



(12) BẢN MÔ TẢ SÁNG CHẾ THUỘC BẰNG ĐỘC QUYỀN SÁNG CHẾ

(19) Cộng hòa xã hội chủ nghĩa Việt Nam (VN)
CỤC SỞ HỮU TRÍ TUỆ

(11)



1-0032303

(51)^{2020.01} C07D 215/00

(13) B

(21) 1-2020-05576

(22) 29/09/2020

(45) 25/06/2022 411

(43) 25/12/2020 393

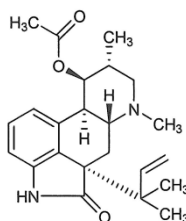
(73) Trường Đại học Y Dược Hải Phòng (VN)

72A, Nguyễn Bình Khiêm, quận Ngô Quyền, thành phố Hải Phòng

(72) Cao Đức Tuấn (VN); Nguyễn Văn Hùng (VN); Nguyễn Văn Khải (VN); Đoàn Thị Mai Hương (VN); Lê Thị Hồng Minh (VN); Phạm Văn Cường (VN); Hoàng Thị Hồng Liên (VN).

(54) HỢP CHẤT ASPERERGOTIN A VÀ PHƯƠNG PHÁP TÁCH CHIẾT HỢP CHẤT NÀY TỪ CHỦNG VI NẤM BIỂN ASPERGILLUS UNGUIS M440

(57) Sáng chế đề cập đến hợp chất asperergotin A có công thức (1) được tách chiết từ chủng vi nấm biển *Aspergillus unguis* M440 và phương pháp tách chiết hợp chất này. Hợp chất asperergotin A thu được thể hiện hoạt tính kháng vi sinh vật đối với 3 chủng gram (+) *Enterococcus faecalis* ATCC29212, *Staphylococcus aureus* ATCC25923, *Bacillus cereus* ATCC14579, 1 chủng gram (-) *Salmonella enterica* ATCC13076 và 1 chủng nấm *Candida albicans* ATCC10231.



Công thức 1

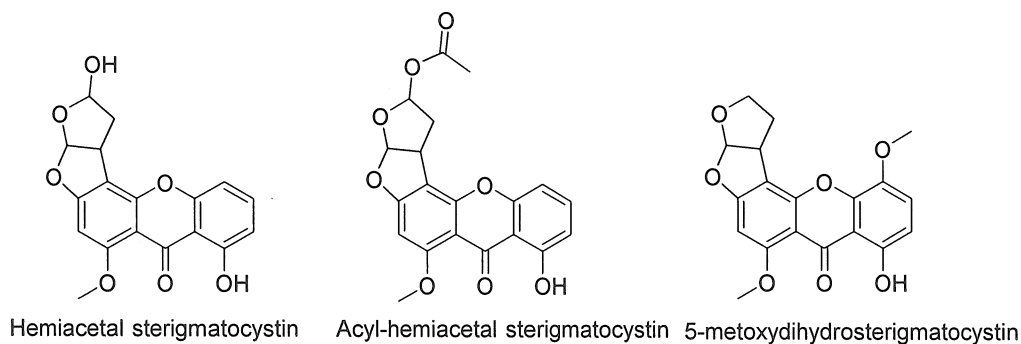
Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế thuộc lĩnh vực các hợp chất thiên nhiên, cụ thể là đề cập đến hợp chất asperergotin A có nguồn gốc từ chủng vi nấm biển *Aspergillus unguis* M440 và phương pháp tách chiết hợp chất này từ chủng vi nấm biển *Aspergillus unguis* M440.

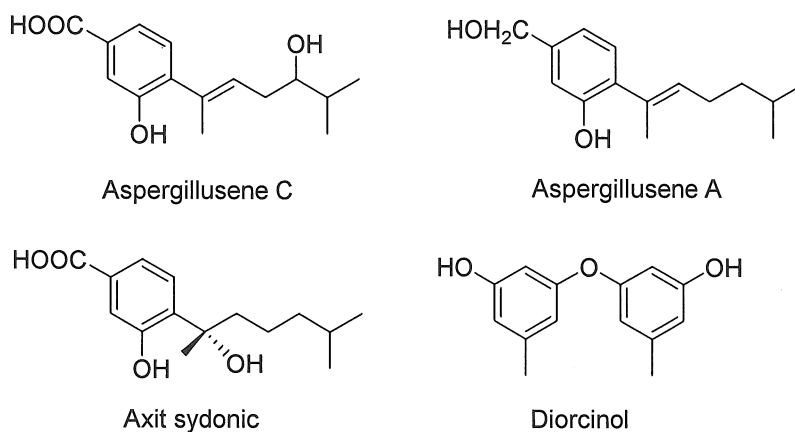
Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Trong số các vi sinh vật biển, vi nấm có một vai trò quan trọng, là nguồn sản xuất các chất chuyển hóa thứ cấp có hoạt tính sinh học. Một số nghiên cứu trước đây cho thấy vi nấm có nguồn gốc từ biển đã được công nhận là nguồn khai thác các chất chuyển hóa thứ cấp có hoạt tính kháng sinh. Trong những năm gần đây, vi nấm biển đã được nghiên cứu ngày càng nhiều hơn để tìm kiếm các hợp chất có hoạt tính sinh học mới, nhiều hợp chất trong số này đang được thử nghiệm sâu hơn nhằm đưa vào ứng dụng trong y học, dược học.

