

**BỘ GIÁO DỤC
VÀ ĐÀO TẠO**

**VIỆN HÀN LÂM KHOA HỌC
VÀ CÔNG NGHỆ VIỆT NAM**

HỌC VIỆN KHOA HỌC VÀ CÔNG NGHỆ



Nguyễn Đức Tiến

**NGHIÊN CỨU THÀNH PHẦN HÓA HỌC VÀ ĐÁNH GIÁ
TÁC DỤNG KHÁNG VIÊM CỦA LOÀI CÔI *Turpinia montana*
(Blume) Kurz**

LUẬN VĂN THẠC SĨ KHOA HỌC VẬT CHẤT

Hà Nội - 2025

NGUYỄN ĐỨC TIẾN

HÓA HỮU CƠ

2025

**BỘ GIÁO DỤC
VÀ ĐÀO TẠO**

**VIỆN HÀN LÂM KHOA HỌC
VÀ CÔNG NGHỆ VIỆT NAM**

HỌC VIỆN KHOA HỌC VÀ CÔNG NGHỆ



Nguyễn Đức Tiến

**NGHIÊN CỨU THÀNH PHẦN HÓA HỌC VÀ ĐÁNH GIÁ TÁC DỤNG
KHÁNG VIÊM CỦA LOÀI CỎI *Turpinia montana* (Blume) Kurz**

LUẬN VĂN THẠC SĨ KHOA HỌC VẬT CHẤT

Ngành : Hóa hữu cơ

Mã số : 8 44 01 14

NGƯỜI HƯỚNG DẪN KHOA HỌC:

1. TS. Nguyễn Phương Minh
2. PGS. TS. Nguyễn Xuân Nhiệm

Hà Nội – 2025

LỜI CAM ĐOAN

Tôi xin cam đoan đề tài 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 trước pháp luật.

Hà Nội, ngày tháng năm 2025

Học viên

Nguyễn Đức Tiến

LỜI CẢM ƠN

Luận văn được hoàn thành tại Viện Hóa sinh biển, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam. Để hoàn thành luận văn tốt nghiệp này, bên cạnh sự cố gắng nỗ lực của bản thân, tôi đã nhận được sự động viên và giúp đỡ rất lớn của nhiều cá nhân và tập thể.

Tôi xin chân thành cảm ơn Viện Hóa sinh biển đã hỗ trợ tôi thực hiện thành công luận văn này.

Tôi xin bày tỏ lòng biết ơn sâu sắc tới TS. Nguyễn Phương Minh và PGS. TS. Nguyễn Xuân Nhiệm đã tận tình hướng dẫn, giúp đỡ tôi trong suốt quá trình học tập và nghiên cứu. Tôi cũng xin gửi lời cảm ơn tới các đồng nghiệp thuộc Trung tâm Nghiên cứu và phát triển thuốc, Viện Hoá sinh biển đã tạo điều kiện, hướng dẫn và giúp đỡ tôi trong suốt thời gian làm luận văn.

Tôi xin chân thành cảm ơn Ban lãnh đạo và các thầy cô giáo tại Học viện Khoa học và Công nghệ đã giúp đỡ, tạo điều kiện và truyền đạt vốn kiến thức quý báu cho chúng tôi trong suốt thời gian tôi học tập và hoàn thành luận văn.

Tôi trân trọng và biết ơn sâu sắc tới gia đình, bạn bè đã động viên, luôn giúp đỡ tôi vượt qua mọi khó khăn để hoàn thành luận văn này.

Xin trân trọng cảm ơn!

MỤC LỤC

| | |
|--|----|
| MỞ ĐẦU | 1 |
| CHƯƠNG 1. TỔNG QUAN NGHIÊN CỨU | 3 |
| 1.1. GIỚI THIỆU VỀ LOÀI CÔI (<i>Turpinia montana</i> (Blume) Kurz) | 3 |
| 1.2. CÁC NGHIÊN CỨU VỀ THÀNH PHẦN HÓA HỌC VÀ HOẠT TÍNH SINH HỌC CỦA LOÀI CÔI (<i>Turpinia montana</i> (Blume) Kurz) | 4 |
| 1.2.1. Tình hình nghiên cứu trên thế giới..... | 4 |
| 1.2.2. Tình hình nghiên cứu ở Việt Nam | 13 |
| 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 nghiên cứu thành phần hóa học..... | 15 |
| 2.2.2. Phương pháp đánh giá hoạt tính sinh học | 16 |
| 2.3. HÓA CHẤT – THIẾT BỊ | 18 |
| 2.3.1. Hóa chất | 18 |
| 2.3.2. Dụng cụ - Thiết bị..... | 18 |
| CHƯƠNG 3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN | 20 |
| 3.1. PHÂN LẬP CÁC HỢP CHẤT | 20 |
| 3.2. THÔNG SỐ VẬT LÝ VÀ DỮ LIỆU PHỔ CỦA CÁC HỢP CHẤT | 23 |
| 3.2.1. Hợp chất TM1: Hợp chất mới | 23 |
| 3.2.2. Hợp chất TM2: Rotundic acid-28-O-β-D-glucopyranosyl ester hay Pedunculoside | 23 |
| 3.2.3. Hợp chất TM3: Rotungenoside..... | 24 |
| 3.2.4. Hợp chất TM4: 2α,3β,19α-trihydroxy-5α,9α-urs-12-en-28-oic acid-28-O-β-D-glucopyranosyl ester..... | 25 |
| 3.2.5. Hợp chất TM5: Ursolic acid..... | 26 |
| 3.2.6. Hợp chất TM6: Quadranosdie III..... | 26 |
| 3.3. XÁC ĐỊNH CẤU TRÚC CỦA CÁC HỢP CHẤT | 27 |
| 3.3.1. Hợp chất TM1: Hợp chất mới | 27 |
| 3.3.2. Hợp chất TM2: Pedunculoside | 29 |
| 3.3.3. Hợp chất TM3: Rotungenoside..... | 33 |
| 3.3.4. Hợp chất TM4: 2α,3β,19α-trihydroxy-5α,9α-urs-12-en-28-oic acid-28-O-β-D-glucopyranosyl ester..... | 37 |
| 3.3.5. Hợp chất TM5: Ursolic acid..... | 41 |

| | |
|---|-----------|
| 3.3.6. Hợp chất TM6: <i>Quadranosdie III</i>..... | 43 |
| 3.4. TỔNG HỢP CÁC HỢP CHẤT ĐÃ PHÂN LẬP VÀ XÁC ĐỊNH CẤU TRÚC TỪ LOÀI <i>Turpinia montana (Blume) Kurz</i> | 47 |
| 3.5. HOẠT TÍNH SINH HỌC CỦA CÁC HỢP CHẤT PHÂN LẬP ĐƯỢC..... | 48 |
| CHƯƠNG 4. KẾT LUẬN VÀ KIẾN NGHỊ..... | 51 |
| 4.1. KẾT LUẬN..... | 51 |
| 4.2. KIẾN NGHỊ..... | 51 |
| TÀI LIỆU THAM KHẢO | 52 |

DANH MỤC CÁC KÝ HIỆU VÀ CHỮ VIẾT TẮT

| Ký hiệu | Tiếng Anh | Diễn giải |
|---------------------|--|--|
| NMR | Nuclear Magnetic Resonance | Phổ cộng hưởng từ hạt nhân |
| ¹³ C-NMR | Carbon-13 Nuclear Magnetic Resonance | Phổ cộng hưởng từ hạt nhân cacbon 13 |
| ¹ H-NMR | Proton Nuclear Magnetic Resonance | Phổ cộng hưởng từ hạt nhân proton |
| COSY | Correlation Spectroscopy | Phổ COSY |
| DEPT | Distortionless Enhancement by Polarization Transfer | Phổ DEPT |
| HSQC | Heteronuclear Single-Quantum Coherence | Phổ tương tác dị hạt nhân qua 1 liên kết |
| HMBC | Heteronuclear Multiple Bond Connectivity | Phổ tương tác dị hạt nhân qua nhiều liên kết |
| NOESY | Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy | Phổ NOESY |
| CC | Column chromatography | Sắc ký cột |
| DMSO | Dimethylsulfoxide | (CH ₃) ₂ SO |
| MS | Mass Spectroscopy | Phổ khối lượng |
| MTT | (3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazol brom) | (3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazol brom) |
| TLC | Thin Layer Chromatography | Sắc ký bản lớp mỏng |
| ppm | Part per million | Phân triệu |

DANH MỤC CÁC BẢNG

| | |
|---|----|
| Bảng 3.1. Số liệu phổ NMR của hợp chất TM1 và hợp chất tham khảo | 28 |
| Bảng 3.2. Số liệu phổ NMR của hợp chất TM2 và hợp chất tham khảo | 32 |
| Bảng 3.3. Số liệu phổ NMR của hợp chất TM3 và hợp chất tham khảo | 36 |
| Bảng 3.4. Số liệu phổ NMR của hợp chất TM4 và hợp chất tham khảo | 40 |
| Bảng 3.5. Số liệu phổ NMR của hợp chất TM5 và hợp chất tham khảo | 42 |
| Bảng 3.6. Số liệu phổ NMR của hợp chất TM6 và hợp chất tham khảo | 46 |
| Bảng 3.7. Kết quả khả năng gây độc tế bào bằng phương pháp MTT | 50 |
| Bảng 3.8. Kết quả đánh giá hoạt tính ức chế sản sinh NO | 50 |

DANH MỤC CÁC HÌNH VẼ

| | |
|--|----|
| Hình 1.1. Cây côì (Turpinia montana (Blume) Kurz) | 3 |
| Hình 3.1. Sơ đồ phân lập các hợp chất từ phần lá của loài Côì T. montana | 22 |
| Hình 3.2. Cấu trúc hóa học và các tương tác HMBC chính của hợp chất TM1 và hợp chất tham khảo | 27 |
| Hình 3.3. Cấu trúc hóa học và các tương tác HMBC chính của hợp chất TM2 ... | 29 |
| Hình 3.4. Cấu trúc hóa học và các tương tác HMBC chính của hợp chất TM3 ... | 33 |
| Hình 3.5. Cấu trúc hóa học của hợp chất TM4 | 37 |
| Hình 3.6. Cấu trúc hóa học và các tương tác HMBC chính của hợp chất TM5 ... | 41 |
| Hình 3.7. Cấu trúc hóa học và các tương tác HMBC chính của hợp chất TM6 ... | 43 |
| Hình 3.8. Cấu trúc của các hợp chất được phân lập từ loài T. montana | 48 |

MỞ ĐẦU

Phản ứng viêm là một đáp ứng chung của hệ thống miễn dịch bảo vệ cơ thể, bao gồm nhiều thay đổi sinh lý và miễn dịch tại chỗ lẫn toàn thân, xảy ra ngay từ thời điểm tác nhân gây viêm xâm nhập vào cơ thể, là những phản ứng sinh học của toàn bộ cơ thể nhằm chống lại các tác nhân gây viêm như hóa chất, yếu tố vật lý, vi sinh vật... cũng như các yếu tố nội sinh phát sinh từ bên trong cơ thể. Ngoài ra, viêm cũng đóng vai trò bảo vệ và nhìn chung là có lợi cho cơ thể sống. Trên thế giới nói chung và Việt Nam nói riêng, viêm nhiễm là một căn bệnh phổ biến. Do đó, cần sử dụng tới các loại thuốc đặc trị để điều trị bệnh lý này. Hiện nay, phần lớn các loại thuốc kháng viêm được sử dụng là các dược phẩm tổng hợp. Mặc dù hiệu quả nhanh nhưng các thuốc này thường đi kèm với những tác dụng phụ không mong muốn. Vì thế, xu hướng nghiên cứu và phát hiện các hoạt chất kháng viêm có nguồn gốc từ tự nhiên ngày càng được quan tâm và phát triển. Những dược liệu tự nhiên được đánh giá cao nhờ ưu điểm nổi bật về tính an toàn và khả năng giảm thiểu tác dụng phụ so với thuốc tổng hợp.

Thời xa xưa, khi nền y học Tây y chưa phát triển, ông cha ta đã biết cách sử dụng nhiều loài thực vật như một loại dược phẩm để phòng bệnh, chữa bệnh cũng như bảo vệ sức khỏe. Ngày nay, chúng ta vẫn tiếp tục sử dụng các loại thảo mộc thông dụng dựa vào dược tính của chúng và kinh nghiệm dân gian để bào chế các loại thuốc. Việc vận dụng các bài thuốc Đông y mang lại nhiều công dụng hiệu quả cho cơ thể mà dược phẩm Tây y thường không có, giúp con người phòng chống, điều trị bệnh tật và hỗ trợ quá trình hồi phục sức khỏe. Do đó, việc nghiên cứu phát hiện các loại thuốc từ cây cỏ giữ một vai trò thiết yếu.

Có hàng ngàn loài thực vật sinh trưởng và phát triển trên thế giới, trong chúng có chứa hàng trăm hoặc hàng nghìn các hợp chất hóa học tương tác theo nhiều hướng phức tạp. Do đó, chúng ta thường không nắm rõ các tác động cụ thể của các hợp chất này đối với cơ thể và dùng các loài thực vật như một loại thuốc phần đa dựa trên kinh nghiệm sử dụng và khả năng chữa bệnh đã được chỉ ra. Do đó, việc nghiên cứu chuyên sâu về thành phần hóa học của các loài cây thuốc nhằm làm sáng tỏ cơ chế đứng sau hoạt tính sinh học của chúng là hết sức cần thiết, qua đó góp phần định

hướng cho việc tinh chế các chế phẩm hoặc phát triển sản phẩm thuốc có hiệu quả điều trị rõ rệt.

Xuất phát từ tình hình thực tế trên, chúng tôi lựa chọn đề tài “**Nghiên cứu thành phần hóa học và đánh giá tác dụng kháng viêm của loài Côi *Turpinia montana* (Blume) Kurz**” với những mục tiêu cụ thể sau:

- Phân lập và xác định được cấu trúc của một số hợp chất sạch từ các cặn chiết của loài Côi (*T. montana*).
- Đánh giá tác dụng kháng viêm của các chất sạch đã phân lập.

Chương 1. TỔNG QUAN NGHIÊN CỨU

1.1. GIỚI THIỆU VỀ LOÀI CÔI (*Turpinia montana* (Blume) Kurz)

Giới: Thực vật (Plante)

Ngành: Ngọc lan (Magnoliophyta)

Lớp: Ngọc lan (Magnoliopsida)

Bộ: Toại thể mộc (Crossosomatales)

Họ: Bàng quang quả (Staphyleaceae)

Chi: *Turpinia* [1, 2]

Đặc điểm thực vật: Cây nhỏ; cành màu trắng xanh. Lá kép chẵn; cuống lá khoảng 15 cm, mảnh; lá chét 5 chiếc; cuống lá chét đầu tiên dài tới 15 mm, mảnh, màu xanh, các cuống bên dài 2-3 mm; phiến lá chét hình chữ nhật hoặc hình oval, kích thước (4-)4,5-6 × 1,5-4 cm, mỏng, không có lông, mặt trên màu xanh, mặt dưới màu xanh nhạt, gân bên nhiều, rõ ràng ở mặt dưới và mờ ở mặt trên, đáy hình nêm rộng, mép lượn sóng hoặc răng cưa thưa, ngọn nhọn với phần nhọn dài 5-7 mm. Cụm hoa ở đầu cành, trục chính dài tới 17 cm. Hoa nhỏ, đường kính khoảng 3 mm, xếp dày đặc trên chùy. Lá đài hình bầu dục rộng, khoảng 1,3 mm, không có lông. Cánh hoa hình bầu dục đến hình tròn, khoảng 2 mm, có lông tơ hoặc không có lông. Sợi nhị không có lông. Đầu nhụy có 2 hoặc 3 ô; mỗi ô có 1 noãn. Quả mọng màu tím đậm, hình cầu, đường kính 4-7 mm, vỏ quả mỏng, khoảng 0,2 mm[2]



Hình 1.1. Hình ảnh loài côi (*Turpinia montana* (Blume) Kurz)

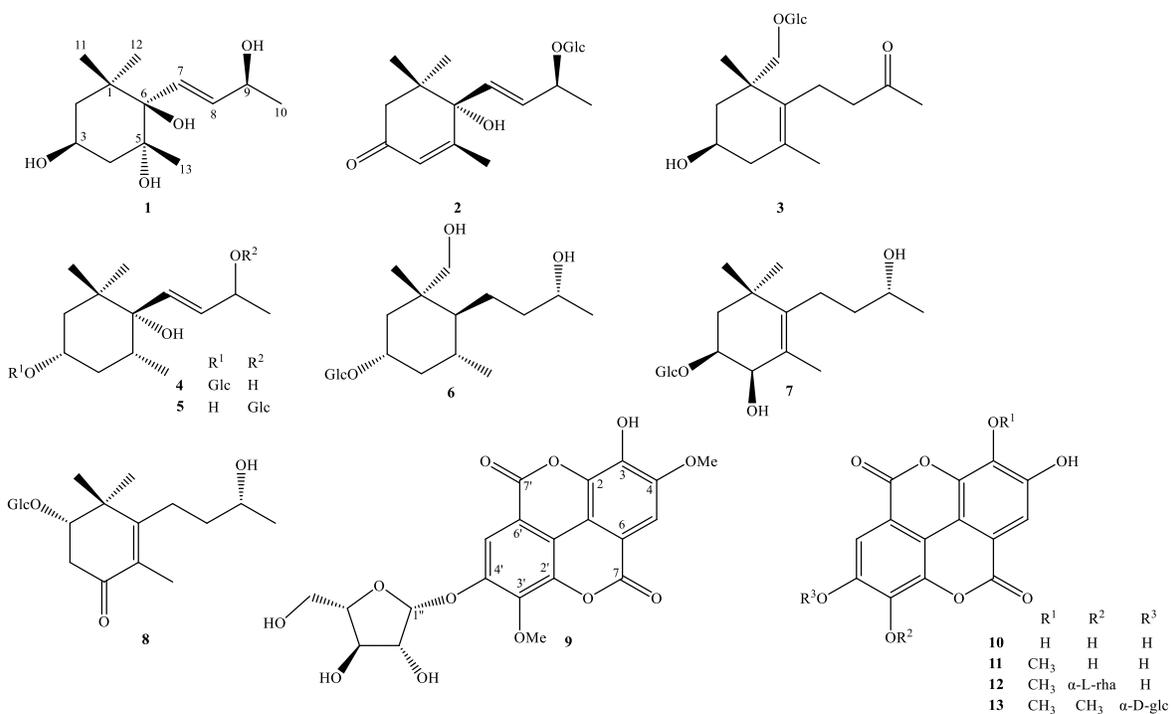
Phân bố: Chủ yếu ở Nam Ấn Độ, Nam Trung Quốc đến bán đảo Đông Dương (bao gồm cả Việt Nam), Sumatra đến Tây Java. Đây là loài cây mọc chủ yếu ở quần xã sinh vật nhiệt đới ẩm.

1.2. CÁC NGHIÊN CỨU VỀ THÀNH PHẦN HÓA HỌC VÀ HOẠT TÍNH SINH HỌC CỦA LOÀI CÔI (*Turpinia montana* (Blume) Kurz)

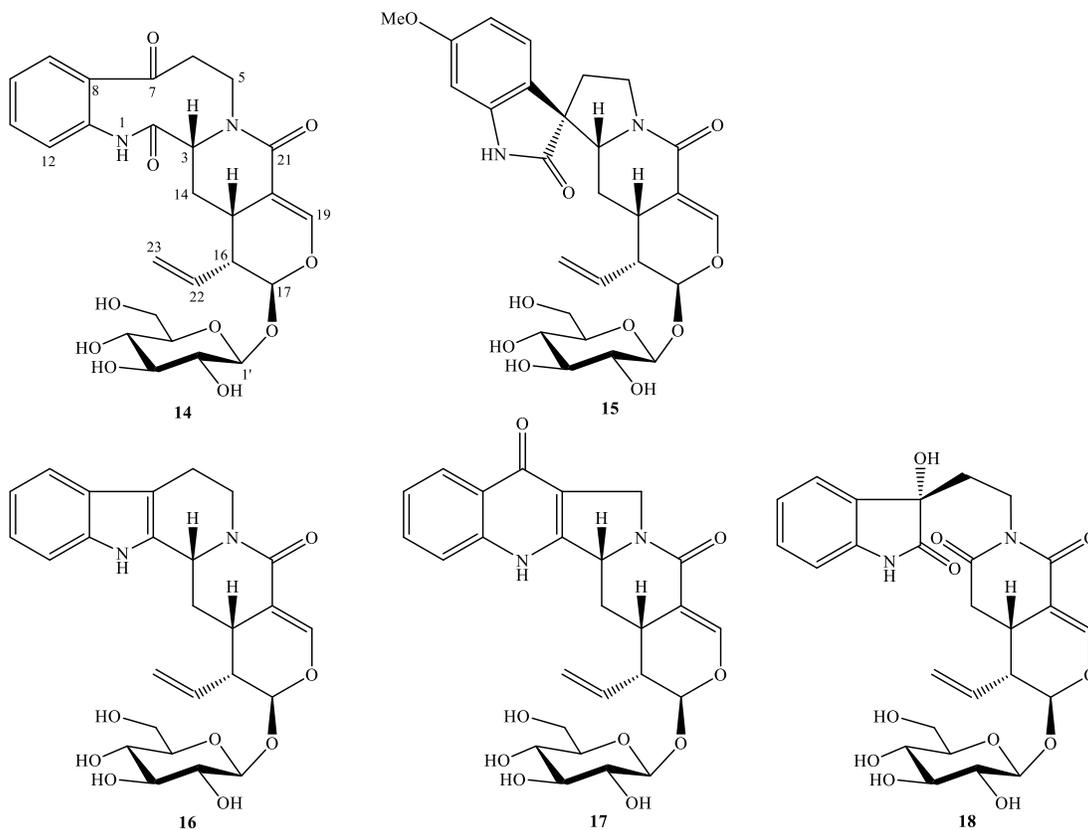
1.2.1. Tình hình nghiên cứu trên thế giới

Hiện nay, trên thế giới chưa công bố nghiên cứu về thành phần hóa học cũng như hoạt tính sinh học của loài *T. montana* mà chỉ có những nghiên cứu về một số loài khác thuộc chi *Turpinia*.

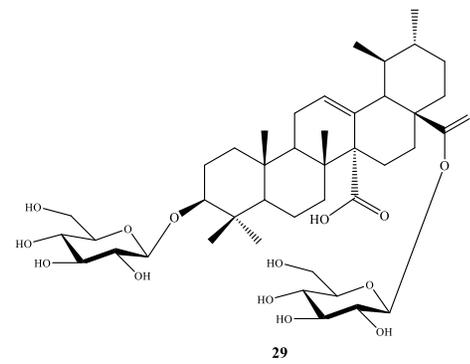
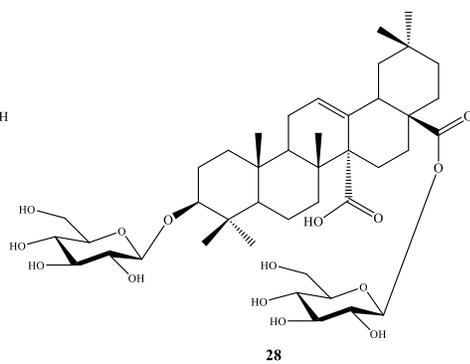
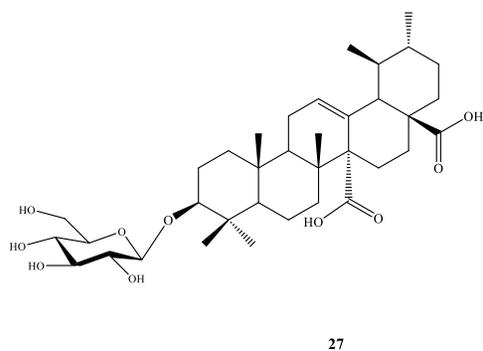
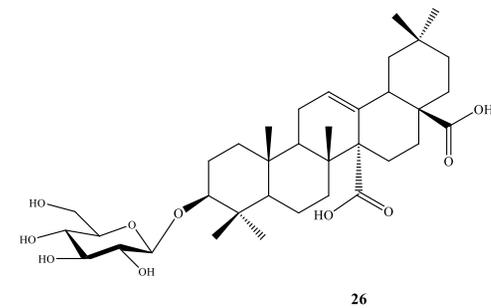
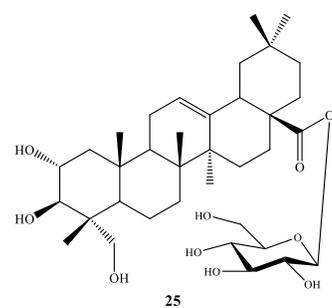
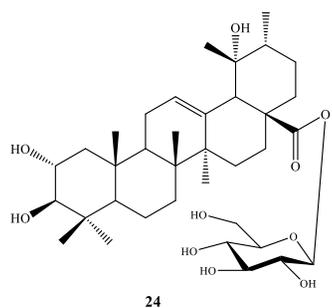
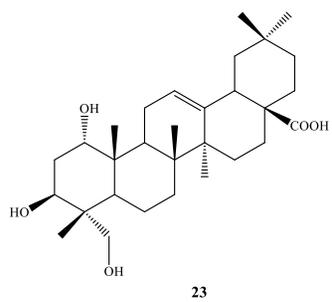
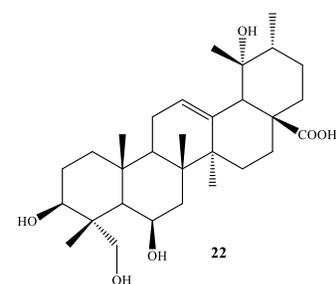
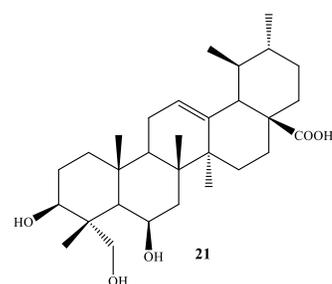
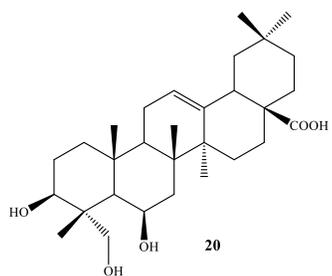
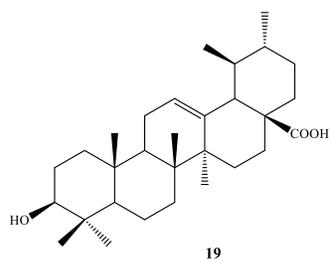
Năm 2002, Qian Yu và nhóm nghiên cứu đã tách chiết được 8 hợp chất từ phần chiết lá loài *T. ternata* bao gồm (3*S*,5*R*,6*R*,9*S*)-tetrahydroxymegastigmane (**1**), corchoionoside C (**2**), icariside B4 (**3**), turpinionoside A – E (**4 – 8**)[3]. Trong năm 2005, từ phân đoạn giàu hoạt tính của cao chiết methanol của thân loài *T. ternata*, Susan Matthew tách thành công 1 hợp chất mới 3,4'-di-*O*-methylellagic acid-4-*O*- α -L-arabinofuranoside (**9**), cùng với các hợp chất đã biết ellagic acid (**10**), 3-*O*-methyl ellagic acid (**11**), 3-*O*-methylellagic acid-3'-*O*- α -L-rhamnopyranoside (**12**), và 3,3'-di-*O*-methylellagic acid-4'-*O*- α -D-glucopyranoside (**13**). Các hợp chất **9**, **11** và **12** cho thấy hoạt tính chống oxy hóa DPPH ở mức độ trung bình, trong khi hợp chất **1** được phát hiện có độc tính trung bình đối với ấu trùng *Artemia salina* [4].



