

BỘ GIÁO DỤC
VÀ ĐÀO TẠO

VIỆN HÀN LÂM KHOA HỌC
VÀ CÔNG NGHỆ VIỆT NAM

HỌC VIỆN KHOA HỌC VÀ CÔNG NGHỆ



TRẦN THỊ BÍCH HÀ

**NGHIÊN CỨU THÀNH PHẦN HÓA HỌC, HOẠT TÍNH
SINH HỌC VÀ ĐỊNH LƯỢNG MỘT SỐ LIMONOID PHÂN
LẬP TỪ HAI LOÀI XU NHỎ (*Xylocarpus moluccensis*)
VÀ XU ỒI (*Xylocarpus granatum*)**

LUẬN ÁN TIẾN SỸ KHOA HỌC VẬT CHẤT

Hà Nội - Năm 2026

BỘ GIÁO DỤC VÀ ĐÀO TẠO

VIỆN HÀN LÂM KHOA HỌC
VÀ CÔNG NGHỆ VIỆT NAM

HỌC VIỆN KHOA HỌC VÀ CÔNG NGHỆ

TRẦN THỊ BÍCH HÀ

**NGHIÊN CỨU THÀNH PHẦN HÓA HỌC, HOẠT TÍNH
SINH HỌC VÀ ĐỊNH LƯỢNG MỘT SỐ LIMONOID PHÂN
LẬP TỪ HAI LOÀI XU NHỎ (*Xylocarpus moluccensis*)
VÀ XU ỒI (*Xylocarpus granatum*)**

LUẬN ÁN TIẾN SỸ KHOA HỌC VẬT CHẤT

Ngành: Hóa phân tích

Mã số: 9 44 01 18

**Xác nhận của Học
viện Khoa học và
Công nghệ**

Người hướng dẫn 1

Người hướng dẫn 2

TS. Nguyễn Văn Thanh

GS.TS. Trần Việt Hùng

Hà Nội - Năm 2026

LỜI CAM ĐOAN

Tôi xin cam đoan luận án: “Nghiên cứu thành phần hóa học, hoạt tính sinh học và định lượng một số limonoid phân lập từ hai loài Xu nhỏ (*Xylocarpus moluccensis*) và Xu ổi (*Xylocarpus granatum*)” là công trình nghiên cứu khoa học mang tính độc lập của riêng tôi và nhóm nghiên cứu dưới sự hướng dẫn của thầy TS. Nguyễn Văn Thanh và GS.TS. Trần Việt Hùng. Luận án sử dụng thông tin trích dẫn từ nhiều nguồn tham khảo khác nhau và các thông tin trích dẫn được ghi rõ nguồn gốc. Các số liệu, kết quả được trình bày trong luận án là hoàn toàn trung thực và một phần đã được công bố trên các tạp chí khoa học chuyên ngành trong nước, quốc tế và được sự đồng ý của nhóm nghiên cứu. Các số liệu, kết quả trong luận án là trung thực, nếu sai tôi hoàn toàn chịu trách nhiệm trước pháp luật.

Hà nội, ngày tháng năm 2026

Tác giả luận án

Trần Thị Bích Hà

LỜI CẢM ƠN

Lời đầu tiên, Tôi xin bày tỏ lòng biết ơn sâu sắc và lòng kính trọng nhất tới thầy hướng dẫn khoa học TS. Nguyễn Văn Thanh và GS.TS. Trần Việt Hùng, những người thầy đã định hướng nghiên cứu, tận tình hướng dẫn, giúp đỡ, động viên, khích lệ và tạo mọi điều kiện thuận lợi nhất cho tôi trong suốt thời gian thực hiện luận án.

Tôi xin trân trọng cảm ơn Ban lãnh đạo Viện Hóa học (Viện Hóa Sinh Biển), Viện Hàn Lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam; Ban lãnh đạo Viện Kiểm nghiệm Thuốc Thành Phố Hồ Chí Minh đã quan tâm, giúp đỡ và đã tạo mọi điều kiện thuận lợi về cơ sở vật chất, trang thiết bị nghiên cứu cho tôi trong quá trình học tập và nghiên cứu.

Tôi xin chân thành cảm ơn đến quý anh chị em đồng nghiệp Phòng Hoạt chất sinh học, Viện Hóa Học (Viện Hóa Sinh Biển), Viện Hàn Lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam và Viện Kiểm nghiệm Thuốc Thành Phố Hồ Chí Minh đã có những lời khuyên bổ ích, những góp ý quý báu cho tôi trong suốt quá trình thực hiện và hoàn thành luận án.

Tôi xin chân thành cảm ơn Ban Lãnh đạo, các phòng thuộc Học viện Khoa học và Công nghệ - Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam; Ban lãnh đạo, các phòng thuộc Viện Công nghệ Tiên tiến - Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam đã tạo điều kiện thuận lợi và giúp đỡ tôi hoàn thành mọi thủ tục cần thiết trong quá trình làm nghiên cứu.

Tôi xin chân thành cảm ơn các nhà khoa học đã giúp đỡ, đóng góp nhiều ý kiến quý báu liên quan đến luận án cũng như đánh giá chất lượng luận án để bản luận án được hoàn thiện hơn.

Cuối cùng, tôi xin gửi lời cảm ơn sâu sắc nhất đến những người đồng nghiệp, bạn bè và gia đình đã luôn quan tâm, động viên khích lệ, ủng hộ và giúp đỡ tôi trong suốt quá trình học tập và nghiên cứu.

Hà Nội, ngày tháng năm 2026

Tác giả luận án

Trần Thị Bích Hà

MỤC LỤC

LỜI CAM ĐOAN.....	i
LỜI CẢM ƠN	ii
MỤC LỤC.....	iii
DANH MỤC CÁC KÝ HIỆU, CÁC CHỮ VIẾT TẮT	vi
DANH MỤC BẢNG.....	viii
DANH MỤC HÌNH VẼ, ĐỒ THỊ	x
MỞ ĐẦU.....	1
CHƯƠNG 1. TỔNG QUAN	4
1.1. Giới thiệu về chi Xu (<i>Xylocarpus</i>).....	4
1.1.1. Đặc điểm thực vật	4
1.1.2. Công dụng	4
1.2. Cây Xu nhỏ	5
1.2.1. Đặc điểm thực vật	5
1.2.2. Mô tả	5
1.3. Cây Xu ổi.....	6
1.3.1. Đặc điểm thực vật	6
1.3.2. Mô tả	6
1.4. Các nghiên cứu về thành phần hóa học của chi Xu (<i>Xylocarpus</i>)	6
1.4.1. Nhóm triterpenoid	8
1.4.2. Nhóm chất steroid	21
1.4.3. Nhóm chất alkaloid	22
1.4.4. Nhóm chất phenolic	23
1.4.5. Nhóm chất monoterpene	23
1.4.6. Nhóm chất flavanol	24
1.4.7. Các thành phần khác	24
1.5. Hoạt tính sinh học của chi Xu.....	25
1.5.1. Hoạt tính gây độc tế bào.....	25
1.5.2. Hoạt tính chống đông.....	29
1.5.3. Hoạt tính kháng khuẩn	30
1.5.4. Hoạt tính chống sốt rét	30
1.5.5. Hoạt tính chống tiêu chảy	30
1.5.6. Hoạt tính ức chế thần kinh	30
1.5.7. Hoạt tính chống nấm	31
1.6. Tình hình nghiên cứu về chi Xu tại Việt Nam.....	31
1.7. Phương pháp phân tích	31
1.7.1. Phương pháp Cộng hưởng từ hạt nhân định lượng (qNMR)	31
1.7.2. Phương pháp quang phổ lưỡng sắc tròn CD	32
1.7.3. Phương pháp sắc ký lỏng ghép khối phổ LC-MS/MS	33
CHƯƠNG 2. ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU.....	35
2.1. Đối tượng nghiên cứu	35
2.2. Phương pháp nghiên cứu	36
2.2.1. Dung môi, hóa chất.....	36
2.2.2. Trang thiết bị.....	36
2.2.3. Phương pháp phân lập các hợp chất	37
2.2.4. Phương pháp xác định cấu trúc hóa học các hợp chất.....	43

2.2.5. Phương pháp thử hoạt tính kháng vi sinh vật	43
2.2.6. Phương pháp thử hoạt tính gây độc tế bào	45
2.2.7. Xác định độ tinh khiết XM07, XM09, XM10 bằng phương pháp qNMR ..	47
2.2.8. Phân tích định tính, định lượng XM07, XM09, XM10 bằng phương pháp sắc ký lỏng ghép khối phổ (LC-MS/MS).....	48
2.2.9. Xử lý mẫu phân tích định tính, định lượng.....	49
2.2.10. Thẩm định quy trình phân tích.....	49
CHƯƠNG 3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN.....	51
3.1. Xác định cấu trúc các hợp chất từ cây Xu nhỏ	51
3.1.1. Hợp chất XM01 – chất mới.....	51
3.1.2. Hợp chất XM02 – chất mới.....	58
3.1.3. Hợp chất XM03 – chất mới.....	51
3.1.4. Hợp chất XM04 – chất mới.....	54
3.1.5. Hợp chất XM05.....	65
3.1.6. Hợp chất XM06.....	67
3.1.7. Hợp chất XM07.....	69
3.1.8. Hợp chất XM08.....	72
3.1.9. Hợp chất XM09.....	74
3.1.10. Hợp chất XM10.....	76
3.2. Phân lập và xác định cấu trúc các hợp chất từ cây Xu ổi	81
3.2.1. Hợp chất XG01 – chất mới	81
3.2.2. Hợp chất XG02 – chất mới	84
3.2.3. Hợp chất XG03 – chất mới	86
3.2.4. Hợp chất XG04	89
3.2.5. Hợp chất XG05	92
3.2.6. Hợp chất XG06	95
3.2.7. Hợp chất XG07	98
3.2.8. Hợp chất XG08	100
3.2.9. Hợp chất XG09	102
3.2.10. Hợp chất XG10	105
3.2.11. Hợp chất XG11	106
3.3. Thử nghiệm hoạt tính sinh học các hợp chất phân lập	111
3.3.1. Kết quả thử hoạt tính kháng vi sinh vật các hợp chất phân lập từ cây Xu nhỏ	111
3.3.2. Kết quả thử hoạt tính kháng vi sinh vật của một số hợp chất phân lập từ cây Xu ổi	112
3.3.3. Kết quả thử hoạt tính gây độc tế bào các hợp chất phân lập được từ cây Xu nhỏ	113
3.3.4. Kết quả thử hoạt tính gây độc tế bào của một số hợp chất phân lập từ cây Xu ổi	114
3.4. Xác định độ tinh khiết XM07, XM09, XM10 bằng phương pháp qNMR	115
3.5. Xây dựng phương pháp phân tích định tính, định lượng 3 hợp chất trong lá cây Xu nhỏ	117
3.5.1. Dự kiến phân mảnh	118
3.5.2. Kết quả thiết lập điều kiện phân tích.....	120
3.5.3. Khảo sát chuẩn nội	122

3.5.4. Khảo sát điều kiện sắc ký.....	122
3.6. Thẩm định phương pháp phân tích	126
3.6.1. Tính tương thích hệ thống LC-MS/MS.....	126
3.6.2. Tính đặc hiệu.....	126
3.6.3. Tính tuyến tính, giới hạn phát hiện (LOD), giới hạn định lượng (LOQ).....	126
3.6.4. Định tính.....	128
3.6.5. Độ đúng.....	129
3.6.6. Độ chính xác (hay độ lặp lại)	130
3.6.7. Độ ổn định mẫu	130
3.6.8. Tóm tắt kết quả thẩm định phương pháp	131
3.7. Ứng dụng quy trình phân tích định tính, định lượng XM07, XM09, XM10.....	132
KẾT LUẬN VÀ KIẾN NGHỊ	135
DANH MỤC CÔNG TRÌNH CÔNG BỐ LIÊN QUAN ĐẾN LUẬN ÁN.....	137
TÀI LIỆU THAM KHẢO.....	138
PHỤ LỤC	
Phụ lục 1. Cấu trúc hóa học các hợp chất từ 61 – 243	PL1
Phụ lục 2. Phổ NMR các hợp chất phân lập từ cây Xu nhỏ	PL13
Phụ lục 3. Phổ NMR các hợp chất phân lập từ cây Xu ổi	PL41
Phụ lục 4. Dữ liệu Phổ LC-MS/MS	PL70

DANH MỤC CÁC KÝ HIỆU, CÁC CHỮ VIẾT TẮT

TT	Ký hiệu, chữ viết tắt	Từ nguyên	Nghĩa tiếng Việt
1.	XG	<i>Xylocarpus Granatum</i> ;	Cây Xu ối
2.	XM	<i>Xylocarpus moluccensis</i>	Cây Xu nhỏ
3.	XR	<i>Xylocarpus rumphii</i>	Cây Xu răm
4.	AOAC	Association of Official Analytical Chemists	Tổ chức Tiêu chuẩn hoá Quốc tế
5.	ICH	International Council for Harmonization	Tổ chức quốc tế về hài hòa các yêu cầu kỹ thuật đối với dược phẩm. (Tiêu chuẩn toàn cầu cho chất lượng Dược phẩm)
6.	IUPAC	International Union of Pure and Applied Chemistry	Hiệp hội Quốc tế về Hóa học thuần túy và ứng dụng
7.	US-FDA	United States of Food and Drug Administration	Cơ quan Quản lý thuốc và Thực phẩm Hoa Kỳ
8.	HPLC	High performance liquid chromatography	Sắc ký lỏng hiệu năng cao
9.	LC	Liquid Chromatography	Sắc ký lỏng
10.	RSD	Relative standard deviation	Độ lệch chuẩn tương đối
11.	APCI	Atmospheric Pressure Chemical Ionization	Ion hóa hóa học tại áp suất khí quyển
12.	HRMS	High-Resolution Mass Spectrometry	Phổ khối phân giải cao
13.	AS	Analysis standard	Chất phân tích
14.	IS	Internal standard	Chuẩn nội
15.	LOQ	Limit of Quantification	Giới hạn định lượng
16.	LOD	Limit of Detection	Giới hạn phát hiện
17.	RSD	Relative Standard Deviation	Độ lệch chuẩn tương đối
18.	D&S	Dilute and shoot	Phương pháp pha loãng và bơm mẫu trực tiếp
19.	EMA	European Medicines Agency	Cơ quan Quản lý thuốc Châu Âu
20.	ESI	Electrospray Ionization	Ion hóa bằng sự phun ion
21.	FAB	Fast atom bombardment	Ion hóa bằng sự bắn phá nhanh nguyên tử
22.	MS	Mass Spectrometry	Khối phổ
23.	IC ₅₀	Half Maximal Inhibitory concentration	Nồng độ ức chế 50% đối tượng thử
24.	VSV	Vi sinh vật	
25.	MIC	Minimum Inhibitory Concentration	Nồng độ ức chế tối thiểu
26.	NCI	National Cancer Institute	Viện Ung thư Quốc gia Hoa Kỳ
27.	SRB	Sulforhodamine B	

TT	Ký hiệu, chữ viết tắt	Từ nguyên		Nghĩa tiếng Việt
28.	OD	Optical Density		Mật độ quang học
29.	TB	Tế bào		
30.	TBUT	Tế bào ung thư		
31.	ATCC	American Type Culture Collection		Trung tâm lưu giữ và cung cấp các chủng vi sinh vật chuẩn, tế bào, plasmid... dùng cho nghiên cứu và kiểm nghiệm

DANH MỤC BẢNG

Bảng 1.1. Thành phần hóa học của chi Xu (<i>Xylocarpus</i>) và số lượng hợp chất đã biết	7
Bảng 1.2. Các hợp chất Andirobin limonoid phân lập từ chi Xu (<i>Xylocarpus</i>).....	9
Bảng 1.3. Các hợp chất Mexicanolide limonoid phân lập từ chi Xu (<i>Xylocarpus</i>)	10
Bảng 1.4. Các hợp chất phragmalin limonoid phân lập từ chi Xu (<i>Xylocarpus</i>).....	14
Bảng 1.5. Các hợp chất protolimonoid phân lập từ chi Xu (<i>Xylocarpus</i>).....	18
Bảng 1.6. Các hợp chất limonoid khác phân lập từ chi Xu (<i>Xylocarpus</i>)	20
Bảng 1.7. Các hợp chất thuộc lớp chất steroid phân lập từ chi Xu (<i>Xylocarpus</i>).....	22
Bảng 1.8. Các hợp chất thuộc lớp chất alkaloid phân lập từ chi Xu (<i>Xylocarpus</i>).....	22
Bảng 1.9. Các hợp chất thuộc lớp chất phenolic phân lập từ chi Xu (<i>Xylocarpus</i>).....	23
Bảng 1.10. Các thành phần khác phân lập từ chi Xu (<i>Xylocarpus</i>)	24
Bảng 1.11. Hoạt tính sinh học của chi Xu (<i>Xylocarpus</i>)	25
Bảng 2.1. Chất đối chiếu.....	36
Bảng 3.1. Bảng số liệu phổ ^1H , ^{13}C -NMR của hợp chất XM01	53
Bảng 3.2. Bảng số liệu phổ ^1H , ^{13}C -NMR của hợp chất XM02	57
Bảng 3.3. Bảng số liệu phổ ^1H , ^{13}C -NMR của hợp chất XM03	60
Bảng 3.4. Bảng số liệu phổ ^1H , ^{13}C -NMR và HMBC của hợp chất XM05	67
Bảng 3.5. Bảng số liệu phổ ^1H , ^{13}C -NMR và HMBC của hợp chất XM06	69
Bảng 3.6. Dữ liệu phổ ^1H và ^{13}C NMR của XM07	71
Bảng 3.7. Bảng số liệu phổ ^1H , ^{13}C -NMR và HMBC của hợp chất XM08	73
Bảng 3.8. Dữ liệu phổ ^1H và ^{13}C NMR của XM09	75
Bảng 3.9. Dữ liệu phổ ^1H và ^{13}C NMR của XM10	77
Bảng 3.10. Bảng số liệu phổ ^1H , ^{13}C -NMR, HMBC, COSY và NOESY của hợp chất XG01 83	
Bảng 3.11. Bảng số liệu phổ ^1H , ^{13}C -NMR, HMBC, COSY và NOESY của hợp chất XG02 86	
Bảng 3.12. Bảng số liệu phổ ^1H , ^{13}C -NMR, HMBC, COSY và NOESY của hợp chất XG03 89	
Bảng 3.13. Bảng số liệu phổ ^1H , ^{13}C -NMR và HMBC của hợp chất XG04	91
Bảng 3.14. Bảng số liệu phổ ^1H , ^{13}C -NMR và HMBC của hợp chất XG05	94
Bảng 3.15. Bảng số liệu phổ ^1H , ^{13}C -NMR, HMBC, COSY và NOESY của hợp chất XG06 97	
Bảng 3.16. Bảng số liệu phổ ^1H , ^{13}C -NMR và HMBC của hợp chất XG07	99
Bảng 3.17. Bảng số liệu phổ ^1H , ^{13}C -NMR và HMBC của hợp chất XG08	102
Bảng 3.18. Bảng số liệu phổ ^1H , ^{13}C -NMR và HMBC của hợp chất XG09	104
Bảng 3.19. Bảng số liệu phổ ^1H , ^{13}C -NMR và HMBC của hợp chất XG10	106
Bảng 3.20. Bảng số liệu phổ ^1H , ^{13}C -NMR và HMBC của hợp chất XG11	108

Bảng 3.21.	Kết quả thử hoạt tính kháng vi sinh vật của một số hợp chất phân lập từ cây Xu nhỏ	112
Bảng 3.22.	Kết quả thử hoạt tính kháng vi sinh vật các hợp chất phân lập từ cây Xu ổi...	113
Bảng 3.23.	Kết quả hoạt tính gây độc tế bào các hợp chất phân lập từ cây Xu nhỏ	113
Bảng 3.24.	Giá trị IC ₅₀ mẫu có hoạt tính các hợp chất phân lập từ cây Xu ổi	114
Bảng 3.25.	Kết quả hàm lượng XM07 , XM09 , XM10 bằng phương pháp qNMR.....	115
Bảng 3.26.	Thông số cài đặt thiết bị UPLC-MS/MS Xevo TQS micro Waters.....	121
Bảng 3.27.	Thế phân mảnh sau khi tối ưu các chất phân tích	121
Bảng 3.28.	Cột sắc ký sử dụng trong khảo sát pha tĩnh	123
Bảng 3.29.	Điều kiện khảo sát pha động.....	124
Bảng 3.30.	Chương trình gradient.....	125
Bảng 3.31.	Thông số tương thích hệ thống của thiết bị	126
Bảng 3.32.	Kết quả định tính mẫu bột dược liệu khô thu từ lá cây Xu nhỏ.....	129
Bảng 3.33.	Độ đúng.....	129
Bảng 3.34.	Độ chính xác trong ngày và khác ngày, độ ổn định mẫu thử.....	130
Bảng 3.35.	Kết quả tóm tắt thẩm định phương pháp.....	131
Bảng 3.36.	Kết quả phân tích mẫu	132

DANH MỤC HÌNH VẼ, ĐỒ THỊ

Hình 1.1. Sơ đồ vị trí phân loại của chi Xu (<i>Xylocarpus</i>).....	4
Hình 1.2. Cành, lá, Quả-hạt, hoa của cây Xu nhỏ.....	5
Hình 1.3. Cành, lá, quả - hạt , hoa của cây Xu ổi.....	6
Hình 1.4. Biểu đồ thành phần hóa học của chi Xu (<i>Xylocarpus</i>).....	8
Hình 1.5. Biểu đồ thành phần hóa học lớp chất triterpenoid	8
Hình 2.1. Mẫu lá của cây Xu ổi	35
Hình 2.2. Mẫu lá của cây Xu nhỏ	35
Hình 2.3. Sơ đồ phân lập các hợp chất từ cây Xu nhỏ.....	39
Hình 2.4. Sơ đồ phân lập các hợp chất từ cây Xu ổi.....	42
Hình 3.1. Cấu trúc và tương tác HMBC và COSY, của hợp chất XM01	51
Hình 3.2. Phổ khối phân giải cao HRMS của hợp chất XM01	51
Hình 3.3. Phổ ECD thực nghiệm và tính toán lý thuyết của hợp chất XM01	53
Hình 3.4. Cấu trúc và tương tác HMBC và COSY của hợp chất XM02	54
Hình 3.5. Phổ khối phân giải cao HRMS của hợp chất XM02	54
Hình 3.6. Phổ ECD thực nghiệm và tính toán lý thuyết của hợp chất XM02	56
Hình 3.7. Cấu trúc và tương tác HMBC và COSY trên hợp chất XM03	58
Hình 3.8. Phổ khối phân giải cao HRMS của hợp chất XM03	58
Hình 3.9. Phổ ECD thực nghiệm và tính toán lý thuyết của hợp chất XM03	60
Hình 3.10. Cấu trúc và tương tác HMBC và COSY trên của hợp chất XM04	61
Hình 3.11. Phổ khối phân giải cao HRMS của hợp chất XM04	62
Hình 3.12. Phổ ECD thực nghiệm và tính toán lý thuyết của hợp chất XM04	64
Hình 3.13. Cấu trúc và tương tác HMBC và COSY của hợp chất XM05	66
Hình 3.14. Phổ khối phân giải cao HRMS của hợp chất XM05	66
Hình 3.15. Cấu trúc và tương tác HMBC của hợp chất XM06	68
Hình 3.16. Phổ khối phân giải cao HRMS của hợp chất XM06	68
Hình 3.17. Cấu trúc hợp chất XM07 và các tương tác COSY, HMBC.....	69
Hình 3.18. Phổ khối phân giải cao HRMS của hợp chất XM07	70
Hình 3.19. Cấu trúc và tương tác HMBC của hợp chất XM08	72
Hình 3.20. Phổ khối phân giải cao HRMS của hợp chất XM08	72
Hình 3.21. Cấu trúc và tương tác HMBC của hợp chất XM09	74
Hình 3.22. Phổ khối phân giải cao HRMS của hợp chất XM09	74
Hình 3.23. Cấu trúc và tương tác HMBC của hợp chất XM10	76
Hình 3.24. Phổ khối phân giải cao HRMS của hợp chất XM10	76
Hình 3.25. Cấu trúc và tương tác HMBC và COSY của hợp chất XG01	81
Hình 3.26. Phổ HRMS của hợp chất XG01	81
Hình 3.27. Phổ ECD thực nghiệm và tính toán lý thuyết của hợp chất XG01	83
Hình 3.28. Cấu trúc và tương tác HMBC và COSY của hợp chất XG02	84

Hình 3.29. Phổ HRMS của hợp chất XG02	84
Hình 3.30. Phổ ECD thực nghiệm và tính toán lý thuyết của hợp chất XG02	86
Hình 3.31. Cấu trúc và tương tác HMBC của hợp chất XG03	87
Hình 3.32. Phổ HRMS của hợp chất XG03	87
Hình 3.33. Phổ ECD thực nghiệm và tính toán lý thuyết của hợp chất XG03	88
Hình 3.34. Cấu trúc và tương tác HMBC của hợp chất XG04	90
Hình 3.35. Phổ HRMS của hợp chất XG04	90
Hình 3.36. Cấu trúc và tương tác HMBC của hợp chất XG05	92
Hình 3.37. Phổ HRMS của hợp chất XG05	93
Hình 3.38. Cấu trúc và tương tác HMBC của hợp chất XG06	95
Hình 3.39. Phổ HR-MS của hợp chất XG06	95
Hình 3.40. Cấu trúc và tương tác HMBC của hợp chất XG07	98
Hình 3.41. Phổ HRMS của hợp chất XG07	98
Hình 3.42. Cấu trúc và tương tác HMBC của hợp chất XG08	100
Hình 3.43. Phổ HRMS của hợp chất XG08	100
Hình 3.44. Cấu trúc và tương tác HMBC của hợp chất XG09	103
Hình 3.45. Phổ HRMS của hợp chất XG09	103
Hình 3.46. Cấu trúc và tương tác HMBC của hợp chất XG10	105
Hình 3.47. Phổ HRMS của hợp chất XG10	105
Hình 3.48. Cấu trúc và tương tác HMBC của hợp chất XG11	107
Hình 3.49. Phổ HRMS của hợp chất XG11	107
Hình 3.50. Phổ qNMR của hợp chất XM07	116
Hình 3.51. Phổ qNMR của hợp chất XM09	116
Hình 3.52. Phổ qNMR của hợp chất XM10	117
Hình 3.53. Phổ MS mảnh mẹ và dự kiến phân mảnh của XM07	118
Hình 3.54. Phổ MS mảnh mẹ và dự kiến phân mảnh của XM09	119
Hình 3.55. Phổ MS mảnh mẹ và dự kiến phân mảnh XM10	119
Hình 3.56. Sắc ký đồ của chuẩn nội.....	122
Hình 3.57. Sắc ký đồ khảo sát pha tĩnh.....	123
Hình 3.58. Sắc ký đồ khảo sát pha động.....	124
Hình 3.59. Sắc ký đồ của mẫu trắng, mẫu chuẩn, mẫu thử, mẫu thử thêm chuẩn.....	126
Hình 3.60. Đồ thị biểu diễn tính tương quan tuyến tính.....	127
Hình 3.61. Tín hiệu S/N của các chất phân tích.....	127
Hình 3.62. Sắc ký đồ của mẫu chuẩn các ion định tính của XM07 , XM09 , XM10	128
Hình 3.63. Sắc ký đồ mẫu thử mảnh ion định tính, định lượng của XM07 , XM09 , XM10	128
Hình 3.64. Sắc ký đồ độ đúng ở 3 mức nồng độ của XM07 , XM09 , XM10	129

MỞ ĐẦU

Rừng ngập mặn Việt Nam là một trong những hệ sinh thái đặc biệt và quý giá, hình thành tại nơi giao thoa giữa sông và biển. Đây không chỉ là vùng sinh thái giàu tài nguyên mà còn đóng vai trò thiết yếu trong việc bảo vệ môi trường. Với khả năng giữ đất, chống xói mòn, hấp thụ khí CO₂ và giảm tác động tiêu cực của biến đổi khí hậu, rừng ngập mặn đang ngày càng được xem là “lá chắn xanh” bảo vệ bờ biển. Rừng ngập mặn phụ thuộc vào các chu kỳ triều và môi trường nước lợ để tồn tại và phát triển, các loài thực vật thuộc hệ sinh thái rừng ngập mặn không chỉ đóng góp vào sự đa dạng sinh học, cung cấp nguồn thực phẩm cho đời sống con người mà còn là nguồn nguyên liệu quý cho y học. Hiện nay tổng diện tích rừng ngập mặn ở Việt Nam khoảng 200.000 ha theo báo cáo của Bộ Nông nghiệp và Phát triển nông thôn (Ngày 21/11/2023, Bộ NN&PTNT tổ chức hội thảo quốc tế "Phát huy giá trị đa dụng của rừng ngập mặn cho mục tiêu giảm nhẹ và thích ứng với biến đổi khí hậu").

Các loài thuộc chi Xu (*Xylocarpus*) đặc biệt là hai loài Xu nhỏ và Xu ổi đã được hệ thống hóa trong các công trình phân loại thực vật lớn như “Từ điển cây thuốc Việt Nam” [1] và “Cây cỏ Việt Nam” [2]. Trong các bài thuốc dân gian, bộ phận của cây thể hiện hoạt tính sinh học đa dạng: vỏ, rễ cây được dùng để hạ nhiệt, chống đông máu, điều trị sốt rét và các rối loạn đường ruột (kiết lý, tiêu chảy); trong khi quả, hạt và nhân hạt thể hiện đặc tính kháng viêm, tiêu sưng (trị sưng vú, phù chân voi), trị ghẻ và làm thuốc bổ đắng" [1-3] cho thấy hai loài Xu nhỏ và Xu ổi được xem là những ứng viên tiềm năng trong lĩnh vực y học.

Gần đây các nghiên cứu cho thấy nhiều hợp chất phân lập được từ cây Xu ổi và Xu nhỏ thể hiện hoạt tính gây độc tế bào mạnh trên một số dòng tế bào ung thư ruột (CaCo-2) [4], [5], tế bào ung thư cổ tử cung (Hela), tế bào ung thư biểu mô vú (KT), tế bào ung thư vú (MDA-MB-453), tế bào ung thư bạch cầu P-388 và ung thư biểu mô phổi người A-549, tế bào ung thư buồng trứng (OVCAR8), ức chế sự sản sinh NO tế bào đại thực bào RAW264, tế bào Eca109, ức chế PTPP1B (tiềm năng để điều trị bệnh tiểu đường tuýp II và béo phì) [6-8], virus cúm A (phân nhóm H1N1) [9] đã được đánh giá bằng thử nghiệm ức chế trên tế bào gốc, đặc biệt hoạt tính in vitro chống lại virus HIV của Krishnolide A [10], và godavarin M [11] trên dòng tế bào 293T ở các nồng độ 20 µM và 100 µM. Với nhiều đặc tính sinh học có giá trị là cơ sở thuận lợi cho những nghiên cứu sâu hơn và tạo được những loại thuốc ứng dụng trong điều trị bệnh và mở ra cơ hội cho các nghiên cứu chuyên sâu nhằm khai thác triệt để giá trị hóa học, sinh học và dược tính của các loài thực vật này.

Các nghiên cứu hiện nay chủ yếu phân lập các hợp chất và thử một số hoạt tính sinh học. Trong nước có hai nhóm nhóm nghiên cứu: nhóm nghiên cứu của Trần

Trung Hiếu và cộng sự đã có một công bố phân lập được 3 hợp chất là Xylocarpin F, Pseudopalmatine và Catechin [12]; Và nhóm nghiên cứu TS. Nguyễn Văn Thanh và các cộng sự cùng nghiên cứu về chi Xu trên với hai loài Xu nhỏ và Xu ổi nhỏ thu thập ở rừng ngập mặn Việt Nam.

Với nhiều dược tính có giá trị trong điều trị bệnh của hai loài Xu nhỏ và Xu ổi cho thấy tiềm năng trong nghiên cứu về chi Xu là vô hạn do đó chúng tôi chọn đề tài “Nghiên cứu thành phần hóa học, hoạt tính sinh học và định lượng một số limonoid phân lập từ hai loài Xu nhỏ (*Xylocarpus moluccensis*) và Xu ổi (*Xylocarpus granatum*)”:

- Nghiên cứu tiến hành chiết xuất, phân lập và xác định cấu trúc các hợp chất phân lập được từ hai loài Xu nhỏ và Xu ổi, khảo sát hoạt tính kháng vi sinh vật và hoạt tính gây độc tế bào trên một số dòng tế bào ung thư.
- Xây dựng và thẩm định quy trình phân tích định tính, định lượng một số hợp chất limonoid có cấu trúc đặc trưng của cây Xu nhỏ bằng phương pháp LC-MS/MS.

Những đóng góp mới của của luận án:

1. Nghiên cứu đã phân lập được **21 hợp chất** từ cây **Xu nhỏ và Xu ổi**, trong đó **7 hợp chất mới** công bố quốc tế và 14 số hợp chất đã biết:

- **04 hợp chất mới** phân lập được từ cây Xu nhỏ gồm **XM01** (Xylomoluccenoid A); **XM02** (Xylomoluccenoid B); **XM03** (Xylomoluccenoid C), **XM04** (Xylomoluccenoid D).
- **03 hợp chất mới** phân lập được từ cây Xu ổi gồm **XG01** (Xylocagranoside A); **XG02** (Xylocagranoside B); **XG03** (Xylocargranin A).
- Ngoài ra, hợp chất **XM10** (Xylococcensin E) lần đầu tiên được phân lập từ cây Xu nhỏ.
- Hai hợp chất **XM06** (1*H*-Dibenzo[b,e][1,4]dioxepin-11-one,3,8-dihydroxy-4 (methoxymethyl) -1,6-dimethyl), **XM08** (Swietmanin H) lần đầu tiên được phân lập từ chi Xu (cụ thể là cây Xu nhỏ).

2. Thử nghiệm hoạt tính sinh học

- Hoạt tính sinh học kháng vi sinh vật trên **21 hợp chất** phân lập từ cây Xu nhỏ và Xu ổi kết quả thử nghiệm cho thấy các hợp chất phân lập từ cây Xu nhỏ thể hiện hoạt tính ức chế từ 1 đến 5 chủng vi sinh vật.
- Kết quả khảo sát hoạt tính sinh học cho thấy 2 chất mới **XM01** (Xylomoluccenoid A), **XM02** (Xylomoluccenoid B) và hợp chất **XM05** (Xylomolin S) trong cây Xu nhỏ thể hiện hoạt tính ức chế sự phát triển của các dòng tế bào ung thư Hela, MCF-7, HepG2 với giá trị IC₅₀ trong khoảng 26,77– 54,19 µM. Các hợp chất Odoratone và Xylogranatin C trong cây Xu ổi thể hiện hoạt tính gây độc tế bào

trên các dòng A549, MCF-7, HepG2 với giá trị IC_{50} trong khoảng 27,54– 46,99 μM .

3. Xác định hàm lượng chất phân tích Moluccensin Y, 3,30-Diacetylphragmalin, Xyloccensin E bằng phương pháp **qNMR**.

4. Nghiên cứu đã đề xuất phương pháp **LC-MS/MS** là một phương pháp hiện đại để phân tích đồng thời 3 chất limonoid có cấu trúc đặc trưng của Xu nhỏ: Moluccensin Y, 3,30-Diacetylphragmalin, Xyloccensin E. Phương pháp LC-MS/MS sử dụng Cột thể hệ mới, hệ ZORBAX XDB-C8 (50 x 4.6 mm; 3.5 μm), việc phân tích trên các cột C8 thể hệ mới với hạt pha tĩnh nhỏ đã mang lại kết quả tốt khi phân tích ảnh hưởng của nền mẫu đến chất phân tích, thời gian phân tích nhanh so với các phương pháp phân tích dược liệu khác, pha động đơn giản với giá thành thấp - kinh tế. Độ tin cậy của phương pháp này trong thử nghiệm dược liệu có thể là tiềm năng lớn trong việc phát hiện định tính và định lượng các nhóm hợp chất Limonoid trong dược liệu. Kết quả thẩm định trên mẫu dược liệu đều đạt các quy định của AOAC, ICH về phân tích hợp chất.

Kết quả của nghiên cứu cung cấp thông tin khoa học về thành phần hóa học và hoạt tính sinh học, làm cơ sở khoa học cho những nghiên cứu tiếp theo, phục vụ công tác nghiên cứu, sản xuất thuốc từ dược liệu, kiểm tra chất lượng dược liệu của nhà quản lý và nhà sản xuất. Nghiên cứu không chỉ mang giá trị khoa học mà còn có ý nghĩa thực tiễn, góp phần nâng cao hiệu quả sử dụng nguồn tài nguyên rừng ngập mặn phục vụ cho lĩnh vực y dược, đánh giá nguồn lợi cây thuốc Việt Nam nhằm có hướng khai thác và bảo tồn hợp lý.

Hy vọng nghiên cứu sẽ đóng góp vào kết quả nghiên cứu về thành phần hóa học thực vật học của cây ngập mặn chi Xu ở Việt Nam, về hoạt tính sinh học của các hợp chất phân lập được, làm cơ sở cho các bài thuốc dân gian. Mặt khác nghiên cứu cũng đóng góp thêm một số hợp chất có khung hóa học cơ bản triterpenoid và hợp chất khác được xác định là tiềm năng trong việc nghiên cứu tác dụng dược lý có giá trị, có hoạt tính phục vụ cho sự phát triển nền công nghiệp dược nước nhà.

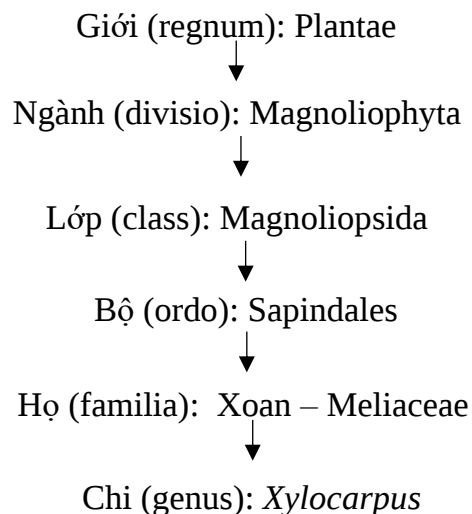
CHƯƠNG 1. TỔNG QUAN

1.1. Giới thiệu về chi Xu (*Xylocarpus*)

1.1.1. Đặc điểm thực vật

Xu nhỏ (*Xylocarpus moluccensis*) (Lam.) M. Roem. [tên đồng nghĩa *Carapa borneensis* Becc., *C. indica* A.Juss., *C. moluccensis* Lam., *Granatum moluccense* (Lam.) Kuntze, *Guarea oblongifolia* Griff. và *Monosoma littorata* Griff.) và Xu ổi (*Xylocarpus granatum*) có tên đồng nghĩa *Amoora salomonensis* C. DC., *Carapa granatum* (J. Koenig) Alston, *C. obovata* Blume, *Granatum obovatum* (Blume) Kuntze và *Xylocarpus obovatus* (Blume) A. Juss.). Đến nay trên thế giới có ba loài thuộc chi Xu: Xu ổi (*Xylocarpus granatum*), Xu nhỏ (*Xylocarpus moluccensis*) và Xu rằm (*Xylocarpus rumphii*) được công nhận theo thống kê của thư viện trực tuyến về danh mục các loài thực vật học trên thế giới (<http://www.theplantlist.org>). Chúng phân bố rộng rãi ở các vùng ven biển, cửa sông của Đông Nam Á, Úc, Đông Phi và Ấn Độ Dương, Việt Nam, Xri Lanca, Thái Lan, Mianma, Philippin, Indônêxia và nhiều nước vùng Thái bình dương [6], [13], [14]. Cây mọc dọc theo các rạch, rừng ngập mặn và nước lợ, thường mọc trên đất sét chặt, ngập triều trung bình hay triều cao, độ mặn vừa. Trong đó, hai loài *Xylocarpus granatum* và *Xylocarpus moluccensis* được ghi nhận là những thực vật ngập mặn thực thụ, trong khi loài *Xylocarpus rumphii* không phải là thực vật ngập mặn [15].

Ở Việt Nam chi Xu (*Xylocarpus*) là chi duy nhất trong họ Xoan (*Meliaceae*) sinh sống trong rừng ngập mặn, có 2 loài thuộc chi Xu là: Xu nhỏ (*Xylocarpus moluccensis*), Xu ổi (*Xylocarpus granatum*). Xu ổi phân bố rộng nhất có ở 3 miền Bắc, Trung và Nam còn Xu nhỏ chỉ phân bố ở phía Nam. Cây Xu nhỏ khác cây Xu ổi là vỏ thân nứt dọc, màu nâu đen, lá hẹp, thuôn và đầu có mũi nhọn; quả Xu nhỏ màu hồng nhạt và nhỏ hơn quả Xu ổi, đường kính chỉ 6-8 cm [1-3]. Phân loại khoa học theo hình 1.1.



Hình 1.1. Sơ đồ vị trí phân loại của chi Xu (*Xylocarpus*)

1.1.2. Công dụng

Hai loài Xu nhỏ, Xu ổi đều có chung công dụng [1-3]: Các bộ phận dùng làm dược liệu chủ yếu là quả, hạt, vỏ cây, rễ cây. Theo Đông Y vỏ có vị chat, người dân địa phương sử dụng vỏ cây được dùng trị kiết lỵ, tiêu chảy, các rối loạn khác của

đường ruột và hạ sốt, điều trị các bệnh sốt như sốt rét và được sử dụng như một chất chống đông, quả làm thuốc tiêu sưng ở vú và bệnh phù chân voi. Tro hạt hợp với lưu huỳnh và dầu dừa làm thuốc mỡ bôi trị ghẻ, nhân hạt dùng làm thuốc bổ. Gần đây, người ta đã chú ý nhiều đến các loài Xu do các limonoid (triterpenoid) có bộ khung cấu trúc C độc đáo và các hoạt tính gây độc tế bào khối u của chúng. Gỗ màu hồng hay nâu xám, nặng, không có vân, bền ít bị mối mọt. Có thể dùng gỗ làm cột nhà,... Vỏ hàm lượng tanin cao, dùng để nhuộm và thuốc da.

1.2. Cây Xu nhỏ

1.2.1. Đặc điểm thực vật

Tên Việt Nam: Xu nhỏ

Tên khoa học: *Xylocarpus moluccensis*

Tên khác: Xu sung; Xương cá nhỏ.

Phân loại khoa học: Xu nhỏ là loài *Xylocarpus moluccensis*

1.2.2. Mô tả

Cây Xu nhỏ [1-3] thân gỗ vừa, cao 10-15 m, nhánh tròn, vỏ nâu nhạt, nứt sâu theo chiều dọc. Có rễ không thành sóng như cây Xu ổi mà rễ hình đầu gối. Lá kép chẵn, có 4-6 lá chét có phiến hình trứng hay bầu dục, đầu lá hẹp và hơi nhọn, phiến mỏng, sậm màu hơn Xu ổi, dài 8-10 cm, rộng 4-5 cm, đầu nhọn, đáy bất xứng, gân mịn. Hình ảnh chụp thực tế cây Xu nhỏ thu hái được về cây, lá, quả, hạt và hoa (Hình 1.3).



Hình 1.2. Cành, lá, Quả-hạt, hoa của cây Xu nhỏ.

Hoa trắng, có 5 cánh, nhỏ tạo thành chùy (chùm xim) ở nách lá, đài tròn có 4 tai nhọn ở đầu, cánh hoa dài gấp 2,5 đài, 8-10 nhị hình trụ, bầu nhụy tròn dài.

Quả nang, vỏ quả lúc non láng và khi già vẫn có màu xanh sáng, to 7-10 cm, khi chín khô nứt làm 4 mảnh, hạt có cạnh 6-8 cm, không phôi nhũ.

1.3. Cây Xu ổi

1.3.1. Đặc điểm thực vật

Tên Việt Nam: Xu ổi

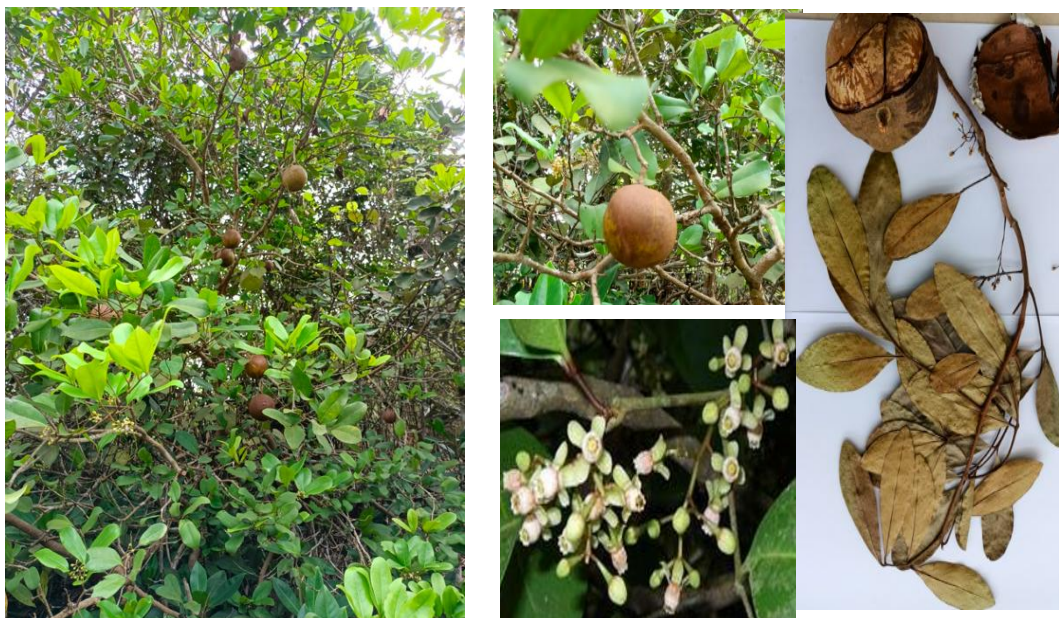
Tên khoa học: *Xylocarpus granatum* (Koenig)

Tên khác: Xương cá; Xu to, Đẳng dinh.

Phân loại khoa học: Xu ổi là loài *Xylocarpus granatum*

1.3.2. Mô tả

Cây Xu ổi [1-3] thân gỗ cao 10 – 20 m, rễ ăn thành dải dài như rắn trên mặt bùn. Lá kép chẵn, mang 2-4-6 lá phụ to dài 4-17 cm, rộng 2,5-9 cm, bầu dục, đầu tròn hay hơi lõm, chùy – tự tán cao 2-7 cm. Cánh hoa cao 5-7 mm, tiểu nhụy dính thành ống cao 3-5 mm. Trái là nang to 10-20 cm, hạt màu nâu, hơi đa giác, to. Hình ảnh chụp thực tế cây Xu ổi thu hái được về cây, lá, quả, hạt và hoa (Hình 1.2).



Hình 1.3. Cành, lá, quả - hạt, hoa của cây Xu ổi

1.4. Các nghiên cứu về thành phần hóa học của chi Xu (*Xylocarpus*)

Cho đến nay, các nghiên cứu trên thế giới về chi Xu (*Xylocarpus*) chỉ dừng ở nghiên cứu phân lập các hợp chất và thử một số hoạt tính sinh học.

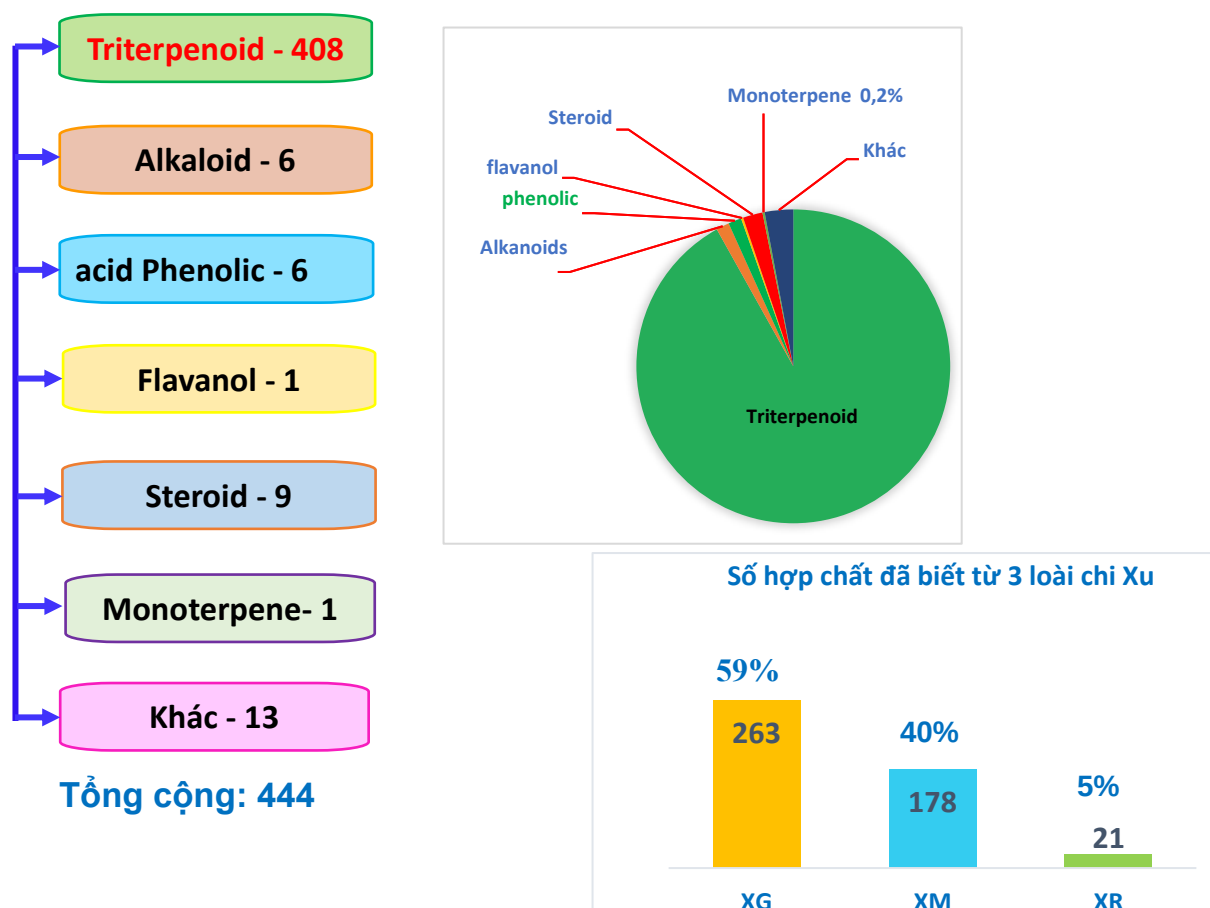
Trong khi đó, nghiên cứu về hóa thực vật của chi Xu (*Xylocarpus*) trên thế giới tính đến nay, nghiên cứu thống kê có khoảng hơn **444 hợp chất** đã được tìm thấy và xác định cấu trúc từ chi Xu (*Xylocarpus*) bao gồm 3 loài thuộc chi Xu (*Xylocarpus*) là Xu ổi (*Xylocarpus granatum*), Xu nhỏ (*Xylocarpus moluccensis*) và Xu rằm (*Xylocarpus rumphii*). Gần đây nhất năm 2025, nghiên cứu [16] công bố phân lập được 13 chất mới từ cây Xu nhỏ đều thuộc nhóm chất limonoid.

Thành phần hóa học của chi Xu (*Xylocarpus*) bao gồm các nhóm hợp chất triterpenoid, alkaloid, acid phenolic, flavanol, steroid, monotерpen và một số thành phần khác [6], [13], [14], [16-20] được tổng hợp từ các tài liệu tham khảo và thống kê kết quả theo bảng 1.1 và biểu đồ theo hình 1.4. Từ kết quả biểu đồ hình 1.4. cho thấy số lượng các hợp chất thuộc nhóm hợp chất triterpenoid đã phân lập được từ chi Xu chiếm 92%, chứng tỏ nhóm triterpenoid là thành phần hóa học chính của chi Xu (*Xylocarpus*); Số lượng hợp chất đã phân lập được từ Xu ổi chiếm 59%; Số lượng hợp chất đã phân lập được từ Xu nhỏ chiếm 40%; Số lượng hợp chất đã phân lập được từ Xu rầm chiếm 5%.

Bảng 1.1. Thành phần hóa học của chi Xu (*Xylocarpus*) và số lượng hợp chất đã biết

TT	Thành phần	Nhóm hợp chất	Số hợp chất chi Xu	Tỷ lệ %	Số hợp chất XG	Số hợp chất XM	Số hợp chất XR
1	Triterpenoid			91,9			
		Obacunol limonoid	1		1	-	-
		Andirobins limonoid	7		2	4	1
		Mexicanolide limonoid	253		144	95	19
		Phragmalin limonoid	70		37	32	1
		Protolimonoid	33		29	9	-
		Các limonoid khác	44		20	29	-
2	Steroid		9	2,0	9	3	-
3	Alkanoid		6	1,4	6	-	-
4	Phenolic		6	1,4	3	3	-
5	Monoterpen		1	0,2	-	1	-
6	Flavanol		1	0,2	1	-	-
7	Khác		13	2,9	11	2	-
Tổng cộng:			444	100	263	178	21
Chủ yếu được chiết từ quả, hạt, lá, vỏ cây, rễ cây							

* XG: Xu ổi; XM: Xu nhỏ ; XR: Xu rầm



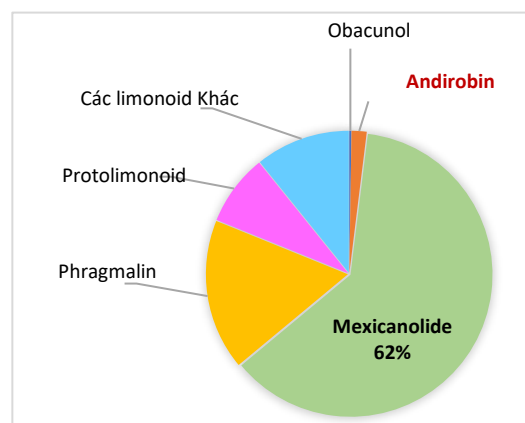
* XG: Xu ổi; XM: Xu nhỏ ; XR: Xu rằm

Hình 1.4. Biểu đồ thành phần hóa học của chi Xu (*Xylocarpus*)

1.4.1. Nhóm triterpenoid

Nhóm chất triterpenoid đến nay không chỉ được tìm thấy trong một Bộ Rutaceae, chúng là những tetranortriterpenoid với vòng β -furyl liên kết ở C-17 với bộ khung cấu trúc 4,4,8-trimethyl-17-furanylsteroid. Các limonoid được phân loại theo cấu trúc nhóm chất triterpenoid bốn vòng và cấu trúc thường có cầu/liên kết oxy ở vòng A, B, C và D.

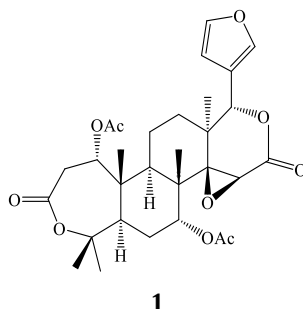
Các hợp chất đã được phân lập từ các loài thuộc chi Xu (*Xylocarpus*) (họ Meliaceae) có khoảng hơn **408 limonoid** được biết đến và chúng đã được phân loại thành một số nhóm chất chính như obacunol, andirobin, mexicanolide, phragmalin, protolimonoid và các nhóm khác [6], [13], [14], [17], [19], [20] được tổng hợp thành biểu đồ theo hình 1.5.



Hình 1.5. Biểu đồ thành phần hóa học lớp chất triterpenoid

1.4.1.1. Obacunol

Một dẫn xuất thuộc khung obacunol limonoid đã được xác định có tên là 7a-Acetoxydihydronomilin [6], [21], [22] được phân lập từ hạt của Xu ổi.

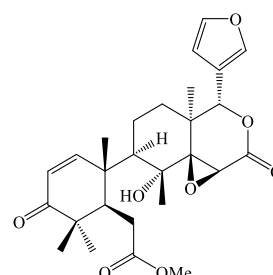
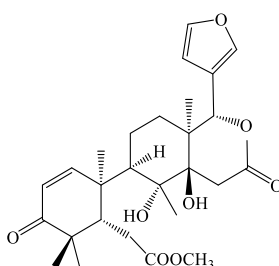
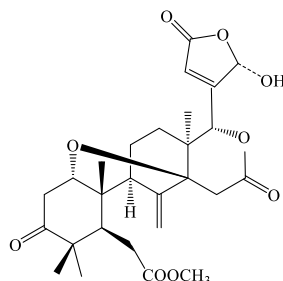
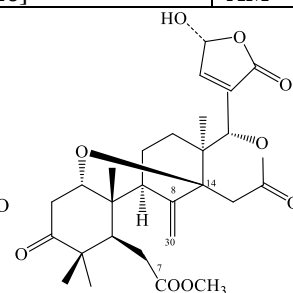
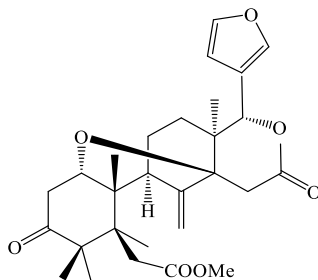
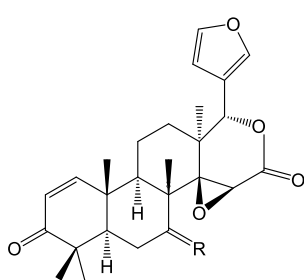


1.4.1.2. Andirobin

Cấu trúc độc đáo của các dẫn xuất limonoid đã thu hút sự chú ý rộng rãi của các nhà khoa học trên thế giới. Năm 1965, limonoid đầu tiên được công bố có tên Gedunin (**2**) được phân lập từ Xu ổi bởi tác giả Taylor. Sau đó các hợp chất **3**: 7-Oxogedunin được phân lập từ Xu ổi nhỏ; **4**: Methyl angolensate được phân lập từ Xu ổi. 7 hợp chất limonoid andirobin được thống kê theo bảng 1.2.

Bảng 1.2. Các hợp chất Andirobin limonoid phân lập từ chi Xu (*Xylocarpus*)

Ký hiệu	Tên hợp chất	TLTK	Cây
2	Gedunin	[6], [23]	XG
3	7-oxogedunin	[6], [22]	XM
4	Methyl angolensate	[24]	XR
5, 6	Moluccensin N, O	[25]	XM
7	Thaimoluccensin A	[8]	XM
8	Krishnolide K	[26]	XM



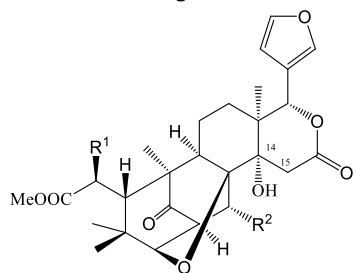
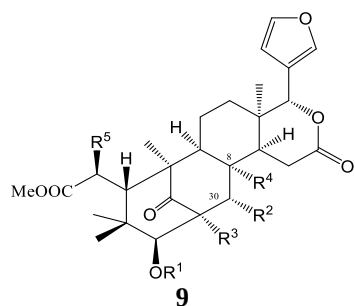
1.4.1.3. Mexicanolide

Phần lớn các hợp chất limonoid có khung mexicanolide đến nay được công bố từ các loài thuộc chi Xu (*Xylocarpus*), **253 hợp chất nhóm mexicanolide** từ hợp chất (9 – 243, 422-439) được phân lập từ Xu ổi, Xu nhỏ và Xu rầm theo bảng 1.3.

Bảng 1.3. Các hợp chất Mexicanolide limonoid phân lập từ chi Xu (*Xylocarpus*)

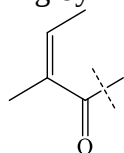
Ký hiệu	Tên hợp chất	TLTK	Cây
9	Mexicanolide	[6], [22]	XG
10	Xylocarpin	[6], [22], [24], [27]	XG; XM
11	Humilin B	[6], [24]	XM
12	3 β -acetoxy-6-deoxyswietenine	[6], [27]	XG
13	Angustidienolide	[6], [24]	XM
14	2-hydroxy- destigloyl-6-deoxyswietenine acetate	[6], [24]	XM
15 - 18, 23	Xyloccensin A, B, C,D, F	[28]	XM
19 - 20	Xyloccensin G, H	[29-31]	XM
21, 22	Xyloccensin I, J	[32]	XM; XG
24, 25	Xyloccensin K, W,	[31], [33]	XG
26	6-acetoxy-cedrodorin	[31], [33]	XG
27	Xyloccensin L	[34]	XG
28, 30	Xyloccensin M, N	[35], [36]	XM, XG
29, 31	3-deacetylxyloccensin M, N	[37]	XG
32, 35	Xyloccensin X, Y	[38]	XM
33, 34	Xyloccensin X ₁ , X ₂	[39]	XM
41, 42	Proceranolide, Khayasin T	[39]	XM
36, 38 -40	Xylogranatin A, B, C, D	[40]	XG
37	30 α -hydroxyxylogranatin A	[41]	XG
43, 44,	Xylocarpin F, G, H (Granaxylocarpin B)	[39], [35]	XG
46, 47	Granaxylocarpin A, C	[42]	XG
48-51	Xylogranatin A _a , B _a , C _a ,D _a	[43]	XG
52	Xylogranatin R	[44]	XG
53	Febrifugin A	[39]	XG
54 - 58	Granatumin A, B, C, D, E	[45]	XG
59, 60	Xylomexicanin A, B	[46]	XG
61, 62	Xylocarponoid A, B	[47]	XG
63 -72	Godavarin A, B, C, D, E, F, G, H, I, J	[48]	XG
73 - 80	Hainangranatumin A, B, C, D, E, F, I, J	[49]	XG
81, 82	Xylomexicanolide A, B	[50]	XM
83 - 86	Xylorumphiin A, B, C, D	[51]	XR
87	Godavarin K	[52]	XM
88 - 94	Moluccensin R, S (Godavarin O), T, U, V, W, X	[53]	XM
95	Krishnolide J	[26]	XM
96 - 99	Granatumin H, I, J, K	[54]	XG
100, 101	Xylomexicanin C, D	[55]	XG
102, 103	Xylogranin A, B	[56]	XG
104 - 109	Thaixylomolin A, B, C, D, E, F	[57]	XM
110, 111	Xylorumphiin E, F	[58]	XR
112	2-hydroxyxylorumphiin F	[58]	XR
113 - 116	Xylorumphiin G, H, I, J	[58]	XR
117, 118	Xylogranatopyridine A, B	[59]	XG
119 - 132	Granatumin L, M, N, O, P, Q, R, S, T, U, V, W, X, Y	[60]	XG
133 -136	Xylomexicanin E, F, G, H	[61]	XG
137	6-O-acetyl-2 α -hydroxymexicanolide	[9]	XM
138	6-O-acetyl-6-dehydroxymoluccensin T	[9]	XM
139	2,3-dideacetylxyloccensin S	[62]	XG
140	30-deacetylxyloccensin W	[62]	XG
141	7-hydroxy-21 β -methoxy-3-oxo-24,25,26,27-tetranortirucalla-1,14-diene-23(21)-lactone	[62]	XG

Ký hiệu	Tên hợp chất	TLTK	Cây
142	9-epixylogranatin A	[63]	XG
143	Xylogranatumin A	[63]	XG
144	6-O-acetyl xylocarpin D	[63]	XG
145	14-hydroxy-14,15-dihydrogranatumin C	[63]	XG
146	30-O-tigloylhainangranatumin J	[63]	XG
147	9-O-methyl xylogranatin R	[63]	XG
148	30-O-acetylhainangranatumin E	[63]	XG
149	1,2-dihydro-3 α -hydroxy-turranolide	[63]	XG
150 - 155	Trangmolin A, B, C, D, E, F	[64]	XM
156 - 159	Thaixylomolin O, P, Q, R	[65]	XM
160	3 β -hydroxy-3-decarbonyl-24- <i>epi</i> -piscidinol	[66]	XM
161, 162	Thaimoluccepimer A, B	[66]	XM
163 - 170	Xylorumphiin L, M, N, O, P, Q, R, K	[67]	XR
171	Krishnadimer A	[68]	XM
172	Granaxylocartin A	[69]	XG
173 - 180	Thaixylogranin A, B, C, D, E, F, G, H	[70]	XG
181, 182	Xylomexicanin I, J	[71]	XG
183 - 187	Sundarbanxylogranin A, B, C, D, E	[72]	XG
188 - 196	Krishnagranatin A, B, C, D, E, F, G, H, I	[73]	XG
197 - 201	Thaigranatin A, B, C, D, E	[74]	XG
202 - 215	Xylomolin A ₁ , A ₂ , A ₃ , A ₄ , A ₅ , A ₆ , A ₇ , B ₁ , B ₂ , C ₁ , C ₂ , D, E, F	[75]	XM
216 - 218	Xylomolone A, B, C	[76]	XM
219 - 234	Hainanxylogranin A, B, C, D, E, F, G, H, I, J, K, L, M, N, O, P	[77]	XG
235 - 241	Thaixylomolin S, T, U, V, W, X, Y	[78]	XM
242, 243	Krishnolide H, I	[26]	XM
422 - 431	Xylomolin O, P, Q, R, S, T, U, V, W, X	[20]	XM
432 - 439	Xylomolones E, F, G, H, I, J, K, L	[16]	XM

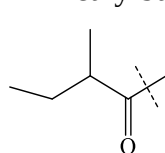


23 R¹ = R² = H
 24 R¹ = H, R² = OAc
 25 R¹ = OAc, R² = H

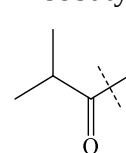
Tigloyl



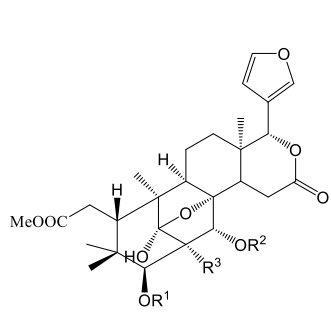
2-Methylbutyryl

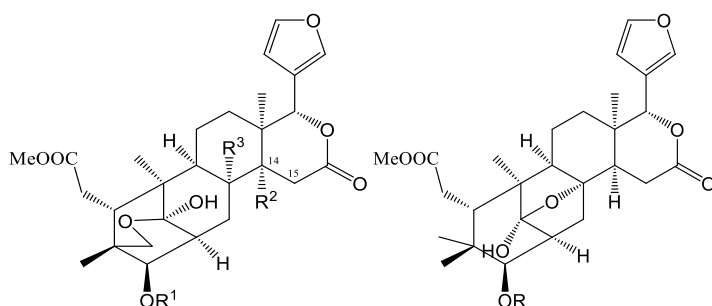


Isobutyryl

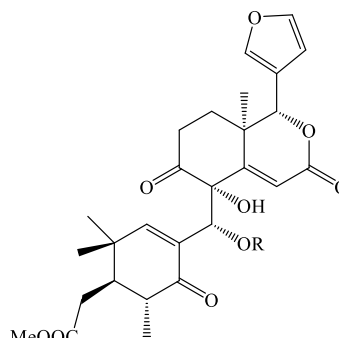
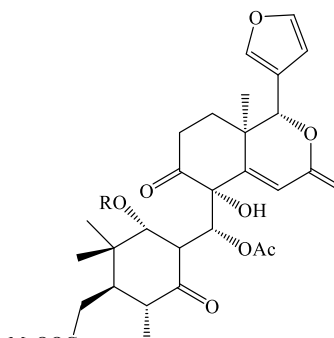
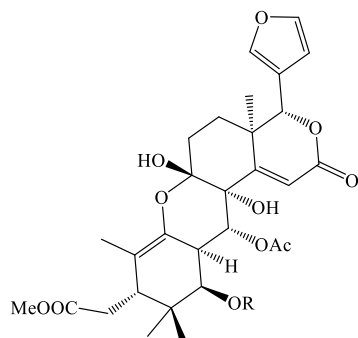


Ký hiệu	nhóm	R ¹	R ²	R ³	R ⁴	R ⁵
9	8,30-epoxy	Ac	H	H	-	H
10	8,30-epoxy	Ac	H	OH	-	H
11	$\Delta^{8,30}$	Ac	H	H	-	H
12	$\Delta^{8,30}, \Delta^{14,15}$	Ac	H	H	-	H
13	$\Delta^{8,30}$	Ac	H	OH	-	H
18	8,30-epoxy	Isobutyryl	Ac	H	-	H
19	8,30-epoxy	Isobutyryl	H	H	-	H
29	-	Ac	H	H	OH	H
30	-	H	H	H	OH	H
32	$\Delta^{14,15}$	H	H	H	OH	OAc
33	$\Delta^{14,15}$	H	H	H	OH	H
35	$\Delta^{14,15}$	Tigloyl	H	H	OH	H
36	$\Delta^{14,15}$	Tigloyl	α OH	H	OH	H
40	$\Delta^{14,15}$	H	H	H	-	H
41	$\Delta^{14,15}$	Tigloyl	H	H	-	H

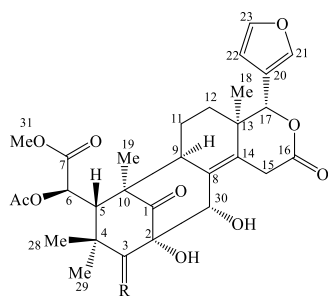
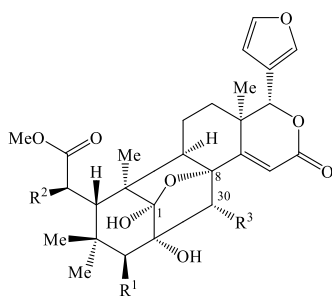
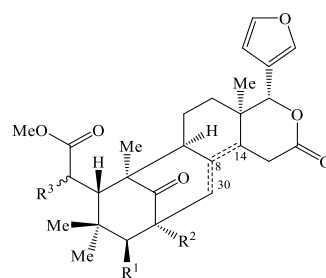
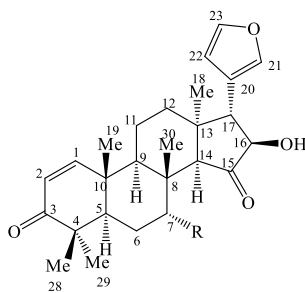
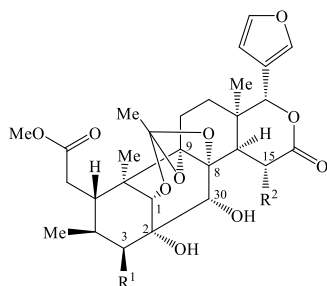
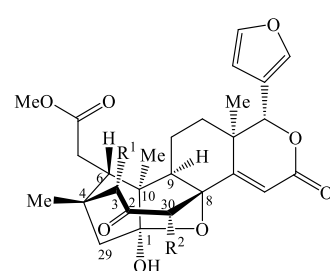
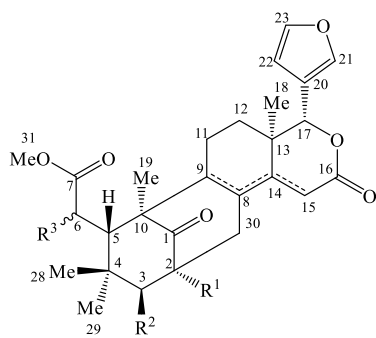
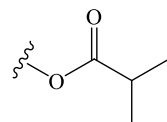
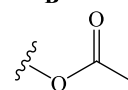
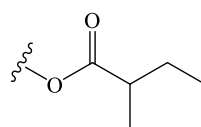
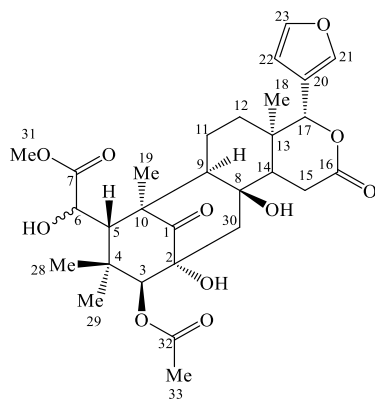
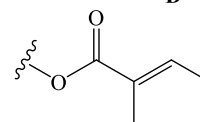
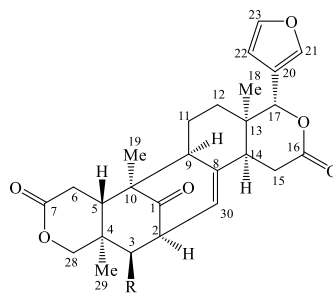
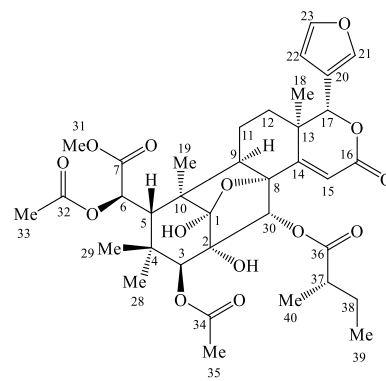
		Ký hiệu	R ¹	R ²	R ³
	14	$\Delta^{14,15}$	PrCO or BuCO	PrCO or BuCO	H
	15	-	PrCO or BuCO	PrCO or BuCO	H
	16	$\Delta^{14,15}$	PrCO or BuCO	PrCO or BuCO	OH
	17	-	PrCO or BuCO	PrCO or BuCO	OH
	20	-	Ac	2-Methylbutyryl	β OH
	21	-	Ac	Isobutyryl	β OH
	22	-	Isobutyryl	Isobutyryl	β OH
	31	$\Delta^{14,15}$	2-Methylbutyryl	Isobutyryl	α OH
	34	$\Delta^{14,15}$	Isobutyryl	2-Methylbutyryl	α OH
	37	$\Delta^{14,15}$	Tigloyl	Ac	H
	38	$\Delta^{14,15}$	2-Methylbutyryl	Ac	H
	39	$\Delta^{14,15}$	Isobutyryl	Ac	H
	42	$\Delta^{14,15}$	Ac	Ac	β H
	43	$\Delta^{8,14}$	Ac	Tigloyl	β H

**26****27** R = Ac ; **28** R = H

		R ¹	R ²	R ³
26	8,30-epoxy	Tigloyl	H	-
46	8,30-epoxy	Tigloyl	OH	-

		
44 R = Tigloyl	45 R = 2-Methylbutyryl	47 R = Tigloyl
49 R = Ac	48 R = Tigloyl	

* Cấu trúc hóa học các hợp chất mang ký hiệu từ 50 – 243 theo phụ lục 1.

