

ĐẠI HỌC HUẾ
TRƯỜNG ĐẠI HỌC KHOA HỌC

ĐOÀN MẠNH DŨNG

**NGHIÊN CỨU TÁCH, ĐIỀU CHẾ CHẤT CHUẨN VÀ
XÂY DỰNG QUY TRÌNH PHÂN TÍCH MỘT SỐ
HỢP CHẤT THIÊN NHIÊN CÓ HOẠT TÍNH SINH HỌC**

Ngành: Hóa Phân tích

Mã số: 9 44 01 18

TÓM TẮT LUẬN ÁN TIẾN SĨ HÓA PHÂN TÍCH

Huế - Năm 2020

Công trình được hoàn thành tại Khoa Hóa học, Trường Đại học
Khoa học, Đại học Huế.

Người hướng dẫn khoa học: 1. PGS.TS. Nguyễn Đình Luyện
2. PGS.TS. Nguyễn Hữu Tùng

Phản biện 1:

Phản biện 2:

Phản biện 3:

Luận án sẽ được bảo vệ trước hội đồng cấp Đại học Huế
vào lúc g ngày năm

Có thể tìm hiểu luận án tại thư viện:

1. Thư viện Quốc gia Việt Nam
2. Thư viện Trường Đại học Khoa học, Đại học Huế

MỞ ĐẦU

Việt Nam nằm ở một trong những khu hệ thực vật phong phú nhất trên thế giới, khu vực rừng nhiệt đới Đông Nam Á. Nhiều nghiên cứu trên thế giới và ở Việt Nam về tách các HCTN có HTSH từ cây Diệp hạ châu, Đan sâm, Mật nhân... bằng sắc ký giấy, sắc ký cột và phân tích hàm lượng bằng HPLC. Một số nghiên cứu đã xây dựng quy trình phân tích HCTN có HTSH như acetogenin, tinh dầu bằng phương pháp GC-MS, LC-MS/MS. Về hướng tinh chế để thu được các chất tinh khiết cũng được nhiều nghiên cứu quan tâm, song chủ yếu là các PTN/các hãng dược chuyên ngành nghiên cứu và giá thành chất chuẩn có HTSH khá đắt. Trong khi đó, ở VN, cho đến nay, những nghiên cứu theo hướng này còn rất hạn chế. Xuất phát từ các vấn đề trên, luận án này được thực hiện nhằm mục đích đóng góp tích cực vào các hướng nghiên cứu ở trên.

Mục đích của nghiên cứu luận án:

Luận án này được thực hiện nhằm xây dựng được quy trình tách chiết, điều chế chất chuẩn và phân tích một số HCTN có HTSH từ một số cây thuốc phân bố ở các địa phương của nước ta: cây Diệp hạ châu, Đan sâm, Mật nhân, Măng cầu xiêm, Riêng đuôi nhon - một loài cây mới phát hiện.

Các nội dung nghiên cứu chính của luận án:

- Nghiên cứu xây dựng quy trình tách chiết các hợp chất phyllanthin, hypophyllanthin từ cây Diệp hạ châu (*P. urinaria* L.); hợp chất tanshinone I, cryptotanshinone, tanshinone IIA từ cây Đan sâm (*S. miltiorrhiza* B.) và hợp chất eurycomanone từ cây Mật nhân (*E. longifolia* J.) bằng các phương pháp sắc ký;

- Tinh chế các hợp chất thu được (phyllanthin, hypophyllanthin, tanshinone I, cryptotanshinone, tanshinone IIA, eurycomanone) để tạo ra các chất chuẩn cho phân tích định tính và định lượng chúng trong các dược liệu khác nhau;

- Xây dựng quy trình phân tích các hợp chất phyllanthin, hypophyllanthin, tanshinone I, cryptotanshinone, tanshinone IIA và eurycomanone bằng phương pháp sắc ký lỏng hiện đại LC-MS/MS, UPLC-DAD để có thể áp dụng cho các PTN phân tích ở nước ta;

- Nghiên cứu xác định hàm lượng các hợp chất có HTSH trong dịch chiết lá cây Măng cầu xiêm bằng phương pháp sắc ký hiện đại: sắc ký lỏng ghép nối với các detector khác nhau (qNMR, HPLC-PDA, MALDI-TOP HRMS) và các hợp chất có trong tinh dầu các bộ phận của cây Riêng đuôi nhon bằng phương pháp sắc ký khí ghép nối với detector khối phổ (GC-MS).

Chương 1. TỔNG QUAN

1.1. Giới thiệu về các hợp chất thiên nhiên có HTSH và một số cây thuốc

1.1.1. Giới thiệu chung

1.1.2. Các nghiên cứu về tách chiết một số hợp chất thiên nhiên có HTSH

1.1.3. Một số loài cây thuốc chứa các hợp chất thiên nhiên có HTSH

1.2. Các phương pháp phân tích các hợp chất thiên nhiên

1.2.1. Phương pháp sắc ký khí

1.2.2. Phương pháp sắc ký lỏng

1.3. Một số nghiên cứu liên quan đến luận án

Chương 2. NỘI DUNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Đối tượng và phạm vi nghiên cứu

2.2. Nội dung nghiên cứu

2.3. Thiết bị, dụng cụ và hóa chất

2.4. Phương pháp nghiên cứu

2.4.1. Thông tin về mẫu

2.4.2. Phương pháp chiết tách/phân lập

2.4.3. Phương pháp xác định cấu trúc và đặc trưng hóa - lý của HCTN

2.4.4. Phương pháp tinh chế HCTN để tạo ra chất chuẩn

2.4.5. PP đánh giá độ tinh khiết của chất chuẩn và dữ liệu chất chuẩn

2.4.6. Phương pháp phân tích các HCTN

2.4.7. Phương pháp đánh giá độ tin cậy của phương pháp phân tích

2.4.8. Phương pháp xử lý số liệu

Chương 3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. CHIẾT TÁCH VÀ XÁC ĐỊNH CẤU TRÚC CỦA CÁC HỢP CHẤT THIÊN NHIÊN

3.1.1. Chiết tách các HCTN từ cây Diệp hạ châu và đặc trưng cấu trúc

3.1.1.1. *Chiết tách và phân lập*

3.1.1.2. *Đặc trưng cấu trúc*

(i) **Hợp chất PU-1:** Dạng tinh thể hình kim, màu trắng; Nhiệt độ nóng chảy 128 – 130 °C; Dung dịch methanol có hấp thụ cực đại trong miền UV ở bước sóng 230 và 280 nm (phụ lục A5); Mảnh phân tử trong phổ khối (ESI-MS) có $m/z = 453,3 [M+Na]^+$ và mảnh này phù hợp với công thức phân tử $C_{24}H_{30}O_7$ (phụ lục A1). Dữ liệu phổ NMR nêu ở bảng 3.1 và phụ lục A2-A5. Các kết quả thu được cho phép khẳng định rằng, hợp chất PU-1 là hypophyllanthin.

(ii) **Hợp chất PU-2:** Dạng tinh thể hình kim, màu trắng; Nhiệt độ nóng chảy 94 - 96°C; Dung dịch methanol có hấp thụ cực đại trong miền UV ở bước

sóng 230 và 280 nm (phụ lục A10); Mảnh phân tử trong phổ khối (ESI-MS) có $m/z = 419 [M+H]^+$ và mảnh này phù hợp với công thức phân tử $C_{24}H_{34}O_6$ (phụ lục A6). Dữ liệu phổ NMR nêu ở bảng 3.2 và phụ lục A8, A9. Các kết quả thu được cho phép khẳng định rằng, hợp chất PU-2 là phyllanthin.

3.1.2. Chiết tách các HCTN từ cây Đan sâm và đặc trưng cấu trúc

3.1.2.1. Chiết tách và phân lập

3.1.2.2. Đặc trưng cấu trúc

(i) Hợp chất SM-1: Dạng bột màu đỏ; $[\alpha]_D^{25} = 90^\circ$ (c 1,0, $CHCl_3$); Nhiệt độ nóng chảy $182 - 183^\circ C$; Dung dịch methanol có hấp thụ cực đại trong miền UV ở bước sóng 220 và 270 nm (phụ lục A18); Mảnh phân tử trong phổ khối (ESI-MS) có $m/z = 297 [M+H]^+$ và mảnh này phù hợp với công thức phân tử $C_{19}H_{20}O_3$ (hình 3.17, phụ lục A19). Dữ liệu phổ NMR nêu ở bảng 3.3 và phụ lục A16, A17. Các kết quả thu được cho phép khẳng định rằng, hợp chất SM-1 là cryptotanshinone.

(ii) Hợp chất SM-2: Dạng bột màu đỏ; Nhiệt độ nóng chảy $202 - 204^\circ C$; Dung dịch methanol có hấp thụ cực đại trong miền UV ở bước sóng 225 và 270 nm (phụ lục A22); Mảnh phân tử trong phổ khối (ESI-MS) có $m/z = 295 [M+H]^+$ và mảnh này phù hợp với công thức phân tử $C_{19}H_{18}O_3$ (hình 3.18 và phụ lục A23). Dữ liệu phổ NMR nêu ở bảng 3.4. Các kết quả thu được cho phép khẳng định rằng, hợp chất SM-2 là tanshinon IIA.

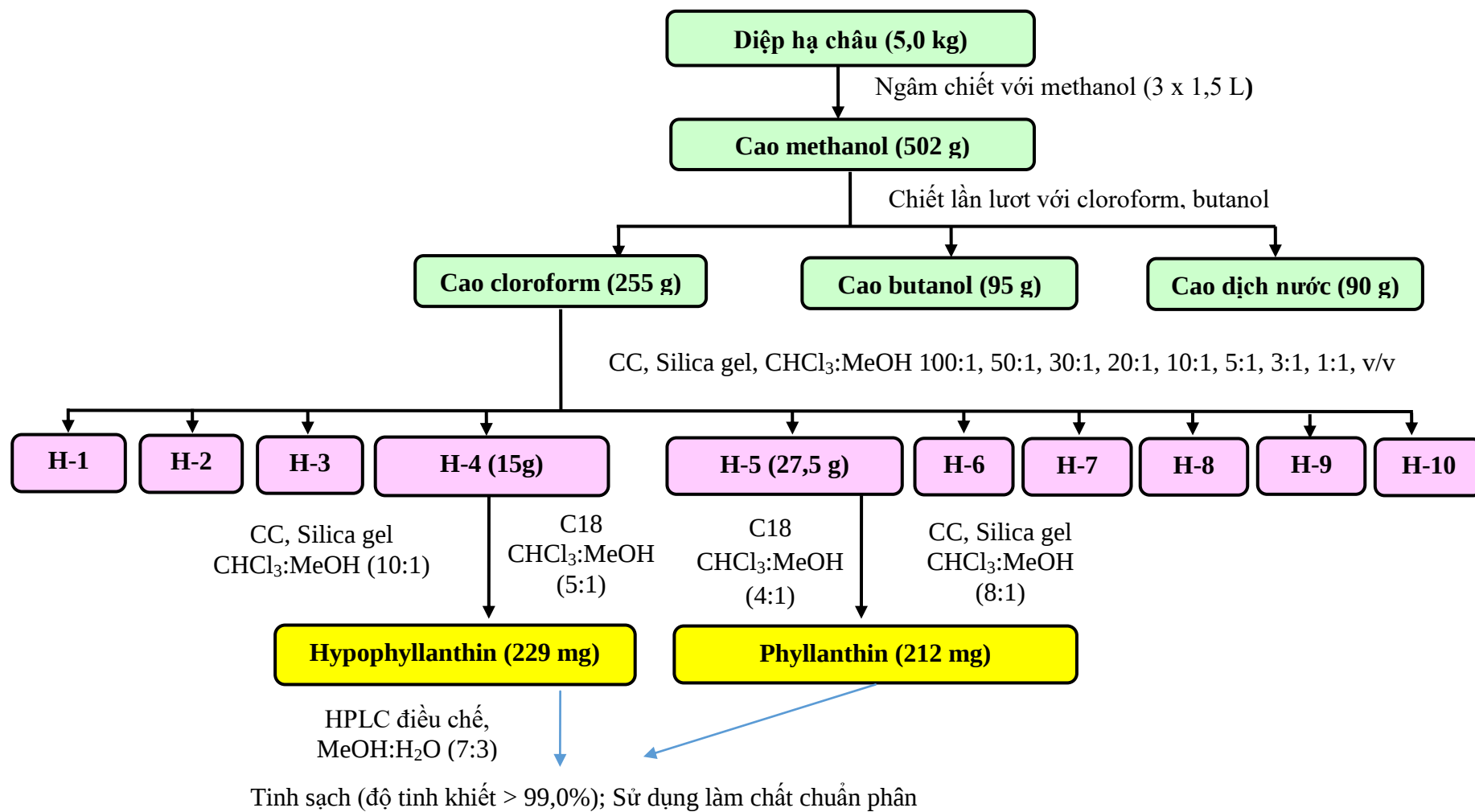
(iii) Hợp chất SM-3: Dạng bột màu đỏ; Nhiệt độ nóng chảy $232-234^\circ C$; Dung dịch methanol có hấp thụ cực đại trong miền UV ở bước sóng 250 nm (phụ lục A14); Mảnh phân tử trong phổ khối (ESI-MS) có $m/z = 277 [M+H]^+$ và mảnh này phù hợp với công thức phân tử $C_{18}H_{12}O_3$ (phụ lục A11). Dữ liệu phổ NMR nêu ở bảng 3.5 và phụ lục A12, A13. Các kết quả thu được cho phép khẳng định rằng, hợp chất SM-3 là tanshinon I.

3.1.3. Chiết tách các HCTN từ cây Mật nhân và đặc trưng cấu trúc

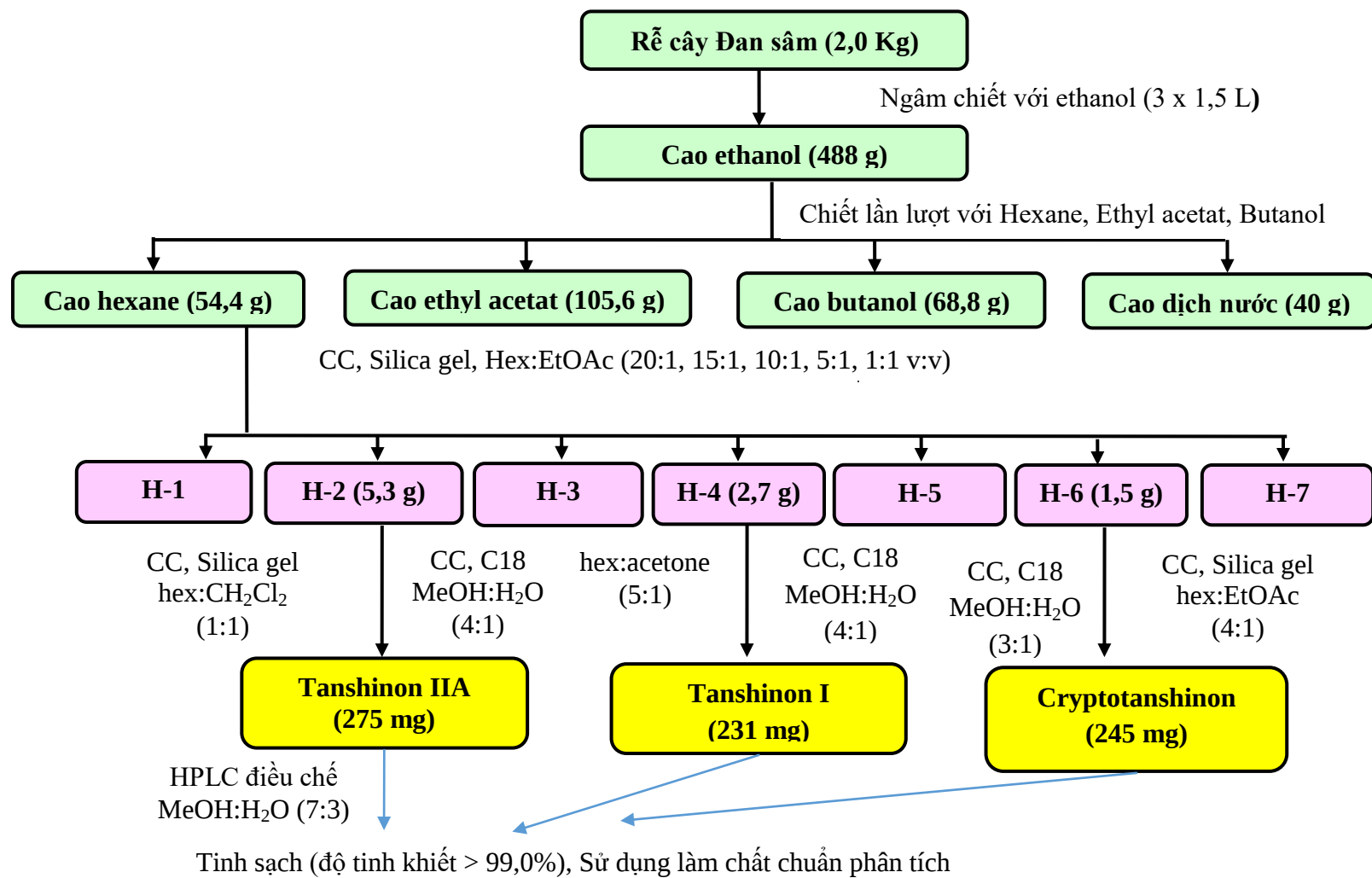
3.1.3.1. Chiết tách và phân lập

3.1.3.2. Đặc trưng cấu trúc

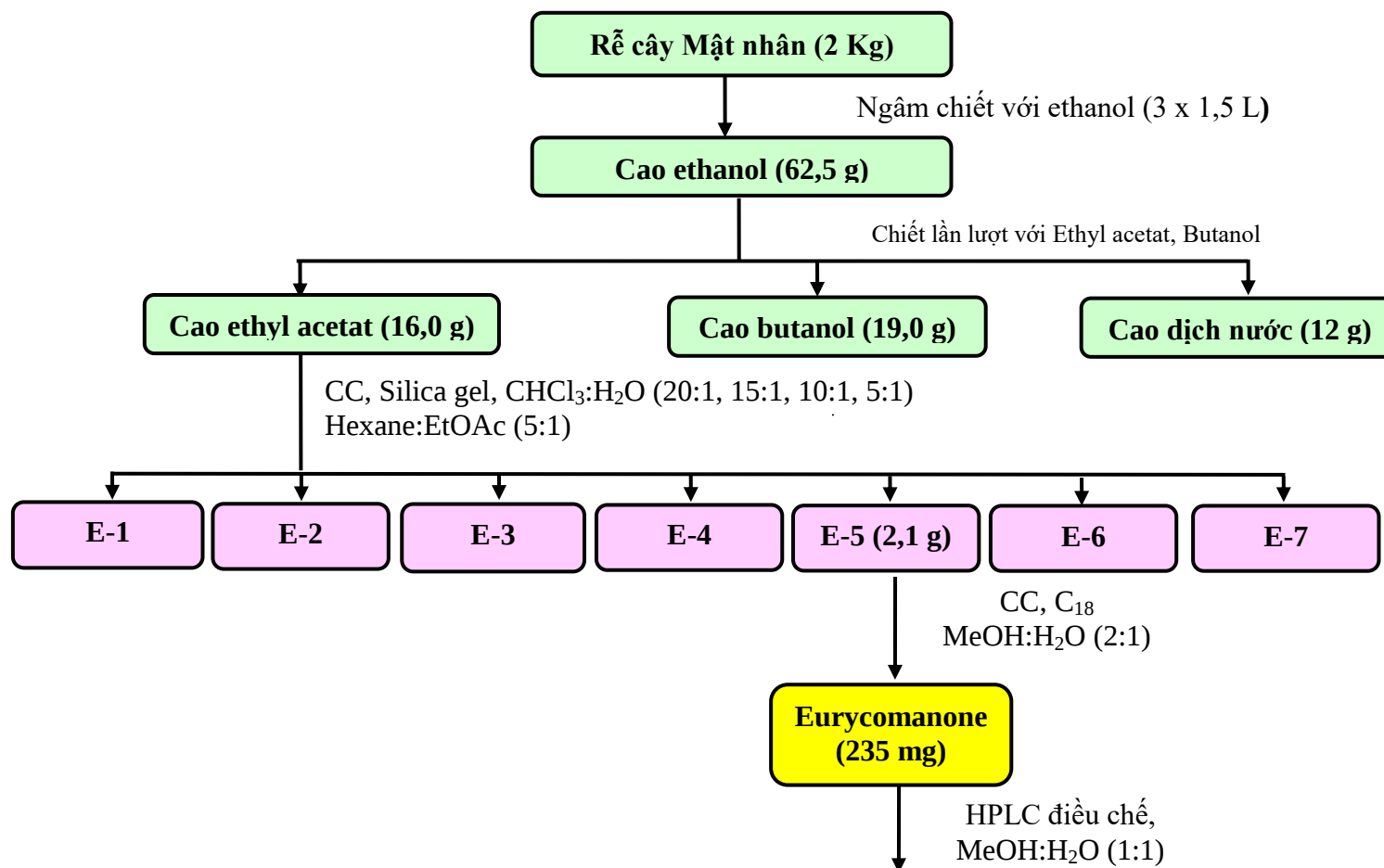
Hợp chất EL-1: Dạng bột màu trắng; $[\alpha]_D^{25} +26$ (c 0,30, MeOH); Nhiệt độ nóng chảy $254 - 255^\circ C$; Dung dịch methanol có hấp thụ cực đại trong miền UV ở bước sóng 255 và 360 nm (phụ lục A27); Mảnh phân tử trong phổ khối (ESI-MS) có $m/z = 409,1 [M+H]^+$ và mảnh này phù hợp với công thức phân tử $C_{20}H_{24}O_4$ (phụ lục A24). Dữ liệu phổ NMR nêu ở bảng 3.6 và phụ lục A25, A26. Các kết quả thu được cho phép khẳng định rằng, hợp chất EL-1 là eurycomanone.



