

BỘ GIÁO DỤC VÀ ĐÀO TẠO

BỘ Y TẾ

TRƯỜNG ĐẠI HỌC DƯỢC HÀ NỘI



HOÀNG VIỆT DŨNG

NGHIÊN CỨU ĐẶC ĐIỂM THỰC VẬT, THÀNH PHẦN
HÓA HỌC VÀ TÁC DỤNG ỨC CHẾ ENZYM
ACETYLCHOLINESTERASE CỦA HAI LOÀI
Piper thomsonii (C. DC.) Hook. f. var. *thomsonii*
VÀ *Piper hymenophyllum* Miq., HỌ HỒ TIÊU (Piperaceae)

TÓM TẮT LUẬN ÁN TIẾN SĨ DƯỢC HỌC

Chuyên ngành : DƯỢC HỌC CỔ TRUYỀN

Mã số : 62.72.04.06

Hà Nội, năm 2014

Công trình được hoàn thành tại:

- Bộ môn Dược liệu - Trường Đại học Dược Hà Nội.
- Trung tâm Đào tạo - Nghiên cứu Dược - Học viện Quân y.
- Viện Hóa sinh biển, Viện Sinh thái và Tài nguyên sinh vật - Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam.
- Khoa Dược, Đại học Catholic, Daegu, Hàn Quốc.

Người hướng dẫn khoa học:

1. TS. Đỗ Quyên
2. PGS. TS. Nguyễn Minh Chính

Phản biện 1:

Phản biện 2:

Phản biện 3:

Luận án sẽ được bảo vệ trước Hội đồng chấm luận án cấp trường họp tại Trường Đại học Dược Hà Nội vào hồigiờ....., ngày.....tháng.....năm 2014.

Có thể tìm hiểu luận án tại:

- Thư viện Quốc gia Việt Nam.
- Thư viện Trường Đại học Dược Hà Nội.
- Thư viện Học viện Quân y.

A. GIỚI THIỆU LUẬN ÁN

1. Đặt vấn đề

Theo giả thuyết về vai trò của hệ cholinergic, enzym acetylcholinesterase (AChE) được xác định là một trong những đích phân tử đối với bệnh Alzheimer. Trên cơ sở đó, một vài phương pháp thử *in vitro* đã được xây dựng, trong đó, phương pháp đo quang sử dụng thuốc thử Ellman được sử dụng khá phổ biến trong hầu hết các nghiên cứu sàng lọc tác dụng ức chế AChE *in vitro* của dược liệu hoặc hợp chất tinh khiết hiện nay. Đây cũng là hướng nghiên cứu vẫn thu hút được sự quan tâm của nhiều nhà khoa học trên thế giới.

Gần đây, kết quả nghiên cứu sàng lọc dược liệu cho thấy dịch chiết của một số loài thuộc chi *Piper* L. có tác dụng ức chế AChE *in vitro*. Bên cạnh đó, tiềm năng nghiên cứu về chi *Piper* L. là khá lớn bởi số lượng phong phú của các loài thuộc chi này.

Xuất phát từ những lý do trên, chúng tôi tiến hành đề tài: **“Nghiên cứu đặc điểm thực vật, thành phần hóa học và tác dụng ức chế enzym acetylcholinesterase của hai loài *Piper thomsonii* (C. DC.) Hook. f. var. *thomsonii* và *Piper hymenophyllum* Miq., họ Hồ tiêu (Piperaceae)”**.

2. Mục tiêu của luận án

1. Mô tả đặc điểm hình thái, xác định tên khoa học và mô tả đặc điểm vi học của 2 loài nghiên cứu.
2. Xác định được thành phần hóa học của 2 loài nghiên cứu.
3. Triển khai được phương pháp và áp dụng để đánh giá hoạt tính ức chế AChE *in vitro* của dịch chiết toàn phần, dịch chiết phân đoạn và hợp chất phân lập được từ 2 loài nghiên cứu.

3. Những đóng góp mới của luận án

3.1. Về thực vật

Đã xác định tên khoa học của 2 loài nghiên cứu đồng thời mô tả chi tiết đặc điểm hình thái và đặc điểm vi học của 2 loài này.

3.2. Về hóa học

Đã chiết xuất, phân lập được từ 2 loài nghiên cứu 14 hợp chất và tất cả đều đã được xác định cấu trúc. Trong đó, có 3 hợp chất lần đầu tiên phân lập được từ tự nhiên, 4 hợp chất lần đầu tiên phân lập được từ chi *Piper* L. và 14 hợp chất được phân lập lần đầu tiên từ hai loài nghiên cứu.

3.3. Về tác dụng sinh học

- Đã triển khai được phương pháp đánh giá tác dụng ức chế AChE *in vitro* phù hợp với điều kiện phòng thí nghiệm trong nước.

- Dựa trên phương pháp này, hoạt tính ức chế AChE *in vitro* của các mẫu dịch chiết và hợp chất tinh khiết phân lập từ 2 loài nghiên cứu đã được đánh giá. Kết quả nghiên cứu góp phần thông tin về hoạt tính của 14 hợp chất phân lập được đồng thời gợi ý khung cấu trúc 1-allyl-3,4-dihydroxybenzen có hoạt tính ức chế AChE *in vitro*.

4. Ý nghĩa của luận án

- Xác định tên khoa học của 2 loài nghiên cứu giúp cho kết quả nghiên cứu về hóa học và tác dụng sinh học được khẳng định rõ nguồn gốc.

- Xác định đặc điểm vi học góp phần tiêu chuẩn hóa thực vật.

- Kết quả nghiên cứu về thành phần hóa học góp phần bổ sung thông tin về 3 hợp chất lần đầu tiên phân lập được từ tự nhiên, 4 hợp chất lần đầu tiên phân lập được từ chi *Piper* L. và 14 hợp chất lần đầu tiên phân lập được từ 2 loài nghiên cứu.

- Kết quả nghiên cứu về tác dụng ức chế AChE *in vitro* góp phần thông tin về hoạt tính này của 14 hợp chất phân lập được. Đồng thời, kết quả này cũng gợi ý khung cấu trúc 1-allyl-3,4-dihydroxybenzen sở hữu hoạt tính ức chế AChE *in vitro*.

5. Bố cục của luận án

Luận án có 128 trang, gồm 4 chương, 46 bảng, 53 hình. Bố cục gồm các phần: Đặt vấn đề (2 trang); Tổng quan (41 trang); Nguyên vật liệu, trang thiết bị và phương pháp nghiên cứu (12 trang); Kết quả nghiên cứu (55 trang); Bàn luận (16 trang); Kết luận và kiến nghị (2 trang). Danh mục các công trình đã công bố liên quan đến luận án (1 trang). Luận án có 153 tài liệu tham khảo (14 trang) và phần phụ lục.

B. NỘI DUNG CỦA LUẬN ÁN

Chương 1. TỔNG QUAN

Đã thu thập tài liệu trong nước và trên thế giới về hai nội dung:

- Tổng quan về chi *Piper* L. gồm 3 nội dung chính: vị trí phân loại, phân bố và đặc điểm thực vật của chi *Piper* L.; thành phần hóa học của chi *Piper* L.; công dụng, tác dụng sinh học và độc tính của chi *Piper* L.

- Tổng quan về nghiên cứu sàng lọc hoạt tính ức chế AChE *in vitro*.

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

2.1. Nguyên vật liệu

- Phần trên mặt đất của hai loài nghiên cứu được thu hái tại Vườn Quốc gia Cúc Phương, Ninh Bình vào tháng 04/2011.

- Các dung môi và hóa chất sử dụng trong nghiên cứu đều đạt tiêu chuẩn tinh khiết phân tích, tiêu chuẩn dùng cho HPLC và tiêu chuẩn dùng cho NMR xuất xứ Trung Quốc, Hàn Quốc, Sigma, Merck.

