



(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) 
1-0021437

(51)⁷ **C07D 307/37, 307/88, C12P 1/06, C12R** (13) **B**
1/01, 1/465

(21) 1-2017-02135

(22) 07.06.2017

(45) 26.08.2019 377

(43) 25.08.2017 353

(73) **VIỆN HÓA SINH BIỂN - VIỆN HÀN LÂM KHOA HỌC VÀ CÔNG NGHỆ VIỆT NAM (VN)**

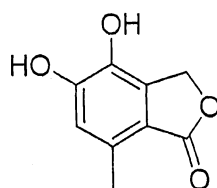
18 Hoàng Quốc Việt, quận Cầu Giấy, thành phố Hà Nội

(72) **Phạm Văn Cường (VN), Đoàn Thị Mai Hương (VN), Trần Văn Hiệu (VN), Lê Thị Hồng Minh (VN), Châu Văn Minh (VN)**

(54) **HỢP CHẤT 4,5-DIHYDROXY-7-METYL-PHTHALIT VÀ PHƯƠNG PHÁP TÁCH CHIẾT HỢP CHẤT NÀY TỪ CHỦNG XẠ KHUẨN BIỂN STREPTOMYCES SP. G212**

(57) Sáng chế đề cập đến hợp chất 4,5-dihydroxy-7-metyl-phthalit có công thức

(1) được tách chiết từ dịch lên men của chủng xạ khuẩn biển *Streptomyces* sp. G212 và phương pháp tách chiết hợp chất này. Hợp chất 4,5-dihydroxy-7-metyl-phthalit thu được thể hiện hoạt tính kháng vi sinh vật đối với với 3 chủng gram (+) *Enterococcus faecalis* ATCC29212, *Staphylococcus aureus* ATCC25923, *Bacillus cereus* ATCC 13245 và 1 chủng gram (-) *Salmonella enterica* ATCC13076.



Công thức 1

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

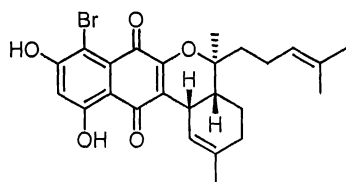
Sáng chế thuộc lĩnh vực các hợp chất thiên nhiên, cụ thể là đề cập đến hợp chất 4,5-dihydroxy-7-metyl-phthalit có nguồn gốc từ chủng xạ khuẩn biển *Streptomyces* sp. G212 và phương pháp tách chiết hợp chất này từ chủng xạ khuẩn biển *Streptomyces* sp. G212.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

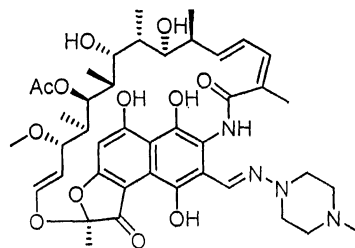
Đa số các chất kháng sinh dùng trong y học hiện nay có nguồn gốc từ xạ khuẩn, trong khoảng 5500 chất kháng sinh đã biết đến hiện nay thì có khoảng 4000 chất kháng sinh có nguồn gốc từ xạ khuẩn. Xạ khuẩn được phân bố rộng rãi trong tự nhiên, môi trường biển là nguồn cung cấp các chủng xạ khuẩn phong phú để tách chiết các hợp chất có hoạt tính sinh học lý thú. Nhiều nghiên cứu cho thấy tính đa dạng về thành phần hóa học và hoạt tính sinh học của các hợp chất được tách chiết từ các chủng xạ khuẩn biển. Một trong những đặc điểm quan trọng của xạ khuẩn là khả năng hình thành chất kháng sinh.