Sơ đồ 3.1: Phân lập các hợp chất từ cây Diệp hạ châu



Sơ đồ 3.2. Phân lập các hợp chất từ rễ cây Đan sâm



Tinh sạch (độ tinh khiết > 99.0%): Sử dụng làm chất chuẩn phân tích

Sơ đồ 3.3: Phân lập các hợp chất từ rễ cây Mật nhân

3.2. TINH CHẾ HỢP CHẤT ĐỂ TẠO RA CHẤT CHUẨN

3.2.1. Chất chuẩn hypophyllanthin và phyllanthin

Bảng 3.1. Dữ liệu đánh giá độ tinh khiết của chất chuẩn

Hợp chất	Tập chất 1		Tập chất 2		Chất chính		Độ tinh khiết TB (%)
	t _R	S	t _R	S	t _R	S	
Hypophyllanthin	7,976	1,95	9,302	2,93	6,889	2433,43	99,8
Phyllanthin	6,902	6,36	9,251	10,75	8,001	3403,76	99,5

3.2.2. Chất chuẩn tanshinone I, cryptotanshinone, tanshinone IIA

Bảng 3.2. Dữ liệu đánh giá độ tinh khiết của chất chuẩn

Hợp chất	Tập chất 1		Tập chất 2		Chất chính		Độ tinh khiết TB (%)
	t _R	S	t _R	S	t _R	S	
Tanshinone I	5,10	1,46	8,62	2,51	7,78	1971,19	99,8
Cryptotanshinone	5,17	2,68	7,84	3,73	8,65	1275,13	99,5
Tanshinone IIA	8,69	3,81	12,79	4,66	15,19	2108,23	99,6

3.2.3. Chất chuẩn eurycomanone

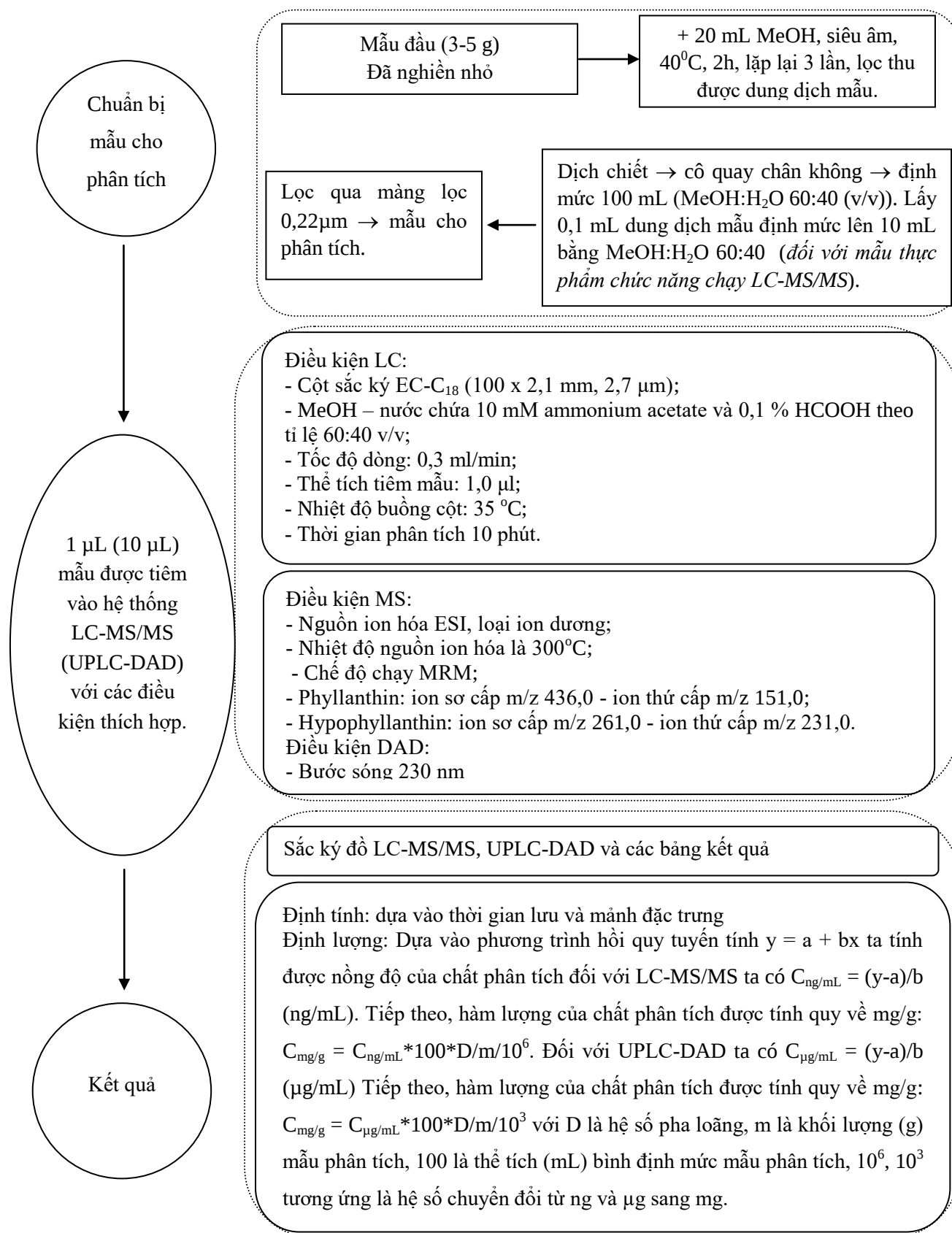
Bảng 3.3. Dữ liệu đánh giá độ tinh khiết của chất chuẩn eurycomanone

Hợp chất	Tập chất 1		Tập chất 2		Chất chính		Độ tinh khiết TB (%)
	t _R	S	t _R	S	t _R	S	
Eurycomanone	0,97	3,51	1,22	7,59	1,46	1839,25	99,4

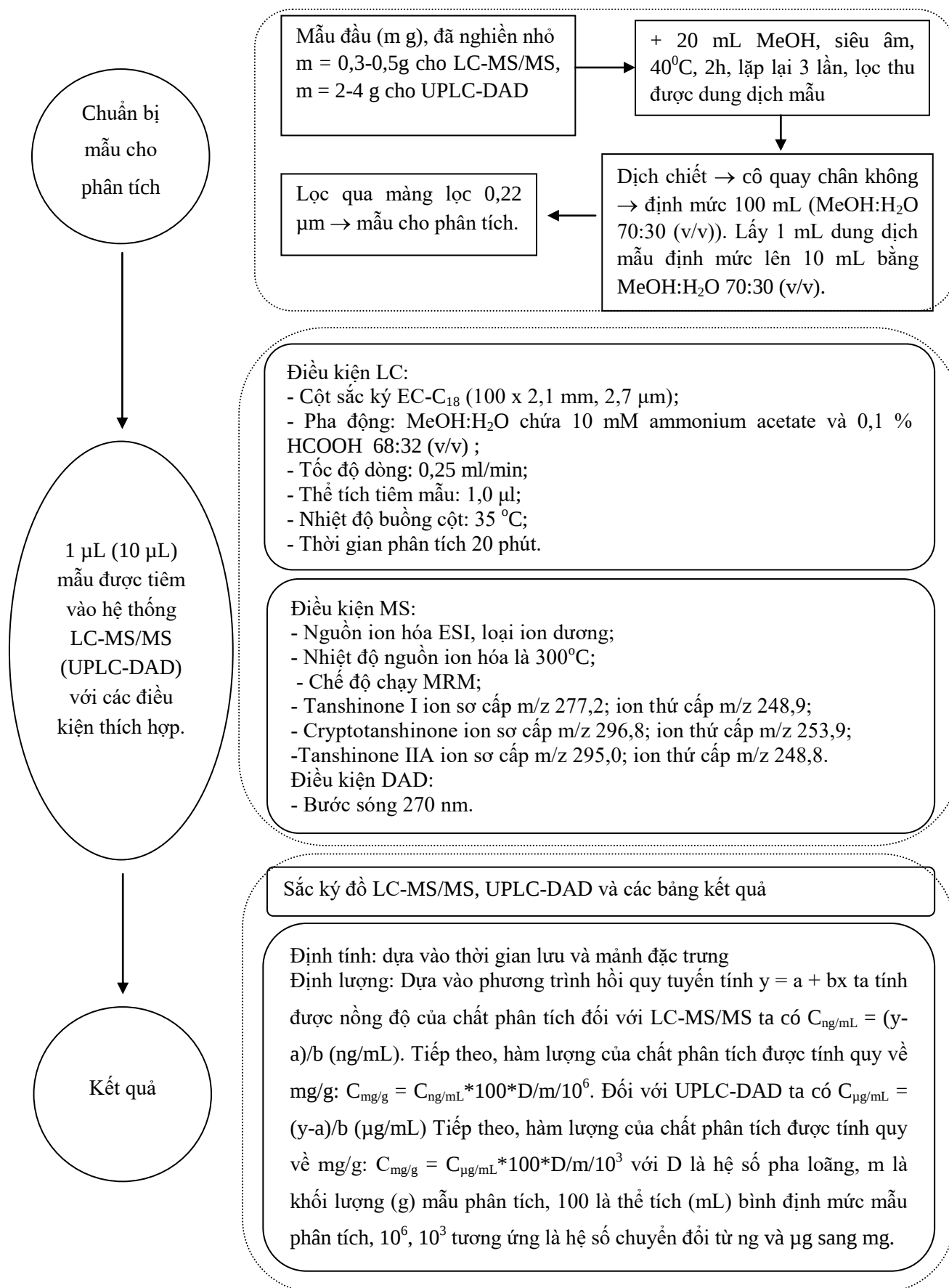
Như vậy, với quá trình tinh sạch bằng sắc ký lỏng điều chế ở trên, đã tạo ra được chất chuẩn hypophyllanthin, phyllanthin, tanshinone I, cryptotanshinone, tanshinone IIA và eurycomanone.

3.3. QUY TRÌNH PHÂN TÍCH HỢP CHẤT THIÊN NHIÊN CÓ HOẠT TÍNH SINH HỌC

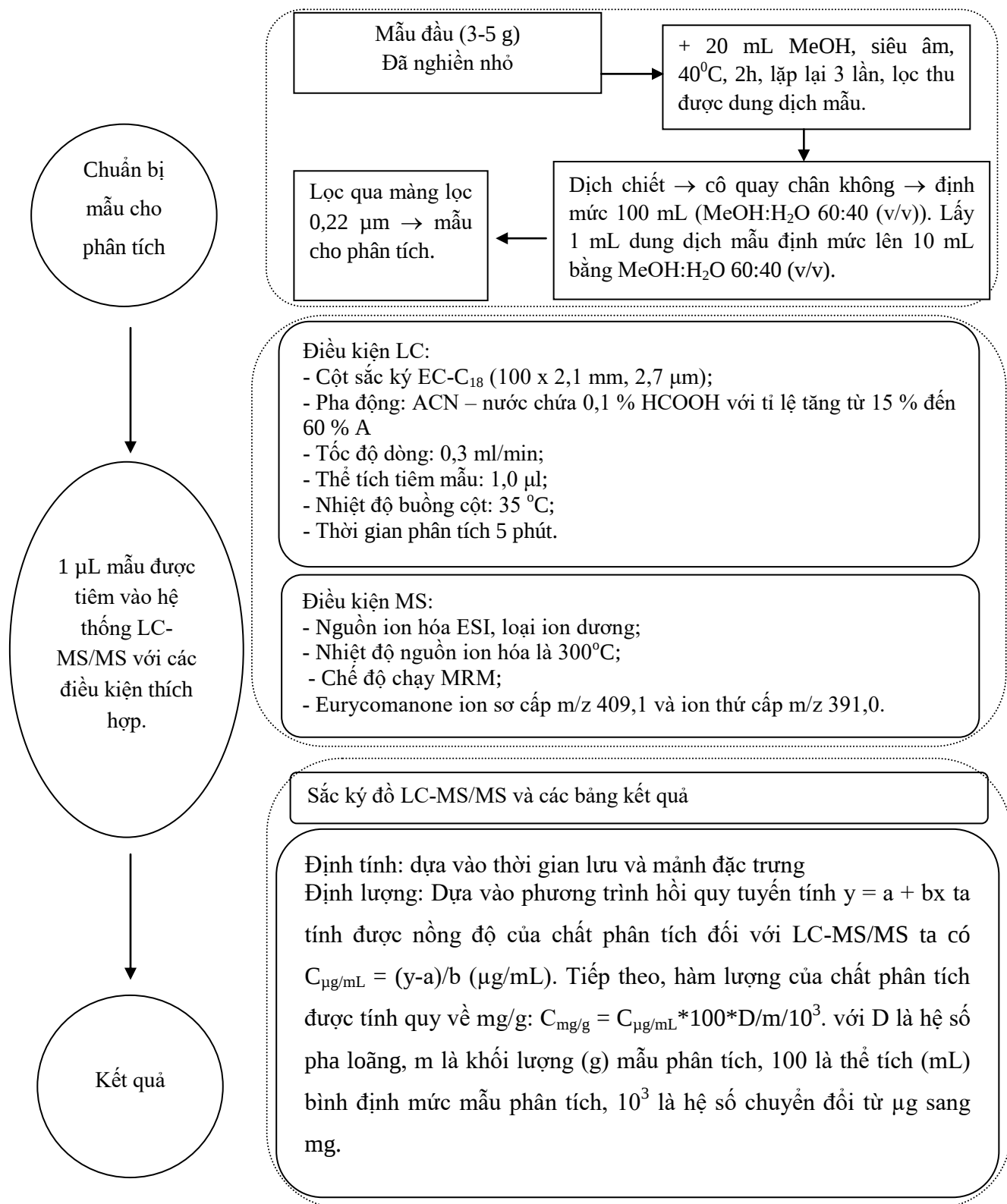
Trên cơ sở khảo sát các yếu tố ảnh hưởng đến phép phân tích LC-MS/MS như: thành phần pha động (hệ dung môi, pH dung dịch đệm), nhiệt độ cột, tốc độ dòng pha động, thể tích tiêm mẫu, thời gian phân tích...) kết hợp với tham khảo các kết quả đã công bố trong các tài liệu đã xây dựng được quy trình phân tích đồng thời hypophyllanthin và phyllanthin được nêu ở hình 3.13; quy trình phân tích đồng thời tanshinone I, cryptotanshinone và tanshinone IIA được nêu ở hình 3.14. Tương tự với quy trình khảo sát trên cũng đã đưa ra được quy trình phân tích eurycomanone trong mẫu cây Mật nhân bằng phương pháp LC-MS/MS.



Hình 3.1. Quy trình phân tích đồng thời hypophyllanthin và phyllanthin bằng phương pháp LC-MS/MS, UPLC-DAD (áp dụng cho mẫu cây Diệp hạ châu và thực phẩm chức năng bào chế từ nó)



Hình 3.2. Quy trình phân tích đồng thời tanshinone I, cryptotanshinone và tanshinone IIA bằng phương pháp LC-MS/MS, UPLC-DAD



Hình 3.3. Quy trình phân tích eurycomanone bằng phương pháp LC-MS/MS

3.4. ĐÁNH GIÁ PHƯƠNG PHÁP PHÂN TÍCH

3.4.1. Tính ổn định của hệ thống thiết bị

Thực hiện chạy sắc ký lặp lại 6 lần ($n = 6$) trên hệ thiết bị (LC-MS/MS và UPLC-DAD) đối với dung dịch chuẩn chứa hypophyllanthin và phyllanthin; tanshinone I, cryptotanshinone và tanshinone IIA, rồi xác định thời gian lưu (t), diện tích pic (S), hệ số đối xứng (A) và số đĩa lý thuyết (D) từ các sắc đồ thu được. Kết quả cho thấy, độ ổn định của hệ thống thiết bị rất tốt (bảng 3.10) với giá trị RSD của các tham số đều bé hơn 2%. Điều này cho thấy rằng các điều kiện sắc ký được chọn và hệ thống sắc ký LC-MS/MS được sử dụng là ổn định, phù hợp để phân tích định tính, định lượng hypophyllanthin và phyllanthin; tanshinone I, cryptotanshinone và tanshinone IIA; eurycomanone trong mẫu thực tế.

Bảng 3.4. Kết quả khảo sát tính ổn định của hệ thống thiết bị LC-MS/MS

Thí nghiệm	Hypophyllanthin				Phyllanthin			
	t	S	a	D	t	S	a	D
1	6,902	262,6327	0,98	40535	7,976	300,7612	1,01	44016
2	6,889	263,1130	1,01	40649	7,997	301,1024	0,99	44750
3	6,903	262,3435	1,02	40673	8,001	300,5615	0,99	49994
4	6,887	261,9856	1,01	40569	8,003	301,2019	1,02	49913
5	6,901	260,9899	0,98	40684	7,999	302,0199	0,98	51015
6	6,890	264,1241	0,99	40595	7,989	299,9845	1,03	50179
TB	6,90	262,5315	0,99	40617	7,994	300,9386	1,00	50144
RSD (%)	0,1	0,3	1,8	0,2	0,1	0,2	1,6	1,0

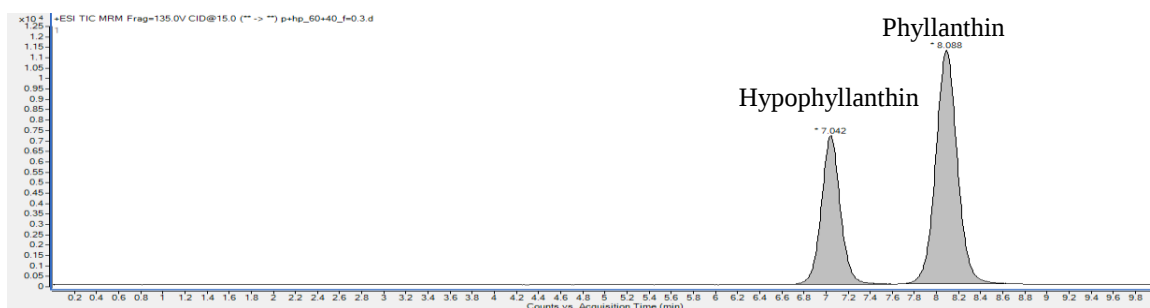
Bảng 3.5. Kết quả khảo sát độ ổn định của hệ thống thiết bị LC-MS/MS khi phân tích đồng thời tanshinone I, cryptotanshinone và tanshinone IIA (n = 6) (*)

TN	Tanshinone I				Cryptotanshinone				Tanshinone IIA			
	t	S	a	D	t	S	A	D	t	S	a	D
1	7,782	380,1	0,99	34535	8,66	367,7	0,98	30535	15,10	600,6	1,01	50016
2	7,785	379,9	1,02	32649	8,65	368,1	1,01	30649	15,18	599,2	0,99	49750
3	7,782	378,5	1,00	30673	8,62	367,5	1,02	30673	15,19	601,3	0,99	49994
4	7,785	381,2	1,01	36569	8,64	366,6	1,01	30569	15,19	598,9	1,02	49913
5	7,792	380,5	0,98	30684	8,63	367,9	0,98	30684	15,19	599,8	0,98	51015
6	7,846	379,6	0,98	33595	8,69	368,5	0,99	30595	15,19	603,8	1,03	50179
TB	7,795	379,97	0,99	33950	8,65	367,7	0,99	30617	15,17	600,6	1,00	50144
RSD (%)	0,3	0,2	1,6	3,5	0,3	0,2	1,8	0,2	0,2	0,3	1,6	1,0

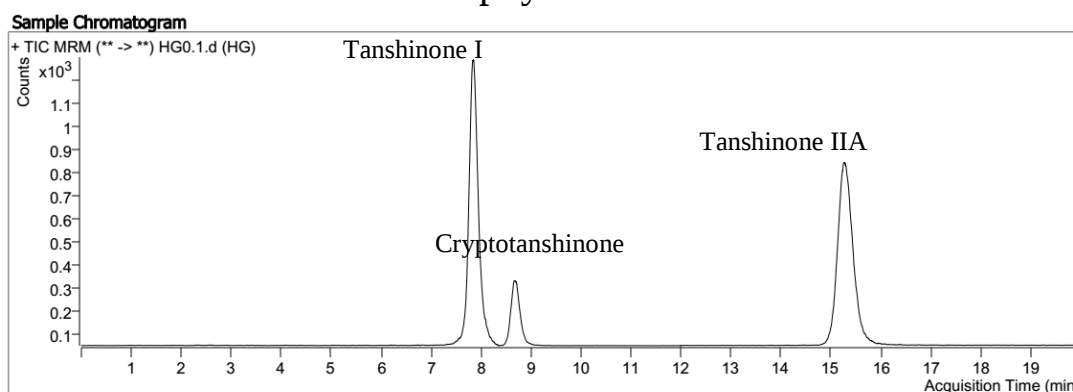
Bảng 3.6. Kết quả khảo sát độ ổn định của hệ thống thiết bị LC-MS/MS

TN	Eurycomanone			
	t	S	a	D
1	1,456	280,1	0,95	24535
2	1,454	279,9	1,02	24649
3	1,457	278,5	1,05	23673
4	1,456	281,2	1,04	26569
5	1,455	280,5	0,96	24684
6	1,454	279,6	0,94	23595
TB	1,455	279,97	0,99	24284
RSD (%)	0,1	0,3	4,9	5,0

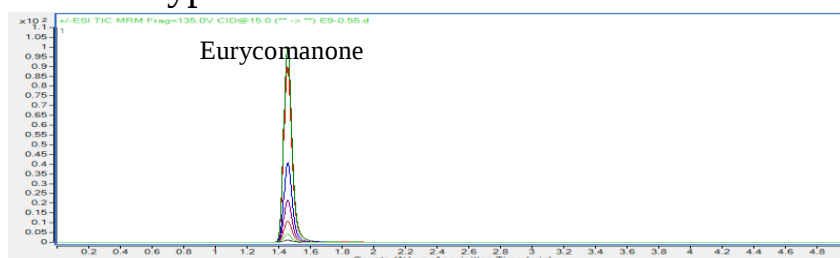
3.4.2. Độ đặc hiệu của phương pháp phân tích



Hình 3.4. Sắc đồ LC-MS/MS đối với dung dịch chuẩn chứa hypophyllanthin và phyllanthin



Hình 3.5. Sắc đồ LC-MS/MS đối với dung dịch chuẩn chứa tanshinone I, cryptotanshinone và tanshinone IIA.