2.2. Trang thiết bị

Một số trang thiết bị chính được sử dụng trong luận án gồm: máy đo phổ cộng hưởng từ hạt nhân, máy đo phổ khối lượng, hệ

thống sắc ký lỏng hiệu năng cao điều chế, máy đo quang ELISA, hệ thống cất quay chân không, hệ thống làm lạnh tuần hoàn, máy hứng mẫu tự động, cân phân tích, kính hiển vi...

2.3. Phương pháp nghiên cứu

** Nghiên cứu về thực vật*

- Quan sát và mô tả đặc điểm hình thái, đối chiếu với tài liệu tham khảo và tiêu bản mẫu để xác định tên khoa học của 2 loài nghiên cứu.

- Xác định đặc điểm vi phẫu của thân, lá và đặc điểm bột phấn trên mặt đất của 2 loài nghiên cứu bằng kính hiển vi.

** Nghiên cứu về hóa học*

- Các phân đoạn dịch chiết bằng dung môi có độ phân cực khác nhau chiết xuất từ hai loài nghiên cứu được đánh giá hoạt tính ức chế AChE *in vitro*. 4 phân đoạn sở hữu hoạt tính mạnh nhất được nghiên cứu phân lập hợp chất bằng phương pháp sắc ký cột kết hợp với phương pháp sắc ký lớp mỏng điều chế, sắc ký lỏng hiệu năng trung bình và sắc ký lỏng hiệu năng cao điều chế.

- Nhận dạng các chất phân lập được dựa trên các dữ liệu về: năng suất quay cực, phản ứng hóa học đặc trưng, phổ khối lượng, phổ cộng hưởng từ hạt nhân kết hợp đối chiếu tài liệu tham khảo.

** Nghiên cứu về tác dụng ức chế AChE in vitro*

- Triển khai phương pháp đánh giá hoạt tính ức chế AChE *in vitro* dựa trên phương pháp đo quang sử dụng thuốc thử Ellman.

- Đánh giá hoạt tính ức chế AChE *in vitro* của các mẫu dịch chiết và hợp chất tinh khiết phân lập được từ 2 loài nghiên cứu bằng phương pháp triển khai được.

Chương 3. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU

3.1. Kết quả nghiên cứu về thực vật

3.1.1. Kết quả nghiên cứu về thực vật của loài *Piper thomsonii* (C. DC.) Hook. f. var. *thomsonii*

*** Đặc điểm hình thái**

Cây thảo, leo. Lá mọc cách. Phiến lá có 2 dạng hình trứng và hình elip; gốc lá tròn hoặc hơi nhọn; mép nguyên; chóp lá nhọn; không có lông. Gân 7.

Cụm hoa dạng bông, mọc đối diện với lá, không có lông. Hoa đơn tính khác gốc. Mỗi hoa có 1 lá bắc, gần hình tròn. Bộ nhị 2-3; bao phấn 2 ô. Bộ nhụy có 1 lá noãn tạo thành bầu, 1 ô, 1 noãn; gần hình cầu, không có lông. Nụm nhụy xẻ 3-5 thùy, không có vòi nhụy.

*** Đặc điểm vi phẫu**

- Vi phẫu thân: lần lượt từ ngoài vào trong gồm: lớp biểu bì; mô dày gồm các đám nằm rải rác trong mô mềm vỏ; vòng mô cứng; ở những chỗ lõm của vòng mô cứng có các bó libe – gỗ; mô mềm ruột; các bó libe – gỗ nằm ở phần ruột thân; khối mang màu nằm rải rác ở mô mềm; chính giữa phần ruột thân là mô khuyết.

- Vi phẫu lá:

+ Phần gân lá: gân lá lồi hai mặt trên và dưới. Biểu bì trên và dưới là một lớp tế bào xếp đều đặn, thành dày, hình tròn. Đám mô dày xếp sát biểu bì trên và cùng mô dày xếp sát biểu bì dưới. Mô mềm gồm những tế bào hình tròn, vách mỏng. Một bó libe – gỗ to, hình tròn, nằm ở chính giữa gân lá với gỗ ở phía trên gồm các tế bào có thành dày, hóa gỗ và libe ở phía dưới. Bao quanh bó libe – gỗ là đám sợi mô cứng. Khối mang màu nằm rải rác ở mô mềm.

+ Phần phiến lá: dưới lớp biểu bì là lớp hạ bì có một hàng tế bào hình chữ nhật, to, vách mỏng. Mô mềm đồng hóa xếp giữa 2 lớp hạ bì, tế bào nhỏ, vách mỏng, xếp khá đều đặn, chứa nhiều lục lạp.

* Đặc điểm bột phần trên mặt đất gồm: mảnh biểu bì thân; mảnh biểu bì mang lỗ khí; mảnh mô mềm; mảnh mạch điểm; mảnh mạch vạch; mảnh mạch xoắn; bó sợi; hạt tinh bột đơn hoặc tụ thành đám; tinh thể calci oxalat hình phiến; mảnh mô cứng; hạt phấn; mảnh mô mang khối có màu.

3.1.2. Kết quả nghiên cứu về thực vật của loài *Piper hymenophyllum* Miq.

* Đặc điểm hình thái

Cây thảo, leo, phần non có nhiều lông. Lá mọc cách. Phiến lá hình trứng hẹp; gốc hình tim, lệch rõ; mép nguyên; chóp lá nhọn; hai mặt lá có lông ở gân. Gân 5-7.

Cụm hoa dạng bông, mọc đối diện với lá. Cuống cụm hoa có lông. Hoa đơn tính khác gốc. Mỗi hoa có một lá bắc, gần hình tròn. Bộ nhị 2; bao phấn 2 ô. Bộ nhụy có 1 lá noãn tạo thành bầu, 1 ô, 1 noãn; gần hình cầu, có lông. Núm nhụy xẻ 4 thùy.

* Đặc điểm vi phẫu

- Vi phẫu thân: gồm các đặc điểm gần giống đặc điểm vi phẫu thân của loài *Piper thomsonii* (C. DC.) Hook. f. var. *thomsonii*. Một số điểm khác là: thân của loài *Piper hymenophyllum* Miq. không tròn đều, có lông che trở và ở dưới lớp biểu bì có mô dày tạo thành vòng chứ không nằm rải rác trong mô mềm.

- Vi phẫu lá: gồm các đặc điểm gần giống với đặc điểm vi phẫu lá của loài *Piper thomsonii* (C. DC.) Hook. f. var. *thomsonii*. Một số điểm khác là lá của loài *Piper hymenophyllum* Miq. có gân trên lõm, bên ngoài có lông che trở.

* Đặc điểm bột phần trên mặt đất của loài *Piper hymenophyllum* Miq. có hầu hết những đặc điểm bột phần trên mặt đất của loài *Piper thomsonii* (C. DC.) Hook. f. var. *thomsonii*. Một số điểm khác là bột

của loài *Piper hymenophyllum* Miq. có mảnh lông che trở đa bào và tinh thể calci oxalat có thêm hình khối đa giác.

3.2. Kết quả nghiên cứu về hóa học

Từ 2 phân đoạn cần trong dung môi *n*-hexan và EtOAc chiết xuất từ loài *P. thomsonii* (C. DC.) Hook. f. var. *thomsonii* và 2 phân đoạn cần trong dung môi CHCl_3 và EtOAc chiết xuất từ loài *P. hymenophyllum* Miq. đã phân lập được 14 hợp chất. Tất cả những hợp chất này đều đã được nhận dạng dựa trên dữ liệu một số loại phổ.

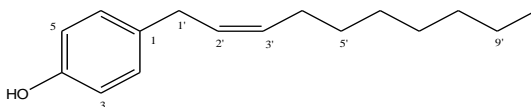
* Nhận dạng hợp chất **PT1**

Phổ $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ_{H} (ppm): 6,76 (2H, *d*, $J = 8,0$ Hz); 7,06 (2H, *d*, $J = 8,0$ Hz); hai proton olefin tại δ_{H} 5,52 (2H, *m*) và một tín hiệu của nhóm methyl tại δ_{H} 0,91 (*t*, $J = 6,0$ Hz).

