TRƯỜNG ĐẠI HỌC ĐÀ LẠT

BÁO CÁO TỔNG KẾT

ĐỀ TÀI NGHIÊN CỨU KHOA HỌC CỦA SINH VIÊN

NGHIÊN CỨU PHÂN LẬP VÀ XÁC ĐỊNH CẤU TRÚC MỘT SỐ HỢP CHẤT TỪ LÁ LOÀI *RUBUS ANNAMENSIS* THU TẠI LÂM ĐỒNG

Thuộc lĩnh vực khoa học và công nghệ: Khoa học Tự nhiên (Hóa học)

Lâm Đồng, tháng 5/2022

TRƯỜNG ĐẠI HỌC ĐÀ LẠT

BÁO CÁO TỔNG KẾT

ĐỀ TÀI KHOA HỌC SINH VIÊN NĂM 2022

NGHIÊN CỨU PHÂN LẬP VÀ XÁC ĐỊNH CẤU TRÚC MỘT SỐ HỢP CHẤT TỪ LÁ LOÀI *RUBUS ANNAMENSIS* THU TẠI LÂM ĐỒNG

Thuộc nhóm ngành khoa học: Khoa học Tự nhiên

Sinh viên thực hiện:

Lê Thị Diễm Trinh (chủ nhiệm đề tài)

Nguyễn Lê Huệ Anh

Trần Thị Ngọc Bích

Người hướng dẫn:

PGS. TS. Trịnh Thị Điệp

TS. Huỳnh Thanh Trúc

Lâm Đồng, tháng 5/2022

MỤC LỤC

MỞ ĐẦU....1
CHƯƠNG 1. TỔNG QUAN....2
1.1. Tổng quan về chi *Rubus*....2
1.1.1. Thành phần hoá học của chi *Rubus*....2
1.1.1.1. Sesquiterpenoid....2
1.1.1.2. Diterpenoid....3
1.1.1.3. Triterpenoid....4
1.1.1.4. Flavonoid....6
1.1.1.5. Anthraquinon....8
1.1.1.6. Các nhóm hợp chất khác....8
1.1.2. Hoạt tính sinh học của chi *Rubus*....9
1.2. Các phương pháp chiết xuất....10
1.2.1. Kỹ thuật chiết ngâm dầm....10
1.2.2. Chiết nhờ hỗ trợ siêu âm....10
1.2.3. Kỹ thuật chiết soxhlet....12
1.2.4. Kỹ thuật chiết pha rắn....12
1.3. Các phương pháp tách bằng sắc ký....13
1.3.1. Sắc ký lớp mỏng....13
1.3.1.1. Nguyên lý....13
1.3.1.2. Chất hấp thụ....14
1.3.1.3. Lựa chọn dung môi....14
1.3.2. Sắc ký cột....15
1.3.2.1. Nguyên tắc sắc ký hấp phụ....15
1.3.2.2. Nguyên tắc sắc ký phân bố....15
1.3.2.3. Dụng cụ, hóa chất....15
CHƯƠNG 2. ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU....17
2.1. Đối tượng nghiên cứu....17
2.2. Phương pháp chiết xuất và phân lập....17

2.2.1. Phương pháp chiết..... 17
2.2.2. Phương pháp sắc ký cột.....17
2.2.3. Phương pháp sắc ký bản mỏng.....18
2.2.4. Phương pháp tinh chế sản phẩm.....18
2.3. Phương pháp xác định cấu trúc..... 18
CHƯƠNG 3. THỰC NGHIỆM.....19
3.1. Điều chế các dịch chiết từ lá cây.....19
3.2. Phân lập các hợp chất từ lá cây..... 19
3.2.1. Quy trình phân lập..... 19
3.2.2. Thông số vật lý và số liệu phổ của các hợp chất phân lập được..... 20
3.2.2.1. RA01..... 20
3.2.2.2. RA02..... 21
CHƯƠNG 4. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN..... 22
4.1. Quy trình phân lập..... 22
4.2. Xác định cấu trúc các hợp chất.....22
4.2.1. Hợp chất RA01.....22
4.2.2. Hợp chất RA02.....33
4.3. Các hợp chất khác được phân lập.....41
4.4. Kết quả khảo sát phân đoạn n-hexan.....42
4.5. Kết quả khảo sát phân đoạn nước.....42
KẾT LUẬN VÀ KIẾN NGHỊ 45
TÀI LIỆU THAM KHẢO..... 46
PHỤ LỤC

DANH MỤC CÁC KÍ HIỆU VÀ CHỮ VIẾT TẮT

δ	Độ chuyển dịch hóa học
ν	Số sóng
^{1}H-NMR	Phổ cộng hưởng từ hạt nhân proton (Proton Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy)
^{13}C-NMR	Phổ cộng hưởng từ hạt nhân carbon 13 (Carbon-13 Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy)
ABTS	2,2'-azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid)
brs	Peak đơn loang rộng (Broad singlet)
C : A	Chloroform : acetone
C : M	Chloroform : methanol
d	Peak đôi (Doublet)
dd	Peak đôi của peak đôi (Doublet of doublet)
DEPT	Distortionless Enhancement by Polarisation Transfer
DMSO	Dimethyl sulfoxide
DPPH	2,2-diphenyl-1-picryl-hydrazyl
ESI-MS	Phổ khối phun mù điện tử (Electrospray Ionization Mass Spectrometry)
EtOAc	Ethyl acetate
Glc	Glucose
H : C	n-hexan : chloroform
HCV	Virus gây bệnh viêm gan C (Hepatitis C Virus)
HIV	Virus gây suy giảm miễn dịch ở người (Human Immunodeficiency Virus)
HMBC	Tương tác dị hạt nhân qua nhiều liên kết (Heteronuclear Multiple Bond Coherence)
HPLC	Sắc ký lỏng hiệu năng cao (High Performance Liquid Chromatography)
HSQC	Tương tác dị hạt nhân qua một liên kết (Heteronuclear Single Quantum Coherence)
Hz	Hertz

IR	Phổ hồng ngoại (Infrared Spectroscopy)
J	Hằng số tương tác
m	Peak đa (Multiplet)
M	Khối lượng phân tử
m/z	Tỉ lệ khối lượng và điện tích của ion
MeOH	Methanol
MHz	Megahertz
MIC	Nồng độ ức chế tối thiểu (Minimum Inhibitory Concentration)
SKC	Sắc ký cột
SKLM	Sắc ký lớp mỏng
TMS	Tetrametylsilan

DANH MỤC BẢNG

Bảng 4.1. Số liệu phổ NMR của RA01.....30

Bảng 4.2. Số liệu phổ NMR của RA02.....39

DANH MỤC HÌNH

Hình 1.1. Cấu trúc hợp chất 5-eudesmen-11-ol thuộc khung eudeusmen..... 2

Hình 1.2. Hợp chất 10,11-epoxyguaian thuộc khung guaian..... 3

Hình 1.3. Hợp chất rubusoside thuộc khung labdan.....3

Hình 1.4. Cấu trúc hợp chất *ent*-16α,17-dihydroxy-kauran-19-oicthuộc khung *ent*-kauran..... 4

Hình 1.5. Cấu trúc hợp chất acid oleanolic khung olean.....5

Hình 1.6. Acid fupenzic – một hợp chất triterpenoid khung ursan..... 5

Hình 1.7. Cấu trúc của luteolin-7-O-glucoside thuộc nhóm chất flavonoid..... 7

Hình 1.8. Cấu trúc của hợp chất 2-methyl-1,3,6-trihydroxy-9,10-anthraquinone 3-O-α-rhamnosyl-(1→2)-β-glucoside.....8

Hình 1.9. Cấu tạo của hợp chất (6R, 7E, 9R), O-(α-L-arabinofuranosyl-(1→6)-β-D-glucopyranoside)..... 9

Hình 2.1. Lá phúc bồn tử *Rubus annamensis* mọc dại tại Nam Ban……17

Hình 2.2. Quả phúc bồn tử *Rubus annamensis* mọc dại tại Nam Ban……17

Hình 4.1. Sơ đồ quy trình phân lập các hợp chất từ lá cây phúc bồn tử *R. annamensis* ……..22

Hình 4.2. Sắc ký đồ SKLM của chất RA01.....23

Hình 4.3. Phổ IR của RA01..... 23

Hình 4.4. Phổ ^{1}H-NMR của RA01 (a) và các phổ ^{1}H-NMR giãn (b,c)..... 25

Hình 4.5. Phổ ^{13}C-NMR của RA01.....26

Hình 4.6. Phổ DEPT của RA01..... 26

Hình 4.7. Phổ HSQC của RA01.....27

Hình 4.8. Phổ HMBC của RA01.....28

Hình 4.9. Phổ ESI-MS của RA01..... 29

Hình 4.10. Cấu trúc hóa học của RA01..... 29

Hình 4.11. Các tương tác chính trên phổ HMBC của RA01.....30

Hình 4.12. Sắc ký đồ SKLM của chất RA02.....33

Hình 4.13. Phổ IR của RA02..... 34

Hình 4.14. Phổ ^{1}H-NMR của RA02.....34

Hình 4.15. Phổ ^{13}C-NMR của RA02.....35

Hình 4.16. Phổ DEPT của RA02..... 35

Hình 4.17. Phổ HSQC của RA02.....36

Hình 4.18. Phổ HMBC của RA02.....37

Hình 4.19. Phổ ESI-MS của RA02..... 37

Hình 4.20. Cấu trúc hóa học của RA02..... 38

Hình 4.21. Các tương tác chính trên phổ HMBC của RA02.....38

Hình 4.22. Sắc ký đồ SKLM của các hợp chất RA03, RA04, RA05, RA06.....41

Hình 4.23. Sắc ký đồ SKLM khảo sát sự có mặt của β-sitosterol trong phân đoạn n-hexan..... 42

Hình 4.24. Cấu trúc hợp chất β-sitosterol.....42

Hình 4.25. Sắc ký đồ SKLM khảo sát sự có mặt của glucose trong phân đoạn nước..43

Hình 4.26. Công thức cấu tạo của glucose..... 44

MỞ ĐẦU

Hiện nay, tỷ lệ mắc các bệnh về lối sống ngày càng gia tăng do chế độ dinh dưỡng không phù hợp và ô nhiễm môi trường. Để ngăn ngừa các bệnh này, nhiều loài cây cỏ chứa các hợp chất có hoạt tính sinh học khác nhau và không có tác dụng phụ bất lợi được quan tâm sử dụng, trong đó có lá của một số loài thực vật hay một số loài cây ăn quả từng được sử dụng trong y học dân gian như là một loại thuốc chữa bệnh.

Trong y học cổ truyền Việt Nam, quả và lá của cây mâm xôi (*Rubus alceaefolius* Poir) đã được sử dụng làm thuốc. Quả có vị ngọt nhạt, tính bình, có tác dụng bổ can thận, giữ tinh khí, làm cường dương mạnh sức. Lá có vị se, có tác dụng hoạt huyết, thanh nhiệt, tán ứ tiêu viêm. Gần đây, nhiều thông tin mới về hoạt tính sinh học của các hợp chất trong các loài *Rubus* đã được công bố. Trong thành phần của lá các loài *Rubus* có chứa polyphenol như tannin và flavonoid, hoạt động như các chất chống oxy hóa, giúp hạn chế nguy cơ tổn thương các tế bào lành mạnh trong cơ thể. Bên cạnh đó, lá phúc bồn tử còn chứa một lượng nhỏ acid ellagic, được chứng minh là có tác dụng ức chế các chất gây ung thư và thậm chí là góp phần làm các tế bào ung thư tự hủy. Một số hợp chất triterpenoid có trong các loài *Rubus* được chứng minh có tác dụng giảm đau, chống viêm, kháng khuẩn.

Nhiều loài phúc bồn tử được biết đến là loài cây phù hợp phát triển trong điều kiện khí hậu mát mẻ quanh năm, độ ẩm thích hợp, nhiệt độ lý tưởng để cây phát triển là khoảng 20 đến 32^0C. Chính vì những điều kiện tương thích này ở Lâm Đồng có nhiều loài *Rubus* mọc tự nhiên, đồng thời còn là nơi phù hợp để nhập trồng các loài phúc bồn tử có giá trị kinh tế cao từ các nước có khí hậu ôn hòa như châu Âu. Đây chính là một nguồn nguyên liệu chứa các hợp chất có hoạt tính sinh học còn chưa được nghiên cứu đánh giá.

Năm 2020, nhóm chúng tôi đã thu thập được mẫu lá của 5 loài *Rubus* mọc hoang dại hoặc được trồng ở các nơi khác nhau trong tỉnh Lâm Đồng và đã xác định được sự có mặt của các nhóm chất như chất béo, saponin, tanin, acid amin, đường tự do, acid hữu cơ, phytosterol, flavonoid trong các mẫu thu được. Hàm lượng polyphenol trong các mẫu lá được xác định dao động trong khoảng 3,84 đến 10,71% tính theo khối lượng khô tuyệt đối, cao nhất ở mẫu lá loài *R. annamensis* mọc hoang dại ở Nam Ban, thấp nhất ở loài *R. sorbifolius* thu ở Lạc Dương. Để có những đánh giá sâu hơn về thành phần hóa học của các loài *Rubus* ở Lâm Đồng, chúng tôi thực hiện đề tài "Nghiên cứu phân lập và xác định cấu trúc một số hợp chất từ lá loài *Rubus annamenis* thu tại Lâm Đồng".

CHƯƠNG 1. TỔNG QUAN

1.1. Tổng quan về chi *Rubus*

Chi Mâm xôi (danh pháp khoa học: *Rubus*) là một chi lớn trong giới Thực vật có hoa, thuộc họ Hoa hồng (Rosaceae), phân họ Rosoideae. Trong chi này, tên gọi phổ biến của các loài bao gồm: mâm xôi, ngấy, mắc hú, đùm đũm, đũm hương, phúc bồn tử, dâu rừng, v.v… (Sytsma và ctg., 2017; Phạm, 1999). Các loài thuộc chi *Rubus* sinh trưởng và phát triển tốt tại nơi có khí hậu ôn đới. Chính vì vậy, ở nước ta chúng thường được gặp nhiều tại các tỉnh miền núi phía Bắc và Lâm Đồng.

Tại Việt Nam, chi *Rubus* tồn tại đa dạng, phong phú về số lượng loài. Các loài này có phạm vi sinh trưởng khá rộng, có thể thích ứng với nhiều hoàn cảnh sinh thái khác nhau, từ rừng ẩm nguyên sinh đến trảng cây bụi hay mọc hoang bên đường, hầu như ta không phát hiện thấy sâu bệnh hại trên các loài *Rubus* (Trần và ctg., 2018).

Theo Phạm Hoàng Hộ (1999), 17 loài *Rubus* đã được tìm thấy tại Việt Nam.

1.1.1. Thành phần hoá học của chi *Rubus*

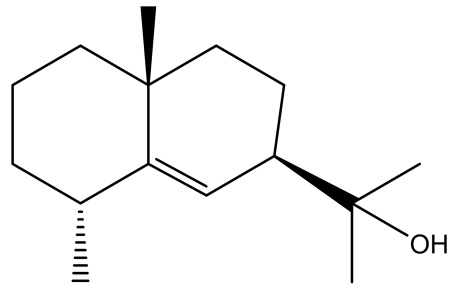
Cho đến nay, đã có khoảng hơn 100 loài thực vật chi *Rubus* được nghiên cứu hoá thực vật, đã phân lập và nhận dạng được nhiều hợp chất thuộc các nhóm chất chính là là terpenoid, flavonoid và anthraquinon (Bhuyan và ctg., 2021).

1.1.1.1. Sesquiterpenoid

Một vài sesquiterpenoid tìm thấy trong thực vật chi *Rubus* có kiểu khung eudesmen và guaian.

* Các hợp chất sesquiterpenoid khung eudeusmen

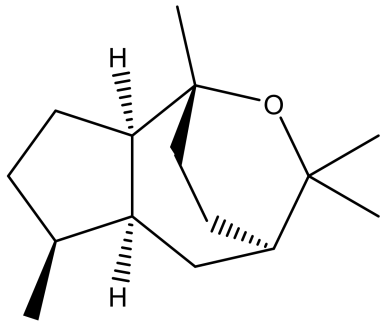
Hợp chất ở hình 1.1 là một sesquiterpenoid có cấu trúc 5-eudesmen-11-ol phân lập được từ loài *Rubus rosifolius* (Beagley và ctg.,1982).



Hình 1.1. Cấu trúc hợp chất 5-eudesmen-11-ol thuộc khung eudeusmen

* Các hợp chất sesquiterpenoid khung guaian

Một số hợp chất sesquiterpenoid có kiểu khung guaian đại diện là 10,11-epoxyguaian phân lập được từ *R. rosifolius* (Southwell, 1977).



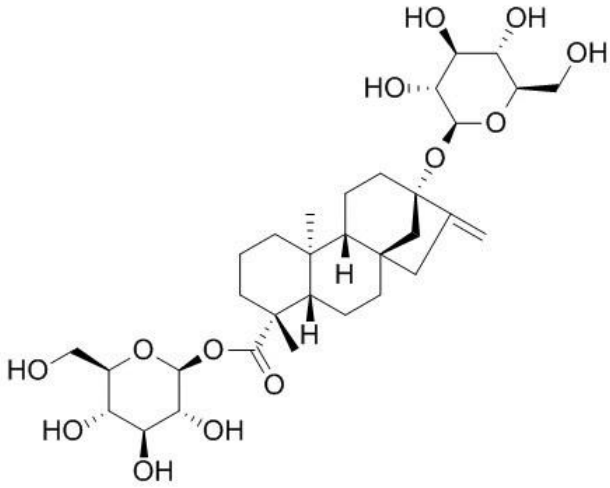
Hình 1.2. Hợp chất 10,11-epoxyguaian thuộc khung guaian

1.1.1.2. Diterpenoid

Diterpenoid là một loại hợp chất hóa học bao gồm bốn đơn vị isopren, thường có công thức phân tử $C_{20}H_n$. Các nghiên cứu ở Trung Quốc về loài *Rubus chingii* đã phân lập được 15 kiểu hợp chất diterpenoid, chủ yếu thuộc vào hai loại khung *ent*-kauran và labdan (Yu và ctg., 2019).

* Các hợp chất diterpenoid khung labdan

Các diterpenoid thuộc khung labdan khác nhau bởi những nhóm thế gắn vào các vị trí 3, 15, 18 và cấu hình proton ở vị trí C13.



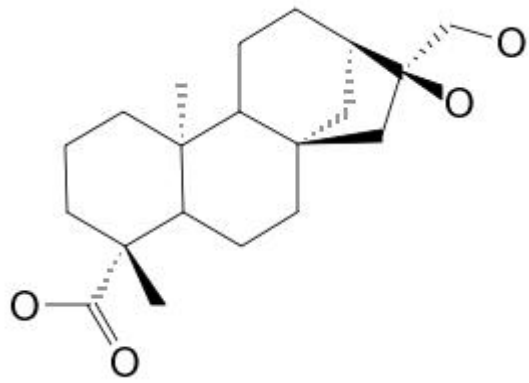
Hình 1.3. Hợp chất rubusoside thuộc khung labdan

Rubusoside là diterpenoid đầu tiên được phân lập từ dịch chiết methanol của lá *R. chingii* vào năm 1981 (Tanaka và ctg., 1981), và các nghiên cứu tiếp theo đã dẫn đến việc phân lập thêm năm glucoside diterpen loại labdan (goshonoside-F1-F5) (Tanaka và ctg., 1984). Hơn nữa, hai glucoside diterpen loại labdan khác, cụ thể là goshonoside-F6 và goshonoside-F7, được báo cáo là thu được từ cả lá và quả của *R. chingii* (Wang, 1991). Vào năm 2013, một saponin ent-labdan diterpen mới, được đặt tên là goshonoside-G, được tách ra từ dịch chiết ethanol 70% của quả chưa chín *R. chingii* và cấu trúc của nó được xác định dựa trên các nghiên cứu quang phổ NMR và

dữ liệu khối phổ (Sun và ctg., 2013). Sau đó, từ chiết xuất ethyl acetat của quả *R. chingii*, (Guo, 2015) đã phân lập được 5 glucoside diterpen loại labdan và được xác định cấu trúc là *ent*-Labda-8(17),13E-diene-3β,15,18-triol, *ent*-Labda-8(17),13E-diene-3α,15,18-triol, 15,18-di-O-β-D-glucopyranosyl-13(E)-*ent*-labda-7(8),13(14)-diene-3β,15,18-triol, 15,18-di-O-β-D-glucopyranosyl-13(E)-*ent*-labda-8(9),13(14)-diene-3β,15,18-triol, và 15-O-β-D-apiofuranosyl-(1→2)β-D-glucopranosyl-18-O-β-D-glucopyranosyl-13(E)-*ent*-labda-8(9),13(14)-diene-3β,15,18-triol.

* Các hợp chất diterpen khung *ent*-kauran

Ent-kauran thuộc loại diterpenoid bốn vòng dính kết khác nhau bởi số lượng các nhóm thế gắn vào các vị trí 9, 13, 15, 16, 17, 19.



Hình 1.4. Cấu trúc hợp chất *ent*-16α,17-dihydroxy-kauran-19-oic thuộc khung *ent*-kauran

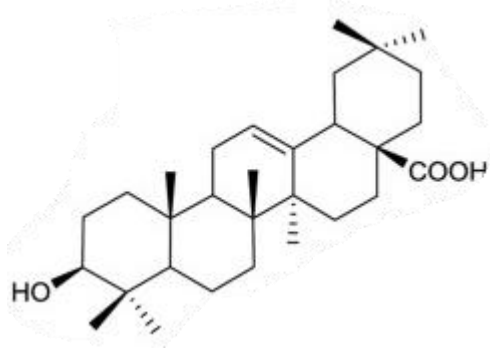
Các nghiên cứu về các thành phần hóa học của *Rubus suavissimus* S. Lee ở Trung Quốc, đã dẫn đến phân lập được 4 hợp chất acid *ent*-13-hydroxy-kauran-16-en-19-oic, *ent*-kaura-16-en-19-oic-13-O-beta-D-glucoside (Wang và ctg., 2007). Gần đây hơn, Zhang và ctg. (2017) đã tìm thấy một diterpenoid loại kauran được gọi là *ent*-16α,17-dihydroxy-kauran-19-oic acid từ quả của *R. chingii* bằng cách phân lập theo định hướng tác dụng sinh học.

1.1.1.3. Triterpenoid

Về mặt cấu trúc hóa học, triterpenoid có công thức tổng quát $C_{30}H_n$ được tạo bởi 6 đơn vị isopren, do 2 mảnh C15 nối với nhau ở giữa theo cách nối đầu với đầu. Cấu trúc hóa học của các triterpenoid có tới hơn 40 khung sườn carbon cơ bản.

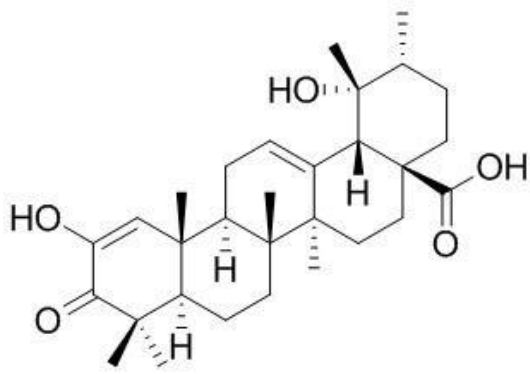
Các hợp chất triterpenoid tìm thấy trong thực vật chi *Rubus* chủ yếu là những chất thuộc hai loại khung oleanan và ursan.

Một số công trình nghiên cứu gần đây đã phát hiện ra triterpenoid khung olean có hoạt tính kháng khuẩn phổ biến trên chủng *Staphylococcus aureus*. Một số hợp chất khác như acid oleanoic có hoạt tính anti-HIV (Kashiwada và ctg., 1998).



Hình 1.5. Cấu trúc hợp chất acid oleanolic khung olean

Gần đây người ta đã nghiên cứu và phát hiện một số triterpenoid khung ursan cũng như triterpenoid khung olean có hoạt tính kháng khuẩn rất tốt trên chủng *Staphylococcus aureus* (Flamini và ctg., 2022). Acid ursolic có hoạt tính ức chế enzyme protease HIV-1 (Messana và ctg., 1991), acid pomolic có hoạt tính anti-HIV (Kashiwada và ctg., 1998). Ngoài ra đã có tổng kết về những triterpenoid kiểu khung ursan tìm thấy trong tự nhiên có nhóm keton ở vị trí C-3 thường có hoạt tính ức chế enzyme protease HIV-1 (Zhou và ctg., 1992).



Hình 1.6. Acid fupenzic – một hợp chất triterpenoid khung ursan

Triterpenoid là các hợp chất hóa học chính có trong *R. chingii*. Chúng chủ yếu là triterpenoid pentacyclic hoặc các dẫn xuất của chúng, với bộ khung loại oleanan và loại ursan. Nghiên cứu đầu tiên về triterpen được xác định ở *R. chingii* bắt đầu từ những năm 1980 với việc phân lập một triterpen loại diosphenol mới có tên là acid fupenzic (Hattori và ctg., 1988). Trong một công trình khác (Guo, 2005), quả của *R. chingii* được chiết bằng methanol. Quá trình phân đoạn tiếp tục dịch chiết methanol dẫn đến sự phân lập năm acid triterpen loại olean (acid oleanic, acid maslinic, acid arjunic, acid 2α,3α,19α-trihydroxyolean-12-ene-28-oic và acid sericic) cùng với bốn

acid triterpen loại ursan (acid ursolic, acid 2α-hydroxyursolic, acid euscaphic và acid hyptatic). Hơn nữa, Cheng và ctg. phát hiện ra rằng rễ của cây này rất giàu triterpenoid. Họ thu được ba acid triterpen (acid ursolic, acid euscaphic và acid 11α-hydroxyeuscaphic) từ bộ phận thực vật này (Cheng, 2008). Trong các nghiên cứu sâu hơn, Chai và ctg. thu được acid 2α,19α,24-trihydroxyurs-12-ene-3-oxo-28-oic và acid toric từ dịch chiết ethanol 95% của quả *R. chingii* (Chai, 2008). Năm 2011, nghiên cứu về dịch chiết ethanol 80% của quả *R. chingii* đã tìm thấy nigaichigoside F1 và acid 2α,19α-dihydroxy-3-oxo-12-ursen-28-oic (Xiao và ctg., 2011).

Hai triterpenoid loại ursan gắn với nhóm isopropylidenedioxy là acid 2,3-*O*-isopropylidene-1β,2β,3β,19α-tetrahydroxyurs-12-en-28-oic và acid 1,2-O-isopropylidene-1β,2α,3α,19α-tetrahydroxyurs-12-en-28-oic đã được phân lập từ hạt của *Rubus fructicosus* cùng với hai triterpenoid loại ursan, acid 2,3-O-isopropylidenyl-2α,3α,19α-trihydroxyurs-12-en-28-oic và acid 1-β-hydroxyeuscaphic. Ngoài ra, hoạt tính gây độc tế bào của chúng đối với các tế bào bệnh bạch cầu ở người HL-60 đã được đánh giá. Trong số đó, 3 loại cho thấy hoạt tính gây độc tế bào rõ ràng với giá trị IC_{50} là 72,8 μM (Masateru Ono và ctg., 2015).

Hai triterpenoid loại olean mới parvifolactone A và rubuside P, cùng với 11 triterpenoid đã biết, acid fupenzic, acid 18,19-seco,2α,3α-dihydroxyl-19-oxo-urs-11,13(18)-dien-28-oic, acid euscaphic, acid maslinic, acid 1β- hydroxyeuscaphic, acid 2α,3α,19α,23-tetrahydroxyolean-12-en-28-oic, acid 2α,3β,19α,23-tetrahydroxyurs-12-en-28-oic, glucosyl pinfaensate, rubuside J, acid 2α,3α,19α,23-tetrahydroxyurs-12-en-24,28-dioic và acid 2α,3β,19α-trihydroxyurs-12-en-23,28-dioic, được phân lập từ rễ của cây *Rubus parvifolius* (Zhang và ctg., 2016).

1.1.1.4. Flavonoid

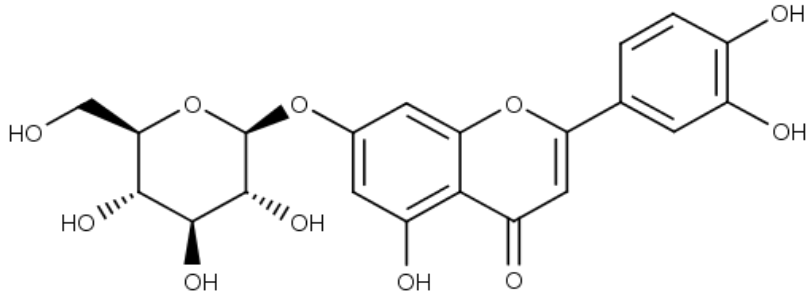
Flavonoid có cấu trúc cơ bản là 1,3-diphenylpropan gồm có 2 vòng benzen nối với nhau qua một dây có 3 cacbon. Chúng là nhóm chất lớn nhất của các hợp chất phenolic thiên nhiên, tồn tại rất phổ biến, dạng tự do và liên kết glycoside. Cho đến nay có khoảng 4000 chất đã được xác định từ các loại thực vật bậc cao, bậc thấp, thậm chí cả tảo. Flavonoid có màu vàng, một số chất có màu xanh, tím, đỏ hoặc không màu, có mặt ở mọi bộ phận nhưng tập trung nhiều nhất ở hoa và quả. Flavonoid xuất hiện tự nhiên trong thực phẩm và cây thuốc, là thành phần polyphenol quan trọng với nhiều tác dụng dược lý khác nhau (Bushman và ctg., 2004).

Các loại flavonoid chính được tìm thấy trong *R. chingii* là kaempferol, quercetin và các dẫn xuất của chúng. Cho đến nay, tổng số 18 flavonoid đã được báo cáo chủ yếu từ quả của *R. chingii*. Guo và ctg. cô lập sáu hợp chất: kaempferol, quercetin, tiliroside, astragalin, quercetin-3-O-β-D-glucopyranoside và kaempferol-3-O-β-D-

glucuronic acid metyl este (Guo, 2005). Cùng năm, Liu (2005) thu được kaempferol-7-O-α-L-rhamnoside và 2″-O-galloyl-hyperin. Sau đó, bằng cách sử dụng một loạt công nghệ sắc ký và quang phổ, Cheng (2008) đã phân lập và xác định được aromadedrin, quercitrin, hyperoside, và *cis* -tiliroside. Hơn nữa, nghiên cứu dịch chiết ethanol 80% của quả khô của *R. chingii* đã tìm thấy phlorizin (Xiao và ctg., 2011). Năm 2018, kaempferol-3-O-hexoside, quercetin-3-O-glucuronide và kaempferol-3-O-glucuronide được xác định trong quả của *R. chingii* bằng sắc ký lỏng hiệu năng cao (HPLC) kết hợp với khối phổ kế bẫy ion-OrbiTrap (Li và ctg., 2018). Ngoài ra, kaempferol-3-O-β-D-rutinoside (He và ctg., 2013) và rutin (Zhang và ctg., 2017) cũng được tìm thấy trong loại cây này.

Năm 2019, người ta đã phát hiện một loại flavonoid hiếm đó là 5,7-dihydroxy-6,8,4'-trimethoxyflavonol, được phân lập từ lá của cây *Rubus rosifolius* cho thấy hoạt động chống tăng sinh đáng kể chống lại các dòng tế bào ung thư khác nhau và có tác dụng lợi tiểu. (Pittarello và ctg., 2019).

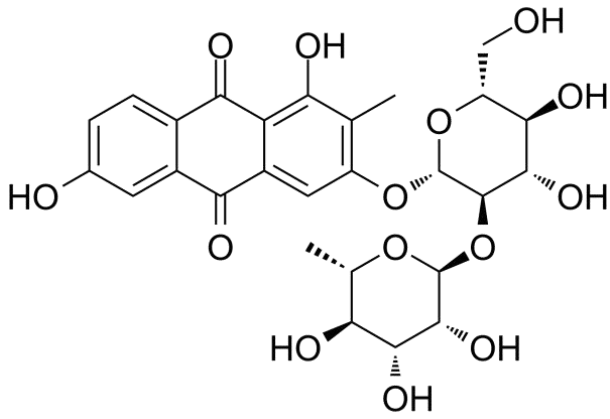
Trong cây *R. idaeus* phát hiện tổng cộng có 16 flavonoid, bao gồm 4 dẫn xuất quercetin, 2 dẫn xuất luteolin, 8 dẫn xuất kaempferol và 2 dẫn xuất isorhamnetin. Hợp chất kaempferol-3-O-glucose-glucose và quercetin-3-O-hexose-deoxyhexose, hợp chất isorhamnetin-7-O-pentose và luteolin-7-O-glucoside, hợp chất luteolin và kaempferol là các đồng phân với các aglycone khác nhau và các saccharide khác nhau. Các hợp chất kaempferol-3-O-glucuronic acid, kaempferol-7-O-glucuronic acid và kaempferol-4'-O-glucuronic acid là đồng phân của cùng một aglycone và cùng một saccharide nhưng vị trí nhóm thế khác nhau. Hợp chất kaempferol-3-O-pentose và kaempferol-3-O-pentose là các đồng phân của cùng một aglycone nhưng saccharide khác nhau. Các hợp chất quercetin-7-O-glucuronic acid, kaempferol-3-O-glucuronic acid, kaempferol-7-O-glucuronic acid và kaempferol-4'-O-glucuronic acid có cùng nhóm thế saccharide của acid glucuronic (Da-Jun He và ctg., 2016).



Hình 1.7. Cấu trúc của luteolin-7-O-glucoside thuộc nhóm chất flavonoid

1.1.1.5. Anthraquinon

Anthraquinon là một nhóm hợp chất thơm có nhân 9,10-dioxoanthracene. Cho đến nay, 79 chất anthraquinon có trong tự nhiên đã được xác định bao gồm emodin, physcion, cascarin, catenarin và rhein (Chien và ctg., 2015).



Hình 1.8. Cấu trúc của hợp chất 2-methyl-1,3,6-trihydroxy-9,10-anthraquinone 3-O-α-rhamnosyl-(1→2)-β-glucoside

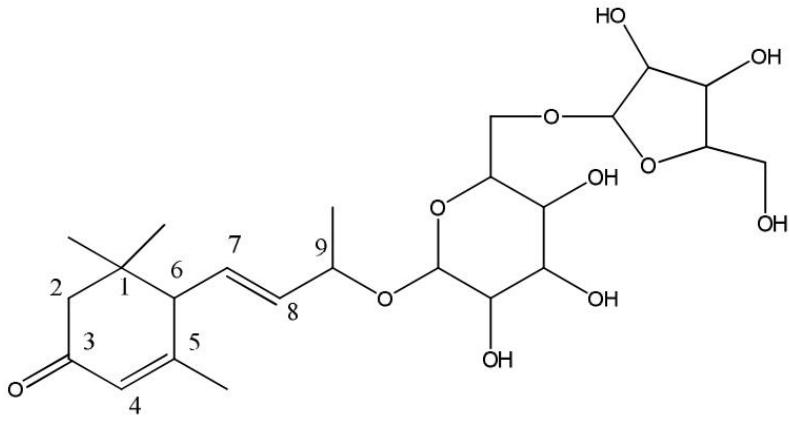
Một số hợp chất anthraquinon có hoạt tính sinh học rất đáng chú ý, người ta đã nghiên cứu và phát hiện một vài hợp chất có tác dụng trong việc điều trị bệnh tiểu đường, viêm nhiễm, hạ đường huyết.

Từ loài *R.ulmifolius,* các nghiên cứu cho thấy đã phân lập ra được các hợp chất: acid 9,10-dihydro-1,2,3,4,6,7,8-heptahydroxy-10-oxo-9-anthraceneacetic, 9,10-dihydro-1,2,3,4,6,7,8-heptahydroxy-10-oxo-9-anthraceneacetic acid metyl este, 9,10-dihydro-1,2,3,4,6,7,8-heptahydroxy -10-oxo-9-anthraceneacetic acid, 4-deoxy metyl este.

1.1.1.6. Các nhóm hợp chất khác

Một số hợp chất megastigmadien như là 4,7-megastigmadien-3,9-diol; 3-ceton, 9-O-β-D-glucopyranoside chỉ khác nhau bởi cấu hình và vị trí ở 3, 7, 9 trong cây *R. idaeus*.

