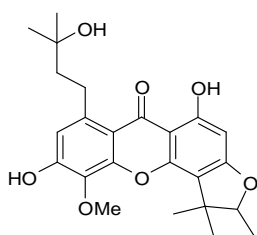
59

Caloxanthon B
V r [79]



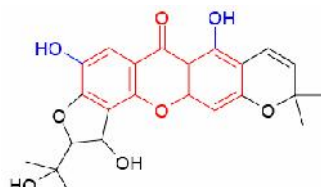
60

1,3,5,6-tetrahydroxy-2-(3-hydroxy-3-methylbutyl)xanthon
Lõi thân [88]



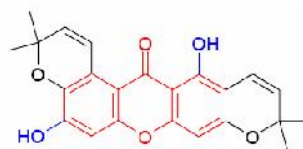
61

Caloxanthon M
R [39]



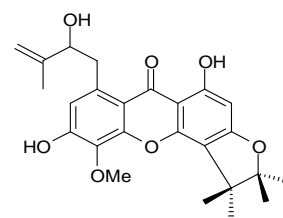
62

Caloxanthon D
V r [81]



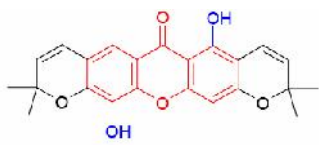
63

Brasilixanthon B
V thân [36]



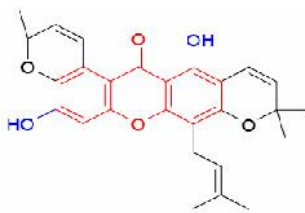
64

Caloxanthon P
Cành non [49]



65

Pyrano-jacareubin
V thân [36]



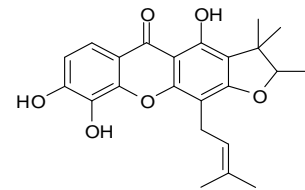
66

Calophynon
V thân [36]



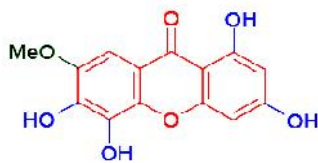
67

Caloxanthone I
V thân [36]



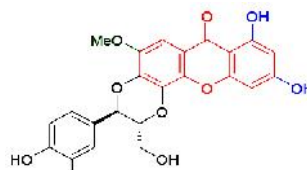
68

Gerontoxanthone C
Cành non [49]



69

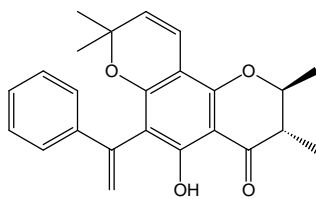
Caloxanthone E
V r [81]



70

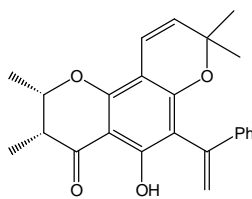
Calophyllumin C
R [64]

Các chromanon ã bi t trong các b ph n khác nhau c a cây Mù u



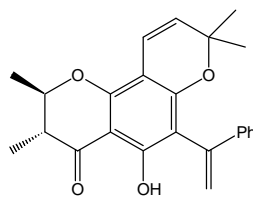
71

9-hydroxy-2,2,6,7-tetramethyl-2H-[1]-benzopyran-(1-phenylethylen-10-yl)-(3,2-b)-dihydropyran-4-one
Lá [13], [19]



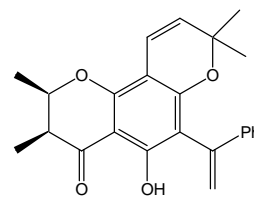
72

(2S, 3R)-2,3-dihydro-5-hydroxy-2,3,8,8-tetramethyl-6-(1-phenylethenyl)-4H,8H benzo [1,2-b: 3,4-b'] dipyrans-4-one
Lá [71]



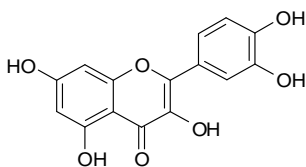
73

Inophynon ((2R, 3R)-2,3-dihydro-5-hydroxy-2,3,8,8-tetramethyl-6-(1-phenylethenyl)-4H,8H benzo [1,2-b: 3,4-b'] dipyrans-4-one
Lá [71]



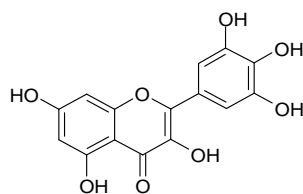
74

Isoinophynon
Lá [71]



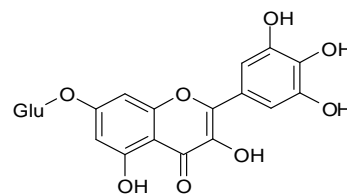
75

Quercetin
Hoa [71]



76

Myricetin
Hoa [71]



77

Myricetin-7-glucosid
Hoa [71]

1.1.3. Hoạt tính sinh học của các hợp chất phenol trong cây Mù u

1.1.3.1. Hoạt tính kháng virus

Trong quýt và dứa chiết xuất lá *Calophyllum inophyllum* đã phân lập hai coumarin có hoạt tính quan trọng chống lại sự phiên mã ngược của virus HIV là (+)-inophyllum B (**1**) và (+)-inophyllum P (**6**) [21]. Thử nghiệm *in vitro* các xanthon phân lập có cấu trúc: caloxanthon C (**43**) và pyrano-jacareubin (**65**) trên coronavirus cho thấy hoạt tính kháng virus với giá trị EC_{50} lần lượt là 3 và 15 $\mu\text{g/ml}$. Kết quả này cho thấy caloxanthon C (**43**) là chất có tiềm năng chống lại nhiễm coronavirus [71].

1.1.3.2. Hoạt tính kháng khuẩn, kháng nấm

Calophyllolid (**22**) có tác dụng ức chế toàn bộ sự tăng trưởng của *Mycobacterium tuberculosis* H₃₇Rv khi pha loãng nồng độ 1/20000 không có huyết thanh, và nồng độ 1/7500 với sự hiện diện của 5% huyết thanh. Acid calophyllic (**13**) có hoạt tính kém hơn nữa, ức chế toàn bộ sự tăng trưởng của vi khuẩn chấy rày nồng độ 1/7500 không có huyết thanh và 1/1000 có 5% huyết thanh [6]. Liều 20 $\mu\text{g/}$ đĩa, calophyllolid (**22**), inophyllum C (**9**) và E (**11**) thể hiện hoạt tính ức chế *Staphylococcus aureus* với đường kính vòng vô khuẩn lần lượt là 16, 10 và 13 mm (so với 30 mm của chất điều trị oxacillin), nhưng không có hoạt tính trên *Vibrio anguillarum*, *Escherichia coli*, nấm men và *Candida tropicalis* [123]. Inophynon (**21**) từ lá Mù u có hoạt tính kháng khuẩn cao với *Staphylococcus aureus*. Liều này lý giải cho tính chất sát trùng ghi nhận trên dứa ép hay cao lá Mù u dùng chữa trị vết thương [14], [15]. Ba xanthon phân lập từ *Calophyllum inophyllum* thể hiện hoạt tính kháng khuẩn trên nấm vi sinh vật khác nhau trong đó có *Staphylococcus aureus* theo thứ tự giảm dần là: 6-deoxyjacareubin (**46**), jacareubin (**55**) và calophyllin B (**36**) [69]. Caloxanthon A (**57**) có tác dụng kháng *Staphylococcus aureus* [123]. 1,5-dihydroxyxanthon có tác dụng kháng *Bacillus subtilis* [96], kháng *Mycobacterium smegmatis* [97], ức chế sự phát triển của *Cladosporium cucumerum* với MIC là 0,25 $\mu\text{g/ml}$ [24], ngoài ra còn có hoạt tính kháng *Staphylococcus aureus* với MIC là 200 $\mu\text{g/ml}$ [48]. Macluraxanthon (**58**) có

tác dụng kháng *Staphylococcus aureus* và *Bacillus subtilis* [24]. 1,5-dihydroxyxanthone (**33**) thể hiện tác dụng kháng nấm *Aspergillus fumigatus* [25]. *Candida albicans*, *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus flavus* và *Aspergillus niger* bị ức chế bởi 1,3,5-trihydroxy-2-methoxyxanthone (**50**) [24].

1.1.3.3. Hoạt tính kháng viêm

Thí nghiệm tác dụng kháng viêm của calophyllolide (**22**) chỉ thực hiện trên chuột *Calophyllum inophyllum* với liều 140 mg/kg trên chuột lang ($LD_{50} = 2,5$ g/kg) cho kết quả tương đương hydrocortisone liều 10 mg/kg. Nấm xanthone gồm: jacareubin (**55**), calophyllin B (**36**), 6-deoxyjacareubin (**46**), mesuaxanthone B (**37**) và euxanthone (**31**) phân lập từ *Calophyllum inophyllum* thể hiện tác dụng kháng viêm cũng như có các tác dụng khác nhau trên hệ thần kinh trung ương [68].

1.1.3.4. Hoạt tính chống ung thư

Calophyllolide (**22**) có hoạt tính ức chế elastase mạnh nhất ($IC_{50} = 8,4$ μ M) trong số các coumarin thí nghiệm phân lập từ nhà tách loài từ đảo Moorea Polynesia thuộc Pháp [101]. Các coumarin phân lập từ *Calophyllum inophyllum* L. Clusiaceae gồm inophyllum A (**3**), D (**5**), E (**11**), calocoumarin A (**15**), B (**26**), calophyllolide (**22**), apetalolide (**23**), acid isocalophyllin (**14**) có hoạt tính ức chế Epstein-Barr Virus (EBV) mà không gây độc tính tế bào, trong số đó calocoumarin A (**15**) có tác dụng mạnh mẽ nhất có thể do mạch nhánh prenyl trong cấu trúc. Calocoumarin A (**15**) cũng có tác dụng ức chế tăng sinh trên mô hình thực bào tế bào da chuột trong thí nghiệm chuyển sinh ung thư giai đoạn *in vivo* [62], [71], [86]. 4-hydroxyxanthone (**29**) ức chế phát triển dòng tế bào ung thư gan và tác dụng trên sự tăng sinh tế bào lympho gan *in vitro* [34].

1.1.3.5. Hoạt tính chống cá

Các inophyllum A (**3**), B (**1**), C (**9**), D (**5**), E (**11**) chỉ thực hiện trên cá *Calophyllum inophyllum* có hoạt tính trên cá *Oryzias latipes* mạnh nhất là inophyllum C (**9**) và inophyllum E (**11**) do có 2 nhóm ceton. Inophyllum A (**3**), B (**1**), D (**5**) có hoạt tính với cá trung bình trong đó inophyllum B (**1**) có cấu trúc *trans* vòng chromanol cho hoạt tính cao nhất [91], [92].

1.1.3.6. Hoạt tính kháng m t và ch t trung gian c a c th

M t s xanthon chi t c t qu *Calophyllum inophyllum* nh jacareubin (**55**), 6-deoxyjacareubin (**46**), macluraxanthon (**58**) có kh n ng c ch m t s th th màng t bào vi sinh v t, có tác d ng i kháng quan tr ng (63 -87%) trên 1-alkyl-2-acetyl-glycero-3-phosphocholin (y u t ho t hóa ti u c u), m t ch t trung gian hóa h c c a vi sinh v t liên quan t i m t s áp ng sinh lý và trong m t vài b nh nh viêm, d ng, hen suy n, các th i tr trong c y ghép t ng...[66].

1.1.3.7. Hoạt tính giãn m ch và ch ng oxy hóa

4-hydroxyxanthon (**29**) có tác d ng giãn m ch và ch ng oxy hóa tuy 2 ho t tính này không t ng quan v i nhau [30].

1.2. S L C V H P CH T PHENOL

1.2.1. nh ngh a

Là nh ng h p ch t có m t ho c nhi u nhóm hydroxyl g n tr c ti p vào vòng th m. Phenol là h p ch t phenol n gi n nh t. Polyphenol là h p ch t có trên m t nhóm hydroxyl g n vào m t hay nhi u vòng benzen. H p ch t phenol trong th c v t th ng d ng ester hay glycosid [74], [106].

1.2.2. Phân lo i

Harborne ã phân lo i các h p ch t phenol thành các nhóm d a trên s carbon trong phân t nh trình bày trong b ng d i ây (B ng 1.1.) [74], [106].

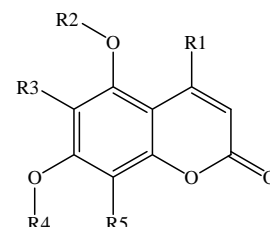
B ng 1.1. Phân lo i các h p ch t phenol theo Harborne

S carbon	Khung c b n	Nhóm
6	C ₆	H p ch t phenol n gi n, benzoquinon
7	C ₆ -C ₁	Acid phenolic
8	C ₆ -C ₂	Acetophenon và acid phenylacetic
9	C ₆ -C ₃	Phenylpropanoid, acid hydroxycinnamic, chromon, coumarin, isocoumarin
10	C ₆ -C ₄	Naphthoquinon
13	C ₆ -C ₁ -C ₆	Xanthonoid
14	C ₆ -C ₁ -C ₆	Stilbenoid
14	(C ₆ -C ₁) ₂	Anthranoid
15	C ₆ -C ₃ -C ₆	Euflavonoid, isoflavonoid, neoflavonoid
16	C ₆ -C ₄ -C ₆	Homoflavonoid
30	(C ₆ -C ₃ -C ₆) ₂	Biflavonoid
18	(C ₆ -C ₃) ₂	Lignan, neolignan
n	(C ₆ -C ₃) _n	Lignin
	(C ₆ -C ₃ -C ₆) _n	Flavolan (tannin ng ng t)

1.2.3. Các hợp chất phenol trong họ chi *Calophyllum*

1.2.3.1. Coumarin

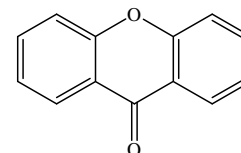
Coumarin thuộc nhóm phenylpropanoid bao gồm các hợp chất phenol tự nhiên có nhân thơm gắn vào mạch nhánh 3 carbon. Các coumarin thuộc chi *Calophyllum* có cấu trúc cơ bản như hình bên với R_1 có thể là nhóm: phenyl, methyl hoặc n-propyl. Nếu R_1 là nhóm phenyl thì gọi là neo-flavonoid [75], [100], [106].



Các coumarin sẽ phân loại và xác định cấu trúc trong vài thập niên trở lại đây là các pyranocoumarin, furocoumarin, furo-pyranocoumarin, các coumarin ngưng tụ [71].

1.2.3.2. Xanthon

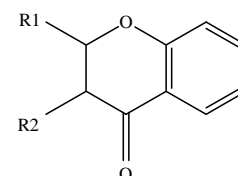
Thành phần hóa học của chi *Calophyllum* có nhiều dẫn xuất xanthon là các hợp chất phenol thơm có màu vàng và có cấu trúc cơ bản như hình bên.



Có thể xếp loại xanthon phân loại *Calophyllum inophyllum* theo số lượng nhóm thế chứa oxy trên cấu trúc cơ bản như: xanthon 1 oxy, 2 oxy, 3 oxy... [100], [106], [75]. Các nhóm thế có thể là OH, OMe, isoprenyl, COOMe [71].

1.2.3.3. Chromanon

Ngoài coumarin và neo-flavonoid, xanthon, còn có các flavonoid, biflavonoid và một số loài như *inophyllum* và *tomentosum* còn có các dẫn xuất chromanon có cấu trúc cơ bản như hình bên [71], [100].



1.2.4. Một số phương pháp chiết xuất hợp chất phenol [33]

1.2.4.1. Phương pháp chiết lỏng-lỏng

Các yếu tố góp phần vào hiệu suất của chiết bằng dung môi là: loại dung môi, pH, nhiệt độ, số lần và thể tích dung môi.

- Bản chất của dung môi: dung môi sử dụng rẻ nhất chiết hợp chất phenol là methanol và hỗn hợp methanol/nước. Các dung môi khác như acetone, ethyl acetate và hỗn hợp thích hợp cho hiệu suất thấp hơn.
- pH của môi trường chiết xuất: pH xác định mức hòa tan của chất tan và nồng độ hòa tan có thể có của phần có thể thủy phân được.

- Nhiệt độ: nhiệt độ cao làm gia tăng hệ số tan và khuếch tán của các chất trong chiết và làm giảm nhớt của dung môi. Tuy nhiên, nhiệt độ cao quá có thể làm thoái biến các hợp chất phenol.
- Số bước chiết xuất và thể tích dung môi. Hiệu suất chiết gia tăng theo số bước chiết. Ví dụ chiết bằng 50 ml dung môi x 4 lần cho hiệu suất cao hơn chiết 1 lần x 200 ml dung môi. Chiết nhỏ lượng cho hiệu suất cao nhất với 3-5 lần chiết tuần.

1.2.4.2. Phương pháp chiết rắn-lỏng

Phương pháp chiết lỏng dưới áp suất (PLE)

Kỹ thuật chiết lỏng dưới áp suất tức là chiết bằng dung môi áp suất và nhiệt độ cao mà không mất đi những thành phần của chúng. Kỹ thuật này có nhiều tên gọi khác nhau như: chiết dung môi gia tốc (Accelerated Solvent Extraction-ASE), chiết lỏng dưới áp suất (Pressurized Fluid Extraction-PFE; Pressurized Liquid Extraction-PLE), chiết dung môi nóng áp suất cao (Pressurized Hot Solvent Extraction-PHSE), chiết dung môi áp suất cao (High-Pressure Solvent Extraction-HPSE), chiết dung môi nhiệt độ cao, áp suất cao (High-Pressure, High Temperature Solvent Extraction-HPHTSE), chiết dung môi siêu tới hạn (Supercritical Solvent Extraction-SSE). Tuy có nhiều tên gọi nhưng kỹ thuật chiết lỏng dưới áp suất (Pressurized Liquid Extraction-PLE) được chấp nhận rộng rãi nhất. Từ những năm 2000 phương pháp PLE bắt đầu được áp dụng chiết các hợp chất phenol. Trong phương pháp này, dùng nhiệt độ và áp suất cao gia tốc cho quá trình chiết. Áp suất làm tăng tiếp xúc giữa dịch chiết và mẫu trong khi nhiệt độ cao phá vỡ các liên kết trong matrix phenol. Dung môi nóng làm biến tính tế bào do làm đông lipoprotein làm cho sự thẩm thấu của thành tế bào ngày càng ít chênh lệch. Qua sự làm nóng lên, thể tích pha lỏng ngậm nước tăng do áp suất gây ra sự tuần hoàn lý tâm của các dung dịch qua các lỗ [110].

Phương pháp này thích hợp chiết trong khí quyển tránh ánh sáng cho hiệu suất cao vì các hợp chất phenol kém bền trong môi trường có oxy và ánh sáng.

1.3. TÌNH HÌNH NGHIÊN CỨU VỀ HỢP CHẤT PHENOL TỰ NHIÊN

1.3.1. Một số công trình nghiên cứu xác định hợp chất phenol

Ngoài nước

Năm 2003, Shen và cộng sự chỉ trích t hợp chất tự nhiên từ rễ cây Mù u ở vùng núi phía bắc tỉnh Hồ Bắc, Trung Quốc. Sau khi chiết xuất bằng dung môi, hòa tan trong nước và lọc với EtOAc rồi cô đặc để áp suất giảm thì thu được chất rắn màu trắng. Tiềm hành sắc ký cột silica gel, rửa giải bằng hỗn hợp n-hexan-EtOAc với phân cực tăng dần thu được 8 phân đoạn. Hai phân đoạn trong số đó tiếp tục phân tách qua cột silica gel, rửa giải bằng hỗn hợp n-hexan-CHCl₃-MeOH với các tỷ lệ khác nhau phân lập được inocalophyllin A (**18**), B (**12**). Một phân đoạn khác emulsify trên silica gel, rửa giải bằng hỗn hợp n-hexan-aceton thay thế tiếp thu được 3 phân đoạn. Dùng sắc ký lớp mỏng để tách tiếp 3 phân đoạn này thành inocalophyllin A, B methyl ester (**18**, **16**) và calophyllolid (**22**). Các tác giả tiếp tục methyl hóa inocalophyllin A, B methyl ester (**18**, **16**) bằng diazomethan thu được inocalophyllin A, B dimethylat [38].

Trong một công trình khác vào năm 2004, Yimdjoo và cộng sự đã chỉ trích t hợp chất tự nhiên từ rễ cây Mù u ở vùng núi phía bắc tỉnh Hồ Bắc, Trung Quốc bằng phương pháp chiết xuất bằng hỗn hợp CH₂Cl₂-MeOH (1:1), chiết xuất bằng dung môi để áp suất giảm rồi tiến hành phân lập trên cột silica gel, rửa giải bằng hỗn hợp n-hexan-EtOAc với phân cực tăng dần thu được 6 phân đoạn. Một phân đoạn trong số đó emulsify trên cột silica gel, rửa giải bằng hỗn hợp n-hexan-EtOAc thu được một chất rắn, emulsify tinh khiết và xác định là calophyllolid (**22**) bằng phản ứng màu trắng. Ngoài ra còn thu được calaustralin (**24**), inophyllum C (**9**), E (**11**) [123].

Gần đây nhất, vào năm 2009, Leu và cộng sự đã phân lập trong nhà tách lỏng từ rễ cây Mù u ở Polynesia thu được 16 coumarin thuộc dòng inophyllum bao gồm calophyllolid (**22**), dòng calanolid, dòng inocalophyllin và tamanolid. Tuy nhiên, chi tiết của quá trình chiết tách không được công bố [101].

Trong nước

Tên hợp chất Mù u đã phân lập, trong phòng thí nghiệm và trong sản xuất pilot, áp dụng nguyên tắc tổng hợp vòng lacton bằng acid và kim loại thay thế tan trong nước

coumarin, r i dùng dung môi h u c thích h p chi t xu t ã thu c 0,15% c n coumarin.

T nhân h t ã ép d u b ng cách chuy n qua các lo i dung môi: benzen, ether d u h a, methanol, ng i ta c ng ã thu c 1,5% c n coumarin.

N m 2002, Tr n Thanh Th o và c ng s ã áp d ng ph ng pháp Spath chi t xu t coumarin. D a vào nguyên t c coumarin tan trong n c khi m vòng lacton môi tr ng ki m và tan trong dung môi h u c kém phân c c khi óng vòng lacton môi tr ng acid, tác gi ã ki m hóa b ng NaHCO_3 r i acid hóa b ng dung d ch HCl 10% thu c c n coumarin. Dùng k thu t s c ký c t áp su t gi m v i pha t nh là silica gel 60H, các dung môi nh : n-hexan, cyclohexan, benzen, ethyl acetat và methanol theo nguyên t c t ng d n phân c c phân l p calophyllolid (22) [5].

1.3.2. Thành ph n hóa h c c a h t Mù u

T n m 1985, các nghiên c u v Mù u t i Khoa D c – i h c Y D c TP. H Chí Minh cho bi t: h t Mù u ch a 41 - 51% d u thô, trong d u thô có 71,5% d u béo và 28,5% ch t nh a. Ho t ch t chính trong h t Mù u thu c nhóm 4-phenylcoumarin. Thành ph n coumarin c a nhân h t Mù u so sánh v i nhân h t ã lo i d u b ng ph ng pháp ép (bã h t) g m 9 v t trên s c ký l p m ng, ã phân l p c 4 h p ch t coumarin t tên là A2, A3, A4, A9 và 2 h p ch t không cho ph n ng v i thu c th c a coumarin. Thành ph n coumarin trong d u Mù u tinh ch t ng t nh trong nh a d ph m g m 8 v t trên s c ký l p m ng, ã phân l p c 4 h p ch t coumarin t tên là A, D, E, F và h p ch t X không cho ph n ng v i thu c th c a coumarin. Các tác gi ã s b k t lu n ó là các coumarin thu c nhóm 4-phenyl coumarin mà các tài li u khác ã c p n [3],[4].

Hàm l ng coumarin chi t xu t c xác nh b ng ph ng pháp kh i l ng: trong d u Mù u thô là 0,77%, trong Mù u d u tinh ch là 0,50%, trong nh a d ph m là 0,15%, trong bã h t ã lo i d u b ng ph ng pháp ép t 1,75 - 2,13% [4].

1.3.3. Tác động dược lý của dầu Mù u [4]

Năm 2000, các nghiên cứu về tính kháng khuẩn, kháng nấm, kháng viêm do các nhà khoa học tại Khoa Dược, Đại học Y-Dược TP.HCM thực hiện cho biết: so sánh dầu Mù u thô, dầu Mù u tinh chế và thuốc BALSINO thì dầu Mù u tinh chế tác động kém hơn dầu Mù u thô. Thuốc BALSINO chỉ chứa 61% dầu mù u tinh chế pha thêm 1,3% tersol vào cho tác dụng tương đương với dầu Mù u tinh chế. Tuy nhiên khi nghiên cứu tác động làm lành sẹo và tác động kháng viêm trên mô hình gây bỏng thực nghiệm thì dầu Mù u tinh chế tốt hơn dầu Mù u thô.

Nghiên cứu chất lượng MIC (~g/ml) của dầu Mù u

	D u Mù u thô	D u Mù u tinh ch	BALSINO
<i>Streptococcus faecalis</i>	64	128	128
<i>Streptococcus aureus</i>	32	64	64
MRSA	64	128	128

Dầu Mù u có tính kháng nấm và kháng khuẩn mạnh trên vi khuẩn Gram (+), yếu hơn với vi khuẩn Gram (-).

phân bố của dầu Mù u và tác động của nó trên vi khuẩn, nấm

	Vi khuẩn Gram (+)	Vi khuẩn Gram (-)	<i>Microsporium canis</i>	<i>Trichophyton rubrum</i>	<i>Epidermophyton floccosum</i>
phân bố	1/5000	1/4	1/100	1/100	1/200

1.3.4. Tiêu chuẩn hóa dầu Mù u và thành phần

Theo chuyên luận Dược Mù u của Dược điển Việt Nam IV: Dầu Mù u là dầu ép từ hạt của cây Mù u (*Calophyllum inophyllum* L.) họ Bala (Clusiaceae) có tính chất lợi khuẩn "nhả". Các chỉ tiêu kiểm nghiệm bao gồm: mô tả, trọng lượng, chỉ số acid, chỉ số xà phòng hóa, hàm lượng phenol và coumarin bằng phương pháp hóa học và sắc ký lớp mỏng để xác định dầu Mù u chuẩn [1]. Các dược điển: Hoa Kỳ 2012, châu Âu 7.0, Nhật 2006, Quốc tế 4, Trung Quốc 2010 đều chưa thấy có chuyên luận về các bộ phận dùng công nghệ thu hái dược liệu Mù u.

Một số chủng phẩm vi nguyên liệu là dầu Mù u như: “Dầu Mù u” của công ty cổ phần dầu Minh Hải, thuốc m “Trên Mù u” của công ty cổ phần dầu Minh Quang Minh, chủng phẩm “Dầu Mù u Inopilo” của Công ty trách nhiệm hữu hạn Thành Mỹ và sản xuất Dầu phẩm Bình Minh, chủng phẩm “Dầu Mù u SP” của Công ty trách nhiệm hữu hạn Dầu phẩm Phương Nam, thuốc m Dầu Mù u K9 của các sản xuất thuốc công nghiệp Cù Long... đã có tiêu chuẩn các sinh học không cao hơn tiêu chuẩn dầu Việt Nam IV.

1.4. M T S PH NG PHÁP PHÂN TÍCH H P CH T PHENOL T MÙ U

1.4.1. Phương pháp sắc ký

nh tính xanthon bằng phương pháp sắc ký lớp mỏng: [37], [75], [111].

Nhiệt độ khô sát 60 h dung môi trên chất hấp phụ là silica gel 25 ± 2 °C. Kiểm tra chất lượng các hệ dung môi khai triển thí nghiệm:

- Cloroform - acid acetic (4:1); (90:10); (85:15); (80:20)
- Cloroform - benzen (7:3)
- Cloroform - ethyl acetat (các tỷ lệ khác nhau)
- Cloroform

Phát hiện bằng màu sắc các vết dưới ánh sáng tử ngoại vì hydrocortison không có amoniac hoặc bằng cách phun thuốc thử để phát hiện phenol.

Giá trị R_f tăng khi tăng phân cực của hệ dung môi triển khai. Khuyến cáo không dùng các hệ dung môi có trên 60% dung môi phân cực (như ethyl acetat, acetone và methanol) vì giá trị R_f quá cao. Giá trị R_f thấp cho vị trí nhóm hydroxyl, thấp hơn vị trí nhóm methyl. Nếu xanthon dạng glycosid thì sẽ không di chuyển vì các hệ dung môi cho aglycon.

Năm 1975, Chawla và cộng sự đã công bố công trình khai thác hiệu suất phân tích trên giá trị R_f và đã thu được kết quả phân tách và nhận danh một số hydroxyxanthon.

Bên trong ống nghiệm (15 x 20 x 0,3 mm) phủ silica gel vào bình sắc ký hình chữ nhật chứa dung dịch nitrobenzen 2%/benzen trong 14 giờ, sau đó khô trong

bình hút m tr c khi s d ng. Ch m các dung d ch trong methanol (0,1 ml) c a t ng hydroxyxanthon và h n h p c a chúng (1 mg/ml) t i i m xu t phát b ng ng mao qu n. S y khô và tri n khai b ng h dung môi: benzene – xylem - ethyl format - acid formic (15:35:40:10) trong bình bão hòa 30 phút. Phát hi n v t b ng cách h h i iod, dung d ch s t (III) clorid trong c n và dung d ch acid sulfuric 15%.

Xác nh xanthon b ng ph ng pháp s c ký khí

N m 1971, Jefferson và c ng s ã phân tích 1,5-dihydroxyxanthon b ng ph ng pháp s c ký khí trên m u ch a x lý, m u t o d n su t methoxy và trimethylsilyl hóa. Máy s c ký khí Varian 1400 v i u dò ion hóa ng n l a, c t thép không g hình xo n c, ng kính ngoài 3,175 mm, dài 2,438 m. Pha t nh là silicon SE-30 2% t m trên Chromosorb W. K t qu cho th y nhi t th p, pic c a các d n xu t methoxy và trimethylsilyl hóa cân i h n so v i m u không t o d n su t [90].

Xác nh coumarin b ng ph ng pháp s c ký l ng hi u n ng cao

Frederic và c ng s ã dùng c t silica (Uptisphere), l s p 120 A°, h t 5 µm, kích th c 250 mm x 4,6 mm tách các coumarin khác nhau có trong cao lá Mù u *Calophyllum inophyllum* b ng h th ng HPLC tiêm m u t ng v i u dò UV-DAD, phát hi n b c sóng 360 nm. T c dòng 1 ml/phút. Ch ng trình dung môi: i-propanol-i-octan t 1-20% (tt/tt) trong 25 phút, t 20/80 (tt/tt) trong 25 phút, sau ó cân b ng trong 15 phút. Th i gian l u c a các ch t l n l t là calophyllolid 21,3 phút; inophyllum B 23,9 phút; inophyllum P 24,5 phút; inophyllum G1 25,6 phút; inophyllum G2 26,7 phút; inophyllum C 31,4 phút. nh danh các pic b ng cách so sánh v i ph UV c a các phân t tinh khi t ã bi t phân tích trong cùng i u ki n s c ký. nh l ng b ng cách s d ng n v di n tích AU c a các pic t ng ng 360 nm [23].

Xác nh coumarin b ng ph ng pháp s c ký khí

N m 1972, Games ã công b công trình phân tích các d n ch t 4-phenyl coumarin bao g m calophyllolid trong *Calophyllum inophyllum* b ng GC/MS dùng c t nh i OV 1 3% ho c OV 17 3% trên Gas Chrom Q ghép ph kh i b ng th y tinh thông qua b tách 2 thì Watson-Biemann. K t qu th c nghi m cho th y pic c b n úng

bằng phân tử khối của chất calophyllolid là 416 từ 15 tới 401 và có số hiên diện của 2 mảnh ion tại m/z 55 và 83 [64].

1.4.2. Phương pháp phân tích

phân tích xanthon bằng phương pháp quang phổ hấp thụ tia UV và khối lượng

Xanthon có các bước sóng hấp thụ riêng biệt tại các bước sóng 230-245, 250-265, 305-330 và 340-400 nm. Phương pháp chuyển dịch bathochromic trong kiềm, nhôm clorid và acid natri acetat-boric, chuyển dịch này thay đổi tùy theo số và vị trí các nhóm thế hydroxyl [75].

phân tích coumarin bằng phương pháp quang phổ hấp thụ tia UV và khối lượng

Coumarin có hai dải chính trong khoảng 310-315 nm và 220-230 nm và thêm vào đó 1 hay 2 bước sóng hấp thụ có thể chuyển thành vai (Goodwin và Pollock, 1954). Huỳnh quang màu xanh lá hay xanh lam quan sát thấy dưới đèn UV khi coumarin phân giải trong môi trường kiềm và sau khi xử lý với dung dịch amoniac.

Các thuốc thử bao gồm: (1) dung dịch sắt III clorid 1-2% trong methanol; (2) thuốc thử Pauly (acid sulfanilic diazo hóa); (3) thuốc thử Gepfner (dung dịch natri nitrit 1% và acid acetic 10%); (4) thuốc thử Millon [109].

phân tích xanthon bằng phương pháp phổ cộng hưởng từ hạt nhân

Philip và cộng sự đã ghi phổ ^{13}C -NMR của 36 xanthon tìm thấy trong tự nhiên. Chuyển dịch hóa học của các xanthon có thể dự đoán các bằng chứng như hình ảnh giá trị của xanthon riêng hay nói cách khác có thể xác định cấu trúc của một xanthon chưa biết bằng ^{13}C -NMR [72].

1.5. M T S KHÁI NI M V CH T CHU N I CHI U

Theo hướng dẫn của cơ quan Dược phẩm châu Âu (EMA) và tiêu chuẩn chung của ngành thuốc dược liệu ban hành năm 2006, các chỉ tiêu trong tiêu chuẩn chung của ngành thuốc dược liệu bao gồm: cảm quan, phân tích, nước, tạp chất (dung môi tồn dư, vô cơ, kim loại nặng, vi sinh vật và nấm, thuốc trừ sâu...) và nhãn. Trong đó phép phân tích bằng phương pháp sắc ký chromatography lỏng không chỉ công nhận là chính mà còn phải dùng các kỹ thuật ghép nối như HPLC-DAD, LC-MS, GC-MS. Cần có phương pháp chuyên biệt nhằm kiểm soát các

chất có tác dụng trừ nhiễm khuẩn hoặc các chất i m ch [57]. Theo EMEA, ph i nh tính và nh l ng thành ph n có ho t tính trong nguyên li u và ch ph m t d c li u [56]. Trong 2 th p k qua, các k thu t s c ký ghép kh i ph nh m thu c thông tin v c u trúc ch t phân tích tr thành ph ng pháp quan tr ng nh t nh danh các ch t ã bi t ho c ch a bi t. Các k thu t này bao g m s c ký khí mao qu n hay s c ký l ng v i u dò DAD ho c ph kh i (HPLC-DAD, GC-MS và LC-MS) là các ph ng pháp a thích phân tích thu c t d c li u [35].

1.5.1. M t s nh ngh a v ch t chu n i chi u

Ch t chu n i chi u hóa h c chính [120]

M t ch t chu n i chi u hóa h c chính c th a nh n r ng rãi là có ch t l ng thích h p trong m t b i c nh c th và giá tr c a nó c ch p nh n mà không d a vào s so sánh v i m t ch t hóa h c khác.

Ch t chu n i chi u d c i n M [116]

Là các ch t ch n l a do có tinh khi t cao, có các c tính o l ng c và thích h p cho m c ích d ki n.

Ch t i chi u hóa h c D c i n châu Âu [120]

M t ch t hay h n h p các ch t d ki n s d ng nh nói rõ trong chuyên lu n ho c chuyên lu n chung c a D c i n châu Âu. ây là các chu n chính, ngo i tr m t s ch t, nh t là kháng sinh tính theo n v qu c t là chu n th c p n i t chu n qu c t .

Ch t i chi u theo c quan Th c-D c ph m Hoa k [61]

M t m hay lô thu c c i u ch c bi t, ho c là b ng cách t ng h p c l p ho c b ng cách tinh ch nguyên li u s n xu t và b ng m t t p h p các phép phân tích sâu r ng cho th y là m t ch t áng tin c y có tinh khi t cao nh t có th t n m t cách h p lý. Chu n này th ng dùng gi i thích c u trúc và dùng làm chu n liên k t thi t l p chu n làm vi c.

Ch t i chi u theo ICH-Q6A [58]

Chu n i chi u hay ch t i chi u là ch t c i u ch có ch t l ng thích h p dùng làm chu n trong nh tính, nh l ng và th tinh khi t. Ch t chu n i

chỉ u là d c ch t m i dùng trong nh l ng thì t p ch t ph i c nh danh và theo dõi hàm l ng.

Ch t chu n i chi u hóa h c th m tra theo D c i n Hoa k v d c li u [42]

Chu n i chi u hóa h c th m tra theo D c i n Hoa k v d c li u trình bày chính xác m c tinh khi t, ph ng pháp ho c ph ng ti n ánh giá tinh khi t. Chu n này c ng c th m tra m t cách c l p v nh danh m c tinh khi t.

Ch t i m ch

C quan D c ph m châu Âu (EMA) nh ngh a ch t i m ch là các thành ph n hay nhóm các thành ph n hóa h c c a d c li u hay thu c t d c li u c quan tâm s d ng cho m c ích ki m tra ch t l ng b t k chúng có tác d ng tr li u hay không [59].

L a ch n các ch t i m ch [73]

Theo EMA có 2 lo i ch t i m ch : *ch t i m ch phân tích* là ch t ho c nhóm ch t ch ph c v cho m c ích phân tích còn *ch t i m ch có ho t tính* là ch t ho c nhóm ch t c th a nh n có óng góp vào tác d ng i u tr .

Srinivasan ngh 4 lo i ch t i chi u sau: ho t ch t, ch t i m ch có ho t tính, ch t i m ch phân tích và ch t i m ch c m oán. Ho t ch t là ch t có các tác d ng lâm sàng rõ ràng; ch t i m ch có ho t tính là ch t có óng góp vào hi u l c lâm sàng; ch t i m ch phân tích không có tác d ng lâm sàng hay d c lý; ch t i m ch c m oán bi u th tính gây d ng ho c gây c. T t c các ch t i m ch trên có th góp ph n vào vi c l ng giá, tiêu chu n hóa và ánh giá an toàn thu c có ngu ng c d c li u.

Lin và c ng s m r ng s phân lo i c a Srinivasan thành 7 lo i bao g m: ho t ch t, ch t i m ch có ho t tính, ch t i m ch nhóm, d u v n tay hóa h c, ch t i m ch phân tích, ch t i m ch “m” và ch t i m ch c m oán.

Ch t i m ch nhóm có c u trúc hóa h c và/ho c lý tính t ng t . Ho t tính d c lý c a chúng không nh t thi t c bi t, thí d các polysaccharid. Lo i ch t i chi u

này không nhất thiết chuyên biệt và có thể dàng bắt gặp ở các thành phần khác của biệt là trong các biệt danh. Các từ chỉ u “ma” là các thành phần có tác động đặc lý ã biệt; tuy vậy, có thể không phát hiện được chúng trong một số thực thể do có hàm lượng thấp. Các từ mà chức năng là các tính hoặc gây động khi nhìn cho thấy nhìn đi nữa chúng là không mong muốn và cần có gì đó nghiêm ngặt về hàm lượng [115].

Songlin Li và cộng sự xuất chia các từ chỉ u hóa học thành 8 loại: (1) các từ có tác động trực tiếp, (2) các từ có hoạt tính sinh học, (3) các từ ngẫu nhiên, (4) các từ cấu trúc, (5) các từ chính, (6) các từ tổng hợp, (7) các từ có tính, (8) các từ phụ biến dùng chung với phần đầu vần tay.

Các từ có tác động trực tiếp

Các từ này có tác động trực tiếp trong thực nghiệm đặc biệt và có thể dùng như từ chỉ u hóa học cho tính và nhúng.

Các từ có hoạt tính sinh học

Là các từ có cấu trúc khác nhau trong thực thể đặc biệt; từng thành phần có thể không có tác động trực tiếp nhưng kết hợp các từ này sẽ góp phần vào hiệu quả trực tiếp. Các từ có hoạt tính sinh học này có thể dùng làm từ chỉ u trong tính và nhúng.

Các từ ngẫu nhiên

Các từ này không góp phần vào hiệu quả trực tiếp hoặc tác động sinh học có liên quan một cách trực tiếp. Tuy nhiên, chúng tác động gián tiếp làm tăng cường hoạt tính sinh học các thành phần khác, do đó hiệu quả của hiệu quả trực tiếp đặc biệt. Các từ ngẫu nhiên dùng làm từ chỉ u trong tính, nhúng.

Các từ cấu trúc

Các từ này có thể đóng góp vào hiệu quả trực tiếp và chúng phụ thuộc biệt và/hoặc là các từ đáng chú ý trong thực thể đặc biệt.

Các từ chính

Là các từ có hàm lượng cao nhất trong thực thể đặc biệt (hoặc hàm lượng cao hơn đáng kể so với các thành phần khác). Các từ này không phải là các từ cấu

trng và ho t tính sinh h c c a chúng có th ch a c bi t. Các ch t chính này có th dùng nh tính và nh l ng thu c t đ c li u nh t là khi phân bi t và ánh giá n nh.

Các ch t t ng t

Các ch t t ng t trong thu c t đ c li u có m i liên quan g n nhau. Thí d các ch t này có th là ti n ch t, s n ph m ho c ch t chuy n hóa c a ph n ng thu c enzym ho c hóa h c. Các ch t t ng t có th dùng làm ch t i chi u ánh giá ch t l ng thu c t đ c li u có ngu n g c t các vùng a lý khác nhau và b o qu n trong th i gian khác nhau.

Các ch t có c tính

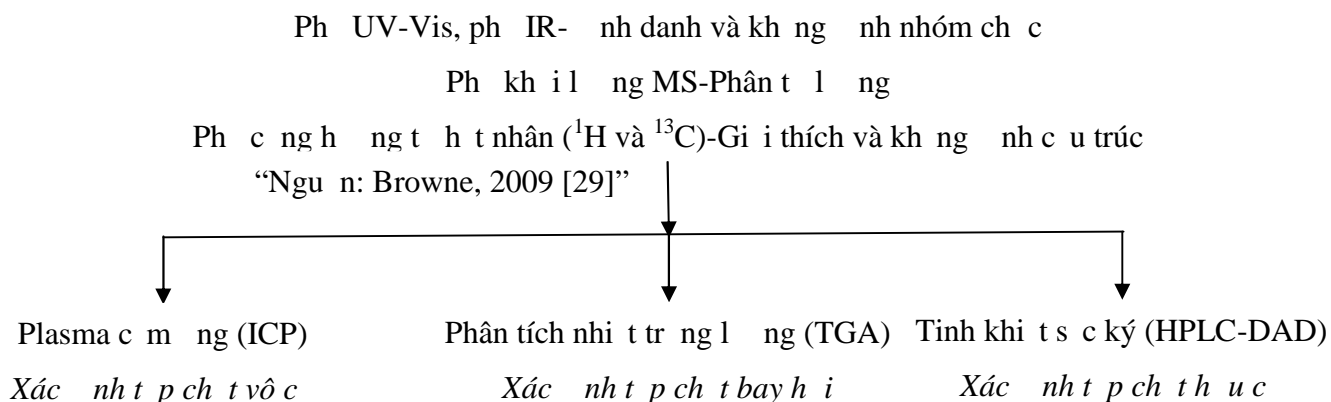
Theo tài li u y d c h c c truy n và các nghiên c u c ch t hi n i cho th y m t s ch t có c tính trong thu c t đ c li u. Các ch t này có th dùng làm ch t i chi u phát hi n các ch t có c tính trong thu c t đ c li u.

Các ch t ph bi n dùng cùng v i k thu t “d u vân tay”

Là các ch t thông th ng và chuyên bi t hi n di n trong chi, loài hay h đ c li u. Các ch t này có th s d ng cùng v i k thu t d u vân tay ki m tra ch t l ng.

1.5.2. Thi t l p các ch t chu n i chi u

Theo h ng d n c a WHO, c n ánh giá nhu c u thi t l p thu c ngu n nguyên li u, sau ó ti n hành ánh giá v i ch tiêu phân tích tùy thu c vào m c ích s d ng ch t chu n i chi u. S cây d i ây có th áp d ng ánh giá ch t chu n i chi u dùng cho nh l ng [29], [120]:



Hình 1.1. S cây ánh giá ch t chu n i chi u dùng cho nh l ng

CHƯƠNG 2

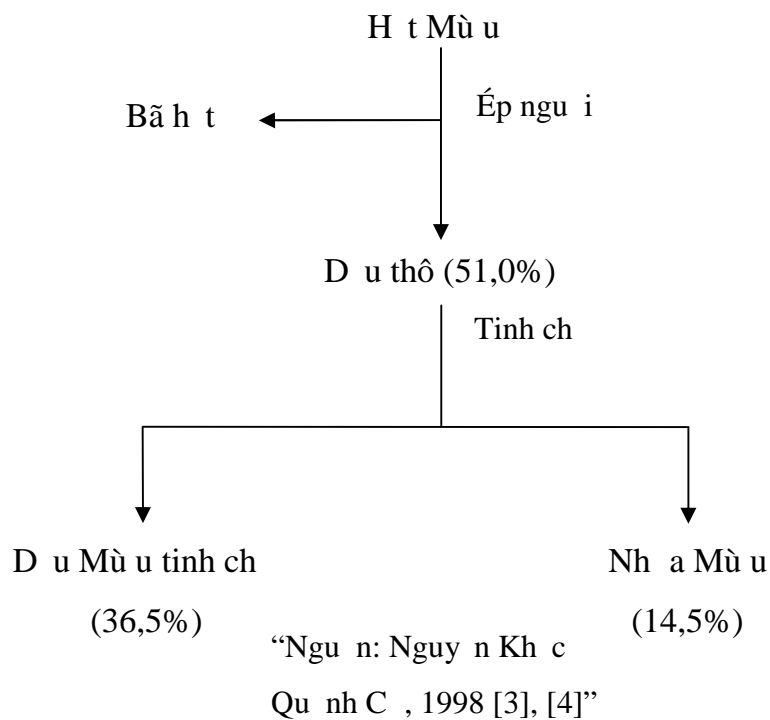
IT NG VÀ PH NG PHÁP NGHIÊN C U

2.1. IT NG

Các h p ch t phenol.

2.2. NGUYÊN V T LI U

- **Nh a** tách lo i khi tinh ch d u thô ép t h t Mùi u thu c nh trong s hình 2.1.. Ch t l ng có màu xanh lá m, mùi c tr ng do Khoa D c- i h c Y D c TP. H Chí Minh cung c p n m 2008.
- **V qu** Mùi u do công ty *Natural Pro* thu t i t nh B n tre cung c p n m 2008 (Hình PL 1.3).



Hình 2.1. S quá trình ép d u và tách lo i nh a Mùi u

- **Ch ph m d u Mùi u Inopilo** (Hình PL. 1.4) c a công ty TNHH th ng m i & s n xu t d c ph m Bình Minh, s ng ký: VNB-4288-05, h n dùng: 2/2015, m i chai ch a:

Lá l t	(<i>Herba piperis lolot</i>)	3,3 g
D u Mùi u	(<i>Oleum Calophilli</i>)	v a 15 ml

2.3. DUNG MÔI, HÓA CHẤT VÀ THIẾT BỊ THÍ NGHIỆM

2.3.1. Dung môi, hóa chất

Các loại dung môi methanol, ethanol, ethyl acetat, cloroform, n-hexan dùng trong chiết xuất là loại kỹ thuật. Bên mua silica gel 60 F₂₅₄ trắng sần (Merck). Silica gel cỡ hạt 0,040-0,063 mm (Merck và BDH).

Các dung môi dùng trong kỹ thuật sắc ký lớp mỏng, sắc ký chân không như: methanol, ethanol, ethyl acetat, chloroform, n-hexan, acetonitril... là loại tinh khiết phân tích (Merck và JT Baker).

Các dung môi dùng trong kỹ thuật sắc ký lỏng (phân tích và điều chế), LC-MS, GC-MS như: methanol, acetonitril, ethyl acetat... là loại dùng trong phòng pháp sắc ký (Merck). Nhiệt độ dùng loại Milli-Q có trở kháng 18 megaohm-cm.

Thuộc thể pháp chế theo Dược điển Việt Nam IV:

Dung dịch selen (III) clorid 5%

Hòa tan 5 g selen (III) clorid (TT) trong nước cất 100 ml.

Vi khuẩn thí nghiệm, môi trường và chất kháng sinh chuẩn

Vi khuẩn thí nghiệm gồm: Gram-dương *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538P), Gram-âm *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 9027), vi khuẩn kháng cồn và acid *Mycobacterium smegmatis* (ATCC 14468). Các vi khuẩn này được cung cấp từ phòng thí nghiệm của hãng Oxoid Ltd (Anh). Môi trường thạch dinh dưỡng của hãng Oxoid Ltd (Anh). Môi trường thạch Mueller Hinton (MHA) của hãng BioMérieux (Pháp). Chất kháng sinh chuẩn của hãng Oxoid Ltd (Anh).

Đồ đạc thí nghiệm khác

Bông thấm y tế của hãng Poly Glass Fibre (Malaysia) và bột y tế (đường kính 1-2 mm) loại JM30 của hãng Pan Abrasives (Singapore) dùng trong chiết lỏng để áp suất.

2.3.2. Thiết bị thí nghiệm

- Kính hiển vi quang học Olympus BX 61.
- Máy đo độ ẩm Buchi B-545 tại Khoa Kỹ thuật Công nghệ Dệt - Da - Da - Li - Vi tại Viện Kỹ thuật TP.HCM và Khoa Dược - Sinh học Quốc gia Singapore.

- Cân phân tích Sartorius A200S (0,1 mg) tại Khoa Dược - Viện Hóa Học Quốc gia Singapore, Mettler Toledo AB 265-S (0,01 mg) tại Khoa Kỹ thuật nghiên cứu các dạng bào chế - Viện Kỹ thuật nghiên cứu TP.HCM.
- Máy quang phổ tia hồng ngoại Shimadzu 2450 tại Khoa Vật lý - Viện Hóa Học Quốc gia Singapore và Viện Kỹ thuật nghiên cứu TP.HCM.
- Máy quang phổ hồng ngoại FTIR Nicolet Magna 760 tại Khoa Vật lý - Viện Kỹ thuật nghiên cứu TP.HCM và Khoa Hóa - Viện Hóa Học Quốc gia Singapore.
- Máy sắc ký khí khí pha GC-MS Shimadzu 2010: Bộ chế biến mẫu AOC-20i, phần mềm xử lý dữ liệu LabSolutions GCMSSolution phiên bản 2.5. tại Khoa Dược - Viện Hóa Học Quốc gia Singapore.
- Máy cộng hưởng từ hạt nhân Bruker AM 500 FT-NMR Spectrometer tại Viện Hóa Học - Viện Khoa Học và Công nghệ Việt Nam và Khoa Hóa - Viện Hóa Học Quốc gia TP.HCM; Bruker AM 300 FT-NMR Spectrometer tại Khoa Dược - Viện Hóa Học Quốc gia Singapore.
- Máy sắc ký lỏng hiệu suất cao Shimadzu: Bộ kiểm tra hệ thống CBM-20Alite; Bộ mô-đun LC-20AD; Bộ chế biến mẫu SIL-20AC; Bộ bơm CTO-20AC; Bộ dò PDA SPD-M20A; Phần mềm xử lý dữ liệu LCsolution tại Khoa Dược - Viện Hóa Học Quốc gia Singapore và Khoa Kỹ thuật nghiên cứu các dạng bào chế - Viện Kỹ thuật nghiên cứu TP.HCM.
- Máy sắc ký lỏng hiệu suất cao Shimadzu: Bộ kiểm tra hệ thống SCL-10A VP; Bộ mô-đun LC-8A; Bộ dò UV-Vis: SPD-10 AV VP; Bộ thu mẫu: FRC-10A tại Khoa Dược - Viện Hóa Học Quốc gia Singapore và máy sắc ký lỏng hiệu suất cao Merck-Hitachi: Bộ mô-đun NOVAPREP 200; Cột: Phenomenex Luna C₁₈ 15 μm, 130 Å, 250 x 50 mm; Bộ chế biến mẫu: Rheodyne, loop 25 ml; Bộ thu mẫu: Gilson FC 204 tại Viện Công nghệ Hóa Học.
- Máy chiết lỏng áp suất Dionex ASE-100 tại Khoa Dược - Viện Hóa Học Quốc gia Singapore.
- Bộ chiết Soxhlet tia hồng ngoại Buchi B-811 tại Khoa Dược - Viện Hóa Học Quốc gia Singapore.

- Máy phân tích nhiệt Shimadzu TGA-DTA model DTG-60A, bộ kiểm soát dòng FC 60A tại phòng thí nghiệm Trung tâm hỗ trợ khách hàng công ty Shimadzu (Asia Pacific) và thiết bị phân tích nhiệt trọng lực Mettler Toledo TGA/DSC 1 STAR^e System tại Khoa Vật lý - Trường Đại học Khoa học Tự nhiên - Viện Kỹ thuật Nhiệt học TP.HCM.
- Máy nhiễu xạ tia X Bruker AXS SMART APEX CCD tại Khoa Hóa học - Viện Kỹ thuật Nhiệt học - Trường Đại học Quốc gia Singapore.

Dòng cơ sở dữ liệu đã thu được và các thông số khác trong phòng thí nghiệm.

Nội dung chi tiết tài:

- Bộ môn Hóa Phân tích-Kỹ thuật Nhiệt học, Khoa Đại học Kỹ thuật TP.HCM.
- Bộ môn Động lực học, Khoa Đại học Kỹ thuật TP.HCM.
- Khoa Kỹ thuật Nhiệt học - Trường Đại học Khoa học Tự nhiên - Viện Kỹ thuật Nhiệt học TP.HCM.
- Khoa Kỹ thuật Nhiệt học các dạng bào chế - Viện Kỹ thuật Nhiệt học TP.HCM.
- Khoa Vật lý - Trường Đại học Khoa học Tự nhiên - Viện Kỹ thuật Nhiệt học TP.HCM.
- Khoa Kỹ thuật Nhiệt học Nguyên lý - Viện Kỹ thuật Nhiệt học TP.HCM.
- Phòng Hóa học các hợp chất tự nhiên - Viện Công nghệ Hóa học.
- Khoa Đại học, Khoa Hóa học - Viện Kỹ thuật Nhiệt học - Trường Đại học Quốc gia Singapore.

2.4. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.4.1. Nghiên cứu xác định hợp chất phenol

2.4.1.1. Nghiên cứu chiết xuất các hợp chất phenol từ nhài và vò quỳ Mùi

X lý nhài Mùi chiết xuất

Nguyên liệu nhài trong các thùng bằng cách gọt nhài vào một thùng 120 lít, khuấy đều, yên một tuần để tách lấy phần dầu còn lại.

X lý vò quỳ Mùi chiết xuất

Xây vò quỳ thành bột bằng máy nghiền M5A-Fitzpatrick (Hoa Kỳ) và rải đều vào các hạt có kích thước trung bình là 1,84 mm xác định theo phương pháp D₅₀ của Viện M 30 (2007) [116].

Chiết xuất hợp chất phenol tinh khiết

Phương pháp dùng dung môi kém phân cực có thay đổi pH

Đưa vào pK_a những chỉ số chiết xuất hợp chất phenol. Nghiên cứu kỹ m hóa bằng các dung dịch kiềm khác nhau như : *natri carbonat (TT)*, *natri hydroxyd (TT)*, *amoniac (TT)* ở các pH 7-8 và 8-9. Acid hóa dung dịch kiềm ở pH 3-4 rồi chiết bằng dung môi kém phân cực [101], [106].

Phương pháp dùng dung môi phân cực không thay đổi pH

Đưa vào những loại dung môi phân cực dùng để chiết hợp chất phenol là methanol [33], [106], nghiên cứu để methanol/năng phù hợp nhất và phương pháp lọc để chiết được thu được những hợp chất phenol và dung dịch chiết không bị nhiễm. Khảo sát quy trình lọc để đưa vào phân cực:

- Chiết phân biệt từng dung dịch chiết MeOH/năng và ether để hòa loãng để phân biệt.
- Lựa chọn cách làm giảm năng dung môi có trong dung dịch chiết MeOH/năng để áp suất giảm còn mức nhất định, lọc và gạn bỏ phần nước bên dưới [45].

Chiết xuất hợp chất phenol tinh khiết [69], [87]

Hợp chất phenol trong vacu chiết bằng các phương pháp: (1) chiết bằng dung môi để áp suất (PLE); (2) chiết bằng soxhlet; (3) chiết bằng miki t.

Phương pháp chiết lỏng để áp suất (PLE) [117]

Dung môi chiết là *n-hexan (TT)* và *methanol (TT)*.

Đặt chiết cốc 10 μm mịn, kén là 1 p bông thủy tinh rời cho vào m để lọc bột vacu, thêm các hạt thủy tinh dày 1-2 mm để chặn không cho lọt trong ống, tiếp tục cho 1 p bông thủy tinh và 1 c 10 μm mịn. Lọc 10 μm và bông thủy tinh những hạt bột vacu mịn vào dung dịch chiết.

điều kiện chiết

Thiết bị chiết lỏng để áp suất: ASE-100-Dionex (Hoa Kỳ)

Áp suất : 1500 psi

Nhiệt độ : 120 °C

Thời gian chiết : 15 phút

Chu kỳ chiết : 1
Thí tích rửa : 60%
Thời gian làm sạch hình thành bong khí nitrogen : 90 giây
Cột chiết có áp suất giảm 40 °C rửa nhấc cột thí tích bằng *methanol* (TT). Lọc chiết bằng giấy lọc Whatman 40.

Phương pháp chiết Soxhlet

Cân chính xác một lượng bột vụn mù u cho vào ống nghiệm chứa cellulose kích thước 25 mm x 27 mm x 100 mm (Whatman, UK) rồi lắp vào bình chiết Soxhlet bằng Buchi B-811 (Thy S) chiết bằng *methanol* (TT) trong 8 giờ. Cột chiết có áp suất giảm 40 °C rửa nhấc cột thí tích bằng *methanol* (TT). Lọc chiết bằng giấy lọc Whatman 40.

Phương pháp ngâm chiết

Vụn mù u xay thành bột bằng máy xay Fritsch (c), ngâm chiết bằng cốc dòng vận tốc 96% thu được chiết cặn. Cách thí nghiệm này cần sử dụng nồi súp. Thêm nước vào cặn này theo tỉ lệ thích hợp rửa bằng ethyl acetat. Cột chiết ethyl acetat có áp suất giảm 40 °C.

2.4.1.2. Thí nghiệm kháng khuẩn của các chất tinh dầu và vụn mù u

Áp dụng phương pháp khuếch tán trên thạch, tiêu chuẩn của CLSI theo khuyến cáo của FDA [67].

Vi khuẩn thí nghiệm

1. *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027
2. *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 P
3. *Mycobacterium smegmatis* ATCC 14468

Các vi khuẩn này cấy và cấy chuyển trên thạch dinh dưỡng để hình thành khuẩn lạc khi thí nghiệm.

Kháng sinh chu n

Dùng các a kháng sinh chu n: methicilin 5 µg cho *Staphylococcus aureus*, carbenicilin 100 µg cho *Pseudomonas aeruginosa* và streptomycin 10 µg i v i *Mycobacterium smegmatis*.

Môi tr ng

Môi tr ng ho t hóa vi khu n th nghi m: th ch dinh d ng. Môi tr ng th nghi m kháng sinh: th ch Mueller Hinton (MHA) 3,8% (kl/tt). Chu n b môi tr ng b ng cách hòa tan v i n c theo h ng d n c a nhà s n xu t. Ti t trùng 121 °C, áp su t 1 atm trong 20 phút.

Chu n b m u

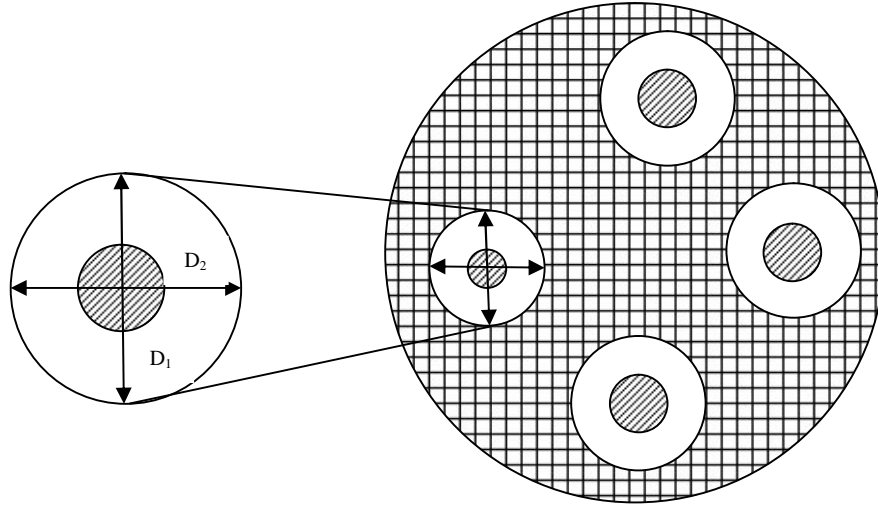
Hòa tan m u trong dung môi ã dùng chi t cao. Dùng micro pipet l y m t l ng m u có ch a 100 µg cao t ng ng t m trên các a gi y l c ng Whatman s 54 ã ti t trùng 121 °C, áp su t 1 atm trong 20 phút. S y khô các a trên qua êm 40 °C.

Ti n hành th nghi m

20 ml th ch Mueller Hinton (MHA) 3,8% (kl/tt) vào các a Petri 90 mm r i yên cho ông l i. R a b m t các khóm vi khu n th nghi m b ng n c ti t trùng. Chu n hóa c c a nh d ch vi khu n t ng ng v i $1,5 \times 10^8$ CFU/ml (ng McFarland 0,5). Pha loãng 10 l n nh d ch vi khu n ã chu n hóa theo ng McFarland 0,5. L y 200 µl d ch treo này (3×10^6 CFU) cho vào gi a a môi tr ng th nghi m. Dùng que tr i b ng th y tinh tr i u nh d ch vi khu n th nghi m trên b m t th ch và khô trong 15 phút. t a gi y l c t m m u và a kháng sinh chu n cách kho ng u nhau trên b m t th ch và 30 phút cho các ch t kháng khu n khu ch tán. 18 gi 37 °C i v i *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* và 48 gi 37 °C i v i *Mycobacterium smegmatis*.

c k t qu

o ng kính vòng kháng khu n chung quanh các a dùng n v o mm sau th i gian . Trung bình ng kính vòng kháng khu n: $D = (D_1 + D_2)/2$.



Hình 2.2. o ng kính vòng vô khu n. (Vòng tròn nh có v ch là a ch ng đ ng ho c a có t m cao. Ph n không v ch là vùng c ch vi khu n.)

Ho t tính kháng khu n xác nh b ng ph n tr m t s gi a trung bình ng kính vòng kháng khu n c a a t m m u th và trung bình ng kính vòng kháng khu n c a a kháng sinh chu n t trong cùng m t a th ch. T s này càng cao thì kh n ng kháng khu n càng m nh trên ch ng vi khu n th nghi m.

% ho t tính kháng khu n c a cao = (ng kính vòng vô khu n c a m u th / ng kính vòng vô khu n c a a kháng sinh chu n) x 100

Chu n b các a ch ng đ ng (a th ch c y vi khu n không t a kháng sinh chu n) ánh giá kh n ng phát tri n c a vi khu n trên môi tr ng và ch ng âm (a th ch không c y vi khu n không t a kháng sinh chu n) kh ng nh hi u l c s h p tí t trùng và k thu t th nghi m vô trùng.

2.4.1.3. Nghiên cứu phân lập và tinh chế các hợp chất phenol

Phân lập

Phương pháp sắc ký lỏng không (VLC)

Np m u là cao toàn phần chiết xuất từ c vào c t silica gel theo nguyên tắc n p c t khô. T l silica gel dùng n p c t g p 7-10 l n l ng m u. L n l t r a gi i b ng dung môi kém phân c c và thay i t l dung môi t ng d n phân c c nh m lo i các d u béo ra tr c, và các h p ch t phenol s c tách ra sau. L ng t ng dung môi phân c c h n c thêm vào m i phân o n dung môi k ti p nhau. T ng phân c c lúc u ít (1%, 2%, 3%...) và sau ó có th t ng lên v i m c (5%, 10%, 20%...). Khi tri n khai c t, cho vào cùng m t th tích dung môi/h dung môi nh nhau thu các phân o n, hút th t khô r i ti p t c v i các phân o n ti p theo. Ki m tra b ng s c ký l p m ng, phát hi n b ng quan sát d i èn các b c sóng 254, 365 nm, phun *dung dịch st (III) clorid 5% (TT)* r i g p các phân o n có các thành ph n gi ng nhau [78].

Tinh chế

Sau khi thu c các h p ch t khác nhau, tinh chế b ng ph ng pháp k t tinh l i [18], [101], ph ng pháp s c ký l ng i u ch thu c các h p ch t tinh khi t [78]. Ki m tra tinh khi t b ng TLC, HPLC:

- **Ki m tra b ng TLC:** b n m ng silica gel 60 F₂₅₄ (Merck) v i các h dung môi có phân c c khác nhau: (1) *Toluen-ethyl acetat (8:2)*; (2) *n-hexan-ethyl acetat (7:3)*; (3) *Cloroform-methanol (9:1)*.
- **Ki m tra b ng HPLC:** máy s c ký l ng Shimadzu LC-20AD, u dò chu i diod quang SPD-M20A, c t pha o Shim-pack VP-ODS 150 mm x 4,6 mm x 5 µm, pha ng acetonitril/n c v i ch ng trình dung môi t ng d n t l dung môi h u c , t c dòng 0,6 ml/phút, nhi t c t 40 °C, phát hi n t i b c sóng thích h p.

2.4.1.4. Nghiên cứu xác định cấu trúc các hợp chất phenol phân lập

Sử dụng phối hợp các phương pháp phân tích như : phổ UV-Vis, phổ IR, phổ khối lượng, phổ NMR 1 và 2 chiều, phổ nhiễu xạ tia X để xác định cấu trúc của các hợp chất phenol phân lập [101].

- Ghi phổ UV-Vis để phân loại khung cấu trúc của hợp chất phenol như : coumarin, xanthon...và so sánh với phổ của các hợp chất đã biết công bố trong các tài liệu hoặc các ghi phổ song song.
- Ghi phổ hồng ngoại để xác định các nhóm chức như : carbonyl, hydroxyl hoặc vòng thơm...
- Ghi phổ khối lượng theo chế độ ion bẫy bẫy phá ion (EI-MS) 70 eV để xác định các ion đặc trưng và có thể nhận danh bằng cách đi chiếu với phổ khối lượng chuẩn của hợp chất phenol trong thư viện phổ (nếu có). Ghi phổ khối lượng có phân giải cao HRESI-TOFMS để xác định khối lượng chính xác và công thức nguyên của hợp chất [11].
- Ghi phổ cộng hưởng từ hạt nhân proton và carbon 13 mạt và hai chiều: hòa tan mẫu trong các dung môi như : methanol- d_4 , cloroform- d , DMSO- d_6 với nội chuẩn là TMS rồi ghi phổ trên thiết bị có tần số 300-500 MHz. Bên ghi phổ để so sánh với các hợp chất mẫu hoặc so sánh với phổ của các hợp chất đã biết công bố trong các tài liệu.
- Ghi phổ nhiễu xạ tia X để xác định cấu trúc tinh thể khi hợp chất đã tinh thể.

2.4.2. Nghiên cứu thị trường chất chuẩn nội chi u

Theo phương pháp của FDA, USP, WHO, ISO guide 35, ISO 13528 và ISO 17043 công nhận mô hình của các nhà cung cấp chất chuẩn nội chi u từ các nhà sản xuất như : Chromadex, Sigma Aldrich, Cerilliant... bao gồm các bước sau: đánh giá các yêu cầu ưu tiên và khả năng nhu cầu, nghiên cứu tài liệu và lập kế hoạch, phân lập nguyên liệu và tinh chế, xác định cấu trúc lý hóa, đánh giá độ tinh khiết, thị trường báo cáo phân tích và chứng minh phân tích [20], [29], [47].

Áp dụng phương pháp khảo sát liên phòng thí nghiệm xác định hàm lượng chất chuẩn i chi u theo ISO guide 35. Phương pháp xác định thành phần là HPLC ghép với đầu dò dãy diod quang sau khi đã thẩm nh. Áp dụng phương pháp phân tích nhiệt trọng lượng theo USP 2007 [116] xác định thành phần bay hơi, phương pháp plasma cảm ứng xác định thành phần vô cơ (Pb, As, Hg) theo Dược điển Trung quốc 2010 [41].

2.4.2.1. Xây dựng bộ dữ liệu nền để chất chuẩn i chi u i u ch

So sánh các phương pháp UV-Vis, IR, MS, NMR của chất chuẩn i chi u i u ch để có phương pháp liên kết chất chuẩn trong cùng điều kiện thí nghiệm. Nếu không sẵn có chất chuẩn i chi u đã có thì lập liên kết thì so sánh với các phương pháp ghi trong tài liệu đã công bố, thí nghiệm và/hoặc xác định cấu trúc bằng kỹ thuật nhiễu xạ tia X để phân định cấu trúc.

2.4.2.2. Đánh giá chất chuẩn i chi u i u ch

Xây dựng và thẩm định phương pháp phân tích xác định thành phần [26], [44], [82], [103]

Dựa vào tính phân cực/không phân cực của các chất cần phân tích, xây dựng phương pháp HPLC phát hiện bằng đầu dò dãy diod quang (HPLC-DAD) xác định thành phần thành phần chưa biết khi không có danh sách thành phần hoặc không có chất chuẩn bằng phương pháp phân tích định tính:

- Khảo sát các cột pha đảo RP C₁₈ như: Shim-pack VP-ODS, Gemini NX C-18, Zorbax C-18.
- Khảo sát pha động và thành phần, thể tích và chương trình. Khảo sát các dung môi acetonitril-nước, dung dịch acid acetic 0,1-2%; methanol-nước, dung dịch acid acetic 0,1-2%.
- Khảo sát nhiệt độ cột: 25, 30 và 40 °C.
- Khảo sát tốc độ dòng: 0,6; 0,8 và 1 ml/phút.
- Khảo sát bước sóng phát hiện thu được hàm lượng thành phần là cao nhất tính theo phương pháp phân tích định tính.

- Kh o sát n ng dung d ch h p ch t phenol nh y phát hi n c t t c t p và pic chính v n n m trong kho ng tuy n tính không làm sai l ch khi tính k t qu .
- Th m nh ph ng pháp phân tích, v n d ng theo h ng d n c a ICH: th tính phù h p c a h th ng, tính c hi u, tính tuy n tính, chính xác, gi i h n phát hi n.

Xác nh t p ch t bay h i b ng ph ng pháp phân tích nhi t tr ng l ng

T c gia nhi t: 6 °C/phút.

Kho ng nhi t : 30-150 °C.

Khí: Nitrogen.

T c dòng: 100 ml/phút.

Xác nh t p ch t vô c (Pb, As, Hg) b ng ph ng pháp ICP-MS

T c khí nebulizer: 0,55 l/phút.

T c khí plasma: 15 l/phút.

Dwell: 15 ms.

ng v theo dõi: As: 75; Pb: 208, 206; Hg: 202.

2.4.2.3. Xây d ng tiêu chu n ch t l ng ch t chu n i chi u

D a vào h ng d n c a WHO, ISO, xây d ng ch tiêu ch t l ng và ph ng pháp ánh giá ch t i chi u hóa h c dùng cho nh l ng bao g m:

B ng 2.1. Tiêu chu n ch t l ng ch t chu n i chi u theo WHO

Ch tiêu	Ph ng pháp th
C m quan	Quan sát b ng m t
nh tính	UV-Vis; IR; MS; NMR; X-Ray
i m ch y	D c i n
tính khi t	
- T p ch t h u c	HPLC-DAD
- N c và các ch t h u c bay h i	TGA
- Kim lo i n ng	ICP-MS
nh l ng	D c i n ho c không d c i n

tính khi t (T p ch t h u c) c ánh giá t i thi u 3 phòng thí nghi m t tiêu chu n ISO/IEC 17025: 2005 và/ho c GLP xác nh giá tr n nh, l ch chu n và không m b o o [83], [84]. Sau cùng, xây d ng ch ng ch phân tích cho h p ch t phenol phân l p c dùng làm ch t i chi u d a vào các tài li u qu c t v ch t chu n, ch t i chi u [20], [29], [42], [47].

2.4.3. Nghiên c u ph ng pháp nh tính, nh l ng h p ch t phenol t nh a và v qu Mù u.

2.4.3.1. Xây d ng và th m nh quy trình phân tích xác nh h p ch t phenol t nh a và v qu Mù u b ng ph ng pháp GC-MS.

Xây d ng ph ng pháp phân tích

N u ch a có tài li u tham kh o v ph ng pháp xây d ng, d a vào tính tan c a h p ch t c n xác nh ch n pha t nh, kh o sát ch n ch ng trình nhi t thích h p [104], [105]. Th tích tiêm m u: 1 µl. Nhi t u dò ph kh i: ngu n ion: 250 °C; giao di n: 200 °C. Ki u thu d li u: scan mode v i kho ng quét: 50-450 amu nh tính và SIM mode nh l ng v i ion ích là pic c b n và 2 ion tham chi u.

