

**BỘ GIÁO DỤC
VÀ ĐÀO TẠO**

**VIỆN HÀN LÂM
KHOA HỌC VÀ CÔNG NGHỆ VN**

HỌC VIỆN KHOA HỌC VÀ CÔNG NGHỆ



Nguyễn Việt Dũng

**NGHIÊN CỨU THÀNH PHẦN HÓA HỌC VÀ HOẠT TÍNH
ỨC CHẾ ENZYME α -GLUCOSIDASE VÀ α -AMYLASE CỦA
LOÀI *Camellia phanii* Ở VIỆT NAM.**

LUẬN VĂN THẠC SĨ KHOA HỌC VẬT CHẤT

Hà Nội - 2024

BỘ GIÁO DỤC
VÀ ĐÀO TẠO

VIỆN HÀN LÂM
KHOA HỌC VÀ CÔNG NGHỆ VN
HỌC VIỆN KHOA HỌC VÀ CÔNG NGHỆ



Nguyễn Việt Dũng

NGHIÊN CỨU THÀNH PHẦN HÓA HỌC VÀ HOẠT TÍNH
ỨC CHẾ ENZYME α -GLUCOSIDASE VÀ α -AMYLASE CỦA
LOÀI *Camellia phanii* Ở VIỆT NAM.

Chuyên ngành: Hóa hữu cơ

Mã số: 8440114

LUẬN VĂN THẠC SĨ HÓA HỌC

NGƯỜI HƯỚNG DẪN KHOA HỌC:

1. TS. Bùi Thị Mai Anh

A handwritten signature in blue ink, appearing to be "lb", on a light blue rectangular background.

2. TS. Nguyễn Thị Minh Hằng

A handwritten signature in blue ink, appearing to be "Minh Hằng", on a light blue rectangular background.

Hà Nội - 2024

LỜI CAM ĐOAN

Tôi xin cam đoan kết quả nghiên cứu trong luận văn này là công trình nghiên cứu của tôi dựa trên những tài liệu, số liệu do chính tôi tự tìm hiểu và nghiên cứu. Chính vì vậy, các kết quả nghiên cứu đảm bảo trung thực và khách quan nhất. Đồng thời, kết quả này chưa từng xuất hiện trong bất cứ một nghiên cứu nào. Các số liệu, kết quả nêu trong luận văn là trung thực nếu sai tôi hoàn chịu trách nhiệm.

Tác giả

A handwritten signature in blue ink, appearing to read 'Dũng', is written over a light gray grid background.

Nguyễn Việt Dũng

LỜI CẢM ƠN

Luận văn này được hoàn thành tại Viện Hóa sinh biển - Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam.

Tôi xin bày tỏ lời cảm ơn sâu sắc nhất tới TS. Bùi Thị Mai Anh và TS. Nguyễn Thị Minh Hằng - Người đã tận tâm hướng dẫn chỉ dạy cho tôi về mặt chuyên môn, và tạo mọi điều kiện thuận lợi nhất cho tôi trong suốt thời gian thực hiện luận văn .

Tôi xin chân thành cảm ơn lãnh đạo và các đồng nghiệp phòng Nghiên cứu cấu trúc - Viện Hóa Sinh biển về sự ủng hộ to lớn, những lời khuyên bổ ích và những góp ý quý báu trong việc thực hiện và hoàn thiện luận văn.

Tôi xin trân trọng cảm ơn Ban lãnh đạo Học viện Khoa học và Công nghệ và Viện Hóa sinh biển đã giúp đỡ và tạo điều kiện thuận lợi cho tôi trong quá trình học.

Tôi xin bày tỏ lòng biết ơn chân thành và sâu sắc nhất tới toàn thể gia đình, bạn bè và những người thân đã luôn luôn quan tâm, khích lệ, động viên tôi trong suốt quá trình học tập và nghiên cứu.

Xin trân trọng cảm ơn!

Tác giả



Nguyễn Việt Dũng

MỤC LỤC

DANH MỤC CHỮ VIẾT TẮT.....	V
DANH MỤC BẢNG.....	VI
DANH MỤC HÌNH.....	VII
MỞ ĐẦU	1
CHƯƠNG 1. TỔNG QUAN NGHIÊN CỨU.....	3
1.1. Tổng quan về chi <i>Camellia</i>	3
1.1.1. Giới thiệu chung về chi <i>Camellia</i>	3
1.1.2. Các nghiên cứu về thành phần hóa học và hoạt tính sinh học của chi <i>Camellia</i>	3
1.1.2.1. Tình hình nghiên cứu ở Việt Nam	3
1.1.2.2. Tình hình nghiên cứu trên thế giới.....	5
1.2. Tổng quan về loài Trà hoa vàng <i>Camellia phanii</i> Hakoda & Ninh	8
1.2.1. Đặc điểm thực vật của loài Trà hoa vàng <i>Camellia phanii</i> Hakoda & Ninh [1]	8
1.2.2. Công dụng của Trà hoa vàng <i>C. phanii</i> trong dân gian	8
1.3. Tổng quan về tiểu đường	9
CHƯƠNG 2. ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU	15
2.1. Đối tượng nghiên cứu	15
2.2. Phương pháp nghiên cứu	15
2.2.1. Phương pháp phân lập các hợp chất.....	15
2.2.2. Phương pháp xác định cấu trúc hóa học các hợp chất.....	16
2.2.3. Phương pháp thử tác dụng ức chế hoạt động của enzyme α -glucosidase [22]	16
2.2.4. Phương pháp thử tác dụng ức chế hoạt động của enzyme α -amylase [23]	17
2.2.5. Phương pháp xác định đường	17
CHƯƠNG 3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN	18
3.1. Phân lập các hợp chất.....	18
3.2. Xác định cấu trúc hóa học của các hợp chất phân lập được	22
3.2.1. Hợp chất CP1: Camphanoside A (hợp chất mới)	22
3.2.2. Hợp chất CP2: Camphanoside B (hợp chất mới)	29
3.2.3. Hợp chất CP3: camphanoside C (hợp chất mới)	36
3.2.4. Hợp chất CP4: chikusetsusaponin IVa	42

3.2.5. Hợp chất CP5: <i>spinasaponin A 28-O-glucoside</i>	44
3.2.6. Hợp chất CP6: (-) <i>Epicatechin</i>	47
3.2.7. Hợp chất CP7: (-)- <i>epicatechin 3-O-gallate</i>	48
3.1.8. Hợp chất CP8: (-)- <i>epigallocatechin 3-O-gallate</i>	50
<i>Chikusetsusaponin IVa (CP4)</i>	52
3.3. Hoạt tính ức chế enzym α -glucosidase của các hợp chất phân lập được.	53
3.4. Hoạt tính ức chế enzyme α -amylase của các hợp chất phân lập được	54
CHƯƠNG IV. KẾT LUẬN VÀ KIẾN NGHỊ	56
CÔNG TRÌNH CÔNG BỐ LIÊN QUAN ĐẾN LUẬN VĂN.....	57
TÀI LIỆU THAM KHẢO	58
PHỤ LỤC	63

DANH MỤC CHỮ VIẾT TẮT

Kí hiệu	Tiếng Anh	Diễn giải
^{13}C -NMR	Carbon-13 Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy	Phổ cộng hưởng từ hạt nhân cacbon 13
^1H -NMR	Proton Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy	Phổ cộng hưởng từ hạt nhân proton
COSY	Correlation Spectroscopy	Phổ COSY
CTPT	Molecular formula	Công thức phân tử
DMSO	Dimethylsulfoxide	$(\text{CH}_3)_2\text{SO}$
FBS	Fetal bovine serum	Huyết thanh bò
HMBC	Heteronuclear Multiple Bond Connectivity Spectroscopy	Phổ tương tác dị hạt nhân qua nhiều liên kết
HPLC	High Performance Liquid Chromatography	Sắc ký lỏng hiệu năng cao
HR-ESI-MS	High Resolution Electrospray Ionization Mass Spectrometry	Phổ khối lượng phân giải cao phun mù điện
HSQC	Heteronuclear Single-Quantum Coherence Spectroscopy	Phổ tương tác dị hạt nhân qua 1 liên kết
IC_{50}	Inhibitory concentration at 50%	Nồng độ ức chế 50% đối tượng thử nghiệm
KLPT	Molecular mass	Khối lượng phân tử
NOESY	Nuclear Overhauser Enhancement Spectroscopy	Phổ NOESY
TLC	Thin layer chromatography	Sắc ký lớp mỏng
TMS	Tetramethylsilane	$(\text{CH}_3)_4\text{Si}$

DANH MỤC BẢNG

<u>Bảng 3.1. Số liệu phổ NMR của CP1</u>	25
<u>Bảng 3.2. Số liệu phổ NMR của CP2</u>	31
<u>Bảng 3.3. Số liệu phổ NMR của CP3</u>	38
<u>Bảng 3.4. Số liệu phổ NMR của CP4</u>	44
<u>Bảng 3.5. Số liệu phổ NMR của CP5 và chất tham khảo</u>	46
<u>Bảng 3.6. Số liệu phổ NMR của CP6 và hợp chất tham khảo</u>	49
<u>Bảng 3.7. Số liệu phổ NMR của CP7 và chất tham khảo</u>	50
<u>Bảng 3.8. Số liệu phổ NMR của CP8 và hợp chất tham khảo</u>	52
<u>Bảng 3.9. Tác dụng ức chế enzyme tác dụng ức chế enzyme α-glucosidase của các hợp chất CP1-CP5</u>	54

DANH MỤC HÌNH

<u>Hình 1.1. Cây Trà hoa vàng <i>Camellia phanii</i> Hakoda & Ninh</u>	8
<u>Hình 2.1. Lá loài <i>Camellia phanni</i> thu tại huyện Tam Đảo, tỉnh Vĩnh Phúc</u>	15
<u>Hình 3.1. Sơ đồ phân lập các hợp chất từ loài <i>C. phanni</i></u>	21
<u>Hình 3.2. Cấu trúc hóa học của hợp chất CP1</u>	22
<u>Hình 3.3. Tương tác COSY, HMBC và NOESY của hợp chất CP1</u>	24
<u>Hình 3.4. Phổ HR-ESI-MS của hợp chất CP1</u>	25
<u>Hình 3.5. Phổ ^1H-NMR của hợp chất CP1</u>	26
<u>Hình 3.6. Phổ ^{13}C-NMR của hợp chất CP1</u>	27
<u>Hình 3.7. Phổ HSQC của hợp chất CP1</u>	27
<u>Hình 3.8. Phổ HMBC của hợp chất CP1</u>	28
<u>Hình 3.9. Phổ COSY của hợp chất CP1</u>	28
<u>Hình 3.10. Phổ NOESY của hợp chất CP1</u>	29
<u>Hình 3.11. Cấu trúc hóa học của hợp chất CP2</u>	29
<u>Hình 3.12. Tương tác COSY, HMBC và NOESY của hợp chất CP2</u>	31
<u>Hình 3.13. Phổ HR-ESI-MS của hợp chất CP2</u>	31
<u>Hình 3.14. Phổ ^1H-NMR của hợp chất CP2</u>	33
<u>Hình 3.15. Phổ ^{13}C-NMR của hợp chất CP2</u>	34
<u>Hình 3.16. Phổ HSQC của hợp chất CP2</u>	34
<u>Hình 3.17. Phổ HMBC của hợp chất CP2</u>	35
<u>Hình 3.18. Phổ COSY của hợp chất CP2</u>	36
<u>Hình 3.19. Phổ NOESY của hợp chất CP2</u>	36
<u>Hình 3.20. Cấu trúc hóa học của hợp chất CP3</u>	36
<u>Hình 3.21. Tương tác COSY, HMBC và NOESY của hợp chất CP3</u>	38
<u>Hình 3.22. Phổ HR-ESI-MS của hợp chất CP3</u>	40
<u>Hình 3.23. Phổ ^1H-NMR của hợp chất CP3</u>	40
<u>Hình 3.24. Phổ ^{13}C-NMR của hợp chất CP3</u>	41
<u>Hình 3.25. Phổ HSQC của hợp chất CP3</u>	41
<u>Hình 3.26. Phổ HMBC của hợp chất CP3</u>	42
<u>Hình 3.27. Phổ COSY của hợp chất CP3</u>	42
<u>Hình 3.28. Phổ NOESY của hợp chất CP3</u>	43
<u>Hình 3.29. Cấu trúc hóa học và tương tác HMBC chính của hợp chất CP4</u>	43
<u>Hình 3.30. Cấu trúc hóa học và tương tác HMBC chính của hợp chất CP5</u>	45
<u>Hình 3.31. Cấu trúc hóa học và tương tác HMBC chính của hợp chất CP6</u>	48
<u>Hình 3.32. Cấu trúc hóa học và tương tác HMBC chính của hợp chất CP7</u>	49
<u>Hình 3.33. Cấu trúc hóa học và tương tác HMBC chính của hợp chất CP8</u>	51
<u>Hình 3.34. Cấu trúc hóa học của các hợp chất phân lập được</u>	54

MỞ ĐẦU

Bệnh tiểu đường nằm trong nhóm các bệnh không lây nhiễm (Non-Communicable diseases-NCDs)-nhóm bệnh mãn tính có tỉ lệ tử vong lớn nhất hiện nay trên toàn thế giới (chiếm hơn 80% tổng số ca tử vong sớm). Theo ước tính, có khoảng 422 triệu người trưởng thành trên toàn cầu sống chung với bệnh tiểu đường vào năm 2014, so với 108 triệu người vào năm 1980. Tỉ lệ số người trưởng thành mắc bệnh tiểu đường đã tăng gần gấp đôi kể từ năm 1980 (tăng từ 4,7% đến 8,5%). Bệnh tiểu đường đã gây ra 1,5 triệu ca tử vong vào năm 2012 và 2,2 triệu người chết do các biến chứng của nó như tim mạch và các bệnh khác. Ở Việt Nam hiện nay có khoảng 5 triệu người mắc bệnh, chiếm 6% dân số và dự báo tăng lên 7-8 triệu người vào năm 2025. Theo số liệu này thì Việt Nam tuy chưa được xếp vào danh sách những quốc gia có tỷ lệ bệnh nhân cao nhưng lại có tốc độ phát triển rất nhanh. Điều đáng lo ngại là tỷ lệ người tiền tiểu đường chiếm tới hơn 10% dân số, nếu không được phát hiện sớm và có biện pháp can thiệp kịp thời thì trong thời gian ngắn sẽ phát triển thành bệnh.

Theo thời gian, bệnh tiểu đường có thể dẫn đến mù, suy thận và tổn thương thần kinh, thúc đẩy quá trình hình thành xơ vữa động mạch, dẫn đến đột quỵ, tim mạch. Các biến chứng mãn tính xảy ra sớm hay muộn, nặng hay nhẹ rất khác biệt ở từng bệnh nhân. Nói chung, nếu kiểm soát tốt đường huyết, chúng ta có thể ngăn ngừa hoặc làm chậm hay nhẹ đi các biến chứng mãn tính của bệnh tiểu đường. Do đó, việc tìm kiếm các hoạt chất điều trị tiểu đường từ thiên nhiên là cần thiết.

Chi Trà (*Camellia*) là một chi thực vật có hoa thuộc họ Chè (*Theaceae*), có nguồn gốc ở khu vực miền đông và miền nam châu Á. Trên thế giới có khoảng 280 loài, ở Việt Nam, hiện đã biết 68 loài trong đó có tới 15 loài đặc hữu của Việt Nam. Một số loài trong chi Trà đang được sử dụng rộng rãi trên thị trường như: trà xanh Thái Nguyên, trà đen, trà ô long (từ lá loài *C. sinensis*), trà hoa vàng (từ loài *C. petelotii*) Các loài trong chi Trà có tiềm năng lớn về các chất có hoạt chất sinh học như: tác dụng hạ đường huyết, hoạt tính gây độc tế bào, hoạt tính chống oxy hóa và hoạt tính kháng viêm, ... Trong số các loài thuộc chi Trà, Trà hoa vàng *C. phanii* là một trong những loài trà hoa vàng đặc hữu của Việt Nam có giá trị kinh tế cao, được dân gian sử dụng nhiều. Tuy nhiên, hiện chưa có công trình nào nghiên cứu về thành phần hóa học và hoạt tính sinh học của loài *C. phanii*. Do vậy, việc điều tra, nghiên cứu, đánh giá về thành phần hóa học và sàng lọc các chất có hoạt tính sinh học tiềm năng từ các loài thực vật trong chi Trà, đặc biệt là những loài đặc hữu của Việt Nam như loài Trà hoa vàng *C. phanii* sẽ có ý nghĩa khoa học và ý nghĩa thực tiễn cao. Nghiên cứu này sẽ góp phần làm rõ giá trị cũng như công dụng các loài này và góp phần tích cực vào

việc khai thác và sử dụng một cách hợp lý nguồn tài nguyên thiên nhiên của đất nước. Vì vậy, chúng tôi đề xuất đề tài “Nghiên cứu thành phần hóa học và hoạt tính ức chế enzyme α -glucosidase và α -amylase của loài *Camellia phanii* ở Việt Nam”.

Nội dung luận văn bao gồm:

- Phân lập các chất từ loài trà hoa vàng đặc hữu (*Camellia phanii*).
- Xác định cấu trúc các thành phần hóa học của loài trà hoa vàng đặc hữu (*Camellia phanii*).
- Xác định tác dụng ức chế enzyme α -glucosidase và α -amylase của một số hợp chất phân lập được.

Những đóng góp của luận văn:

- Phân lập và xác định được cấu trúc của 03 hợp chất mới là camphanoside A-C (**CP1-CP3**), cùng với 5 hợp chất đã biết là chikusetsusaponin IVa (**CP4**), spinasaponin A 28-*O*-glucoside (**CP5**), (-)-epicatechin (**CP6**), (-)-epicatechin 3-*O*-gallate (**CP7**), và (-)- epigallocatechin 3-*O*-gallate (**CP8**) từ phân đoạn chiết nước lá Trà hoa vàng *C. phanii*.
- Đánh giá hoạt tính ức chế enzyme α -glucosidase của 5 hợp chất gồm 3 hợp chất mới camphanoside A-C (**CP1-CP3**), chikusetsusaponin IVa (**CP4**) và spinasaponin A 28-*O*-glucoside (**CP5**). Các hợp chất **CP1-CP3** thể hiện hoạt tính ức chế enzyme α -glucosidase với IC₅₀ lần lượt là 230,7±18,0; 251,4±22,7 và 421,4±25,6 μ M.

Chương 1. TỔNG QUAN NGHIÊN CỨU

1.1. Tổng quan về chi *Camellia*

1.1.1. Giới thiệu chung về chi *Camellia*

Chi Trà (*Camellia*) là một chi thực vật có hoa trong họ *Theaceae* phân bố chủ yếu ở vùng nhiệt đới và cận nhiệt đới, đặc biệt là ở Châu Á. Trên thế giới có khoảng 280 loài thuộc chi *Camellia*, ở Việt Nam, hiện đã biết 68 loài trong đó có tới 15 loài đặc hữu của Việt Nam [1]. Các loài trong chi trà là các cây bụi hay cây thân gỗ nhỏ và thường xanh, cao khoảng 2-20 m. Lá sắp xếp theo kiểu so le, lá đơn, dày, mép lá có khía, dài 3-17 cm. Hoa lớn và dễ thấy, đường kính 1-12 cm, với 5-9 cánh hoa; có màu từ trắng tới hồng hay đỏ, còn màu vàng có ở một số loài. Quả là loại quả nang khô được chia thành 1-5 ngăn, mỗi ngăn chứa 1-8 hạt [2].

1.1.2. Các nghiên cứu về thành phần hóa học và hoạt tính sinh học của chi *Camellia*

1.1.2.1. Tình hình nghiên cứu ở Việt Nam

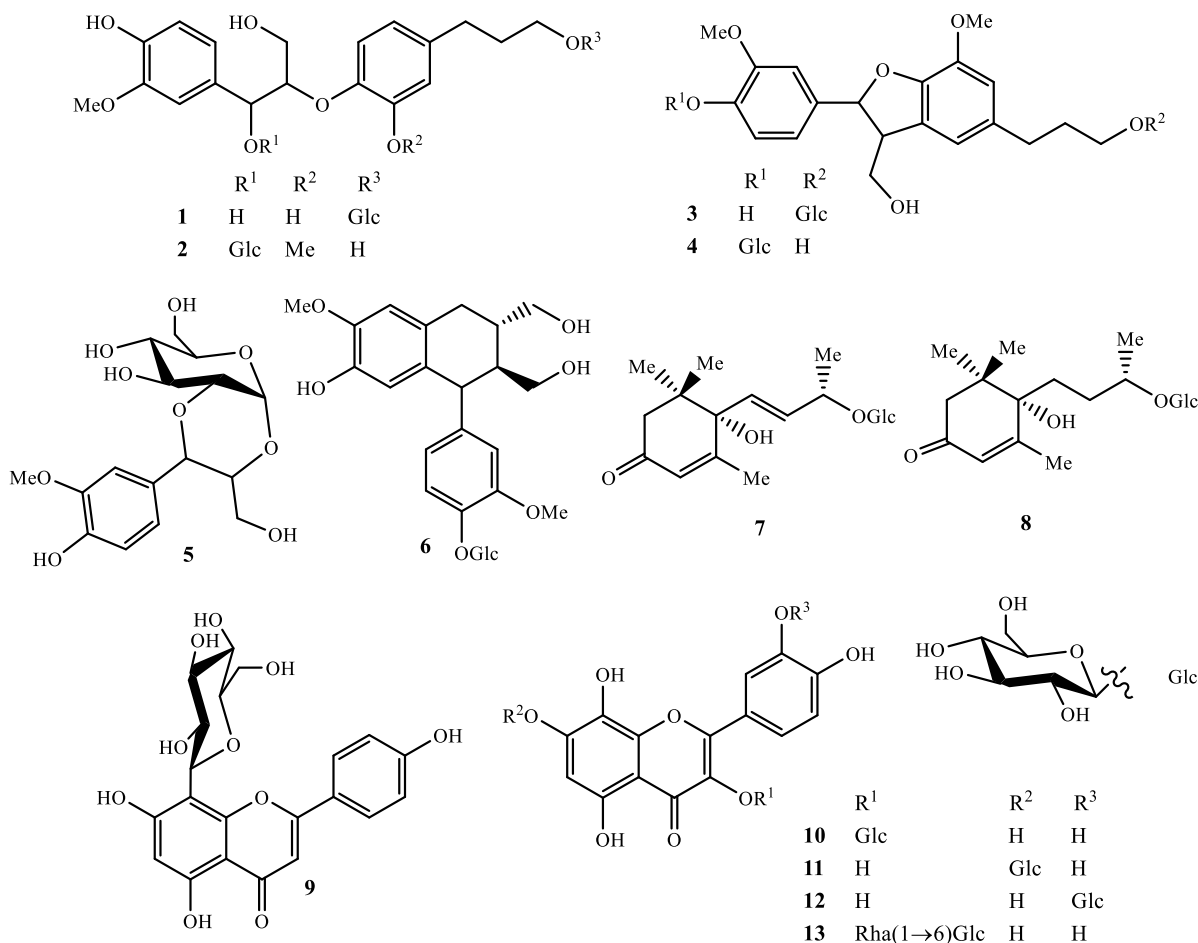
Các nghiên cứu thành phần hóa học đã chỉ ra thành phần chính của chi *Camellia* là các hợp chất flavonoid, polyphenol, triterpene và alkaloid. Các hợp chất phân lập được cũng như các căn chiết của chi này cũng được đánh giá một số hoạt tính sinh học như: hạ đường huyết, gây độc tế bào, kháng viêm và chống oxy hóa...

Năm 2006, Hà Thị Thanh Bình đã tiến hành nghiên cứu hoạt tính sinh học của các hợp chất polyphenol trong lá *C. sinensis* được thu tại Thái Nguyên và Hà Tây [3]. Kết quả nghiên cứu cho biết một số đặc điểm hóa học và tác dụng sinh học của các hợp chất flavonoid trong lá cây trà ở miền Bắc Việt Nam. Từ đó, nghiên cứu đã đề xuất được phương pháp mới trong việc khai thác flavonoid, xác định khả năng ứng dụng các hợp chất polyphenol này trong lĩnh vực y dược.

Sau đó, năm 2010, Hà Thị Thanh Bình và các cộng sự đã nghiên cứu sử dụng các hợp chất polyphenol trong một số giống trà ở Việt Nam [4]. Kết quả nghiên cứu đã cho biết hàm lượng polyphenol, tannin, flavonoid của các mẫu trà nghiên cứu đều chiếm một tỉ lệ cao. Tất cả các giống trà nghiên cứu đều có hoạt tính chống oxy hóa rất tốt, trong đó lá trà Bát Tiên và trà lai thể hiện hoạt tính tốt nhất với giá trị IC_{50} lần lượt là 17,29 và 19,76 $\mu\text{g/ml}$.

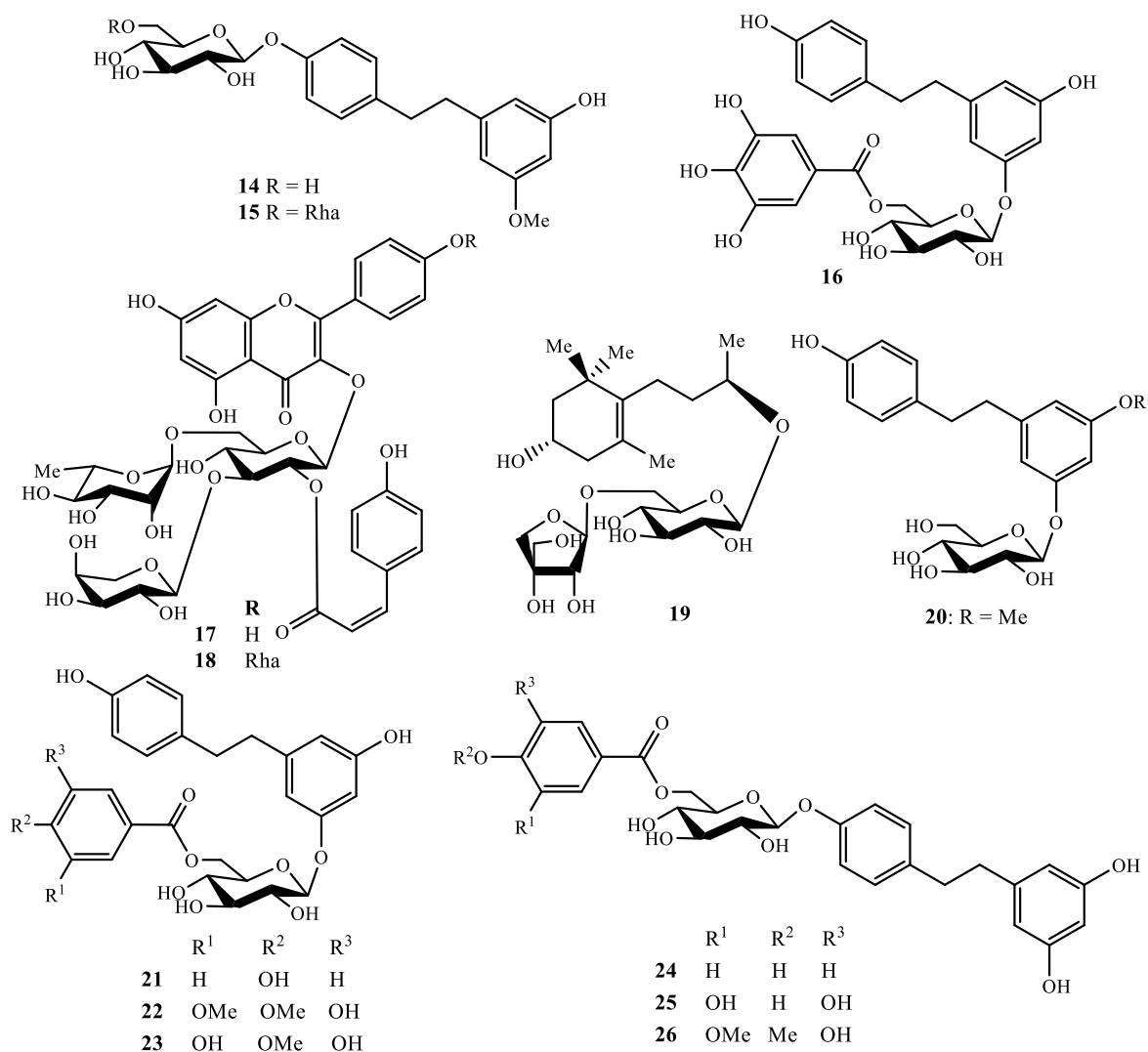
Theo nghiên cứu của Nguyễn Hữu Tùng và cộng sự, từ loài *C. amplexicaulis* đã phân lập được sáu hợp chất lignan gồm camellioside A (1), 7S,8S-4,9,9'-trihydroxy-3,3'-dimethoxy-8-O-4'-neolignan-7-O- β -D-glucopyranoside (2), 7R,8R-dihydrodehidroiconiferyl alcohol-9'-O- β -D-glucopyranoside (3),

urolignoside (4), junipetrioloxide A (5) và isolarciresinol (6), và hai hợp chất megastigman: corchoionoside C (7) và blumeon C glycoside (8) [5].



Theo nghiên cứu của Nguyễn Thị Hồng Vân và cộng sự, từ loài *C. chrysanth* đã phân lập được năm hợp chất flavonoid là vitexin (9), quercetin-3-*O*- β -D-glucopyranoside (10), quercetin-7-*O*- β -D-glucopyranoside (11), quercetin-3'-*O*- β -D-glucopyranoside (12) và quercetin-3-*O*-rutinose (13) [6].

Nguyễn Thị Cúc và cộng sự đã tiến hành nghiên cứu thành phần hóa học từ các loài *C. sasanqua* [7,8], *C. assamica* [9,10], và *C. sinensis* [11,12] (Đề tài NAFOSTED 2019-2022) và đề tài của Học Viện Khoa học và Công nghệ, đã phân lập được 13 hợp chất mới là sasastilboside A (14), sasastilboside B (15), sasastilboside C (16), cameflavoside A-B (17-18), (3*S*,9*R*)-3,9-dihydroxymegastigman-5-ene 9-*O*- β -D-apiofuranosyl-(1→6)- β -D-glucopyranoside (19), assastilboside A-D (20-23) và assamoside A-C (24-26) và 40 hợp chất đã biết. Hoạt tính sinh học của các hợp chất cũng như các dịch chiết từ các loài trà này cũng đã được nghiên cứu như hoạt tính hạ đường huyết, gây độc tế bào, kháng viêm, và chống oxy hóa.



Ở Việt Nam cũng như trên thế giới, loài trà hoa vàng đặc hữu của Việt Nam là loài trà hoa vàng *Phanii* (*Camellia phanii* Hakoda & N.Tran) chưa có bất kỳ nghiên cứu nào về thành phần hóa học và hoạt tính sinh học.

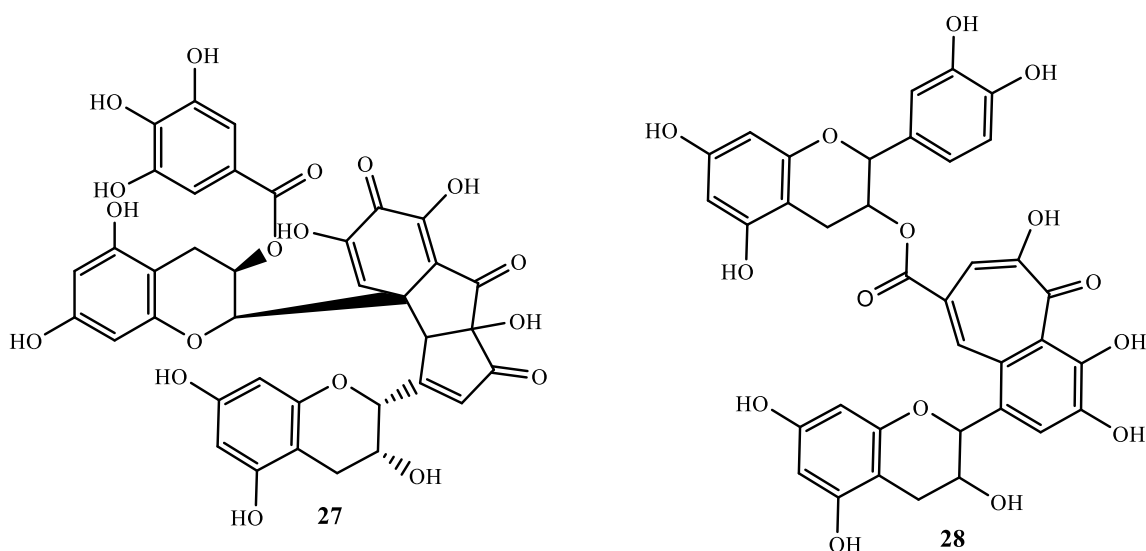
1.1.2.2. Tình hình nghiên cứu trên thế giới

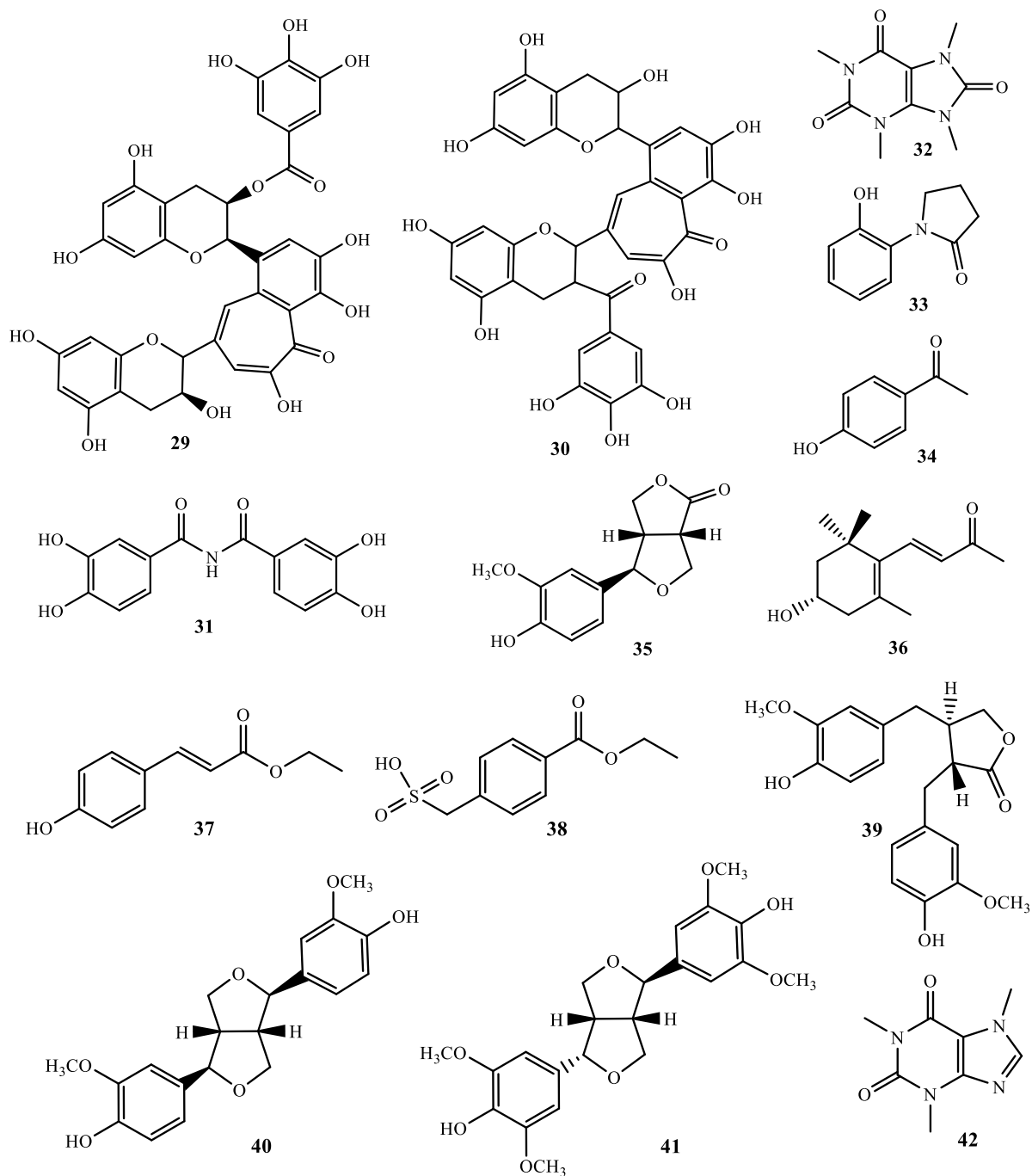
Các nghiên cứu về thành phần hóa học và hoạt tính sinh học của các nhà khoa học trên thế giới được bắt đầu vào những năm 1967. Sho Ito và cộng sự đã nghiên cứu về thành phần hóa học của loài *C. sinensis* [13]. Sau đó, Adrienne L. Davis và cộng sự đã phân lập và xác định cấu trúc một hợp chất polyphenolic, theacitrin A (27) từ trà đen (được lên men từ lá *C. sinensis*) trong năm 1997 [14]. Trong năm 1998, John R. Lewis và cộng sự đã phân lập được ba hợp chất polyphenolic mới, theaflavate B (28), isotheaflavin-3'-O-gallate (29) và neotheaflavin-3-O-gallate (30) từ trà đen [15].

Trong năm 2002, Richard A. Anderson và các cộng sự đã nghiên cứu khả năng tăng nồng độ insulin của trà và các chế phẩm của nó. Kết quả nghiên cứu *in vitro* cho thấy, trà đã làm tăng nồng độ insulin trên 15 lần. Các loại trà đen, trà xanh và

trà oolong (được lên men từ lá của *C. sinensis*) cũng chỉ ra khả năng làm tăng nồng độ insulin. Các hợp chất epigallocatechin gallate, epicatechin gallate, tannin và theaflavin được tìm thấy trong trà cũng chỉ ra khả năng làm tăng nồng độ insulin [16]. Liang Zhang và các cộng sự đã phân lập được một hợp chất amide, *N*-(3,4-dihydroxybenzoyl)-3,4-dihydroxybenzamide 31 từ lá *C. assamica*. Hợp chất 31 được đánh giá khả năng bảo vệ tế bào màng vi mạch bị thương do H_2O_2 gây ra. Kết quả cho thấy, hợp chất 31 có khả năng ngăn ngừa sự chết tế bào màng vi mạch bị thương do H_2O_2 gây ra [17].

Trong năm 2013, Wei-Xi Li và các cộng sự đã phân lập được theacrine (32) từ loài *C. assamica*. Hợp chất này được đánh giá khả năng bảo vệ gan bị tổn thương gây ra do sự căng thẳng ở chuột. Kết quả nghiên cứu cho thấy, khả năng bảo vệ gan bị tổn thương gây ra do sự căng thẳng ở chuột của hợp chất 32 có liên quan đến hoạt tính chống oxy hóa của nó. Hoạt tính chống oxy hóa của hợp chất 32 được đánh giá bằng phương pháp ORAC. Kết quả nghiên cứu cho thấy, hoạt tính chống oxy hóa của hợp chất 32 thể hiện hoạt tính tốt [18]. Trong nghiên cứu của Qian Liu và cộng sự, từ loài *C. sinensis* đã phân lập được 10 hợp chất, *N*-(2-hydroxyphenyl)-2-pyrrolidinone (33), *p*-hydroxyacetophenone (34), salicifoliol (35), (–)-3-hydroxy- β -ionone (36), *p*-hydroxy ethyl cinnamate (37), ethyl 4-(sulfooxy)benzoate (38), (+)-matairesinol (39), (–)-pinioresinol (40), (+)-lirioresinol A (41), and caffeine (42) [19].





Jungbae Oh và cộng sự đánh giá khả năng ức chế α -glucosidase của dịch chiết nước trà (TWE) và dịch chiết bã trà (TPE) của túi trà xanh, trà oolong và trà đen. Kết quả nghiên cứu cho thấy, TWE và TPE của trà xanh thể hiện khả năng ức chế α -glucosidase tốt nhất với giá trị IC_{50} là 2.04 và 1.95 mg/mL. Trong số các enzyme được thử nghiệm, TWE và TPE của trà xanh thể hiện khả năng ức chế sucrose tốt hơn maltase và glucoamylase với giá trị IC_{50} là 0.16 mg/mL và 0.13 mg/mL. Trong nghiên cứu trên động vật, nồng độ glucose trong máu của động vật sau khi ăn TWE và TPE của trà xanh và trà đen (liều lượng 0.5 g/kg thể trọng) giảm hơn so với đối chứng chuột được bổ sung sucrose [20].

Theo tổng quan cho thấy việc điều tra, nghiên cứu, đánh giá về thành phần hóa học và sàng lọc các chất có hoạt tính sinh học tiềm năng từ các loài thực vật trong chi Trà, đặc biệt là những loài đặc hữu của Việt Nam như loài *C. phanii* sẽ có ý nghĩa khoa học và ý nghĩa thực tiễn cao.

1.2. Tổng quan về loài Trà hoa vàng *Camellia phanii* Hakoda & Ninh

1.2.1. Đặc điểm thực vật của loài Trà hoa vàng *Camellia phanii* Hakoda & Ninh [1]

Cây gỗ nhỏ, cao 4-5 m; cành non không lông. Lá hình bầu dục, bầu dục thuôn hoặc trứng-thuôn, dài 14,5-16(20) cm, rộng 6,8-7,7(10) cm, không lông; gốc lá hình nêm hoặc nêm rộng; chóp lá nhọn; mép lá có răng cưa; gân bên 8-10 cặp; cuống lá dài 1-2 cm, không lông. Hoa 1-2 ở đầu cành hoặc nách lá, vàng đậm, đường kính 4-6 cm; cuống hoa dài 1-1,5 cm. Lá bắc 5-6, hình móng, dài 0,1-0,4 cm, rộng 0,2-0,6 cm. Lá đài 5, hình vẩy đến gần tròn, dài 0,7-0,9 cm, rộng 1-1,1 cm, có lông. Cánh hoa 14-19, hình trứng rộng, dài 2-3,5 cm, rộng 1,5-2 cm, có lông. Bộ nhị dài 2-2,5 cm, có lông, chỉ nhị vòng ngoài hợp 1,8-2 cm tạo thành ống chỉ nhị. Bộ nhụy gồm 3 lá noãn hợp thành bầu trên 3 ô, không lông; vòi nhụy 3. Rìi, dài 2,2-2,5 cm, không lông. Quả hình cầu hơi dẹp, đường kính 5,5-6 cm, dài 3,5-4,5 cm, 3 ô, 1-4 hạt trong mỗi ô; vỏ quả dày 0,4-0,5 cm. Hạt dài 1-1,8 cm, có lông.

Sinh học và sinh thái: Cây ra hoa tháng 12-1 (năm sau), có quả tháng 1-4. Cây mọc ven suối, trong rừng thường xanh, ở độ cao 60-200 m.

Phân bố: Vườn quốc gia Tam Đảo, Vĩnh Phúc và Thái Nguyên (Đại Từ). Mới chỉ ghi nhận ở Việt Nam.



Hình 1.1. Cây Trà hoa vàng *Camellia phanii* Hakoda & Ninh

1.2.2. Công dụng của Trà hoa vàng *C. phanii* trong dân gian

Trong số các loài thuộc chi trà, loài trà hoa vàng Phanii (*Camellia phanii* Hakoda & N.Tran) là loài trà hoa vàng đặc hữu của Việt Nam có giá trị kinh tế cao,

được dân gian sử dụng nhiều. Loài trà này phân bố chủ yếu ở Vườn Quốc gia Tam Đảo, Vĩnh Phúc và Đại Từ, Thái Nguyên. Theo đông y, dược liệu này có tính bình, vị ngọt và mùi thơm. Loài trà này có nhiều công dụng khác nhau, chủ yếu là:

- Hỗ trợ giảm đường huyết ở người tiểu đường, giúp ổn định đường huyết và làm giảm các biến chứng.
- Giảm tổng hàm lượng lipid trong huyết thanh, giảm lượng cholesterol xấu và tăng lượng cholesterol tốt. Nước lá trà có tác dụng hạ huyết áp rõ ràng và tác dụng được duy trì trong thời gian dài.
- Nước lá trà có tác dụng chống sự hình thành huyết khối gây tắc nghẽn mạch máu. Phòng ngừa ung thư và ức chế sự phát triển của các khối u khác. Hưng phấn thần kinh, lợi tiểu.
- Giải độc gan và thận, ngăn ngừa xơ vữa động mạch máu. Ức chế và diệt khuẩn. Ngoài ra, lá trà còn có tác dụng chống viêm, chống dị ứng và duy trì trạng thái bình thường của tuyến giáp.
- Giảm tới 36,1 % lượng lipoprotein trong máu, cao hơn 10 % so với các liệu pháp chữa trị bằng thuốc Tây y khác. Có hiệu quả trong việc chữa trị xơ cứng động mạch do lượng mỡ trong máu cao [21].

1.3. Tổng quan về tiểu đường

1.3.1. Giới thiệu về tiểu đường

Tiểu đường là một nhóm bệnh rối loạn chuyển hóa cacbohydrat, mỡ và protein khi hormone insulin của tuyến tụy bị thiếu hay giảm tác động trong cơ thể, biểu hiện bằng mức đường trong máu luôn cao. Bệnh tiểu đường được chia làm hai loại chính sau:

- Tiểu đường tuýp 1 (còn gọi là tiểu đường phụ thuộc insulin): cơ thể ngừng sản xuất insulin. Thường gặp ở trẻ em hoặc thiếu niên. Những bệnh nhân bị tiểu đường tuýp 1 cần phải được điều trị bằng insulin mỗi ngày để duy trì cuộc sống.

- Tiểu đường tuýp 2: là một chứng bệnh mạn tính phát triển khi tuyến tụy không sản xuất đủ insulin hoặc khi các mô trong cơ thể không thể sử dụng insulin một cách bình thường. Tiểu đường tuýp 2 rất phổ biến (chiếm trên 90% số trường hợp mắc bệnh), thường gặp ở người trên 40 tuổi trong đó người bị bệnh tiểu đường thường dễ bị một số bệnh đi kèm như tăng huyết áp, đau thắt ngực, nhồi máu cơ tim, đục thủy tinh thể... và thường có tuổi thọ ngắn hơn những người khác.

- Tiểu đường thai kỳ: đây là một tình trạng rối loạn dung nạp glucose trong quá trình mang thai. Bệnh này làm tăng đường huyết trong thai nhi dẫn đến nguy cơ gây sảy thai, thai lưu, dị tật...

Bệnh tiểu đường thường gây ra những biến chứng nguy hiểm. Những biến chứng cấp tính của bệnh này có thể là hôn mê do tăng đường huyết, hạ đường huyết và tăng

keto-acid máu. Các biến chứng lâu dài do bệnh tiểu đường gây ra gồm có các tổn thương thần kinh, tim mạch, thị giác, nguy cơ nhiễm trùng. Nguyên nhân là do lượng đường trong máu quá cao lâu ngày gây thương tổn các mạch máu nhỏ với hậu quả là mù mắt, suy thận, đồng thời thúc đẩy xơ mỡ động mạch (atherosclerosis) làm hẹp các động mạch lớn gây tai biến mạch máu não, nhồi máu cơ tim... Ngoài ra, bệnh tiểu đường còn có ảnh hưởng xấu lên dây thần kinh, cơ tim, da, chân và răng lợi. Các biến chứng mãn tính xảy ra sớm hay muộn, nặng hay nhẹ rất khác biệt ở từng bệnh nhân.

1.3.2. Các thuốc điều trị bệnh tiểu đường

Để kiểm soát được đường huyết của các bệnh nhân mắc bệnh tiểu đường thường kết hợp chế độ ăn phù hợp với dùng thuốc. Thuốc cho bệnh nhân tiểu đường có 2 loại cơ bản là thuốc dùng đường tiêm và thuốc viên uống.

1.3.2.1. Các thuốc điều trị tiểu đường dùng tiêm

- Insulin: Insulin là nội tiết tố của tuyến tụy do tế bào β của tiểu đảo Langerhans tiết ra. Insulin có tác dụng điều hoà đường huyết bằng cách đưa glucose qua màng tế bào vào chu trình Krebs. Sự tăng glucose trong máu có thể do thiếu insulin hay do insulin không thể hấp thụ vào các mô. Sự mất cân bằng này dẫn đến bất thường trong chuyển hoá glucid, lipid và protid. Insulin gắn vào receptor đặc hiệu trên màng tế bào, quá trình này sẽ hoạt hoá tyrosin kinase đặc hiệu của receptor ở trong tế bào và kinase này lại hoạt hoá protein kinase khác, bằng phản ứng phosphoryl hoá. Cuối cùng những enzym này có thể phosphoryl hoá nhiều enzym quan trọng khác như glucokinase, glycogen synthetase....

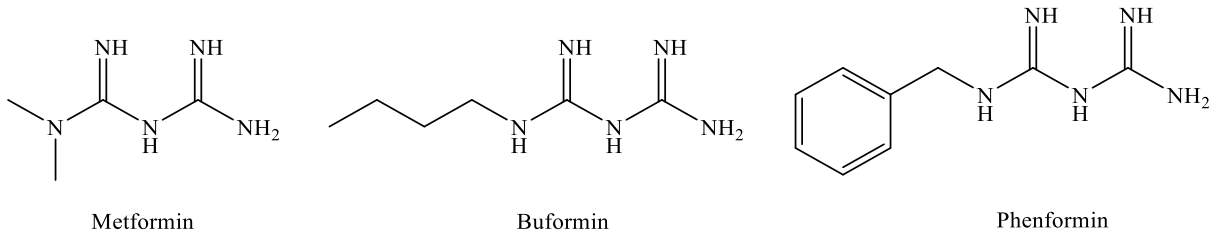
- Amylin: Amylin là một hormon được bài tiết từ tế bào β của tụy cùng với insulin đóng vai trò hết sức quan trọng trong cơ chế điều hoà đường huyết. Trong tế bào β , insulin và amylin cùng được chứa trong mép nang tiết và cùng được bài tiết khi tăng đường huyết. Amylin có tác dụng ức chế bài tiết glucagon sau ăn và làm chậm tiêu hoá thức ăn ở dạ dày, chậm hấp thu đường ở ruột vì vậy làm cho đường huyết tăng chậm. Trong khi đó insulin có tác dụng tăng dự trữ glucose ở mỡ, cơ, xương và giảm sản xuất glucose ở gan, giảm tiết glucagon. Cả hai hormon này hoạt động tương trợ nhau giúp kiểm soát đường huyết tốt hơn.

1.3.2.2. Các thuốc điều trị tiểu đường dùng đường uống

Nhiều thuốc có tác dụng hạ đường huyết được đưa vào cơ thể bằng đường uống. Theo cấu trúc và cơ chế tác dụng các chất này được chia thành 5 nhóm sau:

- Các thuốc nhóm dẫn xuất biguanide:

Chất đầu tiên thuộc biguanide tìm thấy có tác dụng hạ đường huyết là Metformin vào năm 1948. Dẫn xuất biguanid có công thức chung như sau:



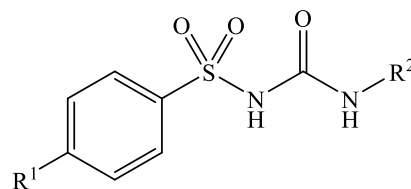
Trong nhóm biguanide gồm có: metformin, buformin, phenformin. Vì nguy cơ gây nhiễm acid lactic nên buformin, phenformin ngày nay ít được sử dụng. Cơ chế tác dụng của các thuốc nhóm này như sau:

- + Làm tăng tác dụng của insulin tại thụ thể và hậu thụ thể
- + Tăng sử dụng glucose ở tổ chức ngoại vi, đặc biệt ở tế bào cơ
- + Giảm sinh glucose ở gan
- + Giảm hấp thu glucose ở ruột
- + Tăng sự nhạy cảm của insulin ở thụ thể và hậu thụ thể

Chúng không có tác dụng kích thích bài tiết insulin ở tụy như các sulfamide chống tiểu đường.

- Các thuốc nhóm dẫn xuất sulfamide:

Khái niệm sulfamide chống tiểu đường xuất hiện từ năm 1942, sau khi Laubatiere thử nghiệm một loại sulfamide kháng khuẩn trên bệnh nhân thương hàn thấy có dấu hiệu hạ đường huyết. Nhưng mãi tới năm 1995 người ta mới thực sự tìm ra những chất có tác dụng điều trị thuộc nhóm dẫn xuất benzen sulfonylurea với các gốc ankyl có công thức chung là:

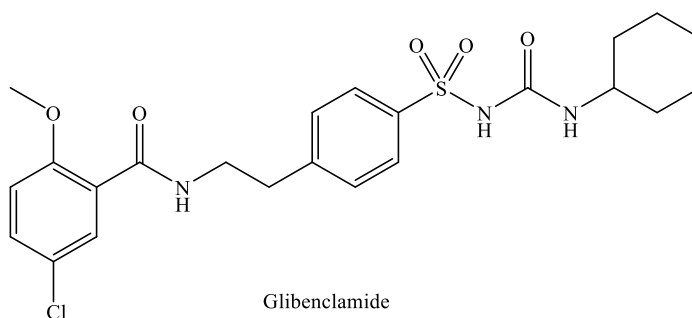
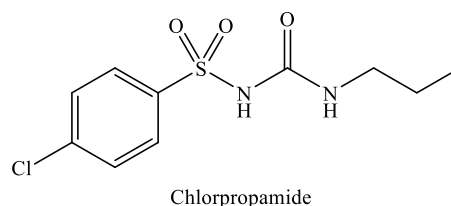
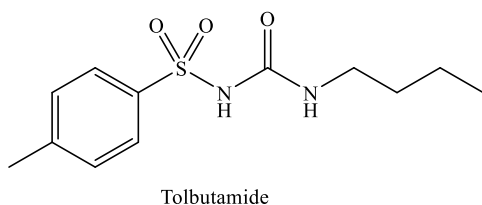


Chất đầu tiên được đưa vào điều trị là Carbutamide ($R^1 = -NH_2$, $R^2 = n-C_4H_9$) được dùng điều trị bệnh tiểu đường dưới dạng thuốc uống vào năm 1955. Sau nhiều năm nghiên cứu người ta thấy rằng không nhất thiết phải có nhóm $-NH_2$ gắn với nhân thơm và khi thay nhóm $-NH_2$ bằng nhóm $-CH_3$, $-Cl$ hay một nhóm thế khác thì vẫn có tác dụng tốt và độc tính giảm đi. Cơ chế tác dụng là kích thích bài tiết insulin. Trong trạng thái sinh lý, đường huyết tăng cao sẽ có hiện tượng khoá kênh $K^+ -ATP$, dẫn tới K^+ trong tế bào tăng đột ngột sẽ kích thích hoạt động của kênh Ca^{++} dưới tác

động của AMP vòng, Ca^{++} vào tế bào tăng. Kích thích quá trình phosphoryl hoá và giải phóng insulin từ nang tiết vào máu. sulfamide có tác dụng như một cái khoá hoạt động trên kênh K^{+} -ATP và vì vậy có tác dụng kích thích bài tiết insulin.

Cho đến nay có rất nhiều sulfamide hạ đường huyết đã được khám phá và đưa vào điều trị. Dựa vào thời gian duy trì tác dụng (nhẹ hoặc kéo dài) và liều dùng mà người ta chia sulfamide hạ đường huyết thành hai thể hệ, thể hệ một và thể hệ hai.

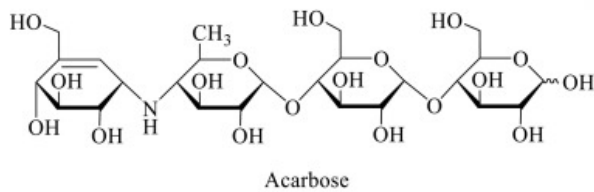
- **Các sulfamide hạ đường huyết thể hệ một:** gồm có carbutamide, tolbutamide, phenbutamide, metabutamide, chlorpropamide, tolcyclamide, acetohexamide, metahexamide, tolazamide.
- **Các sulfamide hạ đường huyết thể hệ hai** cũng là các dẫn xuất của sulfonylurea có công thức tổng quát giống như sulfamide hạ đường huyết thể hệ thứ nhất nhưng được tìm ra trong thập kỷ 70 và đầu thập kỷ 80, nó bao gồm các phân tử có cấu trúc nhóm thế phức tạp hơn, có mạch cacbon dài hơn, có hiệu lực tác dụng mạnh hơn và tác dụng kéo dài hơn nên thường mỗi ngày chỉ phải uống một lần. Các sulfamide hạ đường huyết thể hệ hai gồm có glypnamide, gliclazide, glibonuride, glibenclamide, glipizide, gliCAxepide, gliquidon, glimepiride.



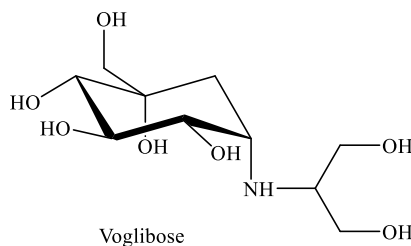
Trong số các sulfamide hạ đường huyết liệt kê ở trên thì tolbutamide, chlorpropamide và glibenclamide hiện đang được sử dụng phổ biến nhất trong điều trị bệnh tiểu đường tuýp 2 ở nước ta.

- **Các thuốc nhóm ức chế enzyme α -glucosidase:** các thuốc loại này có tác dụng ngăn không cho hấp thu glucose vào máu. Vì thế có ưu điểm là không có nguy cơ gây hạ đường máu, không gây tăng cân (như: insulin và các sulfamid hạ đường huyết khác). Ngày nay trên thị trường xuất hiện một số thuốc ức chế enzyme α -glucosidase có tác dụng gây hạ đường huyết sau đây:

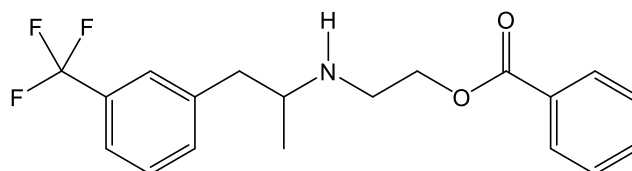
+ **Acarbose:** Acarbose hoạt động theo cơ chế ức chế cạnh tranh sự phân giải đường phức. Acarbose là một phân tử được tổng hợp từ Actiplanes (vi khuẩn) bằng kỹ thuật sinh học. Hoạt động của nó làm chậm tiêu hóa đường bằng cách ức chế cạnh tranh enzyme α -glucosidase ruột và các yếu tố enzyme ở ruột non có nhiệm vụ tách các đường phức thành các đường đơn. Kết quả là kéo dài thời gian thủy phân các đường đôi dẫn đến việc tiêu hóa các đường này bị chậm lại. Thuốc có tác dụng ức chế enzyme α -glucosidase ở rìa bàn chải niêm mạc ruột non. Ngoài ra còn ức chế các enzym thủy phân đường đa ở ruột, do vậy làm giảm hấp thu glucose.



+ **Voglibose (Basen):** Voglibose là một chất ức chế α -glucosidase được sử dụng để làm giảm mức đường huyết sau ăn ở những người bị tiểu đường. Voglibose làm chậm sự hấp thu glucose do đó làm giảm nguy cơ biến chứng mạch máu vĩ mô.

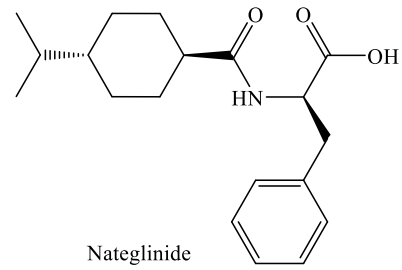
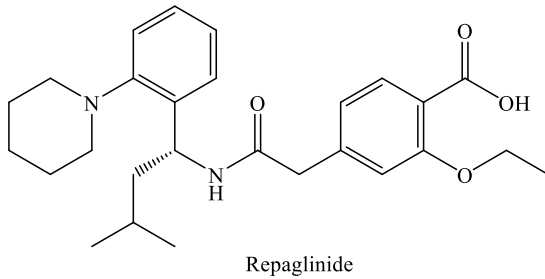


- **Benfluorex:** Benfluorex có tác dụng tạo thuận lợi cho sự xâm nhập và sử dụng glucose ở tế bào, không có tác dụng trên sự bài tiết insulin, ngoài ra còn có tác dụng giảm lipid máu. Thuốc dùng để hỗ trợ cho chế độ ăn kiêng trong bệnh tiểu đường.



- **Các thuốc nhóm meglitinide:** Các thuốc nhóm meglitinide liên kết với kênh K^+ (KATP) phụ thuộc ATP trên màng tế bào của các tế bào beta tuyến tụy theo cách tương tự như sulfoamide nhưng có ái lực liên kết yếu hơn và phân ly nhanh hơn từ vị trí gắn SUR1. Điều này làm tăng nồng độ kali nội bào. Sự khử cực này mở các kênh Ca^{2+} có điện áp. Sự gia tăng canxi nội bào dẫn đến tăng phản ứng tổng hợp insulin

trong màng tế bào, và do đó tăng tiết insulin. Hiện nhóm này có 2 hoạt chất chính là repaglinide (Prandin) và nateglinide (Starlix).



- **Các thuốc nhóm thiazolidinedione (TZD hay glitazone):** Các thuốc nhóm TZD có tác dụng làm tăng nhạy cảm của insulin tại các mô trong cơ thể và giảm rối loạn mỡ máu tương tự như nhóm Biguanide. Nhưng thuốc lại làm tăng tích trữ mỡ dưới da nên thường gây tăng cân cho người bệnh. Mặt khác còn gây giữ nước, do đó cần thận trọng khi sử dụng điều trị cho những người bệnh tim mạch hay viêm gan, men gan tăng cao. Thuốc đang được dùng là rosiglitazone và pioglitazone, nhóm này trước đây có troglitazone nhưng nay đã bị cấm vì tác hại gây độc với gan, dẫn tới suy gan và tử vong.