Các chủng xạ khuẩn thuộc chi *Streptomyces* thích nghi và sinh trưởng rất tốt trong môi trường biển. Các chất chuyển hóa từ *Streptomyces* nguồn gốc biển có cấu trúc thú vị và độc đáo, nhiều hợp chất hiếm hoặc chưa từng có từ các nguồn trên cạn. Từ mẫu trầm tích biển ở San Diego, William Paul đã phân lập được một chủng thuộc chi *Streptomyces*, sản sinh ra hợp chất marinone thuộc lớp chất quinone. Cấu trúc hóa học của lớp chất này cho thấy chúng được sinh tổng hợp từ các phân polyketit và tecpenoit (F. William et al., *Nature Chemical Biology*, 2006, 2, 666-673). Tiếp theo phải kể đến là rifampicin, một kháng sinh chủ yếu dùng để điều trị lao hiện nay được bán tổng hợp từ rifamycin, một hợp chất được phân lập lần đầu

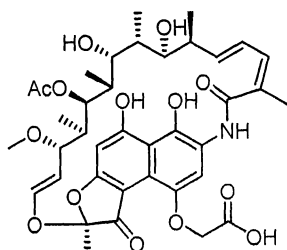
tiên từ *Streptomyces mediterranei* vào năm 1959 (Sensi P. et al., *Ed. Sci.*, 1959, 14, 146–147).



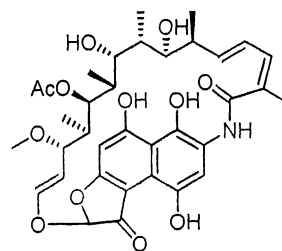
Marinone



Rifampicin

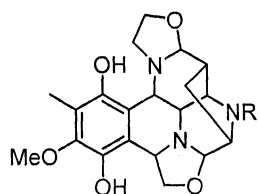


Rifamycin B

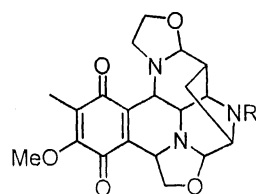


Rifamycin SV

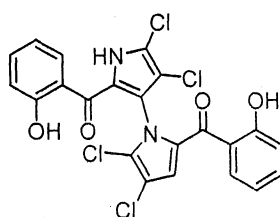
Trong một nghiên cứu về chủng *Streptomyces* phân lập từ trầm tích biển Key West, Florida, các nhà khoa học Mỹ đã phát hiện được bốn hợp chất bioxalomycin $\alpha 1$, $\alpha 2$, $\beta 1$ và $\beta 2$. Kết quả khảo sát về hoạt tính kháng vi sinh vật cho thấy bốn hợp chất này thể hiện hoạt tính tốt đối với các chủng *Staphylococcus hemolyticus* và *Enterococcus faecalis*. Đặc biệt hợp chất bioxalomycin $\alpha 2$ thể hiện hoạt tính mạnh nhất với giá trị MIC nằm trong khoảng 0,002 đến 0,25 $\mu\text{g/ml}$ (Bernan V. Set al., *J. Antibiot.*, 1994, 47, 1417-1424).



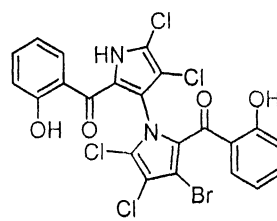
Bioxalomycin $\alpha 1$: R=H
Bioxalomycin $\alpha 2$: R=Me



Bioxalomycin $\beta 1$: R=H
Bioxalomycin $\beta 2$: R=Me



Marinopyrrol A



Marinopyrrol B

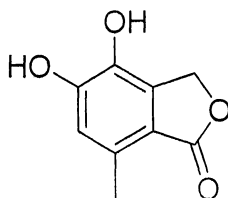
Trong quá trình nghiên cứu một chủng thuộc chi *Streptomyces* có nguồn gốc từ biển, người ta đã phát hiện nước biển cần thiết cho quá trình sinh tổng hợp chất marinopyrrol A và B. Việc phát hiện hợp chất marinopyrrol A và B được xem là báo cáo đầu tiên của một sản phẩm tự nhiên bispyrrol được hình thành qua liên kết N/C-2. Hai hợp chất này có hoạt tính tốt đối với chủng tụ cầu *Staphylococcus aureus* kháng methicillin (Hughes C. C. et al., Org Lett. 2008, 10(4), 629-631)

Việc nghiên cứu khai thác các hợp chất thứ cấp từ nguồn vi sinh vật thuộc các vùng biển Việt Nam cho đến nay chưa được nghiên cứu nhiều. Do đó, nghiên cứu tìm kiếm các hợp chất mới có hoạt tính kháng vi sinh vật, có nguồn gốc từ các chủng xạ khuẩn 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 xạ khuẩn phân lập được tại vùng biển Việt Nam.