Phổ $^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, CDCl_3) δ_{C} (ppm): 133,49 (C-1), 129,39 (C-2/6), 115,23 (C-3/5) và 153,57 (C-4); một liên kết đôi tại δ_{C} 128,32 và 130,77; 7 carbon methylen tại δ_{C} 32,56 (C-1'), 27,21 (C-4'), 29,71 (C-5'), 29,30 (C-6'), 29,20 (C-7'), 31,86 (C-8') và 22,66 (C-9'); 1 nhóm methyl bậc một tại δ_{C} 14,09 (C-10').

Phổ HR-FAB-MS xuất hiện pic ion m/z 232,1829 $[\text{M}]^+$ cho phép xác định công thức phân tử của hợp chất **PT1** là $\text{C}_{16}\text{H}_{24}\text{O}$.

Dựa vào những dữ liệu ở trên kết hợp đối chiếu tài liệu cho phép kết luận hợp chất **PT1** có tên là 4-(2'-(*Z*)-decenyl) phenol và có cấu trúc như sau:



Hình 3.11. Cấu trúc hóa học của hợp chất PT1

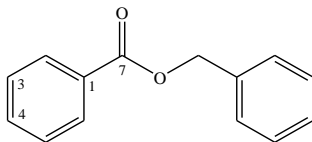
* Nhận dạng hợp chất **PT2**

Phổ $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ_{H} (ppm): tín hiệu của proton oxymethylen tại δ_{H} 5,39 và các tín hiệu proton đặc trưng cho vòng benzen một lần thế trong khoảng δ_{H} 7,45 ~ 8,10.

Phổ ^{13}C -NMR (100 MHz, CDCl_3) δ_{C} (ppm): tín hiệu của 14 nguyên tử cacbon gồm 1 nhóm cacbonyl tại δ_{C} 166,41; một nhóm oxymethylen tại δ_{C} 66,68; hai vòng benzen một lần thế tại δ_{C} 128,16, 128,23, 128,37, 128,59, 129,70, 130,17 và 136,59.

Phổ HR-ESI-MS xuất hiện pic ion m/z 235,0716 $[\text{M}+\text{Na}]^+$ cho phép xác định công thức phân tử của hợp chất **PT2** là $\text{C}_{14}\text{H}_{12}\text{O}_2$.

Dựa vào những dữ liệu ở trên kết hợp đối chiếu tài liệu cho phép kết luận hợp chất **PT2** có tên là benzyl benzoat và có cấu trúc như sau:



Hình 3.13. Cấu trúc hóa học của hợp chất PT2

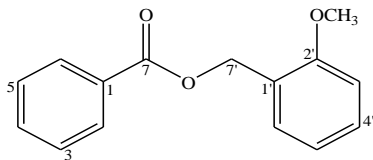
* Nhận dạng hợp chất **PT3**

Phổ ^1H -NMR (400 MHz, CDCl_3) δ_{H} (ppm): tín hiệu của 9 proton thơm trong khoảng δ_{H} 6,92~8,11; một tín hiệu của oxymethylen tại δ_{H} 5,44 và tín hiệu của một nhóm methoxy tại δ_{H} 3,86.

Phổ ^{13}C -NMR (100 MHz, CDCl_3) δ_{C} (ppm): tín hiệu của 15 nguyên tử cacbon bao gồm: 1 cacbonyl tại δ_{C} 166,53; 12 cacbon thơm tại δ_{C} 130,43 (C-1), 129,68 (C-2,6), 128,29 (C-3,5), 132,83 (C-4), 124,46 (C-1'), 157,52 (C-2'), 110,49 (C-3'), 129,46 (C-4'), 120,44 (C-5') và 129,40 (C-6'); 1 cacbon oxymethylen tại δ_{C} 62,17 (C-7'); một nhóm methoxy tại δ_{C} 55,44.

Phổ HR-ESI-MS xuất hiện pic ion m/z 265,0820 $[\text{M}+\text{Na}]^+$ cho phép xác định công thức phân tử của hợp chất **PT3** là $\text{C}_{15}\text{H}_{14}\text{O}_3$.

Dựa vào những dữ liệu ở trên kết hợp đối chiếu tài liệu cho phép kết luận hợp chất **PT3** có tên là 2-methoxybenzyl benzoat và có cấu trúc như sau:



Hình 3.15. Cấu trúc hóa học của hợp chất PT3

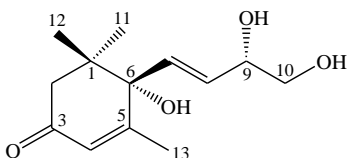
*** Nhận dạng hợp chất PT4**

Phổ $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ_{H} (ppm): tín hiệu của ba proton olefin tại δ_{H} 5,83, 5,91 và 5,93; ba nhóm methyl bậc ba tại δ_{H} 1,05, 1,07 và 1,95.

Phổ $^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, CDCl_3) δ_{C} (ppm): tín hiệu của 13 nguyên tử cacbon trong đó có: một nhóm carbonyl tại δ_{C} 201,38; bốn cacbon olefin tại δ_{C} 127,30, 132,66, 132,71 và 167,53; ba oxycarbon tại δ_{C} 67,46, 73,83 và 80,27; ba nhóm methyl bậc 3 tại δ_{C} 19,71, 23,60 và 24,66.

Phổ HR-ESI-MS xuất hiện pic ion m/z 263,1244 $[\text{M}+\text{Na}]^+$ cho phép xác định công thức phân tử của hợp chất **PT4** là $\text{C}_{13}\text{H}_{24}\text{O}_4$.

Dựa vào những dữ liệu ở trên kết hợp đối chiếu tài liệu cho phép kết luận hợp chất **PT4** có tên là cucumegastigman I và có cấu trúc như sau:



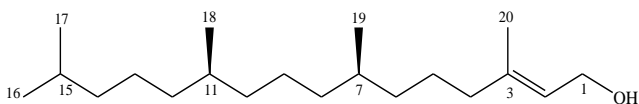
Hình 3.17. Cấu trúc hóa học của hợp chất PT4

*** Nhận dạng hợp chất PT5**

Phổ $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ_{H} (ppm): tín hiệu của một nối đôi bị thế 3 vị trí tại δ_{H} 5,37 (t , $J = 6,8$ Hz) và 5 nhóm methyl tại δ_{H} 0,82 (6H, d , $J = 6,4$ Hz), 0,84 (6H, d , $J = 6,4$ Hz) và 1,63 (3H, s); một nhóm oxymethylen tại δ_{H} 4,11 (d , $J = 6,8$ Hz).

Phổ ^{13}C -NMR (100 MHz, CDCl_3) δ_{C} (ppm): tín hiệu của 20 carbon, trong đó có 5 nhóm methyl tại δ_{C} 22,68 (C-16), 22,78 (C-17), 19,81 (C-18), 19,78 (C-19), 16,21 (C-20); 10 nhóm methylen δ_{C} 59,36 (C-1), 39,95 (C-4), 25,22 (C-5), 36,74 (C-6), 37,50 (C-8), 24,54 (C-9), 37,43 (C-10), 37,35 (C-12), 24,87 (C-13) và 39,44 (C-14); 4 nhóm methin tại δ_{C} 123,10 (C-2), 32,85 (C-7), 32,76 (C-11), 28,04 (C-15); 1 carbon bậc 4 tại δ_{H} 140,22 (C-3).