Hợp chất 4,7-megastigmadien-9-diol; (6R, 7E, 9R), O-(α-L-arabinofuranosyl-(1→6)-β-D-glucopyranoside) cũng được tìm thấy trong cây *R. idaeus* (Glombitza và ctg., 1987).



Hình 1.9. Cấu tạo của hợp chất (6R, 7E, 9R), O-(α-L-arabinofuranosyl-(1→6)-β-D-glucopyranoside)

1.1.2. Hoạt tính sinh học của chi *Rubus*

Hoạt tính sinh học và dược động học của quả chưa chín loài *Rubus mysidentalis* đã được đánh giá. Thành phần hóa học của loài này chứa nhiều hợp chất phenol: acid gallic, acid caffeic, acid p-coumaric, acid ferulic, rutin, myricetin, luteolin, kaempferol liên quan đến khả năng chống oxy hóa (thử trên mô hình DPPH và ABTS). Đồng thời, kết quả nghiên cứu dược động học: T_{max} và C_{max} tương ứng là 0,6 giờ và 0,264 mg/mL. Kết quả cho thấy loại quả chưa chín thuộc chi *Rubus* trên đủ tiêu chuẩn làm thực phẩm hoặc nguyên liệu làm thuốc khô (Shin và ctg., 2018).

Rubus idaeus L., *Rubus ellipticus* Smith, *Rubus niveus* Thunb., *Rubus coreanus* Miquel, *Rubus occidentalis* L., *Rubus ulmifolius* Schott, *Rubus fruiticosus* L., *Rubus adenotrichus* Schltdl., *Rubus glaucus* Benth chứa các hợp chất có hoạt tính sinh học, có tác dụng chống oxy hóa, chống viêm, kháng khuẩn, tác động tích cực đến lipid máu và chứng xơ vữa động mạch (Schulz và ctg., 2019).

Nghiên cứu về quả loài *Rubus ulmifolius* Schott đã tìm thấy sự có mặt của các hợp chất phenol chính như: Cyanidin-3-O-glucoside, acid ellagic, pentoside, ellagic acid glucuronid và sanguin H-10 liên quan đến hoạt tính kháng khuẩn (giá trị MIC dao động từ 5- 20 mg/mL) (Silva và ctg., 2019).

Dịch chiết lá phúc bồn tử *Rubus idaeus* có khả năng chống oxy hóa. Sự hiện diện của các nhóm phenolic trong lá có khả năng ngăn ngừa và chữa trị các bệnh lối sống (Staszowska-Karkut và ctg., 2020).

Các flavonoid từ *Rubus corchorifolius* đã được chiết xuất và làm giàu. Các hợp chất này có tác dụng hạ đường huyết đáng kể ở những con chuột được sử dụng liều lượng cao glucose. Cũng trong nghiên cứu này, lần đầu tiên người ta tìm thấy nhiều

loại flavonoid có hoạt tính hạ đường huyết. Đây là một nguồn nguyên liệu tiềm năng, có thể bổ sung vào chế độ ăn uống (Tian và ctg., 2021).

Như vậy, có thể thấy rằng các hợp chất có mặt trong thành phần hóa học của các loài thuộc *Rubus* có những tính chất đa dạng, phong phú, đặc biệt có thể được ứng dụng trong đời sống con người.

1.2. Các phương pháp chiết xuất

1.2.1. Kỹ thuật chiết ngâm dầm

Kỹ thuật chiết ngâm dầm có thể dễ dàng thao tác với một lượng lớn nguyên liệu. Ngâm nguyên liệu trong một bình thủy tinh hoặc bằng thép không rỉ, bình có nắp đậy. Rót dung môi tinh khiết vào bình cho đến ngập bề mặt của nguyên liệu. Giữ yên ở nhiệt độ phòng trong một đêm hoặc một ngày, để cho dung môi xuyên thấm vào cấu trúc tế bào thực vật và hòa tan các hợp chất tự nhiên. Sau đó, dung dịch chiết được lọc ngang qua tờ giấy lọc, thu hồi dung môi sẽ có được cao chiết. Tiếp theo, rót dung môi mới vào bình chứa nguyên liệu và tiếp tục quá trình chiết thêm một số lần nữa cho đến khi chiết kiệt mẫu cây. Có thể gia tăng hiệu quả chiết bằng cách đảo trộn, xốc đều lớp nguyên liệu.

Dung môi sau khi được thu hồi, được tiếp tục sử dụng để chiết các lần sau. (Nguyễn, 2007).

1.2.2. Chiết nhờ hỗ trợ siêu âm

Siêu âm là sóng cơ học hình thành do sự lan truyền dao động của các phân tử trong không gian có tần số lớn hơn giới hạn trên ngưỡng nghe của con người (16 – 20 kHz). Ngoài ra, sóng siêu âm có bản chất là sóng dọc hay sóng nén, nghĩa là trong trường siêu âm các phân tử dao động theo phương cùng với các phương truyền của sóng.

**** Nguyên lý tác động của sóng siêu âm***

Hiệu ứng xâm nhập

Khi sóng siêu âm được truyền vào môi trường chất lỏng, các chu trình kéo và nén liên tục được tạo thành. Trong điều kiện bình thường, các phân tử chất lỏng ở rất gần nhau nhờ sự liên kết hóa học. Khi có sóng siêu âm, trong chu trình nén các phân tử ở gần nhau hơn và trong chu trình kéo chúng bị tách ra xa. Áp lực âm trong chu trình kéo đủ mạnh để thắng các lực liên kết giữa các phân tử và tạo thành những bọt khí nhỏ. Bọt khí tạo thành hạt nhân của hiện tượng xâm thực khí, bao gồm bọt khí ổn định và bột khí tạm thời.

Bọt khí ổn định là nguồn gốc của những bong bóng nhỏ, kích thước của chúng dao động nhẹ trong chu trình kéo và nén. Sau hàng ngàn chu trình, chúng tăng thêm về kích thước. Trong suốt quá trình dao động, bọt khí ổn định có thể chuyển thành bọt khí tạm thời. Sóng siêu âm làm rung động những bọt khí này, tạo nên hiện tượng "sốc sóng" và hình thành dòng nhiệt bền trong lòng chất lỏng. Bọt khí ổn định có thể lôi kéo những bọt khí khác vào trong trường sóng, kết hợp lại với nhau và tạo thành dòng nhiệt nhỏ.

Các bọt khí tạm thời có kích cỡ thay đổi rất nhanh chóng, chỉ qua vài chu trình chúng bị vỡ ra. Trong suốt chu trình kéo nén, bọt khí kéo giãn và kết hợp lại cho đến khi đạt được cân bằng hơi nước bên trong và bên ngoài bọt khí. Diện tích bề mặt bọt khí trong chu trình kéo lớn hơn trong chu trình nén, vì vậy sự khuếch tán trong chu trình kéo lớn hơn và kích cỡ bọt khí cũng tăng lên trong mỗi chu trình. Các bọt khí lớn dần tới một kích cỡ nhất định mà tại đó năng lượng sóng siêu âm không đủ duy trì pha khí khiến các bọt khí nổ tung dữ dội. Khi đó các phân tử va chạm với nhau mãnh liệt tạo nên hiện tượng "sốc sóng" trong lòng chất lỏng, kết quả là hình thành những điểm có nhiệt độ và áp suất rất cao (5000 kPa) với vận tốc rất nhanh 106.

Hiện tượng xâm thực khi mở đầu cho rất nhiều phản ứng do có sự hình thành các ion tự do trong dung dịch; thúc đẩy các phản ứng hóa học nhờ có sự trộn lẫn các chất phản ứng với nhau; tăng cường phản ứng polymer hóa và depolymer hóa bằng cách phân tán tạm thời các phân tử hay bẻ gãy hoàn toàn các liên kết hóa học trong chuỗi polymer, tăng hiệu suất đồng hóa; hỗ trợ trích ly các chất tan như enzyme từ tế bào động vật, thực vật, nấm men và vi khuẩn; tách virus ra khỏi tế bào bị nhiễm; loại bỏ các phân tử nhạy cảm bao gồm cả vi sinh vật.

Hiện tượng vi xoáy

Sóng siêu âm cường độ cao truyền vào lòng chất lỏng sẽ gây nên sự kích thích mãnh liệt. Tại bề mặt tiếp xúc giữa hai pha lỏng – rắn, sóng siêu âm gây nên sự hỗn loạn cực độ do tạo thành các vi xoáy. Hiện tượng này làm giảm ranh giới giữa các pha, tăng cường sự truyền khối đối lưu và thúc đẩy gây ra sự khuếch tán ở một vài trường hợp mà khuấy trộn thông thường không đạt được.

**** Các yếu tố ảnh hưởng tới kết quả siêu âm***

Kích thước vật liệu:

Quá trình chiết xảy ra chủ yếu do thẩm thấu và khuếch tán nên kích thước vật liệu càng nhỏ, diện tích tiếp xúc càng lớn thì hiệu quả chiết càng cao.

Dung môi:

Dung môi chiết là dung môi hòa tan được các hợp chất cần thiết. Khả năng đó của dung môi phụ thuộc một vài tính chất của dung môi như độ phân cực, độ nhớt, sức căng bề mặt,v.v...

Nhiệt độ và thời gian:

Tùy thuộc vào mẫu nguyên liệu mà chọn nhiệt độ và thời gian siêu âm thích hợp. Tuy nhiên, phương pháp siêu âm cho phép giảm đáng kể thời gian chiết, tăng tốc độ chiết. Quá trình chiết thông thường có thể kéo dài từ vài tiếng đến vài ngày, nhưng quá trình chiết siêu âm chỉ kéo dài khoảng 20 – 30 phút để đạt hiệu quả tương đương.

1.2.3. Kỹ thuật chiết soxhlet

Chiết soxhlet là phương pháp chiết các chất ra khỏi nguyên liệu ban đầu bằng một dung môi hoặc hỗn hợp dung môi với một dụng cụ chuyên dùng đặc biệt gọi là bình chiết soxhlet. Dung môi được đun nóng, cho bay hơi liên tục để dung môi ngưng tụ, chảy vào bình chứa hỗn hợp cần chiết tách (thường gói trong giấy lọc hoặc tấm vải mỏng) nó sẽ hòa tan chất cần chiết. Dịch chiết chảy xuống bình cấu bên dưới, dung môi nguyên chất lại tiếp tục được cất lên. Bằng cách lặp đi lặp lại việc chiết một số lần ta có thể tách hoàn toàn một số chất vào dung môi đã chọn, sau đó cất loại dung môi và cất lấy chất ở nhiệt độ và áp suất thích hợp. Phương pháp này tiết kiệm được dung môi và hiệu quả tương đối cao. (Nguyễn, 2007).

1.2.4. Kỹ thuật chiết pha rắn

Chiết pha rắn có nguyên tắc cơ bản giống như sắc ký cột, đó là sự tương tác giữa chất tan trong một dung dịch lên trên chất hấp thụ. Kỹ thuật này cũng sử dụng các chất hấp thụ giống như loại sử dụng trong sắc ký cột, gồm chất hấp thụ pha thường, pha đảo và trao đổi ion.

Kỹ thuật chiết pha rắn thường được sử dụng để:

+ Xác định mức độ phân cực của một hợp chất chưa biết.

+ Làm đậm đặc một hợp chất đang ở trong một dung dịch rất loãng và lượng thể tích lớn.

+ Để phân chia cao thô ban đầu (có chứa tất cả các loại hợp chất từ không phân cực đến phân cực) thành các phân đoạn có tính phân cực khác nhau.

+ Cô lập một mẫu hợp chất thiên nhiên cần khảo sát ra khỏi cao thô ban đầu hoặc ở giai đoạn cuối cùng muốn tinh chế mẫu hợp chất. Để làm sạch mẫu cần khảo sát thì pha tĩnh nạp một cột sắc ký có thể giữ lại chất tan cần thiết và cho đi ra khỏi cột những chất cản trở hoặc ngược lại pha tĩnh trong cột có thể cho chất khảo sát đi qua, ra khỏi cột còn chất cản trợ bị giữ lại trong cột.

(Nguyễn, 2007).

1.3. Các phương pháp tách bằng sắc ký

Phương pháp cách bằng sắc ký được xem là phương pháp tách riêng từng chất có hiệu quả hiện nay. Đặc biệt, được ứng dụng trong hợp chất thiên nhiên.

Định nghĩa: Sắc ký là quá trình tách dựa trên sự phân bố liên tục các cấu tử chất phân tích trên hai pha: một pha thường đứng yên có khả năng hấp thụ chất phân tích gọi là pha tĩnh, một pha di chuyển qua pha tĩnh gọi là pha động; do các cấu tử chất phân tích có ái lực khác nhau với pha tĩnh, chúng di chuyển với tốc độ khác nhau và tách ra khỏi nhau.

Ngoài chức năng tách, sắc ký còn là một trong những phương pháp có hiệu quả cao trong việc sử dụng để định tính và định lượng một hỗn hợp nhiều cấu tử.

(Trần, 2019).

1.3.1. Sắc ký lớp mỏng

SKLM có nhiều ưu điểm về khả năng tách hỗn hợp phức tạp nhiều cấu tử, các loại hợp chất vô cơ và hữu cơ khác nhau, độ nhạy cao, lượng mẫu phân tích nhỏ, tốc độ phân tích nhanh, có thể biết kết quả sau vài phút, có thể phân tích hàng loạt, kỹ thuật tiến hành đơn giản, ít tốn thiết bị, dung môi và đem lại hiệu quả cao. Vì vậy, hiện nay SKLM được tiến hành rộng rãi trong nhiều lĩnh vực khoa học và công nghiệp khác nhau như: hóa hữu cơ, hóa sinh, hóa dược, v.v… (Nguyễn, 2007).

1.3.1.1. Nguyên lý

SKLM là phương pháp phân tích trong đó dung dịch phân tích di chuyển trên một lớp chất hấp phụ mịn vô cơ hay hữu cơ theo một chiều nhất định. Tốc độ di chuyển của các cấu tử phụ thuộc vào khả năng hòa tan của nó trong hệ dung môi khai triển. Khi quá trình tách sắc ký dừng lại thu được các vùng chất tách rời nhau.

Để đánh giá khả năng phân giải của các vùng sắc ký người ta dùng hệ số R_f và R_f được xác định như sau:

$$R_f = \frac{a}{b}$$

Trong đó: a là khoảng cách chất tan dịch chuyển.

b là khoảng cách dung môi dịch chuyển

(Nguyễn, 2007).

1.3.1.2. Pha tĩnh

Pha tĩnh dùng trong SKLM hầu hết là các oxid không tan, các oxid hydrat hóa và các muối.

* Các chất hấp phụ thường dùng trong pha tĩnh:

Silicagel:

+ Silicagel pha thường: là polymer ba chiều của những đơn vị tứ diện oxid silicon SiO_2, H_2O và trên bề mặt hạt gel có những lỗ rỗng. Bản chất hóa học của bề mặt hạt silicagel là những nhóm silanol-OH đây là những tâm rất hoạt động có thể tạo nên hydrogen mạnh với những chất được sắc ký. Hiện nay các tấm bản mỏng silicagel có cỡ hạt 10 μm, chiều dày lợp tráng là 250 μm, phù hợp để tách các hợp chất có trọng lượng phân tử từ 500 – 1000 Dalton. Các tấm bản mỏng silicagel tráng thường trộn them chất phát huỳnh quang, được ghi trên hộp silicagel 60 F_{254}.

+ Silicagel pha đảo: Chất hấp thụ SKLM cho silicagel pha đảo thường là C-2, C-1, C-12, C-18. Khi qua pha tĩnh tráng silicagel C-18, pha tĩnh này thường có tính chất không phân cực, hấp thụ mạng các hợp chất không phân cực. Pha động thường là nước. Bên cạnh dung môi nước, người ta them vào các dung môi hữu cơ như methanol, acetoniltril,v.v… với nồng độ tăng dần theo nồng dộ sắc ký. Khi giải ly bản mỏng bời các dung môi phân cực, các chất phân cực của mẫu chất, do không bị pha tĩnh níu giữ mạnh, sẽ được giải ly đi lên cao, còn hợp chất không phân cực của mẫu chất sẽ ở vị trí thấp; nghĩa là thứ tự các loại hợp chất phân cực và không phân cực hiện diện trên bản mỏng có trật tự ngược lại với bản mỏng silicagel thông thường.

Alumina (Al_2O_3): được dung dưới dạng dehydrat hóa $Al(OH)_3$ có nhiệt độ nóng chảy 370 – 400℃ và diện tích bề mặt từ 90 – 180 m^2/g, cỡ hạt lớn hơn 10μm.

Kieselgurf: là một loại khoáng đất có cỡ hạt từ 0,02 – 2nm. Trung bình là khoảng 0,2nm.

Celite, cellulose,v.v…

(Nguyễn, 2007).

1.3.1.3. Lựa chọn dung môi

Chọn dung môi triển khai tùy thuộc vào mẫu cần chiết. Với mẫu chưa biết thành phần, chưa có tài liệu tham khảo cần thử nghiệm với nhiều loại dung môi khác nhau từ không phân cực đến phân cực. Dung môi nào tách tốt trên sắc ký bản mỏng sẽ thích hợp cho sắc ký cột. (Nguyễn., 2007).

1.3.2. Sắc ký cột

Sắc ký cột là một trong những phương pháp tách thông dụng để tách các cấu tử hóa học ra khỏi hỗn hợp của chúng. Dựa trên cơ sở sự dịch chuyển khác nhau của chất cần tách giữa pha động và pha tĩnh, người ta có thể tách hầu hết các chất trong bất kì hỗn hợp nào. Tùy thuộc vào pha tĩnh được sử dụng mà sự tách trong cột sẽ xảy ra theo cơ chế hấp phụ (cột hấp phụ) hoặc theo cơ chế phân bố (cột phân bố). (Nguyễn., 2007).

1.3.2.1. Nguyên tắc sắc ký hấp phụ

Phương pháp hấp phụ dựa trên khả năng hấp phụ của các chất trên bề mặt chất hấp phụ. Giữa nồng độ chất trong dung dịch và nòng độ chất bị hấp phụ trên bề mặt chất hấp phụ có một cân bằng động. Cân bằng phụ thuộc vào nhiệt độ. Sự phụ thuộc của lượng chất bị hấp phụ vào nồng độ của nó trong dung dịch(ở nhiệt độ không đổi) được đặc trưng bởi đường đẳng nhiệt hấp phụ. Dựa vào đường đẳng nhiệt hấp phụ ta có thể chọn được điều kiện sắc ký phù hợp.

Pha tĩnh (pha trơ): Chất hấp phụ được xem là trơ nhưng không phải là trơ hoàn toàn mà trên bề mặt của chúng tồn tại nhiều điện từ chưa liên kết. Nếu phóng lớn kích thước của pha trơ thì pha trơ có cấu tạo khuyết tật tinh thể như góc, cạnh, lỗ trống,… đó là các trung tâm hoạt động tại đó xảy ra sự hấp phụ. Các chất hay được dùng làm pha tĩnh là: silicagel, -Al_2O_3 và các chất có electron không liên kết.

(Nguyễn., 2007).

1.3.2.2. Nguyên tắc sắc ký phân bố

Pha tĩnh: gồm các pha trơ và được phủ bên ngoài một lớp phim mỏng bằng chất lỏng. dựa vào độ tan khác nhau của các cấu từ cần tách vào lớp phim lỏng để tách các cấu từ. Chất nào được tan nhiều trong lớp phim lỏng thì sẽ bị giữ lại trên cột lâu. Thông thường pha tĩnh là nước hoặc dung môi phân cực khác, còn pha động là dung môi hữu cơ ít phân cực. Đôi khi pha tĩnh là chất lỏng ít phân cực lúc đó pha động phải là dung môi phân cực hơn. (Nguyễn, 2007).

1.3.2.3. Dụng cụ, hóa chất

Cột: Thường là ống kính trụ bằng thủy tinh có chiều dài 30-70cm, đường kính 1-5cm, đầu dưới có khóa dùng để điều chỉnh tốc độ dòng chảy.

Pha tĩnh: Thường dùng một số chất hấp phụ đã được chuẩn hóa như:

+ Oxid nhôm lưỡng tính (Merk): cỡ hạt 0.063 - 0.200mm.

+ Oxid nhôm base: cỡ hạt 0.063 – 0.200mm.

+ Silicagel 60(Merk): cỡ hạt 0.063 – 0.200mm.

+ Polyamid M-N: cỡ hạt < 0.07mm.

Pha động: Các dung môi thường dùng cho sắc ký cột được sắp xếp theo các thứ tự tăng dần về độ phân cực, khả năng phân cực của dung môi liên quan đến những nhóm chức năng phân cực trong phân tử.

(Nguyễn, 2007).

CHƯƠNG 2. ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Đối tượng nghiên cứu

Đối tượng nghiên cứu là lá loài *Rubus annamensis* mọc dại tại Lâm Đồng, được thu hái ở Nam Ban, Lâm Đồng vào tháng 10/2020.



Hình 2.1. Lá phúc bồn tử *Rubus annamensis* mọc dại tại Nam Ban.



Hình 2.2. Quả phúc bồn tử *Rubus annamensis* mọc dại tại Nam Ban.

Mẫu nghiên cứu do TS. Lương Văn Dũng, Khoa Sinh học, Trường Đại học Đà Lạt định danh tên khoa học.

2.2. Phương pháp chiết xuất và phân lập

2.2.1. Phương pháp chiết

Nguyên liệu xay thô rồi thêm methanol đến ngập bề mặt, chiết ngâm dầm hoặc chiết nhờ hỗ trợ siêu âm. Sau đó lọc để thu được dịch chiết, đem cô quay chân không để loại bỏ dung môi thu được cắn chiết methanol tổng.

Phân tán cắn chiết methanol trong nước, tiến hành chiết lần lượt với các dung môi n-hexan, ethyl acetat. Dịch chiết của các dung môi cũng lần lượt đem cô quay chân không loại bỏ dung môi thu được cắn chiết các phân đoạn.

2.2.2. Phương pháp sắc ký cột

Cột: Sử dụng các loại cột sắc ký có kích thước khác nhau tùy thuộc vào khối lượng mẫu chạy sắc ký.

Pha động: Tùy thuộc bản chất của mẫu đưa vào mà sử dụng các hệ dung môi giải hấp khác nhau như: chloroform – methanol, chloroform – methanol – nước, …

Pha tĩnh: Sắc ký cột được thực hiện với chất hấp phụ là silicagel (cỡ hạt 40-63 µm và 63-200 µm, Merck). Lượng chất dùng làm pha tĩnh so với lượng mẫu theo tỉ lệ 30/1 đến 50/1.

Ổn định cột: Pha tĩnh sau khi trộn đều với dung môi đầu tiên khai triển, được rót vào cột, mở khóa của cột cho dung môi chảy từ từ xuống, sau đó tiếp tục rót dung môi này vào cột để ổn định trong khoảng thời gian từ 1 – 2 giờ.

Đưa mẫu phân tích vào cột: dùng theo 2 cách:

Cách 1: Nếu mẫu hòa tan tốt trong dung môi đầu tiên khai triển, hòa tan mẫu với một ít dung môi rồi bơm đều vào cột đã được ổn định.

Cách 2: Với mẫu không thể hòa tan hết trong dung môi đầu tiên khai triển, hòa tan mẫu với methanol, sau đó thêm silica gel với tỉ lệ 2/1 g mẫu, lắc đều và cô loại methanol ở áp suất thấp đến khi khô. Sau đó, đưa bột silica gel đã tẩm mẫu vào cột đã ổn định.

Khai triển cột: hứng các phân đoạn sau đó dùng sắc ký bản mỏng kiểm tra để xác định thời điểm đổi hệ dung môi và gộp chung những phân đoạn có cấu tử giống nhau, cô loại dung môi để tiến hành các bước phân tích tiếp theo.

2.2.3. Phương pháp sắc ký bản mỏng

Sắc ký lớp mỏng được thực hiện trên bản mỏng tráng sẵn silica gel 60 F254 (Merck) và silica gel RP (Merck). Thuốc thử hiện màu là dung dịch acid sulfuric 10% và đèn tử ngoại bước sóng 254 và 365 nm.

2.2.4. Phương pháp tinh chế sản phẩm

Tiến hành chạy cột sắc kí thu lấy phân đoạn sạch nhất.

Tinh chế các chất phân lập được bằng phương pháp kết tinh lại. Các bước của quá trình kết tinh bao gồm việc chọn dung môi, hòa tan nóng và lọc, để kết tinh lạnh, lọc hút tinh thể và làm khô. Sản phẩm được kết tinh nhiều lần trong dung môi thích hợp.

2.3. Phương pháp xác định cấu trúc

Xác định cấu trúc các hợp chất phân lập được dựa trên các thông số vật lý và các phương pháp phổ bao gồm: phổ hồng ngoại, phổ cộng hưởng từ hạt nhân và phổ khối lượng.

Phổ IR được ghi trên máy Nicolet IS5 FT-IR.

Phổ cộng hưởng từ hạt nhân ^{1}H-NMR, ^{13}C-NMR, DEPT, HSQC, HMBC được ghi trên máy Brucker Avance-500 MHz, chuẩn nội TMS.

Phổ khối ESI-MS được ghi trên máy Thermo ISQ EM.

CHƯƠNG 3. THỰC NGHIỆM

3.1. Điều chế các dịch chiết từ lá cây

Mẫu lá cây tươi *R. annamensis* sau khi hái được rửa sạch bằng nước để khô, cắt nhỏ sau đó đem sấy ở 60^0C cho đến khi nguyên liệu khô hoàn toàn. Bảo quản mẫu trong túi nilon kín.

Tiến hành ngâm 1,7 kg mẫu lá khô với methanol đến ngập bề mặt (8 lít) trong 3 ngày. Gạn, lọc lấy dịch chiết trong đem cô quay chân không loại dung môi để thu được dịch chiết đậm đặc. Cho lần lượt 100 ml dịch chiết methanol vào phễu chiết 500 ml. Sau đó, thêm 150ml n-hexan và 25 ml nước cất vào, lắc đều khoảng 15 phút, để yên 30 phút cho hỗn hợp tách hoàn toàn thành 2 lớp. Lớp trên là dịch chiết n-hexan màu xanh thẫm. Mở khoá phễu chiết lấy lớp nước ở dưới vào cốc 250ml còn lớp trên bỏ vào bình tam giác 250ml. Đổ lớp nước ở cốc 250ml vừa lấy ra trở lại phễu chiết, tiếp tục chiết như trên 2 lần nữa. Gộp chung dịch chiết n-hexan, bốc hơi dung môi thu được cao chiết phân đoạn n-hexan.

Cho pha nước đổ trở lại phễu chiết, thêm 150ml EtOAc vào và lắc đều khoảng 1 phút, để yên 30 phút cho hỗn hợp tách hoàn toàn thành 2 lớp. Lớp trên là dịch EtOAc có màu xanh, mở khoá phễu chiết lấy lớp nước ở dưới có màu cam cho vào cốc 250ml, còn lớp trên đổ vào bình tam giác 250ml. Đổ lớp nước ở cốc 250ml vừa lấy ra trở lại vào phễu chiết, tiếp tục như trên 2 lần nữa, gộp chung dịch chiết EtOAc cả 3 lần và đem đi cô quay chân không thu được cắn phân đoạn EtOAc.

Pha nước còn lại đem bốc hơi dung môi thu được cao chiết phân đoạn nước.

3.2. Phân lập các hợp chất từ lá cây

3.2.1. Quy trình phân lập

Dịch chiết phân đoạn EtOAc được đem cô quay chân không thu được cao chiết và cô kiệt dung môi đến khi thu được cắn khô (50,26 g). Sau đó, hấp phụ mẫu lên silicagel với lượng silicagel khoảng 2 lần lượng mẫu: hòa tan mẫu trong dung môi MeOH, trộn với bột silicagel trong bình cất quay. Cất quay dưới áp suất giảm để loại hết dung môi. Dùng thìa cạo hết mẫu khô đã trộn silicagel vào một cái cốc khô. Nghiền nhẹ cho thành dạng bột mịn.

Đưa lên cột sắc ký silicagel, rửa giải bằng hệ dung môi chloroform – methanol gradient theo độ phân cực tăng dần từ 100% chloroform, tăng dần lên 10%, 20%, 50% và 100% methanol. Thu các phân đoạn sắc ký, mỗi phân đoạn 50 ml, thu được 65 phân đoạn.

- Phân đoạn E36 - 40 tiến hành sắc kí cột với chất hấp phụ silicagel hệ dung môi giải hấp chloroform – methanol (8:2) thu được 40 phân đoạn E1(1 - 40). Gộp phân đoạn E1(17-24) cho bốc hơi dung môi thu được 106 mg cắn. Tiến hành sắc kí cột với chất hấp phụ silicagel (40 - 63µm), hệ dung môi giải hấp n-hexan - chloroform (7:3) cho 30 phân đoạn E1.1(1 - 30). Phân đoạn E1.1 (21 - 24) để kết tinh trong ống nghiệm thu được 8mg chất **RA01**.

- Phân đoạn E11 - 20 tiến hành sắc kí cột với chất hấp phụ silicagel hệ dung môi giải hấp n-hexan - chloroform (2 : 1) thu được 70 phân đoạn E2(1 - 70).

+Phân đoạn E2(12) để kết tinh trong ống nghiệm thu được 5mg chất **RA02**.

+Phân đoạn E2(13) tiến hành chạy sắc ký bản mỏng điều chế. Đợi bay hơi dung môi, kết tinh thu được chất **RA05** và **RA06**.

+Phân đoạn E2(31 - 50), tiến hành sắc ký cột với chất hấp phụ silicagel, hệ dung môi giải hấp chloroform - aceton (5:1) cho 71 phân đoạn E2.1(1 - 71).

- Phân đoạn E2.1(53 - 66), tiến hành sắc ký cột với chất hấp phụ silicagel (40 - 63µm) hệ dung môi giải hấp chloroform - methanol (15:1) cho 20 phân đoạn E2.1.1(1 - 20). Phân đoạn E2.1.1(8 - 13) làm sạch bằng sắc ký bản mỏng điều chế với hệ dung môi chloroform - methanol (10:1) thu được chất **RA03.**

- Phân đoạn E2.1(4 - 14) tiến hành sắc ký cột với chất hấp phụ silicagel (40 - 63µm) hệ dung môi giải hấp chloroform - methanol (10:1). Thu được các phân đoạn có 1 vết chính.

+Phân đoạn E2(29) tiến hành sắc ký cột với chất hấp phụ silicagel (40 - 63µm) hệ dung môi giải hấp chloroform - methanol (30:1) và tăng dần độ phân cực của dung môi, cho 40 phân đoạn E2.2(1 - 40). Phân đoạn E2.2(19 - 23) đợi kết tinh. Thu được chất **RA04.**

Dịch chiết phân đoạn n-hexan được đem quay chân không thu được cao chiết. Tiến hành khảo sát định tính sự có mặt của hợp chất β-sitosterol.

Dịch chiết phân đoạn nước: Hoà tan cắn trong MeOH, lọc lấy phần tan được trong MeOH. Tiến hành khảo sát sự có mặt của glucose.

3.2.2. Thông số vật lý và số liệu phổ của các hợp chất phân lập được

3.2.2.1. RA01

Tinh thể hình kim, màu trắng.

Phổ IR (KBr): ν_{max}, cm^{-1}: 3381,72 (OH); 2930,81 (CH); 1732,36 (C=O).

Phổ ESI – MS: *m/z* 689,39 $[M+Na]^+$, 487,33 $[M-Glc]^+$, M = 666 ($C_{36}H_{68}O_{11}$).

Phổ ^{1}H – NMR (500MHz, CD_3OD) δ, ppm: 0,72 (s, 3H, H-24); 0,80 (s, 3H, H-26); 0,95 (d, J = 5,5 Hz, 3H, H-30); 1,06 (s, 3H, H-25); 1,23 (s, 3H, H-29); 1,37 (s, 3H, H-27); 2,54 (s, 1H, H-18); 3,28 (d, J= 9,0 Hz, 1H, H-23a); 3,52 (d, J = 9,0 Hz, 1H, H-23b); 5,34 (brs, 1H, H-12); 5,35 (s, 1H, H-1').

Phổ ^{13}C – NMR (125MHz, CD_3OD) δ, ppm: 38,44 (C-1); 27,71 (C-2); 79,06 47,99 (C-1); 69,72 (C-2); 78,60 (C-3); 44,12 (C-4); 48,60 (C-5); 19,24 (C-6); 33,54 (C-7); 41,27 (C-8); 48,26 (C-9); 39,00 (C-10); 24,80 (C-11); 129,51 (C-12); 139,77 (C-13); 42,95 (C-14); 29,65 (C-15); 26,53 (C-16); 49,17 (C-17); 54,98 (C-18); 73,64 (C-19); 42,80 (C-20); 27,22 (C-21); 38,32 (C-22); 66,45 (C-23); 13,85 (C-24); 17,60 (C-25); 17,68 (C-26); 24,73 (C-27); 178,55 (C-28); 27,07 (C-29); 16,59 (C-30); 95,79 (C-1'); 73,88 (C-2'); 78,33 (C-3'); 71,16 (C-4'); 78,33 (C-5'); 62,45 (C-6').

3.2.2.2. RA02

Dạng bột kết tinh màu trắng.

Phổ IR (KBr): nmax, cm-1: 3419 (OH), 2925, 2854 (C-H), 1689 (C=O).

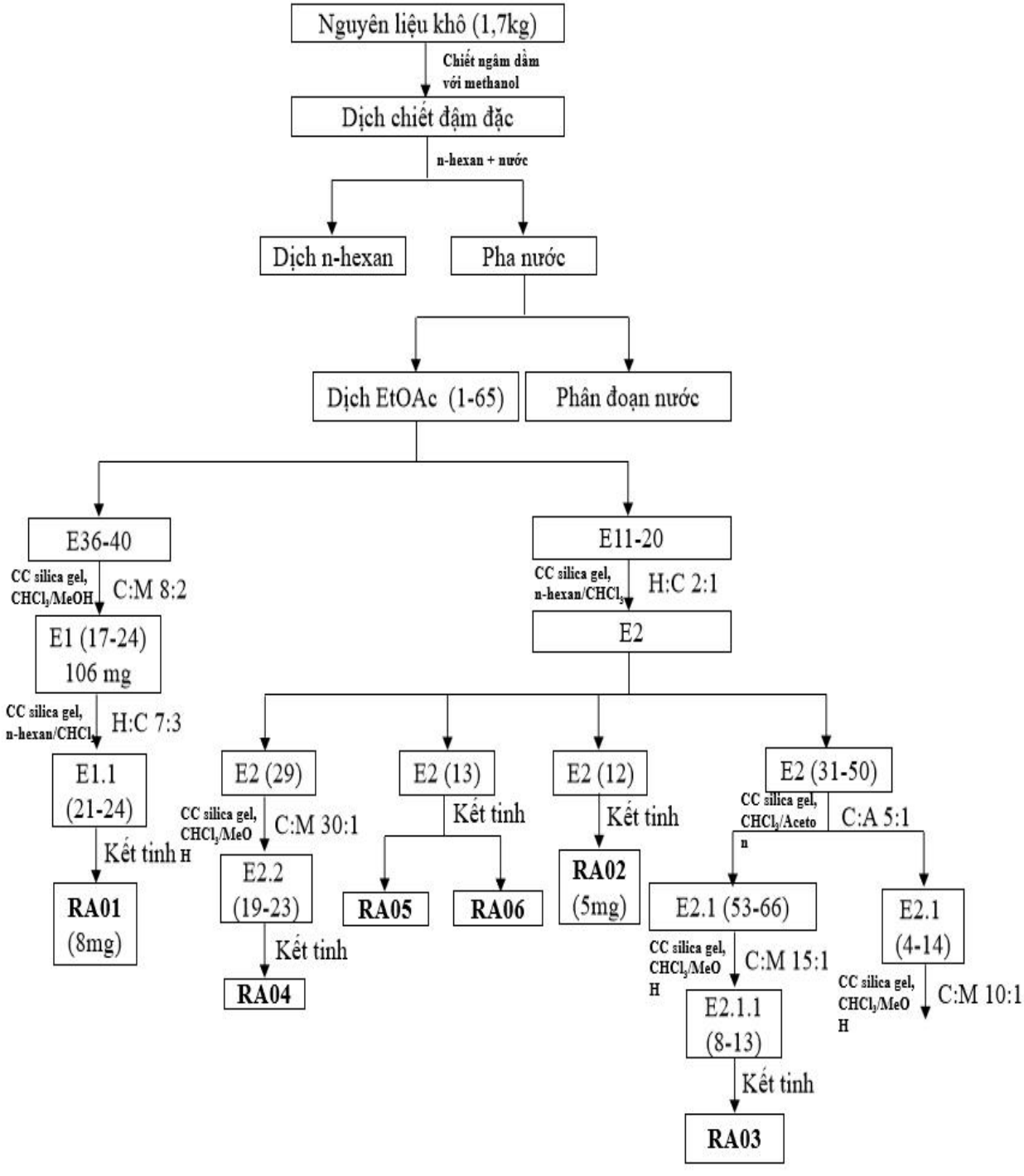
Phổ ESI – MS: m/z 479,42 $[M+Na]^+$, M = 456 ($C_{30}H_{48}O_3$).

