

PHÂN LẬP VÀ ĐỊNH LƯỢNG URSOLIC ACID TỪ LÁ CÂY SẮN THUYỀN *Syzygium resinsum* (GAGNEP.) MERR.

Ngô Quốc Luân¹, Võ Minh Hòa¹ và Ngô Khắc Không Minh²

¹Trường Đại học Cần Thơ

²Trường Đại học Kỹ thuật - Công nghệ Cần Thơ

Email: nkkminh@ctu.edu.vn

Thông tin chung:

Ngày nhận bài:

02.7.2024

Ngày nhận bài sửa:

10.8.2024

Ngày duyệt đăng:

12.8.2024

Từ khóa:

HPLC, *syzygium resinsum*,
ursolic acid.

TÓM TẮT

Từ cao phân đoạn ethyl acetate của lá cây sắn thuyền, sử dụng các phương pháp cô lập, tinh chế và các phương pháp quang phổ hiện đại như MS, 1D-NMR, 2D-NMR đã phân lập và định danh được một hợp chất là ursolic acid. Hàm lượng của ursolic acid được xác định bằng phương pháp sắc ký lỏng hiệu năng cao (HPLC). Kết quả các giá trị thu được là 0,46%, 1,66% và 0,35% tương ứng với phân trăm khối lượng ursolic acid trong các cao phân đoạn n-hexane, ethyl acetate và methanol của lá cây sắn thuyền.

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Cây sắn thuyền (*Syzygium resinsum* (Gagnep.) Merr.) (Lợi, 1999) phân bố ở Campuchia, Indonesia, Malaysia, Brunei, Thái Lan, Myanma, Việt Nam,... được phổ biến chủ yếu ở các nước nhiệt đới và Châu Đại Dương. Hơn nữa, các loài thực vật thuộc chi này đang được sử dụng nhiều trong hệ thống y học cổ truyền ở các nước châu Á, đặc biệt là ở Trung Quốc, Ấn Độ và Bangladesh. Cây sắn thuyền cũng có những giá trị y học vô cùng to lớn bao gồm sát trùng, kháng sinh, kháng viêm, kháng khuẩn, giảm đau, chống tiêu chảy, chữa lành vết thương. Trên thế giới đã có một số công trình nghiên cứu phục vụ y học nhưng đa số chỉ dừng lại ở mức độ khảo sát hoạt tính sinh học của các dịch chiết, rất ít công trình nghiên cứu chi tiết về thành phần hóa học của các hợp chất có trong cây này (Bích, 2004). Tại Việt Nam, việc sử dụng lá cây sắn thuyền chủ yếu dựa theo kinh nghiệm dân gian, rất ít công trình nghiên cứu về thành phần hóa học.

Theo các nghiên cứu trước đây ursolic acid có công dụng đặc tính chống viêm, chống nấm và chống vi khuẩn và đã được sử dụng để giảm đau do bỏng. Ursolic acid thúc đẩy sự phát triển của cơ bắp, giảm sự hao mòn cơ bắp và tăng hoạt động hình thành xương. Ursolic acid có thể ngăn chặn sự hình thành khối u, ức chế sự phát triển của khối u (Lingbao Kong, 2013). Trong quá trình nghiên cứu thành phần hóa học của cao ethyl acetate lá sắn thuyền phát hiện ursolic acid phân lập được với hàm lượng đáng kể, vì vậy vấn đề định lượng chất này bằng phương pháp sắc ký lỏng hiệu năng cao được đặt ra nhằm đánh giá hàm lượng của ursolic acid, làm cơ sở xem xét tiềm năng làm nguyên liệu cho ngành dược. Vì vậy, việc nghiên cứu phân lập và định lượng ursolic acid từ lá cây sắn thuyền là một công việc cần thiết và có ý nghĩa khoa học, nhằm đóng góp thêm thông tin về các hợp chất có trong cây sắn thuyền.

2. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

Nguyên liệu là lá cây sắn thuyền được thu hái tại tỉnh Vĩnh Long đã được xử lý thành bột mịn. Áp dụng các kỹ thuật ngâm dầm ở nhiệt độ phòng, chiết lỏng – lỏng, để điều chế cao tổng và các cao phân đoạn với các dung môi thích hợp.

Sử dụng các phương pháp thường quy trong nghiên cứu các hợp chất tự nhiên như sắc ký cột với hệ dung môi thích hợp, sắc ký lớp mỏng (TLC), kết tinh lại, ... để cô lập được hợp chất sạch (thực hiện tại phòng thí nghiệm Hóa hữu cơ, Khoa Sư phạm, Đại học Cần Thơ).

Việc nhận danh và xác định cấu trúc dựa trên các tính chất vật lý (màu sắc, dạng tinh thể, R_f , nhiệt độ nóng chảy) và từ các dữ liệu phổ khối lượng (MS), phổ cộng hưởng từ hạt nhân ($^1\text{H-NMR}$, $^{13}\text{C-NMR}$, DEPT, HMBC, COSY) kết hợp so sánh với tài liệu đã công bố (thực hiện tại Viện Hóa học, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam).

