

BỘ GIÁO DỤC VÀ ĐÀO TẠO

**VIỆN HÀN LÂM KHOA HỌC
VÀ CÔNG NGHỆ VIỆT NAM**

HỌC VIỆN KHOA HỌC VÀ CÔNG NGHỆ



ĐỖ THỊ QUỲNH

**NGHIÊN CỨU CÁC HỢP CHẤT THỨ CẤP CÓ HOẠT TÍNH
KHÁNG VI SINH VẬT KIỂM ĐỊNH PHÂN LẬP TỪ BA CHỦNG
XẠ KHUẨN THUỘC CHI *ACTINOALLOTEICHUS* VÀ
STREPTOMYCES Ở VÙNG BIỂN TRUNG BỘ, VIỆT NAM**

LUẬN ÁN TIẾN SĨ KHOA HỌC VẬT CHẤT

HÀ NỘI – 2024

BỘ GIÁO DỤC
VÀ ĐÀO TẠO

VIỆN HÀN LÂM KHOA HỌC
VÀ CÔNG NGHỆ VIỆT NAM

HỌC VIỆN KHOA HỌC VÀ CÔNG NGHỆ

ĐỖ THỊ QUỲNH

NGHIÊN CỨU CÁC HỢP CHẤT THỨ CẤP CÓ HOẠT TÍNH
KHÁNG VI SINH VẬT KIỂM ĐỊNH PHÂN LẬP TỪ BA CHỦNG
XẠ KHUẨN THUỘC CHI *ACTINOALLOTEICHUS* VÀ
STREPTOMYCES Ở VÙNG BIỂN TRUNG BỘ, VIỆT NAM

LUẬN ÁN TIẾN SĨ KHOA HỌC VẬT CHẤT

Ngành: Hóa hữu cơ

Mã số: 9 44 01 14

Xác nhận của Học viện

Người hướng dẫn 1

Người hướng dẫn 2

Khoa học và Công nghệ

(Ký, ghi rõ họ tên)

(Ký, ghi rõ họ tên)

LỜI CAM ĐOAN

Tôi xin cam đoan luận án: "Nghiên cứu các hợp chất thứ cấp có hoạt tính kháng vi sinh vật kiểm định phân lập từ ba chủng xạ khuẩn thuộc chi *Actinoalloteichus* và *Streptomyces* ở vùng biển trung bộ, Việt Nam" là công trình nghiên cứu của chính mình dưới sự hướng dẫn khoa học của PGS. TS. Phạm Văn Cường và PSG. TS. Đoàn Thị Mai Hương cùng tập thể hướng dẫn. Luận án sử dụng những thông tin trích dẫn từ nhiều nguồn tham khảo khác nhau và các thông tin trích dẫn được ghi rõ nguồn gốc. Các kết quả nghiên cứu của tôi được công bố chung với các tác giả khác đã được sự nhất trí của đồng tác giả khi đưa vào luận án. Các số liệu, kết quả được trình bày trong luận án là hoàn toàn trung thực và chưa từng được công bố trong bất kỳ một công trình nào khác ngoài các công trình công bố của tác giả. Luận án được hoàn thành trong thời gian tôi làm nghiên cứu sinh tại Học viện Khoa học và Công nghệ, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam.

Hà Nội, ngày tháng năm 2024

Tác giả luận án

Đỗ Thị Quỳnh

LỜI CẢM ƠN

Luận án tiến sỹ được thực hiện tại Học viện Khoa học và Công Nghệ – Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam (Viện HLKH&CH Việt Nam), dưới sự hướng dẫn khoa học tận tình của PGS. TS. Phạm Văn Cường và PSG. TS. Đoàn Thị Mai Hương. Tác giả xin bày tỏ lòng biết ơn chân thành và sự kính trọng sâu sắc đối với các thầy cô trong Tập thể hướng dẫn khoa học, những người đã tạo mọi điều kiện đồng thời động viên tác giả vượt qua những khó khăn trong chuyên môn và cuộc sống. Sự chuyên nghiệp, sự tận tâm, nghiêm khắc và những định hướng đúng đắn của các thầy cô là tiền đề quan trọng giúp tác giả có được những kết quả trình bày trong luận án này.

Tác giả xin trân trọng cảm ơn Ban lãnh đạo Viện Hóa sinh biển, ban Giám đốc Học viện Khoa học và Công nghệ, Phòng Đào tạo, các Phòng Ban chức năng của Học viện và đặc biệt là các giảng viên, các nhà khoa học tại Viện HLKH&CH Việt Nam đã quan tâm, giúp đỡ, tạo mọi điều kiện thuận lợi về cơ sở vật chất, nguồn dữ liệu học tập và các thủ tục hành chính cho tác giả trong quá trình học tập, nghiên cứu và hoàn thành luận án này.

Qua đây, tác giả xin gửi lời cảm ơn chân thành tới các cán bộ, giảng viên, nghiên cứu viên của phòng Tổng hợp hữu cơ, TS. Lê Thị Hồng Minh và các nhà khoa học của phòng Công nghệ sinh học, các phòng chức năng khác tại Viện Hóa sinh biển đã giúp đỡ và tạo điều kiện thuận lợi cho tác giả trong quá trình học tập cũng như hoàn thiện đề tài.

Tác giả cũng xin gửi lời cảm ơn tới các đồng nghiệp, bạn bè và gia đình đã động viên và giúp đỡ tôi trong suốt quá trình học tập.

Kính phí thực hiện luận án từ đề tài nghiên cứu khoa học mã số TĐDLB0.03/20-22.

Hà Nội, ngày tháng năm 2024

Tác giả luận án

NCS. Đỗ Thị Quỳnh

MỤC LỤC

ĐẶT VẤN ĐỀ	1
CHƯƠNG 1. TỔNG QUAN.....	3
1.1. Giới thiệu chung về xạ khuẩn (Actinobacteria).....	3
1.2. Các nghiên cứu về xạ khuẩn biển chi <i>Streptomyces</i>	4
<i>1.2.1. Giới thiệu chung về chi <i>Streptomyces</i></i>	<i>4</i>
<i>1.2.2. Các hợp chất thứ cấp từ xạ khuẩn biển chi <i>Streptomyces</i></i>	<i>5</i>
1.3. Các nghiên cứu về xạ khuẩn biển chi <i>Actinoalloteichus</i>	20
<i>1.3.1. Đặc điểm chung của chi <i>Actinoalloteichus</i></i>	<i>20</i>
<i>1.3.2. Các hợp chất thứ cấp từ xạ khuẩn biển chi <i>Actinoalloteichus</i>.....</i>	<i>20</i>
1.4. Các nghiên cứu ở Việt Nam về thành phần hóa học của xạ khuẩn biển chi <i>Streptomyces</i> và chi <i>Actinoalloteichus</i>	24
CHƯƠNG 2 ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU	29
2.1. Đối tượng nghiên cứu.....	29
2.2. Phương pháp nghiên cứu	31
<i>2.2.1. Hóa chất, thiết bị và phương pháp nuôi cấy nhân sinh khối lượng lớn</i>	<i>31</i>
<i>2.2.2. Phương pháp tạo cặn chiết từ sản phẩm nuôi cấy nhân sinh khối các chủng xạ khuẩn.....</i>	<i>33</i>
<i>2.2.3. Phương pháp phân lập các hợp chất thứ cấp</i>	<i>33</i>
<i>2.2.4. Phương pháp xác định cấu trúc hóa học của các hợp chất phân lập được....</i>	<i>34</i>
<i>2.2.5. Phương pháp thử hoạt tính kháng vi sinh vật kiểm định</i>	<i>35</i>
CHƯƠNG 3 THỰC NGHIỆM	36
3.1. Nuôi cấy nhân nuôi sinh khối lượng lớn 3 chủng xạ khuẩn.....	36
<i>3.1.1. Nhân nuôi sinh khối dạng rắn quy mô 50 kg của chủng <i>Actinoalloteichus cyanogriseus</i> G631.....</i>	<i>36</i>
<i>3.1.2. Nhân nuôi sinh khối dạng rắn quy mô 50kg chủng xạ khuẩn <i>Streptomyces</i> sp. G666.....</i>	<i>38</i>
<i>3.1.3. Nhân nuôi sinh khối dạng rắn quy mô 50 kg chủng <i>Streptomyces</i> sp. G246..</i>	<i>40</i>
3.2. Phân lập các hợp chất từ chủng <i>Actinoalloteichus cyanogriseus</i> G631	42
<i>3.2.1. Xử lý mẫu, tạo cặn chiết và phân lập chủng <i>Actinoalloteichus cyanogriseus</i> G631.....</i>	<i>42</i>
<i>3.2.2. Hằng số vật lý và dữ liệu phổ của các hợp chất phân lập từ chủng <i>Actinoalloteichus cyanogriseus</i> G631.....</i>	<i>44</i>
3.3. Phân lập các hợp chất thứ cấp từ chủng <i>Streptomyces</i> sp. G666.....	46
<i>3.3.1. Xử lý mẫu, tạo cặn chiết và phân lập chủng <i>Streptomyces</i> sp. G666.....</i>	<i>46</i>
<i>3.3.2. Hằng số vật lý và dữ liệu phổ của các hợp chất phân lập từ chủng <i>Streptomyces</i> sp. G666.</i>	<i>48</i>

3.4. Phân lập các hợp chất từ chủng <i>Streptomyces</i> sp. G246	51
3.4.1. Xử lý mẫu, tạo cặn chiết từ chủng <i>Streptomyces</i> sp. G246.....	51
3.4.2. Hằng số vật lý và dữ kiện phổ của các hợp chất phân lập từ chủng <i>Streptomyces</i> sp. G246.....	53
3.5. Hoạt tính sinh học của các hợp chất phân lập được	55
CHƯƠNG 4 THẢO LUẬN VÀ KẾT QUẢ	56
4.1. Xác định cấu trúc hóa học của các hợp chất phân lập từ chủng	
<i>Actinoalloteichus cyanogriseus</i> G631	56
4.1.1. Hợp chất isocyanogramide (G631-1) (hợp chất mới)	56
4.1.2. Hợp chất cyanogramide (G631-2).....	62
4.1.3. Hợp chất marinacarboline F (G631-3).....	66
4.1.4. Hợp chất marinacarboline H (G631-4).....	69
4.1.5. Hợp chất caerulomycinonitril (G631-5).....	72
4.1.6. Hợp chất caerulomycinamide (G631-6)	74
4.1.7. Hợp chất 5'-deoxyuridine (G631-7).....	76
4.1.8. Hợp chất uracil (G631-8)	78
4.2. Xác định cấu trúc hóa học của các hợp chất phân lập từ chủng	
<i>Streptomyces</i> sp. G666	79
4.2.1. Hợp chất streptomine A (G666-1).....	79
4.2.2. Hợp chất streptomine B (G666-2).....	86
4.2.3. Hợp chất streptomine C (G666-3)	91
4.2.4. Hợp chất norharman (G666-4).....	97
4.2.5. Hợp chất 3-acetyl-4-hydroxycinnoline (G666-5)	98
4.2.6. Hợp chất xanthone (G666-6)	99
4.2.7. Hợp chất cyclo-(Pro-Leu) (G666-7)	99
4.2.8. Hợp chất cyclo-(Pro-Gly) (G666-8)	100
4.3. Xác định cấu trúc hóa học của các hợp chất phân lập từ chủng	
<i>Streptomyces</i> sp. G246	102
4.3.1. Hợp chất spirotryprostatin A (G246-1)	102
4.3.2. Hợp chất cyclo-(Pro-Met) (G246-2).....	107
4.3.3. Hợp chất phenol A acid (G246-3).....	108
4.3.4. Hợp chất 3,4-dihydroxy-6,7-dimethyl-quinoline-2-carboxylic (G246-4).....	109
4.3.5. Hợp chất cyclo-(Pro-Gly) (G246-5)	110
4.3.6. Hợp chất xanthone (G246-6)	111
4.3.7. Hợp chất guanosine (G246-7)	111
4.3.8. Hợp chất adenosine (G246-8).....	112
4.3.9. Hợp chất 2'-deoxyadenosine (G246-9)	113

4.4. Kết quả thử hoạt tính kháng vi sinh vật kiểm định của các hợp chất thứ cấp phân lập được	115
KẾT LUẬN	119
ĐÓNG GÓP MỚI CỦA LUẬN ÁN.....	120
KIẾN NGHỊ.....	121
DANH MỤC CÔNG TRÌNH CỦA TÁC GIẢ.....	122
TÀI LIỆU THAM KHẢO	123