Hình 3.6. Sắc đồ LC-MS/MS đối với dung dịch chuẩn chứa eurycomanone

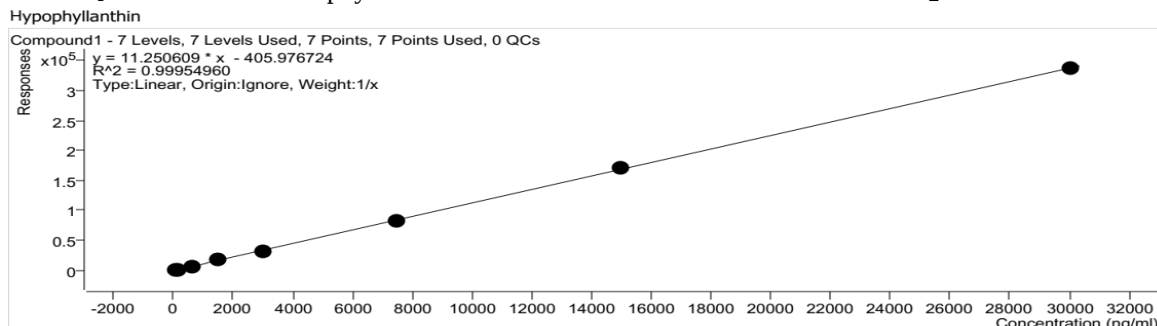
3.4.3. Khoảng tuyến tính

- **Đối với hypophyllanthin và phyllanthin:**

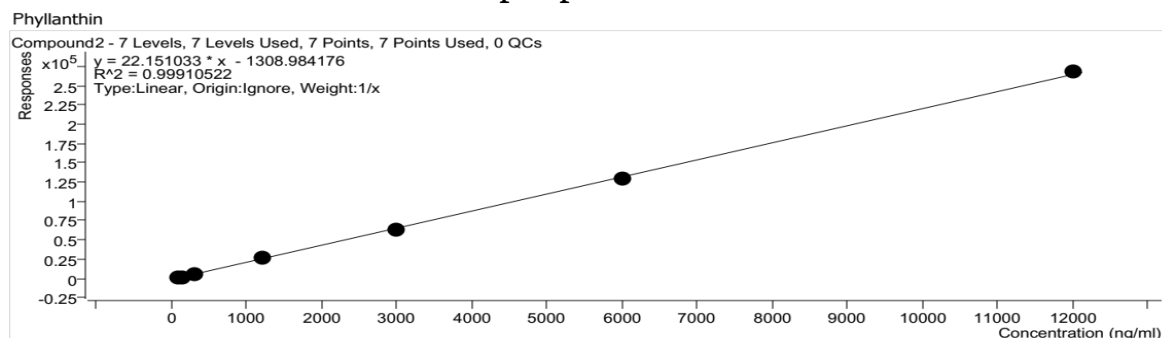
Phương pháp LC-MS/MS:

$$y = 11,251 \cdot C_{\text{hypophyllanthin}} - 405,977; R^2 = 0,9995; p < 0,0001;$$

$$y = 22,151 \cdot C_{\text{phyllanthin}} - 1308,984; R^2 = 0,9991; p < 0,0001;$$



Hình 3.7. Đường hồi quy tuyến tính đối với hypophyllanthin trong phương pháp LC-MS/MS



Hình 3.8. Đường hồi quy tuyến tính đối với phyllanthin trong phương pháp LC-MS/MS

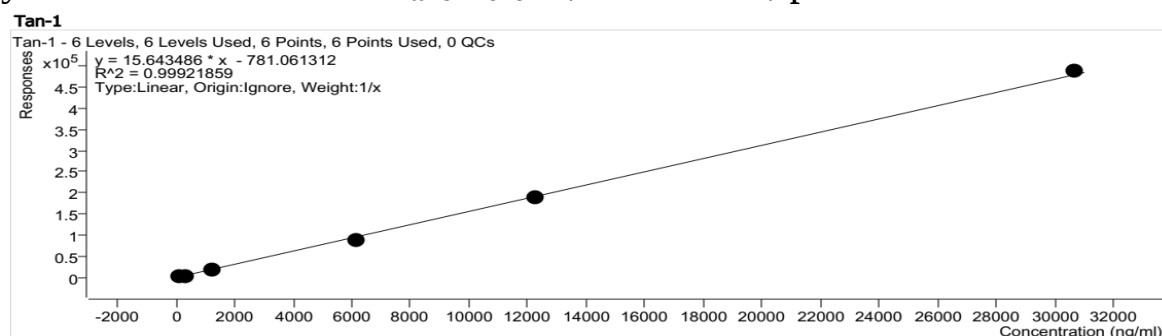
- **Đối với tanshinone I, cryptotanshinone, tanshinone IIA:**

Phương pháp LC-MS/MS:

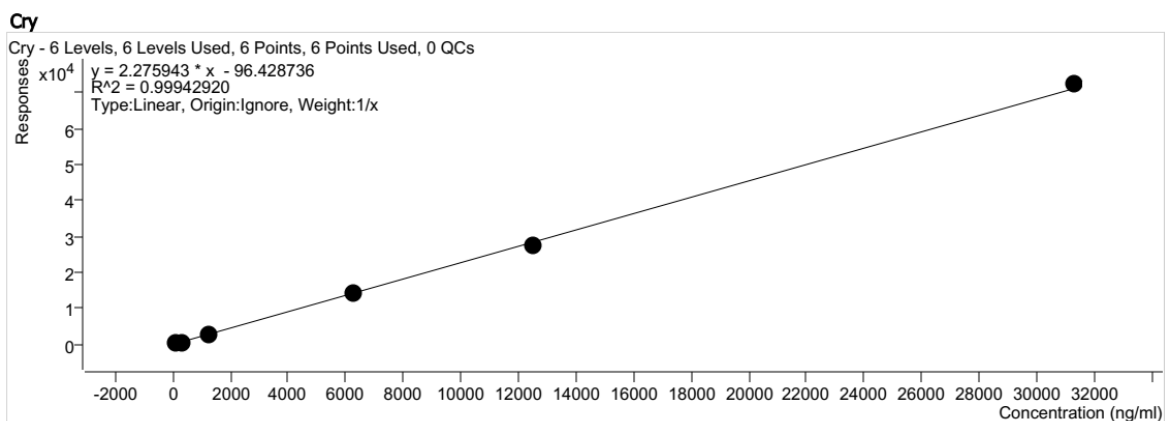
$$y = -781,061 + 15,643 \cdot C_{\text{tanshinone I}}, R^2 = 0,999; p < 0,0001$$

$$y = -96,429 + 2,276 \cdot C_{\text{cryptotanshinone}}, R^2 = 0,999; p < 0,0001$$

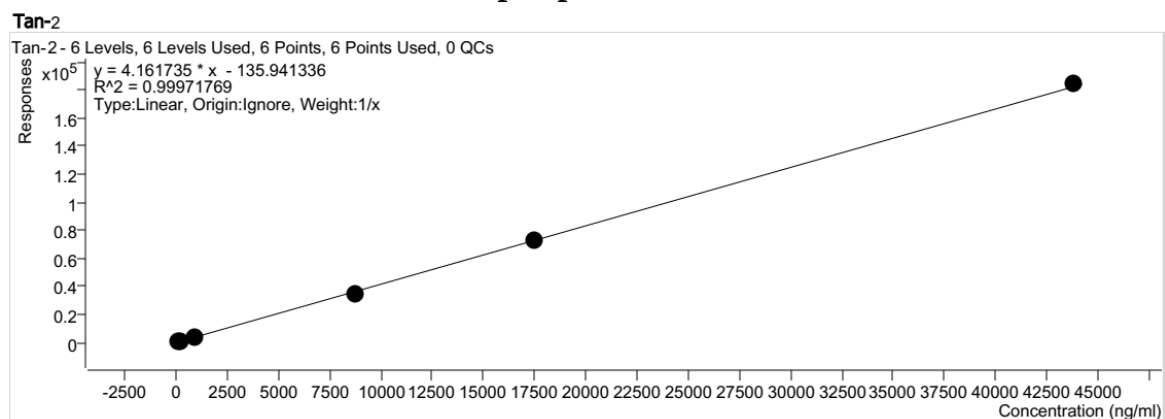
$$y = -135,941 + 4,162 \cdot C_{\text{tanshinone IIA}}, R^2 = 0,999; p < 0,0001$$



Hình 3.9. Đường hồi quy tuyến tính đối với tanshinone I trong phương pháp LC-MS/MS



Hình 3.10. Đường hồi quy tuyến tính đối với cryptotanshinone trong phương pháp LC-MS/MS

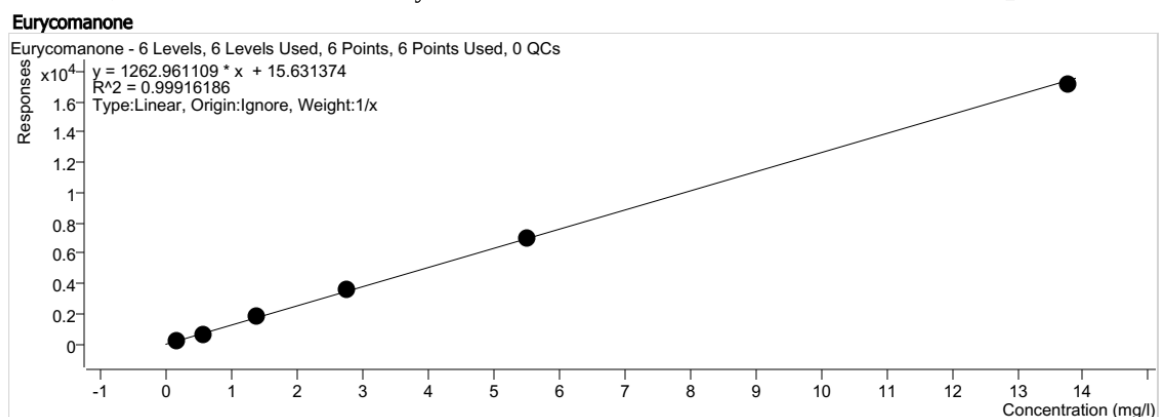


Hình 3.11. Đường hồi quy tuyến tính đối với tanshinone IIA trong phương pháp LC-MS/MS

Đối với eurycomanone:

Phương trình hồi quy tuyến tính thu được như sau (đường hồi quy tuyến tính được nêu ở hình 3.32):

$$y = 1262.961 \cdot C_{\text{eurycomanone}} + 15.631; \quad R^2 = 0.999; \quad p < 0.0001$$



Hình 3.12. Đường hồi quy tuyến tính đối với eurycomanone trong phương pháp LC-MS/MS

3.5. ÁP DỤNG THỰC TẾ

3.5.1. Kiểm soát chất lượng của phương pháp phân tích

3.5.1.1. Độ lặp lại

Bảng 3.7. Kết quả độ lặp lại của phương pháp LC-MS/MS và UPLC-DAD khi phân tích đồng thời hypophyllanthin và phyllanthin, và phân tích eurycomanone^(*)

Chất phân tích	Mẫu	RSD (%) / ½ RSD _H (%); n = 3	
		LC-MS/MS	UPLC-DAD
Hypophyllanthin	DHC-VX	0,02 / 3,8	1,1 / 2,0
	DHC-DH	1,0 / 3,9	0,8 / 1,9
	DHC-PNC	1,0 / 3,9	0,8 / 1,9
	DHC-PV	0,04 / 3,4	0,7 / 1,9
	DHC-DD5	0,05 / 4,3	1,7 / 2,1
	DHC-KH	0,01 / 3,0	0,2 / 1,8
Phyllanthin	DHC-VX	0,02 / 3,4	2,8 / 3,4
	DHC-DH	0,03 / 4,0	3,2 / 4,0
	DHC-PNC	0,01 / 3,2	1,2 / 3,2
	DHC-PV	0,01 / 2,8	1,0 / 2,8
	DHC-DD5	1,1 / 4,1	2,6 / 4,1
	DHC-KH	0,01 / 2,6	0,6 / 2,6
Eurycomanone	Vũng Tàu	0,01 / 2,6	
	Đắk Nông	0,01 / 3,7	
	Hòa Bình	0,01 / 2,9	
	Nghệ An	0,01 / 3,4	
	Bắc Giang	0,01 / 2,4	
	Hà Giang	0,01 / 2,9	

Bảng 3.8. Kết quả đánh giá độ lặp lại của các PP LC-MS/MS và UPLC-DAD

Chất phân tích	Mẫu	RSD (%) / ½ RSD _H (%); n = 3	
		LC-MS/MS	UPLC-DAD
Tanshinone I	Sapa	0,01 / 2,5	0,5 / 2,5
	Lâm Đồng	0,01 / 2,3	0,2 / 2,3
	Hà Giang	0,01 / 2,3	0,4 / 2,3
	Mộc Châu	0,01 / 2,4	1,1 / 2,4
	Quảng Tây	0,01 / 2,6	1,3 / 2,6
	Mường Lống	0,01 / 2,7	1,2 / 2,7
Tanshinone IIA	Sapa	0,01 / 2,0	0,3 / 2,0
	Lâm Đồng	0,01 / 2,0	0,3 / 2,0
	Hà Giang	0,01 / 1,9	0,5 / 1,9
	Mộc Châu	0,01 / 2,1	0,6 / 2,1
	Quảng Tây	0,11 / 2,2	0,6 / 2,2
	Mường Lống	0,01 / 2,3	0,8 / 2,3

Cryptotanshinone	Sapa	0,01 / 2,2	0,4 / 2,2
	Lâm Đồng	0,01 / 2,1	0,2 / 2,1
	Hà Giang	0,01 / 2,2	0,5 / 2,2
	Mộc Châu	0,01 / 2,3	0,5 / 2,3
	Quảng Tây	0,01 / 2,4	0,4 / 2,4
	Mường Lống	0,01 / 2,3	0,8 / 2,3

3.5.1.2. Độ đúng

Bảng 3.9. Kết quả đúng của phương pháp LC-MS/MS đối với hypophyllanthin và phyllanthin^(*)

Chất phân tích	Mẫu	Rev (%)			Rev trung bình (%)
		Mức 1	Mức 2	Mức 3	
Phyllanthin	DHC-VX	97/95/96	98/98/100	99/100/100	95 - 100
	DHC-DH	97/95/95	99/98/99	100/99/99	95 - 100
	DHC-PNC	96/97/97	98/98/100	99/99/100	96 - 100
	DHC-PV	95/101/99	98/101/100	99/99/100	95 - 101
	DHC-DD5	97/102/96	99/99/100	99/100/100	97 - 102
	DHC-KH	95/97/99	99/100/100	99/99/100	95 - 100
Hypophyllanthin	DHC-VX	97/97/98	97/95/99	99/99/100	95 - 100
	DHC-DH	95/99/103	98/100/99	99/101/100	95 - 103
	DHC-PNC	96/96/101	100/97/99	99/99/100	96 - 101
	DHC-PV	97/103/97	99/99/101	99/99/100	97 - 103
	DHC-DD5	96/95/101	96/102/100	99/99/100	95 - 102
	DHC-KH	94/96/101	97/101/97	99/100/99	94 - 101
Eurycomanone	Vũng Tàu	97/99/100	99/98/101	101/100/99	97 - 101
	Đắk Nông	99/97/99	99/99/100	100/99/100	97 - 100
	Hòa Bình	98/99/99	99/98/99	98/101/100	98 - 101
	Nghệ An	97/99/101	99/98/100	100/99/102	97 - 102
	Bắc Giang	99/98/99	100/99/101	99/101/99	98 - 101
	Hà Giang	99/98/98	99/98/100	98/99/101	98 - 101

Bảng 3.10. Kết quả độ đúng của phương pháp LC-MS/MS đối với tanshinone I, cryptotanshinone và tanshinone IIA^(*)

Chất PT	Mẫu	Rev(%)			Rev trung bình (%)
		Mức 1	Mức 2	Mức 3	
Tanshinone I	Sapa	100/98/103	102/98/103	103/100/97	97 - 103
	Lâm Đồng	95/96/97	102/98/99	102/101/96	96 - 102
	Hà Giang	96/98/97	102/100/98	98/102/97	96 - 102
	Mộc Châu	96/98/97	103/101/98	99/103/102	96 - 103
	Quảng Tây	98/96/96	102/100/98	98/100/101	96 - 102

	Mường Lống	98/97/97	101/99/100	103/99/101	97 - 103
Cryptotanshinone	Sapa	97/100/97	102/97/100	98/102/97	97 - 102
	Lâm Đồng	97/98/97	98/103/98	99/101/97	97 - 103
	Hà Giang	96/103/98	99/103/99	97/101/97	96 - 103
	Mộc Châu	97/103/101	98/101/103	98/96/102	97 - 103
	Quảng Tây	97/99/96	103/101/98	104/101/97	96 - 104
	Mường Lống	97/97/96	101/97/102	98/100/101	96 - 102
Tanshinone IIA	Sapa	98/97/98	102/97/98	100/102/100	97 - 102
	Lâm Đồng	97/98/99	100/97/97	98/100/101	97 - 101
	Hà Giang	98/96/99	101/97/101	101/99/102	97 - 102
	Mộc Châu	98/97/98	101/97/102	99/100/102	97 - 102
	Quảng Tây	96/96/97	102/98/97	99/101/102	96 - 102
	Mường Lống	96/98/99	99/102/98	99/98/101	96 - 102

3.5.1.3. Giới hạn phát hiện và giới hạn định lượng

Bảng 3.11. Dữ liệu xác định giá trị LOD của các hợp chất hypophyllanthin, phyllanthin và eurycomanone

Hợp chất	hypophyllanthin	phyllanthin	eurycomanone
Nồng độ (ng/mL)	0,1	0,15	0,1
S/N	5/1,3	200/50	0,32/0,09

- Đối với tanshinone I, cryptotanshinone và tanshinone IIA: LOD tương ứng là 0,39, 0,4 và 0,35 ppb (ứng với các giá trị LOQ là 1,3, 1,4 và 1,2 ppb) (bảng 3.18 và phụ lục B3, B4, B5);

Bảng 3.12. Dữ liệu xác định giá trị LOD của các hợp chất tanshinone I, cryptotanshinone và tanshinone IIA

Hợp chất	tanshinone I	cryptotanshinone	tanshinone IIA
Nồng độ (ng/mL)	0,39	0,4	0,35
S/N	95/20	95/35	90/22

