

ĐẠI HỌC THÁI NGUYÊN
TRƯỜNG ĐẠI HỌC Y DƯỢC



BÁO CÁO TỔNG KẾT
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 THU'

THÁI NGUYÊN 2019

ĐẠI HỌC THÁI NGUYÊN
TRƯỜNG ĐẠI HỌC Y DƯỢC

**BÁO CÁO TỔNG KẾT
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

Xác nhận của tổ chức chủ trì

Chủ nhiệm đề tài

ThS. Nông Thị Anh Thư

THÁI NGUYÊN, tháng 1 năm 2019

**NHỮNG THÀNH VIÊN THAM GIA NGHIÊN CỨU ĐỀ TÀI
VÀ ĐƠN VỊ PHỐI HỢP CHÍNH**

1. NHỮNG THÀNH VIÊN THAM GIA NGHIÊN CỨU ĐỀ TÀI			
TT	Họ và tên	Đơn vị công tác và lĩnh vực chuyên môn	Nội dung nghiên cứu cụ thể được giao
1	Nông Thị Anh Thu	ThS, Trường ĐH Y Dược – ĐH Thái Nguyên.	Thu mẫu, thẩm định tên khoa học của cây Mũi mác, nghiên cứu thành phần hóa học, viết báo cáo tổng kết
2	Nguyễn Thị Bích Thu	TS, Viện Dược Liệu	Nghiên cứu thành phần hóa học
3	Trần Phương Linh	Sinh viên ĐH Dược K4- Trường DDHYD Thái Nguyên	Nghiên cứu tác dụng chống oxy hóa
2. ĐƠN VỊ PHỐI HỢP CHÍNH			
Tên đơn vị trong và ngoài nước	Nội dung phối hợp nghiên cứu	Họ và tên người đại diện đơn vị	
Khoa Hóa Thực vật – Viện Dược Liệu	Phối hợp dùng máy sắc ký lớp mỏng hiệu năng cao để nghiên cứu thành phần hóa học	TS Nguyễn Thị Bích Thu	

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.....	4
2.1. Đặc điểm thực vật.....	4
2.2. Phân bố và sinh thái	4
2.3. Thành phần hoá học	5
2.3.1. Thành phần hóa học của chi <i>Desmodium</i>	5
2.4. Tác dụng dược lý	15
2.5. Một số công dụng theo kinh nghiệm dân gian.....	16
2.6. Một số bài thuốc dân gian.....	17
Chương 2. NGUYÊN LIỆU, TRANG THIẾT BỊ & PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU...	19
2.1. Đối tượng nghiên cứu.....	19
2.2. Phương tiện nghiên cứu	19
2.2.1. Thuốc thử, dung môi, hoá chất	19
2.2.2. Phương tiện và máy móc	20
2.3. Phương pháp nghiên cứu.....	21
2.3.1. Về thực vật	21
2.3.2. Về hóa học	21
2.3.3. Nghiên cứu tác dụng chống oxi hoá invitro.....	29
Chương 3. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU	32
3.1. Đặc điểm thực vật cây Mũi mác	32
3.1.1. Đặc điểm hình thái	32
3.1.2. Đặc điểm vi học	34
3.2. Thành phần hóa học của dược liệu Mũi mác	39
3.2.1. Kết quả định tính hóa học	
3.2.2. Định tính căn các phân đoạn bằng sắc ký lớp mỏng.....	40

3.3. Tác dụng chống oxi invitro của dược liệu.....	50
3.3.1. Dọn gốc tự do DPPH	50
3.3.2. Dọn gốc tự do superoxid anion ($O_2^{\cdot-}$)	50
3.3.3. Kết quả dọn gốc tự do của đối chứng dương quercetin	51
CHƯƠNG 4. BÀN LUẬN	52
4.1. Về thực vật:	52
4.2. Về phương pháp:	52
4.3. Thành phần hóa học và tác dụng chống oxy hóa invitro	53

DANH MỤC CÁC KÝ HIỆU, CHỮ VIẾT TẮT

AST	Ánh sáng thường
ĐĐVN	Dược điển Việt Nam
EtAc	Ethyl acetat
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>

DANH MỤC CÁC BẢNG, BIỂU

Bảng 1.2. Các alcaloid từ các loài thuộc chi <i>Desmodium</i>	10
Bảng 1.3. Các hợp chất steroid phân lập được từ chi <i>Desmodium</i>	
Bảng 2. Một số bài thuốc từ cây Mũi mác trong dân gian.	17
Bảng 3. Bảng kết quả các phản ứng định tính nhóm chất chính có trong dược liệu Mũi mác	39
Bảng 4. Số liệu phổ $^1\text{H-NMR}$ (CD_3OD ; 500 MHz) của các chất 1-4 ..	46
Bảng 5. Số liệu phổ $^{13}\text{C-NMR}$ (CD_3OD ; 125 MHz) của các chất 1-4 ..	46

DANH MỤC CÁC HÌNH

Hình 1.1. Cấu trúc hóa học của các hợp chất khác từ chi <i>Desmodium</i>	12
Hình 2.1. Sơ đồ chiết các phân đoạn cây Mũi mác.....	38
Hình 3.1. Cây Mũi mác (<i>Tadehagi triquetrum</i> (L.) H. Ohashi).....	42
Hình 3.2. Vi phẫu rễ cây Mũi mác.....	43
Hình 3.3. Vi phẫu thân.....	44
Hình 3.4. Vi phẫu lá và phiến lá.....	45
Hình 3.5. Đặc điểm bột dược liệu Mũi mác.....	46
Hình 3.6. Cây Mũi mác (<i>Desmodium triquetrum</i> (L.) DC.).....	47
Hình 3.7. Sắc ký đồ căn dịch chiết toàn phần ở AST, UV ₂₅₄ , UV ₃₆₅	50
Hình 3.8. Sắc ký đồ căn dịch chiết phân đoạn ethylacetat ở UV ₂₅₄ , UV ₃₆₅ , AST/TT	41
Hình 3.9. Sắc ký đồ căn dịch chiết phân đoạn buthanol ở UV ₂₅₄ , UV ₃₆₅ và AST/TT	42

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 Thư
- 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 củ 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 antioxidant 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 Bích 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

Cây Mũi mác (*Desmodium triquetrum* (L.) DC.) hay *Tadehagi triquetrum* (Linnaeus) H. Ohashi, còn gọi là cây Thóc lép, cây Cổ 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. Trong dân gian, cây thường được dùng để điều trị các chứng như: Cảm mạo phát sốt nóng, viêm sung họng, viêm mủ răng, viêm tuyến mang tai, viêm thận cấp, viêm gan vàng da, viêm ruột tiêu chảy, lỵ [1]. Một số nơi sử dụng để chữa bệnh giun móc, trẻ em suy dinh dưỡng, nôn mửa khi có mang, ngộ độc dứa, lao xương và bạch huyết, nhiễm trùng âm đạo *Trichomonas*, nấm da cứng. Dân gian cho vào thịt, cá muối để phòng ruồi, giòi hoặc phối hợp với các loại thuốc khác để diệt ruồi, muỗi. 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 thay trà. Thường dùng mỗi lần 15- 60g đun sôi lấy nước uống.

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. 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:

1. Thẩm định tên khoa học cây Mũi mác
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.
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*:

Giới thực vật: Plantae

Ngành ngọc lan: Magnoliophyta

Lớp ngọc lan: Magnoliopsida

Bộ: Fabales

Họ: Fabaceae

Chi: *Desmodium* [1], [2].

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 [33]. Ở Trung Quốc có khoảng 41 loài [24]. Trang thông tin về tài nguyên các giống cây trồng thuộc Bộ nông nghiệp Mỹ đã ghi nhận sự có mặt của 211 loài [22]. Theo Phạm Hoàng Hộ chi *Desmodium* ở Việt Nam có 59 loài [2].

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 [1,4].

1.3. Đặc điểm một số loài trong chi *Desmodium*

○ *D. cephalotes* Wall. (Ba chẽ)

Cây nhỏ, cao 2 - 3m, thân tròn, cành non hình tam giác, dẹt, lá mọc so le, có 3 lá chét, nguyên, có lá kèm. Lá non có lông trắng bạc ở cả hai mặt. Hoa màu trắng tập trung ở kẽ lá. Quả loại đậu. Cây mọc hoang ở đồi núi ven đường. Lá thu hái vào mùa xuân và mùa hạ, dùng tươi hoặc phơi khô. Người

dân thường dùng lá sao vàng sắc uống để chữa lỵ hoặc giã lá lấy nước uống, bã đắp để chữa rắn cắn. Liều dùng mỗi ngày 20 – 30g lá tươi.

○ ***D. styracifolium* (Osb.) Merr.** (Kim tiền thảo)

Cây thảo mọc bò, sau đứng thẳng, cao 0,3 – 0,5m. Ngọn non dẹt, có khía và lông tơ trắng. Lá mọc so le, gồm 1 hoặc 3 lá chét hình tròn, dài 1,5 – 3,4cm, rộng 2 – 3,5cm, gốc bằng hoặc hơi hình tim, đầu tù hoặc hơi lõm, mặt trên màu lục xám nhạt, có gân rất rõ, mặt dưới phủ lông màu trắng bạc, mềm như nhung, lá kèm có lông, có khía, cuống lá dài 1 – 2,5cm, có lông.

Cụm hoa mọc ở kẽ lá hoặc đầu ngọn thành chùm ngắn hơn lá; lá bắc sớm rụng, hoa màu hồng, đài 4 răng đều, có lông ngắn, tràng có cánh cờ hình bầu dục, các cánh bên thuôn, cánh thìa cong có tai, bộ nhị hai bó, bầu ít lông.

Quả loại đậu hơi cong, có 3 hạt, có lông.

○ ***D. gangeticum* (L.) DC.** (Thóc lép)

Cây thảo, dạng bụi, cao 1 – 1,5m. Cành mọc vươn dài, cành non mảnh hơi có cạnh và có lông. Lá chỉ có một lá chét, mọc so le, hình trái xoan hoặc hình trứng dài 6 – 10cm, rộng 3 – 5cm, gốc tròn, đầu tù hơi nhọn, mặt trên có lông mịn và ngắn, mặt dưới phủ nhiều lông áp sát, ở gốc lá có hai sợi ngắn là vết tích của hai lá chét bên tiêu giảm. Cuống lá dài 1 – 2cm. Lá kèm nhọn.

Cụm hoa là một chùy thưa mọc ở đầu ngọn hoặc kẽ lá, có lông, gồm nhiều hoa nhỏ xếp từng đôi một. Đài có 4 răng nhọn, tràng có cánh cờ và cánh thìa hình trái xoan ngược, cánh bên thuôn, bộ nhị xếp thành 2 bó, bầu có ít lông. Quả cong, có 7 – 8 ngăn, mỗi ngăn đựng 1 hạt.

○ ***D. heterophyllum* (Willd.) DC.** (Hàn the)

Cây bụi nhỏ, mọc bò, phân cành nhiều. Cành dài 20 – 40cm mảnh và cứng, trải rộng trên mặt đất. Lá mọc so le, lá phía dưới thường đơn, lá phía trên kép 3 lá chét hình bầu dục hoặc trái xoan, gốc tù, đầu tròn, đôi khi hơi khuyết, dài 0,7 – 2cm, rộng 0,5 – 1,2cm, mặt trên nhẵn bóng, mặt dưới nhạt có lông, lá chét tận cùng lớn hơn các lá bên, có lá kèm nhỏ.

Cụm hoa ngắn và thưa mọc ở kẽ lá, hoa nhỏ màu tím hồng, đài 5 răng có lông, tràng 5 cánh, cánh cờ hình bầu dục, cánh bên thuôn, cánh thìa không có tai, bộ nhị hai bó, bầu có lông.

Quả loại đậu nhỏ, thuôn, có từ 4 đến 5 hạt.

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 góc; 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 [3]

Phân bố chủ yếu ở vùng nhiệt đới châu Á từ Ấn Độ, Srilanca đến Mianma, Trung Quốc, Philippin. Ở nước ta, cây mọc hoang ở rìa rừng, rừng thưa. Cây ưa bóng và có thể hơi chịu bóng, có khả năng chịu hạn và sống được cả ở những nơi đất khô cằn của vùng đồi trọc và bờ nương rẫy mà nguồn nước chủ yếu là những đợt mưa. Cây ra hoa và quả nhiều. Vỏ quả ngoài có lông dính dễ bám vào súc vật và quần áo người, dễ phát tán xa. 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. Khi dùng thu hái toàn cây vào mùa hè hoặc mùa thu, rửa sạch, chặt nhỏ dùng tươi hay phơi khô dùng dần.

2.3. Thành phần hoá học

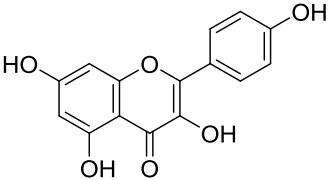
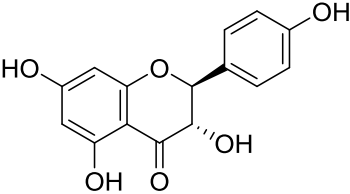
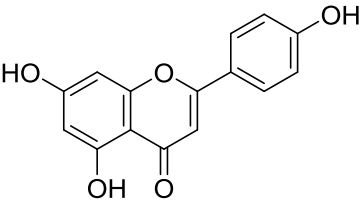
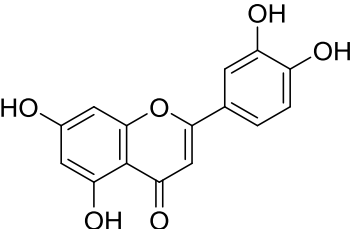
2.3.1. Thành phần hóa học của chi *Desmodium* Desv.

Các nghiên cứu trên thế giới cho thấy, chi *Desmodium* chứa các hợp chất thuộc nhóm flavonoid, alcaloid, steroid, triterpenoid, acid amin, peptid và hợp chất hydrocarbon mạch thẳng [23].

2.3.1.1 Các hợp chất flavonoid

Các flavonoid trong chi *Desmodium* chủ yếu là các isoflavonoid, flavon, flavonol và dẫn xuất của chúng. Tên và cấu trúc của các flavonoid đã phân lập được từ các loài thuộc chi *Desmodium* được trình bày trong bảng sau:

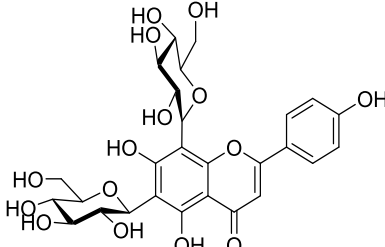
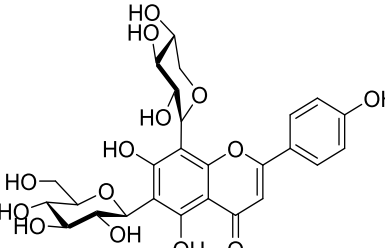
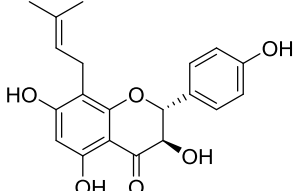
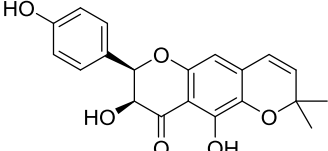
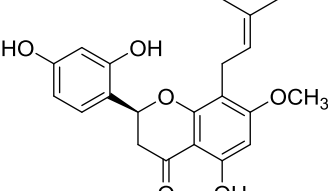
Bảng 1. 1. Các hợp chất flavonoid phân lập được từ các loài thuộc chi *Desmodium*

STT	Tên hợp chất	Cấu trúc hóa học	Loài	BPD	TLT K
1	Kaempferol (D1)		<i>D. caudatum</i>	Toàn cây	[53]
2	5,7,4'-Trihydroxy-dihydroflavonol (D2)		<i>D. caudatum</i>	Toàn cây	[53]
3	Apigenin (D3)		<i>D. styracifolium</i>	Toàn cây	[32]
4	Luteolin (D4)		<i>D. styracifolium</i>	Toàn cây	[6,54]

5	Desmodol (D5)		<i>D. caudatum</i>	Toàn cây	[53]
6	Chrysoeriol (D6)		<i>D. styracifolium</i>	Toàn cây	[6], [54]
7	Isovitexin (D7)		<i>D. triflorum</i>		[21]
			<i>D. styracifolium</i> <i>D. caudatum</i>	Toàn cây	[54], [55]
8	Leachianon G (D8)		<i>D. caudatum</i>	Toàn cây	[53]
9	2'-O-β-D-Xylosylvitexin (D9)		<i>D. triflorum</i>	Lá	[21]
10	6-C-Glycopyranosyl-8-C-arabinosyl apigenin (D10)		<i>D. styracifolium</i>	Toàn cây	[32]
11	6-C-Glycopyranosyl luteolin (D11)		<i>D. styracifolium</i>	Toàn cây	[32]

12	Flavosativasid (D12)		<i>D. triflorum</i>	Lá	[21]
13	Citrusinol (D13)		<i>D. caudatum</i>	Toàn cây	[53]
14	Dalbergioidin (D14)		<i>D. gangeticum</i>	Toàn cây	[28]
15	Desmocarpin (D15)		<i>D. gangeticum</i>	Toàn cây	[28]
16	Diphysolon (D16)		<i>D. gangeticum</i>		[28]
17	Gangetinin (D17)		<i>D. gangeticum</i>	Toàn cây	[46]
18	Swertisin (D18)		<i>D. caudatum</i>	Toàn cây	[55]

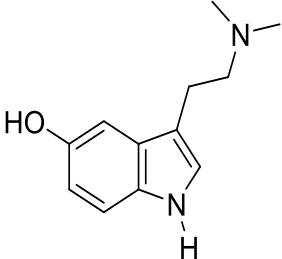
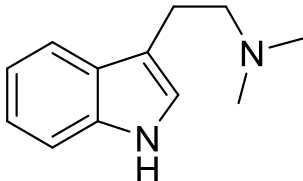
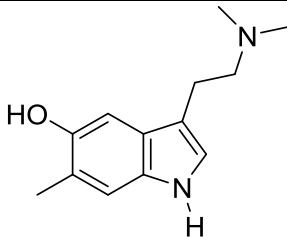
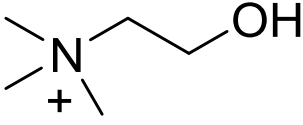
19	Gangetin (D19)		<i>D. gangeticum</i>	Toàn cây	[9]
20	Genistein (D20)		<i>D. styracifolium</i>	Toàn cây	[13]
21	2'- Hydroxy genistein (D21)		<i>D. gangeticum</i>	Toàn cây	[14]
22	Kieviton (D22)		<i>D. gangeticum</i>	Toàn cây	[15]
23	Desmodin (D23)		<i>D. gangeticum</i>	Toàn cây	[46]
24	8- Prenylquercetin (D24)		<i>D. caudatum</i>	Toàn cây	[53]
25	Vitexin (D25)		<i>D. triflorum</i>	Lá	[21]
			<i>D. styracifolium</i>	PTMĐ	[54]
			<i>D. caudatum</i>	Toàn cây	[55]
			<i>D. heterophyllum</i>	Toàn cây	[3]

26	Vicenin-1 (D26)		<i>D. styracifolium</i>	Toàn cây	[54]
27	Vicenin-3 (D27)		<i>D. styracifolium</i>	Toàn cây	[54]
28	Neophellamuretin (D28)		<i>D. caudatum</i>	Toàn cây	[53]
29	Yukovanol (D29)		<i>D. caudatum</i>	Toàn cây	[55]
30	Kenusanon I (D30)		<i>D. caudatum</i>	Toàn cây	[53]

2.3.1.2. Các hợp chất alkaloid

Alcaloid có trong một số loài thuộc chi *Desmodium* Desv. phân bố trong lá, thân, rễ, hoa và quả với hàm lượng khác nhau. Hàm lượng alkaloid cũng thay đổi theo mùa, thời tiết, khí hậu... Một số alkaloid được tìm thấy trong chi *Desmodium* bao gồm alkaloid có nhân indol và các alkaloid không chứa dị vòng (**Bảng 1.2**).

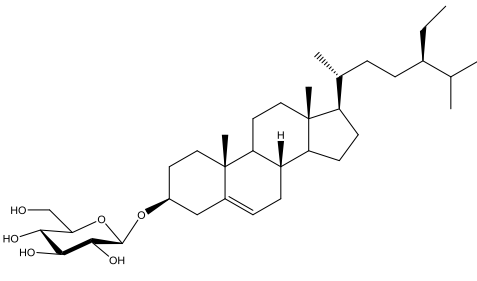
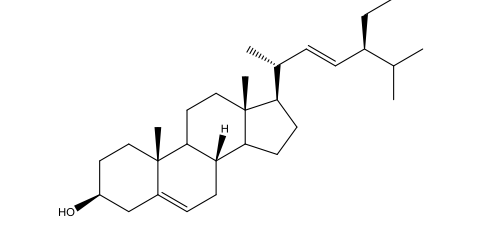
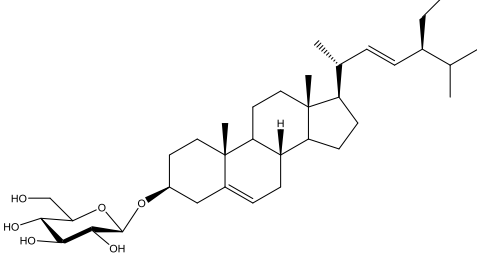
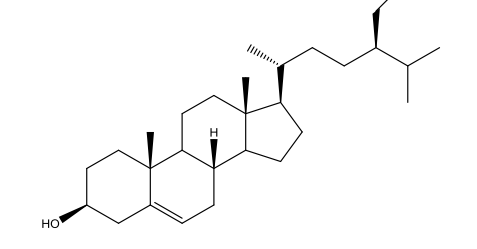
Bảng 1.2. Các alkaloid từ các loài thuộc chi *Desmodium*

STT	Tên hợp chất	Cấu trúc hóa học	Loài	BPD
1	Bufotenin (D31)		<i>D. caudatum</i>	Toàn cây
2	N-N-Dimethyltryptamin (D32)		<i>D. triflorum</i>	Lá
			<i>D. gangeticum</i>	Rễ
3	O-Methylbufotenin (D33)		<i>D. gangeticum</i>	Rễ
4	Cholin (D34)		<i>D. triflorum</i>	Lá

2.3.1.3. Các hợp chất steroid

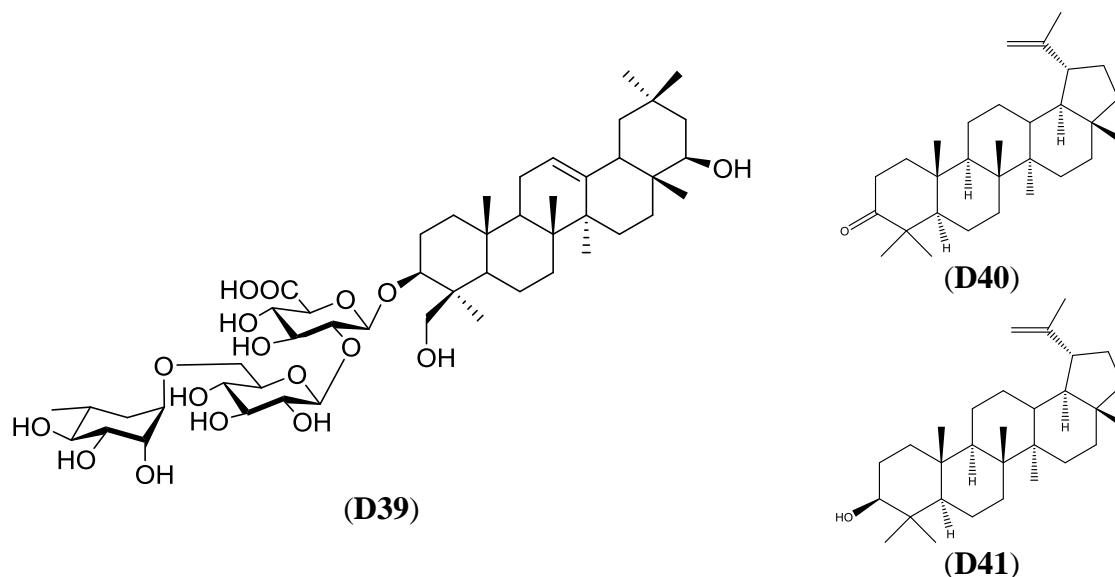
Một số hợp chất steroid phân lập từ chi *Desmodium* được trình bày trong **bảng 1.6**.

Bảng 1.3. Các hợp chất steroid phân lập được từ chi *Desmodium*

STT	Tên hợp chất	Cấu trúc hóa học	Loài	BPD
1	β -Sitosterol-3- O- β - glucopyranosid (D35)		<i>D. styracifolium</i>	PTMĐ
			<i>D. heterophyllum</i>	Toàn cây
2	Stigmatsterol (D36)		<i>D. caudatum</i> <i>D. heterophyllum</i>	Toàn cây
3	Stigmasterol-3- O- β -D- glucopyranosid (D37)		<i>D. styracifolium</i>	PTMĐ
			<i>D. heterophyllum</i>	Toàn cây
4	Beta-sitosterol (D38)		<i>D. styracifolium</i>	PTMĐ
			<i>D. caudatum</i>	Toàn cây

2.3.1.4. Các hợp chất khác

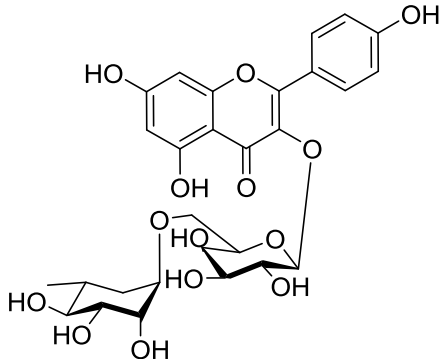
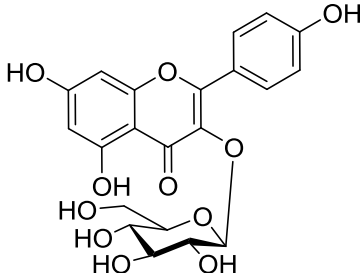
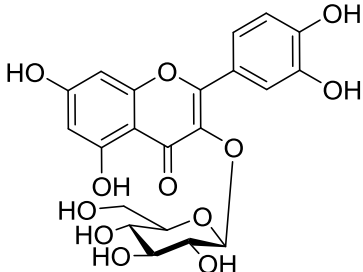
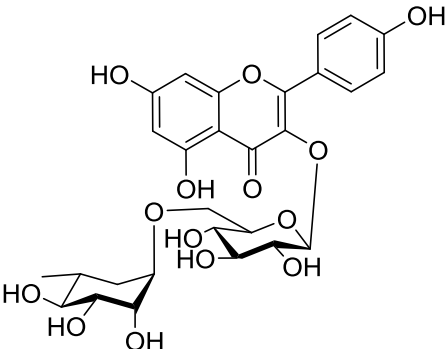
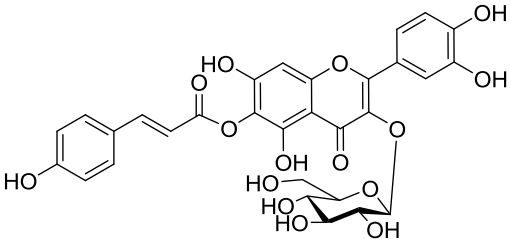
Ngoài các hợp chất flavonoid, alcaloid và steroid, một số saponin (soyasaponin I) (D39) và triterpenoid [lupenon (D40), lupeol (D41)] [52] cũng được tìm thấy trong chi *Desmodium* (**Hình 1.4**).

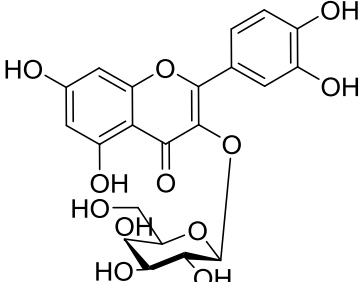
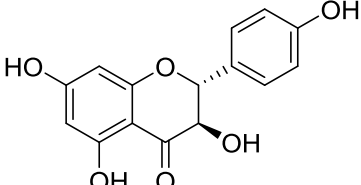
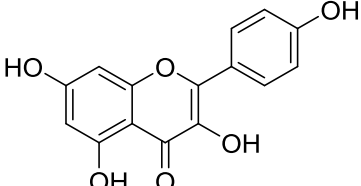
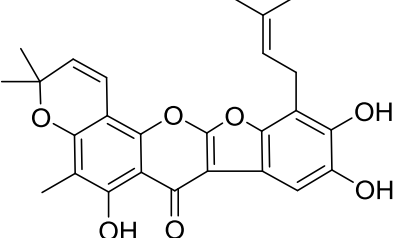
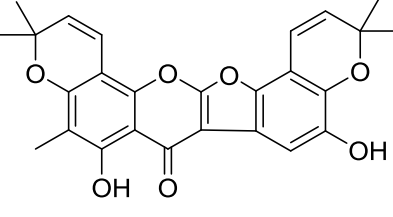
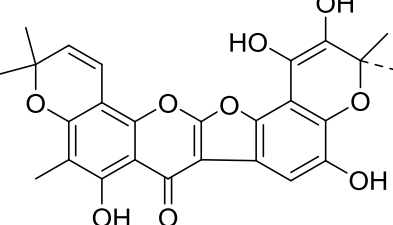
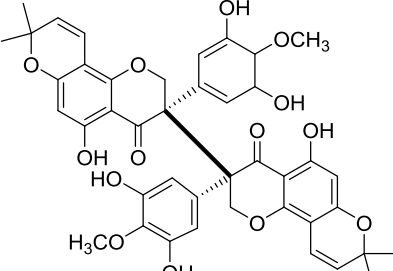


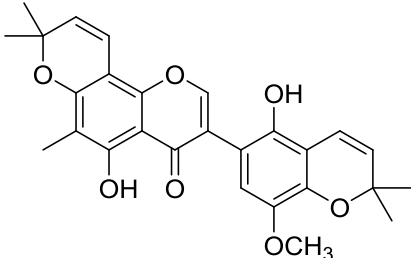
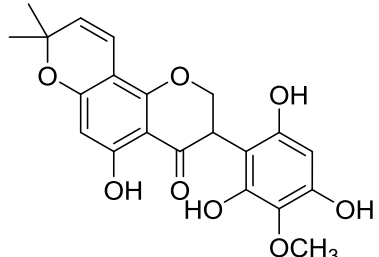
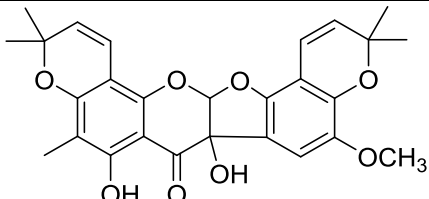
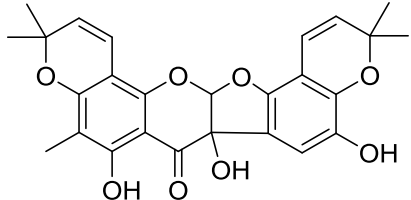
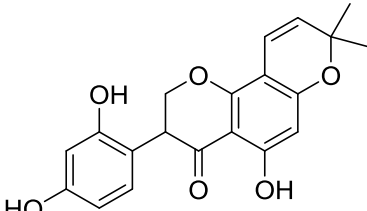
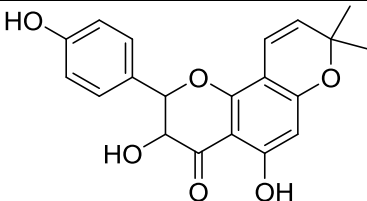
Hình 1.1. Cấu trúc hóa học của các hợp chất khác từ chi *Desmodium*

2.3.2. Bảng 1.3. Các hợp chất steroid phân lập được từ chi *Desmodium*

STT	Tên hợp chất	CTCT	TLTK
1	Kaempferol 3- <i>O</i> - β -D-glucopyranosid (T1)		[48]
2	Kaempferol 3- <i>O</i> - β -D-galactopyranosid (T2)		[48]
3	Quercetin 3- <i>O</i> - α -D-rhamnopyranosyl-(1 \rightarrow 6)- β -D-glucopyranosid (T3)		[48], [49]

4	Kaempferol 3- <i>O</i> - α -D-rhamnopyranosyl-(1 \rightarrow 6)- β -D-galactopyranosid (T4)		[48]
5	Astragalin (T5)		[51]
6	Quercetin 3- <i>O</i> - β -D-glucopyranosid (T6)		[49]
7	Kaempferol 3- <i>O</i> - β -D-rutinosid (T7)		[49]
8	6- <i>O</i> -(<i>E</i>)- <i>p</i> -Hydroxy-cinnamoyl- β -quercetin-3- <i>O</i> - β -D-galactopyranosid (T8)		[49]

9	Quercetin-3- <i>O</i> - β -D-galactopyranosid (T9)		[49]
10	Aromadendrin (T10)		[51]
11	Kaempferol (T11)		[51]
12	Triquetrumon A (T12)		[51]
13	Triquetrumon B (T13)		[51]
14	Triquetrumon C (T14)		[51]
15	<i>(R)</i> -Triquetrumon D (T15)		[51]

16	Triquetrumon E (T16)		[40]
17	Triquetrumon F (T17)		[40]
18	Triquetrumon G (T18)		[40]
19	Triquetrumon H (T19)		[40]
20	Cyclokieviton (T20)		[51]
21	Yukovanol (T21) (D30)		[51]

2.4. Tác dụng dược lý

Cao cồn 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 [57]. Cao cồn *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 [58], 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 [59], [60]. 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 [39]. 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* [24]. 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 sưng 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 [5].