Chương 2. ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Đối tượng nghiên cứu

Mẫu lá loài Trà hoa vàng *Camellia phanii* Hakoda & Ninh được thu ở huyện Tam Đảo, tỉnh Vĩnh Phúc vào tháng 8 năm 2023. Mẫu đã được TS. Nguyễn Thế Cường, Viện Sinh thái và Tài nguyên sinh vật - Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam định tên. Mẫu tiêu bản (TTT2308) được lưu giữ tại Viện Hóa sinh biển, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam.



Hình 2.1. Lá loài *Camellia phanii* thu tại huyện Tam Đảo, tỉnh Vĩnh Phúc

2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Phương pháp phân lập các hợp chất

- *Sắc ký lớp mỏng (TLC)*: được thực hiện trên bản mỏng trắng sẵn DC - Alufolien 60 F₂₅₄ (Merck 1,05715), RP - 18 F_{254S} (Merck). Chất được phát hiện bằng đèn tử ngoại tại hai bước sóng 365 nm và 254 nm và dùng thuốc thử hiện màu là dung dịch H₂SO₄ loãng (10%) được bôi đều lên bản mỏng, sấy khô rồi đốt nóng đến khi màu chất hiện lên.

- *Sắc ký cột (C.C.)*: sử dụng chất hấp phụ là nhựa trao đổi ion Diaion HP - 20 (Mitsubishi Chem. Ind. Co., Ltd.), hạt silica gel kích cỡ là 0.040 - 0.063 mm (240-430 mesh) và hạt pha ngược RP - 18 (150 µm, Fuji Silysia Chemical Ltd.).

- *Sắc ký lỏng hiệu năng cao (HPLC)*: được thực hiện với cột sắc ký HPLC pha ngược (RP-HPLC), pha tĩnh không phân cực, trong khi pha động là chất lỏng phân cực. Cột điều chế được làm bằng thép không gỉ độ dài 250 mm với đường kính 20 mm. Đầu dò UV (detector) nằm ở cuối cột có tác dụng phát hiện chất điều chế. Tín hiệu đầu dò được ghi lại qua phần mềm lưu trữ và xử lý dữ liệu, sau đó hứng phân đoạn thu được chất điều chế.

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

- *Phổ khối phân giải cao HR-ESI-MS*: được đo trên máy AGILENT 6530 Accurate Mass QTOF LC/MS của Viện Hóa sinh biển.

- *Phổ cộng hưởng từ hạt nhân NMR*: được đo trên máy Bruker AM600 FT - NMR và Bruker AM500 FT - NMR của Viện Hoá học. Chất nội chuẩn là TMS. Các kỹ thuật phổ cộng hưởng từ hạt nhân được sử dụng bao gồm: Phổ cộng hưởng từ hạt nhân một chiều: ^1H -NMR và ^{13}C -NMR. Phổ cộng hưởng từ hạt nhân hai chiều: HSQC, HMBC, NOSEY và COSY.

- *Độ quay cực $[\alpha]_D$* : được đo trên máy JASCO P - 2000 Polarimeter tại Viện Hóa sinh biển, VAST.

2.2.3. Phương pháp thử tác dụng ức chế hoạt động của enzyme α -glucosidase [22]

Hoạt tính ức chế α -glucosidase được thực hiện dựa vào phản ứng thủy phân *p*-nitrophenyl- α -D-glucopyranoside (pNPG) thành đường glucose và *p*-nitrophenol, hợp chất có màu vàng, dưới xúc tác của enzyme α -glucosidase. Khi mẫu thử có hoạt tính ức chế enzyme α -glucosidase, sự tạo thành hợp chất *p*-nitrophenol sẽ giảm, do vậy mật độ quang (OD) của *p*-nitrophenol so với mẫu đối chứng, không bị ức chế sẽ giảm theo. Mật độ quang (OD) của *p*-nitrophenol sinh ra sau phản ứng được đo ở bước sóng 405 nm và được dùng để đánh giá hoạt động ức chế enzyme của mẫu thử.

Cách tiến hành:

- Sử dụng phiên 96-giếng

- Trong mỗi giếng chứa mẫu nghiên cứu (50 μL) đã ủ với enzyme α -glucosidase (100 μL) trong 10 phút ở 25°C sau đó bổ sung *p*-nitrophenyl- α -D-glucopyranoside (50 μL), ủ trong 5 phút ở 25°C. Đo OD ở bước sóng 405 nm.

- Chất đối chứng dương: Acarbose

- Kết quả được tính theo công thức sau:

$$\% \text{ Ức chế} = \frac{(\text{OD}_{c+} - \text{OD}_{c-}) - (\text{OD}_s - \text{OD}_b)}{\text{OD}_{c+} - \text{OD}_{c-}} \times 100$$

Trong đó:

OD_{c+}: Mật độ quang trung bình của mẫu chứng dương (không có mẫu thử, có α -glucosidase; trường hợp này coi như giá trị ức chế 0%);

OD_{c-}: Mật độ quang trung bình của mẫu chứng âm (không có mẫu thử và α -glucosidase; trường hợp này coi như giá trị ức chế 100%);

OD_s: Mật độ quang trung bình của mẫu thử;

OD_b: Mật độ quang trung bình mẫu trắng (có mẫu thử, không có α -glucosidase).

Nồng độ ức chế 50%, IC₅₀ được xây dựng trên 5 nồng độ thử nghiệm.

Giá trị IC_{50} được xác định theo phương pháp hồi quy tuyến tính trên phần mềm Graphpad Prism 5.0.

2.2.4. Phương pháp thử tác dụng ức chế hoạt động của enzyme α -amylase [23]

Hoạt tính ức chế α -amylase được thực hiện dựa vào phản ứng tạo màu của tinh bột xanh (Starch Azure) với nước. Dung dịch hòa tan vào tinh bột xanh dưới xúc tác của enzyme α -amylase tạo ra một hỗn hợp phản ứng màu xanh, đo độ giảm màu ở bước sóng 595 nm để đánh giá hoạt tính ức chế enzyme của mẫu nghiên cứu.

Cách tiến hành:

Dung dịch được chuẩn bị trong ống eppendofit 1,5 ml theo thứ tự lần lượt: 100 μ l dung dịch tinh bột xanh, 100 μ l mẫu thử và 50 μ l dung dịch enzyme. Ủ trong 37°C khoảng 15 phút, sau đó thêm 250 μ l acid acetic vào mỗi ống để dừng phản ứng. Ly tâm ở 3000 rpm trong 5 phút. Hút phần 200 μ l dung dịch phía trên ra giếng 96 (2 giếng/ mẫu). Đo ở bước sóng A595 nm.

2.2.5. Phương pháp xác định đường

a) Thủy phân axit và xác định monosaccharide

Mỗi hợp chất (8,0 mg) được hòa tan riêng trong HCl 2,0 M (dioxan/H₂O, 1/1, v/v, 1,0 ml) và đun nóng đến 80 °C trong bồn nước trong 3 giờ. Thêm vài giọt Ba(OH)₂ 1 M vào dung dịch thủy phân. Sự xuất hiện của kết tủa trắng trong dung dịch thủy phân của hợp chất **CP1** và **CP2** xác nhận sự có mặt của anion sulfat. Sau đó, trung hòa tất cả các dung dịch thủy phân axit bằng bạc cacbonat, loại bỏ bạc clorua kết tủa và cô đặc hoàn toàn dung dịch trong môi trường N₂. Sau khi chiết bằng cloroform, lớp nước được cô khô bằng khí nitơ và monosaccharide được tinh chế bằng TLC điều chế (CH₂Cl₂/MeOH/H₂O, 2,2/1/0,1, v/v/v). của hòa tan đường trong H₂O và xác định độ quay cực riêng trong 24 giờ và so sánh với tài liệu: Axit D-glucuronic (1,0 mg hợp chất **CP1** và **CP2**): +9,5 (c 0,1, H₂O), tài liệu tham khảo là +10,2 [24].

b) Thủy phân axit và GC

Hợp chất **CP3** (3,0 mg) được hòa tan riêng trong HCl 1,0 N (dioxan/H₂O, 1:1, v/v, 1,0 ml) và đun nóng đến 80 °C trong bồn nước 3 giờ. Dung dịch axit được trung hòa bằng bạc cacbonat và đuổi hoàn toàn dung môi bằng cách thổi N₂ qua đêm. Sau khi chiết bằng CHCl₃, lớp nước được cô đặc đến khô bằng N₂. Cặn được hòa tan trong 0,1 ml pyridine khô, sau đó thêm L-cysteine methyl ester hydrochloride trong pyridine (0,06 M, 0,1 ml). Đun nóng hỗn hợp phản ứng ở 60 °C trong 2 giờ. Sau đó thêm dung dịch trimethylsilylimidazole (0,1 ml) và đun nóng ở 60 °C trong 1,5 giờ. Sản phẩm khô được phân bố với *n*-hexane và nước (mỗi loại 0,1 ml). Lớp hữu cơ

được phân tích bằng sắc ký khí (GC): cột DB-5 (ID 0,32 mm × chiều dài 30 m), đầu dò FID, nhiệt độ cột 210 °C, nhiệt độ ống tiêm 270 °C, nhiệt độ đầu dò 300 °C, khí mang He (2 ml/phút). Trong điều kiện này, các loại đường chuẩn cho các pic ở t_R (phút) 14,11 và 14,26 đối với D- và L-glucose, 8,35 và 7,88 đối với D- và L-arabinose, và 4,50 đối với L-rhamnose. Các pic ở t_R 14,11, 7,88 và 4,50 phút đối với hợp chất **CP3** đã được quan sát thấy, cho thấy sự có mặt của các đường D-glucose, L-arabinose và L-rhamnose .

Chương 3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Phân lập các hợp chất

Lá trà hoa vàng *C. phanii* sau khi thu hái được phơi khô và xay thành bột. Bột khô lá *C. phanii* (12,0 kg) được chiết siêu âm với methanol (MeOH) 2 lần, mỗi lần sử dụng 15 L MeOH và siêu âm 2 giờ ở 45°C. Dịch chiết MeOH được cất loại hoàn toàn dung môi dưới áp suất giảm thu được 500 g cặn chiết MeOH. Hòa tan cặn chiết này trong 4L nước và chiết phân lớp lần lượt với các dung môi dichloromethane (CH_2Cl_2) và ethyl acetate (EtOAc). Các dịch chiết lần lượt được cất loại hoàn toàn dưới áp suất giảm thu được các cặn chiết tương ứng gồm cặn chiết CH_2Cl_2 (**P1**, 61,8 g), ethyl acetate (**P2**, 23,0 g) và lớp nước (**P3**, 2,0 L).

Cặn chiết EtOAc (**P2**) được phân tách trên sắc ký cột silica gel (CC) rửa giải bằng hệ dung môi $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ (50/1~2/1, v/v) thu được bốn phân đoạn, P2A-P2D.

Phân đoạn P2D (1,45 g) tiếp tục được tách bằng CC trên silica gel RP-18, rửa giải bằng hệ dung môi acetone/nước (1/1, v/v) thu được ba phân đoạn P2D1-P2D3. Tinh chế các phân đoạn P2D1 (245 mg) và P2D2 (187 mg) trên cột Sephadex LH-20, rửa giải bằng $\text{MeOH}/\text{H}_2\text{O}$ (9/1, v/v) lần lượt thu được hợp chất **CP6** (12,4 mg) và **CP7** (13,8 mg).

Phân đoạn P2D3 (3,27 g) được phân tách trên cột silica gel với hệ dung môi $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{acetone}$ (1/2, v/v) thu được hợp chất **CP8** (500,0 mg).

Lớp nước (**P3**, 2L) được phân tách trên cột diaion HP-20 CC, rửa kỹ cột bằng nước, sau đó rửa giải bằng hệ dung môi MeOH trong nước (25, 50, 75 và 100% MeOH, mỗi hệ 1 L), thu được bốn phân đoạn tương ứng, P3A-P3D. Phân đoạn P3D (60,25 g) được phân tách trên cột silica gel, rửa giải bằng phương pháp gradient hệ dung môi $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ (20/1, 10/1, 5/1 và 2/1, v/v), thu được ba phân đoạn P3D1-P3D3.

Phân đoạn P3D3 (13,5 g) sau đó được phân tách trên cột gel silica, rửa giải bằng hệ dung môi $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{acetone}/\text{nước}$ (1/4/0,4, v/v/v), thu bốn phân đoạn P3D3A-P3D3D.

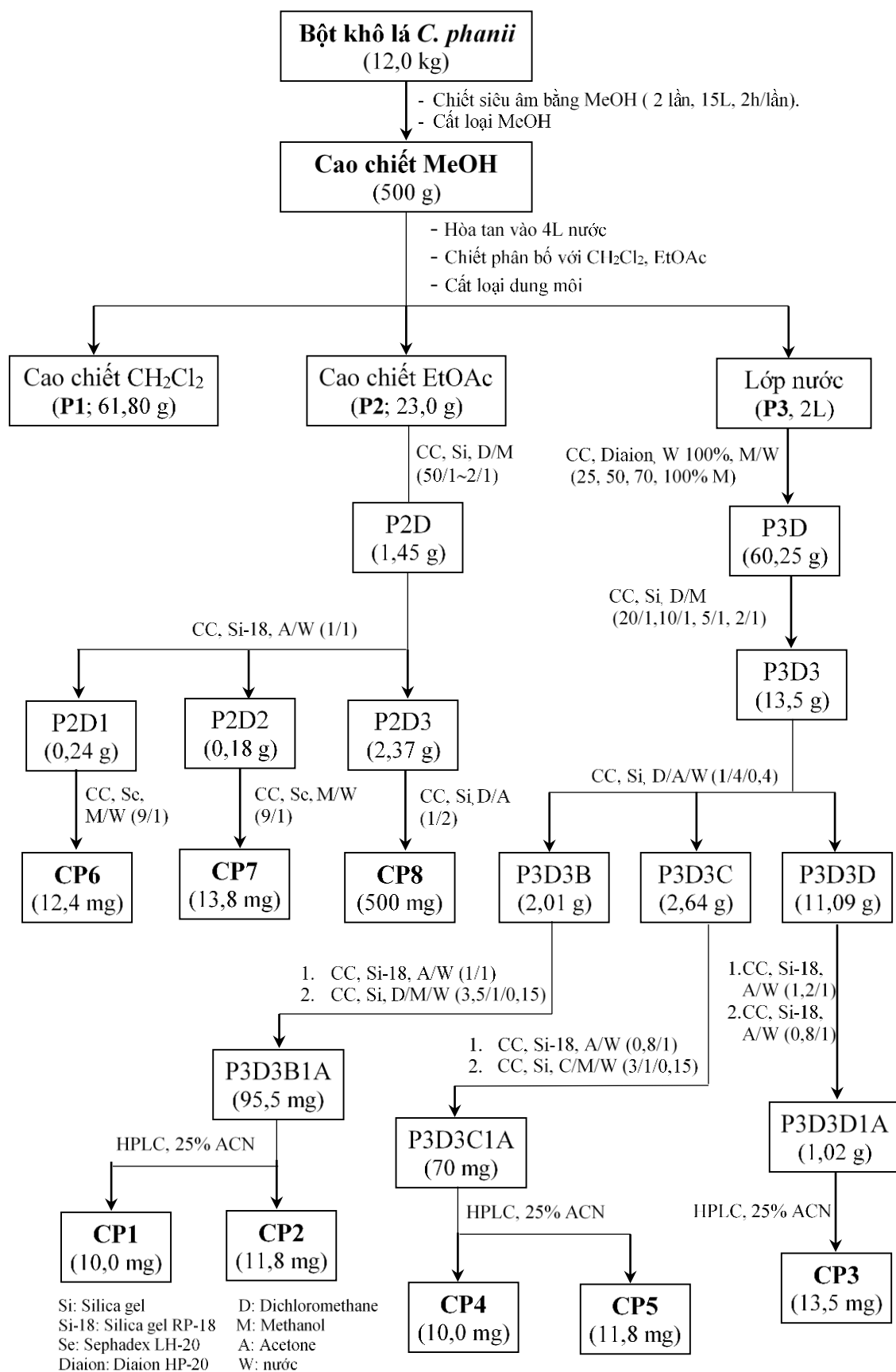
Phân đoạn P3D3B (2,01 g) được tách trên cột silica gel RP-18 và rửa giải bằng acetone/nước (1/1, v/v), tạo ra ba phân đoạn, P3D3B1-CP3D3B. Phân đoạn P3D3B1 (0,35 g) tiếp tục được phân tách trên cột gel silica rửa giải $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}/\text{nước}$ (3,5/1/0,15, v/v/v) thu được hai phân đoạn, P3D3B1A và P3D3B1B. Phân đoạn P3D3B1A (95,5 mg) được tinh chế trên hệ thống HPLC với hệ dung môi 25% ACN

trong nước thu được hợp chất **CP1** (10,0 mg, t_R 34,3 phút) và **CP2** (11,8 mg, t_R 35,9 phút).

Phân đoạn P3D3C (**2,64 g**) được phân tách trên cột silicagel RP-18 với hệ dung môi acetone/nước (0,8/1, v/v) thu được ba phân đoạn P3D3C1-P3D3C3.

Phân đoạn P3D3C1 (**1,02 g**) tiếp tục được tách trên cột silica gel, rửa giải bằng hệ dung môi $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}/\text{nước}$ (3/1/0,15, v/v/v), thu được hai phân đoạn P3D3C1A và P3D3C1B. Phân đoạn P3D3C1A (**70 mg**) được tinh chế bằng hệ thống HPLC với pha động là 25% ACN trong nước thu được hợp chất **CP4** (10,0 mg, t_R 47,0 phút) và **CP5** (11,8 mg, t_R 34,7 phút).

Phân đoạn P3D3D (**11,09 g**) được phân tách trên cột silica gel RP-18 rửa giải bằng hệ dung môi acetone/nước (1,2/1, v/v) thu được ba phân đoạn P3D3D1-P3D3D3. Phân đoạn P3D3D1 (**1,64 g**) tiếp tục được tách trên cột silica gel RP-18 với hệ dung môi acetone/nước (0,9/1, v/v) thu được ba phân đoạn P3D3D1A-P3D3D1C. P3D3D1A (**1,02 g**) sau đó được đưa vào hệ thống HPLC với pha động là 25% ACN trong nước thu được hợp chất **CP3** (13,5 mg, t_R 49,2 phút).



Hình 3.1. Sơ đồ quá trình phân lập các hợp chất từ lá loài *C. phanii*

Hằng số vật lý và dữ kiện phổ của các hợp chất phân lập được:

Camphanoside A (CP1): Bột vô định hình màu trắng; $[\alpha]_D^{25}$: + 37,6 (c 0,2, MeOH); $C_{43}H_{65}O_{16}SNa$.

HR-ESI-MS m/z 915,3777 $[M+Na]^+$ (tính toán cho $[C_{43}H_{65}O_{16}SNa_2]^+$, 915,3783);

1H NMR (600 MHz, CD_3OD) và ^{13}C -NMR (150 MHz, CD_3OD): xem bảng 3.1.

Camphanoside B (2): Bột vô định hình màu trắng; $[\alpha]_D^{25}$: + 45,0 (c 0,2, MeOH); $C_{43}H_{65}O_{16}SNa$.

HR-ESI-MS m/z 915,3795 $[M+Na]^+$ (tính toán cho $[C_{43}H_{65}O_{16}SNa_2]^+$, 915,3783);

1H NMR (600 MHz, CD_3OD) và ^{13}C -NMR (150 MHz, CD_3OD): xem bảng 3.2.

Camphanoside C (3): Bột vô định hình màu trắng; $[\alpha]_D^{25}$: + 30,6 (c 0,2, MeOH); $C_{57}H_{90}O_{23}$, HR-ESI-MS m/z 1141.5763 $[M-H]^-$ (tính toán cho $[C_{57}H_{89}O_{23}]^-$, 1141,5800);

1H NMR (600 MHz, CD_3OD) và ^{13}C -NMR (150 MHz, CD_3OD): xem bảng 3.3.

Chikusetsusaponin IVa (CP4): bột vô định hình màu trắng

1H NMR (600 MHz, $DMSO-d_6$) và ^{13}C NMR (150 MHz, $DMSO-d_6$): xem bảng 3.4

Spinasaponin A 28-O-glucoside (CP5): bột vô định hình màu trắng

1H NMR (600 MHz, CD_3OD) và ^{13}C NMR (150 MHz, CD_3OD): xem bảng 3.5

(-) Epicatechin (CP6): bột vô định hình màu vàng

1H NMR (500 MHz, CD_3OD) và ^{13}C NMR (125 MHz, CD_3OD): xem bảng 3.6

(-)-Epigallocatechin 3-O-gallate (CP7): bột vô định hình màu vàng

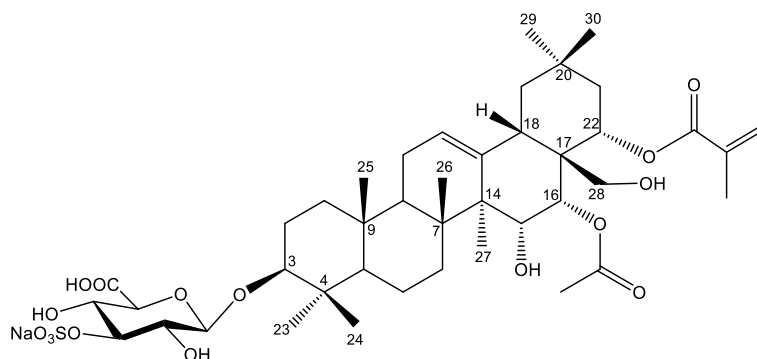
1H NMR (500 MHz, CD_3OD) và ^{13}C NMR (125 MHz, CD_3OD): xem bảng 3.7

(-)-Epigallocatechin 3-O-gallate (CP8): bột vô định hình màu vàng

1H NMR (500 MHz, CD_3OD) và ^{13}C NMR (125 MHz, CD_3OD): xem bảng 3.8

3.2. Xác định cấu trúc hóa học của các hợp chất phân lập được

3.2.1. Hợp chất CP1: Camphanoside A (hợp chất mới)

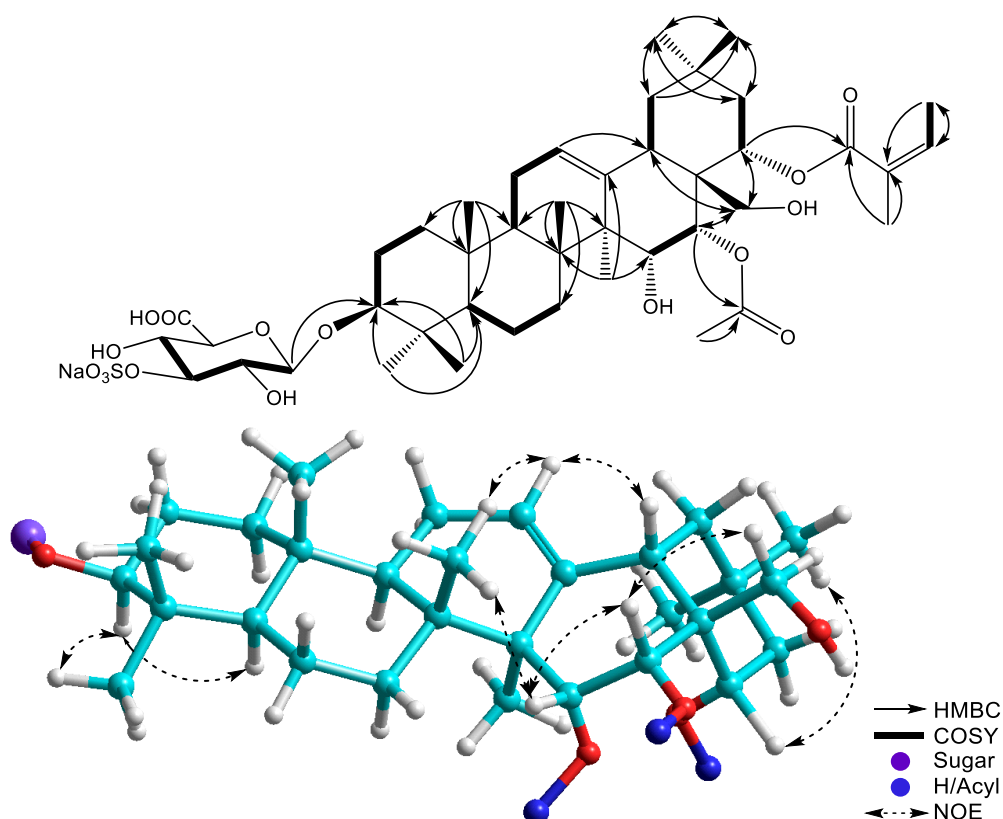


Hình 3.2. Cấu trúc hóa học của hợp chất **CP1**

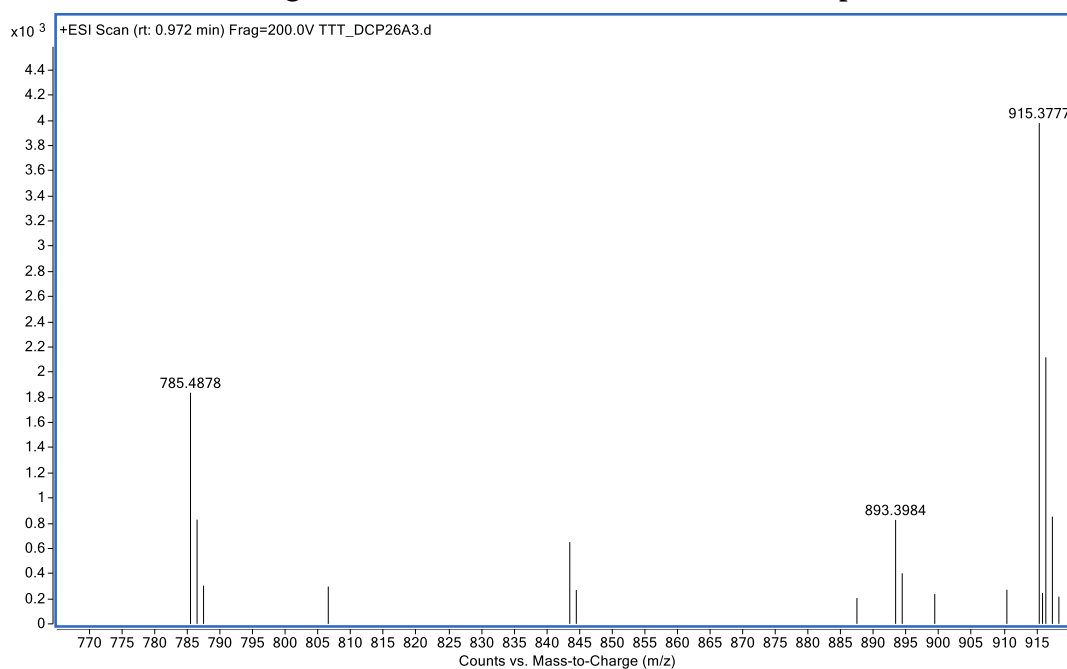
Hợp chất **CP1** thu được dưới dạng bột vô định hình màu trắng. Công thức phân tử của nó được xác định là $C_{43}H_{65}O_{16}SNa$ dựa trên sự có mặt của ion $[M+Na]^+$

ở m/z 915,3777 trên phổ HR-ESI-MS (tính toán cho $[C_{43}H_{65}O_{16}SNa_2]^+$, 915,3783). Phổ 1H -NMR của **CP1** cho thấy tín hiệu proton của chín nhóm methyl bậc ba tại δ_H 0,85, 0,99, 1,01, 1,06, 1,07, 1,08, 1,38, 1,91 và 2,12 (mỗi tín hiệu 3H, s), một nhóm methyl bậc hai tại δ_H 1,96 (3H, d, $J = 6,0$ Hz) và một proton dạng olefin tại δ_H 5,49-5,51 (1H, m), cho biết sự có mặt của một aglycone khung olean-12-ene trong phân tử. Ngoài ra, một proton anome tại δ_H 4,45 (1H, d, $J = 7,8$ Hz) cho thấy sự có mặt của một phân tử monosaccharide. Phổ ^{13}C -NMR và HSQC của **CP1** xuất hiện tín hiệu của 43 carbon, bao gồm 30 carbon của khung triterpen oleanane, 6 carbon của phân tử monosaccharide, 5 carbon thuộc nhóm angeloyl và 2 carbon của nhóm acetoxy. Phân tích dữ liệu NMR của **CP1** cho thấy cấu trúc của nó tương tự như cấu trúc của hợp chất campeteloside A [24], ngoại trừ sự có mặt của nhóm acetoxy tại C-22. Điều này được xác nhận bởi sự dịch chuyển về phía trường thấp của H-16 (δ_H 5,43-5,44)/C-16 (δ_C 76,8) và tín hiệu cộng hưởng của nhóm acetoxy [Me δ_H 2,12/ δ_C 22,2/CO (δ_C 171,7)] và được xác nhận thêm bởi các tương tác HMBC giữa H-2' (δ_H 2,12) và C-1' (δ_C 171,7) và giữa H-16 (δ_H 5,43-5,44) và C-1' (δ_C 171,7) và tương tác COSY của H-15 (δ_H 4,03-4,04)/H-16 (δ_H 5,43-5,44) (Hình 2). Các tương tác HMBC từ H-5'' (δ_H 1,91) đến C-1'' (δ_C 169,1)/C-2'' (δ_C 129,9)/C-3'' (δ_C 138,3) và từ H-4'' (δ_H 1,95-1,96) đến C-2'' (δ_C 129,9)/C-3'' (δ_C 138,3) và tương tác NOESY của H-3'' (δ_H 6,01-6,02)/H-5'' (δ_H 1,91) cho biết sự có mặt của nhóm angeloyl. Vị trí của nhóm angeloyl tại C-22 của aglycone dạng khung oleanane được xác nhận bằng tương tác HMBC từ H-22 (δ_H 5,46-5,48) đến C-1'' (δ_C 169,1). **Nhóm oxy hóa** tại C-3 được xác nhận bằng tương tác HMBC từ H-23 (δ_H 1,07)/H-24 (δ_H 0,85) đến C-3 (δ_C 90,6)/C-4 (δ_C 40,1)/C-5 (δ_C 56,6). Cấu hình α của H-3 được xác định dựa trên tương tác NOESY của H-3 (δ_H 3,22-3,26) và H-5 (δ_H 0,80-0,82)/H-23 (δ_H 1,07); và H-24 (δ_H 0,85) và H-25 (δ_H 1,01). Cấu hình β của H-15, H-16 và H-22 cũng được xác nhận bởi các tương tác NOESY giữa H-15 (δ_H 4,03-4,04) và Ha-28 (δ_H 3,39-3,41); H-16 (δ_H 5,43-5,44) và Hb-28 (δ_H 3,26-3,28); H-30 (δ_H 1,08) và H-18 (δ_H 2,58-2,60); và H-22 (δ_H 5,46-5,48) và H-30 (δ_H 1,08). Thủy phân axit của **CP1** tạo ra axit D-glucuronic, được thể hiện qua góc quay cực dương và phân tích TLC và so sánh với monosaccharide chuẩn. Hằng số tương tác lớn giữa H-1''' và H-2''' ($J = 7,8$ Hz) gợi ý dạng β của nhóm glucuronopyranosyl. Ngoài ra, sự hình thành kết tủa trắng ($BaSO_4$) sau khi thủy phân axit xác nhận sự có mặt của anion sulfat. Nhóm (3-O-sulfonato)glucuronopyranosyl được thiết lập thông qua tương tác trên phổ COSY của H-1''' (δ_H 4,44-4,46)/H-2''' (δ_H 3,45-3,47)/H-3''' (δ_H 4,27-4,29)/H-4''' (δ_H 3,65-3,67) và độ dịch chuyển hóa học dịch

chuyển xuống của C-3''' (δ_C 85,5). Vị trí của nhóm đường tại C-3 của aglycone oleanane được xác định bằng tương tác HMBC giữa H-1''' (δ_H 4,44-4,46) và C-3 (δ_C 90,6). Do đó, cấu trúc của hợp chất **CP1** được xác định là 16 α -acetoxy-22 α -angeloxy-3 β ,15 α ,28-trihydroxyolean-12-ene 3-O- β -D-(3-O-sulfonato sodium)glucuronopyranoside và được đặt tên là camphanoside A.



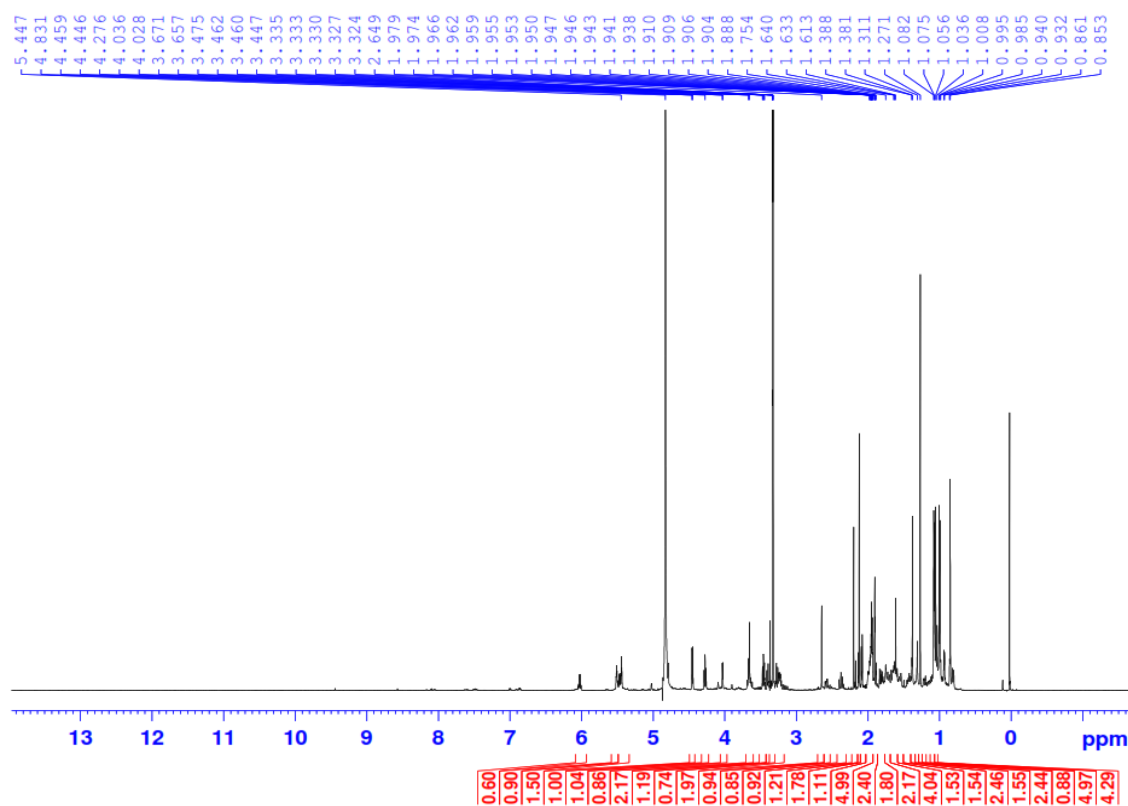
Hình 3.3. Tương tác COSY, HMBC và NOESY của hợp chất **CP1**



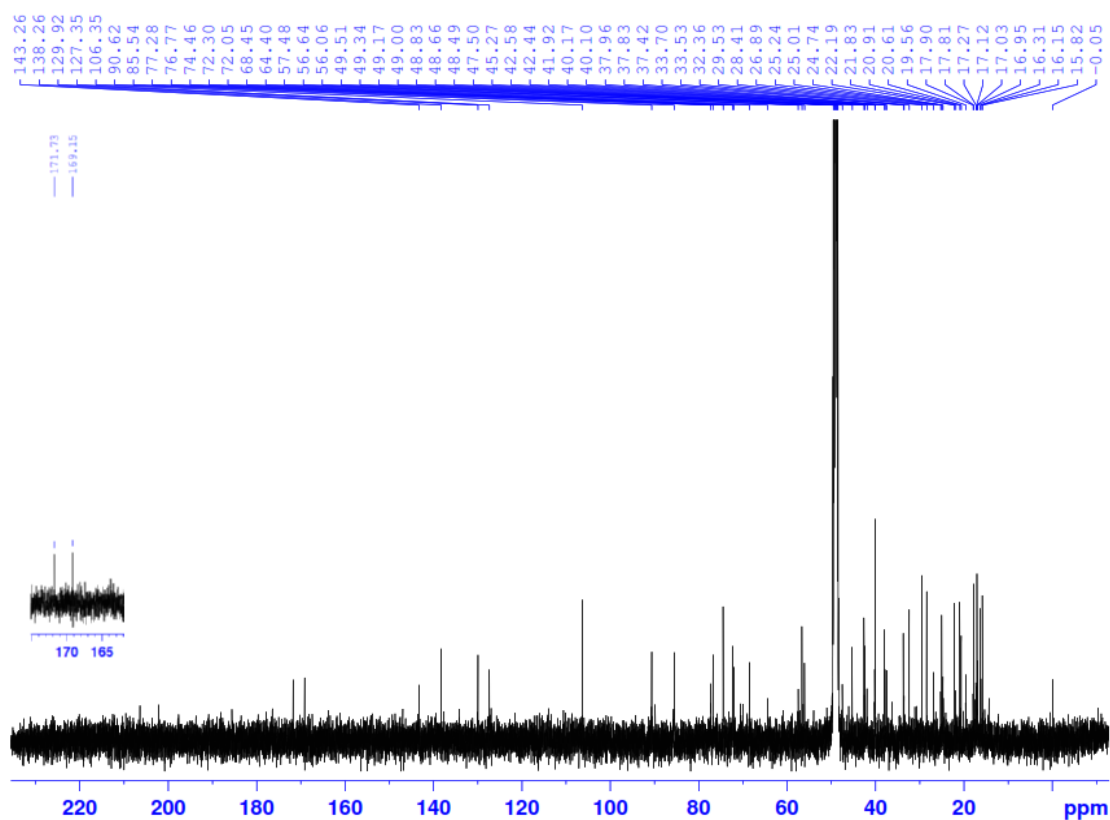
Hình 3.4. Phổ HR-ESI-MS của hợp chất **CP1**Bảng 3.1. Số liệu phổ NMR của hợp chất **CP1**

C	δ_C	δ_H (mult., <i>J</i> , in Hz)	C	δ_C	δ_H (mult., <i>J</i> , in Hz)
Aglycone			24	17,0	0,85 (s)
1	40,2	1,02-1,04 (m)/1,65-1,67 (m)	25	16,3	1,01 (s)
2	26,9	1,70-1,72 (m)/1,97-1,99 (m)	26	17,8	1,06 (s)
3	90,6	3,22-3,26 (dd, 4,2, 12,0)	27	20,6	1,38 (s)
4	40,1	-	28	64,4	3,26-3,28 (d, 10,8) 3,39-3,41 (d, 10,8)
5	56,6	0,80-0,82 (br d, 11,4)	29	33,7	0,99 (s)
6	19,6	1,41-1,43 (m)/1,55-1,58 (m)	30	25,0	1,08 (s)
7	37,4	1,74-1,76 (m)	16-OAc		
8	42,4	-	1'	171,7	-
9	48,2	1,60-1,63 (m)	2'	22,2	2,12 (s)
10	37,8	-	22-OAng		
11	24,7	1,96-1,98 (m)	1''	169,1	-
12	127,4	5,49-5,51 (m)	2''	129,9	-
13	143,3	-	3''	138,3	6,01-6,02 (q, 6,0)
14	48,0	-	4''	15,8	1,95-1,96 (d, 6,0)
15	68,4	4,03-4,04 (d, 4,2)	5''	20,9	1,91 (s)
16	76,8	5,43-5,44 (d, 4,2)	3-OGIA		
17	45,3	-	1'''	106,4	4,44-4,46 (d, 7,8)
18	42,4	2,58-2,60 (dd, 4,8, 14,4)	2'''	74,5	3,45-3,47 (dd, 7,8; 8,4)
19	47,5	1,20-1,22 (m) 2,63-2,65 (m)	3'''	85,5	4,27-4,29 (t, 8,4)
20	32,4	-	4'''	72,3	3,65-3,67 (m)
21	41,9	1,61-1,63 (m)	5'''	77,3	3,64-3,66 (m)
22	72,0	5,46-5,48 (m)	6'''	176,4	-
23	28,4	1,07 (s)			

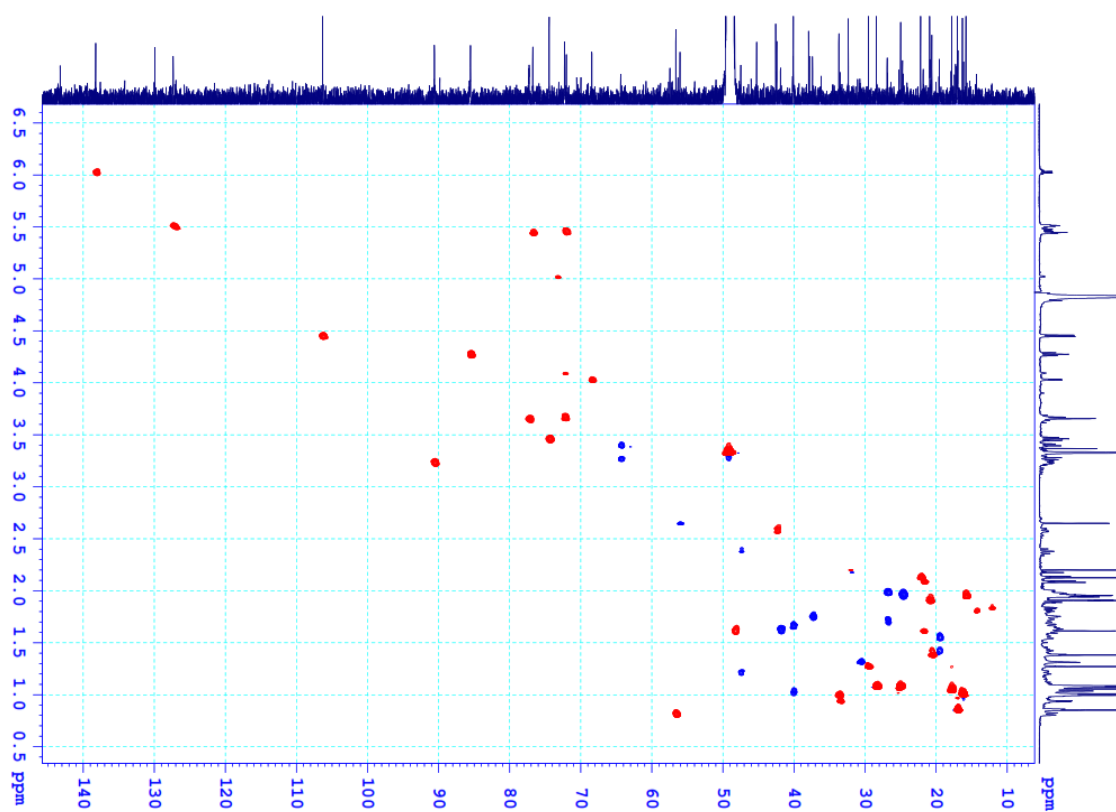
^ađo trong CD₃OD, ^b150 MHz, ^c600 MHz; GIA, glucuropyransyl, Ang, angeloyl, Ac, Acetyl



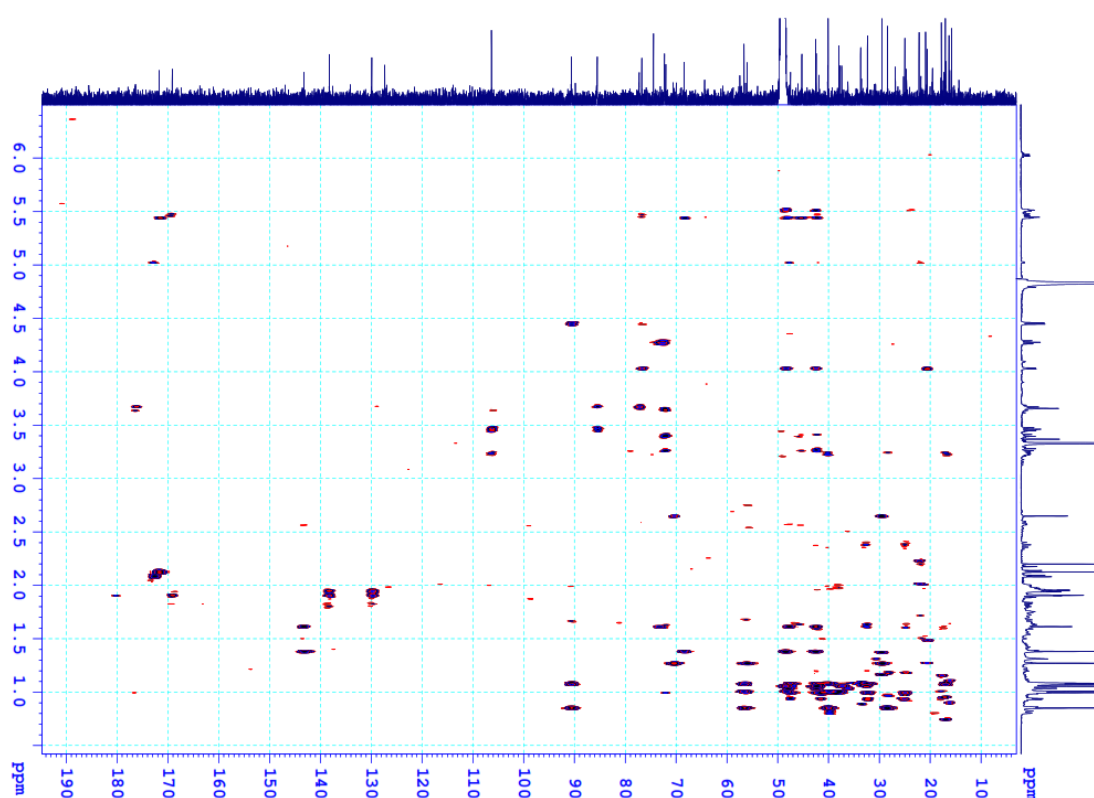
Hình 3.5. Phổ ^1H -NMR của hợp chất **CP1**



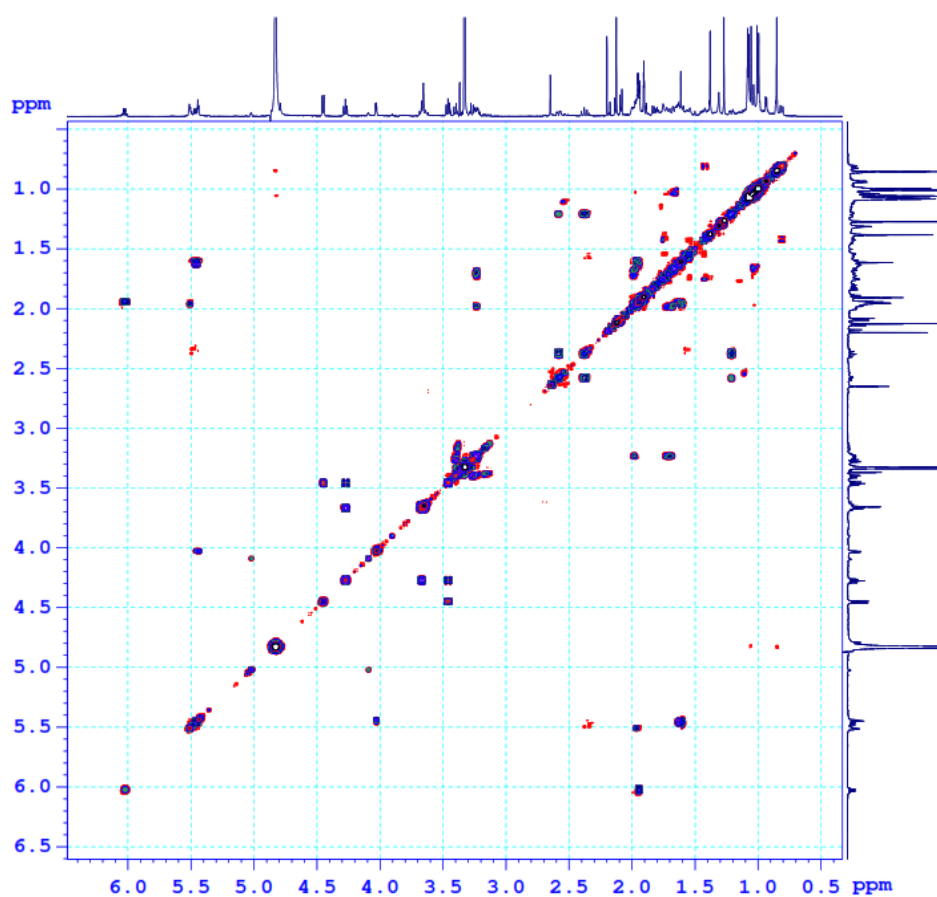
Hình 3.6. Phổ ^{13}C -NMR của hợp chất CP1

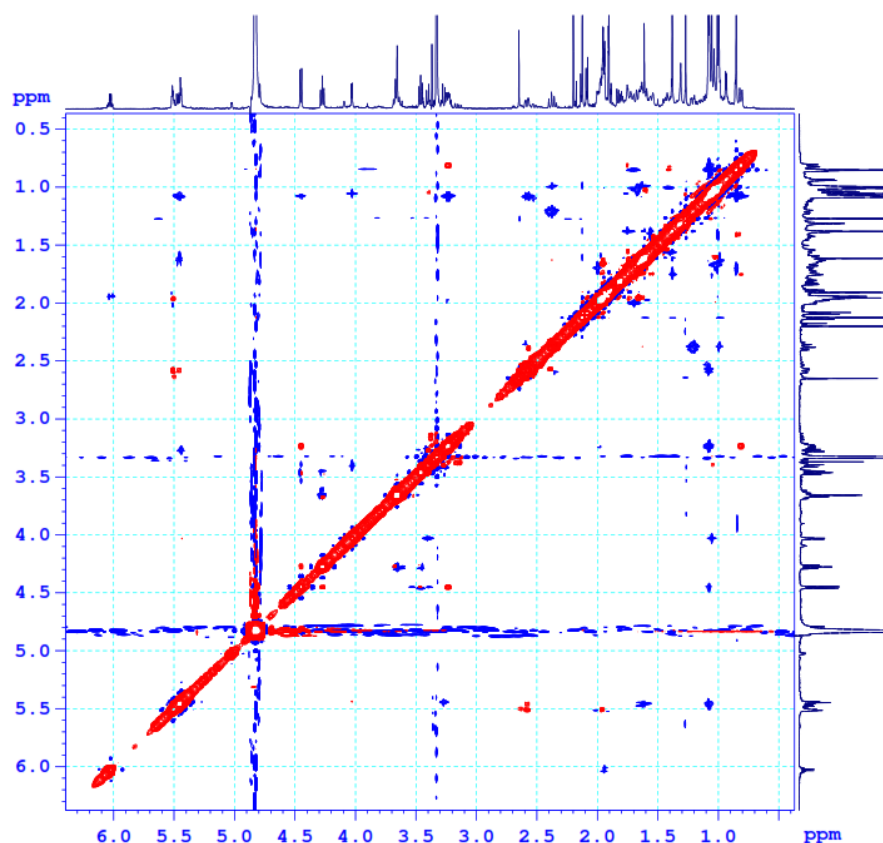


Hình 3.7. Phổ HSQC của hợp chất CP1

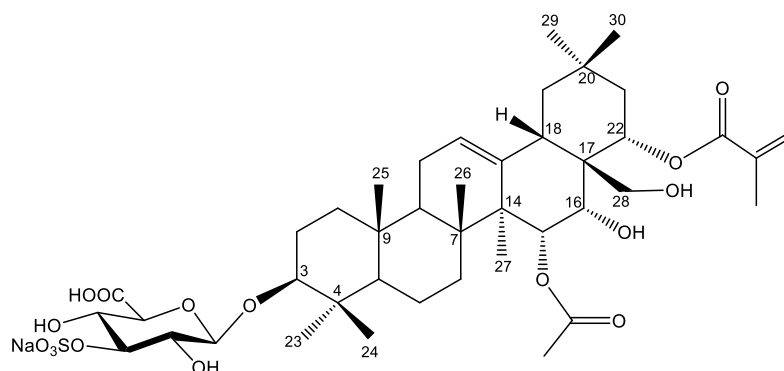


Hình 3.8. Phổ HMBC của hợp chất **CP1**



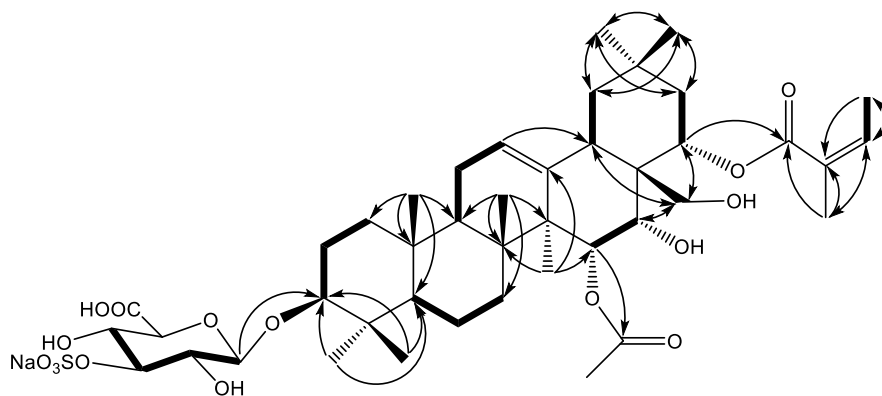
Hình 3.9. Phổ COSY của hợp chất **CP1**Hình 3.10. Phổ NOESY của hợp chất **CP1**

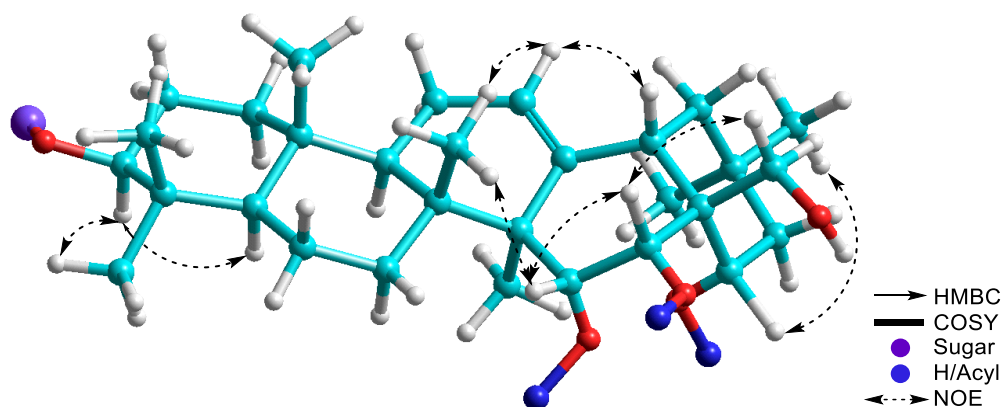
3.2.2. Hợp chất **CP2**: *Camphanoside B* (hợp chất mới)

Hình 3.11. Cấu trúc hóa học của hợp chất **CP2**

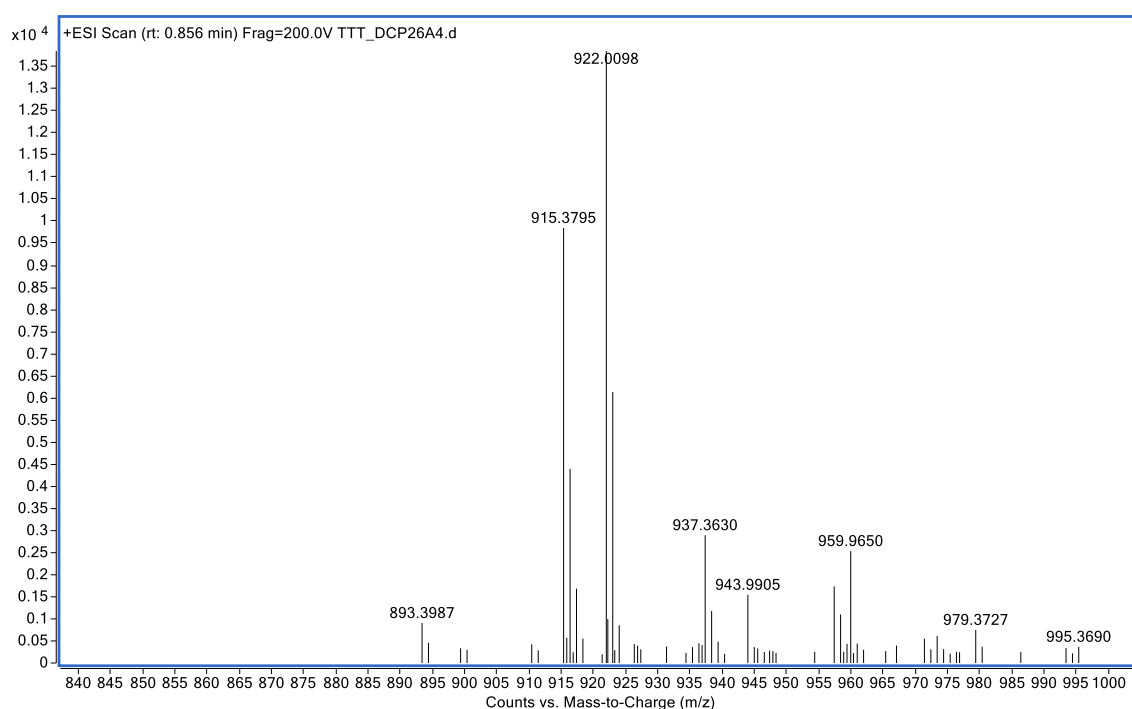
Hợp chất **CP2** thu được dưới dạng bột vô định hình màu trắng có công thức phân tử là $C_{43}H_{65}O_{16}SNa$, xác định bằng HR-ESI-MS ở m/z 915,3795 $[M+Na]^+$ (Tính toán cho $[C_{43}H_{65}O_{16}SNa_2]^+$, 915,3783). Phổ 1H -NMR của **CP2** cho thấy tín hiệu proton của chín nhóm metyl bậc ba tại δ_H 0,85, 0,94, 1,00, 1,04, 1,06, 1,09, 1,61, 1,89 và 2,09 (mỗi nhóm 3H, s), cùng với một nhóm metyl bậc hai tại δ_H 1,96-1,97 (3H, d, $J = 6,0$ Hz) và hai proton olefinic tại δ_H 5,49-5,50 (1H, m) và 5,50-5,51 (1H, m).

Ngoài ra, một proton anome tại δ_H 4,45-4,47 (1H, d, $J = 7,8$ Hz) chỉ ra sự có mặt của một nhóm đường. Phổ ^{13}C -NMR và HSQC xuất hiện tín hiệu của 43 carbon, bao gồm 30 carbon thuộc khung triterpene oleanane, 6 carbon thuộc nhóm glucuronopyranosyl, 5 carbon thuộc nhóm angeloyl và 2 carbon thuộc nhóm acetoxy. Phân tích dữ liệu phổ NMR cho thấy cấu trúc của **CP2** tương tự như cấu trúc của camphanoside A (**CP1**), ngoại trừ sự dịch chuyển của nhóm acetoxy từ C-16 sang C-15. Điều này được xác nhận bởi sự dịch chuyển về phía trường thấp của H-15 (δ_H 5,01-5,02)/C-15 (δ_C 73,3) và tương tác HMBC giữa H-2' (δ_H 2,09)/H-15 (δ_H 5,01-5,02) và C-1' (δ_C 172,7). Vị trí của nhóm angeloxy tại C-22 được xác nhận bởi các tương tác HMBC giữa H-22 (δ_H 5,46-5,48) và C-1'' (δ_C 169,7). Nhóm oxy hóa tại C-3 được xác định bởi các tương tác HMBC giữa H-23 (δ_H 1,07)/H-24 (δ_H 0,85) và C-3 (δ_C 90,6)/C-4 (δ_C 40,1)/C-5 (δ_C 56,3). Cấu hình α của H-3 được xác định bởi tương tác NOESY của H-3 (δ_H 3,23-3,25) và H-5 (δ_H 0,80-0,82). Hơn nữa, cấu hình β của H-15, H-16 và H-22 cũng được xác định bởi các tương tác NOESY giữa H-15 (δ_H 5,01-5,02) và Ha-28 (δ_H 3,39-3,41)/H-16 (δ_H 4,09-4,10); Hb-28 (δ_H 3,16-3,18)/H-30 (δ_H 1,06) và H-18 (δ_H 2,62-2,64); và giữa H-22 (δ_H 5,46-5,48) và H-30 (δ_H 1,06). Tương tự như ở hợp chất **CP1**, phần đường được xác định là phần (3-O-sulfonato natri) glucuronopyranosyl bằng phương pháp thủy phân axit. Vị trí của nhóm đường tại C-3 của aglycone oleanane được xác nhận bằng tương tác HMBC giữa H-1''' (δ_H 4,45-4,47) và C-3 (δ_C 90,6). Do đó, cấu trúc của **CP2** được xác định là 15 α -acetoxy-22 α -angeloxy-3 β ,16 α ,28-trihydroxyolean-12-ene 3-O- β -D-(3-O-sulfonato sodium) glucuronopyranoside và được đặt tên là camphanoside B.





