

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)**

LUẬN ÁN TIẾN SĨ DƯỢC HỌC

CHUYÊN NGÀNH: DƯỢC HỌC CỔ TRUYỀN

MÃ SỐ : 62.72.04.06

Người hướng dẫn khoa học: **1. TS. ĐỖ QUYÊN**

2. PGS. TS. NGUYỄN MINH CHÍNH

HÀ NỘI 2014

LỜI CAM ĐOAN

Tôi xin cam đoan Luận án này là công trình khoa học của riêng tôi dưới sự hướng dẫn của **TS. Đỗ Quyên** và **PGS. TS. Nguyễn Minh Chính**.

Các số liệu, kết quả được trình bày trong luận án là trung thực, khách quan và chưa từng được ai công bố trong bất kỳ công trình nào khác.

Tác giả thực hiện luận án

Hoàng Việt Dũng

LỜI CẢM ƠN

Trong quá trình thực hiện luận án, tôi đã nhận được rất nhiều sự giúp đỡ quý báu của các thầy cô, các nhà khoa học cùng đồng nghiệp và bạn bè công tác tại nhiều cơ quan và đơn vị khác nhau.

Đầu tiên, tôi xin được gửi lời cảm ơn chân thành nhất đến **TS. Đỗ Quyên** và **PGS. TS. Nguyễn Minh Chính**, hai người thầy luôn tận tình hướng dẫn và tạo mọi điều kiện giúp đỡ tôi trong suốt quá trình thực hiện luận án này.

Trong quá trình thực hiện luận án, tôi đã luôn nhận được sự phối hợp và giúp đỡ của các cá nhân ở nhiều cơ quan và đơn vị khác nhau. Tôi xin chân thành cảm ơn các thầy cô, các anh chị đồng nghiệp và bạn bè công tác tại Bộ môn Dược liệu và Bộ môn Thực vật - 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.

Tôi xin gửi lời cảm ơn đến Đảng ủy, Ban Giám hiệu, Phòng Đào tạo Sau Đại học - Trường Đại học Dược Hà Nội; Đảng ủy, Ban Giám đốc - Học viện Quân y cùng các bộ môn và phòng ban chức năng của hai cơ quan đã luôn tạo điều kiện thuận lợi cho tôi trong quá trình học tập và thực hiện luận án.

Cuối cùng, tôi xin gửi lời cảm ơn tới gia đình, người thân và bạn bè, những người đã luôn ở bên, động viên và giúp đỡ tôi vượt qua những khó khăn trong quá trình học tập và nghiên cứu.

Xin trân trọng cảm ơn tất cả những giúp đỡ quý báu này!

Hoàng Việt Dũng

MỤC LỤC

DANH MỤC CÁC KÝ HIỆU, CHỮ VIẾT TẮT

DANH MỤC CÁC BẢNG

DANH MỤC CÁC HÌNH

ĐẶT VẤN ĐỀ	1
CHƯƠNG 1. TỔNG QUAN.....	3
1.1. Tổng quan về chi <i>Piper</i> L.....	3
1.1.1. Vị trí phân loại, phân bố và đặc điểm thực vật của chi <i>Piper</i> L.	3
1.1.1.1. Vị trí phân loại chi <i>Piper</i> L.....	3
1.1.1.2. Đặc điểm phân bố chi <i>Piper</i> L. trên thế giới và ở Việt Nam	3
1.1.1.3. Đặc điểm thực vật chi <i>Piper</i> L.	5
1.1.1.4. Danh lục các loài thuộc chi <i>Piper</i> L. ở Việt Nam.....	7
1.1.2. Thành phần hóa học	9
1.1.2.1. Nghiên cứu trên thế giới	9
1.1.2.2. Nghiên cứu trong nước	23
1.1.3. Công dụng, tác dụng sinh học và độc tính của chi <i>Piper</i> L.....	24
1.1.3.1. Công dụng của chi <i>Piper</i> L.....	24
1.1.3.2. Tác dụng sinh học và độc tính của chi <i>Piper</i> L.	27
1.2. Tổng quan về nghiên cứu sàng lọc hoạt tính ức chế enzym	
acetylcholinesterase in vitro.....	36
1.2.1. Acetylcholin, enzym acetylcholinesterase và giả thuyết về vai trò của	
hệ cholinergic đối với bệnh Alzheimer	36
1.2.1.1. Acetylcholin.....	36
1.2.1.2. Enzym acetylcholinesterase	37
1.2.1.3. Giả thuyết về vai trò của hệ cholinergic đối với bệnh Alzheimer...	38
1.2.2. Một số phương pháp thường dùng trong nghiên cứu sàng lọc hoạt	
tính ức chế enzym acetylcholinesterase in vitro	38
1.2.2.1. Phương pháp sử dụng thuốc thử Ellman	38
1.2.2.2. Phương pháp sử dụng thuốc thử muối Fast Blue B.....	40

CHƯƠNG 2. NGUYÊN VẬT LIỆU, TRANG THIẾT BỊ VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU.....	44
2.1. Nguyên vật liệu	44
2.1.1. <i>Mẫu nghiên cứu</i>	<i>44</i>
2.1.2. <i>Hóa chất, dung môi</i>	<i>44</i>
2.1.3. <i>Máy móc, thiết bị và dụng cụ</i>	<i>44</i>
2.2. Phương pháp nghiên cứu	45
2.2.1. <i>Phân tích đặc điểm thực vật.....</i>	<i>45</i>
2.2.2. <i>Nghiên cứu thành phần hóa học</i>	<i>46</i>
2.2.2.1. <i>Phương pháp chiết xuất và phân lập hợp chất</i>	<i>46</i>
2.2.2.2. <i>Phương pháp xác định cấu trúc hợp chất phân lập được.....</i>	<i>48</i>
2.2.3. <i>Phương pháp đánh giá hoạt tính ức chế enzym acetylcholinesterase in vitro</i>	<i>48</i>
2.2.3.1. <i>Triển khai phương pháp đánh giá hoạt tính ức chế enzym acetylcholinesterase in vitro</i>	<i>48</i>
2.2.3.2. <i>Đánh giá hoạt tính ức chế enzym acetylcholinesterase in vitro của hai loài nghiên cứu.....</i>	<i>544</i>
2.3. Xử lý số liệu.....	555
2.4. Địa điểm thực hiện	555
CHƯƠNG 3. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU.....	566
3.1. Kết quả nghiên cứu về thực vật	56
3.1.1. <i>Kết quả nghiên cứu về thực vật của loài HVD-002-11.....</i>	<i>56</i>
3.1.1.1. <i>Đặc điểm hình thái và định tên khoa học loài HVD-002-11</i>	<i>56</i>
3.1.1.2. <i>Đặc điểm vi phẫu của loài Piper thomsonii (C. DC.) Hook. f. var. thomsonii</i>	<i>57</i>
3.1.1.3. <i>Đặc điểm bột phấn trên mặt đất của loài Piper thomsonii (C. DC.) Hook. f. var. thomsonii.....</i>	<i>59</i>
3.1.2. <i>Kết quả nghiên cứu về thực vật của loài HVD-004-11.....</i>	<i>61</i>
3.1.2.1. <i>Đặc điểm hình thái và định tên khoa học loài HVD-004-11</i>	<i>61</i>
3.1.2.2. <i>Đặc điểm vi phẫu của loài Piper hymenophyllum Miq.</i>	<i>62</i>
3.1.2.3. <i>Đặc điểm bột phấn trên mặt đất của loài Piper hymenophyllum Miq....</i>	<i>64</i>
3.2. Kết quả nghiên cứu về hóa học	66

3.2.1. Kết quả nghiên cứu thành phần hóa học của loài <i>Piper thomsonii</i> (C. DC.) Hook. f. var. <i>thomsonii</i>	66
3.2.1.1. Kết quả chiết xuất và phân lập hợp chất từ loài <i>Piper thomsonii</i> (C. DC.) Hook. f. var. <i>thomsonii</i>	66
3.2.1.2. Kết quả nhận dạng hợp chất phân lập được từ loài <i>Piper thomsonii</i> (C. DC.) Hook. f. var. <i>thomsonii</i>	71
3.2.2. Kết quả nghiên cứu thành phần hóa học của loài <i>Piper hymenophyllum</i> Miq.	82
3.2.2.1. Kết quả chiết xuất và phân lập hợp chất từ loài <i>Piper hymenophyllum</i> Miq.....	82
3.2.2.2. Kết quả nhận dạng hợp chất phân lập được từ loài <i>Piper hymenophyllum</i> Miq.....	85
3.3. Kết quả triển khai phương pháp và áp dụng để đánh giá hoạt tính ức chế enzym acetylcholinesterase <i>in vitro</i> của hai loài nghiên cứu	102
3.3.1. Triển khai phương pháp đánh giá hoạt tính ức chế enzym acetylcholinesterase <i>in vitro</i>	102
3.3.2. Kết quả đánh giá hoạt tính ức chế enzym acetylcholinesterase <i>in vitro</i> của hai loài nghiên cứu.....	107
3.3.2.1. Hoạt tính ức chế enzym acetylcholinesterase <i>in vitro</i> của các mẫu căn chiết xuất từ hai loài nghiên cứu.....	107
3.3.2.2. Hoạt tính ức chế enzym acetylcholinesterase <i>in vitro</i> của các chất phân lập được từ hai loài nghiên cứu	109
CHƯƠNG 4. BÀN LUẬN	111
4.1. Về đặc điểm thực vật	111
4.1.1. Đặc điểm hình thái và xác định tên khoa học của hai loài nghiên cứu	111
4.1.2. Đặc điểm vi học của hai loài nghiên cứu	113
4.2. Về thành phần hóa học	115
4.3. Về nghiên cứu đánh giá hoạt tính ức chế enzym acetylcholinesterase <i>in vitro</i>	121
4.3.1. Về triển khai phương pháp đánh giá hoạt tính ức chế enzym acetylcholinesterase <i>in vitro</i>	121

<i>4.3.2. Về kết quả đánh giá hoạt tính ức chế enzym acetylcholinesterase in vitro của các mẫu thử được chiết xuất và phân lập từ hai loài nghiên cứu</i>	<i>124</i>
KẾT LUẬN VÀ KIẾN NGHỊ	127
KẾT LUẬN.....	127
KIẾN NGHỊ.....	128
CÁC CÔNG TRÌNH ĐÃ CÔNG BỐ LIÊN QUAN ĐẾN LUẬN ÁN	
TÀI LIỆU THAM KHẢO	
PHỤ LỤC	

DANH MỤC CÁC KÝ HIỆU, CHỮ VIẾT TẮT

A	Độ hấp thụ (Absorbance)
ABTS	2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid)
ACh	Acetylcholin
AChE	Enzym acetylcholinesterase
ATCI	Acetylthiocholin iodid
<i>br</i>	Rộng (broad)
BuOH	Buthanol
¹³C-NMR	Cộng hưởng từ hạt nhân cacbon 13 (Carbon-13 Nuclear Magnetic Resonance)
CC	Sắc ký cột (Column chromatography)
COSY	Correlation spectroscopy
<i>d</i>	Tín hiệu đôi (doublet)
<i>dd</i>	Doublet of doublet
<i>dt</i>	Doublet of triplet
DEPT	Distortionless enhancement by polarisation transfer
DMSO	Dimethylsulfoxid
DPPH	2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl
DTNB	Acid 5-5'-dithiobis-2-nitrobenzoic
EI	Ion hóa điện tử (Electro Ionization)
ESI	Ion hóa phun mù điện tử (Electro Spray Ionization)
EtOAc	Ethylacetat
FAB	Fast Atom Bombardment
HMBC	Heteronuclear Multiple Bond Correlation
HPLC	Sắc ký lỏng hiệu năng cao (High Performance Liquid Chromatography)
HR	Phân giải cao (High Resolution)
HSQC	Heteronuclear Single Quantum Coherence
¹H-NMR	Cộng hưởng từ hạt nhân proton (Proton Nuclear Magnetic Resonance)
IC₅₀	Nồng độ ức chế 50% (Inhibitory Concentration 50%)
IU	Đơn vị quốc tế (International Unit)

I%	Phần trăm hoạt tính enzym bị ức chế
J	Hằng số tương tác
LD₅₀	Liều gây chết 50% (Lethal Dose 50%)
M	Đa tín hiệu (multiple)
MPLC	Sắc ký lỏng áp suất trung bình (Medium Pressure Liquid Chromatography)
MeOH	Methanol
MIC	Nồng độ ức chế tối thiểu (Minimum Inhibitory Concentration)
MS	Phổ khối lượng (Mass Spectroscopy)
mult.	Độ bội tín hiệu (multiplicity)
m/z	Khối lượng/điện tích ion
NMR	Cộng hưởng từ hạt nhân (Nuclear Magnetic Resonance)
NST	Nhiễm sắc thể
Nxb.	Nhà xuất bản
ODS	Octadecylsilyl
P.	<i>Piper</i>
PAF	Yếu tố hoạt hóa tiểu cầu (Platelet-activating factor)
PHM	Cẩn trong phân đoạn dung môi methanol chiết xuất từ loài <i>Piper hymenophyllum</i> Miq.
PHH	Cẩn trong phân đoạn dung môi <i>n</i> -hexan chiết xuất từ loài <i>Piper hymenophyllum</i> Miq.
PHC	Cẩn trong phân đoạn dung môi cloroform chiết xuất từ loài <i>Piper hymenophyllum</i> Miq.
PHE	Cẩn trong phân đoạn dung môi ethylacetat chiết xuất từ loài <i>Piper hymenophyllum</i> Miq.
PHB	Cẩn trong phân đoạn dung môi <i>n</i> -butanol chiết xuất từ loài <i>Piper hymenophyllum</i> Miq.
PHN	Cẩn trong phân đoạn dung môi nước chiết xuất từ loài <i>Piper hymenophyllum</i> Miq.
PHPLC	Sắc ký lỏng hiệu năng cao điều chế (Preparative High Performance Liquid Chromatography)

pp.	Trang (page)
PTM	Cẩn trong phân đoạn dung môi methanol chiết xuất từ loài <i>Piper thomsonii</i> (C. DC.) Hook. f. var. <i>thomsonii</i>
PTH	Cẩn trong phân đoạn dung môi <i>n</i> -hexan chiết xuất từ loài <i>Piper thomsonii</i> (C. DC.) Hook. f. var. <i>thomsonii</i>
PTC	Cẩn trong phân đoạn dung môi cloroform chiết xuất từ loài <i>Piper thomsonii</i> (C. DC.) Hook. f. var. <i>thomsonii</i>
PTE	Cẩn trong phân đoạn dung môi ethylacetat chiết xuất từ loài <i>Piper thomsonii</i> (C. DC.) Hook. f. var. <i>thomsonii</i>
PTB	Cẩn trong phân đoạn dung môi <i>n</i> -butanol chiết xuất từ loài <i>Piper thomsonii</i> (C. DC.) Hook. f. var. <i>thomsonii</i>
PTN	Cẩn trong phân đoạn dung môi nước chiết xuất từ loài <i>Piper thomsonii</i> (C. DC.) Hook. f. var. <i>thomsonii</i>
PTLC	Sắc ký lớp mỏng điều chế (Preparative Thin Layer Chromatography)
RSD	Độ lệch chuẩn tương đối (Relative Standard Deviation)
s	Tín hiệu đơn (single)
SD	Độ lệch chuẩn (Standard Deviation)
STT	Số thứ tự
t	Tín hiệu ba (triplet)
TLC	Sắc ký lớp mỏng (Thin Layer Chromatography)
TLCT	Trọng lượng cơ thể
TLTK	Tài liệu tham khảo
$\bar{X}$	Giá trị trung bình
δ	Độ dịch chuyển hóa học

DANH MỤC CÁC BẢNG

STT	Tên bảng	Trang
Bảng 1.1	Đặc điểm phân bố các loài thuộc chi <i>Piper</i> L. ở một số nước trên thế giới	4
Bảng 1.2	Đặc điểm số lượng nhiễm sắc thể của một số loài thuộc chi <i>Piper</i> L.	7
Bảng 1.3	Danh lục các loài thuộc chi <i>Piper</i> L. ở Việt Nam	7
Bảng 1.4	Một số alkaloid có khung piperidin phân lập được từ chi <i>Piper</i> L.	11
Bảng 1.5	Một số alkaloid có khung Δ^3 -piperidin-2-on phân lập được từ chi <i>Piper</i> L.	11
Bảng 1.6	Một số alkaloid có khung pyrrolidin phân lập được từ chi <i>Piper</i> L.	12
Bảng 1.7	Một số alkaloid có khung aporphin phân lập được từ chi <i>Piper</i> L.	13
Bảng 1.8	Một số alkaloid có khung piperolactam phân lập được từ chi <i>Piper</i> L.	14
Bảng 1.9	Một số alkaloid không có dị vòng nitơ phân lập được từ chi <i>Piper</i> L.	16
Bảng 1.10	Một số alkaloid khác phân lập được từ chi <i>Piper</i> L.	16
Bảng 1.11	Một số cấu tử tinh dầu phân lập được từ chi <i>Piper</i> L.	18
Bảng 1.12	Một số hợp chất thuộc nhóm flavonoid phân lập được từ chi <i>Piper</i> L.	20
Bảng 1.13	Một số hợp chất ankanpolyenylbenzen phân lập được từ chi <i>Piper</i> L.	21
Bảng 1.14	Một số kết quả nghiên cứu trong nước về thành phần hóa học của chi <i>Piper</i> L.	23
Bảng 1.15	Một số loài thuộc chi <i>Piper</i> L. được dùng để chữa bệnh theo kinh nghiệm dân gian trên thế giới	25
Bảng 1.16	Một số loài thuộc chi <i>Piper</i> L. được dùng để chữa bệnh theo kinh nghiệm dân gian ở Việt Nam	26
Bảng 1.17	Một số chất có tác dụng chống kết tập tiểu cầu được phân lập từ chi <i>Piper</i> L.	29
Bảng 1.18	Một số chất có tác dụng chống oxy hóa được phân lập từ chi <i>Piper</i> L.	29
Bảng 1.19	Một số chất có tác dụng kháng nấm được phân lập từ chi <i>Piper</i> L.	31

STT	Tên bảng	Trang
Bảng 1.20	Kết quả đánh giá tính an toàn của một số loài thuộc chi <i>Piper</i> L.	33
Bảng 2.1	Khảo sát ảnh hưởng của nồng độ dung dịch cơ chất và thuốc thử đến phương pháp thử	52
Bảng 2.2	Khảo sát ảnh hưởng của hoạt độ AChE đến phương pháp thử	53
Bảng 2.3	Thành phần phối hợp để khảo sát ảnh hưởng của nồng độ dung môi DMSO trong hỗn hợp phản ứng đến hoạt tính của AChE	53
Bảng 3.1	Số liệu phổ NMR của hợp chất PT1	72
Bảng 3.2	Số liệu phổ NMR của hợp chất PT2	74
Bảng 3.3	Số liệu phổ NMR của hợp chất PT3	76
Bảng 3.4	Số liệu phổ NMR của hợp chất PT4	78
Bảng 3.5	Số liệu phổ NMR của hợp chất PT5	79
Bảng 3.6	Số liệu phổ NMR của hợp chất PT6	81
Bảng 3.7	Số liệu phổ NMR của hợp chất PH1	88
Bảng 3.8	Số liệu phổ NMR của hợp chất PH2	90
Bảng 3.9	Số liệu phổ NMR của hợp chất PH3	92
Bảng 3.10	Số liệu phổ NMR của hợp chất PH4	94
Bảng 3.11	Số liệu phổ NMR của hợp chất PH5	95
Bảng 3.12	Số liệu phổ NMR của hợp chất PH6	97
Bảng 3.13	Số liệu phổ NMR của hợp chất PH7	99
Bảng 3.14	Số liệu phổ NMR của hợp chất PH8	101
Bảng 3.15	Ảnh hưởng của nồng độ dung dịch cơ chất và thuốc thử đến phương pháp thử	103
Bảng 3.16	Ảnh hưởng của nồng độ dung môi DMSO trong hỗn hợp phản ứng đến hoạt tính của AChE	105
Bảng 3.17	Thành phần của hỗn hợp phản ứng được xác định	106
Bảng 3.18	Hoạt tính ức chế AChE <i>in vitro</i> của những mẫu căn chiết xuất từ loài <i>Piper thomsonii</i> (C. DC.) Hook. f. var. <i>thomsonii</i>	108
Bảng 3.19	Hoạt tính ức chế AChE <i>in vitro</i> của những mẫu căn chiết xuất từ loài <i>Piper hymenophyllum</i> Miq.	108
Bảng 3.20	Hoạt tính ức chế AChE <i>in vitro</i> của những hợp chất tinh khiết phân lập được từ hai loài nghiên cứu	109

STT	Tên bảng	Trang
Bảng 4.1	Những hợp chất được phân lập và nhận dạng cấu trúc từ loài <i>Piper thomsonii</i> (C. DC.) Hook. f. var. <i>thomsonii</i>	116
Bảng 4.2	Những hợp chất được phân lập và nhận dạng cấu trúc từ loài <i>Piper hymenophyllum</i> Miq.	117
Bảng 4.3	Ba hợp chất phân lập được từ loài <i>Piper hymenophyllum</i> Miq. có hoạt tính ức chế enzym acetylcholinesterase <i>in vitro</i> mạnh nhất	125

DANH MỤC CÁC HÌNH

STT	Tên hình	Trang
Hình 1.1	Đặc điểm phân bố các loài thuộc chi <i>Piper</i> L. trên thế giới	4
Hình 1.2	Công thức tổng quát của nhóm alkaloid có khung piperidin	10
Hình 1.3	Công thức tổng quát của nhóm alkaloid có khung Δ^3 -piperidin-2-on	11
Hình 1.4	Công thức tổng quát của nhóm alkaloid có khung pyrrolidin	12
Hình 1.5	Công thức tổng quát của nhóm alkaloid có khung aporphin	13
Hình 1.6	Công thức tổng quát của nhóm alkaloid có khung piperolactam	14
Hình 1.7	Công thức tổng quát của nhóm alkaloid không có dị vòng nitơ	15
Hình 1.8	Một số khung cấu tạo chính của thành phần tinh dầu phân lập được từ chi <i>Piper</i> L.	17
Hình 1.9	Công thức cấu tạo của khung chalcon (A), dihydrochalcon (B), flavanon (C) và flavon (D)	19
Hình 1.10	Công thức cấu tạo của khung alkanpolyenylbenzen	20
Hình 1.11	Các vị trí hoạt động tại hẻm của AChE	37
Hình 1.12	Bản BTLC của dịch chiết loài <i>Corydalis</i> sp được hiện màu bằng thuốc thử Ellman	40
Hình 1.13	Bản BTLC của các vết có lượng Physostigmin từ 10^{-5} đến 10^{-1} μ g được hiện màu bằng thuốc thử muối Fast Blue B	41
Hình 2.1	Quá trình phản ứng diễn ra trong phương pháp đo quang sử dụng thuốc thử Ellman	49
Hình 3.1	Đặc điểm hình thái của loài <i>Piper thomsonii</i> (C. DC.) Hook. f. var. <i>thomsonii</i>	57
Hình 3.2	Ảnh vi phẫu thân của loài <i>Piper thomsonii</i> (C. DC.) Hook. f. var. <i>thomsonii</i>	58
Hình 3.3	Ảnh vi phẫu lá của loài <i>Piper thomsonii</i> (C. DC.) Hook. f. var. <i>thomsonii</i>	59
Hình 3.4	Đặc điểm bột phần trên mặt đất của loài <i>Piper thomsonii</i> (C. DC.) Hook. f. var. <i>thomsonii</i>	60
Hình 3.5	Đặc điểm hình thái của loài <i>Piper hymenophyllum</i> Miq.	62

STT	Tên hình	Trang
Hình 3.6	Ảnh vi phẫu thân của loài <i>Piper hymenophyllum</i> Miq.	63
Hình 3.7	Ảnh vi phẫu lá của loài <i>Piper hymenophyllum</i> Miq.	64
Hình 3.8	Đặc điểm bột phấn trên mặt đất của loài <i>Piper hymenophyllum</i> Miq.	65
Hình 3.9	Sơ đồ phân lập hợp chất từ căn <i>n</i> -hexan của loài <i>Piper thomsonii</i> (C. DC.) Hook. f. var. <i>thomsonii</i>	69
Hình 3.10	Sơ đồ phân lập hợp chất từ căn ethylacetat của loài <i>Piper thomsonii</i> (C. DC.) Hook. f. var. <i>thomsonii</i>	70
Hình 3.11	Cấu trúc hóa học của hợp chất PT1 và gibbilimbol B (PT1a)	71
Hình 3.12	Các tương tác HMBC và COSY chính của hợp chất PT1	72
Hình 3.13	Cấu trúc hóa học của hợp chất PT2	73
Hình 3.14	Các tương tác HMBC chính của hợp chất PT2	74
Hình 3.15	Cấu trúc hóa học của hợp chất PT3	75
Hình 3.16	Các tương tác HMBC chính của hợp chất PT3	76
Hình 3.17	Cấu trúc hóa học của hợp chất PT4	77
Hình 3.18	Các tương tác HMBC và COSY chính của hợp chất PT4	78
Hình 3.19	Cấu trúc hóa học của hợp chất PT5	78
Hình 3.20	Các tương tác HMBC chính của hợp chất PT5	79
Hình 3.21	Cấu trúc hóa học của hợp chất PT6	80
Hình 3.22	Các tương tác HMBC chính của hợp chất PT6	81
Hình 3.23	Sơ đồ phân lập hợp chất từ căn cloroform của loài <i>Piper hymenophyllum</i> Miq.	85
Hình 3.24	Sơ đồ phân lập hợp chất từ căn ethylacetat của loài <i>Piper hymenophyllum</i> Miq.	86
Hình 3.25	Cấu trúc hóa học của hợp chất PH1 và hợp chất tham khảo PH1a	87
Hình 3.26	Các tương tác HMBC và COSY chính của hợp chất PH1	88
Hình 3.27	Cấu trúc hóa học của hợp chất PH2 và hợp chất tham khảo PH2a	89
Hình 3.28	Các tương tác HMBC và COSY chính của hợp chất PH2	90
Hình 3.29	Cấu trúc hóa học của hợp chất PH3	91
Hình 3.30	Các tương tác HMBC và COSY chính của hợp chất PH3	92
Hình 3.31	Cấu trúc hóa học của hợp chất PH4	93
Hình 3.32	Cấu trúc hóa học của hợp chất PH5	94

STT	Tên hình	Trang
Hình 3.33	Cấu trúc hóa học của hợp chất PH6	96
Hình 3.34	Các tương tác HMBC và COSY chính của hợp chất PH6	97
Hình 3.35	Cấu trúc hóa học của hợp chất PH7	98
Hình 3.36	Các tương tác HMBC và COSY chính của hợp chất PH7	99
Hình 3.37	Cấu trúc hóa học của hợp chất PH8	100
Hình 3.38	Đồ thị biểu diễn sự tương quan giữa độ hấp thụ và thời gian của các hỗn hợp phản ứng ở 3 mức hoạt độ AChE khảo sát	104
Hình 3.39	Sơ đồ quy trình thử nghiệm hoạt tính ức chế AChE <i>in vitro</i>	107

ĐẶT VẤN ĐỀ

Nghiên cứu phát triển thuốc mới là một quá trình gian nan, tốn nhiều thời gian và chi phí bởi quá trình này phải trải qua nhiều giai đoạn. Mặc dù có nhiều hướng tiếp cận vấn đề nghiên cứu khác nhau nhưng quá trình nghiên cứu thường được bắt đầu với việc đánh giá hoạt tính của một lượng lớn các mẫu dược liệu hoặc hợp chất. Giai đoạn này mang tính định hướng và được gọi là giai đoạn nghiên cứu sàng lọc. Ở giai đoạn này, phương pháp thử *in vitro* được ưu tiên sử dụng bởi có ưu điểm là tiến hành đồng thời nhiều mẫu, lượng mẫu cần cho thử nghiệm ít, cho kết quả nhanh và chi phí thấp. Mặc dù vậy, để có thể xây dựng được một phương pháp thử *in vitro* thì đích phân tử của bệnh (thụ thể, enzym, protein) phải được xác định.

Acetylcholinesterase (AChE) là enzym có mặt ở khe synap của hệ thần kinh trung ương và có vai trò duy trì sự ổn định nồng độ của chất dẫn truyền thần kinh acetylcholin [10]. Với việc Whitehouse lần đầu tiên đưa ra giả thuyết về vai trò của hệ cholinergic đối với bệnh Alzheimer vào năm 1982, AChE cũng được xác định là một trong những đích phân tử đối với bệnh này. 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 các nghiên cứu sàng lọc tác dụng ức chế AChE *in vitro* của dược liệu và hợp chất hiện nay. Đây cũng là hướng nghiên cứu thu hút được sự quan tâm của nhiều nhà khoa học trên thế giới bởi 2 trong số 5 thuốc được sử dụng phổ biến để điều trị bệnh Alzheimer hiện nay là Galanthamin và Huperzin A đều có tác dụng ức chế AChE và có nguồn gốc thực vật [61], [88].

Gần đây, kết quả nghiên cứu sàng lọc dược liệu cho thấy dịch chiết của một số loài thuộc chi *Piper* L. như: *P. lolot* C. DC., *P. betle* L., *P. nigrum* L... có tác dụng ức chế AChE *in vitro* [17], [63]. Trong một vài nghiên cứu khác, hợp

chất piperin (alcaloid phổ biến nhất có mặt trong chi *Piper* L.) thể hiện tác dụng ức chế AChE trên thử nghiệm *ex vivo* và tác dụng cải thiện trí nhớ trên thử nghiệm *in vivo* [38], [143]. Bên cạnh đó, tiềm năng nghiên cứu về chi *Piper* L. là khá lớn bởi có hơn 1.000 loài thuộc chi này phân bố trên thế giới. Chỉ riêng ở Việt Nam, số loài thuộc chi *Piper* L. là 46 [5], [16].

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)”** với 3 mục tiêu sau:

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.

Chương 1. TỔNG QUAN

1.1. Tổng quan về chi *Piper* L.

1.1.1. Vị trí phân loại, phân bố và đặc điểm thực vật của chi *Piper* L.

1.1.1.1. Vị trí phân loại chi *Piper* L.

Theo hệ thống phân loại thực vật của 3 tác giả gồm: Hutchinson (1974) [6], Cronquist A. (1988) [40] và Takhtajan (2009) [26], chi Hồ tiêu (*Piper* L.) được xếp nằm trong họ Hồ tiêu (Piperaceae), thuộc bộ Hồ tiêu (Piperales), phân lớp Ngọc Lan (Magnoliidae), lớp Ngọc Lan (Magnoliopsida), ngành Ngọc Lan (Magnoliophyta).

Trên thế giới, họ Hồ tiêu (Piperaceae) có khoảng 2.000 – 3.000 loài [1], [7], [37]. Sự phân nhóm đối với các loài và chi của họ này cho đến nay vẫn chưa đạt được sự thống nhất. Tác giả Miquel (1843-1844) chia họ này thành hai nhóm là *Piperae* gồm 15 chi với 304 loài và *Peperomeae* có 5 chi với 209 loài. De Candolle (1869) xác định họ này gồm 2 chi *Piper* và *Peperomia* với trên 1.000 loài. Theo Rendle (1956), họ Hồ tiêu gồm 2 chi lớn là *Piper* với trên 700 loài và *Peperomia* với trên 600 loài, ngoài ra, còn thêm 7 chi nhỏ khác. Tuy nhiên, theo Lawrence (1957), họ này có 10 – 12 chi với 2 chi lớn là *Piper* và *Peperomia*. Tác giả Burger (1977) cũng đưa ra kết luận tương tự [70]. Theo phân loại của Takhtajan (2009), họ Piperaceae gồm có 7 chi [26].

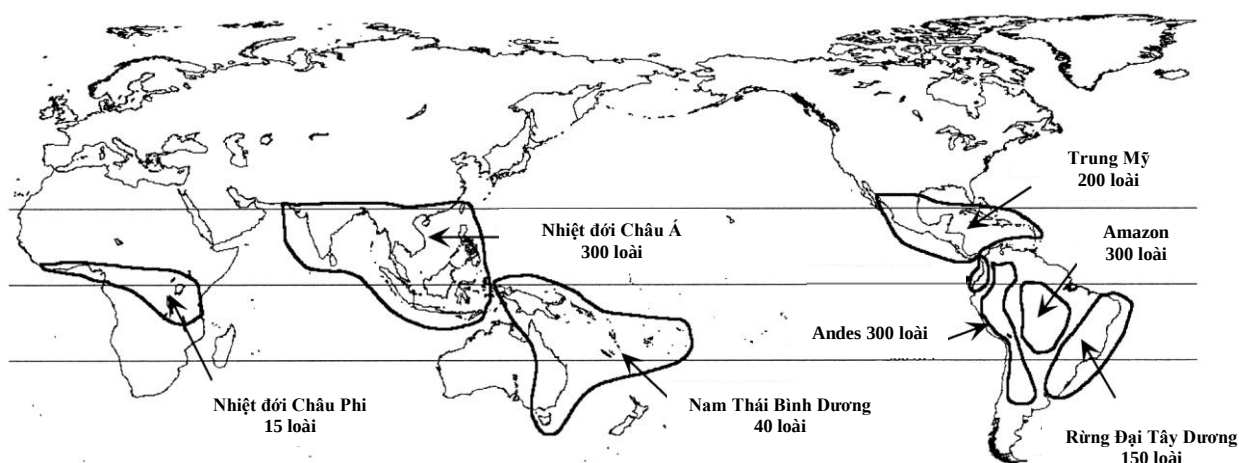
Theo hai tác giả Phạm Hoàng Hộ và Nguyễn Kim Đào, họ Hồ tiêu phân bố ở Việt Nam có 5 chi gồm: *Peperomia*, *Zippelis*, *Circaeocarpus*, *Piper*, *Lepianthes*, trong đó, chi *Piper* L. có 46 loài [5], [16].

1.1.1.2. Đặc điểm phân bố chi *Piper* L. trên thế giới và ở Việt Nam

* Trên thế giới

Chi *Piper* L. là một thành viên của gia đình họ Hồ tiêu (Piperaceae). Với số lượng trên 1.000 loài, chi *Piper* L. là một trong những chi lớn nhất trong ngành thực vật hạt kín. Chi này phân bố chủ yếu ở khu vực nhiệt đới và cận

nhật đới, tại các vùng núi hoặc ở tầng cây thấp của các khu rừng ẩm nhưng cũng có thể mọc ở những khoảng đất trống, mọc ven sông suối, ven đường hoặc gần khu dân cư [31], [67]. Hầu hết các loài thuộc chi *Piper* L. phân bố ở độ cao dưới 2.500 m, chỉ một số ít loài phân bố ở độ cao trên 3.000 m. Các loài thuộc chi này có thể phân bố mang tính đặc hữu vùng hoặc phân bố rộng rãi. Đặc điểm phân bố các loài thuộc chi *Piper* L. trên thế giới được thấy rõ hơn ở hình 1.1 và bảng 1.1.



Hình 1.1. Đặc điểm phân bố các loài thuộc chi *Piper* L. trên thế giới [67]

Bảng 1.1. Đặc điểm phân bố các loài thuộc chi *Piper* L. ở một số nước trên thế giới

STT	Phân bố	Số lượng loài	TLTK
1	Ấn Độ	45	[60]
2	Brazil	330	[49]
3	Ecuador	100	[119]
4	Honduras	45	[28]
5	Hồng Kông	6	[144]
6	Thái Lan	38	[31]
7	Trung Quốc	60	[37]

Hình 1.1 cho thấy khu vực nhiệt đới Châu Mỹ (gồm Trung và Nam Mỹ) có sự phân bố đa dạng nhất của các loài thuộc chi *Piper* L. và tập trung chủ yếu ở một số trung tâm đa dạng sinh học như: vùng rừng nhiệt đới Amazon (300 loài), vùng núi Andes (200 loài), khu vực Trung Mỹ (200 loài). Đứng thứ hai về sự đa dạng loài thuộc chi *Piper* L. trên thế giới là khu vực Châu Á với số lượng khoảng 300

loài và nơi có ít loài *Piper* L. phân bố nhất là vùng nhiệt đới Châu Phi với chỉ khoảng 15 loài.

** Ở Việt Nam*

Theo hai tác giả Phạm Hoàng Hộ và Nguyễn Kim Đào, ở nước ta có 46 loài thuộc chi *Piper* L., trong đó, có hai loài phân bố rộng khắp cả nước gồm: *P. betle* L. (trầu không), *P. lolot* C. DC. (lá lốt) và một loài được trồng phổ biến ở các tỉnh phía Nam là *P. nigrum* L. (hồ tiêu). Tây Nguyên là vùng có nhiều loài thuộc chi *Piper* L. phân bố nhất với trên 15 loài. Một số vùng khác cũng thấy có sự xuất hiện của khá nhiều loài thuộc chi này là Vườn Quốc gia Cúc Phương (Ninh Bình) và Vườn quốc gia Ba Vì (Hà Nội), đây cũng chính là hai trong số những trung tâm đa dạng sinh học của nước ta. Các loài thuộc chi *Piper* L. ở nước ta thường mọc trong rừng ẩm ở độ cao từ 150 – 1.500 m, thường gặp ở độ cao 600 – 1.000 m, cá biệt có loài gặp ở độ cao trên 1.700 m. Một số ít loài phân bố ở gần khu vực dân cư sinh sống, ven rừng, ven đường [5], [16].

1.1.1.3. Đặc điểm thực vật chi Piper L.

- Dạng sống: cây bụi với những nhánh thẳng đứng hoặc trải rộng, cây leo với rễ mọc ở đốt, bám vào thân cây khác; đôi khi có dạng thân thảo bò trên mặt đất hoặc sống bì sinh; hiếm khi có dạng cây gỗ nhỏ và thường có mùi [5], [135].

- Lá: đơn, mép nguyên; mọc đối hoặc mọc cách; có thể có hoặc không có lá kèm (rụng sớm để lại sẹo ở mấu khá rõ). Lá rất khác nhau về hình dạng và kích thước giữa các loài. Lá có các dạng: hình mác, hình trứng, hình tim, hình elip... Trên cùng một cây có thể có nhiều hình dạng lá khác nhau với đặc điểm lá già thường to và nổi bật hơn so với những lá còn lại. Phiến lá có thể mỏng hoặc dày; nhẵn bóng, nhẵn nhéo hoặc thô ráp; có thể có lông. Lông che chở màu nâu hoặc trắng; có thể đơn bào hoặc đa bào; bao phủ bề mặt lá và/hoặc toàn thân cây. Gốc lá cân đối hoặc lệch; dạng hình tròn hoặc hình tim. Cuống lá ngắn hoặc dài khoảng vài centimet. Gân lá thường tạo thành các cặp

xuất phát từ một số điểm như: gốc lá, điểm sát gốc lá, điểm giữa hoặc điểm phía trên của gân giữa lá. Một số lá có hệ gân thứ cấp chạy dọc theo gân giữa, có dạng đường cong từ gốc đến đỉnh của lá, có hình chân vịt hoặc có một phần xẻ lông chim [135].

- Hoa: cụm hoa dạng bông, mọc đối diện với lá hoặc ở nách lá; hiếm khi mọc ở đỉnh cành và cũng hiếm khi tạo thành cụm gồm nhiều bông mọc ở nách lá. Cụm hoa có dạng vươn thẳng hoặc uốn cong nhẹ và có thể bị rũ xuống khi chín. Hoa trần, thường đơn tính (đa số khác gốc, ít khi cùng gốc) hoặc lưỡng tính, không có cuống. Hoa có thể có màu hồng, màu hạt dẻ, màu xanh xám, màu vàng xanh, màu trắng đục... Lá bắc nhỏ; mọc đối diện với hoa, đôi khi dính với trục cụm hoa; hình khiên, hình tam giác hoặc hình tròn; thường nhẵn hoặc có lông mịn. Bộ nhị 2-6, chỉ nhị ngắn; bao phấn 2, 2-4 thùy. Bộ nhụy có bầu nhụy rời hoặc đôi khi ôm lấy trục, 1 ô, 1 noãn; núm nhụy 2-5 [134], [135].

- Quả: loại quả hạch, có hoặc không có cuống; dạng hình trứng, hình cầu, hình trứng ngược hoặc có mặt cắt hình tam giác, hiếm khi hình bầu dục; khi chín thường có màu đỏ hoặc vàng. Quả thường nhẵn hoặc đôi khi có lông tơ; mỗi quả có 1 hạt. Hạt gần hình cầu, vỏ hạt mỏng; phôi nhỏ, ngoại nhũ dạng bột và cứng [135], [136].

- Nhiễm sắc thể: kết quả nghiên cứu của tác giả Joseph Jose và cộng sự (1985) cho thấy số lượng nhiễm sắc thể (NST) của 8 loài thuộc chi *Piper* L. nghiên cứu thay đổi từ $2n = 24$ đến 195. Theo nhóm tác giả này, số NST của các loài thuộc chi *Piper* L. nghiên cứu thường là bội số của 13, trừ loài *P. cubeba* L. f. với $2n = 24$. Kích thước NST của các loài nghiên cứu nằm trong khoảng 0,56 – 2,41 μm , riêng kích thước NST của loài *P. cubeba* L. f. là từ 1,40 – 3,33 μm . Nhóm tác giả cũng đưa ra nhận định rằng thể đa bội có thể là yếu tố quan trọng của quá trình tiến hóa [70]. Trong một nghiên cứu khác, tác giả Rosabelle Samuel (1987) tiến hành nghiên cứu về NST của 11 loài thuộc chi *Piper* L. Kết quả của nghiên cứu này phù hợp với kết quả nghiên cứu trước đó của tác giả

Joseph Jose, theo đó, số lượng cơ bản NST của các loài nghiên cứu là $n = 13$. Về kích thước, NST của loài nhị bội ($2n$) có kích thước từ $1,0 - 2,8 \mu\text{m}$, trong khi đó, NST của loài tứ bội ($4n$) có kích thước nhỏ hơn, khoảng $0,6 - 1,2 \mu\text{m}$ [121].

Tuy nhiên, kết quả một số nghiên cứu khác lại báo cáo về số lượng cơ bản NST của một số loài thuộc chi *Piper* L. thay đổi từ $n = 8$ đến 12. Vì vậy, không thể đưa ra một con số chính xác đặc trưng về số lượng cơ bản NST của loài thuộc chi *Piper* L. dù rằng sự khác biệt trên có thể bởi sự phức tạp trong việc dàn trải mẫu trên tiêu bản và bởi khó khăn trong việc đếm những NST có kích thước rất nhỏ này [121].

Bảng 1.2. Đặc điểm số lượng nhiễm sắc thể của một số loài thuộc chi *Piper* L. [70], [121]

STT	Tên loài	Số lượng NST ($2n$)	STT	Tên loài	Số lượng NST ($2n$)
1	<i>P. apiculatum</i> C. DC.	26	5	<i>P. cubeba</i> L. f.	24
2	<i>P. argyrophyllum</i> Miq.	52	6	<i>P. galeatum</i> C. DC.	40
3	<i>P. betle</i> L.	78	7	<i>P. incana</i> A. Dietr.	22
4	<i>P. chaba</i> Hunt.	104	8	<i>P. magnifuum</i> Trel.	24

1.1.1.4. Danh lục các loài thuộc chi *Piper* L. ở Việt Nam

Qua thu thập tài liệu đã liệt kê được 46 loài thuộc chi *Piper* L. phân bố ở Việt Nam và danh lục của các loài này được giới thiệu ở bảng 1.3.

Bảng 1.3. Danh lục các loài thuộc chi *Piper* L. ở Việt Nam [5], [16]

STT	Tên khoa học	Tên Việt Nam	STT	Tên khoa học	Tên Việt Nam
1	<i>P. acre</i> Blume	Tiêu gât	7	<i>P. betle</i> L.	Trầu không
2	<i>P. albispicum</i> C. DC.	Tiêu gié trắng	8	<i>P. boehmeriaefolium</i> Wall.	Tiêu lá gai
3	<i>P. arboricola</i> C. DC.	Tiêu thượng mộc	9	<i>P. bonnii</i> C. DC	Hàm ếch rừng
4	<i>P. baccatum</i> Blume	Tiêu phì quả	10	<i>P. brevicaule</i> C. DC.	Tiêu thân ngắn
5	<i>P. balansae</i> C. DC.	Tiêu đốm	11	<i>P. cf. caninum</i> Blume	Tiêu chó
6	<i>P. bavinum</i> C. DC.	Tiêu ba vì	12	<i>P. cambodianum</i> C. DC.	Tiêu Cambot

STT	Tên khoa học	Tên Việt Nam	STT	Tên khoa học	Tên Việt Nam
13	<i>P. carnibracteum</i> C. DC.	Tiêu lá bắc mập	30	<i>P. mekongense</i> C. DC.	Tiêu cửu long
14	<i>P. chaudocanum</i> C. DC.	Tiêu châu đốc, trầu rừng	31	<i>P. montinum</i> C. DC.	Tiêu núi
15	<i>P. cubeba</i> L. f.	Tiêu thất	32	<i>P. mutabile</i> C. DC.	Tiêu biến thể
16	<i>P. densum</i> Blume	Tiêu dày	33	<i>P. nigrum</i> L.	Hồ tiêu
17	<i>P. griffithii</i> C. DC.	Tiêu griffith	34	<i>P. pendulispicum</i> C. DC.	Tiêu gié thông
18	<i>P. gymnostachyum</i> C. DC.	Tiêu gié trần, trầu không rừng	35	<i>P. penangense</i> C. DC.	Tiêu penang
19	<i>P. hainanense</i> Hemsl.	Tiêu hải nam, trầu hải nam	36	<i>P. pierrei</i> C. DC.	Tiêu pierre
20	<i>P. harmandii</i> C. DC.	Tiêu harmand	37	<i>P. politifolium</i> C. DC.	Tiêu lá láng
21	<i>P. hymenophyllum</i> Miq.	Tiêu lá mỏng	38	<i>P. pseudonigrum</i> C. DC.	Giả hạt tiêu
22	<i>P. khasianum</i> C. DC.	Tiêu núi khasia	39	<i>P. puberulum</i> (Benth.) Maxim	Tiêu hơi có lông, trầu lông
23	<i>P. laosanum</i> C. DC.	Tiêu Lào	40	<i>P. pubicatum</i> C. DC.	Tiêu sổng có lông
24	<i>P. leptostachyum</i> Wall.	Tiêu gié mảnh	41	<i>P. retrofractum</i> Vahl	Tiêu đội, trầu cánh
25	<i>P. lolot</i> C. DC.	Lá lốt, tắt bật	42	<i>P. rubrum</i> C. DC.	Tiêu đỏ
26	<i>P. longum</i> L.	Tiêu lá tím	43	<i>P. rufescentibaccum</i> C. DC.	Tiêu trái hoe
27	<i>P. majusculum</i> Bl.	Tiêu to	44	<i>P. saigonense</i> C. DC.	Tiêu sài gòn
28	<i>P. cf. maclurei</i> Merr.	Tiêu maclure	45	<i>P. saxicola</i> C. DC.	Tiêu trên đá
29	<i>P. massiei</i> C. DC.	Tiêu massie	46	<i>P. sarmentosum</i> Roxb.	Trầu giả

Trong số 46 loài được liệt kê ở bảng 1.3, có 38 loài được liệt kê trong cả 2 tài liệu [5] và [16], có 3 loài (số thứ tự là 1, 24 và 27) chỉ được liệt kê ở tài liệu [5] và 5 loài (số thứ tự là 5, 11, 19, 21 và 39) chỉ được liệt kê ở tài liệu [16].

1.1.2. Thành phần hóa học

1.1.2.1. Nghiên cứu trên thế giới

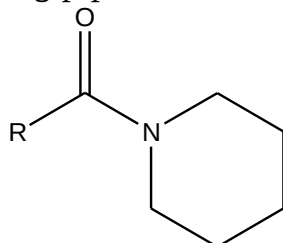
Chi *Piper* L. là chi lớn nhất trong họ Hồ tiêu và là một trong những chi có số lượng loài lớn nhất trong ngành thực vật hạt kín. Vì thế, đã có khá nhiều những nghiên cứu về thành phần hóa học của chi này được thực hiện. Theo một nghiên cứu năm 1996, trong khoảng thời gian gần một thế kỷ (từ năm 1907-1996), đã có 85 loài trên tổng số hơn 1.000 loài thuộc chi *Piper* L. được nghiên cứu về thành phần hóa học và có 555 chất được công bố phân lập từ chi này. Tùy mục đích của từng nghiên cứu, những bộ phận của chi *Piper* L. được chọn làm đối tượng nghiên cứu về thành phần hóa học có thể là thân, lá, rễ, quả hoặc hạt. Những hợp chất phân lập được có cấu trúc hóa học rất đa dạng và nằm trong những nhóm chính sau: alcaloid, tinh dầu, flavonoid, propenylbenzen, lignan, neolignan... Cũng theo nghiên cứu này, alcaloid là nhóm hợp chất phong phú nhất với 145 chất được liệt kê. Trong đó, piperin là hợp chất đầu tiên của nhóm alcaloid được phân lập và cũng là alcaloid phổ biến nhất có mặt trong chi *Piper* L. [106]. Từ năm 1996 đến nay, đã có thêm nhiều hợp chất mới được phân lập từ những loài đã nghiên cứu cũng như từ một số loài mới được nghiên cứu của chi này, trong đó, riêng nhóm hợp chất alcaloid cũng đã có thêm khoảng 135 chất được công bố [58]. Những con số thống kê ở trên cho thấy tiềm năng nghiên cứu về thành phần hóa học của chi *Piper* L. là rất lớn.

*** Nhóm hợp chất alcaloid**

Alcaloid là nhóm hợp chất được quan tâm nhất trong số các nhóm hợp chất có mặt trong chi *Piper* L. không những bởi sự dồi dào của chúng về hàm lượng mà còn bởi những tác dụng sinh học mà chúng đem lại như: độc tính tế bào, chống kết tập tiểu cầu, kháng khuẩn, kháng nấm... Đặc điểm của alcaloid phân lập được từ chi này là có nguyên tử nitơ nằm ở mạch thẳng (ngoài vòng) hoặc là dị tố của vòng 5 hoặc 6 cạnh (piperidin, pyrrolidin...). Qua tham khảo tài liệu, đã thống kê được 280 alcaloid phân lập từ 61 loài thuộc chi *Piper* L.

Những hợp chất này khá đa dạng về cấu tạo, trong đó, số lượng hợp chất trong công thức cấu tạo có 1 nguyên tử nitơ là 241 và có 2 nguyên tử nitơ là 39. Trong số 39 hợp chất có 2 nguyên tử nitơ trong công thức cấu tạo thì có đến 37 hợp chất có cấu tạo dimer và hầu hết các dimer được cấu tạo bởi hai monomer giống hệt nhau. Dựa vào công thức cấu tạo, những alkaloid đã được công bố có thể được chia thành các phân nhóm sau [45], [58], [106].

✓ *Nhóm alkaloid có khung piperidin*



Hình 1.2. Công thức tổng quát của nhóm alkaloid có khung piperidin

Qua tìm hiểu tài liệu, thống kê được 41 hợp chất monomer thuộc nhóm alkaloid piperidin phân lập được từ chi *Piper* L. đã được công bố. Trong đó, 27 hợp chất có gốc R là dẫn xuất của nhân thơm và 14 hợp chất có gốc R dạng mạch thẳng. Piperin (**1**) là alkaloid phổ biến nhất của nhóm alkaloid có khung piperidin nói riêng và của nhóm hợp chất alkaloid nói chung. Hợp chất piperin đã được công bố phân lập từ 20 loài thuộc chi *Piper* L. bao gồm một số loài như: *P. betle* L., *P. longum* L., *P. nigrum* L., *P. khasiana* C. DC., *P. chaba* Hunt... Hợp chất đơn giản nhất của nhóm alkaloid có khung piperidin là *N*-formylpiperidin (**2**) được phân lập từ loài *P. nigrum* L. với gốc R=H [46], [69], [72], [106].

Đặc điểm chung của các hợp chất trong nhóm là:

- Với gốc R là dẫn xuất của nhân thơm: nhóm thế của nhân thơm thường gặp là methyl (-CH₃), methylen dioxy (-OCH₂O-) hoặc gốc alkanpolyenyl mạch thẳng (ví dụ 2 hợp chất (**3**) và (**4**) trong bảng 1.4).

- Với gốc R dạng mạch thẳng: mạch cacbon có số nguyên tử cacbon nhiều nhất là 32. Số nối đôi trong mạch ít nhất là 1 (ví dụ 2 hợp chất (**5**) và (**6**) trong bảng 1.4).

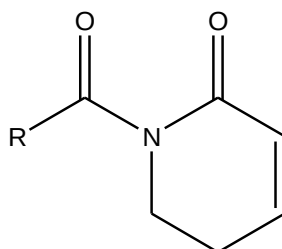
Bên cạnh các alkaloid có cấu tạo monomer ở trên, nhóm hợp chất này còn có 24 alkaloid dimer khác, trong đó, có đến 23 hợp chất phân lập được từ loài *P.*

nigrum L. (ví dụ hợp chất (7) trong bảng 1.4) và chỉ có 1 chất phân lập được từ loài *P. chaba* Hunt. [55], [113], [137].

Bảng 1.4. Một số alkaloid có khung piperidin phân lập được từ chi *Piper* L.

Ký hiệu	Tên hợp chất	Loài	TLTK
3	2'-methoxy-4',5'-methylenedioxy- <i>trans</i> -cinnamoyl piperidin	<i>P. amalago</i> L.	[47]
4	(2 <i>E</i> ,4 <i>E</i>)- <i>N</i> -9-(3,4-methylenedioxyphenyl)-nonadienoyl piperidin	<i>P. retrofractum</i> Vahl.	[19]
5	(2 <i>E</i> ,4 <i>E</i> ,14 <i>Z</i>)- <i>N</i> -(2,4,14-octadecatrienoyl)-piperidin	<i>P. retrofractum</i> Vahl.	[19]
6	(±)-erythro-1-(1-oxo-4,5-dihydroxy-2 <i>E</i> -octaenalcaloid	<i>P. nigrum</i> L.	[58]
7	Nigralcaloid A	<i>P. nigrum</i> L.	[58]

✓ Nhóm alkaloid có khung Δ^3 -piperidin-2-on



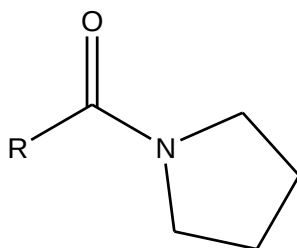
Hình 1.3. Công thức tổng quát của nhóm alkaloid có khung Δ^3 -piperidin-2-on

Kết quả nghiên cứu đã công bố có 15 alkaloid thuộc nhóm này được phân lập từ chi *Piper* L. Trong đó, 14 hợp chất có cấu tạo monomer và chỉ có 1 chất có cấu tạo dimer. Các hợp chất trong nhóm thường có gốc R là dẫn xuất của nhân thơm với các nhóm thế thường là methoxy (-OCH₃) và -OCH₂O- [58], [106].

Bảng 1.5. Một số alkaloid có khung Δ^3 -piperidin-2-on phân lập được từ chi *Piper* L.

Ký hiệu	Tên hợp chất	Loài	TLTK
8	<i>N</i> -(3'-methoxy-4',5'-methylenedioxy-cinnamoyl)- Δ^3 -piperidin-2-on	<i>P. aborescens</i> Roxb.	[58]
9	Piplartin	<i>P. cenocladum</i> C. DC.	[46]
10	Piplartin dimer A	<i>P. tuberculatum</i> Jacq.	[58]

✓ Nhóm alkaloid có khung pyrrolidin



Hình 1.4. Công thức tổng quát của nhóm alkaloid có khung pyrrolidin

Cho đến nay, đã có 53 alkaloid monomer được phân lập từ chi *Piper* L. Trong đó, 37 alkaloid có gốc R là dẫn xuất của nhân thơm và 16 alkaloid có gốc R dạng mạch thẳng [21], [58], [106], [115]. Cấu tạo gốc R của nhóm này tương tự như cấu tạo gốc R của nhóm alkaloid piperidin và có những đặc điểm chung như sau:

- Với gốc R là dẫn xuất của nhân thơm: nhóm thế của nhân thơm thường gặp là $-OCH_2O-$ hoặc gốc alkanpolyenyl mạch thẳng (ví dụ 2 hợp chất (12) và (13) trong bảng 1.6).

- Với gốc R dạng mạch thẳng: mạch cacbon có số nguyên tử cacbon rất khác nhau, thay đổi từ 2 tới 29. Mạch cacbon thường không no với số nối đôi trong mạch thường là 1 và một vài hợp chất có số nối đôi nhiều hơn 1 (ví dụ 2 hợp chất (14) và (15) trong bảng 1.6). Chỉ một số ít chất có mạch cacbon no, ví dụ chất hexadecanoylpyrrolidin (11) phân lập được từ loài *P. methysticum* G. Forst.

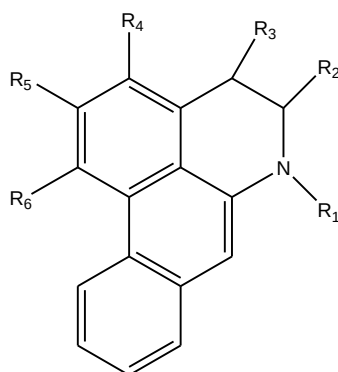
Ngoài ra, nhóm hợp chất này còn có 5 alkaloid có cấu tạo dimer được phân lập từ 3 loài *P. nigrum* L., *P. chaba* Hunt. và *P. peepuloides* Roxb. (ví dụ hợp chất (16) trong bảng 1.6) [113], [137].

Bảng 1.6. Một số alkaloid có khung pyrrolidin phân lập được từ chi *Piper* L.

Ký hiệu	Tên hợp chất	Loài	TLTK
12	Piperamin	<i>P. chaba</i> Hunt.	[95]
13	Trichostachin	<i>P. trichostachyon</i> C. DC.	[64]
14	2-hexadecenoyl-pyrrolidin	<i>P. amalago</i> L.	[106]

Ký hiệu	Tên hợp chất	Loài	TLTK
15	Trichonin	<i>P. trichostachyon</i> C. DC.	[65]
16	Cyclobutan-2,4-bis(1,3-benzodioxol-5-methoxy-6-yl)-1,3-dicarboxapyrrolidid	<i>P. peepuloides</i> Roxb.	[106]

✓ Nhóm alkaloid có khung aporphin



Hình 1.5. Công thức tổng quát của nhóm alkaloid có khung aporphin

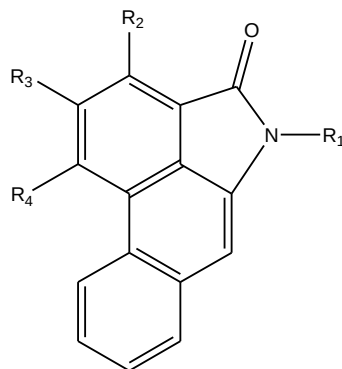
So với các nhóm alkaloid khác, nhóm alkaloid có khung aporphin có số lượng chất ít nhất với 8 hợp chất được công bố. Trong đó, các hợp chất thường có cấu tạo với $R_2=R_3=O$; $R_4=-H$ và $R_5=R_6=-OCH_3$ hoặc $R_5+R_6=-OCH_2O-$. Chỉ có 2 chất có cấu tạo với $R_2=R_3=-H$ và 2 chất có cấu tạo với $R_4=-OCH_3$ [58], [106], [123].

Bảng 1.7. Một số alkaloid có khung aporphin phân lập được từ chi *Piper* L.

Ký hiệu	Tên hợp chất	Cấu trúc						Loài	TLTK
		R_1	R_2	R_3	R_4	R_5	R_6		
17	Cepharadion A	$-CH_3$	$=O$	$=O$	$-H$	$-OCH_2O-$		<i>P. longum</i> L.	[123]
18	Cepharadion B	$-CH_3$	$=O$	$=O$	$-H$	$-OCH_3$	$-OCH_3$	<i>P. longum</i> L.	[123]
19	Norcepharadion B	$-H$	$=O$	$=O$	$-H$	$-OCH_3$	$-OCH_3$	<i>P. longum</i> L.	[123]

Hầu hết những alkaloid thuộc nhóm này đều có mặt trong khá nhiều loài thuộc chi *Piper* L. khác nhau. Điển hình nhất là hợp chất cepharadion A (17), theo thống kê, chất này được phân lập từ 13 loài thuộc chi *Piper* L. khác nhau như: *P. betle* L., *P. longum* L., *P. sanctum* (Miq.) Schlechtendal... [58], [106].

✓ Nhóm alkaloid có khung piperolactam



Hình 1.6. Công thức tổng quát của nhóm alkaloid có khung piperolactam

Những alkaloid khung piperolactam có cấu trúc tương tự như alkaloid khung aporphin. Khác biệt duy nhất giữa hai khung cấu trúc này là vòng piperidin (dị vòng nitơ 6 cạnh) của khung piperolactam được thay bằng vòng pyrrolidin-2-on (dị vòng nitơ 5 cạnh) ở khung aporphin.

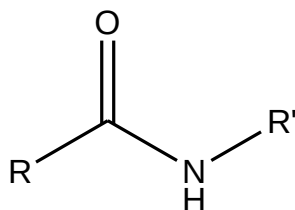
Qua tổng hợp tài liệu, có 16 hợp chất thuộc nhóm này phân lập được từ một số loài thuộc chi *Piper* L. Đặc điểm chung của các chất trong nhóm thường có cấu tạo với $R_1=R_2= -H$; R_3 và R_4 là $-OCH_3$ hoặc hydroxyl ($-OH$) [42], [58], [123].

Bảng 1.8. Một số alkaloid có khung piperolactam phân lập được từ chi *Piper* L.

Ký hiệu	Tên hợp chất	Cấu trúc				Loài	TLTK
		R_1	R_2	R_3	R_4		
20	Cepharanon B	-H	-H	$-OCH_3$	$-OCH_3$	<i>P. marginatum</i> Jacq.	[42]
21	Piperolactam A	-H	-H	$-OCH_3$	-OH	<i>P. marginatum</i> Jacq.	[42]
22	Piperolactam B	-H	-OH	$-OCH_3$	$-OCH_3$	<i>P. longum</i> L.	[123]

Trong số các hợp chất của nhóm, hợp chất piperolactam A (**21**) được công bố phân lập từ nhiều loài thuộc chi *Piper* L. nhất, ví dụ như: *P. longum* L., *P. wightii* Miq., *P. argyrophyllum* Miq., *P. boehmerifolium* Wall. ex C. DC., *P. attenuatum* Buch. Ham. ex Miq. và *P. hamiltonii* C. DC. [106].

✓ Nhóm alkaloid không có dị vòng nito



Hình 1.7. Công thức tổng quát của nhóm alkaloid không có dị vòng nito

Kết quả thu thập tài liệu cho thấy nhóm hợp chất này có 87 alkaloid monomer được phân lập từ chi *Piper* L. [36], [106], [118], [145]. Gốc R hoặc R' trong công thức tổng quát của nhóm có thể là dẫn xuất của nhân thơm hoặc dạng mạch thẳng. Đặc điểm chung của các hợp chất trong nhóm là:

- Với gốc là dẫn xuất của nhân thơm: nhóm thế của nhân thơm thường gặp là -OH, -CH₃, -OCH₂O- hoặc gốc alkanpolyenyl mạch thẳng (ví dụ 2 hợp chất **(23)** và **(24)** trong bảng 1.9).

- Với gốc có dạng mạch thẳng: mạch thẳng thường không no với số nguyên tử cacbon thay đổi từ 2 tới 32 và số nối đôi thay đổi từ 1 tới 3. Trong đó, gốc R' thường gặp là gốc isobutyl hoặc isopentyl (ví dụ 2 hợp chất **(25)** và **(26)** trong bảng 1.9). Một số hợp chất khác có gốc R' là dẫn xuất của nhân thơm (ví dụ 2 hợp chất **(27)** và **(28)** trong bảng 1.9). Đặc biệt, một số ít hợp chất có R'=-H, ví dụ như hợp chất 3-(3'-4'-dimethoxyphenyl)-propionamid **(29)**.

- Một số ít các chất thuộc nhóm này có gốc R dạng mạch thẳng no hoặc mạch thẳng không no có gắn thêm nhóm chức cacboxylic (-COOH) hoặc -OH, ví dụ: chất (2E)-4-[(2-methylpropyl)amino]-4-oxo-butenic acid **(30)** phân lập được từ loài *P. hancei* Max.

Ngoài ra, nhóm hợp chất này còn có 6 alkaloid dimer được công bố phân lập từ ba loài *P. nigrum* L., *P. arboreum* Aubl., *P. aurantiacum* Wall. Ex DC. (ví dụ hợp chất **(31)** trong bảng 1.9) [55], [113], [137].

Bảng 1.9. Một số alkaloid không có dị vòng nitơ phân lập được từ chi *Piper* L.

Ký hiệu	Tên hợp chất	Loài	TLTK
23	Brachyalkaloid A	<i>P. brachystachyum</i> Wall.	[78]
24	Piperoylisopentylamin	<i>P. amalago</i> L.	[106]
25	<i>N</i> -p-coumaroyltyramin	<i>P. argyrophylum</i> Miq.	[124]
26	<i>N</i> -cis-feruloyltyramin	<i>P. argyrophylum</i> Miq.	[124]
27	(2 <i>E</i> ,4 <i>E</i>)- <i>N</i> -isobutyldecadienalcaloid	<i>P. nepalense</i> Miq.	[57]
28	(2 <i>E</i> ,4 <i>E</i> ,14 <i>E</i>)- <i>N</i> -isobutyleicosatrienalcaloid	<i>P. retrofractum</i> Vahl.	[106]
31	Arboreumin	<i>P. arboreum</i> Aubl.	[58]

✓ **Nhóm alkaloid khác**

25 alkaloid còn lại được phân lập từ chi *Piper* L. không nằm trong 6 nhóm alkaloid kể trên có cấu tạo hóa học rất khác nhau, trong đó, có 24 alkaloid monomer và 1 alkaloid dimer [58], [62], [106].

Bảng 1.10. Một số alkaloid khác phân lập được từ chi *Piper* L.

Ký hiệu	Tên hợp chất	Loài	TLTK
32	3-chloro-4-hydroxy-2-piperidon	<i>P. hancei</i> Maxim	[106]
33	<i>N</i> -(3-phenylpropanoyl)-pyrrol	<i>P. sarmentosum</i> Roxburgh	[106]
34	Submultinamid A	<i>P. submultinerve</i> C. DC.	[58]

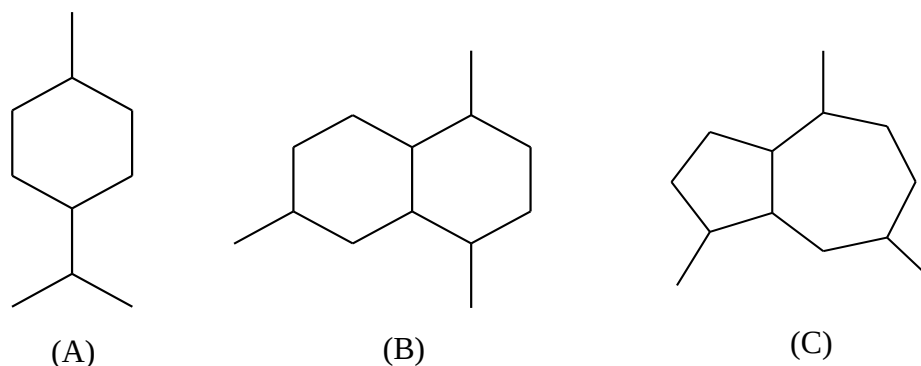
*** Nhóm tinh dầu**

Tinh dầu là nhóm hợp chất điển hình của chi *Piper* L. và được thể hiện ở mùi thơm đặc trưng của các cây trong chi. Hai bộ phận của các loài thuộc chi *Piper* L. được nghiên cứu nhiều về thành phần tinh dầu là lá và quả. Đây cũng là hai bộ phận chứa hàm lượng tinh dầu cao nhất trong cây. Ngoài ra, ở chi *Piper* L., tinh dầu còn xuất hiện ở thân và rễ của cây. Một số cấu tử có mặt khá phổ biến trong thành phần tinh dầu của nhiều loài thuộc chi *Piper* L. như: α -pinen (36), camphen, 1,8-cineol, myrcen, γ -cardinen... [106].

Qua thu thập tài liệu cho thấy thành phần tinh dầu chiết xuất từ 30 loài thuộc chi *Piper* L. gồm có 112 cấu tử. Hầu hết các cấu tử này đều có cấu tạo

monoterpen (53 chất) hoặc sesquiterpen (57 chất), chỉ 2 cấu tử tinh dầu có cấu tạo diterpen [56], [85], [99], [129], [138]. Những hợp chất monoterpen và sesquiterpen này rất phong phú về cấu tạo hóa học và trong công thức cấu tạo của chúng có thể có hoặc không có nguyên tử oxy. Với những hợp chất có oxy trong công thức cấu tạo, nguyên tử này thường nằm trong nhóm chức hydroxy, ether hoặc ceton. Ngược lại, mới chỉ có một hợp chất trong công thức cấu tạo có nhóm chức este được báo cáo, đó là chất α -terpineol acetat được chiết xuất từ lá của loài *P. betle* L. và chưa thấy có hợp chất nào có nhóm chức aldehyd [106].

Một số khung cấu tạo điển hình của các cấu tử tinh dầu phân lập được từ chi *Piper* L. được thể hiện ở hình 1.8.



Hình 1.8. Một số khung cấu tạo chính của thành phần tinh dầu phân lập được từ chi *Piper* L.

Trong đó: (A): 1 - isopropyl - 4 - methylcyclohexan; (B): decahydro - 1, 4, 6 - trimethyl - naphthalen; (C): decahydro - 1,4,7 - trimethylazulen

Cấu tạo khung A ở hình trên đại diện cho hầu hết cấu tử tinh dầu nhóm monoterpen. Ngược lại, cấu tạo của cấu tử tinh dầu nhóm sesquiterpen đa dạng hơn với hai khung cấu tạo điển hình là khung B hoặc C ở hình 1.8. Đa số cấu tử tinh dầu của chi *Piper* L. đều có chứa từ 1 đến 2 vòng 6 cạnh no hoặc không no. Ở vòng 6 cạnh không no thường có từ 1 đến 2 nối đôi, hiếm khi có 3 nối đôi (như: p-cymen, thymol). Qua thu thập tài liệu, mới chỉ thống kê được 7 cấu tử tinh dầu có cấu tạo dạng mạch thẳng gồm: citronellol, β -farnesen, 2Z-6E-

farnesol, linalool, myrcen, *trans*-phytol (**39**) và phytol (**40**). Một số ít những cấu tử tinh dầu còn lại trong công thức cấu tạo chỉ có 1 vòng 5 cạnh (như α -santalen) hoặc 1 vòng 7 cạnh (như 1,1,4-trimethyl-cyclohepta-2,4-dien-6-on) hoặc công thức cấu tạo có hai vòng gồm 1 vòng 5 cạnh và 1 vòng 7 cạnh (như β -guaien, guaiol)...

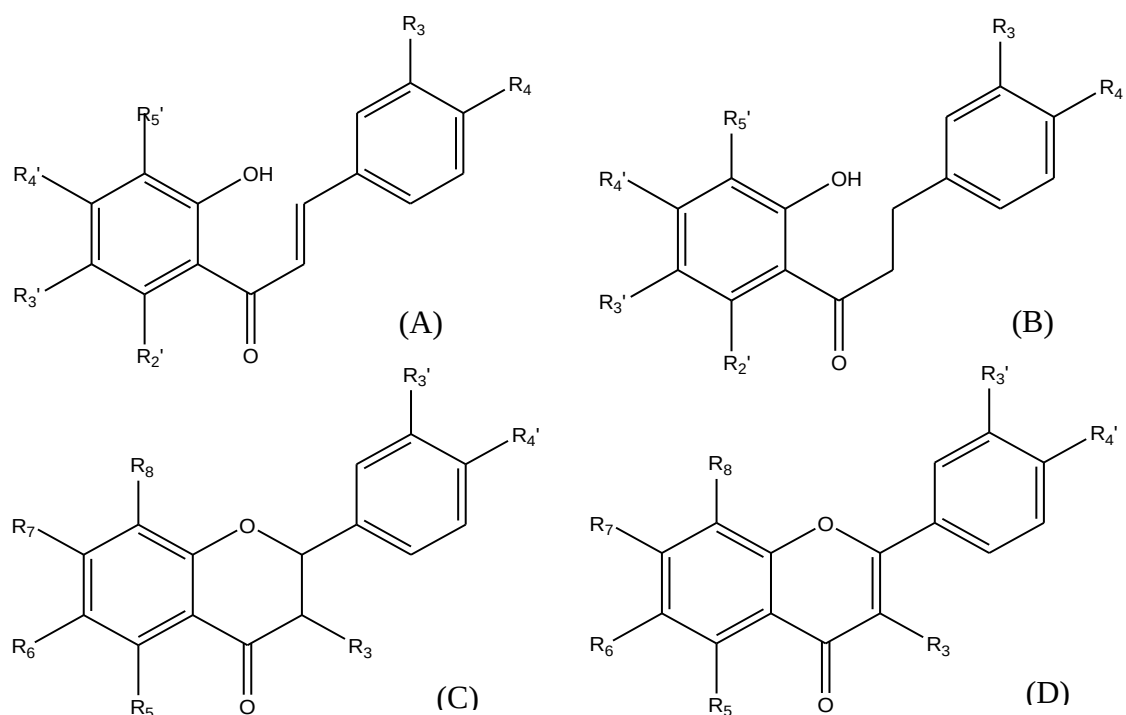
Một số cấu tử tinh dầu thuộc các nhóm phân lập được từ chi *Piper* L. được trình bày ở bảng 1.11.

Bảng 1.11. Một số cấu tử tinh dầu phân lập được từ chi *Piper* L.

Ký hiệu	Tên hợp chất	Nhóm hợp chất	Loài	TLTK
35	γ -Terpinen	Monotepen	<i>P. nigrum</i> L.	[106]
36	α -Pinen	Monotepen	<i>P. longum</i> L.	[11]
37	Ishwaran	Sesquiterpen	<i>P. fulvescens</i> C. DC.	[142]
38	Cubenol	Sesquiterpen	<i>P. guineense</i> Thonn & Schum	[106]
39	<i>trans</i> -phytol	Diterpen	<i>P. aduncum</i> L.	[106]
40	Phytol	Diterpen	<i>P. sarmentosum</i> Roxb.	[111]

*** Nhóm hợp chất flavonoid**

Từ một số loài thuộc chi *Piper* L., đã có 61 hợp chất flavonoid được phân lập và công bố. Những hợp chất thuộc nhóm này sở hữu một số tác dụng sinh học đáng quan tâm như: độc tính tế bào, chống oxy hóa, kháng nấm. Dựa vào công thức cấu tạo, hầu hết những hợp chất này đều thuộc nhóm euflavonoid và nằm trong 4 phân nhóm gồm: chalcon, dihydrochalcon, flavanon và flavon. Chỉ duy nhất có hợp chất piperaduncin C nằm trong nhóm biflavonoid với cấu tạo bidihydrochalcon.



Hình 1.9. Công thức cấu tạo của khung chalcon (A), dihydrochalcon (B), flavanon (C) và flavon (D)

Từ 4 loài thuộc chi *Piper* L., đã có 24 hợp chất nằm trong 2 nhóm chalcon và dihydrochalcon được phân lập với đặc điểm là nhóm thế gắn vào 2 vòng thơm có cấu tạo khá đa dạng, tuy nhiên, nhiều nhất vẫn là 2 nhóm -OH và -OCH₃.

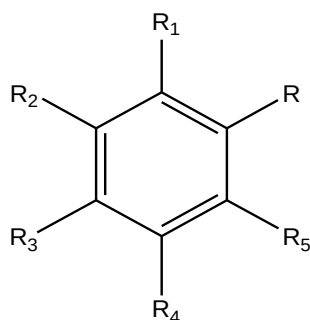
Trong số 36 hợp chất nằm trong 2 nhóm flavanon và flavon được phân lập từ 15 loài thuộc chi *Piper* L., 12 chất có cấu tạo glycosid với phần đường thường gắn với vị trí C₃ của phần aglycon qua liên kết O-glycosid. Một số ít chất có phần đường gắn với vị trí C₆ qua dây nối C-glycosid hoặc C₄ qua dây nối O-glycosid [41], [51], [52], [106]. Một số loại đường thường gặp trong công thức cấu tạo của những chất này gồm có: glucose, rutinose, galactose, rhamnose. Phần aglycon của những glycosid này thường là những flavonoid khá phổ biến trong tự nhiên như: quercetin, kaempferol, isoquercitrin [80], [106]. Nhóm thế gắn vào 2 vòng thơm của những hợp chất thuộc 2 nhóm flavanon và flavon thường là hai nhóm -OH hoặc -OCH₃.

Bảng 1.12. Một số hợp chất thuộc nhóm flavonoid phân lập được từ chi *Piper* L.

Ký hiệu	Tên hợp chất	Cấu trúc	Loài	TLTK
41	6'-hydroxy-2',4',5'-trimethoxychalcon	$R_2'=R_4'=R_5'=-OCH_3$; $R_3'=R_4'=-H$;	<i>P. hispidum</i> Sw.	[122]
42	2',6'-dihydroxy-4'-dimethoxydihydrochalcon	$R_2'=-OH$; $R_4'=-OCH_3$; $R_3'=R_4'=-H$;	<i>P. aduncum</i> L.	[29]
43	Quercetin 3-O- β -D-galactosid	$R_3=-O$ -galactosyl; $R_5=R_7=-OH$; $R_3'=R_4'=-OH$;	<i>P. nigrum</i> L.	[106]
44	7,4'-dimethoxy-5,3'-dihydroxyflavon	$R_3=-H$; $R_5=-OH$; $R_7=-OCH_3$; CH_3 ; $R_3'=-OH$; $R_4'=-OCH_3$;	<i>P. auritum</i> Kunth	[22]

*** Nhóm hợp chất alkanpolyenybenzen**

Tên của nhóm hợp chất này bắt nguồn từ công thức cấu tạo của các chất gồm có phần nhóm thế alkanpolyenyl gắn với nhân thơm. Đã có 90 hợp chất thuộc nhóm này phân lập từ 27 loài thuộc chi *Piper* L. được công bố [103], [106], [107], [139]. Công thức cấu tạo của nhóm được trình bày ở hình 1.20.



Hình 1.10. Công thức cấu tạo của khung alkanpolyenybenzen

Dựa vào cấu tạo hóa học, các chất thuộc nhóm này có thể được chia thành 4 phân nhóm gồm: allylbenzen (24 chất), prop-1-en-1-yl-benzen (10 chất), polyprenylbenzen (42 chất) và những chất alkenylbenzen khác (14 chất). Đặc điểm phân biệt giữa các phân nhóm này là cấu tạo của nhóm thế R. Tương ứng với 4 phân nhóm kể trên, R lần lượt là các nhóm thế: allyl, prop-1-en-1-yl, polyprenyl và alkenyl khác. Hai nhóm thế allyl và prop-1-en-1-yl có cấu tạo giống nhau và đều là gốc propenyl ($-C_3H_5$). Khác biệt duy nhất giữa hai nhóm thế này là vị trí gắn của nhân thơm vào hai nhóm ở vị trí cacbon số 1 và

carbon số 3 tương ứng với gốc prop-1-en-1-yl và allyl. Đặc điểm chung về cấu tạo của nhóm thế R là có dạng mạch thẳng, có từ 3 đến 20 carbon và không no, có từ 1 đến 4 nối đôi.

Thế vào 5 vị trí còn lại của nhân thơm là những nhóm thế thường gặp như: $-OCH_3$, $-OH$ và $-OCH_2O-$, hiếm gặp nhóm thế $-OCOCH_3$. Số lượng nhóm thế gắn vào nhân thơm có sự khác nhau giữa các chất và thay đổi từ 1 đến 4. Tuy nhiên, không có hợp chất nào bị thế ở cả 5 vị trí này. Trong 5 vị trí thế này của nhân thơm, 2 vị trí carbon số 2 và số 6 là ít bị thế nhất tương ứng với $R_1 = R_5 = -H$. Đặc biệt, có 3 hợp chất có cấu tạo khác nhiều so với những chất còn lại ở vị trí nhóm thế R_2 và R_3 , ví dụ: chất (7*S*,8*R*)-4-hydroxy-4',7-epoxy-8,3'-neolignan-7'(*E*)-en (**45**) phân lập được từ loài *P. regnelli* (Miq.) C. DC. [107].

Bảng 1.13. Một số hợp chất ankanpolyenybenzen phân lập được từ chi *Piper* L.

Ký hiệu	Tên hợp chất	Gốc R	Cấu trúc					Loài	TLTK
			R_1	R_2	R_3	R_4	R_5		
46	Chevibetol	$-C_3H_5$	-H	-H	$-OCH_3$	-OH	H	<i>P. betle</i> L.	[29]
47	Apiol	$-C_3H_5$	-H	$-OCH_3$	$-OCH_2O-$		$-OCH_3$	<i>P. schmidtii</i> Hook. f.	[102]
48	Pipermargin	$-C_3H_5$	-H	$-OCH_3$	$-OCH_3$	$-OCH_3$	-H	<i>P. marginatum</i> Jacq.	[43]
49	Isoelemicin	$-C_3H_5$	-H	-H	$-OCH_3$	-H	-H	<i>P. solmsianum</i> C. DC.	[92]
50	3-(3',7'-dimethyl-2',6'-octadienyl)-4-methoxy benzoic acid	$-C_{10}H_{17}$	$-OCH_3$	-H	H	$-COOH$	-H	<i>P. aduncum</i> L.	[27]
51	Gibbilimbol C	$-C_8H_{15}$	-H	-H	-OH	-H	-H	<i>P. gibbilimbium</i> C. DC.	[103]
52	(±)-4-hydroxy-3,5-bis(2-hydroxy-3-methyl-3-butenyl) benzoic acid	$-C_5H_9O$	-OH	$-C_5H_9O$	-H	$-COOH$	-H	<i>P. glabratum</i> Kunth	[54]

Năm 2013, tác giả Chen S. và cộng sự đã phân lập được từ loài *P. taiwanense* Lin & Lu 3 hợp chất dimer mới được cấu tạo bởi 2 monomer allylbenzen giống nhau, ví dụ: hợp chất diallylcatechol (**53**) [34].

*** Nhóm hợp chất lignan**

Lignan là nhóm hợp chất phân lập được từ thực vật và được tạo nên bởi 2 đơn vị phenylpropan có cấu tạo C_6-C_3 và liên kết với nhau ở vị trí cacbon $\beta - \beta'$ của chuỗi bên. Tính đến nay, đã có 57 hợp chất thuộc nhóm này được công bố phân lập từ 31 loài thuộc chi *Piper* L. [36], [91], [92], [106]. Một số hợp chất lignan có mặt trong nhiều loài thuộc chi *Piper* L. khác nhau, trong đó, chất sesamin (**54**) xuất hiện phổ biến nhất và được phân lập từ 10 loài thuộc chi *Piper* L. như: *P. clusii* C. DC., *P. guineense* L., *P. longum* L., *P. retrofractum* Vahl... Chất này cũng là hợp chất lignan đầu tiên được phân lập từ chi *Piper* L. Ngược lại, cũng có những hợp chất chỉ thấy được báo cáo phân lập từ một loài thuộc chi *Piper* L. như hợp chất (-)-dihydrotrichostin (**55**) từ loài *P. trichostachyon* (Miq.) C. DC.; hợp chất (+)-sylvon (**56**) từ loài *P. sylvaticum* Roxb.

Cấu tạo của nhóm hợp chất lignan phân lập được từ chi *Piper* L. khá đa dạng, giữa các chất có sự khác nhau về loại, số lượng và vị trí nhóm thế ở hai nhân thơm. Nhóm thế ở nhân thơm thường gặp gồm: -OH, -OCH₃, -OCH₂O-. Bên cạnh đó, sự kết hợp giữa hai chuỗi bên của hai đơn vị cấu tạo nên hợp chất lignan cũng khá phong phú và tạo thành các dạng: mạch thẳng, vòng cyclobutan, một hoặc hai dị vòng tetrahydrofuran...

Mặc dù đã có khá nhiều nghiên cứu công bố phân lập nhóm lignan từ chi *Piper* L., tuy nhiên, kết quả nghiên cứu về tác dụng sinh học của nhóm hợp chất này khá hạn chế. Đáng kể nhất là những nghiên cứu về tác dụng chống kết tập tiểu cầu của một số hợp chất thuộc nhóm này.

Bên cạnh năm nhóm hợp chất kể trên, một vài nhóm hợp chất khác cũng được công bố phân lập được từ chi *Piper* L. gồm: neolignan, kawapyron, sterol... [106].

1.1.2.2. Nghiên cứu trong nước

Mặc dù đã có rất nhiều nghiên cứu về thành phần hóa học của chi *Piper* L. được thực hiện trên thế giới, tuy nhiên, số lượng những nghiên cứu về chi này ở Việt Nam còn khá hạn chế. Các nghiên cứu trong nước chủ yếu tập trung vào nghiên cứu thành phần tinh dầu của 3 loài thuộc chi *Piper* L. gồm: *P. nigrum* L., *P. betle* L., *P. lolot* C. DC. Kết quả nghiên cứu trong nước tuy không xác định được thành phần tinh dầu mới nào nhưng cũng góp phần bổ sung thông tin về hàm lượng tinh dầu và tỷ lệ các cấu tử trong tinh dầu chiết xuất được từ mẫu nghiên cứu thu hái ở Việt Nam [3], [4], [8], [11].

Một vài hợp chất không phải thuộc nhóm tinh dầu được phân lập từ chi *Piper* L. cũng đã được công bố bởi một số tác giả trong nước. Nổi bật nhất trong đó là nghiên cứu của nhóm tác giả Lê Thanh, Trần Đình Thắng và Nguyễn Xuân Dũng (2007). Nhóm tác giả này đã phân lập được từ dịch chiết methanol của loài *P. lolot* C. DC. 12 alcaloid mới cùng với 29 alcaloid đã được biết đến trước đó [82].

Một số kết quả nghiên cứu trong nước về thành phần hóa học của chi *Piper* L. được trình bày ở bảng 1.14.

**Bảng 1.14. Một số kết quả nghiên cứu trong nước
về thành phần hóa học của chi *Piper* L.**

STT	Nhóm tác giả	Loài nghiên cứu	Thành phần hóa học được xác định	TLTK
1	Đậu Xuân Đức, Hoàng Văn Lựu	<i>P. betle</i> L.	Stigmast-5-en-3- β -ol, furo [2,3-C] acridin-6-ol-5-hydroxyl	[4]
2	Đỗ Đình Răng, Nguyễn Thúy Hằng	<i>P. longum</i> L.	- Tinh dầu lá gồm: β -caryophyllen (11,42%), β -pinen (8,01%), α -pinen (4,9%), α -copaen (3,95%)... - N-[3-(4-methoxyphenyl)-1-oxopropyl]- pyrrol, β -sitosterol, poriferasterol	[11]
3	Lê Thanh, Trần Đình Thắng	<i>P. lolot</i> C. DC.	Piperlotin A-L	[3]

4	Nguyễn Xuân Dũng, Phạm Hoàng Ngọc	<i>P. betle</i> L.	Tinh dầu của rễ có δ -cadinen (11,7%), α -cadinol (26,2%), camphen, α -copaen	[3]
		<i>P. lolot</i> C. DC.	- Tinh dầu của lá (0,1%), thân (0,01%) và thân rễ (0,15%) với thành phần chính là β -caryophyllen (26-30%) - 3-(4'-methoxyphenyl)-propanoyl pyrrol	[82]

Qua thu thập tài liệu cho thấy thành phần hóa học chính của chi *Piper* L. gồm các nhóm hợp chất: alkaloid, tinh dầu, flavonoid, alkanpolyenylbenzen, lignan... Trong đó, alkaloid là nhóm hợp chất được phân lập nhiều nhất từ chi này với tổng số 280 chất đã được báo cáo. Những alkaloid này có cấu tạo tương đối đa dạng trong đó nhiều hợp chất có khung piperidin hoặc khung pyrrolidin. Nhóm hợp chất alkaloid phân lập từ chi *Piper* L. vẫn sẽ tiếp tục thu hút được sự quan tâm của các nhà khoa học trên thế giới trong tương lai.

Nghiên cứu thành phần hóa học chi *Piper* L. đã được thực hiện ở nhiều nước khác nhau trên thế giới, tuy nhiên, số lượng nghiên cứu về chi này ở Việt Nam còn khá khiêm tốn. Mặc dù vậy, kết quả của một vài nghiên cứu trong nước cũng đã có những đóng góp nhất định vào việc xác định thành phần hóa học của chi *Piper* L.

1.1.3. Công dụng, tác dụng sinh học và độc tính của chi *Piper* L.

1.1.3.1. Công dụng của chi *Piper* L.

Với số lượng trên 1.000 loài và phân bố khá rộng, chi *Piper* L. được sử dụng ở nhiều nơi trên thế giới để điều trị một số bệnh theo kinh nghiệm dân gian. Một số loài thuộc chi *Piper* L. được sử dụng để điều trị bệnh trên thế giới được trình bày ở bảng 1.15 [58].

**Bảng 1.15. Một số loài thuộc chi *Piper* L. được dùng để chữa bệnh
theo kinh nghiệm dân gian trên thế giới**

STT	Loài	Nơi sử dụng	Bộ phận dùng	Công dụng
1	<i>P. alyreanum</i> C. DC.	Châu Mỹ	Lá, rễ	Điều hòa miễn dịch, giảm đau
2	<i>P. amalago</i> L.	Guatemala	Quả	Bệnh đường tiêu hóa, đau ngực
3	<i>P. auritum</i> Kunth	Mexico	Lá	Viêm amidan, viêm thanh quản, đau họng, sốt, thấp khớp
4	<i>P. chaba</i> Hunt.	Thái Lan	Lá	Chữa sốt rét, đầy hơi, long đờm
5	<i>P. chaba</i> Hunt.	Ấn Độ	Rễ, quả	Hen, viêm phế quản, sốt, đau lưng...
6	<i>P. guineense</i> Thonn & Schum	Nam Phi	Quả, lá, rễ, hạt	Viêm phế quản, bệnh đường tiêu hóa, bệnh thấp khớp
7	<i>P. longum</i> L.	Trung Quốc	Lá	Giảm đau, bệnh đường tiêu hóa, mỡ máu cao
8	<i>P. methysticum</i> G. Forst	Châu Âu, Mỹ	Rễ	Giảm căng thẳng
9	<i>P. umbellatum</i> L.	Trung Phi, Cameroon	Rễ	Bệnh đường tiêu hóa, khó tiêu, táo bón, kiết lỵ

Qua tham khảo tài liệu, các nước có sử dụng chi *Piper* L. làm thuốc theo kinh nghiệm dân gian phân bố ở 4 châu trên thế giới (trừ châu Đại dương), trong đó, châu Mỹ sử dụng chi này phổ biến hơn cả. Thực tế này khá tương đồng với đặc điểm phân bố của chi *Piper* L. trên thế giới đã đề cập ở phần trên.

Tất cả các bộ phận của nhiều loài thuộc chi *Piper* L. đều có thể được dùng để làm thuốc. Tuy nhiên, giữa các quốc gia khác nhau có sự khác nhau về loài hoặc bộ phận được sử dụng của cùng một loài. Công dụng phổ biến nhất của chi này theo kinh nghiệm dân gian là để chữa các bệnh về đường tiêu hóa (bệnh dạ dày, đầy hơi, tiêu chảy, táo bón), giảm đau (bệnh thấp khớp, đau lưng, đau răng) và kháng khuẩn, chống viêm (viêm phế quản, vết thương phần mềm, viêm đường tiêu hóa) [58].

Ở Việt Nam, một số loài thuộc chi *Piper* L. phổ biến như hồ tiêu, lá lốt thường được dùng làm gia vị và thực phẩm; tràu không được sử dụng theo văn hóa truyền thống. Đồng thời, những loài này cũng được sử dụng để làm thuốc theo kinh nghiệm dân gian và được trình bày ở bảng 1.16 [14], [15].

Bảng 1.16. Một số loài thuộc chi *Piper* L. được dùng để chữa bệnh theo kinh nghiệm dân gian ở Việt Nam

STT	Tên khoa học	Tên thường gọi	Bộ phận dùng	Công dụng
1	<i>P. betle</i> L.	Trầu không	Lá	Chữa viêm kết mạc, sát khuẩn ngoài da, chữa ho hen
2	<i>P. lolot</i> C. DC.	Lá lốt	Lá, thân, rễ	Chữa đau xương khớp, đổ mồ hôi tay chân, tiêu chảy
3	<i>P. longum</i> L.	Tất bật	Rễ, quả, hạt	Chữa đau bụng, nôn mửa, tiêu chảy, nhức đầu, đau răng
4	<i>P. nigrum</i> L.	Hồ tiêu	Hạt	Kích thích tiêu hóa, giảm đau răng, đau bụng

Mặc dù đã có khá nhiều loài thuộc chi *Piper* L. được sử dụng làm thuốc theo kinh nghiệm dân gian, tuy nhiên, việc sử dụng chi này để chữa bệnh trong thực tế hiện nay không nhiều. Hiện nay, có một số sản phẩm thực phẩm chức năng trong thành phần có dịch chiết từ một vài loài thuộc chi *Piper* L. hoặc chứa

hoạt chất piperin. Trong đó, những sản phẩm có chứa piperin phối hợp cùng curcumin là phong phú nhất (ví dụ một số sản phẩm có chứa đồng thời hai hoạt chất này như: Curcumin2K, Curcuma, Biocurmin...). Sự kết hợp giữa hai thành phần hoạt chất này trong nhiều sản phẩm xuất phát từ kết quả nghiên cứu của Shoba và cộng sự (1997), theo đó, piperin có tác dụng làm tăng sinh khả dụng của curcumin lên 20 lần. Cơ chế của tác dụng này là do piperin có khả năng ức chế quá trình liên hợp giữa acid glucuronic và curcumin nên làm giảm quá trình chuyển hóa và đào thải curcumin [126].

Những chế phẩm khác trong thành phần có chứa dịch chiết từ một số loài thuộc chi *Piper* L. được sử dụng để chữa bệnh như: Eupolin (chứa cao đặc lá trầu không và cao đặc cỏ lào có tác dụng chữa viêm lợi, viêm chân răng); Sakantin[®] có chứa dịch chiết từ quả của hai loài *P. nigrum* L., *P. longum* L. và gừng giúp kích thích tiêu hóa; sản phẩm Armorex T[®] (chứa hạt tiêu, tinh dầu tỏi, tinh dầu mè..., có tác dụng kháng khuẩn, chống oxy hóa, giảm co thắt, chữa tiêu chảy). Đặc biệt, một số sản phẩm chứa dịch chiết từ rễ loài *P. methysticum* G. Forst (có tên gọi khác là kava) có tác dụng an thần, giảm lo âu. Tuy nhiên, gần đây, có một số báo cáo về những tác dụng phụ trên gan khi sử dụng những sản phẩm này, vì thế, cần thận trọng khi sử dụng chúng [120].

1.1.3.2. Tác dụng sinh học và độc tính của chi *Piper* L.

* Tác dụng sinh học của chi *Piper* L.