Các chủng vi nấm thuộc chi *Aspergillus* thích nghi và sinh trưởng tốt trong môi trường biển. Các chất chuyển hóa từ *Aspergillus* nguồn gốc biển có cấu trúc thú vị và độc đáo, nhiều hợp chất thể hiện hoạt tính kháng vi sinh vật cao. Từ mẫu hải miên *Hymeniacidon perleve*, Song và cộng sự đã phân lập được chủng vi nấm *Aspergillus versicolor* MF359 sản sinh ra 3 hợp chất mới là hemiacetal sterigmatocystin, acyl-hemiacetal sterigmatocystin và 5-metoxydihydrosterigmatocystin. Hợp chất 5-metoxydihydrosterigmatocystin thể hiện hoạt tính kháng khuẩn mạnh đáng đối với chủng vi sinh vật kiểm định *Staphylococcus aureus* ATCC6538 và *Bacillus subtilissubtilis* ATCC6633 với giá trị MIC lần lượt là 12,5 và 3,15 µg/mL (Song F. H. et al. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **98**, 3753–3758, 2014).

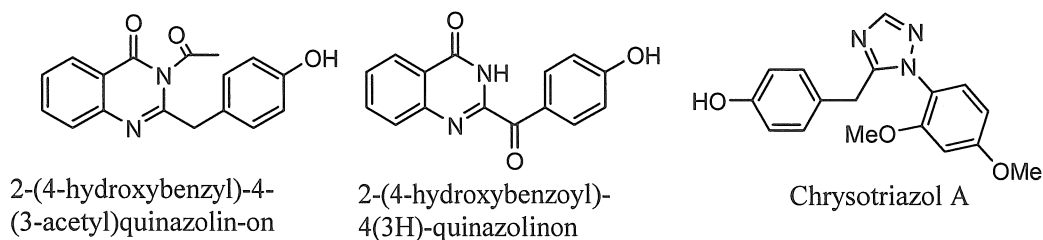


Một hợp chất sesquitepenoit mới là aspergillusene C và 11 hợp chất đã biết được các nhà khoa học Trung Quốc phân lập từ chủng nấm *Aspergillus sydowii* ZSDS1-F6 vào năm 2014. Trong số các hợp chất phân lập được, hợp chất aspergillusene A và diorcinol thể hiện hoạt tính kháng vi khuẩn *Klebsiella pneumonia* gây bệnh viêm phổi với giá trị MIC lần lượt là 21,4 và 21,7 μM và hợp chất axit sydonic thể hiện hoạt tính kháng vi khuẩn *Enterococcus faecalis* với giá trị MIC là 18,8 μM (Wang J. F. et al., *The Journal of Antibiotics*, **67**, 581–583, 2014).

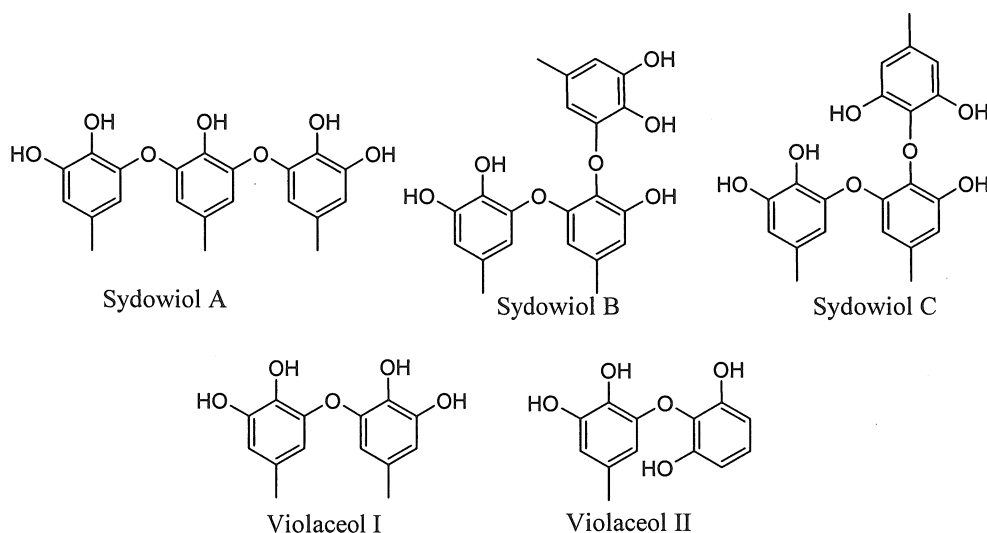


Từ mẫu nước biển, Liu đã phân lập được một chủng vi nấm *Aspergillus sydowii* SW9, sản sinh ra 1 hợp chất ancaloit khung quinazolinon mới là 2-(4-hydroxybenzyl)-4-(3-acetyl)quinazolin-on và 2 hợp chất ancaloit đã biết là 2-(4-hydroxybenzoyl)-4(3H)-quinazolinon và chrysotriazol A. Kết quả thử hoạt tính cho thấy hợp chất 2-(4-hydroxybenzyl)-4-(3-acetyl)quinazolin-on và 2-(4-hydroxybenzoyl)-4(3H)-quinazolinon thể hiện hoạt tính tốt đối với cả 4 chủng vi sinh vật thử nghiệm *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis* và *Streptococcus pneumoniae* với giá trị MIC nằm trong khoảng từ 2,0 đến 16,0 $\mu\text{g/mL}$. Hợp chất chrysotriazoles A thể hiện hoạt tính đối với 2 chủng vi

sinh vật thử nghiệm *Staphylococcus aureus* và *Streptococcus pneumoniae* với giá trị MIC = 32 µg/mL (Liu Y. J. et al., Molecules, 24, 4596, 2019).