Dựa vào những dữ liệu ở trên kết hợp đối chiếu tài liệu cho phép kết luận hợp chất **PT5** có tên là *trans*-phytol và có cấu trúc như sau:



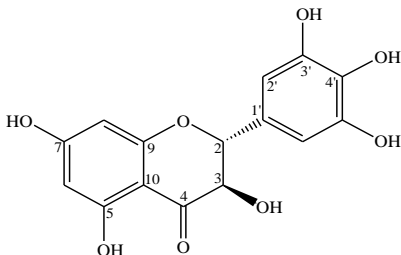
Hình 3.19. Cấu trúc hóa học của hợp chất PT5

* Nhận dạng hợp chất **PT6**

Phổ ^1H -NMR (400 MHz, CDCl_3) δ_{H} (ppm): tín hiệu của các proton tại δ_{H} 4,45 (1H, *d*, $J = 11,2$ Hz), 4,82 (1H, *d*, $J = 11,2$ Hz), 5,88 (1H, *s*), 5,89 (1H, *s*) và 6,52 (2H, *s*).

Phổ ^{13}C -NMR (100 MHz, CDCl_3) δ_{C} (ppm): tín hiệu của 15 carbon tại δ_{C} 73,64, 85,20, 96,25, 97,27, 101,77, 107,99, 128,97, 134,87, 146,77, 164,38, 165,17, 168,63 và 198,25.

Dựa vào những dữ liệu ở trên kết hợp đối chiếu tài liệu cho phép kết luận hợp chất **PT6** có tên là dihydromyricetin và có cấu trúc như sau:



Hình 3.21. Cấu trúc hóa học của hợp chất PT6

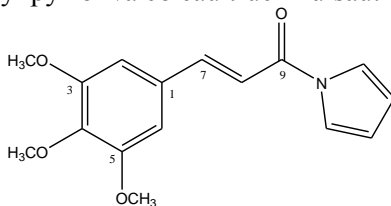
* Nhận dạng hợp chất **PH1**

Phổ $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ_{H} (ppm): tín hiệu của hai proton còn lại trong vòng benzen bị thế đối xứng tại δ_{H} 7,20 (2H), một liên kết đôi có cấu hình *E* –CH=CH– tại δ_{H} 7,45 (*d*, $J = 15,4$ Hz, 1H) và 7,89 (*d*, $J = 15,4$ Hz, 1H); bốn proton đặc trưng cho vòng pyrrol tại δ_{H} 6,32 (2H, *t*, $J = 2,4$ Hz) và 7,61 (2H, *t*, $J = 2,4$ Hz); hai nhóm methoxy tại δ_{H} 3,90 (6H, *s*).

Phổ $^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, CDCl_3) δ_{C} (ppm): tín hiệu của 15 nguyên tử cacbon trong đó có nhóm cacbonyl tại δ_{C} 163,92; 6 cacbon vòng thơm tại δ_{C} 126,25 (C-1), 107,78 (C-2/6), 149,06 (C-3/5) và 140,38 (C-4); một vòng pyrrol tại δ_{C} 120,24 (C-1'/C-4') và 113,58 (C-2'/C-3'); hai nhóm methoxy tại δ_{C} 56,87.

Phổ HR-EI-MS xuất hiện pic ion m/z 273,1003 $[\text{M}]^+$ cho phép xác định công thức phân tử của **PH1** là $\text{C}_{15}\text{H}_{15}\text{NO}_4$.

Dựa vào những dữ liệu ở trên kết hợp đối chiếu tài liệu cho phép kết luận hợp chất **PH1** có tên là 3,5-dimethoxy-4-hydroxycinnamoyl pyrrol và có cấu trúc như sau:



Hình 3.25. Cấu trúc hóa học của hợp chất PH1

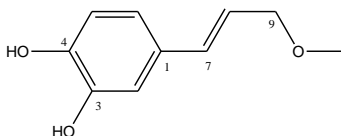
* Nhận dạng hợp chất **PH2**

Phổ $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ_{H} (ppm): tín hiệu proton của vòng benzen dạng ABX tại δ_{H} 6,43 ($J = 8,0$ Hz), 6,81 ($J = 8,0$ Hz) và 7,10 (*s*); tín hiệu của một liên kết đôi cấu hình *trans* tại δ_{H} 6,01 (*dt*, $J = 6,4, 16,0$ Hz) và 7,52 (*d*, $J = 16,0$ Hz); một nhóm methoxy tại δ_{H} 3,32.

Phổ ^{13}C -NMR (100 MHz, CDCl_3) δ_{C} (ppm): tín hiệu của 10 nguyên tử cacbon bao gồm: 3 cacbon bậc 4 tại δ_{C} 130,40, 146,55 và 146,77; 5 cacbon methin tại δ_{C} 114,09, 116,41, 120,19, 123,43 và 134,69; 1 cacbon methylen tại δ_{C} 74,53; một cacbon methoxy tại δ_{C} 58,03.

Phổ HR-EI-MS xuất hiện pic ion m/z 180,0787 $[\text{M}]^+$ cho phép xác định công thức phân tử của hợp chất **PH2** là $\text{C}_{10}\text{H}_{12}\text{O}_3$.

Dựa vào những dữ liệu ở trên kết hợp đối chiếu tài liệu cho phép kết luận hợp chất **PH2** có tên là 3,4-dihydroxycinnamyl alcohol methyl ether và có cấu trúc như sau:



Hình 3.27. Cấu trúc hóa học của hợp chất PH2

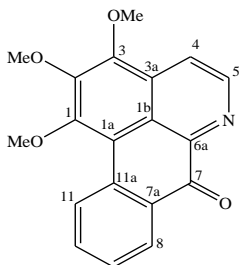
* Nhận dạng hợp chất **PH3**

Phổ ^1H -NMR (400 MHz, CDCl_3) δ_{H} (ppm): tín hiệu của hai proton của dị vòng thơm chứa nitơ tại δ_{H} 8,21 (d , $J = 4,8$ Hz) và 8,97 (d , $J = 4,8$ Hz), bốn proton thuộc vòng thơm thế ở vị trí *ortho* tại δ_{H} 7,52 (t , $J = 8,0$ Hz), 7,74 (t , $J = 8,0$ Hz), 8,56 (d , $J = 8,0$ Hz) và 9,10 (d , $J = 8,0$ Hz); 1 nhóm methoxy tại δ_{H} 4,08, 4,10 và 4,19.

Phổ ^{13}C -NMR (100 MHz, CDCl_3) δ_{C} (ppm): 1 nhóm carbonyl tại δ_{C} 182,57; 9 nguyên tử cacbon bậc 4 tại δ_{C} 115,66, 122,80, 131,06, 131,44, 134,50, 145,47, 147,31, 148,42 và 156,42; 6 nhóm methin tại δ_{C} 110,09, 127,61, 128,12, 128,90, 134,30 và 144,54; ba nhóm methoxy tại δ_{C} 60,96, 61,43 và 61,77.

Phổ HR-ESI-MS xuất hiện pic ion m/z 344,0884 $[\text{M}+\text{Na}]^+$ cho phép xác định công thức phân tử của hợp chất **PH3** là $\text{C}_{19}\text{H}_{15}\text{NO}_4$.

Dựa vào những dữ liệu ở trên kết hợp đối chiếu tài liệu cho phép kết luận hợp chất **PH3** có tên là *O*-methylmoscatolin và có cấu trúc như sau:



Hình 3.29. Cấu trúc hóa học của hợp chất PH3

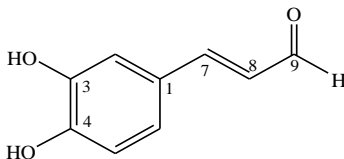
* Nhận dạng hợp chất **PH4**

Phổ $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ_{H} (ppm): tín hiệu proton aldehyd tại δ_{H} 9,54; vòng benzen có các nhóm thế dạng ABX tại δ_{H} 6,81 (d , $J = 8,0$ Hz), 7,03 (d , $J = 8,0$ Hz) và 7,10 (s); một liên kết đôi dạng $-\text{CH}=\text{CH}-$ tại δ_{H} 6,54 (dd , $J = 8,0, 16,0$ Hz) và 7,52 (d , $J = 16,0$ Hz).