Hình 3.12. Tương tác COSY, HMBC và NOESY của hợp chất **CP2**



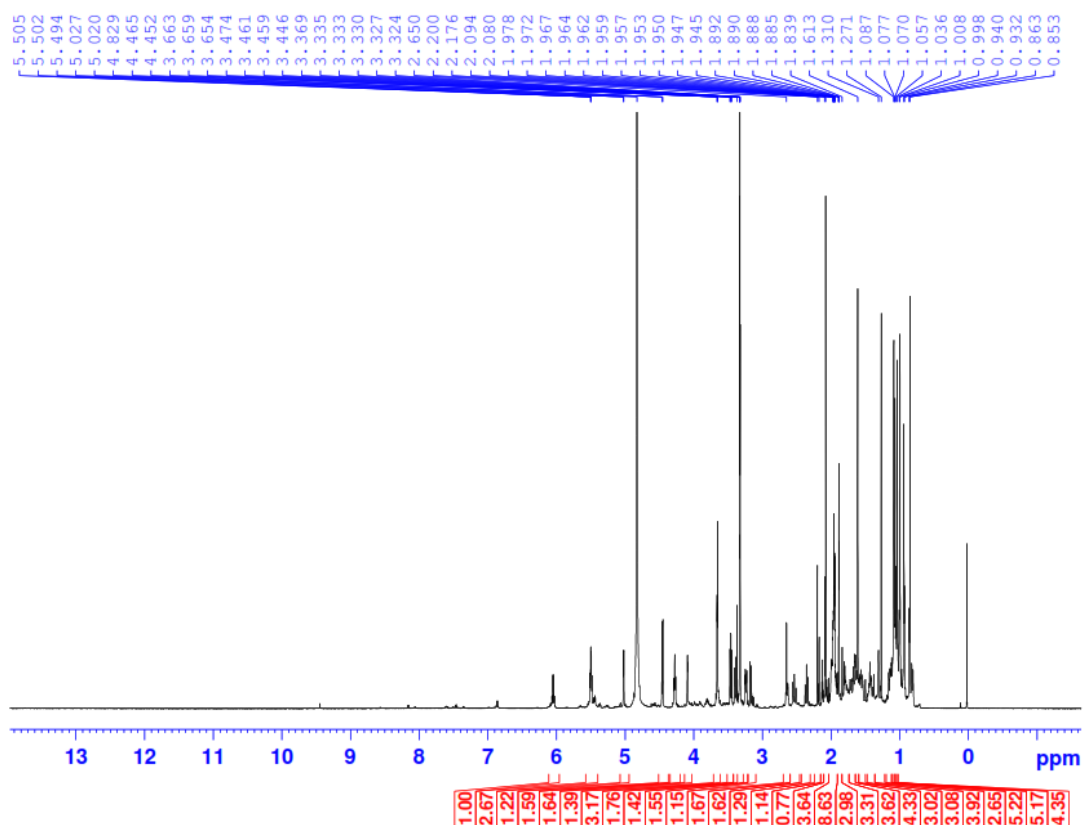
Hình 3.13. Phổ HR-ESI-MS của hợp chất **CP2**

Bảng 3.2. Số liệu phổ NMR của hợp chất **CP2**

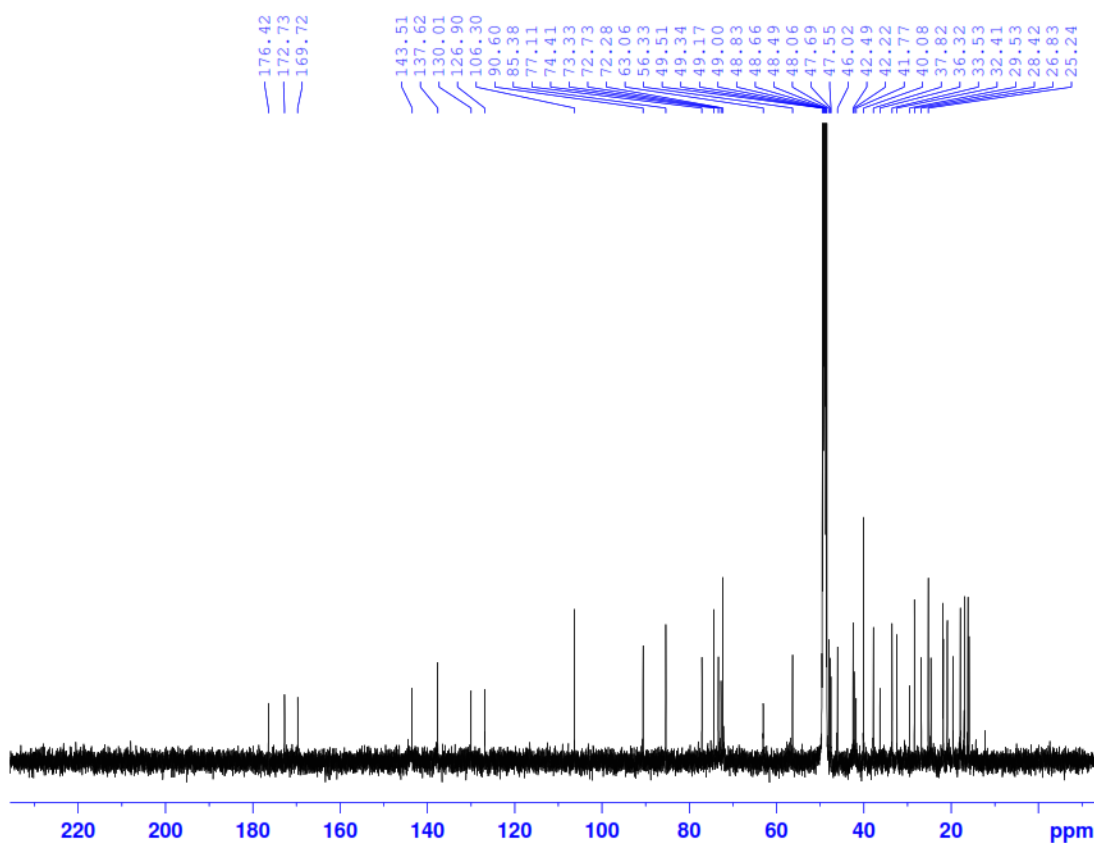
C	$a,b\delta_C$	$a,c\delta_H$ (mult., J , in Hz)	C	$a,b\delta_C$	$a,c\delta_H$ (mult., J , in Hz)
Aglycone			24	17,0	0,85 (s)
1	40,1	1,02-1,04 (m)/1,65-1,67 (m)	25	16,2	1,00 (s)
2	26,8	1,70-1,72 (m)/1,99-2,01 (m)	26	17,9	1,04 (s)
3	90,6	3,23-3,25 (dd, 4,2, 12,0)	27	21,7	1,61 (s)
4	40,1	-	28	63,1	3,16-3,18 (d, 10,8) 3,39-3,41 (d, 10,8)
5	56,3	0,80-0,82 (br d, 11,4)	29	28,4	0,94 (s)
6	19,6	1,41-1,43 (m)/1,55-1,57 (m)	30	25,2	1,06 (s)

7	36,3	1,12-1,15 (m)/1,77-1,79 (m)	15-OAc		
8	42,5	-	1'	172,7	-
9	48,1	1,61-1,64 (m)	2'	21,8	2,09 (s)
10	37,8	-	22-OAng		
11	24,6	1,95-1,98 (m)	1''	169,7	-
12	126,9	5,49-5,50 (m)	2''	130,0	-
13	143,5	-	3''	137,6	5,50-5,51 (q, 5,4)
14	47,7	-	4''	15,9	1,96-1,97 (d, 7,2)
15	73,3	5,01-5,02 (d, 4,2)	5''	20,9	1,89 (s)
16	72,3	4,09-4,10 (d, 4,2)	3-OGIA		
17	46,0	-	1'''	106,3	4,45-4,47 (d, 7,8)
18	42,2	2,62-2,64 (dd, 5,4, 14,4)	2'''	74,4	3,45-3,47 (dd, 7,8, 9,0)
19	47,6	1,10-1,12 (m) 2,52-2,54 (dd, 12,0, 12,0)	3'''	85,4	4,27-4,29 (t, 9,0)
20	32,4	-	4'''	72,3	3,65-3,67 (m)
21	41,8	1,55-1,59 (m) 2,35-2,37 (dd, 11,4, 11,4)	5'''	77,1	3,65-3,67 (m)
22	72,7	5,46-5,48 (m)	6'''	176,4	-
23	28,4	1,09 (s)			

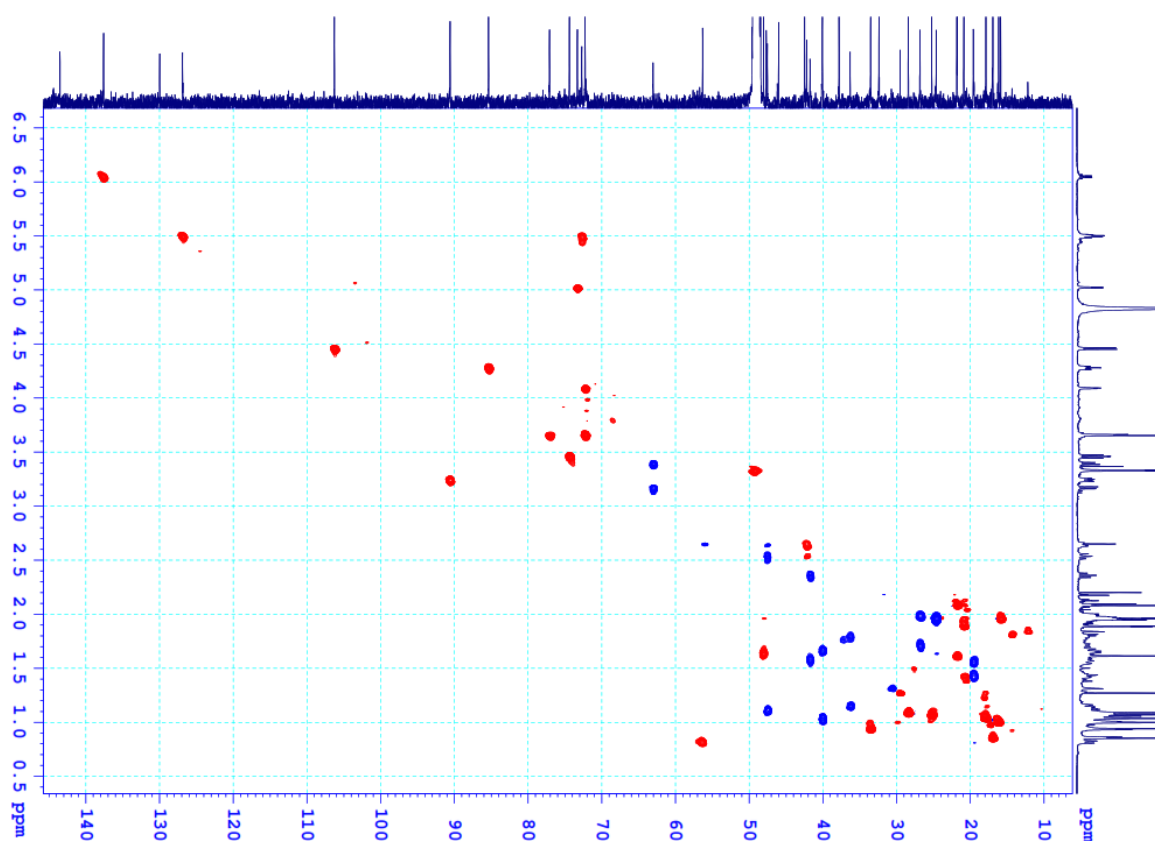
^ađo trong CD₃OD, ^b150 MHz, ^c600 MHz; GIA, glucuropyranosyl, Ang, angeloyl, Ac, Acetyl



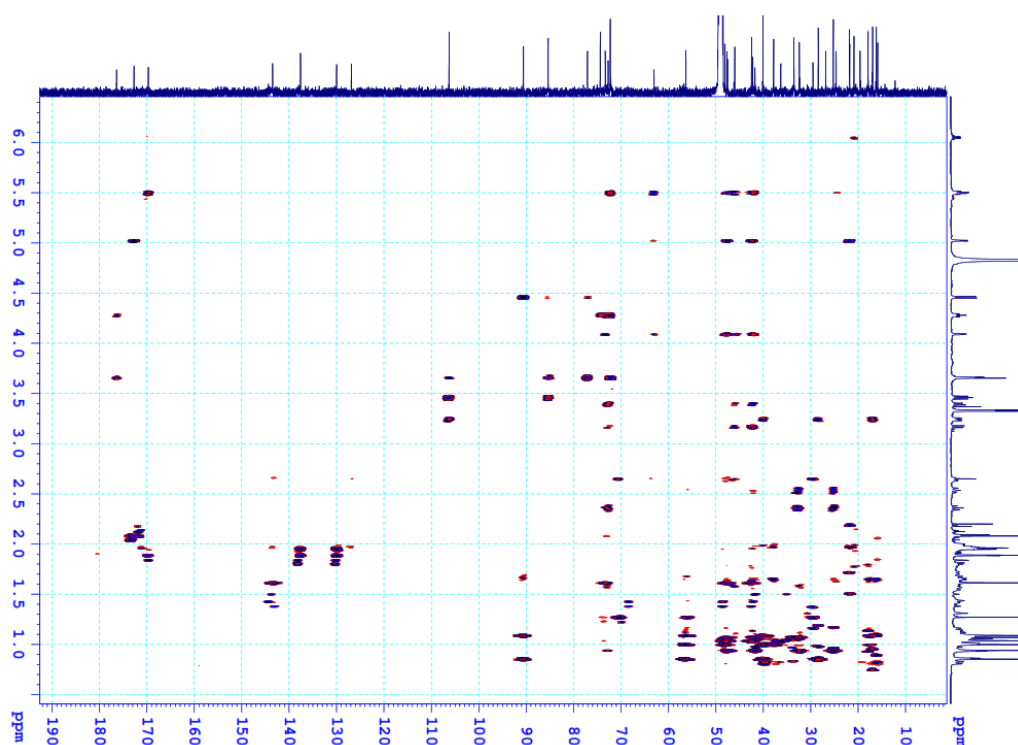
Hình 3.14. Phổ ¹H-NMR của hợp chất CP2



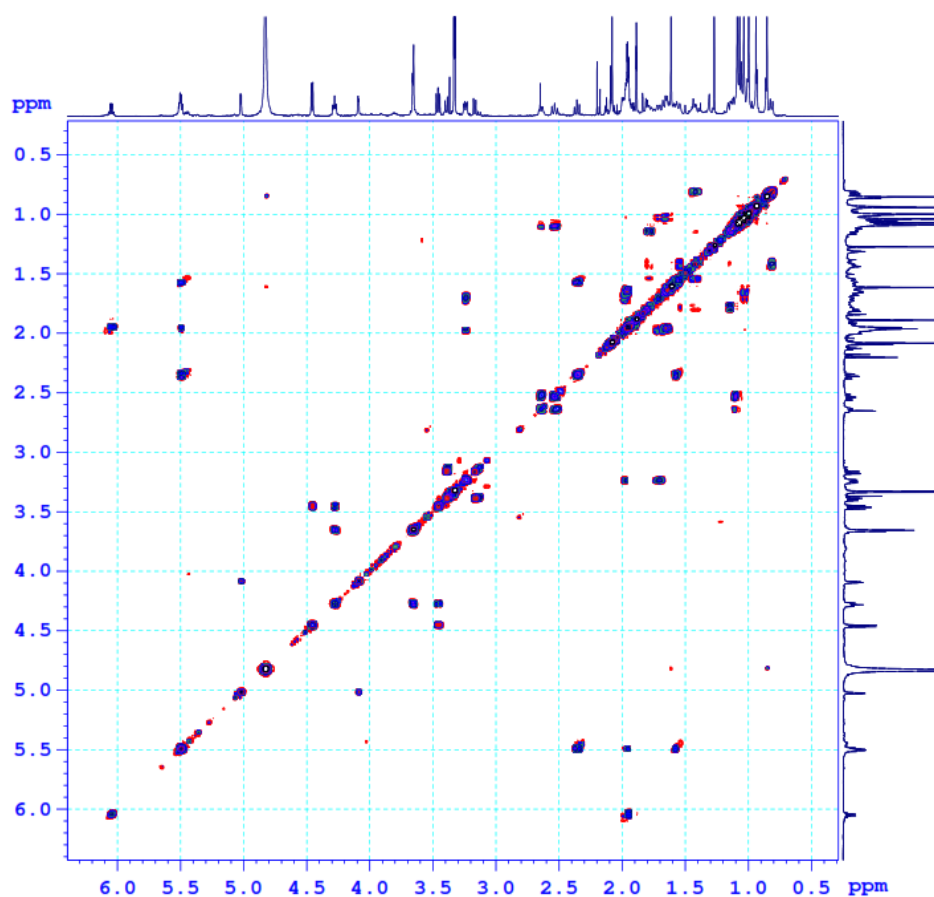
Hình 3.15. Phổ ^{13}C -NMR của hợp chất CP2



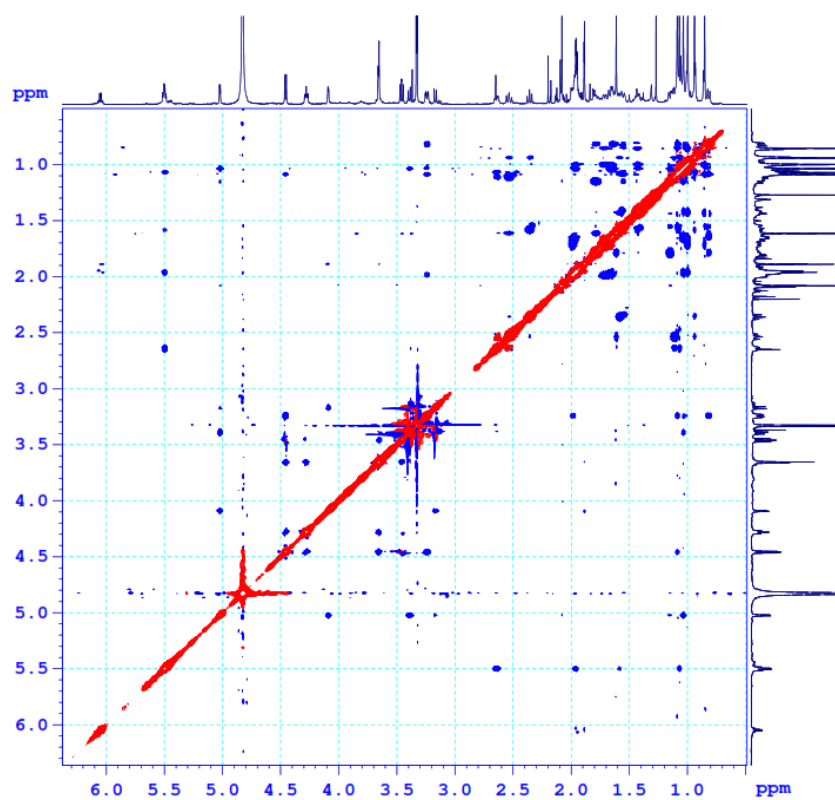
Hình 3.16. Phổ HSQC của hợp chất CP2



Hình 3.17. Phổ HMBC của hợp chất CP2

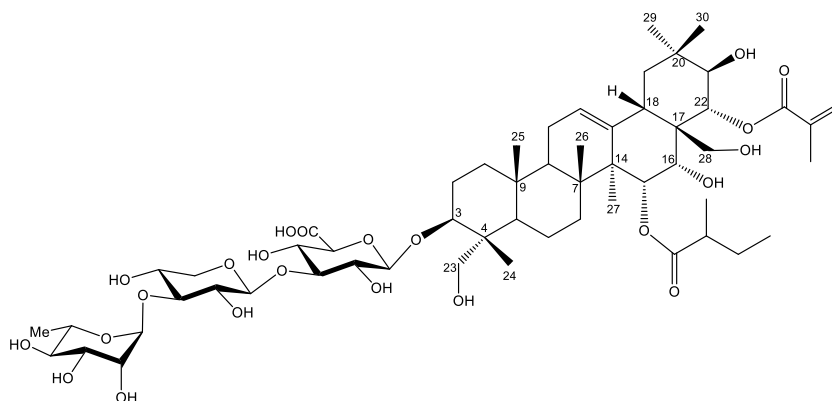


Hình 3.18. Phổ COSY của hợp chất CP2



Hình 3.19. Phổ NOESY của hợp chất CP2

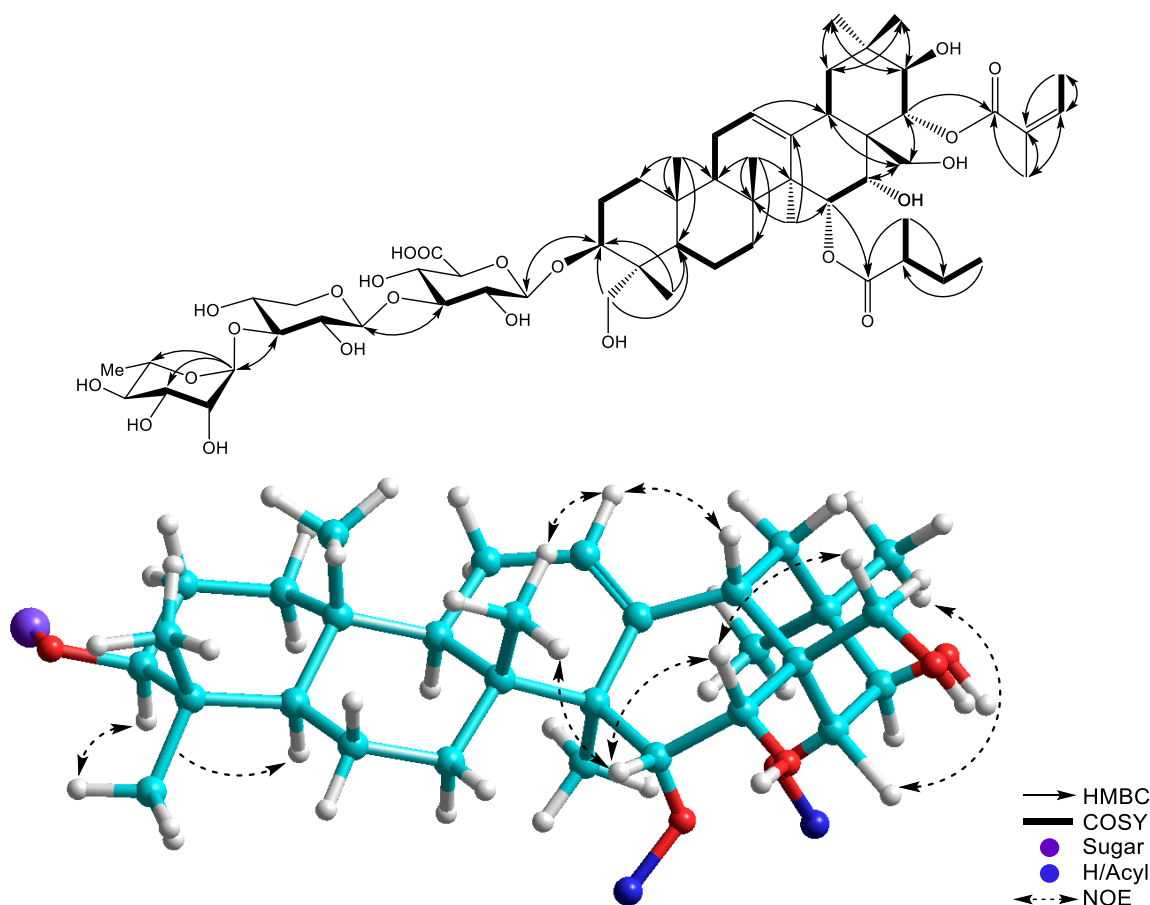
3.2.3. Hợp chất CP3: camphanoside C (hợp chất mới)



Hình 3.20. Cấu trúc hóa học của hợp chất **CP3**

Hợp chất **CP3** thu được dưới dạng bột vô định hình màu trắng. Công thức phân tử của nó được xác định là $C_{57}H_{90}O_{23}$ bằng HR-ESI-MS với sự có mặt của pic ở m/z 1141,5763 $[M-H]^-$ (tính toán cho $[C_{57}H_{89}O_{23}]^-$, 1141,5800). Phổ 1H -NMR cho thấy các tín hiệu tương ứng với bảy nhóm methyl bậc ba tại δ_H 0,71, 1,00, 1,01, 1,02, 1,03, 1,61 và 1,92 (mỗi tín hiệu 3H, s), ba nhóm methyl bậc hai tại δ_H 1,18-1,19 (3H, d, $J = 7,2$ Hz), 1,25-1,27 (3H, d, $J = 6,6$ Hz), và 1,98-1,99 (3H, d, $J = 7,2$ Hz), một nhóm methyl bậc một tại δ_H 0,95-0,96 (3H, t, $J = 7,2$ Hz), hai proton olefin tại δ_H 5,53-5,55 (1H, m) và 6,04-6,05 (1H, q, $J = 6,0$ Hz), và ba proton anome tại δ_H 4,49-4,51 (1H, d, $J = 7,8$ Hz), 4,53-4,55 (1H, d, $J = 7,8$ Hz) và 5,08 (1H, br s). Phổ ^{13}C -NMR và HSQC xuất hiện tín hiệu của 54 carbon, bao gồm 30 carbon của bộ khung triterpen oleanane, 17 carbon của một đơn vị trisaccharide, 5 carbon của một nhóm angeloyl và 5 carbon của một nhóm 2-methylbutanoyl. Tương tự như hợp chất **CP1** và **CP2**, hợp chất **CP3** được nhận dạng là một saponin triterpen oleanane bằng cách phân tích dữ liệu 1H - và ^{13}C -NMR. Phổ NMR của **CP3** gần giống với phổ của 22α -O-angeloyl- $16\alpha,21\beta,23,28$ -tetrahydroxy- 15α -O-(3-methylbutanoyl)olean-12-ene 3β -O- α -L-rhamnopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 3)- α -L-arabinopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 3)- β -D-glucuronopyranoside [*] ngoại trừ sự khác biệt của nhóm thế tại C-15. Độ dịch chuyển hóa học của C-1' (δ_C 177,9), C-2' (δ_C 42,7)/H-2' (δ_H 2,44-2,46), C-3' (δ_C 27,2)/H-3' (δ_H 1,47-1,49 và 1,76-1,78), C-4' (δ_C 12,1)/H-4' (δ_H 0,95-0,96), và C-5' (δ_C 16,9)/H-5' (δ_H 1,18-1,19) chỉ ra sự có mặt của nhóm 2-methylbutanoyl. Vị trí của nhóm này tại C-15 của aglycone oleanane được xác nhận bằng tương tác HMBC giữa H-15 (δ_H 5,08-5,09) và C-1' (δ_H 177,9). Hơn nữa, các thành phần đường được xác định là D-glucose, L-rhamnose và L-arabinose bằng cách xác định các dẫn xuất TMS theo phương pháp GC [25]. Trên phổ HMBC của **CP3**, các tương tác giữa H-1''' (δ_H 4,49-4,51) và C-3 (δ_C 82,0); H-1'''' (δ_H 4,53-4,55) và C-3''' (δ_C 86,1); H-1''''' (δ_H 5,08) và C-3'''' (δ_C 80,7) cho biết liên kết đường là O- α -L-rhamnopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 3)- α -L-arabinopyranosyl-

(1→3)- β -D-glucuronopyranoside và tại C-3 của aglycone oleanane. Các tương tác HMBC giữa H-24 (δ_H 0.71) và C-3 (δ_C 82.0)/C-4 (δ_C 43.8)/C-5 (δ_C 47.6)/C-23 (δ_C 65.0) chỉ ra vị trí của nhóm oxy hóa và nhóm hydroxymethylene tại C-3 và C-4, tương ứng. Cấu hình α của H-3 được xác định bằng tương tác NOESY giữa H-3 (δ_H 3,70-3,72) và H-5 (δ_H 1,20-1,22)/H-23 (δ_H 3,05-3,07 và 3,61-3,63). Tương tác HMBC giữa H-29 (δ_H 1,02)/H-30 (δ_H 1,00) và C-19 (δ_C 47,9)/C-20 (δ_C 37,2)/C-21 (δ_C 77,8), giữa H-22 (δ_H 5,38-5,40) và C-16 (δ_C 72,0)/C-17 (δ_C 49,1)/C-28 (δ_C 63,4)/C-1'' (δ_C 170,8) chỉ ra sự có mặt của nhóm hydroxyl và nhóm angeloxy tại C-21 và C-22. Ngoài ra, hằng số tương tác lớn giữa H-21 và H-22 ($J = 10,2$ Hz) cho biết cấu hình *trans* của các nhóm này. Ngoài ra, định hướng β của H-15, H-16 và H-22 đã được xác nhận thông qua tương tác NOESY của H-15 (δ_H 5,08-5,09) và H-26 (δ_H 1,01), H-21 (δ_H 4,31-4,32) và H-29 (δ_H 1,02). Dựa trên bằng chứng trên, cấu trúc của 3 được xác định là 15 α -acetoxy-22 α -angeloxy-3 β ,21 β ,23,28-tetrahydroxyolean-12-ene 3-O- α -L-rhamnopyranosyl-(1→3)- α -L-arabinopyranosyl-(1→3)- β -D-glucuronopyranoside và được đặt tên là camphanoside C.

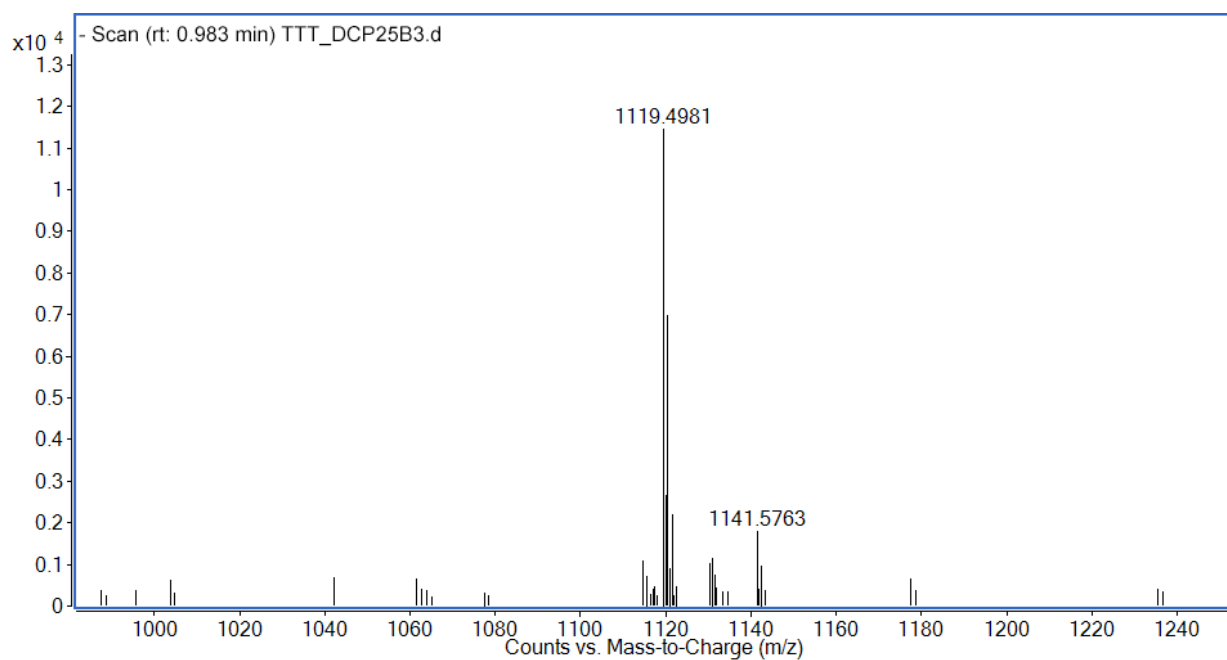


Hình 3.21. Tương tác COSY, HMBC và NOESY của hợp chất **CP3**

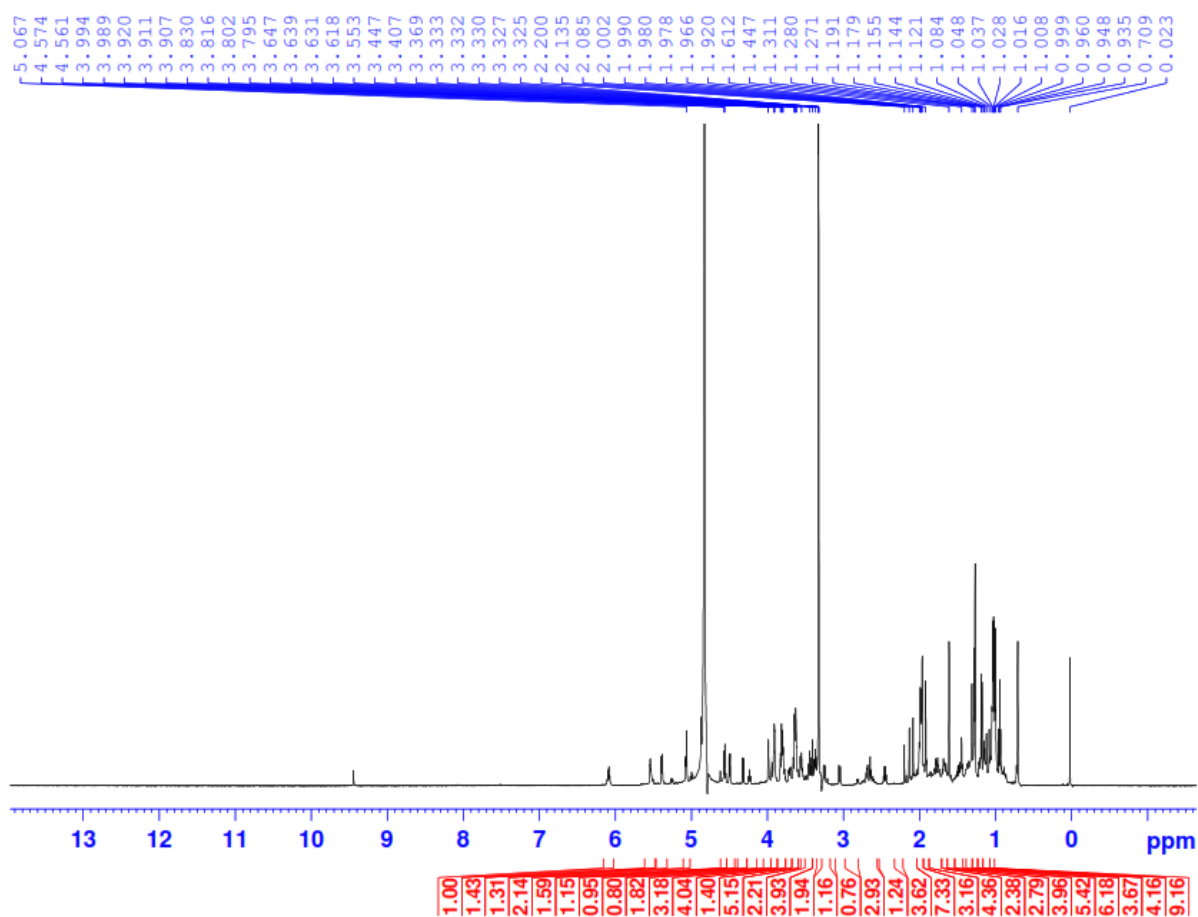
Bảng 3.3. Số liệu phổ NMR của hợp chất **CP3**

C	^{a,b} δ _C	^{a,c} δ _H (mult., J, in Hz)	C	^{a,b} δ _C	^{a,c} δ _H (mult., J, in Hz)
Aglycone			15-OMb		
1	39,8	1,01-1,03 (m)/1,62-1,64 (m)	1'	177,9	-
2	26,2	1,75-1,77 (m)/1,99-2,01 (m)	2'	42,7	2,44-2,46 (m)
3	82,0	3,70-3,72 (dd, 4,2, 11,6)	3'	27,2	1,47-1,49 (m) 1,76-1,78 (m)
4	43,8	-	4'	12,1	0,95-0,96 (t, 7,2)
5	47,6	1,20-1,22 (m)	5'	16,9	1,18-1,19 (d, 7,2)
6	19,1	1,37-1,39 (m) 1,45-1,47 (m)	22-OAng		
7	36,3	1,12-1,14 (m)/1,85-1,88 (m)	1''	170,8	-
8	42,5	-	2''	129,7	-
9	48,0	1,68-1,71 (m)	3''	138,4	6,04-6,05 (q, 6,0)
10	37,7	-	4''	16,0	1,98-1,99 (d, 7,2)
11	24,7	1,96-1,98 (m)	5''	20,9	1,92 (s)
12	127,6	5,53-5,55 (m)	3-OGIA		
13	142,8	-	1'''	104,7	4,49-4,51 (d, 7,8)
14	48,0	-	2'''	74,5	3,44-3,46 (dd, 7,8, 8,4)
15	72,9	5,08-5,09 (d, 4,2)	3'''	86,1	3,62-3,64 (m)
16	72,0	3,90-3,91 (m)	4'''	72,1	3,54-3,56 (t, 9,0)
17	49,1	-	5'''	76,8	3,62-3,64 (m)
18	41,7	2,69-2,71 (m)	6'''	176,6	-
19	47,9	1,19-1,21 (m) 2,61-2,63 (m)	3''-OXyl		
20	37,2	-	1''''	105,4	4,53-4,55 (d, 7,8)
21	77,8	4,31-4,32 (d, 10,2)	2''''	72,0	3,79-3,81 (m)
22	76,1	5,38-5,40 (d, 10,2)	3''''	80,7	3,61-3,63 (m)
23	65,0	3,05-3,07 (d, 10,8)/3,61-3,63 (d, 10,8)	4''''	69,8	3,90-3,92 (m)
24	13,4	0,71 (s)	5''''	67,9	3,63-3,65 (m) 3,92-3,94 (m)
25	16,7	1,03 (s)	3'''-ORha		
26	17,9	1,01 (s)	1'''''	103,6	5,08 (br s)
27	21,7	1,61 (s)	2'''''	72,1	3,98-3,99 (br d, 3,0)
28	63,4	3,04-3,06 (d, 10,8) 3,36-3,38 (d, 10,8)	3'''''	72,0	3,89-3,91 (m)
29	19,0	1,02 (s)	4'''''	74,1	3,39-3,41(t, 9,0)
30	29,9	1,00 (s)	5'''''	70,2	3,79-3,81 (m)
			6'''''	18,0	1,25-1,27 (d, 6,6)

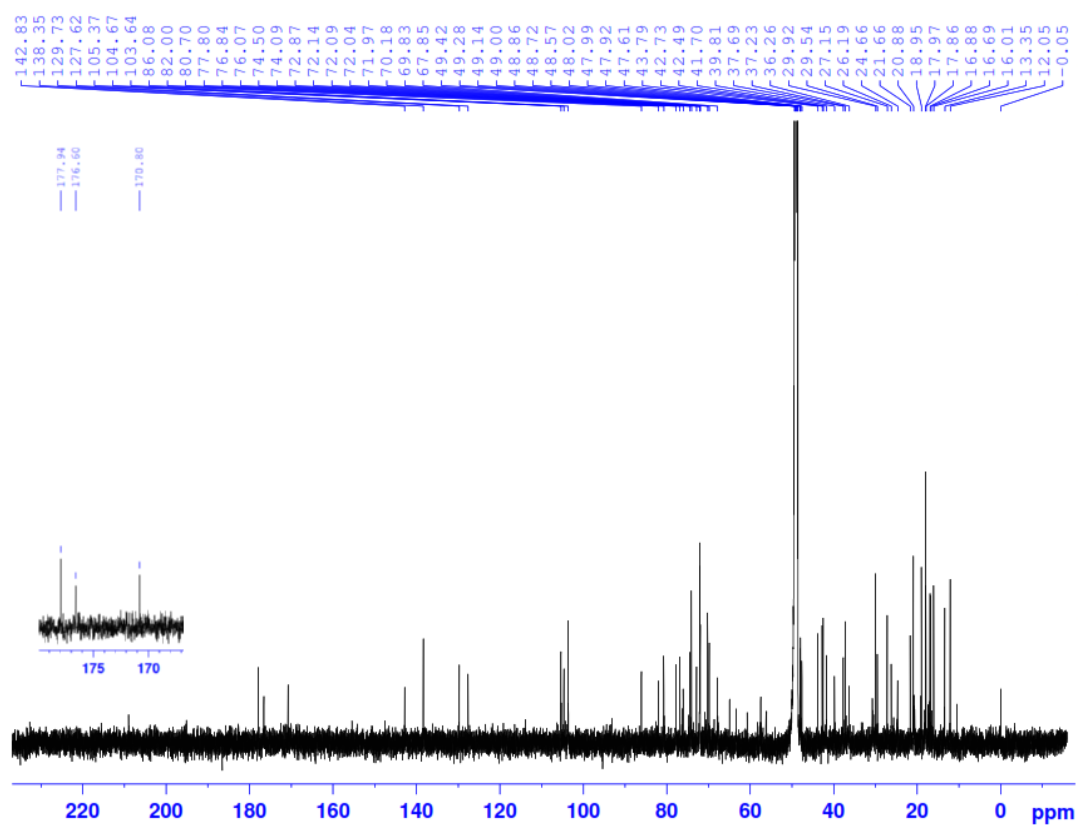
^ađo trong CD₃OD, ^b150 MHz, ^c600 MHz; GIA, glucuropyranosyl, Xyl, xylopyranosyl, Rha, rhamnopyranosyl, Ang, angeloyl, Ac, Acetyl, Mb, 2-methylbutanoyl.



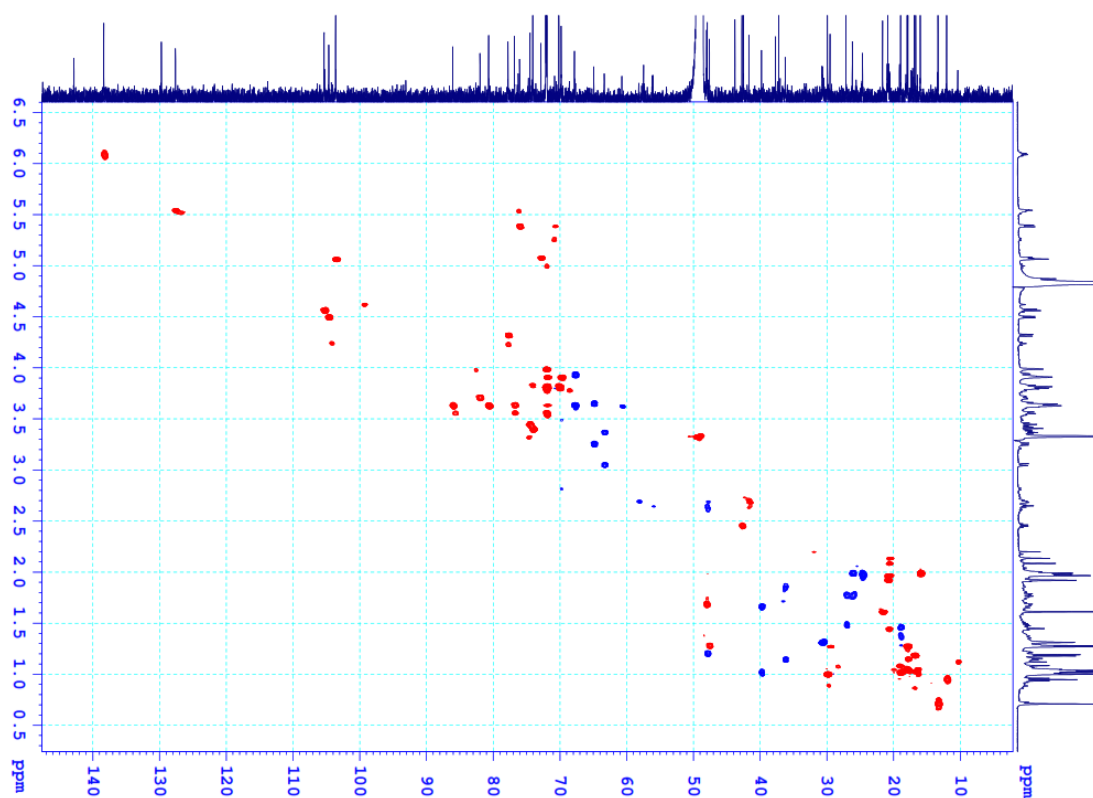
Hình 3.22. Phổ HR-ESI-MS của hợp chất **CP3**



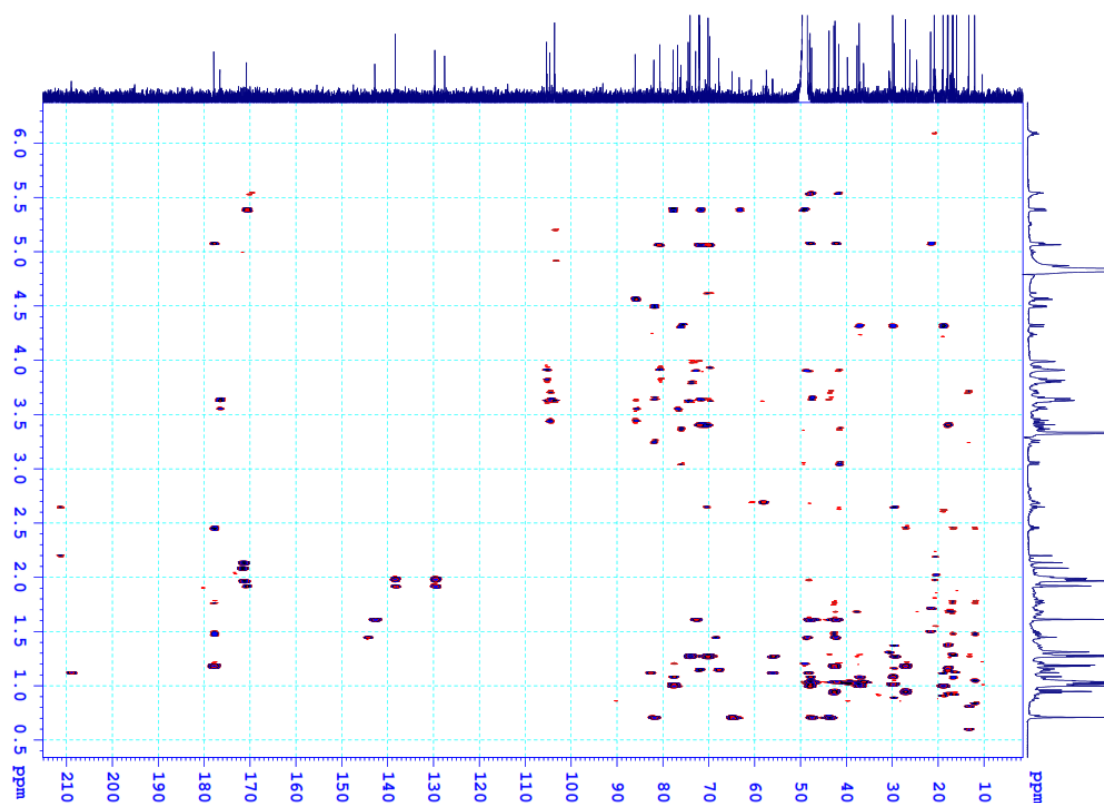
Hình 3.23. Phổ ^1H -NMR của hợp chất **CP3**



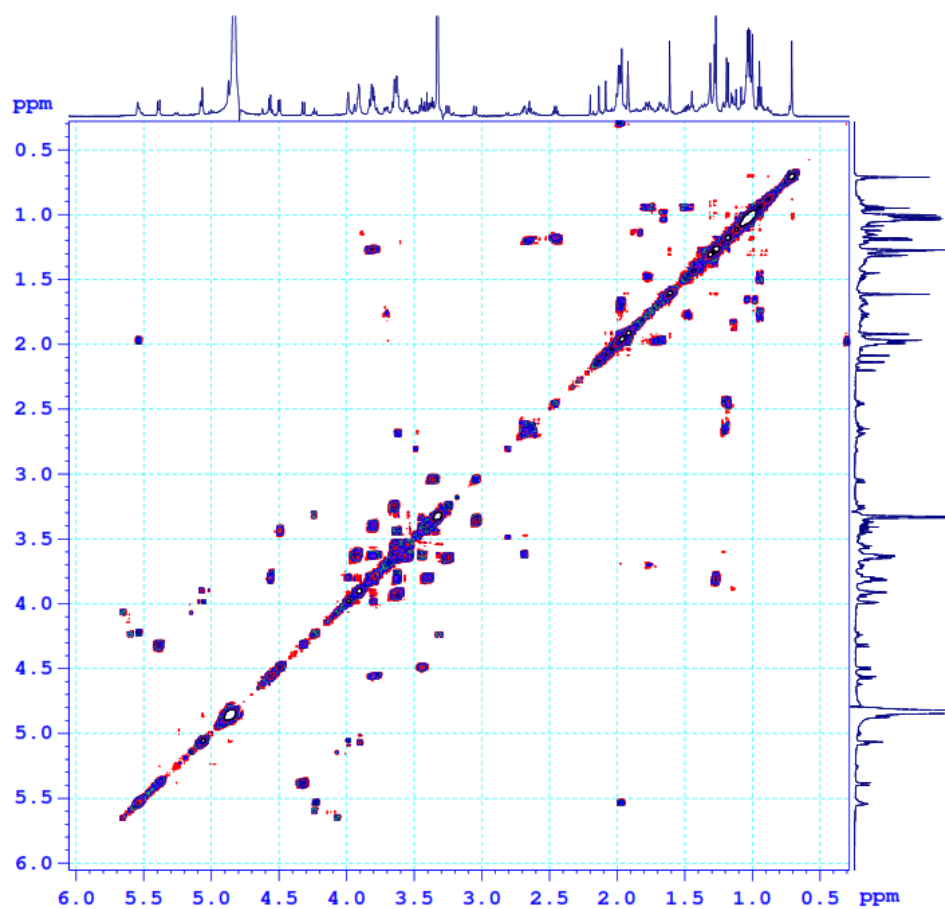
Hình 3.24. Phổ ^{13}C -NMR của hợp chất **CP3**



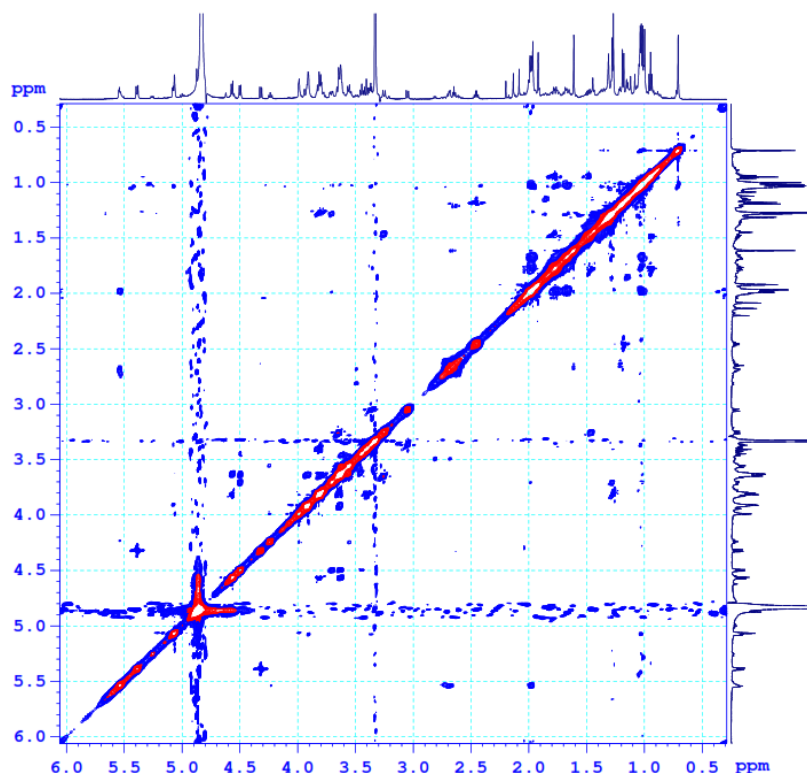
Hình 3.25. Phổ HSQC của hợp chất **CP3**



Hình 3.26. Phổ HMBC của hợp chất **CP3**

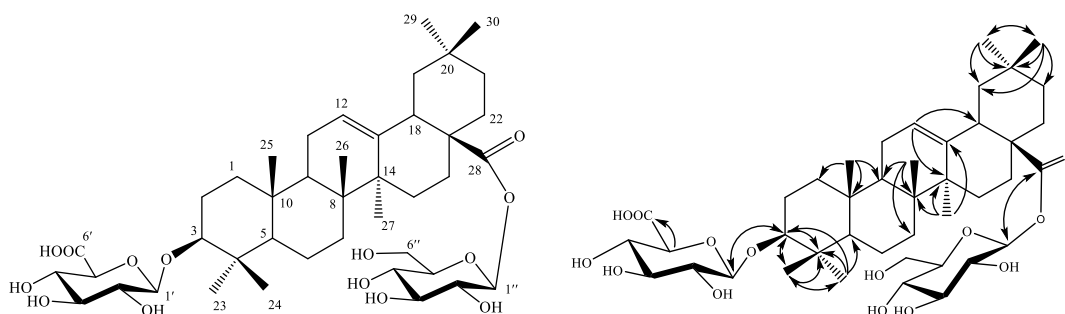


Hình 3.27. Phổ COSY của hợp chất **CP3**



Hình 3.28. Phổ NOESY của hợp chất **CP3**

3.2.4. Hợp chất **CP4**: *chikusetsusaponin IVa*



Hình 3.29. Cấu trúc hóa học và tương tác HMBC chính của hợp chất **CP4**

Hợp chất **CP4** thu được dưới dạng bột vô định hình màu trắng. Phổ ^1H và ^{13}C NMR của CP4 cho phép nhận định đây là một hợp chất triterpen saponin. Phổ ^1H NMR của **CP4** xuất hiện tín hiệu của bảy nhóm methyl bậc ba tại δ_{H} 0,82, 0,87, 0,93, 1,07, 1,18 (mỗi nhóm 3H, s) và 0,96 (6H, s), một proton olefin tại δ_{H} 5,27 (1H, br s). Ngoài ra, hai proton anome tại δ_{H} 4,35 (1H, d, $J = 7,5$ Hz) và 5,40 (1H, d, $J = 7,5$ Hz) chỉ ra sự có mặt của hai đơn vị đường trong cấu trúc của **CP4**. Phổ ^{13}C NMR của **CP4** xuất hiện tín hiệu của 2 carbon anome tại δ_{C} 95.9 và 106.6. Phổ ^{13}C NMR và HSQC xuất hiện tín hiệu của 42 carbon tương ứng 30 carbon của khung triterpene oleanane, và 12 carbon của 2 đơn vị đường hexose. Phổ ^{13}C NMR kết hợp với phổ

^1H NMR và phổ HSQC cho thấy phần aglycon là một triterpen khung oleanane với 7 nhóm methyl singlet, một liên kết đôi tại C-12/C-13 (δ_{C} 123,8/144,8), một cacbon cacbonyl tại C-28 (δ_{C} 178,1), 1 nhóm oximetin tại δ_{C} 90,7 (C-3). Nhóm đường thứ nhất được xác định là β -D-glucuronopyranosyl dựa trên hằng số tương tác lớn của proton anome ($J_{1',2'} = 7,5$ Hz) và độ chuyển dịch hóa học của carbon anome tại δ_{C} 106,6. Vị trí của nhóm đường này tại C-3 của khung oleanane được xác định thông qua tương tác HMBC giữa H-1' (δ_{H} 4,35) và C-3 (δ_{C} 90,7). Tương tự, nhóm đường thứ hai được xác định là β -D-glucopyranosyl dựa trên hằng số tương tác lớn của proton anome ($J_{1'',2''} = 7,5$ Hz) và độ chuyển dịch hóa học của carbon anome δ_{C} 95,5. Tương tác HMBC giữa H-1'' (δ_{H} 5,40) và C-28 (δ_{C} 178,2) cho biết vị trí của nhóm β -D-glucopyranosyl tại C-28 của khung oleanane.

Các dữ liệu phổ trên cho thấy, **CP4** rất giống với hợp chất chikusetsusaponin IVa [26]. Số liệu phổ ^{13}C NMR của **CP4** được so sánh với các số liệu tương ứng đã công bố cho hợp chất chikusetsusaponin IVa (bảng 3.4). Sự tương đồng giữa các số liệu cho phép kết luận cấu trúc hóa học của hợp chất **CP4** là chikusetsusaponin IVa. Hợp chất này đã được phân lập từ loài *Panax stipuleanatus* [26].

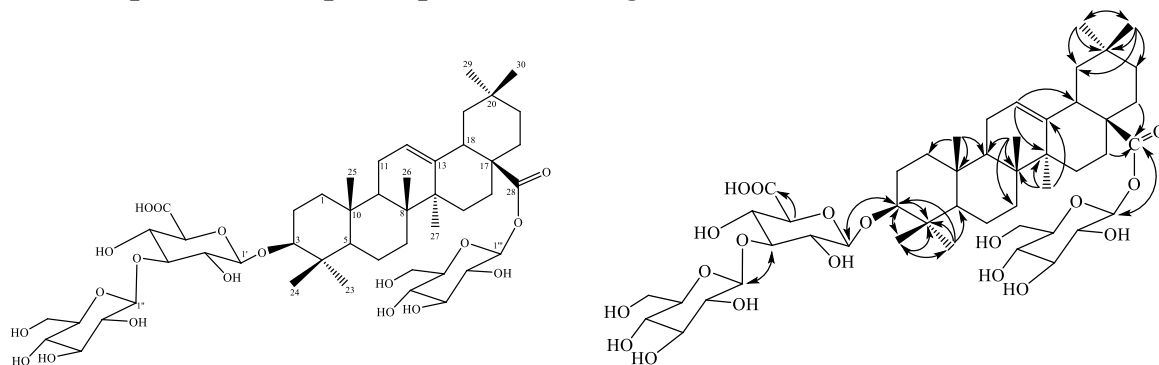
Bảng 3.4. Số liệu phổ NMR của hợp chất **CP4**

C	δ_{C}	$^a, b \delta_{\text{C}}$	DEPT	$^a, c \delta_{\text{H}}$ (độ bội, $J = \text{Hz}$)
1	39,8	39,8	CH ₂	1,02 (m)/1,62 (m)
2	26,8	26,8	CH ₂	1,71 (m)/2,01 (m)
3	90,8	90,7	CH	3,22 (dd, 4,0, 11,5)
4	40,1	40,1	C	-
5	57,0	57,0	CH	0,82 (m)
6	19,3	19,3	CH ₂	1,42 (m)/1,56 (m)
7	33,9	33,9	CH ₂	1,34 (m)/1,51 (m)
8	40,7	40,7	C	-
9	49,1	49,6	CH	1,60 (m)
10	37,8	37,8	C	-
11	24,5	24,0	CH ₂	1,91 (m)
12	123,8	123,8	CH	5,27 (br s)
13	144,8	144,8	C	-
14	42,9	42,9	C	-
15	28,9	28,9	CH ₂	1,11 (m)/1,82 (m)
16	23,8	23,9	CH ₂	1,74 (m)/2,07 (m)
17	48,0	48,0	C	-

18	42,8	42,6	CH	2,87 (br d, 10,5)
19	47,2	47,2	CH ₂	1,17 (m)/1,73 (m)
20	31,5	31,5	C	-
21	34,9	34,9	CH ₂	1,23 (m)/1,42 (m)
22	33,1	33,1	CH ₂	1,63 (m)/1,76 (m)
23	28,5	28,5	CH ₃	1,07 (s)
24	17,0	17,0	CH ₃	0,87 (s)
25	16,0	16,0	CH ₃	0,96 (s)
26	17,7	17,7	CH ₃	0,82 (s)
27	26,2	26,2	CH ₃	1,18 (s)
28	178,1	178,1	COOglc	
29	33,4	33,4	CH ₃	0,93 (s)
30	23,9	23,9	CH ₃	0,96 (s)
3-O-β-D-Glucuronopyranosyl				
1'	106,6	106,6	CH	4,35 (d, 7,5)
2'	75,5	75,5	CH	3,27 (m)
3'	78,0	78,0	CH	3,43 (m)
4'	73,7	73,7	CH	3,45 (m)
5'	76,5	76,5	CH	3,57 (m)
6'	176,9	177,0	COOH	
28-O-β-D-Glucopyranosyl				
1''	95,7	95,9	CH	5,40 (d, 7,5)
2''	73,9	73,9	CH	3,35 (m)
3''	78,3	78,3	CH	3,43 (m)
4''	71,2	71,1	CH	3,38 (m)
5''	78,7	78,6	CH	3,43 (m)
6''	62,5	62,4	CH ₂	3,70 (m)/3,83 (m)

^ađo trong CD₃OD, ^b125 MHz, ^c500 MHz, [#]δ_C: số liệu của chikusetsusaponin IVa [26]

3.2.5. Hợp chất CP5: spinasaponin A 28-O-glucoside



Hình 3.30. Cấu trúc hóa học và tương tác HMBC chính của hợp chất **CP5**

Hợp chất **CP5** thu được dưới dạng bột vô định hình màu trắng. Phổ ^1H và ^{13}C NMR của **CP5** cho phép nhận định đây là một hợp chất triterpen saponin. Phổ ^1H NMR xuất hiện tín hiệu của bảy nhóm methyl tại δ_{H} 0,82, 0,86, 0,95, 1,06 và 1,17 (mỗi tín 3H, s) cùng với δ_{H} 0,97 (6H, s); một proton olefin tại δ_{H} 5,27 (1H, br s); và ba proton anomeric tại δ_{H} 4,41 (1H, d, $J = 7,0$ Hz), 4,60 (1H, d, $J = 8,0$ Hz) và 5,40 (1H, d, $J = 8,0$ Hz) gợi ý sự có mặt của 3 đơn vị đường. Phổ ^{13}C NMR và HSQC của hợp chất **CP5** xuất hiện tín hiệu cộng hưởng của 48 carbon phù hợp với 30 carbon của khung triterpen và 18 carbon của 3 đơn vị đường hexose. Kết hợp phổ ^{13}C NMR với phổ ^1H NMR và HSQC cho phép xác định phần aglycone là triterpen khung oleanane với 7 nhóm methyl bậc 3, một liên kết đôi C-12/C-13 (δ_{C} 123,7/144,6), một nhóm carbonyl tại δ_{C} 178,1 (C-28) và một nhóm methine tại δ_{C} 90,7 (C-3). Tham khảo các tài liệu đã công bố về các hợp chất saponin đã phân lập trước đây, kết hợp với số liệu phổ NMR có thể nhận định 3 đơn vị đường bao 1 đơn vị đường D-glucuronic acid và 2 đơn vị đường β -D-glucose. Tương tác HMBC từ Glc H-1'' (δ_{H} 4,60) đến Glc A C-3' (δ_{C} 86,0), từ Glc A H-1' (δ_{H} 4,41) đến C-3 (δ_{C} 90,7) gợi ý chuỗi liên kết β -D-glucopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 3)-O- β -D-glucuronopyranoside, đồng thời xác định vị trí của chuỗi liên kết này tại C-3 của aglycone. Tương tác HMBC từ Glc H-1''' (δ_{H} 5,40) đến C-28 (δ_{C} 178,1) xác định vị trí đường β -D-glucopyranoside tại C-28 của aglycone.