Th m nh ph ng pháp phân tích [82], [103]

- Th tính phù h p c a h th ng
- Tính c hi u: ph kh i l ng c x lý lo i n n b ng ph n m m AMDIS c a NIST và gi i thích ho c so sánh v i ph kh i l ng chu n c a h p ch t c n xác nh.
- Tính tuy n tính: kh o sát t ng quan gi a c ng m nh ion c b n và n ng ch t c n nh l ng.
- chính xác: xác nh l p l i và chính xác trung gian.
- úng: thêm chu n vào m u ã bi t hàm l ng b a m c n ng , m i m c b a m u, tính t l ph c h i và %RSD.

2.4.3.2. Xây dựng và thẩm định quy trình phân tích xác định hàm lượng phenol trong nước thải đô thị bằng phương pháp HPLC-DAD

Khảo sát quy trình chuẩn bằng dung dịch mẫu

Đưa vào các yếu tố ảnh hưởng thí nghiệm để nghiên cứu quy trình xử lý mẫu thích hợp [55]. Cân chính xác một lượng mẫu, làm mẫu nhiệt thích hợp, thêm hàm lượng dung môi thích hợp và siêu âm trong thời gian thích hợp. Lọc qua lọc 0,45 µm.

Chọn quy trình xử lý cho định lượng pic chính xác nhất là như sau.

Bảng 2.2. Các yếu tố và mức chọn ưu tiên xử lý mẫu

Yếu tố ảnh hưởng	Mức		
	1	2	3
A: Nhiệt độ (°C)	25	45	60
B: Hàm lượng methanol (%)	70	90	100
C: Thời gian làm mẫu (phút)	10	15	20
D: Thời gian siêu âm (phút)	5	10	15

Bảng 2.3. Thí nghiệm để nghiên cứu ưu tiên xử lý mẫu

Stt	A: Nhiệt độ (°C)	B: Hàm lượng methanol (%)	C: Thời gian làm mẫu (phút)	D: Thời gian siêu âm (phút)
1	25	70	10	5
2	25	90	15	10
3	25	100	20	15
4	45	70	15	15
5	45	90	20	5
6	45	100	10	10
7	60	70	20	10
8	60	90	10	15
9	60	100	15	5

Xây dựng phương pháp phân tích [17], [26].

Đưa vào khảo nghiệm hòa tan các mẫu trong pha loãng, xây dựng phương pháp giám sát các khảo sát sau:

- Khảo sát các cột pha loãng khác nhau: Zorbax C₁₈ 150 mm x 4,6 mm ID, 5 μm (Agilent, Hoa Kỳ), Gemini NX C₁₈ 150 mm x 4,6 mm ID, 5 μm (Phenomenex, Mỹ), Shim-pack VP-ODS 150 mm x 4,6 mm x 5 μm (Shimadzu, Nhật Bản) và cột Thermosil[®] C₁₈, 5 μm, 10,0 mm x 2,0 mm ID, (Thermo Electron Corp., Anh)
- Khảo sát pha loãng: sử dụng các dung môi acetonitril, methanol, nước, acid acetic 0,1-2%.
- Khảo sát nhiệt độ: 25-50 °C.
- Khảo sát tốc độ dòng: 0,6-1 ml/phút.
- Khảo sát các bước sóng phát hiện trong vùng tử ngoại-khả kiến

Thẩm định phương pháp phân tích [82], [103]

- Tính phù hợp của hệ thống
- Tính đặc hiệu: phương pháp UV-Vis và tính khi tích a pic so sánh với phương pháp UV-Vis chuẩn của hợp chất cần phân tích.
- Tính tuyến tính: khảo sát tương quan giữa diện tích pic và nồng độ chất cần phân tích.
- Độ chính xác: xác định lặp lại và độ chính xác trung gian.
- Độ đúng: thêm chuẩn vào mẫu để biết hàm lượng bám của mẫu, mức độ bám của mẫu, tính toán phần trăm và %RSD.

Phân tích số liệu thực nghiệm

Tính các số liệu thống kê như giá trị trung bình, lệch chuẩn, lệch chuẩn tương đối, khoảng tin cậy, phương trình hồi quy và hệ số tương quan hồi quy bằng phần mềm Excel 5.0. Đánh giá phương trình hồi quy, độ chính xác trung gian... bằng test t, test F [8], [47].

CHƯƠNG 3

KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU

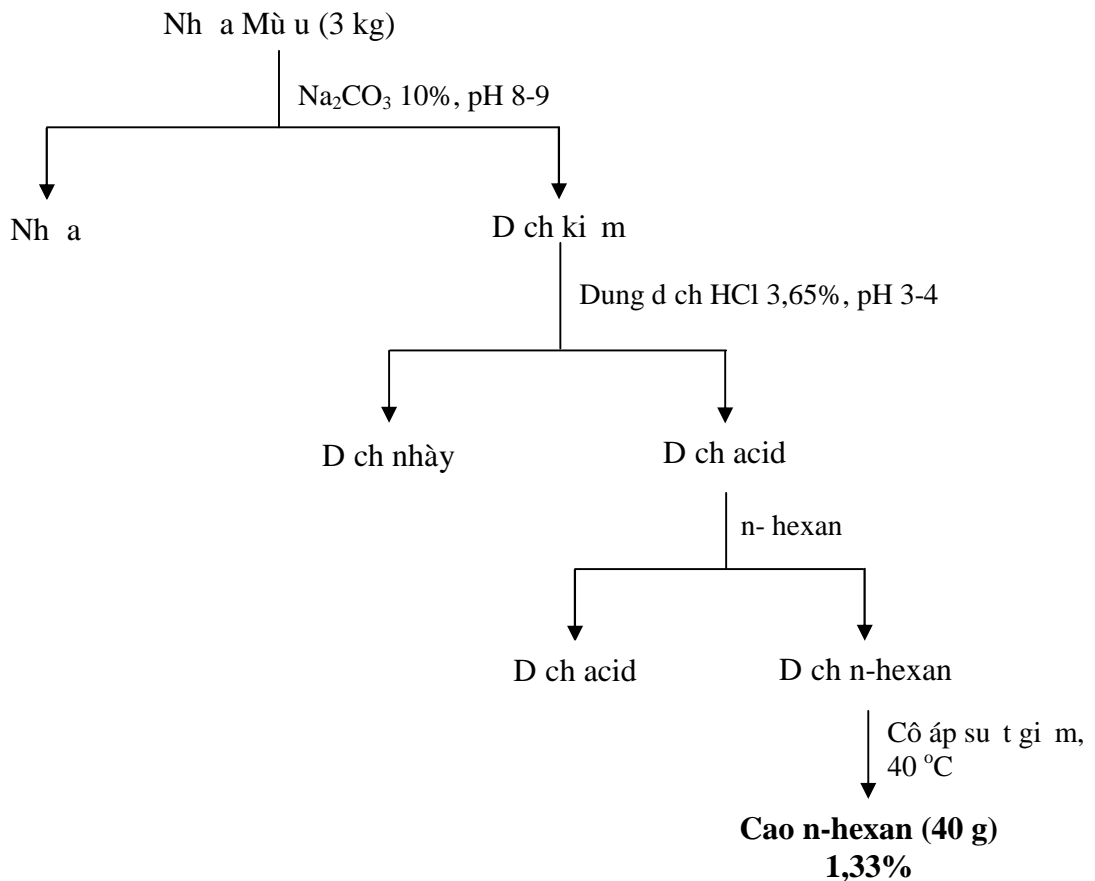
3.1. NGHIÊN CỨU XÁC ĐỊNH HẤP CHẤT PHENOL TỪ NHÀ VÀ VẬT TƯ MÙU

3.1.1. Chỉ tiêu tách hợp chất phenol từ nhà và Mùu

3.1.1.1. Phương pháp dùng dung môi kém phân cực, thay đổi pH

Tiến hành trong điều kiện tránh ánh sáng

Quá trình chiết xuất các hợp chất phenol từ nhà và Mùu bằng *n*-hexan (TT) thể hiện theo sơ đồ hình 3.1. Cao *n*-hexan có phần nồng độ tính về dung dịch s (III) clorid 5% (TT) cho màu xanh đậm (Ph 1 c 2).

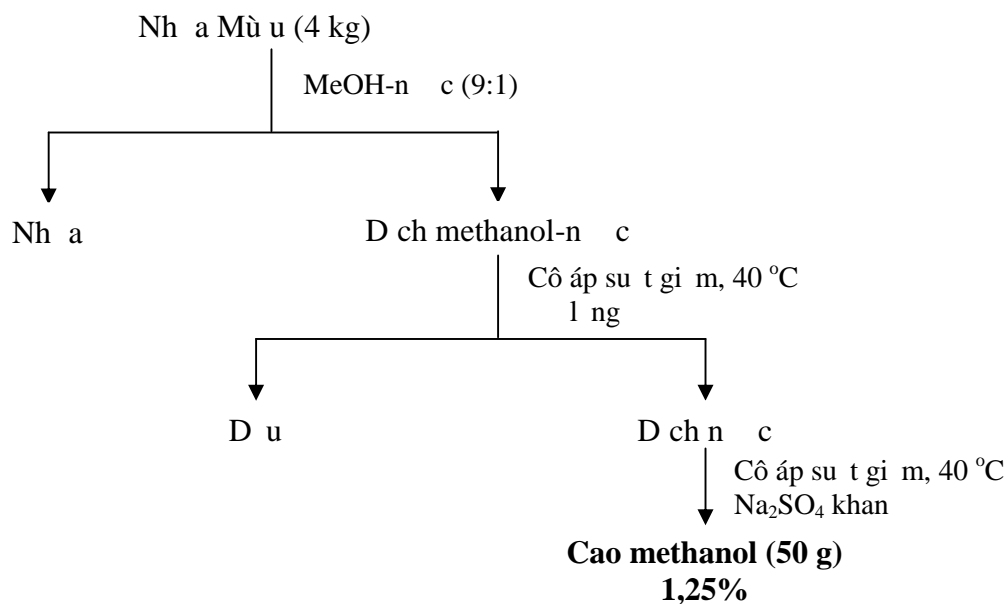


Hình 3.1. Sơ đồ chỉ tiêu tách các hợp chất phenol từ nhà và Mùu bằng *n*-hexan

3.1.1.2. Phương pháp dùng dung môi phân cực, không thay đổi pH

Tiến hành trong điều kiện tránh ánh sáng

Quá trình chiết các hợp chất phenol từ nhũ tương nhũ tương methanol-nước (9:1) thể hiện theo sơ đồ hình 3.2. Cao methanol có phần trăm nồng độ tính với dung dịch chất (III) clorid 5% (TT) cho màu xanh đậm (Ph 1 c 2).



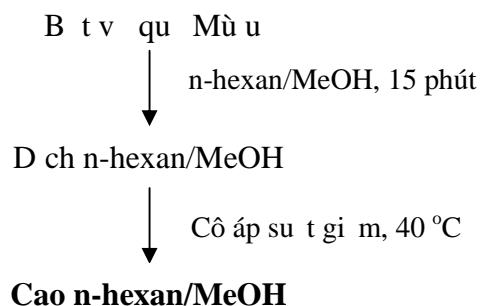
Hình 3.2. Sơ đồ chiết xuất các hợp chất phenol từ nhũ tương MeOH-nước (9:1)

3.1.2. Chiết xuất các hợp chất phenol từ nhũ tương MeOH-nước

3.1.2.1. Phương pháp chiết lỏng áp suất (PLE)

Tiến hành trong điều kiện tránh ánh sáng

Quá trình chiết các hợp chất phenol từ nhũ tương MeOH-nước (9:1) và methanol (TT) thể hiện theo sơ đồ hình 3.3. Các cao lỏng có phần trăm nồng độ tính với dung dịch chất (III) clorid 5% (TT) cho màu xanh đậm (Ph 1 c 2).

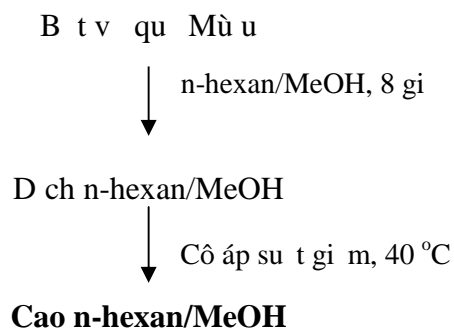


Hình 3.3. Sơ đồ chiết xuất các hợp chất phenol từ nhũ tương MeOH-nước bằng phương pháp PLE

3.1.2.2. Phương pháp chiết Soxhlet

Tiến hành trong điều kiện tránh ánh sáng

Quá trình chiết các hợp chất phenol từ vỏ quả Mù u bằng *n*-hexan (TT) và methanol (TT) thực hiện theo sơ đồ hình 3.4. Các cao thu được có phần nước tính với dung dịch chất (III) clorid 5% (TT) cho màu xanh đậm (Phụ lục 2).



Hình 3.4. Sơ đồ chiết xuất các hợp chất phenol từ vỏ quả Mù u bằng phương pháp Soxhlet. Kết quả chiết bằng phương pháp chiết PLE và chiết Soxhlet trình bày ở bảng 3.1.

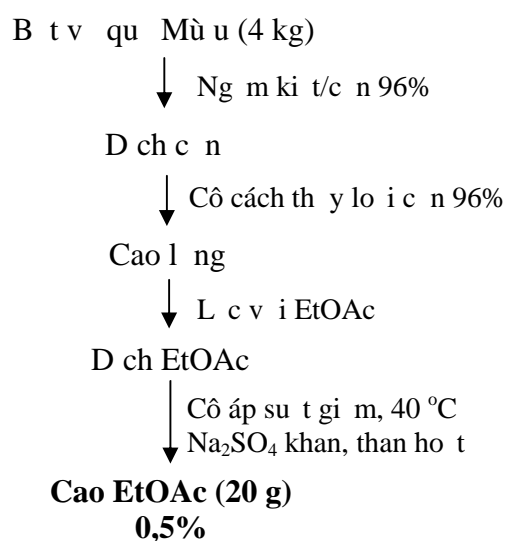
Bảng 3.1. Kết quả chiết xuất hợp chất phenol từ vỏ quả Mù u bằng PLE và Soxhlet

TT	Dung môi	Khối lượng (g)	Khối lượng cao (g)	Hệ số (%) (kl/kl)	Mô tả dịch chiết
Chiết PLE					
1	Methanol		0,499	9,98	Đục nhầy, màu nâu đậm
2	<i>n</i> -hexan	5,0	0,048	0,96	Sánh nhũ đục, màu vàng
Chiết Soxhlet					
1	Methanol		0,081	4,05	Sánh nhũ đục, màu vàng sẫm
2	<i>n</i> -hexan	2,0	0,019	0,95	Rõn vô định hình, màu vàng

3.1.2.3. Phương pháp ngâm chiết

Tiến hành trong điều kiện tránh ánh sáng.

Quá trình chiết các hợp chất phenol từ vỏ quả Mù u bằng ethyl acetat (TT) thực hiện theo sơ đồ hình 3.5. Cao thu được có phần nước tính với dung dịch chất (III) clorid 5% (TT) cho màu xanh đậm (Phụ lục 2).



Hình 3.5. Sơ đồ chi tiết các bước chiết phenol từ vỏ quế Mùi u bằng phương pháp ngâm chiết

3.2. THỰC NGHIỆM KHÁNG KHUẨN CÁC CAO CHIẾT TỪ NHẠ VÀ VỎ QUẾ MÙI U

Kết quả tác dụng kháng khuẩn thể nghiệm phương pháp khuếch tán trên thạch của các cao chiết trình bày trong bảng 3.2. (Hình PL 3.1).

Bảng 3.2. Kết quả thể nghiệm tác dụng kháng khuẩn của cao chiết từ nhạ và vỏ quế Mùi u

		đường kính vòng kháng khuẩn			
		đường kính (mm) / đường kính (%) (n=2)			
Chiết xuất sinh vật thí nghiệm	S. aureus ATCC 6538 P	Ps. aeruginosa ATCC 9027	M. smegmatis ATCC 14468		
				đường kính (mm)	đường kính (%)
đường kính sinh chứng		Methicillin 5 µg	Carbenicillin 100 µg	Streptomycin 10 µg	
Bản chất	Ca	Phương pháp chiết	Đường kính (mm)	Đường kính (%)	Đường kính (%)
Nhạ	n-Hexan	Dung môi	41,0	Âm tính	36,0
	Methanol	Dung môi	45,3	-	48,4
Vỏ quế	Methanol	PLE	58,1	-	47,0
	Ethyl acetat	Ngâm chiết	58,0	-	47,0
	n-Hexan	PLE	53,8	-	37,5
	Methanol	Soxhlet	50,0	-	45,5

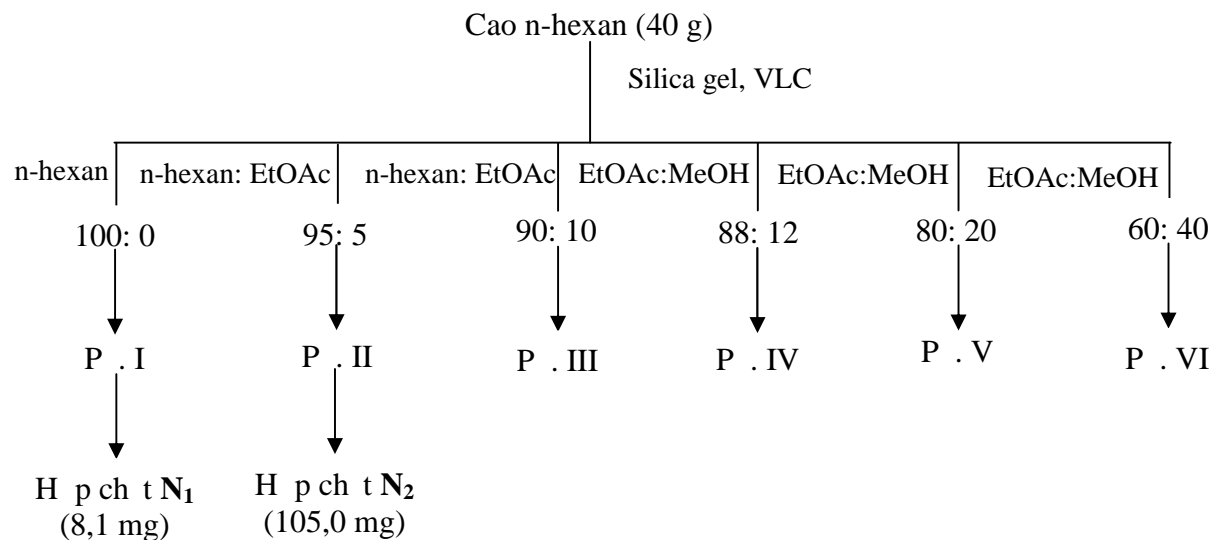
Nhận xét:

- Bằng các phương pháp chiết khác nhau như: dung môi (L - 1 ng), PLE, ng m ki t và soxhlet, t t c các cao chi t t nh a b ng n-hexan và methanol c ng nh cao chi t t v qu b ng n-hexan, ethyl acetat và methanol u cho tác d ng kháng khu n trên *Staphylococcus aureus* và *Mycobacterium smegmatis* nh ng không có tác d ng trên *Pseudomonas aeruginosa*.

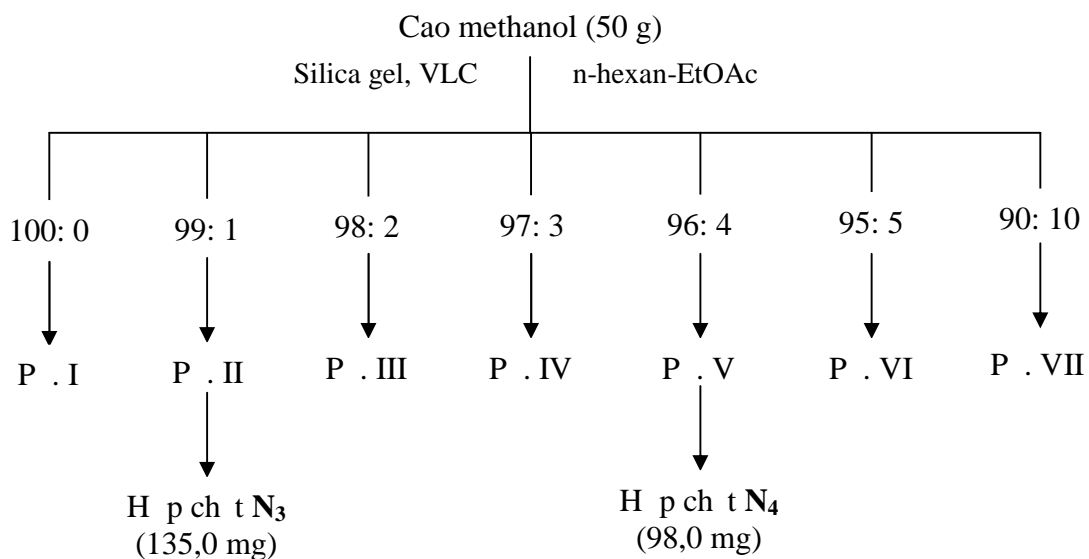
3.3. PHÂN L P CÁC H P CH T PHENOL T NH A VÀ V QU MÙ U

3.3.1. Phân l p các h p ch t phenol t nh a Mù u

Phân l p b ng ph ng pháp s c ký l ng chân không (VLC) theo s hình 3.6. (cao n-hexan) và hình 3.7. (cao methanol). Các cao trên chi t b i quy trình ã kh o sát thu c nhi u h p ch t phenol, ít t p và có tính kháng khu n (Ph l c 2).



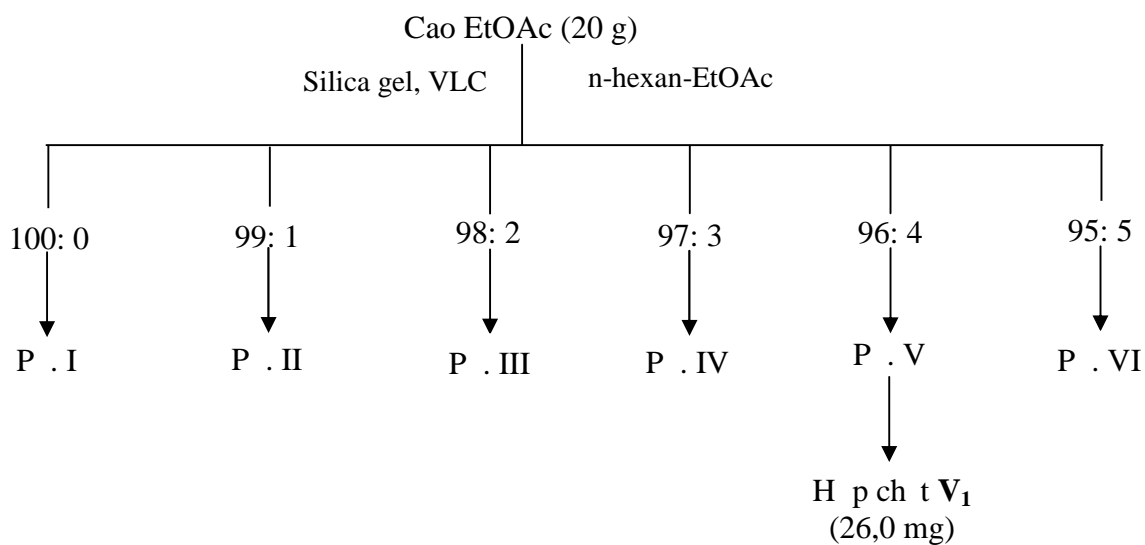
Hình 3.6. S phân l p các h p ch t phenol t cao n-hexan nh a Mù u



Hình 3.7. S phân l p các h p ch t phenol t cao methanol nh a Mù u

3.3.2. Phân l p các h p ch t phenol t v qu Mù u

Phân l p h p ch t phenol trong cao ethyl acetat b ng ph ã ng pháp VLC theo s hình 3.8. (Ph ã c 2).

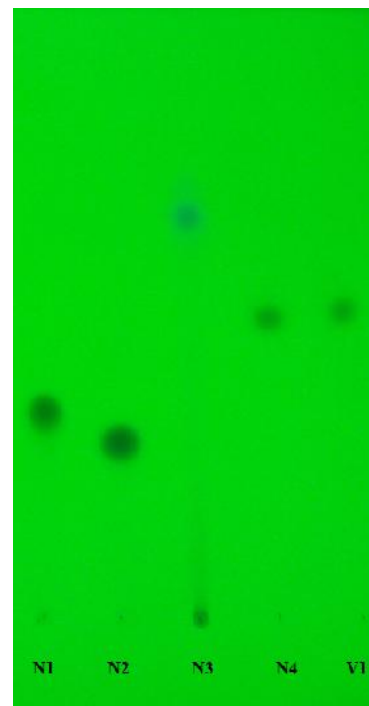


Hình 3.8. S phân l p h p ch t phenol t cao ethyl acetat v qu Mù u

3.3.3. Kiểm tra tinh khiết các hợp chất phân lập

Kiểm tra tinh khiết trên bản mỏng silica gel F₂₅₄ (Merck) cho thấy có một vết trên sắc ký .

H dung môi	R _f				
	N ₁	N ₂	N ₃	N ₄	V ₁
Toluen-EtOAc (8:2)	0,27	0,22	0,52	0,39	0,39
n-hexan-EtOAc (7:3)	0,37	0,31	0,63	0,53	0,53
CHCl ₃ -MeOH (9:1)	0,63	0,61	0,72	0,75	0,75
H dung môi	Phát hiện: 254 nm				
	N ₁	N ₂	N ₃	N ₄	V ₁
Toluen-EtOAc (8:2)	Vết tròn	Vết tròn	Vết tròn	Vết tròn	Vết tròn
n-hexan-EtOAc (7:3)	Vết tròn	Vết tròn	Vết tròn	Vết tròn	Vết tròn
CHCl ₃ -MeOH (9:1)	Vết tròn	Vết tròn	Vết tròn	Vết tròn	Vết tròn
H dung môi	Phát hiện: 366 nm				
	N ₁	N ₂	N ₃	N ₄	V ₁
Toluen-EtOAc (8:2)	Xanh d ng	Xanh d ng	Phát quang	Nâu s m	Nâu s m
n-hexan-EtOAc (7:3)	Xanh d ng	Xanh d ng	Phát quang	Nâu s m	Nâu s m
CHCl ₃ -MeOH (9:1)	Xanh d ng	Xanh d ng	Phát quang	Nâu s m	Nâu s m
H dung môi	Phát hiện: FeCl ₃ 5% (TT)				
	N ₁	N ₂	N ₃	N ₄	V ₁
Toluen-EtOAc (8:2)	Xanh tím	Xanh tím	(-)	(-)	(-)
n-hexan-EtOAc (7:3)	Xanh tím	Xanh tím	(-)	(-)	(-)
CHCl ₃ -MeOH (9:1)	Xanh tím	Xanh tím	(-)	(-)	(-)
Nhóm hợp chất	Có OH phenol	Có OH phenol	Không có OH phenol	Không có OH phenol	Không có OH phenol



Hình 3.9. Sắc ký TLC của các hợp chất phân lập từ nhài và vò quỳ Mùi u (H : n-hexan-EtOAc (7:3); Phát hiện: 254 nm)

3.4. XÁC ĐỊNH CẤU TRÚC CÁC HỢP CHẤT PHENOL PHÂN LẬP C

3.4.1. Xác định cấu trúc các hợp chất phenol phân lập từ nhàu Mù u

Hợp chất N₁

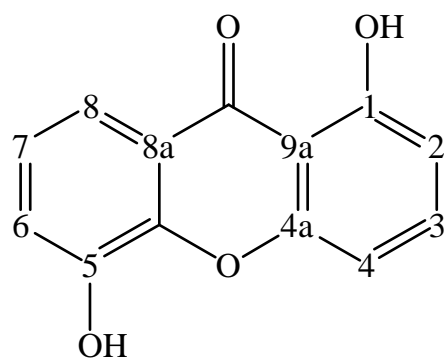
- Bột màu vàng, vô định hình, điểm chảy 245-247 °C.
- Phổ UV (MeOH) của hợp chất N₁ cho các cực đại hấp thụ (λ_{\max} , nm) 248, 315, 370 nm và một vai 235 nm trùng khớp với tài liệu đã công bố của B. Jackson và cộng sự [87], phù hợp với phổ do Iinuma và cộng sự ghi (236 (sh), 248, 313 và 366 nm). Phổ cho thấy hợp chất có khung xanthon [79],[89], [94] (Phụ lục 4.1).
- Phổ IR (KBr) của hợp chất N₁ cho các bước sóng hấp thụ (ν , cm⁻¹): 3421(O-H), 1647 (C=O), 1577 (C=C), 1279 (C-O-), 792, 724 (C-H nhân thơm): cho thấy có sự hiện diện của các nhóm OH phenol liên kết hydrogen nội phân tử với nhau. Băng 3421 cm⁻¹ có cường độ trung bình (m), nhóm carbonyl liên hợp của vòng keton ở bước sóng 1647 cm⁻¹, ether vòng 1279 cm⁻¹, nhân thơm benzen một lần nữa 1577 cm⁻¹, 792 và 724 cm⁻¹[60], [113] (Phụ lục 4.2).
- Phổ EI-MS của hợp chất N₁ cho các mảnh có m/z (rel. int., %): 228 (100), 212 (1,37), 200 (11,12), 171 (11,46), 115 (23,3), 92 (13,75) tương ứng với công thức nguyên C₁₃H₈O₄ (M = 228), phù hợp với dữ liệu phổ EI-MS của Iinuma và cộng sự về pic chính tại m/z 228 [79] (Phụ lục 4.3).
- Phổ NMR
 - Phổ ¹H-NMR (CD₃OD và DMSO-*d*₆, 500 MHz) của hợp chất N₁ cho các tín hiệu (ν_H , ppm; *J*, Hz) 7,72 *t* (8,0); 6,82 *dd* (8,0; 1,0); 7,12 *dd* (7,5; 0,5); 7,36 *dd* (7,5; 2,0); 7,30 *t* (7,5); 7,74 *dd* (8,0; 1,5) cho thấy đây là 3 proton lân cận của vòng thơm A và B (Phụ lục 4.4).
 - Phổ ¹³C-NMR (CD₃OD và DMSO-*d*₆, 125 MHz) của hợp chất N₁ cho các tín hiệu (ν_C , ppm) 183,8; 162,9; 157,5; 147,7; 147,0; 138,2; 125,3; 122,6; 122,2; 116,5; 111,2; 109,7; và 108,4. Phổ DEPT của hợp chất N₁ cho 13 tín hiệu carbon trong đó có 7 carbon bậc 4 và 6 methin carbon. Tất cả các tương tác HMBC của hợp chất N₁ trình bày trong bảng 3.3. So sánh các dữ liệu phổ ¹H-

NMR và ^{13}C -NMR (Ph 1 c 4.9) v i ph ^1H -NMR và ^{13}C -NMR c a ch t 1,5-dihydroxyxanthon [32] cho k t qu hoàn toàn phù h p (Ph 1 c 4.5, 4.6, 4.7 và 4.8).

- T nh ng d li u phân tích ph UV-Vis, IR, EI-MS, ^1H -NMR và ^{13}C -NMR 1 và 2 chi u, h p ch t N_1 xác nh là 1,5-dihydroxyxanthon.

B ng 3.3. B ng d li u ph NMR c a h p ch t N_1 (CD_3OD và $\text{DMSO}-d_6$, máy 500 MHz)

C	DEPT	c, ppm	^1H , ppm; m (J, Hz)	HMBC
1	-O-C=	162,9	-	
2	-CH=	111,2	6,82 dd (8,0; 1,0)	4
3	-CH=	138,2	7,72 t (8,0)	1, 4a
4	-CH=	108,4	7,12 dd (7,5; 0,5)	2
4a	>C=	157,5	-	
5	-O-C=	147,7	-	
6	-CH=	122,2	7,36 dd (7,5; 2)	8, 10a
7	-CH=	125,3	7,30 t (7,5)	5, 8a
8	-CH=	116,5	7,74 dd (8,0; 1,5)	6, 9, 10a
8a	>C=	122,6	-	
9	>C=O	183,8	-	
9a	>C=	109,7	-	
10a	>C=	147,0	-	



Hình 3.10. Công th c c u t o c a h p ch t N_1

H p ch t N₂

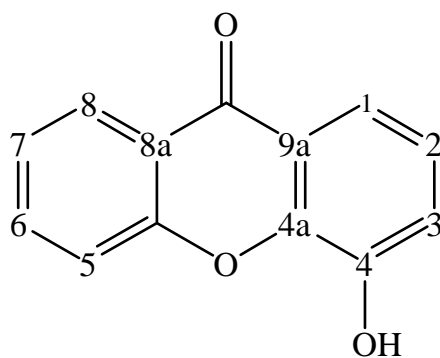
- Tinh thể hình kim, không màu, điểm chảy 228-230 °C.
- Phổ UV (MeOH) của hợp chất N₂ cho các cực đại hấp thụ (λ_{\max} , nm) 231, 248, và 348 nm chứng tỏ hợp chất có khung xanthon [75] (Phần 1 c 5.1).
- Phổ IR (KBr) của hợp chất N₂ cho các band hấp thụ (ν , cm⁻¹): 3197 (O-H), 1652 (C=O), 1589 (C=C), 1292 (C-O-), 754, 729 (C-H nhân thơm): cho thấy có sự hiện diện của các nhóm OH phenol liên kết hydrogen nội phân tử cho thấy rằng, cường độ trung bình 3197 cm⁻¹, nhóm carbonyl liên hợp của vòng keton ở cường độ 1652 cm⁻¹, ether vòng 1292 cm⁻¹, nhân thơm benzen một lần nữa 1589 cm⁻¹, 754 và 729 cm⁻¹[60], [113] (Phần 1 c 5.2).
- Phổ EI-MS của hợp chất N₂ cho các mảnh có m/z (*rel. int.*, %): 212 (100), 184 (22,76), 155 (7,28), 128 (21,91), 102 (9,05), 63 (11,19) với pic chính ở m/z 212. Giá trị chỉ số phù hợp của 4-hydroxyxanthon trong thư viện phổ NIST thu được từ phần mềm LabSolution phiên bản 2.5 thấy các mảnh ion trùng khớp với nhau (Phần 1 c 5.3).
- Phổ NMR:
Trên phổ ¹H-NMR (CD₃OD, 500 MHz) của hợp chất N₂ nhận thấy:
 - Ba tín hiệu (u_H , ppm; J , Hz) 7,73 *dd* (8,0; 2,0); 7,25 *t* (8,0); và 7,31 *dd* (8,0; 1,5) là dấu hiệu của 3 proton kề nhau thuộc vòng thơm B (Phần 1 c 5.4).
 - Bốn tín hiệu (u_H , ppm; J , Hz) 7,68 *dd* (8,5; 0,5); 7,83 *dt* (8,5; 1,5); 7,44 *dt* (7,5; 1,0); và 8,26 *dd* (8,0; 2,0) là dấu hiệu của 4 proton kề nhau thuộc vòng thơm A (Phần 1 c 5.4).
- Phổ ¹³C-NMR (CD₃OD, 125 MHz) của hợp chất N₂ cho các tín hiệu (u_C , ppm) : 179,2; 157,4; 147,9; 147,1; 136,4; 127,3; 125,3; 125,1; 123,6; 122,5; 121,5; 119,4; và 117,1. Phổ DEPT của hợp chất N₂ cho 13 tín hiệu carbon trong đó có 6 carbon bậc 4 và 7 methin carbon (Phần 1 c 5.5 và 5.6).
- Tất cả các tương tác HMBC của hợp chất N₂ trình bày trong bảng 3.4. So sánh các dữ liệu phổ ¹H-NMR và ¹³C-NMR (PL 5.9) với phổ ¹H-NMR và ¹³C-NMR

c a 4-hydroxyxanthon [32], [72] cho k t qu t ng ng (Ph l c 5.7, 5.8 và 5.9).

- T nh ng d li u phân tích ph UV-Vis, IR, EI-MS, $^1\text{H-NMR}$ và $^{13}\text{C-NMR}$ 1 và 2 chỉ u, h p ch t N_2 xác nh là 4-hydroxyxanthon.

B ng 3.4. B ng d li u ph NMR c a h p ch t N_2 (CD_3OD , máy 500 MHz)

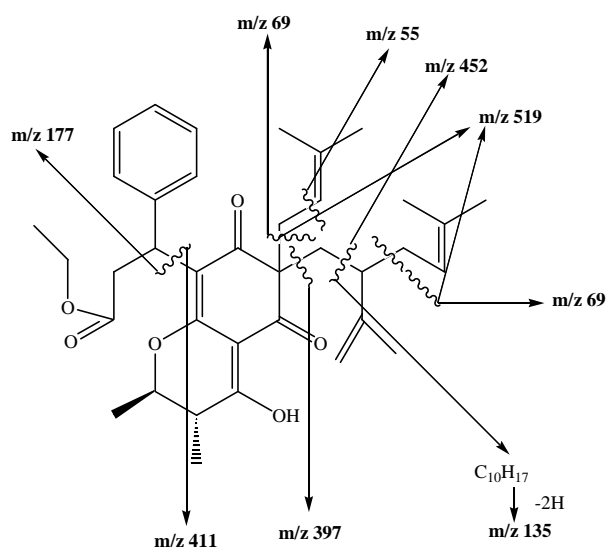
C	DEPT	c, ppm	$^1\text{H}, \text{ppm}; m (J, \text{Hz})$	HMBC
1	-CH=	117,1	7,73 <i>dd</i> (8,0; 2,0)	3, 4a, 9
2	-CH=	125,1	7,25 <i>t</i> (8,0)	4, 9a
3	-CH=	121,5	7,31 <i>dd</i> (8,0; 1,5)	1, 4a
4	-O-C=	147,9	-	
4a	>C=	147,1	-	
5	-CH=	119,4	7,68 <i>dd</i> (8,5; 0,5)	7, 8a, 10a
6	-CH=	136,4	7,83 <i>dt</i> (8,5; 1,5)	8, 10a
7	-CH=	125,3	7,44 <i>dt</i> (7,5; 1,0)	5, 8a
8	-CH=	127,3	8,26 <i>dd</i> (8,0; 2,0)	6, 9, 10a
8a	>C=	123,6	-	
9	>C=O	179,2	-	
9a	>C=	122,5	-	
10a	-O-C=	157,4	-	



Hình 3.11. Công th c c u t o c a h p ch t N_2

H p ch t N₃

- Tinh th hình phi n, không màu, i m ch y 98,2-100,5°C.
- Ph UV (MeOH) c a h p ch t N₃ cho các c c i h p th (λ_{\max} , nm) 239, và 311 nm (Ph l c 6.1).
- Ph IR (KBr) c a h p ch t N₃ cho các b ng h p th (ν , cm⁻¹): 3440 (O-H), 2926, 2855 (CH₂ và CH₃), 1732 (C=O), 1603 (1,3-diketon enol), 1447 (CH₂ và CH₃), 1376 (CH₃), 1257, 1031 (=C-O-C-). Ph cho th y phân t có s hi n đi n c a nhóm 1,3-diketon enol v i liên k t hydrogen n i phân t , dao ng co dẫn, dao ng u n c a các nhóm alkyl [63], [113] (Ph l c 6.2).
- Ph HRMS (ESI-micrOTOFQ) c a h p ch t N₃: [M+H]⁺ m/z 589,3422; [M-H]⁻ m/z 587,3368 và [M+Na]⁺ m/z 611,3325 cho [M]⁺ 588,3400 m/z (Ph l c 6.4 và 6.5). Ph EI-MS c a h p ch t N₃ cho các m nh có m/z (*rel. int.*, %): [M]⁺ 588 (7,45); [M - CH₃]⁺ 573 (1,77); [M - C₅H₉]⁺ 519 (10,81); 485 (1,58); [M - C₅H₉ - C₄H₇ + H]⁺ 465 (2,65); [M - C₁₀H₁₇ + H]⁺ 452 (11,92); 419 (4,49); 411 (7,77); [M - C₁₀H₁₇ - C₄H₇ + H]⁺ 397 (100); 379 (1,51); 363 (14,88); 323 (14,06); 289 (7,51); 267 (9,63); 235 (7,75); 177 (14,47); 135 (37,54); 121 (8,65); 105 (32,88); 97 (13,43); [C₅H₉]⁺ 69 (70,31); [C₄H₇]⁺ 55 (37,42); [OC₂H₅]⁺ 45 (6,43) (Ph l c 6.3) t ng ng v i công th c nguyên C₃₇H₄₈O₆; M = 588,3401 [7].



Hình 3.12. S phân m nh EI-MS c a h p ch t N₃

- Ph ¹H-NMR:

Trên ph ¹H-NMR (CDCl₃, 500 MHz) c a h p ch t N₃ cho th y:

- Tín hi u ($u_H, ppm; J, Hz$) vùng tr ãng th p 16,5 s là d u hi u c a m t proton nhóm OH.
- Các tín hi u ($u_H, ppm; J, Hz$) 7,37 *d* (7,5) x 2; 7,22 *t* (7,5) x 2; 7,11 *t* (7,5) là d u hi u c a các proton k c n thu c vòng th m.
- Các tín hi u ($u_H, ppm; J, Hz$) 4,36 *s*; 4,92 *m*; 4,95 *m* là d u hi u c a các proton olefin.
- Các tín hi u ($u_H, ppm; J, Hz$) 3,21 *dd* (11,0; 7,0); 3,32 *dd* (10,5; 7,0) là d u hi u c a c a các nhóm methylen.
- Các tín hi u ($u_H, ppm; J, Hz$) 1,75 *s*; 1,65 *s*; 1,5 *s*; 1,48 *s* là d u hi u c a các nhóm methyl olefin nh ãn.
- Các tín hi u ($u_H, ppm; J, Hz$) 1,25 *d* (6,0); 1,3 *d* (6,0) là d u hi u c a các nhóm methyl nh ôi.
- Các tín hi u ($u_H, ppm; J, Hz$) 1,29 *t* (3,5); 4,1 *q* (4,5) là d u hi u c a ethyl ester (Ph 1 c 6.6).

- Ph ¹³C-NMR (CDCl₃, 125 MHz) c a h p ch t N₃ cho các tín hi u (u_C, ppm) : 12,4; 14,1; 17,8; 18,1; 19,3; 25,5; 25,6; 35,2; 35,6; 36,8; 40,9; 41,7; 44,6; 60,1; 77,2; 109,7; 113,7; 115,2; 115,6; 117,1; 122,4; 125,6; 127,7; 128,1; 132,2; 143,6; 147,4; 163,1; 187,3; 187,4; 195,7; và 200,3. Ph DEPT c a h p ch t N₃ cho 37 tín hi u carbon trong ó có 8 nhóm methyl, 6 nhóm methylen, 11 methin carbon và 12 carbon b c 4 (Ph 1 c 6.7 và 6.8).

Trên ph ¹³C-NMR (CDCl₃, 125 MHz) c a h p ch t N₃ nh ãn th y:

- Các tín hi u (u_C, ppm) 195,7 và 200,3 là d u hi u c a 2 keton carbonyl liên h p.
- Các tín hi u (u_C, ppm) 14,1 và 60,1 là d u hi u c a ethyl ester.
- Tín hi u (u_C, ppm) 187,3 là d u hi u c a nhóm carbonyl.
- Các tín hi u (u_C, ppm) 125,6; 127,7; 128,1 là d u hi u c a carbon vòng th m.

- Các tín hiệu (u_C , ppm) 12,4; 14,1; 18,1; 17,8; 19,3; 25,5; 35,2 là do hiệu ứng của các nhóm methyl.
- Các tín hiệu (u_C , ppm) 143,6; 187,3 là do hiệu ứng của carbon olefin liên kết với O.
- Tín hiệu (u_C , ppm) 113,7 là do hiệu ứng của carbon nhóm methylen [12], [60].

Bảng 3.5. Bảng dữ liệu phổ NMR của hợp chất N_3 ($CDCl_3$, máy 500 MHz)

C	DEPT	c , ppm	H , ppm; m (J, Hz)	HMBC
2	CH sp^3	77,2	4,15 <i>m</i>	4, 8a, 3-CH ₃
3	CH sp^3	41,7	2,5 <i>m</i>	4a, 2-CH ₃
4	-O-C=	187,4	—	
4a	>C=	117,1	—	
5	>C=O	200,3	—	
6		115,2	—	
7	>C=O	195,7	—	
8	>C=	115,6	—	
8a	-O-C=	163,1	—	
9	CH sp^3	35,5	4,94 <i>m</i>	7, 8a, 11, 2', 6'
10	-CH ₂ -	36,6	3,21 <i>dd</i> (11,0; 7,0); 3,32 <i>dd</i> , (10,5; 7,0)	8, 1'
11	O-C=O	187,3	—	
1'	>C=	143,6	—	
2'	-CH=	127,7	7,37 <i>d</i> (7,5)	9, 4', 6'
3'	-CH=	128,1	7,22 <i>t</i> (7,5)	1', 5'
4'	-CH=	125,6	7,11 <i>t</i> (7,5)	2', 6'
5'	-CH=	128,1	7,22 <i>t</i> (7,5)	1', 3'
6'	-CH=	127,7	7,37 <i>d</i> (7,5)	9, 2', 4'

2-CH₃	-CH ₃	12,4	1,3 <i>d</i> (6,0)	3, 8a
3-CH₃	-CH ₃	14,1	1,25 <i>d</i> (6,0)	2, 4
1''	-CH ₂	40,9	2,15 <i>m</i>	5, 7, 3'', 1'''
2''	>C=	109,7	4,92 <i>m</i>	6, 4'', 5''
3''	>C=	147,4	—	
4''	-CH ₃	35,2	1,75 <i>s</i>	2'', 5''
5''	-CH ₃	18,1	1,65 <i>s</i>	2'', 4''
1'''	-CH ₂ -	44,6	2,1 <i>m</i>	5, 7, 1'', 3''', 8'''
2'''	>CH-	36,8	3,3 <i>m</i>	6, 4''', 9''', 10'''
3'''	-CH ₂ -	25,6	1,6 <i>m</i>	1''', 5''', 8'''
4'''	>C=	122,4	4,95 <i>m</i>	2''', 6''', 7'''
5'''	>C=	132,2	—	
6'''	-CH ₃	25,5	1,5 <i>s</i>	4''', 7'''
7'''	-CH ₃	19,3	1,65 <i>s</i>	6''', 4'''
8'''	>C=	147,4	—	
9'''	>C=	113,7	4,36 <i>s</i>	2''', 10'''
10'''	-CH ₃	17,8	1,5 <i>s</i>	2''', 9'''
OH	—	—	16,5 <i>s</i>	
12	-CH ₂ -O	60,1	4,1 <i>q</i> (4,5)	11
13	-CH ₃	14,1	1,18 <i>t</i> (3,5)	

- Ph n hi u x tia X n tinh th :

Trên ph n hi u x tia X c a h p ch t N₃ nh n th y:

- Góc DHA = 130,9 ° (> 120 °); dài liên k t hydrogen d(D...A) = 1,97 Å (< 2,5 Å) và d(D...A) = 2,590 là d u hi u c a liên k t hydrogen n i phân t .

- dài liên kết (Å) giữa các nguyên tử C và O tiêu biểu cho cấu trúc phân tử N_3 trình bày trong bảng 3.6.

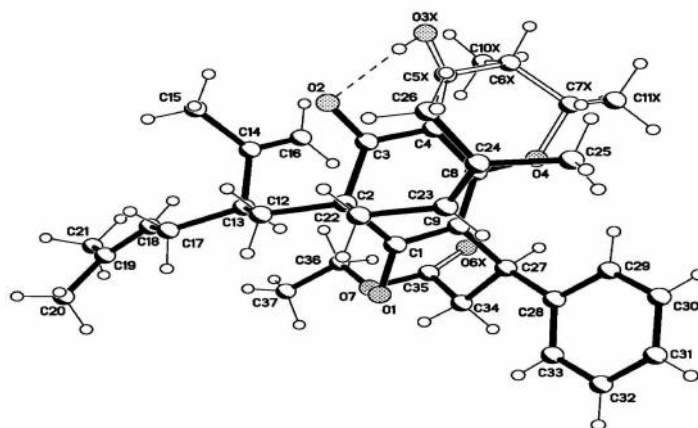
Bảng 3.6. Dữ liệu dài các liên kết tiêu biểu của phân tử N_3

Liên kết	dài thực nghiệm (Å)	Kiểu liên kết	dài lý thuyết (Å) [118]
C (1')-C (6')	1,350	C=C	1,35
C (1')-C (2')	1,388	C-C th m	1,373-1,395
C (2')-C (3')	1,366	C=C	1,35
C (3')-C (4')	1,373	C-C th m	1,373-1,395
C (4')-C (5')	1,357	C=C	1,35
C (5')-C (6')	1,391	C-C th m	1,373-1,395
C (1')-C (9)	1,506	C-C	1,49-1,54
C (9)-C (10)	1,546	C-C	1,49-1,54
C (8)-C (9)	1,521	C-C	1,49-1,54
C (6)-C (7)	1,509	C-C	1,49-1,54
C (6)-C (5)	1,516	C-C	1,49-1,54
C (1'')-C (6)	1,546	C-C	1,49-1,54
C (1''')-C (6)	1,545	C-C	1,49-1,54
C (4a)-C (5)	1,422	C=C-C=	1,421-1,46
C (5)-O	1,26	C=O	1,23-1,26
C (2''')-C (8''')	1,523	C-C	1,49-1,54
C (1''')-C (2''')	1,513	C-C	1,49-1,54
C (2''')-C (3''')	1,54	C-C	1,49-1,54
C (2)-O	1,472	C-O-C	1,47
C (4)-O	1,427	C-O	1,43
C (7)-O	1,226	C=O	1,23-1,26
C (11)-O	1,224	C = O	1,23-1,26
C (11)-O	1,274	O = C-O	1,36

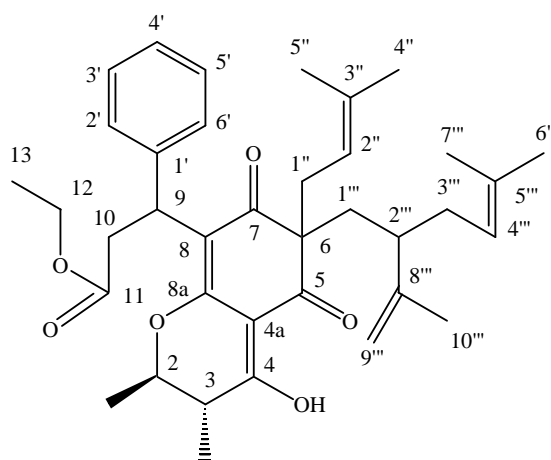
Bảng 3.7. D li u dài và góc liên k t hydrogen c a h p ch t N₃

D-H...A	d(D-H)	d(H...A)	d(D...A)	<(DHA)
O (3)-H (3)...O (2)	0,83	1,97	2,590 (14)	130,9
O (3X)-H (3X)...O (2)	0,83	1,76	2,452 (15)	140,3

Toàn b các d li u ph nhi u x tia X c a h p ch t N₃ ã c g i t i Trung tâm d li u tinh th Cambridge CCDC (Cambridge Crystallographic Data Centre) t t i V ng qu c Anh d i d ng CIF file (Crystallographic Information File) v i s ng ký 939550 (Ph l c 6.11).



Hình 3.13. C u trúc c a h p ch t N₃ (nhi u x tia X)

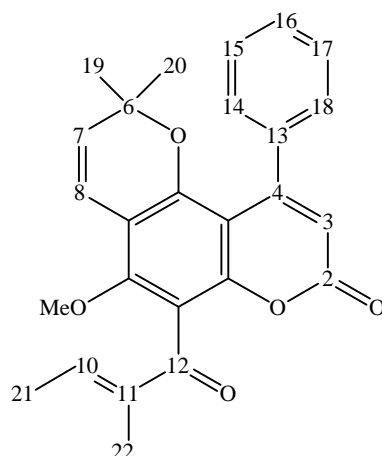


Hình 3.14. Công th c c u t o c a h p ch t N₃

H p ch t N₄

- Tinh thể hình l ng tr , không màu, i m ch y 155 °C.
- Ph UV (EtOH) c a h p ch t N₄ cho các c c i h p th (λ_{\max} , nm) 235, 270 và 295 nm và m t vai 325 nm, cho th y phân t có c u trúc coumarin và phù h p v i d li u ph UV c a calophyllolid ã công b [65] (Ph l c 7.1).
- Ph IR (KBr) c a h p ch t N₄ cho các b ng h p th (ν , cm⁻¹): 1726 (C=O), 1663 (-C=C-), 1580 (C-C vòng th m), 1133 (C-O-), 757, 698 (C=H vòng th m). Ph cho th y phân t có dao ng co dẫn r t c tr ng c a C=O 1728 cm⁻¹, dao ng c a vòng -pyron 1580 và 1663 cm⁻¹, c a vòng phenyl m t l n th 1580, 757 và 698 cm⁻¹ ch ng t phân t có c u trúc neo-flavonoid [60], [113] (Ph l c 7.2).
- Ph EI-MS c a h p ch t N₄ cho các m nh có *m/z* (*rel. int.*, %): 416 (15,42), 401 (100), 83 (5,62), 55 (30,60) phù h p v i d li u ph GC-MS c a D. E. Games [64] (Ph l c 7.3).
- Ph NMR:
Trên ph ¹H-NMR (CDCl₃, 300 MHz) c a h p ch t N₄ nh n th y:
 - Các tín hi u (u_H , ppm; *J*, Hz) 7,26 *m* x 2; 7,40 *m* x 2 là d u hi u c a 4 proton k c n thu c vòng th m.
 - Các tín hi u (u_H , ppm; *J*, Hz) 0,97 *s* x 2; 1,9 *d* (6,3); và 2,01 *s* c a các nhóm methyl.
 - Các tín hi u (u_H , ppm; *J*, Hz) 5,48 *d* (9,9); 6,02 *s*; 6,45 *d* (9,6), và 6,57 *q* (6,0) cho th y ây là c u trúc pyranocoumarin [28] (Ph l c 7.4).
Ph ¹³C-NMR (CDCl₃, 75 MHz) c a h p ch t N₄ cho các tín hi u (u_C , ppm) : 10,7; 15,2; 26,8 x 2; 63,0; 77,4; 105,6; 110,7; 114,2; 115,0; 115,9; 127,2 x 2; 127,5 x 2; 127,7; 129,0; 139,5; 139,9; 144,2; 151,7; 152,0; 155,0; 155,8; 159,4; 194,3.
Trên ph ¹³C-NMR (CDCl₃, 75 MHz) c a h p ch t N₄ nh n th y:
 - Các tín hi u (u_C , ppm) 127,2 x 2; 127,5 x 2; 127,7 là d u hi u c a các carbon vòng th m.

- Tín hiệu (u_C , ppm) 63,0 là dấu hiệu của nhóm methoxy.
- Các tín hiệu (u_C , ppm) 10,7; 15,2; 26,8 là dấu hiệu của các nhóm methyl.
- Tín hiệu (u_C , ppm) 194,3 là dấu hiệu của một nhóm keton.
- Tín hiệu (u_C , ppm) 159,4 là dấu hiệu của một nhóm keton thuộc nhóm coumarin.
- So sánh dữ liệu phổ $^1\text{H-NMR}$ và $^{13}\text{C-NMR}$ (Phần 1 c 7.5, 7.6 và 7.7) với phổ $^1\text{H-NMR}$ và $^{13}\text{C-NMR}$ của calophyllolid [65], [107] cho kết quả hoàn toàn phù hợp.
- Tính năng dữ liệu phân tích phổ UV-Vis, IR, EI-MS, $^1\text{H-NMR}$ và $^{13}\text{C-NMR}$, hợp chất N_4 xác định là calophyllolid.



Hình 3.15. Công thức cấu tạo của hợp chất N_4

3.4.2. Xác định cấu trúc hợp chất phenol phân lập từ vỏ quả Mù u

Hợp chất V_1

- Tính chất hình thái, không màu, điểm sôi $155,5\text{ }^\circ\text{C}$, tính tan trong nước và các dung môi hữu cơ khác.
- Số ký hiệu phân tích:
 - Bản mẫu: silica gel F_{254}
 - Hệ dung môi: [1]: $\text{CHCl}_3\text{-MeOH}$ (9:1); [2]: n-hexan-EtOAc (7:3)
 - Phát hiện: soi đèn bước sóng 254/365 nm.
 - Kết quả: vết có cùng màu sắc, hình dạng và R_f với vết của hợp chất N_4 (h 1: $R_f = 0,85$; h 2: $R_f = 0,53$) (Phần 1 c 8.1).

- Ph UV (EtOH) c a h p ch t V_1 cho các c c i h p th (λ_{max} , nm) 235, 270 và 295 nm và th hi n m t vai 325 nm, phù h p v i ph UV c a h p ch t N_4 (Ph l c 8.2).
- Ph IR (KBr) c a h p ch t V_1 cho các b ng h p th (ν , cm^{-1}): 1728 (C=O), 1663 (-C=C-), 1580 (C-C vòng th m), 1133 (C-O-), 757, 698 (C-H vòng th m) cho th y phù h p v i ph h ng ngo i c a h p ch t N_4 .
- Ph EI-MS c a h p ch t V_1 cho các m nh có m/z (*rel. int.*, %): 416 (11,65), 401 (100), 83 (1,94), 55 (6,95) phù h p v i d li u ph GC-MS c a D. E. Games [64] (Ph l c 8.3).
- Ph NMR:
Trên ph 1H -NMR ($CDCl_3$, 500 MHz) c a h p ch t V_1 nh n th y:
 - Các tín hi u (u_H , ppm; J , Hz) 7,19 *m* x 2; 7,33 *m* x 2 là d u hi u c a 4 proton k c n thu c vòng th m.
 - Các tín hi u (u_H , ppm; J , Hz) 0,90 *s* x 2; 1,83 *d* (7,0); và 1,94 *s* c a các nhóm methyl
 - Các tín hi u (u_H , ppm; J , Hz) 5,40 *d* (10,0); 5,95 *s*; 6,38 *d* (10,0), và 6,49 *m* cho th y ây là c u trúc pyranocoumarin [28] (Ph l c 7.4).
 Ph ^{13}C -NMR ($CDCl_3$, 125 MHz) c a h p ch t V_1 cho các tín hi u (u_C , ppm) : 10,7; 15,1; 26,9; 27,8; 62,9; 77,4; 105,6; 110,7; 114,3; 115,1; 116,0; 127,3 x 2; 127,5 x 2; 127,8; 129,2; 139,6; 140,0; 143,9; 151,8; 152,0; 154,9; 155,9; 159,4; 194,2.
- So sánh d li u ph 1H -NMR và ^{13}C -NMR (Ph l c 8.4 và 8.5) c a h p ch t V_1 v i ph 1H -NMR và ^{13}C -NMR c a calophyllolid cho k t qu hoàn toàn phù h p [65], [107].
- T nh ng d li u phân tích ph UV-Vis, IR, EI-MS, 1H -NMR và ^{13}C -NMR, h p ch t V_1 xác nh c ng là calophyllolid.

3.5. NGHIÊN CỨU THIẾT LẬP CHẤT CHUẨN ICHIU

3.5.1. Thiết lập chất chuẩn i chi u calophyllolid

Tiến hành chiết xuất (Ph 1 c 9), phân lập (Ph 1 c 10) và tinh chế (Ph 1 c 11) calophyllolid đánh giá làm chất chuẩn i chi u. Khối lượng i chi u chỉ c 1,44 g tinh thể không màu.

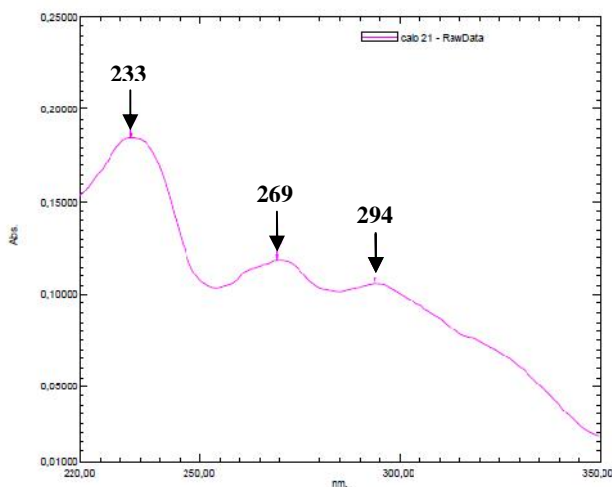
3.5.1.1. i m ch y

M u th	K t qu (°C)
1	155,6
2	155,3
3	155,8
Trung bình	$155,6 \pm 0,4$ °C
Tiêu chuẩn chấp nhận	$155,0 \pm 1,0$ °C
K t lu n	t

3.5.1.2. nh tính calophyllolid i u ch

Ph UV-Vis

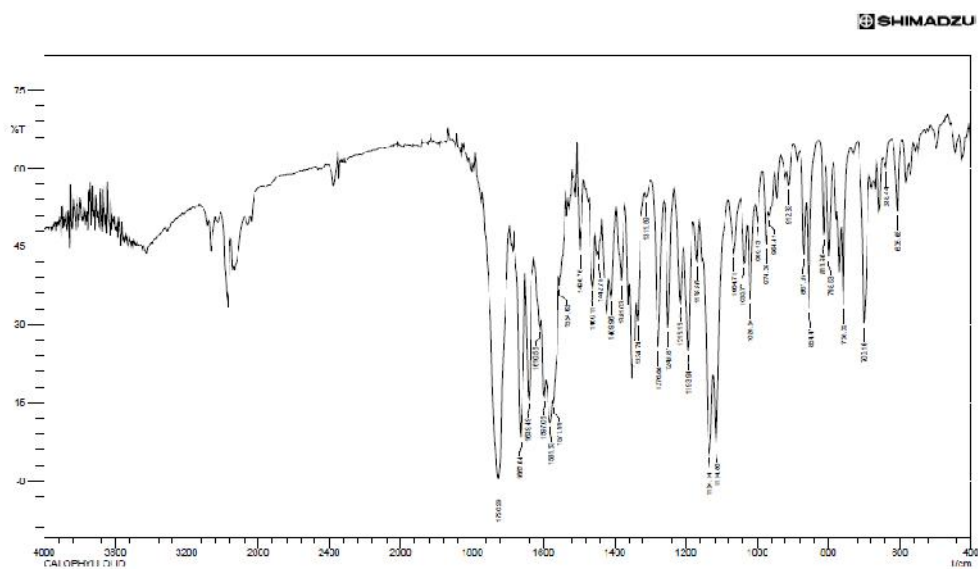
Phương pháp t ngoại và kh ki n c a calophyllolid (EtOH) i u ch ghi trong d i sóng t 220 nm n 350 nm có các c c i h p thu : 233, 269 và 294 nm, phù h p v i tài li u ã công b [65].



Hình 3.16. Ph UV-Vis (EtOH) c a calophyllolid i u ch c

Ph IR

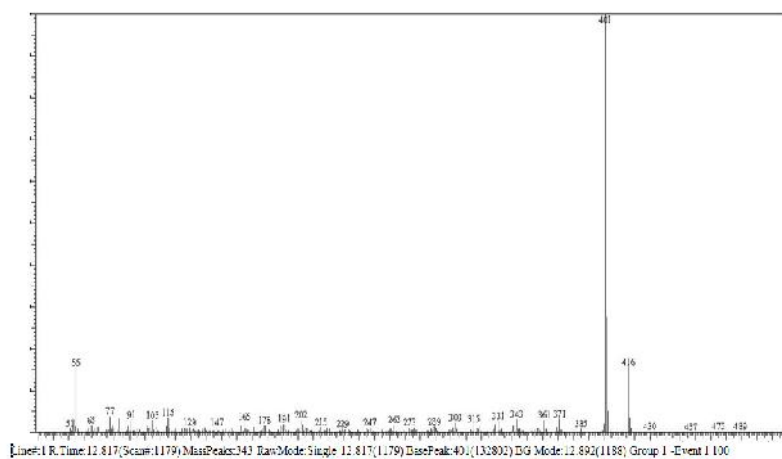
Ph h ng ngo i c a calophyllolid (KBr) i u ch có các nh có s sóng: 1726, 1662, 1581, 1134, 758, 700 cm^{-1} , phù h p v i tài li u ã công b [65].



Hình 3.17. Ph IR (KBr) c a calophyllolid i u ch c

Ph MS

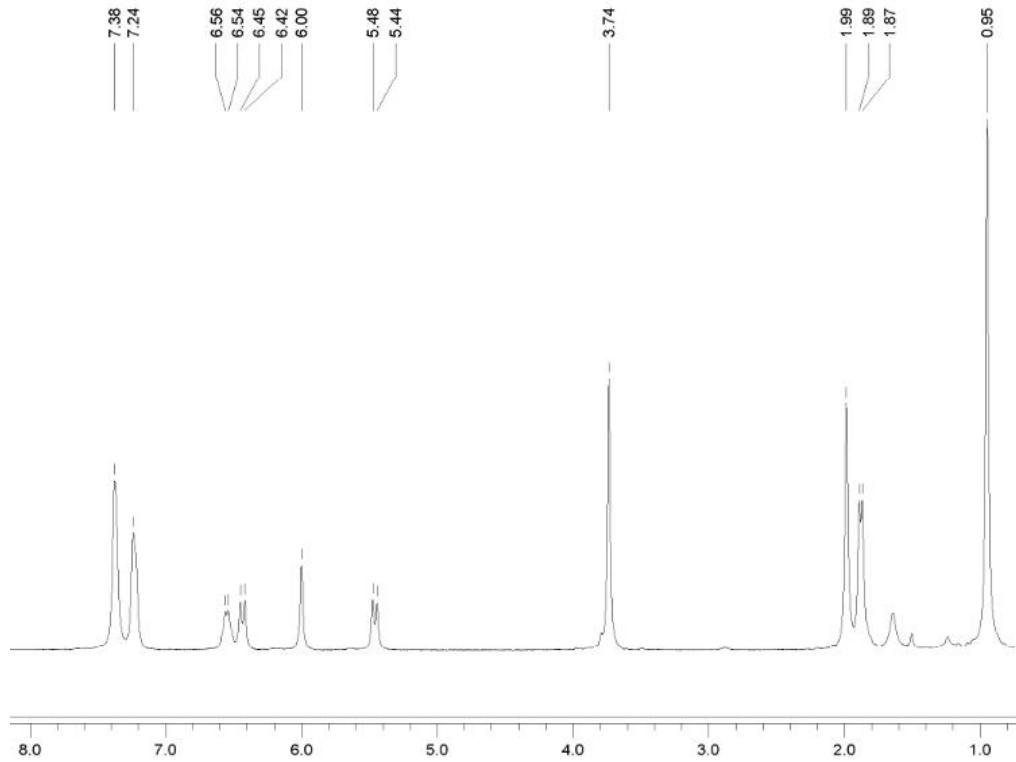
Ph kh i l ng EI-MS (70 eV) c a calophyllolid i u ch có các pic m/z 416 $[\text{M}]^+$, 401 (pic c n b n), m/z 83, 55, phù h p v i tài li u ã công b [65].



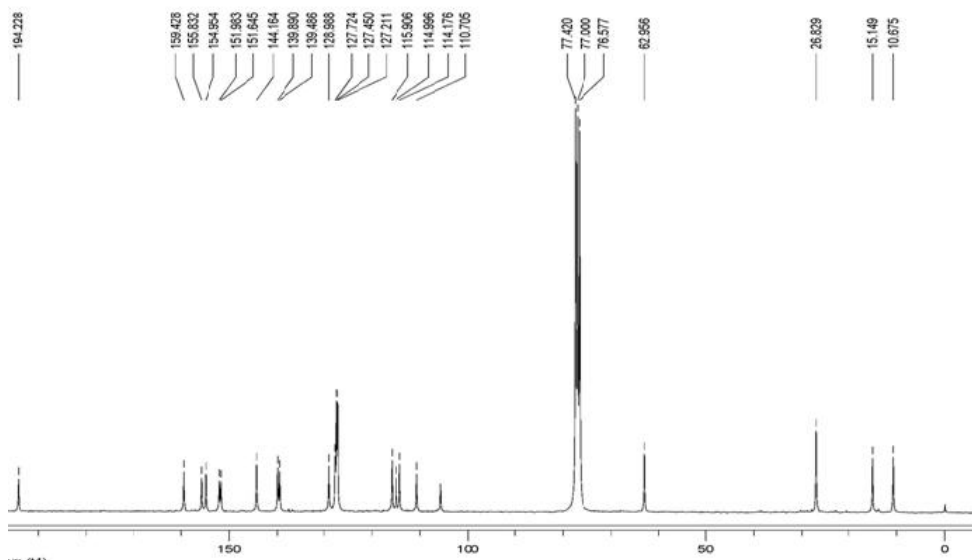
Hình 3.18. Ph MS (EI-MS) c a calophyllolid i u ch c

Ph NMR

Ph ^{13}C -NMR và ph ^1H -NMR của calophyllolid i u ch phù h p v i ph ^{13}C -NMR và ph ^1H -NMR theo tài li u ã công b [65].



Hình 3.19. Ph ^1H -NMR (CDCl_3 , 300 MHz) của calophyllolid i u ch c



Hình 3.20. Ph ^{13}C -NMR (CDCl_3 , 75 MHz) của calophyllolid i u ch c

B ng 3.8. B ng so sánh d li u ph $^1\text{H-NMR}$ và $^{13}\text{C-NMR}$ c a calophyllolid i u ch c v i tài li u tham kh o

C	Calophyllolid i u ch		Calophyllolid [65]	
	c (ppm) ^a	H m (J, Hz) ^b	c (ppm) ^a	H m (J, Hz) ^b
2	159,4	—	159,5	—
3	114,2	6,00 <i>s</i>	114,2	6,02 <i>s</i>
4	155,0	—	155,0	—
4a	105,6	—	105,6	—
4b	151,7	—	151,7	—
6	77,4	—	77,4	—
7	129,0	5,46 <i>d</i> (12,0)	129,0	5,48 <i>d</i> (10,0)
8	115,9	6,43 <i>d</i> (9,0)	116,0	6,45 <i>d</i> (10,0)
8a	110,7	—	110,7	—
8b	155,8	—	155,8	—
10	144,2	6,55 <i>q</i> (6,0)	144,2	6,57 <i>dq</i> (7,0; 1,3)
11	139,9	—	139,9	—
12	194,3	—	194,3	—
12a	115,0	—	115,0	—
12b	152,0	—	152,0	—
13	139,5	—	139,5	—
14, 18	127,2	7,38 <i>m</i>	127,3	7,40 <i>m</i>
15, 17	127,5	7,24 <i>m</i>	127,5	7,26 <i>m</i>
16	127,7	7,38 <i>m</i>	127,7	7,40 <i>m</i>
19	26,8	0,95 <i>s</i>	26,9	0,97 <i>s</i>
20	26,8	0,95 <i>s</i>	26,9	0,97 <i>s</i>
21	15,2	1,88 <i>d</i> (6,0)	15,2	1,90 <i>dd</i> (7,0)
22	10,7	1,99 <i>s</i>	10,7	2,01 <i>m</i>
OMe	63,0	3,74 <i>s</i>	63,0	3,75 <i>s</i>

^a: o trong CDCl_3 75 MHz ^b: o trong CDCl_3 300 MHz

3.5.1.3. *Đánh giá calophyllolid* *in situ*

Xác định thành phần bay hơi

Tiến hành phân tích bằng phương pháp TGA (Phụ lục 12), so sánh với tiêu chuẩn chấp nhận.

Mẫu thử	Kết quả (%)
1	0,99
2	0,96
3	1,2
Trung bình	1,05 ± 0,3
Tiêu chuẩn chấp nhận	1,1
Kết luận	t

Xác định thành phần vô cơ

Tiến hành phân tích bằng phương pháp ICP-MS (Phụ lục 12), so sánh với tiêu chuẩn chấp nhận.

Mẫu thử	Kết quả		
	Pb	As	Hg
1	Không phát hiện	Không phát hiện	Không phát hiện
2	Không phát hiện	Không phát hiện	Không phát hiện
3	Không phát hiện	Không phát hiện	Không phát hiện
Trung bình	t (MDL: 2,49 ppb)	t (MDL: 4,69 ppb)	t (MDL: 0,56 ppb)
Tiêu chuẩn chấp nhận	20 ppm	20 ppm	20 ppm
Kết luận	t	t	t

Xác định thành phần thực

Xây dựng phương pháp phân tích HPLC-DAD

Kết quả chọn các điều kiện sau:

- Cột: Gemini NX C-18 (150 mm x 4,6 mm, 5 µm)
- Bước sóng phát hiện: 270 nm
- Nhiệt độ: 40 °C

- Tốc độ dòng: 0,6 ml/ phút
- Thể tích tiêm: 10 μ l.
- Phương pháp: chương trình gradient

Thời gian (phút)	% acetonitril	% nước
0	50	50
20	90	10
30	100	0
37	100	0
45	50	50
55	50	50

- Nồng độ mẫu thử: 0,06 mg/ml trong acetonitril-nước (50:50)

Kết quả khảo sát bước sóng phát hiện trình bày trong bảng 3.9.