Dưới sự hỗ trợ của khoa học kỹ thuật, ngày càng có nhiều nghiên cứu tiến hành đánh giá tác dụng sinh học của các loài thuộc chi *Piper* L. dựa trên những mô hình dược lý hiện đại. Mục đích của những nghiên cứu này nhằm chứng minh tác dụng chữa bệnh của dược liệu theo kinh nghiệm dân gian hoặc là một giai đoạn của quá trình nghiên cứu phát triển thuốc mới. Kết quả là ngày càng có nhiều tác dụng sinh học của chi *Piper* L. được công bố. Một số tác dụng sinh học đáng quan tâm của các loài thuộc chi này được trình bày dưới đây.

✓ **Độc tính tế bào**

Khoảng 20 năm trở lại đây, cùng với xu hướng đẩy mạnh việc tìm kiếm thuốc chữa ung thư trên toàn thế giới, đã có khá nhiều nghiên cứu về tác dụng gây độc tế bào của chi *Piper* L. được thực hiện. Kết quả cho thấy, nhiều hợp chất phân lập được từ chi *Piper* L. có độc tính tế bào. Các chất có hoạt tính này chủ yếu thuộc nhóm: alcaloid, alkanpolyenylbenzen và flavonoid. Trong nhóm alcaloid, piperin là một trong những hợp chất được nghiên cứu nhiều nhất về tác dụng chống ung thư có thể bởi tiềm năng về tác dụng sinh học của nó cũng như bởi sự xuất hiện phổ biến và dồi dào về hàm lượng của chất này trong chi *Piper* L. Theo kết quả một số nghiên cứu, piperin có tác dụng chống ung thư theo một số cơ chế như: điều chỉnh nồng độ cacbohydrat gắn protein (chất chỉ thị cho xu hướng phát triển khối u), ức chế sản xuất TNF- α (yếu tố hoại tử khối u), làm giảm lượng hydroperoxid, ức chế sự di căn ở phổi... trên động vật thực nghiệm [58].

Ngoài ra, một số hợp chất khác cũng có tác dụng gây độc tế bào được phân lập từ chi *Piper* L. như: hợp chất 1-[(9E)-10-(3,4-methylenedioxy-phenyl)-9-decenoyl] pyrrolidin phân lập được từ loài *P. boehmeriaefolium* (Miq.) C. DC. gây độc với dòng tế bào ung thư biểu mô cổ tử cung HeLa ($IC_{50} = 2,67 \mu\text{g/ml}$) [132]; hợp chất gibbilimbol D phân lập được từ loài *P. gibbilimbum* C. DC. gây độc với dòng tế bào ung thư biểu mô thực quản KB ($IC_{50} = 2,1 \mu\text{g/ml}$) [103]; hợp chất flavokavain B phân lập được từ loài *P. methysticum* G. Forst. tác dụng gây độc với dòng tế bào ung thư gan HepG2 [68]...

✓ **Tác dụng chống kết tập tiểu cầu**

Đây cũng là một trong những tác dụng đáng quan tâm của chi *Piper* L. bởi có khá nhiều công trình nghiên cứu về tác dụng này. Các chất có hoạt tính chống kết tập tiểu cầu phân lập được từ chi *Piper* L. chủ yếu thuộc nhóm alcaloid, bên cạnh đó, một vài hợp chất nhóm lignan được công bố. Trong số các hợp chất thuộc nhóm alcaloid, những dẫn xuất nhân pyrrol hoặc pyrrolidin thường có hoạt tính mạnh hơn. Điều này gợi ý rằng dị vòng năm cạnh chứa nitơ là cấu trúc quan trọng đối với hoạt tính chống kết tập tiểu cầu

[58]. Một số hợp chất có tác dụng chống kết tập tiểu cầu được trình bày ở bảng 1.17.

Bảng 1.17. Một số chất có tác dụng chống kết tập tiểu cầu được phân lập từ chi *Piper* L.

STT	Nhóm hợp chất	Tên hợp chất	Nguồn gốc	TLTK
1	Alcaloid	Piperlotin, 1- <i>trans</i> -cinnamoyl- pyrrolidin	<i>P. lolot</i> C. DC.	[82]
		Pipernonalin	<i>P. longum</i> L.	[105]
		Piperphilippinin	<i>P. philippinum</i> Miq.	[36]
		Piperolactam	<i>P. taiwanense</i> Lin & Lu	[33]
2	Lignan	Bornyl caffeate Kusunokinin	<i>P. philippinum</i> Miq.	[36]

Tất cả các nghiên cứu được tham khảo đều tiến hành đánh giá tác dụng chống kết tập tiểu cầu *in vitro*. Trong thử nghiệm này, các chất acid arachidonic, collagen, thrombin và yếu tố hoạt hóa tiểu cầu (PAF) được sử dụng để gây kết tập tiểu cầu *in vitro*. Kết quả nghiên cứu cho thấy hoạt tính chống kết tập tiểu cầu của hai chất piperlotin E và 1-*trans*-cinnamoylpyrrolidin là rất tiềm năng. Hoạt tính chống kết tập tiểu cầu của hai chất này ở nồng độ 100 µg/ml lần lượt là 96,2% và 100% và giá trị IC₅₀ tương ứng lần lượt là 11,5 µg/ml và 7,3 µg/ml [82].

✓ **Tác dụng chống oxy hóa**

Tác dụng này chủ yếu liên quan đến nhóm hợp chất polyphenol, vì vậy, có khá ít hợp chất alcaloid phân lập được từ chi *Piper* L. sở hữu hoạt tính này. Một số hợp chất có tác dụng chống oxy hóa được trình bày ở bảng 1.18.

Bảng 1.18. Một số chất có tác dụng chống oxy hóa được phân lập từ chi *Piper* L.

STT	Nhóm hợp chất	Tên hợp chất	Nguồn gốc	TLTK
1	Hydroquinon	1-methoxy-4-hydroxy-2-(3',7-dimethyl) -2'E, 6'- octadienyl-benzen	<i>P. crassinervium</i> Kunth	[147]

STT	Nhóm hợp chất	Tên hợp chất	Nguồn gốc	TLTK
2	Polyphenol	3,4-dihydroxyphenyl ethanol glucosid; 3,4-dihydroxy-6-(N-ethylamino) benzalcaloid	<i>P. nigrum</i> L.	[30]
		Chevibetol, allyl pyrocatechol	<i>P. betle</i> L.	[114]
3	Alcaloid	Piperumbellactam B, C	<i>P. umbellatum</i> L.	[130]

Các thử nghiệm đánh giá hoạt tính chống oxy hóa đều sử dụng phương pháp *in vitro*. Có khá nhiều phương pháp *in vitro* để đánh giá hoạt tính này bao gồm các phương pháp: đánh giá hoạt tính dọn gốc DPPH hoặc gốc ABTS; đánh giá hoạt tính khử β -caroten; thử nghiệm peroxyd hoặc hydroperoxyd hóa lipid; đánh giá khả năng tạo phức với ion kim loại...

✓ Tác dụng kháng khuẩn

Tác giả Reddy Venkat S. và cộng sự đã phân lập được từ phân đoạn dịch chiết ether của loài *P. nigrum* L. 5 hợp chất alcaloid. Kết quả thử hoạt tính kháng khuẩn cho thấy, 3 trong 5 chất phân lập được thể hiện tác dụng kháng khuẩn trên cả hai loại vi khuẩn gr(+) và gr(-). Trong đó, đáng chú ý là hợp chất 2E, 4E, 8Z -N-isobutyleicosatrien alcaloid ức chế 3 vi khuẩn gr(+) là *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus sphaericus* với giá trị nồng độ ức chế tối thiểu (MIC) lần lượt là 34 μ M, 34 μ M, 17 μ M và hợp chất pergumidien ức chế vi khuẩn gr(-) *Klebsiella aerogenes* với MIC là 58 μ M [115].

Trong một nghiên cứu khác, tác giả Carola Valdivia và cộng sự phân lập được 5 chất từ loài *P. obliquum* Ruiz & Pav., trong đó, 2 chất có cấu trúc khung alkenylphenol thể hiện hoạt tính khá mạnh trên 2 vi khuẩn gr(+) là *Escherichia coli* và *Staphylococcus epidermis* với MIC lần lượt là 5 μ g/ml và 2,5 μ g/ml [139].

✓ Tác dụng kháng nấm

Trong số các tác dụng dược lý đã được công bố của chi *Piper* L., tác dụng kháng nấm là khá nổi bật bởi có nhiều nghiên cứu đề cập đến tác dụng này. Hầu hết các nghiên cứu tiến hành phân lập hợp chất theo định hướng tác dụng sinh học thông qua khảo sát tác dụng của các phân đoạn dịch chiết khác nhau như dịch chiết

nước, MeOH, CHCl₃... của thực vật từ đó lựa chọn phân đoạn có tác dụng mạnh nhất. Hợp chất được phân lập từ chi *Piper* L. sở hữu hoạt tính kháng nấm có cấu trúc hóa học khá phong phú và thuộc nhiều nhóm khác nhau. Ngay trong cùng một nhóm, cấu trúc của các hợp chất cũng rất khác nhau. Điển hình nhất là nhóm alkaloid, hợp chất thuộc nhóm này có tác dụng kháng nấm gồm: dẫn xuất nhân pyrrolidin, dẫn xuất nhân aristolam, dẫn xuất nhân piplartin... Một số hợp chất có tác dụng kháng nấm được trình bày ở bảng 1.19.

Bảng 1.19. Một số chất có tác dụng kháng nấm được phân lập từ chi *Piper* L.

STT	Nhóm hợp chất	Tên hợp chất	Nguồn gốc	TLTK
1	Alcaloid	Arboreumin, piplartin	<i>P. arboreum</i> Aub.	[141]
		<i>N</i> -[5- (3', 4'-methylenedioxy-phenyl)- 2(<i>E</i>) - pentadienoyl] pyrrolidin	<i>P. hispidum</i> Sw.	[21]
		Piperlongumin	<i>P. chaba</i> Hunt.	[58]
2	Flavonoid	Naringin, sakuranetin	<i>P. crassinervium</i> Kunth	[41]
		5,4'-dihydroxy-7-methoxy-flavanon	<i>P. marginatum</i> Jacq.	[116]
3	Hydroquinon	1,4-dihydroxy-2-(3', 7'- dimethyl-1'-oxo-2'(<i>E</i>), 6'-octadienyl)	<i>P. crassinervium</i> Kunth	[41]
4	Lacton	Kavain, methysticin	<i>P. methysticum</i> G. Forst.	[146]
5	Neolignan	Eupomatenoid-3, eupomatenoid-5	<i>P. regnellii</i> (Miq.) C. DC.	[77]
6	Cyclo-pentenedion	Coruscanon A, B	<i>P. coruscans</i> H. B. & K.	[84]

Hai phương pháp thường được áp dụng trong nghiên cứu tác dụng kháng nấm là phương pháp sắc ký lớp mỏng sinh học và phương pháp *in vitro* (phương pháp khuếch tán hoặc pha loãng). Trong đó, phương pháp sắc ký lớp mỏng sinh học được sử dụng phổ biến hơn. Ở phương pháp này, tác dụng ức chế được xác định dựa vào vùng ức chế trên nền tối của bản mỏng. Với phương pháp *in vitro*, hoạt tính ức chế được đánh giá dựa vào đường kính vòng ức chế (phương pháp khuếch tán) hoặc dựa vào nồng độ thấp nhất ức chế sự phát triển của nấm (phương pháp pha loãng). Tác dụng kháng nấm của các mẫu thường được so sánh với 3 chất đối chiếu là những thuốc kháng nấm đã được sử dụng phổ biến trên lâm sàng như: miconazol, amphotericin B, nystatin [21], [130].

Một số loài nấm được sử dụng trong các nghiên cứu gồm có: *Cladosporium cladosporioides*, *Cladosporium sphaerospermum* [21], [141]; *Candida albicans*, *Cryptococcus neoformans* [84]; *Candida glabrata*, *Aspergillus favus*, *Fusarium solani* [130]...

✓ **Tác dụng ức chế enzym acetylcholinesterase**

Nghiên cứu của Ingkaninan K. và cộng sự cho thấy dịch chiết methanol của hạt loài *P. nigrum* L. và của thân loài *P. interruptum* Opiz thể hiện hoạt tính ức chế AChE *in vitro* với giá trị phần trăm hoạt tính ức chế lần lượt là 58% và 65% [63]. Trong một nghiên cứu khác, tác giả Adewusi E. A. và cộng sự đã xác định được dịch chiết EtOAc của rễ loài *P. carpanse* L. f. ức chế AChE với IC₅₀ là 0,041 mg/ml [17].

Những công bố về hoạt tính ức chế AChE *in vitro* và tác dụng cải thiện trí nhớ *in vivo* của các chất phân lập được từ chi *Piper* L. còn khá hạn chế và chủ yếu đề cập đến tác dụng này của piperin. Đây này là một alkaloid phổ biến nhất và có mặt trong nhiều loài thuộc chi *Piper* L. như: *P. nigrum* L., *P. retrofractum* Vahl., *P. chaba* Hunt, *P. betle* L., *P. cubeba* L. f... Hợp chất này sở hữu nhiều tác dụng sinh học khác nhau trong đó có tác dụng ức chế AChE ở đồi hải mã và tác dụng cải thiện trí nhớ trên động vật thực nghiệm thông qua thử nghiệm với mô hình mê lộ nước Morris [38], [143].

Ở Việt Nam, nhóm tác giả Đỗ Quyên và cộng sự đã tiến hành đánh giá hoạt tính ức chế AChE *in vitro* các mẫu dịch chiết MeOH của 2 loài *P. betle* L. và *P. lolot* C. DC. Kết quả cho thấy tỷ lệ phần trăm hoạt tính ức chế enzym *in vitro* của mẫu dịch chiết từ 2 loài *P. betle* L. và *P. lolot* C. DC. ở nồng độ 100 µg/ml lần lượt là 44,61 và 33,38%.

Ngoài những tác dụng sinh học của chi *Piper* L. được đề cập ở trên, nhiều tác dụng sinh học khác của chi này cũng đã được công bố gồm có: tác dụng chống viêm [86], tác dụng bảo vệ tế bào gan [94], tác dụng trên bệnh tiểu đường [25], tác dụng chống béo phì [150]...

* Độc tính

Bên cạnh những nghiên cứu đánh giá tác dụng sinh học của chi *Piper* L., nhiều nghiên cứu đánh giá tính an toàn của chi này cũng đã được thực hiện. Những nghiên cứu này tập trung đánh giá độc tính cấp và độc tính bán trường diễn của các mẫu cao hoặc dịch chiết từ dược liệu. Kết quả nghiên cứu tính an toàn của một số loài thuộc chi *Piper* L. được tóm tắt ở bảng 1.20.

Bảng 1.20. Kết quả đánh giá tính an toàn của một số loài thuộc chi *Piper* L.

STT	Loài nghiên cứu	Mẫu nghiên cứu	Kết quả	TLTK
1	<i>P. betle</i> L.	Cắn dịch chiết methanol của lá	LD ₅₀ >5.000 mg cắn/kg; Liều 5.000 mg cắn/kg trọng lượng cơ thể (TLCT), đường uống, trong 14 ngày trên chuột cống: không gây tổn thương mô bệnh học	[20]
2	<i>P. chaba</i> Hunt.	Cắn dịch chiết nước của quả	Liều 5.000 mg cắn/kg TLCT, đường uống, trong 14 ngày trên chuột cống: không có dấu hiệu độc; Liều 300-1.200 mg cắn/kg TLCT, đường uống, trong 90 ngày trên chuột cống: không có dấu hiệu độc, chỉ số sinh hóa không thay đổi, một vài chỉ số huyết học thay đổi trong giới hạn bình thường, không có tổn thương mô bệnh học	[66]

STT	Loài nghiên cứu	Mẫu nghiên cứu	Kết quả	TLTK
3	<i>P. longum</i> L.	Bột quả khô	Liều 3.750 mg bột quả khô/kg TLCT, đường uống trên chuột cống: không gây chết động vật; Liều 2.250 mg bột quả khô/kg TLCT, đường uống, trong 45 ngày trên chuột cống: chỉ số sinh hóa bình thường, số lượng bạch cầu tăng nhẹ, có biểu hiện của gan nhiễm mỡ và viêm ruột non nhẹ	[96]
4	<i>P. laetispicum</i> C. DC.	Căn dịch chiết phân đoạn ethylacetat của thân	LD ₅₀ lần lượt là 1.530 và 538,8 mg căn/kg TLCT theo đường uống và đường tiêm phúc mạc liều 500 mg căn/kg TLCT, đường uống, trong 90 ngày trên chuột nhắt: trọng lượng cơ thể không đổi tuy nhiên trọng lượng gan tăng, 50% chuột bị chết	[149]
5	<i>P. methysticum</i> G. Forster	Căn dịch chiết nước và dịch chiết aceton	Liều 50 mg căn/kg TLCT x 3 lần/tuần x 3 tháng, trên thỏ: không thấy có dấu hiệu độc; Thử với căn aceton ở mức liều 24 mg/kg TLCT trên chuột cống và 20 mg/kg TLCT trên chó không thấy xuất hiện tác dụng phụ nào sau 26 tuần thử nghiệm. Tuy nhiên, ở liều cao nhất đem thử là 320 mg căn/kg TLCT và 60 mg căn/kg TLCT lần lượt trên chuột cống và chó thấy có sự thay đổi nhẹ về hình ảnh mô bệnh học của gan và thận	[120]
6	<i>P. nigrum</i> L.	Căn dịch chiết nước của quả	Liều 5.000 mg căn/kg TLCT, đường uống, trong 14 ngày trên chuột cống: không gây chết động vật; Liều 300-1.200 mg căn/kg TLCT, đường uống, trong 90 ngày trên chuột cống: không có tổn thương mô bệnh học, các chỉ số về sinh hóa và huyết học bình thường	[39]

Kết quả ở bảng 1.20 cho thấy, độc tính của các loài thuộc chi *Piper* L. rất khác nhau. Một số loài gần như không độc hoặc độc tính rất thấp như: *P. betle* L., *P. nigrum* L. và *P. longum* L. Những loài này đã được đánh giá độc tính cấp ở mức liều từ 3.750-5.000 mg căn/kg TLCT theo đường uống và đều không thấy dấu hiệu độc cũng như không có động vật nào bị chết trong khoảng thời gian 14 ngày nghiên cứu. Kết quả đánh giá độc tính bán trường diễn của 3 thảo dược trên cho thấy không có những thay đổi bất thường về chỉ số sinh hóa, chỉ số huyết học và hình ảnh mô bệnh học của một số cơ quan như gan, thận, não đều bình thường trong khoảng thời gian 45-118 ngày nghiên cứu. Tuy nhiên, một số loài thuộc chi *Piper* L. khác lại có độc tính đáng lưu ý như: *P. laetispicum* C. DC., *P. methysticum* G. Forster... Đặc biệt, đã có báo cáo về một vài trường hợp người bệnh ở Úc, Đức, Thụy sĩ..., sau khi sử dụng sản phẩm có chứa loài *P. methysticum* G. Forster thấy có biểu hiện độc tính ở gan.

Bên cạnh những nghiên cứu đánh giá tính an toàn của căn hoặc dịch chiết từ các loài thuộc chi *Piper* L., một số nghiên cứu đã tiến hành đánh giá tính an toàn của hợp chất tinh khiết phân lập được từ những loài thuộc chi này như: piperin, piperiton, piperonyl butoxid... [110], [131]. Đáng quan tâm nhất là một số nghiên cứu đánh giá tính an toàn của piperin bởi hiện nay có khá nhiều sản phẩm nguồn gốc thảo dược có chứa hợp chất này. Piperin được phối hợp trong những sản phẩm này nhằm làm tăng sinh khả dụng của thành phần hoạt chất chính (ví dụ như: curcumin, polyphenol...) của những sản phẩm đó [127].

Trong nghiên cứu của tác giả Piyachaturawat P. và cộng sự (1983), độc tính cấp của piperin đã được xác định với giá trị LD₅₀ của các đường dùng thuốc gồm tiêm tĩnh mạch, tiêm phúc mạc, tiêm bắp lần lượt là 15, 43 và 400 mg/kg TLCT chuột nhắt. LD₅₀ trên chuột cống theo đường tiêm phúc mạc cũng được xác định là 33,5 mg/kg TLCT. Nghiên cứu độc tính bán trường diễn trên chuột nhắt cho thấy ở mức liều 100 mg/kg TLCT theo đường uống không gây độc và TLCT không thay đổi. Tuy nhiên, khi mức liều nghiên cứu tăng thì TLCT của

chuột bị giảm và số chuột chết tăng. Nghiên cứu độc tính bán trường diễn trên chuột cống cho thấy ở mức liều 500 mg/kg TLCT theo đường uống gây phù nề nghiêm trọng đường tiêu hóa, một số chuột bị chảy máu bàng quang. Kiểm tra mô bệnh học quan sát thấy những thay đổi về đặc điểm vi học ở dạ dày, ruột non, tuyến thượng thận và bàng quang. Mặc dù vậy, mức liều được sử dụng trong nghiên cứu là cao hơn nhiều so với mức liều thực tế piperin thường được sử dụng. Vì vậy, những tác dụng phụ trên chỉ có thể gặp phải nếu dùng liều rất cao và trong thời gian dài [110].

1.2. Tổng quan về nghiên cứu sàng lọc hoạt tính ức chế enzym acetylcholinesterase *in vitro*

1.2.1. Acetylcholin, enzym acetylcholinesterase và giả thuyết về vai trò của hệ cholinergic đối với bệnh Alzheimer

1.2.1.1. Acetylcholin

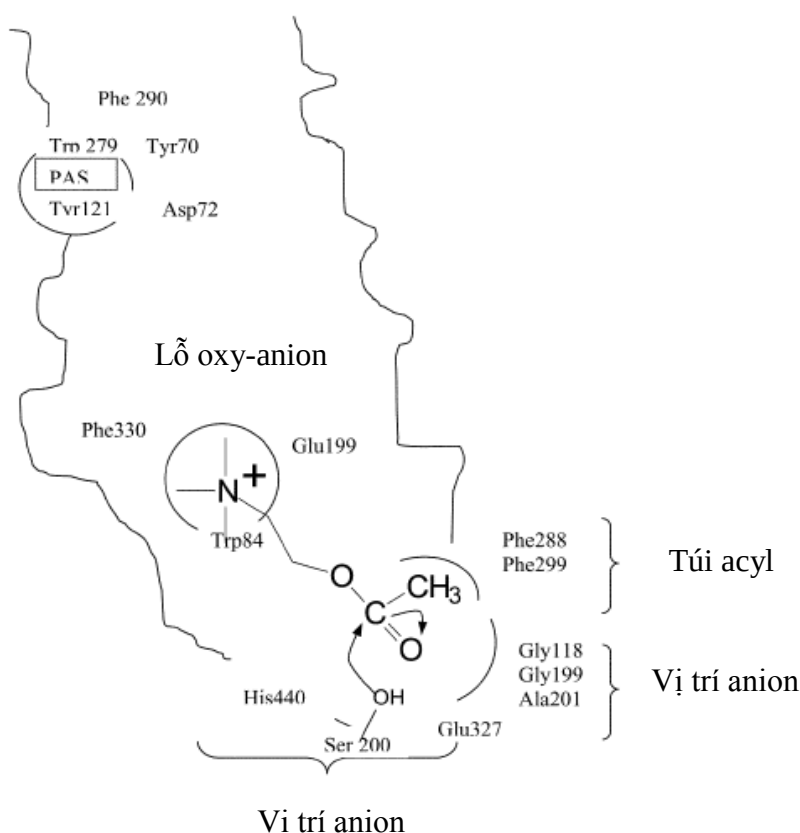
Acetylcholin (ACh) được tìm thấy ở động vật có xương sống, động vật chân khớp và là một trong những chất chính mà nhờ đó xung điện được truyền giữa các tế bào thần kinh với nhau hoặc từ tế bào thần kinh tới cơ vân và cơ trơn. ACh được phát hiện lần đầu tiên vào năm 1867 dưới dạng một chất tổng hợp và được phát hiện trong cơ thể người năm 1906 từ dịch chiết tuyến thượng thận.

ACh được tổng hợp từ cholin và acetyl CoA do enzym cholin acetyl transferase xúc tác phản ứng, sau đó, được lưu giữ ở vị trí cuối dây thần kinh, trong các túi. Các chất trong túi được giải phóng khi vị trí cuối dây thần kinh bị khử cực và khi đó ACh được giải phóng vào khe synap và gắn với thụ thể. ACh sau khi được giải phóng có thời gian bán thải rất ngắn vì sự có mặt của AChE. Đây là enzym thủy phân dây nối este trong phân tử ACh tạo ra cholin và acid acetic. Cholin sau đó được thu nhận lại vào tế bào thần kinh để tổng hợp ACh. Do đó, những chất có tác dụng ức chế AChE sẽ kéo dài thời gian tồn tại và thời gian tác dụng của ACh [10].

Trong những năm gần đây, ACh được thấy có liên quan tới nhiều chức năng khác bên cạnh chức năng dẫn truyền thần kinh. Trong đó, ACh được xem là có liên quan đến sự tiến triển của bệnh viêm dây thần kinh và quá trình sản sinh sợi amyloid, những đặc điểm điển hình được thấy trong tế bào não của bệnh nhân mắc bệnh Alzheimer.

1.2.1.2. Enzym acetylcholinesterase

AChE, với vai trò thủy phân ACh, là một protein có hình elip chứa một rãnh sâu, được gọi là hẻm. Quá trình thủy phân ACh được xúc tác bởi AChE diễn ra ở đáy của hẻm enzym theo cơ chế khá phức tạp. Ở đáy của hẻm, nơi xảy ra sự thủy phân cơ chất ACh, có 4 vị trí hoạt động chính là vị trí este hóa, lỗ oxy-anion, vị trí anion và túi acyl [61]. Những vị trí hoạt động này của AChE được minh họa ở hình 1.11.



Hình 1.11. Các vị trí hoạt động tại hẻm của AChE [61]

AChE là một trong những enzym thủy phân nhanh nhất. Hoạt tính của nó mạnh gấp khoảng 10 lần so với serin protease hoặc butyrylcholinesterase ở cùng điều kiện nhiệt độ và pH.

1.2.1.3. Giả thuyết về vai trò của hệ cholinergic đối với bệnh Alzheimer

AChE chủ yếu có mặt trong hệ thần kinh trung ương, xúc tác thủy phân chất dẫn truyền ACh. Quá trình này cần thiết để chuyển tế bào thần kinh hệ cholinergic từ trạng thái hoạt động sang tình trạng nghỉ [10], [61]. Ở bệnh nhân Alzheimer thấy có sự giảm trầm trọng nồng độ chất dẫn truyền thần kinh ACh. Tình trạng này gây suy giảm khả năng nhận thức đối với người bệnh. Giả thuyết về vai trò của hệ cholinergic trong bệnh Alzheimer được đưa ra lần đầu tiên vào năm 1982 bởi tác giả Whitehouse và cộng sự. Sau đó, giả thuyết này nhanh chóng trở thành động lực cho quá trình nghiên cứu theo hướng cải thiện chức năng hệ cholinergic trên bệnh nhân mắc bệnh Alzheimer. Theo giả thuyết này, những chất ức chế sự hoạt động của AChE làm tăng nồng độ và thời gian hoạt động của ACh ở synap thần kinh từ đó cải thiện triệu chứng bệnh [44].

1.2.2. Một số phương pháp thường dùng trong nghiên cứu sàng lọc hoạt tính ức chế enzym acetylcholinesterase in vitro

Nghiên cứu sàng lọc là giai đoạn đầu của quá trình nghiên cứu phát triển thuốc mới. Giai đoạn này thường tiến hành đánh giá hoạt tính của một lượng lớn các mẫu thử. Vì vậy, những phương pháp được lựa chọn để sử dụng ở giai đoạn này phải là những phương pháp có thể tiến hành đồng thời nhiều mẫu, lượng mẫu cần ít, cho kết quả nhanh và chi phí thấp. Phương pháp thử *in vitro* đáp ứng được tất cả những yêu cầu đó. Đối với nghiên cứu sàng lọc tác dụng ức chế AChE *in vitro*, có 2 phương pháp thường được sử dụng là phương pháp sử dụng thuốc thử Ellman và phương pháp sử dụng thuốc thử muối Fast Blue B.

1.2.2.1. Phương pháp sử dụng thuốc thử Ellman

Trong số những phương pháp được sử dụng để nghiên cứu sàng lọc hoạt tính ức chế AChE *in vitro*, phương pháp sử dụng thuốc thử Ellman được xây dựng và ứng dụng sớm nhất. Hiện nay, phương pháp này vẫn được sử dụng khá phổ biến ở nhiều nghiên cứu cùng hướng, trong đó, phương pháp đo quang

được sử dụng nhiều hơn phương pháp sắc ký lớp mỏng sinh học. Phương pháp này sử dụng cơ chất là acetylthiocholin iodid (ATCI) và thuốc thử là 5,5'-dithiobis - nitrobenzoic acid (DTNB).

*** Phương pháp đo quang**

Phương pháp của Ellman dùng để xác định hoạt tính của enzym cholinesterase dựa vào đo quang được tác giả này mô tả lần đầu tiên vào năm 1961 [48]. Nguyên tắc của phương pháp: cơ chất ATCI bị thủy phân nhờ xúc tác của cholinesterase tạo thiocholin. Thiocholin phản ứng với thuốc thử DTNB giải phóng ra hợp chất 5-thio-2-nitrobenzoic acid màu vàng. Hợp chất này được xác định bằng cách đo độ hấp thụ của dung dịch ở bước sóng 412 nm.

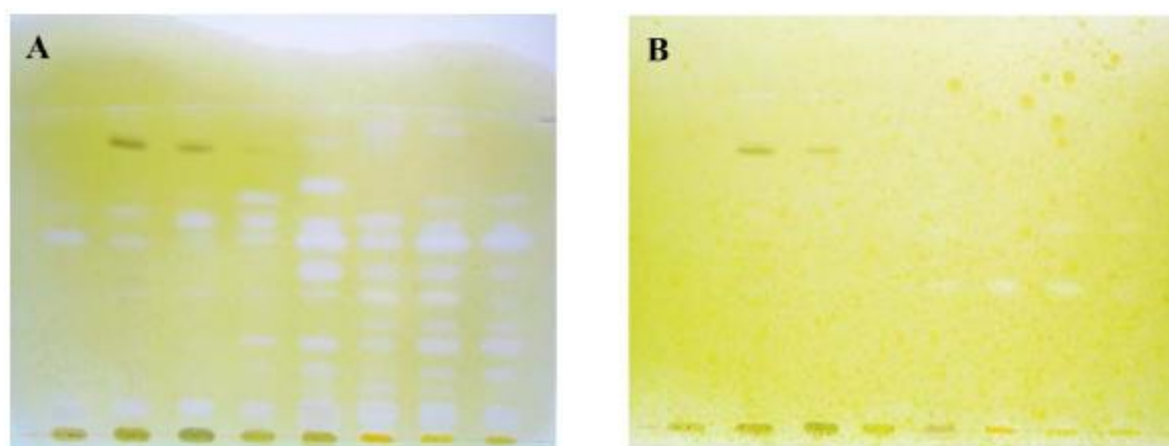
Sau đó, nhiều nghiên cứu sàng lọc về hoạt tính ức chế AChE *in vitro* khác tiếp tục được thực hiện. Tuy nhiên, so với phương pháp gốc được công bố bởi Ellman, phương pháp được triển khai trong các nghiên cứu sau đó đều có một số thay đổi về: nguồn gốc và hoạt độ của enzym, loại đệm sử dụng, nồng độ dung dịch cơ chất và thuốc thử... cũng như tỷ lệ phối hợp của chúng vào hỗn hợp phản ứng [74], [98], [125].

*** Phương pháp sắc ký lớp mỏng sinh học**

Trên cơ sở phương pháp đo quang sử dụng thuốc thử Ellman, phương pháp sắc ký lớp mỏng sinh học (BTLC) đã được phát triển. Ở phương pháp này, sau khi bản mỏng được triển khai, hỗn hợp gồm dung dịch thuốc thử DTNB và cơ chất ATCI được phun lên bản mỏng, sau đó mới phun dung dịch enzym. Những chất gây ức chế AChE sẽ làm xuất hiện các vết màu trắng trên nền vàng [18], [63].

Một trong những hạn chế của phương pháp BTLC là có thể gặp phải hiện tượng dương tính giả, hiện tượng vết màu trắng xuất hiện trên bản mỏng không phải do tác dụng ức chế AChE. Để khắc phục hạn chế này, bên cạnh bản mỏng thử phải tiến hành làm thí nghiệm với một bản mỏng khác (bản đối chiếu). Các bước tiến hành trên bản đối chiếu tương tự như trên bản thử chỉ

khác ở giai đoạn phun thuốc thử hiện màu. Đối với bản thử, hỗn hợp dung dịch thuốc thử DTNB và cơ chất ATCI được phun trước, sau đó mới phun dung dịch AChE. Với bản đối chiếu, dung dịch thuốc thử DTNB được phun trước, sau đó hỗn hợp gồm dung dịch cơ chất ATCI và dung dịch AChE được phun sau. Cách bố trí thử nghiệm như trên nhằm đảm bảo những vết màu trắng xuất hiện trên cả hai bản là những vết cho phản ứng dương tính giả [18]. Hình 1.12 dưới đây minh họa kết quả nghiên cứu sử dụng phương pháp BTLC hiện màu bằng thuốc thử Ellman.



Hình 1.12. Bản BTLC của dịch chiết loài *Corydalis sp* được hiện màu bằng thuốc thử Ellman [18]

- A. Phản ứng ức chế enzym, vết trắng chỉ ra hoạt tính ức chế enzym.
- B. Phản ứng dương tính giả, vết trắng không phải vì ức chế enzym.

1.2.2.2. Phương pháp sử dụng thuốc thử muối Fast Blue B

So với phương pháp sử dụng thuốc thử Ellman, số lượng nghiên cứu sử dụng phương pháp này để sàng lọc hoạt tính ức chế AChE *in vitro* khá hạn chế. Phương pháp này sử dụng cơ chất là α -naphthyl acetat và thuốc thử là muối Fast Blue B (muối *O*-dianisidin bis(diazotized) zinc double).

*** Phương pháp đo quang**

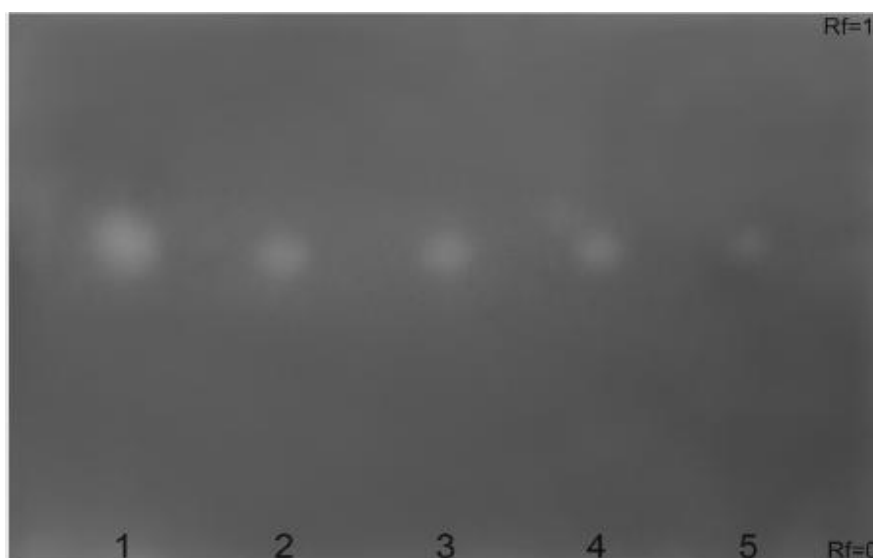
Thử nghiệm đo quang sử dụng thuốc thử muối Fast Blue B được công bố lần đầu tiên bởi tác giả Van Asperen K. vào năm 1962 [140]. Nguyên tắc của phương pháp: cơ chất α -naphthyl acetat bị thủy phân bởi enzym esterase giải phóng chất α -naphthol. Chất này sau đó phản ứng với thuốc thử muối Fast Blue

B tạo thành sản phẩm màu diazo. Hợp chất này được xác định bằng cách đo độ hấp thụ của dung dịch ở bước sóng 600 nm.

Tuy nhiên, sau đó, không có nhiều nghiên cứu sử dụng phương pháp này để nghiên cứu sàng lọc tác dụng ức chế AChE *in vitro* và một trong số đó là nghiên cứu của tác giả Di Giovanni S. [44], [90]. Phương pháp được sử dụng trong nghiên cứu của tác giả này có một số thay đổi so với phương pháp của tác giả Van Asperen về: nguồn gốc và hoạt độ của enzym, hóa chất để bất hoạt enzym và nồng độ dung dịch cơ chất.

*** Phương pháp sắc ký lớp mỏng sinh học**

Muối Fast Blue B cũng được sử dụng như một thuốc thử trong phương pháp BTLC để nghiên cứu sàng lọc hoạt tính ức chế AChE *in vitro* và được phát triển bởi Marston năm 2002. Ở phương pháp này, sau khi bản mỏng được triển khai, dung dịch enzym được phun lên bản mỏng. Sau đó, hỗn hợp gồm dung dịch cơ chất α -naphthyl acetat và dung dịch thuốc thử muối Fast Blue B được phun lên bản mỏng. Những chất gây ức chế AChE sẽ làm xuất hiện các vết màu trắng trên nền màu tím sẫm [44], [148]. Hình 1.13 dưới đây minh họa kết quả nghiên cứu sử dụng phương pháp BTLC hiện màu bằng muối Fast Blue B.



Hình 1.13. Bản BTLC của các vết có lượng Physostigmin từ 10^{-5} đến 10^{-1} μg được hiện màu bằng thuốc thử muối Fast Blue B [148]

Cũng giống phương pháp BTLC sử dụng thuốc thử Ellman, phương pháp BTLC sử dụng thuốc thử muối Fast Blue B cũng có thể gặp phải hiện tượng dương tính giả. Để loại trừ các vết dương tính giả, một bản mỏng đối chiếu tương tự với bản mỏng thử được triển khai. Sau đó, các dung dịch α -naphthol và muối Fast Blue B được phun lên bản mỏng mà không có dung dịch enzym. Nếu xuất hiện vết màu trắng thì vết đó là vết dương tính giả.

Bên cạnh 2 phương pháp được trình bày ở trên, phương pháp điện di mao quản cũng đã được sử dụng để nghiên cứu sàng lọc tác dụng ức chế AChE *in vitro* trong nghiên cứu của Tang Z. M. (2007) [133]. Tuy nhiên, mới chỉ có rất ít nghiên cứu sử dụng phương pháp này được công bố. Lý do là bởi phương pháp này đòi hỏi phải có trang thiết bị phù hợp với thao tác thử nghiệm tương đối phức tạp. Ngoài ra, hạn chế về số lượng mẫu thử được đánh giá ở mỗi lần thao tác máy cũng góp phần cản trở việc ứng dụng phương pháp điện di mao quản trong nghiên cứu sàng lọc.

Như vậy, với số lượng trên 1.000 loài, chi *Piper* L. là một trong những chi lớn nhất của ngành thực vật hạt kín. Chi này cũng đã được nghiên cứu khá nhiều về thành phần hóa học và tác dụng sinh học. Về thành phần hóa học, nhiều hợp chất thuộc một số nhóm như: alkaloid, tinh dầu, flavonoid, alkanpolyenylbenzen, lignan... đã được phân lập và nhận dạng từ chi *Piper* L. Đồng thời, chi này sở hữu một số tác dụng sinh học đáng quan tâm như: gây độc tế bào, chống kết tập tiểu cầu, kháng nấm... Đặc biệt, những kết quả nghiên cứu được công bố gần đây về tác dụng ức chế AChE của một số loài thuộc chi *Piper* L. *in vitro* và tác dụng cải thiện trí nhớ *in vivo* của piperin cũng rất đáng quan tâm. Kết quả này đã mở rộng thêm về các đối tượng nghiên cứu tiềm năng cho quá trình tìm kiếm thuốc mới điều trị bệnh Alzheimer. Điều này càng có ý nghĩa hơn khi số lượng loài thuộc chi *Piper* L. đã được nghiên cứu trên thế giới mới chỉ khoảng trên 100 loài, chiếm tỷ lệ khoảng 10% so với tổng số hơn 1.000 loài của chi này. Riêng ở Việt Nam, cũng có đến 46 loài thuộc chi *Piper* L. phân bố

rộng khắp cả nước, trong đó, có một số loài đặc hữu. Tuy nhiên, chưa có nhiều nghiên cứu về thành phần hóa học và tác dụng sinh học của chi *Piper* L. được thực hiện ở nước ta. Nghiên cứu trong nước chủ yếu tiến hành phân tích thành phần tinh dầu của một số loài thuộc chi *Piper* L. phổ biến như *P. betle* L., *P. lolot* C. DC., *P. nigrum* L. Tác dụng sinh học của chi *Piper* L. được nghiên cứu trong nước cũng chỉ giới hạn ở một vài tác dụng như: chống kết tập tiểu cầu, kháng nấm và kháng khuẩn. Vì vậy, có thể thấy tiềm năng nghiên cứu về tác dụng ức chế AChE của những loài thuộc chi *Piper* L. ở Việt Nam là tương đối lớn. Đây cũng là cơ sở khoa học để hình thành ý tưởng của đề tài này.

Với mục tiêu nghiên cứu sàng lọc hoạt tính ức chế AChE *in vitro* của các mẫu cần và hợp chất tinh khiết phân lập được từ 2 loài nghiên cứu, phương pháp đo quang sử dụng thuốc thử Ellman được lựa chọn để áp dụng trong nghiên cứu của đề tài luận án.

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

2.1. Nguyên vật liệu

2.1.1. Mẫu nghiên cứu

Để lựa chọn đối tượng nghiên cứu của luận án, trước tiên, tiến hành khảo sát hoạt tính ức chế AChE của 12 loài thuộc chi *Piper* L. (được ký hiệu từ HVD-001-11 đến HVD-012-11) thu hái ở Vườn Quốc gia Ba Vì (Hà Nội) và Vườn Quốc gia Cúc Phương (Ninh Bình). Tất cả các mẫu thực vật này được thu hái vào thời điểm tháng 01 năm 2011. Trên cơ sở kết quả khảo sát hoạt tính, lựa chọn được 2 loài có ký hiệu là HVD-002-11 và HVD-004-11 làm đối tượng nghiên cứu của đề tài. Sau đó, mẫu thực vật của hai loài này được thu hái lại tại Vườn Quốc gia Cúc Phương vào tháng 04 năm 2011 để làm tiêu bản (với đầy đủ bộ phận sinh sản) và để tiến hành nghiên cứu về thành phần hóa học và tác dụng sinh học. Tiêu bản mẫu của hai loài nghiên cứu được lưu giữ tại Phòng tiêu bản, Viện Sinh thái và Tài nguyên sinh vật (có giấy xác nhận kèm theo ở phụ lục 3 với số hiệu tiêu bản mẫu lưu trùng với ký hiệu mẫu ban đầu).

2.1.2. Hóa chất, dung môi

- Hóa chất: AChE loại EC 3.1.1.7, acetylthiocholin iodid (ATCI), acid 5-5'-dithiobis-2-nitrobenzoic (DTNB), tris base và berberin clorid chuẩn (Sigma); HCl (Merck).

- Dung môi: *n*-hexan, cloroform (CHCl_3), methylen clorid (CH_2Cl_2), ethylacetat (EtOAc), aceton, *n*-buthanol (BuOH), methanol (MeOH), dimethylsulfoxid (DMSO): đạt tiêu chuẩn tinh khiết phân tích (Duksan - Hàn Quốc); methanol: đạt tiêu chuẩn tinh khiết dùng cho phân tích HPLC (Merck); cloroform (CDCl_3), aceton [$(\text{CD}_3)_2\text{CO}$], methanol (MeOD): đạt tiêu chuẩn tinh khiết dùng cho phân tích NMR (Sigma và Merck).

2.1.3. Máy móc, thiết bị và dụng cụ

- Phổ HR-ESI-MS được đo trên máy QTOF 6550, Agilent (Mỹ) được đặt tại phòng thí nghiệm của Đại học Yonsei, Hàn Quốc.

- Phổ HR-FAB-MS được đo trên máy JEOL JMS-700 MStation™ (Đức) được đặt tại phòng thí nghiệm của Đại học Quốc gia Kyungpook, Daegu, Hàn Quốc.
- Phổ cộng hưởng từ hạt nhân một chiều và hai chiều được đo trên máy Varian Unity Inova 400 (Mỹ) được đặt tại phòng thí nghiệm của Đại học Catholic, Daegu, Hàn Quốc.
- Hệ thống sắc ký lỏng hiệu năng cao điều chế Waters 600E (Mỹ) với đầu dò UV-Vis sử dụng cột YMC-Pack ODS-A 5μm, 20 x 250 mm.
- Hệ thống sắc ký lỏng áp suất trung bình Yamazen YFLC-GR (Nhật).
- Máy hứng mẫu tự động Eyela DC-1200 (Nhật).
- Hệ thống cất quay chân không (Eyela, Nhật) kết hợp bộ phận làm lạnh tuần hoàn (Daihan, Hàn Quốc).
- Máy đo quang ELISA, VERSA max (Mỹ).
- Máy đo pH Mettler Toledo (Thụy sĩ).
- Cân phân tích Mettler Toledo (Thụy sĩ) độ chính xác 0,1 mg.
- Đèn soi tử ngoại UVLS 24-EL (Anh).
- Kính lúp soi nổi Leica EZ4 (Đức).
- Đĩa 96 giếng (Thermo, Mỹ).
- Bản mỏng silica gel F₂₅₄ tráng sẵn trên tấm nhôm và RP-18 F_{254S} tráng sẵn trên tấm thủy tinh (Merck).
- Hệ thống chiết hồi lưu dung tích bình cầu 10 lít.
- Dụng cụ thủy tinh: các loại cột đường kính từ 1 - 10cm, dài từ 30 - 100 cm; bình cầu ngoại dung tích 50 - 2000 ml; ống nghiệm, ống đựng mẫu NMR, pipet chính xác...

2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Phân tích đặc điểm thực vật

- Phân tích hình thái:

Quan sát và mô tả đặc điểm hình thái thực vật về: dạng sống; thân; lá (hình dạng phiến, chóp, gân, gốc, cuống, kích thước...); hoa (dạng cụm hoa, vị

trí cụm hoa, kích thước, lá bắc, bộ nhị, bộ nhụy...); quả và hạt (hình dạng, màu sắc, kích thước...).

Dụng cụ sử dụng gồm: kính lúp soi nổi, máy ảnh kỹ thuật số, thước kẻ.

- Thu hái, làm tiêu bản mẫu cây khô (có đầy đủ bộ phận sinh sản) và lưu giữ tiêu bản tại Phòng tiêu bản, Viện Sinh thái và Tài nguyên sinh vật [9].

- Phân tích đặc điểm vi phẫu: tiêu bản vi phẫu thân được cắt ngang ở đoạn thân thứ 3 tính từ đầu cành. Tiêu bản vi phẫu lá được cắt ngang ở vị trí khoảng 1/2-1/3 dưới gần gốc của lá trưởng thành. Sau đó, các mảnh cắt được nhuộm và làm tiêu bản vi phẫu. Quan sát, mô tả và chụp ảnh các đặc điểm vi phẫu qua kính hiển vi [2], [12].

- Phân tích đặc điểm vi học: bột phần trên mặt đất được sấy khô, nghiền mịn và làm tiêu bản bột. Quan sát, mô tả và chụp ảnh các đặc điểm qua kính hiển vi [12].

- Xác định tên khoa học của loài nghiên cứu dựa trên tài liệu tham khảo và so sánh với tiêu bản mẫu. Một số tài liệu được sử dụng để tham khảo gồm thực vật chí của: Đông Dương [153], Trung Quốc [37] và Ấn Độ [60]. Bên cạnh đó, còn có sự giúp đỡ của chuyên gia phân loại thực vật của Việt Nam.

2.2.2. Nghiên cứu thành phần hóa học

2.2.2.1. Phương pháp chiết xuất và phân lập hợp chất

Để định hướng quá trình nghiên cứu phân lập hợp chất, đầu tiên, tiến hành khảo sát hoạt tính ức chế AChE *in vitro* của các mẫu phân đoạn dịch chiết trong dung môi có độ phân cực khác nhau chiết xuất từ 2 loài nghiên cứu. Sau đó, những phân đoạn có hoạt tính mạnh nhất được chọn cho quá trình nghiên cứu phân lập hợp chất tiếp theo. Quá trình nghiên cứu phân lập hợp chất từ các phân đoạn đã chọn chủ yếu sử dụng phương pháp sắc ký cột kết hợp với một số phương pháp sắc ký khác như phương pháp: sắc ký lỏng áp suất trung bình, sắc ký lỏng hiệu năng cao điều chế và sắc ký lớp mỏng điều chế. Các phân đoạn trong

quá trình phân lập được theo dõi bằng sắc ký lớp mỏng và sắc ký lỏng hiệu năng cao. Đặc điểm chính của những phương pháp sắc ký sử dụng trong nghiên cứu như sau [13]:

- Sắc ký cột mở (CC):

- + Cột thủy tinh: đường kính thay đổi từ 1 - 10 cm với chiều dài thay đổi từ 30 - 100 cm.

- + Pha tĩnh: thường dùng hạt silica gel pha thuận cỡ hạt 63 - 200 μm (dùng cho cột to đường kính khoảng 10 cm) hoặc 40 - 63 μm (dùng cho cột có đường kính 5 cm trở xuống); silica gel pha đảo cỡ hạt 30 - 50 μm .

- + Phương pháp nạp cột và đưa mẫu lên cột:

Hạt silica gel được nạp vào cột theo phương pháp nạp cột ướt sử dụng hỗn hợp dung môi chính là pha động để rửa giải. Lựa chọn pha động rửa giải căn cứ vào bản mỏng sắc ký. Mẫu phân lập được đưa lên cột bằng cách đưa thẳng dung dịch hòa tan mẫu hoặc phân tán mẫu trong silica gel, sau đó, làm khô silica gel, nghiền mịn rồi đưa lên cột.

- + Hứng và gom dịch rửa giải: quá trình rửa giải, dịch rửa được hứng bằng ống thủy tinh sử dụng thiết bị hứng tự động. Dịch rửa giải trong các ống được gom lại dựa vào kết quả phân tích sắc ký lớp mỏng.

- Sắc ký lớp mỏng (TLC):

- + Bản mỏng: sắc ký TLC được thực hiện trên bản mỏng tráng sẵn pha thuận DC-Alufolien 60 GF₂₅₄ và pha đảo RP-18 (Merck).

- + Hiện màu bản mỏng: sắc ký đồ được quan sát dưới ánh sáng đèn tử ngoại ở hai bước sóng 254 và 365 nm hoặc bản mỏng được phun dung dịch acid sulfuric 10% sau đó sấy nóng bản mỏng ở 200⁰C trong khoảng 5 - 10 phút.

- Sắc ký lớp mỏng điều chế (PTLC):

Được thực hiện trên tấm kính tráng sẵn silica gel 60 GF₂₅₄ (Merck) kích thước 20x20 cm, phát hiện vết chất bằng đèn tử ngoại ở bước sóng 254 nm hoặc 365 nm. Sau đó, cạo lớp silica gel đã được đánh dấu, nghiền mịn, giải hấp phụ bằng rửa giải với dung môi thích hợp và loại dung môi bằng cô quay chân không.

- Sắc ký lỏng áp suất trung bình (MPLC):

MPLC được thực hiện trên hệ thống Yamazen YFLC-GR sử dụng cột pha đảo silica gel RP-C18. Mẫu cần phân lập được nạp vào cột qua hệ thống van điều chỉnh. Thể tích mẫu nạp vào cột tối đa là 2 ml. Hứng và gom mẫu dựa vào kết quả TLC.

- Sắc ký lỏng hiệu năng cao điều chế (PHPLC):

PHPLC được thực hiện trên hệ thống Waters 600E với đầu dò UV-Vis sử dụng cột YMC-Pack ODS-A kích thước 20 x 250 mm. Theo dõi pic xuất hiện trên sắc ký đồ và hứng mẫu. Tập trung các mẫu hứng được và cô quay tới gần khô.

2.2.2.2. Phương pháp xác định cấu trúc hợp chất phân lập được

- Phương pháp vật lý: dựa vào góc quay cực.

- Phương pháp hóa học: dựa vào phản ứng hóa học đặc trưng.

- Phương pháp hóa lý:

+ Dựa vào dữ liệu phổ cộng hưởng từ hạt nhân một chiều ($^1\text{H-NMR}$, $^{13}\text{C-NMR}$, DEPT) và hai chiều (HMBC, HSQC, COSY).

+ Phổ khối lượng phân giải cao (HR-MS) chủ yếu được sử dụng để xác định công thức phân tử của hợp chất.

2.2.3. Phương pháp đánh giá hoạt tính ức chế enzym acetylcholinesterase in vitro

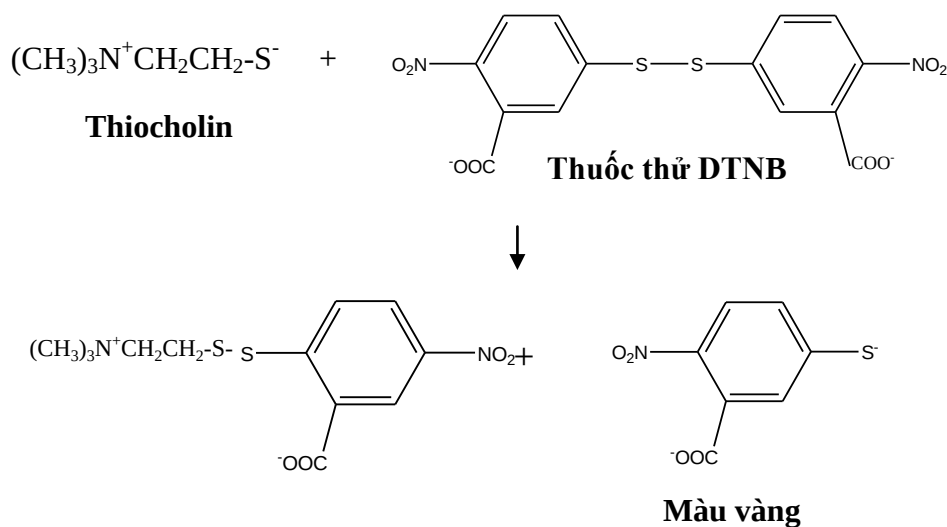
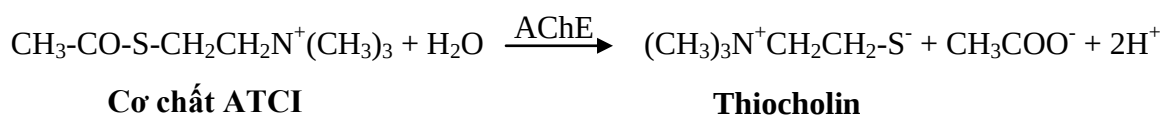
2.2.3.1. Triển khai phương pháp đánh giá hoạt tính ức chế enzym acetylcholinesterase in vitro

* Cách tiếp cận

Phương pháp đo quang *in vitro* dùng để đánh giá hoạt tính ức chế enzym cholinesterase được xây dựng và sử dụng trong nghiên cứu lần đầu tiên bởi tác giả Ellman vào năm 1961. Nguyên tắc của phương pháp như sau [48]:

Cơ chất acetylthiocholin iodid (ATCI) bị thủy phân nhờ xúc tác của AChE tạo thiocholin. Sản phẩm thiocholin phản ứng với thuốc thử acid 5-5'-dithiobis-2-nitrobenzoic (DTNB) tạo thành hợp chất acid 5-thio-2-nitrobenzoic có màu vàng. Lượng hợp chất màu được tạo thành này tỷ lệ thuận với

hoạt độ của AChE. Dựa vào xác định độ hấp thụ (cường độ màu) của mẫu thử ở 412 nm để đánh giá hoạt tính của AChE. Phương trình phản ứng được trình bày ở hình 2.1.



Hình 2.1. Quá trình phản ứng diễn ra

trong phương pháp đo quang sử dụng thuốc thử Ellman

Kể từ thời điểm đó đến nay, đã có rất nhiều nghiên cứu sàng lọc khác cùng hướng được thực hiện. Đa số các nghiên cứu này đều sử dụng phương pháp đo quang của Ellman kết hợp một số điều chỉnh. Cụ thể, điều kiện của phản ứng enzym thường có sự thay đổi giữa các nghiên cứu về:

- Nồng độ dung dịch cơ chất ATCI: khoảng nồng độ cơ chất được sử dụng trong các nghiên cứu thay đổi từ 1-75 mM [44], [79], [125].
- Nồng độ dung dịch thuốc thử DTNB: khoảng nồng độ thuốc thử được sử dụng trong các nghiên cứu thay đổi từ 1,5-10 mM [44], [74], [79], [125].
- Hoạt độ của AChE: khoảng hoạt độ enzym được sử dụng trong các nghiên cứu thay đổi từ 0,2-5,0 IU/ml [17], [44], [74], [125].
- Thời gian ủ trước phản ứng: khoảng 5-15 phút [74], [98]. Đây là khoảng thời gian cần thiết để các thành phần trong hỗn hợp phản ứng đạt được trạng thái

ổn định. Đồng thời, khoảng thời gian này có thể cần thiết để hình thành liên kết giữa cơ chất và enzym.

- Thời gian để phản ứng được xúc tác bởi enzym diễn ra: khoảng 5-30 phút [98]. Khoảng thời gian này phụ thuộc vào tốc độ phản ứng tức là phụ thuộc vào nồng độ cơ chất và hoạt độ enzym.

- Loại đệm và pH của đệm: có 2 loại đệm được sử dụng trong hầu hết các nghiên cứu là đệm tris-HCl và đệm natri phosphat. pH của đệm được sử dụng trong các nghiên cứu từ 7,4-8,0 [18], [44], [97], [98].

- Dung môi dùng để hòa tan mẫu thử: thường dùng 3 loại dung môi là MeOH, DMSO, ACN. Dung môi được chọn dựa vào khả năng hòa tan mẫu thử. Tuy nhiên, cả 3 loại dung môi này đều có hoạt tính ức chế AChE ở mức độ khác nhau [44], [63].

- Bước sóng để đo độ hấp thụ: trong phương pháp đo quang thường chọn bước sóng hấp thụ cực đại của sản phẩm để định lượng. Tuy nhiên, do mỗi loại máy Elisa thường chỉ có một số loại kính lọc sắc đi kèm nên trong các nghiên cứu chỉ có thể chọn bước sóng nào gần với bước sóng hấp thụ cực đại nhất để đo. Các nghiên cứu sàng lọc tác dụng ức chế AChE *in vitro* thường sử dụng một trong 3 bước sóng (phụ thuộc vào kính lọc sắc có sẵn của máy) là 405, 412 và 420 nm để định lượng [17], [98]. Thực tế là độ hấp thụ của cùng một mẫu thử (hỗn hợp phản ứng với thuốc thử Ellman) ở 3 bước sóng trên không khác nhau nhiều.

Những thay đổi về điều kiện phản ứng enzym được đề cập ở trên có thể do một trong những nguyên nhân dưới đây:

- Xuất phát từ điều kiện thực tế phòng thí nghiệm (sự sẵn có về máy móc và hóa chất).

- Enzym và cơ chất khá nhạy cảm bởi tác động của yếu tố khách quan. Điều này tạo ra sự khác nhau về hoạt tính của enzym và mức độ cơ chất bị thủy phân không bởi xúc tác enzym giữa các nghiên cứu.

- Sự khác nhau về tỷ lệ phối hợp giữa các thành phần trong hỗn hợp phản ứng enzym.

- Phụ thuộc vào đặc tính của mẫu nghiên cứu: các mẫu khác nhau có khả năng hòa tan trong các dung môi khác nhau.

Vì những lý do trên nên hiện vẫn chưa có một điều kiện và quy trình chuẩn nào của phương pháp đo quang sử dụng thuốc thử Ellman được áp dụng chung cho tất cả những nghiên cứu sàng lọc tác dụng ức chế AChE *in vitro*. Do đó, cần thiết phải tiến hành khảo sát một số yếu tố ảnh hưởng đến phương pháp thử để lựa chọn được điều kiện thử nghiệm phù hợp với thực tế. Trong đề tài luận án này, những yếu tố được lựa chọn để khảo sát mức độ ảnh hưởng đến phương pháp thử gồm: nồng độ của dung dịch cơ chất ATCI; nồng độ của dung dịch thuốc thử DTNB; hoạt độ của AChE; thời gian để phản ứng diễn ra; hoạt tính ức chế AChE của dung môi DMSO. Đây cũng là những yếu tố thường có sự thay đổi khá nhiều giữa các nghiên cứu.

*** Triển khai phương pháp đánh giá hoạt tính ức chế AChE *in vitro***

- *Quy trình của thử nghiệm bước đầu được tiến hành như sau:*

Thêm lần lượt từng dung dịch gồm: dung dịch đệm tris-HCl pH=8, dung môi hoặc mẫu thử và dung dịch enzym vào từng giếng của đĩa 96 giếng. Hỗn hợp các dung dịch này được trộn đều và ủ ở 25⁰C trong 15 phút. Sau đó, dung dịch thuốc thử DTNB và dung dịch cơ chất ATCI lần lượt được thêm vào hỗn hợp và trộn đều. Tiếp tục ủ hỗn hợp trong một khoảng thời gian nhất định ở 25⁰C, sau đó, dung dịch được đo độ hấp thụ ở bước sóng 412 nm. Mỗi thử nghiệm được làm lặp lại 3 lần, mỗi lần được làm trên 3 giếng [98].

- *Khảo sát một số yếu tố ảnh hưởng đến phương pháp thử:*

+ Khảo sát ảnh hưởng của nồng độ dung dịch cơ chất và thuốc thử đến phương pháp thử:

Để khảo sát ảnh hưởng của nồng độ dung dịch cơ chất và thuốc thử đến phương pháp thử, hai dung dịch này được khảo sát ở 3 mức nồng độ X khác

nhau lần lượt là 1,2; 2,4 và 3,6 mM (cơ chất và thuốc thử được phối hợp vào hỗn hợp phản ứng ở tỷ lệ số mol là 1:1). Thành phần của hỗn hợp phản ứng được trình bày ở bảng 2.1.

Bảng 2.1. Khảo sát ảnh hưởng của nồng độ dung dịch cơ chất và thuốc thử đến phương pháp thử

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

Độ hấp thụ được so sánh giữa các mẫu thử ở 3 mức nồng độ cơ chất và thuốc thử khảo sát và được tính theo công thức sau:

$$\Delta A = A_{Th} - A_{Tr-Th} \quad (CT1)$$

Trong đó:

- ΔA là độ hấp thụ tính toán.
- A_{Th} và A_{Tr-Th} lần lượt là độ hấp thụ của mẫu thử và mẫu trắng của mẫu thử.

+ Khảo sát ảnh hưởng của hoạt độ AChE đến phương pháp thử nghiệm và lựa chọn thời gian phản ứng:

Để khảo sát ảnh hưởng của hoạt độ enzym đến phương pháp thử, dung dịch enzym ở 3 hoạt độ Y khác nhau lần lượt là 0,1; 0,25; 0,5 IU/ml được phối hợp vào hỗn hợp phản ứng với thành phần như được trình bày ở bảng 2.2. Sau đó, độ hấp thụ của mẫu thử được xác định ở 8 thời điểm khác nhau là: 3, 6, 9, 12, 15, 18, 24, 30 phút sau khi phản ứng xúc tác bởi enzym bắt đầu xảy ra.

Bảng 2.2. Khảo sát ảnh hưởng của hoạt độ AChE đến phương pháp thử

STT	Thành phần	Mẫu thử (µl)	Mẫu trắng của mẫu thử (µl)
1	Đệm tris-HCl pH=8	140	160
2	DMSO 10%	20	20
3	AChE Y	20	0
4	DTNB X	10	10
5	ATCI X	10	10
Tổng thể tích (µl)		200	200

Trong đó: nồng độ X đã được xác định dựa trên kết quả khảo sát trước đó

+ Khảo sát ảnh hưởng của nồng độ dung môi DMSO trong hỗn hợp phản ứng đến hoạt tính của AChE:

Để đánh giá ảnh hưởng của dung môi đến hoạt tính của AChE, dung dịch DMSO trong nước ở 3 mức nồng độ Z lần lượt là 10%, 15% và 20% (tương ứng với nồng độ của DMSO trong hỗn hợp phản ứng lần lượt là 1,0%, 1,5% và 2,0%) được chọn để khảo sát. Thành phần của hỗn hợp phản ứng được phối hợp để khảo sát được trình bày ở bảng 2.3.

Bảng 2.3. Thành phần phối hợp để khảo sát ảnh hưởng của nồng độ dung môi DMSO trong hỗn hợp phản ứng đến hoạt tính của AChE

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-HCl pH=8	140	160	160	180
2	DMSO Z	20	20	0	0
3	AChE Y	20	0	20	0
4	DTNB X	10	10	10	10
5	ATCI X	10	10	10	10
Tổng thể tích (µl)		200	200	200	200

Trong đó: các giá trị nồng độ X và Y đã được xác định dựa trên kết quả khảo sát trước đó.

Hoạt tính ức chế AChE của mẫu thử được tính theo công thức [74], [98]:

$$I\% = (1 - A_{\text{thử}}/A_{\text{đối chứng}}) \times 100 \quad (\text{CT2})$$

Trong đó:

- I%: phần trăm hoạt tính AChE bị ức chế.
- $A_{\text{thử}}$ và $A_{\text{đối chứng}}$ lần lượt là độ hấp thụ của mẫu thử và mẫu đối chứng.

Độ hấp thụ của các mẫu được tính theo (CT1).

2.2.3.2. Đánh giá hoạt tính ức chế enzym acetylcholinesterase in vitro của hai loài nghiên cứu

Phương pháp triển khai ở trên được sử dụng để 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.

Quy trình thử nghiệm được tiến hành dựa trên kết quả khảo sát ở mục 2.2.3.1. Hoạt tính ức chế AChE in vitro của mẫu thử được xác định bằng giá trị phần trăm hoạt tính enzym bị ức chế (I%) và được tính theo (CT2) ở trên. Mỗi mẫu thử được thực hiện lặp lại 3 lần, mỗi lần làm trên 3 giếng.

Từ giá trị I% xác định được, tiến hành tính giá trị IC_{50} (nồng độ của mẫu thử ức chế 50% hoạt tính enzym) của từng mẫu thử như sau:

- Pha một dãy nồng độ của từng mẫu thử, xác định giá trị I% ở từng nồng độ của mẫu thử đó.

- Với những mẫu thử có sự tương quan tuyến tính giữa giá trị I% và nồng độ, tiến hành xây dựng đường hồi quy tuyến tính $y = a.x + b$, trong đó, y là giá trị % hoạt tính enzym bị ức chế và x là nồng độ mẫu thử.

- Với những mẫu không có sự tương quan tuyến tính giữa giá trị I% và nồng độ, tiến hành xây dựng đường hồi quy tuyến tính $y = a.lg(x) + b$.

- Thay giá trị $y = 50\%$ vào phương trình hồi quy tuyến tính xây dựng được từ đó tính được giá trị nồng độ x. Giá trị tìm được này chính là giá trị IC_{50} .

Để có cơ sở đánh giá hoạt tính ức chế AChE *in vitro* của mẫu nghiên cứu, berberin clorid được lựa chọn làm mẫu đối chứng dương. Hợp chất này đã được nghiên cứu và chứng minh sở hữu hoạt tính ức chế AChE *in vitro* khá mạnh. Thực tế, berberin clorid cũng đã được sử dụng làm mẫu đối chứng dương trong một số nghiên cứu [98].

2.3. Xử lý số liệu

- Số liệu thực nghiệm được tổng hợp và xử lý bằng phương pháp thống kê thường dùng trong y sinh học với sự trợ giúp của phần mềm Microsoft Excel 2007.

- Kết quả thí nghiệm được biểu thị bằng giá trị trung bình cộng/trừ độ lệch chuẩn, ký hiệu: $\bar{X} \pm SD$. Trong đó, độ lệch chuẩn (SD) được tính theo công thức:

$$SD = \sqrt{\frac{\sum (X_i - \bar{X})^2}{n - 1}}$$

- Độ lặp lại của thí nghiệm được đánh giá dựa trên giá trị độ lệch chuẩn tương đối (RSD) và được tính như sau:

$$RSD = \frac{SD}{\bar{X}} \times 100$$

- So sánh giá trị trung bình giữa các mẫu thử sử dụng phép thử t-Student. Sự khác biệt có ý nghĩa thống kê khi $p < 0,05$.

2.4. Địa điểm thực hiện

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

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 HVD-002-11

3.1.1.1. Đặc điểm hình thái và định tên khoa học loài HVD-002-11

Cây thảo, leo. Lá mọc cách, cuống lá dài khoảng 0,7 cm. Phiến lá có 2 dạng hình trứng và hình elip; dài tới 13 cm, rộng khoảng 5,5 cm; gốc lá tròn hoặc hơi nhọn; mép nguyên; chóp lá nhọn; mặt trên xanh đậm, mặt dưới xanh nhạt, không có lông; mùi thơm. Gân hình cung với 5 gân xuất phát từ gốc và 2 gân xuất phát từ khoảng giữa lá.

Cụm hoa dạng bông, mọc đối diện với lá, không có lông. Cụm hoa đực dài 4,5–5,5 cm, cuống cụm hoa đực dài 0,4–0,7 cm. Cụm hoa cái dài 0,8–1,2 cm, cuống cụm hoa cái dài 0,6–0,8 cm.

Hoa đơn tính khác gốc. Mỗi hoa có 1 lá bắc dạng vẩy, gần tròn, không có lông, đường kính khoảng 0,8 mm, xếp kiểu vẩy cá. Bộ nhị 2-3; chỉ nhị nạc, dài gấp 2 lần bao phấn, kích thước dài 0,5-0,7 mm và rộng 0,2-0,4 mm, thắt lại ở giữa; bao phấn 2 ô. Bộ nhụy có 1 lá noãn tạo thành bầu, 1 ô, 1 noãn. Bầu gần hình cầu, đường kính khoảng 1,0 mm, không có lông. Núm nhụy xẻ 3-5 thùy, không có vòi nhụy.

Cụm quả dài 3,0-4,0 cm, cuống cụm quả dài 0,6-0,9 cm. Quả mọng, hình cầu, đường kính 0,3-0,4 cm; không có cuống; bề mặt nhẵn; mỗi quả có 1 hạt.

Hạt gần hình cầu, màu vàng nâu, đường kính 2-3 mm.

Mùa hoa: tháng 3-5, mùa quả: tháng 6-8.

Dựa vào quan sát các đặc điểm hình thái, tham khảo tài liệu và kết quả giám định của PGS. TS. Vũ Xuân Phương (Viện Sinh thái và Tài nguyên sinh vật, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam), loài thuộc chi *Piper* L. nghiên cứu có ký hiệu HVD-002-11 được xác định tên khoa học là *Piper bavinum* C. DC, tên Việt Nam là: tiêu Ba Vì. Tuy nhiên, tên *Piper bavinum* C. DC. chỉ là

tên đồng nghĩa và tên được công nhận là *Piper thomsonii* (C. DC.) Hook. f. var. *thomsonii*. Vì vậy, tên khoa học của loài HVD-002-11 được sử dụng trong đề tài luận án là *Piper thomsonii* (C. DC.) Hook. f. var. *thomsonii*.

Đặc điểm thực vật của loài *Piper thomsonii* (C. DC.) Hook. f. var. *thomsonii* được minh họa ở hình 3.1.



Hình 3.1. Đặc điểm hình thái của loài *Piper thomsonii* (C. DC.) Hook. f. var. *thomsonii*

1: Dạng sống; 2: Cụm hoa đực và cụm hoa cái; 3: Hoa đực; 4: Nhị ;

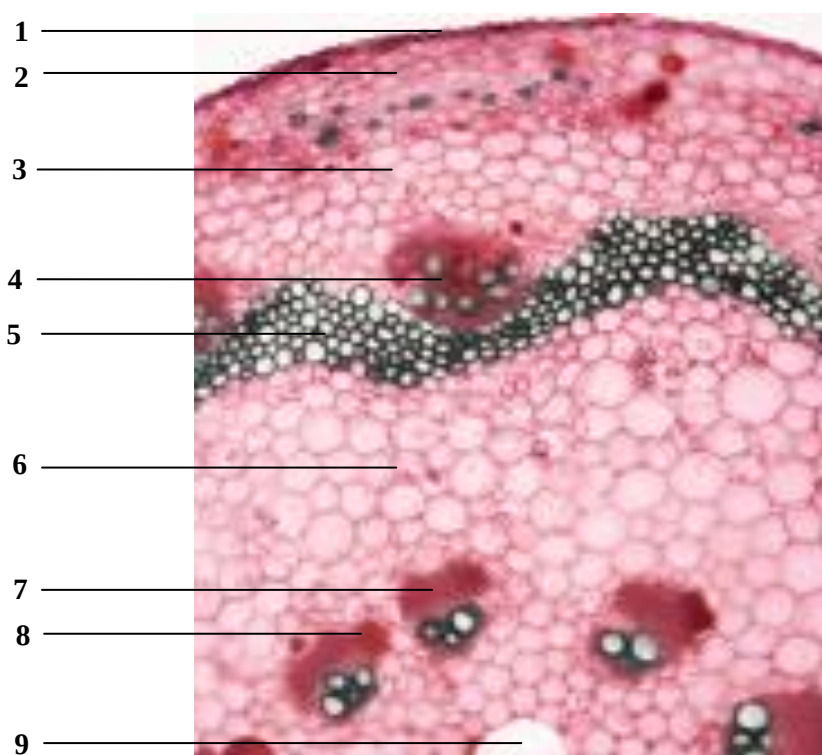
5: Lá bắc; 6: Hoa cái; 7: Chùm quả; 8: Quả và hạt.

3.1.1.2. Đặc điểm vi phẫu của loài *Piper thomsonii* (C. DC.) Hook. f. var. *thomsonii*

- Đặc điểm vi phẫu thân

Mặt cắt thân hình tròn đều. Biểu bì ngoài cùng là một lớp tế bào xếp đều đặn (1). Mô dày (2) gồm những tế bào hình tròn, có vách dày, không xếp thành

vòng tròn liên tục mà nằm rải rác trong lớp mô mềm vỏ (3). Mô mềm vỏ gồm 8-10 lớp tế bào hình tròn, kích thước không đều, vách mỏng. Vòng mô cứng (5) gồm 4-6 lớp tế bào có vách dày hóa gỗ, kích thước không đều và có hình dạng lồi lõm không đều. Ở những chỗ lõm của vòng mô cứng có các bó libe – gỗ (4) nằm ở phần vỏ thân với phần gỗ ở phía trong và phần libe ở phía ngoài. Mô mềm ruột (6) gồm 12-14 lớp tế bào vách mỏng, kích thước không đều và to hơn tế bào mô mềm vỏ. Các bó libe – gỗ (7) nằm ở phần ruột thân, xếp thành vòng tròn, mỗi bó có phần gỗ nằm phía trong, phần libe nằm phía ngoài. Khôi mang màu (8) nằm rải rác ở mô mềm, có hình tròn hoặc hình bầu dục. Chính giữa ruột thân là mô khuyết (9).



Hình 3.2. Ảnh vi phẫu thân của loài

Piper thomsonii* (C. DC.) Hook. f. var. *thomsonii

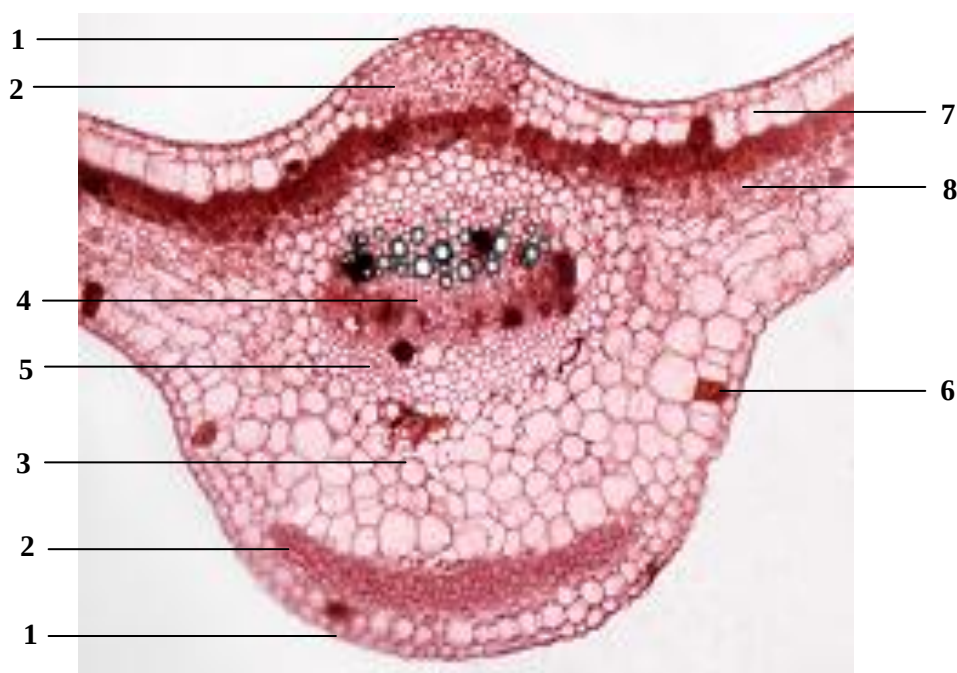
1. Biểu bì; 2: Mô dày; 3: Mô mềm vỏ; 4: Bó libe-gỗ ở vỏ; 5: Vòng mô cứng;
6: Mô mềm ruột; 7: Bó libe-gỗ ở ruột; 8: Khôi mang màu; 9: Mô khuyết.

- Đặc điểm vi phẫu lá

+ Phần gân lá: gân lá lồi hai mặt trên và dưới. Ngoài cùng là biểu bì (1) có cấu tạo bởi một lớp tế bào xếp đều đặn. Mô dày (2) với cung mô dày cấu tạo

bởi 3-4 lớp tế bào, nằm phía trong, cách lớp biểu bì dưới 1-2 lớp tế bào mô mềm và đám mô dày nằm ngay sát dưới lớp biểu bì trên. Tế bào mô dày có hình tròn, vách dày. Bên trong mô dày là mô mềm (3) gồm những tế bào to, hình tròn, kích thước không đều, vách mỏng. Chính giữa gân lá có một bó libe – gỗ (4) to, hình tròn với phần libe ở phía dưới và phần gỗ ở phía trên gồm những tế bào có vách dày, hóa gỗ. Bao quanh bó libe – gỗ là cung mô cứng (5). Khối mang màu (6) nằm rải rác ở mô mềm, có hình tròn hoặc hình bầu dục.

+ Phần phiến lá: dưới biểu bì là hạ bì (7) có 1-2 lớp tế bào to, hình chữ nhật, vách mỏng. Mô mềm đồng hóa (8) nằm giữa 2 lớp hạ bì trên và dưới với những tế bào nhỏ, vách mỏng, xếp khá đều đặn, chứa nhiều lục lạp.



Hình 3.3. Ảnh vi phẫu lá của loài

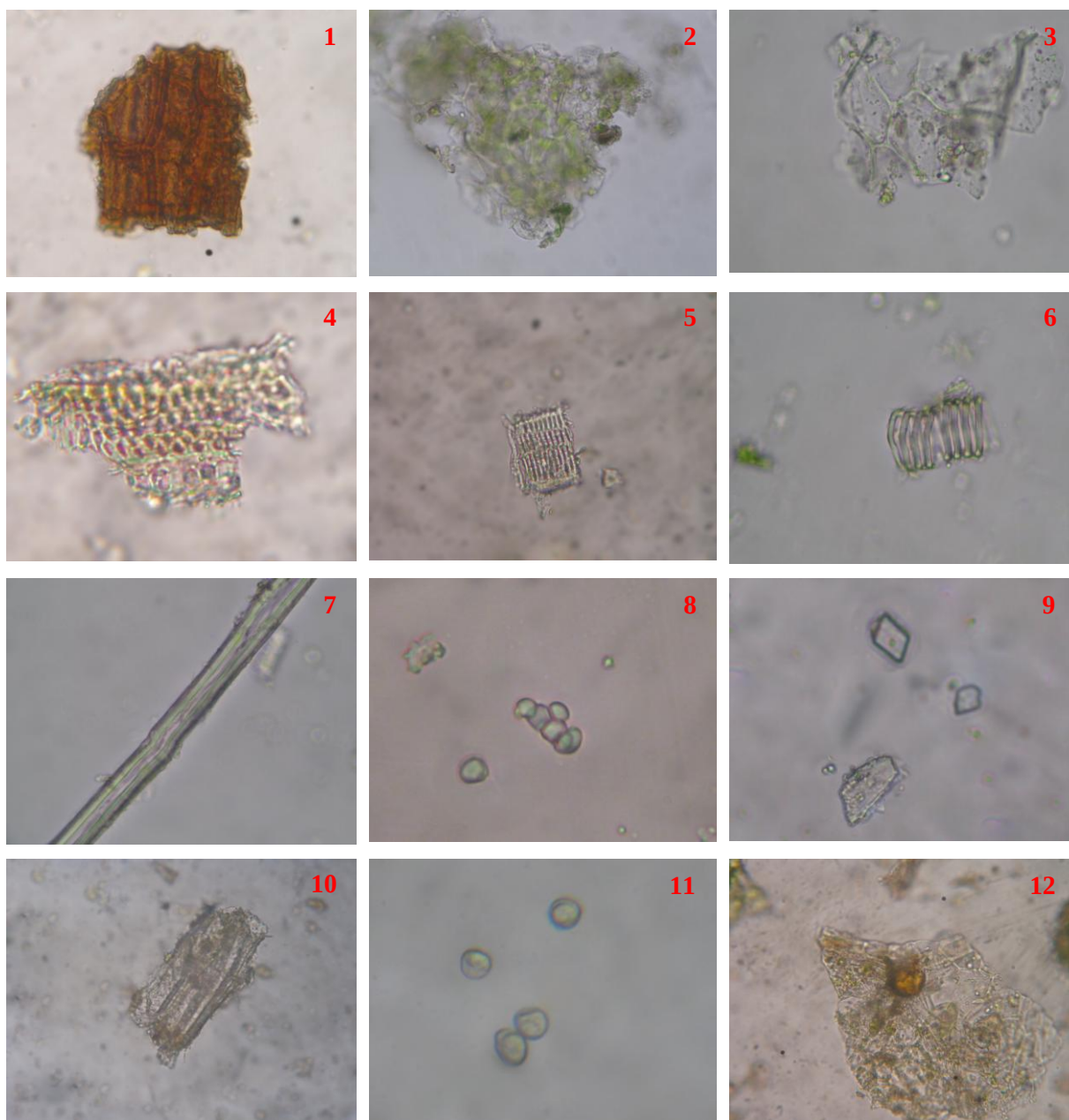
Piper thomsonii* (C. DC.) Hook. f. var. *thomsonii

1: Biểu bì; 2: Mô dày; 3: Mô mềm gân lá; 4: Bó libe-gỗ;

5: Mô cứng; 6: Khối mang màu; 7: Hạ bì; 8: Mô mềm đồng hóa.

3.1.1.3. Đặc điểm bột phần trên mặt đất của loài *Piper thomsonii* (C. DC.) Hook. f. var. *thomsonii*

Đặc điểm bột phần trên mặt đất của loài *Piper thomsonii* (C. DC.) Hook. f. var. *thomsonii* được minh họa ở hình 3.4.



**Hình 3.4. Đặc điểm bột phần trên mặt đất
của loài *Piper thomsonii* (C. DC.) Hook. f. var. *thomsonii***

1. Mảnh biểu bì thân; 2. Mảnh biểu bì mang lỗ khí; 3. Mảnh mô mềm;
4. Mảnh mạch điểm; 5. Mảnh mạch vạch; 6. Mảnh mạch xoắn; 7. Bó sợi;
8. Hạt tinh bột đơn hoặc tụ thành đám; 9. Tinh thể calci oxalat hình phiến;
10. Mảnh mô cứng; 11: Hạt phấn; 12: Mảnh mô mang khối có màu.

Bột dược liệu có màu xanh nâu, mùi thơm. Soi dưới kính hiển vi thấy một số đặc điểm gồm: Mảnh biểu bì thân (1) gồm những tế bào hình chữ nhật, vách dày, màu vàng. Mảnh biểu bì dưới của lá (2) gồm những tế bào có vách ngoằn

ngoài mang lỗ khí kiểu trực bào. Mảnh mô mềm (3) gồm những tế bào hình đa giác, vách cellulose mỏng. Mảnh mạch điểm (4), mạch vạch (5), mạch xoắn (6). Bó sợi (7) dài, vách dày, khoang rộng. Các hạt tinh bột (8) tụ lại thành từng đám hoặc đứng riêng rẽ có đường kính khoảng 0,015 mm. Tinh thể calci oxalat (9) hình phiến có kích thước khoảng 0,015-0,03 mm. Mảnh mô cứng (10). Hạt phấn (11) có dạng hình tròn, đường kính khoảng 0,02 mm. Mảnh mô mang khối có màu vàng sẫm (12).

3.1.2. Kết quả nghiên cứu về thực vật của loài HVD-004-11

3.1.2.1. Đặc điểm hình thái và định tên khoa học loài HVD-004-11

Cây thảo, leo, phần non có nhiều lông. Lá mọc cách, cuống lá dài 1cm. Phiến lá hình trứng hẹp, dài 12-15 cm, rộng 6-7,5 cm; gốc hình tim, lệch rõ; mép nguyên; chóp lá nhọn; hai mặt lá có lông ở gân; mùi thơm. Gân lá hình cung với 3-5 gân xuất phát từ gốc lá và 2 gân xuất phát ở vị trí cách gốc lá khoảng 0,5-1cm.

Cụm hoa dạng bông, mọc đối diện với lá. Cụm hoa đực dài 5,0-7,0 cm, cuống cụm hoa đực dài 1,5-1,8 cm. Cụm hoa cái dài 2,0-3,0 cm, cuống cụm hoa cái dài 3,5-4,0 cm. Cuống cụm hoa có lông.

Hoa đơn tính khác gốc. Mỗi hoa có một lá bắc, dạng vẩy, gần hình tròn, đường kính khoảng 0,3-0,5 mm, xếp theo kiểu vẩy cá, mặt trên có lông mịn màu trắng. Bộ nhị 2, chỉ nhị nạc, dài gấp 3 lần bao phấn, kích thước dài 0,2-0,3 mm và rộng 0,1-0,15 mm; bao phấn 2 ô. Bộ nhụy có 1 lá noãn tạo thành bầu, 1 ô, 1 noãn. Bầu gần hình cầu, đường kính khoảng 0,5 mm, có lông. Núm nhụy xẻ 4 thùy, không có vòi nhụy.

Cụm quả dài 9-12 cm, cuống cụm quả dài 2,5-3,5 cm. Quả mọng, hình cầu, đường kính cỡ 0,4 cm, mỗi quả có 1 hạt.

Hạt gần hình cầu, màu vàng nâu, đường kính cỡ 2-3 mm.

Mùa hoa: tháng 3-5, mùa quả: tháng 6-8.

Dựa vào quan sát các đặc điểm hình thái, tham khảo tài liệu và kết quả giám định của PGS. TS. Vũ Xuân Phương (Viện Sinh thái và Tài nguyên sinh vật, Viện

Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam), loài thuộc chi *Piper* L. nghiên cứu có ký hiệu HVD-004-11 được xác định tên khoa học là *Piper hymenophyllum* Miq., tên Việt Nam là: tiêu lá mỏng.



Hình 3.5. Đặc điểm hình thái của loài *Piper hymenophyllum* Miq.

1: Dạng sống; 2: Cụm hoa đực và cụm hoa cái;

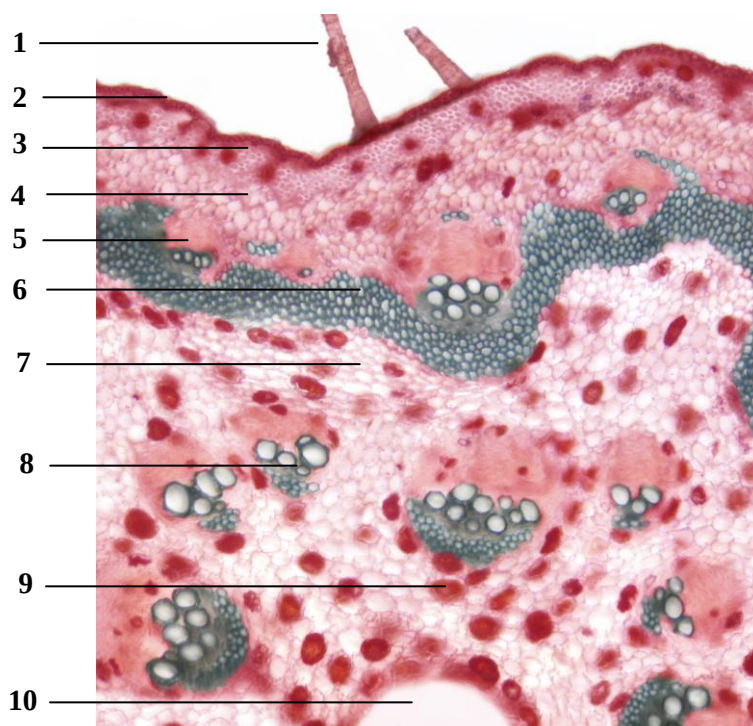
3: Hoa đực; 4: Nhị; 5: Lá bắc; 6: Hoa cái; 7: Chùm quả; 8: Quả.

3.1.2.2. Đặc điểm vi phẫu của loài *Piper hymenophyllum* Miq.

- Đặc điểm vi phẫu thân

Mặt cắt thân không có dạng tròn đều. Lông che chở đa bào (1) nằm bên ngoài biểu bì (2) gồm một lớp tế bào, xếp đều đặn. Mô dày (3) gồm 4-5 lớp tế bào hình tròn, vách dày, xếp sát ngay sát dưới lớp biểu bì. Mô mềm vỏ (4) có 3-4 lớp tế bào hình tròn, vách mỏng. Dưới mô mềm vỏ là mô cứng (6) có 4-6 lớp tế bào hình tròn, kích thước không đều, vách dày hóa gỗ. Mô cứng xếp thành dạng vòng, lõi lõm không đều. Ở những chỗ lõm của vòng mô cứng có các bó

libe – gỗ (5) nằm ở phần vỏ thân với phần gỗ phía trong và phần libe phía ngoài. Xếp ngay dưới vòng mô cứng là mô mềm ruột (7) gồm 18-22 lớp tế bào hình tròn, vách mỏng, kích thước to hơn tế bào mô mềm vỏ. Các bó libe - gỗ (8) nằm ở phần ruột thân, xếp theo hình chu vi thân, có phần libe ở phía ngoài và phần gỗ ở phía trong. Khối mang màu (9) nằm rải rác ở mô mềm, có hình tròn hoặc hình bầu dục. Chính giữa thân là mô khuyết (10).



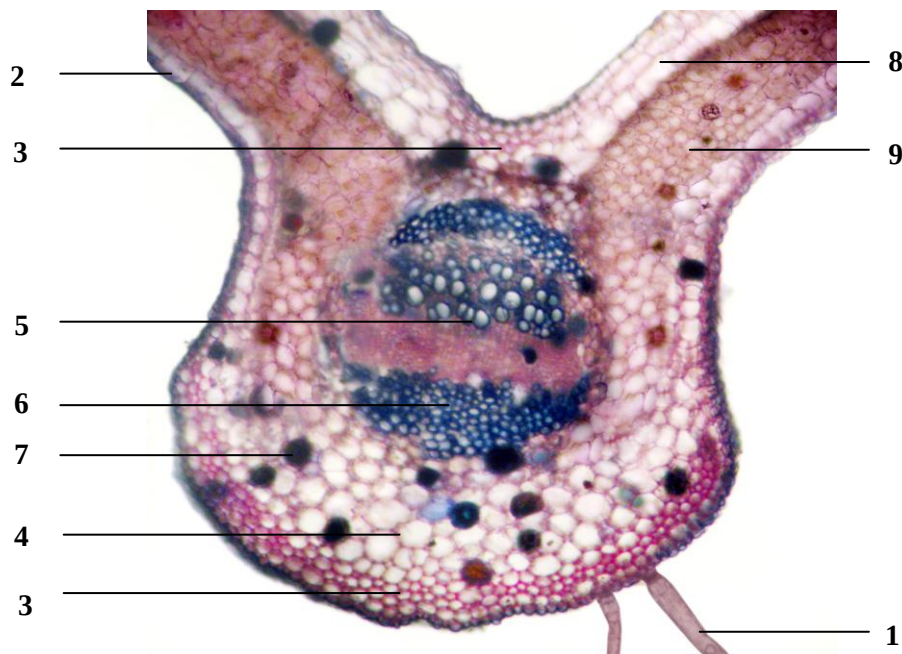
Hình 3.6. Ảnh vi phẫu thân của loài *Piper hymenophyllum* Miq.

- 1: Lông che chở; 2. Biểu bì; 3: Mô dày; 4: Mô mềm vỏ; 5: Bó libe-gỗ ở vỏ;
6: Vòng mô cứng; 7: Mô mềm ruột; 8: Bó libe-gỗ ở ruột; 9: Khối mang màu; 10: Mô khuyết
- Đặc điểm vi phẫu lá

+ Phần gân lá: mặt trên lõm, mặt dưới lồi. Lông che chở đơn bào (1) nằm phía ngoài biểu bì (2) được cấu tạo bởi một lớp tế bào xếp đều đặn. Mô dày (3) cấu tạo bởi những tế bào hình tròn, vách dày với cung mô dày gồm 2-3 lớp tế bào nằm ngay sát trong lớp biểu bì dưới và đám mô dày nằm ngay sát dưới lớp biểu bì trên. Mô mềm (4) gồm những tế bào to, hình tròn, kích thước không đều, vách mỏng. Có một bó libe - gỗ (5) to nằm ở chính giữa gân lá với phần libe ở phía dưới và phần gỗ ở phía trên. Bao quanh bó libe-gỗ là cung mô cứng (6) gồm các

tế bào vách dày, hóa gỗ. Khối mang màu (7) nằm rải rác ở mô mềm, có hình tròn hoặc hình bầu dục.

+ Phần phiến lá: xếp ngay dưới lớp biểu bì là hạ bì (8) gồm 1-2 lớp tế bào hình chữ nhật, vách mỏng. Mô mềm đồng hóa (9) nằm giữa hai lớp hạ bì trên và dưới gồm những tế bào nhỏ, hình tròn, vách mỏng, xếp khá đều đặn, chứa nhiều lục lạp.



Hình 3.7. Ảnh vi phẫu lá của loài *Piper hymenophyllum* Miq.