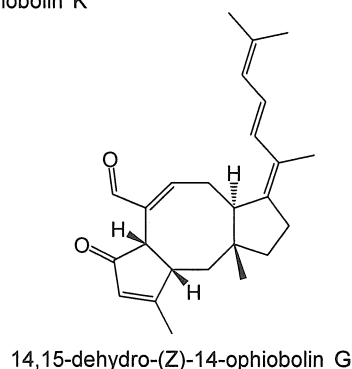
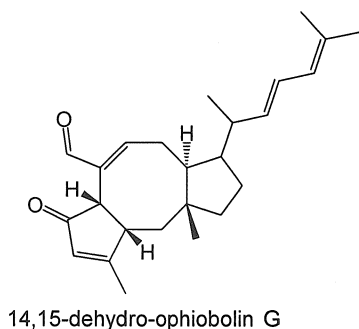
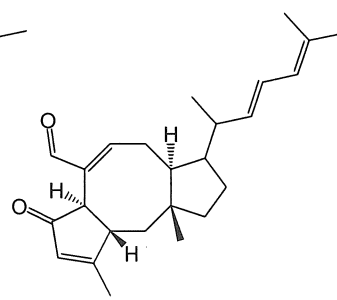
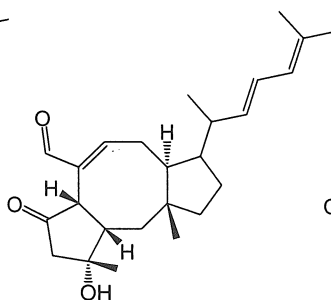
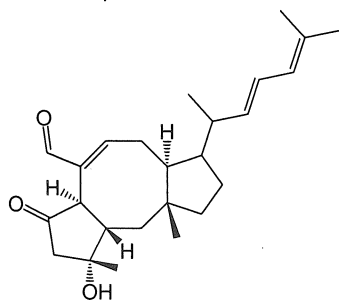
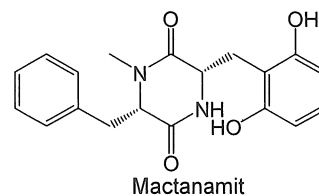
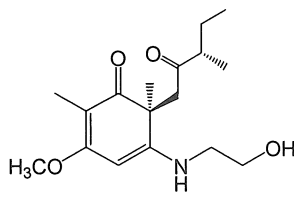
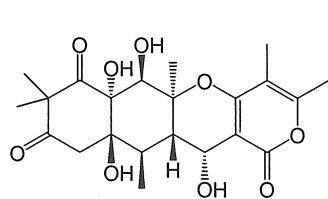


Trong một nghiên cứu về chủng vi nấm biển *Aspergillus sydowii* MF357, các nhà khoa học Trung quốc đã phân lập được 3 hợp chất mới là sydowiol A–C và 2 hợp chất đã biết violaceols I–II. Kết quả khảo sát về hoạt tính cho thấy hợp chất sydowiol A và sydowiol C thể hiện hoạt tính đối với chủng vi khuẩn lao *Mycobacterium tuberculosis* với giá trị IC₅₀ lần lượt là 14 và 24 µg/ml, ngoài ra hợp chất sydowiol C còn thể hiện hoạt tính đối chủng *Staphylococcus aureus* với giá trị MIC = 12,5 µg/ml (Liu X. et al., Tetrahedron Letters, 54, 6081–6083, 2013).



Ở Việt Nam, cho đến nay việc nghiên cứu khai thác các hợp chất thứ cấp từ chủng vi nấm biển thuộc chi *Aspergillus* chưa được nghiên cứu nhiều. Mới chỉ có một vài nghiên cứu về các hợp chất thứ cấp được phân lập từ chủng vi nấm thuộc chi *Aspergillus*. Vào năm 2018, trong khuôn khổ hợp tác quốc tế Việt Nam – Hàn Quốc, các nhà khoa học thuộc Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam đã

phân lập được ba hợp chất có hoạt tính ức chế hiệu quả đối với tế bào hủy xương là aspertetranone D, wasabidienone E và mactanamide từ chủng vi nấm *Aspergillus flocculosus* 01NT.1.1.5 được phân lập từ hải miên *Stylissa* sp. ở vịnh Nha Trang (Shin H. et al. *Mar. Drugs*, 16(1),14, 2018)..



Năm 2019, nhóm nghiên cứu này tiếp tục phát hiện được 05 hợp chất sesterterpen mới gồm 14,15-dehydro-6-*epi*-phiobolin K, 14,15-dehydrophiobolin K, 14,15-dehydro-6-*epi*-phiobolin G, 14,15-dehydro-phiobolin G và 14,15-dehydro-(Z)-14-phiobolin G từ chủng vi nấm biển *Aspergillus flocculosus* được phân lập ở bán đảo Sơn Trà, Đà Nẵng. Cả năm hợp chất này đều thể hiện hoạt tính ức chế hiệu quả sự tăng trưởng của 06 dòng tế bào ung thư ở người gồm ung thư đại tràng, ung thư dạ dày, ung thư phổi, ung thư thận, ung thư tuyến tiền liệt và ung thư vú với giá trị GI₅₀ 0,14-2,01 μ M (Choi B. K. et al., *Mar. Drugs*, 17, 346, 2019).

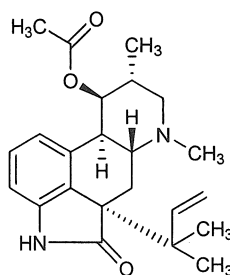
Việc nghiên cứu tìm kiếm các hợp chất mới có hoạt tính kháng vi sinh vật, có

nguồn gốc từ chủng vi nấm biển *Aspergillus* được phân lập từ nguồn trong nước là một hướng nghiên cứu hứa hẹn nhiều triển vọng, cần được đẩy mạnh triển khai thực hiện nhằm ứng dụng trong việc chăm sóc sức khỏe cộng đồng.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Mục đích của sáng chế là đề xuất hợp chất thiên nhiên mới có hoạt tính kháng vi sinh vật, có nguồn gốc từ chủng vi nấm phân lập được tại vùng biển Việt Nam.

