

ĐẠI HỌC THÁI NGUYÊN
TRƯỜNG ĐẠI HỌC Y DƯỢC

**BÁO CÁO TÓM TẮT KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU
ĐỀ TÀI KHOA HỌC VÀ CÔNG NGHỆ CẤP ĐẠI HỌC**

**NGHIÊN CỨU ĐẶC ĐIỂM THỰC VẬT
THÀNH PHẦN HOÁ HỌC VÀ TÁC DỤNG CHỐNG OXY HÓA
CỦA CÂY MŨI MÁC (*DESMODIUM TRIQUETRUM* (L.) DC.,
HỌ ĐẬU - FABACEAE)**

MÃ SỐ: ĐH2013-TN07-07

Chủ nhiệm đề tài: ThS. NÔNG THỊ ANH THƯ

THÁI NGUYÊN 2019

MỤC LỤC

CHƯƠNG 1. TỔNG QUAN.....	2
1. Tổng quan về chi <i>Desmodium</i>	2
1.1. Vị trí phân loại	2
1.2. Đặc điểm thực vật chung của chi <i>Desmodium</i>	2
1.3. Đặc điểm một số loài trong chi <i>Desmodium</i>	2
2. Những nghiên cứu về cây Mũi mác <i>D. triquetrum</i> (L.) DC.	2
2.1. Đặc điểm thực vật	2
2.2. Phân bố và sinh thái	2
2.3. Thành phần hoá học	2
2.4. Tác dụng dược lý.....	3
2.5. Một số công dụng theo kinh nghiệm dân gian.....	3
CHƯƠNG 2. NGUYÊN VẬT LIỆU, TRANG THIẾT BỊ VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU	4
1. Đối tượng nghiên cứu.....	4
2. Phương tiện nghiên cứu.....	4
2.1. Thuốc thử, dung môi, hoá chất.....	4
2.2. Phương tiện và máy móc: các phương tiện máy móc phục vụ nghiên cứu	4
2.3. Phương pháp nghiên cứu.....	4
2.3.1. Về thực vật.....	4
2.3.2. Về hóa học	4
2.3.3. Nghiên cứu tác dụng chống oxi invitro.....	5
CHƯƠNG 3. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU	6
1. Nghiên cứu về thực vật.....	6
2. Định tính thành phần hóa học của dược liệu Mũi mác.....	6
3. Chiết xuất và phân lập các hợp chất.....	6
3.1. Chiết xuất.....	6
3.2. Phân lập các chất trong cây Mũi mác.....	6
3.3. Tác dụng chống oxi invitro của dược liệu	9
CHƯƠNG 4. BÀN LUẬN.....	10
1. Về phương pháp.....	10
2. Thành phần hóa học và tác dụng chống oxy hóa invitro.....	10

DANH MỤC CÁC KÝ HIỆU, CHỮ VIẾT TẮT

AST	Ánh sáng thường
ĐĐVN	Dược điển Việt Nam
EtAc	Ethylacetat
EtOH	Ethanol
GC - MS	Sắc ký khí khối phổ
HPLC	High performance liquid chromatography (Sắc ký lỏng hiệu năng cao)
HPTLC	High performance thin layer chromatography (Sắc ký lớp mỏng hiệu năng cao)
IR	Phổ hồng ngoại
MeOH	Methanol
MS	Phổ khối
NMR	Phổ cộng hưởng từ hạt nhân
SKC	Sắc ký cột
SKLM	Sắc ký lớp mỏng
TLC	Thin layer chromatography (Sắc ký lớp mỏng)
TT	Thuốc thử
UV	Ultra vis (quang phổ UV)
VKH & CNVN	Viện khoa học và công nghệ Việt Nam
<i>D.</i>	<i>Desmodium</i>

ĐẠI HỌC THÁI NGUYÊN
TRƯỜNG ĐẠI HỌC Y DƯỢC

THÔNG TIN KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU

1. Thông tin chung:

- Tên đề tài: Nghiên cứu đặc điểm thực vật, thành phần hóa học và tác dụng chống oxy hóa của cây Mũi mác (*Desmodium triquetrum*, họ Đậu- Fabaceae)

- Mã số: ĐH2013-TN07-07

- Chủ nhiệm đề tài: ThS. Nông Thị Anh Thu

- Tổ chức chủ trì: Trường Đại học Y Dược- Đại học Thái Nguyên

- Thời gian thực hiện: T1/2013-T12/2014

2. Mục tiêu:

- Chiết xuất, phân lập và xác định cấu trúc hoá học của các chất tinh khiết tách được từ mẫu nghiên cứu.

- Thử tác dụng chống oxy hóa invitro của dịch chiết cao mũi mác

3. Tính mới và sáng tạo:

- Không trùng lặp, có tính mới về nghiên cứu hóa học và dược lý.

4. Kết quả nghiên cứu:

➤ **Về thực vật**

- Đã mô tả, phân tích đặc điểm hình thái thực vật, đặc điểm vi phẫu thân, lá, rễ và xác định được đặc điểm bột dược liệu Mũi mác.

- Xác định được tên khoa học của cây Mũi mác là *Desmodium triquetrum* (L.) DC., họ Đậu (Fabaceae).

➤ **Về thành phần hóa học**

- Đã xác định phần trên mặt đất dược liệu Mũi mác có chứa flavonoid, saponin, tanin, chất béo, steroid, caroten, đường khử và acid hữu cơ.

- Đã phân lập và xác định cấu trúc của 4 hợp chất: Kaempferol, astragalin, isoquercitrin, quercitrin là chất lần đầu tiên phân lập được từ loài Mũi mác (*Desmodium triquetrum*)

Về tác dụng sinh học

- Nghiên cứu tác dụng chống oxy hóa *in vitro* qua việc sàng lọc hoạt tính dọn gốc tự do DPPH và superoxide anion (O₂^{-•}) của cao chiết Mũi mác.