Bảng 3.9. Kết quả khảo sát % diện tích của các thành phần theo bước sóng

Stt	210 nm		233 nm		270 nm		295 nm	
	Tổng p (%)	Calophyllolid (%)	Tổng p (%)	Calophyllolid (%)	Tổng p (%)	Calophyllolid (%)	Tổng p (%)	Calophyllolid (%)
1	2,64	97,36	2,32	97,68	3,15	96,71	2,81	97,39
2	2,81	97,20	2,34	97,66	3,10	96,91	2,921	97,08
3	2,79	97,22	2,36	97,60	3,09	96,91	2,89	97,12
4	2,77	97,23	2,34	97,58	3,07	96,90	2,85	97,10
TB	2,75	97,25	2,34	97,63	3,10	96,86	2,86	97,17
RSD%	2,72	0,08	0,63	0,05	1,08	0,1	1,7	0,15

Thẩm nghiệm phương pháp phân tích HPLC-DAD

Thẩm nghiệm phù hợp của hệ thống

Chuẩn bị dung dịch calophyllolid trong acetonitril-nước (50:50) nồng độ 0,06 mg/ml. Tiêm vào hệ thống sắc ký vi mô khí sắc ký đã chuẩn bị sẵn. Tính các thông số sắc ký: thời gian lưu, %RSD của diện tích, phân giải và sự phân giải của pic chính calophyllolid và pic các thành phần. Kết quả trình bày trong bảng 3.10.

B ng 3.10. Tnh phù h p c a h th ng HPLC-DAD (n = 6)

Thông s H p ch t	Th i gian l u (phút)	%RSD di n tích pic	S a lý thuy t	phân gi i
Calophyllolid	14,98			
Yêu c u	-	2	> 2000	2
K t qu	-	1,56	34911	6,8 ^a
T p ch t 1	12,89			
Yêu c u	-	2	> 2000	2
K t qu	-	1,15	29446	6,8 ^b
T p ch t 2	15,65			
Yêu c u	-	2	> 2000	2
K t qu	-	0,90	34733	2,0 ^c

^a: Gi a pic c a calophyllolid và pic c a t p ch t 1

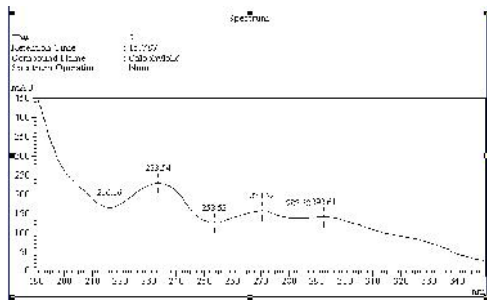
^b: Gi a pic c a t p ch t 1 và pic c a calophyllolid

^c: Gi a pic c a t p ch t 2 và pic c a calophyllolid

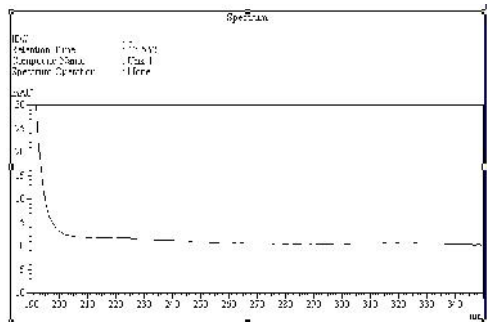
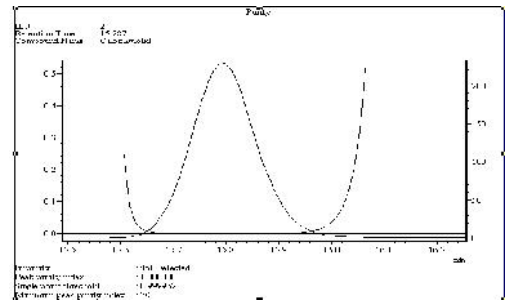
Tính c hi u

Tiêm vào máy s c ký l n l t các m u sau: dung môi pha m u: *acetonitril – n c* (50:50); dung d ch th : dung d ch calophyllolid trong *acetonitril-n c* (50:50) có n ng 0,06 mg/ml. K t qu nh sau:

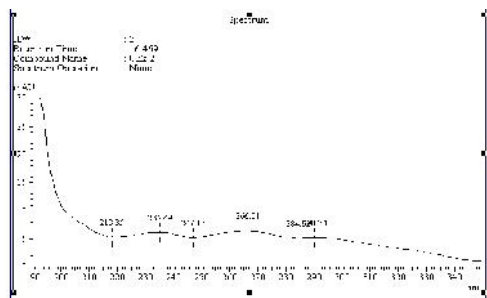
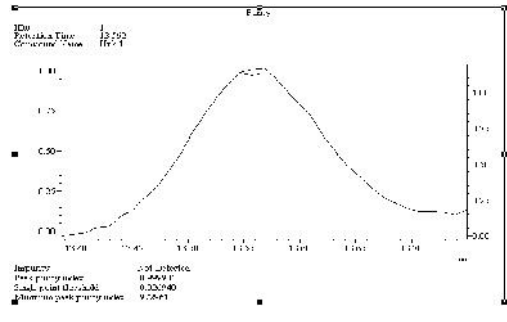
- S c ký c a dung môi pha m u không xu t hi n pic th i gian l u t ng ng v i th i gian l u c a pic chính trong s c ký c a dung d ch th .
- tnh khi t c a pic calophyllolid, t p ch t 1 và 2 l n l t là: 1,00; 0,99 và 0,99 (0,99).
- phân gi i gi a pic c a calophyllolid và pic c a t p ch t 1 và 2 l n l t là 6,8 và 2,2 (1,5).



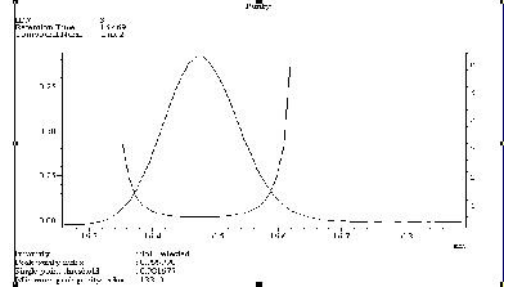
(1)



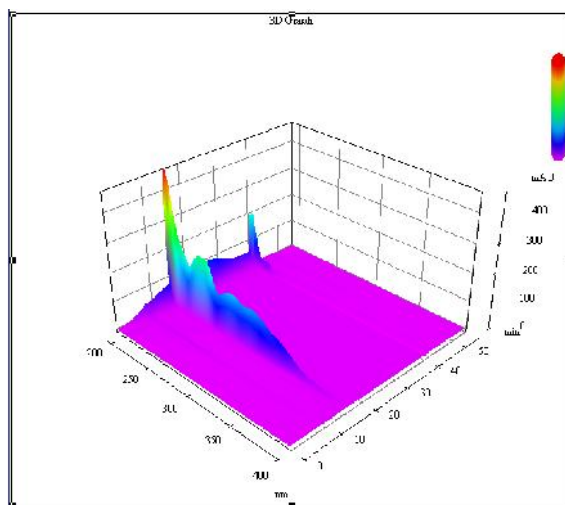
(2)



(3)



Hình 3.21. Phổ UV và tính khi t c a pic calophyllolid i u ch c (1), t p ch t 1 (2) và t p ch t 2 (3)

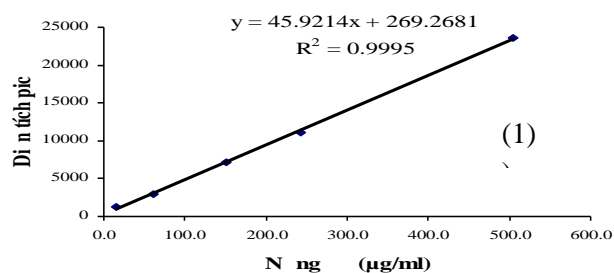


Hình 3.22. Ph 3D c a calophyllolid i u ch c

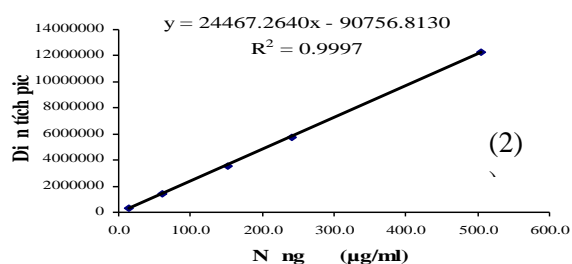
Tính tuyến tính

Kết quả khảo sát kho ng tuyến tính cho thấy các thành phần và calophyllolid cho các áp ng tuyến tính trong kho ng n ng calophyllolid từ 15,1-504,0 µg/ml ($r = 0,995-0,999$ ($r > 0,995$)).

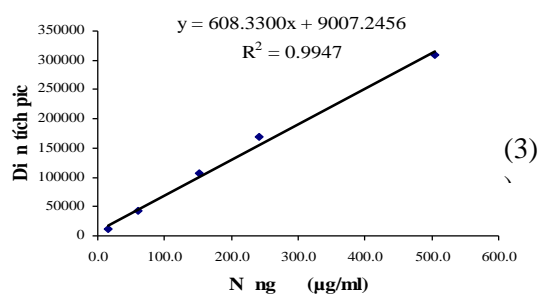
Stt	N ng (µg/ml)	Di n tích
1	15,1	1232
2	60,5	2911
3	151,2	7198
4	241,9	11127
5	504,0	23547



Stt	N ng (µg/ml)	Di n tích
1	15,1	351509
2	60,5	1426677
3	151,2	3548193
4	241,9	5711179
5	504,0	12308455



Stt	N ng (µg/ml)	Di n tích
1	15,1	10719
2	60,5	42658
3	151,2	106058
4	241,9	168628
5	504,0	308708



B ng 3.11. Kết quả khảo sát kho ng tuyến tính của thành phần 1 (1); calophyllolid (2); thành phần 2 (3)

Hình 3.23. Đồ thị quan hệ nồng độ các dung dịch calophyllolid và diện tích pic thành phần 1 (1); calophyllolid (2); thành phần 2 (3)

Gi i h n phát hi n

Theo ICH, tính gi i h n phát hi n dựa vào độ lệch chuẩn và lệch chuẩn của áp ng. Kết quả gi i h n phát hi n của thành phần 1 và 2 lần lượt là 11,6 và 36,1 µg/ml calophyllolid i u ch .

chính xác

Th c hi n b i 3 ki m nghi m viên trên các dung d ch calophyllolid trong acetonitril-n c (50:50) n ng 0,06 mg/ml. K t qu trình bày trong b ng 3.12.

B ng 3.12. K t qu kh o sát l p l i và chính xác trung gian c a ph ng pháp

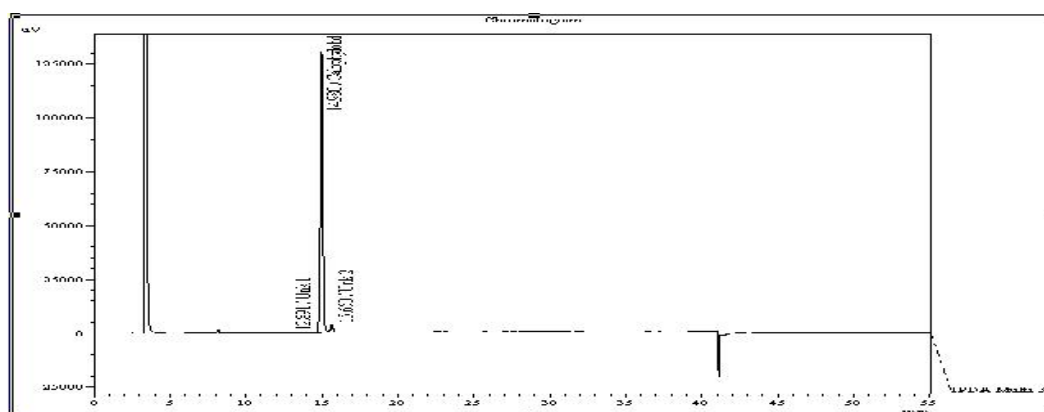
Stt	Ki m nghi m viên 1		Ki m nghi m viên 2		Ki m nghi m viên 3	
	Hàm l	ng t ng t p (%)	Hàm l	ng t ng t p (%)	Hàm l	ng t ng t p (%)
1		2,93		4,10		4,06
2		3,15		4,04		3,66
3		3,02		3,92		3,61
4		3,14		3,96		3,93
5		3,05		3,99		2,97
6		3,39		3,95		3,76
Trung bình		3,11 ± 0,17		3,99 ± 0,07		3,67 ± 0,4
l ch chu n		0,16		0,07		0,38
%RSD		5,08		1,66		10,36

Giá tr th ng kê chính xác trung gian:

Trung bình: 3,59 ± 1,11%

l ch chu n: 0,24

%RSD: 6,7 (10)



Hình 3.24. S c ký HPLC-DAD calophyllolid tinh ch c (phát hi n 270 nm)

Áp d ng quy trình phân tích HPLC-DAD ã xây d ng và th m nh trên xác nh hàm l ng % t p ch th u c trong calophyllolid i u ch c. K t qu : 3,53%.

3.5.1.3. *Óng l và ánh giá ng nh t calophyllolid i u ch*

Óng m u có kh i l ng 10 mg trong l th y tinh nâu, hàn kín, có l p m teflon t tiêu chu n ch t l ng theo quy nh trong Glove box c n p khí nitrogen 99,99%, m t ng i 40%, dán nhãn t m ghi tên ho t ch t và ánh s th t t ng l . tinh khi t calophyllolid i u ch c xác nh b ng ph ng pháp HPLC-DAD trình bày trong b ng 3.13.

B ng 3.13. *tinh khi t calophyllolid trong quá trình óng l*

Stt	L s	K t qu 1 (%)	K t qu 2 (%)
1	2	97,07	96,61
2	8	97,08	96,72
3	9	96,85	97,01
4	11	96,98	96,86
5	20	96,98	97,00
6	27	96,74	96,84
7	30	96,86	96,84
8	36	96,94	96,98

K t qu phân tích ph ng sai m t y u t theo ANOVA

Ng u n sai s	T ng s bình ph ng	B c t do	Bình ph ng trung bình	F_{tn}	F_{tc}
Gi a các nhóm	0,026	1	0,026	1,535	4,600
Trong t ng nhóm	0,234	14	0,017		
T ng c ng	0,259	15			

Nh n xét: $F_{tn} = 1,535 < F_{tc} = 4,600$. Do ó k t lu n các l ng nh t trong quá trình óng gói ($P = 0,05$).

3.5.1.4. *Đánh giá calophyllolid i u ch thông qua liên phòng thí nghiệm*

Xác định tinh khiết calophyllolid i u ch bằng phương pháp HPLC-DAD tiến hành tại các khoa của Viện kỹ thuật nghiên cứu TP.HCM gồm: khoa Kỹ thuật nghiên cứu các dạng bào chế (PTN 1), khoa Kỹ thuật nghiên cứu nguyên liệu (PTN 2), khoa Vật lý ô nhiễm (PTN 3), kết quả trình bày trong bảng 3.14.

Bảng 3.14. *Kết quả xác định tinh khiết của calophyllolid tại 3 phòng thí nghiệm*

	PTN 1	PTN 2	PTN 3
1	97,07	95,94	95,90
2	96,85	96,34	95,96
3	96,98	96,39	96,08
4	96,86	96,07	96,04
5	96,95	97,03	96,01
6	96,61	97,24	96,05
Trung bình	96,89	96,50	96,01

3.5.1.5. Xác định giá trị n và không m b o o (ph ng pháp HPLC-DAD) c a calophyllolid i u ch

Chu k	0	1	2
δ	-	0,99	0,81
$x^* - \delta$	-	95,38	95,66
$x^* + \delta$	-	97,35	97,27
	95,9	95,9	95,9
	95,94	95,94	95,94
	95,96	95,96	95,96
	96,01	96,01	96,01
	96,04	96,04	96,04
	96,05	96,05	96,05
	96,07	96,07	96,07
	96,08	96,08	96,08
	96,34	96,34	96,34
	96,39	96,39	96,39
	96,61	96,61	96,61
	96,85	96,85	96,85
	96,86	96,86	96,86
	96,95	96,95	96,95
	96,98	96,98	96,98
	97,03	97,03	97,03
	97,07	97,07	97,07
	97,24	97,24	97,24
Trung bình	96,47	96,47	96,47
SD	0,476	0,476	0,476
x^*	96,37	96,47	96,47
s^*	0,660	0,539	0,539
không m b o o μ :	$1,25 \times 0,539 / 4,243 = 0,159$		

3.5.1.6. nh l ng

Hàm l ng % tính trên nguyên tr ng: $100 - (3,53) - (1,05) = 95,42\%$ ($> 95,0\%$).

3.5.2. Thi t l p ch t chu n i chi u 4-hydroxyxanthon

3.5.2.1. i m ch y

M u th	K t qu (°C)
1	229,1
2	229,5
3	228,8
Trung bình	229,1 ± 0,9 °C
Tiêu chu n ch p nh n	229,0 ± 1,0 °C
K t lu n	t

3.5.2.2. nh tính

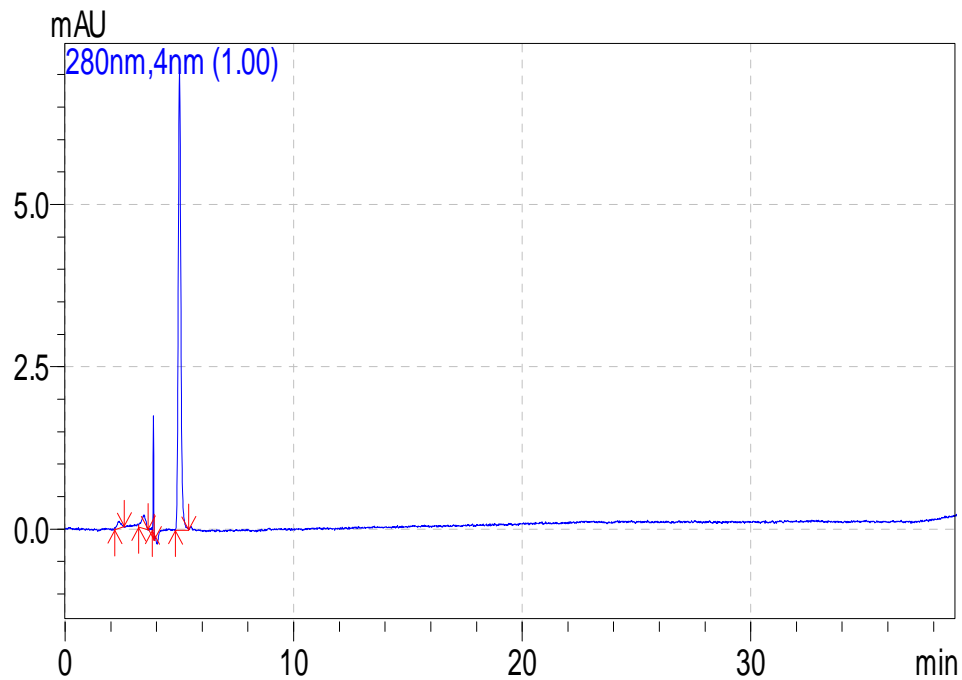
Các ph UV-Vis, IR, MS và ¹H-NMR và ¹³C-NMR u phù h p v i ph i chi u trong b d li u chu n c a 4-hydroxyxanthon.

3.5.2.3. ánh giá 4-hydroxyxanthon i u ch

Xác nh t p ch t h u c

Ti n hành ph ng pháp HPLC-DAD ghi trong quy trình phân tích (Ph l c 13).

M u th	K t qu	
	T ng t p (%)	4-hydroxyxanthon
1	5,57	94,43
2	5,71	94,29
3	5,35	94,65
4	5,25	94,75
5	5,68	94,32
6	5,86	94,14
Trung bình	5,57	
Tiêu chu n ch p nh n	6	
K t lu n	t	



Hình 3.25. Sơ ký xác nhận thành phần của 4-hydroxyxanthon

Xác nhận thành phần bay hơi

Tiến hành phân tích bằng phương pháp TGA (Phần 1.3), so sánh với tiêu chuẩn chấp nhận.

Mẫu thử	Kết quả (%)
1	0,5
2	0,47
3	0,58
Trung bình	0,52 ± 0,1
Tiêu chuẩn chấp nhận	1,0
Kết luận	t

3.5.2.4. Hàm lượng

Hàm lượng % tính trên nguyên trạng: $100 - (5,57) - (0,52) = 93,91\% (> 90\%)$.

3.6. XÂY DỰNG VÀ THỰC NGHIỆM PHƯƠNG PHÁP GC-MS XÁC ĐỊNH CALOPHYLLOLID TRONG CAO METHANOL CHI TIẾT NHƯ A MŨU (PHƯƠNG PHÁP 1)

Chuẩn bị dung dịch mẫu thử

Cân chính xác khoảng 0,04 g cao methanol vào ống eppendorf, thêm chính xác 2,0 ml *methanol* (TT), lắc xoáy (vortex) 1 phút rồi siêu âm trong 10 phút. Ly tâm 8000 vòng/phút trong 5 phút. Hút chính xác 1,0 ml dịch methanol cho vào bình định mức 10,0 ml rồi pha loãng bằng *methanol* (TT) định mức. Lưu.

Chuẩn bị dung dịch chất chuẩn

Cân chính xác một lượng chất chuẩn calophyllolid, hòa tan và pha loãng bằng *methanol* (TT) thu được các dung dịch có nồng độ lần lượt là 3,125; 6,25; 12,5; 25,0 và 50,0 µg/ml.

3.6.1. Xây dựng phương pháp phân tích

Chọn pha tĩnh

Chọn cột DB-5MS 25 m x 0,22 mm ID, $d_f = 5 \mu\text{m}$ do calophyllolid có phân cực trung bình.

Chọn chương trình nhiệt

Khảo sát chương trình nhiệt sao cho calophyllolid ra sớm trong thời gian ngắn nhất mà không bị các chất khác phân giải kèm trong mẫu xen phôi.

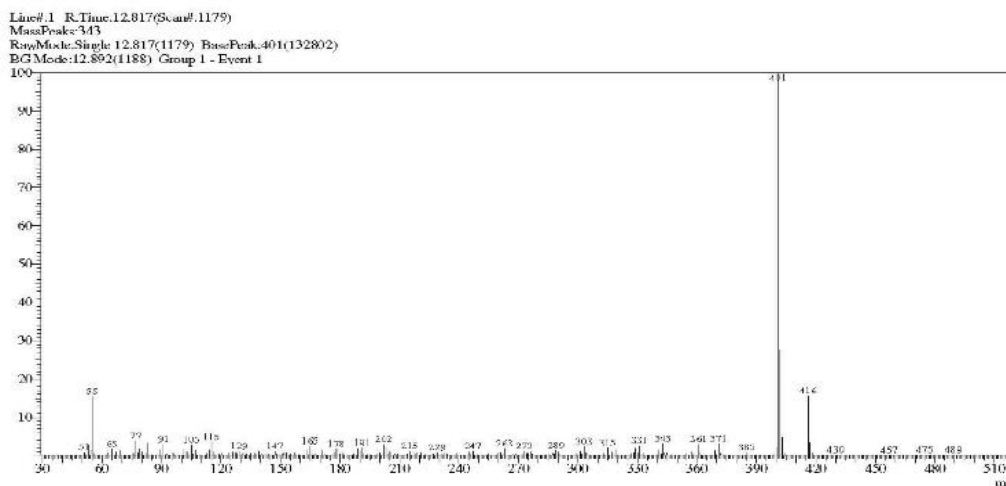
Bảng 3.15. Khảo sát chương trình nhiệt cột

Chương trình nhiệt cột	Temperatur gia nhiệt (°C/phút)	Thời gian lưu (phút)	Mạch ion đặc trưng (m/z)
	15	21,98 ± 0,01	416, 401, 83, 55
	20	18,5 ± 0,006	416, 401, 83, 55
60-300 °C/9 phút	25	16,43 ± 0,01	416, 401, 83, 55
	30	15,06 ± 0,012	416, 401, 83, 55
	40	13,2 ± 0,01	416, 401, 83, 55
80-300 °C/9 phút	40	12,83 ± 0,006	416, 401, 83, 55

Kết quả: Chọn chương trình nhiệt: 80-300 °C/9 phút, tốc độ 40 °C/phút.

Xác nh các m nh ion c tr ng cho calophyllolid

K t qu thu c các m nh ion chính g m: m nh phân t : m/z 416, pic c b n: m/z 401 và các m nh ion: m/z 55 và 83 phù h p v i công b c a Games [64].



Hình 3.26. Các m nh ion c tr ng c a calophyllolid

K t qu ch n i u ki n s c ký:

C t s c ký: DB-5MS 25 m x 0,22 mm ID, $d_f = 5 \mu\text{m}$.

Khí mang: heli dùng cho s c ký (TT) v i t c dòng 1,43 ml/phút

Ki u b m m u: không chia dòng

Nhi t :

	Th i gian (phút)	Nhi t (°C)
C t	0	80
	5,5	300
	14,5	300
Bu ng tiêm m u		250
Ngu n ion		250
Giao đi n		200

Ki u ion : B n phá i n t

Kho ng quét : 50-550 amu

Ki u thu đ li u : SCAN và SIM

Các ion nh ỉ ng

- Ion ỉ ch : m/z 401
- Ion tham chi u : m/z 83, 55

Th ỉ t ỉ ch ti ỉ m u : 1 μ l

3.6.2. Th ỉ m nh ph ỉ ng ph ỉ p h ỉ t ỉ ch [82],[95], [103]

Th ỉ m nh ph ỉ ng ph ỉ p theo h ỉ ng d ỉ n c ỉ a ICH v ỉ c ỉ c k ỉ t qu ỉ nh sau:

Th ỉ t ỉ ch p h ỉ p c ỉ a h ỉ th ỉ ng

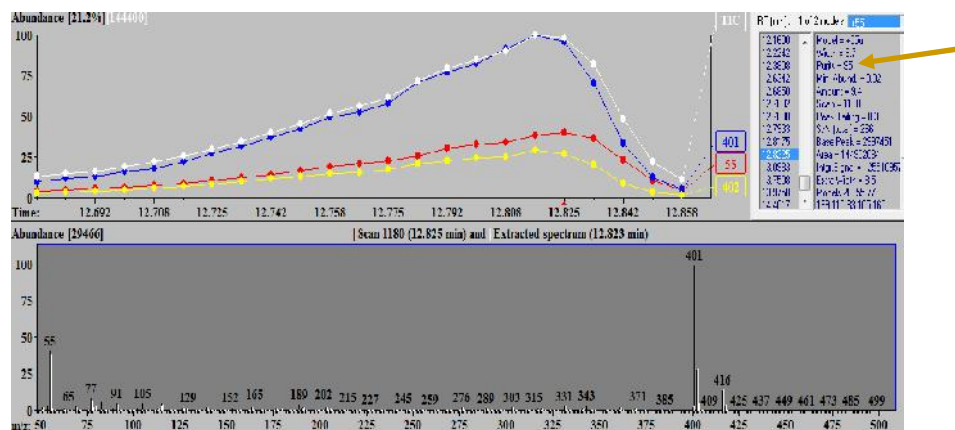
Ti ỉ n h ỉ nh ch ỉ t ỉ ch nh ỉ m ỉ y (auto tune) r ỉ i ti ỉ m v ỉ o th ỉ t b ỉ GC-MS c ỉ c dung d ỉ ch ch ỉ t ỉ i chi u calophyllolid v ỉ dung d ỉ ch m u th ỉ ỉ ch u n b nh tr ỉ n v ỉ i u ki ỉ n s c k ỉ ỉ ch n.

B ỉ ng 3.16. *T ỉ ch p h ỉ p c ỉ a h ỉ th ỉ ng GC-MS (n = 6) trong ph ỉ ng ph ỉ p GC-MS (ph ỉ ng ph ỉ p 1)*

C ỉ c th ỉ ng s	Ti ỉ u ch u n ch p nh n	K ỉ t qu
H ỉ s ỉ x ỉ ng	2,0	1,2
H ỉ s t ỉ ng quan (r) c ỉ a ỉ ng ch u n	> 0,995	0,9994
l ỉ ch c ỉ ng t ỉ ng i c ỉ c m nh	± 20 %	m/z 55: 10,36%
ion c ỉ tr ỉ ng (%) c ỉ a pic ch ỉ t ỉ i		m/z 83: 12,3%
chi u v ỉ pic m u th ỉ		m/z 416: 2,4%
		m/z 401: 0,0%

T ỉ ch c ỉ h ỉ u

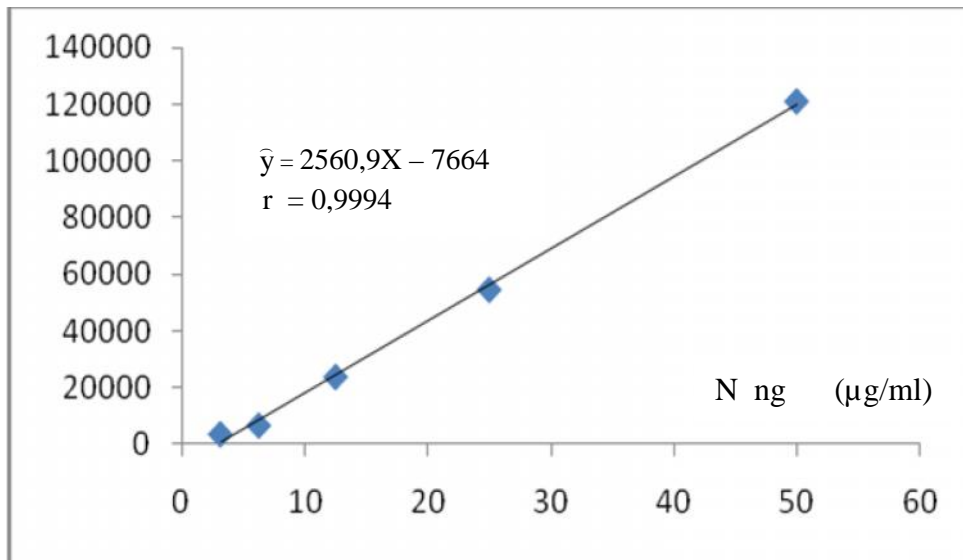
Ki ỉ m tra ỉ nh khi t ỉ c ỉ a pic calophyllolid trong m u th ỉ v ỉ ph ỉ n m m AMDIS 2.69 (NIST) b ỉ ng c ỉ ch x ỉ lý lo ỉ n n r ỉ so s ỉ nh t ỉ ch p h ỉ p v ỉ ph ỉ kh ỉ l ỉ ng c ỉ a calophyllolid ỉ i chi u nh p v ỉ o th ỉ v ỉ n. K ỉ t qu ỉ : t ỉ l ỉ t ỉ ng th ỉ ch l ỉ 95%.



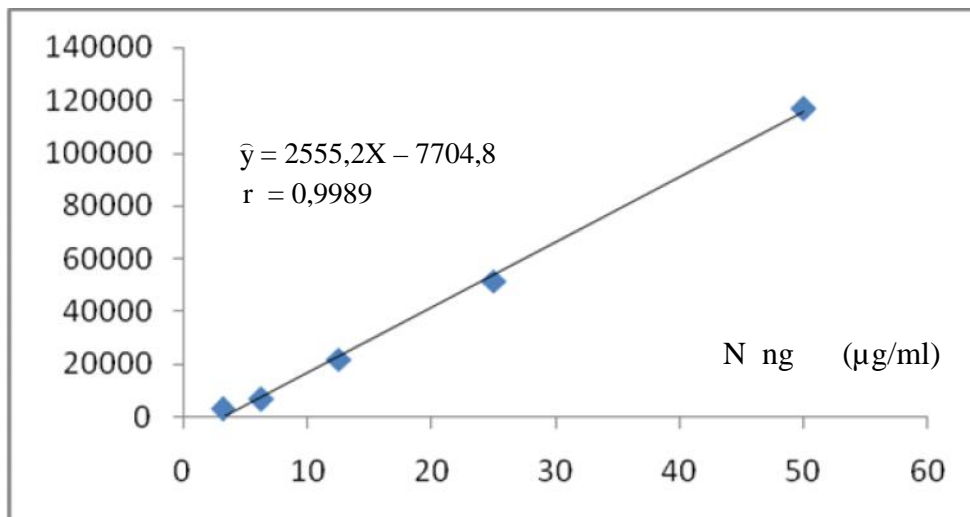
Tính tuyến tính

Có tương quan tuyến tính giữa nồng độ calophyllolid và diện tích pic của các dung dịch chiết xuất calophyllolid: 3,13-50,0 µg/ml và dung dịch calophyllolid trong cao methanol: 3,01-48,21 µg/ml với hệ số tương quan lần lượt là 0,9994 và 0,9989 (r = 0,995).

Diện tích pic (1)



Diện tích pic (2)



Hình 3.27. *th t ng quan gi a n ng các dung d ch i chi u (1), dung d ch m u th (2) và di n tích pic c n b n m/z 401*

Bảng 3.17. Tỉ lệ quan hệ giữa nồng độ và diện tích pic của calophyllolid trong phương pháp GC-MS (phương pháp 1)

Dung dịch chiết lưu calophyllolid trong methanol (TT)	Diện tích pic (A)	121270	54809	24011	6861	2816
	Nồng độ (C) (µg/ml)	50,0	25,0	12,5	6,25	3,13
	Hệ số áp ng (A/C)	2425,4	2192,4	1920,9	1097,8	901,1
Phương trình hồi quy: $\hat{y} = 2560,9X - 7664$						
$r = 0,9994$						
Dung dịch calophyllolid trong cao methanol	Diện tích pic (A)	116836	51544	21931	6784	3006
	Nồng độ (C) (µg/ml)	48,21	24,1	12,05	6,03	3,01
	Hệ số áp ng (A/C)	2424,0	2138,8	1820,0	1126,0	997,8
Phương trình hồi quy: $\hat{y} = 2555,2X - 7704,8$						
$r = 0,9989$						

Kết quả thử nghiệm thống kê: $t = 0,18 < t_{0,05} = 2,78$ cho thấy hệ số áp dụng của calophyllolid trong các dung dịch mẫu lưu và mẫu cao methanol không khác biệt có ý nghĩa thống kê ($P = 0,05$).

Nhận xét: Chất lượng trong cao methanol không làm ảnh hưởng tính tuyến tính của calophyllolid trong khoảng nồng độ 3,13-48,21 µg/ml.

chính xác

Xác định hàm lượng calophyllolid (g/100 g) trong ngày và khác ngày của các dung dịch có nồng độ cao methanol khoảng 1,875 mg/ml trong *methanol (TT)*.

Bảng 3.18. Kết quả lặp lại và chính xác trung gian của phương pháp GC-MS (phương pháp 1)

Stt	Ngày tháng 1		Ngày tháng 2		Ngày tháng 3	
	Điểm tích pic m/z	Hàm lượng (g/100 g)	Điểm tích pic m/z	Hàm lượng (g/100 g)	Điểm tích pic m/z	Hàm lượng (g/100 g)
1	13085	0,66	11692	0,65	10376	0,64
2	12171	0,67	16338	0,65	6718	0,69
3	12720	0,70	20667	0,70	8589	0,66
4	14721	0,68	16009	0,66	10329	0,64
5	12098	0,68	15826	0,67	9841	0,68
6	12619	0,67	14363	0,67	7802	0,67
Trung bình: 0,68 ± 0,01%		Trung bình: 0,67 ± 0,02%		Trung bình: 0,66 ± 0,02%		
%RSD: 1,54		%RSD: 2,99		%RSD: 2,78		

Giá trị thống kê chính xác trung gian

Trung bình: 0,67%

%RSD: 2,51 (< 3,0)

Ngày 1	Ngày 2	Ngày 3	So sánh phương sai	So sánh giá trị trung bình
Trung bình: 0,68 ± 0,01%	Trung bình: 0,67 ± 0,02%	Trung bình: 0,66 ± 0,02%	$F_{1-2} = 1,86 < F_{0,05} = 5,05$	$t_{1-2} = 0,157 < t_{0,05} = 2,228$
SD: 0,01	SD: 0,02	SD: 0,02	$F_{1-3} = 2,29 < F_{0,05} = 5,05$	$t_{1-3} = 1,319 < t_{0,05} = 2,228$
%RSD: 1,54	%RSD: 2,99	%RSD: 2,78	$F_{2-3} = 1,23 < F_{0,05} = 5,05$	$t_{2-3} = 0,294 < t_{0,05} = 2,228$

Kết quả:

- Lặp lại: %RSD: 1,54 (< 3,0)

- Kết quả giữa các ngày khác biệt không có ý nghĩa thống kê (P = 0,05)

Nhận xét: Phương pháp tuân thủ yêu cầu chi tiêu lặp lại và chính xác trung gian

úng

Thêm chính xác m t l ng ch t i chi u calophyllolid vào m u th ã bi t tr c hàm l ng thu c dung d ch m u có n ng t ng ng v i 3 m c n ng 80, 100 và 120% so v i m c n ng nh l ng ã ch n và n m trong kho ng tuyền tính c a ph ng pháp. T i m i m c n ng , th c hi n ít nh t 03 m u c l p. Xác nh hàm l ng calophyllolid tính t l ph n tr m gi a l ng tìm th y so v i l ng thêm vào.

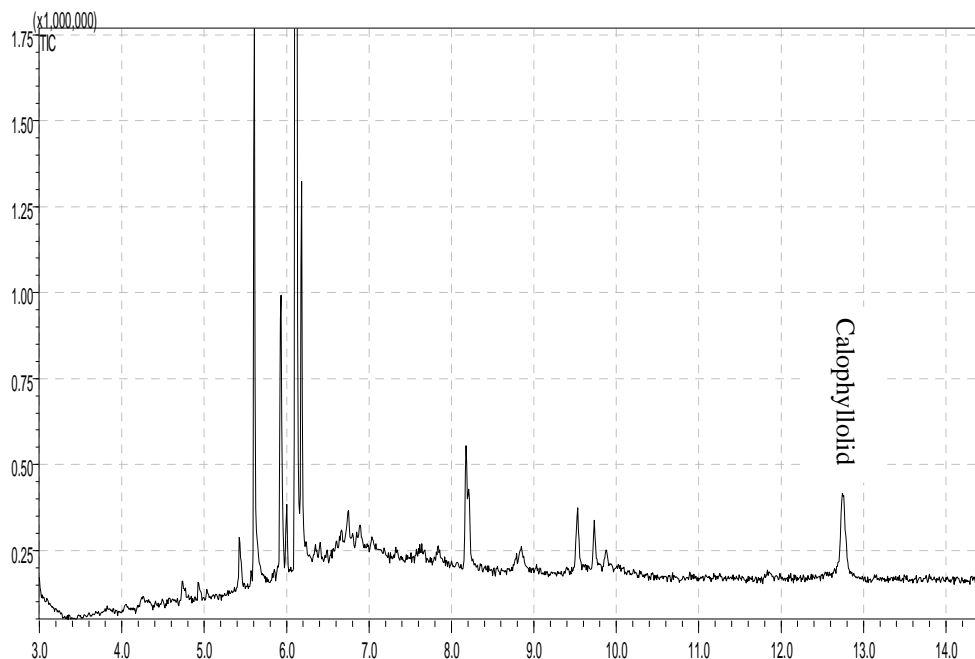
B ng 3.19. K t qu úng c a ph ng pháp GC-MS (ph ng pháp 1)

	L ng thêm vào (μg)	L ng tìm th y (μg)	T l ph c h i (%)	
80%	46,0	45,5	98,91 \pm 5,84	
	46,0	45,8	99,56 \pm 5,84	%RSD = 2,33
	46,0	47,5	103,26 \pm 5,84	
100%	57,5	57,3	99,65 \pm 1,75	
	57,5	57,3	99,65 \pm 1,75	%RSD = 0,7
	57,5	58,0	100,87 \pm 1,75	
120%	69,0	72,0	104,34 \pm 3,63	
	69,0	71,0	103,26 \pm 3,63	%RSD = 1,42
	69,0	70,0	101,45 \pm 3,63	
		Trung bình	101,22 \pm 1,52	%RSD = 1,95

K t qu :

- úng: 101,22 \pm 1,52% (98-102%); %RSD: 1,95 (< 2,0)

Nh n xét: Ph ng pháp t yêu c u ch tiêu úng.



Hình 3.28. *S c ký GC-MS (Scan mode) cao methanol nh a Mù u*

3.7. XÂY DỰNG VÀ TH M NH PH NG PHÁP GC-MS XÁC NH CALOPHYLLOLID TRONG V QU MÙ U (PH NG PHÁP 2)

3.7.1. Chu n b m u th b ng ph ng pháp chi t soxhlet

Cân chính xác kho ng 1,0 g b t v qu Mù u cho vào ng ng m u b ng cellulose kích th c 25 mm x 27 mm x 100 mm (Whatman, UK), l p vào b chi t soxhlet t ng Buchi B-811 chi t b ng *methanol (TT)* trong 8 gi . Cô d ch chi t d i áp su t gi m 40 °C r i nh m c n 20,0 ml b ng *methanol (TT)*. L c u. L c d ch chi t qua gi y l c Whatman 40.

3.7.2. Chu n b m u th b ng ph ng pháp chi t l ng d i áp su t (PLE)

Cân chính xác kho ng 5,0 g b t v qu cho vào thi t b chi t l ng d i áp su t Dionex ASE-100 chi t v i *methanol (TT)*.

i u k i n chi t

Áp su t	: 1500 psi
Nhi t	: 120 °C
Th i gian chi t	: 15 phút

Chu kỳ chiết : 1
Thí tích rửa : 60%
Thời gian làm sạch hệ thống bằng khí nitrogen : 90 giây
Cột chiết chiết độ áp suất giảm ri nh m c n 100,0 ml bằng *methanol (TT)*.
Lọc u. Lọc chiết chiết bằng giấy lọc Whatman 40.

Chuẩn dung dịch i chi u

Cân chính xác một lượng chính i chi u calophyllolid, hòa tan và pha loãng bằng *methanol (TT)* thu được các dung dịch có nồng độ nồng độ lần lượt là 3,19; 6,38; 12,75; 25,5 và 51,0 µg/ml.

i u k i n s c k y

Máy sắc ký khí ghép khối phổ Shimadzu GCMS-QP 2010 và phần mềm xử lý dữ kiện LabSolutions GCMSSolution phiên bản 2.5.

Cột: DB-5MS 25 m x 0,22 mm ID, $d_f = 5 \mu\text{m}$.

Chương trình nhiệt : 80 °C-300 °C/12 phút (40 °C/phút); nhiệt độ tiêm mẫu: 250 °C, không chia dòng; nhiệt độ dò ph khối: ngu n ion: 250 °C; giao diện: 200 °C; ion hóa bằng bắn phá i n t ; tốc độ dòng khí mang (helium): 1,43 ml/phút; khối lượng phân tử : 40-450 amu. Thí tích tiêm mẫu 1 µl. Các ion chính : ion m/z 401; ion tham chiếu m/z 83, 55. Kỹ thuật dò li u: SCAN và SIM.

3.7.3. Thí nghiệm phương pháp GC-MS xác định calophyllolid và quinine

Thí nghiệm phương pháp theo hướng dẫn của ICH trên mẫu thử chuẩn bằng phương pháp chiết độ áp suất (PLE) và các kết quả như sau:

Thí nghiệm phù hợp a h thí nghiệm

Thực hiện thí nghiệm máy (auto tune) rồi tiêm vào thí nghiệm GC-MS các dung dịch chính i chi u calophyllolid và dung dịch mẫu thử chuẩn như trên và i u k i n s c k y để phân tích.

B ng 3.20. Tính phù h p c a h th ng GC-MS ($n = 6$) trong ph ng pháp GC-MS (ph ng pháp 2)

Các thông s	Tiêu chu n ch p nh n	K t qu
H s i x ng	2,0	1,2
H s t ng quan (r) c a ng chu n	$> 0,995$	0,9993
l ch c ng t ng i các m nh	$\pm 20 \%$	m/z 55: 13,66
ion c tr ng (%) c a pic ch t i		m/z 83: 13,11
chi u và pic m u th		m/z 416: 2,1
		m/z 401: 0,0

Tính c hi u

Ph kh i l y t i nh pic c a ch t i chi u calophyllolid và m u th có các m nh ion c tr ng v i l ch v c ng t ng i n m trong kho ng $\pm 20 \%$ (m/z 55: 13,66; m/z 83: 13,11; m/z 83: 13,11; m/z 401: 0,0).

Tính tuy n tính

Có t ng quan tuy n tính gi a n ng calophyllolid và di n tích pic c a các dung d ch i chi u calophyllolid: 3,19-51,04 $\mu\text{g/ml}$ và các dung d ch calophyllolid trong m u chi t PLE: 3,08-49,2 $\mu\text{g/ml}$ v i h s t ng quan l n l t là 0,9993 và 0,9993 ($r = 0,995$).

B ng 3.21. T ng quan gi a n ng và di n tích pic c a calophyllolid trong ph ng pháp GC-MS (ph ng pháp 2)

Dung d ch ch t i chi u calophyllolid trong <i>methanol</i> (TT)	Di n tích pic (A)	121263	54853	24030	6861	2816
	N ng (C) ($\mu\text{g/ml}$)	51,04	25,52	12,76	6,38	3,19
	H s áp ng (A/C)	2377,8	2149,4	1883,2	1075,4	882,8
Ph ng trình h i quy: $\hat{y} = 2510,9X - 7671,4$						
$r = 0,9993$						

Dung dịch calophyllolid trong mẫu chiết PLE	Diện tích pic (A)	119936	52320	22431	7084	3311
	Nồng độ (C) (µg/ml)	49,2	24,6	12,3	6,15	3,08
	Hệ số áp ng (A/C)	2437,7	2126,8	1823,7	1133,4	1076,8
Phương trình hồi quy: $\hat{y} = 2566,4X - 7963,1$						
$r = 0,9993$						

Tiêu chí hành trình thí nghiệm để kiểm tra $t = 1,053 < t_{0,05} = 2,776$. Hệ số áp ng của calophyllolid trong các dung dịch mẫu chiết và mẫu cao methanol không khác nhau có ý nghĩa thống kê $P = 0,05$.

Nhận xét: Chiết xuất trong dung dịch chiết và quá trình phân tích bằng phương pháp PLE không làm ảnh hưởng đến tính tuyến tính của calophyllolid trong khoảng nồng độ 3,19-49,2 µg/ml.

chính xác

Xác định lặp lại bằng cách tiến hành phân tích mẫu thử 06 lần theo phương pháp đã xây dựng nồng độ 100%. Ghi nhận kết quả là hàm lượng calophyllolid (g/100 g) của các lần thử và tính %RSD giữa các lần thử.

Bảng 3.22. Kết quả lặp lại phân tích bằng phương pháp GC-MS (phương pháp 2)

Stt	Diện tích pic (µV.s)	Hàm lượng (g/100 g)	Kết quả
1	24343	0,0254	
2	24030	0,0251	
3	25214	0,026	$\bar{X} = 0,0255 \pm 0,0005\%$
4	26039	0,0262	SD = 0,0005
5	24746	0,025	%RSD = 1,89 (< 3,0)
6	24856	0,0254	

Nhận xét: Phương pháp đạt yêu cầu về chỉ tiêu lặp lại

úg

Thêm chính xác m t l ng ch t i chi u calophyllolid vào m u th ã bi t tr c hàm l ng thu c dung d ch m u có n ng t ng ng v i 3 m c n ng 80, 100 và 120% so v i m c n ng nh l ng ã ch n và n m trong kho ng tuyen tính c a ph ng pháp. T i m i m c n ng , th c hi n ít nh t 03 m u c l p. Xác nh hàm l ng calophyllolid tính t l ph n tr m gi a l ng tìm th y so v i l ng thêm vào.

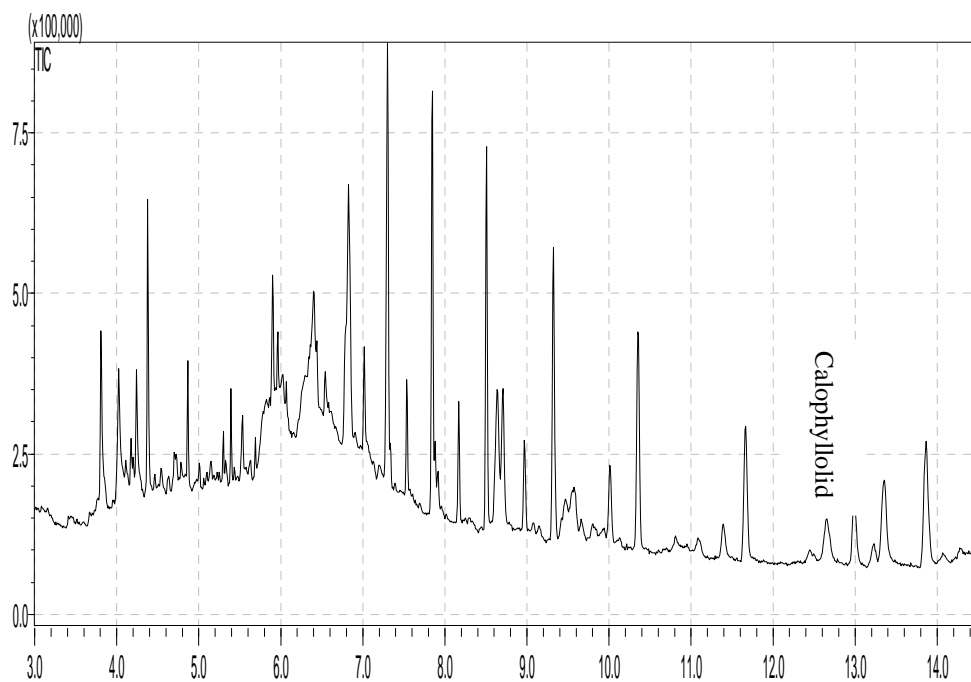
B ng 3.23. K t qu úg c a ph ng pháp GC-MS (ph ng pháp 2)

	L ng thêm vào (μg)	L ng tìm th y (μg)	T l ph c h i (%)	
80%	83,2	83,1	$99,88 \pm 2,05$	
	83,2	81,2	$97,59 \pm 2,05$	%RSD = 2,05
	83,2	84,6	$101,68 \pm 2,05$	
100%	104,0	101,2	$97,31 \pm 1,3$	
	104,0	102,9	$98,94 \pm 1,3$	%RSD = 1,33
	104,0	103,9	$99,9 \pm 1,3$	
120%	124,8	129,4	$103,67 \pm 3,05$	
	124,8	122,9	$98,48 \pm 3,05$	%RSD = 3,05
	124,8	122,7	$98,3, \pm 3,05$	
		Trung bình	$99,53 \pm 2,05$	%RSD = 2,0

K t qu :

- úg: $99,53 \pm 2,05\%$ (98-102%); %RSD: 2,0 (2,0)

Nh n xét: Ph ng pháp t yêu c u ch tiêu úg.



Hình 3.29. S c ký GC-MS (Scan mode) d ch chi t b ng PLE v qu Mù u

K t qu hàm l ng % (g/100 g) calophyllolid trong v qu :

- Chi t l ng d i áp su t PLE : $0,0255 \pm 0,0005\%$
- Chi t b ng soxhlet : $0,025 \pm 0,0005\%$

3.8. XÂY DỰNG VÀ THẨM NHẬN PHƯƠNG PHÁP HPLC-DAD NHẬN ĐỊNH CALOPHYLLOLID TRONG CHIẾT LẤY MỒI MỘT SỐ MẪU UROSAECIA

3.8.1. Xây dựng phương pháp phân tích

Dựa vào điều kiện sắc ký xác định thành phần trong chiết xuất calophyllolid đã nghiên cứu trên, nghiên cứu thay đổi pH và thành phần pha để phân tách calophyllolid trong điều kiện có nêu.

Kết quả chọn điều kiện sắc ký như sau:

Cột Zorbax 250 mm × 4,6 mm, 5 µm. Tốc độ dòng: 1 ml/phút. Thể tích tiêm mẫu: 10 µl. Nhiệt độ: 40 °C. Bước sóng phát hiện 270 nm. Pha động: *acetonitril-dung dịch acid acetic 2%* với chế độ gradient dung môi như sau:

Thời gian (phút)	Acetonitril (%)	Dung dịch acid acetic 2% (%)
0	20	80
30	80	20
35	20	80
40	20	80

Khảo sát quy trình chuẩn bị mẫu thử

Chuẩn bị dung dịch mẫu thử: Cân chính xác khoảng 120,0 mg mẫu cho vào bình định mức 10,0 ml, thêm 6,0 ml hỗn hợp *methanol-nước* với thể tích thích hợp, siêu âm chiết trong thời gian thích hợp. Lọc mẫu qua lọc 0,45 µm. Chọn điều kiện chuẩn bị mẫu là điều kiện sao cho diện tích pic calophyllolid là cao nhất.

B ng 3.24. K t qu thí nghi m ch n i u ki n chu n b m u

Stt	A: Nhi t m u ($^{\circ}$ C)	B: Hàm l ng methanol (%)	C: Th i gian làm m (phút)	D: Th i gian siêu âm (phút)	Di n tích pic Calophyllolid (μ V.s)
1	25	70	10	5	837048
2	25	90	15	10	866757
3	25	100	20	15	1045915
4	45	70	15	15	922057
5	45	90	20	5	1034104
6	45	100	10	10	1032145
7	60	70	20	10	843891
8	60	90	10	15	1057318
9	60	100	15	5	1023195

3.8.2. Th m nh ph ng pháp phân tích

Th tính phù h p c a h th ng

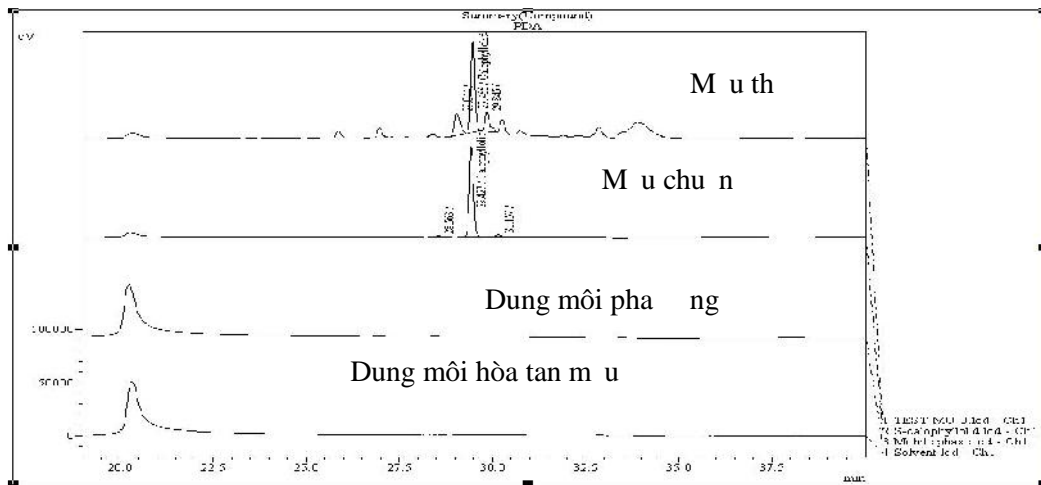
Chu n b dung d ch ch t i chi u calophyllolid trong *methanol* (TT) có n ng 59,2 μ g/ml. Tiêm vào h th ng s c ký theo ph ng pháp phân tích ã xây d ng 6 l n. Tính các thông s s c ký: th i gian l u, %RSD c a di n tích, h s i x ng và s a lý thuy t c a pic calophyllolid. K t qu ghi trong b ng 3.25.

B ng 3.25. Tính phù h p c a h th ng HPLC-DAD ($n = 6$)

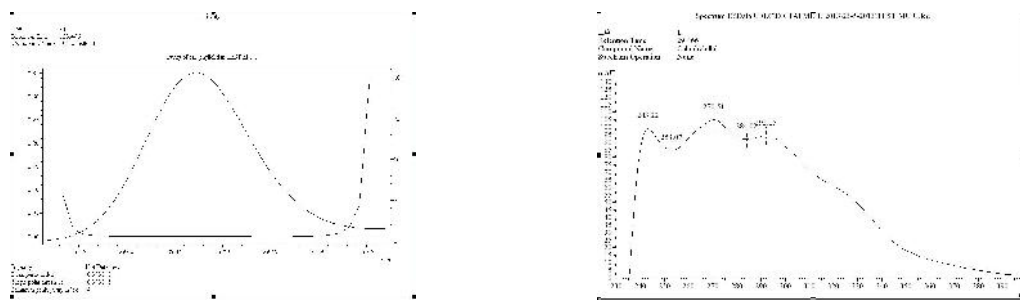
Thông s	Yêu c u	K t qu
Th i gian l u (phút)	–	29,5
H s i x ng	0,8-1,5	1,2
%RSD di n tích pic	2,0	1,65
S a lý thuy t	2000	254523

Tính c hi u

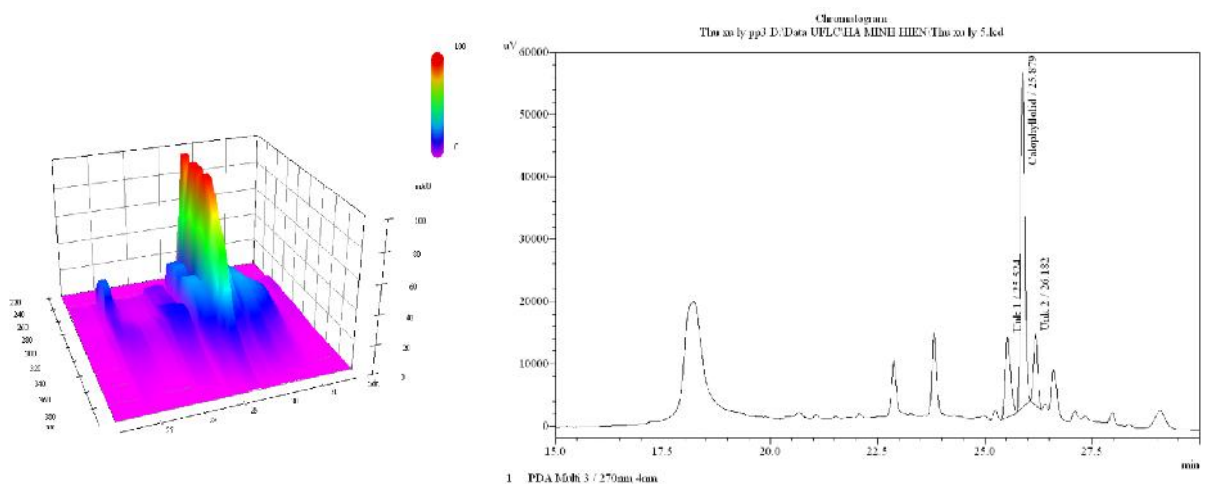
Tiêm vào máy s c ký l n l t các m u sau: Dung môi hòa tan m u: dung d ch methanol 90%; dung môi pha ng; dung d ch ch t i chi u calophyllolid trong *methanol* (TT) ; dung d ch th trong dung môi hòa tan m u.



Hình 3.30. S c ký kh o sát tính c hi u c a ph ng pháp nh l ng calophyllolide trong d u Mù u INOPILO



Hình 3.31. Ph UV và tinh khi t pic calophyllolide trong m u th d u Mù u INOPILO



Hình 3.32. Ph 3D c a calophyllolide trong m u th d u Mù u INOPILO

Hình 3.33. S c ký HPLC c a m u th d u Mù u INOPILO

Kết quả :

- Sắc ký pha ngược và dung môi pha mẫu không xuất hiện tín hiệu trùng với thời gian lưu của calophyllolid trong mẫu thử và mẫu đối chiếu.
- Tính khi tích của pic calophyllolid trong sắc ký mẫu thử : 0,999 (> 0,99).
- Phân giải giữa pic calophyllolid và các pic liên kề trong sắc ký mẫu thử : 1,52 và 1,58 (> 1,5).

Nhận xét: Phương pháp đạt yêu cầu về tính đặc hiệu.

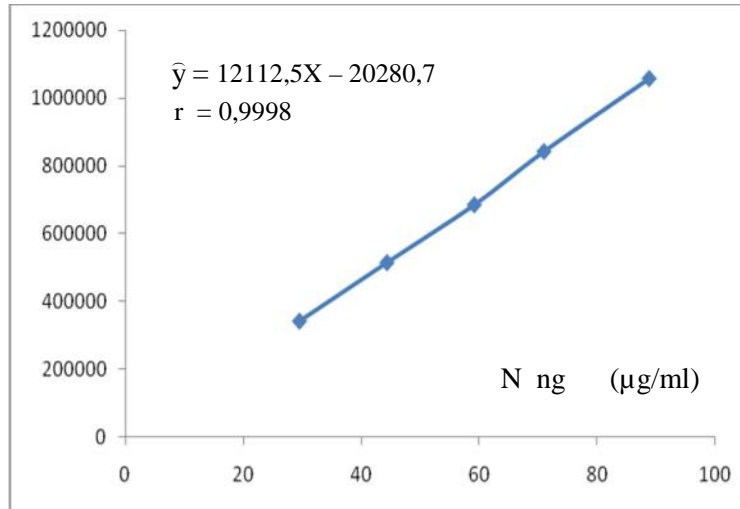
Tính tuyến tính

Có tương quan tuyến tính giữa nồng độ calophyllolid và diện tích pic của các dung dịch đối chiếu calophyllolid: 29,6-88,8 µg/ml và các dung dịch calophyllolid trong mẫu thử : 31,2-84,7 µg/ml với hệ số tương quan liên tiếp là 0,9998 và 0,9999 (r > 0,995).

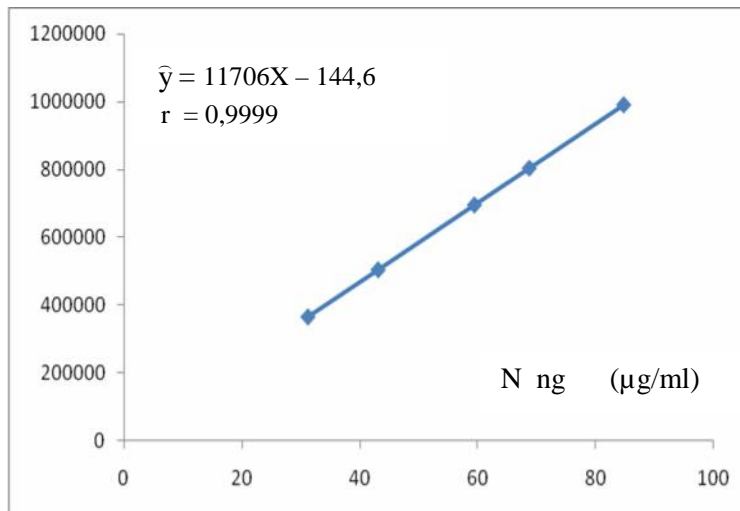
Bảng 3.26. Tương quan giữa nồng độ và diện tích pic của calophyllolid trong phương pháp HPLC-DAD

Dung dịch chiết đối chiếu	Diện tích pic (A) (µV.s)	343587	515919	686280	843388	1058381
calophyllolid	Nồng độ (C) (µg/ml)	29,6	44,4	59,2	71,0	88,8
	Hệ số hấp thụ (A/C)	11608	11620	11593	11879	11919
	Phương trình hồi quy: $\hat{y} = 12112,5X - 20280,7$ r = 0,9998					
Dung dịch mẫu có chứa	Diện tích pic (A) (µV.s)	365105	504192	695425	804107	991236
calophyllolid	Nồng độ (C) (µg/ml)	31,2	43,1	59,4	68,7	84,7
	Hệ số hấp thụ (A/C)	11702	11698	11707	11705	11703
	Phương trình hồi quy: $\hat{y} = 11706X - 144,6$ r = 0,9999					

Diện tích pic ($\mu\text{V}\cdot\text{s}$) (1)



Diện tích pic ($\mu\text{V}\cdot\text{s}$) (2)



Hình 3.34. *th t ng quan gi a n ng các dung d ch i chi u (1), dung d ch m u th (2) và di n tích pic calophyllolid*

Ti n hành tr c nghi m t b t c p cho k t qu $t = 0,29 < t_{0,05} = 2,776$. H s áp ng c a calophyllolid trong các dung d ch m u i chi u và m u i chi u có tá d c không khác nhau có ý ngh a th ng kê $P = 0,05$. Tá d c không làm nh h ng n tính tuy n tính c a calophyllolid trong kho ng n ng kh o sát.

Nh n xét: Ph ng pháp t yêu c u v tính tuy n tính.

chính xác

Ti n hành nh l ng 6 m u th n ng nh l ng b i 2 ki m nghi m vi n trong 2 ngày khác nhau. Xác nh hàm l ng ph n tr m calophyllolid (g/100 g). Tính l ch chu n, %RSD và kho ng tin c y c a các k t qu nh l ng thu c này.

B ng 3.27. K t qu l p l i và chính xác trung gian c a ph ng pháp HPLC-DAD

Stt	Ki m nghi m viên 1		Ki m nghi m viên 2	
	Di n tích pic (μ V.s)	Hàm l ng% (g/100 g)	Di n tích pic (μ V.s)	Hàm l ng% (g/100 g)
1	695425	0,47	584530	0,47
2	700263	0,47	586515	0,47
3	677470	0,46	603457	0,47
4	678107	0,46	773898	0,48
5	684804	0,46	785385	0,50
6	704659	0,48	780604	0,49

Ngày 1	Ngày 2	So sánh ph ng sai	So sánh giá tr trung bình
Trung bình: $0,47 \pm 0,01\%$ SD: 0,0082 %RSD: 1,75	Trung bình: $0,48 \pm 0,01\%$ SD: 0,0126 %RSD: 2,64	$F_{1-2} = 2,4 < F_{0,05} = 5,05$	$t_{1-2} = 2,169 < t_{0,05} = 2,228$

K t qu :

- l p l i: %RSD: 1,75 (< 3,0)
- K t qu gi a các ngày khác bi t không có ý ngh a th ng kê (P = 0,05)

Nh n xét: Ph ng pháp t yêu c u ch tiêu l p l i và chính xác trung gian

úng

Thêm chính xác m t l ng ch t i chi u calophyllolid vào m u th ã bi t tr c hàm l ng thu c dung d ch m u có n ng t ng ng v i 3 m c n ng 80, 100 và 120% so v i m c n ng nh l ng ã ch n và n m trong kho ng tuy n tính c a ph ng pháp. T i m i m c n ng , th c hi n ít nh t 03 m u c l p. Xác nh hàm l ng calophyllolid tính t l ph n tr m gi a l ng tìm th y so v i l ng thêm vào.

B ng 3.28. K t qu úng c a ph ng pháp HPLC-DAD

	L ng thêm vào (μg)	L ng tìm th y (μg)	T l ph c h i (%)	
80%	482,4	482,4	100,0 \pm 0,8	
	483,8	484,1	100,1 \pm 0,8	%RSD = 0,32
	495,2	498,1	100,6 \pm 0,8	
633,4	656,3	103,6 \pm 3,87		
100%	632,7	644,3	101,8 \pm 3,87	%RSD = 1,53
	635,4	638,7	100,5 \pm 3,87	
	746,3	765,7	102,6 \pm 0,87	
120%	721,8	742,7	102,9 \pm 0,87	%RSD = 0,34
	733,2	757,3	103,3 \pm 0,87	
		Trung bình	101,71 \pm 1,1	

K t qu :

- úng: 101,71 \pm 1,1% (97-103%); %RSD: 1,41 (< 2,0)

Nh n xét: Ph ng pháp t yêu c u ch tiêu úng.

CHƯƠNG 4

BẢN LUẬN

Tổng các kết quả của tài liệu, có một số bản luận sau:

4.1. CHI TIẾT THỰC NGHIỆM PHENOL TÊN VÀ VẬT QU MÙU

Trong nghiên cứu của chúng tôi, bằng phương pháp chiết xuất với dung môi kém phân cực (n-hexan) có thay đổi pH, chúng tôi đã phân lập được 8,1 mg hợp chất N_1 xác định là 1,5-dihydroxyxanthon (**33**) và 105,0 mg hợp chất N_2 xác định là 4-hydroxyxanthon (**29**) còn với phương pháp chiết xuất bằng dung môi phân cực (MeOH) không thay đổi pH đã phân lập được 135,0 mg hợp chất N_3 và 98,0 mg hợp chất N_4 xác định là calophyllolid (**22**). Tiếp theo, bằng phương pháp chiết xuất với dung môi phân cực trung bình (EtOAc), chúng tôi đã phân lập được 26,0 mg hợp chất V_1 xác định là calophyllolid (**22**) (Phụ lục 2).

Qua các công trình nghiên cứu xác định hợp chất phenol tên và nhả Mùi, chưa thấy có tác dụng nào chiết xuất nhằm phân lập các chất xác định cấu trúc 1,5-dihydroxyxanthon (**33**) cũng như 4-hydroxyxanthon (**29**). Chưa thấy có công bố chiết xuất phân lập hợp chất N_3 là một hợp chất tự nhiên hoàn toàn mới. Hợp chất N_4 và V_1 đều là calophyllolid (**22**) xác định cấu trúc và vật qu trong khi một số tác giả khác công bố tìm thấy hợp chất Mùi ngoi tr Leu và cũng tìm thấy nhả Mùi nhưng không công bố quy trình chiết xuất [101]. Theo vậy, Trần Thanh Thọ và cộng sự năm 2002 đã chiết xuất và phân lập được calophyllolid (**22**) từ hợp chất Mùi Việt nam bằng phương pháp sắc ký cột nhanh, sắc ký cột ái lực, sắc ký hóa học và phân tích khối lượng [5]. Năm 2003, Chen và cộng sự chiết xuất Mùi từ loài lan l n l t bằng EtOH rồi EtOAc và xác định được 4-dẫn xuất pyranocoumarin và calophyllolid (**22**) [38]. Sau đó vào năm 2004, Yimdjô và cộng sự chiết xuất từ Mùi Cameroon bằng hỗn hợp CH_2Cl_2 -MeOH (1:1) cũng thu được calophyllolid (**22**) và các coumarin khác như calaustralin (**24**), inophyllum C (**9**), E (**11**) là thành phần cấu tạo Mùi theo tài liệu của Tổ chức Y tế thế giới WHO về cây thuốc vùng Nam Thái Bình Dương [123], [119]. Gần đây nhất là công trình năm 2009 của Leu và cộng sự cũng chưa thấy

c p chi t xu t và phân l p c 1,5-dihydroxyxanthon (**33**) và 4-hydroxyxanthon (**29**) trong nh a Mù u tách lo i khi tinh ch d u ép t h t Mù u Polynesia thu c Pháp [101].

4.2. TH TÍNH KHÁNG KHU N CÁC CAO CHI T T NH A VÀ V QU MÙ U

Trong nghiên c u c a chúng tôi, cao nh a Mù u thu c b ng ph ng pháp chi t l ng-l ng v i MeOH và n-hexan u có tác d ng kháng *Mycobacterium smegmatis* và *Staphylococcus aureus*. N m 2000, các tác gi Khoa D c- i h c Y D c TP. H Chí Minh ã xác nh MIC c a d u Mù u thô (bao g m ph n nh a) trên MRSA là 64 µg/ml [3], [4]. N m 2004, Yimdjo và c ng s công b cao h t Mù u Cameroon chi t b ng CH₂Cl₂-MeOH (1:1) có tác d ng kháng *Staphylococcus aureus*. [123]. Các cao MeOH và n-hexan chi t b ng ph ng pháp PLE, cao EtOAc chi t b ng ph ng pháp ng m ki t và cao MeOH chi t b ng ph ng pháp soxhlet c ng u có tác d ng kháng *Mycobacterium smegmatis* và *Staphylococcus aureus*. Theo tra c u c a chúng tôi, ch a th y có các nghiên c u và công b v các tác d ng kháng khu n này tr c ây.

4.3. PHÂN L P H P CH T PHENOL T NH A VÀ V QU MÙ U

Trong nghiên c u c a chúng tôi b ng ph ng pháp VLC, chúng tôi ã thu c calophyllolid (**22**) t nh a Mù u và t v qu cùng 3 h p ch t phenol khác tr c ti p t các phân o n qua c t mà không ph i qua s c ký l i và/ho c tinh ch b ng s c ký l p m ng i u ch . L ng thu c các h p ch t này xác nh c u trúc b ng các k thu t ph nghi m.

Theo t ng quan tài li u, các h p ch t phenol t Mù u (*Calophyllum inophyllum* L.) ch y u là các coumarin, neoflavonoid, xanthon, chromanon...[71]. Phân l p các h p ch t này có th th c hi n b ng các ph ng pháp: s c ký c t c i n, s c ký c t nhanh [66], [79], [81], [123]. Tr n Thanh Th o và c ng s n m 2002 ã phân l p calophyllolid (**22**) t h t Mù u Vi t nam b ng ph ng pháp s c ký c t nhanh, s c ký c t c i n, s c ký ch hóa v i m u n p là cao benzen [5]. N m 2003, Chen và c ng s ã dùng s c ký c t và s c ký l p m ng i u ch phân l p c

calophyllolid (**22**) t cao EtOAc chi t t h t *Calophyllum inophyllum* ài Loan [38]. Trong m t công trình nghiên c u v các tác nhân kháng khu n và gây c tính t bào t *Calophyllum inophyllum* vào n m 2004, Yimdjo và c ng s ã chi t xu t d u trong h t Mù u b ng ph ng pháp ng m ki t trong 24 gi nhi t phòng v i h dung môi CH₂Cl₂-MeOH (1:1) r i dùng ph ng pháp s c ký c t thu m t s phân o n, k ti p r a gi i gradient phân l p calophyllolid (**22**) [123].

4.4. XÁC NH C U TRÚC H P CH T PHENOL PHÂN L P C B NG PH NG PHÁP PH NGHI M

4.4.1. Ph ng pháp quang ph h ng ngo i

Khi so sánh ph h ng ngo i c a h p ch t N₂ v i ph h ng ngo i c a 4-hydroxyxanthon (KBr) thu c b ng con ng t ng h p do Gnerre và c ng s ghi th y có s t ng ng t ng nh m t [32].