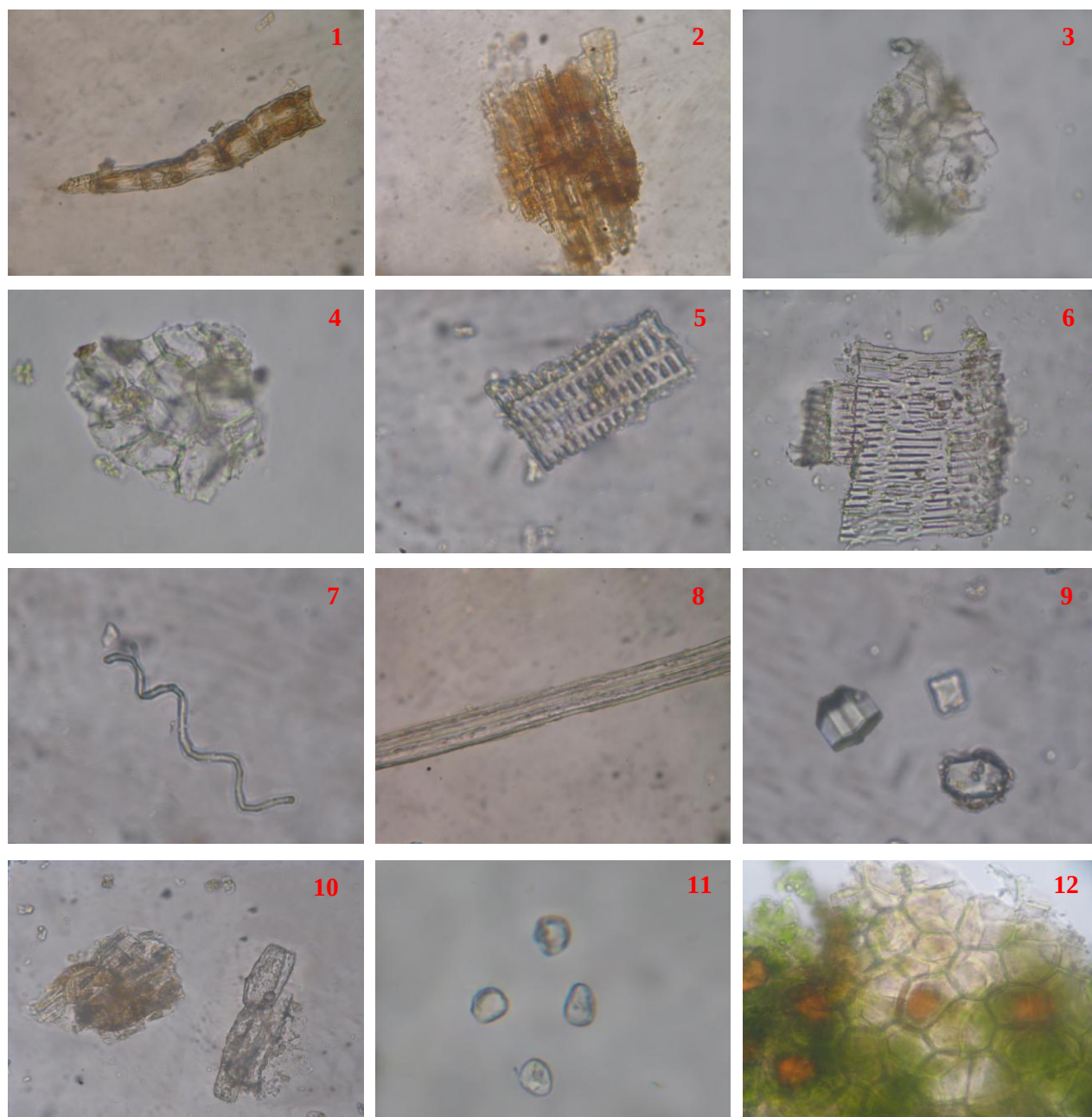
1: Lông che chở; 2: Biểu bì; 3: Mô dày; 4: Mô mềm gân lá; 5: Bó libe-gỗ;

6: Mô cứng; 7: Khối mang màu; 8: Hạ bì; 9: Mô mềm đồng hóa.

3.1.2.3. Đặc điểm bột phân trên mặt đất của loài *Piper hymenophyllum* Miq.

Bột dược liệu màu vàng nâu, mùi thơm, không vị. Soi dưới kính hiển vi thấy: lông che chở (1) có cấu tạo 6-10 tế bào, đầu nhọn. Mảnh biểu bì (2) của thân gồm những tế bào hình đa giác, màu vàng. Mảnh biểu bì dưới của lá (3) gồm những tế bào có vách ngoằn ngoèo mang lỗ khí kiểu trực bào. Mảnh mô mềm (4) gồm những tế bào hình đa giác, vách cellulose mỏng. Mảnh mạch điểm (5), mạch vạch (6), mạch xoắn (7). Bó sợi (8) dài, vách dày, khoang rộng. Tinh thể calci oxalat (9) hình khối và hình phiến có kích thước khoảng 0,03-0,07 mm. Mảnh mô cứng (10). Hạt phấn (11) có dạng hình tròn hoặc hình trứng, kích thước khoảng 0,02 mm. Mảnh mô mang khối có màu vàng sẫm (12).

Đặc điểm bột phần trên mặt đất của loài *Piper hymenophyllum* Miq. được thấy rõ hơn ở hình 3.8.



Hình 3.8. Đặc điểm bột phần trên mặt đất của loài *Piper hymenophyllum* Miq.

1. Lông đa bào; 2. Mảnh biểu bì thân; 3. Mảnh biểu bì mang lỗ khí;
4. Mảnh mô mềm; 5. Mảnh mạch điểm ; 6. Mảnh mạch vạch; 7: Mảnh mạch xoắn;
- 8: Bó sợi; 9. Tinh thể calci oxalat hình khối và hình phiến; 10: Mảnh mô cứng;
- 11: Hạt phấn; 12: Mảnh mô mang khối có màu.

3.2. Kết quả nghiên cứu về hóa học

Hai loài *P. thomsonii* (C. DC.) Hook. f. var. *thomsonii* và *P. hymenophyllum* Miq. được chọn để nghiên cứu sâu hơn về thành phần hóa học và tác dụng ức chế AChE *in vitro* dựa trên kết quả nghiên cứu sàng lọc hoạt tính này. 12 loài thuộc chi *Piper* L. sử dụng trong nghiên cứu sàng lọc được thu hái ở Vườn Quốc gia Ba Vì (Hà Nội) và Vườn Quốc gia Cúc Phương (Ninh Bình). Các loài được ký hiệu theo thứ tự một cách ngẫu nhiên. Kết quả nghiên cứu sàng lọc cho thấy hai loài có ký hiệu HVD-002-11 và HVD-004-011 sở hữu hoạt tính ức chế AChE mạnh nhất. Tên khoa học của hai loài có ký hiệu HVD-002-11 và HVD-004-011 được xác định lần lượt là *P. thomsonii* (C. DC.) Hook. f. var. *thomsonii* và *P. hymenophyllum* Miq. Quá trình nghiên cứu phân lập hợp chất từ 2 loài nghiên cứu được thực hiện dựa trên kết quả đánh giá hoạt tính ức chế AChE *in vitro* của các mẫu phân đoạn dịch chiết trong các dung môi có độ phân cực khác nhau. Những phân đoạn dịch chiết thể hiện hoạt tính ức chế AChE mạnh nhất tiếp tục được nghiên cứu phân lập hợp chất. Nội dung dưới đây trình bày quá trình chiết xuất, phân lập và nhận dạng cấu trúc của 6 hợp chất phân lập được từ loài *P. thomsonii* (C. DC.) Hook. f. var. *thomsonii* và 8 hợp chất phân lập được từ loài *P. hymenophyllum* Miq.

3.2.1. Kết quả nghiên cứu thành phần hóa học của loài *Piper thomsonii* (C. DC.) Hook. f. var. *thomsonii*

3.2.1.1. Kết quả chiết xuất và phân lập hợp chất từ loài *Piper thomsonii* (C. DC.) Hook. f. var. *thomsonii*

Phần trên mặt đất của loài *P. thomsonii* (C. DC.) Hook. f. var. *thomsonii* được thu hái, rửa sạch, thái nhỏ, phơi khô, nghiền thành bột. 15 kg bột (hàm ẩm 8,6%) được chia thành 4 mẻ và chiết hồi lưu với dung môi MeOH trong bình cầu dung tích 10 lít. Mỗi mẻ được chiết với 8 lít MeOH trong thời gian 3 giờ/lần, chiết lặp lại 3 lần/mẻ. Gộp các dịch chiết, cất thu hồi dung môi dưới áp suất giảm ở nhiệt độ 50⁰C, thu được 510g dịch chiết đậm đặc. Phân tán toàn bộ cặn trên vào 2,5 lít nước ấm trong bình thủy tinh dung tích 5 lít bằng thiết bị có cánh khuấy. Thêm khoảng 2,5 lít dung môi *n*-hexan, khuấy đều hỗn hợp trong bình trong thời gian khoảng 60 phút. Để yên cho dung môi phân lớp. Gạn lấy

lớp dung môi *n*-hexan. Lớp nước còn lại trong bình được thêm khoảng 2,5 lít dung môi *n*-hexan. Tiến hành làm lặp lại 4 – 5 lần cho đến khi lớp dung môi hữu cơ chỉ còn màu vàng nhạt. Gộp các dịch *n*-hexan, cất thu hồi dung môi dưới áp suất giảm ở nhiệt độ 50⁰C thu được cặn *n*-hexan (**PTH**). Tiếp tục làm tương tự lần lượt với các dung môi có độ phân cực tăng dần gồm: CHCl₃, EtOAc và BuOH thu được các cặn tương ứng là cặn CHCl₃ (**PTC**), cặn EtOAc (**PTE**) và cặn BuOH (**PTB**). Phần dịch nước còn lại sau khi đã được chiết với các dung môi hữu cơ cũng được hòa loãng và loại nước bằng máy đông khô thu được cặn nước (**PTN**). Sau đó, 5 mẫu cặn này được thử hoạt tính ức chế AChE *in vitro*. Kết quả cho thấy 2 loại cặn **PTH** (224 g) và **PTE** (13,2 g) có hoạt tính mạnh nhất. Vì thế, 2 phân đoạn cặn này được chọn để tiếp tục nghiên cứu về phân lập hợp chất.

- Cặn **PTH** được hòa với một lượng tối thiểu dung môi *n*-hexan, thêm lượng vừa đủ silica gel vào dung dịch, trộn đều hỗn dịch. Sau đó, loại dung môi bằng máy cô quay chân không. Sau khi cột được nạp silica gel bằng phương pháp nạp cột ướt và đã được ổn định bằng hệ dung môi rửa giải, silica gel được trộn với cặn **PTH** và được đưa lên cột. Quá trình rửa giải sử dụng hệ dung môi *n*-hexan:EtOAc theo gradient nồng độ với độ phân cực tăng dần từ tỷ lệ 30:1 đến 5:1 thu được 12 phân đoạn (ký hiệu **PTH1** đến **PTH12**).

+ Phân đoạn **PTH1** được phân lập bằng sắc ký cột pha thuận, rửa giải bằng hệ dung môi *n*-hexan:EtOAc (10:1) và thu được phân đoạn **PTH1a**. Phân đoạn **PTH1a** được phân lập bằng sắc ký cột pha thuận, sử dụng hệ dung môi rửa giải CH₂Cl₂:EtOAc theo gradient nồng độ với tỷ lệ thay đổi từ 100:1 đến 30:1 và thu được 2 phân đoạn (ký hiệu **PTH1a1** và **PTH1a2**). Phân đoạn **PTH1a2** tiếp tục được phân lập bằng sắc ký cột pha thuận, sử dụng hệ dung môi rửa giải *n*-hexan:EtOAc (10:1) và thu được 3 phân đoạn (ký hiệu **PTH1a2a** đến **PTH1a2c**). Phân đoạn **PTH1a2c** được phân lập bằng sắc ký cột pha đảo ODS, rửa giải bằng hệ dung môi MeOH:H₂O (7:1) và thu được 2 hợp chất **PT1** (156 mg) và **PT5** (20 mg).

+ Phân đoạn **PTH6** được phân lập bằng sắc ký cột pha thuận, sử dụng hệ dung môi rửa giải *n*-hexan:EtOAc (30:1) và thu được 4 phân đoạn (ký hiệu **PTH6a** đến **PTH6d**).

Phân đoạn **PTH6c** được phân lập bằng sắc ký cột pha đảo ODS, rửa giải bằng hệ dung môi MeOH:H₂O (3:1) và thu được phân đoạn **PTH6c1**. Phân đoạn **PTH6c1** được tinh chế bằng PTLC, triển khai với hệ dung môi *n*-hexan:aceton (30:1) thu được hợp chất **PT3** (49,5 mg).

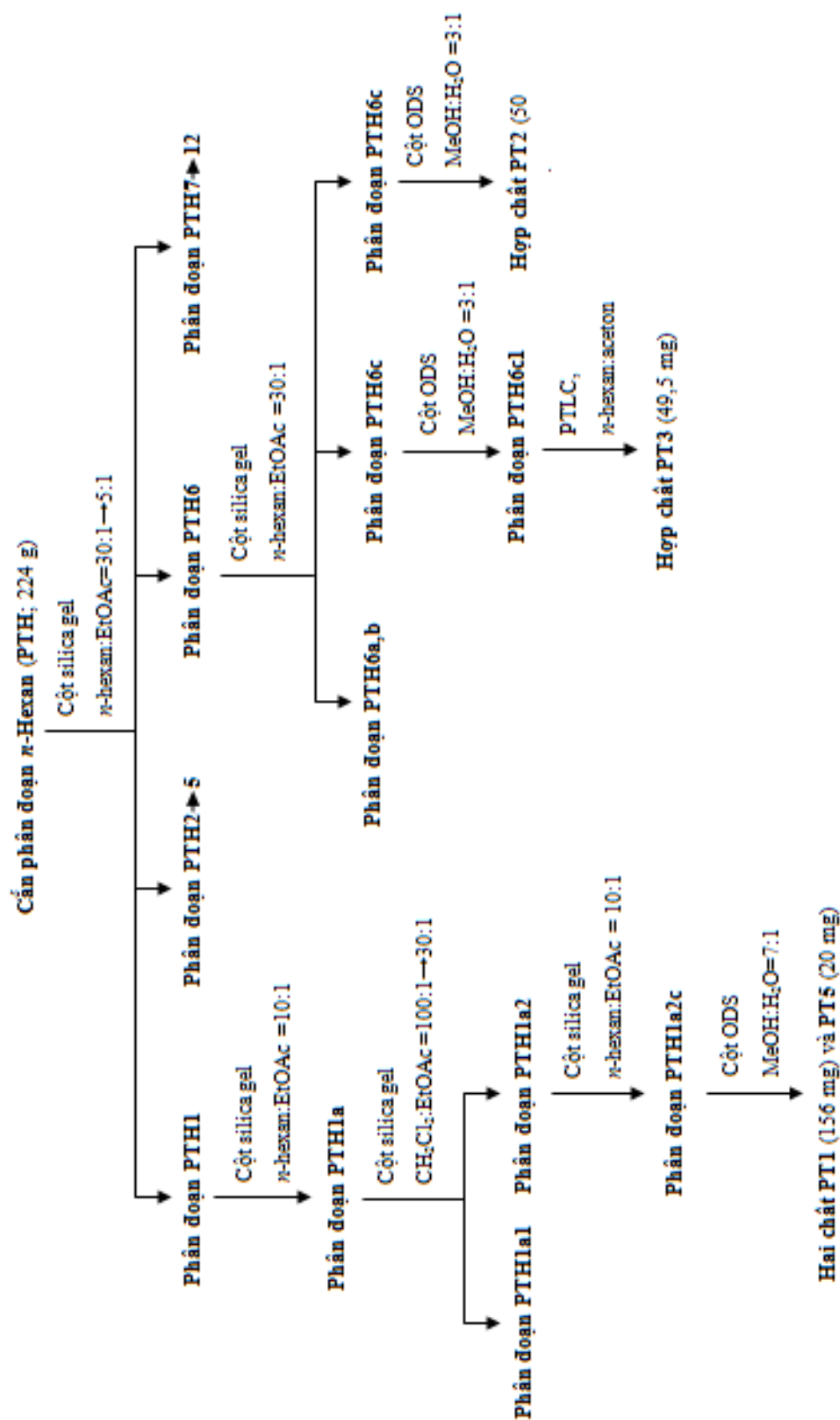
Phân đoạn **PTH6d** được tinh chế bằng sắc ký cột pha đảo ODS, rửa giải bằng hệ dung môi MeOH:H₂O (3:1) thu được hợp chất **PT2** (50 mg).

- Cẩn **PTE** được hòa tan với một lượng tối thiểu aceton, thêm lượng vừa đủ silica gel vào dung dịch, trộn đều hỗn dịch sau đó loại dung môi bằng máy cô quay chân không. Sau khi cột được nạp silica gel bằng phương pháp nạp cột ướt và đã được ổn định bằng hệ dung môi rửa giải, silica gel tẩm **PTE** được đưa lên cột. Quá trình rửa giải sử dụng hệ dung môi CHCl₃:MeOH theo gradient nồng độ với độ phân cực tăng dần từ tỷ lệ 20:1 đến 1:1 thu được 11 phân đoạn (ký hiệu **PTE1** đến **PTE11**). Phân đoạn **PTE8** được phân lập bằng sắc ký cột pha đảo ODS, rửa giải bằng hệ dung môi MeOH:H₂O (1:3) và thu được 5 phân đoạn (ký hiệu **PTE8a** đến **PTE8e**).

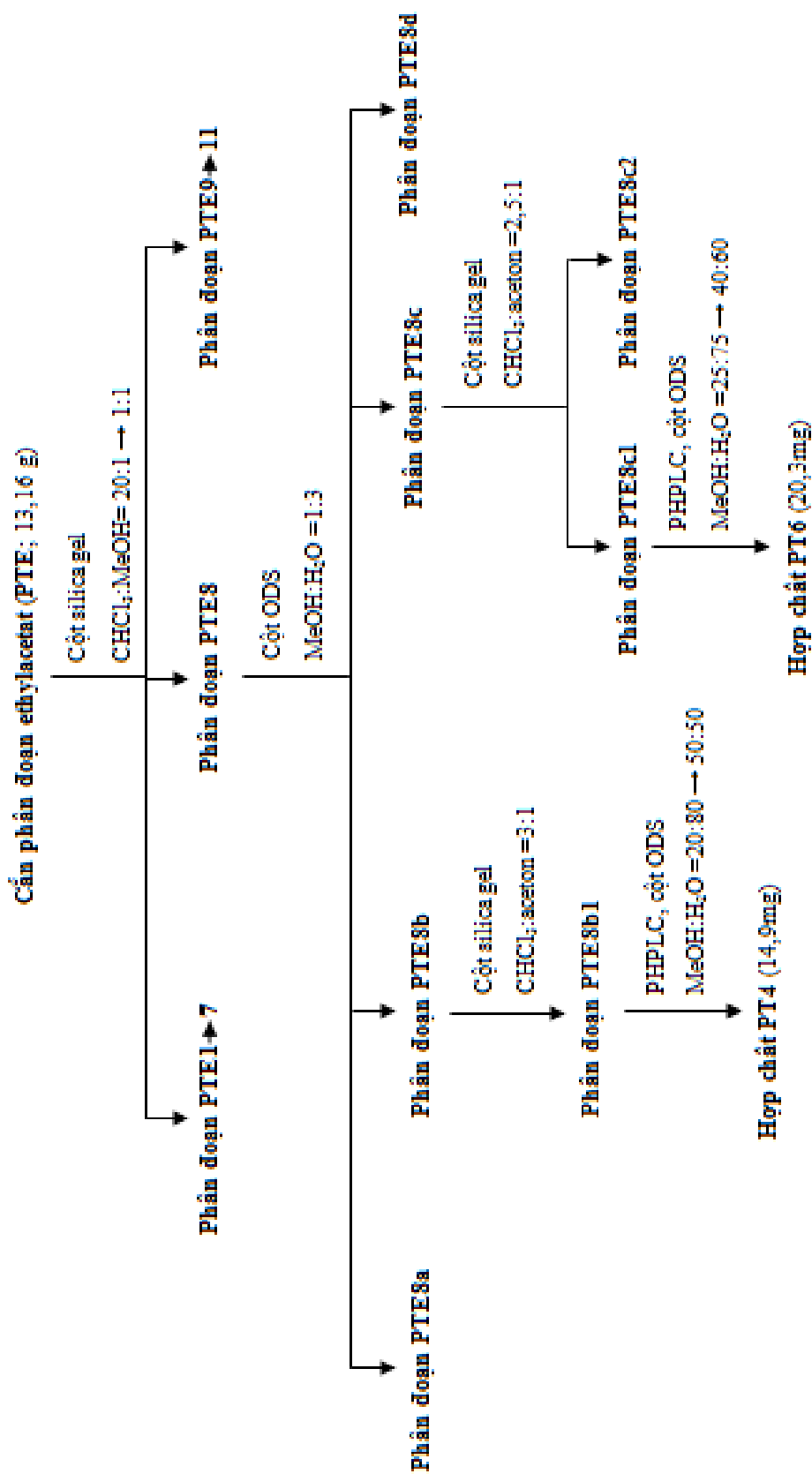
Phân đoạn **PTE8b** được phân lập bằng sắc ký cột pha thuận, rửa giải bằng hệ dung môi CHCl₃:aceton (3:1) và thu được phân đoạn **PTE8b1**. Phân đoạn **PTE8b1** được tinh chế bằng hệ thống PHPLC [điều kiện sắc ký: cột YMC Pak ODS-A (20x250 mm, 5 μm), hệ dung môi rửa giải là MeOH:H₂O theo gradient nồng độ với tỷ lệ thay đổi từ 20:80 đến 50:50 trong thời gian 90 phút, tốc độ dòng 5 ml/phút, phát hiện ở bước sóng 210 nm] và thu được hợp chất **PT4** (14,9 mg).

Phân đoạn **PTE8c** được phân lập bằng sắc ký cột pha thuận, sử dụng hệ dung môi rửa giải CHCl₃:aceton (2,5:1) thu được 2 phân đoạn (ký hiệu **PTE8c1** và **PTE8c2**). Phân đoạn **PTE8c1** được tinh chế bằng hệ thống PHPLC [điều kiện sắc ký: cột YMC Pak ODS-A (20x250 mm, 5 μm), hệ dung môi rửa giải là MeOH:H₂O theo gradient nồng độ với tỷ lệ thay đổi từ 25:75 đến 40:60 trong thời gian 90 phút, tốc độ dòng 5 ml/phút, phát hiện ở bước sóng 210 nm] và thu được hợp chất **PT6** (20,3 mg).

Quá trình phân lập và tinh chế hợp chất từ cẩn *n*-hexan và cẩn EtOAc của loài *P. thomsonii* (C. DC.) Hook. f. var. *thomsonii* được tóm tắt ở hình 3.9 và hình 3.10.



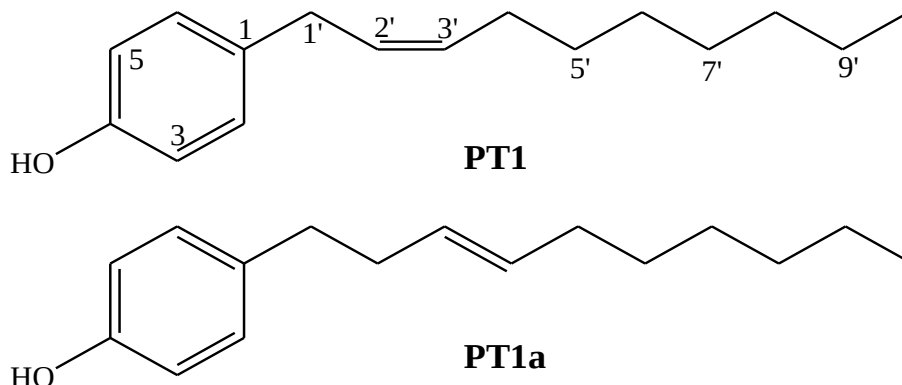
**Hình 3.9. Sơ đồ phân lập hợp chất từ căn *n*-hexan
của loài *Piper thomsonii* (C. DC.) Hook. f. var. *thomsonii***



Hình 3.10. Sơ đồ phân lập hợp chất từ căn ethylacetat của loài *Piper thomsonii* (C. DC.) Hook. f. var. *thomsonii*

3.2.1.2. Kết quả nhận dạng hợp chất phân lập được từ loài *Piper thomsonii* (C. DC.) Hook. f. var. *thomsonii*

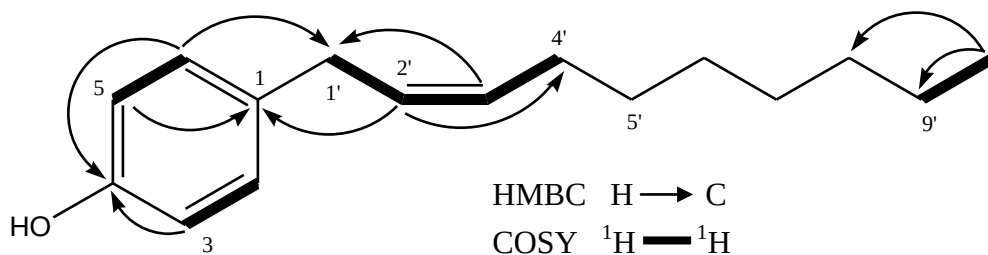
*** Hợp chất PT1: 4-(2'-(Z)-decenyl)-phenol**



Hình 3.11. Cấu trúc hóa học của hợp chất PT1 và gibbilimbol B (PT1a)

Hợp chất **PT1** thu được dưới dạng chất dầu, không màu. Phổ $^1\text{H-NMR}$ của hợp chất **PT1** cho thấy sự xuất hiện tín hiệu của bốn proton thơm thế para tại δ_{H} 6,76 (2H, *d*, $J = 8,0$ Hz) và 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}C NMR của hợp chất **PT1** cho biết sự xuất hiện tín hiệu 6 cacbon của vòng benzen thế para tại δ_{C} 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 cacbon 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'). Dữ liệu phổ ^1H và ^{13}C NMR của **PT1** cơ bản giống với những dữ liệu phổ này của hợp chất gibbilimbol B (**PT1a**) đã được công bố phân lập từ loài *P. gibbilimum* C. DC., ngoại trừ sự khác biệt vị trí liên kết đôi của nhóm decenyl [103]. Ở vùng trường thấp trên phổ HSQC, proton tại δ_{H} 7,06 (*d*, $J = 8,0$ Hz) và 6,76 (*d*, $J = 8,0$ Hz) lần lượt tương tác trực tiếp với cacbon tại δ_{C} 129,39 và 115,23 đã khẳng định sự có mặt của vòng benzen có hai nhóm thế ở vị trí *para*. Các tương tác HMBC giữa H-2/6 (δ_{H} 129,39) với C-1 (δ_{C} 133,49), C-3/5 (δ_{C} 115,23), C-4 (δ_{C} 153,57) và C-1' (δ_{C} 32,56) đã chứng minh có nhóm hydroxy ở vị trí C-4 và một nhóm

methylen liên kết với vòng thơm tại C-1. Các tương tác HMBC giữa H-1' (δ_H 3,34) với C-1 (δ_C 133,49), C-2/6 (δ_C 129,39), C-2' (δ_C 128,32) và C-3' (δ_C 130,77) đã chứng minh một liên kết đôi tại C-2'/C-3'. Trật tự giữa các nhóm nguyên tử còn được khẳng định bởi các tương tác trên phổ COSY H-2/H-3, H-5/H-6, H-1'/H-2'/H-3'/H-4' và H-9'/H-10'. Cấu hình của liên kết đôi tại C-2'/C-3' còn được chứng minh là *Z* dựa trên sự so sánh về sự khác biệt độ chuyển dịch ^{13}C NMR của hai nhóm methylen bên cạnh liên kết đôi của **PT1** (δ_C 27,21 và 32,56) với hợp chất có cấu hình *E*, myricanen B (δ_C 32,6 và 34,6) chứng tỏ liên kết đôi của **PT1** có cấu hình *Z* [93]. Phổ HR-FAB-MS của **PT1** xuất hiện pic ion giả phân tử tại m/z 232,1829 $[\text{M}]^+$ cho phép kết luận công thức phân tử của hợp chất **PT1** là $\text{C}_{16}\text{H}_{24}\text{O}$ (tính toán lý thuyết cho công thức $\text{C}_{16}\text{H}_{24}\text{O}$: 232,1824). Căn cứ vào những dữ kiện phổ ở trên, hợp chất **PT1** được xác định cấu trúc và có tên gọi là 4-(2'-(*Z*)-decenyl)-phenol, đây là lần đầu tiên phân lập được hợp chất này từ tự nhiên.



Hình 3.12. Các tương tác HMBC và COSY chính của hợp chất PT1

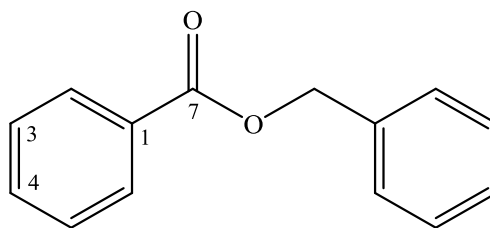
Bảng 3.1. Số liệu phổ NMR của hợp chất PT1

Vị trí cacbon	$^{a,b}\delta_C$	$^{a,c}\delta_H$ (mult., <i>J</i>)
1	133,49	-
2, 6	129,39	7,06 (<i>d</i> , 8,0)
3, 5	115,23	6,76 (<i>d</i> , 8,0)
4	153,57	-
1'	32,56	3,34
2'	128,32	5,52

Vị trí cacbon	^{a,b} δ _C	^{a,c} δ _H (mult., J)
3'	130,77	5,52
4'	27,21	2,16
5'	29,71	1,39
6'	29,30	1,30
7'	29,20	1,30
8'	31,86	1,30
9'	22,66	1,29
10'	14,09	0,91 (t, 7,0)

Đo trong ^{a)} CDCl₃, ^{b)} 100 MHz, ^{c)} 400 MHz

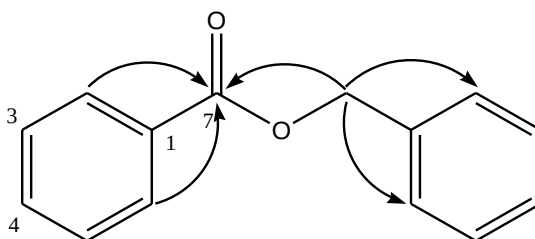
*** Hợp chất PT2: Benzyl benzoat**



Hình 3.13. Cấu trúc hóa học của hợp chất PT2

Hợp chất **PT2** thu được dưới dạng bột, màu trắng. Công thức phân tử của hợp chất **PT2** được xác định là C₁₄H₁₂O₂ dựa trên phổ HR-ESI-MS xuất hiện pic ion giả phân tử tại *m/z* 235,0716 [M+Na]⁺ (tính toán lí thuyết cho công thức C₁₄H₁₂O₂Na: 235,0730). Trên phổ ¹H NMR của hợp chất **PT2** xuất hiện 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. Trên phổ ¹³C NMR và DEPT của **PT2** xuất hiện 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. Ở vùng trường yếu trên phổ HSQC, proton tại δ_H 8,10 có tương tác với C-2/C-6 (δ_C 129,70). Proton này lại tương tác HMBC với C-1 (δ_C 130,17), C-3/C-5 (δ_C 128,37), C-4 (δ_C 133,01) và C-7 (δ_C 166,41) cho phép khẳng định sự

tồn tại của đơn vị benzoyl. Mặt khác, proton tại H-7' (δ_H 5,39) có tương tác HMBC với C-1' (δ_C 136,09), C-2'/C-6' (δ_C 128,16) và C-7 (δ_C 166,41) đã minh chứng nhóm benzoyl liên kết với nhóm benzyl bằng cầu este. Thêm vào đó, số liệu phổ NMR của hợp chất **PT2** hoàn toàn trùng khớp với số liệu phổ của hợp chất benzyl benzoat được công bố trong tài liệu tham khảo [83]. Từ các dữ kiện trên, cho phép kết luận hợp chất **PT2** chính là benzyl benzoat. Trước đây, hợp chất này đã được phân lập từ loài *P. kadsura* (Choisy) Ohwi [75].



Hình 3.14. Các tương tác HMBC chính của hợp chất PT2

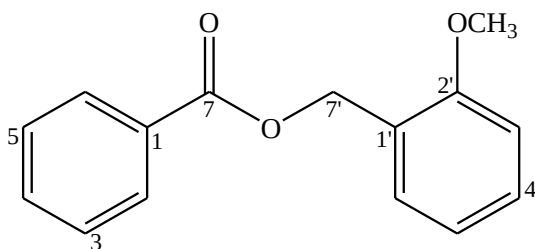
Bảng 3.2. Số liệu phổ NMR của hợp chất PT2

Vị trí cacbon	^{#,d} δ_C	^{a,b} δ_C	^{a,c} δ_H (mult., <i>J</i>)
1	130,0	130,17	-
2, 6	129,6	129,70	8,10 (<i>d</i> , 8,0)
3, 5	128,3	128,37	7,46*
4	132,9	133,01	7,57 (<i>t</i> , 8,0)
7	166,3	166,41	-
1'	136,0	136,09	-
2', 6'	128,1	128,16	7,46*
3', 5'	128,5	128,59	7,45
4'	128,0	128,23	7,38 (<i>t</i> , 8,0)
7'	66,6	66,68	5,39 (<i>s</i>)

Đo trong ^{a)} CDCl₃, ^{b)} 100 MHz, ^{c)} 400 MHz, ^{d)} Aceton, ^{*)} Tín hiệu chồng lấp

^{#)} dữ liệu phổ ¹³C NMR của hợp chất benzyl benzoat trong tài liệu tham khảo [83]

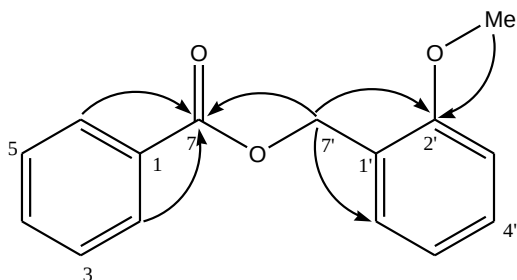
*** Hợp chất PT3: 2-methoxybenzyl benzoat**



Hình 3.15. Cấu trúc hóa học của hợp chất PT3

Hợp chất **PT3** thu được dưới dạng chất bột vô định hình màu trắng. Dữ liệu phổ phân giải cao HR-ESI-MS của hợp chất **PT3** xuất hiện pic ion giả phân tử tại m/z 265,0820 $[M+Na]^+$ dẫn đến kết luận công thức phân tử của **PT3** là $C_{15}H_{14}O_3$ (tính toán lí thuyết cho công thức $C_{15}H_{14}O_3Na$: 265,0835). Phổ 1H NMR của **PT3** xuất hiện 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 của hợp chất **PT3** xuất hiện tín hiệu của 15 nguyên tử cacbon bao gồm: 1 nhóm 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. Phân tích dữ kiện 1H và ^{13}C NMR của hợp chất này cho thấy hợp chất này khác **PT2** ở vị trí C-2' bởi sự có mặt của nhóm thế methoxy. Dữ liệu về phổ NMR của hợp chất **PT3** hoàn toàn trùng khớp với dữ liệu phổ của hợp chất 2-methoxybenzyl benzoat [108]. Trên phổ HSQC, proton H-2/H-6 (δ_H 8,11) tương tác với C-2/C-6 (δ_C 129,68); proton này lại tương tác HMBC với C-3/C-5 (δ_C 128,29), C-4 (δ_C 132,83) và C-7 (δ_C 166,53) chứng tỏ nhóm cacbonyl liên kết trực tiếp với vòng benzen. Các tương tác HMBC giữa H-7' (δ_H 5,44) với C-7 (δ_C 166,53), C-1' (δ_C 124,46), C-2' (δ_C 157,52) và C-6' (δ_C 129,40); giữa proton của nhóm methoxy (δ_H 3,86) với C-2' (δ_C 157,52) đã chứng minh vòng benzen có hai nhóm thế là oxymethylen và methoxy ở vị trí *ortho*. Vòng

benzen này liên kết với nhóm benzoyl bởi oxymethylen $-\text{CH}_2\text{O}-$. Từ các dữ liệu của phổ NMR ở trên kết hợp đối chiếu tài liệu tham khảo, kết luận hợp chất **PT3** chính là 2-methoxybenzyl benzoat.



Hình 3.16. Các tương tác HMBC chính của hợp chất PT3

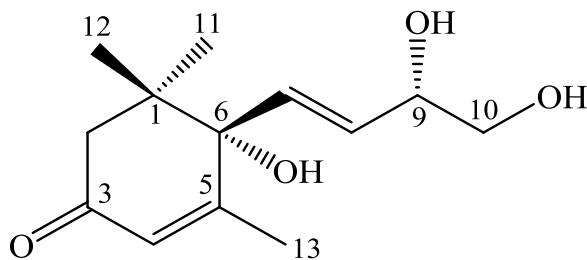
Bảng 3.3. Số liệu phổ NMR của hợp chất PT3

Vị trí cacbon	^{#,d} δ_C	^{a,b} δ_C	^{a,c} δ_H (mult., <i>J</i>)
1	130,9	130,43	-
2, 6	129,8	129,68	8,11 (<i>d</i> , 8,0)
3, 5	130,1	128,29	7,44 [*]
4	133,2	132,83	7,55 (<i>t</i> , 8,0)
7	167,0	166,53	-
1'	124,9	124,46	-
2'	158,0	157,52	-
3'	110,9	110,49	6,92 (<i>d</i> , 8,0)
4'	129,8	129,46	7,34 (<i>t</i> , 8,0)
5'	120,9	120,44	6,99 (<i>t</i> , 8,0)
6'	128,7	129,40	7,44 [*]
7'	62,6	62,17	5,44 (<i>s</i>)
2'-OCH ₃	55,9	55,44	3,86 (<i>s</i>)

Đo trong ^{a)} CDCl₃, ^{b)} 100 MHz, ^{c)} 400 MHz, ^{d)} Aceton, ^{*)} Tín hiệu chồng lấp,

#) dữ liệu phổ ^{13}C NMR của hợp chất 2-methoxybenzyl benzoat trong tài liệu tham khảo [108]

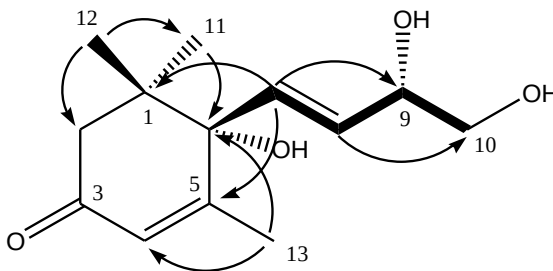
*** Hợp chất PT4: Cucumegastigman I**



Hình 3.17. Cấu trúc hóa học của hợp chất PT4

Hợp chất **PT4** thu được dưới dạng bột màu trắng, $[\alpha]_D^{25} +67,5$ ($c=0,1$, MeOH). Công thức phân tử của **PT4** được xác định là $C_{13}H_{24}O_4$ dựa trên sự xuất hiện của píc ion giả phân tử trên phổ khối lượng phân giải cao HR-ESI-MS tại m/z 263,1244 $[M+Na]^+$ (tính toán lí thuyết cho công thức $C_{13}H_{24}O_4Na$: 263,1254). Phổ 1H NMR của hợp chất **PT4** cho thấy sự xuất hiện 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}C NMR của hợp chất **PT4** cho thấy sự có mặt của 13 nguyên tử cacbon trong đó có: một nhóm cacbonyl tại δ_C 201,38; bốn cacbon olefin tại δ_C 127,30, 132,66, 132,71 và 167,53; ba oxycacbon 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. Từ kết quả phân tích dữ liệu phổ 1H và ^{13}C NMR ở trên, có thể nhận dạng đây là một hợp chất có khung cấu trúc megastigman. Các tương tác HMBC giữa H-4 (δ_H 5,91) với C-3 (δ_C 201,38), C-5 (δ_C 167,53), C-6 (δ_C 80,27) và C-13 (δ_C 19,71); giữa H-13 với C-4 (δ_C 127,30), C-5 (δ_C 167,53) và C-6 (δ_C 80,27) chứng tỏ sự có mặt của nhóm cacbonyl tại C-3, một liên kết đôi tại C-4/C-5 và nhóm methyl tại C-5. Các tương tác HMBC giữa H-8 (δ_H 5,83) với C-6 (δ_C 80,27), C-7 (δ_C 132,71), C-9 (δ_C 73,83) và C-10 (δ_C 67,46); giữa H-10 (δ_H 3,49 và 3,54) với C-8 (δ_C 132,66) và C-9 (δ_C 73,83) đã chứng minh sự có mặt của một liên kết đôi tại C-7/C-8 và ba nhóm hydroxyl tại C-6, C-9 và C-10. Điều này còn được chứng tỏ bởi các tín hiệu trên phổ COSY giữa H-7/H-8/H-9/H-10. Từ những dữ liệu phổ thu được, kết hợp với tra cứu tài liệu tham khảo cho phép kết luận hợp chất **PT4** là

cucumegastigman I [71]. Đây là một hợp chất lần đầu tiên phân lập được từ chi *Piper* L.



Hình 3.18. Các tương tác HMBC và COSY chính của hợp chất PT4

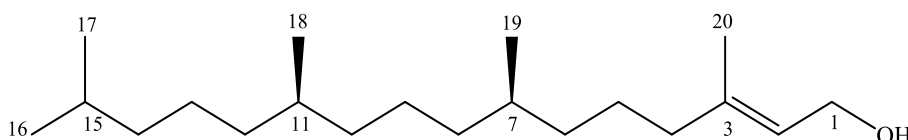
Bảng 3.4. Số liệu phổ NMR của hợp chất PT4

Vị trí cacbon	^{#a} δ _C	^{a,b} δ _C	^{a,c} δ _H (mult., <i>J</i>)	Vị trí cacbon	^{#a} δ _C	^{a,b} δ _C	^{a,c} δ _H (mult., <i>J</i>)
1	42,3	42,55	-	8	132,1	132,66	5,83 (<i>dd</i> , 5,6, 15,6)
2	50,6	50,89	2,56 (<i>d</i> , 16,8) 2,19 (<i>d</i> , 16,8)	9	73,5	73,83	4,23 (<i>m</i>)
3	200,7	201,38	-	10	67,1	67,46	3,54 (<i>dd</i> , 4,8, 11,2) 3,49 (<i>dd</i> , 6,4, 11,2)
4	126,9	127,30	5,91 (<i>d</i> , 1,2)	11	23,4	23,60	1,07 (<i>s</i>)
5	166,9	167,53	-	12	24,5	24,66	1,05 (<i>s</i>)
6	80,0	80,27	-	13	19,6	19,71	1,95 (<i>d</i> , 1,2)
7	132,2	132,71	5,93 (<i>dd</i> , 1,8, 15,6)				

Đo trong ^{a)} CD₃OD, ^{b)} 100 MHz, ^{c)} 400 MHz

#) dữ liệu phổ ^{13}C NMR của hợp chất cucumegastigman I trong tài liệu tham khảo [71]

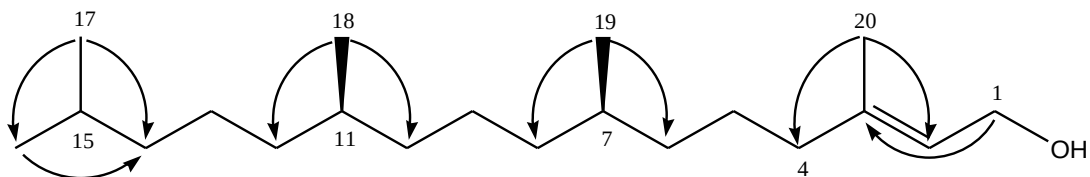
* Hợp chất PT5: *trans*-phytol



Hình 3.19. Cấu trúc hóa học của hợp chất PT5

Hợp chất **PT5** thu được dưới dạng chất dầu, không màu, $[\alpha]_D^{25} +23,1$ (c=0,3, CHCl₃). Trên phổ ¹H NMR xuất hiện tín hiệu của một nối đôi bị thế 3 vị trí tại δ_H 5,37 (t, *J* = 6,8 Hz); 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). Trên phổ ^{13}C NMR cho thấy **PT5** là một diterpen với tín hiệu của 20 cacbon, 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) và 16,21 (C-20); 10 nhóm methylen tại 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) và 28,04 (C-15); 1 cacbon bậc 4 tại δ_{H} 140,22 (C-3). Các tương tác HMBC giữa H-1 (δ_{H} 4,11) với C-2 (δ_{C} 123,10) và C-3 (δ_{C} 140,22); giữa H-20 (δ_{H} 1,63) với C-2 (δ_{C} 123,10), C-3 (δ_{C} 140,22) và C-4 (δ_{C} 39,95) đã chứng minh sự có mặt của hai nhóm hydroxyl và methyl lần lượt tại vị trí C-1 và C-3. Các số liệu phổ NMR của **PT5** gợi ý tới hợp chất *trans*-phytol, một diterpen khá phổ biến trong tự nhiên. So sánh số liệu phổ NMR của hợp chất **PT5** với số liệu phổ của *trans*-phytol đã được công bố bởi Kim và cộng sự cho thấy sự trùng khớp hoàn toàn về các vị trí tương ứng [76]. Điều này cho phép khẳng định cấu trúc hoá học của **PT5** chính là *trans*-phytol. Trước đây, hợp chất này đã được phân lập từ loài *P. kadsura* (Choisy) Ohwi [75].



Hình 3.20. Các tương tác HMBC chính của hợp chất PT5

Bảng 3.5. Số liệu phổ NMR của hợp chất PT5

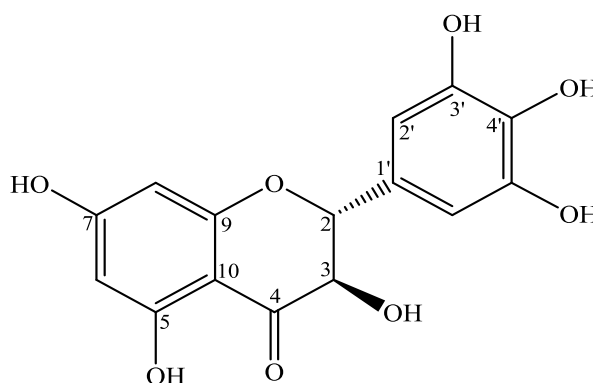
Vị trí cacbon	$\#,\text{a}\delta_{\text{C}}$	$\delta_{\text{C}}^{\text{a,b}}$	$\delta_{\text{H}}^{\text{a,c}}$ (mult., <i>J</i>)	Vị trí cacbon	$\#,\text{a}\delta_{\text{C}}$	$\delta_{\text{C}}^{\text{a,b}}$	$\delta_{\text{H}}^{\text{a,c}}$ (mult., <i>J</i>)
1	59,6	59,36	4,11 (<i>d</i> , 6,8)	6	36,9	36,74	1,03; 1,22
2	123,3	123,10	5,37 (<i>t</i> , 6,8)	7	33,0	32,85	1,34 (<i>m</i>)
3	140,5	140,22	-	8	37,6	37,50	1,03; 1,22
4	40,1	39,95	1,96 (<i>t</i> , 8,0)	9	24,7	24,54	1,15 (<i>m</i>)
5	25,3	25,22	1,36	10	37,6	37,43	1,03; 1,22

Vị trí cacbon	$\#^a\delta_C$	$\delta_C^{a,b}$	$\delta_H^{a,c}$ (mult., J)	Vị trí cacbon	$\#^a\delta_C$	$\delta_C^{a,b}$	$\delta_H^{a,c}$ (mult., J)
11	32,9	32,76	1,34 (m)	16	22,8	22,68	0,84 (d, 6,4)
12	37,5	37,35	1,03; 1,22	17	22,9	22,78	0,84 (d, 6,4)
13	25,0	24,87	1,24 (m)	18	19,9	19,78	0,82 (d, 6,4)
14	39,6	39,44	1,10	19	19,9	19,81	0,82 (d, 6,4)
15	28,2	28,04	1,48 (m)	20	16,4	16,21	1,63 (s)

Đo trong ^{a)} CDCl₃, ^{b)} 100 MHz, ^{c)} 400 MHz

^{#)} dữ liệu phổ ¹³C NMR của hợp chất *trans*-phytol trong tài liệu tham khảo [76]

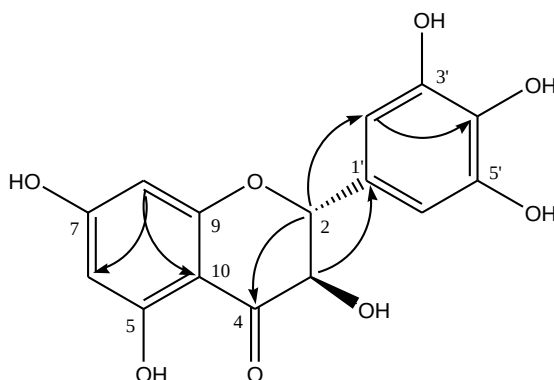
* Hợp chất PT6: Dihydromyricetin



Hình 3.21. Cấu trúc hóa học của hợp chất PT6

Hợp chất **PT6** thu được dưới dạng chất rắn, màu trắng, $[\alpha]_D^{25} +50$ (c=0,2, CHCl₃). Trên phổ ¹H NMR của **PT6** xuất hiện 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 ¹³C NMR của **PT6** cho thấy sự xuất hiện tín hiệu của 15 cacbon 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. Đối chiếu dữ liệu về phổ ¹³C NMR của **PT6** với dữ liệu này của hợp chất dihydromyricetin thấy hoàn toàn trùng khớp [151]. Kết quả này một lần nữa được khẳng định dựa trên phổ HMBC với những tín hiệu tương tác giữa proton H-2 (δ_H 4,82) với C-3 (δ_C 73,64), C-4 (δ_C 198,25), C-1' (δ_C 128,97) và C-2'/C-6' (δ_C 107,99); giữa proton H-3 (δ_H 4,45) với C-2 (δ_C 85,20), C-4 (δ_C 198,25) và C-1' (δ_C 128,97); giữa proton H-2'/H-6' (δ_H 6,52) với C-3 (δ_C 73,64), C-4 (δ_C 198,25) và C-1' (δ_C 128,97).

(δ_{H} 6,52) với C-2 (δ_{C} 85,20), C-1' (δ_{C} 128,97), C-3'/C-5' (δ_{C} 146,77) và C-4' (δ_{C} 134,87). Từ những dữ liệu phổ thu được kết hợp với tra cứu tài liệu tham khảo cho phép kết luận hợp chất **PT6** là dihydromyricetin.



Hình 3.22. Các tương tác HMBC chính của hợp chất PT6

Bảng 3.6. Số liệu phổ NMR của hợp chất PT6

Vị trí cacbon	^{#,d} δ_{C}	^{a,b} δ_{C}	^{a,c} δ_{H} (mult., <i>J</i>)
2	83,2	85,20	4,82 (<i>d</i> , 11,2)
3	71,6	73,64	4,45 (<i>d</i> , 11,2)
4	197,7	198,25	-
5	163,3	165,17	-
6	95,9	96,25	5,88 (<i>s</i>)
7	166,8	168,63	-
8	94,9	97,27	5,91 (<i>s</i>)
9	162,5	164,38	-
10	100,5	101,77	-
1'	127,1	128,97	-
2', 6'	106,9	107,99	6,52 (<i>s</i>)
3', 5'	145,7	146,77	-
4'	133,4	134,87	-

Đo trong ^{a)} CD₃OD, ^{b)} 100 MHz, ^{c)} 400 MHz, ^{d)} DMSO

^{#)} dữ liệu phổ ¹³C NMR của hợp chất dihydromyricetin trong tài liệu tham khảo [151]

3.2.2. Kết quả nghiên cứu thành phần hóa học của loài *Piper hymenophyllum* Miq.

3.2.2.1. Kết quả chiết xuất và phân lập hợp chất từ loài *Piper hymenophyllum* Miq.

Bộ phận của cây gồm thân và lá (phần trên mặt đất) được thu hái, xử lý và chiết xuất với 4 dung môi có độ phân cực khác nhau giống như quy trình nghiên cứu với loài HVD-002-11. Kết quả thu được 560 g cồn MeOH toàn phần và 5 loại cồn chiết được từ các loại dung môi có độ phân cực tăng dần gồm cồn *n*-hexan (**PHH**), cồn CHCl₃ (**PHC**), cồn EtOAc (**PHE**), cồn BuOH (**PHB**) và cồn nước (**PHN**). Sau đó, 5 loại cồn này được đánh giá hoạt tính ức chế AChE *in vitro*. Kết quả cho thấy hoạt tính của 2 loại cồn **PHC** (110 g) và **PTE** (19,3 g) là mạnh nhất. Vì thế, 2 phân đoạn cồn này được chọn để tiếp tục nghiên cứu phân lập hợp chất.

- Cồn **PHC** được hòa tan với một lượng tối thiểu dung môi *n*-hexan, thêm lượng vừa đủ silica gel vào dung dịch, trộn đều hỗn dịch sau đó loại dung môi bằng máy cô quay chân không. Sau khi cột được nạp silica gel bằng phương pháp nạp cột ướt và đã được ổn định bằng hệ dung môi rửa giải, silica gel được trộn với cồn **PHC** và được đưa lên cột. Quá trình rửa giải sử dụng hệ dung môi *n*-hexan:aceton theo gradient nồng độ với độ phân cực tăng dần từ tỷ lệ 15:1 đến tỷ lệ 2:1 thu được 10 phân đoạn (ký hiệu **PHC1** đến **PHC10**).

+ Phân đoạn **PHC3** (1,4 g) được phân lập bằng sắc ký cột pha thuận, sử dụng hệ dung môi rửa giải là *n*-hexan:aceton (50:1) thu được 4 phân đoạn (ký hiệu **PHC3a** đến **PHC3d**). Phân đoạn **PHC3b** tiếp tục được phân lập bằng sắc ký cột pha đảo ODS, rửa giải bằng hệ dung môi MeOH:H₂O (4:1) thu được hợp chất **PH8** (2,0 mg).

+ Phân đoạn **PHC6** (43,94 g) được phân lập bằng sắc ký cột pha thuận, sử dụng hệ dung môi rửa giải là CH₂Cl₂:aceton (100:1) thu được hai phân đoạn (ký hiệu **PHC6a** và **PHC6b**). Phân đoạn **PHC6a** tiếp tục được phân lập bằng sắc ký cột pha đảo ODS, rửa giải bằng hệ dung môi MeOH:H₂O theo gradient nồng độ với tỷ lệ thay đổi từ 1:2 đến 2:1 và thu được 2 phân đoạn (ký

hiệu **PHC6a1** và **PHC6a2**). Phân đoạn **PHC6a1** được tinh chế bằng sắc ký cột pha thuận, sử dụng hệ dung môi rửa giải là *n*-hexan:aceton (5:1) và thu được hợp chất **PH5** (44 mg).

+ Phân đoạn **PHC7** (18,3 g) được phân lập bằng sắc ký cột pha thuận, sử dụng hệ dung môi rửa giải *n*-hexan:aceton theo gradient nồng độ với tỷ lệ thay đổi từ 10:1 đến 1:1 thu được 8 phân đoạn (ký hiệu **PHC7a** đến **PHC7h**).

Phân đoạn **PHC7d** tiếp tục được phân lập bằng sắc ký cột pha thuận, rửa giải bằng hệ dung môi CH₂Cl₂:aceton theo gradient nồng độ với tỷ lệ thay đổi từ 100:1 đến 10:1 và thu được 8 phân đoạn (ký hiệu **PHC7d1** đến **PHC7d8**). Phân đoạn **PHC7d2** được phân lập bằng hệ thống MPLC sử dụng cột pha đảo ODS, rửa giải bằng hệ dung môi MeOH:H₂O theo gradient nồng độ với tỷ lệ thay đổi từ 2:1 đến 1:1 thu được 2 phân đoạn (ký hiệu **PHC7d2a** đến **PHC7d2c**). Phân đoạn **PHC7d2b** được tinh chế bằng hệ thống PHPLC [điều kiện sắc ký: cột YMC Pak ODS-A (20x250 mm, 5 μm), hệ dung môi rửa giải là MeOH:H₂O theo gradient nồng độ với tỷ lệ thay đổi từ 55:45 đến 85:15 trong thời gian 90 phút, tốc độ dòng 5 ml/phút, phát hiện ở bước sóng 210 nm] thu được hợp chất **PH1** (2,6 mg). Phân đoạn **PHC7d7** được tinh khiết bằng hệ thống MPLC sử dụng cột pha đảo ODS, rửa giải bằng hệ dung môi MeOH:H₂O theo gradient nồng độ với tỷ lệ thay đổi từ 1:2 đến 1:1 và thu được hợp chất **PH2** (20,8 mg).

Phân đoạn **PHC7g** được phân lập bằng sắc ký cột pha thuận, rửa giải bằng hệ dung môi *n*-hexan:EtOAc theo gradient nồng độ với tỷ lệ thay đổi từ 2,5:1 đến 1:2 thu được 12 phân đoạn (ký hiệu **PHC7g1** đến **PHC7g12**). Phân đoạn **PHC7g11** được tinh khiết bằng sắc ký cột pha đảo ODS, rửa giải bằng hệ dung môi MeOH:H₂O (2:1) thu được hợp chất **PH3** (4,9 mg).

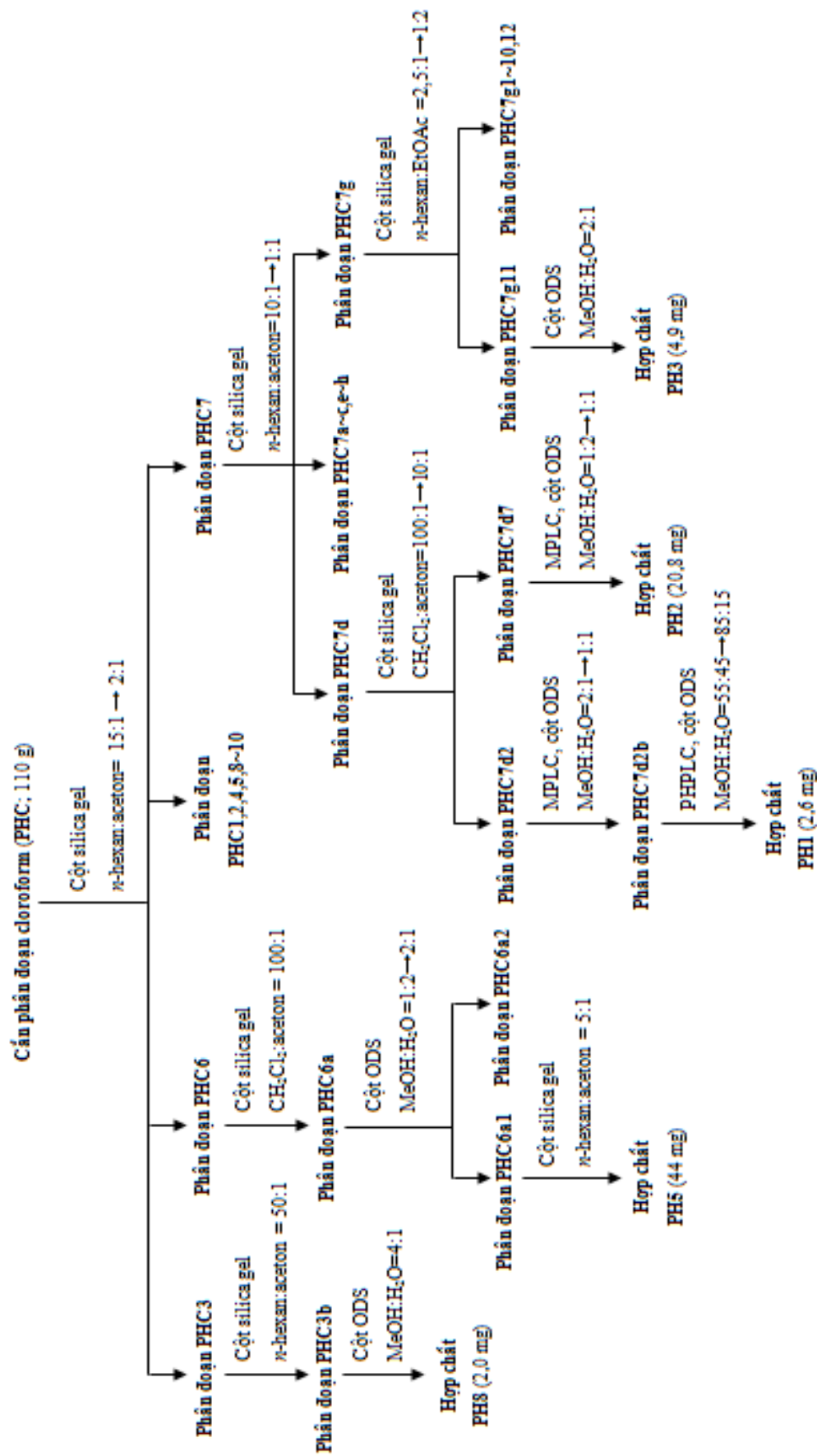
- Cẩn **PHE** được hòa tan với một lượng tối thiểu aceton, thêm lượng vừa đủ silica gel vào dung dịch, trộn đều hỗn dịch sau đó loại dung môi bằng máy cô quay chân không. Sau khi cột được nạp silica gel bằng phương pháp nạp cột ướt

và đã được ổn định bằng hệ dung môi rửa giải, silica gel có tẩm **PHE** được đưa lên cột. Quá trình rửa giải sử dụng hệ dung môi CHCl_3 :MeOH theo gradient nồng độ với độ phân cực tăng dần từ tỷ lệ 80:1 đến tỷ lệ 5:1 thu được 7 phân đoạn (ký hiệu **PHE1** đến **PHE7**).

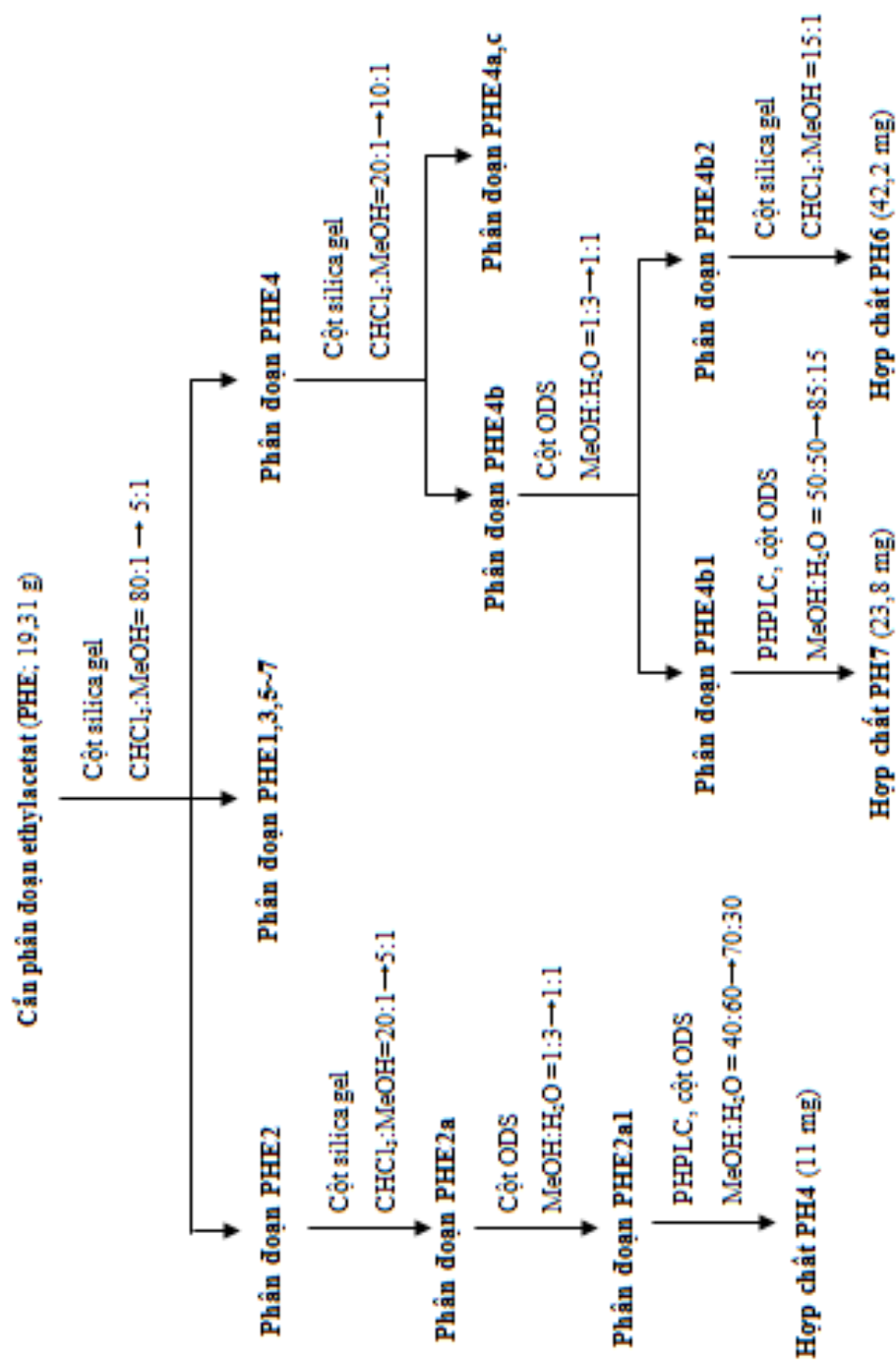
Phân đoạn **PHE2** (0,43 g) được phân lập bằng sắc ký cột pha thuận, rửa giải bằng hệ dung môi CHCl_3 :MeOH theo gradient nồng độ với tỷ lệ thay đổi từ 20:1 đến 5:1 thu được 2 phân đoạn (ký hiệu **PHE2a** đến **PHE2b**). Phân đoạn **PHE2a** được phân lập bằng sắc ký cột pha đảo ODS, sử dụng hệ dung môi rửa giải MeOH:H₂O theo gradient nồng độ với tỷ lệ thay đổi từ 1:3 đến 1:1 thu được 2 phân đoạn (ký hiệu **PHE2a1** và **PHE2a2**). Phân đoạn **PHE2a1** được tinh chế bằng hệ thống PHPLC [điều kiện sắc ký: cột YMC Pak ODS-A (20x250 mm, 5 μm), hệ dung môi rửa giải là MeOH:H₂O theo gradient nồng độ với tỷ lệ thay đổi từ 40:60 đến 70:30 trong thời gian 90 phút, tốc độ dòng 5 ml/phút, phát hiện ở bước sóng 210 nm] thu được hợp chất **PH4** (11 mg).

Phân đoạn **PHE4** (0,87 g) được phân lập bằng sắc ký cột pha thuận, rửa giải bằng hệ dung môi CHCl_3 :MeOH với tỷ lệ thay đổi từ 20:1 đến 10:1 thu được 3 phân đoạn (ký hiệu **PHE4a** đến **PHE4c**). Phân đoạn **PHE4b** được phân lập bằng sắc ký cột pha đảo ODS, sử dụng hệ dung môi rửa giải MeOH:H₂O theo gradient nồng độ với tỷ lệ thay đổi từ 1:3 đến 1:1 thu được 2 phân đoạn (ký hiệu **PHE4b1** và **PHE4b2**). Phân đoạn **PHE4b1** được tinh chế bằng hệ thống PHPLC [điều kiện sắc ký: cột YMC Pak ODS-A (20x250 mm, 5 μm), hệ dung môi rửa giải là MeOH:H₂O theo gradient nồng độ với tỷ lệ thay đổi từ 50:50 đến 85:15 trong thời gian 90 phút, tốc độ dòng 5 ml/phút, phát hiện ở bước sóng 210 nm] và thu được hợp chất **PH7** (23,8 mg). Phân đoạn **PHE4b2** được tinh chế bằng sắc ký cột pha thuận, rửa giải bằng hệ dung môi CHCl_3 :MeOH (15:1) thu được hợp chất **PH6** (42,2 mg).

Quá trình phân lập và tinh chế hợp chất từ căn EtOAc của loài *P. hymenophyllum* Miq. được tóm tắt ở hình 3.23 và hình 3.24.



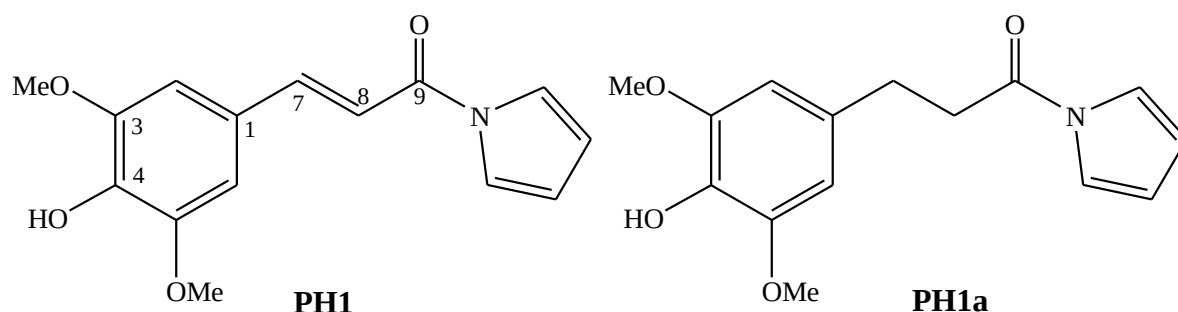
Hình 3.23. Sơ đồ phân lập hợp chất từ củn chloroform của loài *Piper hymenophyllum* Miq.



Hình 3.24. Sơ đồ phân lập hợp chất từ cán ethylacetat của loài *Piper hymenophyllum* Miq.

3.2.2.2. Kết quả nhận dạng hợp chất phân lập được từ loài *Piper hymenophyllum* Miq.

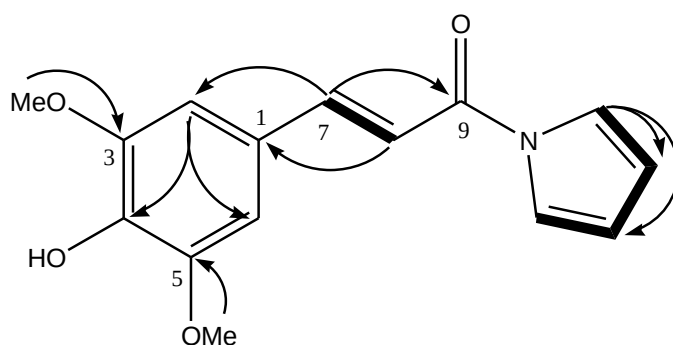
* **Hợp chất PH1: 3,5-dimethoxy-4-hydroxycinnamoyl pyrrol**



Hình 3.25. Cấu trúc hóa học của hợp chất PH1 và hợp chất tham khảo PH1a

Hợp chất **PH1** thu được dưới dạng chất rắn, màu vàng nhạt, cho phản ứng dương tính với thuốc thử Dragendorff. Trên phổ khối lượng phân giải cao HR-EI-MS xuất hiện pic ion giả phân tử tại m/z 273,1003 $[M]^+$ cho phép xác định công thức phân tử của **PH1** là $C_{15}H_{15}NO_4$ (tính toán lí thuyết cho công thức $C_{15}H_{15}NO_4$: 273,1001). Trên phổ 1H NMR của hợp chất **PH1** cho biết sự có mặt 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 (1H, *d*, $J = 15,4$ Hz); 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}C NMR của hợp chất **PH1** cho thấy sự xuất hiện 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. So sánh số liệu phổ NMR của hợp chất **PH1** với số liệu phổ NMR của hợp chất 3-(4-hydroxy-3,5-dimethoxyphenyl) propanoyl pyrrol (**PH1a**) được phân lập từ loài *P. boehmeriaefolium* (Miq.) C. DC. cho thấy sự xuất hiện của một liên kết đôi tại C-7/C-8 thay thế cho một liên kết đơn [132]. Các tương tác HMBC giữa H-2/H-6 (δ_H 7,20) với C-1 (δ_C 126,25), C-5/C-3 (δ_C 149,06), C-4 (δ_C 140,38) và C-7 (δ_C 149,11); giữa 3/5-OMe (δ_H 3,90) với C-3/C-5 (δ_C 149,06) đã chứng minh hai nhóm methoxy và một nhóm hydroxyl lần lượt tại C-3, C-5 và C-4.

Các tương tác HMBC giữa H-8 (δ_H 7,45) với C-1 (δ_C 126,25), C-7 (δ_C 149,11) và C-9 (δ_C 163,92) gợi ý nhóm cacbonyl tại C-9 và một liên kết đôi tại C-7/C-8. Liên kết đôi này có hằng số tương tác giữa hai proton H-7 và H-8 với $J_{7-8} = 15,4$ Hz đã gợi ý cấu hình của liên kết đôi này là *E*. Vòng pyrrol tại C-9 được chứng minh bởi hằng số tương tác thấp $J_{2-3} = J_{3-4} = 2,4$ Hz và nhóm cacbonyl cũng dịch chuyển về phía trường mạnh (δ_C 163,92) khi liên kết với nguyên tử nitơ. Từ các cơ sở phân tích ở trên kết hợp với tra cứu tài liệu tham khảo, **PH1** được xác định là một hợp chất mới có tên gọi là 3,5-dimethoxy-4-hydroxycinnamoyl pyrrol.



Hình 3.26. Các tương tác HMBC và COSY chính của hợp chất PH1

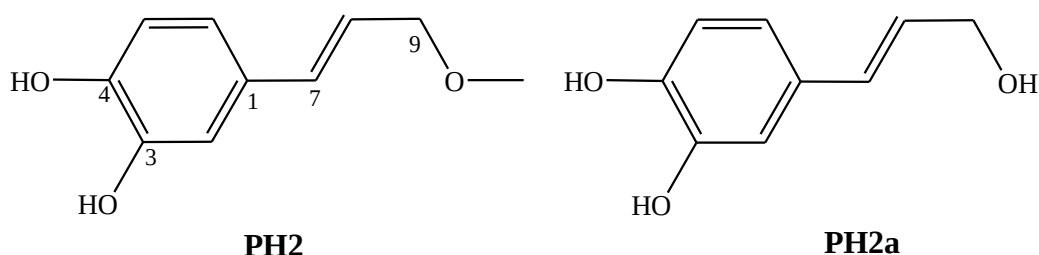
Bảng 3.7. Số liệu phổ NMR của hợp chất PH1

Vị trí cacbon	^{#,d} δ_C	^{a,b} δ_C	^{a,c} δ_H (mult., <i>J</i>)
1	130,9	126,25	-
2	104,7	107,78	7,20 (s)
3	146,7	149,06	-
4	132,9	140,38	-
5	146,7	149,06	-
6	104,7	107,78	7,20 (s)
7	30,3	149,11	7,89 (<i>d</i> , 15,4)
8	36,3	113,94	7,45 (<i>d</i> , 15,4)
9	169,6	163,92	-
1'	118,6	120,24	7,61 (<i>t</i> , 2,4)

Vị trí cacbon	^{#,d} δ _C	^{a,b} δ _C	^{a,c} δ _H (mult., <i>J</i>)
2'	112,8	113,58	6,32 (t, 2,4)
3'	112,8	113,58	6,32 (t, 2,4)
4'	118,6	120,24	7,61 (t, 2,4)
3,5-OMe	55,9	56,87	3,90 (s)

Đo trong ^{a)} Aceton, ^{b)} 100 MHz, ^{c)} 400 MHz, ^{d)} CDCl₃, ^{#)} dữ liệu phổ ¹³C NMR của hợp chất 3-(4-hydroxy-3,5-dimethoxyphenyl) propanoyl pyrrol trong tài liệu tham khảo [132]

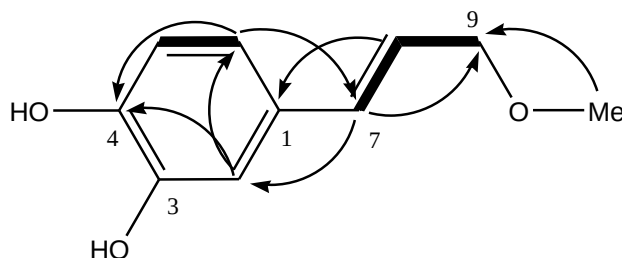
*** Hợp chất PH2: 3,4-dihydroxycinnamyl alcohol methyl ether**



Hình 3.27. Cấu trúc hóa học của hợp chất PH2 và hợp chất tham khảo PH2a

Hợp chất **PH2** thu được dưới dạng chất rắn, màu trắng. Trên phổ khối lượng phân giải cao HR-EI-MS xuất hiện pic ion giả phân tử tại m/z 180,0787 [M]⁺ dẫn đến khẳng định công thức phân tử của **PH2** là C₁₀H₁₂O₃ (tính toán lý thuyết cho công thức C₁₀H₁₂O₃: 180,0786). Phổ ¹H NMR của hợp chất **PH2** xuất hiện 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 ¹³C NMR của **PH2** xuất hiện 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. Phân tích dữ liệu NMR và kết hợp với tra cứu tài liệu tham khảo, có thể nhận dạng đây là một phenylpropanoid. So sánh số liệu ¹³C NMR của **PH2** hầu hết giống với của hợp chất 3,4-dihydroxycinnamyl alcohol (**PH2a**), ngoại trừ sự xuất hiện thêm một nhóm methoxy tại C-9 [59]. Các tương tác trực tiếp giữa proton với cacbon được xác định bằng phổ HSQC.

Theo đó, proton H-2 (δ_H 7,10) có tương tác HSQC với C-2 (δ_C 114,09), proton này lại tương tác HMBC với C-4 (δ_C 146,74), C-6 (δ_C 120,19) và C-7 (δ_C 134,69). Tương tác HMBC giữa H-6 (δ_H 6,43) với C-1 (δ_C 130,40), C-2 (δ_C 114,09), C-4 (δ_C 146,74) và C-7 (δ_C 134,69) đã chứng minh vị trí của hai nhóm -OH tại C-3 và C-4. Mặt khác, tương tác HMBC giữa H-7 (δ_H 7,52) với C-1 (δ_C 130,40), C-2 (δ_C 114,09), C-6 (δ_C 120,19), C-8 (δ_C 123,43) và C-9 (δ_C 74,53); giữa 9-OMe (δ_H 3,32) với C-9 (δ_C 74,53) đã gợi ý một liên kết đôi tại C-7/C-8 và một nhóm methoxy tại C-9. Hằng số tương tác của hai proton H-7 và H-8, $J_{7,8} = 16,0$ Hz đã chứng minh cấu hình của liên kết đôi tại C-7/C-8 là *E*. Bên cạnh đó, các tương tác trên phổ COSY giữa H-5/H-6, H-7/H-8/H-9 một lần nữa gợi ý trật tự sắp xếp các nhóm methin/methylen. Từ các cơ sở phân tích ở trên, cấu trúc của hợp chất **PH2** được xác định là 3,4-dihydroxycinnamyl alcohol methyl ether. Đây là một hợp chất mới lần đầu tiên phân lập được từ tự nhiên.



Hình 3.28. Các tương tác HMBC và COSY chính của hợp chất PH2

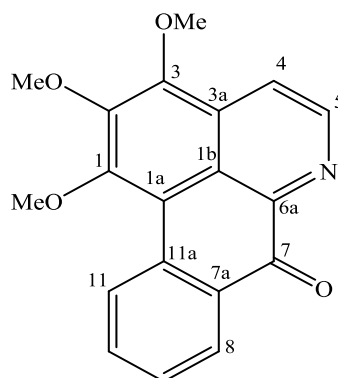
Bảng 3.8. Số liệu phổ NMR của hợp chất PH2

Vị trí cacbon	$^s,a\delta_C$	$^{\#,d}\delta_C$	$^{a,b}\delta_C$	$^{a,c}\delta_H$ (mult., <i>J</i>)
1	132,2	133,2	130,40	-
2	113,9	111,9	114,09	7,10 (<i>s</i>)
3	146,3	151,0	146,55	-
4	146,3	147,5	146,74	-
5	116,3	118,4	116,41	6,81 (<i>d</i> , 8,0)
6	119,9	120,7	120,19	6,43 (<i>d</i> , 8,0)
Vị trí cacbon	$^s,a\delta_C$	$^{\#,d}\delta_C$	$^{a,b}\delta_C$	$^{a,c}\delta_H$ (mult., <i>J</i>)

7	130,6	133,3	134,69	7,52 (<i>d</i> , 16,0)
8	126,6	125,7	123,43	6,01 (<i>dt</i> , 6,4, 16,0)
9	63,9	74,1	74,53	4,00 (<i>d</i> , 6,4)
9-OMe		56,8	58,03	3,32 (<i>s</i>)

Đo trong ^{a)} CD₃OD, ^{b)} 100 MHz, ^{c)} 400 MHz, ^{d)} Pyridin, ^{e)} dữ liệu phổ ¹³C NMR của hợp chất PH2a từ [59], ^{f)} một phần dữ liệu phổ ¹³C NMR của hợp chất dracunculifosid D từ [101]

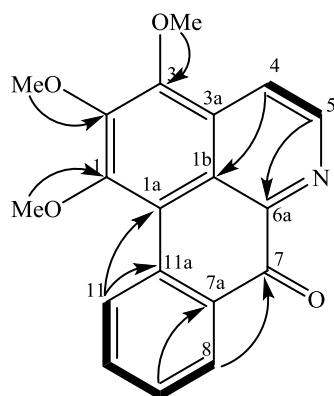
* Hợp chất PH3: O-methylmoscatolin



Hình 3.29. Cấu trúc hóa học của hợp chất PH3

Hợp chất **PH3** thu được dưới dạng chất bột, màu vàng nhạt, cho phản ứng dương tính với thuốc thử Dragendorff. Công thức phân tử của **PH3** được xác định là C₁₉H₁₅NO₄ do có sự xuất hiện pic ion giả phân tử trên phổ khối lượng phân giải cao HR-ESI-MS tại *m/z* 344,0884 [M+Na]⁺ (tính toán lí thuyết cho công thức C₁₉H₁₅NO₄Na: 344,0890). Trên phổ ¹H NMR của **PH3** xuất hiện 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 thể *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); proton của 3 nhóm methoxy tại δ_H 4,08, 4,10 và 4,19. Trên phổ ¹³C NMR của **PH3** cho thấy sự xuất hiện 1 nhóm cacbonyl 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. So sánh dữ liệu phổ ¹³C NMR của **PH3** với dữ liệu phổ ¹³C NMR của O-methylmoscatolin thấy hoàn toàn trùng khớp [89]. Các tương tác HMBC giữa các proton của 3 nhóm methoxy tại δ_H 4,19, 4,10

và 4,08 lần lượt với C-1 (δ_C 148,42), C-2 (δ_C 147,31) và C-3 (δ_C 156,42) chứng tỏ sự có mặt của các nhóm methoxy tại 3 vị trí này. Vị trí của các nhóm nguyên tử được xác định đầy đủ bằng các phổ HSQC, HMBC và COSY. Dựa trên các dữ liệu phổ ở trên kết hợp đối chiếu tài liệu tham khảo đã xác định được cấu trúc của hợp chất **PH3** được xác định là *O*-methylmoscatolin.



Hình 3.30. Các tương tác HMBC và COSY chính của hợp chất PH3

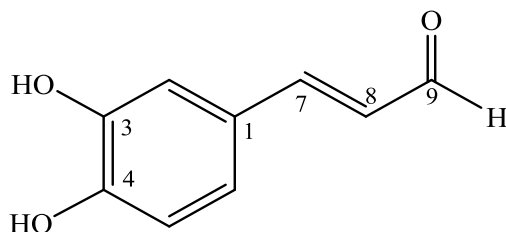
Bảng 3.9. Số liệu phổ NMR của hợp chất PH3

Vị trí cacbon	^{#,a} δ_C	^{a,b} δ_C	^{a,c} δ_H (mult., <i>J</i>)	Vị trí cacbon	^{#,a} δ_C	^{a,b} δ_C	^{a,c} δ_H (mult., <i>J</i>)
1	148,2	148,42	-	3-OCH ₃		60,96	4,08 (s)
1a	115,4	115,66	-	7a	131,4	131,44	-
1b	122,5	122,80	-	8	127,9	128,90	8,56 (<i>d</i> , 8,0)
2	147,0	147,31	-	9	134,1	128,12	7,52 (<i>t</i> , 8,0)
3	156,2	156,42	-	10	127,4	134,30	7,74 (<i>t</i> , 8,0)
3a	130,8	131,06	-	11	127,4	127,61	9,10 (<i>d</i> , 8,0)
4	118,9	110,09	8,21 (<i>d</i> , 4,8)	11a	134,3	134,50	
5	144,3	144,54	8,97 (<i>d</i> , 4,8)	1-OCH ₃		61,77	4,19 (s)
6a	145,0	145,47	-	2-OCH ₃		61,43	4,10 (s)
7	182,3	182,57	-	3-OCH ₃		60,96	4,08 (s)

Đo trong ^a) CDCl₃, ^b) 100 MHz, ^c) 400 MHz

[#]) dữ liệu phổ ¹³C NMR của hợp chất *O*-methylmoscatolin trong tài liệu tham khảo [89]

*** Hợp chất PH4: (*E*)-Caffeoyl aldehyd**



Hình 3.31. Cấu trúc hóa học của hợp chất PH4

Hợp chất **PH4** thu được dưới dạng lỏng, màu vàng nhạt. Trên phổ khối lượng phân giải cao HR-ESI-MS xuất hiện pic ion phân tử tại m/z 163,0431 $[M-H]^-$ cho phép kết luận công thức phân tử của **PH4** là $C_9H_8O_3$ (tính toán lí thuyết cho công thức $C_9H_7O_3$: 163,0401). Trên phổ 1H NMR của hợp chất **PH4** xuất hiện 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 $-CH=CH-$ tại δ_H 6,54 (dd , $J = 8,0, 16,0$ Hz) và 7,52 (d , $J = 16,0$ Hz). Cấu hình của liên kết đôi này được xác định là *E* dựa trên hằng số tương tác giữa hai proton H-7 và H-8, $J_{7-8} = 16,0$ Hz. Phổ ^{13}C NMR của **PH4** xuất hiện 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. Từ các đặc trưng phổ NMR của hợp chất này cho phép dự đoán cấu trúc của **PH4** là (*E*)-caffeoyl aldehyd. Kết hợp tra cứu tài liệu tham khảo, nhận thấy số liệu phổ NMR của (*E*)-caffeoyl aldehyd và hợp chất **PH4** hoàn toàn trùng khớp với nhau [53]. Từ các bằng chứng trên, cho phép kết luận hợp chất **PH4** chính là (*E*)-caffeoyl aldehyd. Hợp chất này đã được các nhà khoa học Trung Quốc thông báo phân lập được từ loài *P. taiwanense* Lin & Lu [35].

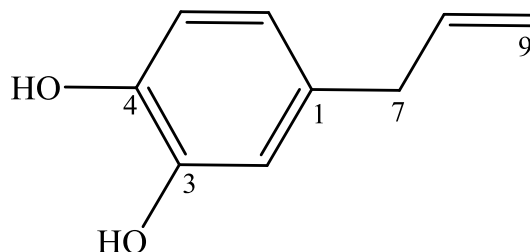
Bảng 3.10. Số liệu phổ NMR của hợp chất PH4

Vị trí cacbon	^{#,a} δ _C	^{a,b} δ _C	^{a,c} δ _H (mult., <i>J</i>)
1	127,6	127,78	-
2	115,5	115,73	7,10 (s)
3	146,9	147,14	-
4	150,7	150,86	-
5	116,6	116,77	6,81 (<i>d</i> , 8,0)
6	123,9	124,12	7,03 (<i>d</i> , 8,0)
7	156,4	156,57	7,52 (<i>d</i> , 16,0)
8	126,3	126,52	6,54 (<i>dd</i> , 8,0, 16,0)
9	196,1	196,33	9,54 (<i>d</i> , 8,0)

Đo trong ^{a)} CD₃OD, ^{b)} 100 MHz, ^{c)} 400 MHz

^{#)} dữ liệu phổ ¹³C NMR của hợp chất (*E*)-caffeoyl aldehyd trong tài liệu tham khảo [53]

*** Hợp chất PH5: 1-allyl-3,4-dihydroxybenzen**



Hình 3.32. Cấu trúc hóa học của hợp chất PH5

Hợp chất **PH5** thu được dưới dạng chất lỏng, không màu. Trên phổ ¹H-NMR của hợp chất **PH5** xuất hiện 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 -CH=CH₂ tại δ_H 5,94 (1H, *m*), 5,07 (1H, *d*, *J* = 14,4 Hz) và 5,09 (1H, *d*, *J* = 16,0 Hz). Trên phổ ¹³C NMR và DEPT của hợp chất **PH5** cho thấy sự có mặt 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); một nhóm methylen tại δ_C 39,65 (C-7). Các dữ liệu phổ NMR của hợp chất **PH5** hoàn toàn trùng khớp với dữ liệu phổ NMR của hợp chất 1-allyl-3,4-dihydroxybenzen đã được công bố trong tài liệu của Fabienne và cộng sự [50]. Công thức phân tử $C_9H_{10}O_2$ của **PH5** một lần nữa được khẳng định bằng phổ khối lượng phân giải cao HR-ESI-MS xuất hiện pic ion giả phân tử tại m/z 151,0745 $[M+H]^+$ (tính toán lí thuyết cho công thức $C_9H_{11}O_2$: 151,0754). Dựa vào cơ sở phân tích ở trên kết hợp đối chiếu tài liệu tham khảo cho phép kết luận hợp chất **PH5** là 1-allyl-3,4-dihydroxybenzen. Trước đây, hợp chất này đã được phân lập từ loài *P. nudibaccatum* Y. Q. Tseng và có tên gọi khác là hydroxychavicol [87].

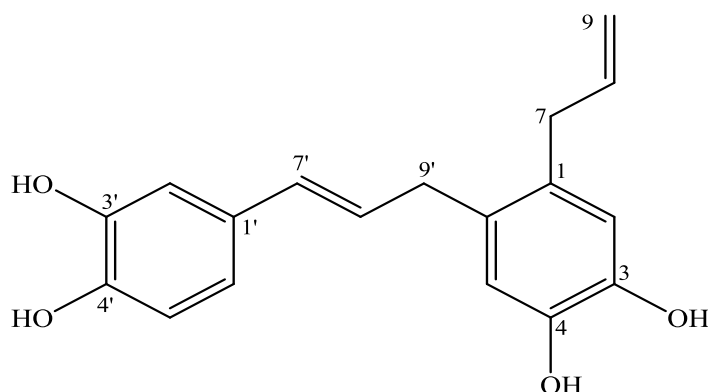
Bảng 3.11. Số liệu phổ NMR của hợp chất PH5

Vị trí cacbon	^{#,a} δ_C	^{a,b} δ_C	^{a,c} δ_H (mult., J)
1	133,6	133,64	-
2	115,7	115,73	6,73 (d, 2,0)
3	142,1	141,71	-
4	143,9	143,50	-
5	116,1	116,05	6,81 (d, 8,0)
6	121,3	121,38	6,65 (dd, 2,0, 8,0)
7	39,9	39,65	3,28 (d, 6,8)
8	138,1	137,78	5,94 (m)
9	115,9	115,82	5,07(d, 14,4) 5,09 (d, 16,0)

Đo trong ^a) $CDCl_3$, ^b) 100 MHz, ^c) 400 MHz

[#]) dữ liệu phổ ^{13}C NMR của hợp chất 1-allyl-3,4-dihydroxybenzen trong tài liệu tham khảo [50]

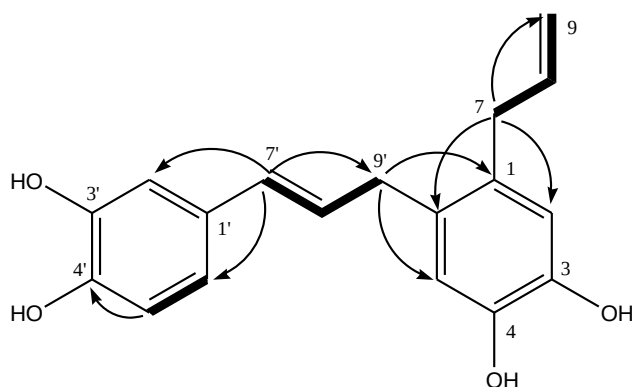
*** Hợp chất PH6: Neotaiwanensol A**



Hình 3.33. Cấu trúc hóa học của hợp chất PH6

Hợp chất **PH6** thu được dưới dạng chất dầu màu vàng nhạt. Công thức phân tử được xác định là $C_{18}H_{18}O_4$ dựa trên phổ khối lượng phân giải cao HR-EI-MS m/z 298,1203 $[M]^+$ (tính toán lí thuyết cho công thức $C_{18}H_{18}O_4$: 298,1205). Trên phổ 1H NMR của hợp chất **PH6** cho biết sự có mặt của một liên kết đôi dạng allyl ($-CH=CH_2$) tại δ_H 4,90 (d , $J = 17,2$ Hz), 5,00 (d , $J = 10,0$ Hz) và 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). Trên phổ ^{13}C NMR của hợp chất **PH6** thấy xuất hiện 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. Phân tích dữ liệu phổ 1H và ^{13}C NMR của **PH6** cho thấy hợp chất này có hai hợp phần phenyl propanoid. Các tương tác HMBC giữa H-7 (δ_H 3,27) với C-1 (δ_C 130,48), C-2 (δ_C 131,09), C-6 (δ_C 118,03), C-8 (δ_C 139,33) và C-9 (δ_C 115,45); giữa H-9 (δ_H 4,90 và 4,50) với C-7 (δ_C 37,60) và C-8 (δ_C 139,33) đã chứng minh sự có mặt của nhóm allyl và nhóm này liên kết với vòng thơm tại vị trí C-1. Các tương tác HMBC giữa H-7' (δ_H 6,07) với C-1' (δ_C 131,61), C-2' (δ_C 113,70), C-6' (δ_C 119,46), C-8' (δ_C 127,78) và C-9' (δ_C 36,58) đã gợi ý về sự có mặt của liên kết đôi tại C-7'/C-8' và liên kết đôi này liên kết với vòng thơm tại C-1'. Ngoài ra, phần cấu trúc này có nhóm methylen C-9' liên kết với phần còn lại tại C-2 qua tín hiệu trên

phổ HMBC giữa H-9' (δ_H 3,31) với C-1 (δ_C 130,48), C-2 (δ_C 131,09) và C-3 (δ_C 117,94). So sánh dữ liệu phổ ^{13}C NMR của **PH6** với dữ liệu phổ ^{13}C NMR của hợp chất neotaiwanensol A thấy hoàn toàn trùng khớp [34]. Từ các bằng chứng trên, cho phép kết luận hợp chất **PH6** chính là neotaiwanensol A. Trước đây, hợp chất này đã được phân lập từ loài *P. taiwanense* Lin & Lu.