Định lượng hàm lượng ursolic acid bằng phương pháp sắc ký lỏng hiệu năng cao (thực hiện tại phòng Hóa phân tích, Công ty TNHH Hóa nông Lúa vàng).

3. THỰC NGHIỆM

3.1. Hóa chất và thiết bị

- Hóa chất: Silica gel 60 F254, Scharlau, đường kính hạt 0,04-0,06 mm, *n*-Hexane, methanol, chloroform, ethyl acetate, acetonitrile, acetic acid, ursolic acid chuẩn (Đức, 99,9%).

- Thiết bị: Bàn silica gel 60 F254, MERCK tráng sẵn, các loại cột sắc ký, bơm cao áp (1260 Quat Pump VL, Đức), thiết bị tiêm mẫu 1260 ALS (Đức), thiết bị nạp mẫu 1260 TCC (Đức), cột pha đảo Gemini 5 μm C18 110Å (Phenomenex, USA), cột ion PhenoSphere 5 μm SAX 80Å (Phenomenex, USA), tiền cột sắc ký KJ0-4282 (Phenomenex, USA), thiết bị ghi tín hiệu UV-Vis Detec tor (Đức), phổ MS ghi trên máy HP1100 series LC/MS Trap, Agilent (Viện

Hóa học, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam), các phổ $^1\text{H-NMR}$, $^{13}\text{C-NMR}$, DEPT-NMR, HMBC: ghi trên máy cộng hưởng từ hạt nhân Bruker Avance 500/600 Digital-NMR spectrometer (Viện Hóa học, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam), thiết bị HPLC 1260 Agilent (Công ty TNHH Hóa Nông lúa vàng Hậu Giang).

3.2. Điều chế cao phân đoạn

Từ nguyên liệu bột lá cây sắn thuyền (7,8 kg) được tận trích với methanol bằng phương pháp ngâm, lọc bỏ bã, phần dịch chiết được cô loại dung môi dưới áp suất kém thu được cao methanol dạng sệt có khối lượng 825 g.

Cao methanol thu được (825 g) chiết lỏng-lỏng lần lượt với các dung môi theo thứ tự độ phân cực tăng dần: *n*-hexane, ethyl acetate.

Lọc lấy phần dịch tan sau khi chiết với *n*-hexane được cô loại dung môi dưới áp suất kém thu được cao *n*-hexane có khối lượng 150 g.

Phần không tan trong *n*-hexane được chiết với ethyl acetate. Lọc lấy phần dịch tan, đem cô loại dung môi dưới áp suất kém thu được cao ethyl acetate có khối lượng 194 g.

Phần dịch còn lại không tan trong ethyl acetate tiếp tục được làm khô dung môi có khối lượng 185 g.

3.3. Phân lập hợp chất ST02 từ cao ethyl acetate

Cao ethyl acetate có khối lượng 194 g tiến hành sắc ký cột pha thường với hệ dung môi giải ly: *n*-hexane: EtOAc (H:E) với các tỉ lệ thay đổi tăng dần độ phân cực từ H:E (100:0) đến H:E (50:50) và cuối cùng là methanol 100%. Theo dõi quá trình sắc ký cột bằng sắc ký bản mỏng (TLC), hiện vết bằng cách phun thuốc thử H_2SO_4 10% trong EtOH và sấy ở 100°C.

Kết quả sắc ký cột trên cao EA thu được 8 phân đoạn chính (EA1-EA8) được trình bày ở Bảng 1. Trong đó các phân đoạn EA4 cho vết chính rõ, đẹp nên được chọn để tiếp tục tinh chế.

Bảng 1. Kết quả sắc ký cột pha thường trên cao phân đoạn ethyl acetate

Phân đoạn	Hệ dung môi	Kết quả kiểm tra với TLC	Khối lượng (g)
EA1	H:E (100:0)	Nhiều vết mờ	24,51
EA2	H:E (95:5)	Nhiều vết đậm	17,50
EA3	H:E (90:10)	Nhiều vết đậm	14,57
EA4	H:E (80:20)	Nhiều vết đậm	27,40
EA5	H:E (70:30)	Nhiều vết đậm	20,3
EA6	H:E (60:40)	Nhiều vết đậm	12,7
EA7	H:E (50:50)	Nhiều vết đậm	16,41
HE8	100% Methanol	Nhiều vết kéo dài	32,72
Tổng			166,11
Hiệu suất (%)			85,62

Nguồn: Công bố của tác giả, (2024).

Phân đoạn EA4 có khối lượng 27,40 g tiến hành sắc ký cột pha thường với hệ dung môi giải ly: *n*-hexane: EtOAc (H:E) với các tỉ lệ thay đổi tăng dần độ phân cực từ H:E (95:5) đến H:E (70:30) và cuối cùng là methanol 100%. Các phân đoạn giống nhau trên TLC (về màu vết và giá trị *R_f*) được gom chung lại thành 7 phân đoạn nhỏ từ EA4.1 đến EA4.7 (Bảng 2).