Nhóm ch c	4-hydroxyxanthon [32]	H p ch t N ₂
OH phenol	3191	3197
C=O	1640	1637
C=	1588	1589
	1502	1506
	1480	1481
	1460	1458
	1353	1355
C-O-	1290	1292
	1225	1228
	1102	1102
	1033	1034
C=H nhân th m	753	754

T ng quan tài li u ch a th y có tiêu chu n ch t l ng 4-hydroxyxanthon (**29**) v ch tiêu ph h ng ngo i có th do ch a có ch t i chi u th ng m i. Nh v y có th nói sau khi ph i h p v i các k thu t ph nghi m khác nh ph UV-Vis, ph kh i l ng, ph NMR 1 và 2 chi u kh ng nh c u trúc thì d li u ph h ng ngo i

này có thể dùng thí nghiệm phổ hồng ngoại chu kỳ trong kính hiển vi, nghiên cứu nguyên tử và cấu trúc phân tử Mẫu.

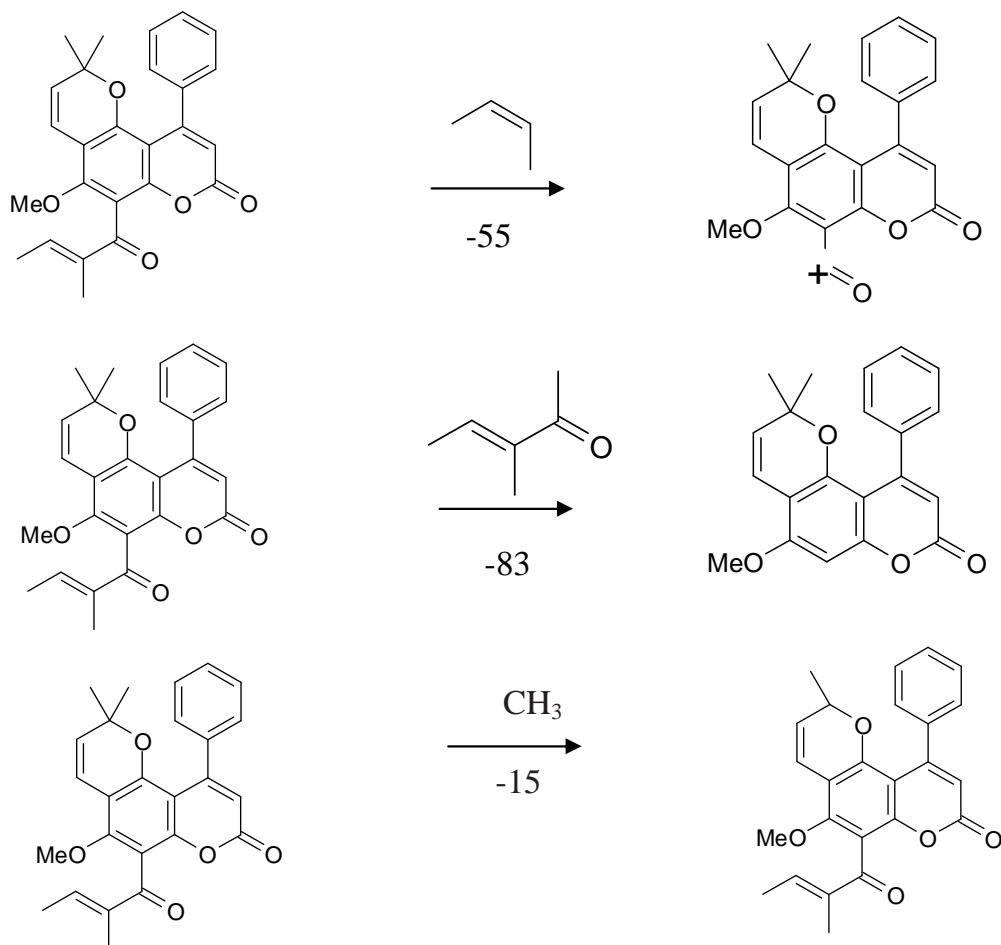
Phổ hồng ngoại của hợp chất **N₁** và **N₂** cho thấy hợp chất có khung xanthon có 1 hoặc 2 nhóm hydroxy đính vào vòng thơm thì hiện các băng đặc trưng vì cấu trúc phù hợp với dữ liệu phổ các xanthon tổng hợp công bố trong sách dữ liệu phổ các hợp chất tự nhiên của Yamaguchi [122]. Ngoài ra phổ hồng ngoại của 4-hydroxyxanthon (**29**) và 1,5-dihydroxyxanthon (**33**) thực tế khi ghi cho thấy có sự hiện diện của các nhóm OH phenol liên kết hydrogen nội phân tử cho thấy, cường độ trung bình khoảng 3000-3500 cm⁻¹ trong khi Iinuma và cộng sự và Yamaguchi không nêu cường độ phổ này mà chỉ công bố phổ hồng ngoại (KBr) cho các số 1625, 1605 và 1575 cm⁻¹ [79].

4.4.2. Phương pháp phân tích khối lượng

Khi phân tích hợp chất **N₁**, 1,5-dihydroxyxanthon (**33**) bằng phương pháp GC-MS và EI-MS, chúng tôi thu được các mảnh ion m/z 228, 212, 200, 171, 115, 92 hoàn toàn phù hợp với dữ liệu phổ EI-MS của Iinuma và cộng sự [79]. Theo công bố trong công trình của Yimdjoo và cộng sự thì phổ khối lượng 1,5-dihydroxyxanthon (**33**) ghi bằng thí nghiệm phân giải cao (HRESI-TOFMS) [123]. Iinuma và cộng sự ghi phổ khối lượng bằng kỹ thuật trực tiếp vào đầu phổ khối lượng EI-MS [79]. Ưu điểm của phương pháp GC-MS trong kính hiển vi là nhạy, và xử lý mẫu đơn giản so với LC-MS [112].

Tiếp theo, khi phân tích hợp chất **N₂**, 4-hydroxyxanthon (**29**) bằng kỹ thuật GC-MS thu được các mảnh m/z 212, 184, 155, 128, 102 và 63 phù hợp với phổ khối lượng của hợp chất này trong thư viện phổ NIST.

Trong nghiên cứu của chúng tôi, phổ khối lượng của hợp chất **N₄** có pic chính m/z 401, ứng bằng phân tử khối của calophyllolid (m/z 416 trừ 15) và có sự hiện diện của 2 mảnh ion tại m/z 55 và 83 phù hợp với phân mảnh điển hình.



Năm 1972, Games đã công bố công trình phân tích các dẫn xuất 4-phenyl coumarin bao gồm calophyllolid (**22**) trong *Calophyllum inophyllum* bằng GC-MS dùng cột tách nhớt OV 17 3% hoặc OV 17 3% tẩm trên Gas Chrom Q ghép với phổ khối bằng kỹ thuật tinh thông qua bước tách 2 thì Watson-Biemann [64].

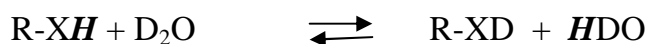
4.4.3. Phương pháp phân tích cấu trúc tự nhiên

Nghiên cứu của chúng tôi thu được phổ ^{13}C -NMR của hợp chất **N₁** là trùng khớp với 1,5-dihydroxyxanthon (**33**) do Inuma và cộng sự ghi trong DMSO- d_6 . Về phổ ^1H -NMR, do lúc đầu chúng tôi chỉ nhận được trong dung môi CD_3OD (nhiệt độ sôi $64,6^\circ\text{C}$) để thu được mẫu cho các nghiên cứu kỹ thuật phân tích do mẫu khó tan nên đã phải hòa tan trong DMSO- d_6 nhằm làm tan mẫu. Kết quả phổ không thấy các tín hiệu (u_H , ppm; J , Hz) $12,64\text{ s}$ và $10,57\text{ br s}$ của proton trong các nhóm OH gắn vào C-1 và C-5 so với phổ ^1H -NMR do Inuma và cộng sự ghi trong DMSO- d_6

[79]. Chúng tôi đã dựa vào các phép hai chiều HSQC, HMBC và phép DEPT để xác định các tương quan và tương tác xa giữa ^1H - ^{13}C cũng như các carbon trong cấu trúc dựa trên thông tin từ các phép UV-Vis, IR, phổ khối lượng cũng như phép chiral NMR chính là 1,5-dihydroxyxanthon (**33**).

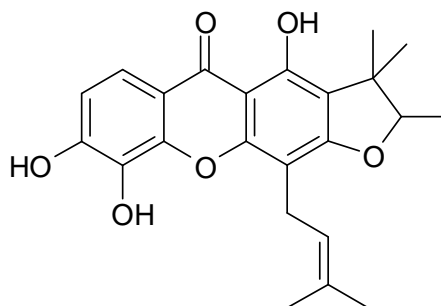
Tương tự, phép ^1H -NMR của hợp chất **N**₂ cũng không xuất hiện tín hiệu của proton thuộc nhóm hydroxy khi đo trong dung môi CD_3OD so với tín hiệu (u_H , ppm; J , Hz) 10,51 s trong phép ghi trong dung môi $\text{DMSO}-d_6$ của 4-hydroxyxanthon (**29**) bán tổng hợp từ 4-methoxyxanthon [32].

Có thể giải thích hiện tượng này là do có sự trao đổi deuteri. Thông thường, các proton liên kết với các dị nguyên (XH proton, X = O, N, S) có thể mất đi trong phép proton bằng cách dùng sự trao đổi deuteri (x lý m u v i m t l ng nh D_2O hay CD_3OD . Sau khi trao đổi deuteri:



Tín hiệu của proton XH trong phép ^1H -NMR không xuất hiện. Thay vào đó, tín hiệu của HDO xuất hiện khoảng 4,8 ppm. Hệ quả của sự trao đổi D_2O là các proton XH thường không phát hiện được trong phép ^1H -NMR nếu dùng dung môi như CD_3OD [27]. Kết quả phép ^1H -NMR của 4-hydroxyxanthon (**29**) và 1,5-dihydroxyxanthon (**33**) đều có các tín hiệu khoảng 4,8 ppm (Ph 1 c 4.4 và 5.4) là hoàn toàn phù hợp với lý luận trên.

Qi Xiao và cộng sự khi ghi phép ^1H -NMR của chất gerontoxanthon C trong CD_3OD cũng không ghi nhận được tín hiệu proton của nhóm hydroxy chelat hóa là thí dụ minh họa [49].



Gerontoxanthon C

V ph $^1\text{H-NMR}$ c a calophyllolid (**22**) thì d li u thu th p c c a h p ch t N_4 h u nh tr ùng kh p v i d li u c a Garazd và c ng s công b n m 2003 v chuy n d ch hóa h c và d ng nh, ch có khác bi t nh v h ng s J [65]. K t qu này do ghi ph trên thi t b có cùng t tr ùng (300 MHz) và s d ng cùng dung môi (CDCl_3). M t khác, khi so sánh v i d li u ph $^1\text{H-NMR}$ c a Nigam và c ng s công b n m 1967 [107] thì có khác bi t áng k v d ng nh c ng nh chuy n d ch hóa h c và m t s nh c a proton nhóm phenyl ã không th hi n. Laure c ng s d ng ph $^1\text{H-NMR}$ c a Nigam so sánh v i d li u trong lu n án c a mình và sau ó ã ghi ph COSY g óp ph n kh ng nh c u trúc calophyllolid (**22**). N m 1967, Nigam và c ng s ã ghi ph $^1\text{H-NMR}$ c a calophyllolid (**22**) v i dung môi CDCl_3 và máy 60 MHz, có th vào m y th p niên tr c, thi t b có t tr ùng th p h n nên l ng m u không làm xu t hi n tín hi u [70]. Ph $^1\text{H-NMR}$ c a h p ch t N_4 ghi c cho th y có tín hi u (u_H , ppm; J, Hz) 6,57 q (6,0) là phù h p v i proton ethylenic g n C-10. Theo Garazd và c ng s , ph cho nh b n ôi còn Nigam và c ng s thì công b nh a có th do ghi trên máy có t l tín hi u/nhi u th p. Tín hi u (u_H , ppm; J, Hz) 1,9 d (6,3) là phù h p v i proton g n C-21 và tr ùng v i k t qu c a Nigam trong khi Garazd công b tín hi u (u_H , ppm; J, Hz) 1,9 dd (7,0). Các proton g n C-22 cho tín hi u (u_H , ppm; J, Hz) 2,01 s là phù h p và tr ùng kh p v i k t qu c a Nigam vì ây là proton thu c c u trúc Me-C-C-O còn k t qu c a Garazd l i cho nh a.

4.5. XÁC NH THÀNH PH N H P CH T PHENOL T NH A VÀ V QU M Ò U

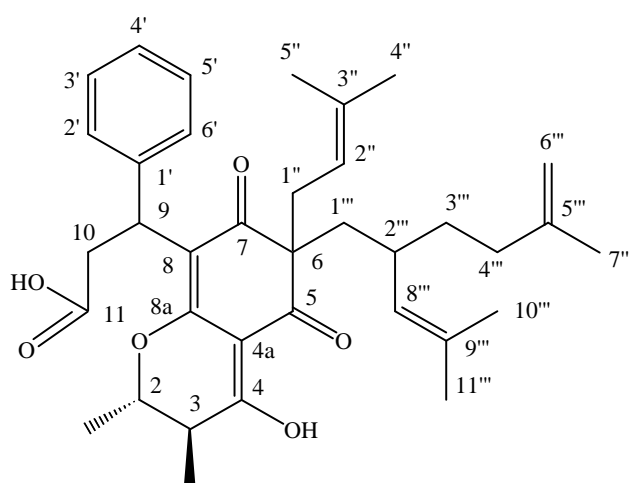
Trong nghiên c u c a chúng tôi, b d li u nh n d ng các h p ch t N_1 , N_2 , N_3 , N_4 phân l p t nh a M ù u và V_1 phân l p t v qu M ù u bao g m các ph : UV-Vis, IR, MS và NMR ã c xác l p (Ph l c 4-8). Theo các tài li u khoa h c mà chúng tôi tham kh o c, n m 1994, Iinuma và c ng s l n u tiên công b phân l p 4-hydroxyxanthon (**29**) t v r c a *Calophyllum inophyllum* L. (Clusiaceae). Tuy nhi n, bài báo không c p chi ti t xác nh c u trúc hay các d li u nh n d ng 4-hydroxyxanthon (**29**) b ng các ph ng pháp ph nghi m nh các ph : UV-

Vis, IR, MS, NMR [80]. Năm 2003, Chen và cộng sự công bố xác định cấu trúc 4-hydroxyxanthon (**29**) trong rễ *Calophyllum inophyllum* nhưng công bố không đầy đủ thông tin về đặc điểm cấu trúc [39]. Tiếp theo, Iinuma và cộng sự đã công bố lần đầu tiên phân lập 1,5-dihydroxyxanthon (**33**) từ rễ của *Calophyllum inophyllum*. Nhật Bản năm 1994. Sau đó vào năm 2004, Yimdjô và cộng sự công bố phát hiện hợp chất này trong rễ *Calophyllum inophyllum* Cameroon [79], [123]. Như vậy có thể nói đây là lần đầu tiên công bố phát hiện 1,5-dihydroxyxanthon (**33**) và 4-hydroxyxanthon (**29**) trong rừng Mù u Việt Nam. Hợp chất N₃ phân lập từ rừng Mù u Việt Nam là hợp chất tự nhiên mới chưa được tác giả nào công bố, người đặt tên là inocalophyllin C. Theo vậy, chúng tôi tiến hành các nghiên cứu để công bố tìm thấy các hợp chất tự nhiên: năm 2003, Chen và cộng sự đã công bố phân lập các hợp chất: inocalophyllin A (**18**), B (**12**) và các dẫn xuất methyl ester A và B (**19**, **16**) từ cao ethanol của rễ *Calophyllum inophyllum* L. Lào. Các tác giả đã tiến hành methyl hóa inocalophyllin A (**18**) bằng diazomethan thu được inocalophyllin A dimethylat và phân tích bằng các phương pháp để xác định cấu trúc inocalophyllin C [38]. Tuy nhiên, có sự khác biệt về cấu trúc như sau:

Điểm khác biệt	Inocalophyllin A dimethylat	Hợp chất N ₃
Loại ester	Methyl ester ¹³ C-NMR _C , ppm 51,3 (COOCH ₃)	Ethyl ester ¹³ C-NMR _C , ppm 60,1; 14,1 (COOC ₂ H ₅)
Vị trí Dioxo	4, 7	5, 7
Vị trí C-4	Keton	Hydroxyl
1,3-diketon enol	Không có	Liên kết hydrogen mạnh ¹ H-NMR _{H m} (J, Hz) 16,5
Vị trí C-5	Methoxy	Keton
Vị trí nhóm th	8, 8; 6-yl	6, 6; 8-yl
Danh pháp	2-isopropenyl 3-methyl-2-buten-1-yl	Prop-1-en-2-yl 3-methylbut-2-en-1-yl

Một công trình khác công bố năm 2004 của Cottiglia và cộng sự đã phát hiện acid brasiliensophyllic C từ cây *Calophyllum brasiliense* Cambess (Clusiaceae). Mô hình cấu trúc tổng hợp của nó là N_3 . Tuy nhiên, có sự khác biệt về phổ 1H -NMR và ^{13}C -NMR ($CDCl_3$, máy 500 MHz) do hợp chất N_3 có nhóm chức ester còn acid brasiliensophyllic C có nhóm chức acid và mạch nhánh còn có thêm một carbon [46]. Phát hiện ra hợp chất mới inocalophyllin C này có thể ứng dụng trong kỹ thuật phân biệt Mùi u Việt Nam với Mùi u nước khác.

C	<i>c</i> , ppm		<i>H</i> , ppm; <i>m</i> (J, Hz)	
	H p ch t N_3	Acid brasiliensophyllic C	H p ch t N_3	Acid brasiliensophyllic C
3'''	25,6	31,8	1,6 m	1,3 m
4'''	122,4	35,1	4,95 m	1,76 m
6'''	25,5	109,7	1,5 s	4,61 s
8'''	147,4	122,2	-	4,9 m
9'''	113,7	132,0	4,36 s	-
11'''	-	17,9		



Acid brasiliensophyllic C

Một khác, Năm 2009, Leu và cộng sự đã tìm thấy trong nhài Mù u m c Polynesia 16 coumarin: calophyllolid (**22**), dòng inophyllum, dòng calanolid, dòng inocalophyllin và dòng tamanolid nhưng không có công bố phân lập hợp chất N₃ [101].

Sau khi tra cứu tài liệu tương quan về các thành phần hóa học của chi *Calophyllum* do Shi và cộng sự viết năm 2008 [71] chúng tôi tham khảo các tài liệu khác về Mù u (*Calophyllum inophyllum*) thu các nguồn dữ liệu: ScienceDirect, Scopus, PubMed, SciFinder (Chemical Abstracts), Patent Databases từ nhiều Viện Nghiên cứu Khoa học Quốc gia Singapore, chúng tôi thấy hợp chất N₃ chưa từng được công bố.

Do đó có thể khẳng định hợp chất N₃ là một hợp chất tự nhiên mới.

Trong nghiên cứu của chúng tôi, hợp chất N₄ xác định nhài và vò qu Mù u về mặt đặc điểm nhận dạng có các phép UV-Vis và NMR (¹H-NMR và ¹³C-NMR) trùng khớp với các đặc điểm phân tích trong bảng điểm các hợp chất nhóm neoflavon của Garazd và cộng sự công bố năm 2003 [65], phép khối lượng có pic ở m/z 401 trùng khớp với đặc điểm của Games năm 1972 [64], Garazd và cộng sự năm 2003 [107]. Năm 2002, Trần Thanh Thảo và cộng sự áp dụng phương pháp của Spath và Socias phân lập calophyllolid từ nhài Mù u bằng cách dùng NaHCO₃ mở vòng lacton của coumarin tạo muối coumarinat kém tan trong nước, sau đó acid hóa dung dịch kim bằng HCl 10% để lacton hóa và chiết coumarin tái tạo bằng dung môi hữu cơ (benzen) thu được coumarin. Sau đó tiến hành sắc ký cột phân lập calophyllolid (**22**) [5]. Năm 2003, Chen và cộng sự đã chiết từ *Calophyllum inophyllum* loài Loan bằng EtOH rồi tiếp tục phân bố trong EtOAc, sau đó dùng sắc ký cột và sắc ký lập m ng để phân lập được calophyllolid [38]. Năm 2004, Yimdjo và cộng sự công bố phân lập calophyllolid từ nhài còn 1,5-dihydroxyxanthon thì từ vò qu *Calophyllum inophyllum* Cameroon [123]. Năm 2009, Leu và cộng sự đã phân lập calophyllolid từ nhài trung tính và nhài acid thu được khi tinh chế đầu thu ép từ nhài *Calophyllum inophyllum* m c Polynesia thu c Pháp, không thấy có tìm thấy 4-hydroxyxanthon và 1,5-dihydroxyxanthon trong các nhài này. Tuy nhiên, chi tiết quy trình chiết xuất và phân lập không được

công bố [101]. Trong nghiên cứu của chúng tôi, khi dùng Na_2CO_3 10% kiềm hóa nhả pH 8-9 rồi acid hóa bằng HCl 3,65% về pH 3-4, sau đó chiết bằng n-hexan, tiếp tục phân lập bằng VLC, rửa lại bằng n-hexan/EtOAc thì không phân lập được calophyllolid vì lẽ này nên danh bằng các phương pháp phân tích. Trái lại, khi chiết nhả bằng hỗn hợp MeOH-n-hexan (9:1) rồi phân lập bằng VLC tiếp tục nhả cao n-hexan thì phân lập được calophyllolid. Như vậy có thể nói calophyllolid đi vào dung môi phân cực trung bình và mạnh và hầu như không tan vào dung môi kém phân cực.

Calophyllolid do Potier phân lập lần đầu tiên vào năm 1951 trong hạt *Calophyllum inophyllum*, sau đó vào năm 1993, Patil cũng đã xác định hợp chất này trong cao chiết từ lá *Calophyllum inophyllum* [21].

Kết quả xác định hàm lượng calophyllolid (**22**) từ cao nhả tách loại chiết với MeOH bằng phương pháp chiết lỏng-lỏng: $0,68 \pm 0,01$ (g/100g) và tổng lượng chiết với MeOH bằng phương pháp PLE: $0,0255 \pm 0,0005$ (g/100g) so với hàm lượng calophyllolid $0,47 \pm 0,01$ (g/100g) trong thành phẩm Dầu Mù u Inopilo (chính trị bằng, ung thư, viêm loét da, làm mau lành vết thương) cùng với tác dụng kháng *Staphylococcus aureus* và *Mycobacterium smegmatis* đã được thực nghiệm tách loại từ dầu và thực phẩm Mù u là một nghiên cứu thực nghiệm lâm sàng.

4.6. THỰC TIỄN PHÂN CHIA CHUẨN ICHU

Thực tế danh mục chất chuẩn ichu là hợp chất tự nhiên hay tổng hợp của các nhà chuyên sản xuất và cung cấp chuẩn như ChromaDex [42], Sigma Aldrich hay USP không thấy có các hợp chất 4-hydroxyxanthone và calophyllolid nên chúng tôi đã lần đầu tiên nghiên cứu đánh giá các chất này thì tiếp làm chất chuẩn ichu ngõ hầu có thể ứng dụng vào kiểm nghiệm độc tính và thu thập dữ liệu Mù u. Theo hướng dẫn của WHO về thực tiễn phân chia ichu, trước tiên cần đánh giá nhu cầu phân tích vì đây là công việc tiêu tốn nhiều thời gian công nhân lực và tài lực. Do vậy, phương pháp thống kê yêu cầu phân tích chất ichu so sánh xác định. Về nguyên tắc cần đánh giá là có phương pháp nào thay thế

xác định hoạt chất mà không cần chiết xuất hay không [85]. Dược liệu và thu hoạch dược liệu luôn chứa nhiều thành phần phức tạp nên các phương pháp sắc ký ghép nối vi phân tích là lựa chọn hàng đầu để phân tích thành phần hoạt chất. Theo EMA, chiết xuất làm chất chuẩn là chất có hoạt tính đặc trưng nhất [56], [73]. Hiện nay có các quy định về tinh khiết của chất chuẩn là hợp chất tự nhiên hoặc phân lập. Do vậy, nên sử dụng các quy định về tinh khiết của chất chuẩn hóa học dùng cho phân tích thuốc bằng cách tổng hợp hoặc trong dược liệu thì tinh khiết của chất chuẩn dùng cho phân tích trên 99,5% tính theo chất lượng. Tuy nhiên, sử dụng phương pháp phân tích chất thì không nhất thiết dùng chất chuẩn có tinh khiết cao nhất vì thành phần hoạt chất trên phép thử không chất [85]. Calophyllolid là chất có hoạt tính như: ức chế elastase ($IC_{50} = 8,4 \mu M$) [101]; kháng viêm ($LD_{50} = 2,5 \text{ g/kg}$) [68]; ức chế tế bào ($IC_{50} = 3,5 \mu g/ml$), kháng khuẩn [123] và là thành phần chính của nhiều bộ phận dùng trong Y học cổ truyền và trên thế giới [14], [53] nên áp dụng vì tiêu chuẩn lựa chọn làm chất chuẩn [73]. Theo nghị quyết của FHH (Forum for the Harmonization of Herbal Medicine) năm 2005, Dược liệu Hàn Quốc quy định chất chuẩn có nguồn gốc tự nhiên có tinh khiết trên 95% có thể dùng cho mục đích phân tích. Đây là cơ sở xây dựng quy định cho tiêu chuẩn calophyllolid (**22**) làm chất chuẩn. Như vậy, chất calophyllolid có tinh khiết trên 95% làm chất chuẩn dùng cho các phương pháp phân tích, phân tích như: GC-MS, HPLC-DAD là phù hợp trong kiểm nghiệm dược liệu và thu hoạch dược liệu. Dược liệu Việt Nam IV tuy chưa có chuyên luận về Dược liệu nhưng đã có phương pháp xác định chất do chất có chất và phương pháp thử thích hợp [1]. Thị trường chất chuẩn chất calophyllolid dùng cho phân tích đóng góp tích cực vào công tác kiểm tra chất lượng dược liệu và thu hoạch dược liệu nói chung và Dược liệu nói riêng theo hướng dẫn của WHO [56], [121].

4.7. CÁC PHƯƠNG PHÁP GHEP NIS C KÝ-PHÂN NGHI M XÁC NH H P CH T PHENOL TRONG NH A, V QU MÙ U VÀ THU C T MÙ U

4.7.1. Phương pháp GC-MS

Năm 1972, Games DE ã công bố bài báo về danh các hợp chất 4-phenyl coumarin trong *Calophyllum inophyllum* bằng GC-MS dùng cột th y tinh v i pha t nh OV 1 hoặc OV 17 3% t m trên Gas Chrom Q. Tuy nhiên, tác gi ã không mô t i u ki n s c ký c ng nh ngu n g c ch t chu n i chi u calophyllolid ã s d ng. Do v y, chúng tôi ã nghiên c u xây d ng và th m nh ph ng pháp s c ký khí mao qu n ghép ph kh i xác nh nhanh và chính xác calophyllolid sau khi ã thi t l p c ch t chu n i chi u này. Phương pháp phân tích xu t c a chúng tôi tuy là phương pháp ngo i chu n do không tìm c n i chu n n i ng v h o c ch t có c u trúc t ng t v i calophyllolid (**22**) nh ng tin c y c a ch p nh n c do s d ng b tiêm m u t ng và quy trình chu n b m u không ph c t p [76], [77], [93]. K t qu là l n u tiên ã công bố phương pháp xác nh calophyllolid trong cao methanol chi t t nh a Mùi u *Calophyllum inophyllum* L.. Phương pháp này sau ó c làm c s xây d ng và th m nh phương pháp GC-MS xác nh calophyllolid có trong v qu Mùi u. Khi th hòa tan cao methanol trong h n h p MeCN-n c v i các t l khác nhau th y có hi n t ng m u b c nh h ng n quá trình phân tách và phát hi n n u s d ng phương pháp LC-MS hoặc HPLC-DAD. Do v y ch n phương pháp GC-MS phân tích v i nh ng lý do sau ây: (1) Giá c a thi t b GC-MS th p h n (75000-150000 USD) LC-MS (120000-trên 250000 USD); (2) Trong GC-MS l ng khí n p t ng i th p vào u dò ph kh i nên b m t o chân không yêu c u công su t th p và t ó chi phí ban u c ng nh chi phí b o trì th p so v i LC-MS; (3) Ph EI cho nhi u thông tin và th ng dùng nh danh các hợp chất ch a bi t; (4) Có th mua th vi n ph EI c a hàng tr m ngàn hợp chất nh danh trong tr ng h p không có ch t chu n i chi u và có th dùng chung cho t t c thi t b c a các nhà s n xu t khác nhau; (5) Không có các v n chu n b pha ng (ch c n khí helium hay

hydrogen); (6) Ít có yêu cầu về bảo trì (ch thay đổi màng lọc và vách buồng tiêm mẫu) so với bảo trì van, seal và làm vệ sinh giao diện của HPLC-MS; (7) Dễ dàng thao tác; (8) Lý tưởng phân tích các chất không phân cực [93].

4.7.2. Phương pháp HPLC-DAD

Khi xác định calophyllolid (**22**) trong thành phần có chứa dầu Mù u, do phương pháp xử lý mẫu để phân tích có nhược điểm nên không khuyến khích áp dụng phương pháp GC-MS [93]. Năm 2008, Frederic và cộng sự đã xác định các coumarin trong calophyllolid (**22**) trong cao chiết xuất lá Mù u bằng kỹ thuật HPLC-DAD pha thu nhận dùng cột silica loại 120 Å, hạt 5 µm, kích thước 250 mm x 4,6 mm. Chương trình dung môi: i-propanol-i-octan 1-20% (tt/tt) trong 25 phút, 20/80 (tt/tt) trong 25 phút, sau đó cân bằng trong 15 phút. Tuy nhiên, sắc ký cho thấy calophyllolid (**22**) kém phân giải và phương pháp chuẩn kém chính xác. Chương trình công bố phương pháp HPLC pha để phân tích xác định calophyllolid (**22**) với tin cậy cao do sử dụng cột i chi u đã tối ưu và sử dụng đầu chuyên biệt DAD. Mặt khác, sắc ký lỏng cột pha đảo kết hợp với phân tích định lượng phòng thí nghiệm trong hệ thống kiểm nghiệm do sử dụng các cột C₁₈, chi phí phân tích thấp, dễ thực hiện và đáp ứng quy trình vận hành thông thường là nước và dung môi hữu cơ như methanol, acetonitril [114].

K T LU N VÀ KI N NGH

K T LU N

tài “Nghiên cứu xác định hợp chất phenol tự nhiên và thực vật Mù u trong ki m nghi m” ã hoàn thành các nội dung nghiên cứu thực nghiệm các mục tiêu đề ra và cho nh ng kết luận sau:

1. Xác định hợp chất phenol tự nhiên và thực vật Mù u

B ng m t s k thu t s c ký nh : s c ký l p m ng, s c ký l ng chân không, s c ký l ng (phân tích và i u ch), s c ký khí và s ph i h p k t qu m t s k thu t ph nghi m nh : ph UV-Vis, ph IR, ph kh i l ng, ph NMR m t và hai chi u, ph nhi u x tia X, ã chi t tách, tinh ch và xác nh c u trúc m t s h p ch t phenol phân l p c t nh a và v qu Mù u nh sau:

- T 3 kg nh a Mù u, ã chi t xu t b ng n-hexan c 40 g cao, t ó phân l p và xác nh c 8,1 mg h p ch t **N₁** xác nh là *1,5-dihydroxyxanthone* (C₁₃H₈O₄) và 105,0 mg h p ch t **N₂** xác nh là *4-hydroxyxanthone* (C₁₃H₈O₃).
- T 4 kg nh a Mù u, ã chi t xu t b ng h n h p MeOH-n c (9:1) c 50 g cao, t ó phân l p và xác nh c 135,0 mg h p ch t **N₃** ngh t tên là *inocalophyllin C* (C₃₇H₄₈O₆) và 98,0 mg h p ch t **N₄** xác nh là *calophyllolid* (C₂₆H₂₄O₅).
- H p ch t **N₃** v i tên khoa h c: **ethyl 3-((2R,3R)-4-hydroxy-2,3-dimethyl-6-(5-methyl-2-(prop-1-en-2-yl) hex-4-enyl)-6-(3-methylbut-2-enyl)-5,7-dioxo-3,5,6,7-tetrahydro-2H-chromen-8-yl)-3-phenylpropanoate** là m t h p ch t t nhiên m i, ch a t ng c công b trong các ngu n d li u: ScienceDirect, Scopus, PubMed, SciFinder (Chemical Abstracts), Patent Databases tra c u t i th vi n i h c Qu c gia Singapore (NUS).
- T 4 kg v qu Mù u, ã chi t xu t b ng EtOAc c 20 g cao, t ó phân l p và xác nh c 26,0 mg h p ch t **V₁** xác nh là *calophyllolid* (C₂₆H₂₄O₅).

2. Thi t l p ch t chu n i chi u

ã xây d ng c b d li u nh n d ng ch t bao g m: ph UV-Vis, ph IR, ph MS, ph NMR, i m ch y c a calophyllolid và 4-hydroxyxanthon.

ã xây d ng và th m nh theo ICH quy trình xác nh t p ch t h u c i kèm v i calophyllolid trong quá trình chi t xu t b ng k thu t HPLC-DAD v i các ch tiêu: tính phù h p c a h th ng, tính c hi u, tính tuy n tính, chính xác, gi i h n phát hi n.

L n u tiên ã thi t l p ch t chu n i chi u calophyllolid (chu n chính) lo i dùng cho nh l ng theo h ng d n c a WHO, ISO v i tiêu chu n ch t l ng bao g m các ch tiêu: c m quan; nh tính: UV-Vis, IR, MS, NMR; i m ch y; tinh khi t: t p ch t h u c , t p ch t vô c , t p ch t bay h i; nh l ng. M c ch t l ng và ph ng pháp th theo các qui nh c a D c i n Vi t Nam và các D c i n qu c t khác nh : Hoa k , Anh, Hàn qu c, Nh t b n, Trung qu c. S l ng ch t chu n i chi u thi t l p c t ng c ng 100 l 10 mg v i hàm l ng 95,27%.

Ngoài ra, còn thi t l p ch t chu n i chi u 4-hydroxyxanthon dùng cho nh tính v i s l ng 9 l 5 mg v i hàm l ng 93,91%.

3. ng d ng ch t chu n i chi u thi t l p ki m nghi m (nh tính, nh l ng) calophyllolid t nh a, v qu Mù u và ch ph m t Mù u

Ph ng pháp GC-MS

ã xây d ng m t ph ng pháp phân tích nhanh, phù h p, chính xác và c hi u xác nh calophyllolid t nh a Mù u b ng k thu t s c ký khí mao qu n ghép kh i ph (GC-MS). Th m nh theo ICH v i các ch tiêu: tính phù h p c a h th ng, tính c hi u, tính tuy n tính, chính xác, úng.

i u ki n s c ký: “*Máy s c ký khí GC-2010 ghép u dò ph kh i GCMS-QP 2010 Shimadzu; b chích m u t ng AOC-20i; ph n m m x lý d ki n LabSolutions GCMS Solution phiên b n 2.5. C t: DB-5MS 25 m x 0,22 mm ID, d_f = 5 μm. Ch ng trình nhi t : 80 °C-300 °C/9 phút (40 °C/phút); nhi t bu ng tiêm m u: 250 °C, không chia dòng; nhi t u dò ph kh i: ngu n ion: 250 °C; giao di n: 200 °C; ion hóa b ng b n phá i n t ; t c dòng khí mang: 1,43 ml/phút; kho ng*

ph : 50-450 amu. Kỹ thuật phân tích: SCAN và SIM (ion đích: m/z 401; ion tham chiếu: m/z 83,55). Th tích tiêm mẫu 1 µl”. Hàm lượng calophyllolid (kl/kl) trong cao methanol chiết tinh từ Mù u là $0,67 \pm 0,01\%$ (g/100 g).

Thí nghiệm pháp GC-MS đã tiến hành, thiết lập và thẩm định bằng phương pháp GC-MS xác định calophyllolid trong vỏ Mù u. Chuẩn bị mẫu thử bằng phương pháp chiết lỏng áp suất (PLE). Điều kiện sắc ký thay đổi: Chương trình nhiệt độ: $80\text{ }^{\circ}\text{C}-300\text{ }^{\circ}\text{C}/12\text{ phút}$ ($40\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{phút}$). Hàm lượng calophyllolid (kl/kl) trong vỏ Mù u là $0,0255 \pm 0,0005\%$ (g/100 g).

Phương pháp HPLC-DAD

Đã xây dựng phương pháp HPLC-DAD phân tích và thẩm định theo ICH với các chỉ tiêu: tính phù hợp của hệ thống, tính chính xác, tính tuyến tính, độ chính xác, ứng dụng của hệ thống. Viện Kỹ thuật thành phố Hồ Chí Minh xác định calophyllolid trong dung dịch thu được từ vỏ Mù u với các điều kiện thử nghiệm là: “Máy HPLC Shimadzu: bộ kiểm tra hệ thống CBM-20Alite; bộ mô-đun LC-20AD; bộ chính mẫu bơm SIL-20AC, bộ bơm cột CTO-20AC; đầu dò PDA SPD-M20A; phần mềm xử lý dữ liệu LCsolution. Cột Zorbax 250 mm × 4,6 mm, 5 µm, pha động acetonitril-dung dịch acid acetic 2% với chương trình gradient: acetonitril 20-80%: dung dịch acid acetic 2% 80-20% trong 30 phút. Tốc độ dòng 1 ml/phút và nhiệt độ cột $40\text{ }^{\circ}\text{C}$. Phát hiện tại bước sóng 270 nm. Th tích tiêm mẫu 10 µl”. Hàm lượng calophyllolid (kl/kl) trong chiết phẩm “Dầu Mù u Inopilo” thu được là $0,47 \pm 0,01\%$ (g/100 g).

KIẾN NGHỊ

Có thể khai thác, tận dụng các sản phẩm phụ từ Mù u nh nh a và v qu c ng nh ng d ng các kết quả nghiên cứu đã đạt được trong công tác kiểm nghiệm mẫu dịch và thu hoạch dịch Mù u, m t s ki n ngh sau nên c nghiên cứu triển khai:

- Tiếp tục áp dụng các phương pháp GC-MS, HPLC-DAD xác định các thành phần có hoạt tính như calophyllolid, 4-hydroxyxanthone trong các thu hoạch dịch Mù u nh m nâng cấp tiêu chuẩn cơ sở.
- Khảo sát tác động sinh học của chất N₃ (hợp chất mới): kháng khuẩn, kháng virus, chống ung thư ...
- Tiếp tục nghiên cứu tìm kiếm các hoạt chất mới như calophyllolid nhằm cải thiện quy trình chiết xuất, phân lập, tinh chế và xây dựng.
- Bổ sung hoạt chất calophyllolid vào Dược phẩm Việt Nam xuất bản lần thứ 5 và nghiên cứu nâng cấp tiêu chuẩn dịch có hoạt chất tổng hợp như dịch Mù u thành tiêu chuẩn quốc gia.

DANH MỤC CÔNG TRÌNH NGHIÊN CỨU CỦA TÁC GIẢ LIÊN QUAN ĐẾN TÀI LUẬN ÁN

1. Hà Minh Hiền, Phạm Ngọc Dung, Nguyễn Khắc Quỳnh Cường, Nguyễn Văn Thành, Võ Thị Bích Huệ (2009), “Phân lập và tổng hợp chất phenol từ nhựa Mù u dẻ phỉ”, *Tạp chí Dược học*, s. 395, tr. 33-36.
2. Hà Minh Hiền, Trần Thị Thủy Tiên, Võ Thị Bích Huệ, Nguyễn Việt Kinh, “Phenolic compound and other constituents determined from crude ethyl acetate extract of fruit peels of *Calophyllum inophyllum* L.”, *Analytica Vietnam Conference Proceedings 3/2009*, Hồ Chí Minh City, Vietnam, pp. 228-232.
3. Minh Hiền Hà, Văn Thị Nguyễn, Khắc Quỳnh Cường Nguyễn, Emily LC Cheah, Paul WS Heng (2009), “Antimicrobial activity of *Calophyllum inophyllum* crude extracts obtained by Pressurized Liquid Extraction”, *Asian Journal of Traditional Medicine*, 4 (4), pp. 141-146.
4. Hà Minh Hiền, Võ Thị Bích Huệ, Nguyễn Khắc Quỳnh Cường, Nguyễn Văn Thành, Françoise NEPVEU, “Antimicrobial and antioxidant activities of methanolic extract obtained from resin of *Calophyllum inophyllum* L. nut oil”, *Proceedings of the Sixth Indochina Conference on Pharmaceutical Sciences 12/2009*, Huế, Vietnam, pp. 64-68.
5. Hà Minh Hiền, Paul WS Heng, Nguyễn Khắc Quỳnh Cường, Nguyễn Văn Thành, Võ Thị Bích Huệ (2011), “Nghiên cứu tổng hợp và hoạt tính kháng khuẩn của calophyllolide dùng trong kiểm nghiệm và nghiên cứu dược liệu Mù u *Calophyllum inophyllum* L.”, *Tạp chí Kiểm nghiệm thuốc*, s. 3.2011, tr. 15-19.
6. Hà Minh Hiền, Paul WS Heng, Nguyễn Văn Thành, Nguyễn Khắc Quỳnh Cường, Võ Thị Bích Huệ (2011), “Development and Validation of a GC-MS Method for Rapid Determination of Calophyllolide in *Calophyllum inophyllum* L.: A Quality Control Approach”, *Chinese Journal of Natural Medicines*, 9 (6), pp. 429-434.
7. Hà Minh Hiền, Bùi Thị Thu Thảo, Nguyễn Khắc Quỳnh Cường, Nguyễn Văn Thành, Võ Thị Bích Huệ (2013), “Nghiên cứu xác định calophyllolide bằng phương pháp HPLC-DAD ứng dụng trong kiểm nghiệm dược liệu có dược liệu Mù u”, *Tạp chí Kiểm nghiệm thuốc*, s. 2.2013, tr. 14-18.

NH NG ÓNG GÓP M I C A LU N ÁN

1. V m t hóa h c: L n u tiên công b xác nh c các h p ch t phenol t nh a và v qu Mù u m c Vi t nam g m có:

Nh a Mù u có ch a: 1,5-dihydroxyxanthon, $C_{13}H_8O_4$ (8,1 mg t 3 kg nh a); 4-hydroxyxanthon, $C_{13}H_8O_3$ (105,0 mg t 3 kg nh a) và *h p ch t N₃: inocalophyllin C (tên ngh)*, $C_{37}H_{48}O_6$ (135,0 mg t 4 kg nh a) là *m t h p ch t t nhiên hoàn toàn m i (Xác nh nh các ph UV-Vis, IR, MS, NMR 1, 2 chi u và ph nhi u x tia X)*.

Nh a Mù u có ch a: calophyllolid, $C_{26}H_{24}O_5$ (26,0 mg t 4 kg v qu).

2. V m t thi t l p ch t chu n i chi u: L n u tiên ã thi t l p 2 ch t chu n i chi u t nh a Mù u m c Vi t nam theo h ng d n c a T ch c Y t th gi i v thi t l p, phân ph i và b o qu n ch t i chi u hóa h c bao g m: 4-hydroxyxanthon, $C_{13}H_8O_4$ dùng cho nh tính (9 l 5 mg; hàm l ng: 93,91%); calophyllolid, $C_{26}H_{24}O_5$ dùng cho nh l ng (100 l 10 mg; hàm l ng: 95,27%).

3. V m t ki m nghi m thu c: L n u tiên ã ng d ng ch t chu n i chi u calophyllolid thi t l p c xây d ng và th m nh quy trình phân tích xác nh calophyllolid trong cao methanol t nh a Mù u, v qu Mù u m c Vi t nam b ng k thu t s c ký khí mao qu ghép kh i ph (GC-MS) và trong ch ph m ch a đ u Mù u b ng k thu t s c ký l ng pha o phát hi n b ng detector dẫy diod quang (RP-HPLC-DAD).

TÀI LI U THAM KH O

PH N TI NG VI T

1. B Y t (2009), *D c i n Vi t nam t p IV*, Hà N i, tr. 738.
2. Võ V n Chi (1997), *T i n cây thu c Vi t nam*, Nhà xu t b n Y H c TP. HCM, tr. 770-771.
3. Nguy n Kh c Qu nh C (1998), *i m l i m t s công trình nghiên c u và ng d ng d u Mù u*, T ng quan và chuyên kh o y d c s 37/98, tr. 2-6.
4. Nguy n Kh c Qu nh C (1998), *M t s k t qu nghiên c u ban u v thành ph n hóa h c c a d u Mù u*, T ng quan và chuyên kh o y d c s 37/98, tr. 10-13.
5. Nguy n Kh c Qu nh C , Võ Th B ch Hu , Tr n Thanh Th o (2002), “Phân l p và xác nh c u trúc c a calophyllolid t h t cây Mù u m c t i Vi t nam”, *T p chí d c h c*, s 317, tr. 16-18.
6. Nguy n Duy C ng, Nguy n H u Qu nh (1999), *T i n bách khoa d c h c*, Nhà xu t b n T i n Bách Khoa, tr. 411.
7. Tr n Th à, Nguy n H u nh (1999), *ng d ng m t s ph ng pháp ph nghiên c u c u trúc phân t*, Nhà xu t b n Giáo d c, Hà N i, tr. 325.
8. ng V n Giáp (1997), *Phân tích d li u khoa h c b ng ch ng trình MS-EXCEL*, Nhà xu t b n Giáo d c, Hà N i, tr. 21-87.
9. Ph m Hoàng H (1999), *Cây c Vi t Nam*, Nhà xu t b n tr TP. HCM, tr. 457.
10. T t L i (2000), *Nh ng cây thu c và v thu c Vi t nam*, Nhà xu t b n Y h c, Hà N i, tr. 106.
11. Nguy n Kim Phi Ph ng (2004), *Kh i ph*, Nhà xu t b n i h c qu c gia TP. HCM, tr. 25-28.
12. Nguy n Kim Phi Ph ng (2005), *Ph NMR s d ng trong phân tích h u c*, Nhà xu t b n i h c qu c gia TP. HCM, tr. 121-127.

PH N TI NG N C NGOÀI

13. Achari B., Khan N.U.D., Parveen N., Singh M.P., Singh R., Dastidar P.G., Dutta P. K. (1996), "Two isomeric benzodipyrone derivatives from *Calophyllum inophyllum*", *Phytochemistry*, 42 (4), pp. 1181-1183.
14. Ahmad V.U., Ali M.S., Mahmud S., Perveen S., Rizwani G.H. (1999), "Screening for the antimicrobial properties of the leaves of *Calophyllum inophyllum* Linn. Guttiferae", *J. Chem. Soc. Pak.*, 21 (2), pp. 174-178.
15. Ahmad V.U., Ali M.S., Mahmud S., Perveen S., Rizwani G.H. (1998), "Antimicrobial studies on fractions and pure compounds of *Calophyllum inophyllum* Linn. Guttiferae", *Pak. J. Pharmacol.*, 15 (2), pp. 13-25.
16. Ahmad V.U., Ali M.S., Mahmud S., Perveen S., Rizwani G.H. (1999), "Epimers from the leaves of *Calophyllum inophyllum*", *Phytochemistry*, 50 (8), pp. 1385-1389.
17. AOAC Official Methods of Analysis (2012), *Guidelines for Standard Method Performance Requirements*, Appendix F, AOAC International, pp. 7-9.
18. Armarego Wlilfred L.F., Chai Christina L.L. (2009), *Purification of Laboratory Chemicals*, Elsevier Inc., UK, 6th edition, pp. 14-17.
19. Arya R., Babu V., Ilyas M. et Nasim K.T. (1994), "9-hydroxy-2,2,6,7-tetramethyl-2H-[1]-benzopyran-(1-phenylethylene-10-yl)-(3,2-b)-dihydropyran-4-one from *Calophyllum tomentosum*", *Phytochemistry*, 35 (2), pp. 507-510.
20. Barwick Vicki, Burke Shaun, Lawn Richard, Roper Peter, Bedson Peter, Walker Ron (2001), *Applications of reference materials in analytical chemistry*, Royal Society of Chemistry, UK, pp. 8-14.
21. Bean M.F., Eggleston D.S., Freyer A.J., Haltiwanger R.C., Patil A.D. *et al* (1993), "The inophyllums, novel inhibitors of HIV-1 reverse transcriptase isolated from the malaysian tree, *Calophyllum inophyllum* Linn.", *J. Med. Chem.*, 36 (26), pp. 4131-4138.

22. Bhushan B., Rangaswami S., Seshadri T.R. (1975), "Calaustralin, a new 4-phenylcoumarin from the seed oil of *Calophyllum inophyllum* Linn.", *Indian J. Chem.*, 13, pp. 746-747.
23. Bianchini Jean-Pierre, Butaud Jean-Francois, Gaydou Emile M., Laure Frederic, Raharivelomanana Phila (2008), "Screening of anti-HIV-1 inophyllums by HPLC-DAD of *Calophyllum inophyllum* leaf extracts from French Polynesia Islands", *Analytica Chimica Acta*, 624, pp. 147-153.
24. Bohle D.S., Fotie J. (2006), "Pharmacological and Biological Activities of Xanthones", *Anti-Infective Agents in Medicinal Chemistry*, 5, pp. 15-31.
25. Bouchara J-P., Landreau A., Larcher G., Morel C., Richomme P., Seraphin D., Tronchin G., (2004), "Investigation of the antifungal activity of caledonixanthone E and other xanthones against *Aspergillus fumigatus*", *Planta Medica*, 70, pp. 569-571.
26. Boysen Reinhard I., Milton T. W., Hearn (2010), *High Performance Liquid Chromatographic Separation Methods*, Elsevier Ltd., pp. 13-19.
27. Breitmaier Eberhard (2002), *Structure elucidation by NMR in organic chemistry*, John Wiley & Sons Ltd, England, 3rd edition, p. 12.
28. Brown Stewart A., Mendez Jesus, Murray Robert D. H. (1982) *The Natural Coumarins-Occurrence, Chemistry and Biochemistry*, John Wiley & Sons Ltd, New York, pp. 14; 56-57; 486.
29. Browne David C. (2009), "Reference-Standard Material Qualification", *Pharmaceutical Technology*, 33 (4), pp. 66-73.
30. Capettini L.S., Campos L.V., Cortes S.F., Lemos V.S., Nagem T.J., Dos Santos M.H. (2009), "Vasodilator and Antioxidant Effect of Xanthones Isolated from Brazilian Medicinal Plants", *Planta Medica*, 75 (2), pp. 145-148.
31. Cardellina 2nd J.H., Fuller R.W., Gustafson K.R., Kashman Y., McMahon J.B. (1992), "The calanolides, a novel HIV-inhibitory class of coumarin derivatives from the tropical rainforest tree, *Calophyllum lanigerum*", *J. Med. Chem*, 35 (15), pp. 2735-2743.

32. Carrupt Pierre-Alain, Cruciani Gabriele, Gaillard Patrick, Gnerre Carmela, Fernandes Eduarda, Hostettmann Kurt, Pinto Manuela, Pinto Madalena M.M., Silva Francisco, Tesla Bernard, Thull Ulrike, Wolfender Jean-Luc (2001), "Natural and Synthetic Xanthonones as Monoamine Oxidase Inhibitors: Biological Assay and 3D-QSAR", *Helvetica Chimica Acta*, 84, p. 567.
33. Celestino Santos-Buelga, Williamson Gary (2003), *Methods in Polyphenol Analysis*, The Royal Society of Chemistry, UK, pp. 1; 11-12.
34. Cerqueira Fatima, Nascimento Maria Sao Jose, Pedro Madalena, Pinto Madalena, Sousa Maria Emilia (2002), "Xanthonones as Inhibitors of Growth of Human Cancer Cell Lines and their Effects on the Proliferation of Human Lymphocytes In Vitro", *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 10, pp. 3725-3730.
35. Chan Kelvin, Liang Yi-Zeng, Peishan (2004), "Quality Control of Herbal Medicines", *Journal of Chromatography B*, 812, p. 57.
36. Chang Y.-T., Cheng H.-C., Khalil A.T., Lin Y.-C., Wang L.-T., Shen Y.-C (2004), "Pyranoxanthonones from *Calophyllum inophyllum*", *J. Chin. Chem. Soc.*, 51 (2), pp. 431-435.
37. Chawla H.M., Chibber S.S., Khera Urmil (1975), "Separation and identification of some hydroxyxanthonones by thin-layer chromatography", *Journal of Chromatography A*, 111, pp. 246-247.
38. Chen Ching-Yu, Hung Meng-Chieh, Shen Ya-Ching, Wang Li-Tang, (2003), "Inocalophyllins A, B and Their Methyl Esters from the Seeds of *Calophyllum inophyllum*", *Chem. Pharm. Bull.*, 51 (7), pp. 802-806.
39. Chen R.-Y., Liang X.-T., Wu Y., Yu D.-Q., Zhang P.-C. (2003), "Two new xanthonones from *Calophyllum inophyllum*", *Acta Chimica Sinica (Huaxue xuebao)*, 61 (7), pp. 1047-1051.

40. Cheow Y. L., Ee G. C. L., Jong V., Kua A. S. M., Lim C. K., Rahmani M. (2004), "A new pyranoxanthone inophyllin B from *Calophyllum inophyllum*", *Natural Product Science*, 10 (5), pp. 220-222.
41. Chinese Pharmacopoeia (2010), p. Appendix IX A-61.
42. Chromadex (2011), *Phytochemicals and Services*, USA, pp. 18; 166-494.
43. Chua Tung Kian, Koh Hwee Ling, Tan Chay Hoon (2009), *A guide to medicinal plants*, World Scientific, Singapore, p. 32.
44. Chung Chow Chan, Lam Herman, Lee Y. C., Zhang Xue-Ming (2004), *Analytical Method Validation and Instrument Performance Verification*, Wiley-Interscience, USA, pp. 29-30.
45. Colegate Steven M., Molyneux Russell J. (2008), *Bioactive Natural Products- Detection, Isolation, and Structural Determination*, CRC Press, USA, 2nd edition, p. 40.
46. Cottiglia Filippo, Dhanapal Boopathy, Heilmann Jorg, Sticher Otto (2004), "New Chromanone Acids with Antibacterial activity from *Calophyllum brasiliense*", *J. Nat. Prod.*, 67 (4), pp. 537-541.
47. Crowther Jonathan B., Miller James M. (2000), *Analytical Chemistry in a GMP environment*, John Wiley & Sons, Inc., USA, pp. 86-94; 365-366; 249; 361.
48. Cruz Alexandre Bella, Cechinel-Filho Valdir, Isaias Daniela E. B., Noldin Vania F., Pretto Juliana B., Sartori Mara R. K. (2004), "Antimicrobial Activity of Fractions and Compounds from *Calophyllum brasiliense* (Clusiaceae/Guttiferae)", *Z. Naturforsch.*, 59c, pp. 657-662.
49. Dai Hao-Fu, Deng Yuan-Yuan, Mei Wen-Li, Xiao Qi, Zeng Yan-Bo, Zhao You-Xing (2008), "Cytotoxic prenylated xanthenes from *Calophyllum inophyllum*", *Journal of Asian Natural Products Research*, 10 (10), pp. 993-997.

50. Dai Hao-Fu, Han Zhuang, Mei Wen-Li, Xiao Qi, Zeng Yan-Bo, Zhao You-Xing (2010), "Caloxanthones O and P: Two new prenylated xanthones from *Calophyllum inophyllum*", *Molecules*, 15, pp. 606-612.
51. Daniel M. (2006), *Medicinal Plants-Chemistry and Properties*, Science Publishers, USA, p. 98.
52. Deodhar V.B., Joshi S.P., Phalgurie U.D. (2000), "A new coumarin from the seeds of *Calophyllum inophyllum* Linn.", *Indian J. Chem. Sect. B*, vol 39 (7), pp. 560-561.
53. Dodier M., Sotheeswaran S., Spino C., (1998) "Anti HIV coumarins from *Calophyllum* seed oil", *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 8 (24), pp. 3475-3478.
54. Ee G. C. L., Jong V., Kua A. S. M., Lee H. L., Lim C. K. (2006), "Inophyllin A, a new pyranoxanthone from *Calophyllum inophyllum* (Guttiferae)", *Natural Product Research*, 20 (5), pp. 485-491.
55. El-Haik Basem S., Yang Kai (2009), *Design for Six Sigma A Roadmap for Product Development*, McGraw-Hill, USA, p. 481.
56. European Medicines Agency (2006), *Guideline on Quality of Herbal Medicinal Products¹/Traditional Herbal Medicinal Products*, pp. 7; 9.
57. European Medicines Agency (2006), *Guideline on Specifications: Test Procedures and Acceptance Criteria for Herbal Substances¹, Herbal Preparations² and Herbal Medicinal Products³/Traditional Herbal Medicinal Products*, pp. 11-12.
58. European Medicines Agency (2006), *Specifications: Test Procedures and Acceptance Criteria for New Drug Substances and New Drug Products: Chemical Substances*, p. 7.
59. European Medicines Agency (2008), *Reflection Paper on markers used for quantitative and qualitative analysis of herbal medicinal products and traditional herbal medicinal products*, p. 4.
60. Fleming Ian, Williams Dudley H. (2008), *Spectroscopic Methods in Organic Chemistry*, McGraw-Hill Higher Education, London, 6th edition, pp. 48-61.

61. Food and Drug Administration (1987), *Guideline for Submitting Documentation in Drug Applications for the Manufacturing of Drug Substances*, pp. 28-29.
62. Furukawa H., Ito C., Itoigawa M., Mukainaka T., Nishino H., Okuda M., Okuda Y., Tokuda H. (1999), "Anti-tumor-promoting effects of 8-substituted 7-methoxycoumarins on Epstein-Barr Virus activation assay", *Cancer Letters*, 138, pp. 87-92.
63. Furukawa H., Ito C., Mishina Y., Ohta M., Tan H. et al (1999), "Studies on anti-tumor promoter from tropical medicinal plants (8). Isolation and structure elucidation of new coumarins from *Calophyllum* species (Guttiferae)", *The 119th Annual Meetings of the Pharmaceutical Society of Japan, Tokushima, Abstract II*, p. 156.
64. Games D.E. (1972), "Identification of 4-phenyl and 4-alkylcoumarins in *Mammea americana* L., *Mammea africana* G. Don and *Calophyllum inophyllum* by gas chromatography-mass spectrometry", *Tetrahedron Letters*, 31, pp. 3187-3190.
65. Garazd M. M., Garazd Ya. L., Khilya V.P. (2003), "Neoflavones, 1. Natural distribution and spectral and biological properties", *Chemistry of natural compounds*, 39 (1), p. 86.
66. Goh S.H., Jantan I. (1991), "A xanthone from *Calophyllum inophyllum*", *Phytochemistry*, 30 (1), pp. 366-367.
67. Goodwin Avery C., Steele-Moore Lynn, Schwalbe Richard (2007), *Antimicrobial Susceptibility Testing Protocols*, CRC Press, USA, pp. 3; 59-72.
68. Gopalakrishnan C., Kameswaran L., Nazimudeen S.K., Shankaranarayanan D., Viswanathan S. (1980), "Antiinflammatory and CNS depressant activities of xanthenes from *Calophyllum inophyllum* and *Mesua ferrea*", *Indian J. Pharmacol.*, 12 (3), pp. 181-191.

69. Gopalakrishnan C., Subramanian S., Sundaram B.M. (1986), "Antibacterial activity of xanthenes from *Calophyllum inophyllum* L.", *Arogya Journal of Health Science*, 12 (1), pp. 48-49.
70. Gottlieb Hugo E., Kotlyar Vadim, Nudelman Abraham (1997), "NMR Chemical shifts of common laboratory solvents as trace impurities", *J. Org. Chem.*, 62, pp. 7512-7515.
71. Gu Yu-Cheng, Huo Chang-Hong, Li Li-Geng, Su Xiao-Hui, Shi Qing-Wen, Zhang Man-Li (2008), "Chemical constituents of the plants of the genus *Calophyllum*", *Chemistry and Biodiversity*, 5, pp. 2579-2608.
72. Gunasekera Sarath P., Kazlauskas Rymantas, Sultanbawa S., Uvais M., Westerman Philip W. (1977), "Carbon-13 N.m.r. Study of Naturally Occurring Xanthenes", *Organic Magnetic Resonance*, 9 (11), pp. 631-636.
73. Han Quanbin, Li Songlin, Cheng Chuen Lung, Qiao Chunfeng, Song Jingzheng, Xu Hongxi (2008), "Chemical markers for the quality control of herbal medicines: an overview", *Chinese medicine*, 3:7, p. 2.
74. Harborne J. B. (1989), *Plant Phenolics*, Academic Press, UK, p. 6.
75. Harborne J. B. (1998), *Phytochemical Methods*, Chapman & Hall, UK, 3rd edition, pp. 40-42; 49; 84.
76. Hocart Charles H. (2010), *Mass Spectrometry: An Essential Tool for Trace Identification and Quantification*, Elsevier Ltd., p. 376.
77. Hubschmann Hans-Joachim (2009), *Handbook of GC/MS-Fundamentals and Applications*, Wiley-VCH, Germany, 2nd edition, pp. 401-402.
78. Hostettmann K., Hostettmann M., Marston A. (1998), *Preparative Chromatography Techniques-Applications in Natural Product Isolation*, Springer, Germany, 2nd edition, pp. 39-41; 45.
79. Iinuma M., Tanaka T., Tosa H., Yonemori S. (1994), "Two xanthenes from root bark of *Calophyllum inophyllum*", *Phytochemistry*, 35 (2), pp. 527-532.

80. Inuma M., Tanaka T., Tosa H., Yonemori S. (1995), "Two xanthenes in the underground part of *Calophyllum inophyllum*", *Heterocycles*, 37 (2), pp. 832-838.
81. Inuma M., Tanaka T., Tosa H., Yonemori S. (1995), "Two xanthenes from root of *Calophyllum inophyllum*", *Phytochemistry*, 38 (3), pp. 725-728.
82. International Conference on Harmonization of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use (2005), *Validation of Analytical Procedure: Text and Methodology*, pp. 1-13.
83. International Organisation for Standardization 13528 (2005), *Statistical methods for use in proficiency testing by interlaboratory comparisons*, Genève, pp. 64-65.
84. International Organisation for Standardization Guide 35 (2006), *Reference materials -General and statistical principles for certification*, Genève, pp. 74-82.
85. International Pharmacopoeia (2003), pp. 330-331.
86. Ito C., Itogawa C., Kuchide M., Tan H.T.W., Tokuda H., et al (2001), "Cancer chemopreventive agents, 4-phenylcoumarins from *Calophyllum inophyllum*", *Cancer Letters*, 169 (1), pp. 15-19.
87. Jackson B., Locksley H. D., Scheinmann F. (1967), "The isolation of 6-(3,3-dimethylallyl)-1,5-dihydroxyxanthone and two related metabolites from *Calophyllum scriblitifolium* Henderson and Wyatt-Smith", *Tetrahedron*, 24, pp. 3059-3068.
88. Jantan I., Jalil J., Warif N.A. (2001), "Platelet Activating Factor (PAF) antagonistic activities of compounds isolated from Guttiferae species", *Pharm. Biol.*, 39 (4), pp. 243-246.
89. Jayaprakasha G. K., Ohnishi-Kameyama M., Ono H., Jaganmohan Rao L., Yoshida M. (2006), "Phenolic Constituents in the Fruits of *Cinnamomum zeylanicum* and their Antioxidant Activity", *J. Agric, Food Chem.*, 54, pp. 1672-1679.

90. Jefferson A., Scheinmann F., Stacey C.I. (1971), "Gas-Liquid Chromatography of naturally occurring xanthenes and related derivatives", *Journal of Chromatography A*, 57, pp. 247-254.
91. Kawazu K., Mitsui T., Ohigashi H. (1968), "The piscicidal constituents of *Calophyllum inophyllum* Linn.", *Tetrahedron Letters*, 19, pp. 2383-2385.
92. Kawazu K., Mitsui T., Ohigashi H., Takahashi N. (1972), "Piscicidal constituents of *Calophyllum inophyllum*", *Bull. Inst.Chem.Res.*, Kyoto Univ., 50 (3), pp. 160-167.
93. Kitson Fulton G., Penton Zelda E., Sparkman David O. (2011), *Gas chromatography and mass spectrometry: a practical guide*, Elsevier, USA, 2nd edition, pp. 213-216.
94. Komarova N. I., Korchagina D. V., Nechepurenko S. B., Nechepurenko I. V., Polovinka M. P., Salakhutdinov N. F. (2008), "Low-Molecular-Weight Phenolic Compounds from *Hedysarum theinum* Roots", *Chemistry of Natural Compound*, 44 (1), pp. 31-34.
95. Krull Ira S., Swartz Michael E. (1997), *Analytical Method Development and Validation*, Marcel Dekker, Inc, New York, p. 60.
96. Kuete V., Beng V. Penlap., Etoa F.-X., , Komguem J., Lontsi D., Meli A.L., Tangmouo J.G. (2007), "Antimicrobial components of the methanolic extract from the stem bark of *Garcinia smeathmannii* Olivier (Clusiaceae)", *South African Journal of Botany*, 73, pp. 347-354.
97. Kuete Victor, Komguem Justin, Lall N., Lontsi David, Louh Gabin N., Meli Alain L., Meyer J.J.M., Tangmouo Jean Gustave (2007), "Antimycobacterial and antifungal activities of the methanolic extract and compounds from *Garcinia polyantha*", *Pharmacologyonline*, 3, pp. 87-95.
98. Kumar P.S.S., Murti V.V.S., Seshadri T.R. (1972), "Structure of ponnalide", *Indian J. Chem.*, 10, pp. 255-257.

99. Kumar V., Ramachandran S., Sultanbawa M.U.S. (1976), "Xanthonés and triterpenoids from timber of *Calophyllum inophyllum*", *Phytochemistry*, 15, pp. 2016-2017.
100. Laure Frederic (2005), *Etude de la composition chimique et de la biodiversité du Calophyllum inophyllum de Polynésie française*, Université de la Polynésie française, Nice-France, pp. 188-227.
101. Leu T., Bianchini J.-P., Faure R., Herbette G., Meijer L., Raharivelomanana P., Soulet S. (2009), "Elastase inhibitors and cancer preventive potential agents from *Calophyllum inophyllum* (L.) grown in French Polynesia", *Planta Medica*, 75 (9), p. PE20.
101. Liu Willow J. H. (2011), *Traditional Herbal Medicine Research Methods*, Wiley, USA, pp. 105-109.
102. Locksley H.D., Al-Jeboury Faik Shalan (1970), "Xanthonés in the heartwood of *Calophyllum inophyllum*: a geographical survey", *Phytochemistry*, 10, pp. 603-606.
103. Ludwig Huber (2007), *Validation and Qualification in Analytical Laboratories*, Informa, USA, 2nd edition, pp.125-154.
104. Marvin C.M. (2008), *GC/MS A practical user's guide*, John Wiley & Sons, Inc., USA, p. 59.
105. McNair Harold M., Miller James M. (1997), *Basic Gas Chromatography*, John Wiley & Sons, Inc., USA, p. 142.
106. Nicholson Ralph, Vermerris Wilfred (2008), *Phenolic Compound Biochemistry*, Springer, USA, pp. 2; 40; 151.
107. Nigam S. K., Das B. C., Kunesch G., Mitra C. R., Polonsky J. (1967), "Constituent of *Calophyllum tomentosum* and *Calophyllum apetalum* nuts: structure of a new 4-alkyl- and of two new 4-phenyl-coumarins", *Tetrahedron Letters*, 8 (28), pp. 2633-2636.

- 108.Nigam S.K., Bhalla T.N., Bhargava K.P., Misra G., Saxena R.C. (1980), "Calophyllolide-a new non-steroidal anti-inflammatory agent", *Indian J. Med. Res.*, 72, pp. 762-765.
- 109.Pascal Ribéreau-Gayon (1972), *Plant Phenolics*, Oliver & Boyd, Great Britain, p. 105.
- 110.Rodriguez-Gonzalo E., Carabias-Martinez R., Hernandez-Mendez J., Revilla-Ruiz P. (2005), "Pressurized liquid extraction in the analysis of food and biological samples", *Journal of Chromatography A*, 1089, pp. 1-17.
- 111.Saleh Nabil A. M. (1974), "A thin layer and paper chromatographic study of some naturally occurring xanthenes", *Journal of Chromatography A*, 92, pp. 467-472.
- 112.Sheehan Terry L. (2002), "The best MS option: GC-MS and LC-MS", *American Laboratory*, pp. 40-43.
- 113.Silverstein Robert M., Webster Francis X., Kiemle David (1998), *Spectrometric Identification of Organic Compounds*, John Wiley & Sons, Inc., New York, 6th edition, pp. 86-87; 92.
- 114.Sherma Joseph, Waksmundzka-Hajnos Monika (2011), *High Performance Liquid Chromatography in Phytochemical Analysis*, CRC Press, USA, pp. 7-8.
- 115.Srinivasan V. Srini (2006), "Challenges and scientific issues in the standardization of botanicals and their preparations. United States Pharmacopeia's dietary supplement verification program-A public health program", *Life Sciences*, 78, p. 2041.
- 116.United States Pharmacopoeia (2007), pp. 318-320; 377-378.
- 117.Waldeback M. (2005), *Pressurized Fluid Extraction*, PhD thesis-Uppsala Sweden, p. 25.
- 118.Weast Robert C., Astle Melvin J., Beyer William H. (1988), *Handbook of Chemistry and Physics*, CRC Press, USA, 68th edition, pp. F-160-161.

119. WHO Regional Publications Western Pacific Series No. 19 (1997), *Medicinal plants in the south pacific*, World Health Organization, Geneve, p. 29.
120. World Health Organization (2006), *General guidelines for the establishment, maintenance and distribution of chemical reference substances*, Geneve, pp. 3-24.
121. World Health Organization (2007), *WHO guidelines on good manufacturing practices (GMP) for herbal medicine*, Genève, p. 16.
122. Yamaguchi K. (1970), *Spectral data of natural products*, 1, Elsevier Publishing Company, pp. 111-112.
123. Yimdjo Marie C. Azebaze Anatole G., Bodo B., Fomum Zacharias T., Meyer AM., Nkengfack Augustin E., (2004) "Antimicrobial and cytotoxic agents from *Calophyllum inophyllum*", *Phytochemistry*, 65, pp. 2789-2795.

DANH MỤC PHỤ LỤC

Ph 1 c s	Tên ph 1 c	Trang
Ph 1 c 1	Hình nh v nguyên v t li u nghiên c u	PL 1
Ph 1 c 2	Quá trình nghiên c u chi t tách và tinh ch các h p ch t phenol t nh a và v qu Mù u	PL 2
Ph 1 c 3	M t s hình nh tác d ng kháng khu n c a cao chi t t nh a Mù u	PL 10
Ph 1 c 4	B d li u ph chu n N ₁ (1,5-dihydroxyxanthon)	PL 11
Ph 1 c 5	B d li u ph chu n N ₂ (4-hydroxyxanthon)	PL 25
Ph 1 c 6	B d li u ph chu n N ₃	PL 39
Ph 1 c 7	B d li u ph chu n N ₄ (Calophyllolid)	PL 63
Ph 1 c 8	B d li u s c ký l p m ng và ph V ₁ (Calophyllolid)	PL 70
Ph 1 c 9	S chi t xu t h p ch t phenol t nh a Mù u phân l p calophyllolid làm ch t chu n i chi u	PL 74
Ph 1 c 10	S phân l p calophyllolid t cao methanol nh a Mù u	PL 75
Ph 1 c 11	Quy trình tinh ch calophyllolid i u ch c	PL 76
Ph 1 c 12	Tiêu chu n ch t l ng ch t chu n i chi u calophyllolid C ₂₆ H ₂₄ O ₅	PL 78
Ph 1 c 13	Tiêu chu n ch t l ng ch t chu n i chi u 4-hydroxyxanthon C ₁₃ H ₈ O ₃	PL 83
Ph 1 c 14	Quy trình xác nh calophyllolid trong cao methanol t nh a Mù u b ng ph ng pháp GC-MS	PL 87
Ph 1 c 15	Quy trình xác nh calophyllolid trong v qu Mù u b ng ph ng pháp GC-MS	PL 89
Ph 1 c 16	Quy trình nh l ng calophyllolid trong ch ph m “Đ u Mù u Inopilo” b ng ph ng pháp HPLC-DAD	PL 92

PH L C 1
HÌNH NH V NGUYÊN V T LI U NGHIÊN C U



Hình PL 1.1 Cây Mù u (*Calophyllum inophyllum* L. Clusiaceae)



Hình PL 1.2 Quả Mù u phơi khô và h t



Hình PL 1.3 Vỏ quả Mù u



Hình PL 1.4 Ch phẩm “D u Mù u INOPILO”

PH L C 2

QUÁ TRÌNH NGHIÊN C U CHI T TÁCH VÀ TINH CH CÁC H P CH T PHENOL T NH A VÀ V QU MÙ U

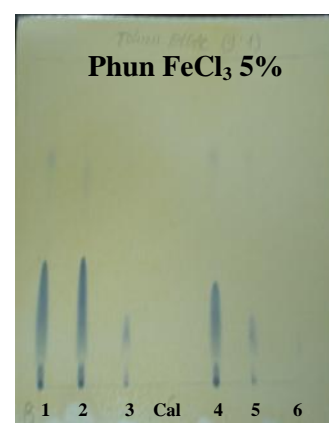
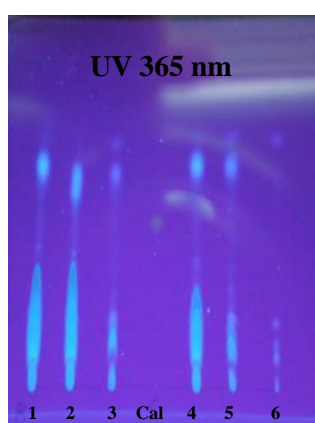
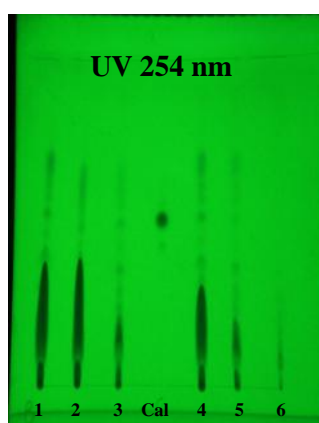
CHI T XU T

Chi t xu t các h p ch t phenol t nh a Mù u b ng dung môi kém phân c c

Ti n hành trong i u ki n tránh ánh sáng

L y 50 g nh a Mù u lo i ch a và ã cô lo i c n, em ki m hóa v i nhi u lo i ki m khác nhau nh : *dung d ch Na₂CO₃ 10% (TT), ammoniac (TT), dung d ch NaOH 1 M (TT)* n pH 7-8 và 8-9. D ch ki m sau ó c acid hóa b ng *dung d ch acid hydrocloric 1 M (TT)* n pH 3-4. Dùng *n-hexan (TT)* chi t các h p ch t phenol trong d ch acid (40 ml x 3), lo i n c b ng *natri sulfat khan (TT)*. b c h i dung môi nhi t phòng thu c cao n-hexan, cân tính hi u su t. Ch n quy trình chi t c nhi u h p ch t phenol nh t xác nh b ng ph n ng v i thu c th *dung d ch s t (III) clorid 5% (TT)* cho màu xanh d ng m. K t qu ch n quy trình chi t nh a ch a cô lo i c n b ng cách ki m hóa v i *dung d ch natri carbonat 10% (TT)* n pH 8-9 do d tách l p nh t và cho hi u su t chi t cao nh t (1,33%) th tính kháng khu n và phân l p h p ch t phenol.