Từ các phân tích trên, cấu trúc của **CP5** được nhận định là tương tự hợp chất spinasaponin A 28-O-glucoside. Do đó, số liệu phổ ^{13}C NMR của **CP5** được so sánh với các số liệu tương ứng đã công bố cho hợp chất spinasaponin A 28-O-glucoside [26] (bảng 3.5). Sự tương đồng giữa các số liệu cho phép kết luận hợp chất **CP5** có cấu trúc là spinasaponin A 28-O-glucoside. Hợp chất này đã được phân lập từ loài *Panax stipuleanatus* [26].

Bảng 3.5. Số liệu phổ NMR của **CP5** và hợp chất tham khảo

C	# δ_{C}	$^{a,b}\delta_{\text{C}}$	DEPT	$^{a,c}\delta_{\text{H}}$ (độ bội, $J = \text{Hz}$)
1	39,8	39,7	CH ₂	1,00 (m)/1,63 (m)
2	26,9	26,7	CH ₂	1,71 (m)/1,98 (m)
3	91,1	90,7	CH	3,21 (d, 11,0)
4	40,1	40,1	C	-
5	57,0	56,9	CH	0,82 (m)
6	19,2	19,2	CH ₂	1,41 (m)/1,56 (m)
7	33,9	33,8	CH ₂	1,33 (m)/1,50 (m)

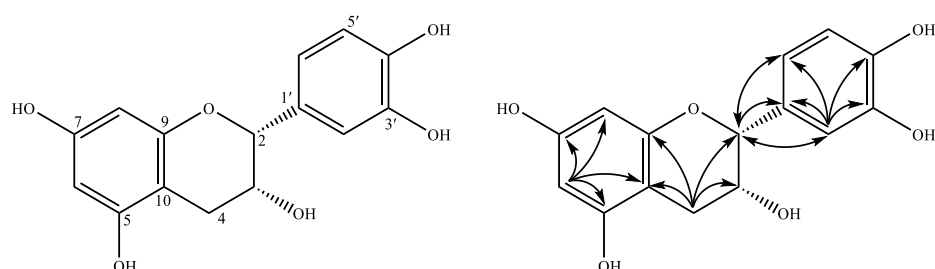
8	40,6	40,6	C	-
9	49,0	49,6	CH	1,60 (m)
10	37,8	37,8	C	-
11	24,5	24,5	CH ₂	1,90 (m)
12	123,7	123,7	CH	5,27 (br s)
13	144,8	144,6	C	-
14	42,9	42,8	C	-
15	28,8	28,8	CH ₂	1,11 (m)/1,80 (m)
16	24,0	23,9	CH ₂	1,74(m)/2,06 (m)
17	47,9	47,9	C	-
18	42,5	42,5	CH	2,88 (br d, 10,5)
19	47,2	47,1	CH ₂	1,19 (m)/1,72 (m)
20	31,5	31,4	C	-
21	34,8	34,8	CH ₂	1,23 (m)/1,41 (m)
22	33,0	33,0	CH ₂	1,64 (m)/1,76 (m)
23	28,5	28,4	CH ₃	1,06 (s)
24	16,9	17,0	CH ₃	0,86 (s)
25	16,0	16,0	CH ₃	0,97 (s)
26	17,7	17,6	CH ₃	0,82 (s)
27	26,4	26,3	CH ₃	1,18 (s)
28	177,9	178,1	C	
29	33,5	33,5	CH ₃	0,95 (s)
30	24,0	23,9	CH ₃	0,97 (s)
3-O-β-D-Glucuronopyranosyl				
1'	106,6	106,2	CH	4,41 (d, 7,0)
2'	74,6	74,6	CH	3,46 (m)
3'	86,5	86,0	CH	3,65 (m)
4'	71,7	72,6	CH	3,65 (m)
5'	76,2	77,1	CH	3,60 (m)
6'	171,0	171,1	C	-
β-D-Glucopyranosyl (1→3)-β-D-Glucuronopyranosyl				
1''	105,0	105,2	CH	4,60 (d, 8,0)
2''	75,4	75,2	CH	3,46 (m)
3''	78,1	78,6	CH	3,35 (m)
4''	71,5	71,0	CH	3,38 (m)
5''	77,6	78,1	CH	3,44 (m)
6''	62,6	62,6	CH ₂	3,70 (m)/3,82 (m)
28-O-β-D-Glucopyranosyl				

1'''	95,6	95,6	CH	5,40 (d, 8,0)
2'''	73,8	73,7	CH	3,35 (m)
3'''	78,2	78,5	CH	3,34 (m)
4'''	71,0	70,7	CH	3,38 (m)
5'''	78,6	79,1	CH	3,37 (m)
6'''	62,4	62,3	CH ₂	3,70 (m)/3,82 (m)

^ađo trong CD₃OD, ^b125 MHz, ^c500 MHz, *tín hiệu chồng chập

[#]δ_C của spinasaponin A 28-O-glucoside đo trong CD₃OD [26]

3.2.6. Hợp chất CP6: (-) Epicatechin



Hình 3.31. Cấu trúc hóa học và tương tác HMBC chính của hợp chất **CP6**

Hợp chất **CP6** phân lập được dưới dạng bột vô định hình màu vàng. Trên phổ ¹H-NMR của **CP6** thấy xuất hiện các tín hiệu proton thơm tại δ_H 5,95 (s), 5,98 (s), 6,79 (d, *J* = 8,5 Hz), 6,82 (d, *J* = 8,5 Hz) và 7,00 (s). Ngoài ra, còn xuất hiện tín hiệu của hai proton oxymethine tại δ_H 4,82 (br s) và 4,29*; và một proton methylene tại δ_H 2,76 (dd, *J* = 2,5, 17,0 Hz)/2,88 (dd, *J* = 4,5, 17,0 Hz).

Phổ ¹³C-NMR và HSQC của hợp chất **CP6** xuất hiện tín hiệu của 15 carbon đặc trưng cho một hợp chất flavan, bao gồm 12 carbon của hai vòng thơm tại δ_C 95,9, 96,4, 100,1, 115,3, 115,9, 119,4, 132,2, 145,7, 145,8, 157,2, 157,5 và 157,7; hai carbon oxymethine tại δ_C 67,4 và 79,8; và một carbon methylene tại δ_C 29,1.

Trên phổ HMBC xuất hiện tương tác giữa H-6 (δ_H 5,95) với C-5 (δ_C 157,5)/C-7 (δ_C 157,7)/C-8 (δ_C 96,4)/C-10 (δ_C 100,1); giữa H-4 (δ_H 2,76/2,88) với C-2 (δ_C 79,8)/C-3 (δ_C 67,4)/C-9 (δ_C 157,2)/C-10 (δ_C 100,1) gợi ý vị trí của các nhóm hydroxyl tại C-3, C-5 và C-7. Vị trí của các nhóm hydroxyl tại C-3', C-4' được xác định dựa trên tương tác HMBC giữa H-2' (δ_H 7,00) với C-1' (δ_C 132,2)/C-3' (δ_C 145,7)/C-4' (δ_C 145,8)/C-6' (δ_C 119,4) và độ chuyển dịch hóa học của C-3' (δ_C 145,7) và C-4' (δ_C 145,8). Tín hiệu proton tại vị trí H-2 dạng broad singlet khẳng định proton H-2 và H-3 cùng dạng β.

Số liệu phổ của hợp chất **CP6** tương đồng với các số liệu đã công bố cho hợp chất tham khảo (-)-epicatechin [27]. Vì vậy, cấu trúc của hợp chất **CP6** được xác định là (-)-epicatechin.

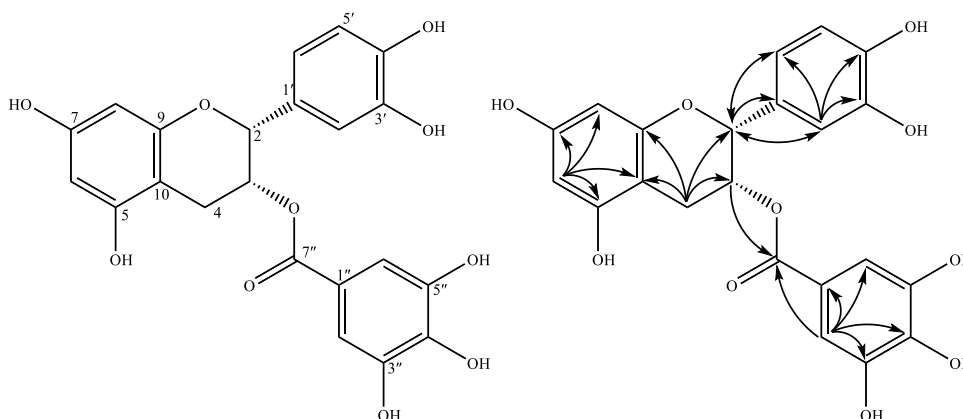
Bảng 3.6. Số liệu NMR của hợp chất **CP6** và hợp chất tham khảo

C	$\delta_C^{\#}$	$\delta_C^{a,b}$	$\delta_H^{a,c}$ (độ bội, $J = \text{Hz}$)
2	79,2	79,8	4,82 (br s)
3	67,0	67,4	4,29*
4	28,7	29,1	2,76 (dd, 2,5, 17,0) 2,88 (dd, 4,5, 17,0)
5	156,6	157,5	-
6	95,7	95,9	5,95 (s)
7	156,8	157,7	-
8	96,3	96,4	5,98 (s)
9	157,2	157,2	-
10	99,7	100,1	-
1'	131,8	132,2	-
2'	114,8	115,3	7,00 (s)
3'	145,1	145,7	-
4'	145,2	145,8	-
5'	115,7	115,9	6,79 (d, 8,5)
6'	119,1	119,4	6,82 (d, 8,5)

^ađo trong CD_3OD , ^b125 MHz, ^c500 MHz, * tín hiệu bị chập,

[#] δ_C của (-)-epicatechin đo trong acetone- d_6 [27].

3.2.7. Hợp chất CP7: (-)-epicatechin 3-O-gallate



Hình 3.32. Cấu trúc hóa học và tương tác HMBC chính của hợp chất **CP7**

Hợp chất **CP7** phân lập được dưới dạng bột vô định hình màu vàng. Trên phổ $^1\text{H-NMR}$ của hợp chất **CP7** thấy xuất hiện các tín hiệu proton thơm tại δ_H 6,00 (2H,

s), 6,98 (2H, s) cùng với một hệ ABX tại δ_H 6,97 (1H, d, $J = 2,0$ Hz), 6,73 (1H, d, $J = 8,0$ Hz) và 6,84 (1H, d, $J = 8,0; 2,0$ Hz). Ngoài ra, còn xuất hiện tín hiệu của hai proton oxymethine tại δ_H 5,05 (1H, br s) và 5,55 (1H, chồng chập); và một proton methylene tại δ_H 2,89 (dd, $J = 17,0; 2,0$ Hz)/3,02 (dd, $J = 17,0; 4,5$ Hz).

Phổ ^{13}C -NMR của hợp chất **CP7** xuất hiện tín hiệu của 22 carbon phù hợp với 15 carbon của khung flavonoid và 7 carbon của một nhóm coumaroyl. Phân tích kỹ số liệu phổ ^1H và ^{13}C -NMR gợi ý hợp chất **CP7** là một hợp chất flavan, tương tự hợp chất tham khảo (-)-epicatechin 3-*O*-gallate [28].

Khi so sánh số liệu phổ ^{13}C NMR của hợp chất **CP7** với hợp chất tham khảo (-)-epicatechin 3-*O*-gallate [29] (bảng 3.7) thấy có sự tương đồng giữa các số liệu. Vì vậy, cấu trúc của hợp chất **CP7** được xác định là (-)-epicatechin 3-*O*-gallate.

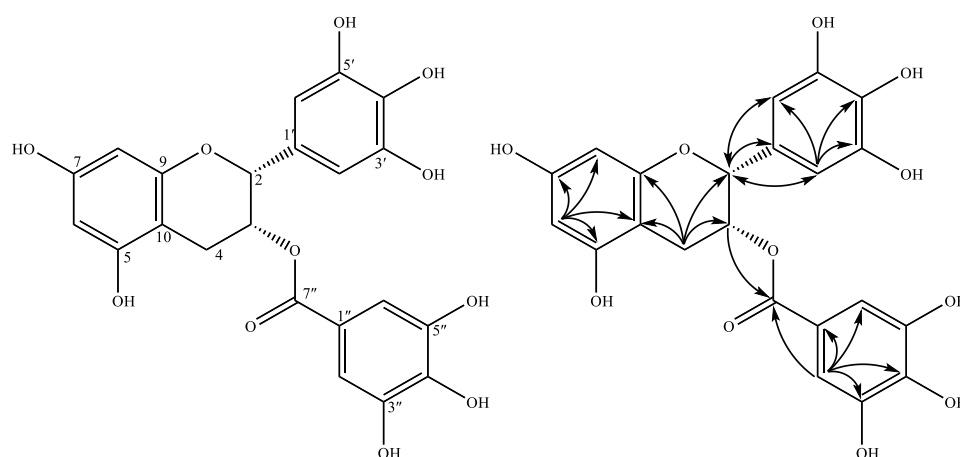
Bảng 3.7. Số liệu NMR của hợp chất **CP7** và hợp chất tham khảo

C	$\delta_C^{\#}$	$\delta_C^{a,b}$	$\delta_H^{a,c}$ (mult., $J = \text{Hz}$)
2	78,7	78,5	5,05 (br s)
3	70,0	70,0	5,55*
4	26,9	26,8	2,89 (dd, 2,0, 17,0) 3,02 (dd, 4,5, 17,0)
5	157,9	157,8	-
6	96,6	96,6	6,00 (s)
7	157,8	157,8	-
8	95,9	95,9	6,00 (s)
9	157,3	157,2	-
10	99,4	99,4	-
1'	131,5	131,4	-
2'	115,1	115,1	6,97 (d, 2,0)
3'	146,0	145,9	-
4'	146,0	145,9	-
5'	116,0	116,0	6,73 (d, 8,0)
6'	119,4	119,4	6,84 (dd, 2,0, 8,0)
1''	121,5	121,5	-
2'', 6''	110,3	110,2	6,98 (s)

3'', 5''	146,3	146,2	-
4''	139,9	139,7	-
7''	167,6	167,6	-

^ađo trong CD₃OD, ^b125 MHz, ^c500 MHz, *tín hiệu bị chập, [#]δ_C của (-)-epicatechin 3-O-gallate đo trong CD₃OD [29].

3.1.8. Hợp chất CP8: (-)-epigallocatechin 3-O-gallate



Hình 3.33. Cấu trúc hóa học và tương tác HMBC chính của hợp chất **CP8**

Hợp chất **CP8** phân lập được dưới dạng bột vô định hình màu vàng. Trên phổ ¹H-NMR của hợp chất **CP8** thấy xuất hiện các tín hiệu proton thơm tại δ_H 6,03 (2H, s), 6,57 (2H, s) và 7,00 (2H, s). Ngoài ra, còn xuất hiện tín hiệu của hai proton oxymethine tại δ_H 5,00 (br s) và 5,56*; và một proton methylene tại δ_H 2,09 (br d, *J* = 17,5 Hz)/3,01 (dd, *J* = 4,5, 17,5 Hz).

Phổ ¹³C-NMR và HSQC của hợp chất **CP8** xuất hiện tín hiệu của 22 carbon, trong đó có 13 carbon không liên kết trực tiếp với hydro; tám carbon methine; và một carbon methylene. Phân tích số liệu phổ ¹H-, ¹³C-NMR gợi ý hợp chất **CP8** là flavan, tương tự hợp chất tham khảo (-)-epigallocatechin 3-O-gallate [30]. Trên phổ HMBC xuất hiện tương tác giữa H-2' (δ_H 6,57) với C-3' (δ_C 146,5)/C-4' (δ_C 133,6)/C-6' (δ_C 106,9); H-6' (δ_H 6,57) với C-2' (δ_C 106,9)/C-4' (δ_C 133,6)/C-5' (δ_C 146,5) và độ chuyển dịch hóa học của C-3'/C-5' (δ_C 145,3), C-4' (δ_C 145,5) gợi ý vị trí của các nhóm hydroxyl tại C-3', C-4' và C-5'. Vị trí của các nhóm hydroxyl tại C-5 và C-7 được xác định dựa trên tương tác HMBC giữa H-6 (δ_H 6,03) với C-5 (δ_C 157,4)/C-7 (δ_C

157,5)/C-8 (δ_C 96,6)/C-9 (δ_C 157,0). Tương tác HMBC giữa H-4 (δ_H 2,90/3,01) với C-2 (δ_C 78,3)/C-3 (δ_C 69,8)/C-9 (δ_C 157,0)/C-10 (δ_C 99,4); giữa H-3 (δ_H 5,56) với C-7'' (δ_C 167,6); giữa H-2'' (δ_H 7,00) với C-1'' (δ_C 121,3)/C-3'' (δ_C 146,1)/C-4'' (δ_C 139,7)/C-6'' (δ_C 110,2)/C-7'' (δ_C 167,6); giữa H-6'' (δ_H 7,00) với C-1'' (δ_C 121,3)/C-2'' (δ_C 110,2)/C-4'' (δ_C 139,7)/C-5'' (δ_C 146,1)/C-7'' (δ_C 167,6) gợi ý vị trí của các nhóm hydroxyl tại C-3'', C-4'' và C-5''; nhóm carbonyl tại C-7''. Tín hiệu proton tại vị trí H-2 dạng broad singlet khẳng định proton H-2 và H-3 cùng dạng β .

So sánh số liệu phổ của hợp chất **CP8** với hợp chất tham khảo (-)-epigallocatechin 3-O-gallate [30] thấy tương tự. Vì vậy, cấu trúc của hợp chất **CP8** được xác định là (-)-epigallocatechin 3-O-gallate.

Bảng 3.8. Số liệu NMR của hợp chất **CP8** và hợp chất tham khảo

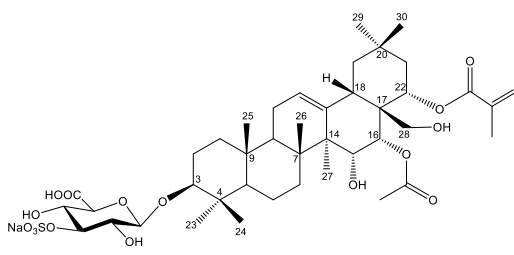
C	$\delta_C^{\#}$	$\delta_C^{a,b}$	$\delta_H^{a,c}$ (mult., J = Hz)
2	78,1	78,3	5,00 (br s)
3	69,2	69,8	5,56 (m)
4	26,6	26,6	2,90 (br d, 17,5) 3,01 (dd, 4,5, 17,5)
5	157,4	157,4	-
6	96,5	96,6	6,03 (s)
7	157,7	157,5	-
8	95,8	95,9	6,03 (s)
9	157,1	157,0	-
10	99,0	99,4	-
1'	130,7	130,7	-
2', 6'	106,8	106,9	6,57 (s)
3', 5'	146,2	146,5	-
4'	133,1	133,6	-
1''	121,9	121,3	-

2'', 6''	110,0	110,2	7,00 (s)
3'', 5''	145,9	146,1	-
4''	138,7	139,7	-
7''	166,0	167,6	-

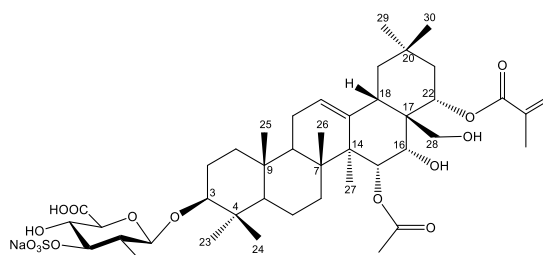
^ađo trong CD₃OD, ^b125 MHz, ^c500 MHz,

[#]δ_C của (-)-epigallocatechin 3-O-gallate đo trong acetone-d₆ [30].

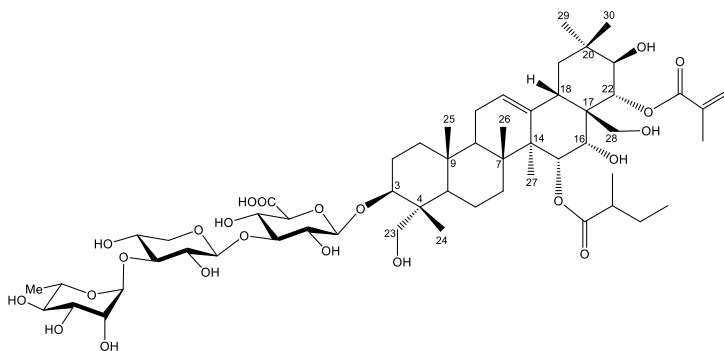
Như vậy: từ phân đoạn chiết ethyl acetate và nước của lá trà hoa vàng *C. phanii*, đã phân lập và xác định được cấu trúc hóa học 08 hợp chất trong đó có 3 hợp chất mới là camphanoside A-C (**CP1-CP3**) và 5 hợp chất đã biết là chikusetsusaponin IVa (**CP4**), spinasaponin A 28-O-glucoside (**CP5**), (-)-epicatechin (**CP6**), (-)-epicatechin 3-O-gallate (**CP7**), và (-)- epigallocatechin 3-O-gallate (**CP8**).



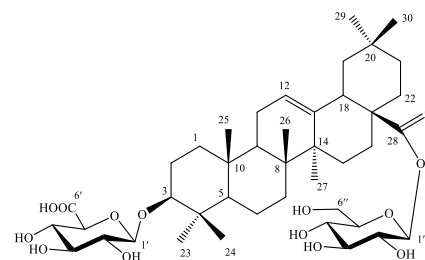
Camphanoside A (**CP1**)(hợp chất mới)



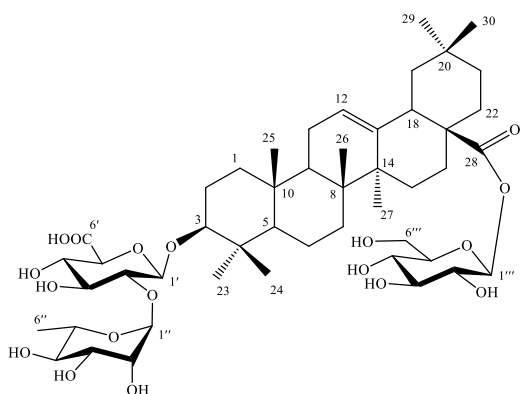
Camphanoside B (**CP2**) (hợp chất mới)



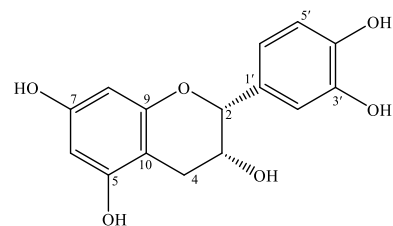
Camphanoside C (**CP3**) (hợp chất mới)



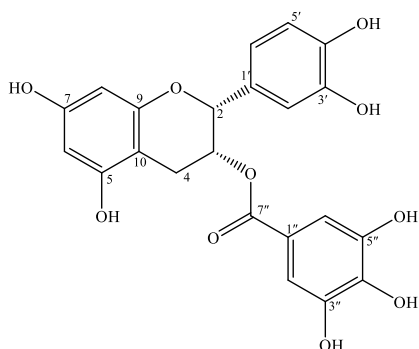
Chikusetsusaponin IVa (**CP4**)



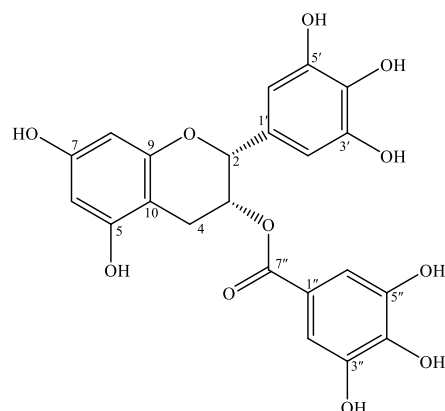
Spinasaponin A 28-O-glucoside (CP5)



(-) Epicatechin (CP6)



(-)-Epicatechin 3-O-gallate (CP7)



(-)-Epigallocatechin 3-O-gallate (CP8)

Hình 3.34. Cấu trúc hóa học của các hợp chất phân lập được

3.3. Hoạt tính ức chế enzym α -glucosidase của các hợp chất phân lập được

Các hợp chất **CP6-CP8** đã được phân lập trước đây từ loài *Camellia sinensis* var. *assamica* và đã được đánh giá về tác dụng ức chế α -glucosidase. Hợp chất (-)-Epicatechin 3-O-gallate (**CP7**) và (-)-Epigallocatechin 3-O-gallate (**CP8**) thể hiện hoạt tính ức chế mạnh enzyme α -glucosidase với IC_{50} tương ứng là $18,3 \pm 1,1$ và $21,9 \pm 0,8$ μ M, (acarbose có IC_{50} là $316,7 \pm 1,9$ μ M) [9].

Do đó, 5 hợp chất CP1-CP5 đã được đánh giá hoạt tính ức chế enzym α -glucosidase. Kết quả thể hiện trong bảng 3.9.

Bảng 3.9. Tác dụng ức chế enzyme α -glucosidase của các hợp chất **CP1-CP5**

Chất	Ức chế (%) tại 500 μ M	IC_{50} (μ M)
1	$94,7 \pm 4,0$	$230,7 \pm 18,0$
2	$92,1 \pm 5,2$	$251,4 \pm 22,7$

3	65,2±6,3	421,4±25,6
4	30,7±4,6	>500
5	21,9± 3,2	>500
Acarbose*	73,7± 8,4	190,3±16,1

Các hợp chất **CP1–CP5** ban đầu được đánh giá về hoạt tính ức chế đối với enzym α -glucosidase ở nồng độ 500 μ M. Acarbose được sử dụng làm chất đối chứng dương. Các thí nghiệm được tiến hành ba lần và kết quả được thể hiện dưới dạng phần trăm ức chế. Các hợp chất **CP1–CP3** cho thấy phần trăm ức chế α -glucosidase > 50%. Do đó, các hợp chất này được chọn để đánh giá thêm ở nồng độ từ 4 đến 500 μ M để xác định giá trị IC_{50} của chúng. Kết quả cho thấy các hợp chất **CP1–CP3** thể hiện khả năng ức chế α -glucosidase đáng kể với các giá trị IC_{50} lần lượt là 230,7±18,0, 251,4±22,7 và 421,4±25,6 μ M (acarbose: IC_{50} là 190,3±16,1 μ M) (Bảng 3.8). Dựa trên kết quả hoạt động ức chế enzym α -glucosidase và cấu trúc của các hợp chất **CP1–CP5**, có thể suy ra rằng sự có mặt của nhóm natri sulfonat trong phần đường và khung oleanane có nhiều oxy có thể đóng vai trò quan trọng trong quá trình ức chế enzym α -glucosidase. Ngoài ra, flavonoid là thành phần chính của *C. phanii*. Do đó, nghiên cứu này gợi ý rằng saponin và flavonoid từ *C. phanii* có thể là các thành phần ức chế α -glucosidase.

3.4. Hoạt tính ức chế enzyme α -amylase của các hợp chất phân lập được

Các hợp chất **CP1–CP8** ban đầu được đánh giá về hoạt tính ức chế đối với enzym α -amylase ở nồng độ 500 μ M. Acarbose được sử dụng làm chất đối chứng dương. Các thí nghiệm được tiến hành ba lần và kết quả được thể hiện dưới dạng phần trăm ức chế. Tất cả các hợp chất cho thấy phần trăm ức chế α -amylase < 50%. Do đó, các hợp chất này không tiếp tục được đánh giá hoạt tính ở các nồng độ thấp hơn để tính IC_{50} và được kết luận là không thể hiện hoạt tính ức chế enzyme α -amylase (bảng 3.10).

Bảng 3.10. Tác dụng ức chế enzyme α -amylase của các hợp chất **CP1–CP8** ở nồng độ 500 μ M

Hợp chất	% ức chế
CP1	7,14±0,72
CP2	19,66±1,85
CP3	10,73±1,78
CP4	11,48±0,07
CP5	17,09±1,46
CP6	12,61±1,44
CP7	17,42±1,58
CP8	19,75±1,26
Acarbose	62,78±1,60

Chương IV. KẾT LUẬN VÀ KIẾN NGHỊ

KẾT LUẬN

- Phân lập và xác định được cấu trúc của 08 hợp chất gồm 03 hợp chất mới là camphanoside A-C (**CP1-CP3**), cùng với 5 hợp chất đã biết là chikusetsusaponin IVa (**CP4**), spinasaponin A 28-O-glucoside (**CP5**), (-)-epicatechin (**CP6**), (-)-epicatechin 3-O-gallate (**CP7**), và (-)-epigallocatechin 3-O-gallate (**CP8**) từ phân đoạn chiết ethyl acetate và nước của lá Trà hoa vàng *C. phanii*.
- Đánh giá hoạt tính ức chế enzyme α -glucosidase của 5 hợp chất gồm 3 hợp chất mới camphanoside A-C (**CP1-CP3**), chikusetsusaponin IVa (**CP4**) và spinasaponin A 28-O-glucoside (**CP5**). Các hợp chất **CP1-CP3** thể hiện hoạt tính ức chế enzyme α -glucosidase với IC_{50} lần lượt là $230,7 \pm 18,0$; $251,4 \pm 22,7$ và $421,4 \pm 25,6$ μ M.
- Đánh giá hoạt tính ức chế enzyme α -amylase của 8 hợp chất **CP1-CP8**. Tuy nhiên tất cả các hợp chất đều chưa thể hiện hoạt tính ($IC_{50} > 500$ μ M).

KIẾN NGHỊ

Từ các kết quả nghiên cứu về thành phần hóa học và hoạt tính ức chế enzyme α -glucosidase và α -amylase trên, chúng tôi nhận thấy:

- Ba hợp chất mới camphanoside A-C (**CP1-CP3**) là các hợp chất có hoạt tính ức chế enzyme α -glucosidase, chúng có thể là các tác nhân tiềm năng trong việc phòng và điều trị bệnh tiểu đường. Do đó, cần tiến hành nghiên cứu sâu hơn về tác dụng chống tiểu đường của các hợp chất này trên mô hình *in vivo* để có thể ứng dụng chúng trong việc phát triển các sản phẩm hỗ trợ nâng cao cho sức khỏe cộng đồng.

- Đánh giá các hoạt tính sinh học khác của ba hợp chất mới như gây chống ung thư, kháng khuẩn, kháng nấm và chống virus.

CÔNG TRÌNH CÔNG BỐ LIÊN QUAN ĐẾN LUẬN VĂN

1. Hoang Thi Tuyen Lan, Vu Thi Xuan, Bui Thi Mai Anh, Nguyen Thi Mai, Nguyen Viet Dung, Bui Huu Tai, Nguyen Thi Minh Hang, Vu Mai Thao, and Nguyen Xuan Nhim, Oleanane-Type Triterpene Glycosides from *Camellia phanii* and Their α -Glucosidase Inhibitory Activity, *Chem. Biodiversity* 2024, e202400053.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- 1) Ninh, L. N. H., (2017) Nghiên cứu phân loại chi *Camellia* L. thuộc họ Chè – Theaceae ở Việt Nam. *Trường Đại học Khoa học Tự nhiên - Đại học Quốc gia Hà Nội, Luận án tiến sĩ.*
- 2) Đỗ Huy Bích, Đ. Q. C., Bùi Xuân Chương, Nguyễn Thượng Dong, Đỗ Trung Đàm, Phạm Văn Hiến, Vũ Ngọc Lộ, Phạm Duy Mai, Phạm Kim Mẫn, Đoàn Thị Nhu, Nguyễn Tập, Trần Toàn, (2003) Cây thuốc và động vật làm thuốc ở Việt Nam. *Nhà xuất bản Khoa học và Kỹ thuật.*
- 3) Bình, H. T. T., (2006) Nghiên cứu một số đặc điểm hóa học và tác dụng sinh học của các hợp chất polyphenol trong lá cây chè (*Camellia sinensis*) trồng ở Tân Cương (Thái Nguyên) và Xuân Mai (Hà Tây). *Trường Đại học Khoa học Tự nhiên - Đại học Quốc gia Hà Nội, Luận án tiến sĩ.*
- 4) Bình, H. T. T., (2010) Nghiên cứu sử dụng các hợp chất Polyphenol trong một số giống chè ở Việt Nam. *Đề tài của Liên hiệp các Hội khoa học và kỹ thuật Việt Nam.*
- 5) Tung, N. H., Ding, Y., Choi, E. M., Van Minh, C., and Kim, Y. H., (2009) New neolignan component from *Camellia amplexicaulis* and effects on osteoblast differentiation. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, 57, 65-68.
- 6) Vân, N. T. H., Ính, C. T., Bách, P. C., Tuyên, T. T., Thanh, N. T., Quỳnh, N. H., and Long, P. Q., (2018) Các hợp chất flavonoid glycoside phân lập từ hoa cây Trà hoa vàng *Camellia chrysantha*. *Vietnam Journal of Chemistry*, 56, 335-340.
- 7) Cuc, N. T., Nhiem, N. X., Tai, B. H., Phan, V. K., and Thu, V. K., (2020) Dihydrostilbene glycosides and lignan from *Camellia sasanqua*. *Vietnam Journal of Chemistry*, 58, 661-665.
- 8) Cuc, N. T., Cuong, N. T., Anh, L. T., Yen, D. T. H., Tai, B. H., Thu Trang, D., Yen, P. H., Kiem, P. V., Nam, N. H., and Minh, C. V., (2021) Dihydrostilbene glycosides from *Camellia sasanqua* and their α -glucosidase and α -amylase inhibitory activities. *Natural Product Research*, 35, 4025-4031.

- 9) Cuc, N. T., Cuong, N. T., Dung, D. T., Tai, B. H., Van Cuong, P., Van Minh, C., Van Kiem, P., Nhiem, N. X., and Ngoc, T. M., (2021) Four new dihydrostilbene glycosides and their α -glucosidase inhibitory effect from *Camellia sinensis* var. *assamica*. *Phytochemistry Letters*, 43, 103-107.
- 10) Cuc, N. T., Yen, D. T. H., Yen, P. H., Hang, D. T. T., Tai, B. H., Seo, Y., Namkung, W., Kim, S. H., Cuong, P. V., and Kiem, P. V., (2022) Dihydrostilbene glycosides from *Camellia sinensis* var. *assamica* and their cytotoxic activity. *Natural Product Research*, 36, 3931-3937.
- 11) Cuc, N. T., Nhiem, N. X., Tai, B. H., Yen, P. H., and Van Kiem, P., (2020) Flavonoids from *Camellia sinensis*. *Vietnam Journal of Chemistry*, 58, 40-44.
- 12) Cuc, N. T., Anh, L. T., Cuong, N. T., Anh, N. H., Nhiem, N. X., Tai, B. H., Hoai, N. T., Yen, P. H., Van Minh, C., and Van Kiem, P., (2020) Flavonol glycosides and their α -glucosidase inhibitory effect from *Camellia sinensis*. *Phytochemistry Letters*, 35, 68-72.
- 13) Itô, S. and Ogino, T., (1967) Two new triterpenes from *Camellia sinensis* and *Camellia sasanqua*. *Tetrahedron Letters*, 8, 1127-1132.
- 14) Davis, A. L., Lewis, J. R., Cai, Y., Powell, C., Davis, A. P., Wilkins, J. P., Pudney, P., and Clifford, M. N., (1997) A polyphenolic pigment from black tea. *Phytochemistry*, 46, 1397-1402.
- 15) Lewis, J. R., Davis, A. L., Cai, Y., Davies, A. P., Wilkins, J. P., and Pennington, M., (1998) Theaflavate B, isotheaflavin-3'-O-gallate and neotheaflavin-3-O-gallate: three polyphenolic pigments from black tea. *Phytochemistry*, 49, 2511-2519.
- 16) Anderson, R. A. and Polansky, M. M., (2002) Tea enhances insulin activity. *Journal of agricultural and food chemistry*, 50, 7182-7186.
- 17) Zhang, L., Ma, Z.-Z., Che, Y.-Y., Li, N., and Tu, P.-F., (2011) Protective effect of a new amide compound from Pu-erh tea on human micro-vascular endothelial cell against cytotoxicity induced by hydrogen peroxide. *Fitoterapia*, 82, 267-271.

- 18) Li, W.-X., Li, Y.-F., Zhai, Y.-J., Chen, W.-M., Kurihara, H., and He, R.-R., **(2013)** Theacrine, a purine alkaloid obtained from *Camellia assamica* var. *kucha*, attenuates restraint stress-provoked liver damage in mice. *Journal of agricultural and food chemistry*, 61, 6328-6335.
- 19) Qian Liu, J. L., Xingyun Chai, Yong Jiang, and Tu, P., **(2013)** Chemical constituents from Qianliang tea. *Journal of Chinese Pharmaceutical Sciences*, 22, 427-430.
- 20) Oh, J., Jo, S.-H., Kim, J. S., Ha, K.-S., Lee, J.-Y., Choi, H.-Y., Yu, S.-Y., Kwon, Y.-I., and Kim, Y.-C., **(2015)** Selected tea and tea pomace extracts inhibit intestinal α -glucosidase activity in vitro and postprandial hyperglycemia in vivo. *International journal of molecular sciences*, 16, 8811-8825.
- 21) Ninh, T. a. N., H., **(2009)** Các loài trà của vườn quốc gia Tam Đảo.
- 22) Ting, L., ZHANG, X.-d., SONG, Y.-w., and LIU, J.-w., **(2005)** A microplate-based screening method for alpha-glucosidase inhibitors. *Chinese Journal of Clinical Pharmacology and Therapeutics*, 10, 1128.
- 23) Wickramaratne, M. N., Punchihewa, J., and Wickramaratne, D., **(2016)** In-vitro alpha amylase inhibitory activity of the leaf extracts of *Adenanthera pavonina*. *BMC complementary and alternative medicine*, 16, 1-5.
- 24) Thi Cuc, N., Anh Bang, N., Huu Tai, B., Xuan Nhiem, N., Hai Yen, P., Thi Hai Yen, D., Thi Thu Hien, T., Thi Huyen, L., and Van Kiem, P., **(2023)** Five New Oleanane Triterpene Saponins from *Camellia petelotii* and their Alpha-glucosidase Inhibitory Activity. *Chemistry & Biodiversity*, 20, e202300093.
- 25) Gauthier, C., Legault, J., Lebrun, M., Dufour, P., and Pichette, A., **(2006)** Glycosidation of lupane-type triterpenoids as potent in vitro cytotoxic agents. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 14, 6713-6725.
- 26) Liang, C., Ding, Y., Nguyen, H. T., Kim, J.-A., Boo, H.-J., Kang, H.-K., Nguyen, M. C., and Kim, Y. H., **(2010)** Oleanane-type triterpenoids from *Panax stipuleanatus* and their anticancer activities. *Bioorganic & medicinal chemistry letters*, 20, 7110-7115.

- 27) Nishino, C., Enoki, N., Tawata, S., Mori, A., Kobayashi, K., and Fukushima, M., (1987) Antibacterial activity of Flavonoids against *Staphylococcus epidermidis*, a Skin Bacterium. *Agric. Biol. Chem.*, 51, 139-143.
- 28) Yang, L.-L., Chang, C.-C., Chen, L.-G., and Wang, C.-C., (2003) Antitumor Principle Constituents of *Myrica rubra* Var. *acuminata*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51, 2974-2979.
- 29) Khallouki, F., Haubner, R., Hull, W., Erben, G., Spiegelhalder, B., Bartsch, H., and Owen, R., (2007) Isolation, purification and identification of ellagic acid derivatives, catechins, and procyanidins from the root bark of *Anisophyllea dichostyla* R. Br. *Food and Chemical Toxicology*, 45, 472-485.
- 30) Davis, A. L., Cai, Y., Davies, A. P., and Lewis, J., (1996) ^1H and ^{13}C NMR assignments of some green tea polyphenols. *Magnetic resonance in Chemistry*, 34, 887-890.

Oleanane-Type Triterpene Glycosides from *Camellia phanii* and Their α -Glucosidase Inhibitory Activity

Hoang Thi Tuyet Lan,^[a] Vu Thi Xuan,^[a] Bui Thi Mai Anh,^[a] Nguyen Thi Mai,^{*,[a]} Nguyen Viet Dung,^[b] Bui Huu Tai,^[b] Nguyen Thi Minh Hang,^[b] Vu Mai Thao,^[b] and Nguyen Xuan Nhiem^{*,[b, c]}

Three new oleanane-type triterpene saponins, named camphanosides A–C (1–3), along with five known compounds, chikusetsusaponin IVa (4), spinasaponin A 28-O-glucoside (5), (–)-epicatechin (6), (–)-epicatechin 3-O-gallate (7), and (–)-epigallocatechin 3-O-gallate (8) were isolated from the leaves of *Camellia phanii* Hakoda & Ninh. Their structures were estab-

lished by 1D and 2D-NMR and mass spectral analysis and chemical methods. Moreover, compounds 1–5 were also evaluated for α -glucosidase inhibitory activity. Compounds 1–3 exhibited moderate α -glucosidase inhibitory activity with IC_{50} values of 230.7 ± 18.0 , 251.4 ± 22.7 , and $421.4 \pm 25.6 \mu\text{M}$, respectively.

Introduction

α -Glucosidase is an enzyme found in the small intestine that plays a crucial role in breaking down carbohydrates into simple sugars during digestion. α -Glucosidase plays a crucial role in the breakdown of carbohydrates into simple sugars during digestion. α -Glucosidase inhibitors are medications that target this enzyme, slowing down the digestion of carbohydrates and helping to control blood sugar levels after meals. Medicinal plants can exert inhibitory effects on α -glucosidase, which can help regulate blood sugar levels in individuals with diabetes.^[1]

Camellia phanii Hakoda & Ninh, a species of the *Camellia* genus, is among eight yellow *Camellia* species recently discovered in Tam Dao National Park, Vietnam.^[2] Previous studies on *Camellia* phytochemicals have highlighted the presence of saponins and phenolics, which exhibit beneficial activities such as α -glucosidase inhibition, cytotoxicity, antioxidant properties, and anti-inflammatory effects.^[3] Two major saponins and flavonoids have been reported in *Camellia* species,^[4] but the chemical constituents and biological activities of *C. phanii* remain unexplored. In our ongoing exploration of bioactive compounds from the *Camellia* genus, we present the isolation of three new oleanane triterpene glycosides (1–3) and five known compounds (4–8) from the *C. phanii* leaves (Fig-

ure 1). Furthermore, the α -glucosidase inhibitory activity of these isolated compounds were also evaluated.

Results and Discussion

The dried leaves of *C. phanii* were sonicated with hot methanol (MeOH) and then evaporated under reduced pressure to give MeOH extract. The MeOH extract was partitioned in water and then successively partitioned with *n*-hexane, dichloromethane (CH_2Cl_2), and ethyl acetate (EtOAc) to provide the corresponding *n*-hexane (CL1), CH_2Cl_2 (CL2), EtOAc (CL3), and water (CL4) layers. Using chromatographic methods such as silica gel, RP-18, and HPLC, three new and five known compounds were isolated. The known compounds were elucidated to be chikusetsusaponin IVa (4), spinasaponin A 28-O-glucoside (5),^[5] (–)-epicatechin (6), (–)-epicatechin 3-O-gallate (7), and (–)-epigallocatechin 3-O-gallate (8),^[6a] which were in good agreement in the literature.

Compound 1 was obtained as a white amorphous powder. Its molecular formula was determined to be $\text{C}_{61}\text{H}_{102}\text{O}_{16}\text{SNa}$ by the HR-ESI-MS ion at m/z 915.3777 $[\text{M} + \text{Na}]^+$ (Calcd. for $[\text{C}_{61}\text{H}_{102}\text{O}_{16}\text{SNa}]^+$, 915.3783). The ^1H -NMR spectrum of 1 showed proton signals of nine tertiary methyl groups at δ_{H} 0.85, 0.99, 1.01, 1.06, 1.07, 1.08, 1.38, 1.91, and 2.12 (each 3H, s), one secondary methyl group at δ_{H} 1.96 (3H, d, $J = 6.0$ Hz) and one olefinic proton at δ_{H} 5.49–5.51 (1H, m), which indicated the presence of an olean-12-ene aglycone. In addition, an anomeric proton at δ_{H} 4.44–4.46 (1H, d, $J = 7.8$ Hz) showed the presence of a monosaccharide moiety. The ^{13}C -NMR and HSQC spectra exhibited signals of 43 carbons, including 30 from an oleanane triterpene skeleton, 6 from a monosaccharide group, 5 from an angeloyl group, and 2 from an acetoxy group. Analysis of NMR data of 1 indicated its structure was similar to that of campeteloside A,^[6] except for an addition of the acetoxy group at C-22. This was confirmed by the down-field chemical shifts of H-16 (δ_{H} 5.43–5.44)/C-16 (δ_{C} 76.8) and addition signals of the acetoxy group [Me δ_{H} 2.12/ δ_{C} 22.2/CO (δ_{C} 171.7)] and further

[a] H. T. T. Lan, V. T. Xuan, B. T. M. Anh, N. T. Mai
University of Transport and Communications, 3 Cau Giay, Dong Da, Hanoi 11512, Vietnam
E-mail: maiht@uttc.edu.vn

[b] N. V. Dung, B. H. Tai, N. T. M. Hang, V. M. Thao, N. X. Nhiem
Institute of Marine Biochemistry, Vietnam Academy of Science and Technology (VAST), 18 Hoang Quoc Viet, Cau Giay, Hanoi 10072, Vietnam

[c] N. X. Nhiem
Graduate University of Science and Technology, VAST, 18 Hoang Quoc Viet, Cau Giay, Hanoi 10072, Vietnam
E-mail: nxnhiem@yahoo.com

Supporting information for this article is available on the WWW under <https://doi.org/10.1002/cbdv.202400033>

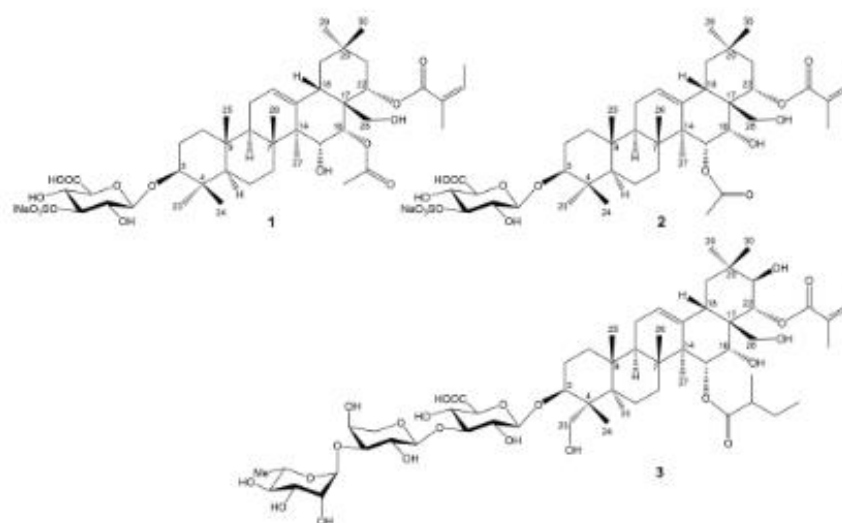


Figure 1. Chemical structures of compounds 1–3.

confirmed by HMBC correlations between H-2' (δ_H 2.12) and C-1' (δ_C 171.7) and COSY correlation of H-15 (δ_H 4.03–4.04)/H-16 (δ_H 5.43–5.44) and between H-16 (δ_H 5.43–5.44) and C-1' (δ_C 171.7) and COSY correlation of H-15 (δ_H 4.03–4.04)/H-16 (δ_H 5.43–5.44) (Figure 2). The HMBC correlations from H-5' (δ_H 1.91)

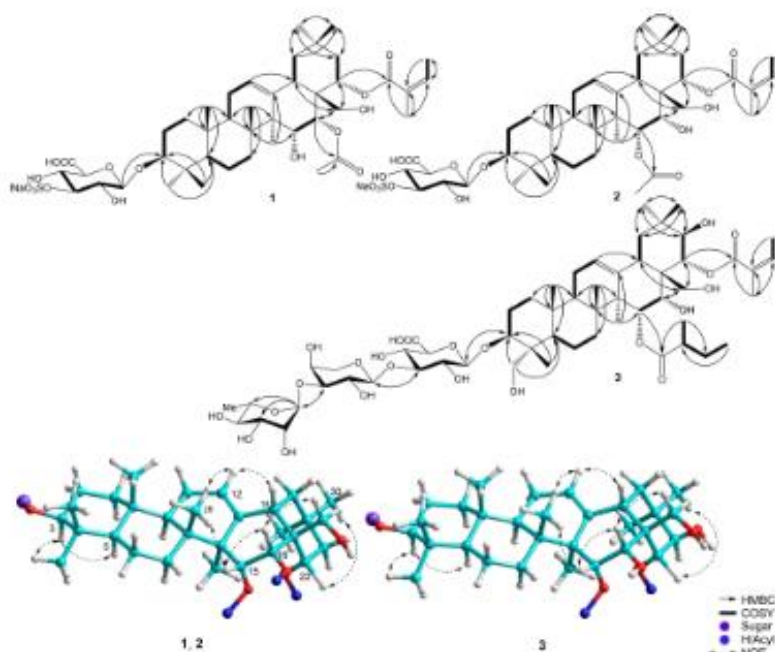


Figure 2. The key HMBC, COSY, and NOESY correlations of compounds 1–3.

to C-1'' (δ_c 169.1)/C-2'' (δ_c 129.9)/C-3'' (δ_c 138.3) and from H-4'' (δ_H 1.95–1.96) to C-2'' (δ_c 129.9)/C-3'' (δ_c 138.3) and NOESY correlation of H-3'' (δ_H 6.01–6.02)/H-5'' (δ_H 1.91) indicated the presence of an angeloyl group. The position of the angeloyl group at C-22 of oleanane-type aglycone was confirmed by HMBC correlation from H-22 (δ_H 5.46–5.48) to C-1'' (δ_c 169.1). The oxygenated group at C-3 was confirmed by HMBC correlations from H-23 (δ_H 1.07)/H-24 (δ_H 0.85) to C-3 (δ_c 90.6)/C-4 (δ_c 40.1)/C-5 (δ_c 56.6). The NOESY correlations of H-3 (δ_H 3.22–3.26) and H-5 (δ_H 0.80–0.82)/H-23 (δ_H 1.07); and H-24 (δ_H 0.85) and H-25 (δ_H 1.01) indicated the α -orientations of H-3 and H-5 and the β -orientation of the methyl group at C-10. NOESY correlations of H-18 (δ_H 2.58–2.60) and H-30 (δ_H 1.08) suggested the β -orientation of C-30. Furthermore, the β -orientations of H-15, H-16, and H-22 were also confirmed by the NOESY correlations between H-15 (δ_H 4.03–4.04) and H₂-28 (δ_H 3.39–3.41); H-16 (δ_H 5.43–5.44) and H₂-28 (δ_H 3.26–3.28); and H-22 (δ_H 5.46–5.48) and H-30 (δ_H 1.08). Acid hydrolysis of **1** yielded D-glucuronic acid, which was shown as the positive optical rotation and TLC analysis and in comparison with the authentic monosaccharide. The large coupling constant between H-1''' and H-2''' (J = 7.8 Hz) suggested the β -form of the glucuronopyranosyl moiety. In addition, the formation of a white precipitate (BaSO₄) after acid hydrolysis confirmed the presence of the sulfate anion. The (3-O-sulfonato)glucuronopyranosyl moiety was established through COSY cross-peaks of H-1''' (δ_H 4.44–4.46)/H-2''' (δ_H 3.45–3.47)/H-3''' (δ_H 4.27–4.29)/H-4''' (δ_H 3.65–3.67) and the downfield-shifted chemical shift of C-3''' (δ_c 85.5). The position of sugar moiety at C-3 of oleanane aglycone was confirmed by HMBC correlation from H-1''' (δ_H 4.44–4.46) to C-3 (δ_c 90.6). Consequently, the structure **1** was elucidated to be 16 α -acetoxy-22 α -angeloxy-3 β ,15 α ,28-trihydroxyolean-12-ene 3-O- β -D-(3-O-sulfonato sodium)glucuronopyranoside and named camphanoside A (Table 1).

Compound **2** was obtained as a white amorphous powder with a molecular formula of C₄₅H₇₀O₁₆Na, determined by the HR-ESI-MS at m/z 915.3795 [M + Na]⁺ (Calcd. for [C₄₅H₇₀O₁₆Na]⁺, 915.3783). The ¹H-NMR spectrum of **2** showed proton signals of nine tertiary methyl groups at δ_H 0.85, 0.94, 1.00, 1.04, 1.06, 1.09, 1.61, 1.89, and 2.09 (each 3H, s), along with one secondary methyl group at δ_H 1.96–1.97 (3H, d, J = 6.0 Hz) and two olefinic protons at δ_H 5.49–5.50 (1H, m) and 5.50–5.51 (1H, m). Additionally, an anomeric proton at δ_H 4.45–4.47 (1H, d, J = 7.8 Hz) indicated the presence of a sugar moiety. The ¹³C-NMR and HSQC spectra displayed signals of 43 carbons, including 30 from an oleanane triterpene skeleton, 6 from a glucuronopyranosyl group, 5 from an angeloyl group, and 2 from an acetoxy group. Analysis of NMR data indicated its structure was similar to that of camphanoside A (**1**), except for a shift of the acetoxy group from C-16 to C-15. This was confirmed by the down-field chemical shifts of H-15 (δ_H 5.01–5.02)/C-15 (δ_c 73.3) and HMBC correlations between H-2' (δ_H 2.09)/H-15 (δ_H 5.01–5.02) and C-1' (δ_c 172.7). The position of the angeloxy group at C-22 was confirmed by HMBC correlations from H-22 (δ_H 5.46–5.48) to C-1'' (δ_c 169.7). The oxygenated group at C-3 was suggested by HMBC correlations between H-23 (δ_H 1.07)/H-24 (δ_H 0.85) and C-3 (δ_c 90.6)/C-4 (δ_c 40.1)/C-5 (δ_c

56.3). The α -orientation of H-3 was determined by the observations of NOESY correlations of H-3 (δ_H 3.23–3.25) and H-5 (δ_H 0.80–0.82). Furthermore, the β -orientations of H-15, H-16 and H-22 were also confirmed by the NOESY correlations between H-15 (δ_H 5.01–5.02) and H₂-28 (δ_H 3.39–3.41)/H-16 (δ_H 4.09–4.10); H₂-28 (δ_H 3.16–3.18)/H-30 (δ_H 1.06) and H-18 (δ_H 2.62–2.64); and between H-22 (δ_H 5.46–5.48) and H-30 (δ_H 1.06). Similar to that of **1**, the sugar moiety was determined to be (3-O-sulfonato sodium) glucuronopyranosyl moiety by acid hydrolysis method. The position of the sugar moiety at C-3 of the oleanane aglycone was confirmed by HMBC correlation between H-1''' (δ_H 4.45–4.47) and C-3 (δ_c 90.6). Thus, the structure of **2** was elucidated to be 16 α -acetoxy-22 α -angeloxy-3 β ,15 α ,28-trihydroxyolean-12-ene 3-O- β -D-(3-O-sulfonato sodium) glucuronopyranoside and named camphanoside B.

Compound **3** was obtained as a white amorphous powder. Its molecular formula was determined to be C₅₇H₉₀O₂₃ using HR-ESI-MS with an ion peak at m/z 1141.5763 [M – H][–] (Calcd. for [C₅₇H₉₀O₂₃][–], 1141.5800). The ¹H-NMR spectrum revealed signals corresponding to seven tertiary methyl groups at δ_H 0.71, 1.00, 1.01, 1.02, 1.03, 1.61 and 1.92 (each 3H, s), three secondary methyl groups at δ_H 1.18–1.19 (3H, d, J = 7.2 Hz), 1.25–1.27 (3H, d, J = 6.6 Hz), and 1.98–1.99 (3H, d, J = 7.2 Hz), one primary methyl groups at δ_H 0.95–0.96 (3H, t, J = 7.2 Hz), two olefinic protons at δ_H 5.53–5.55 (1H, m) and 6.04–6.05 (1H, q, J = 6.0 Hz), and three anomeric protons at δ_H 4.49–4.51 (1H, d, J = 7.8 Hz), 4.53–4.55 (1H, d, J = 7.8 Hz), and 5.08 (1H, br s). The ¹³C-NMR and HSQC spectra demonstrated signals of 54 carbons, including 30 of an oleanane triterpene skeleton, 17 carbons of trisaccharide units, 5 of an angeloyl group, and 5 of a 2-methylbutanoyl group. Similar to **1** and **2**, compound **3** was recognized to be an oleanane triterpene saponin by the analysis of ¹H- and ¹³C-NMR data. The NMR spectra of **3** were almost similar to those of 22 α -O-angeloyl-16 α ,21 β ,23,28-tetrahydroxy-15 α -O-(3-methylbutanoyl)olean-12-ene 3 β -O- α -L-rhamnopyranosyl-(1→3)- α -L-arabinopyranosyl-(1→3)- β -D-glucuronopyranoside²¹ except for difference of the substitution group at C-15. The chemical shifts at C-1' (δ_c 177.9), C-2' (δ_c 42.7)/H-2' (δ_H 2.44–2.46), C-3' (δ_c 27.2)/H-3' (δ_H 1.47–1.49 and 1.76–1.78), C-4' (δ_c 12.1)/H-4' (δ_H 0.95–0.96), and C-5' (δ_c 16.9)/H-5' (δ_H 1.18–1.19) indicated the presence of 2-methylbutanoyl group. The position of this group at C-15 of oleanane aglycone was confirmed by HMBC correlation between H-15 (δ_H 5.08–5.09) and C-1' (δ_c 177.9). Furthermore, the sugar components were identified as D-glucose, L-rhamnose and L-arabinose by identifying as TMS derivatives by GC method.²¹ In the HMBC spectrum of **3**, the correlations between H-1''' (δ_H 4.49–4.51) and C-3 (δ_c 82.0); H-1''' (δ_H 4.53–4.55) and C-3''' (δ_c 86.1); H-1''' (δ_H 5.08) and C-3''' (δ_c 80.7) confirmed that sugar linkage to be O- α -L-rhamnopyranosyl-(1→3)- α -L-arabinopyranosyl-(1→3)- β -D-glucuronopyranoside and at C-3 of oleanane aglycone. The HMBC correlations between H-24 (δ_H 0.71) and C-3 (δ_c 82.0)/C-4 (δ_c 43.8)/C-5 (δ_c 47.6)/C-23 (δ_c 65.0) indicated the positions of oxygenated and hydroxymethylene groups at C-3 and C-4, respectively. The *axial* orientation of H-3 (α -configuration) was confirmed by NOESY correlations between H-3 (δ_H 3.70–3.72) and H-5 (δ_H 1.20–1.22)/H-23 (δ_H 3.05–3.07 and 3.61–3.63). HMBC

Table 1. ^1H and ^{13}C NMR data for compounds 1–3.