Theo một khía cạnh, sáng chế đề xuất hợp chất asperergotin A có công thức (1) được tách chiết từ chủng vi nấm biển *Aspergillus unguis* M440 phân lập được từ loài ốc *Monoplex pilearis* (Linnaeus, 1758) thuộc vùng biển Bạch Long Vĩ của Việt Nam. Hợp chất này có hoạt tính kháng vi sinh vật đối với 3 chủng gram (+) *Enterococcus faecalis* ATCC29212, *Staphylococcus aureus* ATCC25923, *Bacillus cereus* ATCC14579, 1 chủng gram (-) *Salmonella enterica* ATCC13076 và 1 chủng nấm *Candida albicans* ATCC10231.



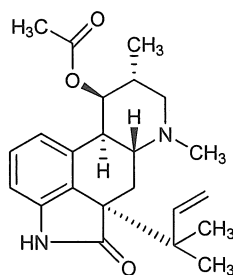
Công thức 1

Theo khía cạnh khác, sáng chế đề xuất phương pháp tách chiết hợp chất alkaloid là ergotin từ chủng vi nấm biển *Aspergillus unguis* M440. Quy trình này bao gồm các bước: a) chuẩn bị các môi trường PDA (Potato Dextroza Agar) lỏng và PDA rắn; b) lên men sinh khối chủng vi nấm biển *Aspergillus unguis* M440; và c) tách chiết hợp chất asperergotin A từ sản phẩm lên men của chủng vi nấm biển *Aspergillus unguis* M440 này.

Mô tả chi tiết sáng chế

Chủng vi nấm biển *Aspergillus unguis* M440 được sử dụng trong sáng chế được phân lập từ loài ốc *Monoplex pilearis* (Linnaeus, 1758) thuộc vùng biển Bạch Long Vĩ của Việt Nam. Chủng vi nấm biển này đã được đăng ký trên Ngân hàng gen quốc tế với mã số MW015806 và được lưu giữ tại Trường Đại học Y Dược Hải Phòng và Viện Hóa sinh biển – Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam ở nhiệt độ -80°C.

Hợp chất asperergotin A được tách chiết từ chủng vi nấm biển *Aspergillus unguis* M440 nêu trên. Hợp chất này có công thức (1) sau:



Công thức 1

Công thức phân tử của hợp chất: $C_{23}H_{30}N_2O_3$

Chất rắn màu trắng, nhiệt độ nóng chảy 174-175°C; $[\alpha]_D^{25} - 41.0$ (c 0.21, MeOH); HR-ESI-MS m/z 383,2333 $[M+H]^+$ (Tính toán lý thuyết cho công thức phân tử $C_{23}H_{31}N_2O_3$ m/z 383,2335); CD (MeOH) λ_{max} ($\Delta\epsilon$) 215 (+29,1), 235 (-78,9), 264 (+37,4) nm.

Hợp chất này được xác định bằng các phương pháp phổ NMR 1D, 2D, phổ khối lượng HR-ESI-MS và phổ CD. Dữ liệu phổ 1H -NMR và ^{13}C -NMR ($CDCl_3$, 1H : 500.13 MHz, ^{13}C : 125.76 MHz) được thể hiện như sau:

C	δ_C (ppm)	δ_H (ppm); J (Hz)
1-NH	-	7,28 s
2	183,8	-
3	52,6	-
4	29,3	1,99 m 2,34 dd (7,0; 14,0)

5	61,9	1,96 m
7	56,9	2,51 m
8	33,0	2,02 m
9	71,9	5,45 t (3,0)
10	37,2	3,26 dd (2,0; 10,0)
11	136,5	-
12	117,7	6,56 d (8,0)
13	127,4	7,08 t (8,0)
14	106,1	6,63 d (7,5)
15	140,8	-
16	129,8	-
17	43,8	2,26 s
18	16,0	1,28 d (7,5)
19	45,5	-
20	21,6	1,12 s
21	22,5	1,02 s
22	143,5	5,91 dd (10,5; 17,5)
23	114,1	5,06 dd (1,0; 17,5) 5,09 dd (1,0; 10,5)
24	170,7	-
25	21,2	1,90 s

Phương pháp tách chiết hợp chất này từ chủng vi nấm biển *Aspergillus unguis* M440 bao gồm các bước: a) chuẩn bị các môi trường PDA lỏng và PDA rắn; b) lên men sinh khối chủng vi nấm biển *Aspergillus unguis* M440; và c) tách chiết hợp chất asperergotin A từ sản phẩm lên men sinh khối dạng rắn của chủng vi nấm này.

Chuẩn bị môi trường PDA lỏng và PDA rắn bằng cách cân, đong chính xác từng thành phần nguyên vật liệu, hóa chất, khuấy tan và điều chỉnh pH =7, rót môi trường rắn (có bổ sung agar) vào 50 bình tam giác thể tích 5l mỗi bình chứa 1l môi trường PDA, môi trường lỏng được chia vào 1 bình tam giác có thể tích 100ml chứa 25ml môi trường để nhân giống cấp 1 và 1 bình 2l có chứa 1l môi trường để nhân

giống cấp 2, các bình môi trường sau khi chuẩn bị được khử trùng ở 121°C trong 30 phút. Môi trường PDA lỏng và PDA rắn bao gồm các thành phần sau đây:

Môi trường PDA lỏng		Môi trường PDA rắn	
Tinh bột khoai tây	33g	Tinh bột khoai tây	1500g
Đường dextroza	22g	Đường dextroza	1000g
Muối biển nhân tạo	33g	Muối biển nhân tạo	1500g
Nước cất	1,12l	Agar	800g
		Nước cất	45,2l

Ổng giữ chủng vi nấm *Aspergillus unguis* M440 được bảo quản ở -80°C được đem rã đông, sau đó cấy chấm trên đĩa petri chứa 10ml môi trường PDA đặc, nuôi tĩnh ở nhiệt độ 28°C trong 6 ngày, từ đĩa petri nhân giống cấp 1 vào bình tam giác thể tích 100ml chứa 25ml môi trường PDA lỏng, sau đó nuôi lắc trên thiết bị lắc với tốc độ 100 vòng/phút ở nhiệt độ 28°C trong 6 ngày để thu được dịch nhân giống cấp 1.