Theo một khía cạnh, sáng chế đề xuất hợp chất 4,5-dihydroxy-7-methyl-phthalit có công thức (1) được tách chiết từ chủng xạ khuẩn biển *Streptomyces* sp. G212 phân lập được từ mẫu trầm tích thuộc vùng biển Quảng Bình 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* ATCC 13245 và 1 chủng gram (-) *Salmonella enterica* ATCC13076.



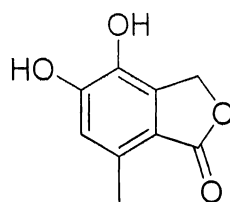
Công thức 1

Theo khía cạnh khác, sáng chế đề xuất phương pháp tách chiết hợp chất dạng phthalit là 4,5-dihydroxy-7-metyl-phthalit từ chủng xạ khuẩn biển *Streptomyces* sp. G212. Quy trình này bao gồm các bước: a) chuẩn bị các môi trường A1 và A1+; b) lên men sinh khối chủng xạ khuẩn *Streptomyces* sp. G212; và c) tách chiết hợp chất 4,5-dihydroxy-7-metyl-phthalit từ dịch lên men của chủng *Streptomyces* sp. G212 này.

Mô tả chi tiết sáng chế

Chủng xạ khuẩn biển *Streptomyces* sp. G212 được sử dụng trong sáng chế do Viện Hóa sinh biển - Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam phân lập từ mẫu bùn biển Quảng Bình của Việt Nam. Chủng xạ khuẩn biển này đã được đăng ký trên Ngân hàng gen quốc tế với mã số MF187963 và được lưu giữ tại Viện Hóa sinh biển – Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam ở nhiệt độ -80°C.

Hợp chất 4,5-dihydroxy-7-metyl-phthalit được tách chiết từ chủng xạ khuẩn biển *Streptomyces* sp. G212 nêu trên. Hợp chất này có công thức (1) sau:



Công thức 1

Công thức phân tử của hợp chất: $C_9H_8O_4$

HR-ESI-MS m/z 179,0358 $[M+H]^+$ (Tính toán lý thuyết cho công thức phân tử $C_9H_7O_4$ m/z 179,0344)

Hợp chất này được xác định bằng các phương pháp phổ NMR 1D, 2D, và phổ khối lượng HR ESI-MS. 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	170,9	
3	66,7	5,13 (s, 2H)

3a	134,7	
4	137,1	
5	150,6	
6	118,4	6,72 (s, 1H)
7	130,1	
7a	113,5	
CH ₃	16,0	2,38 (s, 3H)

Phương pháp tách chiết hợp chất này từ chủng xạ khuẩn *Streptomyces* sp. G212 bao gồm các bước: a) chuẩn bị các môi trường A1 và A1+; b) lên men sinh khối chủng xạ khuẩn *Streptomyces* sp. G212; và c) tách chiết hợp chất 4,5-dihydroxy-7-metyl-phthalit từ dịch lên men của chủng xạ khuẩn này.