Bảng 2. Kết quả sắc ký cột pha thường trên cao phân đoạn EA4

Phân đoạn	Hệ dung môi	Kết quả kiểm tra với TLC	Khối lượng (g)
EA4.1	H:E (95:5)	Nhiều vết mờ	2,71
EA4.2	H:E (90:10)	Nhiều vết kéo dài	1,87
EA4.3	H:E(85:15)	Nhiều vết kéo dài	3,15
EA4.4	H:E (80:20)	Một vết chính màu hồng tím và nhiều vết mờ	5,75
EA4.5	H:E (70:30)	Nhiều vết kéo dài	3,05
EA4.6	H:E (60:40)	Nhiều vết đậm	2,46
EA4.7	100% Methanol	Nhiều vết kéo dài	3,21
Tổng			22,2
Hiệu suất (%)			81,02

Nguồn: Công bố của tác giả, (2024).

Phân đoạn EA4.4 có khối lượng 5,75 g tiến hành sắc ký cột pha thường với hệ dung môi giải ly: *n*-hexane: chloroform (H:C) với các tỉ lệ thay đổi tăng dần độ phân cực từ H:C (40:60) đến H:C (0:100) và cuối cùng là methanol 100%. Kết quả sắc ký cột phân đoạn EA4.4 được trình bày ở Bảng 3

Bảng 3. Kết quả sắc ký cột pha thường trên cao phân đoạn EA4.4

Phân đoạn	Hệ dung môi	Kết quả kiểm tra với TLC	Khối lượng (g)
HE4.4.1	H:C (40:60)	Nhiều vết mờ	0,42
HE4.4.2	H:C (30:70)	Nhiều vết kéo dài	0,56
HE4.4.3	H:C (20:80)	Một vết màu hồng	1,32

Phân đoạn	Hệ dung môi	Kết quả kiểm tra với TLC	Khối lượng (g)
HE4.4.4	H:C (0:100)	Nhiều vết kéo dài	0,92
HE4.4.5	100% Methanol	Nhiều vết kéo dài	1,49
Tổng			3,79
Hiệu suất (%)			65,91

Nguồn: Công bố của tác giả, (2024).

Phân đoạn HE4.4.3 đem kết tinh lại nhiều lần trong dung môi methanol thu được kết tinh dạng bột vô định hình màu trắng có khối lượng 1,08 g và được đặt tên là **ST02**.

3.4. Định lượng ursolic acid trong các cao phân đoạn của lá cây sắn thuyền bằng phương pháp HPLC

3.4.1. Định lượng ursolic acid

Chương trình phân tích mẫu được sử dụng dựa vào lần lượt TCVN 12563:2018 với các thông số kỹ thuật như sau: Pha động: bao gồm acetonitrile : H₂O : acetic acid với tỉ lệ thể tích là (50:48:2), tốc độ dòng: 1 mL/phút, nhiệt độ 25°C, bước sóng $\lambda = 210$ nm, thể tích tiêm 20 μ L.

Phần trăm khối lượng của ursolic acid trong cao *n*-hexane, cao ethyl acetate và cao methanol được xác định bằng công thức (Xuân, 2022):

$$\%m = \frac{1}{2} \left(\frac{m_{C1}}{S_{C1}} + \frac{m_{C2}}{S_{C2}} \right) \times C \times \frac{1}{2} \left(\frac{S_1}{m_1} + \frac{S_2}{m_2} \right) \times 100 \quad (1)$$

Trong đó: m_{C1} và m_{C2} lần lượt là lượng cân đối của chuẩn

m_1 và m_2 lần lượt là lượng cân đối của mẫu thử

S_{C1} và S_{C2} lần lượt là diện tích peak của chuẩn

S_1 và S_2 lần lượt là diện tích peak của mẫu thử

C là độ tinh khiết của chất chuẩn

3.4.2. Thẩm định quy trình định lượng ursolic acid

Tính tuyến tính của phương pháp:

Tiến hành: Pha một dãy dung dịch chuẩn ursolic acid với các nồng độ 20 ppm, 100 ppm, 200 ppm, 500 ppm, 750 ppm và 1000 ppm.

Xác định sự phụ thuộc tuyến tính giữa nồng độ ursolic acid và diện tích peak. Kết quả được biểu diễn trên phương trình đường hồi quy $y = ax + b$ và hệ số tương quan tuyến tính R^2 .

Độ chính xác:

Chuẩn bị 6 mẫu thí nghiệm riêng biệt có nồng độ 500 ppm. Tiến hành sắc ký HPLC cho từng mẫu thí nghiệm để xác định diện tích peak, qua đó tính được độ lệch chuẩn tương đối. Yêu cầu tiêu chuẩn cho giá trị RSD là dưới 2%.