5. Sản phẩm:

a. Sản phẩm khoa học: 02 bài báo khoa học:

- Nông Thị Anh Thư, Nguyễn Thúy An, Nguyễn Thị Bích Thu (2015), “Nghiên cứu đặc điểm thực vật của cây Mũi mác thu hái tại Bắc Kạn”, *Tạp chí Y học Thực hành*, (10), tr 129-132.
- Nông Thị Anh Thư, Vũ Văn Tuấn, Nguyễn Thị Bích Thu (2016), “Flavonoid phân lập từ phần trên mặt đất của cây Mũi mác (*Desmodium triquetrum* (L.) DC.)”, *Tạp chí Dược học*, (477), tr 58-62.

b. Sản phẩm đào tạo:

+ Hướng dẫn 02 sinh viên nghiên cứu khoa học:

- Nguyễn Thị Thắm (2013), *Sơ bộ định tính thành phần hóa học và nghiên cứu các phân đoạn dịch chiết của cây Mũi mác*, Khóa luận tốt nghiệp, trường đại học Y Dược, Đại học Thái Nguyên
- Trần Phương Linh (2013), *Nghiên cứu tác dụng chống oxy hóa của cây Mũi mác*

+ 01 luận văn thạc sĩ:

Nguyễn Minh Ngọc (2013), *Nghiên cứu đặc điểm thực vật, thành phần hóa học của cây Mũi mác (*Desmodium triquetrum* (L.) DC., họ Đậu Fabaceae) mọc hoang ở Bắc Kạn*, Luận văn thạc sĩ, trường đại học Dược Hà Nội.

6. Phương thức chuyển giao, địa chỉ ứng dụng, tác động và lợi ích mang lại của kết quả nghiên cứu:

Là tài liệu tham khảo cho sinh viên, giáo viên và cán bộ ngành y dược.

Ngày 08 tháng 05 năm 2019

Tổ chức chủ trì

(ký, họ và tên, đóng dấu)

Chủ nhiệm đề tài

(ký, họ và tên)

INFORMATION ON RESEARCH RESULTS

1. General information:

Project title: Study on the phytomorphology, phytochemistry and in vitro antioxydant effects of the Plant Mui mac (*Desmodium triquetrum*, họ Đậu- Fabaceae)

Code number: ĐH2013-TN07-07

Coordinator: MS. Nong Thi Anh Thu

Implementing institution: Thai Nguyen University of Medicine and Pharmacy

Duration: from January 2013 to November 2014

2. Objective(s):

- Study about the morphological characteristics and anatomical features of the plant *Desmodium triquetrum*

- To isolate and identify the structure of chemical compounds from aerial parts of the plant *Desmodium triquetrum*.

3. Creativeness and innovativeness:

- The first report about the morphological characteristics and anatomical features of the plant *Desmodium triquetrum*

- This is the first report on the presence of compound 4 in the plant *D. triquetrum*

4. Research results:

- Based on the morphological observations, we determined that the plant voucher specimen collected in Bac Kan, Vietnam, with vernacular names are known as “Mui mac”, “Co binh”, belongs to the species *Desmodium triquetrum* (L.) DC., a member of the family Fabaceae. The analytical phytotomy of leaves, stem, and root described herein also supports the conclusion. This is the first comprehensive morphological and anatomical study about this species.

- By chromatographic methods, 4 substances isolated from the plant and they were identified as kaempferol (1), astragalin (2), isoquercitrin (3), quercitrin (4) by analysis of physicochemical and spectroscopic data.

5. Products:

a. Scientific product (2 scientific articles)

- Nong Thi Anh Thu, Nguyen Thuy An, Nguyen Thị Bích Thu, (2015), “Study on the phytomorphology of the plant *Desmodium triquetrum* (L.) DC. collected in Bac Kan”, *Vietnam Journal of Practical Medicine*, (10), pp. 129-132.

- Nong Thi Anh Thu, Vu Van Tuan, Nguyen Thi Bich Thu, (2016), “Isolation and Identification of flavonoids from the aerial parts of the *Desmodium triquetrum* (L.) DC.”, *Pharmaceutical journal*, (477), pp. 58-62.

b. Education and training product

- 02 Student research:

- ✓ Nguyen Thi Tham (2013), *Preliminary qualitative chemical composition and study of extracts of Desmodium triquetrum plants*, graduation thesis, Thai Nguyen University of medical and pharmacy, Thai Nguyen University.
- ✓ Tran Phuong Linh (2013), *Study the antioxidant effects of Desmodium triquetrum plants*, graduation thesis, Thai Nguyen University of medical and pharmacy, Thai Nguyen University.

- 01 Master of Science

- ✓ Nguyen Minh Ngọc (2013), *Research on plant characteristics, chemical composition of Desmodium triquetrum plants collected in Bac Kan*, master thesis, Ha Noi University of Pharmacy.

6. Transfer alternatives, application institutions, impacts and benefits of research results:

Additional references for students and medical staff

ĐẶT VẤN ĐỀ

1. Tính cấp thiết của đề tài.

Cây Mũi mác (*Desmodium triquetrum* (L.) DC.) hay *Tadehagi triquetrum* (Linnaeus) H. Ohashi, còn gọi là cây Thóc lép, cây Cỏ bình. Cây phân bố ở Ấn Độ, Mianma, Trung Quốc tới Philippin. Ở nước ta, cây mọc hoang ở rìa rừng, rừng thưa. Khi dùng làm dược liệu, cây được thu hái toàn cây vào mùa hè, mùa thu. Toàn cây được rửa sạch, chặt nhỏ dùng tươi hay phơi khô dùng dần. Theo YHCT, cây có vị ngọt, tính mát, có tác dụng thanh nhiệt giải độc, kiện tỳ tiêu thực, lợi niệu, sát trùng. Lá khô cho vào ủ với quần áo để sát trùng. Ở Thái Lan, lá được dùng để chiết thành cao nước làm viên uống trị trĩ hoặc uống như trà. Thường dùng mỗi lần 15- 60g đun lấy nước uống.

Trong cây có chứa friedelin, epifriedelinol, stigmaterol, lá chứa 7,1% – 8,6% tanin. Cho đến nay chưa có công trình nghiên cứu nào công bố đầy đủ về đặc điểm thực vật, thành phần hóa học, tác dụng sinh học của cây Mũi mác (*Desmodium triquetrum* (L.) DC.) mọc ở Việt Nam.

2. Mục tiêu của đề tài

Nhằm tạo cơ sở khoa học cho việc khai thác và sử dụng dược liệu có hiệu quả hơn, chúng tôi tiến hành đề tài "Nghiên cứu đặc điểm thực vật, thành phần hóa học và tác dụng chống oxy hóa của cây Mũi mác" với các mục tiêu:

2.1. Thẩm định tên khoa học cây Mũi mác

2.2. Định tính các nhóm chất đối với căn toàn phần và căn các phân đoạn của mẫu nghiên cứu; Chiết xuất, phân lập và xác định cấu trúc hoá học của các chất tinh khiết tách được từ mẫu nghiên cứu.