Table 1. ¹ H and ¹³ C NMR data for compounds 1–3.						
C	1		2		3	
	δ _C	δ _H (mult., J, in Hz)	δ _C	δ _H (mult., J, in Hz)	δ _C	δ _H (mult., J, in Hz)
Aglycone						
1	40.2	1.02–1.04 (m)/1.65–1.67 (m)	40.1	1.02–1.04 (m)/1.65–1.67 (m)	39.8	1.01–1.03 (m)/1.62–1.64 (m)
2	26.9	1.70–1.72 (m)/1.97–1.99 (m)	26.8	1.70–1.72 (m)/1.99–2.01 (m)	26.2	1.75–1.77 (m)/1.99–2.01 (m)
3	90.6	3.22–3.26 (dd, 4.2, 12.0)	90.6	3.23–3.25 (dd, 4.2, 12.0)	82.0	3.70–3.72 (dd, 4.2, 11.6)
4	40.1	–	40.1	–	43.8	–
5	56.6	0.80–0.82 (br d, 11.4)	56.3	0.80–0.82 (br d, 11.4)	47.6	1.20–1.22 (m)
6	19.6	1.41–1.43 (m)/1.55–1.58 (m)	19.6	1.41–1.43 (m)/1.55–1.57 (m)	19.1	1.37–1.39 (m)/1.45–1.47 (m)
7	37.4	1.74–1.76 (m)	36.3	1.12–1.15 (m)/1.77–1.79 (m)	36.3	1.12–1.14 (m)/1.85–1.88 (m)
8	42.4	–	42.5	–	42.5	–
9	48.2	1.60–1.63 (m)	48.1	1.61–1.64 (m)	48.0	1.68–1.71 (m)
10	37.8	–	37.8	–	37.7	–
11	24.7	1.96–1.98 (m)	24.6	1.95–1.98 (m)	24.7	1.96–1.98 (m)
12	127.4	5.49–5.51 (m)	126.9	5.49–5.50 (m)	127.6	5.53–5.55 (m)
13	143.3	–	143.5	–	142.8	–
14	48.0	–	47.7	–	48.0	–
15	68.4	4.03–4.04 (d, 4.2)	73.3	5.01–5.02 (d, 4.2)	72.9	5.08–5.09 (d, 4.2)
16	76.8	5.43–5.44 (d, 4.2)	72.3	4.09–4.10 (d, 4.2)	72.0	3.90–3.91 (m)
17	45.3	–	46.0	–	49.1	–
18	42.4	2.58–2.60 (dd, 4.8, 14.4)	42.2	2.62–2.64 (dd, 5.4, 14.4)	41.7	2.69–2.71 (m)
19	47.5	1.20–1.22 (m) 2.63–2.65 (m)	47.6	1.10–1.12 (m) 2.52–2.54 (dd, 12.0, 12.0)	47.9	1.19–1.21 (m) 2.61–2.63 (m)
20	32.4	–	32.4	–	37.2	–
21	41.9	1.61–1.63 (m)	41.8	1.55–1.59 (m) 2.35–2.37 (dd, 11.4, 11.4)	77.8	4.31–4.32 (d, 10.2)
22	72.0	5.46–5.48 (m)	72.7	5.46–5.48 (m)	76.1	5.38–5.40 (d, 10.2)
23	28.4	1.07 (s)	28.4	1.09 (s)	65.0	3.05–3.07 (d, 10.8)/3.61–3.63 (d, 10.8)
24	17.0	0.85 (s)	17.0	0.85 (s)	13.4	0.71 (s)
25	16.3	1.01 (s)	16.2	1.00 (s)	16.7	1.03 (s)
26	17.8	1.06 (s)	17.9	1.04 (s)	17.9	1.01 (s)
27	20.6	1.38 (s)	21.7	1.61 (s)	21.7	1.61 (s)
28	64.4	3.26–3.28 (d, 10.8) 3.39–3.41 (d, 10.8)	63.1	3.16–3.18 (d, 10.8) 3.39–3.41 (d, 10.8)	63.4	3.04–3.06 (d, 10.8) 3.36–3.38 (d, 10.8)
29	33.7	0.99 (s)	28.4	0.94 (s)	19.0	1.02 (s)
30	25.0	1.08 (s)	25.2	1.06 (s)	29.9	1.00 (s)
	16-OAc		15-OAc		15-OMe	
1'	171.7	–	172.7	–	177.9	–
2'	22.2	2.12 (s)	21.8	2.09 (s)	42.7	2.44–2.46 (m)
3'					27.2	1.47–1.49 (m) 1.76–1.78 (m)
4'					12.1	0.95–0.96 (t, 7.2)
5'					16.9	1.18–1.19 (d, 7.2)
22-OAng						
1''	169.1	–	169.7	–	170.8	–
2''	129.9	–	130.0	–	129.7	–
3''	138.3	6.01–6.02 (q, 6.0)	137.6	5.50–5.51 (q, 5.4)	138.4	6.04–6.05 (q, 6.0)
4''	15.8	1.95–1.96 (d, 6.0)	15.9	1.96–1.97 (d, 7.2)	16.0	1.98–1.99 (d, 7.2)
5''	20.9	1.91 (s)	20.9	1.89 (s)	20.9	1.92 (s)

Table 1. continued						
C	δ_c	1 δ_H (mult., J , in Hz)	2 δ_c	2 δ_H (mult., J , in Hz)	3 δ_c	3 δ_H (mult., J , in Hz)
Aglycone						
3-OGIA						
1 ^{'''}	106.4	4.44–4.46 (d, 7.8)	106.3	4.45–4.47 (d, 7.8)	104.7	4.49–4.51 (d, 7.8)
2 ^{'''}	74.5	3.45–3.47 (dd, 7.8, 8.4)	74.4	3.45–3.47 (dd, 7.8, 9.0)	74.5	3.44–3.46 (dd, 7.8, 8.4)
3 ^{'''}	85.5	4.27–4.29 (t, 8.4)	85.4	4.27–4.29 (t, 9.0)	86.1	3.62–3.64 (m)
4 ^{'''}	72.3	3.65–3.67 (m)	72.3	3.65–3.67 (m)	72.1	3.54–3.56 (t, 9.0)
5 ^{'''}	77.3	3.64–3.66 (m)	77.1	3.65–3.67 (m)	76.8	3.62–3.64 (m)
6 ^{'''}	176.4	–	176.4	–	176.6	–
3 ^{'''} -OXyl						
1 ^{'''}					105.4	4.53–4.55 (d, 7.8)
2 ^{'''}					72.0	3.79–3.81 (m)
3 ^{'''}					80.7	3.61–3.63 (m)
4 ^{'''}					69.8	3.90–3.92 (m)
5 ^{'''}					67.9	3.63–3.65 (m)
						3.92–3.94 (m)
3 ^{'''} -ORha						
1 ^{'''}					103.6	5.08 (br s)
2 ^{'''}					72.1	3.98–3.99 (br d, 3.0)
3 ^{'''}					72.0	3.89–3.91 (m)
4 ^{'''}					74.1	3.39–3.41 (t, 9.0)
5 ^{'''}					70.2	3.79–3.81 (m)
6 ^{'''}					18.0	1.25–1.27 (d, 6.6)

Assignments were done by HSQC, HMBC, COSY, and NOESY experiments. GIA, glucopyranosyl, Xyl, xylopyranosyl, Rha, rhamnopyranosyl, Ang, angeloyl, Ac, Acetyl, Mb, 2-methylbutanoyl.

correlations between H-29 (δ_H 1.02)/H-30 (δ_H 1.00) and C-19 (δ_C 47.9)/C-20 (δ_C 37.2)/C-21 (δ_C 77.8), between H-22 (δ_H 5.38–5.40) and C-16 (δ_C 72.0)/C-17 (δ_C 49.1)/C-28 (δ_C 63.4)/C-1^{'''} (δ_C 170.8) indicated the presence of the hydroxyl and the angeloxy groups at C-21 and C-22, respectively. In addition, the large coupling constant between H-21 and H-22 (J = 10.2 Hz) indicated the configuration of these groups is *trans*. Additionally, the β -orientations of H-15, H-16, and H-22 were confirmed through NOESY correlations of H-15 (δ_H 5.08–5.09) and H-26 (δ_H 1.01), H-21 (δ_H 4.31–4.32) and H-29 (δ_H 1.02). Based on the above evidence, the structure of **3** was determined to be 15 α -acetoxy-22 α -angeloxy-3 β ,21 β ,23,28-tetrahydroxyolean-12-ene 3-O- α -L-rhamnopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 3)- α -L-arabinopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 3)- β -D-glucuronopyranoside and named camphanoside C.

Compounds **6–8** have been previously reported from *Camellia sinensis* var. *assamica*.^{14b} These compounds were also evaluated for α -glucosidase inhibitory effect. Thus, compounds **1–5** were initially assessed for their inhibitory activity against α -glucosidase at a concentration of 500 μ M. Acarbose was used as a positive control. The experiments were conducted in triplicate, and the results were expressed as the inhibition percentage. Compounds **1–3** showed α -glucosidase inhibitory percentages > 50%. Therefore, these compounds were selected

for further evaluation at concentrations ranging from 4 to 500 μ M to determine their IC_{50} values. As results, compounds **1–3** exhibited moderate α -glucosidase inhibition with IC_{50} values of 230.7 ± 18.0 , 251.4 ± 22.7 , and 421.4 ± 25.6 μ M, respectively (acarbose: IC_{50} of 190.3 ± 16.1 μ M) (Table 2). Based on the results of α -glucosidase inhibitory activity and the structures of compounds **1–5**, it can be inferred that the presence of a sulfonate sodium group in the sugar moiety and a highly

Table 2. The α -glucosidase inhibitory effect of compounds **1–3** from *C. phanix*.

Compounds	Inhibition (%) at 500 μ M	IC_{50} (μ M)
1	94.7 $\pm$ 4.0	230.7 $\pm$ 18.0
2	92.1 $\pm$ 5.2	251.4 $\pm$ 22.7
3	65.2 $\pm$ 6.3	421.4 $\pm$ 25.6
4	30.7 $\pm$ 4.6	> 500
5	21.9 $\pm$ 3.2	> 500
Acarbose*	73.7 $\pm$ 8.4	190.3 $\pm$ 16.1

Data are means of three experiments. *Acarbose was used as a positive control.

oxygenated oleanane framework may play a crucial role in α -glucosidase inhibition. In addition, flavonoids are main components of *C. phanii*. Thus, this study suggested saponins and flavonoids from *C. phanii* could be an α -glucosidase inhibitory components.

Conclusions

The yellow flower tea, *Camellia phanii* Hakoda & Ninh is an endemic species in Vietnam. Phytochemical investigation of *C. phanii* led to the isolation of three new oleanane-type triterpene saponins, camphanosides A–C (1–3), along with five known compounds. Compounds 1–3 exhibited significant α -glucosidase inhibitory activity with IC_{50} values of 230.7 ± 18.0 , 251.4 ± 22.7 , and $421.4 \pm 25.6 \mu\text{M}$, respectively. The results suggested that compounds from *C. phanii* could be used for treatment of type II diabetes.

Experimental Section

General

Chemical shifts are reported in parts per million from TMS. All NMR spectra were recorded on a Bruker AM500 NMR or Bruker Avance III spectrometers. Data processing was carried out with the MestReNova ver.12.0 program. High resolution mass data were obtained from Korea Basic Science Institute (KBSI, Metropolitan Seoul Center). Optical rotations were determined on a Jasco DIP-370 automatic polarimeter. Preparative HPLC was carried out using an AGILENT 1110 HPLC system using J'sphere H-80 column (250 length $\times$ 20 mm ID), a flow rate of 3.0 ml/min, and DAD detector. Column chromatography was performed using a silica-gel (Kieselgel 60, 70–230 mesh and 230–400 mesh, Merck) or RP-18 gel (30–50 μm , Fuji Silysia Chemical Ltd.), thin-layer chromatography (TLC) using a pre-coated silica-gel 60 F254 (0.25 mm, Merck) and RP-18 F2545 plates (0.25 mm, Merck).

Plant Material

The leaves of *Camellia phanii* Hakoda & Ninh were collected at Tamdao, Vinh Phuc, in August 2023. The plant was identified by Dr. Nguyen The Cuong, Institute of Ecology and Biological Resources, VAST. A voucher specimen (TTT2308) was deposited at the Institute of Marine Biochemistry, VAST.

Extraction and Isolation

The dry powder of *C. phanii* (12.0 kg) was ultrasonically extracted with methanol (MeOH) (2 times, each 15 L, 2 h at 45 °C). After solvent removal, the MeOH extract (800 g) was partitioned in water (2 L) and sequentially separated with dichloromethane (CH_2Cl_2) and ethyl acetate (EtOAc), resulting in CH_2Cl_2 (CP1, 61.8 g) and EtOAc residues (CP2, 23.0 g), and the aqueous layer (CP3, 2.0 L).

The CP2 fraction was separated on a silica gel column chromatography (CC) eluting with $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ (50/1–2/1, v/v) to give four fractions, CP2A–CP2D. CP2D was further separated on an RP-18 CC eluting with acetone/water (1/1, v/v) to give fractions CP24A–CP24C. From the CP24A and CP24B fractions, compounds 6 (12.4 mg) and 7 (13.8 mg) were obtained through a Sephadex LH-

20 CC eluting with MeOH in water (9/1, v/v). The CP24C fraction was also purified on silica gel CC eluting with $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{acetone}$ (1/2, v/v) to give compound 8 (500.0 mg). The CP3 layer was loaded on a dialon HP-20 CC, washed with water, and then eluted with MeOH in water (25, 50, 75, and 100% MeOH, each 1 L), resulting in four fractions, CP3A–CP3D. CP3D was further separated on a silica gel column using a $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ gradient (20/1, 10/1, 5/1, and 2/1, v/v), yielding three fractions CP3D1–CP3D3. CP3D3 was then fractionated on a silica gel CC using a solvent system of $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{acetone}/\text{water}$ (1/4/0.4, v/v/v), giving four fractions CP3D3A–CP3D3D. CP3D3B was separated on an RP-18 CC and eluted with acetone/water (1/1, v/v), resulting in three fractions, CP3D3B1–CP3D3B3. CP3D3B1 was further separated on a silica gel CC using $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}/\text{water}$ (3.5/1/0.15, v/v/v), obtaining two fractions, CP3D3B1A and CP3D3B1B. CP3D3B1A was then subjected to HPLC with a solvent system of 25% ACN in water, yielding compounds 1 (10.0 mg, t_R 34.3 min) and 2 (11.8 mg, t_R 35.9 min). CP3D3C was chromatographed on an RP-18 CC and eluted with acetone/water (0.8/1, v/v), resulting in three fractions CP3D3C1–CP3D3C3. CP3D3C1 was further separated on a silica gel CC using $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}/\text{water}$ (3/1/0.15, v/v/v), obtaining two fractions CP3D3C1A and CP3D3C1B. CP3D3C1A was then subjected to HPLC with a mobile phase of 25% ACN in water, yielding compounds 4 (10.0 mg, t_R 47.0 min) and 5 (11.8 mg, t_R 34.7 min). CP3D3D was separated on an RP-18 CC eluting with acetone/water (1.2/1, v/v), resulting in three fractions, CP3D3D1–CP3D3D3. CP3D3D1 was further isolated on an RP-18 CC using acetone/water (0.9/1, v/v), obtaining three fractions CP3D3D1A–CP3D3D1C. CP3D3D1A was then subjected to HPLC with a mobile phase of 25% ACN in water yielding compound 3 (13.5 mg, t_R 49.2 min).

Camphanoside A (1): White powder; $[\alpha]_D^{25}$: +37.6 (c 0.2, MeOH); $\text{C}_{43}\text{H}_{68}\text{O}_{16}\text{SNa}$, HR-ESI-MS m/z 893.3999 $[\text{M} + \text{H}]^+$ (Calcd. for $[\text{C}_{43}\text{H}_{68}\text{O}_{16}\text{SNa}]^+$, 893.3964), 915.3777 $[\text{M} + \text{Na}]^+$ (Calcd. for $[\text{C}_{43}\text{H}_{68}\text{O}_{16}\text{SNa}_2]^+$, 915.3783); ^1H and ^{13}C -NMR (CD_3OD) data, see Table 1.

Camphanoside B (2): White powder; $[\alpha]_D^{25}$: +45.0 (c 0.2, MeOH); $\text{C}_{43}\text{H}_{68}\text{O}_{16}\text{SNa}$, HR-ESI-MS m/z 893.3987 $[\text{M} + \text{H}]^+$ (Calcd. for $[\text{C}_{43}\text{H}_{68}\text{O}_{16}\text{SNa}]^+$, 893.3964), 915.3795 $[\text{M} + \text{Na}]^+$ (Calcd. for $[\text{C}_{43}\text{H}_{68}\text{O}_{16}\text{SNa}_2]^+$, 915.3783); ^1H and ^{13}C -NMR (CD_3OD) data, see Table 1.

Camphanoside C (3): White powder; $[\alpha]_D^{25}$: +30.6 (c 0.2, MeOH); $\text{C}_{43}\text{H}_{68}\text{O}_{16}$, HR-ESI-MS m/z 1141.3763 $[\text{M} - \text{H}]^-$ (Calcd. for $[\text{C}_{43}\text{H}_{68}\text{O}_{16}]^-$, 1141.3800); ^1H and ^{13}C -NMR (CD_3OD) data: see Table 1.

Acid Hydrolysis

See Supporting Information.

Acid hydrolysis and Confirmation of Monosaccharide

See Supporting Information.

α -Glucosidase Assay

See Supporting Information.^[6]

Author Contributions

Isolation and purification: Hoang Thi Tuyet Lan, Vu Thi Xuan, Bui Thi Mai Anh, Nguyen Thi Mai; Biological tests: Phan Thanh Huong; Structure identification: Nguyen Viet Dung, Bui Huu Tai,

Nguyen Thi Minh Hang; Writing, review, and editing: Hoang Thi Tuyet Lan, Nguyen Thi Mai, Nguyen Xuan Nhiem. All authors read and approved the manuscript.

Acknowledgements

This research was supported by the Vietnam Ministry of Education and Training under grant number B2023-GHA-11.

Conflict of Interests

The authors declare no conflict of interest.

Data Availability Statement

The data that support the findings of this study are available in the supplementary material of this article.

Keywords: *Camellia phanii* • α -glucosidase inhibitory • oleanane-type saponin • camphanoside

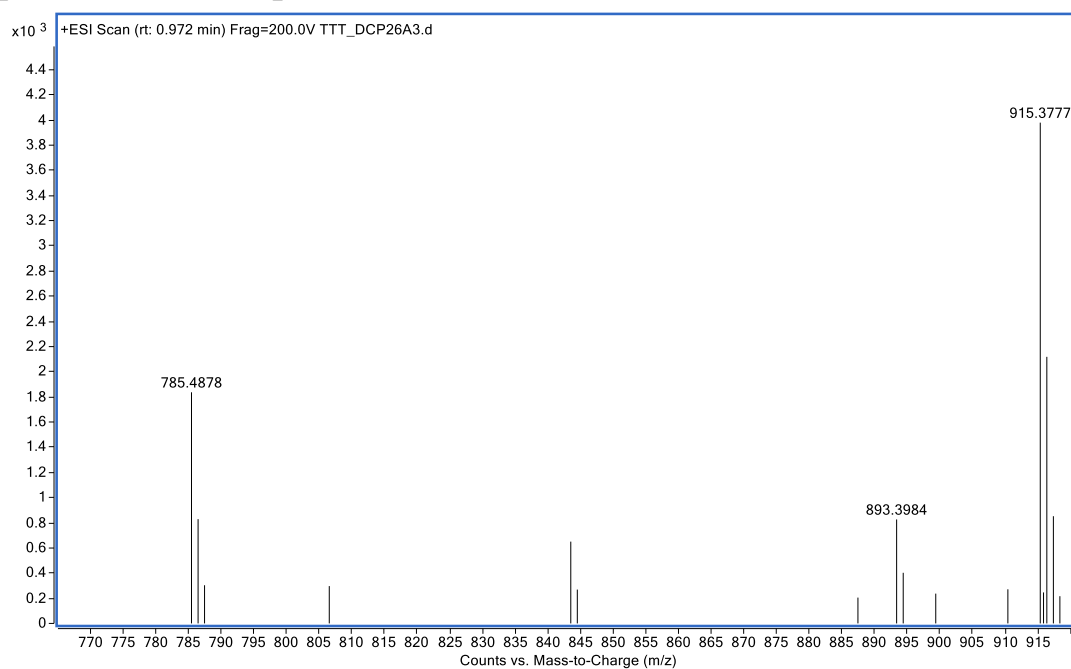
- [1] A. K. Thikekar, A. B. Thomas, S. S. Chitlange, *Phytother. Res.* **2021**, *35*, 4763–4781.
- [2] L. T. V. Anh, T. P. M. Nga, N. P. Nhi, N. T. K. Oanh, *Chem. Biodiversity* **2023**, *20*, e202200843.
- [3] A. M. Teixeira, C. Sousa, *Molecules* **2021**, *26*, 2178.
- [4] a) N. Guo, T. Tong, N. Ren, Y. Tu, B. Li, *Phytochemistry* **2018**, *149*, 42–53; b) N. T. Cuc, N. T. Cuong, D. T. Trang, D. T. Dung, B. H. Tai, P. V. Cuong, C. V. Minh, P. V. Kiem, N. X. Nhiem, T. M. Ngoc, *Phytochem. Lett.* **2021**, *43*, 103–107.
- [5] C. Liang, Y. Ding, H. T. Nguyen, J.-A. Kim, H.-J. Boo, H.-K. Kang, M. C. Nguyen, Y. H. Kim, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2010**, *20*, 7110–7113.
- [6] N. T. Cuc, N. A. Bang, B. H. Tai, N. X. Nhiem, P. H. Yen, D. T. H. Yen, T. T. T. Hien, L. T. Huyen, P. V. Kiem, *Chem. Biodiversity* **2023**, *20*, e202300093.
- [7] K. Ko, L. D. Wahyudi, Y.-S. Kwon, J.-H. Kim, H. Yang, *J. Nat. Prod.* **2018**, *81*, 2399–2409.
- [8] C. Gauthier, J. Legault, M. Lebrun, P. Dufour, A. Pichette, *Bioorg. Med. Chem.* **2006**, *14*, 6713–6723.
- [9] T. Q. Truong, T. H. Le, M. B. Nguyen, D. T. Pham, Q. P. T. Dinh, H. X. Nguyen, T. N. Van Do, M. T. T. Nguyen, *Vietnam J. Chem.* **2023**, *61*, 26–32.

Manuscript received: March 20, 2024

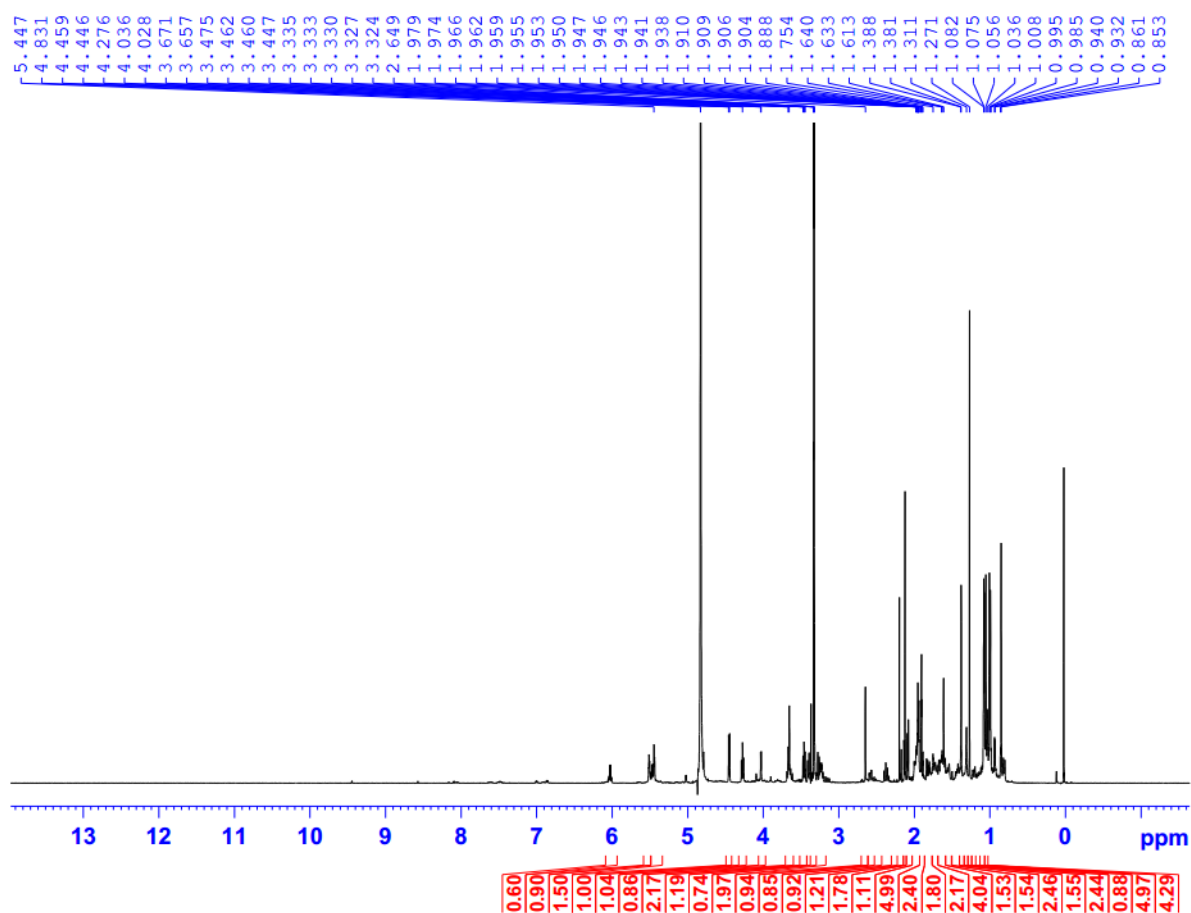
Accepted manuscript online: April 22, 2024

Version of record online: ■■■■■

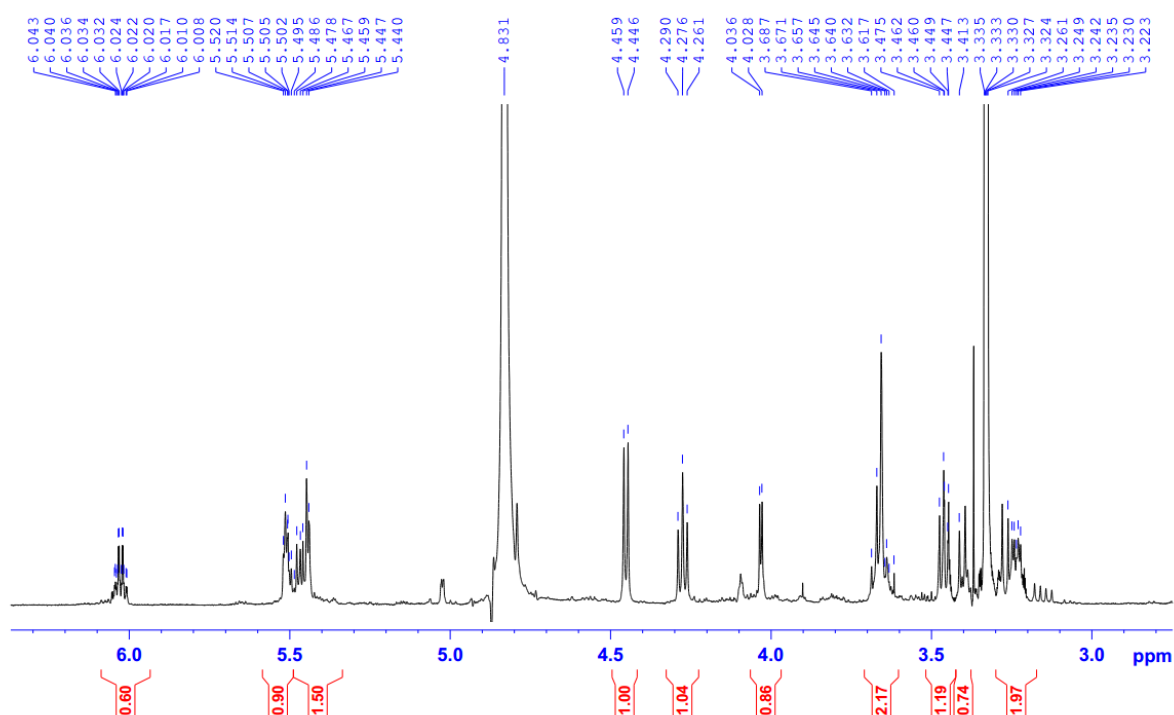
Hợp chất CP1: Camphanoside A



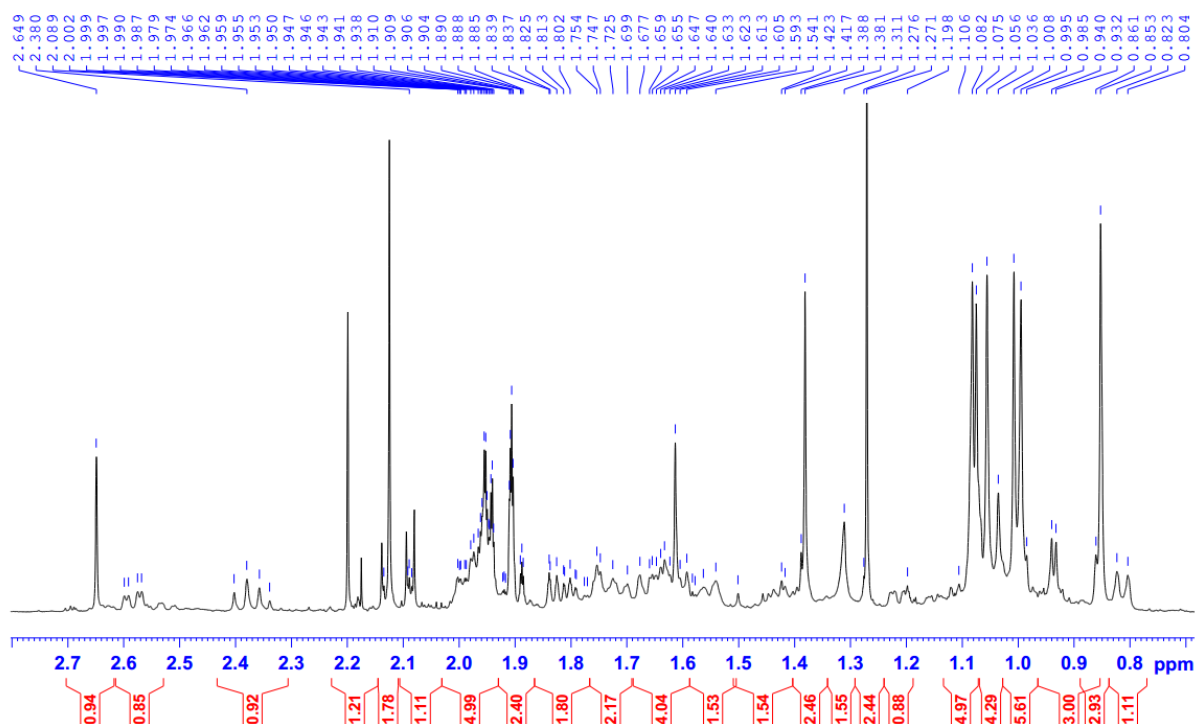
Hình 1. Phổ HR-ESI-MS của hợp chất CP1



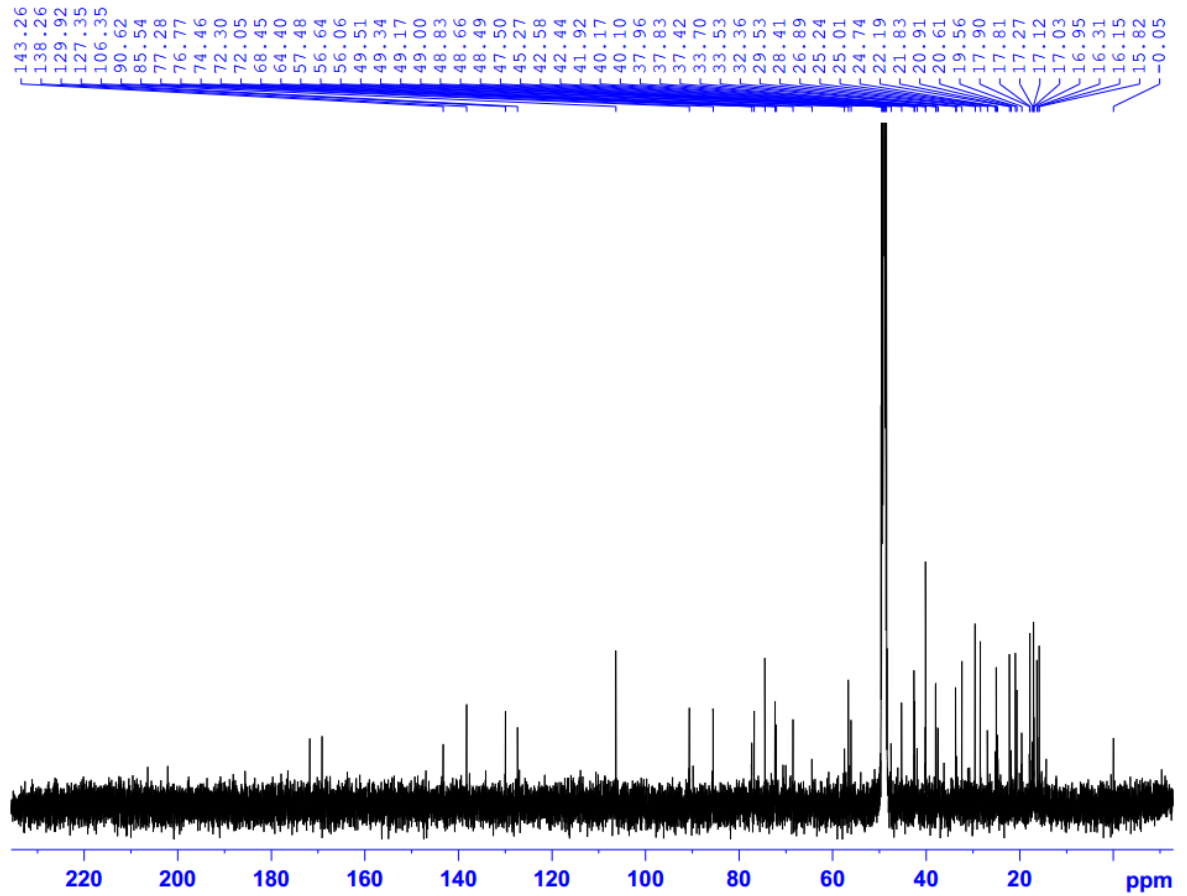
Hình 1.1 Phổ ^1H -NMR của hợp chất CP1



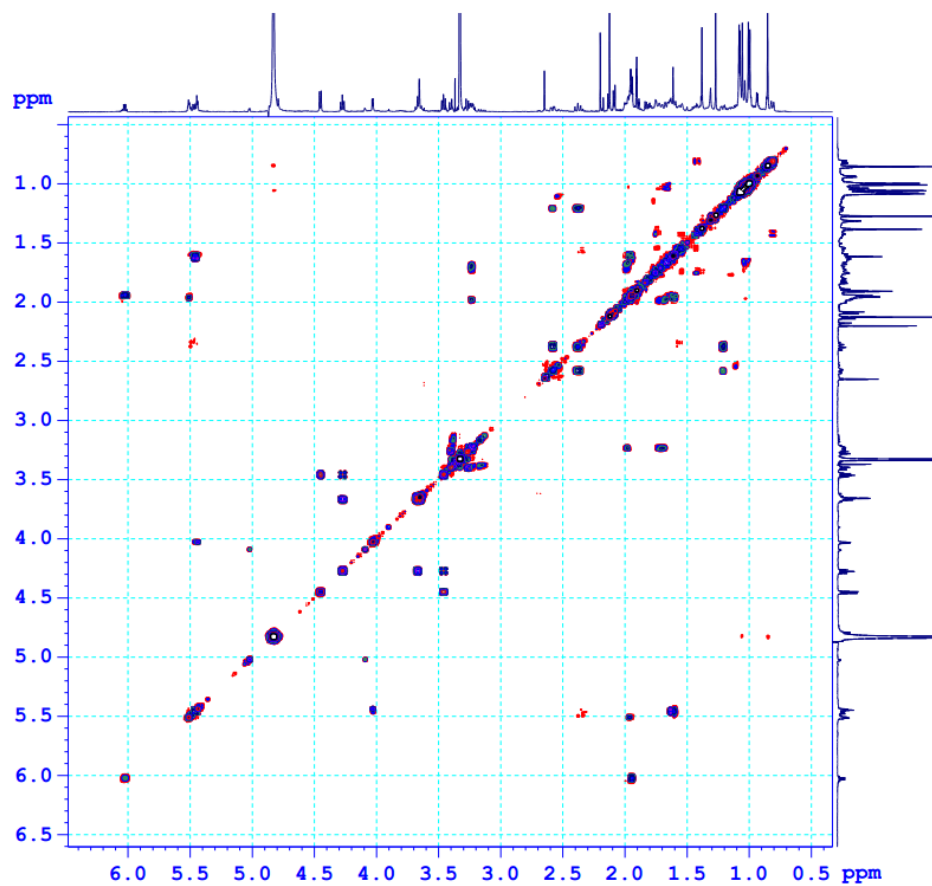
Hình 1.2 Phổ ^1H -NMR giãn của hợp chất CP1



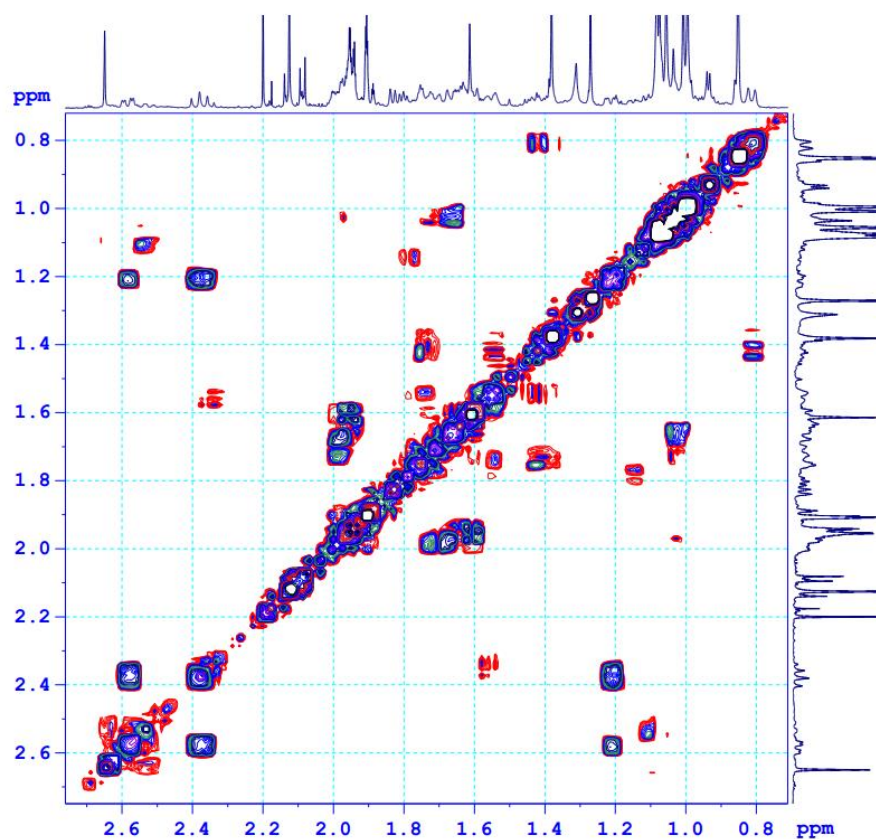
Hình 1.3 Phổ ^1H -NMR giãn của hợp chất CP1



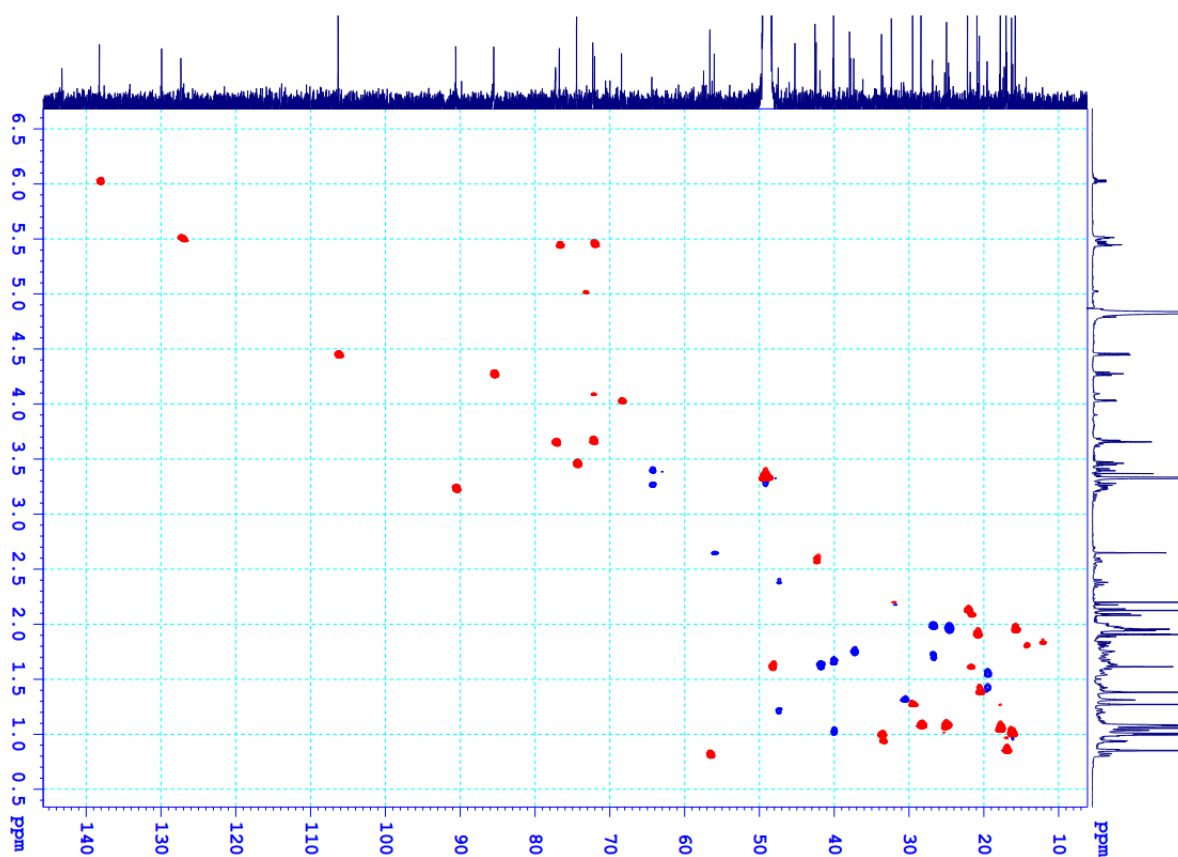
Hình 1.4 Phổ ^{13}C -NMR giãn của hợp chất CP1