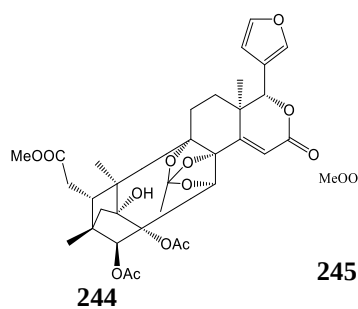
**422** R=C Xylomolin O**423** R=A Xylomolin P**424** $R^1 = R^2 = B, R^3 = A$ **425** $R^1 = R^2 = B, R^3 = D$ **426** $R^1 = B, R^2 = H, R^3 = C$ **427** $R^1 = R^2 = R^3 = B \Delta^{8,14}$ **428** $R^1 = A, R^2 = OH, R^3 = B, \Delta^{8,30}$ **429** R=B**430** $R^1 = R^2 = B$ **431** $R^1 = B, R^2 = C$ **432** $R^1 = B, R^2 = H, R^3 = C$ **433** $R^1 = B, R^2 = H, R^3 = C$ **434** $R^1 = B, R^2 = H, R^3 = C$ **435** $R^1 = B, R^2 = H, R^3 = C$ **A****B****C****D****436****437** R = C ; **438** R = D**439**

1.4.1.4. Phragmalin

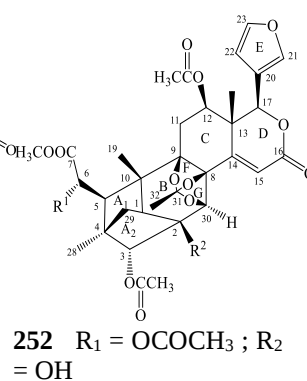
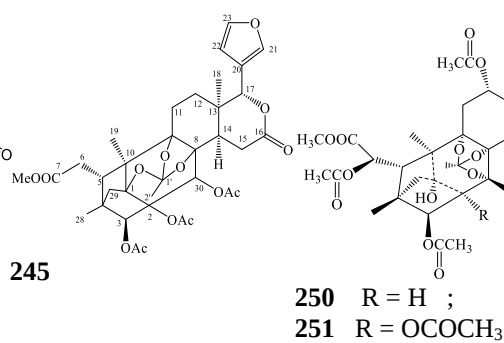
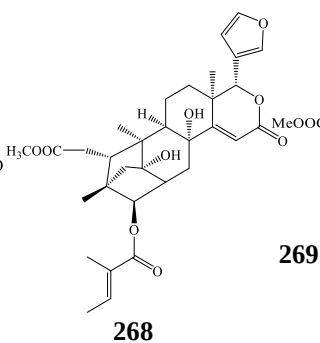
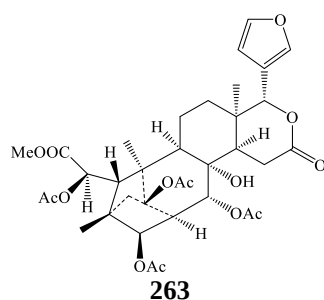
Cho đến nay đã có hơn **70** loại phragmalin được phân lập từ chi Xu (*Xylocarpus*).

Bảng 1.4. Các hợp chất phragmalin limonoid phân lập từ chi Xu (*Xylocarpus*)

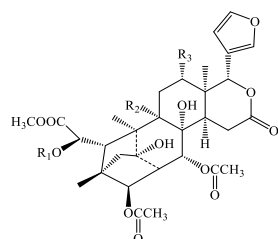
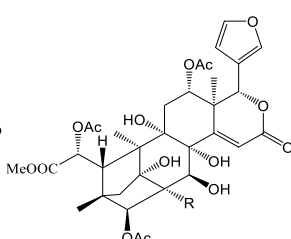
Ký hiệu	Tên hợp chất	TLTK	Cây
244	Moluccensin Y	[53]	XM
245	Xyloccensin E (1)	[79], [74], [75]	XR
246	Phragmalin I	[29]	XG
247	3,30-diacetylphragmalin	[28], [80], [81]	XM
248	Xyloccensin E	[19], [74], [75]	XM
249	Xylocarpin I	[28], [30], [39]	XG
250 - 257	Xyloccensin O, P, Q, R, S, T, U, V	[82], [83], [80]	XG
258 - 262	Xylocarpin A, B, C, D, E	[39]	XG
263	Granaxylocarpin E	[42]	XG
264	Xyloccensin U (2)	[39]	XG
265 - 267	Xyloccensin Y, Z ₁ , Z ₂	[84]	XG
268	Xylogranatin E ₂	[41]	XG
269	Xylogranatin E	[85]	XG
270	Hainangranatumin H	[49]	XG
271, 272	Granatumin F, G	[45]	XG
273 - 279	Moluccensin A, B, C, D, E, F, G	[86]	XM
280 - 282	Moluccensin H (C ₂₉ H ₃₂ O ₁₀), I (C ₃₀ H ₃₆ O ₁₀), J (C ₂₉ H ₃₄ O ₉)	[87]	XM
283	Moluccensin H (C ₃₆ H ₄₄ O ₁₁) (2-methylbutyryl gắn ở C1, isobutyryl gắn ở C-3)	[25]	XM
284	Moluccensin I (C ₃₆ H ₄₄ O ₁₁) (2-methylbutyryl đặt ở C-3, trong khi isobutyryl gắn vào C-1)	[25]	XM
285	Moluccensin J (C ₃₆ H ₄₄ O ₁₁) (2-methylbutyryl đặt ở C-2)	[25]	XM
286 - 288	Moluccensin K L M	[25]	XM
289, 290	Thaimoluccensin B, C	[8]	XM
291	Phragmalin 1 Dẫn xuất của 12-deacetyl derivative of xyloccensin Q, C ₃₃ H ₃₈ O ₁₅	[88]	XG
292	Phragmalin 2 2- deacetoxyl derivative of xyloccensin V C ₃₃ H ₃₈ O ₁₃	[88]	XG
293, 294	Phragmalin 3, 4	[88]	XG
295	12-deacetylxyloccensin U	[9]	XM
296	2-O-acetyl-2-dehydroxy-12-deacetylxyloccensin U	[9]	XM
297 - 299	Godavarin L M N	[11]	XM
300, 301	Thaixylomolin Z, 2-O-acetylthaixylomolin Z	[78]	XM
302 - 306	Hainanxylogranin Q, R, S, T, U	[77]	XG
307, 308	Xylomolin K ₁ , K ₂	[75]	XM
309 - 311	Xylomexicanin K, L, M	[89]	XG
440, 441	Xylomolone M, N	[16]	XM



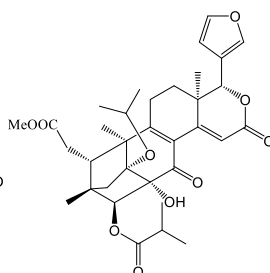
245

253 R₁ = OH ; R₂ = OH254 R₁ = OH ; R₂ = OCOCH₃255 R₁ = OH ; R₂ = H256 R₁ = H ; R₂ = OH257 R₁ = H ; R₂ = OCOCH₃

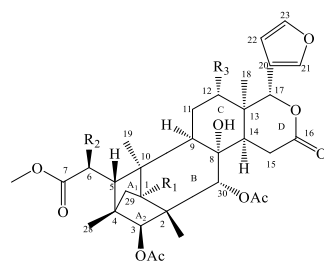
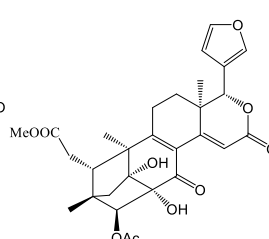
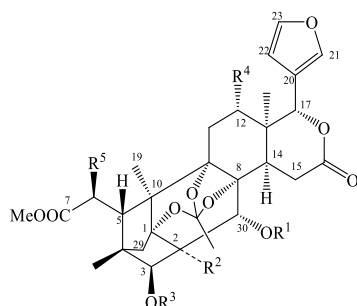
269

266 R₁ = R₂ = H ; R₃ = OAc267 R₁ = R₂ = R₃ = H

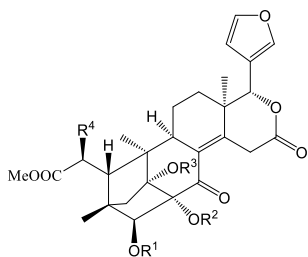
272 R = OAc



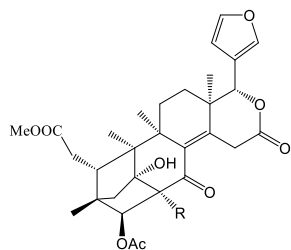
280

259 R₁ = OAc ; R₂ = R₃ = H260 R₁ = OH ; R₂ = H ; R₃ = OAc261 R₁ = R₃ = OAc ; R₂ = OH262 R₁ = R₂ = OAc ; R₃ = OH264 R₁ = R₃ = OAc ; R₂ = H

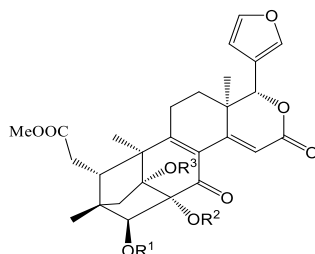
Ký hiệu/nhóm	R ¹	R ²	R ³	R ⁴	R ⁵
246	H	OH	H	H	H
247	Ac	OH	Ac	H	H
248	Ac	βOAc	Ac	H	H
249	Ac	H	Ac	OAc	OAc
270	Ac	αOAc	OH	OAc	OAc



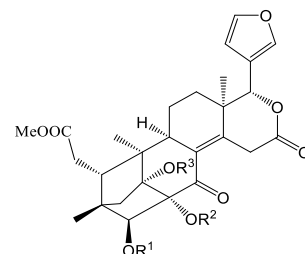
Ký hiệu	R ¹	R ²	R ³	R ⁴
273	Isobutyryl	H	Isobutyryl	H
274	2S-Methylbutyryl	H	Isobutyryl	H
275	Isobutyryl	H	2S-Methylbutyryl	H
276	2S-Methylbutyryl	H	Isobutyryl	OH
277	Isobutyryl	H	2S-Methylbutyryl	OH
278	Isobutyryl	Isobutyryl	H	H



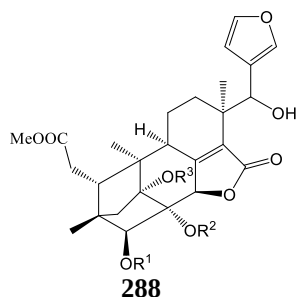
281 R = OMe
282 R = H



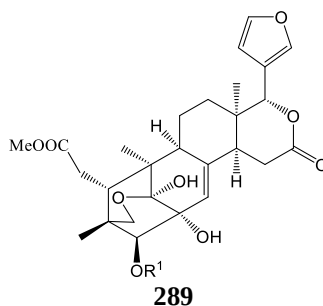
283 R¹ = X ; R² = H ; R³ = Y
284 R¹ = Y ; R² = H ; R³ = X
285 R¹ = X ; R² = Y ; R³ = H



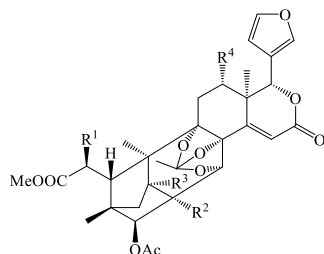
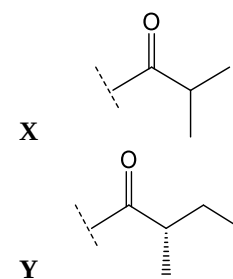
286 R¹ = X ; R² = Y ; R³ = H
287 R¹ = Y ; R² = H ; R³ = Y
290 R¹ = X ; R² = Y ; R³ = H



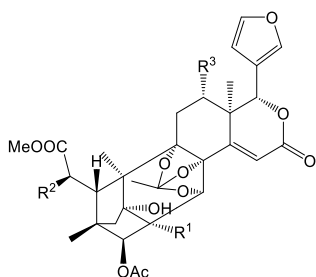
288



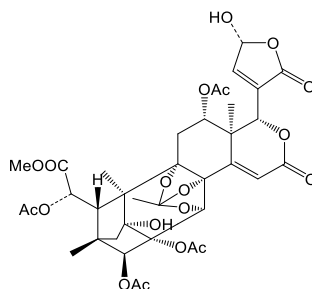
289



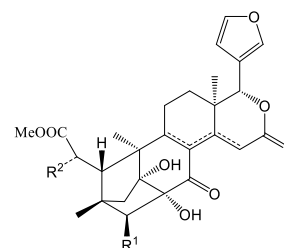
Ký hiệu	R ¹	R ²	R ³	R ⁴
291	OAc	OH	OH	OH
292	H	H	OH	OAc
293	H	H	OAc	OAc
294	OAc	H	OAc	OAc
295	H	H	OH	OH
296	H	OAc	OH	OH



281 R = OMe ;
282 R = H

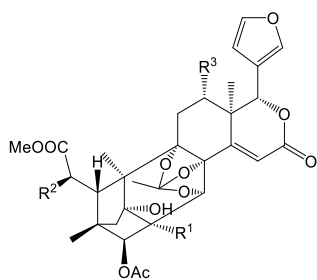
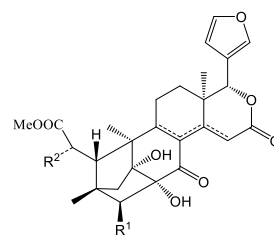
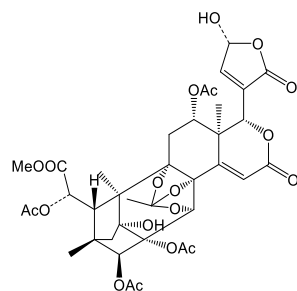


283 R¹ = X ; R² = H ; R³ = Y
284 R¹ = Y ; R² = H ; R³ = X
285 R¹ = X ; R² = Y ; R³ = H



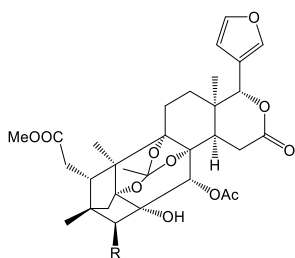
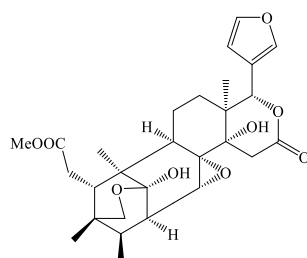
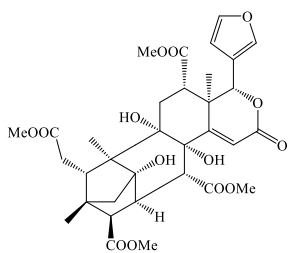
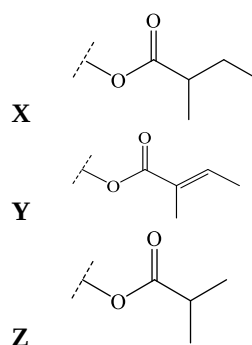
286 R¹ = X ; R² = Y ; R³ = H
287 R¹ = Y ; R² = H ; R³ = Y
290 R¹ = X ; R² = Y ; R³ = H

17

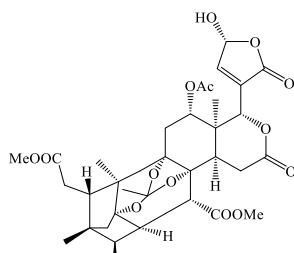
303 $R^1 = R^2 = R^3 = \text{OAc}$ 

300 $R^1 = \text{H}; R^2 = R^3 = \text{OH}$;
 301 $R^1 = \text{OAc}; R^2 = R^3 = \text{OH}$
 302 $R^1 = \text{OH}; R^2 = \text{H} = R^3$

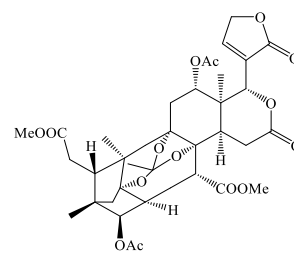
297 $R^1 = \text{OAc}; R^2 = \text{OH}$
 298 $R^1 = \text{H}; R^2 = \text{OH}, \Delta^{8,14}$
 299 $R^1 = \text{X}; R^2 = \text{OH}, \Delta^{8,9}, \Delta^{14,15}$
 307 $R^1 = \text{X}; R^2 = \text{OH}, \Delta^{8,9}, \Delta^{14,15}$
 308 $R^1 = \text{Z}; R^2 = \text{OH}, \Delta^{8,9}, \Delta^{14,15}$

304 $R = \text{Y}$; 305 $R = \text{X}$ 306 $R = \text{X}$ 

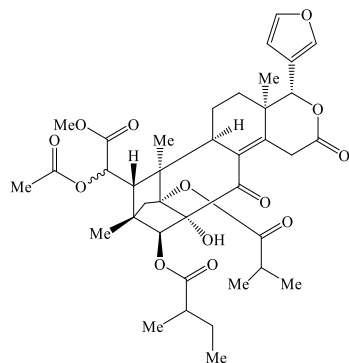
309



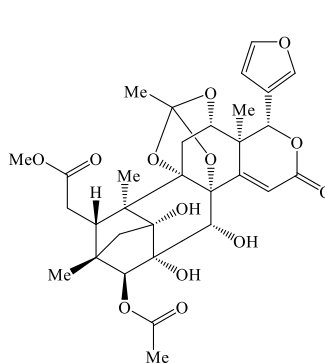
310



311



440



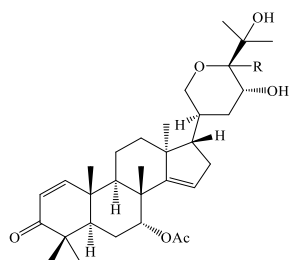
441

Hai limonoid mới được phân lập từ hạt của Xu nhỏ [75] (được thu thập tại đầm lầy ở tỉnh Trang - Thái Lan) do Jun Wu và cộng sự thực hiện đã mô tả cho hai limonoid mới, được đặt tên là Xylomolin K₁-K₂ (307–308, 30-Ketophragmalin với liên kết đôi liên hợp $\Delta^{8,9}$ và $\Delta^{14,15}$). Theo hướng nghiên cứu này, năm 2021, từ phân

lá và cành của Xu ôi, Shao Jung Li và cộng sự đã công bố ba hợp chất mới có tên Xylomexicanin K-M (309–311) [89].

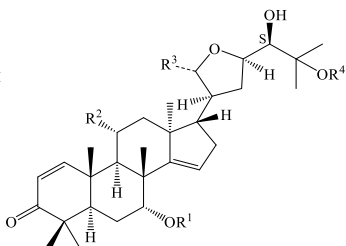
1.4.1.5. Protolimonoid

Cho đến nay, 31 protolimonoid được phân lập từ quả Xu ôi và Xu nhỏ.



312 R = OH;

323 R = H



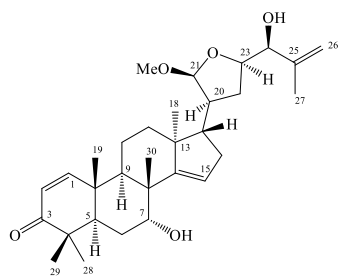
314 R¹ = R² = R⁴ = H, R³ = αOEt

315 R¹ = R² = R⁴ = H, R³ = βOEt

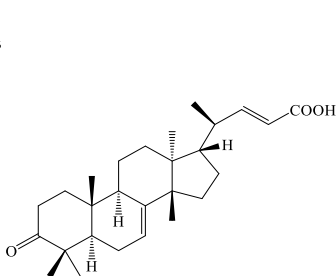
316 R¹ = R² = H, R³ = αOEt, R⁴ = Et

317 R¹ = R² = R⁴ = H, R³ = βOMe

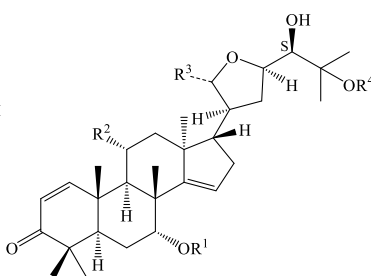
318 R¹ = Ac, R² = OAc, R³ = αOMe, R⁴ = H



313



330



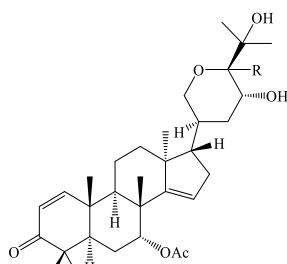
322 R¹ = OH, R² = R³ = OH

334 R¹ = OH, R² = R³ = βOH

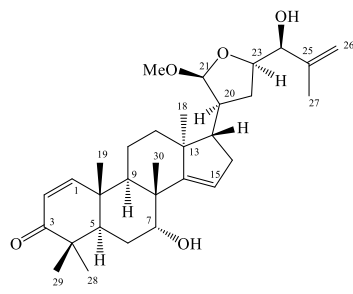
335 R¹ = OH, R² = αOH, R³ = βOH

Bảng 1.5. Các hợp chất protolimonoid phân lập từ chi Xu (*Xylocarpus*)

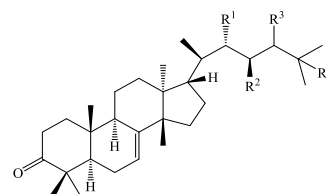
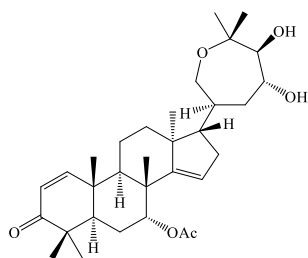
Ký hiệu	Tên hợp chất	TLTK	Cây
312	Spicatin	[90-92]	XG
313	Protoxylogranatin A	[93]	XG
314 - 318	Protoxylocarpin A, B, C, D, E	[94]	XG
319 - 321	Protoxylocarpin F, G, H	[95]	XG
322	Odoratone	[96]	XG
323	Grandifoliolenone	[96]	XG
324	Sapelin E acetate	[96]	XG
325, 326	Holstinone B, C	[96]	XG
327	Hispidol B	[96]	XG
328	Piscidinol G	[96]	XG
329, 330	Moluccensins P, Q	[25]	XM
331 - 335	Xylocarpol A B C D E	[97]	XM, XG
336 - 342	Xylogranatamine A B C D E F G	[98]	XG
442, 443	Xylomolones O, P	[16]	XM



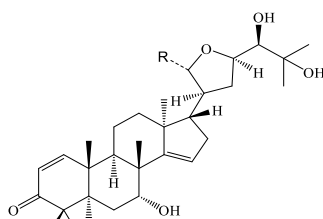
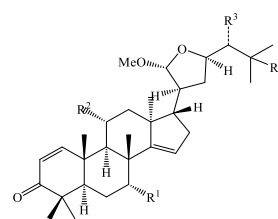
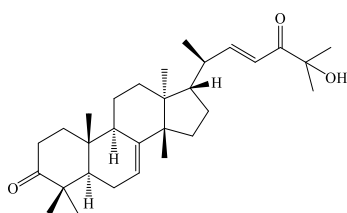
319 R = β OH;
320 R = α OH



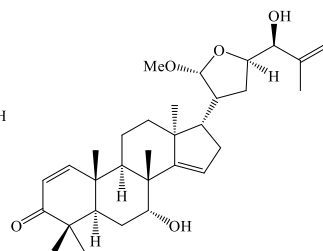
321

327 R¹ = H, R² = R³ = α OH, R⁴ = OH331 R¹ = R² = R⁴ = OH, R³ = α OH332 R¹ = OH, R² = O, R³ = R⁴ = H333 R¹ = R⁴ = H, R² = O, R³ = OH

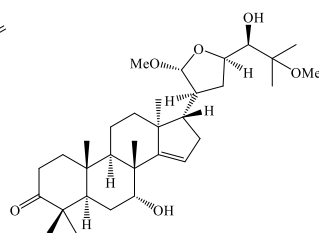
324

325 R = β OMe326 R = α Me328 R = α OH337 R¹ = H, R² = R³ = α OH, R⁴ = OH338 R¹ = R² = R⁴ = OH, R³ = α OH340 R¹ = OH, R² = O, R³ = R⁴ = H

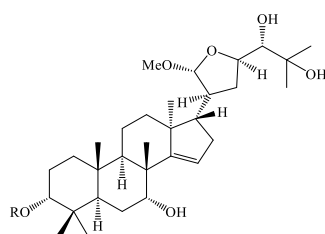
329



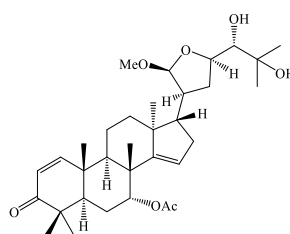
336



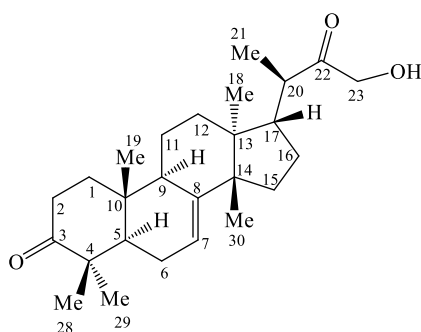
339



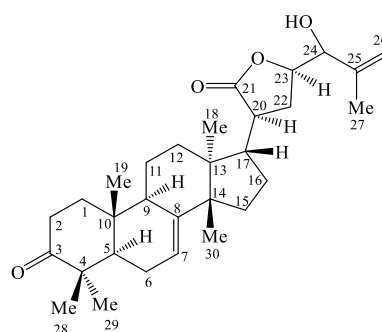
341



342



442



443

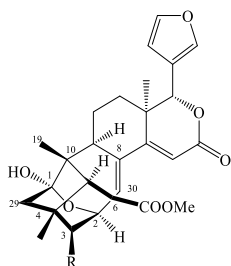
1.4.1.6. Limonoid khác

Hơn 41 limonoid khác đã được phân lập từ hai loài Xu ổi và Xu nhỏ. Năm 2006, từ phần quả của Xu ổi, một hỗn hợp của bốn hợp chất Butyrospermol mới có tên là Butyrospermol 3 β -O-palmitate (374), Butyrospermol 3 β -O-oleate (375),

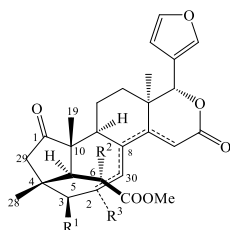
Butyrospermol 3 β -O-stearate (**376**), Butyrospermol 3 β -O-linoleate (**377**) và hai β -Sitosterol fatty acid ester đã biết β -Sitosterol 3 β -O-myristate (**378**) và β -Sitosterol 3 β -O-oleate (**379**) đã được Jun Wu và cộng sự công bố. Ngoài ra, rất nhiều steroid và các dẫn xuất của nó được tìm thấy từ các loài thuộc chi Xu (*Xylocarpus*) như β -Sitosterol (**380**), Stigmasterol (**381**) và daucosterol (**382**), được công bố từ cả hai loài Xu ổi và Xu nhỏ. Bốn dẫn xuất alkaloid **383–386** được phân lập từ phần vỏ rễ của Xu ổi. Mười hai limonoid khác đã được phân lập vào năm 2007, Xylogranatins F - Q đã được phân lập từ hạt của Xu ổi cho các limonoid vòng B thơm đầu tiên [85]. Chúng thuộc hai lớp cấu trúc phụ, trong đó một lớp chứa vòng Pyridine, trong khi lớp kia chứa lõi furan trung tâm.

Bảng 1.6. Các hợp chất limonoid khác phân lập từ chi Xu (*Xylocarpus*)

Ký hiệu	Tên hợp chất	TLTK	Cây
343 - 347	Andhraxylocarpin A, B, C, D, E	[99]	XG, XM
348 - 351	Krishnolide A, B, C, D	[10]	XM
352 - 360	Xylomolin G ₁ , G ₂ , G ₃ , G ₄ , G ₅ , H, I, J ₁ , J ₂	[75]	XM
361 - 368	Thaixylomolin G, H, I, J, K, L, M, N	[100]	XM
369, 370	Granatripodin A, B	[101]	XG
371 - 373	Krishnolide E, F, G	[26]	XM
374 - 385	Xylogranatin F, G, H, I, J, K, L, M, N, O, P, Q	[85]	XG
386	Hainangranatumin G	[49]	XG



343 R = X;
344 R = Ac

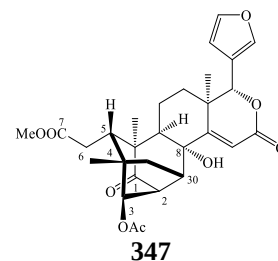


345 R¹ = Ac, R² = R³ = H, $\Delta^{2,30}$, $\Delta^{8,14}$

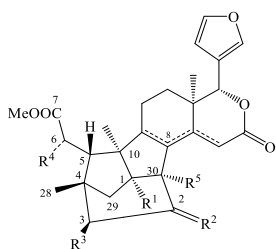
346 R¹ = X, R² = R³ = H, $\Delta^{2,30}$, $\Delta^{8,14}$

359 R¹ = OAc, R² = OH, R³ = O, $\Delta^{8,30}$, $\Delta^{14,15}$

360 R¹ = Y, R² = OH, R³ = O, $\Delta^{8,30}$, $\Delta^{14,15}$



347



352 R¹ = R⁴ = OH, R² = O, R³ = OAc, R⁵ = OEt, $\Delta^{8,14}$

353 R¹ = R⁴ = OH, R² = O, R³ = Z, R⁵ = OEt, $\Delta^{8,14}$

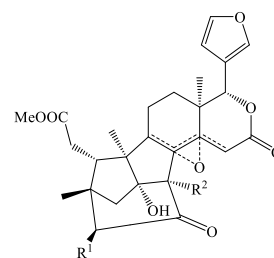
354 R¹ = R⁴ = OH, R² = O, R³ = OAc, R⁵ = H, $\Delta^{8,14}$

355 R¹ = OH, R² = O, R³ = Z, R⁴ = R⁵ = H, $\Delta^{8,14}$

356 R¹ = OH, R² = O, R³ = Y, R⁴ = R⁵ = H, $\Delta^{8,14}$

357 R¹ = Z, R² = O, R³ = OAc, R⁴ = R⁵ = OH, $\Delta^{14,15}$, 8 α OH

358 R¹ = OH, R² = Y, R³ = O, R⁴ = R⁵ = OH, $\Delta^{8,9}$, $\Delta^{14,15}$

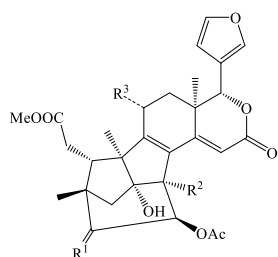


348 R¹ = Y, R² = Z, 8,14-epoxy

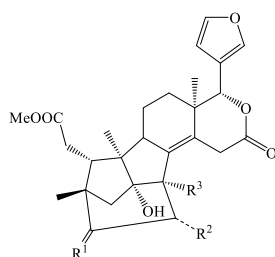
349 R¹ = Z, R² = Y, $\Delta^{8,9}$, $\Delta^{8,14}$

350 R¹ = Y, R² = Z, $\Delta^{8,14}$

351 R¹ = Y, R² = Y, $\Delta^{8,14}$

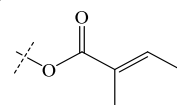


- 361** $R^1 = R^3 = O, R^2 = OH$
362 $R^1 = R^2 = OH, R^3 = H$
367 $R^1 = \beta OAC, R^2 = R^3 = H$
368 $R^1 = \beta OAC, R^2 = X, R^3 = H$

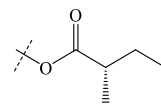


- 363** $R^1 = R^3 = O, R^2 = OH$
364 $R^1 = R^2 = OH, R^3 = H$
365 $R^1 = \beta OAC, R^2 = R^3 = H$
366 $R^1 = \beta OAC, R^2 = O, R^3 = OEt$

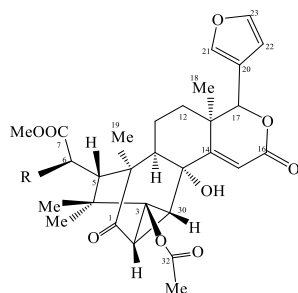
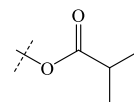
X



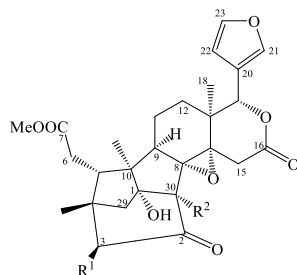
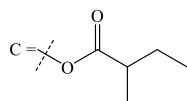
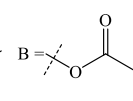
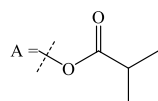
Y



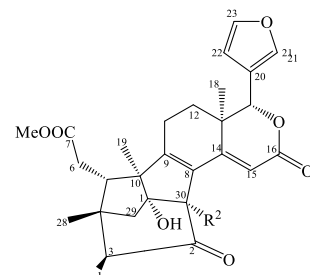
Z



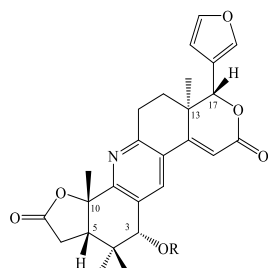
- 369** $R = OAc$
370 $R = H$



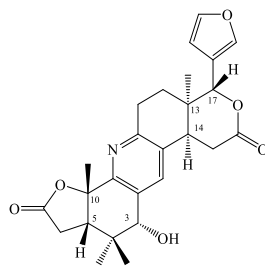
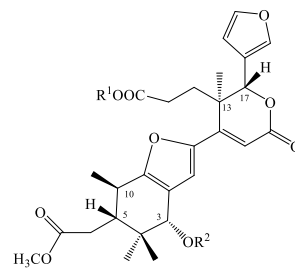
- 371** $R^1 = A \quad R^2 = A$



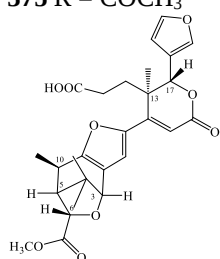
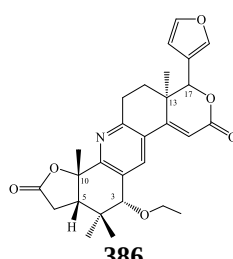
- 372** $R^1 = A \quad R^2 = A$
373 $R^1 = B \quad R^2 = C$



- 374** $R = H$ (Xylogranatin F)
375 $R = COCH_3$

**376**

- 377** $R^1 = H \quad R^2 = H$
378 $R^1 = CH_3 \quad R^2 = CH_3$

**385****386**

- 379** $R^1 = H \quad R^2 = CH_3$
380 $R^1 = H \quad R^2 = CH_2CH_3$
381 $R^1 = CH_3 \quad R^2 = COCH_3$
382 $R^1 = H \quad R^2 = 2S\text{-methylbutyryl}$
383 $R^1 = H \quad R^2 = tigloyl$
384 $R^1 = H \quad R^2 = isobutyryl$

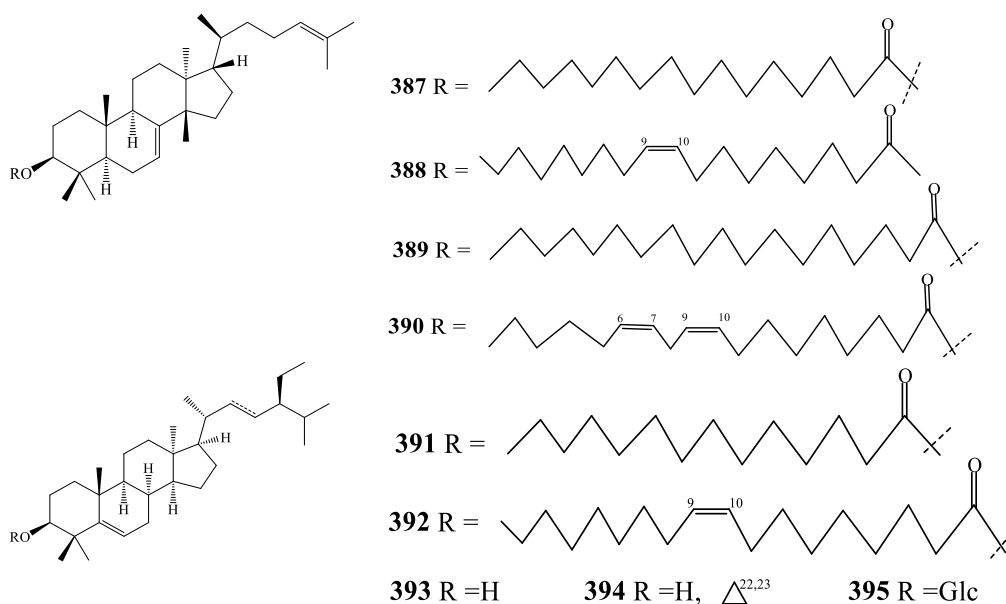
1.4.2. Nhóm chất steroid

Năm 2006, từ phần quả của cây Xu ối, một hỗn hợp của bốn hợp chất Butyrospermol mới có tên là Butyrospermol 3β -O-palmitate (**387**), Butyrospermol 3β -O-oleate (**388**), Butyrospermol 3β -O-stearate (**389**), Butyrospermol 3β -O-linoleate (**390**) và hai β -Sitosterol fatty acid esters đã biết β -Sitosterol 3β -O-myristate (**391**) và β -Sitosterol 3β -O-oleate (**392**) đã được Jun Wu và cộng sự công bố [90]. Ngoài ra, rất nhiều steroid và các dẫn xuất của nó được tìm thấy từ các loài thuộc chi

Xu (*Xylocarpus*) như β -Sitosterol (**393**), Stigmasterol (**394**) và Daucosterol (**395**), được công bố từ cả hai loài Xu ổi và Xu nhỏ. [27], [102-105]

Bảng 1.7. Các hợp chất thuộc lớp chất steroid phân lập từ chi Xu (*Xylocarpus*)

Ký hiệu	Tên hợp chất	TLTK	Cây
387	Butyrospermol 3 β -O-palmitate	[90]	XG
388	Butyrospermol 3 β -O-oleate	[90]	XG
389	Butyrospermol 3 β -O-stearate	[90]	XG
390	Butyrospermol 3 β -O-linoleate	[90]	XG
391	Butyrospermol β -sitosterol 3 β -O-myristate	[90]	XG
392	Butyrospermol β -sitosterol 3 β -O-oleate	[90]	XG
393	β -sitosterol	[27], [102-105]	XM, XG
394	Stigmasterol	[27], [102-105]	XM, XG
395	Daucosterol (β -sitosterol-3-O-D-glucopyranosid)	[27], [102-105]	XM, XG

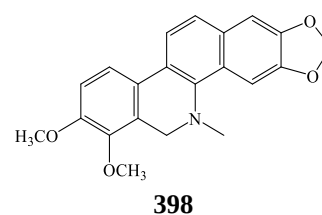
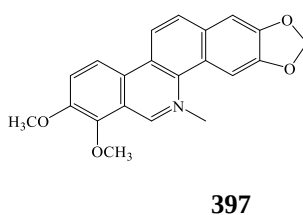
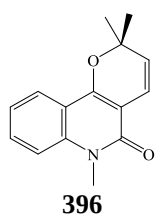


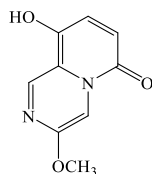
1.4.3. Nhóm chất alkaloid

Sáu alkaloid **396** - **401** được phân lập từ vỏ rễ của Xu ổi.

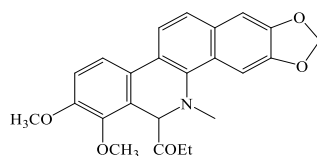
Bảng 1.8. Các hợp chất thuộc lớp chất alkaloid phân lập từ chi Xu (*Xylocarpus*)

Ký hiệu	Tên hợp chất	TLTK	Cây
396	<i>N</i> -Methylflindersine	[6], [91]	XG
397	Chelerythrine	[6], [91]	XG
398	Dihydrochelerythrine	[6], [91]	XG
399	Acetonyldihydrochelerythrine	[6], [91]	XG
400	Xylogranatinin	[106]	XG
401	Granatoine	[107]	XG

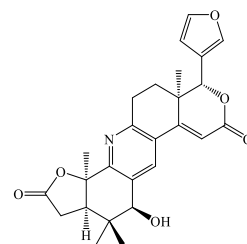




400



399



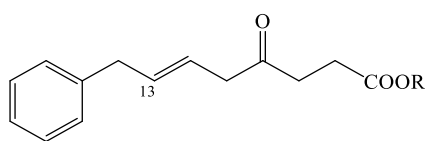
401

1.4.4. Nhóm chất phenolic

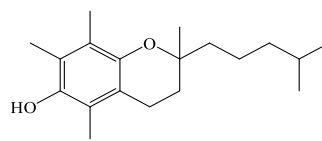
Các hợp chất **phenolic đã phân lập được là 10** hợp chất. Năm 1998, một acid aryl keto chưa bão hòa mới **402** và metyl este **403** của nó được phân lập từ gỗ của Xu nhỏ. Năm 2006, ba hợp chất phenolic, **404** - **406** thu được từ quả của Xu ổi.

Bảng 1.9. Các hợp chất thuộc lớp chất phenolic phân lập từ chi Xu (*Xylocarpus*)

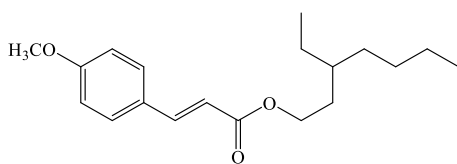
Ký hiệu	Tên hợp chất	TLTK	Cây
402	4-oxo-19-phenylnonadec-5-enoic acid	[103]	XM
403	Methyl 4-oxo-19-phenylnonadec-5-enoate	[103]	XM
404	α -Tocopherol	[84]	XG
405	Acid 4-hydroxybenzoic	[84]	XG
406	Ethyl 3,4-dihydroxybenzoate	[84]	XG
407	2-Ethylhexyl 4-methoxycinnamate	[105]	XM
416, 418	Corniculatolide B, C	[108]	XG
417	Isocorniculatolide B	[108]	XG
420	Granasteroid	[89]	XG



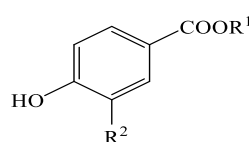
402 R = H ; 403 R = Me



404

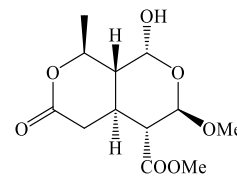


407

405 R¹ = R² = H406 R¹ = Et, R² = OH

1.4.5. Nhóm chất monoterpene

Xylomollin (**408**) [109] là một loại secoiridoid monoterpeneoid bất thường sở hữu nhóm chức hemiacetal và acetal, được phân lập từ quả của Xu rắm.



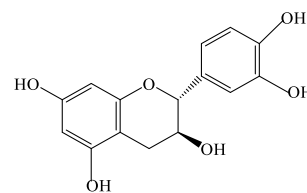
408

1.4.6. Nhóm chất flavanol

Một flavanol, (p)-Catechin (**409**) [6], [103], được phân lập từ Xu ôi.

1.4.7. Các thành phần khác

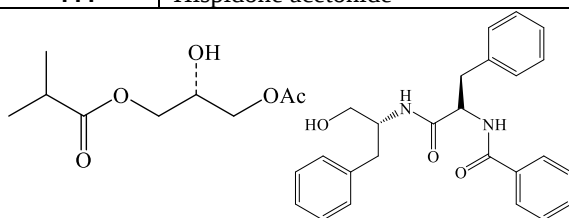
Bên cạnh các hợp chất đã đề cập ở trên, các loài chi Xu (*Xylocarpus*) có thể chứa Glyceride ester (**410**), Aurantiamide (**411**) và axit abscisic (**412**). Mười hai hợp chất thuộc các thành phần khác của Chi Xu đã được phân lập theo bảng 1.10.



409

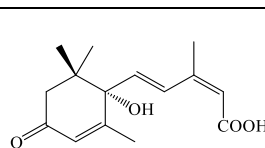
Bảng 1.10. Các thành phần khác phân lập từ chi Xu (*Xylocarpus*)

Ký hiệu	Tên hợp chất	TLTK	Cây
410	Glyceride ester	[6]	XM, XG
411	Aurantiamide	[6]	XG
412	Acid abscisic	[6], [84]	XG
413	3-(1-hydroxyethyl)-4,4-dimethyl-4-butyrolactone	[104]	XG
414	1,3-di-(16'-acetoxy-palmitoyl)-glycerol	[110]	XG
415	2S,3S,4R,8E)-2-[(2'R)-hydroxypalmitoylamino]-8-tetracosene-1,3,4-triol	[110]	XG
419	Xylomexicanin N	[89]	XG
421	5-methoxy-2-pentylbenzofuran-7-ol	[89]	XG
444	Hispidone acetoneide	[16]	XM

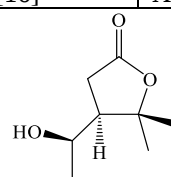


410

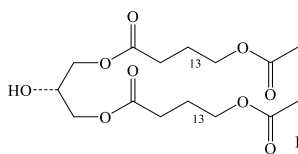
411



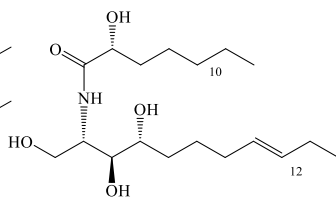
412



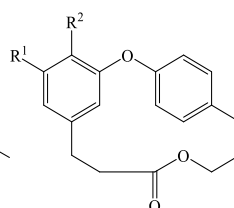
413



414

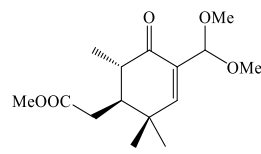


415

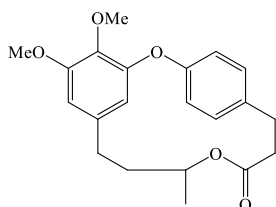


416 $R^1 = R^2 = \text{OCH}_3$

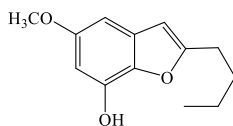
418 $R^1 = R^2 = \text{OH}$



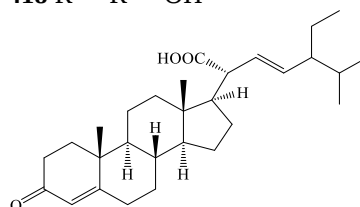
419



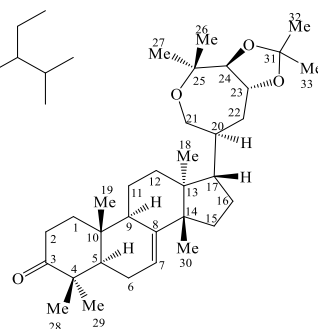
417



420



421



444

1.5. Hoạt tính sinh học của chi Xu

Các nghiên cứu về hoạt tính sinh học của chi Xu (*Xylocarpus*) cho thấy nhiều hoạt tính sinh học như theo liệt kê trong bảng 1.11.

Bảng 1.11. Hoạt tính sinh học của chi Xu (*Xylocarpus*)

TT	Hoạt tính		
1	Hoạt tính gây độc tế bào	1. Ung thư ruột ở người (CaCo2)	[4], [5]
		2. Ung thư đại trực tràng ở người (SW480 và HCT116)	[8], [56]
		3. Ung thư biểu mô ruột kết (HCT-8)	[4], [5]
		4. Ung thư biểu mô dạ dày (BGC-823)	[94]
		5. Ung thư gan (HLE)	[46]
		6. Ung thư bạch cầu (P-388)	[39], [42]
		7. Ung thư thực quản (Eca109)	[6-8]
		8. Ung thư phổi ở người (A549)	[39], [42]
		9. Ung thư vú ở người (MCF-7), (MDA-MB-231; MDA-MB-453)	[6-8], [11]
		10. Ung thư biểu mô vú (KT)	[40], [90]
		11. ung thư cổ tử cung ở người (Hela)	[6-8]
		12. ung thư buồng trứng (OVCA8)	[111]
2	Hoạt tính chống đông máu	Mục 1.5.2	[6], [8], [91]
3	Hoạt tính kháng khuẩn, kháng viêm	1. Ức chế sản sinh NO tế bào đại thực bào trong nghiên cứu thuốc kháng viêm (RAW264.7), lipopolysaccharide (LPS)	[8], [58]
		2. Virus cúm A (phân nhóm H1N1)	[9]
		3. Virus HIV	[72], [11]
		4. Ức chế đối với PTPP1B (Điều trị tiểu đường, béo phì)	[88]
4	Hoạt tính chống sốt rét	Mục 1.5.4	[7]
5	Hoạt tính chống tiêu chảy	Mục 1.5.5	[7]
6	Hoạt tính ức chế thần kinh	Mục 1.5.6	[111], [112]
7	Hoạt tính kháng nấm	Mục 1.5.7	[6]

1.5.1. Hoạt tính gây độc tế bào

Các nghiên cứu tác dụng của các chất chiết xuất từ cây Xu ổi trong Ethyl acetate cho thấy hoạt tính ức chế tăng trưởng trên các tế bào HeLa (tế bào ung thư cổ tử cung) ($IC_{50} = 23,0 \mu\text{g/ml}$), trong khi chiết xuất trong nước thì không [6-8].

Hoạt tính sinh học của gedunin (**2**) phân lập từ vỏ cây Xu ổi (Bangladesh) có khả năng ức chế sự tăng sinh trên dòng tế bào ung thư ruột (CaCo-2, $IC_{50} = 16,83 \mu M$) [4], [5]. Theo hướng nghiên cứu sâu hơn tiếp theo (Western blot) cũng cho thấy (**2**) có khả năng ức chế các tế bào ung thư buồng trứng (OVCAR8) theo cơ chế gây chết theo chương trình (apoptosis) [111]. Đặc biệt, hợp chất gedunin (**2**) còn được xem là một chất có tiềm năng sản xuất dược phẩm đầy hứa hẹn với khả năng ức chế protein Hsp90 (một loại protein thiết yếu cho sự phát triển của các tế bào ung thư và những chất có khả năng ức chế protein này đều được xem như một loại thuốc chữa trị ung thư), nó có khả năng gây chết tế bào ung thư thông qua quá trình bất hoạt protein p23 và kích hoạt caspase 7 [113].

Thaimoluccensin A (**7**), tỉnh Phuket, phía Nam Thái Lan) được công bố. Đánh giá khả năng ức chế sự sản sinh NO tế bào đại thực bào RAW264.7 kích thích bởi LPS, Thaimoluccensin A (**7**) chỉ thể hiện hoạt động khá khiêm tốn, trong khi chất đồng chuyển hóa 7-Deacetylgedunin (khung gedunin limonoid) thể hiện hoạt tính với giá trị $IC_{50} < 10 \mu M$ [8].

Năm 2006, các hợp chất Xylogranatin A^a, B^a, C^a, D^a (**48 – 51**) được phân lập từ hạt của Xu ổi cho thấy hoạt tính gây độc tế bào trên hai dòng tế bào khối u là ung thư bạch cầu P-388 và ung thư biểu mô phổi người A-549 [42], [43]. Trong số đó, các hợp chất **48 – 51** cho thấy độc tính tế bào vừa phải đối với dòng tế bào P-388 với các giá trị IC_{50} tương ứng là 8,9 ; 6,3 và 14,6 μM , trong khi các hợp chất Xylogranatin A^a (**48**) và Xylogranatin B^a (**49**) thể hiện độc tính tế bào đối với dòng tế bào A-549 với các giá trị IC_{50} lần lượt là 15,7 và 11,3 μM [6], [7].

Năm 2007, các hợp chất xylocarpin H (Granaxylocarpin B) (**45**) và Granaxylocarpin A (**46**) đã cho thấy có hoạt tính gây độc tế bào chống lại bệnh bạch cầu ở chuột P-388 và các dòng tế bào ung thư biểu mô phổi A-549 ở người. Qua nghiên cứu đã cho thấy các hoạt tính gây độc tế bào đối với dòng tế bào P-388 (giá trị IC_{50} là 9,3 và 4,9 μM , tương ứng) [39], [42].

Tiếp tục hướng nghiên cứu này, đến năm 2009 nhóm nghiên cứu của Chang Hong Huo và cộng sự xác định từ phần hạt của loài *Xylocarpus granatum* thu hái ở đảo Hải Nam - Trung Quốc hai dẫn xuất mexicanolide limonoid mới là Xylomexicanin A-B (**59–60**) [46]. Để hiểu rõ hơn về các đánh giá *in vitro* hoạt tính gây độc tế bào, Bin Cong và cộng sự (2009) đã thực hiện một nghiên cứu khá sâu về tác dụng ức chế của hai hợp chất **59–60** đối với khả năng tăng sinh của 11 dòng tế bào ung thư ở người là ung thư cổ tử cung (HeLa), ung thư biểu mô nội mạc tử cung (HEC-1), ung thư biểu mô nang buồng trứng (SHIN3), ung thư biểu mô nang buồng trứng (HOC-21), ung thư biểu mô tế bào buồng trứng (HAC-2), ung thư gan (HLE), ung thư thần kinh (U251-SP), ung thư thần kinh (T-98), ung thư sắc tố da (MM1-CB),

ung thư sắc tố da (HMV-1) và ung thư biểu mô vú (KT). Kết quả các hợp chất được thử nghiệm, Xylomexicanin A (**59**) thể hiện ở mức độ khá tốt (với giá trị $IC_{50} = 4,59 \mu M$) chống lại tế bào ung thư biểu mô vú (KT) trong khi Xylomexicanin B (**60**) ở cùng nồng độ thử nghiệm không thể hiện khả năng ức chế trên cả 11 dòng tế bào ung thư thử nghiệm [46].

Tiếp tục thử nghiệm *in vitro* trên dòng tế bào Eca109 đối với hợp chất **61**. Kết quả cho thấy, Xylocarponoid A (**61**) ức chế sự tăng sinh tế bào và tỷ lệ sống sót của tế bào là 7,15% ($IC_{50} = 13,34 \mu M$) [47], [92].

Xylomexicanin C (**100**) thể hiện hoạt tính gây độc tế bào tiềm năng trên dòng tế bào ung thư vú ($IC_{50} = 4,60 \mu M$) [55], trong khi Xylogranin B (**103**) và chất đồng chuyển hóa Swietephragmin là những chất ức chế mạnh và thể hiện độc tế bào dưới micromol đối với hai dòng tế bào ung thư đại trực tràng (SW480 và HCT116) [56].

2-Hydroxyxylorumpihiin F (**112**) và Xylorumpihiin I (**115**) thể hiện khả năng ức chế vừa phải chống lại sự sản sinh NO từ các đại thực bào được hoạt hóa bằng lipopolysaccharide (LPS) với giá trị IC_{50} tương ứng là 24,5 và 31,3 μM [58].

Xylogranatopyridine A (**117**) thể hiện khả năng ức chế đáng kể protein tyrosine phosphatase 1B (PTP1B) với giá trị $IC_{50} = 22,9 \text{ mM}$. Đây cũng là công bố đầu tiên liên quan đến hoạt tính ức chế PTP1B của nhóm chất limonoid [59].

Xylomexicanin E-H (**133–136**, có cầu oxy liên kết C-9–C-30) thể hiện hoạt tính trung bình trên dòng tế bào A549 và RERF với các giá trị IC_{50} tương ứng là 18,83 và 15,83 mM [53].

Sundarbanxylogranin B (**184**) thể hiện hoạt tính kháng virus HIV ở mức vừa phải với giá trị $IC_{50} = 23,14 \pm 1,29 \mu M$ và giá trị IC_{50} tương ứng là $78,45 \pm 1,69 \mu M$ [72].

Hợp chất Thaixylogranin A-H (**173–180**) thể hiện khả năng ức chế yếu đối dòng tế bào ung thư thử nghiệm MDA-MB-231 với giá trị IC_{50} tương ứng là 49,4 ; 58,3 ; 53,6 ; 61,1 ; 57,9 ; 44,6 ; 40,6 và 38,5 mM [70].

Năm 2020, hoạt tính ức chế của các hợp chất **219**, **224–226**, **229** và Tabulvelutin B chống lại carboxylesterase 2 (CES2) đã được thử nghiệm cho thấy các hợp chất được thử nghiệm đều có tỷ lệ ức chế từ 30-64% ở nồng độ 100 μM [77]. 7-deacetylgedunin thể hiện hoạt tính khá tốt ($IC_{50} < 10 \mu M$) [8].

Năm 2014, bốn hợp chất 8,9,30-phragmalin *ortho*-ester mới (**291–294**) cùng với sáu hợp chất đã biết khác (xylocensin O-S và V) được các nhà khoa học Trung Quốc công bố từ phần cành và lá của Xu ổi. Xylocensin S thể hiện khả năng ức chế đối với PTP1B (một đích tiềm năng để điều trị bệnh tiểu đường loại II và béo phì), với giá trị $IC_{50} = 8,72 \mu g/mL$ [88].

Hoạt tính kháng virus HIV được thử nghiệm *in vitro* của Godavarin M (**298**), Godavarin O (Moluccensin S (**89**)) trên dòng tế bào 293T được chuyển gen virus HIV-I ở nồng độ 20 μM và 100 μM , Godavarin M và Godavarin O cho thấy tỷ lệ ức chế ở nồng độ 100 μM lần lượt là $98,21 \pm 0,75\%$ và $39,95 \pm 2,28\%$ (Ở nồng độ 20 μM , tỷ lệ ức chế của cả hai chất thấp). Ngoài ra, hai 30-ketophragmalin **297** và **299** thể hiện hoạt tính gây độc tế bào ức chế trên dòng tế bào ung thư vú (MDA-MB-453) với giá trị IC_{50} tương ứng là $2,1 \pm 0,06$ và $9,0 \pm 1,0$ μM , trong khi Godavarin N (**298**) chỉ thể hiện ở mức yếu ($\text{IC}_{50} = 66,0 \pm 2,5$ μM) [11].

Từ phần hạt của cây Xu nhỏ thu thập ở đầm lầy ngập mặn của tỉnh Trang - Thái Lan, hai phragmalin 8,9,30-*ortho*-ester mới là Thaixylomolin Z (**300**) và 2-O-acetylthaixylomolin Z (**301**) đã được công bố. Cấu hình tuyệt đối của hợp chất **300** được xác định bằng phổ X-ray đơn tinh thể với bức xạ Cu K α ; trong khi đó **301** được xác định là giống như **300** kết hợp với sự tương đồng trên phổ ECD thực nghiệm của chúng. Tất cả các hợp chất được thử nghiệm đều có tỷ lệ ức chế Carboxylesterase 2 (CES2) trong khoảng 16-65% ở nồng độ 100 μM [78].

Năm 2020, từ lá và vỏ của cây Xu ổi, năm phragmalin mới được đặt tên là Hainanxylogranin Q-U (**302–306**) cũng được công bố. Tất cả các hợp chất được thử nghiệm đều có tỷ lệ ức chế CES2 trong khoảng từ 30-64% ở nồng độ 100 μM [77].

Đánh giá *in vitro* hoạt tính kháng virus HIV của hai hợp chất **307–308** đã được thử nghiệm. Tuy nhiên, không có hợp chất nào cho thấy hoạt tính ức chế tiềm năng tại nồng độ thử nghiệm (20 μM) [75].

Spicatin (**312**) được thử nghiệm trên dòng tế bào Eca109 cho thấy ức chế sự tăng sinh tế bào và tỷ lệ sống sót của tế bào là 9,19% ($\text{IC}_{50} = 37,49$ μM) [92].

Trong số các dòng tế bào ung thư phổi kháng thuốc (A549), ung thư buồng trứng (A2780), ung thư gan (Bel-7402), ung thư biểu mô dạ dày (BGC-823) và ung thư biểu mô ruột kết (HCT-8) được thử nghiệm, các hợp chất Protoxylocarpin A-E (**313 – 318**) thể hiện khả năng kháng lại các dòng tế bào trên ở mức trung bình/yếu, với giá trị IC_{50} trong khoảng 0,38 – 19,00 μM , khi so sánh với chất đối chứng dương sử dụng là Taxol ($\text{IC}_{50} = 0,02 – 2,76$ μM) [94].

Năm 2014, một dãy bảy hợp chất khung apotirucallane protolimonoid chưa từng được biết đến Xylogranatamine A-G (**336–342**), được phân lập từ cành và lá của cây Xu ổi thu hái ở tỉnh Hainan - Trung Quốc. Cả bảy hợp chất được đánh giá khả năng ức chế trên dòng tế bào ung thư phổi (A549). Tuy nhiên, chỉ hợp chất Xylogranatamine F (**341**) thể hiện ở mức độ yếu (ức chế tăng sinh tương đương 54,2%) trên dòng tế bào ung thư A549 ở nồng độ thử nghiệm 10 μM . Các hợp chất còn lại ức chế thấp hơn 50% [98].

Krishnolide A (**347**) có cầu 8,14-epoxy, thể hiện hoạt tính kháng virus HIV ở mức độ trung bình, với giá trị tương ứng $IC_{50} = 17,45 \pm 1,65 \mu M$ và $CC_{50} = 78,45 \pm 1,69 \mu M$. Đây không chỉ là báo cáo đầu tiên về nhóm chất khayanolide từ loài thực vật ngập mặn thuộc chi *Xylocarpus*, mà còn là công bố đầu tiên về khả năng kháng virus HIV của các hợp chất khayanolide [10].

Hoạt tính kháng virus của các hợp chất phân lập được chống lại virus cúm A (phân nhóm H1N1) đã được đánh giá bằng thử nghiệm ức chế trên tế bào gốc. Ba khayanolide bao gồm Thaixylomolin I, K và M thể hiện các hoạt động chống H1N1 vừa phải. Khả năng ức chế mạnh nhất, Thaixylomolin I ($IC_{50} = 77,1 \pm 8,7 \mu M$), cho thấy hoạt tính ức chế mạnh hơn so với đối chứng dương được sử dụng là Ribavirin ($IC_{50} = 185,9 \pm 16,8 \mu M$) [9].

Krishnolide F (**372**) thể hiện tác dụng khá mạnh đối với hPXR ở nồng độ 10 μM . Việc gắn kết phân tử chứng tỏ rằng krishnolide F có thể liên kết một chuỗi xoắn gần vùng Helix 12 của hPXR. Ngoài ra, mười dư lượng của hPXR góp phần chủ yếu vào tương tác phối tử protein là Val211, Leu240, Met243, Met246, Phe281, Gln285, Phe288, Trp299, His407 và Leu411. Đây là báo cáo đầu tiên về tác dụng trên hPXR của khayanolide limonoid [26].

Mangala G. Ponnappalli và cộng sự tìm thấy từ cặn chiết chloroform vỏ của XG. Hợp chất Corniculatolide C (**404**) thể hiện tốt nhất khả năng ức chế AGH ($IC_{50} = 24,8 \mu M$) sự ức chế enzyme α -Glucosidase (*Saccharomyces cerevisiae*) [108].

1.5.2. Hoạt tính chống đông

Hợp chất Xylomollin (**408**) được phân lập từ Xu nhỏ và các hợp chất Chelerythrine (**397**) và Dihydrochelerythrine (**398**) thu được từ Xu ổi, tất cả đều có hoạt tính chống đông máu [6], [8], [91].

Vào năm 2005, các hoạt tính chống đông của Xyloccensin O-V (**250 - 257**) đã được thử nghiệm, trong số đó, các hợp chất **251** và **252** hoạt tính mạnh ở nồng độ 500 ppm, với 50 ppm tương ứng với nồng độ 1 $\mu g/cm^2$, trong khi các hợp chất khác cho thấy hoạt tính yếu [114].

Năm 2007, các hợp chất, Xylogranatin C và Xylogranatin D (**39** và **40**) [40], F-G (**374** và **375**), I-K (**377**, **378**, **379**) và P-R (**384**, **385**, và **52** [44]) cũng đã được thử nghiệm cho các hoạt tính chống đông của chúng. Xylogranatin F, G và R (**374**, **375** và **52**) thể hiện hoạt tính chống đông rõ rệt ở nồng độ 1 mg/ml. Hợp chất mạnh nhất được thử nghiệm là Xylogranatin G. Giá trị AFC_{50} (nồng độ cho hoạt tính chống đông là 50%) của nó ở 24 và 48 giờ lần lượt là 0,31 và 0,30 mg/ml [6], [85].

1.5.3. Hoạt tính kháng khuẩn

N-Methylflinderine (**396**) được tìm thấy có hoạt tính kháng khuẩn được chiết xuất từ vỏ rễ cây Xu ổi trong Methanol 60% [6]. Hơn nữa, chất p-Catechin (**409**) cũng ức chế sự phát triển của vi khuẩn Acid lactic [6].

Gedunin là một limonoid đầy tiềm năng và quan trọng được tìm ra từ họ Bông (Meliaceae), một hợp chất phân lập từ thiên nhiên có tác dụng về dược lý nổi bật, một số trong đó có giá trị lớn trong việc ngăn ngừa và điều trị nhiều mầm bệnh ở người. Những nghiên cứu đầu tiên về hoạt tính sinh học của Gedunin (**2**) chủ yếu tập trung vào khả năng kháng nấm, kháng khuẩn, chống và diệt côn trùng, diệt cỏ và ức chế hệ thần kinh trung ương [112].

Năm 2009, nhóm nghiên cứu của Jun Wu công bố từ hạt của cây Xu ổi thu hái ở Andhra Pradesh - Ấn Độ phân lập một số hợp chất có Khayasin T thể hiện hoạt tính diệt ấu trùng *Brontispa longissima* (Gestro) (ấu trùng bọ dừa, sâu hại đọt dừa) ở mức độ vừa phải tại nồng độ 20 mg/L [48].