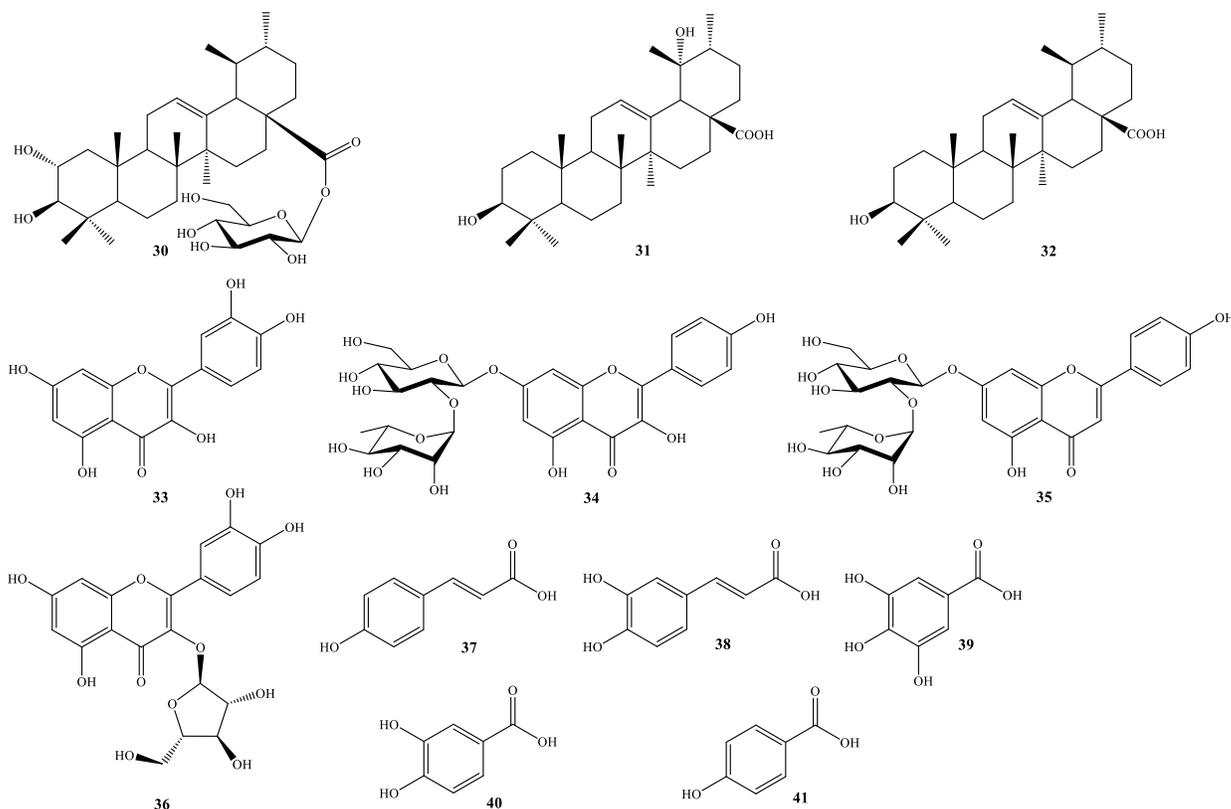
Năm 2011, hai dẫn xuất alkaloid indole monoterprenoid mới, turpiniside (**14**) và 11-methoxyjavaniside (**15**), cùng với các alkaloid đã biết, vincosamide (**16**), (3*R*)-pumiloside (**17**), và paratunamide C (**18**), đã được phân lập từ lá cây *T. arguta* (Lindl.) Seem. Các hợp chất **14** và **16–18** được phát hiện có khả năng làm giãn DNA plasmid pBR322 dạng siêu xoắn với sự hiện diện của Cu²⁺ [5].



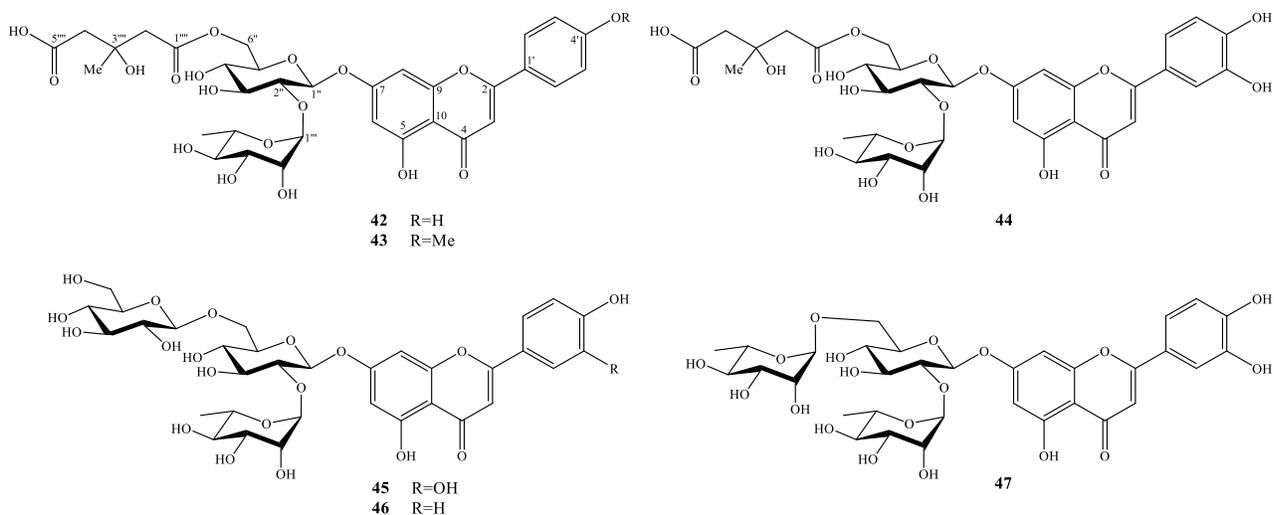
Năm 2012, một nhóm nghiên cứu tại Trung Quốc đã phân lập và xác định cấu trúc 11 hợp chất triterpenoid từ phần chiết lá loài *T. arguta*, bao gồm: ursolic acid (**19**), uncargenin C (**20**), $3\beta,6\beta,23$ -trihydroxyurs-12-en-28-oic acid (**21**), $3\beta,6\beta,19\alpha,23$ -tetrahydroxyurs-12-en-28-oic acid (**22**), $1\alpha,3\beta,23$ -trihydroxy-12-oleanen-28-oic acid (**23**), rosamultin (**24**), arjunglucoside II (**25**), 3β -*O*- β -D-glucopyranoylcincholic acid (**26**), cinchonaglycoside C (**27**), mussaendoside S (**28**), 3β -*O*- β -D-glucopyranosyl quinovic acid 28-*O*- β -D-glucopyranosyl ester (**29**) [6].



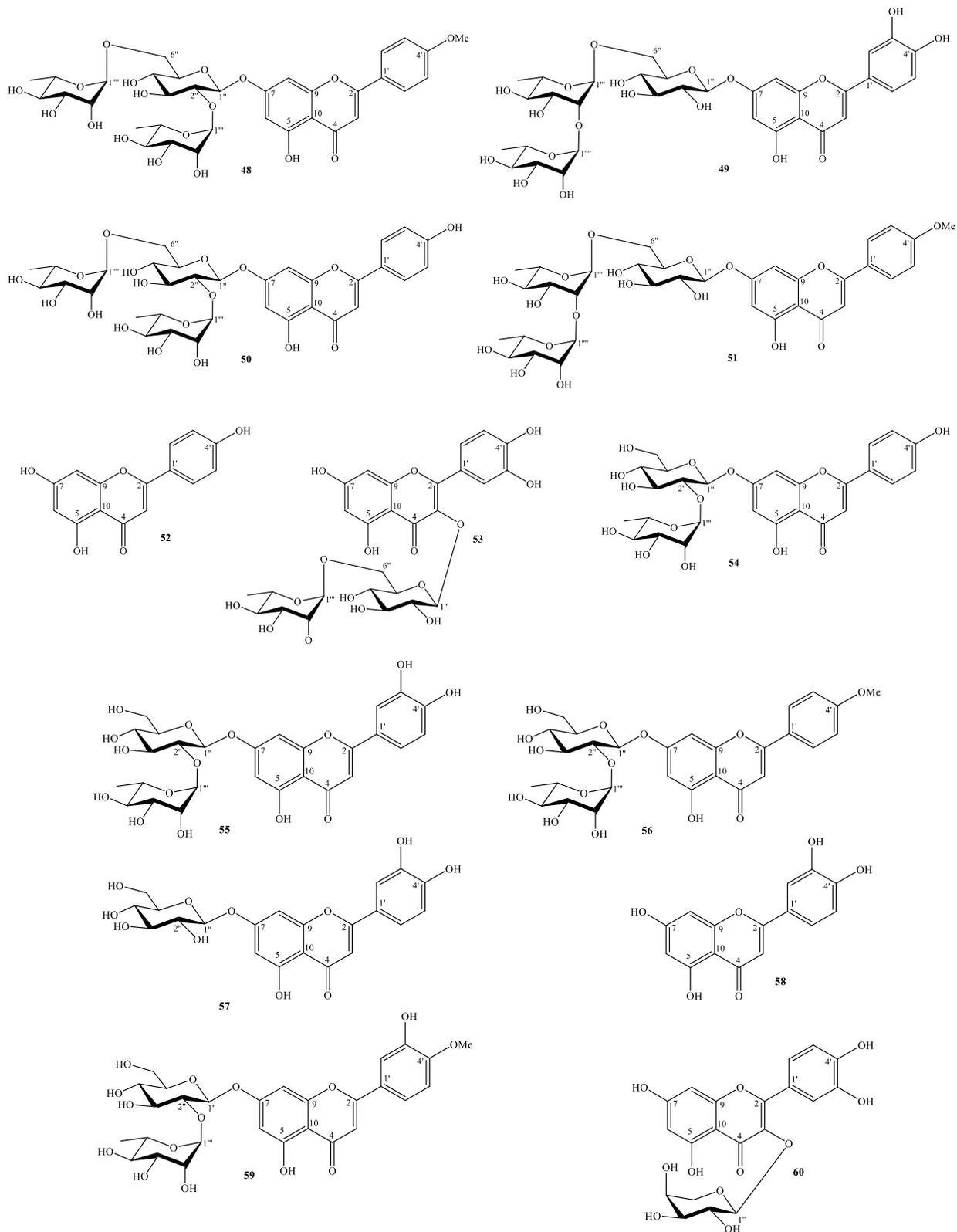
Năm 2015, Hongtao Li và cộng sự đã phát hiện ra 12 hợp chất từ loài *T. arguta*, bao gồm corosolic acid-28-*O*- β -D-glucopyranosyl ester (**30**), pomolic acid (**31**), ursolic acid (**32**), quercetin (**33**), rhoifolin (**34**), apigenin-7-*O*-rutinoside (**35**), quercetin-3-*O*- α -L-arabinopyranoside (**36**), 4-hydroxycinnamic acid (**37**), caffeic acid (**38**), gallic acid (**39**), 3,4-dihydroxybenzoic acid (**40**) và 4-hydroxybenzoic acid (**41**) [7].



Cũng trong năm 2018, Shuang-Gang Ma đã phân tích và phân tách phần lá cây *T. arguta* năm flavonoid mới là argutoside A-E (**42–46**) và một apigenin 7-*O*-triglycoside đã biết (**47**). Cấu trúc của các hợp chất này đã được xác định bằng các phương pháp phổ. Tác dụng ức chế sự sản sinh NO của các hợp chất **42–47** đã được đánh giá bằng cách sử dụng các tế bào RAW264.7, kích thích bằng lipopolysaccharide. Chỉ hợp chất **43** thể hiện hiệu ứng ức chế sự sản sinh NO ở mức độ trung bình với giá trị IC_{50} là 25.74 μ M. Các hợp chất **42–47** không có độc tính đối với các tế bào RAW264.7 ở nồng độ 10 μ M [8].

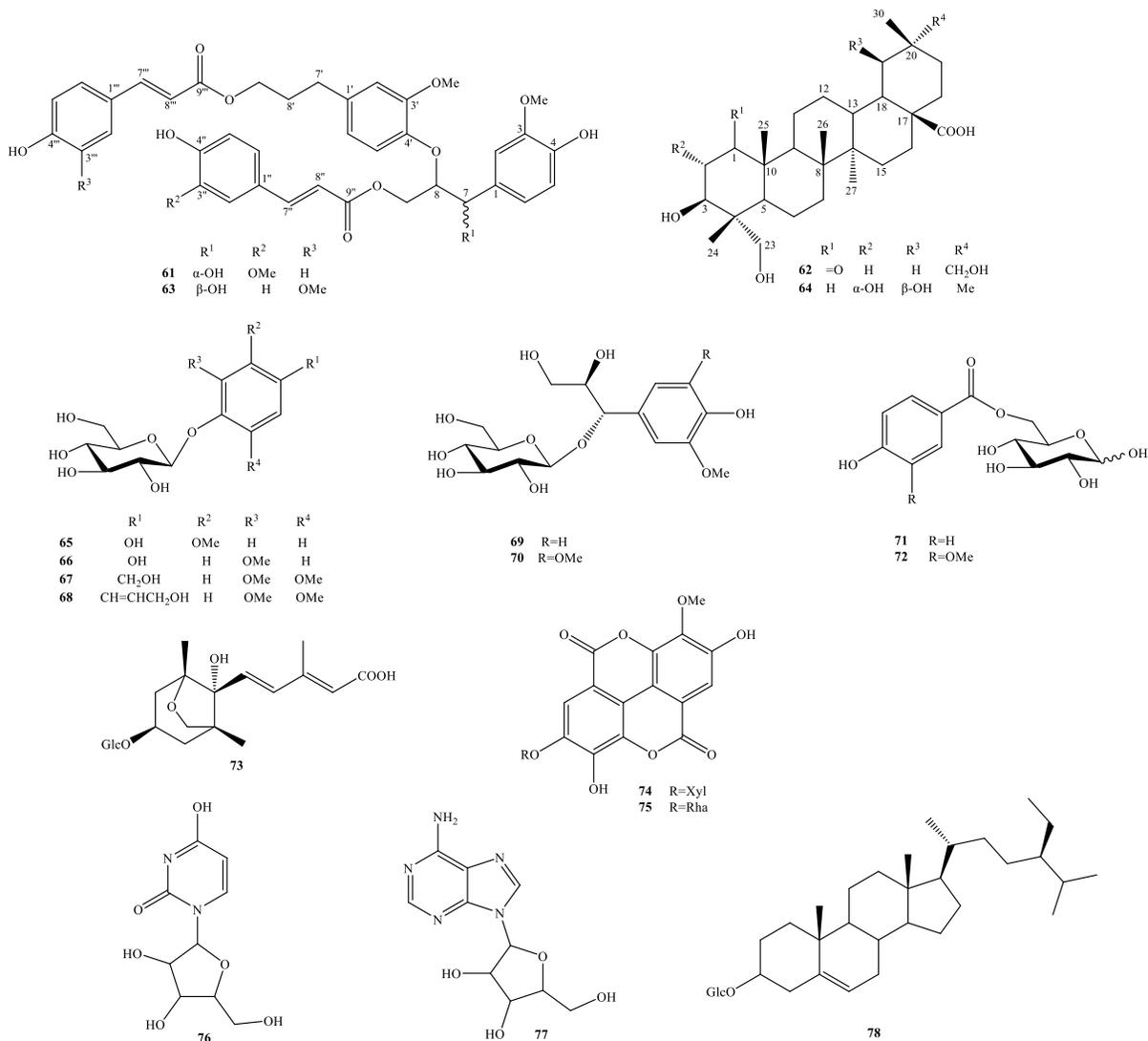


Đến năm 2019, 15 flavonoid đã được tách từ cao chiết ethanol của loài *T. arguta*. Cấu trúc của 15 hợp chất flavonoid đã biết bao gồm: argutoside F (**48**), luteolin-7-*O*- α -L-rhamanopyranosyl-(1 \rightarrow 2)- α -L-rhamnopyranosyl-(1 \rightarrow 6)- β -D-glucopyranoside (**49**), nuezhenoside (**50**), acacetin-7-*O*- α -L-rhamnopyranosyl-(1 \rightarrow 2)- α -L-rhamnopyranosyl-(1 \rightarrow 6)- β -D-glucopyranoside (**51**), apigenin (**52**), quercetin (**33**), quercetin-3-*O*- α -L-rhamnopyranosyl-(1 \rightarrow 6)- β -D-glucopyranoside (**53**), rhoifolin (**54**), luteolin-7-*O*- α -L-rhamanopyranosyl-(1 \rightarrow 2)- β -D-glucopyranoside (**55**), acacetin-7-*O*- α -L-rhamnopyranosyl-(1 \rightarrow 2)- β -D-glucopyranoside (**56**), luteolin-7-*O*- β -D-glucopyranoside (**57**), luteolin (**58**), neodiosmin (**59**), apigenin-7-*O*-rutinoside (**35**) và quercetin-3-*O*- α -L-arabinopyranoside (**60**). Hợp chất **37** là hợp chất mới, trong khi hợp chất **35**, **49**, **53**, **55**, **59**, **60** lần đầu tiên được tìm ra từ cây *T. arguta* [9].



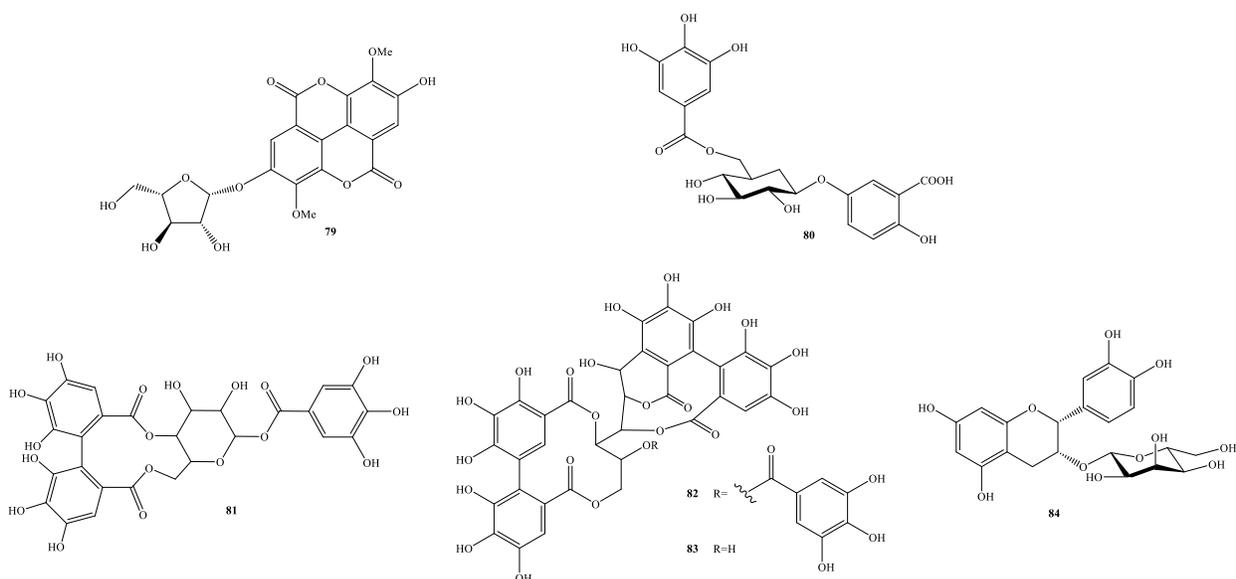
Năm 2012, một hợp chất phenylpropanoid mới, turformosin A (**61**), và một hợp chất triterpen mới, turformosinic acid (**62**), cùng với 16 hợp chất đã biết (**63–78**), đã

được phân lập từ thân loài *T. formosana* Nakai. Cấu trúc của những hợp chất này được chứng minh dựa trên phân tích quang phổ, bao gồm phổ 1D và 2D-NMR cũng như phân tích phổ khối MS. Các hợp chất tách chiết đã được đánh giá về độc tính *in vitro* đối với bốn dòng tế bào ung thư người và khả năng chống oxy hóa. (–)-(7'S,8'S)-*threo*-carolignan X (**63**) thể hiện độc tính đối với các dòng tế bào Hep2, WiDr, Daoy, và MCF-7 với giá trị ED₅₀ lần lượt là 3.60, 4.45, 6.07, và 13.7 µg/mL. Turformosin A (**61**), (–)-(7'S,8'S)-*threo*-carolignan X (**63**), methoxyhydroquinone-4-β-D-glucopyranoside (**65**), và methoxyhydroquinone-1-β-D-glucopyranoside (**66**) cũng thể hiện hoạt tính chống oxy hóa tương tự. Ở nồng độ 10 µg/mL, hợp chất **63** cho thấy sự gia tăng số lượng sub-G1 (từ 20% tại 8 giờ lên 60% tại 48 giờ) với dòng tế bào Hep2 và kích hoạt chuỗi phản ứng caspase-9/caspase-3/PARP. Hợp chất **63** kích thích con đường apoptosis ở các tế bào Hep2 với sự phụ thuộc vào liều lượng và thời gian (10 µg/mL trong 8 giờ) [10].



Trong năm 2019, Zuha Imtiyaz phát hiện ra tiềm năng tạo xương của *T. formosana* với thử nghiệm các tế bào osteoblast (HOb) của người. Sử dụng các phương pháp sắc kí khác nhau tác giả đã tinh chế được 6 hợp chất, bao gồm 1 hợp chất mới: 3,3'-di-*O*-methylsuccinic acid-4-*O*- α -l-arabinofuranoside (**79**). Các hợp chất 3,3'-di-*O*-methylsuccinic acid-4-*O*- α -l-arabinofuranoside (**79**), gentisic acid 5-*O*- β -D-(6'-*O*-galloyl) glucopyranoside (**80**), strictinin (**81**), và (-)-epicatechin-3-*O*- β -D-allopyranoside (**84**) không thể hiện độc tính đáng kể đối với tế bào HOb, do đó, các tác dụng của chúng trên các chỉ số tạo xương khác nhau đã được phân tích. Kết quả cho thấy các hợp chất **79** – **81** và **84** làm tăng đáng kể hoạt động của enzyme phosphatase kiềm (ALP) lên tới 120.0, 121.3, 116.4 và 125.1%, tương ứng. Hơn nữa, các hợp chất **79**, **80** và **84** cũng tăng cường quá trình khoáng hóa với các giá trị

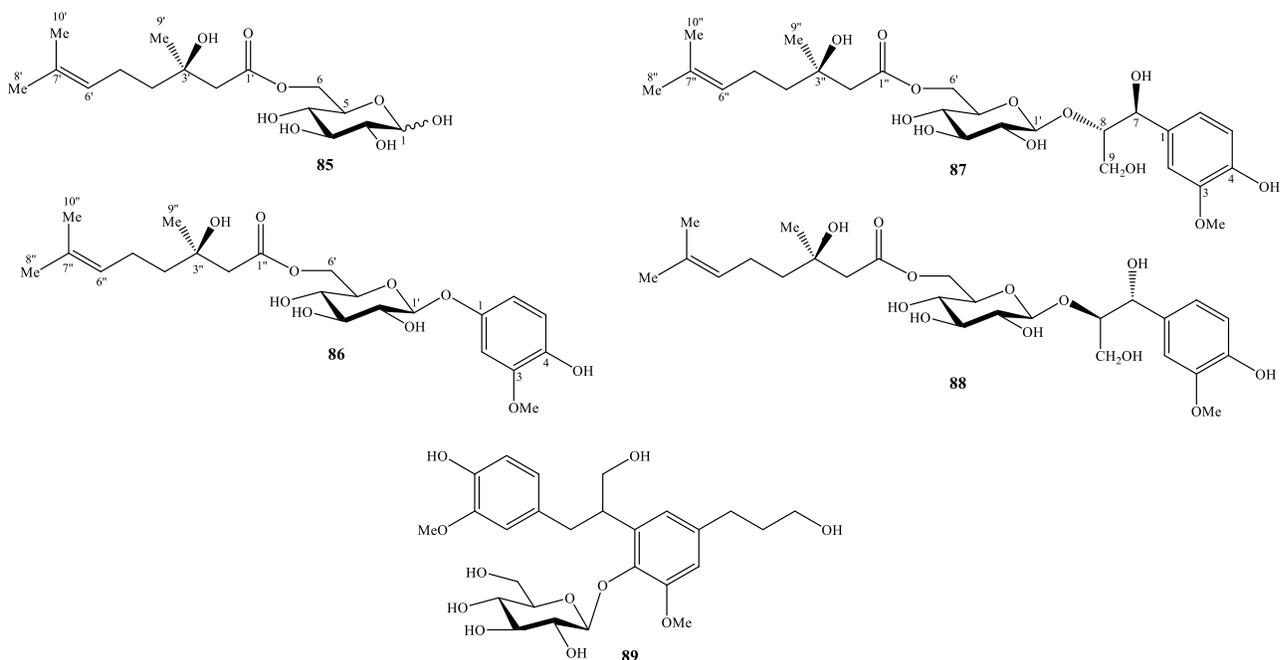
tương ứng lên tới 136.4, 118.9 và 134.6%. Thêm vào đó, hợp chất mới, **79**, đã làm tăng mức biểu hiện của thụ thể estrogen- α (133.4%) và các gen liên quan đến tạo xương như yếu tố phiên mã liên quan đến Runt 2 (Runx2), osteopontin (OPN), protein định hình xương (BMP)-2, protein liên kết xương (BSP), collagen loại I (Col-1) và yếu tố thần kinh xuất phát từ não (BDNF) ít nhất là 1.5 lần. Kết quả này chứng minh rằng các hợp chất tách được từ *T. formosana* có tiềm năng tạo xương mạnh mẽ [11].



Năm 2019, Chun-Rong Xiao và các cộng sự đã tổng hợp các nghiên cứu về loài *Turpinia*. Chúng đã được sử dụng như thuốc y học ở Trung Quốc có tác dụng kháng khuẩn, chống viêm, chống oxy hóa, giảm đau và điều hòa miễn dịch. Các nghiên cứu hiện đại cho thấy các thành phần hóa học của chi *Turpinia* bao gồm flavonoid, triterpenoid, megastigmane và acid phenolic [12].