Giới hạn phát hiện (LOD):

Giới hạn phát hiện được tính bằng công thức (Hoàng, 2015): $LOD = 3,3 \cdot \frac{SD}{B}$ (2)

Trong đó: B là độ dốc, SD là độ lệch chuẩn của phương trình đường hồi quy.

Giới hạn định lượng (LOQ): Là nồng độ tối thiểu của một chất có trong mẫu thử để thực hiện được phép định lượng bằng phương pháp đang khảo sát (Hoàng, 2015).

$$LOQ = 10 \cdot \frac{SD}{B} \quad (3)$$

4. KẾT QUẢ VÀ BÀN LUẬN

4.1. Xác định cấu trúc hóa học của hợp chất ST02

Hợp chất ST02 dạng bột vô định hình, màu trắng, tan tốt trong dung môi chloroform, nhiệt độ nóng chảy 285-288°C, là chất bền nhiệt, không phát quang dưới ánh sáng của đèn UV. Sắc ký lớp mỏng hiện vết màu tím khi được phun xịt bằng dung dịch H₂SO₄ 10% trong EtOH, sấy ở 100°C (Hình 1). ST02 có $R_f = 0,65$ trong hệ dung môi chloroform: methanol = 95:5.



Hình 1. Tinh thể và TLC của chất ST02

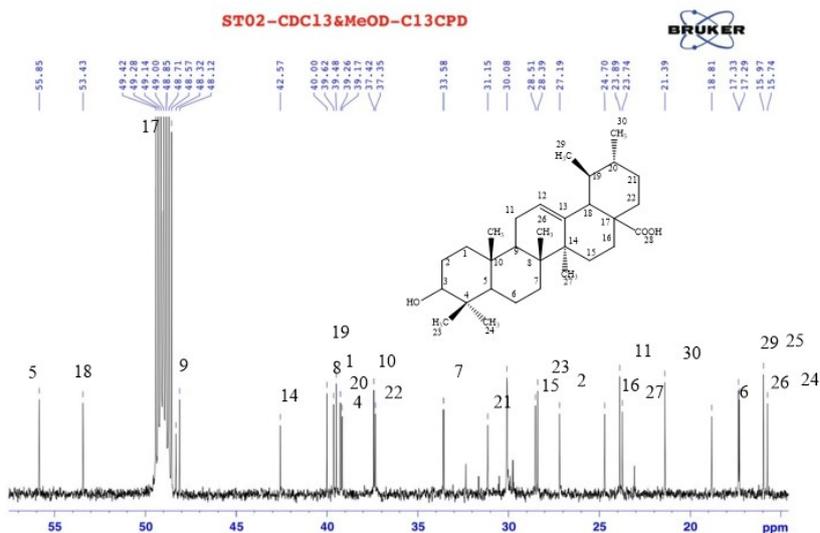
Nguồn: Công bố của tác giả, (2024).

Phổ MS cho peak ion phân tử giả $[M+H]^+ = 457$ phù hợp với công thức $C_{30}H_{48}O_3$ (456 đvC, 7 độ bất bão hòa).

Phổ ^1H-NMR ($CDCl_3$, 600 MHz, J Hz): δ 3,19 (1H, dd, $J = 5$ Hz và 11 Hz, H-3), 5,25 (1H, t, H-12), 0,99 (3H, s, H-23), 0,78 (3H, s, H-24), 0,94 (3H, s, H-25), 0,84 (3H, s, H-26), 1,11 (3H, s, H-27), 0,88 (3H, d, $J = 6$ Hz, H-29), 0,96 (3H, d, $J = 6$ Hz, H-30). Phổ $^{13}C-NMR$ ($CDCl_3$, 125 MHz) kết hợp phổ DEPT cho thấy tín hiệu của 30 carbon, gồm: δ 39,5

(C-1), 27,2 (C-2), 79,2 (C-3), 39,1 (C-4), 55,9 (C-5), 18,9 (C-6), 33,6 (C-7), 40,0 (C-8), 48,1 (C-9), 37,4 (C-10), 23,9 (C-11), 126 (C-12), 138,8 (C-13), 42,6 (C-14), 28,5 (C-15), 24,7 (C-16), 48,3 (C-17), 53,4 (C-18), 39,6 (C-19), 39,3 (C-20), 31,2 (C-21), 37,5 (C-22), 28,4 (C-23), 15,7 (C-24), 16,0 (C-25), 17,3 (C-26), 23,7 (C-27), 181,1 (C-28), 17,3 (C-29) và 21,4 (C-30).

Từ các dữ kiện phổ MS, 1D-NMR phân tích trên cho phép dự đoán ST02 là một triterpene 5 vòng (với 1 nối C=C và 1 nối C=O). Ngoài ra, vì ST02 có 7 tín hiệu của proton nhóm $-CH_3$; 9 tín hiệu carbon nhóm $-CH_2$; 7 tín hiệu carbon nhóm $-CH$, trong đó có tín hiệu của carbon liên kết nhóm $-OH$ tại δ_C 79,19 ppm và tín hiệu của carbon olefin tại δ_C 126,04 ppm, 7 tín hiệu của carbon tứ cấp trong đó có tín hiệu của carbon olefin tại δ_C 138,75 ppm và tín hiệu của carbon C=O (nhóm $-COOH$) tại δ_C 181,12 ppm. Từ những thông tin trên, ST02 được dự đoán là ursolic acid có cấu trúc hóa học như Hình 2.