Các môi trường A1 và A1+ được chuẩn bị là các môi trường có các thành phần sau đây:

Môi trường A1		Môi trường A1+	
Tinh bột tan	25,5g	Tinh bột tan	475g
Cao nấm men	10,2g	Cao nấm men	190g
Pepton	5,1g	Pepton	95g
Muối biển nhân tạo	76,5g	CaCO ₃	47,5g
Nước cất	2,52l	FeSO ₄	1,9g
		KBr	4,75g
		Muối biển nhân tạo	1425g
		Nước cất	43,85l

Ổng giữ chủng xạ khuẩn *Streptomyces* sp. G212 được bảo quản ở -80°C được đem rã đông, sau đó cấy ria trên đĩa petri chứa 10ml môi trường A1, nuôi tĩnh ở nhiệt độ 28°C trong 6 ngày. Chọn 20 khuẩn lạc riêng rẽ được mọc từ đĩa petri để nhân giống cấp 1 bằng cách cấy vào bình tam giác chứa 50ml môi trường A1, sau đó nuôi lắc trên thiết bị lắc với tốc độ 190 vòng/phút ở nhiệt độ 28°C trong 6 ngày để thu được dịch nhân giống cấp 1.

Dịch nhân giống cấp 1 được tiến hành nhân giống cấp 2 bằng cách bổ sung vào bình chứa môi trường A1 theo tỷ lệ 1:50 (theo thể tích) và nuôi lắc với tốc độ 190 vòng/phút ở nhiệt độ 28°C trong 6 ngày.

Tiến hành lên men sinh khối bằng cách bổ sung dịch nhân giống cấp 2 vào bình chứa môi trường A1+ theo tỷ lệ 1:19 (theo thể tích), nuôi lắc với tốc độ 190 vòng/phút ở nhiệt độ 28°C trong 12 ngày để thu được dịch lên men của chủng xạ khuẩn *Streptomyces* sp. G212.

Dịch lên men của chủng xạ khuẩn *Streptomyces* sp. G212 thu được được đem chiết phân bố 5 lần với etyl axetat theo tỉ lệ mỗi lần là 1:2 (theo thể tích). Dịch chiết thu được sau đó được đem quay cất trong chân không dưới áp suất giảm để loại hoàn toàn dung môi và thu được phần cặn chiết etyl axetat.

Phần cặn 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, 90:10, 80:20, 70:30, 0:100 thu được 5 phân đoạn được ký hiệu lần lượt là F1-F5 (Bảng 1).

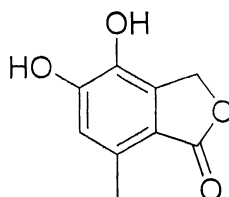
Bảng 1. Các phân đoạn thu được sau khi sắc ký cột silica gel

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

Phân đoạn F2 tiếp tục được sắc ký cột silica gel với hệ dung môi diclometan:etyl axetat theo tỉ lệ thể tích lần lượt là 80:20; 70:30; 50:50; 0:100 để thu được 4 phân đoạn nhỏ ký hiệu lần lượt là F2.1-F2.4;

Phân đoạn F2.1 thu được được tinh chế trên cột sephadex LH-20 theo tỷ lệ 1:1,43 (trọng lượng:thể tích) với hỗn hợp dung môi metanol:diclometan theo tỉ lệ thể tích 9:1, sau đó thu được 5 phân đoạn ký hiệu lần lượt là F2.1.1-F2.1.5 với tỉ lệ từng phân đoạn là 3,5:4:4,5:4:4 (theo thể tích).

Phân đoạn F2.1.1 được tinh chế bằng sắc ký bản mỏng điều chế với hệ dung môi diclometan:axeton theo tỉ lệ thể tích 6:1 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, và phổ khối lượng HR ESI-MS. Kết quả thu được hợp chất axit 4,5-dihydroxy-7-metyl-phthalit, có công thức 1 là:



Công thức 1

Hợp chất 4,5-dihydroxy-7-metyl-phthalit thu được có hoạt tính kháng vi sinh vật đối với chủng gram (+) *Enterococcus faecalis* ATCC29212, *Staphylococcus aureus* ATCC25923, *Bacillus cereus* ATCC 13245 và chủng gram (-) *Salmonella enterica* ATCC13076 với giá trị IC_{50} và MIC lần lượt là $IC_{50}=34,13\mu\text{g/ml}$, $MIC=64\mu\text{g/ml}$; $IC_{50}=65,67\mu\text{g/ml}$, $MIC=128\mu\text{g/ml}$; $IC_{50}=66,33\mu\text{g/ml}$, $MIC=128\mu\text{g/ml}$ và $IC_{50}=129,23\mu\text{g/ml}$, $MIC=256\mu\text{g/ml}$.