1.2.2. Tình hình nghiên cứu ở Việt Nam

Hiện nay mới có 1 kết quả nghiên cứu từ nhóm tác giả, Lê Thanh Hương và các cộng sự khi phát hiện ra 4 hợp chất monoterpene glucoside mới và 1 hợp chất đã xác định cấu trúc icariside E3 từ cao chiết lá cây *T. montana* vào năm 2024 tại Việt Nam [13].



Loài Côi (*Turpinia montana* (Blume) Kurz) đến thời điểm này chưa được quan tâm nghiên cứu đầy đủ ở Việt Nam cũng như trên toàn thế giới. Chính vì thế, loài cây này được lựa chọn làm đối tượng nghiên cứu của luận văn thạc sĩ với mục tiêu phân lập, tìm kiếm các hợp chất có hoạt tính sinh học, có khả năng ứng dụng thuốc chữa bệnh đồng thời nâng cao giá trị sử dụng của loài cây này ở Việt Nam.

Chương 2. ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. ĐỐI TƯỢNG NGHIÊN CỨU

Cây Côi - *Turpinia montana* (Blume) Kurz được thu hái tại Phúc Yên, Vĩnh Phúc vào tháng 6 - 2021 và được định danh khoa học bởi TS. Nguyễn Thế Cường, Viện Sinh học. Mẫu tiêu bản thực vật (TM01) hiện đang được lưu trữ tại Trung tâm Nghiên cứu và phát triển thuốc, Viện Hóa học, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam.

2.2. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.2.1. Phương pháp nghiên cứu thành phần hóa học

- Phương pháp xử lý và chiết xuất mẫu:

Mẫu thực vật, cụ thể là phần lá của cây Côi, phơi khô trong bóng râm và xay nhỏ rồi mang đi ngâm chiết với methanol (MeOH). Dịch chiết MeOH sau khi cất loại MeOH, được phân bố đều trong nước rồi chiết lần lượt với các dung môi phân cực tăng dần như dichloromethane, ethyl acetate để thu lấy các dịch chiết phân đoạn.

- Phương pháp phân tích và phân tách các hỗn hợp và phân lập chất sạch:

Các phương pháp sắc ký được sử dụng như sắc ký lớp mỏng (TLC), sắc ký cột (CC) dùng pha tĩnh là: silica gel pha thường có kích cỡ hạt 0.040-0.063 mm (230 - 400 Mesh), silica gel pha đảo có kích cỡ hạt 0.040-0.063 mm (ODS), Sephadex LH-20 (Sigma), Diaion (Supelco) để phân tích, phân tách các hỗn hợp cùng với phân lập chất sạch.

Sắc ký lớp mỏng là kỹ thuật sắc ký được tiến hành trên bản mỏng để nhôm được phủ sẵn Silica gel 60 F₂₅₄ hoặc 60 RP-18 F₂₅₄S của hãng Merck có độ dày 0,2 mm. Dung môi dùng triển khai là hỗn hợp các dung môi như *n*-hexane, dichloromethane (CH₂Cl₂), ethyl acetate (EtOAc), acetone, MeOH.

Sắc ký cột với pha tĩnh là silica gel thường dùng hỗn hợp dung môi là *n*-hexane, CH₂Cl₂, EtOAc, acetone, MeOH, nước cất để rửa giải. Khi pha tĩnh sử dụng Sephadex LH-20 là chất mang thì rửa giải bằng MeOH, MeOH/ CH₂Cl₂ , MeOH /nước.

- Các phương pháp xác định cấu trúc của các hợp chất phân lập được:

Việc xác định cấu trúc hóa học của các hợp chất hữu cơ thường dựa trên các kỹ thuật phổ khác nhau. Việc lựa chọn phương pháp phù hợp phụ thuộc vào đặc điểm

cấu trúc của từng chất. Khi cấu trúc phân tử càng phức tạp, cần kết hợp nhiều kỹ thuật phổ để đạt độ chính xác cao hơn. Các phương pháp được sử dụng để xác định cấu trúc các hợp chất phân lập từ loài Côi gồm phổ khối lượng (Mass spectroscopy-MS), phổ cộng hưởng từ hạt nhân (1D- và 2D-NMR)

2.2.2. Phương pháp đánh giá hoạt tính sinh học

- Phương pháp đánh giá khả năng gây độc tế bào RAW 264.7 bằng thử nghiệm MTT [14]

Phương pháp MTT (Mosmann, 1983): Phản ứng giữa MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) và các enzyme dehydrogenase trong ty thể của tế bào sống dẫn đến sự khử MTT thành các tinh thể formazan có màu xanh tím không tan. Để định lượng, các tinh thể formazan này được hòa tan bằng các dung môi hữu cơ như isopropanol hoặc dimethyl sulfoxide (DMSO), đồng thời làm phá vỡ màng tế bào. Mật độ quang học (OD) được đo tại bước sóng 540 nm, phản ánh trực tiếp mức độ chuyển hóa tế bào và do đó tương quan thuận với số lượng tế bào sống trong mỗi giếng nuôi cấy.

Tế bào đại thực bào RAW 264.7 được đưa vào đĩa 96 giếng với mật độ 2×10^5 tế bào/giếng và ủ trong điều kiện 37°C , 5% CO_2 trong 24 giờ. Sau thời gian ủ, môi trường nuôi cấy được loại bỏ và thay thế bằng môi trường DMEM không chứa FBS trong vòng 3 giờ để đồng hóa tế bào. Tiếp theo, tế bào được xử lý với mẫu nghiên cứu với dải nồng độ thử nghiệm trong 2 giờ trước khi được kích thích bằng LPS (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$) để thúc đẩy sản sinh NO trong 24 giờ. Tiếp theo, mỗi giếng được bổ sung 90 μL môi trường nuôi cấy và 10 μL dung dịch MTT (với nồng độ cuối cùng là 5 mg/mL). Sau thời gian ủ 4 giờ, môi trường nuôi cấy được loại bỏ và thay thế bằng 50 μL DMSO 100% để hòa tan các tinh thể formazan. Mức độ hấp thụ quang (OD) tại bước sóng 540 nm được đo bằng máy ELISA Plate Reader (BioTek).

Khả năng sống sót của tế bào RAW 264.7 dưới tác dụng của mẫu nghiên cứu được tính toán theo công thức:

$$\% \text{ sống sót} = \frac{OD_{\text{mẫu}} - OD_{\text{blank}}}{OD_{\text{DMSO}} - OD_{\text{blank}}} * 100$$

- Phương pháp xử lý số liệu

Các số liệu nghiên cứu được xử lý thống kê theo phương pháp thống kê y sinh học, sử dụng phần mềm SPSS 16.0.

- Giá trị IC_{50} tính toán trên phần mềm TableCurve 2Dv4, Microsoft Excel 2016 và GraphPad Prism 6.0.

- Số liệu được xử lý bằng phần mềm Excel và thể hiện bằng giá trị trung bình và sai số SD hoặc SE.

- Phương pháp đánh giá hoạt tính kháng viêm bằng việc xác định tác dụng ức chế sản sinh NO của đại thực bào RAW 264.7 [15]

Đại thực bào là một loại bạch cầu thuộc hệ miễn dịch bẩm sinh, đồng thời đóng vai trò quan trọng như một tế bào trình diện kháng nguyên. Chúng có khả năng thực bào mạnh mẽ, giúp nhận diện, nuốt và tiêu diệt các tác nhân gây hại như vi khuẩn, tế bào ung thư và các mảnh vụn tế bào, từ đó hỗ trợ bảo vệ cơ thể trước nhiễm trùng và tổn thương mô. Bên cạnh đó, đại thực bào cũng là yếu tố chủ chốt trong các phản ứng viêm mạn tính thông qua việc tiết ra nhiều chất trung gian như chemokine, cytokine, protease, lysozyme, interferon, nitric oxide (NO), yếu tố tăng trưởng và eicosanoids. Trong số các yếu tố trung gian gây viêm, nitric oxide (NO) là một hợp chất được sản sinh quá mức bởi enzyme iNOS (inducible nitric oxide synthase) có liên quan đến nhiều bệnh lý mạn tính như hen phế quản, viêm khớp, viêm đại tràng, bệnh vẩy nến, các bệnh thoái hóa thần kinh và ung thư. Vì vậy, việc nghiên cứu các chất có khả năng ức chế sự sản sinh NO trong mô hình đại thực bào là bước khởi đầu quan trọng trong quá trình sàng lọc và đánh giá hoạt tính chống viêm của các hợp chất hoặc mẫu nghiên cứu.

Đại thực bào RAW264.7 được nuôi cấy trong môi trường DMEM với thành phần kèm theo gồm 2 mM L-glutamin, 10 mM HEPES và 1,0 mM sodium pyruvat, ngoài ra bổ sung 10% huyết thanh bào thai bò. Tế bào được cấy chuyển sau 3-5 ngày với tỉ lệ (1:3) và nuôi trong tủ ấm CO_2 ở điều kiện $37^{\circ}C$, 5% CO_2 .

Tế bào đại thực bào RAW 264.7 được đưa vào đĩa 96 giếng với mật độ 2×10^5 tế bào/giếng và ủ trong điều kiện $37^{\circ}C$, 5% CO_2 trong 24 giờ. Sau thời gian ủ, môi trường nuôi cấy được loại bỏ và thay thế bằng môi trường DMEM không chứa FBS trong vòng 3 giờ để đồng hóa tế bào. Sau đó, các tế bào được xử lý với mẫu nghiên cứu ở các nồng độ khác nhau trong 2 giờ, trước khi được kích thích bằng LPS (1

µg/mL) nhằm thúc đẩy quá trình sản sinh NO trong 24 giờ tiếp theo. Các giếng chỉ chứa dung dịch pha mẫu mà không có mẫu nghiên cứu được sử dụng làm đối chứng âm, trong khi đối chứng dương là chất ức chế L-NMMA ở các nồng độ 100, 20, 4 và 0,8 µg/mL

Nồng độ nitrit (NO₂⁻), chỉ số thể hiện mức độ sản xuất nitric oxide (NO), được đo bằng bộ kit Griess Reagent System (Promega Cooperation, WI, USA). Cụ thể, 100 µL dung dịch nuôi cấy từ mỗi giếng được chuyển sang một đĩa 96 giếng mới, sau đó thêm vào 100 µL dung dịch thuốc thử Griess, bao gồm 50 µL sulfanilamide 1% (w/v) trong acid phosphoric 5% (v/v) và 50 µL N-1-naphthylethylenediamine dihydrochloride 0,1% (w/v) pha trong nước. Hỗn hợp này sau đó được ủ trong 10 phút ở điều kiện nhiệt độ phòng (24°C), sau đó nồng độ nitrit được xác định bằng máy đọc microplate reader ở bước sóng 540 nm. Môi trường DMEM không chứa FBS được dùng làm giếng trắng. Hàm lượng NO trong các mẫu được tính dựa trên đường chuẩn của NaNO₂ và tính toán theo tỷ lệ phần trăm so với mẫu đối chứng âm (LPS).

Khả năng ức chế sản sinh NO của mẫu được tính toán theo công thức sau:

$$\% \text{ Ức chế (đơn vị \%)} = 100\% - [\text{hàm lượng NO}_{\text{mẫu}} / \text{hàm lượng NO}_{\text{LPS}}] * 100\%$$

Mỗi thí nghiệm được thực hiện ba lần để đảm bảo độ tin cậy và chính xác của kết quả. Giá trị IC₅₀ (nồng độ ức chế 50% sự sản sinh NO) được xác định thông qua phần mềm TableCurve 2Dv4.

2.3. HÓA CHẤT – THIẾT BỊ

2.3.1. Hóa chất

- Dung môi: *n*-hexan, CH₂Cl₂, EtOAc, acetone, MeOH, H₂SO₄, nước cất.
- Đại thực bào RAW264, môi trường DMEM, LPS, L-NMMA, Griess rent.
- DMSO tinh khiết (>99,0 %); 100 µL Avidin- Peroxidase Complex I; 90 µL cơ chất TMB.

2.3.2. Dụng cụ - Thiết bị.

- Đĩa 96 giếng, ống eppendorf.
- GraphPad Prism 6.0, máy đo quang phổ (hệ thống BioTek ExL800).
- Hệ thống sắc ký lỏng hiệu năng cao Agilent 1100 Series

- Sắc ký bản mỏng TLC Silica gel 60 F₂₅₄ và Silica gel 60 RP-18 F_{254S}
- Máy cô quay chân không.
- Đèn tử ngoại (254 nm và 365 nm).
- Bình chạy sắc ký, cột sắc ký.
- Silica gel 60 (0,04-0,063 mm) Merck.
- Silica gel pha đảo ODS hoặc YMC (30-50 nm)
- Máy đo phổ cộng hưởng từ hạt nhân (NMR): Bruker Avance 500 MHz và Bruker Avance Neo 600 MHz.
- Máy đo phổ khối Agilent 6530 Accurate-Mass Q-TOF LC/MS.

Chương 3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. PHÂN LẬP CÁC HỢP CHẤT

Quy trình phân tách và tinh chế các hợp chất từ loài cỏ *Turpinia montana* được tiến hành như sau:

Phần lá của loài *T. montana* (4.7 kg) được chiết bằng MeOH dưới điều kiện sóng siêu âm (2 lần, mỗi lần 10 L, 2 giờ ở 45°C). Sau khi loại bỏ dung môi, cao chiết MeOH (400 g) được phân bố đều trong nước và chiết phân bố lần lượt với dichloromethane CH₂Cl₂ và EtOAc thu được cặn CH₂Cl₂ (TMD, 52.9 g), cặn EtOAc (TME, 33.6 g) và lớp nước (TMW, 2.0 L).

Cặn EtOAc (TME) được đưa lên cột sắc ký silica gel, rửa giải bằng gradient hệ dung môi *n*-hexane/acetone (40/1, 20/1, 10/1, 5/1, v/v) và CH₂Cl₂/MeOH (5/1, v/v) thu được 4 phân đoạn, TME1-TME4. Phân đoạn TME3 phân tách trên cột silica gel sử dụng gradient hệ dung môi CH₂Cl₂/MeOH (20/1, 10/1, 5/1, 2.5/1, v/v) thu được 4 phân đoạn, TME3A-TME3D. TME3B phân tách trên cột silica gel rửa giải bằng hệ dung môi *n*-hexane/acetone (1/1, v/v) thu được 3 phân đoạn, TME3B1-TME3B3. TME3B3 phân tách trên cột silica gel pha đảo RP-18 bằng hệ dung môi MeOH/nước (5/1, v/v) thu được hợp chất **TM6** (10.1 mg). TME3D đưa lên cột silica gel sử dụng hỗn hợp dung môi CH₂Cl₂/MeOH/nước (4/1/0.1, v/v/v) rửa giải thu lấy 3 phân đoạn nhỏ hơn, TME3D1-TME3D3. TME3D2 đưa lên trên cột RP-18 phân tách bằng hỗn hợp dung môi MeOH/nước (1.8/1, v/v) thu lấy 3 phân đoạn, TME3D2A-TME3D2C. TME3D2A được phân tách bằng hệ thống sắc ký lỏng hiệu năng cao HPLC sử dụng hỗn hợp dung môi rửa giải ACN/nước (35%/65%, v/v) thu được 2 chất, **TM2** (11.8 mg, t_R 40.5 phút) và **TM3** (7.2 mg, t_R 45.6 phút), Hợp chất **TM4** (10.9 mg, t_R 28.2 phút) được tách lần lượt từ phân đoạn TME3D2C bằng HPLC sử dụng dung môi 45% MeOH trong nước.

Lớp nước (TMW) sau khi loại bỏ CH₂Cl₂ và EtOAc được phân tách trên cột diaion rửa giải gradient bằng hỗn hợp dung môi MeOH/nước (0%, 25%, 50%, 75%, 100% MeOH, v/v) thu được 4 đoạn nhỏ hơn, TMW1-TMW4. Gộp hai phân đoạn TMW2 và TMW3, đưa lên trên cột silica gel phân tách gradient bằng hỗn hợp dung môi CH₂Cl₂/MeOH (20/1, 10/1, 5/1, 2/1, v/v) thu được 4 phân đoạn, TMW2A-

TMW2D. TMW2C được tinh chế trên cột silica gel sử dụng hỗn hợp dung môi CH_2Cl_2 /acetone/nước để rửa giải (1/3/0.2, v/v/v) thu được 3 phân đoạn, TMW2C1-TMW2C3. Sử dụng cột RP-18 để phân lập phân đoạn TMW2C1 bằng hỗn hợp dung môi MeOH/nước (1/1, v/v) thu lấy TMW2C1A. TMW2C1A tinh chế bằng máy HPLC sử dụng hệ 25% ACN trong nước để rửa giải, thu được hợp chất **TM1** (7.1 mg, t_R 33.0 phút). TMW2C2 phân tách trên cột RP-18 rửa giải với hệ dung môi MeOH/nước (1/1, v/v/v) thu được 3 phân đoạn, TMW2C2A-TMW2C2C. Hợp chất **TM5** (3.8 mg, t_R 34.7 phút) được tách từ phân đoạn TMW2C2B bằng hệ thống HPLC sử dụng hỗn hợp dung môi rửa giải 22% ACN trong nước.

3.2. THÔNG SỐ VẬT LÝ VÀ DỮ LIỆU PHỔ CỦA CÁC HỢP CHẤT

3.2.1. Hợp chất TM1: Hợp chất mới

Chất rắn màu vàng.

Công thức phân tử: $C_{27}H_{30}O_{12}$. Khối lượng phân tử: 546

δ_C (CD_3OD , 150 MHz), δ_H (CD_3OD , 600 MHz): xem Bảng 3.1.

3.2.2. Hợp chất TM2: Pedunculoside

Tinh thể hình kim.

Công thức phân tử: $C_{36}H_{58}O_{10}$. Khối lượng phân tử: 650

δ_C (CD_3OD , 150 MHz), δ_H (CD_3OD , 600 MHz): xem

Bảng 3.2.

3.2.3. Hợp chất TM3: Rotungenoside

Chất bột màu trắng.

Công thức phân tử: $C_{36}H_{58}O_{10}$. Khối lượng phân tử: 650

δ_C (CD_3OD , 150 MHz), δ_H (CD_3OD , 600 MHz): xem

Bảng 3.3.

3.2.4. Hợp chất TM4: 2 α ,3 β ,19 α -trihydroxy-5 α ,9 α -urs-12-en-28-oic acid-28-O- β -D-glucopyranosyl ester.

Tinh thể hình kim.

Công thức phân tử: C₃₆H₅₈O₁₀. Khối lượng phân tử: 650

δ_C (CD₃OD, 150 MHz), δ_H (CD₃OD, 600 MHz): xem

Bảng 3.4

3.2.5. Hợp chất TM5: Ursolic acid

Chất bột màu trắng.

Công thức phân tử: $C_{36}H_{58}O_{10}$. Khối lượng phân tử: 650

δ_C (CD_3OD , 150 MHz), δ_H (CD_3OD , 600 MHz): xem Bảng 3.5.

3.2.6. Hợp chất TM6: Quadranosdie III

Tinh thể hình kim.

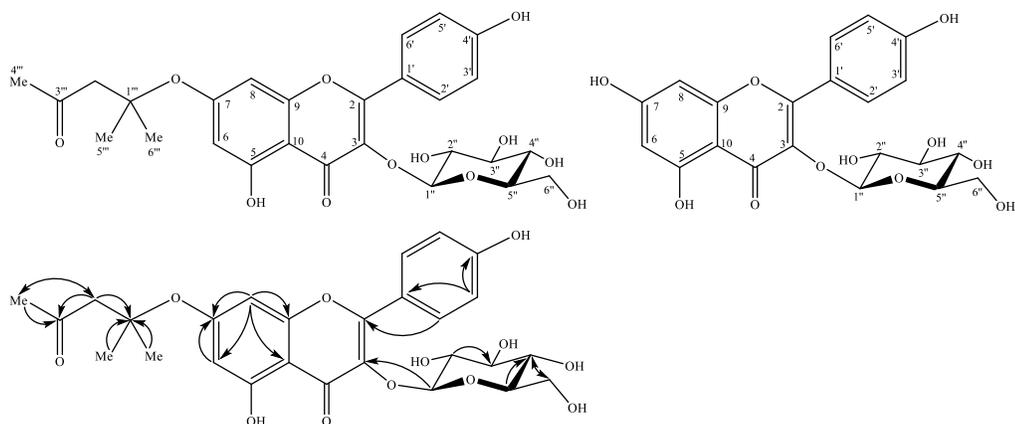
Công thức phân tử: $C_{15}H_{14}O_7$. Khối lượng phân tử: 306

δ_C (CD_3OD , 150 MHz), δ_H (CD_3OD , 600 MHz): xem

Bảng 3.6.

3.3. XÁC ĐỊNH CẤU TRÚC CỦA CÁC HỢP CHẤT

3.3.1. Hợp chất TM1: Hợp chất mới



Hình 3.2. Cấu trúc hóa học và các tương tác HMBC chính của hợp chất **TM1** và hợp chất tham khảo

Hợp chất **TM1** thu được dưới dạng tinh thể hình kim. Trên phổ HR-ESI-MS của hợp chất **TM1** xuất hiện pic ion phân tử $[M+H]^+$ tại m/z 547.1819 (tính toán lý thuyết cho công thức $C_{27}H_{31}O_{12}$, $[M+H]^+$ 547.1737), do đó cấu trúc phân tử của hợp chất **TM1** được xác định là $C_{27}H_{30}O_{12}$. Trên phổ 1H -NMR của hợp chất **TM1** cho thấy tín hiệu proton vòng thơm tại δ_H 6.20 (1H, s), 6.39 (1H, s), 6.90 (2H, d, $J = 9.0$ Hz), 8.06 (2H, d, $J = 9.0$ Hz) gợi ý cấu trúc khung flavonol, proton anomer tại δ_H 5.24 (1H, d, $J = 7.2$ Hz) và 2 proton methylene tại δ_H 3.55 (dd, 5.4, 12.0)/3.71 (dd, 2.4, 12.0) đặc trưng cho nhóm glucopyranosyl. Ngoài ra, trên phổ 1H của hợp chất **TM1** còn xuất hiện tín hiệu proton methyl tại δ_H 1,27 (6H, s), 2,20 (3H, s) và proton methylene tại δ_H 2,65 (2H, s). Trên phổ ^{13}C -NMR của hợp chất **TM1** cho biết sự có mặt của 27 nguyên tử carbon (Bảng 3.1). Kết hợp dữ liệu phổ 1H - và phổ ^{13}C -NMR chỉ ra hợp chất **TM1** thuộc lớp chất flavonoid khung flavonol tương tự hợp chất kaempferol 3-*O*- β -D-glucopyranoside[16], ngoại trừ sự có mặt của các tín hiệu sau: carbon carbonyl tại δ_C 211,5 (C-3'''), carbon không liên kết trực tiếp với hydro tại δ_C 70,6 (C-1'''), 3 carbon methyl tại δ_C 29,5 (C-5''', C-6'''), 32,1 (C-4'''), 1 carbon methylene tại δ_C 56,1 (C-2'''). Phân tích các tương tác HMBC giữa H-2''' (δ_H 2.65)/H-5''' (δ_H 1.27)/H-6''' (δ_H 1.27) với C-1''' (δ_C 70.6), giữa H-2''' (δ_H 2.65)/H-4'''

(δ_{H} 2.20) với C-3''' (δ_{C} 211.5), giữa H-4''' (δ_{H} 2.20) với C-2''' (δ_{C} 56.1), mạch carbon xuất hiện thêm được xác định là -O-1,1-dimethyl-3-oxobut-1-yl và vị trí liên kết có thể tại C-5, C-7 hoặc C-4'. Do độ chuyển dịch hóa học của C-7 (δ_{C} 166.9) lùi về vùng từ trường thấp, độ chuyển dịch hóa học của C-5 (δ_{C} 163.0) và C-4' (δ_{C} 161.6) gần như giữ nguyên so với chất tham khảo nên có thể kết luận vị trí liên kết của mạch carbon tại C-7 của phần aglycone.

Dựa vào các phân tích dữ liệu nêu trên, hợp chất **TM1** được xác định là 7-O-1,1-dimethyl-3-oxobut-1-yl kaempferol 3-O- β -D-glucopyranoside và là một hợp chất mới.

Bảng 3.1. Số liệu phổ NMR của hợp chất TM1 và hợp chất tham khảo

| C | $\delta_{\text{C}}^{\#}$ | $\delta_{\text{C}}^{\text{a,b}}$ | $\delta_{\text{H}}^{\text{a,c}}$ (độ bội, $J = \text{Hz}$) |
|---------------------------------|--------------------------|----------------------------------|---|
| 2 | 158.5 | 159.0 | - |
| 3 | 135.5 | 135.5 | - |
| 4 | 179.5 | 179.1 | - |
| 5 | 163.1 | 163.0 | - |
| 6 | 99.9 | 99.2 | 6.20 (s) |
| 7 | 166.0 | 166.9 | - |
| 8 | 94.7 | 95.0 | 6.39 (s) |
| 9 | 159.1 | 158.6 | - |
| 10 | 105.7 | 105.5 | - |
| 1' | 122.8 | 122.8 | - |
| 2' | 132.3 | 132.3 | 8.06 (d, 9.0) |
| 3' | 116.1 | 116.1 | 6.90 (d, 9.0) |
| 4' | 161.6 | 161.6 | - |
| 5' | 116.1 | 116.1 | 6.90 (d, 9.0) |
| 6' | 132.3 | 132.3 | 8.06 (d, 9.0) |
| β-D-Glc | | | |
| 1'' | 104.1 | 104.3 | 5.24 (d, 7.2) |
| 2'' | 75.7 | 75.7 | 3.47 (dd, 7.2, 9.0) |
| 3'' | 78.1 | 78.1 | 3.43 (t, 9.0) |
| 4'' | 71.4 | 71.4 | 3.32 (m) |

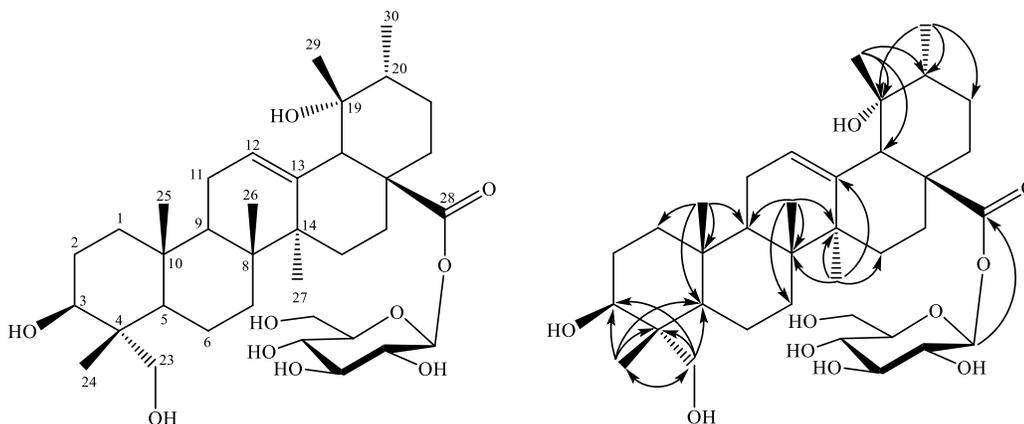
| | | | |
|------|------|-------|--|
| 5'' | 78.4 | 78.4 | 3.22 (m) |
| 6'' | 62.6 | 62.7 | 3.55 (dd, 5.4, 12.0) 3.71 (dd, 2.4, 12.0) |
| 1''' | | 70.6 | - |
| 2''' | | 56.1 | 2.65 (s) |
| 3''' | | 211.5 | - |
| 4''' | | 32.1 | 2.20 (s) |
| 5''' | | 29.5 | 1.27 (s) |
| 6''' | | 29.5 | 1.27 (s) |

^aĐo trong CD₃OD, ^b600MHz, Glc: glucopuranoside

Bổ sung thêm chú thích c

δ_C của kaempferol 3-glucoside trong CD₃OD [16].