3.5.2. Hàm lượng các hợp chất trong các mẫu thực tế

(iii) Hàm lượng eurycomanone trong cây Mật nhân:

Bảng 3.13. Hàm lượng (mg/g) eurycomanone trong các mẫu thực tế

Mẫu	Vũng Tàu	Đắk Nông	Hòa Bình	Nghệ An	Bắc Giang	Hà Giang
C	1,8533 ± 0,0001	0,1716 ± 0,0001	0,8015 ± 0,0001	0,2739 ± 0,0001	3,1336 ± 0,0005	0,9291 ± 0,0001

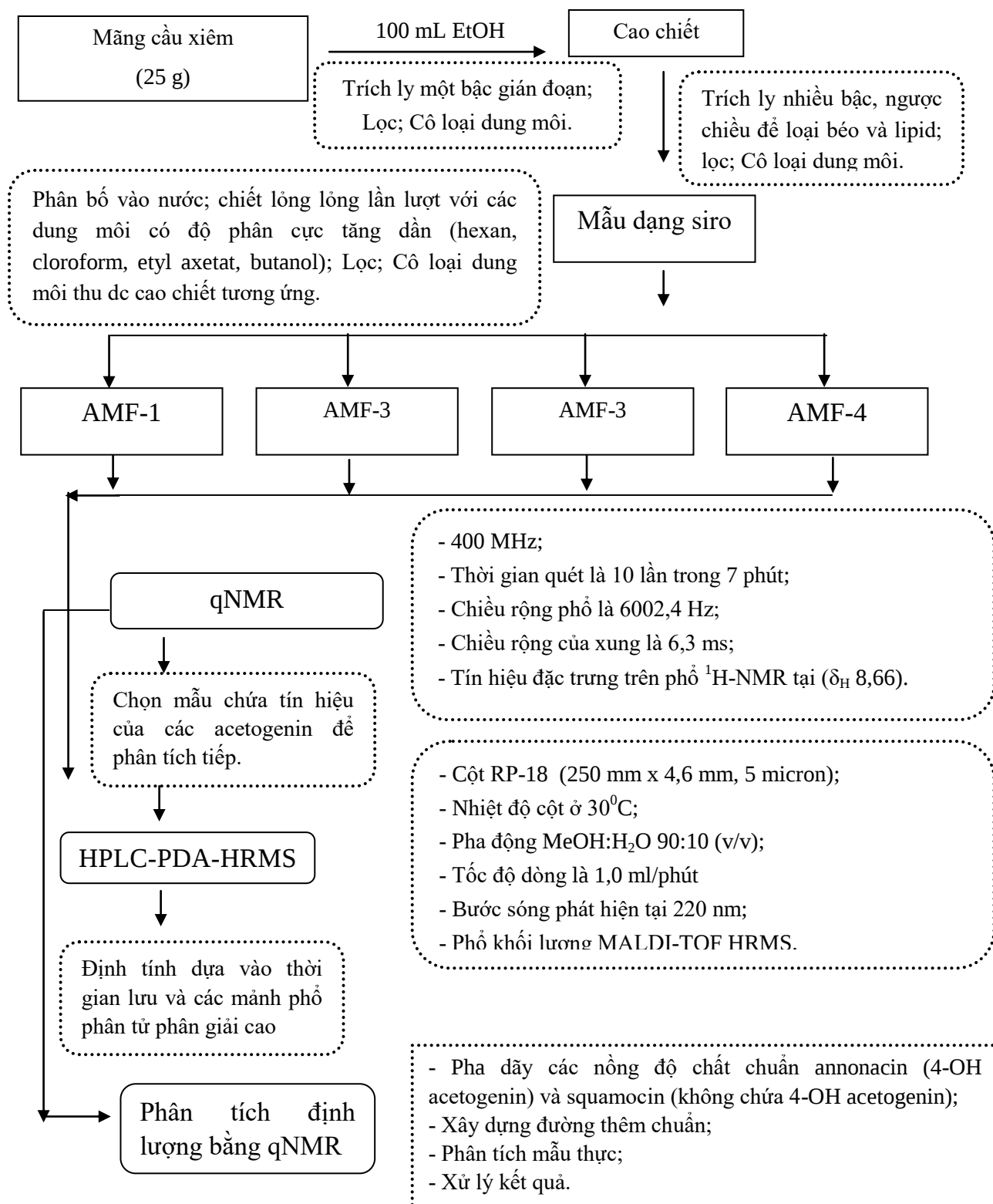
Bảng 3.14. Hàm lượng (mg/g) hypophyllanthin và phyllanthin trong các mẫu thực tế

Mẫu	LC-MS/MS		UPLC-DAD	
	Hypophyllanthin	Phyllanthin	Hypophyllanthin	Phyllanthin
DHC-VX	0,1364 ± 0,0003	0,3249 ± 0,0005	0,135 ± 0,002	0,321 ± 0,009
DHC-DH	0,0607 ± 0,0002	0,1044 ± 0,0003	0,059 ± 0,001	0,096 ± 0,003
DHC-PNC	0,1197 ± 0,0012	0,4952 ± 0,0003	0,119 ± 0,001	0,420 ± 0,005
DHC-PV	0,3007 ± 0,0012	1,1547 ± 0,0006	0,299 ± 0,002	1,149 ± 0,012
DHC-DD5	0,0599 ± 0,0003	0,0805 ± 0,0009	0,059 ± 0,001	0,079 ± 0,002
DHC-KH	0,6602 ± 0,0008	1,9056 ± 0,0006	0,660 ± 0,001	1,901 ± 0,011
Lá	0,2748 ± 0,0004	0,0439 ± 0,0004	-	-
Thân	0,0167 ± 0,0004	0,0051 ± 0,0003	-	-
Rễ	0,0029 ± 0,0002	0,0039 ± 0,0002	-	-

Bảng 3.15. Hàm lượng (mg/g) tanshinone I, tanshinone IIA và cryptotanshinone trong các mẫu thực tế

Mẫu	LC-MS/MS			UPLC-DAD		
	<i>Tanshinone I</i>	<i>Tanshinone IIA</i>	<i>Cryptotanshinone</i>	<i>Tanshinone I</i>	<i>Tanshinone IIA</i>	<i>Cryptotanshinone</i>
Sa Pa	2,4613 ± 0,0007	9,1889 ± 0,0002	4,6549 ± 0,0006	2,45 ± 0,01	9,18 ± 0,03	4,65 ± 0,02
Lâm Đồng	4,4286 ± 0,0009	9,8970 ± 0,0035	8,1589 ± 0,0006	4,43 ± 0,01	9,88 ± 0,03	8,14 ± 0,02
Hà Giang	3,5345 ± 0,0011	13,0252 ± 0,0004	5,2017 ± 0,0015	3,53 ± 0,02	12,99 ± 0,06	5,19 ± 0,03
Mộc Châu	2,8852 ± 0,0009	8,3844 ± 0,0006	4,1723 ± 0,0005	2,88 ± 0,03	8,39 ± 0,05	4,16 ± 0,02
Quảng Tây	1,5559 ± 0,0013	4,7958 ± 0,0007	2,8630 ± 0,0008	1,56 ± 0,02	4,78 ± 0,03	2,85 ± 0,01
Mường Lống	1,2717 ± 0,0013	3,8278 ± 0,0003	3,8956 ± 0,0012	1,26 ± 0,02	3,81 ± 0,03	3,88 ± 0,03

3.6. CÁC HỢP CHẤT ACETOGENIN CHIẾT TÁCH TỪ LÁ CÂY MĂNG CẦU XIÊM



Hình 3.13. Quy trình phân tích định tính, định lượng các hợp chất acetogenin từ dịch chiết của cây Măng cầu xiêm

3.6.1. Xác định phân đoạn giàu hoạt chất acetogenin

Kết quả phân tích phân đoạn AMF3 bằng phương pháp qNMR (^1H -NMR 500 MHz trong dung môi CDCl_3) cho thấy (hình 3.38, phụ lục B11, B12, B13): Tín hiệu tại độ dịch chuyển hóa học $\delta_{\text{H}} = 0,85$ và $1,2 - 1,6$ là ứng với một nhóm methyl cuối mạch và các nhóm methylene trong chuỗi dài; Tín hiệu của vòng (lacton) α , β và γ chưa bão hòa xuất hiện tại $\delta_{\text{H}} = 6,96/7,17$ (1H, H-33/35) và $5,09/5,10$ (1H, H-34/36); Đồng thời, cũng xuất hiện tín hiệu của vòng mono-THF ứng với hai nhóm hydroxyl nằm bên sườn tại $\delta_{\text{H}} = 3,76/3,81$ và $3,37/3,44$. Các tín hiệu trên là đặc trưng cho nhóm acetogenin và chúng cũng phù hợp với kết quả đã được công bố ở [46], [59], [90].

Kết quả phân tích phổ ^1H -NMR (500 MHz trong dung môi CDCl_3) đối với các phân đoạn AMF-1, AMF-2 và AMF-4 cho thấy, không xuất hiện các tín hiệu đặc trưng của nhóm acetogenin và như vậy, các phân đoạn đó chủ yếu giàu các axit béo (phổ ^1H -NMR của các phân đoạn AMF-1, AMF-2 và AMF-4 không đưa ra ở đây). Điều này cũng chứng tỏ rằng, quy trình chiết phân đoạn nói trên đã cho phép thu được phân đoạn AMF3 (cao ethylacetate) giàu acetogenin.

3.6.2. Định tính các acetogenin chính trong phân đoạn AMF-3

Từ các mảnh đặc trưng có tỷ số (m/z) trong khoảng 100-1000 trên phổ MADLI-TOF-HRMS, xác định được các hợp chất acetogenin chính trong phân đoạn AMF3 (chiết tách từ lá của cây Măng cầu xiêm). Việc nhận biết (hay định tính) các hợp chất nhóm acetogenin là dựa vào thư viện phổ (cài đặt sẵn trong máy) và kết hợp so sánh với các công bố trước đây. Các chất chính trong nhóm acetogenin trong phân đoạn AMF3 gồm các chất: Annonacin ($m/z = 597,47$); cis-annomonacin ($m/z, 625,50$); annocatacin A ($m/z 579,46$); Cohibin A ($m/z, 549,48$); cis-corossolone ($m/z, 579,46$); muricin A ($m/z, 597,47$); muricin B ($m/z, 597,47$); muricin C ($m/z, 597,47$); muricin D ($m/z, 569,44$), muricin E ($m/z, 569,44$), muricin F ($m/z, 595,46$), muricin G ($m/z, 595,46$).

3.6.3. Định lượng các acetogenin chính trong phân đoạn AMF-3

Phân tích định lượng tổng số hợp chất acetogenin 4-OH và tổng số hợp chất acetogenin không 4-OH trong phân AMF-3 được sử dụng bằng phương pháp phân tích phổ NMR. Tín hiệu đo được hoặc diện tích đỉnh (để thiết lập đường thêm chuẩn), tín hiệu mục tiêu của tiêu chuẩn nội bộ ($\delta_{\text{H}} 8.66$). Tỷ lệ

tích phân và nồng độ được vẽ thêm bằng cách sử dụng hồi quy tuyến tính, và đường chuẩn (đường thêm chuẩn và hệ số xác định của phân tích hồi quy) cho chất chuẩn của hai hợp chất acetogenin loại có thể thu được và là cơ sở của phương pháp phân tích định lượng này (Bảng 3.22).

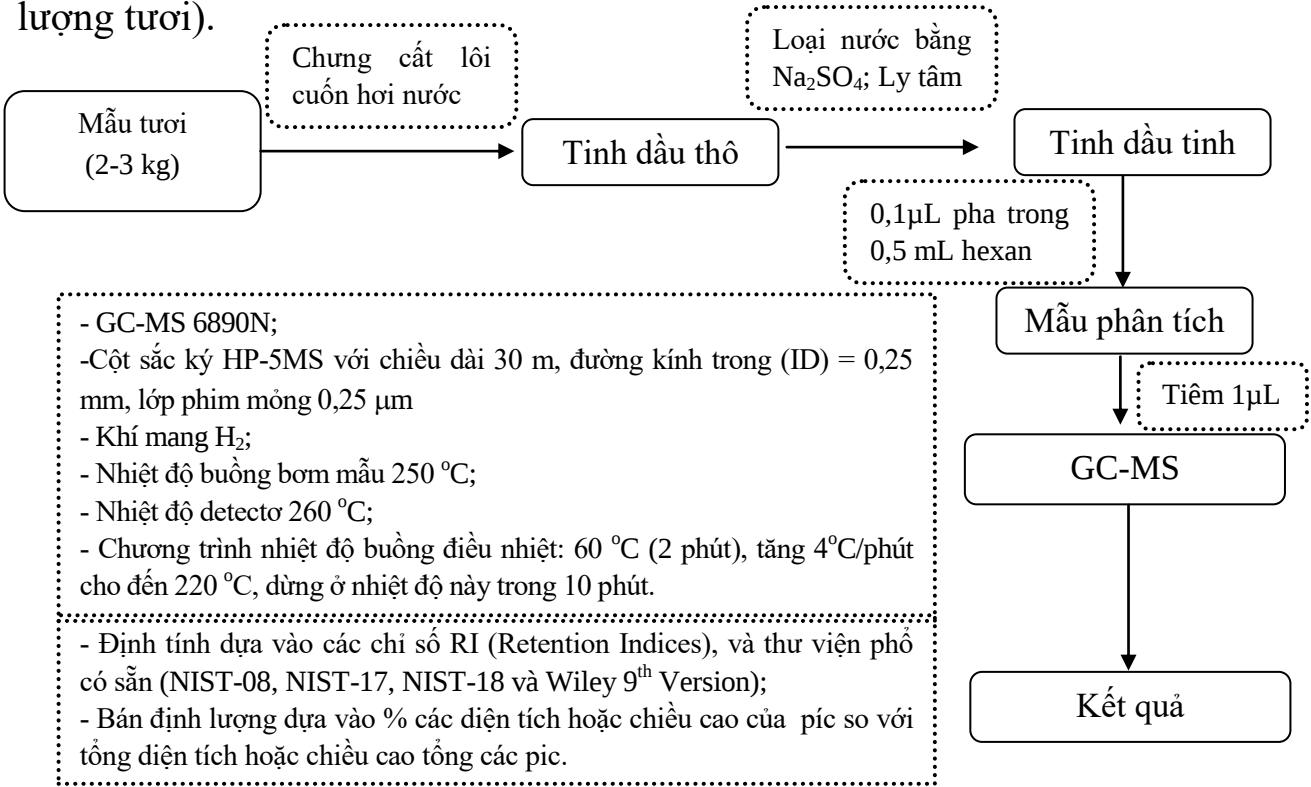
Bảng 3.16. Phương trình đường thêm chuẩn và LOD, LOQ của PP phân tích

Chất phân tích	Phương trình đường thêm chuẩn	R ²	LOD (mg/mL)	LOQ (mg/mL)
Annonacin	y= 3,4705x + 1,1743	0,9925	0,05	0,14
Squamocin	y= 3,575x + 0,209	0,9997	0,06	0,17

Kết quả phân tích cho thấy: Hàm lượng của tổng các chất chứa 4-OH trong mẫu (10 mg phân đoạn AMF3) là 2,88 mg và tổng các chất không chứa 4-OH là 1,77 mg. Như vậy, tổng hàm lượng các hoạt chất nhóm acetogenin có HTSH trong mẫu là 46%.

3.7. THÀNH PHẦN TINH DẦU TỪ CÂY RIỀNG ĐUÔI NHỌN

Kết quả xác định tính chất cảm quan, thành phần hóa học (định tính) và hàm lượng các chất (hay cấu tử) trong tinh dầu ở các bộ phận của cây Riềng đuôi nhọn được nêu ở Bảng 3.23 cho thấy: Tinh dầu thu được từ các bộ phận của cây có màu vàng nhạt (lá, rễ, thân) hoặc không màu (quả và hoa); Hàm lượng tinh dầu trong các bộ phận của cây (theo thứ tự tăng dần): thân (0,15 %) < quả (0,18 %) < lá (0,21 %) < rễ (0,24 %) < hoa (0,30 % tính theo khối lượng tươi).



Hình 3.14. Quy trình phân tích định tính, bán định lượng các hợp chất trong tinh dầu chiết tách từ các bộ phận của cây Riềng đuôi nhọn

Thành phần tinh dầu thu được từ thân chứa 32 cấu tử (chiếm 93,6 % tổng hàm lượng tinh dầu). Trong đó, chứa nhiều nhất là các hợp chất (nhóm) monoterpene hydrocarbon (71,9 %), tiếp theo là các dẫn xuất chứa oxy của monoterpene (13,6 %); Tinh dầu thu được từ quả chứa 42 cấu tử (chiếm 93,5% tổng hàm lượng tinh dầu) và cũng chứa nhiều nhất là nhóm monoterpene hydrocarbon (35,9 %), tiếp theo là nhóm sesquiterpene hydrocarbon (30,5 %) và các dẫn xuất chứa oxy của monoterpenes (18,0%); Tinh dầu thu được từ lá cây chứa 33 cấu tử (chiếm 95,2% tổng hàm lượng tinh dầu), gồm các cấu tử (xếp theo thứ tự giảm dần) như sau: linalool (25,6%) > δ -cadinen (20,4%); Thành phần tinh dầu thu được từ rễ chứa 46 cấu tử (chiếm 92,0 % tổng hàm lượng tinh dầu). Trong đó, chứa nhiều nhất là nhóm monoterpene hydrocarbon (56,3 %) > các dẫn xuất chứa oxy của monoterpene (21,7 %) > các sesquiterpene hydrocarbon (10,7 %); Thành phần tinh dầu thu được từ hoa chứa 16 cấu tử (chiếm 97,7% tổng hàm lượng tinh dầu), trong đó chứa nhiều nhất vẫn là nhóm monoterpene hydrocarbon (44,8 %), tiếp theo là các dẫn xuất chứa oxy của monoterpene (22,9 %) và sesquiterpene hydrocarbon (18,2 %).

KẾT LUẬN

Từ các kết quả thu được, luận án đi đến những kết luận chính sau:

1) Trên cơ sở khảo sát ảnh hưởng của các yếu tố đến quá trình tách bằng các phương pháp khác nhau (sắc ký lớp mỏng, sắc ký cột, sắc ký điều chế), đã tìm được điều kiện thích hợp để phân lập các hợp chất phyllanthin, hypophyllanthin từ cây Diệp hạ châu (*Phyllanthus urinaria* L.), tanshinone I, cryptotanshinone, tanshinone IIA từ cây Đan sâm (*Salvia miltiorrhiza* B.) và eurycomanone từ cây Mật nhân (*Eurycoma longifolia* J.) với độ tinh khiết đạt được trên 95 % đối với mỗi chất. Cấu trúc của các hợp chất đó đã được khẳng định qua các dữ liệu phổ cộng hưởng từ hạt nhân ($^1\text{H-NMR}$, $^{13}\text{C-NMR}$), phổ hấp thụ phân tử UV-Vis và phổ khối lượng (ESI-MS).

2) Đã tìm được các điều kiện thích hợp cho phương pháp sắc ký lỏng điều chế để tinh chế 06 hợp chất trên và đạt được độ tinh khiết trên 99 % đối với mỗi chất và do vậy, đã lần đầu tiên ở nước ta đã tạo ra các hóa chất thỏa mãn điều kiện làm chất chuẩn cho phân tích định tính và định lượng.

3) Đã xây dựng được quy trình phân tích đồng thời phyllanthin và hypophyllanthin trong các mẫu cây Diệp hạ châu và thực phẩm chức năng

được bào chế từ cây đó; Xác định đồng thời tanshinone I, cryptotanshinone và tanshinone IIA trong các mẫu cây Đan sâm và xác định eurycomanone trong cây Mật nhân bằng phương pháp LC-MS/MS và UPLC-DAD với các điều kiện thí nghiệm thích hợp và sử dụng các chất chuẩn tạo ra được ở trên. Phương pháp LC-MS/MS đạt được độ lặp lại tốt đối với tất cả 06 chất với $RSD < 2 \%$ ($n = 3$). Phương pháp LC-MS/MS đạt được độ đúng tốt với độ thu hồi trung bình 95 - 104 %, độ nhạy cao (hay LOD thấp, khoảng 0,1 - 0,5 ppb) và khoảng tuyến tính đủ rộng (0,005 – 50 ppm) với $R^2 > 0,999$ và $p < 0,001$ đối với tất cả 06 chất. Phương pháp UPLC-DAD tuy có độ lặp lại kém hơn phương pháp LC-MS/MS, nhưng cũng có thể sử dụng để phân tích định lượng 06 chất với kết quả thu được không khác với phương pháp LC-MS/MS ($p > 0,05$).