DANH MỤC CÁC CHỮ VIẾT TẮT

Ký hiệu	Chú thích	Tiếng anh
^{13}C -NMR	Phổ cộng hưởng từ hạt nhân carbon 13	Carbon-13 Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy
^1H -NMR	Phổ cộng hưởng từ hạt nhân proton	Proton Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy
A549	Ung thư phổi ở người	Human lung carcinoma
ADN	Axit Deoxyribonucleic	Deoxyribonucleic Acid
ATTC	Trung tâm lưu giữ chủng Hoa Kỳ	American Type Culture Collection
br	broad	
CC	Sắc ký cột	Column Chromatography
COSY	Phổ tương tác 2 chiều đồng hạt nhân ^1H - ^1H	Correlation Spectroscopy
Cq	Carbon không liên kết với hydro	
d		doublet
dd		doublet of doublets
dt		doublet of triplets
DCM	CH_2Cl_2	Dicloromethan
CTPT	Công thức phân tử	
DEPT	Phổ DEPT	Distortionless Enhancement by Polarisation Transfer
DMSO	$(\text{CH}_3)_2\text{SO}$	Dimethylsulfoxide
EtOAc	$\text{CH}_3\text{COOC}_2\text{H}_5$	Ethyl acetate
ECD	Phổ CD tính toán	Electronic Circular Dichroism
ESI-MS	Phổ khối phun mù điện tử	Electrospray Ionization Mass Spectroscopy
Hela	Ung thư tử cung ở người	Human cervix carcinoma
Hep3B	Ung thư gan ở người	Human hepatocellular carcinoma
HMBC	Phổ tương tác đa liên kết hai chiều dị hạt nhân	Heteronuclear Multiple Bond Correlation
HR-ESI-MS	Phổ khối phân giải cao phun mù điện tử	High-resolution Electrospray Ionization Mass Spectroscopy
HSQC	Phổ tương tác hai chiều trực tiếp dị hạt nhân	Heteronuclear Single Quantum Correlation
IC ₅₀	Nồng độ ức chế 50% sự tăng trưởng của tế bào thử nghiệm	50% inhibitory concentration

J (Hz)	Hằng số tương tác tính bằng Hz	
KS	Kháng sinh	
MIC	Nồng độ ức chế tối thiểu	Minimum inhibitory concentration
m		multiplet
MeOH		methanol
MRSA	Tụ cầu khuẩn <i>Staphylococcus Aureus</i> kháng Methicillin	Methicillin-Resistant <i>Staphylococcus Aureus</i>
<i>n</i> -BuOH	<i>n</i> -C ₄ H ₉ OH	<i>n</i> -Butanol
<i>n</i> -Hexan	<i>n</i> -C ₆ H ₁₄	<i>n</i> -Hexane
NOESY	Phổ NOESY	Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy
OD	Mật độ quang	Optical density
q		quartet
quint		quintet
s		singlet
ppm	phần triệu	Part per million
RNA	Axit Ribonucleic	Ribonucleic Acid
RP	Sắc ký pha đảo	Reverse Phase
TLC	Sắc ký lớp mỏng	Thin Layer Chromatography
TMS	(CH ₃) ₄ Si	Tetramethyl silan
UIC	Trường đại học Illinois Chicago	University of Illinois at Chicago
UV	Tia cực tím	Ultraviolet
VK	Vi khuẩn	
VSV	Vi sinh vật	
VSVKĐ	Vi sinh vật kiểm định	
XK	Xạ khuẩn	
δ_H, δ_C	Độ chuyển dịch hóa học của proton, carbon	Proton and carbon chemical shift

Tên riêng của các hợp chất tự nhiên được viết theo nguyên bản tiếng Anh.

DANH MỤC CÁC HÌNH

Hình 1.1: Hình ảnh bào tử xạ khuẩn và khuẩn lạc của xạ khuẩn	3
Hình 1.2: Một số hợp chất kháng sinh phân lập từ xạ khuẩn chi <i>Streptomyces</i>	5
Hình 2.3: Hình ảnh khuẩn lạc của chủng <i>Actinoalloteichus cyanogriseus</i> G631	30
Hình 2.4: Hình ảnh khuẩn lạc của chủng xạ khuẩn <i>Streptomyces</i> sp. G666	30
Hình 2.5: Hình ảnh khuẩn lạc của chủng xạ khuẩn <i>Streptomyces</i> sp. G246	31
Hình 3.6: Sơ đồ nhân sinh khối dạng rắn 50 kg chủng xạ khuẩn <i>Actinoalloteichus cyanogriseus</i> G631	37
Hình 3.7: Sơ đồ nhân sinh khối dạng rắn 50 Kg chủng <i>Streptomyces</i> sp. G666.....	39
Hình 3.8: Sơ đồ nhân nuôi sinh khối dạng rắn chủng <i>Streptomyces</i> sp. G246	41
Hình 3.9: Sơ đồ tạo cặn chiết chủng <i>Actinoalloteichus cyanogriseus</i> G631	42
Hình 3.10: Sơ đồ phân lập cặn chiết EtOAc chủng xạ khuẩn <i>Actinoalloteichus cyanogriseus</i> G631	43
Hình 3.11: Sơ đồ tạo cặn chiết chủng <i>Streptomyces</i> sp. G666.....	46
Hình 3.12: Sơ đồ phân lập cặn chiết EG666 chủng <i>Streptomyces</i> sp. G666	47
Hình 3.13: Sơ đồ phân lập cặn chiết MG666 chủng <i>Streptomyces</i> sp. G666	48
Hình 3.14: Sơ đồ tạo cặn chiết sinh khối lượng lớn của chủng xạ khuẩn <i>Streptomyces</i> sp. G246	51
Hình 3.15: Sơ đồ phân lập từ cặn chiết chủng <i>Streptomyces</i> sp. G246.....	52
Hình 4.16: Phổ HR-ESI-MS của hợp chất G631-1	56
Hình 4.17: Phổ ¹ H-NMR của hợp chất G631-1	57
Hình 4.18: Phổ DEPT của hợp chất G631-1	58
Hình 4.19: Phổ HSQC của hợp chất G631-1	59
Hình 4.20: Một số tương tác phổ COSY, HMBC, NOESY của hợp chất G631-1 ..	60
Hình 4.21: Phổ HMBC của hợp chất G631-1	60
Hình 4.22: Phổ CD thực nghiệm (trái) của hợp chất G631-1 và phổ CD tham khảo của hợp chất cyanogramide [60]	61
Hình 4.23: Phổ ¹ H-NMR của hợp chất G631-2	63
Hình 4.24: Phổ DEPT của hợp chất G631-2	63
Hình 4.25: Phổ COSY của hợp chất G631-2	64
Hình 4.26: Phổ HMBC của hợp chất G631-2	65
Hình 4.27: Một số tương tác COSY, HMBC của hợp chất G631-2	65
Hình 4.28: Phổ ¹ H-NMR của hợp chất G631-3	67
Hình 4.29: Phổ ¹³ C-NMR của hợp chất G631-3	69
Hình 4.30: Phổ ¹ H-NMR của hợp chất G631-4	70
Hình 4.31: Phổ ¹³ C-NMR của hợp chất G631-4	71
Hình 4.32: Phổ COSY của hợp chất G631-5	72
Hình 4.33: Một số tương tác COSY, HMBC của hợp chất G631-5	73
Hình 4.34: Phổ HMBC của hợp chất G631-5	73
Hình 4.35: Phổ COSY của hợp chất G631-6	75
Hình 4.36: Phổ HSQC của hợp chất G631-6	76
Hình 4.37: Một số tương tác COSY, HMBC của hợp chất G631-6	76
Hình 4.38: Một số tương tác HMBC của hợp chất G631-7	77
Hình 4.39: Phổ HR-ESI-MS của hợp chất G666-1	79
Hình 4.40: ¹ H-NMR của hợp chất G666-1	80
Hình 4.41: Phổ DEPT của hợp chất G666-1	81
Hình 4.42: Phổ HSQC của hợp chất G666-1	83
Hình 4.43: Phổ HMBC của hợp chất G666-1	83

Hình 4.44: Phổ COSY của hợp chất G666-1	84
Hình 4.45: Một số tương tác chính phổ COSY, HMBC của hợp chất G666-1	84
Hình 4.46: Phổ NOESY của hợp chất G666-1	85
Hình 4.47: Tương tác NOESY của hợp chất G666-1	85
Hình 4.48: Phổ HR-ESI-MS của hợp chất G666-2	86
Hình 4.49: Phổ ¹ H-NMR của hợp chất G666-2	87
Hình 4.50: Phổ DEPT của hợp chất G666-2	88
Hình 4.51: Phổ HSQC của hợp chất G666-2	88
Hình 4.52: Phổ HMBC của hợp chất G666-2	89
Hình 4.53: Phổ COSY của hợp chất G666-2	89
Hình 4.54: Phổ NOESY của hợp chất G666-2	90
Hình 4.55: Một số tương tác COSY, HMBC, NOESY của hợp chất G666-2	90
Hình 4.56: Phổ HR-ESI- MS của hợp chất G666-3	92
Hình 4.57: Phổ ¹ H-NMR của hợp chất G666-3	93
Hình 4.58: Phổ HSQC của hợp chất G666-3	94
Hình 4.59: Phổ HMBC của hợp chất G666-3	94
Hình 4.60: Phổ COSY của hợp chất G666-3	97
Hình 4.61: Phổ NOESY của hợp chất G666-3	95
Hình 4.62: Một số tương tác COSY, HMBC, NOESY của hợp chất G666-3	97
Hình 4.63: Phổ ¹ H-NMR của hợp chất G246-1	106
Hình 4.64: Phổ DEPT của hợp chất G246-1	106
Hình 4.65: Phổ HMBC của hợp chất G246-1	107
Hình 4.66: Phổ COSY của hợp chất G246-1	109
Hình 4.67: Một số tương tác phổ COSY, HMBC của hợp chất G246-1	112
Hình 4.68: Một số tương tác HMBC của hợp chất G246-3	109
Hình 4.69: Một số tương tác phổ HMBC của hợp chất G246-7	112

DANH MỤC CÁC BẢNG

Bảng 2.1. Giá trị MIC của cặn chiết ethyl acetate của 3 chủng xạ khuẩn.....	29
Bảng 2.2: Thành phần môi trường nuôi cấy	32
Bảng 2.3: Điều kiện nuôi cấy nhân sinh khối lượng lớn 3 chủng xạ khuẩn <i>Actinoalloteichus cyanogriseus</i> G631, <i>Streptomyces</i> sp. G666, <i>Streptomyces</i> sp. G246	32
Bảng 4.4 : Dữ liệu phổ ^1H và ^{13}C -NMR của hợp chất G631-1	61
Bảng 4.5: Dữ liệu phổ ^1H và ^{13}C -NMR của hợp chất G631-2 và chất tham khảo...66	66
Bảng 4.6: Dữ liệu phổ ^1H và ^{13}C -NMR của hợp chất G631-3	68
Bảng 4.7: Dữ liệu phổ ^1H và ^{13}C -NMR của hợp chất G631-4	71
Bảng 4.8: Dữ liệu phổ ^1H và ^{13}C -NMR của hợp chất G631-5	74
Bảng 4.9: Dữ liệu phổ ^1H và ^{13}C -NMR của hợp chất G631-6	75
Bảng 4.10: Dữ liệu phổ ^1H và ^{13}C -NMR của hợp chất G631-7	77
Bảng 4.11: Dữ liệu phổ ^1H và ^{13}C -NMR của hợp chất G631-8	78
Bảng 4.12: Số liệu phổ NMR, DEPT của hợp chất G666-1	82
Bảng 4.13: Dữ liệu phổ ^1H và ^{13}C -NMR của hợp chất G666-2	91
Bảng 4.14: Dữ liệu phổ ^1H và ^{13}C -NMR của hợp chất G666-3	96
Bảng 4.15: Dữ liệu phổ ^1H và ^{13}C -NMR của hợp chất G666-4	97
Bảng 4.16 : Dữ liệu phổ ^1H và ^{13}C -NMR của hợp chất G666-5	98
Bảng 4.17: Dữ liệu phổ ^1H và ^{13}C -NMR của hợp chất G666-6	99
Bảng 4.18: Dữ liệu NMR của hợp chất G666-7 và hợp chất tham khảo	100
Bảng 4.19: Dữ liệu phổ ^1H và ^{13}C -NMR của hợp chất G666-8	101
Bảng 4.20: Dữ liệu phổ ^1H và ^{13}C -NMR của hợp chất G246-1	105
Bảng 4.21: Dữ liệu phổ NMR của G246-2 và hợp chất tham khảo.....	108
Bảng 4.22: Dữ liệu phổ NMR của G246-3	109
Bảng 4.23: Dữ liệu phổ NMR của G246-4 và hợp chất tham khảo.....	110
Bảng 4.24: Dữ liệu phổ NMR của G246-7 và hợp chất tham khảo.....	112
Bảng 4.25: Số liệu phổ NMR của hợp chất G246-8 và hợp chất tham khảo	113
Bảng 4.26: Dữ liệu NMR của hợp chất G246-9 và hợp chất tham khảo	114
Bảng 4.27: Kết quả thử hoạt tính kháng vi sinh vật kiểm định của của các hợp chất thứ cấp phân lập được từ chủng <i>Actinoalloteichus cyanogriseus</i> G631	115
Bảng 4.28: Kết quả thử hoạt tính kháng vi sinh vật kiểm định của của các hợp chất thứ cấp phân lập được từ chủng <i>Streptomyces</i> sp. G666	116
Bảng 4.29: Kết quả thử hoạt tính kháng vi sinh vật kiểm định của của các hợp chất thứ cấp phân lập được từ chủng <i>Streptomyces</i> sp. G246	117

ĐẶT VẤN ĐỀ

Đại dương chiếm 70% diện tích bề mặt trái đất, là nơi có sự đa dạng về sinh học lớn nhất. Đây là nơi sinh sống của 34 trên 36 ngành động thực vật trên trái đất với hơn 300.000 loài sinh vật đã được biết đến. Môi trường biển là một nguồn phong phú cung cấp các hợp chất thiên nhiên, một kho dược liệu khổng lồ đang chờ được khai thác và khám phá. Đặc thù môi trường sống khắc nghiệt dưới biển sâu chính là điều kiện để hình thành các hợp chất hữu cơ với đặc điểm cấu trúc hóa học độc đáo và hoạt tính sinh học quý giá.