Từ nhân giống cấp 1 tiến hành nhân giống cấp 2 bằng cách bổ sung dịch nhân giống cấp 1 vào bình tam giác thể tích 5l chứa 1l môi trường PDA lỏng theo tỷ lệ 1:50 (theo thể tích) và nuôi lắc với tốc độ 100 vòng/phút ở nhiệt độ 28°C trong 6 ngày.

Tiến hành lên men sinh khối ở trạng thái rắn bằng cách bổ sung dịch nhân giống cấp 2 vào 50 bình tam giác thể tích 5l có chứa 1l môi trường PDA đặc đã chuẩn bị sẵn theo tỷ lệ 1:50 (theo thể tích), nuôi tĩnh ở nhiệt độ 28°C trong 14 ngày để thu được sản phẩm lên men ở trạng thái rắn của chủng vi nấm *Aspergillus* M440.

Sản phẩm lên men ở trạng thái rắn của chủng vi nấm biến *Aspergillus* M440 được gộp lại cắt nhỏ thành kích thước 1x1cm rồi chiết bằng siêu âm 5 lần với dung môi etyl axetat ở 40 °C trong 30 phút theo tỉ lệ mỗi lần là 5:3 (theo thể tích), lọc thu dịch chiết rồi cất loại dung môi dưới áp suất giảm thu được phần cặn chiết etyl axetat.

Phân cận chiết etyl axetat thu được được đem sắc ký cột silica gel với hệ dung môi diclometan:metanol theo tỷ lệ thể tích lần lượt là 100:0, 95:5, 90:10, 80:20, 70:30, 0:100 thu được 6 phân đoạn được ký hiệu lần lượt là F1-F6 (Bảng 1).

Bảng 1. Các phân đoạn thu được sau khi sắc ký cột silica gel cận chiết etyl axetat

STT	Phân đoạn	Tỷ lệ thể tích hệ dung môi diclometan:metanol (theo thể tích)
1	F1	100:0
2	F2	95:5
3	F3	90:10
4	F4	80:20
5	F5	70:30
6	F6	0:100

Phân đoạn F1 tiếp tục được sắc ký cột silica gel với hệ dung môi diclometan:axeton theo tỷ lệ thể tích lần lượt là 100:0; 90:10; 80:20; 70:30; 60:40; 20:80 để thu được 6 phân đoạn nhỏ ký hiệu lần lượt là F1.1-F1.6 (Bảng 2).

Bảng 2. Các phân đoạn thu được sau khi sắc ký cột silica gel phân đoạn F1

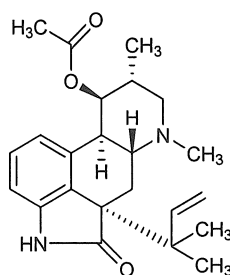
STT	Phân đoạn	Tỷ lệ thể tích hệ dung môi diclometan:axeton (theo thể tích)
1	F1	100:0
2	F2	90:10
3	F3	80:20
4	F4	70:30
5	F5	60:40
6	F6	20:80

Phân đoạn F1.3 được tiếp tục sắc ký cột silica gel theo tỷ lệ 1:5 (trọng lượng:thể tích) với hỗn hợp dung môi diclometan:etyl axetat theo tỷ lệ thể tích 8:2,

sau đó thu được 4 phân đoạn ký hiệu lần lượt là F1.3.1-F1.3.4 với tỉ lệ từng phân đoạn là 0,5:4,0:3,0:2,5 (theo thể tích).

Phân đoạn F1.3.2 được tiếp tục tinh chế trên cột sephadex LH-20 theo tỷ lệ 1:2 (trọng lượng:thể tích) với hỗn hợp dung môi metanol:diclometan theo tỉ lệ thể tích 9:1, sau đó thu được 3 phân đoạn tương ứng ký hiệu lần lượt là F1.3.2.1-F1.3.2.3 với tỉ lệ từng phân đoạn là 3,0:5,0:8,0 (theo thể tích).

Phân đoạn F1.3.2.2 được tinh chế bằng sắc ký bản mỏng điều chế với hệ dung môi diclometan:ethyl axetat theo tỉ lệ thể tích 7:1 thu được hợp chất ở dạng chất rắn màu trắng. Hợp chất này được xác định cấu trúc hóa học bằng các phương pháp phổ NMR 1D, 2D, phổ khối lượng HR-ESI-MS và phổ CD. Kết quả thu được hợp chất asperergotin A, có công thức 1 là:



Công thức 1

Hợp chất asperergotin A thu được có hoạt tính kháng vi sinh vật đối với chủng gram (+) *Enterococcus faecalis* ATCC29212, *Staphylococcus aureus* ATCC25923, *Bacillus cereus* ATCC14579, chủng gram (-) *Salmonella enterica* ATCC13076 và chủng nấm *Candida albicans* ATCC10231 với giá trị MIC lần lượt là 128, 128, 256, 64 và 64 µg/ml.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Sáng chế được minh họa thêm bằng các ví dụ sau. Các ví dụ này được đưa ra chỉ nhằm mục đích minh họa mà không nhằm làm giới hạn phạm vi bảo hộ của sáng chế này.