Phổ ^{1}H-NMR (500 MHz, DMSO) δ, ppm: 5,12 (1H, t, J = 4,0Hz, H-12); 3,00 (1H, m, H-3); 2,08 (1H, d, J = 10,5Hz, H-18); 1,03 (3H, s, H-27); 0,89 (3H, s, H-23); 0,90 (3H, d, J = 9,0Hz, H-30); 0,86 (3H, s, H-25); 0,80 (3H, d, J = 6,0Hz, H-29); 0,74 (3H, s, H-26); 0,67 (3H, s, H-24).

Phổ ^{13}C-NMR (125 MHz, DMSO) δ, ppm: 38,13 (C-1); 27,58 (C-2); 76,94 (C-3); 38,55 (C-4); 54,84 (C-5); 18,03 (C-6); 32,76 (C-7); 40,64 (C-8); 47,07 (C-9); 36,57 (C-10); 23,80 (C-11); 124,63 (C-12); 138,24 (C-13); 41,69 (C-14); 26,98 (C-15); 22,89 (C-16); 46,91 (C-17); 52,46 (C-18); 38,48 (C-19); 38,41 (C-20); 30,22 (C-21); 36,36 (C-22); 28,30 (C-23); 16,10 (C-24); 15,25 (C-25); 16,99 (C-26); 23,30 (C-27); 174,66 (C-28); 17,05 (C-29); 21,10 (C-30).

CHƯƠNG 4. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

4.1. Quy trình phân lập

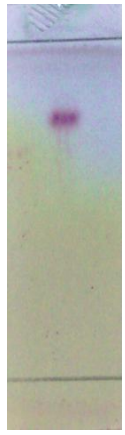


Hình 4.1. Sơ đồ quy trình phân lập các hợp chất từ lá cây phúc bồn tử *R. annamensis*

4.2. Xác định cấu trúc các hợp chất

4.2.1. Hợp chất RA01

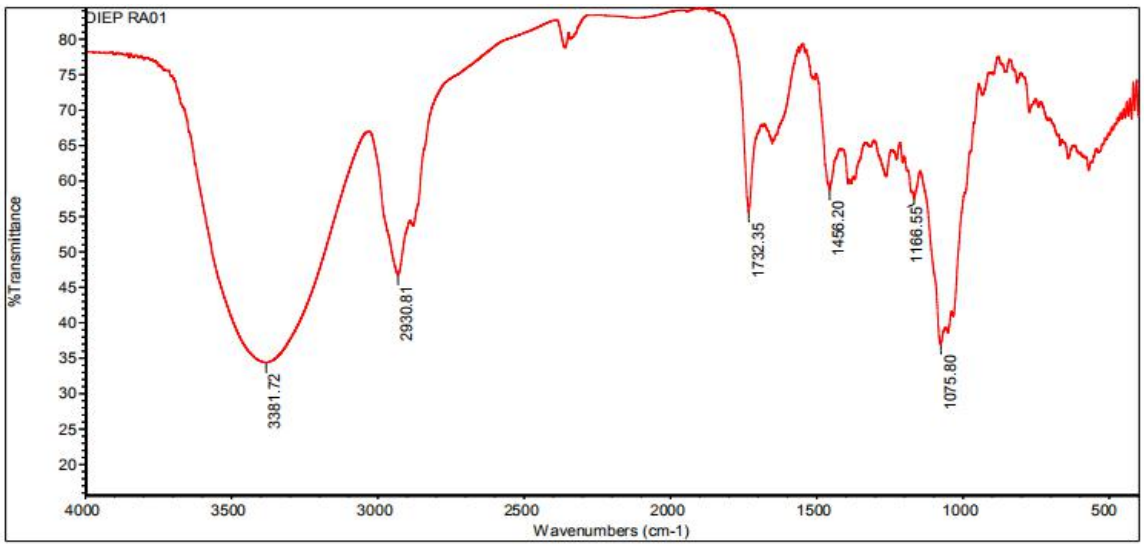
Hợp chất RA01 thu được dưới tinh thể hình kim, màu trắng, hiện màu tím với thuốc thử H_2SO_4 10%, gợi ý đây là một hợp chất triterpen.



Ghi chú:
- Thuốc thử hiện màu H_2SO_4 10%
- Hệ dung môi: chloroform – methanol (8:2)

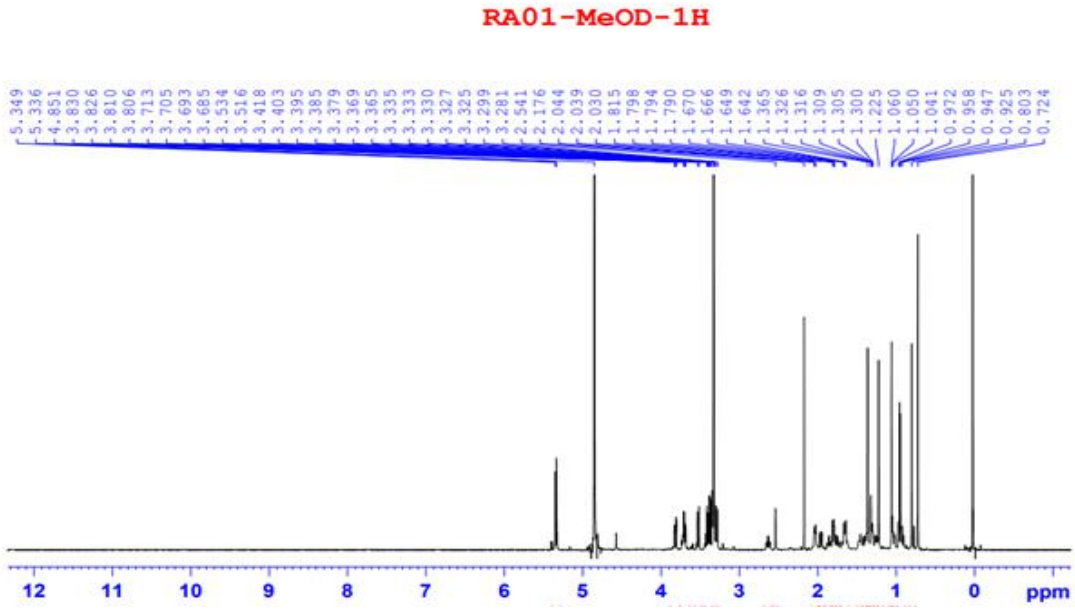
Hình 4.2. Sắc ký đồ SKLM của chất RA01

Phổ IR của RA01 cho thấy ở 3381 cm^{-1} xuất hiện pic tròn, rộng, là tín hiệu của nhóm OH. Ở 2930 cm^{-1} có pic nhọn của C-H alkan. Ngoài ra, ở 1732 cm^{-1} có tín hiệu hấp thụ của nhóm C=O.

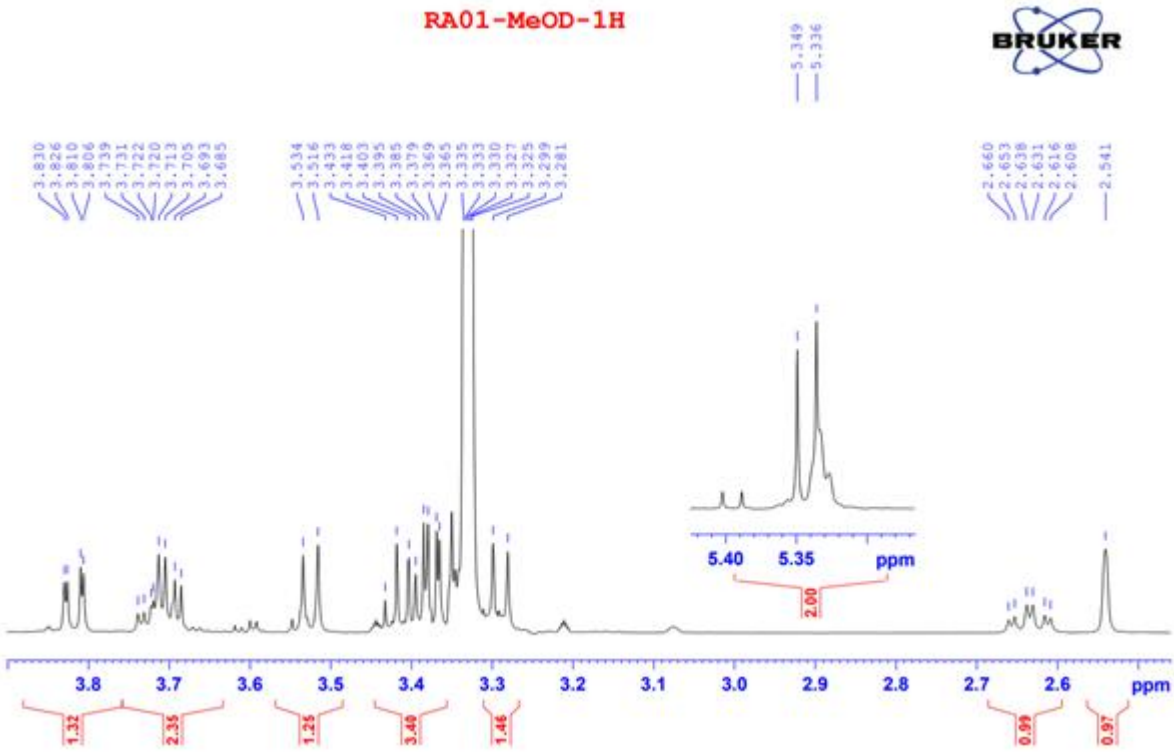


Hình 4.3. Phổ IR của RA01

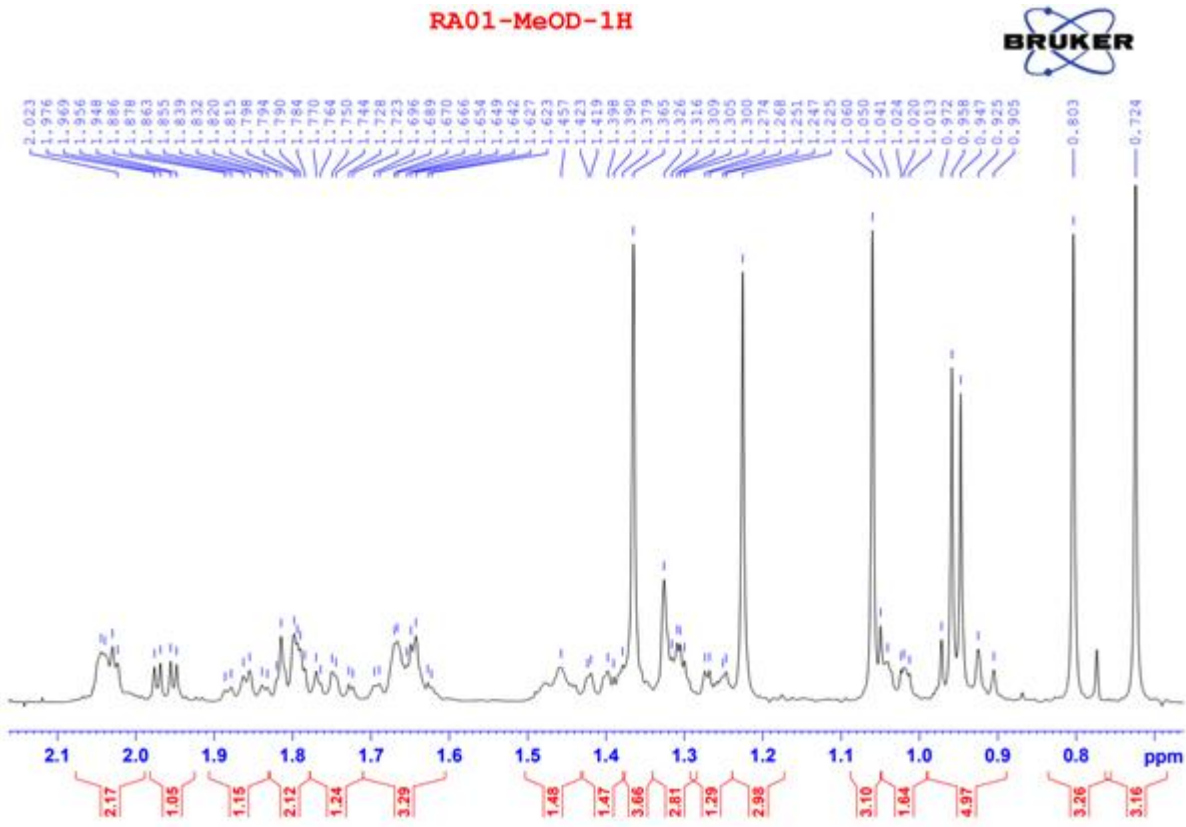
Phổ ^{1}H-NMR của RA01 cho thấy tín hiệu cộng hưởng của 5 nhóm CH_3 bậc ba ở δ_H 0,72 (s); 0,80 (s); 1,06 (s); 1,23 (s) và 1,37 (s), và 1 nhóm CH_3 bậc hai ở δ_H 0,95 (d, J = 5,5 Hz). Dựa vào các tương tác trên phổ HSQC có thể xác định được các proton này gắn với các carbon tương ứng ở δ_C 13,85; 17,68; 17,60; 27,07 và 24,73 ppm.


RA01-MeOD-1H
12
11
10
9
8
7
6
5
4
3
2
1
0
ppm

a)


RA01-MeOD-1H
BRUKER
5.40
5.35
ppm
2.00
3.8
3.7
3.6
3.5
3.4
3.3
3.2
3.1
3.0
2.9
2.8
2.7
2.6
ppm
1.32
2.35
1.25
3.40
1.46
0.99
0.97

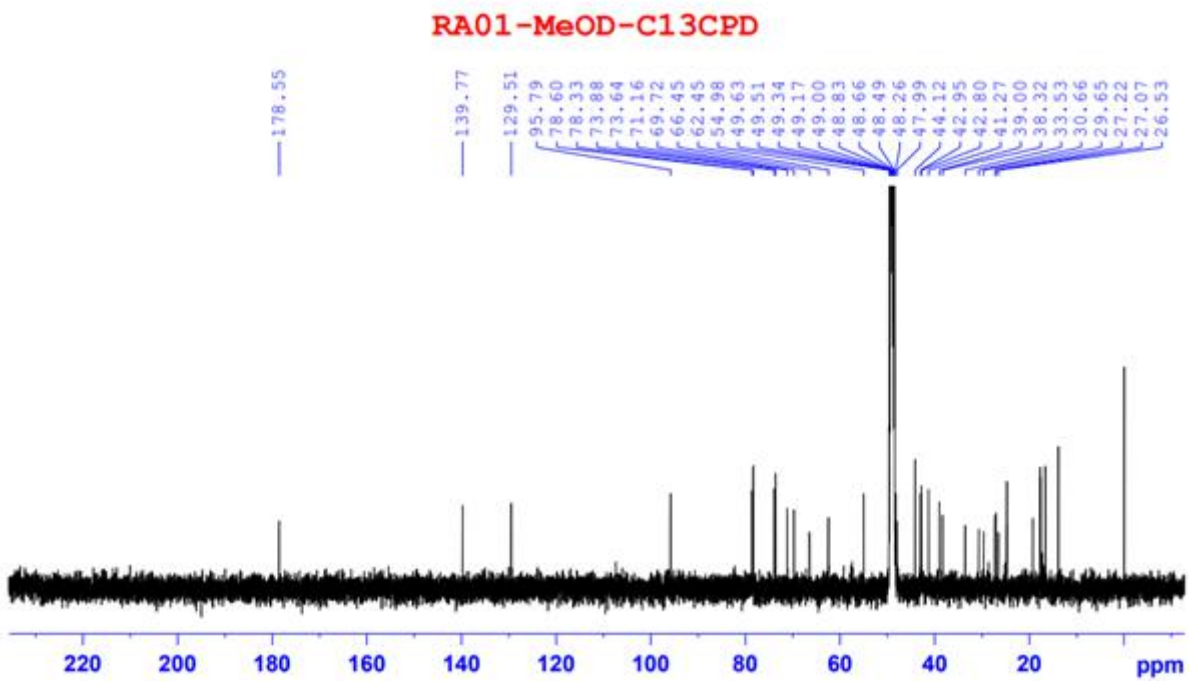
b)



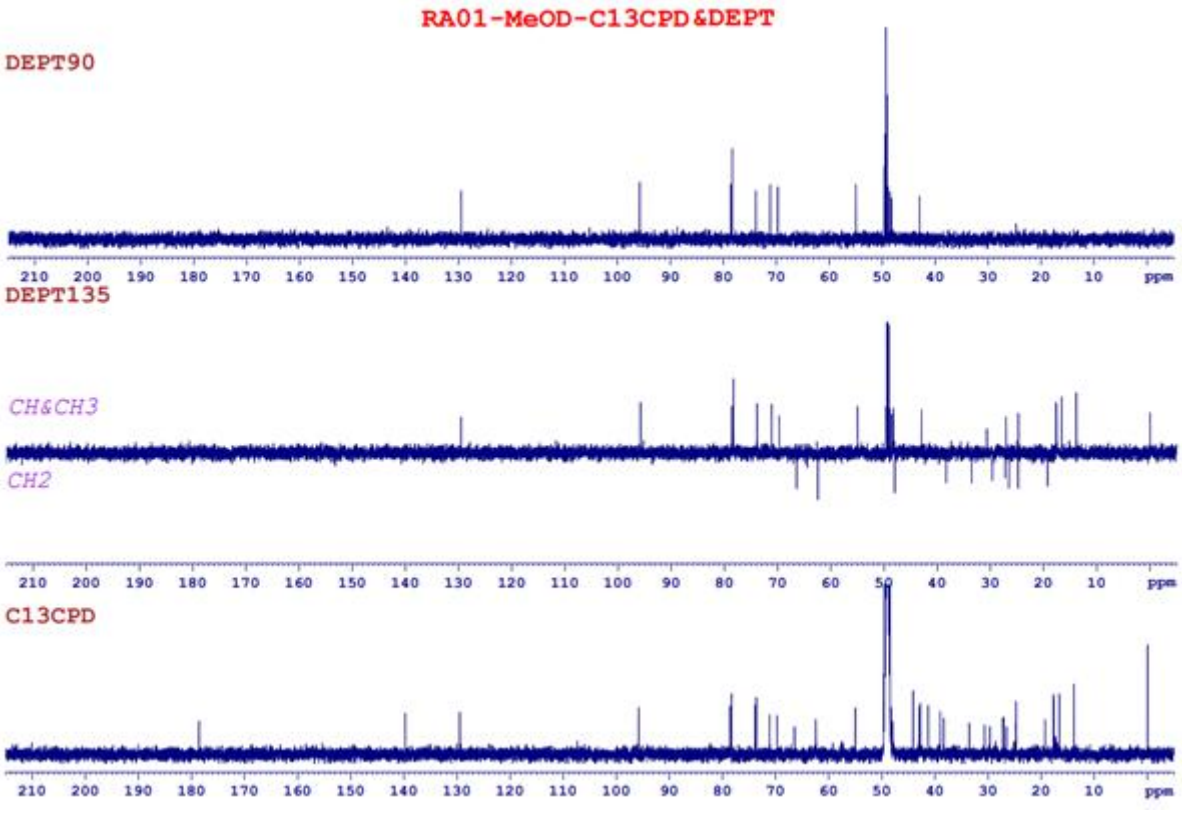
c)

Hình 4.4. Phổ ^{1}H-NMR của RA01 (a) và các phổ ^{1}H-NMR giãn (b,c)

Phổ ^{1}H-NMR còn cho thấy sự có mặt của một tín hiệu proton olefin dưới dạng mũi đơn rộng ở δ_H 5,34 (brs, 1H) đặc trưng cho H-12 trong khung cấu trúc của triterpen 5 vòng. Sự có mặt của các tín hiệu của carbon olefin ở δ 129,51 và 139,77 ứng với carbon methin và carbon bậc 4 (trên phổ DEPT) cũng xác nhận sự tồn tại của liên kết đôi trong vòng ở vị trí C-12 của khung ursan. Ngoài ra, trên phổ ^{1}H-NMR có một tín hiệu singlet của proton methin tại δ_H 2,54 là tín hiệu đặc trưng cho H-18 của khung triterpen ursan có nhóm thế OH tại C-19.



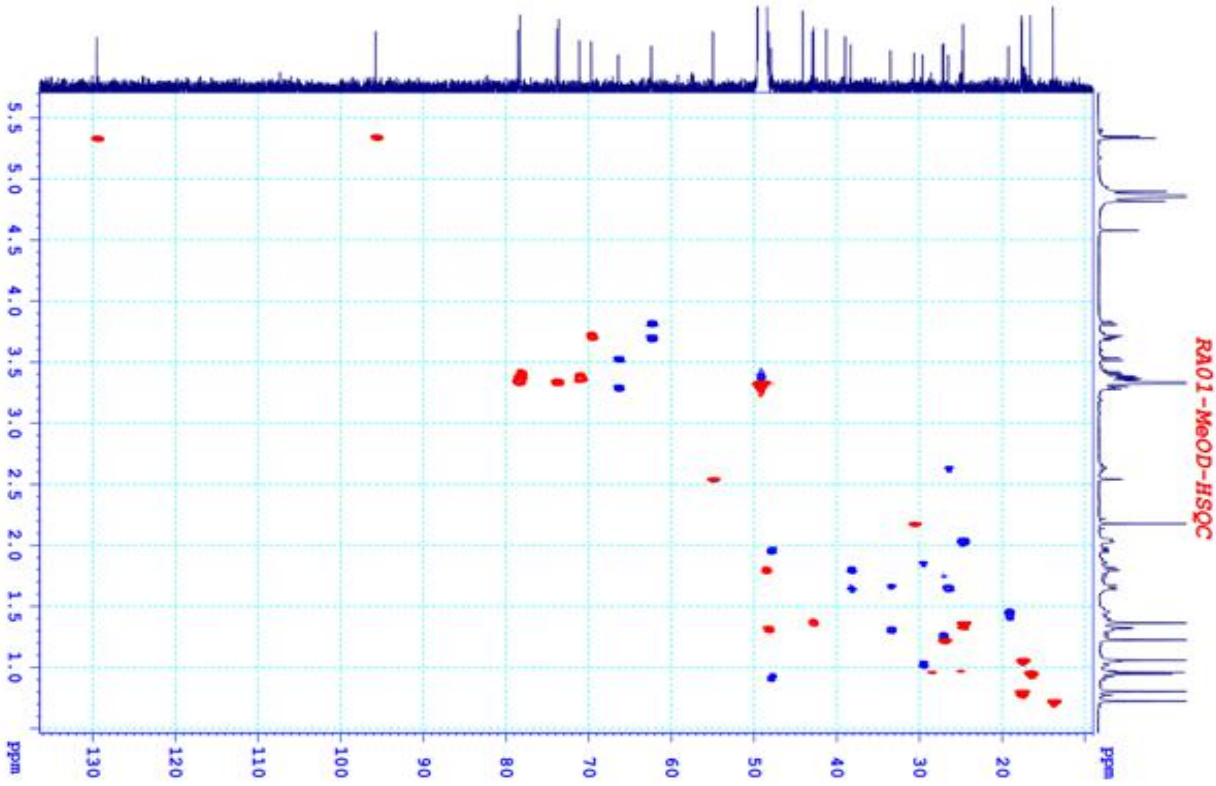
Hình 4.5. Phổ ^{13}C-NMR của RA01



Hình 4.6. Phổ DEPT của RA01

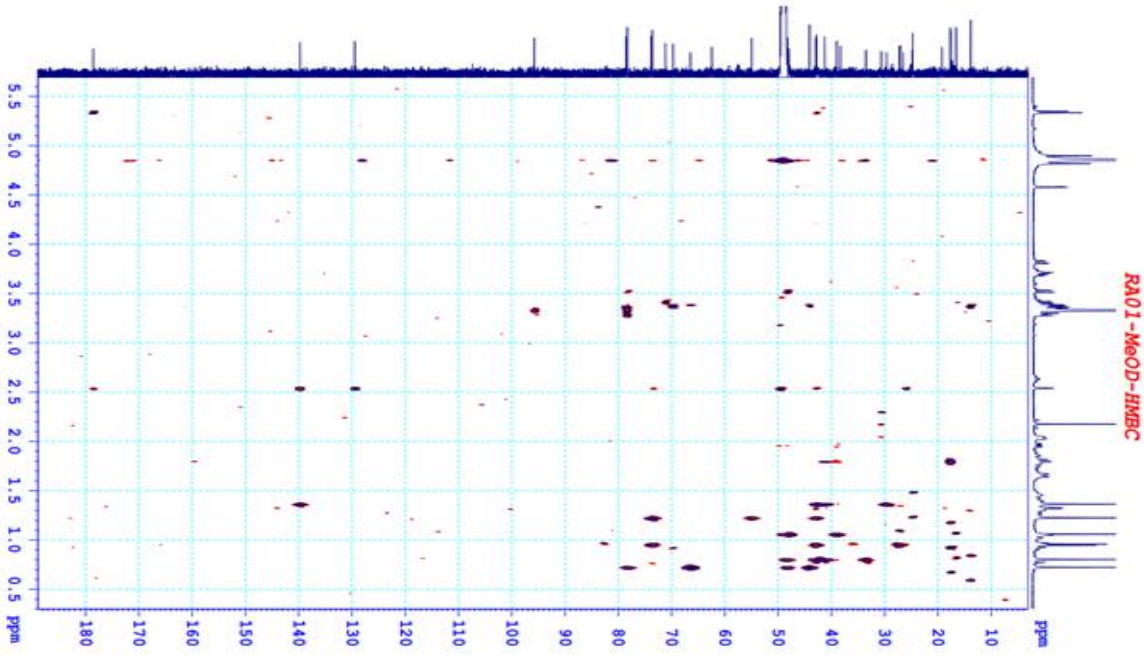
Phổ ^{13}C-NMR và DEPT của RA01 cho thấy sự có mặt của 36 carbon, bao gồm 6 nhóm CH_3, 10 nhóm CH_2, 12 nhóm CH và 8C, trong đó giá trị δ_C 178,55 ppm khẳng định sự tồn tại của một nhóm carbonyl. Ngoài 30 carbon thuộc khung ursan, sự có mặt của một đơn vị đường glucose được xác nhận bằng tín hiệu cộng hưởng của một

carbon anomeric tại δ_C 95,79 ppm, 4 nhóm CH và 1 nhóm CH_2 trong vùng từ δ_C 62,45 đến 78,33 ppm. Phổ ^{1}H-NMR và HSQC cũng xác nhận có 1 proton anomeric tương tác với carbon anomeric trên tại δ_H 5,35 (s, 1H). Ngoài các tín hiệu của đơn vị đường glucose, trên phổ ^{13}C-NMR còn tín hiệu của 4 carbon liên kết trực tiếp với nguyên tử oxy khác thuộc khung triterpen bao gồm một carbon methylen tại δ_C 62,45 ppm và 3 carbon methin tại δ_C 69,72; 73,63 và 78,60 ppm.

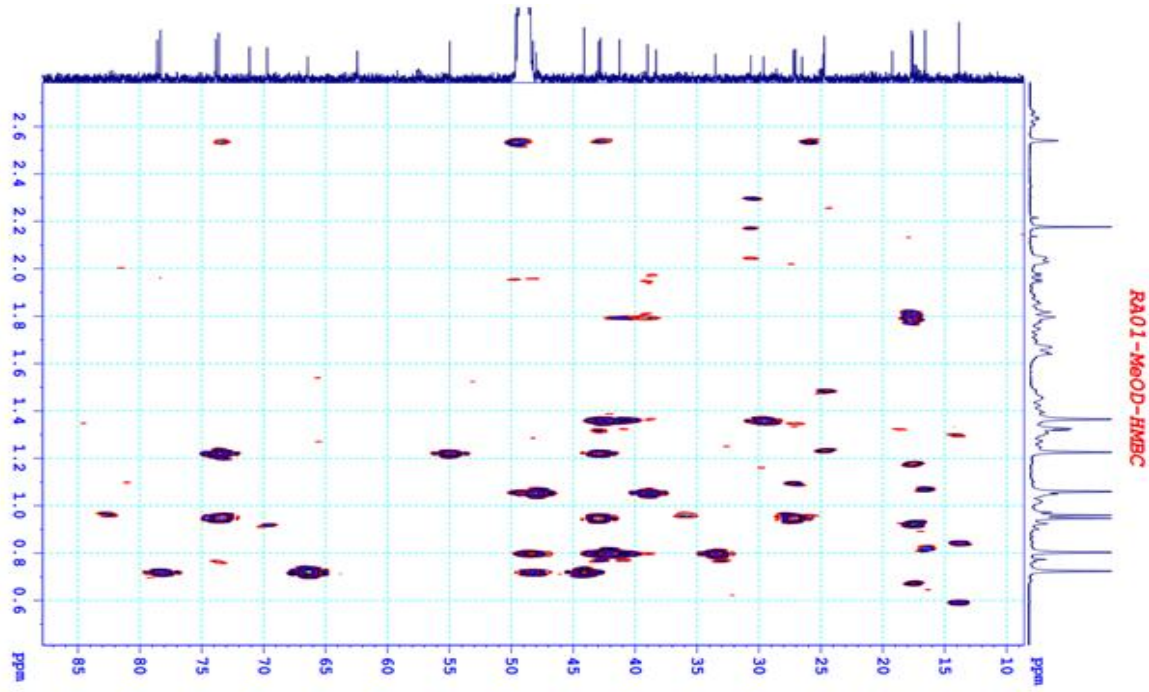


Hình 4.7. Phổ HSQC của RA01

Từ các đặc trưng phổ nói trên, dự kiến RA01 là một dẫn xuất thế 4 nhóm OH của urs-12-enoic acid β-D-glucopyranosyl ester. Độ dịch chuyển hóa học của C-28 (δ 178,55 ppm) trên phổ ^{13}C-NMR cho thấy đường glucose được gắn vào vị trí này. Vị trí liên kết với đơn vị đường được xác nhận thêm nhờ tương tác HMBC giữa proton anomeric của đường glucose (δ_H 5,35 ppm) với C-28 của aglycon (δ_C 178,55).



a)



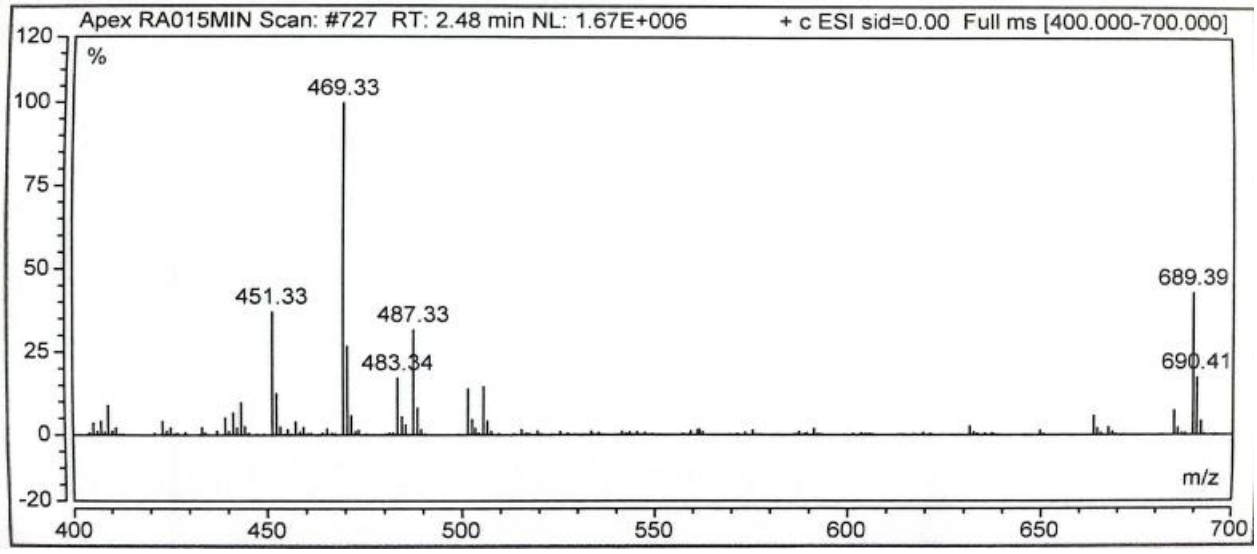
b)

Hình 4.8. Phổ HMBC của RA01

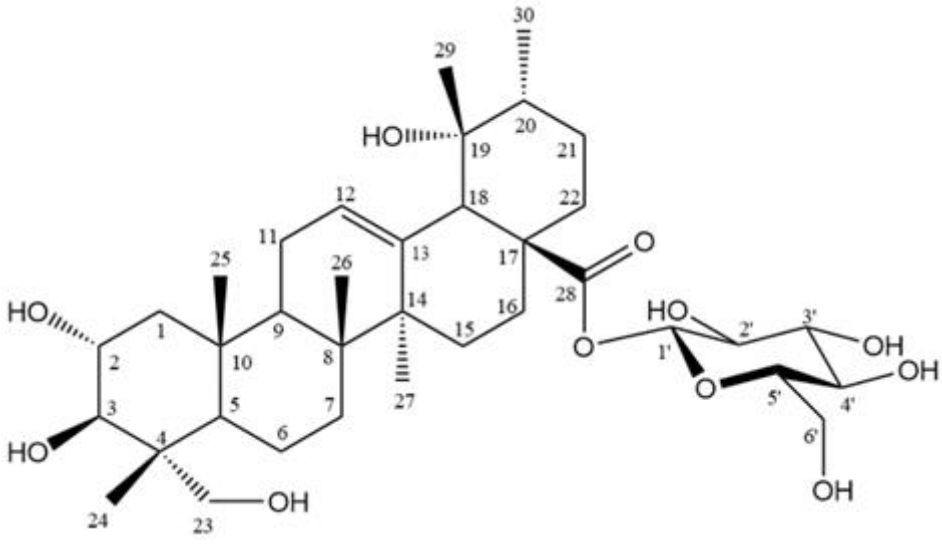
Số liệu phổ NMR của RA01 được so sánh với số liệu phổ NMR của hợp chất 2*α*,3*β*,19*α*,23-tetrahydroxy-urs-12-en-28-oic acid-β-D-glucopyranosyl ester (Kim và ctg., 1993) cho thấy hoàn toàn phù hợp (bảng 4.1). Các giá trị phổ ^{1}H- và ^{13}C-NMR của các vị trí được gán chính xác nhờ vào các phổ hai chiều 2D-NMR. Phổ HSQC đã giúp xác định các giá trị độ dịch chuyển hoá học δ_H từ các giá trị δ_C của các carbon có mang proton trong cấu trúc và được thể hiện ở bảng 4.1. Các tương tác xa (HMBC)

giữa H với C đã giúp khẳng định các giá trị độ dịch chuyển hóa học của các vị trí C và H như ở bảng 4.1 là hoàn toàn phù hợp.