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[1].

D. triquetrum (L.) DC. được sử dụng trong YHCT các nước Trung Quốc, Ấn Độ để chữa các bệnh ngoài da như bỏng, 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 như ho ra máu, viêm phổi, cảm lạnh

thông thường. Ngoài ra cây này còn được sử dụng trong trường hợp suy dinh dưỡng ở trẻ em [5].

2.6. Một số bài thuốc dân gian

Bảng 2. Một số bài thuốc từ cây Mũi mác trong dân gian: [1].

STT	Các bệnh được điều trị theo kinh nghiệm	Cách dùng
1	Chữa tiêu hoá kém, cam tích ở trẻ em	Mũi mác phối hợp với bạch mao căn, cam thảo (lượng bằng nhau), phơi khô, tán bột ngày uống 10 – 20g hãm với nước sôi. Dùng Mũi mác 50g, trần bì 10g, ngò gai 10g, nụ vối(hoặc lá vối) 20g, vối đường kính 10g, sắc với 1 lít nước, uống khi khát.
2	Chữa ho có đờm đặc quánh màu xanh	Mũi mác, xạ can, qua lâu (lượng bằng nhau). Ngày 15 – 20g sắc uống.
3	Chữa nôn ra máu	Rễ Mũi mác thái nhỏ, sao vàng 8 – 12g, sắc đặc trộn với mật ong rồi uống.
4	Chữa cảm sốt	Cành lá Mũi mác, cúc tần, chùa dù tươi, mỗi vị 30g, nấu nước uống và xông ra mồ hôi.
5	Chữa viêm thận, phù thũng	Dùng 60g cây Mũi mác sắc uống. Dùng Mũi mác 30g, đậu đen 125g, sắc nước uống trong ngày.
6	Chữa trĩ	Lá cây Mũi mác 15-60g đun sôi lấy nước uống thay trà, có thể tán bột, làm viên uống hàng ngày
7	Chữa nôn mửa khi có thai	Mũi mác, sắc nước, chia ngày uống 3 lần
8	Chứng phiền khát mùa hè	Dùng cây, sắc nước uống, thay trà trong ngày.
9	Chữa cảm mạo, sốt cao	Dùng Mũi mác, cúc tần, lá chè tươi mỗi thứ 30g, sắc lấy nước uống.

10	Chữa họng sưng đau	Dùng Mũi mác 60g, sắc lấy nước, chia ra ngậm, nuốt dần, nhiều lần trong ngày.
11	Chữa viêm họng, ho	Dùng Mũi mác 50g, trần bì 15g, húng chanh (tần dày lá) 30g, gừng 5g, sắc uống.
12	Chữa viêm gan vàng da, viêm đường tiết niệu	Mũi mác, mỗi ngày 100g tươi sắc với 1 lít nước, chia ra uống mỗi lần 100ml. Ngoài ra có thể phối hợp với các vị thuốc khác có tác dụng phục hồi chức năng gan, thận như quả dứa dại, thân cây mốp gai, cây chó đẻ răng cưa tác dụng càng nhanh.
13	Chữa phong thấp khớp xương đau nhức	Dùng Mũi mác 30g, hầm với móng giò lợn, chia ra ăn trong ngày
14	Chữa mày đay, dị ứng	Dùng cành, lá Mũi mác 30g tươi sắc nước uống. Hoặc dùng toàn cây, lượng thích hợp, nấu nước xông rửa.
15	Ho ra máu	Dùng Mũi mác 75g, sắc nước uống.
16	Chữa nôn ra máu	Dùng Mũi mác (thái nhỏ, sao vàng) 8-12g, sắc đặc, chắt lấy nước, hòa thêm chút mật ong vào uống
17	Chữa trẻ cam tích, tiêu hóa kém	Dùng Mũi mác 50g, trần bì 10g, ngò gai 10g, nụ vối (hoặc lá vối) 20g, vối đường kính 10g, sắc với 1 lít nước, uống khi khát.

Chương 2

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

2.1. 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. Mẫu nghiên cứu hiện đang được lưu giữ tại Phòng sinh học- Bảo tàng thiên nhiên Việt Nam, Khoa Hóa phân tích-Tiêu chuẩn, Viện Dược liệu. Dược liệu là phần trên mặt đất của cây, được rửa sạch, thái nhỏ phơi, sấy khô trước khi nghiên cứu.

2.2. Phương tiện nghiên cứu

2.2.1. 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.

- Dung môi phân tích, các hóa chất khác đạt tiêu chuẩn phân tích.

- Hóa chất: Bản mỏng tráng sẵn pha thường silica gel F₂₅₄ (Merck), pha đảo RP₁₈ F_{254s} (Merck), chất hấp phụ silica gel pha thường (cỡ hạt 63-200 µm, Merck), pha đảo RP-18 (30-50 µm, Merck), acid sulfuric 10%/ethanol. Dung môi công nghiệp *n*-hexan, ethyl acetat, *n*-butanol, dicloromethan (CH₂Cl₂), methanol (MeOH), nước cất (H₂O).

- Các loại cột sắc ký, đèn tử ngoại, máy đo nhiệt độ nóng chảy GALLENKAMP (Sanyo, Nhật Bản), máy đo phổ hồng ngoại FT-IR Spectrophotometer (Perkin Elmer, Mỹ), máy đo phổ khối Agilent 1100 LC/MSD, máy đo phổ cộng hưởng từ hạt nhân (NMR) Bruker AM500 FT-NMR.

- Các dung môi, hóa chất cần thiết đều đạt tiêu chuẩn cho thử tác dụng sinh học, được mua của các hãng hóa chất có uy tín như Merck, Sigma-Aldrich, Invitrogen... gồm có:

- Các dung môi, hóa chất sử dụng cho nghiên cứu về thành phần hoạt chất đạt tiêu chuẩn kỹ thuật.

- Gốc tự do DPPH (Sigma).
- Enzym xanthin oxidase (XO).
- Các hóa chất pha dung dịch đệm: K_2HPO_4 (hoặc KH_2PO_4), NaOH, HCl, ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA).
- Các chất được sử dụng để làm cơ chất hoặc tác nhân oxy hóa: xanthin, nitro blue tetrazolium (NBT), (EDTA).
- Các chất đối chiếu: BHT (butylated hydroxytoluene), quercetin, (+)-catechin, thioure.
- Methanol, nước cất 2 lần
- Các dung môi, hóa chất sử dụng cho nghiên cứu về thành phần hoạt chất đạt tiêu chuẩn kỹ thuật.

2.2.2. Phương tiện và máy móc

- Cân kỹ thuật Precisa.
- Tủ sấy.
- Máy sắc ký lỏng hiệu năng cao Shimadzu bao gồm bơm LC-20AD, detector SPD-20A UV/Vis, hệ thống tiêm mẫu tự động SIL-20A, bộ phận ổn nhiệt CTO-20A (Shimadzu, Japan).
- Sắc ký cột dùng chất hấp phụ là Silica gel F₂₅₄ cỡ hạt 60-200 μ m (Merck), Sephadex LH-20 .
- Máy đo điểm nóng chảy Gallenkamp, Sanyo, Nhật Bản (Viện Dược liệu).
- Máy đo quang phổ UV-Vis 1800 Shimadzu, Nhật Bản (Viện Dược liệu).
- Máy đo phổ hồng ngoại (IR) FT-IR Spectrophotometer 1650-Perkin Elmer (Viện Hóa học, VAST).
- Máy đo phổ khối lượng LC/MS/MS – Water – API – ISI (Viện Hóa học, VAST).
- Máy đo phổ cộng hưởng từ hạt nhân (¹H- và ¹³C-NMR) của hãng Bruker (500MHz), Viện Hóa học, VAST.
- Máy đo pH

- Ống ly tâm 1,5 và đầu côn các loại
- Tủ ấm (37°C)
- Pipet: dùng pipet các cỡ (0.5 μ l – 1000 μ l).
- Ống nghiệm 2 ml.
- Thiết bị nghiền đồng thể.
- Máy ly tâm lạnh.

2.3. Phương pháp nghiên cứu

2.3.1. Về thực vật

* *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 [7]. Nghiên cứu hình thái vi phẫu được thực hiện theo tài liệu Kiểm nghiệm dược liệu bằng phương pháp hiển vi (là phương pháp vi học, bao gồm quan sát các đặc điểm vi học trên vi phẫu và trên bột một Dược liệu: Cát và nhuộm kép một vi phẫu Dược liệu, lên tiêu bản (phải nhuộm được 2 màu, có thể phân biệt được các mô, tổ chức dưới kính hiển vi), nhận biết và mô tả được các đặc điểm, chụp ảnh, có ghi chú các đặc điểm. 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) [7], .

* *Giám định tên khoa học của mẫu nghiên cứu* [7], [2], [27].

- 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

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

Sấy khô dược liệu trong tủ sấy ở nhiệt độ 60°C. Dem ra tán nhỏ bằng thuyền tán thành bột thô, bảo quản trong túi nilon kín, để ở chỗ thoáng mát, khô ráo để làm các phản ứng hóa học định tính theo tài liệu [5], [6].

Định tính Alcaloid:

Cho khoảng 10g bột dược liệu vào bình nón dung tích 100ml, thấm ẩm bằng dung dịch amoniac đặc, đậy kín bình trong 30 phút. Cho thêm 15ml chloroform, lắc đều, ngâm 12 giờ. Lọc lấy dịch chiết cho vào bình gạn. Sau đó lắc kỹ 2 lần, mỗi lần với 10 ml dung dịch H_2SO_4 1N. Để phân lớp, gạn lấy dịch chiết acid, cho vào 3 ống nghiệm, mỗi ống 1ml dịch chiết acid.

+ Ống 1: 1ml dịch chiết + 2 giọt tt Mayer

+ Ống 2: 1ml dịch chiết + 2 giọt tt Bouchardat.

+ Ống 3: 1ml dịch chiết + 2 giọt tt Dragendorff.

Định tính glycosid tim:

Cho 20g bột dược liệu vào bình nón dung tích 250ml, thêm 60ml cồn 25° , lắc đều, ngâm trong 24 giờ. Lọc lấy dịch chiết, loại tạp (chất nhày, chất nhựa) bằng chì acetat 30% để dư. Để lắng, lọc. Loại chì acetat thừa bằng dung dịch Na_2SO_4 bão hòa đến khi không còn tủa với Na_2SO_4 nữa. Lọc lấy dịch lọc vào bình gạn. Lắc kỹ 2 lần với hỗn hợp chloroform : ethanol (4:1), mỗi lần 20ml, để lắng, gạn lấy dịch chiết, loại nước bằng cách lọc qua bông. Chia đều dịch chiết vào 4 ống nghiệm đã được sấy khô, đem cô cách thủy đến khô. Cẩn thu được để làm phản ứng định tính.

+ *Phản ứng Liberman:*

Cho vào ống nghiệm có chứa sẵn 1ml anhydrid acetic, lắc đều cho tan hết cặn. Nghiêng ống 45° . Cho từ từ theo thành ống nghiệm 1ml H_2SO_4 đặc để dịch lỏng trong ống nghiệm chia thành hai lớp.

+ *Phản ứng Baljet:*

Pha thuốc thử Baljet: Cho vào ống nghiệm to 1 phần dung dịch acid picric 1% và 9 phần dung dịch NaOH 10%. Lắc đều.

Cho vào ống nghiệm có chứa sẵn 0,5ml ethanol 90%. Lắc đều cho tan hết cặn. Nhỏ từng giọt thuốc thử Baljet mới pha vào ống nghiệm.

+ *Phản ứng Legal:*

Cho vào ống nghiệm có chứa sẵn 0,5ml ethanol 90%. Lắc đều cho tan hết cặn. Nhỏ 1 giọt dung dịch natrinitroprussiat 0,5% và 2 giọt dung dịch NaOH 10%.

+ *Phản ứng Keller-Kiliani:*

Cho vào ống nghiệm chứa sẵn 0,5ml ethanol 90%. Lắc đều cho tan hết cặn. Thêm vào giọt dung dịch sắt (III) clorid 5% pha trong acid acetic. Lắc đều. Nghiêng ống 45°. Cho từ từ theo thành ống 0,5ml acid H₂SO₄ đặc, tránh xáo trộn chất lỏng trong ống nghiệm.

Định tính saponin:

+ *Quan sát hiện tượng tạo bọt:*

Cho 0,5g bột dược liệu vào ống nghiệm có dung tích 20ml, thêm vào đó 5ml nước cất, đun sôi nhẹ, lọc nóng qua bông vào ống nghiệm có dung tích 20ml, thêm 5ml nước cất. Bịt ống nghiệm bằng ngón tay cái, lắc mạnh ống nghiệm theo chiều dọc 5 phút, để yên và quan sát.

+ *Phản ứng Salkowski:*

Cho vào bình nón 2g dược liệu, thêm 20ml ethanol 90%, đun sôi cách thủy. Lọc lấy dịch lọc và cho vào một ống nghiệm, để nghiêng ống nghiệm 45°, cho từ từ vào thành ống nghiệm 1-2 giọt acid H₂SO₄ đặc.

Định tính anthranoid:

+ *Phản ứng Borntraeger:*

Lấy 3g bột dược liệu cho vào bình nón dung tích 100ml, thêm 50ml dung dịch H₂SO₄ 10%. Đun cách thủy sôi trong 15 phút. Lọc nóng vào bình gạn. Để nguội rồi lắc với 5ml chloroform. Gạn lớp chloroform để làm phản ứng.

Cho vào 2 ống nghiệm:

Ống 1: 1ml dịch chiết chloroform + 1ml dung dịch NH₄OH 10%.

Ống 2: 1ml dịch chiết chloroform + 1ml dung dịch NaOH 10%.

Lắc nhẹ.

+ *Vi thăng hoa:*

Đặt khoảng 3g bột dược liệu trong một đĩa nhôm. Hơ nhẹ trên bếp điện cho bay hết nước trong dược liệu. Đặt lên trên đĩa nhôm một phiến kính, trên phiến kính đó có để một miếng bông đã tẩm nước lạnh. Để đĩa nhôm trực tiếp trên bếp điện. Sau 5 – 10 phút lấy lam kính ra để nguội rồi soi dưới kính hiển vi.

Định tính flavonoid:

Cho 5g bột dược liệu vào bình nón 250ml, thêm 100ml ethanol 90%, đun cách thủy 10 phút, lọc nóng. Dùng dịch lọc để làm phản ứng.

+ *Phản ứng với kiềm:*

Phản ứng với NH₃: Nhỏ một giọt dịch chiết lên tờ giấy lọc, sấy khô, quan sát dưới ánh sáng thường thấy có màu vàng, sau đó hơ trên miệng lọ amoniac đặc.

Phản ứng với NaOH: cho vào ống nghiệm 1ml dịch chiết, thêm vài giọt dung dịch NaOH 10%.

+ *Phản ứng Cyanidin:*

Cho 2ml dịch chiết vào ống nghiệm, thêm một ít bột magie kim loại, rồi giở từ từ 4-5 giọt acid HCl đậm đặc.

+ *Phản ứng với dung dịch FeCl₃ 5%*

Cho 1ml dịch chiết vào ống nghiệm, thêm 2-3 giọt dung dịch FeCl₃ 5%, lắc nhẹ.

+ *Phản ứng Diazo hóa:*

Cho 1ml dịch chiết vào ống nghiệm, kiềm hóa bằng NaOH 10%. Thêm vài giọt thuốc thử Diazoni, lắc đều, đun cách thủy vài phút.

Định tính coumarin:

Cho 3g bột dược liệu vào bình nón dung tích 100ml, thêm 30ml ethanol 90%. Đun cách thủy sôi trong 5 phút. Lọc nóng. Dịch lọc thu được để làm phản ứng.

+ *Phản ứng mở, đóng vòng lacton:*

Cho vào 2 ống nghiệm mỗi ống 1ml dịch chiết.

Ống 1: Thêm 0,5ml dung dịch NaOH 10%

Ống 2: Để yên.

Đun sôi cả 2 ống nghiệm, để nguội. Quan sát thấy:

Ống 1: Dung dịch có tủa vàng.

Ống 2: Trong

Thêm vào cả hai ống nghiệm, mỗi ống 2ml nước cất. Lắc đều, thấy:

Ống 1: Dung dịch vẫn đục

Ống 2: Trong

Acid hóa ống 1 bằng vài giọt HCl đặc.

+ *Phản ứng Diazo hóa:*

Cho vào ống nghiệm nhỏ 1ml dịch chiết, thêm vào đó 2ml dung dịch NaOH 10%. Đun cách thủy sôi 5 phút rồi để nguội. Thêm vài giọt thuốc thử Diazo mới pha.

+ *Quan sát huỳnh quang:*

Nhỏ một giọt dịch chiết lên tờ giấy lọc, hơi trên ngọn lửa đèn cồn cho khô. Nhỏ tiếp lên đó một giọt NaOH 5%, hơi cho khô. Bịt một nửa phần giấy lọc thấm dịch chiết bằng tấm kim loại và đặt tấm giấy lọc dưới ánh sáng UV trong vòng 10 phút. Bỏ miếng kim loại ra và quan sát dưới đèn UV thấy phần giấy lọc thấm dịch chiết không bị che có huỳnh quang sáng hơn phần bị che, tiếp tục đặt giấy lọc dưới ánh sáng UV mà không bị che miếng kim loại.

Định tính tanin:

Cho vào ống nghiệm lớn 1g bột dược liệu, thêm 10ml nước cất, đun sôi trực tiếp 5 phút. Lọc qua giấy lọc gấp nếp. Lấy dịch lọc làm các phản ứng sau:

+ Ống 1: 2ml dịch lọc, thêm 2 giọt FeCl₃ 5%.

Kết quả: Xuất hiện tủa xanh đen.

+ Ống 2: 2ml dịch lọc, thêm 2 giọt chì acetat 10%.

Kết quả: Xuất hiện tủa bông.

+ Ống 3: 2ml dịch lọc, thêm 5 giọt dung dịch gelatin 1%.

Định tính chất béo:

Cân khoảng 10g dược liệu vào túi lọc đã chuẩn bị sẵn rồi cho vào bình chiết Soxhlet. Chiết hồi lưu trên bếp cách thủy với dung môi chiết là ether dầu hỏa trong 3 giờ, thu được dịch lọc. Nhỏ một giọt dịch lọc lên mảnh giấy trắng, sấy nhẹ cho bay hơi hết dung môi.

Định tính steroid:

Cho vào ống nghiệm 1ml dịch chiết ether dầu hỏa ở trên. Bốc hơi dung môi đến khô. Thêm vào ống nghiệm 1ml anhydrid acetic, lắc kỹ. Để nghiêng ống nghiệm 45° , thêm từ từ từng giọt H_2SO_4 đặc theo thành ống nghiệm.

Định tính carotenoid:

Lấy 5ml dịch chiết ether dầu hỏa trên cho vào ống nghiệm, bốc hơi trên nồi cách thủy đến cạn, thêm vài giọt H_2SO_4 đặc vào cạn, lắc đều.

Định tính acid hữu cơ:

Cho 1g bột dược liệu vào ống nghiệm lớn, thêm 10ml nước cất. Đun sôi trực tiếp 10 phút trên ngọn lửa đèn cồn, để nguội, lọc. Thêm vào dịch lọc một ít tinh thể Na_2CO_3 .

Định tính đường khử:

Cho 2g bột dược liệu vào ống nghiệm to, thêm 10ml nước cất, đun sôi cách thủy vài phút, lọc lấy dịch. Cho 2ml dịch lọc vào ống nghiệm khác, thêm 3 giọt thuốc thử Fehling A + 3 giọt thuốc thử Fehling B. Đun sôi cách thủy 10 phút.

Định tính acid amin

Lấy 2g bột dược liệu cho vào ống nghiệm to, thêm 10ml nước cất, đun sôi cách thủy 5 phút, lọc nóng. Lấy 2ml dịch lọc vào ống nghiệm khác, thêm vào 3 giọt thuốc thử Ninhydrin 3%, đun sôi cách thủy 10 phút.

Định tính polysaccharid:

Lấy khoảng 2g bột dược liệu cho vào bình nón dung tích 50ml, thêm 20ml nước cất, đun sôi cách thủy vài phút, lọc lấy dịch, cho vào 2 ống nghiệm:

- + Ống 1: 4ml dịch lọc + 5 giọt thuốc thử Lugol.
- + Ống 2: 4ml nước cất + 5 giọt thuốc thử Lugol.
- + Ống 3: 4ml dịch lọc

**** Định tính bằng sắc ký lớp mỏng***

- Tiến hành nghiên cứu sắc ký lớp mỏng đối với dược liệu, các căn phân đoạn theo tài liệu [5], [9].

- Pha tĩnh: Sử dụng bản mỏng silica gel 60 F₂₅₄ của hãng Merck. Trước khi chấm, bản mỏng được hoạt hóa ở 110⁰C trong 1 giờ.

- Pha động: Lựa chọn hệ dung môi thích hợp để các chất được tách tốt nhất.

- Dung môi chấm sắc ký: MeOH

- Bình sắc ký rửa sạch, sấy khô, lót một lớp giấy lọc cao gần miệng và kín 3 mặt thành trong của bình.

- Bão hòa dung môi: Rót dung môi đã pha ở trên từ từ theo thành bình, để yên cho dung môi bão hòa.

- Chấm sắc ký: Lấy một lượng mẫu thích hợp vào xi lanh, đưa xi lanh và hệ thống bơm mẫu tự động. Lập file cho mỗi mẫu phân tích. Nhập các thông số cần thiết: Độ rộng vết, số lượng vết, thể tích mẫu chấm. Song song với quá trình bơm mẫu là quá trình làm khô tự động dịch chiết trên bản mỏng bằng khí nén.

- Triển khai sắc ký: Đặt thẳng bản mỏng vào bình sắc ký đã bão hòa dung môi, đậy kín, để yên, quan sát quá trình tách đến khi vết dung môi cách mép trên bản mỏng khoảng 2cm thì lấy ra, đánh dấu đường dung môi và để khô tự nhiên trong tủ hút. Quan sát và chụp ảnh bản mỏng sắc ký dưới ánh

sáng trắng và ánh sáng tử ngoại ở bước sóng 254nm và 365nm, sau khi phun thuốc thử hiện màu.

* *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). Dịch chiết được gộp lại và cất loại còn nước dưới áp suất giảm thu được cặn chiết còn đã cô khô (538 g). Cặn chiết (205 g) được hòa tan vào nước cất (0,5 lít) thành hỗn dịch rồi lọc, chiết phân đoạn lần lượt với *n*-hexan (0,5 lít × 3 lần), ethyl acetat (0,5 lít × 3 lần), *n*-butanol (0,5 lít × 3 lần). (Hình 1).

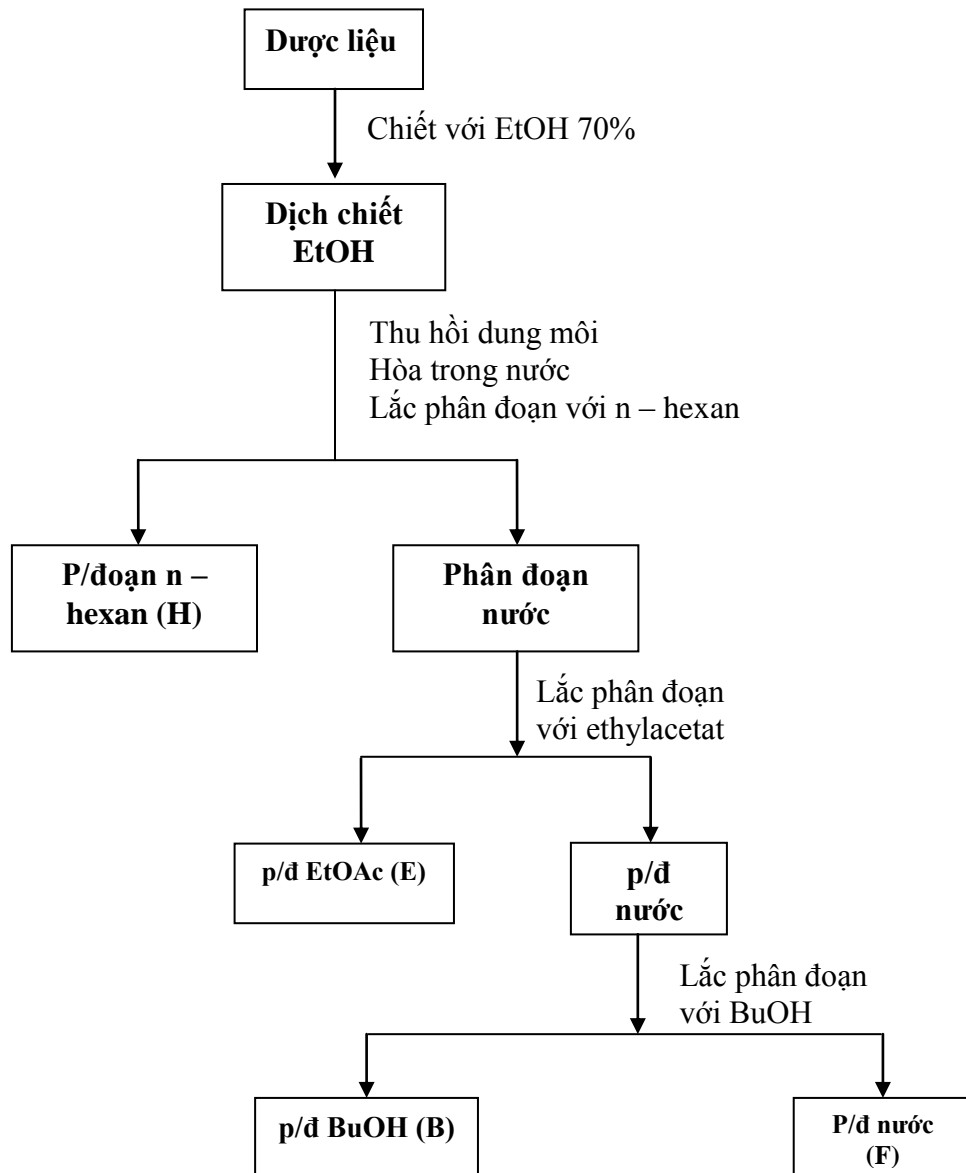
* *Phương pháp phân lập các hợp chất*

- Phân lập các hợp chất bằng sắc ký cột và SKLM điều chế.
- Sắc ký cột được tiến hành với chất hấp phụ là silica gel pha thường (0,040-0,063mm, Merck), silica gel pha đảo YMC (30-50 μ m, Fuji Silica Chemical Ltd.), cột Sephadex LH-20, cột Dianion HP-20.
- SKLM được thực hiện trên bản mỏng tráng sẵn DC-Alufolien 60 F₂₅₄ (Merck), RP18 (Merck). Phát hiện chất bằng đèn tử ngoại ở hai bước sóng 254 nm và 366 nm hoặc dùng thuốc thử là dung dịch H₂SO₄ 10% trong ethanol.
- SKLM điều chế thực hiện trên bản mỏng tráng sẵn silica gel 60 F₂₅₄ (Merck, ký hiệu 105875), phát hiện vết chất bằng đèn tử ngoại ở hai bước sóng 254 nm và 366 nm, thu gom chất và tinh chế lại bằng cách kết tinh trong dung môi thích hợp.

* *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 sử dụng chất nội chuẩn là TMS (tetramethyl silan) và so sánh các dữ liệu thu được từ thực nghiệm với các dữ liệu đã công bố

Quá trình chiết xuất được tiến hành như **Hình 2.1**.



Hình 2.1. 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

Mẫu khô của các cây thuốc được nghiền thành bột và chiết với cồn 96° bằng máy soxhet. Các dịch chiết được cô cạn hết dung môi, thu được cao khô của cây thuốc. Cao khô một phần hòa tan trong nước và lắc phân đoạn với dung môi có độ phân cực tăng dần từ *n*-Hexan, ethyl acetat. Dịch phân đoạn được cô thành cao. Cao toàn phần và cao phân đoạn ethyl acetat được hòa tan

trong MeOH ở các nồng độ đã chọn. Các dung dịch thu được sẽ được dùng để sàng lọc hoạt tính chống oxy hóa.