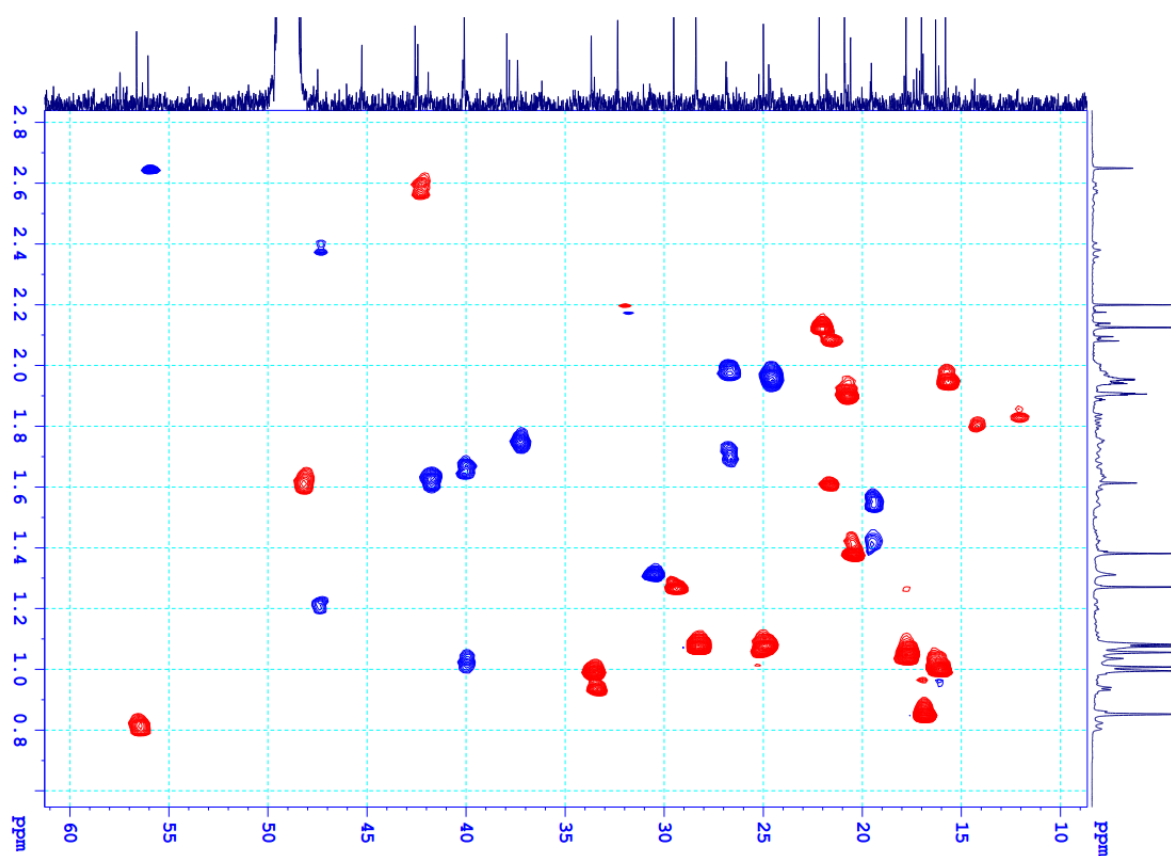
Hình 1.5 Phổ COSY của hợp chất CP1



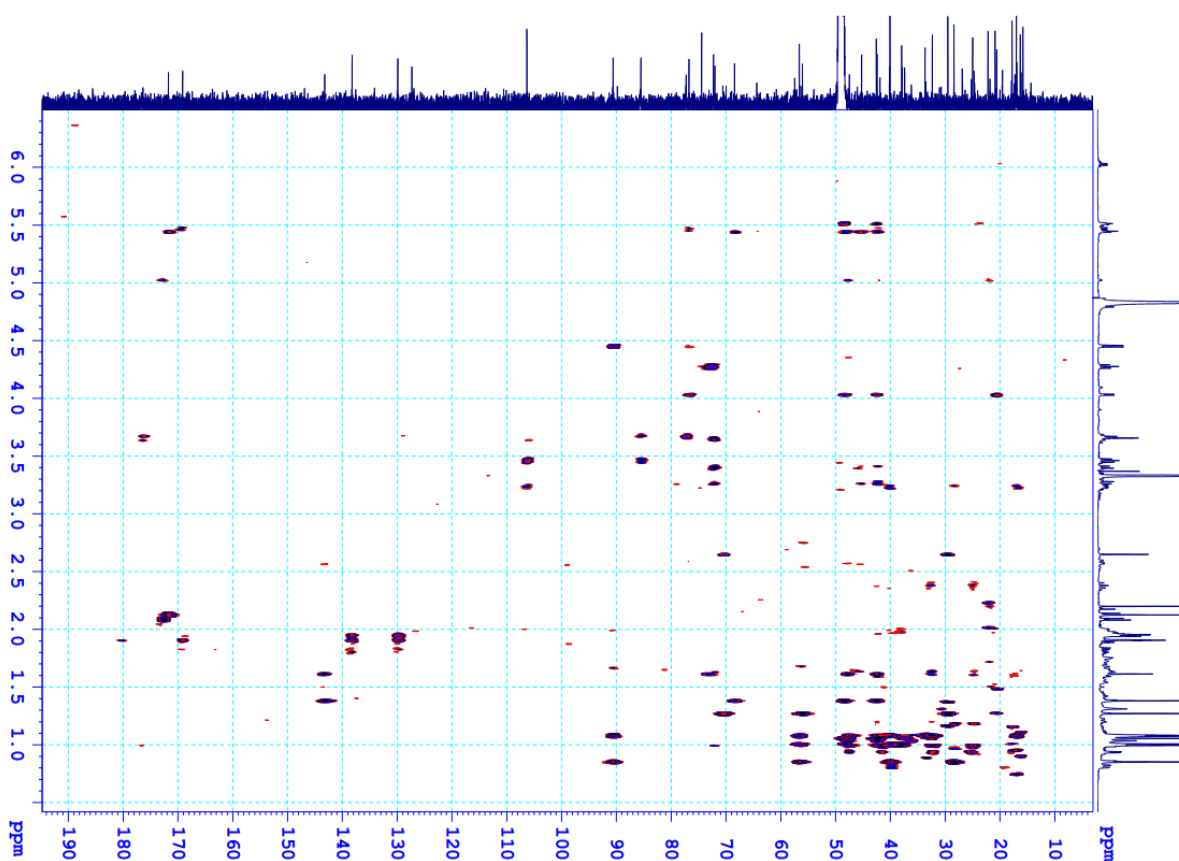
Hình 1.6 Phổ COSY giãn của hợp chất CP1



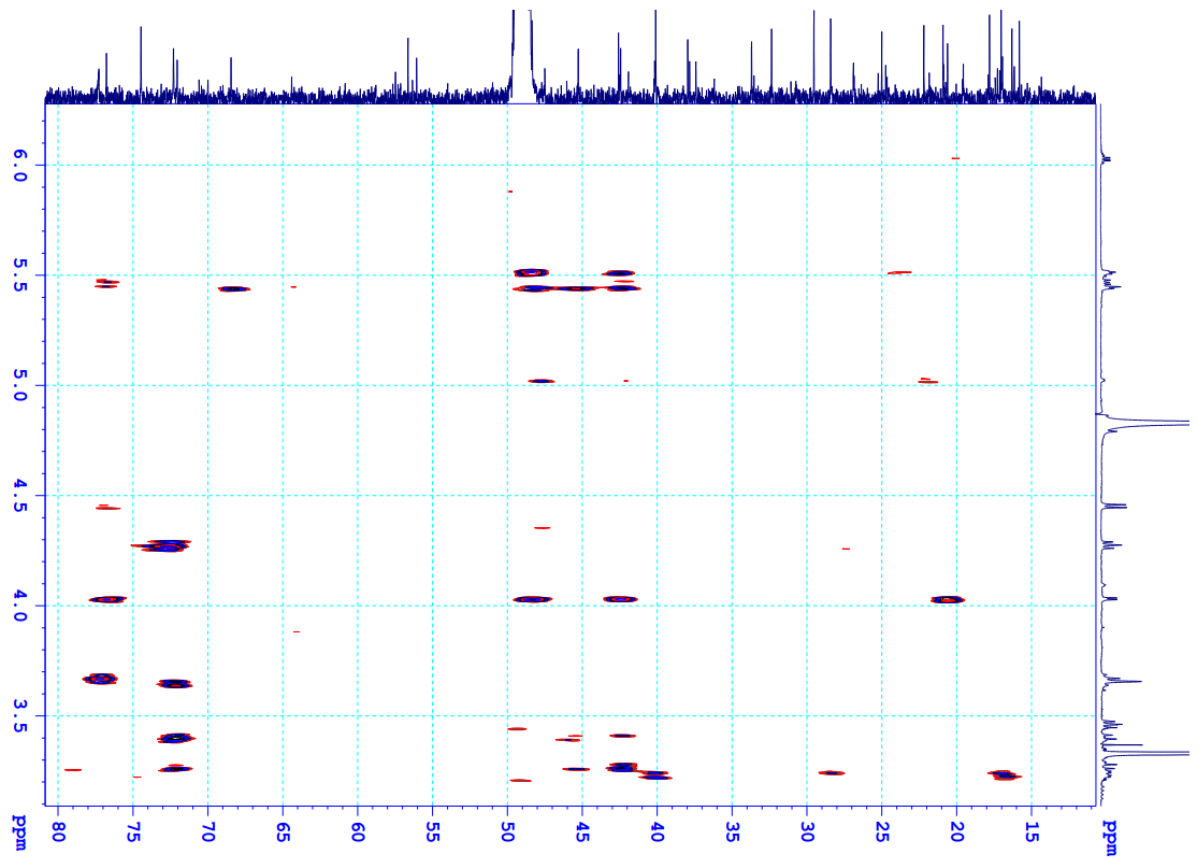
Hình 1.7 Phổ HSQC của hợp chất CP1



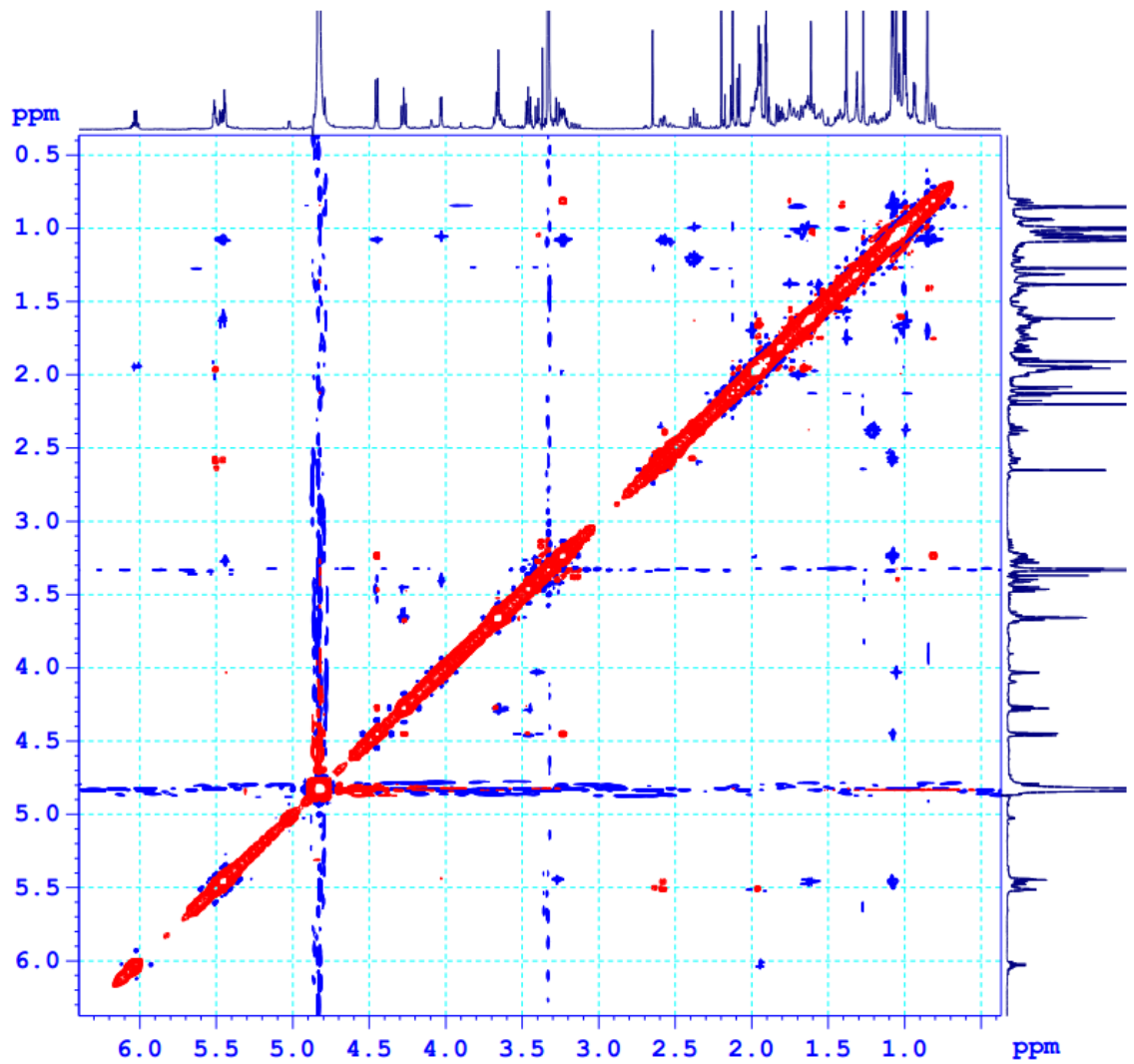
Hình 1.8 Phổ HSQC giãn của hợp chất CP1



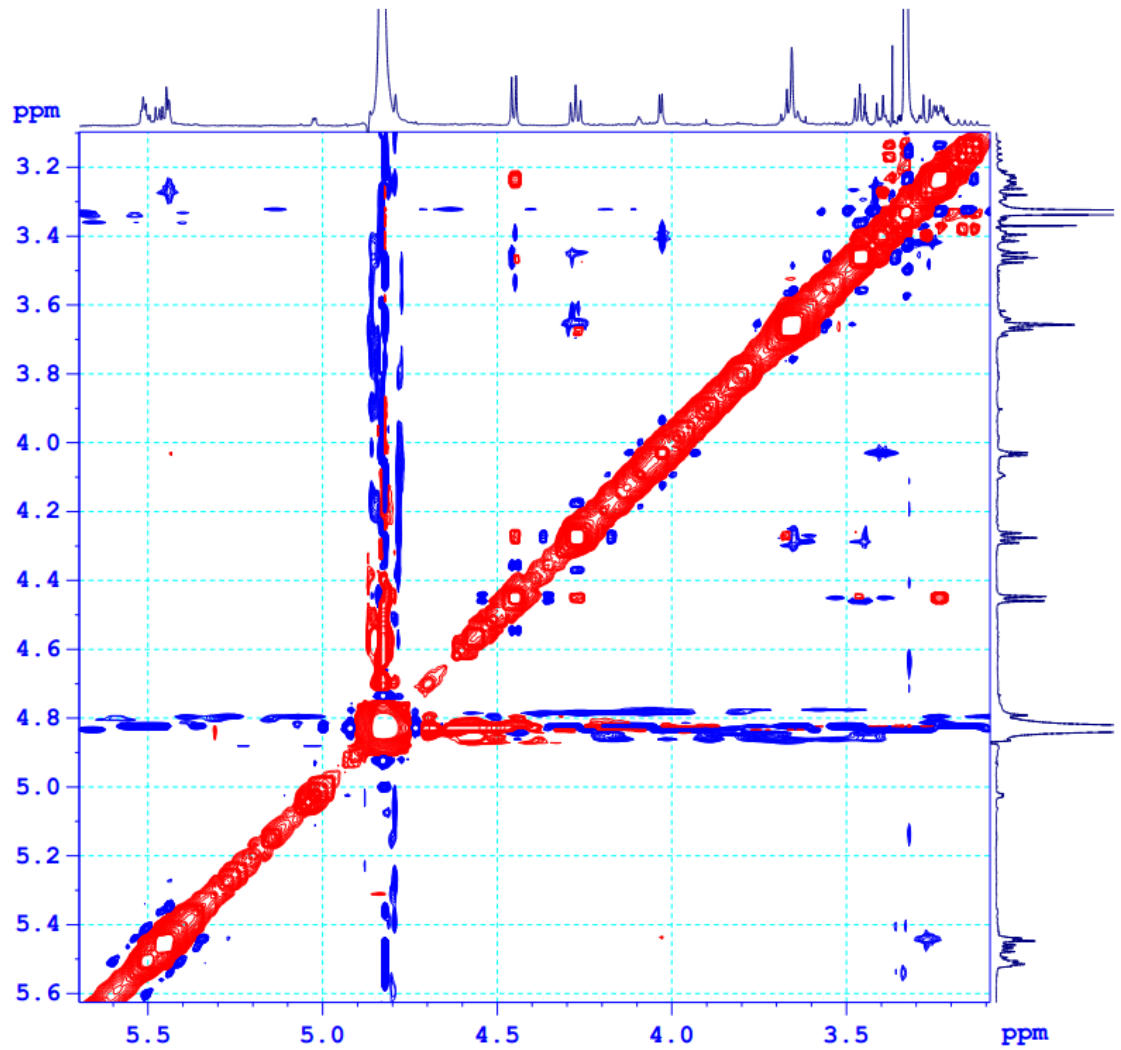
Hình 1.8 Phổ HMBC của hợp chất CP1



Hình 1.9 Phổ HMBC giãn của hợp chất CP1

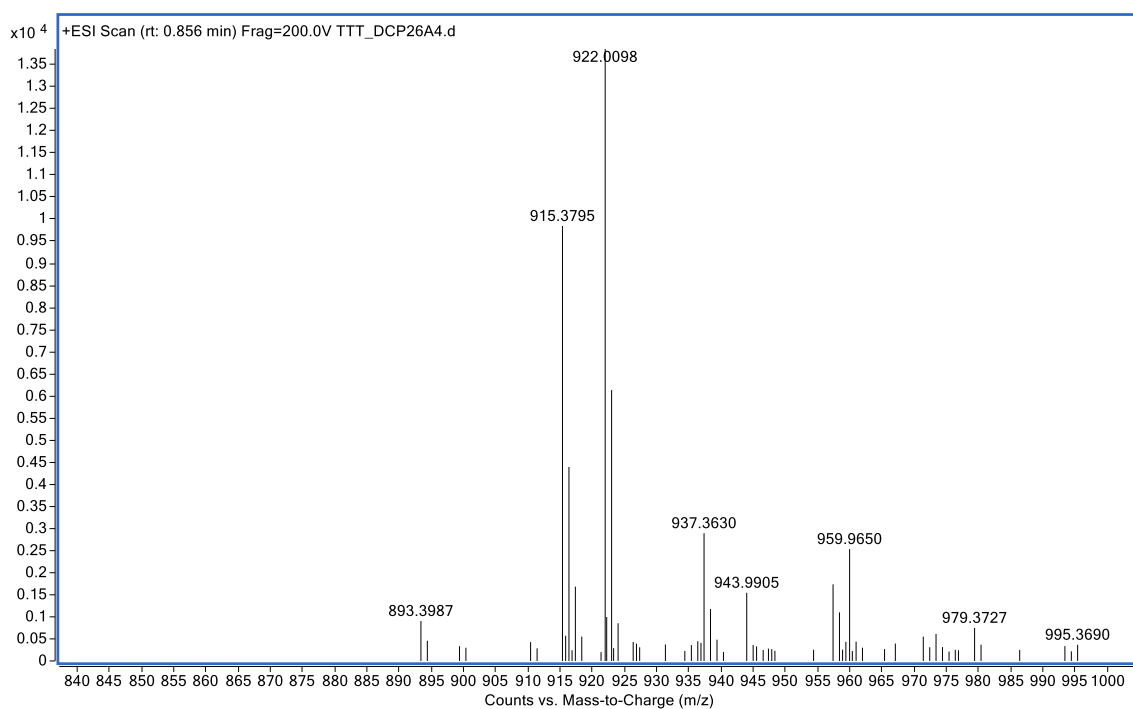


Hình 1.10 Phổ NOESY của hợp chất CP1

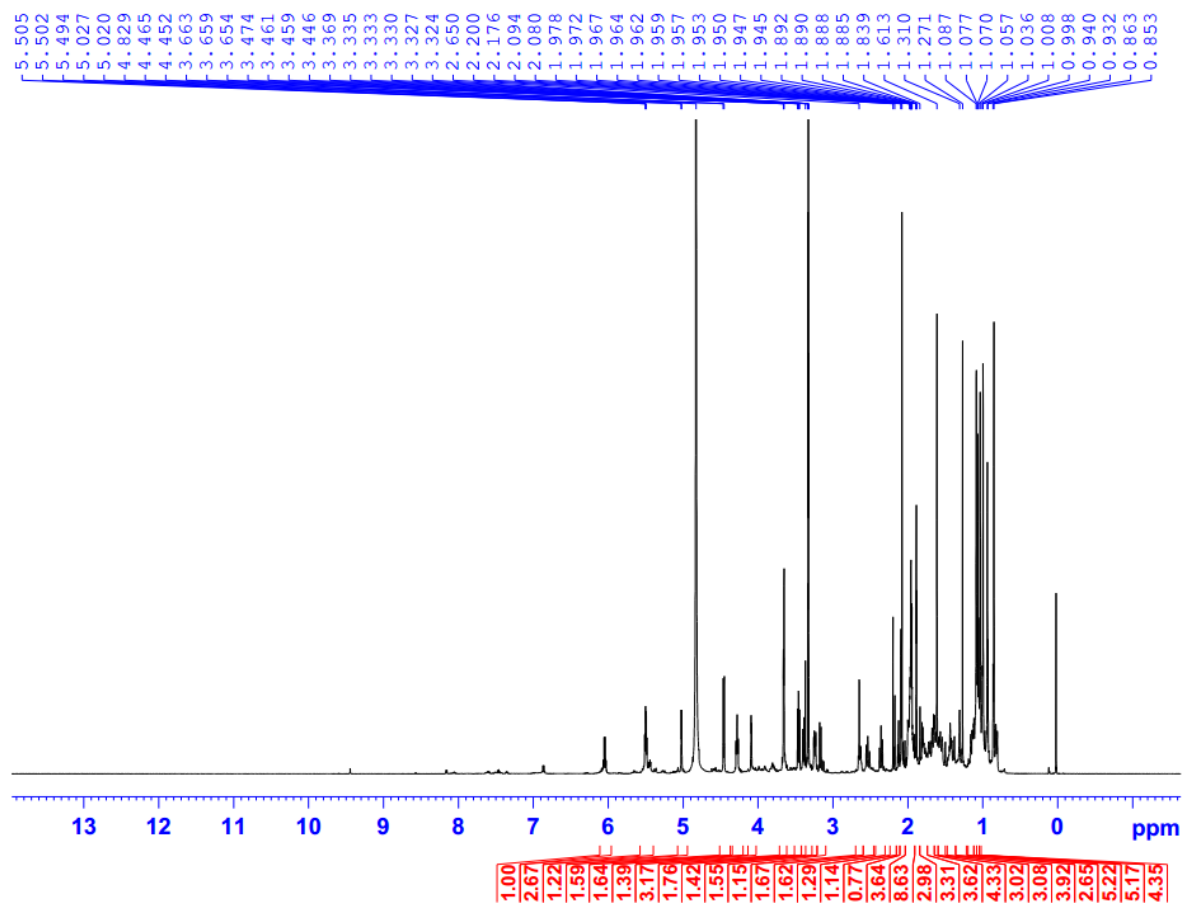


Hình 1.11 Phổ NOESY giãn của hợp chất CP1

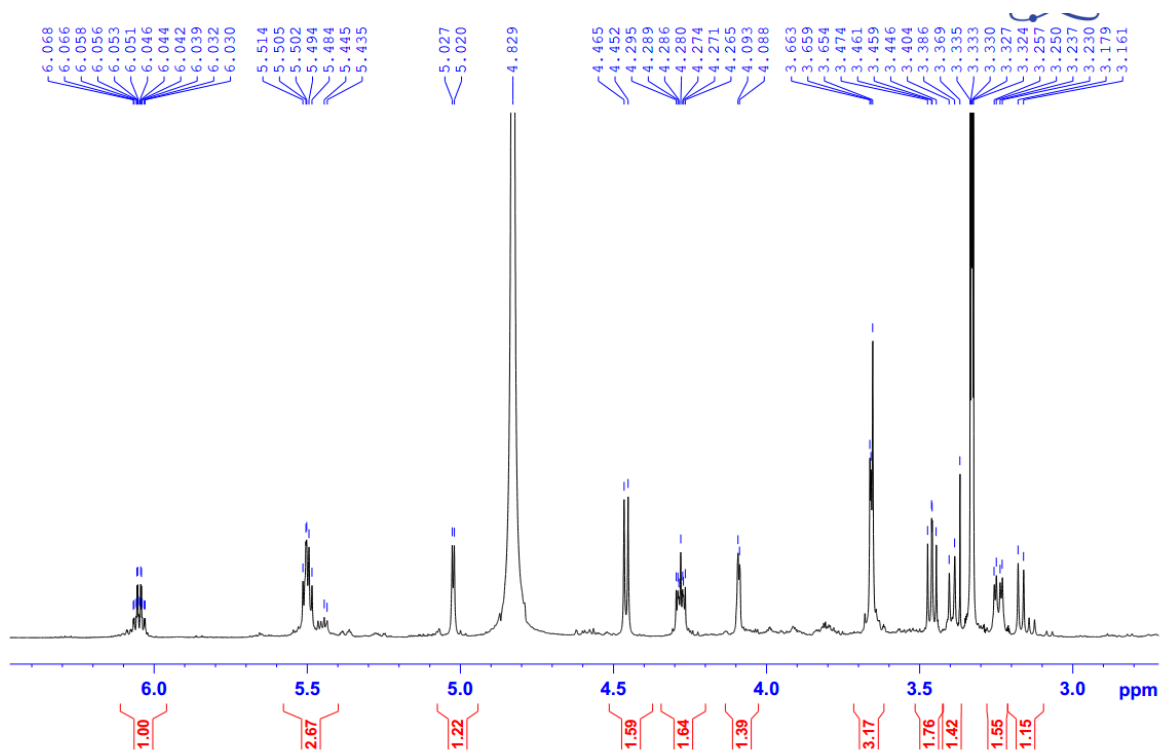
Hợp chất CP2: Camphanoside B



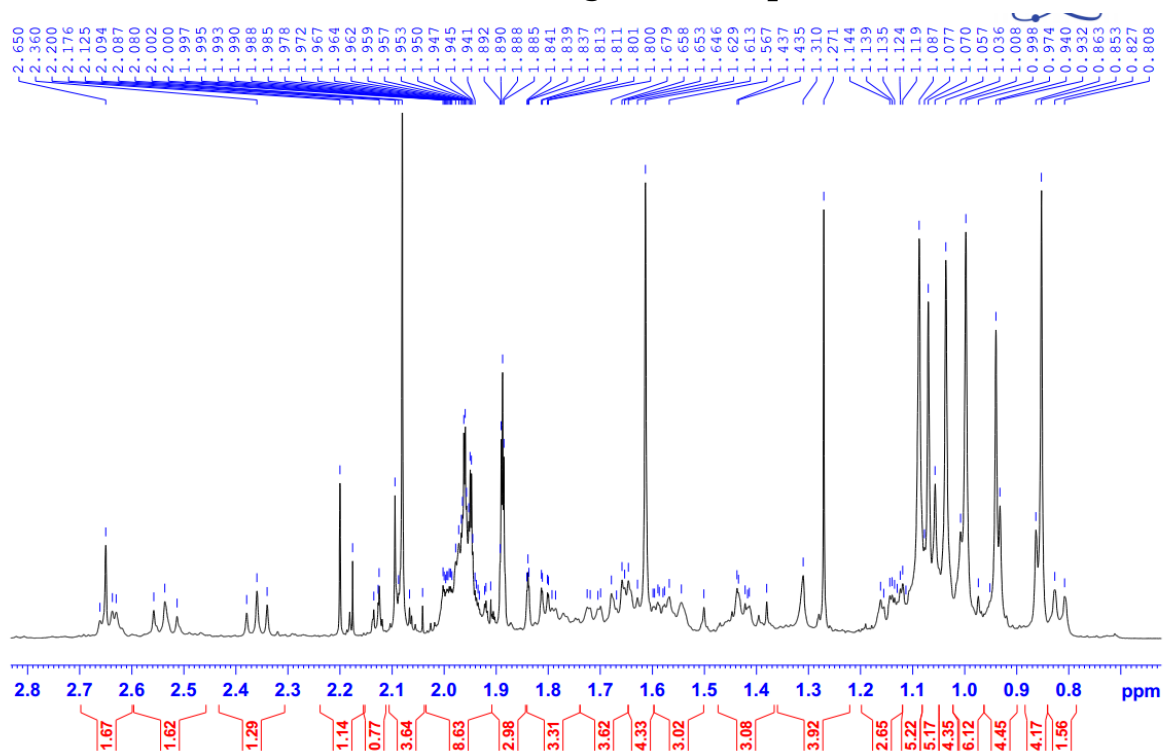
Hình 1.12 Phổ HR-ESI-MS của hợp chất CP2



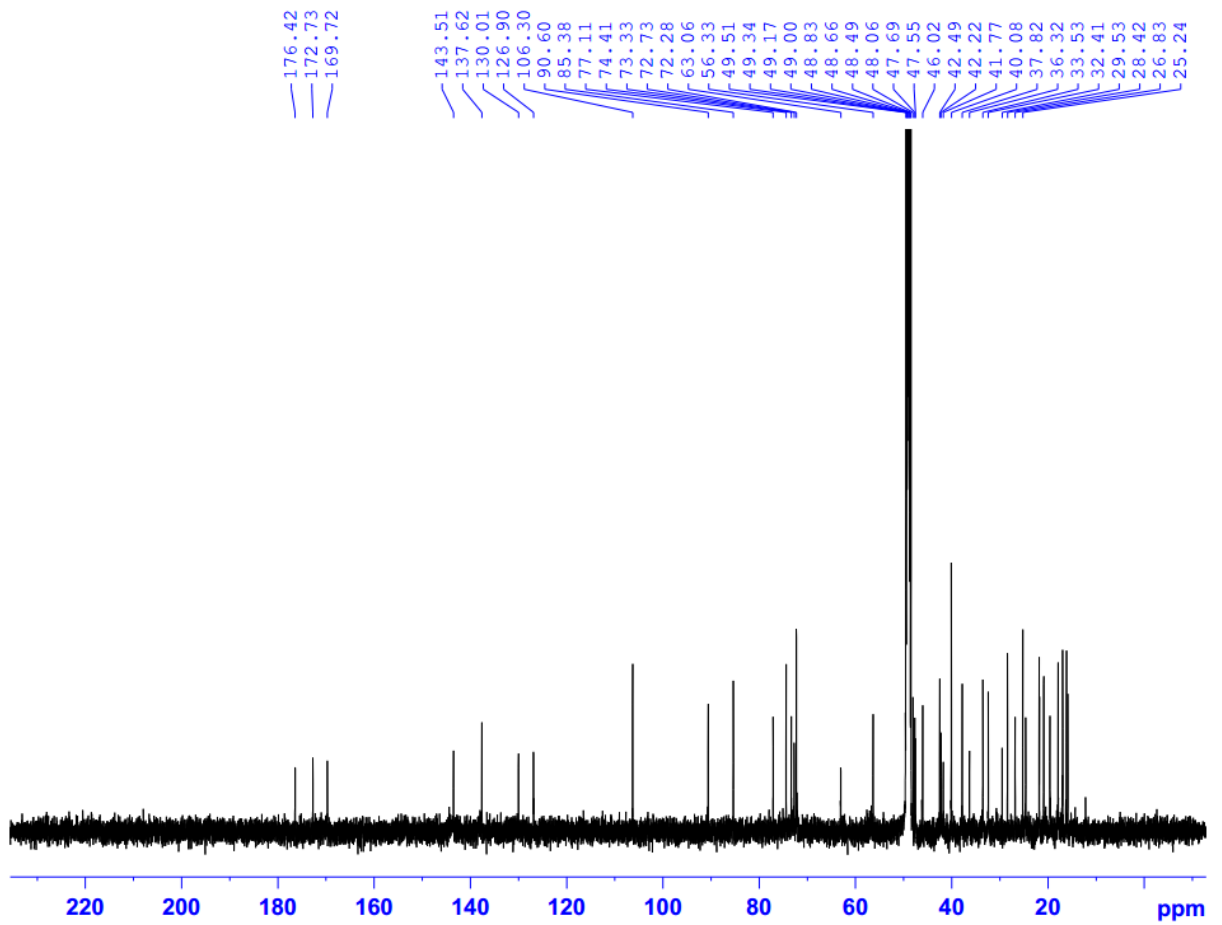
Hình 1.13 Phổ ¹H-NMR của hợp chất CP2



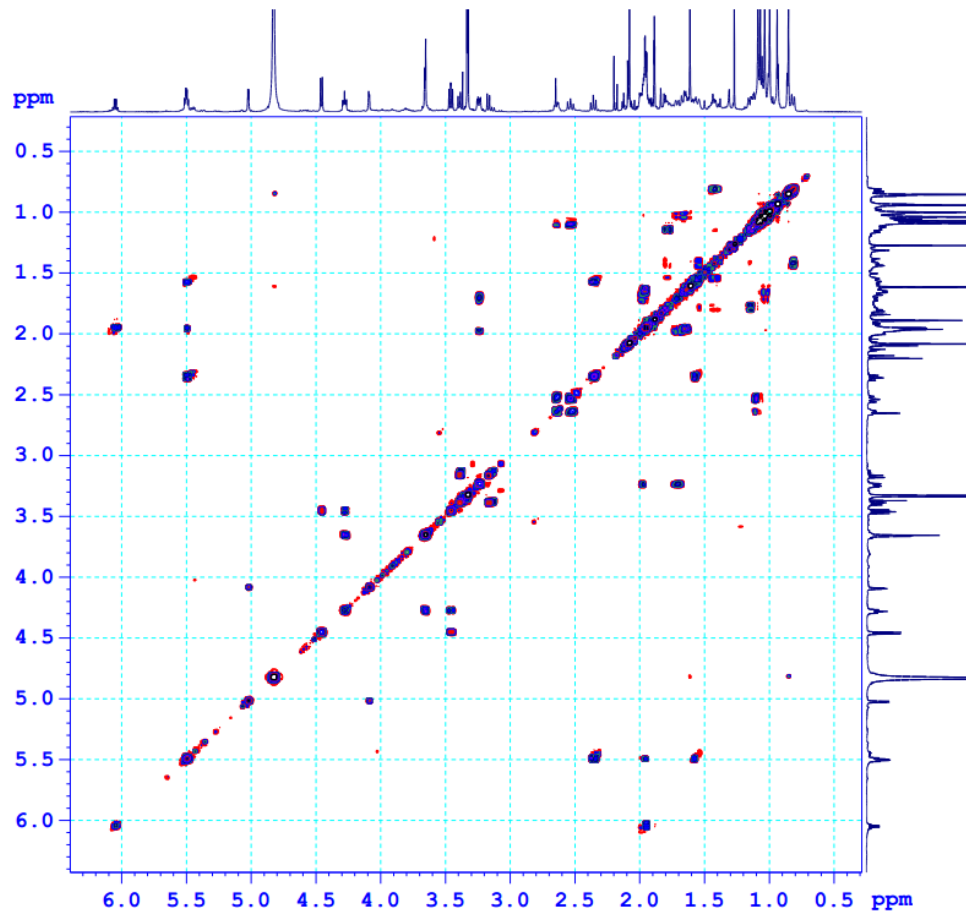
Hình 1.14 Phổ ¹H-NMR giản của hợp chất CP2



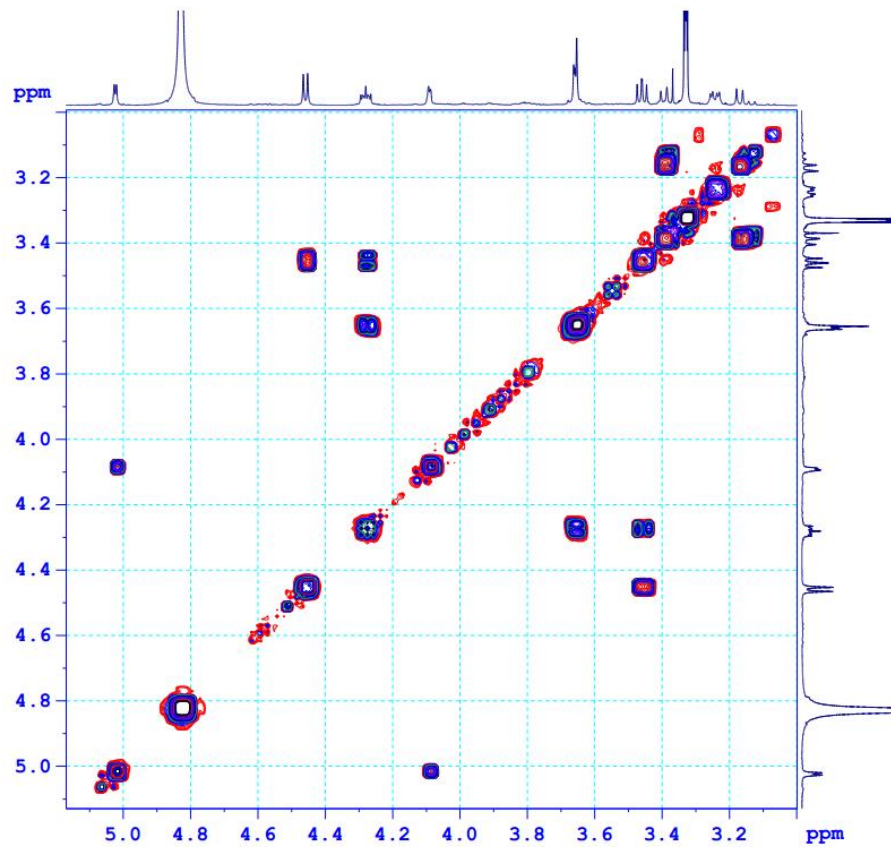
Hình 1.15 Phổ ¹H-NMR giản của hợp chất CP2



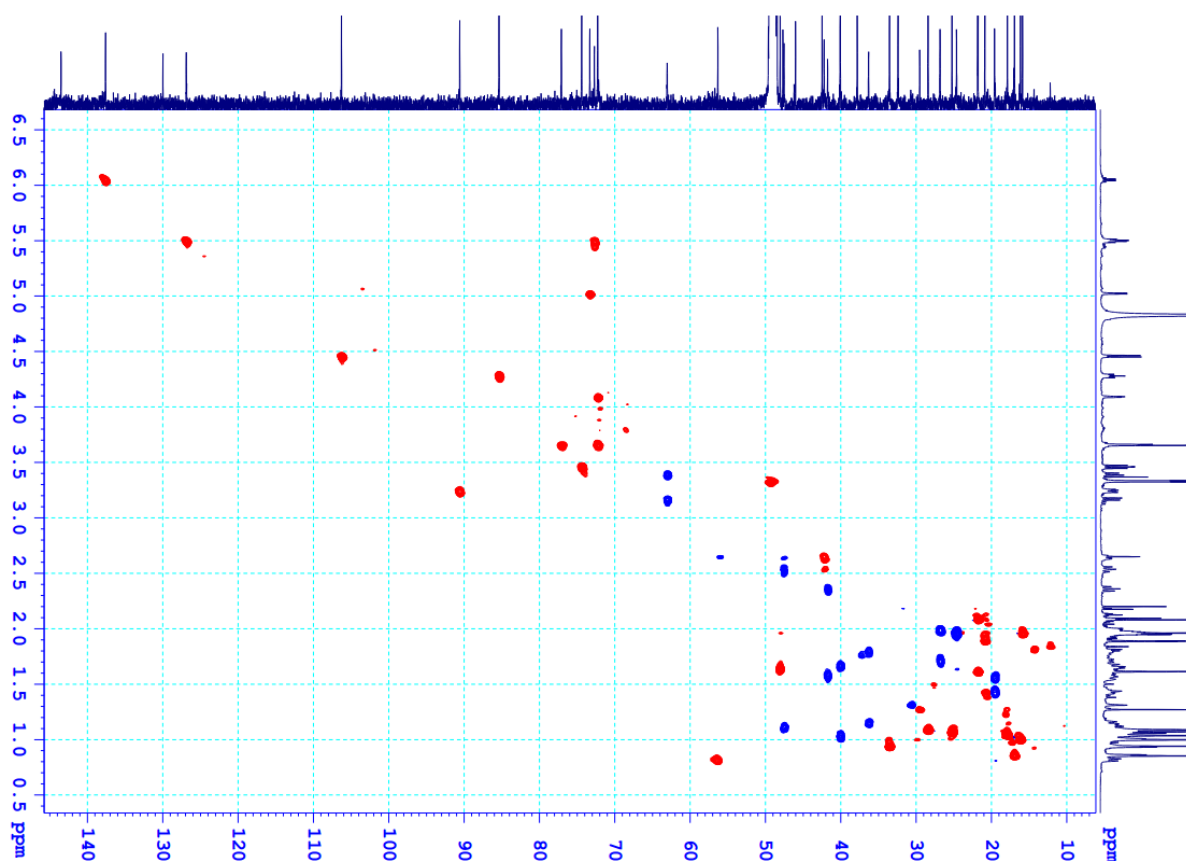
Hình 1.16 Phổ ^{13}C -NMR giãn của hợp chất CP2



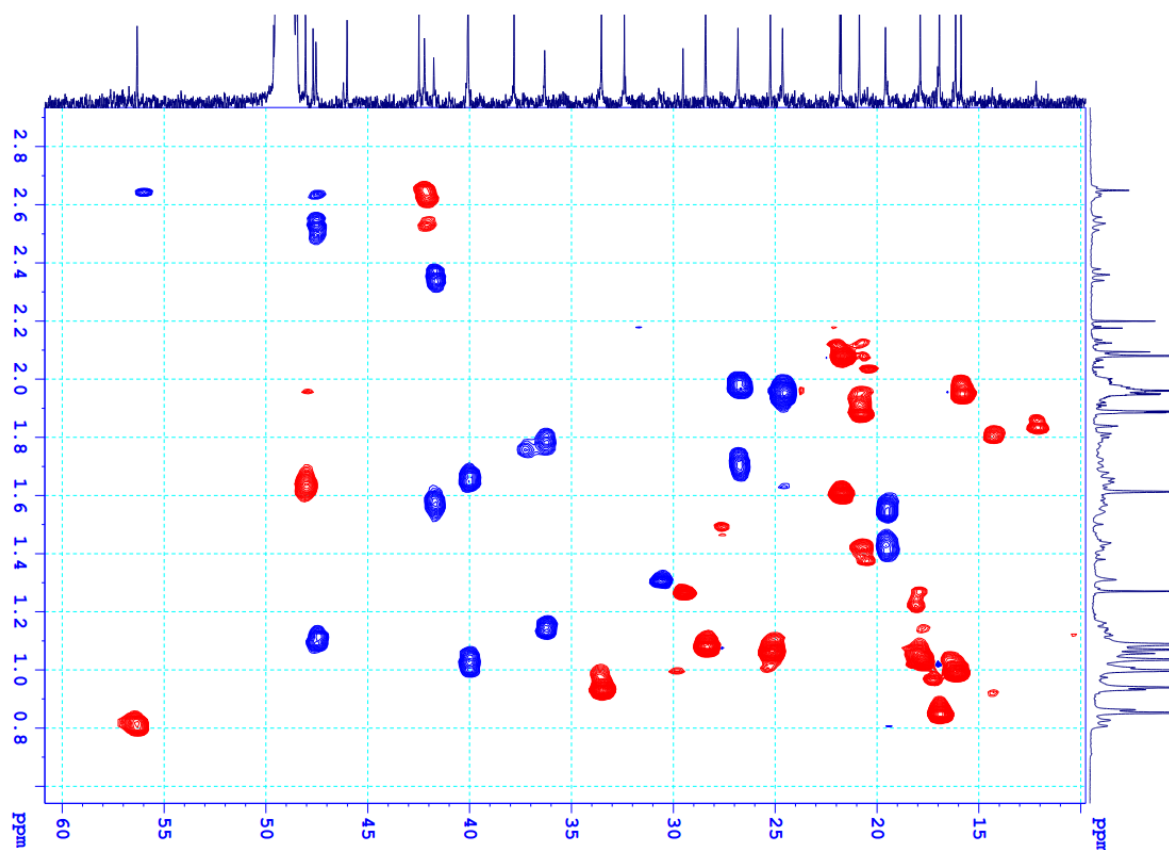
Hình 1.17 Phổ COSY của hợp chất CP2



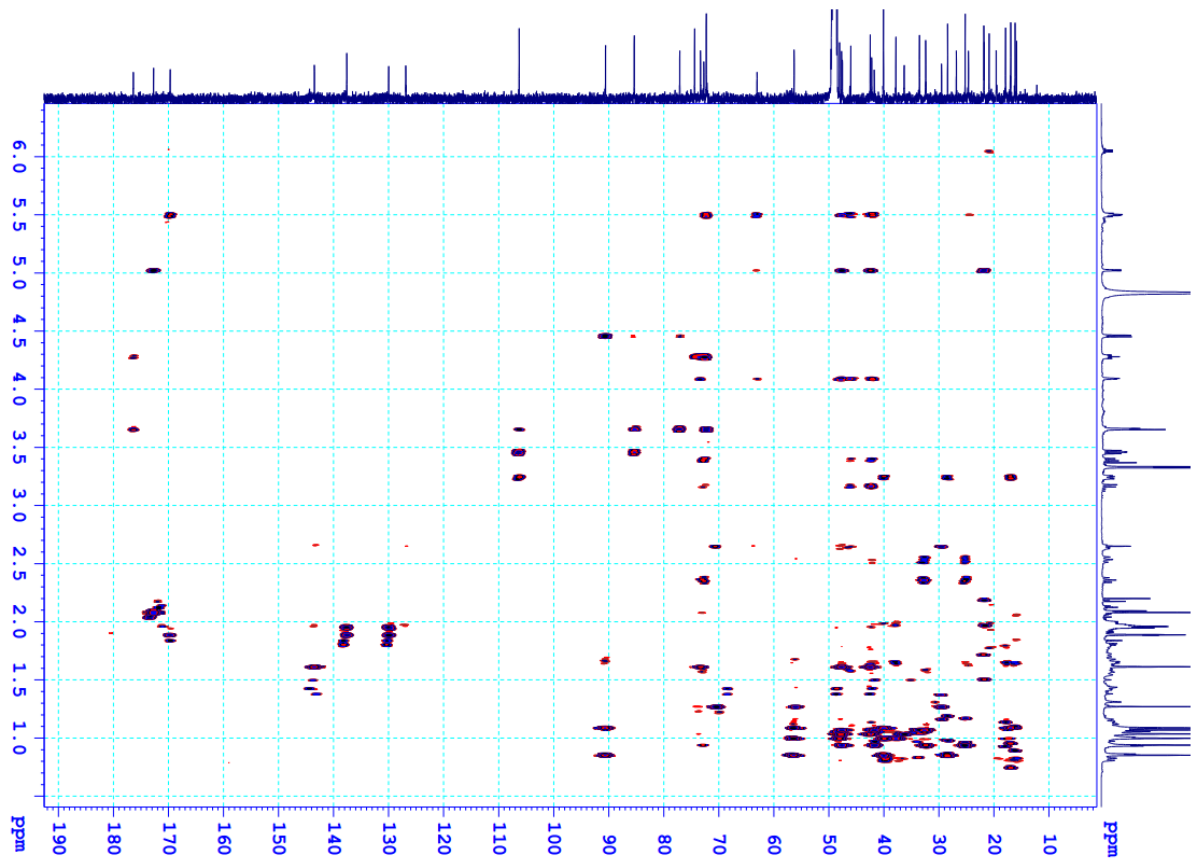
Hình 1.18 Phổ COSY giãn của hợp chất CP2



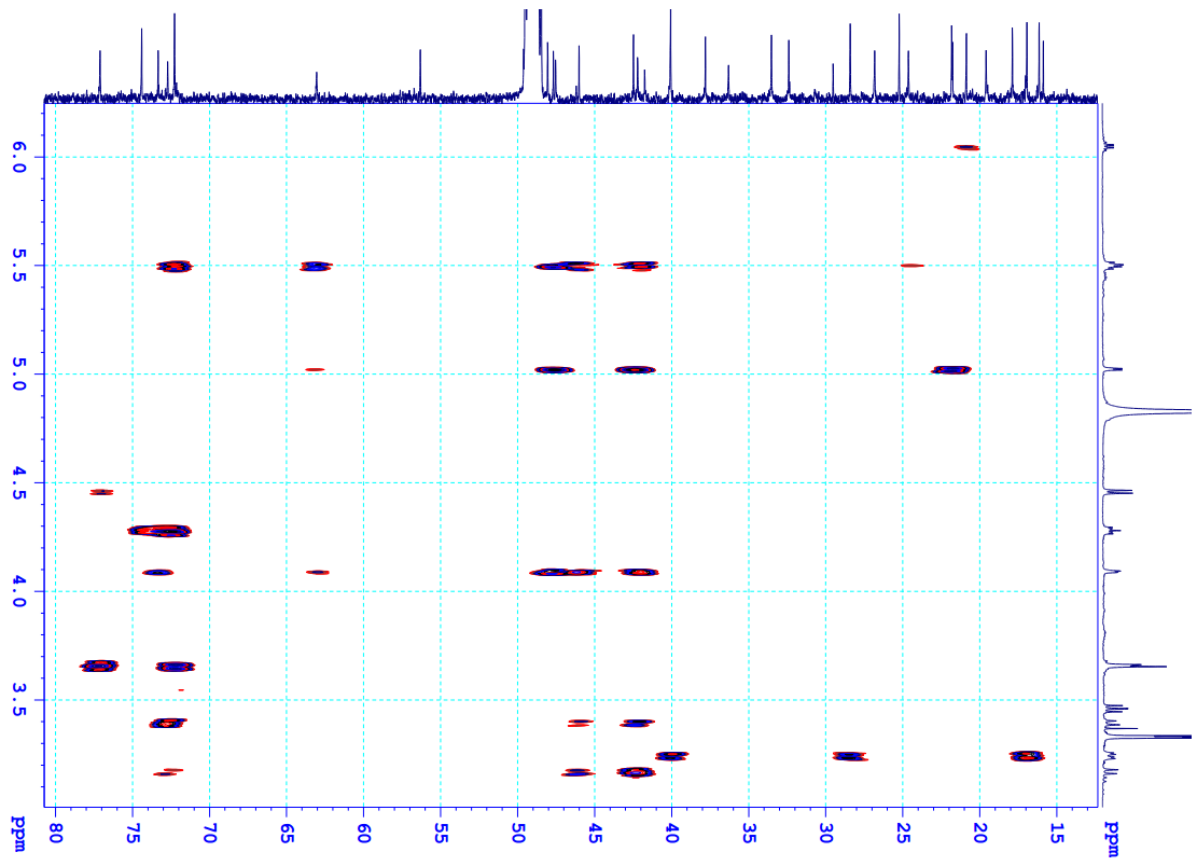
Hình 1.19 Phổ HSQC của hợp chất CP2



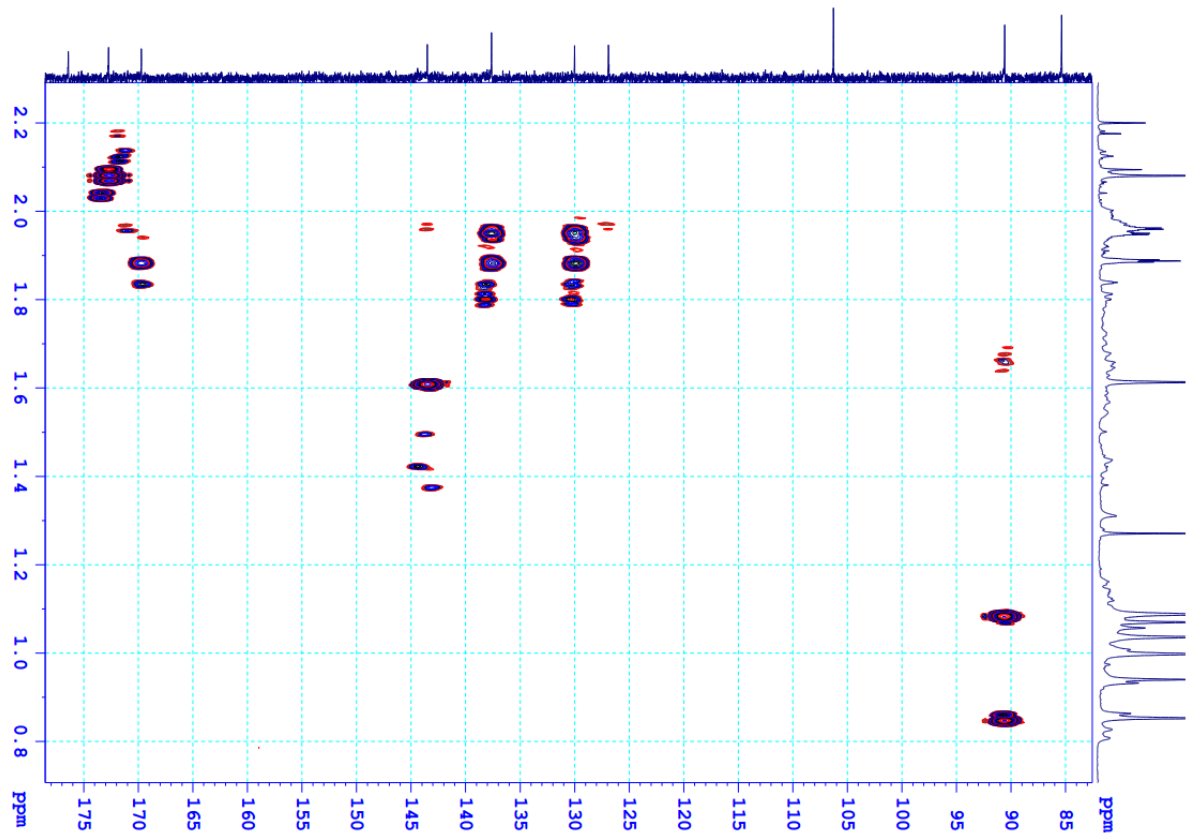
Hình 1.20 Phổ HSQC giản của hợp chất CP2



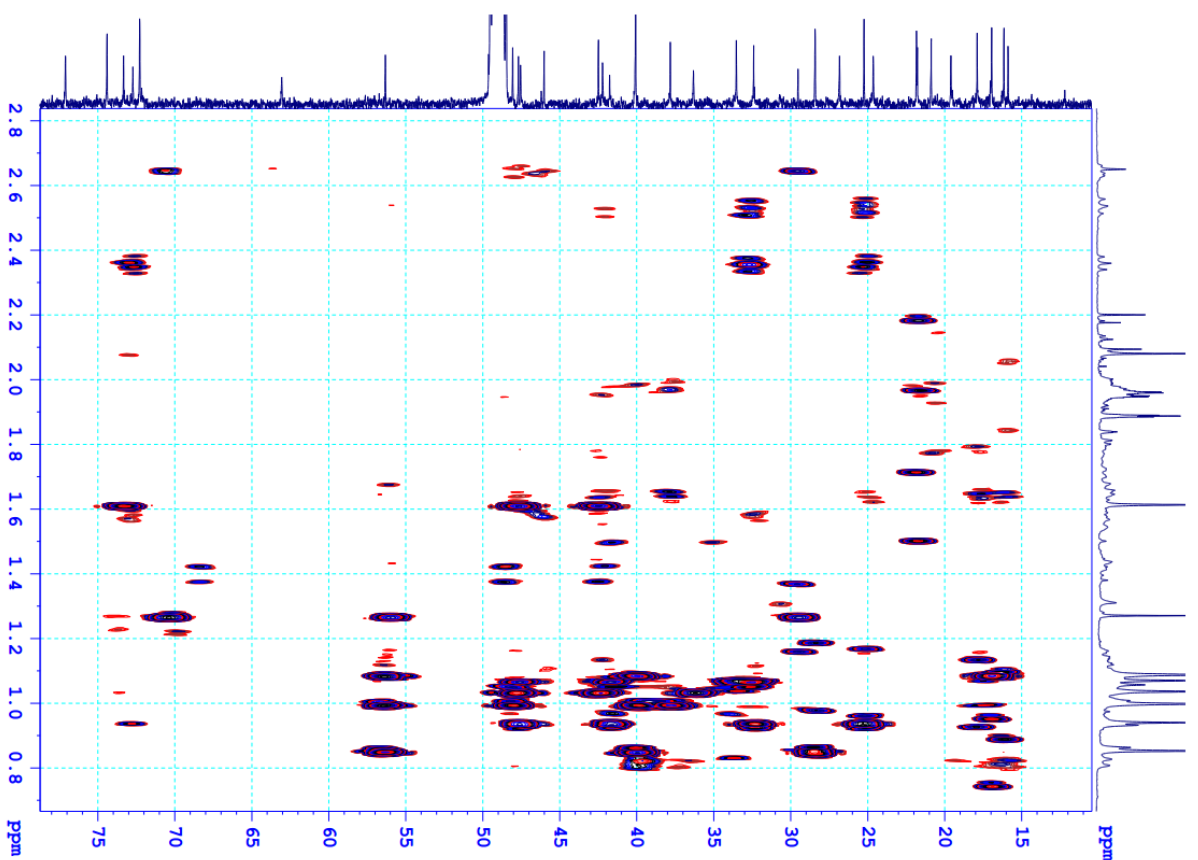
Hình 1.21 Phổ HMBC của hợp chất CP2

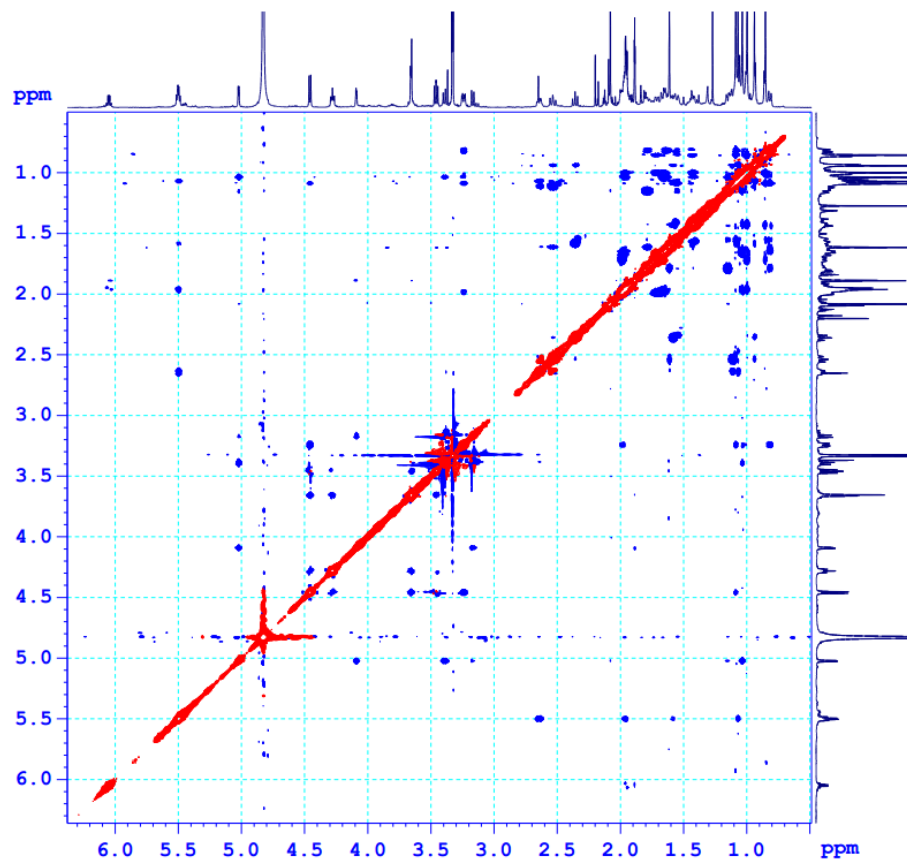


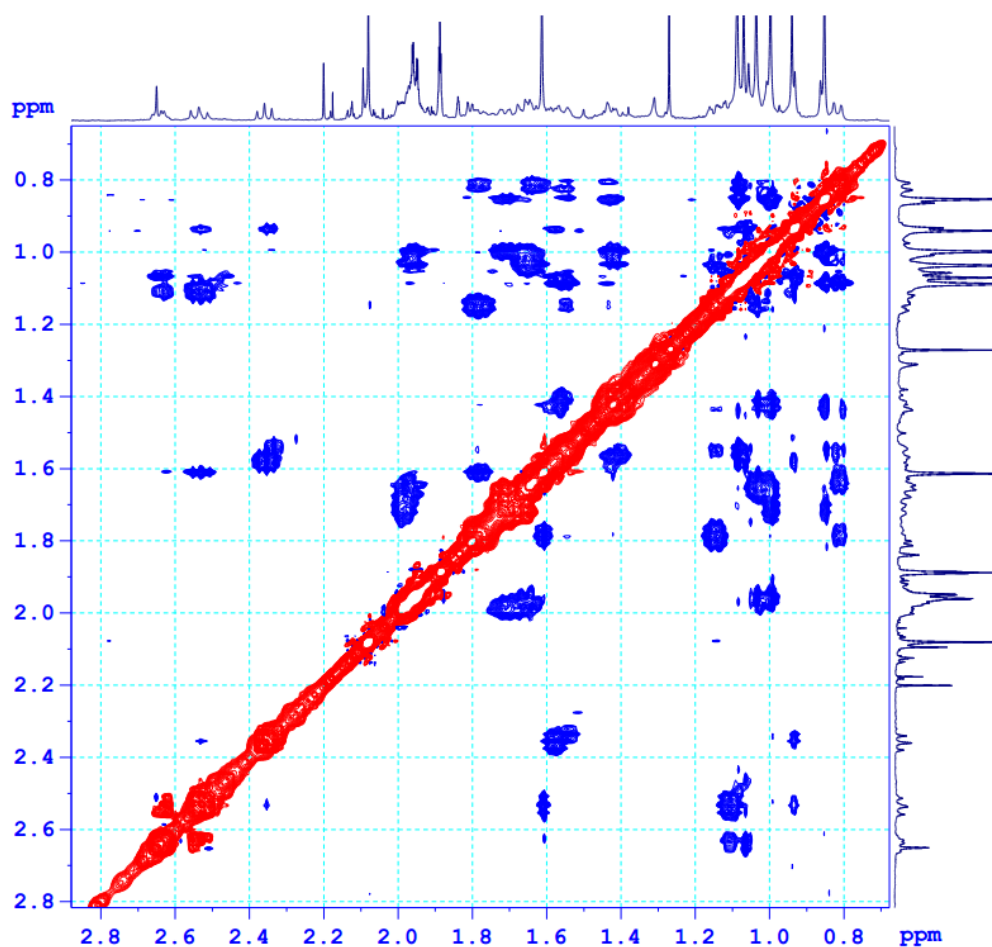
Hình 1.22 Phổ HMBC giãn của hợp chất CP2



Hình 1.23 Phổ HMBC giãn của hợp chất CP2

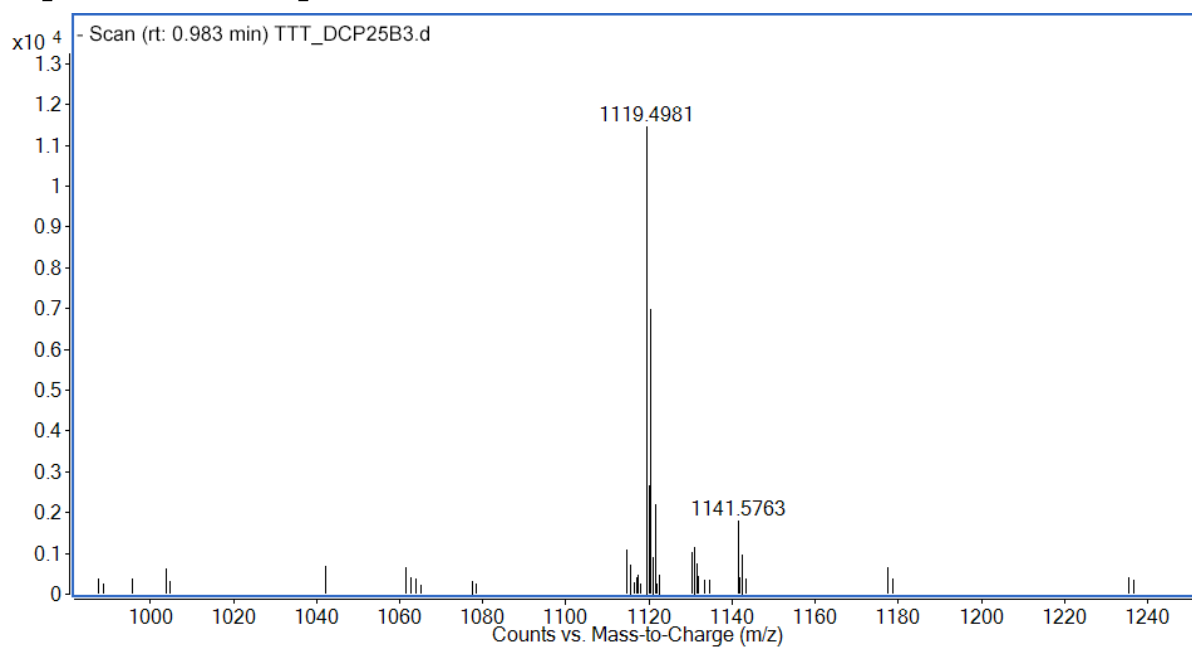


Hình 1.24 Phổ HMBC giãn của hợp chất CP2**Hình 1.25 Phổ NOESY của hợp chất CP2**

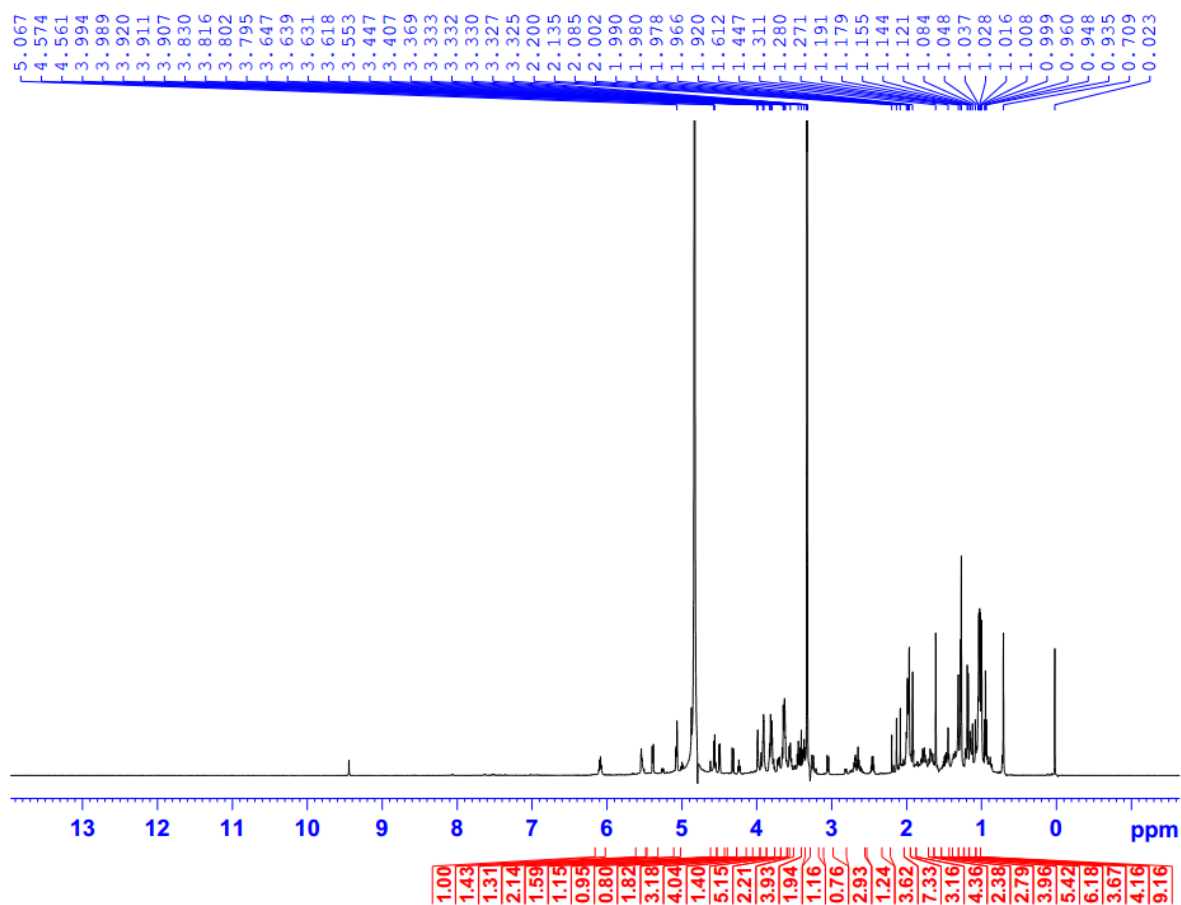


Hình 1.26 Phổ NOESY giãn của hợp chất CP2

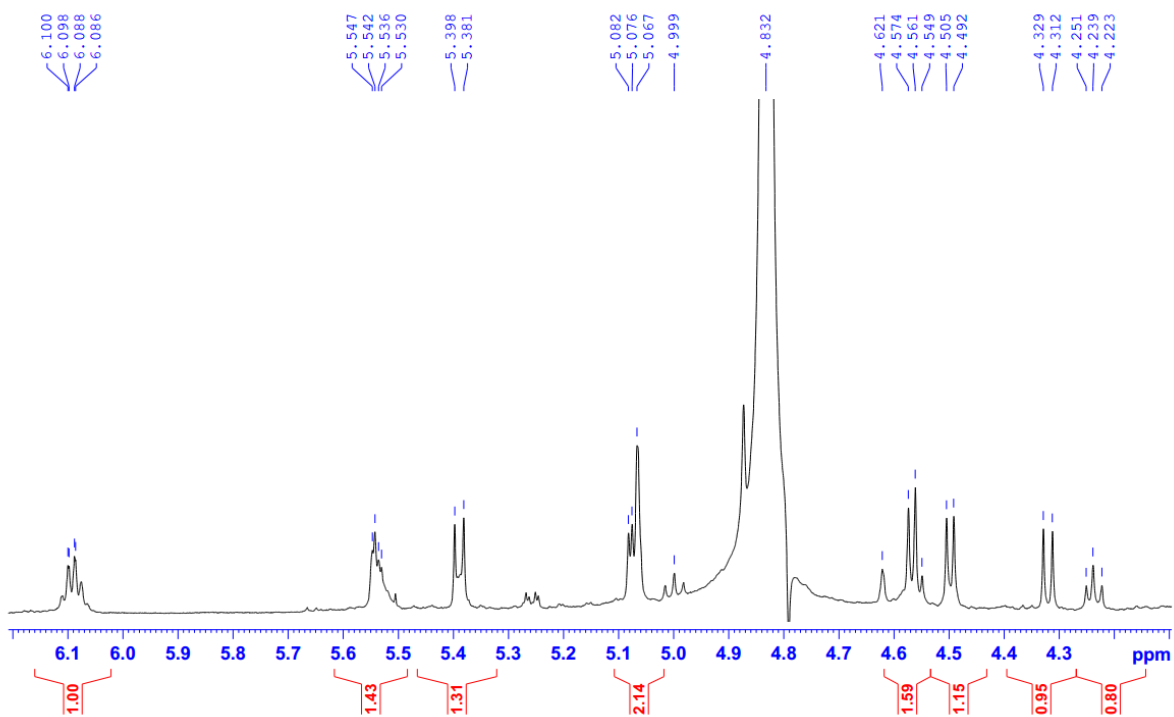
Hợp chất CP3: camphanoside C



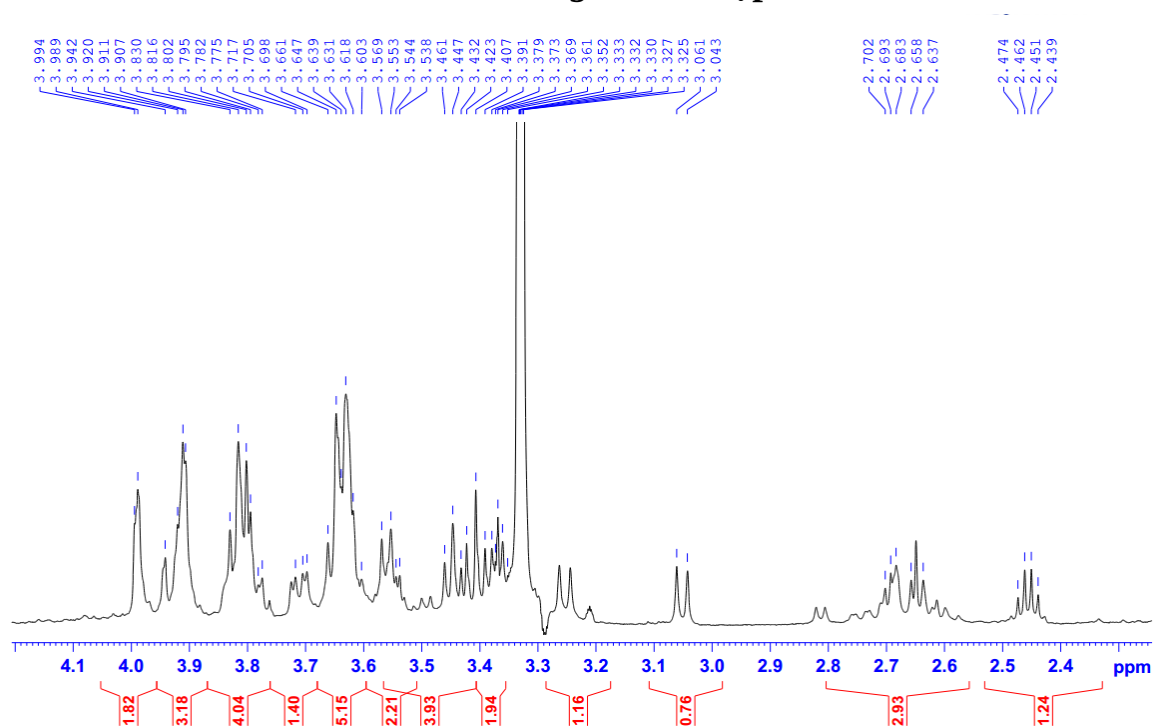
Hình 1.27 Phổ HR-ESI-MS của hợp chất CP3



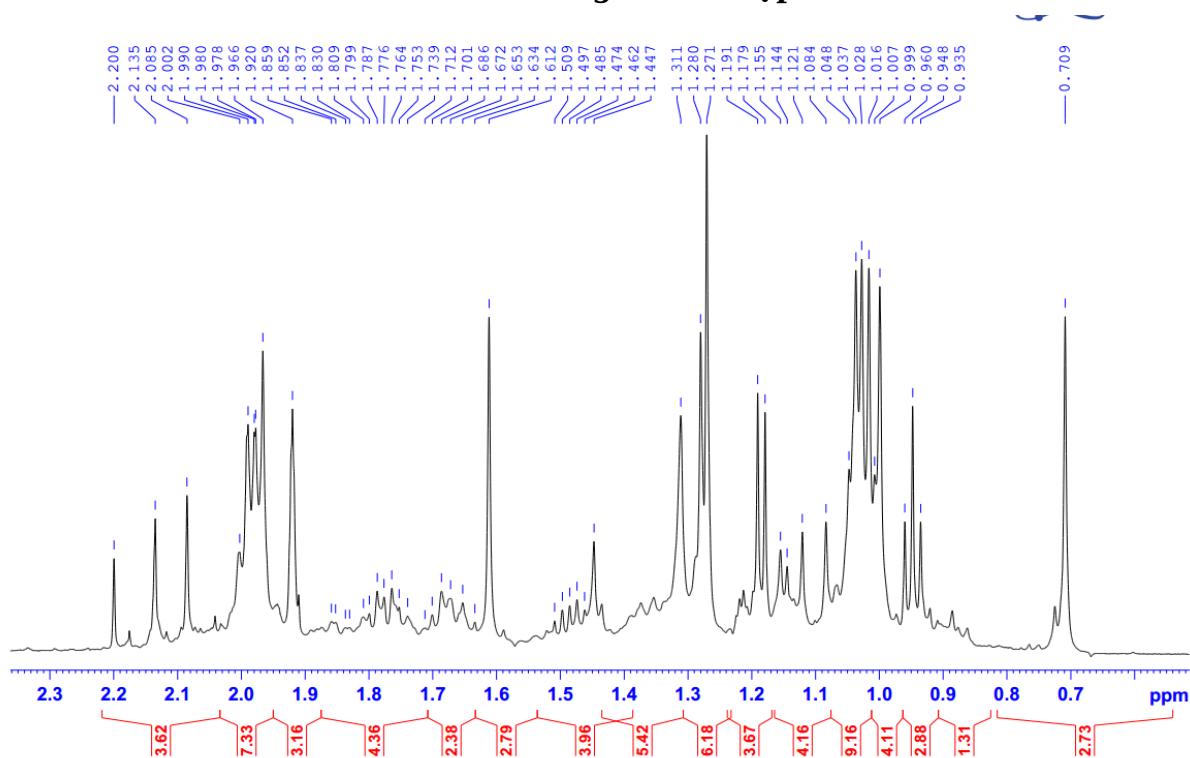
Hình 1.28 Phổ ^1H -NMR của hợp chất CP3



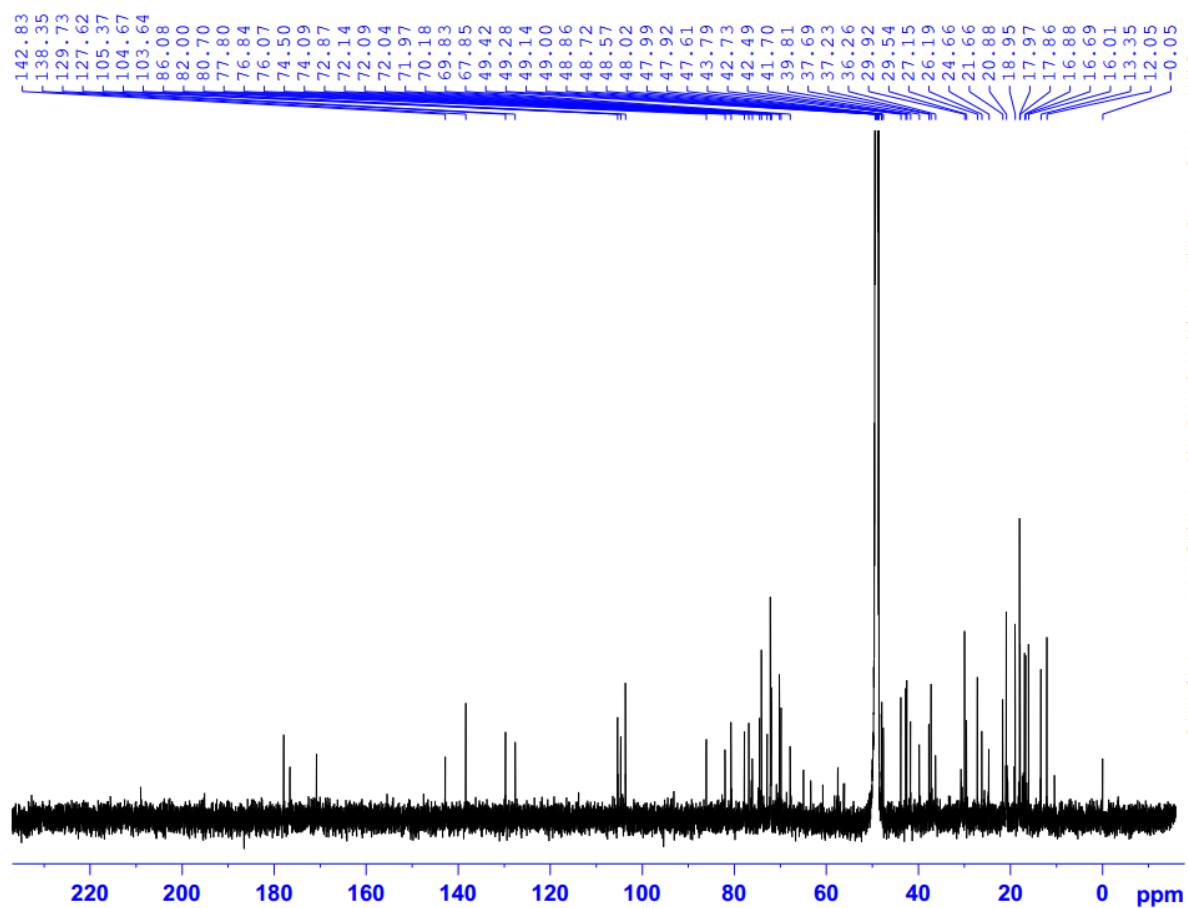
Hình 1.29 Phổ ^1H -NMR giãn của hợp chất CP3