Hình 2. Phổ $^{13}C-NMR$ và cấu trúc hóa học dự đoán của ST02

Nguồn: Công bố của tác giả, (2024).

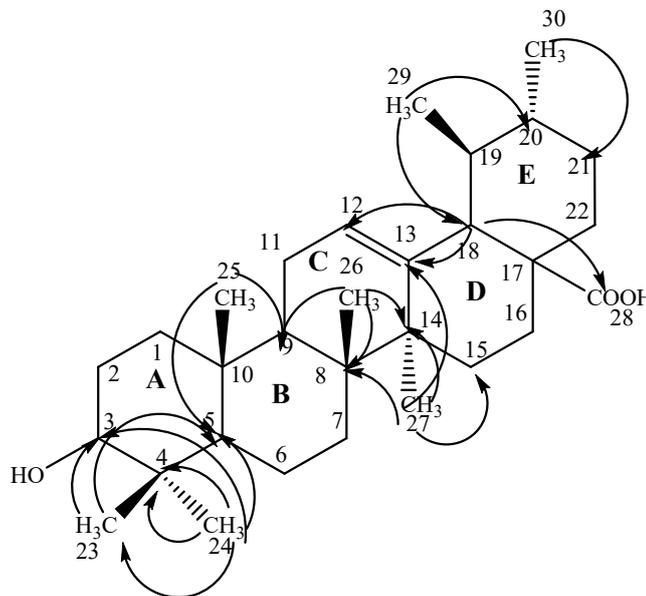
Trên phổ **HMBC**, xét vòng **C**, C-13 và C-12 đều tương quan với proton của nhóm $-CH$ δ_C 53,43 ppm, cho phép xác định proton δ_H 2,21 ppm là H-18. Proton của nhóm $-CH_3$ δ_C 23,74 ppm tương quan với C-13, cho phép xác định đây là proton δ_H 1,11 ppm là H-27. Ngoài ra, H-27 và H-18 cùng tương quan với carbon tứ cấp δ_C 42,57 ppm (được xác định là C-14). Vì vậy, carbon tứ cấp δ_C 40,00 ppm còn lại có sự tương quan với H-27 là C-8.

Xét vòng **B**, phổ **HMBC** cho thấy proton của nhóm $-CH_3$ δ_C 17,29 ppm đều tương quan với C-14 và C-8, cho phép xác định proton δ_H 0,84 ppm là H-26. Ngoài ra, H-26 còn tương quan với carbon của nhóm $-CH$ δ_C 48,12 ppm được xác định là C-9. Proton của carbon δ_C 15,97 ppm cùng tương quan với C-9 và carbon nhóm $-CH$ δ_C 55,85 ppm, cho

phép xác định carbon δ_C 55,85 ppm là C-5, carbon δ_C 15,97 ppm là C-25 và δ_H 0,94 ppm là H-25.

Xét vòng **A**, phổ **HMBC** cho thấy proton của hai nhóm $-CH_3$ δ_C 28,39 ppm và δ_C 15,74 ppm đều tương quan với C-5 và C-3 cho phép xác định đây lần lượt là C-23 và C-24, proton δ_H 0,99 ppm và δ_H 0,78 ppm lần lượt là H-23 và H-24.

Xét vòng **E**, phổ **HMBC** cho thấy C-18 tương quan với proton nhóm $-CH_3$ δ_H 0,88 ppm nhưng không tương quan với proton nhóm $-CH_3$ δ_H 0,96 ppm. Vì vậy, có thể xác định proton δ_H 0,88 ppm là H-29, carbon δ_C 17,33 ppm là C-29 và proton δ_H 0,96 ppm là H-30, carbon δ_C 21,39 ppm là C-30.



Hình 3. Tương quan HMBC trong cấu trúc của hợp chất ST02

Nguồn: Công bố của tác giả, (2024)

Bảng 4. So sánh dữ liệu phổ 1D-NMR của ST02 và ursolic acid

Vị trí C/H	ST02		Loại carbon	Ursolic acid (Tùng, 2016)	
	1H $\delta_H^{a,b}$ (ppm) (J, Hz)	^{13}C $\delta_C^{c,b}$ (ppm)		1H $\delta_H^{d,b}$ (ppm) (J, Hz)	^{13}C $\delta_C^{e,b}$ (ppm)
1		39,48	$>CH_2$	1.00 (1H, <i>m</i>) 1.58 (1H, <i>m</i>)	39,2