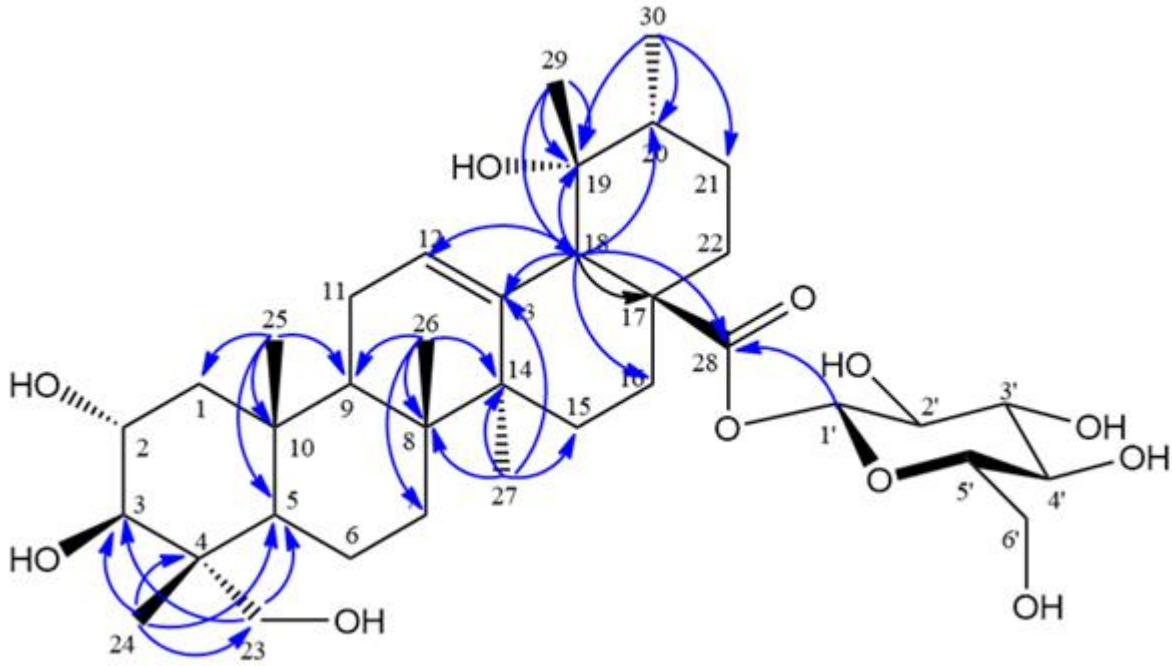
Phổ ESI-MS của RA01 cho thấy pic ion $[M+Na]^+$ tại *m/z* 689,39 và pic ion $[M-Glc]^+$ tại m/z 487,33 hoàn toàn phù hợp với công thức phân tử $C_{36}H_{58}O_{11}$, M = 666.



Hình 4.9. Phổ ESI-MS của RA01



Hình 4.10. Cấu trúc hóa học của RA01
23-hydroxytormentic acid-(28→1)-O-*β*-D-glucopyranosyl ester



Hình 4.11. Các tương tác chính trên phổ HMBC của RA01

Bảng 4.1: Số liệu phổ NMR của RA01 (đo trong MeOD)

C	*δ_C (ppm)	δ_C của RA01 (ppm)	DEPT	δ_H (ppm) (*J*, Hz)	HMBC (H→C)
1	47,9	47,99	CH_2	1,96 (dd, 3,5; 10,0, 1H) 0,91 (m, 1H)	C-5, C-9, C-10 C-2, C-25
2	68,9	69,72	CH	3,71 (m, 1H)	
3	78,3	78,60	CH	3,34 (m, 1H)	C-2, C-4, C-24, C-23
4	43,6	44,12	C	-	
5	48,0	48,60	CH	1,80 (m, 1H)	C-10, C-25
6	18,9	19,24	CH_2	1,42 (m, 1H) 1,32 (m, 1H)	C-8, C-10
7	33,1	33,54	CH_2	1,67 (m, 1H)	

				1,32 (m, 1H)	C-8, C-14
8	40,8	41,27	C	-	
9	47,8	48,26	CH	1,32 (m, 1H)	C-8, C-14
10	38,3	39,00	C	-	
11	24,2	24,80	CH_2	2,04 (m, 1H) 1,34 (m, 1H)	
12	128,3	129,51	CH	5,34 (brs, 1H)	C-14, C-18
13	139,2	139,77	C	-	
14	42,1	42,95	C	-	
15	29,2	29,65	CH_2	1,86 (m, 1H) 1,02 (m, 1H)	
16	26,6	26,53	CH_2	2,63 (dt, 3,5; 11,0; 11,0, 1H) 1,65 (m, 1H)	
17	48,6	49,17	C	-	
18	54,4	54,98	CH	2,54 (s, 1H)	C-28, C-20, C-19, C-14, C-16, C-17, C-12, C-13
19	72,6	73,64	C	-	
20	42,1	42,80	CH	1,37 (m, 1H)	C-29, C-21
21	26,6	27,22	CH_2	1,75 (m, 1H) 1,26 (m, 1H)	

22	37,7	38,32	CH_2	1,80 (m, 1H) 1,63 (m, 1H)	
23	66,6	66,45	CH_2	3,52 (d, 9,0, 1H) 3,29 (d, 9,0, 1H)	C-3, C-5 C-3
24	14,2	13,85	CH_3	0,72 (s, 3H)	C-23, C-3, C-4, C-5
25	17,4	17,60	CH_3	1,06 (s, 3H)	C-1, C-5, C-9, C-10
26	17,5	17,68	CH_3	0,80 (s, 3H)	C-7, C-8, C-9, C-14,
27	24,5	24,73	CH_3	1,37 (s, 3H)	C-8, C-14, C-15, C-13
28	177,0	178,55	C	-	
29	26,9	27,07	CH_3	1,23 (s, 3H)	C-18, C-19, C-20
30	16,6	16,59	CH_3	0,95 (d, 5,5, 3H)	C-21, C-19, C-20
1’	95,8	95,79	CH	5,35 (brs, 1H)	C-28
2’	74,0	73,88	CH	3,33 (m, 1H)	C-1’, C-3’, C-4’
3’	78,9	78,33	CH	3,40 (m, 1H)	C-4’
4’	71,2	71,16	CH	3,36 (m, 1H)	C-3’, C-5’
5’	79,2	78,33	CH	3,41 (m, 1H)	C-3’, C-4’

6’	62,3	62,45	CH_2	3,69 (m, 1H) 3,82 (dd, 2,0; 10,0, 1H)	

* Số liệu phổ của hợp chất 23-hydroxytormentic acid-(28→1)-O-β-D-glucopyranosyl ester, đo trong pyridin-d_6, 75,5 MHz (Kim và ctg., 1993).

Dựa trên các bằng chứng phổ nói trên, hợp chất RA01 được xác định là 2*α*,3*β*,19*α*,23-tetrahydroxy-urs-12-en-28-oic acid-β-D-glucopyranosyl ester hay 23-hydroxytormentic acid-(28→1)-O-*β*-D-glucopyranosyl ester hay **niga-ichigoside F1** (Kim và ctg., 1993). Hợp chất này đã được phân lập từ một số loài *Rubus* như *R. coreanus* (Kim và ctg., 2011), *R. chingii* (Wan và ctg., 2021), *R. imperialis* (Ardenghi và ctg., 2006). Tuy nhiên, đây, đây là lần đầu tiên hợp chất này được phân lập từ loài *R. annamensis* và đã được chứng minh có hàng loạt các hoạt tính sinh học đáng chú ý như:

- Hoạt tính chống tăng lipid máu và chống oxy hóa, ngăn ngừa nhiễm mỡ gan do chế độ ăn giàu chất béo gây ra (Xia và ctg., 2018).

- Hoạt tính chống viêm, giảm đau (Niero và ctg. 1999; Choi và ctg., 2003; Ardenghi và ctg., 2006; Tonin và ctg., 2016), chống viêm khớp và chống đau dạ dày (Nam và ctg., 2006; Berte và ctg., 2014).

- Hoạt tính bảo vệ thận (Kim và ctg., 2011; Sohn và ctg., 2011).

- Hoạt tính chống ung thư (Hattori và ctg.1988).

4.2.2. Hợp chất RA02

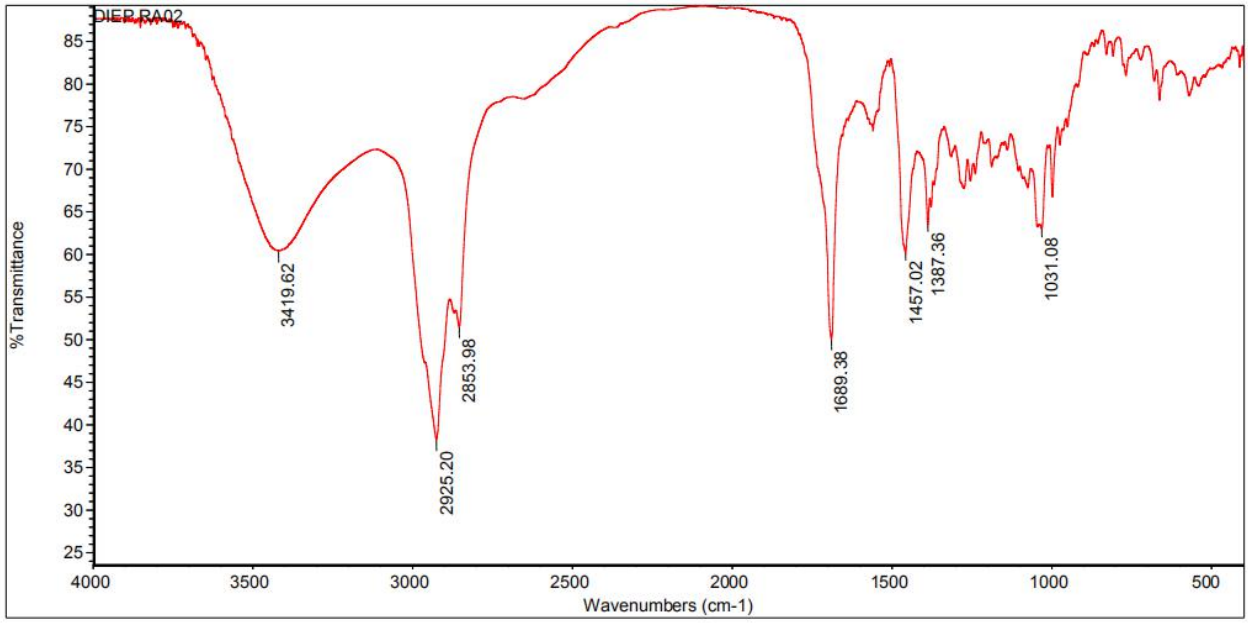


Ghi chú:
- Thuốc thử hiện màu H_2SO_4 10%
- Hệ dung môi: chloroform – methanol (20:1)

Hình 4.12. Sắc ký đồ SKLM của chất RA02

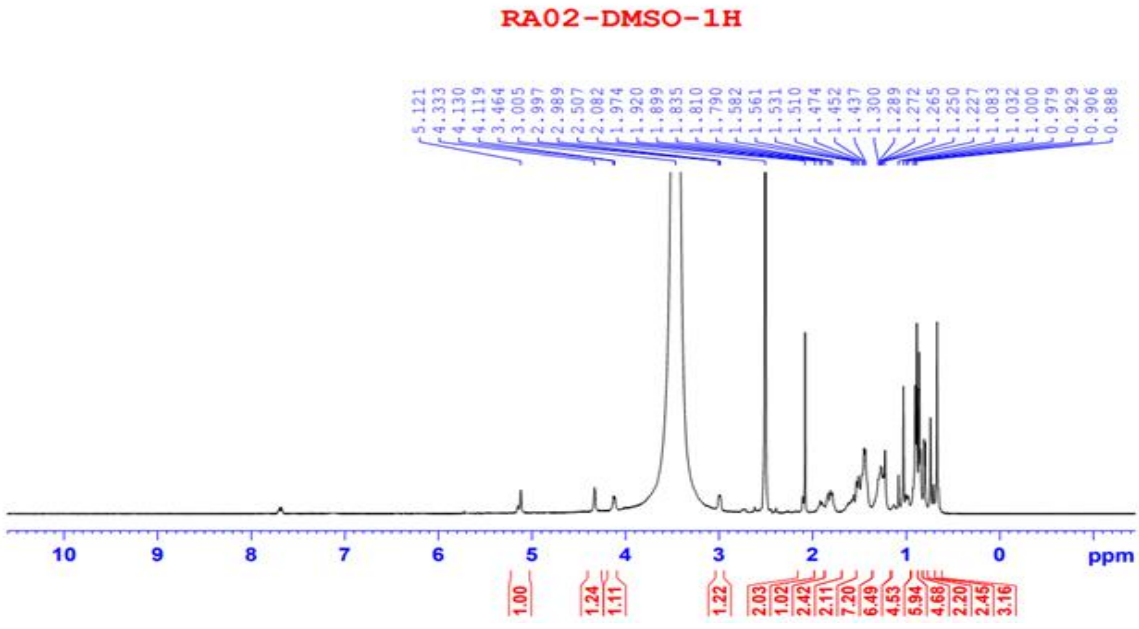
Hợp chất RA02 thu được dưới dạng bột vô định hình màu trắng, hiện màu tím đỏ với thuốc thử H_2SO_4 10%, gợi ý đây là cũng một hợp chất triterpen

Phổ IR của RA02 cho thấy ở 3419 cm^{-1} xuất hiện pic tròn, rộng, là tín hiệu của nhóm OH. Ở 2925, 2854 cm^{-1} có pic nhọn của C-H ankan. Ngoài ra, ở 1689 cm^{-1} có tín hiệu hấp thụ của nhóm C=O.



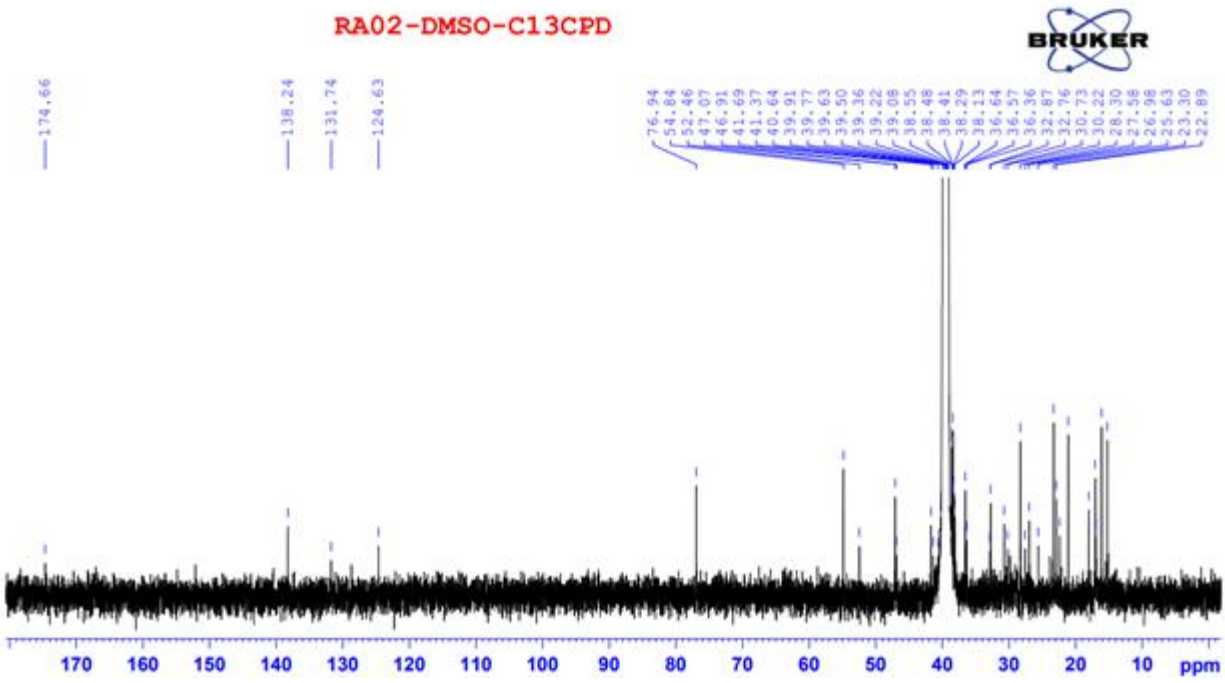
Hình 4.13. Phổ IR của RA02

Phổ ^{1}H-NMR của RA02 cho thấy sự có mặt của 5 nhóm CH_3 bậc ba (δ_H 0,67 (s, 3H); 0,74 (s, 3H); 0,86 (s, 3H); 0,89 (s, 3H); 1,03 (s, 3H)) và 2 cặp tín hiệu doublet của 2 nhóm CH_3 bậc hai (δ_H 0,80 (d, J = 5,0 Hz, 3H); 0,90 (d, J = 9,0 Hz, 3H)) thuộc khung triterpen ursan. Một tín hiệu triplet ở 5,12 (t, J = 4,0 Hz, 1H) đặc trưng cho proton olefin H-12 của khung triterpen 5 vòng.

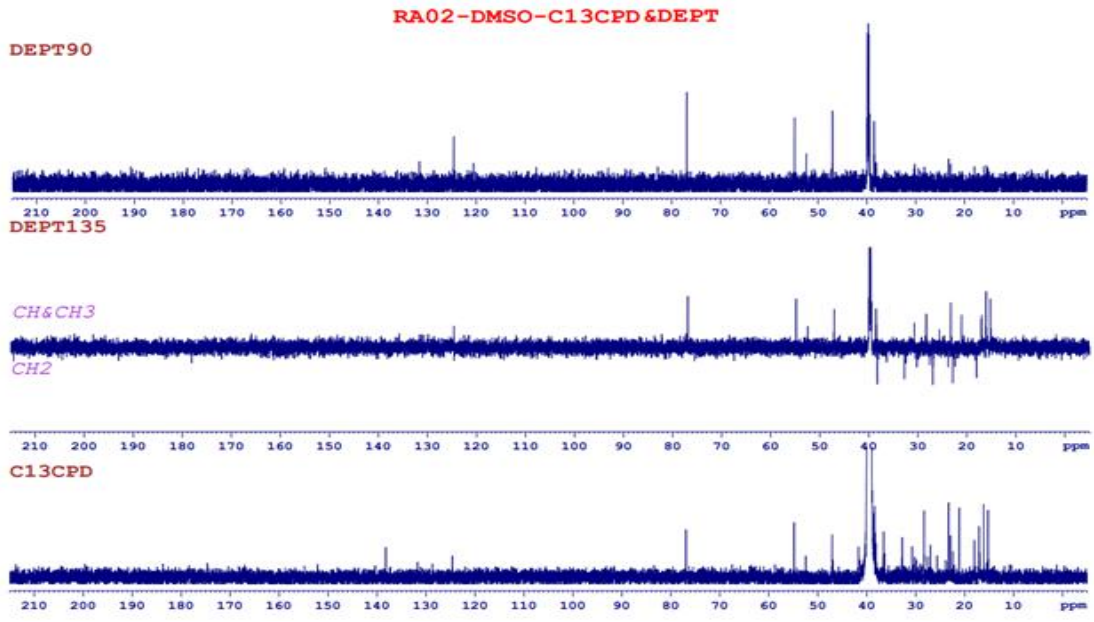


Hình 4.14. Phổ ^{1}H-NMR của RA02

Phổ ^{13}C-NMR và phổ DEPT của RA02 cũng cho thấy sự có mặt của 30 tín hiệu carbon thuộc khung ursan, trong đó có 7 nhóm CH_3 (δ_C 15,25; 16,10; 16,99; 17,05; 21,10; 23,30 và 28,30 ppm), 9 nhóm CH_2, 7 nhóm CH và 7C. Tín hiệu cộng hưởng tại δ_C 174,66 ppm cho thấy có một nhóm carboxylic (COOH) trong cấu trúc. Các giá trị δ_C 138,24 và 124,63 ppm khẳng định sự tồn tại của một liên kết đôi giữa C-12 và C-13. Một nhóm methin liên kết trực tiếp với nguyên tử oxy cộng hưởng ở δ_C 76,94 ppm.

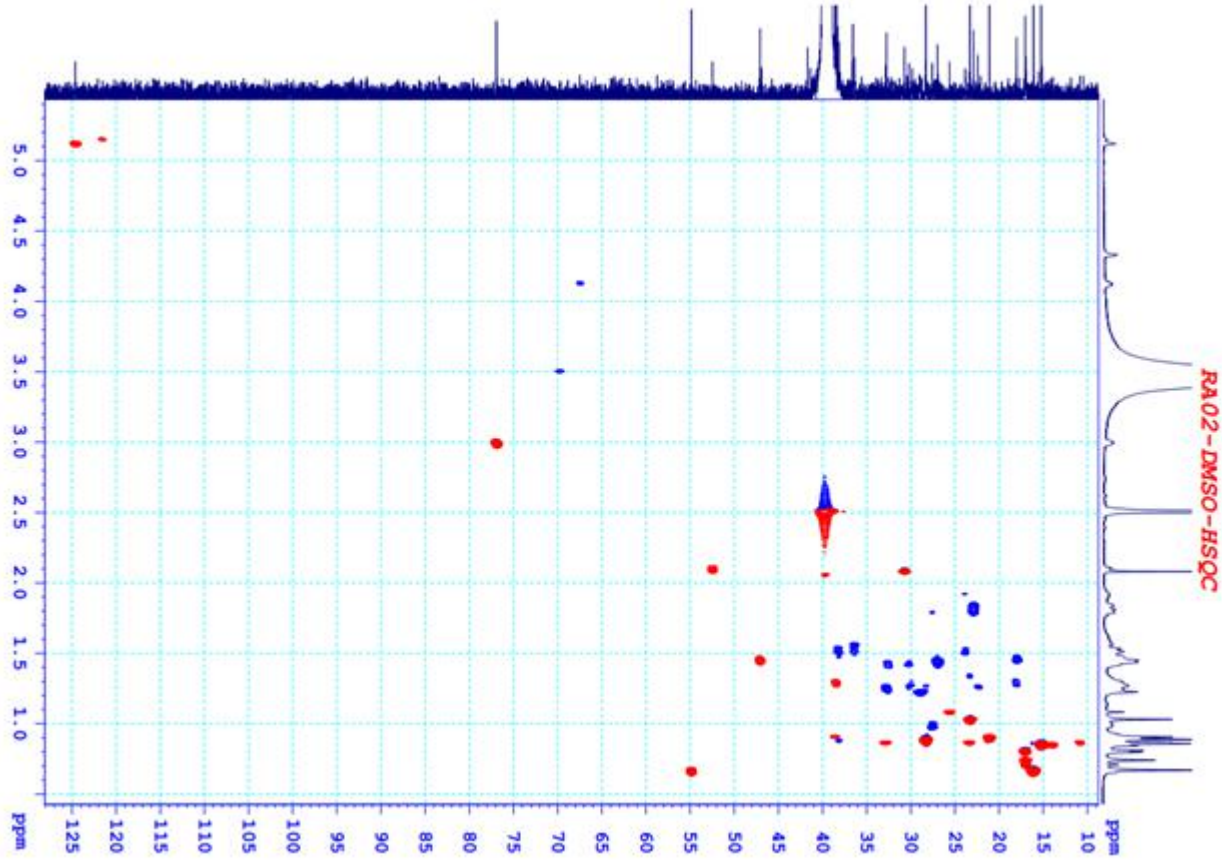


Hình 4.15. Phổ ^{13}C-NMR của RA02

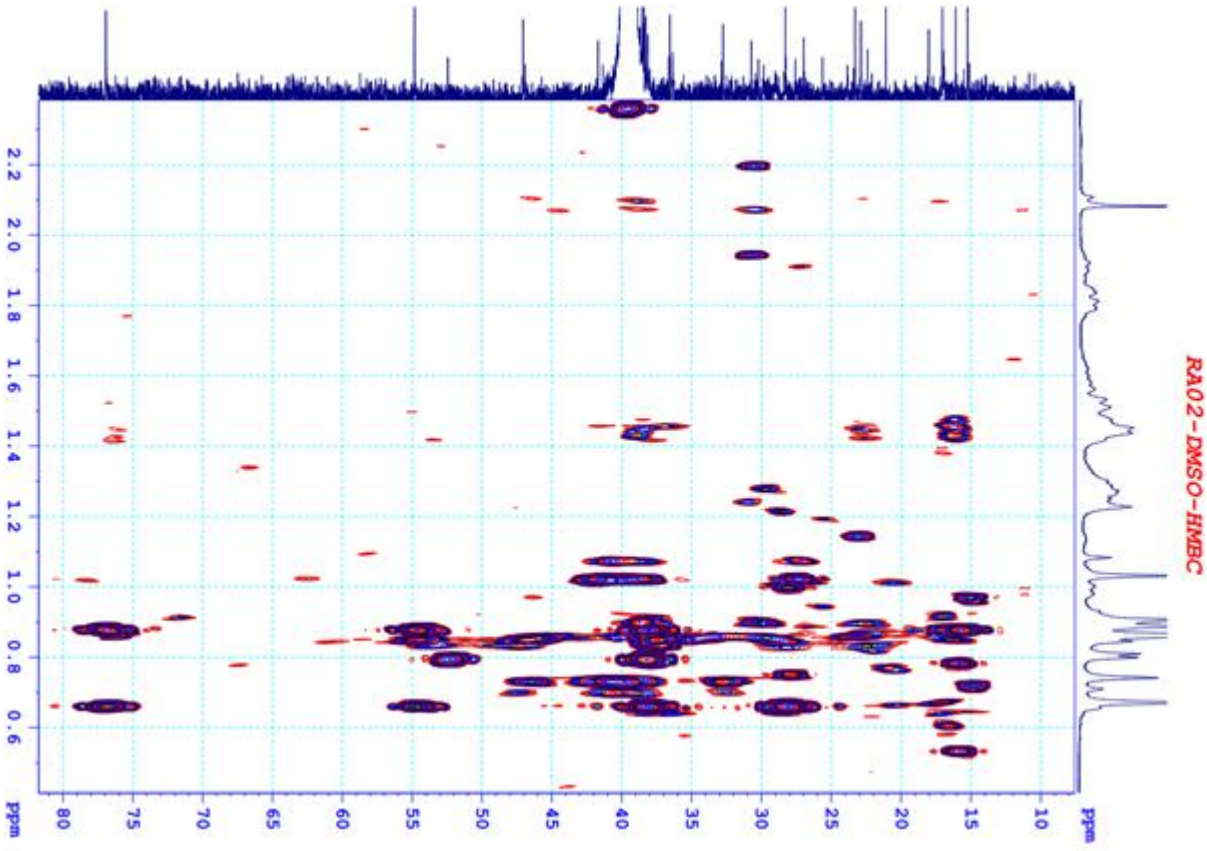


Hình 4.16. Phổ DEPT của RA02

Từ các đặc trưng phổ nói trên, dự kiến RA02 là một triterpen có tên gọi là acid ursolic. Các số liệu phổ NMR của hợp chất RA02 được so sánh với số liệu đã công bố cho acid ursolic (Trịnh và ctg., 2016) (bảng 4.2) là hoàn toàn phù hợp. Các phổ hai chiều 2D-NMR đã được sử dụng để gán chính xác giá trị phổ ^{1}H- và ^{13}C-NMR của các vị trí carbon trong cấu trúc. Phổ HSQC đã giúp xác định tất cả các giá trị độ dịch chuyển hoá học δ_H từ các giá trị δ_C của các carbon có mang proton và được thể hiện ở bảng 4.2. Các tương tác xa HMBC giữa H với C đã giúp khẳng định các giá trị độ dịch chuyển hóa học của các vị trí C và H như ở bảng 4.2 là hoàn toàn phù hợp.

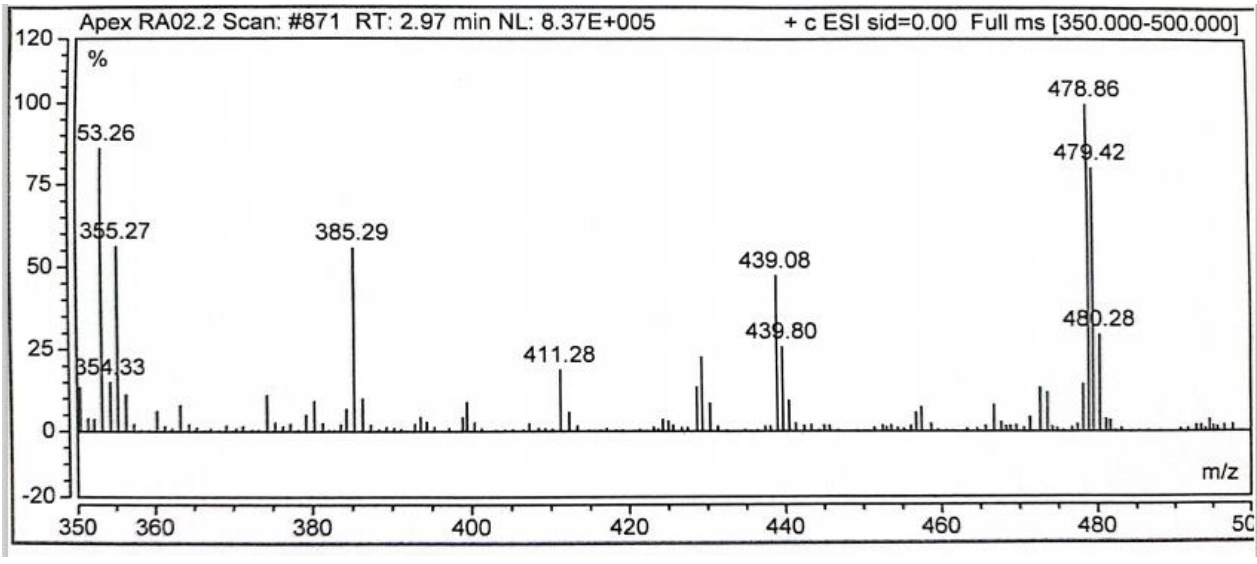


Hình 4.17. Phổ HSQC của RA02



Hình 4.18. Phổ HMBC của RA02

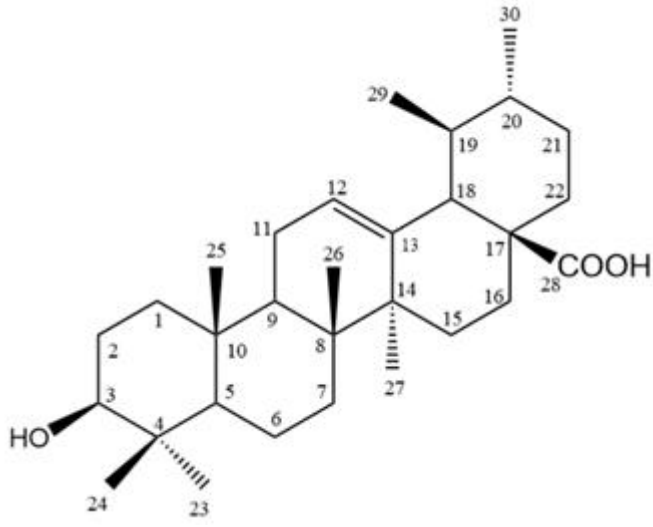
Phổ ESI-MS của RA02 cho thấy pic ion $[M+Na]^+$ tại m/z 479,42 hoàn toàn phù hợp với công thức phân tử $C_{30}H_{48}O_3$ của acid ursolic, M = 456.



Hình 4.19. Phổ ESI-MS của RA02

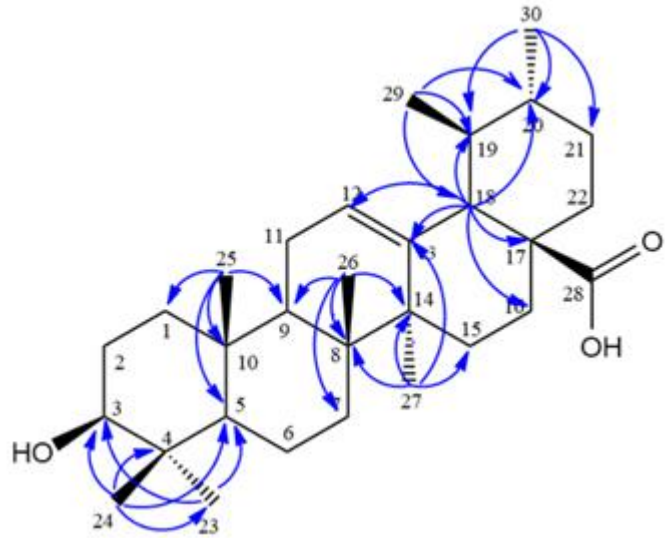
Từ những bằng chứng phổ nêu trên, hợp chất RA02 được xác định là **acid ursolic** hay **3-beta-3-hydroxy-urs-12-ene-28-oic acid,** có cấu trúc như hình 4.20. Hợp chất này đã được phân lập từ một số loài *Rubus* (Yu và ctg., 2019). Tuy nhiên, đây là lần

đầu tiên acid ursolic được phân lập từ loài *Rubus annamensis*. Hợp chất này có trong nhiều loại thực vật và đã được chứng minh có nhiều hoạt tính đáng chú ý như tác dụng bảo vệ gan, phổi, thận, não, chống viêm, kháng khuẩn, kháng virus HIV, HCV và ức chế tăng sinh tế bào ung thư (Woźniak và ctg., 2015; Mlala và ctg., 2019; Nguyen và ctg., 2021).



Hình 4.20. Cấu trúc hóa học của RA02

3-beta-3-hydroxy-urs-12-ene-28-oic acid



Hình 4.21. Các tương tác chính trên phổ HMBC của RA02

Bảng 4.2: Số liệu phổ NMR của RA02

C	* δ_C (ppm) của acid ursolic	δ_C (ppm) của RA02	DEPT	δ_H (ppm) (J, Hz)	Các tương tác HMBC quan trọng
1	38,23	38,13	CH_2	1,51 (m, 1H) 0,87 (m, 1H)	
2	27,53	27,58	CH_2	0,99 (m, 1H) 1,79 (m, 1H)	
3	76,84	76,94	CH	3,00 (m, 1H)	
4	38,37	38,55	C	-	
5	54,78	54,78	CH	0,66 (m, 1H)	
6	18,00	18,03	CH_2	1,45 (m, 1H) 1,29 (m, 1H)	
7	32,70	32,76	CH_2	1,42 (m, 1H) 1,25 (m, 1H)	
8	39,51	40,64	C	-	
9	46,82	47,07	CH	1,45 (m, 1H)	
10	36,52	36,57	C	-	
11	23,80	23,80	CH_2	1,91 (m, 1H) 1,51 (m, 1H)	
12	124,57	124,63	CH	5,12 (t, J = 4,0Hz, 1H)	C-14
13	138,18	138,24	C	-	

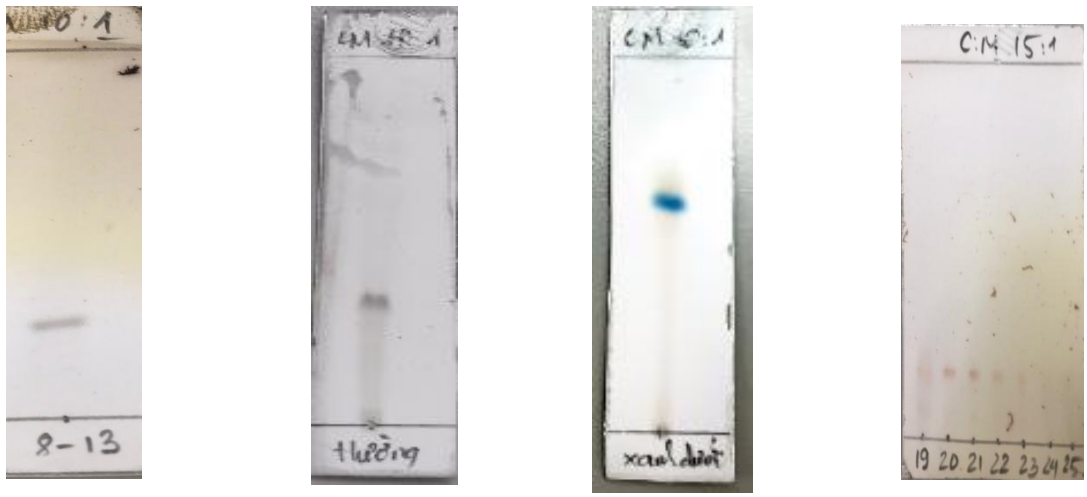
14	41,64	41,69	C	-	
15	26,98	26,98	CH_2	1,44 (m, 2H)	
16	22,84	22,89	CH_2	1,81 (m, 2H)	
17	47,01	46,91	C	-	
18	52,37	52,46	CH	2,08 (m, 1H)	C-12, C-13, C-17, C-19, C-20
19	38,50	38,48	CH	0,93 (m, 1H)	
20	38,44	38,41	CH	1,29 (m, 1H)	
21	30,18	30,22	CH_2	1,43 (m, 1H) 1,27 (m, 1H)	
22	36,31	36,36	CH_2	1,53 (m, 2H)	
23	28,25	28,30	CH_3	0,89 (s, 3H)	C-3, C-4, C-5, C-24
24	16,06	16,10	CH_3	0,67 (s, 3H)	C-3, C-4, C-5, C-23
25	15,21	15,25	CH_3	0,86 (s, 3H)	C-1, C-5, C-9, C-10
26	16,91	16,99	CH_3	0,74 (s, 3H)	C-7, C-8, C-9, C-14
27	23,26	23,30	CH_3	1,03 (s, 3H)	C-8, C-13, C-14, C-15
28	178,26	174,66	C	-	
29	17,00	17,05	CH_3	0,80 (d, J =	C-18, C-19, C-20

				5,0Hz, 3H)	
30	21,06	21,10	CH_3	0,90 (d, J = 9,0Hz, 3H)	C-19, C-20, C-21

*) Số liệu phổ của acid ursolic đo trong DMSO, 125 MHz (Trịnh và ctg., 2016).