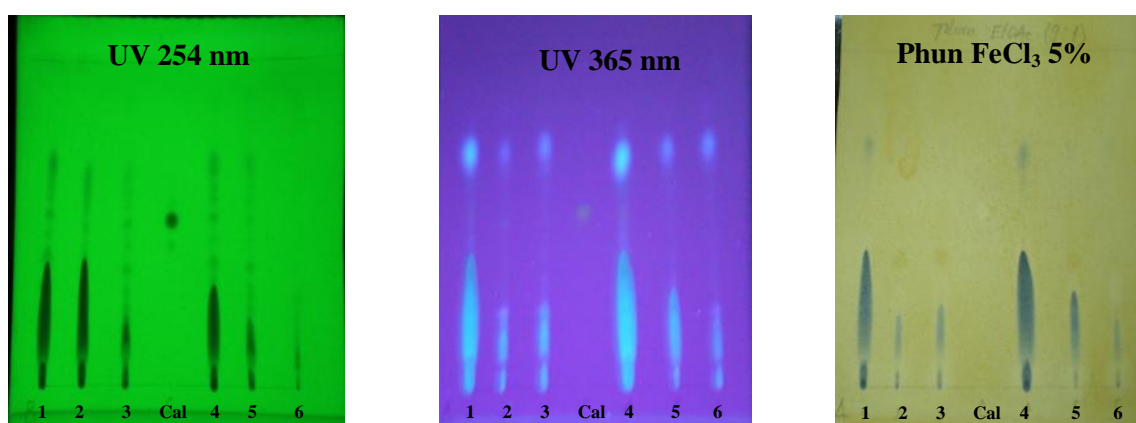
pH 7-8	Nh a Mù u (50 g)					
	Ch a cô lo i c n			ã cô lo i c n		
	Na ₂ CO ₃ 10%	NH ₄ OH	NaOH 1N	Na ₂ CO ₃ 10%	NH ₄ OH	NaOH 1N
Mô t d ch chi t	Vàng-xanh lá m , d o quánh, mùi c tr ng	Vàng nh t, mùi c tr ng	Vàng r t nh t, mùi c tr ng	Vàng-xanh lá m , d o quánh, mùi c tr ng	Vàng nh t, mùi c tr ng	Vàng r t nh t, mùi c tr ng
Tách l p	Rõ	Không rõ (<i>Ph i x lý b ng NaCl</i>)		Rõ	Không rõ (<i>Ph i x lý b ng NaCl</i>)	
L ng h p ch t phenol thu c (g)	0,47	0,34	0,04	0,22	0,02	0,03
Hì u su t (%)	0,94	0,64	0,08	0,44	0,04	0,06
S v t TLC	9					
nh tính h p ch t phenol	+	+	+	+	+	+



Hình PL 2.1 S c ký TLC (Toluen-EtOAc: 9:1) các d ch chi t pH 7-8 ki m hóa v i: 1, 4: Na₂CO₃ 10%; 2, 5: NaOH 1 N; 3, 6: NH₄OH ; Cal: Calophyllolid.

D ch chi t t nh a 1, 2, 3: ch a cô lo i c n; 4, 5, 6: ã cô lo i c n

pH 8-9	Nhựa Mùi u (50 g)					
	Chứa cô lo i c n			ã cô lo i c n		
	Na ₂ CO ₃ 10%	NH ₄ OH	NaOH 1N	Na ₂ CO ₃ 10%	NH ₄ OH	NaOH 1N
Mô tả đặc tính	Vàng-xanh lá m , d o quánh, mùi c tr ng	Vàng nh t, mùi c tr ng	Vàng r t nh t, mùi c tr ng	Vàng-xanh lá m , d o quánh, mùi c tr ng	Vàng nh t, mùi c tr ng	Vàng r t nh t, mùi c tr ng
Tách l p	Rõ	Không rõ (Ph i x lý b ng NaCl)		Rõ	Không rõ (Ph i x lý b ng NaCl)	
L ng h p ch t phenol thu c (g)	0,65	0,06	0,03	0,64	0,06	0,03
Hì u su t (%)	1,30	0,12	0,06	1,28	0,12	0,06
S v t TLC	9					
nh tính h p ch t phenol	+	+	+	+	+	+

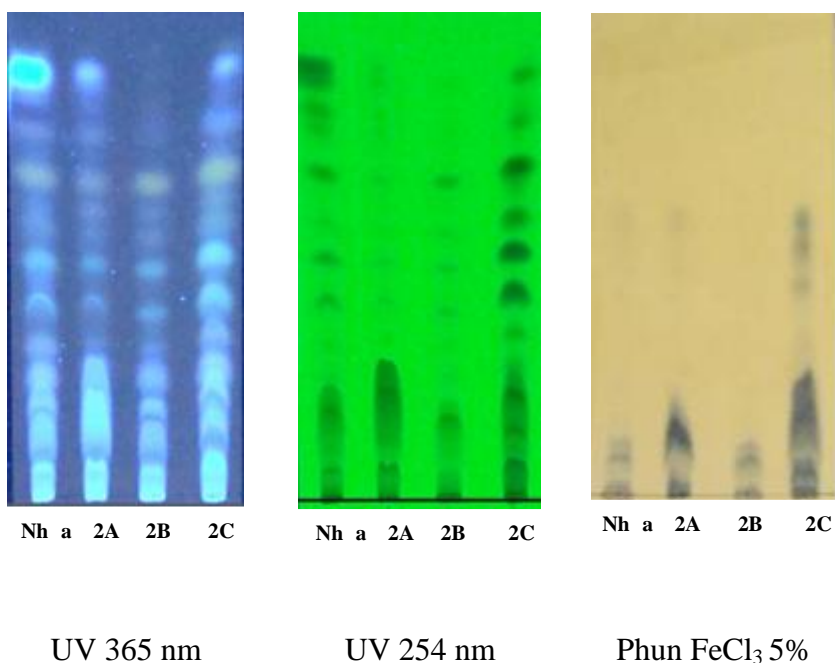


Hình PL 2.2 Sơ ký TLC (Toluen-EtOAc: 9:1) các đặc tính pH 8-9 khi m hóa
v i: 1, 4: Na₂CO₃ 10%; 2, 5: NaOH 1 N; 3, 6: NH₄OH ; Cal: Calophyllolid.
Đặc tính t nh a 1, 2, 3: chứa cô lo i c n; 4, 5, 6: ã cô lo i c n

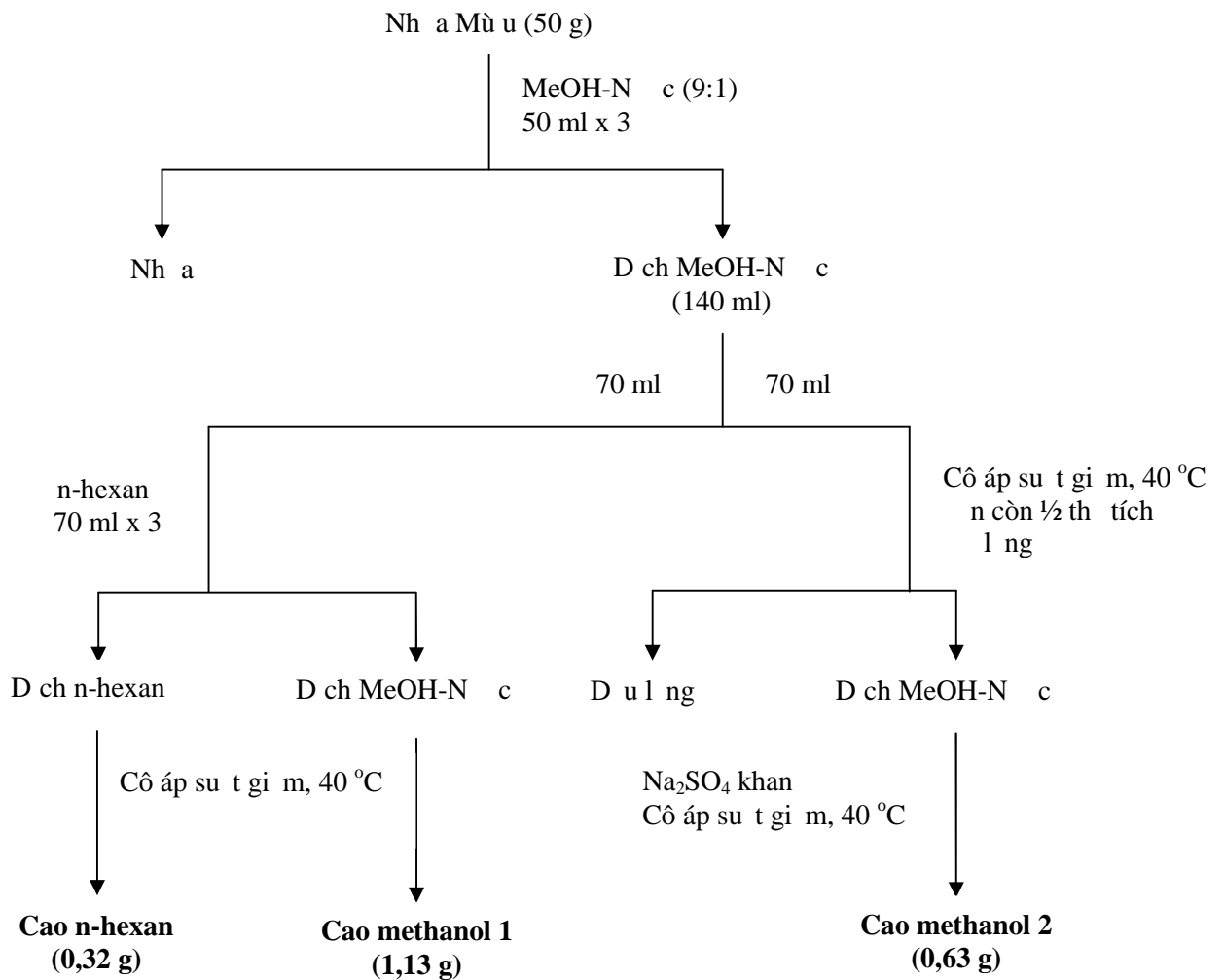
Chiết xuất các hợp chất phenol từ nhũ a Mù u bằng dung môi phân cực

Tiến hành trong điều kiện tránh ánh sáng

Chiết 50 g nhũ a Mù u bằng hỗn hợp methanol-n-hexan (9:1) (50 ml x 3), tách lấy dịch methanol-n-hexan. Loại tạp (chủ yếu là chất béo, dầu...) bằng cách chia dịch methanol-n-hexan thu được làm hai phần, phần 1 chiết lần lượt với n-hexan (70 ml x 3 lần) thu được dịch n-hexan, cô đặc dưới áp suất giảm dịch n-hexan 40 °C nên còn thu được cao n-hexan (0,72 g), dịch methanol-n-hexan còn lại cô đặc dưới áp suất giảm 40 °C nên còn thu được cao methanol 1 (2,52 g). Phần 2 cô đặc dưới áp suất giảm 40 °C nên còn ½ thể tích. Lọc qua màng, tách phần tạp bằng cách chiết dịch methanol-n-hexan trên cột lọc bằng natri sulfat khan (TT) rồi cô thu hồi dung môi dưới áp suất giảm 40 °C nên còn thu được cao methanol 2 (1,4 g). Kết quả trên TLC cho thấy cao methanol 2 loại tạp bằng cách giảm thể tích methanol vẫn còn chứa nhiều hợp chất phenol và ít tạp, các chất có tính kháng khuẩn và phân lập hợp chất phenol.



Hình PL 2.3 Sơ ký TLC (Toluen-EtOAc: 9:1) các cao và dịch chiết: 2A: Cao methanol 1; 2B: Cao n-hexan, 2C: Cao methanol 2



Hình PL 2.4 S Chi tách các hợp chất phenol trong nhựa Mù u bằng MeOH-N (9:1)

Chi tách các hợp chất phenol trong vỏ quế Mù u bằng phương pháp chiết lỏng-lỏng áp suất

Xây vỏ quế thành bột bằng máy nghiền M5A-Fitzpatrick (Hoa Kỳ) và rây thu các hạt có kích thước trung bình là 1,84 mm theo phương pháp D của Viện M. Bột vỏ quế chiết với *n*-hexan (TT) và methanol (TT). Ống chiết có đường kính 10 µm, miệng ống là lớp bông thủy tinh rời cho vào 5 g bột vỏ quế, thêm các hạt thủy tinh dày 1-2 mm để ngăn chặn bột quế trong ống, tiếp tục cho lớp bông thủy tinh và đường kính 10 µm nữa. Đường kính 10 µm và bông thủy tinh ngăn các hạt bột vỏ quế rơi vào dịch chiết.

i u ki n chi t

Thi t b chi t l ng d i áp su t: ASE-100-Dionex (Hoa k)

Áp su t : 1500 psi

Nhi t : 120 °C

Th i gian chi t : 15 phút

Chu k chi t : 1

Th tích r a : 60%

Th i gian làm s ch h th ng b ng khí nitrogen : 90 giây

Làm khô d ch chi t d i áp su t gi m b ng máy c t quay chân không Eyela (Nh t B n). Tính hi u su t và gi cao chi t nhi t 2-8 °C.

Chi t xu t các h p ch t phenol trong v qu Mù u b ng soxhlet

Cân chính xác kho ng 2 g b t v qu Mù u cho vào ng ng m u b ng cellulose kích th c 25 mm x 27 mm x 100 mm (Whatman, UK) r i l p vào b chi t Soxhlet t ng Buchi B-811(Th y S) chi t b ng *methanol* (TT) và *n-hexan* (TT) trong 8 gi . Cô d ch chi t d i áp su t gi m 40 °C. Tính hi u su t và gi cao chi t nhi t 2-8 °C.

Chi t xu t các h p ch t phenol trong v qu Mù u b ng ph ng pháp ng m ki t

Ti n hành trong i u ki n tránh ánh sáng.

B t v qu (1 kg) c chi t v i 3 lít c n 96% b ng ph ng pháp ng m ki t thu c 2,5 lít d ch chi t c n. Cô cách th y d ch chi t c n này n s t nh siro r i thêm n c vào và chi t v i ethyl acetat. Cô d ch chi t d i áp su t gi m 40 °C, thu c 20 g cao ethyl acetat d o màu vàng s m, có mùi th m.

PHÂN L P VÀ TINH CH

Phân l p t cao n-hexan

Cao n-hexan (40 g) tr n v i silica gel c h t 0,040-0,063 mm theo t l 1:1 thành m t h n h p ng nh t n p vào c t và tách phân o n b ng ph ng pháp s c ký chân không (VLC) v i pha t nh là silica gel cùng lo i (400 g) và pha ng là (1) n-hexan-ethyl acetat v i t l ethyl acetat t ng d n: (100:0), (95:5), (90:10), (2) ethyl

acetat-methanol v i t l methanol t ng d n: (88:12), (80:20), (60:40). Ki m tra các phân o n b ng s c ký l p m ng trên b n silica gel F₂₅₄ trắng s n (Merck) v i h dung môi khai tri n n-hexan-ethyl acetat (7:3), phát hi n b ng cách quan sát d i ánh sáng t ngo i 254, 366 nm. K t qu thu c 6 phân o n (H_I, H_{II},... H_{VI}) và các h p ch t N₁ (8,1 mg), N₂ (105,0 mg). R a các h p ch t N₁ và N₂ b ng *ether d u h a (TT)*, k t tinh l i trong *n-hexan (TT)* và ki m tra tinh khi t b ng s c ký l p m ng trên b n silica gel F₂₅₄ trắng s n (Merck) v i các h dung môi khai tri n có phân c c khác nhau [1] *n-hexan-ethyl acetat (7:3)*, [2] *cloroform-methanol (9:1)*, [3] *toluen-ethyl acetat (8:2)*, phát hi n b ng cách quan sát d i èn 254, 365 nm.

Phân l p t cao methanol

Cao methanol (50 g) tr n v i silica gel c h t 0,040-0,063 mm theo t l 1:1 thành m t h n h p ng nh t n p vào c t và tách phân o n b ng ph ng pháp VLC v i pha t nh là silica gel cùng lo i (500 g) và pha ng là n-hexan-ethyl acetat v i t l ethyl acetat t ng d n t (100:0), (99:1), (98:2),...(90:10). Ki m tra các phân o n b ng s c ký l p m ng trên b n silica gel F₂₅₄ trắng s n (Merck) v i h dung môi khai tri n toluen-ethyl acetat (9:1), phát hi n b ng cách quan sát d i èn 254, 365 nm. K t qu thu c 7 phân o n (M_I, M_{II},...M_{VII}) và các h p ch t N₃ (135,0 mg), N₄ (98,0 mg). R a các h p ch t N₃ và N₄ b ng *aceton (TT)* l nh, k t tinh l i trong *n-hexan (TT)* và ki m tra tinh khi t b ng s c ký l p m ng trên b n silica gel F₂₅₄ trắng s n (Merck) v i các h dung môi khai tri n có phân c c khác nhau [1] *n-hexan-ethyl acetat (9:1)*, [2] *cloroform-methanol (9:1)*, [3] *toluen-ethyl acetat (9:1)*, phát hi n b ng cách quan sát d i èn 254, 365 nm.

Ti n hành tinh ch qua HPLC i u ch trên máy Shimadzu LC-8A, c t ACE 10 C₁₈ 150 mm x 10 mm ID, 10 µm, pha ng acetonitril-n c (75:25), t c dòng 4,8 ml/phút thu c 60,2 mg h p ch t N₃ và 52,2 mg h p ch t N₄.

Cao ethyl acetat

Cao ethyl acetat (20 g) tr n v i silica gel c h t 0,040-0,063 mm (Merck) theo t l 1:1 thành m t h n h p ng nh t n p vào c t và tách phân o n b ng ph ng pháp VLC v i pha t nh là silica gel cùng lo i (200 g) và pha ng là (1) n-hexan-ethyl acetat v i t l ethyl acetat t ng d n t (100:0), (99:1), (98:2),...(96:4). Ki m tra các phân o n b ng s c ký l p m ng trên b ng silica gel F₂₅₄ trắng s n (Merck) v i h dung môi khai tri n toluen-ethyl acetat (9:1), phát hi n b ng cách quan sát d i èn 254, 365 nm. K t qu thu c 6 phân o n (E_I, E_{II},...E_{VII}) và h p ch t V_I (26,0 mg). R a h p ch t V_I b ng *n-hexan (TT)* l nh và *aceton (TT)* l nh và ki m tra tinh khi t b ng s c ký l p m ng trên b n silica gel F₂₅₄ trắng s n (Merck) v i các h dung môi khai tri n có phân c c khác nhau [1] *n-hexan-ethyl acetat* (9:1), [2] *cloroform-methanol* (9:1), [3] *toluen-ethyl acetat* (9:1), phát hi n b ng cách quan sát d i èn 254, 365 nm.

PH L C 3
M T S H ÌNH NH TÁC D NG KHÁNG KHU N C A
CAO CHI T T NH A MÙ U

(a)



(b)

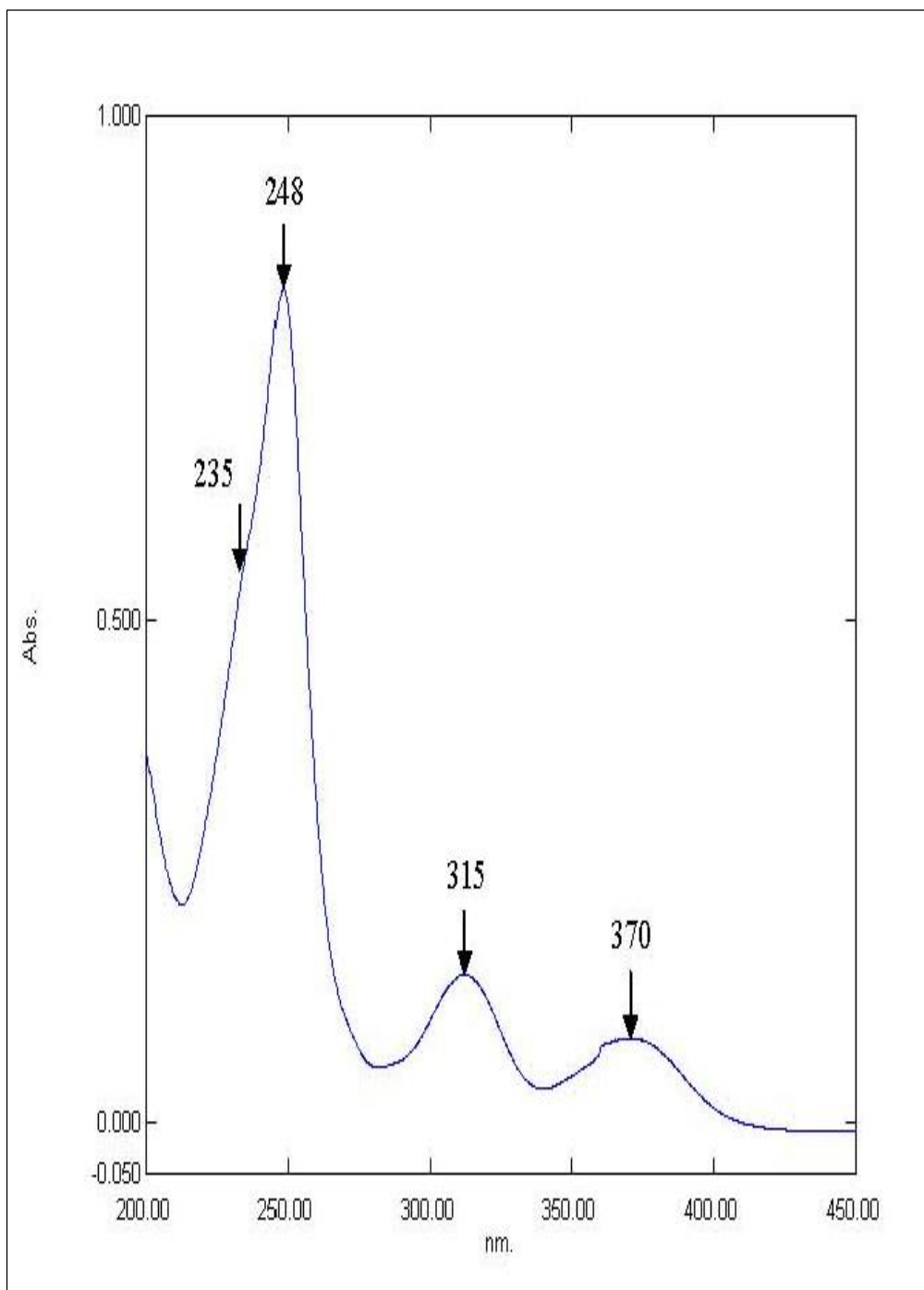


(c)

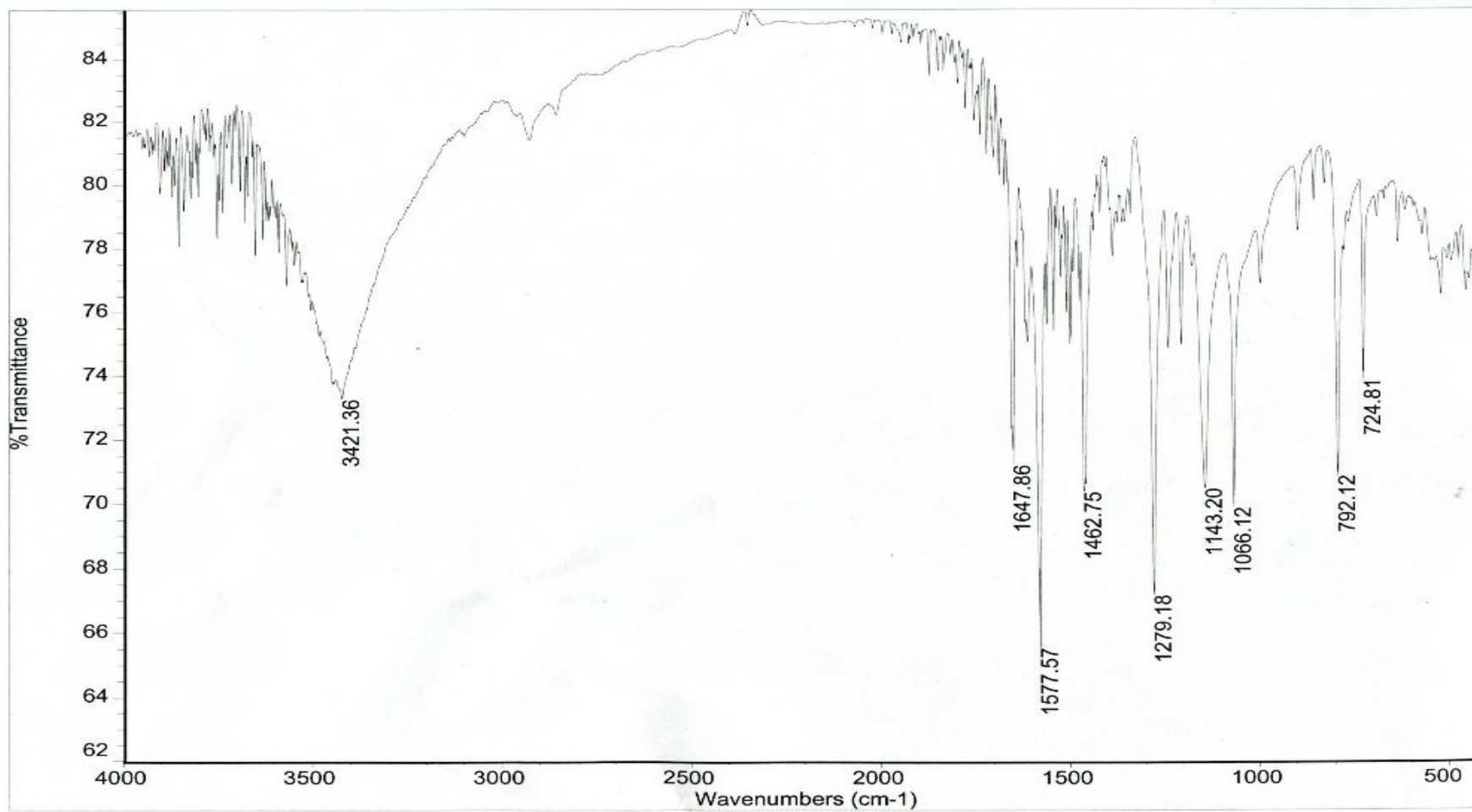


Hình PL 3.1 Vòng kháng khu n t o ra do ã t m cao methanol chỉ t t nh a Mù u trên các vi khu n **(a)** *Staphylococcus aureus*, **(b)** *Pseudomonas aeruginosa* và **(c)** *Mycobacterium smegmatis*. (Vòng có ã ng kính l ã nh t do ã kháng sinh chu n).

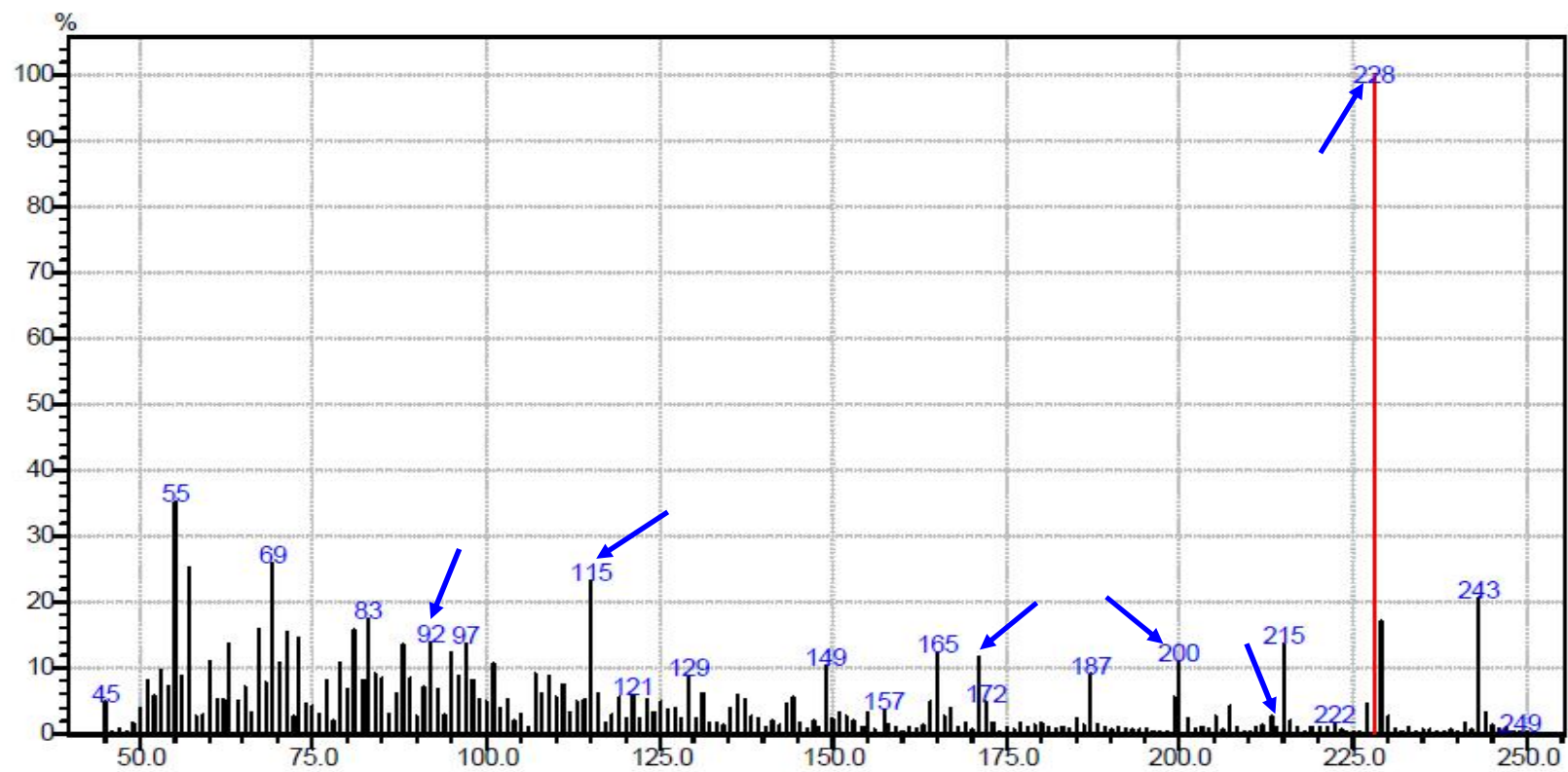
PH L C 4
B D LI U PH CHU N
N₁ (1,5-DIHYDROXYXANTHON)



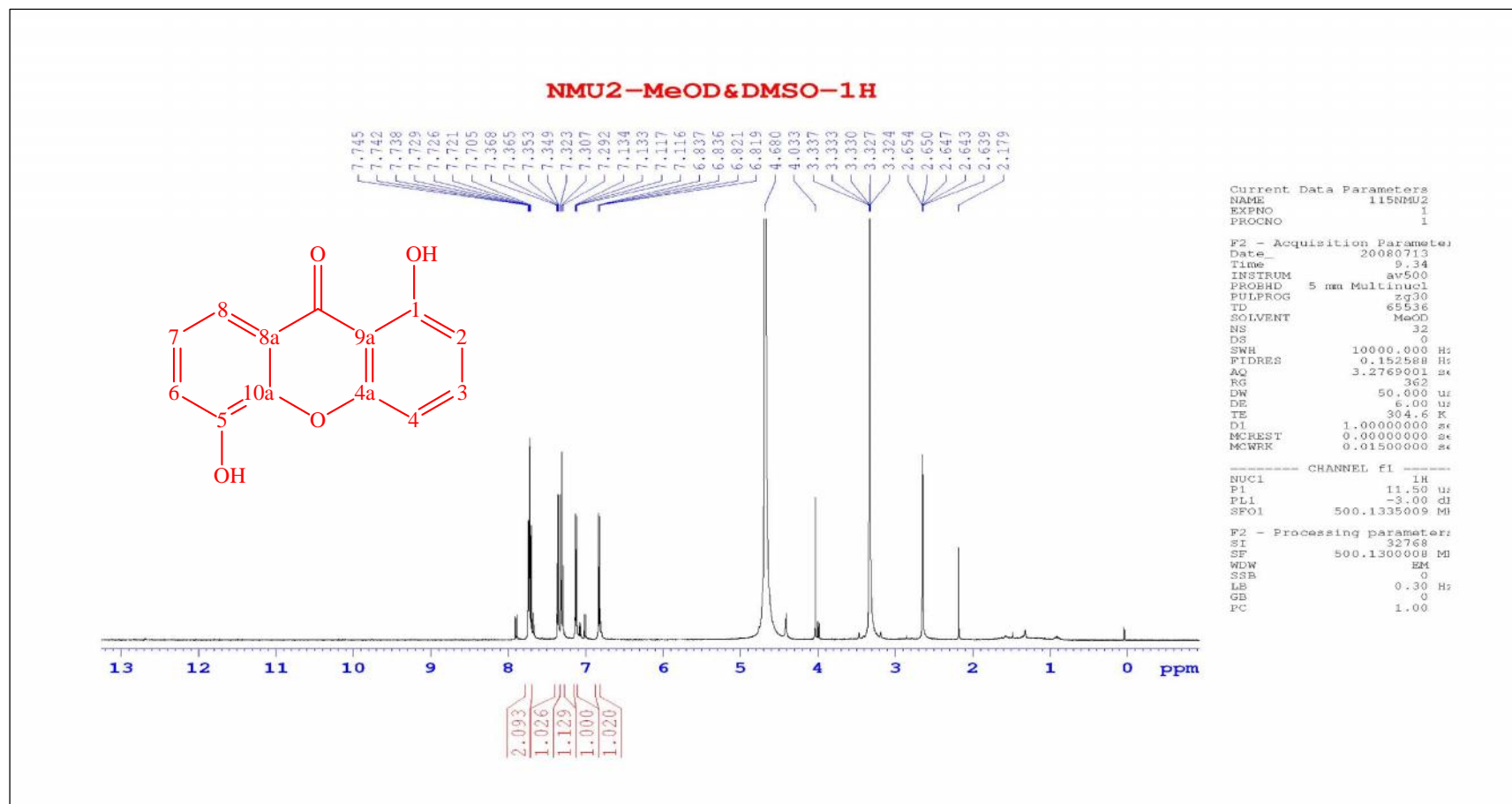
Ph 1 c 4.1 Ph UV-Vis (MeOH) c a h p c h t N₁ (1,5-dihydroxyxanthon)



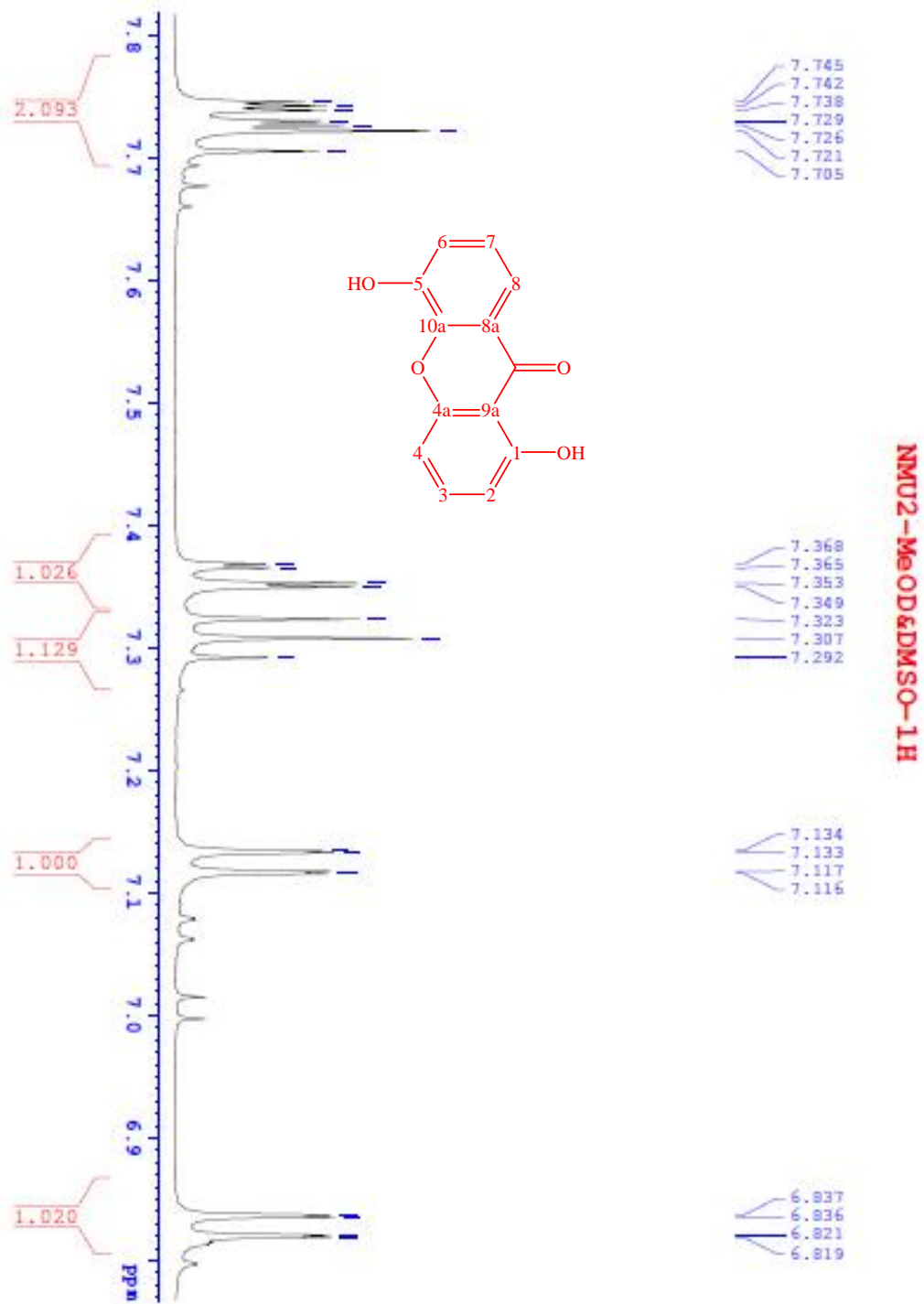
Ph 1 c 4.2 Ph IR (a KBr) c a h p c h t N₁ (1,5-dihydroxyxanthon)



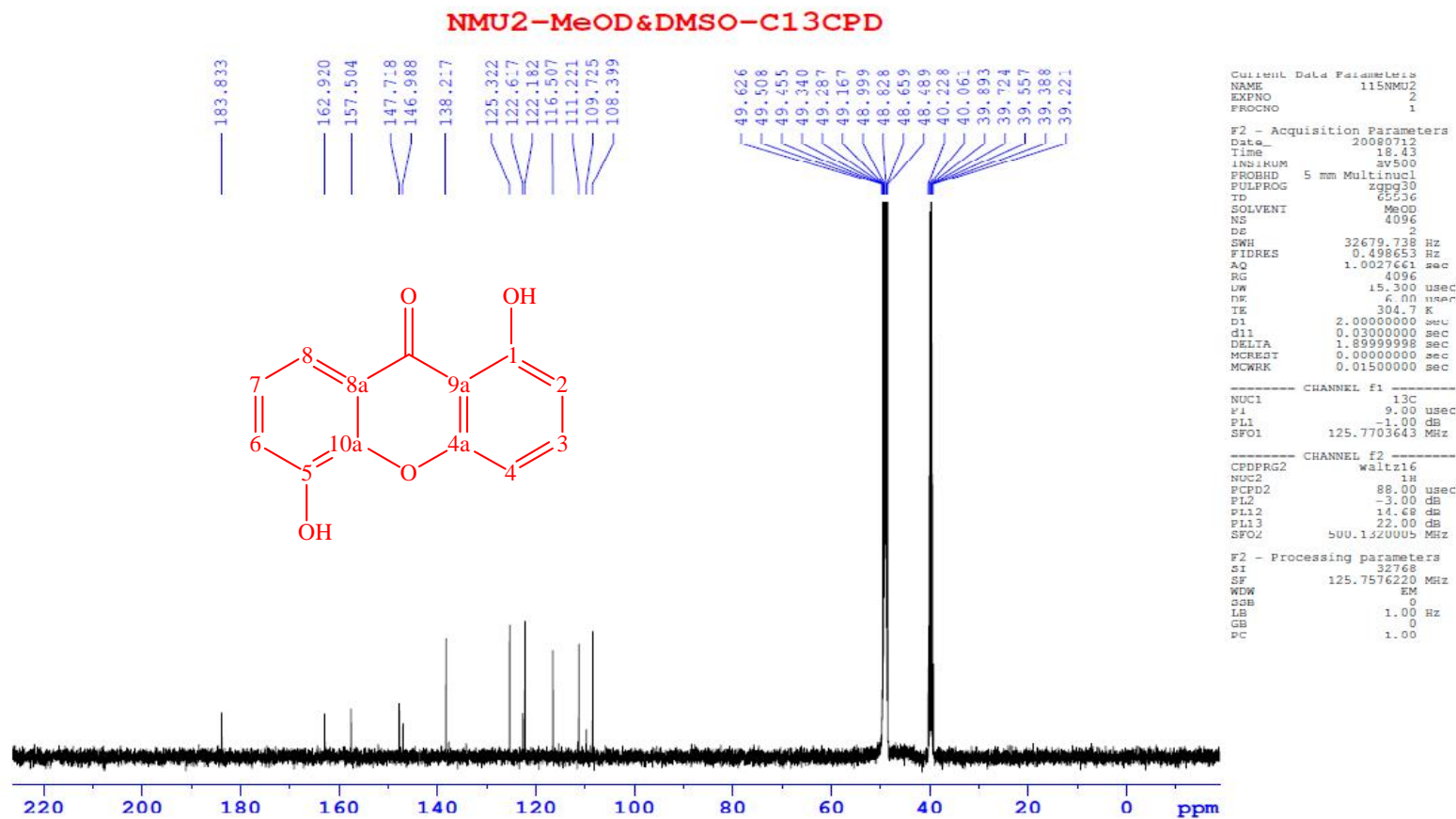
Ph 1 c 4.3 Ph MS (EI-MS) c a h p c h t N₁ (1,5-dihydroxyxanthon)



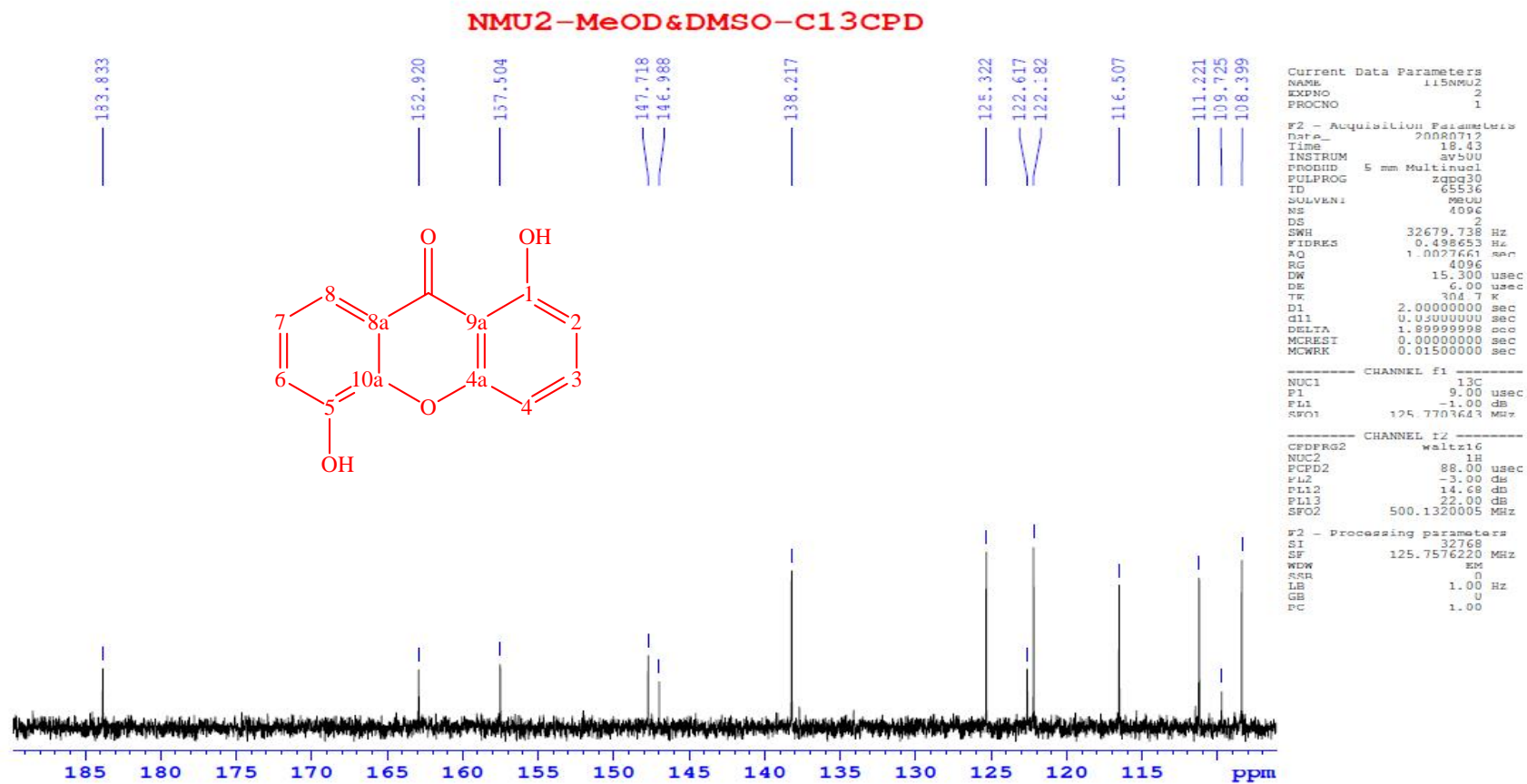
Ph 1 c 4.4 *Ph* ¹H-NMR (MeOD & DMSO-d₆, 500 MHz) *c a h p c h t N₁* (1,5-dihydroxyxanthon)



Ph 1 c 4.4a *Ph* $^1\text{H-NMR}$ (MeOD & DMSO- d_6 , 500 MHz) gần r ng c a h p ch t N_1
(1,5-dihydroxyxanthon)

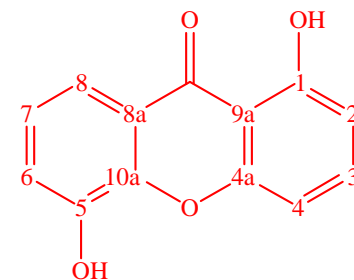


Ph 1 c 4.5 Ph $^{13}\text{C-NMR}$ (MeOD & DMSO- d_6 , 125 MHz) *c a h p c h t N_1* (1,5-dihydroxyxanthone)

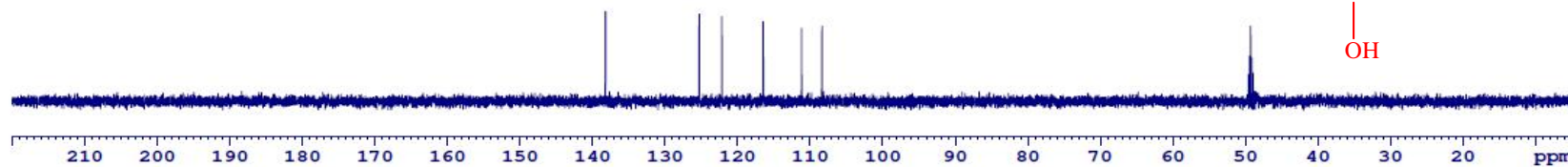


Ph 1 c 4.5a Ph ¹³C-NMR (MeOD & DMSO-d₆, 125 MHz) gần r ng c a h p ch t N₁
(1,5-dihydroxyxanthon)

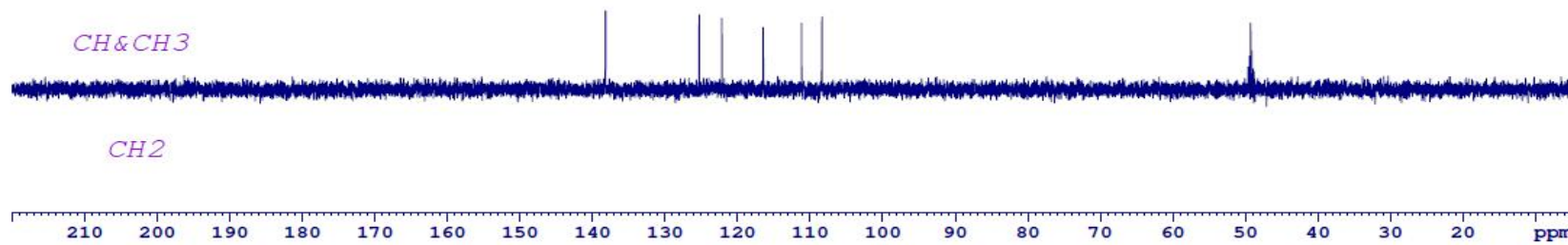
NMU2-MeOD&DMSO-C13CPD&DEPT



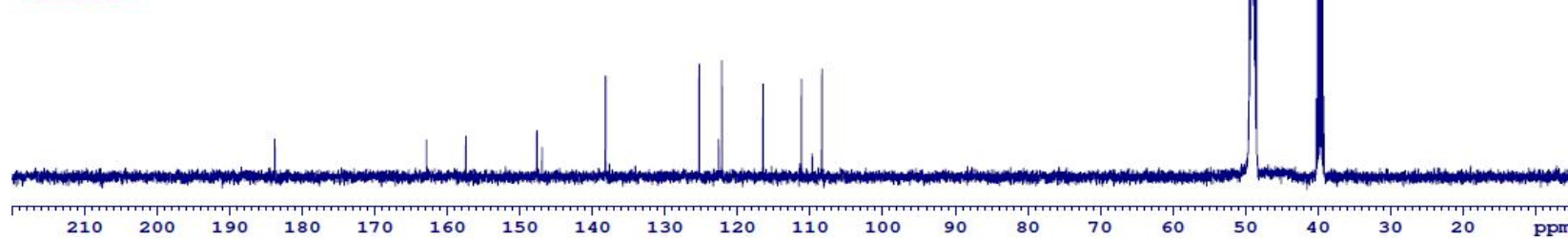
DEPT90



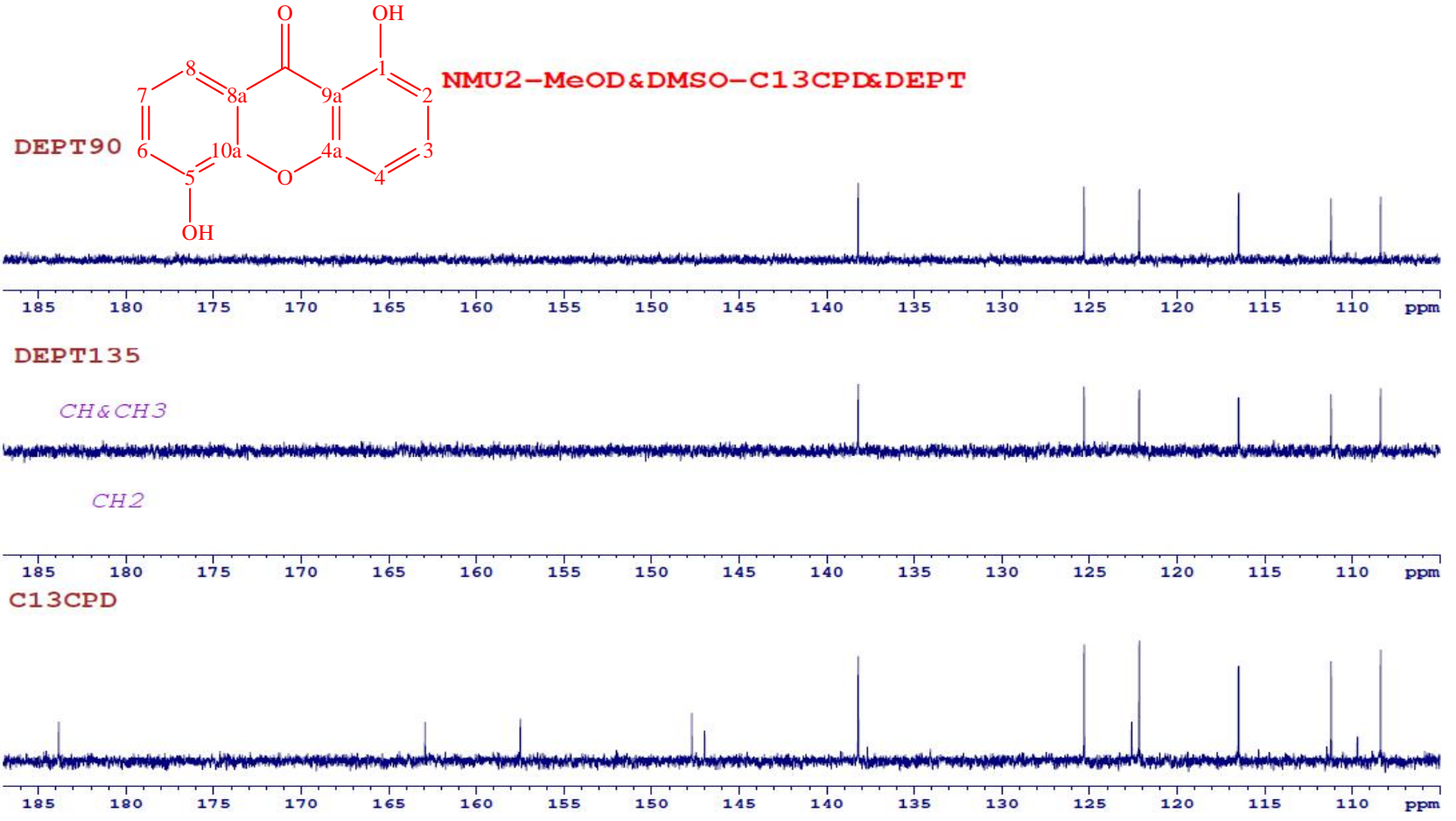
DEPT135



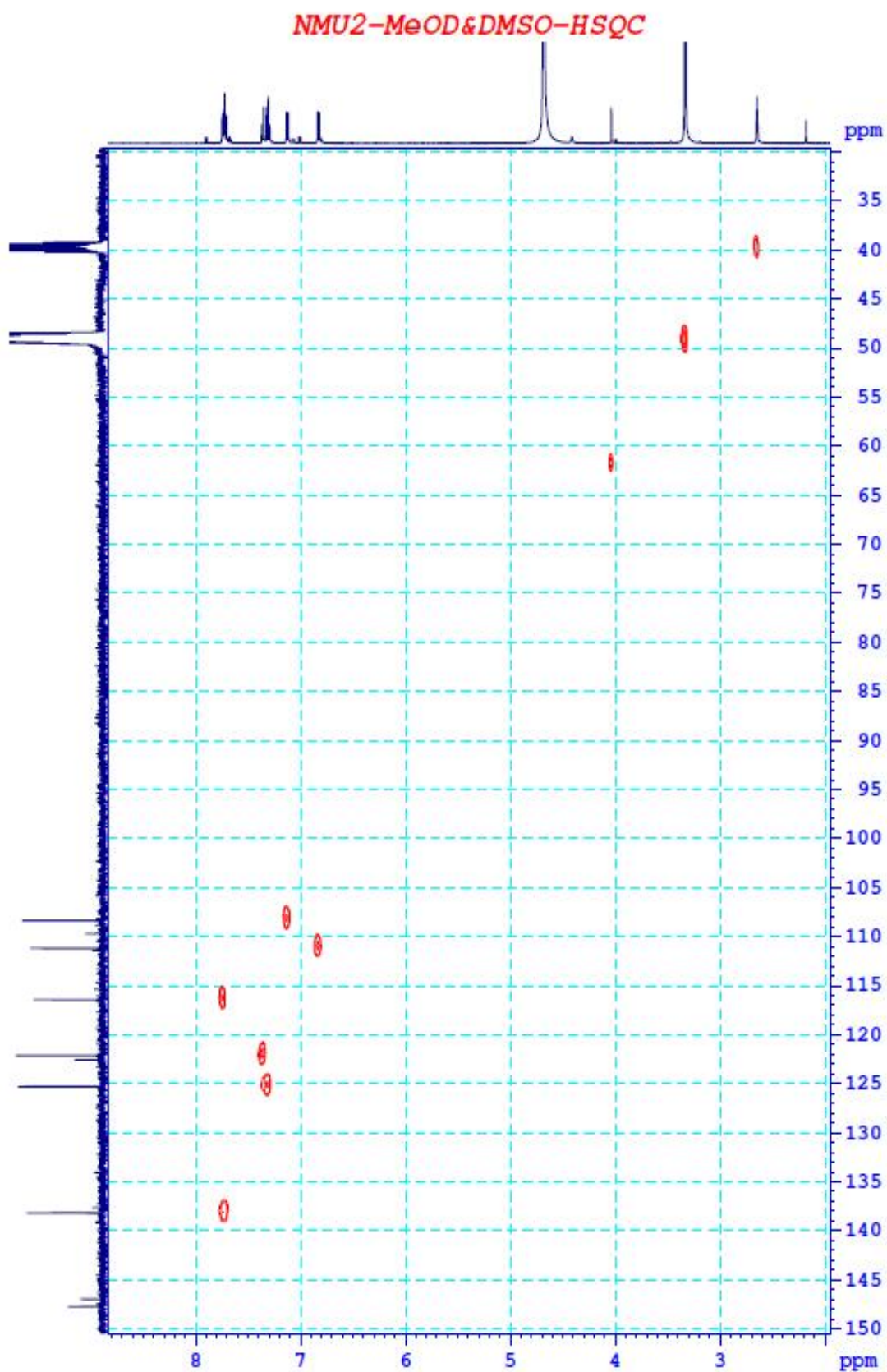
C13CPD



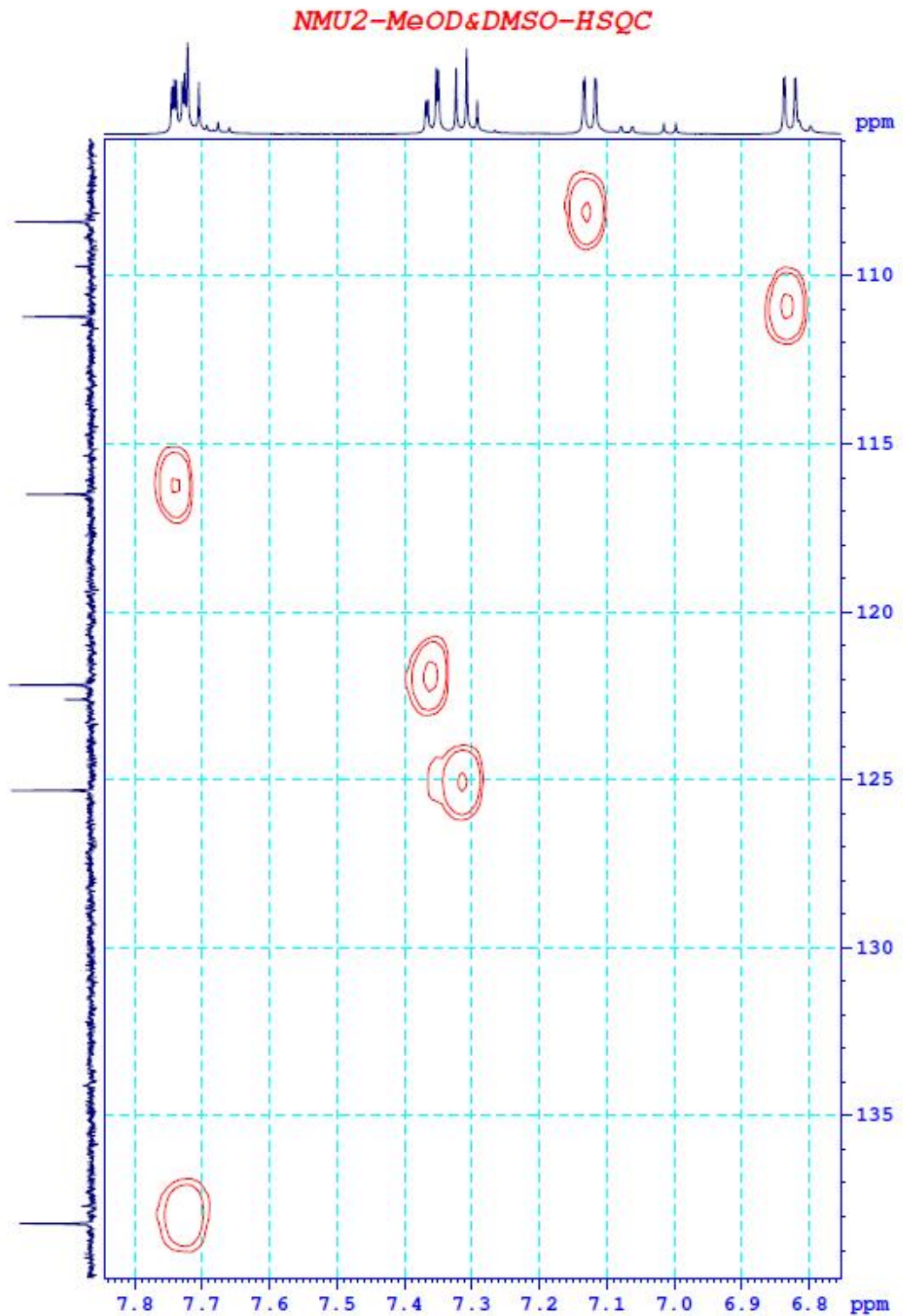
Ph 1 c 4.6 Ph DEPT (MeOD & DMSO-*d*₆) c a h p ch t N₁ (1,5-dihydroxyxanthon)



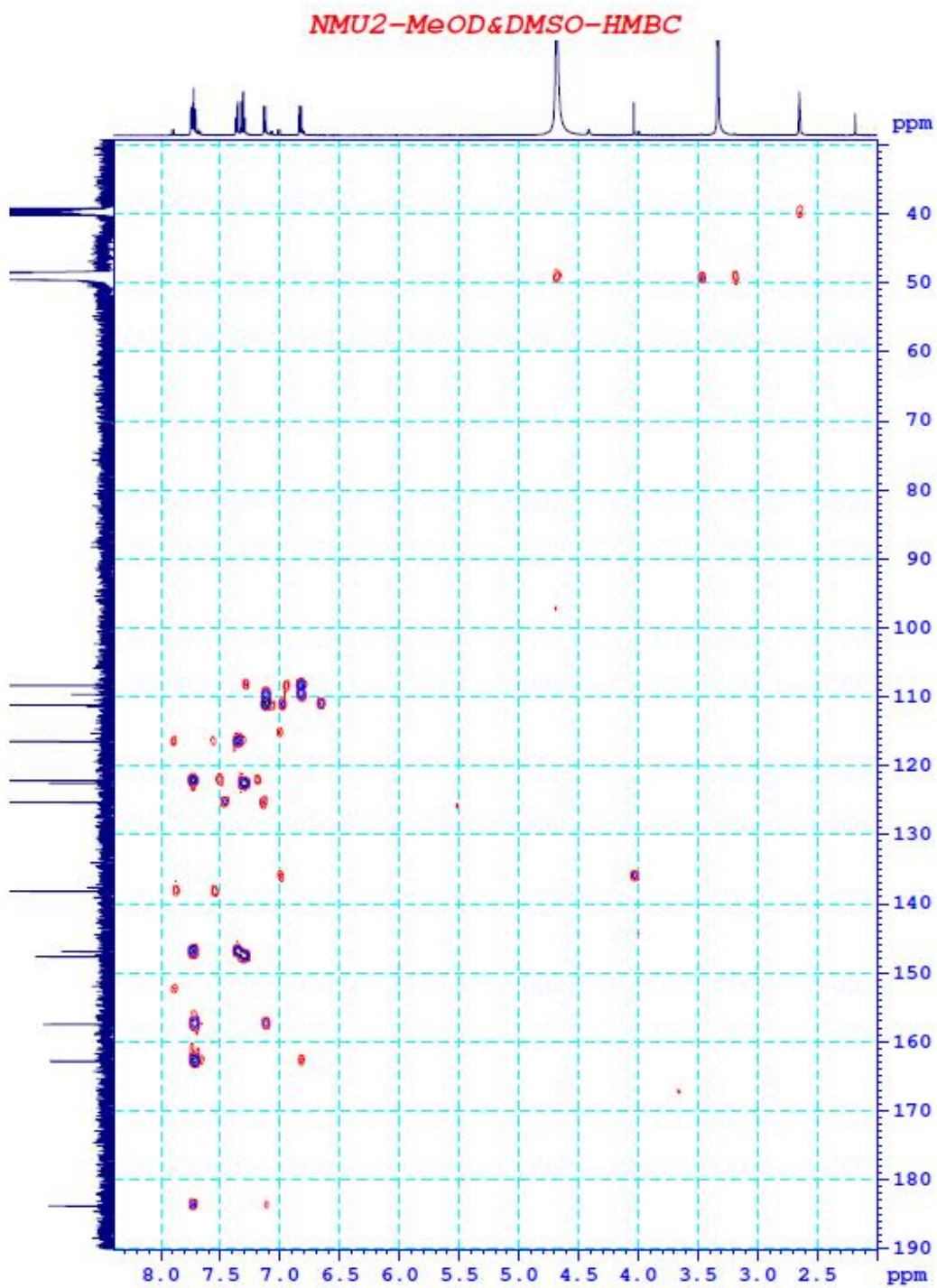
Ph 1 c 4.6a *Ph* DEPT (MeOD & DMSO- d_6) gi ăn r ng c a h p ch t N_1 (1,5-dihydroxyxanthon)



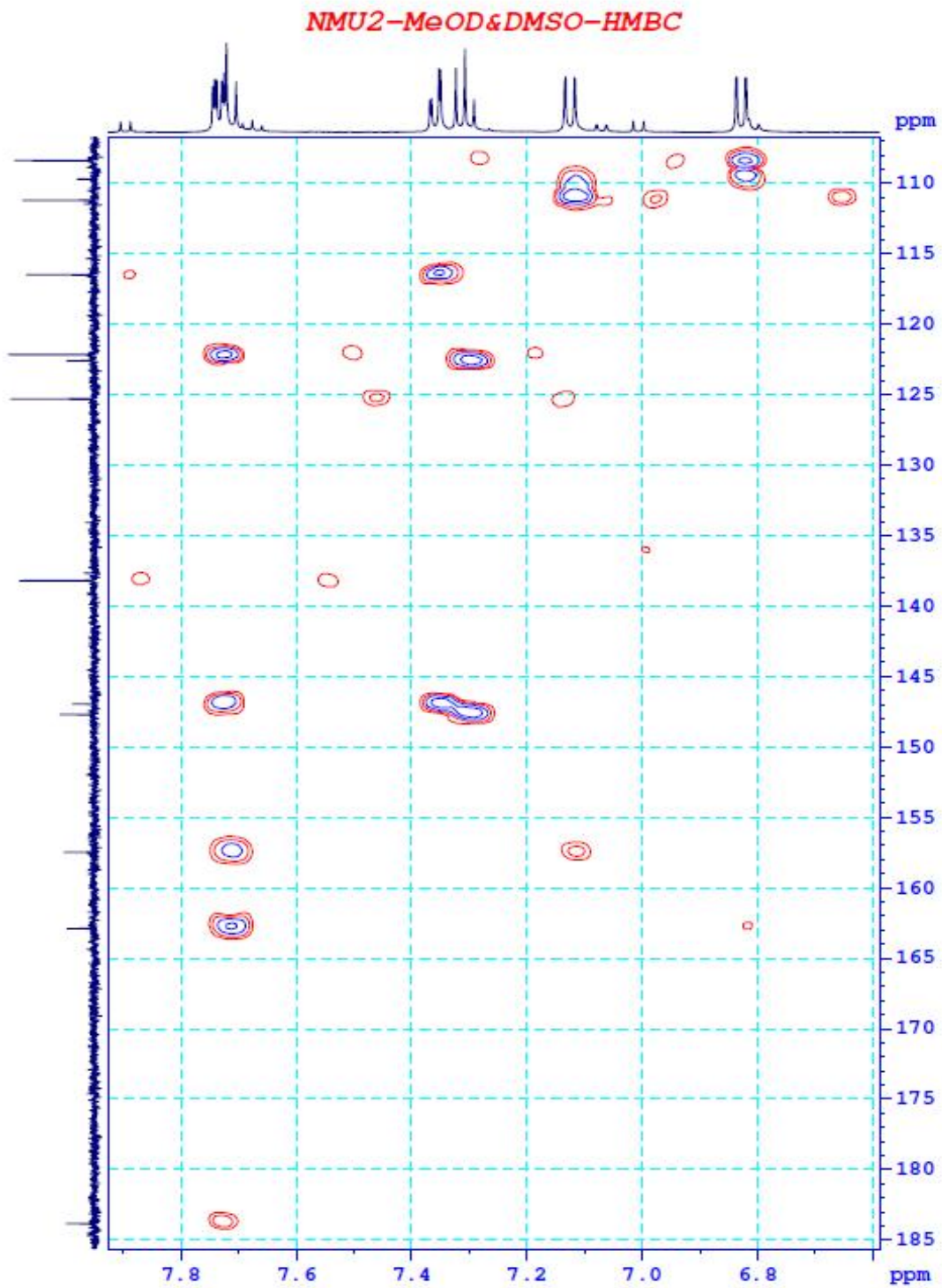
Ph 1 c 4.7 *Ph HSQC (MeOD & DMSO- d_6) c a h p ch t N₁ (1,5-dihydroxyxanthon)*



Ph 1 c 4.7a Ph HSQC (MeOD & DMSO- d_6) giữa r ng c a h p ch t N_1 (1,5-dihydroxyxanthon)



Ph 1 c 4.8 Ph HMBC (MeOD & DMSO- d_6) c a h p c h t N_1 (1,5-dihydroxyxanthon)



Ph 1 c 4.8a *Ph* HMBC (MeOD & DMSO- d_6) giữa r ng c a h p ch t N_1 (1,5-dihydroxyxanthon)