4) Sử dụng kỹ thuật chiết phân đoạn bằng các dung môi khác nhau, kết hợp với hệ thống thiết bị phối hợp qNMR và HPLC-PDA-HRMS đã cho phép nhận biết phân đoạn chiết etylacetate (AMF-3) từ cây Mãng cầu xiêm (*Annona muricata* (Soursop)) là phân đoạn giàu nhóm hợp chất acetogenin và đã phân tích định tính các hợp chất (thuộc nhóm acetogenin) có hoạt tính sinh học trong phân đoạn đó. Mặt khác, với phương pháp qNMR đã định lượng tổng nhóm acetogenin chứa 4-OH và tổng nhóm acetogenin không chứa 4-OH. Tổng hàm lượng hai nhóm acetogenin đó chiếm 46 % của phân đoạn AMF3.

5) Bằng kỹ thuật chưng cất lôi cuốn hơi nước kết hợp với phương pháp khối lượng, đã xác định được hàm lượng tinh dầu chiết tách từ các bộ phận (lá, thân, rễ, hoa, quả) của cây Riềng đuôi nhọn (*Alpinia macroura* K. Schum). Sử dụng phương pháp GC-MS, lần đầu tiên trên thế giới, đã định tính và bán định lượng các hợp chất có mặt trong tinh dầu thu được từ các bộ phận của cây. Tuy thành phần các cấu tử trong tinh dầu ở các bộ phận của cây khác nhau, nhưng chiếm nhiều nhất là nhóm monoterpene hydrocarbon với hàm lượng 35,9 – 71,9 %, tiếp theo là nhóm dẫn xuất chứa oxy của monoterpene (13,6 – 27,2 %) và nhóm sesquiterpene hydrocarbon (5,4 – 30,5 %); các nhóm còn lại có hàm lượng $< 10 \%$. Các kết quả này là tiền đề tốt cho các nghiên cứu tiếp theo về các hợp chất có hoạt tính sinh học có mặt trong loài cây dược liệu quý này.

DANH MỤC CÁC CÔNG TRÌNH CÔNG BỐ KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU CỦA LUẬN ÁN

Tạp chí trong nước

1. Đoàn Mạnh Dũng, Đặng Thị Ngân, Nguyễn Thị Huệ, Lê Quốc Hùng, Nguyễn Hữu Tùng, Nguyễn Đình Luyện, Trần Đình Thắng (2019), Phân lập và xác định hàm lượng tanshinon I, cryptotanshinon, tanshinon IIA trong dược liệu cây Đan sâm (*Salvia miltiorrhiza* B.) bằng sắc ký lỏng siêu hiệu năng (UPLC-DAD), *Tạp chí Khoa học và Công nghệ các trường Khoa học Kỹ thuật*, 137, 100-105.

2. Đoàn Mạnh Dũng, Nguyễn Ngọc Tuấn, Hoàng Văn Trung, Nguyễn Hữu Tùng, Nguyễn Đình Luyện (2019), Phân lập và xác định hàm lượng phyllanthin, hypophyllanthin trong một số chế phẩm từ cây Diệp hạ châu (*Phyllanthus urinaria* L.) bằng sắc ký lỏng siêu hiệu năng (UPLC-DAD), *Tạp chí Phân tích Hóa, Lý và Sinh học*, Tập 24, số 2, 37-42.

3. Đoàn Mạnh Dũng, Nguyễn Ngọc Tuấn, Hoàng Văn Trung, Nguyễn Hữu Tùng, Nguyễn Đình Luyện, Trần Đình Thắng (2019), Xác định hàm lượng phyllanthin, hypophyllanthin trong các mẫu thuốc từ cây Diệp hạ châu (*Phyllanthus urinaria* L.) bằng sắc ký lỏng ghép nối khối phổ (LC-MS/MS), *Tạp chí Phân tích Hóa, Lý và Sinh học*, Tập 24, số 2, 140-146.

4. Đoàn Mạnh Dũng, Hoàng Văn Trung, Nguyễn Đình Luyện, Nguyễn Hữu Tùng (2018), Phân lập và phân tích hàm lượng eurycomanone trong cây mật nhân (*Eurycoma longifolia*) ở Việt Nam bằng sắc ký lỏng ghép nối khối phổ LC-MS/MS – *Tạp chí Khoa học, Đại học Huế*, Tập 127, số 1B, 153-162.

5. Đoàn Mạnh Dũng, Nguyễn Hữu Tùng, Nguyễn Đình Luyện (2018), Phân tích hàm lượng phyllanthin, hypophyllanthin trong cây Diệp hạ châu (*Phyllanthus urinaria* L.) bằng sắc ký lỏng ghép nối khối phổ (LC-MS/MS), *Tạp chí Khoa học trường Đại học Khoa học – Đại học Huế*, Tập 13, số 2, 13-24.

6. Nguyễn Huy Hùng, Đoàn Mạnh Dũng, Đinh Thị Trường Giang, Yang - Chang Wu, Trần Đình Thắng (2015), Định tính, định lượng và thử nghiệm hoạt tính sinh học các Acetogenin của dịch chiết Etanol từ lá Mãng cầu xiêm (*Annona muricata*) bằng phương pháp HPLC-PDA, qNMR, MALDI-TOP MS, *Tạp chí Hóa học*, 53(6e1,2): 232-236.

Tạp chí Quốc tế

7. Le T. Huong, Do N. Dai, Mai V. Chung, Doan M. Dung & Isiaka A. Ogunwande (2017), Constituents of essential oils from the leaf, stem, root, fruit and flower of *Alpinia macroura* K. Schum, *Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas*, 16(1), 26 - 33 (SCIE).

8. Đoàn Mạnh Dũng và cộng sự, Simultaneous quantitative analyses of tanshinone IIA, cryptotanshinone, and tanshinone I in danshen (*Salvia miltiorrhiza*) cultivated in Vietnam using LC-MS/MS, *Indian Journal of Natural Products and Resources* (IJNPR), (*Đang phản biện*).

HUE UNIVERSITY
UNIVERSITY OF SCIENCES

DOAN MANH DUNG

**RESEARCH ON ISOLATION, PREPARATION OF
STANDARD CONSTITUENTS,
AND ESTABLISHMENT OF THE ANALYSIS
PROCESS FOR BIOACTIVE COMPOUNDS**

Major: Analytical Chemistry

Code: 944.01.18

PhD DISSERTATION ABSTRACT

HUE – 2020

The thesis has been completed at Department of Chemistry,
University of Sciences, Hue University.

Supervisors:

Assoc. Prof. Nguyen Dinh Luyen

Assoc. Prof. Nguyen Huu Tung

Reviewer 1 :

Reviewer 2 :

Reviewer 3 :

The thesis will be defended in front of the doctoral thesis defense
committee of Hue University at h date year

The thesis can be found at:

1. The National Library of Vietnam
2. University of Sciences, Hue University.

INTRODUCTION

Vietnam is one of the most biodiverse countries on earth, with a huge variety of distinctive and fascinating wildlife. There are many studies in the world and in Vietnam on isolation of bioactive natural compounds from *P. urinaria*, *S. miltiorrhiza*, *E. longifolia*... by paper chromatography, column chromatography and mixture analysis by HPLC. Some studies built the process of analyzing bioactive natural compounds such as acetogenin, essential oils by GC-MS, LC-MS/MS method. The direction of purification to obtain pure substances is interested and researched in many studies, mainly by research labs/pharmaceutical company, and the cost of standard bioactive materials are quite expensive. Meanwhile, in Vietnam, up to now, studies in this direction are very limited. Stemming from the above issues, this thesis is done with the aim of contributing positively to the research directions above.

The purpose of the thesis study:

This thesis is designed to build the process of isolation and preparation of standard substances, and analysis of a number of bioactive natural compounds from a number of local medicinal plants in our country: *Phyllanthus urinaria*, *Salvia miltiorrhiza*, *Eurycoma longifolia*, *Annona muricata*, *Alpinia macroura* - a new species of tree discovered.

To achieve the above purposes, the main research contents include:

- Research on building the extraction process for phyllanthin, hypophyllanthin compounds from *P. urinaria* plants; compounds tanshinone I, cryptotanshinone, tanshinone IIA from *S. miltiorrhiza* and eurycomanone compounds from *E. longifolia* by chromatographic methods;
- Purification of the resulting compounds (phyllanthin, hypophyllanthin, tanshinone I, cryptotanshinone, tanshinone IIA, eurycomanone) to create standards for qualitative and quantitative analysis of them in different medicinal plants;
- Develop the process of analyzing phyllanthin, hypophyllanthin, tanshinone I, cryptotanshinone, tanshinone IIA, and eurycomanone compounds by modern liquid chromatography method LC-MS/MS, UPLC-DAD to be applied to laboratories analysis in our country;
- Determination of bioactive compounds in *A. muricata* leaf extract by modern chromatography: liquid chromatography coupled with different detectors (qNMR, HPLC-PDA, MALDI-TOP HRMS) and compounds

contained in essential oils (leaves, stems, roots ...) of *A. macrooura* plant by gas chromatography coupled with mass spectrometry (GC-MS).

Chapter 1. LITERATURE REVIEW

1.1. Introduction to bioactive natural compounds and some medicinal plants

1.1.1. General introduction

1.1.2. Studies on the extraction of some bioactive natural compounds

1.1.3. Some medicinal plants containing natural compounds with biological activity

1.2. Methods of analysis of natural compounds

1.2.1. Gas chromatographic method

1.2.2. Liquid chromatography method

1.3. Some researches related to the thesis

Chapter 2. CONTENTS AND EXPERIMENTAL METHODS

2.1. Object and scope of the study

2.2. Research content

2.3. Equipment, tools and chemicals

2.4. Research methods

2.4.1. Sample information

2.4.2. Extraction/isolation method

2.4.3. Methods of determining the structure and physio-chemical characterization of natural compounds

2.4.4. Method of purifying natural compounds to create standard substance

2.4.5. Method of evaluating the purity of standard materials and setting of standard material data

2.4.6. Methods of analysis of natural compounds

2.4.7. Methods of evaluating the reliability of analytical methods

2.4.8. Data processing methods

Chapter 3. RESULTS AND DISCUSSION

3.1. Extraction and structure determination of natural compounds

3.1.1. Extraction of natural compounds from the *P. urinaria* plant and structural properties

3.1.1.1. Extraction and isolation

3.1.1.2. Identification of the standard compounds

(i) Compound PU-1: White needle-shaped crystals; m.p. 128 - 130 °C; UV (MeOH) λ_{max} (log ϵ) 230 and 280 nm; ESI-MS m/z = 431 $[M+H]^+$ and

revealed the molecular formula as $C_{24}H_{30}O_7$. NMR spectral data shown in table 3.1. The results obtained confirm that the PU-1 compound is hypophyllanthin.

(ii) Compound PU-2: White needle-shaped crystals; m.p. 94 – 96 °C; UV (MeOH) λ_{max} (loge) 230 and 280 nm; ESI-MS $m/z = 419 [M+H]^+$ and revealed the molecular formula as $C_{24}H_{34}O_6$. NMR spectral data shown in table 3.2. The results obtained confirm that the PU-2 compound is phyllanthin.

3.1.2. Extraction of natural compounds from the *S. miltiorrhiza* plant and structural properties

3.1.2.1. Extraction and isolation

3.1.2.2. Identification of the standard compounds

(i) Compound SM-1: red powder; mp 182-183 °C; $[\alpha]_D^{25} = 90^\circ$ (c 1,0, $CHCl_3$); m.p. 182 – 183 °C; UV (MeOH) λ_{max} (loge) 220 and 270 nm. ESI-MS $m/z = 297 [M+H]^+$ and revealed the molecular formula as $C_{19}H_{20}O_3$. NMR spectral data shown in table 3.3. The results obtained confirm that the SM-1 compound is cryptotanshinone.

(ii) Compound SM-2: red powder; mp 202-204 °C; UV (MeOH) λ_{max} (loge) 225 and 270 nm. ESI-MS $m/z = 295 [M+H]^+$ and revealed the molecular formula as $C_{19}H_{18}O_3$. NMR spectral data shown in table 3.4. The results obtained confirm that the SM-2 compound is tanshinon IIA.

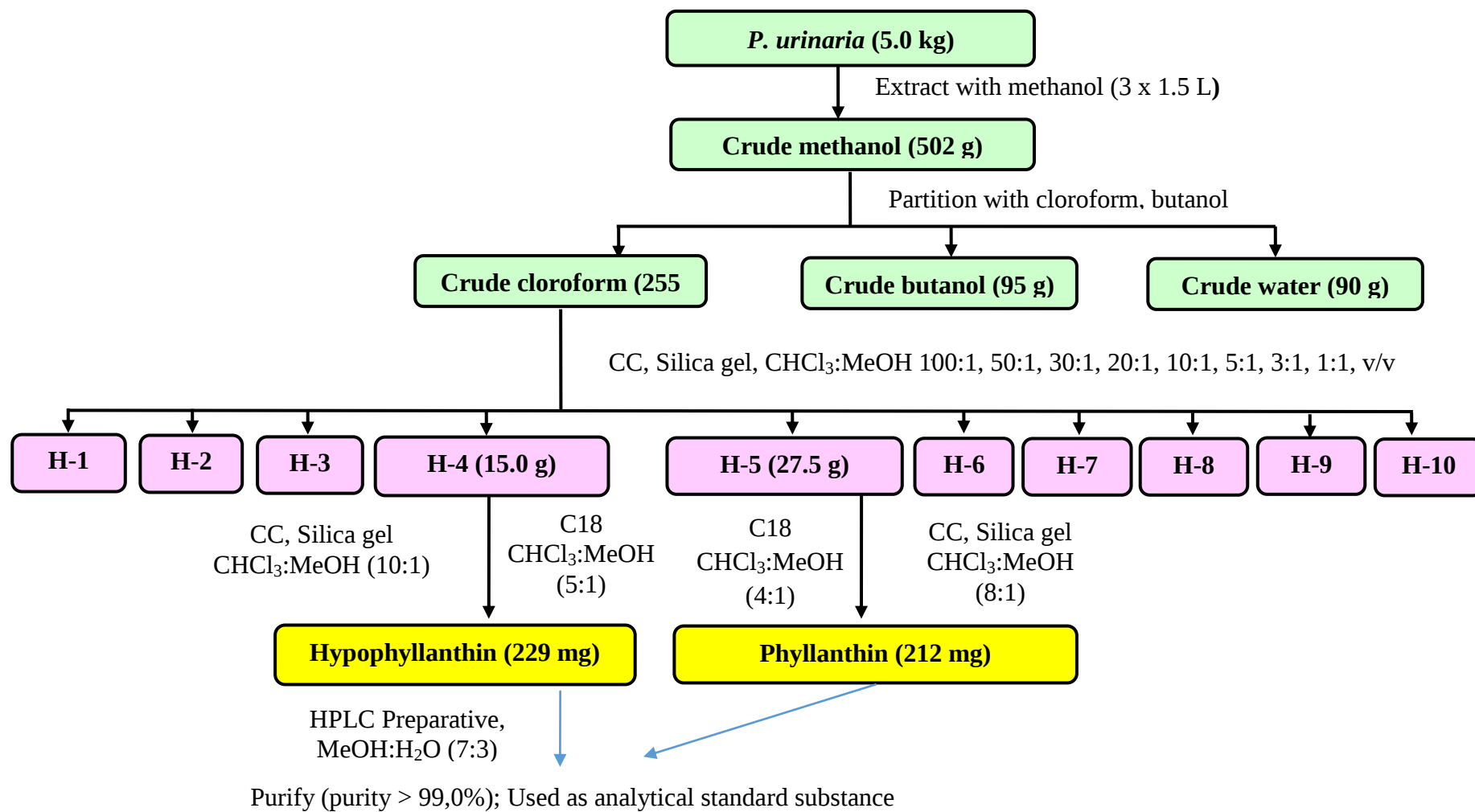
(iii) Compound SM-3: reddish brown powder; m.p 232-234 °C; UV (MeOH) λ_{max} (loge) 250 nm. ESI-MS $m/z = 279 [M+H]^+$ and revealed the molecular formula as $C_{18}H_{12}O_3$. NMR spectral data shown in table 3.5. The results obtained confirm that the SM-3 compound is tanshinon I.