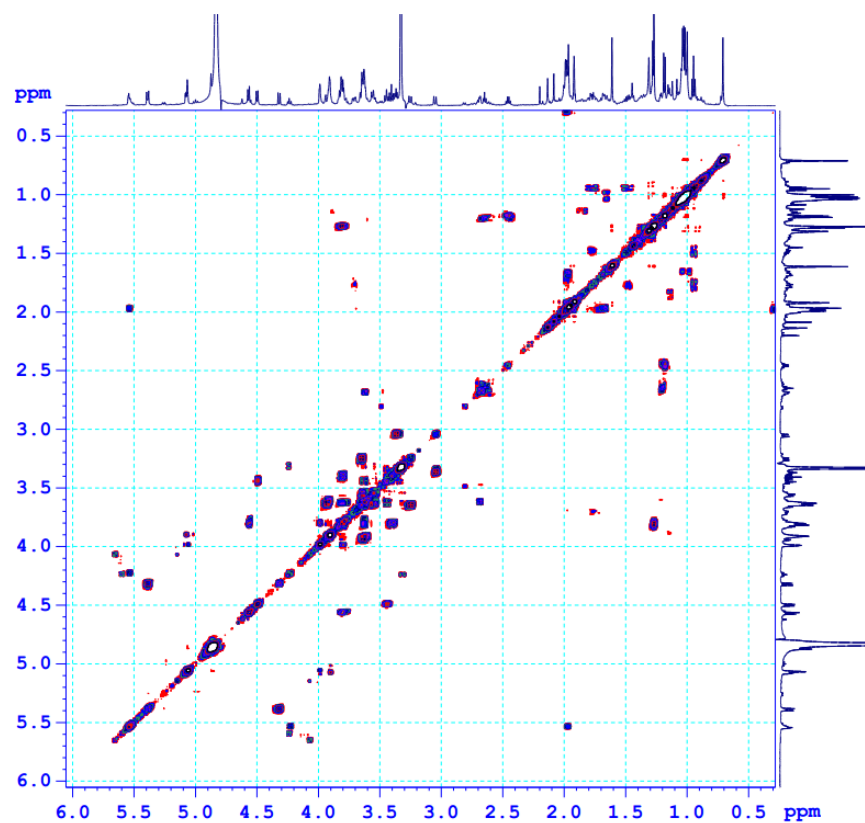
Hình 1.30 Phổ ^1H -NMR giãn của hợp chất CP3



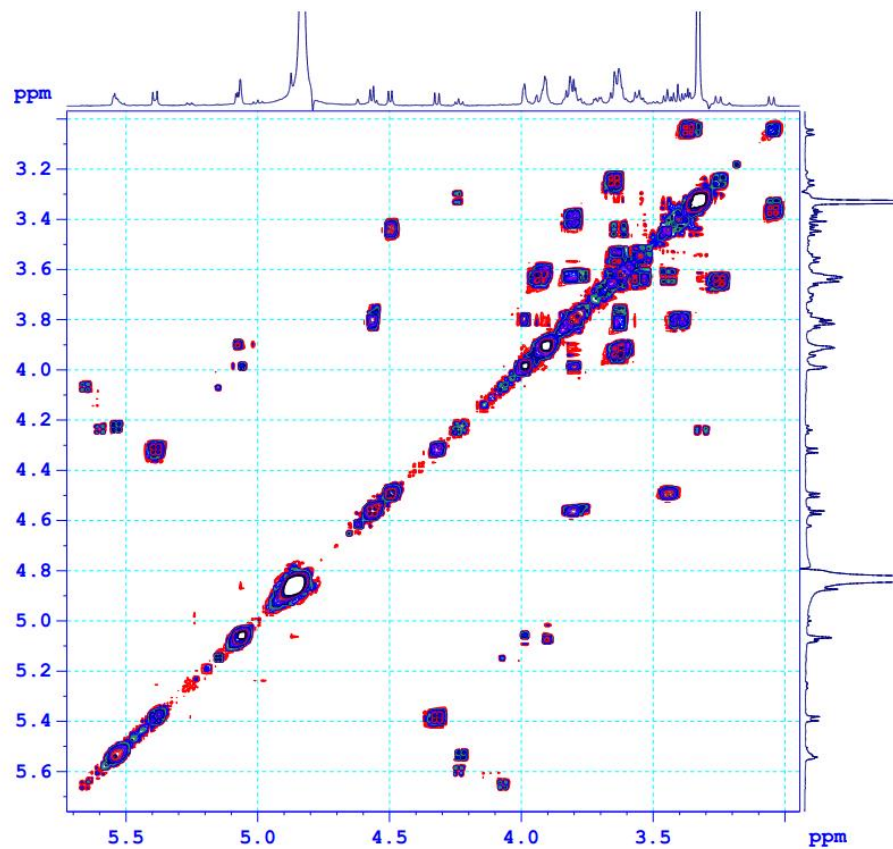
Hình 1.31 Phổ ^1H -NMR giãn của hợp chất CP3



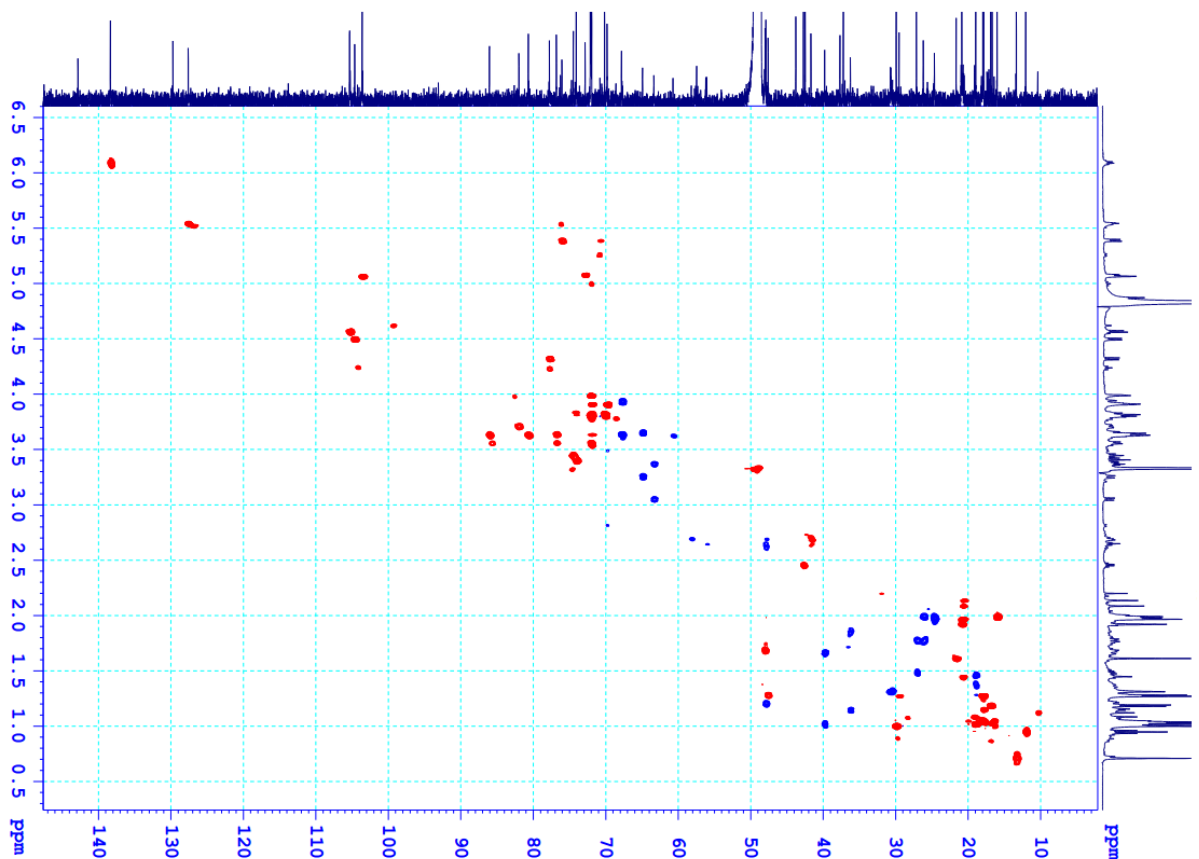
Hình 1.32 Phổ ^{13}C -NMR giãn của hợp chất CP3



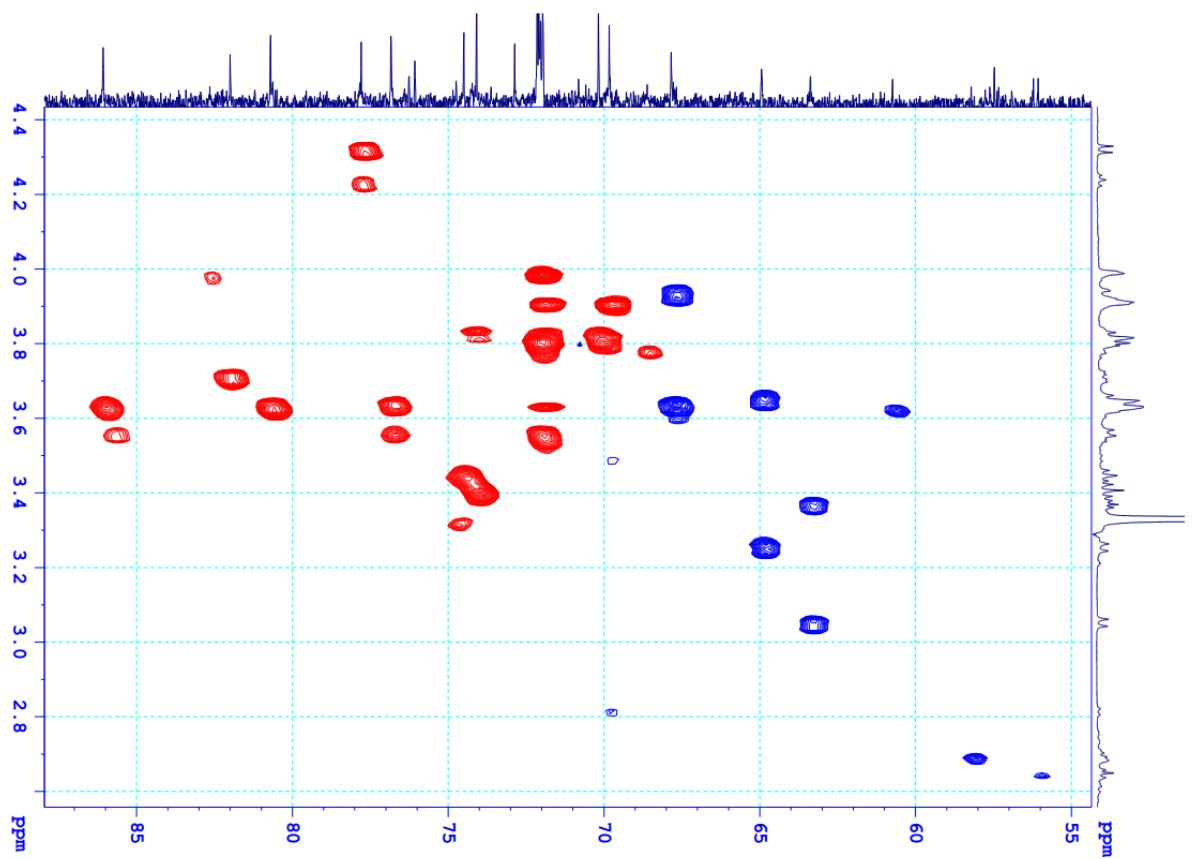
Hình 1.33 Phổ COSY của hợp chất CP3



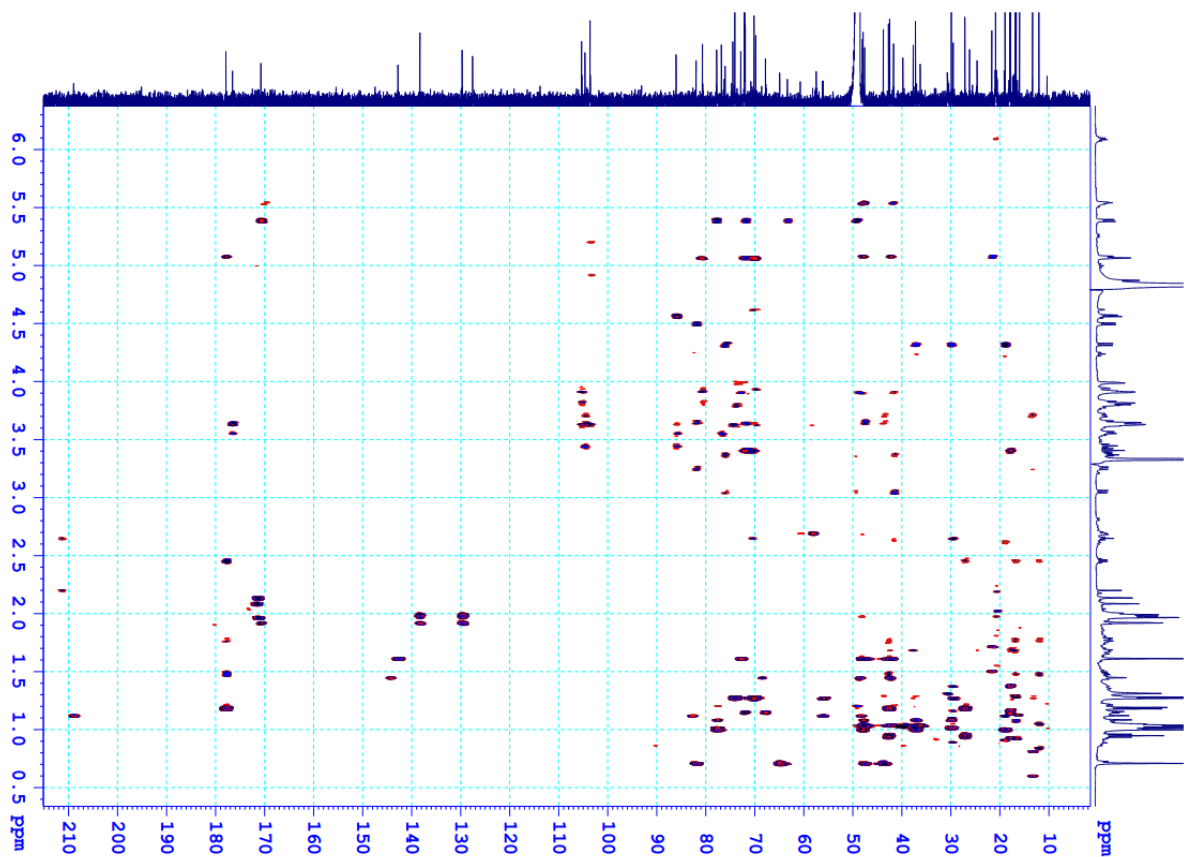
Hình 1.34 Phổ COSY giãn của hợp chất CP3

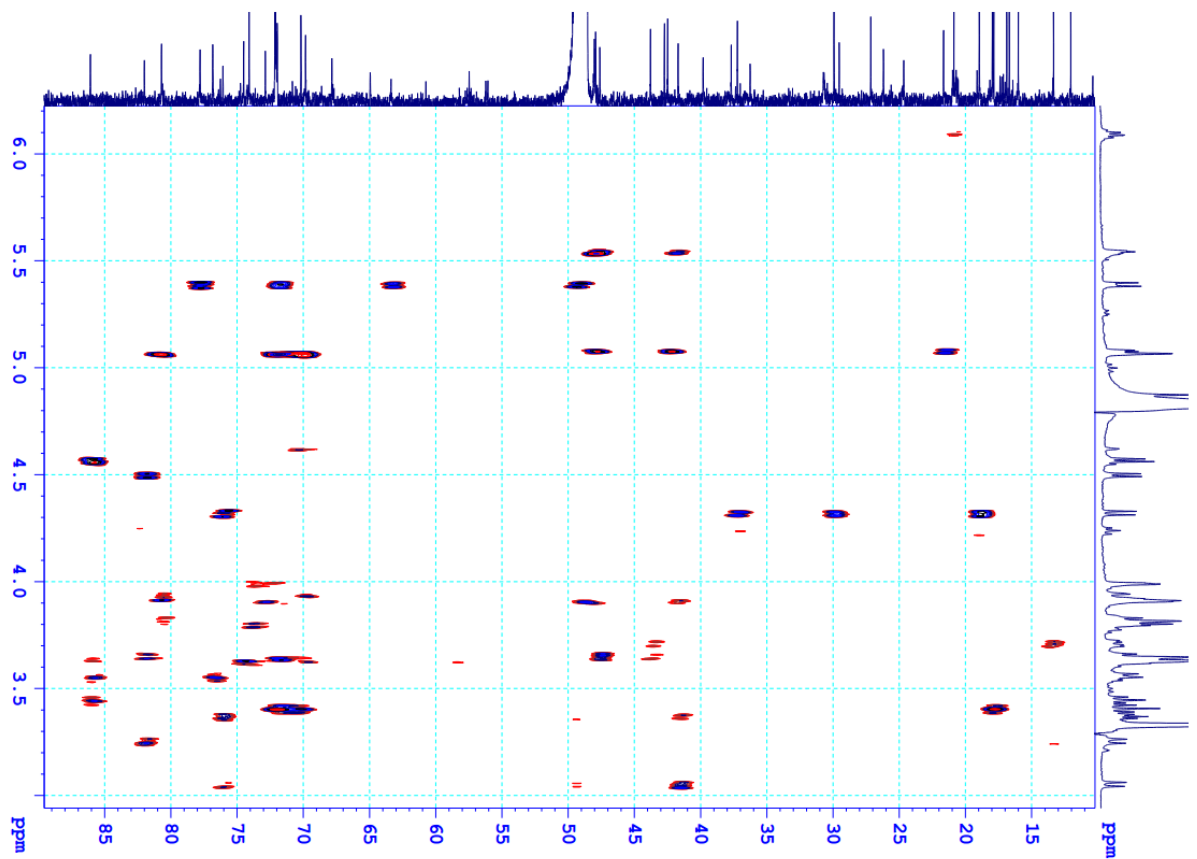


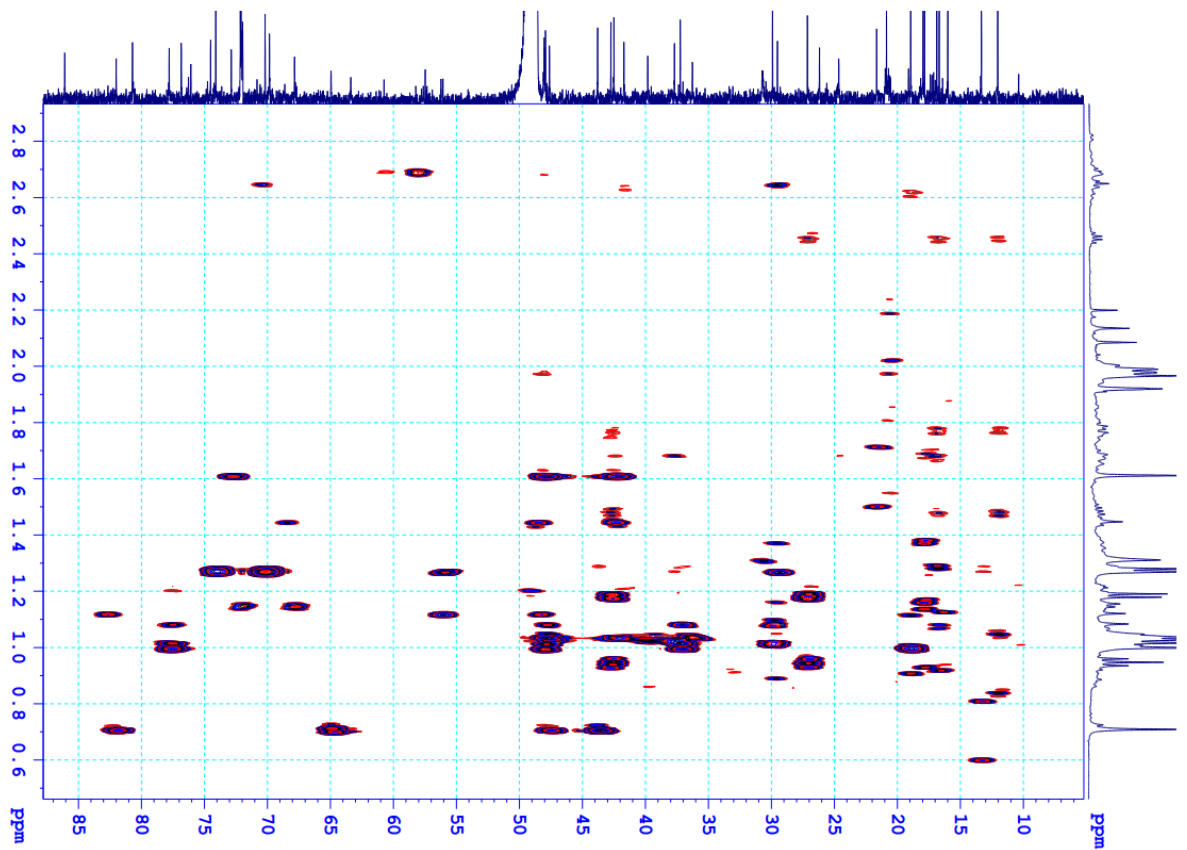
Hình 1.35 Phổ HSQC của hợp chất CP3



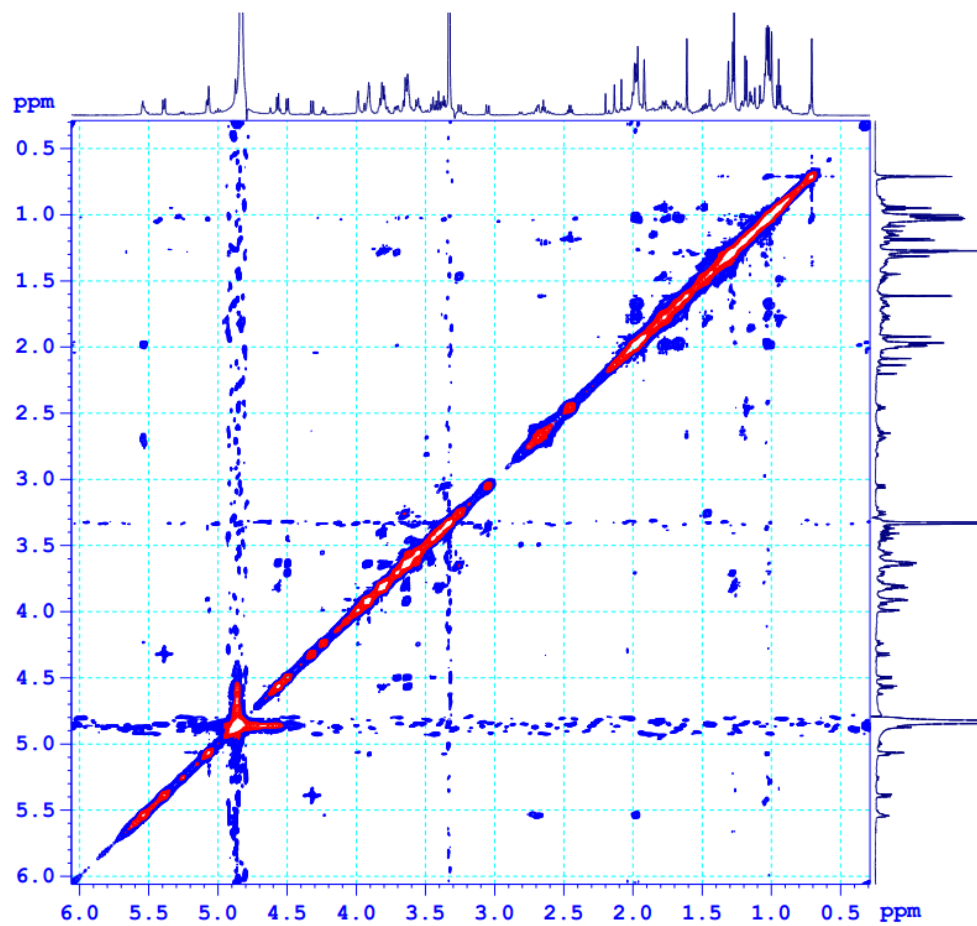
Hình 1.36 Phổ HSQC giãn của hợp chất CP3



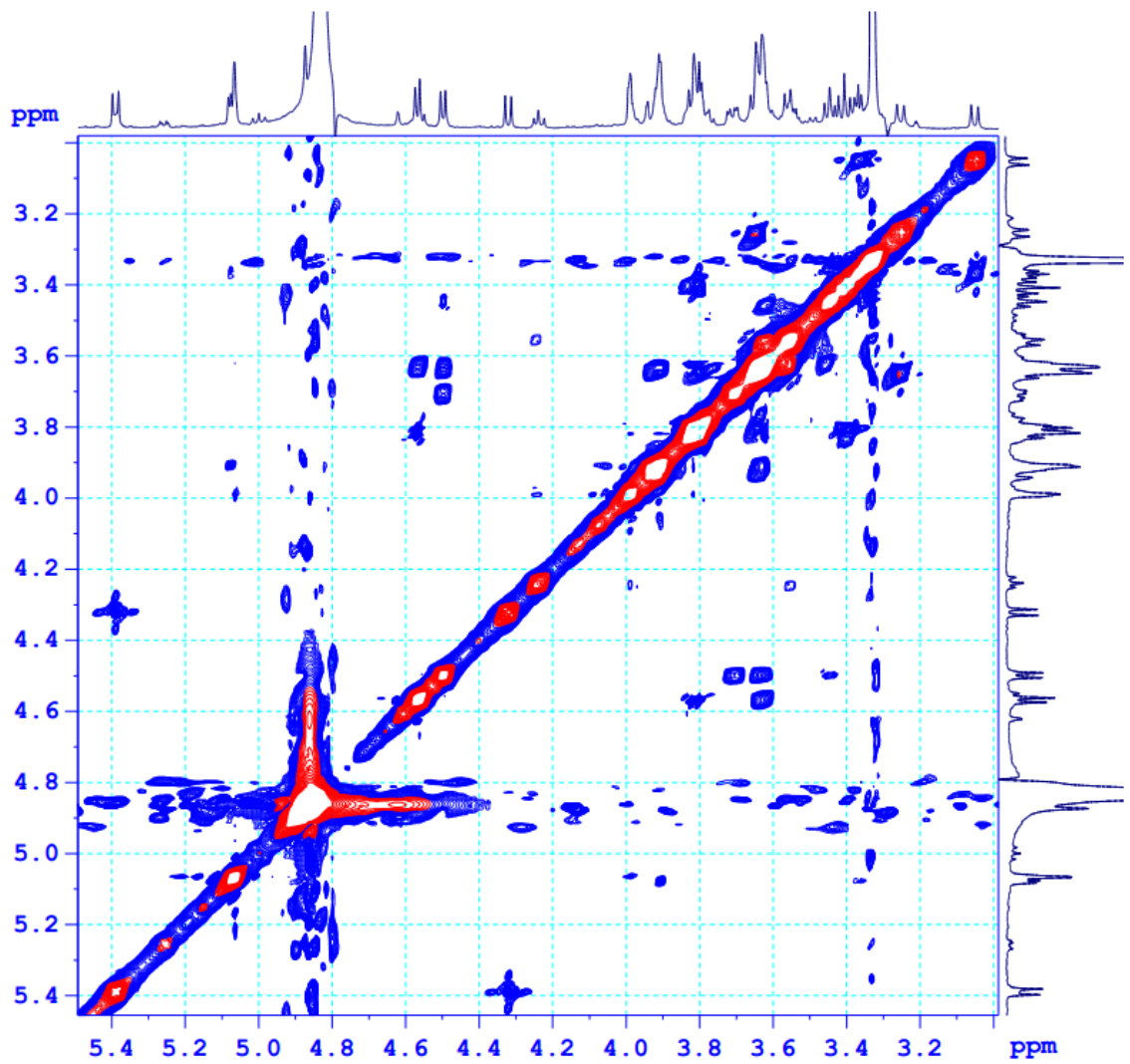
Hình 1.37 Phổ HMBC của hợp chất CP3**Hình 1.38 Phổ HMBC giãn của hợp chất CP3**



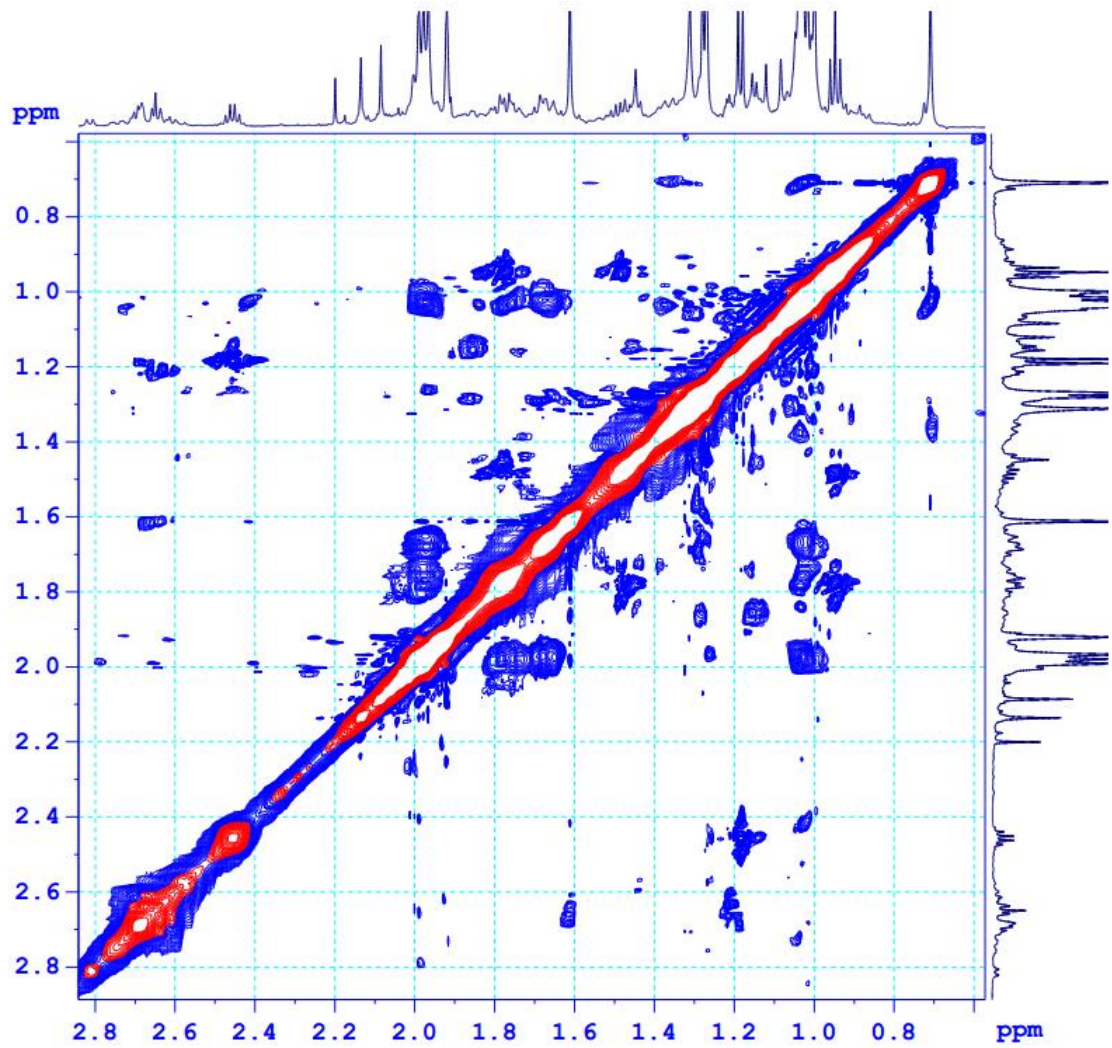
Hình 1.39 Phổ HMBC giãn của hợp chất CP3



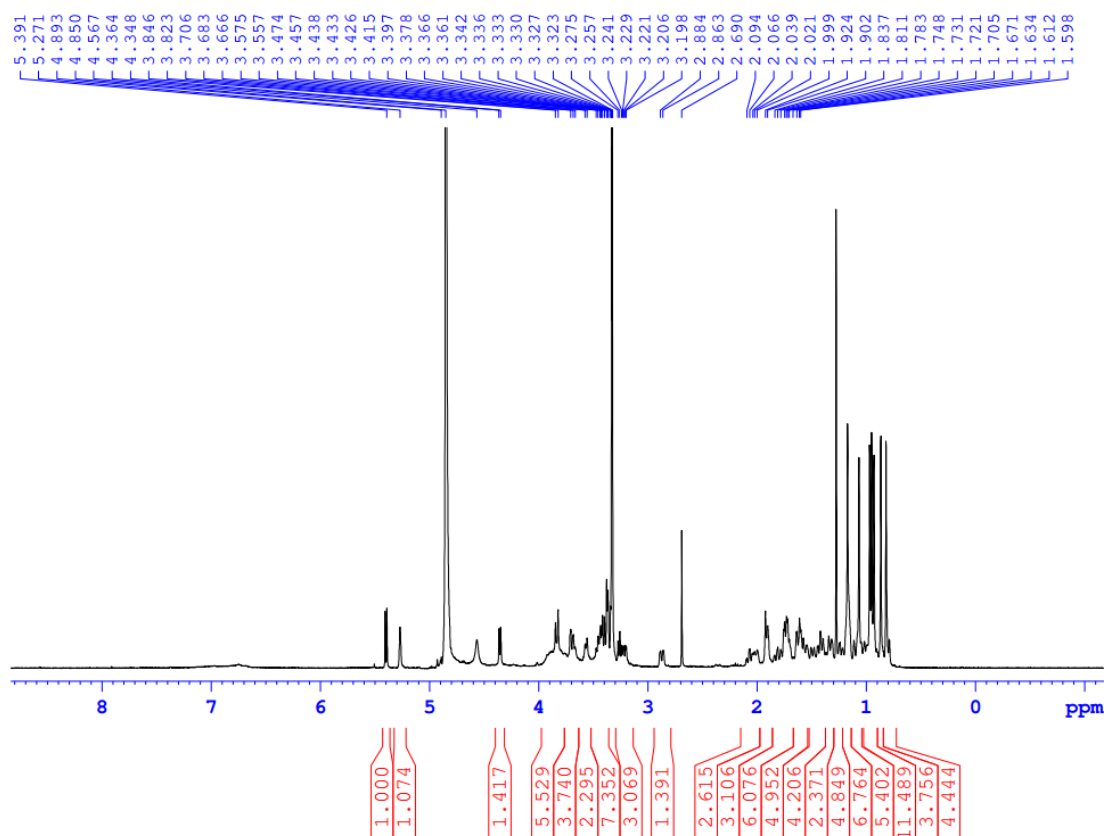
Hình 1.40 Phổ NOESY của hợp chất CP3



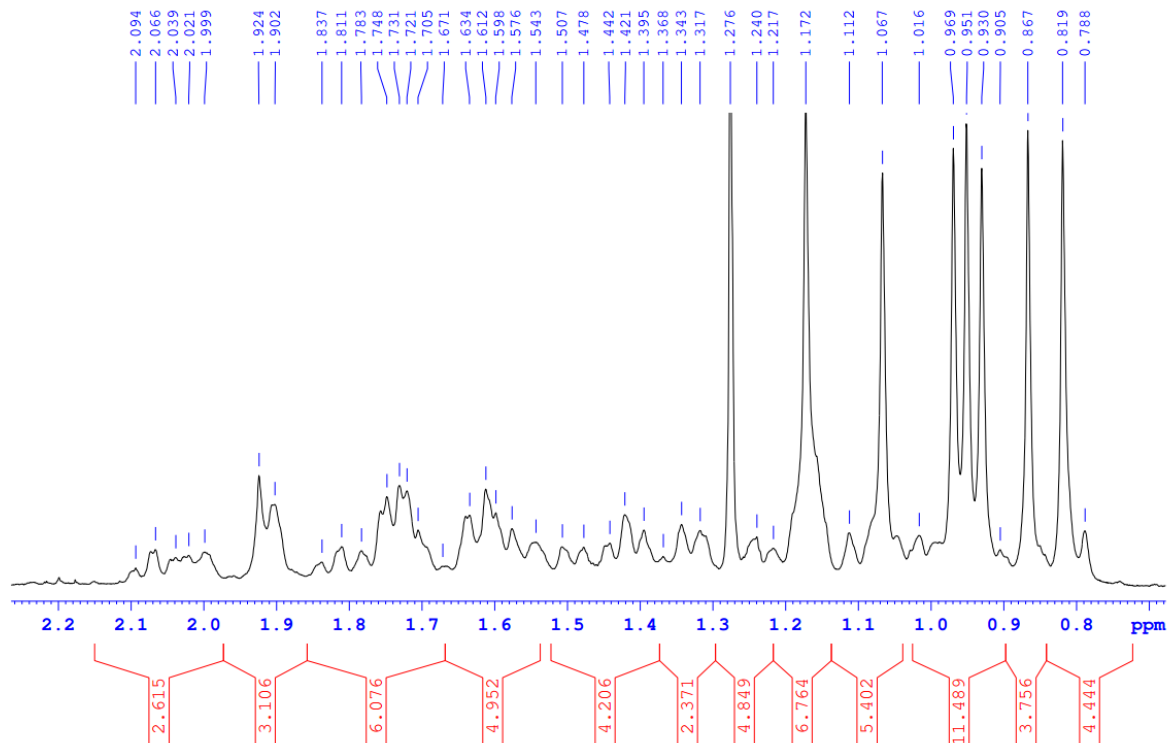
Hình 1.41 Phổ NOESY giãn của hợp chất CP3



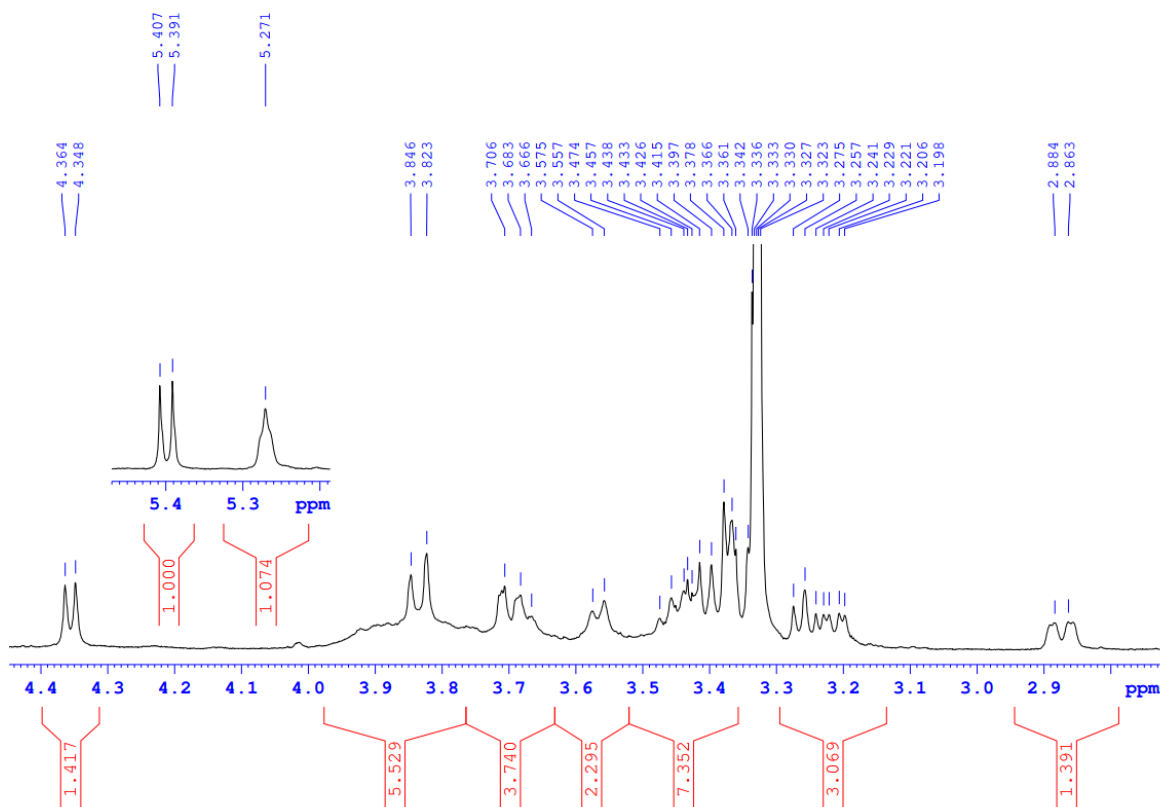
Hình 1.42 Phổ NOESY giãn của hợp chất CP3
Hợp chất CP4: chikusetsusaponin IVa



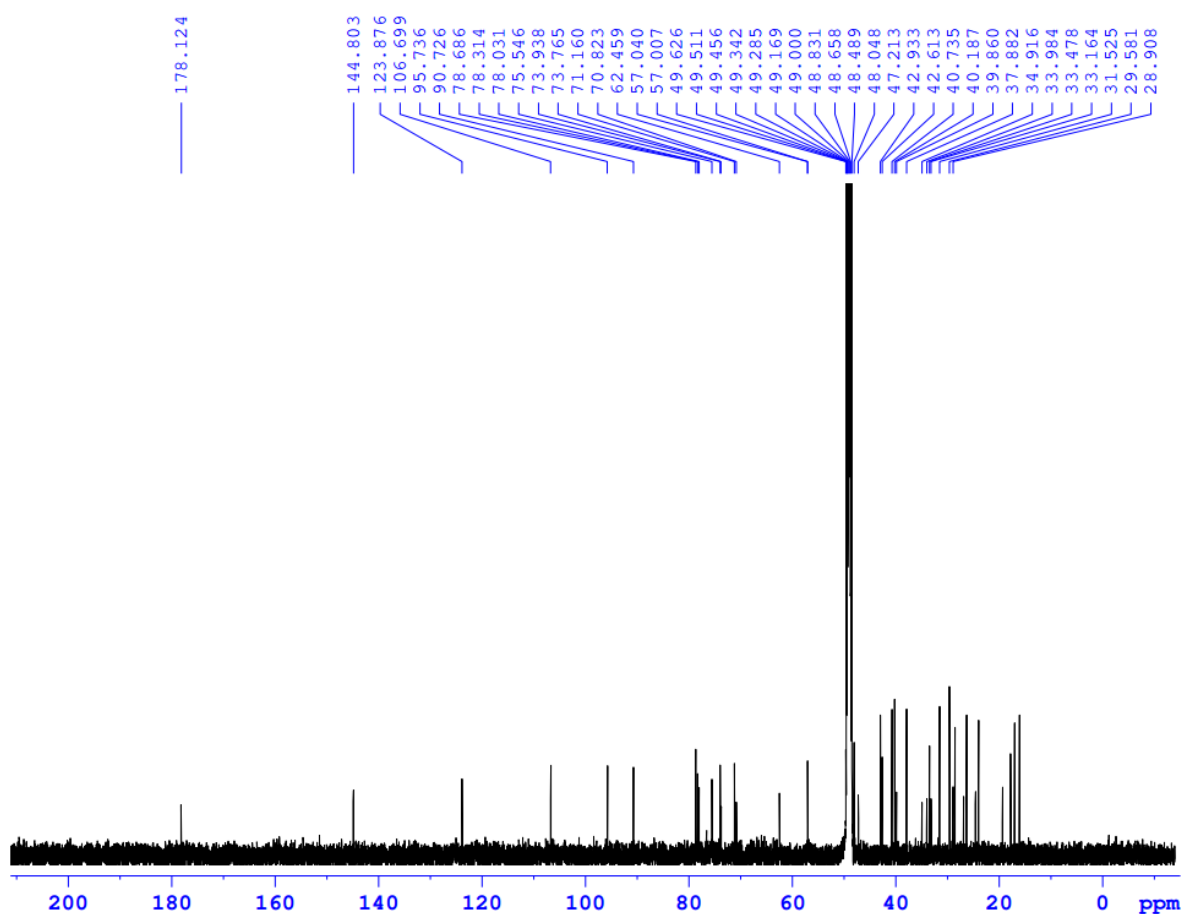
Hình 1.43 Phổ ^1H -NMR của hợp chất CP4



Hình 1.44 Phổ ^1H -NMR giãn của hợp chất CP4

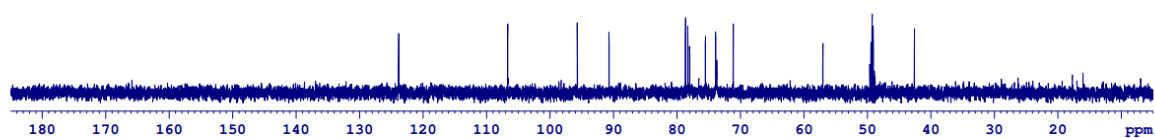


Hình 1.45 Phổ ¹H-NMR giãn của hợp chất CP4



Hình 1.46 Phổ ¹³C-NMR giãn của hợp chất CP4

DEPT90



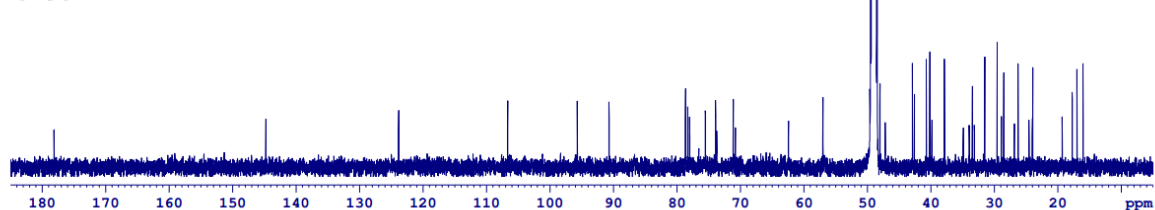
DEPT135

CH&CH3

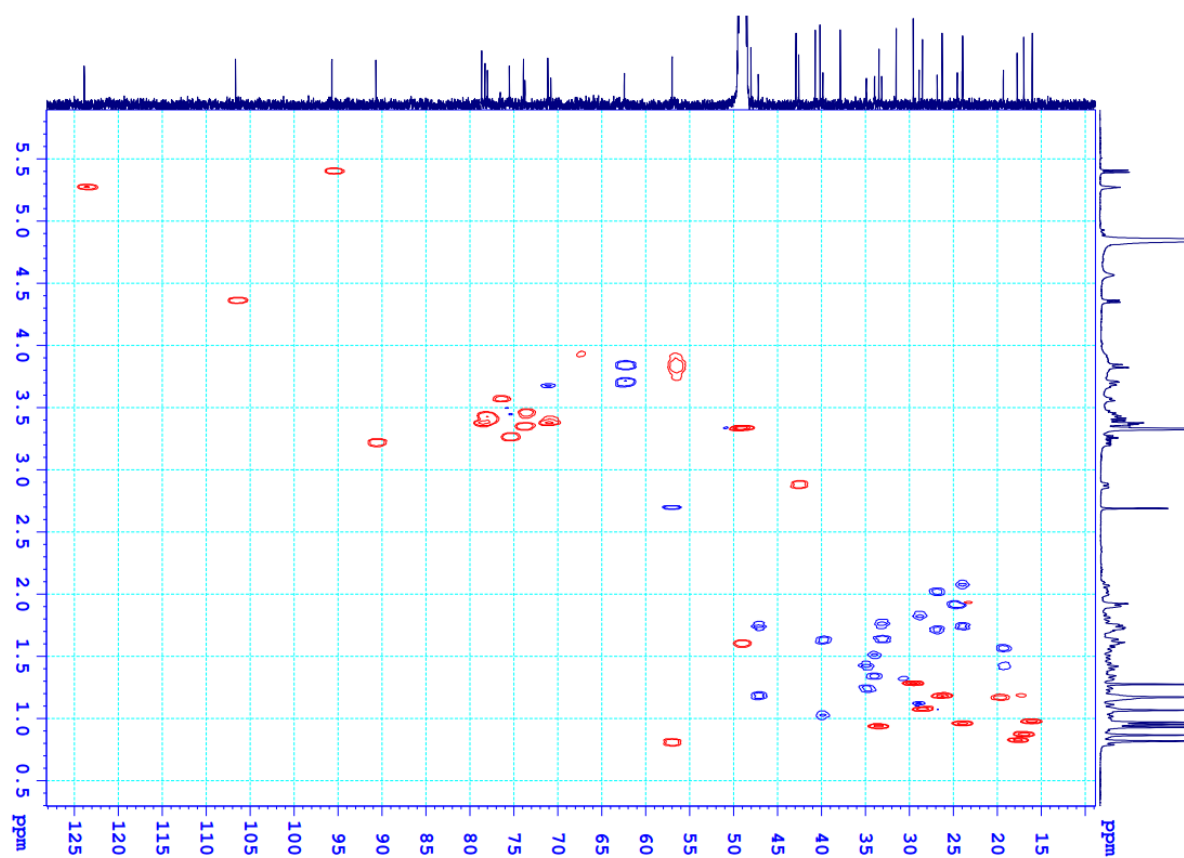
CH2



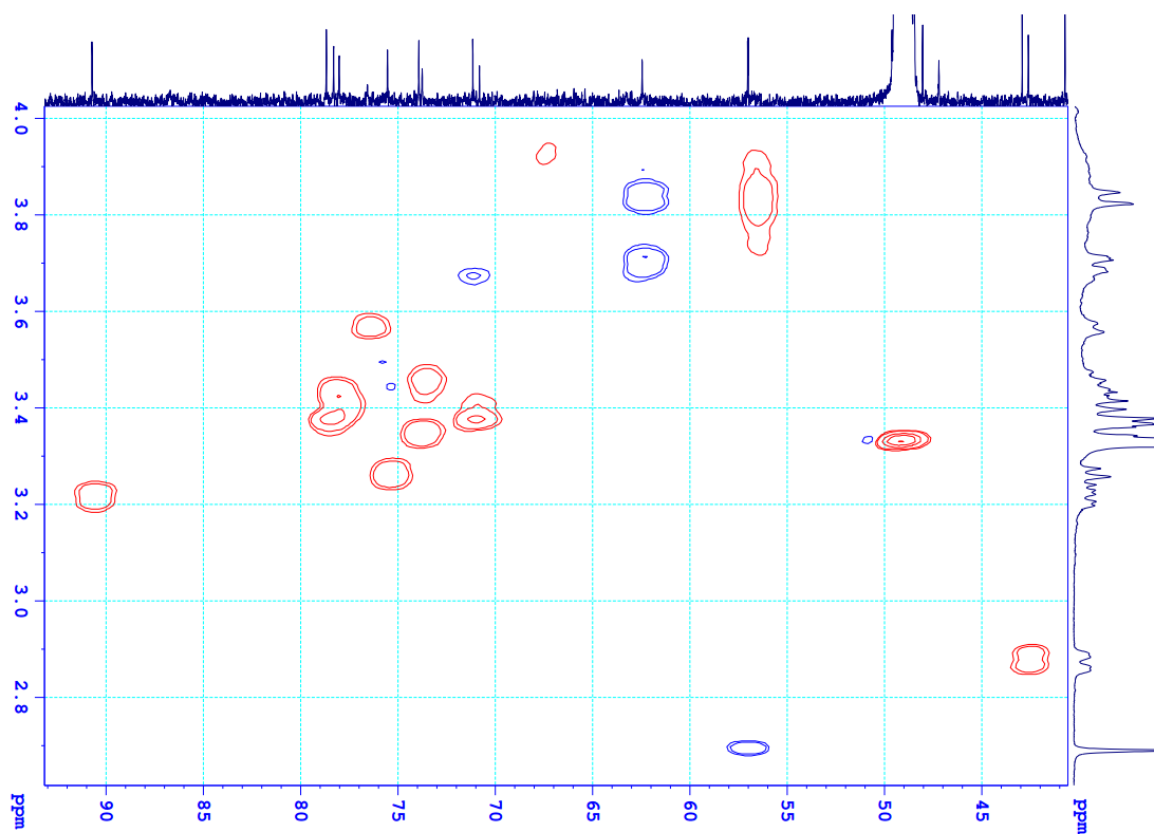
C13CPD



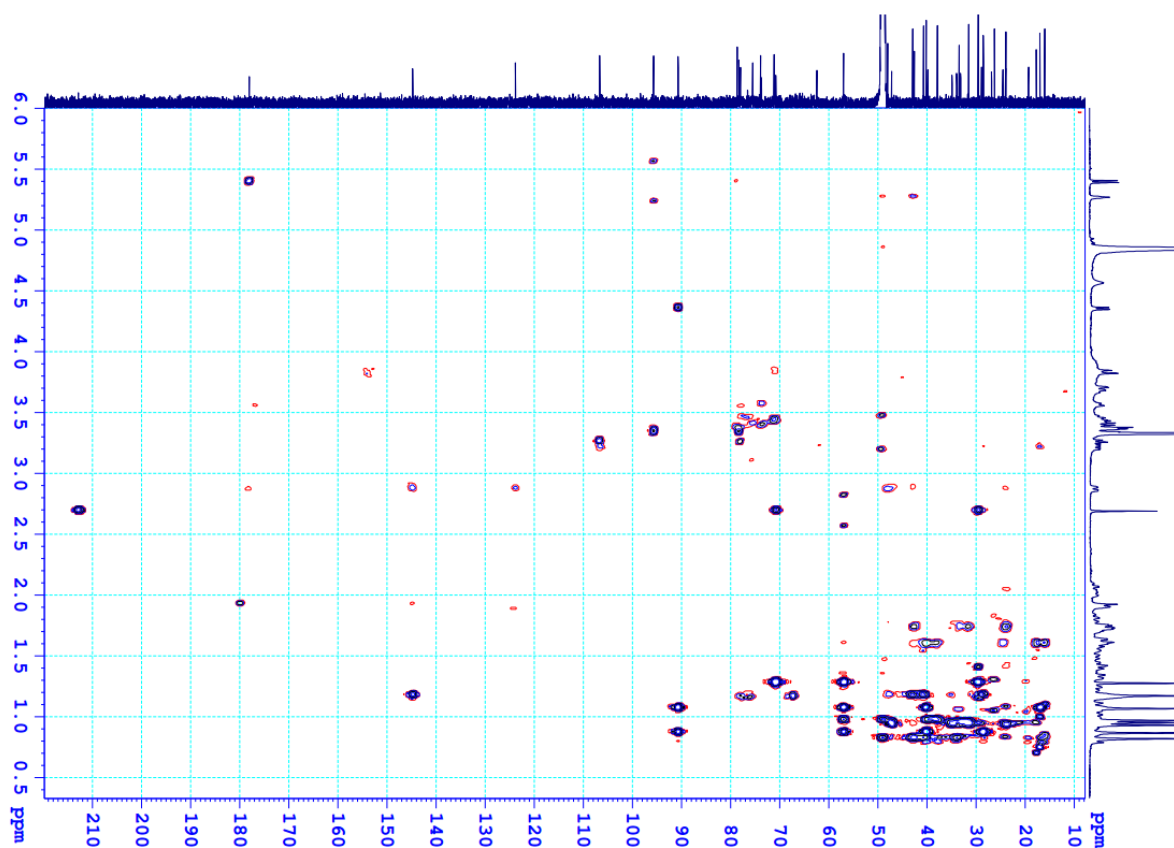
Hình 1.47 Phổ Dept của hợp chất CP4



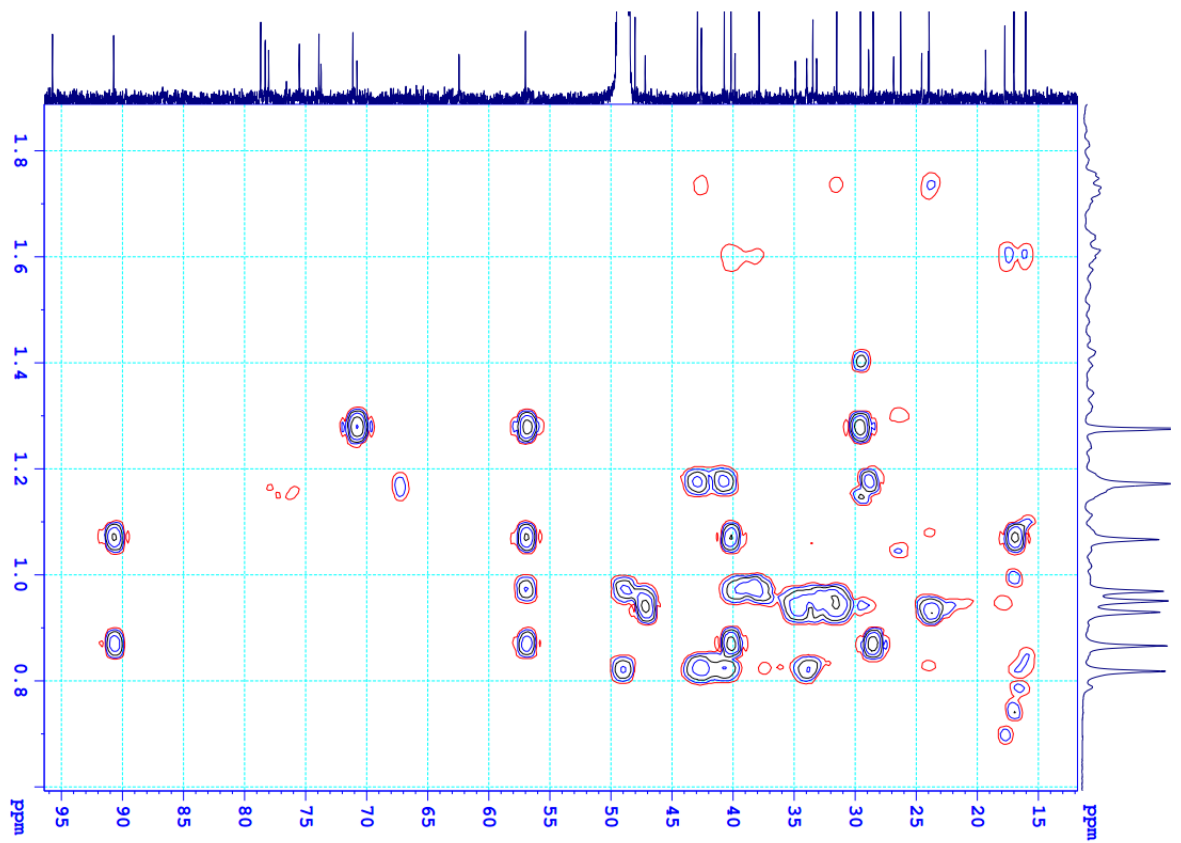
Hình 1.48 Phổ HSQC của hợp chất CP4



Hình 1.49 Phổ HSQC giãn của hợp chất CP4

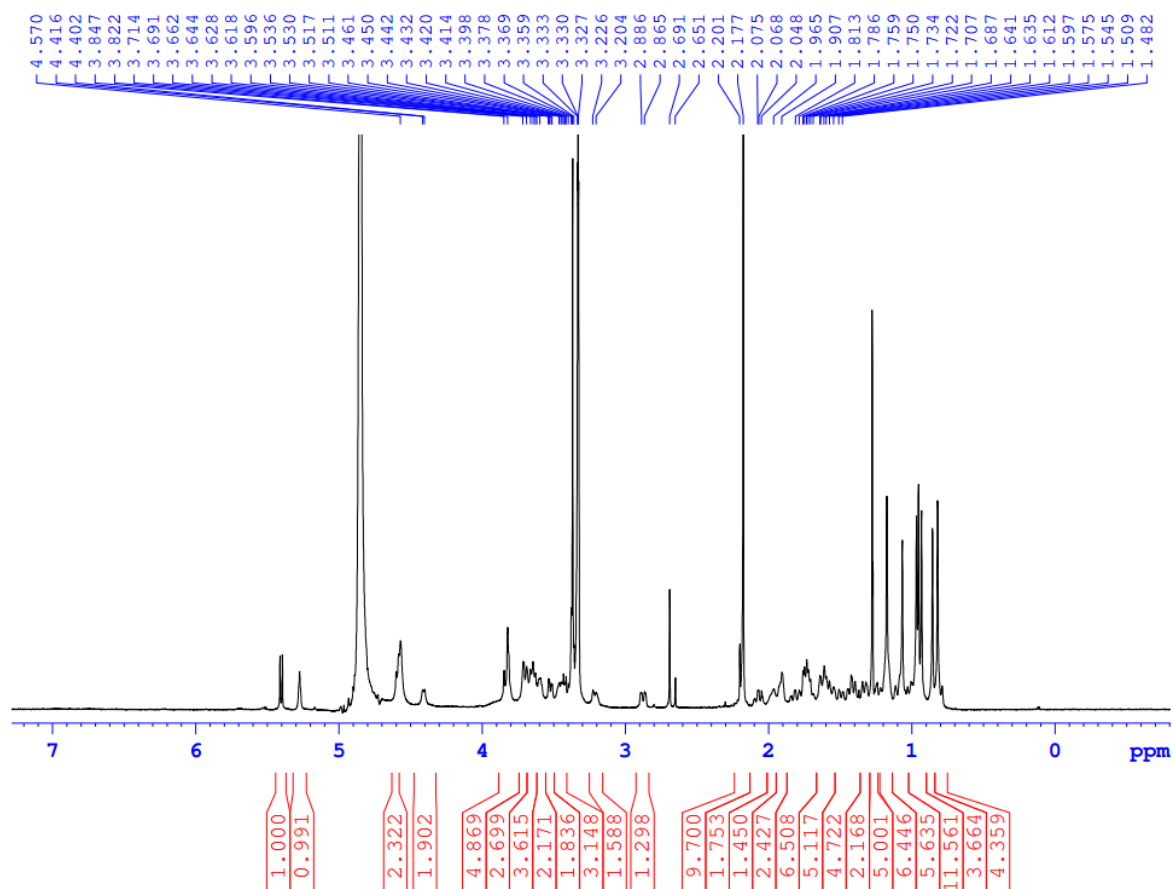


Hình 1.50 Phổ HMBC của hợp chất CP4

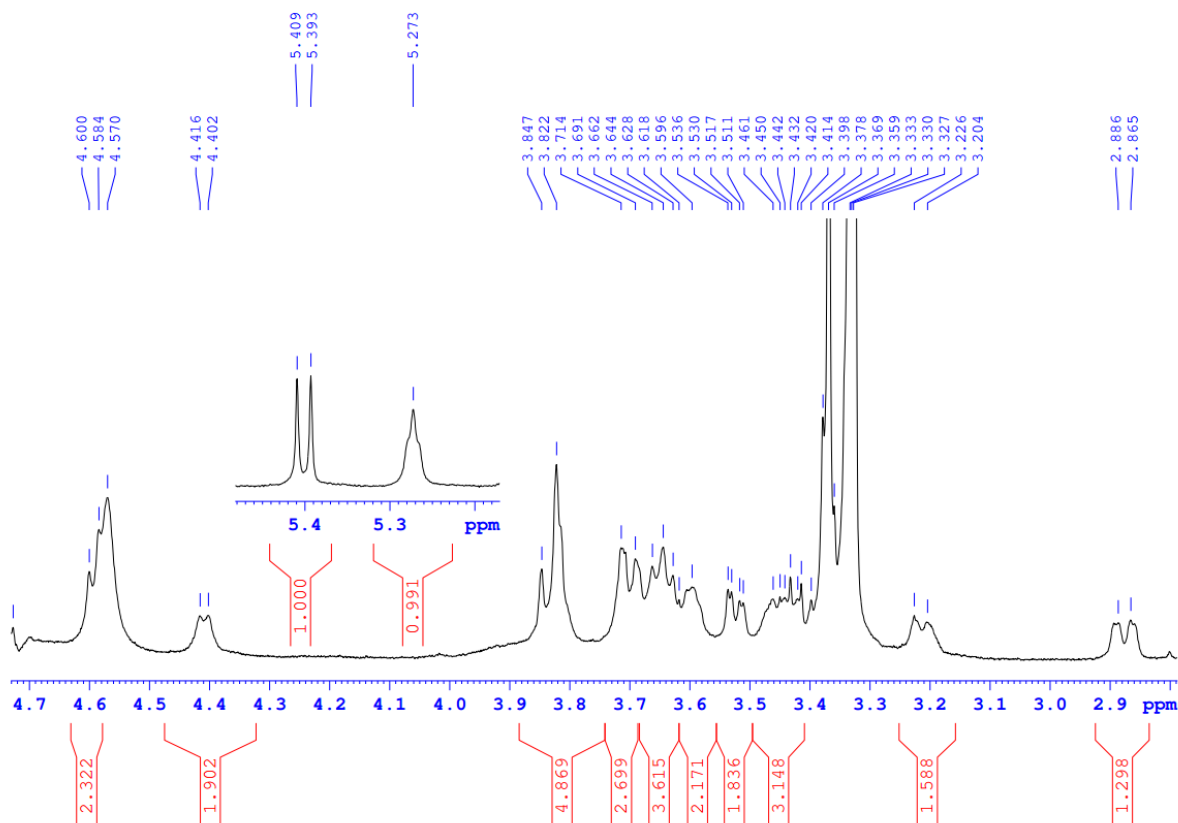


Hình 1.51 Phổ HMBC giãn của hợp chất CP4

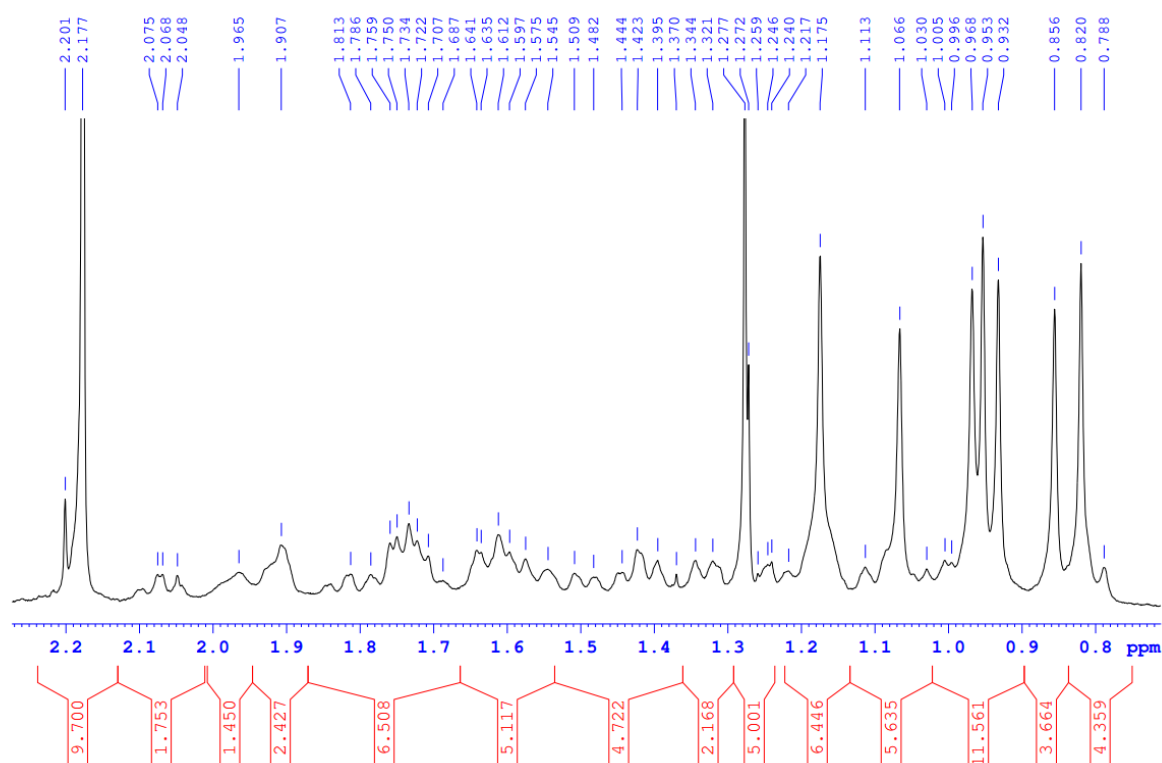
Hợp chất CP5: spinasaponin A 28-O-glucoside