Việt Nam là quốc gia có đường bờ biển dài hơn 3260 km chạy dọc từ Bắc xuống Nam với thềm lục địa rộng, nhiều đảo gần bờ và đặc biệt có hai quần đảo Hoàng Sa – Trường Sa ở giữa biển Đông. Điều kiện địa lý thuận lợi đã cho nước ta tiềm năng to lớn về nguồn tài nguyên biển phong phú, tạo nên hệ sinh vật biển đa dạng, dồi dào cả về trữ lượng và thành phần chủng loài. Việt Nam có định hướng phát triển kinh tế biển, khai thác tài nguyên thiên nhiên và nghiên cứu các sản phẩm tự nhiên từ biển. Tuy nhiên nghiên cứu các hợp chất thứ cấp từ nguồn vi sinh vật biển của Việt Nam mới chỉ được bắt đầu, có rất ít các nghiên cứu đã công bố, mặc dù nguồn đa dạng vi sinh vật biển của nước ta là rất lớn.

Việc khảo sát, tìm kiếm các hợp chất thứ cấp từ vi sinh vật biển nói chung và các loài xạ khuẩn biển nói riêng trên thế giới đang là vấn đề được quan tâm hiện nay. Các nghiên cứu về thành phần hóa học và hoạt tính sinh học đã chỉ ra hợp chất thứ cấp từ xạ khuẩn biển có cấu trúc hóa học đa dạng và có hoạt tính sinh học lý thú. Nhiều hợp chất thứ cấp từ xạ khuẩn biển đã được thử nghiệm nhằm ứng dụng trong y học, công nghiệp, nông nghiệp.

Trong khuôn khổ của đề tài trọng điểm “Nghiên cứu phát hiện các hợp chất kháng lao và kháng vi sinh vật kiểm định từ nguồn vi sinh vật đáy biển ở Khu vực Nam Trung Bộ (vùng biển Khánh Hòa-Bình Thuận)”, cặn chiết ethyl acetate của các chủng xạ khuẩn đã được sàng lọc hoạt tính kháng VSVKD, trong đó ba chủng xạ khuẩn biển G631, G666, G246 thể hiện hoạt tính kháng vi sinh vật tốt đối với 3-5 chủng vi sinh vật kiểm định với giá trị MIC từ 2-256 $\mu\text{g/ml}$. Xuất phát từ những lý do trên, chúng tôi đã thực hiện luận án với tên đề tài ***“Nghiên cứu các hợp chất thứ cấp có hoạt tính kháng vi sinh vật kiểm định phân lập từ ba chủng xạ khuẩn thuộc chi Actinolloteichus và Streptomyces ở vùng biển trung bộ, Việt Nam”***, với mục tiêu

“Nghiên cứu, phát hiện các hợp chất thứ cấp có hoạt tính kháng vi sinh vật kiểm định từ ba chủng xạ khuẩn biển (G631, G666, G246) được phân lập từ vùng biển của Việt Nam”.

Nội dung của luận án bao gồm:

1. Lên men nhân sinh khối lượng lớn 03 chủng xạ khuẩn biển có hoạt tính kháng VSVKD tốt là G631, G666 và G246.
2. Phân lập và xác định cấu trúc hóa học của các hợp chất thứ cấp từ 03 chủng xạ khuẩn biển đã nhân nuôi sinh khối lượng lớn.
3. Đánh giá hoạt tính kháng VSVKD của các hợp chất thứ cấp phân lập được.

CHƯƠNG 1. TỔNG QUAN

1.1. Giới thiệu chung về xạ khuẩn (Actinobacteria)

Xạ khuẩn có tên khoa học là *Actinomycetes*, thuộc bộ Actinomycetales, ngành Actinobacteria, tên xạ khuẩn – *Actinomycetes* – bắt nguồn từ tiếng Hy Lạp "actys" (tia) và "mykes" (nấm), ban đầu xạ khuẩn được coi là nấm nhỏ vì chúng sinh trưởng giống với nấm. Ngành xạ khuẩn bao gồm các vi khuẩn Gram dương dạng sợi và có tỉ lệ guanine-cytosine (G + C) cao trong ADN của chúng, tỉ lệ này dao động trong khoảng 51% ở một số trực khuẩn *Corynebacterium* đến hơn 70% ở chi *Streptomyces* và *Frankia*. Có một ngoại lệ là loài xạ khuẩn gây bệnh *Tropheryma Whipplei* có G + C nhỏ hơn 50% [1].

Phần lớn các chủng xạ khuẩn là sinh vật hoại sinh (saprophytic) nhưng cũng có một số chủng có thể gây bệnh cho thực vật hoặc động vật (pathogenic). Xạ khuẩn sinh trưởng hiếu khí và chúng đã thích nghi với nhiều môi trường khác nhau trong tự nhiên như đất, nước (nước ngọt hoặc nước mặn), không khí. Tuy nhiên, loại vi sinh vật này được tìm thấy chủ yếu trong đất chứa nhiều hợp chất hữu cơ có tính kiềm. Xạ khuẩn đã và đang được quan tâm nghiên cứu vì chúng đóng vai trò quan trọng trong chu trình tuần hoàn vật chất của tự nhiên bởi khả năng phân hủy và sử dụng các chất hữu cơ khó phân hủy. Nhìn chung, nhiệt độ ôn hòa 25-30°C và pH trung tính là các điều kiện tối ưu cho xạ khuẩn phát triển. Mặc dù vậy, nhiều chủng xạ khuẩn đã được phân lập ở các môi trường khắc nghiệt như *Arthrobacter ardleyensis* ưa lạnh được phân lập từ trầm tích hồ ở Nam cực có thể sống ở nhiệt độ 0°C và *Nocardiosis alkaliphila* được phân lập từ đất sa mạc ở Ai Cập có thể sống ở pH 9,5-10 [2-4].



Hình 1.1: Hình ảnh bào tử xạ khuẩn và khuẩn lạc của xạ khuẩn

Một trong những đặc điểm đáng chú ý của xạ khuẩn là chúng không bền vững về di truyền và thường xảy ra sự đột biến trong phân tử DNA. Điều này tạo ra tính đa dạng về hình thái, tính kháng thuốc do sự xuất hiện các dị vòng. Hơn nữa, sự tự nhân lên của các đoạn DNA còn làm phức tạp thêm việc nghiên cứu di truyền ở xạ khuẩn

[5]. Các nghiên cứu hiện nay hầu hết đều sử dụng hệ thống phân loại xạ khuẩn theo khóa Bergey, đây là một phương pháp có độ tin cậy cao dựa trên các cơ sở dữ liệu về các cấu trúc đơn gene của rRNA [6]. Xạ khuẩn sinh trưởng có thể tạo thành nhiều kiểu hình đa dạng, như: hình cầu, hình que của xạ khuẩn thuộc phân bộ Micrococccineae; hình dạng sợi nấm phân mảnh của phân bộ Corynebacterineae; hoặc hình dạng sợi nấm phân nhánh và biệt hóa cao của chi *Streptomyces*. Sự sinh ra bào tử diễn ra ở đa số xạ khuẩn, chúng rất khác nhau về hình dạng và kích thước. Đây là một trong những đặc điểm để phân loại xạ khuẩn. Theo thống kê năm 2012 cho thấy ngành xạ khuẩn là một ngành lớn trong giới vi khuẩn gồm 6 lớp, 23 bộ, 53 họ và 222 chi và khoảng 3000 loài [7].

Xạ khuẩn có khả năng sản sinh nhiều loại enzyme như: protease, amylase, cellulase, glucoizomerase,... ngoài ra chúng có thể tổng hợp các hợp chất thứ cấp có hoạt tính kháng khuẩn, kháng nấm, ức chế thần kinh, chống ung thư, kháng viêm, chống sốt rét, chống nhiễm trùng [8]. Trong các hợp chất tự nhiên do vi sinh vật sinh ra đã được công bố sử dụng trên toàn thế giới thì 45% được sinh ra từ xạ khuẩn, 38% từ nấm và 17% từ vi khuẩn đơn bào [9].

Giai đoạn những năm 1980 trở về trước, các nhà nghiên cứu chủ yếu tập trung vào khám phá các chủng xạ khuẩn trên đất liền. Từ vài thập kỷ trở lại đây các nhà khoa học đã phát hiện ra các chủng xạ khuẩn biển có khả năng tổng hợp các hợp chất thứ cấp có hoạt tính kháng khuẩn, kháng nấm, ức chế các tế bào ung thư, kháng viêm... có ý nghĩa ứng dụng trong y học. Bên cạnh đó, môi trường sống của xạ khuẩn biển rất đa dạng, có thể phân lập chúng từ các mẫu trầm tích, nước biển và các sinh vật biển. Đó là lý do xạ khuẩn biển đã và đang thu hút được nhiều sự quan tâm của các nhà khoa học trên toàn thế giới trong lĩnh vực tìm kiếm và phát triển thuốc mới [10].

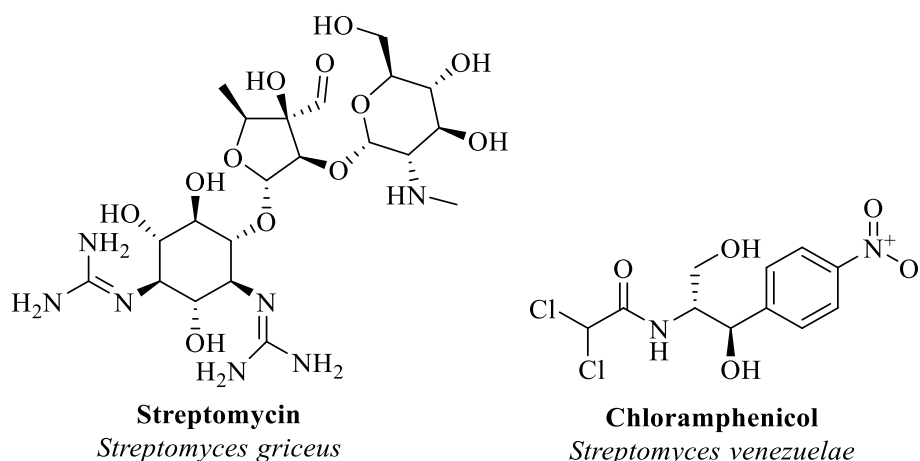
1.2. Các nghiên cứu về xạ khuẩn biển chi *Streptomyces*

1.2.1. Giới thiệu chung về chi *Streptomyces*

Chi *Streptomyces* thuộc họ Streptomycetaceae, bộ Streptomycetales, lớp Actinomycetia. Chi *Streptomyces* là giống xạ khuẩn được Wakman và Henrici đặt tên năm 1943, đây là chi có số lượng loài được định danh lớn nhất hiện nay trong ngành xạ khuẩn với khoảng 500 loài (số liệu được thống kê trên NCBI), tất cả đều có tỷ lệ G + C cao (69–73%) trong DNA.

Chi *Streptomyces* là nhóm vi khuẩn Gram dương được tìm thấy trong nhiều

loại môi trường khác nhau và hình dạng của nó giống như nấm sợi. Sự phân hóa hình thái của *Streptomyces* liên quan đến sự hình thành một lớp sợi nấm có thể biệt hóa thành chuỗi bào tử. Các chủng xạ khuẩn loại này được tìm thấy đặc biệt nhiều trong đất và thảm thực vật mục nát, nơi chúng có thể phân hủy hoại sinh rất nhiều phức chất hữu cơ bằng các enzyme ngoại bào. Hai phần ba kháng sinh đã biết được phân lập từ xạ khuẩn và chủ yếu từ các chủng *Streptomyces*. Nhiều hợp chất kháng sinh từ xạ khuẩn đã được công bố như aminoglycoside, anthracyclin, glycopeptide, β -lactam, macrolide, nucleoside, peptide, polyene, polyeste, polyketide, actinomycin, tetracycline.... Các hợp chất này đã được sử dụng thành công làm thuốc kháng sinh, thuốc diệt cỏ, thuốc chống ung thư, các chất điều hòa miễn dịch và các chất chống ký sinh trùng (**Hình 1.2**) [9, 11, 12].