Ví dụ 1. Lên men ở trạng thái rắn sinh khối chủng *Aspergillus unguis* M440

Chuẩn bị môi trường PDA lỏng và PDA rắn bằng cách cân, đóng chính xác từng thành phần nguyên vật liệu, hóa chất, khuấy tan và điều chỉnh pH =7, rót môi trường rắn (có bổ sung agar) vào 50 bình tam giác thể tích 5l mỗi bình chứa 1l môi trường PDA, môi trường lỏng được chia vào 1 bình tam giác có thể tích 100ml chứa 25ml môi trường để nhân giống cấp 1 và 1 bình 2l có chứa 1l môi trường để nhân giống cấp 2, các bình môi trường sau khi chuẩn bị được khử trùng ở 121°C trong 30 phút. Môi trường PDA lỏng và PDA rắn bao gồm các thành phần sau đây:

Môi trường PDA lỏng		Môi trường PDA rắn	
Tinh bột khoai tây	33g	Tinh bột khoai tây	1500g
Đường dextroza	22g	Đường dextroza	1000g
Muối biển nhân tạo	33g	Muối biển nhân tạo	1500g
Nước cất	1,12l	Agar	800g
		Nước cất	45,2l

Lấy ống giữ chủng vi nấm *Aspergillus unguis* M440 được bảo quản ở -80°C được đem rã đông, sau đó cấy chấm trên đĩa petri chứa 10ml môi trường PDA đặc, nuôi tĩnh ở nhiệt độ 28°C trong 6 ngày, từ đĩa petri nhân giống cấp 1 bằng cách cấy 1 khuẩn lạc vào bình tam giác thể tích 100ml có chứa 25ml môi trường PDA, sau đó nuôi lắc trên thiết bị lắc với tốc độ 100 vòng/phút ở nhiệt độ 28°C trong 6 ngày để thu được dịch nhân giống cấp 1.

Nhân giống cấp 2 bằng cách bổ sung 20ml dịch nhân giống cấp 1 vào bình tam giác thể tích 2l có chứa 1l môi trường PDA lỏng, nuôi lắc với tốc độ 100 vòng/phút ở nhiệt độ 28°C trong 6 ngày.

Lên men sinh khối ở trạng thái rắn bằng cách cấy trái 20ml dịch nhân giống cấp 2 lên trên bề mặt môi trường của mỗi bình tam giác thể tích 5l có chứa 1l môi trường PDA đặc đã chuẩn bị sẵn, quá trình này được thực hiện song song 50 lần (50 bình), nuôi tĩnh ở nhiệt độ 28°C trong 14 ngày để thu được sản phẩm lên men ở trạng thái rắn của chủng vi nấm *Aspergillus unguis* M440.

Ví dụ 2. Tách chiết hợp chất asperergotin A

Sản phẩm lên men dạng rắn của chủng vi nấm biển *Aspergillus* M440 được cắt nhỏ thành kích thước 1x1cm, gộp lại, rồi chiết bằng siêu âm 5 lần với dung môi etyl axetat ở 40 °C trong 30 phút theo thể tích 5:3. Lọc thu dịch chiết rồi cất loại dung môi dưới áp suất giảm thu được 20 g phần cặn chiết etyl axetat. Phần cặn chiết này được đem sắc ký cột silica gel với hệ dung môi diclometan:metanol theo tỉ lệ thể tích từ 100:0 đến 0:100 thu được 6 phân đoạn ký hiệu lần lượt là F1-F6 như nêu trong bảng 3.

Bảng 3. Các phân đoạn sau khi sắc ký cột silica gel của cặn chiết etyl axetat

STT	Phân đoạn	Tỉ lệ dung môi diclometan:metanol (theo thể tích)	Khối lượng các phân đoạn (g)
1	F1	100:0	1,10
2	F2	95:5	1,50
3	F3	90:10	1,75
4	F4	80:20	1,80
5	F5	70:30	2,1
6	F6	0:100	10

Phân đoạn F1 thu được có khối lượng 1,1 g tiếp tục được đem sắc ký cột silica gel với hệ dung môi diclometan:axeton theo tỉ lệ thể tích 80:20; 70:30; 50:50; 0:100 thu được 6 phân đoạn nhỏ tương ứng ký hiệu lần lượt là F1.1-F1.6 (Bảng 4).

Bảng 4. Các phân đoạn sau khi sắc ký cột silica gel của phân đoạn F1

STT	Phân đoạn	Tỉ lệ hệ dung môi diclometan: etyl axetat (theo thể tích)	Khối lượng các phân đoạn (mg)
1	F1.1	100:0	100
2	F1.2	90:10	190
3	F1.3	80:20	200
4	F1.4	70:30	195
5	F1.5	60:40	120

6	F1.6	20:80	103
---	------	-------	-----

Phân đoạn F1.3 thu được có khối lượng 200mg tiếp tục được đem sắc ký cột silica gel với hỗn hợp dung môi diclometan:etyl axetat theo tỉ lệ thể tích 8:2 thu được 4 phân đoạn nhỏ tương ứng ký hiệu lần lượt là F1.3.1-F1.3.4 (Bảng 5).