Các chất chiết xuất bằng nước của các phần khác nhau của Xu nhỏ và Xu ổi đã được báo cáo là có hoạt tính chống nấm đáng kể. [6], [112]

1.5.4. Hoạt tính chống sốt rét

Hai limonoid, Gedunin (**2**) và Methyl angolensate (**4**) được thử nghiệm có hoạt tính chống lại ký sinh trùng sốt rét *Plasmodium falciparum* với giá trị IC₅₀ trong khoảng 1,25 đến 9,63 µg/ml. Gedunin (**2**) có hoạt tính mạnh nhất, thể hiện tác dụng phụ khi kết hợp với Chloroquine. [7]

1.5.5. Hoạt tính chống tiêu chảy

Các chất chiết xuất trong Methanol từ vỏ cây Xu nhỏ cho thấy chúng có hoạt tính chống tiêu chảy bằng cách sử dụng mô hình tiêu chảy do dầu thầu dầu và magiê sunfat ở chuột. Ở liều 250 và 500 mg/kg, chiết xuất methanol cho thấy hoạt động chống tiêu chảy đáng kể ở cả hai mô hình. Phần Ethyl acetate cũng cho thấy chúng có hoạt tính tương tự bằng cách sử dụng liều 250 mg/kg trong cả hai mô hình. [7]

1.5.6. Hoạt tính ức chế thần kinh

Các chất chiết xuất bằng Methanol từ vỏ và rễ cây Xu nhỏ có tác động đối với hệ thần kinh trung ương. Những kết quả này cho thấy rằng cả các chất chiết xuất từ vỏ và rễ đều có hoạt tính ức chế thần kinh trung ương, các chất chiết xuất từ rễ mạnh hơn chiết xuất vỏ cây.

Những nghiên cứu đầu tiên về hoạt tính sinh học của Gedunin (**2**) chủ yếu tập trung vào khả năng kháng nấm, kháng khuẩn, chống và diệt côn trùng, diệt cỏ và ức chế hệ thần kinh trung ương. Những phát hiện này không chỉ mở ra hướng nghiên cứu mới mà còn ứng dụng các phương pháp điều trị khác của Gedunin, đặc biệt là kháng các tế bào ung thư và bảo vệ hệ thần kinh [111], [112].

1.5.7. Hoạt tính chống nấm

Các chất chiết xuất bằng nước của các phần khác nhau của Xu nhỏ và Xu ổi đã được báo cáo là có hoạt tính chống nấm đáng kể [6].

1.6. Tình hình nghiên cứu về chi Xu tại Việt Nam

Trong nước: Năm 2022 có một bài báo “Bước đầu khảo sát thành phần hóa học của quả Xu ổi (*Xylocarpus granatum*) thu hái ở Vũng tàu – Việt Nam” [12] của nhóm nghiên cứu Trần Trung Hiếu và cộng sự đã công bố phân lập được 3 hợp chất là Xylocarpin F, Pseudopalmatine và Catechin.

Và nhóm nghiên cứu của TS. Nguyễn Văn Thanh và các cộng sự cùng nghiên cứu về Chi Xu (*Xylocarpus*) trên với hai loài Xu ổi và Xu nhỏ thu thập ở Việt Nam. Các nghiên cứu hiện đang phân lập một số các hợp chất thuộc lớp chất **triterpenoid**, xác định cấu trúc, thử một số hoạt tính sinh học.

1.7. Phương pháp phân tích

1.7.1. Phương pháp Cộng hưởng từ hạt nhân định lượng (qNMR)

Ý tưởng ứng dụng NMR trong phân tích định lượng (qNMR) do Solomon đề xuất tại hội thảo Liên hợp quốc về "Ứng dụng hòa bình của năng lượng Nguyên tử" (1958), tức là 12 năm sau khi ra đời NMR, được xem là một trong những đề xuất có tính hệ thống đầu tiên về qNMR, mặc dù có những nghiên cứu và công bố thăm dò về qNMR trong lĩnh vực hóa được ra đời trước đó vài năm. Cũng như nhiều lĩnh vực ứng dụng NMR khác, qNMR sau đó đã "tăng tốc" nhanh chóng và ngày nay đã trở thành một nhánh ứng dụng quan trọng của NMR. Trong lịch sử phát triển của hóa phân tích, việc xác định hàm lượng và độ tinh khiết của các hợp chất hóa học, đặc biệt là các hợp chất phân lập từ tự nhiên thường dùng các phương pháp sắc ký như sắc ký lỏng hiệu năng cao (HPLC), sắc ký khí (GC), hoặc các kỹ thuật quang phổ như UV-Vis và khối phổ (MS), ... Các phương pháp này được chuẩn hóa qua các tiêu chuẩn quốc gia và quốc tế, đều có một đặc điểm chung là chúng dựa trên đặc trưng của toàn bộ phân tử.

Sự ra đời và hoàn thiện của phương pháp cộng hưởng từ hạt nhân định lượng (**qNMR**) [115] đã tạo ra một cuộc cách mạng về tư duy phân tích, phương pháp qNMR tập trung vào đặc trưng của các hạt nhân nguyên tử (proton ^1H , carbon ^{13}C , fluor ^{19}F hoặc phosphor ^{31}P) cấu thành nên phân tử đó. Khi phân tích một hợp chất bằng phương pháp qNMR, tín hiệu được ghi nhận không phải là "phản ứng của phân tử hợp chất đó" mà là phản ứng từ của các proton hoặc carbon trong cấu trúc khung của nó. Sự thay đổi này dẫn đến những ưu thế vượt trội: qNMR không yêu cầu chất chuẩn phải là chính chất cần phân tích và không cần xây dựng đường chuẩn. Một chất chuẩn qNMR nhất định có thể dùng chung cho hàng loạt các chất phân tích khác nhau, miễn là chúng có chứa các hạt nhân tương ứng. Điều này mang ý nghĩa quan trọng

trong việc nghiên cứu các hợp chất mới, các chất quý hiếm phân lập từ dược liệu bởi việc tìm kiếm hoặc mua một chất chuẩn tinh khiết tương ứng là điều khó khăn.

- Chọn dạng phổ, thường là phổ proton ^1H .
- Xác định giá trị thời gian hồi phục T1 của (các) tín hiệu proton ^1H cần quan tâm (của cả chất chuẩn và chất phân tích), trên cơ sở đó chọn thời gian chờ (d1) sao cho đủ dài (cỡ 5-7 lần T1).

- Duy trì thông số đo như nhau với mọi toàn bộ các phép đo, kể cả mẫu so sánh. Chất chuẩn nội (chất chuẩn) trong qNMR:

- Có độ sạch cao (tuyệt đối hoặc gần tuyệt đối);
- Không hút ẩm, không bay hơi, không lẫn nước;
- Hòa tan tốt trong các dung môi NMR;
- Có phổ proton ^1H NMR tương đối đơn giản, rõ.

1.7.2. Phương pháp quang phổ lưỡng sắc tròn CD

Quang phổ lưỡng sắc tròn (CD) [116] là kỹ thuật phân tích quang phổ dựa trên sự hấp thụ khác biệt giữa ánh sáng phân cực tròn trái (L) và phải (R) của các phân tử bất đối xứng (chiral) khi chúng đi qua một môi trường quang hoạt. Sự khác biệt giữa tốc độ hấp thụ của ánh sáng phân cực tròn trái và phải của một chất hoạt động quang học được gọi là lưỡng sắc tròn ($A_L - A_D$). Ánh sáng phân cực phẳng truyền qua chất trở nên phân cực elip do sự hiện diện của lưỡng sắc tròn và chỉ quan sát được ở bước sóng nơi xảy ra sự hấp thụ. Sự khác biệt giữa sự hấp thụ ánh sáng phân cực tròn bên trái và bên phải bởi một chất hoạt động quang học, ΔA ($A_L - A_D$), được gọi là độ lưỡng sắc tròn của chất đó. Ánh sáng phân cực phẳng truyền qua chất trở nên phân cực elip do sự hiện diện của lưỡng sắc tròn và chỉ quan sát được ở bước sóng nơi xảy ra sự hấp thụ.

Theo định luật Lambert-Beer, tính elip có thể được chứng minh, và đường cong quang phổ lưỡng sắc hình tròn được đo như mối quan hệ giữa giá trị theta (hoặc $\Delta\epsilon$) và bước sóng λ ở các bước sóng khác nhau. Nếu không có sự hấp thụ đặc trưng của chất đo trong đường cong phổ này, điều đó có nghĩa là giá trị của $\Delta\epsilon$ rất nhỏ và không thể thu được phổ lưỡng sắc tròn đặc trưng. Khi ϵ_l lớn hơn ϵ_d , sẽ thu được đường cong quang phổ lưỡng sắc tròn dương, có nghĩa là chất được đo thuận tay phải; nếu ϵ_l nhỏ hơn ϵ_d thì thu được đường cong quang phổ lưỡng sắc âm tròn, có nghĩa là chất được đo thuận tay trái.

Ứng dụng của máy quang phổ lưỡng sắc tròn:

- Xác định cấu trúc của các hợp chất hoạt động quang học.
- Các nghiên cứu về sự phù hợp của protein, peptit và Acid nucleic.
- Động học phản ứng.
- Nghiên cứu biến tính nhiệt và hóa học.

- Nghiên cứu về cấu trúc tuyệt đối của các hợp chất.
- Nghiên cứu phân tử sinh học, cấu trúc bậc hai của protein, ...

1.7.3. Phương pháp sắc ký lỏng ghép khối phổ LC-MS/MS

Phương pháp khối phổ (Mass Spectrometry-MS) [117], [118] là phương pháp nghiên cứu các chất bằng cách đo, phân tích chính xác khối lượng phân tử của chất đó dựa trên sự chuyển động của các ion nguyên tử hay ion phân tử trong một điện trường hoặc từ trường nhất định. Tỉ số giữa khối lượng và điện tích (m/z) có ảnh hưởng rất lớn đối với chuyển động này của ion. Nếu biết được điện tích của ion thì ta dễ dàng xác định được khối lượng của ion đó. Các loại đầu dò khối phổ chính đang được sử dụng bao gồm: đầu dò bẫy ion (ion trap), đầu dò khối phổ cộng hưởng cyclotron sử dụng phép biến đổi Fourier (FTICR hay FT-MS), đầu dò tứ cực (Quadrupole), đầu dò khối phổ thời gian bay (TOF). Trong đó, đầu dò tứ cực (một hoặc ba tứ cực) có độ nhạy cao trong phân tích định lượng một chất đã biết, tạo được nhiều phân mảnh trong chế độ MS/MS, có thể làm được kiểu đo mất phân tử trung hòa (neutral loss), thích hợp cho phân tích vi lượng các chất đã biết trước cấu trúc.

Máy phân tích phổ khối lượng (thường được gọi là máy đo phổ khối – Mass Spectrometer – MS) dựa trên sự đo lường trực tiếp tỷ lệ khối lượng theo thể điện tích (ký hiệu là m/z) của những ion trong pha khí của chất phân tích.

Những ion của chất phân tích – được sinh ra từ nguồn ion của máy – được gia tốc và rồi được tách ra bởi bộ phận phân tích trước khi đến được bộ phận phát hiện. Tất cả quá trình này xảy ra trong một buồng có hệ thống bơm chân không sâu, đạt từ 10^{-3} đến 10^{-6} Pa. Việc ghép máy sắc ký lỏng với phổ khối phức tạp hơn nhiều vì nhiều yếu tố không tương thích về kỹ thuật giữa hai máy cần phải giải quyết:

- Máy sắc ký lỏng: hoạt động ở áp suất cao, nhiệt độ thấp, mẫu phân tích ở thể lỏng trong pha động (đôi khi khó bay hơi như dung dịch đậm), lưu lượng lớn (vài ml/phút)...
- Máy phổ khối: hoạt động ở áp suất chân không sâu, nhiệt độ cao, mẫu phân tích phải ở thể khí, lưu lượng nhỏ (vài μ l/phút).

Do đó cần có những giao diện trung gian (interface) thích hợp như: giao diện đưa mẫu lỏng trực tiếp, giao diện chùm tia hạt (partical beam), giao diện FAB, giao diện tia nhiệt (thermospray), giao diện APCI.

Các kiểu ion hóa trong LC – MS/MS

Có hai kiểu ion hóa thông dụng cho hệ thống LC-MS/MS dung trong định lượng ở ngành dược là ESI và APCI.

- Bộ ion hóa phun điện (Electrospray Ionization – ESI)

Mẫu phân tích được hòa tan trong dung môi để tạo thành dung dịch điện ly. Dung dịch điện ly này cùng với khí mang được phun sương ra khỏi ống mao quản bằng thép

không gỉ với vận tốc 1 – 10 $\mu\text{l/phút}$ đi vào vùng điện trường có thể từ 3 – 6 kV trong áp suất khí quyển ở nhiệt độ phòng. Ra khỏi đầu mao quản, các giọt sương mang điện tích âm hay dương (tùy thuộc vào điện thế dương hay âm của điện trường) bị bay hơi dung môi nên càng ở xa đầu phun, giọt sương càng có kích thước nhỏ và bị hút vào bộ phận phân tích khối lượng.

Trong kiểu ion hóa này mẫu thử phải được chuyển hóa thành chất điện ly mà điều này phụ thuộc vào dung môi, pKa của mẫu thử trong dung môi và pH của dung dịch điện ly.

- Ion hóa hóa học tại áp suất khí quyển (Atmospheric Pressure Chemical Ionization – APCI)

Mẫu được hòa tan vào pha động từ máy sắc ký lỏng cho đi ngang qua một ống mao quản đốt nóng và được phun sương ra khỏi ống mao quản nhờ dòng khí mang nitrogen với lưu lượng dòng có thể đến 1 ml/phút. Các giọt sương này đi vào vùng điện trường có điện cực corona ở điện thế vài kV. Sự ion hóa có được do hiệu ứng nhiệt ở áp suất khí quyển để tạo thành ion tựa phân tử $(M+H)^+$ nếu trao đổi proton, hoặc tạo thành ion phân tử $(M-H)^-$ nếu trao đổi electron. Các ion này bị hút vào bộ phận phân tích khối lượng do áp suất chân không ở đây. Kiểu ion hóa này có thể tạo ra một số phân mảnh ion và thích hợp cho những phân tích những hợp chất có phân tử lượng nhỏ, độ phân cực trung bình rửa giải từ máy HPLC.

CHƯƠNG 2. ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Đối tượng nghiên cứu

Thông tin về mẫu lá cây Xu ổi: Thời gian thu hái: tháng 5 năm 2021; Nơi thu: rừng ngập mặn Vịnh Bái Tử Long, Quảng Ninh, Việt Nam; Tọa độ: N: 20°95'36", E: 107°38'40". Tên khoa học: *Xylocarpus granatum* (Koenig); Tên tiếng Việt : Xương cá; Xu to, Đẳng dinh.



Tên khoa học được TS. Nguyễn Thế Cường, Viện Sinh thái và Tài nguyên sinh vật giám định, định danh. Mẫu tiêu bản được lưu trữ tại Viện Sinh học, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam.

Hình 2.1. Mẫu lá của cây Xu ổi

Thông tin về mẫu lá cây Xu nhỏ: Thời gian thu hái: tháng 5 năm 2019 và tháng 4 năm 2022; Nơi thu: rừng ngập mặn Ngọc Hiển, Cà Mau, Việt Nam; Tọa độ: N: 8°35'55"; E: 104°46'30". Tên khoa học: *Xylocarpus moluccensis* (Lam.) M.Roem; Tên tiếng Việt : Xương cá nhỏ, Xu nhỏ, Xu sung.



Tên khoa học được TS. Nguyễn Thế Cường, Viện Sinh học giám định. Mẫu tiêu bản được lưu trữ tại Viện Sinh học, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam.

Hình 2.2. Mẫu lá của cây Xu nhỏ

Mẫu được xác định bằng phương pháp hình thái so sánh. Các đặc điểm của cơ quan sinh sản (cụm hoa, các bộ phận của hoa, quả, các bộ phận của quả...) và cơ quan sinh dưỡng (thân, cành, lá...) được lựa chọn làm cơ sở cho việc xác định. Các tài liệu về phân loại thực vật trong và ngoài nước được sử dụng làm tài liệu tham khảo trong quá trình định loại. Mẫu vật được so sánh với các mẫu vật được lưu giữ tại Phòng Tiêu bản thực vật, Viện Sinh học (Viện Sinh thái và Tài nguyên sinh vật), ảnh mẫu vật tham khảo website của một số bảo tàng thực vật trên thế giới. Danh pháp tên khoa học của các loài theo: International Code of Nomenclature for algae, fungi, and plants (Melbourne Code) - adopted by the Eighteenth International Botanical Congress Melbourne, Australia, July 2011, tham khảo website: <http://www.theplantlist.org/>. Tên tiếng Việt của loài dựa theo Danh lục các loài thực vật Việt Nam. Bản mô tả sơ bộ được xây dựng dựa trên mẫu tiêu bản và các thông tin thu thập ngoài thực địa khi thu mẫu, có tham khảo các tài liệu thực vật trong nước và quốc tế có liên quan. Toàn bộ ảnh minh họa được chụp tại thực địa trong quá trình thu mẫu các loài.

Mẫu lá cây Xu ổi, Xu nhỏ được sử dụng để tiến hành phân lập và xác định cấu trúc, đồng thời các chất phân lập được từ mẫu lá cây Xu nhỏ được sử dụng làm chất chuẩn trong nghiên cứu xây dựng quy trình phân tích. Các mẫu còn lại được sử dụng nhằm định tính và định lượng một số hợp chất có trong lá cây Xu nhỏ.

2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Dung môi, hóa chất

Acid formic (PA, Merk), Amoni format (PA, Fisher), Amoni acetat (PA, Fisher), Acid acetic (PA, Merk), Acid trifloroacetic (PA, Merk) đạt tiêu chuẩn phân tích, *n*-hexan (HPLC, J.T. Baker- Mỹ), Aceton (PA, Fisher), Ethylacetate (PA, J.T Baker-Mỹ), Methanol và Acetonitril (MS, J.T Baker-Mỹ);

Chuẩn nội Ethylene carbonate ($C_3H_4O_3$, lô BCCC5614, 99,92%, Merck)

Chuẩn nội Etodolac ($C_{17}H_{21}NO_3$, lô LC58403, 98%, AK Scientific)

Chất chuẩn đối chiếu: Chất tinh khiết được phân lập từ lá cây Xu nhỏ được xác định độ tinh khiết bằng phương pháp qNMR, dùng làm chuẩn đối chiếu để xây dựng quy trình phân tích.

Bảng 2.1. Chất đối chiếu

Ký hiệu chất phân tích	Tên chất phân tích	Độ tinh khiết (%) NMR
XM07	Moluccensin Y	98,07
XM09	3,30-Diacetylphragmalin	98,43
XM10	Xyloccensin E	98,36

2.2.2. Trang thiết bị

- Xác định cấu trúc các hợp chất bằng phương pháp NMR được đo trên máy phổ cộng hưởng từ hạt nhân FT-NMR Ascend 500/AVANCE III HD và AVANCE NEO 600 (Bruker, Billerica, MA, Mỹ). (đặt tại Viện Hóa Học).

- Định lượng các hợp chất bằng phương pháp qNMR được đo trên máy phổ cộng hưởng từ hạt nhân NMR (Bruker) 400Mz (Mỹ). (đặt tại Viện Kiểm nghiệm Thuốc Tp. Hồ Chí Minh).

- Hệ thống máy LC-MS/MS Xevo TQS micro Waters (Mỹ). (đặt tại Viện Kiểm nghiệm Thuốc Tp. Hồ Chí Minh).

- Hệ thống máy LCMS Xevo G2-XS QTOF Waters (Mỹ). (đặt tại Viện Kiểm nghiệm Thuốc Tp. Hồ Chí Minh).

- Hệ thống máy Prominence LCMS-IT-TOF Shimadzu (Nhật). (đặt tại Viện Kiểm nghiệm Thuốc Tp. Hồ Chí Minh).

- Phổ UV và phổ lưỡng sắc tròn điện tử (ECD) được ghi trên máy quang phổ Chirascan sử dụng cuvet thạch anh có chiều dài đường quang 0,1 cm (Chirascan Photophysics, Anh, đặt tại Viện Hóa Học, phần mềm Chirascan).
- Cột sắc ký: C18, C8 hoặc C6 – phenyl.
- Cân phân tích, cân kỹ thuật, màng lọc PES Syringe filter 0.22 μm .
- Nước tinh khiết được lọc qua máy lọc nước Mili Q - IQ 7000.
- Các thiết bị đã được hiệu chuẩn theo GLP/ISO 17025.
- Các dụng cụ thủy tinh đạt yêu cầu chính xác dùng trong phân tích.

2.2.3. Phương pháp phân lập các hợp chất

Sắc ký lớp mỏng (TLC): sắc ký lớp mỏng được thực hiện trên bản mỏng tráng sẵn TLC Silica gel 60 F254 (Merck 1,05715), RP-18 F254S (Merck). Vị trí chất trên bản mỏng được phát hiện bằng đèn tử ngoại ở hai bước sóng 254 nm và 365 nm hoặc dùng thuốc thử là dung dịch H_2SO_4 10% phun đều lên bản mỏng, sấy khô rồi hơi nóng từ từ đến hiện màu.

Sắc ký cột (CC): Sắc ký cột được tiến hành với pha tĩnh là silica gel pha thường và pha đảo, Sephadex LH-20 hoặc nhựa trao đổi diaion HP-20 (Sigma), (sắc ký silica gel pha thường có cỡ hạt là 0,040-0,063 mm (Merck), sắc ký silica gel RP-18 có cỡ hạt 12 μm).

2.2.3.1. Phân lập các hợp chất từ cây Xu nhỏ

Lá cây Xu nhỏ (*Xylocarpus moluccensis*) sau khi thu hái, làm sạch, phơi khô, xay nhỏ thu được 6,7 kg bột khô và ngâm chiết với Ethanol (30 lít, $\times 3$ lần) thu được 1,1 kg cao chiết Ethanol. Cao chiết này được bổ sung nước và chiết phân lớp lần lượt với các dung môi có độ phân cực tăng dần: *n*-Hexane, Ethylacetate để thu được các dịch chiết tương ứng và dịch nước. Cất loại bỏ dung môi các phần dịch chiết trên thu được: cao *n*-Hexane (154,5 g), cao Ethylacetate (115,3 g).

Theo các tài liệu tham khảo hầu hết lớp chất triterpenoid được phân lập từ cao Ethylacetate [5] do đó nghiên cứu chọn cao Ethylacetate để chiết xuất và phân lập các hợp chất thuộc lớp chất triterpenoid. Bằng các phương pháp sắc ký cột, các phương pháp sắc ký kết hợp và hệ dung môi thích hợp thu được 10 hợp chất sạch là: **XM01** (18,6 mg), **XM02** (10,2 mg), **XM03** (19,1 mg), **XM04** (15,6 mg), **XM05** (11,7 mg), **XM06** (26,0 mg), **XM07** (160,6 mg), **XM08** (28,0 mg), **XM09** (178,3 mg), **XM10** (202,0 mg), các chất phân lập được xác định cấu trúc bằng khối phổ phân giải cao và phổ cộng hưởng từ hạt nhân. Quy trình phân lập các hợp chất được trình bày theo sơ đồ hình 2.3.

Phần cao chiết Ethylacetate tiến hành sắc ký cao Ethyl acetate (EtOAc) trên cột silica gel với hệ dung môi gradient (100% *n*-Hexane $\rightarrow$ 100% Acetone) thu được 30 phân đoạn nhỏ từ XME1 $\rightarrow$ XME10.

Phân đoạn XME6 tiến hành sắc ký trên cột silica gel với hệ dung môi rửa giải gradient (100% Dichloromethane $\rightarrow$ 100% Methanol) thu được 5 phân đoạn XME6A – XME6E. Phân đoạn XME6A được sắc ký trên cột silica gel với hệ dung môi *n*-Hexane : Dichloromethane (30:1, v/v) thu được phân đoạn XME6A1 và XME6A2. Phân đoạn XME6A1 được sắc ký trên hai cột silica gel với hệ dung môi *n*-Hexane : Acetate : Dichloromethane (20:20:0,1, v/v) thu được phân đoạn E6A1.1 tiếp tục tiếp tục sắc ký trên cột silica gel với hệ dung môi Dichloromethane: Acetone: Ethylacetate (35:1:0,5, v/v) thì thu được hợp chất sạch **XM01** (18,6 mg). Phân đoạn XME6A2 được sắc ký trên hai cột silica gel với hệ dung môi Dichloromethane : Acetone : Ethylacetate (30:1:0,5, v/v) thu được phân đoạn E6A2.1 tiếp tục tiếp tục sắc ký trên cột silica gel RP18 với hệ dung môi Acetone : Nước (1:3, v/v) thu được hợp chất sạch **XM02** (10,2 mg).

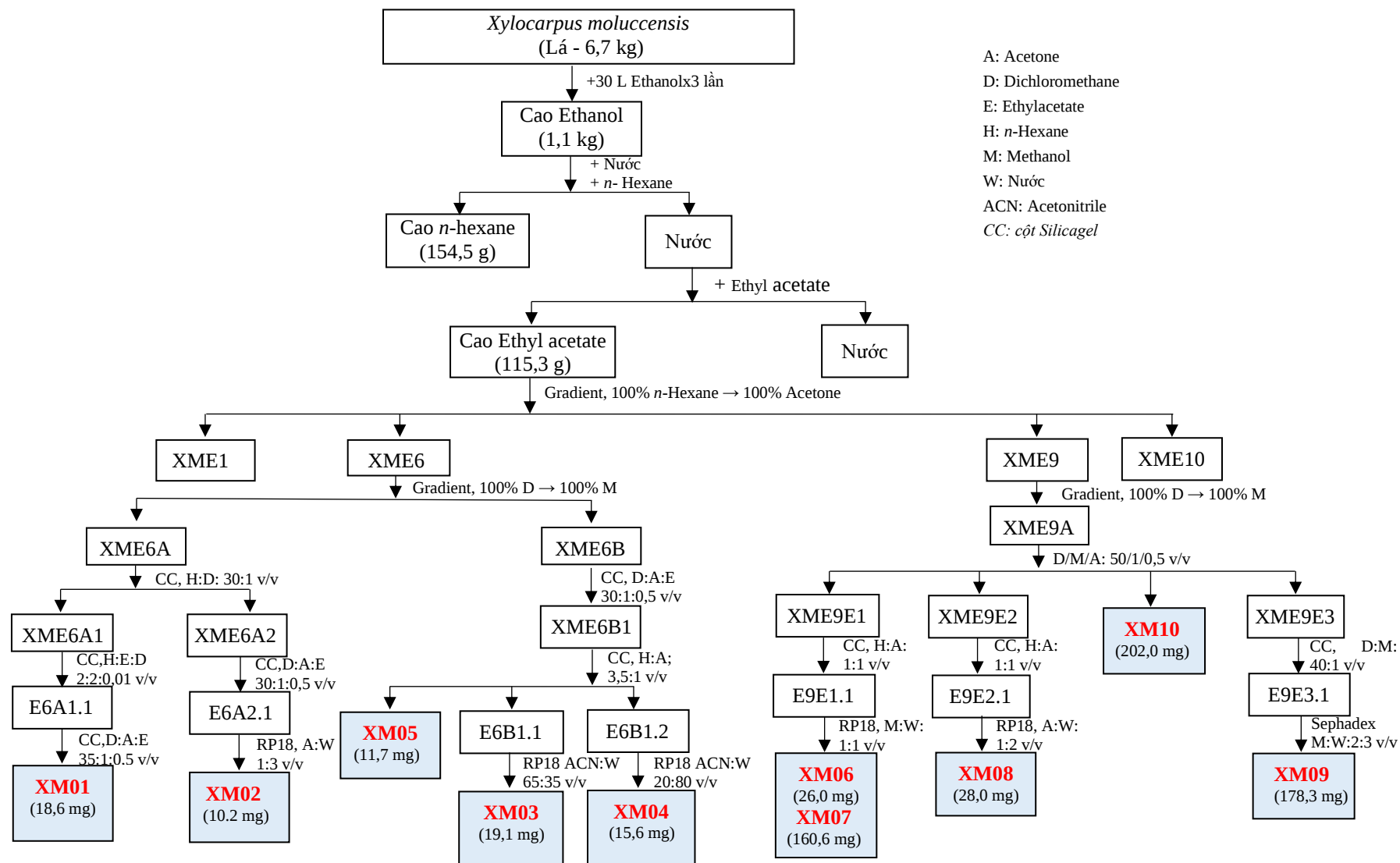
Phân đoạn XME6B được sắc ký trên cột silica gel với hệ dung môi Dichloromethane : Acetone : Ethylacetate (30:1:0,5, v/v) thu được phân đoạn XME6B1 tiếp tục tiếp tục sắc ký trên cột silica gel với hệ dung môi *n*-Hexane : Acetone (3,5:1, v/v) thu được 4 phân đoạn nhỏ từ E6B1.1 – E6B1.4 và hợp chất sạch **XM05** (11,7 mg). Phân đoạn E6B1.1 tiến hành sắc ký trên cột silica gel RP18 với hệ dung môi Acetonitrile : Nước (65:35, v/v) thu được hợp chất sạch **XM03** (19,1 mg). Phân đoạn E6B1.2 tiến hành sắc ký trên cột RP18 (hệ HPLC) với hệ dung môi Acetonitrile : Nước (20:80, v/v) thu được hợp chất sạch **XM04** (15,6 mg).

Phân đoạn XME9 tiến hành sắc ký trên cột silica gel với hệ dung môi rửa giải gradient (100% Dichloromethane $\rightarrow$ 100% Methanol) thu được 8 phân đoạn XME9A – XME9H. Phân đoạn XME9E tiến hành sắc ký trên cột silica gel với hệ dung môi Dichloromethane : Methanol : Acetone (50:1:0,5, v/v) thu được 5 phân đoạn nhỏ từ XME9E.1 – XME9E5 và hợp chất sạch **XM10** (202,0 mg).

Phân đoạn XME9E1 được sắc ký trên hai cột silica gel với hệ dung môi *n*-Hexane : Acetone (1:1, v/v) thu được phân đoạn E9E1.1 tiếp tục tiếp tục sắc ký trên cột Sephadex cùng với hệ dung môi Methanol : Nước (1:1, v/v) thì thu được hợp chất sạch **XM06** (26,0 mg) và **XM07** (160,6 mg).

Phân đoạn XME9E2 được sắc ký trên hai cột silica gel với hệ dung môi *n*-Hexane : Acetone (1:1, v/v) thu được phân đoạn E9E2.1 tiếp tục tiếp tục sắc ký trên cột RP18 cùng với hệ dung môi Acetone : Nước (1:2, v/v) thì thu được hợp chất sạch **XM08** (28,0 mg).

Phân đoạn XME9E3 được sắc ký trên hai cột silica gel với hệ dung môi Dichloromethane : Methanol (40:1, v/v) thu được phân đoạn E9E3.1 tiếp tục tiếp tục sắc ký trên cột Sephadex cùng với hệ dung môi Methanol : nước (2:3, v/v) thì thu được hợp chất sạch **XM09** (178,3 mg).



Hình 2.3. Sơ đồ phân lập các hợp chất từ cây Xu nhỏ

2.2.3.2. Phân lập các hợp chất từ cây Xu ôi

Lá cây xu ôi (*Xylocarpus granatum*) sau khi thu hái, làm sạch, phơi khô, xay nhỏ thu được bột khô (2,6 kg). Lấy 2,6 kg bột này được ngâm chiết với Ethanol (10 lít, x3 lần), sau 48 giờ thì gạn, lọc, thu dịch chiết, cô cạn trên máy cô quay ở 50 °C với áp suất thấp thu được cao Ethanol, lặp lại bước chiết thêm hai lần thì thu được cao Ethanol (410,5 g). Hòa tan cao ethanol vào một ít nước ấm, sau khi hòa tan hoàn toàn thì chiết phân lớp lần lượt với các dung môi có độ phân cực khác nhau là *n*-Hexane, Dichloromethane, *n*-Butanol, cô cạn bằng máy cô quay ở nhiệt độ 50 °C dưới áp suất thấp, thu được cao tương ứng, thu được cao *n*-Butanol (82 g).

Theo các tài liệu tham khảo hầu hết lớp chất triterpenoid được phân lập từ cao Ethylacetate [5] do đó nghiên cứu chọn cao Ethylacetate và cao để chiết xuất và phân lập các hợp chất thuộc lớp chất triterpenoid. Tuy nhiên dung môi *n*-Butanol là một dung môi có độ phân cực trung bình đến mạnh, có khả năng tạo liên kết hydro rất tốt, giúp hòa tan hiệu quả các limonoid có nhiều nhóm chức chứa oxy, do đó nghiên cứu chọn chiết cao *n*-Butanol. Trong quy trình chiết hệ thống, *n*-Butanol thường được sử dụng sau bước *n*-Hexane và Ethyl acetate để "vét" nốt các hợp chất thứ cấp phân cực còn sót lại trong pha nước. Nó đóng vai trò là dung môi trung gian hoàn hảo: đủ không phân cực để tách pha khỏi nước, nhưng đủ phân cực để kéo các hoạt chất quý mà các dung môi trước đó không chiết hết được.

Bằng các phương pháp sắc ký cột, các phương pháp sắc ký kết hợp và hệ dung môi thích hợp thu được 11 hợp chất sạch là: **XG01** (3,0 mg), **XG02** (2,7 mg), **XG03** (3,5 mg), **XG04** (5,6 mg), **XG05** (6,7 mg), **XG06** (7,5 mg), **XG07** (5,5 mg), **XG08** (4,0 mg), **XG09** (4,8 mg), **XG10** (3,6 mg), **XG11** (3,2 mg), các chất phân lập được xác định cấu trúc bằng khối phổ phân giải cao và phổ cộng hưởng từ hạt nhân. Quy trình phân lập các hợp chất được trình bày theo sơ đồ hình 2.4.

Nghiên cứu tiến hành sắc ký cao *n*-Butanol trên cột silica gel với hệ dung môi gradient (5% Acetone trong *n*-Hexane → 100% Acetone) được cắt thành từng phân đoạn nhỏ XGB1 → XGB5.

Phân đoạn XGB2 được tiến hành sắc ký trên cột silica gel pha thường với hệ dung môi gradient (10% Ethylacetate trong *n*-Hexane) thu được 3 phân đoạn nhỏ từ XGB2.1, XGB2.2, XGB2.3.

Phân đoạn XGB2.2 này tiếp tục sắc ký trên cột silica gel với hệ dung môi gradient (10% Acetone trong *n*-Hexane cho đến 100 % Acetone, tiếp tục 100% Methanol) thu được 4 phân đoạn nhỏ B2.2.1, B2.2.2, B2.2.3, B2.2.4.

Phân đoạn B2.2.2 được phân tách trên cột sephadex LH-20 với hệ dung môi rửa Acetone : Dichloromethane (1:9, v/v) thu được hợp chất sạch **XG03 (3,5 mg)**.

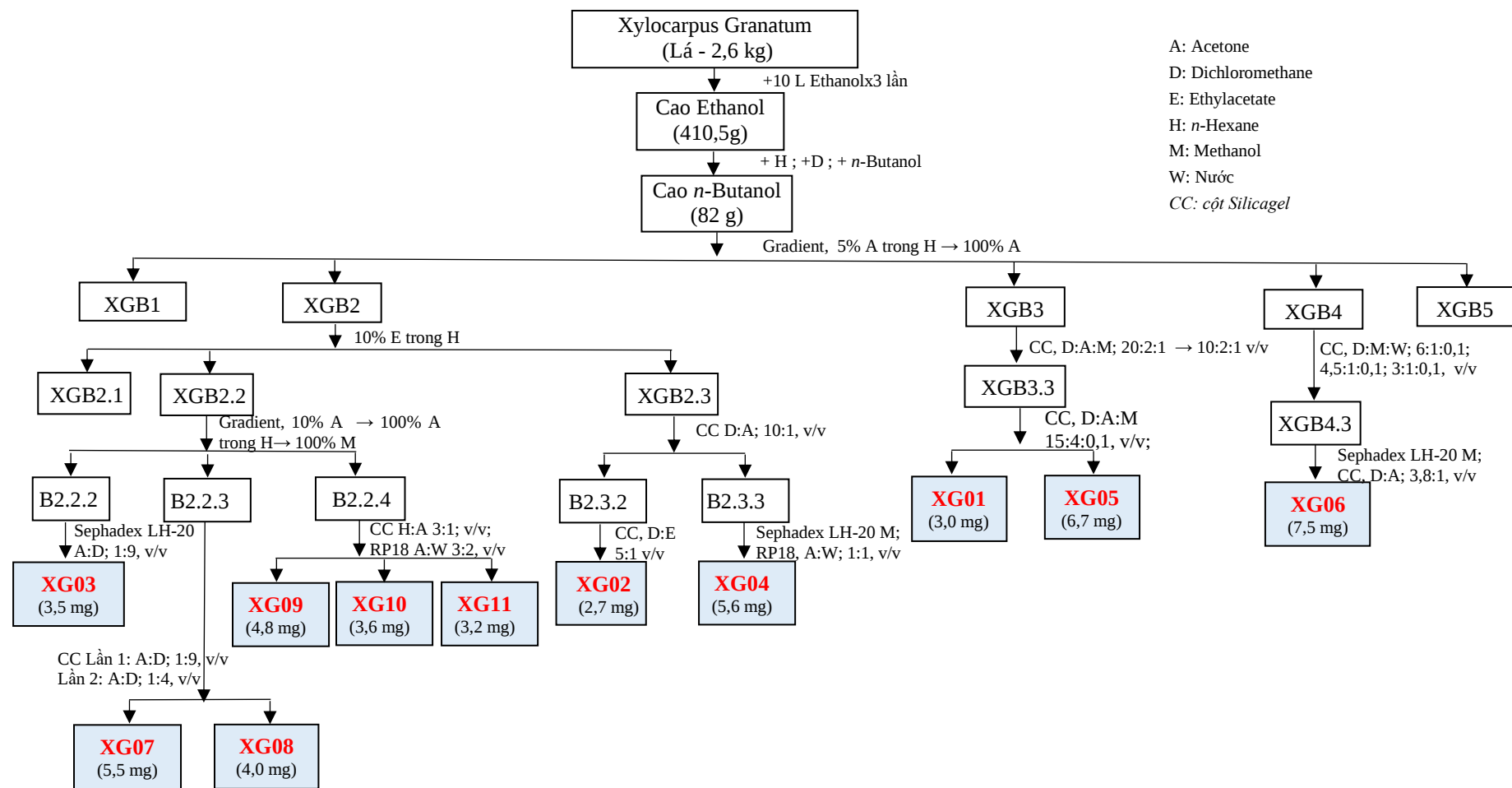
Phân đoạn B2.2.3 được phân tách 2 lần trên sắc ký trên cột silica gel với hệ dung môi rửa giải Acetone : Dichloromethane (1:9, v/v) và Acetone : Dichloromethane (1:4, v/v) thu được hai hợp chất sạch **XG07 (5,5 mg)** và **XG08 (4,0 mg)**.

Phân đoạn B2.2.4 được phân tách trên sắc ký trên cột silica gel với hệ dung môi rửa giải *n*-Hexane : Acetone (3:1, v/v) và cột RP18 với hệ dung môi Acetone : Nước (3:2, v/v) thu được ba hợp chất sạch **XG09 (4,8 mg)**, **XG10 (3,6 mg)** và **XG11 (3,2 mg)**.

Phân đoạn XGB2.3 được phân tách trên sắc ký cột với hệ dung môi rửa giải Dichloromethane : Acetone : Methanol (10:2:1, v/v) thu được phân đoạn nhỏ B2.3.1, B2.3.2, B2.3.3. Phân đoạn B2.3.2 được tiến hành sắc ký trên cột silica gel pha thường với hệ dung môi Dichloromethane : Ethylacetate (5:1,v/v) thu được hợp chất sạch **XG02 (2,7 mg)**. Phân đoạn B2.3.3 được phân tách trên sắc ký cột sephadex LH-20 với hệ dung môi rửa giải 100% Methnol, sau đó tiếp tục phân tách trên cột silica gel RP18 (YMC *GEL) thu được hợp chất sạch **XG04 (5,6 mg)**.

Phân đoạn XGB3 tiến hành sắc ký trên cột silica gel với hệ dung môi rửa giải Dichloromethane : Acetone : Methanol (20:2:1, v/v) thu được 4 phân đoạn XGB3.1, XGB3.2, XGB3.3, XGB3.4. Phân đoạn XGB3.3 được phân tách trên cột silica gel với hệ dung môi rửa giải Dichloromethane : Acetone : Methanol (15:4:0,1, v/v) thu được hai hợp chất sạch **XG01 (3,0 mg)** và hợp chất sạch **XG05 (6,7 mg)**.

Phân đoạn XGB4 được tiến hành sắc ký trên cột silica gel với hệ dung môi gradient Dichloromethane : Methanol : Nước lần lượt với tỉ lệ phân cực dần (6:1:0,1; 4,5:1:0,1; 3:1:0,1, v/v) thu được 4 phân đoạn nhỏ từ XGB4.1, XGB4.2, XGB4.3, XGB4.4. Phân đoạn XGB4.2 được phân tách trên sắc ký cột sephadex LH-20 với hệ dung môi rửa giải Dichloromethane : Acetone (3,8:1, v/v) thu được hợp chất sạch **XG06 (7,5 mg)**.



Hình 2.4. Sơ đồ phân lập các hợp chất từ cây Xu ỏ

2.2.4. Phương pháp xác định cấu trúc hóa học các hợp chất

Phương pháp xác định cấu trúc hóa học của các hợp chất phân lập được là sự kết hợp giữa các thông số vật lý với các phương pháp phổ hiện đại, bao gồm:

Phương pháp phổ khối lượng (MS): Phổ khối lượng đo trên hệ thiết bị LC-MS/MS Xevo G2-XS QTOF Waters (Mỹ) và thiết bị Prominence LCMS-IT-TOF Shimadzu (Nhật); Định lượng được phân tích trên thiết bị LC-MS/MS Xevo TQS micro Waters (Mỹ).

Phương pháp phổ cộng hưởng từ hạt nhân NMR: phổ cộng hưởng từ hạt nhân được đo trên máy Bruker AM500 FT-NMR.

Các kỹ thuật phổ cộng hưởng từ hạt nhân được sử dụng xác định cấu trúc hóa học các hợp chất phân lập được bao gồm:

- + Phổ cộng hưởng từ hạt nhân một chiều: ^1H -NMR, ^{13}C -NMR và DEPT.
- + Phổ cộng hưởng từ hạt nhân hai chiều: HSQC, HMBC, ^1H - ^1H COSY và NOESY.
- + Dung môi sử dụng bao gồm DMSO- d_6 , CD_3OD , CDCl_3 .

Phương pháp quang phổ lưỡng sắc tròn CD: Xác định cấu hình tuyệt đối bằng phổ lưỡng sắc tròn CD được đo trên thiết bị máy quang phổ lưỡng sắc tròn CD Chirascan Photophysics (Anh), phần mềm Chirascan Chirascan Photophysics (Anh), tính toán lý thuyết theo phương pháp hóa học lượng tử TD-DFT với phần mềm Gaussian.

2.2.5. Phương pháp thử hoạt tính kháng vi sinh vật

2.2.5.1. Vật liệu và chủng giống

Chủng giống: Các chủng vi sinh vật (VSV) được sử dụng để thử hoạt tính cung cấp từ Microbiologics - Mỹ:

3 chủng vi khuẩn Gr (+): *Enterococcus faecalis* ATCC29212; *Staphylococcus aureus* ATCC25923; *Staphylococcus aureus* ATCC14579.

3 chủng vi khuẩn Gr (-): *Escherichia coli* ATCC25922; *Pseudomonas aeruginosa* ATCC27853; *Salmonella enterica* ATCC13076.

1 chủng Nấm men: *Candida albicans* ATCC10231.

Thiết bị và dụng cụ

Máy móc thiết bị được sử dụng trong nghiên cứu này bao gồm: Box cấy Class II; tủ nuôi cấy (Sanyo, nhật); cân phân tích (Sartorius, Đức); máy đo pH Meter Delta 320 (Mettler Toledo, Thụy Sĩ); lò vi sóng; máy nuôi lắc; nồi khử trùng, máy đọc quang phổ Biotech (Laboratories, Mỹ)... Các dụng cụ dùng cho nghiên cứu vi sinh thông thường như que cấy; đĩa peptri; bình tam giác; đèn cồn; Phiến nuôi cấy tế bào 96 giếng; ống Eppendorf 2 ml;...

Hóa chất và môi trường

Sử dụng môi trường Luria Bertani (LB) (tryptone 10 g; yeast extract 5 g; Natri chloride

(NaCl) 10 g) trong nuôi cấy các chủng vi sinh vật để thử hoạt tính các chất sạch phân lập được.

2.2.5.2. Kiểm tra sự thuần khiết của các chủng VSV trong quá trình bảo quản

Các chủng VSV được lấy ra từ tủ lạnh – 80°C, để trên xốp đá cho tan từ từ khoảng 30 phút, tiến hành hoạt hóa cấy ria trên đĩa thạch để kiểm tra độ sạch của các chủng nghiên cứu [119]:

Nung đỏ đầu que cấy vòng, để nguội khoảng 15s, dùng vòng que cấy lấy một ít tế bào trong ống lưu giữ giống. Tay trái hé mở nắp hộp thạch. Đặt đầu que cấy vào 1 góc hộp thạch, chấm nhẹ để loại bớt tế bào một lần nữa. Từ điểm này đẩy nhẹ đầu que cấy lướt nhanh trên bề mặt thạch theo đường zích zắc. Xoay đĩa và tiếp tục vạch các đường zích zắc sao cho không trùng lên nhau trên khoảng trống còn lại, nhằm tạo điều kiện cho các khuẩn lạc mọc rời nhau ra. Đóng nắp hộp. Khử trùng que cấy trước khi cắm vào giá. Các thao tác phải nhanh tay và làm trên ngọn lửa đèn cồn đặt trong tủ cấy, đảm bảo vô trùng. Đặt các đĩa petri đã được quấn kín bằng parafilm vào tủ ẩm ở nhiệt độ thích hợp sau một thời gian nhất định ta sẽ nhận được các khuẩn lạc riêng rẽ từ các đĩa nuôi cấy. Khuẩn lạc phải có màu sắc, bề mặt, hình dạng đặc trưng giống như khuẩn lạc chủng mẫu không có các màu sắc và sắc tố lạ.

2.2.5.3. Hoạt hoá và nuôi cấy các chủng vi sinh vật

Từ đĩa kiểm tra độ thuần khiết, nhặt một khuẩn lạc cấy chuyển vào lọ penicillin có chứa 5ml môi trường LB lỏng đã khử trùng 121°C trong 30 phút, nuôi lắc sau 24h. Sau đó dùng pipette hút 150 µl dịch nuôi chuyển sang bình tam giác 50ml khác có chứa 15ml môi trường LB đã khử trùng, nuôi lắc qua đêm [119].

2.2.5.4. Phương pháp thử hoạt tính kháng vi sinh vật

Hoạt tính kháng vi sinh vật được thực hiện dựa trên phương pháp pha loãng đa nồng độ của Hadacek (2000) [120]. Đây là phương pháp thử hoạt tính kháng vi sinh vật và nấm nhằm đánh giá mức độ kháng khuẩn mạnh yếu của các mẫu thử thông qua các giá trị thể hiện hoạt tính là MIC (nồng độ ức chế tối thiểu). Mẫu ban đầu được pha loãng trong DMSO ở dải nồng độ giảm dần: 256 µg/ml, 128 µg/ml, 64 µg/ml, 32 µg/ml, 16 µg/ml, 8 µg/ml, 4 µg/ml và 2 µg/ml với số thí nghiệm lặp lại N=3. Bổ sung 50 µl dung dịch vi khuẩn và nấm ở nồng độ 2.10^5 bào tử/ml, ủ ở 37°C. Sau 24h, đọc giá trị MIC. Giá trị MIC được xác định tại giếng có nồng độ chất thử thấp nhất gây ức chế hoàn toàn sự phát triển của vi sinh vật sau 24 giờ nuôi cấy và IC₅₀ được xác định chính xác dựa trên số liệu đo độ đục tế bào bằng máy quang phổ Bioteck và phần mềm GraphPad Prism data. Chất đối chứng là kháng sinh Streptomycin (hoặc Ciprofloxacin) cho các chủng vi khuẩn và Cycloheximide cho nấm.

2.2.6. Phương pháp thử hoạt tính gây độc tế bào

Trong lĩnh vực tìm kiếm các chất chống ung thư, việc tìm kiếm, sàng lọc chủ yếu dựa trên khả năng gây độc các dòng tế bào ung thư thực nghiệm. Chính vì vậy, có được một phương pháp nhằm đánh giá nhanh và chính xác tác dụng gây độc cho tế bào là rất cần thiết.

2.2.6.1. *Chủng giống*

Các dòng tế bào ung thư có nguồn gốc từ ngân hàng tế bào ATCC.

- ✓ Tế bào ung thư vú (MCF-7)
- ✓ Tế bào ung thư gan (HepG2)
- ✓ Tế bào ung thư cổ tử cung ở người (Hela)
- ✓ Tế bào ung thư phổi (SK-LU-1)
- ✓ Tế bào ung thư phổi (A549)

2.2.6.2. *Phương pháp gây độc tế bào sử dụng chất chỉ thị sunforhodamine B*

Phép thử sinh học xác định tính độc tế bào (Cytotoxic assay) đối với tế bào nuôi cấy dạng đơn lớp [121-124]. Phương pháp thử độ độc tế bào ung thư *in vitro* được Viện Ung thư Quốc gia Hoa Kỳ (National Cancer Institute – NCI) xác nhận là phép thử độ độc tế bào chuẩn nhằm sàng lọc, phát hiện các chất có khả năng kìm hãm sự phát triển hoặc diệt TBUT ở điều kiện *in vitro*. Phép thử này được thực hiện theo phương pháp của Skekan et al. (1990) [125]. Phép thử tiến hành xác định hàm lượng protein tế bào tổng số dựa vào mật độ quang học (OD – Optical Density) đo được khi thành phần protein của tế bào được nhuộm bằng Sulforhodamine B (SRB). Giá trị OD máy đo được tỉ lệ thuận với lượng SRB gắn với phân tử protein, do đó lượng tế bào càng nhiều (lượng protein càng nhiều) thì giá trị OD càng lớn. Phép thử được thực hiện trong điều kiện cụ thể như sau:

- ✓ Trypsin hóa tế bào thí nghiệm để làm rời tế bào và đếm trong buồng đếm để điều chỉnh mật độ cho phù hợp với thí nghiệm.
- ✓ Chất thử đã pha ở các nồng độ được đưa vào các giếng của đĩa 96 giếng. Giếng không có chất thử nhưng có TBUT (số lượng tế bào: 10000 tế bào/giếng /200 µl) sẽ được sử dụng làm đối chứng ngày 0. Sau 1 giờ, giếng đối chứng ngày 0 tế bào sẽ được cố định bằng Trichloroacetic acid (TCA) 20%.
- ✓ Ủ trong tủ ấm 72 giờ. Sau 72 giờ, tế bào được cố định bằng TCA trong 1 giờ, được nhuộm bằng SRB trong 30 phút ở 37 °C, rửa 3 lần bằng acetic acid rồi để khô ở nhiệt độ phòng.
- ✓ 10 mM unbuffered Tris base để hòa tan lượng SRB, lắc nhẹ trong 10 phút rồi đọc kết quả OD ở bước sóng 540nm trên máy ELISA Plate Reader (Biotek).
- ✓ Phần trăm ức chế sự phát triển của tế bào khi có mặt chất thử sẽ được xác định thông qua công thức sau:

$$\% \text{ ức chế} = 100\% - \frac{OD(\text{mẫu}) - OD(\text{ngày0})}{OD(\text{DMSO}) - OD(\text{ngày0})}$$

- Phép thử được lặp lại 3 lần để đảm bảo tính chính xác. Ellipticine ở các nồng độ 10 µg/ml; 2 µg/ml; 0,4 µg/ml; 0,08 µg/ml được sử dụng như là chất đối chứng dương;
- DMSO 1% luôn được sử dụng như đối chứng âm. Giá trị IC₅₀ (nồng độ ức chế 50% sự phát triển) sẽ được xác định nhờ vào phần mềm máy tính TableCurve 2Dv4.
- Theo tiêu chuẩn của Viện ung thư quốc gia Hoa Kỳ (NCI), cao chiết được coi có hoạt tính tốt với IC₅₀ ≤ 20 µM, trong khi chất tinh khiết được coi có hoạt tính tốt khi IC₅₀ ≤ 5 µM [126].

2.2.6.3. Phương pháp xác định tính độc tế bào đối với các dòng tế bào nuôi cấy hỗn dịch sử dụng thuốc thử muối tetrazolium MTT

Phương pháp thử độ độc tế bào *in vitro* được Viện Ung thư Quốc gia Hoa Kỳ (National Cancer Institute - NCI) xác nhận là phép thử độ độc tế bào chuẩn nhằm sàng lọc, phát hiện các chất có khả năng gây độc tế bào ở điều kiện *in vitro*. Phương pháp này lần đầu tiên được miêu tả bởi Tim Mosmann trên tạp chí *Immunological Methods* năm 1983. Tác giả sử dụng muối Tetrazolium (MTT) (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazolium)) làm thuốc thử trong phép so màu, qua đó đánh giá về sự sống sót và khả năng phát triển của tế bào. Vòng Tetrazolium của thuốc thử bám chặt vào ti thể của tế bào hoạt động. Dưới tác dụng của enzym Dehydrogenase trong tế bào, màu vàng của MTT biến đổi thành màu tím Formazan [127]. Phép thử được thực hiện trong điều kiện cụ thể như sau:

- Chất thử (20 µl) được đưa vào các giếng của khay 96 giếng để có nồng độ 100 µg/ml; 20 µg/ml; 4 µg/ml; 0,8 µg/ml.
- Sau khi điều chỉnh để có mật độ tế bào phù hợp, hút 180 µl tế bào vào các giếng của khay 96 giếng đã có chất thử. Trên cùng một đĩa thử, bố trí một số giếng để làm đối chứng không có mẫu thử, chỉ có dung môi pha mẫu là DMSO 10%.
- Để đĩa nuôi cấy vào trong tủ ấm CO₂ ở điều kiện 37°C, 5% CO₂, nuôi trong thời gian 72 giờ.
- Sau 72 giờ, 10 µl MTT (nồng độ cuối cùng là 5mg/ml) được cho vào mỗi giếng.
- Sau 4h, loại bỏ môi trường, tinh thể Formazan được hòa tan bằng 50 µl (DMSO) 100%.
- Giá trị OD đo ở bước sóng 540nm bằng máy quang phổ.
- Lượng tế bào sống sót sẽ được tính theo công thức:

$$\% \text{ sống sót} = \frac{OD(\text{chất thử}) - OD(\text{đối chứng trắng})}{OD(\text{DMSO}) - OD(\text{đối chứng trắng})}$$

$$\% \text{ ức chế} = 100\% - \% \text{ sống sót}$$

- Các phép thử được lặp lại 3 lần để đảm bảo tính chính xác. Ellipticine (Sigma) luôn được sử dụng như là chất đối chứng dương và được thử nghiệm ở các nồng độ 10 µg/ml; 2 µg/ml; 0,4 µg/ml; 0,08 µg/ml.
- DMSO 10% luôn được sử dụng như đối chứng âm. Giá trị IC₅₀ (nồng độ ức chế 50% sự phát triển) sẽ được xác định nhờ vào phần mềm máy tính TableCurve 2Dv4.
- Theo tiêu chuẩn của Viện ung thư quốc gia Hoa Kỳ (NCI), cao chiết được coi có hoạt tính tốt với IC₅₀ ≤ 20 µg/ml, trong khi chất tinh khiết được coi có hoạt tính tốt (hit compound) khi IC₅₀ ≤ 5 Mm.

2.2.7. Xác định độ tinh khiết XM07, XM09, XM10 bằng phương pháp qNMR

Tiêu chuẩn cơ bản cho phương pháp qNMR [115] là diện tích tín hiệu tích hợp (I) tỷ lệ thuận với số hạt nhân (n), tạo ra đường cộng hưởng tuân thủ theo công thức được mô tả bên dưới:

$$I = Ks \times n$$

Trong đó: n biểu thị số spin (proton) tạo ra cộng hưởng. Ks là hằng số duy nhất đối với mỗi máy quang phổ. Tỷ lệ diện tích tương đối I1/I2 là phương pháp đơn giản nhất để thu được kết quả định lượng. Có thể xóa Ks khỏi tỷ lệ sau vì nó vẫn không đổi đối với tất cả các đường cộng hưởng trong một quang phổ nhất định:

$$I1/I2 = n1/n2$$

Với một chuẩn nội đã biết được áp dụng, cường độ NMR có thể được sử dụng để xác định độ tinh khiết của một chất bằng cách sử dụng các phương trình sau:

$$W_x = \frac{I_x}{I_{std}} \frac{N_{std}}{N_x} \frac{M_x}{M_{std}} m_{std}$$

$$P_x = \frac{I_x}{I_{std}} \frac{N_{std}}{N_x} \frac{M_x}{M_{std}} \frac{m_{std}}{m_s} P_{std}$$

Trong đó: W_x và P_x biểu thị trọng lượng và độ tinh khiết của hợp chất được nghiên cứu, tương ứng. M_x và M_{std} biểu thị trọng lượng phân tử của hợp chất được phân tích và chuẩn nội, tương ứng. I_x và I_{std} biểu thị diện tích đỉnh tích hợp của hợp chất được nghiên cứu và chuẩn nội, tương ứng. N_x và N_{std} biểu thị số proton trong diện tích đỉnh tích hợp của hợp chất được nghiên cứu và chuẩn nội. M_x và M_{std} là trọng lượng của hợp chất được nghiên cứu và chuẩn nội. P_{std} là độ tinh khiết của chuẩn nội.

Định lượng các hợp chất bằng phương pháp qNMR được đo trên máy phổ cộng hưởng từ hạt nhân NMR Bruker 400Mz, Viện Kiểm nghiệm thuốc Thành phố Hồ Chí Minh.

Các hợp chất **XM07**, **XM09** và **XM10** được xác định bằng máy quang phổ hệ thống Bruker 400 MHz Advance III. Sau đây là các hệ số thu thập cụ thể được sử dụng cho phép đo qNMR: xung đơn với 900; số quét 32; thời gian thu thập 3,99 giây;

thời gian hồi phục T1: 6,9 μ giây; độ lợi máy thu 101; độ lệch 14,74 ppm; chiều rộng phổ 20,48; Tất cả các phép đo được thực hiện ở nhiệt độ không đổi là 25°C.

Chuẩn bị dung dịch chuẩn

Dung dịch hòa tan: Ethylene carbonate làm chuẩn nội được hòa tan trong dung môi NMR CDCl₃ để thu được dung dịch có nồng độ Ethylene carbonate 0,5 mg/ml. Lượng chuẩn chính xác 11-19 mg **XM07**, **XM09** và **XM10** được hòa tan trong 1 ml dung dịch mẫu đã hòa tan.

2.2.8. Phân tích định tính, định lượng XM07, XM09, XM10 bằng phương pháp sắc ký lỏng ghép khối phổ (LC-MS/MS)

Điều kiện khối phổ được khảo sát trên hệ thống máy UPLC-MS/MS Waters Xevo TQS Micro, sử dụng kỹ thuật ghi phổ full scan để xác định ion phân tử các chất và kỹ thuật phân tích daughter ion để tìm mảnh ion con định lượng và mảnh ion con định tính. Các thông số thể phân mảnh và năng lượng va đập được tối ưu hóa bằng phần mềm tối ưu hóa tự động IntelliStart và kiểm tra lại bằng Manual Tune sao cho cường độ tín hiệu của ion định lượng đạt cao nhất.

Sử dụng các dung dịch chuẩn riêng biệt với nồng độ khoảng 1 ppm trong các khảo sát này.

2.2.8.1. Khảo sát điều kiện ion hóa

Sử dụng chế độ scan với giao diện ESI: Quét tìm mảnh mẹ và khảo sát điện áp mao quản (capillary voltage) để thu được tín hiệu cao nhất.

2.2.8.2. Tối ưu hóa điều kiện phân mảnh

Sử dụng chế độ Daughter ion để: quét tìm mảnh con từ mảnh mẹ thu được ở chế độ scan, đối chiếu với tài liệu tham khảo để tìm được mảnh con phù hợp.

Điều chỉnh mảnh ion mẹ, ion con và tối ưu các thông số cone voltage (CV), collision energy (CE), dwell time... bằng chức năng Intelistart (tune tự động) và Manual Optimization (tune thủ công) từ phần mềm MassLynx 4.2 để thu được các thông số cho chế độ định lượng và định tính MRM.

2.2.8.3. Khảo sát chuẩn nội

Các hợp chất nghiên cứu đều là các hợp chất mới, hiện nay trên thế giới chưa có nghiên cứu về các hợp chất này bằng phương pháp LC-MS/MS do đó nghiên cứu hướng đến lựa chọn chuẩn nội là các hợp chất có tính chất, thời gian lưu gần giống với tính chất của các chất phân tích, tối ưu hóa điều kiện khối phổ để đạt tín hiệu cao, ổn định tương đương với chất phân tích.

2.2.8.4. Khảo sát điều kiện sắc ký

Điều kiện sắc ký được khảo sát sơ bộ trên các hệ pha động và các pha tĩnh khác nhau để biết được xu hướng ảnh hưởng của các điều kiện sắc ký tương ứng lên độ nhạy của tín hiệu cũng như các thông số của pic sắc ký.

Yêu cầu: Độ nhạy của các chất phân tích cao, tín hiệu ổn định, các pic quan sát phải đạt các thông số sắc ký, thời gian phân tích ngắn.

2.2.8.5. Điều kiện Phân tích mẫu bằng LC- MS/MS

Các mẫu thực nghiệm được định lượng bằng cách sử dụng chuẩn có sử dụng nội chuẩn. Để tối ưu điều kiện khối phổ, hỗn hợp dung dịch chuẩn chứa 3 chất **XM07**, **XM09**, **XM10** với nồng độ 1 µg/ml mỗi loại đã được chuẩn bị. Dựa trên điều kiện khối phổ đó, điều kiện sắc ký cũng được tối ưu với các thông số tỷ lệ dung môi, loại dung môi, bản chất pha tĩnh... bằng cách sử dụng hỗn hợp dung dịch chuẩn: **XM07** với nồng độ 3 µg/ml, **XM09** với nồng độ 5 µg/ml, **XM10** với nồng độ 12 µg/ml và nội chuẩn Etodolac ở nồng độ 5 µg/ml.

Tính tương thích hệ thống LC-MS/MS được tiến hành bằng cách tiêm lặp lại 6 lần hỗn hợp chuẩn và nội chuẩn. Giá trị thống kê của độ lệch chuẩn tương đối được tính thông qua hệ số thời gian lưu tương đối và tỷ lệ diện tích pic của 3 chất phân tích so với nội chuẩn. Tính đặc hiệu của phương pháp được tiến hành bằng cách so sánh thời gian lưu và đáp ứng tín hiệu của mẫu trắng là Methanol.

Giá trị LOQ của phương pháp được xác định bằng cách dựa vào tín hiệu đáp ứng của chất phân tích đối với nhiễu nền khi $S/N \geq 10$, từ đó suy ra giới hạn phát hiện (LOD) theo công thức: $LOQ = 3,3 \times LOD$.

Để thẩm định tính tuyến tính, khoảng tuyến tính có nồng độ **XM07** từ 0,03 – 7,50 ppm, **XM09** từ 0,05 – 12,50 ppm, **XM10** từ 0,12 – 30,00 ppm, nồng độ nội chuẩn là 5,0 ppm. Đường cong chuẩn được xây dựng để thể hiện mối quan hệ tuyến tính giữa nồng độ chất phân tích và tỷ lệ diện tích pic của chất phân tích và chất chuẩn nội.

2.2.9. Xử lý mẫu phân tích định tính, định lượng

Mẫu lá Xu nhỏ dùng xây dựng quy trình phân tích định tính, định lượng. Mẫu được liệu phân tích ở các dạng khác nhau được phơi khô tự nhiên, xay nhỏ thành bột khô. Cân chính xác 5 g mẫu, chiết với 25 mL MeOH trong ống falcon 50 ml, đặt trong máy siêu âm 30 phút, lọc dịch chiết bằng giấy lọc thường chuyển vào bình định mức 100 ml. Chiết lặp lại 3 lần, thu tất cả dịch lọc chuyển vào bình định mức 100 ml, định mức bằng MeOH đến vạch. Pha loãng cùng dung môi MeOH để thu được dung dịch thử có nồng độ chính xác khoảng 25 mg/ml và nồng độ chuẩn nội là 5 µg/ml, lọc mẫu thử qua màng lọc mẫu PES Syringe filter 0,22 µm, dịch lọc được chuyển vào lọ chứa mẫu rồi đưa vào hệ thống LC-MS/MS.

2.2.10. Thẩm định quy trình phân tích

Theo AOAC [128] và ICH [129], các chỉ tiêu cần phải thẩm định đối với một quy trình định tính, định lượng được chất và/hoặc chất chuyển hóa có tác dụng trong mẫu được liệu bao gồm: kiểm tra tính phù hợp của hệ thống, tính đặc hiệu, tỷ lệ thu hồi

(hiệu suất chiết), đường chuẩn và khoảng tuyến tính, độ đúng và độ chính xác, giới hạn định tính, giới hạn định lượng, độ ổn định của mẫu thử.

2.2.10.1. Tính phù hợp của hệ thống

Tiến hành Tiêm lặp lại 6 lần dung dịch chuẩn hỗn hợp và chuẩn nội. Xác định các thông số về thời gian lưu, diện tích pic, độ lệch chuẩn tương đối (RSD %) của diện tích đỉnh và thời gian lưu của chất chuẩn và chuẩn nội.

Yêu cầu: Các thông số sắc ký khảo sát có độ lệch chuẩn tương đối $RSD \leq 5,3 \%$.

2.2.10.2. Tính đặc hiệu

Tiêm mẫu trắng (Methanol); mẫu chuẩn; mẫu chuẩn thêm chuẩn nội ở mức nồng độ định lượng; mẫu thử (cao Methanol). Xác định thời gian lưu, tín hiệu đáp ứng pic. Yêu cầu: Mẫu trắng cho tín hiệu phân tích nằm trong giới hạn cho phép ($\leq 20 \%$ diện tích pic đối với các chất phân tích và $\leq 5,3 \%$ đối với chuẩn nội trong dung dịch ở mức nồng độ giới hạn định lượng dưới).

2.2.10.3. Giới hạn định tính và định lượng

Tiến hành xác định nồng độ thấp nhất sao cho thỏa mãn điều kiện tín hiệu đáp ứng của chất phân tích so với tín hiệu nhiễu đường nền (S/N).

2.2.10.4. Đường chuẩn và khoảng tuyến tính

Chuẩn bị dung dịch chuẩn được pha trong dung môi thích hợp với có nồng độ phù hợp. Tiến hành pha loãng các dung dịch này để được các mẫu chuẩn tương ứng với khoảng tuyến tính đã xây dựng. Xác định sự tương quan giữa nồng độ và tỷ số diện tích pic của chất phân tích và diện tích của pic chuẩn nội của từng hoạt chất theo một hàm nhất định, phù hợp với quy trình phân tích được đề ra. Vẽ đường biểu diễn sự tương quan giữa giá trị nồng độ và tỷ số diện tích pic theo hàm giá trị đã xây dựng được. Yêu cầu: Hệ số tương quan $R \geq 0,99$.

2.2.10.5. Độ đúng

Chuẩn bị mẫu, mỗi nồng độ 3 mẫu tiêm lặp lại 2 lần.

Yêu cầu: Tỷ lệ hồi phục nằm trong khoảng $90,0 - 107,0 \%$, $RSD \leq 5,3\%$.

2.2.10.6. Độ chính xác, chính xác trung gian, độ ổn định

Chuẩn bị mẫu, 6 mẫu tiêm lặp lại 2 lần, $RSD \leq 5,3\%$.

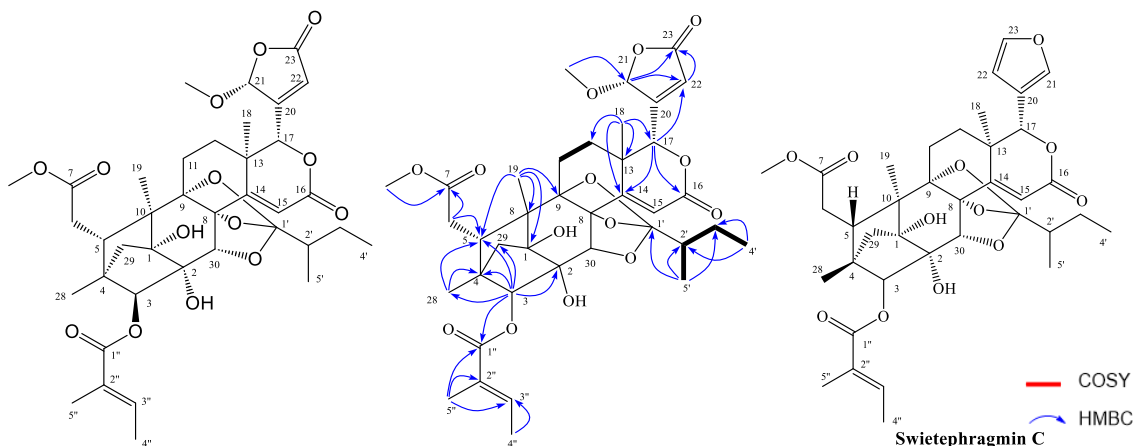
Độ ổn định của mẫu trong phòng thí nghiệm sau khi xử lý mẫu 24 giờ: Tiêm lại mẫu, 6 mẫu, sau 24 giờ xử lý và bảo quản trong phòng thí nghiệm ở 25°C . $RSD \leq 5,3\%$.