Các chất đối chiếu cũng được pha thành dung dịch trong cùng dung môi với mẫu dược liệu đem thử.

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**

- Pha mẫu thử trong MeOH thành dung dịch, có nồng độ chính xác khác nhau.
- Cho vào ống nghiệm hỗn hợp gồm có: 10 µl dung dịch mẫu thử, 990 µl dung dịch DPPH đã pha. Trộn hỗn hợp trong khoảng 1 phút rồi để yên 30 phút trong bóng tối, ở nhiệt độ thường. Dung dịch sau khi phản ứng được đem đo mật độ quang (A) ở bước sóng 517 nm. Tiến hành đo mật độ quang của mẫu cùng với mẫu trắng (1000 µl dung dịch DPPH), dung dịch chất thử trong 1000 µl MeOH và mẫu đối chứng dương (10 µl dung dịch chất đối chiếu, 990 µl dung dịch DPPH).

*** 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 ($O_2^{\cdot-}$)

*** Tiến hành thí nghiệm**

- Pha các dung dịch đệm phosphat từ hỗn hợp K_2HPO_4 (hoặc KH_2PO_4) để có được dung dịch ở nồng độ 20 mM chứa 0.1 mM EDTA và có độ pH 7.8; dung dịch xanthin 5 mM, dung dịch nitro blue tetrazolium (NBT) ở nồng độ 5 mM và dung dịch enzym xanthin oxidase (XO) (pha loãng trong nước tinh khiết) ở nồng độ khoảng 2 mM.

- Cho vào ống nghiệm hỗn hợp gồm có: 10 μ l dung dịch mẫu thử, 960 μ l dung dịch đệm phosphat, 10 μ l dung dịch xanthin 5 mM, 10 μ l dung dịch NBT 5 mM và cuối cùng cho 10 μ l dung dịch enzym XO. Trộn đều hỗn hợp trong khoảng 1 phút rồi để yên trong 5 phút tiếp theo ở điều kiện thường. Dung dịch thu được đem đo mật độ quang (A_m) ở bước sóng 560 nm. Tiến hành đo mật độ quang của mẫu cùng với mẫu trắng để so sánh (không có mẫu thử và không cho enzym XO), dung dịch chỉ cho mẫu thử (A_{mt} 10 μ l dung dịch mẫu trong 990 μ l dung dịch đệm), dung dịch phản ứng không cho mẫu (A_o) và mẫu đối chứng dương .

*** Tính kết quả**

Khả năng dọn gốc tự do $O_2^{\cdot-}$ 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 $O_2^{\cdot-}$ 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

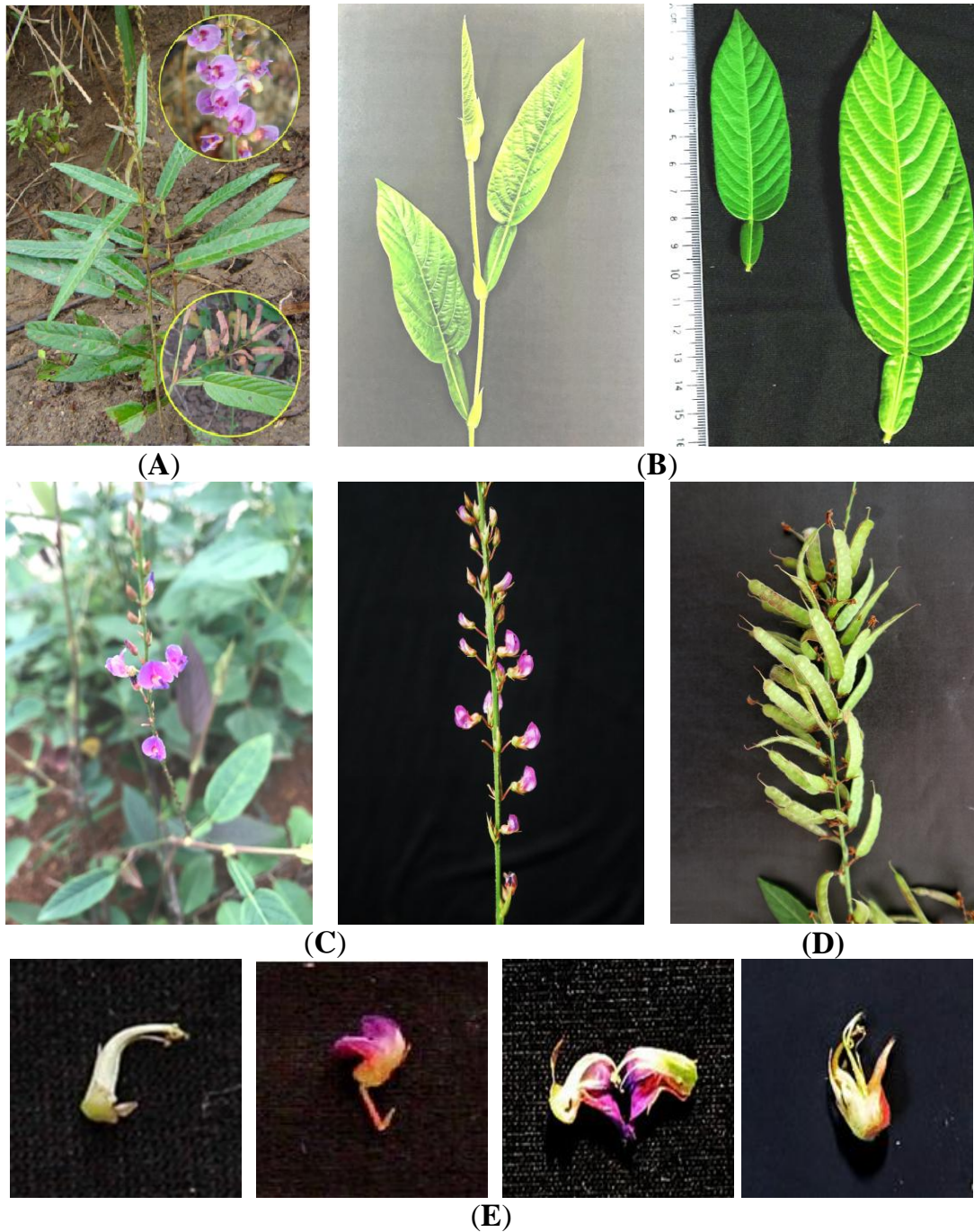
- Kết quả thử tác dụng chống oxy hóa, được xử lý bằng phương pháp Probit trên phần mềm Excel, để tính ra giá trị IC_{50}

Chương 3. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU

3.1. Đặc điểm thực vật cây Mũi mác

3.1.1. Đặc điểm hình thái

Cây bụi thấp, thân có 3 cạnh, mọc thẳng, cao 1-2 m. Lá có 1 lá chét; cuống lá dài 1-3 cm, có cánh rộng 4-8 mm; phiến lá hình thuôn đến hình mác hẹp, góc lá hình tim hay tròn, đầu lá nhọn; kích thước 5,8-13,0 × 1,1-3,5 cm; có lông mịn ở gân giữa và gân bên. Cụm hoa hình bông thưa, có thể phân nhánh, dài từ 15 đến 30 cm, có 2-3 hoa ở mỗi đốt, cuống hoa dài 2-6 mm, có lông nhỏ. Lá bắc và lá bắc con dạng vảy nhọn, có lông. Đài hoa hình chuông loe rộng, xẻ 4 thùy nhọn, đường kính khoảng 3 mm. Phần dưới tràng hoa màu trắng, phía trên màu hồng hoặc hồng lam, 2 cánh bên dạng thùy tròn; cánh hoa giữa (cánh cò) gần tròn, đường kính 5-6 mm; góc cánh hoa (họng) màu tím đậm hay nâu tím, ở mặt lưng có gờ dọc, chia cánh cò thành 2 phần đối xứng nhau. Bộ nhị gồm 10 nhị, 9 nhị hàn liền và 1 nhị rời (A_{9+1}), dính liền nhau ở phần gốc tạo thành bộ nhị 2 bó. Bầu thuôn, dẹt, đầu nhọn, có lông, thường có 5-8 noãn dính bên. Quả thuộc loại đậu, thuôn đều, dẹt, đầu có mũi nhọn, hơi thắt lại giữa các hạt, tạo thành mép lượn sóng, toàn quả có lông dính màu vàng nâu. Hạt thường có số lượng từ 5-8, có hình thận hay gần tròn, hơi dẹt (**Hình 3.1.**).



Hình 3.6. Cây Mũi mác (*Tadehagi triquetrum* (L.) H. Ohashi)

(A. Cây Mũi mác ngoài thực địa, B. Lá cây Mũi mác, C. Cành mang hoa, D. Quả Mũi mác, E. Bộ nhị hoa Mũi mác)

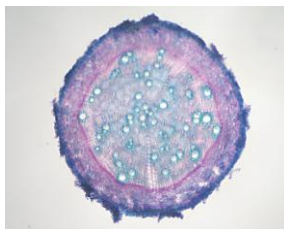
3.1.2. Đặc điểm vi học

3.1.2.1. Vi phẫu rễ cây Mũi mác

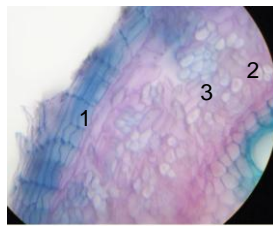
Vi phẫu cắt ngang rễ hình tròn, vùng vỏ chiếm 1/4 diện tích, vùng trung trụ chiếm 3/4. Rễ cây có cấu tạo đối xứng tỏa tròn gồm các phần sau:

Vùng vỏ: Bần (1) gồm 4 - 10 lớp tế bào hình bầu dục dẹt, méo mó, vách dày, xếp thành vòng đồng tâm và dây xuyên tâm, các lớp phía ngoài thường bị bong rách. Mô mềm vỏ (2) gồm vài lớp tế bào hình tròn hay bầu dục dẹt, vách mỏng hơn và xấp xếp lộn xộn, chứa ra những khuyết nhỏ. Tế bào mô cứng (3) nằm rải rác thành từng cụm nhiều tế bào trong mô mềm vỏ.

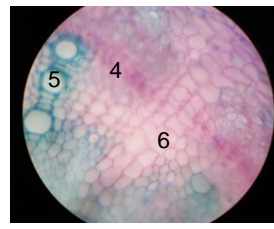
Vùng trung trụ: libe (4) tạo thành vòng gòn như liên tục, là các tế bào hình chữ nhật, vách uốn lượn. Libe nằm ngoài, gỗ nằm phía trong. Gỗ (5) xấp xếp lộn xộn đến tâm; Mạch gỗ kích thước không đều, rải rác xen lẫn các mô mềm gỗ. Mô mềm gỗ là những tế bào hình đa giác, xếp xít nhau, vách dày hóa gỗ. Bên cạnh các mạch gỗ và mô mềm gỗ có rất nhiều tế bào nhỏ mô cứng, tập trung thành cụm. Tia ruột (6) đi từ tâm vi phẫu, xuyên qua vùng gỗ và libe.



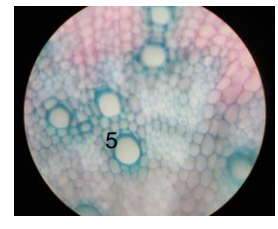
Hình 3.2a



Hình 3.2b



Hình 3.2c



Hình 3.2d

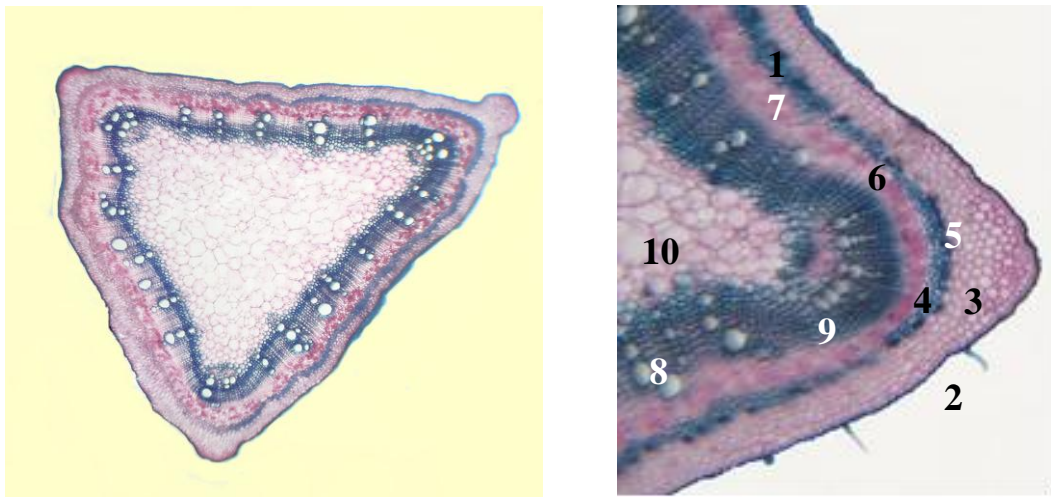
Hình 3.7. Vi phẫu rễ cây Mũi mác

(1. Bần, 2. Mô mềm vỏ, 3. Tế bào cứng, 4. Libe, 5. Mạch gỗ, 6. Tia ruột)

3.1.2.2. Vi phẫu thân Mũi mác

Mô tả mặt cắt ngang thân cây có hình tam giác. Từ ngoài vào trong có: Ngoài cùng là biểu bì (1) gồm một hàng tế bào đều đặn, xếp sát nhau, mang lông che chở dạng sợi thuôn nhỏ ở đầu (2). Dưới biểu bì có lớp mô dày (3) được cấu tạo bởi vài lớp tế bào hình tròn hay đa giác có thành dày xếp sát nhau bắt màu hồng trong phương pháp nhuộm kép, mô dày và phát triển hơn ở phần góc của

thân cây. Mô mềm vỏ (4) gồm 5-10 lớp tế bào hình bầu dục xếp ngang hoặc hình tròn kích thước không đều, có thành mỏng, các tế bào xếp cạnh nhau để hở ra các khoảng gian bào. Sợi (5) gồm 4-5 lớp tế bào hình đa giác, không đều, xếp sát nhau tạo thành vòng liên tục bao quanh libe. Libe - gỗ cấp 2. Libe cấp 2 (6) có màu đỏ trong phương pháp nhuộm kép, được cấu tạo từ các tế bào nhỏ, thành mỏng, xếp chồng lên nhau tạo thành vòng bao quanh gỗ. Tầng phát sinh libe - gỗ (7) cấu tạo bởi 1-2 hàng tế bào hẹp. Gỗ cấp 2 bắt màu xanh trong phương pháp nhuộm kép bao gồm mạch gỗ (8) kích thước to nhỏ không đều nằm xen lẫn các tế bào mô mềm gỗ (9) tạo thành vòng liên tục quanh thân cây. Tia ruột gồm 1 dải tế bào bắt màu hồng rất hẹp đi từ trong ra ngoài qua vùng libe - gỗ. Mô mềm ruột (10) gồm những tế bào kích thước lớn hơn mô mềm vỏ, không đồng đều, hình đa giác, thành mỏng (**Hình 3.3**).



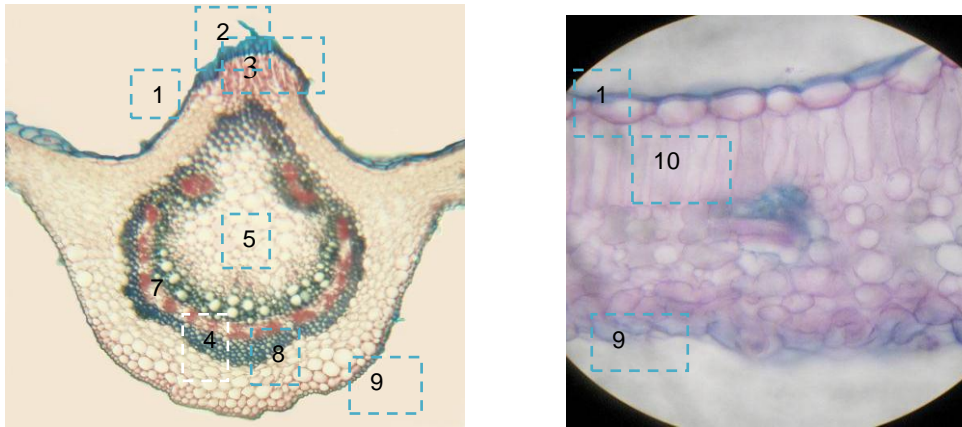
Hình 3.8. Vi phẫu thân

(1. Biểu bì, 2. Lông che chở, 3. Mô dày, 4. Mô mềm vỏ, 5. Sợi, 6. Libe cấp 2, 7. Libe - gỗ, 8. Mạch gỗ, 9. Mô mềm gỗ, 10. Mô mềm ruột)

3.1.2.3. Vi phẫu lá *Mùi mác*

Cả gân phía trên và phía dưới đều lồi ở phần gân lá. Biểu bì trên (1) gồm 1 lớp tế bào xếp đều đặn, liên tục, có lông che chở (2). Ở phần lồi lên có mô dày (3) ngay sát biểu bì trên, mô dày là những tế bào hình đa giác, kích thước không đều, có thành dày. Ngay sát dưới mô dày là các đám mô cứng (4), xếp cạnh nhau, có

thành tế bào dày hóa gỗ. Ở phần không lõi lên, ngay dưới biểu bì là các dãy tế bào mô mềm (5) là các tế bào hình tròn, hình đa giác, kích thước không đều nhau, màng mỏng bằng cellulose. Hệ thống dẫn là cung libe - gỗ tạo thành vòng không liên tục, gỗ (6) xếp ở trong, libe (7) ở vòng ngoài, ngay sát dưới cung libe - gỗ là vòng mô cứng (8). Mô mềm ruột (9) là những tế bào bất màu hồng có màng mỏng, hình tròn hoặc đa giác, kích thước to nhỏ không đều, xếp xít nhau. Biểu bì dưới (10) gồm một lớp tế bào xếp đều đặn, liên tục, có mang lông che chở và lông tiết (**Hình 3.4**).



Hình 3.9. Vi phẫu lá và phiến lá

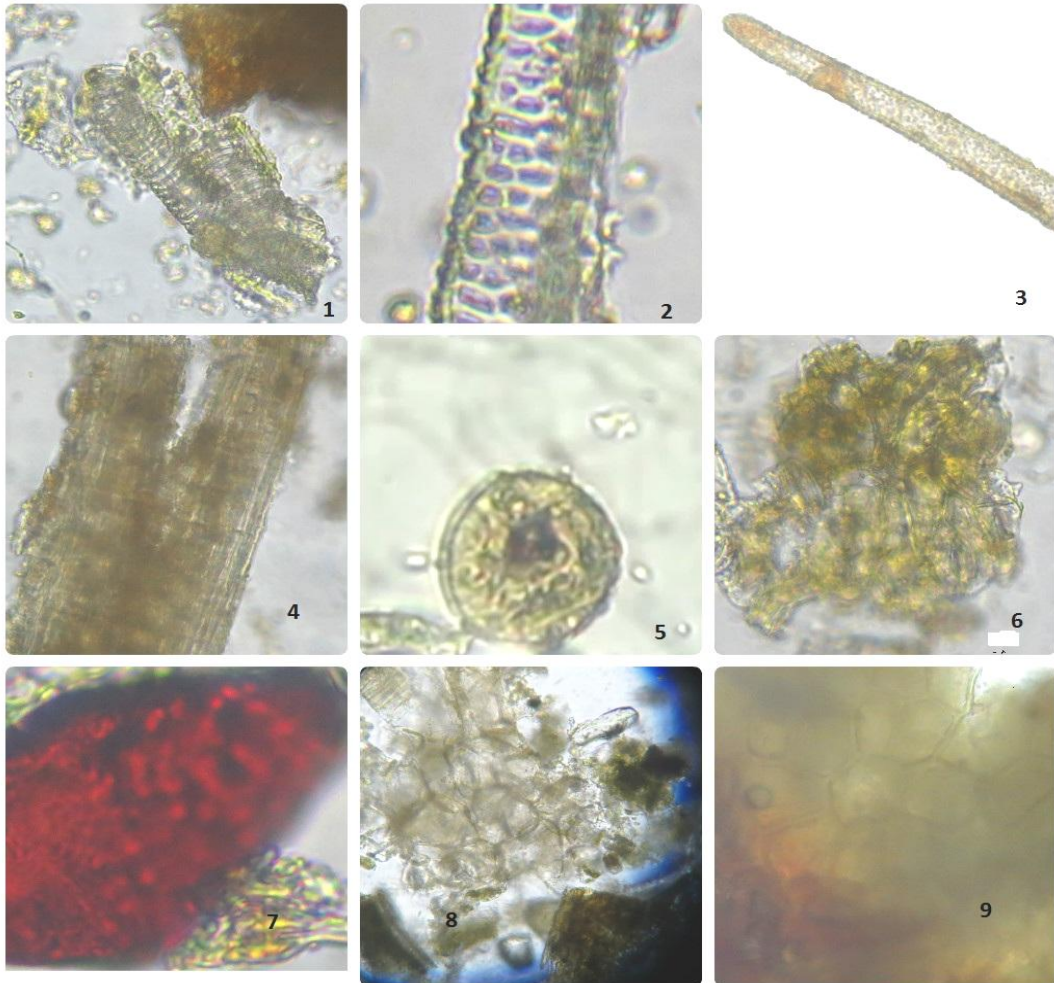
(1. Biểu bì trên, 2. Lông che chở, 3. Mô dày, 4. mô cứng, 5. Mô mềm, 6. Gỗ, 7. Libe, 8. Mô mềm ruột, 9. Biểu bì dưới, 10. Mô giậu)

3.1.2.4. Đặc điểm bột dược liệu Mũi mác

Mô tả cảm quan dược liệu: Màu lục nhạt, mùi thơm nhẹ, vị ngọt nhẹ.

Quan sát dưới kính hiển vi quang học ở vật kính X40 thấy các đặc điểm như sau: Mạch (1), (2) màu vàng nhạt có loại xếp thành hình xoắn như lò xo hoặc hình mạng; Mạch biểu bì thân mang lông che chở (3) bao gồm các tế bào biểu bì màu lục nhạt mang các lông che chở đơn bào có đầu thuôn dài. Bó sợi (4) có tế bào vách dày, bên trên có tinh thể calci oxalat hình khối xếp thành hàng hoặc rải rác. Lông che chở thuôn dài có thể nguyên nhưng thường gãy thành từng đoạn, vách mỏng và nhẵn hay vách dày lấm tấm. Lông tiết (5) có dạng đầu tròn. Mạch biểu bì dưới của lá mang lỗ khí (6) kiểu song bào; tế bào có vách dày, ngoằn ngoèo. Mạch mang màu nâu sẫm (7). Mạch mô mềm

(8) bao gồm các tế bào mô mềm có màng mỏng trong suốt. Mảnh bản (9) gồm các tế bào sẫm màu, thành tế bào dày (**Hình 3.5**).



Hình 3.10. Đặc điểm bột dược liệu Mũi mác

1,2. Mảnh mạch, 3. Lông che chở, 4. Bó sợi mang tinh thể calci oxalat, 5. Lông tiết, 6. Mảnh biểu bì mang lỗ khí, 7. Mảnh mang màu nâu, 8. Mảnh mô mềm, 9. Mảnh bản.

3.1.3. Tên khoa học của cây mũi mác

Qua quan sát và phân tích các mẫu cây mang hoa, quả tại thực địa chúng tôi thấy mẫu cây nghiên cứu có dạng là: Cây bụi, thân có lông thô. Gốc có thể hóa gỗ. Thân cành hình tam giác và có lông thưa. Lá đơn, đầu nhọn, góc phiến tròn hay hơi hình tim, mặt dưới phiến lá màu nhạt hơn, có lông. Cuống lá dài 1 – 5cm, dạng cánh, cánh rộng 1 – 6mm; gân phụ từ 8 đến 14 đôi. Có lá kèm nhỏ, hình tam giác nhọn, màu xanh hoặc màu nâu. Cụm hoa mảnh, mọc ở kẽ lá và đầu cành, cụm hoa có ít lông thô, nhánh có 2 – 5 hoa. Đài dạng chuông, có 4 thùy. Tràng gần tròn, màu hồng. Quả loại đậu, có lông mềm màu xám, mép uốn lượn. Có từ 7 đến 9 hạt.



Hình 3.6. Cây Mũi mác (*Desmodium triquetrum* (L.) DC.)

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) hay *Tadehagi triquetrum* (Linnaeus) H. Ohashi. (Giấy giám định TKH: Phụ lục 1)

3.2. Thành phần hóa học của dược liệu Mũi mác

3.2.1. Kết quả định tính hóa học

Tiến hành định tính một số nhóm chất chính trong dược liệu bằng phương pháp phân tích định tính sử dụng các phản ứng hóa học thường quy. Kết quả được trình bày ở **Bảng 3**.

Bảng 3. Bảng kết quả các phản ứng định tính nhóm chất chính có trong dược liệu Mũi mác

<i>STT</i>	<i>Nhóm chất</i>	<i>Phản ứng định tính</i>	<i>Kết quả</i>	<i>Kết luận</i>
1	Glycosid tim	Phản ứng Liebermann	+	Không
		Phản ứng Baljet	-	
		Phản ứng Legal	-	
		Phản ứng Keller – Kiliani	-	
2	Alcaloid	Phản ứng với TT Mayer	-	Không
		Phản ứng với TT Bouchardat	-	
		Phản ứng với TT Dragendoff	-	
3	Flavonoid	Phản ứng Cyanidin	+++	Có
		Phản ứng với NaOH 10%	+++	
		Phản ứng với FeCl ₃ 5%	+++	
		Phản ứng Diazo	+++	
4	Saponin	Hiện tượng tạo bọt	+	Có
		Saponin steroid	++	Có
		Saponin triterpenic	-	Không
5	Anthranoid	Dạng glycozid	-	Không
		Dạng toàn phần	-	Không
6	Coumarin	Phản ứng đóng vòng lacton	-	Không
		Phản ứng Diazo	+	
		Huỳnh quang	+	

7	Tanin	Phản ứng với dung dịch gelatin 1%	+	Có
		Phản ứng với d.d FeCl ₃ 5%	+++	
		Phản ứng với Pb(CH ₃ COOH) ₂ 10%	+++	
8	Chất béo	Quan sát vết mờ trên giấy lọc	++	Có
9	Steroid	Phản ứng Libermann	+	Có
10	Caroten	Phản ứng với H ₂ SO ₄ đặc	+	Có
11	Đường khử	Phản ứng với thuốc thử Fehling	++	Có
12	Acid hữu cơ	Phản ứng với Na ₂ CO ₃	+	Có
13	Polysaccharid	Phản ứng với TT Lugol	-	Không

Chú thích: (-): Phản ứng âm tính. (++) : Phản ứng dương tính rõ

(+): Phản ứng dương tính. (+++): Phản ứng dương tính rất rõ.

Kết luận: Từ kết quả định tính các nhóm chất bằng phản ứng hóa học ở bảng trên cho thấy trong dược liệu Mũi mác có chứa: Flavonoid, saponin, tanin, chất béo, steroid, caroten, đường khử, acid hữu cơ.

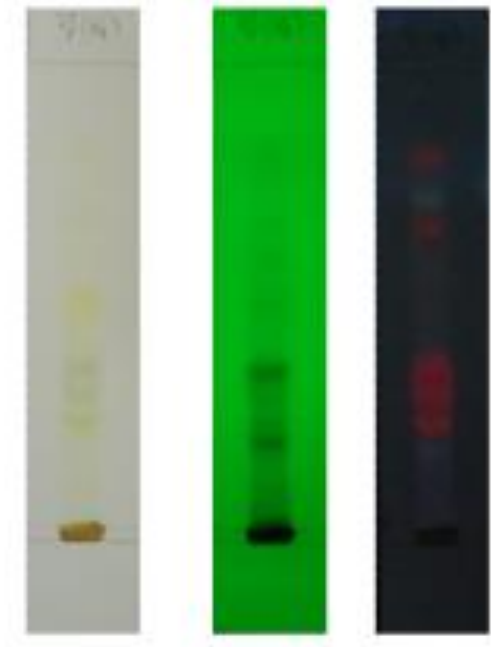
3.2.2. Định tính căn các phân đoạn bằng sắc ký lớp mỏng

Chiết xuất theo sơ đồ hình 2.1 và thu được căn các phân đoạn n- hexan (H), Ethylacetat (E), Buthanol (B), Căn nước (F) và tiến hành định tính căn các phân đoạn bằng sắc ký lớp mỏng

Sau khi triển khai sắc ký các phân đoạn dịch chiết với các hệ dung môi khác nhau, thu được kết quả như sau:

+ **Căn toàn phần:** Có khả năng tách vết tốt với hệ:

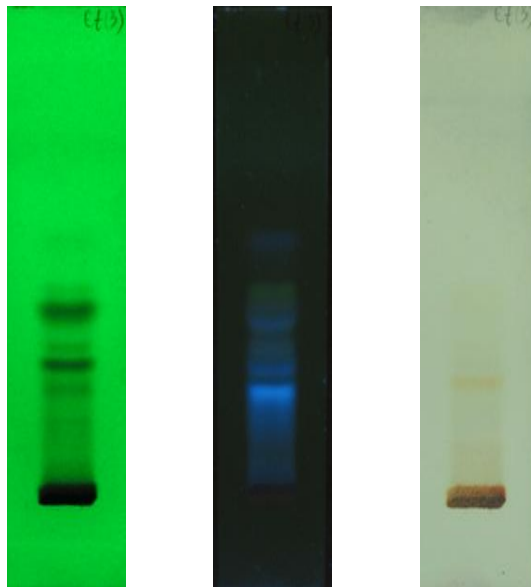
Toluen – Ethylacetat – Acid Formic (6,5: 4: 0,25).



Hình 3.7. Sắc ký đồ căn dịch chiết toàn phần ở AST, UV₂₅₄, UV₃₆₅

+ Căn phân đoạn ethylacetat:

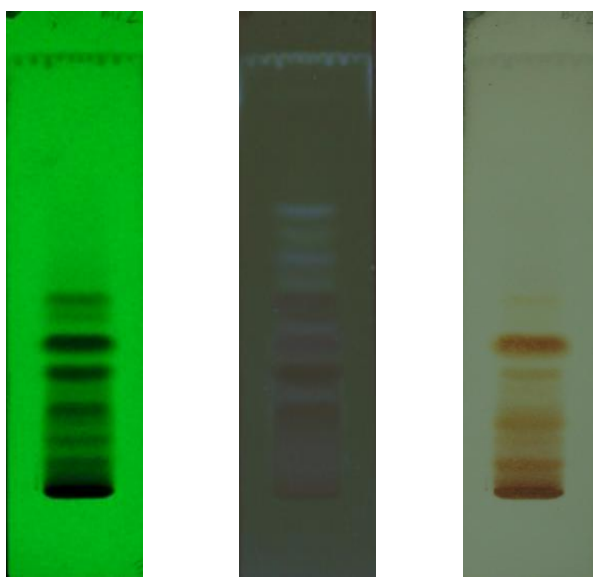
Tách tốt với hệ: Toluen – Ethylacetat – Acid Formic (5 : 2,5 : 0,5).