2.3. Thử tác dụng chống oxy hóa invitro của dịch chiết cao mũi mác

CHƯƠNG 1. TỔNG QUAN

1. Tổng quan về chi *Desmodium*

1.1. Vị trí phân loại

Theo khung phân loại ngành Ngọc lan, vị trí phân loại của chi *Desmodium*: Thuộc họ Đậu-1, bộ đậu- Fabales, lớp ngọc lan: Magnoliopsida, ngành Ngọc lan -Magnoliophyta, giới thực vật-Plantae.

Desmodium là một chi lớn thuộc họ Đậu với khoảng 350 loài thực vật đa số được sử dụng làm ngũ cốc và thảo dược. Hiện nay chỉ có khoảng 30 loài được nghiên cứu về đặc điểm thực vật, tính chất hóa học và tác dụng sinh học. Ở Trung Quốc có khoảng 41 loài. Trang thông tin về tài nguyên các giống cây trồng thuộc Bộ nông nghiệp Mỹ đã ghi nhận sự có mặt của 211 loài. Theo Phạm Hoàng Hộ chi *Desmodium* ở Việt Nam có 59 loài.

1.2. Đặc điểm thực vật chung của chi *Desmodium*

Cây thảo cứng. Lá kép hoặc có một lá chét hình tam giác dài cụt hình tim ở gốc. Cuống có cánh. Có lá kèm. Cụm hoa chùm kép ở nách lá và ở ngọn. Hoa màu hồng. Quả loại đậu và có mang lông màu xám tro ở một số loài.

1.3. Đặc điểm một số loài trong chi *Desmodium* : *D. cephalotes* Wall. (Ba chẽ), *D. styracifolium* (Osborn) Merr. (Kim tiền thảo), *D. gangeticum* (L.) DC. (Thóc lép), *D. heterophyllum* (Willd.) DC. (Hàn the).

2. Những nghiên cứu về cây Mũi mác *D. triquetrum* (L.) DC.

2.1. Đặc điểm thực vật

Cây Mũi mác là cây thảo cứng, cao 1 - 1,5m. Thân có 3 cạnh. Lá có một lá chét hình tam giác dài cụt hình tim ở gốc; cuống có cánh; lá kèm hình tam giác nhọn dạng vẩy, dài 1,5cm, màu nâu. Cụm hoa chùm kép ở nách lá và ở ngọn. Hoa màu hồng, xếp 1-2 cái một. Quả đậu có lông xám tro hay không, có số đốt thay đổi từ 4-5 tới 8-9, rộng từ 2-2,5 tới 4-5mm hay hơn. Có nhiều thứ khác nhau bởi quả có lông hay không, số đốt nhiều hay ít, rộng hay hẹp.

2.2. Phân bố và sinh thái

Phân bố chủ yếu ở vùng nhiệt đới châu Á từ Ấn Độ, Srilanka đến Mianma, Trung Quốc, Philippin. Hình thức tái sinh tự nhiên của cây chủ yếu từ hạt. Có thể trồng từ hạt, dễ phủ đất, hạn chế xói mòn trong mùa mưa.

2.3. Thành phần hoá học

Bảng 1. Các chất phân lập được từ loài *Desmodium triquetrum* (L.) DC.

STT	Tên hợp chất	BPD	TLTK
1	Kaempferol 3 O β D glucopyranosid(1)	Toàn cây	[15]
2	Kaempferol 3 O β D galactopyranosid (2)	Toàn cây	[15]
3	Quercetin 3 O β D glucopyranosyl (6 \rightarrow 1) α L rhamnopyranosid (3)	Toàn cây	[15], [16]
4	Kaempferol 3-O- β - D-galactopyranosyl (6 \rightarrow 1)- α -L-rhamnopyranosid (4)	Toàn cây	[15]
5	Triquetrumones A (5)	Toàn cây	[17]
6	Triquetrumones B (6)	Toàn cây	[17]
7	Triquetrumones C (7)	Toàn cây	[17]

8	(R)-triquetrumonD (8)	Toàn cây	[17]
9	Cyclokieviton (9)	Toàn cây	[17]
10	Yukovanol (10)	Toàn cây	[17]
11	Aromadendrin (11)	Toàn cây	[17]
12	Kaempferol (12)	Toàn cây	[17]
13	Astragalin (13)	Toàn cây	[17]
14	Rutin (14)	Toàn cây	[16]
15	Quercetin-3-O- β -D-glucopyranosid (15)	Toàn cây	[16]
16	Quercetin-3-O- β -D-galactopyranosid (16)	Toàn cây	[16]
17	6-O-(E)-p-hydroxy-cinnamoyl- β - quercetin-3-O- β -D-galactopyranosid (17)	Toàn cây	[16]
18	Kaempferol-3-O- β -D-rutinosid (18)	Toàn cây	[16]
19	Triquetrumones (19)	Toàn cây	[13]
20	Triquetrumones F (20)	Toàn cây	[13]
21	Triquetrumones G (21)	Toàn cây	[13]
22	Triquetrumones H (22)	Toàn cây	[13]

2.4. Tác dụng dược lý

Cao còn chiết từ dược liệu lá khô cây *D. triquetrum* L. DC. có tác dụng làm lành vết thương do có khả năng làm tăng sự tạo thành collagen cũng như khả năng liên kết và tái tạo tế bào. Cao còn *D. triquetrum* L. DC. được chứng minh là có tác dụng ức chế men AMP phosphodiesterase, trong thành phần cao có chứa flavonoid, đây có thể là lý do cao chiết này có tác dụng kháng khuẩn, ngoài ra cao còn *D. triquetrum* L. DC. cũng được chứng minh là có tác dụng chống viêm, chống oxy hoá, bảo vệ tế bào gan. Trên thế giới đã có công bố nghiên cứu tác dụng tới đường huyết từ dịch chiết của *D. gangeticum* L., dịch chiết dược liệu này đã làm giảm đáng kể lượng đường huyết khi điều trị cho chuột đã được kích thích tăng đường huyết bằng streptozotocin. Dịch chiết của một số loài *Desmodium* như *D. ilinoense* A. Grey, *D. canadense* (L.) DC có tác dụng ức chế một số chủng vi khuẩn như *Salmonella typhimurium*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*. Ở Việt Nam cho tới nay chưa có công bố nào về tác dụng sinh học của cây Mũi mác.