4.3. Các hợp chất khác được phân lập

Các hợp chất RA03, RA04, RA05, RA06 đã được phân lập, dường như đều đã thu được 1 vết. Tuy nhiên vì lượng chất thu được khá ít nên không thể tiến hành đo các phổ ^{1}H, ^{13}C-NMR, DEPT để xác định cấu trúc cũng như hoạt tính sinh học của chúng.



a) b) c) d)

Hình 4.22. Sắc ký đồ SKLM của các hợp chất RA03, RA04, RA05, RA06.

Ghi chú:

- Thuốc thử hiện màu H_2SO_4 10%

a) Hợp chất RA03

- Hệ dung môi: chloroform – methanol (10:1)

b) Hợp chất RA04

- Hệ dung môi: chloroform – methanol (15:1)

c) Hợp chất RA05

- Hệ dung môi: chloroform – methanol (10:1)

d) Hợp chất RA06

- Hệ dung môi: chloroform – methanol (15:1)

4.4. Kết quả khảo sát phân đoạn n-hexan

Tiến hành kiểm tra sự có mặt của **β-sitosterol** trong phân đoạn bằng SKLM. Kết quả phân tích SKLM các phân đoạn thu được được trình bày ở hình 4.23.



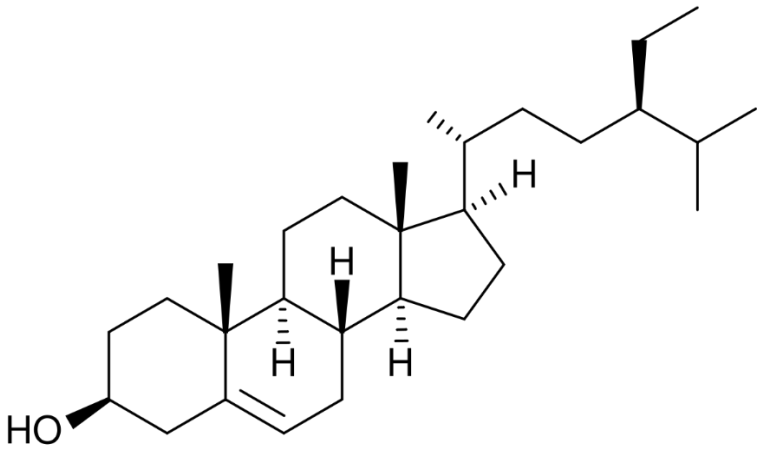
Ghi chú:

- Thuốc thử hiện màu H_2SO_4 10%
- Hệ dung môi: n-hexan – aceton (7:3)

Hình 4.23. Sắc ký đồ SKLM khảo sát sự có mặt của β-sitosterol trong phân đoạn n-hexan.

Nhận xét:

Kết quả phân tích bằng SKLM dịch chiết phân đoạn n-hexan trong mẫu lá phúc bồn tử *Rubus annamensis* với hệ dung môi n-hexan – aceton (7:3) cho thấy: Trong dịch chiết các phân đoạn n-hexan có chứa β-sitosterol. Hợp chất này có trong nhiều loại thực vật và đã được chứng minh có nhiều hoạt tính đáng chú ý như: tác dụng chống oxi hoá, chống viêm, hạ sốt, giảm đau, điều hòa miễn dịch và tác dụng chống HIV, ngăn ngừa ung thư, tiểu đường, lao phổi (Bin Sayeed và ctg., 2016).



Hình 4.24. Cấu trúc hợp chất β-sitosterol

4.5. Kết quả khảo sát phân đoạn nước

Cắn chiết nước sau khi cho bay hết dung môi thì tiến hành hòa tan cắn trong MeOH, lọc lấy phần tan trong MeOH, loại bỏ phần cặn không tan. Tiến hành kiểm tra sự có mặt của đường glucose trong phân đoạn nước bằng sắc ký lớp mỏng.



a) b)

Hình 4.25. Sắc ký đồ SKLM khảo sát sự có mặt của glucose trong phân đoạn nước.

Ghi chú:

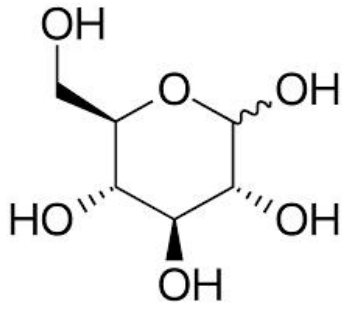
- Thuốc thử hiện màu H_2SO_4 10%

a) Hệ dung môi: chloroform – methanol – nước (8:4:0,4).

b) Hệ dung môi: chloroform – methanol – nước (6:2:0,2).

Nhận xét:

Kết quả phân tích bằng SKLM dịch chiết phân đoạn nước trong mẫu lá phúc bồn tử *Rubus annamensis* với hệ dung môi chloroform – methanol – nước (8:4:0,4) cho thấy: Có sự xuất hiện của **glucose** trong dịch chiết nước của lá phúc bồn tử. Hợp chất này có nhiều trong tự nhiên và có vai trò cung cấp năng lượng cho các hoạt động sống của cơ thể mỗi ngày.



Hình 4.26. Công thức cấu tạo của Glucose

KẾT LUẬN VÀ KIẾN NGHỊ

Kết luận

Từ dịch chiết methanol của lá cây phúc bồn tử *Rubus annamensis*, bằng các phương pháp sắc ký kết hợp với các phương pháp phổ (IR, ^{1}H-NMR, ^{13}C-NMR, DEPT, HSQC, HMBC, ESI-MS) đã phân lập và nhận dạng được cấu trúc của 2 hợp chất triterpen là **niga-ichigoside F1** (2α,3β,19α,23-tetrahydroxy-urs-12-en-28-oic acid-β-D-glucopyranosyl ester) và **acid ursolic** (acid 3-beta-3-hydroxy-urs-12-ene-28-oic). Đây là lần đầu tiên các hợp chất hợp chất này được phân lập từ loài *Rubus annamensis*.

Bằng phương pháp SKLM so sánh với chất đối chiếu, đã xác định trong lá cây phúc bồn tử *Rubus annamensis* có mặt **β-sitosterol** và đường **glucose**.

Kiến nghị

- Tiếp tục nghiên cứu về hoạt tính của các hợp chất phân lập được và tác dụng sinh học của lá cây phúc bồn tử *Rubus annamensis.*

- Xây dựng phương pháp định lượng và xác định hàm lượng hợp chất 2*α*,3*β*,19*α*,23-tetrahydroxy-urs-12-en-28-oic acid-β-D-glucopyranosyl ester, một thành phần hóa học chính có trong các loài *Rubus.*

TÀI LIỆU THAM KHẢO

A. Tiếng Việt

1. Phạm Hoàng Hộ (1999), Cây cỏ Việt Nam, Nhà xuất bản Trẻ, tr. 783 – 797.

2. Trần Thị Thu Hoài, Đinh Bạch Yến (2018), Đặc điểm nhận biết và đa dạng hình thái chi *Rubus* (Rosaceae) ở vườn quốc gia Hoàng Liên, tr.1 – 11.

3. Nguyễn Kim Phi Phụng (2007), Phương pháp cô lập hợp chất hữu cơ, Nhà xuất bản Đại học quốc gia TP Hồ Chí Minh, tr 7 – 79, tr 151 – 212, tr 213 – 282, tr 283 – 322.

4. Trần Thị Hoài Linh (2019). *Các phương pháp phân tích sắc kí*. Trường Đại học Đà Lạt.

5. Trịnh Thị Điệp, Trần Thị Ngọc Hạnh, Nguyễn Thị Tố Uyên, Lương Văn Dũng, Nguyễn Văn Hạ (2016), Các hợp chất triterpen và triterpen ester phân lập từ lá cây *Ilex triflora* Blume., Tạp chí Dược học, số 03 (Số 479 năm 56), tr. 64-69.

B. Tiếng Anh

6. Ardenghi, J. V., Kanegusuku, M., Niero, R., Filho, V. C., Monache, F. D., Yunes, R. A., & De Souza, M. M. (2006). Analysis of the mechanism of antinociceptive action of niga-ichigoside F1 obtained from *Rubus imperialis* (Rosaceae). The Journal of pharmacy and pharmacology, 58(12), 1669–1675.

7. Beagley, B., Pritchard, R. G., Ramage, R. & Southwell, I. (1982). (+)-2-{(3R,6S,10R)-6,10- Dimethylbieyelo(4.4.0)dee-l-en-3-yl}-2-propanol, Rosifoliol. Acta Cryst. B38, 1391-1393.

8. Berté, P. E., da Silva Lopes, J., Comandulli, N. G., Rangel, D. W., Monache, F. D., Filho, V. C., Niero, R., & de Andrade, S. F. (2014). Evaluation of the gastroprotective activity of the extracts, fractions, and pure compounds obtained from aerial parts of *Rubus imperialis* in different experimental models. Naunyn-Schmiedeberg's archives of pharmacology, 387(4), 313–319.

9. Bhuyan, B., & Dutta, A. (2021). A review on the phytochemical, pharmacological and traditional profile on the *Rubus* genus in North-Eastern and Wester parts of India. Current Trends in Pharmaceutical Research, 8(1), 73–87.

10. Bin Sayeed, M. S., Karim, S., Sharmin, T., & Morshed, M. M. (2016). Critical Analysis on Characterization, Systemic Effect, and Therapeutic Potential of Beta-Sitosterol: A Plant-Derived Orphan Phytosterol. Medicines (Basel, Switzerland), 3(4), 29. https://doi.org/10.3390/medicines3040029

11. Bushman, B. S., Phillips, B., Isbell, T., Ou, B., Crane, J. M., & Knapp, S. J. (2004). Chemical composition of caneberry (*Rubus* spp.) seeds and oils and their

antioxidant potential. Journal of agricultural and food chemistry, 52(26), 7982–7987. https://doi.org/10.1021/jf049149a

12. Chai W. (2008). Studies on the chemical constituents and quality standard of *Rubus chingii* Hu. Ph.D Thesis. Beijing, China: China Academy of Chinese Medical Science.

13. Cheng K. J. (2008). Studies on the bioactive constituents of *Rubus chingii* II. Studies on the stability of stilbenoids from the roots of Caragana sinica. Ph.D Thesis. Shanghai China: Fudan University.

14. Chien, S. C., Wu, Y. C., Chen, Z. W., & Yang, W. C. (2015). Naturally occurring anthraquinones: chemistry and therapeutic potential in autoimmune diabetes. *Evidence-based complementary and alternative medicine* : eCAM, 2015, 357357. https://doi.org/10.1155/2015/357357

15. Choi, J., Lee, K. T., Ha, J., Yun, S. Y., Ko, C. D., Jung, H. J., & Park, H. J. (2003). Antinociceptive and antiinflammatory effects of Niga-ichigoside F1 and 23-hydroxytormentic acid obtained from *Rubus coreanus*. Biological & pharmaceutical bulletin, 26(10), 1436–1441.

16. Da-Jun He and et al. (2016), Rapid Identification of Flavonoid Constituents Directly from PTP1B Inhibitive Extract of Raspberry (*Rubus idaeus* L.) Leaves by HPLC–ESI–QTOF–MS-MS, Journal of Chromatographic Science, Vol. 54, No. 5, pp 805–810.

17. Flamini, G., Catalano, S., Capon, C., Panizzi, L., Morelli, I. (2002), Three anthrones from *Rubus ulmifolius*, Phytochemistry, 59, p. 873–876.

18. Glombitza, K.W., and Kurth, H., Die structur einiger triterpensaponine aus Anagallis arvensis, Planta medica**,** 1987, p. 548–555.

19. Gudej J., Tomczyk M. (2004), Determination of flavonoids, tannins and ellagic acid in leaves from *Rubus* L. species, Archives of Pharmacal Research, 27(11), pp. 1114–1119.

20. Gudej J., Tomczyk M., et.al (1999), Analysis of chemical composition of *Rubus saxatilis* L. leaves, Herba Polonica (Poland)(4), pp. 340–344.

21. Guo Q. (2015). Studies on the chemical constituents and quality control standard of Rubus chingii Hu. Master's Thesis. Nanchang, China: Jiangxi University of Chinese Medicine.

22. Guo Q. L. (2005). Studies on the chemical constituents of *Rubus chingii* and *Inula cappa*. Ph.D Thesis. Beijing, China: Peking Union Medical College.

23. Hattori M., Kuo K. P., Shu Y. Z., Tezuka Y., Kikuchi T., Namba T. (1988). A triterpene from the fruits of *Rubus chingii*. Phytochemistry 27, 3975–3976.

24. He J. M., Sun N., Wu W. D., Fan L. J., Guo M. L. (2013). Determination of ellagic acid, flavonoids and goshonoside-F5 in Rubi Fructus by HPLC. Chin. J. Chin. Mater. Med. 38, 4351–4356.

25. Kashiwada, Y., Wang, H. K., Nagao, T., Kitanaka, S., Yasuda, I., Fujioka, T., Yamagishi, T., Cosentino, L. M., Kozuka, M., Okabe, H., Ikeshiro, Y., Hu, C. Q., Yeh, E., & Lee, K. H. (1998). Anti-AIDS agents. 30. Anti-HIV activity of oleanolic acid, pomolic acid, and structurally related triterpenoids. Journal of natural products, 61(9), 1090–1095. https://doi.org/10.1021/np9800710

26. Kim, Y. H., & Kang, S. S. (1993). Triterpenoids from Rubi Fructus (Bogbunja). Archives of Pharmacal Research, 16(2), 109-113.

27. Kim, Y. H., Choi, J. H., Rim, H. K., Kang, H. J., Chang, S. G., Park, J. H., Park, H. J., Choi, J. W., Kim, S. D., & Lee, K. T. (2011). 23-Hydroxytormentic acid and niga-ichgoside F1 isolated from *Rubus coreanus* attenuate cisplatin-induced cytotoxicity by reducing oxidative stress in renal epithelial LLC-PK$_1$ cells. Biological & pharmaceutical bulletin, 34(6), 906–911.

28. Li K. Y., Zeng M. L., Li Q. L., Zhou B. H. (2018). Identification of polyphenolic composition in the fruits of *Rubus chingii* Hu and its antioxidant and antiproliferative activity on human bladder cancer T24 cells. J. Food Meas. Charact. 13 (1), 51–60.

29. Lidija Jakobek, et.al (2009), Phenolic compound composition and antioxidant activity of fruits of Rubus and Prunus species from Croatia, International journal of food science & technology, 44(4), pp. 860 – 868.

30. Liu J. (2005). Study on the chemical constituents of *Rubus chingii* Hu and its pharmacological effects on renal asthenia yang test of mouse. Master's Thesis. Shenyang, China: Shenyang Pharmaceutical University.

31. Messana, I., Ferrari, F., Salete, M., Cavalcanti, B., Morace, G. (1991). An anthraquinone and three naphthopyrone derivatives from *Cassia pudibunda*, Phytochemistry 30 (2), p. 708-710.

32. Mlala, S., Oyedeji, A. O., Gondwe, M., & Oyedeji, O. O. (2019). Ursolic Acid and Its Derivatives as Bioactive Agents. Molecules (Basel, Switzerland), 24(15), 2751.

33. Nam, J. H., Jung, H. J., Choi, J., Lee, K. T., & Park, H. J. (2006). The anti-gastropathic and anti-rheumatic effect of niga-ichigoside F1 and 23-hydroxytormentic acid isolated from the unripe fruits of *Rubus coreanus* in a rat model. Biological & pharmaceutical bulletin, 29(5), 967–970. https://doi.org/10.1248/bpb.29.967.

34. Nguyen, H. N., Ullevig, S. L., Short, J. D., Wang, L., Ahn, Y. J., & Asmis, R. (2021). Ursolic Acid and Related Analogues: Triterpenoids with Broad Health Benefits. Antioxidants (Basel, Switzerland), 10(8), 1161. https://doi.org/10.3390/antiox10081161

35. Niero, R., Cechinel Filho, V., Souza, M. M., Montanari, J. L., Yunes, R. A., & Delle Monache, F. (1999). Antinociceptive activity of niga-ichigoside F1 from *Rubus imperialis*. Journal of natural products, 62(8), 1145–1146.

36. Pittarello, JL da R, .; Petreanu, M .; Cechinel Filho, V .; Rodrigues, CA ; Klein Júnior, LC ; Niero, R (2019). Extraction optimization of 5,7-dihydroxy-6,8,4'-trimethoxyflavonol, a bioactive flavonoid from *Rubus rosifolius* (Rosaceae) leaves. Natural Product Communications Vol.14 No.1 pp.47-50 ref.28.

37. Shin, D., Chae, K.S., Choi, H.R., Lee, S.J., Gim, S.W., Kwon, G.T., Lee, H.T., Song Y.C., Kim, K.J., Kong H.S., and Kwon, J.W., (2018) "bioactive and pharmacokinetic characteristics of pre-matured black raspberry, Rubus Occidentalis", 30, 428.

38. Sohn, S. I., Rim, H. K., Kim, Y. H., Choi, J. H., Park, J. H., Park, H. J., Choi, J. W., Kim, S. D., Jeong, S. Y., & Lee, K. T. (2011). The ameliorative effect of 23-hydroxytormentic acid isolated from *Rubus coreanus* on cisplatin-induced nephrotoxicity in rats. Biological & pharmaceutical bulletin, 34(9), 1508–1513.

39. Southwell, I. A. (1977). Biogenetically significant sesquiterpenoids from *Rubus rosifolius* oil. Tetrahedron Letters, 18(10), 873-876.

40. Sun N., Wang Y., Liu Y., Guo M. L., Yin J. (2013). A new ent-labdane diterpene saponin from the fruits of *Rubus chingii*. Chem. Nat. Comp. 49, 49–53.

41. Sytsma, Kenneth J., Robertson, Kenneth R. (2017), Rosales, Encyclopedia Britannica.

42. Tanaka T., Kawamura K., Kitahara T., Kohda H., Tanaka O. (1984). Ent-labdane-type diterpene glucosides from leaves of *Rubus chingii*. Phytochemistry 23, 615–621.

43. Tanaka T., Kohda H., Tanaka O., Chen F. H., Chou W. H., Leu J. L. (1981). Rubusoside (β-D-glucosyl ester of 13-O-β-D-glucosyl-steviol), a sweet principle of *Rubus chingii* Hu (Rosaceae). Agric. Biol. Chem. 45, 2165–2166.

44. Tonin, T. D., Thiesen, L. C., de Oliveira Nunes, M. L., Broering, M. F., Donato, M. P., Goss, M. J., Petreanu, M., Niero, R., Machado, I. D., & Santin, J. R. (2016). *Rubus imperialis* (Rosaceae) extract and pure compound niga-ichigoside F1: wound

healing and anti-inflammatory effects. Naunyn-Schmiedeberg's archives of pharmacology, 389(11), 1235–1244. https://doi.org/10.1007/s00210-016-1285-8.

45. Wan, J., Wang, X. J., Guo, N., Wu, X. Y., Xiong, J., Zang, Y., Jiang, C. X., Han, B., Li, J., & Hu, J. F. (2021). Highly Oxygenated Triterpenoids and Diterpenoids from Fructus Rubi (*Rubus chingii* Hu) and Their NF-kappa B Inhibitory Effects. Molecules (Basel, Switzerland), 26(7), 1911.

46. Wang G. Q. (1991). Study on the chemical components of Fupenzi. World Notes Plant med. 6, 32.

47. Wang J. X., Hua-chong Lü (2007). Studies on the chemical constituents of *Rubus suavissimus* S. Lee. Journal of Chinese Medicinal Materials, 30(7):800-802.

48. Wang, B. G., Shen, X. M., Yang, L. & Jia, Z. J. (1997). Pentacyclic triterpenoid glycosyl esters from *Rubus pileatus*. Phytochemistry, 46(3), 559-563.

49. Woźniak Ł, Skąpska S, Marszałek K (2015), Ursolic Acid-A Pentacyclic Triterpenoid with a Wide Spectrum of Pharmacological Activities, Molecules 20(11), pp. 20614-20641.

50. Xia, S. F., , Shao, J., , Zhao, S. Y., , Qiu, Y. Y., , Teng, L. P., , Huang, W., , Wang, S. S., , Cheng, X. R., , & Jiang, Y. Y., (2018). Niga-ichigoside F1 ameliorates high-fat diet-induced hepatic steatosis in male mice by Nrf2 activation. Food & function, 9(2), 906–916.

51. Xiao H. M., Zu L. B., Li S. P., Wang K. J., Li N. (2011). Chemical constituents from dried fruits of *Rubus chingii*. Chin. J. Med. Chem. 21, 220–226.

52. Yu Fu, Xiaozhou Zhou, et.at (2015), Chemical composition and antioxidant activity of Chinese wild raspberry (*Rubus hirsutus* Thunb.), LWT-Food Science and Technology, 60(2), pp. 1262–1268.

53. Yu, G., Luo, Z., Wang, W., Li, Y., Zhou, Y., & Shi, Y. (2019). *Rubus chingii* Hu: A Review of the Phytochemistry and Pharmacology. Frontiers in pharmacology, 10, 799.

54. Zhang, L., Qiu, X. X., Yue, J. Y. (2017). Simultaneous determination of ellagic acid and five flavonoids of *Rubus chingii* Hu by HPLC. *Journal of Chinese medicinal materials, 40*, 2625–2628.

55. Zhang, X., Zhu, Z. X., Wang, J., Yang, W. Q., Su, C., Li, J., Zhang, Y., Zheng, J., Shi, S. P., & Tu, P. F. (2016). Triterpenoids from the roots of Rubus parvifolius. Chinese journal of natural medicines, 14(5), 377–381. https://doi.org/10.3724/SP.J.1009.2016.00377

56. Zhou, X. H., Kasai, R., Ohtani, K., Tanaka, O., Nie, R. L., Yang, C. R., Zhou, J., Yamasaki.K. (1992), Oleanane and ursane glucosides from *Rubus* species, Phytochemistry, 31 (10), p. 3642–3644.

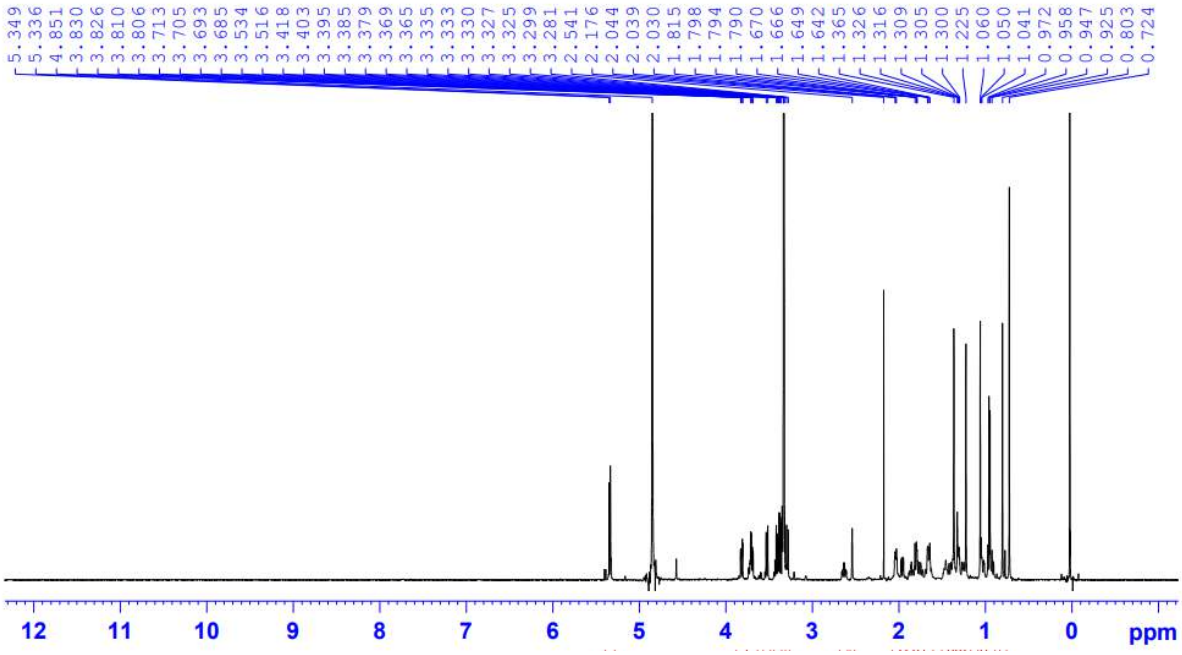
57. Schulz, M., Seraglio, S., Della Betta, F., Nehring, P., Valese, A. C., Daguer, H., Gonzaga, L. V., Costa, A., & Fett, R. (2019). Blackberry (*Rubus ulmifolius* Schott): Chemical composition, phenolic compounds and antioxidant capacity in two edible stages. *Food research international (Ottawa, Ont.)*, *122*, 627–634. https://doi.org/10.1016/j.foodres.2019.01.034

58. Silva, L. P., Pereira, E., Pires, T., Alves, M. J., Pereira, O. R., Barros, L., & Ferreira, I. (2019). Rubus ulmifolius Schott fruits: A detailed study of its nutritional, chemical and bioactive properties. *Food research international (Ottawa, Ont.)*, *119*, 34–43. https://doi.org/10.1016/j.foodres.2019.01.052

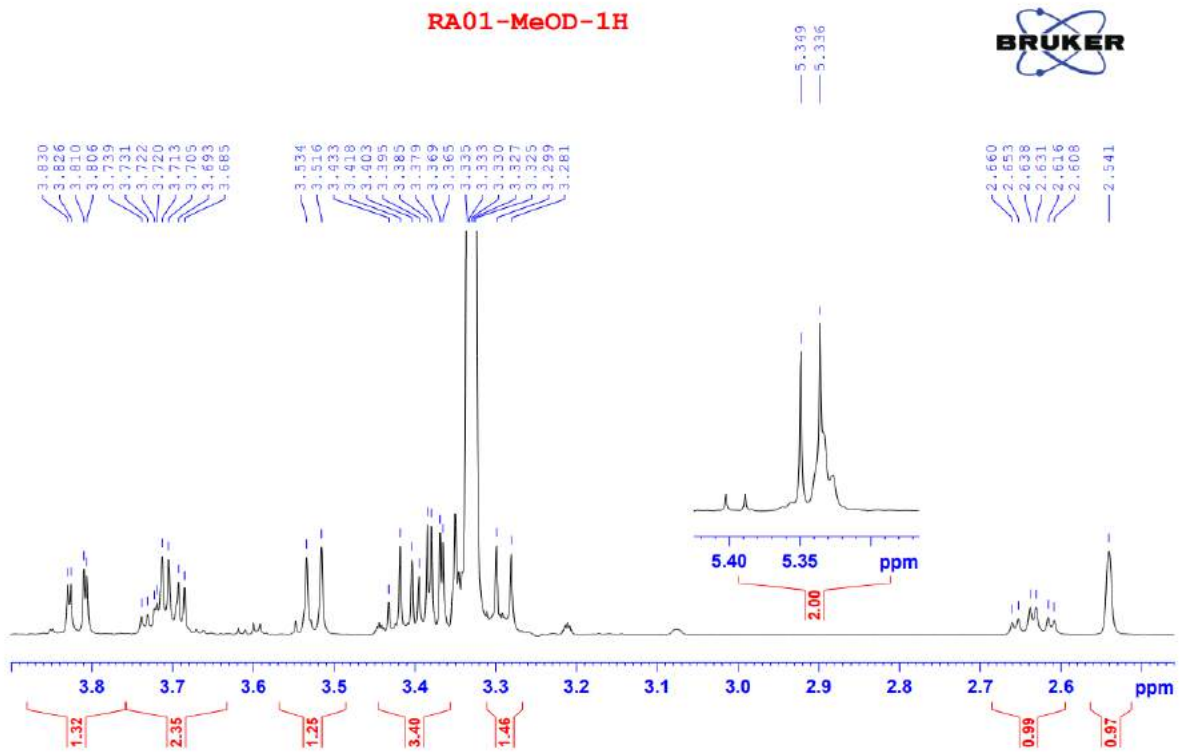
59. Staszowska-Karkut, M., & Materska, M. (2020). Phenolic Composition, Mineral Content, and Beneficial Bioactivities of Leaf Extracts from Black Currant (*Ribes nigrum* L.), Raspberry (*Rubus idaeus*), and Aronia (*Aronia melanocarpa*). *Nutrients, 12*(2), 463. https://doi.org/10.3390/nu12020463

60. Tian, J. L., Si, X., Wang, Y. H., Gong, E. S., Xie, X., Zhang, Y., Li, B., & Shu, C. (2021). Bioactive flavonoids from *Rubus corchorifolius* inhibit α-glucosidase and α-amylase to improve postprandial hyperglycemia. *Food chemistry, 341*(Pt 1), 128149. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.128149 .