CHƯƠNG 3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

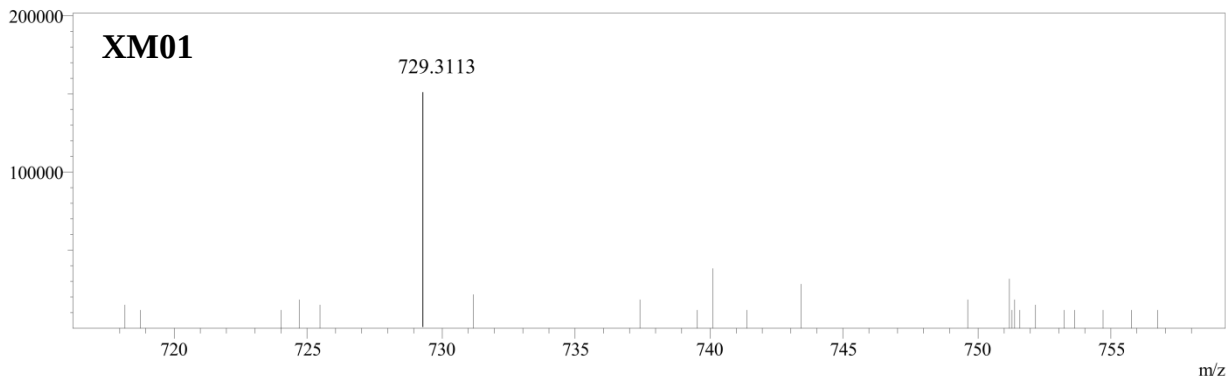
3.1. Xác định cấu trúc các hợp chất từ cây Xu nhỏ

3.1.1. Hợp chất XM01 – chất mới

Hợp chất **XM01** (Hình 3.1) thu được dưới dạng bột vô định hình màu trắng. Phổ khối phân giải cao HR-MS chế độ dương xuất hiện pic ion dương tại m/z 729,3113 $[M + H]^+$ (Hình 3.2), (tính toán theo lý thuyết ứng với công thức ion giả phân tử $C_{38}H_{49}O_{14}^+$, m/z 729,3117). Kết hợp với phổ 1H -NMR và ^{13}C -NMR xác định hợp chất **XM01** có công thức phân tử $C_{38}H_{48}O_{14}$, khối lượng phân tử 728,3044.



Hình 3.1. Cấu trúc và tương tác HMBC và COSY, của hợp chất **XM01**



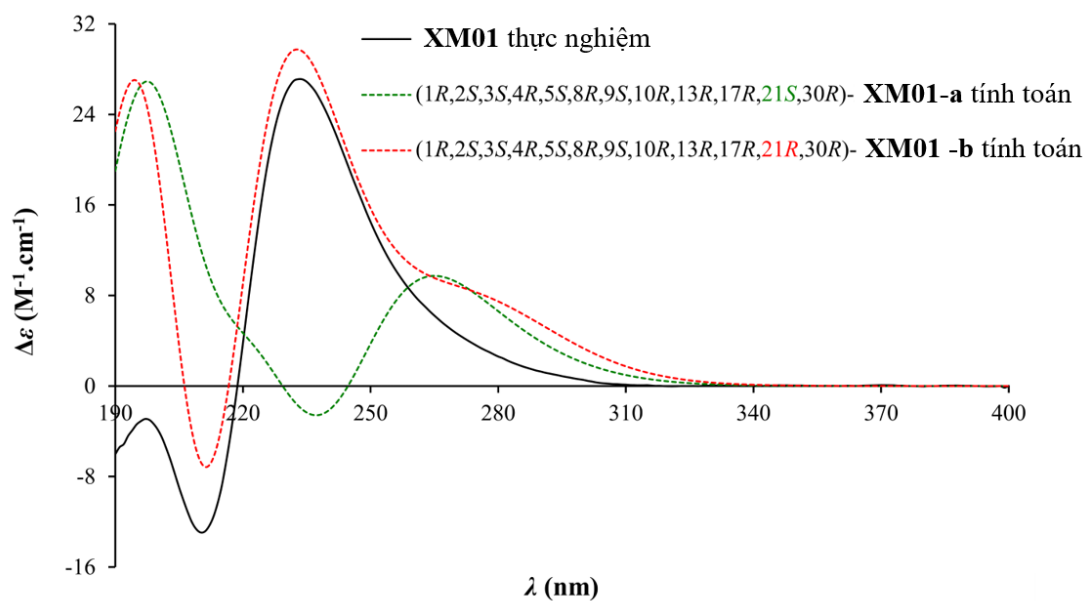
Hình 3.2. Phổ khối phân giải cao HRMS của hợp chất **XM01**

Phổ 1H -NMR (Bảng 3.1 và Phụ lục 2, hình PL1) của **XM01** cho thấy các tín hiệu của bốn nhóm methyl dạng đơn (δ_H 1,36; 1,30; 0,80 và 1,84), hai nhóm methyl bậc hai [δ_H 1,75 (dd, 7,2; 0,6) và 1,02 (d, 7,2)], một nhóm methyl tận cùng [δ_H 0,93 (t, 7,8)], hai nhóm oxymethyl [δ_H 3,68 (s) và 3,57 (s)], bốn nhóm methine gắn oxy [δ_H 4,83 (s); 5,56 (br d, 1,2); 5,83 (d, 0,6) và 4,48 (s)] và ba nhóm methine olefin [δ_H 5,98 (s); 6,29 (s) và 6,85 (dd, 7,2; 1,2)].

Phổ ^{13}C -NMR (Bảng 3.1 và Phụ lục 2, hình PL2) cho thấy hợp chất chứa 38 nguyên tử carbon, dựa trên phân tích HSQC (Phụ lục 2, hình PL3), các tín hiệu này được phân loại thành chín nhóm methyl, năm nhóm methylene, chín nhóm methine

(bao gồm ba nhóm methine sp² tại δ C 122,1; 124,4 và 139,5) cùng với mười lăm carbon bậc bốn. Trong số các carbon không gắn với proton, bốn carbon được xác định là carbon carbonyl ester (δ C 173,6; 161,1; 169,0 và 167,8), ba carbon thuộc liên kết đôi (δ C 152,4; 159,4 và 130,2), một carbon orthoester (δ C 122,9) và bốn carbon gắn với oxy (δ C 84,6; 75,7; 83,6 và 86,2). Do ba liên kết đôi và bốn nhóm carbonyl chiếm bảy đơn vị độ bất bão hòa, hợp chất **XM01** được xác định là một phân tử có cấu trúc tám vòng.

Việc phân tích phổ HMBC (Phụ lục 2, hình PL4) và COSY (Phụ lục 2, hình PL5) của hợp chất **1** đã cho phép xác định cấu trúc phẳng của nó (Hình 3.1); cấu trúc này được tìm thấy là tương tự như hợp chất swietephragmin C [130] đã công bố trước đây. Hai hợp chất này chỉ khác nhau ở điểm: vòng furan trong swietephragmin C đã được thay thế bằng một nhóm γ -methoxybutenolide (vòng E) trong hợp chất **XM01**. Sự khác biệt về cấu trúc này được xác định dựa trên các tương quan HMBC quan trọng: từ H-17 đến C-20, C-21 và C-22; từ H-21 và H-22 đến C-23; và từ proton của nhóm 21-OMe đến C-21. Tương tác NOESY (Phụ lục 2, hình PL6 và cấu trúc 3D phụ lục 2, hình PL7) giữa H-11b/H-12b cùng tương tác 1,3-diaxial giữa H-11b/H3-18 cho thấy các proton này có định hướng α . Cấu hình β của H-17, H-5, nhóm Me-28 và H-30 được xác định dựa trên các tín hiệu tương quan chéo giữa H-12a/H-17, H-12a/H-5, H-5/H3-28 và H-30/H-15. Hiệu ứng NOESY giữa H-3/H-29b, H-29a/H3-19, H3-19/OH-1 và OH-1/OH-2 đã xác nhận cấu hình tại các vị trí C-3, C-10, C-1 và C-2. Cấu hình E của liên kết đôi giữa C-2" và C-3" được củng cố bởi tương tác NOESY giữa H-4"/H-5". Cấu hình tại C-21 không thể xác định được bằng phân tích NOESY do sự quay tự do của vòng E quanh liên kết đơn C-17–C-20. Để xác định cấu hình tương đối tại vị trí C-21, các giá trị dịch chuyển hóa học NMR đã được tính toán bằng phương pháp orbital nguyên tử độc lập với hệ quy chiếu (GIAO) ở mức lý thuyết mPW1PW91/6–31+G(d,p)/IEFPCM-CHCl₃ cho hai đồng phân epimer tại C-21 là (1*R**,2*S**,3*S**,4*R**,5*S**,8*R**,9*S**,10*R**,13*R**,17*R**,21*S**,30*R**)-**XM01a** và (1*R**,2*S**,3*S**,4*R**,5*S**,8*R**,9*S**,10*R**,13*R**,17*R**,21*R**,30*R**)- **XM01b** (Hình 3.3). Kết quả tính toán cho thấy chỉ có phổ ECD lý thuyết của đồng phân **XM01b** phù hợp tốt với phổ ECD thực nghiệm, cho phép khẳng định cấu hình tuyệt đối của **XM01** là (1*R**,2*S**,3*S**,4*R**,5*S**,8*R**,9*S**,10*R**,13*R**,17*R**,21*R**,30*R**). Truy cập cơ sở dữ liệu theo nguồn Scifinder vào tháng 12/2025 cho thấy hợp chất **XM01** chưa được công bố. Từ những phân tích nêu trên, cấu trúc chất mới **XM01** đã xác nhận và đặt tên là Xylomoluccenoid A.



Hình 3.3. Phổ ECD thực nghiệm và tính toán lý thuyết của hợp chất **XM01**

Bảng 3.1. Bảng số liệu phổ ^1H , ^{13}C -NMR của hợp chất **XM01**

XM01				
Vị trí C	$^*\delta_{\text{C}}^{\text{a,b}}$	$\delta_{\text{C}}^{\text{a,b}} \text{CDCl}_3$	$\delta_{\text{H}}^{\text{a,c}} (J = \text{Hz})$	HMBC H→C
1	84,6	84,6	-	-
2	75,7	75,7	-	-
3	86,6	86,7	4,83 (1H, s)	2, 4, 5, 28, 1''
4	43,7	43,9	-	-
5	40,1	40,4	2,47 (1H, m)	3, 7
6	33,7	33,8	2,38 (2H, #)	4, 5, 7
7	173,9	173,6	-	-
8	83,6	83,6	-	-
9	86,6	86,3	-	-
10	47,2	47,3	-	-
11	25,7	25,7	2.17 (1H, dt. 15.0, 3.0) eq 1.92 (1H, overlapped) ax	- 9
12	29,0	28,9	1.64 (1H, overlapped) ax 1.38 (1H, m) eq	- 9
13	37,7	38,4	-	-
14	153,1	152,4	-	-
15	122,5	122,1	5,98 (1H, s)	8, 13, 14, 16
16	163,2	161,1	-	-
17	79,7	80,0	5,56 (1H, br d, 1,2)	13, 14, 18, 20, 21, 22
18	19,8	20,9	1,36 (3H, s)	12, 13, 14, 17
19	15,5	15,6	1,30 (3H, s)	1, 5, 9, 10
20	119,8	159,4	-	-
21	142,0	103,7	5,83 (1H, br d, 0,6)	22, 23, 21-OMe
22	110,1	124,4	6,29 (1H, s)	17, 20y, 21, 23
23	143,2	169,0	-	-
28	14,4	14,5	0,80 (3H, s)	3, 4, 5, 28, 29
29	38,5	38,7	1,83 (1H, d, 12,0) 1,77 (1H, d, 12,0)	28, 2 1y
30	77,9	78,0	4,48 (1H, s)	1, 2, 8, 9
7-OMe	52,1	52,2	3,74 (3H, s)	7

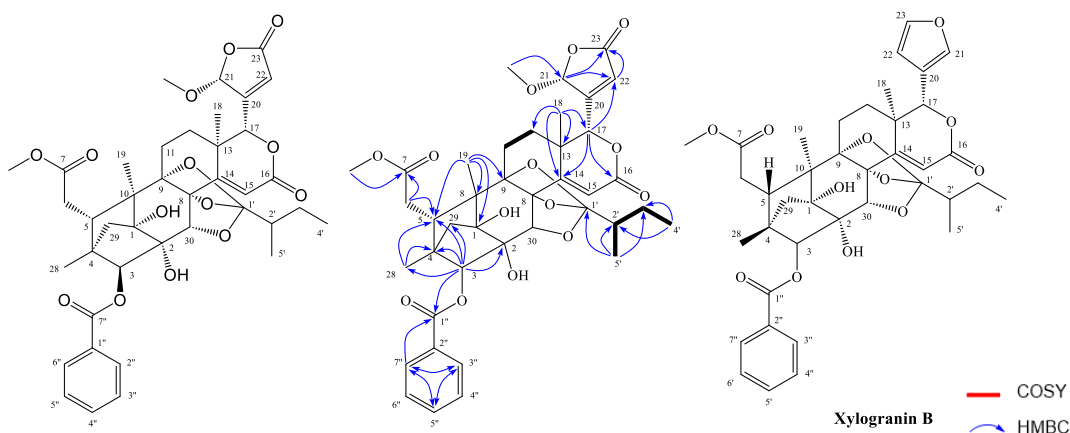
21-OMe	-	57,0	3,57 (3H, s)	21
Orthoster	-	-	-	-
1'	122,9	122,9	-	-
2'	35,5	35,6	1,92 (1H, #)	-
3'	23,6	23,8	1,70 (1H, m) 1,22 (1H, m)	- -
4'	11,4	11,6	0,93 (3H, t, 7,8)	2', 3'
5'	13,1	13,3	1,02 (3H, d, 7,2)	1', 2', 3'
Tiglate	-	-	-	-
1''	168,1	167,8	-	-
2''	130,0	130,2	-	-
3''	139,9	139,5	6,85 (1H, qd, 7,2, 1,2)	1'', 5''
4''	14,2	14,3	1,75 (3H, dd, 7,2, 0,6)	2'', 3''
5''	12,3	12,5	1,84 (3H, s)	1'', 2'', 3''

* tham khảo chất swietephragmin C [130]

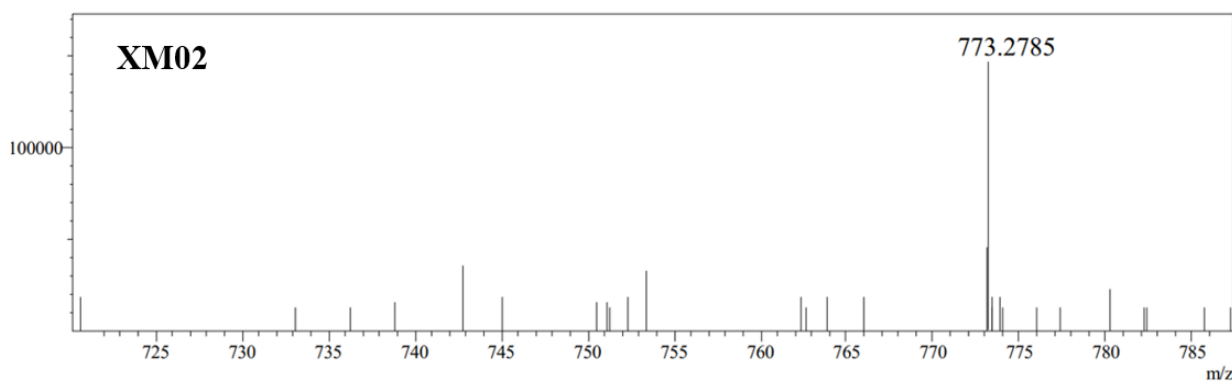
^a đo trong CDCl₃, ^b 150 MHz, ^c 600 MHz,

3.1.2. Hợp chất XM02 – chất mới

Hợp chất **XM02** (Hình 3.4) thu được dưới dạng bột vô định hình màu trắng. Phổ khối phân giải cao HRMS xuất hiện pic ion dương tại m/z 773,2785 [M + Na]⁺ (Hình 3.5), (tính toán theo lý thuyết ứng với công thức ion giả phân tử C₄₀H₄₇O₁₄Na⁺, m/z 773,2780). Kết hợp với phổ ¹H-NMR và ¹³C-NMR xác định hợp chất **XM02** có công thức phân tử C₄₀H₄₆O₁₄, khối lượng phân tử 750,2888.



Hình 3.4. Cấu trúc và tương tác HMBC và COSY của hợp chất **XM02**



Hình 3.5. Phổ khối phân giải cao HRMS của hợp chất **XM02**

Các dữ liệu phổ NMR của **XM02** (Bảng 3.2) rất tương đồng với Xylomoluccenoid A (**XM01**); sự khác biệt duy nhất về cấu trúc là nhóm tigloyloxy trong **1** được thay thế bằng nhóm benzoyloxy trong **XM02**. Kết luận này được khẳng định thông qua các hệ thống ghép spin H-2''/H-3''/H-4''/H-5''/H-6'' và các tương tác HMBC (Phụ lục 2, hình PL11) từ H-3, H-2'' và H-6'' đến C-7'' (Hình 3.4). Cấu hình tương đối của **XM02** được xác định là giống hệt với **XM01** dựa trên sự tương đồng về kiểu tương tác NOESY (Phụ lục 2, hình PL13, hình PL14). Cuối cùng, cấu hình tuyệt đối của **XM02** (ngoại trừ vị trí C-2') được xác định là *1R*,2S*,3S*,4R*,5S*,8R*,9S*,10R*,13R*,17R*,21R*,30R** dựa trên việc so sánh phổ ECD thực nghiệm với phổ tính toán bằng phương pháp TD-DFT của các đồng phân lập thể.

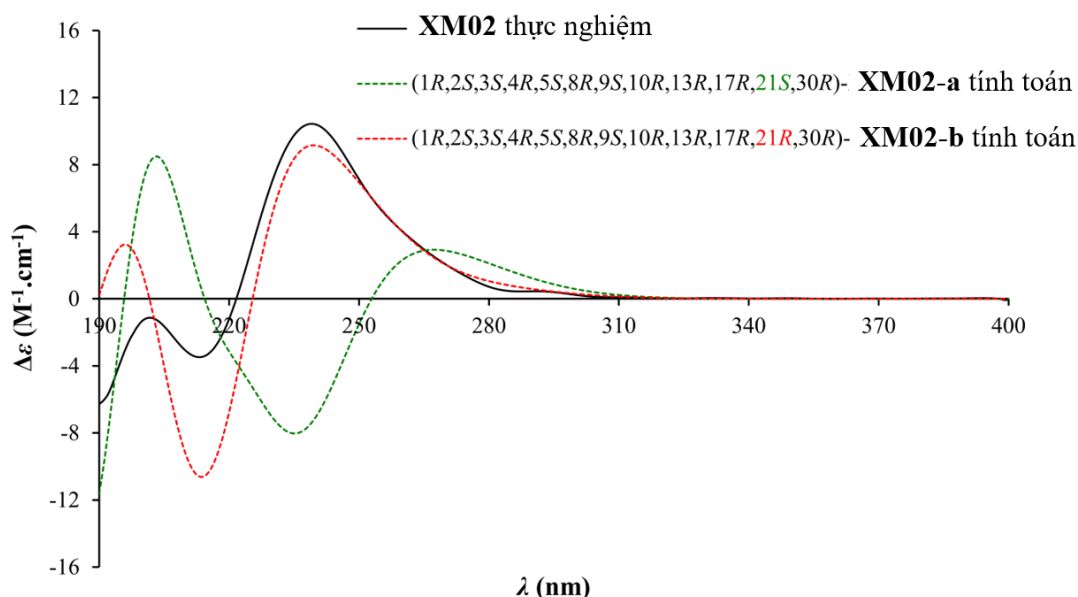
Quan sát trên phổ ¹H-NMR ((Phụ lục 2, hình PL8) cho thấy xuất hiện năm tín hiệu của một vòng thơm tại δH 8,05 (2H, dd, J = 8,4, 1,2 Hz), 7,45 (2H, dd, J = 8,4, 7,2 Hz) và 7,61 (1H, ddd, J = 8,4, 7,2, 1,2 Hz), bên cạnh đó là hai tín hiệu proton trên liên kết đôi tại δH 5,78 (1H, s) và 6,27 (1H, br t, J = 0,9 Hz). Về phía vùng trường mạnh hơn xuất hiện ba tín hiệu oxymethine tại δH 5,04 (1H, s), 5,80 (1H, br d, J = 0,6 Hz) và 4,52 (1H, s); một tín hiệu của nhóm methyl este tại δH 3,74 (3H, s) và một tín hiệu của nhóm oxymethyl tại δH 3,59 (3H, s). Dịch về phía vùng trường mạnh xuất hiện các tín hiệu đặc trưng của năm nhóm methyl tại δH 1,29 (3H, s), 1,34 (3H, s), 0,89 (3H, s), 0,92 (3H, t, J = 7,5 Hz) và 1,02 (3H, d, J = 6,6 Hz).

Phổ ¹³C-NMR (Phụ lục 2, hình PL9) và HSQC (Phụ lục 2, hình PL10) cho thấy hợp chất chứa 40 nguyên tử carbon. Trong đó 26 tín hiệu carbon của khung limoloid. Trong đó tín hiệu của ba nhóm carboxyl tại δC 173,8, 160,2 và 169,0 ppm; bốn tín hiệu carbon của hai liên kết đôi tại δC 152,5/121,9, 159,4/124,4 ppm; ba tín hiệu đặc trưng các nhóm methyl tại δC 20,6, 15,7 và 14,6 ppm. Ngoài ra là các nhóm thế: Bảy tín hiệu carbon của một nhóm thế benzoyl [δC 166,7, 129,7, 129,9 (x2), 129,1 (x2) và 134,2 ppm]; một nhóm methyl este tại δC 52,3 ppm; một nhóm oxymethyl tại δC 56,9 ppm và một nhóm thế *ortho*-2-methylbutanoyl [δC 122,8, 35,6, 23,7, 11,6 và 13,4 ppm].

Dựa trên phổ HMBC (Phụ lục 2, hình PL11), phổ COSY (Phụ lục 2, hình PL12) cũng xác định được một số mảnh carbon trên hợp chất **XM02**: C-5/C-6, C-11/C-12, C-5'/C-2'/C-3'/C-4', tương tác HMBC và COSY. Phân tích các tương tác trên phổ NOESY (phụ lục 2, hình PL13) so sánh cấu trúc hợp chất **XM02** với hợp chất Xylogranin B [56] thì thấy chúng trường đồng nhau, chỉ khác trên vòng furane, dữ liệu phổ của hợp chất **XM02** (Bảng 3.2). Trong hợp chất xylogranin B vòng furane có hai liên kết đôi tại C-20/C-21 và C22/C-23, còn trên hợp chất **XM02** chỉ còn một

liên kết đôi C-20/C-22. Bên cạnh đó trên vị trí C-21 xuất hiện thêm nhóm thế oxymethyl và nhóm methylene tại vị trí C-23 chuyển thành nhóm ketone.

So sánh phổ ECD thực nghiệm với các phổ ECD tính toán tại mức lý thuyết M062x/ccPVDZ/IEFPCM-ACN cho các đồng phân diastereomer $(1R^*,2S^*,3S^*,4R^*,5S^*,8R^*,9S^*,10R^*,13R^*,17R^*,21S^*,30R^*)$ -**XM02a** và $(1R^*,2S^*,3S^*,4R^*,5S^*,8R^*,9S^*,10R^*,13R^*,17R^*,21R^*,30R^*)$ -**XM02b** (hình 3.6) cho thấy chỉ có phổ ECD của đồng phân **XM02b** phù hợp tốt với phổ ECD thực nghiệm, cho phép khẳng định cấu hình tuyệt đối của **XM02** là $(1R^*,2S^*,3S^*,4R^*,5S^*,8R^*,9S^*,10R^*,13R^*,17R^*,21R^*,30R^*)$. Truy cập cơ sở dữ liệu theo nguồn Scifinder vào tháng 12/2025 cho thấy hợp chất **XM02** chưa được công bố. Từ những phân tích nêu trên, cấu trúc chất mới **XM02** đã được xác định và được đặt tên là Xylomoluccenoid B.



Hình 3.6. Phổ ECD thực nghiệm và tính toán lý thuyết của hợp chất **XM02**

Bảng 3.2. Bảng số liệu phổ ^1H , ^{13}C -NMR của hợp chất **XM02**

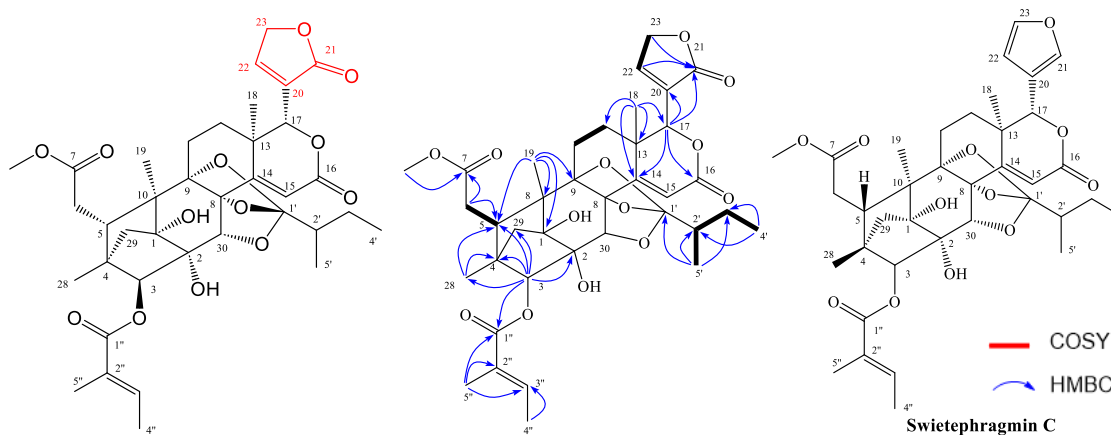
Vị trí C	XM02			
	$^*\delta_{\text{C}}^{\text{a,b}}$	$\delta_{\text{C}}^{\text{a,b}}$	$\delta_{\text{H}}^{\text{a,c}} (J = \text{Hz})$	HMBC H→C
1	84,6	84,6	-	-
2	75,7	75,8	-	-
3	86,5	87,2	5,04 (1H, s)	2, 4, 5, 28, 1''
4	43,9	44,0	-	-
5	40,2	40,5	2,64 (1H, m)	9
6	33,8	33,9	2,44 (2H, #)	4, 5, 7
7	173,7	173,8	-	-
8	83,7	83,7	-	-
9	87,1	86,3	-	-
10	47,4	47,4	-	-
11	25,8	25,7	2,19 (1H, dt, 15,0, 3,6) 1,94 (1H, m)	- -
12	29,1	28,9	1,76 -1,66 (1H, m) 1,38 (1H, dt, 13,6, 3,6)	- 9y
13	38,0	38,8	-	-
14	152,9	152,5	-	-
15	122,1	121,9	5,78 (1H, s)	8, 13, 14, 16
16	161,9	160,2	-	-
17	79,6	79,7	5,62 (1H, br d, 1,6)	14, 16, 18, 21, 22
18	19,6	20,6	1,29 (3H, s)	12, 13, 14, 17
19	15,6	15,7	1,34 (3H, s)	1, 5, 9, 10
20	119,8	159,4	-	-
21	141,8	103,7	5,80 (1H, br d, 0,6)	22, 23
22	110,0	124,4	6,27 (1H, br t, 0,9)	21, 23
23	143,0	169,0	-	-
28	14,5	14,6	0,89 (3H, s)	3, 4, 5, 29
29	38,7	38,5	1,89 (1H, br d, 11,4) 1,83 (1H, dd, 11,4, 1,2)	- 1, 2, 3, 10
30	77,8	77,9	4,52 (1H, s)	1, 2, 8, 9
7-OMe	52,2	52,3	3,74 (3H, s)	7
21-OMe	-	56,9	3,59 (3H, s)	21
1'	122,6	122,8	-	-
2'	35,5	35,6	1,92 (1H, #)	-
3'	23,7	23,8	1,76 -1,66 (1H, #) 1,20 (1H, m)	- -
4'	11,6	11,6	0,92 (3H, t, 7,5)	2', 3'
5'	13,3	13,4	1,02 (3H, d, 6,6)	1', 2', 3'
1''	166,7	166,7	-	-
2''	129,6	129,7	-	-
3''	129,8	129,9	8,05 (2H, dd, 8,4, 1,2)	1'', 5'', 7''
4''	129,0	129,1	7,45 (2H, dd, 8,4, 7,2)	2'', 6''
5''	134,0	134,2	7,61 (1H, ddd, 8,4, 7,2, 1,2)	3'', 7''
6''	129,0	129,1	7,45 (2H, dd, 8,4, 7,2)	2'', 4''
7''	129,8	129,9	8,05 (2H, dd, 8,4, 1,2)	1'', 3'', 5''

* Tài liệu tham khảo chất xylogranin B[56]

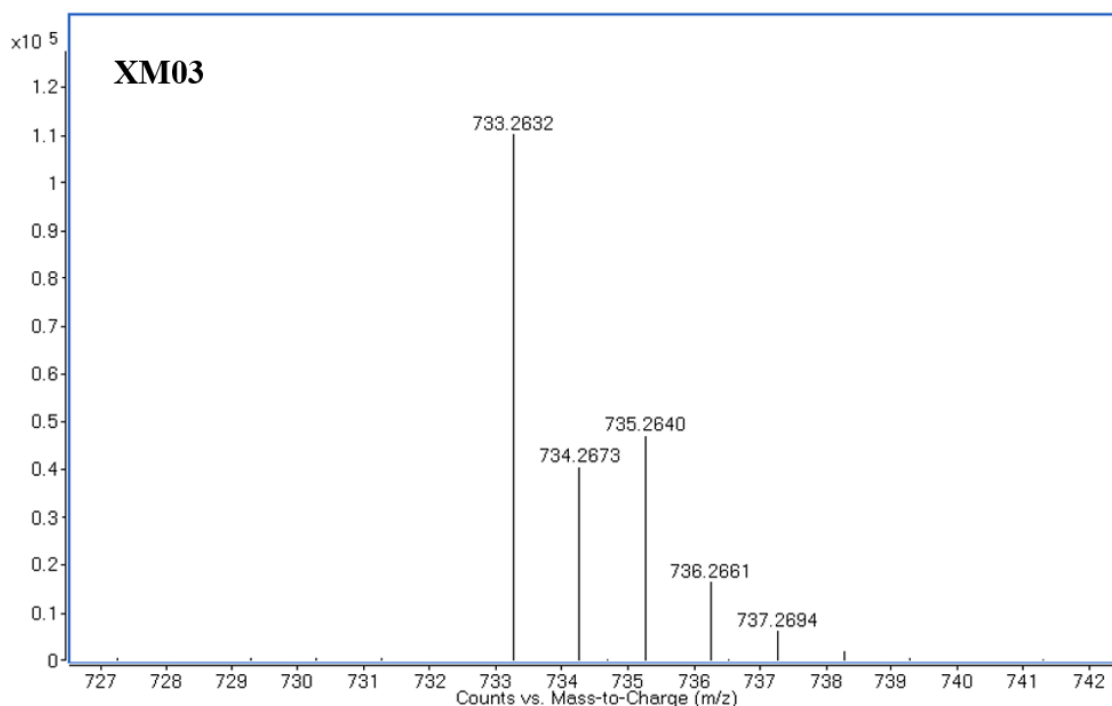
^a đo trong CDCl_3 , ^b 150 MHz, ^c 600 MHz, ^d 150 MHz

3.1.3. Hợp chất XM03 – chất mới

Hợp chất **XM03** (Hình 3.7) thu được dưới dạng chất bột vô định hình màu trắng. Phổ khối phân giải cao HR-MS xuất hiện pic ion âm tại m/z 733,2632 $[M + Cl]^-$ (Hình 3.8), (tính toán theo lý thuyết ứng với công thức ion giả phân tử $C_{37}H_{46}O_{13}Cl^-$, m/z 733,2632). Kết hợp với phổ 1H -NMR và ^{13}C -NMR xác định hợp chất **XM03** có công thức phân tử $C_{37}H_{46}O_{13}$, khối lượng phân tử 698,2938.



Hình 3.7. Cấu trúc và tương tác HMBC và COSY trên hợp chất **XM03**



Hình 3.8. Phổ khối phân giải cao HRMS của hợp chất **XM03**

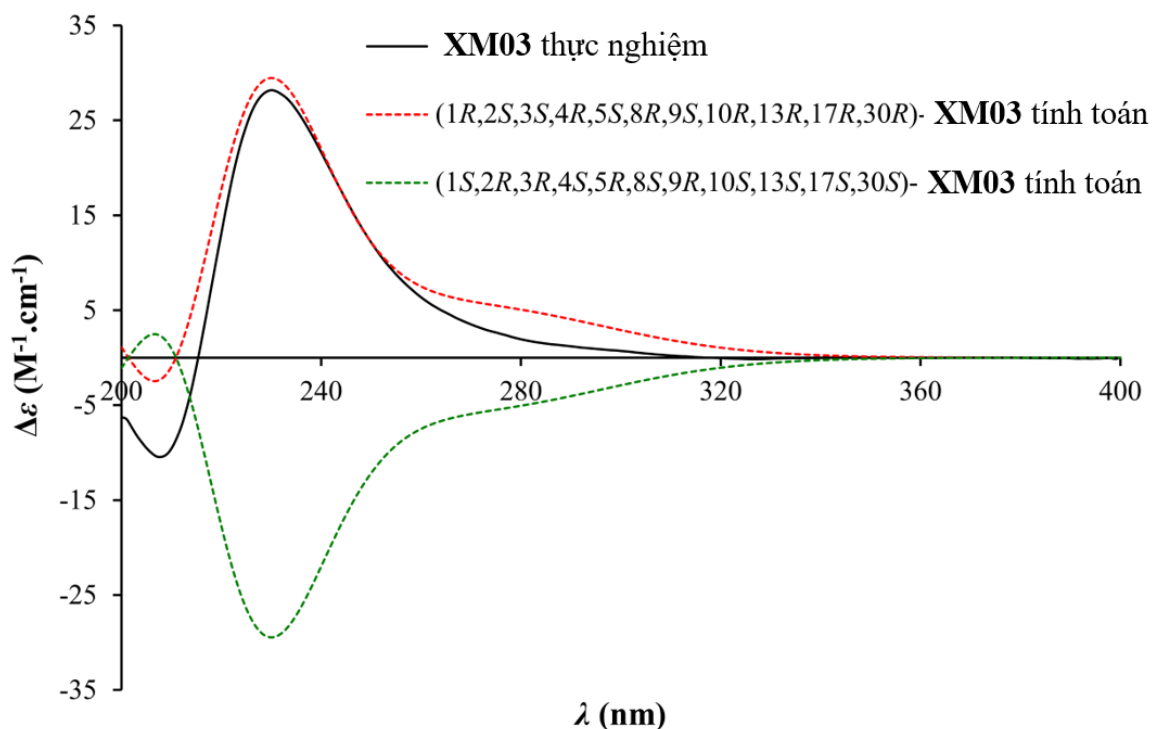
Việc so sánh dữ liệu NMR (phổ 1H Phụ lục 2, hình PL15, ^{13}C -NMR Phụ lục 2, hình PL16) cho thấy hợp chất 3 sở hữu khung limonoid gần như tương đồng với hợp chất **XM01** (Bảng 3.1). Điểm khác biệt duy nhất về cấu trúc là sự hiện diện của vòng α,β -unsaturated- γ -lactone trong 3 thay vì nhóm γ -methoxybutenolide như ở 1;

điều này được khẳng định qua tương quan COSY giữa H-22 và H-23, cùng với các tương quan HMBC quan trọng từ H-23 đến C-20 và C-21, và từ H-17 đến C-20 và C-22 (Hình 3.7). Cấu hình tương đối của **XM03** được xác định là tương tự như của **XM01**, dựa trên sự tương đồng cao về cả độ dịch chuyển hóa học và các tín hiệu chéo NOESY (Phụ lục 2, hình PL20, hình PL21). Phổ ECD thực nghiệm của 3 hoàn toàn phù hợp với đường cong ECD được tính toán cho đồng phân ($1R^*, 2S^*, 3S^*, 4R^*, 5S^*, 8R^*, 9S^*, 10R^*, 13R^*, 17R^*, 30R^*$), qua đó xác định cấu hình tuyệt đối của hợp chất, ngoại trừ tâm bất đối tại vị trí C-2' (Hình 3.9). Phổ ECD thực nghiệm của **XM03** (hình 3.9) cho cấu hình tuyệt đối là $1R^*, 2S^*, 3S^*, 4R^*, 5S^*, 8R^*, 9S^*, 10R^*, 13R^*, 17R^*, 30R^*$. Truy cập cơ sở dữ liệu theo nguồn Scifinder vào tháng 12/2025 cho thấy hợp chất **XM03** chưa được công bố. Từ những phân tích dữ liệu phổ nêu trên, cấu trúc chất mới **XM03** đã được nhận dạng và được đặt tên là Xylomoluccenoid C.

Quan sát trên phổ $^1\text{H-NMR}$ (Phụ lục 2, hình PL15) của **XM03** cho thấy xuất hiện ba tín hiệu cộng hưởng proton trên liên kết đôi tại δH 5,99 (1H, s), 7,73 (1H, d, $J = 1,0$ Hz) và 7,07 (1H, dd, $J = 7,0, 1,5$ Hz). Về phía vùng trường mạnh hơn xuất hiện ba tín hiệu oxymethine tại δH 4,83 (1H, s), 5,52 (1H, s) và 4,47 (1H, s); một tín hiệu của nhóm oxymethylene tại δH 4,92 (2H, br s); một tín hiệu của nhóm methyl este tại δH 3,67 (3H, s). Dịch về phía vùng trường mạnh xuất hiện các tín hiệu đặc trưng của bảy nhóm methyl tại δH 1,24 (3H, s), 1,81 (3H, s), 1,27 (3H, s), 0,92 (3H, t, $J = 7,5$ Hz), 1,02 (3H, d, $J = 7,0$ Hz), 1,76 (3H, d, $J = 7,0$ Hz), 1,87 (3H, s).

Phổ $^{13}\text{C-NMR}$ (Phụ lục 2, hình PL16) và HSQC (Phụ lục 2, hình PL17) cho thấy hợp chất chứa 37 nguyên tử carbon, với 26 tín hiệu carbon của khung limoloid. Trong đó tín hiệu của ba nhóm carboxyl tại δC 172,3, 162,1 và 171,3 ppm; bốn tín hiệu carbon của hai liên kết đôi tại δC 152,5/122,1, 130,0/151,7 ppm; ba tín hiệu đặc trưng các nhóm methyl tại δC 19,7, 15,5 và 14,6 ppm. Ngoài ra còn các nhóm thế: một nhóm methyl este tại δC 52,1 ppm; một nhóm *ortho* ester [δC 122,8, 35,7, 23,7, 11,7 và 13,4 ppm]; một nhóm tiglate [δC 168,2, 129,7, 140,1, 14,5 và 12,5 ppm]. So sánh hợp chất này với hợp chất Swietephragmin C [130] đã công bố cho thấy chúng tương đồng nhau, chỉ khác phần vòng furane (như hình 3.4). Điều đó được chứng minh dựa trên dữ liệu phổ $^{13}\text{C-NMR}$ trên hai vòng furane của hai chất. Vòng 5 cạnh của hợp chất Swietephragmin C [δC 119,8 (C-20), 142,0 (C-21), 110,1 (C-22) và 143,2 (C-23)] còn trên vòng năm cạnh của hợp chất **XM03** với độ chuyển dịch [δC 130,0 (C-20), 171,3 (C-21), 151,7 (C-22) và 70,6 (C-23)]. Cấu trúc, vị trí nhóm ketone cũng như vị trí liên kết đôi được xác định dựa trên phổ HMBC (Phụ lục 2, hình PL18), tương tác HMBC và COSY (Phụ lục 2, hình PL19), các tương tác thu được từ phổ NOESY (Phụ lục 2, hình PL20), cấu trúc 3D của hợp chất **XM03** (Phụ lục 2, hình

PL21), so sánh với dữ liệu phổ của hợp chất **XM03** (Bảng 3.3) với hợp chất Swietephragmin C trong tài liệu đã công bố.



Hình 3.9. Phổ ECD thực nghiệm và tính toán lý thuyết của hợp chất **XM03**

Bảng 3.3. Bảng số liệu phổ ^1H , ^{13}C -NMR của hợp chất **XM03**

Vị trí C	XM03			
	$\delta_{\text{C}}^{\text{a,d}}$	$\delta_{\text{C}}^{\text{a,b}}$	$\delta_{\text{H}}^{\text{a,c}}$ ($J = \text{Hz}$)	HMBC ($\text{H} \rightarrow \text{C}$)
1	84,6	84,5	-	
2	75,5	75,7	-	
3	86,6	87,0	4,84 (1H, s)	1", 2
4	43,7	43,6	-	
5	40,1	39,5	2,53 (1H, overlapped)	
6	33,7	33,4	2,53 (1H, overlapped) 2,34 (1H, m)	
7	173,9	172,3	-	
8	83,6	83,6	-	
9	86,6	87,0	-	
10	47,2	47,0	-	
11	25,7	25,7	2,12 (1H, m) 1,83 (1H, m)	
12	29,0	29,0	1,76 (1H, m) 1,13 (1H, m)	
13	37,7	38,3	-	
14	153,1	152,5	-	
15	122,5	122,1	5,99 (1H, s)	13, 14, 16
16	163,2	162,1	-	
17	79,7	78,8	5,52 (1H, s)	13, 18, 20, 21
18	19,8	19,7	1,24 (3H, s)	12, 13, 14, 17
19	15,5	15,5	1,28 (3H, s)	1, 5, 9, 10
20	119,8	130,0	-	-
21	142,0	171,3	-	-

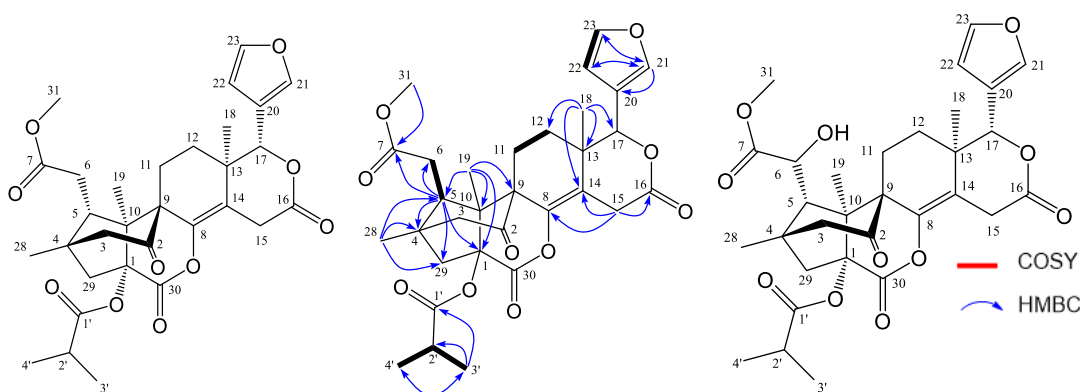
22	110,1	151,7	7,73 (1H, d, 1,0)	21, 23
23	143,2	70,6	4,93 br s	
28	14,4	14,6	0,81 (3H, s)	3, 4, 5, 29
29	38,5	39,1	1,80 (1H, m) 1,74 (1H, m)	
30	77,9	77,8	4,47 (1H, s)	
OMe-7	52,1	52,1	3,67 (3H, s)	
Orthoester				
1'	122,9	122,8		-
2'	35,5	35,7	1,92 (1H, m)	-
3'	23,6	23,7	1,71 (1H, m) 1,14 (1H, m)	-
4'	11,4	11,7	0,92 (3H, t, 7,5)	2', 3'
5'	13,1	13,4	1,02 (3H, d, 7,0)	1', 2', 3'
Tiglate				
1''	168,1	168,2	-	-
2''	130,0	129,7	-	-
3''	139,9	140,1	7,07 (1H, dd, 1,5, 7,0)	1'', 5''
4''	14,2	14,5	1,76 (3H, d, 7,0)	2'', 3''
5''	12,3	12,5	1,87 (3H, s)	1'', 2'', 3''

* swietephragmin C [130]

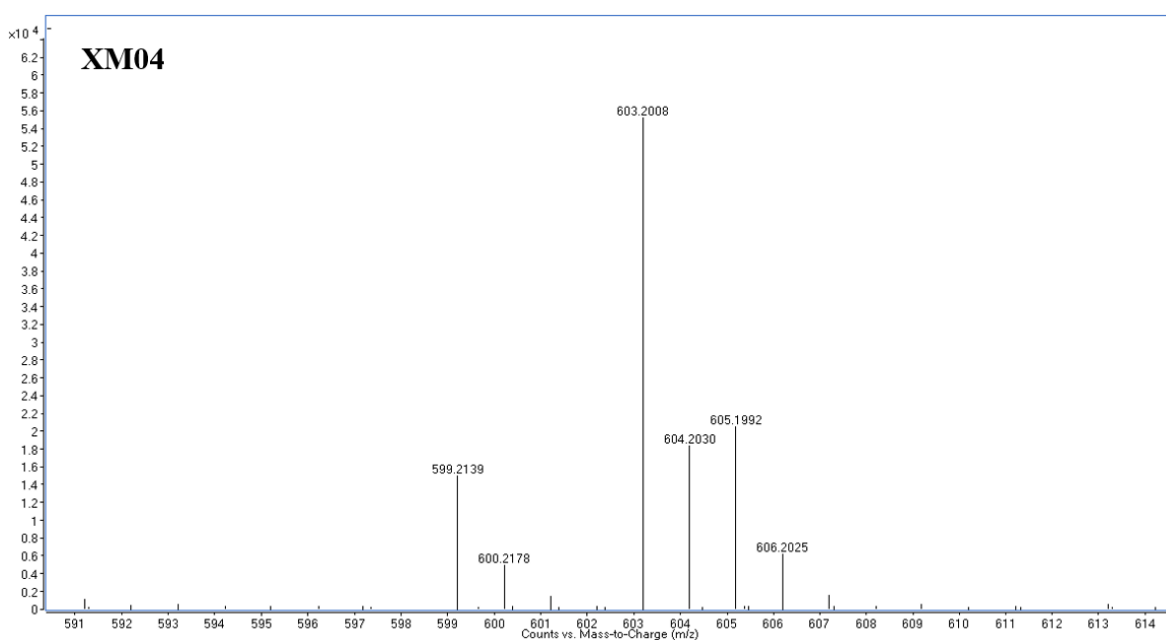
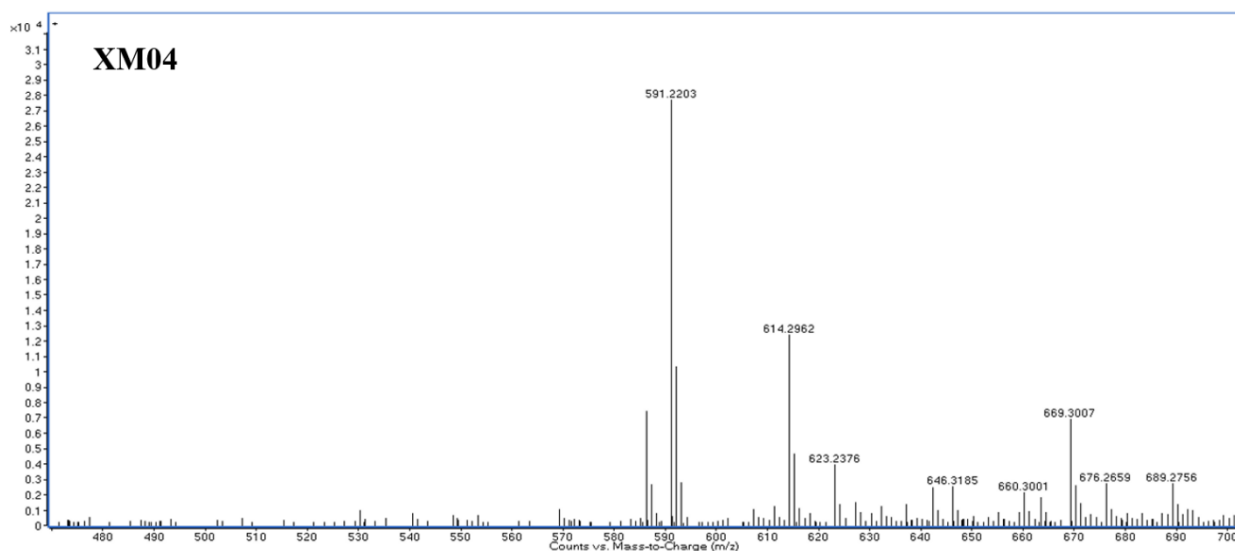
^a đo trong CDCl₃, ^b 125 MHz, ^c 500 MHz, ^d 150 MHz

3.1.4. Hợp chất XM04 – chất mới

Hợp chất **XM04** (Hình 3.10) thu được dưới dạng chất bột vô định hình màu trắng. Phổ khối phân giải cao HRMS (chế độ âm) xuất hiện peak ion âm tại m/z 603,2008 [M + Cl]⁻ (hình 3.11) (tính toán theo lý thuyết ứng với công thức ion giả phân tử C₃₁H₃₆O₁₀Cl⁻, m/z 603,2002; (chế độ dương) peak ion dương tại m/z 591,2203 [M + Na]⁺ (tính toán theo lý thuyết ứng với công thức ion giả phân tử C₃₁H₃₆O₁₀Na⁺, m/z 591,2201) (hình 3.11). Kết hợp với phổ ¹H-NMR và ¹³C-NMR xác định hợp chất **XM01** có công thức phân tử C₃₁H₃₆O₁₀, khối lượng phân tử 568,6190.



Hình 3.10. Cấu trúc và tương tác HMBC và COSY trên của hợp chất **XM04**

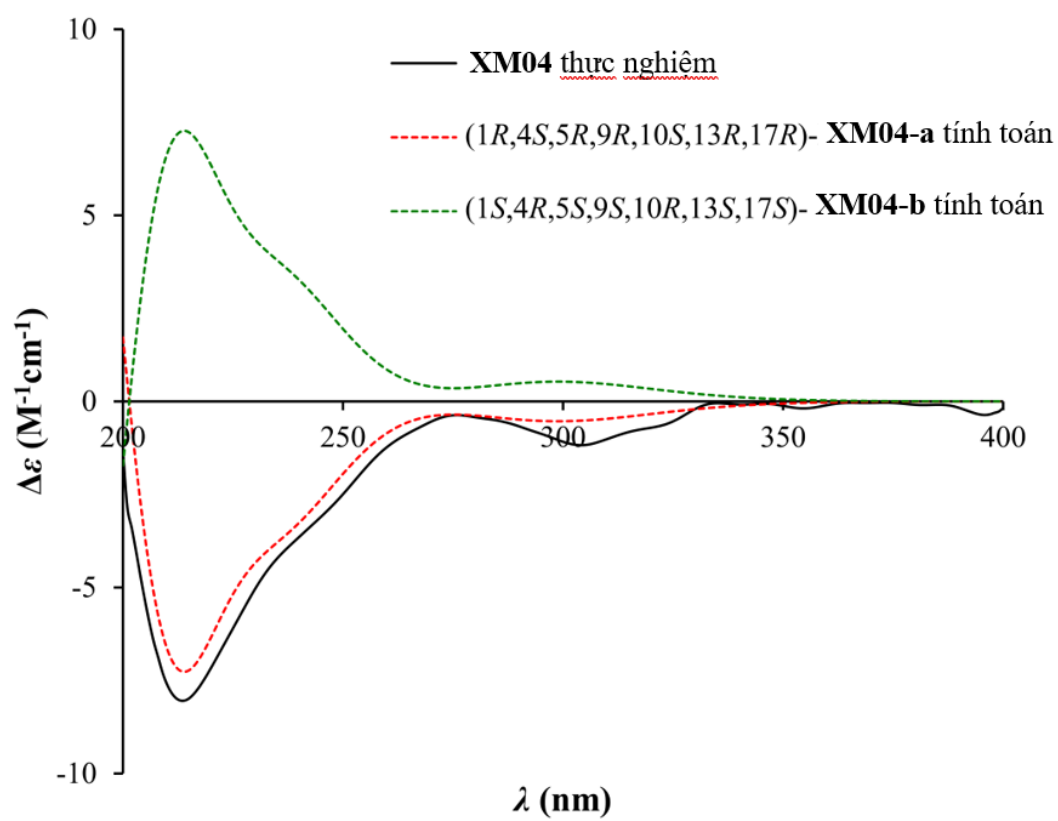


Hình 3.11. Phổ khối phân giải cao HRMS của hợp chất **XM04**

Phổ ¹H-NMR (Phụ lục 2, hình PL22) cho các tín hiệu cộng hưởng trên vùng trường thấp ghi nhận ba proton olefin tại δ_H 7,46 (1H, d, $J = 1,0$ Hz), 6,39 (1H, d, $J = 1,0$ Hz) và 7,41 (1H, t, $J = 1,5$ Hz). Dịch chuyển về phía vùng trường mạnh hơn, Phổ cho thấy một proton nhóm oxymethine tại δ_H 5,14 (1H, s), cùng hai proton của nhóm methylene cạnh nhóm ketone tại δ_H 3,61 (1H, d, $J = 22,0$ Hz) và 3,78 (1H, d, $J = 22,0$ Hz); Ngoài ra một nhóm methyl ester tại δ_H 3,74 (3H, s). Vùng trường mạnh xuất hiện năm nhóm methyl tại δ_H 1,06 (3H, s), 1,03 (3H, s), 1,09 (3H, s), 1,20 (3H, d, $J = 7,0$ Hz) và 1,22 (3H, d, $J = 7,0$ Hz). Còn lại là những tín hiệu của các nhóm methylene, methine thông thường dao động trong vùng trường δ_H 2,84 -1,84 ppm.

Phổ ¹³C-NMR (Phụ lục 2, hình PL23) kết hợp phổ HSQC (Phụ lục 2, hình PL24), cho thấy hợp chất **XM04** gồm 31 nguyên tử carbon. Tại vùng trường thấp quan sát thấy một nhóm ketone tại δ_C 205,9 ppm, bốn carboxyl tại δ_C 173,5, 169,1,

165,5 và 175,7 ppm; sáu tín hiệu của 3 liên kết đôi tại δ_C 140,1/119,4, 119,8/141,2 và 109,8/142,1 ppm; một tín hiệu nhóm oxymethine tại δ_C 80,7 ppm; một carbon oxygenate tại δ_C 84,9 ppm; một tín hiệu nhóm methyl ester tại δ_C 52,2 ppm. Vùng trường mạnh xuất hiện năm nhóm methyl tại δ_C 16,8; 15,7; 23,0; 18,6 và 18,8 ppm. Vị trí các liên kết đôi, các nhóm thế trên phân tử được xác định dựa trên phổ HMBC (Phụ lục 2, hình PL25). Nhóm methyl ester được xác định thế vào vị trí C-7 dựa trên tương tác giữa H-31 (δ_H 3,74) lên C-7 (δ_C 173,5). Phân tích đồng thời các phổ HMBC và COSY (hình 3.10), kết hợp đối chiếu dữ liệu phổ của hợp chất **XM04** (Bảng 3.4) với hợp chất có ký hiệu **3a** [131] trong tài liệu đã công bố cho thấy tại vị trí C-1 tồn tại nhóm thế isobutyryl. Tuy nhiên, nguyên tử carbon oxymethine tại vị trí C-6 trong limonoid **3a** đã được thay thế bằng một nhóm methylene [δ_H 2.57 (dd, 7.5, 16.5) và 2.51 (dd, 6.0, 16.5); δ_C 31.9] ở hợp chất **4**; điều này được xác nhận bởi tín hiệu tương tác chéo COSY giữa H-5 và H-6 (hình 3.10, (Phụ lục 2, PL26). Như thể hiện trong Hình 3, H-11a được xác định có định hướng trục (axial) dựa trên hằng số ghép cặp lân cận lớn ($J = 14,5$ Hz) và được quy ước là có định hướng α . Các tương tác NOESY (Phụ lục 2, hình PL27 và hình PL28) giữa H-11a/H3-19, H-11a/H3-18, H-11a/H-12b và H-12a/H-17 cho thấy các nhóm Me-19, Me-18 và H-12b có định hướng α , trong khi H-12a và H-17 có định hướng β . Trong vòng cyclohexanone, tương tác NOESY kiểu 1,3-diaxial (tương tác giữa các nhóm ở vị trí trục cách nhau một nguyên tử) quan sát được giữa H-11b và H-5 đã xác định cấu hình tương đối tại C-5 và C-9 lần lượt là *5R* và *9R*. Cấu hình tương đối tại vị trí C-4 được xác định là *4S* dựa trên các tín hiệu tương tác NOESY giữa H3-28/H-5, H3-28/H-3a và H3-28/H-3b. Giá trị độ dịch chuyển hóa học tại C-1 của hợp chất **4** (δ_C 84,9) gần như tương đồng với hợp chất **3a** (δ_C 85,0), cho thấy cả hai hợp chất đều có cùng cấu hình *1R*. Cuối cùng, cấu hình tuyệt đối của **XM04** được xác định là *1R*,4S*,5R*,9R*,10S*,13R*,17R** dựa trên sự phù hợp giữa phổ ECD thực nghiệm và phổ lý thuyết được tính toán ở mức $\omega B97XD/6-31+G(d,p)/IEFPCM-MeOH$ (Hình 3.12). Kết quả cho thấy phổ ECD tính toán cho đồng phân (*1R*,4S*,5R*,9R*,10S*,13R*,17R**)-**XM04** -a phù hợp tốt với phổ ECD thực nghiệm (hình 3.3) cho phép xác định cấu hình tuyệt đối của hợp chất này là *1R*,4S*,5R*,9R*,10S*,13R*,17R**. Truy cập cơ sở dữ liệu theo nguồn Scifinder vào tháng 12/2025 cho thấy hợp chất **XM04** chưa được công bố. Với những phân tích dữ liệu phổ như trên, cấu trúc của hợp chất mới **XM04** đã được xác định và được đặt tên là Xylomoluccenoid D.



Hình 3.12. Phổ ECD thực nghiệm và tính toán lý thuyết của hợp chất **XM04**

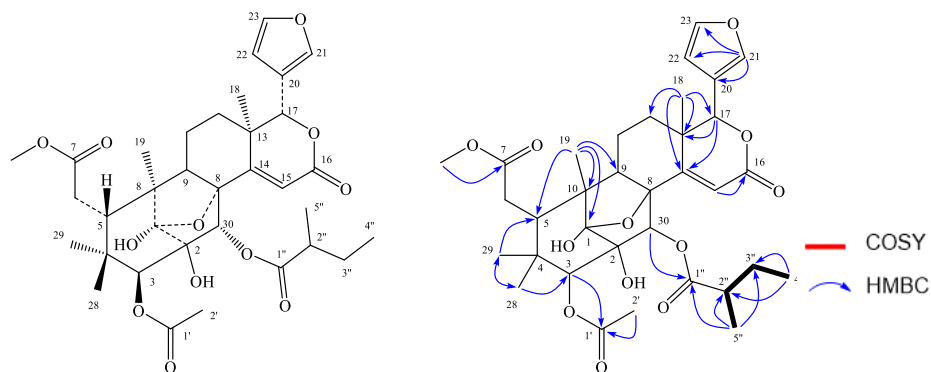
Bảng 3.4. Bảng số liệu phổ ^1H , ^{13}C -NMR của hợp chất **XM04**

XM04				
Vị trí C	$\delta_{\text{C}}^{\text{a,d}}$	$\delta_{\text{C}}^{\text{a,b}}$	$\delta_{\text{H}}^{\text{a,c}} (J = \text{Hz})$	HMBC
1	85,0	84,9	-	-
2	206,0	205,9	-	-
3	55,2	53,5	2,30 (1H, br d, 16,5) 2,82 (1H, dd, 2,5, 16,5)	2, 4, 29
4	41,1	41,6	-	-
5	54,1	49,3	2,79 (1H, br dd, 6,0, 7,0)	1, 3, 4, 6, 7, 29
6	69,6	31,9	2,51 (1H, dd, 6,0, 16,5) 2,57 (1H, dd, 7,5, 16,5)	4, 5, 7, 10
7	174,5	173,5	-	-
8	140,0	140,1	-	-
9	58,5	57,9	-	-
10	54,5	54,9	-	-
11	23,5	23,3	1,85 (1H, ddd, 3,5, 3,5, 14,5) 2,16 (1H, ddd, 3,5, 14,5, 14,5)	-
12	27,4	27,3	1,20 (1H, m) 1,32 (1H, m)	-
13	37,8	37,8	-	-
14	119,6	119,4	-	-
15	29,1	29,1	3,61 (1H, d, 22,0) 3,78 (1H, d, 22,0)	8, 14, 16
16	169,1	169,1	-	-
17	80,7	80,7	5,14 (1H, s)	18, 20, 21, 22
18	16,8	16,8	1,06 (3H, s)	12, 13, 14, 17
19	15,4	15,7	1,03 (3H, s)	1, 5, 9, 10
20	119,7	119,8	-	-
21	141,1	141,2	7,46 (1H, d, 1,0)	20, 22, 23
22	109,7	109,8	6,39 (1H, d, 1,0)	20, 21, 23
23	143,1	143,1	7,41 (1H, t, 1,5)	20, 21, 22
28	21,7	23,0	1,09 (3H, s)	3, 4, 5, 29
29	51,8	50,3	2,30 (1H, br d, 16,5) 2,45 (1H, dd, 2,5, 16,5)	1, 3, 28, 30
30	166,1	165,5	-	-
31	53,3	52,2	3,74 (3H, s)	7
isobutyryl				-
1'	176,0	175,7	-	-
2'	33,9	33,8	2,61 (1H, m)	1', 3'
3'	18,6	18,6	1,20 (3H, d, 7,0)	1', 2', 4'
4'	18,7	18,8	1,22 (3H, d, 7,0)	1', 2', 3'

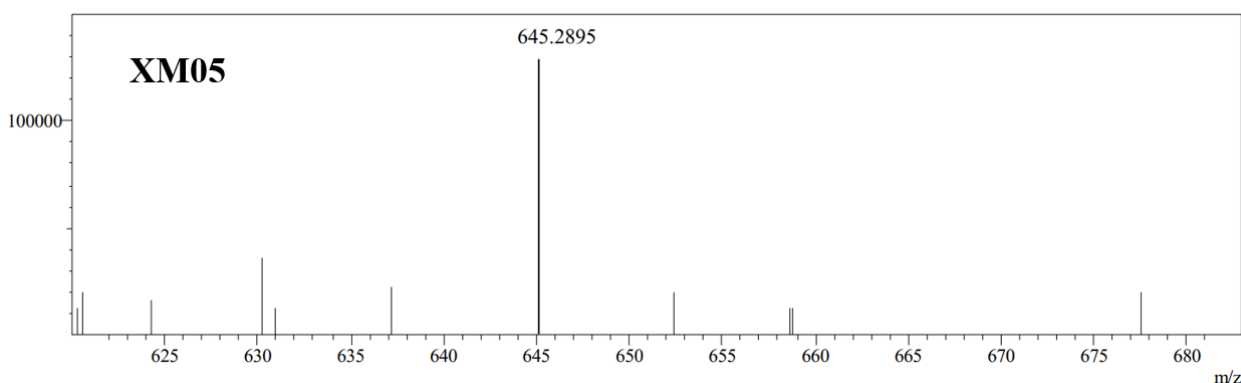
δ_{C} tham khảo của chất 3a [131]; ^a Đo trong CDCl_3 ; ^b 125MHz; ^c 500MHz; ^d 100MHz

3.1.5. Hợp chất XM05

Hợp chất **XM05** (Hình 3.13) thu được dưới dạng chất bột vô định hình, màu trắng. Phổ khối phân giải cao HRMS (Hình 3.14) xuất hiện pic ion dương tại m/z 645,2895 $[\text{M} + \text{H}]^+$ (tính toán theo lý thuyết ứng với công thức ion giả phân tử $\text{C}_{34}\text{H}_{45}\text{O}_{12}^+$, m/z 645,2906). Kết hợp với phổ ^1H -NMR và ^{13}C -NMR xác định hợp chất **XM05** có công thức phân tử $\text{C}_{34}\text{H}_{44}\text{O}_{12}$, khối lượng phân tử 644,2833.



Hình 3.13. Cấu trúc và tương tác HMBC và COSY của hợp chất **XM05**



Hình 3.14. Phổ khối phân giải cao HRMS của hợp chất **XM05**

Dựa trên phổ ^1H -NMR (Phụ lục 2, hình PL29), ^{13}C -NMR (Phụ lục 2, hình PL30), HSQC (Phụ lục 2, hình PL31) và HMBC (Phụ lục 2, hình PL32) cho thấy hợp chất chứa 34 nguyên tử carbon. Trong đó 26 tín hiệu carbon của khung chất limonoid: Bốn tín hiệu đặc trưng của các nhóm methyl [δ_{H} 1,21/ δ_{C} 19,5 (C-18), δ_{H} 1,04/ δ_{C} 20,7 (C-19), δ_{H} 0,87/ δ_{C} 24,3 (C-28), δ_{H} 1,30/ δ_{C} 21,6 (C-29)]. Cộng hưởng trên vùng trường yếu xuất hiện hai tín hiệu của nhóm carboxyl tại δ_{C} 173,8 và 163,1 ppm; sáu tín hiệu của ba liên kết đôi [δ_{C} 158,4/118,4, 119,9/141,3 và 109,9/143,0 ppm]. Về phía vùng mạnh hơn là các tín hiệu của carbon liên kết trực tiếp với nguyên tử oxy tại δ_{C} 108,5, 81,1, 82,5, 80,3, 81,4 và 75,2 ppm. Ngoài ra còn có các nhóm thế: Một nhóm oxymethyl tại δ_{H} 3,69/ δ_{C} 52,1, một nhóm acetyl tại [δ_{C} 171,3 (C-1'), δ_{H} 2,02/ δ_{C} 20,8 (C-2')]; một nhóm thế (2-methyl-propanoyl)- [δ_{C} 175,0 (C-1''), δ_{H} 2,36/ δ_{C} 40,9 (C-2''), δ_{H} 1,44 và 1,63/ δ_{C} 26,6 (C-3''), δ_{H} 0,92/ δ_{C} 11,6 (C-4''), δ_{H} 1,09/ δ_{C} 16,1 (C-5'')]. Hợp chất có khung limonoid là lớp chất điển hình của chi *Xylocarpus*. Với những phân tích dữ liệu phổ như trên và khi so sánh dữ liệu phổ của hợp chất **XM05** (Bảng 3.5) với hợp chất Xylomolin S [20] cho thấy chúng tương đồng. Vậy hợp chất **XM05** được xác định là Xylomolin S.

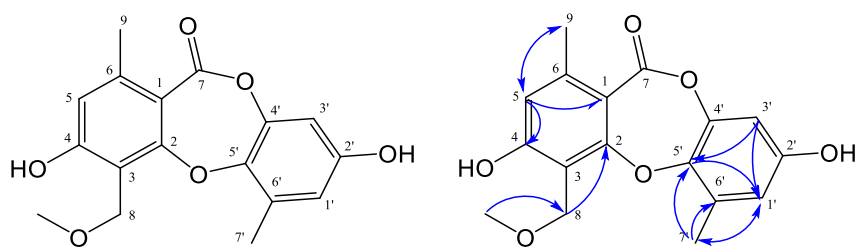
Bảng 3.5. Bảng số liệu phổ ^1H , ^{13}C -NMR và HMBC của hợp chất **XM05**

Vị trí C	XM05		
	$\delta_{\text{C}}^{\text{a,d}}$	$\delta_{\text{C}}^{\text{a,b}}$	$\delta_{\text{H}}^{\text{a,c}}$ ($J = \text{Hz}$)
1	108,5	108,5	
2	81,1	81,1	
3	82,5	82,5	4,84 (1H, s)
4	38,6	38,4	
5	40,4	40,3	2,67 (1H, dd, 1,5, 10,0)
6	32,0	31,9	2,17 (1H, m); 2,35 (1H, m)
7	174,0	173,8	
8	80,4	80,3	
9	51,5	51,5	2,20 (1H, m)
10	42,3	42,3	
11	15,2	15,1	1,82 (1H, m); 2,36 (1H, m)
12	25,3	25,2	1,41 (1H, m); 1,98 (1H, m)
13	39,1	39,0	
14	158,6	158,4	
15	118,4	118,4	6,06 (1H, s)
16	163,3	163,1	
17	81,5	81,4	4,89 (1H, s)
18	19,6	19,5	1,21 (3H, s)
19	20,8	20,7	1,04 (3H, s)
20	120,0	119,9	-
21	141,1	141,3	7,48 (1H, t, 1,0)
22	110,0	109,9	6,40 (1H, dd, 1,0, 1,5)
23	143,1	143,0	7,41 (1H, t, 1,5)
28	24,4	24,3	0,87 (3H, s)
29	21,7	21,6	1,30 (3H, s)
30	75,2	75,2	5,64 (1H, s)
OMe-7	52,1	52,0	3,69 (3H, s)
3-OAc			
1'	171,3	171,1	
2'	21,0	20,8	2,02 (3H, s)
(2-methyl propanoyl)-30			
1''	175,0	175,0	
2''	41,1	40,9	2,36 (1H, m)
3''	26,8	26,6	1,44 (1H, m); 1,63 (1H, m)
4''	11,7	11,6	0,92 (3H, t, 7,5)
5''	16,3	16,1	1,09 (3H, d, 7,0)
1-OH			4,62 (1H, brs)
2-OH			3,94 (1H, brs)

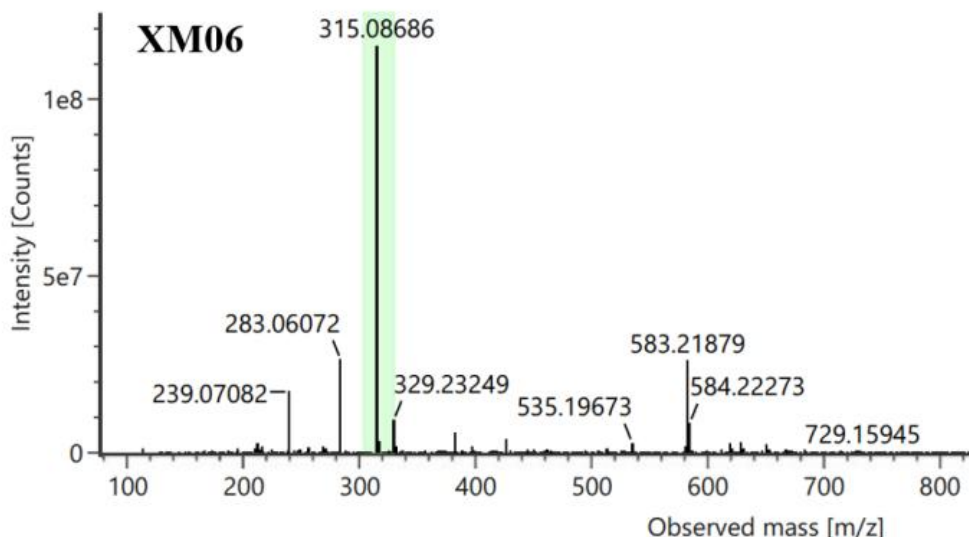
^{a,d} tham khảo chất xylomolin S [20] ; ^a đo trong CDCl_3 , ^b 125 MHz, ^c 500 MHz, ^d 100 MHz

3.1.6. Hợp chất XM06

Hợp chất **XM06** (Hình 3.15) thu được dưới dạng chất bột vô định hình, màu trắng. Phổ khối phân giải cao HRMS (Hình 3.16) xuất hiện pic ion âm tại m/z 315,0868 [$\text{M} + \text{H}$]⁻ (tính toán theo lý thuyết ứng với công thức ion giả phân tử $\text{C}_{17}\text{H}_{15}\text{O}_6^-$, m/z 315,0874) từ đó xác định được hợp chất **XM06** có công thức phân tử tương ứng $\text{C}_{17}\text{H}_{16}\text{O}_6$. Kết hợp phổ ^1H -NMR và ^{13}C -NMR xác định hợp chất **XM06** có công thức phân tử $\text{C}_{17}\text{H}_{16}\text{O}_6$, khối lượng phân tử 316,0947.