Hình 3.34. Các tương tác HMBC và COSY chính của hợp chất PH6

Bảng 3.12. Số liệu phổ NMR của hợp chất PH6

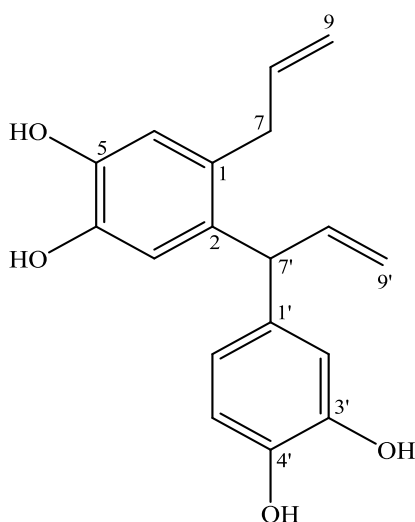
Vị trí cacbon	^{#,d} δ_C	^{a,b} δ_C	^{a,c} δ_H (mult., <i>J</i>)
1	130,5	130,48	-
2	131,2	131,09	-
3	118,1	117,94	6,64
4	144,8	144,55	-
5	144,8	144,57	-
6	118,2	118,03	6,60 (<i>s</i>)
7	37,8	37,60	3,27 (<i>m</i>)
8	139,6	139,33	5,90 (<i>m</i>)
9	115,9	115,45	6,84 (<i>m</i>)
1'	131,7	131,61	-
2'	114,1	113,70	6,81 (<i>s</i>)
3'	146,4	146,36	-
4'	146,1	145,83	-

Vị trí cacbon	^{#,d} δ _C	^{a,b} δ _C	^{a,c} δ _H (mult., J)
5'	116,7	116,40	6,66 (d, 8,0)
6'	119,8	119,46	6,65 (d, 8,0)
7'	131,8	131,61	6,07 (d, 16,0)
8'	128,1	127,78	5,95 (dt, 6,0, 16,0)
9'	36,7	36,58	3,31 (m)

Đo trong ^{a)} CD₃OD, ^{b)} 100 MHz, ^{c)} 400 MHz, ^{d)} Aceton

^{#)} dữ liệu phổ ¹³C NMR của hợp chất neotaiwanensol A trong tài liệu tham khảo [34]

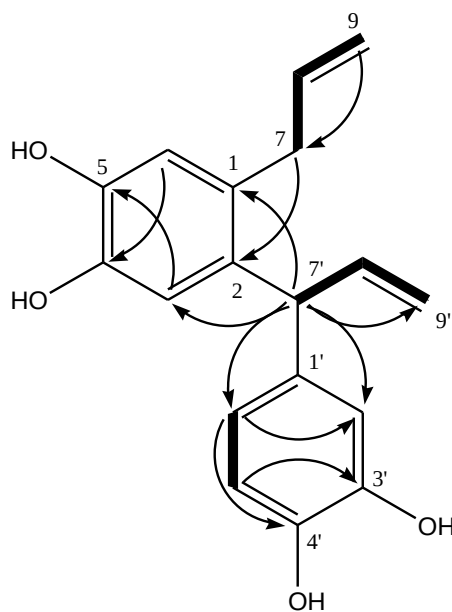
* Hợp chất PH7: Neotaiwanensol B



Hình 3.35. Cấu trúc hóa học của hợp chất PH7

Hợp chất **PH7** thu được dưới dạng chất dầu, màu vàng nhạt, $[\alpha]_D^{25} +9,3$ (c 0,08, MeOH). Trên phổ HR-EI-MS xuất hiện pic ion giả phân tử tại m/z 298,1203 [M]⁺ từ đó công thức phân tử của **PH7** được xác định là C₁₈H₁₈O₄ (tính toán lí thuyết cho công thức C₁₈H₁₈O₄: 298,1205). Trên phổ ¹H NMR của hợp chất **PH7** cho biết sự có mặt của hai liên kết đôi dạng allyl (–CH=CH₂) 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 ¹³C NMR của hợp chất **PH7** cho thấy sự có mặt 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. So sánh dữ liệu phổ ^{13}C NMR của **PH7** với dữ liệu phổ ^{13}C NMR của hợp chất neotaiwanensol B thấy hoàn toàn trùng khớp. Trên phổ HMBC xuất hiện tín hiệu tương tác giữa proton H-7' (δ_H 4,69) với C-2 (δ_C 134,39), C-1 (δ_C 130,56), C-3 (δ_C 117,43), C-1' (δ_C 136,47), C-2' (δ_C 117,22) và C-3' (δ_C 146,11); giữa proton H-7 (δ_H 3,18) với C-1 (δ_C 130,56), C-2 (δ_C 134,39) và C-6 (δ_C 118,17); giữa proton H-9 với C-7 (δ_C 37,58); giữa proton H-9' với C-7' (δ_C 50,57) đã chứng minh thêm về cấu trúc của **PH7**. Từ cơ sở phân tích ở trên cho phép kết luận hợp chất **PH7** là neotaiwanensol B. Trước đây, hợp chất này đã được phân lập từ loài *P. taiwanense* Lin & Lu [34].



Hình 3.36. Các tương tác HMBC và COSY chính của hợp chất **PH7**

Bảng 3.13. Số liệu phổ NMR của hợp chất **PH7**

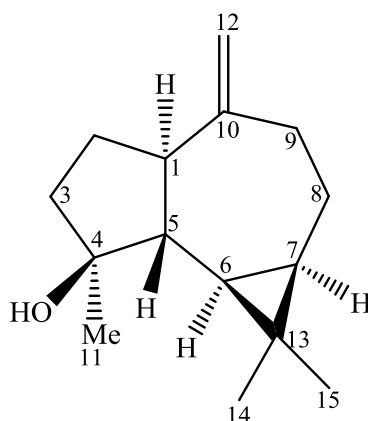
Vị trí cacbon	$^{\#,\text{d}}\delta_C$	$^{\text{a,b}}\delta_C$	$^{\text{a,c}}\delta_H$ (mult., <i>J</i>)
1	129,6	130,56	-
2	133,4	134,39	-
3	116,5	117,43	6,57 (s)
4	143,6	144,37	-

Vị trí cacbon	^{#,d} δ _C	^{a,b} δ _C	^{a,c} δ _H (mult., <i>J</i>)
5	143,8	144,51	-
6	117,3	118,17	6,57 (s)
7	36,7	37,58	3,18 (<i>br s</i>)
8	138,8	139,50	5,86 (<i>m</i>)
9	114,9	115,45	4,95 (<i>d</i> , 17,2) 4,97 (<i>d</i> , 10,0)
1'	135,6	136,47	-
2'	116,3	117,22	6,65 (s)
3'	145,3	146,11	-
4'	143,9	144,59	-
5'	115,4	116,14	6,67 (<i>d</i> , 8,0)
6'	120,5	121,31	6,44 (<i>d</i> , 8,0)
7'	49,5	50,57	4,69 (<i>br s</i>)
8'	142,4	143,20	6,16 (<i>m</i>)
9'	115,1	115,74	4,75 (<i>d</i> , 17,2) 5,11 (<i>d</i> , 10,0)

Đo trong ^{a)} CD₃OD, ^{b)} 100 MHz, ^{c)} 400 MHz, ^{d)} Aceton

^{#)} dữ liệu phổ ¹³C NMR của hợp chất neotaiwanensol B trong tài liệu tham khảo [34]

*** Hợp chất PH8: Spathulenol**



Hình 3.37. Cấu trúc hóa học của hợp chất PH8

Hợp chất **PH8** thu được dưới dạng bột không màu, $[\alpha]_D^{25}$ -25 ($c=0,5$, CHCl_3). Phổ ^1H NMR của **PH8** cho thấy 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}C NMR của **PH8** thấy xuất hiện 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). Số liệu phổ ^{13}C NMR của **PH8** hoàn toàn trùng khớp với số liệu phổ ^{13}C NMR của spathulenol [24]. Hợp chất này là thành phần hóa học chính của một số loài thuộc chi *Piper* L. như *P. fimbriatum* C. DC. và *P. peltatum* (L.) Miq. [100], [109].

Bảng 3.14. Số liệu phổ NMR của hợp chất PH8

Vị trí cacbon	^{#,a} δ_{C}	^{a,b} δ_{C}	^{a,c} δ_{H} (mult., J)
1	53,6	53,63	-
2	26,8	26,95	-
3	41,9	41,97	-
4	81,0	81,21	-
5	54,4	54,57	-
6	30,1	30,13	-
7	27,6	27,72	-
8	24,9	25,01	-
9	39,0	39,09	-
10	153,4	153,68	-
11	26,1	26,32	1,28 (s)
12	106,4	106,49	4,67 (d , 10,4)
13	20,3	20,49	-
14	16,4	16,56	1,05 (s)
15	28,7	28,89	1,04 (s)

Đo trong ^{a)} CDCl_3 , ^{b)} 100 MHz, ^{c)} 400 MHz

^{#)} dữ liệu phổ ^{13}C NMR của hợp chất spathulenol trong tài liệu tham khảo [24]

Như vậy, cấu trúc của 14 chất phân lập được của luận án đều đã được nhận dạng chủ yếu dựa vào dữ liệu phổ cộng hưởng từ hạt nhân và phổ khối lượng kết hợp đối chiếu tài liệu tham khảo. Trong số 14 hợp chất phân lập được có 2 alcaloid, 2 cấu tử tinh dầu, 2 neolignan, 3 alkanpolyenylenbenzen, 1 flavonoid và 4 hợp chất thuộc các nhóm khác. Cấu trúc của các hợp chất phân lập được rất phong phú. Hầu hết các chất này đều nằm trong những nhóm hợp chất chính phân lập được từ chi *Piper* L. đã được đề cập ở phần tổng quan. Đặc biệt, có 3 hợp chất lần đầu tiên công bố phân lập được từ tự nhiên và 4 hợp chất lần đầu tiên công bố phân lập được từ chi *Piper* L. Kết quả này là những đóng góp giá trị của luận án.

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

3.3.1. Triển khai phương pháp đánh giá hoạt tính ức chế enzym acetylcholinesterase *in vitro*

Phương pháp đo quang dùng để đánh giá hoạt tính ức chế enzym cholinesterase được sử dụng lần đầu tiên vào năm 1961 bởi tác giả Ellman. Kể từ đó, phương pháp đo quang của Ellman được nhiều tác giả trên thế giới sử dụng trong nghiên cứu sàng lọc hoạt tính ức chế AChE. Tuy nhiên, một số điều kiện thử nghiệm như: nồng độ cơ chất và thuốc thử, hoạt độ enzym, thời gian phản ứng... thường có sự khác nhau giữa các nghiên cứu. Vì thế, hiện không có một điều kiện tối ưu nào cho phương pháp thử này. Với mục tiêu triển khai được phương pháp đánh giá hoạt tính ức chế AChE *in vitro* phù hợp với điều kiện phòng thí nghiệm trong nước cũng như để chủ động trong quá trình triển khai nghiên cứu, một số yếu tố ảnh hưởng đến phương pháp đã được khảo sát. Kết quả khảo sát và triển khai phương pháp được trình bày ở nội dung dưới đây.

*** Kết quả khảo sát ảnh hưởng của nồng độ dung dịch cơ chất và thuốc thử đến phương pháp thử**

Tiến hành đánh giá ảnh hưởng của nồng độ dung dịch cơ chất và thuốc thử đến phương pháp thử ở 3 mức nồng độ là 1,2; 2,4 và 3,6 mM. Kết quả khảo sát được trình bày ở bảng 3.15.

Bảng 3.15. Ảnh hưởng của nồng độ dung dịch cơ chất và thuốc thử đến phương pháp thử

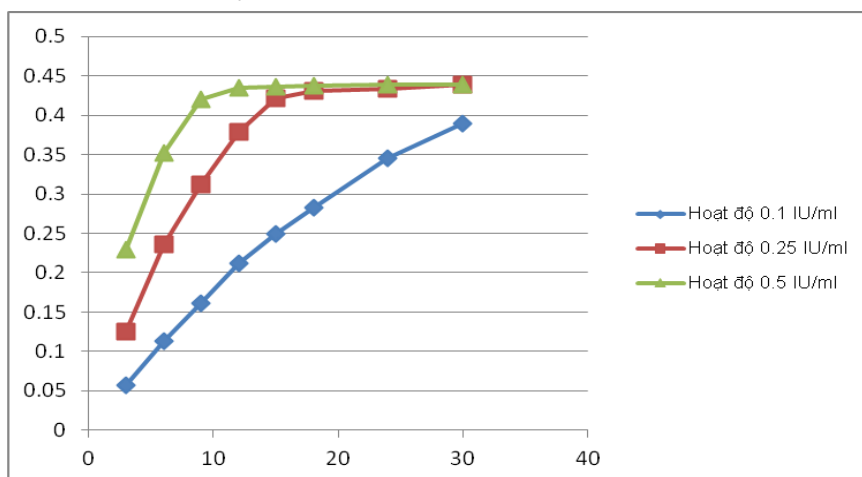
Mẫu	Độ hấp thụ đo được ở nồng độ cơ chất và thuốc thử khảo sát		
	1,2 mM	2,4 mM	3,6 mM
	(1)	(2)	(3)
1	0,1233	0,4506	0,4412
2	0,1432	0,4225	0,4678
3	0,1399	0,4406	0,4581
$\bar{X}$	0,1355	0,4379	0,4557
RSD (%)	7,87	3,25	2,95
t-test	$p_{1-2}, p_{1-3} < 0,05; p_{2-3} > 0,05$		

Nhận xét:

Kết quả ở bảng 3.15 cho thấy khi nồng độ dung dịch cơ chất và thuốc thử thay đổi, độ hấp thụ của mẫu thử cũng thay đổi. Giá trị độ hấp thụ của thử nghiệm thấp nhất khi nồng độ dung dịch cơ chất và thuốc thử là 1,2 mM. Ở điều kiện này, độ lặp lại của thử nghiệm cũng là kém nhất với RSD là 7,87%. Giữa hai mức nồng độ cơ chất và thuốc thử còn lại được khảo sát là 2,4 và 3,6 mM, chênh lệch về độ hấp thụ và độ lệch chuẩn tương đối không đáng kể, sự khác biệt không có ý nghĩa thống kê với $p > 0,05$. Tuy nhiên, mức nồng độ cơ chất và thuốc thử là 2,4 mM được chọn cho những nghiên cứu tiếp theo để giảm lượng cơ chất và thuốc thử phải dùng trong nghiên cứu nhưng vẫn đảm bảo độ lặp lại của các thử nghiệm. Đồng thời, mức nồng độ bằng 2,4 mM này cũng nằm trong khoảng nồng độ của cơ chất ATCI và thuốc thử DTNB đã được sử dụng trong các nghiên cứu trước đây lần lượt là 1-75 mM và 1,5-10 mM.

*** Kết quả khảo sát ảnh hưởng của hoạt độ AChE đến phương pháp thử và lựa chọn thời điểm đo độ hấp thụ**

Khảo sát ảnh hưởng của hoạt độ enzyme đến phương pháp thử ở 3 mức hoạt độ là 0,10; 0,25 và 0,50 IU/ml. Sự phụ thuộc của độ hấp thụ theo thời gian ở 3 mức hoạt độ enzyme khảo sát được thể hiện ở hình 3.38.



Hình 3.38. Đồ thị biểu diễn sự tương quan giữa độ hấp thụ và thời gian của các hỗn hợp phản ứng ở 3 mức hoạt độ AChE khảo sát

Nhận xét:

Kết quả ở hình 3.38 cho thấy hoạt độ enzyme ảnh hưởng lớn đến tốc độ phản ứng thủy phân cơ chất.

- Ở hoạt độ enzyme 0,1 IU/ml, tốc độ phản ứng diễn ra rất chậm tương ứng với độ hấp thụ của mẫu thử là thấp nhất khi so sánh với độ hấp thụ của các mẫu thử tương tự đo ở điều kiện hoạt độ enzyme cao hơn tại cùng một thời điểm. Do vậy, ở điều kiện này, kết quả thử nghiệm sẽ gặp phải sai số lớn hơn đặc biệt với những mẫu thử có hoạt tính ức chế AChE mạnh.

- Ở hoạt độ enzyme 0,5 IU/ml, tốc độ phản ứng diễn ra nhanh nhất và chỉ sau khoảng 10 phút, phản ứng đã đạt tới trạng thái bão hòa. Tuy nhiên, khi tốc độ của phản ứng thủy phân được xúc tác bởi enzyme diễn ra quá nhanh, ảnh hưởng của những yếu tố khách quan sẽ gây sai số lớn hơn.

- Ở hoạt độ enzyme 0,25 IU/ml, tốc độ phản ứng diễn ra vừa phải. Thời gian để phản ứng đạt tới trạng thái bão hòa khoảng 18 phút. Trong khoảng thời gian từ 9-15 phút, tương quan giữa độ hấp thụ của mẫu thử và thời gian phản ứng là khá tuyến tính với hệ số tương quan $R^2=0,9842$.

Vì vậy, mức hoạt độ AChE là 0,25 IU/ml được chọn cho những nghiên cứu tiếp theo và thời điểm đo độ hấp thụ của mẫu thử được xác định là 15 phút sau khi phản ứng bắt đầu xảy ra. Đồng thời, mức hoạt độ enzym là 0,25 IU/ml được chọn cũng nằm trong khoảng hoạt độ AChE đã được sử dụng trong các nghiên cứu trước đây là từ 0,2-5,0 IU/ml.

*** Kết quả khảo sát ảnh hưởng của nồng độ dung môi DMSO trong hỗn hợp phản ứng đến hoạt tính của AChE**

Dung môi có thể ảnh hưởng trực tiếp đến hoạt tính của enzym hoặc có thể ảnh hưởng đến khả năng di chuyển của cơ chất đến vị trí gắn với enzym. Vì vậy, lựa chọn dung môi phù hợp cho những thử nghiệm đánh giá hoạt tính enzym là khá quan trọng. Kết quả khảo sát ảnh hưởng của nồng độ dung môi DMSO trong hỗn hợp phản ứng đến hoạt tính của AChE *in vitro* được thể hiện ở bảng 3.16.

Bảng 3.16. Ảnh hưởng của nồng độ dung môi DMSO trong hỗn hợp phản ứng đến hoạt tính của AChE *in vitro*

STT	Nồng độ của DMSO trong hỗn hợp phản ứng (%)	Độ hấp thụ				RSD (%)	I (%)
		Lần 1	Lần 2	Lần 3	X		
1	0	0,6391	0,6441	0,6105	0,6312	2,87	0
2	1,0	0,4274	0,4412	0,4545	0,4413	3,18	30,09
3	1,5	0,4013	0,3769	0,3966	0,3916	3,31	37,95
4	2,0	0,3034	0,3221	0,3286	0,3180	3,71	49,62

Nhận xét:

Kết quả ở bảng 3.16 cho thấy dung môi DMSO có tác dụng ức chế AChE khá mạnh. Mức độ ức chế của dung môi này phụ thuộc vào nồng độ của nó trong hỗn hợp phản ứng. Trong khoảng nồng độ từ 1,0-2,0% của DMSO trong hỗn hợp phản ứng, hoạt tính của AChE bị giảm tương ứng từ 30,09-49,62%. Mặc dù vậy, nghiên cứu này vẫn phải phối hợp dung môi DMSO ở nồng độ

1,0% trong hỗn hợp phản ứng để thử nghiệm. Lý do là bởi nhiều chất phân lập được từ hai loài nghiên cứu của luận án là những hợp chất kém phân cực nên không thể sử dụng những loại dung môi có độ phân cực cao hơn (như MeOH, acetonitril) hoặc dung môi DMSO ở nồng độ thấp hơn để hòa tan chúng được. Đồng thời, ở một số nghiên cứu đánh giá hoạt tính ức chế AChE trước đây, nồng độ DMSO trong hỗn hợp phản ứng là 1,0% đã được sử dụng. Vì vậy, nghiên cứu này sử dụng dung môi DMSO 10% để hòa tan mẫu thử với tỷ lệ phối hợp vào hỗn hợp phản ứng như ở bảng 2.3 (tương đương nồng độ của DMSO trong hỗn hợp phản ứng là 1,0%) là phù hợp.

*** Phương pháp đánh giá hoạt tính ức chế AChE *in vitro***

Dựa vào kết quả khảo sát, đã xác định được điều kiện cho phương pháp đánh giá hoạt tính ức chế AChE *in vitro* của luận án, cụ thể như sau:

- Thành phần hỗn hợp phản ứng được trình bày ở bảng 3.17.

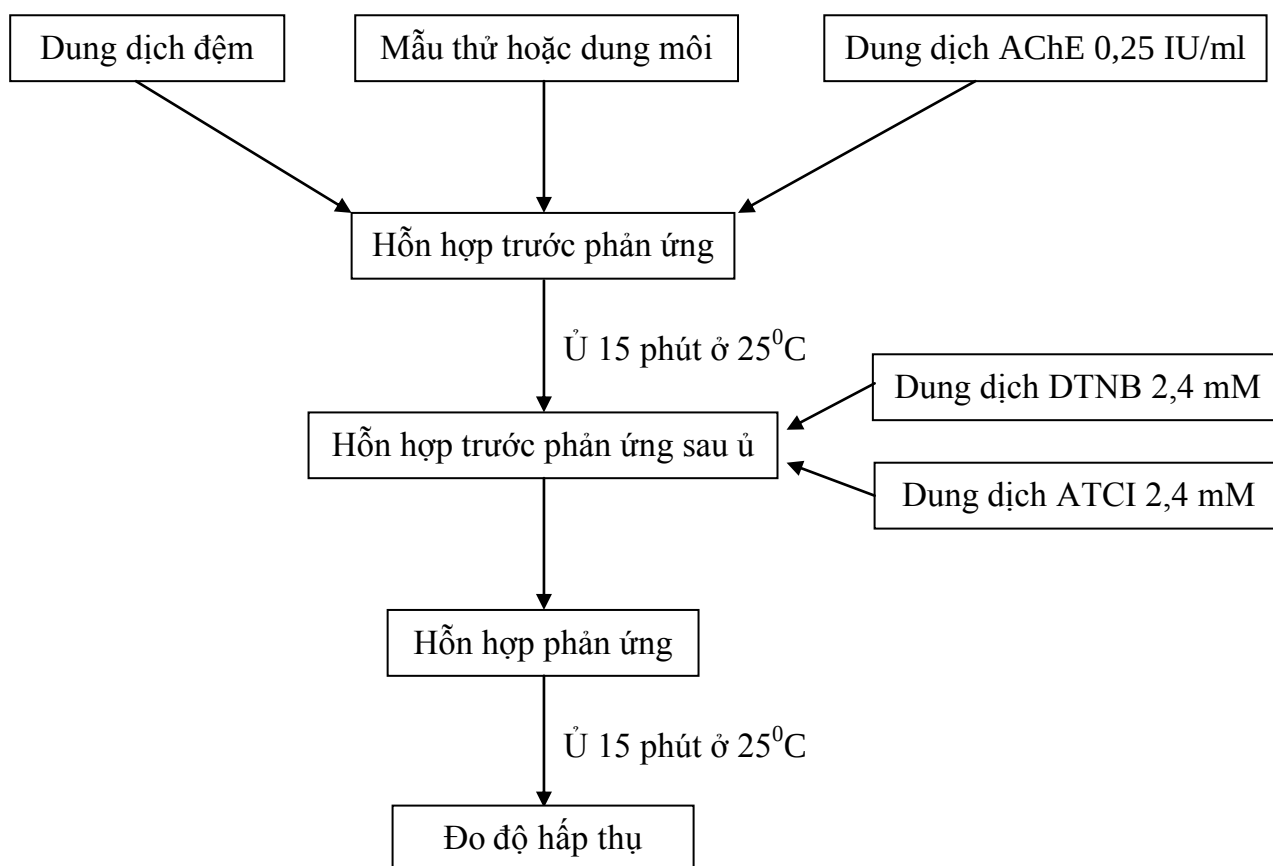
Bảng 3.17. Thành phần của hỗn hợp phản ứng được xác định

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-HCl 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 của thử nghiệm được tiến hành như sau:

Thêm lần lượt từng dung dịch gồm dung dịch đệm tris-HCl pH=8, mẫu thử và dung dịch enzym 0,25 IU/ml vào từng giếng của đĩa 96 giếng. Hỗn hợp các dung dịch này được trộn đều và ủ 15 phút ở 25⁰C. Sau đó, dung dịch thuốc thử

DTNB 2,4 mM và dung dịch cơ chất ATCI 2,4 mM lần lượt được thêm vào hỗn hợp và trộn đều. Tiếp tục ủ hỗn hợp trong 15 phút ở 25⁰C, sau đó, dung dịch được đo độ hấp thụ ở bước sóng 412 nm. Mỗi mẫu thử được tiến hành làm lặp lại 3 lần, mỗi lần làm ở 3 giếng. Hoạt tính ức chế AChE của mẫu nghiên cứu được xác định theo (CT2) ở mục 2.2.3.1. Quy trình thử nghiệm được tóm tắt ở hình 3.39.



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

Phương pháp triển khai ở trên được sử dụng để đánh giá hoạt tính ức chế AChE *in vitro* của các dịch chiết phân đoạn và hợp chất tinh khiết được chiết xuất và phân lập từ hai loài nghiên cứu.

3.3.2. Kết quả đánh giá hoạt tính ức chế enzym acetylcholinesterase *in vitro* của hai loài nghiên cứu

3.3.2.1. Hoạt tính ức chế enzym acetylcholinesterase *in vitro* của các mẫu căn chiết xuất từ hai loài nghiên cứu

Trong quá trình chiết xuất và phân lập hợp chất từ hai loài nghiên cứu, mẫu căn chiết xuất từ những loại dung môi có độ phân cực khác nhau được đánh

giá hoạt tính ức chế AChE *in vitro*. Kết quả thu được là cơ sở để định hướng quá trình phân lập hợp chất ở giai đoạn tiếp theo. Hoạt tính ức chế AChE *in vitro* của các mẫu cần được trình bày ở hai bảng 3.18 và bảng 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			

Nhận xét:

Kết quả ở bảng 3.18 cho thấy tất cả 6 mẫu cần đem thử đều có hoạt tính ức chế AChE ở các mức độ khác nhau. Trong số 5 phân đoạn cần được đánh giá hoạt tính, cần CHCl₃ có hoạt tính ức chế AChE yếu nhất với giá trị IC₅₀ là 14,75 µg/ml và hoạt tính này còn yếu hơn cả hoạt tính của mẫu cần toàn phần trong MeOH. Ngược lại, hai phân đoạn cần sở hữu hoạt tính ức chế enzym mạnh nhất là cần *n*-hexan và cần EtOAc với các giá trị IC₅₀ tương ứng lần lượt là 2,94 và 6,21 µg/ml. Tuy nhiên, hoạt tính của 2 phân đoạn cần *n*-hexan và EtOAc vẫn yếu hơn hoạt tính của berberin clorid lần lượt là 98 và 207 lần. Hai phân đoạn cần có hoạt tính mạnh nhất này được lựa chọn để tiếp tục nghiên cứu phân lập hợp chất.

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			

Nhận xét:

Kết quả ở bảng 3.19 cho thấy tất cả 6 mẫu cần đem thử đều ức chế AChE ở mức độ khác nhau. Trong số 5 phân đoạn cần trong các dung môi có độ phân cực khác nhau, cần *n*-hexan có hoạt tính ức chế AChE yếu nhất với giá trị IC_{50} là 7,93 $\mu\text{g/ml}$. Ngược lại, hai phân đoạn cần sở hữu hoạt tính ức chế enzyme này mạnh nhất là cần CHCl_3 và cần EtOAc với các giá trị IC_{50} tương ứng lần lượt là 1,36 và 0,54 $\mu\text{g/ml}$. Tuy nhiên, hoạt tính của 2 phân đoạn cần CHCl_3 và EtOAc vẫn yếu hơn hoạt tính của berberin clorid lần lượt là 45 và 18 lần. Hai phân đoạn cần có hoạt tính mạnh nhất này được lựa chọn để tiếp tục nghiên cứu phân lập hợp chất.

3.3.2.2. Hoạt tính ức chế enzyme acetylcholinesterase *in vitro* của các chất phân lập được từ hai loài nghiên cứu

Từ những mẫu cần được chọn dựa trên kết quả khảo sát trước về tác dụng ức chế AChE *in vitro*, đã phân lập được 14 hợp chất tinh khiết từ hai loài nghiên cứu. Kết quả đánh giá hoạt tính ức chế AChE *in vitro* của những 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	$IC_{50} \pm SD (\mu\text{M})$	STT	Hợp chất	$IC_{50} \pm SD (\mu\text{M})$
1	PT1	$29,78 \pm 0,44$	9	PH3	$149,61 \pm 8,52$
2	PT2	$435,95 \pm 5,04$	10	PH4	$476,12 \pm 20,50$
3	PT3	$338,63 \pm 0,14$	11	PH5	$51,10 \pm 0,11$
4	PT4	$285,15 \pm 38,96$	12	PH6	$28,29 \pm 0,06$
5	PT5	$207,59 \pm 0,92$	13	PH7	$14,46 \pm 4,07$
6	PT6	$59,23 \pm 1,33$	14	PH8	$361,43 \pm 20,68$
7	PH1	$327,71 \pm 17,79$	15	Berberin clorid	$0,54 \pm 0,02$
8	PH2	$83,52 \pm 8,11$			

Nhận xét:

Kết quả bảng 3.20 ở trên cho thấy hoạt tính ức chế AChE *in vitro* của 14 chất phân lập được từ hai loài nghiên cứu rất khác nhau với giá trị IC_{50} nằm trong khoảng từ 14,46-476,12 μM . Trong số 14 hợp chất này, hợp chất **PH7** sở hữu hoạt tính ức chế AChE *in vitro* mạnh nhất với $IC_{50} = 14,46 \mu M$. Hoạt tính của **PH7** yếu hơn khoảng 27 lần so với hoạt tính của berberin clorid (với $IC_{50} = 0,54 \mu M$) ở cùng điều kiện thử nghiệm. Ngược lại, hoạt tính ức chế AChE *in vitro* của hợp chất **PH4** là yếu nhất trong số 14 chất được đánh giá (với $IC_{50} = 476,12 \mu M$) và yếu hơn khoảng 881 lần so với hoạt tính của berberin clorid ở cùng điều kiện thử nghiệm.

Chương 4. BÀN LUẬN

4.1. Về đặc điểm thực vật

4.1.1. Đặc điểm hình thái và xác định tên khoa học của hai loài nghiên cứu

Theo hệ thống phân loại của một số chuyên gia phân loại thực vật trên thế giới như Cronquist [40], Hutchinson [6] và Takhtajan [26] đều thống nhất xếp chi *Piper* L. nằm trong họ Hồ tiêu. Chi *Piper* L. là chi lớn nhất trong họ Hồ tiêu nói riêng và là một trong những chi lớn nhất của ngành thực vật hạt kín nói chung. Sự phân nhóm các chi trong họ Hồ tiêu cho đến nay vẫn chưa đạt được sự thống nhất. Theo các tài liệu tham khảo, số lượng chi trong họ Piperaceae thay đổi từ 7 - 15 [67]. Về số lượng loài của chi *Piper* L., tất cả các tài liệu tham khảo đều chỉ ước lượng có khoảng trên 1.000 loài mà không đưa ra con số chính xác. Những thông tin trên cho thấy sự khó khăn nhất định khi nghiên cứu về thực vật chi *Piper* L.

Ở Việt Nam, qua tổng hợp tài liệu, có 46 loài thuộc chi *Piper* L. phân bố. Trong tài liệu “Cây cỏ Việt Nam” của Phạm Hoàng Hộ (1999), tác giả liệt kê 43 loài thuộc chi *Piper* L., nhưng có 9 loài không tìm thấy thông tin về phân bố ở nước ta. Ngoài ra, hai trong số 9 loài này chỉ được nêu tên, không có mô tả [5]. Ở tài liệu “Danh lục các loài thực vật Việt Nam, tập II” của Viện Dược liệu (2003), tác giả Nguyễn Kim Đào liệt kê 42 loài thuộc chi *Piper* L. và tất cả đều có thông tin về phân bố của chúng ở Việt Nam [16]. Trong số 42 loài này, có 38 loài đã được liệt kê trong tài liệu của tác giả Phạm Hoàng Hộ. Điểm giống nhau giữa hai tài liệu nêu trên là thông tin mô tả về các loài thuộc chi *Piper* L. trong cả hai tài liệu tương đối hạn chế. Tài liệu của tác giả Phạm Hoàng Hộ cung cấp nhiều thông tin hơn vì có ảnh vẽ kèm theo. Ngoài hai tài liệu trên, không có tài liệu tiếng Việt nào khác liệt kê một cách hệ thống những loài thuộc chi *Piper* L. phân bố ở nước ta. Điều này gây ra những khó khăn nhất định trong quá trình

định tên khoa học hai loài nghiên cứu. Thực tế, quá trình giám định tên khoa học chủ yếu dựa vào tham khảo thông tin trong 3 tài liệu thực vật chí của Đông Dương [153], Trung Quốc [37] và Ấn Độ [60]. Đây cũng là những nước, khu vực hoặc gần về địa lý (Trung Quốc, Đông Dương) hoặc giống về khí hậu (Ấn Độ) với nước ta. Số lượng loài thuộc chi *Piper* L. phân bố ở Việt Nam được mô tả và phân loại trong thực vật chí Ấn Độ, Trung Quốc và Đông Dương lần lượt là 8, 9 và 28 loài. Trong 3 tài liệu này, tài liệu thực vật chí Trung Quốc có hệ thống khóa phân loại chi *Piper* L. đầy đủ nhất dựa trên những mô tả khá chi tiết về cơ quan dinh dưỡng và cơ quan sinh sản. Ngược lại, hệ thống khóa phân loại chi *Piper* L. trong tài liệu thực vật chí Ấn Độ là đơn giản nhất và cơ sở để phân loại trong tài liệu này chủ yếu dựa trên đặc điểm cơ quan dinh dưỡng.

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, số lượng gân lá, trơn nhẵn hay có lông; kích thước cụm hoa; hình dạng của lá bắc và quả. Bên cạnh đó, vẫn có một số điểm khác nhau về 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 [37]. 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 nghiên cứu 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.

So với những mô tả trong tài liệu tham khảo, luận án đã mô tả đầy đủ và chi tiết hơn về đặc điểm hình thái của hai loài nghiên cứu. Việc xác định tên khoa học của hai loài nghiên cứu góp phần cung cấp thông tin chính xác về nguồn gốc những kết quả nghiên cứu về hóa học và tác dụng sinh học của luận án.

4.1.2. Đặc điểm vi học của hai loài nghiên cứu

So với số lượng trên 1000 loài của chi *Piper* L., số lượng tài liệu đã công bố về đặc điểm vi học của chi này còn khá hạn chế. Qua tham khảo tài liệu, mới chỉ liệt kê được 7 tài liệu công bố kết quả nghiên cứu về đặc điểm vi phẫu thân và lá của 17 loài thuộc chi *Piper* L. nhưng không có công bố nào liên quan đến 2 loài nghiên cứu của luận án [112], [128], [144]. Đặc biệt, chưa thấy tài liệu nào thông tin về đặc điểm bột phấn trên mặt đất của chi *Piper* L. Vì vậy, kết quả nghiên cứu đặc điểm vi học của luận án là công bố đầu tiên về đặc điểm vi phẫu và đặc điểm bột phấn trên mặt đất của hai loài *P. thomsonii* (C. DC.) Hook. f. var. *thomsonii* và *P. hymenophyllum* Miq.

So sánh đặc điểm vi phẫu của hai loài nghiên cứu với nhau nhận thấy có một số đặc điểm khá giống nhau như: vị trí và hình dạng của vòng mô cứng, vị trí và số lượng bó libe – gỗ, vị trí mô khuyết trong tiêu bản vi phẫu thân; vị trí của mô dày, vị trí và hình dạng của bó libe – gỗ trong tiêu bản vi phẫu lá. Tuy nhiên, cũng có một số đặc điểm khác nhau giữa hai loài nghiên cứu gồm: hình dạng vi phẫu thân, hình dạng vi phẫu gân lá và lông che chở. Khi phân tích kỹ hơn, những đặc điểm về vị trí, hình dạng và số lượng lớp tế bào mô dày; số lượng lớp tế bào hạ bì của 2 loài nghiên cứu cũng không giống nhau. Vì vậy, dựa vào một số đặc điểm vi phẫu thân và lá có thể phân biệt 2 loài nghiên cứu với nhau.

Kết hợp những thông tin đã được công bố trước đây với kết quả nghiên cứu của luận án nhận thấy một số đặc điểm vi phẫu tương đối có giá trị khi dùng để phân biệt các loài *Piper* L. với nhau nên được lưu ý gồm:

- Có hay không có lông che chở.
- Vị trí và hình dạng mô dày:
 - + Ở vỏ thân, mô dày có thể tạo thành lớp liên tục hoặc có dạng hình cung hoặc tạo thành các đám gần tròn, nằm rải rác trong mô mềm.
 - + Ở gân lá, mô dày có thể nằm ngay sát dưới hoặc cách biểu bì của gân lá một số lớp tế bào mô mềm.
- Hình dạng gân trên của lá: gân trên lồi hoặc lõm.
- Số lượng lớp tế bào hạ bì ở phiến lá: thay đổi từ 1-3 lớp tế bào.
- Số lượng bó libe-gỗ ở phần ruột thân và ở gân lá.

Khi nghiên cứu đặc điểm bột phần trên mặt đất của 2 loài nghiên cứu thấy có một số đặc điểm giống nhau gồm: mảnh biểu bì thân, mảnh mô mềm, mảnh biểu bì của lá mang lỗ khí, mảnh mạch xoắn, mảnh mạch vạch, mảnh mạch điểm, bó sợi, mảnh mô mang khối có màu. Ngược lại, ba đặc điểm có sự khác nhau giữa hai loài là: lông che chở đa bào (chỉ có ở bột của loài *P. hymenophyllum* Miq.), hạt tinh bột tụ thành đám (chỉ có ở bột của loài *P. thomsonii* (C. DC.) Hook. f. var. *thomsonii*) và tinh thể calci oxalat hình khối đa giác (chỉ có ở bột

của loài *P. hymenophyllum* Miq.). Những điểm khác nhau về đặc điểm bột này góp phần bổ sung thông tin để phân biệt hai loài nghiên cứu với nhau.

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

Qua tổng hợp tài liệu, mới chỉ có trên 100 loài trong số hơn 1.000 loài thuộc chi *Piper* L. được nghiên cứu về thành phần hóa học. Theo các tài liệu đã công bố, alkaloid là nhóm hợp chất chính và quan trọng nhất của chi *Piper* L. với số lượng 280 chất được báo cáo [58], [106]. Bên cạnh đó, ba nhóm hợp chất khác cũng đáng được quan tâm của chi *Piper* L. là tinh dầu, flavonoid và alkanpolyenylbenzen với số lượng chất được công bố cho từng nhóm lần lượt là 112; 61 và 90. Công thức cấu tạo của các hợp chất trong từng nhóm đều khá phong phú, đặc biệt là nhóm alkaloid. Trong số trên 100 loài đã được nghiên cứu, *P. nigrum* L. là loài được nghiên cứu nhiều nhất. Kết quả đã phân lập được 40 alkaloid, 51 tinh dầu, 8 flavonoid, 4 alkanpolyenylbenzen... từ loài này [82], [118], [137]. Trong số hai loài thuộc chi *Piper* L. được chọn làm đối tượng nghiên cứu của luận án, mới chỉ có một nghiên cứu của nhóm tác giả Dominique Leuseur và cộng sự (2009) công bố về thành phần hóa học của tinh dầu loài *P. bavinum* C. DC. gồm một số cấu tử chính: bicyclogermacren (10,6%), globulol (5,7%), leden (5,1%), α -pinen (4,4%), terpinen-4-ol (3,2%)... [81]. Vì vậy, kết quả của luận án là những công bố đầu tiên về thành phần hóa học không phải tinh dầu phân lập được từ hai loài *P. thomsonii* (C. DC.) Hook. f. var. *thomsonii* và *P. hymenophyllum* Miq.

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. Tuy nhiên, nhược điểm của phương pháp là có thể bỏ sót những hợp chất có hoạt tính đáng quan tâm trong những phân đoạn không được 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 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 *P. thomsonii* (C. DC.) Hook. f. var. *thomsonii*; 2 phân đoạn cần trong dung môi CHCl₃ và EtOAc chiết xuất từ loài *P. hymenophyllum* Miq. Kết quả phân lập hợp chất từ hai loài nghiên cứu được tóm tắt ở hai bảng 4.1 và 4.2.

Bảng 4.1. Những hợp chất được phân lập và nhận dạng cấu trúc từ loài *Piper thomsonii* (C. DC.) Hook. f. var. *thomsonii*

STT	Ký hiệu	Tên hợp chất	Nhóm hợp chất	Phân lập từ loài	TLTK
1	PT1	4-(2'-(Z)-decenyl)-phenol	Alkanpolyenylbenzen	Hợp chất lần đầu tiên phân lập từ tự nhiên	
2	PT2	Benzyl benzoat	Dẫn chất nhân thơm	<i>Piper kadsura</i> (Choisy) Ohwi	[75]
3	PT3	2-methoxybenzyl benzoat	Dẫn chất nhân thơm	<i>Desmos chinensis</i> L.	[108]
4	PT4	Cucumegastigman I	Dẫn chất cyclohex-2-enon	<i>Cucumis sativus</i> L.	[71]
5	PT5	<i>Trans</i> -phytol	Tinh dầu	<i>Piper kadsura</i> (Choisy) Ohwi; <i>P. aduncum</i> L.	[75], [106]
6	PT6	Dihydromyricetin	Flavonoid	<i>Ampelopsis grossedentata</i> W. T. Wang	[152]

**Bảng 4.2. Những hợp chất được phân lập và nhận dạng cấu trúc
từ loài *Piper hymenophyllum* Miq.**

STT	Ký hiệu	Tên hợp chất	Nhóm hợp chất	Phân lập từ loài	TLTK
1	PH1	<i>N</i> -3,5-dimethoxy-4-hydroxy cinnamoyl pyrrol	Alcaloid nhân pyrrol	Hợp chất mới lần đầu phân lập được từ tự nhiên	
2	PH2	Caffeoyl ancohol methyl ether	Dẫn chất nhân thơm	Hợp chất mới lần đầu phân lập được từ tự nhiên	
3	PH3	<i>O</i> -methylmoscatolin	Alcaloid nhân aporphin	<i>Dugetia eximia</i> Diels	[89]
4	PH4	(<i>E</i>)- Caffeoyl aldehyd	Alkanpolyenylenbenzen	<i>P. taiwanense</i> Lin & Lu	[35]
5	PH5	1-allyl-3,4-dihydroxybenzen	Alkanpolyenylenbenzen	<i>P. nudibaccatum</i> Y. Q. Tseng	[87]
6	PH6	Neotaiwanensol A	Neolignan	<i>P. taiwanense</i> Lin & Lu	[34]
7	PH7	Neotaiwanensol B	Neolignan	<i>P. taiwanense</i> Lin & Lu	[34]
8	PH8	Spathulenol	Tinh dầu	<i>P. fimbriulatum</i> C. DC.; <i>P. peltatum</i> (L.) Miq.	[100], [109]

- Về 2 hợp chất alcaloid phân lập được từ loài *P. hymenophyllum* Miq.:

Trong số 2 alcaloid này, hợp chất *O*-methylmoscatolin (**PH3**) có chứa khung aporphin và hợp chất *N*-3,5-dimethoxy-4-hydroxy cinnamoyl pyrrol (**PH1**) có chứa khung pyrrol. 2 alcaloid này là những hợp chất kém phân cực bởi trong công thức cấu tạo của chúng chỉ nhiều nhất có một nhóm chức phân cực là hydroxyl. Kết quả phân lập thực tế khẳng định thêm điều này bởi cả 2 alcaloid đều được phân lập từ phân đoạn dịch chiết trong dung môi CHCl₃ chiết xuất từ loài *P. hymenophyllum* Miq. Giữa hai nhóm alcaloid này, nhóm

có chứa khung aporphin được sử dụng trên lâm sàng nhiều hơn nhóm còn lại. Apomorphin là ví dụ điển hình về hợp chất thuộc nhóm aporphin. Hợp chất này là một chất đồng vận với dopamin trên hệ thần kinh trung ương nhờ tác dụng hoạt hóa 2 thụ cảm thể D₁ và D₂ của nó. Chính bởi tác dụng này mà hiện nay apomorphin chủ yếu được sử dụng để điều trị bệnh Parkinson. Ngoài ra, apomorphin cũng được nghiên cứu để sử dụng trong một số trường hợp như nghiện rượu, nghiện morphin hoặc heroin.

Qua thu thập tài liệu thấy rằng kết quả của luận án là công bố đầu tiên phân lập được hợp chất *O*-methylmoscatolin (**PH3**) từ chi *Piper* L. [89] và là công bố đầu tiên phân lập được hợp chất *N*-3,5-dimethoxy-4-hydroxy cinnamoyl pyrrol (**PH1**) từ tự nhiên.

- Về 2 cấu tử tinh dầu phân lập được từ hai loài nghiên cứu:

Cấu tử tinh dầu spathulenol (**PH8**) phân lập được từ loài *P. hymenophyllum* Miq. thuộc nhóm sesquiterpen và có cấu tạo khung azulan. Cấu tử tinh dầu còn lại là *trans*-phytol (**PT5**) phân lập được từ loài *Piper thomsonii* (C. DC.) Hook. f. var. *thomsonii* là một trong hai hợp chất diterpen được báo cáo phân lập từ chi *Piper* L. Cả 2 cấu tử tinh dầu đều được phân lập từ những phân đoạn kém phân cực là phân đoạn căn *n*-hexan chiết xuất từ loài *P. thomsonii* (C. DC.) Hook. f. var. *thomsonii* và phân đoạn căn CHCl₃ chiết xuất từ loài *P. hymenophyllum* Miq.

Trước đây, cả hai cấu tử tinh dầu này đã được công bố phân lập từ chi *Piper* L. Cụ thể, *trans*-phytol (**PT5**) đã được phân lập từ hai loài *P. aduncum* L. và *P. auritum* Kunth [75], [106] và spathulenol (**PH8**) đã được phân lập từ hai loài *P. fimbriatum* C. DC., *P. peltatum* (L.) Miq. [100], [109].

- Về hợp chất flavonoid duy nhất phân lập được từ phân đoạn căn EtOAc chiết xuất từ loài *P. thomsonii* (C. DC.) Hook. f. var. *thomsonii*:

Hợp chất dihydromyricetin (**PH6**) phân lập được thuộc nhóm flavanonol nằm trong nhóm lớn euflavonoid. Trước đó, nhiều hợp chất flavonoid thuộc

một số nhóm như chalcon, dihydrochalcon, flavanon và flavon phân lập được từ chi *Piper* L. cũng đã được công bố. Một trong những tác dụng sinh học nổi bật của nhóm flavonoid nói chung và của hợp chất dihydromyricetin nói riêng là hoạt tính chống oxy hóa nhờ khả năng dọn gốc tự do, cung cấp điện tử và tạo phức với ion kim loại của chúng. Vòng B của dihydromyricetin (**PH6**) sở hữu 3 nhóm thế hydroxyl với cấu tạo kiểu ortho-phenolic cùng với 3 nhóm thế hydroxyl khác ở 2 vòng A và C là những yếu tố quan trọng quyết định đến hoạt tính chống oxy hóa khá mạnh của hợp chất này [152].

Trước đây, chưa thấy có tài liệu nào công bố phân lập được hợp chất dihydromyricetin (**PH6**) từ chi *Piper* L.

- Về 3 hợp chất nhóm alkanpolyenylbenzen phân lập được từ 2 loài nghiên cứu:

Hai trong số 3 chất, gồm có (*E*)-caffeoyl aldehyd (**PH4**) và 1-allyl-3,4-dihydroxybenzen (**PH5**), có cấu tạo phenylpropanoid. Đây là nhóm hợp chất tương đối lớn được sinh tổng hợp trong cây từ một acid amin là phenylalanin. Tên của nhóm hợp chất xuất phát từ cấu tạo của các chất gồm có một nhân thơm gắn với mạch 3 cacbon. Phenylpropenoid tham gia vào cấu tạo của nhiều hợp chất polymer trong thực vật. Những chất này bảo vệ cây trước những tác động bất lợi của môi trường sống như: ánh sáng tử ngoại, động vật ăn thực vật và mầm bệnh, đồng thời, tạo những yếu tố thuận lợi cho quá trình thụ phấn như màu sắc hoặc hương thơm của hoa. Trong số 3 hợp chất alkanpolyenylbenzen phân lập được của luận án, 1-allyl-3,4-dihydroxybenzen (**PH5**) có cấu tạo đơn giản nhất nhưng lại là chất được nghiên cứu về tác dụng sinh học nhiều hơn cả. Kết quả một số nghiên cứu cho thấy hợp chất này có tác dụng gây độc tế bào, ức chế enzym lipase, ức chế đáp ứng miễn dịch... [32], [73], [104]. Khung cấu tạo của hợp chất này cũng có mặt trong cấu tạo của nhiều hợp chất khác trong đó có 2 hợp chất neolignan phân lập được từ loài *P.*

hymenophyllum Miq. trong luận án. Điều này gợi ý có thể 1-allyl-3,4-dihydroxybenzen (**PH5**) là một mắt xích tham gia vào quá trình sinh tổng hợp một số hợp chất hữu cơ thực vật.

Trước đây, đã có nghiên cứu công bố phân lập được hợp chất 1-allyl-3,4-dihydroxybenzen (**PH5**) từ loài *P. betle* L. [106] và phân lập được caffeoyl aldehyd (**PH4**) từ loài *P. taiwanense* Lin & Lu [35]. Ngược lại, 4-(2'-(Z)-decenyl)-phenol (**PT1**) chưa từng được công bố phân lập từ tự nhiên trước đây.

- Về 2 hợp chất neolignan phân lập được từ loài *P. hymenophyllum* Miq.:

Hai hợp chất neotaiwanensol A (**PH6**) và B (**PH7**) là đồng phân của nhau. Trong công thức cấu tạo của chúng đều có 4 nhóm hydroxy gắn với các vòng thơm tạo cho phân tử của chúng có tính phân cực ở mức độ trung bình. Điều này phù hợp với thực tế nghiên cứu bởi hai neolignan này được phân lập từ phân đoạn cặn EtOAc. Hai neolignan này mới được tác giả Si Chen (2013) công bố phân lập được từ loài *P. taiwanense* Lin & Lu gần đây. Cũng trong nghiên cứu này, hoạt tính ức chế kết tập tiểu cầu của hợp chất neotaiwanensol A (**PH6**) đã được xác định với $IC_{50} = 63,9 \mu M$ [34]. Trước đây, đã có khoảng trên 50 neolignan được báo cáo phân lập từ chi *Piper* L. Tác dụng sinh học đáng kể nhất của nhóm hợp chất này cũng là hoạt tính ức chế kết tập tiểu cầu với một số hợp chất điển hình gồm: kadsurenol, puberulin A và C... [106], [124].

- Về 4 hợp chất còn lại, gồm 3 dẫn chất nhân thơm và một dẫn chất cyclohex-2-enon, có hợp chất 3,4-dihydroxy cinnamyl alcohol methyl ether (**PH2**) đã được tổng hợp hóa học nhưng đây là lần đầu tiên công bố phân lập được từ tự nhiên; 2 chất 2-methylbenzyl benzoat (**PT3**) và cucumegastigman I (**PT4**) lần đầu tiên phân lập được từ chi *Piper* L. và hợp chất benzyl benzoat (**PT2**) còn lại đã được phân lập từ loài *P. kadsura* (Choisy) Ohwi trước đây [75].

Như vậy, trong số 14 hợp chất phân lập được từ 2 loài nghiên cứu của luận án 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 hợp chất này đều là những hợp chất lần đầu tiên được công bố phân lập từ hai loài nghiên cứu.

4.3. Về nghiên cứu đánh giá hoạt tính ức chế enzym acetylcholinesterase *in vitro*

Dựa trên những kết quả nghiên cứu sàng lọc gần đây cho thấy dịch chiết một số loài thuộc chi *Piper* L. thể hiện hoạt tính ức chế AChE *in vitro*. Thêm vào đó, tiềm năng nghiên cứu về chi này là rất lớn bởi mới chỉ khoảng 10% số loài thuộc chi này phân bố trên thế giới được nghiên cứu về hóa học và tác dụng sinh học. Vì vậy, nhóm nghiên cứu đã hình thành ý tưởng nghiên cứu sàng lọc thành phần hợp chất có tác dụng ức chế AChE *in vitro* từ 2 loài thuộc chi *Piper* L. phân bố ở Việt Nam.

4.3.1. Về phương pháp đánh giá hoạt tính ức chế enzym acetylcholinesterase *in vitro*

Trong quá trình nghiên cứu tìm kiếm hợp chất mới có tác dụng ức chế AChE, ngoài phương pháp *in vitro* được đề cập ở trên 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 cứu 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 mẫu cần và hợp chất phân lập được từ 2 loài nghiên cứu, phương pháp *in vitro* được chọn để nghiên cứu. Qua thu thập tài liệu cho thấy, mặc dù phần lớn nghiên cứu áp dụng phương pháp đo quang sử dụng thuốc thử Ellman nhưng điều kiện thử nghiệm thường có sự khác nhau giữa các nghiên cứu như đã được trình bày ở mục 2.2.3.1. Vì vậy, việc tiến hành khảo sát ảnh hưởng của một số yếu tố đến phương pháp đánh giá hoạt tính ức chế AChE *in vitro* là cần thiết nhằm xây dựng phương pháp thử phù hợp với điều kiện thực tế.

Quá trình triển khai phương pháp đo quang sử dụng thuốc thử Ellman *in vitro* nhận thấy kết quả thực nghiệm có thể bị sai số gây bởi một vài nguyên nhân dưới đây:

- Sự có mặt của tạp chất hoặc chất thử trong hỗn hợp phản ứng: bởi tạp chất hoặc chất thử có thể gây ra một số hiện tượng như phản xạ, tán xạ ánh sáng hoặc bản thân chúng cũng có thể hấp thụ ánh sáng.

- Phản ứng thủy phân cơ chất xảy ra không phải do enzyme xúc tác: bởi song song với những phản ứng được xúc tác bởi enzyme, một số ít cơ chất có thể tự bị thủy phân mà không cần enzyme xúc tác. Tỷ lệ cơ chất tham gia những phản ứng như vậy phụ thuộc chủ yếu vào độ bền hóa học của cơ chất đó tức là phụ thuộc vào đặc tính hóa học của nó.

- Dung môi sử dụng để hòa tan mẫu thử: bởi 3 loại dung môi thường dùng để hòa tan mẫu thử là MeOH, ACN và DMSO đều có tác dụng ức chế hoạt tính của AChE ở mức độ khác nhau. Theo một số tài liệu tham khảo, để hạn chế tác dụng ức chế hoạt tính AChE của dung môi, nồng độ trong hỗn hợp phản ứng cuối cùng của hai dung môi MeOH và DMSO chỉ nên tối đa lần lượt là 10% và 1% [44], [63].

Vì vậy, một số biện pháp đã được áp dụng trong nghiên cứu để hạn chế tối đa những sai số có thể gặp phải ở trên gồm:

- Sử dụng hóa chất đạt tiêu chuẩn tinh khiết phân tích của hãng Sigma như: ATCI, DTNB, tris base.

- Sử dụng nước cất 2 lần, mới được cất trong thời gian 48 giờ.

- Lựa chọn đúng dung môi có khả năng hòa tan hoàn toàn mẫu thử và tỷ lệ của dung môi trong hỗn hợp phản ứng là thấp nhất có thể.

- Bên cạnh việc tiến hành thử nghiệm với mẫu thử, cần song song tiến hành làm với mẫu trắng nhằm loại trừ những sai số khách quan có thể gặp phải.

Đối với mỗi thử nghiệm *in vitro*, bên cạnh việc xác định các điều kiện thử nghiệm phù hợp, việc lựa chọn chất đối chứng dương là yêu cầu bắt buộc. Điều này giúp định lượng tương đối hoạt tính của các mẫu nghiên cứu khi so sánh với cùng một chất chuẩn. Với nghiên cứu sàng lọc hoạt tính ức chế AChE *in vitro*, ba chất thường được sử dụng làm mẫu đối chứng dương là galanthamin, tacrin và berberin clorid [44], [79], [98]. Trong số 3 hợp chất này, chỉ có berberin clorid là chưa từng được sử dụng trên lâm sàng để điều trị bệnh Alzheimer. Mặc dù vậy, berberin clorid vẫn được lựa chọn làm chất đối chứng dương trong một số nghiên cứu *in vitro* bởi chất này sở hữu hoạt tính ức chế AChE mạnh *in vitro* đồng thời sẵn có và giá thành rẻ hơn nhiều so với 2 chất còn lại. Vì vậy, việc lựa chọn berberin clorid làm chất đối chứng dương của nghiên cứu này là phù hợp với những nghiên cứu trước đây cũng như phù hợp với điều kiện thực tiễn ở Việt Nam.

Với phương pháp *in vitro* để đánh giá hoạt tính ức chế AChE, bên cạnh phương pháp đo quang còn có một phương pháp khác cũng thường được sử dụng để nghiên cứu sàng lọc là phương pháp sắc ký lớp mỏng sinh học [23], [117]. So sánh giữa hai phương pháp *in vitro* này thì phương pháp đo quang thuận lợi hơn về khả năng thử nghiệm đồng thời nhiều mẫu khác nhau, khả năng tự động hóa và lượng mẫu cần cho từng phản ứng ít. Hơn nữa, phương pháp đo quang sử dụng máy chuyên dụng để đánh giá nên kết quả thu được là chính xác, đáng tin cậy và tiết kiệm thời gian. Khi tiến hành đánh giá hoạt tính ức chế AChE

của các hợp chất tinh khiết được phân lập hay tổng hợp, phương pháp đo quang thường được sử dụng. Một hạn chế của phương pháp này là phải lựa chọn được dung môi thích hợp để vừa đảm bảo hòa tan hoàn toàn mẫu thử nhưng cũng để hạn chế tối đa ảnh hưởng đến hoạt tính của enzym. Ngược lại, thử nghiệm sắc ký lớp mỏng sinh học thuận lợi hơn cho sàng lọc dịch chiết từ thực vật vì nó có khả năng phân tách và phát hiện những hợp chất có hoạt tính trong một hỗn hợp nhiều chất qua đó giúp định hướng quá trình phân lập tiếp theo tốt hơn.

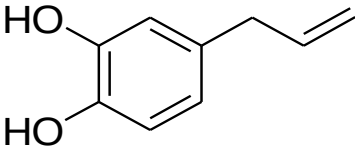
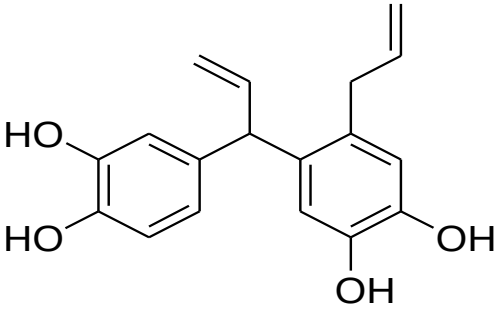
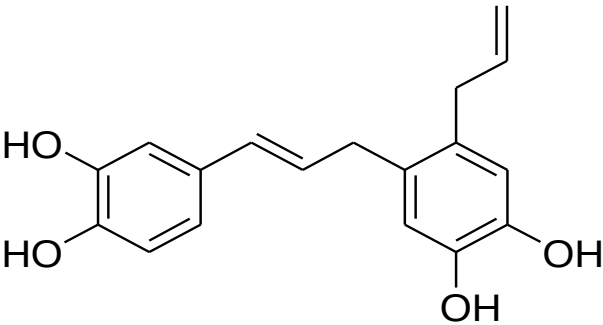
4.3.2. Về kết quả đánh giá hoạt tính ức chế enzym acetylcholinesterase in vitro của các mẫu thử được chiết xuất và phân lập từ hai loài nghiên cứu

Đánh giá hoạt tính ức chế AChE của 14 chất tinh khiết phân lập được từ hai loài nghiên cứu cho thấy tất cả các chất này đều thể hiện hoạt tính ức chế AChE. Tuy nhiên, mức độ ức chế của các chất rất khác nhau với các giá trị IC_{50} thay đổi từ 14,46-476,12 μM . So với chất đối chứng dương là berberin clorid, hoạt tính của 14 chất phân lập được yếu hơn khoảng từ 27-881 lần. Trong số các chất này, chỉ có 6 chất có hoạt tính ức chế AChE *in vitro* với $IC_{50} < 100 \mu M$ và **PH7** là chất sở hữu hoạt tính mạnh nhất. 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 ở mức độ khác nhau.

Về liên quan cấu trúc - tác dụng, dựa vào những kết quả thực nghiệm cho thấy trong số 4 hợp chất có hoạt tính ức chế AChE mạnh nhất thì có 2 hợp chất thuộc nhóm alkanpolyenylbenzen là chất **PT1** và **PH5**; 2 hợp chất còn lại thuộc nhóm neolignan là chất **PH6** và **PH7**. Đặc biệt, 3 trong 4 hợp chất này

(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 có thể đóng vai trò quan trọng đối với hoạt tính ức chế AChE *in vitro* của những chất sở hữu khung này. Thông tin về 3 hợp chất **PH5**, **PH6** và **PH7** được trình bày ở bảng 4.3.

Bảng 4.3. Ba hợp chất phân lập được từ loài *Piper hymenophyllum* Miq. có hoạt tính ức chế enzym acetylcholinesterase *in vitro* mạnh nhất

Ký hiệu hợp chất	Tên hợp chất	IC ₅₀ (μM)	Công thức cấu tạo
PH5	1-allyl-3,4-dihydroxybenzen	51,10	
PH6	Neotaiwanensol A	28,29	
PH7	Neotaiwanensol B	14,46	

Kết quả ở bảng 4.3 gợi ý về tiềm năng nghiên cứu hoạt tính ức chế AChE *in vitro* của nhóm hợp chất phenylpropanoid (nhóm hợp chất xuất hiện khá phổ biến trong chi *Piper* L.).

Mặc dù kết quả nghiên cứu của luận án không tìm ra được một hợp chất nào sở hữu hoạt tính ức chế AChE thực sự mạnh và tiềm năng, tuy nhiên, đây là nghiên cứu đầu tiên tiến hành đánh giá hoạt tính ức chế AChE *in vitro* của hai loài *Piper thomsonii* (C. DC.) Hook. f. var. và *Piper hymenophyllum* Miq. Vì vậy, kết quả của luận án đã góp phần bổ sung những thông tin cho cơ sở dữ liệu về những hợp chất có hoạt tính ức chế AChE *in vitro* nói riêng và về những hợp chất phân lập được từ tự nhiên nói chung. Cơ sở dữ liệu này là căn cứ cho những nghiên cứu tìm kiếm hợp chất dựa trên khung cấu trúc dẫn đường đã được xác định bằng sử dụng phần mềm trên máy vi tính (sàng lọc ảo). Đồng thời, kết quả của luận án góp phần định hướng cho những nghiên cứu tìm kiếm hợp chất ức chế AChE theo hướng phân lập hợp chất từ chi *Piper* L. hoặc theo hướng tổng hợp hóa học trong tương lai.

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 phân 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 phân 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 phân trên mặt đất của loài *Piper hymnophyllum* 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 Vì (*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 alkanpolyenylbenzen 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.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

Tài liệu tiếng Việt

1. Nguyễn Tiến Bân (1997), *Cẩm nang tra cứu và nhận biết các họ thực vật hạt kín ở Việt Nam*, Nxb. Nông nghiệp, Hà Nội, trang 7.
2. Lê Đình Bích, Trần Văn Ôn (2007), *Thực vật học*, Nxb. Y học, Hà Nội, trang 390.
3. Nguyễn Xuân Dũng, Phạm Hoàng Ngọc, Đỗ Đình Răng (2005), "Nghiên cứu về mặt hóa học một số loài thuộc họ Piperaceae", *Hội nghị khoa học và công nghệ Hóa hữu cơ lần thứ III*, trang 305-310.
4. Đậu Xuân Đức, Hoàng Văn Lựu (2007), "Separation and structure determination of some compounds from *Piper betle* L.", *Hội nghị khoa học và công nghệ Hóa hữu cơ toàn quốc lần thứ IV*, trang 307-310.
5. Phạm Hoàng Hộ (1999), *Cây cỏ Việt Nam, quyển I*, Nxb. Trẻ, TP Hồ Chí Minh, trang 288-301.
6. Hutchinson J. (Nguyễn Thạch Bích, Vũ Văn Chuyên, Vũ Văn Dũng và cộng sự dịch) (1975), *Những họ thực vật có hoa*, Nxb. Khoa học và kỹ thuật, Hà Nội.
7. Trần Công Khánh, Nguyễn Thị Sinh (1997), *Thực vật Dược - Phân loại thực vật*, Trường đại học Dược Hà Nội, trang 77.
8. Phan Nhật Minh, Mai Thành Chí, Phùng Văn Trung và cộng sự (2006), "Khảo sát thành phần hóa học của tinh dầu tiêu (*Piper nigrum* L.) chiết xuất bằng phương pháp carbon dioxid lỏng siêu tới hạn", *Tạp chí nghiên cứu khoa học*, số 6, trang 97-102.
9. Trần Văn Ôn (2003), *Thực vật và nhận thức cây thuốc*, Trung tâm thông tin - Thư viện, Đại học Dược Hà Nội.
10. Đào Văn Phan, Nguyễn Trần Giáng Hương, Nguyễn Trọng Thông (2011), *Dược lý học, tập I*, Nxb. Giáo dục Việt Nam, trang 69-71.
11. Đỗ Đình Răng, Nguyễn Thúy Hằng (2005), "Nghiên cứu thành phần hóa học của lá cây tắt bạt (*Piper longum* Linn)", *Hội nghị khoa học và công nghệ hóa hữu cơ toàn quốc lần thứ III*, trang 413-416.
12. Nguyễn Viết Thân (2003), *Kiểm nghiệm dược liệu bằng phương pháp hiển vi*, Nxb. Khoa học và Kỹ thuật, Hà Nội.

13. Viện Dược liệu (2006), *Nghiên cứu thuốc từ thảo dược*, Nxb. Khoa học và kỹ thuật, trang 493-511, 581-602.
14. Viện Dược liệu (2004), *Cây thuốc và động vật làm thuốc ở Việt Nam, tập 1*, Nxb. Khoa học và Kỹ thuật, Hà Nội, trang 977-982.
15. Viện Dược liệu (2004), *Cây thuốc và động vật làm thuốc ở Việt Nam, tập 2*, Nxb. Khoa học và kỹ thuật, Hà Nội, trang 127-129, 1007-1010.
16. Viện sinh thái và tài nguyên sinh vật (2003), *Danh lục các loài thực vật Việt Nam*, Nxb. Nông nghiệp, Hà Nội, trang 115-121.

Tài liệu tiếng Anh

17. Adewusi E. A., Steenkamp V. (2011), "In vitro screening for acetylcholinesterase inhibition and antioxidant activity of medicinal plants from southern Africa", *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*, pp. 829-835.
18. Adersen A., Gauguin B., Gudiksen L. et al (2006), "Screening of plants used in Danish folk medicine to treat memory dysfunction for acetylcholinesterase inhibitory activity", *Journal of Ethnopharmacology*, vol. 104, pp. 418-422.
19. Ahn J. W., Ahn M. J., Zee O. P. et al (1992), "Piperidine alkaloids from *Piper retrofractum* fruits", *Phytochemistry*, vol. 31 (10), pp. 3609-3612.
20. Al-Adhroey A. H., Nor Z. M., Al-Mekhlafi H. M. et al (2011), "Antimalarial activity of methanolic leaf extract of *Piper betle* L. ", *Molecules*, vol. 16, pp. 107-118.
21. Alecio A. C., Da Silva Bolzani V., Young M. C. et al (1998), "Antifungal amide from leaves of *Piper hispidum*", *J. Nat. Prod.*, vol. 61, pp. 637-639.
22. Ampofo S. A., Roussis V., Wiemer D. F. (1987), "New prenylated phenolics from *Piper auritum*", *Phytochemistry*, vol. 26 (8), pp. 2367-2370.
23. Andrade M. T., Lima J. A., Pinto A. C. et al (2005), "Indole alkaloids from *Tabernaemontana australis* (Muell. Arg) Miers that inhibit acetylcholinesterase enzyme", *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, vol. 13, pp. 4092-4095.
24. Anjaneyulu A. S. R., Krishnamurthy M. V. R. and Rao G. V. (1997), "Rare aromadendrane diterpenoids from a new soft coral species of *Sinularia* genus of the Indian Ocean", *Tetrahedron*, vol. 53, pp. 9301-9312.

25. Arambewela L. S. R., Arawwawala L. D. A. M., Ratnasooriya W. D. (2003), "Antidiabetic activities of aqueous and ethanolic extracts of *Piper betle* leaves in rats", *Journal of Ethnopharmacology*, vol. 102, pp. 239-245.
26. Armen L. Takhtajan (2009), *Flowering Plants*, pp. 56-60.
27. Baldoqui D. C., Kato M. J., Cavaleiro A. J. et al (1999), "A chromene and prenylated benzoic acid from *Piper aduncum*", *Phytochemistry*, vol. 51, pp. 899-902.
28. Bornstein A., Coe F. G. (2007), "The genus *Piper* (Piperaceae) in Honduras", *Novon*, vol. 17, pp. 11-19.
29. Burke B., Nair M. (1986), "Phenylpropene, benzoic acid and flavonoid derivatives from fruits of Jamaican *Piper* species", *Phytochemistry*, vol. 25 (6), pp. 1427-1430.
30. Chatterjee S., Niaz Z., Gautam S. (2007), "Antioxidant activity of some phenolic constituents from green pepper (*Piper nigrum* L.) and fresh nutmeg mace (*Myristica fragrans*)", *Food Chemistry*, vol. 101, pp. 515-523.
31. Chaveerach A., Mookamul P., Sudmoon R. and Tanee T. (2006), "Ethnobotany of the genus *Piper* (Piperaceae) in Thailand", *Ethnobotany Research & Applications*, vol. 4, pp. 223-231.
32. Chen C. L., Chi C. W., Liu T. Y. (2000), "Enhanced hydroxychavicol-induced cytotoxic effects in glutathione-depleted HepG2 cells", *Cancer Letters*, vol. 155, pp. 29-35.
33. Chen I. S., Chen Y. C., Liao C. H. (2007), "Amides with anti-platelet aggregation activity from *Piper taiwanense*", *Fitoterapia*, vol. 78, pp. 414-419.
34. Chen S., Huang H. Y., Cheng M. J. et al (2013), "Neolignans and phenylpropanoids from the roots of *Piper taiwanense* and their antiplatelet and antitubercular activities", *Phytochemistry*, pp. 1-7.
35. Chen Y. C., Chen J. J., Chang Y. L. et al (2004), "A new aristolactam alkaloid and anti-platelet aggregation constituents from *Piper taiwanense*", *Planta Med.*, vol. 70, pp. 174-177.
36. Chen Y. C., Liao C. H., Chen I. S. et al (2007), "Lignans, an amide and anti-platelet activities from *Piper philippinum*", *Phytochemistry*, vol. 68, pp. 2101-2111.
37. Cheng Y., Xia N., Gilbert M. G. (1999), *Flora of China*, pp. 110-131.

38. Chonpathompikunlert P., Wattanathorn J., Muchimapura S. (2010), "Piperine, the main alkaloid of Thai black pepper, protects against neurodegeneration and cognitive impairment in animal model of cognitive deficit like condition of Alzheimer's disease", *Food and Chemical Toxicology*, vol. 48, pp. 798-802.
39. Chunlaratthanaphorn S., Lertprasertsuke N., Srisawat U. et al (2007), "Acute and subchronic toxicity study from *P. nigrum*", *Songklanakarin J. Sci. Technol.*, vol. 29, pp. 109-124.
40. Cronquist A. (1988), *The evolution and classification of flowering plants*, Second Edition, Bronx NY: The New York Botanical Garden.
41. Danelutte A. P., Lago J. H., Young M. C. et al (2003), "Antifungal flavanones and prenylated hydroquinones from *Piper crassinervium* Kunth", *Phytochemistry*, vol. 64, pp. 555-559.
42. De Oliveira Chaves M. C., De Oliveira A. H., De Oliveira Santos B. V. (2006), "Aristolactams from *Piper marginatum* Jacq (Piperaceae)", *Biochemical Systematics and Ecology*, vol. 34, pp. 75-77.
43. De Santos B. V., Da-Cunha E. V. L., De O. Chaves M. C. et al (1998), "Phenylalkaloids from *Piper marginatum*", *Phytochemistry*, vol. 38 (4), pp. 1381-1384.
44. Di Giovanni S., Borloz A., Urbain A. et al (2008), "In vitro screening assays to identify natural or synthetic acetylcholinesterase inhibitors: thin layer chromatography versus microplate methods", *European journal of pharmaceutical sciences*, vol. 33, pp. 109-119.
45. Do Nascimento J. C., De Paula V. F., David J. M., David J. P. (2012), "Occurrence, biological activities and ¹³C-NMR data of amides from *Piper* (Piperaceae)", *Quim. Nova*, vol. 35 (11), pp. 2288-2311.
46. Dodson C. D., Dyer L. A., Searcy J. et al (2000), "Cenocladamide, a dihydropyridone alkaloid from *Piper Cenocladum*", *Phytochemistry*, vol. 53, pp. 51-54.
47. Dominguez X. A., Verde J. S., Sucar S., Rosa Trevino (1986), "Two amides from *Piper amalago*", *Phytochemistry*, vol. 25 (1), pp. 239-240.

48. Ellman G. L., Courtney K. D., Andres V. et al (1961), "A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity", *Biochemical pharmacology*, vol. 7, pp. 88-95.
49. Elsie F. G., Daniele M. (2008), "*Piper giordanoi* (Piperaceae): A new species from Southeastern Brazil", *Novon*, vol. 18 (2), pp. 175-177.
50. Fabienne Fache, Nicolas Suzan and Olivier Piva (2005), "Total synthesis of cimracemate B and analogs", *Tetrahedron*, vol. 61, pp. 5261-5266.
51. Facundo V. A., De Silveira A. S. P., Morais S. M. (2005), "Constituents of *Piper alatabaccum* Trel & Yuncker (Piperaceae)", *Biochemical Systematics and Ecology*, vol. 33, pp. 753-756.
52. Facundo V. A., Morais S. M. (2003), "Constituents of *Piper aleyreanum* (Piperaceae)", *Biochemical Systematics and Ecology*, vol. 31, pp. 111-113.
53. Faler C. A., Joullié M. M. (2007), "The Kulinkovich reaction in the synthesis of constrained *N,N*-dialkyl neurotransmitter analogues", *Organic Letters*, vol. 9, pp. 1987-1990.
54. Flores N., Jiménez I. A., Giménez A. et al (2008), "Benzoic acid derivatives from *Piper* species and their antiparasitic activity", *J. Nat. Prod.*, vol. 71, pp. 1538-1543.
55. Fujiwara Y., Naithou K., Miyazaki T. et al (2001), "Two new alkaloids, pipericyclobutanamides A and B, from *Piper nigrum*", *Tetrahedron Letters*, vol. 42, pp. 2497-2499.
56. Guerrini A., Sacchetti G., Rossi D. et al (2009), "Bioactivities of *Piper aduncum* L. and *Piper obliquum* Ruiz & Pavon (Piperaceae) essential oils from Eastern Ecuador", *Environmental Toxicology and Pharmacology*, vol. 27, pp. 39-48.
57. Gupta O. P., Atal C. K., Gaiad K. N. (1972), "Constituents of *Piper nepalense*", *Phytochemistry*, vol. 11 (2646).
58. Gutierrez R. M., Gonzalez A. M., Hoyo-Vadillo C. (2013), "Alkaloids from *Piper*: A review of its phytochemistry and pharmacology", *Mini-Reviews in Medicinal Chemistry*, vol. 13, pp. 163-193.

59. Han M. H., Yang X. W., Zhang M. and Zhong G. Y. (2006), "Phytochemical study of the rhizome of *Pinellia ternata* and quantification of phenylpropanoids in commercial *Pinellia* tuber by RP-LC", *Chromatographia*, vol. 64, pp. 647-653.
60. Hooker J. D. (1886), *Flora of British India*, London, pp. 78-99.
61. Houghton P. J., Ren Y., Howes M. J. (2005), "Acetylcholinesterase inhibitors from plants and fungi", *Natural product report*, vol. 23, pp. 181-199.
62. Huang X. Z., Yin Y., Dai J. H. et al (2010), "Two new ceramides from the stems of *Piper betle* L.", *Chinese Chemical Letters*, vol. 21, pp. 433-436.
63. Ingkaninan K., Temkitthawon P., Chuenchom K. et al (2003), "Screening for acetylcholinesterase inhibitory activity in plants used in Thai traditional rejuvenating and neurotonic remedies", *Journal of Ethnopharmacology*, vol. 89, pp. 261-264.
64. Jagdev S., Dhar K. L., Atal C. K. (1969), "Studies on the genus *Piper* - IX. Structure of Trichostachine. An alkaloid from *Piper trichostachyon*", *Tetrahedron letters*, vol. 56, pp. 4975-4978.
65. Jagdev S., Dhar K. L., Atal C. K. (1971), "Studies on the genus *Piper* - XII. Structure of Trichonine. A new *N*-pyrroliridyl eicosa-trans-2-trans-4-dienamid", *Tetrahedron letters*, vol. 24, pp. 2119-2120.
66. Jaijoy K., Vannasiri S., Piyabhan P. et al (2011), "Acute and subchronic toxicity study of the water extract from the fruits of *Piper chaba* Hunter in rats", *International Journal of Applied Research in Natural Products*, vol. 3 (4), pp. 29-35.
67. Jaramillo M. A., Manos P. S. (2001), "Phylogeny and patterns of floral diversity in the genus *Piper* (Piperaceae)", *American Journal of Botany*, vol. 88 (4), pp. 706-716.
68. Jhoo J. W., Freeman J. P., Heinze T. M. et al (2006), "In vitro cytotoxicity of nonpolar constituents from different parts of Kava plant (*Piper methysticum*)", *J. Agric. Food Chem.*, vol. 54, pp. 3157-3162.
69. Jiang Z. Y., Liu W. F., Huang C. G., Huang X. Z. (2013), "New amide alkaloids from *Piper longum*", *Fitoterapia*, vol. 84, pp. 222-226.
70. Jose J., Sharma A. K. (1985), "Structure and behavior of chrosomes in *Piper* and *Pepermonia* (family Piperaceae)", *Cytologia*, vol. 50, pp. 301-310.

71. Kai H., Baba M., Okuyama T. (2007), "Two new megastigmanes from the leaves of *Cucumis sativus*", *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, vol. 55, pp. 133-136.
72. Kaou A. M., Mahiou-Leddert V., Canlet C. et al (2010), "New amide alkaloid from the aerial part of *Piper capense* L. f. (Piperaceae)", *Fitoterapia*, vol. 81, pp. 632-635.
73. Kato E., Nakagomi R., Gunawan-Puteri M. D. et al (2013), "Identification of hydroxychavicol and its dimers, the lipase inhibitors contained in the Indonesian spice, *Eugenia polyantha*", *Food Chemistry*, vol. 136, pp. 1239-1242.
74. Khadri A., Neffati M., Smiti S. et al (2010), "Antioxidant, antiacetylcholinesterase and antimicrobial activities of *Cymbopogon schoenanthus* L. Spreng (lemon grass) from Tunisia", *LWT - Food Science and Technology*, vol. 43, pp. 331-336.
75. Kim K. H., Choi J. W., Choi S. U. et al (2011), "The chemical constituents of *Piper kadsura* and their cytotoxic and anti-neuroinflammatory activities", *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, vol. 26, pp. 254-260.
76. Kim K. H., Lee K. H., Choi S. U. et al (2008), "Terpene and phenolic constituents of *Lactuca indica* L.", *Arch. Pharm. Res.*, vol. 31 (8), pp. 983-988.
77. Koroishi A. M., Foss S. R., Cortez D. A. et al (2008), "In vitro antifungal activity of extracts and neolignans from *Piper regnellii* against dermatophytes", *Journal of Ethnopharmacology*, vol. 117, pp. 270-277.
78. Koul S. K., Taneja S. C., Agarwal V. K., Dhar K. L. (1988), "Minor amides of *Piper* species", *Phytochemistry*, vol. 27 (11), pp. 3523-3527.
79. Langjae R., Bussarawit S., Yuenyongsawad S. et al (2007), "Acetylcholinesterase-inhibiting steroidal alkaloid from the sponge *Corticium* sp.", *Steroids*, vol. 72, pp. 682-685.
80. Larionova M., Spengler I., Nogueiras C. (2010), "A C-Glycosylflavone from *Piper ossanum*, a compound conformationally controlled by CH/ π and other weak intramolecular interactions", *J. Nat. Prod.*, vol. 73, pp. 1623-1627.
81. Leuseur D., Bighelli A., Casanova J. et al (2009), "Composition of the essential oil of *Piper bavinum* C. DC. from Vietnam", *Journal of essential oil research*, vol. 21, pp. 16-21.

82. Li C. Y., Tsai W. J., Damu A. G. et al (2007), "Isolation and identification of antiplatelet aggregatory principles from the leaves of *Piper lolot*", *J. Agric. Food Chem.*, vol. 55, pp. 9436-9442.
83. Li L., Sheng H., Xu F. (2009), "Heterometal clusters $\text{Ln}_2\text{Na}_8(\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{NMe}_2)_{12}(\text{OH})_2$ as homogeneous catalysts for the Tishchenko reaction", *Chinese Journal of Chemistry*, vol. 27, pp. 1127-1131.
84. Li X. C., Ferreira D., Jacob M. R. et al (2004), "Antifungal cyclopentenones from *Piper coruscans*", *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 126, pp. 6872-6873.
85. Lima D. K., Ballico L. J., Rocha L. F. et al (2012), "Evaluation of the antinociceptive, anti-inflammatory and gastric antiulcer activities of the essential oil from *Piper aleyreanum* C. DC. in rodents", *Journal of Ethnopharmacology*, vol. 142, pp. 274-282.
86. Lin L. C., Shen C. C., Shen Y. C., Tsai T. H. (2006), "Anti-inflammatory neolignans from *Piper kadsura*", *J. Nat. Prod.*, vol. 69, pp. 842-844.
87. Liu H. X., Chen K., Sun Q. Y. et al (2013), "Nudibaccatumone, a trimer comprising a phenylpropanoid and two sesquiterpene moieties from *Piper nudibaccatum*", *Journal of Natural Products*, vol. 76, pp. 732-736.
88. Ma X., Tan C., Zhu D. et al (2007), "Huperzine A from *Huperzia* species - An ethnopharmacological review", *Journal of ethnopharmacology*, vol. 113, pp. 15-34.
89. Marsaioli A. J., Magalhaes A. F., Ruveda E. A. et al (1980), " ^{13}C NMR analysis of some oxoaporphine alkaloids", *Phytochemistry*, vol. 19, pp. 995-997.
90. Marston A. (2010), "Thin-layer chromatography with biological detection in phytochemistry", *Journal of Chromatography A*, vol. 1218, pp. 2676-2683.
91. Martins R. C., Lago J. H., Albuquerque S. et al (2003), "Trypanocidal tetrahydrofuran lignans from inflorescences of *Piper solmsianum*", *Phytochemistry*, vol. 64, pp. 667-670.
92. Martins R. C., Latorre L. R., Sartorelli P. (2000), "Phenylpropanoids and tetrahydrofuran lignans from *Piper solmsianum*", *Phytochemistry*, vol. 55, pp. 843-846.
93. Matsuda H., Morikawa T., Tao J. et al (2002), "Bioactive constituents of Chinese natural medicines. VII. Inhibitors of degranulation in RBL-2H3 cells and

absolute stereostructures of three new diarylheptanoid glycosides from the bark of *Myrica rubra*", *Chemical & Pharmaceutical Bulletin*, vol. 50, pp. 208-215.

94. Matsuda H., Ninomiya K., Morikawa T. et al (2009), "Hepatoprotective amide constituents from the fruit of *Piper chaba*: Structural requirements, mode of action, and new amides", *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, vol. 17, pp. 7313-7323.
95. Matsuda H., Ninomiya K., Morikawa T. et al (2008), "Protective effects of amide constituents from the fruit of *Piper chaba* on D-galactosamine/TNF- α -induced cell death in mouse hepatocytes", *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, vol. 18, pp. 2038-2042.
96. Megha P., Hitesh V., Mahesh V. et al (2013), "A toxicity study of Pippali (*Piper Longum* Linn.) fruits", *International Journal of Pharmaceutical & Biological Archives*, vol. 4 (1), pp. 89-93.
97. Miao Y., He N., Zhu J. J. (2010), "History and new developments of assays for cholinesterase activity and inhibition", *Chem. Rev.*, vol. 110, pp. 5216-5234.
98. Min B. S., To D. C., Lee. J.-S. et al (2010), "Cholinesterase inhibitors from *Cleistocalyx operculatus* Buds", *Arch. Pharm. Res.*, vol. 33 (10), pp. 1665-1670.
99. Miriam C. L. P., Humberto R. B., Joseane P. S. et al (2012), "Chemical characterization of essential oil constituents of four populations of *Piper aduncum* L. from Distrito Federal, Brazil", *Biochemical Systematics and Ecology*, vol. 42, pp. 25-31.
100. Mundina M., Vila R., Tomi F. et al (1998), "Leaf essential oils of three panamanian *Piper* species", *Phytochemistry*, vol. 47, pp. 1277-1282.
101. Nagatani Y., Warashina T., Noro T. (2001), "Studies on the constituents from the aerial part of *Baccharis dracunculifolia* DC.", *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, vol. 49, pp. 1388-1394.
102. Om D. T., Soren J., Per M. B. et al (1993), "Lignans and neolignans from *Piper schmidtii*", *Phytochemistry*, vol. 32 (2), pp. 445-448.
103. Orjala J., Mian P., Rali T., Sticher O. (1998), "Gibbilibols A-D, cytotoxic and antibacterial alkenylphenols from *Piper gibbilimum*", *Journal of Natural Products*, vol. 61, pp. 939-941.

104. Pandey A., Bani S. (2010), "Hydroxychavicol inhibits immune responses to mitigate cognitive dysfunction in rats", *Journal of Neuroimmunology*, vol. 226, pp. 48-58.
105. Park B. S., Son D. J., Park Y. H. et al (2007), "Antiplatelet effects of acidamides isolated from the fruits of *Piper longum* L.", *Phytomedicine*, vol. 14 (12), pp. 853-855.
106. Parmar V. S., Jain S. C., Bisht K. S. et al (1996), "Phytochemistry of the genus *Piper*", *Phytochemistry*, vol. 46 (4), pp. 591-673.
107. Paulo J. C. B., Patricia S., Massuo J. K. (1999), "Phenylpropanoids and neolignans from *Piper regnellii*", *Phytochemistry*, vol. 52, pp. 339-343.
108. Phan V. K., Chau V. M., Hoang T. H. et al (2005), "Phenolic constituents with inhibitory activity against NFAT transcription from *Desmos chinensis*", *Archives of Pharmaceutical Research*, vol. 28, pp. 1345-1349.
109. Pino J. A., Marbot R., Bello A. and Urquiola A. (2004), "Essential oils of *Piper peltata* (L.) Miq. and *Piper aduncum* L. from Cuba", *Journal of Essential Oil Research*, vol. 16, pp. 124-126.
110. Piyachaturawat P., Glinsukon T., Toskulkao C. (1983), "Acute and subacute toxicity of piperine in mice, rats and hamsters", *Toxicology letters*, vol. 16, pp. 351-359.
111. Qin W, Huang S., Li C. et al (2010), "Biological activity of the essential oil from the leaves of *Piper sarmentosum* Roxb. (Piperaceae) and its chemical constituents on *Brontispa longissima* (Gestro) (Coleoptera: Hispididae)", *Pesticide Biochemistry and Physiology*, vol. 96, pp. 132-139.
112. Raman Vijayasankar, Galal M. Ahmed, Khan A. Ikhlas (2012), "An investigation of the vegetative anatomy of *Piper sarmentosum*, and a comparison with the anatomy of *Piper betle* (Piperaceae)", *American Journal of Plant Sciences*, vol. 3, pp. 1135-1144.
113. Rao V. S. R., Suresh K. G., Sarma V. U. M. et al (2009), "Chabamides F and G, two novel dimeric alkaloids from the roots of *Piper chaba* Hunter", *Tetrahedron Letters*, vol. 50, pp. 2774-2777.
114. Rathee J. S., Patro B. S., Mula S. et al (2006), "Antioxidant activity of *Piper betle* leaf extract and its constituents", *J. Agric. Food Chem.*, vol. 54, pp. 9046-9054.

115. Reddy S. V., Srinivas P. V., Praveen B. et al (2004), "Antibacterial constituents from the berries of *Piper nigrum*", *Phytomedicine*, vol. 11, pp. 697-700.
116. Reigada J. B., Tcacenco C. M., Andrade L. H. et al (2007), "Chemical constituents from *Piper marginatum* Jacq. (Piperaceae) - antifungal activities and kinetic resolution of (RS)-marginatumol by *Candida antarctica* lipase (Novozym 435)", *Tetrahedron: Asymmetry*, vol. 18, pp. 1054-1058.
117. Rhee I. K., van de Meent M., Ingkaninan K. et al (2001), "Screening for acetylcholinesterase inhibitors from Amaryllidaceae using silica gel thin-layer chromatography in combination with bioactivity staining", *Journal of Chromatography A*, vol. 915, pp. 217-223.
118. Rho M. C., Lee S. W., Park H. R. et al (2007), "ACAT inhibition of alkamides identified in the fruits of *Piper nigrum*", *Phytochemistry*, vol. 68, pp. 899-903.
119. Ricardo C. (1989), "Studies in neotropical Piperaceae - I. A new species of *Piper* from Ecuador", *Brittonia*, vol. 41 (3), pp. 325-327.
120. Rolf T. (2011), "Kava and the risk of liver toxicity: past, current, and future", *The Official Publication of the American Herbal Products Association*, vol. 26 (3), pp. 9-17.
121. Rosabelle S. (1987), "Chromosome numbers in *Piper*", *Kew bulletin*, vol. 42 (2), pp. 465-469.
122. Ruiz C., Haddad M., Alban J. et al (2011), "Activity-guided isolation of antileishmanial compounds from *Piper hispidum*", *Phytochemistry Letters*, vol. 4, pp. 363-366.
123. Sanjay J. D., Bharathi R. P., Newand B. M. (1988), "Aristolactams and 4,5 - dioxoaporphines from *Piper longum*", *Phytochemistry*, vol. 27 (5), pp. 1511-1515.
124. Sanjay K. S., Ashok K. P., Carl E. O. (1996), "Neolignans and alkaloids from *Piper argyrophyllum*", *Phytochemistry*, vol. 43 (6), pp. 1355-1360.
125. Satheeshkumar N., Mukherjee P. K., Bhadra S. et al (2010), "Acetylcholinesterase enzyme inhibitory potential of standardized extract of *Trigonella foenum graecum* L. and its constituents", *Phytomedicine*, vol. 17, pp. 292-295.

126. Shoba G., Joy D., Joseph T. et al (1997), "Influence of Piperin on the pharmacokinetics of Curcumin in animals and human volunteers", *Planta Med.*, vol. 64, pp. 353-356.
127. Shoba G., Joy D., Joseph T. et al (1998), "Influence of piperine on the pharmacokinetics of curcumin in animals and human volunteers", *Planta Med.*, vol. 64 (4), pp. 353-356.
128. Souza L. A., Moscheta I. S., Oliveira J. H. G. (2004), "Comparative morphology and anatomy of the leaf and stem of *Peperomia Dahlstedii* C. DC., *Ottonia Martiana* Miq. and *Piper Diospyrifolium* Kunth (Piperaceae)", *Gayana Bot.*, vol. 61 (1), pp. 6-17.
129. Sperotto A. R., Moura D. J., Péres V. F. et al (2013), "Cytotoxic mechanism of *Piper gaudichaudianum* Kunth essential oil and its major compound nerolidol", *Food and Chemical Toxicology*, vol. 57, pp. 57-68.
130. Tabopda T. K., Ngoupayo J., Liu J. et al (2008), "Bioactive aristolactams from *Piper umbellatum*", *Phytochemistry*, vol. 69, pp. 1726-1731.
131. Takahashi O., Oishi S., Fujitani T. et al (1997), "Chronic toxicity studies of piperonyl butoxide in CD-1 mice: induction of hepatocellular carcinoma", *Toxicology*, vol. 124, pp. 95-103.
132. Tang G. H., Chen D. M., Qiu B. Y. et al (2011), "Cytotoxic amide alkaloids from *Piper boehmeriaefolium*", *J. Nat. Prod.*, vol. 74, pp. 45-49.
133. Tang Z. M., Wang Z. Y., Kang J. W. (2007), "Screening of acetylcholinesterase inhibitors in natural extracts by CE with electrophoretically mediated microanalysis technique", *Electrophoresis*, vol. 28, pp. 360-365.
134. Tawan C. S., Ipor I. B., Fasihuddin B. A., Sani H. (2002), "A brief account on the wild *Piper* (Piperaceae) of the crocker range, Sabah", *Asean review of biodiversity and environmental conservation (ARBEC)*, pp. 1-11.
135. Tebbs M. C. (1990), "Revision of *Piper* (Piperaceae) in the new world - 2. The taxonomy of *Piper* section *Churumayu*", *Bull. Br. Mus. Nat. Hist. (Bot.)*, vol. 20 (2), pp. 193-236.
136. Tebbs M. C. (1993), "Revision of *Piper* (Piperaceae) in the new world - 3. The taxonomy of *Piper* section *Lepianthes* and *Radula*", *Bull. Nat. Hist. Mus. Lond. (Bot.)*, vol. 23 (1), pp. 1-50.

137. Tsukamoto S., Tomise K., Miyakawa K. (2002), "Dipiperamides A, B and C: bisalkaloids from the white pepper *Piper nigrum* inhibiting CYP3A4 activity", *Tetrahedron*, vol. 58, pp. 1667-1671.
138. Usia T., Watabe T., Kadota S. et al (2005), "Potent CYP3A4 inhibitory constituents of *Piper cubeba*", *J. Nat. Prod.*, vol. 68, pp. 64-68.
139. Valdivia C., Marquez N., Eriksson J. et al (2008), "Bioactive alkenylphenols from *Piper obliquum*", *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, vol. 16, pp. 4120-4126.
140. Van Asperen K. (1962), "A study of housefly esterase by means of a sensitive colorimetric method", *J. Ins. Physiol.*, vol. 8, pp. 401-416.
141. Vasques da Silva R., Navickiene H. M., Kato M. J. et al (2002), "Antifungal amides from *Piper arboreum* and *Piper tuberculatum*", *Phytochemistry*, vol. 59, pp. 521-527.
142. Vila R., Milo B., Tomi F. et al (2001), "Chemical composition of the essential oil from the leaves of *Piper fulvescens*, a plant traditionally used in Paraguay", *Journal of Ethnopharmacology*, vol. 76 (1), pp. 105-107.
143. Wattanathorn J., Chonpathompikunlert P., Muchimapura S. et al (2008), "Piperine, the potential functional food for mood and cognitive disorders", *Food and Chemical Toxicology*, vol. 46, pp. 3106-3110.
144. Xia N. H. (2008), *Flora of Hong kong*, pp. 58-62.
145. Xie H., Yan M. C., Jin D. et al (2011), "Studies on antidepressant and antinociceptive effects of ethyl acetate extract from *Piper laetispicum* and structure-activity relationship of its amide alkaloids", *Fitoterapia*, vol. 82, pp. 1086-1092.
146. Xuan T. D., Elizaawely A. A., Fukuta M., Tawata S. (2006), "Herbicidal and fungicidal activities of lactones in Kava (*Piper methysticum*)", *J. Agric. Food Chem.*, vol. 54, pp. 720-725.
147. Yamaguchi L. F., Lago J. H., Tanizaki T. M. et al (2006), "Antioxidant activity of prenylated hydroquinone and benzoic acid derivatives from *Piper crassinervium* Kunth", *Phytochemistry*, vol. 67, pp. 1838-1843.
148. Yang Z., Zhang X., Duan D. et al (2009), "Modified TLC bioautographic method for screening acetylcholinesterase inhibitors from plant extracts", *J. Sep. Sci.*, vol. 32, pp. 3257-3259.