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 sinh khối chủng *Streptomyces* sp. G212

Chuẩn bị môi trường A1 và A1+ bao gồm các thành phần sau:

Môi trường A1		Môi trường A1+	
Tinh bột tan	25,5g	Tinh bột tan	475g
Cao nấm men	10,2g	Cao nấm men	190g
Pepton	5,1g	Pepton	95g
Muối biển nhân tạo	76,5g	CaCO_3	47,5g

Nước cất	2,52l	FeSO ₄	1,9g
		KBr	4,75g
		Muối biển nhân tạo	1425g
		Nước cất	43,85l

Lấy ống giữ chủng xạ khuẩn được bảo quản ở -80°C đem rã đông, dùng que cấy cấy ria trên đĩa petri chứa 10ml môi trường A1, sau đó nuôi tĩnh ở nhiệt độ 28°C trong 6 ngày, chọn ra 20 khuẩn lạc riêng rẽ được mọc từ đĩa petri để cấy vào bình tam giác thể tích 125ml chứa 50ml môi trường A1, nuôi lắc trên thiết bị lắc với tốc độ 190 vòng/phút ở nhiệt độ 28°C trong 6 ngày thu được dịch nhân giống cấp 1.

Nhân giống cấp 2 bằng cách chuyển toàn bộ 50ml dịch nhân giống cấp 1 vào bình tam giác thể tích 5l chứa 2,5l môi trường A1, nuôi lắc với tốc độ 190 vòng/phút ở nhiệt độ 28°C trong 6 ngày.

Lên men sinh khối chủng *Streptomyces* sp. G212 bằng cách chuyển 2,5l dịch nhân giống cấp 2 vào bình chứa 47,5l môi trường A1+, nuôi lắc với tốc độ 190 vòng/phút ở nhiệt độ 28°C trong 12 ngày thu được 50l dịch lên men của chủng xạ khuẩn *Streptomyces* sp. G212.

Ví dụ 2. Tách chiết hợp chất 4,5-dihydroxy-7-metyl-phthalit

50l dịch lên men của chủng *Streptomyces* sp. G212 được chiết phân bố 5 lần, mỗi lần với 25l etyl axetat. Dịch chiết sau đó được cất dưới áp suất giảm để loại hoàn toàn dung môi và thu được 6g 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 5 phân đoạn ký hiệu lần lượt là F1-F5 như nêu trong bảng 2.

Bảng 2. 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 (mg)
1	F1	100:0	750

2	F2	90:10	900
3	F3	80:20	800
4	F4	70:30	1000
5	F5	0:100	2000

Phân đoạn F2 thu được có khối lượng 900mg tiếp tục được đem sắc ký cột silica gel với hệ dung môi diclometan:etyl axetat theo tỉ lệ thể tích 80:20; 70:30; 50:50; 0:100 thu được 4 phân đoạn nhỏ tương ứng ký hiệu lần lượt là F2.1-F2.4 (Bảng 3).

Bảng 3. Các phân đoạn sau khi sắc ký cột silica gel của phân đoạn F2

STT	Phân đoạn	Tỉ lệ hệ dung môi diclometan: etyl axetat (theo thể tích)	Khối lượng các phân đoạn (mg)
1	F2.1	80:20	140
2	F2.2	70:30	180
3	F2.3	50:50	250
4	F2.4	0:100	200

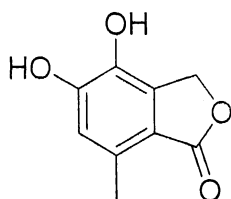
Phân đoạn F2.1 thu được có khối lượng 140mg được tinh chế trên cột Sephadex LH-20 với 200ml hỗn hợp dung môi metanol:diclometan theo tỉ lệ thể tích 9:1, thu được 5 phân đoạn nhỏ với thể tích từng phân đoạn là 35ml, 40ml, 45ml, 40ml, 40ml được ký hiệu lần lượt là F2.1.1–F2.1.5 (Bảng 4).