2.5. Một số công dụng theo kinh nghiệm dân gian

Theo kinh nghiệm dân gian, mũi mác có vị ngọt, tính mát, có tác dụng thanh nhiệt giải độc, kiện tỳ tiêu thực, lợi niệu, sát trùng, nhanh liền sẹo. Dân gian thường dùng để điều trị các bệnh: Cảm mạo phát sốt nóng, viêm sung họng, viêm mủ răng, viêm tuyến mang tai, viêm thận cấp, viêm gan vàng da, viêm ruột ỉa chảy, lỵ, bệnh giun móc, nhiễm trùng sán lá gan, trẻ em suy dinh dưỡng, nôn mửa khi có mang, ngộ độc dứa, lao xương, viêm hạch bạch huyết, nhiễm trùng âm đạo *Trichomonas*, nấm da cứng.

Trong dân gian cây này còn được dùng cho vào thịt, cá muối để phòng ruồi, giòi hay phối hợp với các loại thuốc khác để diệt ruồi, muỗi, lá khô cho vào quần áo để sát trùng. Người dân ở vùng Bắc Á thường dùng dưới dạng uống để chữa áp se phổi, viêm thận phù nề, ở Ấn độ, người dân dùng chữa đau răng, rắn cắn. Ở Thái Lan, Indonesia lá dùng chiết nước hay làm thành viên uống trị trĩ và dùng uống thay trà, mỗi lần 15-60g sắc lấy nước uống.

D. triquetrum (L.) DC. được sử dụng trong YHCT các nước Trung Quốc, Ấn Độ để chữa các bệnh ngoài da như bồng, mụn nhọt, đinh nhọt, bệnh đường tiêu hóa như bệnh lỵ, bệnh trĩ, viêm

ruột. Các bệnh về gan như tổn thương gan vàng da, bệnh đường hô hấp. Ngoài ra cây này còn được sử dụng trong trường hợp suy dinh dưỡng ở trẻ em.

CHƯƠNG 2. NGUYÊN VẬT LIỆU, TRANG THIẾT BỊ VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

1. Đối tượng nghiên cứu

Đối tượng nghiên cứu là phần trên mặt đất của cây mũi mác thu hái tại Bắc Kạn vào ngày 10 tháng 10 năm 2011, đã được thẩm định tên khoa học là *Desmodium triquetrum* (L.) DC.

2. Phương tiện nghiên cứu

2.1. Thuốc thử, dung môi, hoá chất

- Các thuốc thử, dung môi, hoá chất sử dụng trong nghiên cứu đạt tiêu chuẩn phân tích đã ghi trong Dược điển Việt Nam III, IV.

2.2. Phương tiện và máy móc: các phương tiện máy móc phục vụ nghiên cứu

2.3. Phương pháp nghiên cứu

2.3.1. Về thực vật

2.3.1.1. Phân tích hình thái giải phẫu, đặc điểm hiển vi của thực vật: Mô tả đặc điểm hình thái theo phương pháp ghi trong tài liệu. Nghiên cứu đặc điểm vi học được thực hiện theo tài liệu Kiểm nghiệm dược liệu bằng phương pháp hiển vi. Với một bột Dược liệu: Lên tiêu bản bột, quan sát và chụp ảnh trên kính hiển vi quang học với độ phóng đại X40).

2.3.1.2. Giám định tên khoa học của mẫu nghiên cứu.

- Sử dụng khóa phân loại tới họ, chi và loài trong tài liệu
- Đối chiếu với mô tả trong các tài liệu chuyên sâu về thực vật.
- So sánh đối chiếu với mẫu tiêu bản tại một số phòng tiêu bản mẫu khô.

2.3.2. Về hóa học

2.3.2.1. Phương pháp định tính bằng phản ứng hoá học thường quy kết hợp sắc ký lớp mỏng TLC

2.3.2.2. Định tính bằng sắc ký lớp mỏng

2.3.2.3. Chiết xuất

Phần trên mặt đất của cây mũi mác đã phơi khô (5,0 kg) được cắt nhỏ, chiết bằng phương pháp ngâm với ethanol 70% ở nhiệt độ thường tại phòng thí nghiệm (ngâm 3 lần, mỗi lần 4 ngày). (Hình 1).

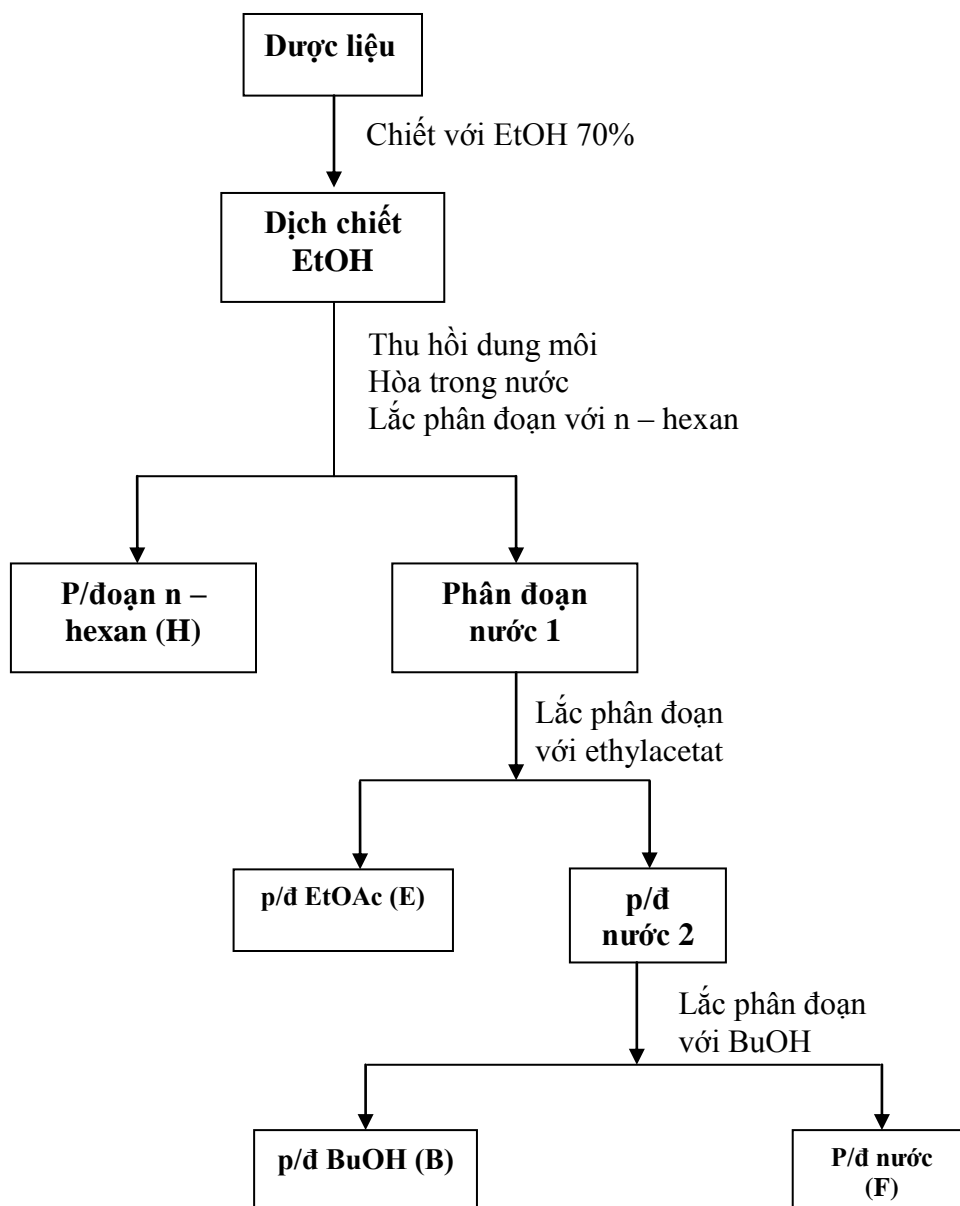
2.3.2.4. Phương pháp phân lập các hợp chất