149. Yao C. (2009), *Antinociceptive, antidepressant, anxiolytic and toxicity studies on Piper laetispicum C. DC.*, Ph.D dissertation, pp. 128-137.
150. Zhang H., Matsuda H., Nakamura S. et al (2008), "Effects of amide constituents from pepper on adipogenesis in 3T3-L1 cells", *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, vol. 18, pp. 3272–3277.
151. Zhang Y., Que S., Yang X. et al (2007), "Isolation and identification of metabolites from dihydromyricetin", *Magn. Reson. Chem.*, vol. 45, pp. 909-916.
152. Zheng Q., Xu L., Zhu L. et al (2010), "Preliminary investigations of antioxidation of dihydromyricetin in polymers", *Bull. Mater. Sci.*, vol. 33 (3), pp. 273-275.

Tài liệu tiếng Pháp

153. De Candolle C. (1910), *Flore generale de l'Indochine*, 5, Paris: Masson et C^{ie}, pp. 62-92.

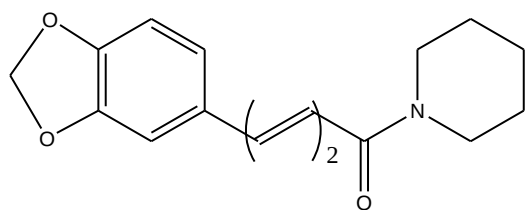
DANH MỤC PHỤ LỤC CỦA LUẬN ÁN

Phụ lục 1	Cấu trúc hóa học của những hợp chất phân lập được từ chi <i>Piper</i> L.
Phụ lục 2	Ảnh tiêu bản mẫu nghiên cứu và tiêu bản mẫu đối chiếu
Phụ lục 3	Kết quả giám định tên khoa học của hai loài nghiên cứu
Phụ lục 4	Dữ liệu phổ NMR và phổ MS của các hợp chất phân lập được
Phụ lục 4.1	Dữ liệu phổ NMR và phổ MS của hợp chất PT1
Phụ lục 4.2	Dữ liệu phổ NMR và phổ MS của hợp chất PT2
Phụ lục 4.3	Dữ liệu phổ NMR và phổ MS của hợp chất PT3
Phụ lục 4.4	Dữ liệu phổ NMR và phổ MS của hợp chất PT4
Phụ lục 4.5	Dữ liệu phổ NMR của hợp chất PT5
Phụ lục 4.6	Dữ liệu phổ NMR của hợp chất PT6
Phụ lục 4.7	Dữ liệu phổ NMR và phổ MS của hợp chất PH1
Phụ lục 4.8	Dữ liệu phổ NMR và phổ MS của hợp chất PH2
Phụ lục 4.9	Dữ liệu phổ NMR và phổ MS của hợp chất PH3
Phụ lục 4.10	Dữ liệu phổ NMR và phổ MS của hợp chất PH4
Phụ lục 4.11	Dữ liệu phổ NMR và phổ MS của hợp chất PH5
Phụ lục 4.12	Dữ liệu phổ NMR và phổ MS của hợp chất PH6
Phụ lục 4.13	Dữ liệu phổ NMR và phổ MS của hợp chất PH7
Phụ lục 4.14	Dữ liệu phổ NMR của hợp chất PH8
Phụ lục 5	Các công trình đã công bố liên quan đến luận án

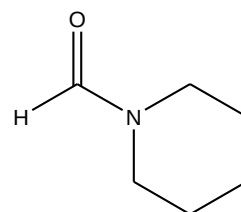
PHỤ LỤC 1

CẤU TRÚC HÓA HỌC CỦA NHỮNG HỢP CHẤT
PHÂN LẬP ĐƯỢC TỪ CHI *Piper* L.

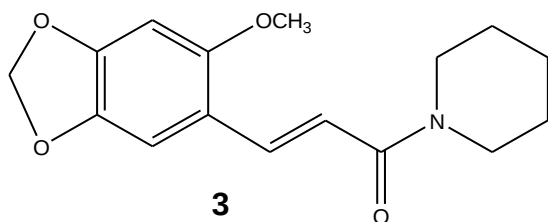
CẤU TRÚC NHÓM HỢP CHẤT ALCALOID



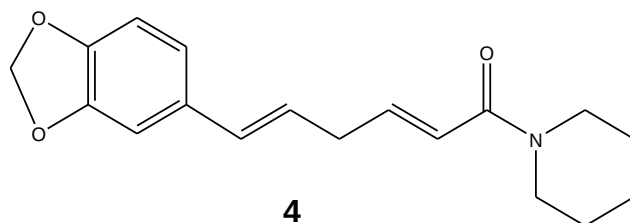
1



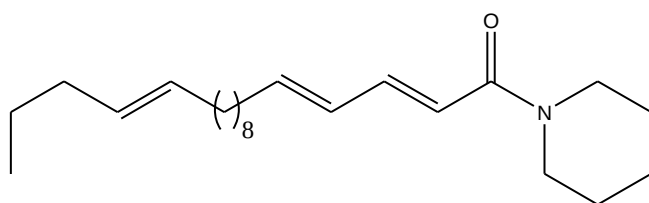
2



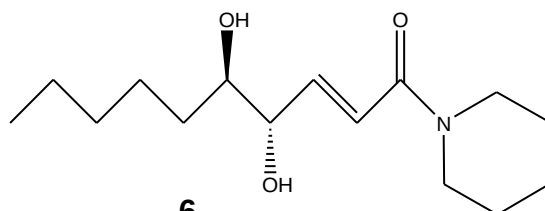
3



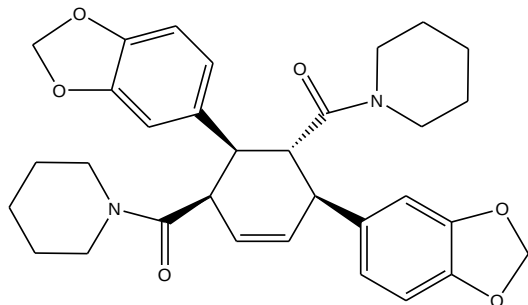
4



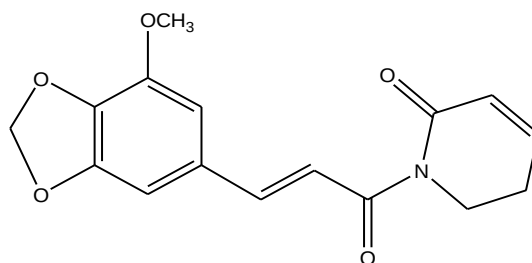
5



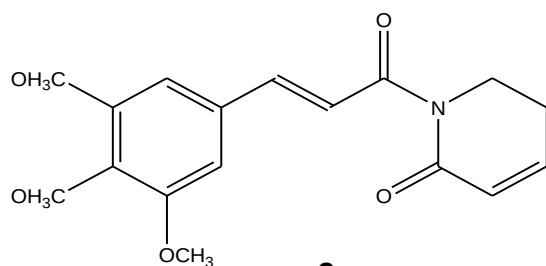
6



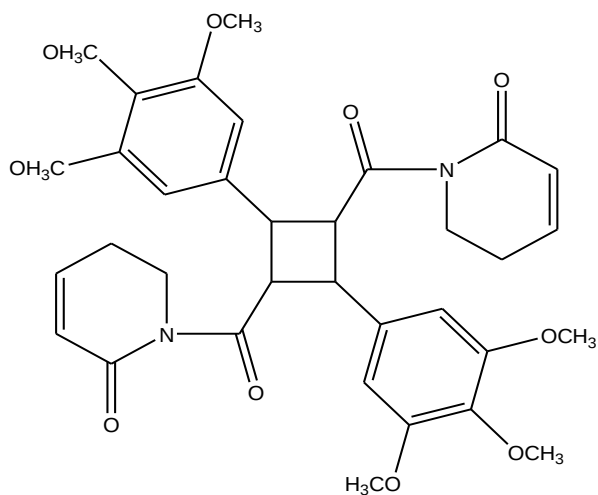
7



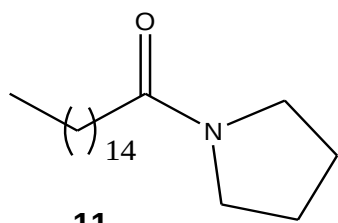
8



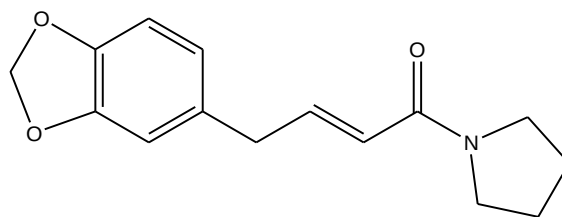
9



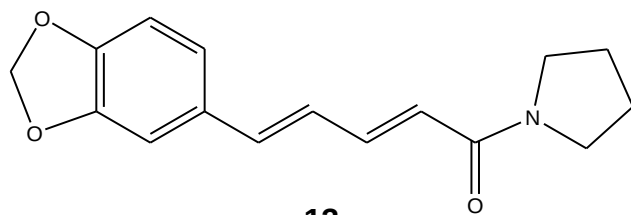
10



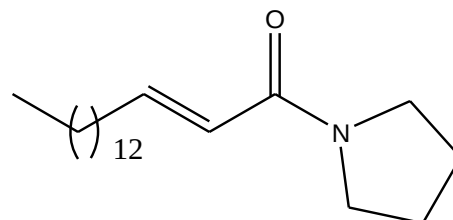
11



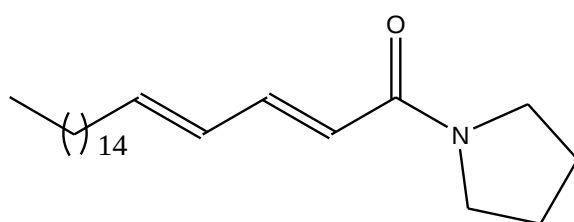
12



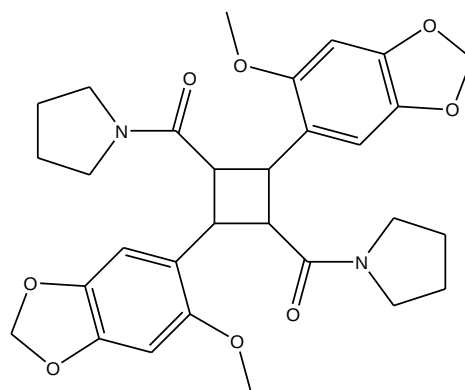
13



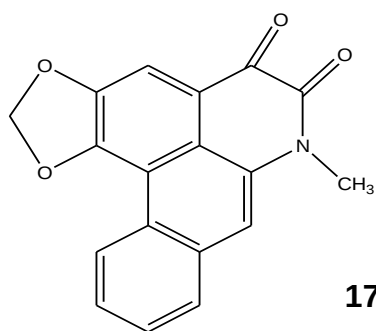
14



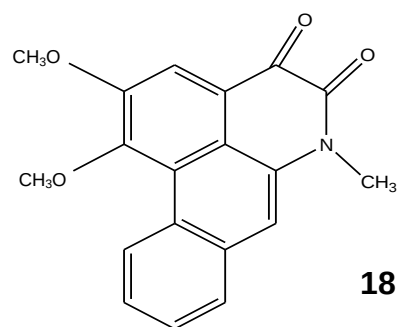
15



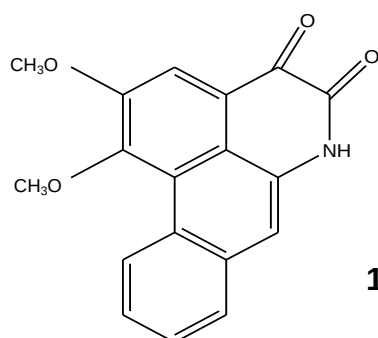
16



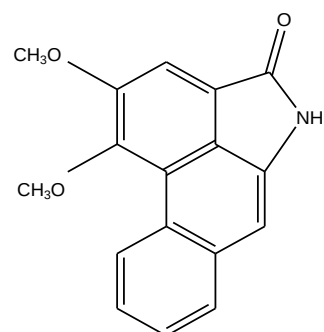
17



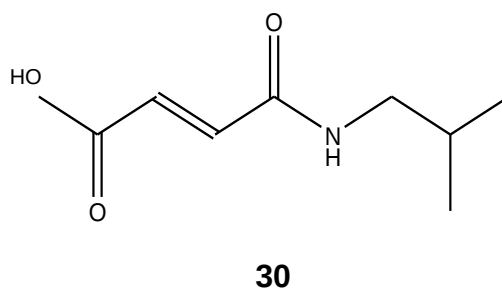
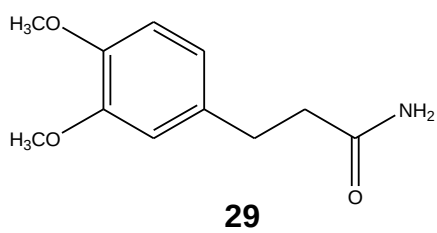
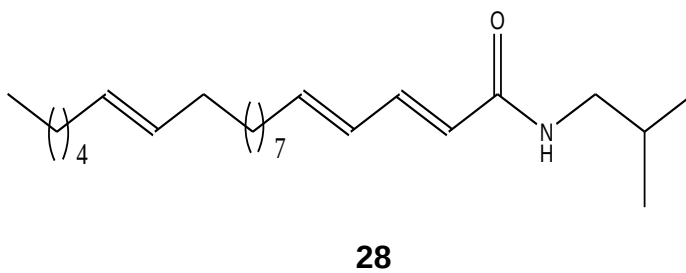
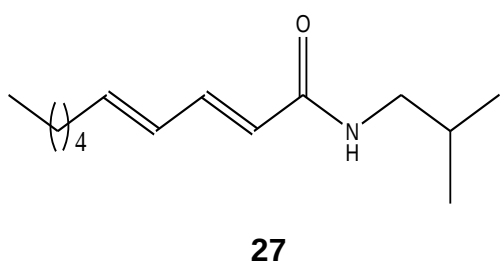
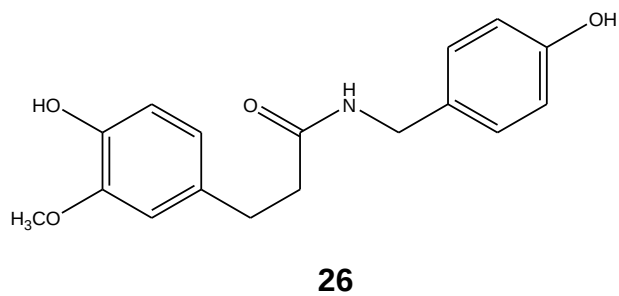
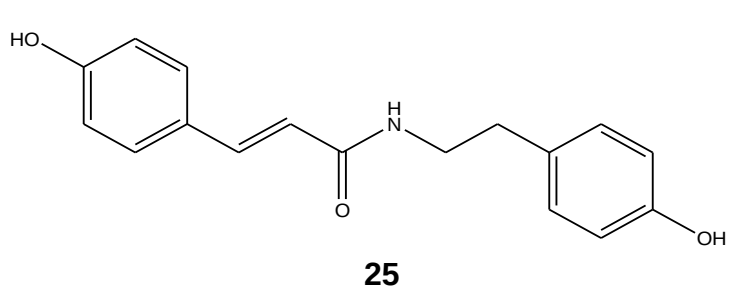
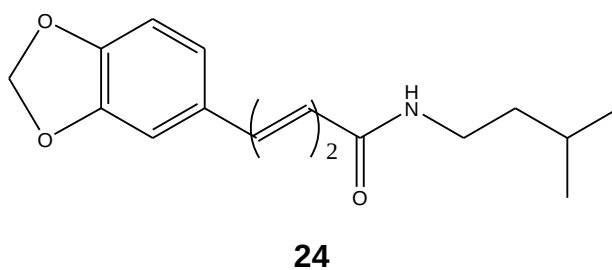
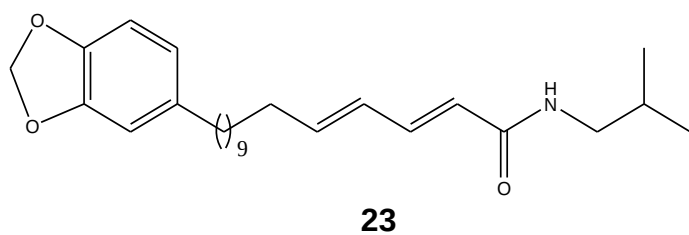
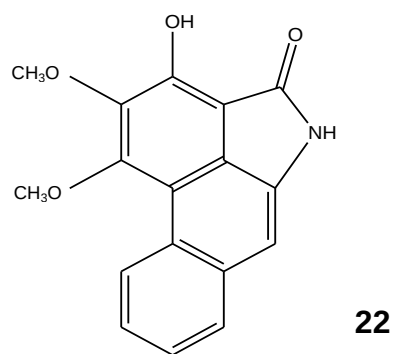
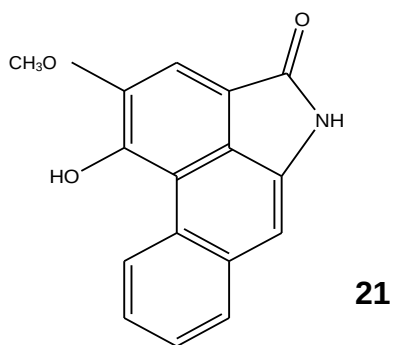
18

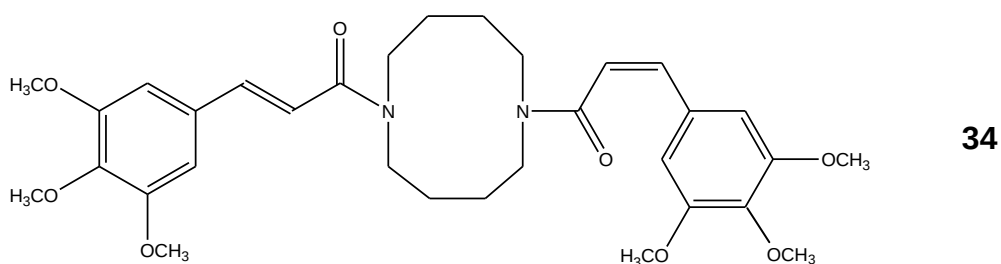
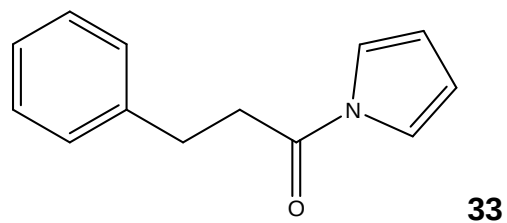
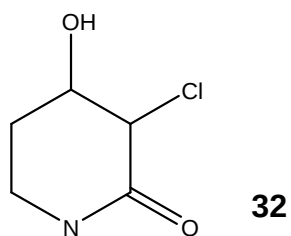
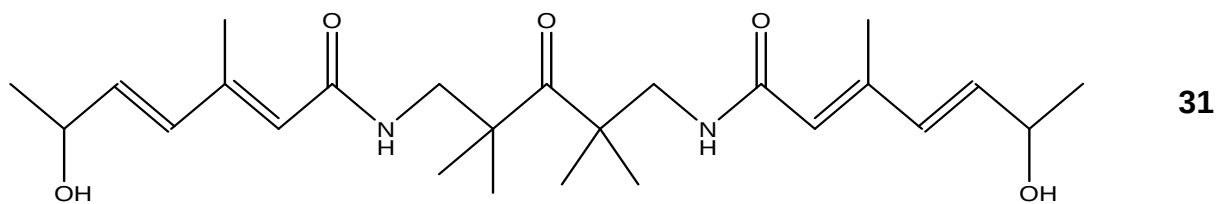


19

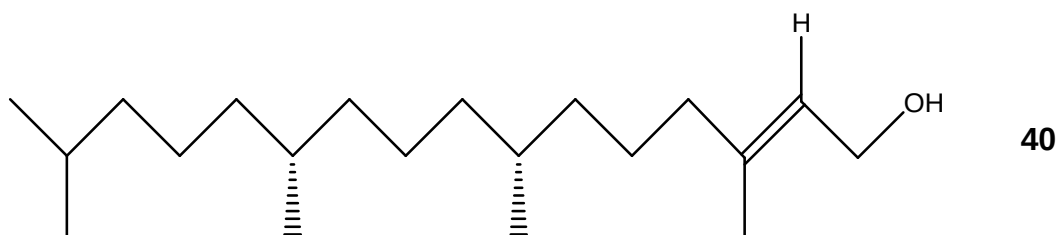
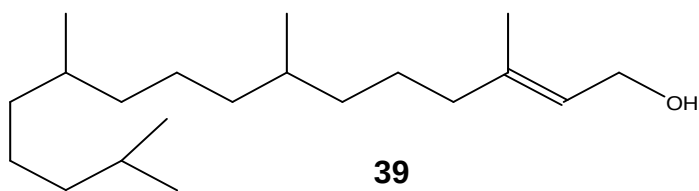
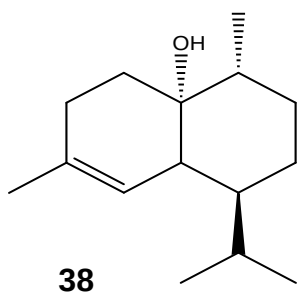
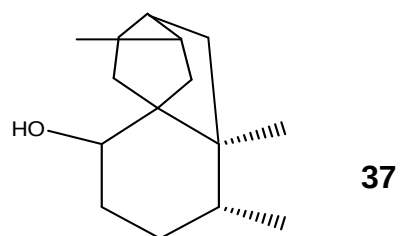
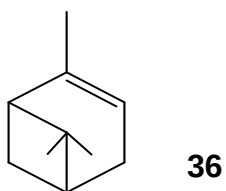
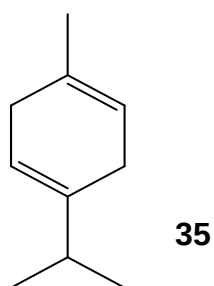


20

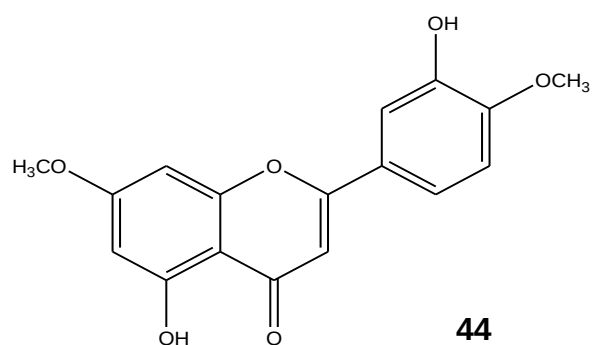
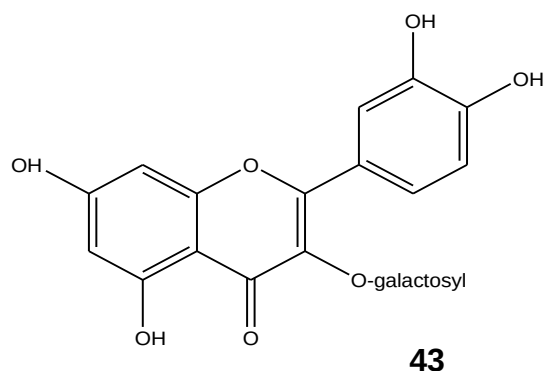
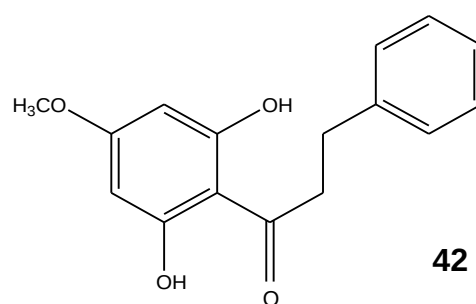
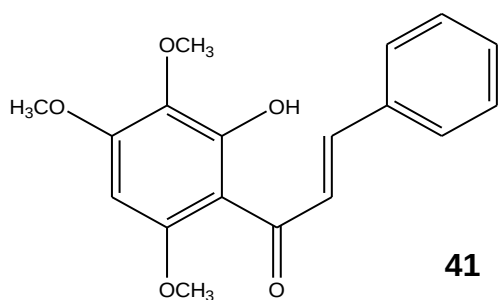




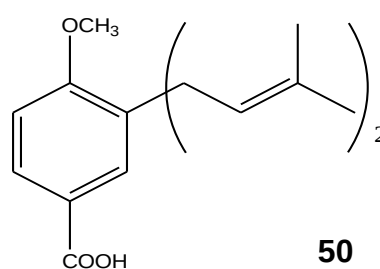
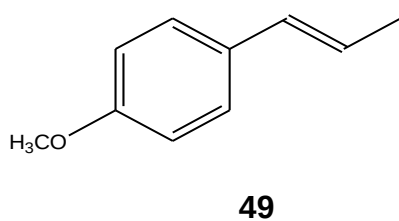
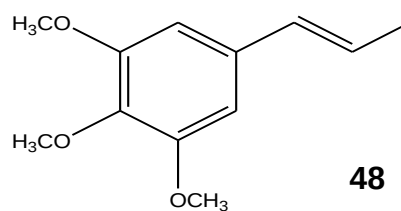
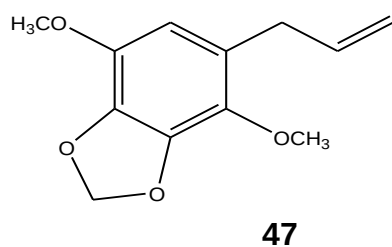
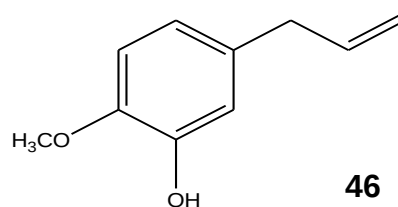
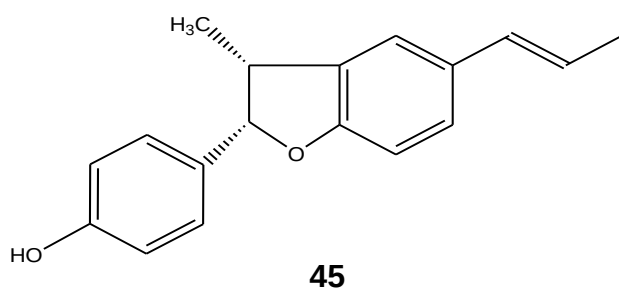
CẤU TRÚC NHÓM TÍNH DẦU

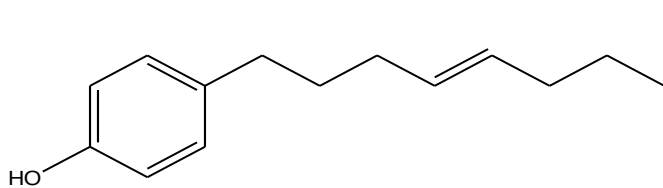


CẤU TRÚC NHÓM HỢP CHẤT FLAVONOID

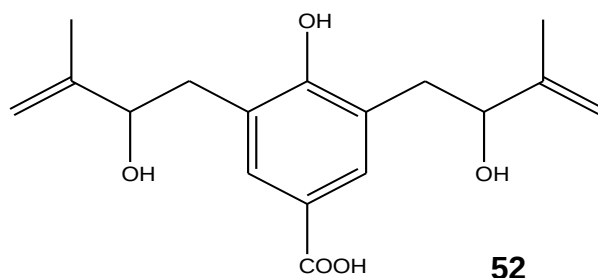


CẤU TRÚC NHÓM HỢP CHẤT ALKANPOLYENYLBENZEN

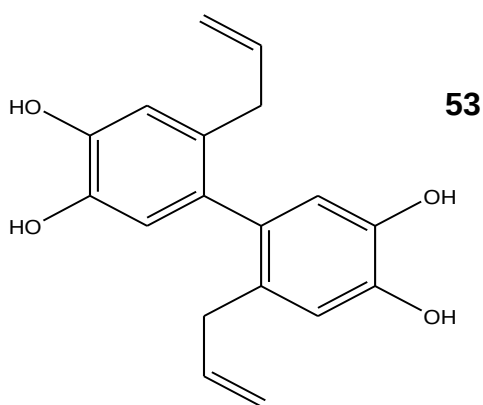




51

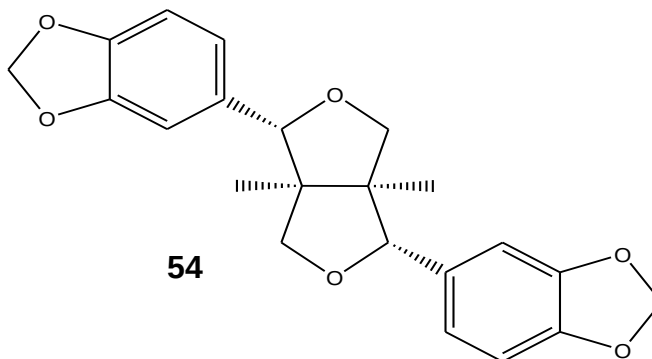


52

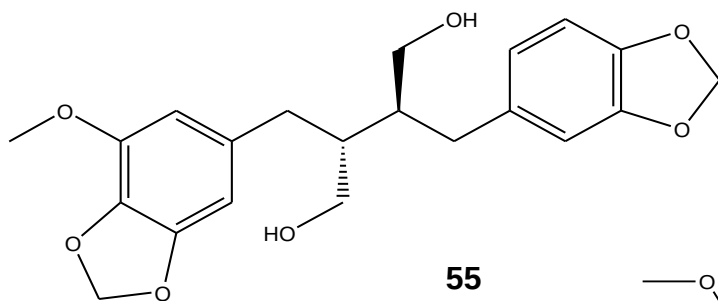


53

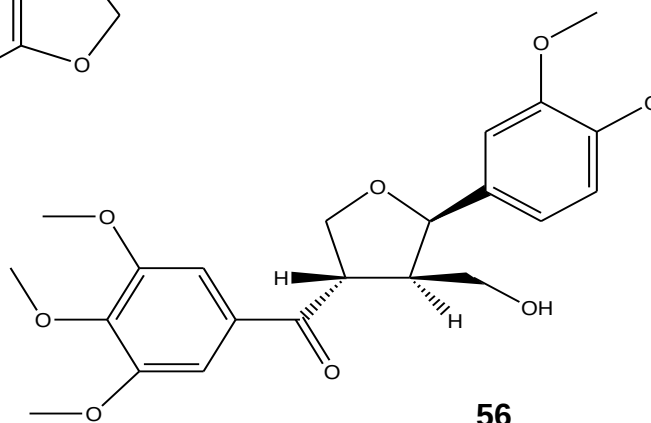
CẤU TRÚC NHÓM HỢP CHẤT LIGNAN



54



55



56

PHỤ LỤC 2

ẢNH TIÊU BẢN MẪU NGHIÊN CỨU VÀ TIÊU BẢN MẪU ĐỐI CHIẾU



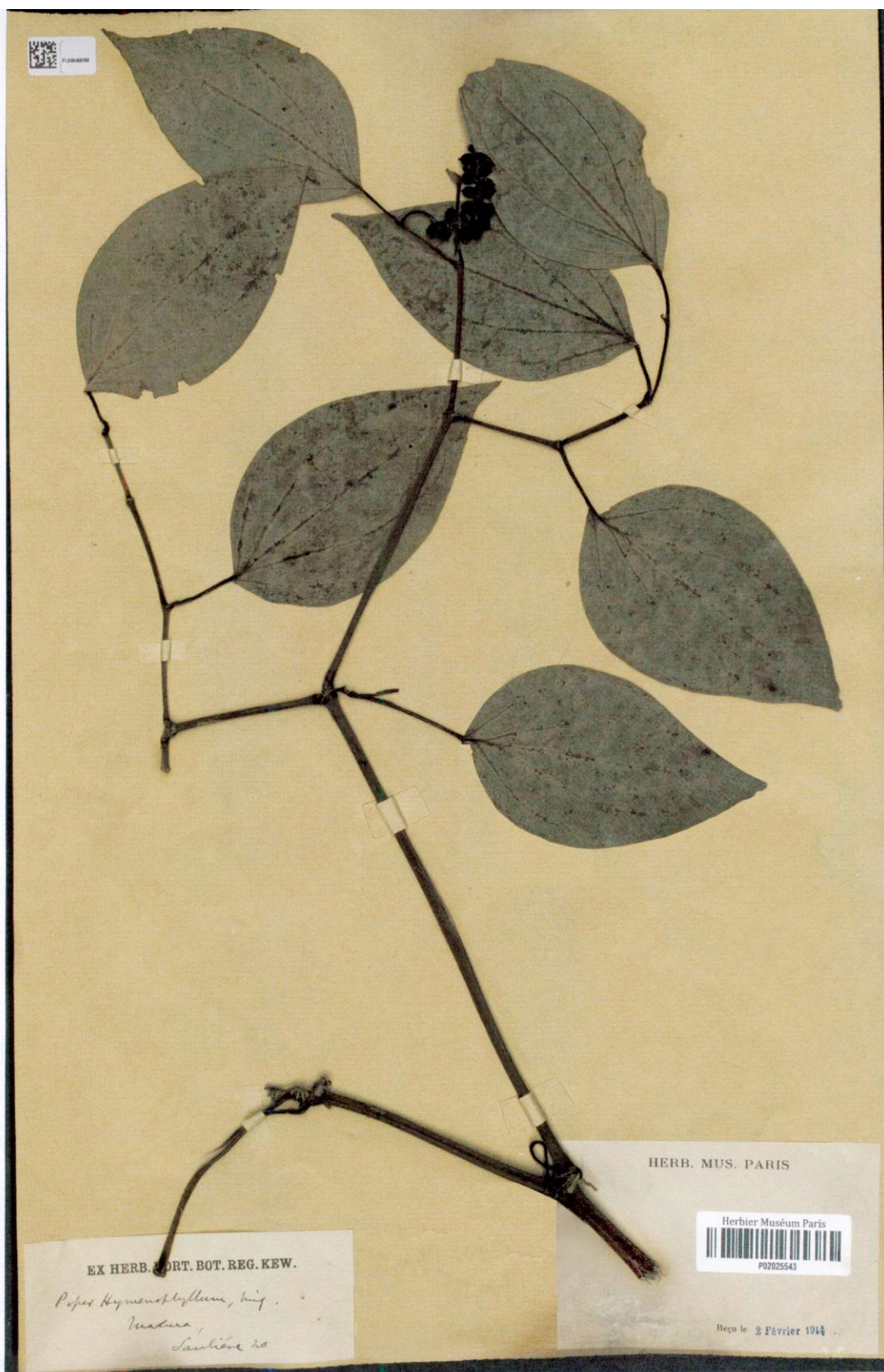
Ảnh tiêu bản mẫu nghiên cứu của loài *Piper bavinum* C. DC.



Ảnh tiêu bản mẫu đối chiếu của loài *Piper bavinum* C. DC.



Ảnh tiêu bản mẫu nghiên cứu của loài *Piper hymenophyllum* Miq.



Ảnh tiêu bản mẫu đối chiếu của loài *Piper hymenophyllum* Miq.

PHỤ LỤC 3

KẾT QUẢ GIÁM ĐỊNH TÊN KHOA HỌC

VIỆT SINH THÁI VÀ
TÀI NGUYÊN SINH VẬT
PHÒNG THỰC VẬT

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

KẾT QUẢ GIÁM ĐỊNH TÊN KHOA HỌC

Kính gửi: Nghiên cứu sinh **Hoàng Việt Dũng**, Bộ môn Dược liệu – Đại học Dược Hà Nội.

Chúng tôi nhận được đề nghị giám định tên khoa học cho mẫu tiêu bản của Nghiên cứu sinh Hoàng Việt Dũng, Bộ môn Dược liệu – Đại học Dược Hà Nội vào ngày 16 tháng 5 năm 2011.

Thành viên tham gia giám định: PGS.TS. Vũ Xuân Phương

TS. Trần Thế Bách

Các thông tin về mẫu vật: Các mẫu vật ở dạng tiêu bản khô, có đủ tiêu chuẩn để định loại bao gồm cơ quan sinh sản (hoa) và cơ quan sinh dưỡng (cành non, lá...), ảnh chụp mô tả mẫu ngoài thực địa và các thông tin ghi chép được tại thực địa.

Nơi thu hái: Vườn quốc gia Cúc Phương – Nho Quan – Ninh Bình.

Người thu hái: Nguyễn Huy Quang, Phòng Hợp tác Quốc tế - Vườn quốc gia Cúc Phương.

Ngày, tháng thu hái: 15 tháng 4 năm 2011.

Kết quả giám định tên khoa học: Các mẫu tiêu bản của Nghiên cứu sinh Hoàng Việt Dũng, Bộ môn Dược liệu – Đại học Dược Hà Nội gửi giám định có tên khoa học là:

Số TT	Số hiệu	Tên khoa học	Tên Việt Nam	Họ thực vật
1.	HVD 001 – 11	<i>Piper mekongense</i> C. DC.	Tiêu cửu long	Piperaceae
2.	HVD 002 – 11	<i>Piper bavinum</i> C. DC.	Tiêu ba vì	Piperaceae
3.	HVD 003 – 11	<i>Piper pendulispicum</i> C. DC.	Tiêu gié thông	Piperaceae
4.	HVD 004 – 11	<i>Piper hymenophyllum</i> Miq.	Tiêu lá mỏng	Piperaceae

Hiện nay, các mẫu tiêu bản được lưu trữ tại Phòng tiêu bản – Viện Sinh thái và Tài nguyên sinh vật Việt Nam.

Chúng tôi xin gửi tới Nghiên cứu sinh Hoàng Việt Dũng, Bộ môn Dược liệu – Đại học Dược Hà Nội kết quả giám định trên.

Hà Nội, ngày 04 tháng 7 năm 2011

Người giám định

PGS. TS. Vũ Xuân Phương

**Xác nhận của Viện Sinh thái và
Tài nguyên sinh vật**

PHÓ VIỆN TRƯỞNG



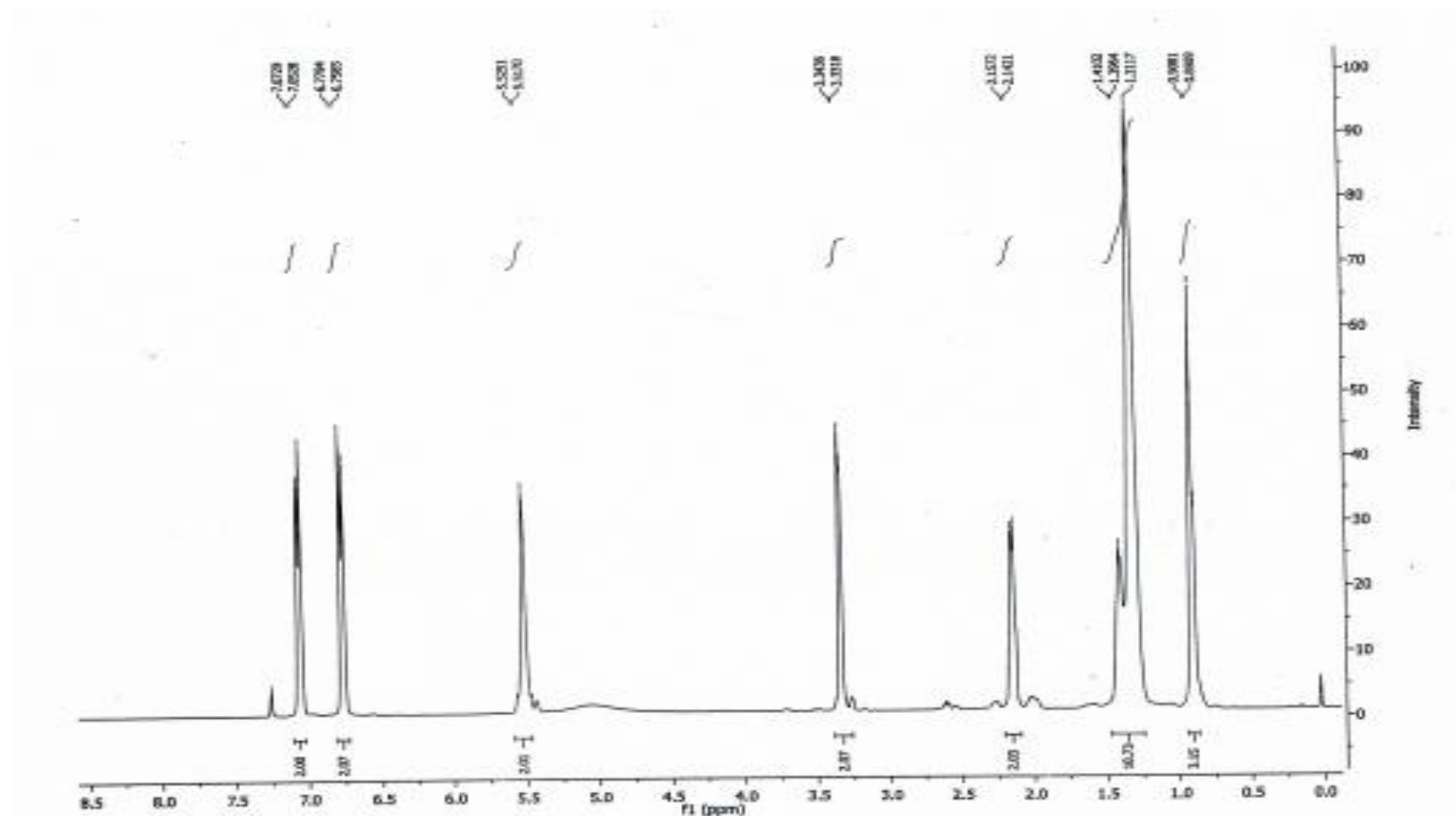
Trần Huy Thái

PHỤ LỤC 4

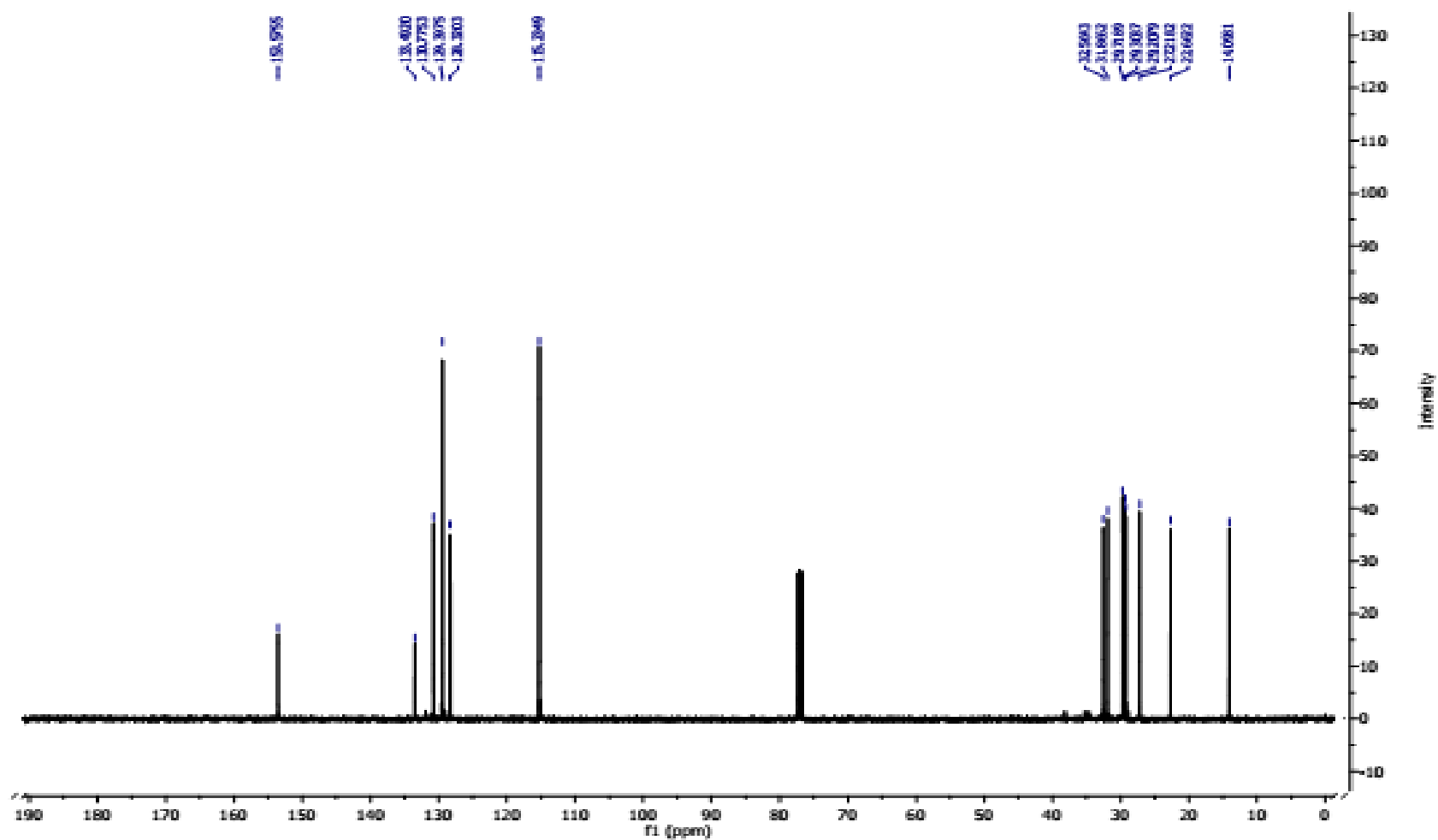
**DỮ LIỆU PHỔ NMR VÀ PHỔ MS CỦA CÁC HỢP CHẤT
PHÂN LẬP ĐƯỢC TỪ HAI LOÀI NGHIÊN CỨU**

PHỤ LỤC 4.1

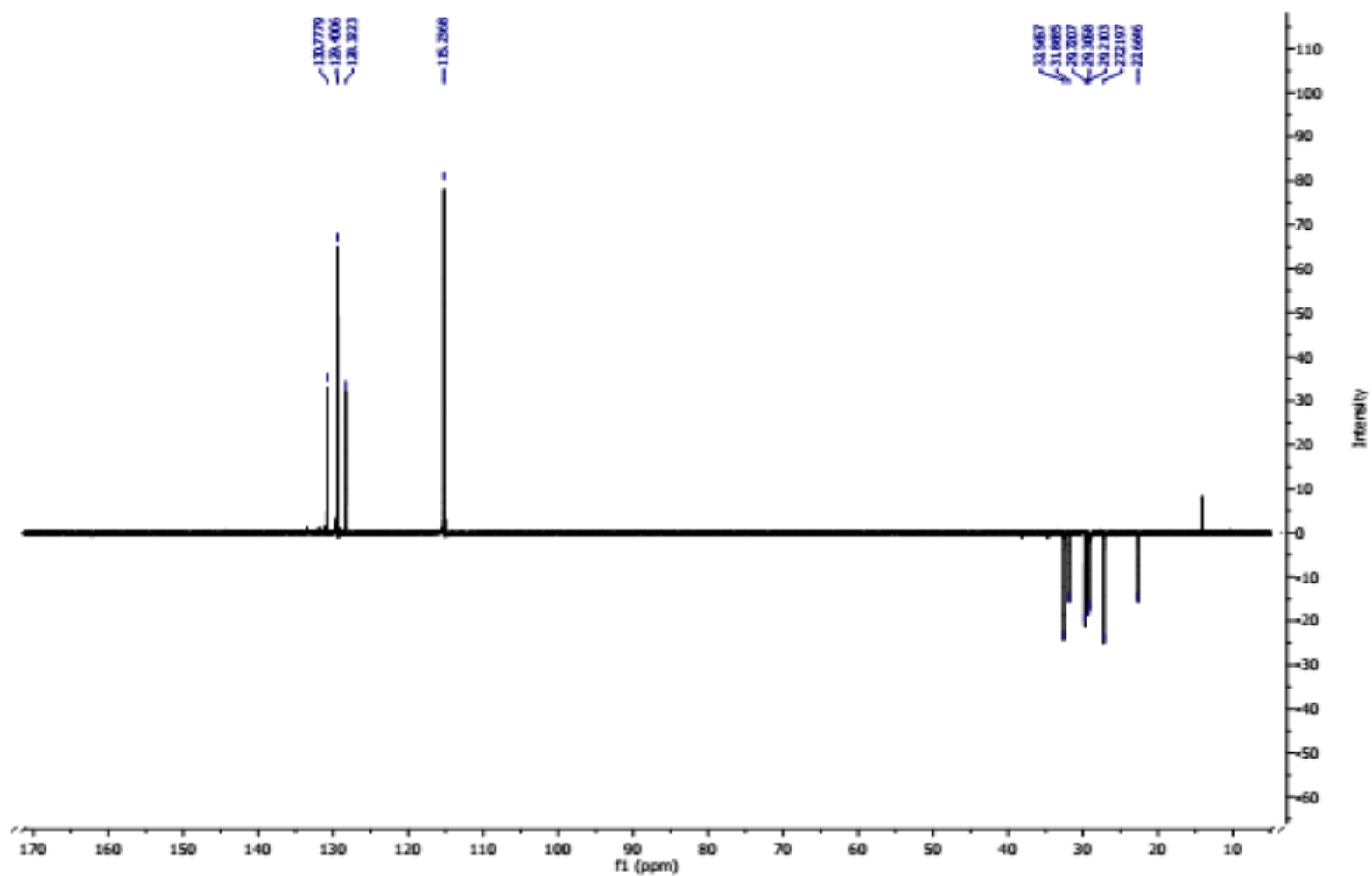
DỮ LIỆU PHỔ NMR VÀ PHỔ MS CỦA HỢP CHẤT PT1



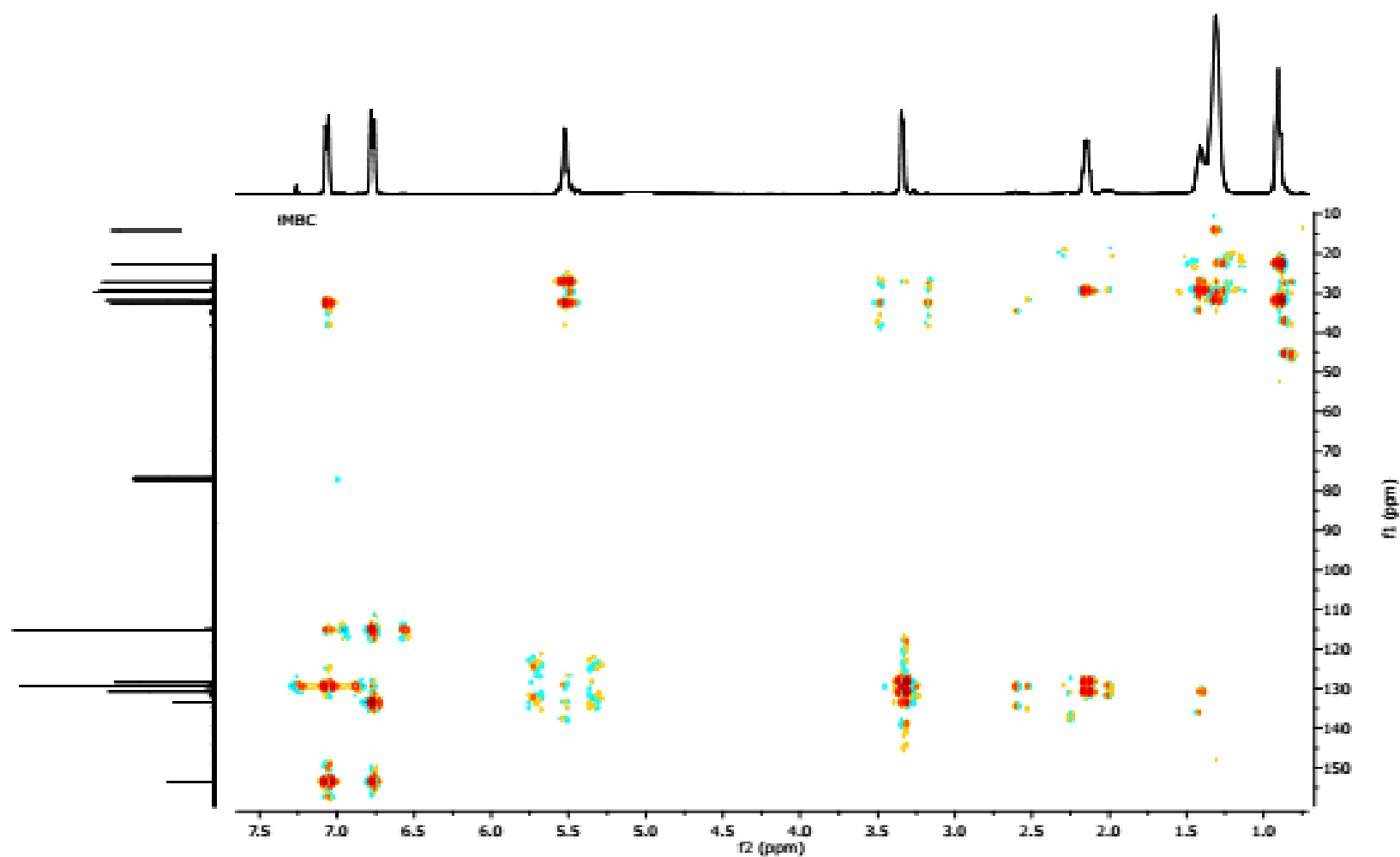
Phổ ¹H-NMR của hợp chất PT1 (156 mg) đo trong CDCl₃



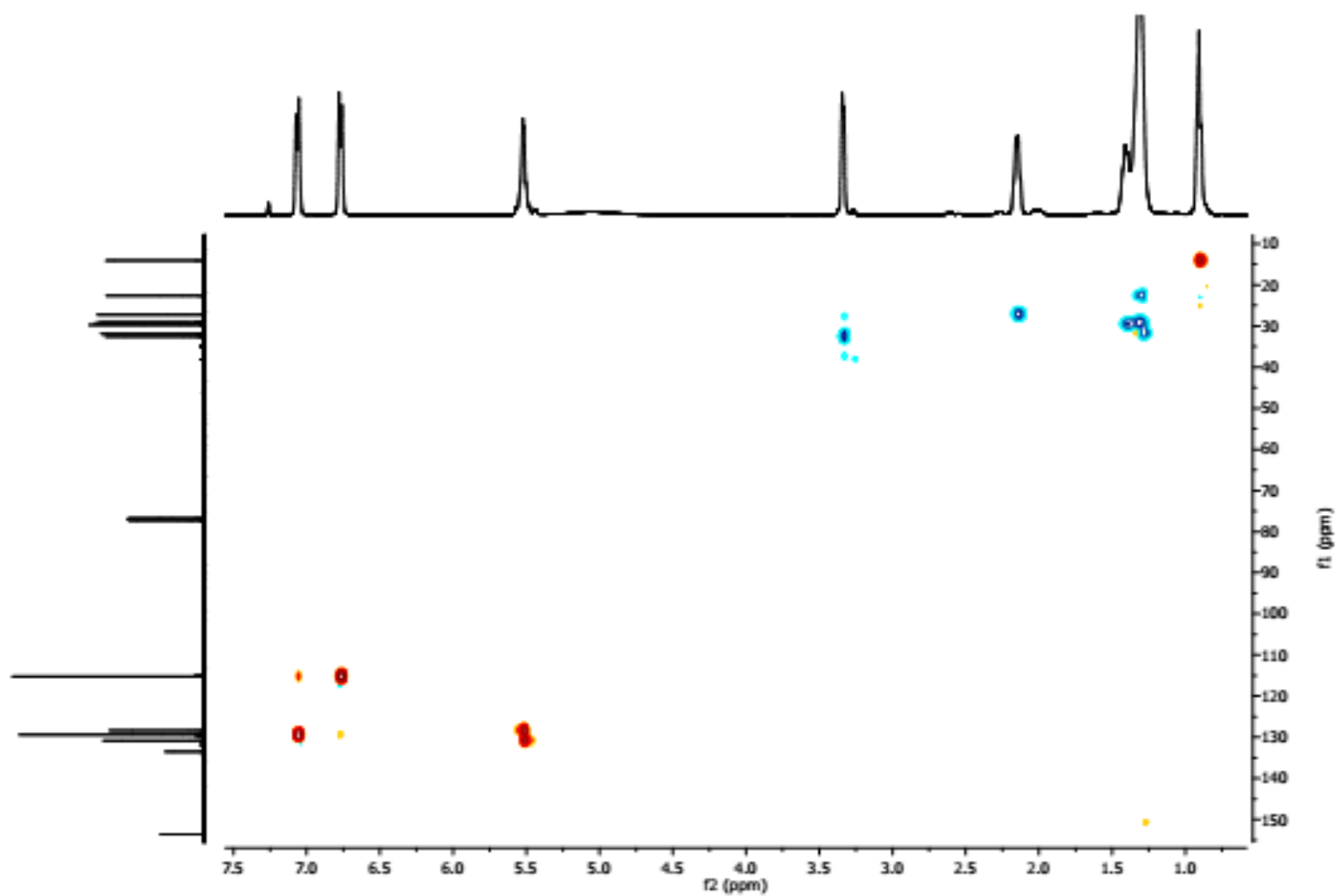
Phổ ¹³C-NMR của hợp chất PT1 (156 mg) đo trong CDCl₃



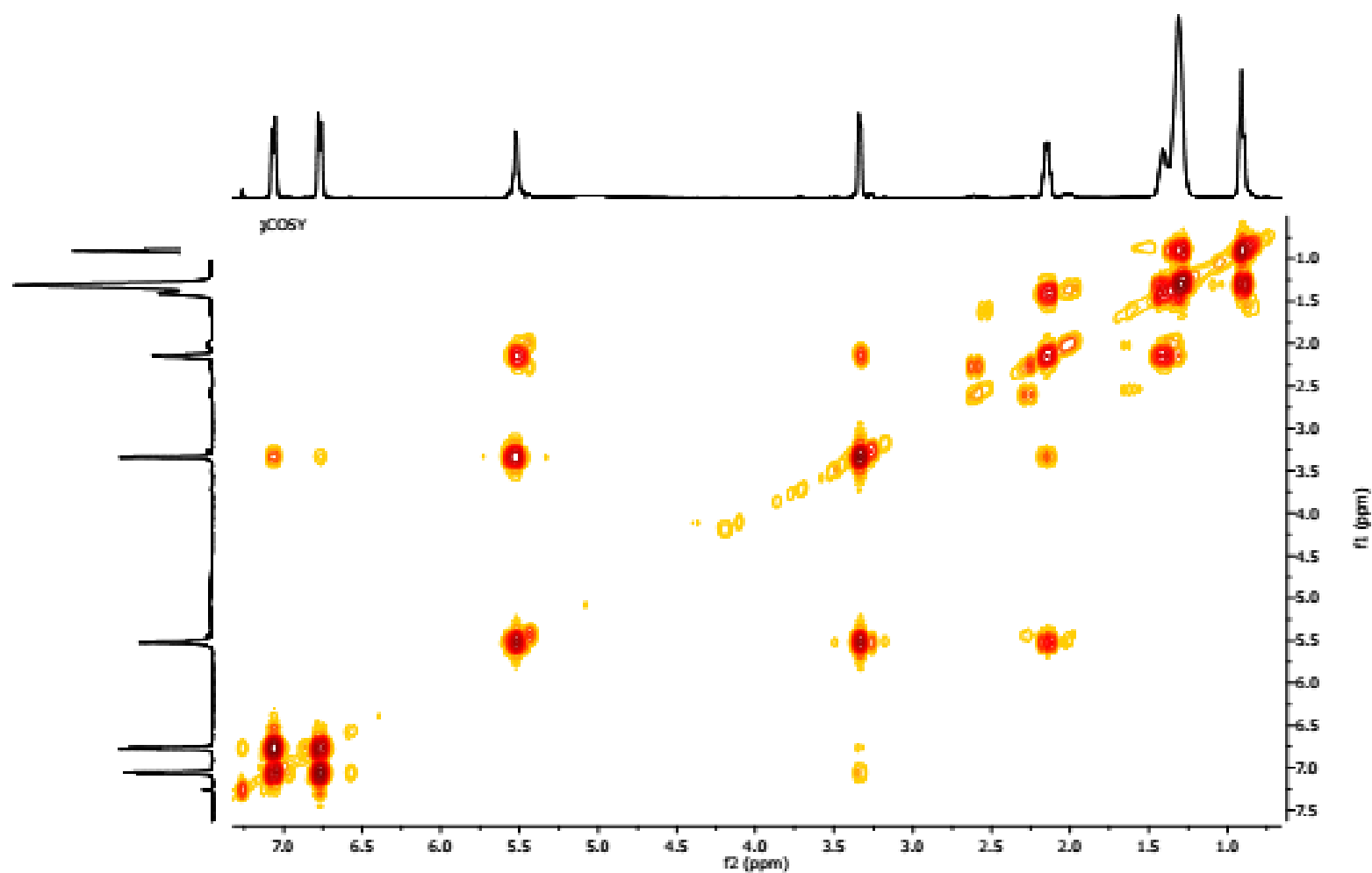
Phổ DEPT-NMR của hợp chất PT1 (156 mg) đo trong CDCl_3



Phổ HMBC-NMR của hợp chất PT1 (156 mg) đo trong CDCl_3

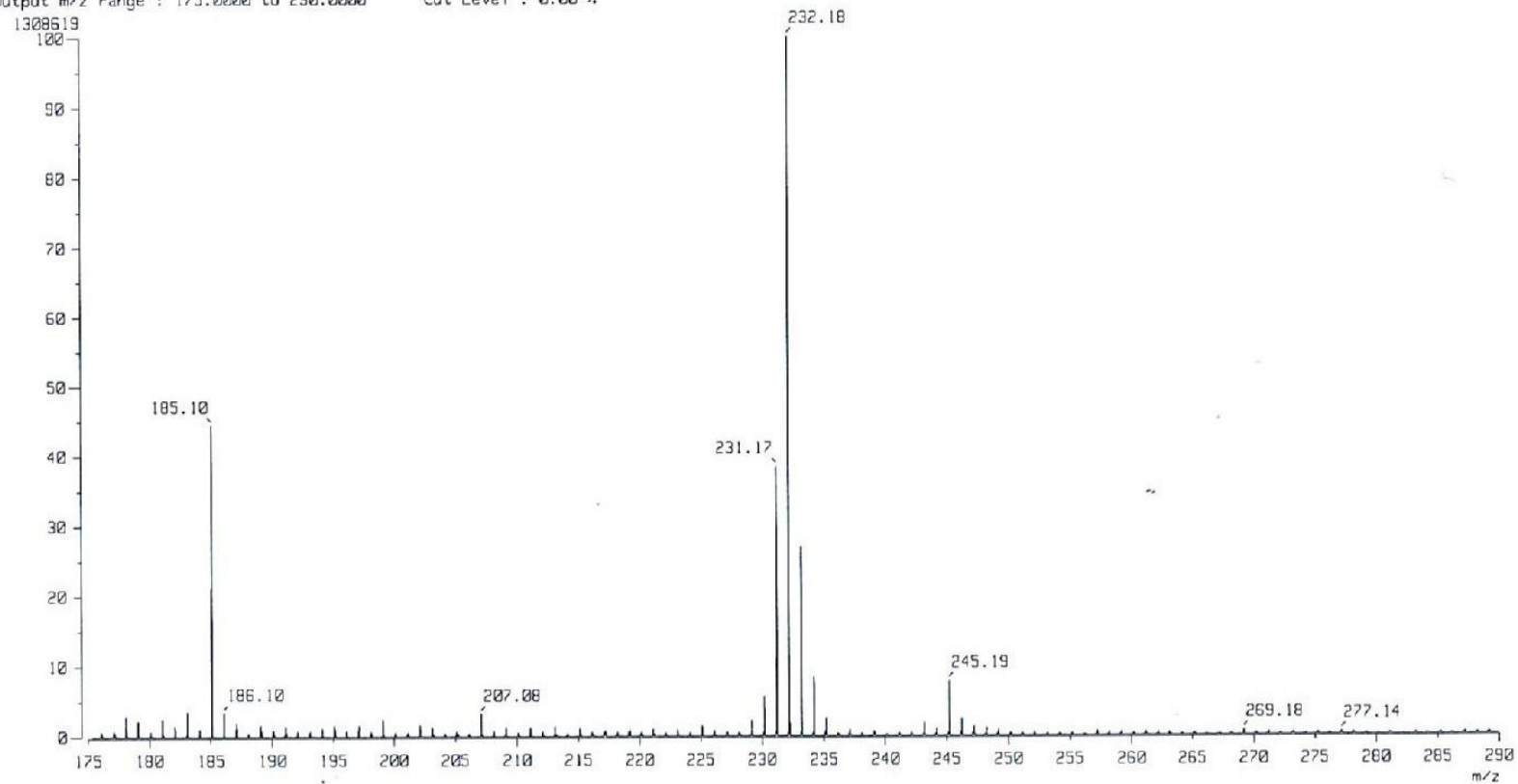


Phổ HSQC của hợp chất PT1 (156 mg) đo trong CDCl_3



Phổ COSY-NMR của hợp chất PT1 (156 mg) đo trong CDCl₃

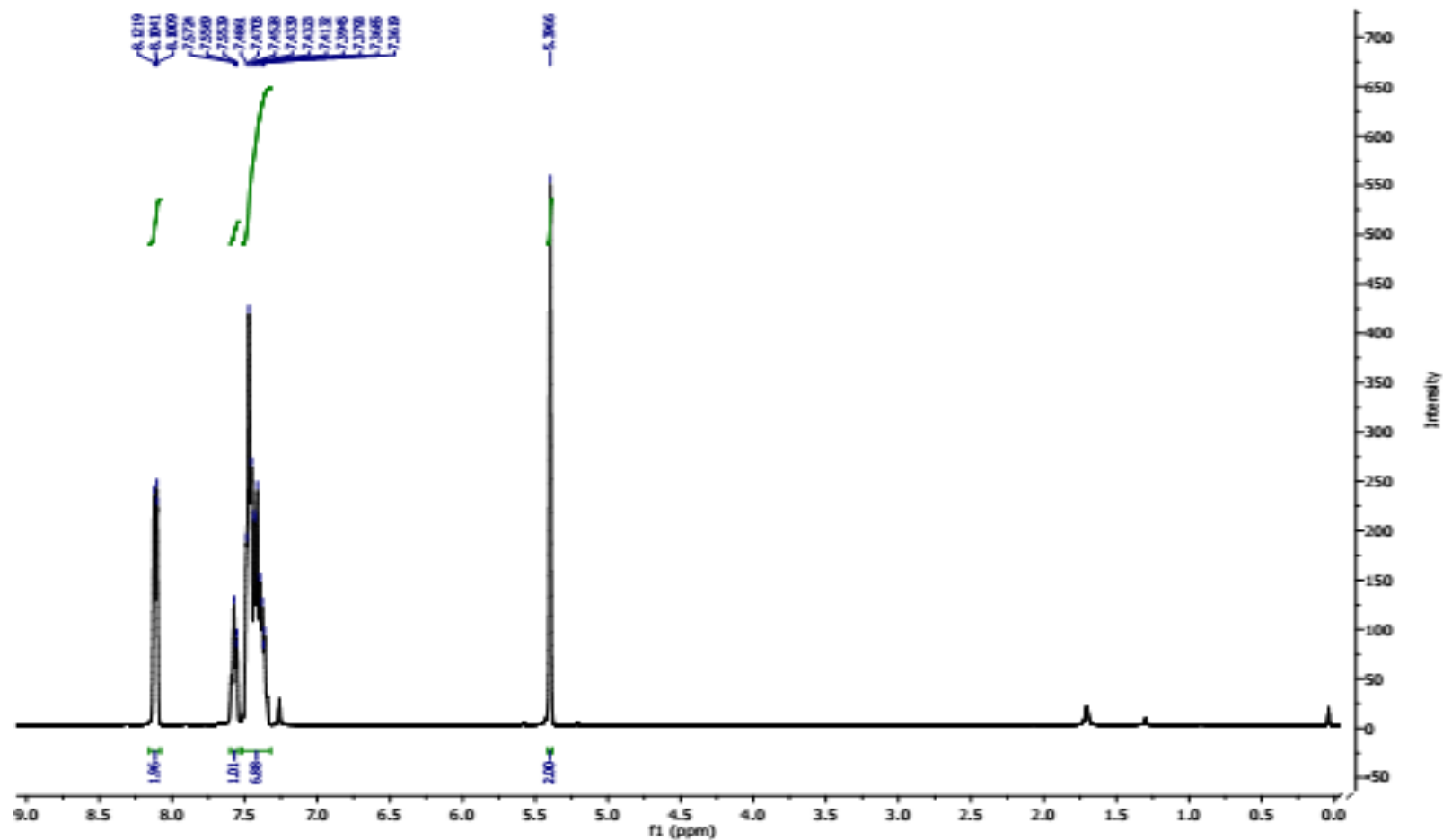
Note : -
Inlet : Direct Ion Mode : FAB+
Spectrum Type : Normal Ion [EF-Linear]
RT : 0.33 min Scan# : (7,8)
BP : m/z 232.1829 Int. : 62.40
Output m/z range : 175.0000 to 290.0000 Cut Level : 0.00 %



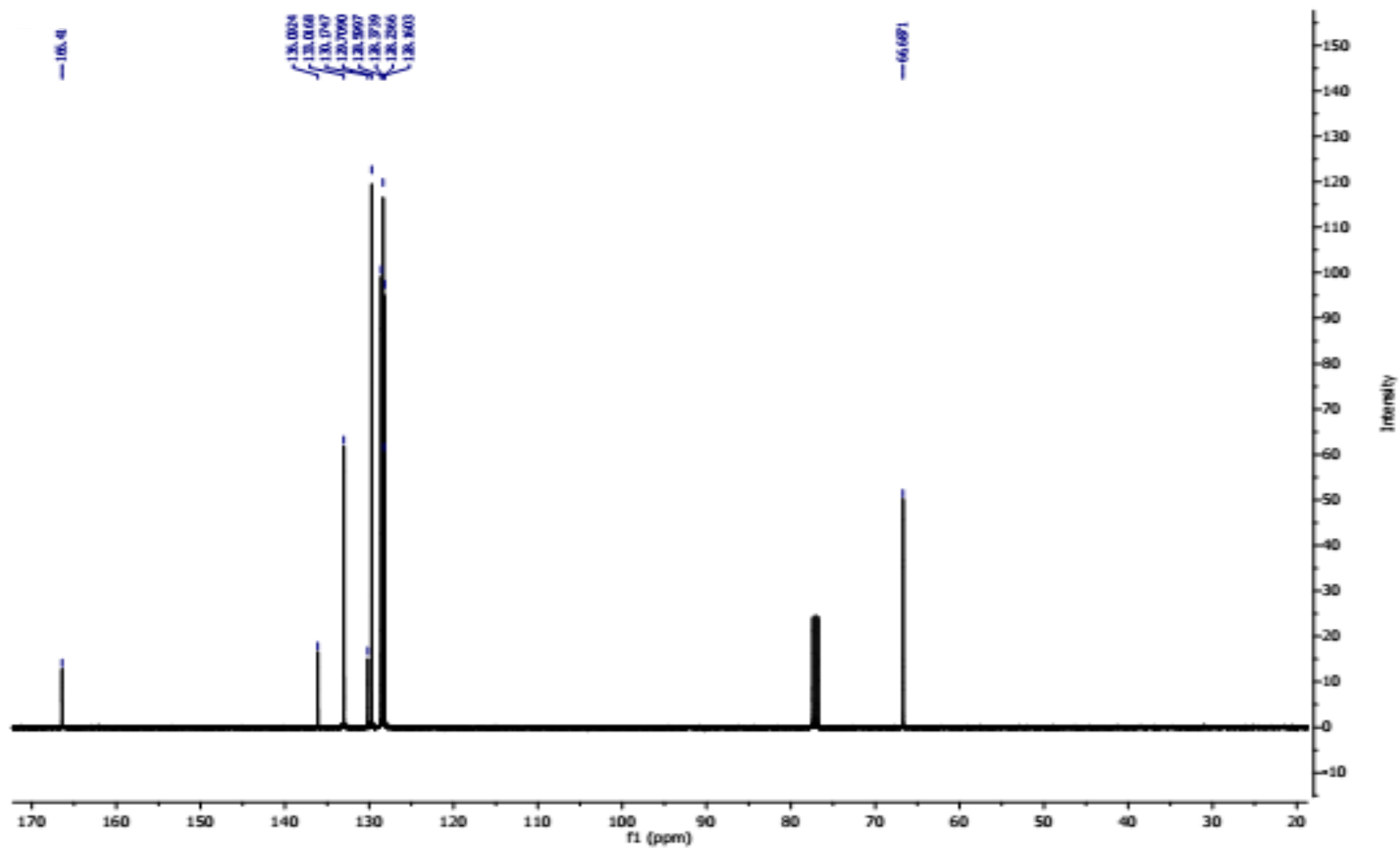
Phổ HR-FAB-MS $[M]^+$ của hợp chất PT1 (156 mg)

PHỤ LỤC 4.2

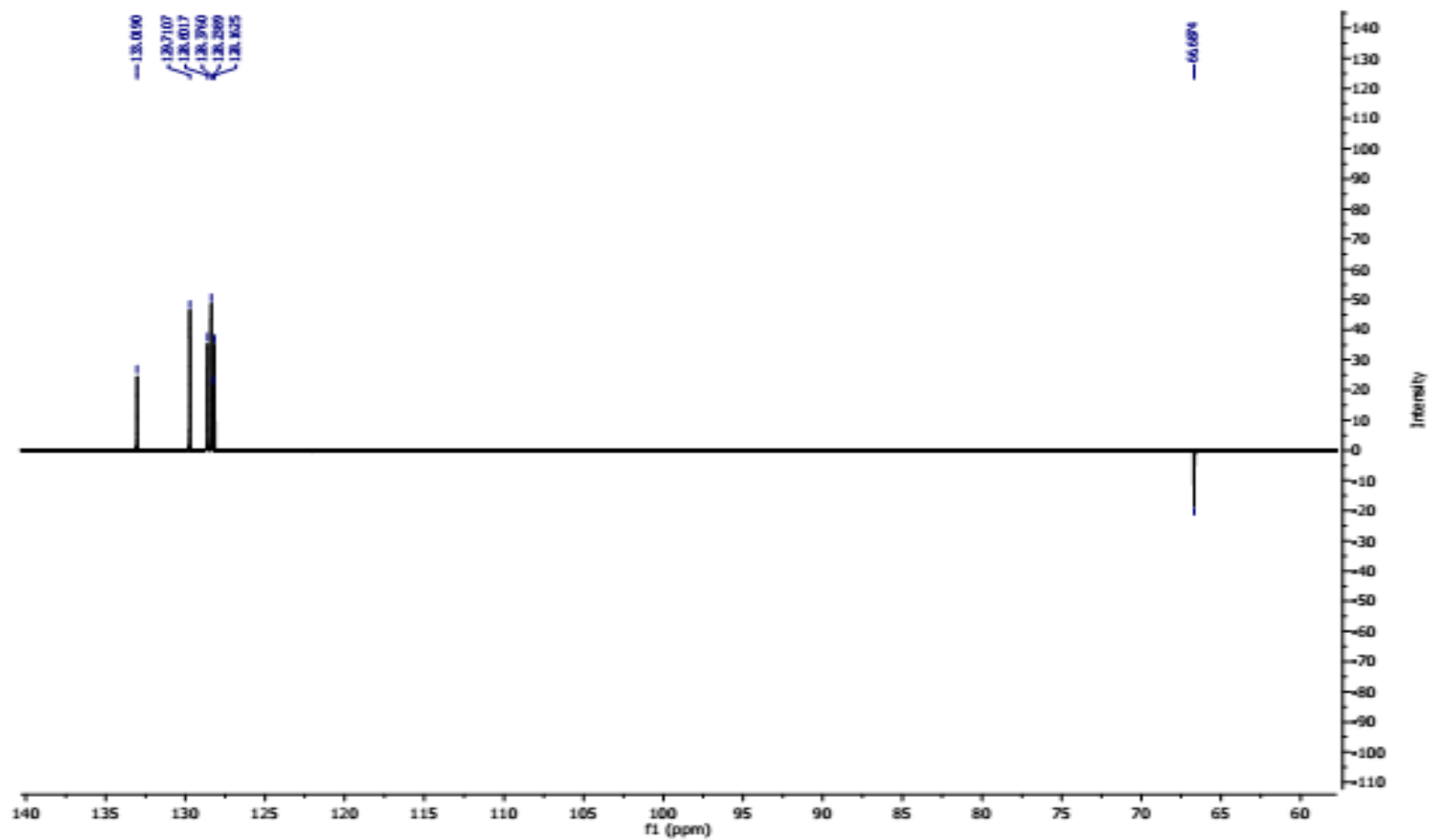
DỮ LIỆU PHỔ NMR VÀ PHỔ MS CỦA HỢP CHẤT PT2



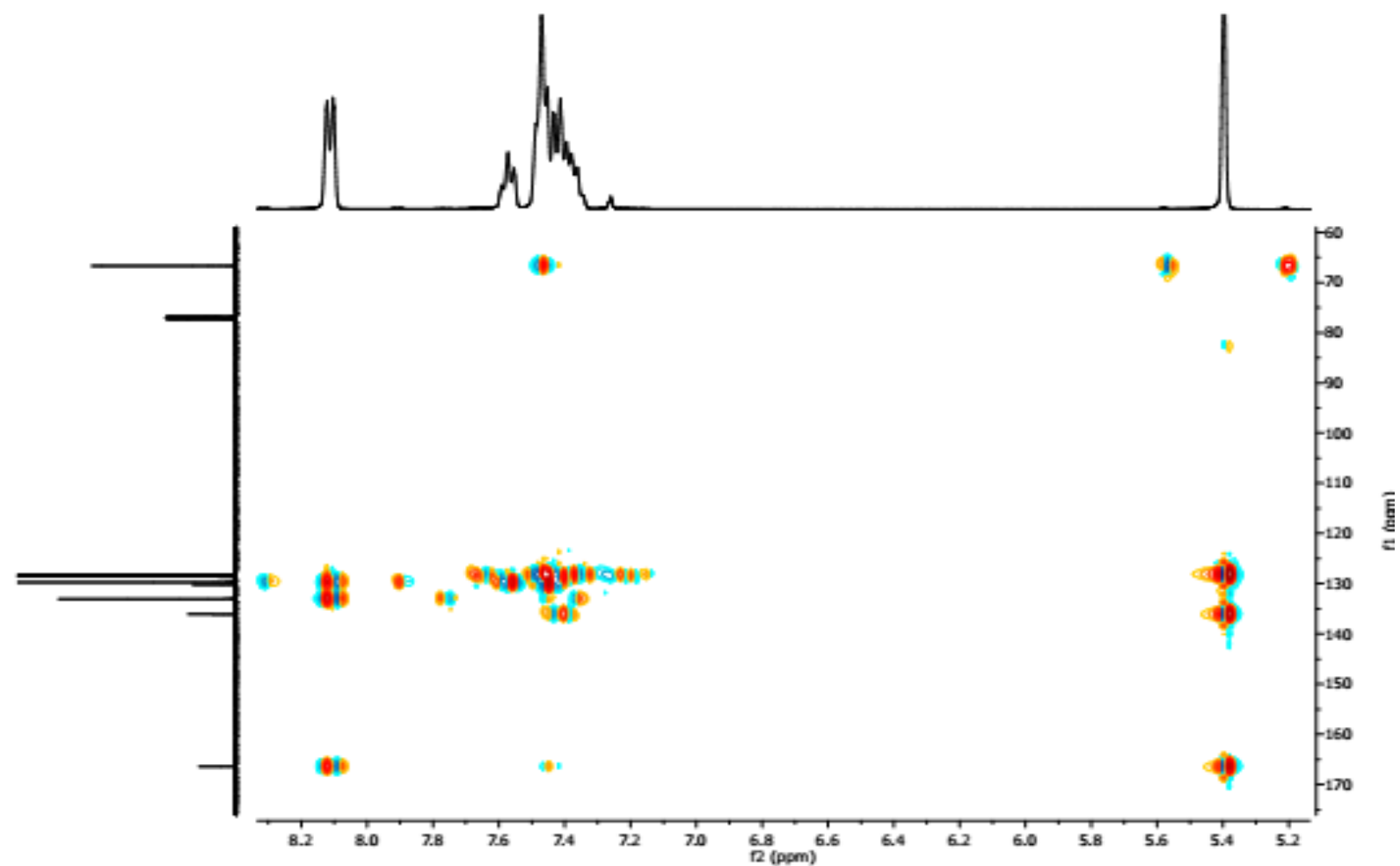
Phổ ^1H -NMR của hợp chất PT2 (50 mg) đo trong CDCl_3



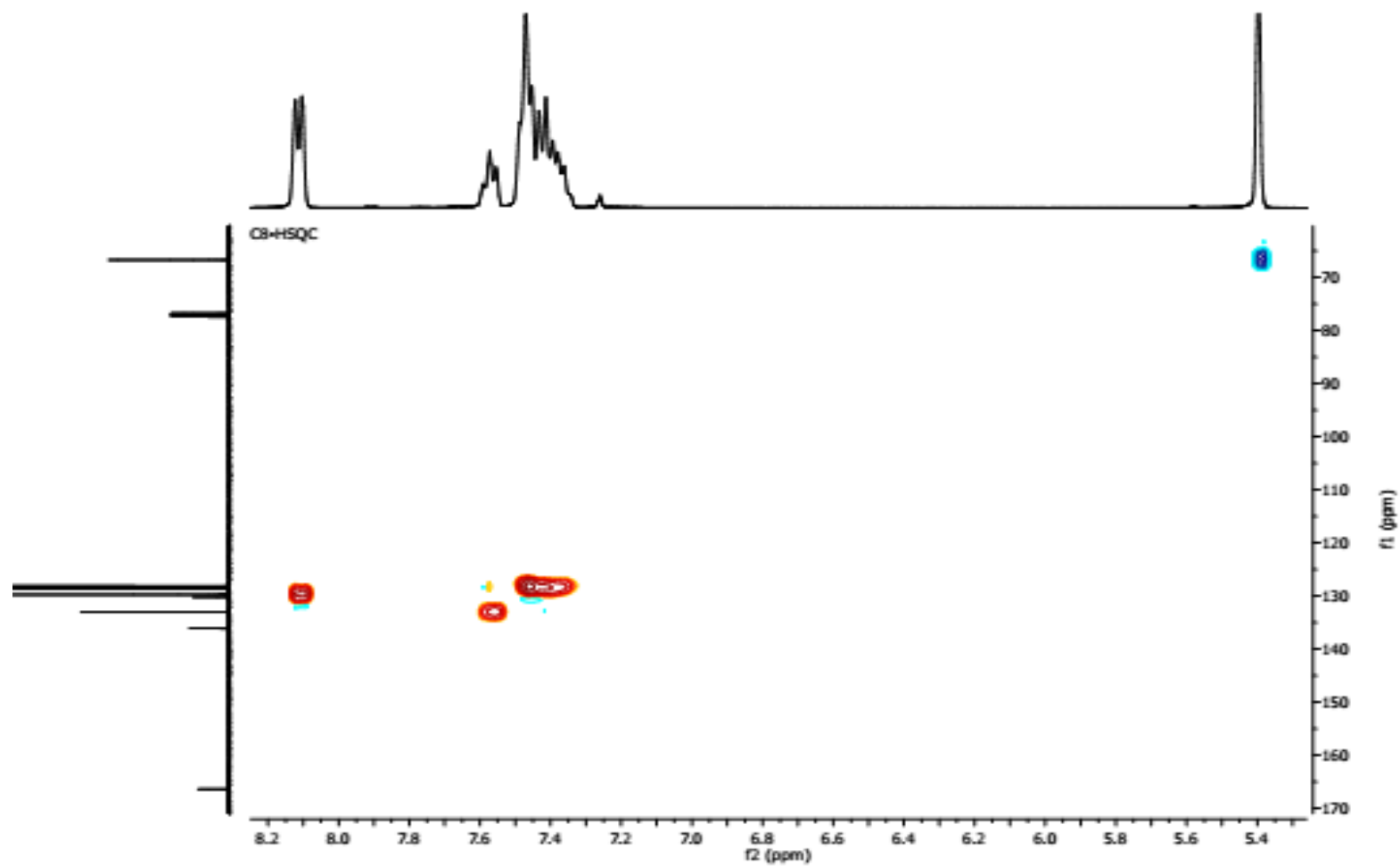
Phổ ¹³C-NMR của hợp chất PT2 (50 mg) đo trong CDCl₃



Phổ DEPT-NMR của hợp chất PT2 (50 mg) đo trong CDCl_3



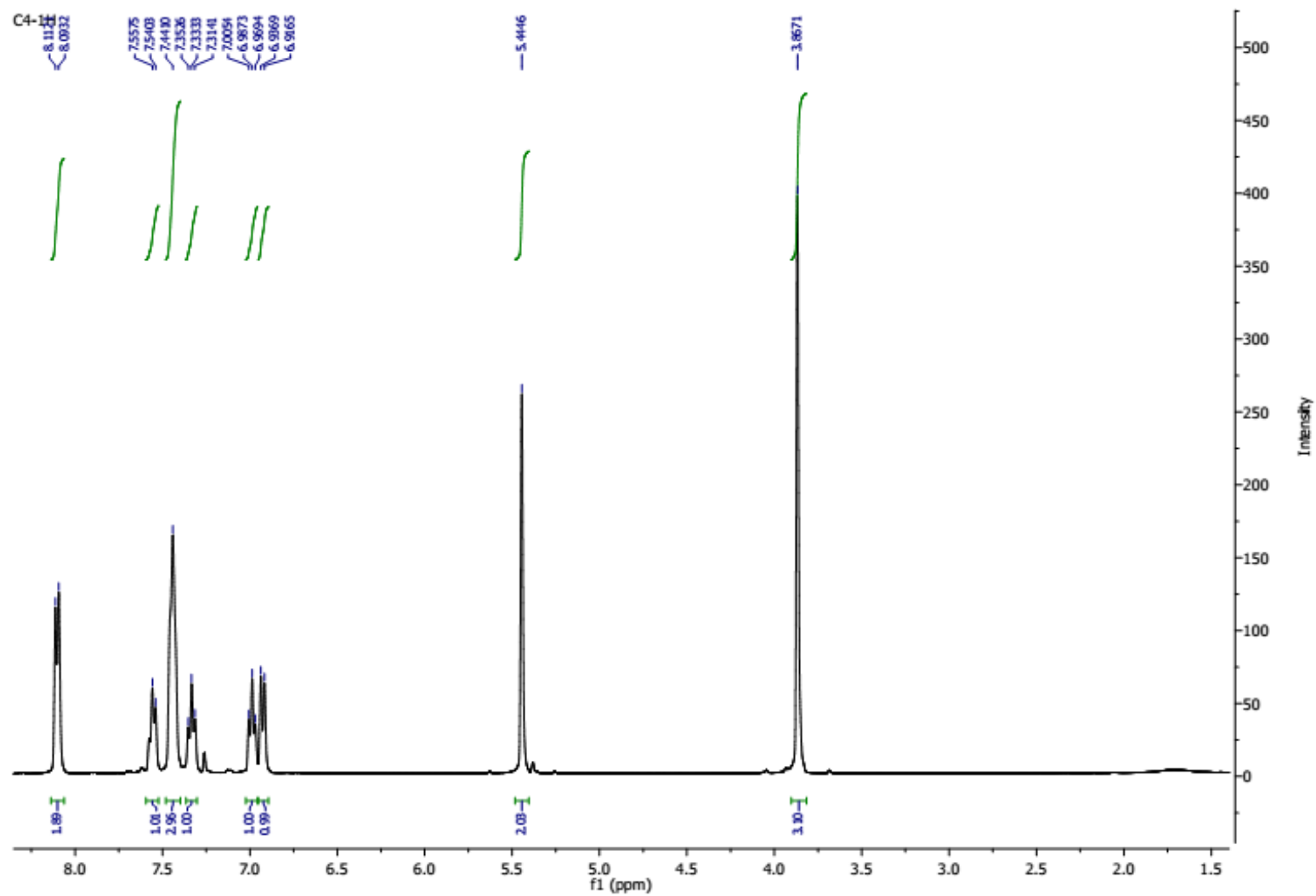
Phổ HMBC-NMR của hợp chất PT2 (50 mg) đo trong CDCl_3



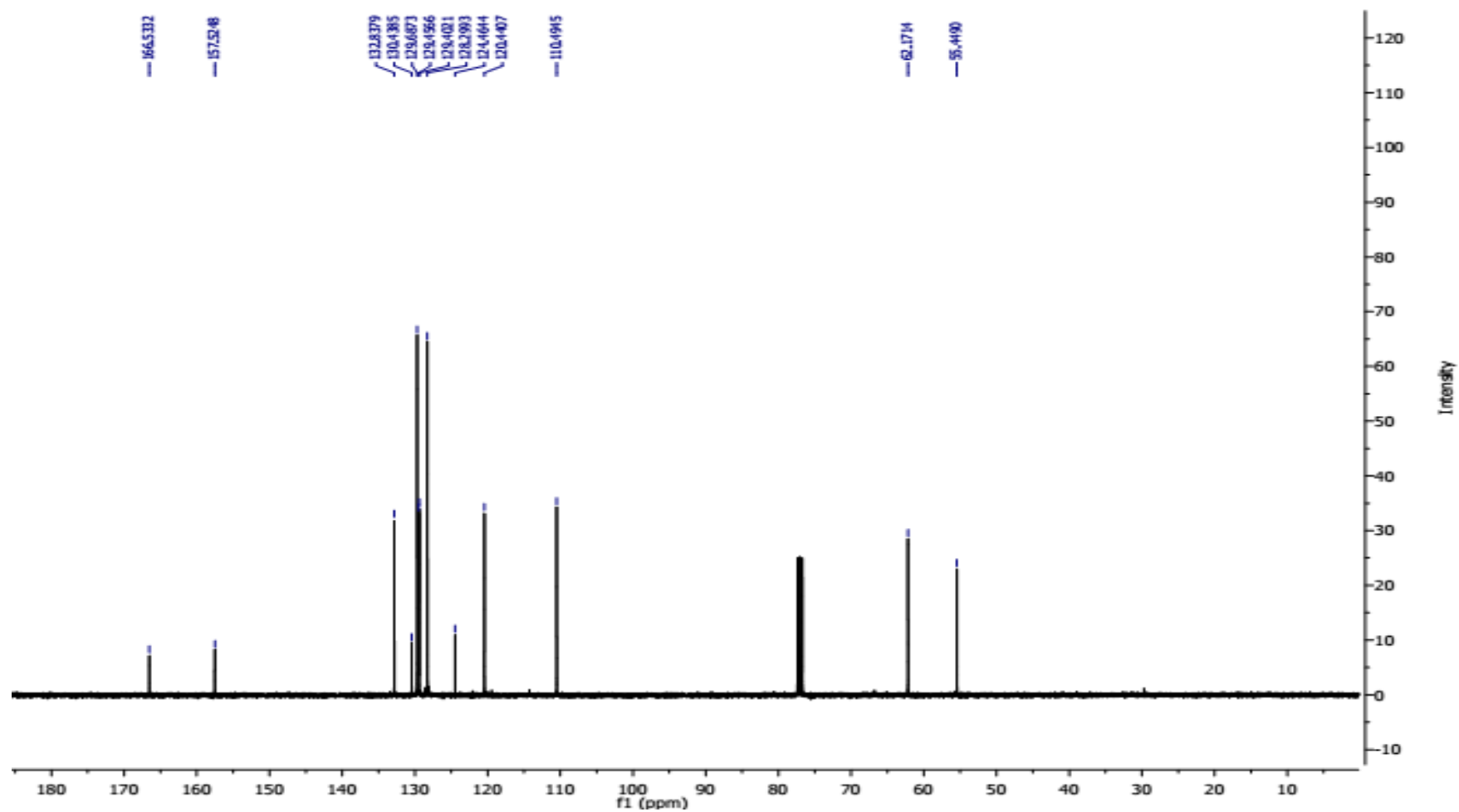
Phổ HSQC-NMR của hợp chất PT2 (50 mg) đo trong CDCl_3

PHỤ LỤC 4.3

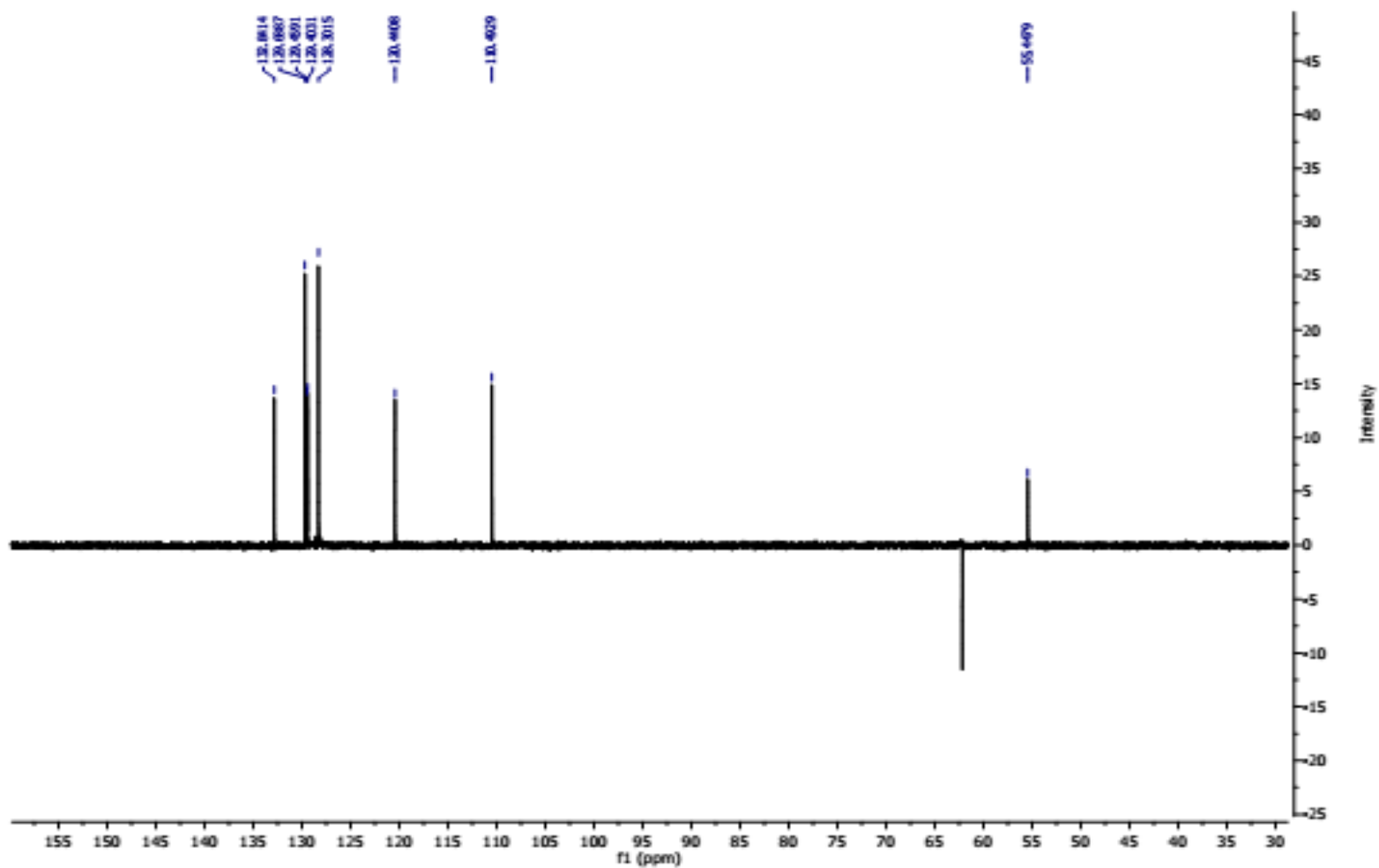
DỮ LIỆU PHỔ NMR VÀ PHỔ MS CỦA HỢP CHẤT PT3