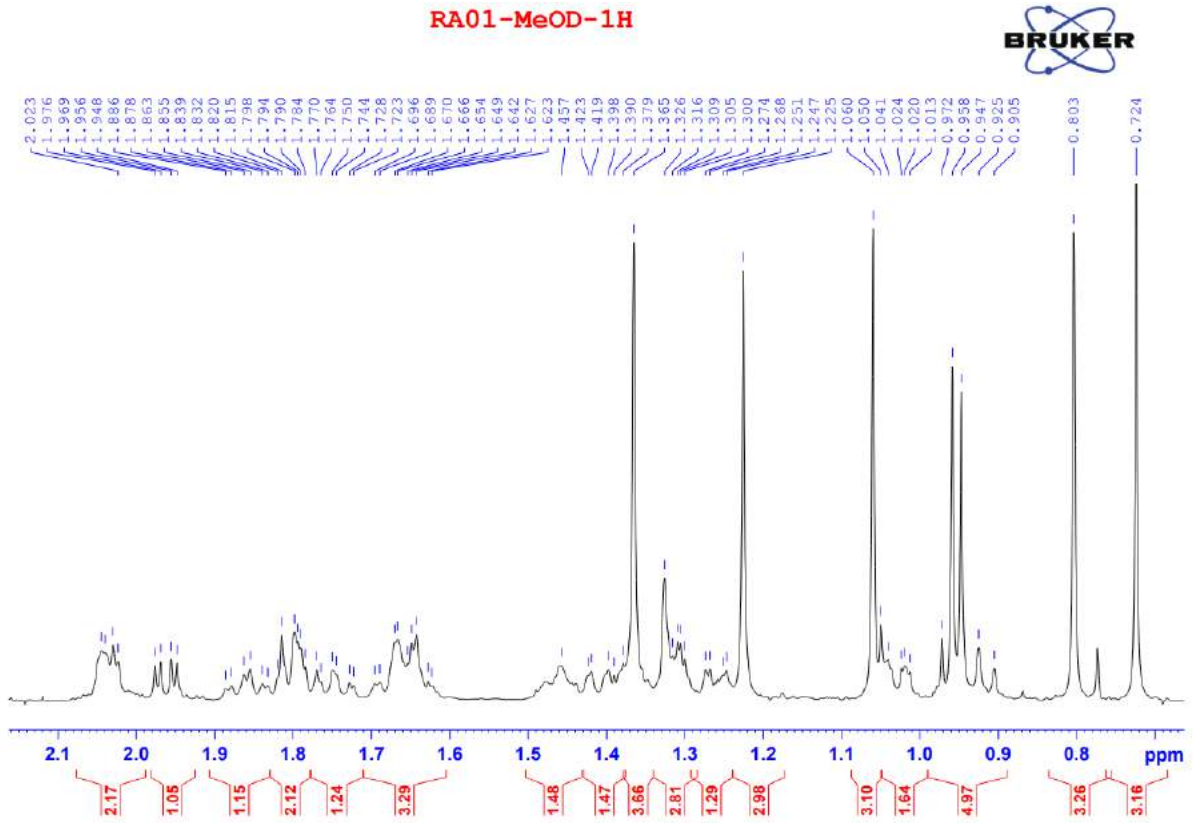
RA01-MeOD-1H



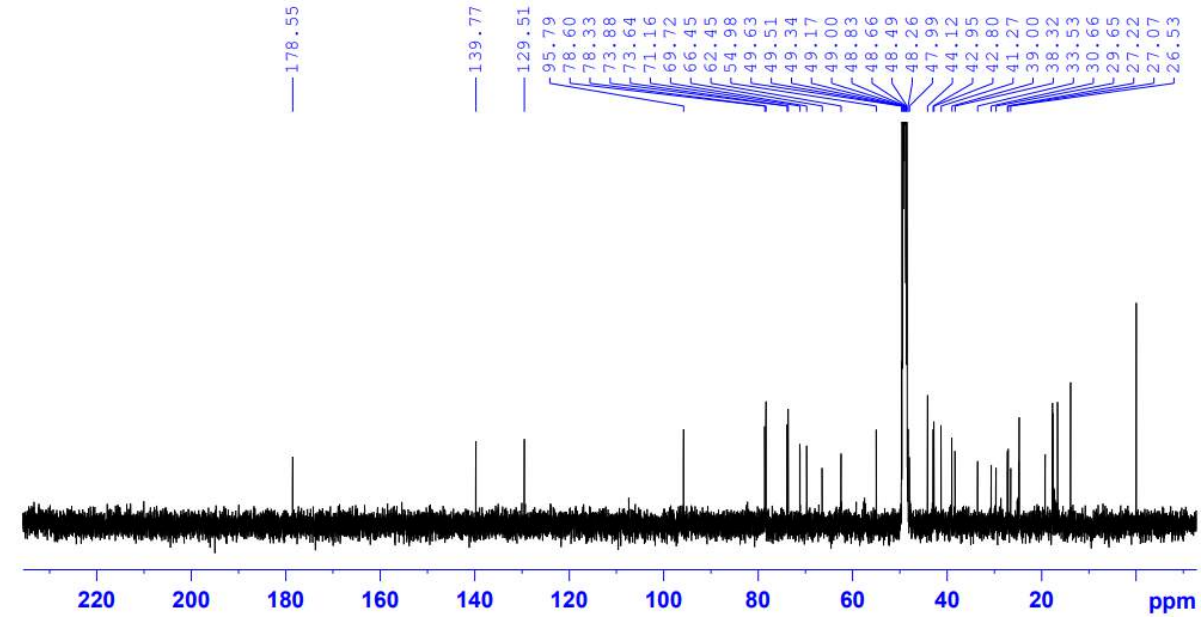
RA01-MeOD-1H

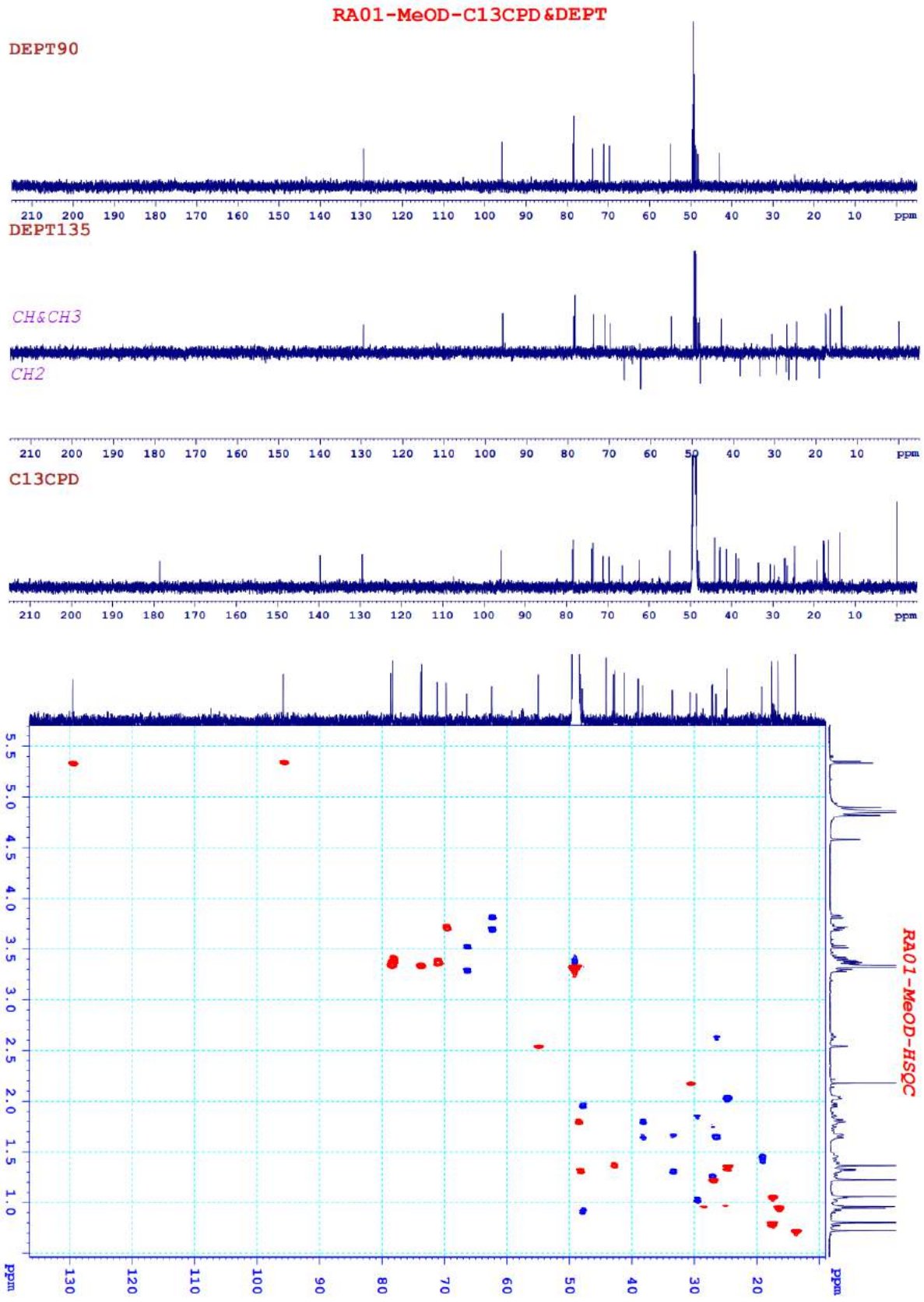


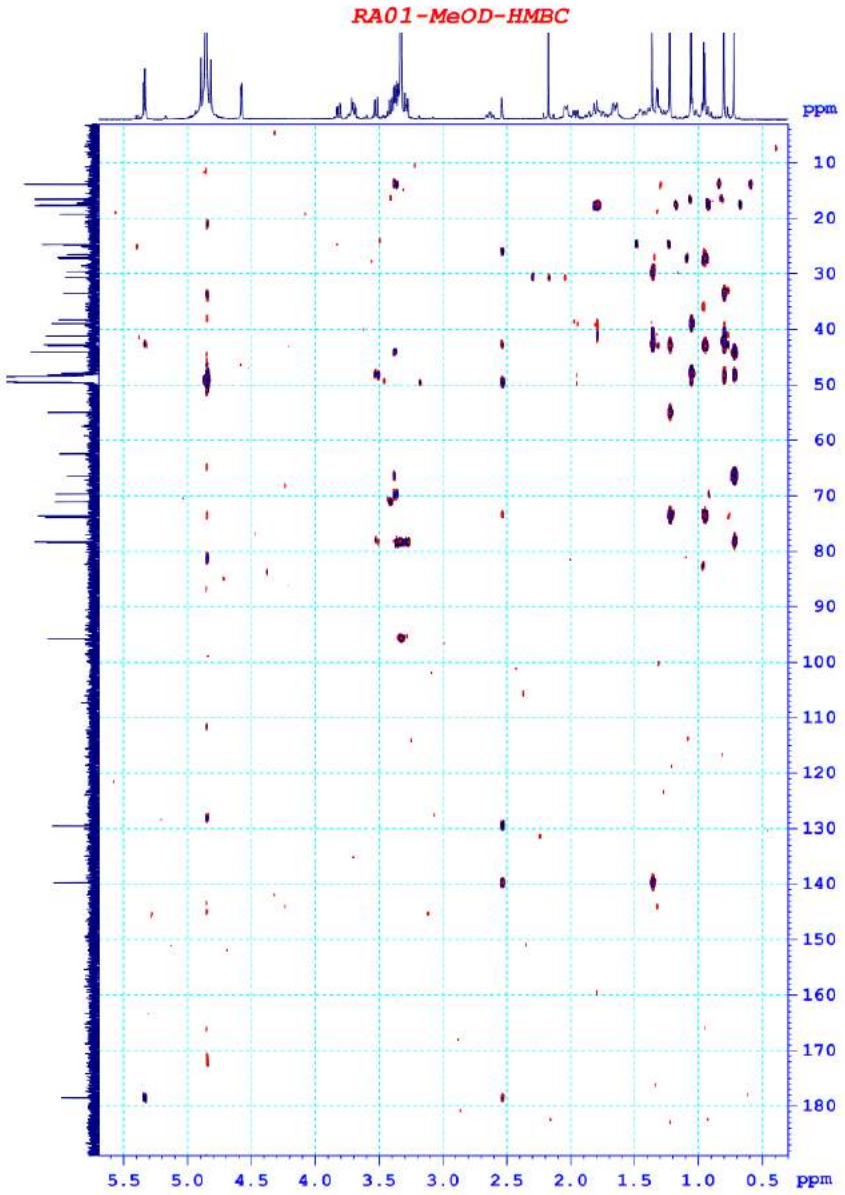
RA01-MeOD-1H

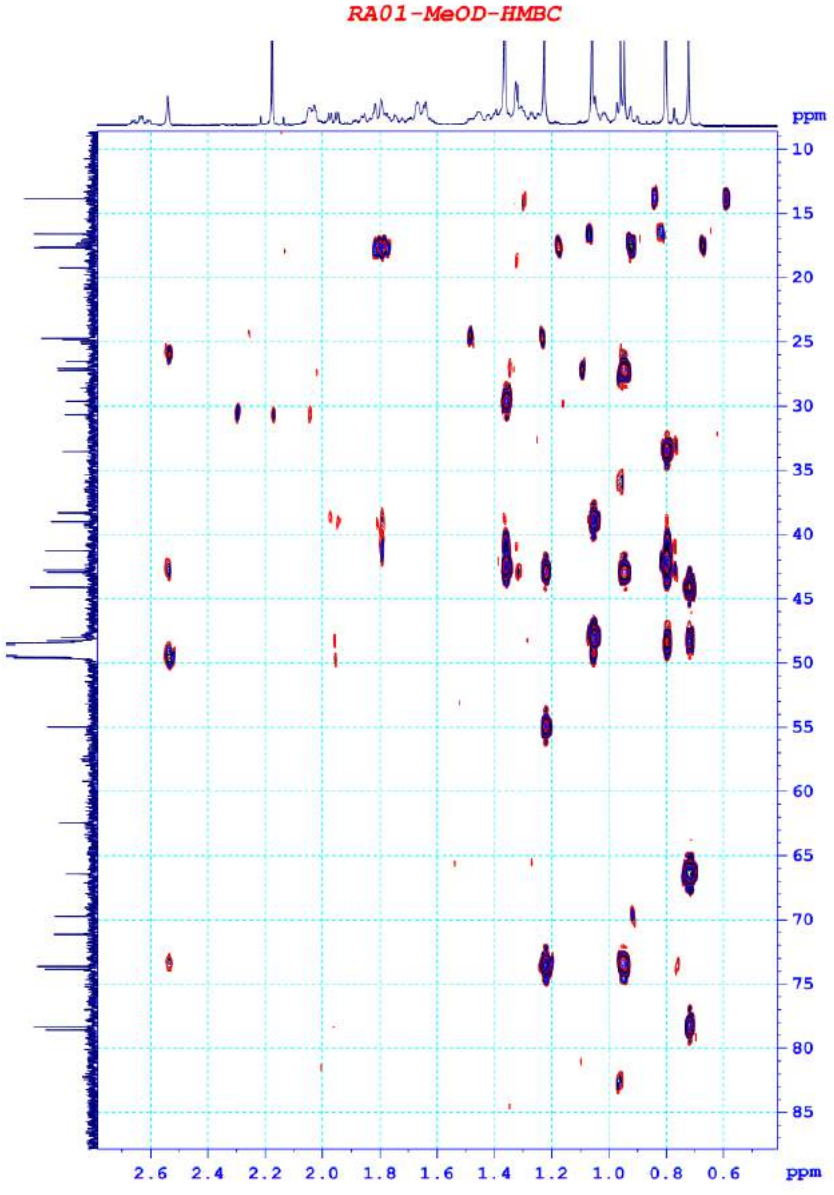


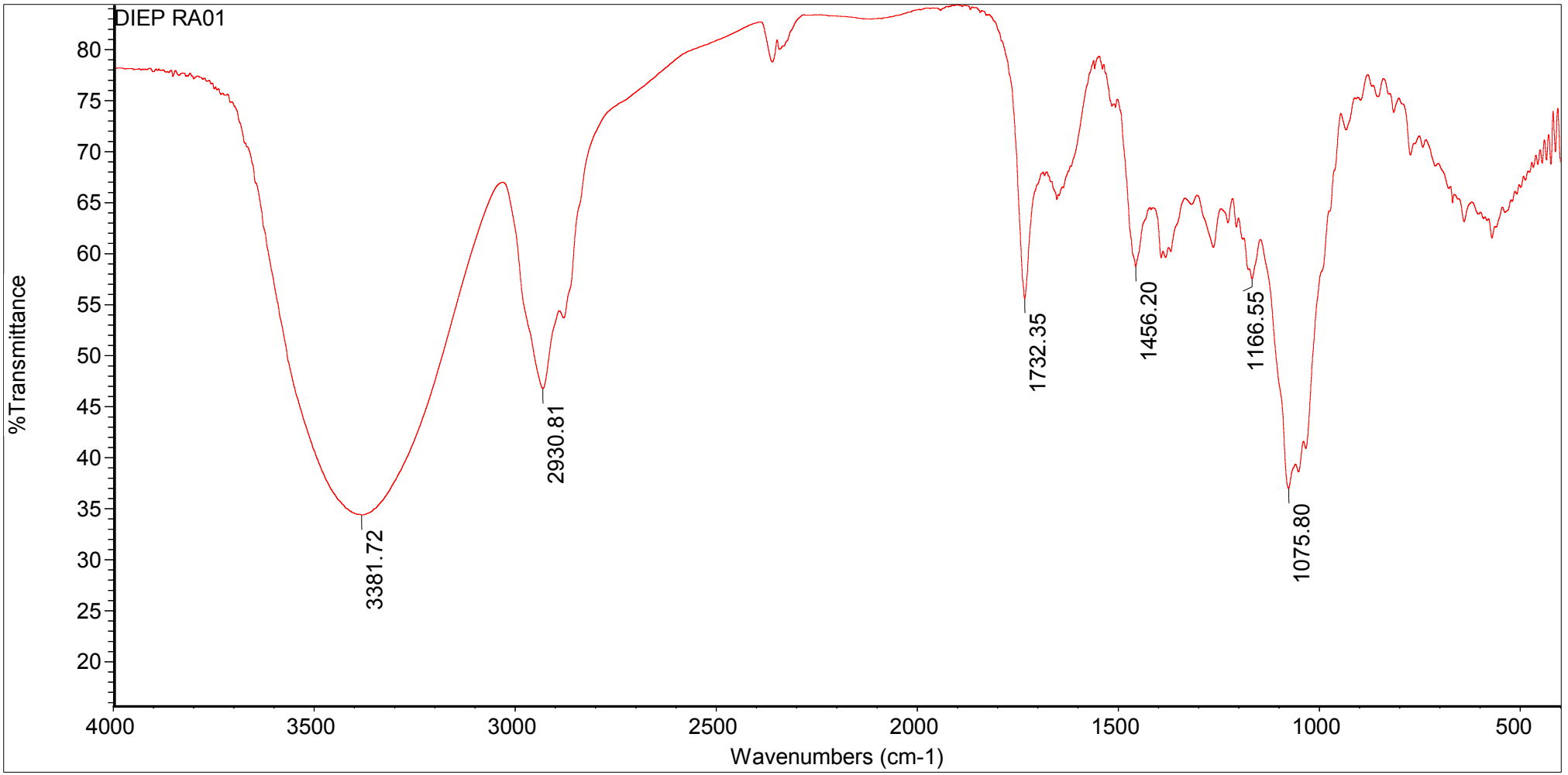
RA01-MeOD-C13CPD




RA01-MeOD-C13CPD&DEPT
DEPT90
DEPT135
CH&CH3
CH2
C13CPD
ppm
RA01-MeOD-HSQC


RA01-MeOD-HMBC
ppm
10
20
30
40
50
60
70
80
90
100
110
120
130
140
150
160
170
180
5.5
5.0
4.5
4.0
3.5
3.0
2.5
2.0
1.5
1.0
0.5
ppm


RA01-MeOD-HMBC
ppm
10
15
20
25
30
35
40
45
50
55
60
65
70
75
80
85
2.6
2.4
2.2
2.0
1.8
1.6
1.4
1.2
1.0
0.8
0.6
ppm

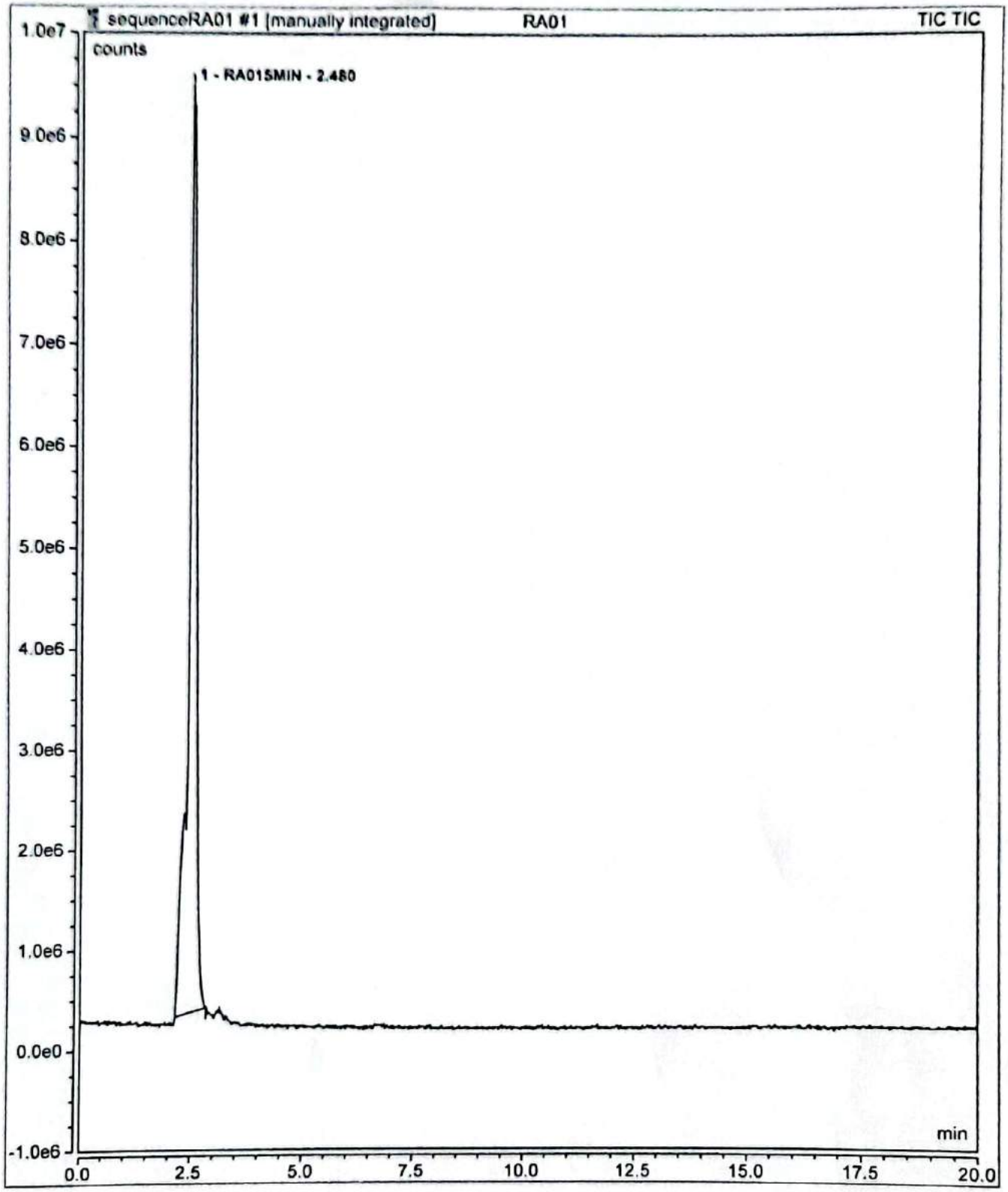


Wed Apr 20 11:57:40 2022 (GMT+07:00)
FIND PEAKS:

Spectrum:	DIEP RA01		
Region:	4000.00	400.00	
Absolute threshold:	59.352		
Sensitivity:	50		
Peak list:			

Position:	1075.80	Intensity:	36.980
Position:	1166.55	Intensity:	57.515
Position:	1456.20	Intensity:	58.681
Position:	1732.35	Intensity:	55.579
Position:	2930.81	Intensity:	46.742
Position:	3381.72	Intensity:	34.344

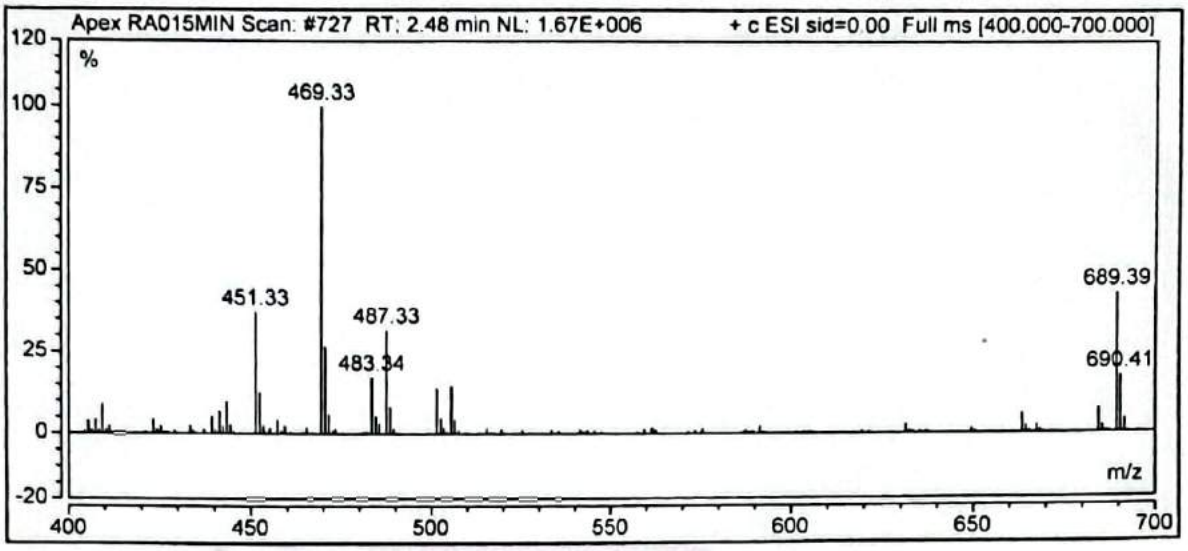
Chromatogram



Default MS Report/Chromatogram

© 2009-2020 Thermo Fisher Scientific Inc. All rights reserved.
Chromeleon 7.3.0.60919

Scanned with CamScanner

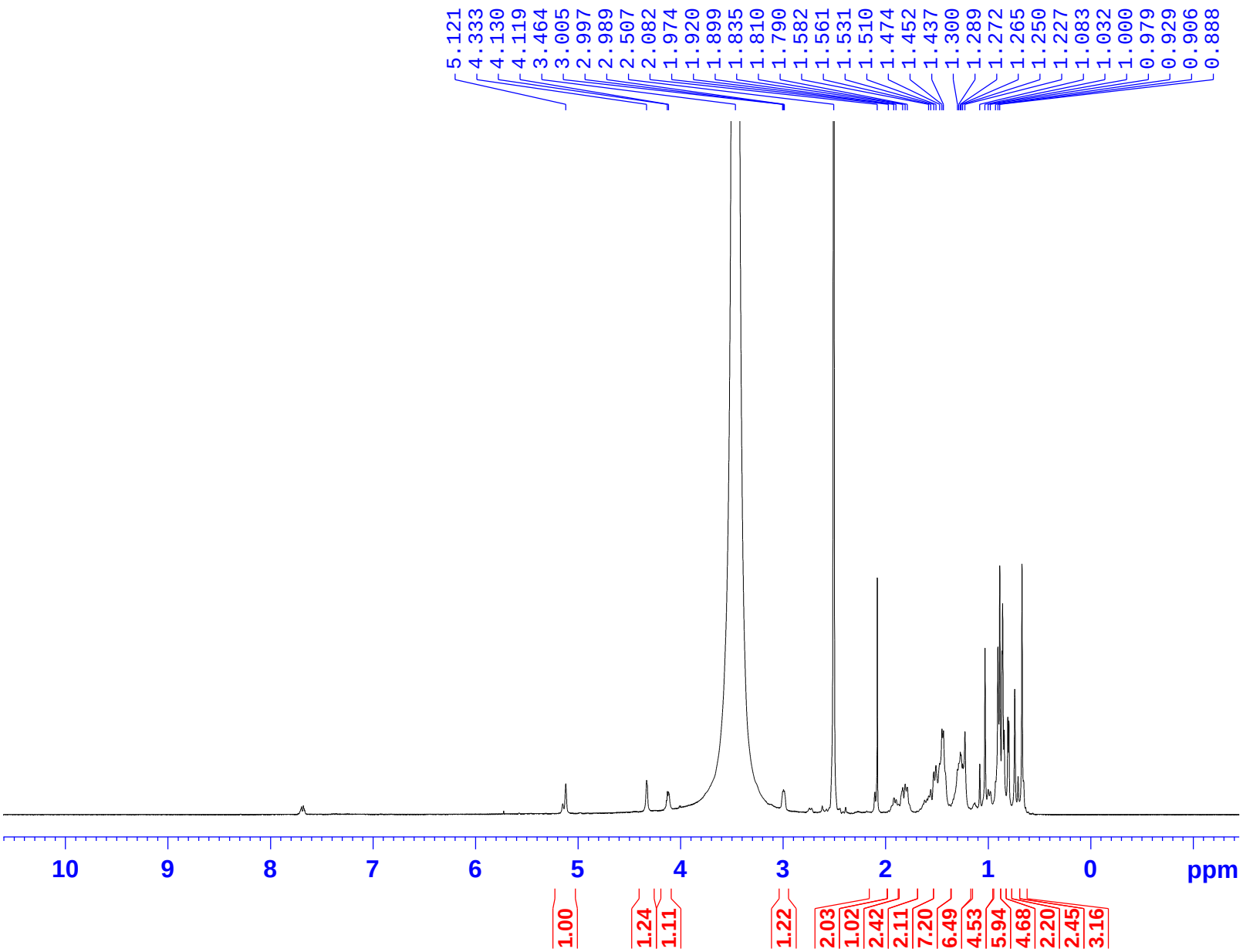


Default MS Report/Chromatogram

© 2009-2020 Thermo Fisher Scientific Inc. All rights reserved.
Chromeleon 7.3.0.60919

Scanned with CamScanner

RA02-DMSO-1H

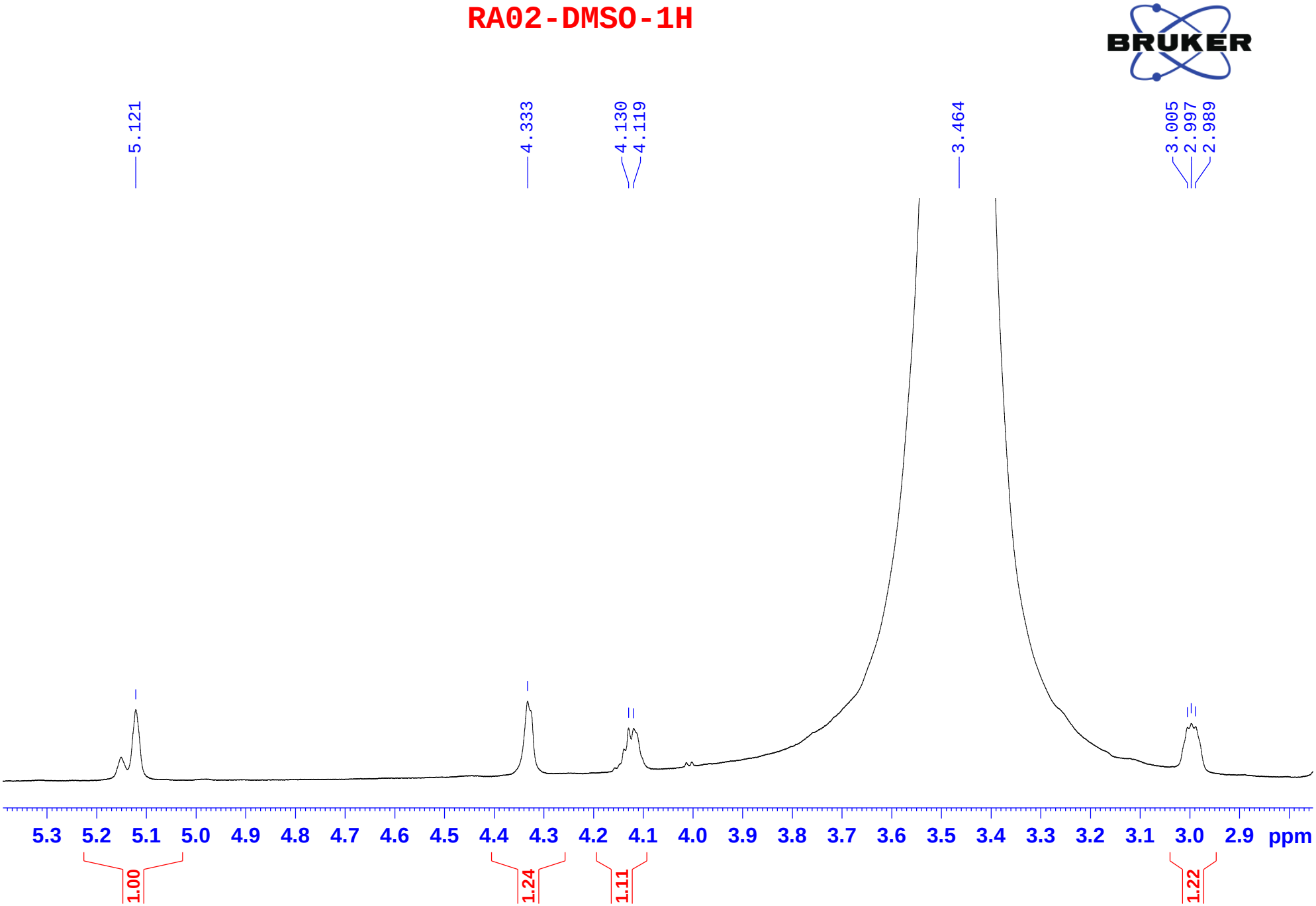



```
Current Data Parameters
NAME        110DIEP_RA02
EXPNO                  1
PROCNO                 1

F2 - Acquisition Parameters
Date_           20220415
Time                5.20 h
INSTRUM  AvanceNEO_600MHz
PROBHD   Z814601_0129 (
PULPROG             zg30
TD                 65536
SOLVENT             DMSO
NS                    16
DS                     2
SWH            11904.762 Hz
FIDRES          0.363304 Hz
AQ             2.7525120 sec
RG               46.2222
DW                42.000 usec
DE                 9.08 usec
TE                303.2 K
D1           1.00000000 sec
TD0                    1
SFO1         600.4037075 MHz
NUC1                  1H
P0                 2.77 usec
P1                 8.30 usec
PLW1         13.36600018 W

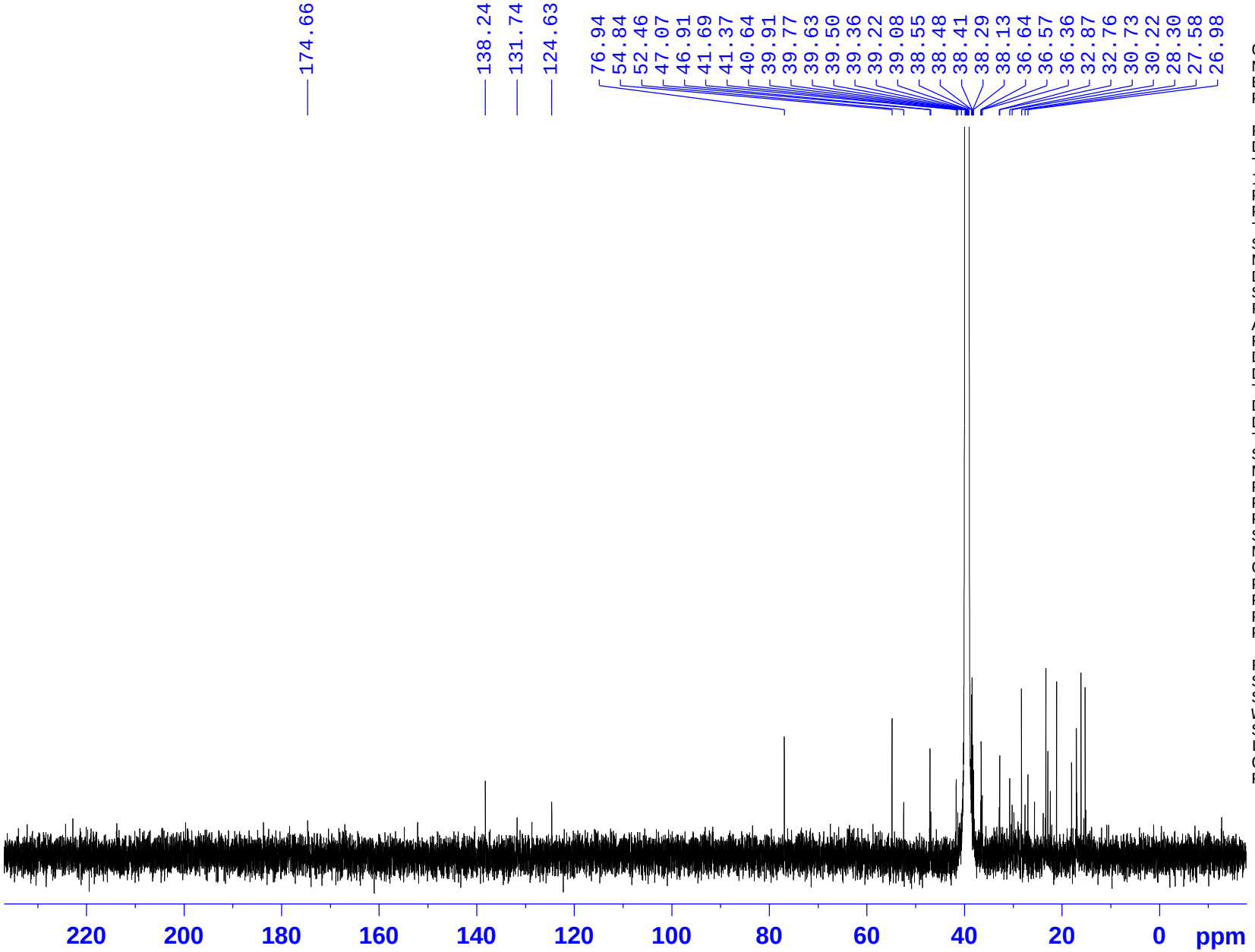
F2 - Processing parameters
SI                 65536
SF           600.4000000 MHz
WDW                   EM
SSB       0
LB                 0.30 Hz
GB        0
PC                 1.00
```

RA02-DMSO-1H


5.121
4.333
4.130
4.119
3.464
3.005
2.997
2.989
5.3 5.2 5.1 5.0 4.9 4.8 4.7 4.6 4.5 4.4 4.3 4.2 4.1 4.0 3.9 3.8 3.7 3.6 3.5 3.4 3.3 3.2 3.1 3.0 2.9 ppm
1.00
1.24
1.11
1.22

RA02-DMSO-1H
2.082
1.974
1.920
1.899
1.835
1.810
1.790
1.582
1.561
1.531
1.510
1.474
1.452
1.437
1.300
1.289
1.272
1.265
1.250
1.227
1.083
1.032
1.000
0.979
0.929
0.906
0.888
0.866
0.860
0.845
0.809
0.799
0.742
0.709
0.671
0.655
2.03
1.02
2.42
2.11
7.20
6.49
4.53
5.94
4.68
2.20
2.45
3.16
2.2
2.1
2.0
1.9
1.8
1.7
1.6
1.5
1.4
1.3
1.2
1.1
1.0
0.9
0.8
0.7
0.6
ppm
BRUKER

RA02-DMSO-C13CPD



Current Data Parameters

NAME	110DIEP_RA02
EXPNO	2
PROCNO	1

F2 - Acquisition Parameters

Date_	20220415
Time	8.40 h
INSTRUM	AvanceNEO_600MHz
PROBHD	Z814601_0129 (
PULPROG	zgpg30
TD	65536
SOLVENT	DMSO
NS	4096
DS	4
SWH	38461.539 Hz
FIDRES	1.173753 Hz
AQ	0.8519680 sec
RG	101
DW	13.000 usec
DE	6.50 usec
TE	303.1 K
D1	2.00000000 sec
D11	0.03000000 sec
TD0	1
SFO1	150.9873069 MHz
NUC1	13C
P0	5.33 usec
P1	16.00 usec
PLW1	113.90000153 W
SFO2	600.4024016 MHz
NUC2	1H
CPDPRG[2	waltz65
PCPD2	70.00 usec
PLW2	13.36600018 W
PLW12	0.18792000 W
PLW13	0.09452000 W