Hình 1.2: Một số hợp chất kháng sinh phân lập từ xạ khuẩn chi *Streptomyces*

Năm 2018, Anthony R. Carroll thực hiện một đánh giá thường niên về vi sinh vật biển cho thấy có 240 hợp chất tự nhiên và hợp chất lần đầu phân lập từ vi khuẩn biển đã được công bố trong năm này và khoảng 167 hợp chất thứ cấp được công bố trong các báo cáo có nguồn gốc từ các chủng xạ khuẩn thuộc chi *Streptomyces* (chiếm trên 69% tổng số lượng vi khuẩn được phân lập từ biển). Các hợp chất tự nhiên có cấu trúc đa dạng bao gồm: các peptide (cyclic-, linear-, depsi- and lipo-peptide); các hợp chất polyketide (loại I, loại II, loại III) hoặc các hợp chất có nguồn gốc từ sinh tổng hợp hỗn hợp bởi các enzyme polyketide synthases (PKS) và non-ribosomal peptide synthetases (NRPs); các alkaloid; các terpenoid và acid béo [13].

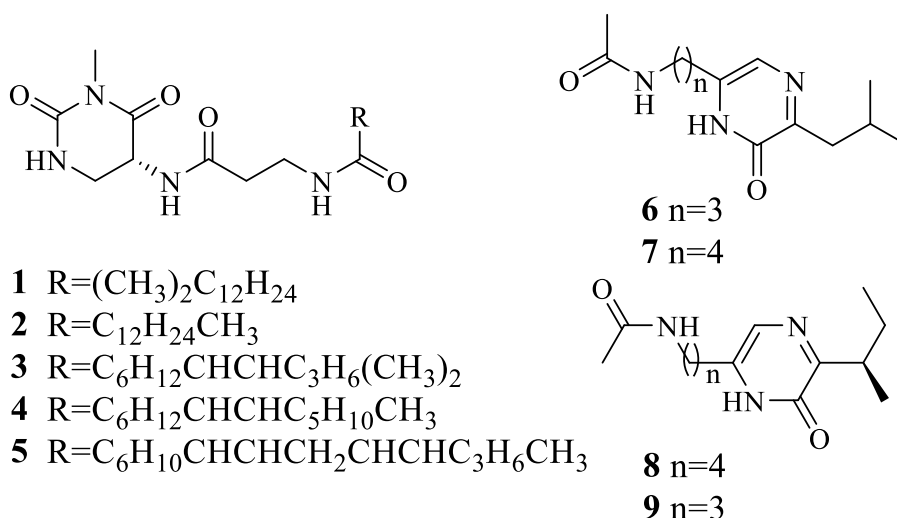
1.2.2. Các hợp chất thứ cấp từ xạ khuẩn biển chi *Streptomyces*

Do sự đa dạng về số lượng các chủng và cấu trúc hoá học của các hợp chất thứ

cấp từ xạ khuẩn biển thuộc chi *Streptomyces*, việc phân loại thường được tiến hành theo các lớp chất. Các lớp chất chủ yếu sản sinh bởi xạ khuẩn biển bao gồm polyketide, alkaloid, terpenoid, peptide và các hợp chất sinh tổng hợp hỗn hợp, trong đó có nhiều hợp chất mới, có cấu trúc đa dạng và có hoạt tính sinh học có giá trị đã được phát hiện.

1.2.2.1. Các hợp chất polyketide

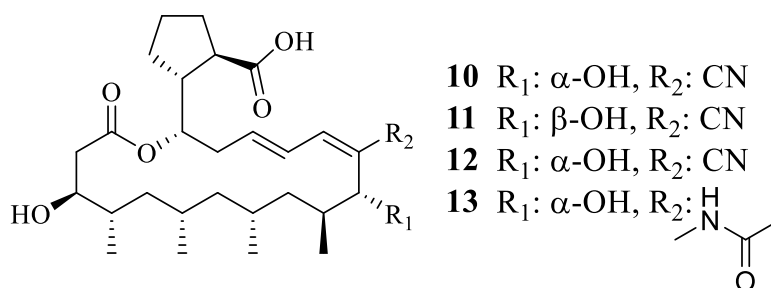
Theo IUPAC qui định trong “Sách vàng” – tổng hợp thuật ngữ hóa học, các hợp chất polyketide (còn được gọi là acetogenin hoặc ketide) là các hợp chất nguồn gốc từ tự nhiên có chứa xen kẽ các nhóm carbonyl và methylene ('β-polyketones'). Các polyketide được chia thành 3 dạng: I, II và III, một số hợp chất loại này đã được sử dụng trong điều trị lâm sàng như: chartreusin, aurantimycin, kirromycin, concanamycin, polyketomycin và lysolipin [14].



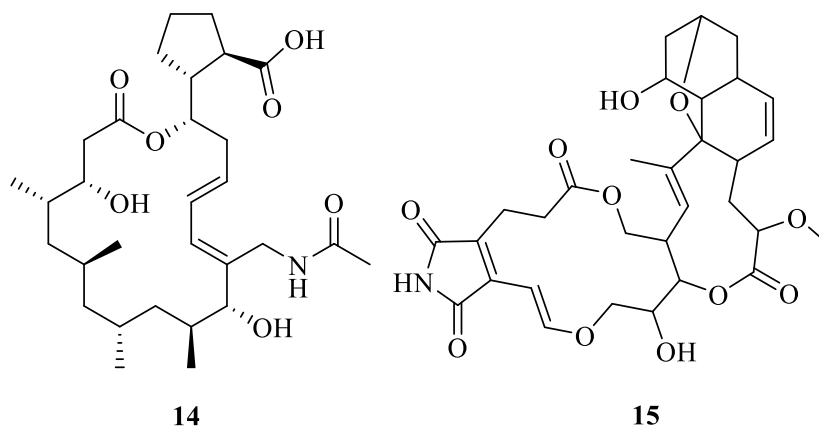
Năm 2018, Zhang và các cộng sự đã phân lập được 5 hợp chất biamamide A-E (**1-5**), chúng là dẫn xuất pyrimidinedione loại 5,6-dihydrouracil từ một chủng *Streptomyces* sp. có nguồn gốc từ Hải tiêu *Ecteinascidia turbinata* được thu thập ở Florida - Hoa Kỳ, các hợp chất này có hoạt tính ức chế TGF-β của tế bào biểu mô phổi chồn (MLEC) với các giá trị IC₅₀ lần lượt là 51,5; 18,7; 51,5; 101,7 và 83,2 μM. Các hợp chất loại pyrimidine này có vai trò quan trọng đối với tế bào sống, chúng thường ở dạng bazơ nucleoside của acid nucleic, ví dụ như cytosine, thymine, uracil, adenine và guanine [15].

Cùng năm 2018, bốn hợp chất streptopyrazinone A-D (**6-9**) đã được phân lập từ chủng *Streptomyces* sp. ZZ446 có nguồn gốc từ bùn duyên hải Trung Quốc. Đây là các hợp chất có khung 2(1H)-pyrazinone, một cấu trúc hiếm gặp trong tự nhiên,

chúng có hoạt tính kháng nấm *Candida albicans* với giá trị MIC lần lượt là 35; 38; 45; 45 $\mu\text{g/ml}$ [16].



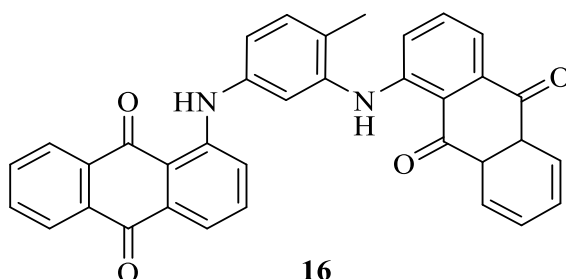
Tiếp đó, từ chủng *Streptomyces rochei* SCSIO ZJ89 có nguồn gốc từ trầm tích rừng ngập mặn Trung Quốc, bốn hợp chất borrelidin F-I (**10-13**) đã được Sun và cộng sự phân lập, đây là các hợp chất polyketide macrolactone vòng 16C. Hợp chất **12** có hoạt tính gây độc tế bào đối với 7 dòng tế bào ung thư A549, CNE2, HeLa, HepG2, MCF-7, L02, Huvec-12 với giá trị IC₅₀ lần lượt là 1,22; 1,27; 1,28; 2,05; 0,12; 7,26; 6,13 μM trong khi các hợp chất còn lại đều cho giá trị IC₅₀ > 10 μM . Hợp chất **12** có tác dụng chọn lọc giữa tế bào ung thư và tế bào khỏe mạnh, ức chế hiệu quả sự di căn của tế bào ung thư A549, HeLa ở nồng độ $\frac{1}{2}$ IC₅₀, điều này cho thấy hợp chất này có tiềm năng trở thành thuốc chống ung thư [17].



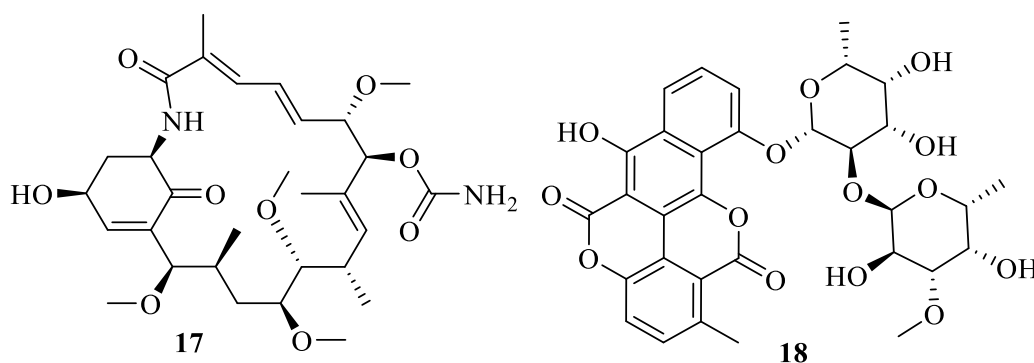
Từ chủng *Streptomyces mutabilis* MII có trong trầm tích Biển Đỏ tại bờ biển Hurghada, hợp chất *N*-acetylborrelidin B (**14**) được Hamed và cộng sự phân lập và xác định cấu trúc. Hợp chất này là một kháng sinh macrolide với vòng 18-macrolactone. Hợp chất **14** thể hiện hoạt tính kháng sinh mạnh với *Staphylococcus warneri* DSMZ 20036 (18mm), đối với các chủng *Micrococcus luteus* DSMZ 1605, *B. subtilis* DSMZ 704, *P. agarici* DSMZ 11810, *M. luteus* DSMZ 1605 cũng thể hiện hoạt tính từ thấp đến trung bình (8-11mm), hợp chất này có tác dụng chọn lọc lên vi khuẩn [18].

Năm 2018, Zhang và cộng sự đã phân lập được một hợp chất streptoseomycin

(15) từ chủng *Streptomyces seoulensis*, hợp chất này là một macrodilactone hiếm gồm hệ 5 vòng 5/14/10/6/6 và một cầu ete. Hợp chất **15** có hoạt tính kháng sinh tốt và chọn lọc trên các chủng vi khuẩn *Helicobacter pylori*, *Lactobacillus acidophilus*, *Bifidobacterium bifidum*, *Eubacterium brachy*, *Propionibacterium acnes* với các giá trị MIC lần lượt là 2; 4; 4; 8; 8 $\mu\text{g/mL}$, hợp chất **15** có hoạt tính mạnh đối với vi khuẩn hiếu khí [19].