Phổ $^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, CDCl_3) δ_{C} (ppm): tín hiệu của 9 nguyên tử cacbon bao gồm: 3 cacbon bậc 4 tại δ_{C} 127,78, 147,14 và 150,86; 5 nhóm methin tại δ_{C} 115,73, 116,77, 124,12, 126,52 và 156,57; một nhóm aldehyd tại δ_{C} 196,33.

Phổ HR-ESI-MS xuất hiện pic ion m/z 163,0431 $[\text{M}-\text{H}]^-$ cho phép xác định công thức phân tử của hợp chất **PH4** là $\text{C}_9\text{H}_8\text{O}_3$.

Dựa vào những dữ liệu ở trên kết hợp đối chiếu tài liệu cho phép kết luận hợp chất **PH4** có tên là (*E*)-caffeoyl aldehyd và có cấu trúc như sau:



Hình 3.31. Cấu trúc hóa học của hợp chất PH4

* Nhận dạng hợp chất **PH5**

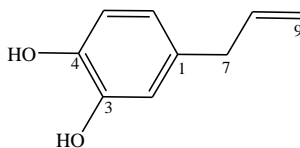
Phổ $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ_{H} (ppm): tín hiệu proton của vòng thơm thế ở vị trí 1, 3, 4 tại δ_{H} 6,65 (1H, dd , $J = 2,0, 8,0$ Hz), 6,73 (1H, d , $J = 2,0$ Hz) và 6,81 (d , $J = 8,0$ Hz). Ngoài ra, thấy sự có

mặt của các proton liên kết đôi dạng $-\text{CH}=\text{CH}_2$ tại δ_{H} 5,94 (1H, *m*), 5,07 (1H, *d*, $J = 14,4$ Hz) và 5,09 (1H, *d*, $J = 16,0$ Hz).

Phổ ^{13}C -NMR (100 MHz, CDCl_3) δ_{C} (ppm): tín hiệu của ba nguyên tử cacbon bậc 4 tại δ_{C} 133,64 (C-1), 141,71 (C-3) và 143,50 (C-4); bốn nhóm methin tại δ_{C} 115,73 (C-2), 115,73 (C-5), 121,38 (C-6) và 137,78 (C-8); một nhóm methylen của liên kết đôi tại δ_{C} 115,82 (C-9) và một nhóm methylen tại δ_{C} 39,65 (C-7).

Phổ HR-ESI-MS xuất hiện pic ion m/z 151,0745 $[\text{M}+\text{H}]^+$ cho phép xác định công thức phân tử của hợp chất **PH5** là $\text{C}_9\text{H}_{10}\text{O}_2$.

Dựa vào những dữ liệu ở trên kết hợp đối chiếu tài liệu cho phép kết luận hợp chất **PH5** có tên là 1-allyl-3,4-dihydroxybenzen và có cấu trúc như sau:



Hình 3.32. Cấu trúc hóa học của hợp chất PH5

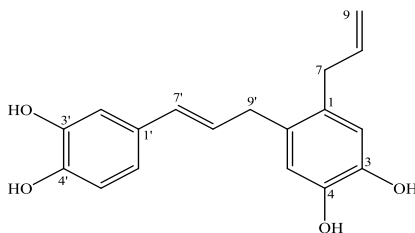
* Nhận dạng hợp chất **PH6**

Phổ ^1H -NMR (400 MHz, CDCl_3) δ_{H} (ppm): tín hiệu của một liên kết đôi dạng allyl ($-\text{CH}=\text{CH}_2$) tại δ_{H} 4,90 (*d*, $J = 17,2$ Hz), 5,00 (*d*, $J = 10,0$ Hz), 5,90 (*m*); một vòng thơm ba nhóm thế dạng ABX tại δ_{H} 6,65 (*d*, $J = 8,0$ Hz), 6,66 (*d*, $J = 8,0$ Hz), và 6,81 (*s*); hai proton của một liên kết đôi tại δ_{H} 5,95 (*dt*, $J = 6,0, 16,0$ Hz) và 6,07 (*d*, $J = 16,0$ Hz).

Phổ ^{13}C -NMR (100 MHz, CDCl_3) δ_{C} (ppm): tín hiệu của 14 nguyên tử cacbon gồm: 7 nguyên tử cacbon bậc 4 tại δ_{C} 130,48, 131,09, 131,61, 144,55, 144,57, 145,83 và 146,36; 8 nhóm methin tại δ_{C} 113,70, 116,40, 117,94, 118,03, 119,46, 127,78, 131,61 và 139,33; 3 nhóm methylen tại δ_{C} 36,58, 37,60 và 115,45.

Phổ HR-EI-MS xuất hiện pic ion m/z 298,1203 $[\text{M}]^+$ cho phép xác định công thức phân tử của hợp chất **PH6** là $\text{C}_{18}\text{H}_{18}\text{O}_4$.

Dựa vào những dữ liệu ở trên kết hợp đối chiếu tài liệu cho phép kết luận hợp chất **PH6** có tên là neotaiwanensol A và có cấu trúc như sau:



Hình 3.33. Cấu trúc hóa học của hợp chất PH6

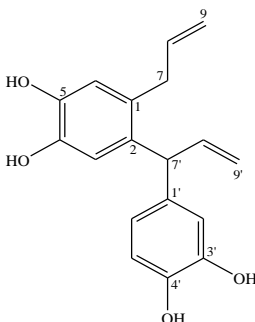
*** Nhận dạng hợp chất PH7**

Phổ $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ_{H} (ppm): tín hiệu của hai liên kết đôi dạng allyl ($-\text{CH}=\text{CH}_2$) tại δ_{H} 4,75 (*d*, $J = 17,2$ Hz), 5,11 (*d*, $J = 10,0$ Hz), 6,16 (*m*), 4,95 (*d*, $J = 17,2$ Hz), 4,97 (*d*, $J = 10,0$ Hz) và 5,86 (*m*); một vòng thơm có ba nhóm thế dạng ABX tại δ_{H} 6,44 (*d*, $J = 8,0$ Hz), 6,67 (*d*, $J = 8,0$ Hz) và 6,54 (*s*).

Phổ $^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, CDCl_3) δ_{C} (ppm): tín hiệu của 14 nguyên tử cacbon bao gồm 7 nguyên tử cacbon bậc 4 tại δ_{C} 130,56, 134,39, 136,47, 144,37, 144,51, 144,59 và 146,11; 8 nhóm methin tại δ_{C} 50,57, 116,14, 117,22, 117,43, 118,17, 121,31, 139,50 và 143,20; 3 nhóm methylen tại δ_{C} 37,58, 115,45 và 115,74.

Phổ HR-EI-MS xuất hiện pic ion m/z 298,1203 $[\text{M}]^+$ cho phép xác định công thức phân tử của hợp chất **PH7** là $\text{C}_{18}\text{H}_{18}\text{O}_4$.

Dựa vào những dữ liệu ở trên kết hợp đối chiếu tài liệu cho phép kết luận hợp chất **PH7** có tên là neotaiwanensol B và có cấu trúc như sau:



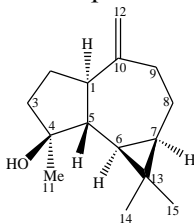
Hình 3.35. Cấu trúc hóa học của hợp chất PH7

* Nhận dạng hợp chất **PH8**

Phổ $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ_{H} (ppm): tín hiệu của một liên kết đôi thế hai lần dạng $>\text{C}=\text{CH}_2$ tại δ_{H} 4,67 (*d*, $J = 10,4$ Hz); ba nhóm methyl tại δ_{H} 1,04 (*s*), 1,05 (*s*) và 1,28 (*s*).

Phổ $^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, CDCl_3) δ_{C} (ppm): tín hiệu của 15 nguyên tử cacbon δ_{C} 53,56 (C-1), 26,95 (C-2), 41,97 (C-3), 81,21 (C-4), 54,57 (C-5), 30,13 (C-6), 27,72 (C-7), 25,01 (C-8), 39,09 (C-9), 153,68 (C-10), 26,32 (C-11), 106,49 (C-12), 20,49 (C-13), 16,56 (C-14) và 28,89 (C-15).