- Phân lập các hợp chất bằng sắc ký cột và SKLM điều chế.

2.3.2.5. Phương pháp xác định cấu trúc hoá học các hợp chất

- Xác định cấu trúc các hợp chất phân lập được dựa trên các thông số vật lý và các phương pháp phổ bao gồm: Điểm chảy, phổ UV-VIS, phổ hồng ngoại (IR), phổ khối (MS), phổ cộng hưởng từ hạt nhân một chiều và hai chiều (nếu cần)-1D và 2D NMR.

- Quá trình chiết xuất được tiến hành như **Hình 1**.



Hình 1. Sơ đồ chiết các phân đoạn cây Mũi mác

2.3.3. Nghiên cứu tác dụng chống oxi invitro

Chuẩn bị mẫu để sàng lọc

Sàng lọc hoạt tính dọn gốc tự do DPPH của các dược liệu

Sàng lọc hoạt tính dọn gốc tự do DPPH của các mẫu cao dược liệu được chọn cho ở nồng độ ban đầu là 200 mg/ml, sau đó nếu mẫu có tác dụng dọn gốc tự do > 50% thì được thử tiếp ở nồng độ nhỏ hơn là 100, 50, 25, 12.5 (mg/ml). Những mẫu có hoạt tính thấp hơn 50 % thì không tiến hành thử ở các nồng độ thấp hơn nữa. Giá trị IC₅₀ được hiểu là nồng độ tại đó mẫu thử dọn được 50% lượng gốc tự do.

* Tiến hành thí nghiệm

* Tính kết quả

Khả năng dọn gốc tự do của mẫu thử (cho cả chất đối chiếu dương) được tính theo công thức: $I (\%) = [(OD_{ch} - OD_{th}) / OD_{ch}] \times 100$

Trong đó: I (%): Khả năng dọn gốc tự do DPPH của mẫu thử, OD_{ch}: Độ hấp thụ quang của mẫu chứng, OD_{th}: Độ hấp thụ quang của mẫu thử .

Phương pháp thử tác dụng dọn gốc tự do superoxide anion (O₂^{•-})

* Tiến hành thí nghiệm

* Tính kết quả: Khả năng dọn gốc tự do O₂^{•-} của mẫu thử (cho cả chất đối chiếu dương) được tính theo công thức:

$$I (\%) = [(OD_{ch} - OD_{th})/OD_{ch}] \times 100$$

Trong đó: I (%): Khả năng dọn gốc tự do O₂^{•-} của mẫu thử, OD_{ch}: Độ hấp thụ quang của mẫu chứng, OD_{th}: Độ hấp thụ quang của mẫu thử .

Phương pháp thu thập và xử lý số liệu

- Kết quả thử tác dụng chống oxy hóa, được xử lý bằng phương pháp Probit trên phần mềm Excel, để tính ra giá trị IC₅₀

CHƯƠNG 3. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU

1. Nghiên cứu về thực vật

Qua các đặc điểm hình thái trên, kết hợp so sánh, đối chiếu với khóa phân loại, tài liệu chuyên sâu về thực vật, TS. Nguyễn Quốc Bình và cộng sự tại Viện sinh thái tài nguyên đã kết luận mẫu nghiên cứu trên là *Desmodium triquetrum* (L.) DC., thuộc họ Đậu (Fabaceae) còn có tên khoa học là *Tadehagi triquetrum* (Linnaeus) H. Ohashi. (Giấy giám định TKH: Phụ lục 1)

2. Định tính thành phần hóa học của dược liệu Mũi mác

Kết quả được trình bày ở **Bảng 3**. Kết quả định tính hóa học cho thấy trong cây có các nhóm hợp chất tự nhiên: Flavonoid, saponin, tanin, chất béo, steroid, caroten, đường khử, acid hữu cơ.