3.3.2. Hợp chất TM2: Pedunculoside



Hình 3.3. Cấu trúc hóa học và các tương tác HMBC chính của hợp chất **TM2**

Hợp chất **TM2** thu được dưới dạng tinh thể hình kim. Trên phổ ¹H-NMR của hợp chất **TM2** chỉ ra pic proton olefin tại δ_H 5.32 (1H, t, $J = 3.6$ Hz), proton methyl tại δ_H 0.73 (3H, s), 0.80 (3H, s), 0.95 (3H, d, $J = 6.6$ Hz), 1.00 (3H, s), 1.22 (3H, s), 1.36 (3H, s), 1 proton anome tại δ_H 5.34 (1H, d, $J = 7.8$ Hz) và 2 proton nhóm methylene tại δ_H 3.70 (1H, dd, $J = 4.8, 12.0$ Hz)/3.82 (1H, dd, $J = 1.8, 12.0$ Hz) đặc trưng cho nhóm glucopyranosyl. Kết hợp dữ liệu phổ ¹³C-NMR và phổ HSQC của hợp chất **TM2** cho biết sự có mặt của 36 nguyên tử carbon, trong đó có 30 nguyên tử carbon đặc trưng cho một triterpene, 6 carbon đặc trưng cho nhóm glucopyranosyl. Từ dữ liệu phổ (

Bảng 3.2) dự đoán hợp chất **TM2** là một triterpene monoglucoside khung urs-12-ene. Thêm vào đó, độ chuyển dịch hóa học của C-3 (δ_C 74.2), C-28 (δ_C 178.6) về vùng từ trường thấp và tương tác HMBC giữa H-1' (δ_H 5.34) với C-28 (δ_C 178.6) gợi ý hợp chất **TM2** là một dẫn xuất ester monoglucoside của ursolic acid. Ngoài ra, tương tác HMBC giữa H-23 (δ_H 3.33/3.55) với C-3 (δ_C 74.2)/C-4 (δ_C 43.3)/C-5 (δ_C 48.9)/C-24 (δ_C 12.7), giữa H-24 (δ_H 0.73) với C-3 (δ_C 74.2)/C-4 (δ_C 43.3)/C-5 (δ_C 48.9)/C-23 (δ_C 67.7), giữa H-29 (δ_H 1.22) với C-18 (δ_C 55.0)/C-19 (δ_C 73.7)/C-20 (δ_C 42.9), giữa H-30 (δ_H 0.95) với C-19 (δ_C 73.7)/C-20 (δ_C 42.9)/C-21 (δ_C 27.2), độ chuyển dịch hóa học về trường thấp của C-19 (δ_C 73.7) và C-23 (δ_C 67.7) gợi ý sự có mặt của nhóm hydroxy tại vị trí C-19 và C-23.

Khi so sánh với tài liệu tham khảo[17], hợp chất **TM2** có số liệu phổ tương tự với dữ liệu về phổ của hợp chất pedunculoside (

Bảng 3.2). Do đó, hợp chất **TM2** được chứng minh là pedunculoside.

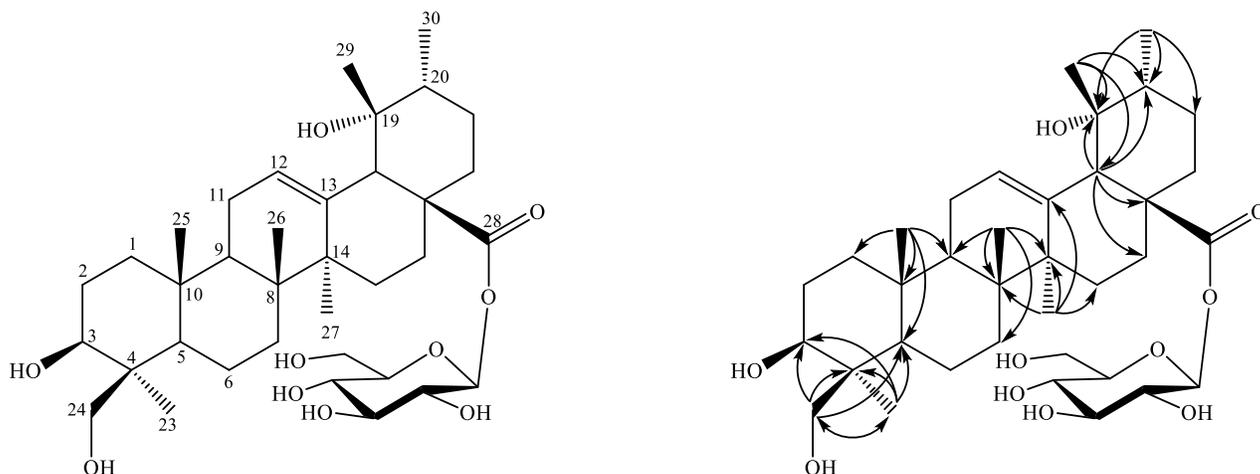
Bảng 3.2. Số liệu phổ NMR của hợp chất **TM2** và hợp chất tham khảo

| C | $\delta_C^{\#}$ | $\delta_C^{a,b}$ | $\delta_H^{a,c}$ (độ bội, $J = \text{Hz}$) |
|----|-----------------|------------------|---|
| 1 | 39.1 | 39.6 | 1.03* 1.65* |
| 2 | 27.8 | 27.4 | 1.66* |
| 3 | 74.2 | 74.2 | 3.63 (dd, 4.8, 12.0) |
| 4 | 43.0 | 43.3 | - |
| 5 | 48.8 | 48.9 | 1.17 (m) |
| 6 | 19.0 | 19.3 | 1.42 (m) |
| 7 | 33.5 | 33.7 | 1.30 (m) 1.65* |
| 8 | 40.8 | 41.2 | - |
| 9 | 48.0 | 48.5 | 1.73 (m) |
| 10 | 37.4 | 37.9 | - |
| 11 | 24.3 | 24.7 | 2.00 (m) |
| 12 | 128.7 | 129.7 | 5.32 (t, 3.6) |
| 13 | 139.5 | 139.6 | - |
| 14 | 42.3 | 42.7 | - |
| 15 | 29.5 | 29.7 | 1.03* 1.88 (m) |
| 16 | 26.3 | 26.6 | 1.65* 2.62 (m) |
| 17 | 48.8 | * | - |
| 18 | 54.6 | 55.0 | 2.54 (s) |
| 19 | 72.9 | 73.7 | - |
| 20 | 42.3 | 42.9 | 1.36 (s) |
| 21 | 26.9 | 27.2 | 1.25 (m) 1.71 (m) |
| 22 | 37.9 | 38.3 | 1.65* 1.80 (m) |
| 23 | 68.2 | 67.7 | 3.33* 3.55 (d, 10.8) |

| | | | |
|---------------------------------|-------|-------|--|
| 24 | 13.2 | 12.7 | 0.73 (s) |
| 25 | 17.7 | 16.3 | 1.00 (s) |
| 26 | 16.9 | 17.7 | 0.80 (s) |
| 27 | 24.8 | 24.7 | 1.36 (s) |
| 28 | 177.2 | 178.6 | - |
| 29 | 27.2 | 27.1 | 1.22 (s) |
| 30 | 16.3 | 16.6 | 0.95 (d, 6.6) |
| β-D-Glc | | | |
| 1' | 95.0 | 95.8 | 5.34 (d, 7.8) |
| 2' | 73.9 | 73.9 | 3.31* |
| 3' | 79.3 | 78.3 | 3.41 (m) |
| 4' | 71.4 | 71.2 | 3.38 (m) |
| 5' | 79.0 | 78.6 | 3.33* |
| 6' | 62.6 | 62.5 | 3.70 (dd, 4.8, 12.0) 3.82 (dd, 1.8, 12.0) |

^aĐo trong CD_3OD , ^b150 MHz, ^c600MHz, *tín hiệu chồng chập
[#] δ_c của pedunculoside trong pyridin- d_5 [17].

3.3.3. Hợp chất TM3: Rotungenoside



Hình 3.4. Cấu trúc hóa học và các tương tác HMBC chính của hợp chất **TM3**

Hợp chất **TM3** thu được dưới dạng chất bột màu trắng. Trên phổ 1H -NMR của hợp chất **TM3** xuất hiện tín hiệu của proton olefin tại δ_H 5.32 (1H, t, $J = 3.6$ Hz), proton methyl tại δ_H 0.78 (3H, s), 0.94 (3H, s), 0.94 (3H, d, $J = 6.0$ Hz), 1.22 (3H, s), 1.22 (3H, s), 1.33 (3H, s), 1 proton anome tại δ_H 5.34 (1H, d, $J = 8.4$ Hz) và 2

proton nhóm methylene tại δ_H 3.70 (1H, dd, $J = 4.8, 12.0$ Hz)/3.81 (1H, dd, $J = 2.4, 12.0$ Hz) đặc trưng cho nhóm glucopyranosyl. Trên phổ ^{13}C -NMR cho biết sự có mặt của 36 nguyên tử carbon, trong đó có 30 carbon thuộc về khung triterpene và 6 carbon đặc trưng cho nhóm glucopyranosyl (

Bảng 3.3). Giống với hợp chất **TM2**, hợp chất **TM3** được xác định là một dẫn xuất ester monoglucoside của ursolic acid dựa vào độ chuyển dịch hóa học của C-3 và C-28 về vùng từ trường thấp và tương tác HMBC giữa H-1' (δ_H 5.34) với C-28 (δ_C 178.5). Ngoài ra, tương tác HMBC giữa H-23 (δ_H 1.22) với C-3 (δ_C 81.4)/C-4 (δ_C 43.5)/C-5 (δ_C 57.3)/C-24 (δ_C 65.3), giữa H-24 (δ_H 3.38/4.13) với C-3 (δ_C 81.4)/C-4 (δ_C 43.5)/C-5 (δ_C 57.3)/C-23 (δ_C 23.2), giữa H-29 (δ_H 1.22) với C-18 (δ_C 55.0)/C-19 (δ_C 73.7)/C-20 (δ_C 42.6), giữa H-30 (δ_H 0.94) với C-19 (δ_C 73.7)/C-20 (δ_C 42.6)/C-21 (δ_C 27.2), độ chuyển dịch hóa học về trường thấp của C-3 (δ_C 81.4), C-19 (δ_C 73.7) và C-24 (δ_C 65.3) cũng chỉ ra vị trí liên kết của nhóm hydroxy tại C-3, C-19 và C-24 thay vì C-23 như ở hợp chất **TM2**.

So sánh với tài liệu tham khảo[17], dữ liệu phổ của hợp chất **TM3** tương tự với dữ liệu phổ của rotungenoside. Do đó, hợp chất **TM3** được chứng minh là rotungenoside.

Bảng 3.3. Số liệu phổ NMR của hợp chất **TM3** và hợp chất tham khảo

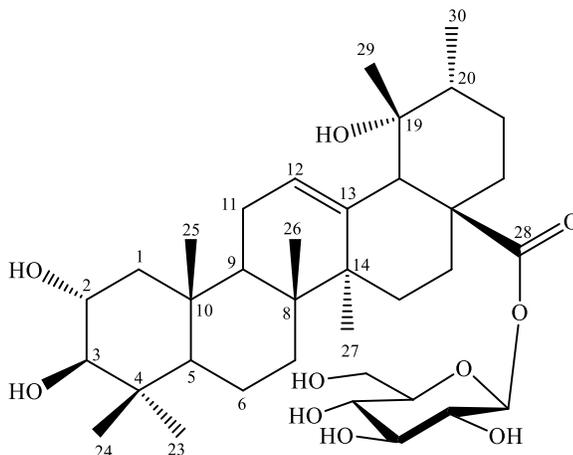
| C | $\delta_C^{\#}$ | $\delta_C^{a,b}$ | $\delta_H^{a,c}$ (độ bội, $J = \text{Hz}$) |
|----------|-----------------|------------------|---|
| 1 | 38.9 | 39.6 | 1.03* 1.69* |
| 2 | 28.5 | 28.4 | 1.69* 1.78* |
| 3 | 80.4 | 81.4 | 3.35 (m) |
| 4 | 43.2 | 43.5 | - |
| 5 | 48.0 | 57.3 | 0.89 (d, 12.0) |
| 6 | 19.4 | 19.9 | 1.38* 1.62* |
| 7 | 33.9 | 34.5 | 1.35* 1.52 (m) |
| 8 | 40.6 | 41.3 | - |
| 9 | 48.0 | 48.5 | 1.69* |
| 10 | 37.2 | 37.8 | - |
| 11 | 24.4 | 24.9 | 1.18 (m) |
| 12 | 128.4 | 129.6 | 5.32 (t, 3.6) |
| 13 | 139.3 | 139.6 | - |
| 14 | 42.1 | 42.9 | - |
| 15 | 29.3 | 29.7 | 1.02* 1.85* |
| 16 | 26.2 | 26.5 | 1.65* 2.61 (dd, 4.2, 13.2) |
| 17 | 48.7 | 49.0 | - |
| 18 | 54.5 | 55.0 | 2.54 (s) |
| 19 | 72.7 | 73.7 | - |
| 20 | 42.1 | 42.6 | 1.36* |
| 21 | 26.8 | 27.2 | 1.26 (m) 1.76 (m) |
| 22 | 37.8 | 38.3 | 1.63* 1.80* |

| | | | |
|---------------------------------|-------|-------|--|
| 23 | 23.7 | 23.2 | 1.22 (s) |
| 24 | 64.7 | 65.3 | 3.38 (d, 10.8) 4.13 (d, 10.8) |
| 25 | 17.4 | 16.3 | 0.94 (s) |
| 26 | 16.8 | 17.5 | 0.78 (s) |
| 27 | 24.6 | 24.6 | 1.33 (s) |
| 28 | 177.0 | 178.5 | - |
| 29 | 27.1 | 27.1 | 1.22 (s) |
| 30 | 16.2 | 16.6 | 0.94 (d, 6.0) |
| β-D-Glc | | | |
| 1' | 95.5 | 95.8 | 5.34 (d, 8.4) |
| 2' | 74.1 | 73.9 | 3.33* |
| 3' | 79.3 | 78.3 | 3.40* |
| 4' | 71.3 | 71.2 | 3.37* |
| 5' | 79.0 | 78.6 | 3.34* |
| 6' | 62.4 | 62.5 | 3.70 (dd, 4.8, 12.0) 3.82 (dd, 2.4, 12.0) |

^aĐo trong CD₃OD, ^b150 MHz, ^c600MHz, *tín hiệu chống chập

δ_C của rotungenoside trong pyridin-d₅ [17].

3.3.4. Hợp chất TM4: 2 α ,3 β ,19 α -trihydroxy-5 α ,9 α -urs-12-en-28-oic acid-28-O- β -D-glucopyranosyl ester.



Hình 3.5. Cấu trúc hóa học của hợp chất TM4

Hợp chất **TM4** thu được dưới dạng tinh thể hình kim. Trên phổ $^1\text{H-NMR}$ của hợp chất **TM4** chỉ ra pic proton olefin tại δ_{H} 5.33 (1H, t, $J = 4.2$ Hz), proton methyl tại δ_{H} 0.80 (3H, s), 0.83 (3H, s), 0.95 (3H, d, $J = 6.6$ Hz), 1.03 (6H, s), 1.22 (3H, s), 1.35 (3H, s), 1 proton anomer tại δ_{H} 5.35 (1H, d, $J = 8.4$ Hz) và 2 proton nhóm methylene tại δ_{H} 3.70 (1H, dd, $J = 4.8, 12.0$ Hz)/3.81 (1H, dd, $J = 2.4, 12.0$ Hz) đặc trưng cho nhóm đường glucopyranosyl. Trên phổ $^{13}\text{C-NMR}$ của hợp chất **TM4** chỉ ra tín hiệu của 36 nguyên tử carbon, bao gồm 30 carbon đặc trưng cho triterpene khung urs-12-ene và 6 carbon đặc trưng cho nhóm glucopyranosyl (

Bảng 3.4). Tương tự như hợp chất **TM2** và hợp chất **TM3**, hợp chất **TM4** được xác định là một dẫn xuất ester monoglucoside của ursolic acid. Ngoài ra, độ chuyển dịch hóa học lùi về trường thấp của C-2 (δ_C 69.6) và C-19 (δ_C 73.9) chỉ ra sự tồn tại của nhóm hydroxy tại vị trí C-2 thay vì C-23 (như ở hợp chất **TM2**)/C-24 (như ở hợp chất **TM3**) và C-19.

So sánh với tài liệu tham khảo[18], số liệu phổ của hợp chất **TM4** tương tự với số liệu phổ của *2 α ,3 β ,19 α -trihydroxy-5 α ,9 α -urs-12-en-28-oic acid-28-O- β -D-glucopyranosyl ester*. Do đó, hợp chất **TM4** được xác định là *2 α ,3 β ,19 α -trihydroxy-5 α ,9 α -urs-12-en-28-oic acid-28-O- β -D-glucopyranosyl ester*.

Bảng 3.4. Số liệu phổ NMR của hợp chất **TM4** và hợp chất tham khảo

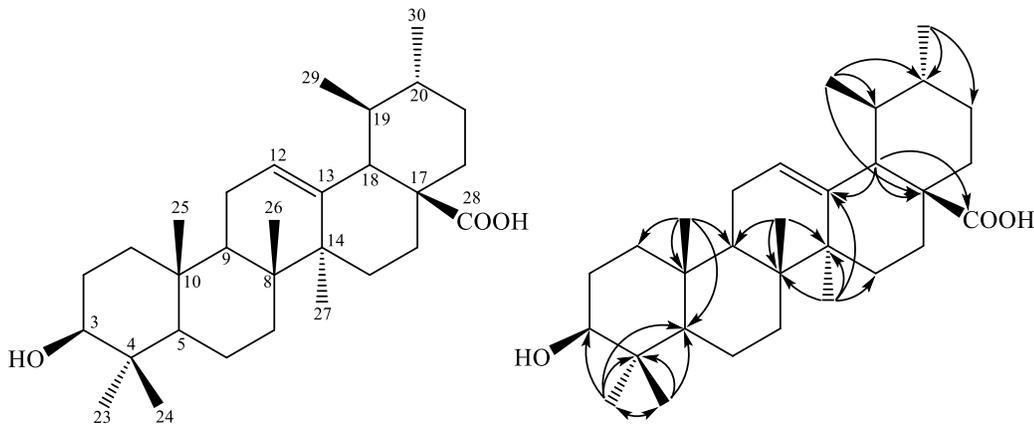
| C | $\delta_C^{\#}$ | $\delta_C^{a,b}$ | $\delta_H^{a,c}$ (độ bội, $J = \text{Hz}$) |
|----------|-----------------|------------------|---|
| 1 | 46.83 | 48.3 | 0.92 (m) 1.97 (m) |
| 2 | 68.13 | 69.6 | 3.67 (m) |
| 3 | 83.04 | 84.6 | 2.93 (d, 9.6) |
| 4 | 39.10 | 40.5 | - |
| 5 | 55.26 | 56.7 | 0.87 (d, 12.0) |
| 6 | 18.28 | 19.7 | 1.35* 1.56* |
| 7 | 36.90 | 38.3 | 1.65 (m) 1.80 (m) |
| 8 | 41.29 | 41.3 | - |
| 9 | 47.23 | 48.5 | 1.75 (m) |
| 10 | 37.79 | 39.2 | - |
| 11 | 23.38 | 24.8 | 2.02 (m) |
| 12 | 128.02 | 129.3 | 5.33 (t, 4.2) |
| 13 | 138.33 | 139.7 | - |
| 14 | 41.53 | 42.9 | - |
| 15 | 32.67 | 34.1 | 1.35* 1.57* |
| 16 | 25.12 | 26.5 | 1.65 2.63 |
| 17 | 48.06 | * | - |
| 18 | 53.55 | 55.0 | 2.54 (s) |
| 19 | 72.22 | 73.9 | - |
| 20 | 39.88 | 42.7 | 1.37 (m) |
| 21 | 25.65 | 27.2 | 1.23 1.76 |
| 22 | 28.23 | 29.7 | 1.86 (m) |
| 23 | 27.90 | 29.3 | 1.03 (s) |
| 24 | 15.19 | 17.7 | 0.83 (s) |

| | | | |
|----------------|--------|-------|--|
| 25 | 15.74 | 17.2 | 1.03 (s) |
| 26 | 16.01 | 17.5 | 0.80 (s) |
| 27 | 23.27 | 24.7 | 1.35 (s) |
| 28 | 176.98 | 178.6 | - |
| 29 | 25.81 | 27.1 | 1.22 (s) |
| 30 | 16.22 | 16.6 | 0.95 (d, 6.6) |
| 28-OGlc | | | |
| 1' | 94.29 | 95.8 | 5.35 (d, 8.4) |
| 2' | 69.71 | 73.7 | 3.30* |
| 3' | 72.45 | 78.3 | 3.42 (t, 4.2) |
| 4' | 76.90 | 71.2 | 3.37 (m) |
| 5' | 77.18 | 78.6 | 3.32* |
| 6' | 61.02 | 62.5 | 3.70 (dd, 4.8, 12.0) 3.81 (dd, 2.4, 12.0) |

^ađo trong CD₃OD, ^b150 MHz, ^c600 MHz, Glc: glucopyranoside, * tín hiệu bị chập

δ_c trong CD₃OD [18].

3.3.5. Hợp chất TM5: Ursolic acid



Hình 3.6. Cấu trúc hóa học và các tương tác HMBC chính của hợp chất **TM5**

Hợp chất **TM5** được phân lập dưới dạng chất bột màu trắng. Phổ ¹H-NMR cho biết tín hiệu proton olefin tại δ_H 5,14 (1H, br.s), proton nhóm hydroxymethine tại δ_H 3,01 (1H, m), proton của 7 nhóm methyl, trong đó có 5 nhóm methyl bậc 3 tại δ_H

1.03 (3H, s), 0,67 (3H, s), 0,84 (3H, s), 0,74 (3H, s), 0,89 (3H, s), 2 nhóm methyl bậc 2 tại δ_H 0,80 (3H, d, $J = 6,6$ Hz), 0,90 (3H, d, $J = 6,6$ Hz). Kết hợp phân tích phổ ^{13}C -NMR và phổ HSQC cho biết pic tín hiệu của 30 nguyên tử carbon, trong đó có 1 carbon carbonyl (δ_C 178.3), 2 carbon olefin (δ_C 124.6 và 138.2), 7 carbon methyl, 9 carbon methylene, 5 carbon methine, 1 carbon hydroxymethine, và 5 carbon không liên kết trực tiếp với hydro. Dựa vào các dữ liệu được phân tích ở trên gợi ý hợp chất **TM5** là một hợp chất triterpene khung urs-12-ene. Kết hợp phân tích các tương tác HMBC và đối chiếu dữ liệu phổ của hợp chất **TM5** với các hợp chất triterpene có cấu trúc khung ursane, sự giống nhau giữa số liệu của hợp chất **TM5** với ursolic acid [19] cho phép kết luận hợp chất **TM5** là ursolic acid.

*Bảng 3.5. Số liệu phổ NMR của hợp chất **TM5** và hợp chất tham khảo*

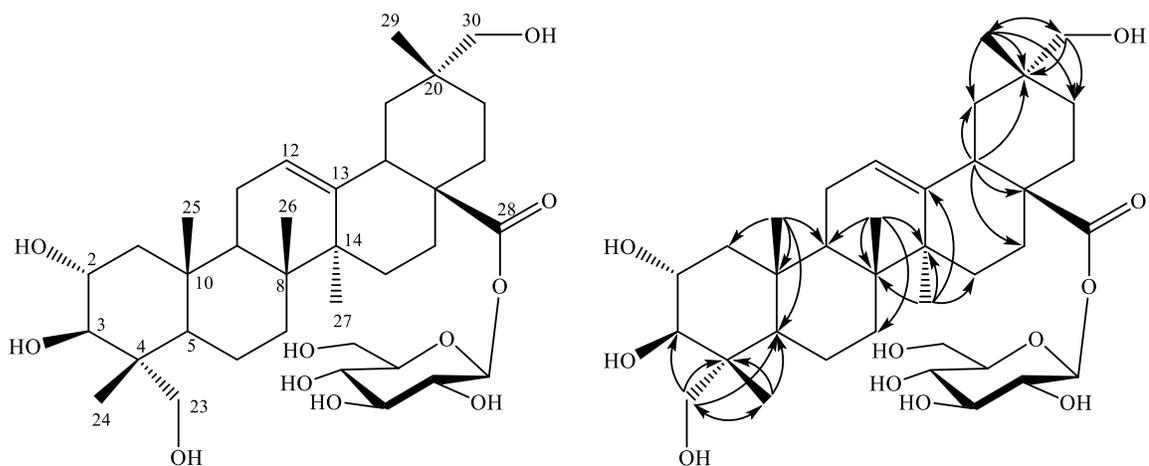
| C | $\delta_C^{\#}$ | $\delta_C^{a,b}$ | $\delta_H^{a,c}$ (độ bội, $J = \text{Hz}$) |
|----------|-----------------|------------------|---|
| 1 | 39.5 | 38.2 | 1.50* 1.53* |
| 2 | 28.2 | 27.0 | 1.43* 1.48* |
| 3 | 76.6 | 76.9 | 3.01 (m) |
| 4 | 38.4 | 38.4 | - |
| 5 | 54.8 | 54.8 | 0.66 (m) |
| 6 | 18.0 | 18.0 | 1.29* 1.46* |
| 7 | 32.8 | 32.7 | 1.25* 1.42* |
| 8 | 40.1 | 40.0 | - |
| 9 | 47.1 | 47.0 | 1.45* |
| 10 | 36.6 | 36.5 | - |
| 11 | 23.2 | 22.8 | 1.82* |
| 12 | 124.5 | 124.6 | 5.14 (br.s) |
| 13 | 138.1 | 138.2 | - |
| 14 | 41.6 | 41.7 | - |
| 15 | 27.5 | 27.5 | 1.00 (m) 1.80* |
| 16 | 23.8 | 23.8 | 1.51* 1.92 (m) |

| | | | |
|----|-------|-------|-------------------|
| 17 | 46.8 | 46.8 | - |
| 18 | 52.4 | 52.4 | 2.10 (m) |
| 19 | 39.9 | 38.4 | 1.30* |
| 20 | 39.9 | 38.5 | 0.90 (m) |
| 21 | 30.1 | 30.2 | 1.25* 1.42* |
| 22 | 36.5 | 36.3 | 1.52* 1.58 (m) |
| 23 | 28.2 | 28.3 | 0.89 (s) |
| 24 | 15.2 | 16.1 | 0.67 (s) |
| 25 | 16.0 | 15.2 | 0.84 (s) |
| 26 | 16.9 | 16.9 | 0.74 (s) |
| 27 | 23.2 | 23.3 | 0.89 (s) |
| 28 | 178.3 | 178.3 | 1.03 (s) |
| 29 | 17.0 | 17.0 | 0.80 (d. 6.6) |
| 30 | 21.1 | 21.1 | 0.90 (d. 6.6) |
| OH | | | 4.28 (d. 4.8) |

^ađo trong DMSO-d₆, ^b150 MHz, ^c600 MHz

[#]δ_C của ursolic acid đo trong DMSO-d₆[19].