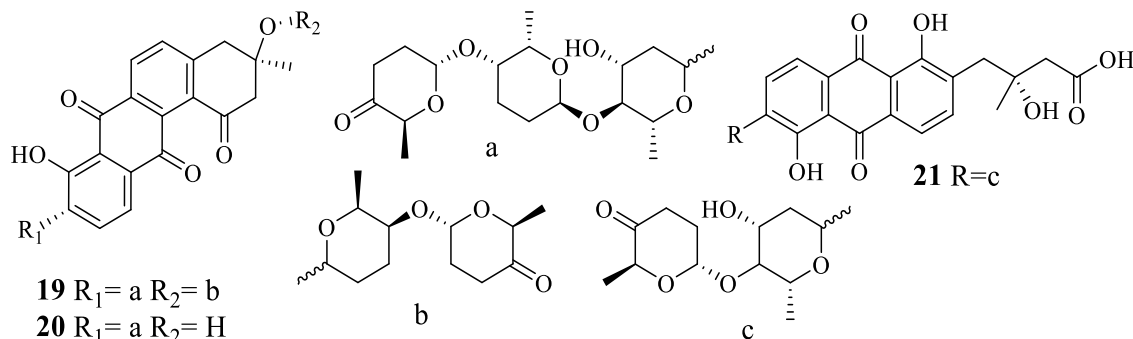
Năm 2006, Socha và các cộng sự đã phân lập được hợp chất Bisanthraquinone (**16**) được phân lập từ chủng *Streptomyces* sp. DQ470014 có hoạt tính kháng sinh được đánh giá đối với các chủng *Enterococcus faecium* (VRE), *Staphylococcus aureus* (MSSA, MRSA, TRSA) với giá trị MIC lần lượt là 0,11; 0,23; 0,90 μM [20]



Tiếp đó, Buedenbender và cộng sự đã phân lập được hợp chất herbimycin G (**17**) từ chủng *Streptomyces* sp. USC16018. Hợp chất **17** là một dẫn xuất macrolactam dạng geldanamycin với một đơn vị benzoquinone trong vòng lactam, được phân lập từ chủng *Streptomyces* sp. USC-16018. Hợp chất **17** không gây độc lên tế bào thường và ức chế yếu sự phát triển của ký sinh trùng sốt rét ở mức 77% đối với chủng 3D7 ở 40 μM [21].

Năm 1953, Leach và cộng sự đã phân lập được hợp chất chartreusin (**18**) là một poliketide glycoside dạng anthracycline được phân lập từ chủng *Streptomyces chartreusis* bao gồm fucose, digitalose và một aglycone bislactone hiếm gặp được gọi là chartarin. Hợp chất **18** có hoạt tính kháng khuẩn trên chủng *Bacillus subtilis*

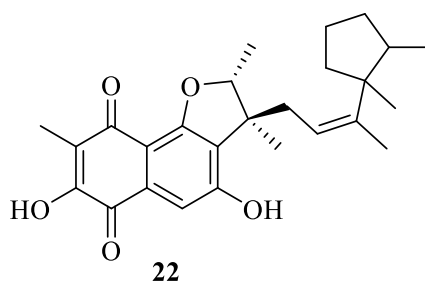
(IC₅₀ 1,25 µg/mL), kí sinh trùng *Mycobacterium tuberculosis* (IC₅₀ 1,7 µg/mL). Ngoài ra hợp chất **18** còn có hoạt tính kháng khối u rất mạnh trong thử nghiệm *in vitro* đối với tế bào P388, L1210 và tế bào u ác tính B16, nhưng dược động học của hợp chất này không thuận lợi nên không thể sử dụng làm thuốc, thay vào đó các nhà nghiên cứu chuyển hướng sang các dẫn xuất của Chartreusin để phát triển các loại thuốc chống ung thư [22, 23].



Ba hợp chất grincamycin I-K (**19-21**) được Lai và cộng sự phân lập từ chủng xạ khuẩn biển *Streptomyces lusitanus* SCSIO LR32. Các hợp chất **19-21** được thử hoạt tính gây độc tế bào đối với 5 dòng tế bào bao gồm ung thư hắc tố ở người MDA-MB-435, ung thư vú có khả năng di căn MDA-MB-231, ung thư phổi tế bào lớn NCI-H460, ung thư đại trực tràng HCT116, ung thư gan HepG2 và tế bào biểu mô vú bình thường, trong đó hợp chất **21** không có hoạt tính, hợp chất **19** thể hiện hoạt tính yếu với IC₅₀>10 µM, hợp chất **20** cho kết quả gây độc tế bào mạnh trong khoảng từ 2-5 µM, tuy nhiên nó cũng gây độc lên những tế bào bình thường [24].

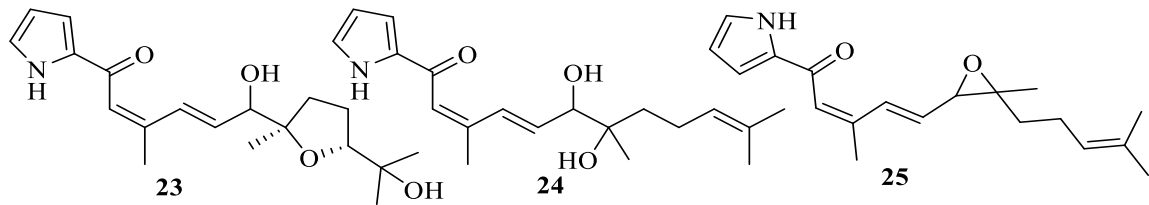
1.2.2.2. Các hợp chất terpenoid

Theo thống kê của Jeffrey Rudolf, đến năm 2018, có khoảng 1062 hợp chất terpenoid có nguồn gốc từ vi khuẩn đã được phân lập và công bố trên các bài báo, điều đó cho thấy các hợp chất terpenoid được biết đến khá ít trong nghiên cứu về vi khuẩn mặc dù chúng đã được biết đến từ cuối thế kỉ XIX [25, 26].

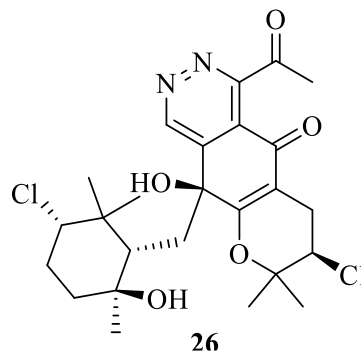


Năm 2000, hợp chất neomarinone (**22**) được Hardt và cộng sự phân lập từ

chủng *Streptomyces* sp. TMKS8. Hợp chất **22** có nguồn gốc sinh tổng hợp liên quan đến tổng hợp terpene và polyketide, chuỗi sesquiterpene liên kết với khung naphthoquinone ở phía không-quinone. Hợp chất **22** có hoạt tính kháng khuẩn đối với các chủng vi khuẩn *Staphylococcus aureus* (MRSA), *Enterococcus faecium* (VREF) với giá trị MIC lần lượt 1,95 $\mu\text{g/ml}$; 3,9 $\mu\text{g/ml}$, ngoài ra hợp chất **23** còn có hoạt tính chống ung thư biểu mô ruột kết ở người (HCT-116) với giá trị IC_{50} 2,4 $\mu\text{g/ml}$ [27].



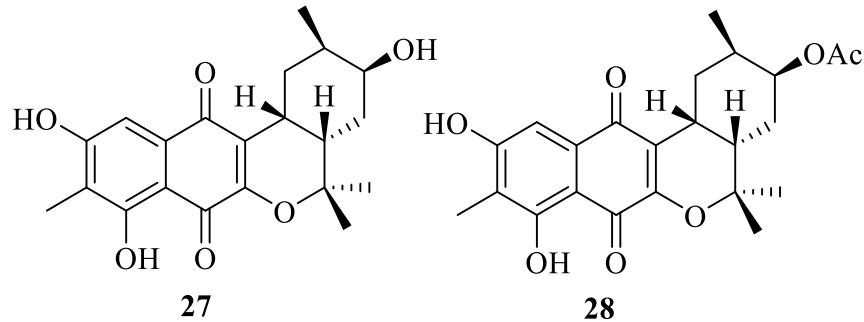
Năm 2005, khi nghiên cứu về chủng *Streptomyces* sp. NPS008187 có nguồn gốc từ trầm tích biển Alaska, Macherla và cộng sự đã phân lập được ba hợp chất pyrrolsesquiterpene đó là Glyciapyrrole A-C (**23-25**). Hợp chất **25** có hoạt tính ức chế ung thư biểu mô tuyến đại trực tràng HT-29 và sự phát triển tế bào khối u melanoma B16-F10 với giá trị IC_{50} là 180 μM [28].



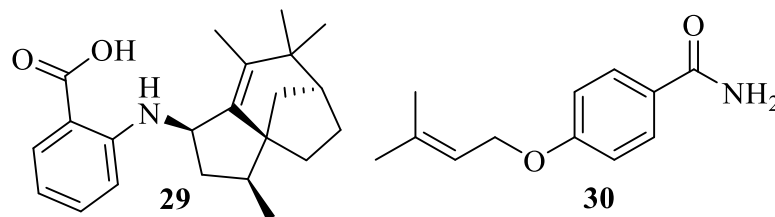
Năm 2006, Cho và cộng sự đã phân lập được hợp chất azamerone (**26**) từ chủng xạ khuẩn biển *Streptomyces* sp. CNQ766. Hợp chất **26** là một phthalazinone meroterpene có cấu trúc bao gồm lõi chloropyranophthalazinone liên kết với chuỗi bên 3-chloro-6-hydroxy-2,2,6-trimethylcyclohexylmethyl, azamerone là đại diện duy nhất cho đến nay cho thấy hợp chất nguồn gốc tự nhiên có chứa khung phthalazinone trong số các hợp chất dạng napyradiomycin. Hợp chất **26** có hoạt tính gây độc tế bào *in vitro* yếu đối với tế bào T và đại thực bào của chuột với giá trị IC_{50} là 40 μM [29].

Năm 2018, Park và cộng sự đã phân lập được hai hợp chất naphterpin D-E (**27-28**) từ chủng *Streptomyces* sp. CNQ-509 có nguồn gốc từ trầm tích biển ngoài khơi La Jolla, California, Hoa Kỳ. Hai hợp chất **27-28** là hai meroterpenoid dạng

naphterpin có cấu trúc gồm naphthoquinone và gốc geranyl. Qua khảo sát khả năng bắt gốc tự do ABTS của hai hợp chất **27-28** với Trolox là chất đối chứng dương cho thấy, lượng gốc tự do ABTS có giảm ở 734 nm, có thể kết luận hai hợp chất trên có hoạt tính chống oxy hóa [30].



Cùng năm 2018, Kim và cộng sự đã phân lập được hợp chất antartin (**29**) từ chủng xạ khuẩn *Streptomyces* sp. SCO736 có nguồn gốc từ trầm tích ngoài khơi Nam Cực. Hợp chất **29** là một sesquiterpene kiểu zizaane với cấu trúc ba vòng liên kết với một nhóm phenyl, có hoạt tính gây độc tế bào ở mức trung bình đối với một số dòng tế bào ung thư biểu mô phổi không tế bào nhỏ (NSCLC), tế bào u não, ngoài ra hợp chất **29** có thể ảnh hưởng đến chu kỳ tế bào thông qua việc điều hòa các protein kiểm soát chu kỳ tế bào [31].



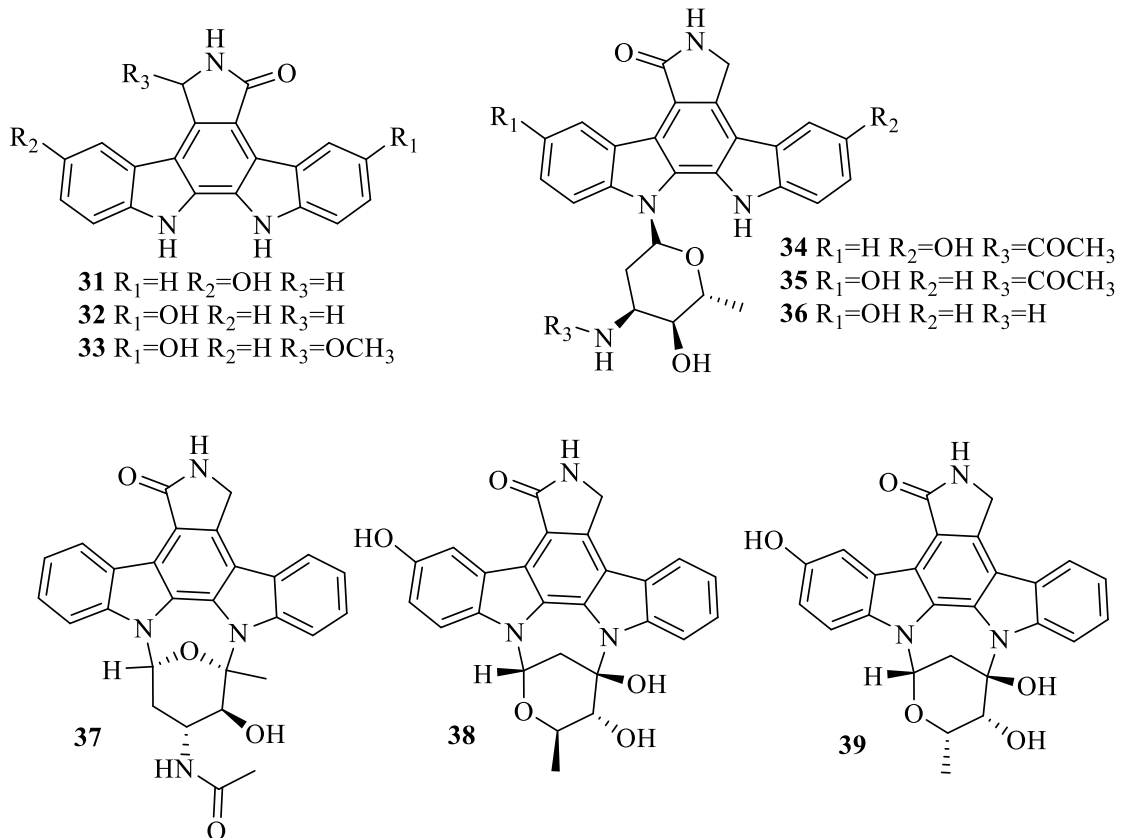
Tiếp đó, Guo và cộng sự đã phân lập được hai hợp chất *p*-*O*-(3,3-dimethylallyl)-benzamide (**30**) được phân lập từ chủng *Streptomyces spectabilis* HDa1, một chủng xạ khuẩn có trong ruột của loài nhím biển *Anthocardis crassispina*. Hai hợp chất **30** là amide thơm được và được đánh giá hoạt động ức chế enzyme acetylcholinesterase, cho kết quả ức chế *in vitro* theo tỷ lệ phần trăm ức chế tương ứng là 43,5% ở nồng độ 100 μ M, có tiềm năng về thuốc điều trị thoái hóa dây thần kinh [32].