Vị trí C/H	ST02		Loại cacbon	Ursolic acid (Tùng, 2016)	
	$^1\text{H } \delta_{\text{H}}^{\text{a, b}}$ (ppm) (J, Hz)	$^{13}\text{C } \delta_{\text{C}}^{\text{c, b}}$ (ppm)		$^1\text{H } \delta_{\text{H}}^{\text{d, b}}$ (ppm) (J, Hz)	$^{13}\text{C } \delta_{\text{C}}^{\text{e, b}}$ (ppm)
2		27,19	>CH ₂	1,81 (1H, <i>m</i>) 1,81 (1H, <i>m</i>)	28,2
3	3,19 (1H, <i>m</i>)	79,19	>CH-	3,44 (1H, <i>dd</i> ,)	78,2
4		39,17	>C<	-	39,6
5		55,85	>CH-	0,88 (1H, <i>d</i>)	55,9
6		18,81	>CH ₂	1,58 (1H, <i>m</i>) 1,39 (1H, <i>m</i>)	18,8
7		33,58	>CH ₂	1,59 (1H, <i>m</i>) 1,39 (1H, <i>m</i>)	33,7
8	-	40,0	>C<	-	40,1
9		48,12	>CH-	1,65 (1H, <i>m</i>)	48,1
10		37,42	>C<	-	37,5
11		23,89	>CH ₂	1,96 (2H, <i>m</i>)	23,7
12	5,25 (1H, <i>t</i>)	126,04	>CH-	5,49 (1H, <i>m</i>)	125,7
13		138,75	>C<	-	139,3
14		42,57	>C<	-	42,6
15		28,51	>CH ₂	1,22 (1H, <i>m</i>) 2,33 (1H, <i>m</i>)	28,8
16		24,7	>CH ₂	2,14 (1H, <i>m</i>) 2,01 (1H, <i>m</i>)	25,0
17		48,32	>C<	-	48,1
18		53,43	>CH-	2,63 (1H, <i>d</i>)	53,6
19		39,62	>CH-	1,49 (1H, <i>m</i>)	39,5
20		39,26	>CH-	1,05 (1H, <i>m</i>)	39,4
21		31,15	>CH ₂	1,40 (1H, <i>m</i>) 1,49 (1H, <i>m</i>)	31,1
22		37,35	>CH ₂	1,79 (2H, <i>m</i>)	37,4
23	0,99 (3H, <i>s</i>)	28,39	-CH ₃	0,124 (3H, <i>s</i>)	28,8
24	0,78 (3H, <i>s</i>)	15,74	-CH ₃	1,02 (3H, <i>s</i>)	16,5
25	0,94 (3H, <i>s</i>)	15,97	-CH ₃	0,92 (3H, <i>s</i>)	15,7
26	0,84 (3H, <i>s</i>)	17,29	-CH ₃	1,06 (3H, <i>s</i>)	17,5
27	1,11 (3H, <i>s</i>)	23,74	-CH ₃	1,24 (3H, <i>s</i>)	24,0
28		181,12	>C<	-	179,7
29	0,88 (3H, <i>d</i>)	17,33	-CH ₃	1,02 (3H, <i>s</i>)	17,5
30	0,96 (3H, <i>s</i>)	21,39	-CH ₃	0,97 (3H, <i>s</i>)	21,4

Ghi chú: ^a 600 MHz, ^b đo trong CDCl₃, ^c 150 MHz, ^d 500 MHz, ^e 125 MHz

Như vậy cấu trúc giả định được gán đầy đủ dữ liệu phổ ¹H-NMR và ¹³C-NMR trên cơ sở thống nhất các tương quan trên phổ HMBC. Mặt khác, có sự tương đồng khi so sánh dữ liệu phổ của ST02 với dữ liệu phổ

ursolic acid đã được nhiều tác giả công bố trước đây (Tùng, 2016; Kofi Annan, 2011; Michael Azael Ludeña Huaman, 2021). Vì vậy hợp chất ST02 được nhận danh là ursolic acid.

4.2. Kết quả định lượng ursolic acid bằng phương pháp HPLC

4.2.1. Kết quả xác định hàm lượng ursolic acid

Phần trăm khối lượng của ursolic acid trong các cao *n*-hexane, ethyl acetate, methanol được trình bày ở Bảng 5. Kết quả cho thấy, phần trăm khối lượng ursolic acid có trong cao *n*-hexane, ethyl acetate và methanol lần lượt là 0,46%, 1,66% và 0,35%.