**Hình 3.8. Sắc ký đồ căn dịch chiết phân đoạn ethylacetat ở UV₂₅₄, UV₃₆₅,
AST/TT**

+ Cẩn phân đoạn butanol:

Tách tốt với hệ: Cloroform – Methanol – Nước (6,5 : 3,5 : 1) (lớp dưới).



Hình 3.9. Sắc ký đồ cẩn dịch chiết phân đoạn butanol ở UV₂₅₄, UV₃₆₅ và AST/TT

3.2.3. Phân lập các hợp chất

3.2.3.1. Chiết xuất:

Chiết xuất theo sơ đồ hình 2.1 và thu được cẩn các phân đoạn n- hexan (H), Ethylacetat (E), Buthanol (B), Cẩn nước (F).

Các dịch chiết n-hexan, ethyl acetat và n-butanol được tách riêng, cất loại dung môi dưới áp suất giảm thu được các phần cẩn tương ứng: cẩn phân đoạn n-hexan (35 g), cẩn phân đoạn ethyl acetat (77 g) và cẩn phân đoạn n-butanol (44 g).

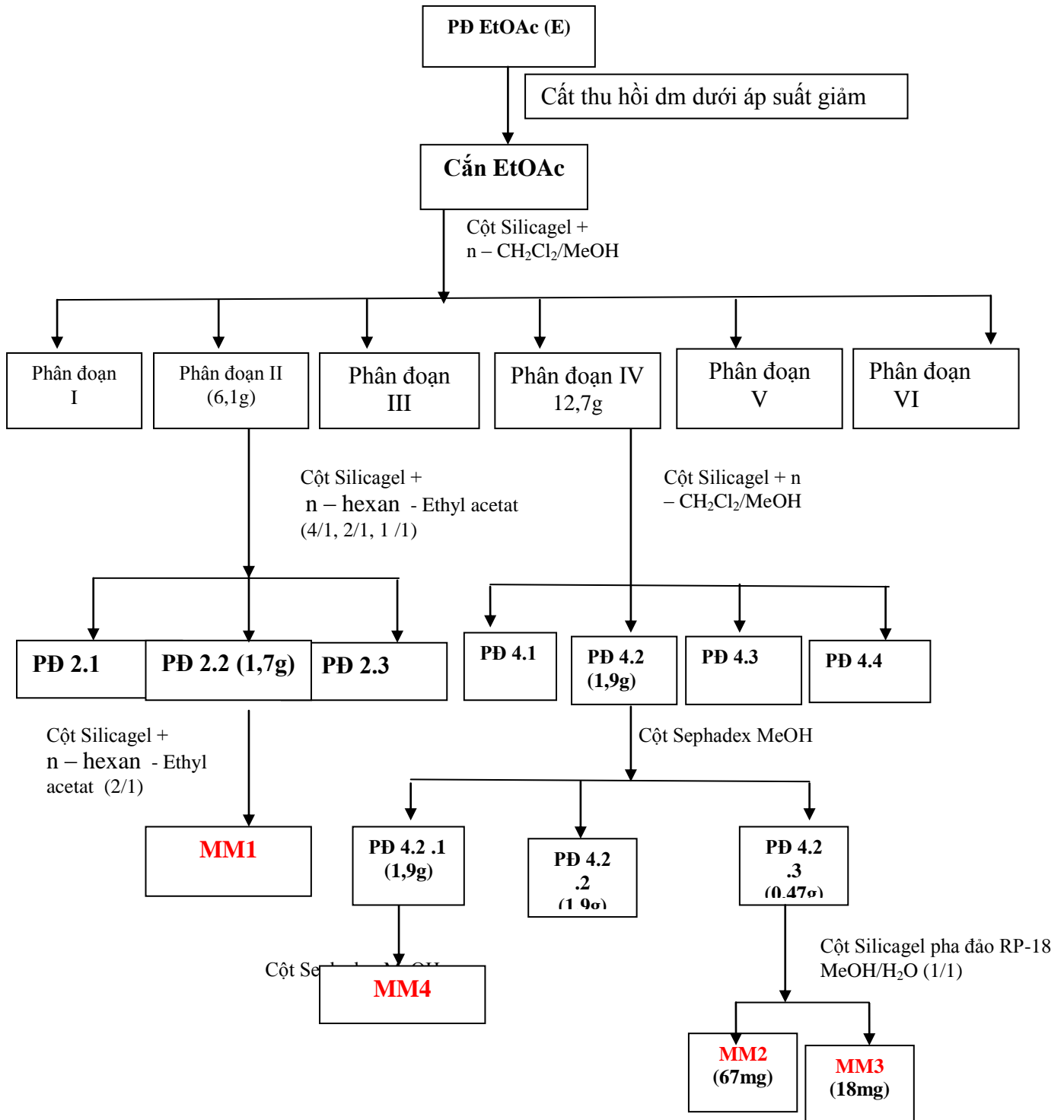
Dịch chiết được tiến hành cất thu hồi dung môi và sấy ở áp suất giảm thu được cao khô. Cao khô này đem hòa trong nước rồi đem dịch lọc lần lượt với n – hexan, ethylacetat và n – butanol. Cất thu hồi dung môi dưới áp suất giảm, duy trì nhiệt độ nồi cách thủy dưới 60°C, thu được các cẩn tương ứng là H, E, B, F.

3.2.3.2. Phân lập các chất trong cây Mũi mác

Tiến hành chiết 5kg dược liệu bằng cồn 70% thu cao toàn phần và phân đoạn cao theo Hình 1. Theo như kết quả khảo sát định tính trong ống nghiệm và định tính bằng SKLM các phân đoạn E, B, F ta thấy: Flavonoid tập trung trong cấn E (dịch chiết ethylacetat). Do đó, ta tiến hành chạy cột phân đoạn E để tách các flavonoid có trong cây Mũi mác. Hệ dung môi được chọn để tách phân đoạn E này sẽ có độ phân cực gần với độ phân cực của hệ dung môi III (Toluen – ethylacetat – acid formic (5 : 2,5 : 0,5)). Do hệ dung môi III này là hệ 3 dung môi, có toluen và acid formic là hai dung môi tương đối đặc biệt, khó bay hơi, khó thu hồi và đắt tiền nên ở giai đoạn chạy cột thô, đề tài sử dụng hệ dung môi đơn giản, thường quy là n.hexan – ethylacetat để tiết kiệm dung môi và có thể tối ưu được phương pháp tách chiết. Ở giai đoạn chạy cột tinh chế, đề tài sẽ tiếp tục lựa chọn hệ dung môi phù hợp với từng phân đoạn. Quy trình chạy cột được tóm tắt ở sơ đồ **Hình 3**.

Cấn phân đoạn ethyl acetat (50 g) được đưa lên cột sắc ký silica gel pha thường, rửa giải bằng hệ dung môi CH₂Cl₂/MeOH với tỷ lệ methanol tăng dần từ 0 đến 100 % thu được 6 phân đoạn **PD1-PD6**. Phân đoạn **PD2** (6,1 g) tiếp tục được phân tách bằng cột silica gel pha thường với hệ dung môi rửa giải n-hexan/ethyl acetat (4/1; 2/1; 1/1) thu được 3 phân đoạn **PD2.1-PD2.3**. Phân đoạn **PD2.2** (1,7 g) được tinh chế trên cột silica gel pha thường, rửa giải đẳng dòng n-hexan/ethyl acetat (2/1) thu được chất số **1** (14 mg). Phân đoạn **PD4** (12,7 g) được phân tách trên cột silica gel pha thường rửa giải gradient với hệ dung môi CH₂Cl₂/MeOH (10/1; 8/1; 6/1) thu được 4 phân đoạn **PD4.1-PD4.4**. Phân đoạn **PD4.2** (1,9 g) tiếp tục được phân tách trên cột Sephadex LH-20 sử dụng dung môi rửa giải là methanol. Kiểm tra thành phần dịch rửa giải bằng sắc ký lớp mỏng, thu được 3 phân đoạn **PD4.2.1** đến **PD4.2.3**. Phân đoạn **PD4.2.3** (0,47 g) được tinh chế trên cột silica gel pha đảo RP-18 rửa giải đẳng dòng với hệ dung môi MeOH/H₂O (1/1) thu được chất số **2** (67 mg) và chất số

3 (18 mg). Phân đoạn **PD4.2.1** được đưa lên cột Sephadex LH-20 rửa giải đẳng dòng bằng methanol thu được chất số **4** (8 mg)



Hình 3. Sơ đồ phân lập các chất từ phân đoạn Ethylacetat

Chất số 1: Bột màu vàng, nhiệt độ nóng chảy 274-276°C. Phổ IR (cm^{-1}): 3376; 2925; 1651; 1599; 1493; 1257; 1069. Phổ ESI-MS (m/z)=285 $[\text{M}-\text{H}]^-$.

Phổ $^1\text{H-NMR}$ (CD_3OD ; 500 MHz) và $^{13}\text{C-NMR}$ (CD_3OD ; 125 MHz): Xem bảng 1 và 2.

Chất số 2: Bột màu vàng, nhiệt độ nóng chảy $215\text{-}217^\circ\text{C}$. Phổ IR (cm^{-1}): 3330; 2911; 1607; 1465; 1232; 1082. Phổ ESI-MS (m/z)=447 $[\text{M-H}]^-$. Phổ $^1\text{H-NMR}$ (CD_3OD ; 500MHz) và $^{13}\text{C-NMR}$ (CD_3OD ; 125 MHz): Xem bảng 1 và 2.

Chất số 3: Bột màu vàng, nhiệt độ nóng chảy $147\text{-}149^\circ\text{C}$. Phổ IR (cm^{-1}): 3482; 1648; 1477; 1244; 1017. Phổ ESI-MS (m/z)=463 $[\text{M-H}]^-$. Phổ $^1\text{H-NMR}$ (CD_3OD ; 500MHz) và $^{13}\text{C-NMR}$ (CD_3OD ; 125 MHz): xem bảng 1 và bảng 2

Chất số 4: Bột màu vàng, nhiệt độ nóng chảy $184\text{-}186^\circ\text{C}$. Phổ IR (cm^{-1}): 3417; 2974; 1465; 1415; 1077. Phổ APCI-MS (m/z)=449 $[\text{M+H}]^+$. Phổ $^1\text{H-NMR}$ (CD_3OD ; 500MHz) và $^{13}\text{C-NMR}$ (CD_3OD ; 125 MHz): xem bảng 4 và bảng 5.

3.3.2.2. *Xác định cấu trúc hóa học của các chất chính phân lập được từ Mũi mác*

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** thu được là chất bột màu vàng, có nhiệt độ nóng chảy ở 274-276°C. Phổ IR cho biết các đỉnh hấp thụ của nhóm OH (3376 cm⁻¹), của nhóm keton C=O (1651 cm⁻¹) và liên kết đôi C=C nhân thơm (1493 cm⁻¹). Trong phổ ¹³C-NMR của **1** xuất hiện tất cả mười ba tín hiệu cacbon, trong đó có một tín hiệu keton cacbon tại δ_C 177,4 ppm và mười hai tín hiệu ở trường thấp đặc trưng cho cacbon của vòng thơm hay của liên kết đôi C=C (δ_C 94,5-165,6 ppm). Phổ ¹H-NMR cho các tín hiệu của sáu proton vòng thơm tại δ_H 6,20-8,09 ppm. 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 [1], [51] cho biết chất số **1** là một flavonoid (chỉ có các nhóm thế hydroxy trong phân tử). Hai tín hiệu doublet của 4 proton thơm lần lượt ở: δ_H 8,09 (2H, dd, *J*=8,5 Hz) và 6,92 (2H, d, *J*=8,5 Hz) được xác định là các proton ở vị trí H-2', H-6' và H-3', H-5' vòng B của một flavonoid. Do cacbon ở vị trí C-2' và C-6' đối xứng nhau, và cacbon ở vị trí C-3' và C-5' đối xứng với nhau nên trên phổ ¹³C-NMR xuất hiện tín hiệu của 13 cacbon, phù hợp với 15 cacbon như khung cơ bản C₆-C₃-C₆ của một flavonoid. Hai tín hiệu proton ghép cặp *meta* δ_H 6,20 (d, *J*=2,0 Hz) và 6,41 (d, *J*=2,0 Hz) còn lại được xác định lần lượt là hai

proton ở vị trí H-6 và H-8 vòng A. Phổ khối ESI-MS có pic ion tại m/z : 285 [M-H] (negative) cho biết khối lượng phân tử của **1** là $M=286$. Phân tích các dữ kiện phổ, tham khảo tài liệu đã công bố [34], [22], [19] 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 ^{13}C -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 ^{13}C -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**). Các tín hiệu trong phổ ^{13}C -NMR của phần đường cho biết có một phân tử đường có sáu cacbon tại δ_{C} 104,2; 78,4; 78,1; 75,7; 71,4 và 62,6 ppm. Kết hợp với dữ liệu của phổ ^1H -NMR có δ_{H} 5,26 (d, $J=7,5$ Hz); 3,22-3,71 (6H, các proton của đường) đi đến kết luận phần đường là β -D-glucopyranosid [7-8]. Phần đường này được xác định gắn với aglycon tại vị trí số 3 do đa số các tín hiệu cacbon phần aglycon của chất **2** tương tự với chất số **1**, chỉ có tín hiệu của C-2 (δ_{C} 159,1) xuất hiện ở trường thấp hơn tín hiệu này của **1** (δ_{C} 148,1) [6-8]. Như vậy, chất số **2** có thể là kaempferol-3- O - β -D-glucopyranosid hay còn có tên gọi khác là astragalin. Phổ khối cho biết khối lượng phân tử của **2** là 448, phù hợp với công thức $\text{C}_{21}\text{H}_{20}\text{O}_{11}$ của astragalin. So sánh số liệu phổ thu được với các số liệu đã được công bố của astragalin [42], [31] khẳng định chất số **2** phân lập được là astragalin.

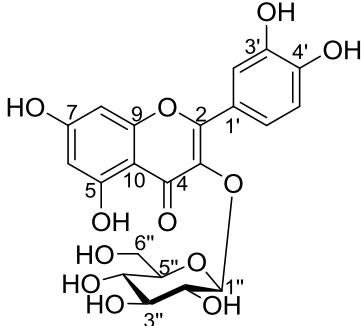
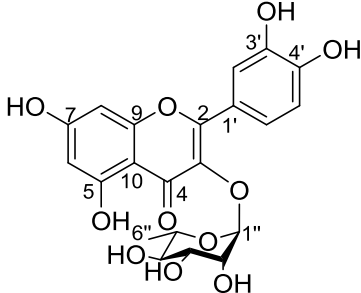
Chất số **3** thu được cũng là một flavonoid glycosid. Cũng tương tự như **2**, phần đường của **3** được xác định là β -D-glucopyranosid dựa vào phổ ^1H - và ^{13}C -NMR (Bảng 1 và 2). Phần aglycon của **3** có khác so với **2** ở chỗ phổ ^1H -

NMR của **3** có tổng cộng năm proton nhân thơm, trong đó có ba proton tương tác với nhau dạng ABX (δ_H 6,89; 7,73 và 7,61 ppm) và hai proton khác tương tác dạng AX (δ_H 6,22 và 6,40). Như vậy, phần aglycon này được nhận dạng là quercetin và chất số **3** được dự đoán là quercetin-3-*O*- β -D-glucopyranosid [31]. So sánh các dữ kiện phổ của chất số **3** với dữ liệu phổ đã công bố [31], [18] 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 $^1\text{H-NMR}$ 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) [12]. Phổ khối APCI-MS có pic ion $m/z=449$ $[\text{M}+\text{H}]^+$, cho phép xác định công thức phân tử của **4** là $\text{C}_{21}\text{H}_{20}\text{O}_{11}$. So sánh số liệu phổ thu được với các số liệu đã được công bố [12], [8] cho biết chất số **4** phân lập được là quercetin-3-*O*- α -L-rhamnopyranosid hay còn được gọi là quercitrin.

Công thức cấu tạo của các chất 1-4

STT	Tên chất	Cấu trúc hóa học
1	Kaempferol (MM1)	
2	Astragalin (MM2) (Kaempferol 3- <i>O</i> - β -D-glucopyranosid)	

3	Isoquercitrin (TT7)	
4	Quercitrin (TT9) (Quercetin 3-O- α -D-rhamnopyranosid)	

3.3. Tác dụng chống oxi invitro của dược liệu

3.3.1. Độ gốc tự do DPPH

Cao ethanol; ethyl acetat; quercetin

TT	% loại bỏ gốc DPPH					
Nồng độ mẫu thử	200 μ g/ml	100 μ g/ml	50 μ g/ml	25 μ g/ml	12,5 μ g/ml	IC50 μ g/ml
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. Độ gốc tự do superoxid anion ($O_2^{\cdot-}$)

Cao ethanol; ethyl acetat; quercetin

	% loại bỏ gốc tự do superoxide anion					
Nồng độ	200 mg/ml	100 mg/ml	50 mg/ml	25 mg/ml	12,5 mg/ml	IC50 μ g/ml
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

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 *in vitro* cho thấy quercetin, một hợp chất gặp ở nhiều dược liệu và thường được sử dụng làm chất đối chứng dương trong các thử nghiệm chống oxy hóa *in vitro* có giá trị IC₅₀ trên 2 mô hình thử nghiệm dọn gốc tự do bằng DPPH và dọn gốc tự do O₂^{•-} lần lượt là 5,1 và 5,2 μg/ml. Trong khi đó cao EtOH và EtOAc chiết xuất từ Mũi mác có IC₅₀ đối với DPPH và O₂^{•-} lần lượt là: 36,1; 29,2 và 37,5; 20,0 μg/ml. Qua đó thể hiện được cao chiết có tác dụng bắt gốc tự do DPPH và superoxid 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

4.1. Về thực vật:

Nghiên cứu đặc điểm thực vật được thực hiện từ mô tả đặc điểm hình thái, phân loại thực vật, quan sát cảm quan trên thực địa, làm tiêu bản mẫu nghiên cứu, chụp ảnh, đối chiếu với mô tả trong các tài liệu phân loại thực vật chuẩn, kinh điển, so sánh với mẫu chuẩn lưu trữ, nghiên cứu đặc điểm vi phẫu, đặc điểm hiển vi. Kết quả này đã góp phần vào việc tiêu chuẩn hóa dược liệu giúp cho việc kiểm nghiệm dược liệu chính xác hơn và tránh nhầm lẫn.

Tiến hành nghiên cứu đặc điểm hình thái và vi học chúng tôi đã xác định được cây Mũi mác *Desmodium triquetrum* (L.) DC.. Việc giám định đúng tên khoa học của mẫu cây nghiên cứu giúp cho các nghiên cứu về hóa học và tác dụng dược lý được rõ nguồn gốc.

4.2. 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. Nghiên cứu hình thái phân loại thực vật, từ quan sát cảm quan trên thực địa, mẫu thu hái, chụp ảnh, đối chiếu với mô tả trong các tài liệu phân loại thực vật chuẩn, kinh điển, so sánh với mẫu chuẩn lưu trữ, nghiên cứu vi học hiển vi. 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.

Một số nhóm chất thường gặp trong dược liệu được định tính bằng phản ứng hóa học đặc hiệu thông thường. Đây là phương pháp phổ biến, từ lâu đã trở thành thường quy trong dược liệu học. Tuy đơn giản mà tính đặc hiệu cao và rất tin cậy, đặc biệt có kết hợp với SKLM.

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 kiếm), dễ tiến hành, đặc biệt ít gây biến đổi hóa học sản phẩm chiết. Tiếp đến là SKLM và SKC. SKLM dễ thực hiện, cho kết quả nhanh, mà độ nhạy cao (đòi hỏi lượng mẫu ít) ... nên được dùng rất rộng rãi để định tính, theo dõi phản ứng hóa học, quá trình sắc ký điều chế (SKC), chiết phân đoạn... trong nghiên cứu hóa học, hóa dược, sinh hóa, dược liệu... 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.

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

Kết quả định tính cho thấy phần trên mặt đất của Mũi mác có chứa flavonoid, saponin, tanin, chất béo, steroid, caroten, đường khử và acid hữu cơ. Như vậy kết quả này cũng phù hợp với các nghiên cứu về thành phần hóa học của các loài thuộc chi *Desmodium* với nhóm hợp chất chính là flavonoid.

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*.

➤ **Kaempferol (MM1)**

Hợp chất này đã được công bố cùng một số hợp chất khác như astragalin, 2-*O*-methyl-Lchiro-inositol, galactitol, acid *p*-hydroxycinnamic, acid ursolic, acid betulonic, β -sitosterol, daucosterol, stigmasterol... từ cây Mũi mác (*Tadehagi triquetrum*) [51].

Kaempferol (3,5,7,4'-tetrahydroxyflavon) và các kaempferol glycosid là các flavonoid phổ biến trong thực vật như các họ Pteridophyta, Pinophyta và Magnoliophyta và được phân lập từ nhiều loài khác nhau như *Acacia nilotica*, *Allium cepa*, *Aloe vera*, *Alternanthera tenella*, *Althaea rosea*, ...

Kaempferol là một chất chống oxy hóa mạnh với IC₅₀ là 50 μ M. Khả năng chống oxy hóa ở nồng độ thấp của kaempferol tạo nên vai trò quan trọng trong phòng chống stress [9], [30]. Ngoài ra, kaempferol còn có tác dụng chống viêm mạnh thông qua ức chế hoạt động của NF-kB, ức chế các cytokin và các enzym gây viêm (ví dụ TNF- α , IL-1, IL-6, IL8, COX-2, iNOS...) [9], [15]. Hợp chất này còn có tác dụng ức chế các vi khuẩn *Staphylococcus aureus* [17], [18], *Enterococcus faecalis* [14], *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia* [47], *Helicobacter pylori* [20], *Vibrio cholerae* [14], *Propionibacterium acnes* [21]. Kaempferol và các kaempferol glycosid còn có tác dụng tiêu diệt các tế bào ung thư phổi [25], gan [26], máu [10], da [29]...

➤ **Astragalin (MM2)**

Astragalin có tác dụng ức chế vi khuẩn *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Enterobacter cloacae*, *Klebsiella pneumoniae* [35], chống oxy hóa [44], hạ đường huyết [45], bảo vệ gan [46], chống viêm. Astragalin là một trong những chất flavonoid tự nhiên, astragalin (kaempferol 3-glucosid) được biết đến là thành phần có hoạt tính sinh học của nhiều cây thuốc truyền thống như *Cuscuta chinensis*. Hợp chất này nổi trội với các tác dụng dược lý đa dạng như chống viêm, chống oxy hóa, bảo vệ thần kinh, bảo

vệ tim mạch, chống ăn mòn, chống ung thư và thuốc trị đái tháo đường [36]. Astragalin là một flavonoid từ nhiều loại thảo dược truyền thống và cây thuốc, đã được công bố về tác dụng chống viêm *in vitro*. Nghiên cứu này nhằm xác định các tác dụng bảo vệ và các cơ chế cơ bản của astragalin đối với nội độc tố lipopolysaccharid gây ra và cải thiện tổn thương phổi ở chuột. Chuột được tiêm trong màng bụng (i.p.) với lipopolysaccharid (LPS) (khoảng liều: 5-40 mg/kg). Nghiên cứu cho thấy astragalin có thể cải thiện sự sống còn trong giai đoạn nội độc tố gây chết chuột và làm giảm phản ứng viêm trong mô hình chuột của tổn thương phổi cấp tính do lipopolysaccharid gây ra [48]. Astragalin đã được tìm thấy từ lá hồng hoặc *Rosa agrestis* cũng đã được chứng minh có tác dụng chống viêm da và hoạt động chống oxy hóa, tuy nhiên, hiệu quả của astragalin đối với đáp ứng viêm chưa được xác định rõ. Một số hợp chất hóa học trong đó có kaempferol, quercetin, astragalin và isoquercetin được phân lập từ lá của *Centella asiatica* đã được nghiên cứu trên *in vitro* thể hiện tác dụng chống viêm và ức chế yếu tố hoại tử khối u [37]. Astragalin được minh chứng có tác dụng ức chế mạnh sự phát triển của viêm da trong mô hình viêm da dị ứng trên chuột [38]. Ngoài ra, astragalin còn có tác dụng ức chế trên phản ứng viêm ở tế bào biểu mô tử cung và nội mạc tử cung của chuột do *Leptospira interrogans* gây ra [40], tác dụng bảo vệ chống lại tình trạng viêm dị ứng do viêm xoang gây ra [41] và phòng ngừa viêm da dị ứng [43].

➤ **Isoquercitrin (MM3)**

Isoquercitrin là 3-*O*-monoglycosid của quercetin, đã được tìm thấy từ rất lâu ở nhiều loài thực vật như dương xỉ [11], một số loài thuộc chi *Astilbe* [56]. Gần đây, isoquercitrin được quan tâm với tác dụng chống tăng đường huyết trên thử nghiệm *in vitro* [16].

➤ **Quercitrin (MM4)**

Quercetin là hợp chất glycosid được hình thành từ flavonoid quercetin và đường deoxy rhamnose. Hợp chất này gặp ở nhiều loài thực vật khác nhau như ở loài *Nymphaea odorata* hoặc *Taxillus kaempferi* [51]. Quercitrin đã được chứng minh có nhiều tác dụng trong đó có tác dụng chống viêm [50], chống oxy hóa, lợi tiểu và bảo vệ gan [28]. Đây là lần đầu tiên hợp chất này được tìm thấy ở loài *Desmodium 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.

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 có thể lý giải được phần nào về tác dụng sinh học này. 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 được đặc điểm hình thái, đặc điểm vi học, đối chiếu với các tài liệu chuyên khảo về thực vật đã kết luận được mẫu nghiên cứu có tên khoa học là *Desmodium triquetrum* (L.) DC. thuộc họ Đậu (Fabaceae) hay: *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 căn Ethylacetat đã phân lập được

3. Bằng các phương pháp sắc ký, nhóm nghiên cứu đã phân lập được bốn flavonoid từ căn 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 (MM1),
- Astragalin (MM2)
- Isoquercitrin (MM3),
- Quercitrin (MM4).

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 định hướng về kinh nghiệm sử dụng và thành phần hóa học đã phân lập được. Nghiên cứu tác dụng chống oxy hóa invitro cũng góp phần dữ liệu trong nghiên cứu tiếp theo của đề tài về tác dụng chống oxy hóa *in vivo* theo hướng bảo vệ gan của dược liệu.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

Tài liệu tham khảo tiếng Việt Nam

1. Đỗ Huy Bích, Đặng Quang Chung, Bùi Xuân Chương, Nguyễn Thượng Dong, Đỗ Trung Đàm, Phạm Văn Hiến, Vũ Ngọc Lộ, Phạm Duy Mai, Phạm Kim Mãn, Đoàn Thị Nhu, Nguyễn Tập, Trần Toàn (2004), *Cây thuốc và động vật làm thuốc ở Việt Nam*, Nxb Khoa học và Kỹ thuật, tr. 315, 316, 897
2. Phạm Hoàng Hộ, (1999), *Cây cỏ Việt Nam*, Nxb trẻ, tr. 814, 914, 920.
3. Nghiêm Thị Hương, (2009), *Nghiên cứu một số thành phần hoá học có trong cây hàn the *Desmodium heterophyllum**, Luận văn thạc sĩ hóa học, Trường ĐH sư phạm Đại học Thái Nguyên.
4. Lê Đình Bích, Trần Văn Ôn, Hoa, H.Q., (2005), *Thực vật học*, Bộ môn Thực vật, Trường đại học Dược Hà Nội, tr 393.
5. Đỗ Tất Lợi (1999), *Những cây thuốc và vị thuốc Việt Nam*, Nxb Y học, tr. 697.
6. Phạm Thị Màu, P.V.C., Nguyễn Ngọc Hạnh, (2010), "Góp phần khảo sát thành phần hóa học cây Kim tiền thảo (*Desmodium styractifolium* (Osbeck) Merr.)", *Tạp chí khoa học- Trường Đại học Cần Thơ*, 15a, tr. 15-20.
7. Nguyễn Viết Thân (2003), *Kiểm nghiệm dược liệu bằng phương pháp hiển vi*, Nxb Khoa học và Kỹ thuật, Hà Nội.

Tài liệu tham khảo tiếng Anh

8. Aline A. Boligon, Andriéli C. Feltrin, Michel M. Machado, Vanessa Janovik, Athayde, M.L. (2009), "HPLC analysis and phytoconstituents isolated from Ethyl acetate fraction of *Scutia buxifolia* Reiss. leaves", *Latin American Journal of Pharmacy*, 28, pp. 121-124.
9. Atanu Bhattacharjee, Shastry Chakrakodi Shashidhara et al. (2013), "Phytochemical and ethno-pharmacological profile of *Desmodium gangeticum* (L.) DC.: A review", *IJBR*, 04, pp. 507-515.
10. Bestwick, C.S., Milne, L., Pirie, L., Duthie, S.J. (2005), "The effect of short-term kaempferol exposure on reactive oxygen levels and integrity of human (HL-60) leukaemic cells", *Biochim Biophys Acta*, 1740, pp. 340-349.