3. Chiết xuất và phân lập các hợp chất

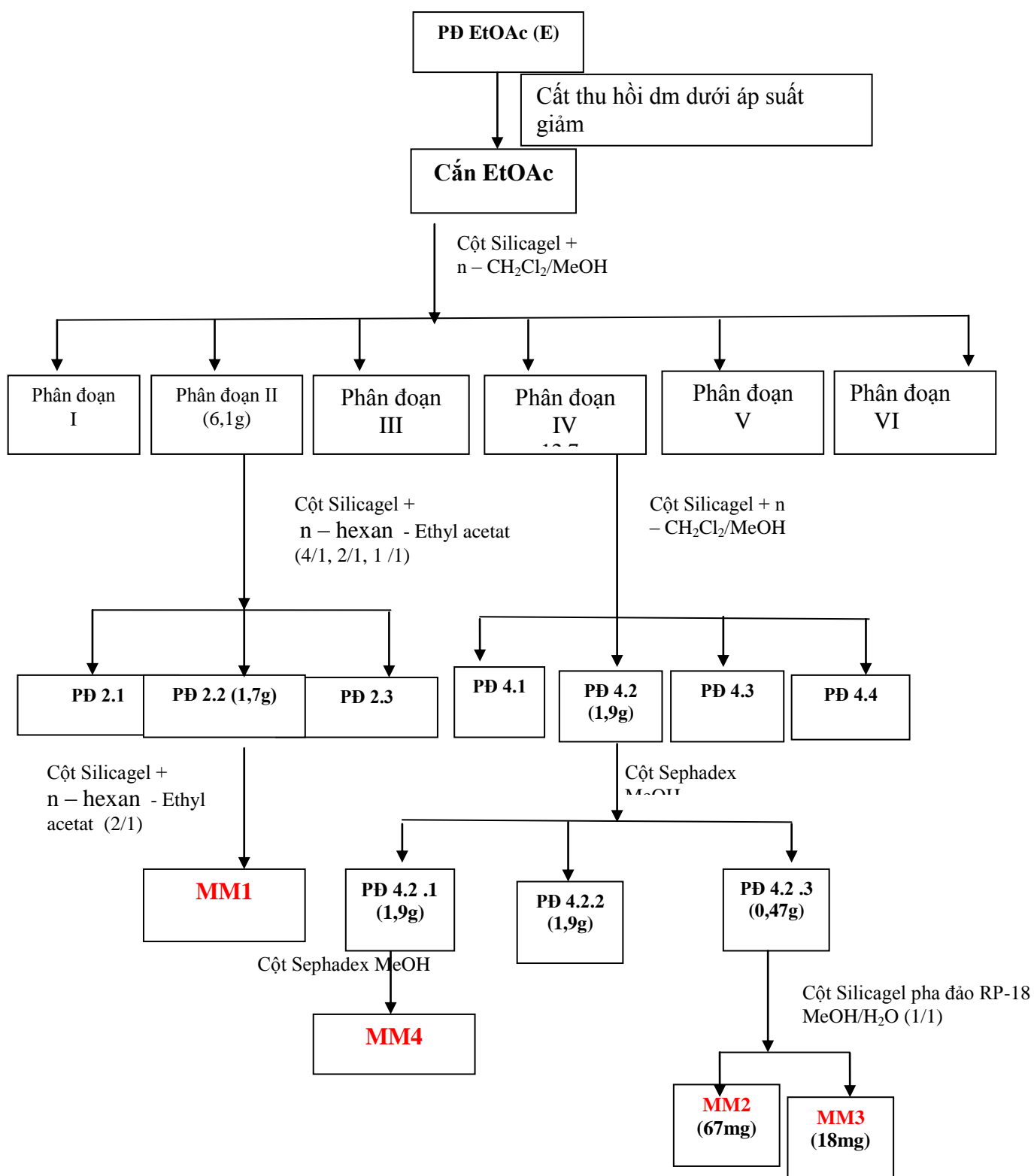
3.1. Chiết xuất: Chiết xuất theo sơ đồ hình 2 và thu được căn các phân đoạn n- hexan (H), Ethylacetat (E), Buthanol (B), Căn nước (F).

3.2. Phân lập các chất trong cây Mũi mác

3.2.1. Phân lập

Quy trình chạy cột được tóm tắt ở sơ đồ **Hình 2**.

Các chất thu được : **Chất số 1; Chất số 2; Chất số 3; Chất số 4:** xem bảng 4 và bảng 5.



Hình 2. Sơ đồ phân lập các chất từ phân đoạn Ethylacetat

3.2.2. Xác định cấu trúc hóa học của các chất chính phân lập được từ Mùi mốc

Xác định cấu trúc của các hợp chất chính sử dụng các phương pháp phổ hiện đại trong trường hợp cần thiết (phổ cộng hưởng từ hạt nhân, phổ khối, phổ hồng ngoại, phổ UV, ...) kết hợp xác định các đặc trưng hóa lý của hợp chất tinh khiết.

Bảng 4. Số liệu phổ $^1\text{H-NMR}$ (CD_3OD ; 500 MHz) của các chất **1-4**

Vị trí proton	δ_{H} (độ bội; $J = \text{Hz}$) (ppm)			
	1	2	3	4
6	6,20 (d; 2,0)	6,22 (d; 1,5)	6,22 (d; 2,0)	6,22 (d; 2,0)
8	6,41 (d; 2,0)	6,41(br s)	6,40 (d; 2,0)	6,39 (d; 2,0)
2'	8,09 (d; 8,5)	8,07 (d; 9,0)	7,73 (d; 2,0)	7,36 (d; 2,5)
3'	6,92 (d; 8,5)	6,90 (d; 9,0)		
5'	6,92 (d; 8,5)	6,90 (d; 9,0)	6,89 (d; 8,5)	6,93 (d; 8,0)
6'	8,09 (d; 8,5)	8,07 (d; 9,0)	7,61 (d; 2,0; 8,5)	7,33 (dd; 2,0; 8,5)
1''		5,26 (d; 7,5)	5,26 (d; 7,5)	5,37 (d; 1,5)
2''		3,45 (m)	3,51 (t; 9,0)	4,24 (m)
3''		3,42 (m)	3,46 (t; 9,0)	3,77 (dd; 3,5; 9,5)
4''		3,33 (m)	3,37(t; 9,5)	3,36 (m)
5''		3,22 (m)	3,25 (m)	3,44 (dd, 6,0; 9,5)
6''		3,53 (dd; 6,5; 12,0) 3,71 (dd; 2,0; 12,0)	3,73 (dd; 2,0; 12,0) 3,61 (dd; 5,5; 12,0)	0,96 (d; 6,5)

Bảng 5. Số liệu phổ $^{13}\text{C-NMR}$ (CD_3OD ; 125 MHz) của các chất **1-4**

Vị trí carbon	δ_{C} (ppm)			
	1	2	3	4
2	148,1	159,1	159,0	159,3
3	137,1	135,5	135,6	136,2
4	177,4	179,5	179,5	179,7
5	162,5	166,1	163,0	158,5
6	99,3	100,0	99,9	99,9
7	165,6	166,1	166,1	165,9
8	94,5	94,7	94,7	94,7
9	158,3	158,6	158,5	163,2
10	104,6	104,2	105,7	105,9
1'	123,7	122,8	123,2	122,9
2'	130,7	132,3	117,6	116,4
3'	116,3	116,1	145,9	146,4
4'	160,5	161,6	149,8	149,8
5'	116,3	116,1	116,0	117,0
6'	130,7	132,3	123,1	123,0
1''		104,2	104,3	103,6
2''		75,7	75,7	72,0
3''		78,1	78,1	72,2
4''		71,4	71,2	73,3
5''		78,4	78,4	71,9
6''		62,6	62,6	17,6