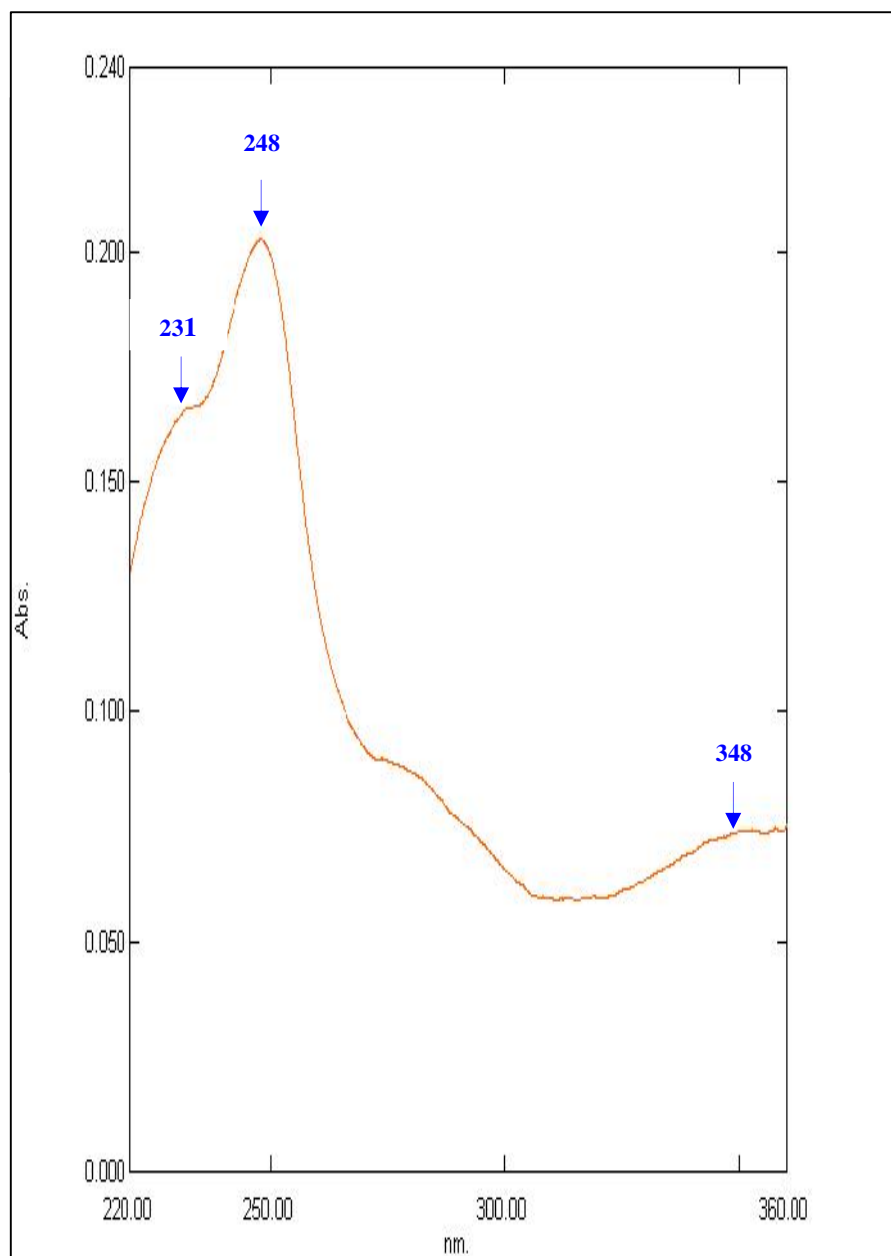
Ph 1 c 4.9 Bảng so sánh dữ liệu phổ $^1\text{H-NMR}$, $^{13}\text{C-NMR}$ của hợp chất N_1 và 1,5-dihydroxyxanthon

C	H p ch t N_1		1,5-dihydroxyxanthon [32]	
	c (ppm) ^a	$H m$ (J, Hz) ^b	c (ppm) ^c	$H m$ (J, Hz) ^d
1	162,9	-	161,0	
1-OH				12,64 <i>s</i>
2	111,2	6,82 <i>dd</i> (8,0; 1,0)	110,0	6,83 <i>br d</i> (8,0)
3	138,2	7,72 <i>t</i> (8,0)	137,4	7,75 <i>t-like dd</i> (8,0)
4	108,4	7,12 <i>dd</i> (7,5; 0,5)	107,3	7,11 <i>br d</i> (8,0)
4°	157,5	-	155,6	
5	147,7	-	146,4	
5-OH				10,57 <i>br s</i>
6	122,2	7,36 <i>dd</i> (7,5; 2)	120,9	7,37 <i>dd</i> (8,0; 2,0)
7	125,3	7,30 <i>t</i> (7,5)	124,3	7,30, <i>t-like dd</i> , J = 8
8	116,5	7,74 <i>dd</i> (8,0; 1,5)	114,6	7,61 <i>dd</i> (8,0; 2,0)
8°	122,6	-	121,0	
9	183,8	-	182,1	
9°	109,7	-	108,1	
10°	147,0	-	145,2	

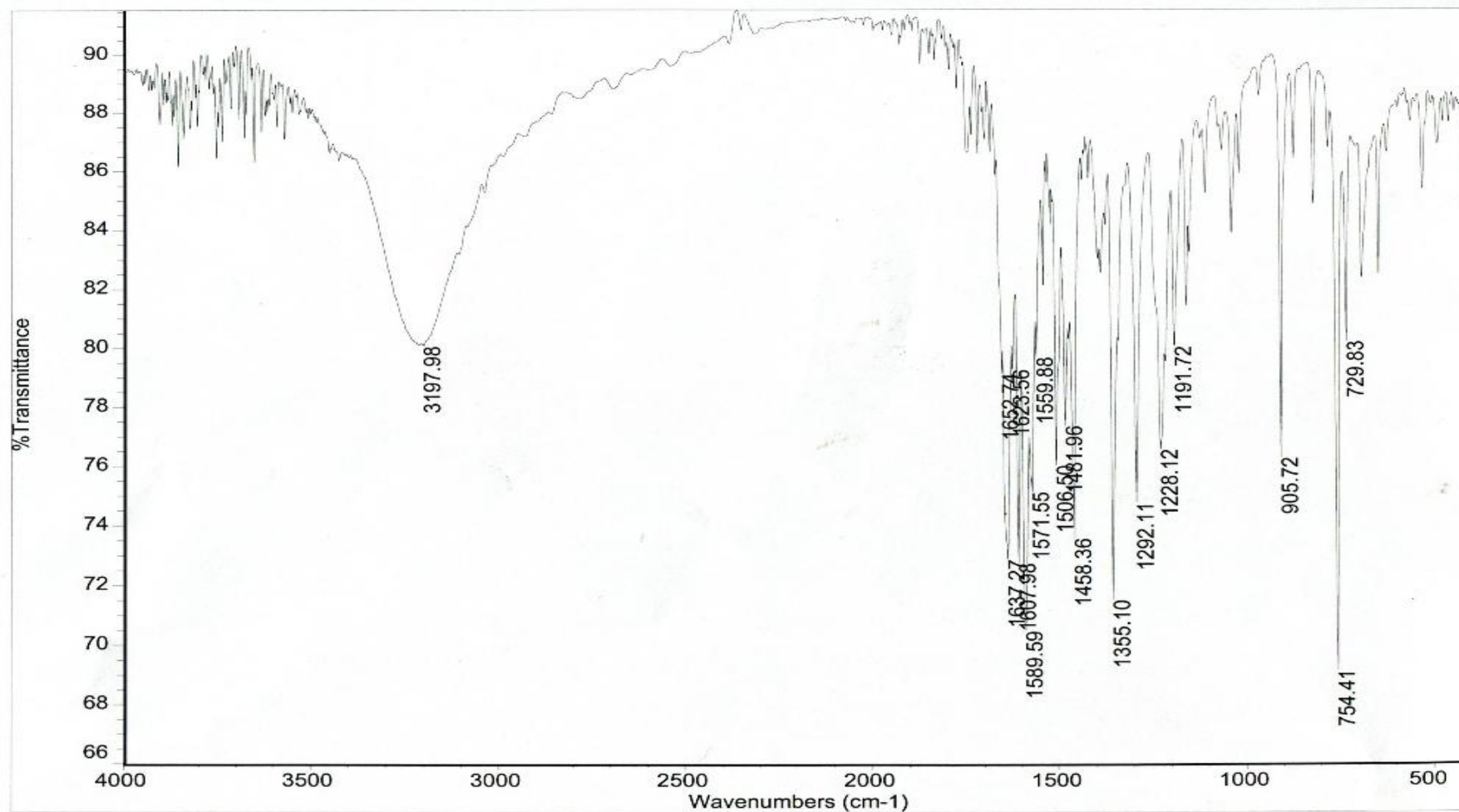
^a: đo trong DMSO- d_6 -CD₃OD 125 MHz ^b: đo trong DMSO- d_6 -CD₃OD 500 MHz

^c: đo trong DMSO- d_6 67,5 MHz ^d: đo trong DMSO- d_6 - 270 MHz

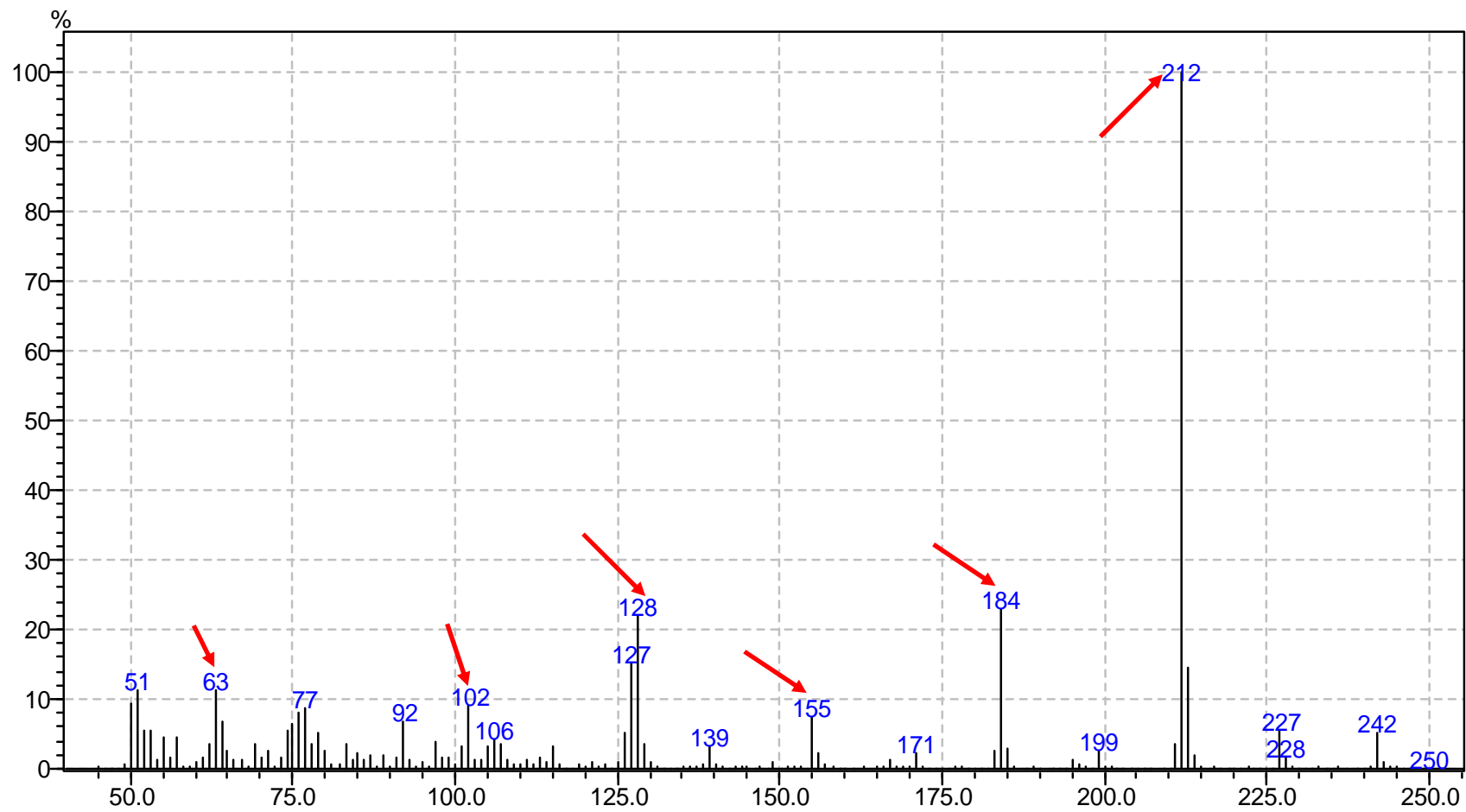
PH L C 5
B D LI U PH CHU N
N₂ (4-HYDROXYXANTHON)



Ph 1 c 5.1 Ph UV-Vis (MeOH) c a h p ch t N₂ (4-hydroxyxanthone)

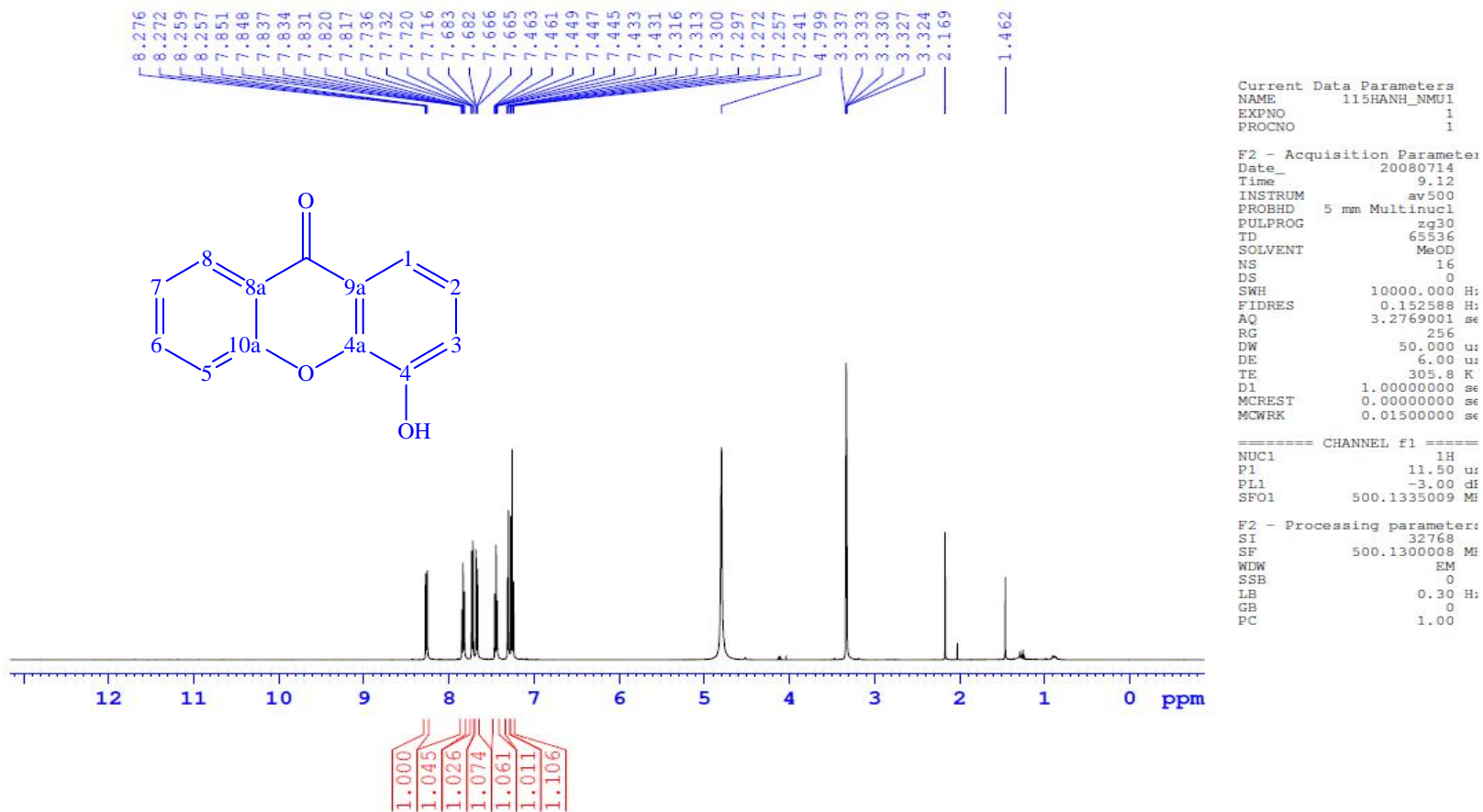


Ph 1 c 5.2 Ph IR (a KBr) c a h p ch t N₂ (4-hydroxyxanthone)

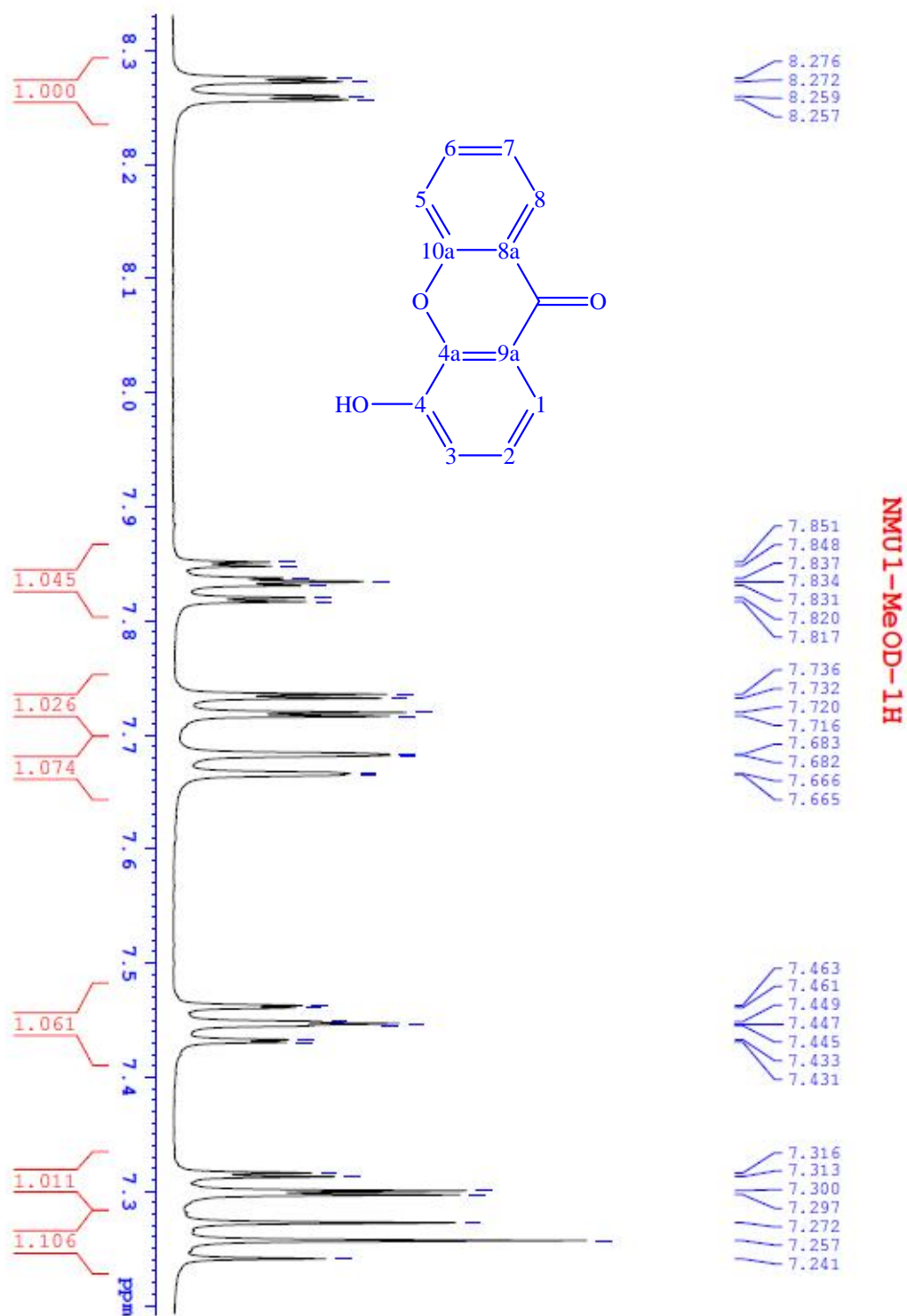


Ph 1 c 5.3 Ph MS (EI-MS) c a h p c h t N₂ (4-hydroxyxanthon)

NMU1-MeOD-1H

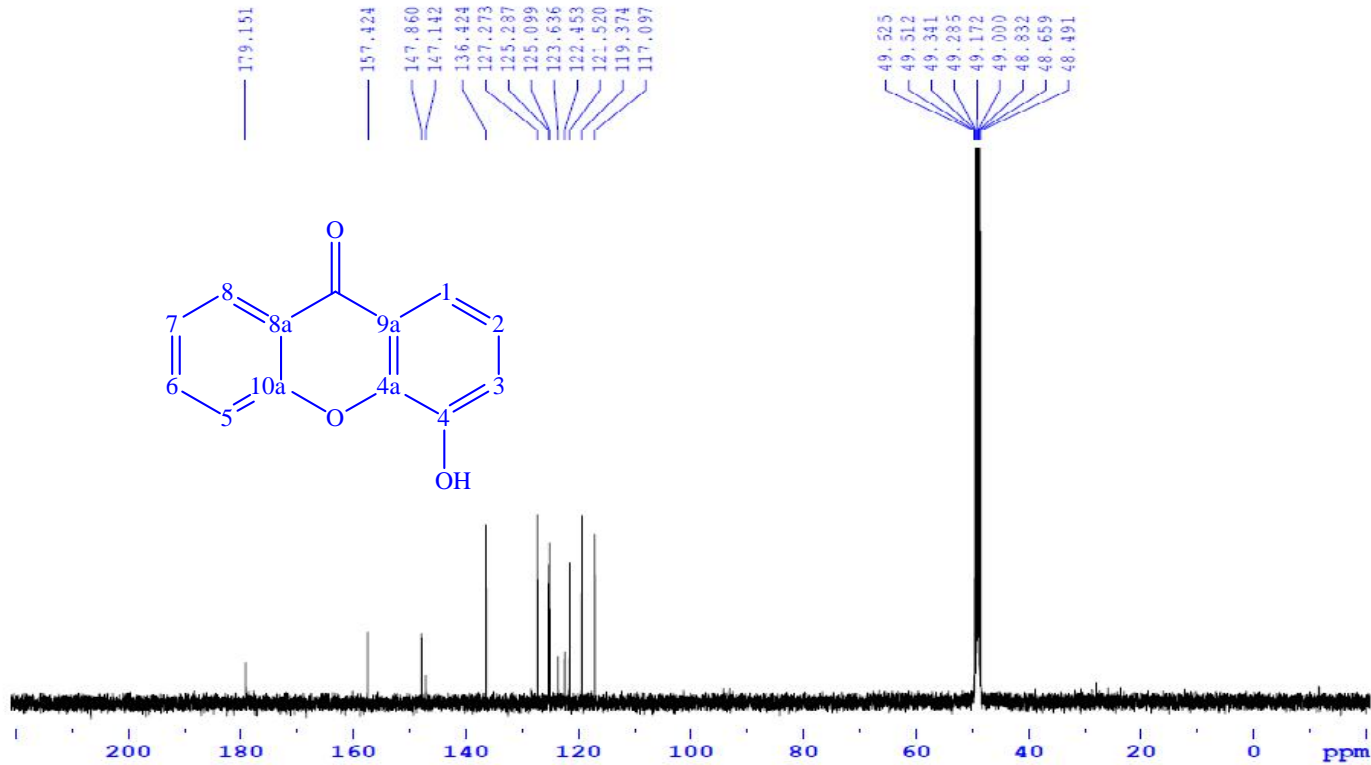


Ph 1 c 5.4 Ph ¹H-NMR (MeOD, 500 MHz) c a h p c h t N₂ (4-hydroxyxanthone)



Ph 1 c 5.4a Ph ¹H-NMR (MeOD, 500 MHz) giän r ng c a h p ch t N₂ (4-hydroxyxanthon)

NM1-MeOD-C13CPD



```

Current Data Parameters
NAME      115HANH_NM1
EXPNO    2
PROCNO   1

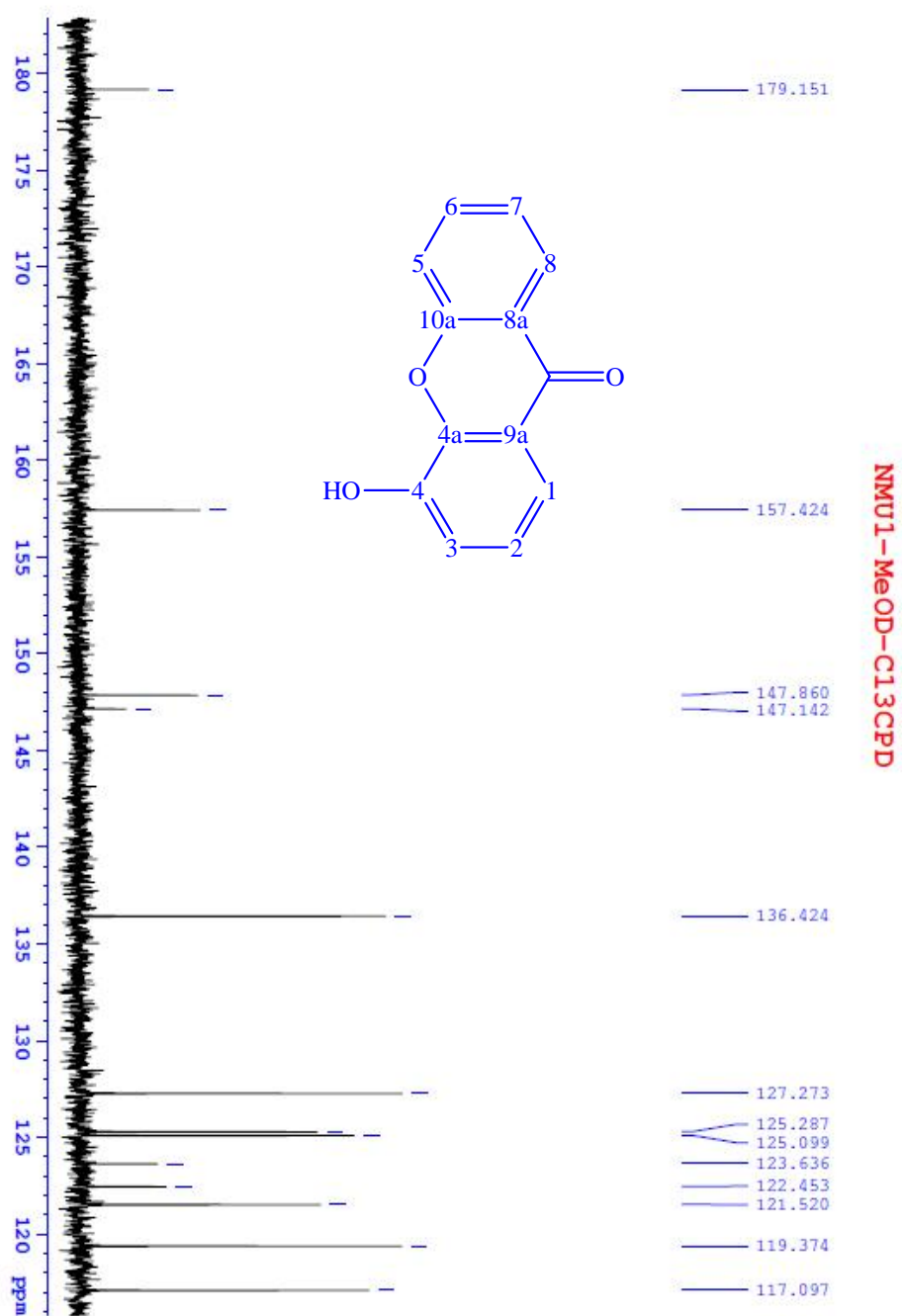
F2 - Acquisition Parameters
Date_    20080714
Time     8.47
INSTRUM  av500
PROBHD   5 mm Multinucl
PULPROG  zgpg30
TD       65536
SOLVENT  dmf-d7
NS       1024
DS       2
SWH      32679.138 Hz
FIDRES   0.498453 Hz
AQ       1.0027661 sec
RG       8192
DW       15.300 usec
DE       6.00 usec
TE       305.2 K
D1       2.0000000 sec
d11      0.0300000 sec
DELTA    1.899999998 sec
MCRST    0.0000000 sec
MCWRK    0.0100000 sec

----- CHANNEL f1 -----
NUC1      13C
P1        9.00 usec
PL1       -1.00 dB
SFO1     125.7703643 MHz

----- CHANNEL f2 -----
CEPRG2   waltz16
NUC2      1H
PCPD2     88.00 usec
PL2       -3.00 dB
PL12      14.60 dB
PL13      22.00 dB
SFO2     500.1320005 MHz

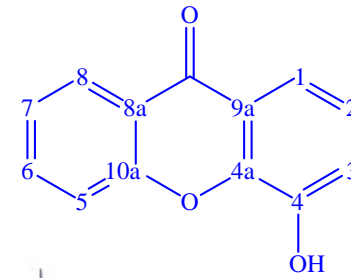
F2 - Processing parameters
SI        32768
SF        125.7576130 MHz
WDW       RM
SSB       0
LB        1.00 Hz
GB        0
PC        1.40
    
```

Ph 1 c 5.5 Ph ¹³C-NMR (MeOD, 125 MHz) c a h p c h t N₂ (4-hydroxyxanthone)

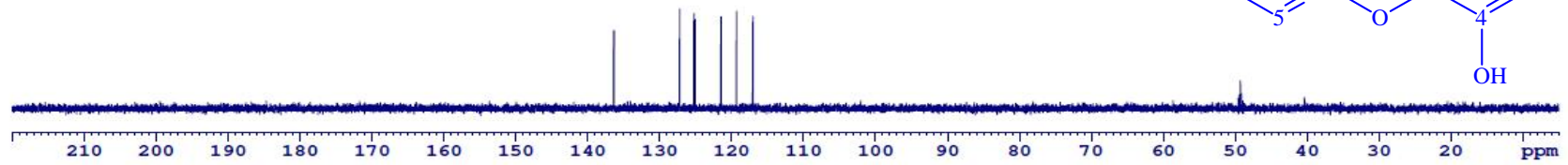


Ph 1 c 5.5a *Ph* $^{13}\text{C-NMR}$ (MeOD, 125 MHz) gi \ddot{a} n r ng c a h p ch t N_2
(4-hydroxyxanthone)

NMU1-MeOD-C13CPD&DEPT

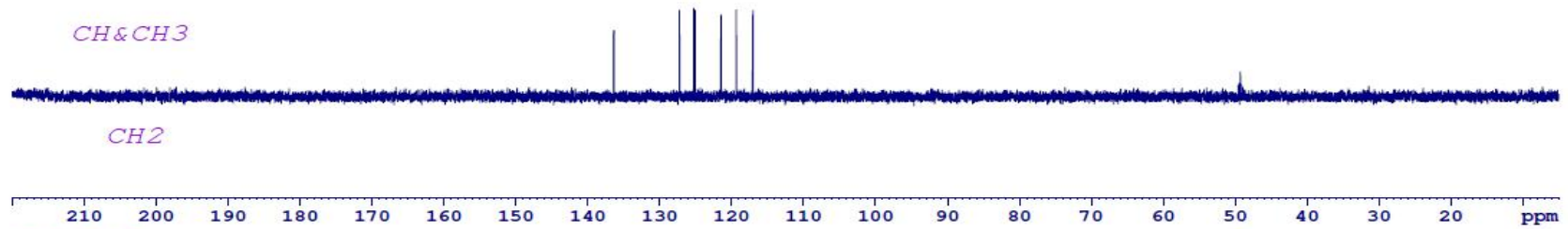


DEPT90



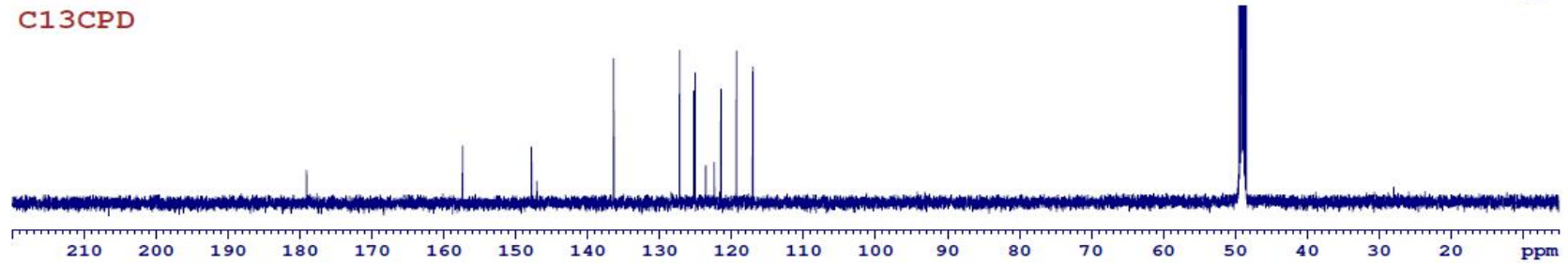
DEPT135

CH&CH3

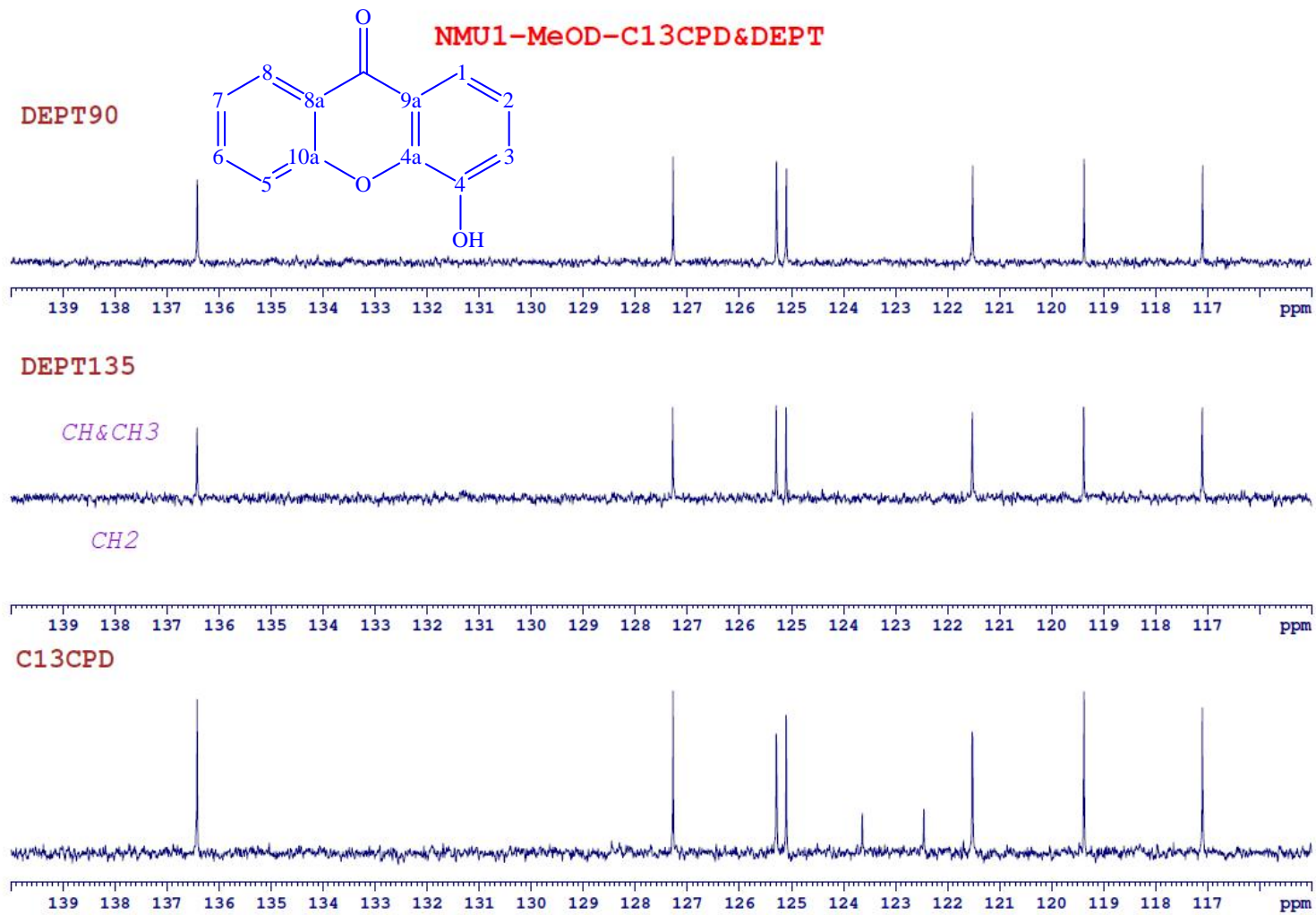


CH2

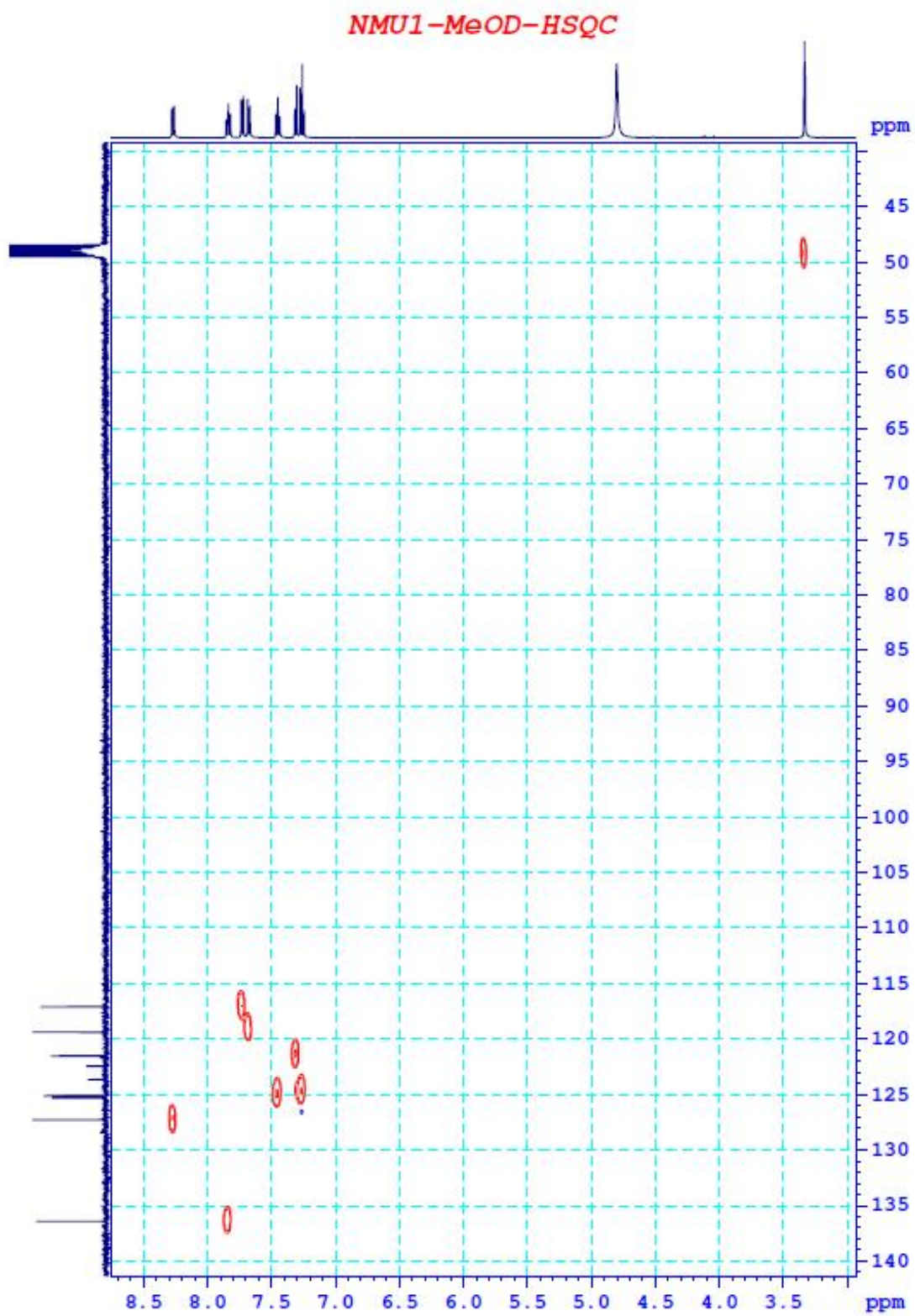
C13CPD



Ph 1 c 5.6 Ph DEPT (MeOD) c a h p ch t N₂(4-hydroxyxanthone)

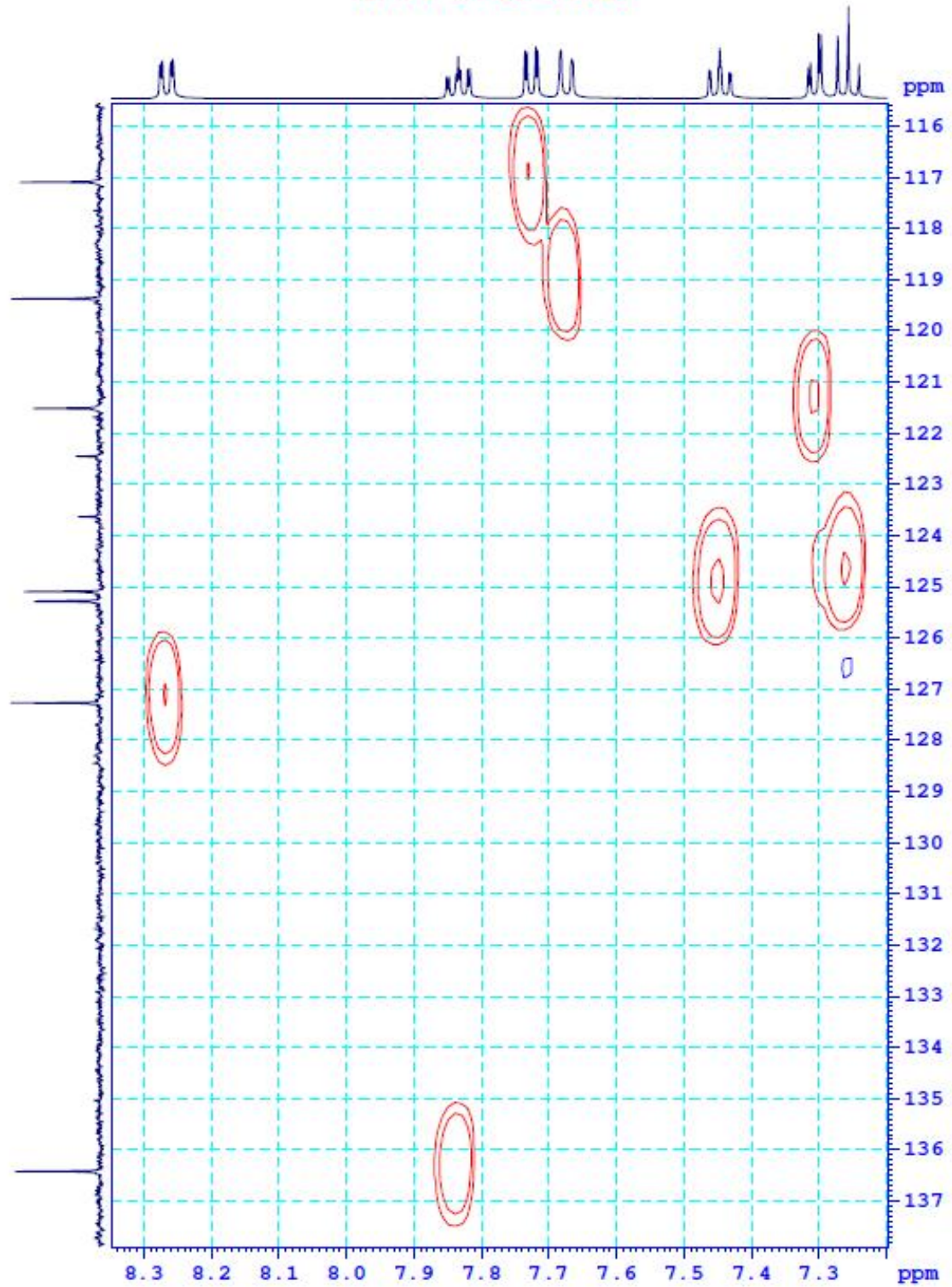


Ph 1 c 5.6a *Ph* DEPT (MeOD) giã n r ng c a h p ch t N₂ (4-hydroxyxanthon)

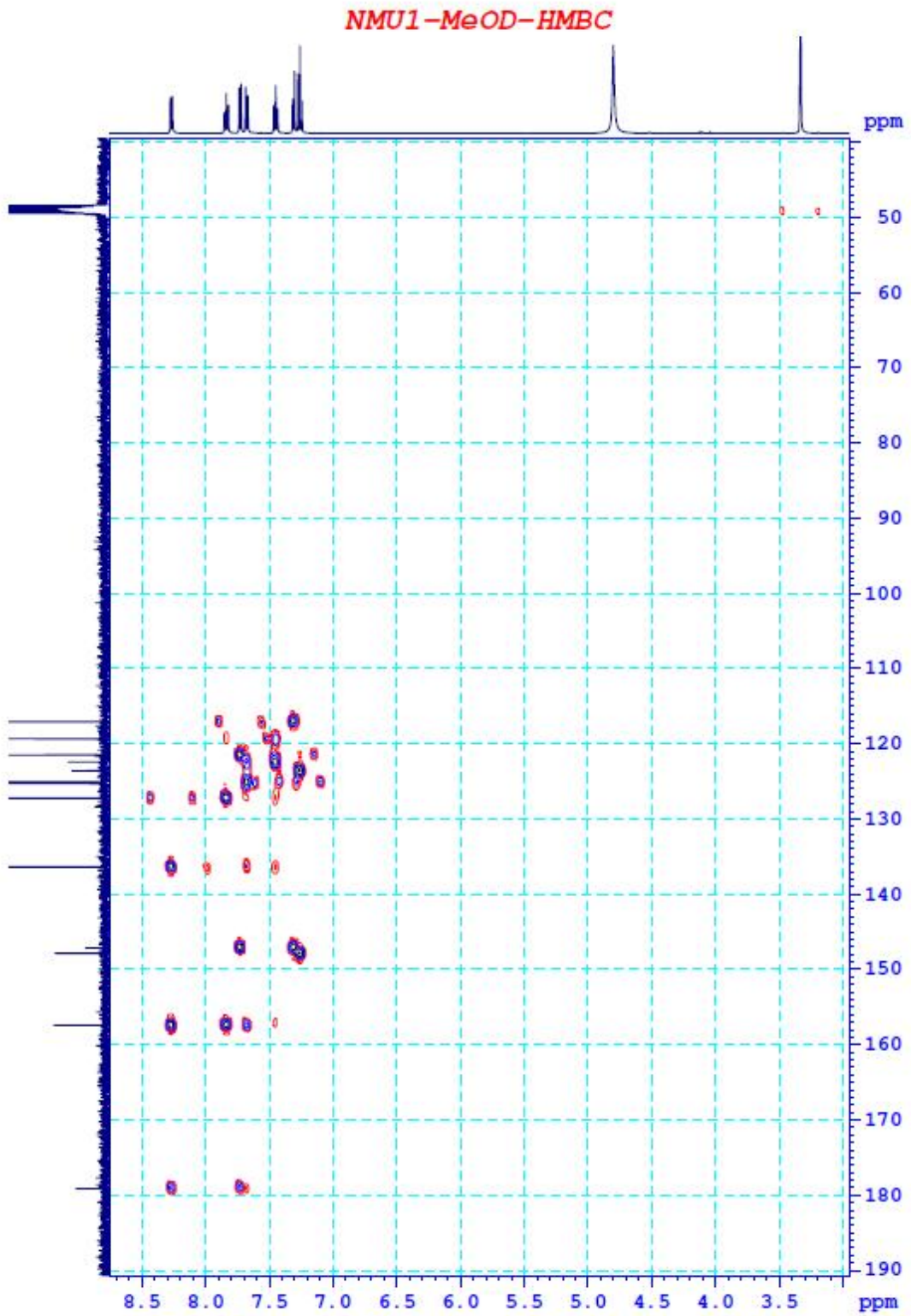


Ph 1 c 5.7 Ph HSQC (MeOD) c a h p c h t N₂(4-hydroxyxanthon)

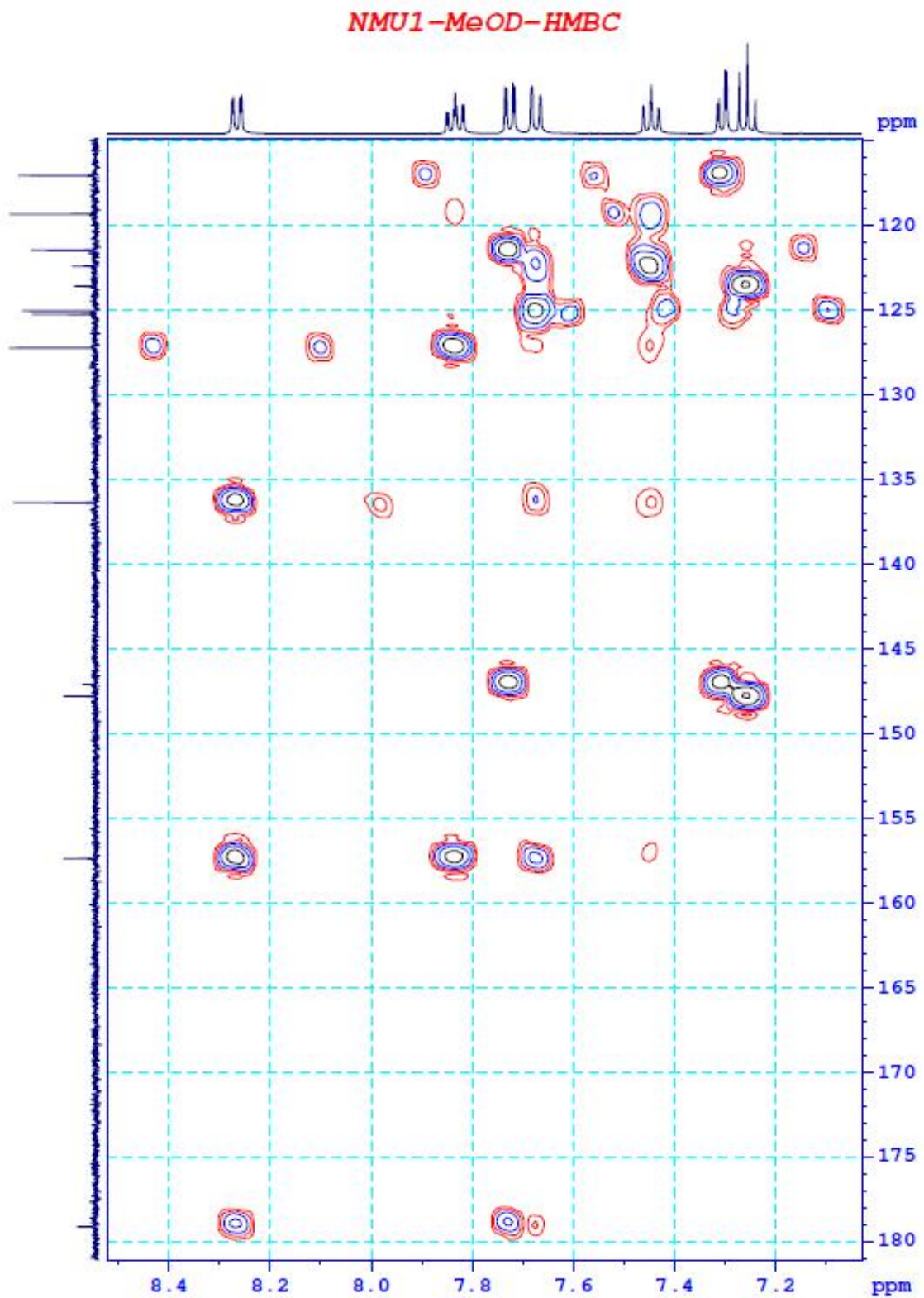
NMU1-MeOD-HSQC



Ph 1 c 5.7a Ph HSQC (MeOD) gần r ng c a h p ch t N₂ (4-hydroxyxanthon)



Ph 1 c 5.8 Ph HMBC (MeOD) c a h p ch t N₂ (4-hydroxyxanthone)



Ph 1 c 5.8a Ph HMBC (MeOD) gi ăn r ng c a h p ch t N₂ (4-hydroxyxanthon)

Ph 1 c 5.9 Bảng so sánh dữ liệu phổ $^1\text{H-NMR}$, $^{13}\text{C-NMR}$ của hợp chất N_2 và 4-hydroxyxanthon

C	H p ch t N ₂		4-hydroxyxanthon [106]	
	<i>c</i> (ppm) ^a	<i>H m</i> (J, Hz) ^b	<i>c</i> (ppm) ^c	<i>H m</i> (J, Hz) ^d
1	117,1	7,73 <i>dd</i> (8,0; 2,0)	115,5	7,61 <i>dd</i> (7,8; 1,8)
2	125,1	7,25 <i>t</i> (8,0)	124,5	7,26 <i>t</i> (7,8)
3	121,5	7,31 <i>dd</i> (8,0; 1,5)	120,5	7,34 <i>dd</i> (7,8; 1,8)
4	147,9	—	146,8	
4-OH				10,51 <i>s</i>
4°	147,1	—	145,4	—
5	119,4	7,68 <i>dd</i> (8,5; 0,5)	118,1	7,73 <i>dd</i> (8,0; 0,8)
6	136,4	7,83 <i>dt</i> (8,5; 1,5)	135,1	7,88 <i>ddd</i> (8,0; 7,6; 1,6)
7	125,3	7,44 <i>dt</i> (7,5; 1,0)	124,0	7,48 <i>ddd</i> (7,8; 7,6; 0,6)
8	127,3	8,26 <i>dd</i> (8,0; 2,0)	125,9	8,19 <i>dd</i> (7,8; 1,6)
8°	123,6	—	121,1	—
9	179,2	—	179,3	—
9°	122,5	—	121,7	—
10°	157,4	—	155,7	—

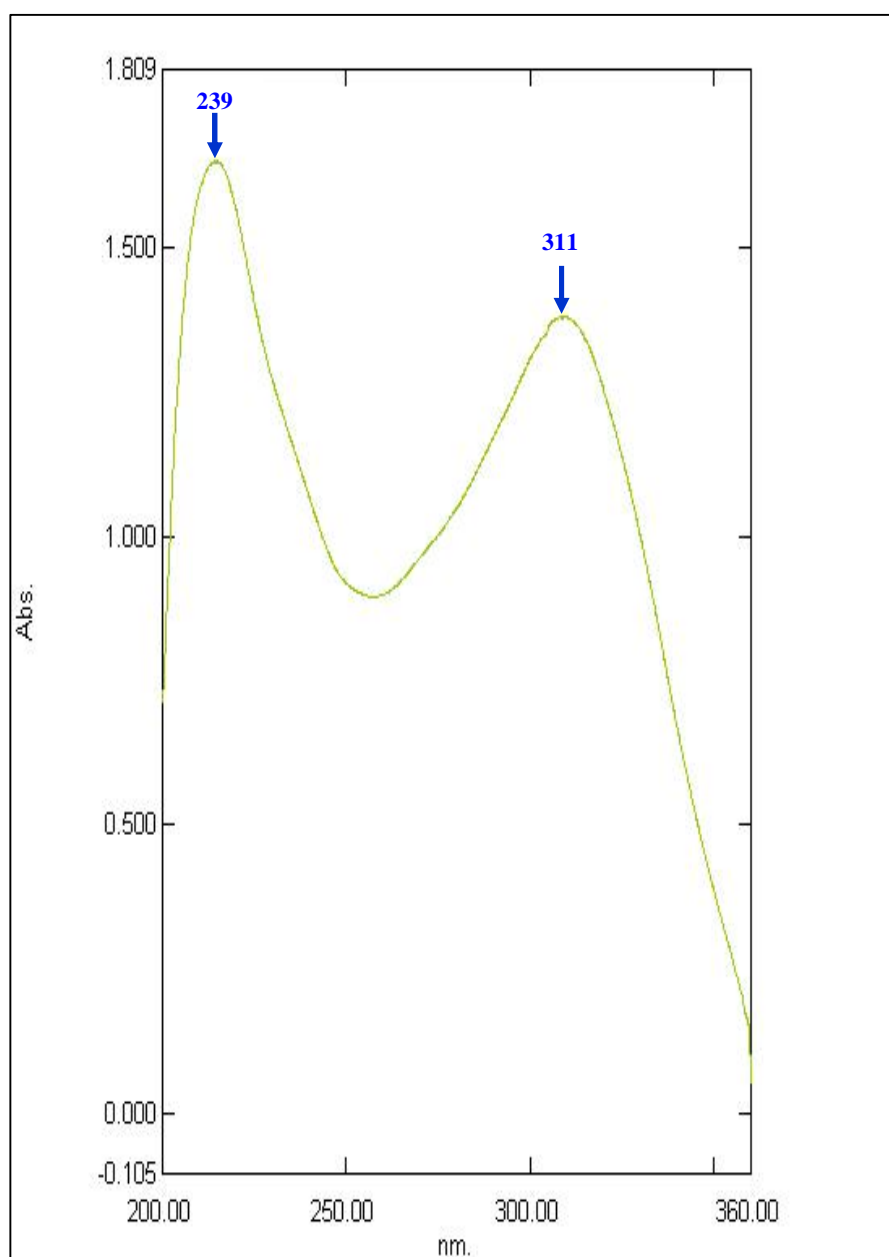
^a: đo trong CD₃OD 125 MHz

^b: đo trong CD₃OD 500 MHz

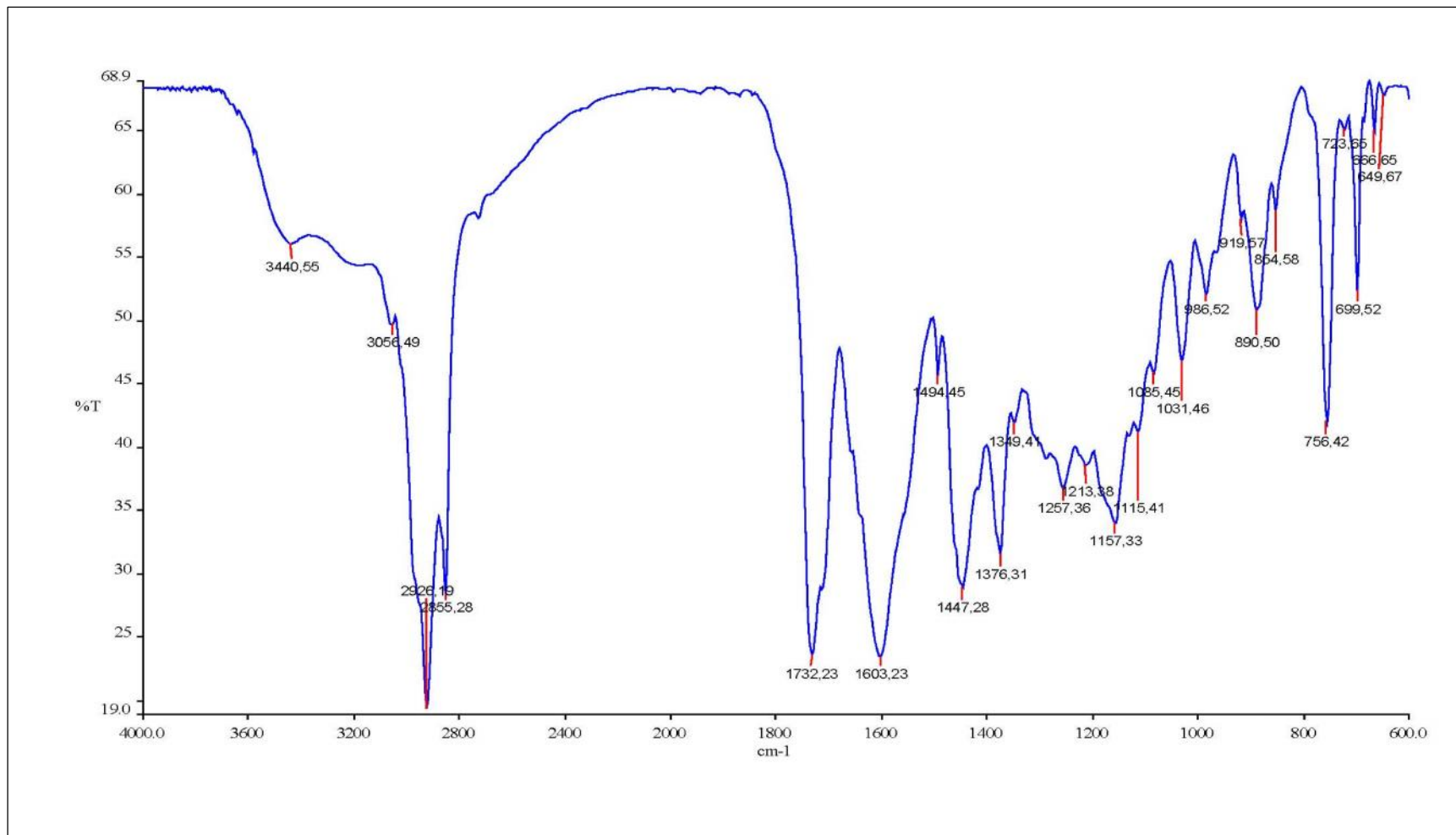
^c: đo trong DMSO-*d*₆ 67,5 MHz

^d: đo trong DMSO-*d*₆ 270 MHz

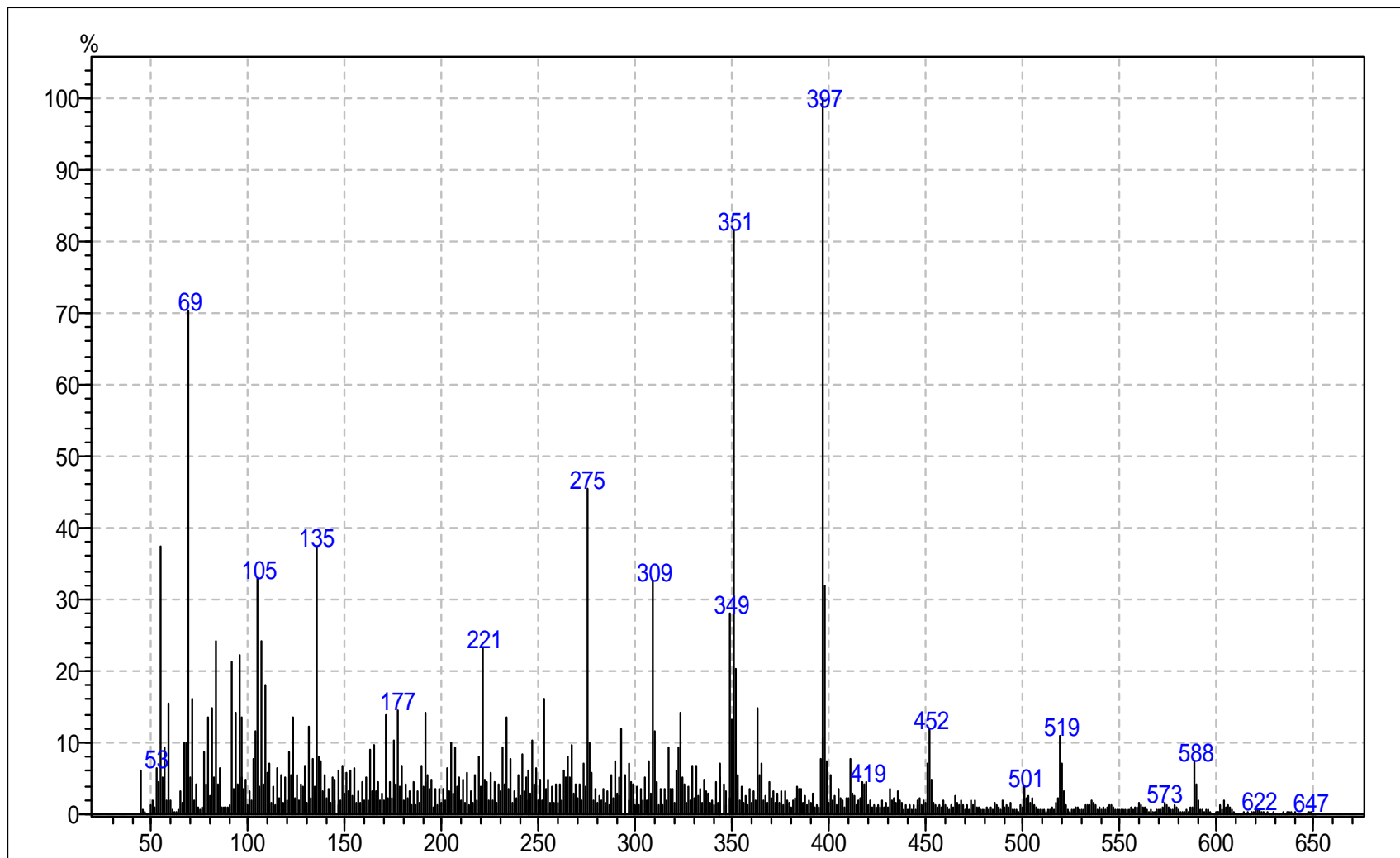
PH L C 6
B D LI UPH CHU N N₃



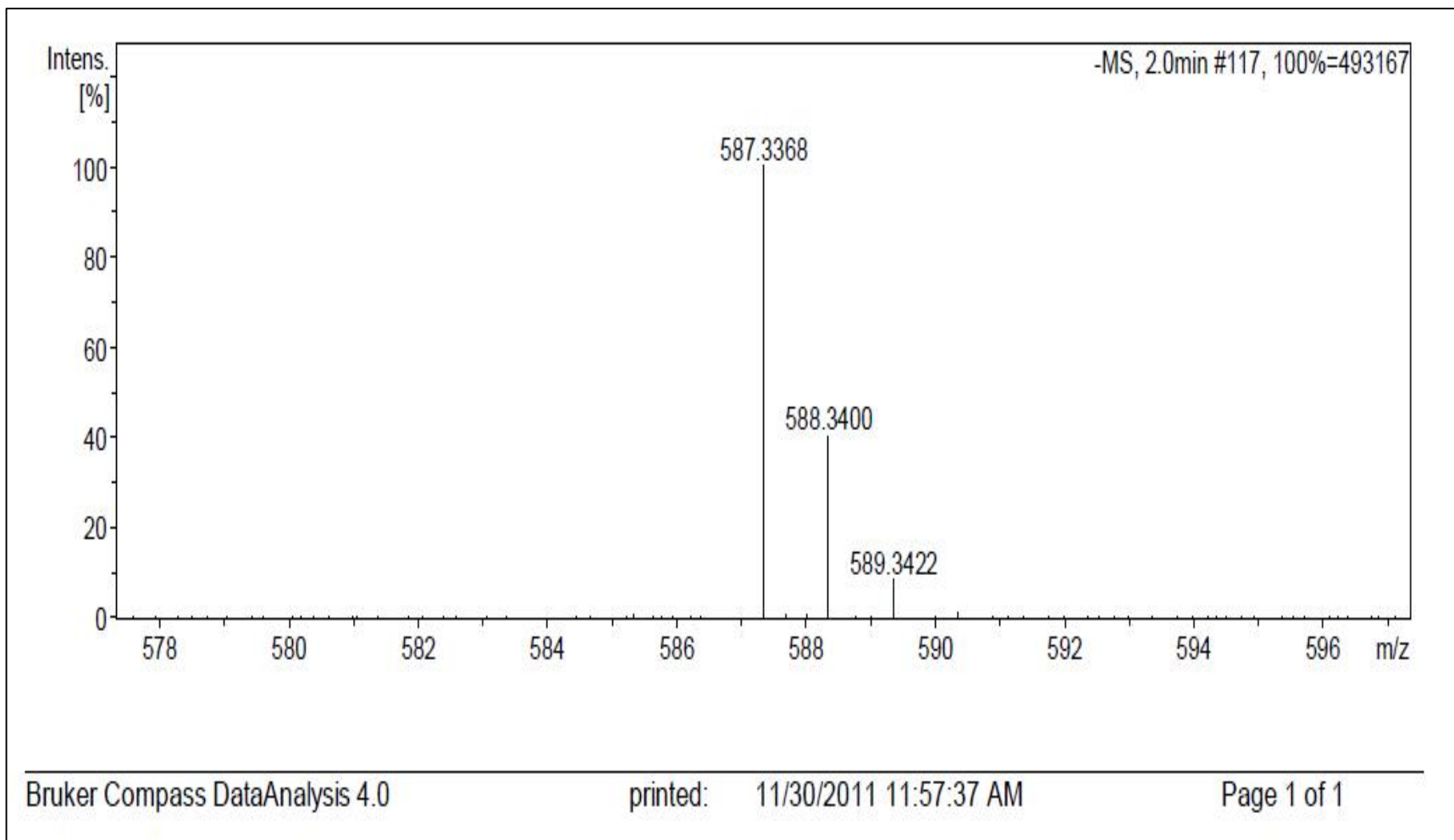
Ph 1 c 6.1 Ph UV-Vis (MeOH) c a h p ch t N₃



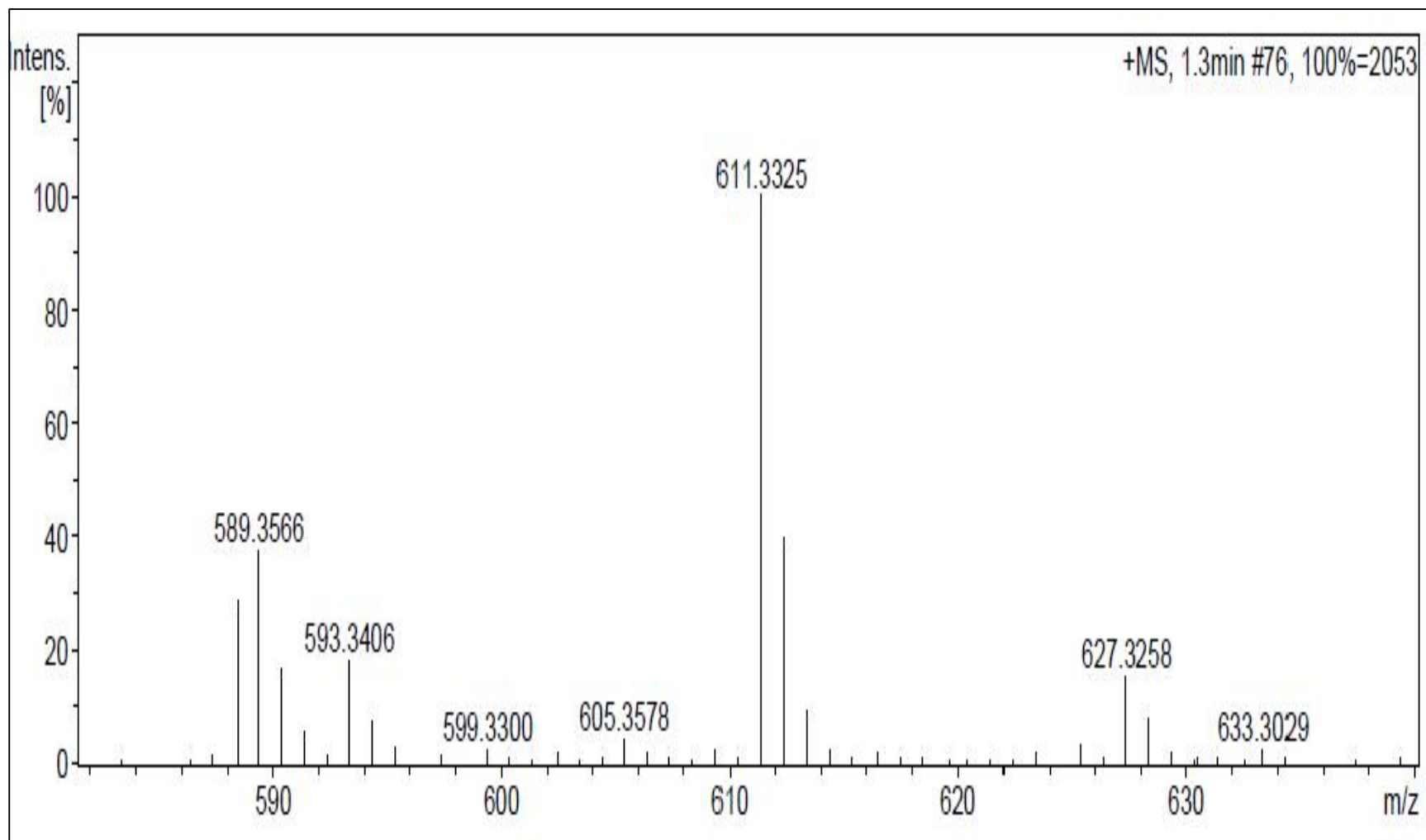
Ph 1 c 6.2 Ph IR (a KBr) c a h p c h t N₃