11. Boer H. J., Vongsombath C. et al. (2011), "A fly in the ointment: evaluation of traditional use of plants to repel and kill blowfly larvae in fermented fish", *PLoS One*, 6, p 29521.
12. Bose S, Maji S, Chakraborty P (2013), "Quercitrin from *Ixora coccinea* leaves and its anti-oxidant activity", *Journal of PharmaSciTech*, 2, pp. 72-74.
13. Brasseur T, Angenot L (1986), "Flavonol glycosides from leaves of *Strychnos variabilis*", *Phytochemistry*, 25, pp. 563-564.
14. C François, M.F.e.a. (2015), "Safety of *Desmodium adscendens* extract on hepatocytes and renal cells. Protective effect against oxidative stress", *J Intercult Ethnopharmacol*, 4, pp. 1-5.
15. Chang SW, Kim KH, Lee IK, Choi SU, Ryu SY, Lee KR (2009), "Phytochemical constituents of *Bistorta manshuriensis*", *Natural Product Sciences*, 15, pp. 234-240.
16. Chen A. Y. and Chen Y. C. (2013), "A review of the dietary flavonoid, kaempferol on human health and cancer chemoprevention", *Food Chem*, 138, pp. 2099-2107.
17. D Ghosh, Anandakumar A (1983), "Anti-inflammatory and analgesic activities of gangetin – A pterocarpene from *Desmodium gangeticum*", *Indian Journal of Pharmacology*, 15, pp. 391-492.
18. Fernandez J, Reyes R, Ponce H, Oropeza M, Vancalsteren MR, Jankowski C, Campos MG (2005), "Isoquercitrin from *Argemone platyceras* inhibits carbachol and leukotriene D4-induced concentration in Guinea-pig Airways", *European Journal of Pharmacology*, 522, pp. 108-115.
19. Gangwal A, Parmar SK, Sheth NR (2010), "Triterpenoid, flavonoids and sterols from *Lagenaria siceraria* fruits", *Der Pharmacia Lettre*, 2, pp. 307-317.
20. Ghani A, (2003), *Medicinal plants of Bangladesh: chemical constituents and uses*, Asiatic Society of Bangladesh.
21. Ghosal R, Srivastava S, Banerjee P K (1971), "Alkaloids of *Desmodium triflorum*", *Phytochemistry*, 10, pp. 3312-3313.

22. Hadizadeh F, Khalilia N, Hosseinzadeh H, Khair-Aldine R (2003), "Kaempferol from Saffron petals", *Iranian Journal of Pharmaceutical Research*, 2, pp. 251-252.
23. Harborne J. B. al et, (1994), *Phytochemistry Dictionary of the Leguminosae, vol.1, Plant and their constituents*, Chapman and Hall,
24. Hkun Saw Lwin Tu, Margaret (1968), "Effect of *Desmodium Triquetrum* extract on some pathogenic bacteria", *Union of Burma Journal of Life Sciences*.
25. Ho C. S., Wong Y. H. et al. (1989), "The hypotensive action of *Desmodium styracifolium* and *Clematis chinensis*", *Am J Chin Med*, 17, pp. 189-202.
26. Hou WC, Lin RD, Lee TH, Huang YH, Hsu FL, Lee MH (2005), "The phenolic constituents and free radical scavenging activities of *Gynura formosana* Kiamnra", *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 85, pp. 615-621.
27. Huang Puhua, Ohashi Hiroyoshi, (2010), *Tadehagi H. Ohashi, in: Nu, Z.Y.; P.H. Raven and D.Y. Hong (eds.), Flora of China*, Science Press ;Missouri Botanical Garden Press, Beijing St. Louis,
28. John L., Paul M. (1984), "The Structure of Desmocarpin, a Pterocarpan Phytoalexin from *Desmodium gangeticum*", *Z. Naturforsch*, 39, pp. 531–534.
29. Jung HA, Kim JE, Chung HY, Choi JS (2003), "Antioxidant principles of *Nelumbo nucifera* stamens", *Archives of Pharmacal Research*, 26, pp. 279-285.
30. Kampkotter A., Gombitang Nkwonkam C. et al. (2007), "Effects of the flavonoids kaempferol and fisetin on thermotolerance, oxidative stress and FoxO transcription factor DAF-16 in the model organism *Caenorhabditis elegans*", *Arch Toxicol*, 81, pp. 849-858.
31. Kima HY, Moon BH, Lee HJ, Choi DH (2004), "Flavonol glycosides from the leaves of *Eucommia ulmoides* O. with glycation inhibitory activity", *Journal of Ethnopharmacology*, 93, pp. 227-230.
32. Li X. L., Wang H. et al (2007), "Study on chemical constituents from *Desmodium styracifolium*", *Zhong Yao Cai*, 30, pp. 802-805.

33. Ma X, Zheng C, Hu C, Rahman K, Qin L (2011), "The genus *Desmodium* (Fabaceae)-traditional uses in Chinese medicine, phytochemistry and pharmacology", *Journal of Ethnopharmacology*, 138, pp. 314-332.
34. Mabry TJ, Markham KR, Thomas MB, (1970), *The systematic identification of flavonoids*, Springer-Verlag, New York.
35. Mouffok S, Haba H, Lavaud C, Long C, Benkhaled M (2012), "Chemical constituents of *Centaurea omphalotricha* Coss. & Durieu ex Batt. & Trab.", *Records of Natural Products*, 6, pp. 292-295.
36. Na M.K., An R.B., Jin W.Y., Min B.S., Yoo J.K., Kim Y.H., Bae K.H. (2003), "Antioxidant effect of plant extracts on free radical and lipid peroxidation", *Natural Product Sciences*, 9, pp. 226-231.
37. NP Rajith, VS ramchandran (2010), "Ethnomedicines of Kurichyas, kannur district, Western Ghats, Kerela., Indian", *Indian Journal Of Natural Products and Resources*, 1, pp. 249-253.
38. R Govindarajan, S Rastogi et al. (2003), "Studies on the antioxidant activities of *Desmodium gangeticum*", *Biol Pharm Bull*, 26, pp. 1424-1427.
39. Raghavan Govindarajan, Henry Asare-Anane, Shanta Persaud, Peter Jones, Houghton, P.J. (2007), "Effect of *Desmodium gangeticum* extract on blood glucose in rats and on insulin secretion in vitro", *Planta Medica*, 73, pp. 427-432.
40. Rong-Ting Zhang, Gui-Guang Cheng, Tao Feng (2011), "Four new isoflavanones from *Tadehagi triquetrum*", *Nat Prod Bioprospect*, 1, pp. 121-123.
41. S Ghosal and PK Banerjee (1969), "Alkaloids of the roots of *Desmodium gangeticum*", *Aust.J. Chem*, 22, pp. 2029-2031.
42. Samuel Saito, Givaldo Silva, Regineide Xavier Santos. et al (2012), "Astragalin from *Cassia alata* Induces DNA Adducts in Vitro and Repairable DNA Damage in the Yeast *Saccharomyces cerevisiae*", *International Journal of Molecular Sciences*, 13, pp. 2846-2862.
43. Shurong Li, Qihua Li (2003), "Killing tests on Lymnaeidae of extracts from *Tadehagi triquetrum*", *Journal of Traditional Chinese Veterinary Medicine*, 1.

44. Singh N., Mishra P. K. et al. (2005), "Efficacy of *Desmodium gangeticum* extract and its fractions against experimental visceral leishmaniasis", *J Ethnopharmacol*, 98, pp. 83-88.
45. Singh Suman, Parmar Neha et al. (2015), "A review on Shalparni (*Desmodium gangeticum* DC.) and *Desmodium* species (*Desmodium triflorum* DC. & *Desmodium laxiflorum* DC.) – Ethnomedicinal perspectives", *Journal of Medicinal Plants Studies*, 3, pp. 38-43.
46. T. Shri Vijaya Kirubha, M. Jegadeesan, S. Kavimani (2011), "Studies on *Desmodium gangeticum*: A review", *J. Chem. Pharm. Res*, 3, pp. 850-855.
47. Vogel H. Gerhard (2008), "Drug discovery and evaluation Pharmacological assays Chapter H: analgesic, anti-inflammatory, anti- pyretic activity", *Springer*, pp. 669-774.
48. Wen XD, Lu MY, Tang RJ, Zheng XZ, Inoue K (2000), "Studies on the chemical constituents of *Triquetrous Tadehagi* (*Tadehagi triquetrum*) (II)", *Chinese Traditional and Herbal Drugs*, 31, pp. 3-5 (In Chinese).
49. Wu JN, Ma GX, Li HL, Wu CM. et al (2015), "Chemical constituents with antihyperlipidemic activities from *Desmodium triquetrum*", *Chinese Herbal Medicines*, 6, pp. 324-327.
50. Wu Zhengyi, Raven Peter H. et al., (1994), *Flora of China*, Science Press ;Missouri Botanical Garden Press, Beijing St. Louis,
51. Xiang W, Li RT et al. (2005), "Four new prenylated isoflavonoids in *Tadehagi triquetrum*", *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53, pp. 267-271.
52. Yang J. S., Su Y. L. et al. (1993), "Studies on the chemical constituents of *Desmodium styracifolium* (Osbeck) Merr", *Yao Xue Xue Bao*, 28, pp. 197-201.
53. Yao Wu, Qiang Lou and Cuiling Sun (2012), "Chemical constituents contained in *Desmodium caudatum*", *China journal of Chinese materia medica*, 37, pp. 1788-1792
54. Yuying Lin, Lingyi Kong (1993), "Studies on the Chemical Constituents of *Desmodium styracifolium* (Osbeck) Merr.", *Asian Journal of Traditional Medicines*, 1.

55. Zhu D , Wang D , Wang GH, (2014), "Chemical constituents in higher polar substances from *Desmodium caudatum*", *China journal of Chinese materia medica*, 39, pp. 3112-3116.
56. Chadburn H. The IUCN Red List of Threatened Species, Version 2017-1. <http://www.iucnredlist.org/search>
57. Annie Shirwaikar, Shilpa Jahagirdar, Udupa, A.L. (2003), "Wound Healing Activity Of *Desmodium Triquetrum* Leaves", *Indian J Pharm Sci*, 65 (5), pp. 461-464.
58. Chit;, K., Myint;, W., Khin, K.T.W.W.M.M.M.M.A.T.M. (2001), "Cyclic AMP Phosphodiesterase Inhibitory Activity and Chemical Screening of Four Medicinal Plants", *Pharm Biol*, 39, pp. 181-183.
59. Kalyani, G.A., Ashok, P., Taranalli, A.D., Ramesh, C.K., Krishna, V., Swamy, A.H. (2011), "Anti-inflammatory and in vitro antioxidant activity of *Desmodium triquetrum* (L.)", *Indian J Pharmacol*, 43, pp. 740-741.
60. Kalyani, G.A., Ramesh, C.K., Krishna, V. (2011), "Hepatoprotective and Antioxidant Activities of *Desmodium Triquetrum* DC", *Indian J Pharm Sci*, 73, pp. 463-466.

PHỤ LỤC

PHỤ LỤC I: Giấy giám định tên khoa học của cây Mũi mác

CỘNG HOÀ XÃ HỘI CHỦ NGHĨA VIỆT NAM
Độc lập – Tự do – Hạnh phúc

KẾT QUẢ XÁC ĐỊNH TÊN KHOA HỌC

Kính gửi: Nông Thị Anh Thư

Phòng Sinh học nhận được đề nghị xác định tên khoa học cho mẫu tiêu bản của bà Nông Thị Anh Thư, Đại học Thái Nguyên vào ngày 18 tháng 10 năm 2011. Phòng Sinh học đã tiến hành xác định tên khoa học của mẫu này

Thành viên tham gia xác định: TS. Nguyễn Quốc Bình



Các thông tin về mẫu: Mẫu vật ở dạng tiêu bản khô, số hiệu AT 01 (1 tiêu bản) thu ngày 10/10/2011, tại Bắc Kạn, đủ tiêu chuẩn để định loại, cả cây bao gồm thân, lá và cơ quan sinh sản (cụm hoa và hoa).

Mẫu tiêu bản do Nông Thị Anh Thư, trường Đại học Thái Nguyên thu thập.

Kết quả xác định tên khoa học: Sau khi phân tích các bộ phận sinh sản (là những bộ phận không thay đổi theo các điều kiện sinh thái) chúng tôi đã xác định mẫu trên có tên khoa học là: *Desmodium triquetrum* (L.) DC., thuộc họ Đậu (Fabaceae) với tên Việt Nam là Tràng quả ba cạnh.

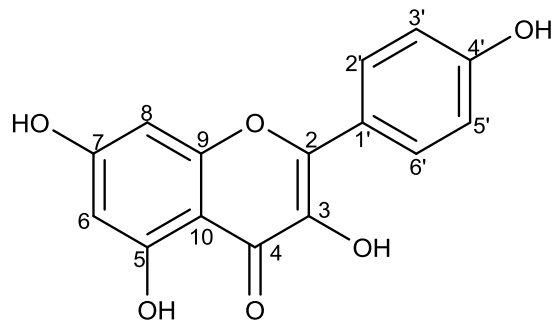
Phòng Sinh học xin gửi tới bà Nông Thị Anh Thư kết quả xác định trên.

Hà Nội, ngày 25 tháng 10 năm 2011

<p>Xác nhận của Bảo tàng thiên nhiên Việt Nam</p>  <p style="text-align: center;">Lưu Đàm Cư</p>	<p>Người xác định</p>  <p>TS. Nguyễn Quốc Bình</p>
--	---

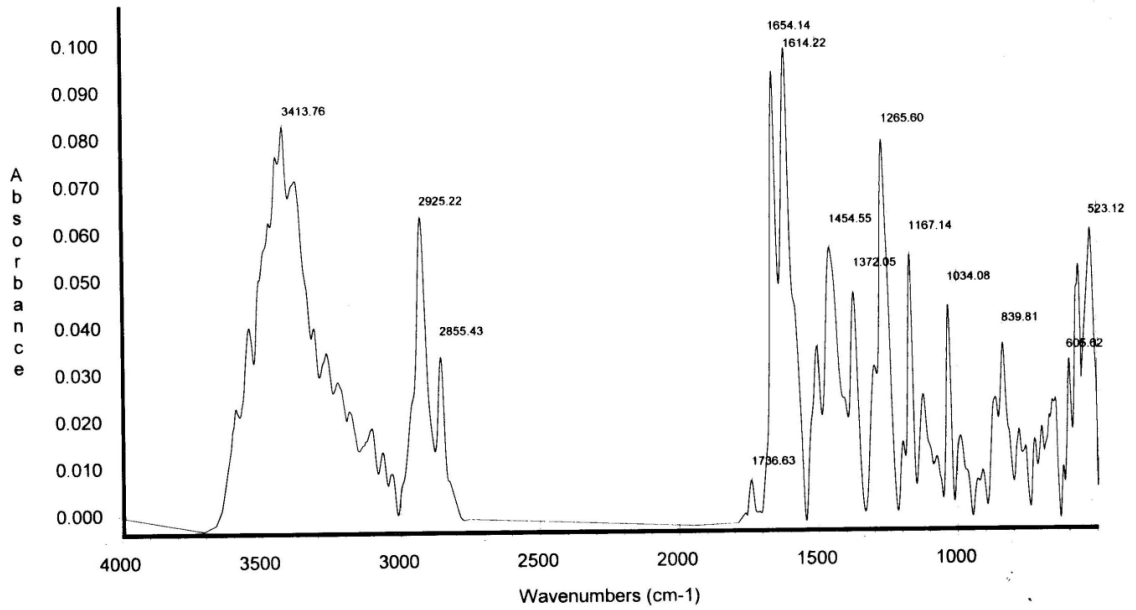
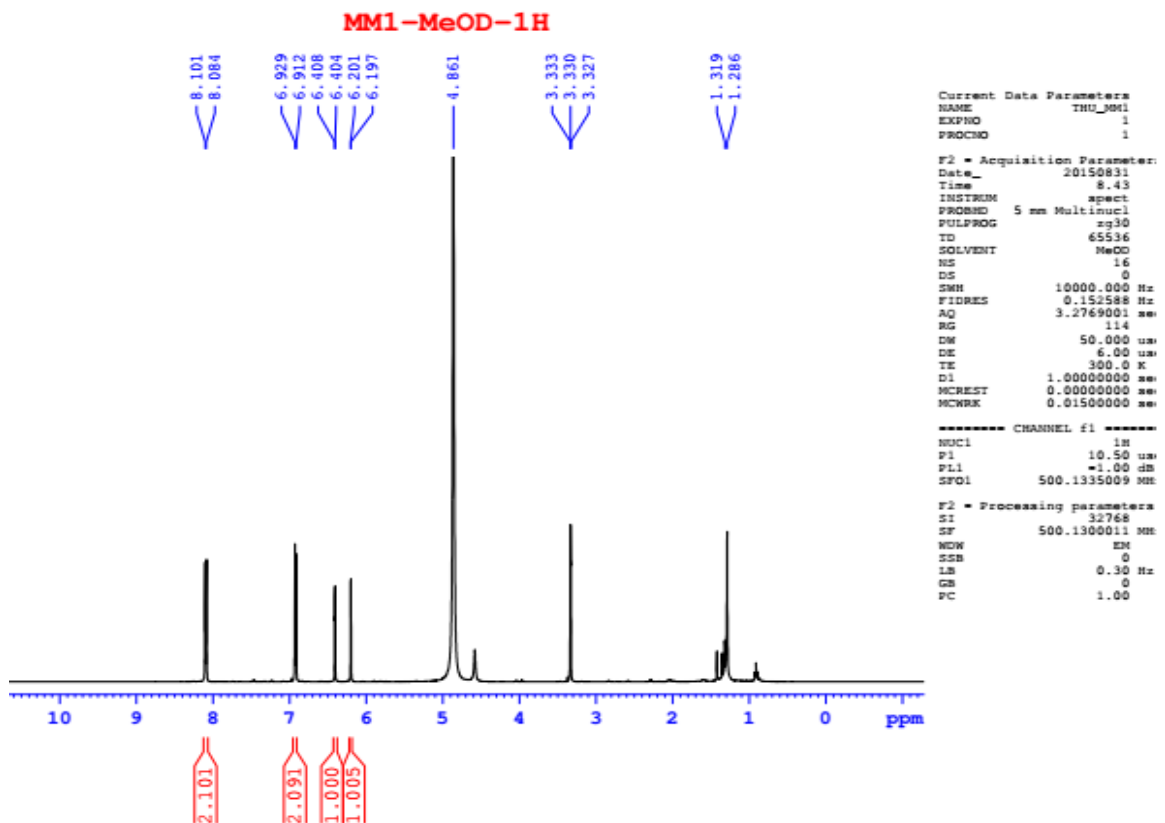
PHỤ LỤC II. PHỤ LỤC PHỔ CỦA CÁC CHẤT PHÂN LẬP ĐƯỢC

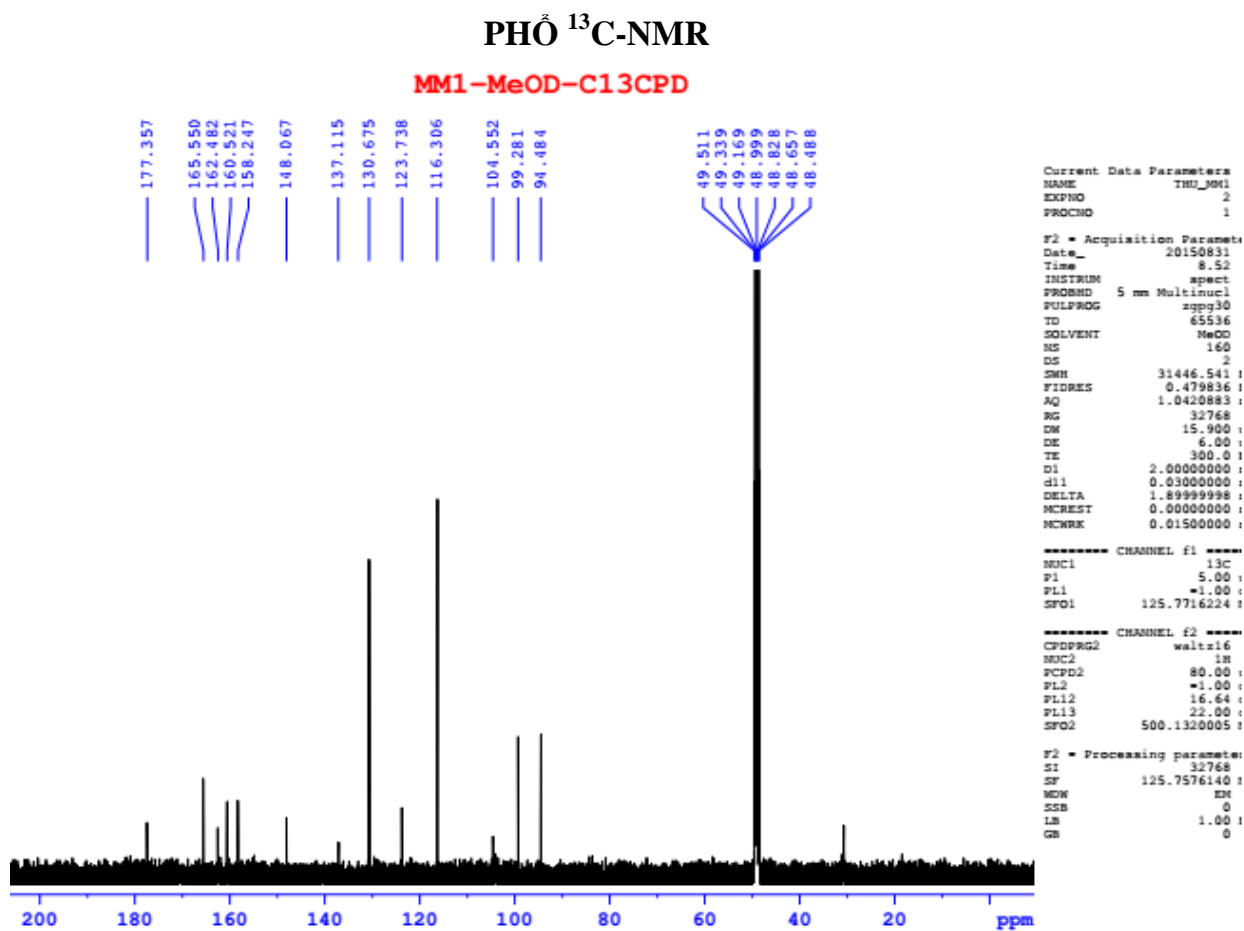
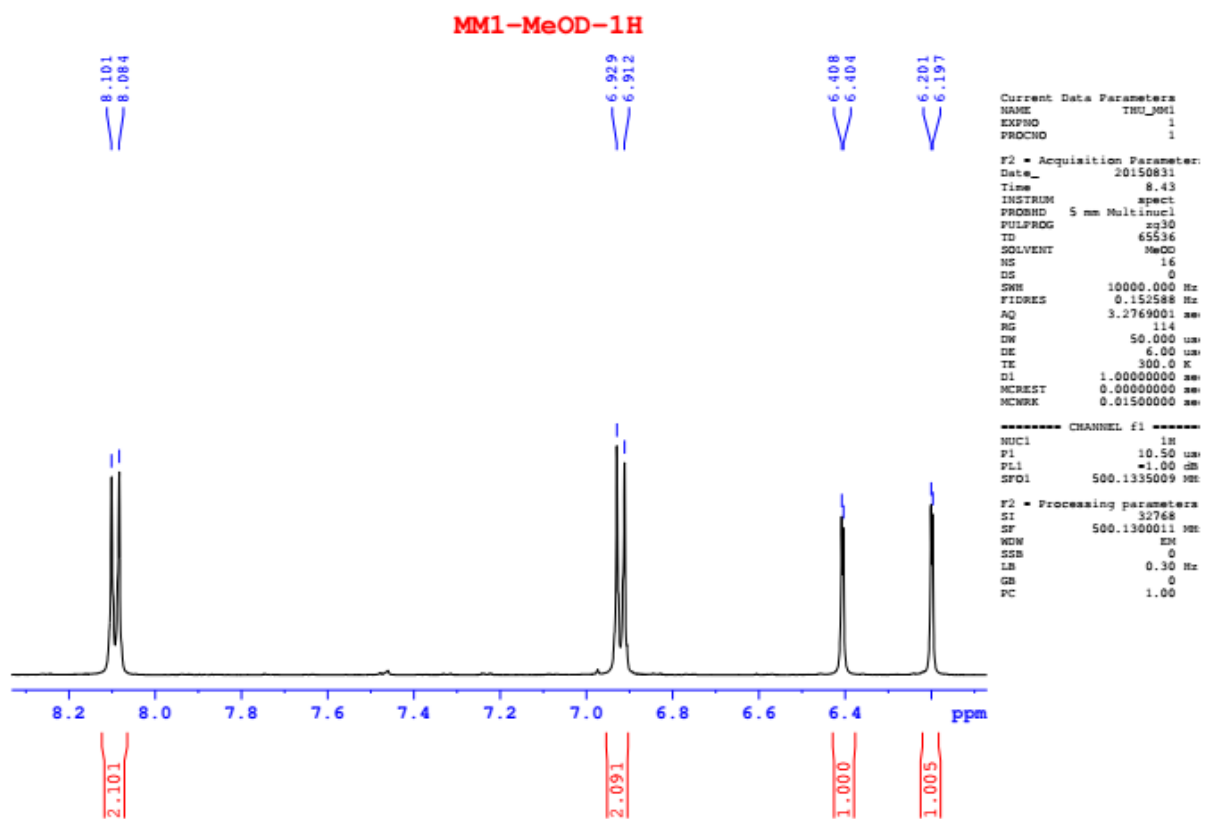
PHỤ LỤC 1. CÁC PHỔ CỦA CHẤT MM1

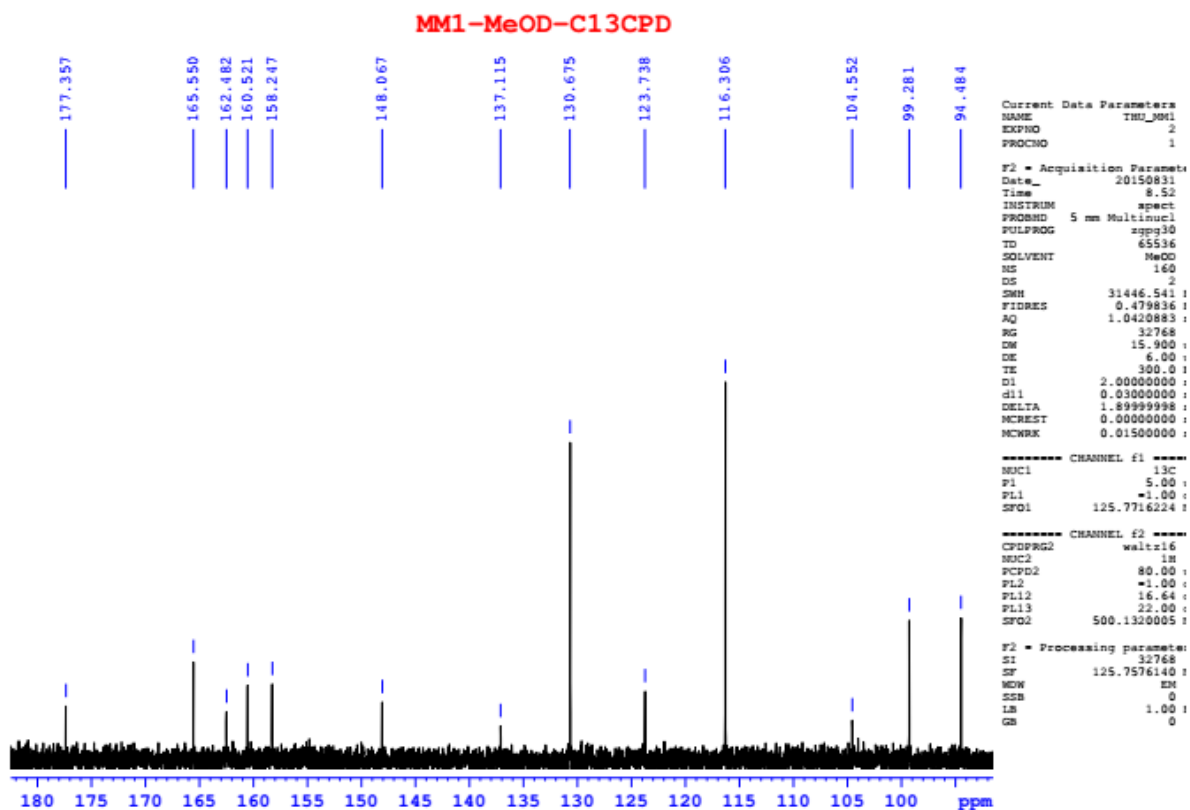


Công thức cấu tạo của chất **MM1** (kaempferol)