3.3.6. Hợp chất TM6: Quadranosdie III



Hình 3.7. Cấu trúc hóa học và các tương tác HMBC chính của hợp chất **TM6**

Hợp chất **TM6** thu được dưới dạng tinh thể hình kim. Trên phổ ¹H-NMR của hợp chất **TM6** xuất hiện pic proton olefin tại δ_H 5.30 (1H, d, J = 3.0 Hz), proton methyl tại δ_H 0.72 (3H, s), 0.83 (3H, s), 0.95 (3H, s), 1.06 (3H, s), 1.21 (3H, s), proton anomer tại 5.41 (1H, d, J = 8.4 Hz) và 2 proton methylene tại δ_H 3.69 (1H, m)/3,84 (1H, d, J = 10.8 Hz) đặc trưng cho nhóm glucopyranosyl. Kết hợp phân tích phổ

^{13}C -NMR và phổ HSQC của hợp chất **TM6** chỉ ra sự tồn tại của 36 nguyên tử carbon, trong đó có 30 carbon đặc trưng cho 1 triterpene và 6 carbon đặc trưng cho nhóm glucopyranosyl (

Bảng 3.6). Các dữ kiện trên dự đoán hợp chất **TM6** là một triterpene monoglucoside khung olean-12-ene. Tương tự như hợp chất **TM5**, độ chuyển dịch hóa học của C-3 (δ_C 78.2) và C-28 (δ_C 178.0) về vùng từ trường thấp và tương tác HMBC giữa H-1' (δ_H 5.41) với C-28 (δ_C 178.0) gợi ý hợp chất **TM6** là một dẫn xuất ester monoglucoside của oleanoic acid. Ngoài ra, tương tác HMBC giữa H-3 (δ_H 3.35) với C-2 (δ_C 69.7)/C-4 (δ_C 44.1), giữa H-23 (δ_H 3.24/3.52) với C-3 (δ_C 78.2)/C-4 (δ_C 44.1)/C-5 (δ_C 48.3)/C-24 (δ_C 13.8), giữa H-24 (δ_H 0.72) với C-3 (δ_C 78.2)/C-4 (δ_C 44.1)/C-5 (δ_C 48.3)/C-23 (δ_C 66.4), giữa H-29 (δ_H 0.95)/ H-30 (δ_H 3.21) với C-19 (δ_C 41.4)/C-20 (δ_C 36.8)/ C-21 (δ_C 29.3), độ chuyển dịch hóa học về trường thấp của C-2 (δ_C 69.7), C-23 (66.4) và C-30 (δ_C 74.3) gợi ý sự có mặt của nhóm hydroxy tại vị trí C-2, C-23 và C-30. So sánh với tài liệu tham khảo[20], hợp chất **TM6** được xác định là quadranosdie III.

Bảng 3.6. Số liệu phổ NMR của hợp chất **TM6** và hợp chất tham khảo

| C | $\delta_C^{\#}$ | $\delta_C^{a,b}$ | $\delta_H^{a,c}$ (độ bội, $J = \text{Hz}$) |
|----------|-----------------|------------------|---|
| 1 | 47.8 | 48.2 | 0.90* 1.94* |
| 2 | 68.9 | 69.7 | 3.71 (m) |
| 3 | 78.2 | 78.2 | 3.35 |
| 4 | 42.2 | 44.1 | - |
| 5 | 48.2 | 48.3 | 1.30 (m) |
| 6 | 18.5 | 19.1 | 1.30* 1.97* |
| 7 | 32.0 | 33.3 | 1.30* 1.61 (m) |
| 8 | 40.0 | 40.7 | - |
| 9 | 47.9 | 49.5 | 1.70 (m) |
| 10 | 38.4 | 39.0 | - |
| 11 | 24.0 | 24.7 | 1.98* |
| 12 | 122.9 | 123.7 | 5.30 (t, 3.0) |
| 13 | 144.3 | 145.0 | - |
| 14 | 43.6 | 43.0 | - |
| 15 | 28.3 | 28.9 | 1.11 (m) 1.82* |
| 16 | 23.4 | 24.0 | 1.74 (m) 2.08 (m) |
| 17 | 47.4 | 48.0 | - |
| 18 | 41.1 | 41.9 | 2.91 (dd, 3.6, 13.2) |
| 19 | 40.9 | 41.4 | 1.03* 1.83* |
| 20 | 36.4 | 36.8 | - |
| 21 | 28.9 | 29.3 | 1.18 (m) 1.51 (m) |
| 22 | 32.8 | 32.4 | 1.68 (m) 1.77 (m) |

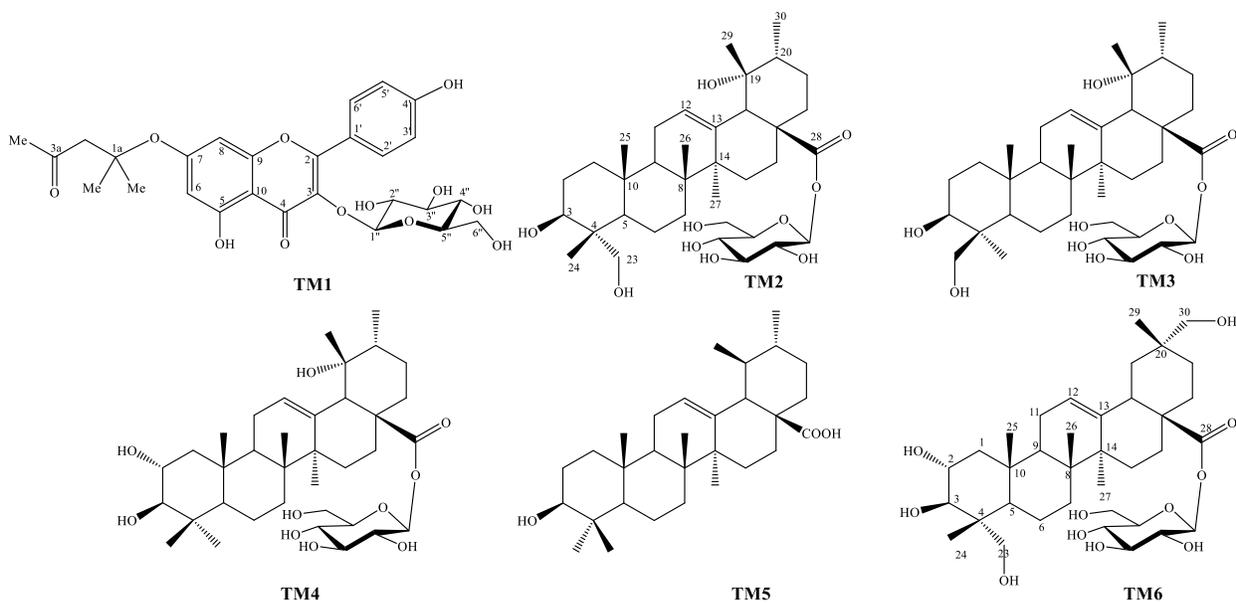
| | | | |
|----------------|-------|-------|----------------------------------|
| 23 | 66.5 | 66.4 | 3.24 (d, 10.0) 3.52 (d, 10.0) |
| 24 | 14.4 | 13.8 | 0.72 (s) |
| 25 | 17.6 | 17.6 | 1.06 (s) |
| 26 | 17.5 | 17.8 | 0.83 (s) |
| 27 | 26.1 | 26.4 | 1.21 (s) |
| 28 | 176.5 | 178.0 | - |
| 29 | 19.7 | 19.5 | 0.95 (s) |
| 30 | 73.7 | 74.3 | 3.21 (s) |
| 28-OGlc | | | |
| 1' | 95.7 | 95.8 | 5.41 (d, 8.4) |
| 2' | 74.1 | 73.9 | 3.34* |
| 3' | 78.9 | 78.3 | 3.43 (m) |
| 4' | 71.1 | 71.2 | 3.37* |
| 5' | 79.3 | 78.7 | 3.37* |
| 6' | 62.2 | 62.4 | 3.69 (m) 3.84 (d, 10.8) |

^ađo trong CD₃OD, ^b150 MHz, ^c600 MHz, Glc: glucopyranoside, * tín hiệu bị chập

[#]δ_C của quadranoside III trong pyridin-d₅ [20].

3.4. CÁC HỢP CHẤT ĐÃ PHÂN LẬP VÀ XÁC ĐỊNH CẤU TRÚC TỪ LOÀI *T. MONTANA*

Từ phần chiết lá của loài *T. montana* đã phân lập và xác định cấu trúc của 6 hợp chất (**TM1-TM6**), trong đó có hợp chất **TM1** được xác định là một hợp chất mới. Các hợp chất phân lập được chủ yếu là các triterpenoid và phù hợp với lớp chất chính của chi *Turpinia*.



Hình 3.8. Cấu trúc của các hợp chất được phân lập từ loài *T. montana*

3.5. HOẠT TÍNH KHÁNG VIÊM CỦA CÁC HỢP CHẤT PHÂN LẬP ĐƯỢC

Những hợp chất **TM1-TM6** được phân tách từ phần chiết lá của loài *T. montana* lần lượt được khảo sát khả năng gây độc tế bào bằng phương pháp MTT sau đó thử hoạt tính ức chế sản sinh NO định hướng kháng viêm. Kết quả của hai phép thử trên được nêu ra như trong

Bảng 3.7 và
Bảng 3.8.

Bảng 3.7. Kết quả khả năng gây độc tế bào bằng phương pháp MTT

| Hợp chất \ Nồng độ | 30 μ M | | 100 μ M | |
|--------------------|------------|-------|-------------|------|
| | %SS | SD | %SS | SD |
| Chất đối chứng | | | 100 | 0.63 |
| LPS | | | 97.48 | 3.94 |
| TM1 | 101.37 | 3.40 | 102.29 | 3.46 |
| TM2 | 97.68 | 3.59 | 97.73 | 3.89 |
| TM3 | 104.58 | 10.61 | 113.10 | 5.31 |
| TM4 | 101.41 | 1.63 | 106.53 | 2.32 |
| TM5 | 102.32 | 4.91 | 92.76 | 0.78 |
| TM6 | 109.06 | 4.51 | 129.91 | 2.27 |

%SS: phần trăm sống sót so với chất đối chứng (100%)

Các hợp chất **TM1 – TM6** gây độc tế bào ở mức thấp và được tiếp tục đánh giá khả năng ức chế sản sinh NO. Kết quả được trình bày trong Bảng 3.8.

Bảng 3.8. Kết quả đánh giá hoạt tính ức chế sản sinh NO

| Hợp chất \ Nồng độ | 30 μ M | | 100 μ M | |
|--------------------|------------|------|-------------|------|
| | %ƯC | SD | %ƯC | SD |
| Chất đối chứng | | | 100 | 2.14 |
| TM1 | 13.65 | 6.55 | 20.06 | 2.36 |
| TM2 | 21.01 | 1.47 | 45.55 | 6.38 |
| TM3 | 23.19 | 4.15 | 30.48 | 4.47 |
| TM4 | 32.89 | 2.38 | 61.49 | 4.40 |
| TM5 | 9.56 | 7.37 | 28.83 | 3.62 |
| TM6 | 8.74 | 6.56 | 38.09 | 6.47 |

%ƯC: phần trăm ức chế so với chất đối chứng (100%)

Từ kết quả thực nghiệm trong bảng trên, ta có thể dễ dàng nhận thấy hợp chất **TM4** có hoạt tính ức chế sản sinh NO ở mức trung bình 61.49% ở nồng độ 100 μ g/mL, trong khi đó các hợp chất **TM1-TM3** và **TM5-TM6** biểu hiện ức chế sản sinh NO ở mức độ yếu từ 20.06 đến 45.55% ở cùng nồng độ.

Chương 4. KẾT LUẬN VÀ KIẾN NGHỊ

4.1. KẾT LUẬN

Thông qua việc ứng dụng kết hợp giữa các kỹ thuật sắc ký và các phương pháp phổ hiện đại, sáu hợp chất đã được phân lập thành công từ phần chiết lá của cây Côi *T. montana*, bao gồm: 1 hợp chất mới 7-*O*-1,1-dimethyl-3-oxobut-1-yl kaempferol 3-*O*- β -D-glucopyranoside (**TM1**) và 5 hợp chất đã biết pedunculoside (**TM2**), rotungenoside (**TM3**), 2 α ,3 β ,19 α -trihydroxy-5 α ,9 α -urs-12-en-28-oic acid-28-*O*- β -D-glucopyranosyl ester (**TM4**), ursolic acid (**TM5**), quadranoside III (**TM6**).

Kết quả đánh giá hoạt tính kháng viêm thông qua khả năng ức chế sự sản sinh NO cho thấy, hợp chất **TM4** thể hiện mức độ ức chế trung bình với hiệu quả đạt 61,49% tại nồng độ 100 μ g/mL. Trong khi đó, các hợp chất còn lại (**TM1–TM3** và **TM5–TM6**) chỉ cho thấy hiệu lực ức chế yếu, dao động từ 20,06% đến 45,55% ở cùng nồng độ.

4.2. KIẾN NGHỊ

Dựa trên kết quả nghiên cứu thành phần hóa học và đánh giá hoạt tính sinh học của phần lá cây Côi (*T. montana*), chúng tôi đề xuất một số hướng nghiên cứu tiếp theo như sau:

- Tiếp tục phân tích chuyên sâu thành phần hóa học ở các phân đoạn khác của cây để làm rõ phổ hợp chất tự nhiên mà loài này sở hữu.
- Tiến hành khảo sát thêm các hoạt tính sinh học tiềm năng của các hợp chất đã phân lập được, chẳng hạn như khả năng chống ung thư, điều hòa lipid máu, ... nhằm định hướng cho các thử nghiệm tiền lâm sàng trong tương lai.

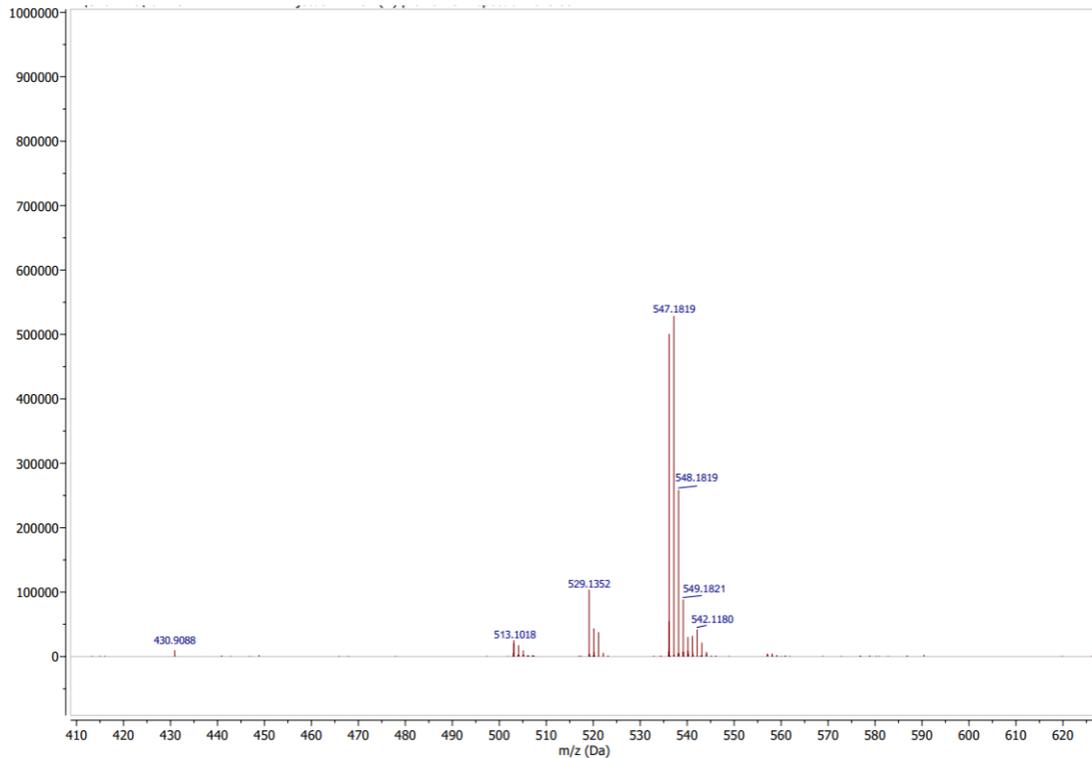
TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. T.n.h. secretary, *Part II. Natural history*, Journal of the Asiatic Society of Bengal, **1875**, 44, 182.
2. WFO (2025): *Turpinia montana* (Blume) Kurz. [cited 2024; Available from: <http://www.worldfloraonline.org/taxon/wfo-0001226731>].
3. Q. Yu, H. Otsuka, E. Hirata, T. Shinzato, Y. Takeda, *Turpinionosides A-E: megastigmene glucosides from leaves of Turpinia ternata Nakai*, Chemical and Pharmaceutical Bulletin, **2002**, 50, 640-644.
4. S. Matthew, K.-C. Kao, Y.-S. Chang, P. Abreu, *Ellagic acid glycosides from Turpinia ternata*, Natural Product Research, **2007**, 21, 83-88.
5. M. Wu, P. Wu, H. Xie, G. Wu, X. Wei, *Monoterpenoid indole alkaloids mediating DNA strand scission from Turpinia arguta*, Planta Medica, **2011**, 77, 284-286.
6. W.U. Min, Z. Guang-cai, W.E.I. Xiao-yi, *Triterpenoids from the leaves of Turpinia arguta*, Journal of Tropical and Subtropical Botany, 20, 78-83.
7. L. Hongtao, W. Xiangming, L. Fengxiang, L. Yongming. *Studies on the chemical constituents of Turpinia arguta Seem.* in *Proceedings of the 5th International Conference on Information Engineering for Mechanics and Materials*. 2015. Atlantis Press.
8. S.G. Ma, S.P. Yuan, Y.B. Liu, J. Qu, Y. Li, X.J. Wang, R.B. Wang, S. Xu, Q. Hou, S.S. Yu, *3-Hydroxy-3-methylglutaryl flavone glycosides from the leaves of Turpinia arguta*, Fitoterapia, **2018**, 124, 80-85.
9. C.-R. Xiao, L.-F. Tu, R.-Z. Zhang, D.-P. Liu, Y.-M. Luo, *Study on chemical constituents of flavonoids in Turpinia arguta*, **2019**.
10. H.-C. Huang, C.-T. Chiou, P.-C. Hsiao, C.-C. Liaw, L.-J. Zhang, C.-L. Chang, I.-S. Chen, W.-C. Chen, K.-H. Lee, Y.-H. Kuo, *Cytotoxic phenylpropanoids and a new triterpene, turformosinic acid, from Turpinia formosana Nakai*, Molecules, **2012**, 17, 1837-1851.
11. Z. Imtiyaz, Y.-F. Wang, Y.-T. Lin, H.-K. Liu, M.-H. Lee, *Isolated compounds from Turpinia formosana Nakai induce ossification*, International Journal of Molecular Sciences, **2019**, 20, 3119.
12. C.R. Xiao, L.F. Tu, R.Z. Zhang, D.P. Liu, Y.M. Luo, *Research progress on chemical constituents and biological activities from Turpinia species*, Zhongguo Zhong Yao Za Zhi, **2019**, 44, 1295-1304.
13. L.T. Huong, T.T. Anh, N.M. Hang, V.M. Thao, N.X. Nhiem, N.H. Dang, *Stereochemical assignment of four monoterpene glucoside derivatives from Turpinia montana Kurz by NMR study combined with CD spectroscopy*, Magn Reson Chem, **2024**, 62, 629-635.

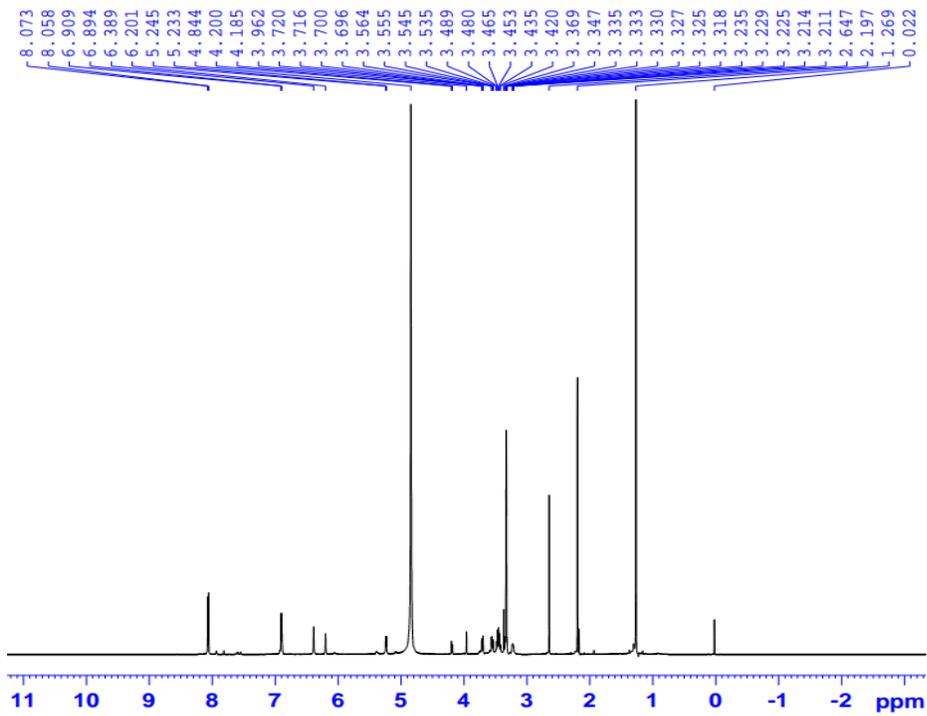
14. P. Kumar, A. Nagarajan, P.D. Uchil, *Analysis of Cell Viability by the MTT Assay*, Cold Spring Harb Protoc, **2018**, 2018.
15. X.-D. Hu, Y. Yang, X.-G. Zhong, X.-H. Zhang, Y.-N. Zhang, Z.-P. Zheng, Y. Zhou, W. Tang, Y.-F. Yang, L.-H. Hu, J.-P. Zuo, *Anti-inflammatory effects of Z23 on LPS-induced inflammatory responses in RAW264.7 macrophages*, Journal of Ethnopharmacology, **2008**, 120, 447-451.
16. K. Kazuma, N. Noda, M. Suzuki, *Malonylated flavonol glycosides from the petals of Clitoria ternatea*, Phytochemistry, **2003**, 62, 229-237.
17. M. Nakatani, S. Hatanaka, H. Komura, T. Kubota, T. Hase, *The Structure of Rotungenoside, a New Bitter Triterpene Glucoside from Ilex Rotunda*, Bulletin of the Chemical Society of Japan, **1989**, 62, 469-473.
18. A. Enayati, A. Salehi, M. Alilou, H. Stuppner, H. Mirzaei, A. Omraninava, V. Khorrami, N. Yassa, *Six new triterpenoids from the root of Potentilla reptans and their cardioprotective effects in silico*, Natural Product Research, **2022**, 36, 2504-2512.
19. R. El-Shiekh, D. Al-Mahdy, M. Hifnawy, T. Tzanova, E. Evain-Bana, S. Philippot, D. Bagrel, E. Abdel-sattar, *Chemical and Biological Investigation of Ochrosia elliptica Labill. Cultivated in Egypt*, Records of Natural Products, **2017**, 11, 552-557.
20. I.K. Adnyana, Y. Tezuka, A.H. Banskota, Q. Xiong, K.Q. Tran, S. Kadota, *Quadransides I–V, New Triterpene Glucosides from the Seeds of Combretum quadrangulare*, Journal of Natural Products, **2000**, 63, 496-500.