Hình 3.15. Cấu trúc và tương tác HMBC của hợp chất **XM06**



Hình 3.16. Phổ khối phân giải cao HRMS của hợp chất **XM06**

Xét trên phổ ^1H -NMR (Phụ lục 2, Hình PL33) thấy xuất hiện ba tín hiệu proton olefin cộng hưởng tại δ_{H} 6,69, 6,51 và 6,52 ppm. Một tín hiệu oxymethyl tại δ_{H} 3,41 ppm, một tín hiệu oxymethylene tại δ_{H} 4,77 ppm. Về phía vùng trường mạnh là hai tín hiệu của nhóm methyl cộng hưởng tại δ_{H} 2,37 và 2,42 ppm.

Phổ ^{13}C -NMR (Phụ lục 2, hình PL34) kết hợp phổ HSQC (Phụ lục 2, hình PL35) cho thấy hợp chất **XM06** chứa 17 nguyên tử carbon. Dựa trên phổ HMBC (Phụ lục 2, hình PL36) cho biết được nhóm thế oxymethyl tại C-8, Các nhóm methyl thế tại C-6 và C-6' tương tác HMBC (Hình 3.15) và cấu trúc phẳng của hợp chất cũng được xác định. Hợp chất là dẫn xuất của botryorhodine [132].

Với những phân tích dữ liệu phổ trên và so sánh (Bảng 3.6) với tài liệu tham khảo đã công bố xác định được hợp chất **XM06** là 1*H*-Dibenzo[b,e][1,4]dioxepin-11-one,3,8-dihydroxy-4-(methoxymethyl)-1,6-dimethyl [133]. Đây là lần đầu tiên hợp chất này được phân lập từ chi Xu.

Bảng 3.6. Bảng số liệu phổ ^1H , ^{13}C -NMR và HMBC của hợp chất **XM06**

Vị trí C	$^*\delta_{\text{C}}^{\text{d,e}}$	XM06		
		$\delta_{\text{C}}^{\text{a,b}}$	$\delta_{\text{H}}^{\text{a,c}}, (J = \text{Hz})$	HMBC (H $\rightarrow$ C)
1	113,8	113,8	-	-
2	162,8	162,4	-	-
3	117,1	114,1	-	-
4	162,4	161,8	-	-
5	116,2	116,2	6,69 (1H, s)	1, 4, 9
6	145,8	145,4	-	-
7	165,9	163,7	-	-
8	54,8	64,3	4,77 (2H, s)	2, 3, 4
9	21,4	21,2	2,37 (3H, s)	1, 5, 6
1'	113,9	114,8	6,51 (1H, br s)	7', 3', 5'
2'	144,5	145,7	-	-
3'	135,1	105,8	6,52 (1H, br s)	1', 5'
4'	135,5	145,4	-	-
5'	144,4	143,1	-	-
6'	120,6	132,5	-	-
7'	16,4	16,6	2,42 (3H, s)	1', 5', 6'
8-OCH ₃	-	58,4	3,41 (3H, s)	8

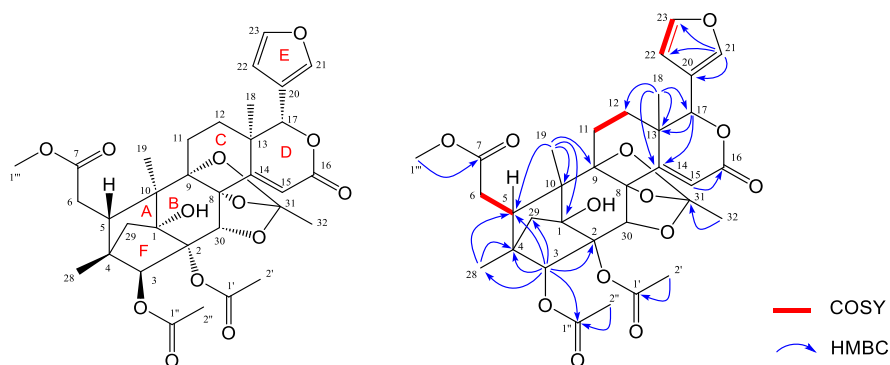
$^*\delta_{\text{C}}$ của hợp chất botryorhodine I [133]

^a đo trong acetone- d_6 , ^b 125 MHz, ^c 500 MHz,

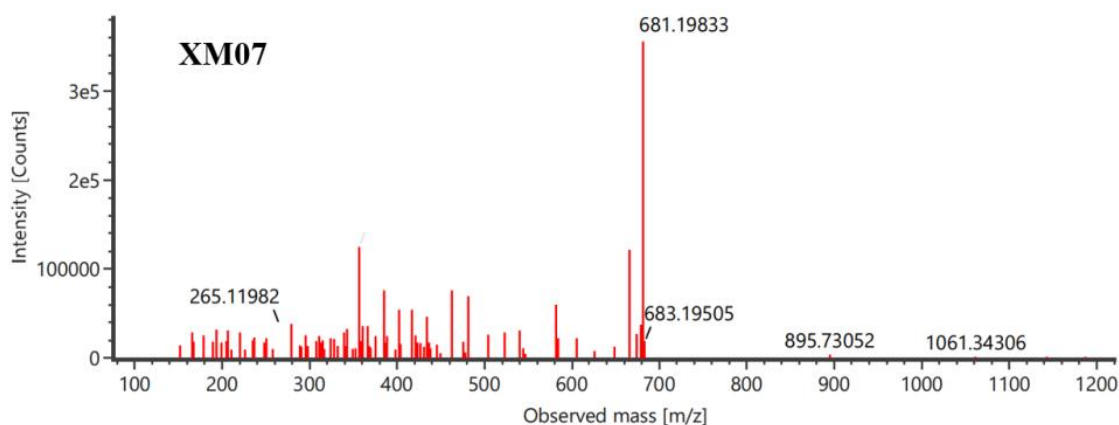
^d đo trong CD_3OD , ^e 150 MHz,

3.1.7. Hợp chất XM07

Hợp chất **XM07** (Hình 3.17) thu được dưới dạng chất bột vô định hình, màu trắng. Phổ khối phân giải cao HR-MS xuất hiện pic ion dương tại m/z 681,1983 $[\text{M} + \text{K}]^+$ (Hình 3.18), (tính toán lý thuyết cho ion phân tử $\text{C}_{33}\text{H}_{38}\text{O}_{13}\text{K}^+$ cho số khối tương ứng là 681,1944). Kết hợp với phổ ^1H -NMR và ^{13}C -NMR xác định hợp chất **XM07** có công thức phân tử $\text{C}_{33}\text{H}_{38}\text{O}_{13}$, khối lượng phân tử 642,2312.



Hình 3.17. Cấu trúc hợp chất **XM07** và các tương tác COSY, HMBC



Hình 3.18. Phổ khối phân giải cao HRMS của hợp chất **XM07**

Phổ ^1H -NMR (Phụ lục 2, Hình PL37) cho các tín hiệu singlet của sáu nhóm methyl (δ_{H} 0,74–2,16), một nhóm methoxy (δ_{H} 3,68), ba nhóm oxymethine (δ_{H} 5,25, 5,37 và 5,77) và bốn proton olefin (δ_{H} 6,43, 6,58, 7,41 và 7,45).

Phổ ^{13}C NMR (Phụ lục 2, Hình PL38) và HSQC (Phụ lục 2, Hình PL39) của hợp chất này cho thấy sự có mặt của 33 carbon, gồm bảy nhóm methyl, bốn nhóm methylene, tám nhóm methine và mười bốn carbon không liên kết với hydro. Trong số đó có bốn nhóm carbonyl ester (δ_{C} 173,38, 170,46, 169,25 và 163,98), sáu carbon olefin (δ_{C} 109,97–154,32), bảy carbon sp^3 có liên kết với oxy (δ_{C} 74,21–86,26) và một nhóm oxymethyl (δ_{C} 52,19). Ngoài ra tín hiệu cộng hưởng tại δ_{C} 119,62 có thể gán cho một carbon sp^3 liên kết với ba nguyên tử oxy, thuộc một gốc trioxyethyl rất đặc trưng cho các hợp chất limonoid từ chi *Xylocarpus*, được nhận dạng từ tương tác HMBC giữa Me-32 (δ_{H} 2,16) với C-31 (δ_{C} 119,62). Từ các phân tích nêu trên, kết hợp với các tài liệu đã công bố từ chi *Xylocarpus*, cho phép nhận dạng hợp chất **XM07** là Moluccensin Y [53] (một hợp chất phragmalin limonoid phân lập từ loài Xu nhỏ năm 2012), dựa trên sự phù hợp hoàn toàn các giá trị phổ NMR cũng như công thức phân tử $\text{C}_{33}\text{H}_{38}\text{O}_{13}$ giữa 2 hợp chất (bảng 3.7). Nhận định trên còn được khẳng định thêm bởi các tương tác quan sát được trên phổ HMBC (Phụ lục 2, Hình PL40), phổ COSY (Phụ lục 2, Hình PL41) và NOESY (Phụ lục 2, Hình PL42). Thật vậy, một số tương tác quan trọng cho phép xây dựng các mảnh phân tử cũng như xác định vị trí các nhóm thế, chẳng hạn tương tác COSY giữa H-22/H-23 và các tương tác HMBC giữa H-21 với C-20, C-22 và C-23, giữa H-17 với C-20, C-21 và C-22 chứng minh cấu trúc vòng furan và cho biết vòng này liên kết với C-17. Tương tác COSY giữa H-11 và H-12 và các tương tác HMBC giữa H-11 với C-8, C-9, giữa H-18 với C-12, C-13, C-14, C-17, giữa H-15 với C-13, C-14, C-16, C-8 khẳng định cấu trúc của các vòng C và D. Cấu trúc các vòng A, B và F cũng hoàn toàn phù hợp với các tương tác HMBC giữa H-28 với C-3, C-4, C-5, C-29, giữa H-19 với C-1, C-5, C-9, C-10, giữa

H-29 với C-4, C-5, C-1, C-2, C-10, giữa H-3 với C-2, C-29, C-30, giữa H-30 với C-2, C-8, C-9. Ngoài ra, nhóm methyl ester liên kết tại vị trí C-6 bởi các tương tác COSY giữa H-5/H-6 và các tương tác HMBC giữa H-6 và H-1''' với C-7. Cuối cùng, 2 nhóm O-acetyl liên kết tại vị trí C-2 và C-3 được khẳng định bởi sự chuyển dịch mạnh về phía trường yếu của C-2 (δ_C 83.94) và C-3 (δ_C 85.04) kết hợp với các tương tác HMBC giữa H-3 và H-2'' với C-1'' và giữa H-2' với C-1'. Với những phân tích dữ liệu phổ và so sánh với tài liệu tham khảo đã công bố thì xác định được hợp chất **XM07** (Hình 3.17) là Moluccensin Y.

Bảng 3.7. Dữ liệu phổ ^1H và ^{13}C NMR của **XM07**

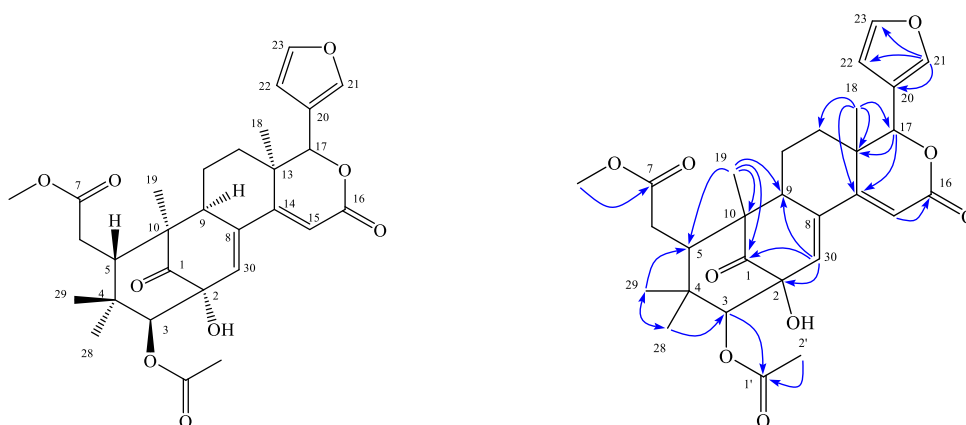
Vị trí C	$^*\delta_{\text{C}}^{\text{a,b}}$	XM07		
		$\delta_{\text{C}}^{\text{a,b}}$	$\delta_{\text{H}}^{\text{a,c}}$ ($J = \text{Hz}$)	HMBC ($\text{H} \rightarrow \text{C}$)
1	84,3	84,3	-	-
2	83,9	83,9	-	-
3	85,0	85,0	5,25 (1H, s)	5, 28, 29, 30
4	44,7	44,7	-	-
5	39,5	39,5	2,32 (1H, m)	7, 9, 19, 3
6	33,7	33,7	2,34 (1H, m)	4, 5, 7
7	173,4	173,4	-	-
8	84,0	84,0	-	-
9	86,3	86,3	-	-
10	48,0	48,0	-	-
11	26,5	26,5	1,93 (1H, m) 2,13 (1H, m)	
12	29,2	29,2	1,17 (1H, m) 1,51 (1H, m)	
13	38,0	38,0	-	-
14	154,4	154,3	-	
15	122,5	122,5	6,58 (1H, s)	13,14, 16
16	164,0	164,0	-	-
17	80,4	80,4	5,77 (1H, s)	13, 14, 18, 21
18	19,7	19,7	1,40 (3H, s)	12, 13, 14, 17
19	15,5	15,5	1,28 (3H, s)	1, 5, 9, 10
20	119,8	119,8		-
21	141,9	141,9	7,45(1H, s)	17, 22, 23
22	110,0	110,0	6,43 (1H, d, 1,5)	17, 21, 23
23	143,1	143,0	7,41(1H, t, 1,5)	20, 21, 22
28	14,5	14,5	0,74 (3H, s)	3, 4, 5, 29
29	39,5	39,5	1,70 (1H, m) 1,93 (1H, m)	3, 4, 5, 28
30	74,2	74,2	5,36 (1H, s)	1, 2, 9
31	119,6	119,6	-	-
32	16,6	16,6	2,16 (3H, s)	31
7-OCH ₃	52,2	52,2	3,68 (3H, s)	7
2-OAc				
1'	170,5	170,5	-	-
2'	21,9	21,9	2,16 (3H, s)	1'

3-OAc				
1''	169,3	169,3	-	-
2''	21,7	21,7	2,09 (3H, s)	1''

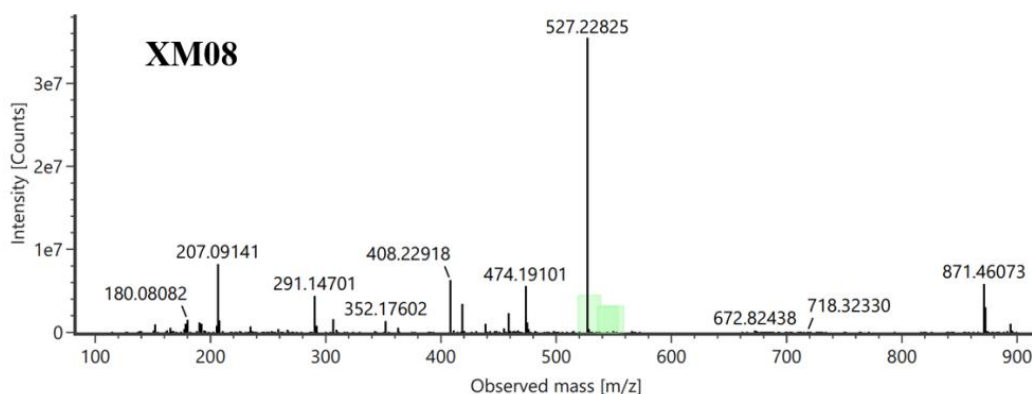
* δ_C của hợp chất moluccensin Y [46] ; ^ađo trong $CDCl_3$, ^b 125 MHz, ^c 500 MHz

3.1.8. Hợp chất XM08

Hợp chất **XM08** (Hình 3.19) thu được dưới dạng chất bột vô định hình, màu trắng. Phổ khối phân giải cao HR-MS xuất hiện pic ion dương phân tử tại m/z 527,2282 $[M + H]^+$ (Hình 3.20), (tính toán lý thuyết cho ion phân tử $C_{29}H_{35}O_9^+$ cho số khối tương ứng là 527,2276). Kết hợp với phổ 1H -NMR và ^{13}C -NMR xác định hợp chất **XM08** có công thức phân tử $C_{29}H_{34}O_9$ và khối lượng phân tử 526,2203.



Hình 3.19. Cấu trúc và tương tác HMBC của hợp chất **XM08**



Hình 3.20. Phổ khối phân giải cao HRMS của hợp chất **XM08**

Dựa trên phổ 1H (Phụ lục 2, Hình PL43), ^{13}C -NMR (Phụ lục 2, Hình PL44) và HSQC (Phụ lục 2, Hình PL45) cho thấy hợp chất chứa 29 nguyên tử carbon. Trong đó xuất hiện một số tín hiệu đặc trưng: Bốn tín hiệu đặc trưng của các nhóm methyl [δ_H 1,06/ δ_C 22,6 (C-18), δ_H 1,25/ δ_C 15,7 (C-19), δ_H 0,70/ δ_C 21,9 (C-28), δ_H 0,80/ δ_C 21,0 (C-29)], một nhóm oxymethyl tại δ_H 3,64/ δ_C 52,1, một nhóm acetyl tại [δ_C 170,5 (C-1'), δ_H 2,22/ δ_C 20,7 (C-2')]. Hợp chất có khung limonoid – là lớp chất điển hình của chi *Xylocarpus*. Hợp chất có chứa nhóm thế acetyl tại vị trí C-3 của khung chất dựa trên phổ HMBC (Phụ lục 2, Hình PL46): H-3 (δ_H 5,00) tương tác với C-1' (δ_C

170,5). Tương tự các nhóm gem-dimethyl, nhóm methyl, nhóm hidroxy và nhóm ketone cũng được xác định vị trí dựa trên tương tác HMBC (hình 3.46). Khi so sánh dữ liệu phổ của hợp chất **XM08** (Bảng 3.8) với hợp chất Swietmanin H cho thấy chúng tương đồng. Vậy hợp chất **XM08** (Hình 3.19) được xác định là Swietmanin H [134]. Đây là lần đầu tiên hợp chất này được phân lập từ chi Xu.

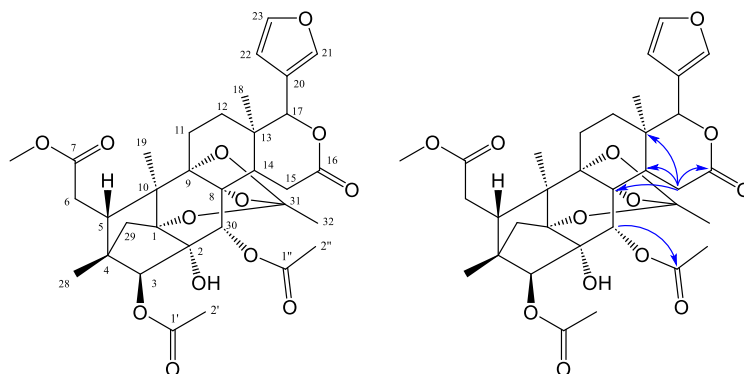
Bảng 3.8. Bảng số liệu phổ ^1H , ^{13}C -NMR và HMBC của hợp chất **XM08**

Vị trí C	$^*\delta_{\text{C}}^{\text{d,e}}$	XM08		
		$\delta_{\text{C}}^{\text{a,b}}$	$\delta_{\text{H}}^{\text{a,c}} (J = \text{Hz})$	HMBC (H $\rightarrow$ C)
1	212,6	213,2	-	-
2	77,0	78,6	-	-
3	85,7	86,4	5,00 (1H, s)	5, 28, 29, 30
4	39,4	40,4	-	-
5	40,6	41,39	3,20 (1H, dd, 2,0, 9,5)	7, 9, 19, 3
6	32,7	33,2	2,42 (2H, m)	4, 5, 7
7	173,4	174,2	-	-
8	134,3	135,3	-	-
9	53,9	54,5	2,32 (1H, dt, 3,0, 12,5)	10, 12, 30
10	52,5	53,1	-	-
11	22,0	22,3	1,90 (1H, m) 1,52 (1H, dd, 5,0, 12,5)	
12	32,5	33,2	1,31 (1H, m) 2,05 (1H, m)	
13	37,4	38,2	-	-
14	160,0	160,5	-	-
15	113,3	113,6	6,37(1H, s)	13,14, 16
16	164,7	164,8	-	-
17	79,6	80,1	5,33 (1H, s)	13, 14, 18, 21
18	22,6	22,6	1,06 (3H, s)	12, 13, 14, 17
19	15,5	15,7	1,25 (3H, s)	1, 5, 9, 10
20	120,0	121,7	-	-
21	141,4	142,9	7,76 (1H, t, 1,0)	17, 22, 23
22	110,1	111,3	6,62 (1H, d, 1,5)	17, 21, 23
23	143,2	144,1	7,66 (1H, t, 1,5)	20, 21, 22
28	21,5	21,9	0,70 (3H, s)	3, 4, 5, 29
29	20,6	21,0	0,81 (3H, s)	3, 4, 5, 28
30	132,8	134,4	6,47 (1H, d, 3,0)	1, 2, 9
7-OCH ₃	52,1	52,1	3,64 (3H, s)	7
3-OAc				
1'	170,2	170,5	-	-
2'	20,8	20,7	2,22 (3H, s)	1'

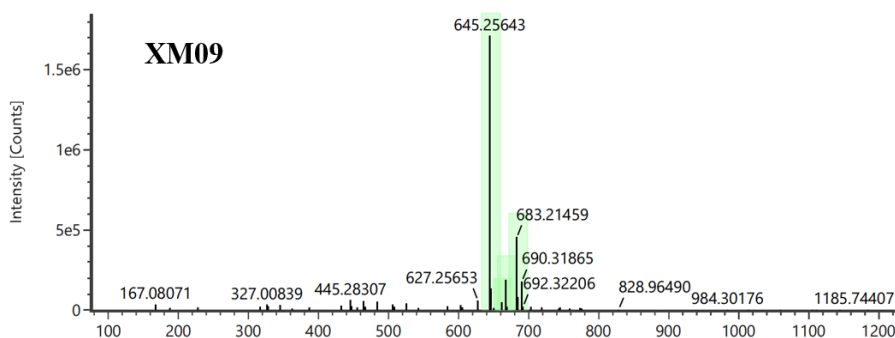
$^*\delta_{\text{C}}$ của hợp chất Swietmanin H; a đo trong acetone- d_6 , b 125 MHz, c 500 MHz, d đo trong CDCl_3 , e 100 MHz.

3.1.9. Hợp chất XM09

Hợp chất **XM09** (Hình 3.21) thu được dưới dạng bột kết tinh màu trắng (dạng vô định hình). Phổ khối phân giải cao HRMS xuất hiện pic ion dương tại m/z 645,2564 $[M + H]^+$ (Hình 3.22) (tính toán lý thuyết cho ion phân tử $C_{33}H_{41}O_{13}^+$ cho số khối tương ứng là 645,2542). Kết hợp với phổ 1H -NMR và ^{13}C -NMR xác định hợp chất **XM09** có công thức phân tử $C_{33}H_{40}O_{13}$ và khối lượng phân tử 644,2469.



Hình 3.21. Cấu trúc và tương tác HMBC của hợp chất **XM09**



Hình 3.22. Phổ khối phân giải cao HRMS của hợp chất **XM09**

Phân tích chi tiết các phổ phổ 1H -NMR (Phụ lục 2, Hình PL47) và ^{13}C -NMR (Phụ lục 2, Hình PL48) và phổ HSQC (Phụ lục 2, Hình PL49) cho thấy **XM09** có cấu trúc hoàn toàn tương tự với **XM07**. Tuy nhiên liên kết đôi ở vị trí C-14/C-15 ở **XM07** đã được thay thế bằng liên kết đơn trong phân tử **XM09** với các tín hiệu (δ_C 42,87, C-14) và (δ_C 26,63, C-15) bị dịch chuyển mạnh về vùng trường mạnh. Điều này còn được khẳng định thêm bằng các tương tác trên phổ HMBC (Hình 3.21) của **XM09** giữa H_2 -15 với C-8, C-13, C-14 và C-16. Ngoài ra, phổ HMBC (Phụ lục 2, Hình PL50) của **XM09** xuất hiện tương tác giữa H-30 với C-1" cho thấy C-30 liên kết với nhóm acetyl, thay vì liên kết trực tiếp với gốc trioxyethyl như trong phân tử **XM07**. Độ chuyển dịch hóa học của vị trí C-1 (δ_C 87,14) của **XM09** bị dịch chuyển nhiều hơn về phía trường yếu so với vị trí C-1 (δ_C 84,33) của hợp chất **XM07** gợi ý cho thấy C-1 có thể liên kết với gốc trioxyethyl. Cuối cùng, so sánh dữ liệu phổ MS và NMR

của **XM09** với các hợp chất limonoid đã công bố cho thấy sự phù hợp hoàn toàn với dữ liệu phổ của hợp chất 3,30-Diacetylphragmalin (Bảng 3.9) cho phép nhận dạng **XM09** là 3,30-Diacetylphragmalin [80], [81].

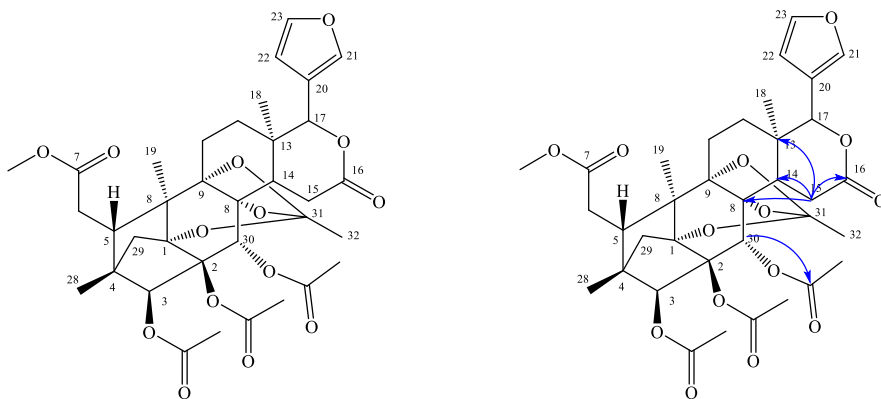
Bảng 3.9. Dữ liệu phổ ^1H và ^{13}C NMR của **XM09**

C	$^*\delta_{\text{C}}^{\text{a,d}}$	XM09		
		$\delta_{\text{C}}^{\text{a,b}}$	$\delta_{\text{H}}^{\text{a,c}}$ ($J = \text{Hz}$)	HMBC ($\text{H} \rightarrow \text{C}$)
1	87,2	87,1	-	-
2	79,4	79,4	-	-
3	83,4	83,3	4,64 (1H, s)	5, 28, 29, 30
4	45,4	45,3	-	-
5	36,4	36,4	2,96 (1H, dd, 2,0, 9,5)	7, 9, 19, 3
6	33,5	33,5	2,24 (1H, dd, 2,0, 16,0) 2,467 (1H, dd, 9,5, 16,0)	4, 5, 7
7	172,8	172,7	-	-
8	86,2	86,1	-	-
9	85,6	85,6	-	-
10	45,3	45,3	-	-
11	25,3	25,3	1,66 (1H, m) 2,06 (1H, m)	
12	29,2	29,2	1,29 (1H, m) 1,55 (1H, m)	
13	34,4	34,4	-	-
14	42,9	42,9	2,06 (1H, m)	
15	26,7	26,6	2,69 (1H, dd, 10,0, 20,0) 3,24 (1H, d, 20,0)	13,14, 16
16	170,8	170,3	-	-
17	78,8	78,7	5,49 (1H, s)	13, 14, 18, 21
18	19,7	19,7	1,07 (3H, s)	12, 13, 14, 17
19	16,2	16,20	1,13 (3H, s)	1, 5, 9, 10
20	121,2	121,1	-	-
21	140,7	140,6	7,51 (1H, s)	17, 22, 23
22	109,7	109,6	6,45 (1H, d, 1,5)	17, 21, 23
23	143,1	143,1	7,41 (1H, t, 1,5)	20, 21, 22
28	14,5	14,5	0,90 (3H, s)	3, 4, 5, 29
29	39,4	39,4	1,74 (1H, d, 11,0) 1,89 (1H, d, 11,0)	3, 4, 5, 28
30	71,2	71,2	5,92 (1H, s)	1, 2, 9
31	119,1	119,0	-	-
32	21,1	21,1	1,66 (3H, s)	
7-OCH ₃	52,1	52,0	3,70 (3H, s)	7
1'	170,3	170,8	-	-
2'	21,2	21,3	2,18 (3H, s)	1'
1''	169,0	169,0	-	-
2''	21,2	21,2	2,08 (3H, s)	1''

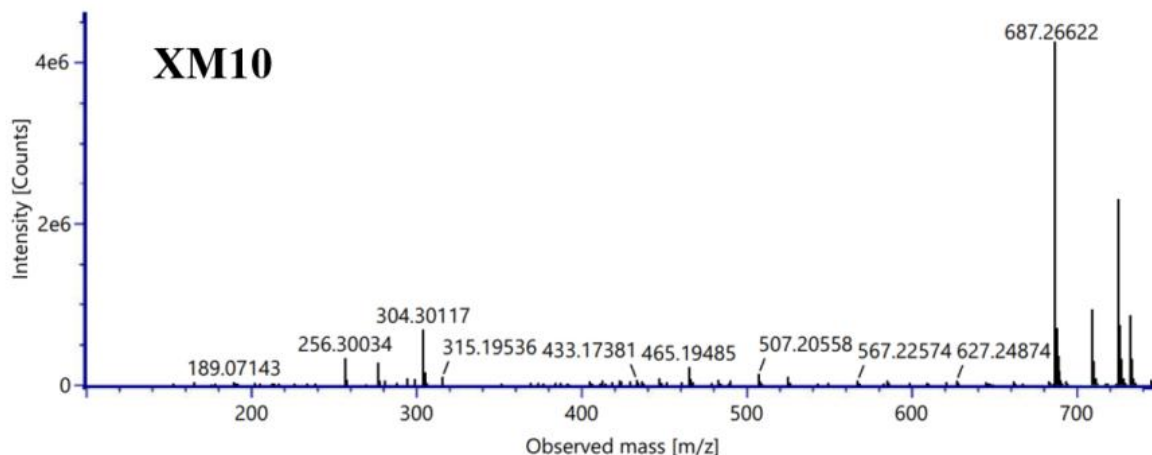
^a δ_C của hợp chất 3,30-diacetylphragmalin ; ^a đo trong $CDCl_3$, ^b 125 MHz, ^c 500 MHz, ^d 100 MHz.

3.1.10. Hợp chất XM10

Hợp chất **XM10** (Hình 3.23) thu được dưới dạng bột kết tinh màu trắng (dạng vô định hình). Phổ HR-MS cho peak ion phân tử tại m/z 687,2662 $[M + H]^+$ (tính toán lý thuyết cho ion phân tử $C_{35}H_{43}O_{14}^+$ có số khối tương ứng là 687,2647) (Hình 3.24) cho phép xác định công thức phân tử là $C_{35}H_{42}O_{14}$. Kết hợp với phổ 1H -NMR và ^{13}C -NMR xác định hợp chất **XM10** có công thức phân tử $C_{35}H_{42}O_{14}$, khối lượng phân tử 642,2312.



Hình 3.23. Cấu trúc và tương tác HMBC của hợp chất **XM10**



Hình 3.24. Phổ khối phân giải cao HRMS của hợp chất **XM10**

Dựa trên phổ 1H (Phụ lục 2, Hình PL51), ^{13}C NMR (Phụ lục 2, Hình PL52) và HSQC (Phụ lục 2, Hình PL53) cho thấy các phổ 1H và ^{13}C NMR của **XM10** hoàn toàn tương tự với phổ của **XM09**. Sự khác biệt duy nhất giữa 2 hợp chất là độ chuyển dịch hóa học ở vị trí C-2 (δ_C 85,20) của **XM10** bị dịch chuyển mạnh về phía trường yếu so với vị trí C-2 (δ_C 79,38) của hợp chất **XM09**, gợi ý cho thấy nhóm thế tại C-3 của **XM10** là acetyl thay vì nhóm hydroxy tại C-3 trong cấu trúc **XM09**, các tương tác quan sát được trên phổ HMBC (Phụ lục 2, Hình PL54), phổ COSY (Phụ lục 2, Hình PL55) phổ NOESY (Phụ lục 2, Hình PL56) cho thấy nhận định này cũng hoàn

toàn phù hợp với sự chênh lệch KLPT và CTPT giữa 2 hợp chất. So sánh với dữ liệu phổ của các limonoid đã công bố cho phép nhận dạng **XM10** là Xylococcin E (2,3,30-triacetyl Phragmalin) [80], [81] dựa trên sự phù hợp hoàn toàn về dữ liệu phổ của 2 hợp chất (bảng 3.10). Đây là lần đầu tiên hợp chất này được phân lập từ cây Xu nhỏ.

Bảng 3.10. Dữ liệu phổ ^1H và ^{13}C NMR của **XM10**

C	$^*\delta_{\text{C}}^{\text{a,b}}$	XM10		
		$\delta_{\text{C}}^{\text{a,b}}$	$^*\delta_{\text{C}}^{\text{a,c}}$ (J = Hz)	HMBC (H $\rightarrow$ C)
1	86,9	86,8	-	-
2	85,3	85,2	-	-
3	81,1	81,1	5,10 (1H, s)	5, 28, 29, 30
4	46,2	46,2	-	-
5	35,5	35,5	2,97 (1H, dd, 2,0, 10,0)	7, 9, 19, 3
6	33,3	33,3	2,23 (1H, dd, 2,0, 16,5) 2,46 (1H, dd, 10,0, 16,5)	4, 5, 7
7	172,7	172,6	-	-
8	85,9	85,9	-	-
9	85,3	85,3	-	-
10	45,7	45,7	-	-
11	25,4	25,4	1,68 (1H, m) 2,06 (1H, m)	
12	29,1	29,1	1,30 (1H, m) 1,54 (1H, m)	
13	34,3	34,3	-	-
14	43,1	43,1	2,06 (1H, m)	
15	26,5	26,5	2,71 (1H, dd, 10,0, 20,0) 3,28 (1H, d, 20,0)	13, 14, 16
16	170,3	170,3	-	-
17	78,6	78,6	5,54 (1H, s)	13, 14, 18, 21
18	19,6	19,6	1,07 (3H, s)	12, 13, 14, 17
19	16,5	16,5	1,14 (3H, s)	1, 5, 9, 10
20	121,1	121,1	-	-
21	140,8	140,8	7,52 (1H, s)	17, 22, 23
22	109,7	109,7	6,14 (1H, d, 1.5)	17, 21, 23
23	143,0	143,0	7,40 t (1.5)	20, 21, 22
28	14,6	14,6	0,89 (3H, s)	3, 4, 5, 29
29	40,2	40,2	1,67 (1H, m) 1,98 (1H, m)	3, 4, 5, 28
30	69,3	69,3	6,31 (1H, s)	1, 2, 9
31	119,0	119,0	-	-
32	21,0	21,0	1,66 (3H, s)	
7-OCH ₃	52,1	52,0	3,69 (3H, s)	7
2-OAc				
1'	170,3	170,3	-	-
2'	21,7	21,7	2,15 (3H, s)	1'
3-OAc				

1''	170,2	170,1	-	-
2''	21,1	21,1	2,25 (3H, s)	
30-OAc				
1'''	168,6	168,5	-	-
2'''	21,6	21,5	1,94 (3H, s)	

* δ_C của hợp chất xycloccensin E ; ^a đo trong $CDCl_3$, ^b 125 MHz, ^c 500 MHz, ^d 100 MHz,

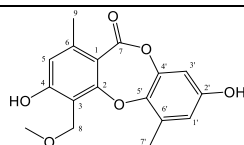
Nhận xét

Theo những nghiên cứu trước đây cho thấy Xu nhỏ là cây phổ biến trong nghiên cứu thực nghiệm cho thấy chi Xu chứa thành phần chính là nhóm hợp chất triterpenoid. Từ cây Xu nhỏ thu thập ở rừng ngập mặn Cà Mau - Việt Nam, các hợp chất đã phân lập được phù hợp với các nghiên cứu trước đây là thuộc nhóm hợp chất triterpenoid là nhóm đặc trưng cho chi Xu. Trong số **10 hợp chất đã phân lập** được có: 04 chất mới trong tự nhiên chưa được tìm thấy, 06 hợp chất đã biết đều có khung triterpenoid tương tự các hợp chất đã công bố trước đây.

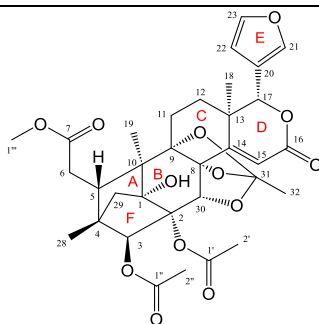
- **04 chất mới** phân lập được từ cây Xu nhỏ gồm **XM01** (Xylomoluccenoid A); **XM02** (Xylomoluccenoid B); **XM03** (Xylomoluccenoid C), **XM04** (Xylomoluccenoid D);
- 06 hợp chất đã biết đều có khung triterpenoid chất mới phân lập được từ cây Xu nhỏ gồm: **XM05** (Xxylomolin S), **XM 06** (1*H*-Dibenzo[b,e][1,4]dioxepin-11-one,3,8-dihydroxy-4-(methoxymethyl)-1,6-dimethyl), **XM07** (Moluccensin Y), **XM 08** (Swietmanin H), **XM09** (3,30-diacetylphragmalin), **XM10** (Xyloccensin E).
- **XM10** (xyloccensin E) lần đầu tiên hợp chất này được phân lập từ cây Xu nhỏ.
- **XM06** (1*H*-Dibenzo[b,e][1,4]dioxepin-11-one,3,8-dihydroxy- 4(methoxymethyl)-1,6-dimethyl), **XM08** (Swietmanin H) lần đầu tiên hợp chất này được phân lập từ chi Xu (cụ thể là cây Xu nhỏ).

Các hợp chất **XM01–XM10** nhìn chung đều thuộc nhóm limonoid, chia sẻ khung carbon /triterpenoid đặc trưng, hệ vòng phức tạp và nhiều nhóm chức chứa oxy như hydroxyl, carbonyl, ester và ether. Sự tương đồng rõ rệt thể hiện ở việc bảo toàn bộ khung limonoid, thường kèm theo vòng furan ở mạch nhánh. Tuy nhiên, các hợp chất khác nhau đáng kể về mức độ oxy hóa, số lượng và vị trí nhóm acyl hóa. Những biến đổi cấu trúc này dẫn đến khác biệt về khối lượng phân tử và phân mảnh MS, phản ánh sự đa dạng hóa sinh học trong cùng một họ hợp chất.

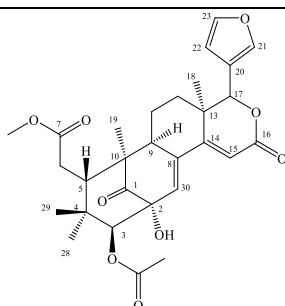
TT	Ký hiệu	Công thức cấu tạo	Ghi chú
1.	XM01		Chất mới: Xylomoluccenoid A Công thức phân tử $C_{38}H_{48}O_{14}$, Khối lượng phân tử 728,3044
2.	XM02		Chất mới: Xylomoluccenoid B Công thức phân tử $C_{40}H_{46}O_{14}$, Khối lượng phân tử 750,2888
3.	XM03		Chất mới: Xylomoluccenoid C Công thức phân tử $C_{37}H_{46}O_{13}$, Khối lượng phân tử 698,2938
4.	XM04		Chất mới: Xylomoluccenoid D Công thức phân tử $C_{31}H_{36}O_{10}$ Khối lượng phân tử 568,6190
5.	XM05		Xylomolin S Công thức phân tử $C_{34}H_{44}O_{12}$, Khối lượng phân tử 644,2833

6. **XM06**

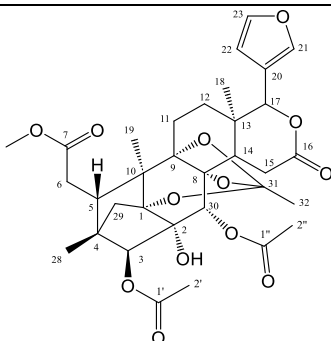
1*H*-Dibenzo[b,e][1,4]dioxepin-11-one,3,8-dihydroxy-4-(methoxymethyl)-1,6-dimethyl
 Công thức phân tử $C_{17}H_{16}O_6$ và
 khối lượng phân tử là 316,0947

7. **XM07**

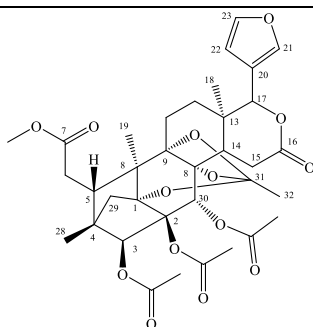
Moluccensin Y
 Công thức phân tử $C_{33}H_{38}O_{13}$
 Khối lượng phân tử là 642,2312

8. **XM08**

Swietmanin H
 Công thức phân tử $C_{29}H_{34}O_9$ và
 Khối lượng phân tử là 526,2203

9. **XM09**

3,30-diacetylphragmalin
 Công thức phân tử $C_{33}H_{40}O_{13}$ và
 Khối lượng phân tử là 644,2469

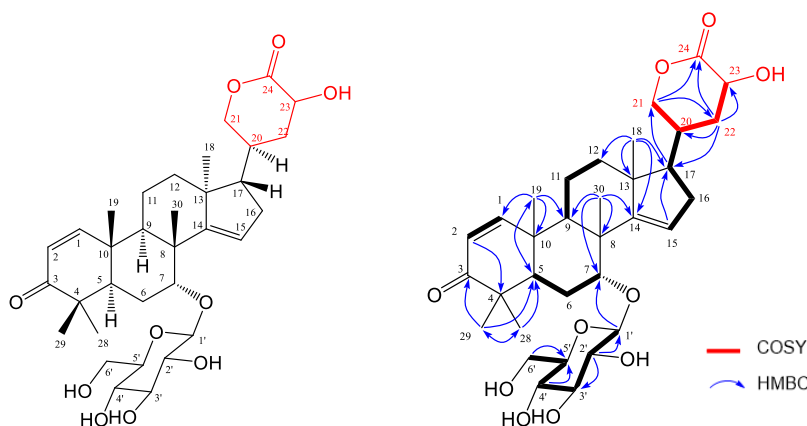
10. **XM10**

Xyloccensin E
 Công thức phân tử $C_{35}H_{42}O_{14}$
 Khối lượng phân tử là 686,2312

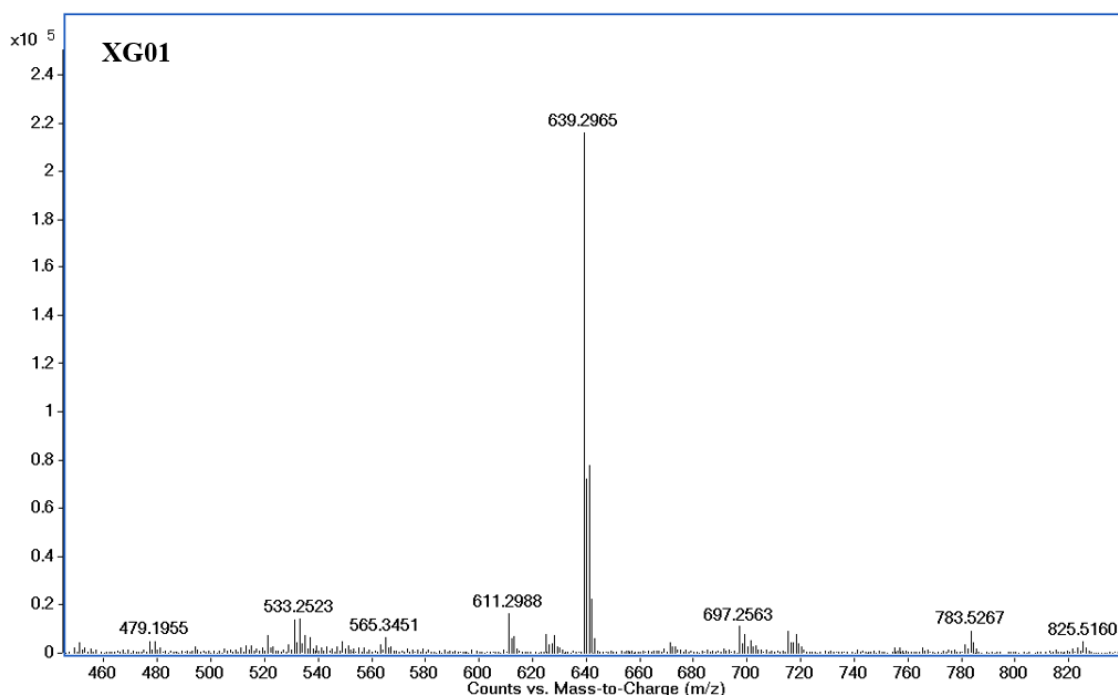
3.2. Phân lập và xác định cấu trúc các hợp chất từ cây Xu ôi

3.2.1. Hợp chất XG01 – chất mới

Hợp chất **XG01** (Hình 3.25) thu được dưới dạng chất bột vô định hình, màu trắng. Phổ khối phân giải cao HRMS xuất hiện peak ion tại m/z 639,2965 $[M + Cl]^-$ (Hình 3.26), (tính toán theo lý thuyết ứng với công thức ion giả phân tử $C_{33}H_{48}O_{10}Cl^-$, m/z 639,2936). Kết hợp với phổ 1H -NMR và ^{13}C -NMR xác định hợp chất **XG01** có công thức phân tử $C_{33}H_{48}O_{10}$, khối lượng phân tử 604,3247.



Hình 3.25. Cấu trúc và tương tác HMBC và COSY của hợp chất **XG01**



Hình 3.26. Phổ HRMS của hợp chất **XG01**

Phổ 1H -NMR (Phụ lục 3, Hình PL57) xuất hiện năm tín hiệu đặc trưng của các nhóm methyl tại δ_H 1,09, 1,19, 1,18, 1,12 và 1,23 ppm; hai tín hiệu của nhóm oxymethine tại δ_H 4,20 (H-7) và 4,47 (H-23); hai tín hiệu của nhóm oxymethylene

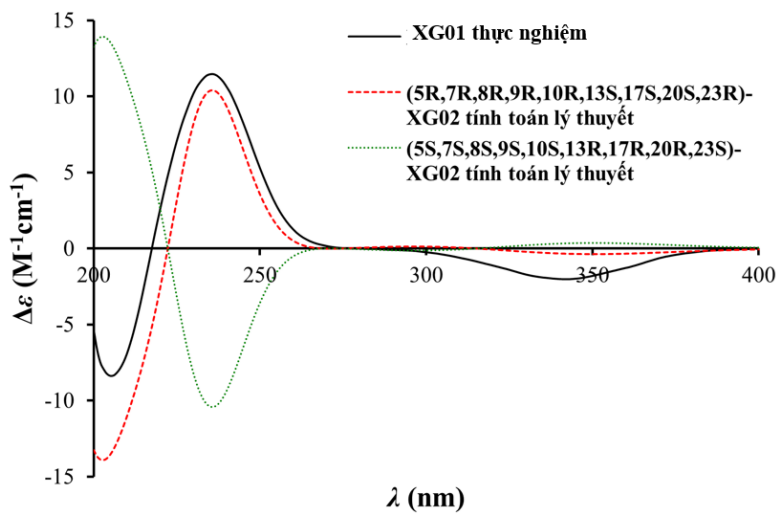
tại δH 4,14 (Ha-21) và 4,42 (Hb-21); bảy tín hiệu đặc trưng của một gốc đường glucose [δH 4,33, 3,10, 3,33, 3,17, 3,25, 3,61 và 3,90 ppm]; ba tín hiệu cộng hưởng về vùng trường thấp của các proton olefin tại δH 7,34 (H-1), 5,81 (H-2) và 5,54 (H-15). Các tín hiệu proton còn lại cộng hưởng trong vùng trường mạnh 1,58 – 2,58 ppm của các proton có trong nhóm methine, methylene thông thường.

Phổ ^{13}C -NMR (Hình 3.58) kết hợp phổ HSQC (Phụ lục 3, Hình PL59) cho thấy hợp chất **XG01** chứa 33 nguyên tử carbon. Trong đó 27 nguyên tử carbon của gốc glycone và 6 tín hiệu carbon còn lại của gốc đường glucose [δC 100,8, 75,3, 78,4, 72,3, 77,7, 63,6 ppm]. Quan sát trên vùng trường thấp xuất hiện một nhóm ketone tại δC 208,2 ppm; một nhóm carboxyl tại 177,2 ppm; bốn tín hiệu của hai liên kết đôi tại δC 162,0/125,8 và 158,9/122,1 ppm. Dịch về phía vùng trường mạnh hơn xuất hiện hai tín hiệu oxymethine tại δC 78,4 và 71,8 ppm; một tín hiệu oxymethylene tại δC 65,7 ppm. Còn lại cộng hưởng trong vùng trường từ δC 58,0 – 18,2 ppm là các tín hiệu carbon của các nhóm methine, methylene và carbon không chứa hidro.

Phổ HMBC (Phụ lục 3, Hình PL60) xuất hiện một số tương tác chính: H-19 (δH 1,19) tương tác lên C-1 (δC 162,0), C-5 (δC 45,6), C-9 (δC 39,5) và C-10 (δC 41,1); H-2 (δH 5,81) tương tác lên C-4 (δC 45,7); H3-28 (δH 1,18) và H3-29 (δH 1,12) cùng tương tác lên C-3 (δC 208,2) và C-5 (δC 45,6). Từ đó xác định được vòng A của khung chất với 6 cạnh, trong đó có 1 nhóm ketone liên hợp với liên kết đôi và bên cạnh hai nhóm gem-dimethyl. Xét tương tự các tương tác HMBC (hình 3.41) xác định được các vòng B, C, D và vòng pyran như hình. Vị trí của gốc đường xác định được thế vào C-7 của khung chất dựa trên tương tác HMBC (Hình 3.25) giữa H-1' (δH 4,33) với C-7 (δC 78,4). Vị trí của vòng pyrane cũng xác định được thế vào vị trí C-17 của vòng D của khung chất dựa vào tương tác giữa H-17 (δH 1,67) và C-21 (δC 71,8) và giữa H-22 (δH 2,15) với C-17 (δC 58,0). Dựa trên phổ COSY (Phụ lục 3, Hình PL61) xác định được một số mảnh mạch carbon trên phân tử: H-1 (δH 7,34) tương tác với H-2 (δH 5,81), xác định được mảnh C-1/C-2. Tương tự xét các tương tác khác xác định được một số mảnh khác trên cấu trúc hợp chất XG02: C-5/C-6/C-7; C-9/C-11/C-12; C-16/C-16/C-17/C-20/C-22/C-23 và mạch gốc đường C-1' $\rightarrow$ C-6', các tương tác NOESY được xác định dựa trên phổ NOESY (Phụ lục 3, Hình PL62) và cấu trúc lập thể 3D (Phụ lục 3, Hình PL63).

Cấu hình tuyệt đối của **XG01**, các tính toán hóa học lượng tử theo phương pháp TD-DFT cho hai đồng phân đối quang ($5R^*,7R^*,8R^*,9R^*,10R^*,13S^*,17S^*,20S^*,23R^*$) - **XG01** và ($5S^*,7S^*,8S^*,9S^*,10S^*,13R^*,17R^*,20R^*,23S^*$) - **XG01**. Kết quả cho thấy phổ phổ ECD thực nghiệm phù hợp tốt với phổ tính toán cho đồng phân thứ nhất (hình 3.27), xác nhận cấu hình tuyệt đối của hợp chất này là ($5R^*,7R^*,8R^*,9R^*,10R^*,13S^*,17S^*,20S^*,23R^*$) - **XG01**. Truy cập cơ sở dữ liệu theo nguồn

Scifinder vào tháng 6/2025 cho thấy hợp chất **XG01** chưa được công bố. Với những phân tích dựa trên phổ ^1H -NMR, ^{13}C -NMR (Bảng 3.11) và phổ hai chiều xác định được hợp chất mới **XG01** đặt tên là Xylocagranoside A.



Hình 3.27. Phổ ECD thực nghiệm và tính toán lý thuyết của hợp chất **XG01**

Bảng 3.11. Bảng số liệu phổ ^1H , ^{13}C -NMR, HMBC, COSY và NOESY của hợp chất **XG01**

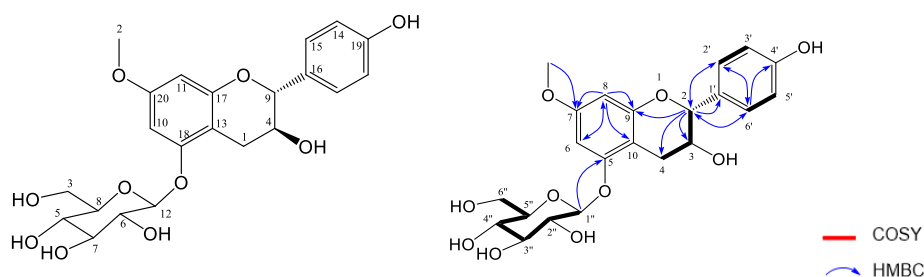
XG01					
Vị trí C	$\delta_{\text{C}}^{\text{a,b}}$	$\delta_{\text{H}}^{\text{a,c}}$ (J = Hz)	HMBC	COSY	NOESY
1	162,0	7,34 (1H, d, 10,2)	3, 5, 9, 10	2	11b, 19
2	125,8	5,81 (1H, d, 10,2)	4, 10	1	-
3	208,2	-	-	-	-
4	45,7	-	-	-	-
5	45,6	2,57 (1H, dd, 2,5, 12,5)	4, 10, 19, 29	6	9,28
6	22,7	1,90 (1H, m) 1,95 (1H, m)	4, 5	5, 7 -	- 7
7	78,4	4,20 (1H, br s)	9	6	1', 15, 30
8	44,8	-	-	-	-
9	39,5	2,28 (1H, m)	8, 10, 19, 30	11	5, 18
10	41,1	-	-	-	-
11	18,1	1,70 (1H, m) 1,93 (1H, m)	12	9, 12 -	19, 30 1
12	37,1	1,62 (1H, m) 1,80 (1H, m)	-	11 -	- 18
13	47,4	-	-	-	-
14	158,9	-	-	-	-
15	122,1	5,54 (1H, d, 1,8)	13, 17	16b	7, 16b, 30
16	35,4	2,09 (1H, m) 2,31 (1H, m)	14, 15, 17	17 15, 17	- 15, 17, 22b
17	58,0	1,67 (1H, m)	12, 21	16, 20	16b, 21a
18	20,9	1,09 (3H, s)	12, 13, 14, 17	-	9, 12b, 20
19	20,1	1,19 (3H, s)	1, 5, 9, 10	-	1, 11a
20	35,1	2,29 (1H, m)	-	17, 21, 22	18
21	71,8	4,14 (1H, dd, 11,0, 11,5) 4,42 (1H, 4,5, 11,5)	22, 24	20	17 22a
22	34,0	1,82 (1H, m)	17, 20, 23, 24	20, 23	21b

		2,15 (1H, ddd, 8,5, 8,5, 13,5)			16, 23
23	65,7	4,47 (1H, dd, 9,0, 9,0)	22, 24	22	22b
24	177,2	-	-	-	-
28	27,7	1,18 (3H, s)	3, 5, 29	-	5
29	22,1	1,12 (3H, s)	3, 5, 28	-	-
30	28,0	1,23 (3H, s)	7, 8, 9, 14	-	11a, 7, 15
		β -D-glucopyranoside			
1'	100,8	4,33 (1H, d, 7,2)	7	2'	3', 5', 7
2'	75,3	3,10 (1H, dd, 7,8, 9,0)	1', 3'	1', 3'	-
3'	78,4	3,33 (1H, #)	2'	2', 4'	1'
4'	72,3	3,17 (1H, dd, 9,0, 9,6)	5'	3', 5'	-
5'	77,7	3,25 (1H, m)	-	4', 6'	1'
6'	63,6	3,61 (1H, dd, 6,5, 11,5) 3,90 (1H, dd, 2,0, 11,5)	5'	5'	-

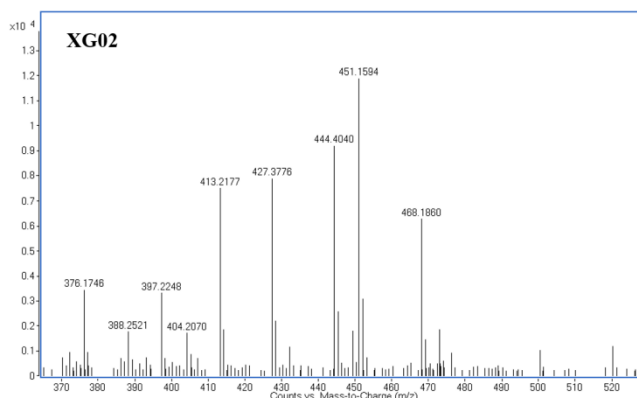
^a Đo trong CD₃OD; ^b 125MHz; ^c 500MHz; # tín hiệu chập nhau

3.2.2. Hợp chất XG02 – chất mới

Hợp chất **XG02** (hình 3.28) thu được dưới dạng chất bột vô định hình, màu vàng nhạt. Phổ khối phân giải cao HRMS xuất hiện peak ion tại m/z 451,1594 [$M + H$]⁺ (hình 3.29), (tính toán theo lý thuyết ứng với công thức giả phân tử C₂₂H₂₇O₁₀⁺, m/z 451,1604). Kết hợp phổ ¹H-NMR và ¹³C-NMR, phổ HMBC, HSQC xác định hợp chất **XG02** có công thức phân tử C₂₂H₂₆O₁₀, khối lượng phân tử 450,1526.



Hình 3.28. Cấu trúc và tương tác HMBC và COSY của hợp chất **XG02**



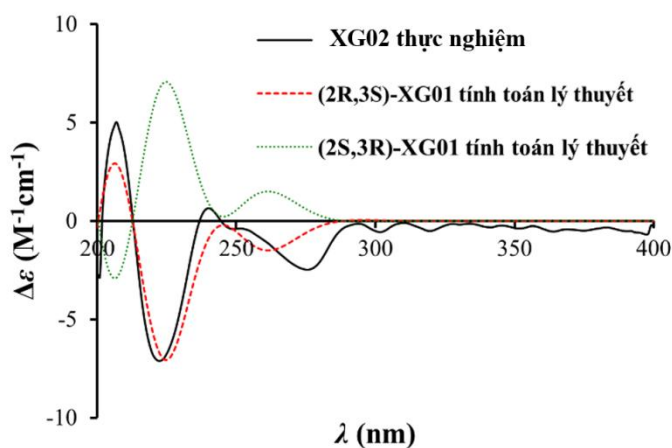
Hình 3.29. Phổ HRMS của hợp chất **XG02**

Phổ ¹H-NMR (Phụ lục 3, Hình PL64) xuất hiện hai tín hiệu proton chập đặc trưng của hệ vòng thơm A2B2 cộng hưởng trên vùng trường thấp tại δ_H 7,23 (1H, d, 8,5) (x 2) và 6,81 (1H, d, 8,5) (x 2), bên cạnh đó là hai tín hiệu proton thơm ở vị trí meta với nhau tại δ_H 6,42 (1H, d, 2,0) và 6,16 (1H, d, 2,0). Về phía vùng trường mạnh hơn

xuất hiện một tín hiệu đặc trưng của nhóm oxymethyl tại δ_H 3,74 (3H, s), hai tín hiệu của nhóm oxymethine tại δ_H 4,67 (1H, d, $J = 7,5$ Hz) và 4,02 (1H, ddd, $J = 5,5, 7,5, 8,5$ Hz). Bảy tín hiệu của gốc đường glucose [δ_H 4,89 (1H, d, $J = 7,5$ Hz), 3,48 (1H, m), 3,46 (1H, m), 3,40 (1H, m), 3,42 (1H, m), 3,72 (1H, dd, $J = 6,0, 12,0$ Hz) và 3,92 (1H, dd, $J = 2,0, 12,0$ Hz)], còn lại là hai tín hiệu của nhóm methylene tại δ_H 2,62 (1H, dd, $J = 8,5, 16,5$ Hz) và 3,10 2,62 (1H, dd, $J = 5,5, 16,5$ Hz).

Phổ ^{13}C -NMR (Phụ lục 3, Hình PL65) kết hợp phổ HSQC (Phụ lục 3, Hình PL66) cho thấy hợp chất **XG02** chứa 22 nguyên tử carbon. Trong đó có một tín hiệu của nhóm oxymethyl tại δ_C 55,8 ppm, sáu tín hiệu của gốc đường glucose (δ_C 102,7, 74,9, 78,3, 71,5, 78,3 và 62,6 ppm). Còn lại là 15 tín hiệu carbon của khung chất. Với những đặc điểm phổ trên cho thấy hợp chất là một flavanol glycoside. Gốc đường với proton anome có hằng số tương tác với giá trị lớn ($J = 7,5$ Hz) cho phép xác định được gốc đường β -D-glucopyranoside. Vị trí thế của gốc đường được thế vào vị trí C-5 trên vòng A của khung flavanoid dựa vào tương tác HMBC. Proton H-1" (δ_H 4,89) tương tác lên C-3 (δ_C 158,0). Nhóm oxymethyl cũng được xác nhận thế vào vị trí C-7 cùng trên vòng A của khung chất flavanoid dựa trên phổ HMBC (Phụ lục 3, Hình PL67). Một số mảnh phân tử được xác định dựa trên phổ COSY (Phụ lục 3, Hình PL68). Quan sát trên phổ COSY thấy xuất hiện tương tác giữa H-3 (δ_H 4,02) với H-2 (δ_H 4,67) và H_a-4 (δ_H 2,62), nên nối được mạch carbon C-2/C-3/C-4. Tương tự nối được mạch C-2'/C-3', C-5'/C-6' và C-1"/C-2"/C-3"/C-4"/C-5"/C-6" tương tác HMBC và COSY (hình 3.28). Với những phân tích phổ ^1H , ^{13}C -NMR, HSQC cũng như phổ HMBC (Bảng 3.12) xác định được cấu trúc phẳng của hợp chất như hình 3.38. các tương tác NOESY của hợp chất **XG02** được xác định dựa trên phổ NOESY (Phụ lục 3, Hình PL69) và cấu trúc lập thể 3D (Phụ lục 3, Hình PL70).

Cấu hình tuyệt đối của **XG02**, các tính toán hóa học lượng tử theo phương pháp TD-DFT cho hai đồng phân đối quang ($2R^*,3S^*$) - **XG02** và ($2S^*,3R^*$) - **XG02**. Kết quả cho thấy phổ phổ ECD thực nghiệm phù hợp tốt với phổ tính toán cho đồng phân thứ nhất (hình 3.30), xác nhận cấu hình tuyệt đối của hợp chất này là $2R,3S$. Truy cập cơ sở dữ liệu theo nguồn Scifinder vào tháng 6/2025 cho thấy hợp chất **XG02** chưa được công bố. Với những phân tích trên xác định được hợp chất **XG02** là chất mới đặt tên là Xylocagranoside B.



Hình 3.30. Phổ ECD thực nghiệm và tính toán lý thuyết của hợp chất **XG02**

Bảng 3.12. Bảng số liệu phổ ^1H , ^{13}C -NMR, HMBC, COSY và NOESY của hợp chất **XG02**

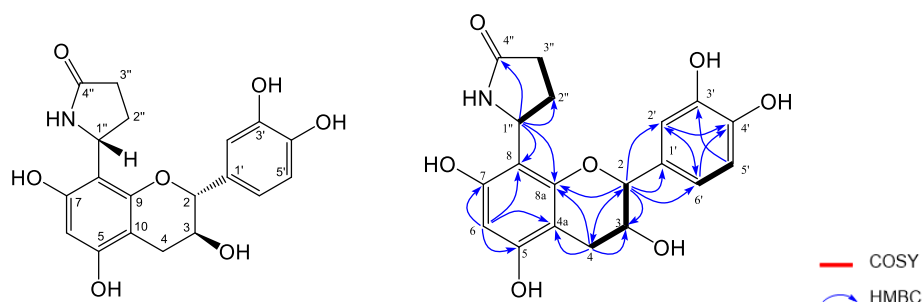
XG02					
Vị trí C	$\delta_{\text{C}}^{\text{a,b}}$	$\delta_{\text{H}}^{\text{a,c}}$ ($J = \text{Hz}$)	HMBC	COSY	NOESY
2	83,0	4,67 (1H, d, 7,5)	3, 4, 9, 1', 2', 6'	3	
3	68,6	4,02 (1H, ddd, 5,5, 7,5, 8,5)	10	2, 4	4b
4	28,7	2,62 (1H, dd, 8,5, 16,5) 3,10 (1H, dd, 5,5, 16,5)	2, 3, 9, 10	3	3
5	158,0	-	-	-	-
6	96,2	6,42 (1H, d, 2,0)	5, 7, 8, 10		
7	161,0	-	-	-	-
8	96,5	6,16 (1H, d, 2,0)	6, 7, 9, 10		
9	156,8	-		-	-
10	104,7	-	-	-	-
1'	131,3	-	-	-	-
2'	129,5	7,23 (1H, d, 8,5)	2, 4', 6'	3'	
3'	116,1	6,81 (1H, d, 8,5)	1', 4', 5'	2'	
4'	158,5	-	-	-	-
5'	116,1	6,81 (1H, d, 8,5)	1', 3', 4'	6'	
6'	129,5	7,23 (1H, d, 8,5)	2, 2', 4'	5'	
1''	102,7	4,89 (1H, d, 7,5)	3	2''	6, 3'', 5''
2''	74,9	3,48 (1H, m)	1'', 3''	1'', 3''	
3''	78,3	3,46 (1H, m)		2''	1''
4''	71,5	3,40 (1H, m)	5''		
5''	78,3	3,42 (1H, m)	3'', 4''		1''
6''	62,6	3,72 (1H, dd, 6,0, 12,0) 3,92 (1H, dd, 2,0, 12,0)	4'', 5''	-	-
7-OCH ₃	55,8	3,74 (3H, s)	7	-	6, 8

^a Đo trong CD₃OD; ^b125MHz; ^c500MHz;

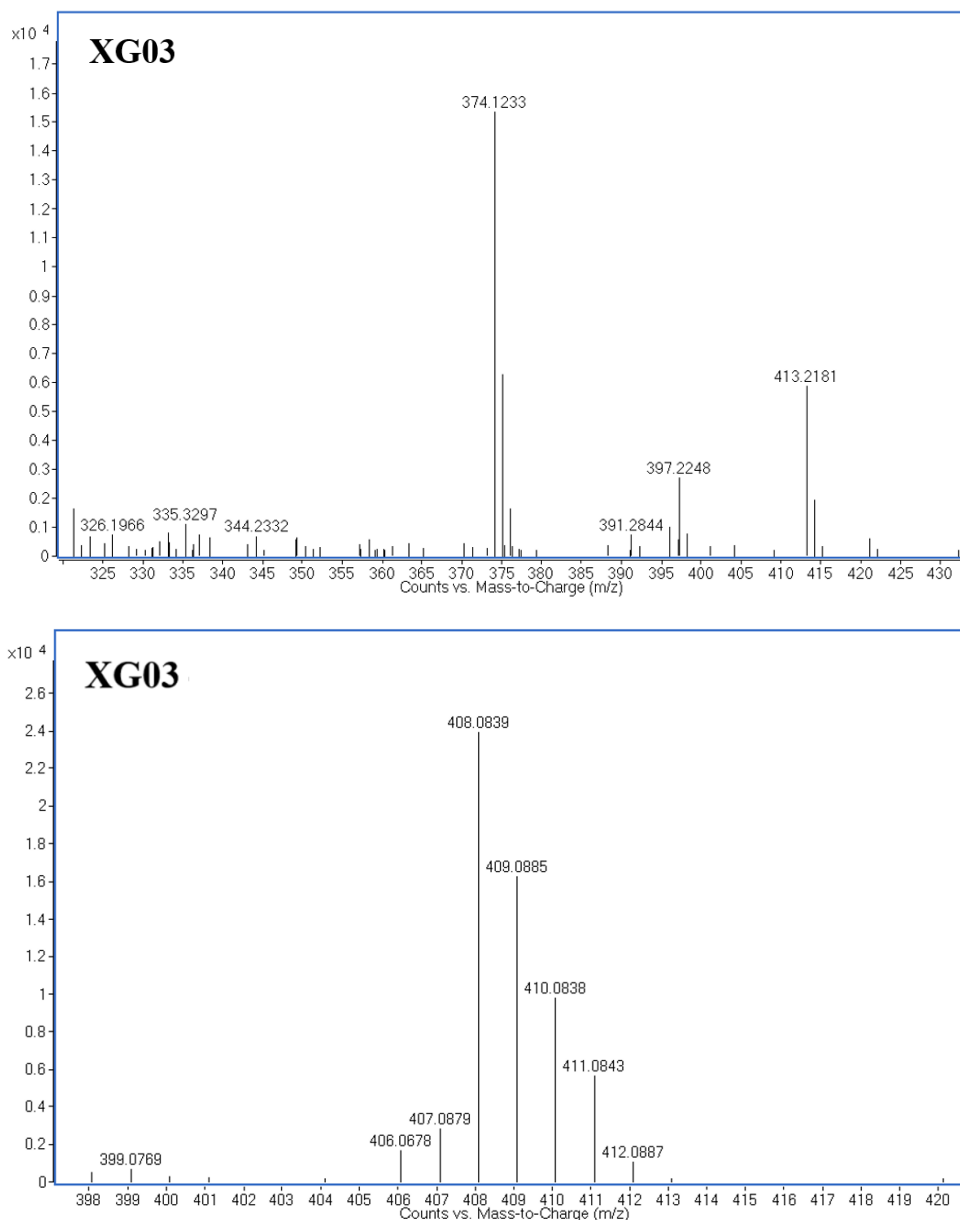
3.2.3. Hợp chất XG03 – chất mới

Hợp chất **XG03** (hình 3.31) thu được dưới dạng chất bột vô định hình, màu nâu nhạt. Phổ khối phân giải cao HRMS xuất hiện peak ion tại m/z 374,1233 $[\text{M} + \text{H}]^+$ (hình 3.32), (tính toán theo lý thuyết cho gợi ý công thức giả phân tử $\text{C}_{19}\text{H}_{20}\text{NO}_7^+$, m/z

374,1240); peak m/z 408,0839 $[M + Cl]^-$ (tính toán theo lý thuyết gợi ý công thức giả phân tử $C_{19}H_{19}NO_7Cl$, m/z 408,0850). Kết hợp với phổ 1H -NMR và ^{13}C -NMR (Bảng 3.13) xác định hợp chất **XG03** có công thức phân tử $C_{19}H_{19}NO_7$, khối lượng phân tử 373,1162.