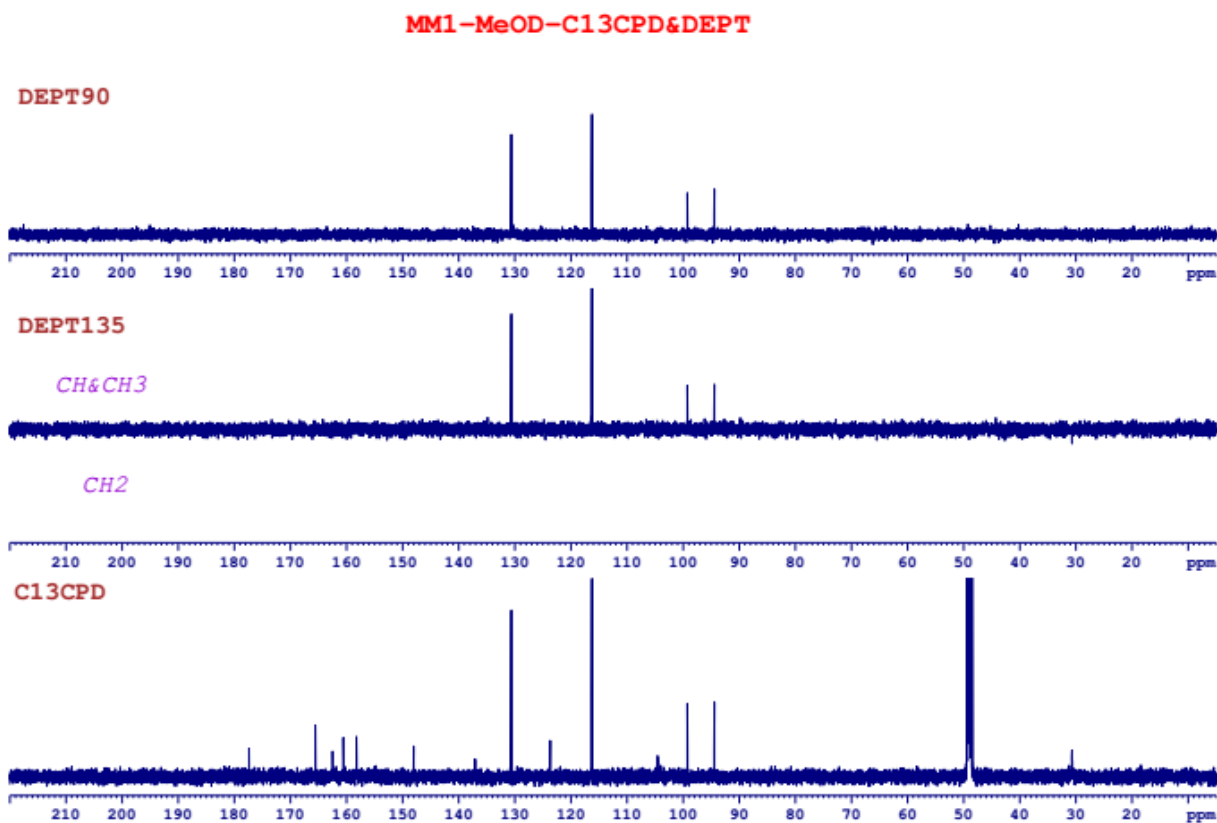
PHỔ IR

PHỔ ¹H-NMR

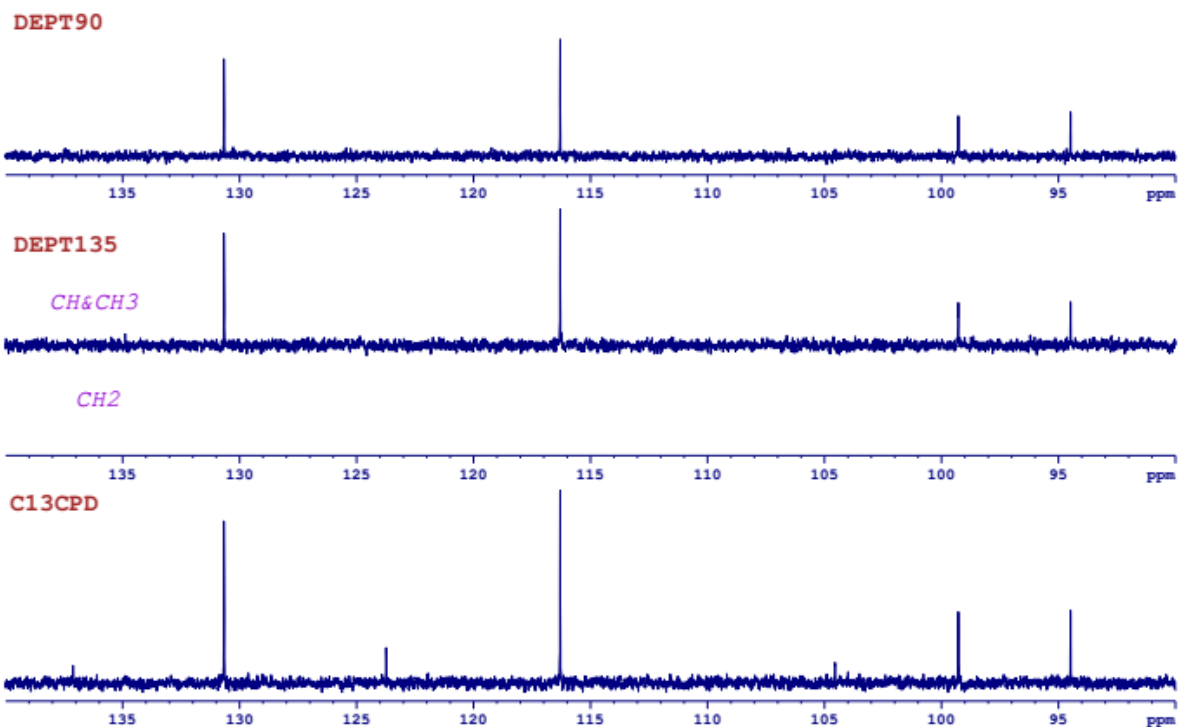




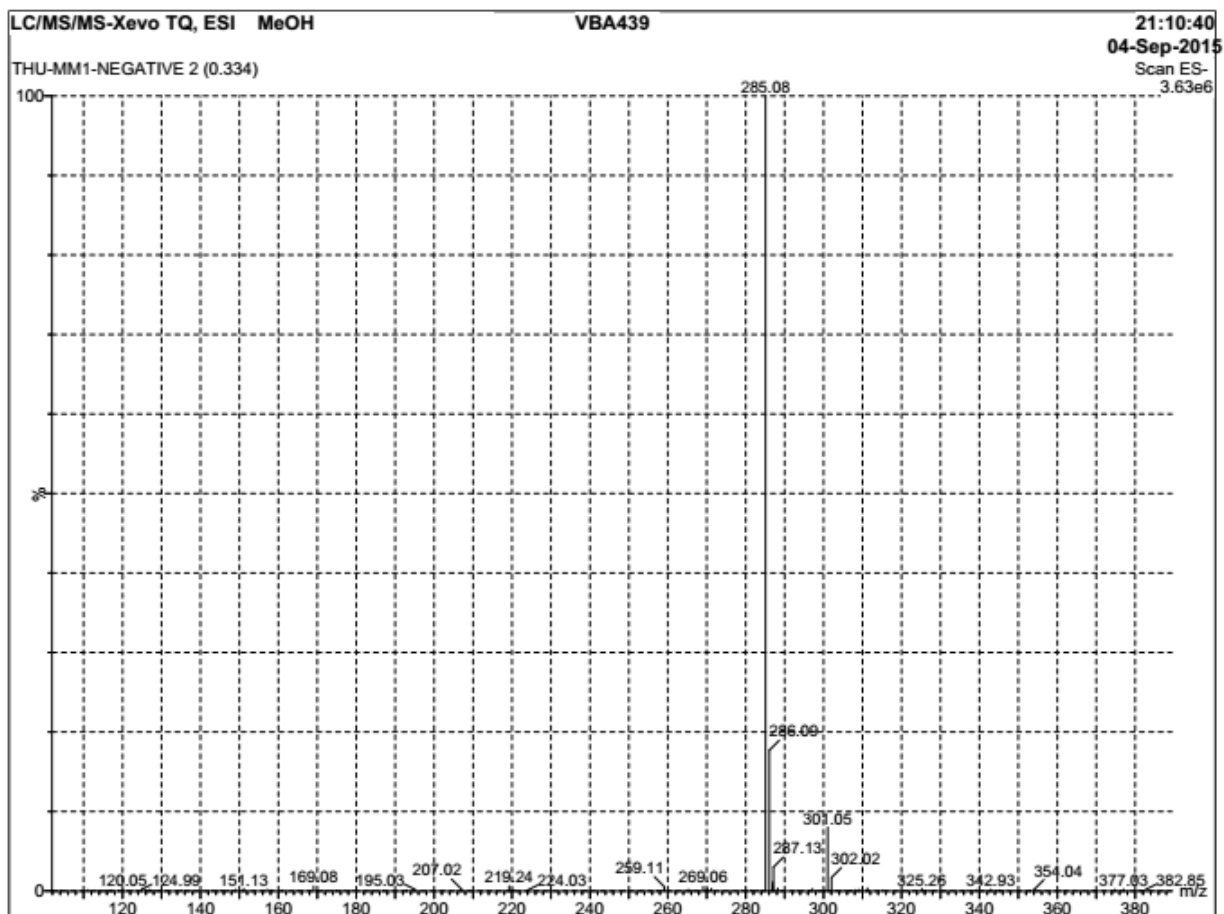
PHO DEPT



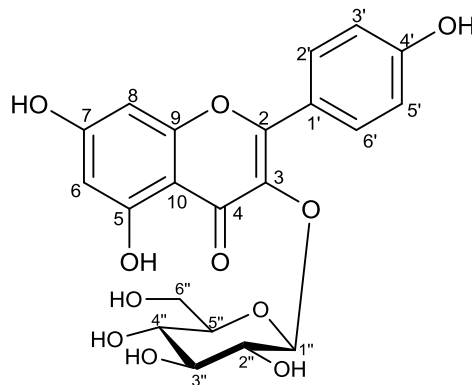
MM1-MeOD-C13CPD&DEPT



PHO MS

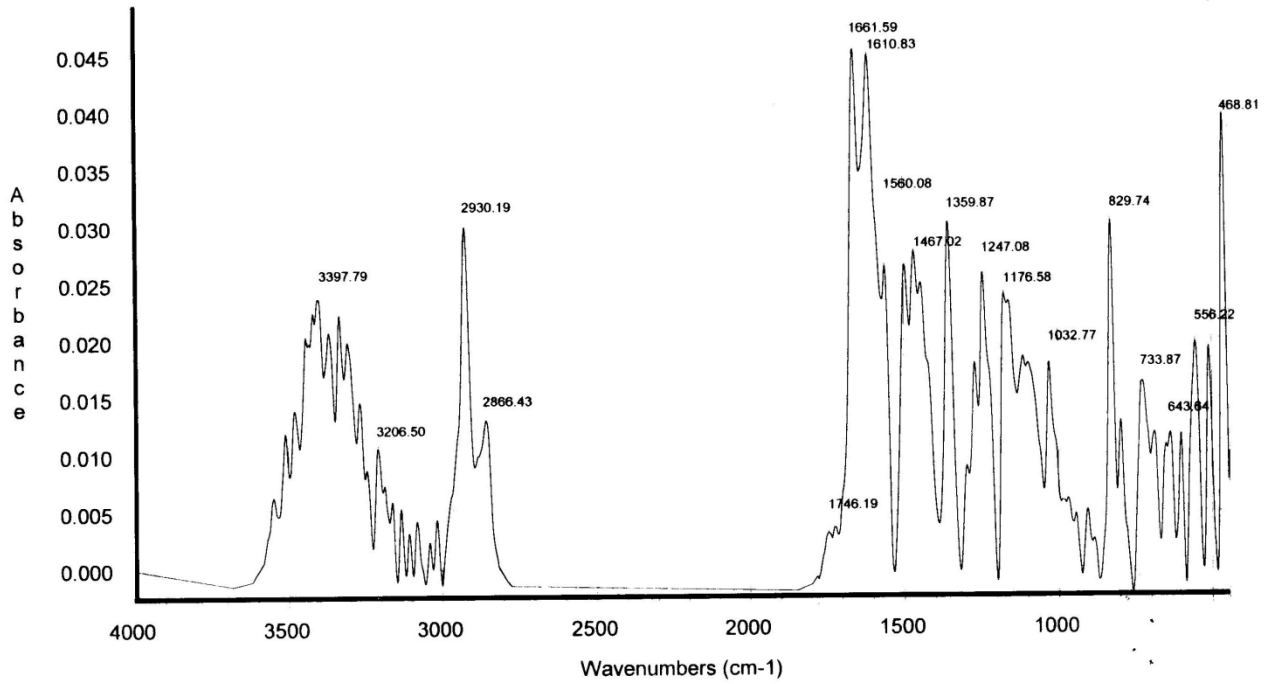


PHỤ LỤC 2. CÁC PHỖ CỦA CHẤT MM2

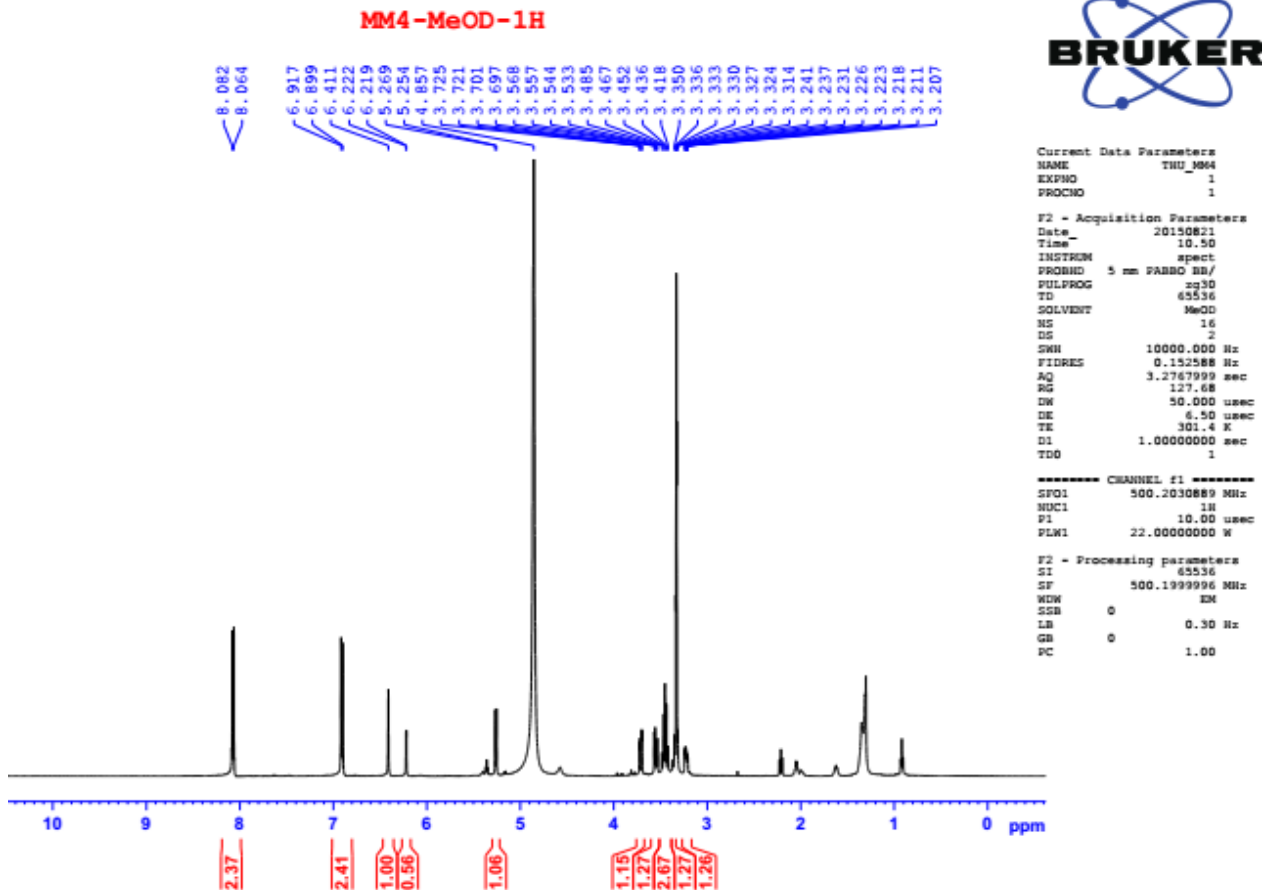


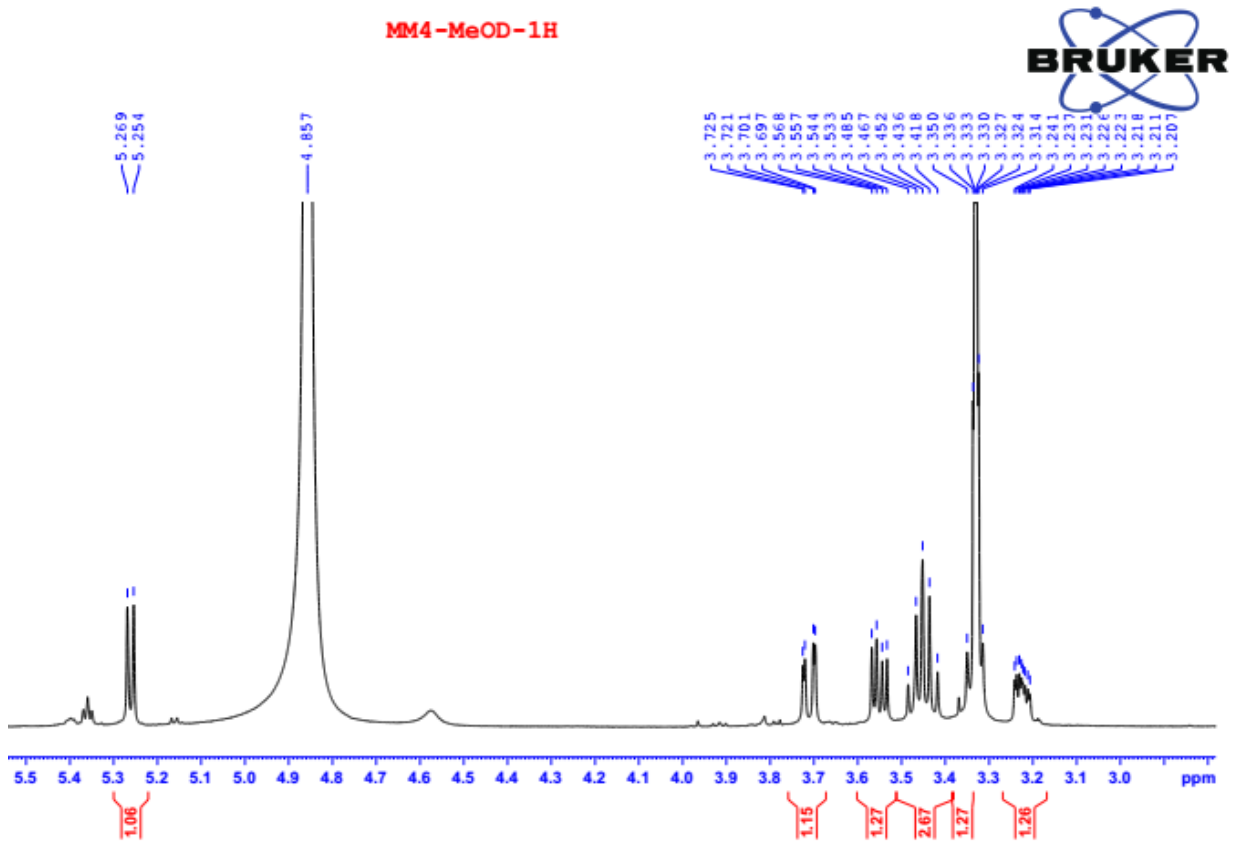
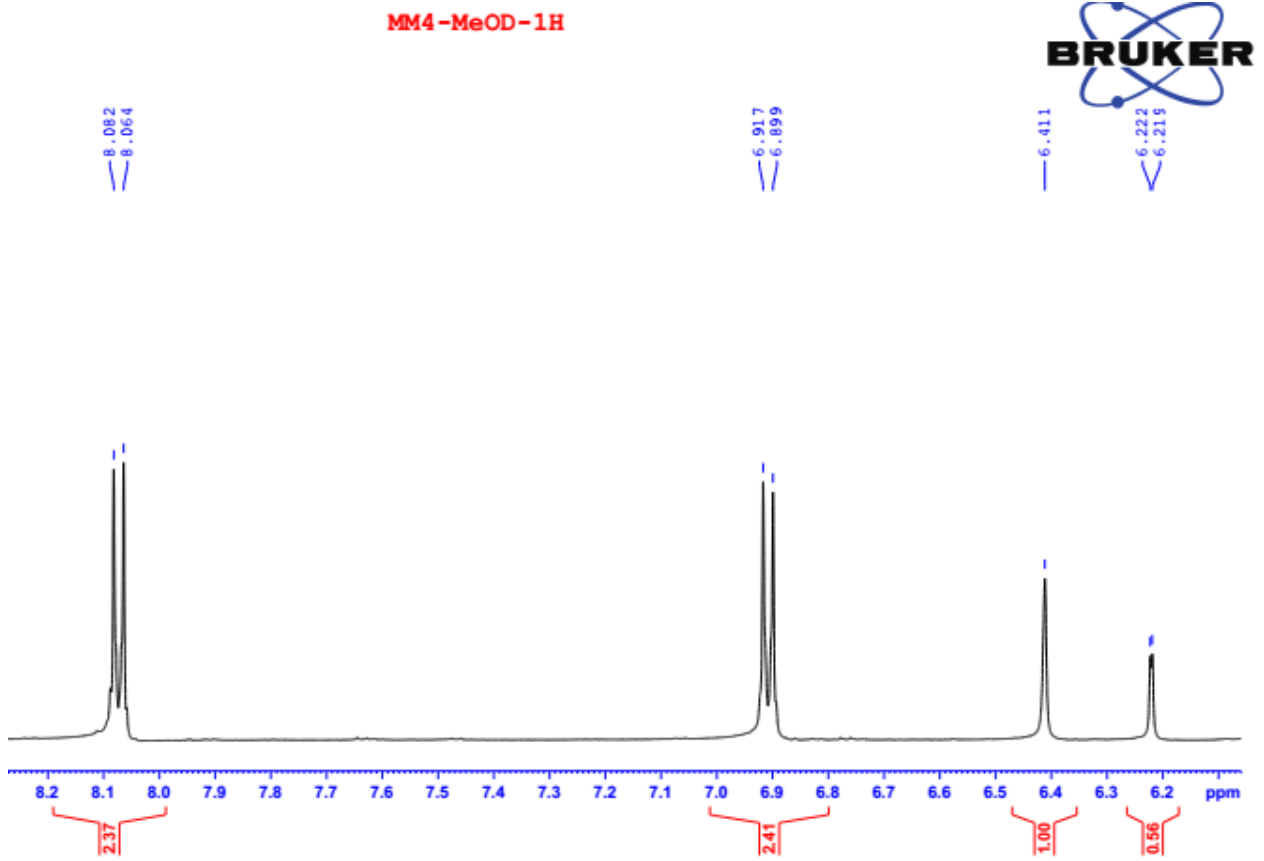
Công thức cấu tạo của chất **MM2** (astragalin)

PHỔ IR



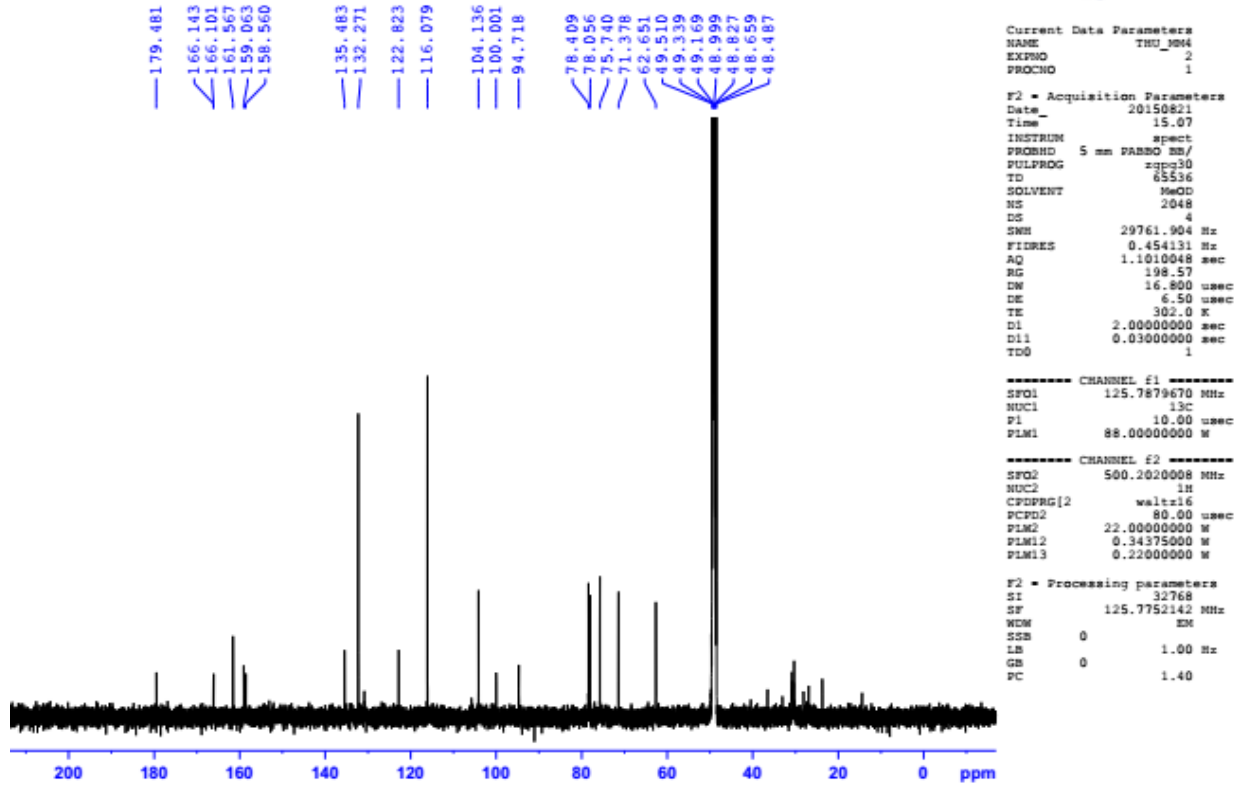
PHỔ ¹H-NMR



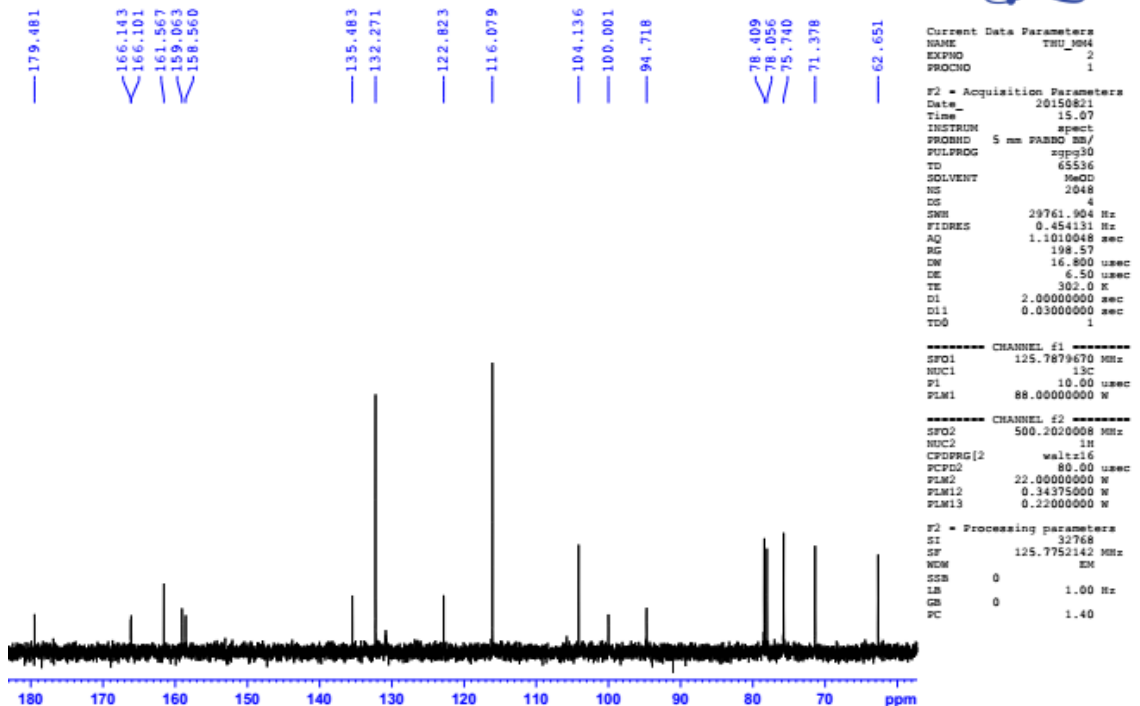


PHO ¹³C-NMR

MM4-MeOD-C13CPD

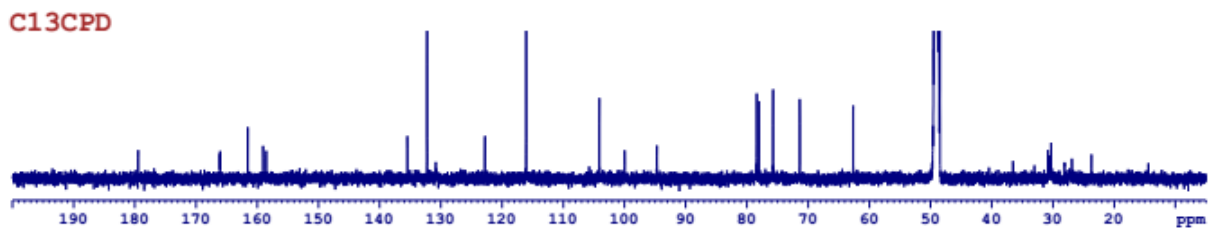
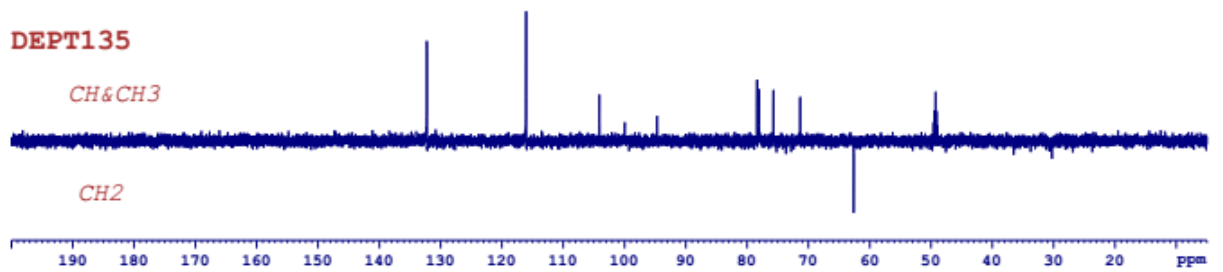
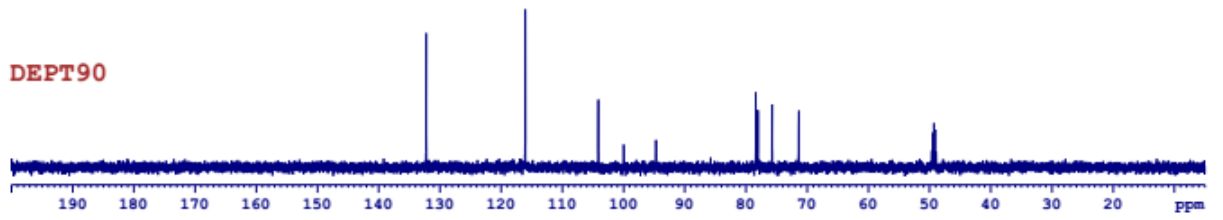