PHỤ LỤC PHỔ

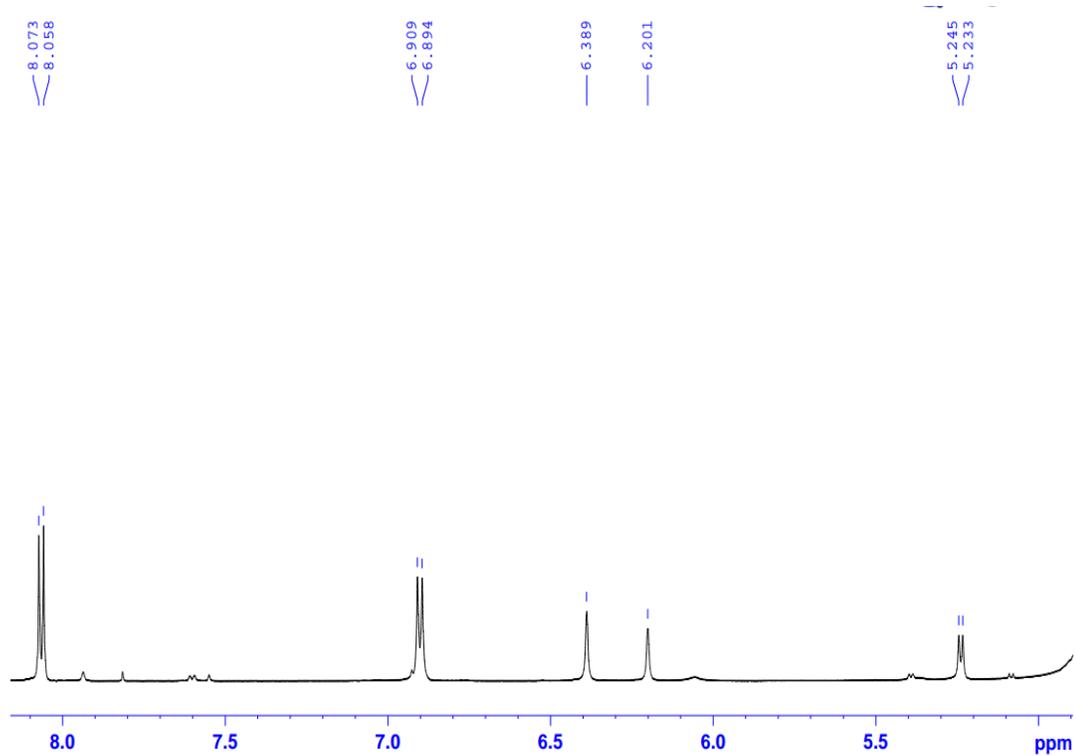
1. PHỤ LỤC PHỔ CỦA HỢP CHẤT TM1



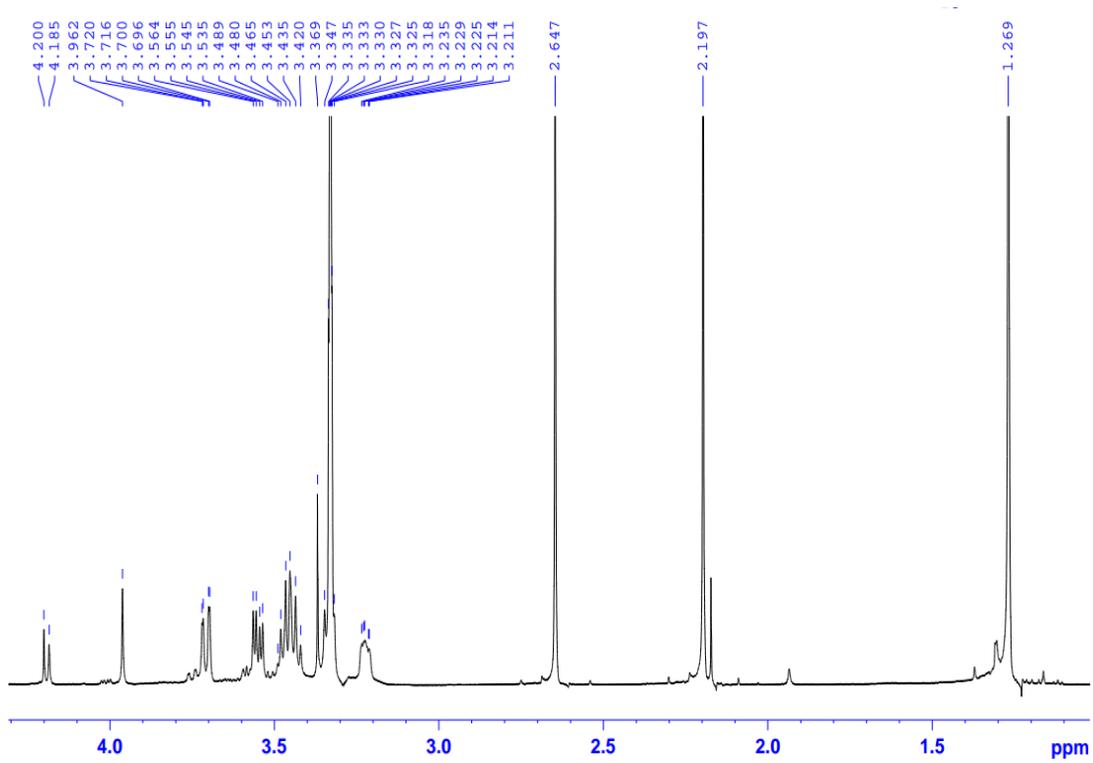
Phụ lục 1. Phổ HR-ESI-MS của hợp chất TM1



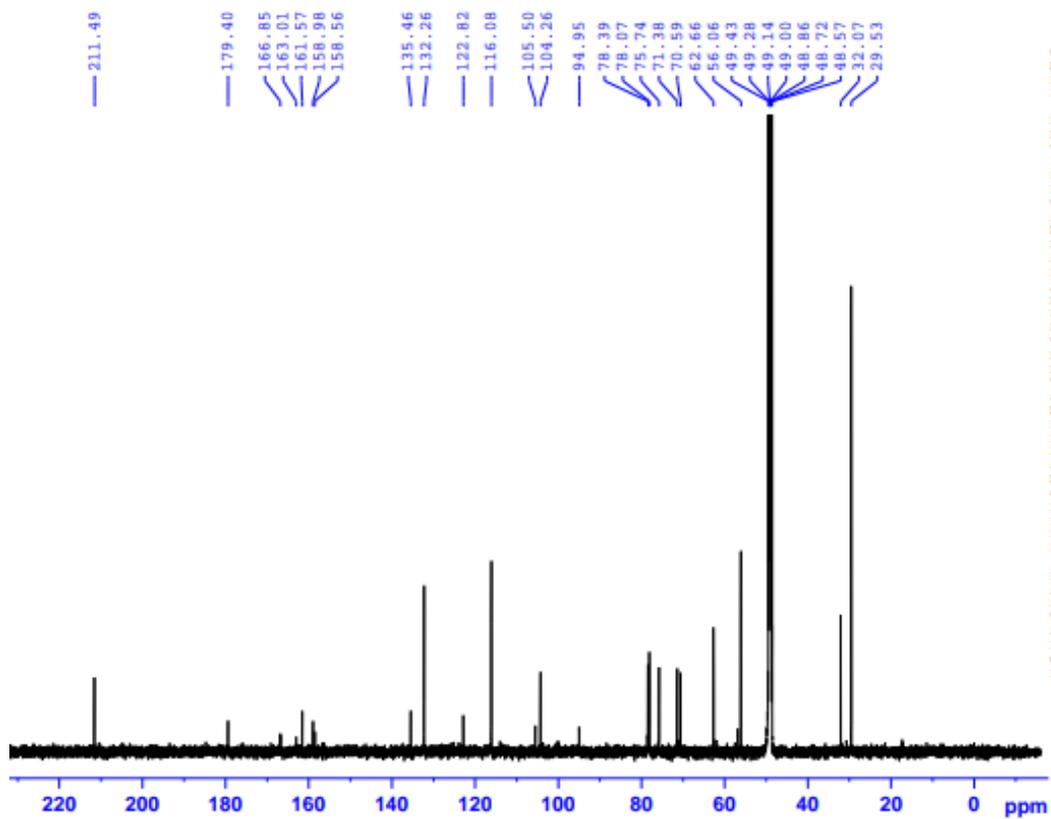
Phụ lục 2. Phổ $^1\text{H-NMR}$ của hợp chất TM1



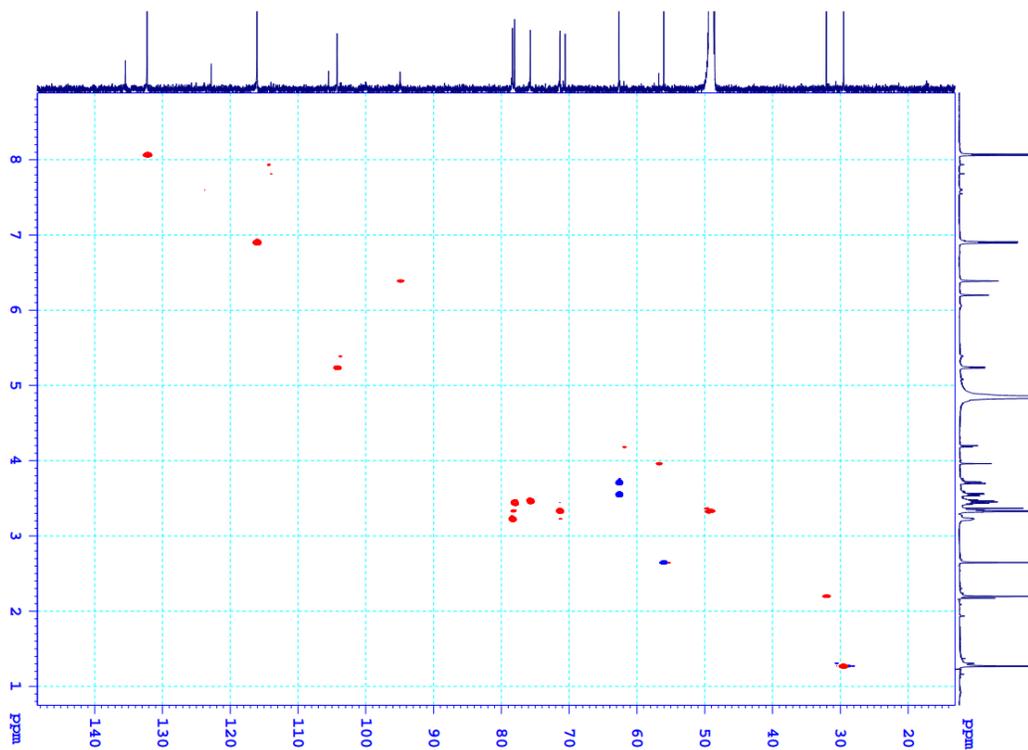
Phụ lục 3. Phổ $^1\text{H-NMR}$ giãn của hợp chất **TMI**



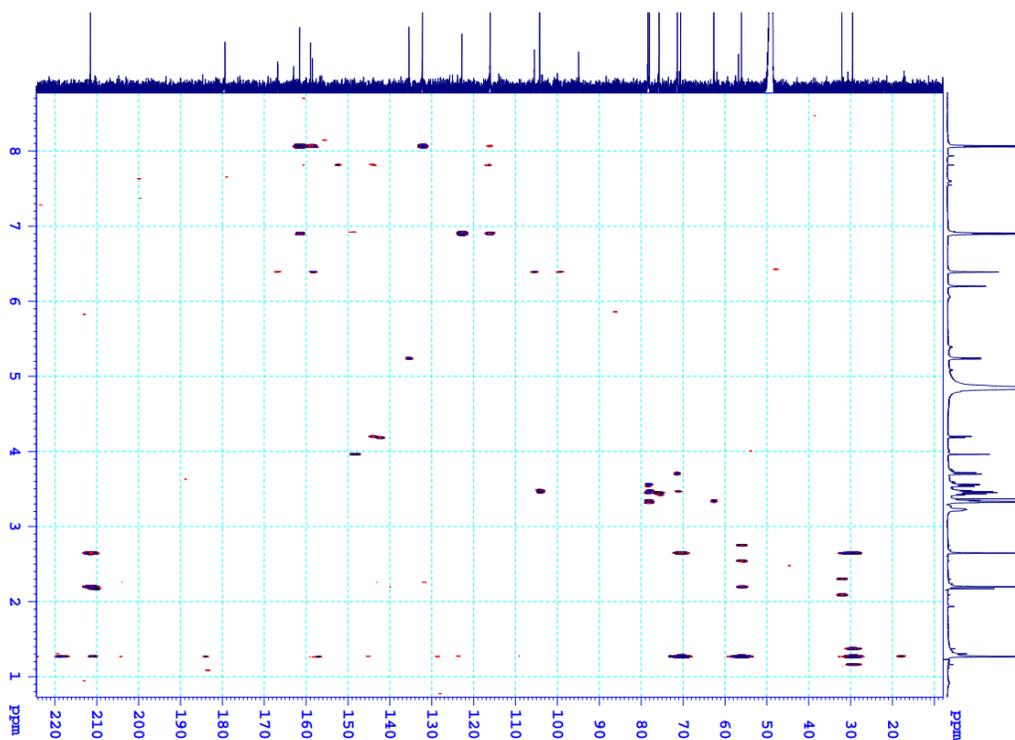
Phụ lục 4. Phổ $^1\text{H-NMR}$ giãn của hợp chất **TMI**



Phụ lục 5. Phổ ^{13}C -NMR của hợp chất **TM1**

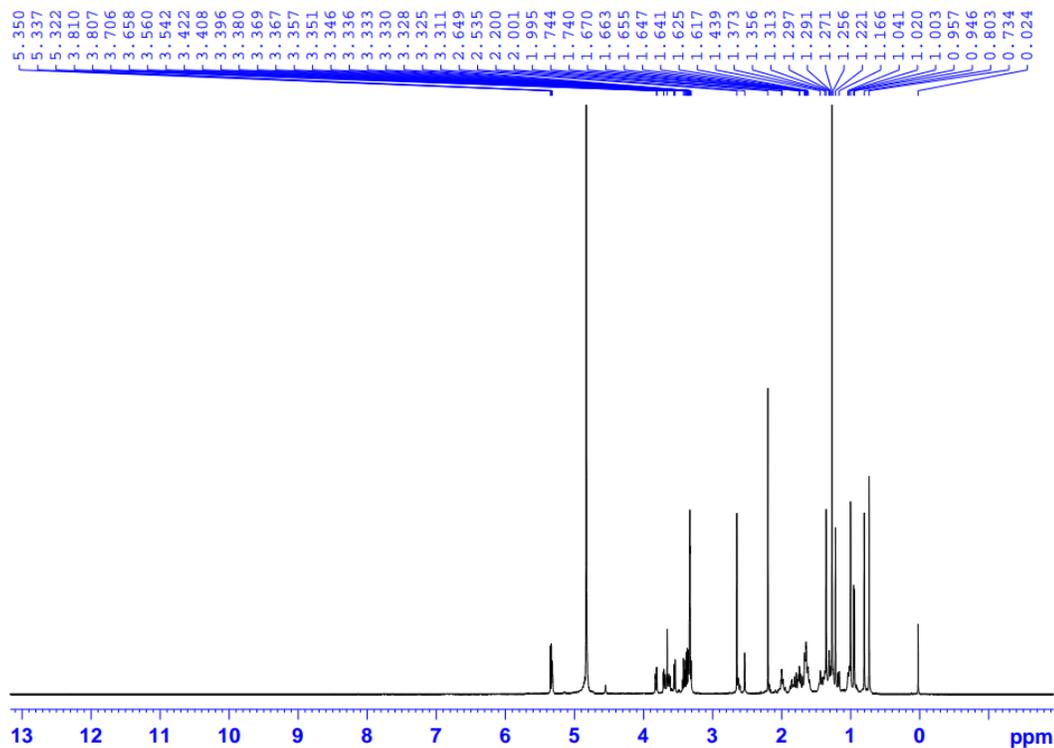


Phụ lục 6. Phổ HSQC của hợp chất **TM1**

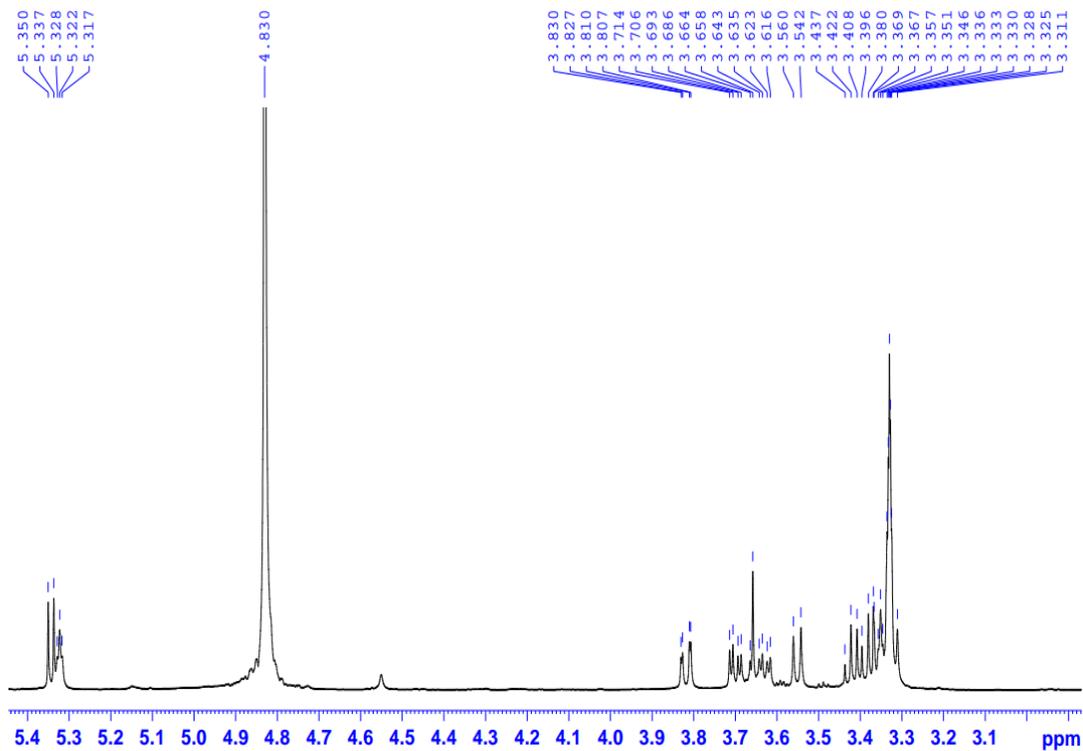


Phụ lục 7. Phổ HMBC của hợp chất **TM1**

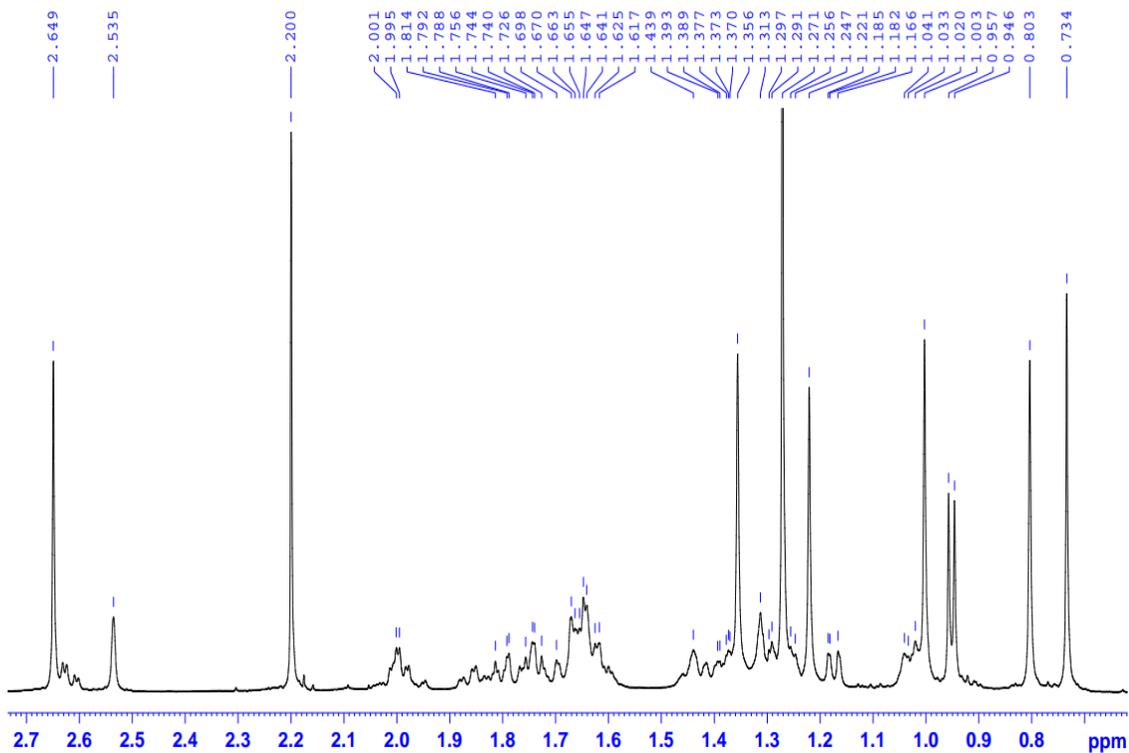
2. PHỤ LỤC PHỔ CỦA HỢP CHẤT **TM2**



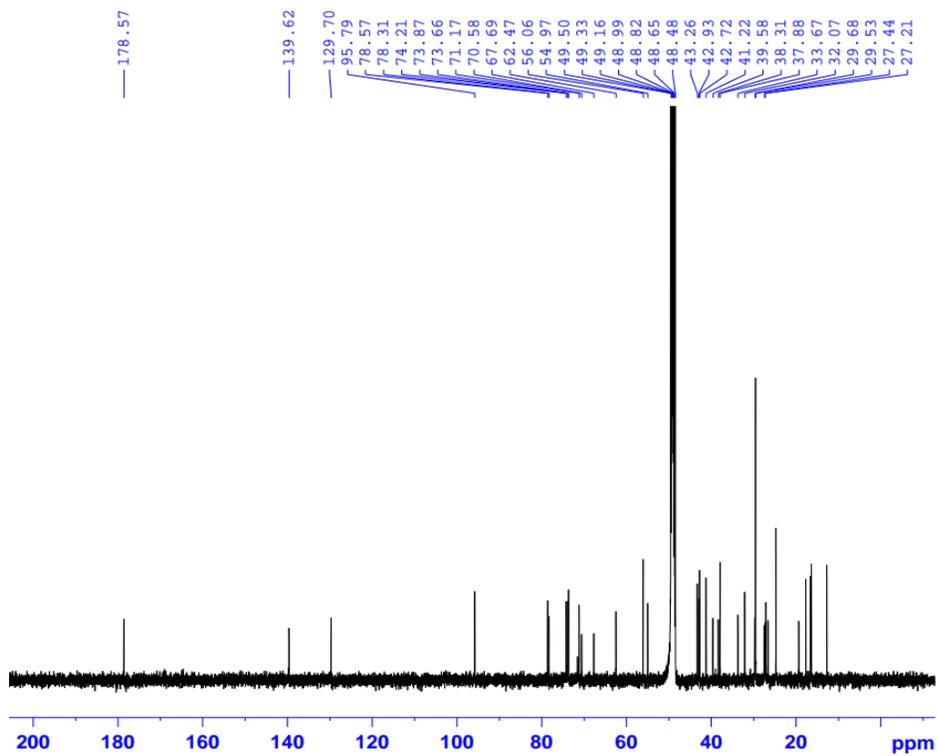
Phụ lục 8. Phổ $^1\text{H-NMR}$ của hợp chất **TM2**



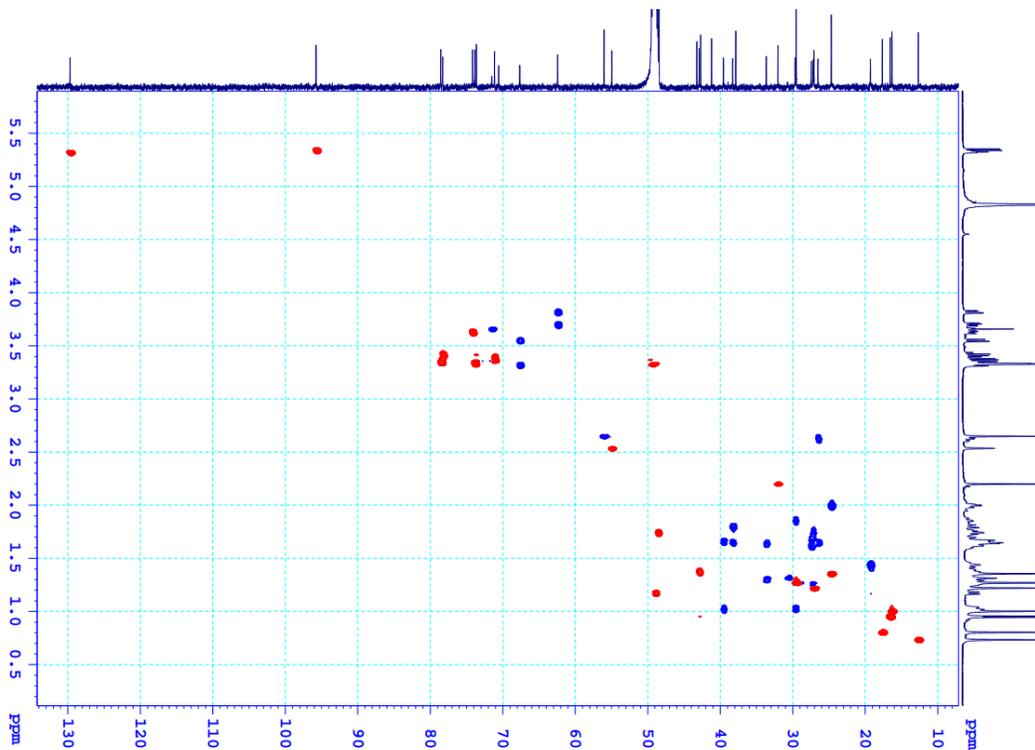
Phụ lục 9. Phổ $^1\text{H-NMR}$ giãn của hợp chất **TM2**



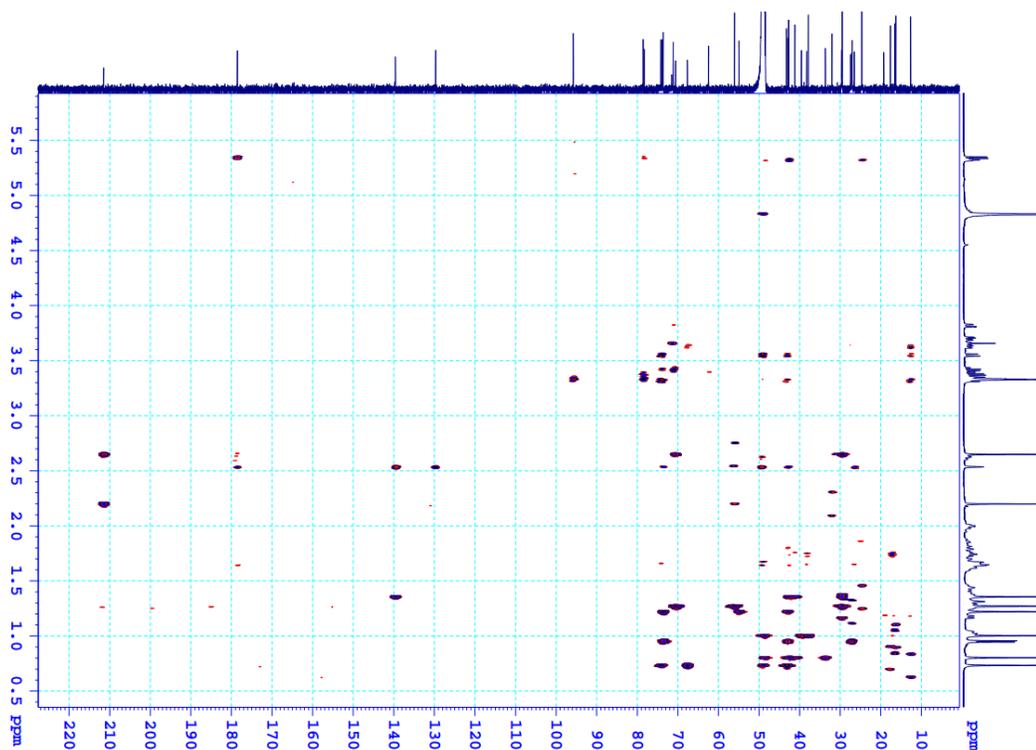
Phụ lục 10. Phổ $^1\text{H-NMR}$ giãn của hợp chất **TM2**