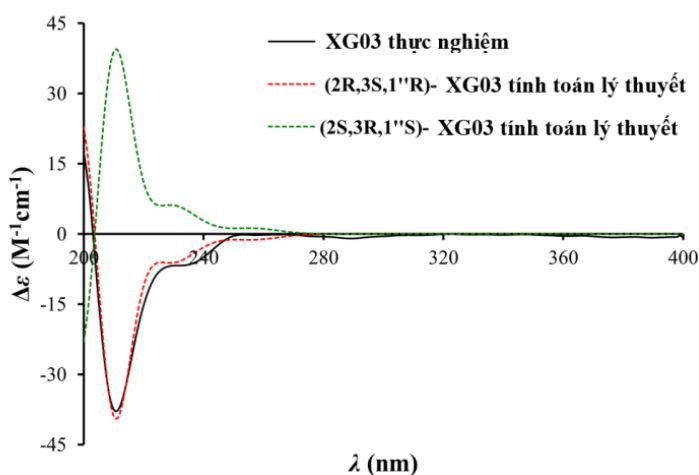


Hình 3.31. Cấu trúc và tương tác HMBC của hợp chất **XG03**



Hình 3.32. Phổ HRMS của hợp chất **XG03**

Phổ ^1H NMR (Phụ lục 3, Hình PL71) của **3** hiển thị các tín hiệu đặc trưng tương ứng với một đơn vị catechin, bao gồm một tập hợp hệ thống ghép nối ABX [δH 6,85 (d, $J = 2,0$ Hz, H-2'), 6,79 (d, $J = 8,5$ Hz, H-5'), và 6,75 (dd, $J = 8,5, 2,0$ Hz, H-6')], một vòng thơm một proton [δH 6,01 (s, H-6)], hai proton methine chứa oxy [δH 4,57 (d, $J = 8,0$ Hz, H-2) và 3,96 (ddd, $J = 8,5, 8,0, 5,5$ Hz, H-3)], và một nhóm methylene [δH 2,89 (dd, $J = 16,0, 5,5$ Hz, H-4a) và 2,54 (dd, $J = 16,0, 8,5$ Hz, H-4b)]. Ngoài ra, một methine bị khử chắn [δH 5,36 (dd, $J = 9,0, 4,5$ Hz, H-1'')], và hai nhóm methylene mạch hở [δH 2,37 (m, Ha-2'')/2,22 (m, Hb-2''), và 2,30 (m, Ha-3'')/2,21 (m, Hb-3'')] đã được phát hiện. Phổ ^{13}C NMR (Phụ lục 3, Hình PL72) và HSQC (Phụ lục 3, Hình PL73) cho 19 tín hiệu carbon được phân loại thành một nhóm carbonyl (δC 181,3), mười hai carbon thơm (δC 96,4–156,8), hai nhóm oxymethine (δC 68,7 và 83,1), một nhóm methine (δC 50,2) và ba nhóm methylene (δC 26,8, 29,2 và 32,1). Việc kiểm tra phổ HMBC (Phụ lục 3, Hình PL74), COSY (Phụ lục 3, Hình PL75) đã dẫn đến việc xác định cấu trúc 2D của **XG03** (Phụ lục 3, Hình PL77), giống hệt với cấu trúc của 8-(2-pyrrolidinone-5-yl)-(-)-epicatechin [135]. Các tương quan COSY của H-1''/H-2''/H-3'' cùng với các đỉnh chéo HMBC từ H-1'' Việc xác nhận cấu trúc của phần 2-pyrrolidinone gắn vào C-8 dựa trên các tương quan HMBC từ H-1'' đến C-8 và C-9 (Hình 3.31) đã được thực hiện đối với C-3'' và C-4'' (Hình 3.31). Cấu hình tuyệt đối của **XG03**, các tính toán hóa học lượng tử theo phương pháp TD-DFT cho hai đồng phân đối quang ($2R^*,3S^*,1''R^*$) - **XG03** và ($2S^*,3R^*,1''S^*$) - **XG03**. Kết quả cho thấy phổ ECD thực nghiệm phù hợp tốt với phổ tính toán cho đồng phân thứ nhất (hình 3.33), xác nhận cấu hình tuyệt đối của hợp chất này là ($2R^*,3S^*,1''R^*$) - **XG03**. Truy cập cơ sở dữ liệu theo nguồn Scifinder vào tháng 6/2025 cho thấy hợp chất **XG03** chưa được công bố. Dựa trên những dữ liệu phổ ^1H -NMR, ^{13}C -NMR và các phổ khác (Bảng 3.13) và so sánh với tài liệu tham khảo đã công bố xác định được hợp chất mới **XG03** và đặt tên là Xylocargranin A.



Hình 3.33. Phổ ECD thực nghiệm và tính toán lý thuyết của hợp chất **XG03**

Bảng 3.13. Bảng số liệu phổ ^1H , ^{13}C -NMR, HMBC, COSY và NOESY của hợp chất **XG03**

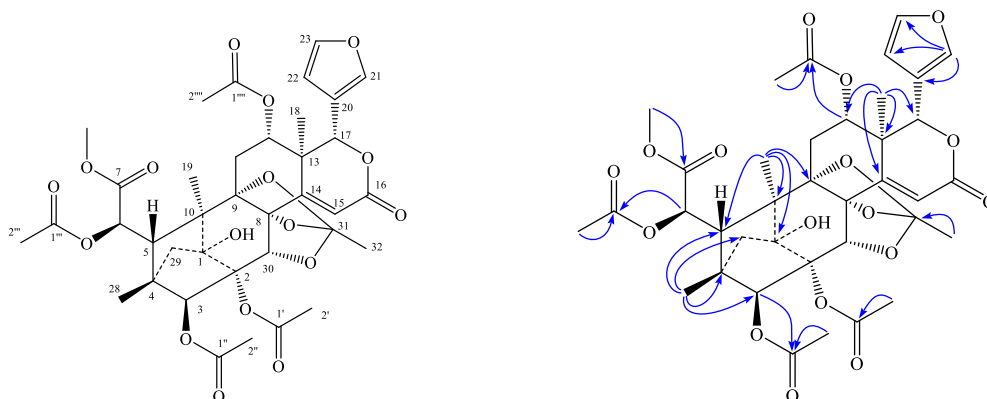
XG03						
Vị trí C	* $\delta_{\text{C}}^{\text{a,b}}$	$\delta_{\text{C}}^{\text{a,b}}$	$\delta_{\text{H}}^{\text{a,c}}$ ($J = \text{Hz}$)	HMBC	COSY	NOESY
2	80,3	83,1	4,57 (1H, d, 8,0)	3, 4, 8a, 1', 2', 6'	3	2', 4a, 6'
3	67,1	68,7	3,96 (1H, ddd, 5,5, 8,0, 8,5)	2, 1'	2, 4	2', 4a, 4b
4	29,5	29,2	2,54 (1H, dd, 8,5, 16,0) 2,89 (1H, dd, 5,5, 16,0)	2, 3, 4a, 4, 8a	3 3	2 3
4a	100,2	101,5	-	-		
5	157,3	156,1	-	-		
6	96,6	96,4	6,01 (1H, s)	4a, 5, 7, 8	-	-
7	156,4	156,8	-	-		
8	107,9	108,0	-	-		
8a	155,6	155,6	-	-		
1'	132,3	131,8	-	-		
2'	115,5	115,3	6,85 (1H, d, 2,0)	2, 4', 6'	-	2, 3
3'	146,3	146,2	-	-		
4'	146,2	146,4	-	-		
5'	116,2	116,2	6,79 (1H, d, 8,5)	1', 3'	6'	-
6'	119,7	120,1	6,75 (1H, dd, 2,0, 8,0)	2, 2', 4'	5'	2, 3
1''	50,5	50,2	5,36 (1H, dd, 4,5, 9,0)	8, 8a, 2'', 4''	2''	2''a, 2''b, 3''b
2''	26,8	26,8	2,22 (1H, m) 2,37 (1H, m)	8, 1'', 4''	- 1'', 3''	1'' 1''
3''	32,2	32,1	2,21 (1H, m) 2,30 (1H, m)	2'', 4''		
4''	181,4	181,3	-	-		

* δ_{C} của 8-(2-pyrrolidinone-5-yl)-(-)-elicatechin [135]

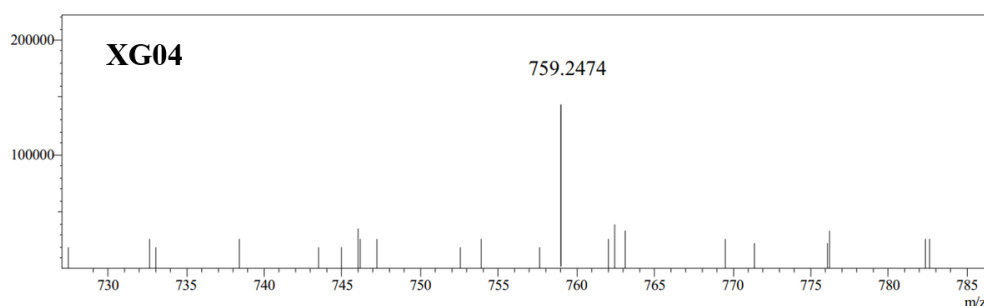
^a Đo trong CD_3OD ; ^b125MHz; ^c500MHz;

3.2.4. Hợp chất **XG04**

Hợp chất **XG04** (hình 3.34) thu được dưới dạng chất bột kết tinh màu trắng (dạng vô định hình). Phổ khối phân giải cao HR-MS xuất hiện peak ion tại m/z $[\text{M}+\text{H}]^+$ là 759,2474 (hình 3.35), (tính toán theo lý thuyết ứng với công thức ion giả phân tử $\text{C}_{37}\text{H}_{43}\text{O}_{17}^+$, m/z 759,2495). Kết hợp với phổ ^1H -NMR và ^{13}C -NMR kết hợp phổ HMBC, HSQC (Bảng 3.15) cho thấy các chuyển dịch hóa học phù hợp với chất Xylocensin P [82] đã công bố trong các tài liệu, hợp chất **XG04** được xác định có công thức phân tử $\text{C}_{37}\text{H}_{42}\text{O}_{17}$ và khối lượng phân tử là $M = 758,2422$.



Hình 3.34. Cấu trúc và tương tác HMBC của hợp chất **XG04**



Hình 3.35. Phổ HRMS của hợp chất **XG04**

Phổ $^1\text{H-NMR}$ (Phụ lục 3, Hình PL78) xuất hiện bốn tín hiệu đặc trưng của proton thơm tại δH 6,60 (1H, s, H-15), 7,45 (1H, s, H-21), 6,55 (1H, d, $J = 1,5$ Hz, H-22) và 7,30 (1H, t, $J = 1,5$ Hz, H-23); năm tín hiệu của nhóm oxymethine tại δH 5,21 (1H, s, H-3), 6,30 (1H, s, H-6), 4,94 (1H, s, H-12), 5,90 (1H, s, H-17) và 5,34 (1H, s, H-30). Vùng trường mạnh xuất hiện ba tín hiệu đặc trưng cho các nhóm methyl tại δH 1,59 (3H, s, H-18), 1,31 (3H, d, $J = 7,0$ Hz, H-19) và 0,92 (3H, s, H-28); bốn tín hiệu của các nhóm methyl của các nhóm acetyl tại δH 2,17 (3H, s, H-2'), 2,06 (3H, s, H-2''), 2,20 (3H, s, H-2'''), 1,55 (3H, s, H-2'''); một tín hiệu methyl của nhóm orthoacetate tại δH 1,69 (3H, s, H-32) và một tín hiệu đặc trưng của methyl trong nhóm este tại δH 3,74 (3H, s, 7-OCH₃). Còn lại những tín hiệu proton chuyển dịch trong vùng trường từ δH 1,75 đến 2,47 của các nhóm methine, methylen thông thường.

Phổ $^{13}\text{C-NMR}$ (Phụ lục 3, Hình PL79) kết hợp phổ HSQC (Phụ lục 3, Hình PL80) cho thấy hợp chất **XG04** chứa 37 nguyên tử carbon, gồm 26 carbon của khung limonoid và 11 tín hiệu còn lại của các nhóm thế. Trong khung limonoid xuất hiện hai tín hiệu đặc trưng cho các nhóm ketone tại δC 171,7 (C-7), 163,4 (C-16), sáu tín hiệu của ba liên kết đôi tại δC 152,7 (C-14)/124,2 (C-15), 121,0 (C-20)/142,1 (C-21) và 110,2 (C-22)/143,0 (C-23). Về phía vùng trường mạnh hơn xuất hiện năm tín hiệu của các nhóm oxymethine tại δC 85,2 (C-3), 71,2 (C-6), 68,5 (C-12), 79,0 (C-17) và 74,0 (C-30), bốn nhóm carbon oxygenated tại δC 84,1 (C-1), 83,7 (C-2), 83,6 (C-8)

và 86.1 (C-9). Vùng trường mạnh xuất hiện ba tín hiệu của các nhóm methyl tại δ_C 14,4 (C-18), 16,4 (C-19) và 15,3 (C-28). Các nhóm thế bao gồm: bốn nhóm acetyl tại δ_C 170,5 (C-1')/21,9 (C-2'), 169,0 (C-1'')/21,7 (C-2''), 169,2 (C-1''')/20,9 (C-2''') và 170,4 (C-1''')/ 19,8 (C-2'''); một nhóm methyl este tại δ_C 53,3 (7-OCH3) và hai tín hiệu của một nhóm orthoacetate tại δ_C 119,6 (C-31)/16,4 (C-32). Phổ HMBC (Phụ lục 3, Hình PL81) xuất hiện một số tương tác chính: H3-19 (δ_H 1,31) tương tác lên C-1, C-5, C-9 và C-10; H3-18 (δ_H 1,59) tương tác lên C-12, C-13, C-14 và C-17; H3-28 (δ_H 0,92) tương tác lên C-3, C-4, C-5 và C-29. Từ những đặc điểm này cho biết hợp chất chứa ba nhóm methyl và vị trí của chúng. Proton H-3 (δ_H 5,21) tương tác lên C-1'', H-6 (δ_H 6,30) tương tác lên C-1''' và H-12 (δ_H 4,94) tương tác lên C-1'''. Những tương tác HMBC này cho biết tại các vị trí C-3, C-6 và C-12 có chứa các nhóm thế acetyl. Tương tác proton δ_H 3,70 (3H, s, OCH3) lên C-7 tại vị trí C-7 bị este methyl, cấu trúc và tương tác HMBC của hợp chất **XG04** (Hình 3.34). Dựa trên những dữ liệu phổ 1H -NMR, ^{13}C -NMR và các phổ khác (Bảng 3.14) và so sánh với tài liệu tham khảo đã công bố xác định được hợp chất mới **XG04** là Xylococcensin P.

Bảng 3.14. Bảng số liệu phổ 1H , ^{13}C -NMR và HMBC của hợp chất **XG04**

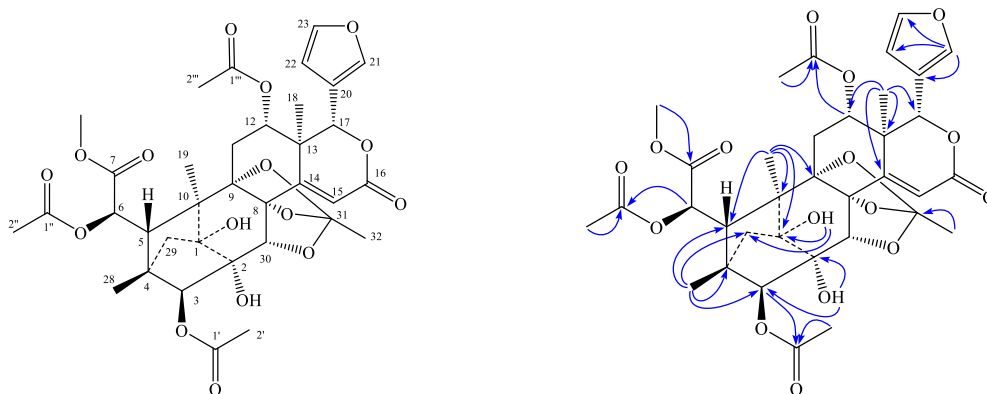
XG04				
Vị trí C	* $\delta_C^{d,b}$ Acetone	$\delta_C^{a,b}$ $CDCl_3$	$\delta_H^{a,c}$ (J = Hz)	HMBC H→C
1	84,6	84,1	-	-
2	84,3	83,7	-	-
3	86,2	85,2	5,21 (1H, s)	2, 4, 5, 28, 30
4	45,4	44,5	-	-
5	45,5	44,7	2,46 (1H, s)	3, 7, 10
6	71,8	71,2	6,30 (1H, s)	5, 7, 10
7	172,7	171,7	-	-
8	84,9	83,6	-	-
9	87,8	86,1	-	-
10	49,7	48,8	-	-
11	33,2	32,4	2,35 (1H, dd, 14,0, 4,0) 2,00 (1H, d, 14,0)	- 9, 10, 12
12	69,0	68,5	4,94 (1H, dd, 14,0, 4,0)	1''', 17, 18
13	43,7	42,9	-	-
14	153,8	152,7	-	-
15	124,8	124,2	6,60 (1H, s)	8, 13, 16
16	163,6	163,4	-	-
17	79,6	79,0	5,90 (1H, s)	14, 18, 20, 21, 22
18	15,0	14,4	1,59 (3H, s)	12, 13, 14, 17
19	16,4	16,4	1,31 (3H, s)	1, 5, 9, 10
20	122,3	121,0	-	-
21	142,8	142,1	7,45 (1H, s)	20, 22, 23
22	111,1	110,2	6,55 (1H, d, 1,5)	20, 21, 23
23	144,4	143,0	7,30 (1H, t, 1,5)	20, 21, 22
28	15,9	15,3	0,92 (3H, s)	3, 4, 5, 29
29	41,5	40,8	2,23 (1H, d, 11,0) 1,75 (1H, d, 11,0)	1, 2, 3 1, 4, 10
30	74,8	74,0	5,34 (1H, s)	3, 8, 9
31	120,5	119,6	-	-

32	16,6	16,4	1,69 (3H, s)	31
1-OH	-	-	3,38 (3H, s)	1, 29
7-OMe	53,7	53,3	3,74 (3H, s)	7
2-OAc				
1'	168,8	170,5	-	-
2'	21,6	21,9	2,17 (3H, s)	1'
3-OAc				
1''	170,9	169,0	-	-
2''	21,8	21,7	2,06 (3H, s)	1''
6-OAc				
1'''	169,3	169,2	-	-
2'''	21,0	20,9	2,20 (3H, s)	1'''
12-OAc				
1''''	170,2	170,4	-	-
2''''	19,8	19,8	1,55 (3H, s)	1''''

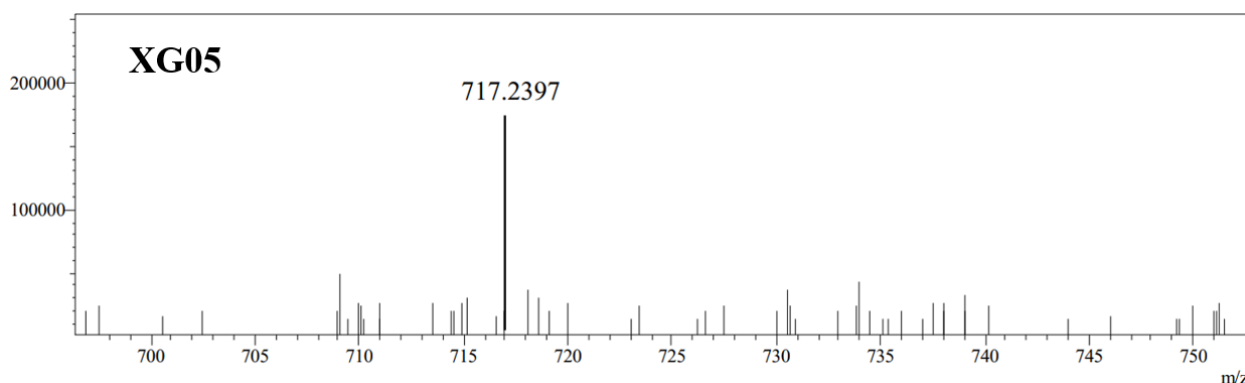
* Tài liệu tham khảo [82] ; ^a đo trong CDCl₃, ^b 125 MHz, ^c 500 MHz, ^d đo trong acetone-d₆

3.2.5. Hợp chất XG05

Hợp chất **XG05** (hình 3.36) thu được dưới dạng chất bột kết tinh màu trắng (dạng vô định hình). Phổ khối phân giải cao HRMS xuất hiện peak ion tại m/z [M+H]⁺ là 717,2397 (hình 3.37), (tính toán theo lý thuyết ứng với công thức ion giả phân tử C₃₅H₄₁O₁₆⁺ là 717,2389. Kết hợp với phổ ¹H-NMR và ¹³C-NMR kết hợp phổ HMBC, HSQC (Bảng 3.15) cho thấy các chuyển dịch hóa học phù hợp với chất Xylococcin Q [114] đã công bố trong các tài liệu, xác định hợp chất **XG05** công thức phân tử C₃₅H₄₀O₁₆, khối lượng phân tử: 716,2316.



Hình 3.36. Cấu trúc và tương tác HMBC của hợp chất **XG05**



Hình 3.37. Phổ HRMS của hợp chất **XG05**

Phổ $^1\text{H-NMR}$ (Phụ lục 3, Hình PL82) xuất hiện bốn tín hiệu đặc trưng của proton thơm tại δH 6,44 (1H, s, H-15), 7,44 (1H, br s, H-21), 6,55 (1H, d, $J = 1.0$ Hz, H-22) và 7,30 (1H, t, $J = 1.7$ Hz, H-23); năm tín hiệu của nhóm oxymethine tại δH 5,14 (1H, s, H-3), 6,32 (1H, s, H-6), 4,91 (1H, s, H-12), 5,93 (1H, s, H-17) và 5,54 (1H, s, H-30). Vùng trường mạnh xuất hiện ba tín hiệu đặc trưng cho các nhóm methyl tại δH 1,59 (3H, s, H-18), 1,30 (3H, d, $J = 7.0$ Hz, H-19) và 0,93 (3H, s, H-28); ba tín hiệu của các nhóm methyl của các nhóm acetyl tại δH 2,04 (3H, s, H-2'), 2,20 (3H, s, H-2''), 1,55 (3H, s, H-2'''); một tín hiệu methyl của nhóm orthoacetate tại δH 1,70 (3H, s, H-32) và một tín hiệu đặc trưng của methyl trong nhóm este tại δH 3,75 (3H, s, 7-OCH₃). Còn lại những tín hiệu proton chuyển dịch trong vùng trường từ δH 1,81 đến 2,50 của các nhóm methine, methylen thông thường.

Phổ $^{13}\text{C-NMR}$ (Phụ lục 3, Hình PL83) kết hợp phổ HSQC (Phụ lục 3, Hình PL84) cho thấy hợp chất **XG05** chứa 35 nguyên tử carbon, gồm 26 carbon của khung limonoid và 9 tín hiệu còn lại của các nhóm thế. Trong khung limonoid xuất hiện hai tín hiệu đặc trưng cho các nhóm ketone tại δC 171,7 (C-7), 163,3 (C-16), sáu tín hiệu của ba liên kết đôi tại δC 153,1 (C-14)/123,7 (C-15), 120,9 (C-20)/142,1 (C-21) và 110,2 (C-22)/143,1 (C-23). Về phía vùng trường mạnh hơn xuất hiện năm tín hiệu của các nhóm oxymethine tại δC 85,7 (C-3), 71,2 (C-6), 68,3 (C-12), 78,9 (C-17) và 78,0 (C-30), bốn nhóm carbon oxygenated tại δC 84,1 (C-1), 75,2 (C-2), 83,6 (C-8) và 87,1 (C-9). Vùng trường mạnh xuất hiện ba tín hiệu của các nhóm methyl tại δC 14,4 (C-18), 16,4 (C-19) và 15,4 (C-28). Các nhóm thế bao gồm: ba nhóm acetyl tại δC 169,3 (C-1')/21,7 (C-2'), 169,2 (C-1'')/20,9 (C-2''), 170,4 (C-1''')/19,8 (C-2'''); một nhóm methyl este tại δC 53,3 (7-OCH₃) và hai tín hiệu của một nhóm orthoacetate tại δC 119,4 (C-31)/16,4 (C-32).

Phổ HMBC (Phụ lục 3, Hình PL85) xuất hiện một số tương tác chính: H3-19 (δH 1,30) tương tác lên C-1, C-5, C-9 và C-10; H3-18 (δH 1,59) tương tác lên C-12, C-13, C-14 và C-17; H3-28 (δH 0,93) tương tác lên C-3, C-4, C-5 và C-29. Từ những

đặc điểm này cho biết hợp chất chứa ba nhóm methyl và vị trí của chúng. Proton H-3 (δ H 5.14) tương tác lên C-1', H-6 (δ H 6.32) tương tác lên C-1'' và H-12 (δ H 4.91) tương tác lên C-1'''. Những tương tác HMBC này cho biết tại các vị trí C-3, C-6 và C-12 có chứa các nhóm thế acetyl. Tương tác proton δ H 3,75 (3H, s, OCH₃) lên C-7 tại vị trí C-7 bị este methyl, cấu trúc và tương tác HMBC của hợp chất **XG05** (Hình 3.50). Dựa trên những dữ liệu phổ ¹H-NMR, ¹³C-NMR và các phổ khác (Bảng 3.15) và so sánh với tài liệu tham khảo đã công bố xác định được hợp chất mới **XG05** là Xylococcensin Q.

Bảng 3.15. Bảng số liệu phổ ¹H, ¹³C-NMR và HMBC của hợp chất **XG05**

XG05				
Vị trí C	* δ _C ^{d,b} Acetone	δ _C ^{a,b} CDCl ₃	δ _H ^{a,c} (J = Hz)	HMBC H→C
1	84,7	84,1		
2	76,0	75,2		
3	86,4	85,7	5,14 s	
4	45,0	44,3		
5	46,1	45,3	2,50 s	
6	71,9	71,2	6,32 s	5, 7, 10
7	172,7	171,7		
8	84,9	83,6		
9	87,6	87,1		
10	49,0	48,1		
11	33,0	32,2	2,32 dd (14,0, 4,0) 2,02 t (14,0)	
12	69,0	68,3	4,91 dd (14,0, 4,0)	
13	43,7	42,9		
14	153,9	153,1		
15	125,0	123,7	6,44 s	8, 13, 16
16	163,8	163,3		
17	79,4	78,9	5,93 s	14, 18, 20, 21, 22
18	15,0	14,4	1,59 s	12, 13, 14, 17
19	16,5	16,4	1,30 s	1, 5, 9, 10
20	122,5	120,9		
21	142,8	142,1	7,44 br s	
22	111,1	110,2	6,55 d (1,0)	
23	144,3	143,1	7,30 t (1,7)	
28	15,9	15,4	0,93 s	3, 4, 5, 29
29	41,2	40,3	2,12 d (11,0) 1,83 dd (11,0, 1,0)	
30	78,8	78,0	4,54 s	3, 8, 9
1-OH	-	-	3,45 s	1, 29
2-OH	-	-	3,55 s	2, 3
7-OMe	53,6	53,3	3,75 s	7
3-OAc				
1'	170,0	169,6	-	-
2'	21,8	21,7	2,04 s	1'
6-OAc				
1''	169,3	169,2	-	-
2''	21,0	20,9	2,20 s	1''

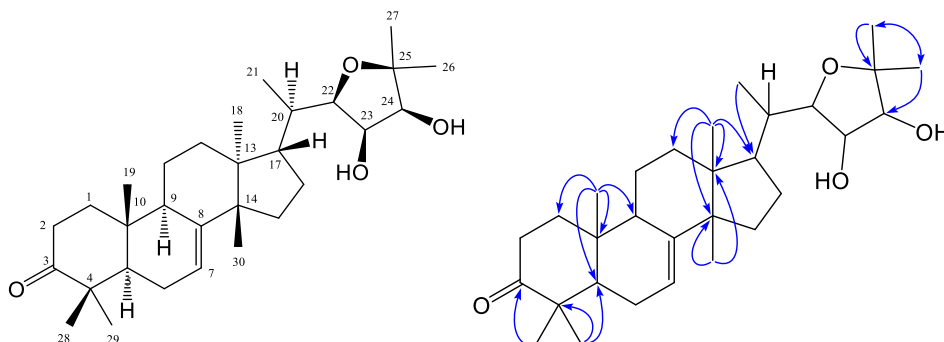
12-OAc				
1'''	170,2	170,4	-	-
2'''	19,8	19,8	1,55 s	1'''
31	120,1	119,4		-
32	16,6	16,4	1,70 s	31

* Tài liệu tham khảo [114]

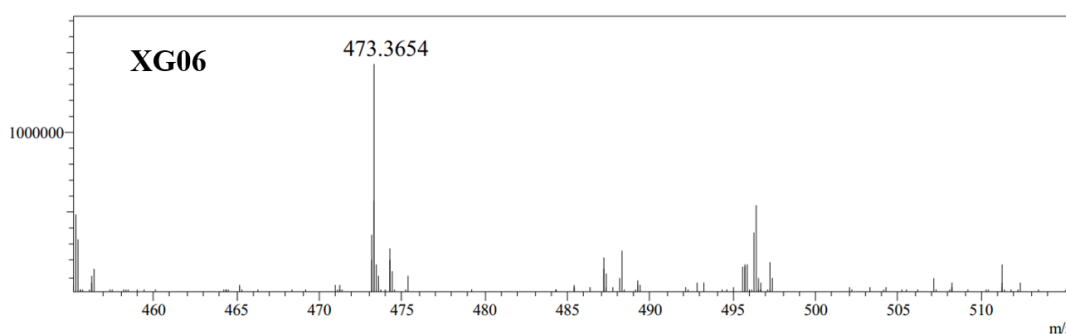
^a đo trong CDCl₃, ^b 125 MHz, ^c 500 MHz, ^d đo trong acetone-d₆

3.2.6. Hợp chất XG06

Hợp chất **XG06** (hình 3.38) thu được dưới dạng chất bột kết tinh màu trắng (dạng vô định hình). Phổ khối phân giải cao HRMS xuất hiện peak ion tại m/z [M+H]⁺ là 473,3654 (hình 3.39), (tính toán theo lý thuyết ứng với công thức ion giả phân tử C₃₀H₄₉O₄⁺ là 473,3625. Kết hợp phổ ¹H-NMR và ¹³C-NMR, phổ HMBC, HSQC (Bảng 3.16) cho thấy các chuyển dịch hóa học của **XG06** phù hợp với chất Odoratone [136] tương ứng với công thức phân tử C₃₀H₄₈O₄, khối lượng phân tử 472,3553.



Hình 3.38. Cấu trúc và tương tác HMBC của hợp chất **XG06**



Hình 3.39. Phổ HR-MS của hợp chất **XG06**

Phổ ¹H-NMR (Phụ lục 3, Hình PL86) trên vùng trường cao xuất hiện các tín hiệu đặc trưng của 8 nhóm methyl tại δH 0,82 (3H, s, H-18), 1,00 (3H, s, H-19), 0,85 (3H, d, J = 6,5 Hz, H-18), 1,22 (6H, s, H-26 và H-27), 1,04 (6H, s, H-28, và H-30) và 1,11 (3H, s, H-29). Trên vùng trường trung bình là các tín hiệu proton của 3 nhóm

oxymethine tại δH 3,82 (1H, dd, $J = 1,5, 6,0$ Hz, H-22), 3.97 (1H, d, $J = 6,5$ Hz, H-23), 3,66 (1H, d, $J = 6,5$ Hz, H-23). Vùng trường thấp xuất hiện một tín hiệu proton thơm tại δH 5,30 (1H, m, H-7). Ngoài ra là các tín hiệu của các nhóm methine, methylene.

Phổ ^{13}C -NMR (Phụ lục 3, Hình PL87) kết hợp phổ HSQC (Phụ lục 3, Hình PL88) cho thấy hợp chất chứa 30 nguyên tử carbon, bao gồm có 7 nguyên tử carbon không chứa hydro, 8 nhóm methine, 7 nhóm methylene và 8 nhóm methyl. Trong đó xuất hiện một số tín hiệu đặc trưng của một số nhóm trong phân tử: 8 tín hiệu carbon đặc trưng của nhóm methyl tại δC 21,8 (C-18), 12,8 (C-19), 12,4 (C-21), 27,7 (C-26 và C-30), 21,2 (C-27), 24,5 (C-28) và 21,6 (C-29); một tín hiệu đặc trưng của nhóm ketone tại δC 217,0 (C-3); ba tín hiệu đặc trưng của nhóm oxymethine tại δC 83,7 (C-22), 72,9 (C-23) và 77,4 (C-24) và một nhóm carbon oxygenate tại δC 80,9 (C-25).

Trên phổ HMBC (Phụ lục 3, Hình PL88) xuất hiện một số tương tác chính. Proton H3-18 tương tác lên C-12, C-13, C-14 và C-17; H3-19 tương tác lên C-1, C-5, C-9, C-10; H3-19 tương tác lên C-1; H3-26 và H3-27 tương tác lên C-24, C-25; H3-28 và H3-29 tương tác lên C-3, C-4, C-5; H3-30 tương tác lên C-13, C-14. Với những tương tác trên xác định được vị trí các nhóm methyl trên hợp chất và cũng đồng thời cho biết được hợp chất có khung lanostane.

Xét trên phổ COSY (Phụ lục 3, Hình PL90) và NOESY (Phụ lục 3, Hình PL91) thấy xuất hiện một số tương tác chính: Proton H-1a (δH 1,45) tương tác với proton H2b (δH 2,76), H-5 (δH 1,72) tương tác với H-6 (δH 2,09), H-6 tương tác với H-7 (δH 5,30), H-9 (δH 2,29) tương tác với H-11 (δH 1,56), H-11 tương tác với H-12b (δH 1,87), H-15 (δH 1,50) tương tác với H-16b (δH 2,02), H-16b tương tác với H-17 (δH 1,87), H-17 tương tác với H-20 (δH 1,65), H-20 tương tác với H-21 (δH 0,85) và H-22 (δH 3,82), H-22 tương tác với H-23 (δH 3,97), H-23 tương tác với H-24 (δH 3,66), cấu trúc và tương tác HMBC của hợp chất **XG06** (Hình 3.38). Với những phân tích dữ liệu phổ như trên và so sánh với dữ liệu phổ hợp chất Odoratone [136] (Bảng 3.16) cho thấy chúng có sự tương đồng, hợp chất **XG06** có công thức cấu tạo như hình 3.38. Đây là lần đầu tiên hợp chất này được phân lập từ chi Xu.

Bảng 3.16. Bảng số liệu phổ ^1H , ^{13}C -NMR, HMBC, COSY và NOESY của hợp chất
XG06

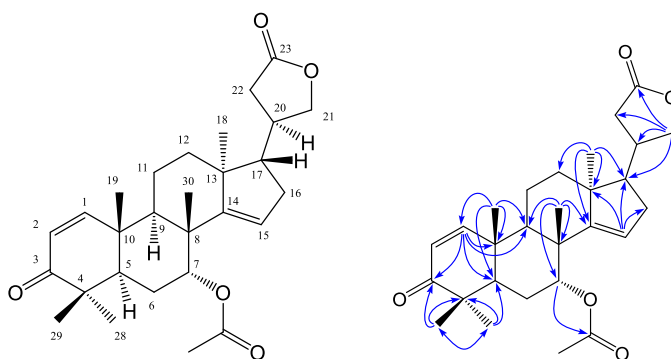
XG06						
Vị trí C	$^*\delta_{\text{C}}^{\text{d,e}}$	$\delta_{\text{C}}^{\text{a,b}}$	$\delta_{\text{H}}^{\text{a,c}}$ ($J = \text{Hz}$)	HMBC H $\rightarrow$ C	COSY	NOESY
1	38,5	38,5	1,45 (1H, m) 1,98 (1H, m)		2	19
2	34,9	34,9	2,24 (1H, ddd, 3,5, 3,5, 14,0) 2,76 (1H, ddd, 5,5, 14,5, 14,5)		1	19, 28
3	217,1	217,0	-			
4	47,9	47,9	-			
5	52,3	52,4	1,72 (1H, dd, 8,0, 9,0)	19, 4, 10, 6, 28	6	9, 29
6	24,3	24,4	2,09 (2H, m)		5, 7, 9	19
7	117,8	117,8	5,30 (1H, m)	5, 14, 9	6	
8	146,0	146,0	-			
9	49,3	48,6	2,29 (1H, m)		6, 11	5, 18
10	35,0	35,0	-			
11	18,4	18,3	1,56 (2H, m)		9, 12	19
12	34,0	33,5	1,61 (1H, m) 1,87 (1H, m)		11	18 30, (21)
13	43,5	43,5	-			
14	51,2	51,2	-			
15	33,5	34,1	1,50 (2H, m)		16	30
16	29,6	27,8	1,36(1H, m); 2,02(1H, m)		15, 17	18, 20, 22, 30, 22
17	48,5	49,3	1,87 (1H, m)		16, 20	30, 21
18	21,9	21,8	0,82 (3H, s)	12, 13, 14, 17		12a, 9, 16a
19	12,8	12,8	1,00 (3H, s)	5, 9, 1, 10		1b, 2b, 6, 11
20	37,6	37,5	1,65 (1H, m)		21, 17, 22	22, 23
21	12,3	12,4	0,85 (3H, d, 6,5)	17, 20, 22	20	17(12b), 23, 24
22	83,7	83,7	3,82 (1H, dd, 1,5, 6,0)		20, 23	16ab, 26(27)
23	72,9	72,9	3,97 (1H, t, 6,5)		22, 24	22, 24
24	77,5	77,4	3,66 (1H, d, 6,0)		23	
25	81,0	80,9	-			
26	29,6	27,7	1,22 (3H, s)	24, 25, 27		(22)
27	21,3	21,2	1,22 (3H, s)	24, 25, 26		(22)
28	24,6	24,5	1,04 (3H, s)	28, 5, 4, 3		2b
29	21,6	21,6	1,11 (3H, s)	29, 5, 4, 3		5
30	27,8	27,7	1,04 (3H, s)	8, 13, 14, 15		15, 12b, 17, 16b

* Tài liệu tham khảo [136]

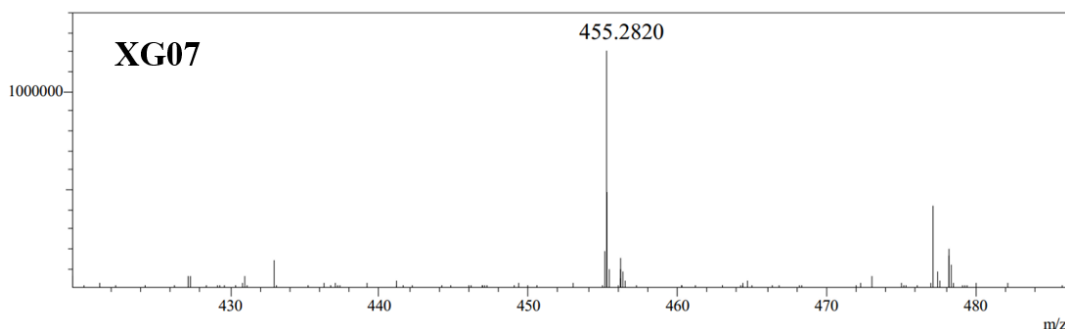
^a đo trong CDCl_3 , ^b 125 MHz, ^c 500 MHz, ^e 100 MHz

3.2.7. Hợp chất XG07

Hợp chất **XG07** (hình 3.40) thu được dưới dạng chất bột kết tinh màu trắng (dạng vô định hình), Phổ khối phân giải cao HR-MS xuất hiện peak ion tại m/z $[M+H]^+$ là 455,2774 (hình 3.41), (tính toán theo lý thuyết ứng với công thức ion giả phân tử $C_{28}H_{39}O_5^+$ là 455,2792. Kết hợp phổ 1H -NMR và ^{13}C -NMR, HMBC, HSQC (Bảng 3.17) cho thấy các chuyển dịch hóa học của **XG07** phù hợp với chất Chisocheton F (Apotirucallane 20,21,22,23, tetrahydro-23-oxoazadirone) [137] tương ứng với công thức phân tử tương ứng với công thức phân tử $C_{28}H_{38}O_5$, khối lượng phân tử: 454,2719.



Hình 3.40. Cấu trúc và tương tác HMBC của hợp chất **XG07**



Hình 3.41. Phổ HRMS của hợp chất **XG07**

Phổ 1H -NMR (Phụ lục 3, Hình P92) xuất hiện ba tín hiệu đặc trưng của proton thơm tại δ_H 7,13 (1H, d, $J = 10,0$ Hz, H-1), 5,86 (1H, d, $J = 10,0$ Hz, H-2) và 5,30 (1H, m, H-15); một tín hiệu của nhóm oxymethine tại δ_H 5,24 (1H, t, $J = 3,0$ Hz, H-7); hai tín hiệu của nhóm oxymethylene tại δ_H 3,93 (1H, dd, $J = 9,0, 9,5$ Hz, H-21a) và 4,46 (1H, dd, $J = 8,0, 8,5$ Hz, H-21b). Vùng trường mạnh xuất hiện các tín hiệu đặc trưng cho các nhóm methyl tại δ_H 1,02 (3H, s, H-18), 1,07 (6H, s, H-28 và H-29), 1,18 (6H, s, H-19 và H-30), và một tín hiệu nhóm methyl đặc trưng của methyl trong nhóm acetyl tại δ_H 1,95 (3H, s, H-2'). Còn lại những tín hiệu proton chuyển dịch trong vùng trường từ δ_H 1,56 đến 2,75 của các nhóm methine, methylen thông thường.

Phổ ^{13}C -NMR (Phụ lục 3, Hình PL93) kết hợp phổ HSQC (Phụ lục 3, Hình PL94) cho thấy hợp chất **XG07** chứa 32 nguyên tử carbon. Trong đó xuất hiện ba tín hiệu đặc trưng cho các nhóm ketone tại δC 204,4 (C-3), 176,6 (C-23) và 170,0 (C-1'), bên cạnh đó là bốn tín hiệu của hai liên kết đôi tại δC 157,8 (C-1)/125,6 (C-2) và δC 158,7 (C-14)/118,9 (C-15). Về phía vùng trường mạnh hơn xuất hiện một tín hiệu của nhóm oxymethine tại δC 74,4 (C-7), một tín hiệu của nhóm oxymethylene tại δC 72,4 (C-21). Vùng trường mạnh xuất hiện các tín hiệu của các nhóm carbon không chứa hydro, nhóm methine, methylene và nhóm methyl dịch chuyển trong khoảng δC 58,2 đến 16,4. Phổ HMBC (Phụ lục 3, Hình PL95) xuất hiện một số tương tác chính: H3-19 (δH 1,18) tương tác lên C-1, C-5, C-9, C-10; H3-18 (δH 1,02) tương tác lên C-12, C-13, C-14, C-17; H3-30 (δH 1,18) tương tác lên C-7, C-8, C-9, C-14; H3-28 và H3-29 (δH 1,02) cùng tương tác lên C-3, C-4 và C-5. Từ những đặc điểm này cho biết hợp chất chứa 5 nhóm methyl và vị trí của chúng. Proton H-21a (δH 3,93) tương tác lên C-17 và C-20; H-21b tương tác lên C-22 và C-23. Với những tương tác này cho biết hợp chất có chứa vòng furan và thế vào vị trí C-17. Từ đó cho thấy hợp chất là một limonoid. Tương tác proton H-7 (δH 5,24) tương tác lên C-1', cho biết vị trí C-7 trên hợp chất có nhóm thế acetyl. Với những phân tích dữ liệu phổ trên và so sánh với hợp chất chisocheton F đã công bố thì thấy chúng có sự tương đồng. Vậy hợp chất **XG07** (hình 3.54) được xác định là Chisocheton F (Apotirucallane 20,21,22,23, tetrahydro-23-oxoazadirone) [137]. Đây là lần đầu tiên hợp chất này được phân lập từ chi Xu.

Bảng 3.17. Bảng số liệu phổ ^1H , ^{13}C -NMR và HMBC của hợp chất **XG07**

XG07				
Vị trí C	$^*\delta_{\text{C}}^{\text{a,e}} \text{CDCl}_3$	$\delta_{\text{C}}^{\text{a,b}} \text{CDCl}_3$	$\delta_{\text{H}}^{\text{a,c}} (J = \text{Hz})$	HMBC H $\rightarrow$ C
1	157,8	157,8	7,13 (1H, d, 10,0)	3, 5, 9, 10
2	125,6	125,6	5,86 (1H, d, 10,0)	4, 10
3	204,5	204,4	-	-
4	44,1	44,2	-	-
5	46,6	46,2	2,18 (1H, m)	
6	23,7	23,8	1,79 (1H, m) 1,91 (1H, m)	
7	74,4	74,4	5,24 (1H, t, 3,0)	1', 5
8	42,7	42,7		
9	38,3	38,4	2,20 (1H, m)	
10	39,9	39,9		
11	16,4	16,4	1,73 (1H, m) 1,96 (1H, m)	
12	33,8	33,8	1,57 (1H, m) 1,73 (1H, m)	
13	46,2	46,6		
14	158,7	158,7		
15	118,9	118,9	5,30 (1H, m)	13, 16, 17
16	34,8	34,8	1,18 (1H, m) 2,05 (1H, m)	
17	58,2	58,2	1,71 (1H, m)	

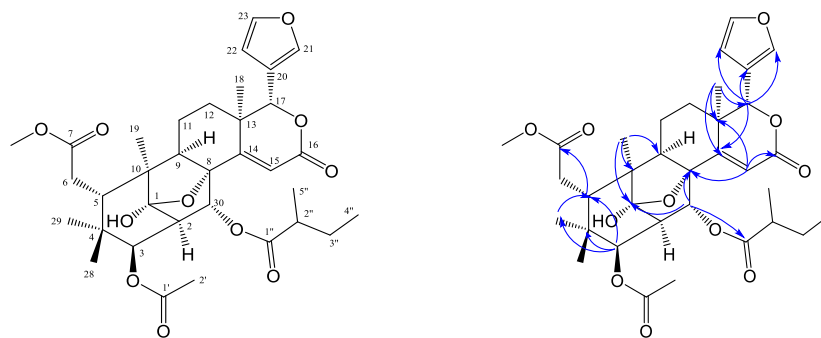
18	19,9	20,0	1,02 (3H, s)	12, 13, 14, 17
19	19,0	19,0	1,18 (3H, s)	1, 5, 9, 10
20	37,5	37,5	2,71 (1H, m)	
21	72,4	72,4	3,93 dd (9.0, 9.5) 4,46 dd (8.0, 8.5)	17, 20 22, 23
22	34,0	34,0	2,20 (1H, m) 2,52 (1H, dd, 8.0, 17.0)	
23	177,0	176,6	-	
28	27,0	27,0	1,07 (3H, s)	3, 4, 5, 29
29	21,1	21,3	1,07 (3H, s)	3, 4, 5, 28
30	27,4	27,4	1,18 (3H, s)	7, 8, 9, 14
7-OAc				
C-1'	170,0	170,0	-	
C-2'	21,3	21,1	1,95 (3H, s)	1'

*Tài liệu tham khảo[137]

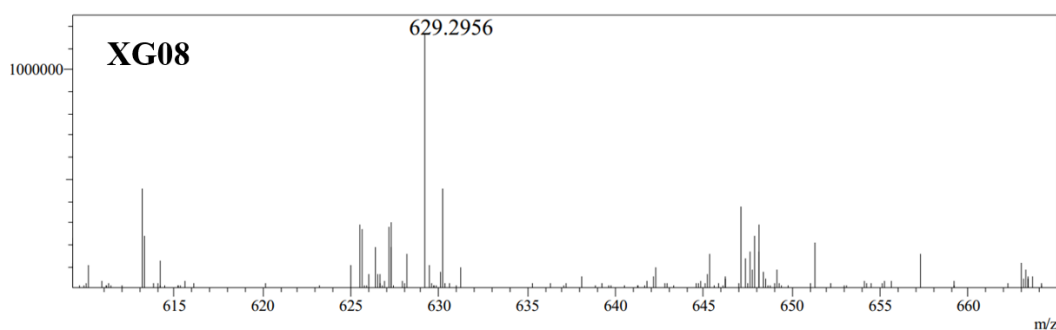
^a đo trong CDCl₃, ^b 125 MHz, ^c 500 MHz, ^d 400 MHz, ^e 100 MHz

3.2.8. Hợp chất XG08

Hợp chất **XG08** (Hình 3.42) thu được dưới dạng chất rắn, vô định hình màu trắng. Phổ khối phân giải cao HRMS xuất hiện peak ion tại m/z 629,2956 $[M + H]^+$ (hình 3.43) (tính toán theo lý thuyết ứng với công thức giả phân tử $C_{34}H_{45}O_{11}^+$, m/z 629,2956). Kết hợp với phổ 1H -NMR và ^{13}C -NMR cho gợi ý hợp chất **XG08** được xác định có công thức phân tử $C_{34}H_{44}O_{11}$ và khối lượng phân tử là $M = 628,2884$, so sánh với tài liệu tham khảo đã công bố thì hợp chất **XG08** được xác định là Xylogranatin S [138].



Hình 3.42. Cấu trúc và tương tác HMBC của hợp chất **XG08**



Hình 3.43. Phổ HRMS của hợp chất **XG08**

Phổ $^1\text{H-NMR}$ (Phụ lục 3, Hình PL96) xuất hiện các tín hiệu đặc trưng của các nhóm methyl tại δ_{H} 1,21 (3H, s, H-18), 1,06 (3H, s, H-19), 0,78 (3H, s, H-28), 1,24 (3H, s, H-29), 1,99 (3H, s, H-2'), 0,90 (3H, t, $J = 7,5$ Hz, H-4''), 1,05 (3H, d, $J = 7,5$ Hz, H-5'') và 3,69 (3H, s, 7-OCH₃). Ba tín hiệu đặc trưng của các nhóm oxymethine tại δ_{H} 5,08 (1H, d, $J = 9,0$ Hz, H-3), 4,99 (1H, s, H-17), 5,57 (1H, d, $J = 4,5$ Hz, H-30). Bên cạnh đó còn xuất hiện bốn tín hiệu proton thơm tại δ_{H} 6,03 (1H, s, H-15), 7,49 (1H, s, H-21), 6,42 (1H, d, $J = 1,0$ Hz, H-22), 7,41 (1H, t, $J = 1,5$ Hz, H-23). Còn lại là những tín hiệu của các nhóm methine, methylene.

Phổ $^{13}\text{C-NMR}$ (Phụ lục 3, Hình PL97) kết hợp với phổ HSQC (Phụ lục 3, Hình PL98) cho biết hợp chất chứa 34 nguyên tử carbon. Trong đó 26 tín hiệu carbon của khung chất chính limonoid, còn lại tám tín hiệu carbon của các nhóm thế. Trong khung limonoid có một số tín hiệu đặc trưng như: Bốn tín hiệu các nhóm methyl tại δ_{C} 19,6 (C-18), 20,6 (C-19), 24,5 (C-28), 21,8 (C-29); ba nhóm oxymethine tại δ_{C} 74,0 (C-3), 81,3 (C-17), 75,9 (C-30); một tín hiệu của carbon liên kết với hai nguyên tử oxy tại δ_{C} 107,5 (C-1); một nhóm carbon oxygenated tại δ_{C} 81,5 (C-8); hai tín hiệu của một liên kết đôi tại δ_{C} 159,5 (C-14)/117,7 (C-15); bốn tín hiệu của hai liên kết đôi trong vòng furan tại δ_{C} 120,0 (C-20)/141,3 (C-21) và δ_{C} 109,9 (C-22)/142,9 (C-23); hai tín hiệu đặc trưng của các nhóm carboxyl tại δ_{C} 173,9 (C-7) và δ_{C} 163,7 (C-16). Các nhóm thế trên khung limonoid bao gồm: một nhóm methyl este tại δ_{C} 51,9 (7-OCH₃); một nhóm acetyl tại [δ_{C} 170,1 (C-1') và 20,9 (C-2')], và một nhóm acyl tại [δ_{C} 176,2 (C-1''), 40,8 (C-2''), 26,6 (C-3''), 11,6 (C-4'') và 16,0 (C-5'')]. Phổ HMBC (Phụ lục 3, Hình PL99) xuất hiện một số tương tác chính và phổ COSY (Phụ lục 3, Hình PL100) và NOESY (Phụ lục 3, Hình PL101) với proton H-18 tương tác lên C-12, C-13, C-14, C-17; H-19 tương tác lên C-1, C-5, C-9, C-10; H-28 tương tác lên C-3, C-4, C-5, C-29; H-29 tương tác lên C-3, C-4, C-5, C-28. Tương tác này cho biết vị trí các nhóm methyl trên cấu trúc hợp chất. Tương tác giữa proton H-3 lên C-1' cho biết nhóm acetyl thế vào vị trí C-3 của khung chất. Tương tác H-30 tương tác lên C-1'' cho biết nhóm acyl thế vào vị trí C-30 trên hợp chất. Tương tác proton 7-OCH₃ tương tác lên C-7 cho biết vị trí C-7 este hóa. Với những phân tích dữ liệu phổ như trên và so sánh với tài liệu tham khảo đã công bố (Bảng 3.18) thì hợp chất **XG08** (hình 3.42) được xác định là xylogranatin S [138]. Vậy hợp chất **XG08** được xác định làm Xylogranatin S.

Bảng 3.18. Bảng số liệu phổ ^1H , ^{13}C -NMR và HMBC của hợp chất **XG08**

XG08				
Vị trí C	$^*\delta_{\text{C}}^{\text{a,e}} \text{CDCl}_3$	$\delta_{\text{C}}^{\text{a,b}} \text{CDCl}_3$	$\delta_{\text{H}}^{\text{a,c}} (J = \text{Hz})$	HMBC H $\rightarrow$ C
1	107,7	107,5	-	-
2	53,6	53,3	2,90 (1H, dd, 4,0, 9,0)	
3	73,7	74,0	5,08 (1H, d, 9,0)	4, 5, 29, 30
4	38,0	37,5	-	-
5	40,8	40,6	2,63 (1H, dd, 1,5, 10,0)	7
6	32,3	32,1	2,36 (1H, #) 2,14 (1H, #)	-
7	174,0	173,9	-	-
8	81,8	81,5	-	-
9	51,8	51,6	2,14 (1H, #)	-
10	43,1	42,9	-	-
11	15,3	15,1	1,80 (1H, m) 2,36 (1H, #)	-
12	25,1	25,1	1,40 (1H, #) 2,14 (1H, #)	-
13	39,1	39,0	-	-
14	159,7	159,5	-	-
15	118,0	117,7	6,03 (1H, s)	8, 13, 16
16	163,7	163,7	-	-
17	81,4	81,3	4,99 (1H, s)	14, 20, 21, 22,
18	19,9	19,6	1,21 (3H, s)	12, 13, 14, 17
19	20,7	20,6	1,06 (3H, s)	1, 5, 9, 10
20	120,2	120,0	-	-
21	141,4	141,3	7,49 (1H, s)	17, 20, 22, 23
22	110,2	109,9	6,42 (1H, d, 1.0)	20, 21, 23
23	143,1	142,9	7,41 (1H, t, 1.5)	20, 21, 23
28	24,8	24,5	0,78 (3H, s)	3, 4, 5, 29
29	22,1	21,8	1,24 (3H, s)	3, 4, 5, 28
30	76,4	75,9	5,57 (1H, d, 4,5)	1, 1'', 3, 8
7-OCH ₃	52,2	51,9	3,69 (3H, s)	7
3-OAc				
1'		170,1	-	-
2'		20,9	1,99 (3H, s)	1'
30-acyl				
1''	176,2	176,2	-	-
2''	40,9	40,8	2,29 (1H, dd, 7,0, 13,5)	1'', 3'', 4'', 5''
3''	26,6	26,6	1,40 (1H, m) 1,63 (1H, m)	-
4''	11,9	11,6	0,90 (3H, t, 7,5)	2'', 3''
5''	15,9	16,0	1,05 (3H, d, 7,5)	1'', 2'', 3''

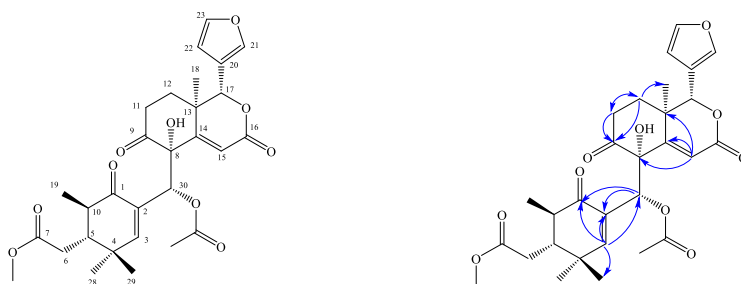
* Tài liệu tham khảo [138]

^a đo trong CDCl₃, ^b 125 MHz, ^c 500 MHz, ^d 400 MHz, ^e 100 MHz ;

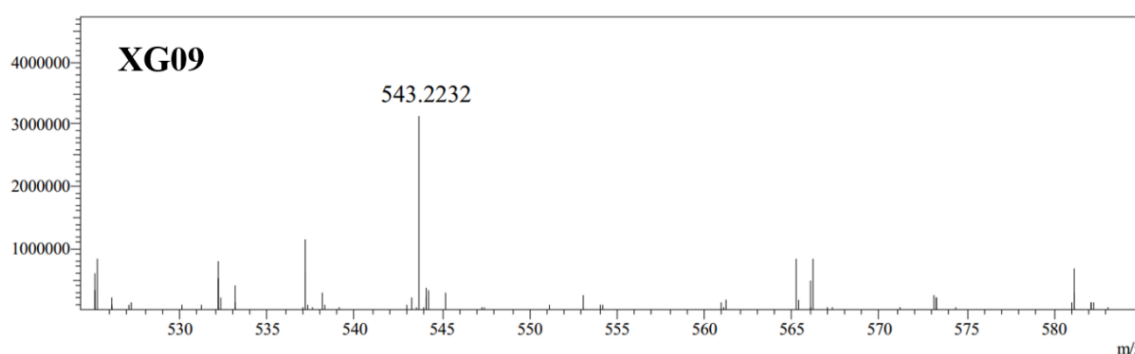
3.2.9. Hợp chất XG09

Hợp chất **XG09** (Hình 3.44) thu được dưới dạng chất lỏng sánh đặc không màu. Phổ khối phân giải cao HR-MS xuất hiện peak ion tại m/z 543,2232 $[\text{M} + \text{H}]^+$ (hình 3.45), (tính toán theo lý thuyết ứng với công thức giả phân tử $\text{C}_{29}\text{H}_{35}\text{O}_{10}^+$, m/z 543,2225). Kết hợp với phổ ^1H -NMR và ^{13}C -NMR (Bảng 3.19) cho gợi ý hợp chất **XG09** được xác định có công thức phân tử $\text{C}_{29}\text{H}_{34}\text{O}_{10}$ và khối lượng phân tử là $M =$

542,2152 và so sánh với tài liệu tham khảo đã công bố cho thấy hợp chất **XG09** là hợp chất Xylogranatin C [43].



Hình 3.44. Cấu trúc và tương tác HMBC của hợp chất **XG09**



Hình 3.45. Phổ HRMS của hợp chất **XG09**

Phổ $^1\text{H-NMR}$ (Phụ lục 3, Hình PL102) xuất hiện năm tín hiệu đặc trưng của proton thơm tại δ_{H} 7,00 (1H, s, H-3), 6,17 (1H, s, H-15) và 7,54 (1H, s, H-21), 6,45 (1H, d, $J = 1,0$ Hz, H-22) và 7,44 (1H, t, $J = 1.5$ Hz, H-23); hai tín hiệu của nhóm oxymethine tại δ_{H} 5,33 (1H, s, H-17) và 6,53 (1H, s, H-30). Vùng trường mạnh xuất hiện các tín hiệu đặc trưng cho các nhóm methyl tại δ_{H} 0,98 (3H, s, H-18), 1,04 (3H, d, $J = 6,0$ Hz, H-19), 1,11 (3H, s, H-28), 1,20 (3H, s, H-29) và một tín hiệu đặc trưng của methyl trong nhóm este tại δ_{H} 3,69 (3H, s, 7-OCH₃). Còn lại những tín hiệu proton chuyển dịch trong vùng trường từ δ_{H} 1,62 đến 3,06 của các nhóm methine, methylen thông thường.

Phổ $^{13}\text{C-NMR}$ (Phụ lục 3, Hình PL103) kết hợp phổ HSQC (Phụ lục 3, Hình PL104) cho thấy hợp chất **XG09** chứa 29 nguyên tử carbon. Trong đó xuất hiện bốn tín hiệu đặc trưng cho các nhóm ketone tại δ_{C} 198,8 (C-1), 173,4 (C-7), 208,8 (C-9), 163,3 (C-16), một tín hiệu keton trong nhóm acetyl tại δ_{C} 169,9 (C-1'), bên cạnh đó là tám tín hiệu của bốn liên kết đôi tại δ_{C} 128,5 (C-2)/162,0 (C-3), 164,1 (C-14)/118,2 (C-15), 119,6 (C-20)/141,5 (C-21) và 109,8 (C-22)/143,3 (C-23). Về phía vùng trường mạnh hơn xuất hiện hai tín hiệu của các nhóm oxymethine tại δ_{C} 80,2 (C-17) và 67,4 (C-30), một nhóm carbon oxygenated tại δ_{C} 80,1 (C-8). Vùng trường mạnh xuất hiện các tín hiệu của các nhóm carbon không chứa hydro, nhóm methine,

methylene và nhóm methyl dịch chuyển trong khoảng δ_C 52,0 đến 11,7. Phổ HMBC (Phụ lục 3, Hình PL105) xuất hiện một số tương tác chính: H3-19 (δ_H 1,04) tương tác lên C-1, C-5, C-10; H3-18 (δ_H 0,98) tương tác lên C-12, C-13, C-14, C-17; H3-28 và H3-29 (δ_H 1,11 và 1,20) cùng tương tác lên C-3, C-4 và C-5. Từ những đặc điểm này cho biết hợp chất chứa bốn nhóm methyl và vị trí của chúng. Proton H-21 (δ_H 7,54) tương tác lên C-20, C-22 và C-23. Với những tương tác này cho biết hợp chất có chứa vòng furan và thế vào vị trí C-17. Từ đó cho thấy hợp chất là một limonoid. Tương tác proton δ_H 3,69 (3H, s, OCH₃) lên C-7 tại vị trí C-7 bị este methyl. Tương tác giữa H-30 (δ_H 6,53) với C-1' cho biết tại vị trí C-30 có nhóm thế acetyl. Với những phân tích dữ liệu phổ trên và so sánh với tài liệu tham khảo đã công bố hợp chất xylogranatin C [43] thì thấy chúng có sự tương đồng. Vậy hợp chất **XG09** được xác định là Xylogranatin C.

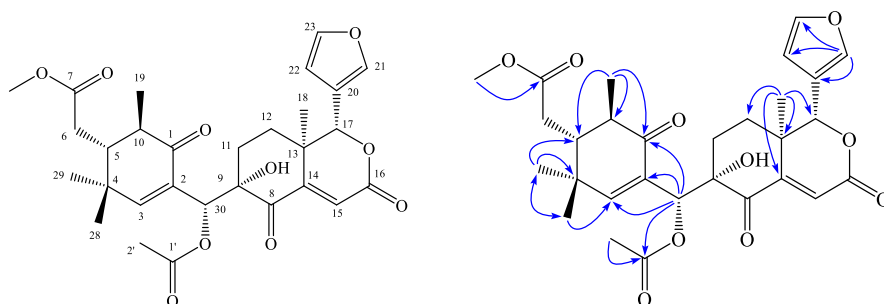
Bảng 3.19. Bảng số liệu phổ 1H , ^{13}C -NMR và HMBC của hợp chất **XG09**

XG09				
Vị trí C	$\delta_C^{a,e} CDCl_3$	$\delta_C^{a,b} CDCl_3$	$\delta_H^{a,c} (J = Hz)$	HMBC H→C
1	198,8	198,8	-	-
2	128,4	128,5	-	-
3	162,0	162,0	7,00 (1H, s)	1, 2, 4, 5, 28, 29, 30
4	36,8	36,9	-	-
5	45,2	45,3	2,24-2,31 (1H, overlaped)	
6	34,6	34,6	2,47 (1H, m) 2,24-2,31 (1H, overlaped)	
7	173,4	173,4	-	-
8	80,0	80,1	-	-
9	208,6	208,8	-	-
10	42,8	42,8	2,24-2,31 (1H, overlaped)	
11	33,0	33,0	2,51 (1H, m) 3,02 (1H, dd, 6,5, 20,0)	9, 12, 13
12	25,5	25,6	1,64 (1H, dd, 6,5, 13,0) 2,60 (1H, dd, 7,0, 13,0)	9, 11, 13, 14 18
13	38,4	38,4	-	-
14	164,1	164,1	-	-
15	118,1	118,2	6,17 (1H, s)	8, 13, 14
16	163,3	163,3	-	-
17	80,1	80,2	5,33 (1H, s)	13, 14, 16, 18, 20, 21, 22
18	18,4	18,5	0,98 (3H, s)	12, 13, 14, 17
19	11,6	11,7	1,04 (1H, d, 6,0)	1, 5, 10
20	119,5	119,6	-	-
21	141,4	141,5	7,54 (1H, s)	20, 22, 23
22	109,8	109,8	6,45 (1H, d, 1,0)	20, 21, 23
23	143,2	143,3	7,44 (1H, t, 1,5)	20, 21, 22
28	20,5	20,6	1,11 (3H, s)	3, 4, 5, 29
29	27,8	27,9	1,20 (3H, s)	3, 4, 5, 28
30	67,3	67,4	6,53 (1H, s)	1, 2, 3, 1'
7-OCH ₃	52,0	52,0	3,69 (3H, s)	7
30-OAc				
1'	169,9	169,9	-	-
2'	21,0	21,1	2,10 (3H, s)	1'

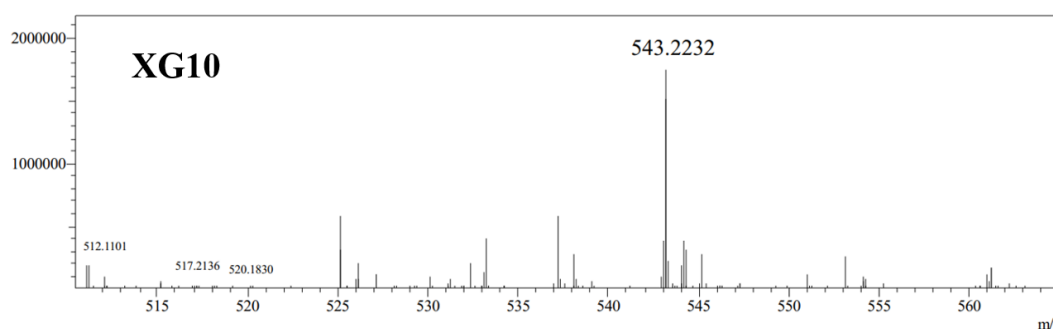
* Tài liệu tham khảo [43] ; ^a đo trong $CDCl_3$, ^b 125 MHz, ^c 500 MHz, ^d 400 MHz, ^e 100 MHz

3.2.10. Hợp chất **XG10**

Hợp chất **XG10** (Hình 3.46) thu được dưới dạng chất lỏng sánh đặc không màu. Phổ khối phân giải cao HR-MS xuất hiện peak ion tại m/z 543,2232 $[M + H]^+$ (hình 3.47), (tính toán theo lý thuyết ứng với công thức giả phân tử $C_{22}H_{27}O_{10}^+$, m/z 543,2225). Kết hợp với phổ 1H -NMR và ^{13}C -NMR kết hợp phổ HMBC, HSQC (Bảng 3.20) và so sánh với hợp chất Xylogranatin D [43] đã công bố xác định hợp chất **XG10** có công thức phân tử $C_{29}H_{34}O_{10}$ và khối lượng phân tử là $M = 542,2152$.