Bảng 5. Các phân đoạn sau khi sắc ký cột silica gel của phân đoạn F1.3

STT	Phân đoạn	Thể tích các phân đoạn (ml)	Khối lượng các phân đoạn (mg)
1	F1	50	10
2	F2	500	80
3	F3	300	60
4	F4	250	40

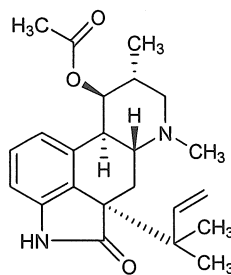
Phân đoạn F1.3.2 thu được có khối lượng 80mg được tinh chế trên cột Sephadex LH-20 với 160ml hỗn hợp dung môi metanol:diclometan theo tỉ lệ thể tích 9:1, thu được 3 phân đoạn nhỏ với thể tích từng phân đoạn là 30ml, 50ml, 80ml được ký hiệu lần lượt là F1.3.2.1-F1.3.2.3 (Bảng 6).

Bảng 6. Các phân đoạn sau khi tinh chế bằng sephadex LH-20 của phân đoạn F1.3.2

STT	Phân đoạn	Thể tích các phân đoạn (ml)	Khối lượng các phân đoạn (mg)
1	F1.3.2	30	10
2	F1.3.3	50	20
3	F1.3.4	80	50

Cuối cùng, phân đoạn F1.3.2.2 có khối lượng 20mg được tiếp tục tinh chế bằng sắc ký bản mỏng điều chế với hệ dung môi diclometan:etyl axetat theo tỉ lệ thể tích 7:1 để thu được 4,5mg hợp chất ở dạng chất rắn màu trắng.

Hợp chất thu được được xác định bằng các phương pháp phổ NMR 1D, 2D, phổ khối lượng HR-ESI-MS và phổ CD cho thấy hợp chất này là asperergotin A có công thức.



Công thức 1

Ví dụ 3. Thử nghiệm hoạt tính của phần cặn chiết etyl axetat và hợp chất có công thức (1).

Phần cặn chiết etyl axetat và hợp chất thu được trong ví dụ 2 được thử hoạt tính đối với 3 chủng gram (-) (*Escherichia coli* ATCC25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC27853, *Salmonella enterica* ATCC13076), 3 chủng gram (+) (*Enterococcus faecalis* ATCC29212, *Staphylococcus aureus* ATCC25923, *Bacillus cereus* ATCC14579) và 1 chủng nấm (*Candida albicans* ATCC10231).

Hoạt tính kháng vi sinh vật được thực hiện dựa trên phương pháp pha loãng đa nồng độ của Hadacek (2000). Đây là phương pháp thử hoạt tính kháng vi sinh vật nhằm đánh giá mức độ kháng vi sinh vật kiểm định của các mẫu thử thông qua các giá trị thể hiện hoạt tính là MIC (nồng độ ức chế tối thiểu). Phần cặn chiết etyl axetat và hợp chất có công thức 1 được pha loãng trong DMSO ở các dải nồng độ giảm dần: 256µg/ml, 128µg/ml, 64µg/ml, 32µg/ml, 16µg/ml, 8µg/ml, 4µg/ml và 2µg/ml, sau đó được thử hoạt tính với dung dịch chứa vi khuẩn hoặc nấm với nồng độ 5×10^5 CFU/ml. Đối chứng được sử dụng là streptomycin đối với các chủng vi khuẩn, nistatin và xyclohexamit đối với nấm. Kết quả được thể hiện trong bảng 7.

Bảng 7. Kết quả thử nghiệm hoạt tính kháng vi sinh vật của phần cặn chiết etyl axetat và hợp chất có công thức (1)

TT	Tên chủng	Cặn etyl axetat	Hợp chất có công thức (1)	Streptomycin	Nistatin	Xyclohexamit
		MIC (µg/mL)	MIC (µg/mL)	MIC (µg/mL)	MIC (µg/mL)	MIC (µg/mL)
1	<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC29212	128	128	256		
2	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC25923	64	128	256		
3	<i>Bacillus cereus</i> ATCC14579	128	256	128		
4	<i>Escherichia coli</i> ATCC25922	-	-	32		
5	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC27853	-	-	256		
6	<i>Salmonella enterica</i> ATCC13076	-	64	128		
7	<i>Candida albicans</i> ATCC10231	64	64		8	32

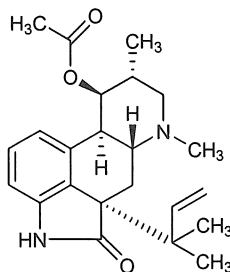
Kết quả cho thấy cả phần cặn chiết etyl axetat và hợp chất theo sáng chế đều có hoạt tính kháng 3 chủng gram (+) *Enterococcus faecalis* ATCC29212, *Staphylococcus aureus* ATCC25923, *Bacillus cereus* ATCC14579 và chủng nấm *Candida albicans* ATCC10231. Ngoài ra, hợp chất có công thức (1) sau khi được tách chiết ra từ phần cặn chiết etyl axetat có độ tinh sạch cao còn thể hiện hoạt tính đối với chủng *Salmonella enterica* ATCC13076 trong khi cặn chiết không thể hiện hoạt tính này.

Hiệu quả đạt được của sáng chế

Hợp chất asperergotin A được tách chiết từ chủng vi nấm biển *Aspergillus unguis* M440 phân lập từ mẫu ốc lông *Monoplex pilearis* (Linnaeus, 1758) thuộc vùng biển Bạch Long Vĩ của Việt Nam. Hợp chất này có hoạt tính kháng vi sinh vật đối với 3 chủng gram (+) *Enterococcus faecalis* ATCC29212, *Staphylococcus aureus* ATCC25923, *Bacillus cereus* ATCC14579, 1 chủng gram (-) *Salmonella enterica* ATCC13076 và 1 chủng nấm *Candida albicans* ATCC10231, là tiền đề cho các nghiên cứu khoa học tiếp theo nhằm phát triển và ứng dụng hợp chất này trong việc sản xuất thuốc kháng sinh dựa vào nguồn vi nấm được phân lập từ vùng biển Việt Nam.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Hợp chất asperergotin A có công thức 1 được tách chiết từ chủng vi nấm biển *Aspergillus unguis* M440, hợp chất này có hoạt tính kháng vi sinh vật đối với ba chủng gram (+) *Enterococcus faecalis* ATCC29212, *Staphylococcus aureus* ATCC25923, *Bacillus cereus* ATCC14579, một chủng gram (-) *Salmonella enterica* ATCC13076 và một chủng nấm *Candida albicans* ATCC10231.



công thức 1.