Phụ lục 11. Phổ ^{13}C -NMR của hợp chất TM2

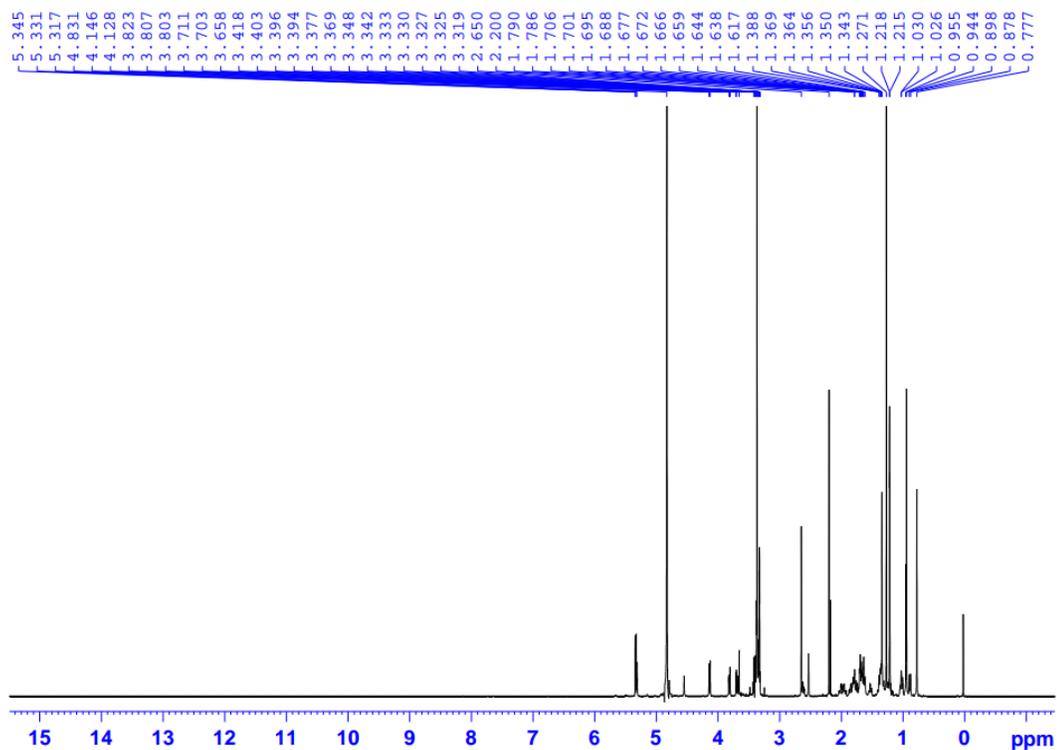


Phụ lục 12. Phổ HSQC của hợp chất TM2

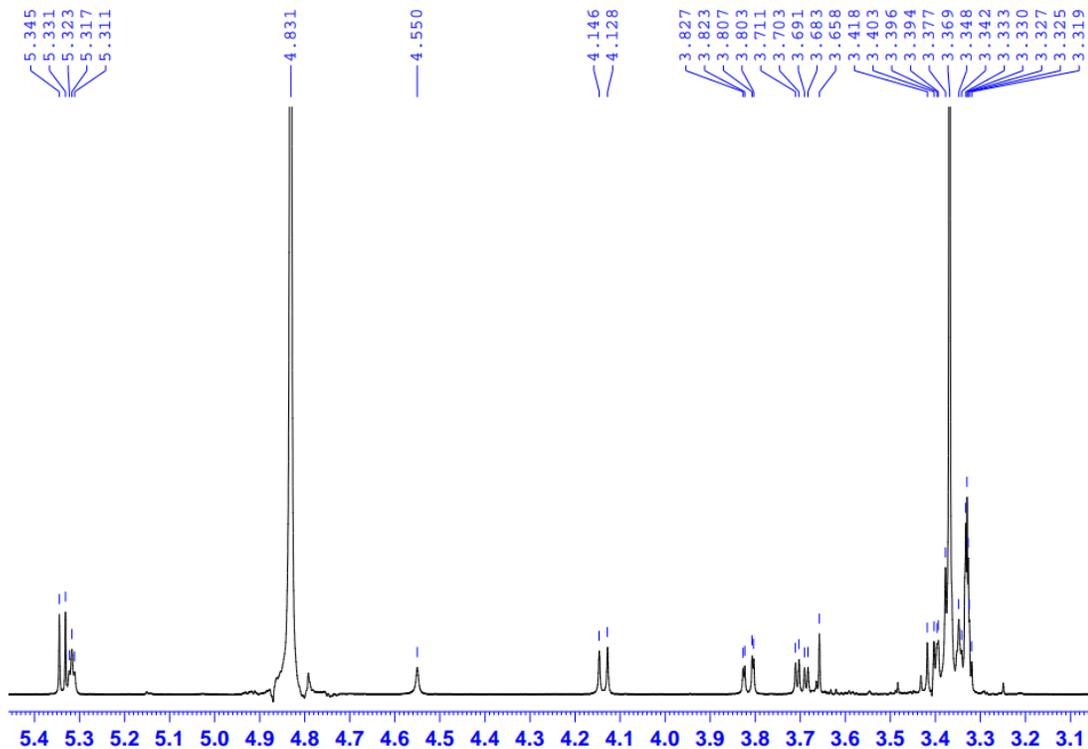


Phụ lục 13. Phổ HMBC của hợp chất TM2

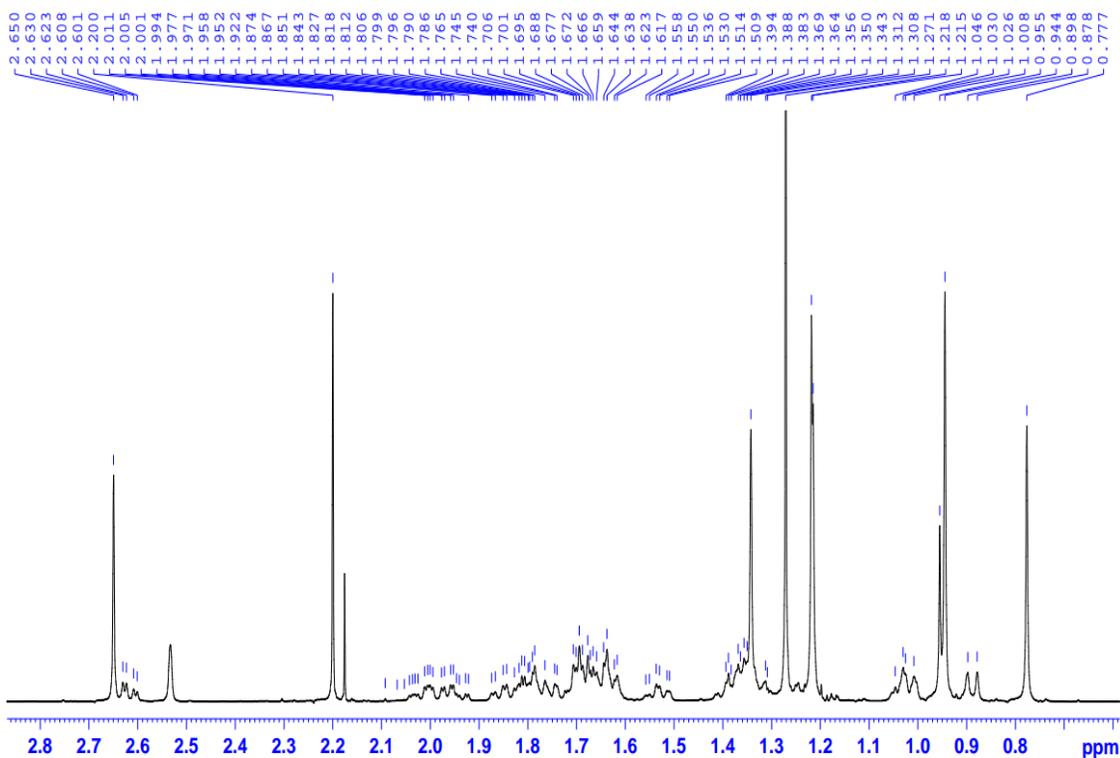
3. PHỤ LỤC PHỔ CỦA HỢP CHẤT TM3



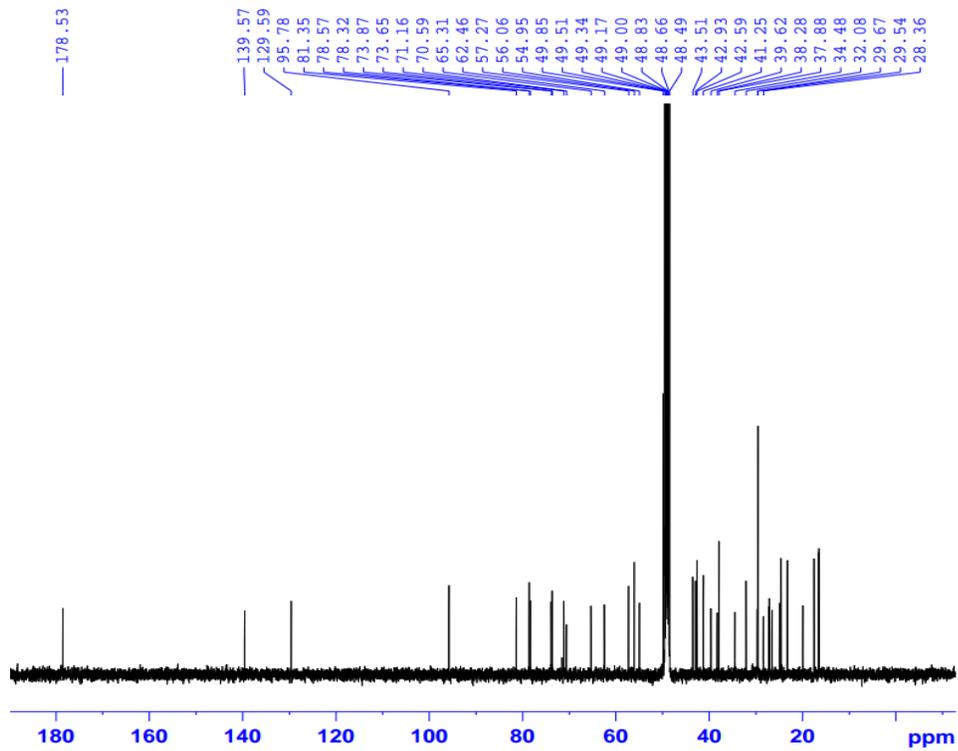
Phụ lục 14. Phổ $^1\text{H-NMR}$ của hợp chất TM3



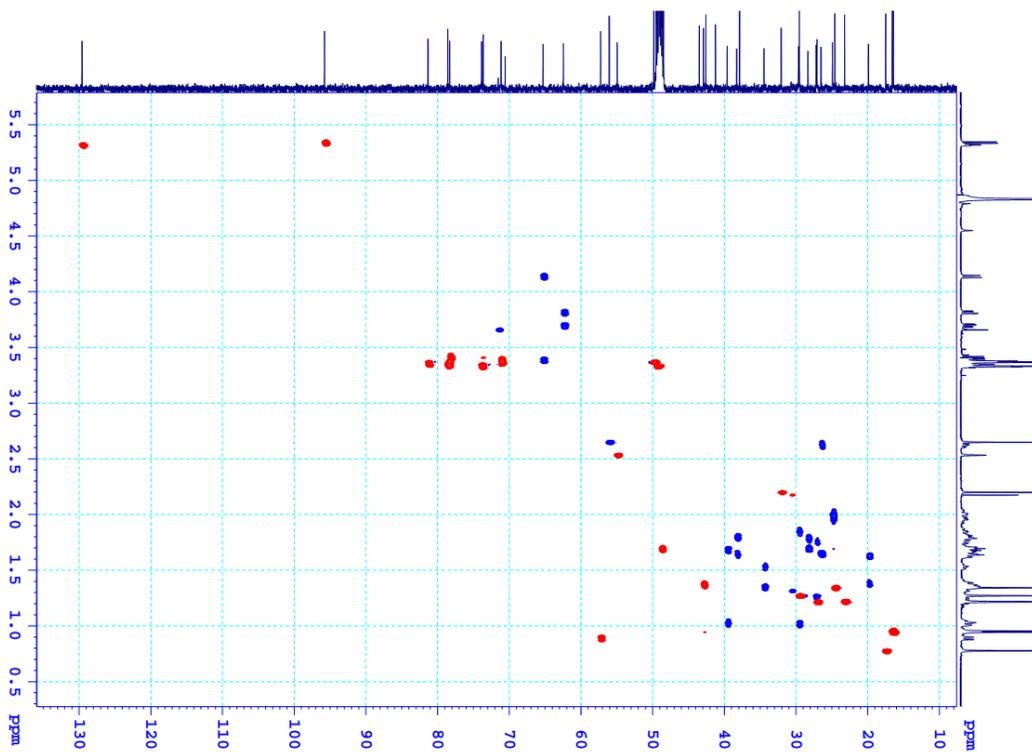
Phụ lục 15. Phổ $^1\text{H-NMR}$ giãn của hợp chất **TM3**



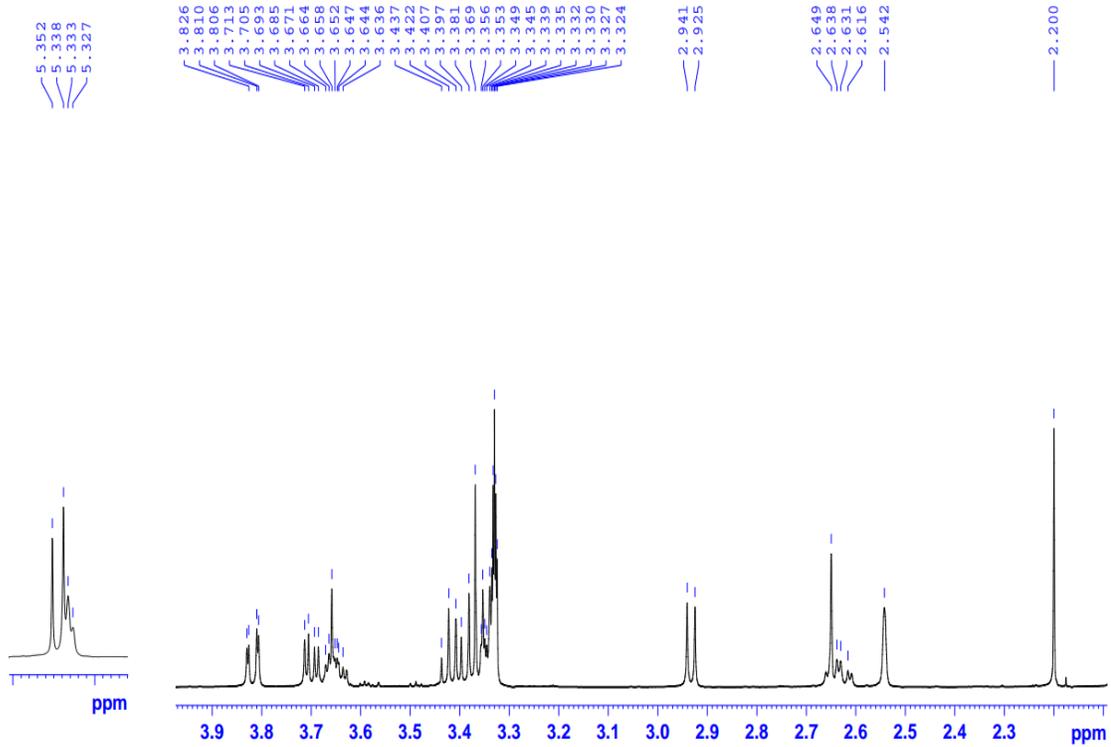
Phụ lục 16. Phổ $^1\text{H-NMR}$ giãn của hợp chất **TM3**



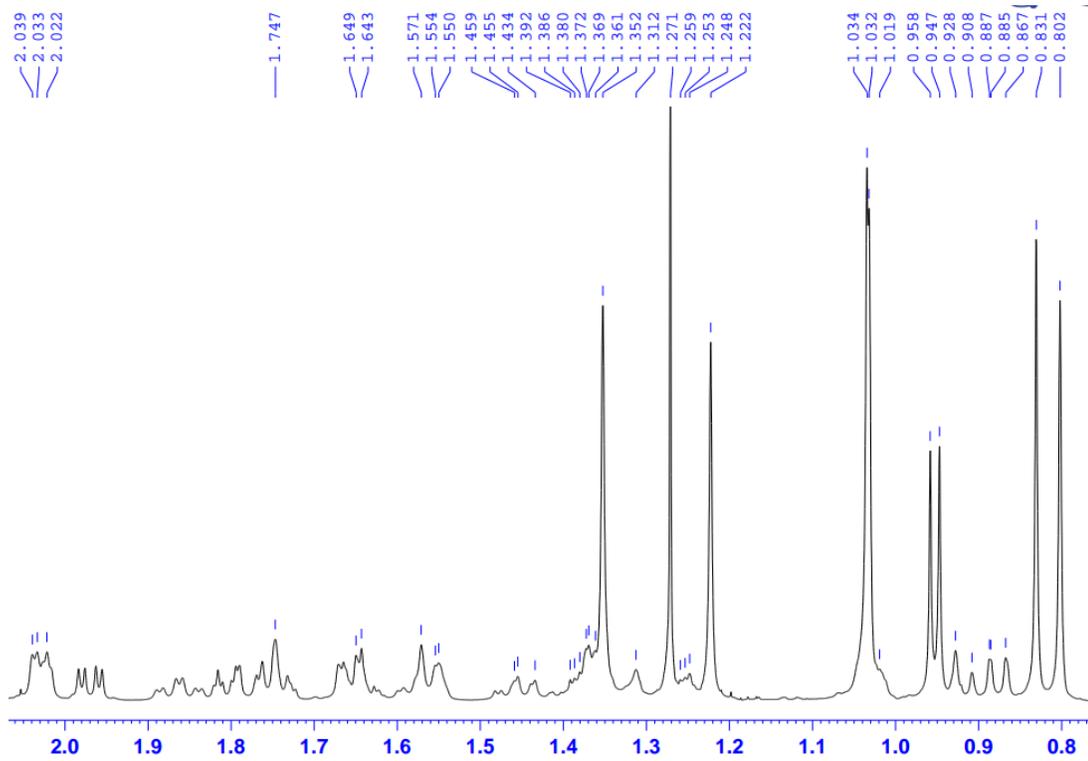
Phụ lục 17. Phổ $^{13}\text{C-NMR}$ của hợp chất **TM3**



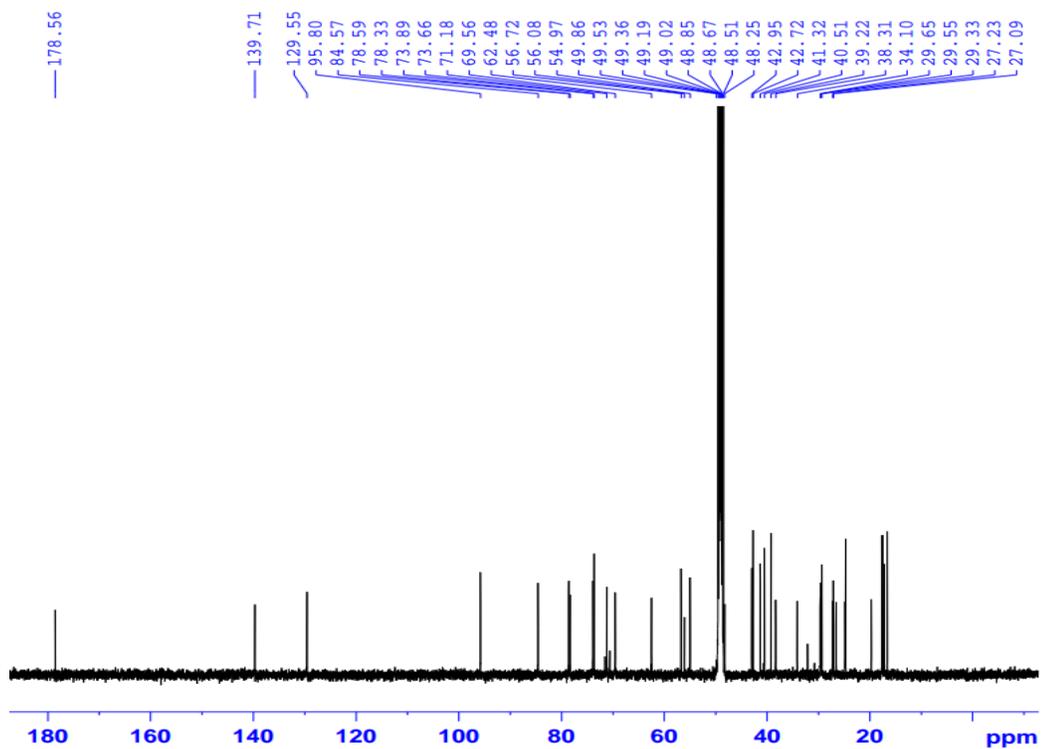
Phụ lục 18. Phổ HSQC của hợp chất **TM3**



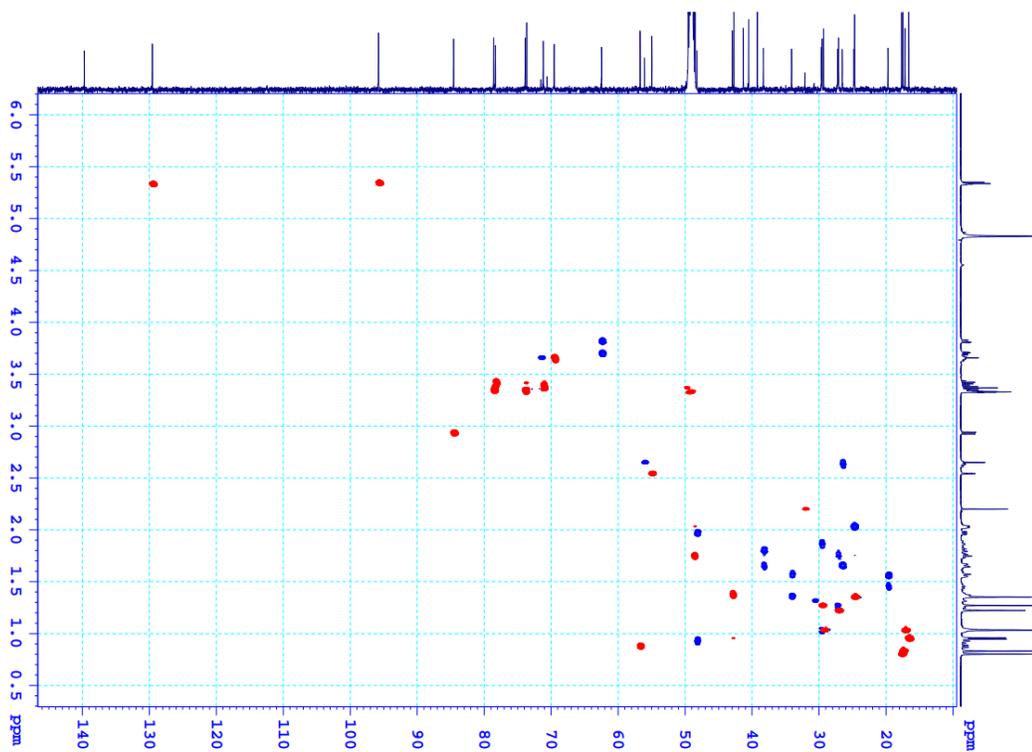
Phụ lục 21. Phổ $^1\text{H-NMR}$ giãn của hợp chất **TM4**