MM4-MeOD-C13CPD

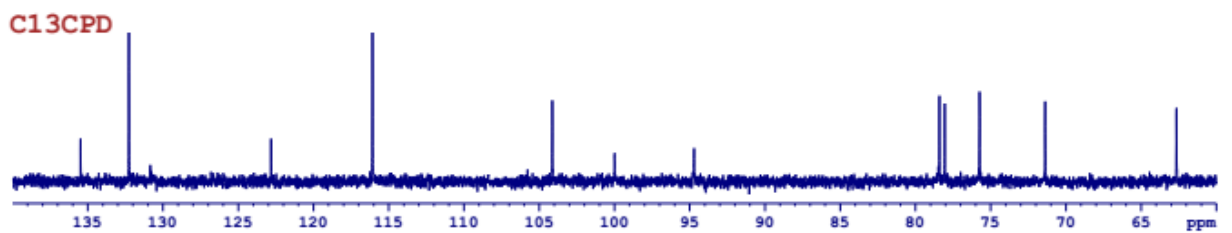
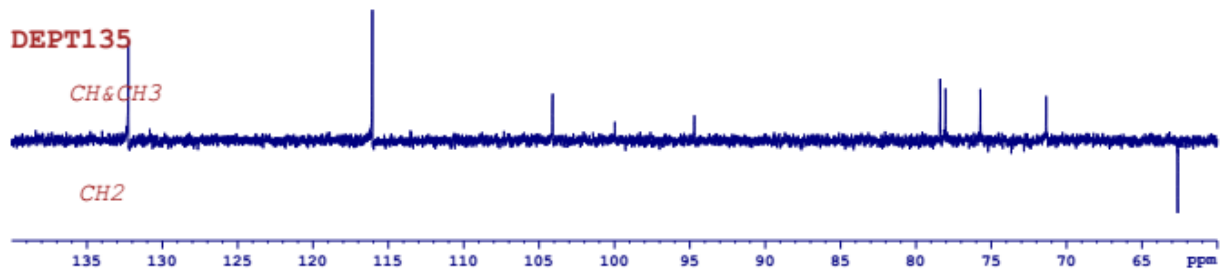
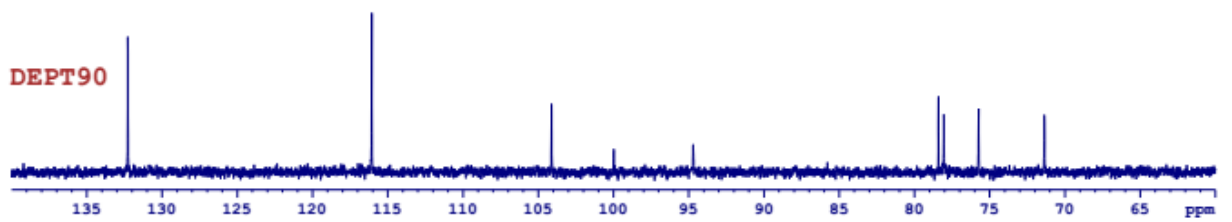


PHỔ DEPT

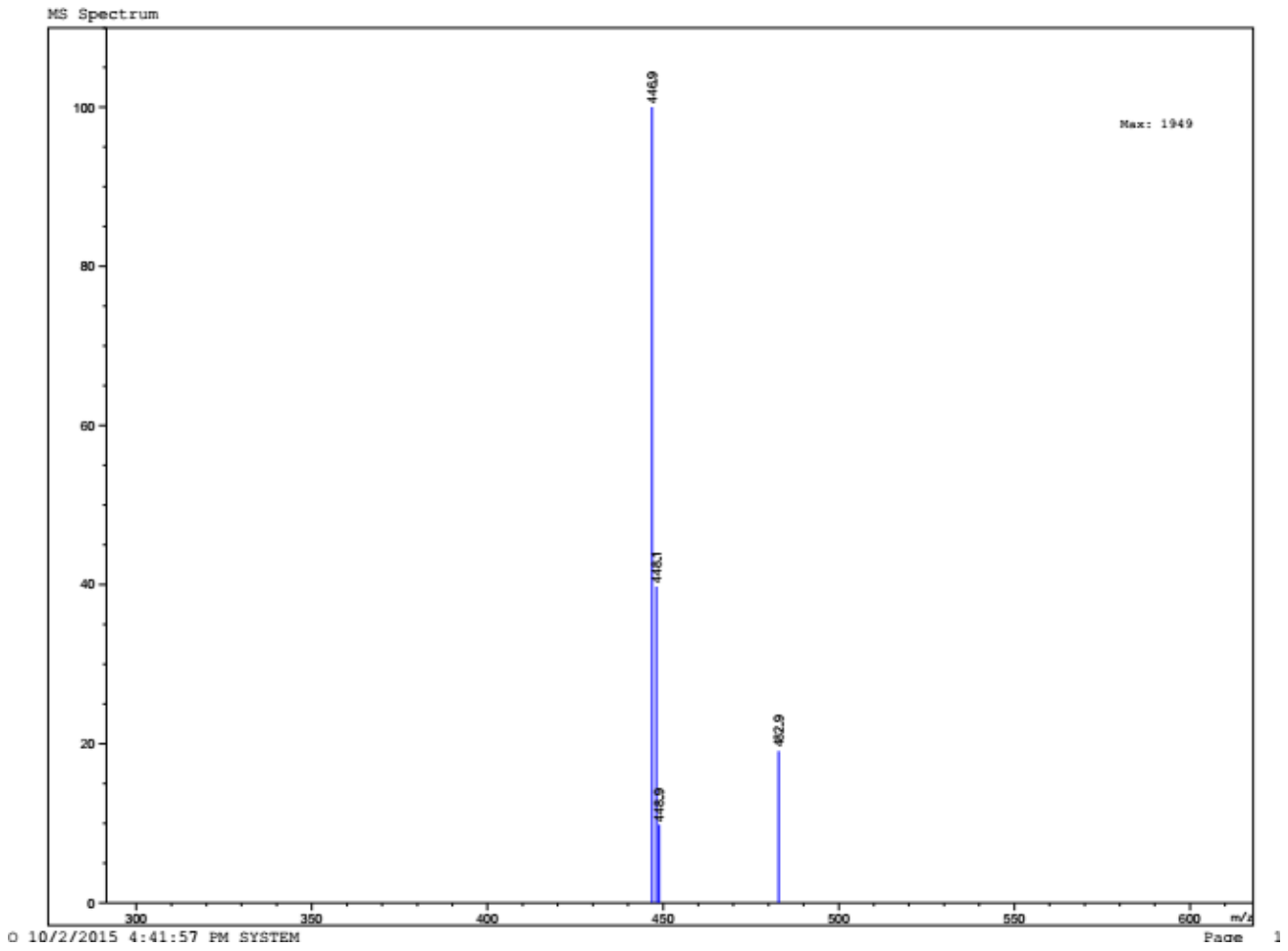
MM4-MeOD-C13CPD &DEPT



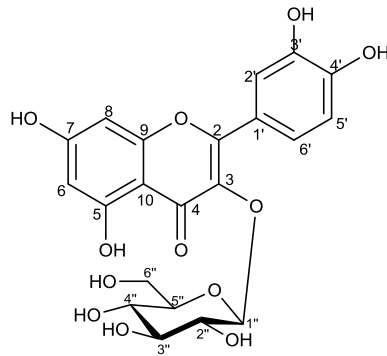
MM4-MeOD-C13CPD &DEPT



PHỔ MS

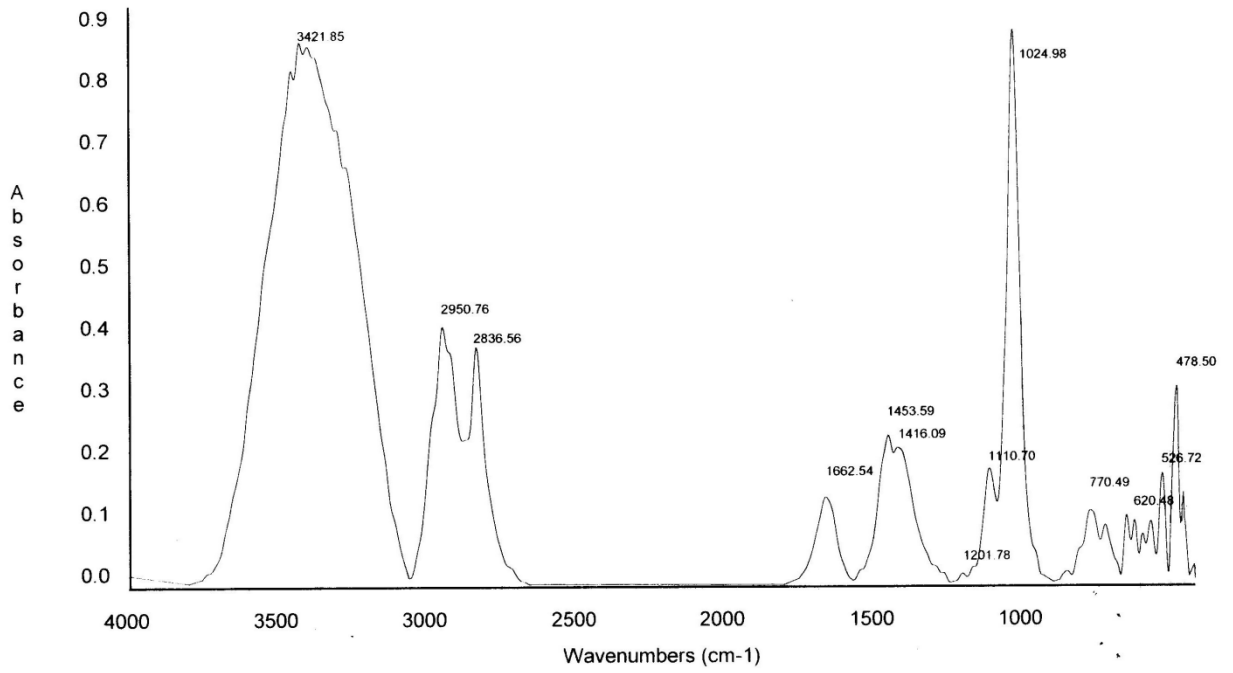


PHỤ LỤC 3. CÁC PHỖ CỦA CHẤT MM3



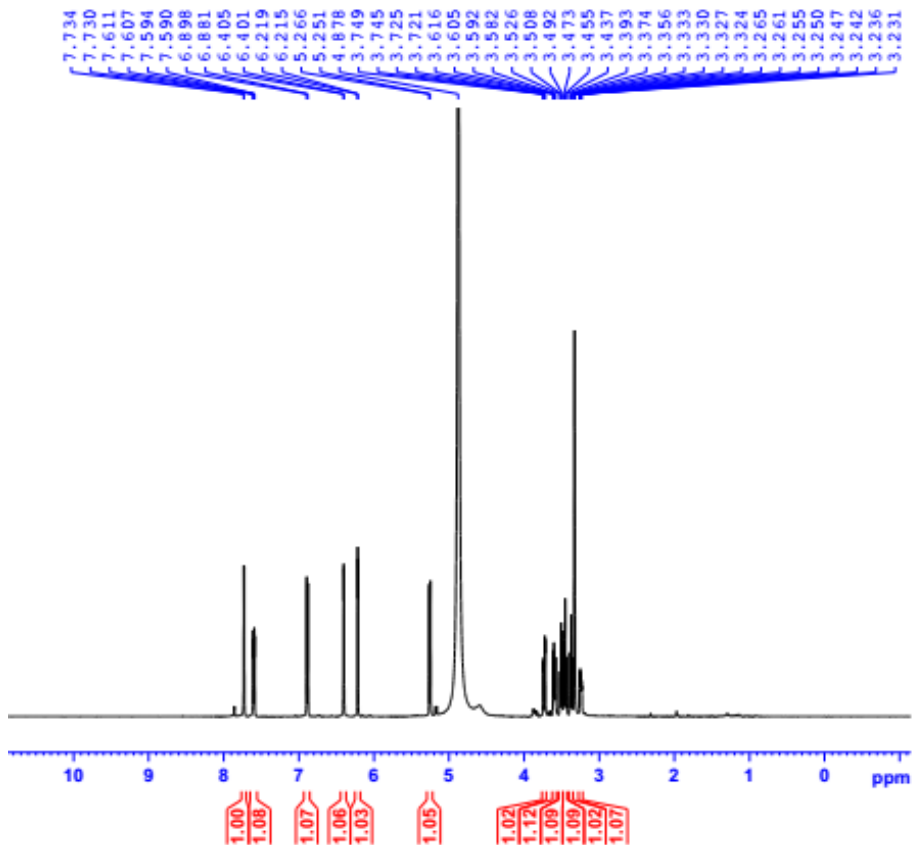
Công thức cấu tạo của chất **MM3** (isoquercitrin)

PHỔ IR



PHỔ ¹H-NMR

MM7-MeOD-1H

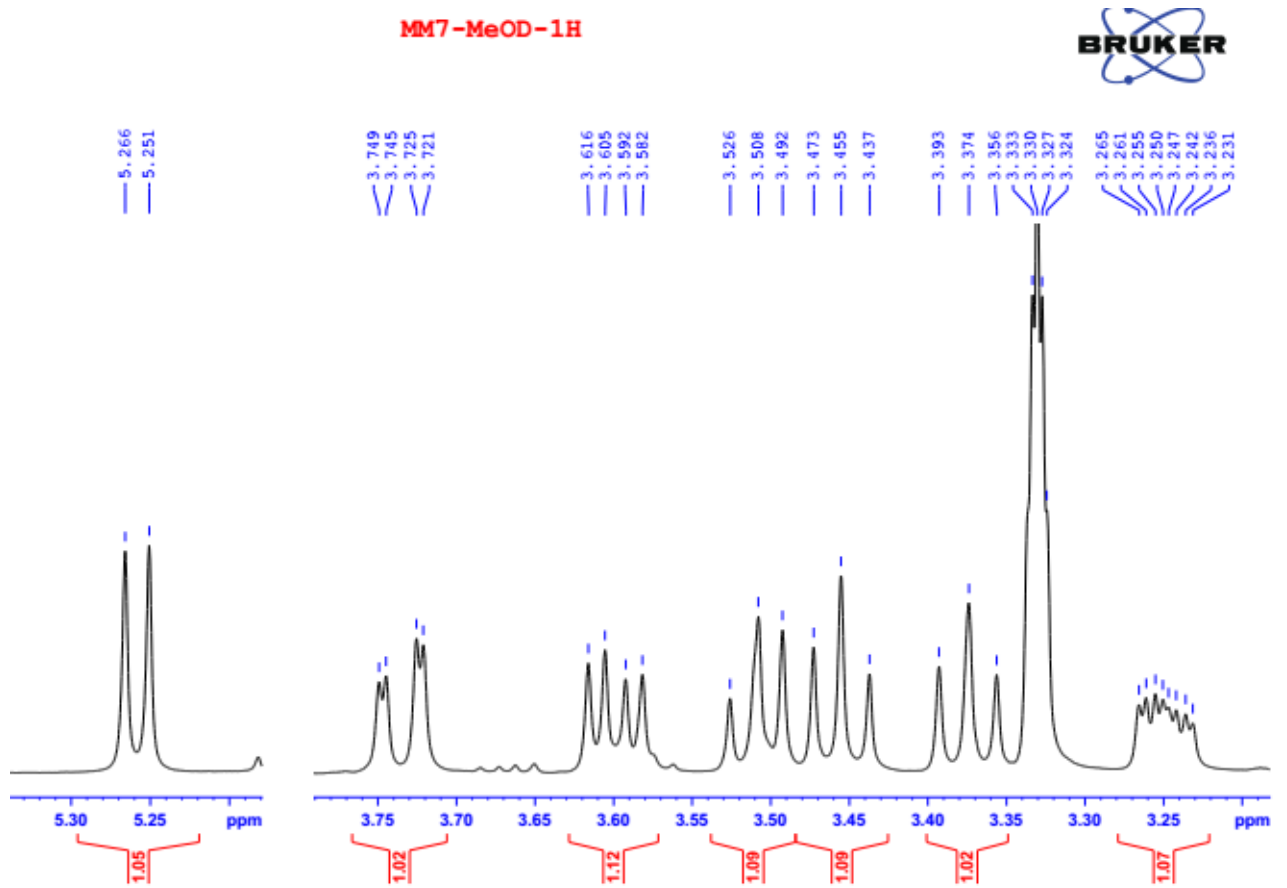
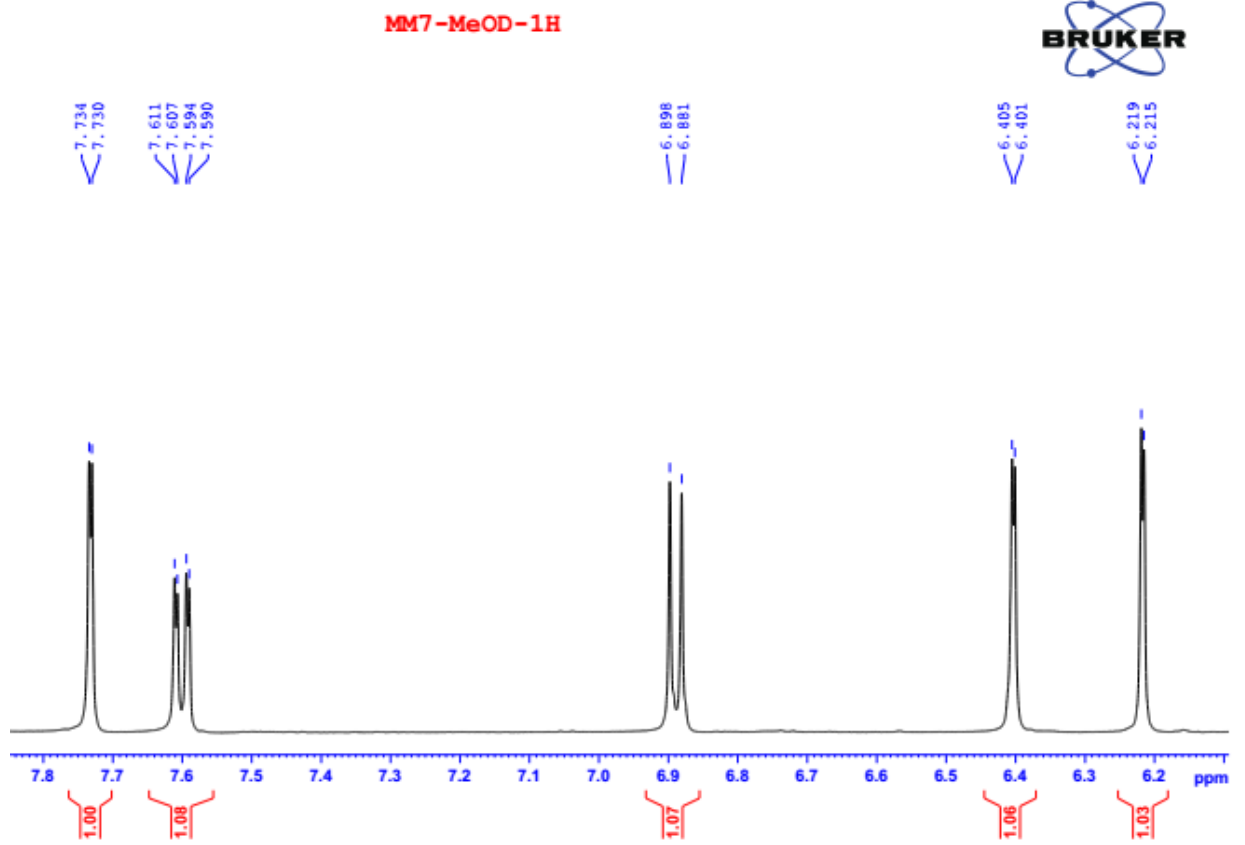


Current Data Parameters
 NAME THU_MM7
 EXPNO 1
 PROCNO 1

F2 - Acquisition Parameters
 Date_ 20151001
 Time 10.31
 INSTRUM spect
 PROBNM 5 mm PABBO BB/
 PULPROG zg30
 TD 65536
 SOLVENT MeOD
 NS 16
 DS 2
 SMH 10000.000 Hz
 FIDRES 0.152588 Hz
 AQ 3.2767999 sec
 RG 97.76
 DW 50.000 usec
 DE 6.50 usec
 TE 300.7 K
 D1 1.00000000 sec
 TD0 1

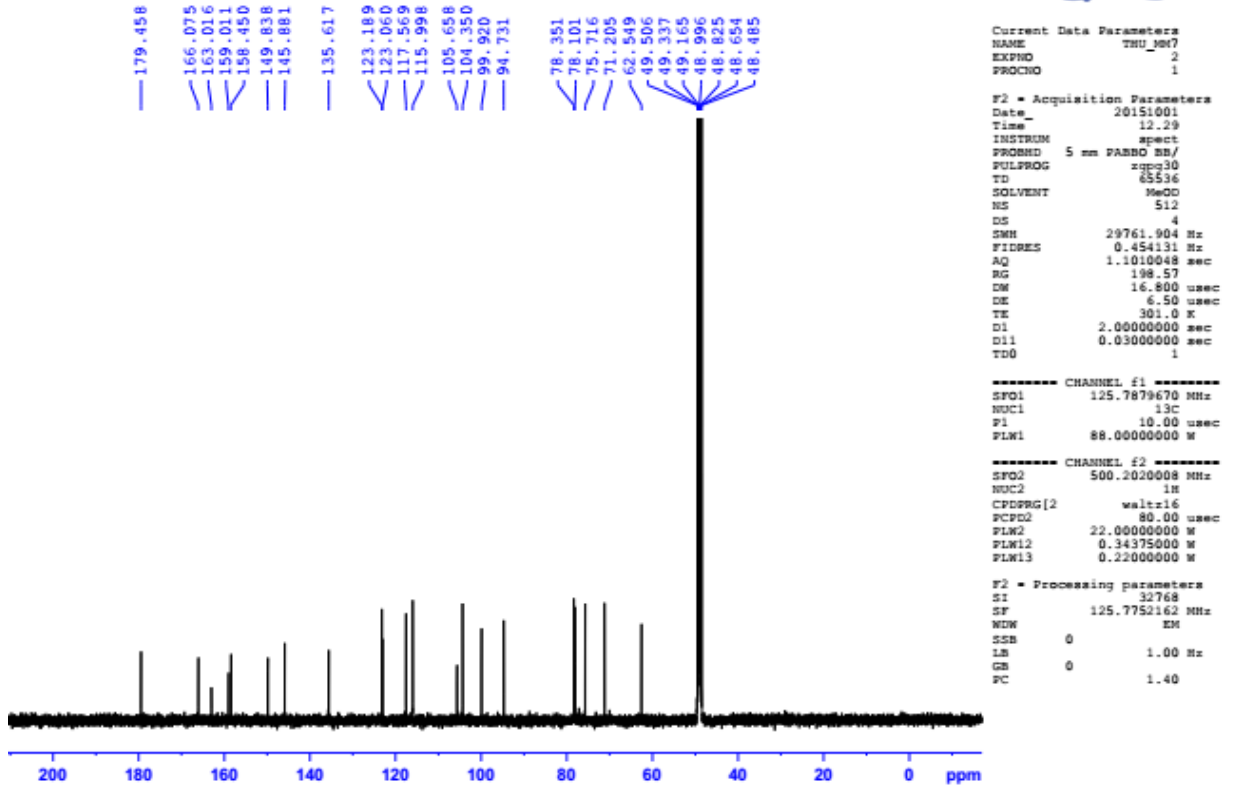
----- CHANNEL f1 -----
 SFO1 500.2030889 MHz
 NUC1 1H
 P1 10.00 usec
 PLW1 22.00000000 W

F2 - Processing parameters
 SI 65536
 SF 500.1999995 MHz
 NDM EM
 SSB 0
 LB 0.30 Hz
 GB 0
 PC 1.00