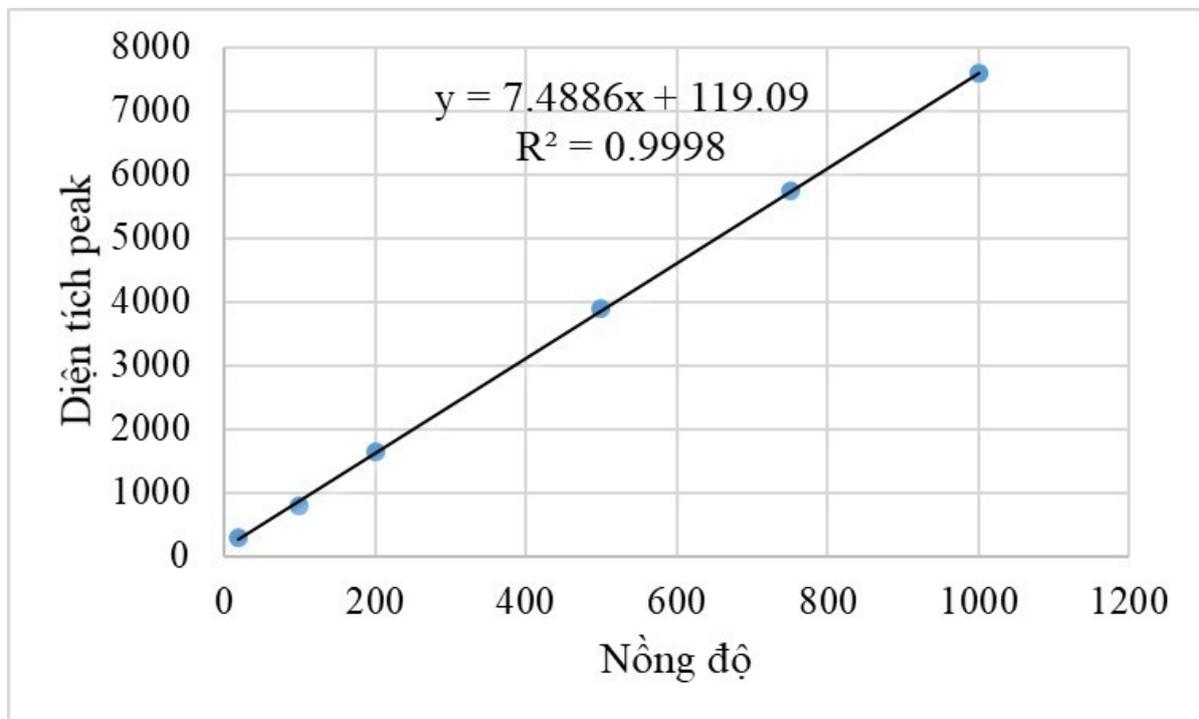
Bảng 5. Hàm lượng ursolic acid trong các cao *n*-hexane, ethyl acetate, methanol

Cao	Cao <i>n</i> -hexane	Cao ethyl acetate	Cao methanol
m_{C1} (mg)	4,62	4,62	4,62
m_{C2} (mg)	4,96	4,96	4,96
m_1 (mg)	320,5	159,8	458,4
m_2 (mg)	345,8	164,3	467,2
S_{C1}	3575,5	3575,5	3575,5
S_{C2}	3854,6	3854,6	3854,6
S_1	1104,3	2018,9	1251,1
S_2	1254,9	2168,3	1289,8
C	99,9	99,9	99,9
$\%m_{\text{ursolic acid}}$	0,46	1,66	0,35

Nguồn: Công bố của tác giả, (2024).

4.2.2. Thẩm định quy trình định lượng ursolic acid

Tính tuyến tính:



Hình 4. Đồ thị tuyến tính giữa diện tích peak và nồng độ các mẫu chuẩn ursolic acid

Nguồn: Công bố của tác giả, (2024).

Bảng 6. Tương quan giữa nồng độ và diện tích peak của mẫu chuẩn ursolic acid

Nồng độ (ppm)	Diện tích peak	Diện tích peak trung bình
20	296,8	284,03
	272,9	
	282,4	
100	847,4	802,83
	804,7	
	756,4	
200	1639,8	1649,13
	1658,1	
	1649,5	
500	3894,5	3898,50
	3915,8	
	3885,2	
750	5755,2	5733,31
	5733,8	
	5710,9	
1000	7608,4	7591,57
	7579,2	
	7587,1	

Nguồn: Công bố của tác giả, (2024).

Sự phụ thuộc giữa diện tích peak và nồng độ của dãy chuẩn ursolic acid được trình bày ở Bảng 6. Kết quả được biểu diễn ở đồ thị Hình 4. Với ursolic acid, trong khoảng nồng độ 20 ppm đến 1000 ppm, đồ thị tuyến tính với hệ số tương quan $R^2 = 0,9998$. Vậy phương pháp định lượng này đạt sự tuyến tính tốt.

Độ chính xác:

Tiến hành sắc ký HPLC đối với 6 mẫu thí nghiệm riêng biệt có nồng độ ursolic acid 500 ppm để ghi nhận thông tin diện tích peak. Kết quả được trình bày ở Bảng 7.

Bảng 7. Thông số diện tích peak của 6 mẫu thí nghiệm ursolic acid nồng độ 500 ppm

STT	Diện tích peak (S)	Thống kê
1	3894,5	$S_{TB} = 3897,8$ $RSD = 0,78\%$
2	3915,8	
3	3885,2	
4	3928,4	
5	3904,2	
6	3858,9	

Nguồn: Công bố của tác giả, (2024).