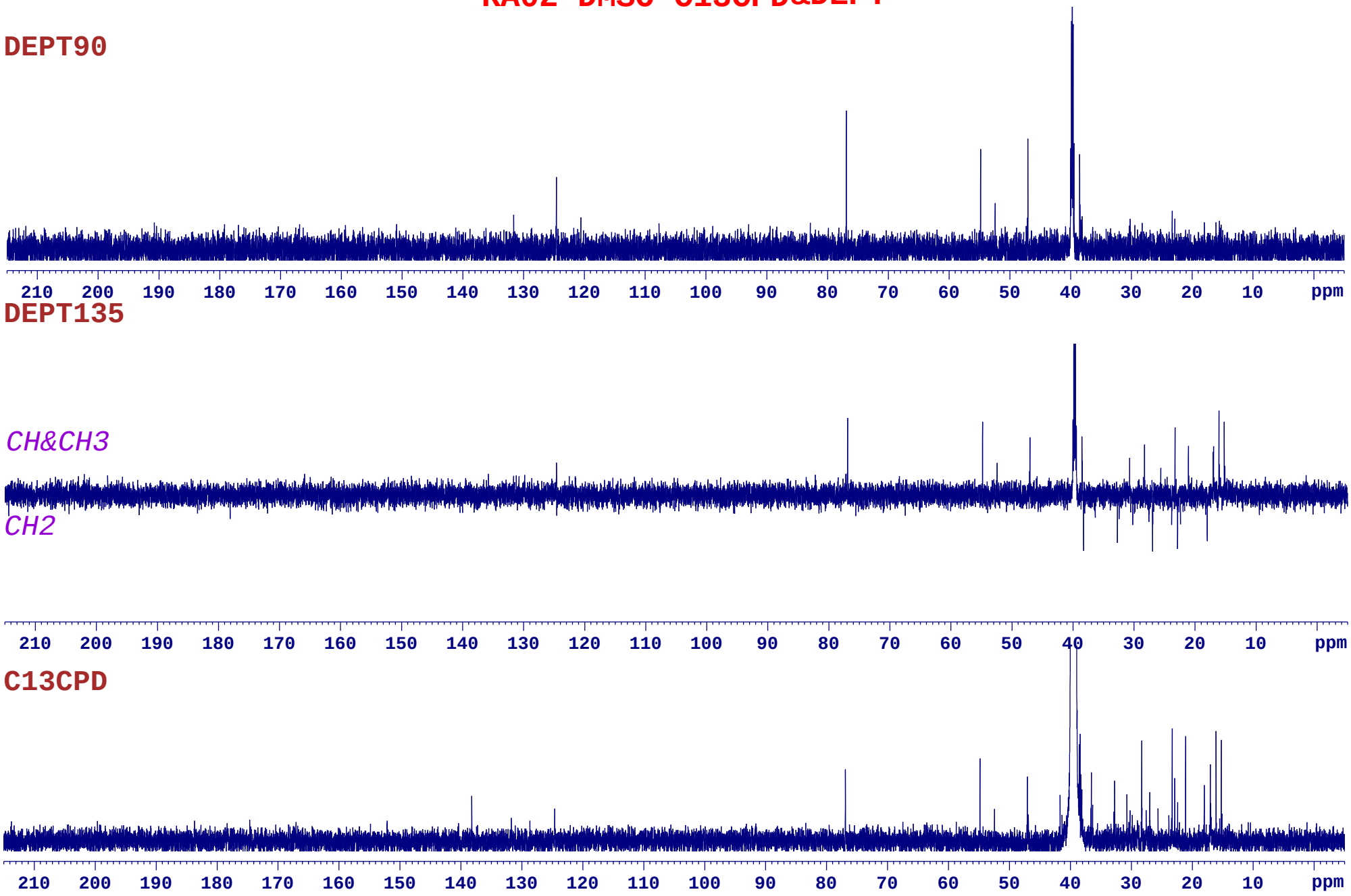
F2 - Processing parameters

SI	32768
SF	150.9707629 MHz
WDW	EM
SSB	0
LB	1.00 Hz
GB	0
PC	1.00

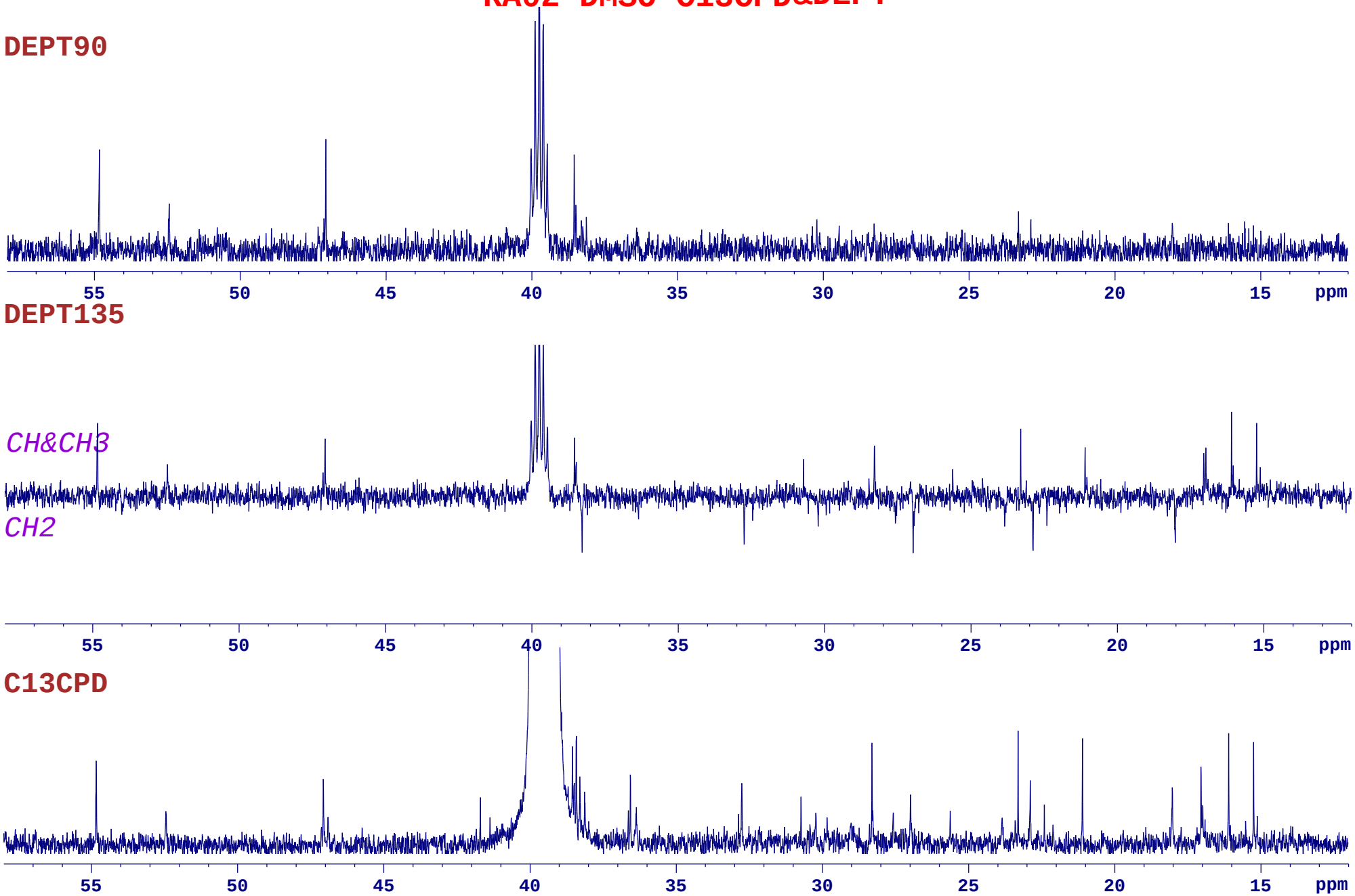
174.66
138.24
131.74
124.63
76.94
54.84
52.46
47.07
46.91
41.69
41.37
40.64
39.91
39.77
39.63
39.50
39.36
39.22
39.08
38.55
38.48
38.41
38.29
38.13
36.64
36.57
36.36
32.87
32.76
30.73
30.22
28.30
27.58
26.98
25.63
23.30
22.89
170
160
150
140
130
120
110
100
90
80
70
60
50
40
30
20
10
ppm
RA02-DMSO-C13CPD
BRUKER

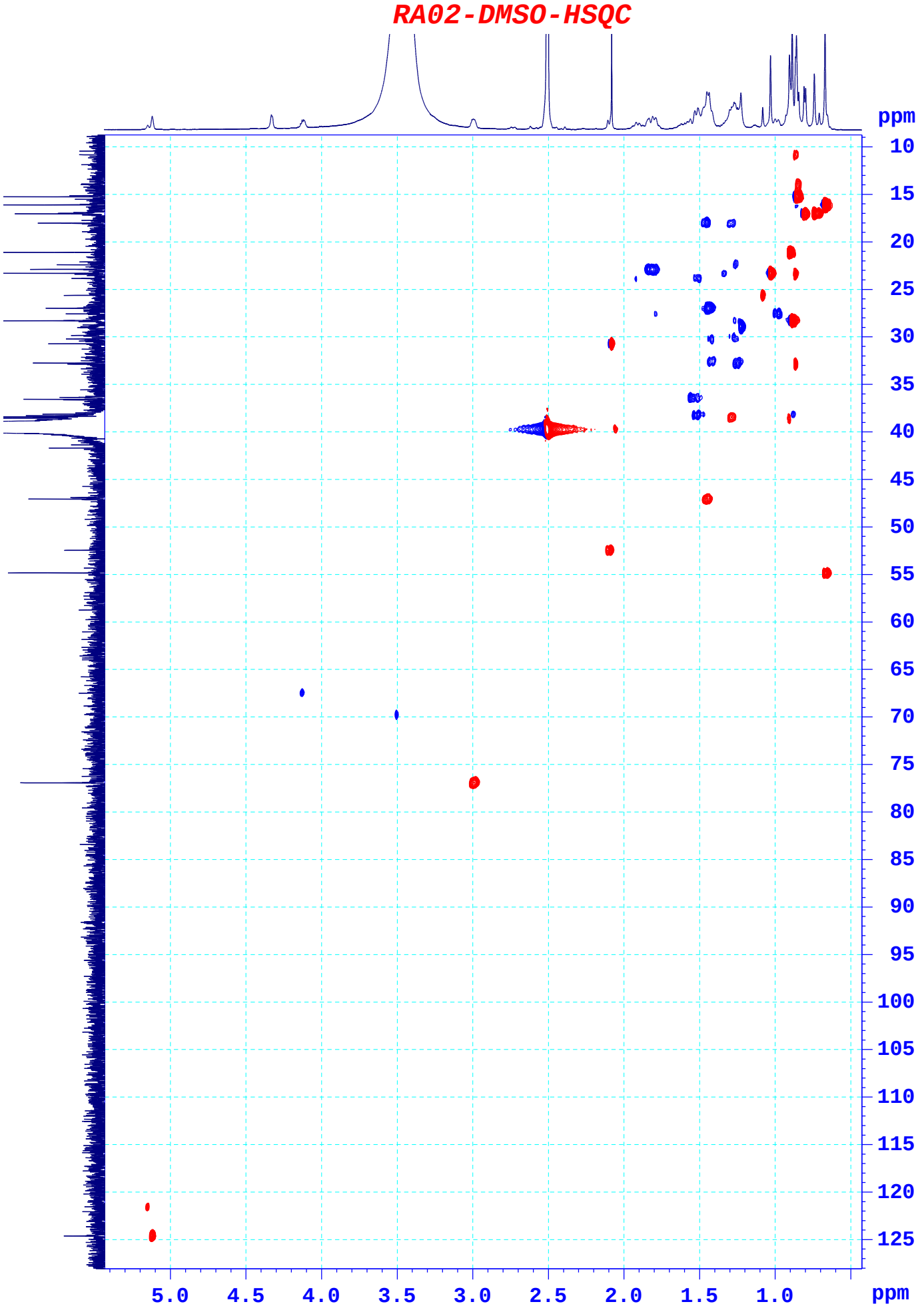
55
50
45
40
35
30
25
20
15
ppm
54.84
52.46
47.07
46.91
41.69
41.37
40.64
39.91
39.77
39.63
39.50
39.36
39.22
39.08
38.55
38.48
38.41
38.29
38.13
36.64
36.57
36.36
32.87
32.76
30.73
30.22
28.30
27.58
26.98
25.63
23.30
22.89
22.41
21.10
18.03
17.05
16.99
16.10
15.25
RA02-DMSO-C13CPD
BRUKER

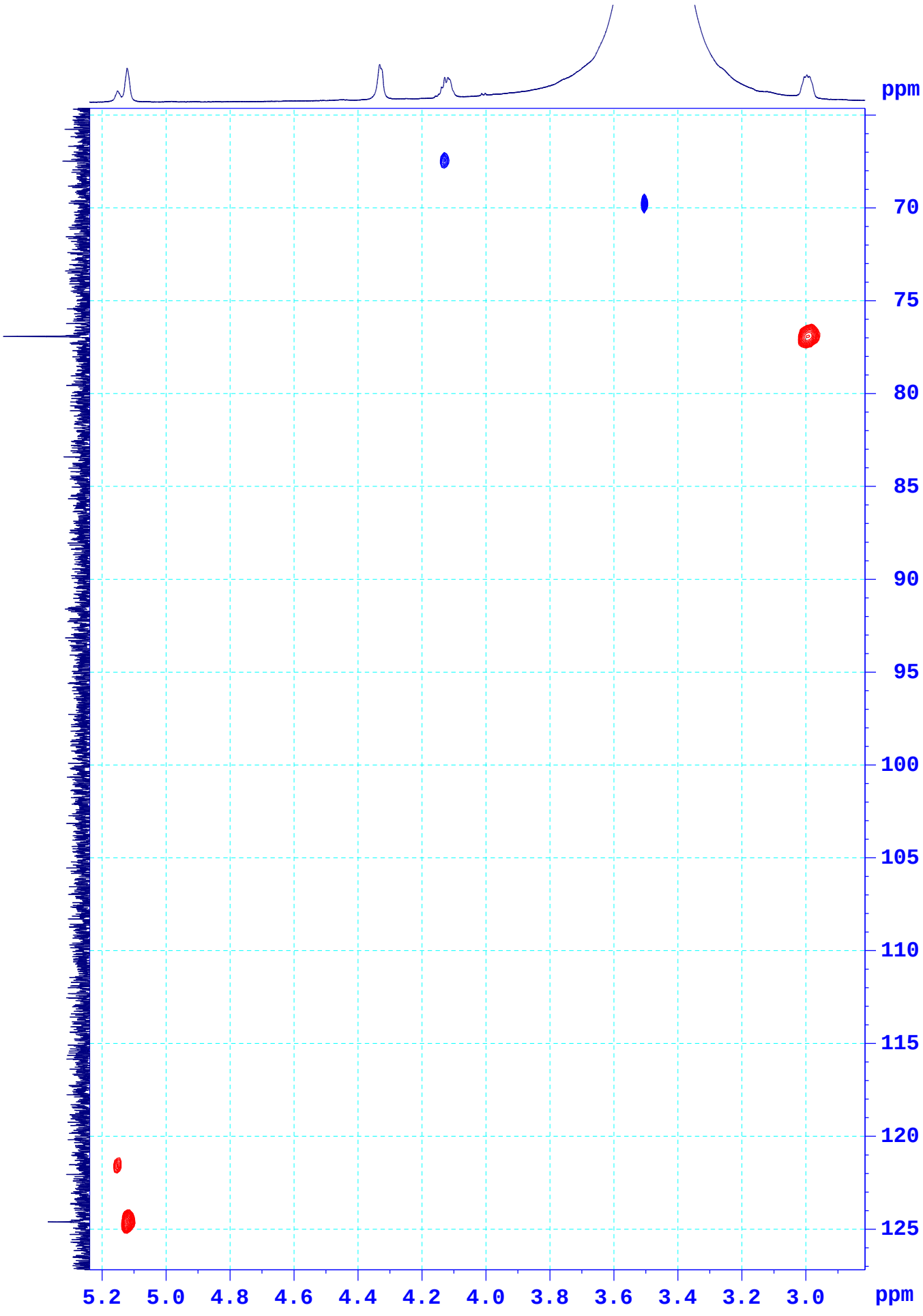
RA02-DMSO-C13CPD&DEPT

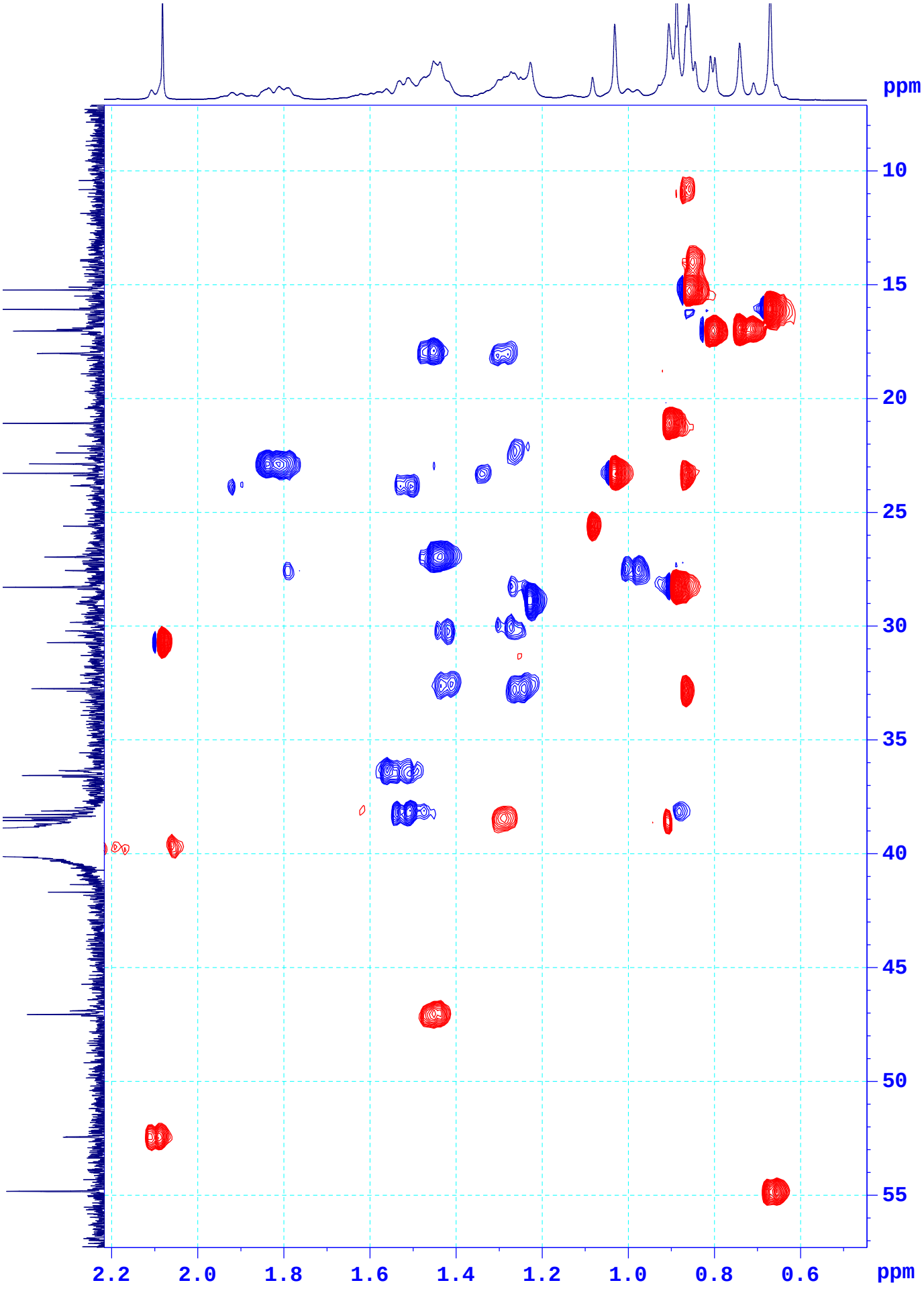


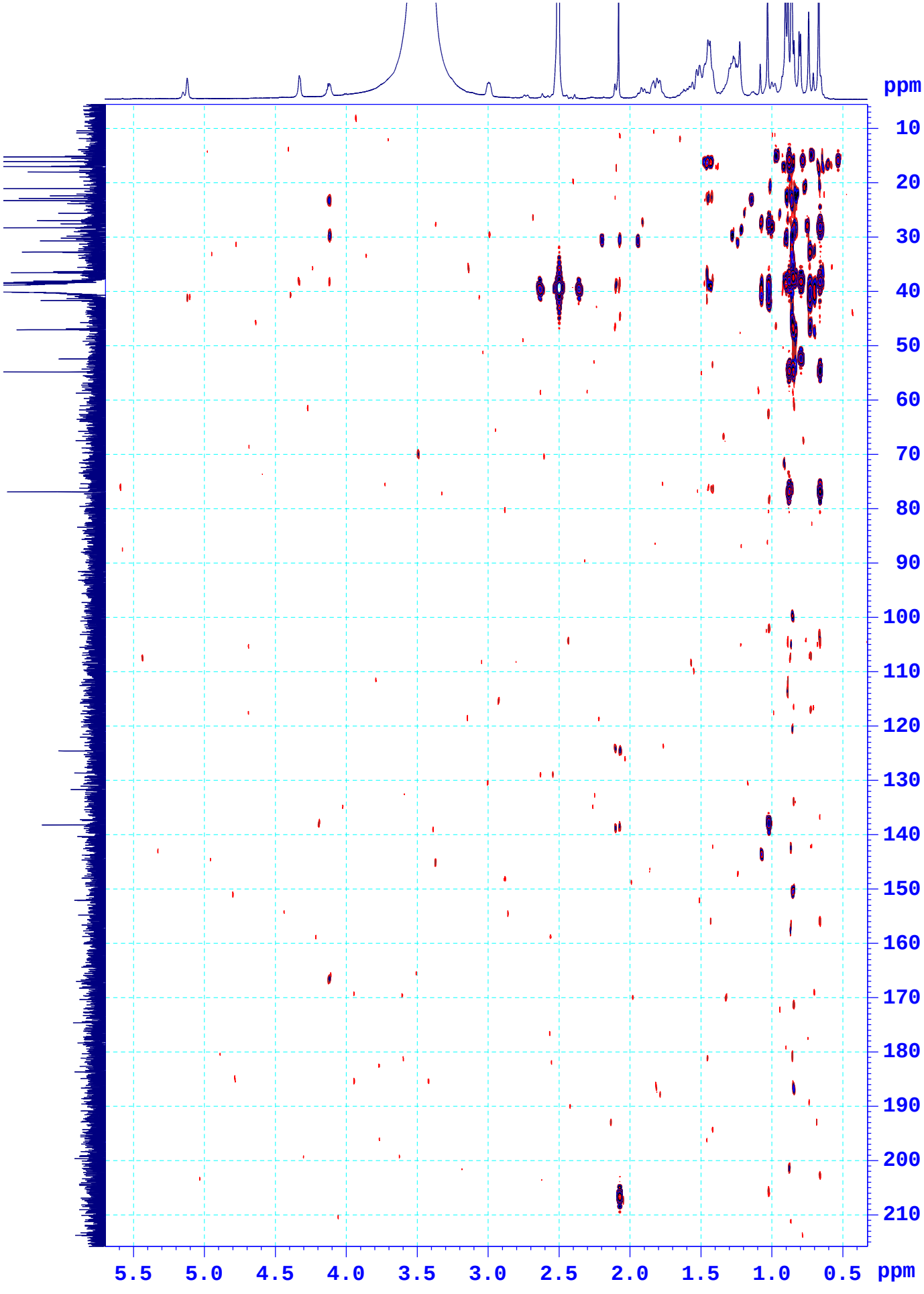
RA02-DMSO-C13CPD&DEPT



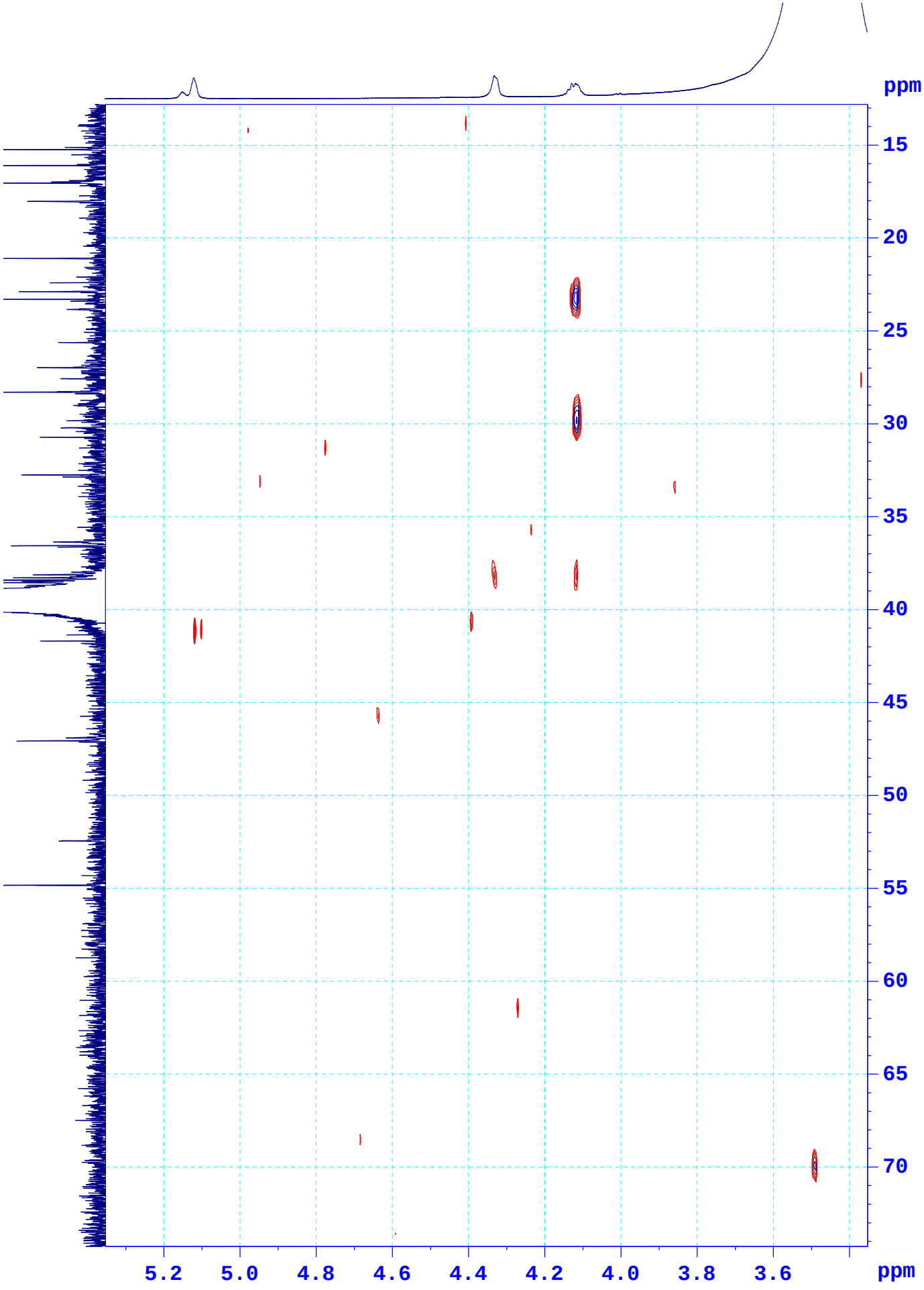

RA02-DMSO-HSQC
ppm
10
15
20
25
30
35
40
45
50
55
60
65
70
75
80
85
90
95
100
105
110
115
120
125
5.0
4.5
4.0
3.5
3.0
2.5
2.0
1.5
1.0
ppm


RA02-DMSO-HSQC
ppm
70
75
80
85
90
95
100
105
110
115
120
125
5.2
5.0
4.8
4.6
4.4
4.2
4.0
3.8
3.6
3.4
3.2
3.0
ppm

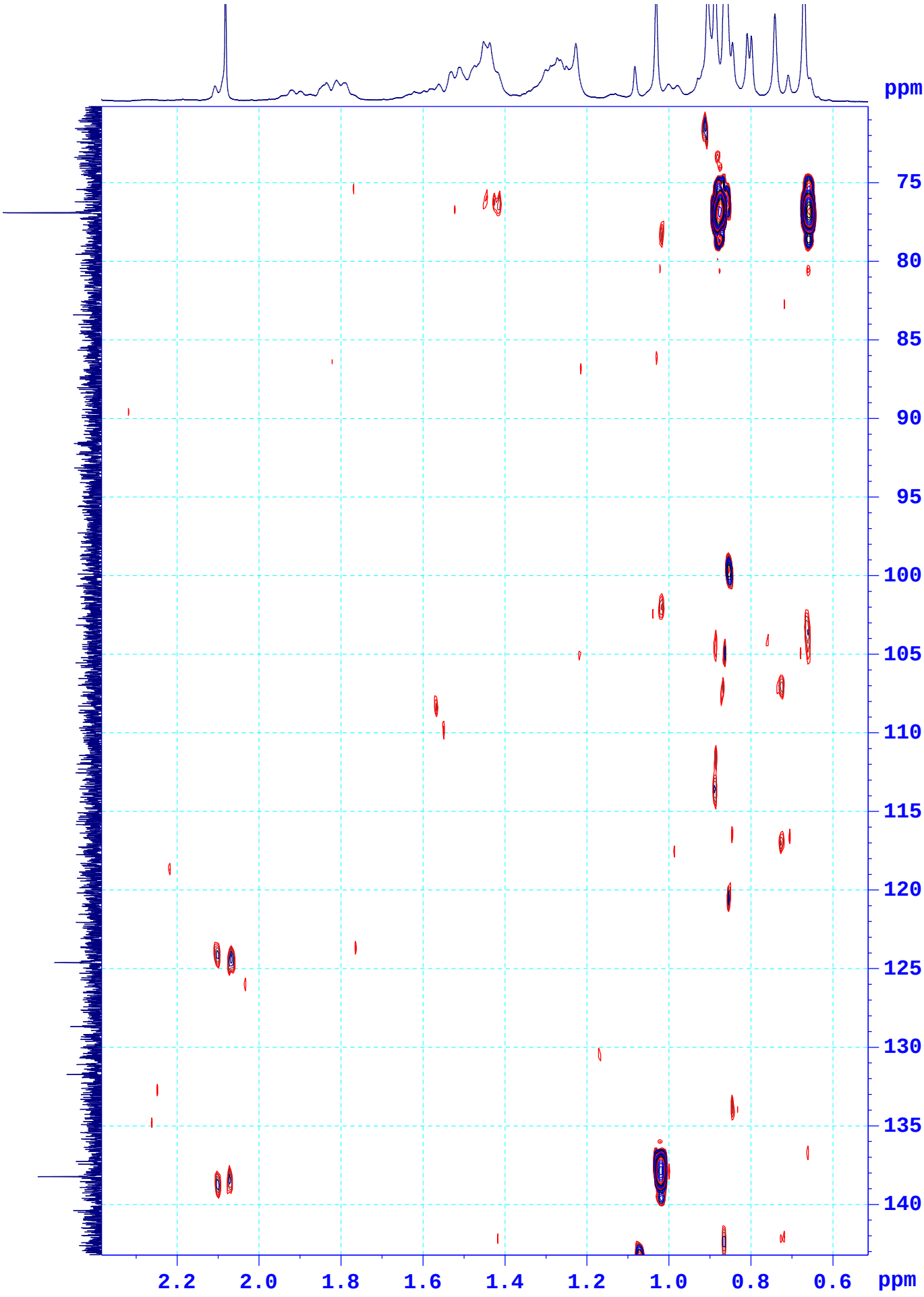

RA02-DMSO-HSQC
ppm
10
15
20
25
30
35
40
45
50
55
2.2
2.0
1.8
1.6
1.4
1.2
1.0
0.8
0.6
ppm


RA02-DMSO-HMBC
ppm
10
20
30
40
50
60
70
80
90
100
110
120
130
140
150
160
170
180
190
200
210
5.5
5.0
4.5
4.0
3.5
3.0
2.5
2.0
1.5
1.0
0.5
ppm