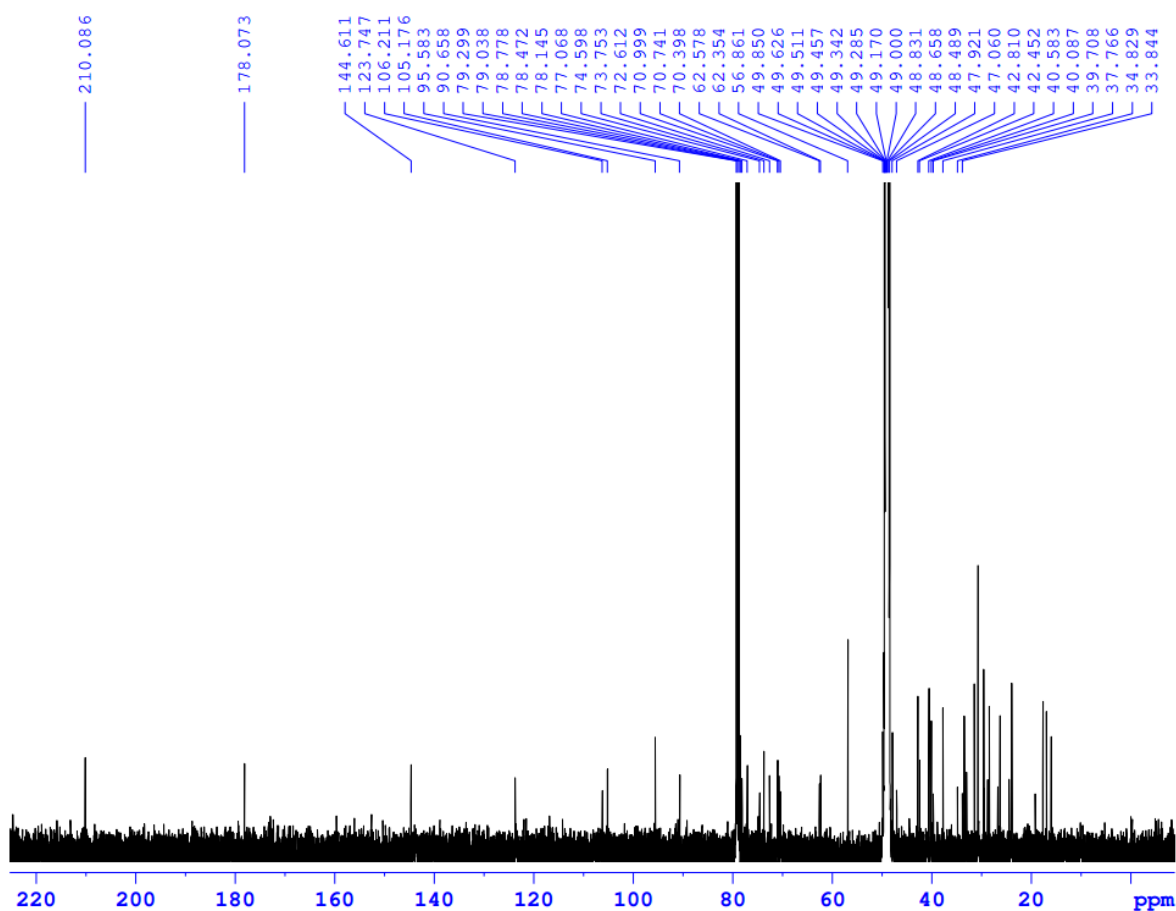
Hình 1.52 Phổ ^1H -NMR của hợp chất CP5



Hình 1.53 Phổ ^1H -NMR giản của hợp chất CP5

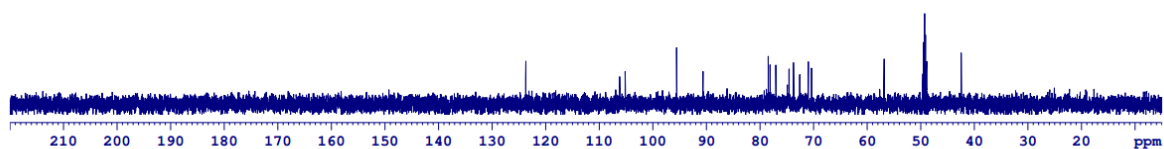


Hình 1.54 Phổ ^1H -NMR giản của hợp chất CP5



Hình 1.55 Phổ ^{13}C -NMR giản của hợp chất CP5

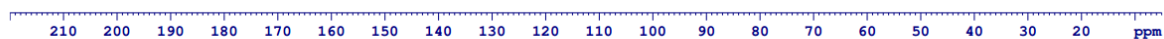
DEPT90



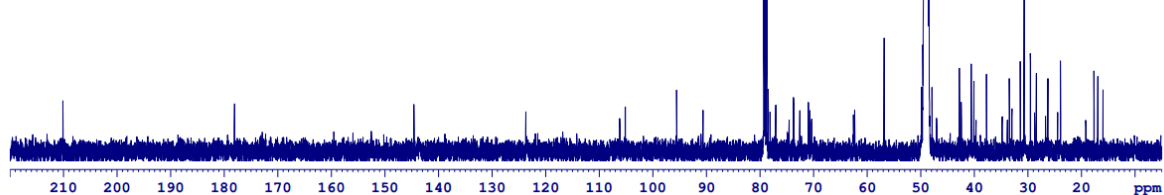
DEPT135

CH&CH3

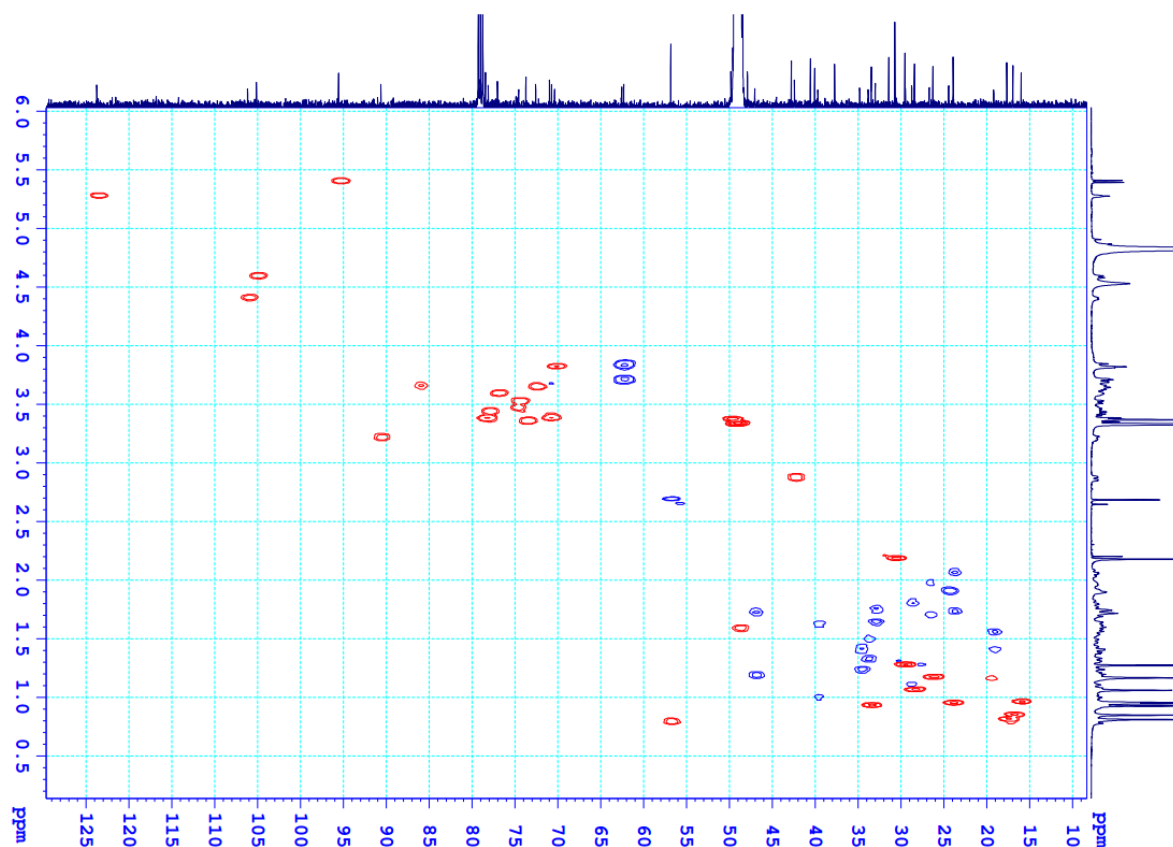
CH2



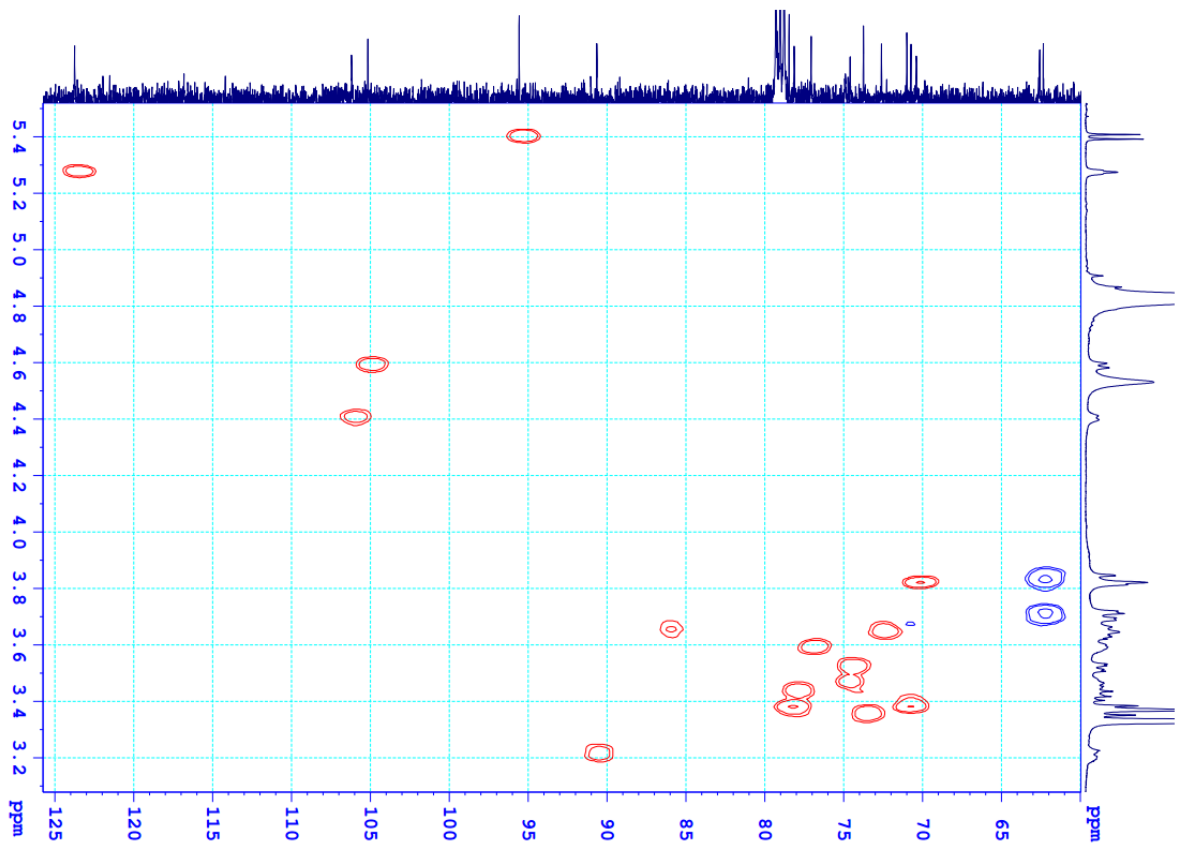
C13CPD



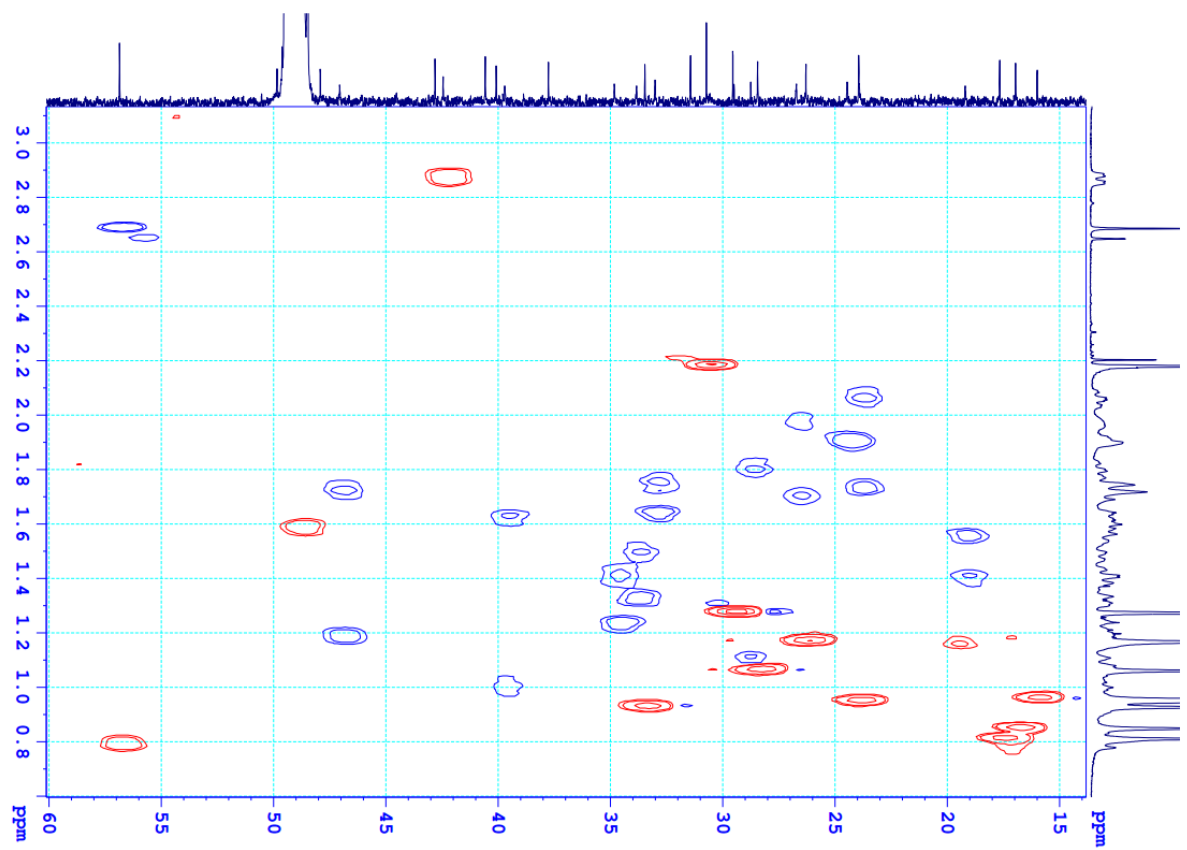
Hình 1.56 Phổ Dept của hợp chất CP5

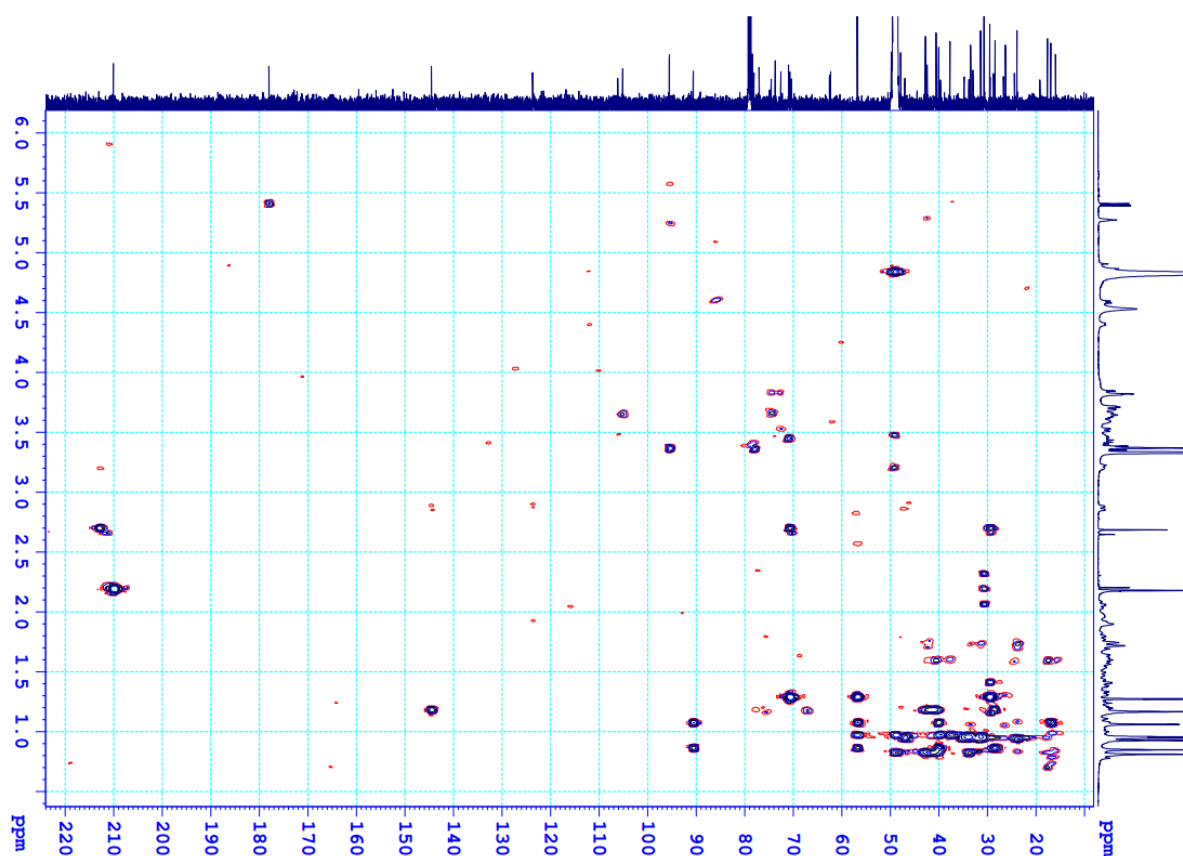
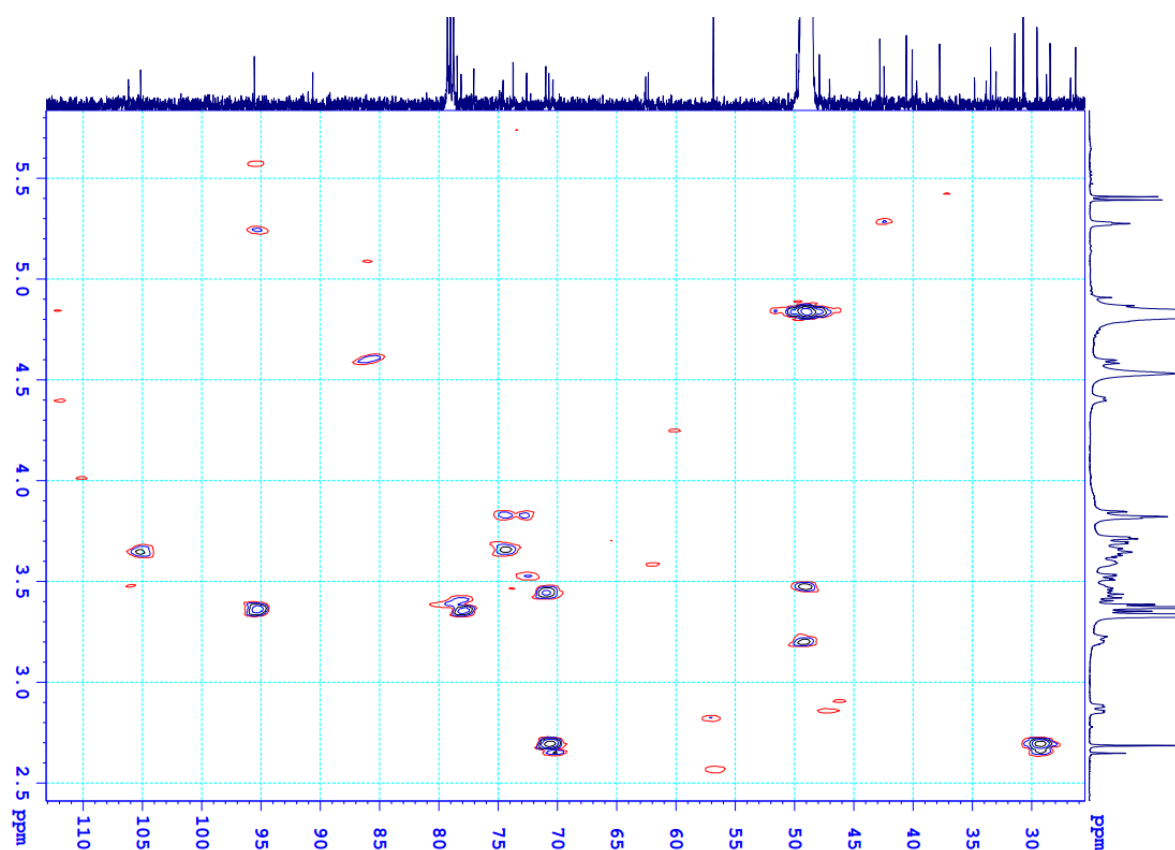


Hình 1.57 Phổ HSQC của hợp chất CP5

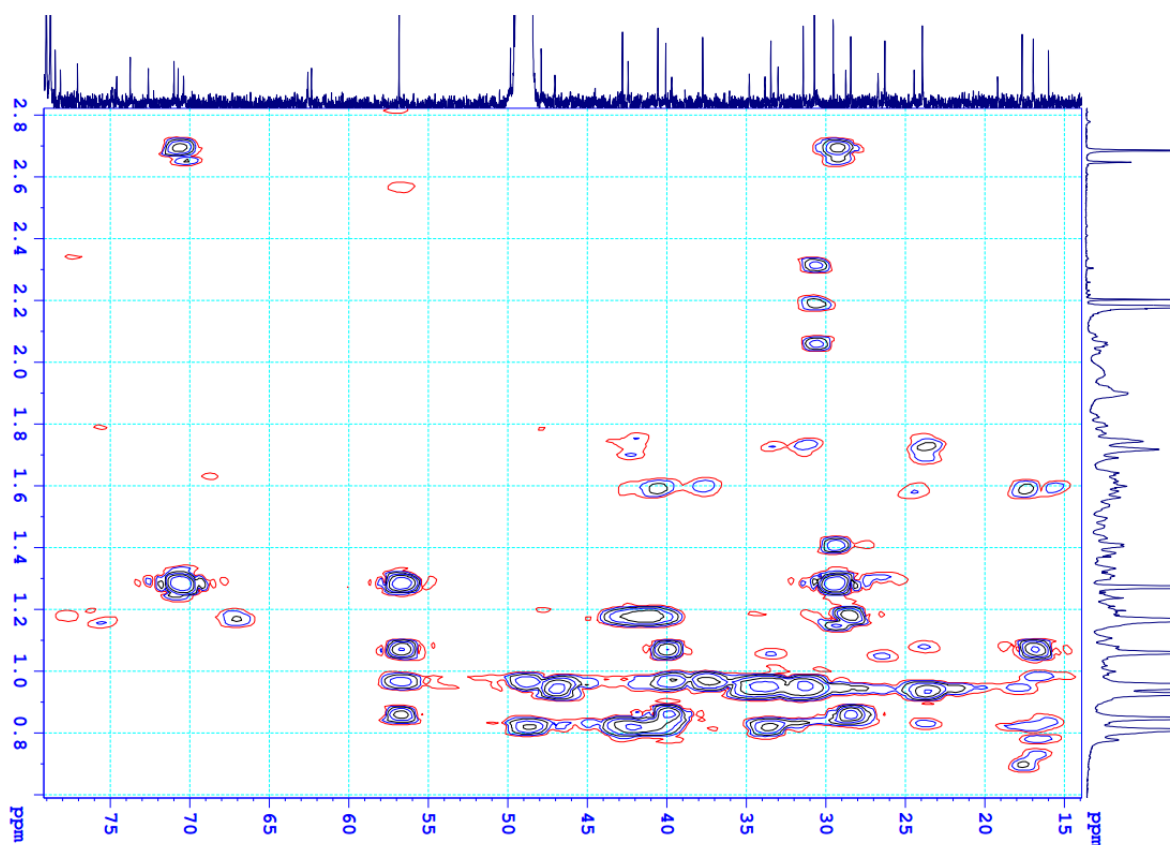


Hình 1.58 Phổ HSQC giãn của hợp chất CP5

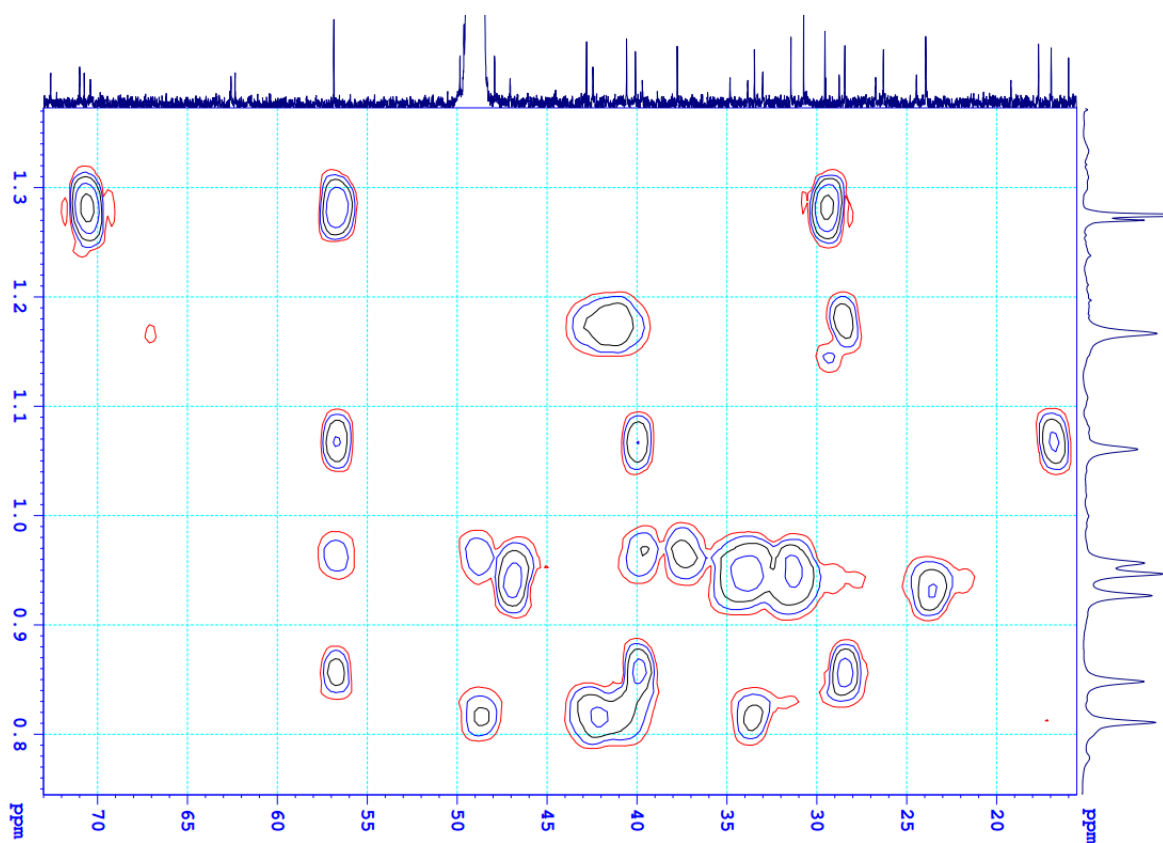


Hình 1.59 Phổ HSQC giãn của hợp chất CP5**Hình 1.60 Phổ HMBC của hợp chất CP5**

Hình 1.61 Phổ HMBC giãn của hợp chất CP5

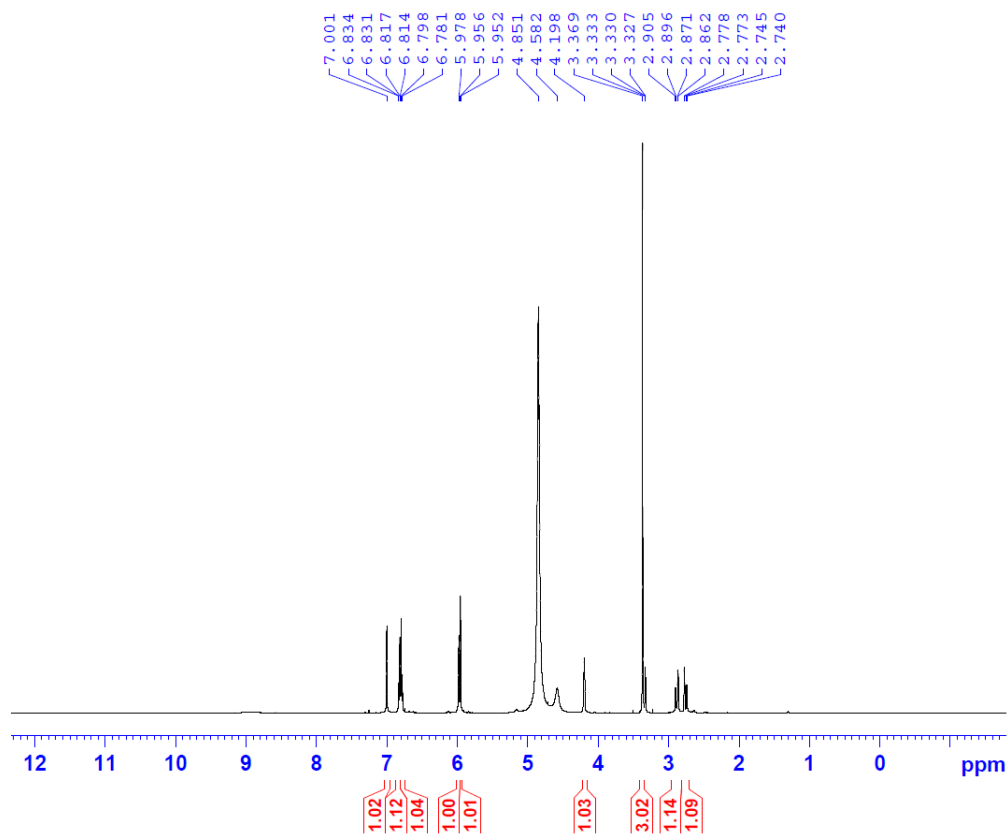


Hình 1.62 Phổ HMBC giãn của hợp chất CP5

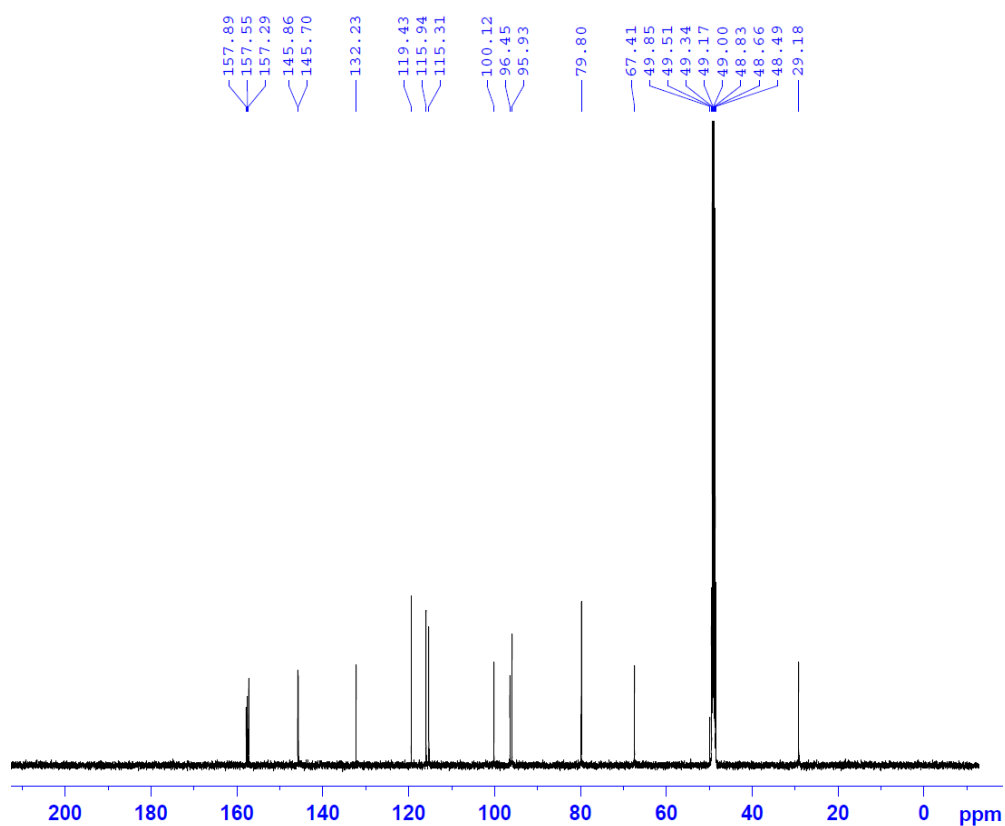


Hình 1.63 Phổ HMBC giã của hợp chất CP5

Hợp chất CP6: (-) Epicatechin

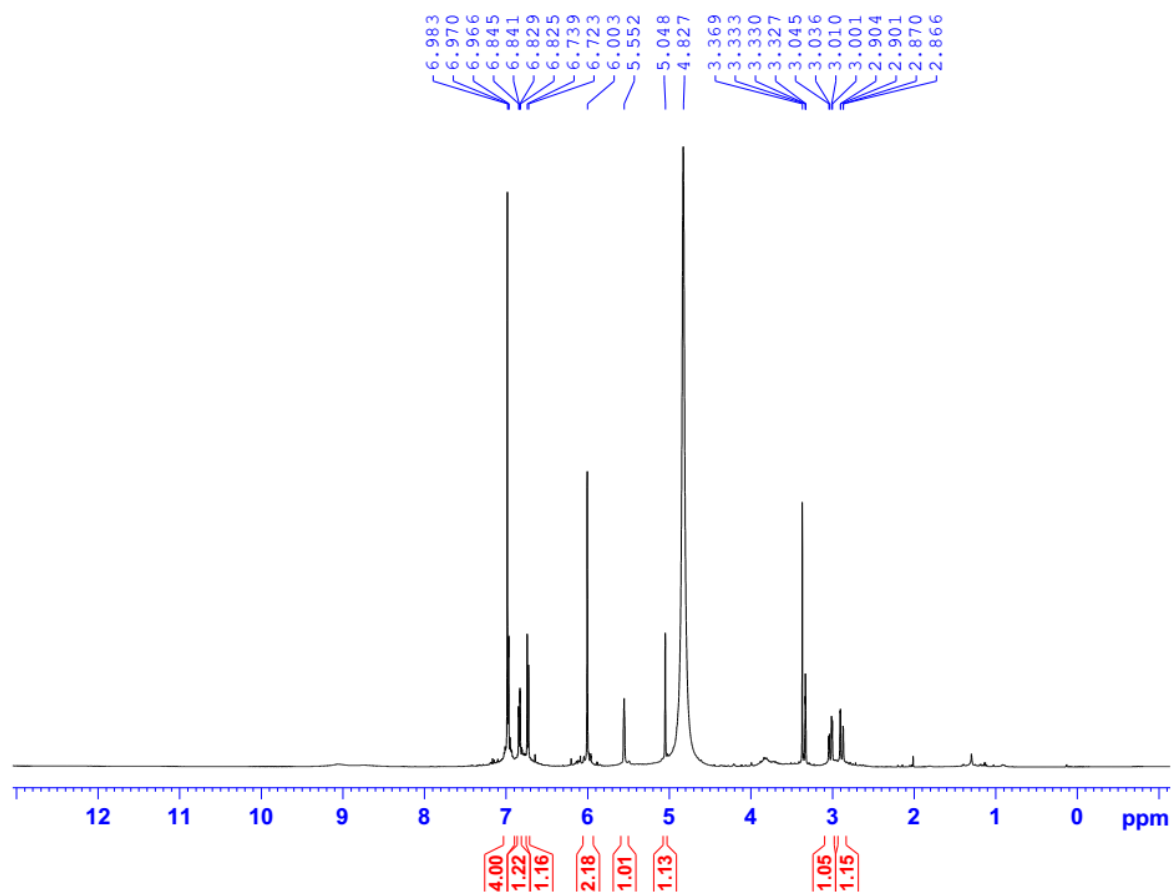


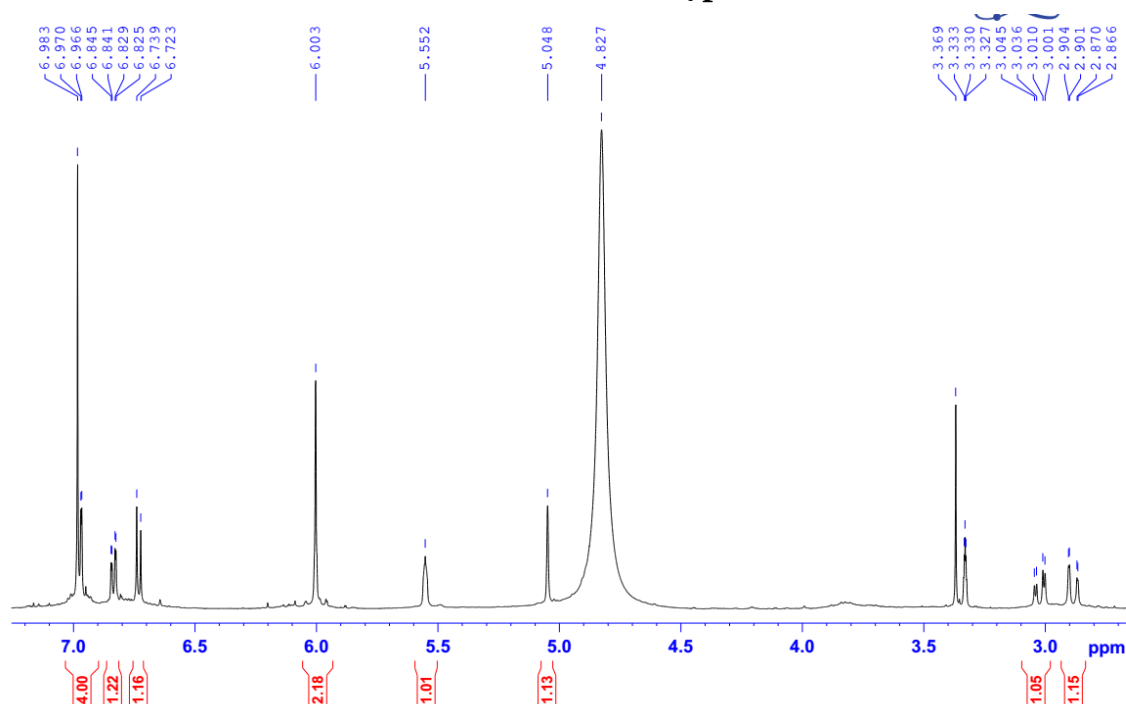
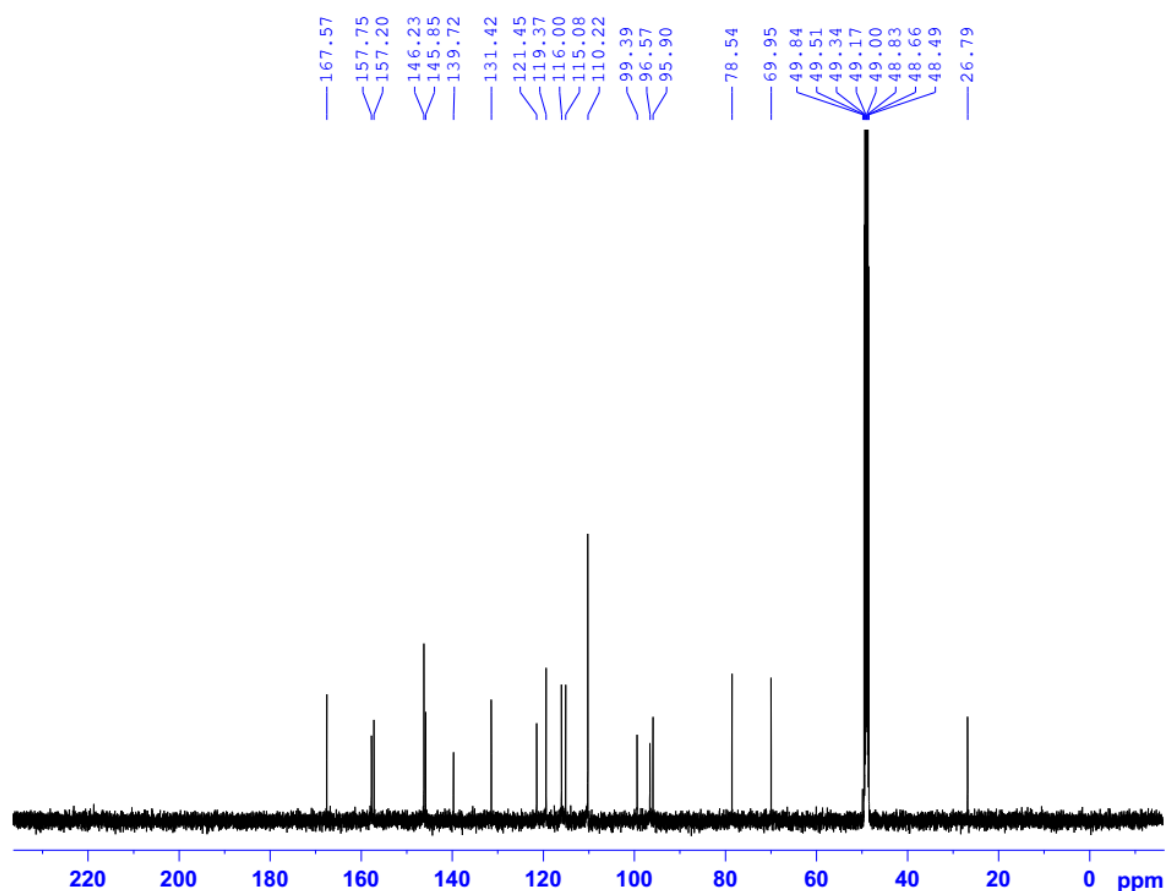
Hình 1.64 Phổ ^1H NMR (500 MHz, CD_3OD) của hợp chất CP6



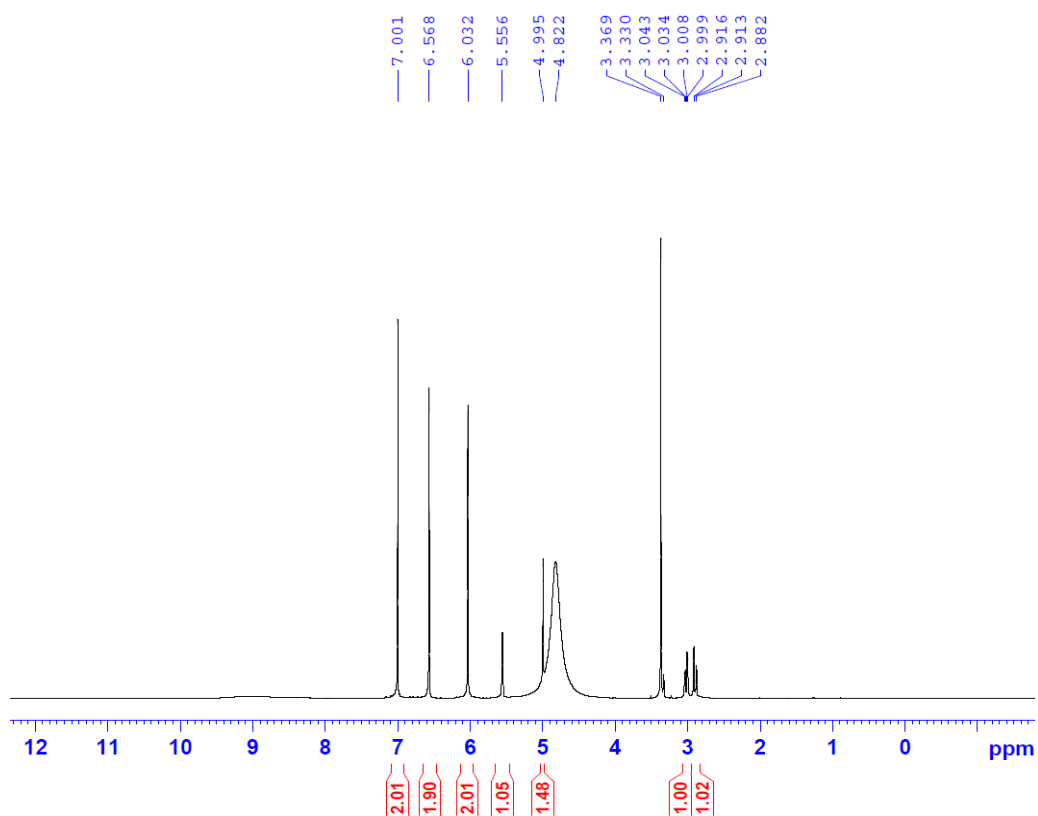
Hình 1.65 Phổ ¹³C NMR (125 MHz, CD₃OD) của hợp chất CP6

Hợp chất CP7: (-)-epicatechin 3-O-gallate

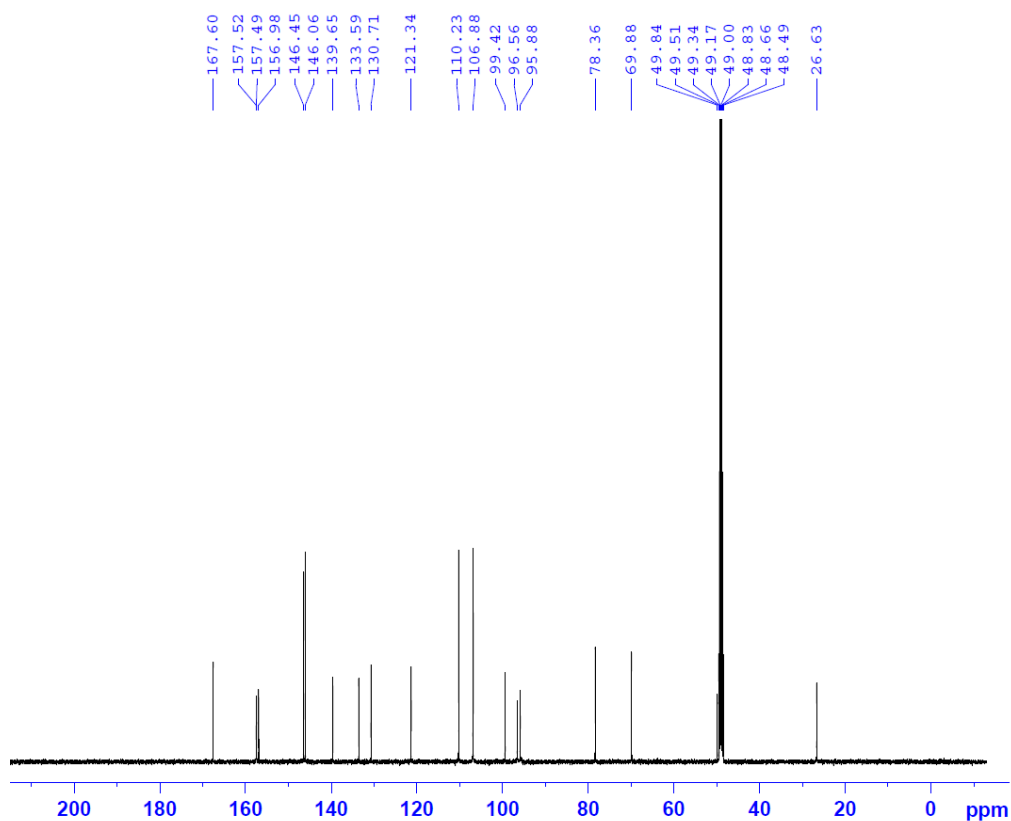


Hình 1.66 Phổ ^1H -NMR của hợp chất CP7**Hình 1.67 Phổ ^{13}C -NMR giãn của hợp chất CP7****Hình 1.68 Phổ ^{13}C -NMR giãn của hợp chất CP7**

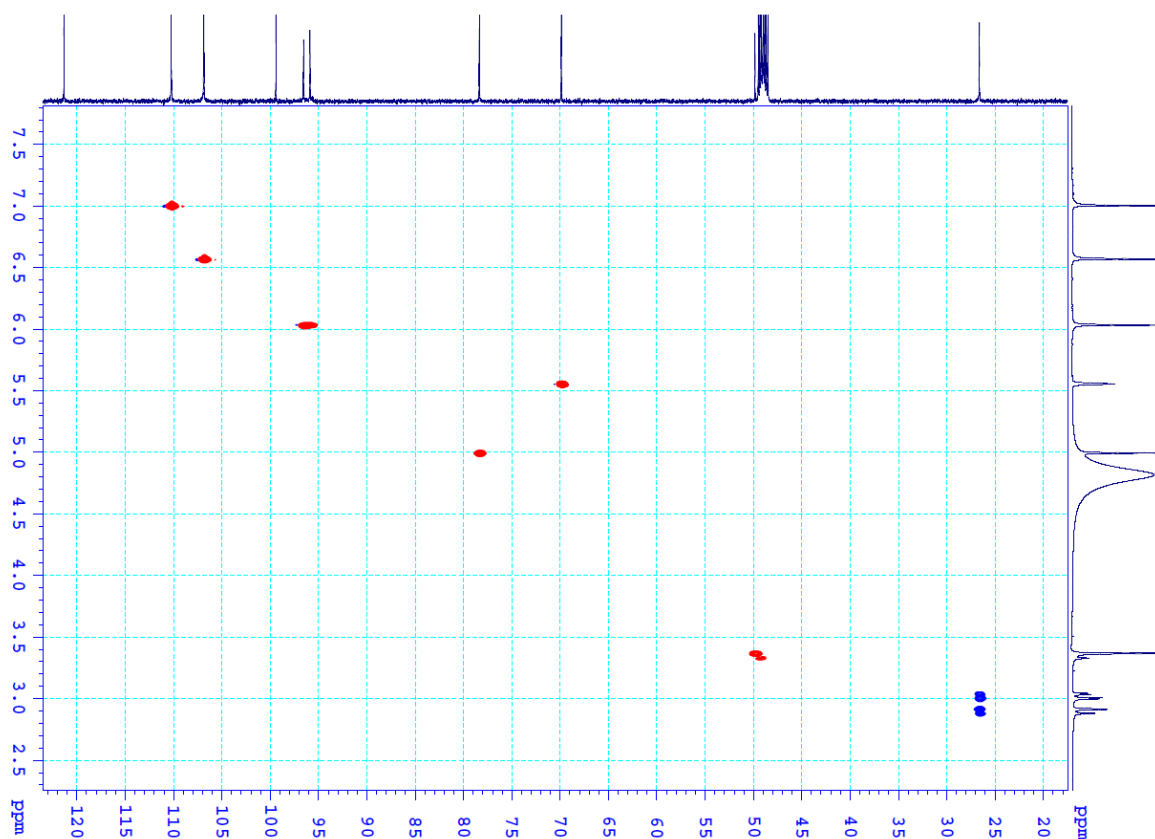
Hợp chất CP8: (-)-epigallocatechin 3-O-gallate



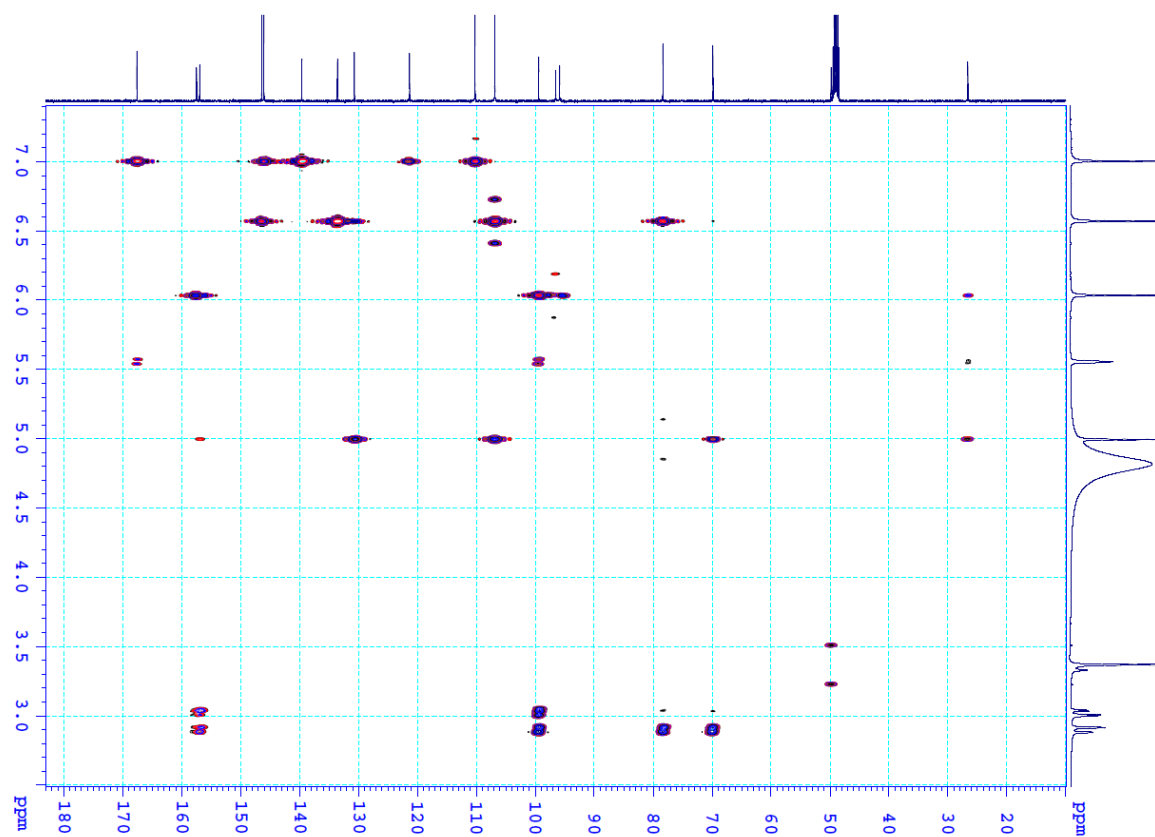
Hình 1.69 Phổ ^1H NMR của hợp chất CP8



Hình 1.70 Phổ ^{13}C NMR của hợp chất CP8



Hình 1.71 Phổ HSQC của hợp chất CP8



Hình 1.72 Phổ HMBC của hợp chất CP8

Giáo viên hướng dẫn

Hướng dẫn 1

Hướng dẫn 2



TS. Bùi Thị Mai Anh



TS. Nguyễn Thị Minh Hằng

Học viên cao học



Nguyễn Việt Dũng