Dựa vào những dữ liệu ở trên kết hợp đối chiếu tài liệu cho phép kết luận hợp chất **PH8** có tên là spathulenol và có cấu trúc như sau:



Hình 3.37. Cấu trúc hóa học của hợp chất **PH8**

3.3. Kết quả triển khai phương pháp và áp dụng để đánh giá hoạt tính ức chế enzyme acetylcholinesterase *in vitro* của hai loài nghiên cứu

3.3.1. Triển khai phương pháp

- Khảo sát ảnh hưởng của nồng độ cơ chất và thuốc thử đến phương pháp thử ở 3 mức nồng độ 1,2; 2,4 và 3,6 mM. Kết quả, mức nồng độ 2,4 mM được chọn vì ở mức nồng độ này tốc độ phản ứng diễn ra mạnh và độ lặp lại của thử nghiệm tốt.

- Khảo sát ảnh hưởng của hoạt độ AChE đến phương pháp thử ở 3 mức hoạt độ 0,1; 0,25 và 0,5 IU/ml. Kết quả, mức hoạt độ 0,25 IU/ml được chọn vì ở hoạt độ này phản ứng diễn ra không quá nhanh nên hạn chế sai số gây bởi yếu tố khách quan. Đồng thời, xác định được thời điểm để đo độ hấp thụ của mẫu thử là 15 phút sau khi phản ứng bắt đầu xảy ra.

- Khảo sát ảnh hưởng của 3 nồng độ dung môi DMSO trong hỗn hợp phản ứng là 1%; 1,5% và 2% đến hoạt tính của AChE *in vitro*.

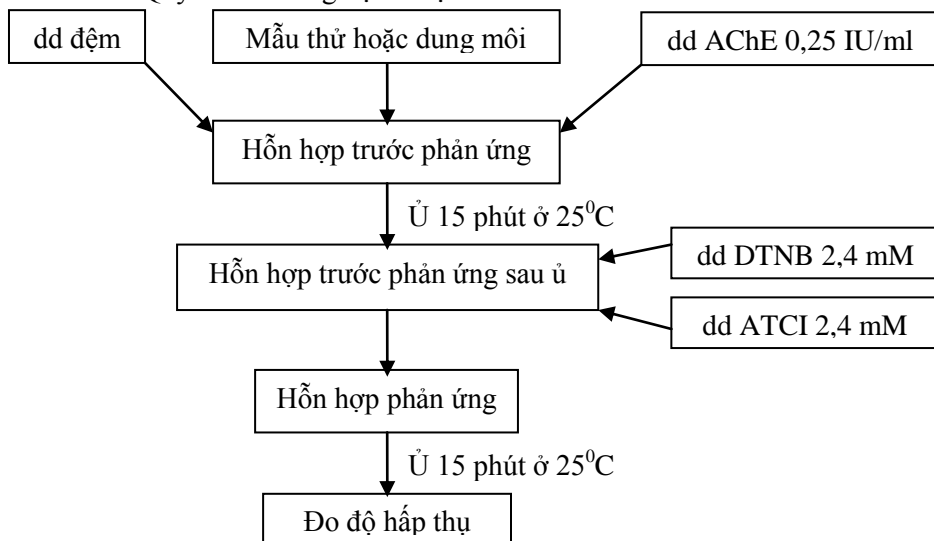
Kết quả cho thấy DMSO ở 3 nồng độ khảo sát đều có tác dụng ức chế AChE *in vitro*. Nồng độ DMSO trong hỗn hợp càng cao thì hoạt tính AChE bị ức chế càng mạnh.

- Dựa vào kết quả khảo sát ở trên đã xác định được thành phần của hỗn hợp phản ứng như ở bảng 3.17.

Bảng 3.17. Thành phần hỗn hợp phản ứng được xác định

STT	Thành phần	Mẫu thử (μl)	Mẫu trắng của mẫu thử (μl)	Mẫu đối chứng (μl)	Mẫu trắng của mẫu đối chứng (μl)
1	Đệm tris pH=8	140	160	140	160
2	Mẫu thử	20	20	0	0
3	DMSO 10%	0	0	20	20
4	AChE 0,25 IU/ml	20	0	20	0
5	DTNB 2,4 mM	10	10	10	10
6	ATCI 2,4 mM	10	10	10	10
Tổng thể tích (μl)		200	200	200	200

- Quy trình thử nghiệm được tiến hành như sau:



Hình 3.39. Sơ đồ quy trình thử nghiệm hoạt tính ức chế AChE *in vitro*

3.3.2. Hoạt tính ức chế enzym acetylcholinesterase của hai loài nghiên cứu

Để định hướng quá trình nghiên cứu phân lập hợp chất, hoạt tính của các phân đoạn cần chiết xuất từ những dung môi có độ phân cực khác nhau đã được đánh giá. Kết quả được trình bày ở 2 bảng 3.18 và 3.19.

Bảng 3.18. Hoạt tính ức chế AChE *in vitro* của những mẫu cần chiết xuất từ loài *Piper thomsonii* (C. DC.) Hook. f. var. *thomsonii*

STT	Mẫu cần	IC ₅₀ ± SD (µg/ml)	STT	Mẫu cần	IC ₅₀ ± SD (µg/ml)
1	PTM	12,77 ± 1,30	5	PTB	8,01 ± 2,11
2	PTH	2,94 ± 0,23	6	PTN	12,33 ± 1,85
3	PTC	14,75 ± 1,26	7	Berberin clorid	0,03 ± 0,0001
4	PTE	6,21 ± 1,68			

Bảng 3.19. Hoạt tính ức chế AChE *in vitro* của những mẫu cần chiết xuất từ loài *Piper hymenophyllum* Miq.

STT	Mẫu cần	IC ₅₀ ± SD (µg/ml)	STT	Mẫu cần	IC ₅₀ ± SD (µg/ml)
1	PHM	8,09 ± 0,81	5	PHB	1,53 ± 0,31
2	PHH	7,93 ± 1,78	6	PHN	6,33 ± 1,20
3	PHC	1,36 ± 0,14	7	Berberin clorid	0,03 ± 0,0001
4	PHE	0,54 ± 0,03			

Kết quả 2 bảng 3.18 và 3.19 cho thấy 2 phân đoạn cần *n*-hexan và EtOAc chiết xuất từ loài *Piper thomsonii* (C. DC.) Hook. f. var. *thomsonii* và 2 phân đoạn cần CHCl₃ và EtOAc chiết xuất từ loài *Piper hymenophyllum* Miq. là những phân đoạn cần có hoạt tính ức chế AChE *in vitro* mạnh nhất ở từng loài nghiên cứu. Trên cơ sở đó, những phân đoạn này tiếp tục được nghiên cứu về thành phần hóa học.

Từ 4 phân đoạn được chọn ở trên, đã phân lập được 14 hợp chất tinh khiết. Hoạt tính của những hợp chất này được trình bày ở bảng 3.20.

Bảng 3.20. Hoạt tính ức chế AChE *in vitro*

của những hợp chất tinh khiết phân lập được từ hai loài nghiên cứu

STT	Hợp chất	IC ₅₀ ± SD (µM)	STT	Hợp chất	IC ₅₀ ± SD (µM)
1	PT1	29,78 ± 0,44	9	PH3	149,61 ± 8,52
2	PT2	435,95 ± 5,04	10	PH4	476,12 ± 20,50
3	PT3	338,63 ± 0,14	11	PH5	51,10 ± 0,11
4	PT4	285,15 ± 38,96	12	PH6	28,29 ± 0,06
5	PT5	207,59 ± 0,92	13	PH7	14,46 ± 4,07
6	PT6	59,23 ± 1,33	14	PH8	361,43 ± 20,68
7	PH1	327,71 ± 17,79	15	Berberin clorid	0,54 ± 0,02
8	PH2	83,52 ± 8,11			

Kết quả bảng 3.20 cho thấy hoạt tính ức chế của 14 hợp chất tinh khiết phân lập được từ 2 loài nghiên cứu rất khác nhau với IC₅₀ từ 14,46 – 476,12 µM. Trong đó, hợp chất **PH7** sở hữu hoạt tính ức chế AChE *in vitro* mạnh nhất và hợp chất **PH4** có hoạt tính yếu nhất.