Xác định cấu trúc của các hợp chất phân lập được

Chất số **1** có các dữ kiện phổ ở trên kết hợp với những tài liệu đã công bố về thành phần hóa học của loài *Desmodium triquetrum* (L.) DC. Phân tích các dữ kiện phổ, tham khảo tài liệu đã công bố xác định chất số **1** là hợp chất kaempferol, một flavonol phổ biến trong thực vật và cũng đã được tìm thấy trong thành phần của loài *D. triquetrum*.

Hợp chất số **2** thu được cũng là dạng bột màu vàng, có nhiệt độ nóng chảy 215-217°C. Các phổ IR, ¹H- và ¹³C-NMR (Bảng 1 và 2) của **2** tương tự như **1**, gợi ý rằng chất số **2** cũng là một flavonoid. Tuy nhiên, phổ ¹H- và ¹³C-NMR cho thấy chất số **2** gồm hai phần chính, phần aglycon và phần đường. Các số liệu phổ phần aglycon của **2** rất giống với kaempferol (**1**), gồm có sáu tín hiệu proton vòng thơm (bốn proton tương tác với nhau dạng AABB và hai proton tương tác theo dạng AX) và mười ba tín hiệu cacbon. Vì vậy, **2** được suy đoán là một glycosid của kaempferol (**1**). Phổ khối cho biết khối lượng phân tử của **2** là 448, phù hợp với công thức C₂₁H₂₀O₁₁ của astragalín. So sánh số liệu phổ thu được với các số liệu đã được công bố của astragalín khẳng định chất số **2** phân lập được là astragalín.

Chất số **3** thu được cũng là một flavonoid glycosid. Cũng tương tự như **2**, phần đường của **3** được xác định là β-D-glucopyranosid dựa vào phổ ¹H- và ¹³C-NMR (Bảng 1 và 2). Như vậy, phần aglycon này được nhận dạng là quercetin và chất số **3** được dự đoán là quercetin-3-O-β-D-glucopyranosid. So sánh các dữ kiện phổ của chất số **3** với dữ kiện phổ đã công bố trên đi đến kết luận hợp chất **3** là quercetin-3-O-β-D-glucopyranosid, còn được gọi là isoquercitrin.

Chất số **4** thu được cũng là một flavonoid glycosid với phần aglycon là quercetin (Bảng 1 và bảng 2). Tuy nhiên, khác với **3**, phần đường của **4** được xác định là α-L-rhamnopyranosid bởi các tín hiệu δ_C 103,6; 73,3; 72,2; 72,0; 71,9 và 17,6 ppm, kết hợp với dữ liệu của phổ ¹H-NMR có δ_H 5,37 (1H, d, J = 1,5 Hz); 3,26-4,24 (4H, các proton của đường) và 0,96 (1H, d, 6,5). Phổ khối APCI-MS có pic ion m/z=449 [M+H]⁺, cho phép xác định công thức phân tử của **4** là C₂₁H₂₀O₁₁. So sánh số liệu phổ thu được với các số liệu đã được công bố cho biết chất số **4** phân lập được là quercetin-3-O-α-L-rhamnopyranosid hay còn được gọi là quercitrin.

3.3. Tác dụng chống oxi invitro của dược liệu

3.3.1. Dạng gốc tự do DPPH

Bảng 6. Kết quả dạng gốc tự do DPPH của dược liệu

Cao ethanol; ethyl acetat; quercetin

TT	% loại bỏ gốc DPPH					IC50 μg/ml
	200 μg/ml	100 μg/ml	50 μg/ml	25 μg/ml	12,5 μg/ml	
Nồng độ mẫu thử						
ETOH	93,36 %	83,73	59,09	35,09	23,09	36,1
ETOAC	95,91	90,18	65,73	43,36	26,54	29,2

3.3.2. Dạng gốc tự do superoxide anion (O₂⁻)

Bảng 7. Kết quả dạng gốc tự do superoxide anion (O₂⁻)

Cao ethanol; ethyl acetat; quercetin

TT	% loại bỏ gốc tự do superoxide anion					IC50 μg/ml
	200 mg/ml	100 mg/ml	50 mg/ml	25 mg/ml	12,5 mg/ml	
Nồng độ						
ETOH	75,83%	70,33%	54,67%	42,5%	31,0%	37,5
ETOAC	77,33	70,36	60,0	53,5	43,83	20,0

3.3.3. Kết quả dọn gốc tự do của đối chứng dương quercetin

Bảng 8. Kết quả dọn gốc tự do của đối chứng dương quercetin

Nồng độ	% loại bỏ gốc superoxid					IC50 μg/ml
	20 μg/ml	10 μg/ml	5 μg/ml	2,5 μg/ml	1,25 μg/ml	
DPPH	91,54	65,18	45,09	29,55	14,82	5,1
Superoxid	70,34	59,83	48,5	39,67	28,5	5,2

Từ kết quả nghiên cứu tác dụng chống oxy hóa invitro kết luận được cao chiết có tác dụng bắt gốc tự do DPPH nhưng tác dụng này cũng không nổi trội. Tuy vậy nghiên cứu cũng có ý nghĩa định hướng sàng lọc cho các nghiên cứu về tác dụng chống oxy hóa theo hướng bảo vệ gan tiếp theo của đề tài. Qua thu thập tài liệu và kết quả nghiên cứu về hóa học của đề tài cũng cho thấy sự có mặt của các phenolic, flavonoid là những nhóm hợp chất có khả năng chống oxy hóa nên ở đây cũng lý giải được phần nào sự có mặt của tác dụng sinh học này.