3.1.3. Extraction of natural compounds from the *E. longifolia* plant and structural properties

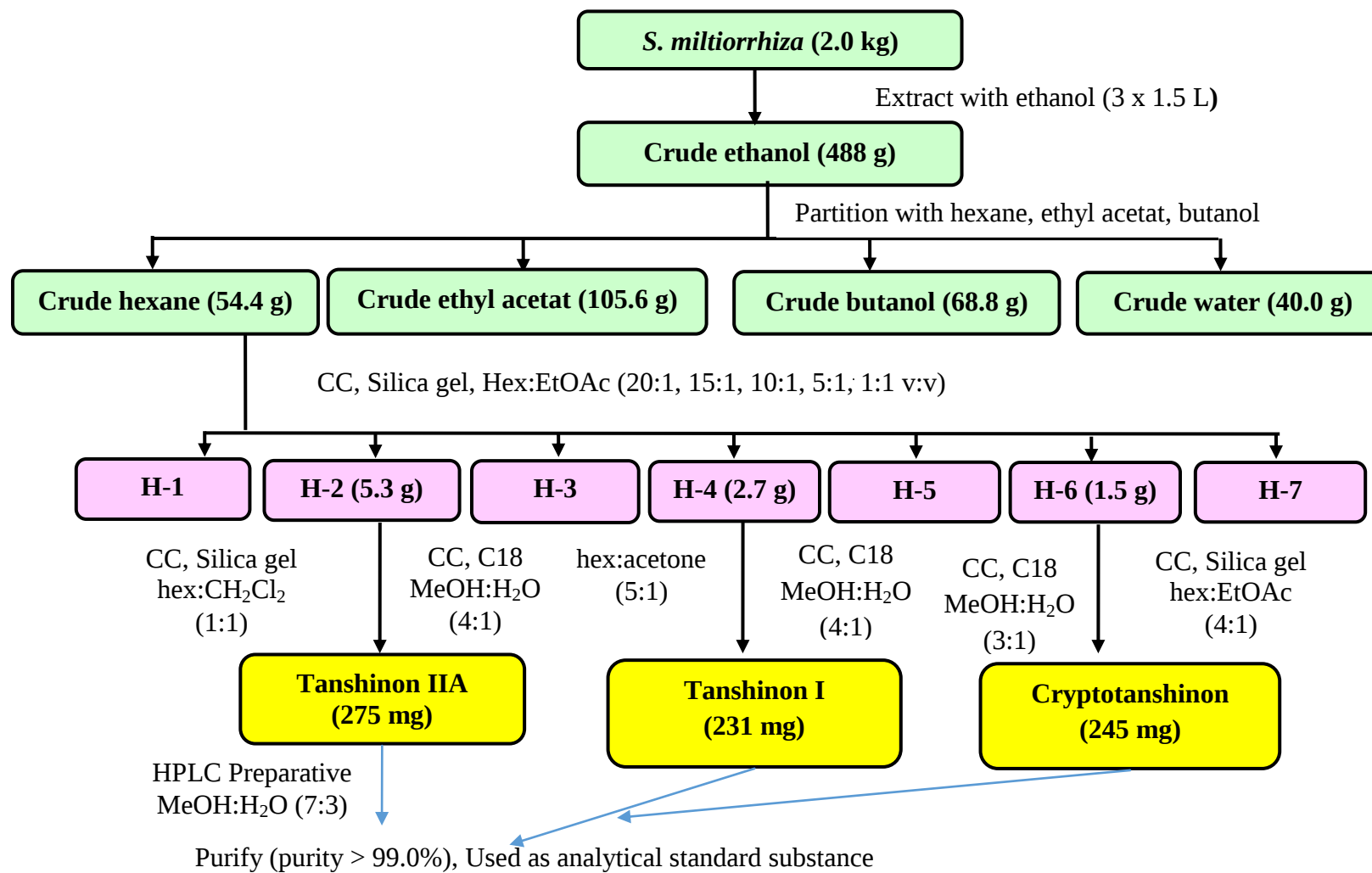
3.1.3.1. Extraction and isolation

3.1.3.2. Identification of the standard compounds

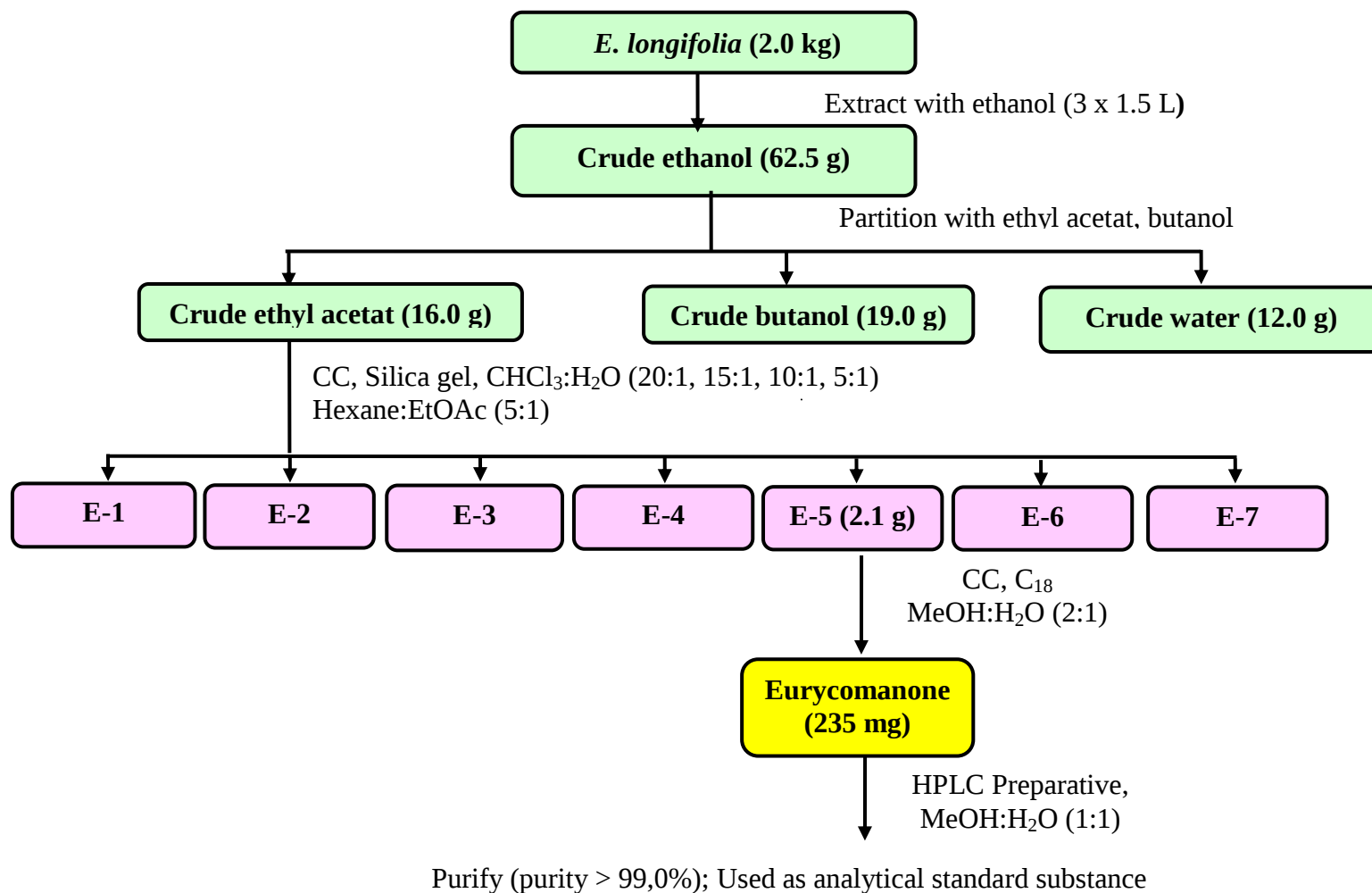
Compound EL-1: white powder; m.p. 254-255 °C; $[\alpha]_D^{25} +26$ (c 0,30, MeOH); UV (MeOH) λ_{max} (loge) 255 and 360 nm. ESI-MS $m/z = 409,1 [M+H]^+$ and revealed the molecular formula as $C_{20}H_{24}O_4$. NMR spectral data shown in table 3.6. The results obtained confirm that the EL-1 compound is eurycomanone.



Scheme 3.1: Isolation of compounds from *P. urinaria*



Scheme 3.2. Isolation of compounds from *S. miltiorrhiza*



Scheme 3.3: Isolation of compounds from *E. longifolia*

3.2. PURIFY COMPOUNDS TO CREATE STANDARD SUBSTANCES

3.2.1. Standard hypophyllanthin and phyllanthin

Table 3.1. Data for evaluating the purity of the standard substance

Compound	Impurities 1		Impurities 2		Main compound		Purity (%)
	t _R	S	t _R	S	t _R	S	
Hypophyllanthin	7.976	1.95	9.302	2.93	6.889	2433.43	99.8
Phyllanthin	6.902	6.36	9.251	10.75	8.001	3403.76	99.5

3.2.2. Standard tanshinone I, cryptotanshinone and tanshinone IIA

Table 3.2. Data for evaluating the purity of the standard substance

Compound	Impurities 1		Impurities 2		Main compound		Purity (%)
	t _R	S	t _R	S	t _R	S	
Tanshinone I	5.10	1.46	8.62	2.51	7.78	1971.19	99.8
Cryptotanshinone	5.17	2.68	7.84	3.73	8.65	1275.13	99.5
Tanshinone IIA	8.69	3.81	12.79	4.66	15.19	2108.23	99.6

3.2.3. Standard eurycomanone

Table 3.3. Data for evaluating the purity of the standard substance

Compound	Impurities 1		Impurities 2		Main compound		Purity (%)
	t _R	S	t _R	S	t _R	S	
Eurycomanone	0.97	3.51	1.22	7.59	1.46	1839.25	99.4

3.3. PROCEDURE FOR ANALYSIS OF NATURAL BIOACTIVE COMPOUND

Based on the investigation of the factors affecting the LC-MS/MS analysis such as: mobile phase composition (solvent system, buffer solution pH), column temperature, mobile phase flow rate, sample injection volume, analysis time...) combined with reference to published results in documents, the process of simultaneous analysis of hypophyllanthin and phyllanthin was established in Figure 3.13; The simultaneous analysis of tanshinone I, cryptotanshinone and tanshinone IIA was shown in Figure 3.14. Similar to the above procedure, we have also shown the process of analyzing eurycomanone by LC-MS/MS method.

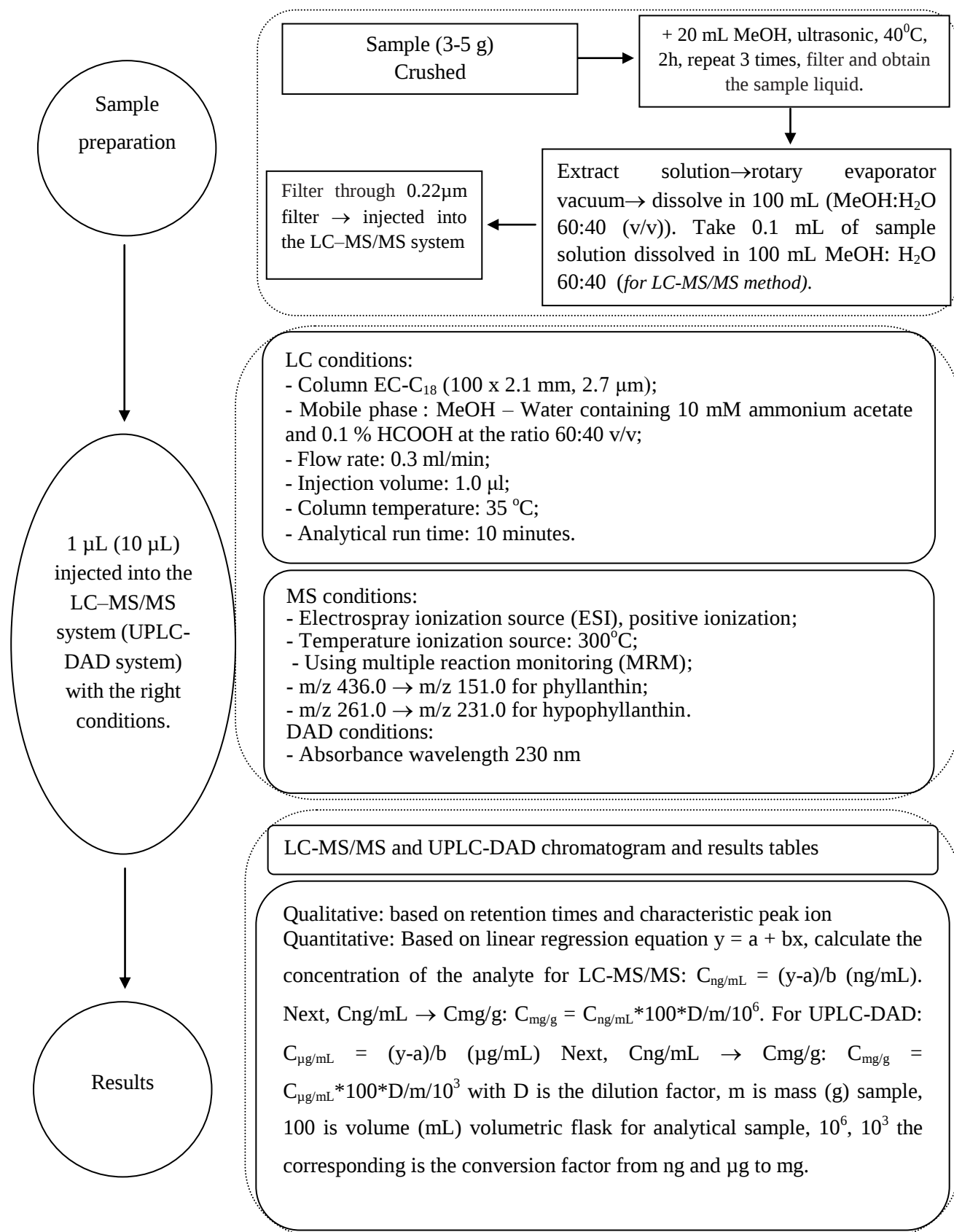


Figure 3.1. Simultaneous analysis of hypophylline and phyllanthin by LC-MS/MS, UPLC-DAD method
(Applicable to *P. urinaria* and its dietary supplements)

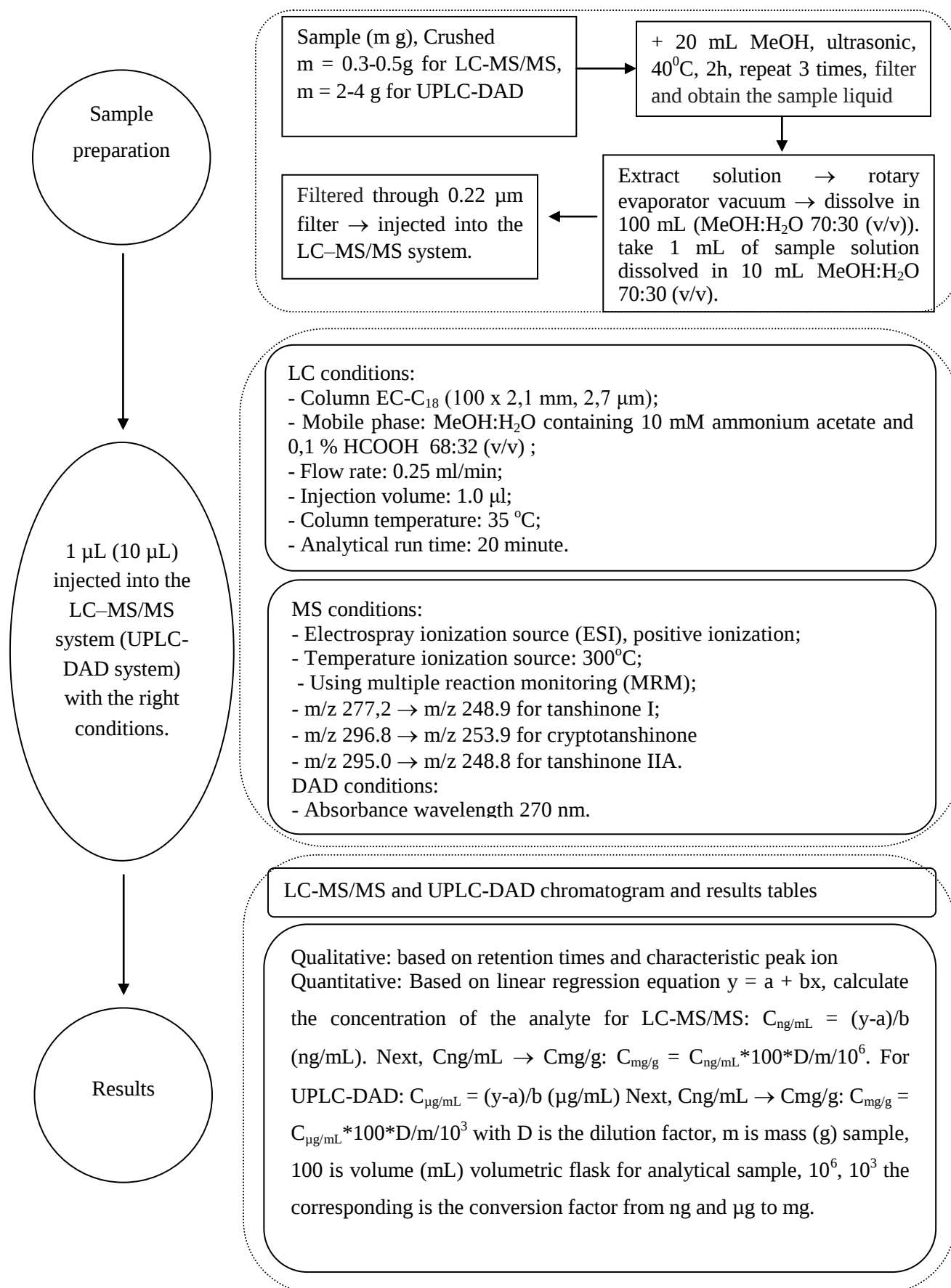


Figure 3.2. Simultaneous analysis of tanshinone I, cryptotanshinone and tanshinone IIA by LC-MS/MS, UPLC-DAD method

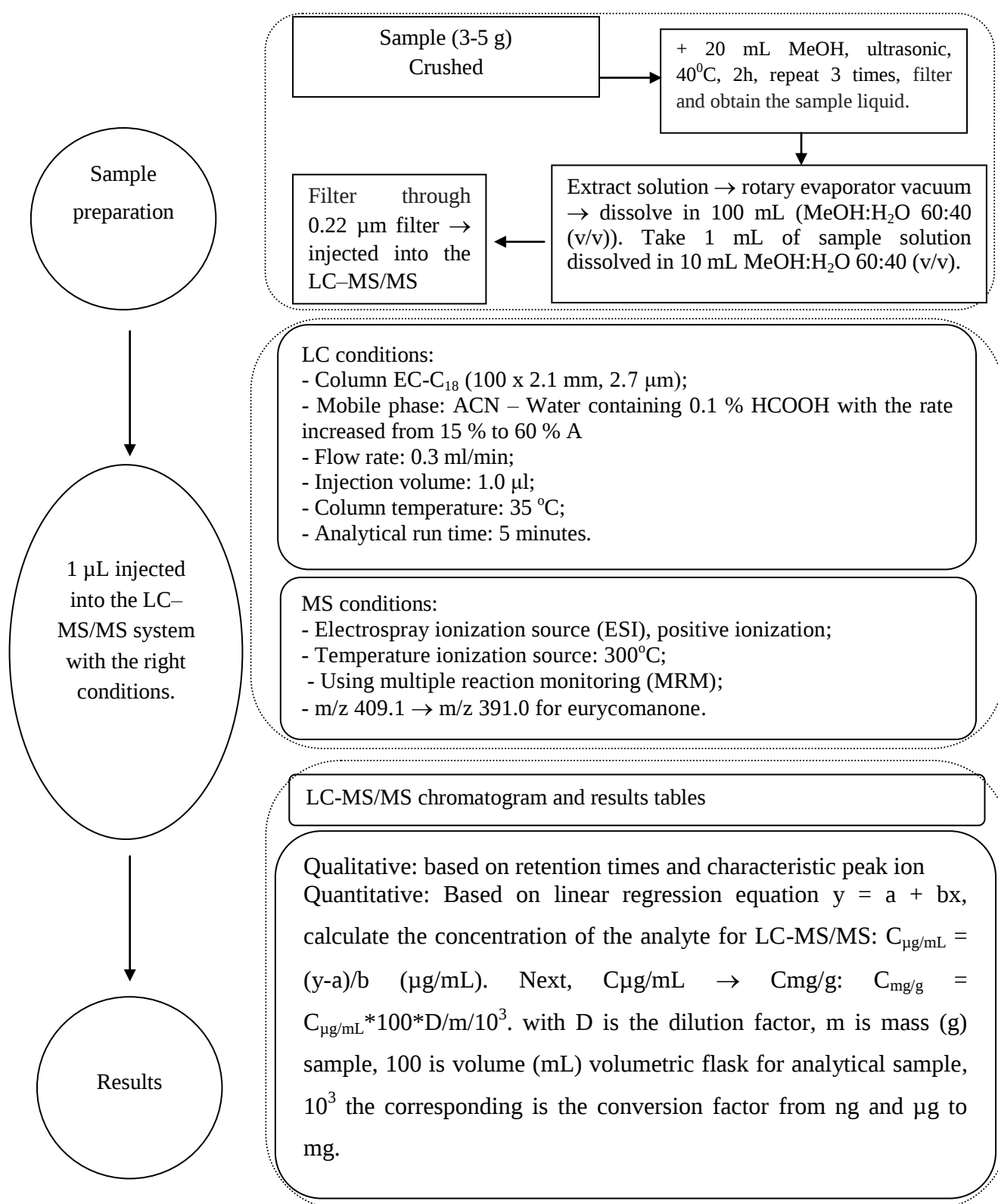


Figure 3.3. Analysis of eurycomanone by LC-MS/MS method

3.4. EVALUATION OF ANALYTICAL METHOD

3.4.1. The suitability of the system

The standard solutions of hypophyllanthin and phyllanthin;tanshinone I, cryptotanshinone and tanshinone IIA; eurycomanone are analyzed repeatedly for six times and the respective retention time, and peak area are identified. The results show that each relative standard deviation of the parameter is lower than 2%. This indicates that the chromatographic conditions selected and the LC-MS/MS chromatographic system used are stable, suitable for qualitative, quantitative analysis of hypophyllanthin and phyllanthin;tanshinone I, cryptotanshinone and tanshinone IIA; eurycomanone in real samples (Table 3.10).

Table 3.4. Survey results on the stability of the LC-MS/MS equipment system (Simultaneous analysis of hypophyllanthin and phyllanthin (n=6))

Experiment	Hypophyllanthin				Phyllanthin			
	t	S	a	D	t	S	a	D
1	6.902	262.6327	0.98	40535	7.976	300.7612	1.01	44016
2	6.889	263.1130	1.01	40649	7.997	301.1024	0.99	44750
3	6.903	262.3435	1.02	40673	8.001	300.5615	0.99	49994
4	6.887	261.9856	1.01	40569	8.003	301.2019	1.02	49913
5	6.901	260.9899	0.98	40684	7.999	302.0199	0.98	51015
6	6.890	264.1241	0.99	40595	7.989	299.9845	1.03	50179
TB	6.90	262.5315	0.99	40617	7.994	300.9386	1.00	50144
RSD (%)	0.1	0.3	1.8	0.2	0.1	0.2	1.6	1.0

Table 3.5. Survey results on the stability of the LC-MS/MS equipment system (Simultaneous analysis of tanshinone I, cryptotanshinone and tanshinone IIA (n = 6))

Experiment	Tanshinone I				Cryptotanshinone				Tanshinone IIA			
	t	S	a	D	t	S	A	D	t	S	a	D
1	7.782	380.1	0.99	34535	8.66	367.7	0.98	30535	15.10	600.6	1.01	50016
2	7.785	379.9	1.02	32649	8.65	368.1	1.01	30649	15.18	599.2	0.99	49750
3	7.782	378.5	1.00	30673	8.62	367.5	1.02	30673	15.19	601.3	0.99	49994
4	7.785	381.2	1.01	36569	8.64	366.6	1.01	30569	15.19	598.9	1.02	49913
5	7.792	380.5	0.98	30684	8.63	367.9	0.98	30684	15.19	599.8	0.98	51015
6	7.846	379.6	0.98	33595	8.69	368.5	0.99	30595	15.19	603.8	1.03	50179
TB	7.795	379.97	0.99	33950	8.65	367.7	0.99	30617	15.17	600.6	1.00	50144
RSD (%)	0.3	0.2	1.6	3.5	0.3	0.2	1.8	0.2	0.2	0.3	1.6	1.0

Table 3.6. Survey results on the stability of the LC-MS/MS equipment system

Experiment	Eurycomanone			
	t	S	a	D
1	1.456	280.1	0.95	24535
2	1.454	279.9	1.02	24649
3	1.457	278.5	1.05	23673
4	1.456	281.2	1.04	26569
5	1.455	280.5	0.96	24684
6	1.454	279.6	0.94	23595
TB	1.455	279.97	0.99	24284
RSD (%)	0.1	0.3	4.9	5.0

3.4.2. Specificity of analytical method

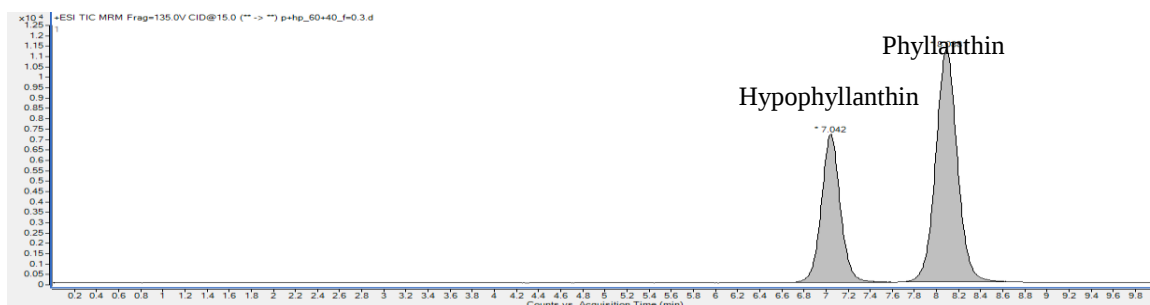


Figure 3.4. LC-MS/MS chromatogram for standard solutions containing hypophyllanthin and phyllanthin

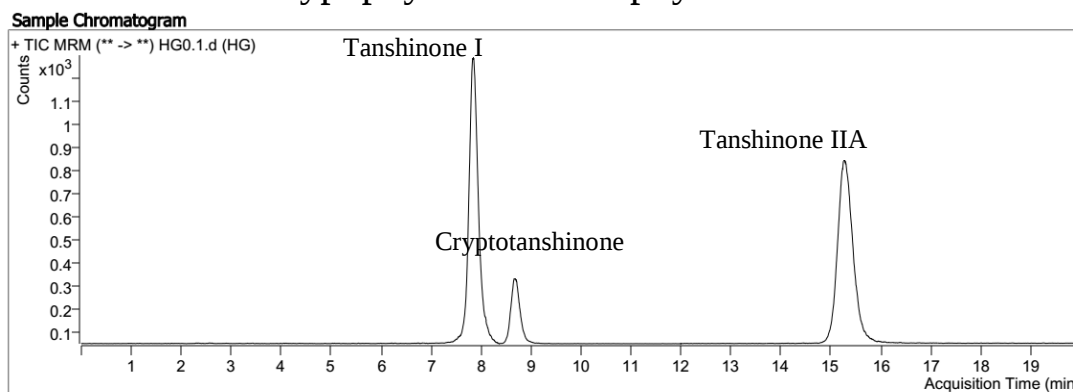


Figure 3.5. LC-MS/MS chromatogram for standard solutions containing tanshinone I, cryptotanshinone and tanshinone IIA.