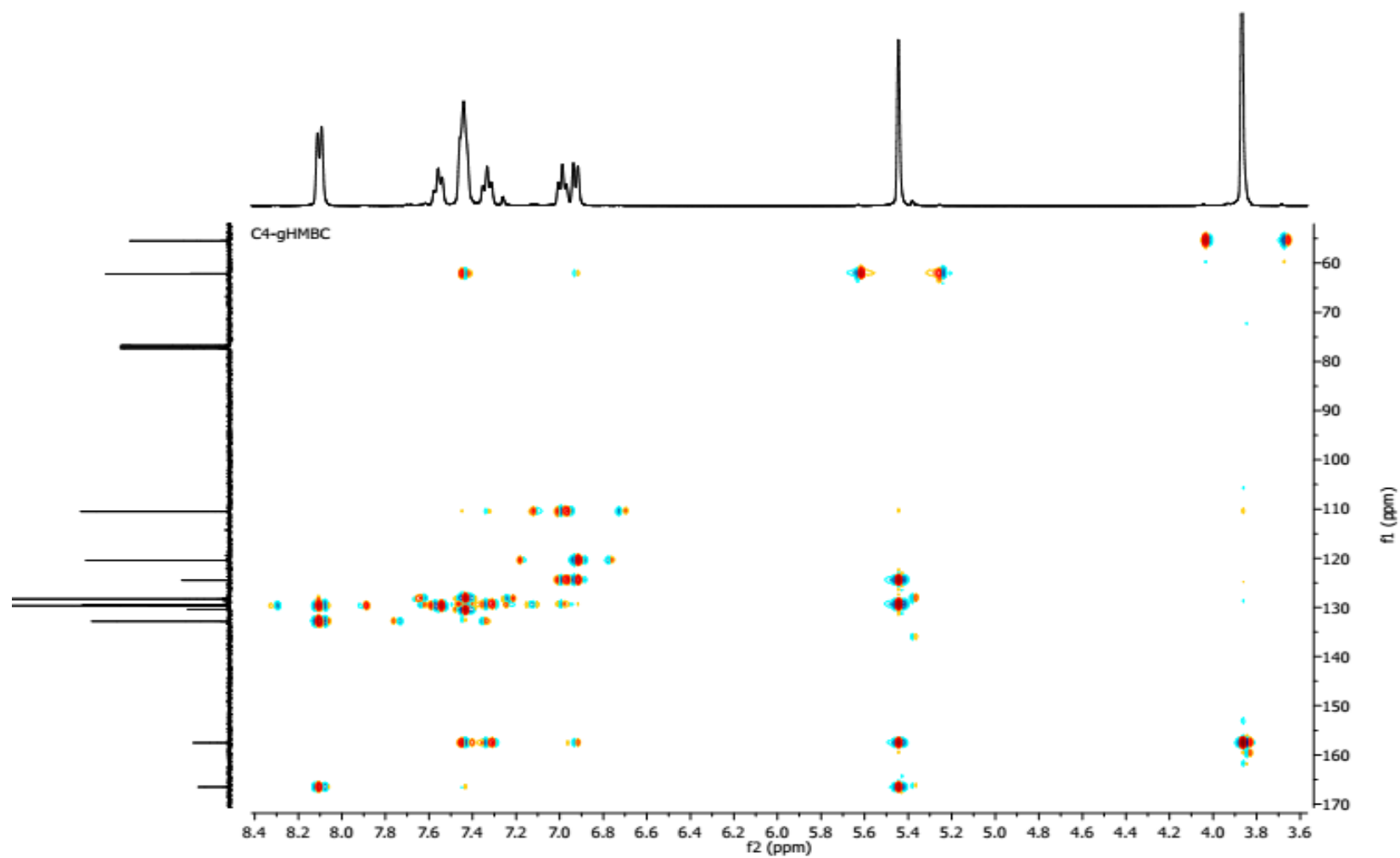
Phổ ^1H -NMR của hợp chất PT3 (49,5 mg) đo trong CDCl_3



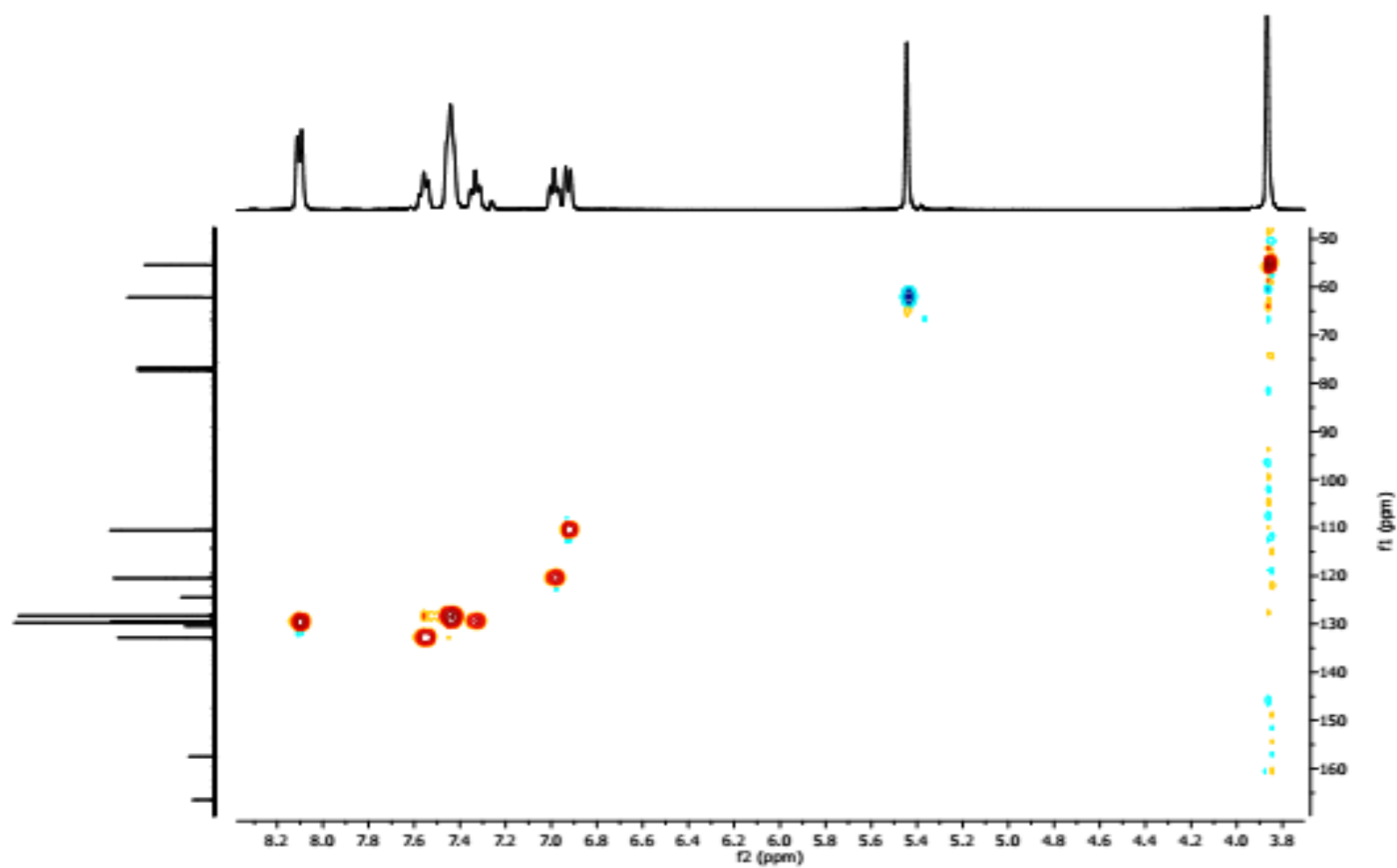
Phổ ^{13}C -NMR của hợp chất PT3 (49,5 mg) đo trong CDCl_3



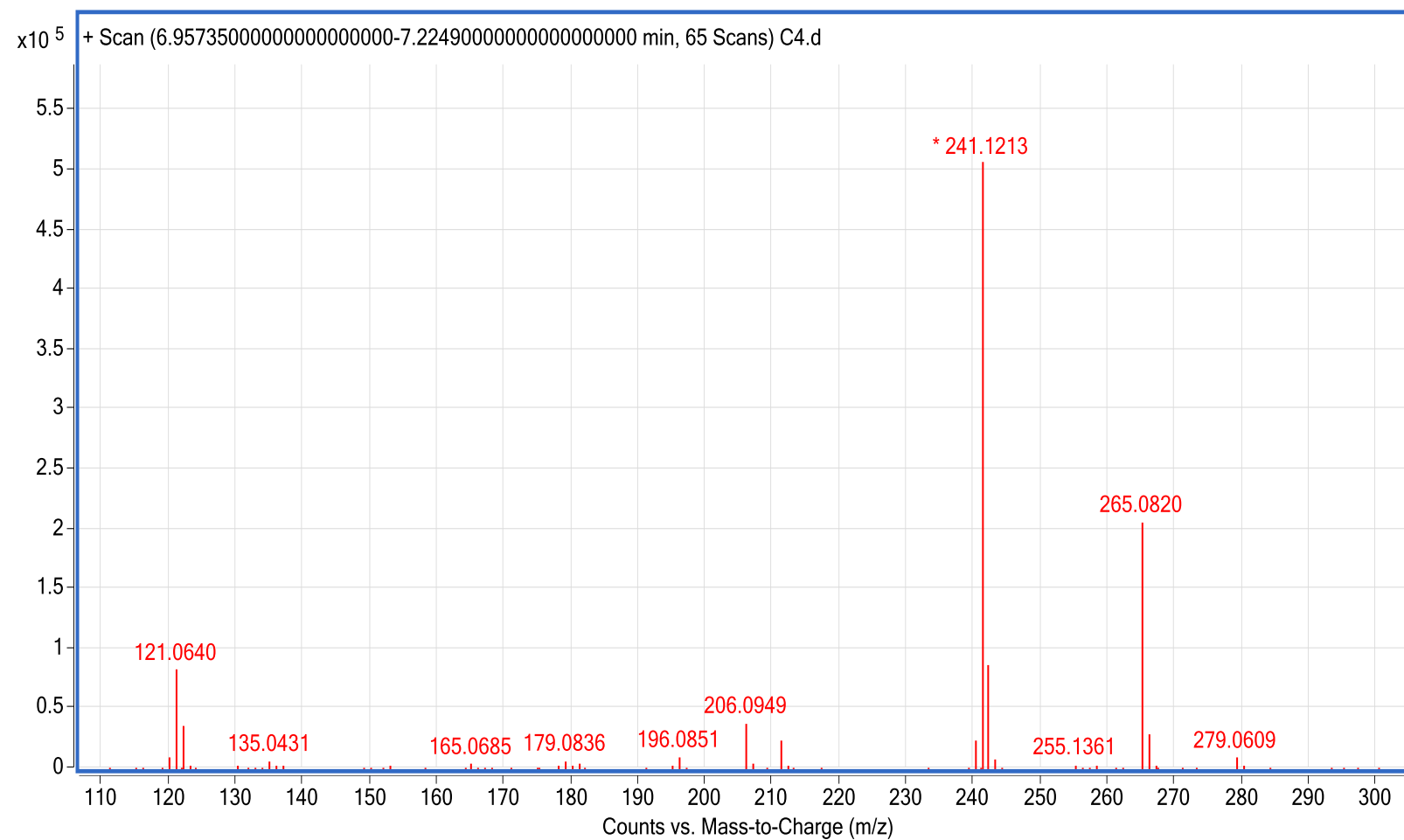
Phổ DEPT-NMR của hợp chất PT3 (49,5 mg) đo trong CDCl_3



Phổ HMBC-NMR của hợp chất PT3 (49,5 mg) đo trong CDCl_3



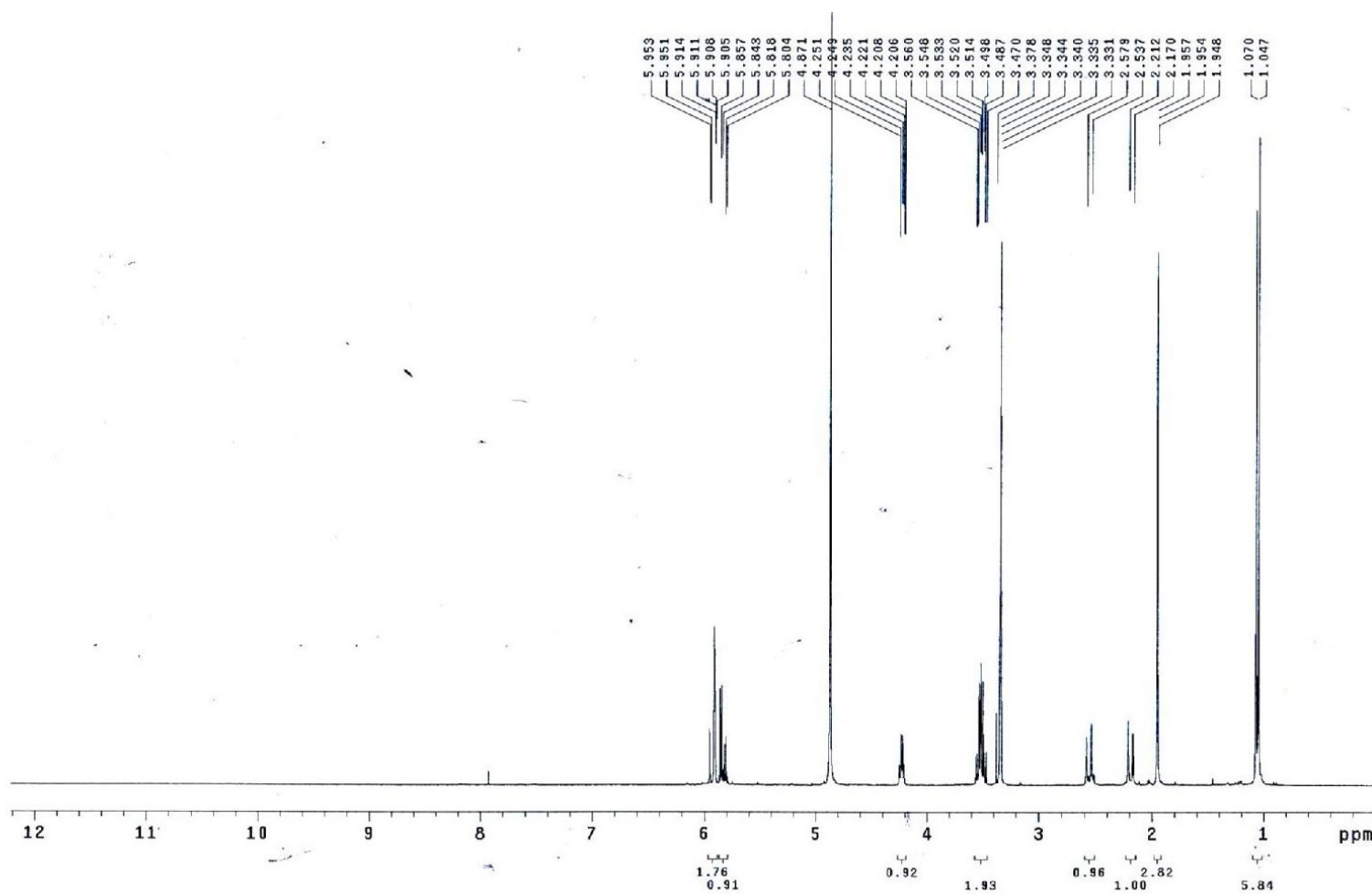
Phổ HSQC-NMR của hợp chất PT3 (49,5 mg) đo trong CDCl₃



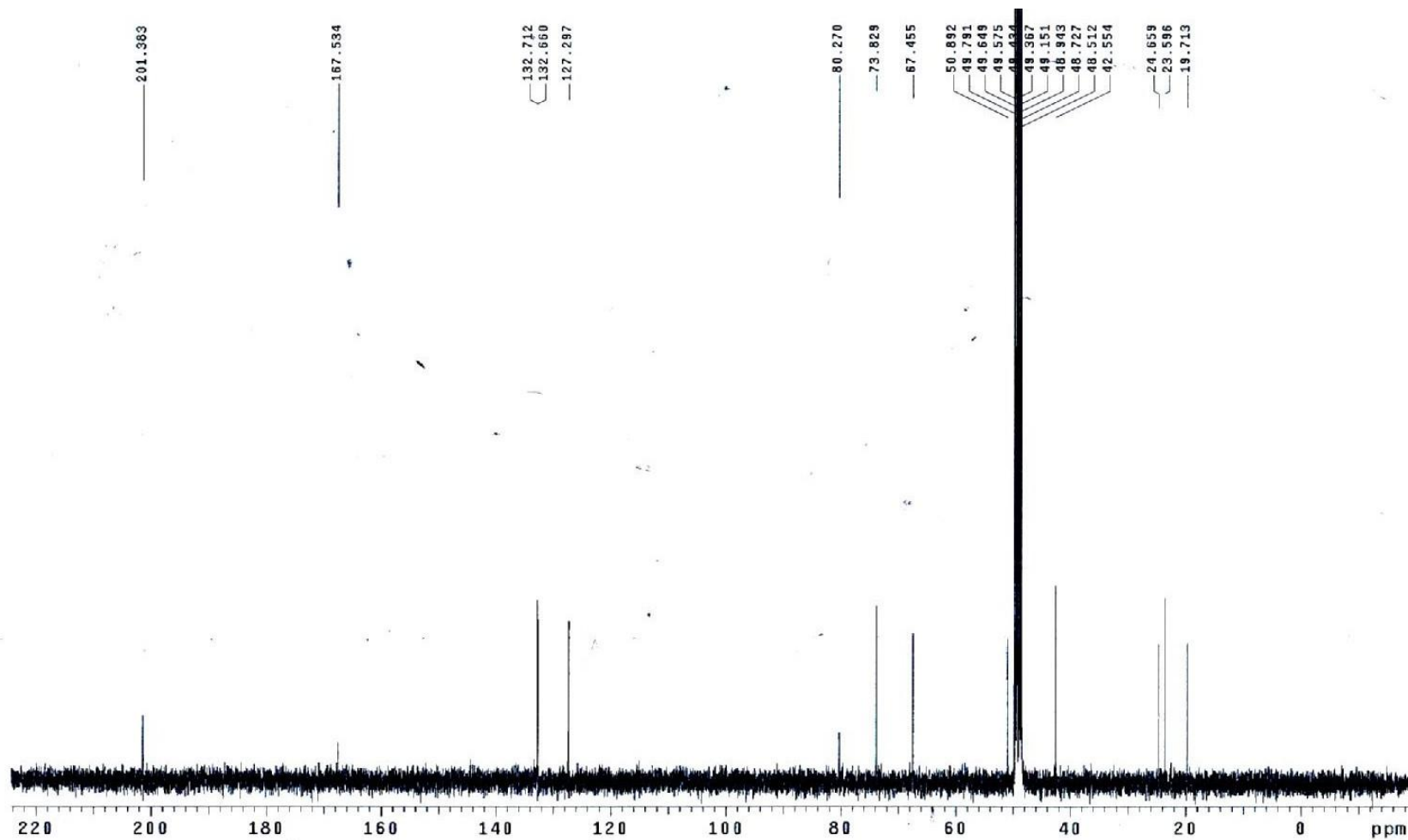
Phổ HR-ESI-MS $[M+Na]^+$ của hợp chất PT3 (49,5 mg)

PHỤ LỤC 4.4

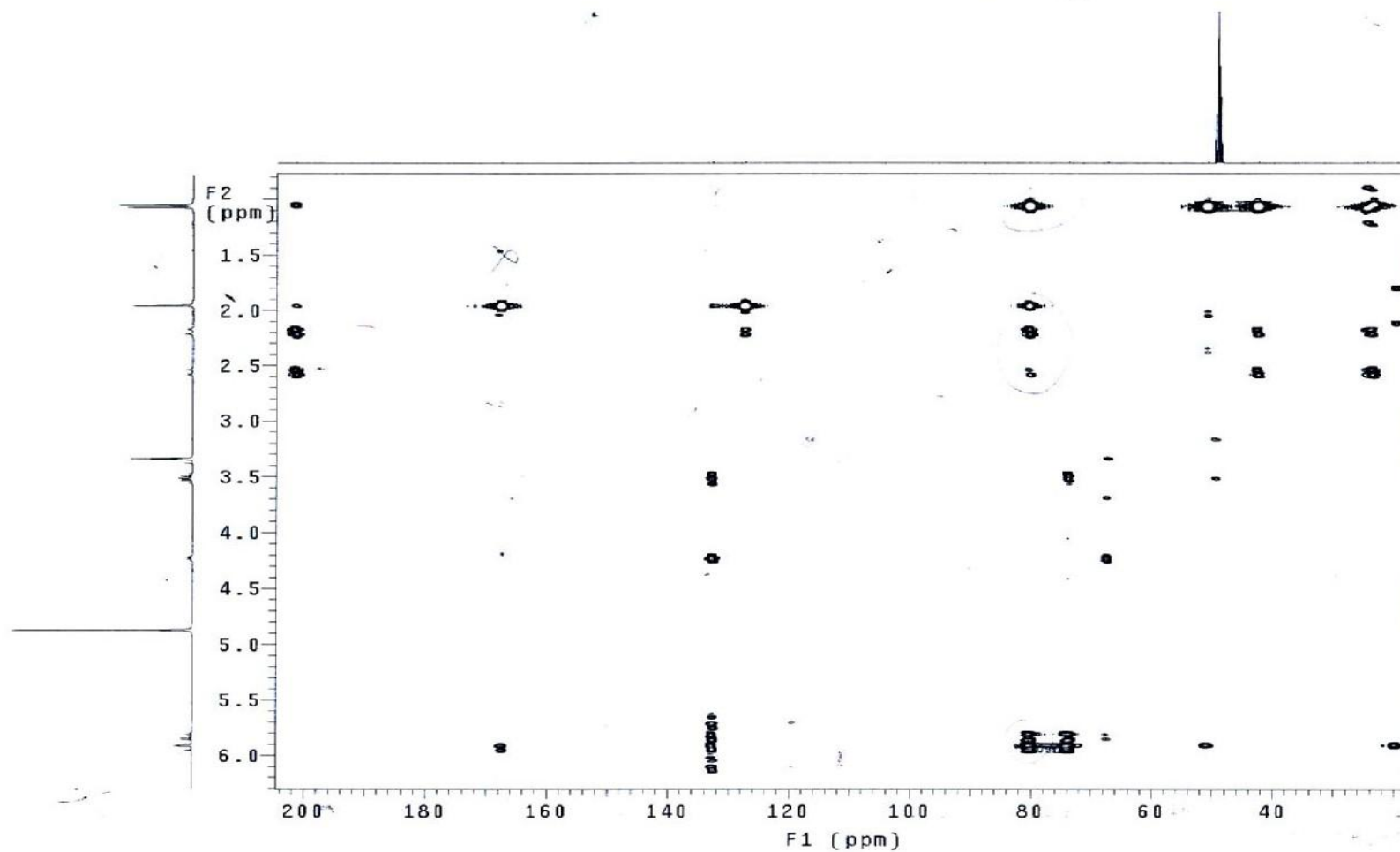
DỮ LIỆU PHỔ NMR VÀ PHỔ MS CỦA HỢP CHẤT PT4



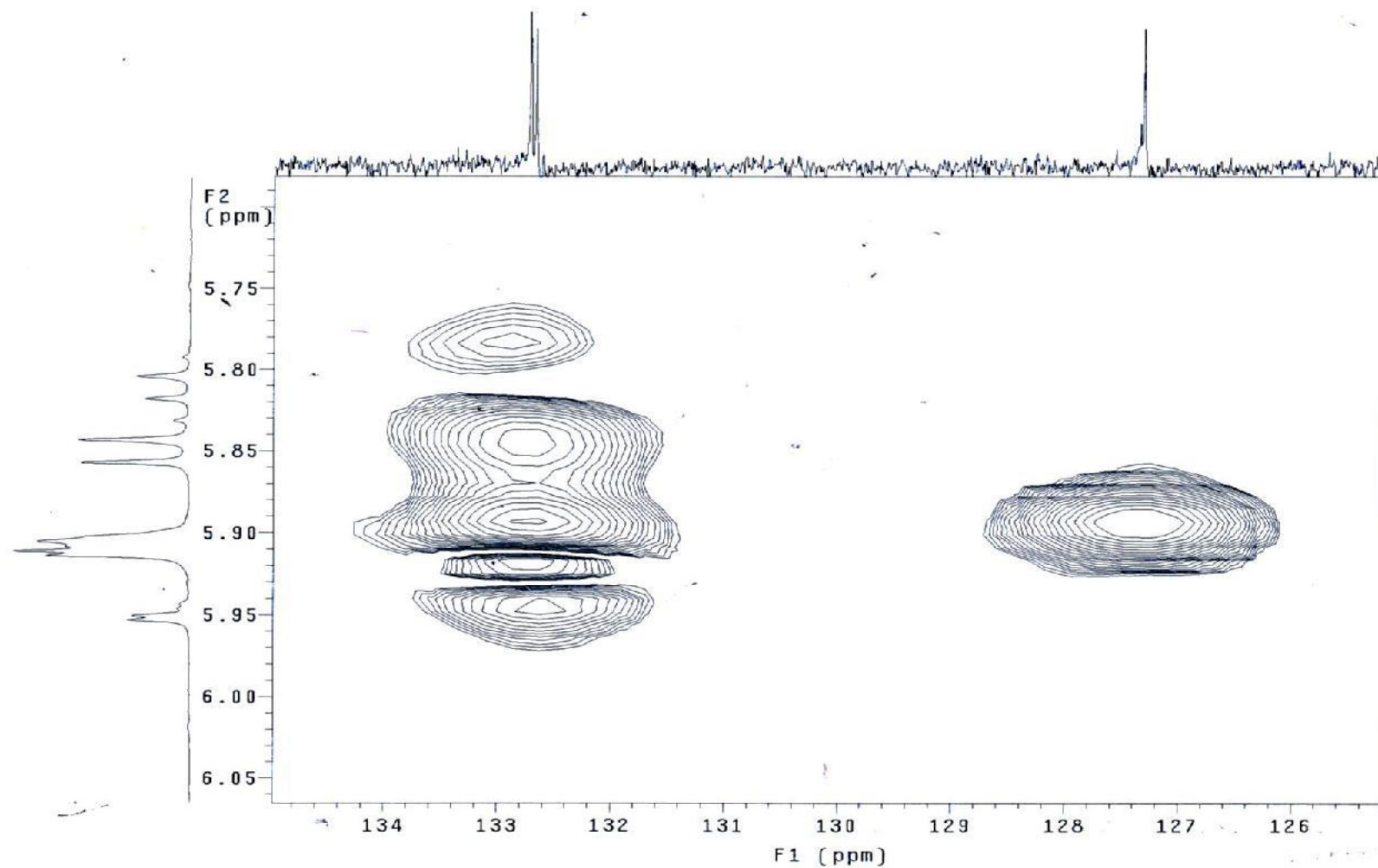
Phổ ^1H -NMR của hợp chất PT4 (14,9 mg) đo trong CD_3OD



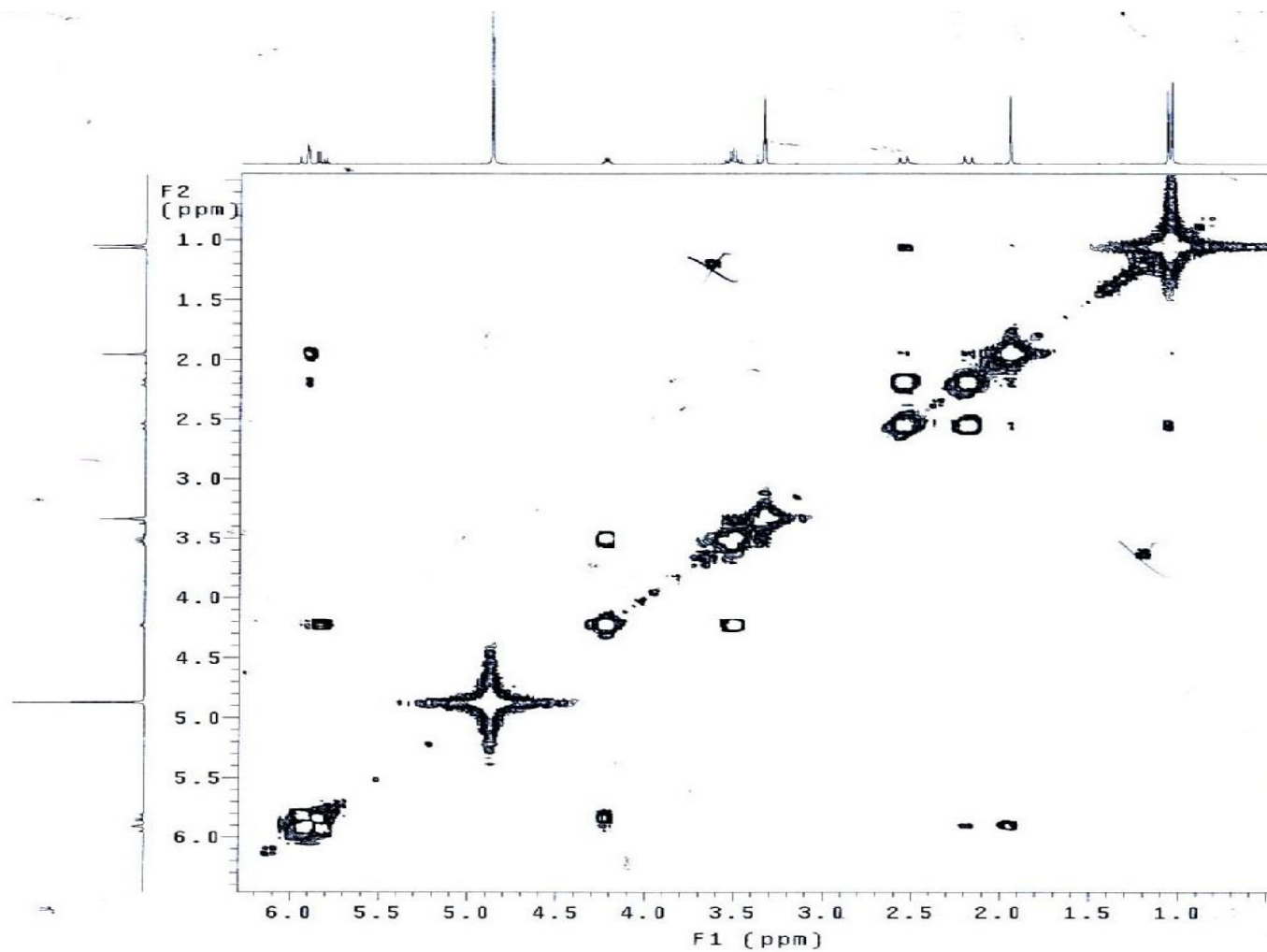
Phổ ^{13}C -NMR của hợp chất PT4 (14,9 mg) đo trong CD_3OD



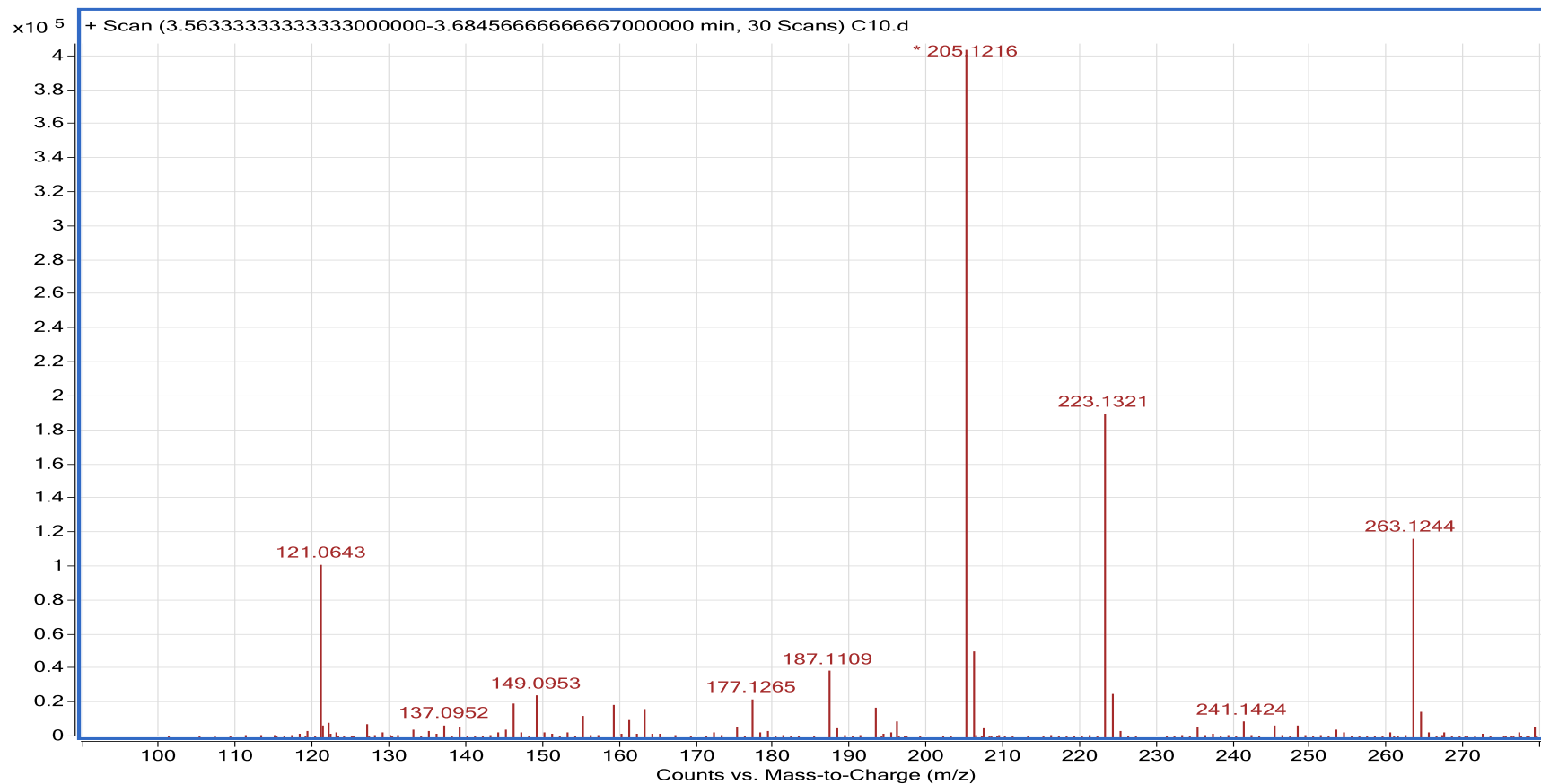
Phổ HMBC-NMR của hợp chất PT4 (14,9 mg) đo trong CD_3OD



Phổ HSQC-NMR của hợp chất PT4 (14,9 mg) đo trong CD₃OD



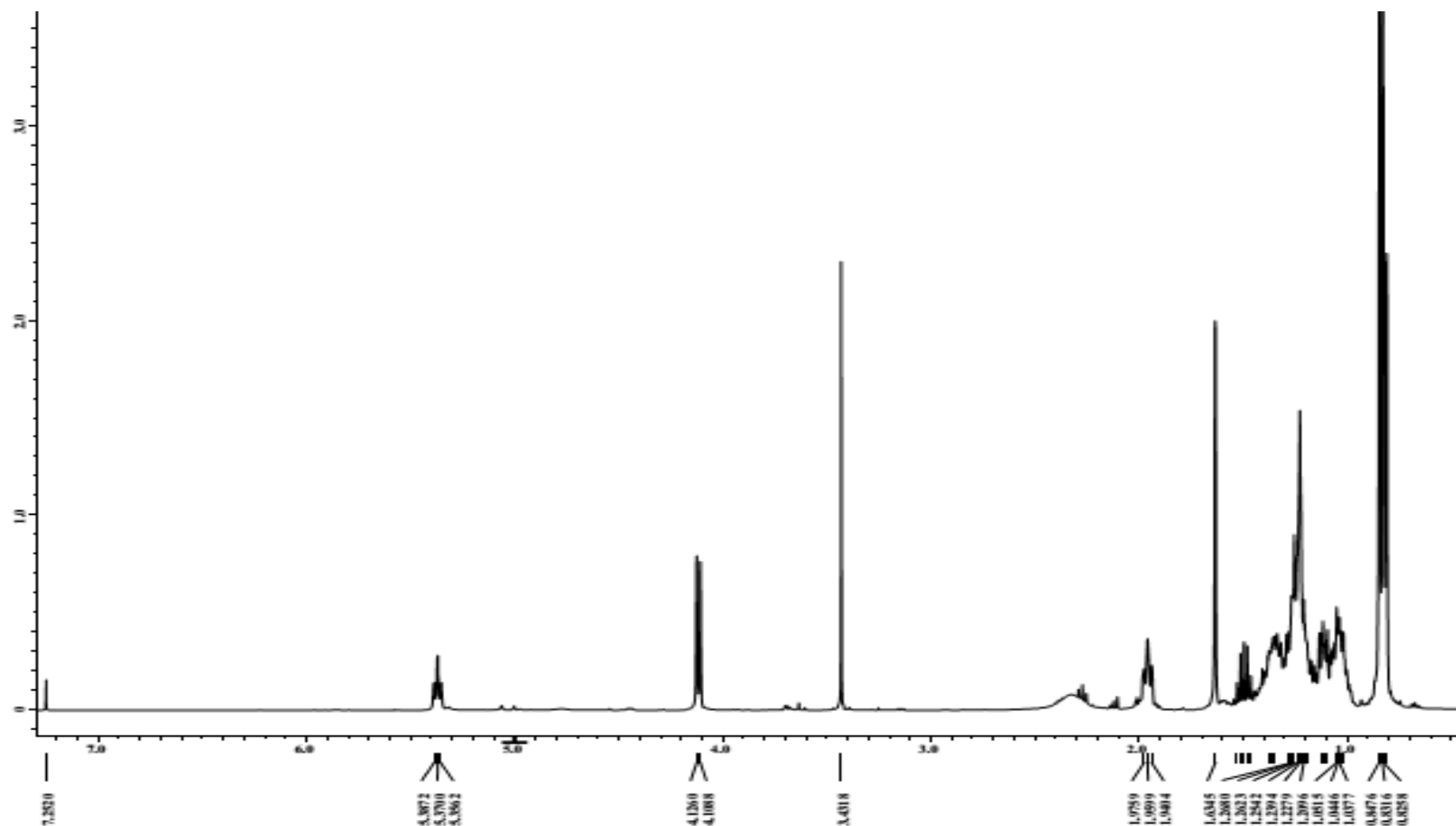
Phổ COSY-NMR của hợp chất PT4 (14,9 mg) đo trong CD₃OD



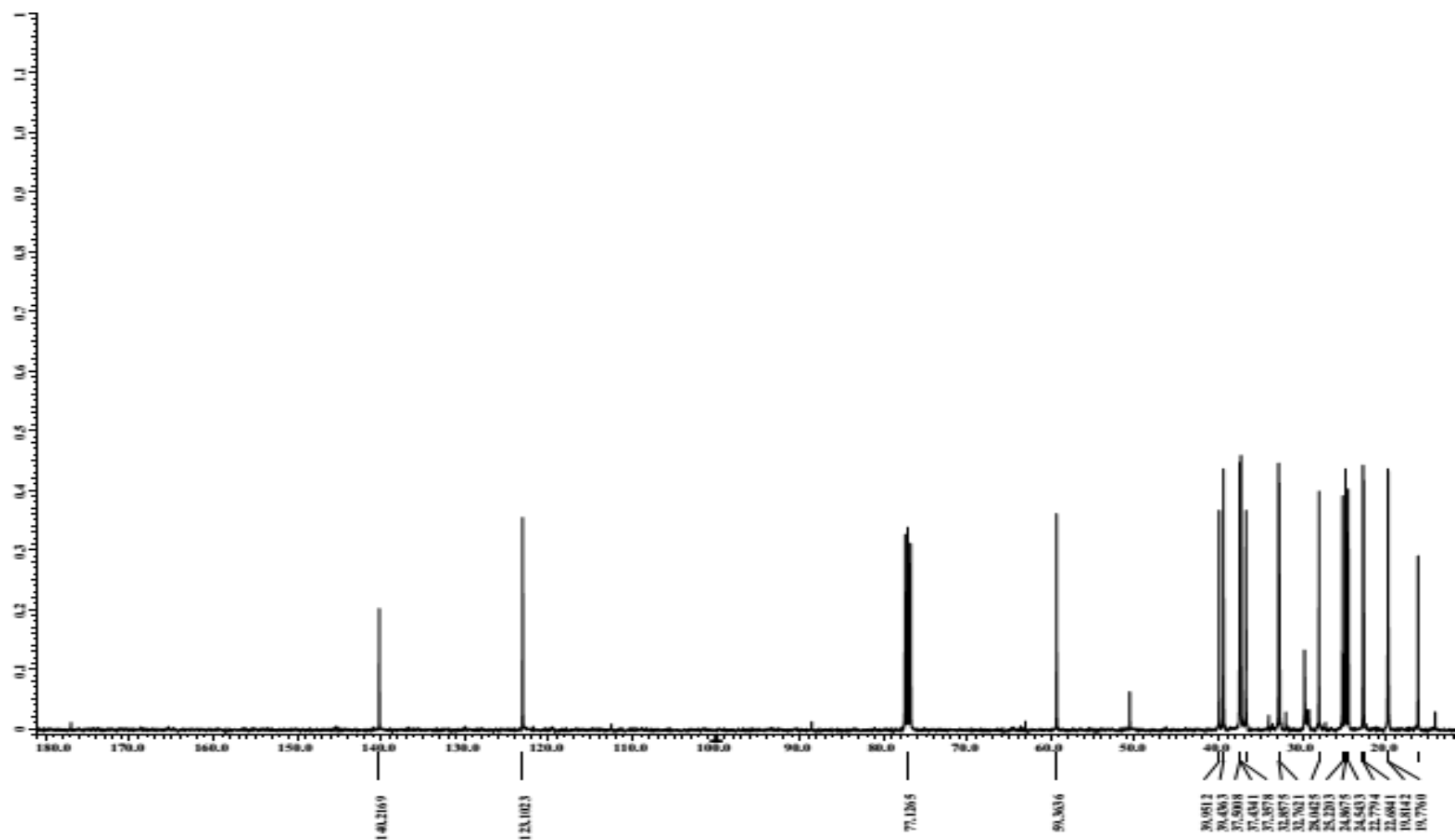
Phổ HR-ESI-MS $[M+Na]^+$ của hợp chất PT4 (14,9 mg)

PHỤ LỤC 4.5

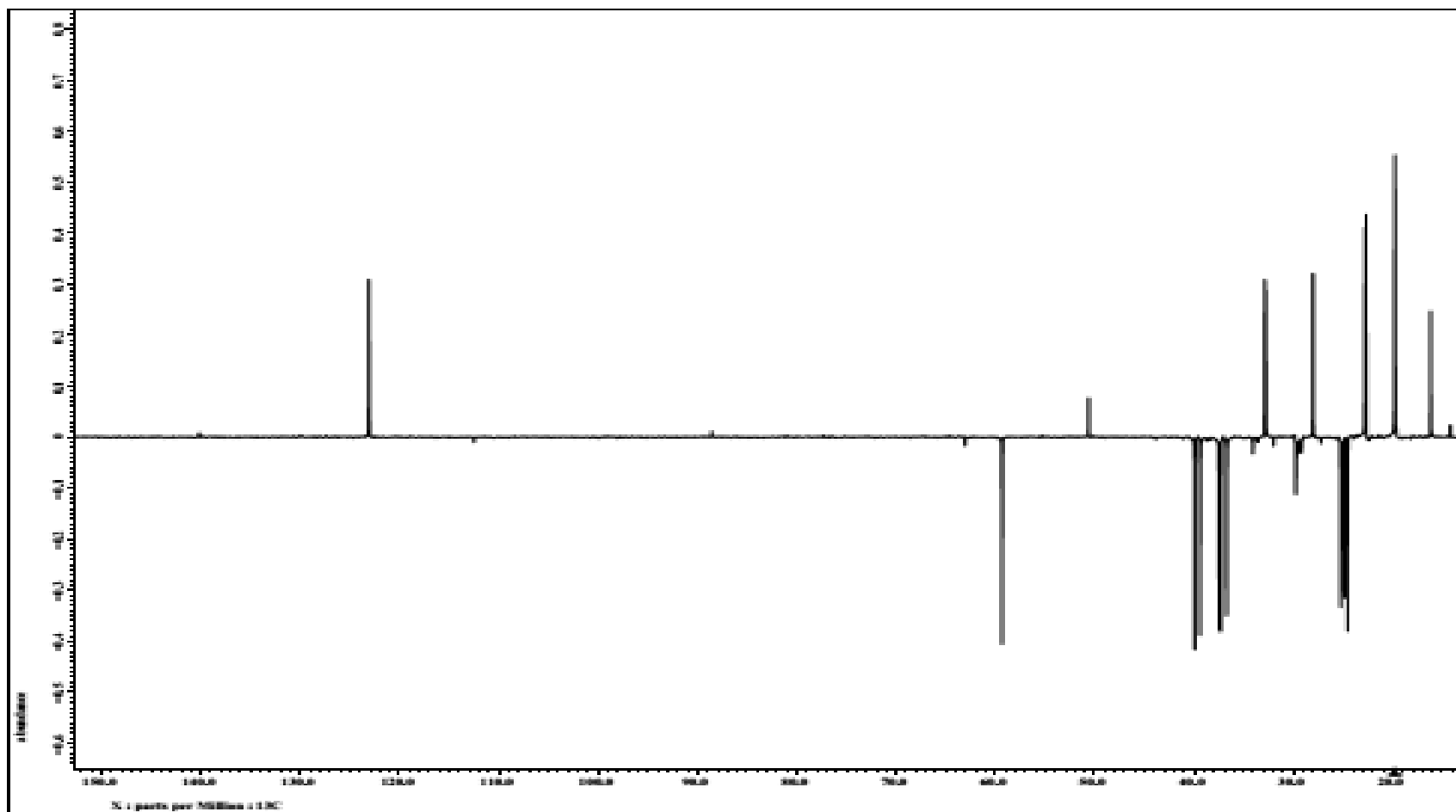
DỮ LIỆU PHỔ NMR VÀ PHỔ MS CỦA HỢP CHẤT PT5



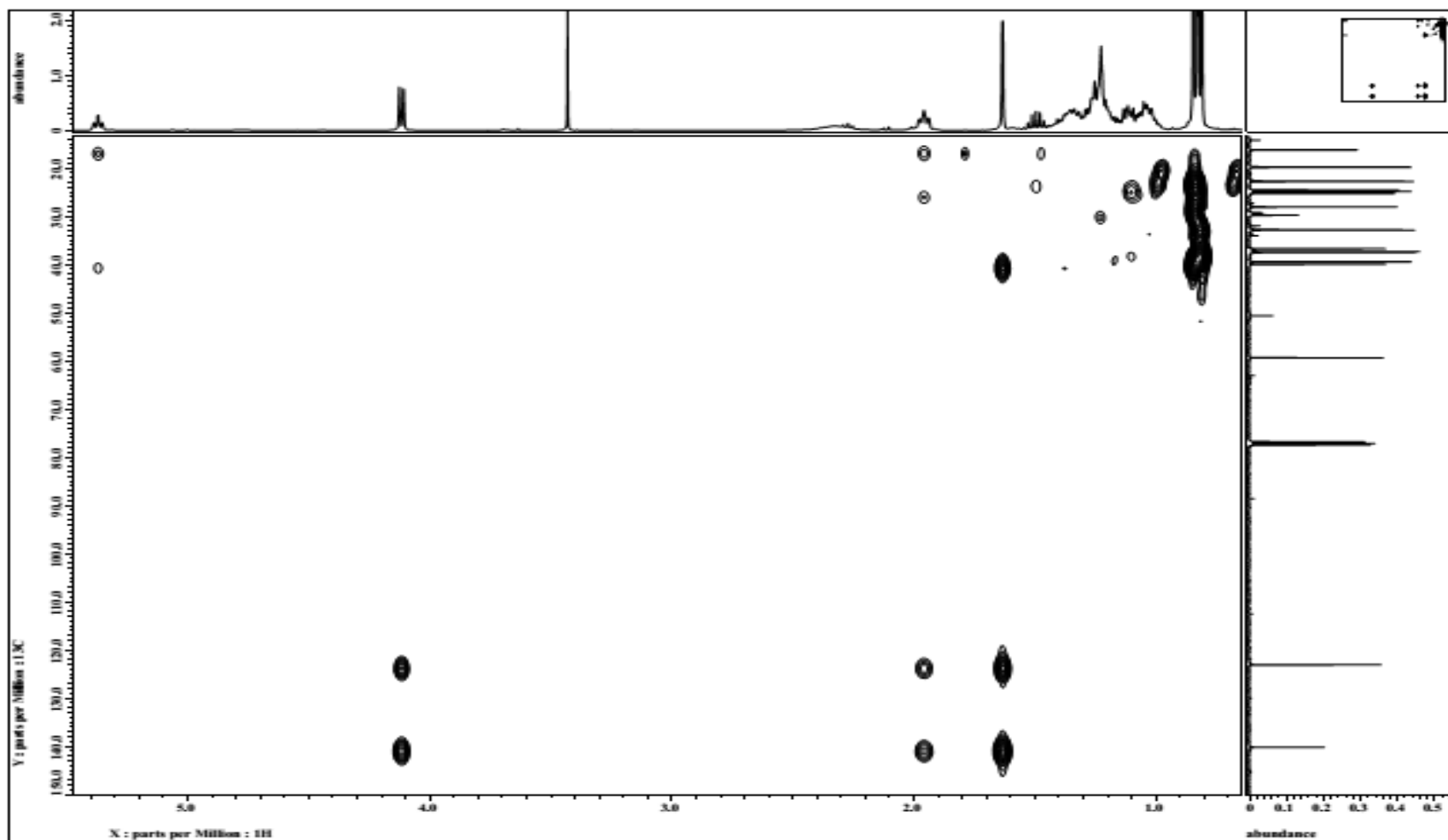
Phổ ^1H -NMR của hợp chất PT5 (20 mg) đo trong CDCl_3



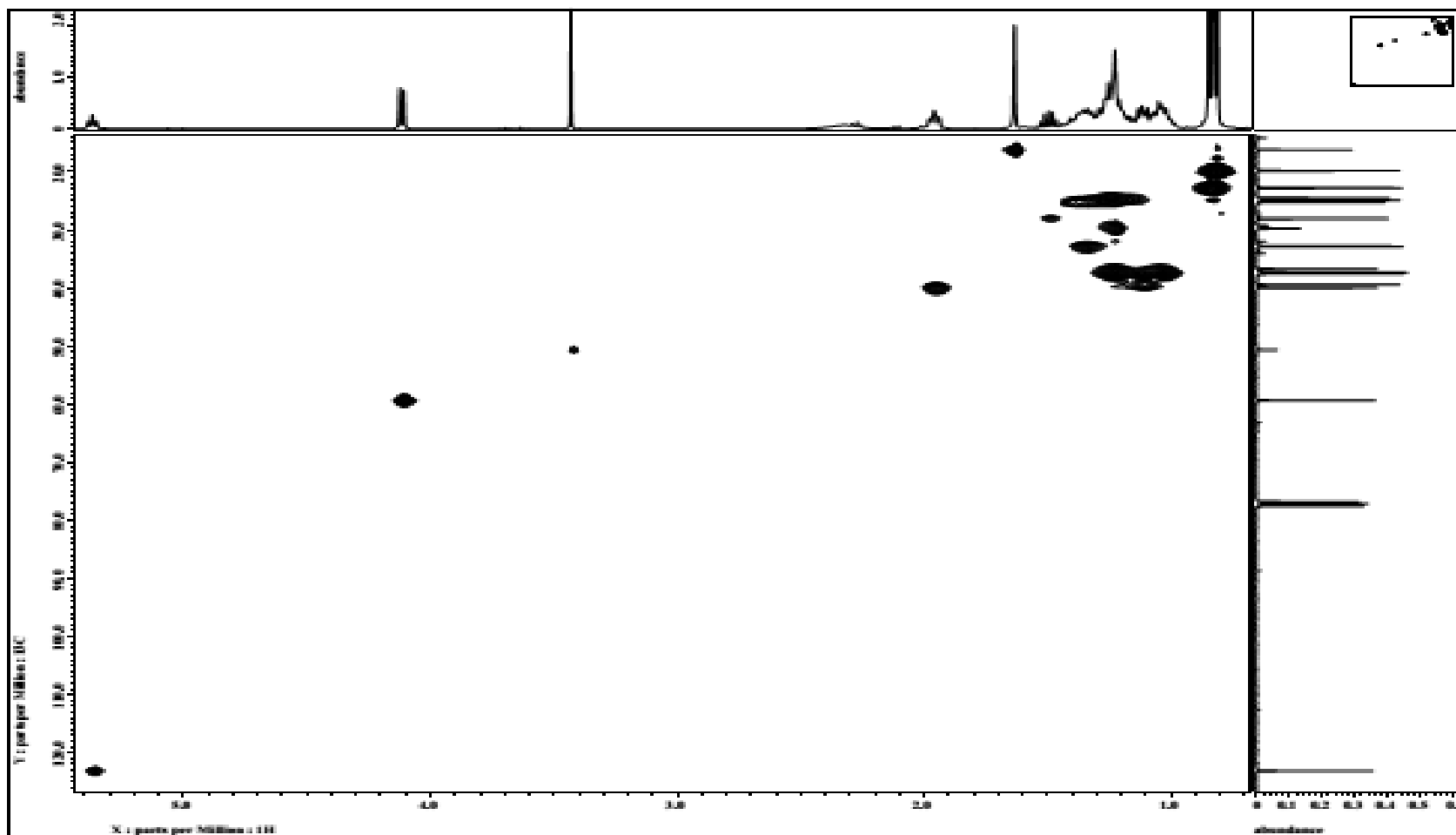
Phổ ^{13}C -NMR của hợp chất PT5 (20 mg) đo trong CDCl_3



Phổ DEPT-NMR của hợp chất PT5 (20 mg) đo trong CDCl_3



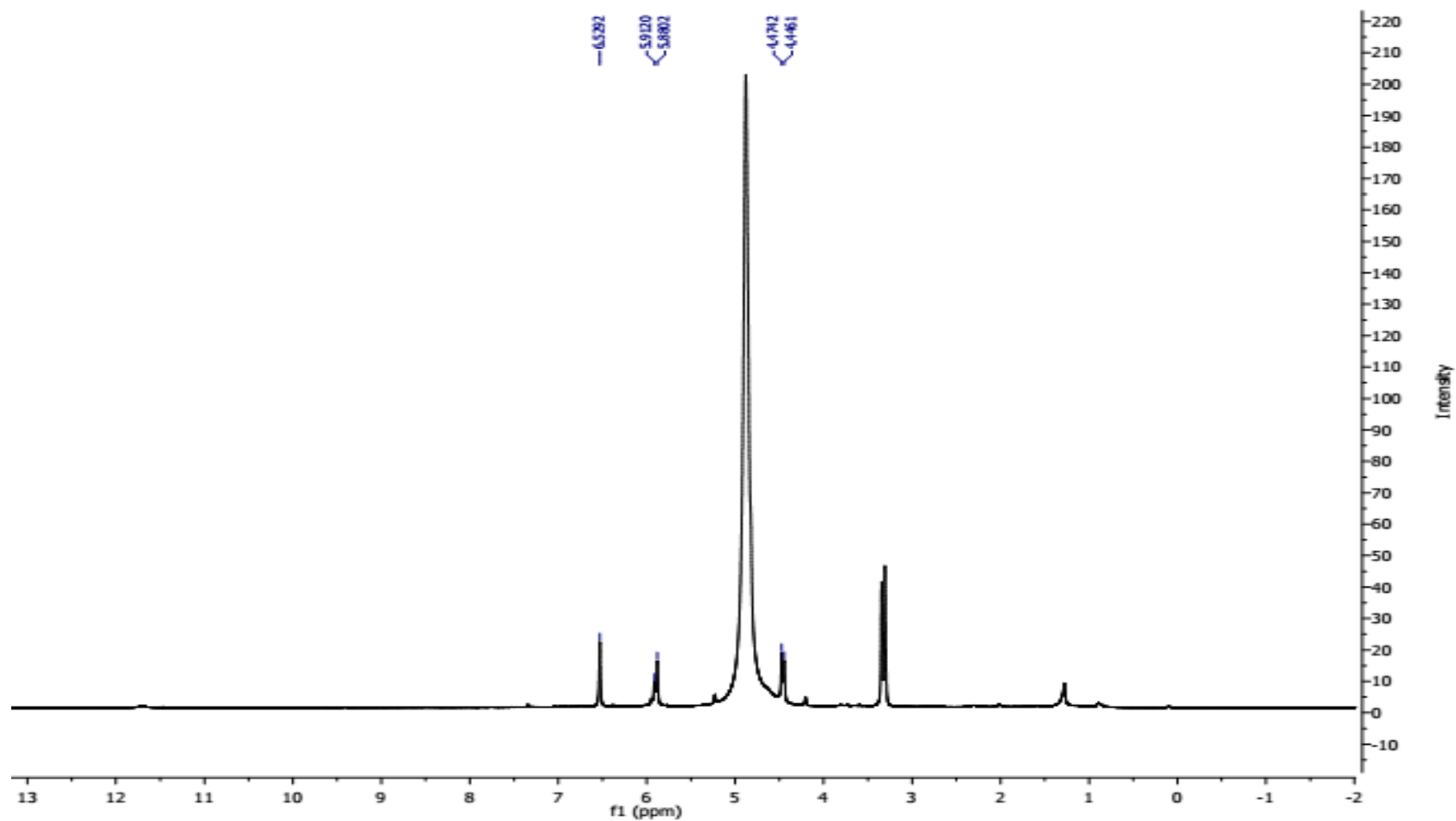
Phổ HMBC-NMR của hợp chất PT5 (20 mg) đo trong CDCl_3



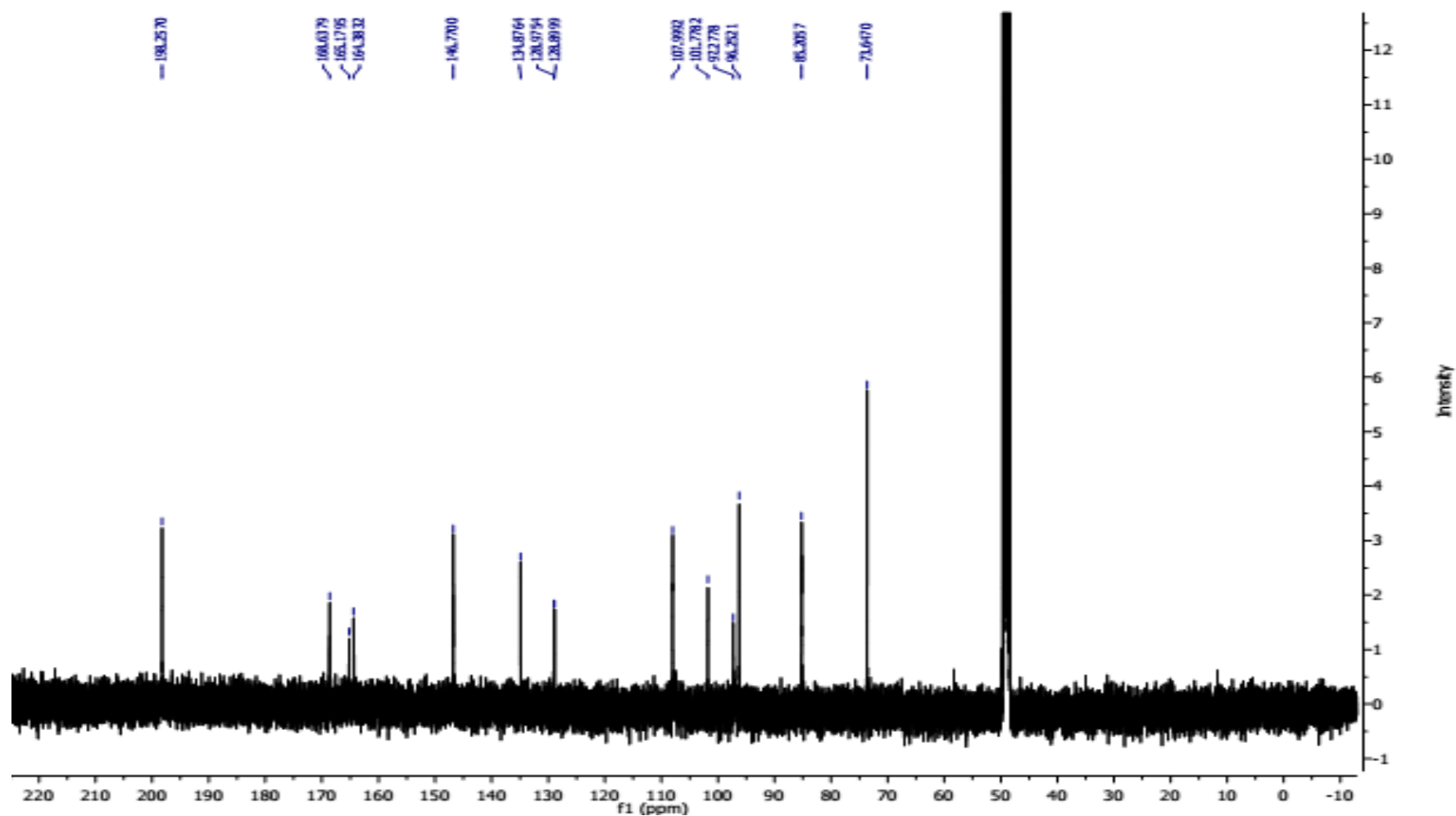
Phổ HSQC-NMR của hợp chất PT5 (20 mg) đo trong CDCl_3

PHỤ LỤC 4.6

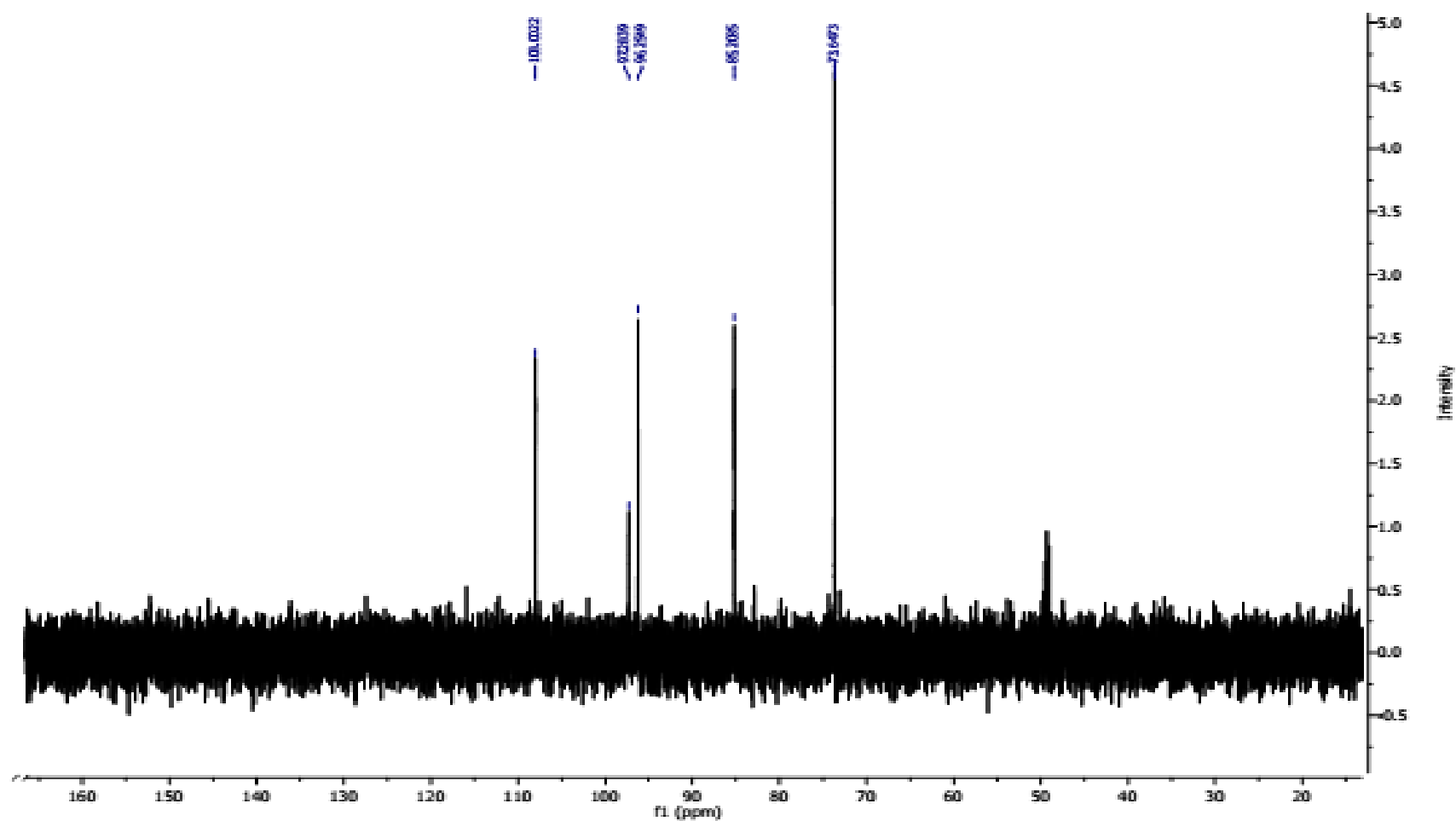
DỮ LIỆU PHỔ NMR VÀ PHỔ MS CỦA HỢP CHẤT PT6



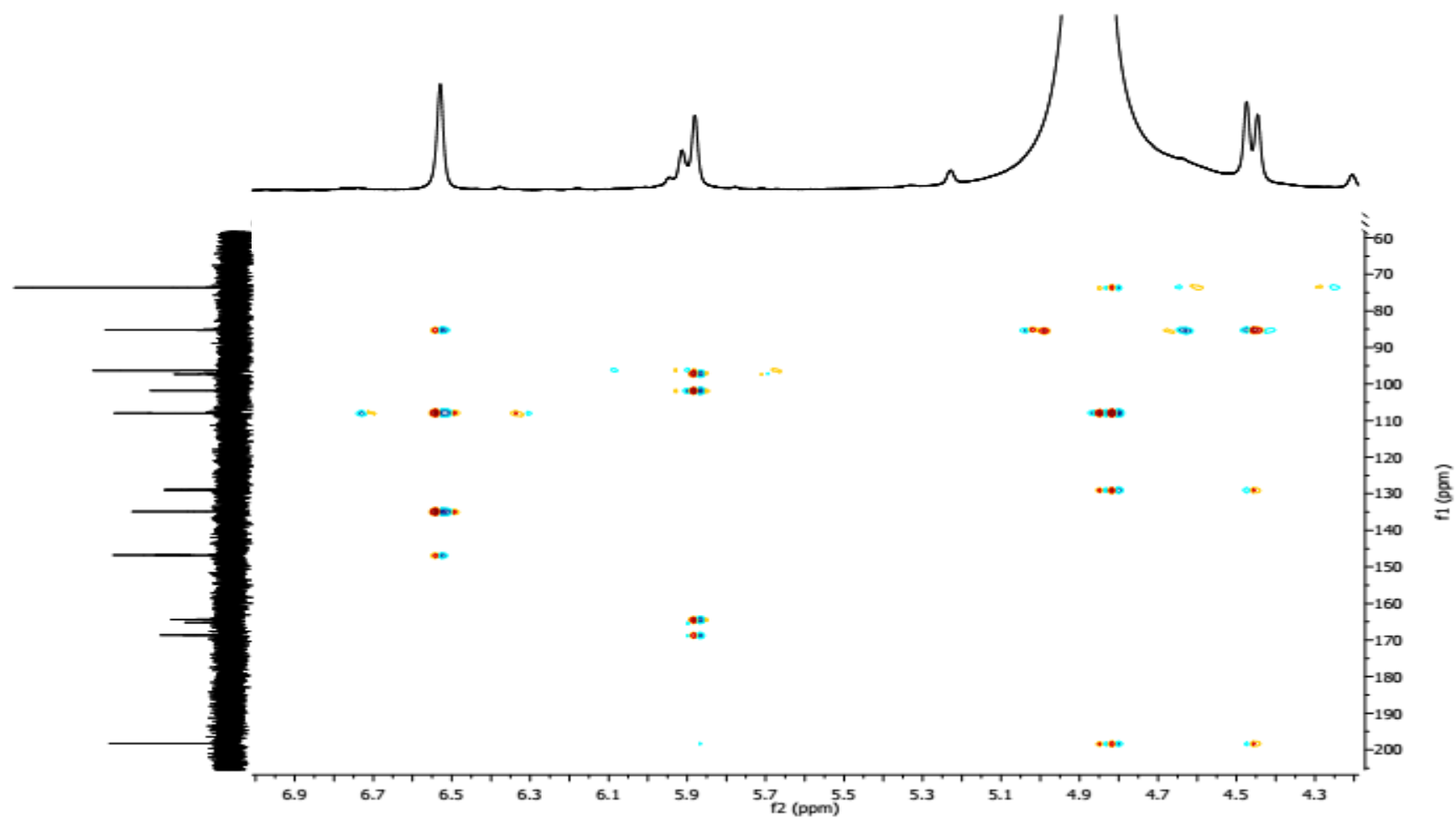
Phổ ^1H -NMR của hợp chất PT6 (20,3 mg) đo trong CD_3OD



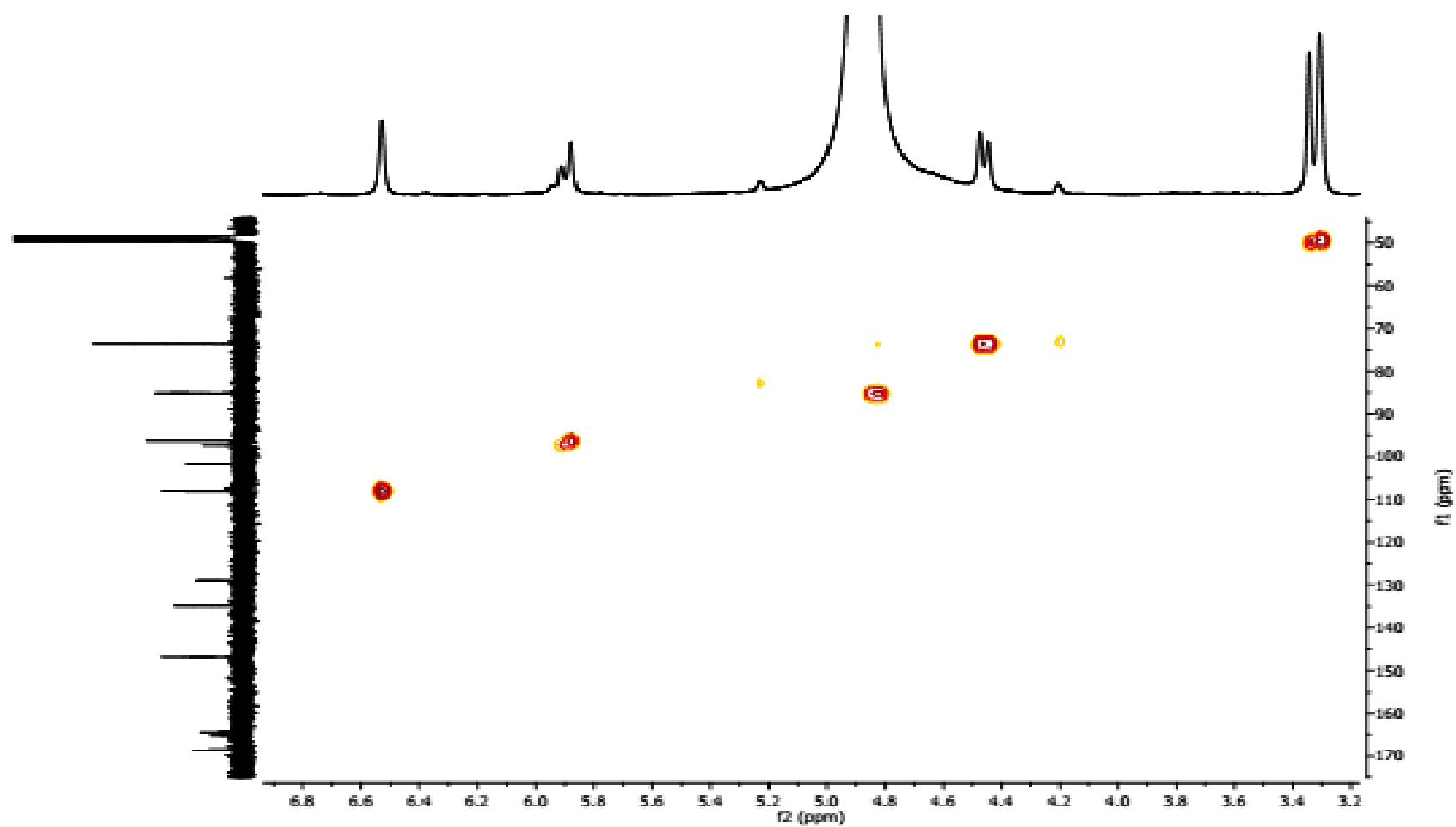
Phổ ^{13}C -NMR của hợp chất PT6 (20,3 mg) đo trong CD_3OD



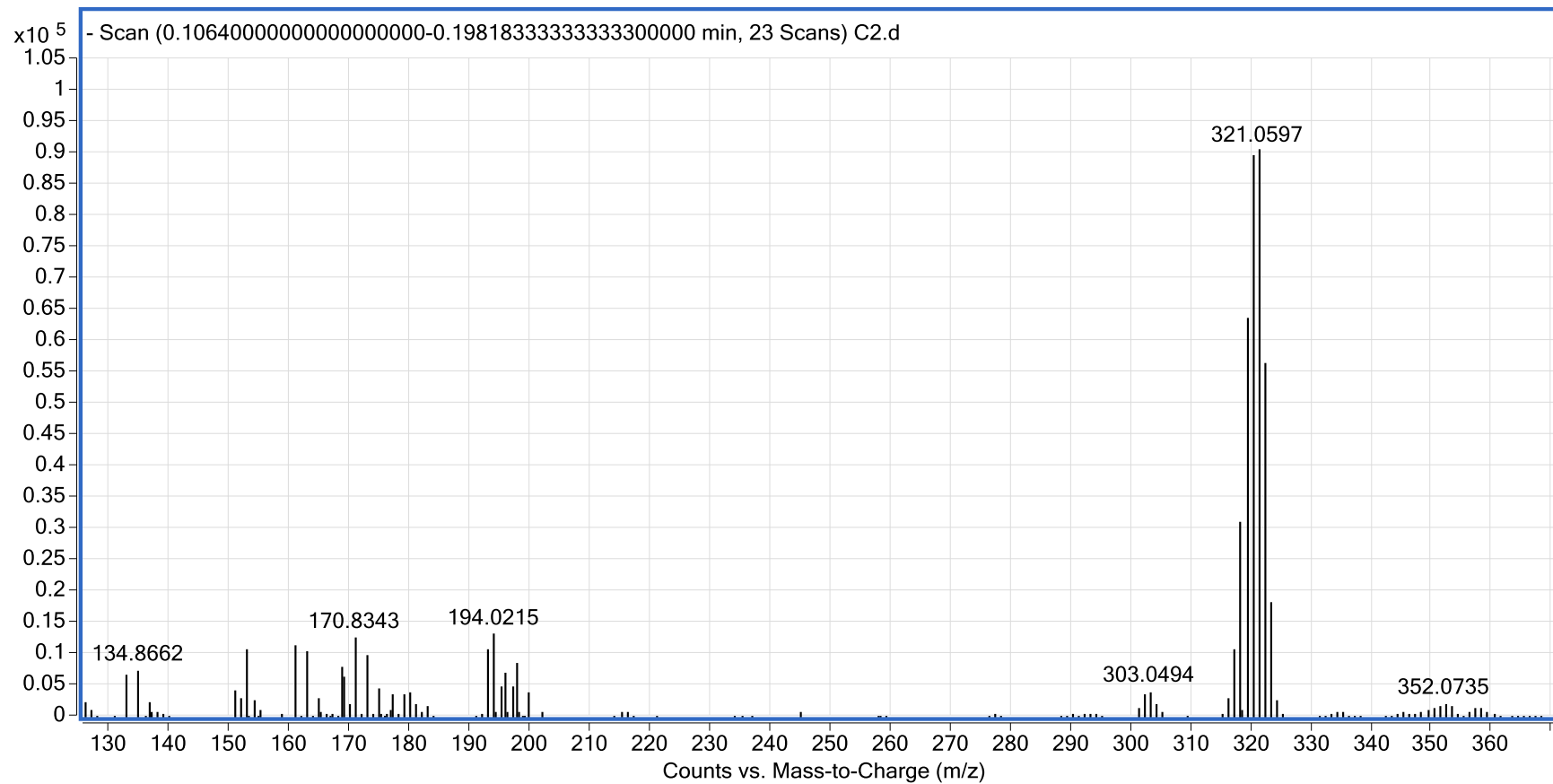
Phổ DEPT-NMR của hợp chất PT6 (20,3 mg) đo trong CD₃OD



Phổ HMBC-NMR của hợp chất PT6 (20,3 mg) đo trong CD_3OD



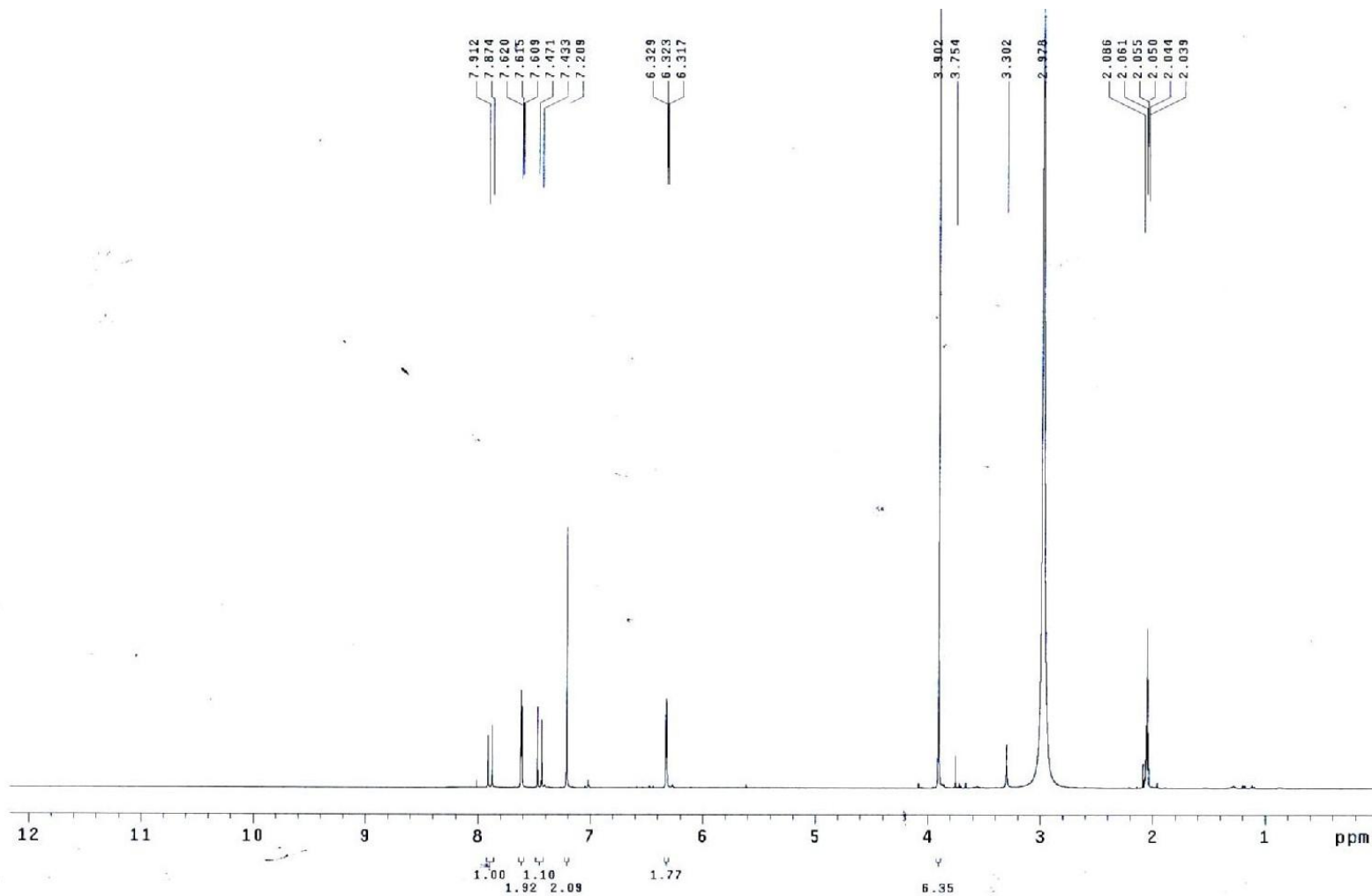
Phổ HSQC-NMR của hợp chất PT6 (20,3 mg) đo trong CD_3OD



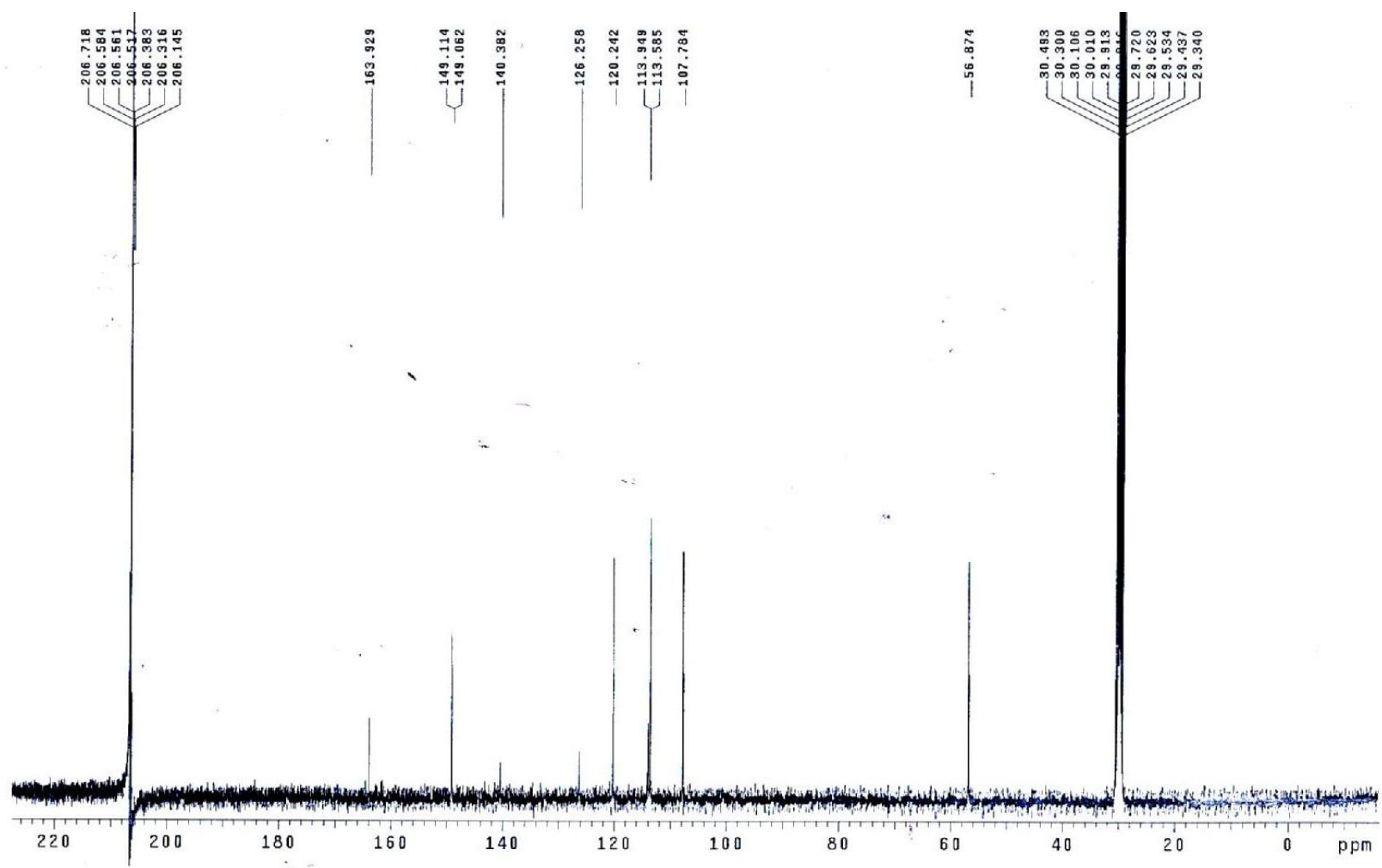
Phổ HR-ESI-MS $[M+H]^+$ của hợp chất PT6 (20,3 mg)

PHỤ LỤC 4.7

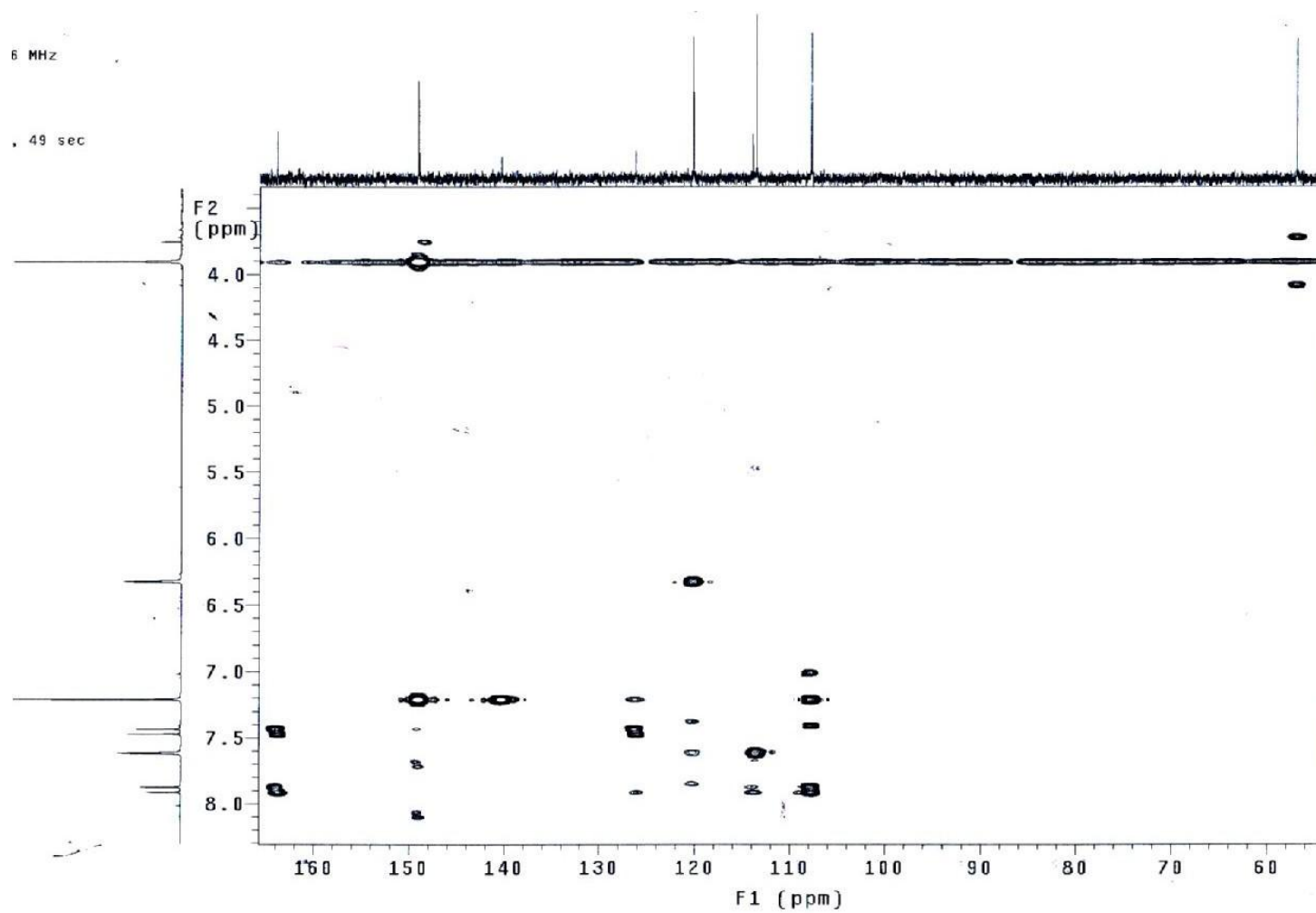
DỮ LIỆU PHỔ NMR VÀ PHỔ MS CỦA HỢP CHẤT PH1



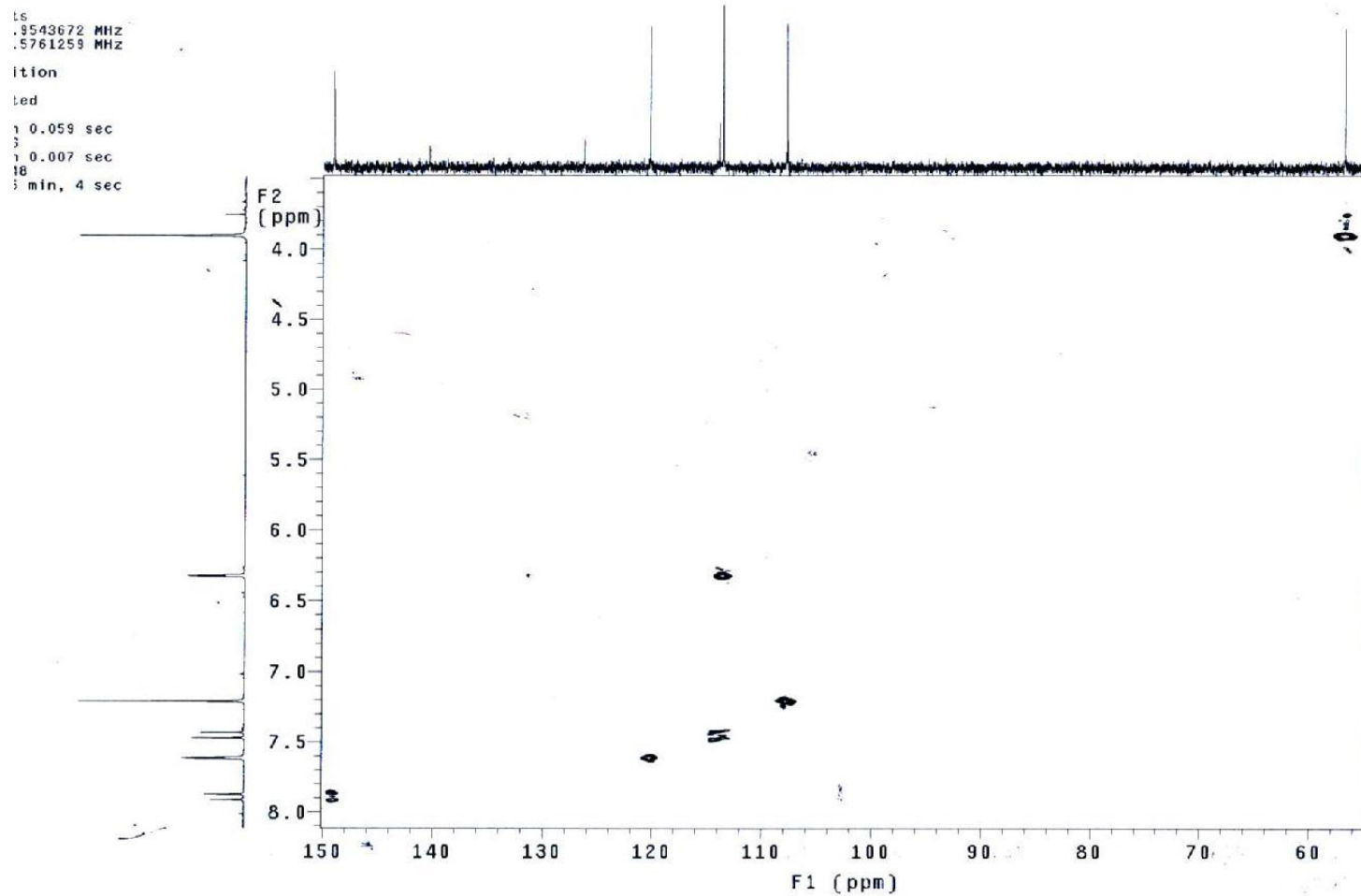
Phổ ¹H-NMR của hợp chất PH1 (2,6 mg) đo trong Aceton