Bảng 4. Các phân đoạn sau khi tinh chế bằng sephadex LH-20 của phân đoạn F2.1

STT	Phân đoạn	Thể tích các phân đoạn (ml)	Khối lượng các phân đoạn (mg)
1	F2.1.1	35	15
2	F2.1.2	40	20
3	F2.1.3	45	30
4	F2.1.4	40	25
5	F2.1.5	40	35

Cuối cùng, phân đoạn F2.1.1 có khối lượng 15mg được tiếp tục tinh chế bằng sắc ký bản mỏng điều chế với hệ dung môi diclometan:axeton theo tỉ lệ thể tích 6:1 để thu được 7mg hợp chất ở dạng chất rắn màu trắng.

Hợp chất thu được được xác định bằng các phương pháp phổ NMR 1D, 2D, và phổ khối lượng ESI-MS cho thấy hợp chất này là 4,5-dihydroxy-7-metyl-phthalit 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 vi khuẩn gram (-) (*Escherichia coli* ATCC25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC27853, *Salmonella enterica* ATCC13076), 3 chủng gram (+) (*Enterococcus faecalis* ATCC29212, *Staphylococcus aureus* ATCC25923, *Bacillus cereus* ATCC 13245) và 1 chủng nấm (*Candida albicans* ATCC1023).

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 và kanamycin đối với các chủng vi khuẩn và xyclohexamit đối với nấm. Kết quả được thể hiện trong bảng 6.

Bảng 6. 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	Kanamycin	xyclohexamit
		MIC (µg/mL)	MIC (µg/mL)	IC ₅₀ (µg/mL)	MIC (µg/mL)	MIC (µg/mL)	MIC (µg/mL)
1	<i>Escherichia coli</i> ATCC25922		-	-	32	128	
2	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC27853		-	-	256	64	
3	<i>Salmonella enterica</i> ATCC13076		256	129,23	128	16	
4	<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC29212	128	64	34,13	256	128	
5	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC25923	-	128	65,67	256	4	
6	<i>Bacillus cereus</i> ATCC 13245	128	128	66,33	128	8	
7	<i>Candida albicans</i> ATCC10231	-	-	-			32

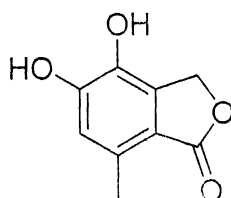
Kết quả cho thấy cả phần cặn chiết etyl axetat và hợp chất theo sáng chế đều có hoạt tính kháng hai chủng *Enterococcus faecalis* ATCC29212 và *Bacillus cereus* ATCC 13245. Ngoài ra, hợp chất có công thức (1) sau khi được tách chiết ra từ phần cặn chiết etyl axetat có độ tinh sạch cao còn thể hiện hoạt tính đối với chủng *Salmonella enterica* ATCC13076 và *Staphylococcus aureus* ATCC25923, trong khi cặn chiết không thể hiện hoạt tính này.

Hiệu quả đạt được của sáng chế

Hợp chất axit 4,5-dihydroxy-7-metyl-phthalit được tách chiết từ dịch lên men của chủng xạ khuẩn biển *Streptomyces* sp. G212 phân lập được từ mẫu bùn biển Quảng Bình của Việt Nam. Hợp chất này có hoạt tính kháng vi sinh vật đối với với 3 chủng gram (+) *Enterococcus faecalis* ATCC29212, *Staphylococcus aureus* ATCC25923, *Bacillus cereus* ATCC 13245 và 1 chủng gram (-) *Salmonella enterica* ATCC13076, 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 sinh vật được phân lập từ vùng biển Việt Nam.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Hợp chất 4,5-dihydroxy-7-metyl-phthalit có công thức 1 được tách chiết từ dịch lên men của chủng xạ khuẩn biển *Streptomyces* sp. G212, hợp chất này có hoạt tính kháng vi sinh vật đối với 3 chủng gram (+) *Enterococcus faecalis* ATCC29212, *Staphylococcus aureus* ATCC25923, *Bacillus cereus* ATCC13245 và 1 chủng gram (-) *Salmonella enterica* ATCC13076.