Hình 3.46. Cấu trúc và tương tác HMBC của hợp chất **XG10**



Hình 3.47. Phổ HRMS của hợp chất **XG10**

So sánh phổ 1H -NMR (Phụ lục 3, Hình PL106) và Phổ ^{13}C -NMR (Phụ lục 3, Hình PL107) của **XG10** với phổ của **XG09** cho thấy cấu trúc của cả hai hợp chất liên quan chặt chẽ, sự khác biệt chính xảy ra tại C-8 và C-9. Các tương quan phổ HMBC (Phụ lục 3, Hình PL109) quan trọng của H-15/C-8 (δ_C 200,8) và H-11/C-30 cho thấy methine ở C-30 đã di chuyển đến C-9 ở 4, dẫn đến hình thành carbon bậc bốn chứa nhóm OH ở C-9 (δ_C 79.6) và nhóm ceton liên hợp ở C-8. Do đó, dịch chuyển hóa học của H2-11 ở δ_H 1,79 và 1,68 ở **XG10** rõ ràng bị đẩy lên trường trước so với các hợp chất **XG09**, kết hợp phổ HSQC (Phụ lục 3, Hình PL108) và sự tương quan hóa học với **XG09**, **XG10** là đồng phân của **XG09**.

Với những phân tích dữ liệu phổ trên và so sánh với hợp chất xylogranatin D [43] đã công bố (Bảng 3.20) thì thấy chúng có sự tương đồng. Vậy hợp chất **XG10** được xác định là Xylogranatin D.

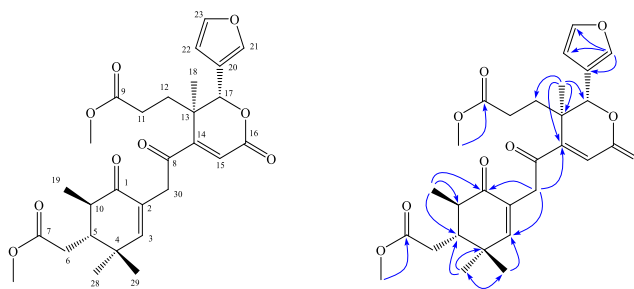
Bảng 3.20. Bảng số liệu phổ ^1H , ^{13}C -NMR và HMBC của hợp chất **XG10**

XG10				
Vị trí C	$\delta_{\text{C}}^{\text{a,e}} \text{CDCl}_3$	$\delta_{\text{C}}^{\text{a,b}} \text{CDCl}_3$	$\delta_{\text{H}}^{\text{a,c}} (J = \text{Hz})$	HMBC H $\rightarrow$ C
1	198,6	198,7	-	-
2	130,1	130,2	-	-
3	161,5	161,5	7,00 (1H, s)	1, 2, 4, 5, 28, 30
4	36,7	36,7	-	-
5	45,2	45,3	2,28-2,34 (1H, m)	-
6	34,7	34,7	2,30 (1H, m) 2,49 (1H, m)	-
7	173,4	173,4	-	-
8	200,8	200,9	-	-
9	79,6	79,6	-	-
10	43,1	43,2	2,42 (1H, dd, 6.5, 12.0)	1, 4, 5
11	29,2	29,4	1,68 (1H, dt, 3,5) 1,79 (1H, ddd, 3,5, 15,0, 15,0)	- 8, 9, 12
12	28,3	28,4	1,37 (1H, dt, 3,5) 2,24 (1H, ddd, 3,5, 15,0, 15,0)	9 -
13	41,4	41,4	-	-
14	156,2	156,3	-	-
15	121,6	121,6	6,35 (1H, s)	8, 13, 14, 16
16	163,3	163,3	-	-
17	81,3	81,4	5,52 (1H, s)	13, 14, 18, 20, 21, 22
18	18,5	18,6	1,07 (3H, s)	12, 13, 14, 17
19	12,2	12,3	1,15 d (7.0)	1, 5, 10
20	119,2	119,3	-	-
21	141,4	141,5	7,61 t (1,0)	20, 22, 23
22	109,7	109,7	6,50 t (1,0)	20, 21, 23
23	143,3	143,3	7,44 t (1,5)	20, 21, 22
28	28,0	28,0	1,18 (3H, s)	3, 4, 5, 29
29	20,5	20,6	1,09 (3H, s)	3, 4, 5, 28
30	66,4	66,5	6,27 (1H, s)	1, 1', 2, 3, 8, 9, 11
7-OCH ₃	52,0	52,0	3,70 (3H, s)	7
30-OAc				
1'	168,9	168,9	-	-
2'	20,7	20,7	1,99 (3H, s)	1'

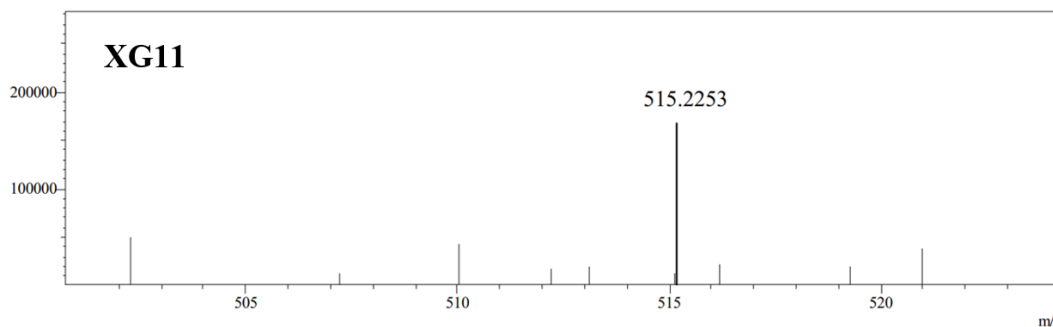
^a đo trong CDCl_3 , ^b 125 MHz, ^c 500 MHz, ^d 400 MHz, ^e 100 MHz

3.2.11. Hợp chất XG11

Hợp chất **XG11** (Hình 3.48) thu được dưới dạng chất bột vô định hình màu trắng. Phổ khối phân giải cao HR-MS xuất hiện peak ion tại m/z 515,2263 $[\text{M} + \text{H}]^+$ (hình 3.49), (tính toán theo lý thuyết ứng với công thức giả phân tử $\text{C}_{28}\text{H}_{34}\text{O}_9^+$, m/z 515,2276). Kết hợp với phổ ^1H -NMR và ^{13}C -NMR kết hợp phổ HMBC, HSQC (Bảng 3.21) và so sánh với tài liệu tham khảo đã công bố thì hợp chất **XG11** được xác định là 9-O-methyl Xylogranatin R [63] xác định hợp chất **XG11** có công thức phân tử $\text{C}_{28}\text{H}_{34}\text{O}_9$ và khối lượng phân tử là $M = 514,2203$.



Hình 3.48. Cấu trúc và tương tác HMBC của hợp chất **XG11**



Hình 3.49. Phổ HRMS của hợp chất **XG11**

Phổ $^1\text{H-NMR}$ (Phụ lục 3, Hình PL110) xuất hiện năm tín hiệu đặc trưng của proton thơm tại δH 6,48 (1H, s, H-3), 6,67 (1H, s, H-15) và 7,52 (1H, t, $J = 1,0$ Hz, H-21), 6,43 (1H, dd, $J = 1,0, 1,5$ Hz, H-22) và 7,43 (1H, t, $J = 1,5$ Hz, H-23); một tín hiệu của nhóm oxymethine tại δH 5,33 (1H, s, H-17). Vùng trường mạnh xuất hiện các tín hiệu đặc trưng cho các nhóm methyl tại δH 1,19 (3H, s, H-18), 1,08 (3H, d, $J = 6,5$ Hz, H-19), 1,09 (3H, s, H-28), 1,17 (3H, s, H-29) và hai tín hiệu đặc trưng của methyl trong nhóm este tại δH 3,69 (3H, s, 7-OCH₃), 3,67 (3H, s, 9-OCH₃). Còn lại những tín hiệu proton chuyển dịch trong vùng trường từ δH 1,76 đến 3,67 của các nhóm methine, methylen thông thường.

Phổ $^{13}\text{C-NMR}$ (Phụ lục 3, Hình PL111) kết hợp phổ HSQC (Phụ lục 3, Hình PL112) cho thấy hợp chất **XG11** chứa 28 nguyên tử carbon. Trong đó xuất hiện năm tín hiệu đặc trưng cho các nhóm ketone tại δC 199,3 (C-1), 173,6 (C-7), 197,9 (C-8), 172,8 (C-9), 163,4 (C-16), bên cạnh đó là tám tín hiệu của bốn liên kết đôi tại δC 129,3 (C-2)/158,3 (C-3), 158,9 (C-14)/124,4 (C-15), 119,8 (C-20)/141,7 (C-21) và 109,8 (C-22)/143,4 (C-23). Về phía vùng trường mạnh hơn xuất hiện một tín hiệu của nhóm oxymethine tại δC 78,6 (C-17). Vùng trường mạnh xuất hiện các tín hiệu của các nhóm carbon không chứa hydro, nhóm methine, methylene và nhóm methyl dịch chuyển trong khoảng δC 51,9 đến 11,8.

Phổ HMBC (Phụ lục 3, Hình PL113) xuất hiện một số tương tác chính: H3-19 (δH 1,08) tương tác lên C-1, C-5, C-10; H3-18 (δH 1,19) tương tác lên C-12, C-13, C-14, C-17; H3-28 và H3-29 (δH 1,09 và 1,17) cùng tương tác lên C-3, C-4 và C-5.

Từ những đặc điểm này cho biết hợp chất chứa bốn nhóm methyl và vị trí của chúng. Proton H-21 (δ_H 7.52) tương tác lên C-20, C-22 và C-23. Với những tương tác này cho biết hợp chất có chứa vòng furan và thế vào vị trí C-17. Từ đó cho thấy hợp chất là một limonoid. Tương tác proton δ_H 3.69 (3H, s, OCH₃) lên C-7 và δ_H 3.67 (3H, s, OCH₃) lên C-9 cho biết tại hai vị trí C-7 và C-9 bị este methyl. Với những phân tích dữ liệu phổ trên và so sánh với hợp chất 9-O-methyl Xylogranatin R đã công bố (Bảng 3.21) thì thấy chúng có sự tương đồng. Vậy hợp chất **XG11** được xác định là 9-O-methyl Xylogranatin R [63].

Bảng 3.21. Bảng số liệu phổ 1H , ^{13}C -NMR và HMBC của hợp chất **XG11**

XG12				
Vị trí C	$\delta_C^{a,e}$ DCl_3	$\delta_C^{a,b}$ $CDCl_3$	$\delta_H^{a,c}$ ($J = Hz$)	HMBC H $\rightarrow$ C
1	199,3	199,3	-	-
2	129,2	129,3	-	-
3	158,3	158,3	6,48 (1H, s)	1, 2, 4, 5, 29, 30
4	36,8	36,8	-	-
5	43,0	45,7	2,39 (1H, m)	-
6	34,7	34,8	2,31 (1H, m) 2,48 (1H, dd, 2.0, 16.0)	- 4, 7, 10
7	173,6	173,6	-	-
8	197,8	197,9	-	-
9	172,8	172,8	-	-
10	45,6	43,0	2,36 (1H, dd, 2.0, 6.5)	1, 5
11	29,4	29,5	2,31 (2H, m)	-
12	29,8	30,1	1,79 (1H, m) 2,28 (1H, m)	- -
13	41,4	41,4	-	-
14	158,9	158,9	-	-
15	124,4	124,4	6,67 (1H, s)	8, 16
16	163,4	163,4	-	-
17	78,5	78,6	5,33 (1H, s)	12, 13, 14, 18, 20, 21, 22
18	20,4	20,1	1,19 (3H, s)	12, 13, 14, 17
19	11,7	11,8	1,08 (3H, d, 6.5)	1, 5, 10
20	119,6	119,8	-	-
21	141,6	141,7	7,52 (1H, t, 1.0)	20, 22, 23
22	109,8	109,8	6,43 (1H, dd, 1.0, 1.5)	20, 21, 23
23	143,4	143,4	7,43 (1H, t, 1.5)	20, 21
28	20,1	20,5	1,09 (3H, s)	3, 4, 5, 29
29	28,2	28,2	1,17 (3H, s)	3, 4, 5, 28
30	41,3	41,3	3,45 (1H, d, 17.0) 3,63 (1H, d, 17.0)	1, 3, 14 1, 3, 14
7-OCH ₃	52,0	51,9	3,69 (3H, s)	7
9-OCH ₃	51,8	51,8	3,67 (3H, s)	9

* Tài liệu tham khảo [63]; ^a đo trong $CDCl_3$, ^b 125 MHz, ^c 500 MHz, ^d 400 MHz, ^e 100 MHz

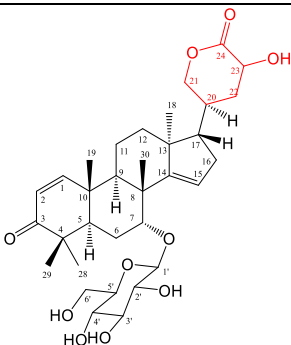
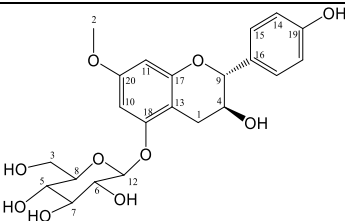
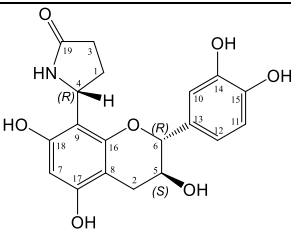
Nhận xét

Theo những nghiên cứu trước đây cho thấy Xu ôi là cây phổ biến trong nghiên cứu thực nghiệm cho thấy chi Xu chứa thành phần chính là nhóm hợp chất triterpenoid. Từ cây Xu ôi thu thập ở rừng ngập mặn Quảng Ninh - Việt Nam, các hợp chất đã phân lập được phù hợp với các nghiên cứu trước đây là thuộc nhóm hợp chất triterpenoid là nhóm đặc trưng cho chi Xu. Trong số 11 hợp chất đã phân lập

được có: 03 chất mới trong tự nhiên chưa được tìm thấy, 08 hợp chất đều có khung triterpenoid tương tự các hợp chất đã công bố trước đây.

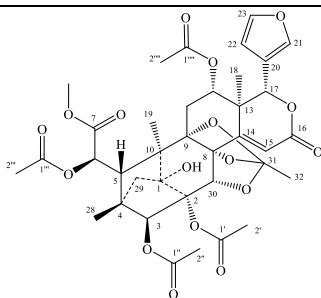
- **03 chất mới** phân lập được từ cây Xu ối gồm **XG01** (Xylocagranoside A); **XG02** (Xylocagranoside B); **XG03** (Xylocargranin A).
- 08 hợp chất đã biết đều có khung triterpenoid phân lập được từ cây Xu ối gồm **XG04** (Xyloccensin P), **XG05** (Xyloccensin Q), **XG06** (Odoratone), **XG07** (Chisocheton F), **XG08** (Xylogranatin S), **XG09** (Xylogranatin C), **XG10** (Xylogranatin D), **XG11** (9-O-methyl Xylogranatin R).

Các hợp chất **XG01–XG11** thể hiện sự đa dạng cấu trúc đáng kể nhưng vẫn chia sẻ một số đặc điểm chung về nguồn gốc sinh học và kiểu khung carbon. Phần lớn các hợp chất thuộc nhóm limonoid, mang bộ khung đa vòng furan. Một số hợp chất (**XG01–XG03**) có cấu trúc glycosid hoặc flavonoid, trong khi các hợp chất còn lại (**XG04–XG11**) chủ yếu mang khung limonoid đặc trưng kèm vòng furan. Sự khác nhau chủ yếu nằm ở mức độ oxy hóa, số lượng nhóm acyl hóa và biến đổi mạch nhánh, dẫn đến khác biệt rõ rệt về khối lượng phân tử và tính chất phân tích.

TT	Ký hiệu	Công thức cấu tạo	Ghi chú
1.	XG01		Chất mới: Xylocagranoside A Công thức phân tử $C_{33}H_{48}O_{10}$, Khối lượng phân tử 604,3247
2.	XG02		Chất mới: Xylocagranoside B Công thức phân tử $C_{22}H_{26}O_{10}$, Khối lượng phân tử 450,1526
3.	XG03		Chất mới: Xylocargranin A Công thức phân tử $C_{19}H_{19}NO_7$, Khối lượng phân tử 373,1162

XG04

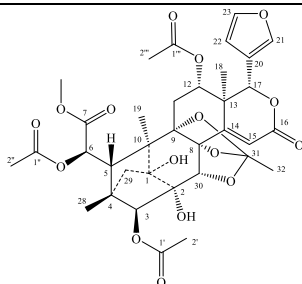
4.

**Xyloccensin P**Công thức phân tử: $C_{37}H_{42}O_{17}$

Khối lượng phân tử: 758,2422

XG05

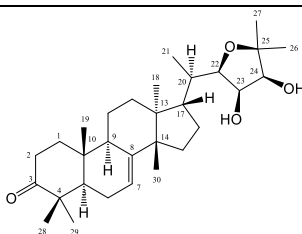
5.

**Xyloccensin Q**Công thức phân tử $C_{35}H_{40}O_{16}$,

Khối lượng phân tử là 716,2316

XG06

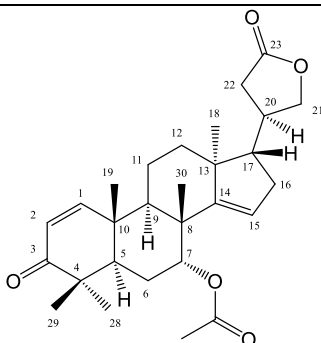
6.

**Odoratone**Công thức phân tử $C_{30}H_{48}O_4$

Khối lượng phân tử là 472,3553

XG07

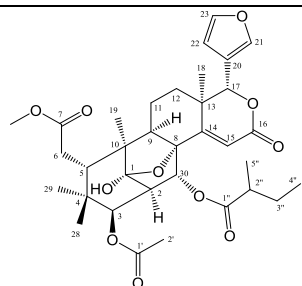
7.

**Chisocheton F**Công thức phân tử $C_{28}H_{38}O_5$

Khối lượng phân tử là 454,2719

XG08

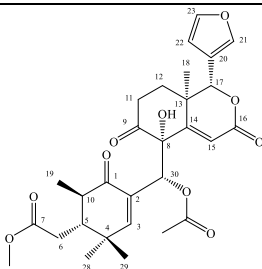
8.

**Xylogranatin S**Công thức phân tử $C_{34}H_{44}O_{11}$

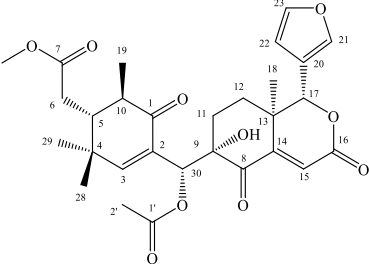
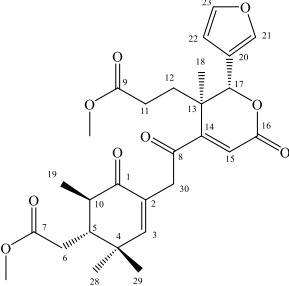
Khối lượng phân tử là 628,2884

XG09

9.

**Xylogranatin C**Công thức phân tử $C_{29}H_{34}O_{10}$

Khối lượng phân tử là 542,2152

10.	XG10		Xylogranatin D Công thức phân tử $C_{29}H_{34}O_{10}$ Khối lượng phân tử là 542,2152
11.	XG11		9-O-methyl xylogranatin R Công thức phân tử $C_{28}H_{34}O_9$ Khối lượng phân tử là 514,2203

3.3. Thử nghiệm hoạt tính sinh học các hợp chất phân lập

3.3.1. Kết quả thử hoạt tính kháng vi sinh vật các hợp chất phân lập từ cây Xu nhỏ

Từ cây Xu nhỏ - *Xylocarpus moluccensis* luận án đã phân lập và xác định cấu trúc được 10 hợp chất được thử hoạt tính gây độc tế bào một số các hợp chất phân lập được từ loài Xu nhỏ trên 7 chủng vi sinh vật ATCC có nguồn gốc (loại Microbiologics - Mỹ) được liệt kê tại mục 2.2.6.1.

Mẫu ban đầu được pha loãng trong DMSO ở dải nồng độ giảm dần: 256 $\mu\text{g/ml}$, 128 $\mu\text{g/ml}$, 64 $\mu\text{g/ml}$, 32 $\mu\text{g/ml}$, 16 $\mu\text{g/ml}$, 8 $\mu\text{g/ml}$, 4 $\mu\text{g/ml}$ và 2 $\mu\text{g/ml}$ với số thí nghiệm lặp lại $N = 3$. Bổ sung 50 μl dung dịch vi khuẩn và nấm ở nồng độ 2.10^5 bào tử/ml, ủ ở 37°C . Sau 24h, đọc giá trị MIC. Giá trị MIC được xác định tại giếng có nồng độ chất thử thấp nhất gây ức chế hoàn toàn sự phát triển của vi sinh vật sau 24 giờ nuôi cấy. Chất đối chứng là kháng sinh streptomycin cho các chủng vi khuẩn và cycloheximide cho nấm: thu được kết quả thông kê tại bảng 3.22.

Bảng 3.22. Kết quả thử hoạt tính kháng vi sinh vật của một số hợp chất phân lập từ cây Xu nhỏ

TT	Ký hiệu mẫu	Gram dương (+)			Gram âm (-)			Nấm
		<i>E.faecalis</i> ATCC29212	<i>S.aureus</i> ATCC25923	<i>B.cereus</i> ATCC14579	<i>E.coli</i> ATCC25922	<i>P.aeruginosa</i> ATCC27853	<i>S. enterica</i> ATCC13076	<i>C.albicans</i> ATCC10231
		MIC (µg/ml)						
1.	XM01	>256	>256	>256	>256	>256	>256	>256
2.	XM02	>256	>256	>256	>256	>256	>256	>256
3.	XM03	>256	>256	>256	>256	>256	>256	>256
4.	XM04	>256	>256	>256	>256	>256	>256	>256
5.	XM05	>256	>256	>256	>256	>256	>256	>256
6.	XM06	32	64	64	-	64	-	64
7.	XM07	256	-	128	-	-	-	-
8.	XM08	-	-	128	-	-	-	-
9.	XM09	128	-	128	-	-	-	-
10.	XM10	128	-	256	-	-	-	-
	Streptomycin	128	128	128	32	128	128	
	Cycloheximide							32

Nhận xét: Kết quả thử nghiệm cho thấy các hợp chất **XM06, XM07, XM08, XM09, XM10** thể hiện hoạt tính ức chế từ 1 đến 5 chủng vi sinh vật, trong đó hợp chất **XM06** có hoạt tính khá mạnh với MIC 32-64 µg/ml trên 5 chủng *E.faecalis* ATCC29212, *S.aureus* ATCC25923, *B.cereus* ATCC14579, *P.aeruginosa* ATCC27853 và *C.albicans* ATCC10231.

3.3.2. Kết quả thử hoạt tính kháng vi sinh vật của một số hợp chất phân lập từ cây Xu ổi

Các hợp chất phân lập được từ cây Xu ổi được thử nghiệm kháng vi sinh vật trên 7 chủng vi sinh vật có nguồn gốc (loại Microbiologics - Mỹ) được liệt kê tại mục 2.2.6.1. Mẫu ban đầu được pha loãng trong DMSO ở dải nồng độ giảm dần: 256 µg/ml, 128 µg/ml, 64 µg/ml, 32 µg/ml, 16 µg/ml, 8 µg/ml, 4 µg/ml, 2 µg/ml, 1 µg/ml, 0,5 µg/ml và 0,25 µg/ml với số thí nghiệm lặp lại N = 3. Bổ sung 50 µl dung dịch vi khuẩn và nấm ở nồng độ 2,105 CFU/ml, ủ ở 37°C. Sau 24h, đọc giá trị MIC. Giá trị MIC được xác định tại giếng có nồng độ chất thử thấp nhất gây ức chế hoàn toàn sự phát triển của vi sinh vật sau 24 giờ nuôi cấy. Chất đối chứng là kháng sinh Ciprofloxacin cho các chủng vi khuẩn và Cyclohexamide cho nấm: thu được kết quả như bảng 3.23.

Bảng 3.23. Kết quả thử hoạt tính kháng vi sinh vật các hợp chất phân lập từ cây Xu ổi

TT	Tên mẫu	Gram dương			Gram âm			Nấm
		<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC29921 2	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC25923	<i>Bacillus cereus</i> ATCC14579	<i>Escherichia coli</i> ATCC25922	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC27853	<i>Salmonella enterica</i> ATCC13076	<i>Candida albicans</i> ATCC10231
		MIC ($\mu\text{g/ml}$)						
1.	XG01	>256	>256	>256	>256	>256	>256	>256
2.	XG02	>256	>256	>256	>256	>256	>256	>256
3.	XG03	>256	>256	>256	>256	>256	>256	>256
4.	XG04	>256	>256	>256	>256	>256	>256	>256
5.	XG05	>256	>256	>256	>256	>256	>256	>256
6.	XG06	>256	>256	>256	>256	>256	>256	>256
7.	XG07	>256	>256	>256	>256	>256	>256	>256
8.	XG08	>256	>256	>256	>256	>256	>256	>256
9.	XG09	>256	>256	>256	>256	>256	>256	>256
10.	XG10	>256	>256	>256	>256	>256	>256	>256
11.	XG11	>256	>256	>256	>256	>256	>256	>256
12.	XG12	>256	>256	>256	>256	>256	>256	>256
Ciprofloxacin		128	32	8	0,5	32	1	-
Cyclohexamide		-	-	-	-	-	-	32

Ghi chú: “-“ : Không thử

Nhận xét: Kết quả trên cho thấy các hợp chất thử nghiệm không thể hiện hoạt tính ức chế các chủng vi sinh vật ở các nồng độ nghiên cứu.

3.3.3. Kết quả thử hoạt tính gây độc tế bào các hợp chất phân lập được từ cây Xu nhỏ

Các hợp chất phân lập được từ cây Xu nhỏ được thử nghiệm trên 3 dòng tế bào ung thư: ung thư vú (MCF-7) và ung thư gan (HepG2), ung thư cổ tử cung ở người (Hela) bằng phương pháp thử SRB, số lượng tế bào: 10000 tế bào/giếng /200 μl và thu được kết quả như bảng 3.24.

Bảng 3.24. Kết quả hoạt tính gây độc tế bào các hợp chất phân lập từ cây Xu nhỏ

IC ₅₀ (μM)							
Tên mẫu	Dòng tế bào			Tên mẫu	Dòng tế bào		
	Hela	HepG2	MCF7		Hela	HepG2	MCF7
XM01	46,82 $\pm$ 2,82	54,19 $\pm$ 3,33	42,40 $\pm$ 3,17	XM06	>100	>100	>100
XM02	26,78 $\pm$ 2,63	32,60 $\pm$ 3,22	26,77 $\pm$ 2,42	XM07	>100	>100	>100
XM03	>100	>100	>100	XM08	98,12 $\pm$ 1,16	97,67 $\pm$ 1,34	86,06 $\pm$ 6,77
XM04	>100	>100	>100	XM09	>100	>100	>100
XM05	46,26 $\pm$ 2,25	39,92 $\pm$ 2,63	36,80 $\pm$ 2,95	XM10	>100	>100	>100
Ellipticine					0,38 $\pm$ 0,04	0,39 $\pm$ 0,04	0,40 $\pm$ 0,02

Nhận xét: Kết quả trên cho thấy có 3 chất XM01, XM02, XM05 đã thể hiện hoạt tính ức chế sự phát triển của các dòng tế bào ung thư nghiên cứu với giá trị IC₅₀

từ 26,77 – 54,19 μM . Các mẫu còn lại chưa thể hiện rõ hoạt tính gây độc tế bào ở thử nghiệm này với giá trị $\text{IC}_{50} > 100 \mu\text{M}$. Chất đối chứng dương Ellipticine hoạt động ổn định trong thí nghiệm.

3.3.4. Kết quả thử hoạt tính gây độc tế bào của một số hợp chất phân lập từ cây Xu ổi

Nghiên cứu thử hoạt tính gây độc tế bào thử nghiệm trên các dòng tế bào ung thư phổi (A549), ung thư vú (MCF-7), ung thư gan (HepG2) bằng phương pháp thử MTT một số hợp chất phân từ cây Xu ổi, số lượng tế bào: 10000 tế bào/giếng /200 μl và thu kết quả như bảng 3.25.

Bảng 3.25. Giá trị IC_{50} mẫu có hoạt tính các hợp chất phân lập từ cây Xu ổi

Tên mẫu	$\text{IC}_{50} (\mu\text{M})$			Tên mẫu	$\text{IC}_{50} (\mu\text{M})$		
	HepG2	A549	MCF-7		HepG2	A549	MCF-7
XG01	>100	>100	>100	XG06	44,36 $\pm$ 1,11	38,11 $\pm$ 1,23	46,99 $\pm$ 1,85
XG02	>100	>100	>100	XG07	>100	>100	>100
XG03	>100	>100	>100	XG08	>100	>100	>100
XG04	>100	>100	>100	XG09	33,04 $\pm$ 1,43	27,54 $\pm$ 1,08	34,91 $\pm$ 1,74
XG05	>100	>100	>100	XG10	>100	>100	>100
				XG11	>100	>100	>100
Camptothecin					2,24 $\pm$ 0,15	1,58 $\pm$ 0,12	1,09 $\pm$ 0,12

Nhận xét: Kết quả sàng lọc thử độc tế bào của các mẫu cho thấy các hợp chất **XG06**, **XG09** thể hiện hoạt tính gây độc tế bào ở các nồng độ nghiên cứu. Các mẫu còn lại thể hiện hoạt tính yếu ở các nồng độ nghiên cứu.

Kết quả thử nghiệm các hợp chất phân lập từ cây Xu ổi thể hiện hoạt tính ức chế từ 1 đến 5 chủng vi sinh vật, trong đó hợp chất **XM05** có hoạt tính khá mạnh với MIC 32-64 $\mu\text{g/ml}$ trên 5 chủng *E.faecalis* ATCC29212, *S.aureus* ATCC25923, *B.cereus* ATCC14579, *P.aeruginosa* ATCC27853 và *C.albicans* ATCC10231.

Kết quả thử nghiệm các hợp chất phân lập từ cây Xu ổi thử nghiệm trên các dòng tế bào ung thư phổi (**SK-LU-1**), ung thư vú (MCF-7), ung thư gan (HepG2), ung thư cổ tử cung ở người (Hepla). Kết quả trên cho thấy có 3 mẫu đã thể hiện hoạt tính ức chế sự phát triển của các dòng tế bào ung thư nghiên cứu với giá trị IC_{50} từ 27,54 – 46,99 μM . Các mẫu còn lại chưa thể hiện rõ hoạt tính gây độc tế bào ở thử nghiệm này với giá trị $\text{IC}_{50} > 100 \mu\text{M}$. Chất đối chứng dương Ellipticine hoạt động ổn định trong thí nghiệm.

Kết quả sàng lọc thử độc tế bào của các hợp chất phân lập từ cây Xu ổi cho thấy các hợp chất **XG06**, **XG09** thể hiện hoạt tính gây độc tế bào ở các nồng độ nghiên cứu. Các mẫu còn lại hoạt tính yếu và không thể hiện hoạt tính ở các nồng độ nghiên cứu.

3.4. Xác định độ tinh khiết XM07, XM09, XM10 bằng phương pháp qNMR

Hiện trên thế giới chưa có chuẩn đối chiếu của 3 hợp chất trên do đó nghiên cứu đã phân lập 3 hợp chất này làm chuẩn cơ sở để xây dựng quy trình phân tích, ứng dụng phương pháp phân tích hiện đại để xác định hàm lượng chất phân tích bằng phương pháp qNMR nội chuẩn. Phương pháp qNMR nội chuẩn dựa trên đặc trưng của hạt nhân, của nguyên tử có trong thành phần phân tử cần phân tích sẽ dựa trên đặc trưng từ của proton (^1H) có trong thành phần cấu trúc của chất phân tích và nội chuẩn tương ứng đã biết hàm lượng chính xác để xác định hàm lượng chính xác của chất phân tích.

Nghiên cứu khảo sát trên một số chất chuẩn nội của phương pháp qNMR cho thấy ethylene carbonate đáp ứng yêu cầu về chất chuẩn nội của phương pháp và phù hợp với công thức cấu tạo, tính chất hóa lý của các chất phân tích **XM07**, **XM09**, **XM10**, có mũi proton (^1H) tách hoàn toàn với proton (^1H) của các chất phân tích và có độ sạch cao (tuyệt đối hoặc gần tuyệt đối); Không hút ẩm, không bay hơi, không lẫn nước; Hòa tan tốt trong các dung môi NMR; phổ proton ^1H NMR tương đối đơn giản, rõ.

Xác định hàm lượng chất phân lập được bằng phương pháp qNMR. Chất sạch được phân lập từ lá cây Xu nhỏ được xác định hàm lượng bằng phương pháp qNMR nội chuẩn, phổ qNMR của hợp chất **XM07** (Hình 3.50), **XM09** (Hình 3.51), **XM10** (Hình 3.52) kết quả như bảng 3.26.

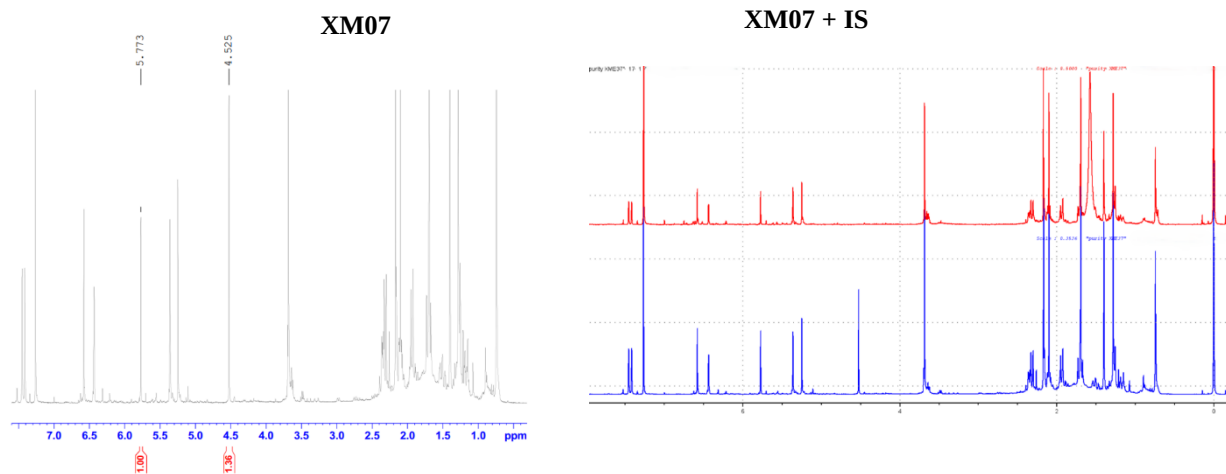
Bảng 3.26. Kết quả hàm lượng **XM07**, **XM09**, **XM10** bằng phương pháp qNMR

Mã ký hiệu	Tên chất phân tích	HL (%) (qNMR)
XM07	Moluccensin Y	98,07
XM09	3,30-Diacetylphragmalin	98,43
XM10	Xyloccensin E	98,36

Nhận xét: Độ tinh khiết các chất phân lập được xác định bằng phương pháp so sánh với chuẩn nội đã xác hàm lượng bằng phương pháp qNMR: từ phổ ^1H -NMR của các chất đã phân lập, xác định tín hiệu hydro đặc trưng cho hợp chất cần phân tích, lựa chọn chuẩn nội với tín hiệu hydro đặc hiệu với chất cần phân tích.

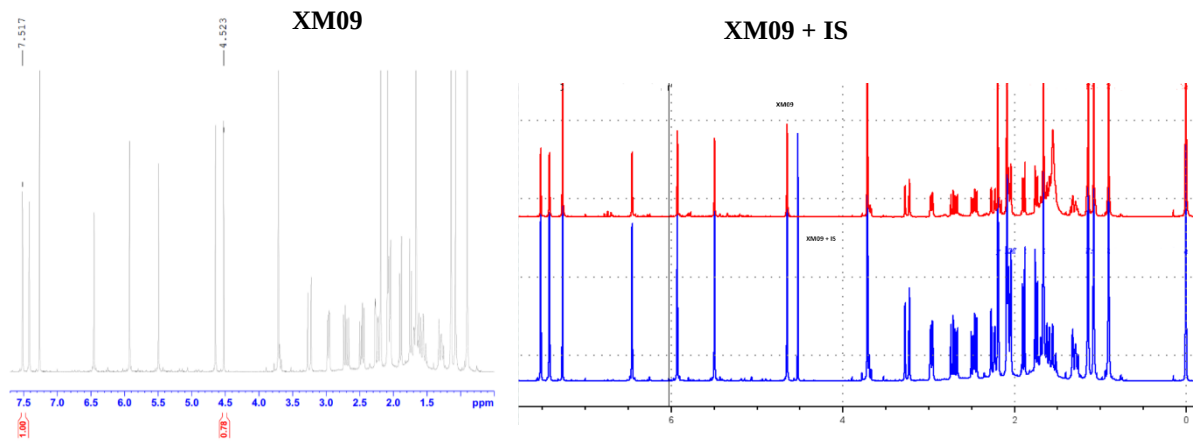
Hiện trên thế giới chưa có chuẩn đối chiếu của 3 hợp chất trên do đó nghiên cứu đã phân lập 3 hợp chất này làm chuẩn cơ sở để xây dựng quy trình phân tích, ứng dụng phương pháp phân tích hiện đại để xác định hàm lượng chất phân tích bằng phương pháp qNMR nội chuẩn trộn chất chuẩn. Phương pháp qNMR nội chuẩn dựa trên đặc trưng của hạt nhân, của nguyên tử có trong thành phần phân tử cần phân tích

sẽ dựa trên đặc trưng từ của proton (^1H) có trong thành phần cấu trúc của chất phân tích và nội chuẩn tương ứng đã biết hàm lượng chính xác để xác định hàm lượng chính xác của chất phân tích.



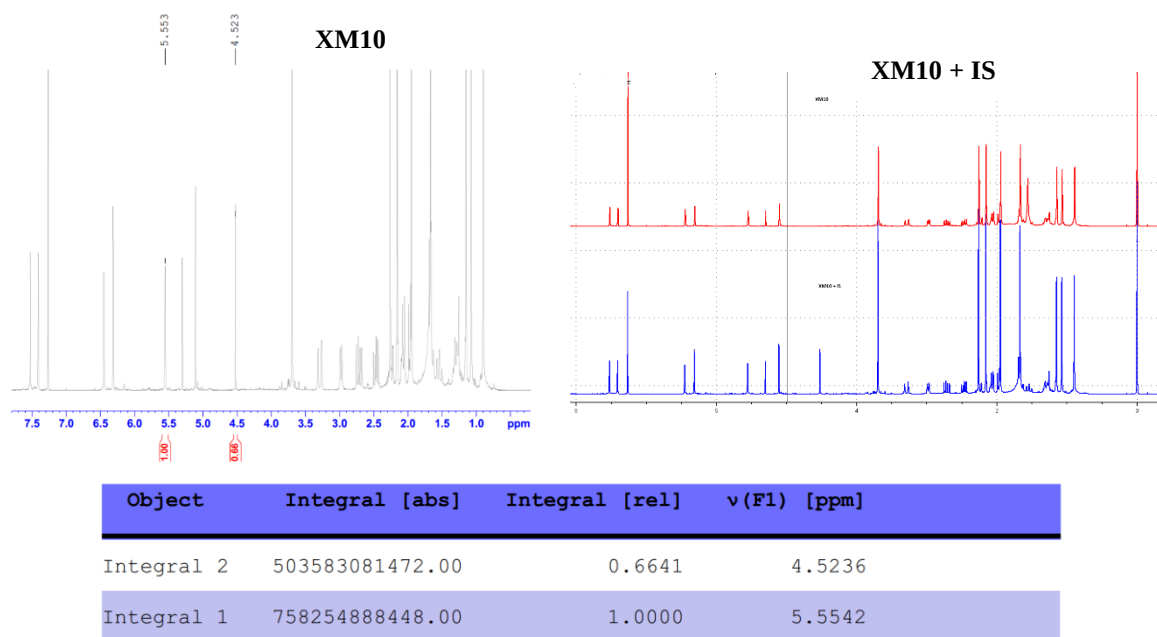
Object	Integral [abs]	Integral [rel]	$\nu(\text{F1})$ [ppm]
Integral 2	408715127296.00	1.3560	4.5221
Integral 1	301418604032.00	1.0000	5.7692

Hình 3.50. Phổ qNMR của hợp chất **XM07**



Object	Integral [abs]	Integral [rel]	$\nu(\text{F1})$ [ppm]
Integral 2	633775973376.00	0.7759	4.5133
Integral 1	816871902720.00	1.0000	7.5056

Hình 3.51. Phổ qNMR của hợp chất **XM09**



Hình 3.52. Phổ qNMR của hợp chất **XM10**

3.5. Xây dựng phương pháp phân tích định tính, định lượng 3 hợp chất trong lá cây Xu nhỏ

Hàm lượng chất phân tích trong dược liệu thấp, nền mẫu phức tạp và khả năng phát hiện hạn chế của LC-PDA khiến việc xác định các chất có hàm lượng thấp trong trong loài Xu nhỏ và Xu ổi gặp nhiều thách thức, cùng với khả năng phát hiện hạn chế của LC-PDA, đặt ra những thách thức trong việc phân lập và định lượng các hợp chất đánh dấu này. Trong điều kiện phân tích HPLC-PDA, sắc ký đồ cho thấy hàm lượng Moluccensin Y (**XM37**), 3,30-Diacetylphragmalin (**XM50**) và Xyclocensin E (**XM36**) rất thấp trong các mẫu thử nghiệm, ngay cả ở bước sóng 205 nm. Ngoài ra, ảnh hưởng nền mẫu rất lớn, đường nền dâng cao. do đó phương pháp HPLC-PDA không đáp ứng đủ độ nhạy và độ đặc hiệu cho phân tích vết trong nền mẫu dược liệu và cần được thay thế bằng một phương pháp nhạy, chuyên biệt hơn.

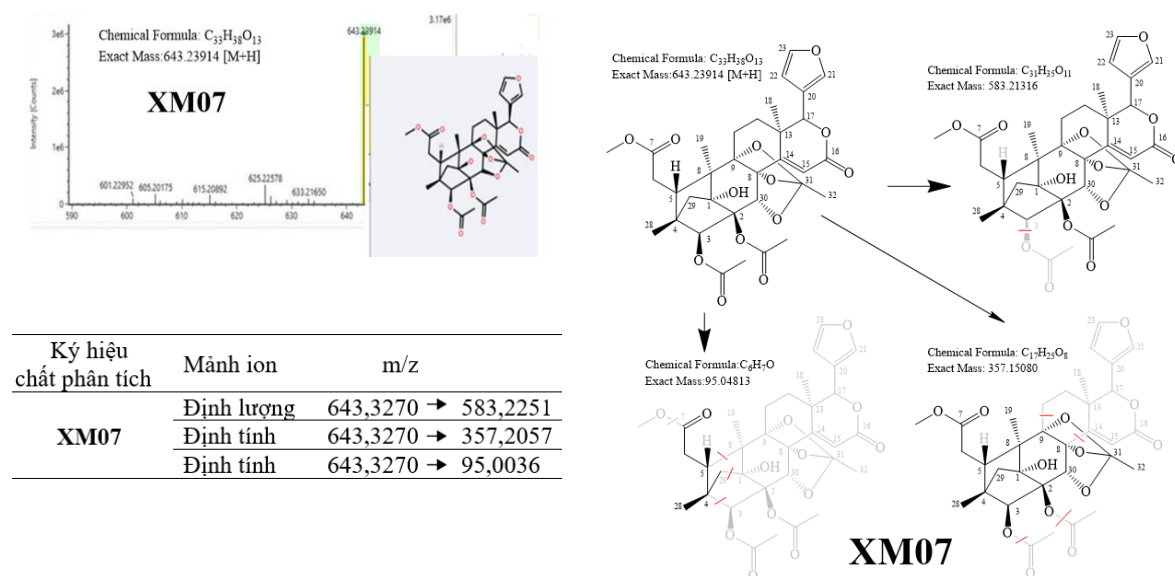
Phương pháp sắc ký lỏng ghép khối phổ LC-MS/MS đã trở thành một phương pháp phân tích hiện đại, độ nhạy, chính xác cao để phân tích các thành phần tự nhiên trong thực vật. Dữ liệu từ phân tích MS/MS cung cấp thông tin hữu ích cho việc xác định và xác nhận cấu trúc cùng với việc đề xuất mảnh mẹ. Ngoài ra, phổ MS/MS còn cung cấp thông tin để phân tích định tính và định lượng các hợp chất riêng lẻ trong nguyên liệu thực vật [27], [28].

Phương pháp sắc ký lỏng ghép khối phổ LC-MS/MS đã trở thành một phương pháp phân tích hiện đại, độ nhạy, chính xác cao để phân tích các thành phần tự nhiên trong thực vật. Dữ liệu từ phân tích MS/MS cung cấp thông tin hữu ích cho việc xác định và xác nhận cấu trúc cùng với việc đề xuất mảnh mẹ. Ngoài ra, phổ MS/MS còn cung cấp thông tin để phân tích định tính và định lượng các hợp chất riêng lẻ trong

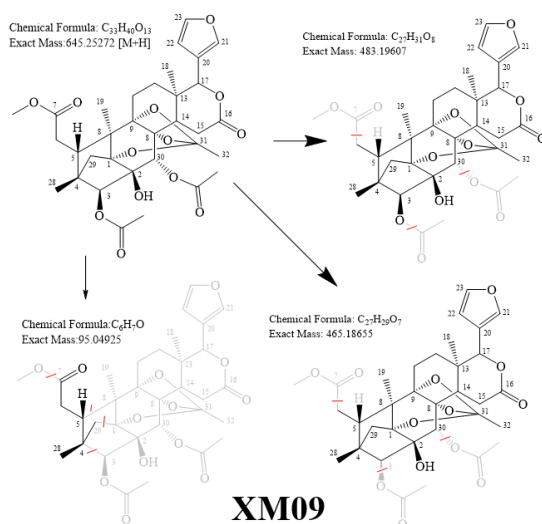
nguyên liệu thực vật. Do đó nghiên cứu chọn xây dựng phương pháp sắc ký lỏng ghép khối phổ LC-MS/MS để phân tích định tính, định lượng 3 hợp chất có cấu trúc đặc trưng của chi Xu – Xu nhỏ **XM07**, **XM09**, **XM10**.

3.5.1. Dự kiến phân mảnh

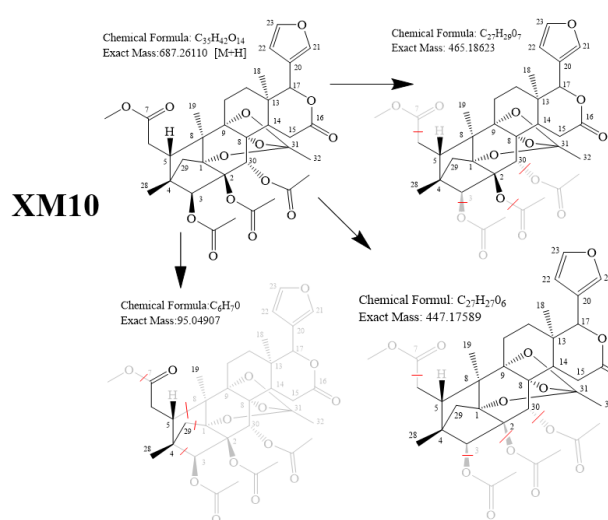
Các hợp chất **XM07**, **XM09**, **XM10** chưa có tài liệu báo cáo về sự phân mảnh của các chất này nhưng nhóm nghiên cứu cũng dựa trên sự phân mảnh của các hợp chất này trên hệ thống LC-MS/MS Xevo G2-XS QTOF Waters (Mỹ) đã được báo cáo và đặc trưng cấu trúc có nhóm cacbonyl dễ bể gãy do đó đề xuất cơ chế phân mảnh cho các hợp chất **XM07** theo hình 3.53, **XM09** theo hình 3.54, **XM10** theo hình 3.55, hình phân mảnh định lượng và định tính theo phụ lục 4. Điều này được khẳng định lại bằng kết quả quét phổ thực nghiệm cho thấy cơ chế phân mảnh nhóm nghiên cứu đề xuất có độ tin cậy cao, phổ khối được quét định tính mảnh mẹ trên thiết bị UPLC-MS/MS Xevo G2-XS QTof.



Hình 3.53. Phổ MS mảnh mẹ và dự kiến phân mảnh của **XM07**



Hình 3.54. Phổ MS mảnh mẹ và dự kiến phân mảnh của **XM09**



Hình 3.55. Phổ MS mảnh mẹ và dự kiến phân mảnh **XM10**

Nhận xét: Phổ khối các chất phân tích đều có mảnh mẹ phù hợp với công thức phân tử, các mảnh con thu được trên phổ daughter scan cũng trùng khớp với dữ liệu phân mảnh của các nghiên cứu trước. Kết quả tối ưu đã chọn ra được điều kiện mảnh ion con của từng chất có cường độ tín hiệu cao nhất làm mảnh định lượng để đáp ứng độ nhạy của phương pháp và các mảnh định tính ở các mức năng lượng bẻ gãy khác nhau.

Các hợp chất **XM07**, **XM09** và **XM10** đều có cấu trúc khung cơ bản là tetranortriterpenoid (30 carbon bị mất đi 4 carbon để còn lại 26 carbon chính).

Cấu trúc khung Limonoid rất bền vững ở phần lõi nhưng lại dễ bị cắt đứt ở các cầu nối ester, cơ chế hình thành ion m/z 95 đối với cả 3 chất dựa trên công thức phân tử và cấu hình thu được, mảnh ion này được hình thành thông qua quá trình phân mảnh chọn lọc của phân tử mẹ. Mảnh ion m/z 95 đều được hình thành trong quá trình ion hóa ưu tiên tại nhóm carbonyl, electron bị lấy đi ưu tiên tại O của C=O, nhóm

carbonyl (C=O) có tâm hút electron, là tâm giàu electron và dễ bị kích hoạt dưới điều kiện ion hóa. Ion mảnh tại m/z 95 (C_6H_7O , m/z 95.0481) được quan sát rõ ràng trong phổ khối của cả 3 hợp chất, cho thấy đây là một ion bền và có giá trị dự đoán cấu trúc.

Hợp chất **XM07** ($C_{33}H_{38}O_{13}$), ion MH^+ (m/z 643,2391). Dựa trên công thức phân tử và cấu hình thu được, mảnh ion định lượng (m/z 583,2251) được hình thành thông qua quá trình phân mảnh chọn lọc của phân tử mẹ. Đây là mảnh ion có cường độ cao nhất, thường dùng để định lượng do tính ổn định và nhạy. Ion m/z 583 ($C_{31}H_{35}O_{11}$) được tạo thành chủ yếu thông qua quá trình loại bỏ trung tính một nhóm acyl hoặc ester ngoại vòng do sự đứt gãy chọn lọc liên kết ester, trong khi khung triterpenoid vẫn được bảo toàn. Trong khi đó, mảnh ion định tính 1 (m/z 357,2057) ($C_{17}H_{25}O_8$) hình thành do phân mảnh sâu hơn, bao gồm sự đứt gãy liên kết C–C tại vùng nối giữa khung vòng trung tâm và mạch thế chứa oxy, kèm theo tái sắp xếp nội phân tử, tạo nên ion nhỏ gọn và bền trong pha khí, là sự phân mảnh sâu hơn, liên quan đến việc bẻ gãy khung carbon chính và loại bỏ nhiều nhóm ester đồng thời.

Hợp chất **XM09** ($C_{33}H_{40}O_{13}$), ion MH^+ (m/z 645,4065). Mảnh định lượng (m/z 483,2574, $C_{27}H_{35}O_8$) được tạo thành thông qua quá trình đứt gãy chọn lọc liên kết ester, kèm theo sự loại bỏ trung tính một phân đoạn acyl–oxy có khối lượng lớn, trong khi khung triterpenoid trung tâm vẫn được duy trì. Mảnh định tính 1 (m/z 465,2359, $C_{27}H_{33}O_7$) tiếp tục mất thêm một phân tử nhóm hydroxy từ mảnh 483 do sự khử nước nội phân tử ($-H_2O$) hoặc loại bỏ thêm một nhóm oxy chức, dẫn đến cấu trúc ion bền hơn nhờ tái sắp xếp và ổn định cộng hưởng trong pha khí.

Hợp chất **XM10** ($C_{35}H_{42}O_{14}$), ion MH^+ (m/z 687,4809). Mảnh định lượng (m/z 465,2508, $C_{27}H_{35}O_8$) được hình thành chủ yếu thông qua sự đứt gãy liên kết ester và ether, kèm theo loại bỏ một phân đoạn acyl–oxy có khối lượng lớn, trong khi khung triterpenoid trung tâm vẫn được bảo toàn. Mảnh định tính 1 (m/z 447,1207) được tạo thành từ ion m/z 465 thông qua quá trình khử nước nội phân tử nhóm hydroxy hoặc loại bỏ thêm một nhóm oxy chức, dẫn đến cấu trúc ion bền hơn trong pha khí nhờ sự tái sắp xếp và ổn định cộng hưởng.

3.5.2. Kết quả thiết lập điều kiện phân tích

Các mẫu được chuẩn bị và phân tích bằng LC-MS/MS. Điều kiện khối phổ được khảo sát trên hệ thống máy UPLC-MS/MS Waters Xevo TQS Micro, sử dụng kỹ thuật ghi phổ full scan để xác định ion phân tử các chất và kỹ thuật phân tích daughter ion để tìm mảnh ion con định lượng và mảnh ion con định tính. Các thông số thế phân mảnh và năng lượng va đập được tối ưu hóa bằng phần mềm tối ưu hóa tự động IntelliStart và kiểm tra lại bằng Manual Tune sao cho cường độ tín hiệu của ion định lượng đạt cao nhất. Điều kiện khối phổ tối ưu đã được xác định như sau:

* Điều kiện sắc ký

Pha động: acid fomic 0,1% (A) – Acetonitril (B): 60-40

Cột: ZORBAX XDB-C8 (50 x 4.6 mm; 3.5 μ m)

Nhiệt độ cột: 35 °C.

Nhiệt độ buồng mẫu: 15 °C.

Tốc độ dòng: 0,6 ml/ phút.

Thể tích tiêm: 2 μ l.

* Điều kiện khối phổ được ghi trong Bảng 3.27 và thể phân mảnh sau khi tối ưu các chất phân tích được ghi trong Bảng 3.28.

Bảng 3.27. Thông số cài đặt thiết bị UPLC-MS/MS Xevo TQS micro Waters

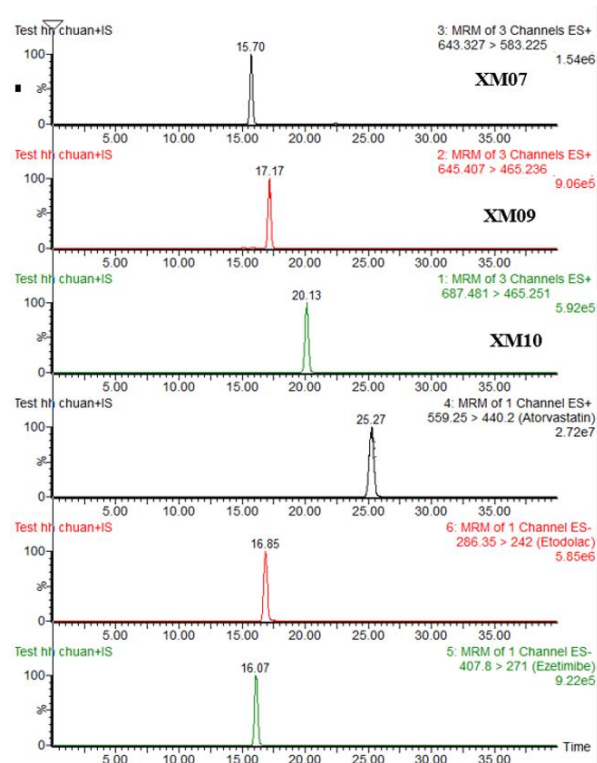
Thông số nguồn ion hóa
Kiểu ion hóa: ESI (+)
Tốc độ dòng khí khử dung môi (nitơ): 900 lít/ giờ
Tốc độ dòng khí đầu cone (nitơ): 30 lít/ giờ
Nhiệt độ hóa hơi dung môi: 150 °C
Nhiệt độ buồng ion hóa: 350 °C
Chế độ ghi phổ: MRM
Thế ion hóa (IS voltage): 0,5KV
Khoảng phổ (mass range): 50 – 1000 Da

Bảng 3.28. Thể phân mảnh sau khi tối ưu các chất phân tích

Ký hiệu chất phân tích	Mảnh ion	m/z	Cone (V)	CE (V)	Tỷ lệ ion	Sai số (%)
XM07	Định lượng	643,3270 → 583,2251	20	8	+	
	Định tính 1	643,3270 → 357,2057	20	32	0,18	
	Định tính 2	643,3270 → 95,0036	20	46	0,12	
XM09	Định lượng	645,4065 → 483,2574	6	14	+	
	Định tính1	645,4065 → 465,2359	6	16	0,50	± 25
	Định tính 2	645,4065 → 95,0053	6	48	0,12	
XM10	Định lượng	687,4809 → 465,2508	40	16	+	
	Định tính 1	687,4809 → 447,1207	40	42	0,84	
	Định tính 2	687,4809 → 95,0046	40	20	0,21	
IS	Định lượng	287,1539 → 242,1559	25	18		

3.5.3. Khảo sát chuẩn nội

Do sự thay đổi của dòng ion trong phép đo phổ khối, việc sử dụng chất chuẩn nội là điều cần thiết để nâng cao độ chính xác và kiểm soát quá trình phân tích. Các tiêu chuẩn nội bộ được phân thành hai loại: đồng vị và tương tự. Chất chuẩn nội đồng vị có cấu trúc giống hệt chất phân tích nhưng chứa nhân đồng vị. Mặc dù các chất chuẩn đồng vị là tối ưu về mặt lý thuyết nhưng chúng có thể không có sẵn cho các hợp chất mới được phân tích mà không có tài liệu tham khảo được thiết lập. Trong những trường hợp như vậy, chất chuẩn nội tương tự có các đặc tính tương tự với chất phân tích, liên quan đến quá trình chiết (độ hòa tan), phân tích sắc ký (thời gian lưu) và phát hiện MS (chế độ ion hóa) được chọn. Dựa trên công thức hóa học, hệ số phân bố log và giá trị pKa của ba hợp chất: Etodolac ($C_{17}H_{21}NO_3$; LogP = 2,5; pKa = 4,65) [139], Atorvastatin ($C_{33}H_{35}FN_2O_5$; LogP = 6,36; pKa = 4,46)[140], và Ezetimibe ($C_{24}H_{21}F_2NO_3$; LogP = 4,5; pKa = 9,48) [141], nghiên cứu tiến hành đo phổ khối, cường độ tín hiệu thu được của các nội chuẩn khảo sát và xem xét các điều kiện phát hiện sắc ký và MS. Kết quả khảo sát được trình bày trong hình 3.56. Kết quả đều cho tín hiệu cao nhất là mảnh ion mẹ $[M+H]^+$ tương ứng với từng CTPT của các nội chuẩn khảo sát tuy nhiên tín hiệu của Etodolac (IS) cao hơn rõ so với Ezetimibe, Atorvastatin cho tín hiệu cao nhưng thời gian lưu quá dài so với Etodolac mặc dù được pha ở cùng mức nồng độ 5 $\mu\text{g/ml}$. Chọn Etodolac để thực hiện các khảo sát tiếp theo.



Hình 3.56. Sắc ký đồ của chuẩn nội

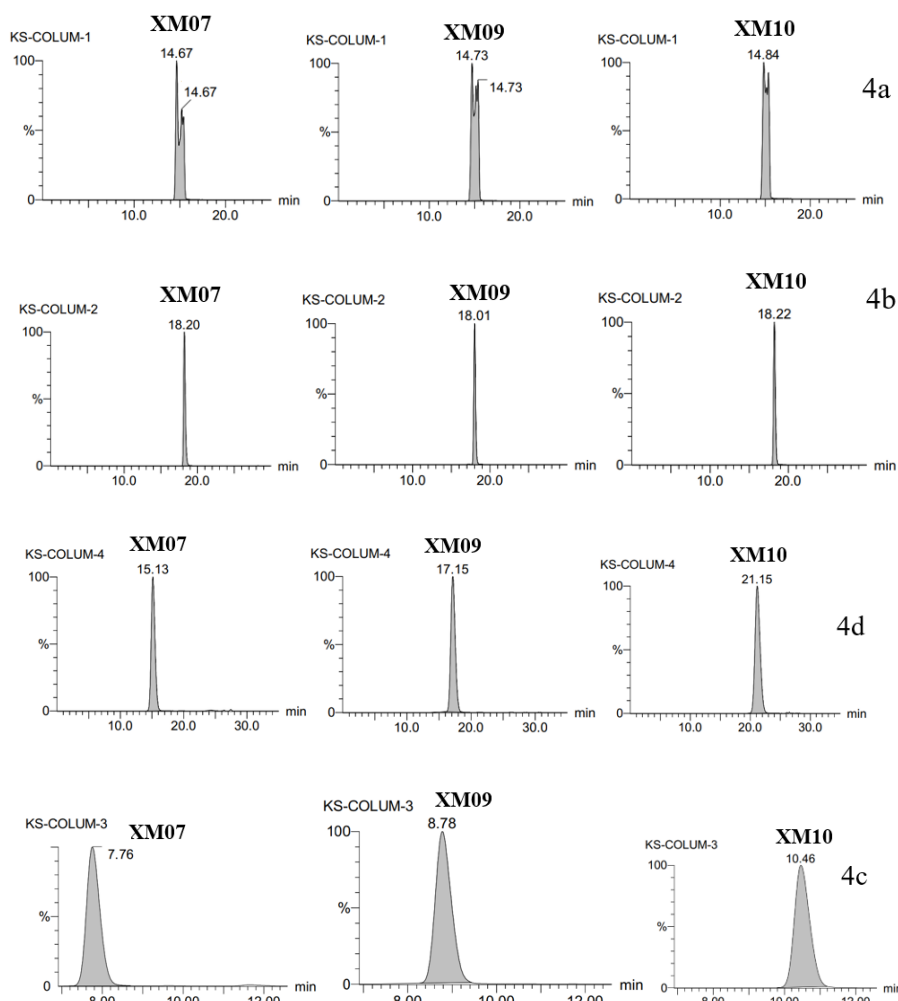
3.5.4. Khảo sát điều kiện sắc ký

Khảo sát pha tĩnh

Dựa vào tính chất kém phân cực của chất phân tích, nghiên cứu tiến hành khảo sát lựa chọn cột sắc ký mà bản chất pha tĩnh có pha liên kết là các nhóm kém phân cực thường được sử dụng trong phân tích như: C18, C8, C6 phenyl. Các cột sắc ký được sử dụng trong khảo sát pha tĩnh (Bảng 3.29).

Bảng 3.29. Cột sắc ký sử dụng trong khảo sát pha tĩnh

Điều kiện	Bản chất pha tĩnh	Tên thương mại
1	C6 phenyl	Gemini C6 phenyl (150 x 4,6 mm; 5,0 μ m)
2	C18	Agilent 5 HC- C18 (150 x 4,6 mm; 5,0 μ m)
4	C8	Luna C8 (150 x 4,6 mm; 5,0 μ m)
3	C8	ZORBAX XDB-C8 (50 x 4,6 mm; 3,5 μ m)



Hình 3.57. Sắc ký đồ khảo sát pha tĩnh

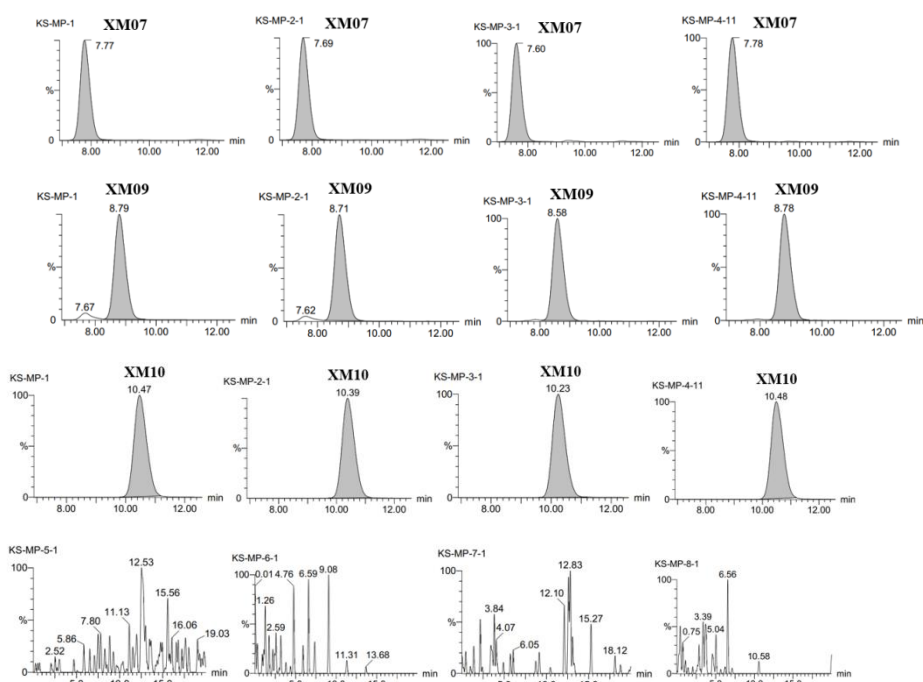
Nhận xét: Kết quả sắc ký đồ hình 3.57 cho thấy cột C6 phenyl (hình 3.57-4a) tương tác mạnh với chất phân tích, peak không đối xứng $b/a > 2,0$ và bị chệch peak; cột với bản chất pha tĩnh là C18 (hình 3.57-4b) peak không tách, peak không đối xứng $b/a > 2,0$; cột với bản chất pha tĩnh là C8 dài 150 mm (hình 3.57-4d) peak tách hoàn toàn, peak đối xứng với tất cả các chất phân tích, thời gian phân tích dài; cột với bản chất pha tĩnh là C8 dài 50 mm (hình 3.57-4c) peak tách hoàn toàn, Peak đối xứng với tất cả các chất phân tích, thời gian phân tích ngắn, $b/a < 2,0$. Do đó chọn cột C8 làm pha tĩnh của phương pháp.

Khảo sát pha động

Khảo sát được tiến hành trên mẫu chuẩn hỗn hợp chứa các chất phân tích **XM37**, **XM50**, **XM36** trong methanol ở nồng độ 5 µg/ml ở điều kiện khối phổ đã khảo sát với điều kiện ban đầu như sau: Cột phân tích ZORBAX XDB-C8 (50 x 4,6 mm; 3,5 µm) thể tích tiêm 2 µl, tốc độ dòng 0,4 ml/phút với các pha động khác nhau được trình bày trong bảng 3.30.

Bảng 3.30. Điều kiện khảo sát pha động

Điều kiện	Dung môi A	Dung môi B	Tỉ lệ
KS-MP1	Acid formic 0,1 %	Acetonitril	60 : 40
KS-MP2-1	Acid acetic 0,1 %	Acetonitril	60 : 40
KS-MP3-1	Đệm amoni acetat pH 3,0	Acetonitril	60 : 40
KS-MP4-11	Đệm amoni format pH 3,0	Acetonitril	60 : 40
KS-MP5-1	Đệm amoni acetat pH 3,0	Methanol	60 : 40
KS-MP6-1	Đệm amoni format pH 3,0	Methanol	60 : 40
KS-MP7-1	Acid formic 0,1 %	Methanol	60 : 40
KS-MP8-1	Acid acetic 0,1 %	Methanol	60 : 40



Hình 3.58. Sắc ký đồ khảo sát pha động

Nhận xét: Kết quả sắc ký đồ hình 3.58 cho thấy các điều kiện sắc ký với hệ dung môi có Methanol 40% áp suất tăng cao, các chất phân tích không đáp ứng phân tích với các hệ dung môi này. Với điều kiện sắc ký với hệ dung môi có Acetonitrile kết hợp với các dung môi là muối các hợp chất bị giảm cường độ tín hiệu không phân tích được trong thời gian 20 phút. Trong khi với hệ dung môi Acid formic 0,1% (hoặc acid acetic 0,1%) với Acetonitrile (60:40) đều đáp ứng các chất phân tích **XM07**, **XM09**, **XM10** với thời gian lưu khoảng 11 phút, tuy nhiên hệ dung môi Acid formic

0,1% với Acetonitrile (60:40) cho tín hiệu cường độ lớn hơn acid acetic 0,1% (hình 3.85). Do đó chọn điều kiện sắc ký với hệ dung môi Acid formic 0,1% và Acetonitrile (60:40).

Như vậy qua các khảo sát trên mẫu chuẩn nghiên cứu đã chọn ra được điều kiện pha động và pha tĩnh cho phương pháp, các điều kiện sắc ký khác bao gồm thể tích tiêm, nhiệt độ cột, chương trình pha động sẽ được điều chỉnh khi tiến hành các khảo sát trên mẫu EXM01.