2. Phương pháp tách chiết hợp chất asperergotin A theo điểm 1, trong đó phương pháp này bao gồm các bước:

a) chuẩn bị các môi trường PDA (Potatoes Dextrose Agar) lỏng và PDA rắn

i) cân, đóng chính xác từng thành phần nguyên vật liệu, hóa chất, khuấy tan và điều chỉnh pH =7, rót môi trường rắn có bổ sung agar vào 50 bình tam giác thể tích 5l mỗi bình chứa 1l môi trường PDA, môi trường lỏng được chia vào 1 bình tam giác có thể tích 100ml chứa 25ml môi trường để nhân giống cấp 1 và 1 bình 2l có chứa 1l môi trường để nhân giống cấp 2, các bình môi trường sau khi chuẩn bị được khử trùng ở 121°C trong 30 phút, môi trường PDA lỏng và PDA rắn bao gồm các thành phần sau đây:

Môi trường PDA lỏng:

Tinh bột khoai tây	33g;
Đường dextroza	22g;
Muối biển nhân tạo	33g;
Nước cất	1,12l;

Môi trường PDA rắn:

Tinh bột khoai tây	1500g;
Đường dextroza	1000g;
Muối biển nhân tạo	1500g;
Agar	800g;
Nước cất	45,2l;

b) lên men sinh khối chủng vi nấm biến *Aspergillus unguis* M440:

i) nhân giống cấp 1 bằng cách cấy chắm chủng vi nấm biến *Aspergillus unguis* M440 trên đĩa petri chứa 10ml môi trường PDA đặc, sau đó nuôi tĩnh ở nhiệt độ 28°C trong 6 ngày, từ đĩa petri nhân giống cấp 1 vào bình tam giác thể tích 100 ml chứa 25ml môi trường PDA, sau đó nuôi lắc trên thiết bị lắc với tốc độ 100 vòng/phút ở nhiệt độ 28°C trong 6 ngày;

ii) nhân giống cấp 2 bằng cách bổ sung dịch nhân giống cấp 1 vào bình tam giác thể tích 5l chứa 1l môi trường PDA rắn theo tỷ lệ 1:50 (theo thể tích) và nuôi lắc với tốc độ 100 vòng/phút ở nhiệt độ 28°C trong 6 ngày;

iii) lên men sinh khối ở trạng thái rắn bằng cách bổ sung dịch nhân giống cấp 2 vào 50 bình tam giác thể tích 5l có chứa 1l môi trường PDA đã chuẩn bị sẵn theo tỷ lệ 1:50 (theo thể tích), nuôi tĩnh ở nhiệt độ 28°C trong 14 ngày để thu được sản phẩm lên men ở trạng thái rắn của chủng vi nấm *Aspergillus unguis* M440;

c) tách chiết hợp chất asperergotin A:

i) cắt nhỏ sản phẩm lên men ở trạng thái rắn thành kích thước 1x1cm rồi gộp lại và chiết bằng siêu âm 5 lần với dung môi etyl axetat ở 40°C trong 30 phút theo tỉ lệ mỗi lần là 5:3 (theo thể tích), sau đó lọc và cất loại dung môi dưới áp suất giảm thu được phần cặn chiết etyl axetat;

ii) sắc ký cột silica gel phân cặn chiết etyl axetat thu được với các hệ dung môi diclometan:metanol theo tỉ lệ thể tích lần lượt là 100:0, 95:5, 90:10, 80:20, 70:30, 0:100 thu được 6 phân đoạn được ký hiệu lần lượt là F1-F6;

iii) sắc ký cột silica gel phân đoạn F1 thu được với các hệ dung môi diclometan:axeton theo tỉ lệ thể tích lần lượt là 100:0; 90:10; 80:20; 70:30; 60:40; 20:80 thu được 6 phân đoạn nhỏ tương ứng ký hiệu là F1.1-F1.6;

iv) sắc ký cột silica gel phân đoạn F1.3 thu được theo tỷ lệ 1:5 (trọng lượng:thể tích) với hỗn hợp dung môi diclometan:etyl axetat theo tỉ lệ thể tích 8:2, thu được 4 phân đoạn nhỏ tương ứng ký hiệu là F1.3.1-F1.3.4;

v) tinh chế phân đoạn F1.3.2 thu được bằng cột Sephadex LH-20 theo tỷ lệ 1:2 (trọng lượng:thể tích) với hỗn hợp dung môi metanol:diclometan theo tỉ lệ thể

tích 9:1, sau đó thu được 3 phân đoạn tương ứng ký hiệu lần lượt là F1.3.2.1-F1.3.2.3 với tỉ lệ từng phân đoạn là 3,0:5,0:8,0 (theo thể tích);

vi) tiếp tục tinh chế phân đoạn F1.3.2.2 thu được bằng sắc ký bản mỏng điều chế với hệ dung môi diclometan:etyl axetat theo tỉ lệ thể tích 7:1 thu được hợp chất dưới dạng chất rắn màu trắng là hợp chất asperergotin A.