công thức 1

2. Phương pháp tách chiết hợp chất 4,5-dihydroxy-7-metyl-phthalit theo điểm 1, trong đó phương pháp này bao gồm các bước:

a) chuẩn bị các môi trường A1 và A1+ bao gồm các thành phần sau:

Môi trường A1		Môi trường A1+	
Tinh bột tan	25,5g	Tinh bột tan	475g
Cao nấm men	10,2g	Cao nấm men	190g
Pepton	5,1g	Pepton	95g
Muối biển nhân tạo	76,5g	CaCO ₃	47,5g
Nước cất	2,52l	FeSO ₄	1,9g
		KBr	4,75g
		Muối biển nhân tạo	1425g
		Nước cất	43,85l

b) lên men sinh khối chủng xạ khuẩn *Streptomyces* sp. G212:

i) nhân giống cấp 1 bằng cách cấy ria chủng xạ khuẩn *Streptomyces* sp. G212 trên đĩa petri chứa 10ml môi trường A1, sau đó nuôi tĩnh ở nhiệt độ 28°C trong 12 ngày, chọn ra 20 khuẩn lạc riêng rẽ để cấy vào 50ml môi trường A1, nuôi lắc với tốc độ 190 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 môi trường A1 theo tỉ lệ 1:50 (theo thể tích), nuôi lắc với tốc độ 190 vòng/phút ở nhiệt độ 28°C trong 6 ngày;

iii) lên men sinh khối bằng cách chuyển dịch nhân giống cấp 2 vào môi trường A1+ theo tỷ lệ 1:19 (theo thể tích), nuôi lắc với tốc độ 190 vòng/phút ở nhiệt độ 28°C trong 12 ngày thu được dịch lên men của chủng xạ khuẩn *Streptomyces* sp. G212;

c) tách chiết hợp chất 4,5-dihydroxy-7-metyl-phthalit:

i) chiết phân bố 5 lần dịch lên men của chủng xạ khuẩn *Streptomyces* sp. G212 với etyl axetat, mỗi lần theo tỉ lệ 2:1 (theo thể tích), sau đó quay cất trong chân không dưới áp suất giảm để loại dung môi và 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, 90:10, 80:20, 70:30, 0:100 thu được 5 phân đoạn được ký hiệu lần lượt là F1-F5;

iii) sắc ký cột silica gel phân đoạn F2 thu được với các hệ dung môi diclometan:etyl axetat theo tỉ lệ thể tích lần lượt là 80:20; 70:30; 50:50; 0:100 thu được 4 phân đoạn nhỏ tương ứng ký hiệu là F2.1-F2.4;

iv) tinh chế phân đoạn F2.1 thu được bằng cột Sephadex LH-20 theo tỷ lệ 1:1,43 (trọng lượng:thể tích) với hệ dung môi metanol:diclometan theo tỉ lệ thể tích 9:1, sau đó thu lần lượt 5 phân đoạn tương ứng ký hiệu là F2.1.1-F2.1.5 với tỉ lệ từng phân đoạn là 3,5:4:4,5:4:4 (theo thể tích);

v) tiếp tục tinh chế phân đoạn F2.1.1 thu được bằng sắc ký bản mỏng điều chế với hệ dung môi diclometan:axeton theo tỉ lệ thể tích 6:1 thu được hợp chất dưới dạng chất rắn màu trắng là hợp chất 4,5-dihydroxy-7-metyl-phthalit.