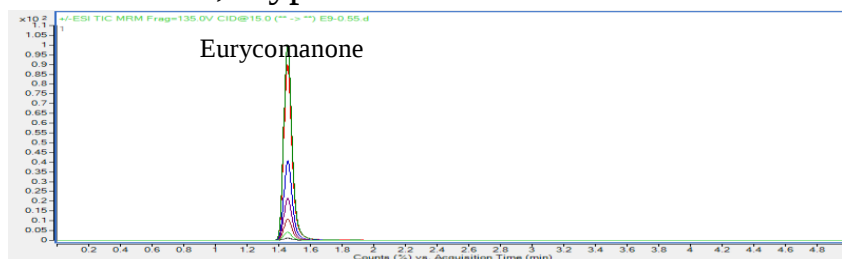


Figure 3.6. LC-MS/MS chromatogram for standard solutions containing

3.4.3. Linearity

- For hypophyllanthin and phyllanthin:

LC-MS/MS method:

$$y = 11,251 \cdot C_{\text{hypophyllanthin}} - 405,977; R^2 = 0,9995; p < 0.0001;$$

$$y = 22,151 \cdot C_{\text{phyllanthin}} - 1308,984; R^2 = 0,9991; p < 0.0001;$$

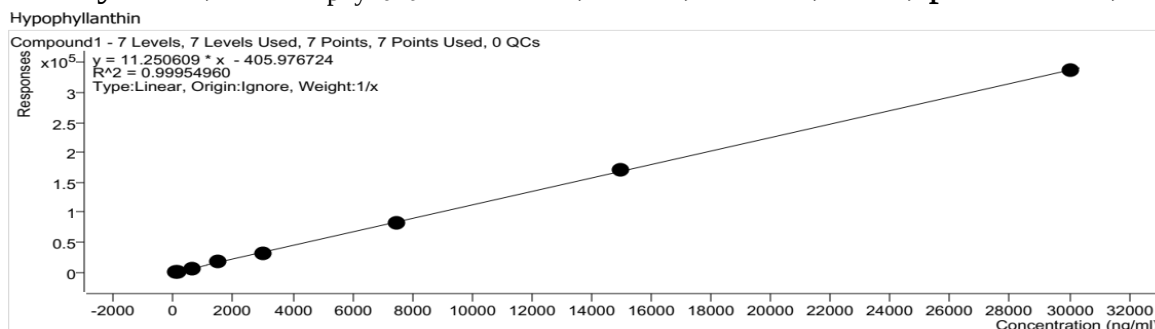


Figure 3.7. Linear regression line for hypophyllanthin using LC-MS/MS method

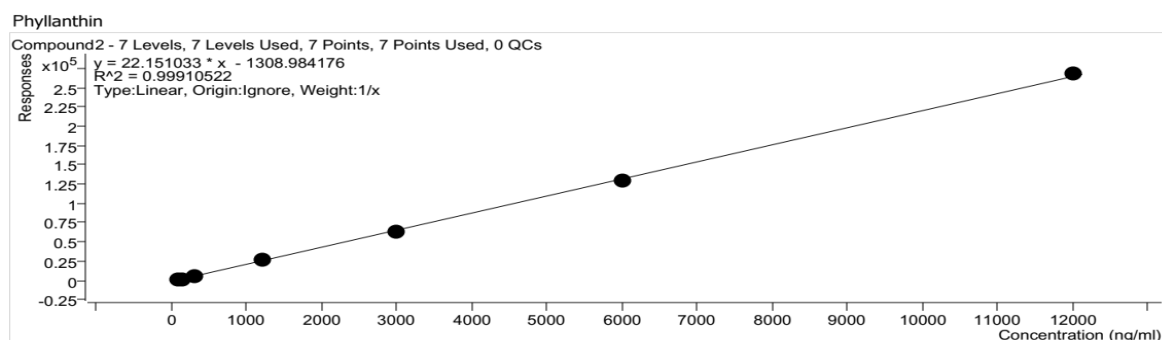


Figure 3.8. Linear regression line for phyllanthin using LC-MS/MS method

- For tanshinone I, cryptotanshinone, tanshinone IIA:

LC-MS/MS method:

$$y = -781.061 + 15.643 \cdot C_{\text{tanshinone I}}, R^2 = 0.999; p < 0.0001$$

$$y = -96.429 + 2.276 \cdot C_{\text{cryptotanshinone}}, R^2 = 0.999; p < 0.0001$$

$$y = -135.941 + 4.162 \cdot C_{\text{tanshinone IIA}}, R^2 = 0.999; p < 0.0001$$

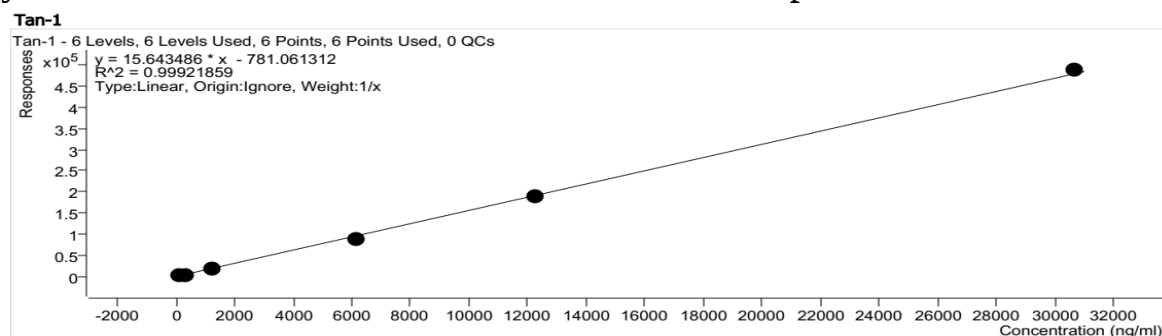


Figure 3.9. Linear regression line for tanshinone I using LC-MS/MS method

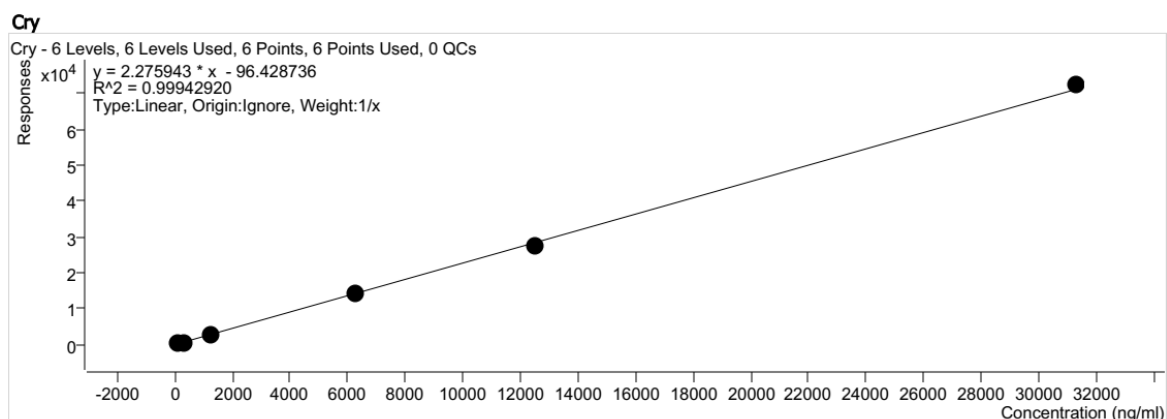


Figure 3.10. Linear regression line for cryptotanshinone using LC-MS/MS method

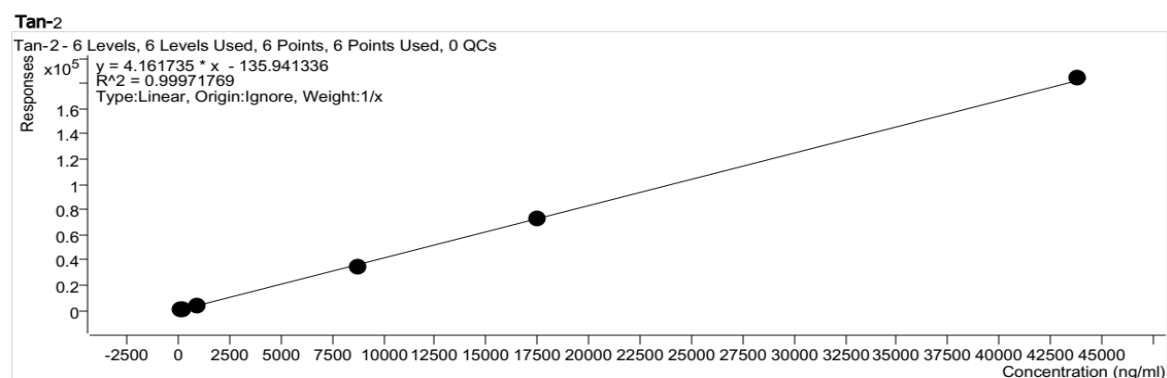


Figure 3.11. Linear regression line for tanshinone IIA using LC-MS/MS method

For eurycomanone:

LC-MS/MS method:

$$y = 1262.961 * C_{\text{eurycomanone}} + 15.631; \quad R^2 = 0.999; \quad p < 0.0001$$

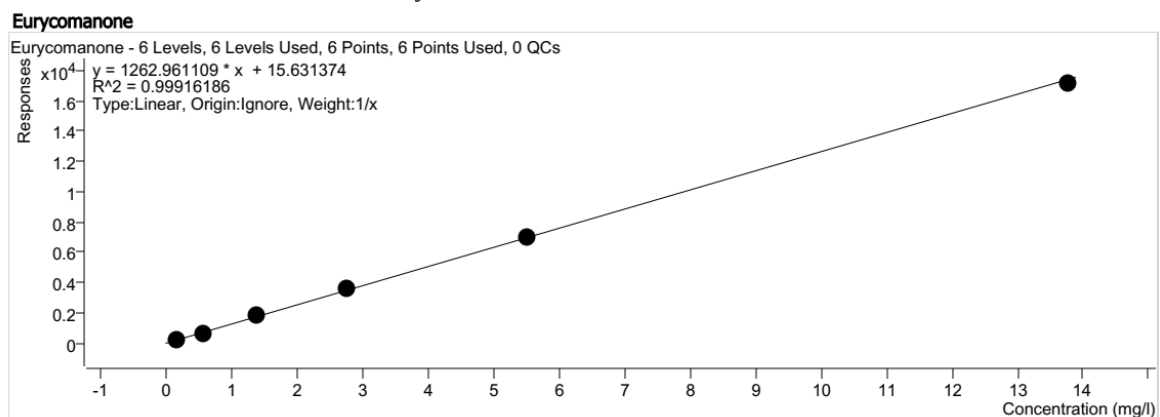


Figure 3.12. Linear regression line for eurycomanone using LC-MS/MS method

3.5. ANALYSIS OF COMPOUNDS IN REAL SAMPLES

3.5.1. Quality control of analytical methods

3.5.1.1. Repeatability

Table 3.7. Results of the repeatability using LC-MS/MS and UPLC-DAD methods

Compound	Sample	RSD (%) / $\frac{1}{2}$ RSD _H (%); n = 3	
		LC-MS/MS	UPLC-DAD
Hypophyllanthin	DHC-VX	0.02 / 3.8	1.1 / 2.0
	DHC-DH	1.0 / 3.9	0.8 / 1.9
	DHC-PNC	1.0 / 3.9	0.8 / 1.9
	DHC-PV	0.04 / 3.4	0.7 / 1.9
	DHC-DD5	0.05 / 4.3	1.7 / 2.1
	DHC-KH	0.01 / 3.0	0.2 / 1.8
Phyllanthin	DHC-VX	0.02 / 3.4	2.8 / 3.4
	DHC-DH	0.03 / 4.0	3.2 / 4.0
	DHC-PNC	0.01 / 3.2	1.2 / 3.2
	DHC-PV	0.01 / 2.8	1.0 / 2.8
	DHC-DD5	1.1 / 4.1	2.6 / 4.1
	DHC-KH	0.01 / 2.6	0.6 / 2.6
Eurycomanone	Vung Tau	0.01 / 2.6	
	Dak Nong	0.01 / 3.7	
	Hoa Binh	0.01 / 2.9	
	Nghe An	0.01 / 3.4	
	Bac Giang	0.01 / 2.4	
	Ha Giang	0.01 / 2.9	

Table 3.8. Results of the repeatability using LC-MS/MS and UPLC-DAD methods

Compound	Sample	RSD (%) / $\frac{1}{2}$ RSD _H (%); n = 3	
		LC-MS/MS	UPLC-DAD
Tanshinone I	Sapa	0.01 / 2.5	0.5 / 2.5
	Lam Dong	0.01 / 2.3	0.2 / 2.3
	Ha Giang	0.01 / 2.3	0.4 / 2.3
	Moc Chau	0.01 / 2.4	1.1 / 2.4
	Quang Tay	0.01 / 2.6	1.3 / 2.6
	Muong Long	0.01 / 2.7	1.2 / 2.7
Tanshinone IIA	Sapa	0.01 / 2.0	0.3 / 2.0
	Lam Dong	0.01 / 2.0	0.3 / 2.0

	Ha Giang	0.01 / 1.9	0.5 / 1.9
	Moc Chau	0.01 / 2.1	0.6 / 2.1
	Quang Tay	0.11 / 2.2	0.6 / 2.2
	Muong Long	0.01 / 2.3	0.8 / 2.3
Cryptotanshinone	Sapa	0.01 / 2.2	0.4 / 2.2
	Lam Dong	0.01 / 2.1	0.2 / 2.1
	Ha Giang	0.01 / 2.2	0.5 / 2.2
	Moc Chau	0.01 / 2.3	0.5 / 2.3
	Quang Tay	0.01 / 2.4	0.4 / 2.4
	Muong Long	0.01 / 2.3	0.8 / 2.3

3.5.1.2. Correctness

Table 3.9. Results the accuracy using LC-MS/MS method for hypophyllanthin and phyllanthin

Compound	Sample	Rev (%)			Rev _{Aver} (%)
		Level 1	Level 2	Level 3	
Phyllanthin	DHC-VX	97/95/96	98/98/100	99/100/100	95 - 100
	DHC-DH	97/95/95	99/98/99	100/99/99	95 - 100
	DHC-PNC	96/97/97	98/98/100	99/99/100	96 - 100
	DHC-PV	95/101/99	98/101/100	99/99/100	95 - 101
	DHC-DD5	97/102/96	99/99/100	99/100/100	97 - 102
	DHC-KH	95/97/99	99/100/100	99/99/100	95 - 100
Hypophyllanthin	DHC-VX	97/97/98	97/95/99	99/99/100	95 - 100
	DHC-DH	95/99/103	98/100/99	99/101/100	95 - 103
	DHC-PNC	96/96/101	100/97/99	99/99/100	96 - 101
	DHC-PV	97/103/97	99/99/101	99/99/100	97 - 103
	DHC-DD5	96/95/101	96/102/100	99/99/100	95 - 102
	DHC-KH	94/96/101	97/101/97	99/100/99	94 - 101
Eurycomanone	Vung Tau	97/99/100	99/98/101	101/100/99	97 - 101
	Dak Nong	99/97/99	99/99/100	100/99/100	97 - 100
	Hoa Binh	98/99/99	99/98/99	98/101/100	98 - 101
	Nghe An	97/99/101	99/98/100	100/99/102	97 - 102
	Bac Giang	99/98/99	100/99/101	99/101/99	98 - 101
	Ha Giang	99/98/98	99/98/100	98/99/101	98 - 101

Table 3.10. Results the accuracy using LC-MS/MS method for tanshinone I, cryptotanshinone và tanshinone IIA

Compound	Sample	Rev(%)			Rev _{Aver} (%)
		Level 1	Level 2	Level 3	
Tanshinone I	Sapa	100/98/103	102/98/103	103/100/97	97 - 103
	Lam Dong	95/96/97	102/98/99	102/101/96	96 - 102

	Ha Giang	96/98/97	102/100/98	98/102/97	96 - 102
	Moc Chau	96/98/97	103/101/98	99/103/102	96 - 103
	Quang Tay	98/96/96	102/100/98	98/100/101	96 - 102
	Muong Long	98/97/97	101/99/100	103/99/101	97 - 103
Cryptotanshinone	Sapa	97/100/97	102/97/100	98/102/97	97 - 102
	Lam Dong	97/98/97	98/103/98	99/101/97	97 - 103
	Ha Giang	96/103/98	99/103/99	97/101/97	96 - 103
	Moc Chau	97/103/101	98/101/103	98/96/102	97 - 103
	Quang Tay	97/99/96	103/101/98	104/101/97	96 - 104
	Muong Long	97/97/96	101/97/102	98/100/101	96 - 102
Tanshinone IIA	Sapa	98/97/98	102/97/98	100/102/100	97 - 102
	Lam Dong	97/98/99	100/97/97	98/100/101	97 - 101
	Ha Giang	98/96/99	101/97/101	101/99/102	97 - 102
	Moc Chau	98/97/98	101/97/102	99/100/102	97 - 102
	Quang Tay	96/96/97	102/98/97	99/101/102	96 - 102
	Muong Long	96/98/99	99/102/98	99/98/101	96 - 102

3.5.1.3. Limitation of detection (LOD) and limitation of quantitation (LOQ)

Table 3.11. Data for determining LOD values of hypophyllanthin, phyllanthin and eurycomanone compounds

Compound	hypophyllanthin	phyllanthin	eurycomanone
C (ng/mL)	0.1	0.15	0.1
S/N	5/1.3	200/50	0.32/0.09

- For tanshinone I, cryptotanshinone and tanshinone IIA: the corresponding LOD is 0.39, 0.4 and 0.35 ppb, respectively (corresponding to the values LOQ is 1.3, 1.4 and 1.2 ppb, respectively) (Table 3.18 and appendix B3, B4, B5).