1.2.2.3. Các hợp chất alkaloid

Alkaloid là nhóm các hợp chất thứ cấp có cấu trúc đa dạng trong tự nhiên có thể tìm thấy ở vi sinh vật, thực vật và động vật, điểm chung duy nhất của chúng là chứa các nguyên tử nitơ trong phân tử. Các hợp chất này có nhiều tác dụng quan trọng

lên các quá trình sinh lý của người cũng như động vật. Các hợp chất alkaloid được phân lập từ chi *Streptomyces* rất phong phú và đa dạng [33].

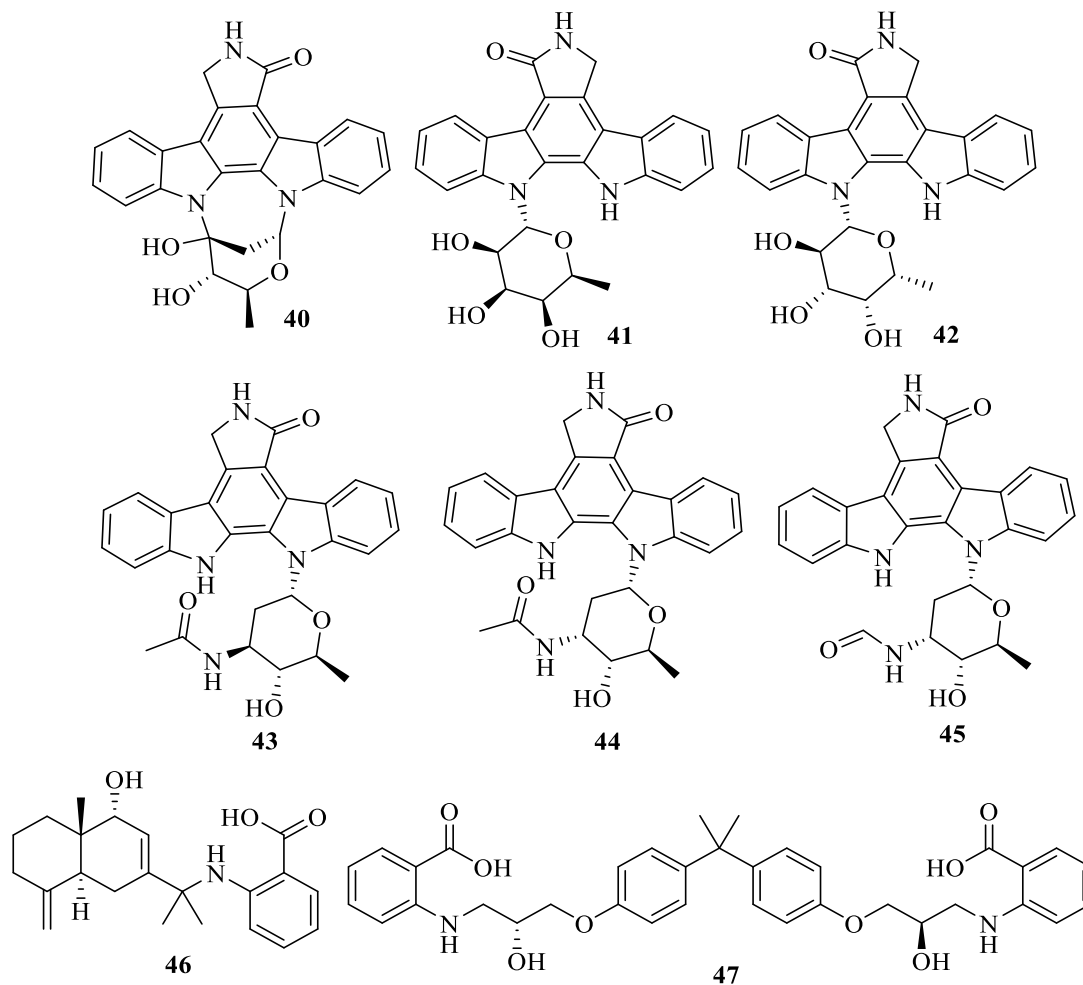
Đối với xạ khuẩn biển, theo Anne Sofie De Rop thống kê từ năm 2017 đến giữa năm 2021 đã có 77 hợp chất alkaloid mới nguồn gốc từ xạ khuẩn biển đã được công bố trong đó đa số là các indole (15), diketopiperazine (15), glutarimide (10), indolizidine (10) và pyrrole (8). Các hợp chất đó thể hiện nhiều hoạt tính đáng chú ý như chống khối u, giảm viêm và giảm đau trong các thử nghiệm *in vivo* [34, 35].



Năm 2018, chín hợp chất gồm 9-hydroxy-K252c (**31**); 3-hydroxy-K252c (**32**); 3-hydroxy-7-methoxy-K252c (**33**); 9-hydroxy-3'-*N*-acetylholyrine A (**34**); 3-hydroxy-3'-*N*-acetylholyrine A (**35**); 3-hydroxyholyrine A (**36**); 3'-*O*-hemethyl-4'-*N*-demethyl-4'-*N*-acetyl-4'-*epi*-staurosporine (**37**), streptocarbazole D-E (**38-39**) đã được phân lập từ chủng *Streptomyces* sp. DT-A61 bởi Wang và các cộng sự. Các hợp chất **31-39** có hoạt tính gây độc tế bào *in vitro* đối với dòng tế bào ung thư tuyến tiền liệt PC-3, trong đó, hợp chất **37** có hoạt tính cao với giá trị IC_{50} 0,16 μ M, các hợp chất **31**, **34**, **35**, **39** có hoạt tính khá cao với các giá trị IC_{50} lần lượt là 8,0; 3,6; 3,1; 5,6 μ M, hợp chất **33** có hoạt tính ức chế mạnh đối với protein kinase (ROCK2) với giá trị IC_{50} 5,7 μ M [36].

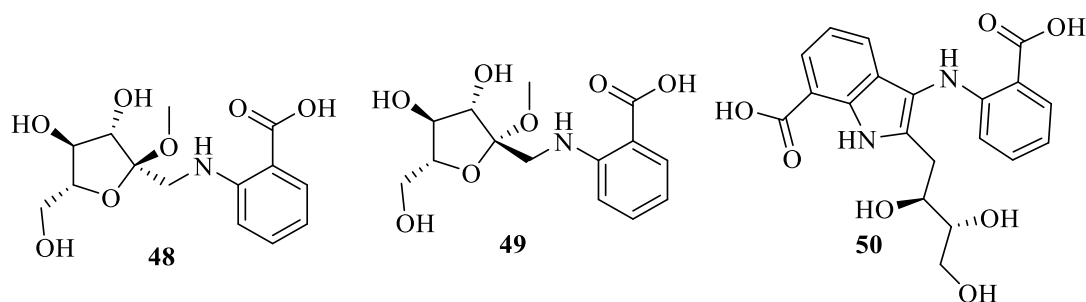
Tiếp đó, ba hợp chất alkaloid indolocarbazole khác là streptocarbazole C (**40**), 3'-

epi-K252d (**41**) và 2',4'-epi-K252d (**42**) đã được phân lập từ chủng *Streptomyces* sp. A65 có trong trầm tích biển do Zhou và cộng sự thực hiện. Các hợp chất **40-42** có hoạt tính gây độc tế bào ung thư tuyến tiền liệt PC-3 với các giá trị IC₅₀ lần lượt là 41,3; 9,67 và 6,79 μ M [37].

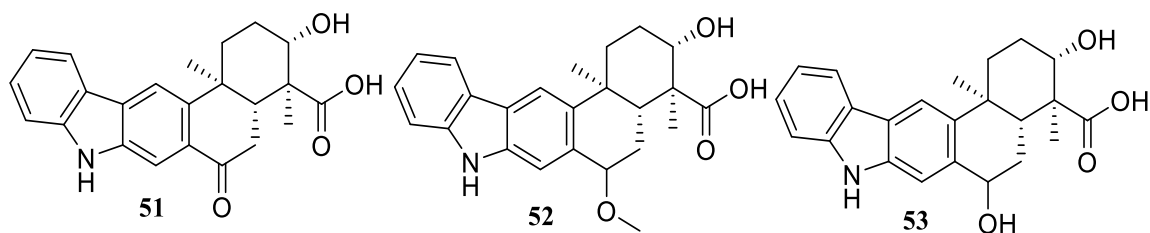


Từ chủng *Streptomyces* sp. A68, năm hợp chất gồm 3'-epi-N-acetyl-holyrine A (**43**); 3'-N-acetyl-holyrine A (**44**); 3'-N-formyl-holyrine A (**45**); eudesm-4(15),7-diene-9 α -hydroxy-11-amino-benzoic acid (**46**); (9R, 22R)-bisphenol A bis (9,22-hydroxy-10,23-anthranilicacidpropyl) ether (**47**) là các hợp chất analogue indolocarbazole đã được phân lập bởi Qin và các cộng sự. Ba hợp chất **43-45** có hoạt tính gây độc tế bào rõ rệt đối với dòng tế bào PC-3 với các giá trị IC₅₀ lần lượt là 0,8; 16,2; 1,5 μ M; các hợp chất **43, 44, 45** có hoạt tính ức chế enzyme PKC α , ROCK II và BTK với các giá trị trong khoảng IC₅₀ 0,17–3,24 μ M. Hai hợp chất **46** là dẫn xuất dạng eudesmane bao gồm một khung sesquiterpene liên kết với một amino benzoic acid, đây là sản phẩm của con đường sinh tổng hợp hỗn hợp giữa terpene và alkaloid,

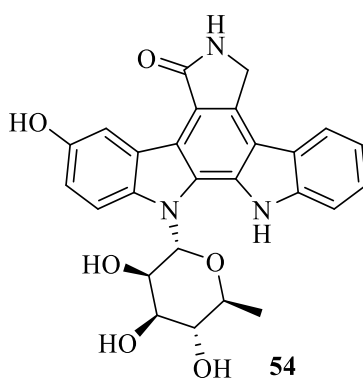
hợp chất **47** là một analogue bisphenol A propyl ether. Hợp chất **47** có hoạt tính ức chế enzyme PKC α , ROCK II và BTK với IC₅₀ 3,24 μ M [38].



Năm 2018, ba hợp chất anthranoside A-C (**48-50**) được phân lập từ chủng *Streptomyces* sp. CMN-62 bởi Che và cộng sự. Hai hợp chất **48** và **49** là hai đồng phân lập thể có cấu tạo gồm anthranilate và phân tử fructofuranose nối với nhau thông qua liên kết carbon-nitơ, ở hợp chất **50** thì fructofuranose được thay thế bằng một khung indole. Ba hợp chất **48-49** được đánh giá về khả năng gây độc tế bào, chống virut cúm A H1N1 và hoạt tính ức chế NF- κ B, chỉ có hợp chất **50** có hoạt tính kháng virut với IC₅₀ bằng 171 μ M [39].

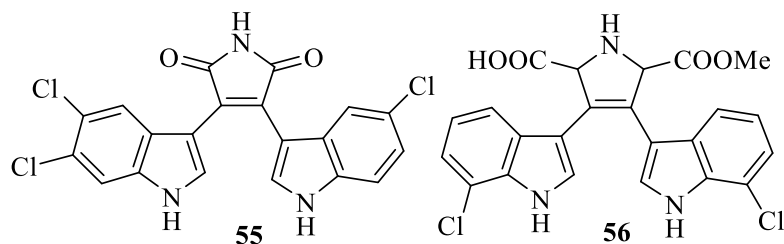


Cùng thời gian này, Chen và cộng sự đã sử dụng phương pháp genome để phân lập và chứng minh cấu trúc của ba hợp chất 19-hydroxyl-xiamycin, 19-carboxyl-xiamycin và 19-methoxyl-xiamycin (**51-53**), chúng là các hợp chất xiamycin, một loại indolosesquiterpene 5 vòng kề nhau. Ba hợp chất **51-53** được phân lập từ chủng *Streptomyces xinghaiensis* NRRL B-24674 [40].