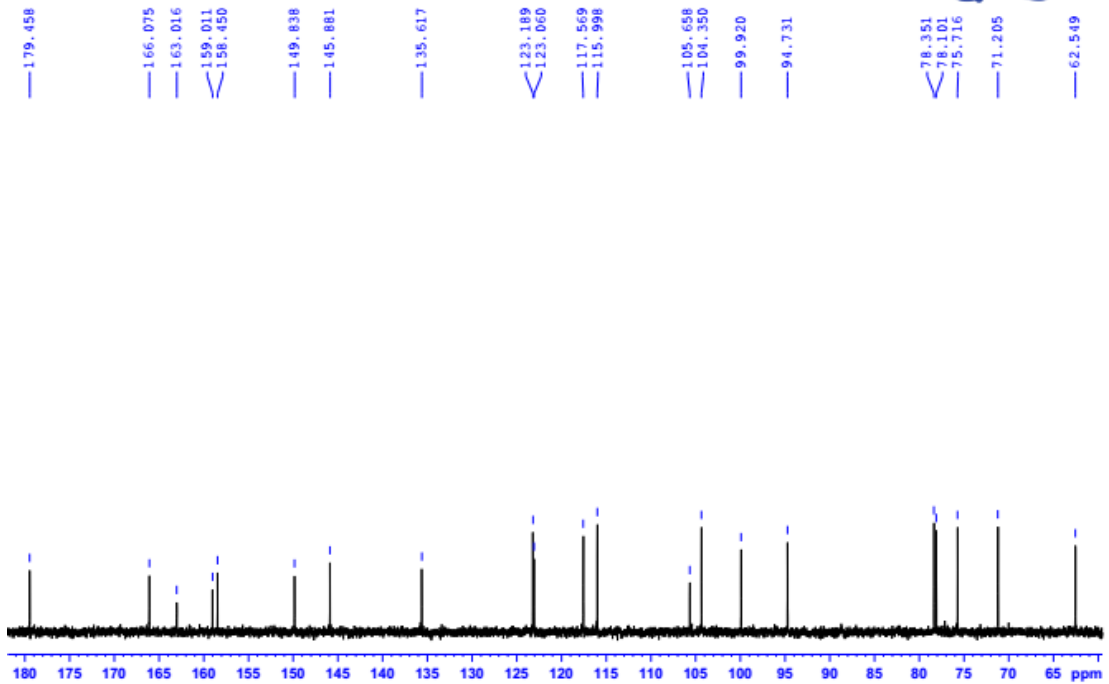


PHO ¹³C-NMR

MM7-MeOD-C13CPD



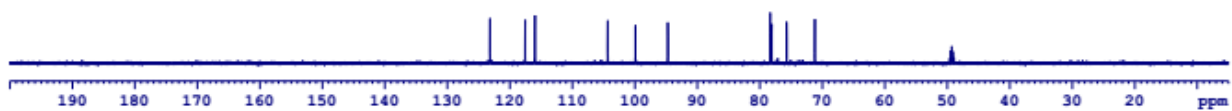
MM7-MeOD-C13CPD



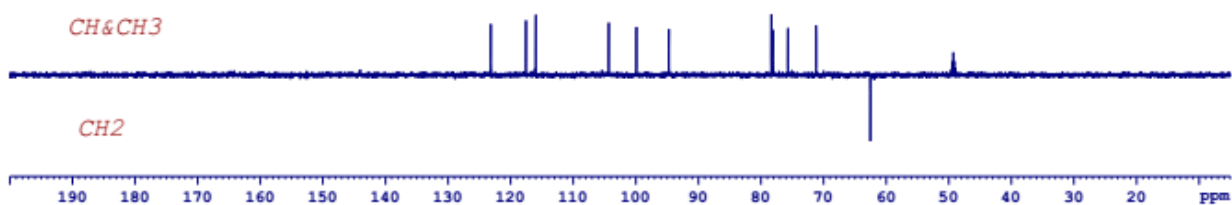
PHỔ DEPT

MM7-MeOD-C13CPD&DEPT

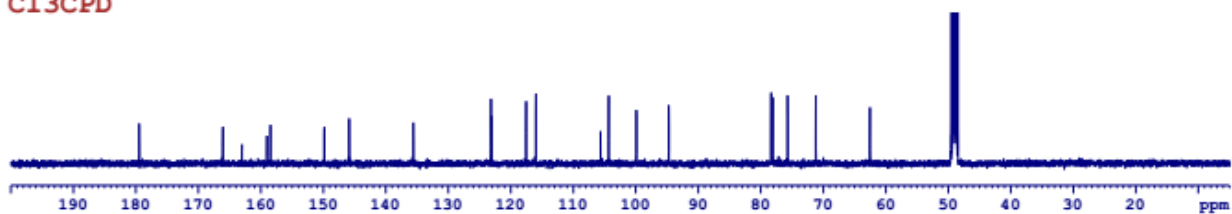
DEPT90



DEPT135

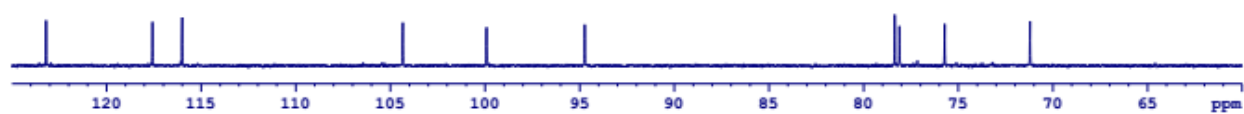


C13CPD

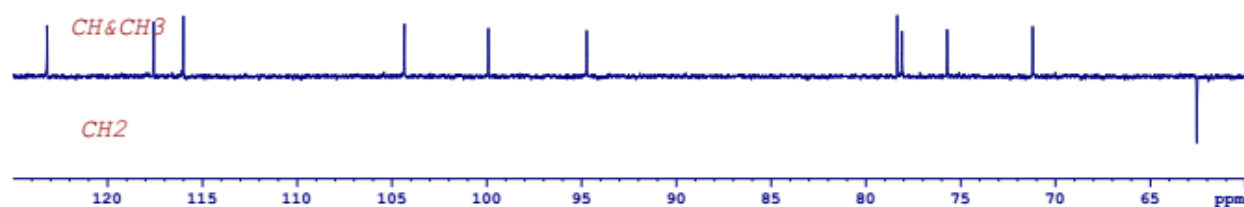


MM7-MeOD-C13CPD&DEPT

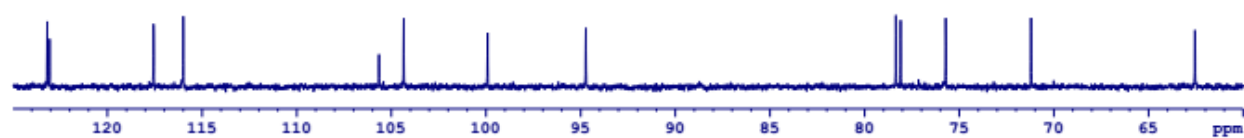
DEPT90



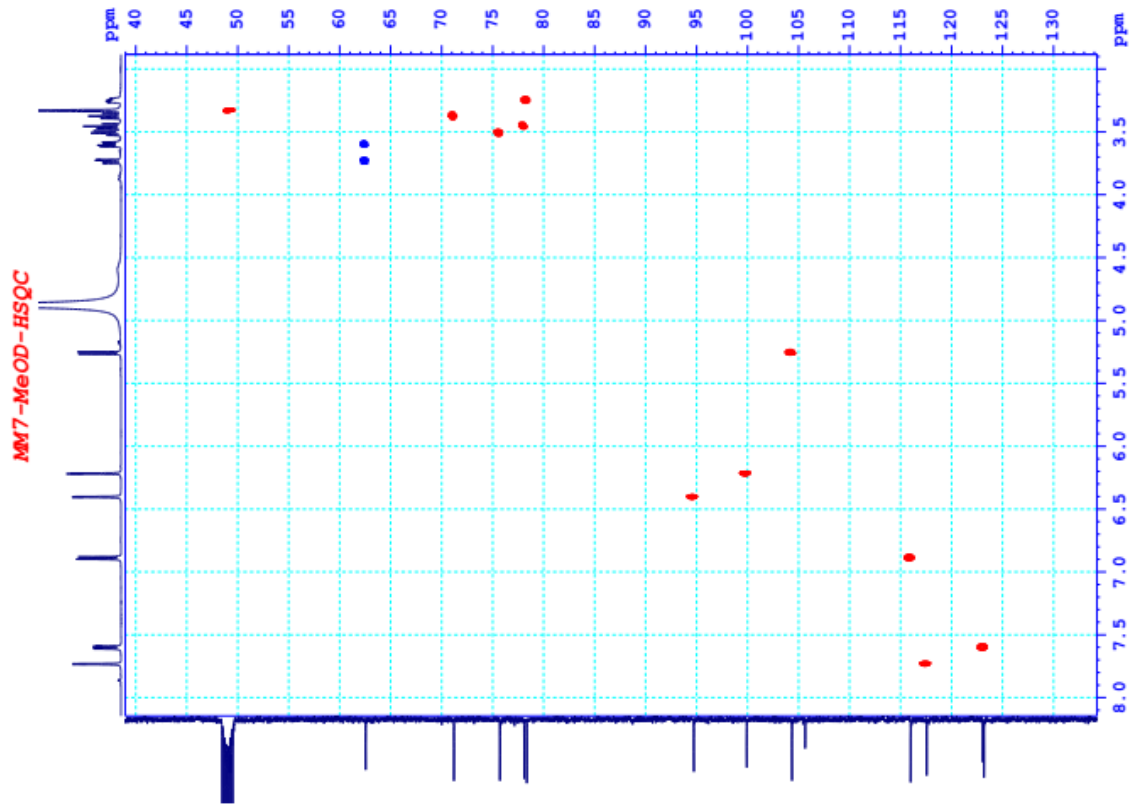
DEPT135



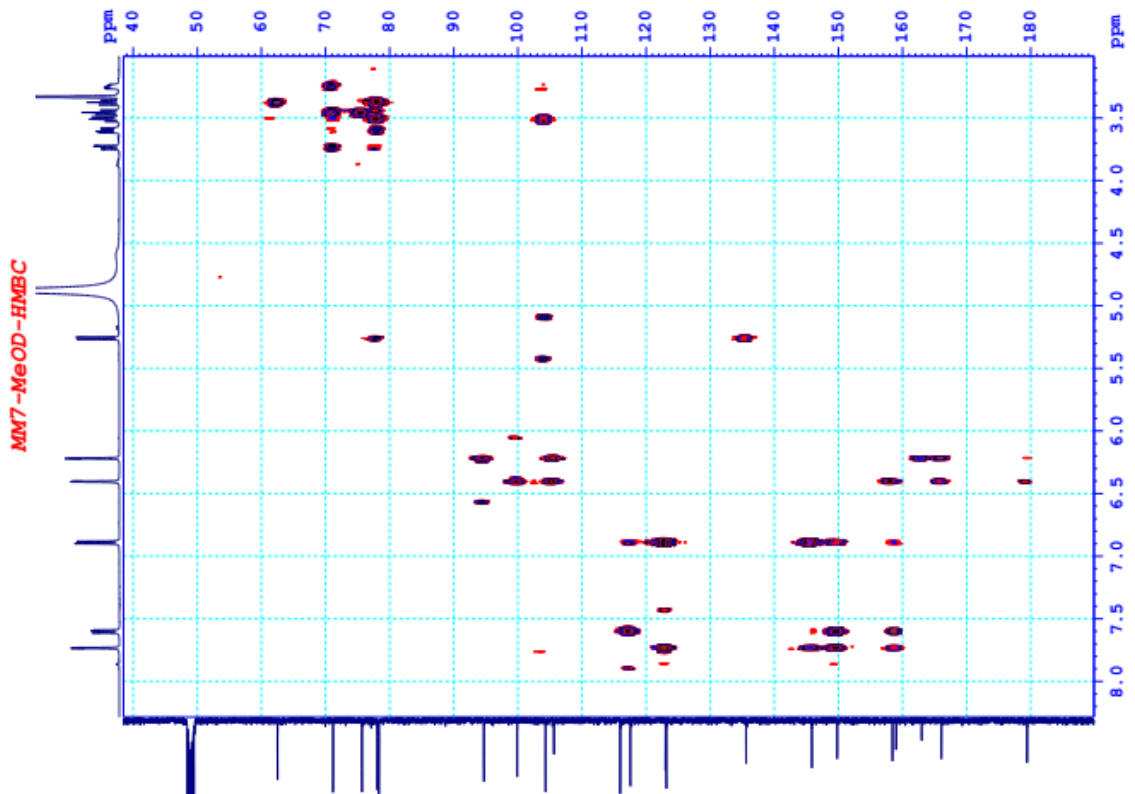
C13CPD



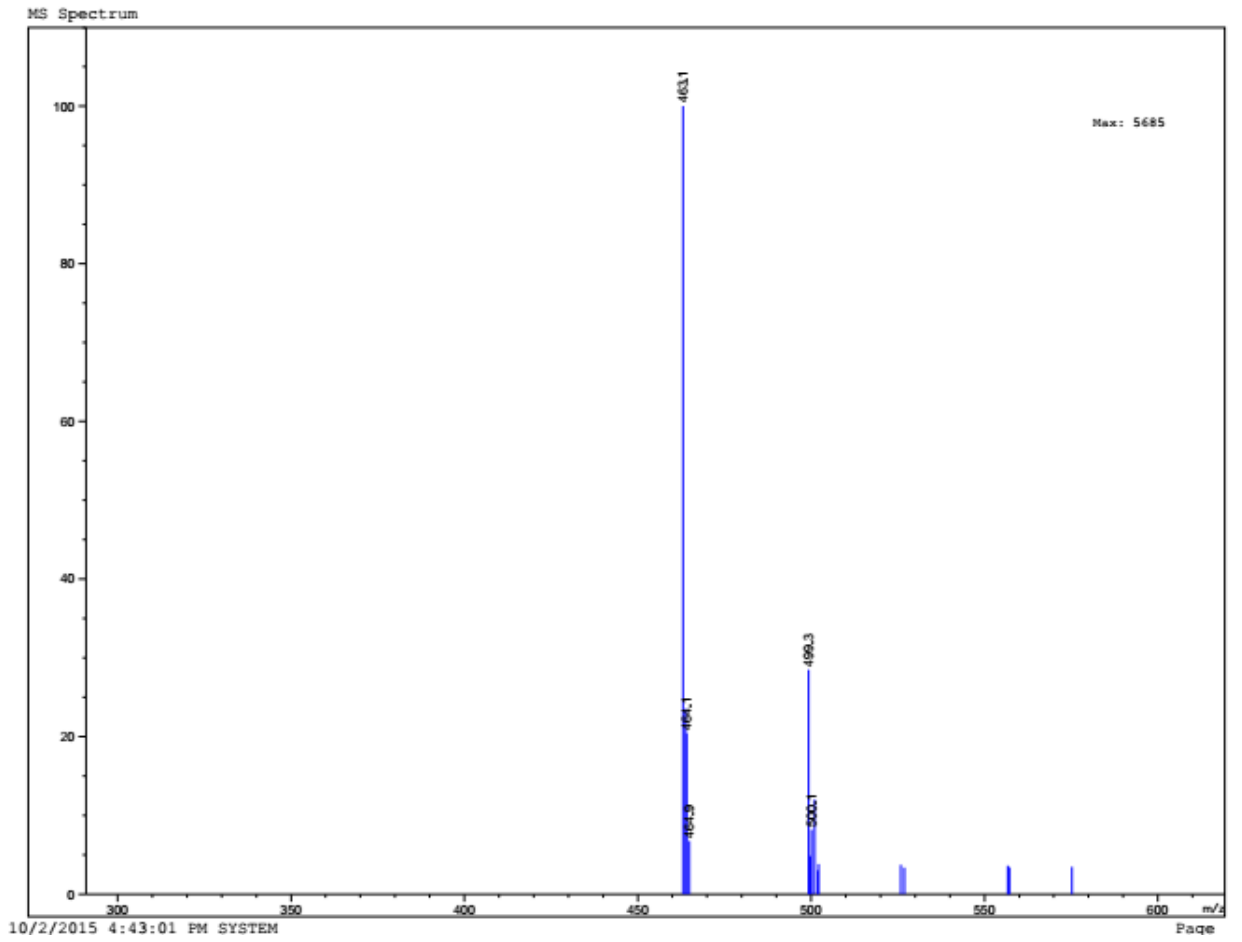
PHỔ HSQC



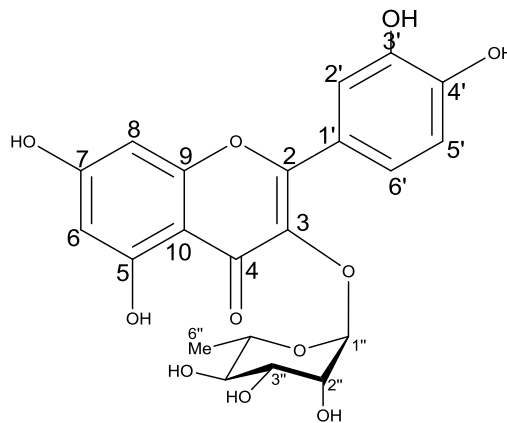
PHỔ HMBC



PHỔ MS

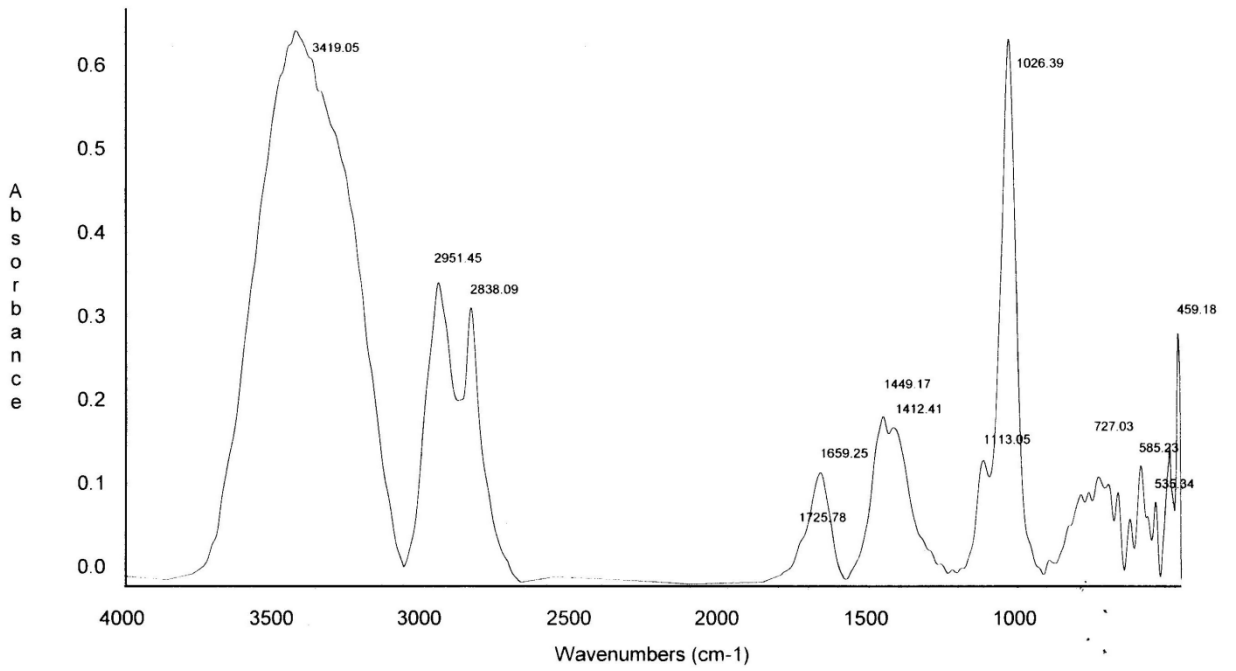


PHỤ LỤC 4. CÁC PHỔ CỦA CHẤT MM4



Công thức cấu tạo của chất **MM4** (quercitrin)

PHỔ IR



PHỔ ¹H-NMR

MM9-MeOD-1H



7.360
7.356
7.335
7.331
7.319
7.314
6.939
6.922
6.387
6.383
6.220
6.216
5.374
5.371
4.865
4.247
4.244
4.241
4.237
3.784
3.777
3.765
3.758
3.458
3.451
3.446
3.439
3.427
3.375
3.356
3.337
3.333
3.330
3.327
3.324
0.970
0.958

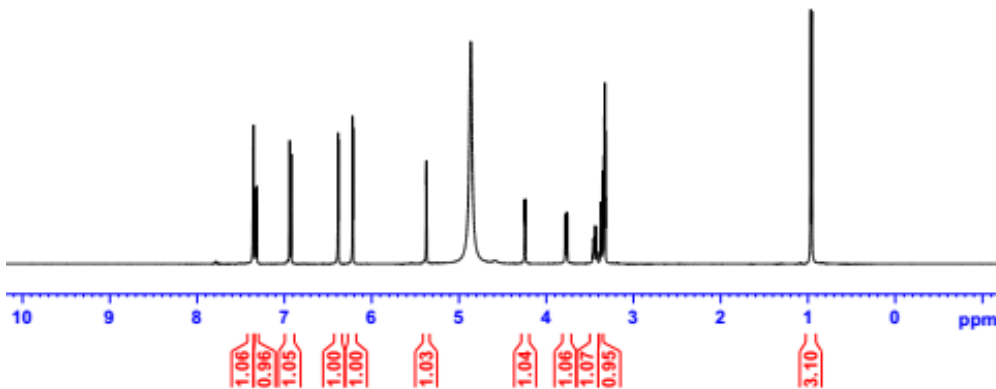
```

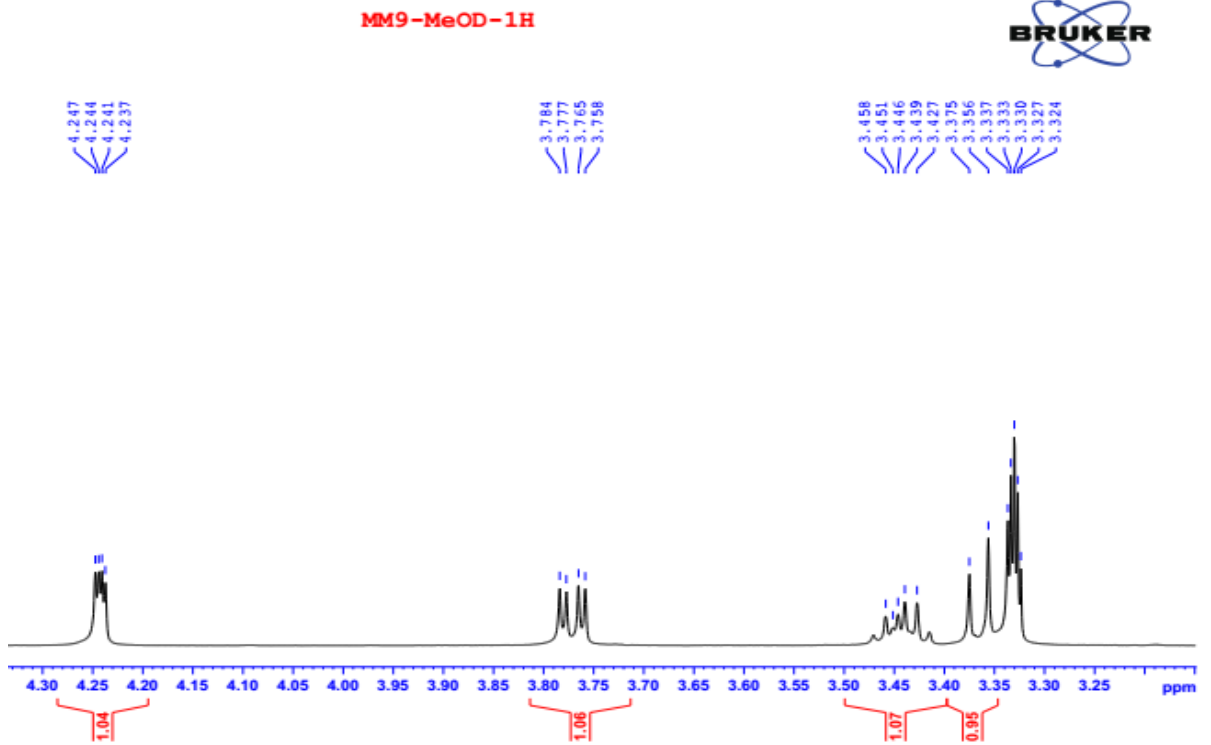
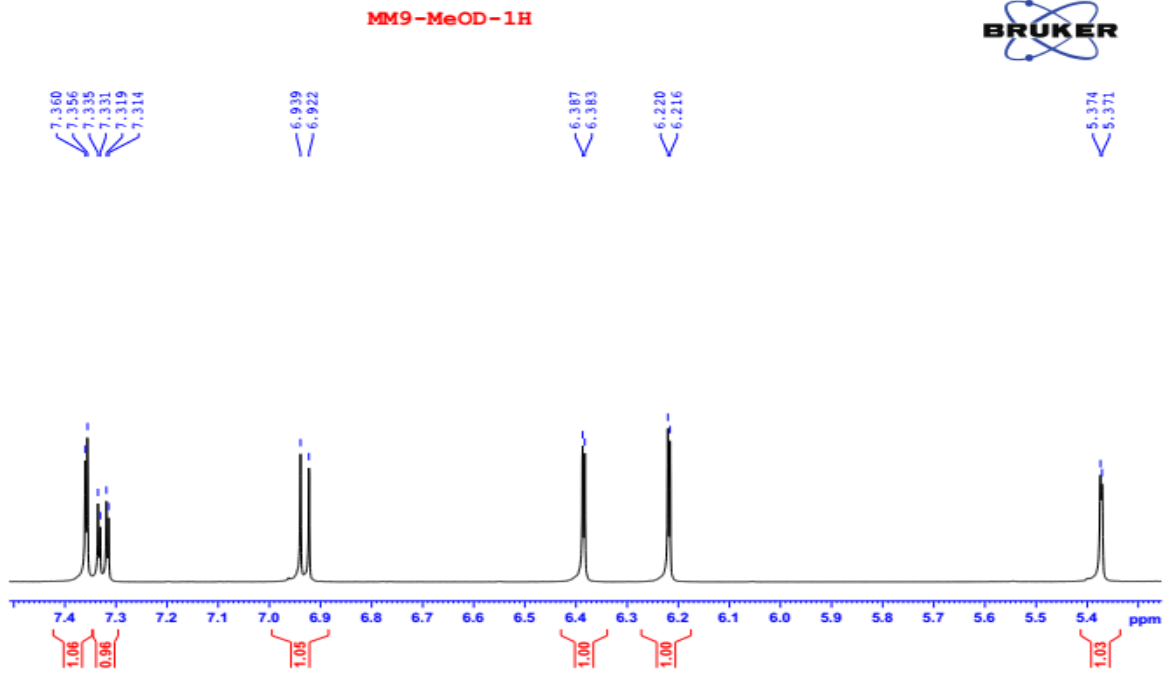
Current Data Parameters
NAME          THU_MM9
EXPNO         1
PROCNO        1

F2 - Acquisition Parameters
Date_         20151015
Time          11.09
INSTRUM      spect
PROBHD       5 mm Multinucl
PULPROG      zg30
TD            65536
SOLVENT      MeOD
NS            16
DS            0
SMH           10000.000 Hz
FIDRES       0.152588 Hz
AQ           3.2768500 sec
RG            143.7
DM            50.000 usec
DE             6.00 usec
TE            300.0 K
D1            1.00000000 sec
MCREST       0 sec
MCNRK        0.01500000 sec

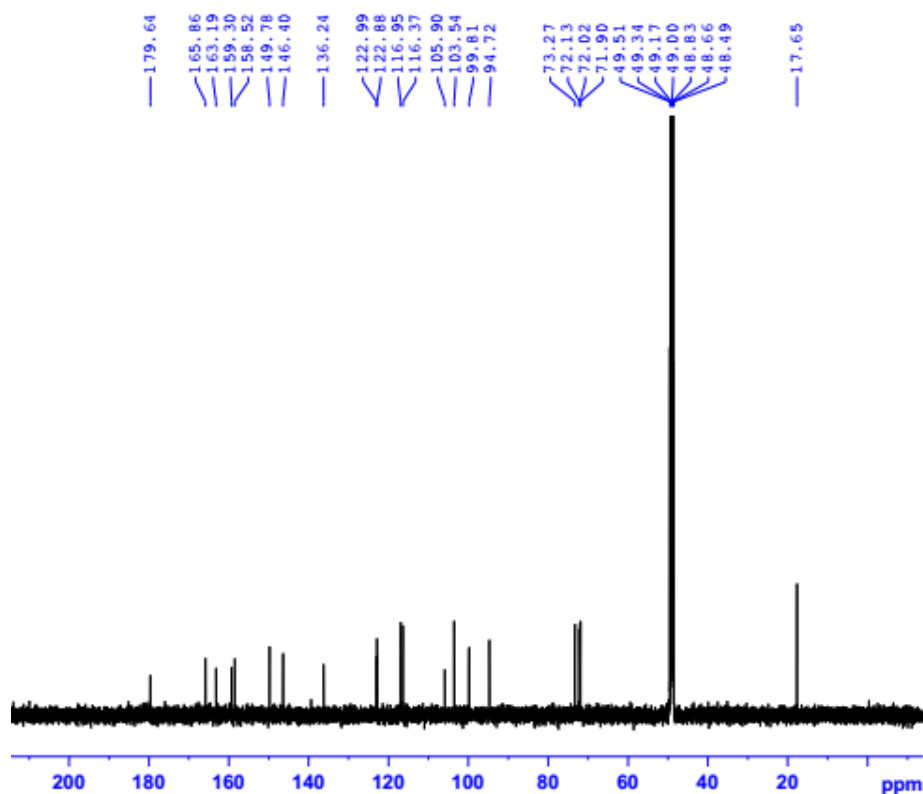
***** CHANNEL f1 *****
NUC1          1H
P1            10.20 usec
PL1           -3.00 dB
SFO1          500.1335009 MHz

F2 - Processing parameters
SI            32768
SF            500.1300007 MHz
WDW           EM
SSB           0
LB            0.30 Hz
GB            0
PC            1.00
    
```





PHỔ ^{13}C -NMR
MM9-MeOD-C13CPD



Current Data Parameters
NAME THU_MM9
EXPNO 2
PROCNO 1

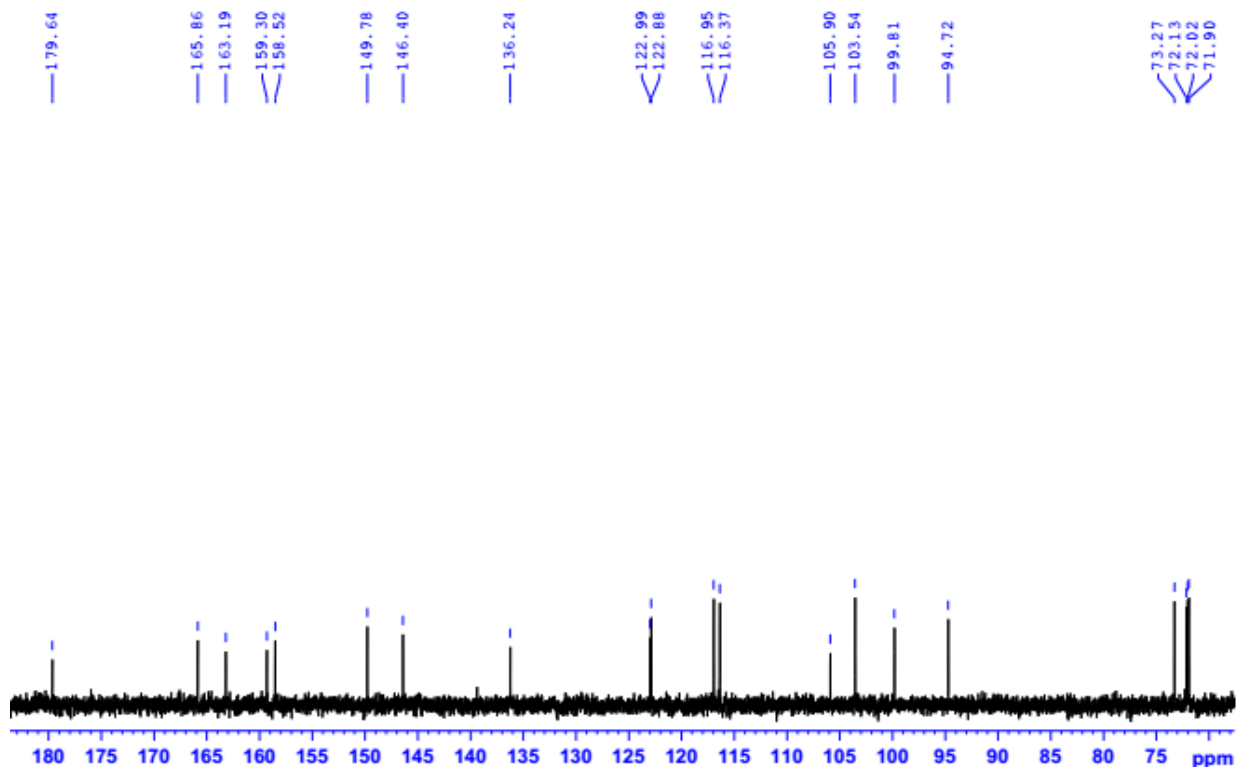
F2 = Acquisition Parameters
Date_ 20151015
Time 11.16
INSTRUM spect
PROBHD 5 mm Multinucl
PULPROG zgpg30
TD 65536
SOLVENT MeOD
NS 128
DS 2
SWH 31446.541 Hz
FIDRES 0.479836 Hz
AQ 1.0420383 sec
RG 32768
DW 15.900 usec
DE 6.00 usec
TE 300.0 K
D1 2.00000000 sec
d11 0.03000000 sec
DELTA 1.89999998 sec
MCREST 0 sec
MCWRK 0.01500000 sec

----- CHANNEL f1 -----
NUC1 ^{13}C
P1 7.40 usec
PL1 0 dB
SFO1 125.7715724 MHz

----- CHANNEL f2 -----
CPDPRG[2] waltz16
NUC2 ^1H
PCPD2 80.00 usec
PL2 -3.00 dB
PL12 14.89 dB
PL13 22.00 dB
SFO2 500.1320005 MHz

F2 = Processing parameters
SI 32768
SF 125.7576142 MHz
WDW EM
SSB 0
LB 1.00 Hz
GB 0
PC 1.40

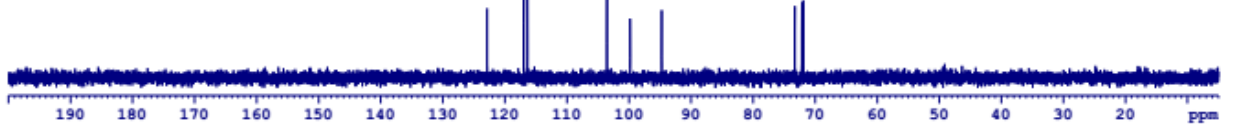
MM9-MeOD-C13CPD



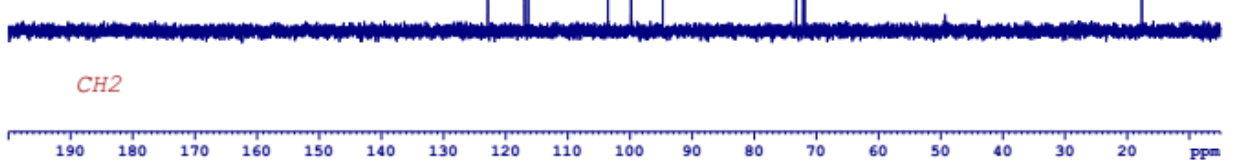
PHŌ DEPT

MM9-MeOD-C13CPD & DEPT

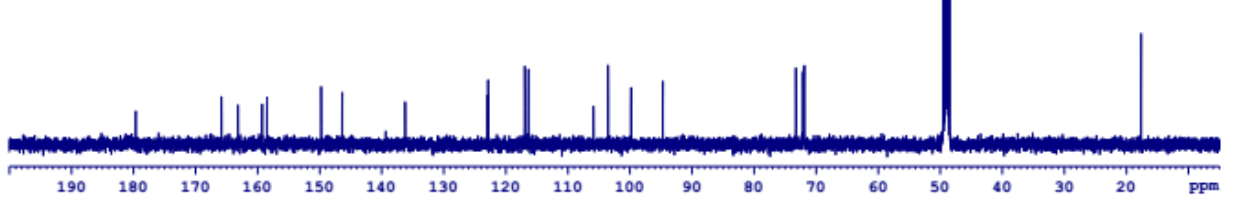
DEPT90



DEPT135

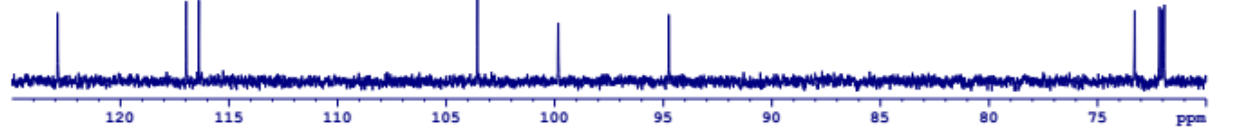
CH&CH3*CH2*

C13CPD

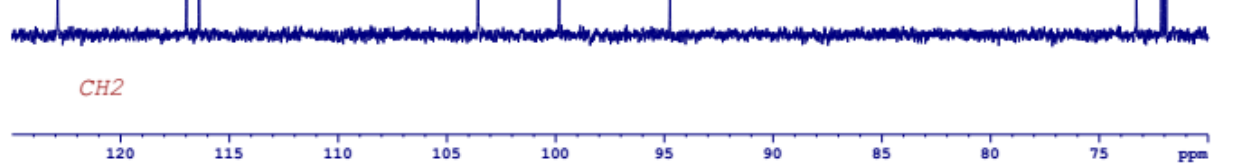


MM9-MeOD-C13CPD & DEPT

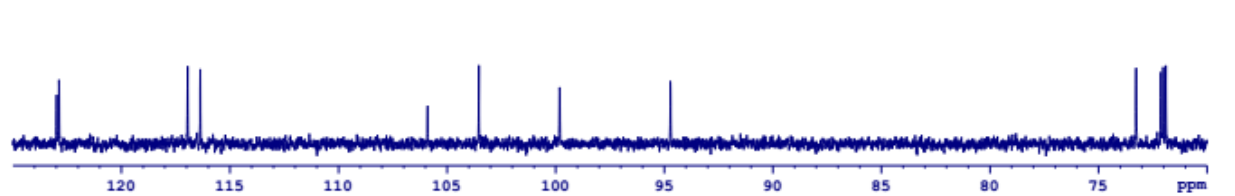
DEPT90



DEPT135

CH&CH3*CH2*

C13CPD



PHO MS

MS Spectrum