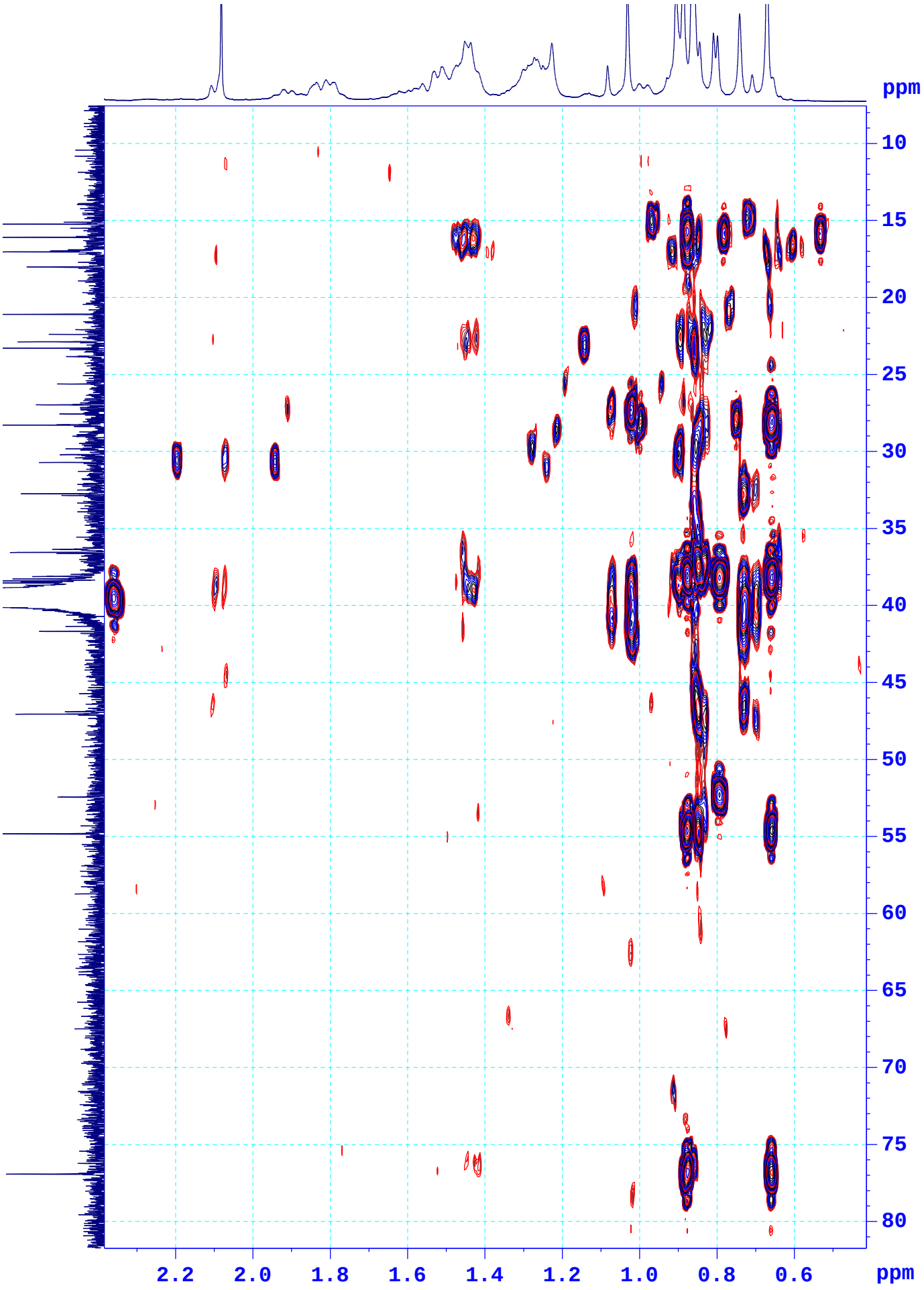
RA02-DMSO-HMBC

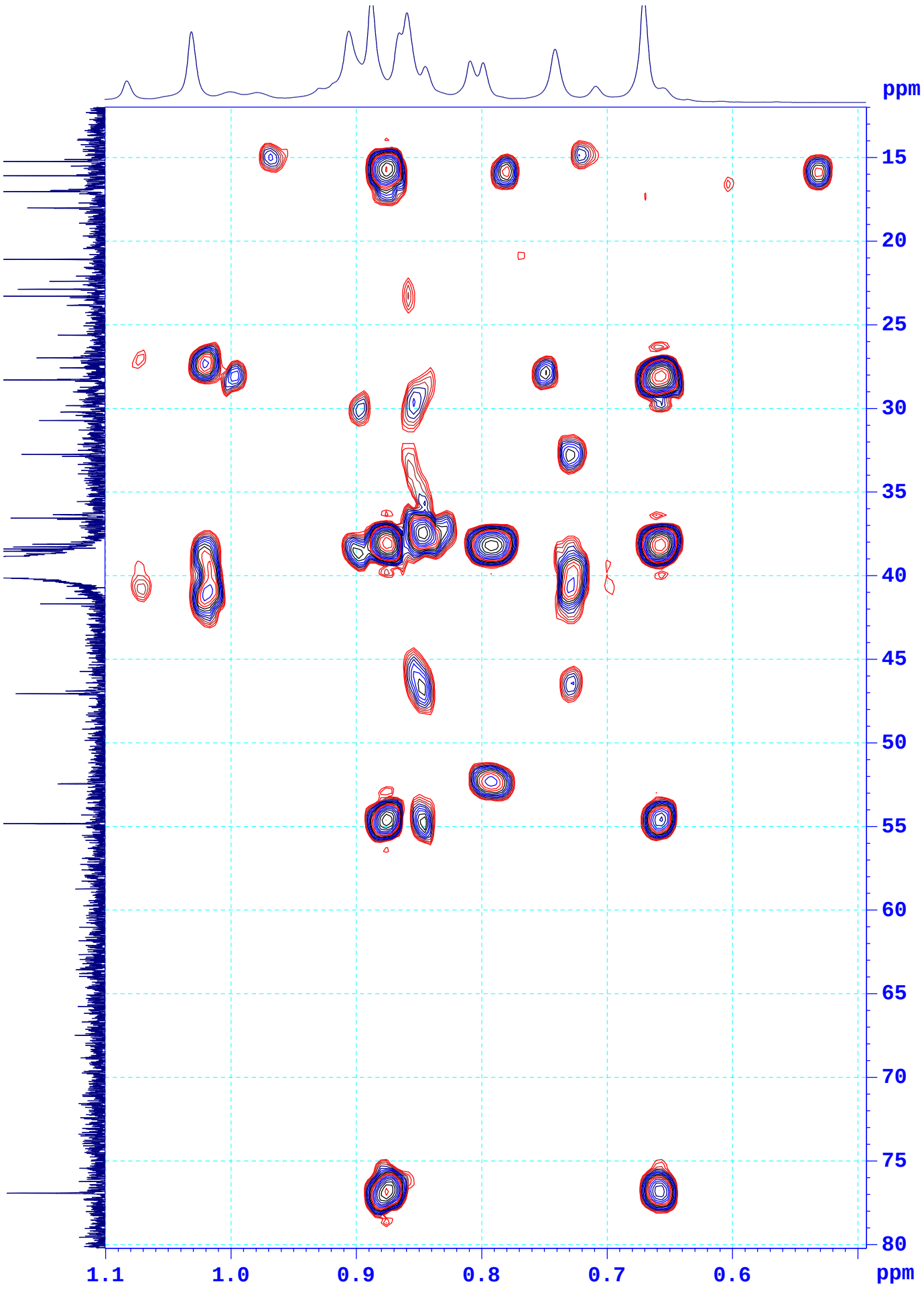


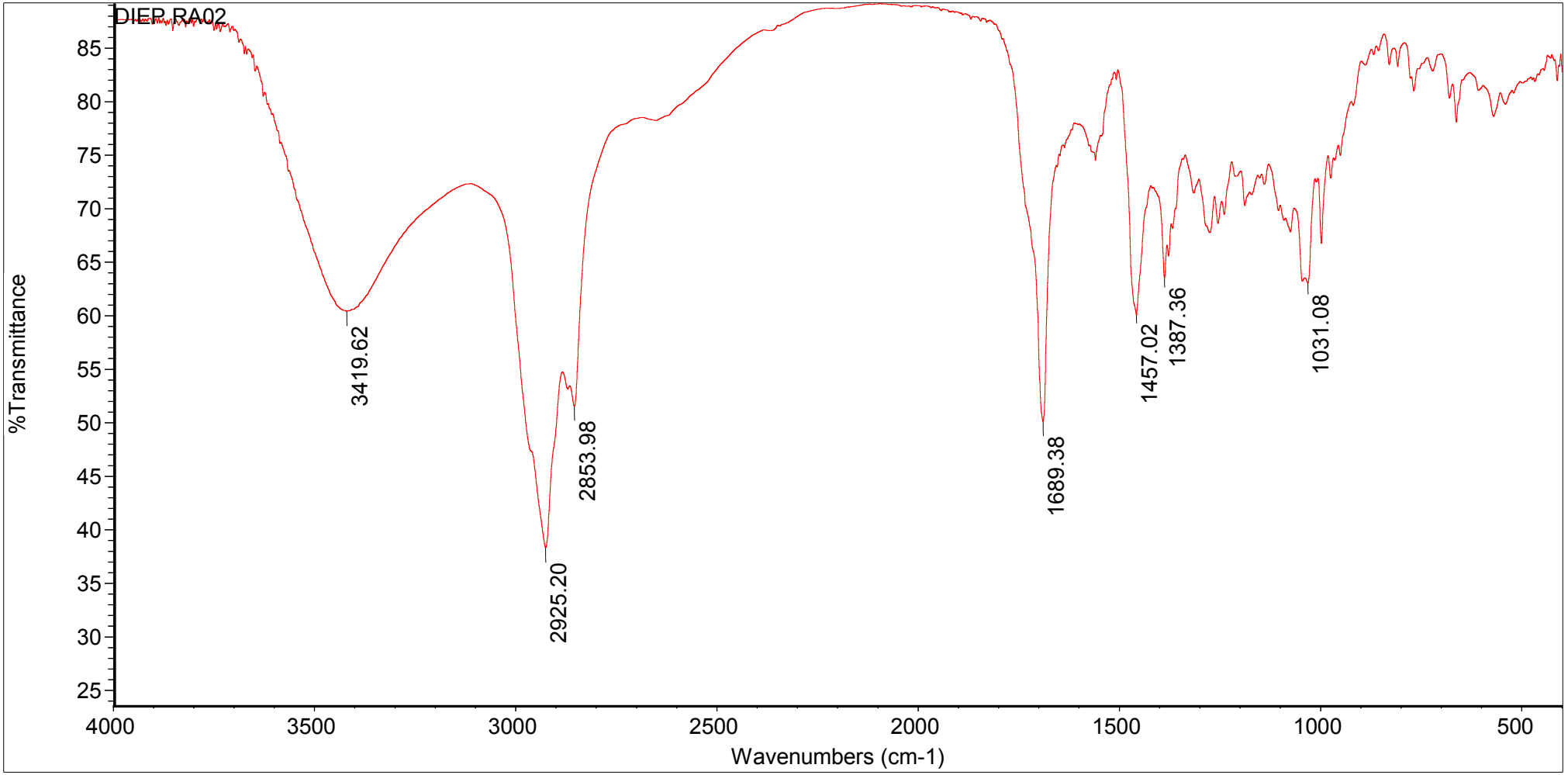
RA02-DMSO-HMBC



RA02-DMSO-HMBC




RA02-DMSO-HMBC
ppm
15
20
25
30
35
40
45
50
55
60
65
70
75
80
1.1
1.0
0.9
0.8
0.7
0.6
ppm

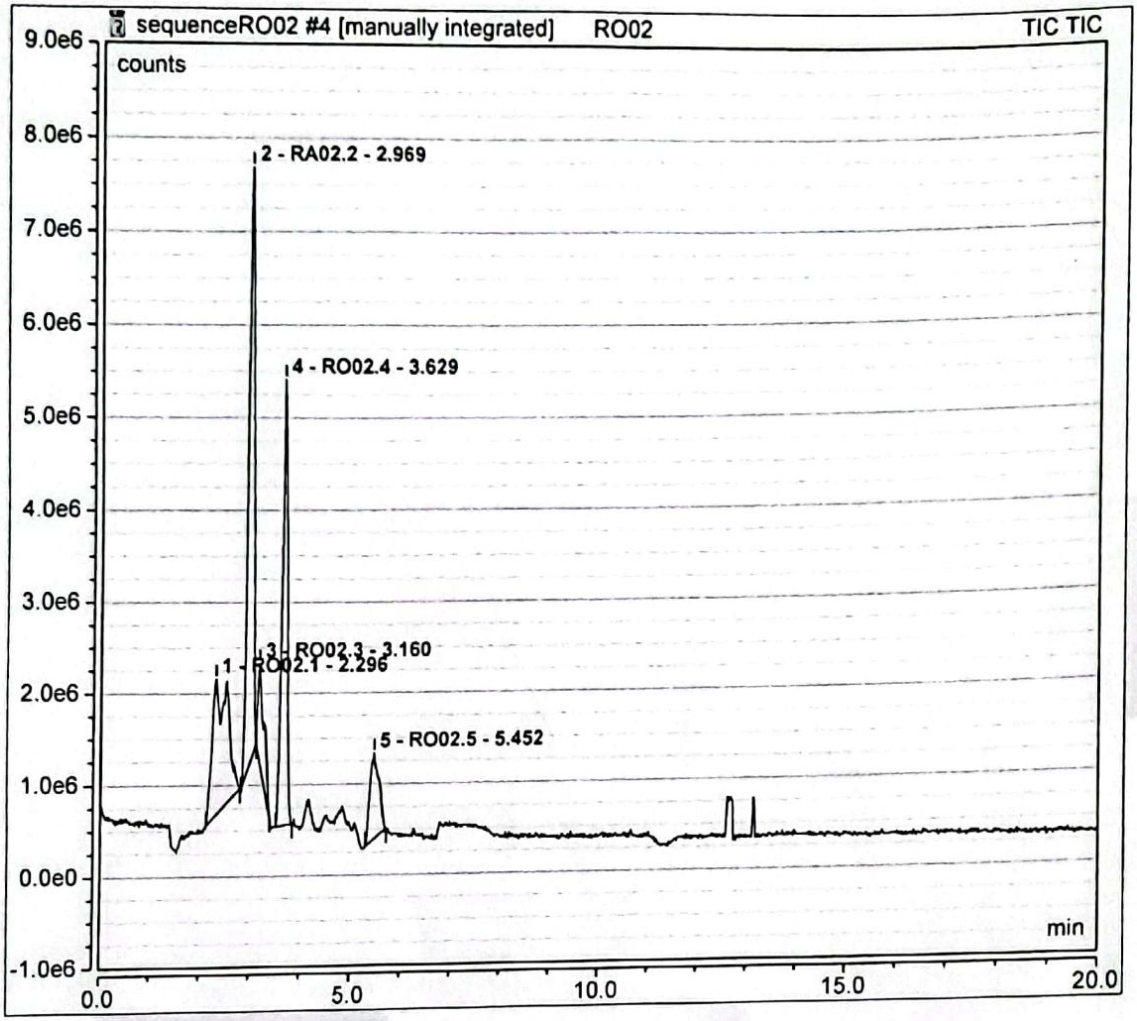


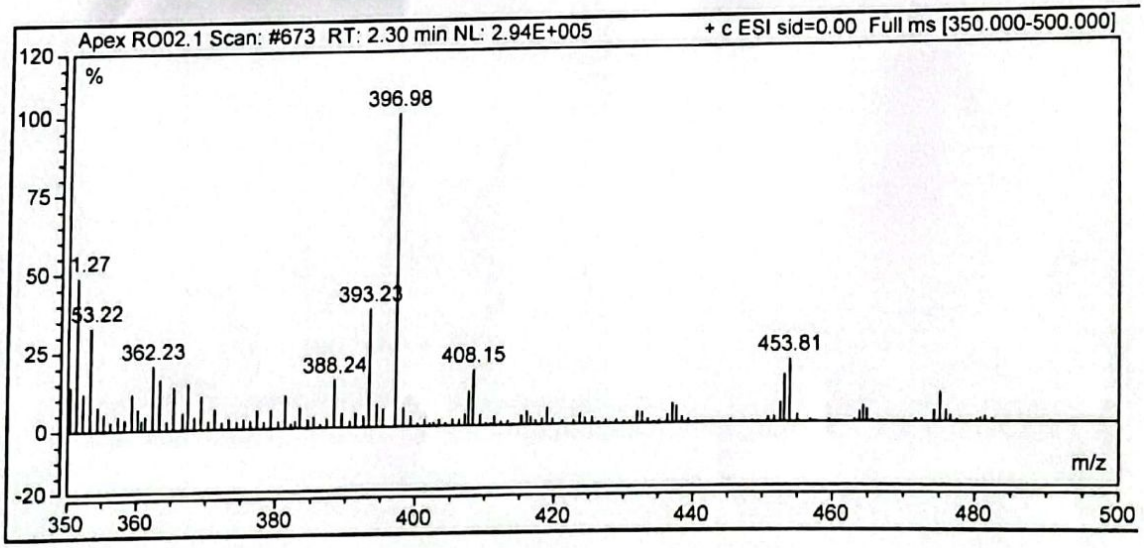
Wed Apr 20 12:12:31 2022 (GMT+07:00)
FIND PEAKS:

Spectrum: DIEP RA02
Region: 4000.00 400.00
Absolute threshold: 64.249
Sensitivity: 52
Peak list:

Position:	1031.08	Intensity:	63.023
Position:	1387.36	Intensity:	63.429
Position:	1457.02	Intensity:	60.024
Position:	1689.38	Intensity:	50.087
Position:	2853.98	Intensity:	51.519
Position:	2925.20	Intensity:	38.314
Position:	3419.62	Intensity:	60.379

Chromatogram

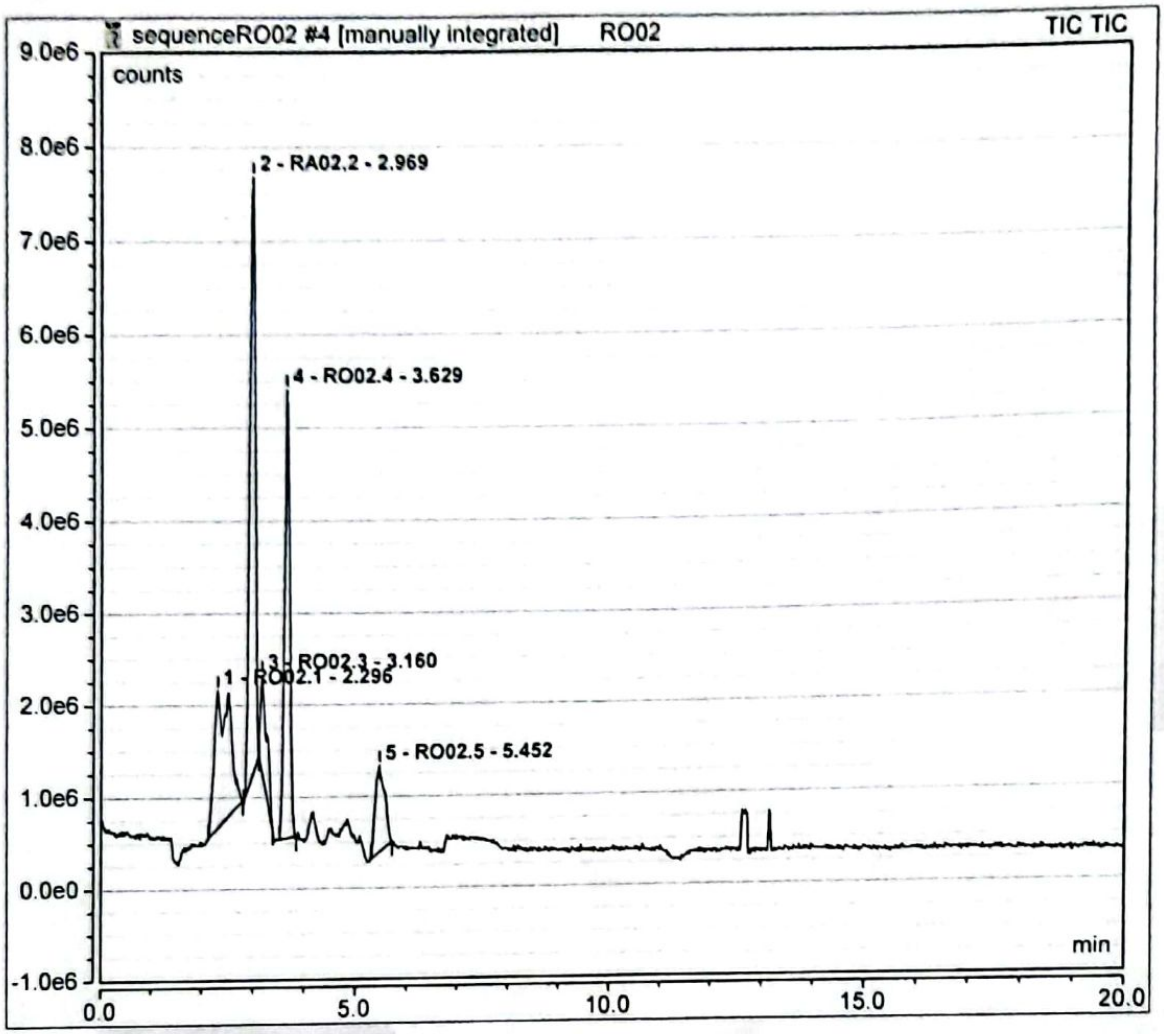


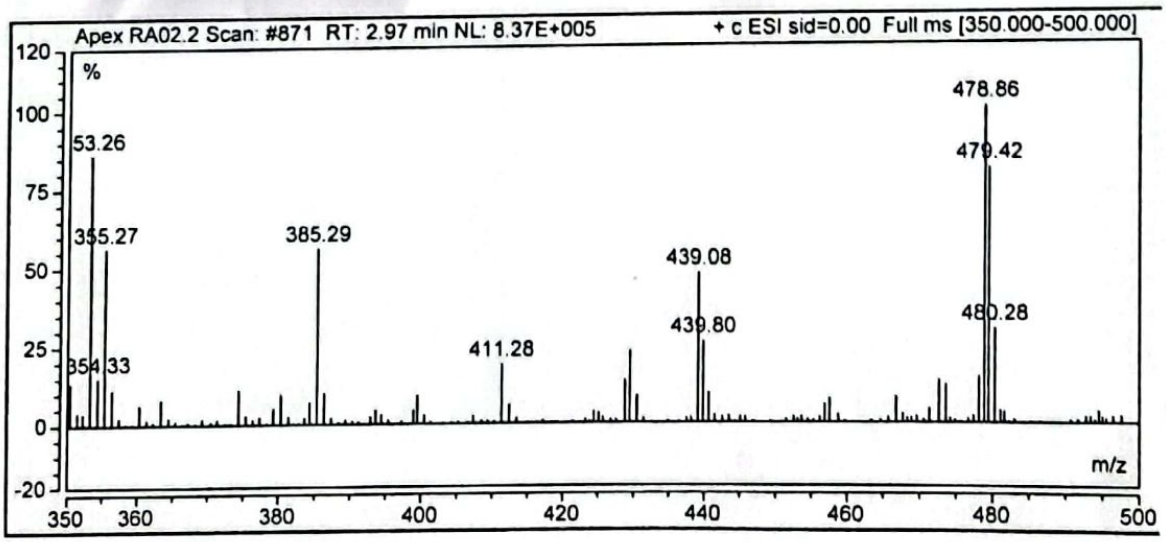


© 2009-2020 Thermo Fisher Scientific Inc. All rights reserved.

Scanned with CamScanner

Chromatogram

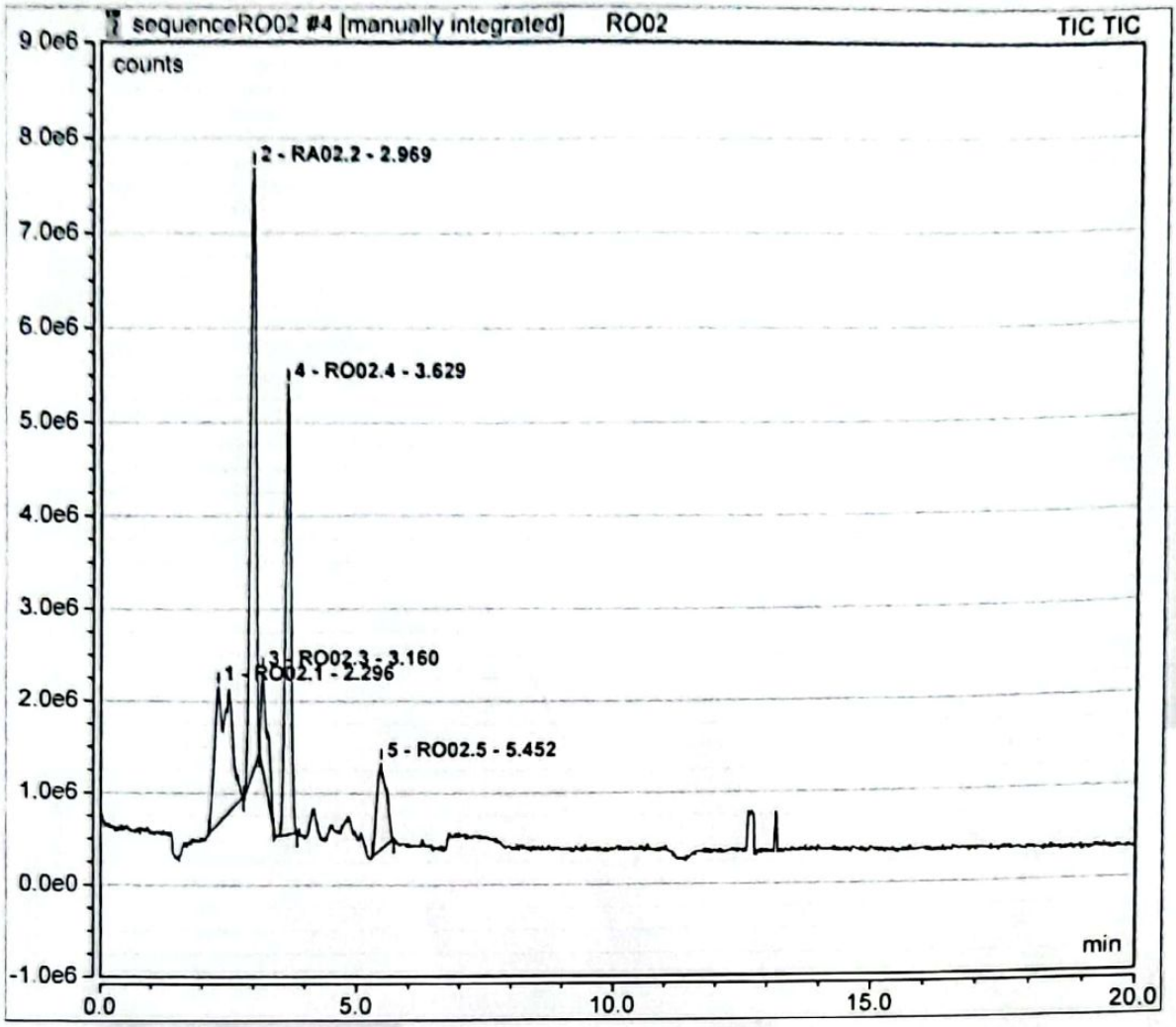


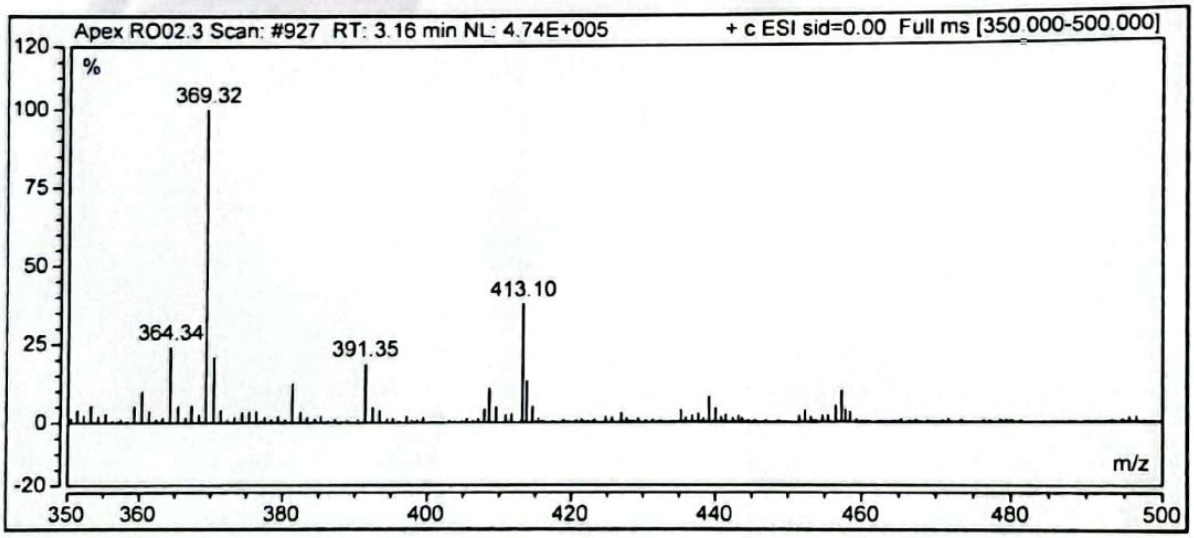


© 2009-2020 Thermo Fisher Scientific Inc. All rights reserved.
Chromeleon 7.3.0.60919

Scanned with CamScanner

Chromatogram

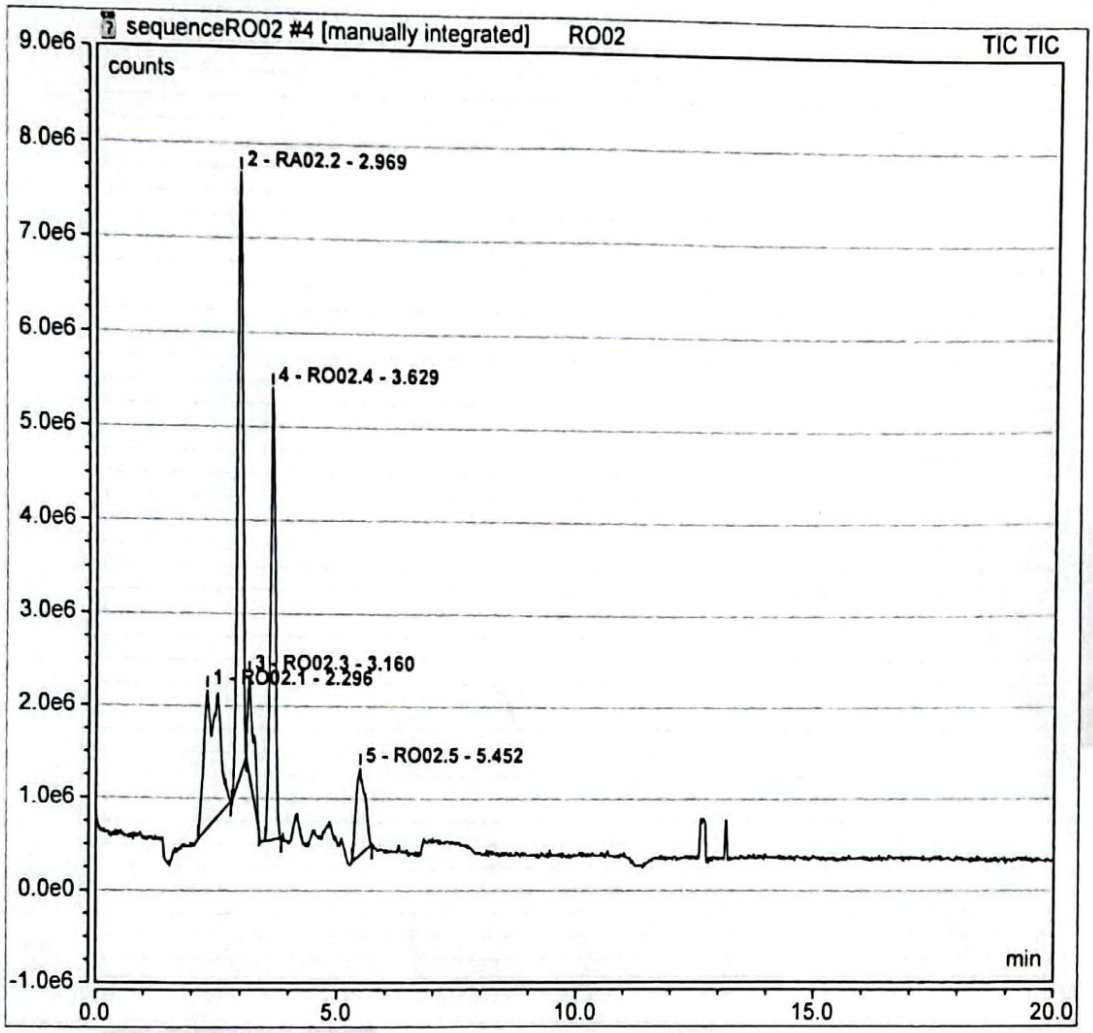


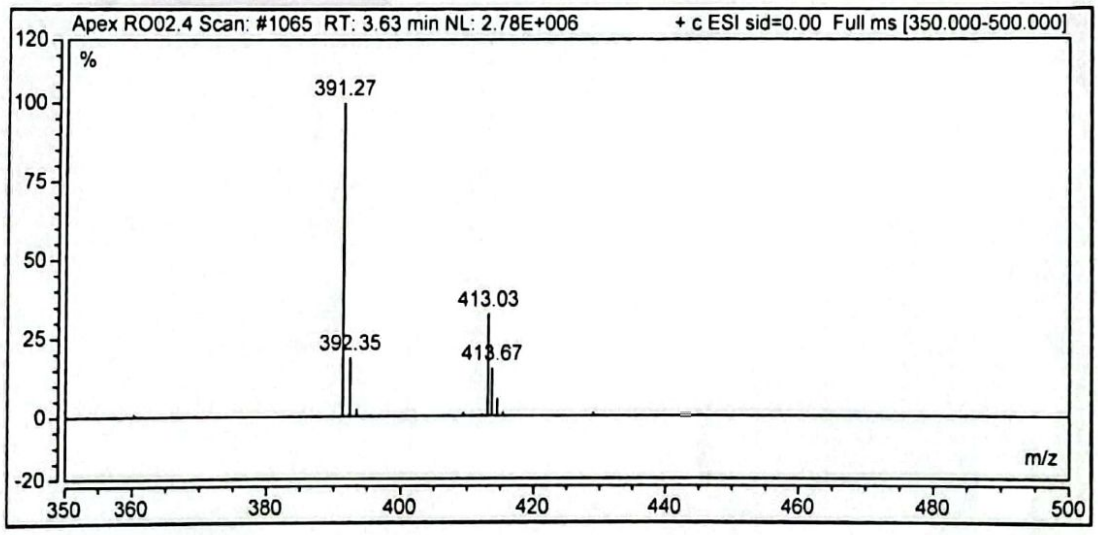


© 2009-2020 Thermo Fisher Scientific Inc. All rights reserved.
Chromeleon 7.3.0.60919

Scanned with CamScanner

Chromatogram

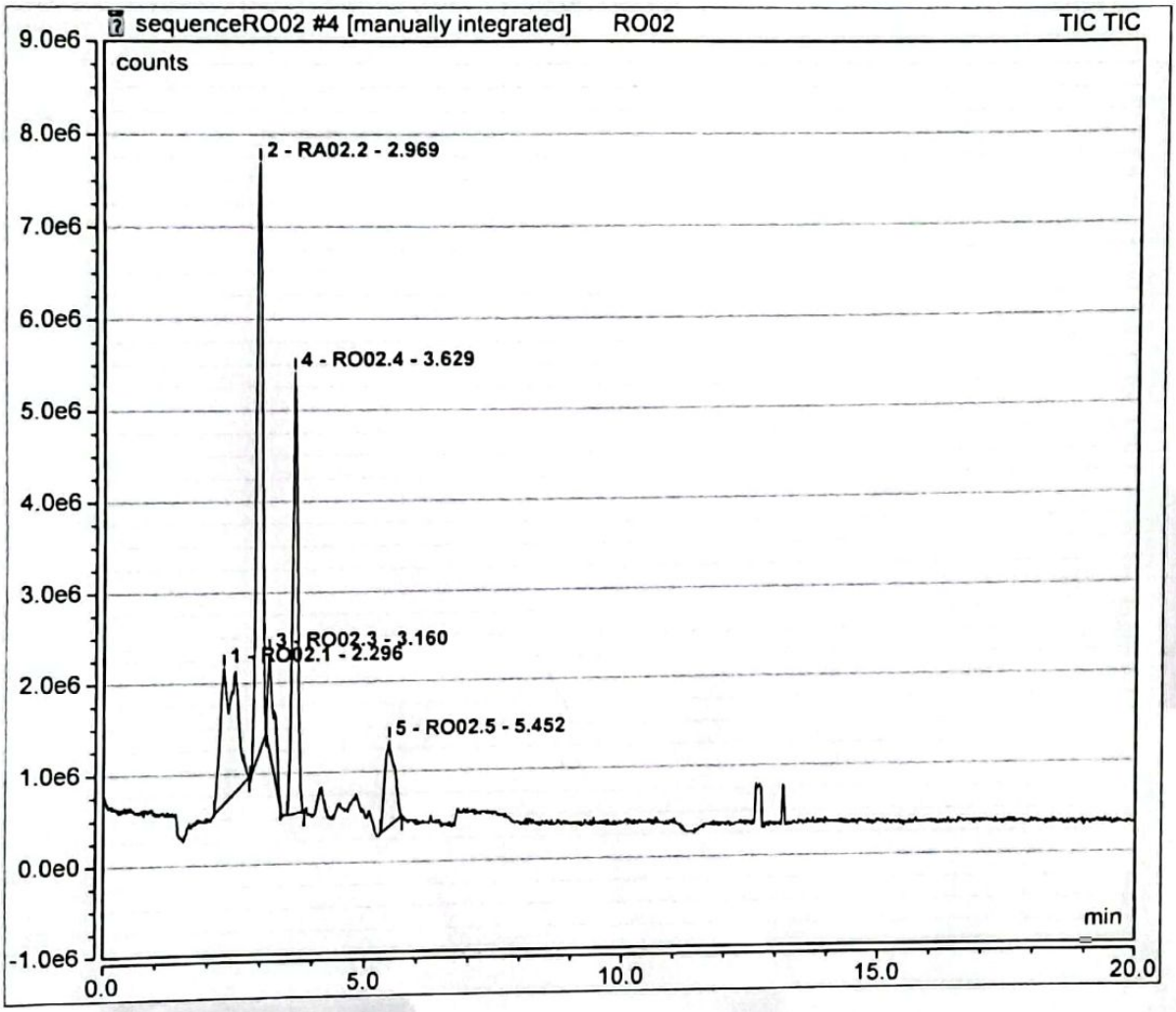


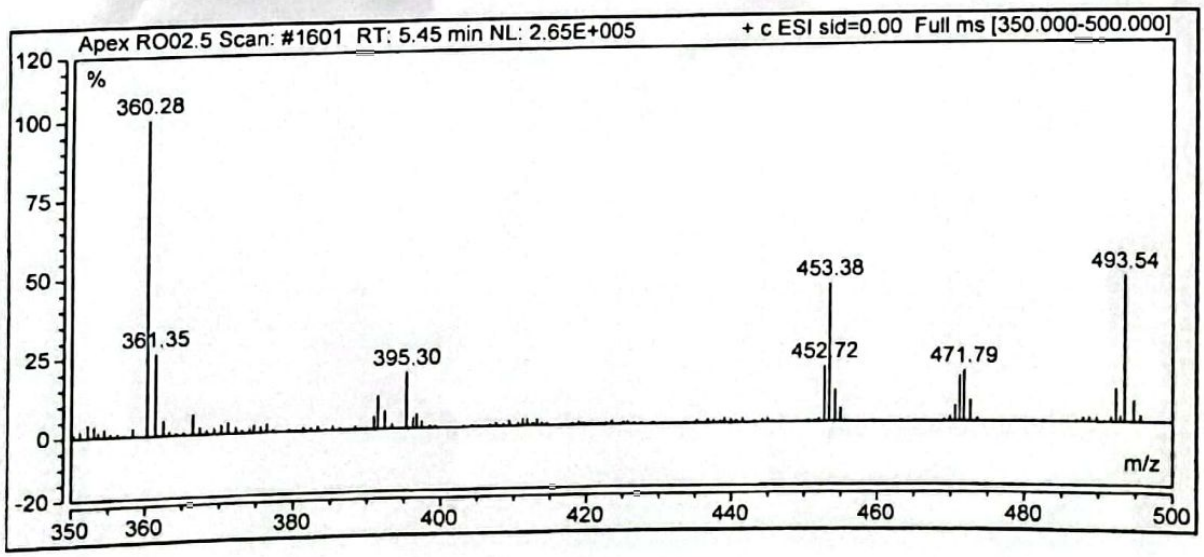


© 2009-2020 Thermo Fisher Scientific Inc. All rights reserved.
Chromeleon 7.3.0.60919

Scanned with CamScanner

Chromatogram





© 2009-2020 Thermo Fisher Scientific Inc. All rights reserved.
Chromeleon 7.3.0.60919

Scanned with CamScanner