

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

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

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

<b>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></b> .....	<b>66</b>
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
<b>3.2.2. Kết quả nghiên cứu thành phần hóa học của loài <i>Piper hymenophyllum</i> Miq.</b> .....	<b>82</b>
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
<b>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</b> .....	<b>102</b>
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 cấy 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
<b>CHƯƠNG 4. BÀN LUẬN</b> .....	<b>111</b>
<b>4.1. Về đặc điểm thực vật</b> .....	<b>111</b>
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
<b>4.2. Về thành phần hóa học</b> .....	<b>115</b>
<b>4.3. Về nghiên cứu đánh giá hoạt tính ức chế enzym acetylcholinesterase <i>in vitro</i></b> .....	<b>121</b>
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>	<b>124</b>
<b>KẾT LUẬN VÀ KIẾN NGHỊ .....</b>	<b>127</b>
<b>KẾT LUẬN .....</b>	<b>127</b>
<b>KIẾN NGHỊ.....</b>	<b>128</b>
<b>CÁC CÔNG TRÌNH ĐÃ CÔNG BỐ LIÊN QUAN ĐẾN LUẬN ÁN</b>	
<b>TÀI LIỆU THAM KHẢO</b>	
<b>PHỤ LỤC</b>	

## DANH MỤC CÁC KÝ HIỆU, CHỮ VIẾT TẮT

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



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

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