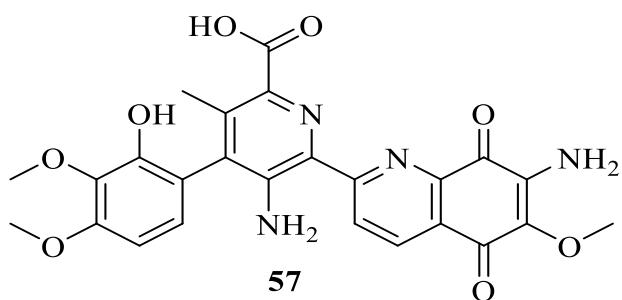


Từ chủng *Streptomyces* sp. OUCMDZ-3118 có nguồn gốc từ trầm tích Biển Đông, Wang và cộng sự đã phân lập được hợp chất 3-hydroxy-K252d (**54**). Hợp chất

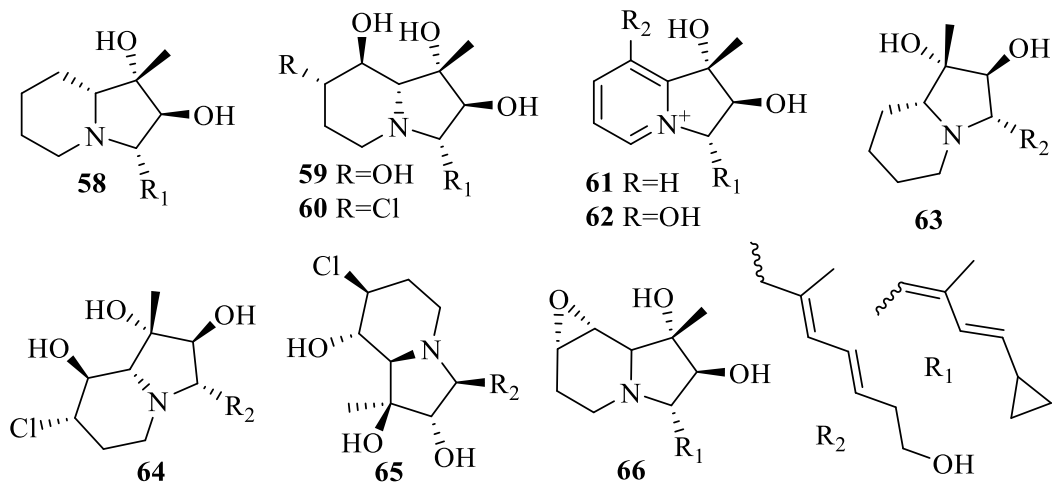
54 có hoạt tính gây độc tế bào hiệu quả lên các dòng tế bào ung thư A549, K562, MCF-7 với giá trị IC_{50} lần lượt là 0,51; 5,0; 7,2 μ M. Ngoài ra, hợp chất **54** có khả năng ức chế topoisomerase II α điều trị ung thư dạ dày và các bệnh ung thư kháng etoposide cao khác [41].



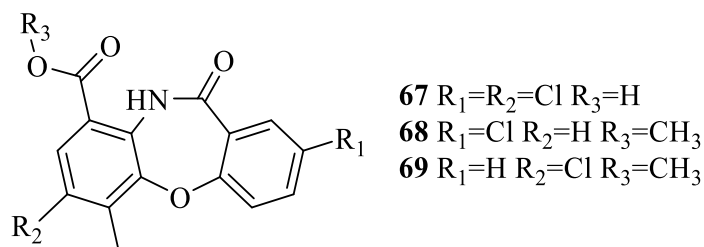
Năm 2020, Song và cộng sự đã phân lập được hai hợp chất bis-indole alkaloid có tên là dionemycin (**55**) và 6-OMe-7',7''-dichloro-chromopyrrolic acid (**56**) từ chủng *Streptomyces* sp. SCSIO 11791 có nguồn gốc từ trầm tích biển sâu. Sau khi khảo sát hoạt tính kháng vi sinh vật cho thấy hợp chất **56** có hoạt tính kháng 6 chủng *Staphylococcus aureus* (MRSA) kháng kháng sinh với giá trị MIC trong khoảng 1–2 μ g/mL. Bên cạnh đó, hợp chất **56** cũng có hoạt tính gây độc tế bào đối với các dòng tế bào ung thư NCI-H460, MDA-MB-231, HCT-116, HepG2, giá trị IC_{50} trong khoảng từ 3,1–11,2 μ M [42].



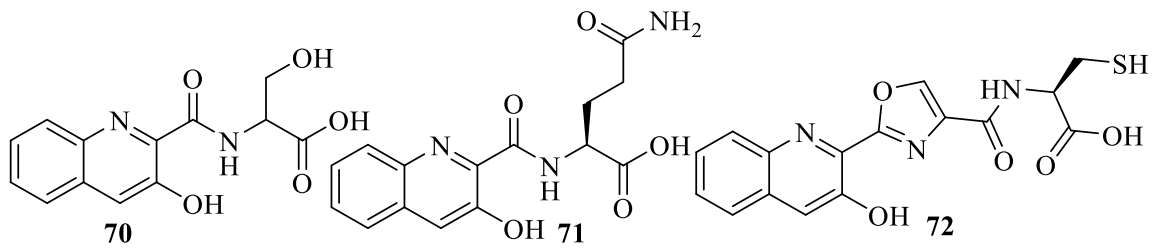
Streptonigrin (**57**) (STN) là một alkaloid có cấu trúc quinone aminoquinoline được phân lập đầu tiên vào năm 1985 từ chủng xạ khuẩn *Streptomyces flocculus*, sau đó hợp chất **57** cũng được tìm thấy ở chủng xạ khuẩn biển *Streptomyces* sp. SMS636 được phân lập bởi Xu và cộng sự. Hợp chất **57** có hoạt tính kháng khuẩn phổ rộng bao gồm cả vi khuẩn gram dương, vi khuẩn gram âm, nấm, hoạt tính chống virut, hoạt tính chống khối u phổ rộng và đặc biệt là bệnh bạch cầu cùng khối u ác tính cho thấy hiệu quả lâm sàng tốt. Tuy nhiên, tác dụng phụ của nó là ức chế tủy xương khiến ứng dụng của nó bị hạn chế [43, 44].



Từ chủng *Streptomyces* sp. HNA39 có trong trầm tích biển ở đảo Hải Nam-Trung Quốc, chín hợp chất cyclizidine B-I (**58-65**) và (+)-*ent*-cyclizidine (**66**) đã được phân lập bởi Jiang và các đồng sự. Các hợp chất **58-66** thuộc lớp chất cyclizidine alkaloid, đặc trưng bởi hệ hai vòng 6/5 cạnh nhau, có một amin bậc 3 trong vòng và một tiểu đơn vị cyclopropyl *trans*-dienic được thế ở vị trí C-3. Khi được thử hoạt tính gây độc tế bào, hợp chất số **59** có hoạt tính mạnh đối với dòng tế bào PC-3, HCT116 với giá trị IC₅₀ lần lượt là 0,52 và 8,3 μ M, ngoài ra các hợp chất **59**, **62**, **64**, **65** đều thể hiện sự ức chế trung bình đối với protein kinase ROCK2 với IC₅₀ từ 7,0 đến 42 μ M [45].



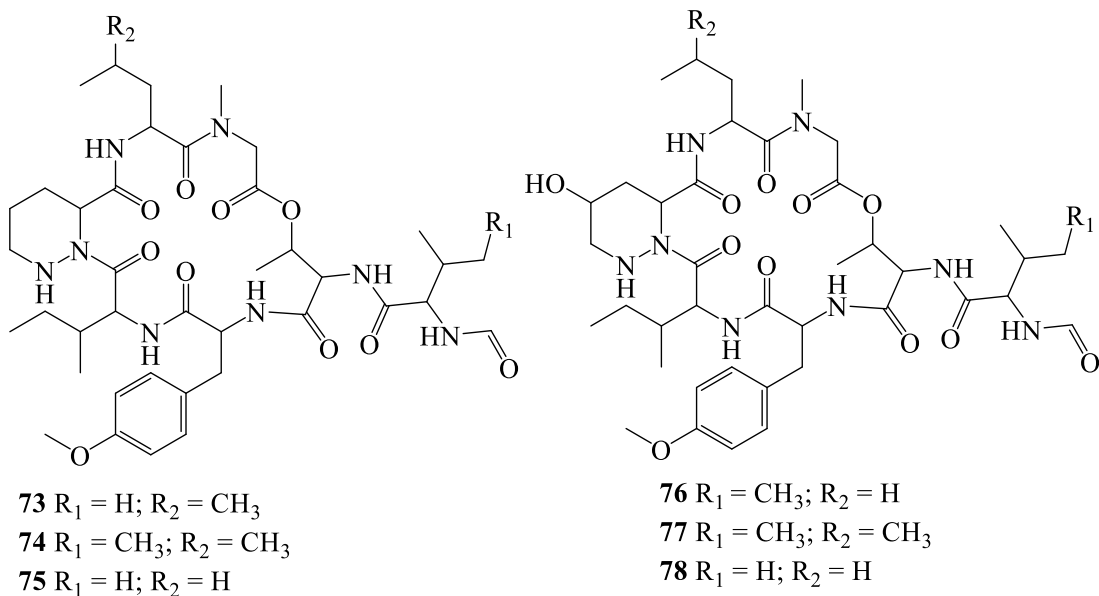
Khi nghiên cứu về khai thác gen, Zhang và cộng sự đã phân lập được ba hợp chất mycemycin F-H (**67-69**) từ chủng *Streptomyces olivaceus* SCSIO T05, các hợp chất **67-69** có cấu trúc khung dibenz[b,e]-[1,4]oxazepin-11(5H)-one (DBP) được hình thành từ các đơn vị 5-chlorokynurenine và acid salicylic, đây là nhóm các hợp chất dị vòng bảy cạnh có hoạt tính đáng chú ý như ức chế HIV-1 RT, ức chế chủ vận H4R, thuốc chống trầm cảm, thuốc chống loạn thần, thuốc chống khối u và chống oxy hóa. Các hợp chất trên cần được nghiên cứu thêm về hoạt tính do có khung dibenzoxazepin đáng chú ý trong cấu trúc [46].



Từ chủng *Streptomyces cyaneofuscatus* M-157 có nguồn gốc từ một loài san hô thuộc bộ Scleractinia, Lopez và cộng sự đã phân lập được ba hợp chất là 3-hydroxyquinoline-2-carbonyl (**70**), (3-hydroxyquinoline-2-carbonyl)-L-glutamine (**71**), (2-(3-hydroxyquinolin-2-yl) oxazole-4-carbonyl)-L-cysteine (**72**), chúng đều là dẫn xuất của hydroxyquininaldic acid. Các hợp chất này đã được đánh giá hoạt tính gây độc tế bào trên dòng tế bào ung thư gan ở người HepG2, chỉ có hợp chất **72** có hoạt tính yếu với giá trị IC_{50} 51,5 μ M [47].

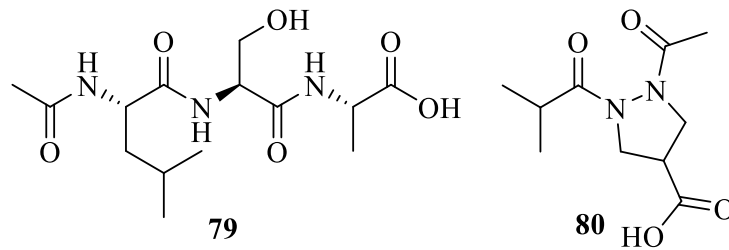
1.2.2.3. Các hợp chất peptide

Peptide là các chuỗi amino acid ngắn, được cấu tạo từ 2 đơn vị amino acid đến 50 đơn vị amino acid. Hầu hết các peptide phân lập từ xạ khuẩn biển có cấu trúc vòng (cyclic) và có chứa các nhóm cấu trúc hiếm như chromophore hoặc các amino acid không thông dụng.