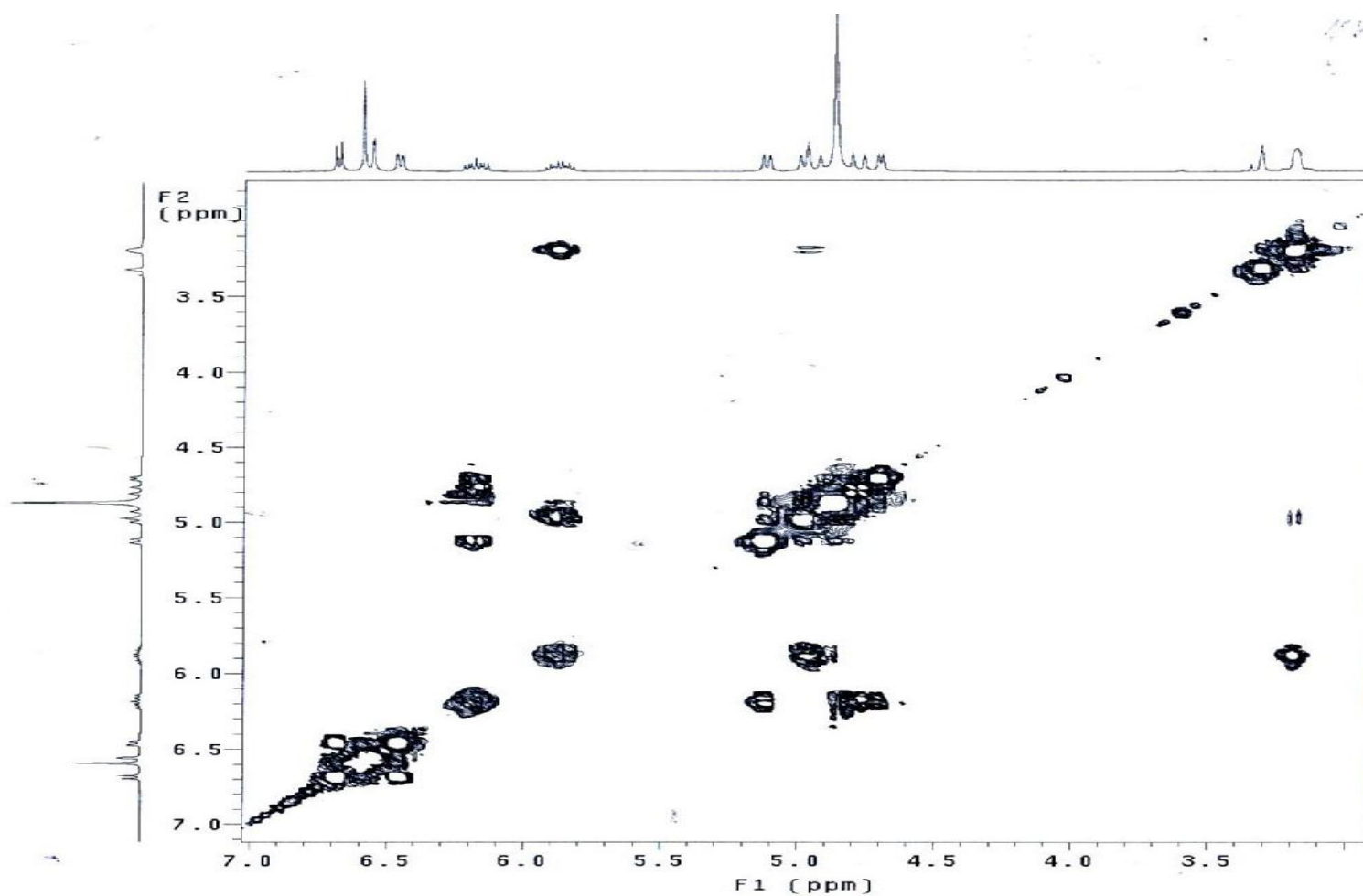
Phổ ¹³C-NMR của hợp chất PH1 (2,6 mg) đo trong Aceton



Phổ HMBC-NMR của hợp chất PH1 (2,6 mg) đo trong Aceton

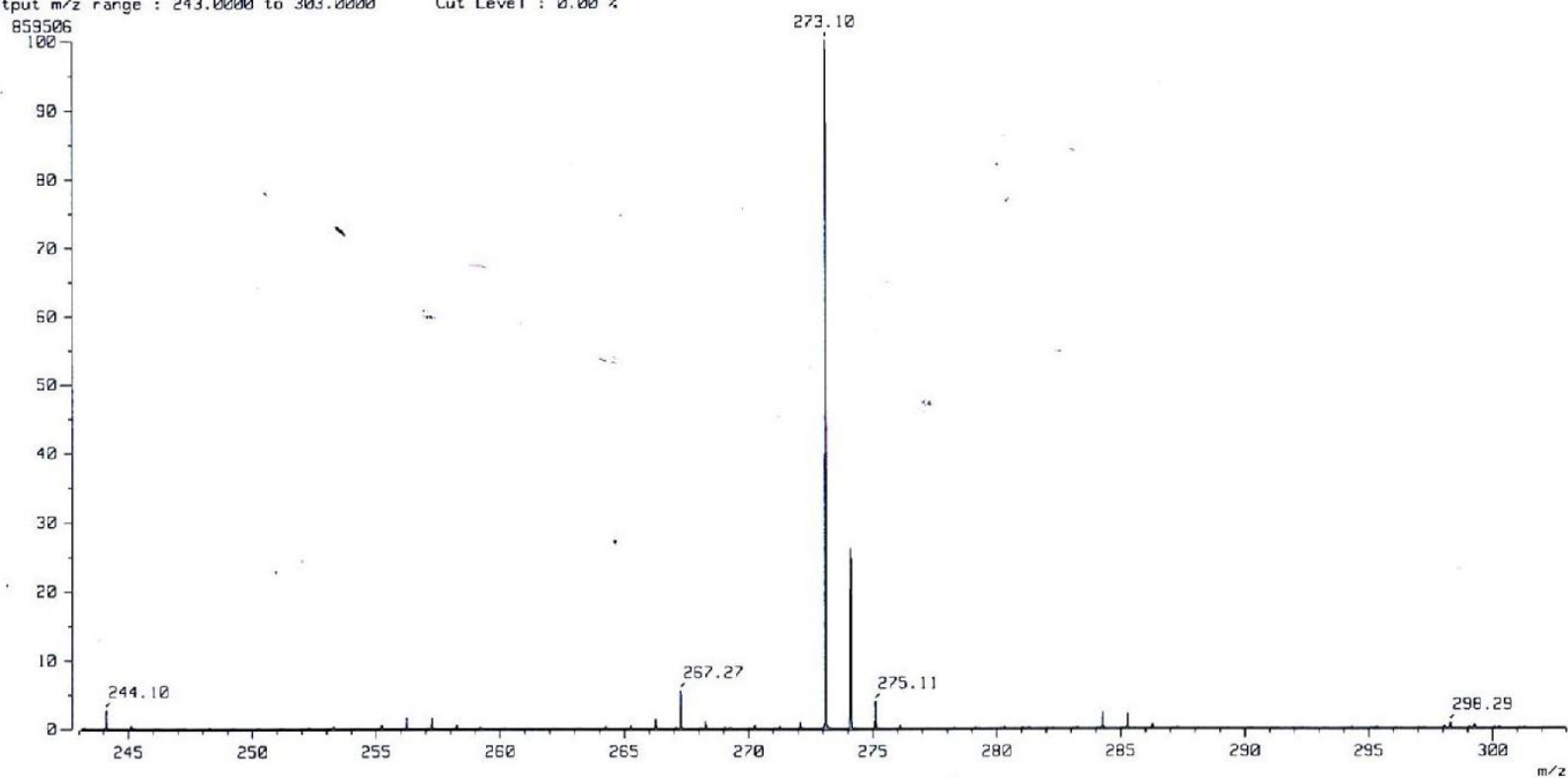


Phổ HSQC-NMR của hợp chất PH1 (2,6 mg) đo trong Aceton



Phổ COSY-NMR của hợp chất PH1 (2,6 mg) đo trong Aceton

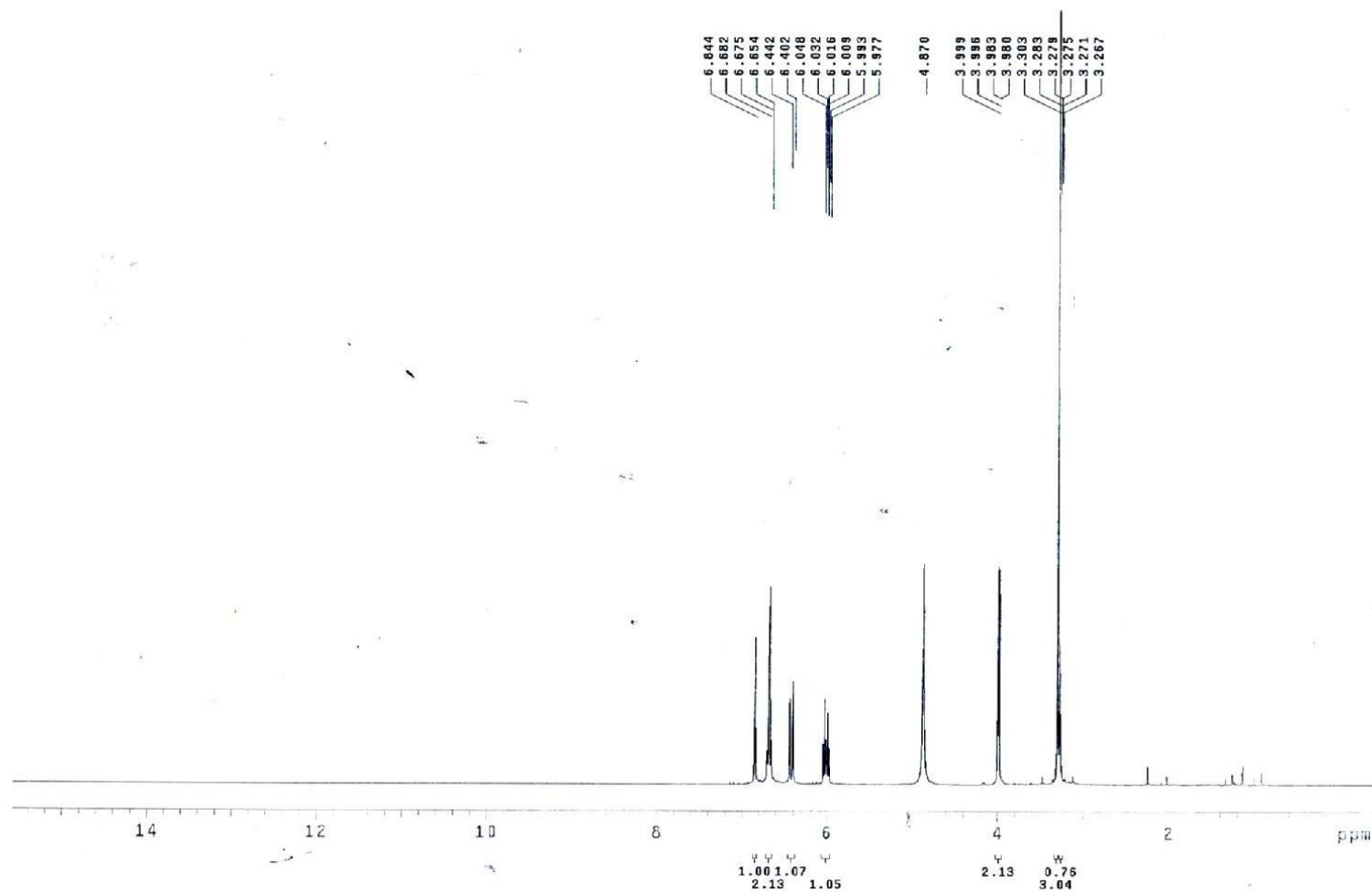
[Mass Spectrum]
Data : C12-C15H15NO4 Date : 01-Feb-2013 15:23
Sample : -
Note : -
Inlet : Direct Ion Mode : EI+
Spectrum Type : Normal Ion [EF-Linear]
RT : 0.58 min Scan# : (12,13)
BP : m/z 273.1003 Int. : 40.98
Output m/z range : 243.0000 to 303.0000 Cut Level : 0.00 %



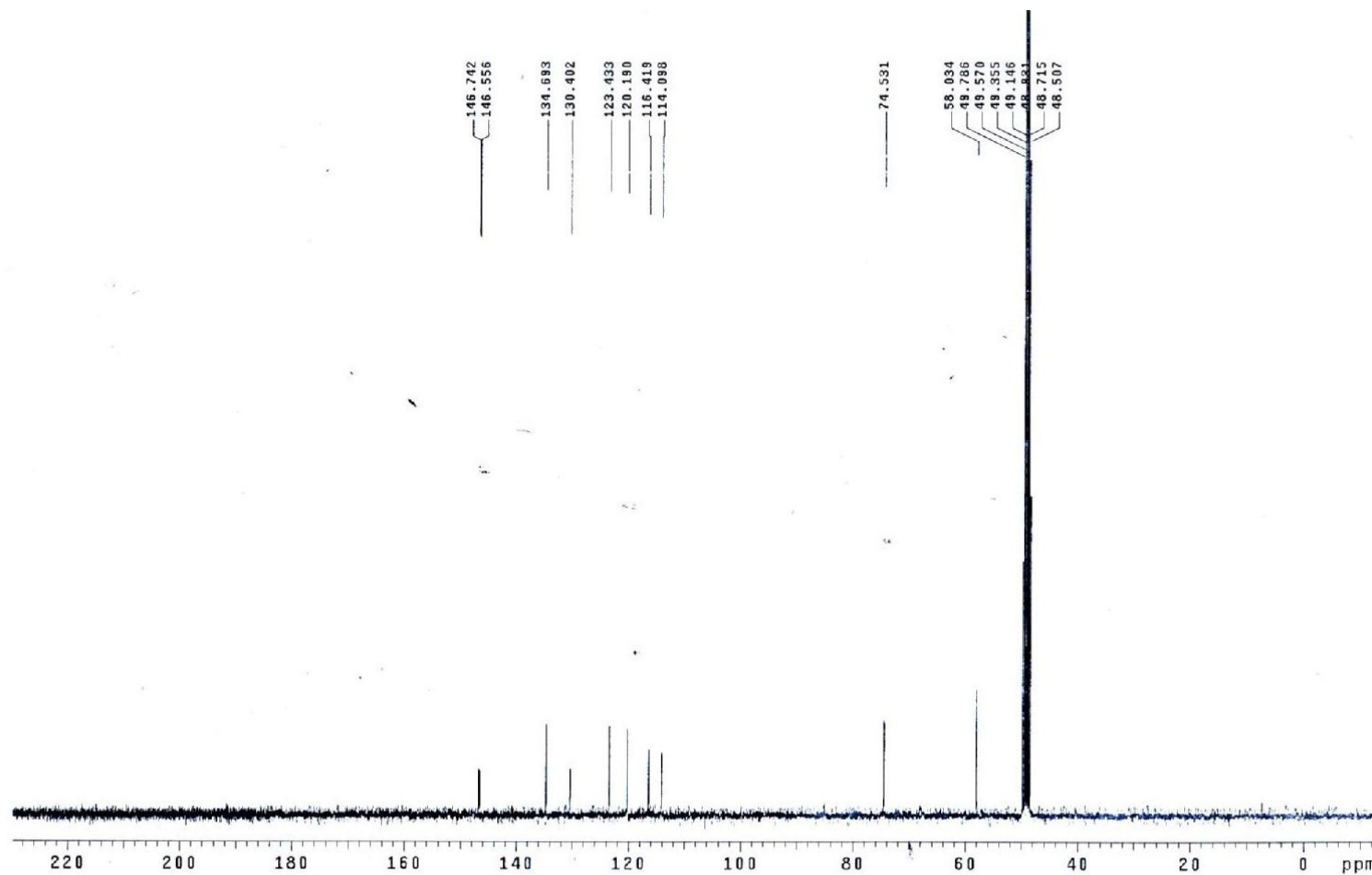
Phổ HR-EI-MS $[M]^+$ của hợp chất PH1 (2,6 mg)

PHỤ LỤC 4.8

DỮ LIỆU PHỔ NMR VÀ PHỔ MS CỦA HỢP CHẤT PH2

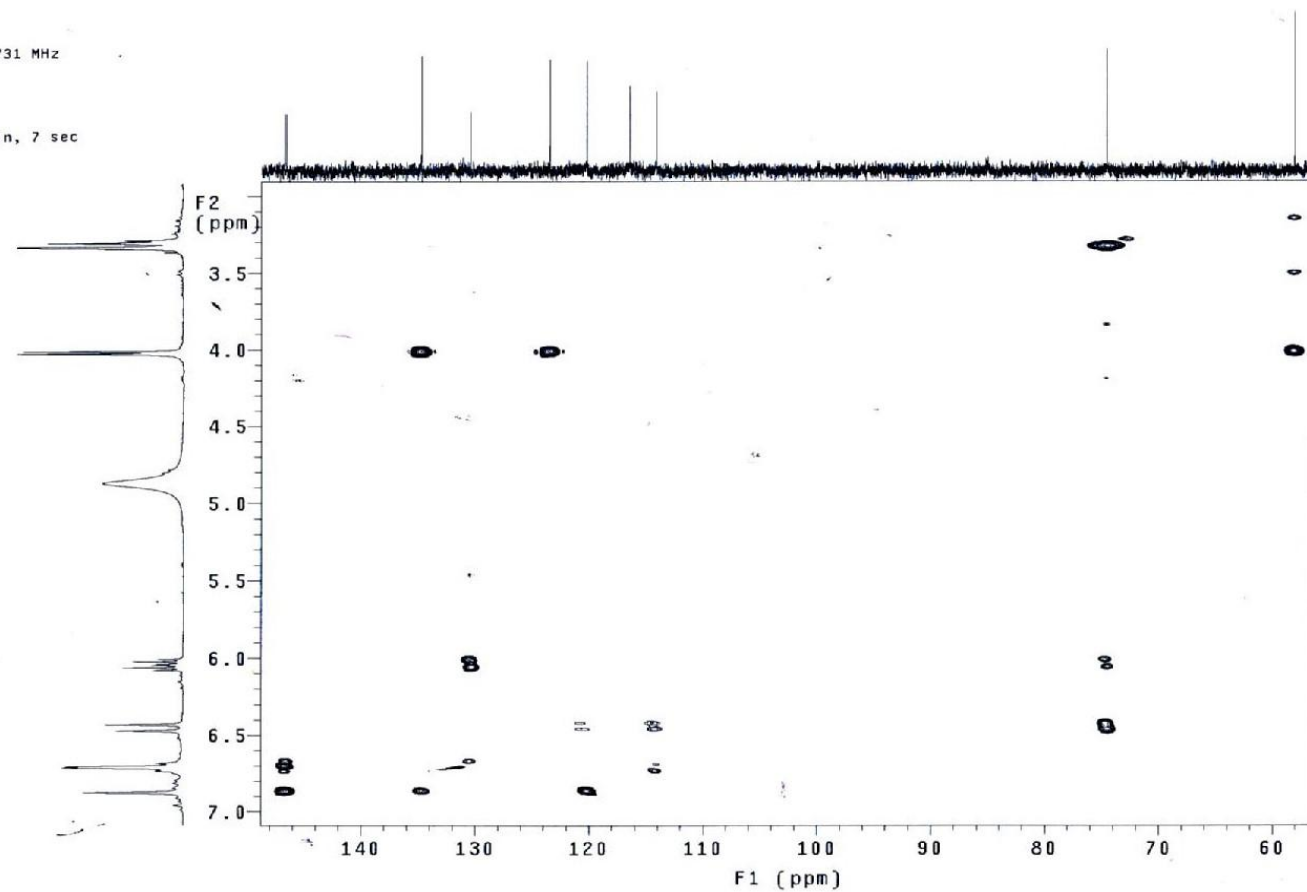


Phổ ¹H-NMR của hợp chất PH2 (20,8 mg) đo trong CD₃OD



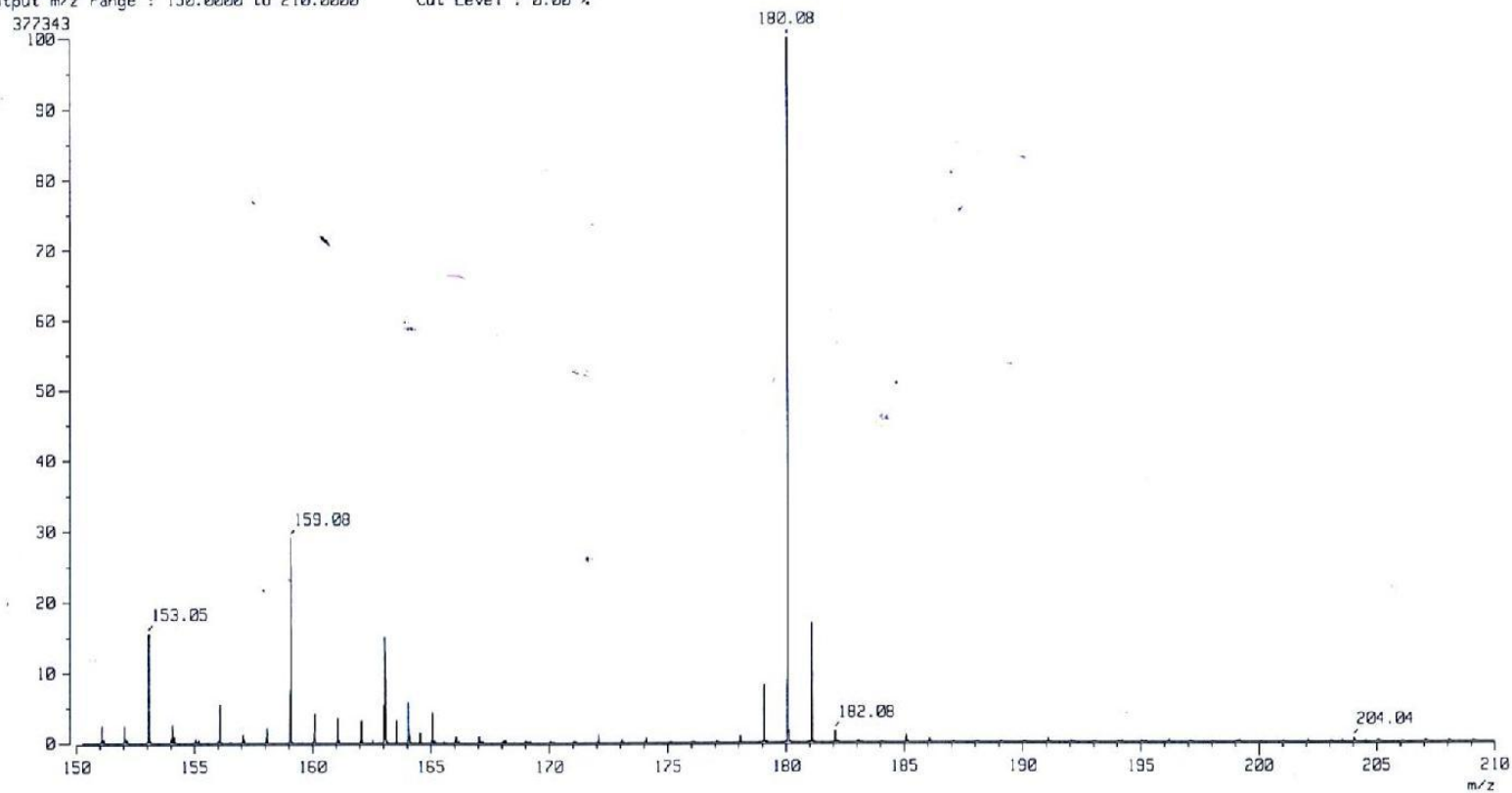
Phổ ¹³C-NMR của hợp chất PH2 (20,8 mg) đo trong CD₃OD

Width 6410.3 Hz
2D Width 24140.0 Hz
250 repetitions
200 increments
OBSERVE H1, 399.9538731 MHz
DATA PROCESSING
Sine bell 0.064 sec
F1 DATA PROCESSING
Sine bell 0.008 sec
FT size 4096 x 2048
Total time 16 hr, 52 min, 7 sec



Phổ HMBC-NMR của hợp chất PH2 (20,8 mg) đo trong CD_3OD

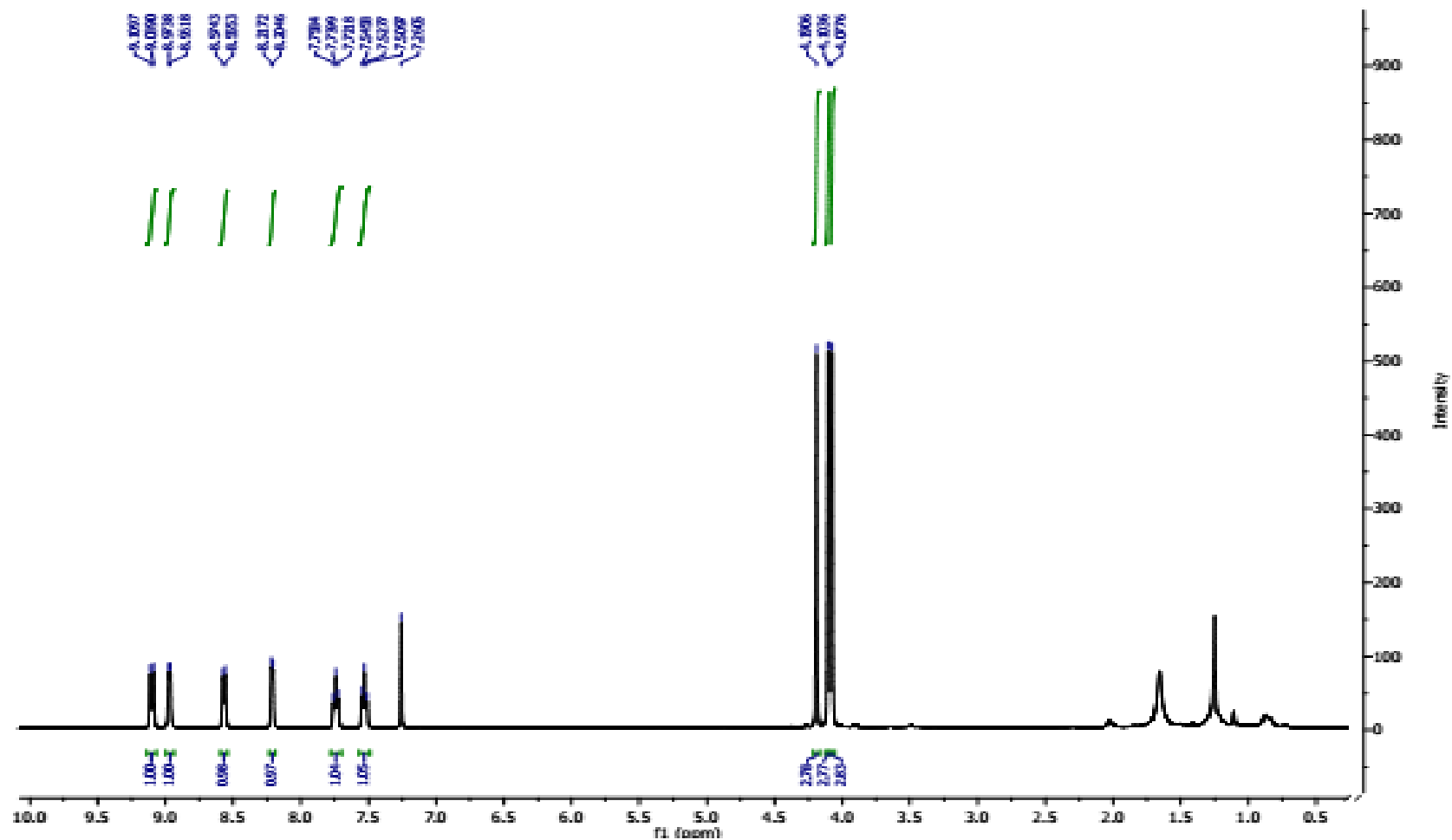
Note : -
Inlet : Direct Ion Mode : EI+
Spectrum Type : Normal Ion [EF-Linear]
RT : 0.68 min Scan# : (14,15)
BP : m/z 180.0787 Int. : 17.99
Output m/z range : 150.0000 to 210.0000 Cut Level : 0.00 %



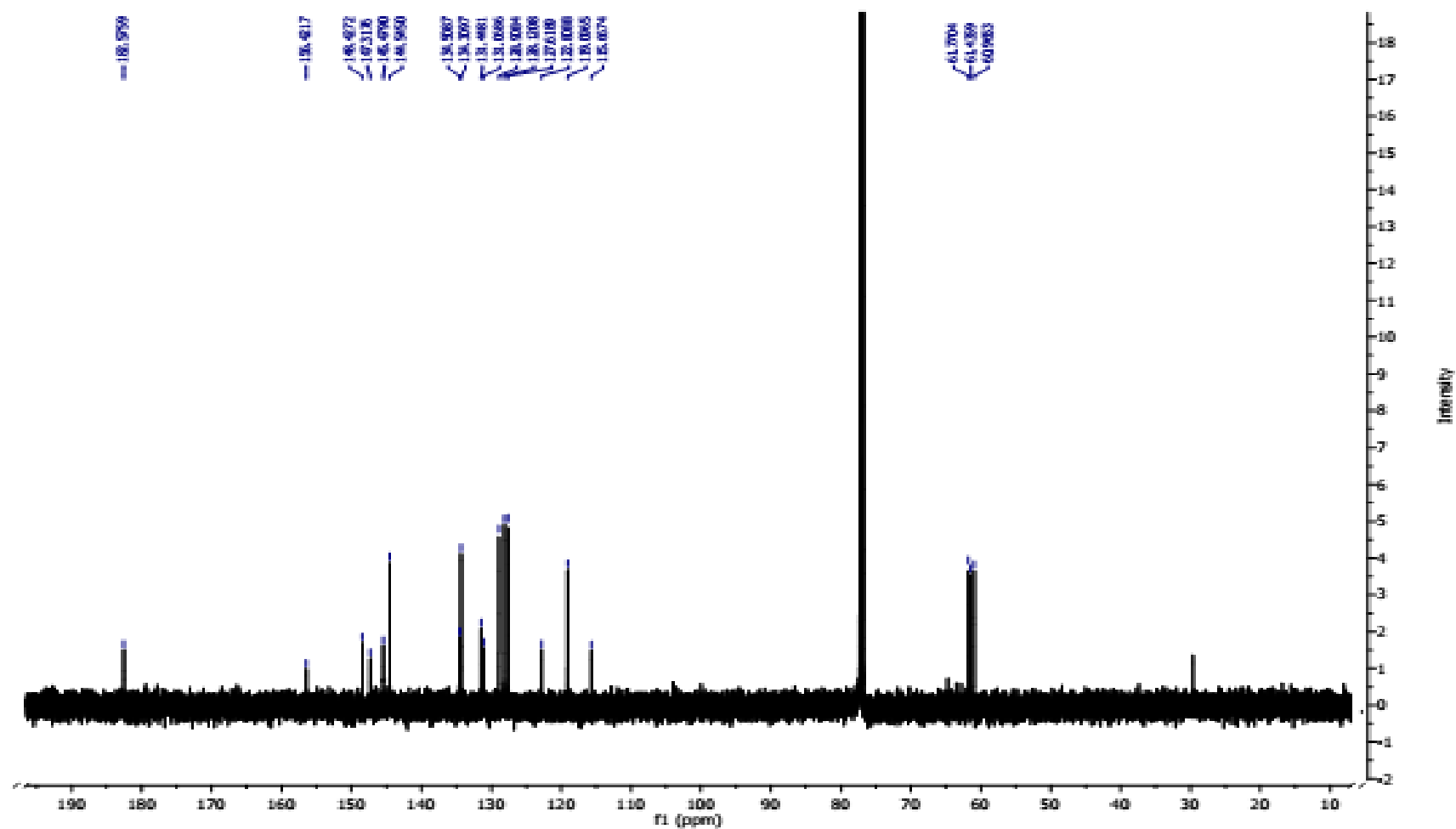
Phổ HR-EI-MS $[M]^+$ của hợp chất PH2 (20,8 mg)

PHỤ LỤC 4.9

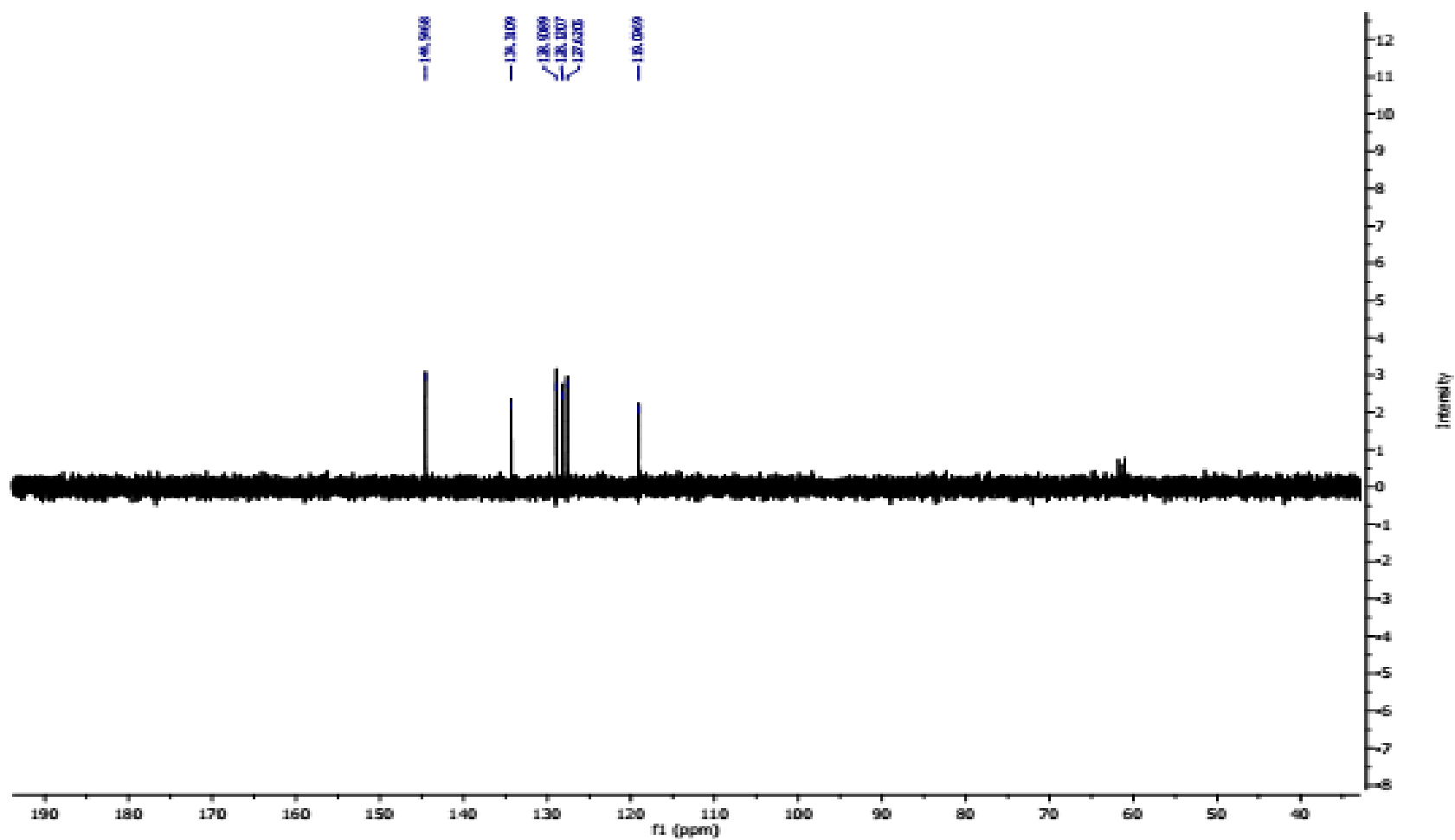
DỮ LIỆU PHỔ NMR VÀ PHỔ MS CỦA HỢP CHẤT PH3



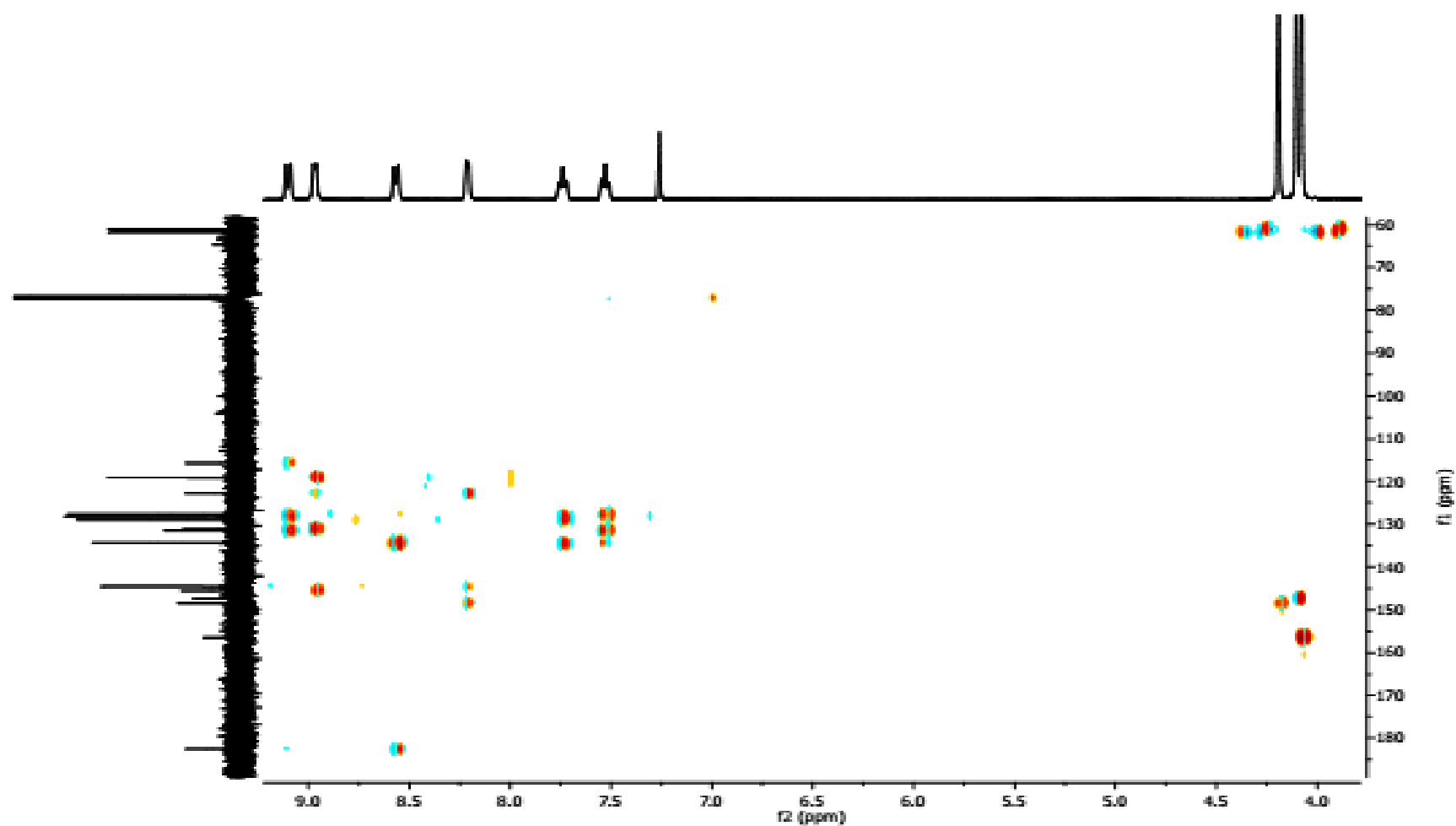
Phổ ¹H-NMR của hợp chất PH3 (4,9 mg) đo trong CDCl₃



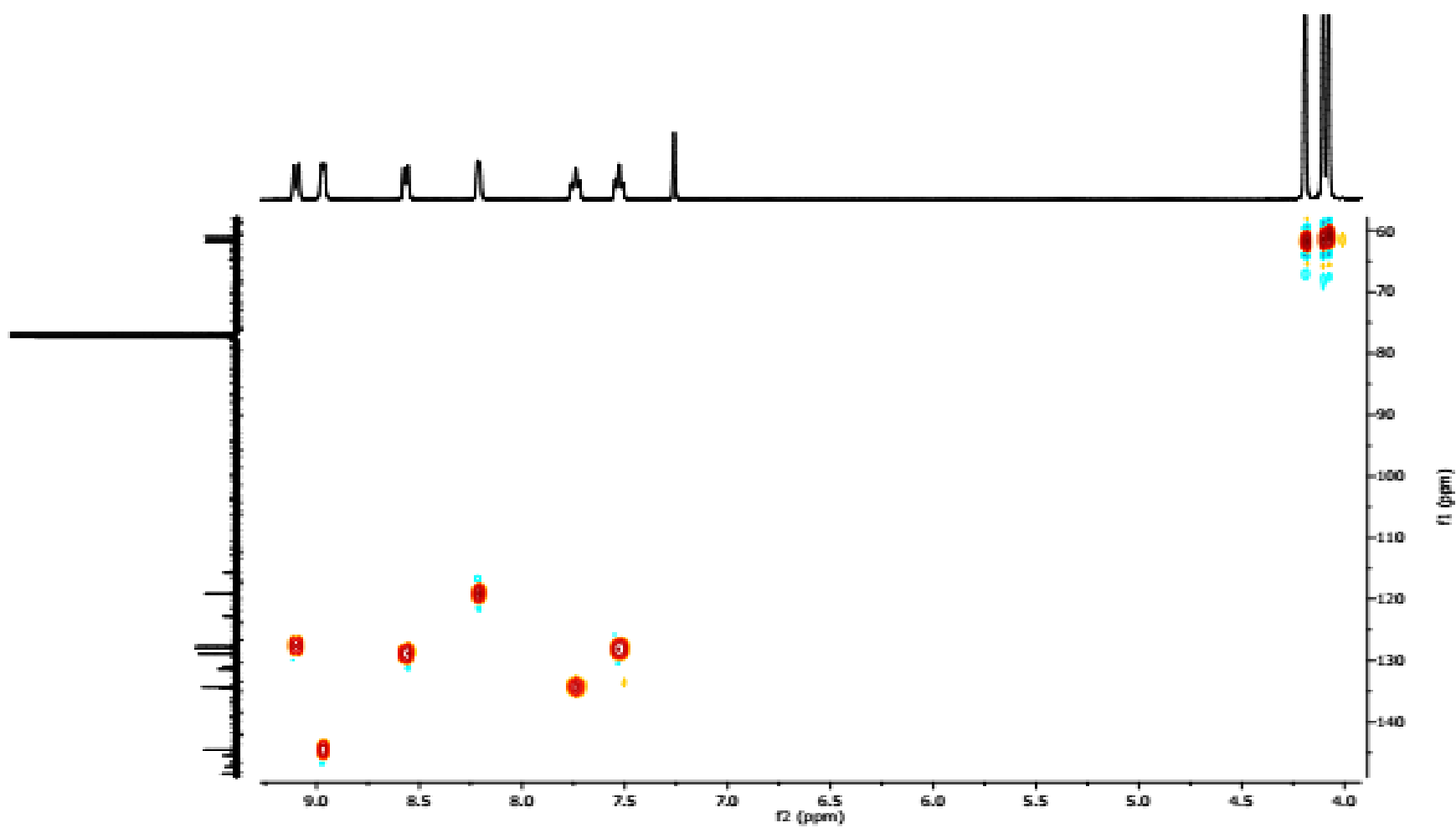
Phổ ^{13}C -NMR của hợp chất PH3 (4,9 mg) đo trong CDCl_3



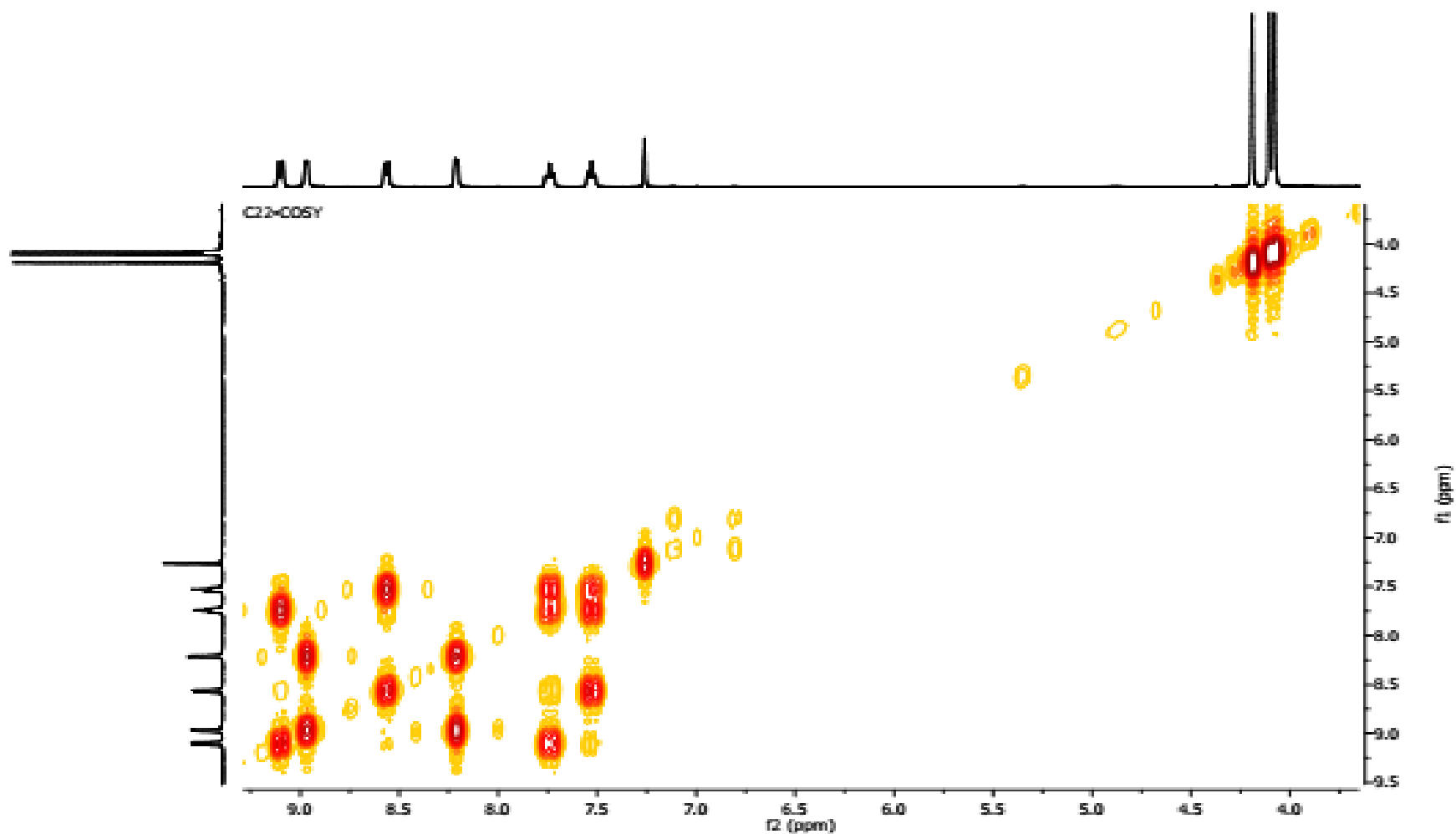
Phổ DEPT-NMR của hợp chất PH3 (4,9 mg) đo trong CDCl_3



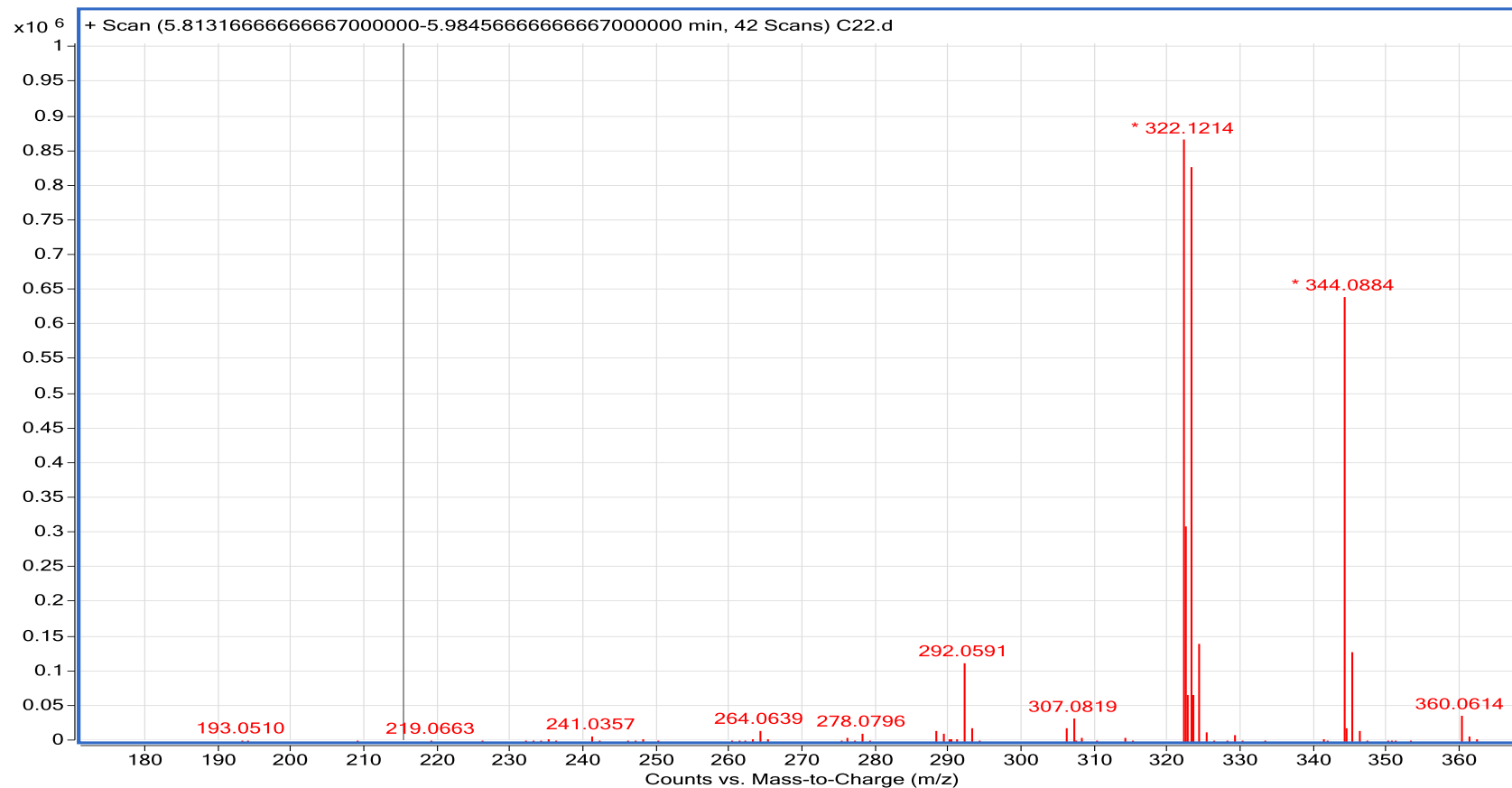
Phổ HMBC-NMR của hợp chất PH3 (4,9 mg) đo trong CDCl_3



Phổ HSQC-NMR của hợp chất PH3 (4,9 mg) đo trong CDCl_3



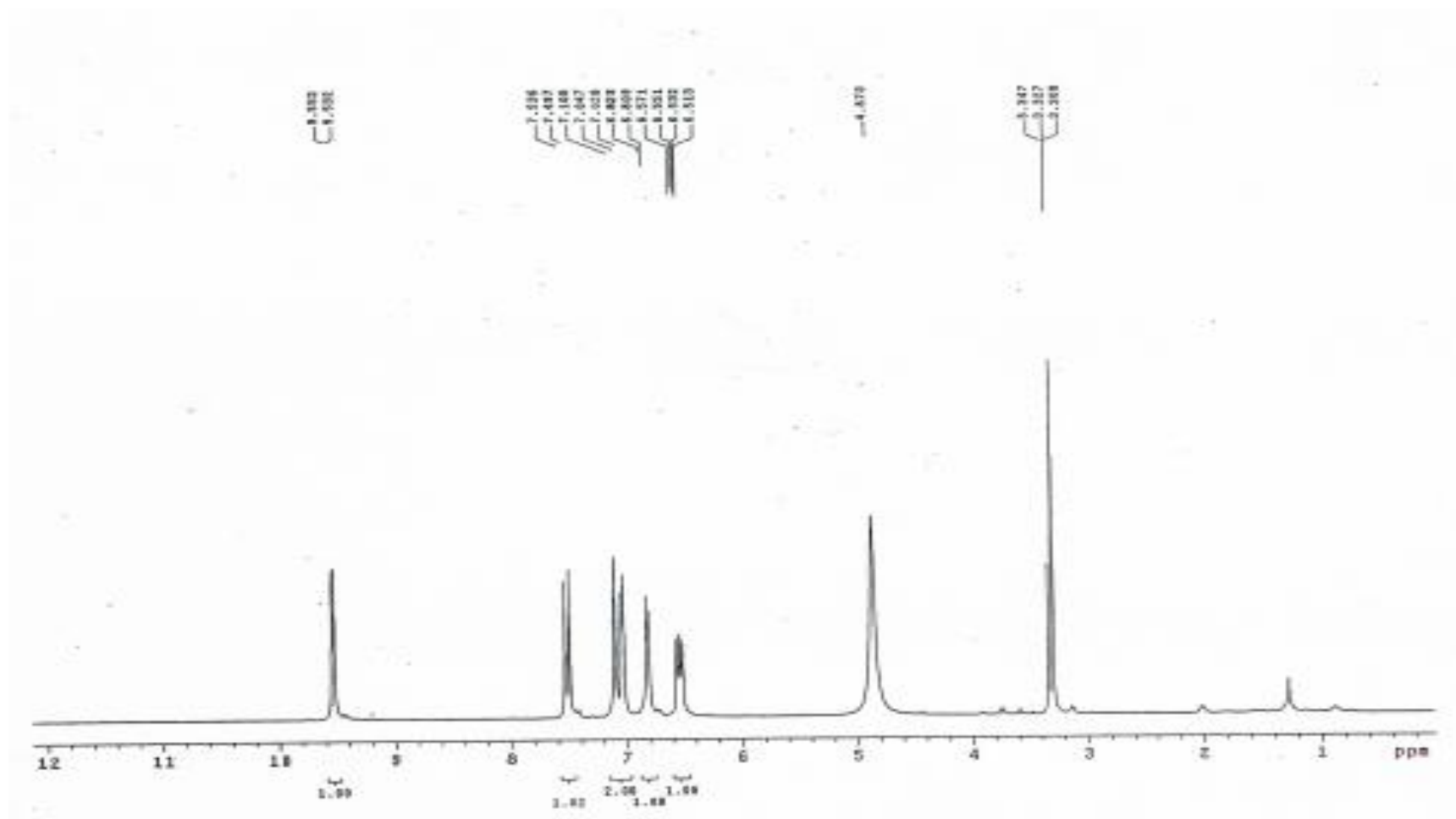
Phổ COSY-NMR của hợp chất PH3 (4,9 mg) đo trong CDCl₃



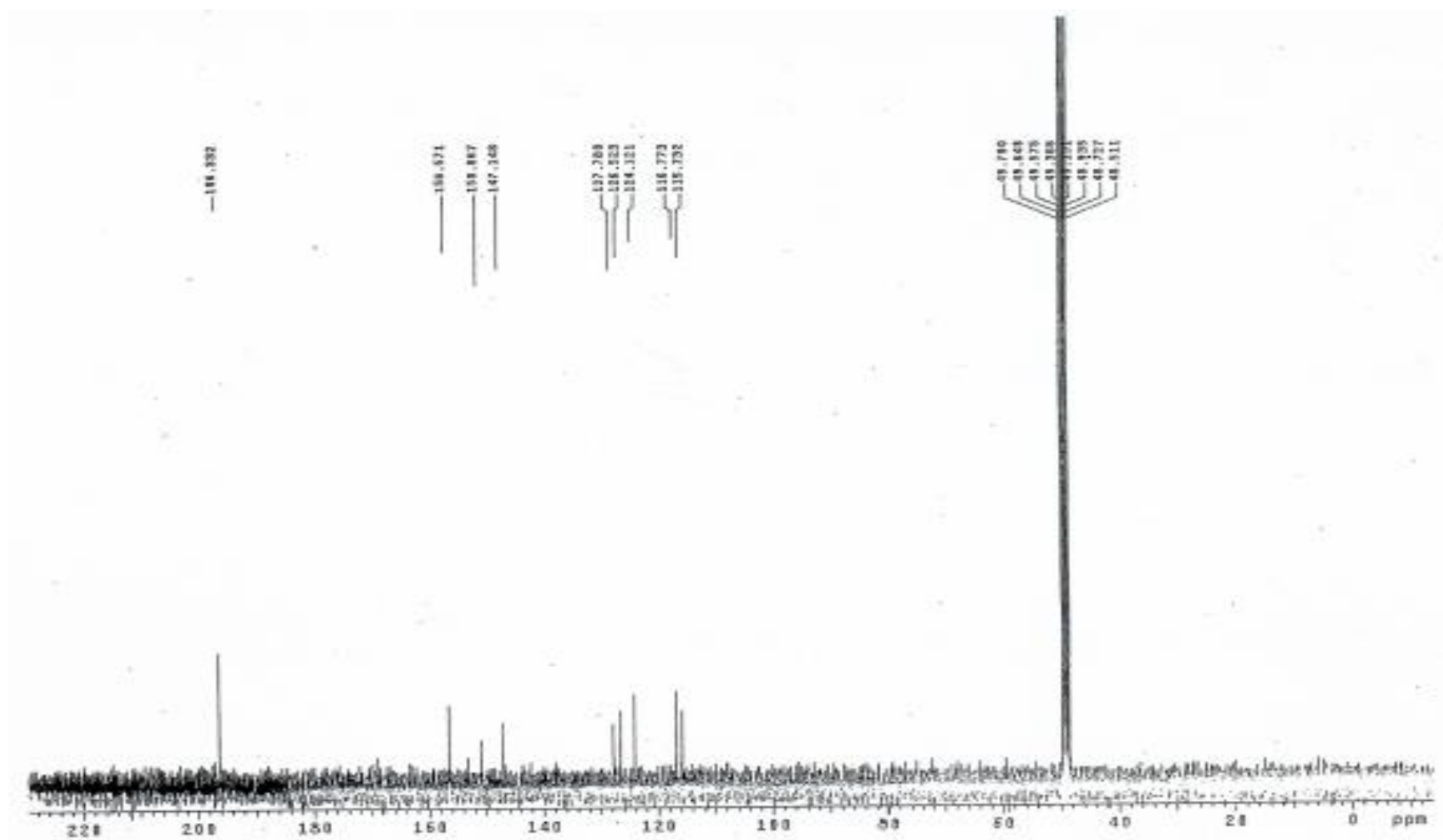
Phổ HR-ESI-MS $[M+Na]^+$ của hợp chất PH3 (4,9 mg)

PHỤ LỤC 4.10

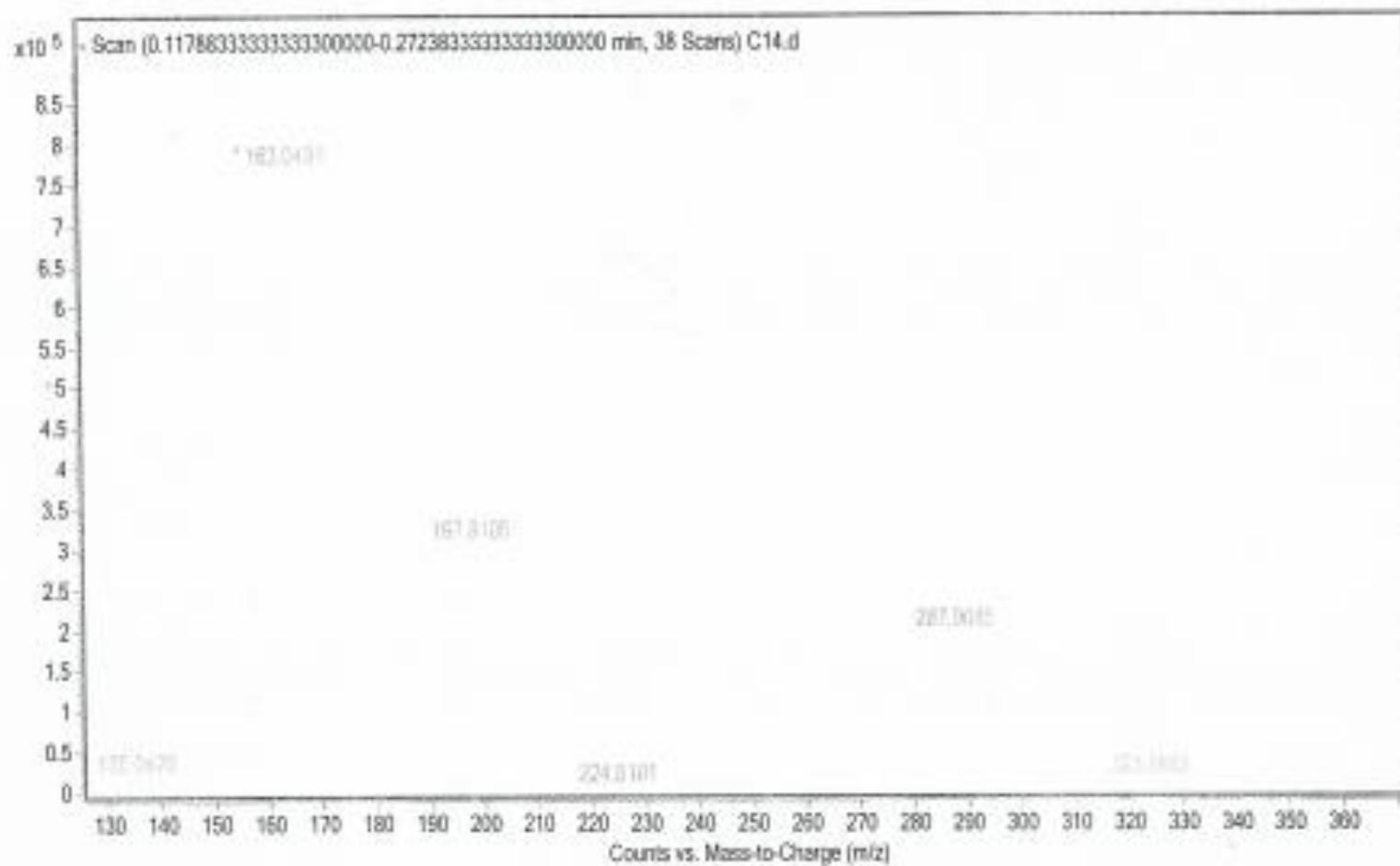
DỮ LIỆU PHỔ NMR VÀ PHỔ MS CỦA HỢP CHẤT PH4



Phổ ^1H -NMR của hợp chất PH4 (11 mg) đo trong CD_3OD



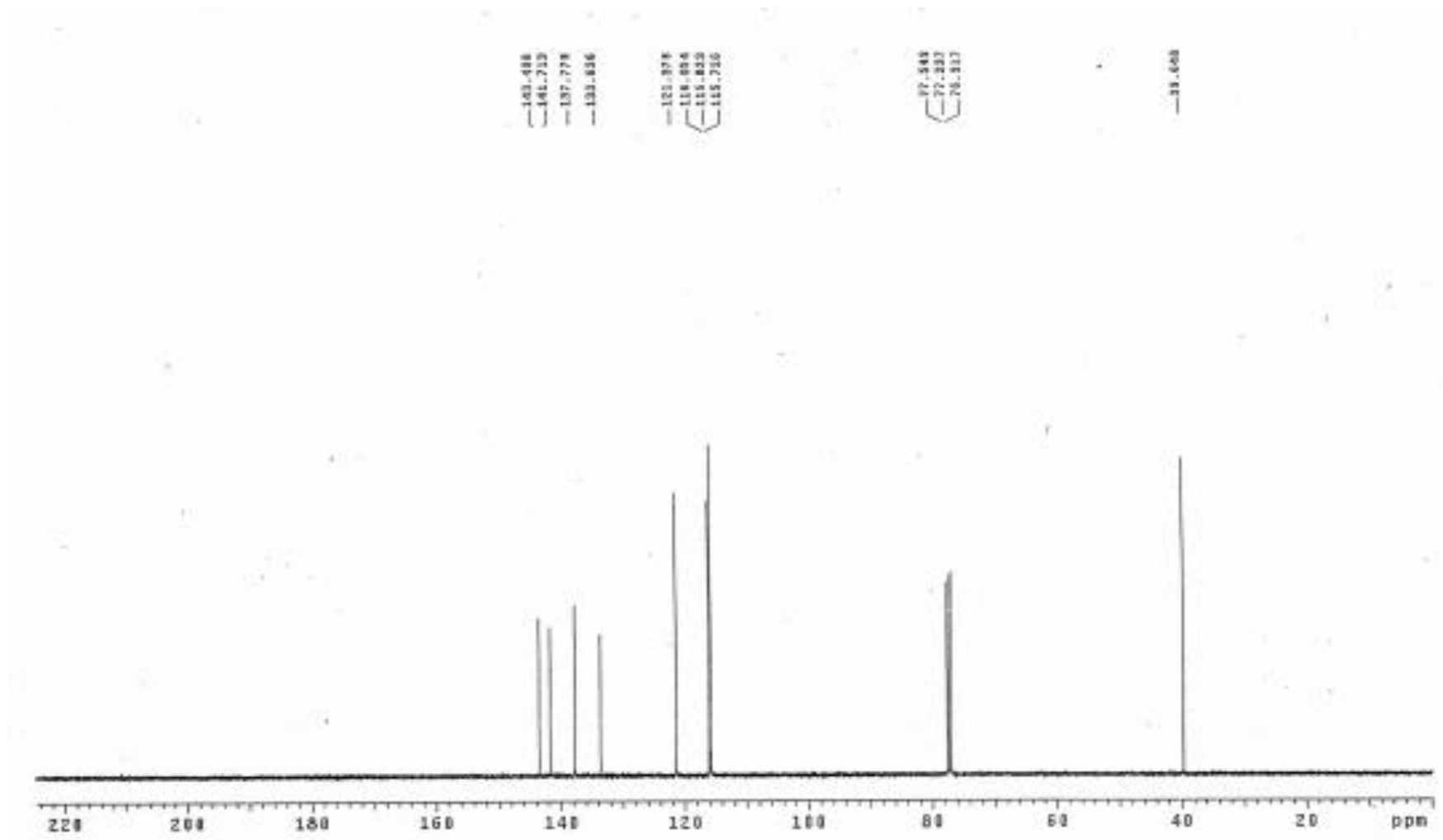
Phổ ^{13}C -NMR của hợp chất PH4 (11 mg) đo trong CD_3OD



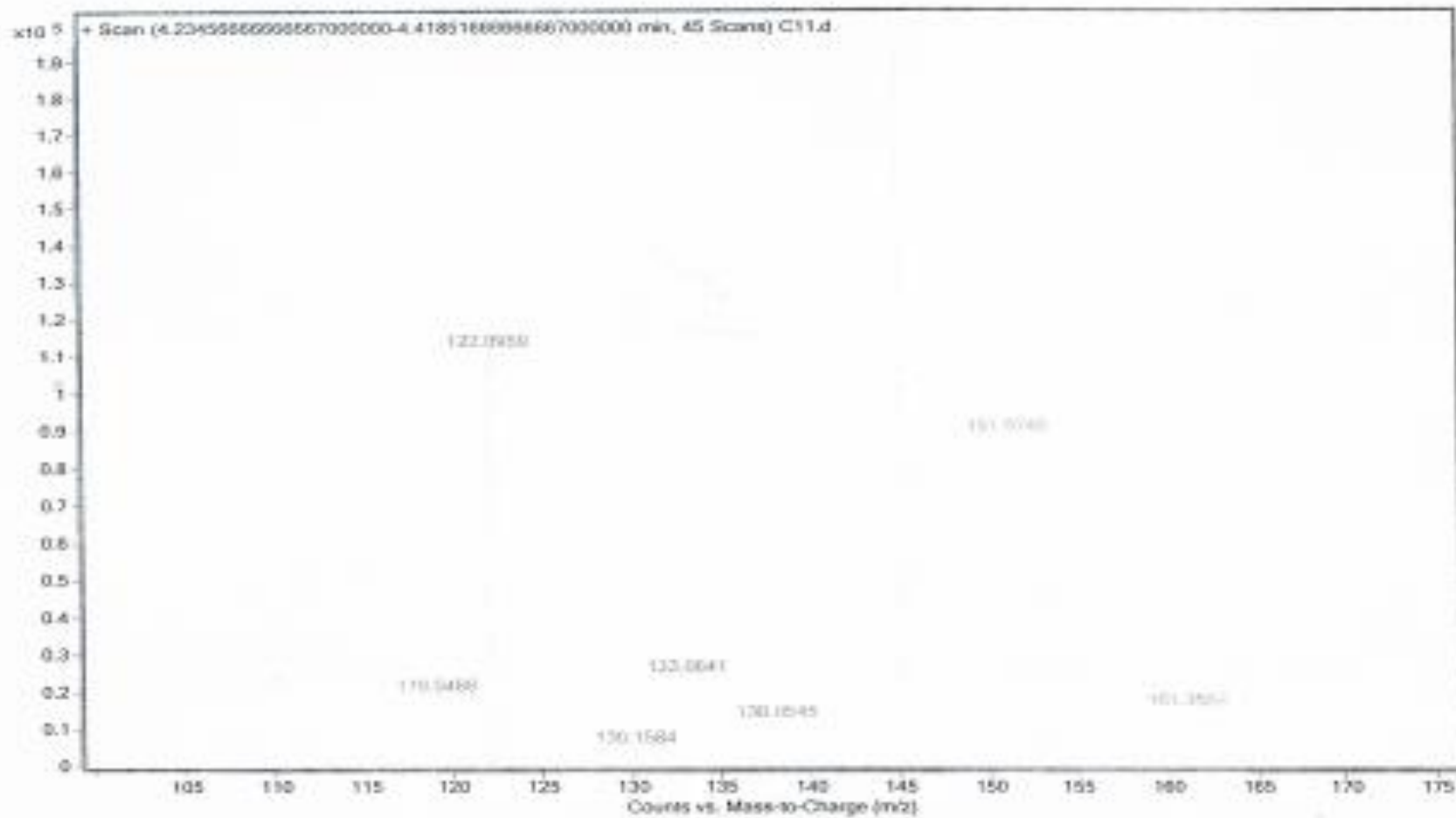
Phổ HR-ESI-MS $[M-H]^-$ của hợp chất PH4 (11 mg)

PHỤ LỤC 4.11

DỮ LIỆU PHỔ NMR VÀ PHỔ MS CỦA HỢP CHẤT PH5



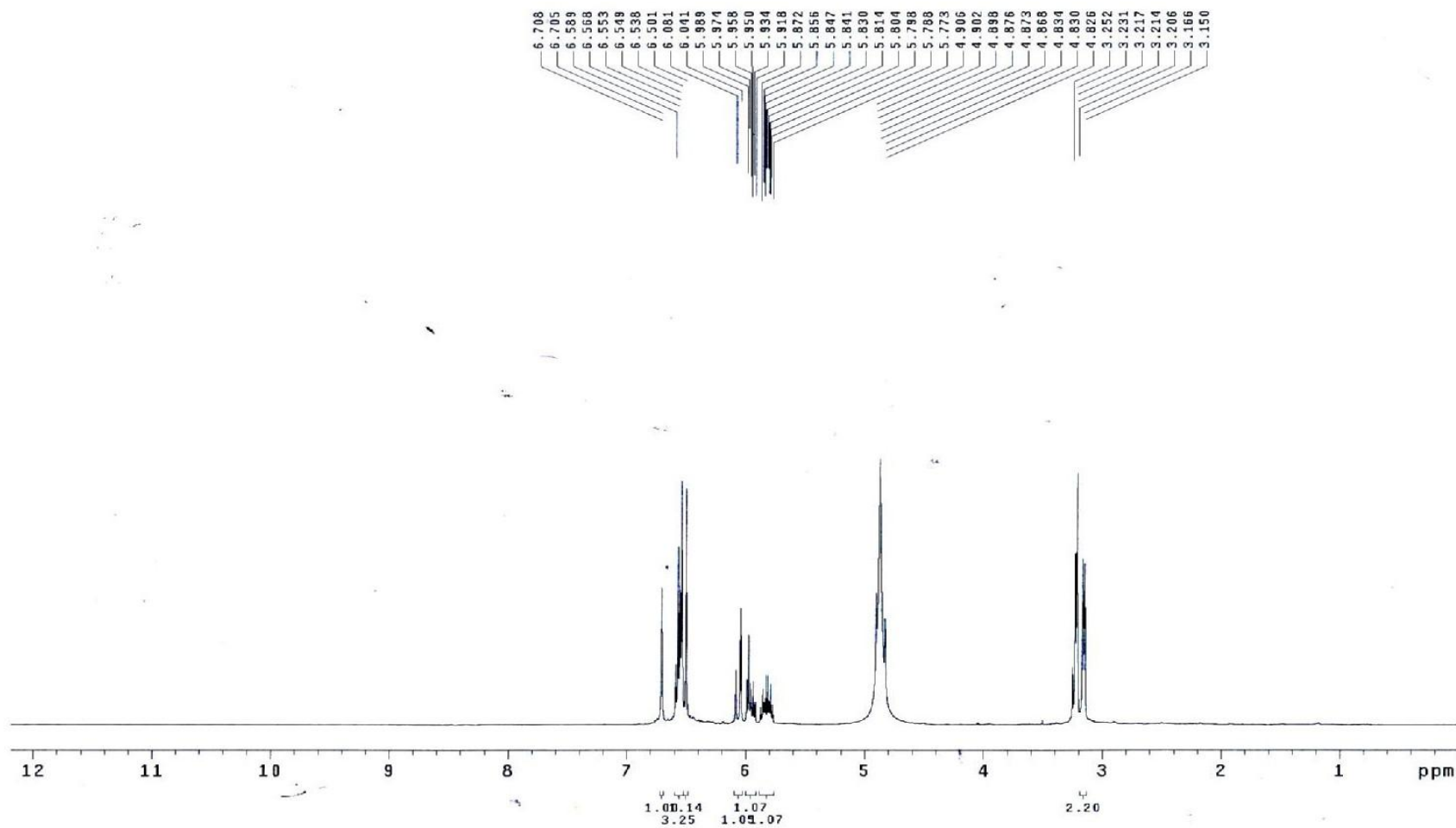
Phổ ^{13}C -NMR của hợp chất PH5 (44 mg) đo trong CDCl_3



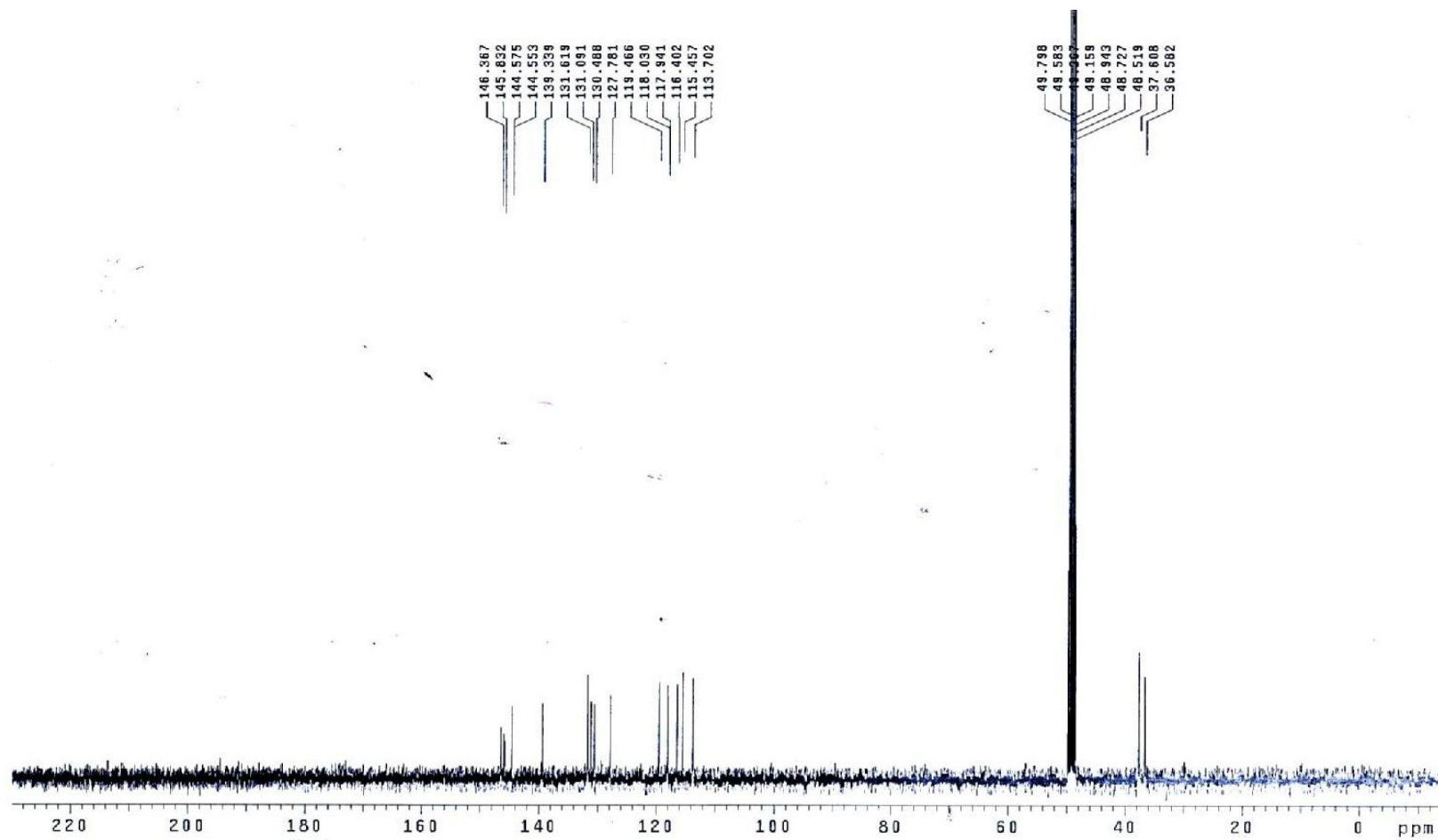
Phổ HR-ESI-MS $[M+H]^+$ của hợp chất PH5 (44 mg)

PHỤ LỤC 4.12

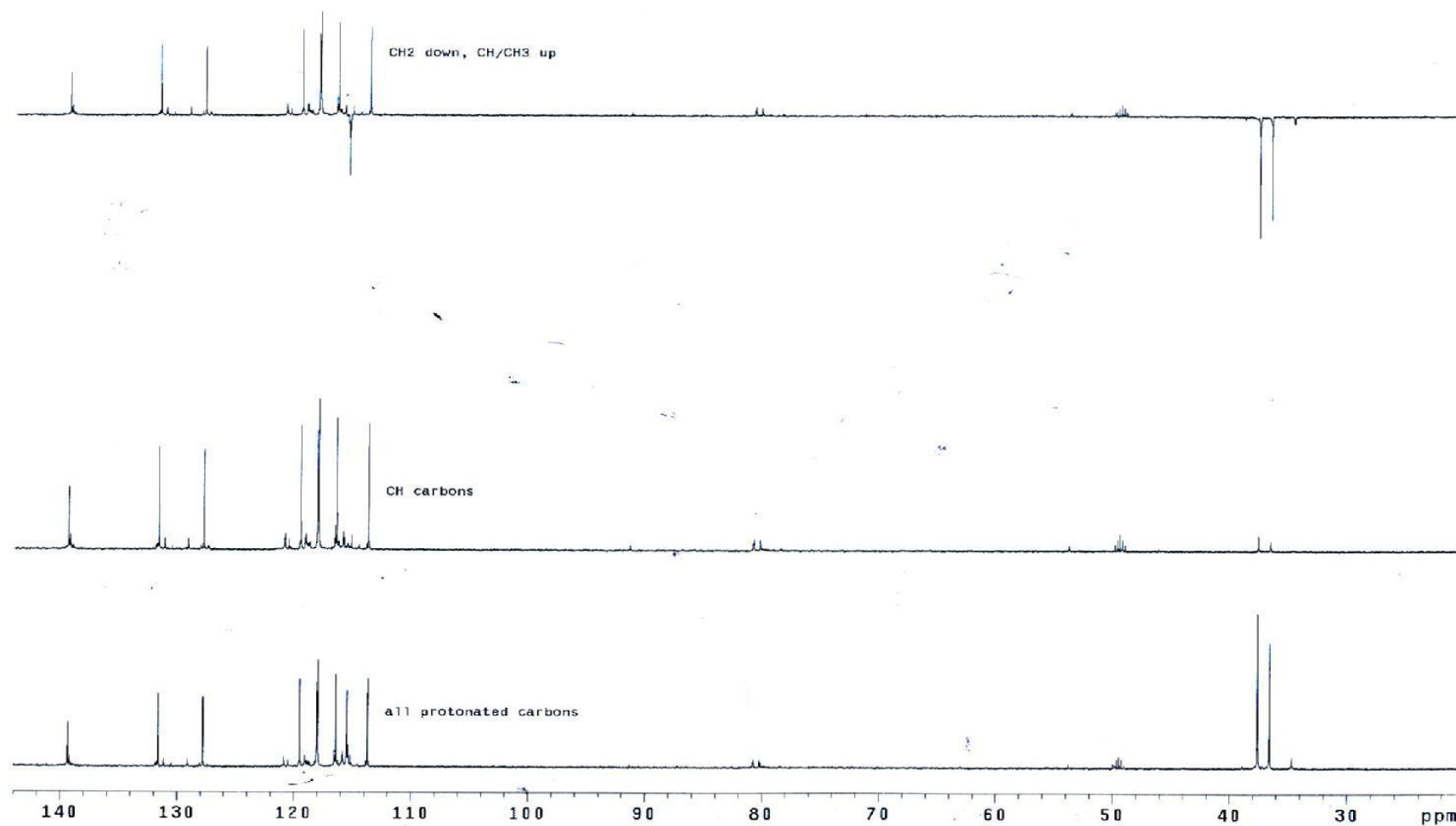
DỮ LIỆU PHỔ NMR VÀ PHỔ MS CỦA HỢP CHẤT PH6



Phổ ^1H -NMR của hợp chất PH6 (42,2 mg) đo trong CD_3OD

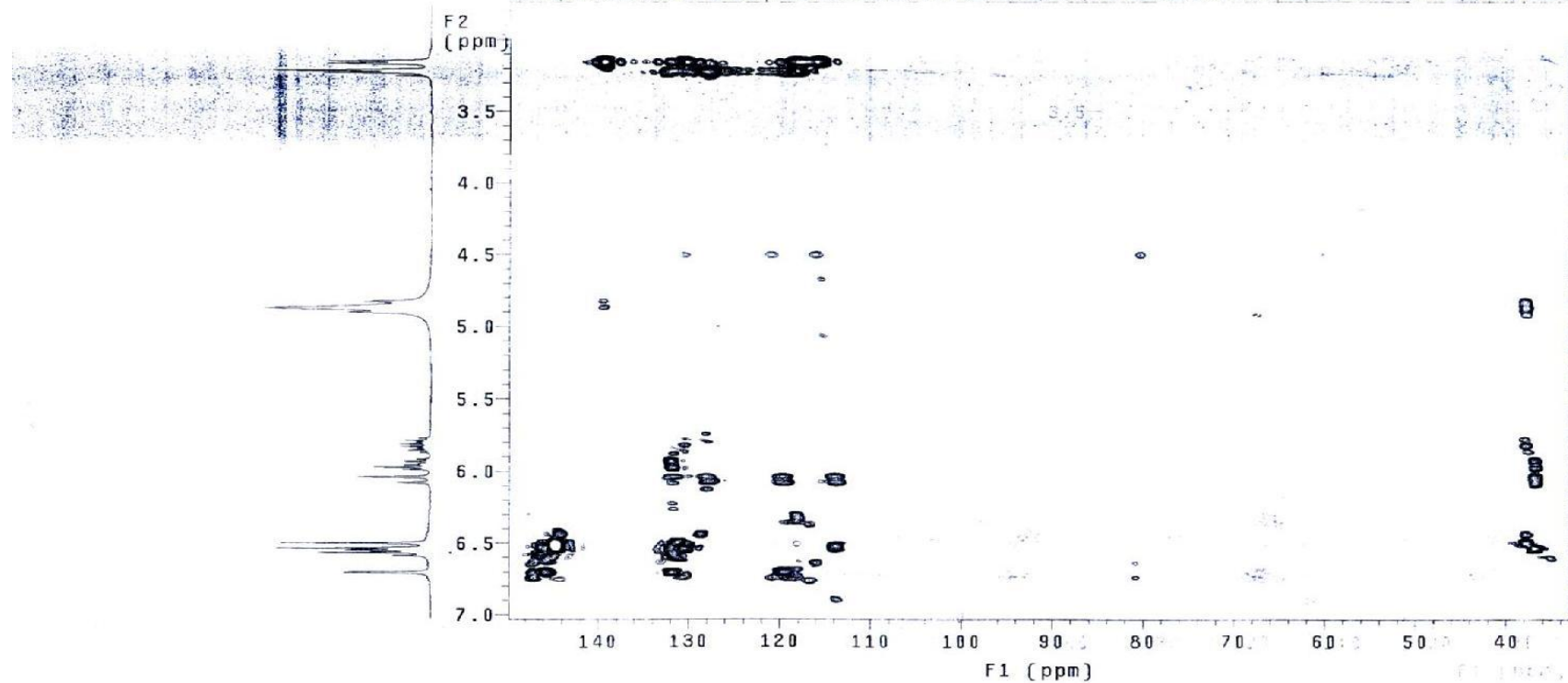


Phổ ^{13}C -NMR của hợp chất PH6 (42,2 mg) đo trong CD_3OD



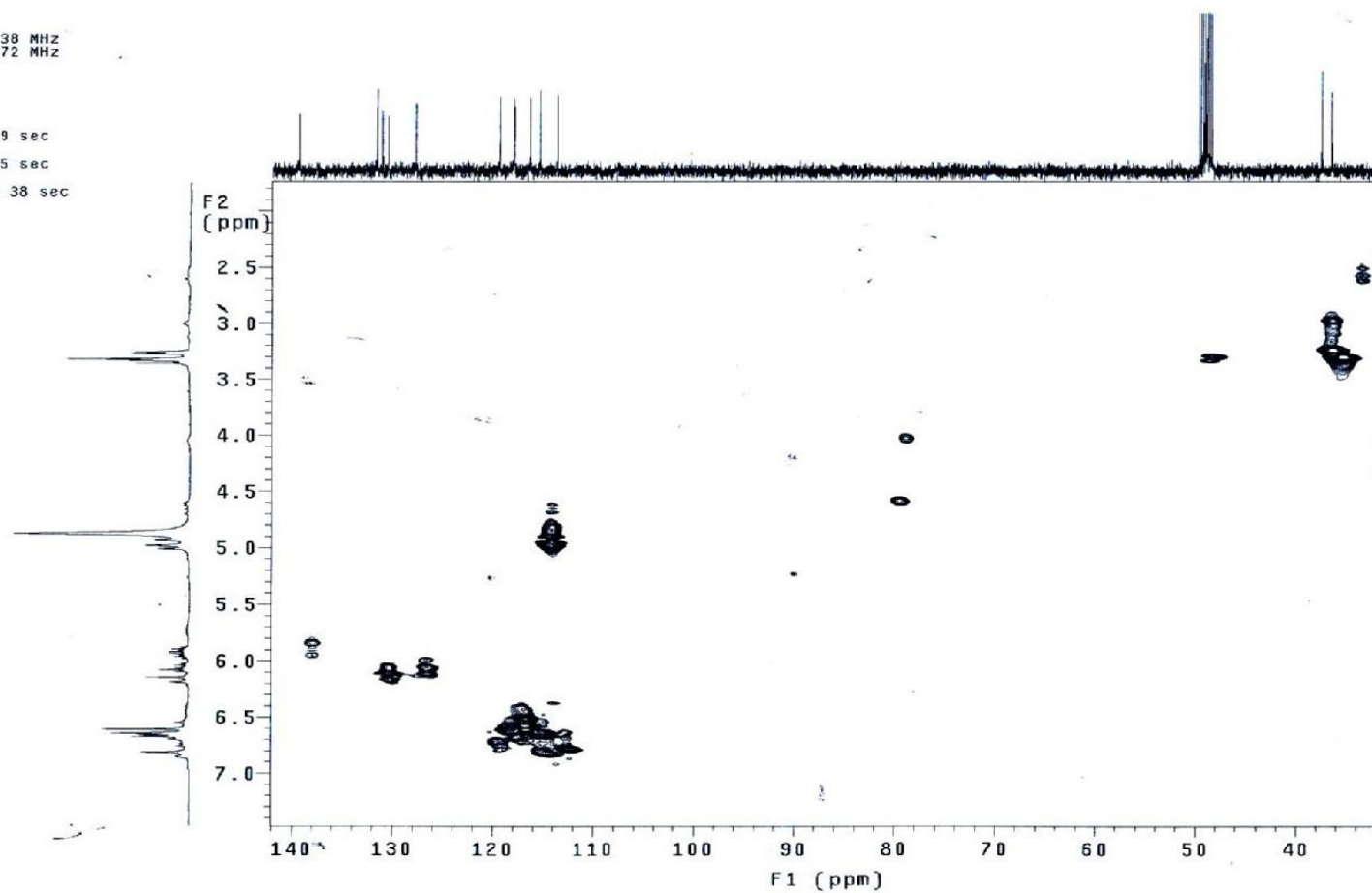
Phổ DEPT-NMR của hợp chất PH6 (42,2 mg) đo trong CD₃OD

Relax. delay 1.000 sec
Mixing 0.080 sec
Acq. time 0.128 sec
Width 6410.3 Hz
2D Width 24146.0 Hz
150 repetitions
200 increments
OBSERVE H1 399.9539059 Mhz
DATA PROCESSING
Sine bell 0.054 sec
F1 DATA PROCESSING
Sine bell 0.008 sec
FT size 4096 x 2048
Total time 10 hr, 7 min, 32 sec



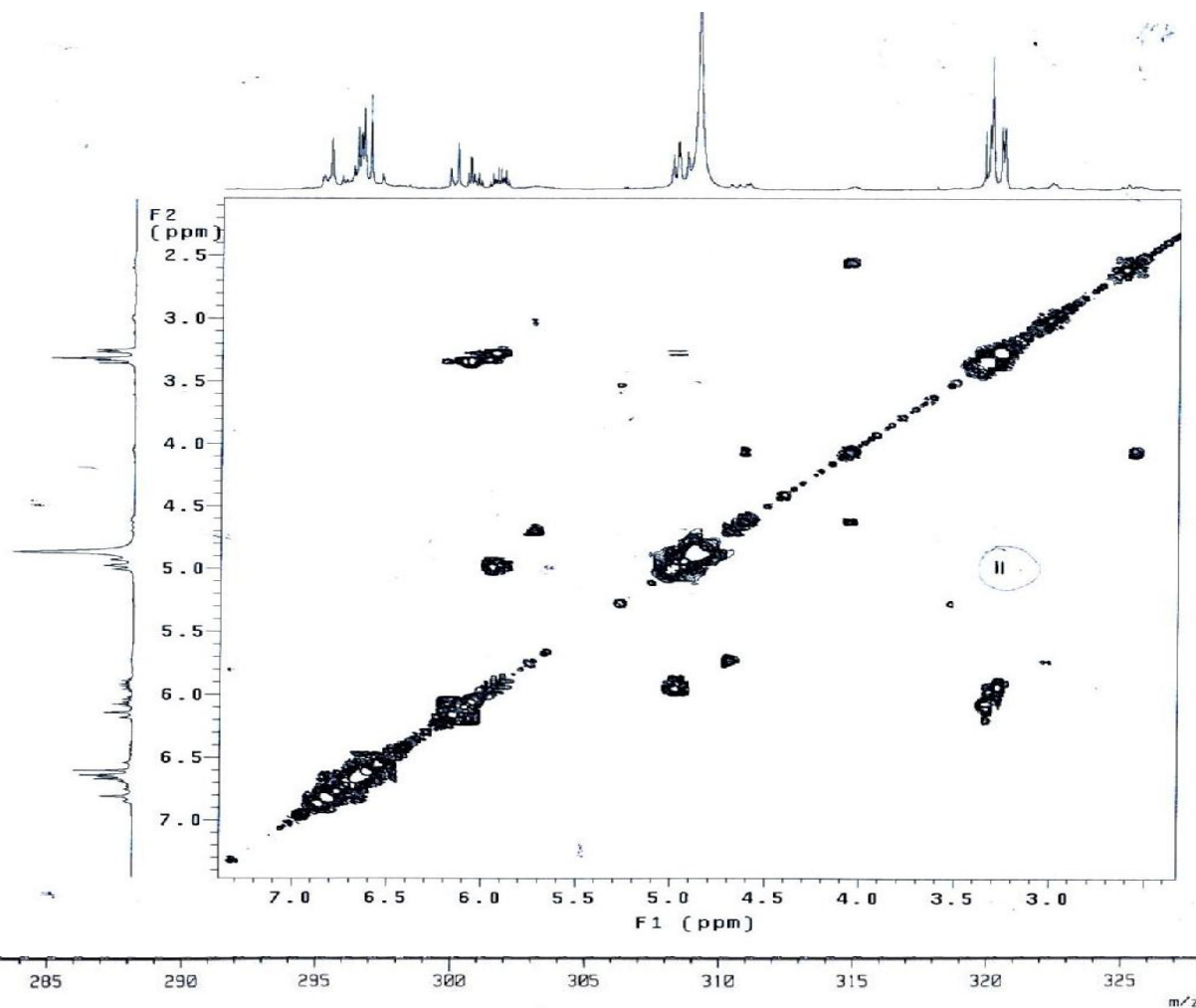
Phổ HMBC-NMR của hợp chất PH6 (42,2 mg) đo trong CD_3OD

Relax. delay 1.000 sec
Acq. time 0.128 sec
Width 8410.3 Hz
2D Width 24140.0 Hz
96 repetitions
2 x 128 increments
OBSERVE H1, 399.9538738 MHz
DECOUPLE C13, 100.5790172 MHz
Power 33 dB
on during acquisition
off during delay
W40 swafrg modulated
DATA PROCESSING
Gauss apodization 0.059 sec
F1 DATA PROCESSING
Gauss apodization 0.005 sec
FT size 4096 x 2048
Total time 8 hr, 4 min, 38 sec