Kết quả ở Bảng 6 cho thấy giá trị RSD của 6 lần tiến hành HPLC trên 6 mẫu nhỏ hơn 2%. Vậy phương pháp định lượng đạt được độ chính xác, đáng tin cậy.

Giới hạn phát hiện (LOD):

Các giá trị độ dốc, độ lệch chuẩn được xác định dựa trên phương trình đường hồi quy ở Hình 4. Vậy, nồng độ giới hạn phát hiện có giá trị là:

$$LOD=3,3 \cdot \frac{SD}{B}=3,3 \cdot \frac{6,7051}{7,4886}=2,955 \text{ ppm}$$

Giới hạn định lượng (LOQ):

$$LOQ=10 \cdot \frac{SD}{B}=10 \cdot \frac{6,7051}{7,4886}=8,95 \text{ ppm}$$

5. KẾT LUẬN

Từ cao ethyl acetate của lá cây sắn thuyền, bằng phương pháp sắc ký cột pha thường kết hợp với các phương pháp phân tích phổ hiện đại, chúng tôi đã phân lập và nhận danh được một hợp chất là ursolic acid. Thông qua phương pháp HPLC, phần trăm khối lượng của ursolic acid có trong các cao *n*-hexane, ethyl acetate và methanol được xác định lần lượt là 0,46%, 1,66% và 0,35%. Ngoài ra, các hợp chất khác trong cao ethyl acetate cũng tiếp tục được phân lập, định danh và định lượng nhằm bổ sung dữ liệu hóa thực vật trong cây sắn thuyền.

Tài liệu tham khảo

Đỗ Huy Bích, Đặng Quang Chung, Bùi Xuân Chương, Nguyễn Thượng Dong, Đỗ Trung Đàm, (2004), *Cây thuốc và động vật làm thuốc ở Việt Nam*, Nhà xuất bản Khoa học Kỹ thuật Hà Nội.

Đỗ Tất Lợi (1999), *Những cây thuốc và vị thuốc Việt Nam*, Nhà xuất bản Y Học, trang 143-144.

Kofi Annan, Nora Jackson, Rita A. Dickson, George H. Sam, Gustav Komlaga,

(2011), “Acaricidal effect of an isolate from *Hoslundia opposita* vahl against *Amblyomma variegatum* (Acari: Ixodidae)”, *Pharmacognosy Research*, 3(3), pp. 185-188.

Lingbao Kong, Shanshan Li, Qingjiao Liao, Yanni Zhang, Ruina Sun, (2013), “Oleanolic acid and ursolic acid: Novel hepatitis C virus antivirals that inhibit NS5B activity”, *Antiviral Research*, 98, pp. 44-53.

Michael Azael Ludeña Huaman, Ana Luz Tupa Quispe, René Isabel Huamán Quispe, Carlos Alberto Serrano Flores, Juana Robles Caycho, (2021), “A simple method to obtain ursolic acid”, *Results in Chemistry*, 3, pp.100144.

Nguyễn Hữu Tùng, Vũ Đức Lợi, Bùi Thanh Tùng, Lê Quốc Hùng, (2016), “Thành phần triterpen khung ursan phân lập từ rễ cây Đan sâm (*Salvia miltiorrhiza* Bunge.) trồng ở Việt Nam”, *Tạp chí Khoa học ĐHQGHN: Khoa học Y Dược*, 32(2), trang 58-62.

Phạm Thị Mỹ Hoàng, Bành Thị Ngọc Quỳnh, Mai Tòng Ba, Lý Thị Mỹ Dung, (2015), “Xây dựng phương pháp định lượng carboplatin trong thuốc tim đông khô carbonplatin bằng HPLC”, *Tạp chí Khoa học và Công nghệ Việt Nam*, 1(2), trang 51-54.

Phan Nguyễn Thu Xuân, Bùi Thế Vinh, (2022), “Định lượng acid amin bằng kỹ thuật sắc ký lỏng hiệu năng cao đầu dò UV”, *HIUJS, Số đặc biệt*, trang 283-291.

ISOLATION AND QUANTIFICATION OF URSOLIC ACID FROM LEAVES OF *Syzygium resinum* (GAGNEP.) MERR.

ABSTRACT

*From the ethyl acetate fraction of *Syzygium resinum* (Gagnep.) Merr. leaves, using isolation, purification and modern spectroscopic methods such as MS, 1D-NMR, 2D-NMR, a compound was isolated and identified as ursolic acid. The content of ursolic acid was determined by high performance liquid chromatography (HPLC). The results obtained values were 0.46%, 1.66% and 0.35% corresponding to the mass percentage of ursolic acid in the *n*-hexane, ethyl acetate and methanol fractions of *Syzygium resinum* (Gagnep.) Merr. leaves.*

Keywords: HPLC, *Syzygium resinum*, ursolic acid.