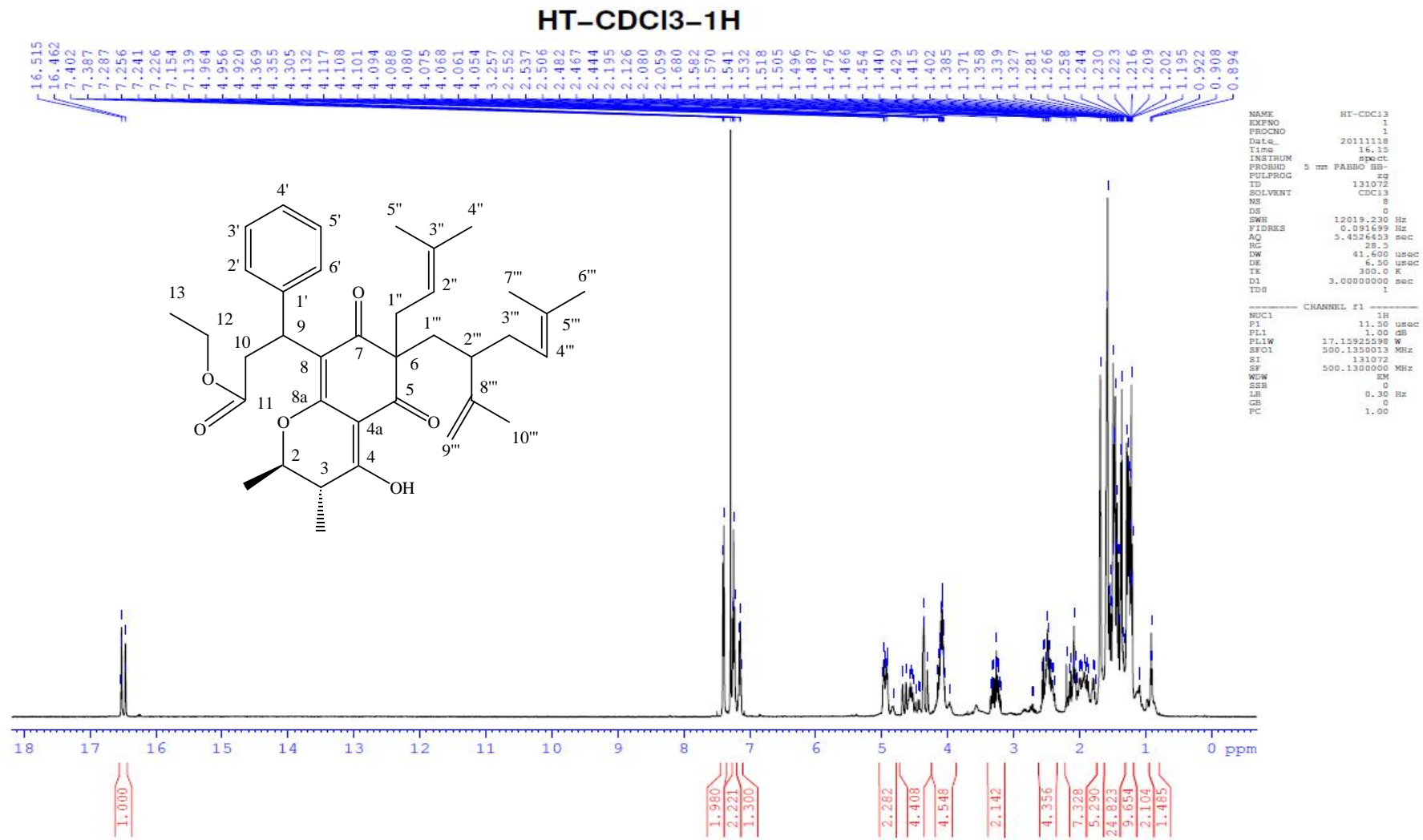
Ph 1 c 6.3 Ph MS (EI-MS) c a h p c h t N₃



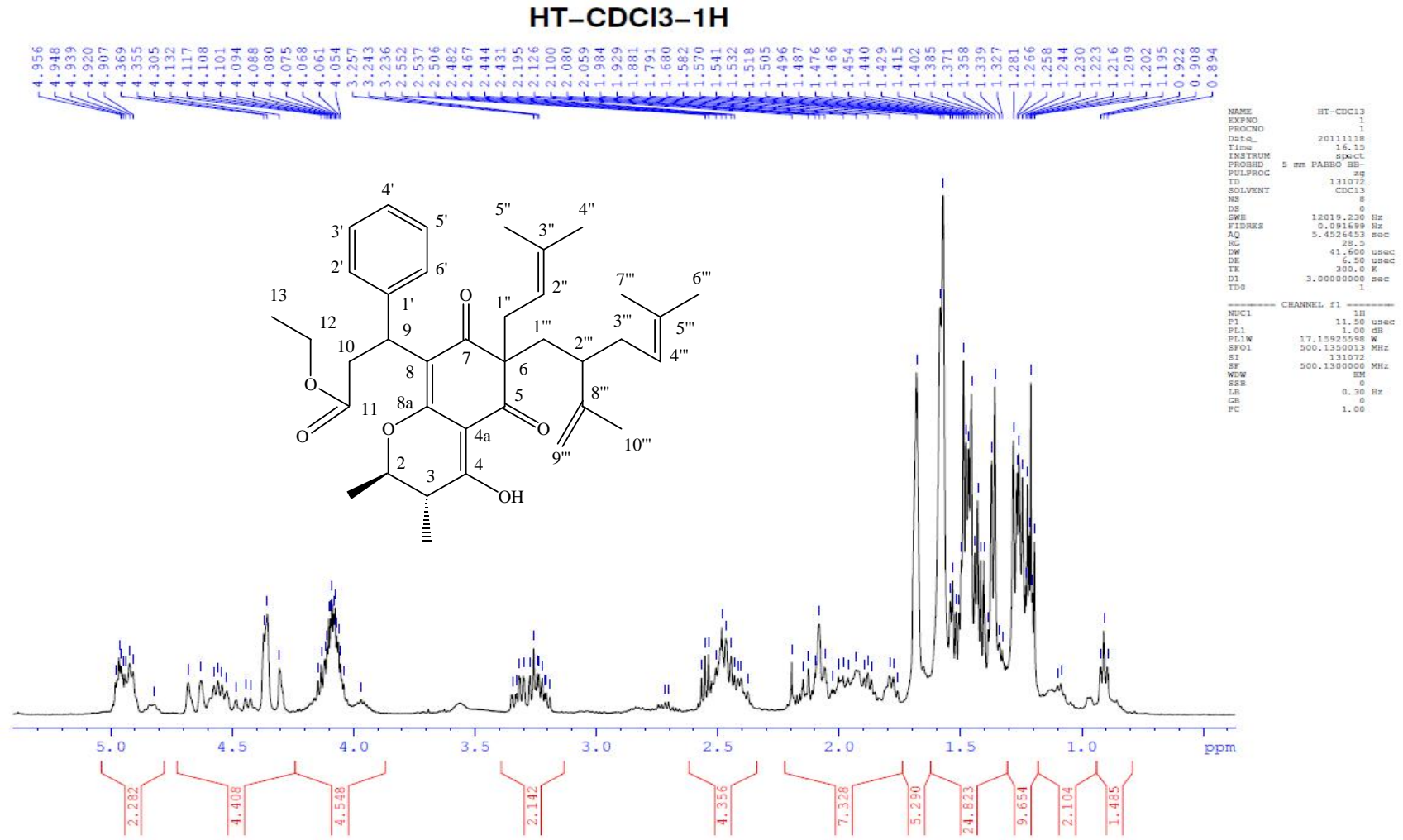
Ph 1 c 6.4 Ph HRMS (ESI-micrOTOF-Q negative) c a h p ch t N₃



Ph 1 c 6.5 Ph HRMS (ESI-microTOF-Q positive) c a h p c h t N₃



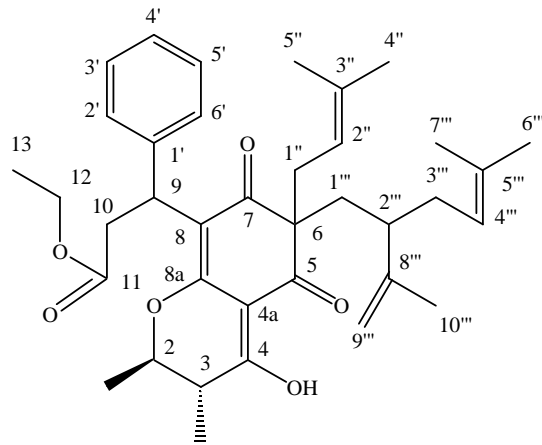
Ph 1 c 6.6 Ph ¹H-NMR (CDCl₃, 500 MHz) c a h p c h t N₃



Ph 1 c 6.6a Ph ¹H-NMR (CDCl₃, 500 MHz) giã n r ng c a h p ch t N₃

HT-CDCI3-1H

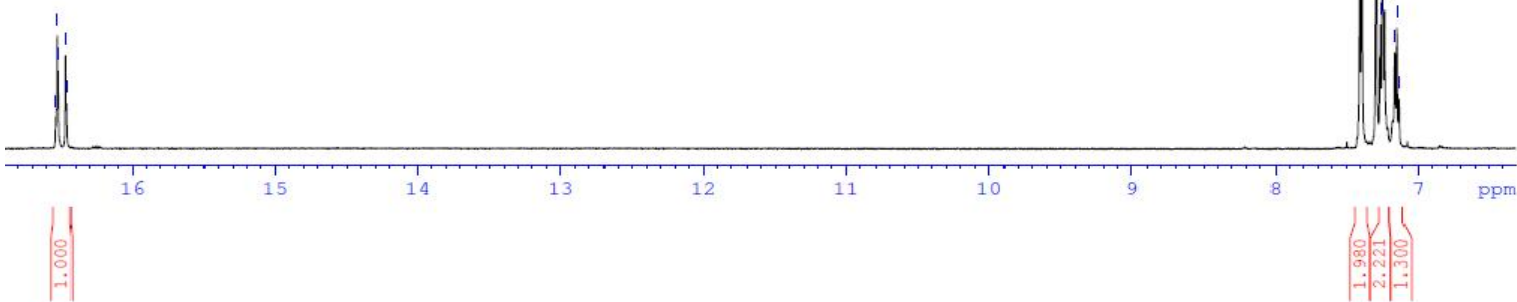
16.532
16.521
16.515
16.462
16.455



7.402
7.387
7.287
7.256
7.241
7.226
7.154
7.139
7.124

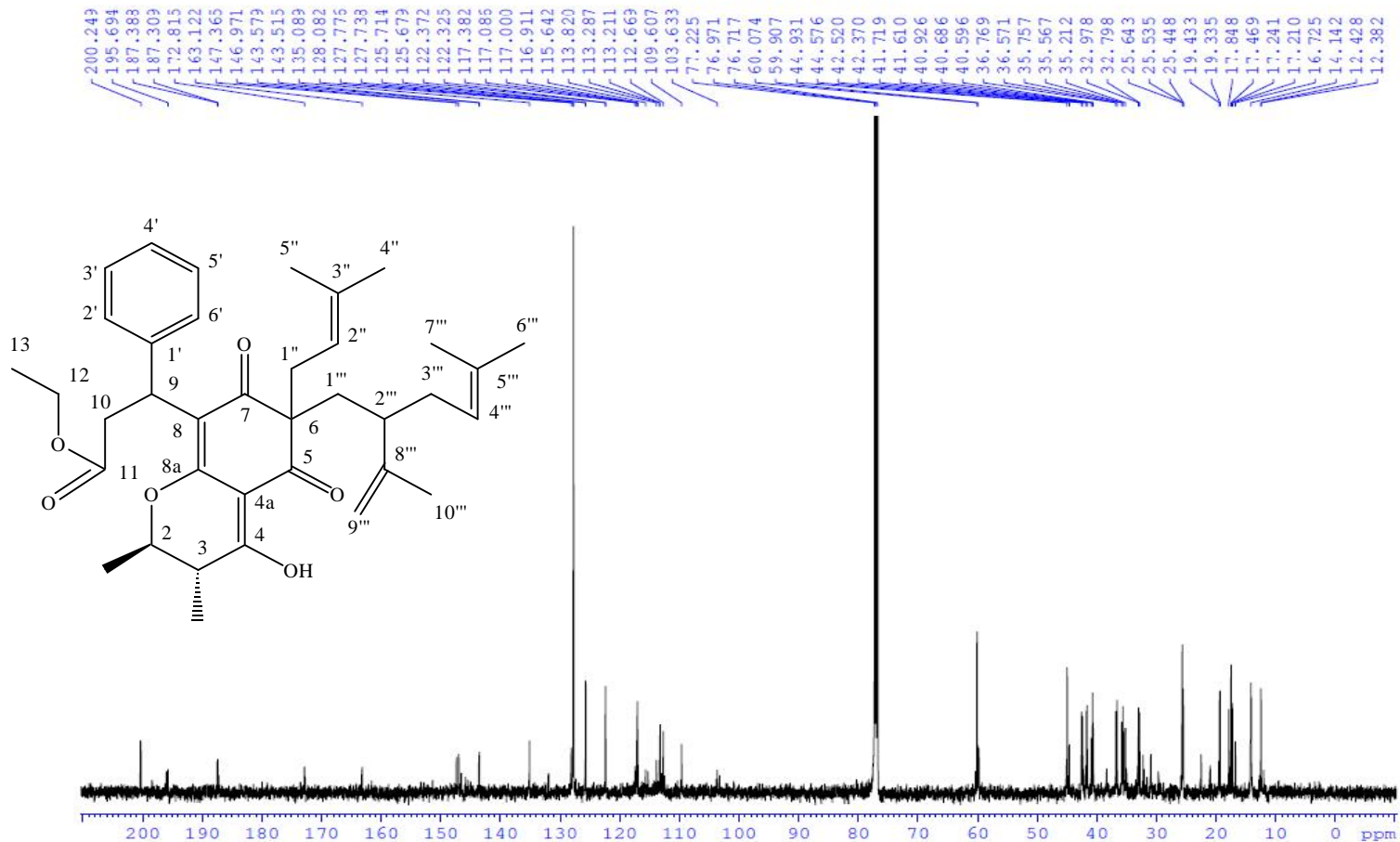
```

NAME          HT-CDCI3
EXPNO         1
PROCNO        1
Date_         20111118
Time          16.15
INSTRUM       spect
PROBHD        5 mm PABBO BB-
PULPROG       zgpg30
TD            131072
SOLVENT       CDCI3
NS            8
DS            0
SWH           12019.230 Hz
FIDRES        0.091699 Hz
AQ            5.4526433 sec
RG            28.5
DW            41.600 usec
DE            6.50 usec
TE            300.0 K
D1            3.00000000 sec
TD0           1
----- CHANNEL f1 -----
NUC1          1H
P1            11.50 usec
PL1           1.00 dB
PL1W          17.13925598 W
SFO1          500.1350013 MHz
SI            131072
SF            500.1300000 MHz
WDW           EM
SSB           0
LB            0.30 Hz
GB            0
PC            1.00
    
```



Ph 1 c 6.6b Ph ¹H-NMR (CDCl₃, 500 MHz) giã n r ng c a h p ch t N₃

HT-CDCl3-13C



```

NAME          HI-LA-15
EXPNO         2
PROCNO        1
Date_         20111107
Time          12.01
INSTRUM       spect
PROBHD        5 mm PABBO BB-
PULPROG       zgpg30
TD             65536
SOLVENT       CDCl3
NS             4559
DS             4
ZWH           32894.735 Hz
FIDRES        0.501934 Hz
AQ            0.4461877 sec
RG            512
SW            15.500 USGC
DE            6.50 USGC
TE            300.2 K
D1            3.0000000 sec
D11           0.0300000 sec
TD0           1

----- CHANNEL f1 -----
NUC1          13C
P1            9.00 USGC
PL1           -0.30 dB
PL1W          114.15417480 W
SFO1          125.7703648 MHz

----- CHANNEL f2 -----
P2           waltz16
NUC2          1H
PCPD2         80.00 USGC
PL2           1.00 dB
PL12          17.85 dB
PL1W          17.15625598 W
PL1W          0.35440382 W
SFO2          500.1320005 MHz
SI            32768
SF            125.7577890 MHz
WDW           ms
SSB           0
LB            1.50 Hz
GB            0
PC            1.00
    
```

Ph 1 c 6.7 Ph ¹³C-NMR (CDCl₃, 125 MHz) c a h p c h t N₃

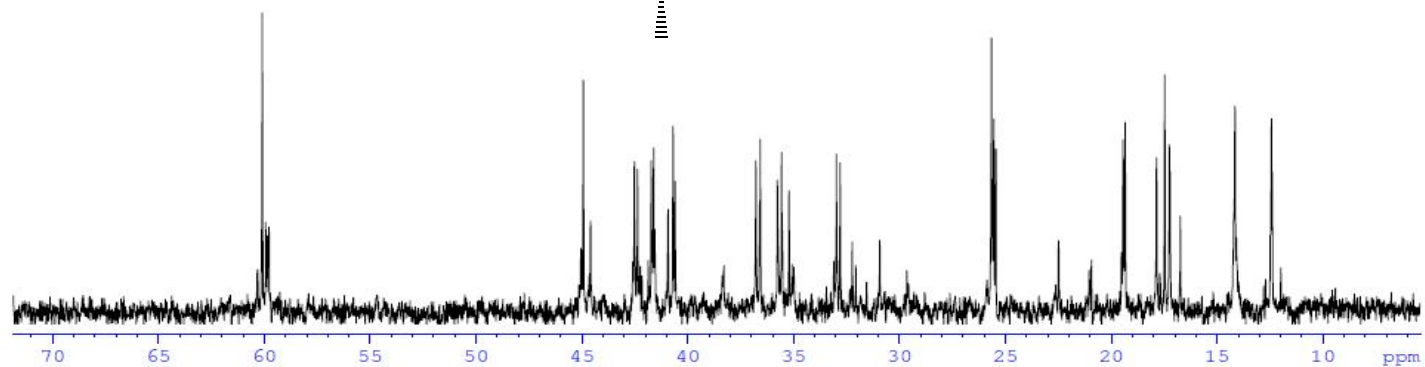
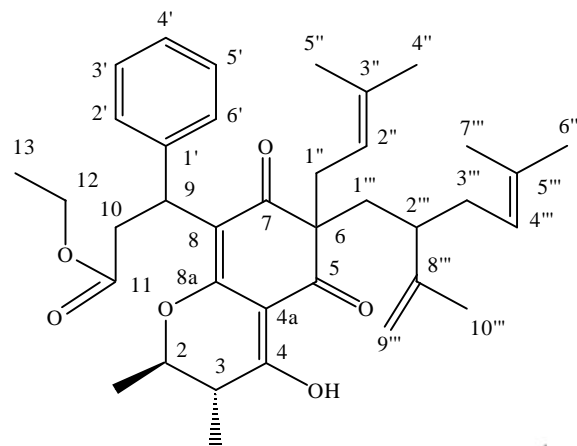
HT-CDCl₃-13C

60.074
59.907

44.931
44.576
42.520
42.370
41.719
41.610
40.926
40.686
40.596
36.769
36.571
35.757
35.567
35.212
32.978
32.798

25.643
25.535
25.448

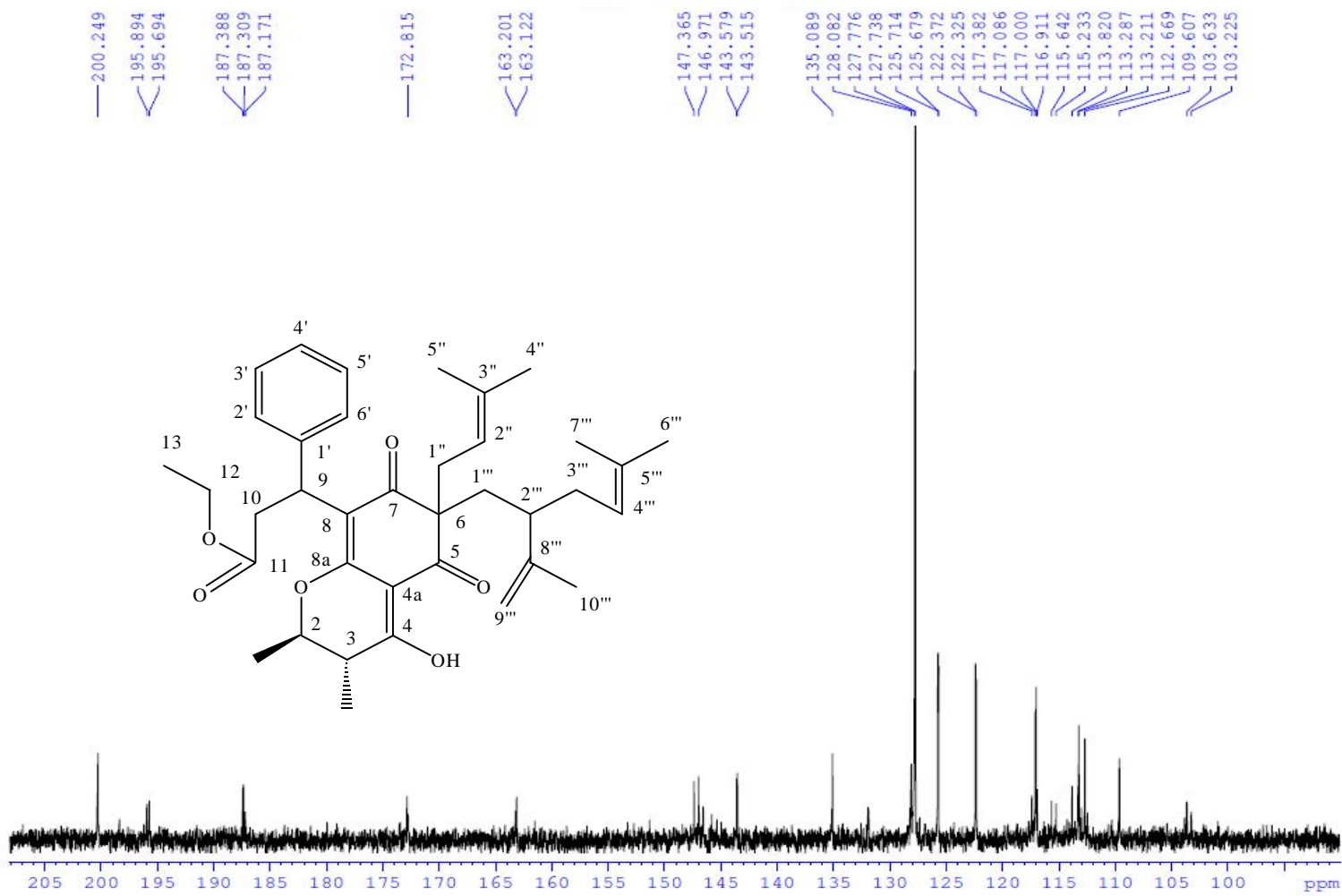
19.433
19.335
17.848
17.469
17.241
17.210
16.725
14.142
12.428
12.382



NAME	HT-CDCl ₃
EXPNO	2
F2PROC1	1
Date_	20111107
Time	12.01
INSTRUM	gpcct
PROBHD	5 mm PABBO BB-
PULPROG	zgpgc
TD	65536
SOLVENT	CDCl ₃
NS	4669
DS	4
SWH	32894.738 Hz
FIDRES	0.501934 Hz
AQ	0.9861972 sec
RG	912
DW	15.200 usec
DE	6.50 usec
TE	300.0 K
D1	2.0000000 sec
D11	0.0300000 sec
TD0	1
----- CHANNEL f1 -----	
NUC1	¹³ C
P1	9.00 usec
PL1	-0.80 dB
PL1W	114.10417480 W
SFO1	125.7703648 MHz
----- CHANNEL f2 -----	
CPDPRG2	waltz16
NUC2	¹ H
PCPD2	80.00 usec
PL2	1.00 dB
PL12	17.85 dB
PL2W	17.10925598 W
PL12W	0.35440382 W
SFO2	500.1320005 MHz
SI	32768
SF	125.7577890 MHz
WDW	EM
SSB	0
LB	1.00 Hz
GB	0
PC	1.00

Ph 1 c 6.7a Ph ¹³C-NMR (CDCl₃, 125 MHz) giã n r n g c a h p c h t N₃

HT-CDCI3-13C



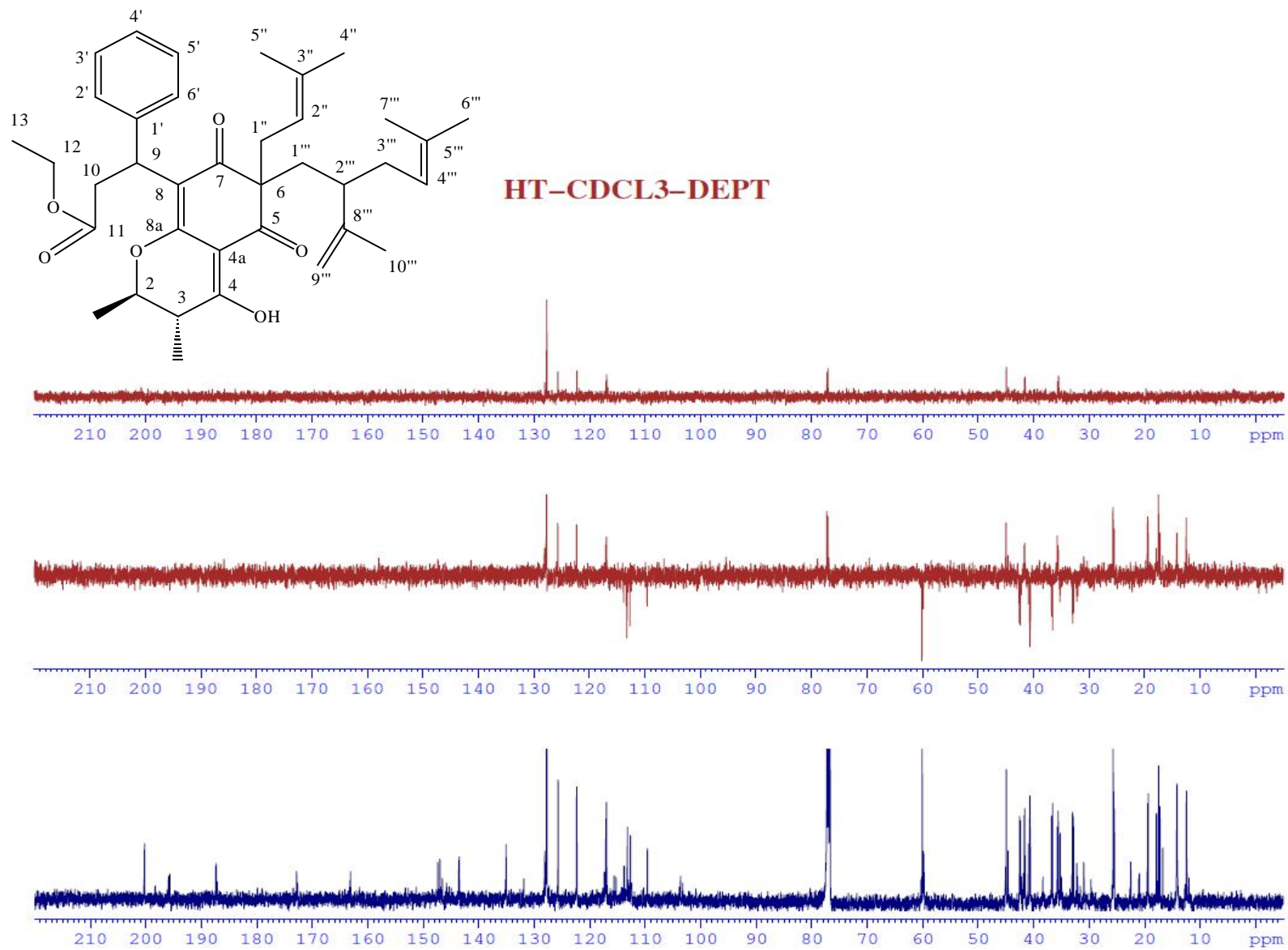
```

NAME HT-CDCI3
EXPNO 2
PROCNO 1
Date_ 20111107
Time 12.01
INSTRUM spect
PROBHD 5 mm PABBO BH-
PULPROG zgpg30
ID 65236
SOLVENT CDCI3
NS 4649
DS 4
SWH 32894.738 Hz
FIDRES 0.501934 Hz
AQ 0.9961972 sec
RG 512
AQ 0.9961972 sec
DE 6.50 usec
TE 300.0 K
D1 2.0000000 sec
D11 0.0300000 sec
TD0 1

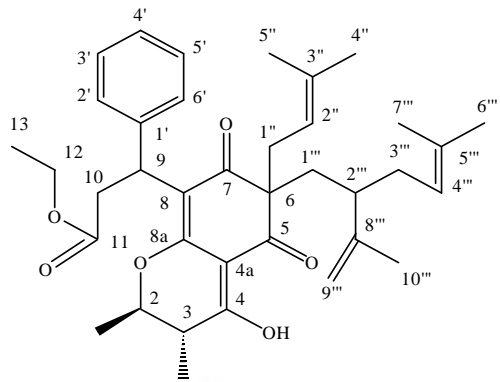
===== CHANNEL f1 =====
NUC1 13C
P1 9.00 usec
PL1 -0.80 dB
PL1W 114.15417480 W
SFO1 125.7603648 MHz

===== CHANNEL f2 =====
CDEPRG2 waltz16
NUC2 1H
PCPD2 80.00 usec
FL2 1.00 dB
FL12 17.80 dB
PL2W 17.15925598 W
PL12W 0.35440382 W
SFO2 500.1320000 MHz
SI 32768
SF 125.7577890 MHz
WDW EM
SSB 0
LB 1.50 Hz
GB 0
PC 1.00
    
```

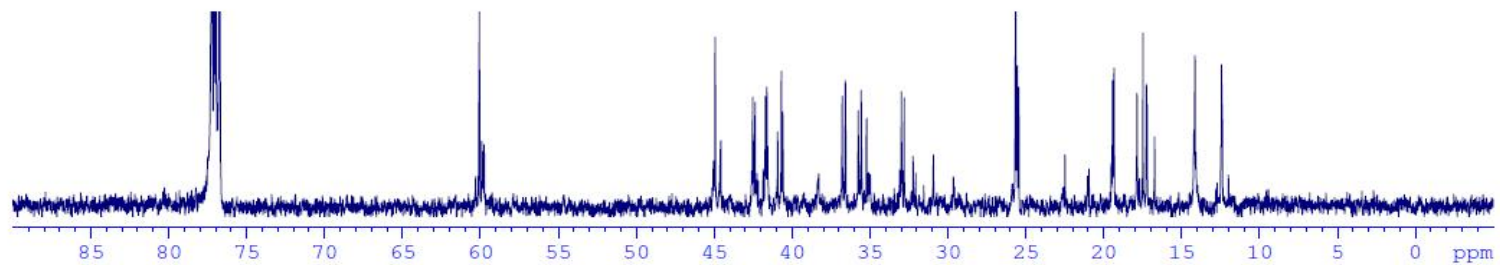
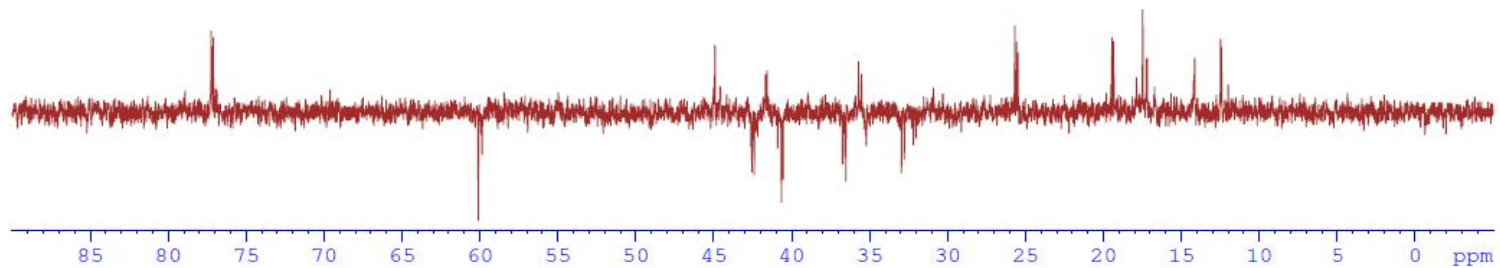
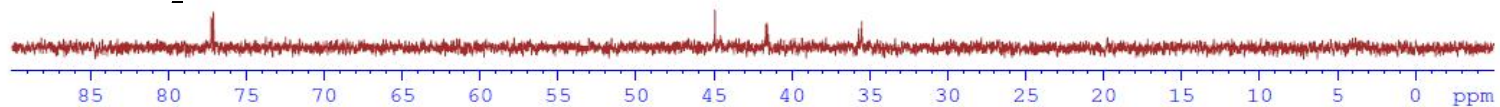
Ph 1 c 6.7b Ph ¹³C-NMR (CDCl₃, 125 MHz) giã n r n g c a h p c h t N₃



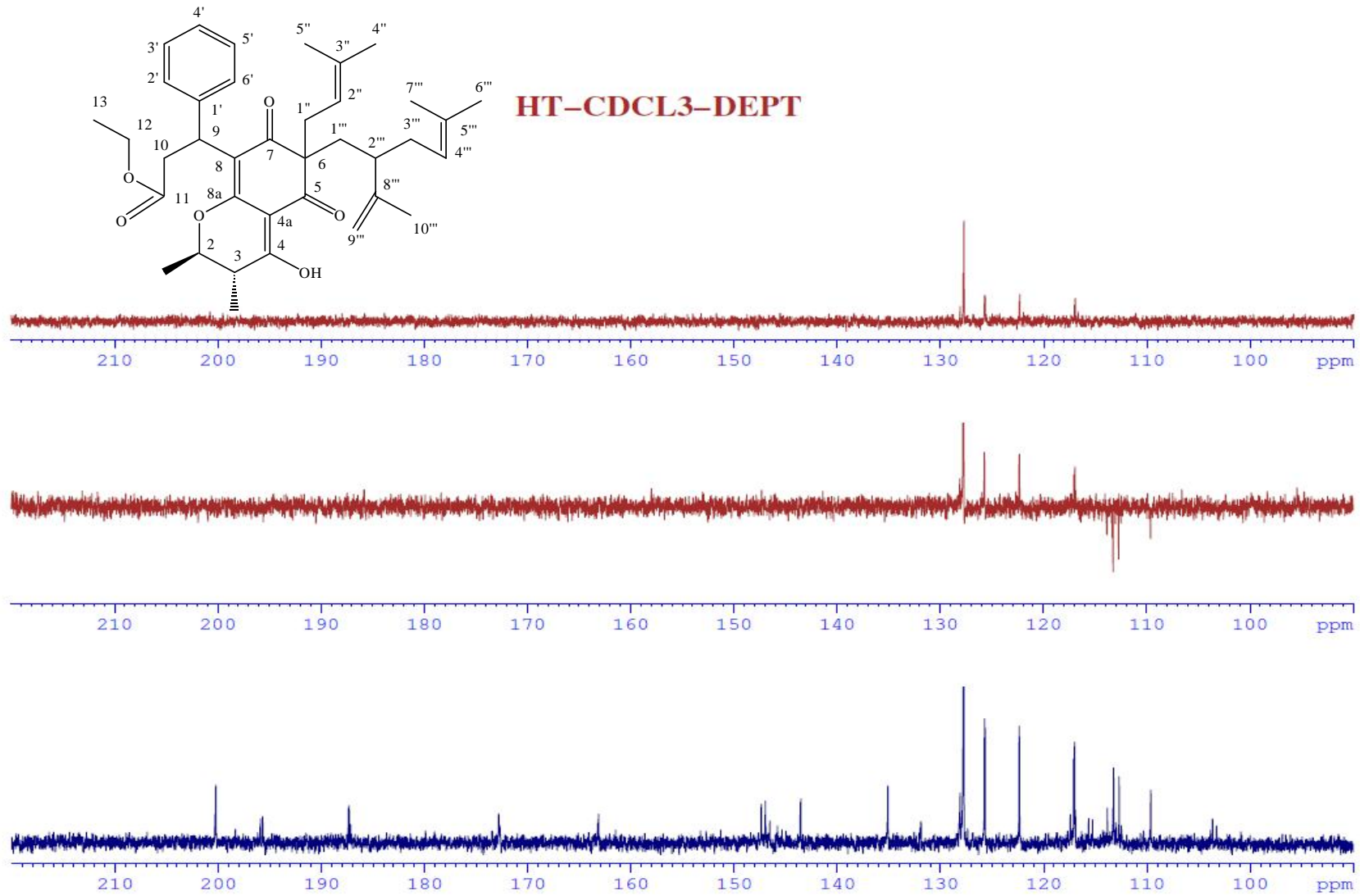
Ph 1 c 6.8 Ph DEPT (CDCl₃) c a h p c h t N₃



HT-CDCl₃-DEPT

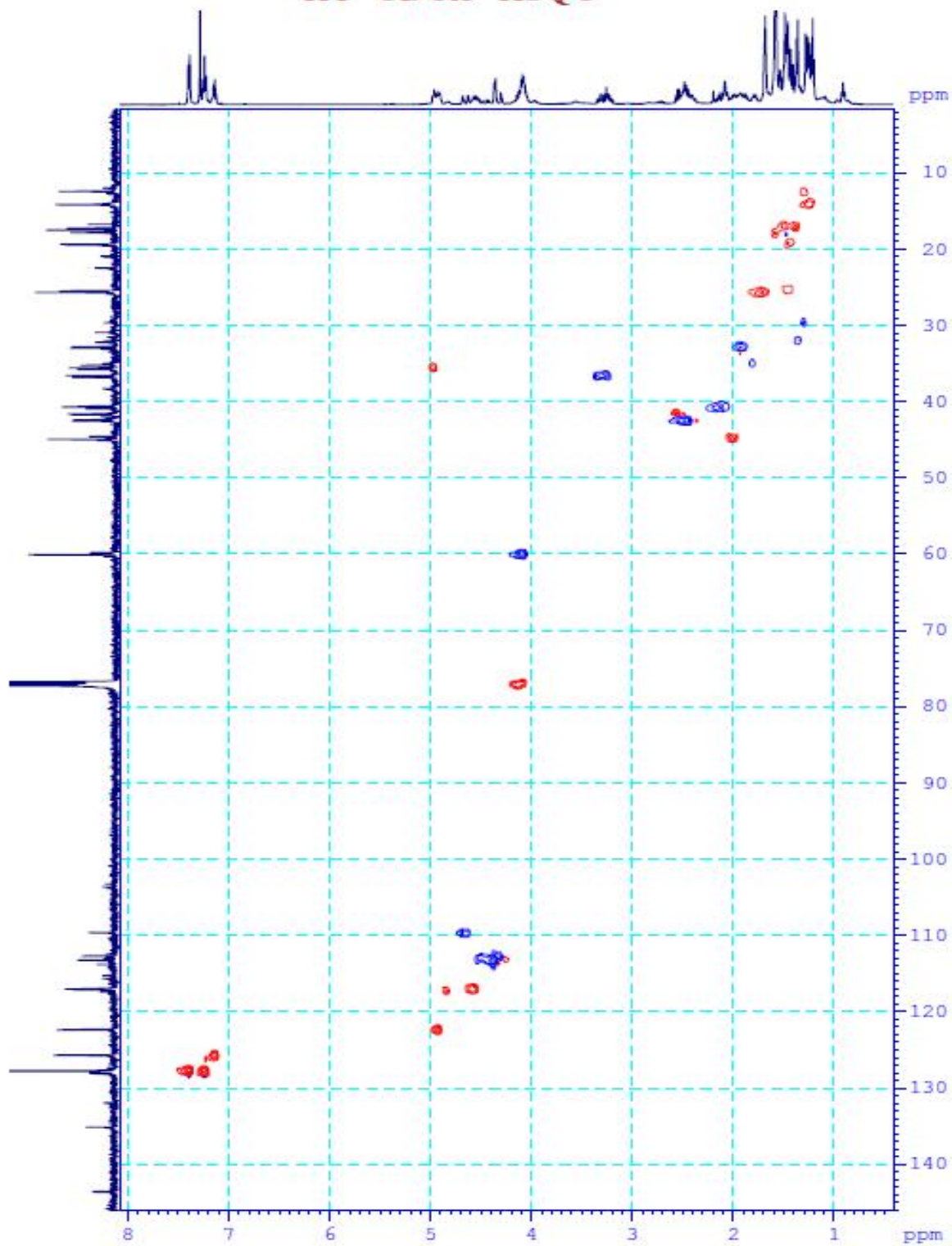


Ph 1 c 6.8a Ph DEPT (CDCl₃) giã n r ng c a h p ch t N₃



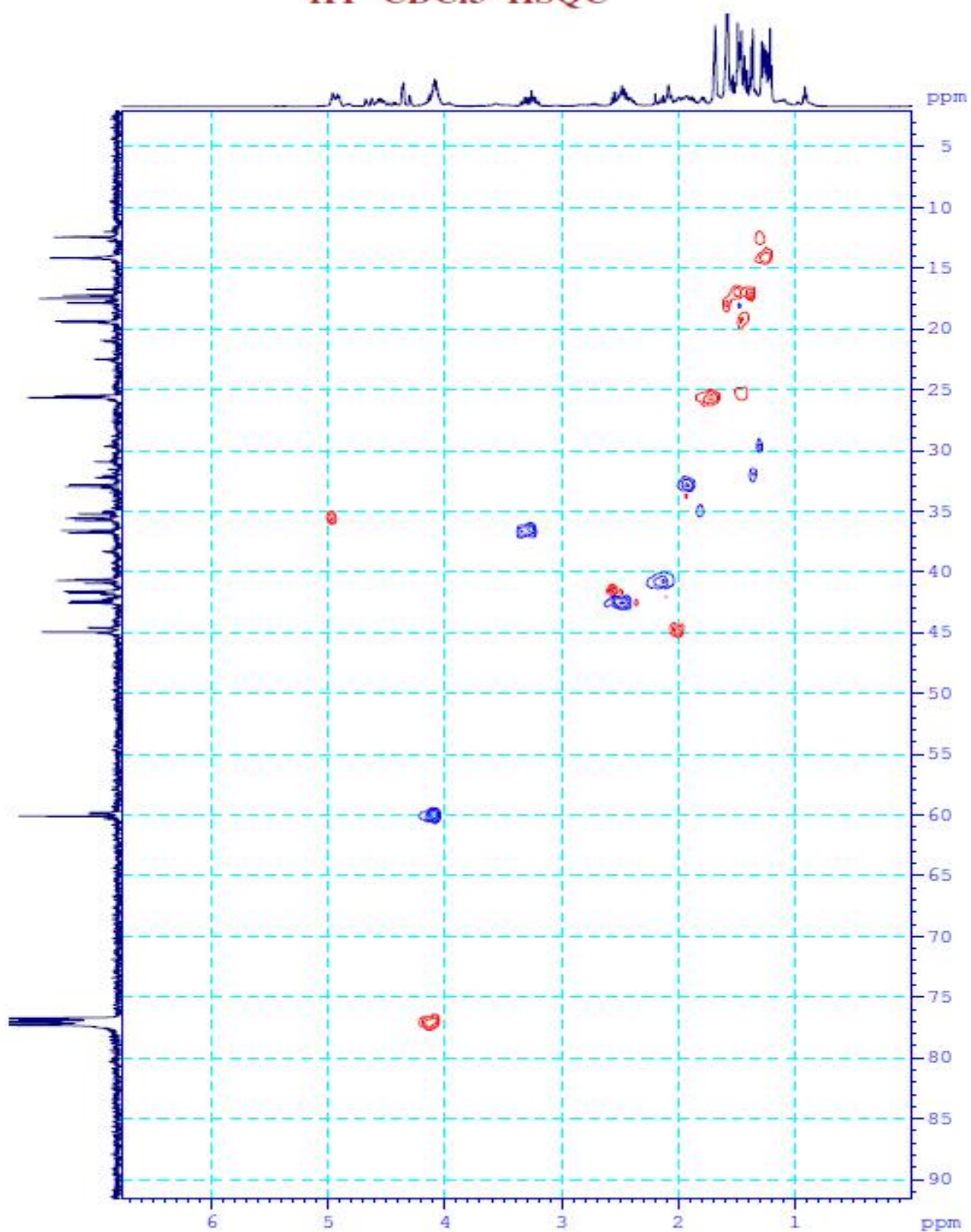
Ph 1 c 6.8b *Ph* DEPT (CDCl₃) giã n r ng c a h p ch t N₃

HT-CDCl₃-HSQC

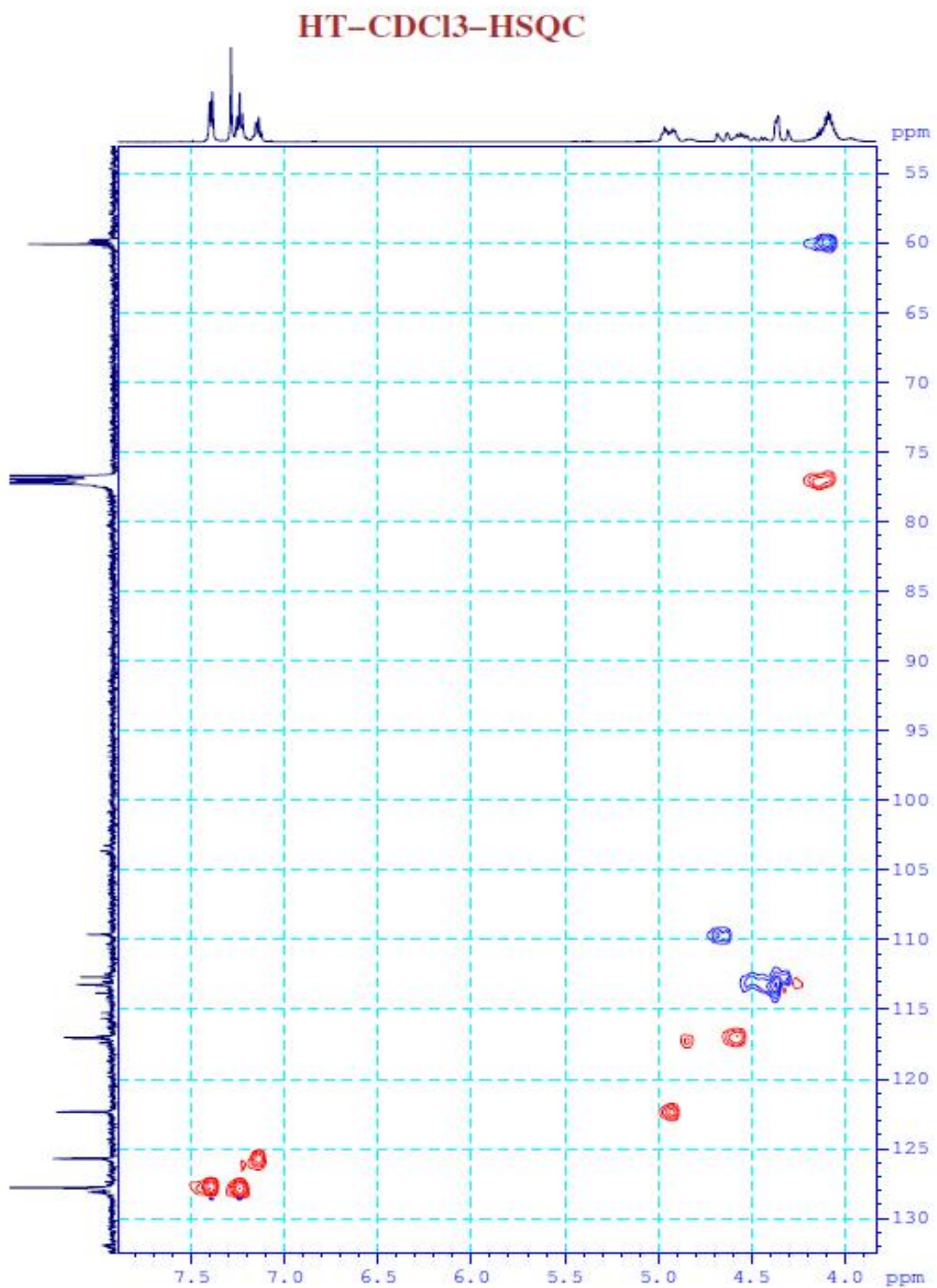


Ph 1 c 6.9 Ph HSQC (CDCl₃) c a h p c h t N₃

HT-CDCl₃-HSQC

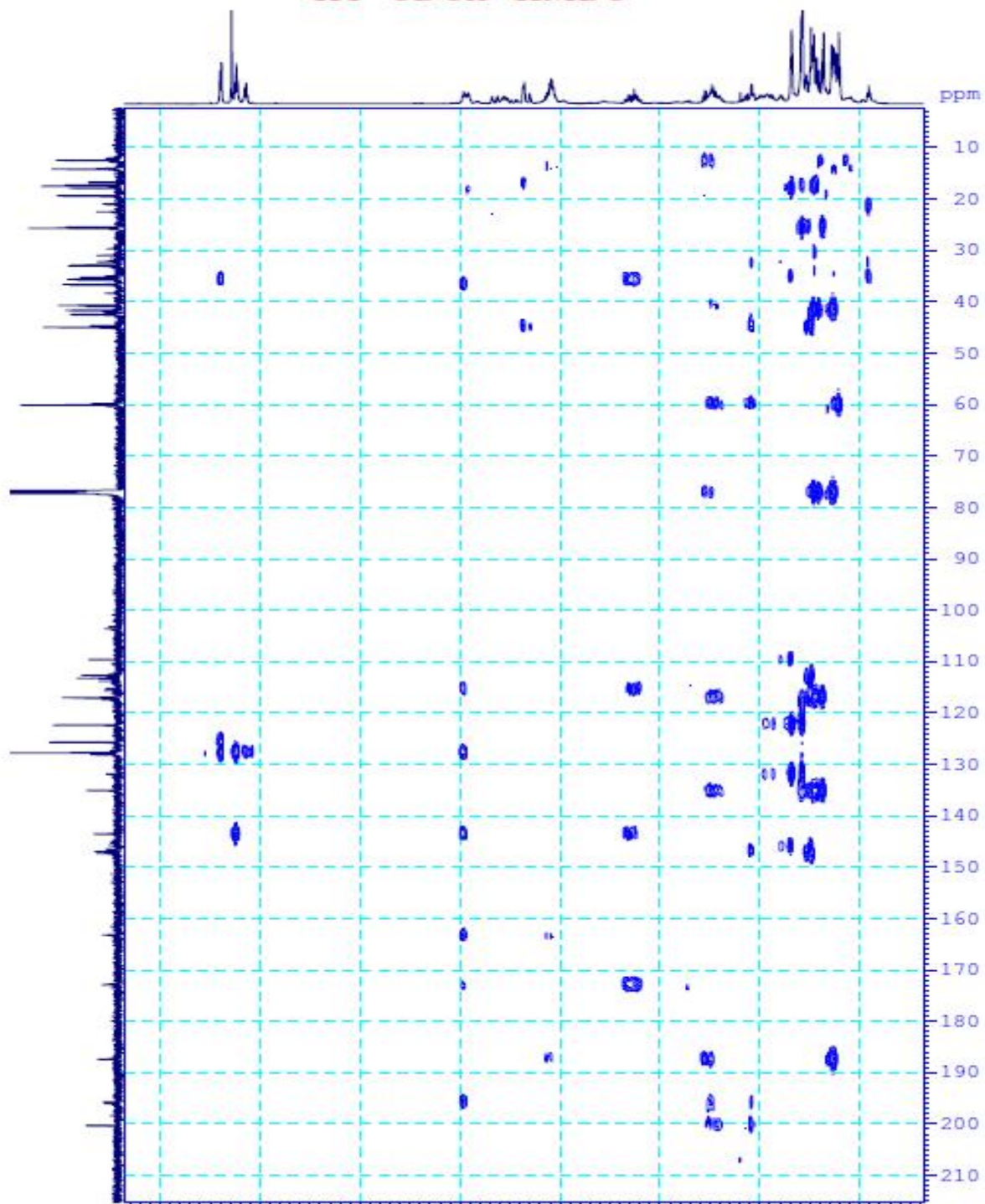


Ph 1 c 6.9a Ph HSQC (CDCl₃) giữa r ng c a h p ch t N₃



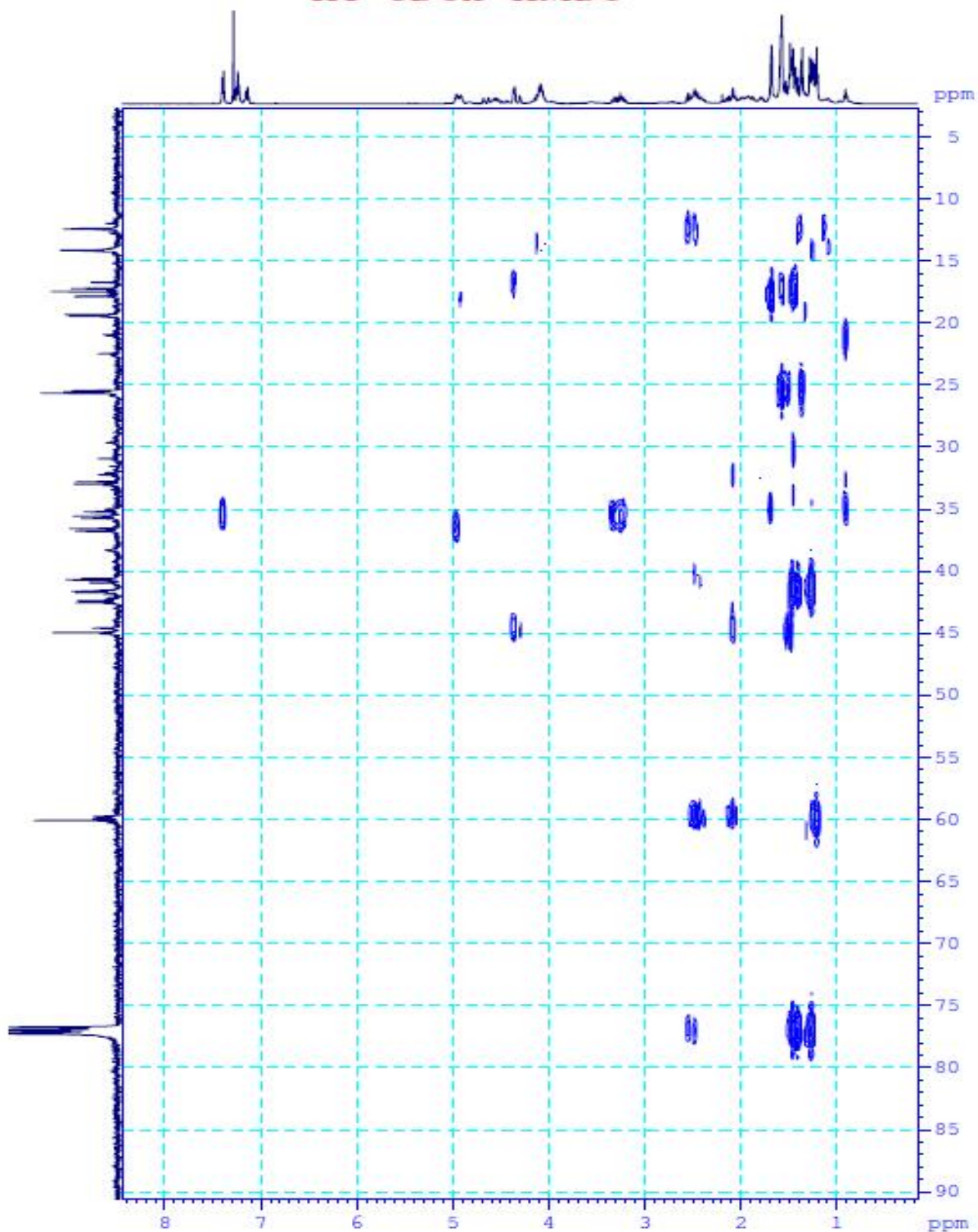
Ph 1 c 6.9b Ph HSQC (CDCl₃) gần r ng c a h p ch t N₃

HT-CDCl₃-HMBC



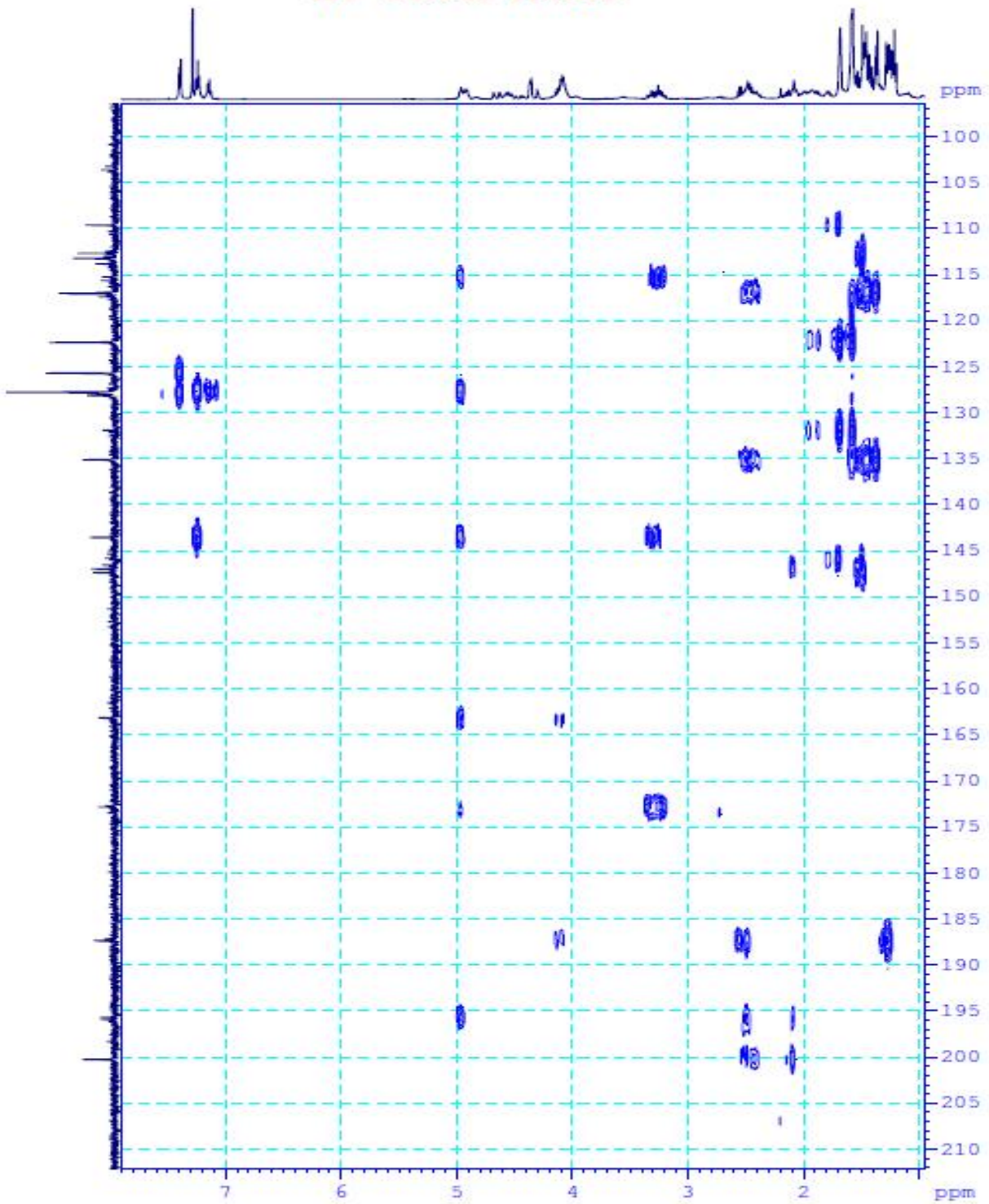
Ph 1 c 6.10 Ph HMBC (CDCl₃) c a h p c h t N₃

HT-CDCl₃-HMBC



Ph 1 c 6.10a Ph HMBC (CDCl₃) gần r ng c a h p ch t N₃

HT-CDCl₃-HMBC



Ph 1 c 6.10b Ph HMBC (CDCl₃) gi ̃n r ng c a h p ch t N₃

Ph 1 c 6.11 *dài liên k t c a h p ch t N₃*

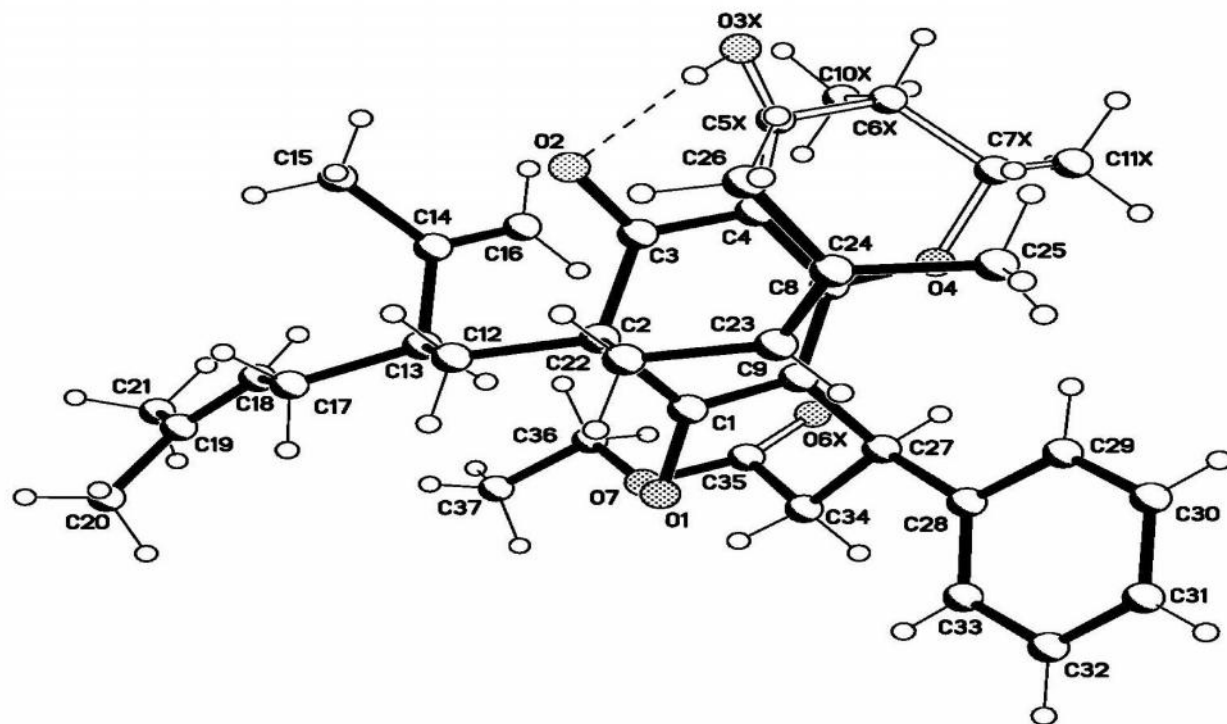
dài liên k t th c nghi m (Å)			
O(1)-C(1)	1.226(4)	C(7X)-C(11X)	1.489(13)
O(2)-C(3)	1.260(4)	C(8)-C(9)	1.363(5)
O(3)-C(5)	1.427(12)	C(9)-C(27)	1.521(5)
O(4)-C(8)	1.348(4)	C(12)-C(13)	1.513(5)
O(4)-C(7)	1.451(11)	C(13)-C(14)	1.523(6)
O(4)-C(7X)	1.472(10)	C(13)-C(17)	1.540(6)
O(6)-C(35)	1.224(11)	C(14)-C(16)	1.311(7)
O(6X)-C(35)	1.277(9)	C(14)-C(15)	1.485(7)
O(7)-C(35)	1.274(6)	C(17)-C(18)	1.481(6)
O(7)-C(36)	1.469(6)	C(18)-C(19)	1.321(7)
C(1)-C(9)	1.454(5)	C(19)-C(20)	1.442(9)
C(1)-C(2)	1.537(5)	C(19)-C(21)	1.507(8)
C(2)-C(3)	1.516(5)	C(22)-C(23)	1.508(6)
C(2)-C(12)	1.545(5)	C(23)-C(24)	1.301(7)
C(2)-C(22)	1.546(5)	C(24)-C(26)	1.491(8)
C(3)-C(4)	1.422(6)	C(24)-C(25)	1.510(7)
C(4)-C(5)	1.398(8)	C(27)-C(28)	1.506(5)
C(4)-C(5X)	1.409(8)	C(27)-C(34)	1.546(5)
C(4)-C(8)	1.444(5)	C(28)-C(33)	1.350(6)
C(5)-C(6)	1.493(10)	C(28)-C(29)	1.388(6)
C(6)-C(7)	1.509(11)	C(29)-C(30)	1.366(7)
C(6)-C(10)	1.528(14)	C(30)-C(31)	1.353(8)
C(7)-C(11)	1.501(14)	C(31)-C(32)	1.357(7)
O(3X)-C(5X)	1.476(12)	C(32)-C(33)	1.391(7)
C(5X)-C(6X)	1.520(10)	C(34)-C(35)	1.482(6)
C(6X)-C(10X)	1.482(13)	C(36)-C(37)	1.427(9)
C(6X)-C(7X)	1.529(9)		

Ph 1 c 6.11a Góc liên kết cấu trúc N₃

Góc liên kết thực nghiệm (°)			
C(8)-O(4)-C(7)	116.1(6)	C(4)-C(5X)-C(6X)	120.5(8)
C(8)-O(4)-C(7X)	119.6(5)	O(3X)-C(5X)-C(6X)	119.6(9)
C(7)-O(4)-C(7X)	27.1(4)	C(10X)-C(6X)-C(5X)	110.0(9)
C(35)-O(7)-C(36)	118.0(4)	C(10X)-C(6X)-C(7X)	114.6(9)
O(1)-C(1)-C(9)	121.3(3)	C(5X)-C(6X)-C(7X)	108.2(8)
O(1)-C(1)-C(2)	116.9(3)	O(4)-C(7X)-C(11X)	109.6(9)
C(9)-C(1)-C(2)	121.8(3)	O(4)-C(7X)-C(6X)	107.9(6)
C(3)-C(2)-C(1)	113.6(3)	C(11X)-C(7X)-C(6X)	116.8(9)
C(3)-C(2)-C(12)	111.9(3)	O(4)-C(8)-C(9)	117.3(3)
C(1)-C(2)-C(12)	109.3(3)	O(4)-C(8)-C(4)	118.6(3)
C(3)-C(2)-C(22)	106.3(3)	C(9)-C(8)-C(4)	124.1(3)
C(1)-C(2)-C(22)	106.1(3)	C(8)-C(9)-C(1)	119.0(3)
C(12)-C(2)-C(22)	109.5(3)	C(8)-C(9)-C(27)	121.8(3)
O(2)-C(3)-C(4)	120.4(4)	C(1)-C(9)-C(27)	118.8(3)
O(2)-C(3)-C(2)	117.9(3)	C(13)-C(12)-C(2)	115.7(3)
C(4)-C(3)-C(2)	121.1(3)	C(12)-C(13)-C(14)	113.9(3)
C(5)-C(4)-C(5X)	25.3(6)	C(12)-C(13)-C(17)	109.8(3)
C(5)-C(4)-C(3)	117.9(5)	C(14)-C(13)-C(17)	110.7(3)
C(5X)-C(4)-C(3)	120.2(6)	C(16)-C(14)-C(15)	121.7(5)
C(5)-C(4)-C(8)	121.2(5)	C(16)-C(14)-C(13)	120.1(5)
C(5X)-C(4)-C(8)	117.9(5)	C(15)-C(14)-C(13)	118.2(4)
C(3)-C(4)-C(8)	119.8(3)	C(18)-C(17)-C(13)	115.2(4)
C(4)-C(5)-O(3)	114.6(9)	C(19)-C(18)-C(17)	126.1(5)
C(4)-C(5)-C(6)	118.0(8)	C(18)-C(19)-C(20)	123.3(5)
O(3)-C(5)-C(6)	118.5(9)	C(18)-C(19)-C(21)	120.9(6)
C(5)-C(6)-C(7)	106.0(9)	C(20)-C(19)-C(21)	115.7(6)
C(5)-C(6)-C(10)	110.7(10)	C(23)-C(22)-C(2)	114.3(3)
C(7)-C(6)-C(10)	113.0(11)	C(24)-C(23)-C(22)	128.0(4)
O(4)-C(7)-C(11)	113.4(9)	C(23)-C(24)-C(26)	124.4(5)
O(4)-C(7)-C(6)	111.7(8)	C(23)-C(24)-C(25)	121.4(5)
C(11)-C(7)-C(6)	114.7(11)	C(26)-C(24)-C(25)	114.1(5)
C(4)-C(5X)-O(3X)	108.3(8)	C(28)-C(27)-C(9)	110.5(3)

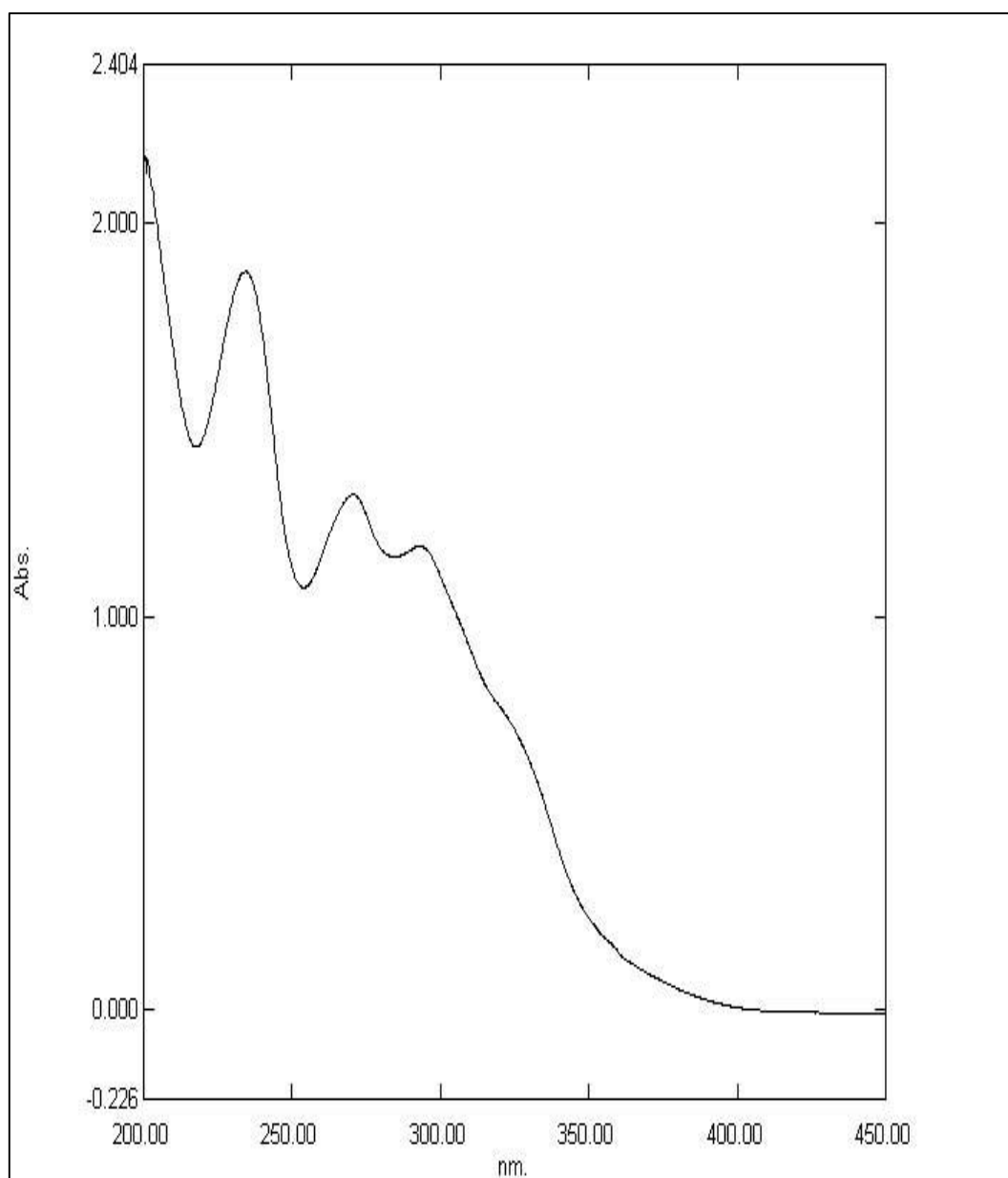
Ph 1 c 6.11a Góc liên kết cấu trúc N_3 (tiếp theo)

Góc liên kết thực nghiệm (°)			
C(28)-C(27)-C(34)	114.4(3)	C(28)-C(33)-C(32)	122.2(5)
C(9)-C(27)-C(34)	112.3(3)	C(35)-C(34)-C(27)	112.8(4)
C(33)-C(28)-C(29)	115.9(4)	O(6)-C(35)-O(7)	115.3(8)
C(33)-C(28)-C(27)	125.4(4)	O(6)-C(35)-O(6X)	40.1(7)
C(29)-C(28)-C(27)	118.7(4)	O(7)-C(35)-O(6X)	122.0(7)
C(30)-C(29)-C(28)	122.4(5)	O(6)-C(35)-C(34)	124.8(7)
C(31)-C(30)-C(29)	120.3(5)	O(7)-C(35)-C(34)	115.1(4)
C(30)-C(31)-C(32)	118.9(5)	O(6X)-C(35)-C(34)	119.1(7)
C(31)-C(32)-C(33)	120.2(5)	C(37)-C(36)-O(7)	109.1(5)