Phổ HSQC-NMR của hợp chất PH6 (42,2 mg) đo trong CD_3OD

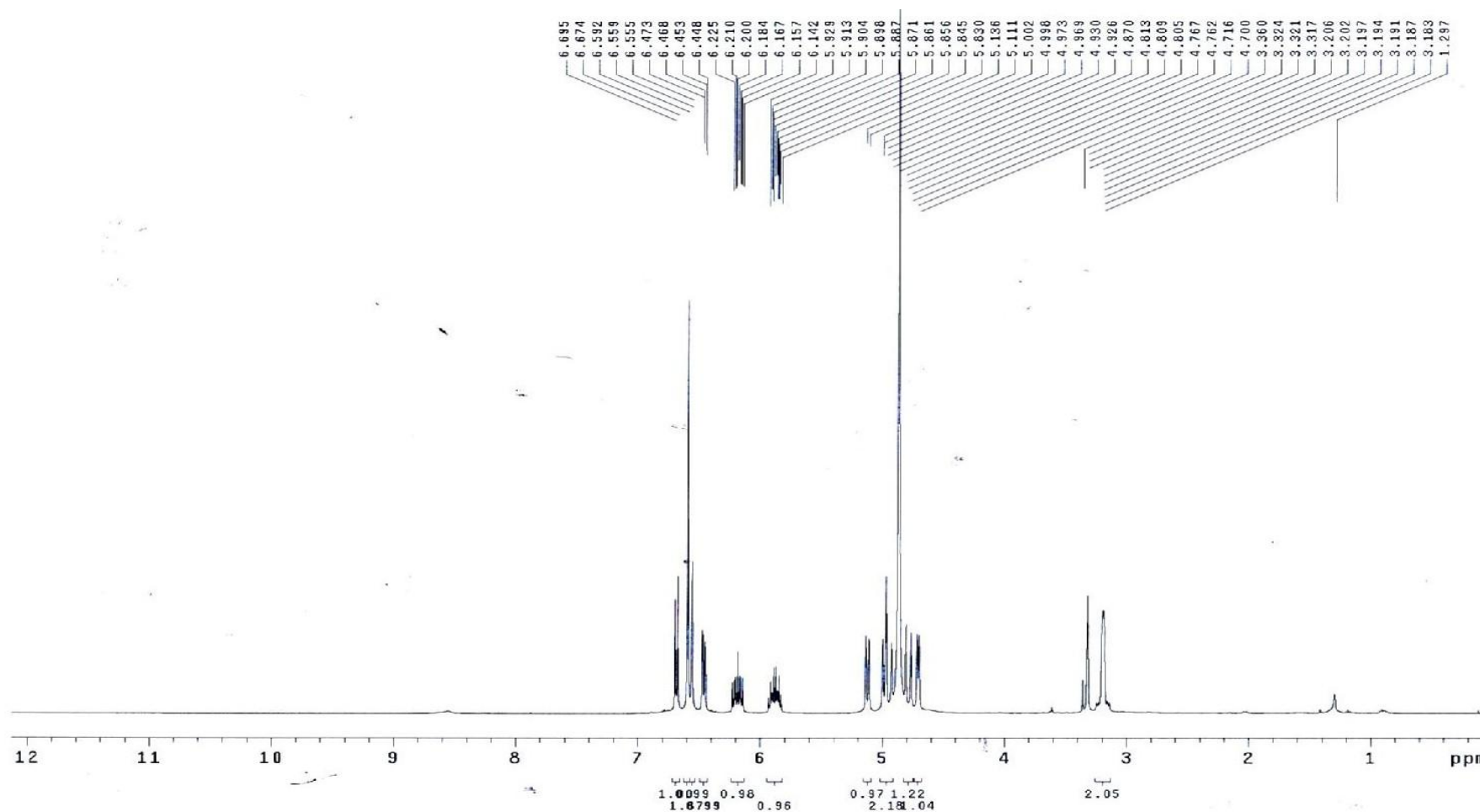
COSY-Dung-C19-42.4mg
 File: Gcosy
 Pulse Sequence: gCOSY
 Solvent: cd3od
 Temp. 25.0 C / 298.1 K
 Operator: vnmr1
 VNMR-400 "DCUNMR400"
 Relax. delay 1.301 sec
 Acq. time 0.160 sec
 Width 6410.3 Hz
 2D Width 6410.3 Hz
 64 repetitions
 128 increments
 OBSERVE H1, 399.9538582 MHz
 DATA PROCESSING
 Sine bell 0.080 sec
 F1 DATA PROCESSING
 Sine bell 0.040 sec
 FT size 2048 x 2048
 Total time 3 hr, 22 min, 56 sec



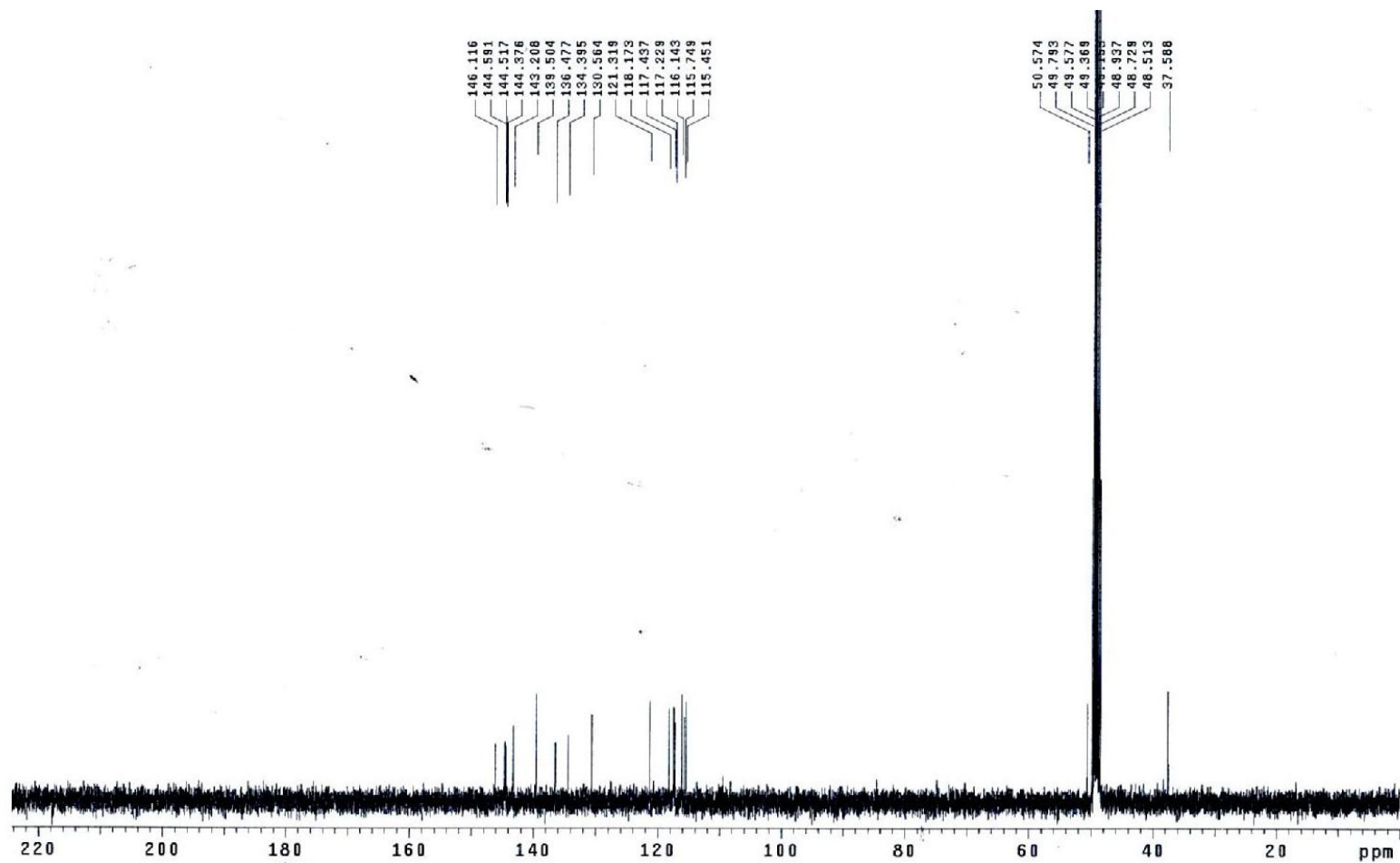
Phổ HR-EI-MS $[M]^+$ của hợp chất PH6 (42,2 mg)

PHỤ LỤC 4.13

DỮ LIỆU PHỔ NMR VÀ PHỔ MS CỦA HỢP CHẤT PH7

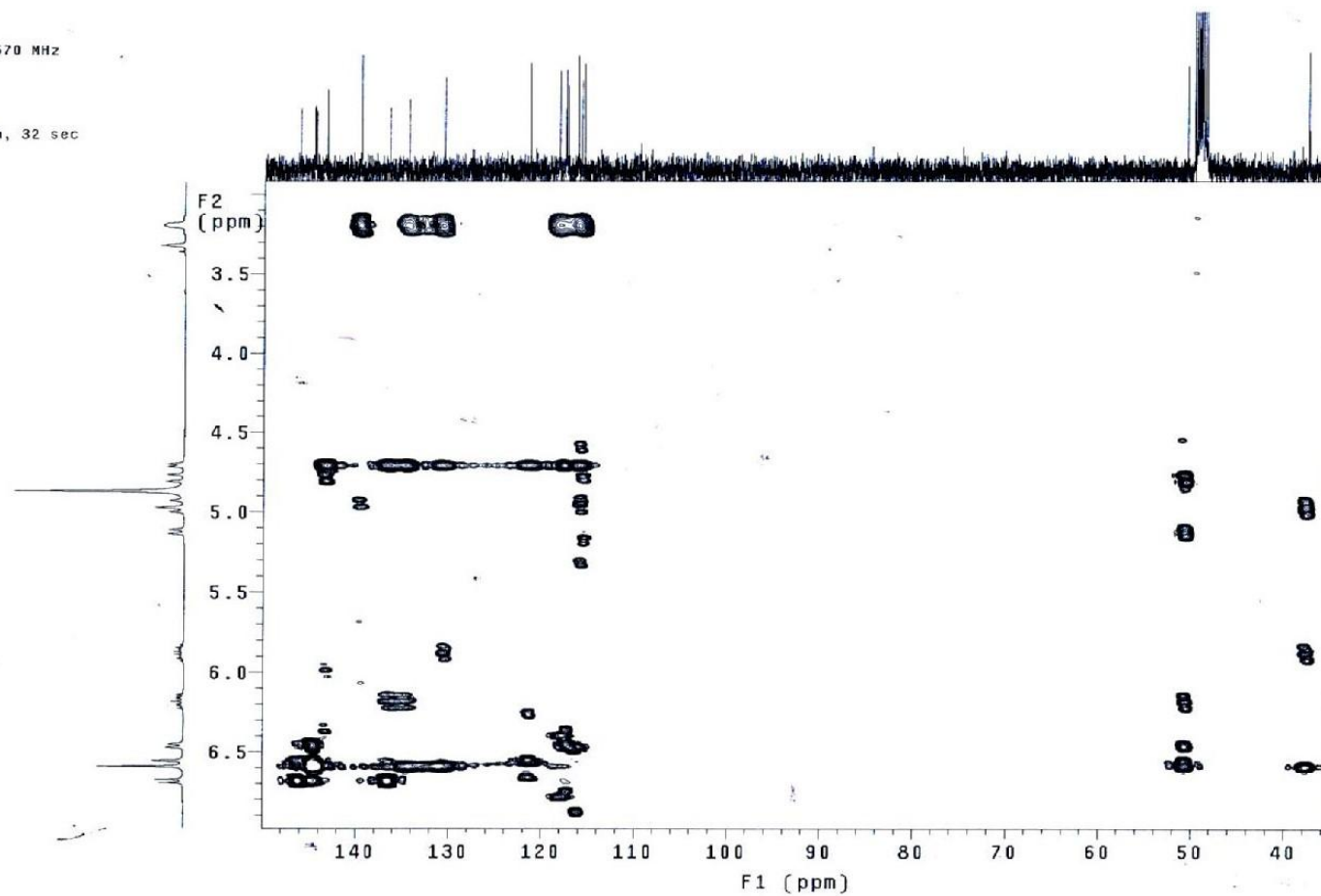


Phổ ^1H -NMR của hợp chất PH7 (23,8 mg) đo trong CD_3OD

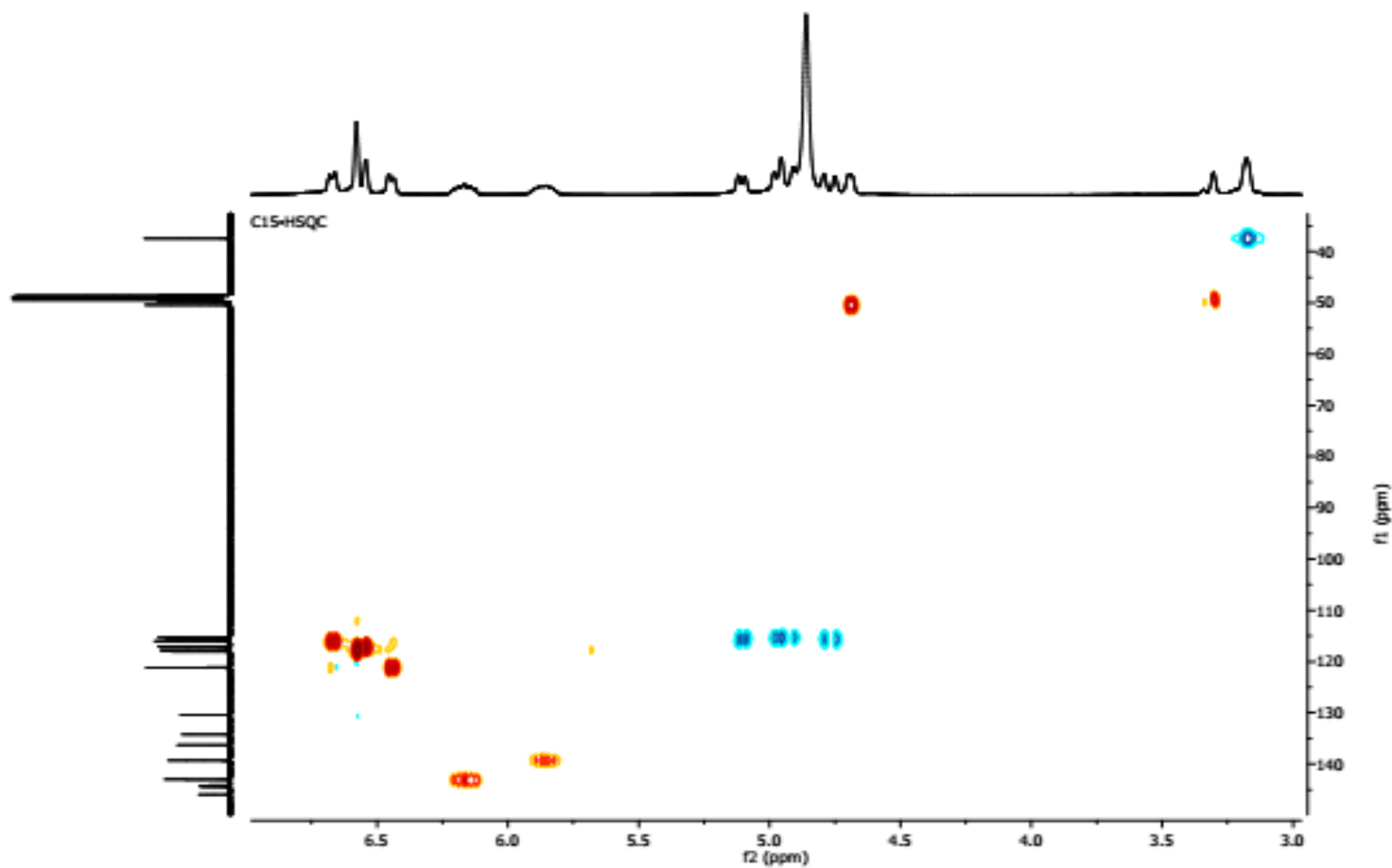


Phổ ¹³C-NMR của hợp chất PH7 (23,8 mg) đo trong CD₃OD

Relax. delay 1.000 sec
Mixing 0.080 sec
Acq. time 0.128 sec
Width 6410.3 Hz
2D Width 24140.0 Hz
150 repetitions
200 increments
OBSERVE H1, 399.9538570 MHz
DATA PROCESSING
Sine bell 0.064 sec
F1 DATA PROCESSING
Sine bell 0.008 sec
FT size 4096 x 2048
Total Time 10 hr, 7 min, 32 sec



Phổ HMBC-NMR của hợp chất PH7 (23,8 mg) đo trong CD₃OD



Phổ HSQC-NMR của hợp chất PH7 (23,8 mg) đo trong CD₃OD

COSY-Dung-PHE4b1a-C15

File: Gcosy

Pulse Sequence: gCOSY

Solvent: cd3od

Temp. 25.0 C / 298.1 K

Operator: vnmr1

VNMR-400 "DCUNMR400"

Relax. delay 1.301 sec

Acq. time 0.160 sec

Width 6410.3 Hz

2D Width 6410.3 Hz

64 repetitions

128 increments

OBSERVE H1, 399.9538591 MHz

DATA PROCESSING

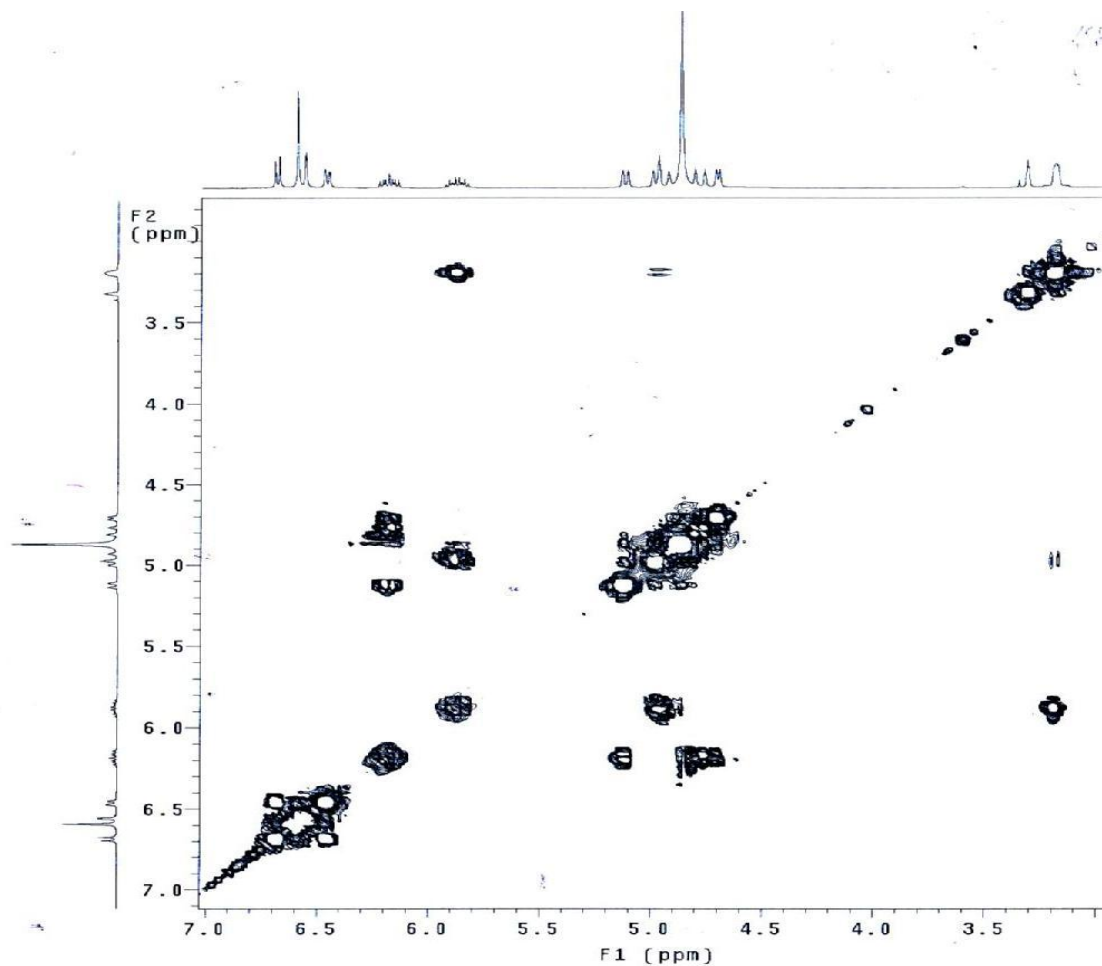
Sine bell 0.080 sec

F1 DATA PROCESSING

Sine bell 0.040 sec

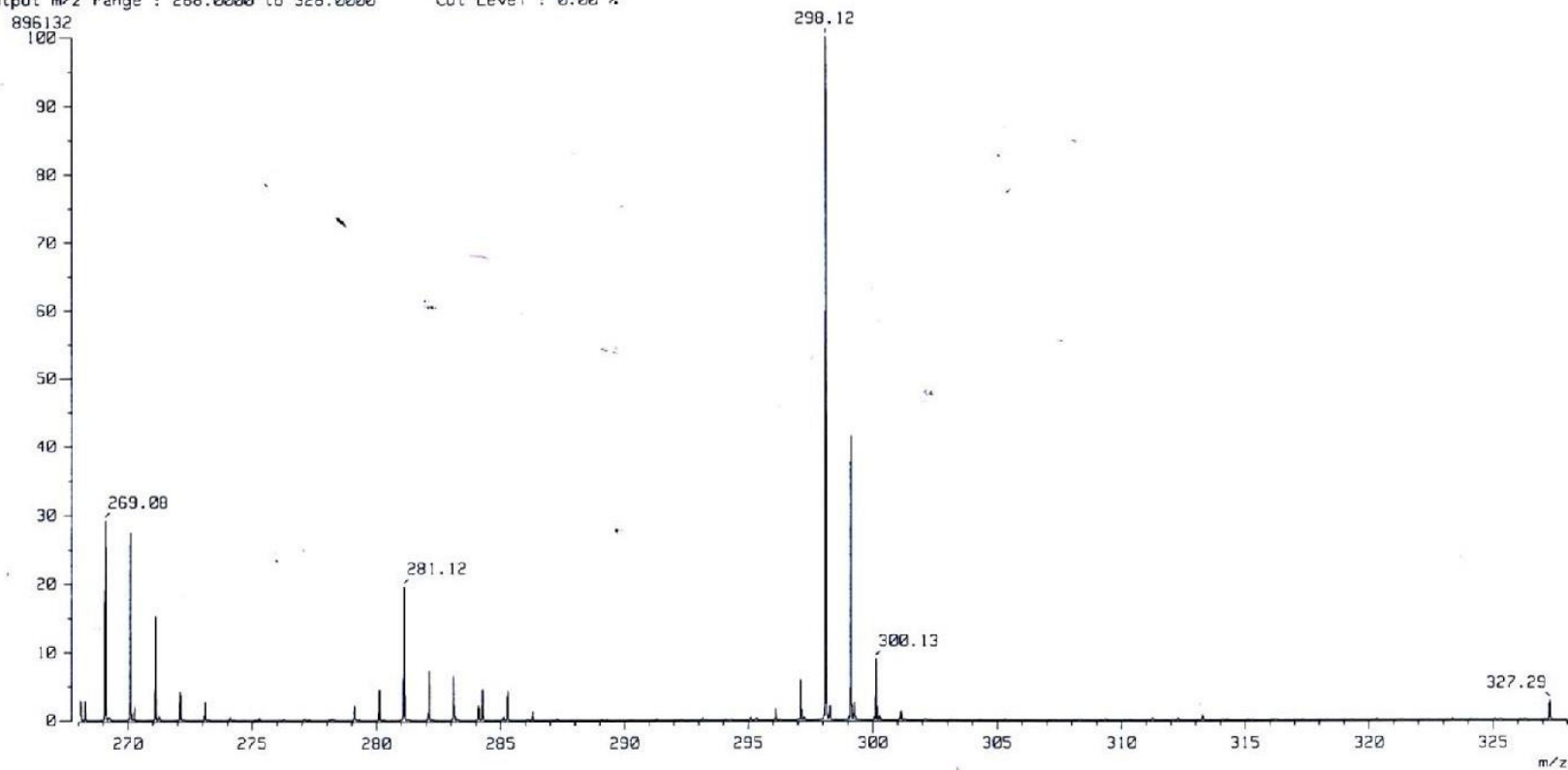
FT size 2048 x 2048

Total time 3 hr, 22 min, 56 sec



Phổ COSY-NMR của hợp chất PH7 (23,8 mg) đo trong CD₃OD

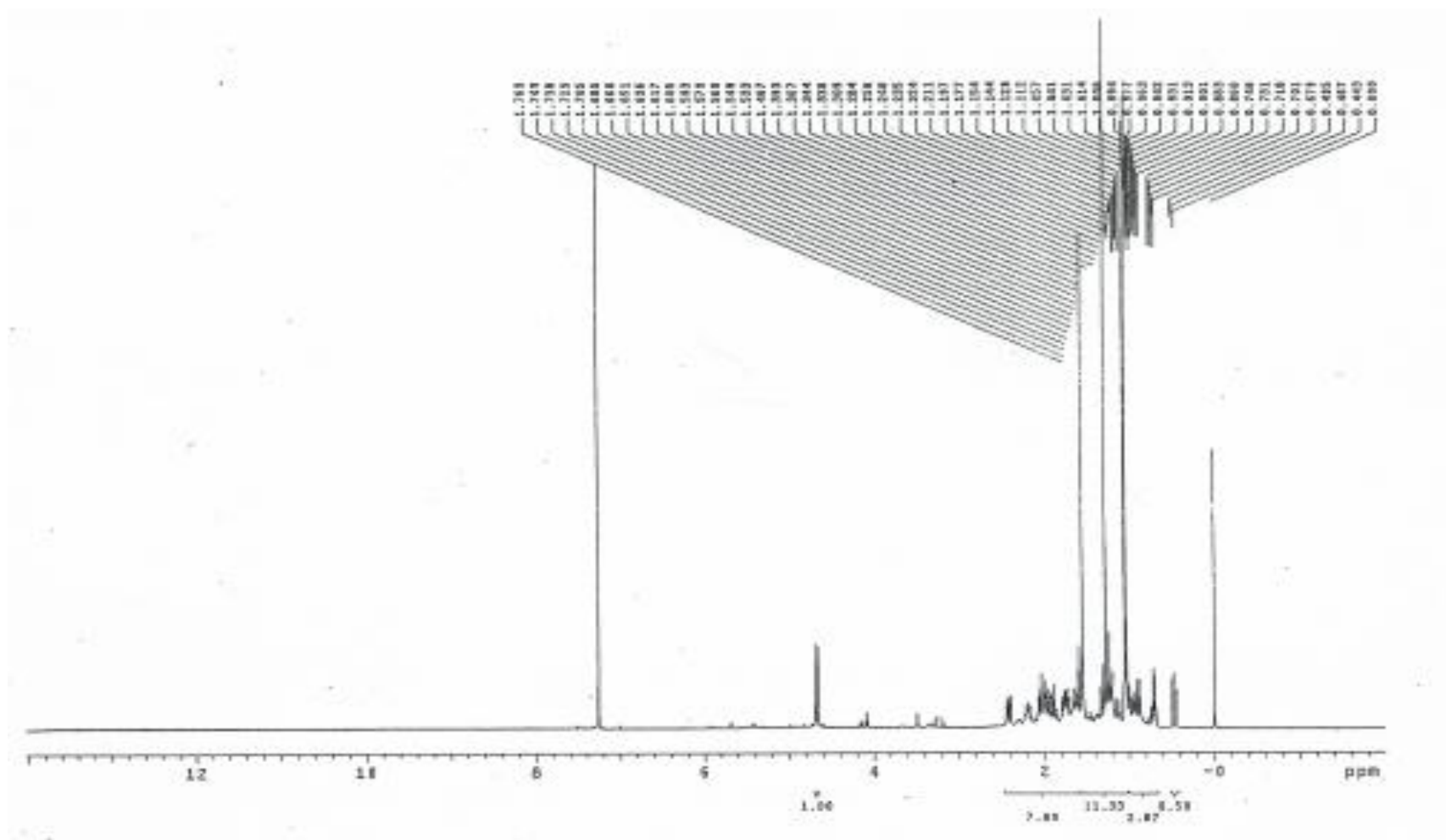
Note : -
Inlet : Direct Ion Mode : EI+
Spectrum Type : Normal Ion [EF-Linear]
RT : 1.28 min Scan# : (26,27)
BP : m/z 298.1203 Int. : 42.73
Output m/z range : 268.0000 to 328.0000 Cut Level : 0.00 %



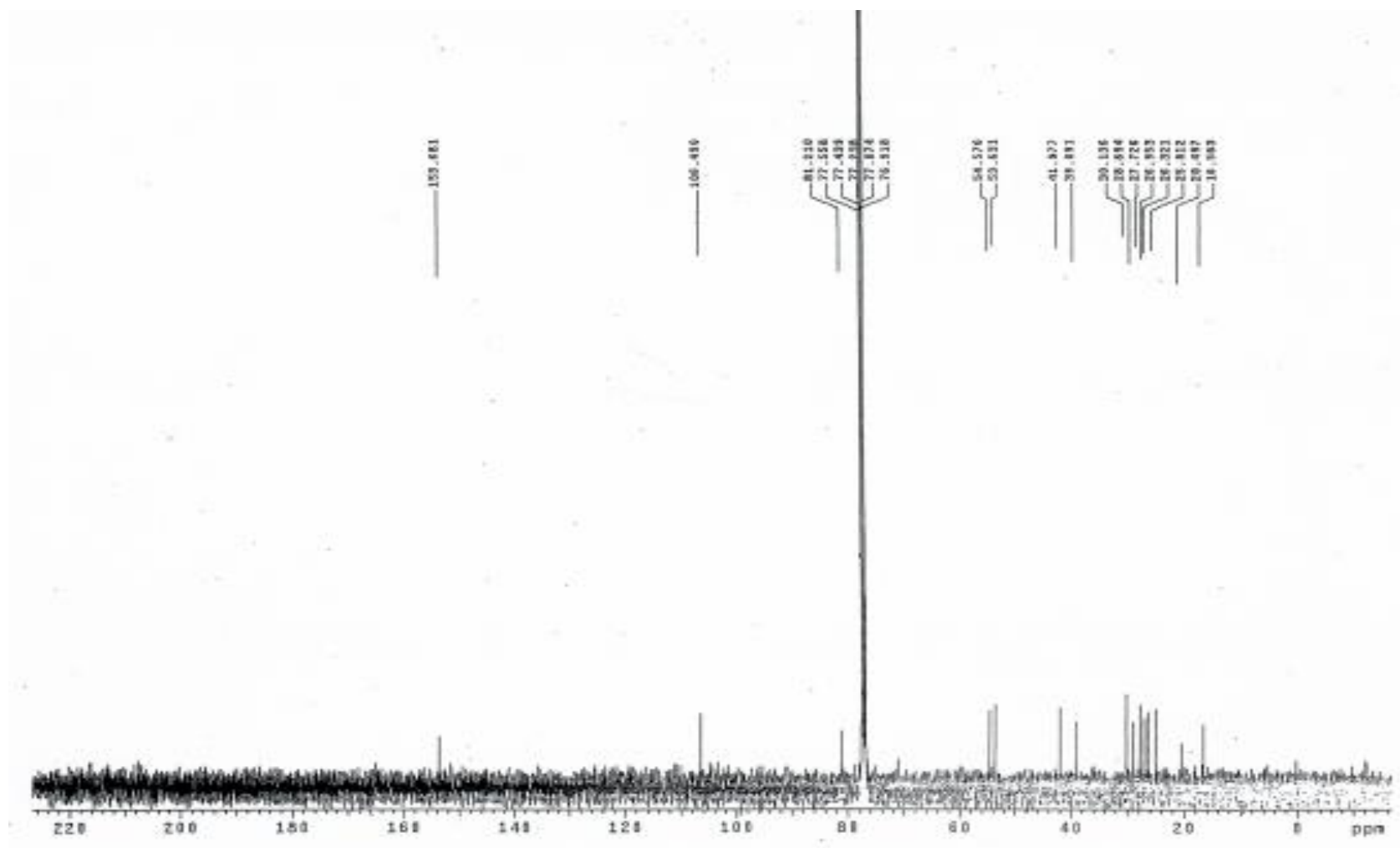
Phổ HR-EI-MS $[M]^+$ của hợp chất PH7 (23,8 mg)

PHỤ LỤC 4.14

DỮ LIỆU PHỔ NMR VÀ PHỔ MS CỦA HỢP CHẤT PH8



Phổ ^1H -NMR của hợp chất PH8 (2,0 mg) đo trong CDCl_3



Phổ ^{13}C -NMR của hợp chất PH8 (2,0 mg) đo trong CDCl_3

PHỤ LỤC 5

CÁC CÔNG TRÌNH ĐÃ CÔNG BỐ LIÊN QUAN ĐẾN LUẬN ÁN

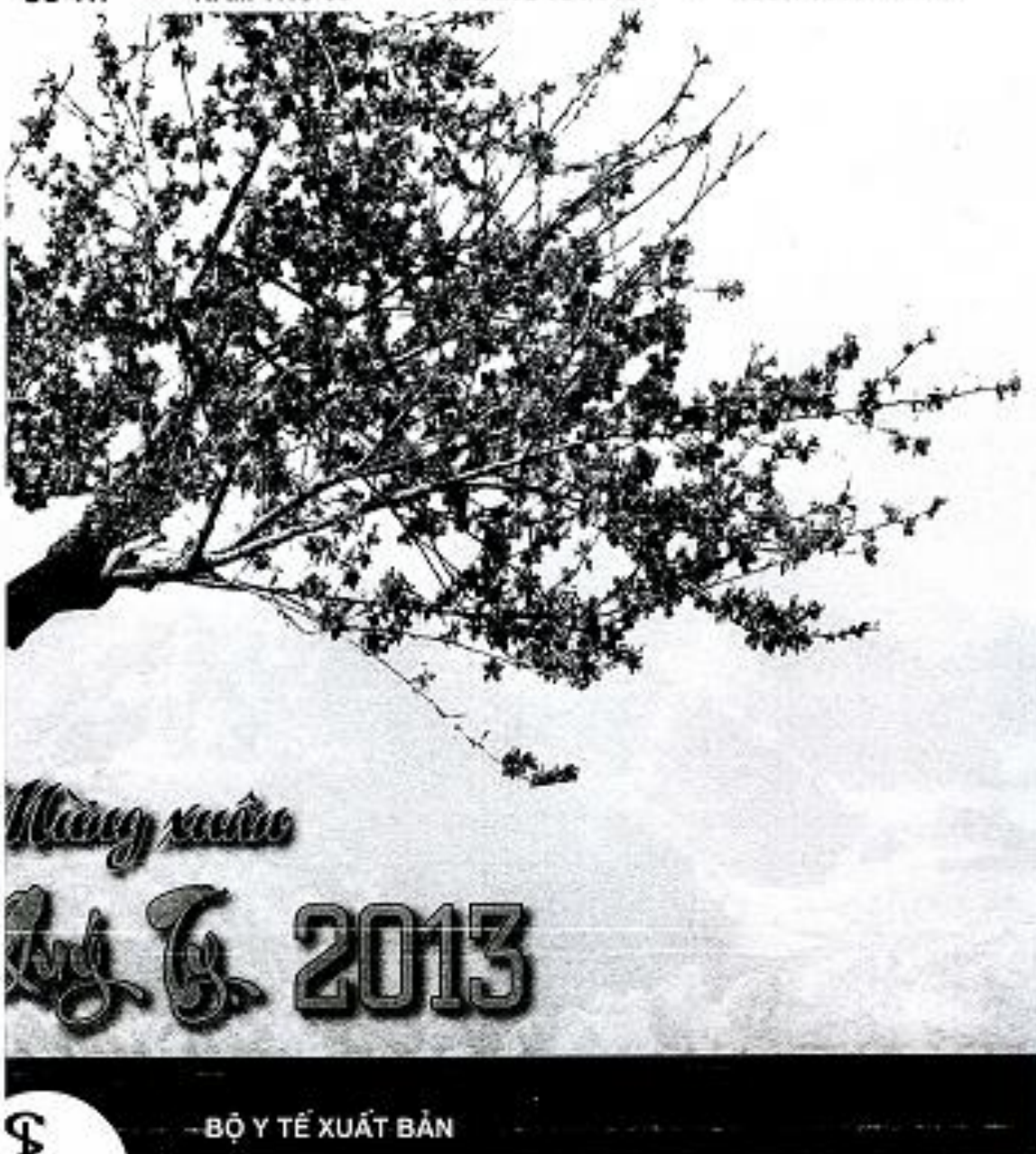
441

1-2013

tạp chí

DƯỢC HỌC

SỐ 441 * NĂM THỨ 53 * THÁNG RA 1 KỶ * ISSN 0866 - 7225



BỘ Y TẾ XUẤT BẢN

MỤC LỤC

QUẢN LÝ – TRAO ĐỔI

ĐỖ TRUNG ĐAM: Cách xác định liều ED ₅₀ (tiếp theo)	2
---	---

NGHIÊN CỨU – KỸ THUẬT

VŨ THỊ HUỠNH HÂN, NGUYỄN NGỌC SAO MAI, NGUYỄN QUANG NAM, TRẦN HÙNG, LÊ HẬU, LÊ QUAN NGHIÊM: Đánh giá tương đương sinh học thuốc dán hấp thu qua da chứa scopolamine 1,5 mg	5
--	---

NGUYỄN THẠCH TÙNG, ĐÀO DANH SƠN: Khảo sát các yếu tố ảnh hưởng đến tính thấm của dược chất trong hệ tế bào qua da chứa rivastigmin	9
--	---

TRẦN HỮU DŨNG: Nghiên cứu các đặc tính lý hóa, hình thái cấu trúc của tinh bột củ mài (<i>Rhizoma Dioscoreae persimilis</i>) ảnh hưởng lên khả năng chịu đựng sự thủy phân bởi hệ enzyme amylase	13
--	----

HOÀNG VIỆT DŨNG, ĐỖ QUYÊN, NGUYỄN MINH CHÍNH, HÀ MINH TÂM, TÔ ĐÀO CƯỜNG: Nghiên cứu đặc điểm thực vật, đặc điểm vi học và tác dụng ức chế enzyme acetylcholinesterase của loài tiêu lá mỏng (<i>Piper tymentophyllum</i> Miq.)	18
---	----

TRẦN VŨ QUỐC BẢO, NGUYỄN NGỌC VINH, ĐẶNG VĂN GIÁP: Vai trò của tá dược Mannogem EZ trong công thức viên nén rã nhanh trong miệng chứa S-amlodipin 2,5 mg	22
--	----

ĐOÀN THỊ NGỌC YẾN, NGUYỄN ĐỨC TUẤN: Định lượng đồng thời paracetamol, loratadin và dexbromethophan HBr trong chế phẩm đa thành phần bằng phương pháp sắc ký lỏng hiệu năng cao với đầu dò dây điện quang	25
--	----

NGUYỄN XUÂN TRƯỜNG, VŨ THỊ MIÊN: Định lượng 1-benzylpiperazin trong viên nén bằng phương pháp sắc ký khí GC-FID	30
---	----

NGUYỄN THỊ LẬP, BÙI BÀ MINH: Nghiên cứu phương pháp liposom hóa doxorubicin bằng kỹ thuật chênh lệch nồng độ amoni sulfate	34
--	----

NGUYỄN HỮU LẠC THỦY, NGUYỄN HỒNG THIÊN THANH, VŨ THỊ BẠCH HUỆ: Phân lập và xây dựng chất chuẩn cinnamidin từ lá trình nữ hoàng cung <i>Cinnam latifolium</i> L. (Amaryllidaceae)	38
--	----

ĐỖ QUANG DƯƠNG, CHUNG KHANG KIẾT: Phân tích mối liên quan nhân quả trong công thức viên nén phóng thích có kiểm soát bằng tọa độ song song	42
--	----

PHÙNG THANH HƯƠNG, NGUYỄN THỊ QUỲNH HOA, HÀ THU: Xác định tính tự đoạn ADN ribosom ITS của loài bạc cần và so sánh sự tương đồng tính tự với một số loài cây thuốc cùng phân họ Chu đồng	46
--	----

VŨ BÌNH DƯƠNG, HỒ ANH SƠN, VŨ XUÂN NGHĨA, TRẦN NAM TRUNG: Đánh giá tác dụng bảo vệ cơ quan miễn dịch của dịch chiết tỏi đen Lý Sơn trên chuột bị chiếu xạ	51
---	----

DIỆM SÁCH BÁO

56

CONTENTS

MANAGEMENT – PROFESSIONAL EXCHANGES

• ĐỖ TRUNG ĐAM: Method for establishment of ED ₅₀ doses (cont.)	2
--	---

RESEARCH – TECHNIQUES

• VŨ THỊ HUỠNH HÂN, NGUYỄN NGỌC SAO MAI, NGUYỄN QUANG NAM, TRẦN HÙNG, LÊ HẬU, LÊ QUAN NGHIÊM: Estimation of the scopolamine-transdermal bioequivalence between the patches TTS (1.5 mg) and Aclat TDDS (1.5 mg)	5
---	---

• NGUYỄN THẠCH TÙNG, ĐÀO DANH SƠN: Study on influences of some formulation factors on the transdermal permeability of rivastigmine	9
--	---

• TRẦN HỮU DŨNG: The tuber starch from <i>Rhizoma Dioscoreae persimilis</i> - Physical and chemical properties, morphological and structural features that determine amylase-resistant potential of the starch	13
--	----

• HOÀNG VIỆT DŨNG, ĐỖ QUYÊN, NGUYỄN MINH CHÍNH, HÀ MINH TÂM, TÔ ĐÀO CƯỜNG: Botanic morphology, microscopy and taxonomy of the <i>Piper</i> species of Vietnam known as "Tiêu lá mỏng" by the Vietnamese agronom	18
---	----

• TRẦN VŨ QUỐC BẢO, NGUYỄN NGỌC VINH, ĐẶNG VĂN GIÁP: Effects of the excipient Mannogem EZ in the formulation of rapid-dispersion tablets containing S-amlodipine 2.5 mg	22
---	----

• ĐOÀN THỊ NGỌC YẾN, NGUYỄN ĐỨC TUẤN: An HPLC method for simultaneous determination of paracetamol, loratadine and dexbromethophane HBr in their multi-component pharmaceuticals	25
--	----

• NGUYỄN XUÂN TRƯỜNG, VŨ THỊ MIÊN: Quantitative determination of 1-benzylpiperazine in tablets by GC-FID	30
--	----

• NGUYỄN THỊ LẬP, BÙI BÀ MINH: Liposomization of doxorubicin by the ammonium sulfate gradient technique	34
---	----

• NGUYỄN HỮU LẠC THỦY, NGUYỄN HỒNG THIÊN THANH, VŨ THỊ BẠCH HUỆ: Isolation and establishment of the reference standard of cinnamidine from the leaves of <i>Cinnam latifolium</i> L. (Amaryllidaceae)	38
---	----

• ĐỖ QUANG DƯƠNG, CHUNG KHANG KIẾT: Analysis of the cause-effect relationships in formulation of controlled-release tablets by parallel coordinates	42
---	----

• PHÙNG THANH HƯƠNG, NGUYỄN THỊ QUỲNH HOA, HÀ THU: Determination of the ITS-ribosome DNA sequence of <i>Streptococcus kleini</i> in comparison with the analogous sequence of <i>Streptococcus juvenis</i>	46
--	----

• VŨ BÌNH DƯƠNG, HỒ ANH SƠN, VŨ XUÂN NGHĨA, TRẦN NAM TRUNG: Protective actions of the extracts from Ly Son black garlic on the immune system in irradiated mice	51
---	----

MEDICAL BOOKS AND MAGAZINES IN BRIEF

56

**Nghiên cứu đặc điểm thực vật, đặc điểm
vi học và tác dụng ức chế enzym
cetylcholinesterase của loài tiêu lá mỏng
(*Piper hymenophyllum* Miq.)**

Hoàng Việt Dũng¹, Đỗ Quyền², Nguyễn Minh Chính¹,
Hà Minh Tâm³, Tô Đào Cường⁴

¹ Học viện Quân y, ² Trường Đại học Dược Hà Nội

⁵ Trường Đại học Sư phạm Hà Nội 2

⁴ Trường Đại học Catholic Daegu - Hàn Quốc

: vấn đề

Piper L., thuộc họ Hồ tiêu (*Piperaceae*), chi lớn của giới thực vật. Nghiên cứu về ứng dụng lý cho thấy các loài của chi này dùng kháng khuẩn, chống nấm, kháng r, chữa tiểu đường, chống oxy hóa... Đặc biệt nghiên cứu gần đây cho thấy một số thuộc chi này có hoạt tính ức chế acetylcholinesterase (AChE)^[3, 9]. Đây là có thể tác động để điều chỉnh sự thiếu hụt acetylcholin trong não, tình trạng gặp ở bệnh nhân Alzheimer. Trên cơ sở khảo sát hoạt tính ức chế AChE của một số loài thuộc chi *Piper* L. thu hái ở vùng núi phía Bắc, chúng tôi đã lựa chọn hai loài để nghiên cứu về tác dụng lý này của chúng. Trong bài báo này, tôi thông báo những kết quả nghiên cứu về vật, đặc điểm bột, đặc điểm vi học, định xa học và tác dụng ức chế AChE của loài *Piper nigrum* L.

uyên liệu, thiết bị và phương
nghiên cứu

Nguyên liệu, hoá chất và thiết bị

Nguyên liệu

J đã làm tiêu bản (ký hiệu HVD 004-11) nghiên cứu tác dụng dược lý được thu hái ở Quốc gia Cúc Phương, Ninh Bình vào 14/2011.

2 chất

(ATCl), acid 5-5'-dithiobis-2-nitrobenzoic (DTNB), NaH_2PO_4 , Na_2HPO_4 và berberin: mua của Hãng Sigma – Mỹ.

Thiét bị dụng cụ

Bộ chiết hồi lưu, máy cắt quay chân không (Buchi - Thụy Sĩ), máy đo quang 96 giếng (VERSA max - Mỹ), cân phân tích Satorius (độ chính xác 0.1 mg)...

Phương pháp nghiên cứu

Phân tích hình thái thực vật và định tên khoa học

- Mô tả đặc điểm hình thái mẫu nghiên cứu^[1]. Phân tích hoa trên kính lúp soi nổi và chụp ảnh.
- Giám định tên khoa học của mẫu nghiên cứu: đối chiếu với các tài liệu thực vật chi và tiêu bản gốc.
- Nghiên cứu đặc điểm vi học: quan sát và chụp ảnh cấu tạo vi phẫu lá, thân và bột được liêu trên kính hiển vi^[2].

Nhiên cứu tác dụng dược lý in vitro

Hoạt tính ức chế AChE được đánh giá theo phương pháp đo quang của Ellman, được mô tả trong tài liệu³¹. Hỗn hợp phản ứng gồm: 140 μ l đệm natri phosphat pH=8,0; 20 μ l dung dịch mẫu thử; 20 μ l dung dịch AChE sau đó trộn và ủ 15 phút ở nhiệt độ phòng (mẫu thử và berberin được hòa tan trong DMSO). Phản ứng được bắt đầu bằng việc thêm lần lượt 10 μ l dung dịch DTNB và 10 μ l dung dịch ATCl. Tiến hành đo quang ở bước sóng 412 nm trong thời gian 15

442

2-2013

tạp chí

ĐƯỢC HỌC

SỐ 442 * NĂM THỨ 53 * THÁNG RA 1 KỶ * ISSN 0866 - 7225

HỘI NGHỊ TRỰC TUYẾN TỔNG KẾT CÔNG TÁC Y TẾ 2012, TRIỂN KHAI KẾ HOẠCH 2013

Hà Nội, ngày 24 tháng 01 năm 2013



Bộ Y tế: Hội nghị trực tuyến tổng kết công tác y tế 2012, triển khai kế hoạch 2013



BỘ Y TẾ XUẤT BẢN

Địa chỉ Tòa soạn: 138A Giảng Võ - Hà Nội

Tel: 04.3 8461 430 - 04.3 8463 952. Fax: 04.3 8463 952

E-mail: tanchiduong@tuhoc.com

NGHIÊN CỨU - KỸ THUẬT

• NGUYỄN PHƯƠNG NHUNG, VŨ ĐĂNG HOÀNG: Tổng quan ứng dụng quang phổ đạo hàm trong định lượng thuốc đa thành phần. Phần 1: Đại cương phổ đạo hàm	2
• NGUYỄN NGỌC YẾN NHÌ, VĨNH BÌNH: Xây dựng quy trình định lượng đồng thời paracetamol và caffeine bằng phương pháp điện di mao quản, tối ưu hóa bằng phần mềm JMP	6
• NGUYỄN NGỌC CHIẾN, TRINH HUY CÔNG: Nghiên cứu xây dựng công thức bào chế pellet omeprazol bao tan ở ruột	10
• HUỖNH THỊ ÁNH HẰNG, ĐẶNG VĂN GIÁP, PHẠM THỊ BÍCH THUY: Xây dựng công thức viên nén glimepirid 2 mg với Mannogem 2000 cải thiện độ hoà tan	14
• TRẦN HỮU DŨNG: Khảo sát các yếu tố ảnh hưởng đến sự phóng thích metronidazol từ film cholesteryl dendrimer G5	18
• PHÙNG ĐỨC TRUYỀN, NGUYỄN PHƯỚC TRƯỜNG, HUỖNH VĂN HÒA, ĐẶNG VĂN TÍNH: Nghiên cứu điều chế hệ phân tán rắn hydroxybutyl-beta-cyclodextrin làm tăng độ tan của rutin	23
• TIÊU NGỌC CHIẾN, NGUYỄN TRỌNG THÔNG, MAI PHƯƠNG THANH, PHẠM THỊ VĂN ANH, NGUYỄN KIỆU VÂN: Nghiên cứu tác dụng hạ glucose huyết của cao lỏng thảo vị gừng đường phượng trên chuột nhắt bình thường và một số mô hình tăng glucose máu thực nghiệm	28
• NGUYỄN TƯỜNG VY, NGUYỄN TIẾN ĐẠT: Xác định cấu trúc và hoạt tính chống oxy hóa của một số flavonoid phân lập từ cây cỏ láo (<i>Chromolaena odorata</i>)	33
• HOÀNG VIỆT DŨNG, ĐỖ QUYÊN, NGUYỄN MINH CHÍNH, TÔ ĐẠO CƯỜNG, ĐƯƠNG SUN MINH: Nghiên cứu đặc điểm thực vật, đặc điểm vi học và tác dụng ức chế enzyme acetylcholinesterase của loài tiêu ba vị (<i>Piper bawitum</i> C.DC.)	36
• <u>TRẦN THU HOÀ</u> , TRẦN HOÀNG DŨNG, NGUYỄN LÊ HUYỀN THANH, NGUYỄN THỊ NGỌC TUYẾT, NGUYỄN THỊ PHƯƠNG THẢO, TRẦN HỒNG BẢO QUYÊN, TRẦN CÔNG LUÂN: Khảo sát đặc tính dược liệu và bước đầu định danh bằng tính tự ITS và matK cho một mẫu ngải mới tìm thấy ở vùng núi Cẩm - An Giang	40
• PHẠM VĂN VƯỢNG, PHẠM THANH KỶ, NGUYỄN THỊ BÍCH THỦY, PHẠM VĂN KIỂM: Các hợp chất phenylpropanoid phân lập từ rễ cây đơn kim (<i>Bidens pilosa</i> L.)	46
• NGUYỄN HỮU LẠC THỦY, LÊ MINH THẮNG, KIỆU LÊ THANH THẢO, VŨ THỊ BẠCH HUỆ: Định lượng đồng thời 6 alkaloid (cinarinidin, 6-hydroxycinarinidin, 6-hydroxyposellin, 6-hydroxybuphanidin, undulatin, 6-hydroxyundulatin) từ cao chiết lá hình số hoàng cùng (<i>Croton laetifolius</i>) bằng sắc ký lỏng hiệu năng cao	52
DIỂM SÁCH BẢO	57
TIN TRONG NGÀNH	58

RESEARCH - TECHNIQUES

• NGUYỄN PHƯƠNG NHUNG, VŨ ĐĂNG HOÀNG: A review on the potential applicability and practical use of UV-VIS derivative spectrophotometry in the quality control of multi-component pharmaceuticals. Part 1 - Theoretical foundations of derivative spectrophotometry	2
• NGUYỄN NGỌC YẾN NHÌ, VĨNH BÌNH: A new capillary electrophoresis (CE) method optimized by JMP software for simultaneous determination of paracetamol and caffeine	6
• NGUYỄN NGỌC CHIẾN, TRINH HUY CÔNG: Study on formulation of enteric-coated pellets of omeprazol	10
• HUỖNH THỊ ÁNH HẰNG, ĐẶNG VĂN GIÁP, PHẠM THỊ BÍCH THUY: Formulation of tablets Glimepirid 2 mg of enhanced dissolubility with Mannogem 2000 as dissolubility enhancer	14
• TRẦN HỮU DŨNG: Investigation of influencing factors on the metronidazol release from the film coat of cholesteryl dendrimer G5	18
• PHÙNG ĐỨC TRUYỀN, NGUYỄN PHƯỚC TRƯỜNG, HUỖNH VĂN HÒA, ĐẶNG VĂN TÍNH: Preparation of the solid-dispersion vehicle with hydroxybutyl-beta-cyclodextrin to improve the dissolubility of rutin	23
• TIÊU NGỌC CHIẾN, NGUYỄN TRỌNG THÔNG, MAI PHƯƠNG THANH, PHẠM THỊ VĂN ANH, NGUYỄN KIỆU VÂN: Hypoglycaemic virtue of the liquid extracts from the herbal remedy "thảo vị gừng đường phượng" (10 herbal blend sugar-reducing remedy) in normal and experimentally induced hyperglycaemic mice	28
• NGUYỄN TƯỜNG VY, NGUYỄN TIẾN ĐẠT: Structural confirmation and estimation of antioxidant activities of some flavonoids from <i>Chromolaena odorata</i>	33
• HOÀNG VIỆT DŨNG, ĐỖ QUYÊN, NGUYỄN MINH CHÍNH, TÔ ĐẠO CƯỜNG, ĐƯƠNG SUN MINH: Study on botanic morphology, microscopic characterization and inhibitory actions on acetylcholinesterase enzymes of <i>Piper bawitum</i> C.DC. grown in Ba Vi (North Vietnam)	36
• <u>TRẦN THU HOÀ</u> , TRẦN HOÀNG DŨNG, NGUYỄN LÊ HUYỀN THANH, NGUYỄN THỊ NGỌC TUYẾT, NGUYỄN THỊ PHƯƠNG THẢO, TRẦN HỒNG BẢO QUYÊN, TRẦN CÔNG LUÂN: Pharmacognostic specifications and preliminary taxonomic identification by ITS and matK sequences of the plant "Ngải sây cù lơn" found in Cam Mountain, An Giang province (South Vietnam)	40
• PHẠM VĂN VƯỢNG, PHẠM THANH KỶ, NGUYỄN THỊ BÍCH THỦY, PHẠM VĂN KIỂM: Phenylpropanoid compounds from the roots of <i>Bidens pilosa</i> L.	46
• NGUYỄN HỮU LẠC THỦY, LÊ MINH THẮNG, KIỆU LÊ THANH THẢO, VŨ THỊ BẠCH HUỆ: HPLC simultaneous determination of 6 alkaloids, viz. cinarinidin, 6-hydroxycinarinidin, 6-hydroxyposellin, 6-hydroxybuphanidin, undulatin and 6-hydroxyundulatin, from the leaves of <i>Croton laetifolius</i>	52
MEDICAL BOOKS AND MAGAZINES IN BRIEF	57
NEWS IN BRANCH	58

acacetin (1), kaempferide (2), luteolin (3), velutin (4) - were isolated and identified. Their antioxidant activities were evaluated on the DPPH and superoxide scavenging capacities. While only luteolin showed scavenging activity on DPPH, other three compounds (1), (2) and (3) were active on superoxide radicals. The superoxide scavenging capacity of kaempferide and velutin was reported for the first time.

Tài liệu tham khảo

1. Võ Văn Chi (1997), Từ điển cây thuốc Việt Nam, Nhà xuất bản Y học, trang 274.
2. Hung T. M., Cuong T. D., Dang N. H., Zhu S., Long P. Q., Komatsu K., Min B.S. (2011), "Flavonoid glycosides from *Chromolaena odorata* leaves and their in vitro cytotoxic activity", *Chem. Pharm. Bull.* (Tokyo), 59(1), 129-131.
3. Ling B., Zhang M., Kong C., Pang X., Liang G. (2003), "Chemical composition of volatile oil from

Chromolaena odorata and its effect on plant, fungi and insect growth", *Ying Yang Sheng Tai Xue Bao*, 14 (5), 744-746.

4. Ohtsuki Takashi, Hiraka Takahito, Kikuchi Hiroyuki et al (2009), "Flavonoids from *Eupatorium odoratum* with death receptor 5 promoter enhancing activity", *Heterocycles*, 77(2), 1379-1388.

5. Agrawal P. K. (1989), *Carbon-13 NMR of flavonoids*, Elsevier-Amsterdam, tr. 123-157.

6. Cacares A., Menendez H., Mendez E., Cohobon E., Samayla B. E., Jauregui E., Presita E., Carrilo G. (1995), "Antigonorrheal activity of plants used in Guatemala for the treatment of sexually transmitted diseases", *Journal of Ethnopharmacology*, 48, 85-88.

7. Samhan-Arias A. K., Marín-Romero F. J., Gutiérrez-Merino C. (2004), "Kaempferol blocks oxidative stress in cerebellar granule cells and reveals a key role for reactive oxygen species production at the plasma membrane in the commitment to apoptosis", *Free Radic. Biol. Med.*, 37(1), 48-61.

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.)

Hoàng Việt Dũng¹, Đỗ Quyên², Nguyễn Minh Chính¹,
Tô Đào Cường³, Byung Sun Min³

¹ Học viện Quân y

² Trường Đại học Dược Hà Nội

³ Đại học Catholic Daegu - Hàn Quốc

Đặt vấn đề

Chi *Piper* L. thuộc họ Hồ tiêu (Piperaceae) là một chi lớn với số lượng khoảng 1000 loài trên toàn thế giới và khoảng 40 loài ở Việt Nam. Những nghiên cứu gần đây cho thấy một vài loài thuộc chi *Piper* L. có hoạt tính ức chế enzym acetylcholinesterase (AChE), một enzym hiện được coi là đích tác động để điều trị triệu chứng bệnh Alzheimer [1,6]. Dựa trên kết quả thực nghiệm, hai loài *Piper* thu hái ở Cúc Phương - Ninh Bình đã được chọn để tiến hành

những nghiên cứu sâu hơn. Ở bài báo trước [7], chúng tôi đã thông báo những nghiên cứu về thực vật, vi học và tác dụng dược lý của loài *Piper hymenophyllum* Miq.. Trong bài báo này, chúng tôi tiếp tục thông báo những kết quả nghiên cứu về thực vật, đặc điểm bột, đặc điểm vi phẫu, định tên khoa học và tác dụng ức chế AChE của loài *Piper bavinum* C.DC..

Nguyên liệu, thiết bị và phương pháp nghiên cứu

447

7-2013

tạp chí

DƯỢC HỌC

SỐ 447 * NĂM THỨ 53 * THÁNG RA 1 KỶ * ISSN 0866 - 7861



CÂY HỒ TIÊU

Piper nigrum L.,

họ Hồ tiêu (Piperaceae)



BỘ Y TẾ XUẤT BẢN

Địa chỉ Tòa soạn: 138A Giảng Võ - Hà Nội

Tel: 04.3 8461 430 - 04.3 8463 952. Fax: 04.3 8463 952

E-mail: tapchiduc@yphoc.com

NGHIÊN CỨU – KỸ THUẬT

• HOÀNG VIỆT DŨNG, ĐỖ QUYÊN, NGUYỄN MINH CHÍNH: Tổng quan về nhóm hợp chất alkanopolybenzen phân lập được từ chi <i>Piper</i> L., họ Hồ tiêu	2
• TRẦN HỮU DŨNG, NGUYỄN HẢI THUY: Tổng quan về vai trò sinh lý của kháng trong kiểm soát đường huyết sau ăn trên bệnh nhân đái tháo đường type 2	6
• NGUYỄN THẠCH TÙNG, YUN-SEOK RHEE: Khảo sát ảnh hưởng của tá dược, kích thước tiểu phân và một số đặc tính vật lý của hệ phân tán rắn chứa celecoxib	14
• VŨ THỊ THUẬN, TRƯƠNG VIỆT BÌNH, NGUYỄN THỊ THANH HẠ, NGUYỄN TRỌNG THÔNG, PHẠM THỊ VĂN ANH, NGUYỄN PHƯƠNG THANH: Nghiên cứu tác dụng điều chỉnh rối loạn lipid máu của BBT trên chuột nhắt trắng thực nghiệm	18
• PHẠM THỊ HÒA, VŨ THỊ HƯƠNG NÀ: Khảo sát tác dụng chống oxy hóa và bảo vệ gan của rễ khi sinh cây dứa Kaldia (<i>Pandanus kaldi</i> Kurz.) trên thực nghiệm	21
• VŨ BÌNH DƯƠNG, NGUYỄN VĂN LONG: Đánh giá tác dụng chống oxy hóa của dịch chiết vỏ đơn Ly Sơn trên động vật thực nghiệm	24
• NGUYỄN THỊ HOÀI, NGUYỄN THỊ HOÀI LY, HỒ VIỆT ĐỨC, PHAN VĂN KIEM: Tác dụng độc hại tế bào của các cao chiết phân đoạn và 2 alkaloid phân lập từ cây bồ đề lá lớn (<i>Urena cordata</i> (Dun.) Walp. ex Alston)	29
• NGUYỄN HOÀNG ANH, LÊ THỊ GIANG, NGUYỄN THU HẰNG, NGUYỄN QUỐC HUY: Nghiên cứu tác dụng an thần và chống trầm cảm trên động vật thực nghiệm của <i>Stephania sinica</i> Diels và <i>Stephania dielsiana</i> Y. C. Wu	35
• ĐỖ VĂN BÌNH, TRẦN DUY DIỆT, HOÀNG VIỆT DŨNG: Đánh giá tác dụng chống viêm của cao chiết xuất từ lá cây cỏ Bả Bò (<i>Kopsia tonkinensis</i> Pitard, họ Trúc đào Apocynaceae)	40
• NGUYỄN VĂN THANH, TRƯƠNG THỊ THU HIỀN, CHÂU VĂN MINH, PHAN VĂN KIEM, NGUYỄN VĂN TUYẾN, ĐAN THUY HẰNG, NINH KHẮC BÀN: Tetraglabriloside, một dẫn xuất mới của acid glutaric phân lập từ lá cây <i>Tetradium glaberrimum</i> (Benth.) Hartl.	43
• PHẠM LÊ MINH, HỒ THỊ THANH HUYỀN, NGUYỄN THÁI AN, THÁI NGUYỄN HỒNG THU: Nghiên cứu xây dựng phương pháp xác định hàm lượng một số hợp chất có trong vỏ thân cây gạo (<i>Bombax malabaricum</i> DC.)	46
• TRƯƠNG PHƯƠNG, TRẦN THỊ NGỌC YẾN: Nghiên cứu điều chế avobenzone	53
ĐIỂM SÁCH BÁO	59
TIN TRONG NGÀNH	60

RESEARCH – TECHNIQUES

• HOÀNG VIỆT DŨNG, ĐỖ QUYÊN, NGUYỄN MINH CHÍNH: Review on natural alkanopolybenzene compounds from the genus <i>Piper</i> L. (Piperaceae)	2
• TRẦN HỮU DŨNG, NGUYỄN HẢI THUY: Review on resistant starch for control of postprandial level of blood glucose in the diabetes type II	6
• NGUYỄN THẠCH TÙNG, YUN-SEOK RHEE: Investigation on pharmaceutical effects of the excipients in use, particle size and some physical properties of the solid dispersion containing celecoxib	14
• VŨ THỊ THUẬN, TRƯƠNG VIỆT BÌNH, NGUYỄN THỊ THANH HẠ, NGUYỄN TRỌNG THÔNG, PHẠM THỊ VĂN ANH, NGUYỄN PHƯƠNG THANH: Study on effects of the herbal compound remedy "Bán hạ bạch tuất thiên ma thang" (BBT) for regulation of serum lipid levels in mice	18
• PHẠM THỊ HÒA, VŨ THỊ HƯƠNG NÀ: Experimental study on antioxidant and hepatoprotective virtue of the aerial roots of <i>Pandanus kaldi</i> (Kurz.)	21
• VŨ BÌNH DƯƠNG, NGUYỄN VĂN LONG: Estimation of antioxidant value of the extracts from <i>Ly Son</i> black garlic	24
• NGUYỄN THỊ HOÀI, NGUYỄN THỊ HOÀI LY, HỒ VIỆT ĐỨC, PHAN VĂN KIEM: Study of cytotoxicity of the fractional extracts and two isolated alkaloids from <i>Urena cordata</i> (Dun.) Walp. ex Alston	29
• NGUYỄN HOÀNG ANH, LÊ THỊ GIANG, NGUYỄN THU HẰNG, NGUYỄN QUỐC HUY: Tranquillizant and antidepressant activities of <i>Stephania sinica</i> Diels và <i>Stephania dielsiana</i> Y. C. Wu on experimental animals	35
• ĐỖ VĂN BÌNH, TRẦN DUY DIỆT, HOÀNG VIỆT DŨNG: Anti-inflammatory properties of the leaf extracts from <i>Kopsia tonkinensis</i> Pitard (Apocynaceae)	40
• NGUYỄN VĂN THANH, TRƯƠNG THỊ THU HIỀN, CHÂU VĂN MINH, PHAN VĂN KIEM, NGUYỄN VĂN TUYẾN, ĐAN THUY HẰNG, NINH KHẮC BÀN: Tetraglabriloside, a new derivative of glutaric acid, now first isolated from the leaves of <i>Tetradium glaberrimum</i> (Benth.) Hartl.	43
• PHẠM LÊ MINH, HỒ THỊ THANH HUYỀN, NGUYỄN THÁI AN, THÁI NGUYỄN HỒNG THU: Analytical procedure for some natural compounds from the stem bark of calba tree (<i>Bombax malabaricum</i> DC.)	46
• TRƯƠNG PHƯƠNG, TRẦN THỊ NGỌC YẾN: Synthesis of avobenzone	53
MEDICAL BOOKS AND MAGAZINES IN BRIEF	59
NEWS IN BRANCH	60

Tổng quan về nhóm hợp chất alkanpolyenyibenzen phân lập được từ chi *Piper* L., họ Hồ tiêu (Piperaceae)

Hoàng Việt Dũng^{1*}, Đỗ Quyên², Nguyễn Minh Chính¹

¹Học viện Quân y

²Trường Đại học Dược Hà Nội

*E-mail: vietdungk85@yahoo.com

Summary

A review on natural compounds of alkanpolyenyibenzen group isolated from *Piper* L. genus is presented. The compounds of this group are divided into 3 subgroups, including: propenylbenzen (34 compounds), polyprenylbenzen (42 compounds) and alkenylbenzen (14 compounds). Of them, many compounds possess interesting bioactivities, such as antiplatelet, antifungality, antioxidance, cytotoxicity... Therefore, this group still remains promisingly potential in recovery of new pharmaceutical compounds and active structures in the coming future.

Keywords: Alkanpolyenyibenzen, propenylbenzene, polyprenylbenzene, alkenylbenzene, *Piper* L.

Đặt vấn đề

Piper L. là chi lớn nhất trong số các chi thuộc họ Hồ tiêu và là một trong những chi lớn nhất của ngành thực vật hạt kín. Chi này có số lượng khoảng trên 1000 loài và phân bố rộng khắp ở khu vực khí hậu nhiệt đới và cận nhiệt đới [1,19]. Những khu vực trên thế giới có sự phân bố đa dạng của chi *Piper* L. gồm có: Nam Mỹ, Trung Mỹ, châu Á. Theo kinh nghiệm dân gian, chi *Piper* L. được sử dụng để làm thuốc chữa một số bệnh như: viêm đường tiêu hóa, đầy bụng khó tiêu, viêm họng, sốt, giảm đau, bệnh thấp khớp, điều chỉnh miễn dịch... [19]. Theo thống kê, đã có khoảng gần 100 loài *Piper* L. được nghiên cứu về thành phần hóa học và tác dụng dược lý. Về hóa học, các nhóm hợp chất chính trong chi này gồm có: amid, alkanpolyenyibenzen (APB), flavonoid, lignan, neolignan, terpen... và cũng đã một bài báo tổng quan về hóa học đề cập đến một nhóm nhỏ của nhóm hợp chất APB [19]. Tuy nhiên, tài liệu [19] đã xuất bản cách đây 17 năm, kể từ đó đến nay, đã có thêm nhiều công trình nghiên cứu về hóa học chi *Piper* L. được thực hiện. Bên cạnh đó, theo cách phân loại trong tài liệu [19], nhóm propenylphenol chỉ là một nhóm nhỏ trong nhóm APB mà chúng tôi tổng quan ở đây. Vì vậy, chúng tôi thực hiện nội dung này nhằm cập nhật thông tin để có cái nhìn

đầy đủ hơn về nhóm hợp chất APB, một trong những nhóm hợp chất chính của chi *Piper* L.

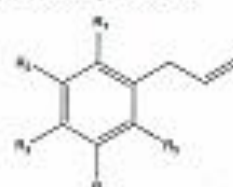
Nhóm hợp chất alkanpolyenyibenzen

Tên của nhóm hợp chất này bắt nguồn từ công thức cấu tạo của nó gồm có phần nhóm thể alkanpolyenyl gắn với nhân thơm. Các chất thuộc nhóm này được chia thành 3 nhóm dưới đây.

Nhóm hợp chất có cấu tạo khung propenylbenzen

Nhóm hợp chất propenylbenzen được chia thành 2 nhóm nhỏ là nhóm allylbenzen và nhóm prop-1-en-1-yl-benzen. Công thức cấu tạo chung của 2 nhóm chỉ khác nhau ở vị trí nối đôi của nhóm thể propenyl. Qua tổng hợp tài liệu, đã có 34 chất thuộc nhóm này được báo cáo phân lập từ chi *Piper* L. Trong đó, có 24 chất thuộc nhóm allylbenzen và 10 chất thuộc nhóm prop-1-en-1-ylbenzen [12,19,19].

Nhóm hợp chất allylbenzen



Hình 1: Cấu tạo khung allylbenzen

449

9-2013

tạp chí

DƯỢC HỌC

SỐ 449 * NĂM THỨ 53 * THÁNG RA 1 KỶ * ISSN 0866 - 7861



Salvia miltiorrhiza Bunge
họ Hoa môi (Lamiaceae)



Ây đan sâm



BỘ Y TẾ XUẤT BẢN

Địa chỉ Tòa soạn: 138A Giảng Võ - Hà Nội

Tel: 04.3 8461 430 - 04.3 8463 952. Fax: 04.3 8463 952

Email: tachienh@tcohn.com

MỤC LỤC

NGHIÊN CỨU – KỸ THUẬT

- PHẠM THU HÀ, NGUYỄN THÀNH HẢI, BRUNO GUIARD, THÁI NGUYỄN HÙNG THU: Nghiên cứu mô hình đánh giá hiệu quả tác dụng của các chất ma túy thông qua nồng độ dopamine dựa vào kỹ thuật tách chiết micro 2
- HOÀNG VIỆT DŨNG, ĐỖ QUYÊN, NGUYỄN MINH CHÍNH: Tổng quan về nhóm hợp chất amid alkaloid phân lập được từ chi *Piper* L. họ Hồ tiêu (*Piperaceae*) 6
- NGUYỄN HỒNG TRANG, VŨ THỊ THU GIANG, PHẠM THỊ MINH HUỆ, BUI THỊ HỒNG NHUNG, LÊ VĂN THANH: Nghiên cứu bào chế viên nén acyclovir nổi - kết dính niêm mạc đường tiêu hoá 11
- NGUYỄN HẠNH THỦY, NGUYỄN NGỌC CHIẾN: Nghiên cứu bào chế pellet glactazid giải phóng kéo dài 16
- BUI TÙNG HIỆP: Thử nghiệm tương đương sinh học của hai chế phẩm có hoạt chất chlorpheniramine racemic 21
- VŨ THỊ THUẬN, TRƯƠNG VIỆT BÌNH, MAI PHƯƠNG THANH, NGUYỄN TRỌNG THÔNG, PHẠM THỊ VĂN ANH, NGUYỄN PHƯƠNG THANH: Nghiên cứu tác dụng điều chỉnh rối loạn lipid máu và giảm xơ vữa mạch máu của BBT trên chó thực nghiệm 24
- LÊ THỊ XUÂN LINH, HÀ ĐỨC CƯỜNG, NGUYỄN ĐĂNG THOẠI, TRẦN MẠNH HÙNG: Mô phỏng mô hình gây suy giảm bạch cầu thực nghiệm trên chuột nhắt bằng phối hợp paclitaxel và carboplatin 28
- HÀ DIỆU LY, TRỊNH HOÀNG DƯƠNG: Định lượng đồng thời đường đơn - glucose, fructose và đường polyalcol - sorbitol, manitol bằng phương pháp sắc ký lỏng hiệu năng cao 32
- NGUYỄN VĂN ĐÀU, ĐỖ THỊ MAI, ĐINH NHƯ CHIẾN: Phân lập một số thành phần hóa học từ cây rau má ngò (*Polygonum perforatum* L.) 36
- PHƯƠNG THIÊN THƯƠNG, TRẦN TRỌNG HẢI, NGUYỄN TIẾN ĐẠT, LÊ VIỆT DŨNG, NGUYỄN MINH KHÔI: Thành phần hóa học của cây thanh ngâm (*Picris foliolosa* Lour.) 39
- PHƯƠNG THIÊN THƯƠNG, NGUYỄN THỊ KIM AN, NGUYỄN MINH KHÔI, FUMIAKI ITO: Các tanhinon phân lập từ rễ cây đàn cốm (*Salvia miltiorrhiza* Bunge) di thực và trồng ở Việt Nam 44
- NGUYỄN THỊ HOÀNG ANH, NGUYỄN ĐÌNH LUYỆN: Nghiên cứu bán tổng hợp troloxenol từ rutin 49
- TRỊNH VĂN NINH, HOÀNG THU TRANG, VŨ TRẦN ANH, NGUYỄN QUANG ĐẠT: Tổng hợp và thử hoạt tính kháng tế bào ung thư của một số dẫn chất 3-(4'-nitrophenyl)-5-halogenoarylidenhydantoin 53

ĐIỂM SÁCH BÁO

TIN TRONG NGÀNH

CONTENTS

RESEARCH – TECHNIQUES

- PHẠM THU HÀ, NGUYỄN THÀNH HẢI, BRUNO GUIARD, THÁI NGUYỄN HÙNG THU: Study on determination of narcotic bioactivities of drugs through the dopamine content by microdialysis 2
- HOÀNG VIỆT DŨNG, ĐỖ QUYÊN, NGUYỄN MINH CHÍNH: A review on the group of amid alkaloids from the genus *Piper* L. (*Piperaceae*) 6
- NGUYỄN HỒNG TRANG, VŨ THỊ THU GIANG, PHẠM THỊ MINH HUỆ, BUI THỊ HỒNG NHUNG, LÊ VĂN THANH: Study on formulation of floating gastroretentive dosage forms of Acyclovir 11
- NGUYỄN HẠNH THỦY, NGUYỄN NGỌC CHIẾN: Study on formulation of sustainable-released pellets of glactazid 16
- BUI TÙNG HIỆP: Stereoselective versus non-stereoselective assessment for bioequivalence of two formulations of racemic chlorpheniramine 21
- VŨ THỊ THUẬN, TRƯƠNG VIỆT BÌNH, MAI PHƯƠNG THANH, NGUYỄN TRỌNG THÔNG, PHẠM THỊ VĂN ANH, NGUYỄN PHƯƠNG THANH: Bioactivities of the traditional remedy BBT in regulation of the blood lipid level and reduction of atherosclerosis in experimental rabbits 24
- LÊ THỊ XUÂN LINH, HÀ ĐỨC CƯỜNG, NGUYỄN ĐĂNG THOẠI, TRẦN MẠNH HÙNG: A model of mouse neutropenia induced by paclitaxel and carboplatin in combination 28
- HÀ DIỆU LY, TRỊNH HOÀNG DƯƠNG: Simultaneous determination of monosaccharides (glucose and fructose) and polyalcolic saccharides (sorbitol and manitol) by HPLC 32
- NGUYỄN VĂN ĐÀU, ĐỖ THỊ MAI, ĐINH NHƯ CHIẾN: Isolation and identification of some phytochemical compounds from the plant *Polygonum perforatum* L. 36
- PHƯƠNG THIÊN THƯƠNG, TRẦN TRỌNG HẢI, NGUYỄN TIẾN ĐẠT, LÊ VIỆT DŨNG, NGUYỄN MINH KHÔI: Study on chemical components of the plant *Picris foliolosa* (Lour.) 39
- PHƯƠNG THIÊN THƯƠNG, NGUYỄN THỊ KIM AN, NGUYỄN MINH KHÔI, FUMIAKI ITO: Tanshinon compounds isolated from the roots of *Salvia miltiorrhiza* Bunge domesticated to Vietnam 44
- NGUYỄN THỊ HOÀNG ANH, NGUYỄN ĐÌNH LUYỆN: Study on semisynthesis of troloxenol from rutin 49
- TRỊNH VĂN NINH, HOÀNG THU TRANG, VŨ TRẦN ANH, NGUYỄN QUANG ĐẠT: Synthesis and anticancer bioactivity of some derivatives of 3-(4'-nitrophenyl)-5-halogenoarylidenhydantoin 53

MEDICAL BOOKS AND MAGAZINES IN BRIEF

NEWS IN BRANCH

**Tổng quan về nhóm hợp chất amid alkaloid
phân lập được từ chi *Piper* L.,
ho Hồ tiêu (Piperaceae)**

Hoàng Việt Đông^{1*}, Đỗ Quyên², Nguyễn Minh Chính¹¹ Học viện Quân y² Trường Đại học Dược Hà Nội

*E-mail: vietdungk85@yahoo.com

Summary

Amide is a major group of phytochemical compounds observed in the genus *Piper* L. References available to the authors document 260 amide compounds isolated from 61 species of the genus. By their chemical structures, they are classified into 11 subgroups. Of them, 5 subgroups including 134 compounds in all are presented.

Keywords: Amide, amide alkaloid, Piper L.

Đặt vấn đề

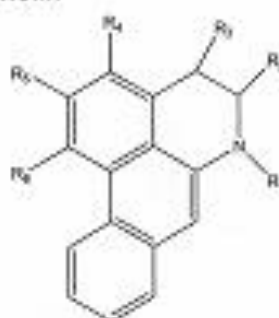
Piper L. là chi lớn nhất trong số các chi thuộc họ Hồ tiêu và là một trong những chi lớn nhất của ngành thực vật hạt kín. Chi này có số lượng khoảng hơn 1000 loài trên thế giới và 47 loài ở Việt Nam^[1,7]. Theo thống kê, đã có khoảng trên 100 loài *Piper* L. được nghiên cứu về thành phần hóa học và các nhóm hợp chất đã được phân lập từ chi này gồm có: amid alkaloid (sau đây gọi là nhóm hợp chất amid), alkanpolyenylbenzen, flavonoid, lignan, neolignan, terpen... Trong đó, amid là nhóm hợp chất chính có mặt trong các loài *Piper* L.. Qua tổng hợp tài liệu, đã có ba bài báo với nội dung tổng quan về nhóm hợp chất amid phân lập được từ chi *Piper* L.. Tuy nhiên, nội dung của hai trong ba bài báo này chỉ mang tính liệt kê các hợp chất phân lập được và nội dung của bài báo còn lại thì phần nhóm chưa thật đầy đủ và chi tiết^[10,14,17]. Vì vậy, chúng tôi thực hiện nội dung này nhằm tổng hợp và cập nhật thông tin để có cái nhìn đầy đủ hơn về nhóm hợp chất amid phân lập được từ chi *Piper* L..

Nhóm hợp chất amid

Amid là những hợp chất có chứa nhóm chức $-NH-CO-$. Ở các hợp chất amid phân lập được từ chi *Piper* L., nguyên tử nitơ của nhóm chức amid có thể nằm ở mạch thẳng hoặc là dị tố trong vòng 5 hoặc 6 cạnh. Thường các amid

monomer này có một nguyên tử nitơ của nhóm chức amid, chỉ một số rất ít chất có số nguyên tử nitơ nhiều hơn một. Amid là nhóm hợp chất chính có mặt trong chi *Piper* L.. Với số lượng 280 chất phân lập từ 61 loài thuộc chi *Piper* L. đã được báo cáo, nhóm hợp chất amid khá đa dạng về cấu trúc và có thể được phân thành 11 nhóm sau đây^[70, 74, 17].

1. Nhóm hợp chất có khung cấu tạo dibenzo quinolin



Hình 1: Cấu tạo hóa học của khung dibenzoquinolin

So với các nhóm còn lại, nhóm này có số lượng chất ít nhất với 8 hợp chất được báo cáo. Trong đó, các hợp chất thường có cấu tạo với $R_2=R_3=O$; $R_4=H$ và $R_5=R_6=OCH_3$ hoặc $R_5+R_6=OCH_2O$. Chỉ có 2 chất có cấu tạo với $R_2=R_3=H$ và 2 chất có cấu tạo với $R_4=OCH_3$ [14, 17].

450

10-2013

tap chí

DƯỢC HỌC

SỐ 450 * NĂM THỨ 53 * THÁNG RA 1 KỶ * ISSN 0866 - 7861

Polyscias fruticosa L. Harms
họ Ngũ gia bì (Araliaceae)



Cây đinh lăng



BỘ Y TẾ XUẤT BẢN

Địa chỉ Tòa soạn: 138A Giảng Võ - Hà Nội

Tel: 043.8461430 - 043.7368367

E-mail: tapchiduoc@yahoo.com

TẠP CHÍ DƯỢC HỌC
ISSN 0866-7861
10/2013 (Số 450 NĂM 53)
MỤC LỤC

NGHIÊN CỨU - KỸ THUẬT

• HOÀNG VIỆT DŨNG, ĐỖ QUYÊN, NGUYỄN MINH CHÍNH: Tổng quan về nhóm hợp chất amid alkaloid phân lập được từ chi <i>Piper</i> L., họ Hồ tiêu - Piperaceae (Tiếp theo)	2
• NGUYỄN THỊ KIM CHI, HOÀNG THỊ KIM HUYỀN, NGUYỄN THỊ LIÊN HƯƠNG, LÊ BÀ HẢI, HOÀNG HẢI PHƯƠNG: Khảo sát thực trạng sử dụng amikacin trong điều trị cho trẻ em tại một số bệnh viện trên địa bàn Hà Nội	7
• BÌNH THỊ HẢI BÌNH, HOÀNG THỊ THUY HỒNG, NGUYỄN THẠCH TÙNG, NGUYỄN THANH HẢI, PHẠM THỊ MINH HUỆ: Nghiên cứu bào chế và đánh giá viên pseudoephedrine giải phóng kéo dài bằng phương pháp bao màng zein	11
• TRẦN BÌNH DUY, HÀ ĐỨC CƯỜNG, NGUYỄN ĐĂNG THỌ, TRẦN MẠNH HÙNG: Nghiên cứu tác dụng dự phòng và điều trị suy giảm bạch cầu của cao linh chi (<i>Ganoderma lucidum</i>) và chế phẩm linh chi trên mô hình gây suy giảm bạch cầu bằng paclitaxel và carboplatin	15
• NGUYỄN XUÂN TRƯỜNG, ĐỖ THỊ YẾN, NGUYỄN THỊ MINH NGUYỆT: Xây dựng phương pháp nhận dạng đồng thời methadone, 6-monosacetylmorphine và morphine trong mẫu nước tiểu	20
• HÀ BÍCH HỒNG, VŨ THỊ THƠM, VŨ ĐỨC LỢI, LÊ ANH TUẤN, NGUYỄN THANH HẢI: Bước đầu xây dựng quy trình nhân giống in vitro cây đinh lăng lá nhỏ (<i>Polyscias frutescens</i> L. Hance)	25
• PHẠM VĂN VƯỢNG, PHẠM THANH KÝ, NGUYỄN THỊ BÍCH THỦ, PHAN VĂN KIỂM: Hai hợp chất mới từ phần trên mặt đất cây đơn kim (<i>Bidens pilosa</i> L.)	30
• NGUYỄN THỊ KIM CHI, HOÀNG THỊ KIM HUYỀN, KHU THỊ KHÁNH DUNG, LÊ THỊ MINH HƯƠNG, ĐÀO MINH TUẤN, NGUYỄN THỊ HỒNG HẢI: Đánh giá quy trình giám sát điều trị qua xác định nồng độ amikacin trong huyết tương tại Bệnh viện Nhi Trung ương	35
• VŨ XUÂN GIANG, PHẠM THANH KÝ, PHAN VĂN KIỂM: Phân lập và xác định cấu trúc hợp chất triterpen trong lá cây na - <i>Macrosolen bicolor</i> (Lecomte) Dans.	41
• TRƯƠNG PHƯƠNG, TRẦN CÁT ĐÔNG, NGUYỄN TRI THÀNH: Nghiên cứu điều chế kojo dipalmitat. Phần 2: Tổng hợp ester - kojo dipalmitat	48
• TRẦN VĂN NINH, VŨ TRẦN ANH, LÊ TRỌNG ĐẠT, HOÀNG THU TRANG: Tổng hợp và thử hoạt tính kháng tế bào ung thư của một số dẫn chất 3-aryl-5-arylidenehydantoin	51
Y DƯỢC HỌC NGÀY NAY	56
DIỄN SÁCH BẢO	59
TIN TRONG NGÀNH	60

PHARMACEUTICAL JOURNAL
ISSN 0866-7861
10/2013 (N° 450 Vol. 53)
CONTENTS

RESEARCH - TECHNIQUES

• HOÀNG VIỆT DŨNG, ĐỖ QUYÊN, NGUYỄN MINH CHÍNH: Review on the group of amide alkaloids from the genus <i>Piper</i> L. - Piperaceae (cont.)	2
• NGUYỄN THỊ KIM CHI, HOÀNG THỊ KIM HUYỀN, NGUYỄN THỊ LIÊN HƯƠNG, LÊ BÀ HẢI, HOÀNG HẢI PHƯƠNG: Actual use of amikacin for pediatric therapy in some hospitals of Hanoi	7
• BÌNH THỊ HẢI BÌNH, HOÀNG THỊ THUY HỒNG, NGUYỄN THẠCH TÙNG, NGUYỄN THANH HẢI, PHẠM THỊ MINH HUỆ: Formulation and estimation of zein-coated sustained-release tablets of pseudoephedrine	11
• TRẦN BÌNH DUY, HÀ ĐỨC CƯỜNG, NGUYỄN ĐĂNG THỌ, TRẦN MẠNH HÙNG: Study on preventive activities and therapeutic effects of Lingzhi (<i>Ganoderma lucidum</i>) against experimental neutropenia induced by paclitaxel plus carboplatin	15
• NGUYỄN XUÂN TRƯỜNG, ĐỖ THỊ YẾN, NGUYỄN THỊ MINH NGUYỆT: GC-MS analysis for simultaneous determination of methadone, 6-monosacetylmorphine and morphine in human urine	20
• HÀ BÍCH HỒNG, VŨ THỊ THƠM, VŨ ĐỨC LỢI, LÊ ANH TUẤN, NGUYỄN THANH HẢI: Establishment of an in-vitro process for propagation of <i>Polyscias frutescens</i> L. Hance	25
• PHẠM VĂN VƯỢNG, PHẠM THANH KÝ, NGUYỄN THỊ BÍCH THỦ, PHAN VĂN KIỂM: Two new natural compounds from the aerial parts of the plant <i>Bidens pilosa</i> L.	30
• NGUYỄN THỊ KIM CHI, HOÀNG THỊ KIM HUYỀN, KHU THỊ KHÁNH DUNG, LÊ THỊ MINH HƯƠNG, ĐÀO MINH TUẤN, NGUYỄN THỊ HỒNG HẢI: Estimation of monitoring amikacin therapy in the National Hospital of Pediatrics	35
• VŨ XUÂN GIANG, PHẠM THANH KÝ, PHAN VĂN KIỂM: Isolation and identification of triterpene compounds from the custard-apple mistletoes <i>Macrosolen bicolor</i> (Lecomte) Dans.	41
• TRƯƠNG PHƯƠNG, TRẦN CÁT ĐÔNG, NGUYỄN TRI THÀNH: Synthesis of kojo dipalmitate. Part II: Synthesis of kojo dipalmitate ester	48
• TRẦN VĂN NINH, VŨ TRẦN ANH, LÊ TRỌNG ĐẠT, HOÀNG THU TRANG: Synthesis and anti-cancer activity of some 3-aryl-5-arylidenehydantoin derivatives	51
TODAY MEDICINE AND PHARMACY	56
MEDICAL BOOKS AND MAGAZINES IN BRIEF	59
NEWS IN BRANCH	60

Tổng quan về nhóm hợp chất amid alkaloid phân lập được từ chi *Piper* L., họ Hồ tiêu - Piperaceae

(Tiếp theo số tháng 9/2013)

Hoàng Việt Dũng^{1*}, Đỗ Quyên², Nguyễn Minh Chính¹

¹Học viện Quân y

²Trường Đại học Dược Hà Nội

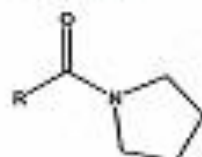
* E-mail: vietdungk85@yahoo.com

Summary

The review involves 280 amide alkaloids isolated from 61 species of the genus *Piper* L., which are divided into 11 subgroups. Of these, the group of aryl – alkanopolyenoyl – pyrrolidin structure is the largest one consisting of 48 compounds, and the group of dibenzo quinolin structure is the least one possessing only 8 compounds. Of these compounds, many own interesting bioactivities such as antiplatelet, cytotoxic, inhibitory to acetylcholinesterase, hepatoprotection... Therefore, this group is much worth further researches.

Keywords: *Piper* L., amide, amide alkaloid.

6. Nhóm hợp chất có khung cấu tạo alkanopolyenoyl pyrrolidin

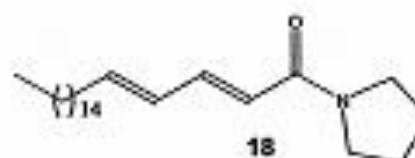
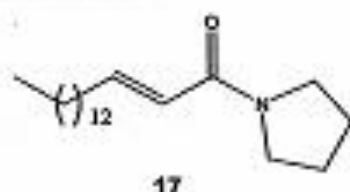


Hình 6: Công thức cấu tạo của khung
alkanopolyenoyl pyrrolidin

Đã có 17 hợp chất thuộc nhóm này được báo cáo phân lập từ chi *Piper* L., trong đó, có 12 chất trên tổng số 17 chất là những chất phân lập được từ loài *P. amalago* L. Đặc điểm chung của các chất thuộc nhóm này là có gốc R cấu tạo dạng mạch thẳng, mạch carbon dài nhất là 32 carbon, số nối đôi trong mạch thay đổi từ 1 đến 3 [1,10,11].

Bảng 6: Một số hợp chất thuộc nhóm alkanopolyenoyl – piperidin

Ký hiệu	Tên hợp chất	R	Loài	TLTK
17	2-Hexadecenoyl- pyrrolidin	$C_{26}H_{51}$	<i>P. amalago</i> L.	[12]
18	Trichonin	$C_{32}H_{57}$	<i>P. trichostachyon</i> C. DC.	[3]



Số lượng hợp chất trong nhóm có gốc R cấu tạo dạng mạch carbon thẳng và no là rất ít, ví dụ: chất hexadecanoyl- pyrrolidin (19) phân lập

được từ loài *P. methysticum* G. Forst. và có cấu tạo như sau^[12]:

Cholinesterase Inhibitors from the Aerial Part of *Piper hymenophyllum*Hoang Viet Dung, To Dao Cuong,^{1,2} Nguyen Minh Chinh, Do Quyen,³ Jeong Su Byeon,⁴
Jeong Ah Kim,⁵ Mi Hee Woo,⁶ Jae Sui Choi,⁶ and Byung Sun Min^{1,7}

Centre of Pharmaceutical Research-Training, Vietnam Military Medical University, 160 Phung Hung, Hanoi, Vietnam

¹College of Pharmacy, Catholic University of Daegu, Gyeongsangbuk 712-702, Korea. *E-mail: bomin@cu.ac.kr²Institute of Natural Products Chemistry, Vietnam Academy of Science and Technology,

18 Hoang Quoc Viet, Cau Giay, Hanoi, Vietnam

³Department of Pharmacognosy, Hanoi University of Pharmacy, 15 Le Thanh Tong, Hoan Kiem, Hanoi, Vietnam⁴Faculty of Food Science and Biotechnology, Pukyong National University, Busan 608-737, Korea⁵College of Pharmacy, Kyungpook National University, Daegu 702-701, Korea

Received November 14, 2013; Accepted November 27, 2013

Key Words : *Piper hymenophyllum*, Piperaceae, AChE, BChE, Alzheimer's disease

Alzheimer's disease (AD) is a neurodegenerative disease and the predominant cause of dementia among the elderly. AD provokes progressive cognitive decline, psychobehavioral disturbances, and memory loss, and is characterized by the presence of senile plaque, neurofibrillary tangles, and reduced cholinergic transmission.^{1,2} Although the pathogenesis of AD has not been fully elucidated, it is believed to be due to a deficiency of the neurotransmitter acetylcholine (ACh), which is referred to as the cholinergic hypothesis. Therefore, the inhibition of acetylcholinesterase (AChE; EC 3.1.1.7) (the key enzyme responsible for the hydrolysis of ACh to choline and acetic acid) has become a widely used treatment strategy.³ Because reactive oxygen species have been reported to contribute to cellular aging and neuronal damage,⁴ it is advantageous for an anti-AD drug candidate to possess antioxidant activity as well as an anti-cholinesterase effect. On the other hand, oxidative injury caused by free radical formation and iron accumulation also has been shown to contribute to the pathogenesis of AD.⁵ Furthermore, AChE inhibitors, such as berberine which is reported to ameliorate spatial memory impairment by activating microglia and senile plaque clearance.⁶ Moreover, berberine is also reported to inhibit AChE enzyme activity and play an important role in metabolic syndrome.⁷ In addition, Peng *et al.* showed that anti-amnesic effect of berberin is related to increase peripheral and central cholinergic neuronal system activity.⁸ Butyrylcholinesterase (BChE) may also play a role in Alzheimer's disease since inhibitors of this enzyme improve learning performance in rats and reduce β -amyloid protein levels.⁹ Since ACh is also a physiological substrate for BChE, inhibition of BChE elevates the levels of this neurotransmitter in the brain.^{9,10}

The *Piper* genus is the largest in Piperaceae family, and consists of approximately 1300 species in the Neotropics and an estimated 700 species in the tropics of the World.¹¹ Throughout the tropics, numbers of *Piper* sp. are used for market, the pepper of Piperaceae is the world's most traded

spice. The ripened fruit of *P. nigrum* are the source of white pepper, while its unripe fruit are the source of black pepper. Furthermore, a narcotic beverage is produced in Oceania from the roots of *P. methysticum*.¹² The chemistry of *Piper* species has been widely investigated and phytochemical investigations conducted in all parts of the World have led to the isolation of a number of physiologically active compounds, which include alkaloids/amides, propenylphenols, lignans, neolignans, terpenes, steroids, kawapyrone, piperolides, chalcones, dihydrochalcones, flavones and flavanones.¹³ In Latin America, *Piper* species are used to treat a variety of gynecological ailments and to treat gastrointestinal problems, depression, anxiety, pain and inflammation, and bacterial and fungal infections.¹⁴ However, no report has been issued on the constituents of *P. hymenophyllum* and their anti-cholinesterase activity. Therefore, to identify inhibitors of cholinesterase, we fractionated the CHCl₃- and EtOAc-soluble fractions of *P. hymenophyllum* and isolated a new compound (1) and six known compounds (2-7), and the results of investigation of their AChE and BChE inhibitory activities.

Reversed column chromatography (silica gel, RP-C18, and semi-preparative HPLC) of the CHCl₃- and EtOAc-soluble fractions of the aerial part of *P. hymenophyllum* resulted in the isolation of a new compound (1) and six known ones (2-7). The six known compounds were identified as neotaiwanensol B (2),¹⁵ neotaiwanensol A (3),¹⁶ caffeoylaldehyde (4),¹⁶ hydroxychavicol (5),¹⁷ guaicol (6),¹⁸ and *N*-acetylannonaine (7)¹⁹ by comparing physicochemical and spectroscopic data (IR, UV, MS, 1D and 2D NMR) with previously reported data.

Compound 1 was obtained as yellow amorphous solid, and was positive by the Dragendorff's reagent test. The molecular formula of 1 was C₁₅H₁₃NO₄ from the molecular ion peak at *m/z* 273.1003 based on a [M]⁺ ion (calcd. 273.1001) by high resolution electron impact ionization. IR indicated the presence of hydroxyl (3490 cm⁻¹), carbon-