Table 3.12. Data for determining LOD values of tanshinone I, cryptotanshinone and tanshinone IIA compounds

Compound	tanshinone I	cryptotanshinone	tanshinone IIA
C (ng/mL)	0.39	0.4	0.35
S/N	95/20	95/35	90/22

3.5.2. Content of compounds in actual samples

(iii) Eurycomanone content in *E. longifolia* plant:

Table 3.13. Content (mg/g) of eurycomanone in actual samples

Sample	Vung Tau	Dak Nong	Hoa Binh	Nghe An	Bac Giang	Ha Giang
C	1.8533 ±	0.1716 ±	0.8015 ±	0.2739 ±	3.1336 ±	0.9291 ±
	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001	0.0005	0.0001

Table 3.14. Content (mg/g) of hypophyllanthin and phyllanthin in actual samples

Sample	LC-MS/MS		UPLC-DAD	
	Hypophyllanthin	Phyllanthin	Hypophyllanthin	Phyllanthin
DHC-VX	0.1364 ± 0.0003	0.3249 ± 0.0005	0.135 ± 0.002	0.321 ± 0.009
DHC-DH	0.0607 ± 0.0002	0.1044 ± 0.0003	0.059 ± 0.001	0.096 ± 0.003
DHC-PNC	0.1197 ± 0.0012	0.4952 ± 0.0003	0.119 ± 0.001	0.420 ± 0.005
DHC-PV	0.3007 ± 0.0012	1.1547 ± 0.0006	0.299 ± 0.002	1.149 ± 0.012
DHC-DD5	0.0599 ± 0.0003	0.0805 ± 0.0009	0.059 ± 0.001	0.079 ± 0.002
DHC-KH	0.6602 ± 0.0008	1.9056 ± 0.0006	0.660 ± 0.001	1.901 ± 0.011
Leaf	0.2748 ± 0.0004	0.0439 ± 0.0004	-	-
Stem	0.0167 ± 0.0004	0.0051 ± 0.0003	-	-
Root	0.0029 ± 0.0002	0.0039 ± 0.0002	-	-

Table 3.15. Content (mg/g) of tanshinone I, tanshinone IIA and cryptotanshinone in actual samples

Sample	LC-MS/MS			UPLC-DAD		
	<i>Tanshinone I</i>	<i>Tanshinone IIA</i>	<i>Cryptotanshinone</i>	<i>Tanshinone I</i>	<i>Tanshinone IIA</i>	<i>Cryptotanshinone</i>
Sa Pa	2.4613 ± 0.0007	9.1889 ± 0.0002	4.6549 ± 0.0006	2.45 ± 0.01	9.18 ± 0.03	4.65 ± 0.02
Lam Dong	4.4286 ± 0.0009	9.8970 ± 0.0035	8.1589 ± 0.0006	4.43 ± 0.01	9.88 ± 0.03	8.14 ± 0.02
Ha Giang	3.5345 ± 0.0011	13.0252 ± 0.0004	5.2017 ± 0.0015	3.53 ± 0.02	12.99 ± 0.06	5.19 ± 0.03
Moc Chau	2.8852 ± 0.0009	8.3844 ± 0.0006	4.1723 ± 0.0005	2.88 ± 0.03	8.39 ± 0.05	4.16 ± 0.02
Quang Tay	1.5559 ± 0.0013	4.7958 ± 0.0007	2.8630 ± 0.0008	1.56 ± 0.02	4.78 ± 0.03	2.85 ± 0.01
Muong Long	1.2717 ± 0.0013	3.8278 ± 0.0003	3.8956 ± 0.0012	1.26 ± 0.02	3.81 ± 0.03	3.88 ± 0.03

3.6. ACETOGENIN COMPONENTS ISOLATED FROM *ANNONA MURICATA*

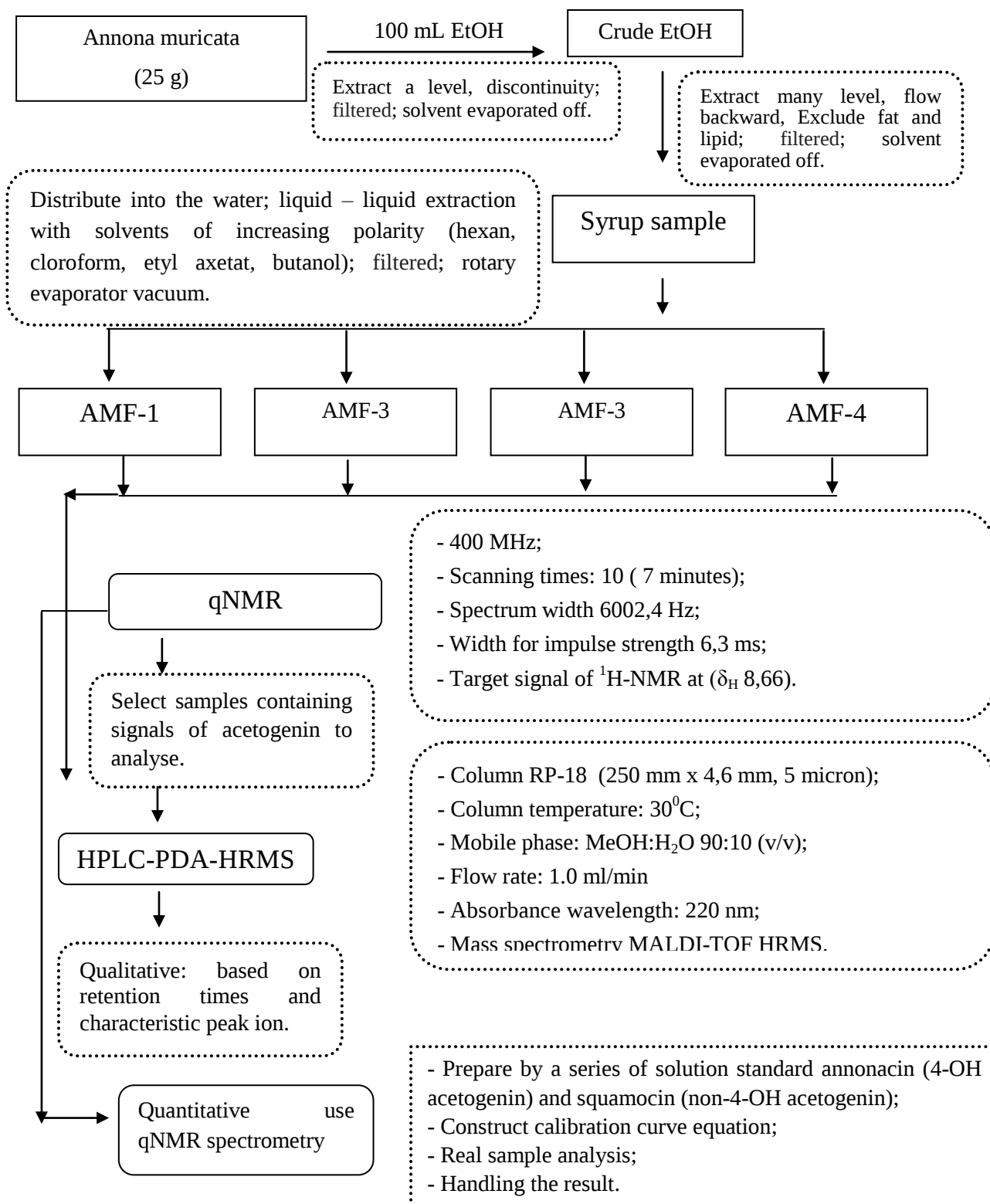


Figure 3.13. The process of qualitative and quantitative analysis of acetogenin compounds from the extract of the annona muricata plant

3.6.1. Determination of the fraction rich in the active substance acetogenin

The efficiency of the fractionation procedures was evaluated utilizing ^1H NMR. AMF-3 ^1H NMR spectrum (CDCl_3 , 500 MHz) (Fig. 3.38, annexes B11, B12, B13) showed signals at δ_{H} 0.85 and 1.2 to 1.6, corresponding to a terminal methyl and the methylene signals in the long chain, respectively. The signal of an α,β -unsaturated γ -lactone ring at δ_{H} 6.96/7.17 (1H, H-33/35), 5.09/5.10 (1H, H-34/36) as well as the mono-THF ring with one/two flanking hydroxyl signal at δ_{H} 3.76/3.81 and 3.37/3.44 were also detected. The above signals are specific to the acetogenin group and they are consistent with the published results at [46], [59], [90].

These specific signals were not observed in the ^1H NMR spectra of AMF-1, AMF-2 and AMF-4 (the fatty acid rich fraction). These findings clearly demonstrated the efficiency of the developed fractionation protocol for concentrating EEAM acetogenins in AMF-3.

3.6.2. Qualitative the major acetogenins in the fraction AMF-3

From characteristic fragments with m/z in the range 100-1000 on the MADLI-TOF-HRMS spectrum, the main acetogenin compounds in the AMF3 fraction (extracted from the leaves of the *annona muricata*) were identified. The identification (or qualitative) of acetogenin compounds is based on spectral library (pre-installed in the machine) and combined with previous publications. These major components are annonacin (m/z , 597.47), *cis*-annomonacin (m/z , 625.50), annocatacin A (m/z , 579.46), cohibin A (m/z , 549.48), *cis*-corossolone (m/z , 579.46), muricin A (m/z , 597.47), muricin B (m/z , 597.47), muricin C (m/z , 597.47), muricin D (m/z , 569.44), muricin E (m/z , 569.44), muricin F (m/z , 595.46), muricin G (m/z , 595.46), muricin H (m/z , 581.48) and muricin I (m/z , 607.49).

3.6.3. Quantification of AMF-3 major acetogenins

The quantitative analysis of the total 4-OH acetogenin compounds and the total non-4-OH acetogenin compounds in AMF-3 fraction was using by NMR spectrum analysis method. The measured signal or peak area (to establish the internal standard), the target signal of internal standard (δ_{H} 8.66). The integral ratio and concentration further was plotted using linear regression, and calibration curve (standard curve and the determination

coefficient of regression analysis) for the standard of two type acetogenin compounds could be obtained and to be the basis of this quantitative analysis method (Table 3.22).

Table 3.16. Standard addition line equation, LOD and LOQ for the two analyte.

Analyte	Equation	R ²	LOD (mg/mL)	LOQ (mg/mL)
Annonacin	y= 3.4705x + 1.1743	0.9925	0.05	0.14
Squamocin	y= 3.575x + 0.209	0.9997	0.06	0.17

The results show that the absolute concentrations of total 4-OH acetogenin compounds was 2.88 mg and that of total non-4-OH acetogenin compounds was 1.77 mg in 10 mg (containing around 46% active ingredient acetogenins) of AMF-3.

3.7. CONSTITUENTS OF ESSENTIAL OILS FROM THE *ALPINIA MACROURA*

The yield of essential oils were 0.15% (v/w, stem) < 0.18% (v/w, fruit) < 0.21% (v/w, leaf), 0.24% (v/w, root), and 0.30% (v/w, flower), calculated on a dry weight basis. Oil samples were light yellow (leaf and root), yellow (stem) and colourless (fruit and flower) (Table 3.23).

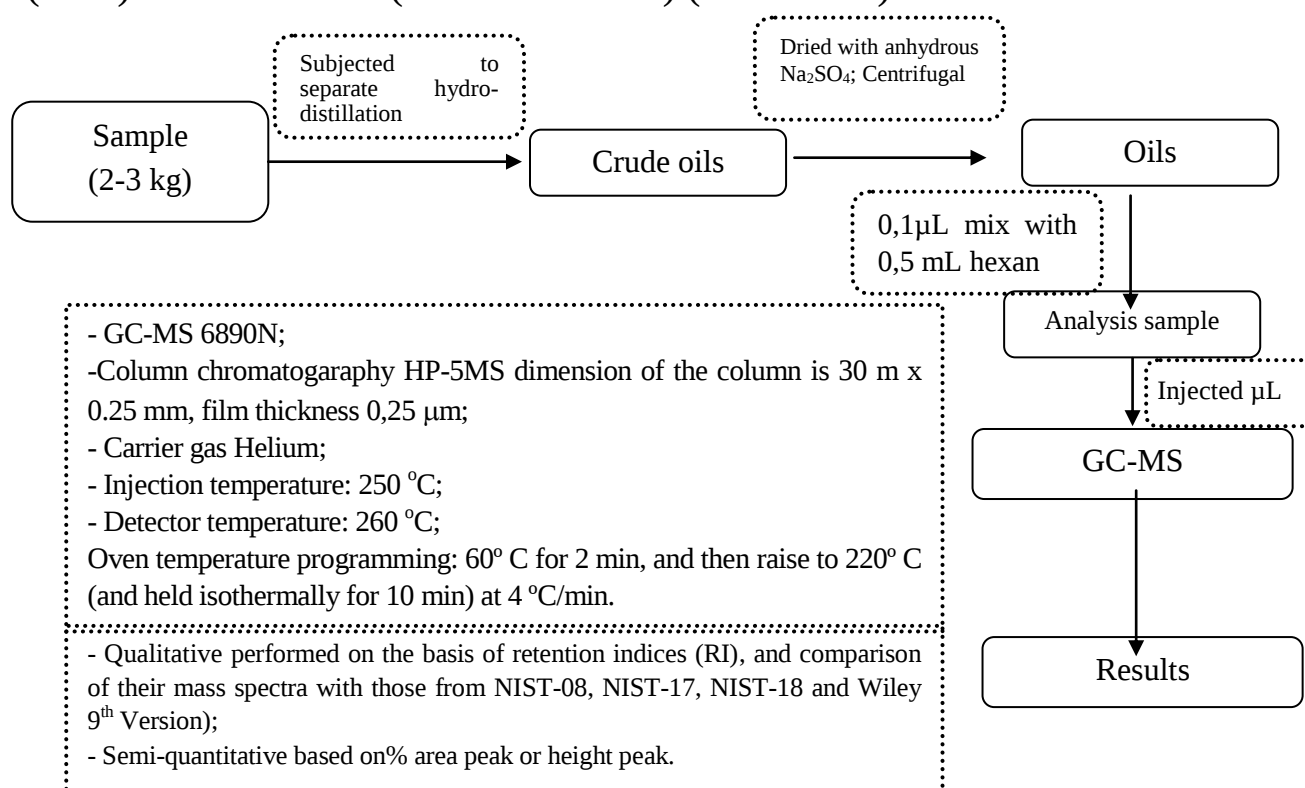


Figure 3.14. Process of qualitative and semi-quantitative analysis of compounds in essential oils extracted from parts of the *Alpinia macrooura* plant

The essential oil composition obtained from the stem contains 32 constituents (accounting for 93.6% of the total essential oil content). In the mixture, containing the most are monoterpene hydrocarbons (71.9%), followed by oxygenated monoterpenes (13.6%); The essential oil obtained from the fruit contains 42 constituents (accounting for 93.5% of the total essential oil content) and also contains the most monoterpene hydrocarbons (35.9%), followed by the sesquiterpene hydrocarbons (30.5%) and oxygenated monoterpenes (18.0%); Essential oils obtained from the leaves contain 33 constituents (accounting for 95.2% of the total essential oil content), including the components (in descending order) as follows: linalool (25.6%) > δ -cadinene (20.4%); Essential oils obtained from roots contain 46 constituents (92.0% of the total essential oil content). In the mixture, containing the most are hydrocarbon monoterpene (56.3%) > oxygenated monoterpene (21.7%) > hydrocarbon sesquiterpene (10.7%); The composition of essential oils obtained from flowers contains 16 constituents (accounting for 97.7% of the total essential oil content), of which monoterpene hydrocarbons (44.8%) is the largest, followed by oxygenated monoterpenes (22.9 %) and Sesquiterpene hydrocarbons (28.2%).

CONCLUDE

From the obtained results, the thesis comes to the following main conclusions:

1) On the basis of investigating the effects of the factors on the isolated process by different methods (thin layer chromatography, column chromatography, prepared chromatography), suitable conditions for the isolation of compounds phyllanthin, hypophyllanthin from *Phyllanthus urinaria*, tanshinone I, cryptotanshinone, tanshinone IIA from *Salvia miltiorrhiza* and eurycomanone from *Eurycoma longifolia* plant with over 95% purity for each substance have been found. The structure of these compounds is determined on the basis of physical data (^1H -NMR spectrum, ^{13}C -NMR spectrum, UV-Vis spectrum and ESI-MS mass spectrum).

2) The suitable conditions for liquid chromatography were found to purify the six compounds above and achieve the purity over 99% for each substance and thus, for the first time in our country chemicals that are qualified as standard substances for qualitative and quantitative analysis are prepared.

3) The process of simultaneous analysis of phyllanthin and

hypophyllanthin in *Phyllanthus urinaria* and functional foods prepared from that plant has been established; Simultaneous determination of tanshinone I, cryptotanshinone and tanshinone IIA in *Salvia miltiorrhiza* plant samples and determination of eurycomanone in *Eurycoma longifolia* by LC-MS / MS and UPLC-DAD method under appropriate experimental conditions and use of the generated standard is above. The LC-MS/MS method achieved good repeatability for all 06 substances with an RSD<2% (n = 3). The LC-MS / MS method achieved good accuracy with an average recovery of 95 - 104%, high sensitivity (or low LOD, about 0.1 - 0.5 ppb) and a sufficiently wide linear range (0.005 - 50 ppm) for $R^2 > 0.999$ and $p < 0.001$ for all 06 substances. Although the UPLC-DAD method is less repeatable than the LC-MS/MS method, it can also be used for quantitative analysis of 06 substances with the results obtained equivalent from the LC-MS / MS method ($p > 0.05$).

4) Using fractional extraction technique with different solvents, combined with the system of equipment qNMR and HPLC-PDA-HRMS has allowed the recognition of ethyl acetate extraction fraction (AMF-3) from *Annona muricata* which is rich in acetogenin compounds and qualitative analysis of compounds (of the acetogenin group) with biological activity in that segment has been done. On the other hand, the qNMR method quantified the total acetogenin group containing 4-OH and the total acetogenin group which did not contain 4-OH. The total content of these two groups of acetogenin accounted for 46% of the AMF3 fraction.

5) By separate hydro-distillation technique combined with the weight method, the essential oil content extracted from the parts (leaves, stems, roots, flowers, and fruits) of *Alpinia macroura* was determined. Using GC-MS method, for the first time in the world, the compounds present in essential oils obtained from plant parts have been quantified and semi-quantified. The composition of the constituents in essential oils in different parts of the plant is different. The monoterpene hydrocarbon group occupies the most (35.9 - 71.9%), followed by the oxygen derivative group of monoterpene (13.6 - 27.2%) and sesquiterpene hydrocarbon group (5.4 - 30.5%); the remaining groups <10%. These results are a good foundation for further studies on bioactive compounds present in this precious medicinal plant.

LIST OF RESEARCH WORKS

I. National journal

1. Doan Manh Dung, Dang Thi Ngan, Nguyen Thi Hue, Le Quoc Hung, Nguyen Huu Tung, Nguyen Dinh Luyen, Tran Dinh Thang (2019), Isolation and determination of tanshinon I, cryptotanshinone, tanshinone IIA in Danshen (*Salvia miltiorrhiza* B.) by ultra performance liquid chromatography (UPLC-DAD), *Journal of Science and Technology*, Vol. 137, pp. 100-105.
2. Doan Manh Dung, Nguyen Ngoc Tuan, Hoang Van Trung, Nguyen Huu Tung, Nguyen Dinh Luyen (2019), Isolation and determination of phyllanthine, hypophyllanthine in some plants from diep chau ha preparation (*Phyllanthus urinaria* L.) by ultra performance liquid chromatography (UPLC-DAD), *Journal of analytical sciences*, Vol. 24(2), pp. 37-42.
3. Doan Manh Dung, Nguyen Ngoc Tuan, Hoang Van Trung, Nguyen Huu Tung, Nguyen Dinh Luyen, Tran Dinh Thang (2019), Determination of phyllanthine, hypophyllanthine in some from diep chau ha drug (*Phyllanthus urinaria* L.) by liquid chromatography- mass spectrometry (LC-MS/MS), *Journal of analytical sciences*, Vol. 24(2), pp. 140-146.
4. Doan Manh Dung, Hoang Van Trung, Nguyen Dinh Luyen, Nguyen Huu Tung (2018), Isolation and quantity determination of eurycomanone from *Eurycoma longifolia* by liquid chromatography-mass spectrometry (LC-MS/MS) – *Hue University Journal of Science: Natural Science*, Vol. 127(1B), pp. 153-162.
5. Doan Manh Dung, Nguyen Huu Tung, Nguyen Dinh Luyen (2018), Isolation and quantity determination of phyllanthin, hypophyllanthin from *Phyllanthus urinaria* L. by liquid chromatography- mass spectrometry (LC-MS/MS), *Journal of Science and Technology, Hue University of Science - Hue University*, Vol. 13(2), pp. 13-24.
6. Nguyen Huy Hung, Doan Manh Dung, Dinh Thi Truong Giang, Yang - Chang Wu, Tran Dinh Thang (2015), Qualitative, quantitative and bioactive annonaceous acetogenins of ethanol extracts from the leaves of *Annona muricata* by HPLC-PDA, qNMR, MALDI-TOF MS, *Vietnam Journal of Chemistry*, Vol. 53(6e1,2), pp. 232-236.

II. International journal

7. Le T. Huong, Do N. Dai, Mai V. Chung, Doan M. Dung & Isiaka A. Ogunwande (2017), Constituents of essential oils from the leaf, stem, root, fruit and flower of *Alpinia macroura* K. Schum, *Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas*, Vol. 16(1), pp. 26 - 33 (SCIE).
8. Doan Manh Dung at all, Simultaneous quantitative analyses of tanshinone IIA, cryptotanshinone, and tanshinone I in danshen (*Salvia miltiorrhiza*) cultivated in Vietnam using LC-MS/MS, *Indian Journal of Natural Products and Resources (IJNPR)*, (Inreview).