Chương 4. BÀN LUẬN

4.1. Về đặc điểm thực vật

* Về đặc điểm hình thái và định tên khoa học 2 loài nghiên cứu

Để xác định tên khoa học của 2 loài nghiên cứu, đặc điểm hình thái của 2 mẫu tiêu bản nghiên cứu được đối chiếu với thông tin mô tả trong tài liệu tham khảo. Kết quả cho thấy, về cơ bản, đặc điểm hình thái có sự giống nhau giữa loài HVD-002-11 với loài *P. bavinum* C. DC. và giữa loài HVD-004-11 với loài *P. hymenophyllum* Miq. Những điểm giống nhau gồm có: dạng sống; hình dạng, kích thước lá, tron nhẵn hay có lông, số lượng gân lá; kích thước cụm hoa; hình dạng và kích thước lá bắc; hình dạng và kích thước quả. Bên cạnh đó, vẫn có một số điểm khác nhau về đặc điểm hình thái (dù không nhiều) giữa hai cặp loài được so sánh ở

trên gồm khác nhau về: vị trí của gân lá, độ dài cuống lá và độ dài cụm hoa cái. Mặc dù vậy, sự khác nhau này xuất hiện giữa các mẫu tiêu bản của cùng một loài nhưng được thu hái ở những địa điểm khác nhau. Điều này là khá thường gặp bởi đặc điểm hình thái phụ thuộc nhiều vào điều kiện môi trường (khí hậu, thổ nhưỡng) nơi mà thực vật sinh sống.

Kết quả giám định tên khoa học của loài HVD-002-11 được khẳng định thêm khi so sánh tiêu bản mẫu nghiên cứu của loài này với tiêu bản mẫu (mã số: P02030118) được lưu giữ ở bảo tàng thực vật Paris, Pháp. Vì vậy, tên khoa học của loài HVD-002-11 được xác định là *P. bavinum* C. DC. Tuy nhiên, đây chỉ là tên đồng nghĩa và tên được chấp nhận rộng rãi là *P. thomsonii* (C. DC.) Hook. f. var. *thomsonii*. Do đó, mẫu nghiên cứu được giám định lại bằng cách so sánh đặc điểm hình thái của nó với thông tin mô tả và ảnh vẽ của loài *P. thomsonii* (C. DC.) Hook. f. var. *thomsonii* trong tài liệu thực vật chí Trung Quốc. Kết quả cho thấy hầu hết các đặc điểm hình thái giữa loài nghiên cứu và loài đối chiếu là giống nhau. Dựa vào kết quả so sánh này, loài HVD-002-11 được xác định có tên khoa học là *P. thomsonii* (C. DC.) Hook. f. var. *thomsonii* và tên này được sử dụng trong đề tài luận án.

Kết quả giám định tên khoa học của loài HVD-004-11 được khẳng định thêm khi so sánh tiêu bản mẫu của loài này với tiêu bản mẫu (mã số: P02025543) được lưu giữ ở bảo tàng thực vật Paris, Pháp. Vì vậy, tên khoa học của loài HVD-004-11 được xác định là *P. hymenophyllum* Miq. và đây là tên được chấp nhận do đó được sử dụng trong đề tài luận án.

* Về đặc điểm vi học của 2 loài nghiên cứu

Nhìn chung, thông tin về đặc điểm vi học của các loài thuộc chi *Piper* L. còn rất hạn chế so với số lượng loài thực có của chi này. Vì vậy, để có thể sử dụng đặc điểm vi học một cách hiệu quả hơn trong xác định loài, cần có thêm nhiều kết quả nghiên cứu hơn trong tương lai. Hiện tại, nghiên cứu về đặc điểm vi học chủ yếu nhằm góp phần tiêu chuẩn hóa thực vật.

4.2. Về thành phần hóa học

Hiện nay, trong lĩnh vực nghiên cứu hóa thực vật, phương pháp nghiên cứu phân lập hợp chất tự nhiên theo định hướng tác dụng sinh học được sử dụng khá phổ biến. Phương pháp này có ưu điểm là đem lại xác suất thành công cao hơn đồng thời tiết kiệm được chi phí và thời gian nghiên cứu. Áp dụng phương pháp này, dựa trên kết quả sàng lọc tác dụng ức chế AChE *in vitro* của các mẫu cần trong các phân đoạn dung môi khác nhau đã định hướng quá trình nghiên cứu về hóa học của luận án vào 4 phân đoạn gồm: 2 phân đoạn cần trong dung môi *n*-hexan và EtOAc chiết xuất từ loài *Piper thomsonii* (C. DC.) Hook. f. var. *thomsonii* và 2 phân đoạn cần trong dung môi CHCl₃ và EtOAc chiết xuất từ loài *Piper hymenophyllum* Miq. Từ 4 phân đoạn cần được chọn, 14 hợp chất đã được phân lập trong đó có 3 chất mới lần đầu tiên phân lập được từ tự nhiên gồm: **PT1**, **PH1** và **PH2**; 4 hợp chất lần đầu tiên phân lập được từ chi *Piper* L. gồm: **PT3**, **PT4**, **PH3** và **PH6**. Tất cả 14 chất đều là những hợp chất lần đầu tiên được công bố phân lập từ hai loài nghiên cứu.

4.3. Về tác dụng sinh học

Trong quá trình nghiên cứu tìm kiếm hợp chất mới có tác dụng ức chế AChE, ngoài phương pháp *in vitro* còn có hai mô hình khác cũng được sử dụng là mô hình *ex vivo* và mô hình *in vivo*. Việc lựa chọn mô hình nào trong số 3 mô hình kể trên để nghiên cứu phụ

thuộc vào mục đích của từng nghiên cứu. Ở giai đoạn nghiên sàng lọc ban đầu (sàng lọc các mẫu dịch chiết từ thực vật, các hợp chất tổng hợp...) phương pháp *in vitro* được lựa chọn bởi ưu điểm của nó là cho kết quả nhanh, tiến hành đồng thời được nhiều mẫu và ít tốn kém. Ở giai đoạn tiếp theo, khi lựa chọn được mẫu thử có hoạt tính mạnh *in vitro*, những nghiên cứu sâu hơn trên mô hình *ex vivo* hoặc *in vivo* mới được thực hiện. Với hai mô hình sau này, những thông tin thu được là về cơ chế tác dụng, sinh khả dụng và khả năng thấm qua hàng rào máu não của mẫu nghiên cứu. Kết quả của nghiên cứu *ex vivo* và *in vivo* là cơ sở để các nhà khoa học quyết định có hay không tiến hành những thử nghiệm lâm sàng tiếp theo. Ở luận án này, với mục tiêu nghiên cứu sàng lọc đánh giá hoạt tính ức chế của những hợp chất phân lập được từ 2 loài nghiên cứu, phương pháp *in vitro* được chọn để áp dụng.

Kết quả nội dung nghiên cứu về hóa học của luận án là đã phân lập được 14 hợp chất tinh khiết từ hai loài *Piper* L. Tất cả 14 hợp chất này đều được đánh giá hoạt tính ức chế AChE *in vitro*. Trong số 4 hợp chất có hoạt tính ức chế AChE *in vitro* mạnh nhất, không có hợp chất nào thuộc nhóm alkaloid. Kết quả này một lần nữa khẳng định tác dụng ức chế có thể do những liên kết khác được hình thành giữa chất ức chế và AChE chứ không nhất thiết phải là liên kết giữa nguyên tử nitơ của chất ức chế (trung tâm tích điện dương) với trung tâm tích điện âm ở hẻm hoạt tính của AChE. Vì vậy, bên cạnh nhóm alkaloid, các nhóm hợp chất khác như: tinh dầu, flavonoid, alkanpolyenylbenzen, neolignan... cũng có thể sở hữu hoạt tính ức chế AChE *in vitro* ở mức độ khác nhau.