Phụ lục 22. Phổ $^1\text{H-NMR}$ giãn của hợp chất **TM4**

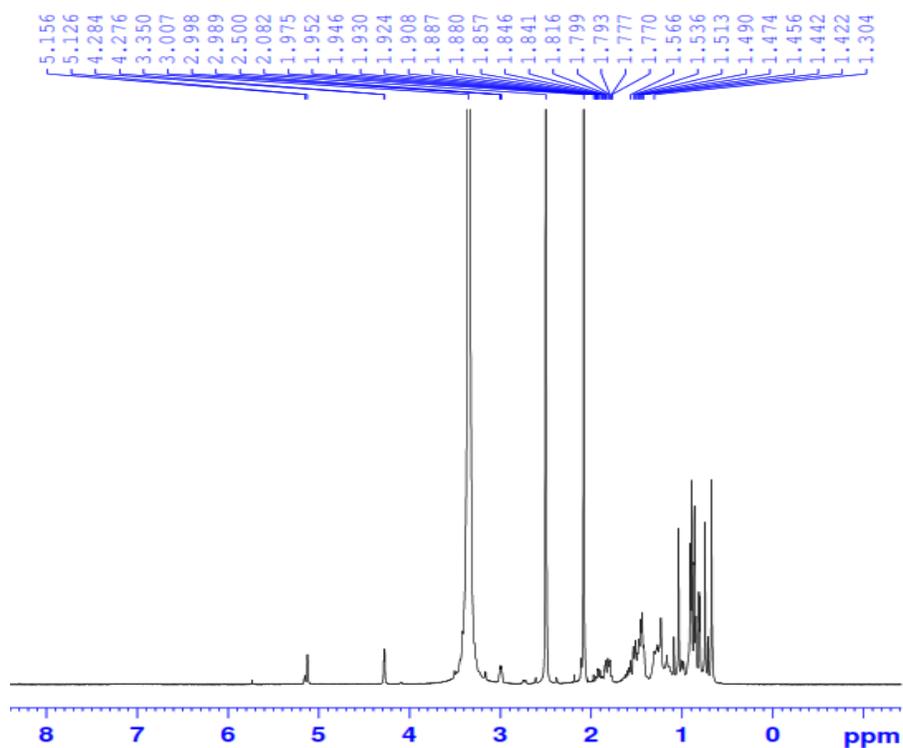


Phụ lục 23. Phổ ^{13}C -NMR của hợp chất **TM4**

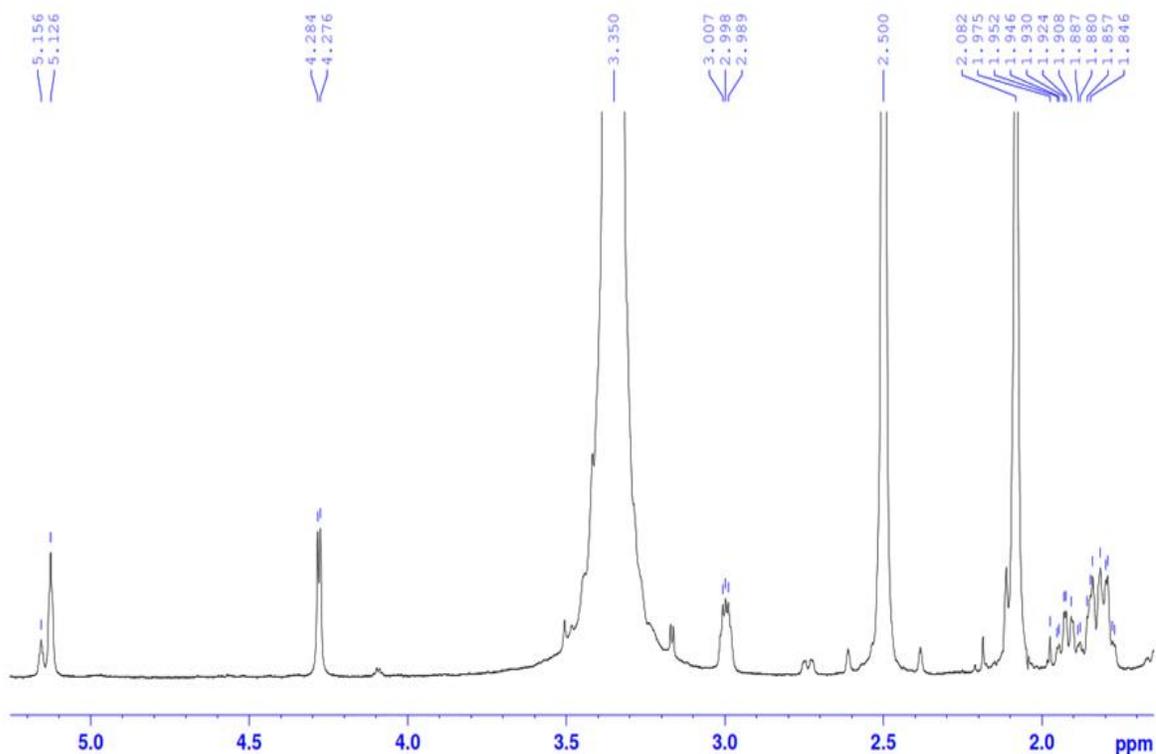


Phụ lục 24. Phổ HSQC của hợp chất **TM4**

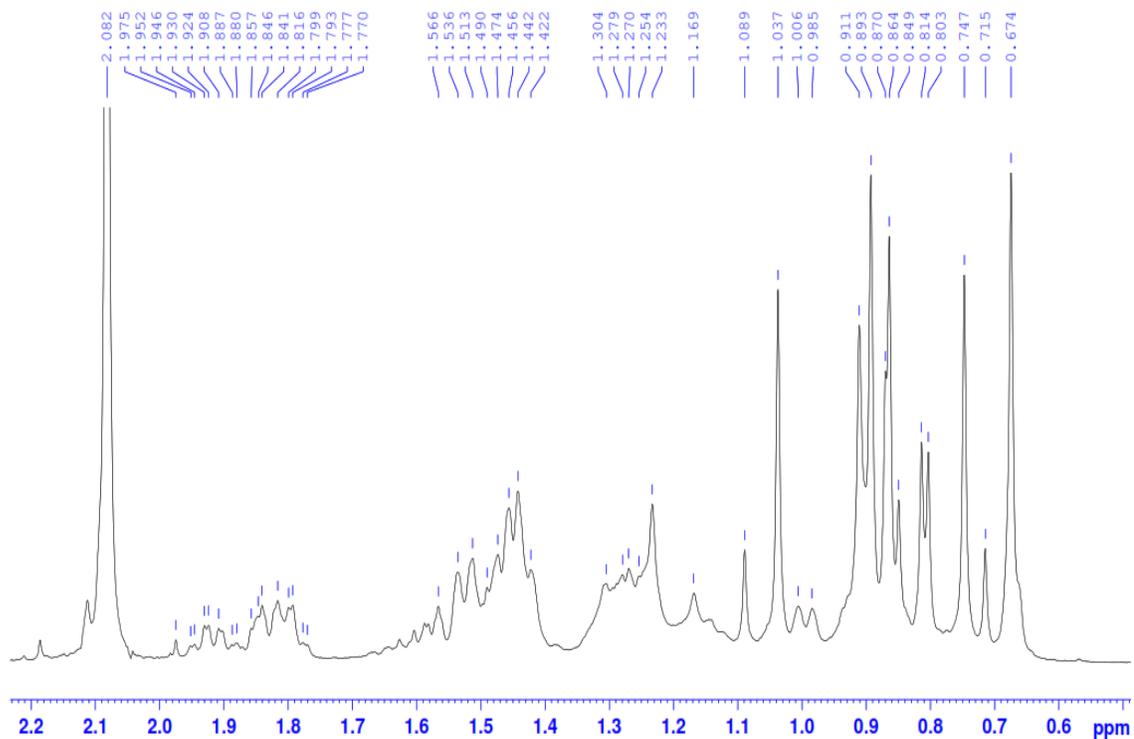
5. PHỤ LỤC PHỔ CỦA HỢP CHẤT TM5



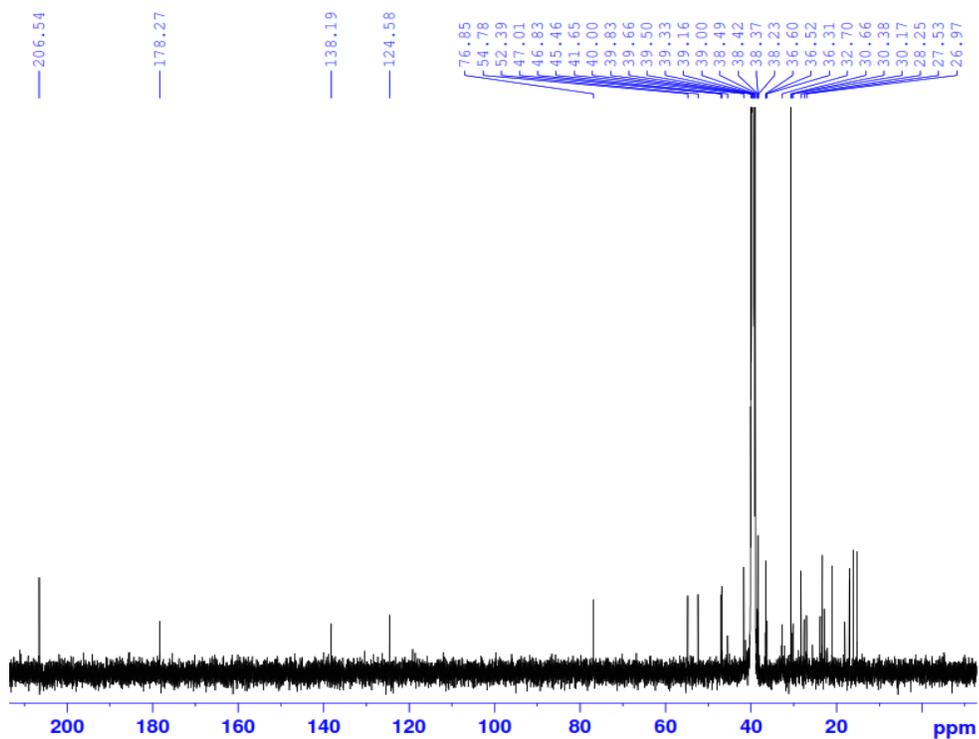
Phụ lục 25. Phổ $^1\text{H-NMR}$ của hợp chất TM5



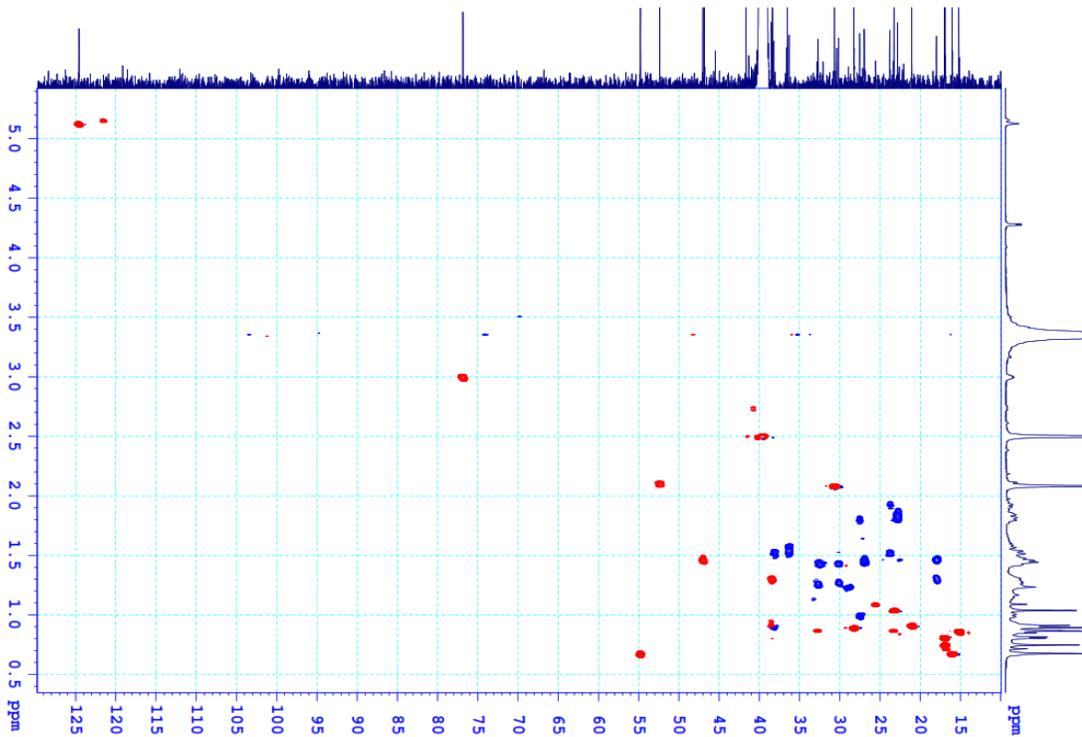
Phụ lục 26. Phổ $^1\text{H-NMR}$ giãn của hợp chất TM5



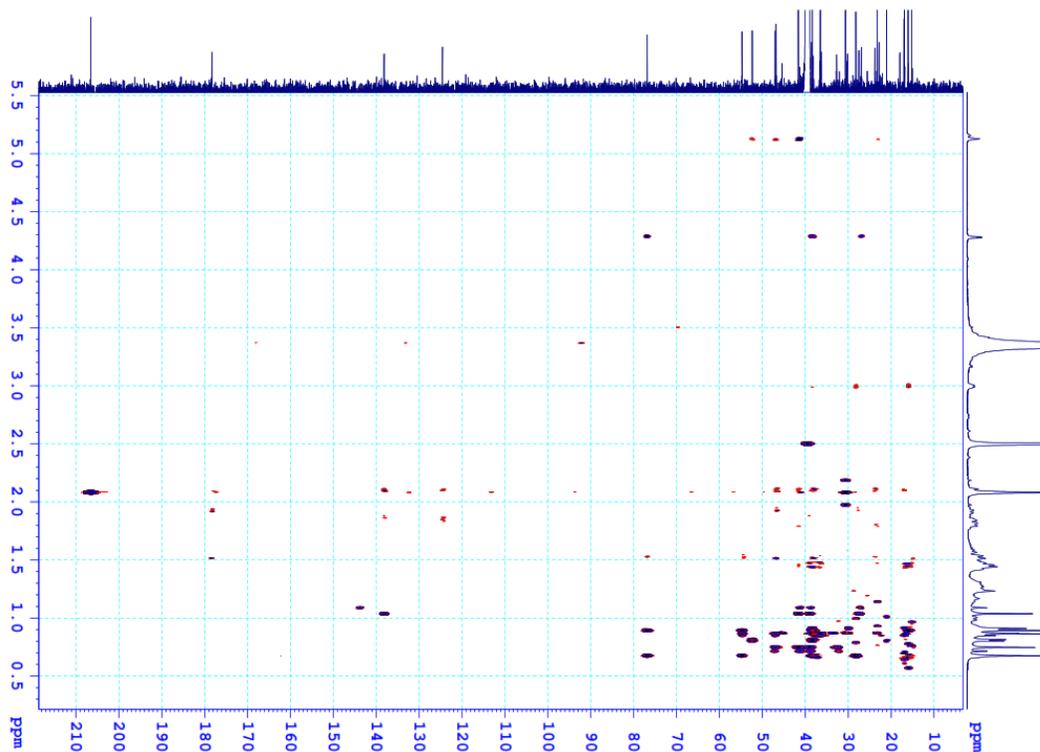
Phụ lục 27. Phổ $^1\text{H-NMR}$ giãn của hợp chất **TM5**



Phụ lục 28. Phổ $^{13}\text{C-NMR}$ của hợp chất **TM5**

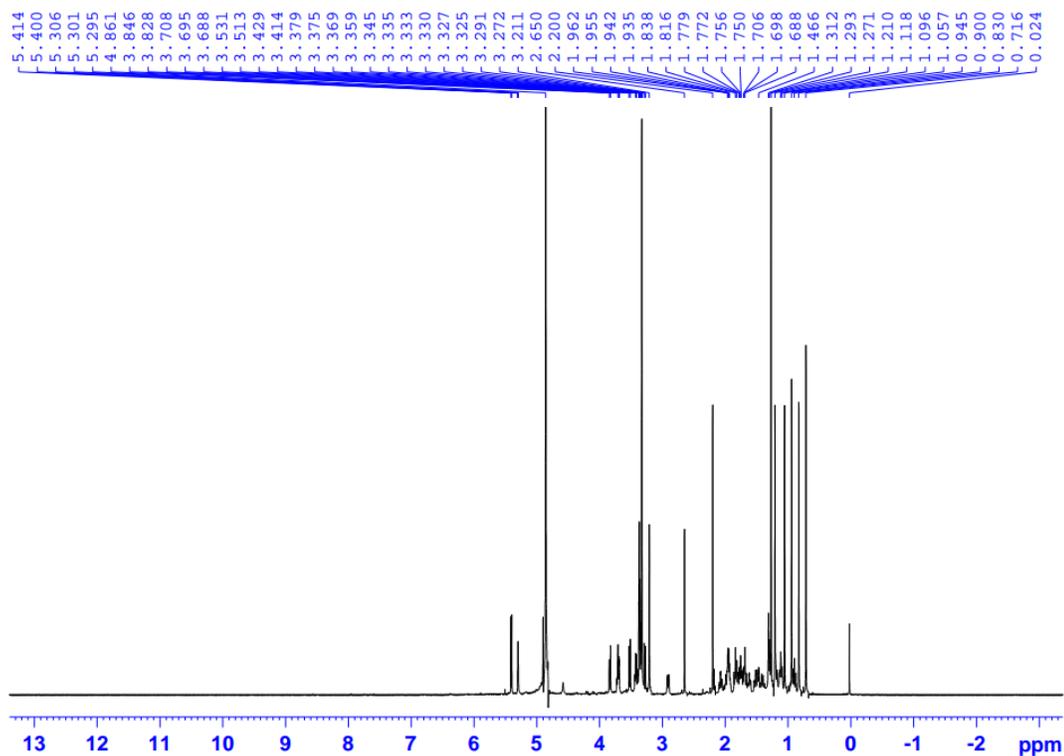


Phụ lục 29. Phổ HSQC của hợp chất **TM5**

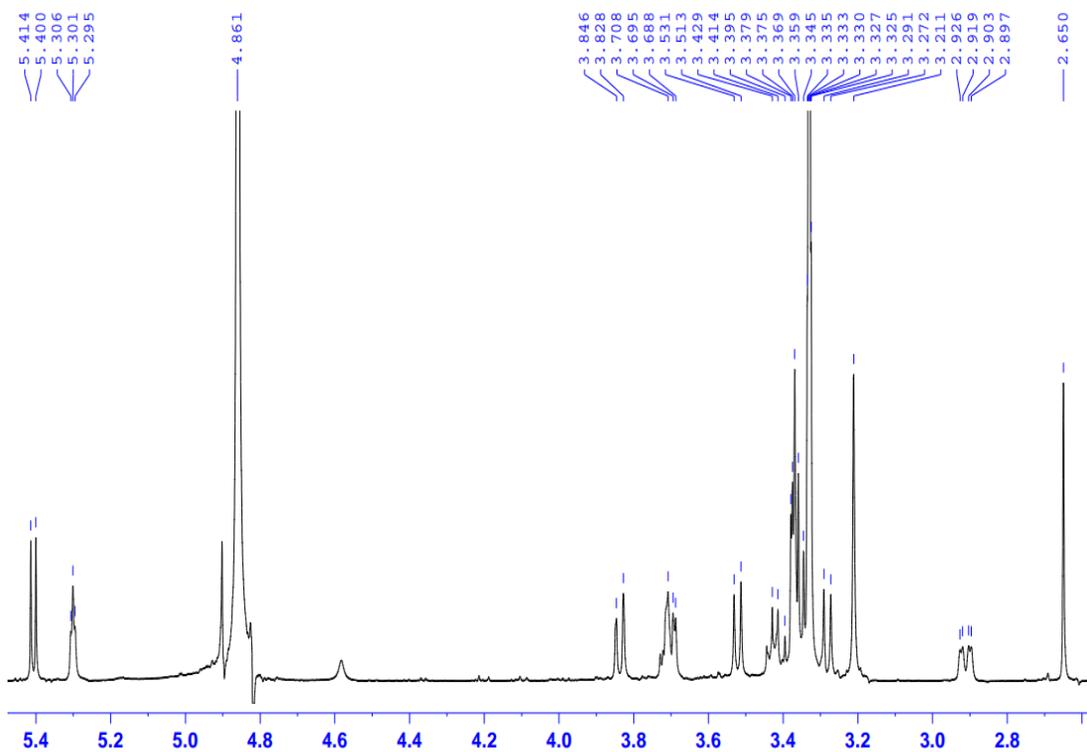


Phụ lục 30. Phổ HMBC của hợp chất **TM5**

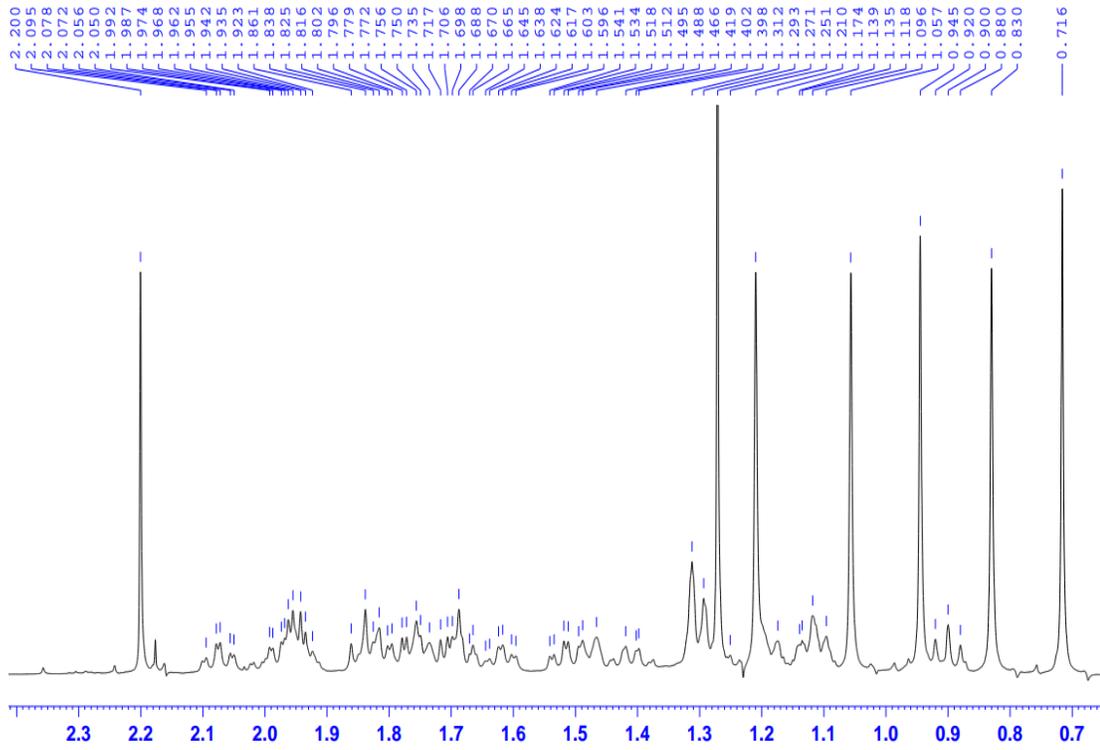
6. PHỤ LỤC PHỔ CỦA HỢP CHẤT TM6



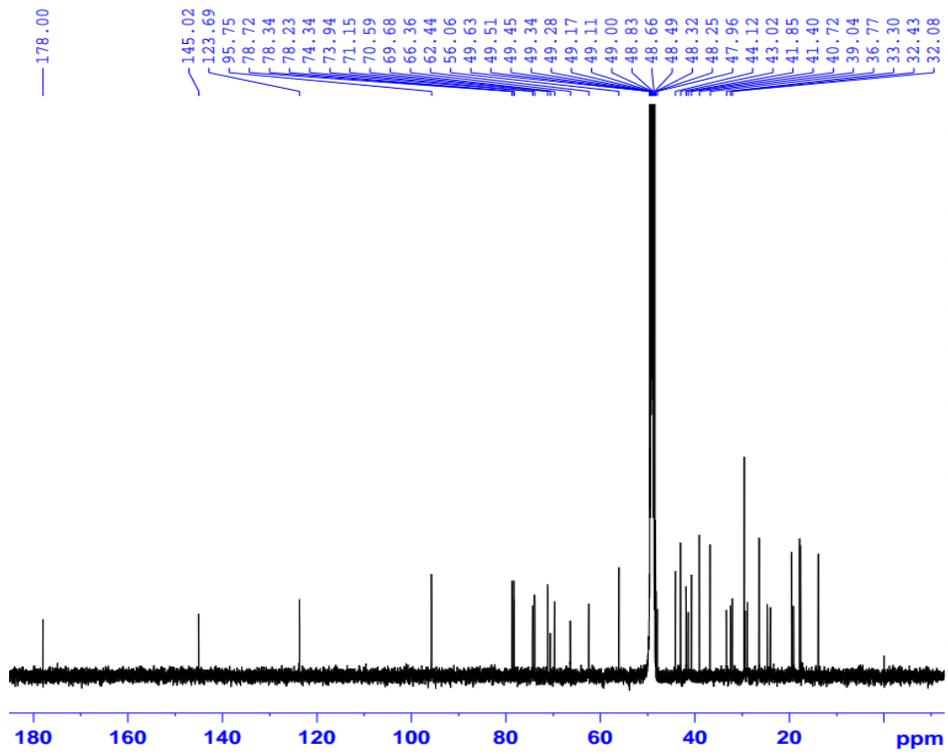
Phụ lục 31. Phổ $^1\text{H-NMR}$ của hợp chất TM6



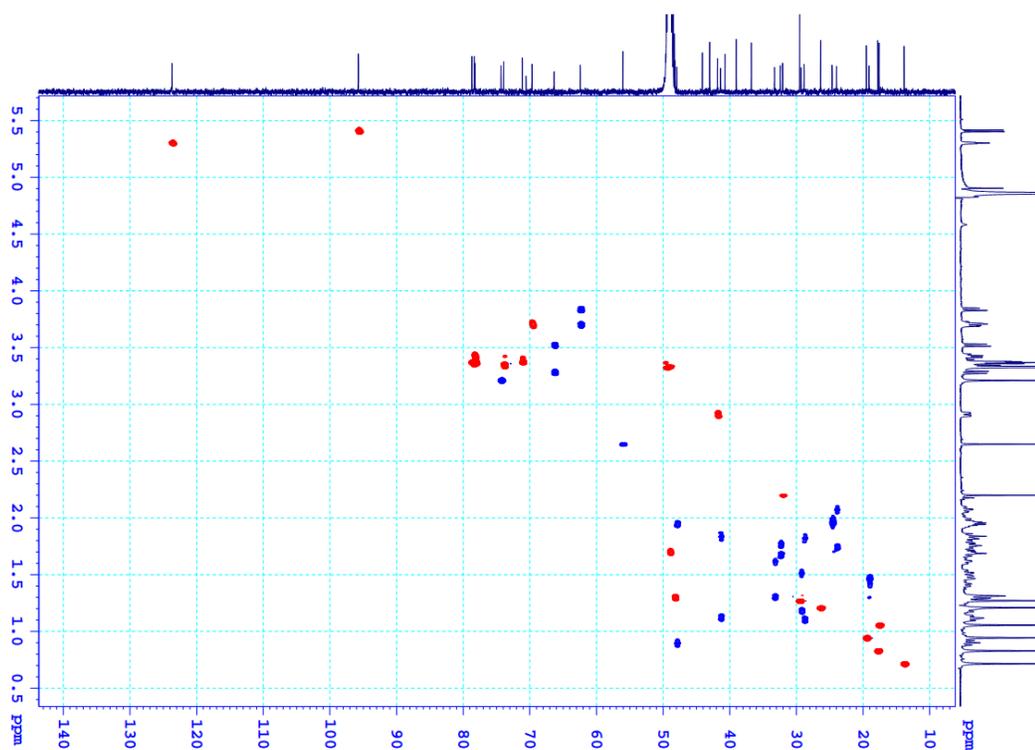
Phụ lục 32. Phổ $^1\text{H-NMR}$ giãn của hợp chất TM6



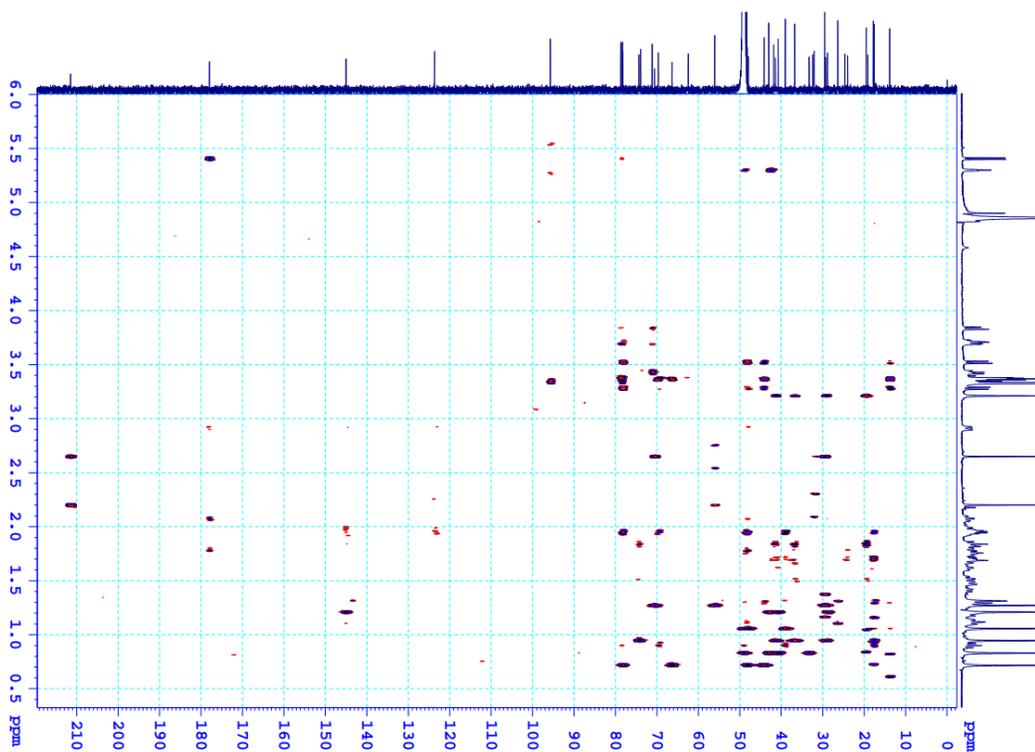
Phụ lục 33. Phổ $^1\text{H-NMR}$ giãn của hợp chất **TM6**



Phụ lục 34. Phổ $^{13}\text{C-NMR}$ của hợp chất **TM6**



Phụ lục 35. Phổ HSQC của hợp chất **TM6**



Phụ lục 36. Phổ HMBC của hợp chất **TM6**