Đề nghị điều kiện sắc ký như sau:

Cột sắc ký: Zobax XDB-C8, 80A, 4,6 x 50 mm, 3,5 μ m, nhiệt độ cột 35 °C

Pha động: acid formic 0,1% (A) – ACN (B) : 60-40

Chương trình Gradient (Bảng 3.31):

Bảng 3.31. Chương trình gradient

Thời gian (phút)	Tốc độ dòng	A (%)	B (%)
0	0,6	60	40
12,40	0,6	60	40
12,50	0,6	20	80
17,00	0,6	20	80
17,01	0,6	60	40
20,00	0,6	60	40

3.6. Thẩm định phương pháp phân tích

3.6.1. Tính tương thích hệ thống LC-MS/MS

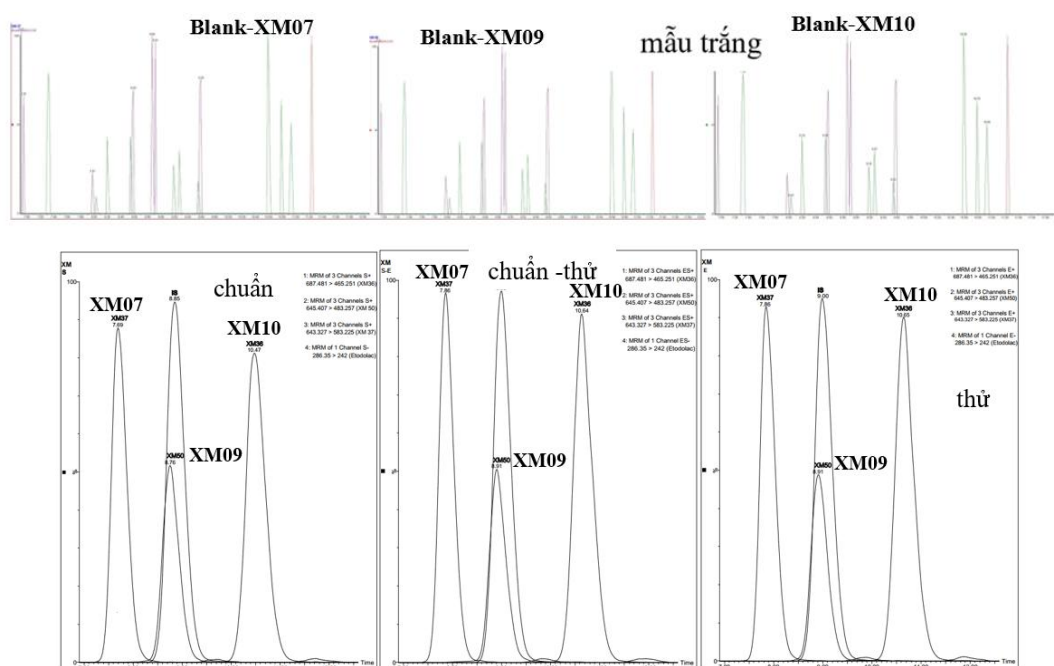
Tiêm 6 lần dung dịch chuẩn để xác định tính tương thích hệ thống của thiết bị. Kết quả cho thấy các thông số thời gian lưu, diện tích peak, tỷ số diện tích peak và tỷ số thời gian lưu của các chất phân tích và chuẩn nội khi tiêm lặp lại 6 lần đều có RSD < 5%. Hệ thống UPLC MS/MS Waters đạt yêu cầu về tương thích để phân tích (Bảng 3.32).

Bảng 3.32. Thông số tương thích hệ thống của thiết bị

Chất phân tích	t_r		$t_r, s / t_{r,IS}$		A_s / A_{IS}	
	X_{tb}	RSD (%)	X_{tb}	RSD (%)	X_{tb}	RSD (%)
XM07	7,86	0,07	0,87	0,09	1,01	0,91
XM09	8,90	0,12	0,99	0,12	0,98	1,25
XM10	10,64	0,18	1,18	0,10	1,34	0,93
IS (Etodolac)	8,99	0,12				

3.6.2. Tính đặc hiệu

Lần lượt tiêm các dung dịch mẫu trắng, dung dịch mẫu thử - IS, dung dịch hỗn hợp 3 chuẩn - IS, dịch mẫu thử có thêm hỗn hợp 3 chuẩn - IS. Sắc ký đồ cho thấy không có peak lạ ở mẫu trắng (Hình 3.59).



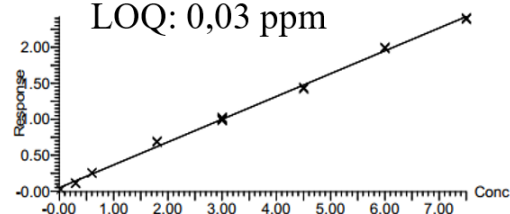
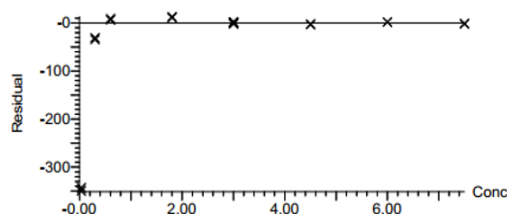
Hình 3.59. Sắc ký đồ của mẫu trắng, mẫu chuẩn, mẫu thử, mẫu thử thêm chuẩn.

3.6.3. Tính tuyến tính, giới hạn phát hiện (LOD), giới hạn định lượng (LOQ)

Đồ thị biểu diễn khoảng tuyến tính hình 3.60 với nồng độ **XM07** từ 0,03 – 7,50 ppm, **XM09** từ 0,05 – 12,50 ppm, **XM10** từ 0,12 – 30,00 ppm, tín hiệu S/N > 10 của các chất phân tích (hình 3.61).

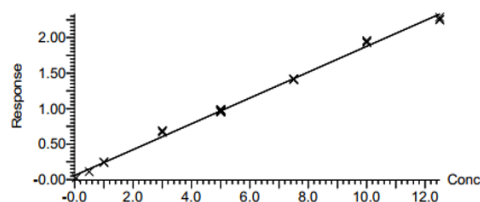
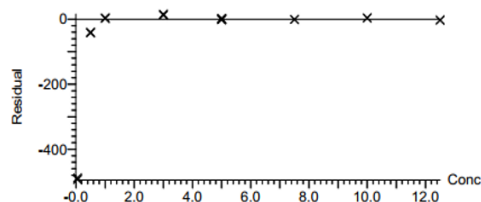
Correlation coefficient: $r = 0.998924$, $r^2 = 0.997849$
 Calibration curve: $0.316953 \cdot x + 0.049306$
 Response type: Internal Std (Ref 4), Area * (IS Conc. / IS Area)
 Curve type: Linear, Origin: Exclude, Weighting: Null, Axis trans: None

LOD: 0,009 ppm **XM07**
 LOQ: 0,03 ppm



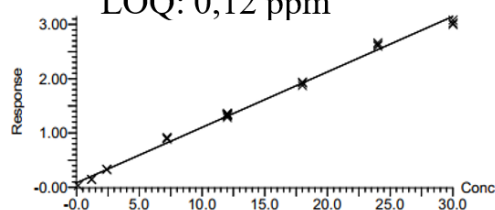
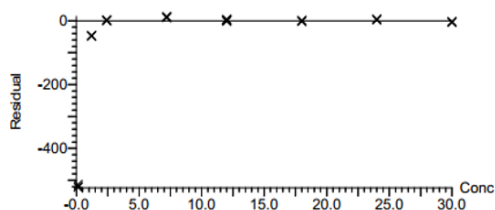
Correlation coefficient: $r = 0.998068$, $r^2 = 0.996140$
 Calibration curve: $0.181827 \cdot x + 0.0585083$
 Response type: Internal Std (Ref 4), Area * (IS Conc. / IS Area)
 Curve type: Linear, Origin: Exclude, Weighting: Null, Axis trans: None

LOD: 0,015 ppm **XM09**
 LOQ: 0,05 ppm

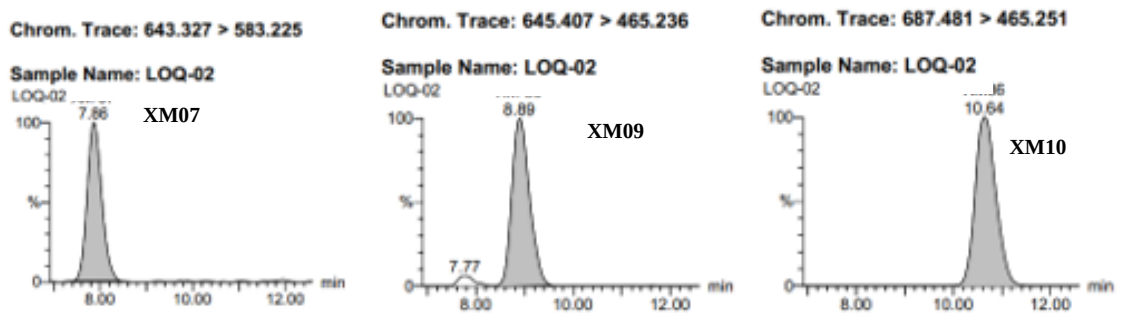


Correlation coefficient: $r = 0.997709$, $r^2 = 0.995424$
 Calibration curve: $0.102166 \cdot x + 0.0830877$
 Response type: Internal Std (Ref 4), Area * (IS Conc. / IS Area)
 Curve type: Linear, Origin: Exclude, Weighting: Null, Axis trans: None

LOD: 0,036 ppm **XM10**
 LOQ: 0,12 ppm



Hình 3.60. Đồ thị biểu diễn tính tương quan tuyến tính

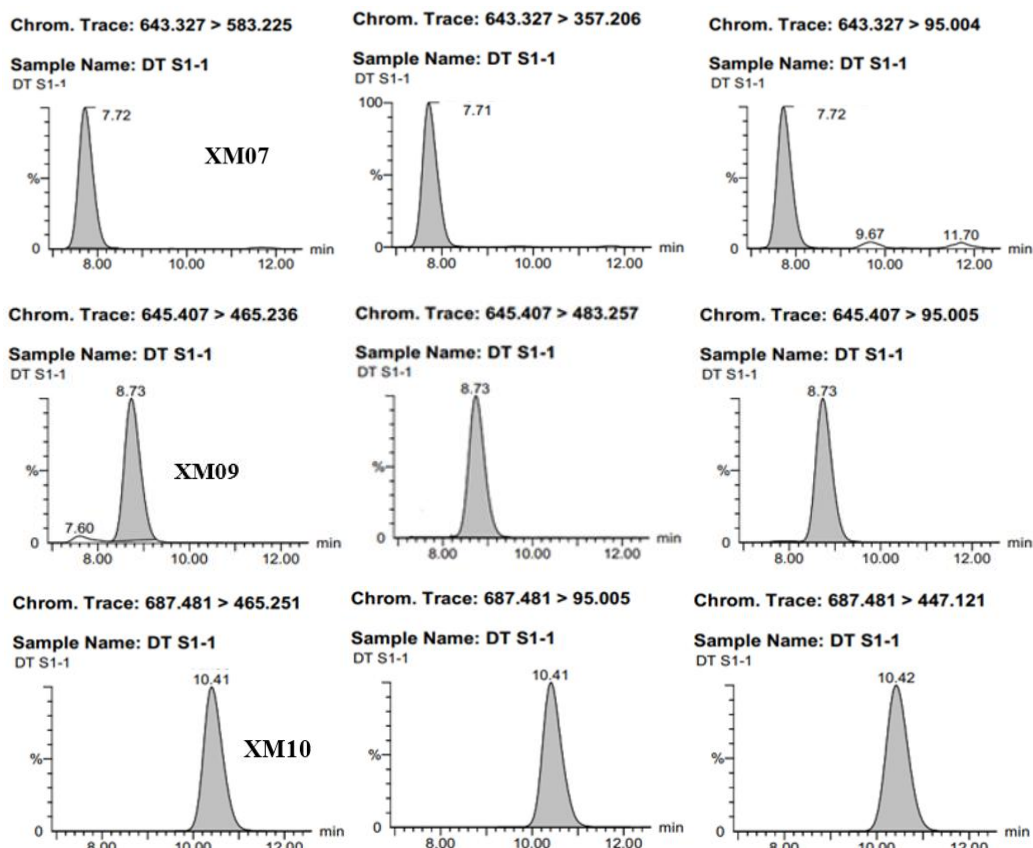


Hình 3.61. Tín hiệu S/N của các chất phân tích

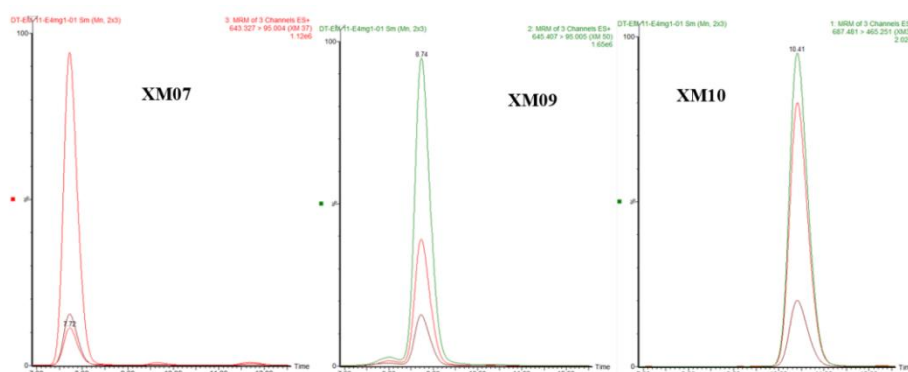
Nhận xét: Kết quả phân tích thống kê cho thấy khoảng tuyến tính hình 3.60 có nồng độ **XM07** từ 0,03 – 7,50 ppm, **XM09** từ 0,05 – 12,50 ppm, **XM10** từ 0,12 – 30,00 ppm có sự tương quan tuyến tính giữa nồng độ và tỉ số diện tích A_s/A_{is} của 3 hợp chất đạt hệ số $R^2 \geq 0,995$; LOD và LOQ của **XM07** 0,009 ppm và 0,03 ppm, **XM09** 0,015 ppm và 0,05 ppm, **XM10** 0,036 ppm và 0,12 ppm.

3.6.4. Định tính

Các mẫu bột dược liệu khô thu từ lá cây Xu nhỏ đều cho kết quả dương tính với 3 hợp chất **XM07**, **XM09**, **XM10**. Xét ion phân tử, thời gian lưu, tỉ lệ cường độ ion định tính và ion định lượng cho kết quả theo bảng 3.33, Sắc ký đồ mẫu chuẩn hình 3.62, Sắc ký đồ mẫu thử của **XM07**, **XM09**, **XM10** theo hình 3.63.



Hình 3.62. Sắc ký đồ của mẫu chuẩn các ion định tính của **XM07**, **XM09**, **XM10**



Hình 3.63. Sắc ký đồ mẫu thử mảnh ion định tính, định lượng của **XM07**, **XM09**, **XM10**

Bảng 3.33. Kết quả định tính mẫu bột dược liệu khô thu từ lá cây Xu nhỏ

Hợp chất	XM07		XM09		XM10	
	S	E	S	E	S	E
t_R	7,72	7,72	8,73	8,74	10,41	10,42
Tỷ lệ ion định tính 1 /Định lượng	0,17 (0,68%*)	0,17 (-1,55%)	0,49 (0,8%)	0,47 (-3,8%)	0,86 (0,22%)	0,85 (-1,64%)
Tỷ lệ ion định tính 2 /Định lượng	0,12 (0,43%)	0,12 (-0,81%)	0,12 (0,43%)	0,12 (-0,81%)	0,21 (0,41)	0,21 (-0,64%)
Kết quả định tính	Đúng		Đúng		Đúng	

*: Độ lệch so với S(%) mẫu chuẩn :S ; mẫu thử :E

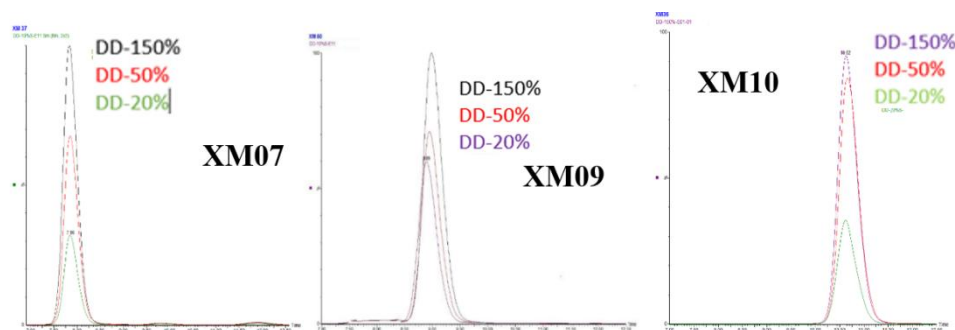
Nhận xét: Kết quả phân tích cho thấy quy trình phân tích định tính đồng thời 3 hợp chất **XM07, XM09, XM10**. Các mẫu bột dược liệu khô thu từ lá cây Xu nhỏ đều cho kết quả dương tính với 3 hợp chất **XM07, XM09, XM10**.

3.6.5. Độ đúng

Xác định hiệu suất thu hồi với 3 mức nồng độ 20%; 100%; 150% (Bảng 3.34).
Sắc ký đồ độ đúng ở 3 mức nồng độ của **XM07, XM09, XM10** (hình 3.64).

Bảng 3.34. Độ đúng

C (%) / hợp chất	XM07		XM09		XM10	
	H (%)	RSD (%)	H (%)	RSD (%)	H (%)	RSD (%)
20	97,75 – 100,59	1.21	97,11 – 101,27	1.61	96,32 – 99,46	1.20
100	101,45 – 103,32	0.63	100,58 – 101,59	0.37	102,57 – 104,13	0.51
150	101,99 – 104,13	0.82	100,63 – 102,89	0.88	101,26 – 102,73	0.53

Hình 3.64. Sắc ký đồ độ đúng ở 3 mức nồng độ của **XM07, XM09, XM10**

Nhận xét: Kết quả cho thấy hiệu suất thu hồi H rất tốt, dao động trong khoảng 96.32 % ÷ 104.13 %, RSD dưới 5% đạt yêu cầu so với quy định (theo AOAC hàm lượng chất phân tích trên 10 % thì tỷ lệ phục hồi nằm trong khoảng 90 % – 107 %).

3.6.6. Độ chính xác (hay độ lặp lại)

Kết quả cho thấy độ chính xác trong ngày, độ chính xác trung gian (khác ngày) cả 3 hợp chất **XM07**, **XM09**, **XM10** đều có RSD < 5,3 % Bảng 3.35.

3.6.7. Độ ổn định mẫu

Kết quả hàm lượng cả 3 hợp chất **XM07**, **XM09**, **XM10** sau 24 giờ (bảo quản nhiệt độ phòng 25 °C đều có RSD < 5,3 %. Bảng 3.35.

Bảng 3.35. Độ chính xác trong ngày và khác ngày, độ ổn định mẫu thử

Chất phân tích	XM07		XM09		XM10	
	X_{tb}	RSD (%)	X_{tb}	RSD (%)	X_{tb}	RSD (%)
Trong ngày	0.0134 ± 0.00034	2.35	0.0225 ± 0.0011	4.24	0.0598 ± 0.0023	3.47
Khác ngày	0.0128 ± 0.00025	1.76	0.0216 ± 0.00083	3.49	0.0571 ± 0.0016	2.56
Độ ổn định sau 24 giờ	0.0129 ± 0.00061	4.32	0.0219 ± 0.0011	4.62	0.0569 ± 0.0030	4.81

Nhận xét: Kết quả cho thấy độ chính xác trong ngày, độ chính xác trung gian (khác ngày), độ ổn định mẫu cả 3 hợp chất **XM07**, **XM09**, **XM10** đều đạt theo quy định.

3.6.8. Tóm tắt kết quả thẩm định phương pháp

Bảng 3.36. Kết quả tóm tắt thẩm định phương pháp

Thông số	Kết quả			
Tính tương thích hệ thống	Kết quả cho thấy các thông số thời gian lưu, diện tích pic, tỷ số diện tích pic và tỷ số thời gian lưu của các chất phân tích và chuẩn nội khi tiêm lặp lại 6 lần đều có RSD < 5,3 %.			
Tính đặc hiệu	Kết quả khảo sát cho thấy trên sắc ký đồ mẫu LOQ có các pic XM07 (7,86 phút), XM09 (8,90 phút), XM10 (10,64 phút), IS (8,99 phút) Mẫu trắng không xuất hiện pic tại thời gian lưu các pic trên. Tín hiệu đáp ứng của mẫu trắng tại thời điểm trùng với thời gian lưu của các hoạt chất không vượt quá 20% tín hiệu đáp ứng của chất phân tích ở nồng độ.			
Giới hạn phát hiện và giới hạn định lượng	LOD và LOQ			
	XM07	0,009 ppm và 0,03 ppm		
	XM09	0,015 ppm và 0,05 ppm		
	XM10	0,036 ppm và 0,12 ppm.		
Khoảng tuyến tính	Tương quan tuyến tính giữa nồng độ và tỉ số diện tích A_s/A_{is} của 3 hợp chất đạt hệ số $R^2 \geq 0,995$;			
	XM07	: 0,03 – 7,50 ppm	$R^2 = 0,9978$	
	XM09	: 0,05 – 12,50 ppm	$R^2 = 0,9961$	
	XM10	: 0,12 – 30,00 ppm	$R^2 = 0,9954$	
Độ đúng	20%	XM07	: 97,75 – 100,59 %	RSD : 1,21 %
		XM09	: 97,11 – 101,27 %	RSD : 1,61 %
		XM10	: 96,32 – 99,46 %	RSD : 1,20 %
	100%	XM07	: 101,45 – 103,32 %	RSD : 0,63 %
		XM09	: 100,58 – 101,59 %	RSD : 0,37 %
		XM10	: 102,57 – 104,13 %	RSD : 0,51 %
	150%	XM07	: 101,99 – 104,13 %	RSD : 0,82 %
		XM09	: 100,63 – 102,89 %	RSD : 0,88 %
		XM10	: 101,26 – 102,73 %	RSD : 0,53 %
Độ chính xác trong ngày và khác ngày	XM07 (%)	: 0,0134 ± 0,00034	RSD : 2,35 %	
		: 0,0128 ± 0,00025	RSD : 1,76 %	
	XM09 (%)	: 0,0225 ± 0,0011	RSD : 4,24 %	
		: 0,0216 ± 0,00083	RSD : 3,49 %	
	XM10 (%)	: 0,0598 ± 0,0023	RSD : 3,47 %	
		: 0,0571 ± 0,0016	RSD : 2,56 %	
Độ ổn định của hoạt chất sau xử lý mẫu 24 giờ ở ở nhiệt độ phòng thí nghiệm 25 °C	XM07 (%)	: 0,0129 ± 0,00061	RSD : 4,32 %	
	XM09 (%)	: 0,0219 ± 0,0011	RSD : 4,62 %	
	XM10 (%)	: 0,0569 ± 0,0030	RSD : 4,81 %	

3.7. Ứng dụng quy trình phân tích định tính, định lượng XM07, XM09, XM10

Kết quả phân tích định tính, định lượng **XM07**, **XM09**, **XM10** đối với các mẫu thử được liệt kê cho hàm lượng **XM07** khoảng từ 0,012 % - 0,015 %, **XM09** khoảng từ 0,019 % - 0,025 %, **XM10** khoảng từ 0,059 % - 0,074 % (Bảng 3.37). Đối với các mẫu thử được liệt kê cây Xu ổi, mẫu thử EXG-cai MeOH, EXG-cai Etylacetate đều không phát hiện có chứa 3 chất này.

Bảng 3.37. Kết quả phân tích mẫu

Tên mẫu Chỉ tiêu	Mẫu EXM1	Mẫu EXM2	Mẫu EXM3	Mẫu EXM4	Mẫu EXM5
1. Định tính XM07	Đúng	Đúng	Đúng	Đúng	Đúng
2. Định tính XM09	Đúng	Đúng	Đúng	Đúng	Đúng
3. Định tính XM10	Đúng	Đúng	Đúng	Đúng	Đúng
4. Định lượng XM07 (%)	0,0135 ± 0,00036 RSD = 1,66	0,0159 ± 0,00065 RSD = 1,82	0,0123 ± 0,00024 RSD = 0,86	0,0143 ± 0,0010 RSD = 3,17	0,0144 ± 0,00057 RSD = 1,78
5. Định lượng XM09 (%)	0,0232 ± 0,0015 RSD = 4,00	0,0250 ± 0,0010 RSD = 2,60	0,0194 ± 0,00061 RSD = 1,99	0,0195 ± 0,0020 RSD = 4,55	0,0183 ± 0,00087 RSD = 2,11
6. Định lượng XM10 (%)	0,0601 ± 0,0024 RSD = 1,78	0,0741 ± 0,0040 RSD = 2,40	0,0589 ± 0,0016 RSD = 1,22	0,0646 ± 0,0037 RSD = 2,57	0,0643 ± 0,00074 RSD = 0,51
7. Định tính EXG-cai MeOH	Moluccensin Y : 3,30-Diacetylphragmalin: Xylocensin E:			Không phát hiện Không phát hiện Không phát hiện	
EXG-cai Etylacetate	Moluccensin Y: 3,30-Diacetylphragmalin: Xylocensin E:			Không phát hiện Không phát hiện Không phát hiện	

* EXM1 – EXM5 : kí hiệu mẫu thử

Nhận xét

Nghiên cứu cung cấp những bằng chứng quan trọng về Chi Xylocarpus. Cả hai loài đều thể hiện tiềm năng hóa học rất lớn với tổng cộng 7 hợp chất mới được công bố. Cây Xu nhỏ thể hiện ưu thế hơn về số lượng chất mới (04 chất: **XM01-XM04**) so với Xu ổi (03 chất: **XM01-XM03**). Việc tìm thấy các dẫn xuất Moluccenoid và Xylocagranoside mới chứng tỏ sự khác biệt rõ rệt trong con đường sinh tổng hợp thứ cấp giữa hai loài, dù chúng cùng thuộc một chi. Việc lần đầu tiên phân lập được **XM06** và **XM08** từ chi này, cũng như **XM10** từ loài Xu nhỏ, không chỉ mở rộng thư viện hợp chất tự nhiên mà còn giúp các nhà khoa học hiểu rõ hơn về sự phân bố của các khung triterpenoid trong tự nhiên.

Khả năng kháng khuẩn: Kết quả thử nghiệm hoạt tính sinh học cho thấy sự khác biệt rõ rệt giữa hai loài thuộc chi Xu (*Xylocarpus*). Xu nhỏ nổi bật về khả năng kháng khuẩn, đặc biệt hợp chất **XM06** có hoạt tính khá mạnh trên 5 chủng vi sinh vật với giá trị MIC (32–64 µg/ml), cho thấy tiềm năng phát triển kháng sinh mới.

Khả năng gây độc tế bào: Điều này đặc biệt có giá trị khoa học vì các hợp chất mới thường mang lại hy vọng về cơ chế tác động mới trong điều trị ung thư, Xu ổi: các hợp chất **XG06**, **XG09**. Cả hai loài đều có các hợp chất thể hiện hoạt tính trên các dòng tế bào ung thư phổ biến như MCF-7 (tế bào ung thư vú) và HepG2 (tế bào ung thư gan). Đây là ngưỡng hoạt tính tiềm năng để tiến hành các nghiên cứu sâu hơn trên mô hình in vivo.

Các hợp chất phân lập từ Xu nhỏ (**XM01–XM10**) và Xu ổi (**XG01–XG11**) cho thấy vừa có tính tương đồng, vừa thể hiện sự khác biệt rõ rệt về đa dạng cấu trúc hóa học. Điểm chung nổi bật là cả hai loài đều giàu các hợp chất limonoid mang khung carbon đa vòng phức tạp, có vòng furan và nhiều nhóm chức chứa oxy. Tuy nhiên, các hợp chất phân lập được từ Xu nhỏ là các phragmalin, trong khi các hợp chất phân lập được từ Xu ổi đa dạng hơn, bao gồm glycosid, flavonoid và limonoid phản ánh sự khác biệt về con đường sinh tổng hợp và tiềm năng hóa sinh giữa hai loài.

Nghiên cứu đã đề xuất một phương pháp LC-MS/MS để phân tích đồng thời 3 chất phân tích Moluccensin Y, 3,30-Diacetylphragmalin, xylocensin E là một phương pháp hiện đại. Phương pháp LC-MS/MS sử dụng Cột ZORBAX XDB-C8 (50 x 4.6 mm; 3.5 µm), kỹ thuật MRM, ESI chế độ dương, pha động đơn giản với giá thành thấp - kinh tế để phân tích các chất. Việc phân tích trên các cột C8 thế hệ mới với hạt pha tĩnh nhỏ đã mang lại kết quả tốt khi phân tích ảnh hưởng của nền mẫu đến chất phân tích, thời gian phân tích nhanh so với các phương pháp phân tích dược liệu khác. Phương pháp này đã được đánh giá đầy đủ về các yếu tố khác nhau, chẳng hạn như độ chọn lọc, độ ổn định, phạm vi tuyến tính, LOD và LOQ thấp, độ phục hồi và độ lặp lại, sử dụng một chuẩn nội phổ biến, giá thành rẻ là Etodolac. Độ tin cậy của phương pháp này trong thử nghiệm dược liệu có thể là tiềm năng lớn trong việc phát hiện định tính và định lượng các nhóm hợp chất Limonoid trong dược liệu. Kết quả thẩm định trên mẫu dược liệu đều đạt các quy định của AOAC, ICH về phân tích hợp chất.

Kết quả thẩm định cho thấy quy trình phân tích định tính, định lượng đồng thời 3 hợp chất Moluccensin Y, 3,30-Diacetylphragmalin, xylocensin E trong lá cây Xu nhỏ bằng kỹ thuật LC-MS/MS đã được xây dựng và thẩm định đáp ứng các yêu cầu theo hướng dẫn của AOAC và ICH về thẩm định phương pháp phân tích thuốc. Quy trình này có thể được ứng dụng để xác định hàm lượng 3 chất Moluccensin Y, 3,30-Diacetylphragmalin, xylocensin E trong lá cây Xu nhỏ. Đối với các mẫu thử dược

liệu cây Xu ổi, mẫu thử EXG-caio MeOH, EXG-caio Etylacetate đều không phát hiện có chứa 3 chất này.

Việc thiết lập được 03 chất chuẩn đối chiếu (Moluccensin Y, 3,30-Diacetylphragmalin, Xyloccensin E) với độ tinh khiết cao (> 98%) bằng phương pháp qNMR là một bước tiến quan trọng. Điều này tạo cơ sở khoa học vững chắc để định lượng các hoạt chất này trong các nghiên cứu kiểm soát chất lượng dược liệu sau này.

Đánh giá về phương pháp luận và tính tin cậy: nghiên cứu sử dụng qNMR (Cộng hưởng từ hạt nhân định lượng) để xác định hàm lượng chất chuẩn. Như chúng ta đã biết, qNMR là phương pháp định lượng tuyệt đối, không cần chất chuẩn cùng loại. Việc xác định độ sạch của Moluccensin Y, 3,30-Diacetylphragmalin và Xyloccensin E đạt trên 98% bằng phương pháp qNMR cho thấy tính chính xác của phương pháp LC-MS/MS được xây dựng sau đó. Sự kết hợp giữa qNMR (để thiết lập chuẩn) và phương pháp LC-MS/MS (để định lượng hàng loạt trong mẫu thực) là một hướng tiếp cận chuẩn mới trong hóa phân tích hiện đại, đáp ứng đầy đủ các yêu cầu khắt khe của AOAC và ICH.

KẾT LUẬN VÀ KIẾN NGHỊ

KẾT LUẬN

Luận án đã khảo sát thành phần hóa học của hai loài Xu ổi và Xu nhỏ thu hái tại rừng ngập mặn Việt Nam. Kết quả đạt được như sau:

1. Nghiên cứu về hóa học

- ❖ Bằng các phương pháp sắc ký kết hợp nghiên cứu đã phân lập được **21 hợp chất** từ cây **Xu nhỏ và Xu ổi** trong đó **7 hợp chất mới** chưa được tìm thấy trong tự nhiên (công bố quốc tế):
 - **04 chất mới** phân lập được từ cây Xu nhỏ gồm **XM01** (Xylomoluccenoid A); **XM02** (Xylomoluccenoid B); **XM03** (Xylomoluccenoid C), **XM04** (Xylomoluccenoid D);
 - **03 chất mới** phân lập được từ cây Xu ổi gồm **XG01** (Xylocagranoside A); **XG02** (Xylocagranoside B); **XG03** (Xylocargranin A).
 - 06 hợp chất đã biết đều có khung triterpenoid chất mới phân lập được từ cây Xu nhỏ gồm: **XM05** (xylomolin S), **XM06** (1*H*-Dibenzo[b,e][1,4]dioxepin-11-one,3,8-dihydroxy-4-(methoxymethyl)-1,6-dimethyl), **XM07** (Moluccensin Y), **XM08** (Swietmanin H), **XM09** (3,30-diacetylphragmalin), **XM10** (Xyloccensin E).
 - 08 hợp chất đã biết đều có khung triterpenoid phân lập được từ cây Xu ổi gồm **XG04** (Xyloccensin P), **XG05** (Xyloccensin Q), **XG06** (Odoratone), **XG07** (Chisocheton F), **XG08** (Xylogranatin S), **XG09** (Xylogranatin C), **XG10** (Xylogranatin D), **XG11** (9-*O*-Methyl xylogranatin R).
- ❖ **XM10** (xyloccensin E) lần đầu tiên hợp chất này được phân lập từ cây Xu nhỏ.
- ❖ **XM06** (1*H*-Dibenzo[b,e][1,4]dioxepin-11-one,3,8-dihydroxy- 4(methoxymethyl)-1,6-dimethyl), **XM08** (Swietmanin H) lần đầu tiên hợp chất này được phân lập từ Chi Xu (*Xylocarpus*) (cụ thể là cây Xu nhỏ).
- ❖ Nghiên cứu đã phân lập và sử dụng chất sạch phân lập được từ lá cây Xu nhỏ sử dụng làm chất chuẩn đối chiếu trong thiết lập quy trình phân tích định tính và định lượng là **Moluccensin Y, 3,30-Diacetylphragmalin, Xyloccensin E**.
- ❖ Xác định cấu trúc và định lượng 03 hợp chất phân lập được từ lá cây Xu nhỏ sử dụng làm chất chuẩn đối chiếu trong thiết lập quy trình phân tích bằng **phương pháp qNMR** với hàm lượng: Moluccensin Y 98,07 %, 3,30-Diacetylphragmalin 98,36 %, Xyloccensin E 98,43 %.
- ❖ Nghiên cứu đã xây dựng và thẩm định **quy trình phân tích định tính, định lượng** đồng thời ba hợp chất đặc trưng của cây Xu nhỏ Moluccensin Y, 3,30-Diacetylphragmalin, Xyloccensin E bằng phương pháp phân tích hiện đại **LC-MS/MS** đã được xây dựng và thẩm định đáp ứng các yêu cầu theo hướng dẫn của

AOAC và ICH về thẩm định phương pháp phân tích thuốc. Quy trình này có thể được ứng dụng để xác định hàm lượng 3 chất **Moluccensin Y**, **3,30-Diacetylphragmalin**, **Xyloccensin E** trong cây Xu nhỏ.

2. Về thử nghiệm hoạt tính sinh học

➤ Hoạt tính kháng vi sinh vật

Thử nghiệm hoạt tính kháng vi sinh vật trên 21 hợp chất phân lập từ cây Xu nhỏ và Xu ổi kết quả thử nghiệm cho thấy các hợp chất phân lập từ cây Xu nhỏ thể hiện hoạt tính ức chế từ 1 đến 5 chủng vi sinh vật, trong đó hợp chất **XM06** có hoạt tính khá mạnh với MIC 32-64 µg/ml trên 5 chủng *E.faecalis* ATCC29212, *S.aureus* ATCC25923, *B.cereus* ATCC14579, *P.aeruginosa* ATCC27853 và *C.albicans* ATCC10231.

➤ Hoạt tính gây độc tế bào

Các hợp chất phân lập từ cây Xu nhỏ thử nghiệm trên các dòng tế bào ung thư phổi (SK-LU-1), ung thư vú (MCF-7), ung thư gan (HepG2), ung thư cổ tử cung ở người (Hela). Kết quả trên cho thấy có **3 mẫu XM01-chất mới** (Xylomoluccenoid A), **XM02-chất mới** (Xylomoluccenoid B), **XM05** (Xylomolin S), thể hiện hoạt tính ức chế sự phát triển của các dòng tế bào ung thư nghiên cứu (Hela, MCF-7, HepG2) với giá trị IC₅₀ từ 26,77 – 54,19 µM. Các mẫu còn lại chưa thể hiện rõ hoạt tính gây độc tế bào ở thử nghiệm này.

Kết quả sàng lọc thử độc tế bào của các hợp chất phân lập từ cây Xu ổi cho thấy các hợp chất **XG06** (Odoratone), **XG09** (Xylogranatin C) thể hiện hoạt tính gây độc tế bào nghiên cứu (A549, MCF-7, HepG2) với giá trị IC₅₀ từ 27,54– 46,99 µM, các mẫu còn lại chưa thể hiện rõ hoạt tính gây độc tế bào ở thử nghiệm này.

KIẾN NGHỊ

Đây là công trình nghiên cứu cơ bản về thành phần hóa học, hoạt tính sinh học của các hợp chất phân lập được từ hai loài Xu nhỏ và Xu ổi ở rừng ngập mặn Việt Nam, thiết lập quy trình phân tích định tính và định lượng đồng thời 03 hợp chất thuộc nhóm triterpenoid đặc trưng đối với loài Xu nhỏ tại Việt Nam bằng phương pháp LC-MS/MS. Từ công trình nghiên cứu này tác giả có đề xuất kiến nghị như sau:

➤ Nghiên cứu thử nghiệm đối với các hợp chất có hoạt tính sinh học như: **XM01-chất mới** (Xylomoluccenoid A), **XM02-chất mới** (Xylomoluccenoid B), **XM05** (**Xylomolin S**), thử thêm một số hoạt tính gây độc tế bào thần kinh, độc tính bán trường diễn đối với các chất mới lần đầu tiên được công bố quốc tế nhằm phát hiện thêm nhiều tác dụng dược lý tiềm năng đối với việc điều trị bệnh tật của hai loài cây ngập mặn Xu ổi và Xu nhỏ của Việt Nam.

➤ Tiếp tục khảo sát các phân đoạn còn lại của các cao thô từ hai loài Xu nhỏ và Xu ổi.

DANH MỤC CÔNG TRÌNH CÔNG BỐ LIÊN QUAN ĐẾN LUẬN ÁN

1. **Thi Bích Ha Tran**, Van Thanh Nguyen, Phuong Thao Nguyen, Thanh Hoang Le, Nguyen Trung Nguyen Le, Thi Ngoc Hanh Le, Dai Lam Tran, Dang Quang Ta, Viet Hung Tran*, *Simultaneous quantification of 3 typical limonoids in the Vietnam mangrove *Xylocarpus moluccensis* leaves by LC-MS/MS*, Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies, 2025, 48:11-15, 313-323, <https://doi.org/10.1080/10826076.2025.2478104>.
(Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies, ISSN 1082-6076, CHEMISTRY, ANALYTICAL – SCIE, (IF = 1.4; Q3))
2. Nguyen Phuong Thao, **Tran Thi Bích Ha***, Kieu Thi Phuong Linh, Pham Thi Mai Huong, Pham Thanh Binh, Vu Thanh Trung, Nguyen The Cuong, Tran Viet Hung, Nguyen Van Thanh, *Xylocargranosides A–B and xylocargranin A from the mangrove *Xylocarpus granatum**, Journal of Natural Medicines, 2026, 80 (2), 418-428. <https://doi.org/10.1007/s11418-025-01993-5>.
(Journal of Natural Medicines, ISSN 13403443, SCIE, IF = 2.9; Q1)
3. **Tran Thi Bích Ha**, Tran Viet Hung, Nguyen Phuong Thao, Kieu Thi Phuong Linh, Pham Thi Mai Huong, Pham Thanh Binh, Vu Thanh Trung, Nguyen The Cuong, Nguyen Van Thanh*, *Xylomoluccenoids A–D from the mangrove *Xylocarpus moluccensis* leaves*, 2026, (Elsevier - Fitoterapia, SCIE, IF = 2.6; Q2) Manuscript Number: FITOTE-D-26-01361. Đã phản biện, đang chờ accept bài.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] Võ Văn Chi, 1999, *Tự điển cây thuốc Việt Nam*, Nhà xuất bản Y học, pp. 1356-1357.
- [2] Phạm Hoàng Hộ, 2000, *Cây cỏ Việt Nam*, Quyển 2, Nhà xuất bản Y học, pp. 387-388.
- [3] Quyết định số 1165/QĐ-TTg của Thủ tướng Chính phủ ngày 09-10-2023: “*Phê duyệt Chiến lược quốc gia phát triển ngành Dược Việt Nam giai đoạn đến năm 2030 và tầm nhìn đến năm 2045*”
- [4] Bickii J. et al., 2000, In vitro antimalarial activity of limonoids from *Khaya grandifoliola* CDC (Meliaceae), *Journal of Ethnopharmacology*, 69 (1), pp. 27-33.
- [5] Uddin S. J. et al., 2007, Gedunin, a limonoid from *Xylocarpus granatum*, inhibits the growth of CaCo-2 colon cancer cell line in vitro, *Phytotherapy Research*, 21 (8), pp. 757-761.
- [6] Shen L. et al., 2009, Chemical constituents of plants from the genus *Xylocarpus*, *Chemistry & Biodiversity*, 6 (9), pp. 1293-1308.
- [7] Das S. K. et al., 2019, Bioactivity guided isolation of antidiabetic and antioxidant compound from *Xylocarpus granatum* J. Koenig bark, *Biotech*, 9, pp. 1-9.
- [8] Ravangpai W. et al., 2011, Limonoids from seeds of Thai *Xylocarpus moluccensis*, *Bioorganic Med. Chem. Lett*, 21 (15), pp. 4485-4489.
- [9] Li W. et al., 2015, Antiviral limonoids including khayanolides from the Trang mangrove plant *Xylocarpus moluccensis*, *Journal of Natural Products*, 78 (7), pp. 1570-1578.
- [10] Zhang Q., Satyanandamurty T., Shen L. , Wu J. J. M. D., 2017, Krishnolides A–D: New 2-ketokhayanolides from the Krishna mangrove, *Xylocarpus moluccensis*, *Marine Drugs*, 15 (11), pp. 333.
- [11] Zhang M. et al., 2018, New 30-ketophragmalins with anti-breast cancer activity against MDA-MB-453 cells from the Godavari mangrove, *Xylocarpus moluccensis* (Lam.) M. Roem, *Phytochemistry Letters*, 26, pp. 143-148.
- [12] Trần Trung Hiếu et al., 2022, Bước đầu khảo sát thành phần hóa học của quả Su ối, *Tạp chí phân tích Hóa, Lý và Sinh học*, 27 (3), pp. 238-243.
- [13] Baba S. et al., 2016, Botany, uses, chemistry and bioactivities of mangrove plants III: *Xylocarpus granatum*, *ISME/GLOMIS Electronic*, 14 (1), pp. 1-4.
- [14] Lakshmi V. , Gupta P. J. N. P. R., 2008, An overview of the genus *Xylocarpus*, *Natural Product Research*, 22 (14), pp. 1197-1224.
- [15] Sachithanandam V. et al., 2019, A review on antidiabetic properties of Indian mangrove plants with reference to island ecosystem, *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, pp. 21.
- [16] Li-Fu Liu W. Z., Patchara Pedpradab , Jun Wu , Li Shen 2025, Ten limonoids and three protolimonoids from the Thai mangrove *Xylocarpus moluccensis*, *Fitoterapia*, 180 (106307).
- [17] Islam M. T. et al., 2020, Chemical profile and therapeutic potentials of *Xylocarpus moluccensis* (Lam.) M. Roem.: A literature-based review, *Journal of Ethnopharmacology*, 259, pp. 112958.

- [18] Das S. K., Samantaray D. , Thatoi H. J. J. B. B., 2014, Ethnomedicinal, antimicrobial and antidiarrhoeal studies on the mangrove plants of the genus *Xylocarpus*: a mini review, *Journal of Bioanalysis & Biomedicine*, 12 (004).
- [19] Nabeelah Bibi S. et al., 2019, Ethnopharmacology, phytochemistry, and global distribution of mangroves—A comprehensive review, *Marine Drugs*, 17 (4), pp. 231.
- [20] Li-Min Luo L.-F. L., Wei Zhao , Jun Wu , Li Shen 2023, Xylomolins O-X: New limonoids from the Thai mangrove *Xylocarpus moluccensis*, *Fitoterapia*, 168 (105558).
- [21] Ahmed F. R., Ng A. , Fallis A. G., 1978, 7 α -Acetoxymexicanolide: isolation, spectra, and crystal structure, *Canadian Journal of Chemistry*, 56 (7), pp. 1020-1025.
- [22] Ng A. S. , Fallis A. G., 1979, Comment: 7 α -Acetoxymexicanolide and mexicanolide: limonoids from *Xylocarpus granatum* (Koenig), *Canadian Journal of Chemistry*, 57 (23), pp. 3088-3089.
- [23] Taylor D., 1965, Extractives from East African timbers, *Journal of the Chemical Society*, pp. 3495–3496.
- [24] Mulholland D. A. , Taylor D. A. J. P., 1992, Limonoids from Australian members of the Meliaceae, *Phytochemistry*, 31 (12), pp. 4163-4166.
- [25] Wu J. et al., 2010, Limonoids and tirucallane derivatives from the seeds of a Krishna mangrove, *Xylocarpus moluccensis*, *Journal of Natural Products*, 73 (4), pp. 644-649.
- [26] He C.-L., Li W.-S., Wu J. , Shen, 2021, Krishnolides E–K: New limonoids from the Krishna mangrove *Xylocarpus moluccensis*, *Fitoterapia*, 150, pp. 104835.
- [27] Adesogan E., Okorie D. , Taylor, 1970, Limonoids from *Khaya anthotheca* (Welw.) C. DC, *Journal of the Chemical Society C*(2), pp. 205-211.
- [28] Connolly J. D., MacLellan M., Okorie D. A. , Taylor D. A., 1976, Limonoids from *Xylocarpus moluccensis* (Lam.) M. Roem, *Journal of the Chemical Society*(19), pp. 1993-1996.
- [29] Taylor A. R. , Taylor D. A., 1983, Limonoid extractives from *Swietenia macrophylla*, *Phytochemistry*, 22 (12), pp. 2870-2871.
- [30] Taylor D. A., 1983, Limonoid extractives from *Xylocarpus moluccensis*, *Phytochemistry*, 22 (5), pp. 1297-1299.
- [31] Kokpol U. et al., 1996, A limonoid from *Xylocarpus granatum*, *Phytochemistry*, 41 (3), pp. 903-905.
- [32] Alvi K. A., Crews P., Aalbersberg B. , Prasad R., 1991, Limonoids from the Fijian medicinal plant dabi (*Xylocarpus*), *Tetrahedron Letters*, 47 (43), pp. 8943-8948.
- [33] Wu J. et al., 2006, Complete assignments of ¹H and ¹³C NMR data for two 3 β , 8 β -epoxymexicanolides from the fruit of a Chinese mangrove *Xylocarpus granatum*, *Magnetic resonance in chemistry*, 44 (1), pp. 87-89.
- [34] Wu J. et al., 2004, Xylococcins L, a novel limonoid from *Xylocarpus granatum*, *Tetrahedron Letters*, 45 (3), pp. 591-593.
- [35] Wu J. et al., 2003, Xylococcins M and N, two new B, D-seco limonoids from *Xylocarpus granatum*, *Zeitschrift für Naturforschung B*, 58 (12), pp. 1216-1219.
- [36] Wu J. et al., 2005, Two new mexicanolides from the fruit of the Chinese mangrove *Xylocarpus granatum*, *Zeitschrift für Naturforschung B*, 60 (12), pp. 1291-1294.

- [37] Cheng F., Zhou Y., Wu J. , Zou K., 2006, Xyloccensins X1 and X2, two new mexicanolides from the fruit of a Chinese mangrove *Xylocarpus granatum*, *Zeitschrift für Naturforschung B*, 61 (5), pp. 626-628.
- [38] Roy A. D. et al., 2006, Xyloccensin X and Y, two new limonoids from *xylocarpus molluccensis*: NMR investigation in mixture, *Magnetic resonance in chemistry*, 44 (11), pp. 1054-1057.
- [39] Cui J. et al., 2007, Xylocarpins A– I, Limonoids from the Chinese mangrove plant *Xylocarpus granatum*, *Journal of Natural Products*, 70 (5), pp. 772-778.
- [40] Wu J. et al., 2006, Xylogranatins A—D, New Mexicanolides from the Fruit of a Chinese Mangrove *Xylocarpus granatum*, *Chemical pharmaceutical bulletin*, 54 (11), pp. 1582-1585.
- [41] Wu J. et al., 2007, Two new limonoids with a 3-O- β -tigloyl group from the seeds of the Chinese mangrove *Xylocarpus granatum*, *Zeitschrift für Naturforschung B*, 62 (6), pp. 859-862.
- [42] Yin S. et al., 2007, Limonoids from the seeds of the marine mangrove *Xylocarpus granatum*, *Journal of Natural Products*, 70 (4), pp. 682-685.
- [43] Yin S. et al., 2006, Xylogranatins A– D: novel Tetranortriterpenoids with an unusual 9, 10-s eco scaffold from Marine Mangrove *Xylocarpus granatum*, *Organic letters*, 8 (21), pp. 4935-4938.
- [44] Wu J. et al., 2008, Xylogranatins F–R: antifeedants from the Chinese mangrove, *Xylocarpus granatum*, a new biogenetic pathway to tetranortriterpenoids, *Chemistry–A European*, 14 (4), pp. 1129-1144.
- [45] Li M.-Y. et al., 2009, Granatumins A– G, limonoids from the seeds of a krishna mangrove, *Xylocarpus granatum*, *Journal of natural products*, 72 (12), pp. 2110-2114.
- [46] Shen L.-R. et al., 2009, Xylomexicanins A and B, new Δ^{14} , 15-mexicanolides from seeds of the Chinese mangrove *Xylocarpus granatum*, *Zeitschrift für Naturforschung C*, 64 (1-2), pp. 37-42.
- [47] Huo C.-H. et al., 2010, Xylocarpanoids A and B, unique C28 skeleton limonoids from *Xylocarpus granatum*, *Tetrahedron Letters*, 51 (4), pp. 754-757.
- [48] Li J. et al., 2010, Limonoids from the seeds of a Godavari mangrove, *Xylocarpus moluccensis*, *Phytochemistry*, 71 (16), pp. 1917-1924.
- [49] Pan J.-Y. et al., 2010, Limonoids from the Seeds of a Hainan Mangrove, *Xylocarpus granatum*, *Journal of Natural Products*, 73 (10), pp. 1672-1679.
- [50] Zhang J. et al., 2010, Mexicanolides from the seeds of a Krishna mangrove, *Xylocarpus moluccensis*, *Chemical pharmaceutical bulletin*, 58 (4), pp. 552-555.
- [51] Sarigaputi C. et al., 2010, Xylorumphiins A– D, Mexicanolide Limonoids from the Seed Kernels of *Xylocarpus rumphii*, *Journal of Natural Products*, 73 (8), pp. 1456-1459.
- [52] Li J., Li M. Y., Satyanandamurty T. , Wu J., 2011, Godavarin K: a new limonoid with an oxygen bridge between C (1) and C (29) from the Godavari mangrove *Xylocarpus moluccensis*, *Helvetica Chimica Acta*, 94 (9), pp. 1651-1656.
- [53] Li J. et al., 2012, Moluccensins R–Y, Limonoids from the Seeds of a Mangrove, *Xylocarpus moluccensis*, *Journal of Natural Products*, 75 (7), pp. 1277-1283.
- [54] Chen H. et al., 2013, New limonoids from the seeds of a Krishna mangrove, *Xylocarpus granatum*, *Chemistry Biodiversity*, 10 (4), pp. 612-620.

- [55] Wu Y.-B. et al., 2013, Xylomexicanins C and D, new mexicanolide-type limonoids from *Xylocarpus granatum*, *Bioscience, biotechnology, biochemistry* 77 (4), pp. 736-740.
- [56] Toume K. et al., 2013, Xylogranin B: a potent Wnt signal inhibitory limonoid from *Xylocarpus granatum*, *Organic letters*, 15 (23), pp. 6106-6109.
- [57] Li J. et al., 2013, Thaixylomolins A–C: Limonoids featuring two new motifs from the Thai *Xylocarpus moluccensis*, *Organic letters*, 15 (14), pp. 3682-3685.
- [58] Sarigaputi C., Sommit D., Teerawatananond T. , Pudhom K., 2014, Weakly anti-inflammatory limonoids from the seeds of *Xylocarpus rumphii*, *Journal of Natural Products*, 77 (9), pp. 2037-2043.
- [59] Zhou Z.-F. et al., 2014, Bioactive rearranged limonoids from the Chinese mangrove *Xylocarpus granatum* Koenig, *Tetrahedron*, 70 (37), pp. 6444-6449.
- [60] Li M. Y., Xiao Q., Satyanandamurty T. , Wu J., 2014, Limonoids with an oxygen bridge between C (1) and C (29) from the seeds of a Krishna mangrove, *Xylocarpus granatum*, *Chemistry & Biodiversity*, 11 (2), pp. 262-275.
- [61] Wu Y.-B. et al., 2014, Xylomexicanins EH, new limonoids from *Xylocarpus granatum*, *Tetrahedron*, 70 (30), pp. 4557-4562.
- [62] Wu Y. B. et al., 2015, New limonoids from the seeds of *Xylocarpus granatum*, *Helvetica Chimica Acta*, 98 (5), pp. 691-698.
- [63] Zhou Z.-F. et al., 2016, Novel and neuroprotective tetranortriterpenoids from Chinese mangrove *Xylocarpus granatum* Koenig, *Scientific Reports*, 6 (1), pp. 1-10.
- [64] Li W. et al., 2016, Trangmolins A–F with an unprecedented structural plasticity of the rings A and B: New insight into limonoid biosynthesis, *Chemistry–A European Journal*, 22 (33), pp. 11719-11727.
- [65] Dai Y.-G. et al., 2016, Thaixylomolins O–R: Four new limonoids from the Trang mangrove, *Xylocarpus moluccensis*, *RSC Advances*, 6 (89), pp. 85978-85984.
- [66] Niu K., Shen L. , Wu J., 2016, A tirucallane and two pairs of tetranortriterpene 23-epimers from the Thai mangrove *Xylocarpus moluccensis*, *Journal of Asian natural products research*, 18 (1), pp. 36-40.
- [67] Waratchareeyakul W. et al., 2017, Application of residual dipolar couplings and selective quantitative NOE to establish the structures of tetranortriterpenoids from *Xylocarpus rumphii*, *Journal of Natural Products*, 80 (2), pp. 391-402.
- [68] Li W. S. et al., 2017, Krishnadimer A, an axially chiral non-biaryl natural product: Discovery and biomimetic synthesis, *Organic letters*, 19 (1), pp. 182-185.
- [69] Wu Y. et al., 2017, Granaxylocartin A, New Limonoid from the Seeds of *Xylocarpus granatum*, *Chemistry of Natural Compounds*, 53, pp. 901-903.
- [70] Liao M., Pedpradab P. , Wu J., 2017, Thaixylogranins A–H: Eight new limonoids from the Thai mangrove, *Xylocarpus granatum*, *Phytochemistry Letters*, 19, pp. 126-131.
- [71] Wu Y.-B. et al., 2017, Xylomexicanins I and J: limonoids with unusual B/C rings from *Xylocarpus granatum*, *Journal of Natural Products*, 80 (9), pp. 2547-2550.
- [72] Dai Y.-G., Wu J., Padmakumar K. P. , Shen L., 2017, Sundarbanxylogranins A–E, five new limonoids from the Sundarban Mangrove, *Xylocarpus granatum*, *Fitoterapia*, 122, pp. 85-89.

- [73] Liu R.-X., Liao Q., Shen L. , Wu J., 2018, Krishnagranatins A–I: New limonoids from the mangrove, *Xylocarpus granatum*, and NF- κ B inhibitory activity, *Fitoterapia*, 131, pp. 96-104.
- [74] Ren J.-L. et al., 2018, Limonoids containing a C1–O–C29 moiety: Isolation, structural modification, and antiviral activity, *Marine Drugs*, 16 (11), pp. 434.
- [75] Zhang J. et al., 2018, Twenty-nine new limonoids with skeletal diversity from the mangrove plant, *Xylocarpus moluccensis*, *Marine Drugs*, 16 (1), pp. 38.
- [76] Li W.-S. et al., 2019, Xylomolones A–D from the Thai mangrove *Xylocarpus moluccensis*: Assignment of absolute stereostructures and unveiling a convergent strategy for limonoid biosynthesis, *Journal of Organic Chemistry*, 84 (5), pp. 2596-2606.
- [77] Zhang J.-C., Liao Q., Shen L. , Wu J., 2020, Twenty-five limonoids from the Hainan mangrove, *Xylocarpus granatum*, *Bioorganic Chemistry*, 100, pp. 103903.
- [78] Shen L., Liao Q., Zhang M. , Wu J., 2020, Limonoids with diverse structures of rings-A, B from the Thai mangrove, *Xylocarpus moluccensis*, *Fitoterapia*, 147, pp. 104737.
- [79] Sarigaputi C. et al., 2010, Xyloccensin E, *Acta Crystallographica Section E: Structure Reports Online*, 66 (6), pp. o1348-o1349.
- [80] Connolly J. D., Labbé C. , Rycroft D. S., 1978, Tetranortriterpenoids and related substances. Part 20. New tetranortriterpenoids from the seeds of *Chukrasia tabularis* (Meliaceae); simple esters of phragmalin and 12 α -acetoxyphragmalin, *Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 1*(3), pp. 285-288.
- [81] Narender T., Khaliq T. , Shweta, 2008, 13C NMR spectroscopy of D and B, D-ring seco-limonoids of Meliaceae family, *Natural Product Research*, 22 (9), pp. 763-800.
- [82] Wu J. et al., 2004, Xyloccensins O and P, Unique 8, 9, 30-Phragmalin Ortho Esters from *Xylocarpus granatum*, *Organic letters*, 6 (11), pp. 1841-1844.
- [83] Cui J. et al., 2005, Phragmalin-type limonoids from the mangrove plant *Xylocarpus granatum*, *Phytochemistry*, 66 (19), pp. 2334-2339.
- [84] Zhou Y., Cheng F., Wu J. , Zou K., 2006, Polyhydroxylated Phragmalins from the Fruit of a Chinese Mangrove, *Xylocarpus granatum*, *Journal of Natural Products*, 69 (7), pp. 1083-1085.
- [85] Wu J., Ding H., Li M. , Zhang S., 2007, Xylogranatin E, a new phragmalin with a rare oxygen bridge between C1 and C29, from the fruit of a Chinese mangrove *Xylocarpus granatum*, *Zeitschrift für Naturforschung B*, 62 (4), pp. 569-572.
- [86] Li M.-Y. et al., 2009, Moluccensins A– G, phragmalins with a conjugated C-30 carbonyl group from a krishna mangrove, *Xylocarpus moluccensis*, *Journal of Natural Products*, 72 (9), pp. 1657-1662.
- [87] Pudhom K. et al., 2010, Moluccensins H– J, 30-Ketophragmalin Limonoids from *Xylocarpus moluccensis*, *Journal of Natural Products*, 73 (2), pp. 263-266.
- [88] Zhou Z.-F. et al., 2014, Four phragmalin orthoesters from the Chinese mangrove *Xylocarpus granatum*, *Planta medica*, 80 (11), pp. 949-954.
- [89] Li S.-J. et al., 2022, Xylomexicanins KN: limonoids from the leaves and twigs of *Xylocarpus granatum*, *Natural Product Research*, 36 (19), pp. 5001-5008.

- [90] Wu J., Li M., Xiao Z. , Zhou Y., 2006, Butyrospermol fatty acid esters from the fruit of a Chinese mangrove *Xylocarpus granatum*, *Zeitschrift für Naturforschung B*, 61 (11), pp. 1447-1449.
- [91] Chou F. et al., 1977, Isolation of an insect anti-feedant n-methylflindersine and several benz [c] phenanthridine alkaloids from east-african plants-comment on chelerythrine, *Phytochemistry*, 7, pp. 969-977.
- [92] Jing L. et al., 2020, Limonoid compounds from *Xylocarpus granatum* and their anticancer activity against esophageal cancer cells, *Thoracic Cancer*, 11 (7), pp. 1817-1826.
- [93] Li M.-Y. et al., 2008, The absolute stereochemistry of protoxylogranatin A—a new protolimonoid from the seeds of Chinese mangrove *Xylocarpus granatum*, *Journal of Asian natural products research*, 10 (6), pp. 503-508.
- [94] Cui J. et al., 2009, Protolimonoids and limonoids from the Chinese mangrove plant *Xylocarpus granatum*, *Helvetica Chimica Acta*, 92 (1), pp. 139-150.
- [95] Pudhom K. et al., 2009, Protoxylocarpins F– H, protolimonoids from seed kernels of *Xylocarpus granatum*, *Journal of Natural Products*, 72 (12), pp. 2188-2191.
- [96] Yin B. et al., 2009, Protolimonoids from the seeds of *Xylocarpus granatum*, *Biochemical systematics*, 37 (3), pp. 218-220.
- [97] Jiang Z.-P. et al., 2018, Mangrove tirucallane-and apotirucallane-type triterpenoids: Structure diversity of the C-17 side-chain and natural agonists of human farnesoid/Pregnane–X–Receptor, *Marine Drugs*, 16 (12), pp. 488.
- [98] Zhou Z.-F. et al., 2014, Apotirucallane protolimonoids from the Chinese mangrove *Xylocarpus granatum* Koenig, *Fitoterapia*, 97, pp. 192-197.
- [99] Li J. et al., 2012, Andhraxylocarpins A–E: structurally intriguing limonoids from the true mangroves *Xylocarpus granatum* and *Xylocarpus moluccensis*, *Chemistry–A European Journal*, 18 (45), pp. 14342-14351.
- [100] Chen W. et al., 2014, Absolute configurations of new limonoids from a Krishna mangrove, *Xylocarpus granatum*, *Fitoterapia*, 94, pp. 108-113.
- [101] Shen L. et al., 2021, Granatripodins A–B, limonoids featuring a Tricyclo [3.3.1.0^{2,8}] nonane motif: Absolute configuration and agonistic effects on human pregnane–X–receptor, *Bioorganic Chemistry*, 111, pp. 104888.
- [102] Wu J., Xiao Q., Li Q. , ecology, 2006, Limonoids from the Mangrove *Xylocarpus granatum*, *Biochemical systematics*, 34 (11), pp. 838-841.
- [103] Bercich M. G., Cambie R. C., Lal A. R. , Sidwell D., 1998, Chemistry of Fijian plants. XIV an unsaturated aryl keto acid from *Xylocarpus moluccensis*, *Australian journal of chemistry*, 51 (8), pp. 795.
- [104] Du S., Wang M., Zhu W. , Qin Z., 2009, A new fungicidal lactone from *Xylocarpus granatum* (Meliaceae), *Natural Product Research*, 23 (14), pp. 1316-1321.
- [105] Tukiran T., Cahyasari S. S. , Shimizu K., 2012, An ester of 4-methoxy cinnamic acid isolated from *xylocarpus moluccensis* (Lamk) M. Roem (Meliaceae), *Indonesian Journal of Chemistry*, 12 (2), pp. 184-188.
- [106] Zhou Y., Wu J. , Zou K., 2007, Xylogranatinin, a new pyrido [1, 2-a] pyrazine alkaloid from the fruit of a Chinese mangrove *Xylocarpus granatum*, *Chemistry of Natural Compounds*, 43, pp. 426-428.

- [107] Cui J., Ouyang J., Deng Z. , Lin W., 2008, Structure elucidation of an unprecedented alkaloid and a new limonoid from *Xylocarpus granatum*, *Magnetic resonance in chemistry*, 46 (9), pp. 894-897.
- [108] Olanipekun B. E. et al., 2020, α -Glucosidase inhibitory isomeric corniculatolides from the stems of the indian mangrove plant, *Xylocarpus granatum*, *Journal of Natural Products*, 83 (1), pp. 20-25.
- [109] Kubo I., Miura I. , Nakanishi K., 1976, The structure of xylomollin, a secoiridoid hemiacetal acetal, *Journal of the American Chemical Society*, 98 (21), pp. 6704-6705.
- [110] Huo C. et al., 2013, A new glyceride from the seeds of *Xylocarpus granatum*, *Chemistry of Natural Compounds*, 48, pp. 934-937.
- [111] Kamath S. G. et al., 2009, Gedunin, a novel natural substance, inhibits ovarian cancer cell proliferation, *International Journal of Gynecologic Cancer*, 19 (9), pp. 1564-1569.
- [112] Braga T. M. et al., 2020, Biological activities of gedunin—A limonoid from the Meliaceae family, *Molecules*, 25 (3), pp. 493.
- [113] Patwardhan C. A. et al., 2013, Gedunin Inactivates the Co-chaperone p23 Protein Causing Cancer Cell Death by Apoptosis*♦, *Journal of Biological Chemistry*, 288 (10), pp. 7313-7325.
- [114] Wu J. et al., 2005, Xylococcins Q–V, six new 8, 9, 30-phragmalin ortho ester antifeedants from the Chinese mangrove *Xylocarpus granatum*, *Tetrahedron Letters*, 61 (35), pp. 8382-8389.
- [115] Oxford U. o., 2017, Quantitative NMR Spectroscopy, *Book*.
- [116] Maksimenka K., 2010, *Quantum Chemical CD Calculations*.
- [117] Phung N. K. P., 2004, *Khối Phở*, Đại học Quốc gia TP.HCM
- [118] *Mass Spectrometry: Principles and Applications, Third Edition Edmond de Hoffmann and Vincent Stroobant*, 2007, John Wiley & Sons Ltd.
- [119] Nguyễn Lâm Dũng Đ. X. M., Nguyễn Phùng Tiên, Đặng Đức Trạch, Phạm Văn Ty, 1977, *Một số phương pháp nghiên cứu vi sinh vật học*, 3, NXB Khoa học Kỹ thuật.
- [120] Hadacek F. , Greger H., 2000, Testing of antifungal natural products: methodologies, comparability of results and assay choice, *Phytochemical Analysis: An International Journal of Plant Chemical Biochemical Techniques*, 11 (3), pp. 137-147.
- [121] Alley M. C. et al., 1988, Feasibility of drug screening with panels of human tumor cell lines using a microculture tetrazolium assay, *Cancer research*, 48 (3), pp. 589-601.
- [122] Kardono L. B. et al., 1991, Cytotoxic and antimalarial constituents of the roots of *Eurycoma longifolia*, *Journal of Natural Products*, 54 (5), pp. 1360-1367.
- [123] Monks A. et al., 1991, Feasibility of a high-flux anticancer drug screen using a diverse panel of cultured human tumor cell lines, *Journal of the National Cancer Institute*, 83 (11), pp. 757-766.
- [124] Scudiero D. A. et al., 1988, Evaluation of a soluble tetrazolium/formazan assay for cell growth and drug sensitivity in culture using human and other tumor cell lines, *Cancer research*, 48 (17), pp. 4827-4833.
- [125] Nagle D. G. et al., 2004, Mechanism targeted discovery of antitumor marine natural products, *Current medicinal chemistry*, 11 (13), pp. 1725-1756.

- [126] Hughes J. P., Rees S., Kalindjian S. B. , Philpott K. L., 2011, Principles of early drug discovery, *British journal of pharmacology*, 162 (6), pp. 1239-1249.
- [127] Naithani R. et al., 2008, Comprehensive review of cancer chemopreventive agents evaluated in experimental carcinogenesis models and clinical trials, *Current medicinal chemistry*, 15 (11), pp. 1044-1071.
- [128] AOAC International A. O. M. 2016, Appendix F: Guidelines for Standard Method performance requirements, AOAC, USA,.
- [129] Q2(R2) I. 2022, guideline on validation of analytical procedures, step 2b
- [130] Abdelgaleil S. A., Doe M., Morimoto Y. , Nakatani M., 2006, Rings B, D-seco limonoids from the leaves of *Swietenia mahogani*, *Phytochemistry*, 67 (5), pp. 452-458.
- [131] Wu J. et al., 2023, UV light–driven late-stage skeletal reorganization to diverse limonoid frameworks: a proof of concept for photobiosynthesis, *Science Advances*, 9 (4), pp. eade2981.
- [132] Abdou R. et al., 2010, Botryorhodines A–D, antifungal and cytotoxic depsidones from *Botryosphaeria rhodina*, an endophyte of the medicinal plant *Bidens pilosa*, *Phytochemistry*, 71 (1), pp. 110-116.
- [133] Umeokoli B. O. et al., 2019, A new depsidone derivative from mangrove sediment derived fungus *Lasiodiplodia theobromae*, *Natural Product Research*, 33 (15), pp. 2215-2222.
- [134] Lin B.-D. et al., 2009, Structurally Diverse Limonoids from the Fruits of *Swietenia mahagoni*, *Journal of Natural Products*, 72 (12), pp. 2084-2090.
- [135] Jang DS, Lee GY, Lee YM, Kim YS, Sun H, Kim D-H, Kim JS (2009) Flavan-3-ols Having a γ -Lactam from the Roots of *Actinidia arguta* Inhibit the Formation of Advanced Glycation End Products *in Vitro*. *Chem Pharm Bull* 57:397-400.
- [136] King-Díaz B. et al., 2014, Triterpenes from *Cabralea canjerana* as in vitro inhibitors to light reactions of photosynthesis, *American Journal of Plant Sciences*, 5 (16), pp. 2528-2540.
- [137] de Paula J. et al., 1997, Sesquiterpenes, triterpenoids, limonoids and flavonoids of *Cedrela odorata* graft and speculations on the induced resistance against *Hypsipyla grandella*, *Phytochemistry*, 44 (8), pp. 1449-1454.
- [138] Huo ChangHong H. C. et al., 2010, One new limonoid from seeds of *Xylocarpus granatum*, *Chinese Traditional and Herbal Drugs*, 41 (2), pp. 176-178.
- [139] <https://go.drugbank.com/drugs/DB00749>.
- [140] <https://go.drugbank.com/drugs/DB01076>.
- [141] <https://go.drugbank.com/drugs/DB00973>.

PHỤ LỤC

Phụ lục 1. Cấu trúc hóa học các hợp chất từ 61 – 243	PL1
Phụ lục 2. Phổ NMR các hợp chất phân lập từ cây Xu nhỏ	PL13
Phụ lục 3. Phổ NMR các hợp chất phân lập từ cây Xu ổi	PL41
Phụ lục 4. Dữ liệu Phổ LC-MS/MS	PL70