Về liên quan cấu trúc - tác dụng, 3 trong 4 hợp chất có hoạt tính ức chế AChE *in vitro* mạnh nhất gồm các chất **PH5**, **PH6** và **PH7** có điểm chung là trong công thức cấu tạo đều có phần khung 1-allyl-

3,4-dihydroxybenzen. Kết quả này gợi ý rằng khung 1-allyl-3,4-dihydroxybenzen sở hữu tác dụng ức chế AChE *in vitro*.

KẾT LUẬN VÀ KIẾN NGHỊ

KẾT LUẬN

1. Về đặc điểm thực vật của hai loài nghiên cứu

- Đã mô tả chi tiết đặc điểm thực vật của hai loài nghiên cứu thuộc chi *Piper* L. và xác định được tên khoa học của hai loài này là *Piper thomsonii* (C. DC.) Hook. f. var. *thomsonii* (tên đồng nghĩa là *Piper bavinum* C. DC.) và *Piper hymenophyllum* Miq.

- Đã mô tả đặc điểm vi phẫu thân, lá và đặc điểm bột phần trên mặt đất của 2 loài nghiên cứu góp phần tiêu chuẩn hóa hai loài này.

2. Về thành phần hóa học của hai loài nghiên cứu

- Từ bột phần trên mặt đất của loài *Piper thomsonii* (C. DC.) Hook. f. var. *thomsonii* đã phân lập và nhận dạng được 6 hợp chất gồm: 4-(2'-(Z)-decenyl)-phenol; benzyl benzoat; 2-methoxy benzyl benzoat; cucumegastigman I; *trans*-phytol; dihydromyricetin.

- Từ bột phần trên mặt đất của loài *Piper hymenophyllum* Miq. đã phân lập và nhận dạng được 8 hợp chất gồm: 3,5-dimethoxy-4-hydroxycinnamoyl pyrrol; 3,4-dihydroxycinnamyl alcohol methyl ether; *O*-methylmoscatolin; (*E*)-caffeoyl aldehyd; 1-allyl-3,4-dihydroxybenzen; neotaiwanensol A và B; spathulenol.

- Trong số 14 hợp chất phân lập được, có 3 chất gồm: 4-(2'-(Z)-decenyl)-phenol; 3,5-dimethoxy-4-hydroxycinnamoyl pyrrol và 3,4-dihydroxycinnamyl alcohol methyl ether là những chất lần đầu tiên công bố phân lập được từ tự nhiên; 4 chất gồm: 2-methoxy benzyl benzoat, cucumegastigman I, dihydromyricetin và *O*-methylmoscatolin lần đầu tiên phân lập được từ chi *Piper* L. và tất cả 14 chất đều được phân lập lần đầu tiên từ hai loài nghiên cứu.

3. Về triển khai phương pháp và áp dụng để đánh giá hoạt tính ức chế enzym acetylcholinesterase *in vitro* của hai loài nghiên cứu

- Đã xác định được một số điều kiện cho phương pháp đánh giá hoạt tính ức chế AChE *in vitro* gồm: nồng độ dung dịch cơ chất ATCI là 2,4 mM; nồng độ dung dịch thuốc thử DTNB là 2,4 mM; hoạt độ AChE là 0,25 IU/ml; thời điểm đo độ hấp thụ của mẫu thử là sau khi phản ứng xảy ra 15 phút; nồng độ dung môi DMSO trong hỗn hợp phản ứng cuối cùng là 1%.

- Hai phân đoạn dịch chiết trong dung môi *n*-hexan và EtOAc chiết xuất từ loài *Piper thomsonii* (C. DC.) Hook. f. var. *thomsonii* và hai phân đoạn dịch chiết trong dung môi CHCl₃ và EtOAc chiết xuất từ loài *Piper hymenophyllum* Miq. được chọn để nghiên cứu về thành phần hóa học bởi chúng sở hữu hoạt tính ức chế AChE *in vitro* mạnh hơn những phân đoạn dịch chiết trong các dung môi khác được nghiên cứu.

- Đã đánh giá được hoạt tính ức chế AChE *in vitro* của 14 chất tinh khiết phân lập được từ 2 loài nghiên cứu và xác định được hợp chất neotaiwanensol B có hoạt tính mạnh nhất (với IC₅₀ = 14,46 μM).

KIẾN NGHỊ

1. Sử dụng phương pháp đánh giá hoạt tính ức chế enzym acetylcholinesterase *in vitro* của luận án cho những nghiên cứu sàng lọc khác.
2. Dựa trên kết quả dự đoán về liên quan cấu trúc - tác dụng của luận án, triển khai nghiên cứu tổng hợp hóa học dựa trên khung cấu trúc dẫn đường là 1-allyl-3,4-dihydroxybenzen.
3. Tiếp tục nghiên cứu thêm về thành phần hóa học và sàng lọc một số tác dụng sinh học khác của những hợp chất phân lập được từ hai loài nghiên cứu của luận án.

CÁC CÔNG TRÌNH ĐÃ CÔNG BỐ LIÊN QUAN ĐẾN LUẬN ÁN

1. Hoàng Việt Dũng, Đỗ Quyên, Nguyễn Minh Chính, Hà Minh Tâm, Tô Đào Cường (2013), “Nghiên cứu đặc điểm thực vật, đặc điểm vi học và tác dụng ức chế enzym acetylcholinesterase của loài tiêu lá mỏng (*Piper hymenophyllum* Miq., chi *Piper* L., họ Piperaceae)”, *Tạp chí Dược học*, tập 449, số 01/2013, tr. 18-21.
2. Hoàng Việt Dũng, Đỗ Quyên, Nguyễn Minh Chính, Tô Đào Cường, Byung Sun Min (2013), “Nghiên cứu đặc điểm thực vật, đặc điểm vi học và tác dụng ức chế enzym acetylcholinesterase của loài tiêu Ba Vĩ (*Piper bavinum* C. DC., chi *Piper* L., họ Piperaceae)”, *Tạp chí Dược học*, tập 449, số 02/2013, tr. 36-40.
3. Hoàng Việt Dũng, Đỗ Quyên, Nguyễn Minh Chính (2013), “Tổng quan về nhóm hợp chất alkanpolyenylnbenzen phân lập được từ chi *Piper* L., họ Hồ tiêu (Piperaceae)”, *Tạp chí Dược học*, tập 449, số 07/2013, tr. 2-5.
4. Hoàng Việt Dũng, Đỗ Quyên, Nguyễn Minh Chính (2013), “Tổng quan về nhóm hợp chất amid alkaloid phân lập được từ chi *Piper* L., họ Hồ tiêu (Piperaceae), phần 1”, *Tạp chí Dược học*, tập 449, số 09/2013, tr. 6-10.
5. Hoàng Việt Dũng, Đỗ Quyên, Nguyễn Minh Chính (2013), “Tổng quan về nhóm hợp chất amid alkaloid phân lập được từ chi *Piper* L., họ Hồ tiêu (Piperaceae)”, phần 2, *Tạp chí Dược học*, tập 449, số 10/2013, tr. 2-7.
6. Hoang Viet Dung, To Dao Cuong, Nguyen Minh Chinh, Do Quyen, Jeong Su Byeon, Jeong Ah Kim, Mi Hee Woo, Jae Sui Choi, Byung Sun Min (2014), “Cholinesterase inhibitors from the aerial part of *Piper hymenophyllum*”, *Bull. Korean Chem. Soc.*, vol. 35, No. 2, pp. 655-658.