CHƯƠNG 4. BÀN LUẬN

1. Về phương pháp:

Phần thực nghiệm nghiên cứu đã áp dụng kết hợp các phương pháp nghiên cứu dược liệu học từ kinh điển, cơ bản, thường quy, đơn giản đến hiện đại, đòi hỏi phương tiện kỹ thuật cao. Về hóa thực vật, phương pháp nghiên cứu bao gồm từ định tính sơ bộ bằng phản ứng hóa học trong ống nghiệm, chiết ngâm lạnh, chiết phân đoạn, sắc ký lớp mỏng định tính và điều chế, sắc ký cột, sắc ký lỏng hiệu năng cao, phổ hồng ngoại, phổ tử ngoại, phổ cộng hưởng từ hạt nhân H1, C13, phổ khối.

Về chiết tách, trong số rất nhiều phương pháp chiết xuất trong nghiên cứu, vì mục đích nghiên cứu thành phần hóa học, chiết ngâm lạnh được lựa chọn vì tính đơn giản (thiết bị, phương tiện rẻ tiền, dễ kiểm), dễ tiến hành, đặc biệt ít gây biến đổi hóa học sản phẩm chiết. Trong đề tài nghiên cứu này SKLM được sử dụng để định tính các chất trong các phân đoạn chiết, thăm dò hệ dung môi để lựa chọn hệ dung môi chiết, phân lập, kiểm tra các phân đoạn trong quá trình phân lập. SKC hiệu quả tách cao, phân đoạn dễ tinh sạch (theo dõi bằng SKLM), đặc biệt là nhẹ nhàng, không hay ít gây biến tính, bảo toàn nguyên vẹn chất chiết, mà tiến hành đơn giản, chi phí thấp.

2. Thành phần hóa học và tác dụng chống oxy hóa invitro

Định tính các nhóm chất chính trong dược liệu Mũi mác, sơ bộ phát hiện trong Mũi mác có: Flavonoid, saponin, tanin, chất béo, steroid, caroten, đường khử, acid hữu cơ.

Kết quả phân lập hóa học thu được 4 hợp chất. Dựa vào số liệu các phổ và so sánh với tài liệu đã công bố, các hợp chất này được xác định là kaempferol (1), astragalin (2), isoquercitrin (3), quercitrin (4). Trong bốn hợp chất phân lập được, hợp chất quercitrin (4) lần đầu tiên được tìm thấy trong loài *D. triquetrum*. Đây là đóng góp mới của nghiên cứu nhằm làm phong phú thêm tri thức về hóa thực vật học của cây mũi mác *D. triquetrum*.

Cây mũi mác được dùng trong dân gian với các tác dụng chống viêm, chống oxy hóa, bảo vệ gan. Mặt khác kết quả nghiên cứu hóa học cho thấy trong thành phần của cây có chứa các flavonoid, các chất này đã được nghiên cứu về tác dụng sinh học. Vì vậy phải chăng tác dụng sinh học và các công dụng trên của dược liệu Mũi mác phần nào có thể giải thích do có phần đóng góp của các flavonoid như kaempferol (tác dụng chống oxh, ngăn ngừa xơ cứng động mạch), astragalin (chống viêm, chống dị ứng, giảm nguy cơ biến chứng trong bệnh tiểu đường), isoquercitrin (tác dụng bảo vệ gan, lợi tiểu, bền thành mạch máu), quercetin (chống oxy hóa). Đây cũng là một đóng góp về tìm hiểu mối liên quan giữa thành phần hóa học và tác dụng sinh học của dược liệu, chứng

minh kinh nghiệm dân gian sử dụng cây Mũi mác, gợi mở các thử nghiệm tác dụng sinh học Mũi mác.

Kết quả nghiên cứu về đặc điểm thực vật, thành phần hoá học của cây Mũi mác cho phép định hướng nghiên cứu tiếp theo và nâng cao giá trị sử dụng cũng như giá trị kinh tế của cây Mũi mác. Thử nghiệm tác dụng chống oxy hóa invitro của dược liệu cũng góp phần sàng lọc trước nghiên cứu, các số liệu này góp phần trong nghiên cứu tiếp theo của đề tài về tác dụng bảo vệ gan cũng như các tác dụng sinh học khác của dược liệu.

KẾT LUẬN VÀ KIẾN NGHỊ

Kết luận:

Qua nghiên cứu chúng tôi thu được một số kết quả sau:

1. Mô tả hình thái, đối chiếu tài liệu tham khảo, kết luận: Mẫu nghiên cứu có tên khoa học là *Desmodium triquetrum* (L.) DC. thuộc họ Đậu (Fabaceae) hay còn có tên khoa học là: *Tadehagi triquetrum* (Linnaeus) H. Ohashi.
2. Định tính thành phần hóa học bằng phản ứng học thấy cây Mũi mác có flavonoid, saponin, tanin, chất béo, steroid, caroten, đường khử, acid hữu cơ. Từ cấn Ethylacetat đã phân lập được
3. Bằng các phương pháp sắc ký, nhóm nghiên cứu đã phân lập được bốn flavonoid từ cấn phân đoạn ethyl acetat của phần trên mặt đất cây mũi mác *Desmodium triquetrum* (L.) DC thu hái tại Bắc Kạn. Dựa vào số liệu các phổ và so sánh với tài liệu đã công bố, các hợp chất này được xác định là kaempferol (1), astragalin (2), isoquercitrin (3), quercitrin (4). Trong bốn hợp chất phân lập được, hợp chất quercitrin (4) lần đầu tiên được tìm thấy trong loài *D. triquetrum*. Đây là đóng góp mới của nghiên cứu nhằm làm phong phú thêm tri thức về hóa thực vật học của cây mũi mác *D. triquetrum*.

Kiến nghị:

Các kết quả của đề tài đã đáp ứng đầy đủ các mục tiêu đề ra., qua các kết quả thu được trong nghiên cứu đã gợi mở cho đề tài các hướng nghiên cứu tiếp theo về thành phần hóa học cũng như tác dụng sinh học của cây. Cụ thể như nghiên cứu tiếp về biến động thành phần hóa học của cây Mũi mác theo điều kiện sinh thái, khí hậu, thời tiết, thời kỳ sinh trưởng phát triển của cây, phân tích thêm thành phần hóa học của cây (định tính và định lượng), điều tra tài nguyên và biện pháp bảo vệ nguồn tài nguyên dược liệu, nguồn gen, nghiên cứu tác dụng sinh học dựa trên kinh nghiệm sử dụng và thành phần hóa học đã phân lập được. Nghiên cứu tác dụng chống oxy hóa invitro cũng góp phần cho số liệu trong nghiên cứu tiếp theo của đề tài về tác dụng chống oxy hóa invivo theo hướng bảo vệ gan của dược liệu.