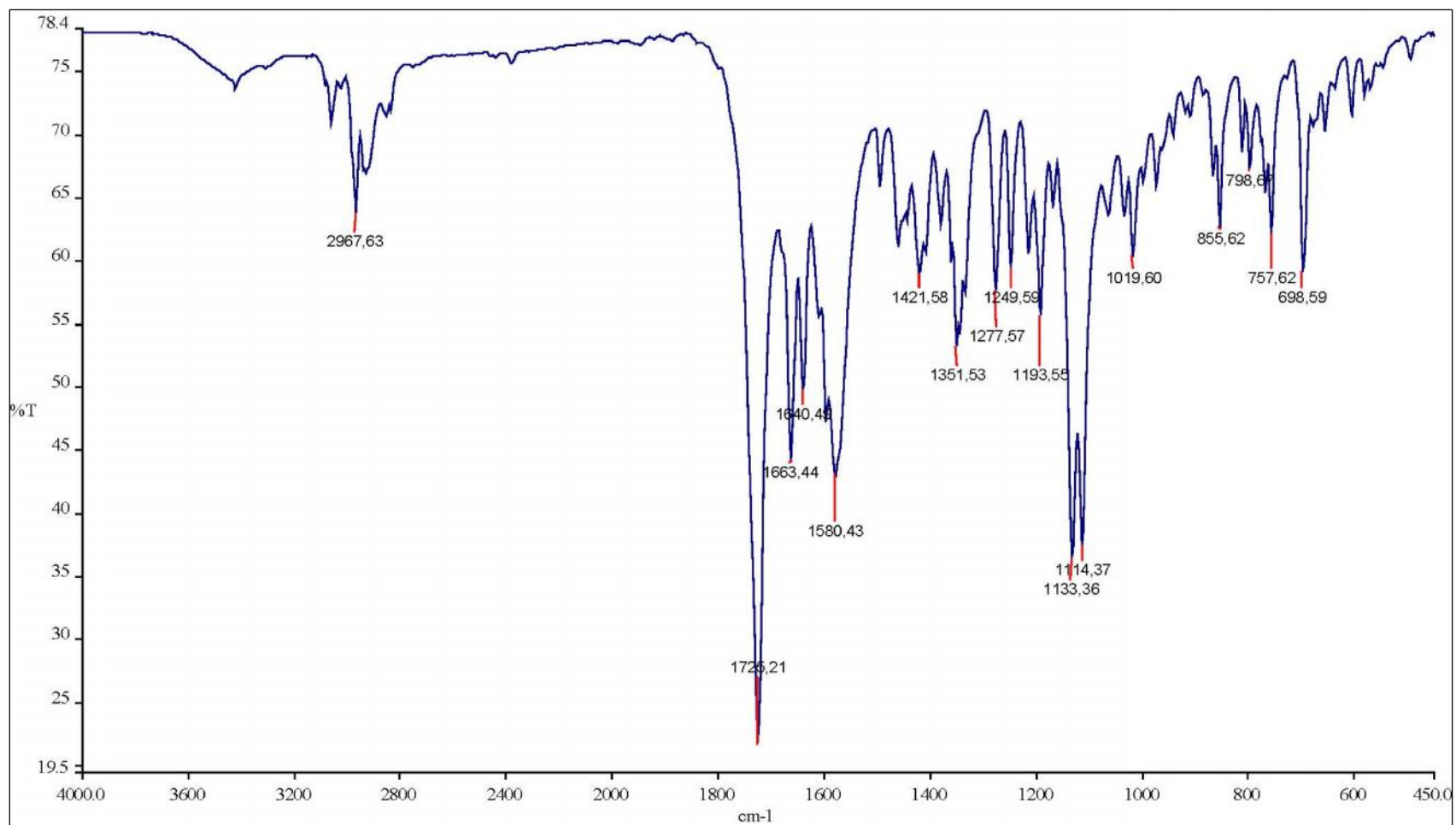


Ph 1 c 6.11b C u trúc c a h p ch t N_3 (nhi u x tia X)

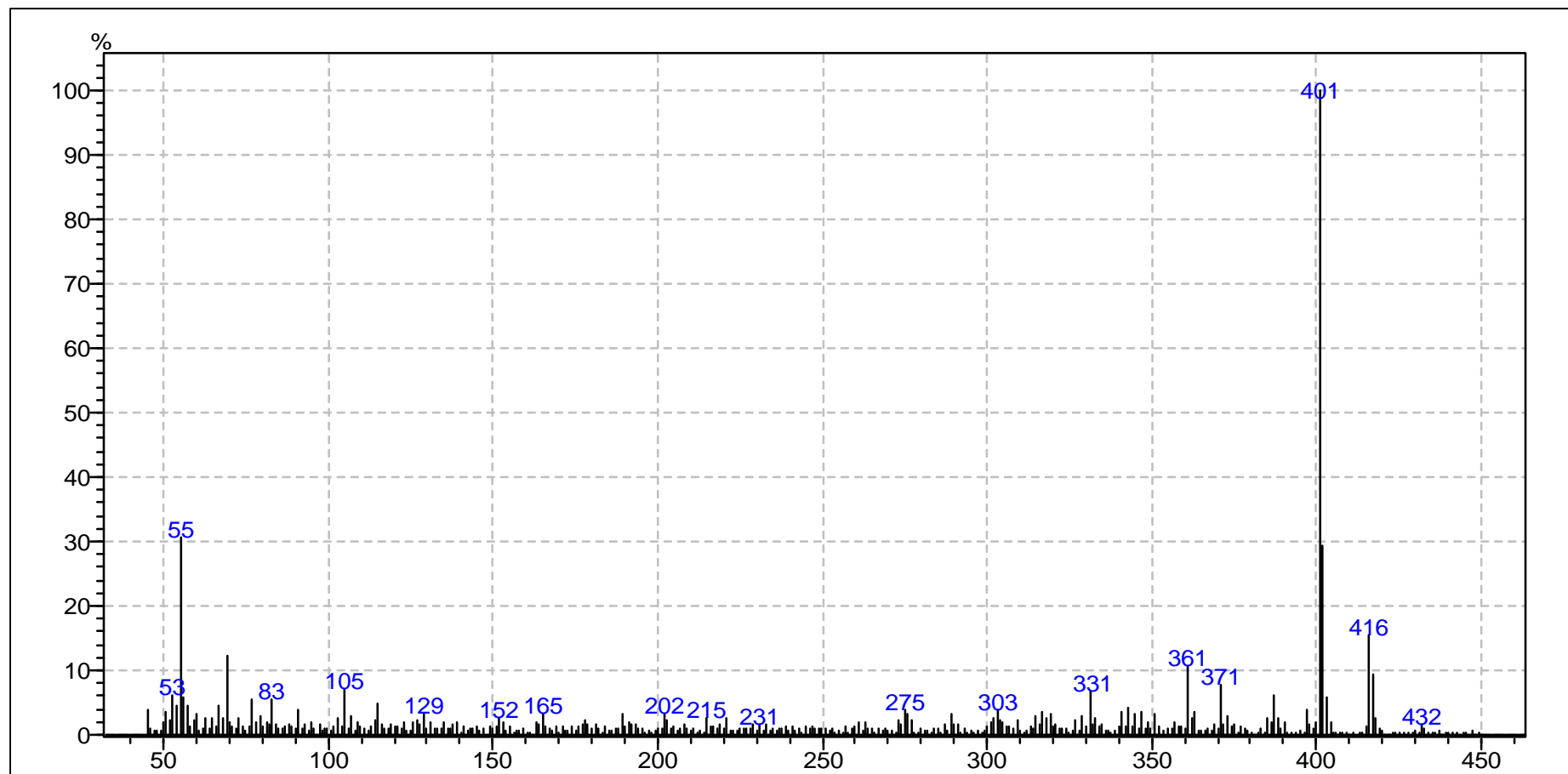
PH L C 7
B D LI UPH CHU N
N₄ (CALOPHYLLOLID)



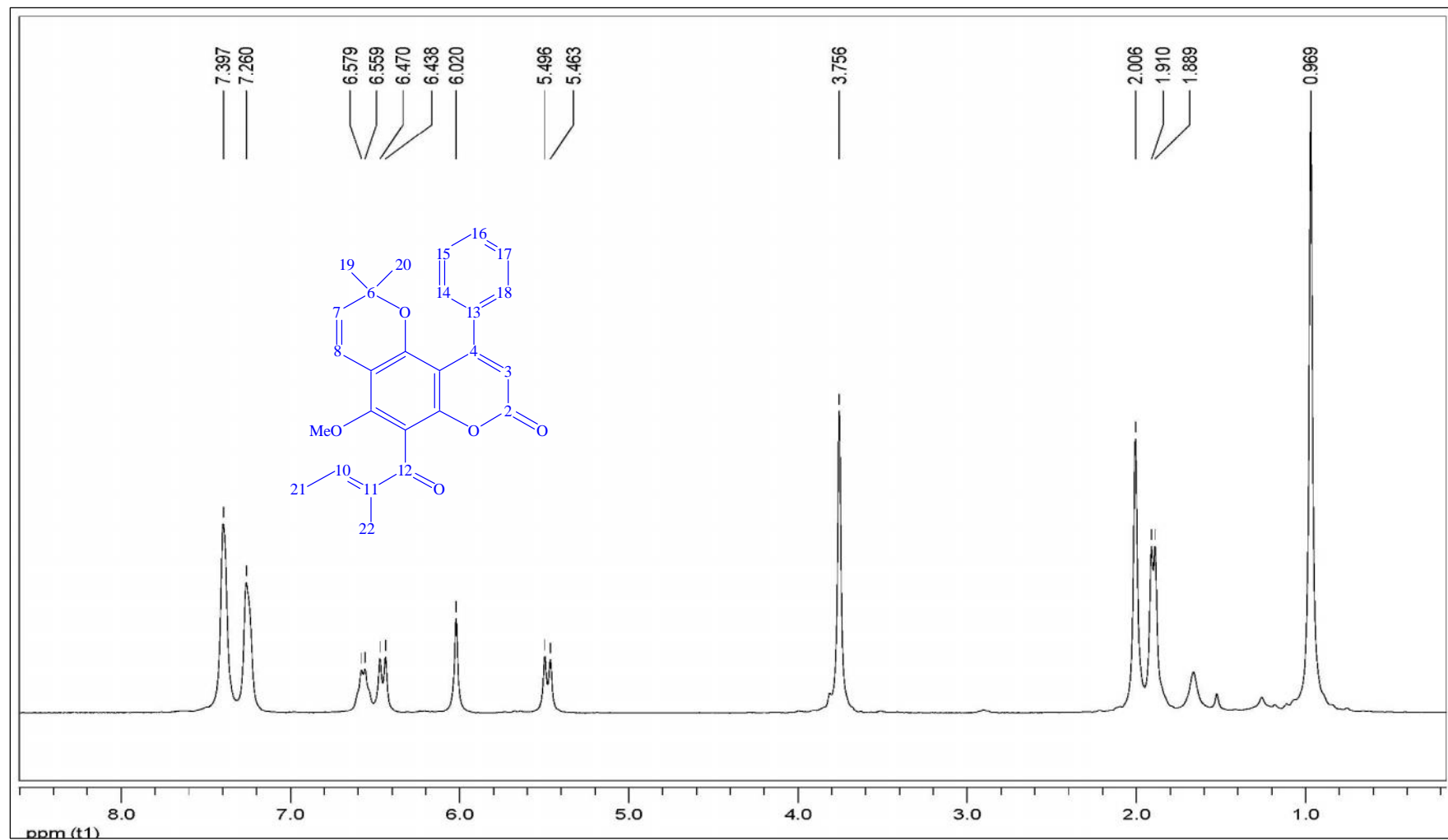
Ph 1 c 7.1 Ph UV-Vis (EtOH) c a h p ch t N₄ (calophyllolid)



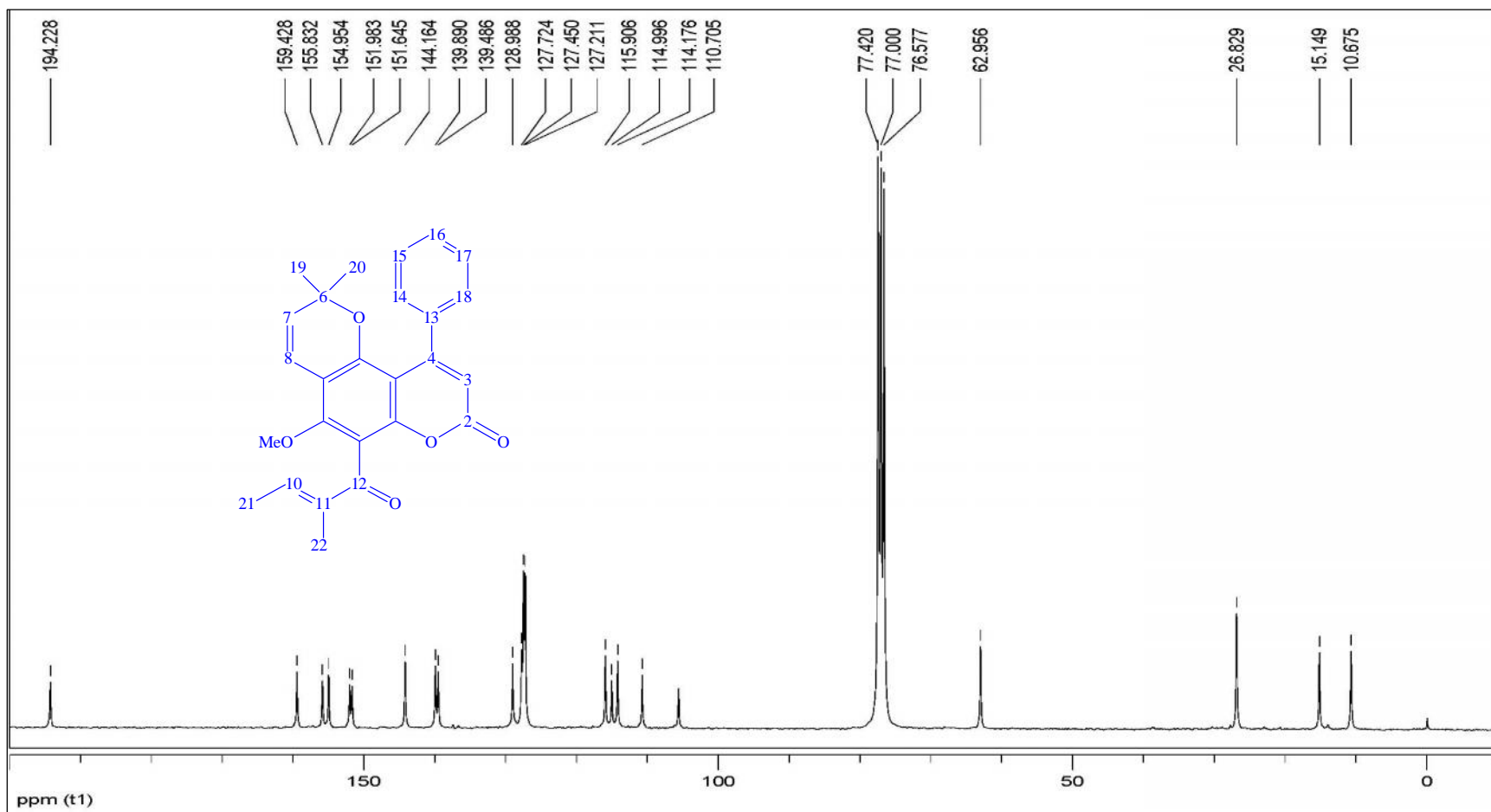
Ph 1 c 7.2 Ph IR (a KBr) c a h p ch t N₄ (calophyllolid)



Ph 1 c 7.3 Ph MS (EI-MS) c a h p c h t N₄ (calophyllolid)



Ph 1 c 7.4 $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 300 MHz) *c a h p c h t N_4* (calophyllolid)



Ph 1 c 7.5 ^{13}C -NMR (CDCl_3 , 300 MHz) *c a h p c h t N_4* (calophyllolid)

Ph 1 c 7.6 B ng so sánh d li u ph ¹H -NMR c a N₄ và calophyllolid

C	H p ch t N₄	Calophyllolid [107]	Calophyllolid [108]
	<i>H m (J, Hz)^a</i>	<i>H m (J, Hz)^a</i>	<i>H m (J, Hz)^b</i>
2	—	—	—
3	6,02 <i>s</i>	6,02 <i>s</i>	5,89 <i>s</i>
4	—	—	—
4a	—	—	—
4b	—	—	—
6	—	—	—
7	5,48 <i>d</i> (9,9)	5,48 <i>d</i> (10,0)	5,38 <i>d</i> (10,0)
8	6,45 <i>d</i> (9,6)	6,45 <i>d</i> (10,0)	6,42 <i>d</i> (10,0)
8a	—	—	—
8b	—	—	—
10	6,57 <i>q</i> (6,0)	6,57 <i>dq</i> (7,0; 1,3)	6,5 <i>m</i>
11	—	—	—
12	—	—	—
12a	—	—	—
12b	—	—	—
13	—	—	—
14, 18	7,4 <i>m</i>	7,4 <i>m</i>	
15, 17	7,26 <i>m</i>	7,26 <i>m</i>	
16	7,4 <i>m</i>	7,4 <i>m</i>	
19	0,97 <i>s</i>	0,97 <i>s</i>	0,94 <i>s</i>
20	0,97 <i>s</i>	0,97 <i>s</i>	0,94 <i>s</i>
21	1,9 <i>d</i> (6,3)	1,9 <i>d</i> (7,0)	1,92 <i>d</i> (7,0)
22	2,01 <i>s</i>	2,01 <i>m</i>	1,95 <i>s</i>
OMe	3,76 <i>s</i>	3,75 <i>s</i>	

^a: o trong CDCl₃ 300 MHz

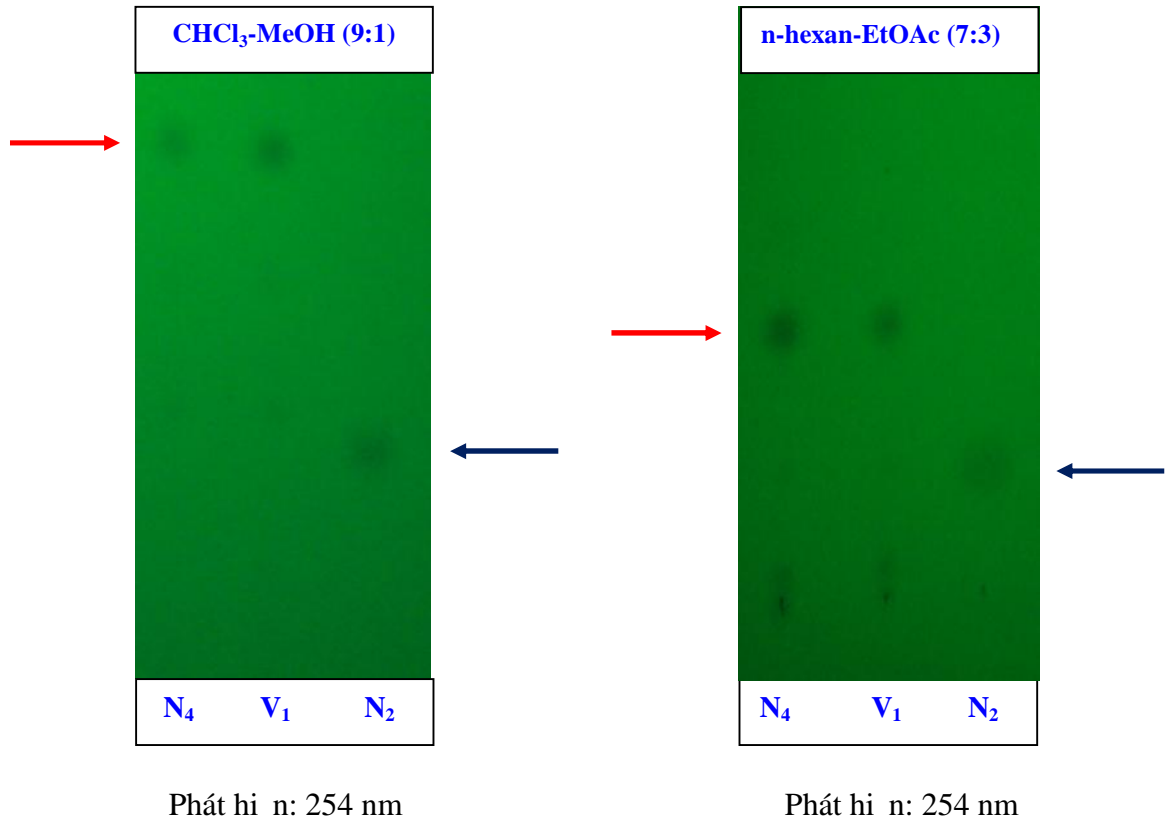
^b: o trong CDCl₃ 60 MHz

Ph 1 c 7.7 B ng so sánh d li u ph ^{13}C -NMR c a N_4 và calophyllolid

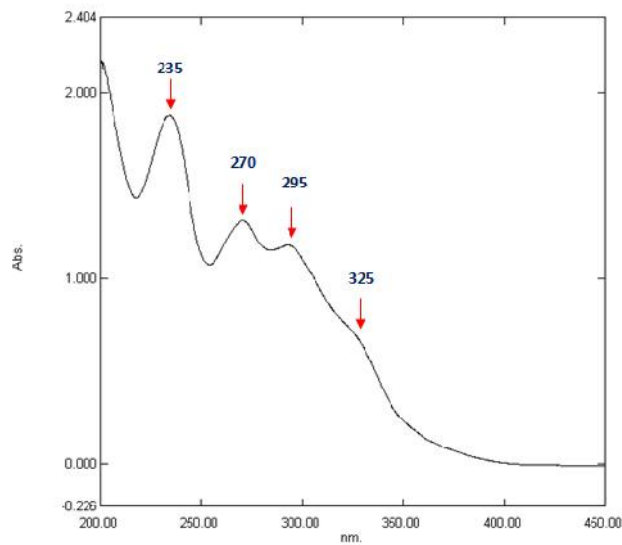
C	H p ch t N_4	Calophyllolid [107]
	<i>c (ppm)^a</i>	<i>c (ppm)^a</i>
2	159,4	159,5
3	114,2	114,2
4	155,0	155,0
4a	105,6	105,6
4b	151,7	151,7
6	77,4	77,4
7	129,0	129,0
8	115,9	116,0
8a	110,7	110,7
8b	155,8	155,8
10	144,2	144,2
11	139,9	139,9
12	194,3	194,3
12a	115,0	115,0
12b	152,0	152,0
13	139,5	139,5
14	127,2	127,3
15	127,5	127,5
16	127,7	127,8
17	127,5	127,5
18	127,2	127,3
19	26,8	26,9
20	26,8	26,9
21	15,2	15,2
22	10,7	10,7
OMe	63,0	63,0

^a: o trong CDCl_3 75 MHz

PH L C 8
B D LI US CKÝ L P M NG VÀ PH
V₁ (CALOPHYLLOLID)

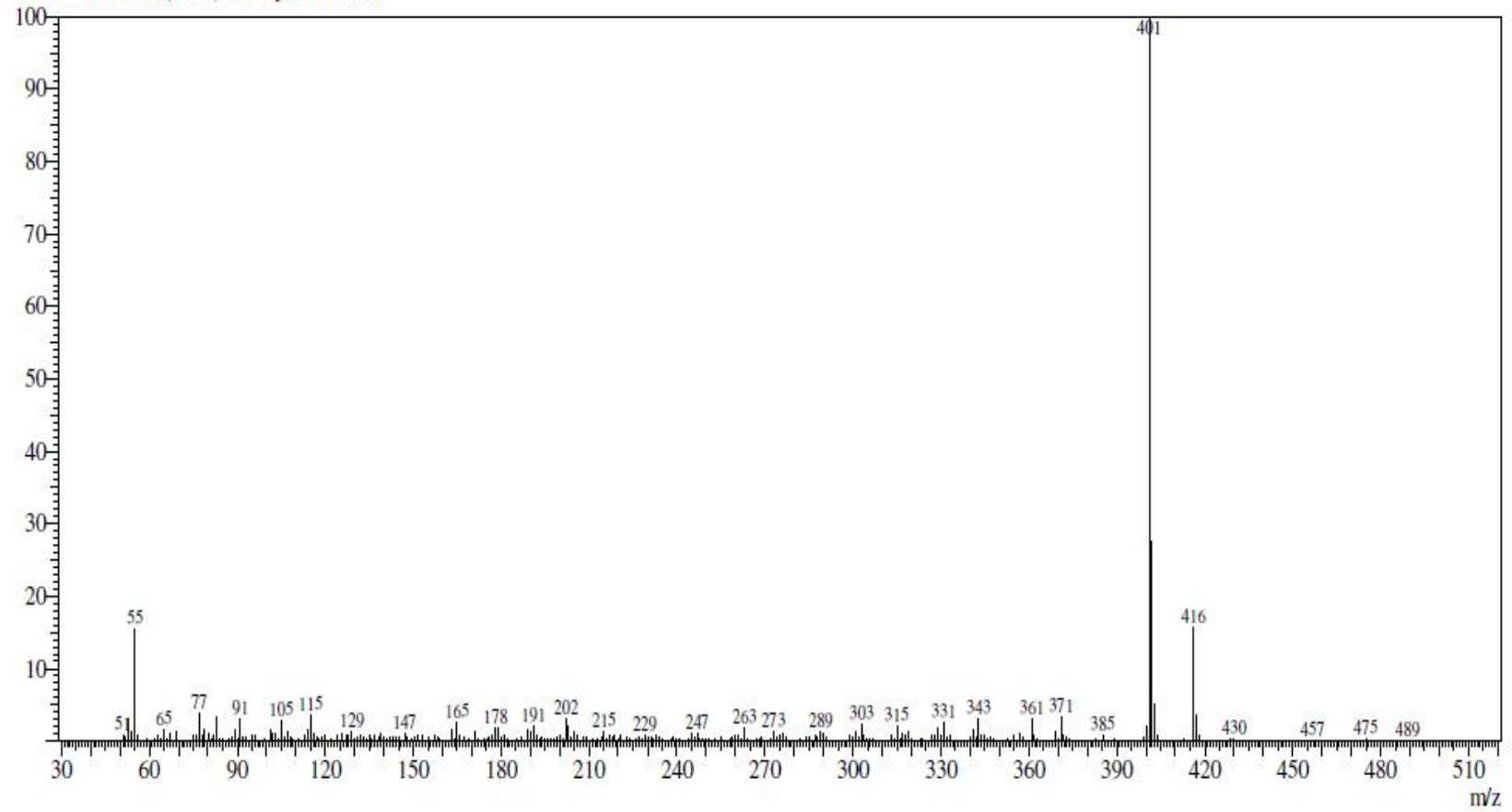


Ph 1 c 8.1 *S c ký TLC c a h p ch t V₁ song song v i h p ch t N₄ và N₂*

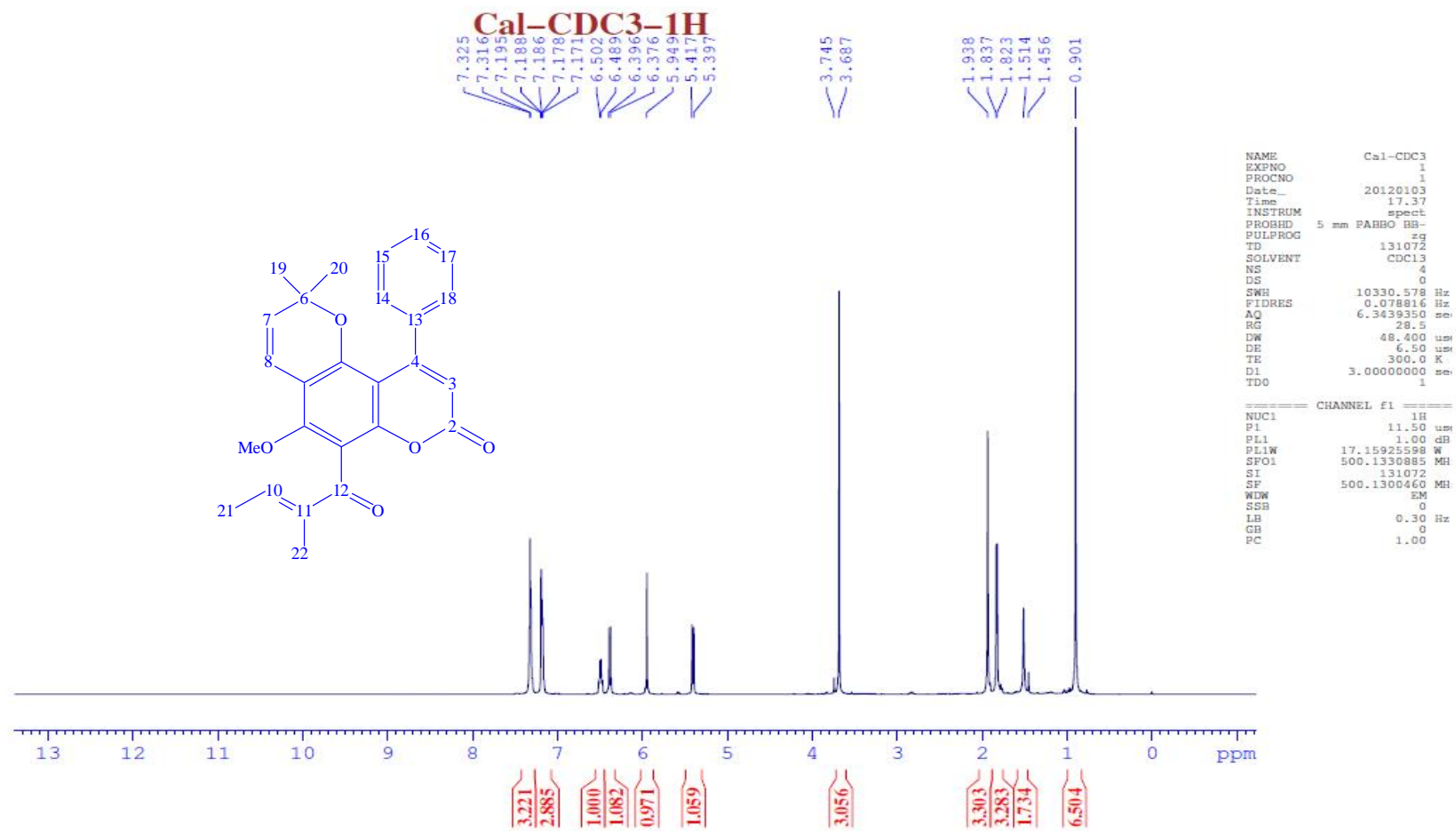


Ph 1 c 8.2 *Ph UV-Vis (EtOH) c a h p ch t V₁ (calophyllolid)*

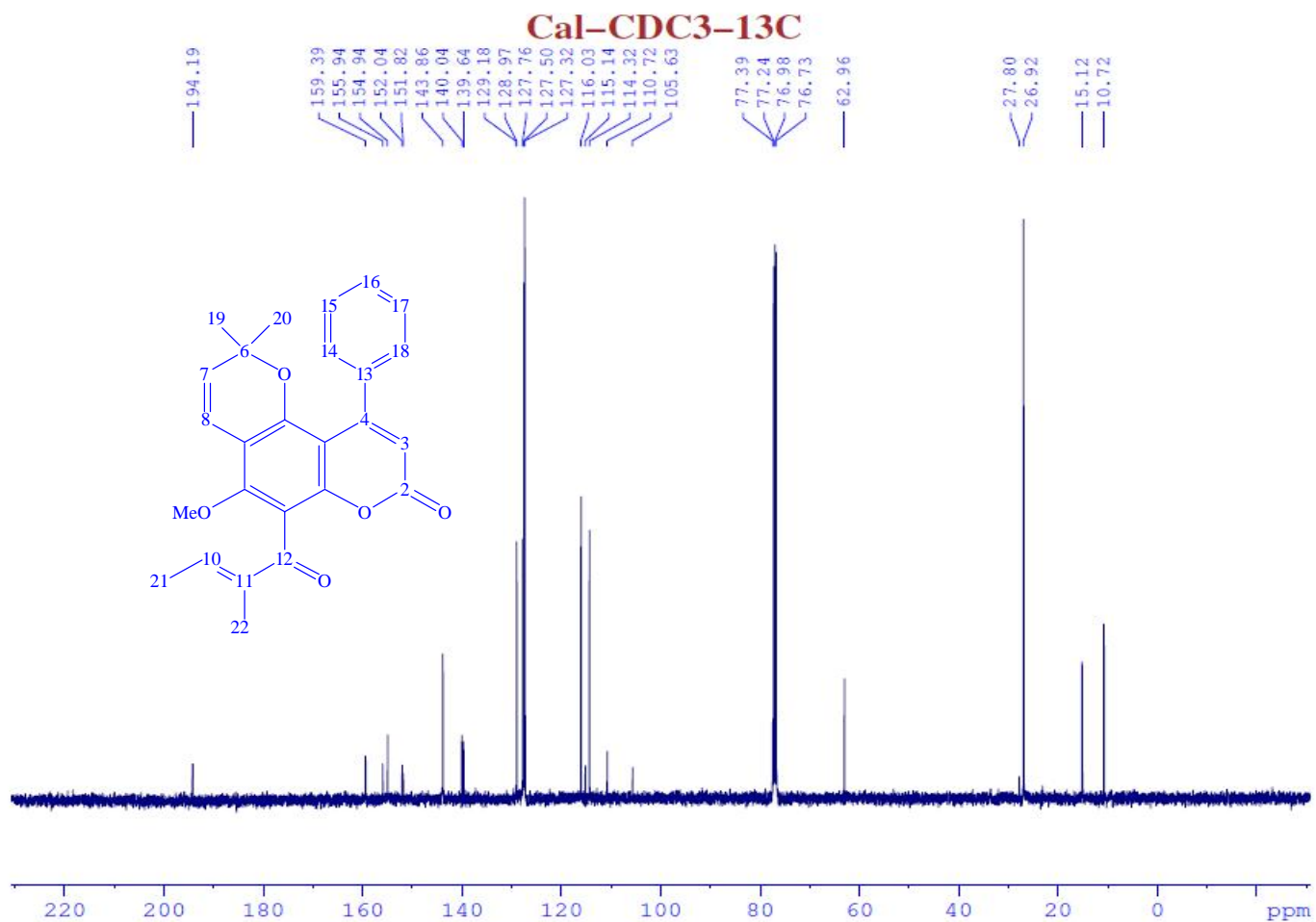
Line#:1 R.Time:12.817(Scan#:1179)
MassPeaks:343
RawMode:Single 12.817(1179) BasePeak:401(132802)
BG Mode:12.892(1188) Group 1 - Event 1



Ph 1 c 8.3 Ph MS (EI-MS) c a h p c h t V₁ (calophyllolid)



Ph 1 c 8.4 *Ph* ¹H-NMR (CDCl₃, 500 MHz) *c a h p c h t V₁* (calophyllolid)



```

NAME          Cal-CDC3
EXPNO         2
PROCNO        1
Date_         20120103
Time         17.42
INSTRUM       spect
PROBHD        5 mm PABBO BB-
PULPROG       zgdc
TD            65536
SOLVENT       CDCl3
NS            925
DS            4
SWH           32894.738 Hz
FIDRES        0.501934 Hz
AQ            0.9961972 sec
RG            912
DW            15.200 usec
DE            6.50 usec
TE            300.0 K
D1            2.00000000 sec
D11           0.03000000 sec
TDO           1

```

```

===== CHANNEL f1 =====
NUC1          13C
P1            9.50 usec
PL1          -0.80 dB
PL1W         114.15417480 W
SFO1         125.7703648 MH

```

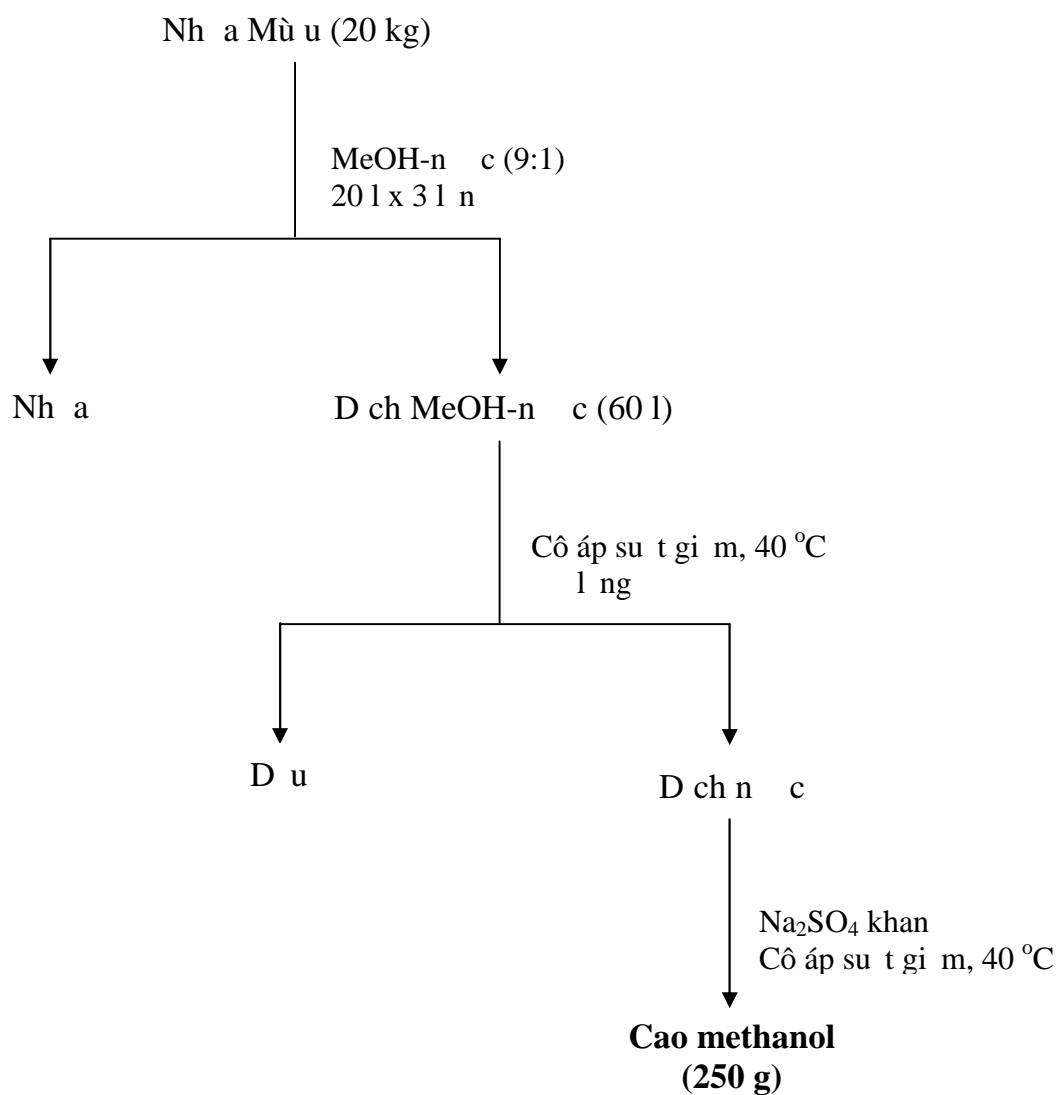
```

===== CHANNEL f2 =====
CDDPRG2       waltz16
NUC2          1H
PCPD2         80.00 usec
PL2           1.00 dB
PL12         17.85 dB
PL2W         17.15925598 W
PL12W        0.35440382 W
SFO2         500.1320005 MH
SI            32768
SF           125.7577890 MH
W1W           EM
SSB           0
LB            1.50 Hz
GB            0
PC            1.00

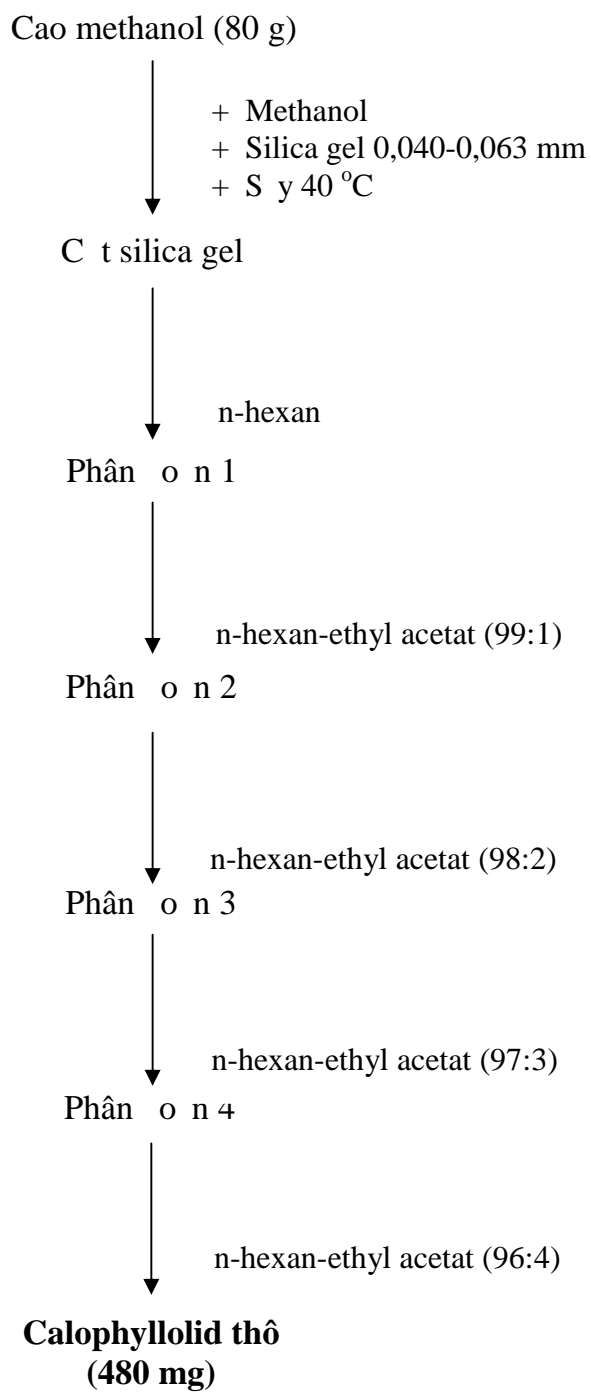
```

Ph 1 c 8.5 Ph ^{13}C -NMR (CDCl₃, 125 MHz) c a h p c h t V₁

PH L C 9
S CHI T XU TH P CH T PHENOL T
NH A MÙ U PHÂN L P CALOPHYLLOLID LÀM
CH T CHU N I CHI U



PH L C 10
S PHÂN L P CALOPHYLLOLID
T CAO METHANOL NH A MÙ U



PH L C 11
QUY TRÌNH TINH CH CALOPHYLLOLID
I U CH C

Dùng phương pháp kết tinh lại với dung môi và nhiệt thích hợp.

Dùng phương pháp sắc ký lỏng hiệu suất cao tinh chế calophyllolid tách được còn lại n
t p. Xây dựng quy trình sắc ký cột am u trên cột phân tích, tính toán các thông
s v t c dòng và lưu lượng mẫu sắc ký trên cột hiệu suất cao.

Quy trình sắc ký hiệu suất cao:

Phương pháp: Hỗn hợp acetonitril/n-hexan-ethyl thích hợp

Tốc độ dòng: 30 ml/phút

Thời gian tiêm: 20 ml

Nồng độ mẫu: 50 mg/ml

Thời gian phân tích: 30 ml

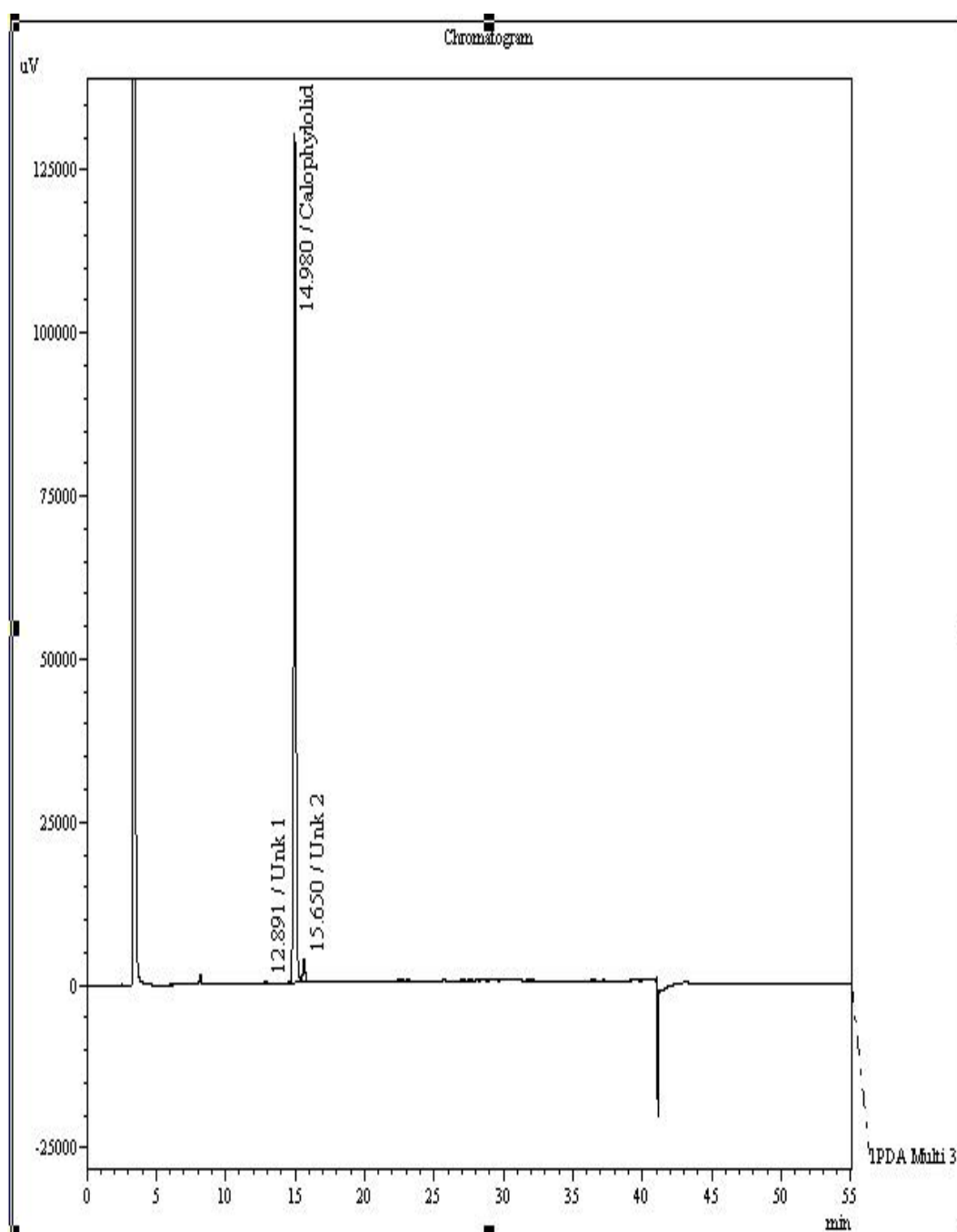
Kiểm tra tinh khiết các phân tử có calophyllolid bằng sắc ký lỏng hiệu suất cao và HPLC với các quy trình sau:

Kiểm tra tinh khiết calophyllolid đã tinh chế

Kiểm tra bằng TLC: bản mỏng silica gel 60 F₂₅₄ (Merck) với các hệ dung môi (1) Toluene-ethyl acetat (8:2); (2) n-hexan-ethyl acetat (7:3); (3) Chloroform-methanol (9:1).

Kiểm tra bằng HPLC: máy sắc ký lỏng Shimadzu LC-20AD, đầu dò quang SPD-M20A, cột pha đảo Gemini NX C-18 (150 mm x 4,6 mm, 5 μ m), pha
dung môi acetonitril/n-hexan-ethyl thích hợp trong dung môi tinh khiết, tốc độ dòng 0,6 ml/phút, nhiệt độ cột 40 °C, thời gian tiêm là 5 μ l, phát hiện với đầu dò quang cho kết quả phù hợp với phổ UV của calophyllolid.

Tinh độ các phân tử có tinh khiết > 95%, loại bỏ hệ dung môi thu được
sạch. Các phân tử có tinh khiết 95% loại bỏ hệ dung môi lặp lại
quy trình tinh chế.



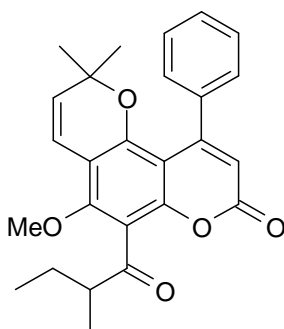
Hình PL 11.1 *Sắc ký HPLC-DAD calophyllolide tinh chế*

PH L C 12

TIÊU CHU N CH T L NG CH T CHU N I CHI U CALOPHYLLOLID $C_{26}H_{24}O_5$

1. C u trúc

Công th c c u t o:



Công th c phân t : $C_{26}H_{24}O_5$

Phân t l ng: 416,5.

Tên khoa h c: 5-methoxy-2, 2-dimethyl-6-[(2E)-2-methylbut-2-enoyl]-10-phenyl-2H, 8Hpyrano [2, 3-f]chromen-8-one.

2. Ki m tra ch t l ng nguyên li u

2.1. Tính ch t: ch p h m là tinh th không màu, d tan trong aceton, benzen, ether ethylic, alcol.

2.2. nh tính:

2.2.1. Ph h p th t ngo i và kh ki n:

Ti n hành theo ph l c 4.1. D VN IV. Chu n b dung d ch m u th trong *ethanol* (TT) có n ng 0,5 $\mu\text{g/ml}$. Ph h p th t ngo i và kh ki n c a ch p h m thu c trong d i sóng t 220 nm n 350 nm ph i có các c c i h p thu : 235, 270 và 295 nm.

2.2.2. Ph h ng ngo i:

Ti n hành theo ph l c 4.2. D VN IV. Chu n b m u b ng cách t o viên nén KBr. Ph h ng ngo i c a ch ph m ph i có các nh có s sóng: 1726, 1662, 1579, 1133, 759, 702 cm^{-1} .

2.2.3. Ph kh i l ng:

Ph kh i l ng EI-MS (70 eV) c a m u th ph i có các pic m/z 416 $[\text{M}]^+$, 401 (pic c n b n), m/z 83, 55.

2.2.4. Ph c ng h ng t h t nhân:

Ph ^{13}C -NMR và ph ^1H -NMR c a m u th ph i phù h p v i ph ^{13}C -NMR và ph ^1H -NMR theo ph l c ính kèm.

2.3. i m ch y: Ti n hành theo ph l c 6.7 – D VN IV

Tiêu chu n ch p nh n: 154-156 $^{\circ}\text{C}$.

2.4. tinh khi t:

2.4.1. Xác nh t p ch t h u c :

Ph ng pháp s c ký l ng. Ti n hành theo ph l c 5.3. D VN IV.

Pha ng: H n h p acetonitril: n c v i ch ng trình dung môi

Th i gian (phút)	% acetonitril	% n c
0	50	50
20	90	10
30	100	0
37	100	0
45	50	50
55	50	50

Chu n b dung môi pha m u: Acetonitril – N c (50 : 50)

Chu n b dung d ch th : Cân chính xác kho ng 1,5 mg ch ph m vào bình nh m c 25 ml, thêm 20 ml dung môi pha m u, siêu âm hòa tan trong 30 phút, b sung dung môi pha m u v a 25 ml, l c qua màng l c 0,45 μm .

i u ki n s c ký:

Cột: Gemini NX C-18 bằng thép không gỉ (15 cm x 4,6 mm x 5 µm).

Detector dãy diod quang (270 nm).

Tốc độ dòng: 0,6 ml/phút.

Thể tích tiêm: 5 µl.

Cách tiến hành:

Tiêm dung môi pha mẫu. Tiêm 6 lần dung dịch thử. Sử dụng lý thuyết các pic calophyllolid và các tạp chất hữu cơ phi không dễ dàng phân giải để phân giải các pic calophyllolid và pic tạp chất hữu cơ nặng như tạp chất phi không dễ dàng phân giải thành 2%. Tính hàm lượng phần trăm các tạp chất hữu cơ trong mẫu theo công thức: $100 (r_U/r_T)$ trong đó: r_U là tổng diện tích các pic thử trong sắc ký của dung dịch thử ngoại trừ pic của calophyllolid, r_T là tổng diện tích các pic thử trong sắc ký của dung dịch thử ngoại trừ pic của dung môi pha mẫu.

Tiêu chuẩn chấp nhận: Không quá 3,8% tính theo thành phần nguyên tử.

2.4.2. Xác định tạp chất bay hơi (nước và các dung môi hữu cơ)

Phương pháp phân tích nhiệt trọng lượng. Tiến hành theo USP.

Tốc độ gia nhiệt: 6 °C/phút.

Khoảng nhiệt độ: 30-150 °C.

Khí: Nitrogen.

Tốc độ dòng: 100 ml/phút.

Tiêu chuẩn chấp nhận: Không quá 1,1%

2.4.3. Xác định tạp chất vô cơ (Chì, arsen, thủy ngân)

Phương pháp ICP-MS. Tiến hành theo phần IX D của Dược điển Trung Quốc 2010.

Công suất ICP RF: 1300 W

Tốc độ khí nebulizer: 0,55 l/phút

Tốc độ khí plasma: 15 l/phút

Dwell: 15 ms

Tiêu chuẩn chấp nhận: Không quá 20 ppm

2.5. nh l ng

% Calophylloid = 100% – (% t p ch t h u c) – (% t p ch t bay h i) – (% t p ch t v o c)

Tiêu chu n ch p nh n: Không ít h n 95% $C_{26}H_{24}O_5$

3. B o qu n

ng trong l th y tinh màu nâu kín, tránh ánh sáng, nhi t 2-8 °C.

Quy cách óng gói: 10 mg/l .

K T Q U PHÂN TÍCH CH T L NG CH T CHU N I CHI U
CALOPHYLLOLID

Ch tiêu	M c ch t l ng	K t qu	K t lu n
Tính ch t nh tính	Ch p h m là tinh th không màu, , d tan trong aceton, benzen, ether ethylic, alcol.	Tinh th không màu, d tan trong aceton, benzen, ether ethylic, alcol.	t
<i>Ph UV-Vis</i>	Ph h p th t ngo i và kh ki n c a ch p h m thu c trong d i sóng t 220 nm n 350 nm ph i có các c c i h p thu : 235, 270 và 295 nm	233, 269 và 294 nm.	t
<i>Ph IR</i>	Ph h ng ngo i c a ch p h m ph i có các nh có s sóng: 1726, 1662, 1579, 1133, 759, 702 cm ⁻¹ .	1726, 1662, 1581, 1134, 758, 700 cm ⁻¹ .	t
<i>Ph MS</i>	Ph kh i l ng EI-MS (70 eV) c a m u th ph i có các pic m/z 416 [M] ⁺ , <u>401</u> , m/z 83, 55.	m/z 416 [M] ⁺ , <u>401</u> , m/z 83, 55.	t
<i>Ph NMR</i>	Ph ¹³ C-NMR và ph ¹ H-NMR c a m u th ph i phù h p v i ph ¹³ C-NMR và ph ¹ H-NMR theo tài li u tham kh o.	¹ H-NMR (CD ₃ Cl ₃ , 300 MHz): 7,26 <i>m</i> x 2; 7,40 <i>m</i> x 2; 0,97 <i>s</i> x 2; 1,9 <i>d</i> (6,3); 2,01 <i>s</i> ; 5,48 <i>d</i> (9,9); 6,02 <i>s</i> ; 6,45 <i>d</i> (9,6), 6,57 <i>q</i> (6,0). ¹³ C-NMR (CD ₃ Cl ₃ , 75 MHz): 10,7; 15,2; 26,8 x 2; 63,0; 77,4; 105,6; 110,7; 114,2; 115,0; 115,9; 127,2 x 2; 127,5 x 2; 127,7; 129,0; 139,5; 139,9; 144,2; 151,7; 152,0; 155,0; 155,8; 159,4; 194,3.	t
i m ch y	154-156 °C	155,6 °C.	t
T p ch t h u c	Không quá 3,8%	3,59%.	t
T p ch t bay h i	Không quá 1,1%	1,05%.	t
T p ch t vô c	Không quá 20 ppm	Pb: Không phát hi n (MDL: 2,49 ppb). As: Không phát hi n (MDL: 4,69 ppb). Hg: Không phát hi n (MDL: 0,56 ppb).	t
nh l ng	Không ít h n 95%	95,42%.	t

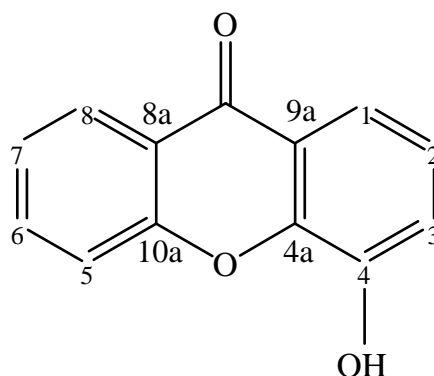
PH L C 13

TIÊU CHU N CH T L NG CH T CHU N I CHI U

4-HYDROXYXANTHON $C_{13}H_8O_3$

1. C u trúc

Công th c c u t o:



Công th c phân t : $C_{13}H_8O_3$

Phân t l ng: 212,2.

Tên khoa h c: 4-hydroxy-9H-xanthen-9-one

2. Ki m tra ch t l ng nguyên li u

2.1. Tính ch t: Ch p h m là tinh th hình kim, không màu, d tan trong aceton, methanol.

2.2. nh tính

2.2.1. Ph h p th t ngo i và kh ki n:

Ti n hành theo ph l c 4.1. D VN IV. Chu n b dung d ch m u th trong *methanol* (TT) có n ng 0,6 $\mu\text{g/ml}$. Ph h p th t ngo i và kh ki n c a ch p h m thu c trong d i sóng t 220 nm n 400 nm ph i có các c c i h p thu : 231, 248 và 348 nm.

2.2.2. Ph h ng ngo i:

Ti n hành theo ph l c 4.2. D VN IV. Chu n b m u b ng cách t o viên nén KBr. Ph h ng ngo i c a ch p h m ph i có các nh có s sóng: 3197, 1652, 1589, 1292, 754, 729 cm^{-1} .

2.2.3. Ph kh i l ng:

Ph kh i l ng EI-MS (70 eV) c a m u th ph i có các pic m/z 212 $[M]^+$ (pic c n b n), m/z 184, 155, 128, 102, 63.

2.2.4. Ph c ng h ng t h t nhân:

Ph ^{13}C -NMR và ph ^1H -NMR c a m u th ph i phù h p v i ph ^{13}C -NMR và ph ^1H -NMR theo ph l c ính kèm.

2.3. i m ch y: Ti n hành theo ph l c 6.7 D VN IV

Tiêu chu n ch p nh n: 228-230 °C.

2.4. tnh khi t

2.4.1. Xác nh t p ch t h u c

Ph ng pháp s c ký l ng. Ti n hành theo ph l c 5.3 D VN IV

Pha ng: H n h p acetonitril: n c v i ch ng trình dung môi

Th i gian (phút)	% acetonitril	% n c
0	50	50
20	90	10
30	100	0
37	100	0
45	50	50
55	50	50

Chu n b dung môi pha m u: Acetonitril – N c (50 : 50)

Chu n b dung d ch th : Cân chính xác kho ng 2,5 mg ch p h m vào bình nh m c 25 ml, thêm 20 ml dung môi pha m u, siêu âm hòa tan trong 3 phút, thêm dung môi pha m u v a 25 ml, l c qua màng l c 0,45 μm .

i u ki n s c ký:

C t: Gemini NX C-18 b ng thép không g (15 cm x 4,6 mm x 5 μm) ho c t ng ng.

Detector chu i diod quang (280 nm).

Tốc độ dòng: 0,6 ml/phút.

Thể tích tiêm: 5 μ l.

Cách tiến hành:

Tiêm dung môi pha mẫu. Tiêm 6 l n dung dịch thử. Sử dụng lý thuyết các pic 4-hydroxyxanthone và các tạp chất hữu cơ phi không đ i 2000, phân giải các pic 4-hydroxyxanthone và pic tạp chất hữu cơ gần nhất phi không đ i 1,5, để kiểm tra chất lượng của di n tích pic 4-hydroxyxanthone và các tạp chất hữu cơ không đ i n h n 2%. Tính hàm lượng phần trăm các tạp chất hữu cơ trong mẫu theo công thức: $100 (r_U/r_T)$ trong đó: r_U là tổng diện tích các pic thu được trong số ký của dung dịch thử ngoại trừ pic của 4-hydroxyxanthone, r_T là tổng diện tích các pic thu được trong số ký của dung dịch thử ngoại trừ pic của dung môi pha mẫu.

Tiêu chuẩn chấp nhận: Không quá 6,0% tính theo chất lượng nguyên tử

4.2. Xác định tạp chất bay hơi

Phương pháp phân tích nhiệt trọng lượng. Tiến hành theo USP 34.

Tốc độ gia nhiệt: 6 °C/phút.

Khoảng nhiệt độ: 30-150 °C.

Khí: Nitrogen.

Tốc độ dòng: 100 ml/phút.

Tiêu chuẩn chấp nhận: Không quá 1,0%

5. Độ tinh khiết

%4-hydroxyxanthone = 100% - (% tạp chất hữu cơ) - (% tạp chất bay hơi)

Tiêu chuẩn chấp nhận: Không ít hơn 90% $C_{13}H_8O_3$

K T Q U PHÂN TÍCH CH T L NG CH T CHU N I CHI U
4-HYDROXYXANTHON

Ch tiêu	M c ch t l ng	K t qu	K t lu n
Tính ch t nh tính	Ch ph m là tinh th hình kim, không màu. D tan trong aceton, methanol	Tinh th hình kim, không màu. D tan trong aceton, methanol	t
<i>Ph UV-Vis</i>	Ph h p th t ngo i và kh ki n c a ch ph m thu c trong d i sóng t 220 nm n 400 nm ph i có các c c i h p thu : 231, 248 và 348 nm	231, 248 và 348 nm.	t
<i>Ph IR</i>	Ph h ng ngo i c a ch ph m ph i có các nh có s sóng: 3197, 1652, 1589, 1292, 754, 729 cm ⁻¹ .	3197, 1652, 1589, 1292, 754, 729 cm ⁻¹ .	t
<i>Ph MS</i>	Ph kh i l ng EI-MS (70 eV) c a m u th ph i có các pic <i>m/z</i> 212 [M] ⁺ , <i>m/z</i> 184, 155, 128, 102, 63.	<i>m/z</i> 212 [M] ⁺ , <i>m/z</i> 184, 155, 128, 102, 63.	t
<i>Ph NMR</i>	Ph ¹³ C-NMR và ph ¹ H-NMR c a m u th ph i phù h p v i ph ¹³ C-NMR và ph ¹ H-NMR theo tài li u tham kh o.	¹ H-NMR (CD ₃ OD, 500 MHz): 7,73 <i>dd</i> (8,0; 2,0); 7,25 <i>t</i> (8,0); và 7,31 <i>dd</i> (8,0; 1,5); 7,68 <i>dd</i> (8,5; 0,5); 7,83 <i>dt</i> (8,5; 1,5); 7,44 <i>dt</i> (7,5; 1,0); và 8,26 <i>dd</i> (8,0; 2,0). ¹³ C-NMR (CD ₃ OD, 125 MHz): 179,2; 157,4; 147,9; 147,1; 136,4; 127,3; 125,3; 125,1; 123,6; 122,5; 121,5; 119,4; 117,1.	t
i m ch y	228-230 °C	229,1°C.	t
T p ch t h u c	Không quá 6,0%	5,57%.	t
T p ch t bay h i	Không quá 1,0%	0,52%.	t
nh l ng	Không ít h n 90%	93,91%.	t

PH L C 14
QUY TRÌNH XÁC NH CALOPHYLLOLID
TRONG CAO METHANOL T NH A MÙ U B NG
PH NG PHÁP GC-MS

Cao nh a Mù u i u ch b ng ph ng pháp chi t v i *methanol -n c* (9:1) nh a Mù u lo i ra khi tinh ch d u Mù u.

Mô t

Cao nh a Mù u có th ch t m m, ng nh t. Màu nâu s m. Mùi c bi t.

nh tính

Trong ph n xác nh hàm l ng calophyllolid, trên s c ký c a dung d ch th ph i có pic có th i gian l u t ng ng v i th i gian l u c a pic calophyllolid trên s c ký c a dung d ch i chi u (khác bi t v th i gian l u ph i trong kho ng $\pm 2\%$). Ph i có các m nh ion phân t m/z 416, pic c n b n m/z 401, m nh ion m/z 83 và 55.

Hàm l ng calophyllolid

Ti n hành trong i u ki n tránh ánh sáng

Ph ng pháp s c ký khí ghép ph kh i

Dung d ch th : Cân chính xác kho ng 0,04 g cao methanol vào ng eppendorf, thêm chính xác 2,0 ml *methanol (TT)*, l c xoáy 1 phút r i siêu âm trong 10 phút. Ly tâm 8000 vòng/phút trong 5 phút. Hút chính xác 1,0 ml d ch methanol cho vào bình nh m c 10,0 ml r i pha loãng b ng *methanol (TT)* n nh m c. L c u.

Dung d ch chu n i chi u: Hòa tan ch t chu n i chi u calophyllolid trong *methanol (TT)* c dung d ch có n ng 12,5 $\mu\text{g/ml}$.

i u ki n s c ký:

C t s c ký: DB-5MS 25 m x 0,22 mm ID, $d_f = 5 \mu\text{m}$.

Khí mang: *heli dùng cho s c ký (TT)* v i t c dòng 1,43 ml/phút

Ki u b m m u: không chia dòng

Nhiệt độ:

	Thời gian (phút)	Nhiệt độ (°C)
Cột	0	80
	5,5	300
	14,5	300
Buồng tiêm mẫu		250
Nguồn ion		250
Giao diện		200

Kiểm soát ion : Bền phát hiện

Khoảng quét : 50-550 amu

Kiểm soát dữ liệu : SCAN và SIM

Các ion chính : Ion chính m/z 401; ion tham chiếu m/z 83 và 55

Thể tích tiêm mẫu : 1 μ l

Cách tiến hành:

Phương pháp có giá trị khi hàm lượng capic chính trên sắc ký của dung dịch chuẩn ít nhất không quá 2 và độ lệch phần trăm (%) các ion m/z 55, 83, 416 trong dung dịch chuẩn ít nhất và dung dịch thử không quá 20%.

Tiêm lần lượt dung dịch thử và dung dịch chuẩn ít nhất vào máy GC-MS và ghi sắc ký. Phân tích bằng cách so sánh thời gian lưu và các mảnh ion của dung dịch thử và dung dịch chuẩn ít nhất kiểm soát dữ liệu SCAN.

Xác định hàm lượng phần trăm calophyllolid (X%), $C_{26}H_{24}O_5$, bằng cách so sánh cường độ mảnh m/z 401 của dung dịch thử và dung dịch chuẩn ít nhất trong kiểm soát dữ liệu SIM theo công thức:

$$X\% \text{ (g/100 g)} = (A_t/A_c) \times (C \times D)/m_t \times 0,1$$

A_t : Cường độ mảnh m/z 401 của dung dịch thử

A_c : Cường độ mảnh m/z 401 của dung dịch chuẩn ít nhất

C : Hàm lượng calophyllolid trong dung dịch chuẩn ít nhất (μ g/ml)

D : Độ pha loãng

m_t : Khối lượng mẫu thử (mg)

PH L C 15

QUY TRÌNH XÁC NH CALOPHYLLOLID

TRONG V QU MÙ U B NG PH NG PHÁP GC-MS

X lý m u

Xay v qu thành b t b ng máy nghi n và rây thu c các h t có kích th c trung bình là 1,84 mm xác nh theo ph ng pháp D c i n M 30 (2007).

Ti n hành trong i u ki n tránh ánh sáng

Cân chính xác kho ng 5 g b t v qu cho vào ng chi t c t l c 10 μm m t u, k n là l p bông th y tinh, thêm các h t th y tinh dày 1-2 mm h n ch kho ng tr ng trong ng, ti p t c cho l p bông th y tinh và l c 10 μm u kia.

i u ki n chi t

Thi t b chi t l ng d i áp su t: ASE-100-Dionex

Áp su t : 1500 psi

Nhi t : 120 °C

Th i gian chi t : 15 phút

Chu k chi t : 1

Th tích r a : 60%

Th i gian làm s ch h th ng b ng khí nitrogen : 90 giây

Cô d ch chi t d i áp xu t gi m 40 °C r i nh m c n 100 ml b ng *methanol* (TT). L c d ch chi t b ng gi y l c Whatman 40 (D ch chi t V).

nh tính

Trong ph n xác nh hàm l ng calophyllolid, trên s c ký c a dung d ch th ph i có pic có th i gian l u t ng ng v i th i gian l u c a pic calophyllolid trên s c ký c a dung d ch chu n i chi u (khác bi t v th i gian l u ph i trong kho ng $\pm 2\%$). Ph i có các m nh ion phân t m/z 416, pic c n b n m/z 401, m nh ion m/z 83 và 55.

Hàm lượng calophyllolid

Ti n hành trong i u ki n tránh ánh sáng

Ph ng pháp s c ký khí ghép ph kh i

Dung d ch th : D ch chi t V.

Dung d ch chu n i chi u: Hòa tan ch t chu n i chi u calophyllolid trong methanol (TT) c dung d ch có n ng 12,5 µg/ml.

i u ki n s c ký:

C t s c ký: DB-5MS 25 m x 0,22 mm ID, $d_f = 5 \mu\text{m}$.

Khí mang: heli dùng cho s c ký (TT) v i t c dòng 1,43 ml/phút

Ki u b m m u: không chia dòng

Nhi t :

	Th i gian (phút)	Nhi t (°C)
C t	0	80
	5,5	300
	17,5	300
Bu ng tiêm m u		250
Ngu n ion		250
Giao đ n		200

Ki u ion : B n phá i n t

Kho ng quét : 50-450 amu

Ki u thu đ li u : SCAN và SIM

Các ion nh l ng

- Ion ích : m/z 401

- Ion tham chi u : m/z 83, 55

Th tích tiêm m u : 1 µl

Cách ti n hành:

Phép th ch có giá tr khi h s i x ng c a pic chính trên s c ký c a dung d ch chu n i chi u không quá 2 và l ch c ng t ng i (%) các ion m/z

55, 83, 416 của calophyllolid trong dung dịch chuẩn i chi u và dung dịch th không quá 20%.

Tiêm l n l t dung dịch th và dung dịch chuẩn i chi u vào máy GC-MS và ghi s c ký . nh tính b ng cách so sánh th i gian l u và các m nh ion c a dung dịch th và dung dịch chuẩn i chi u ki u thu đ li u SCAN.

Xác nh hàm l ng ph n tr m calophyllolid (X%), $C_{26}H_{24}O_5$, b ng cách so sánh c ng m nh m/z 401 c a dung dịch th và dung dịch chuẩn i chi u ki u thu đ li u SIM theo công th c sau:

$$X\% = (A_t/A_c) \times (C \times D)/m_t \times 0,1$$

A_t : C ng m nh m/z 401 c a dung dịch th

A_c : C ng m nh m/z 401 c a dung dịch chuẩn i chi u

C : Hàm l ng calophyllolid trong dung dịch chuẩn i chi u ($\mu\text{g/mL}$)

D : pha loãng

m_t : Kh i l ng v qu em th (mg)

PH L C 16

QUY TRÌNH NH L NG CALOPHYLLOLID TRONG CH PH M “D U MÙ U INOPILO” B NG PH NG PHÁP HPLC-DAD

Ti n hành trong i u ki n tránh ánh sáng.

Ti n hành b ng ph ng pháp s c ký l ng theo D VN IV (Ph l c 5.3)

Dung d ch th : Cân chính xác kho ng 120 mg m u th cho vào bình nh m c 10 ml, làm m m u 60 °C trong 10 phút r i thêm 6 ml h n h p *methanol-n c (TT)* (9:1), siêu âm trong 15 phút. B sung h n h p *methanol-n c (TT)* (9:1) n th tích. L c m u qua l c 0,45 µm.

Dung d ch chu n i chi u: pha các dung d ch chu n calophyllolid trong *methanol (TT)* có n ng kho ng 75 µg/ml; 60 µg/ml và 45 µg/ml. L c m u qua l c 0,45 µm.

i u ki n s c ký:

Pha ng A: *Acetonitril (TT)*

Pha ng B: Dung d ch acid acetic 2%

Ti n hành ch y s c ký theo ch ng trình b ng sau:

Th i gian (phút)	Acetonitril (%)	Dung d ch acid acetic 2% (%)
0	20	80
30	80	20
35	20	80
40	20	80

C t thép không g (25 cm x 4,6 mm) c nh i pha t nh C₁₈ (5 µm), c t Zorbax là phù h p

T c dòng: 1 ml/phút. Th tích tiêm m u: 10 µl.

Nhi t c t: 40 °C.

Detector DAD t b c sóng 270 nm.

Cách tiến hành:

Kiểm tra tính phù hợp của hệ thống ký: Tiến hành sắc ký v i dung dịch chu n i chi u. Hệ số i x ng thu c t pic calophyllolid ph i n m trong kho ng 0,8-1,5, l ch chu n t ng i c a di n tích pic calophyllolid trong 6 l n tiêm l p l i không c quá 2,0 %, s a lý thuy t c a pic calophyllolid ph i không đ i 2000. Tiến hành sắc ký l n l t v i dung dịch chu n i chi u và dung dịch th .

V th bi u di n di n tích pic calophyllolid theo n ng c a calophyllolid trong các dung dịch chu n i chi u và xác l p ph ng trình h i quy tuy n tính, đ a vào ó tính n ng calophyllolid trong dung dịch th ($\mu\text{g/ml}$).

Tính hàm l ng ph n tr m (kl/kl) calophyllolid, $\text{C}_{26}\text{H}_{24}\text{O}_5$, trong ch ph m đ a vào di n tích pic thu c t dung dịch th , các dung dịch chu n i chi u và hàm l ng $\text{C}_{26}\text{H}_{24}\text{O}_5$ c a calophyllolid chu n i chi u theo công th c:

$$X\% (\text{g} / 100 \text{ g}) = C_t / m_t$$

C_t : N ng calophyllolid trong dung dịch th ($\mu\text{g/ml}$).

m_t : Kh i l ng m u th (mg).