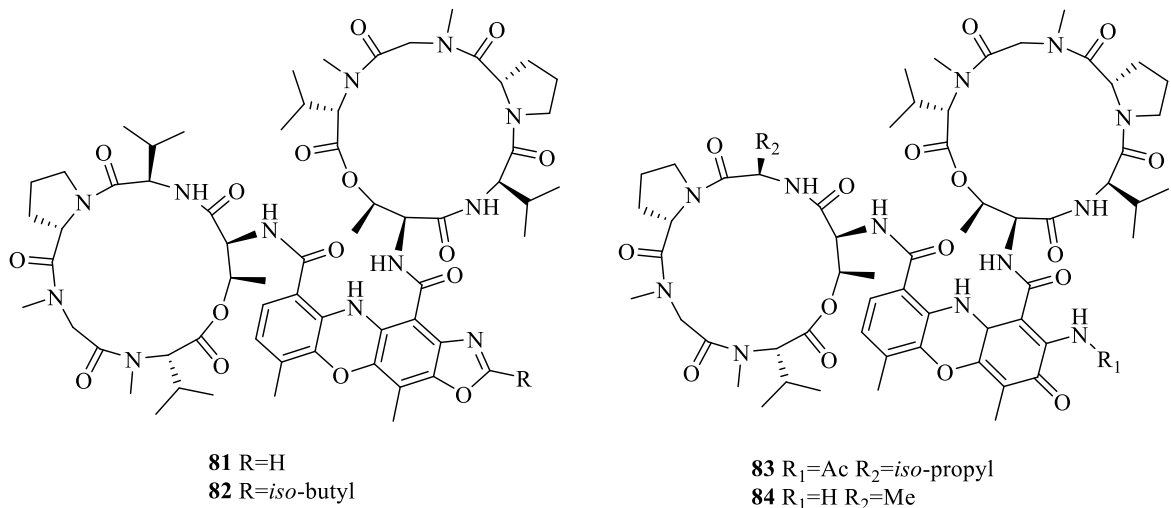


Năm 2015, khi nghiên cứu về chủng xạ khuẩn *Streptomyces drozdowiczii* SCSIO 10141 có trong trầm tích biển Nam Trung Hoa, Liu và các đồng sự đã phân lập được 6 hợp chất cyclopeptide đó là các marformycin A-F (**73-78**), chúng có hoạt tính ức chế chọn lọc đối với chủng *Micrococcus luteus*, *Propionibacterium acnes* và *Propionibacterium granulosum*. Tương tự như các cyclopeptide, cấu hình của các

hợp chất trên được xác định bằng các phương pháp phổ vật lý hiện đại và phương pháp Marfey [48].



Năm 2018, Chen và cộng sự đã phân lập được hai hợp chất *N*-acetyl-L-leucine-L-serine-L-alanine (**79**) và 1-acetyl-2-isobutyryl pyrazolidine-4-carboxylic acid (**80**) từ chủng *Streptomyces* sp. ZZ406 sống cộng sinh cùng loài hải quỳ *Haliplanella lineata*, chúng là các peptide mạch thẳng, khi thủy phân bởi acid HCl người ta thu được 3 amino acid ở dạng tự do gồm L-leucine, L-serine và L-alanine. Hợp chất **80** là một dẫn xuất của pyrazolidine, đây là dẫn xuất của pyrazolidine đầu tiên được phân lập từ tự nhiên [49].



Từ chủng *Streptomyces* sp. LHW52447 sống cộng sinh cùng hải miên *Phyllospongia foliascens*, bốn hợp chất actinomycin D1-D4 (**81-84**) được phân lập bởi Jiao và cộng sự các hợp chất này có tên gọi là actinomycin - một lớp chất chromopeptide được phân lập từ nhiều chủng khác nhau của chi *Streptomyces*. Cấu trúc của 4 hợp chất trên được xác định dựa vào việc kết hợp các phương pháp quang phổ vật lý hiện đại và phương pháp phân tích cấu hình tuyệt đối các amino acid của Marfey, cấu tạo của chúng bao gồm hai chuỗi pentapeptide lactone (vòng α và vòng β) gắn với nhóm phenoxazinone mang màu thông qua các liên kết amide. Có khoảng 34 hợp chất actinomycin có nguồn gốc tự nhiên đã được phát hiện, chúng thể hiện hoạt tính chống khối u và kháng khuẩn rất mạnh. Các hợp chất **81-84** có hoạt tính

1.3. Các hợp chất thứ cấp từ xạ khuẩn biển chi *Actinoalloteichus*

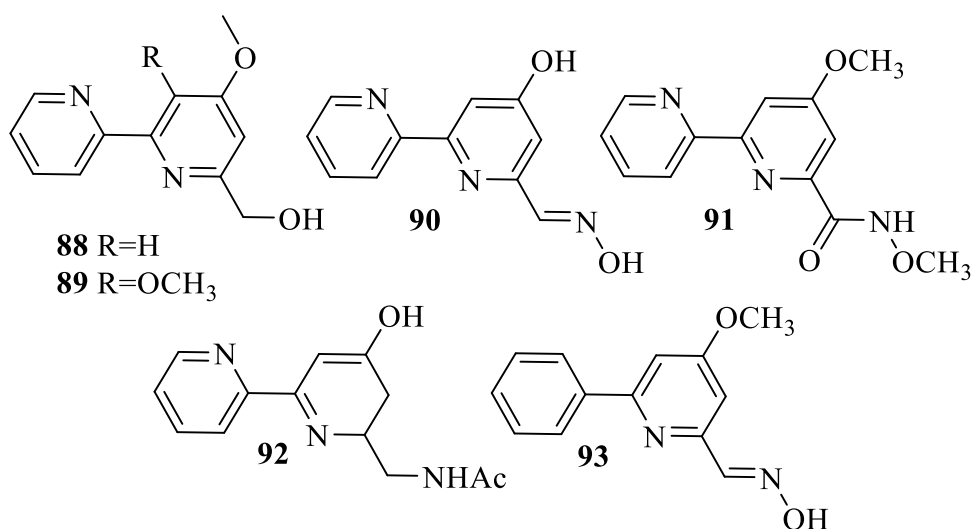
1.3.1. Đặc điểm chung của chi *Actinoalloteichus*

Chi *Actinoalloteichus* là nhóm xạ khuẩn hiếm, chúng thuộc họ Pseudonocardaceae, bộ Pseudonocardiales, lớp Actinomycetia. Chi xạ khuẩn này được Tamura đặt tên vào năm 2000 và cho đến nay chỉ có sáu loài được định danh trên NCBI gồm *Actinoalloteichus cyanogriseus*, *Actinoalloteichus fjordicus*, *Actinoalloteichus hoggarensis*, *Actinoalloteichus hymeniacidonis*, *Actinoalloteichus spitiensis*. Ngoài ra, chi *Actinoalloteichus* có khả năng sản sinh ra nhiều loại hợp chất thứ cấp như macrolactam tetramat đa vòng, polyene macrolactam, pyridin alkaloid, các dẫn xuất cyclopentenon,...v.v. Tuy nhiên, số lượng các công bố liên quan đến hóa học sản phẩm tự nhiên của chi *Actinoalloteichus* còn hạn chế [53-56]. Một số chủng xạ khuẩn thuộc chi *Actinoalloteichus* có thể thích nghi với môi trường có nồng độ muối và kiềm cao, cạnh chiết của chúng có hoạt tính kháng nấm mạnh, hứa hẹn tiềm năng nghiên cứu về các chủng xạ khuẩn này là rất lớn [57].

1.3.2. Các hợp chất thứ cấp từ xạ khuẩn biển chi *Actinoalloteichus*

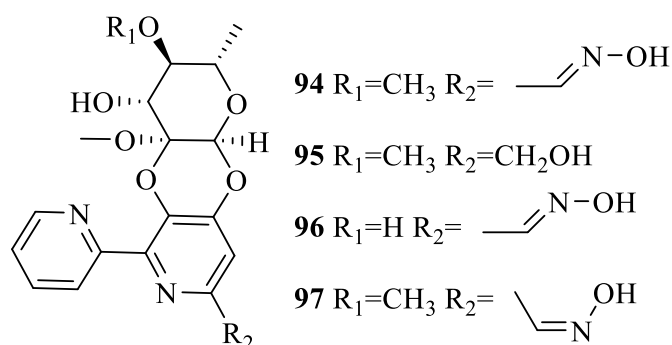
Cho đến nay, chưa có nhiều nghiên cứu về các hợp chất thứ cấp được phân lập từ các loài thuộc chi *Actinoalloteichus*. Các hợp chất phân lập được chủ yếu là các hợp chất alkaloid, macrolactam thể hiện hoạt tính gây độc tế bào ung thư đối với một số dòng tế bào ung thư thử nghiệm.

1.3.2.1. Các hợp chất alkaloid

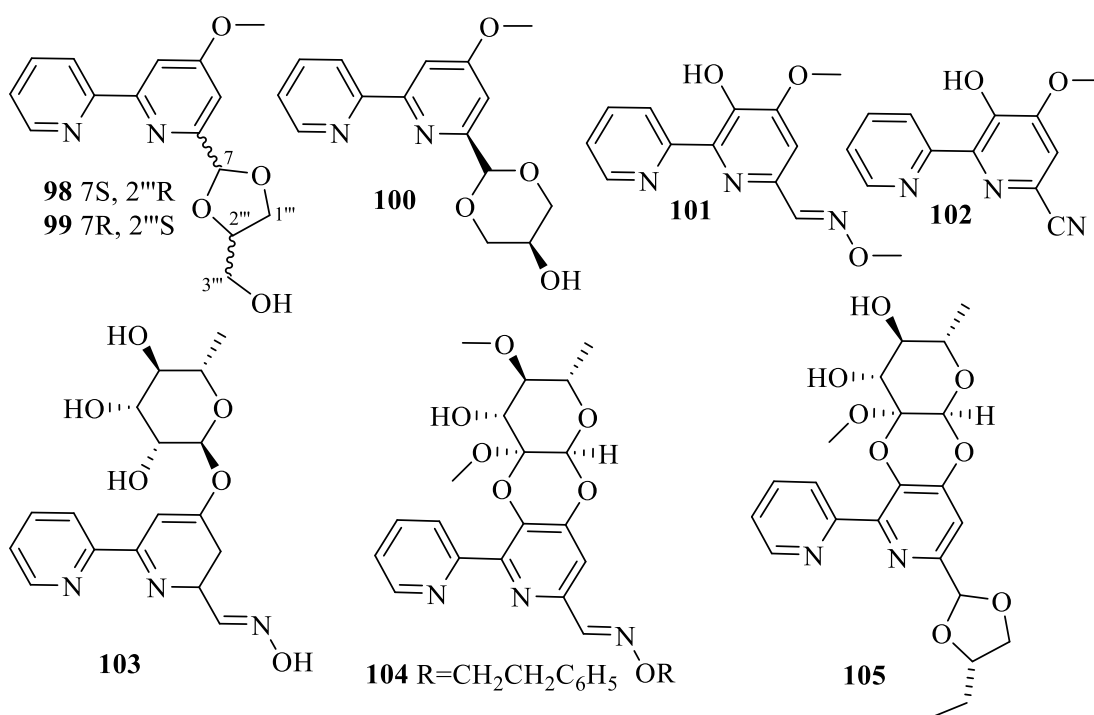


Năm 2011, Fu và các cộng sự khi nghiên cứu về chủng xạ khuẩn hiếm *Actinoalloteichus cyanogriseus* WH1-2216-6. Họ đã phân lập được 6 hợp chất gồm caerulomycin F-K (**88-93**), các hợp chất trên được gọi là bipyridine alkaloid hoặc

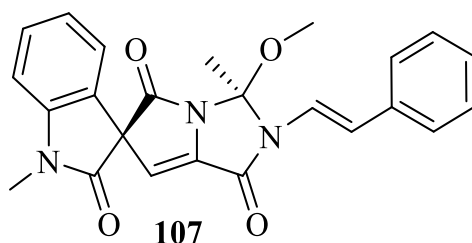
phenylpyridine alkaloid. Hợp chất số **90**, **91** có hoạt tính gây độc tế bào mạnh lên các dòng tế bào K562, KB với giá trị IC_{50} lần lượt là 0,37; 15 μ M và 5,2; 25,7 μ M [56].



Năm 2011, trong một nghiên cứu khác do nhóm của Fu thực hiện với chủng xạ khuẩn *Actinoalloteichus cyanogriseus* WH1-2216-6, họ phân lập được 4 hợp chất bipyridine cyclic glycoside có tên là cyanogriside A-D (**94-97**), chúng là sản phẩm được tạo thành từ các bipyridine và L-rhamnose. Khảo sát hoạt tính gây độc tế bào cho thấy, hợp chất **94** có hoạt tính gây độc tế bào ở mức trung bình đối với dòng K562, KB và MCF-7 với các giá trị IC_{50} là 1,2; 4,7; và 9,8 μ M; hợp chất **96** có hoạt tính lên các dòng tế bào K562 và KB với các giá trị IC_{50} lần lượt là 0,73 và 4,7 μ M. Hợp chất **95** được thử nghiệm khả năng đảo ngược tính kháng adriamycin của hai dòng tế bào K562/A02, MCF7/Adr và tính kháng vincristine của KB/VCR. Kết quả cho thấy hợp chất **95** có thể đảo ngược việc kháng nhiều loại thuốc của các dòng tế bào K562/A02, MCF-7/Adr và KB/VCR ở nồng độ 10 μ M, với sự đảo ngược lần lượt có các giá trị 1,7; 1,2 và 3,6 [58].

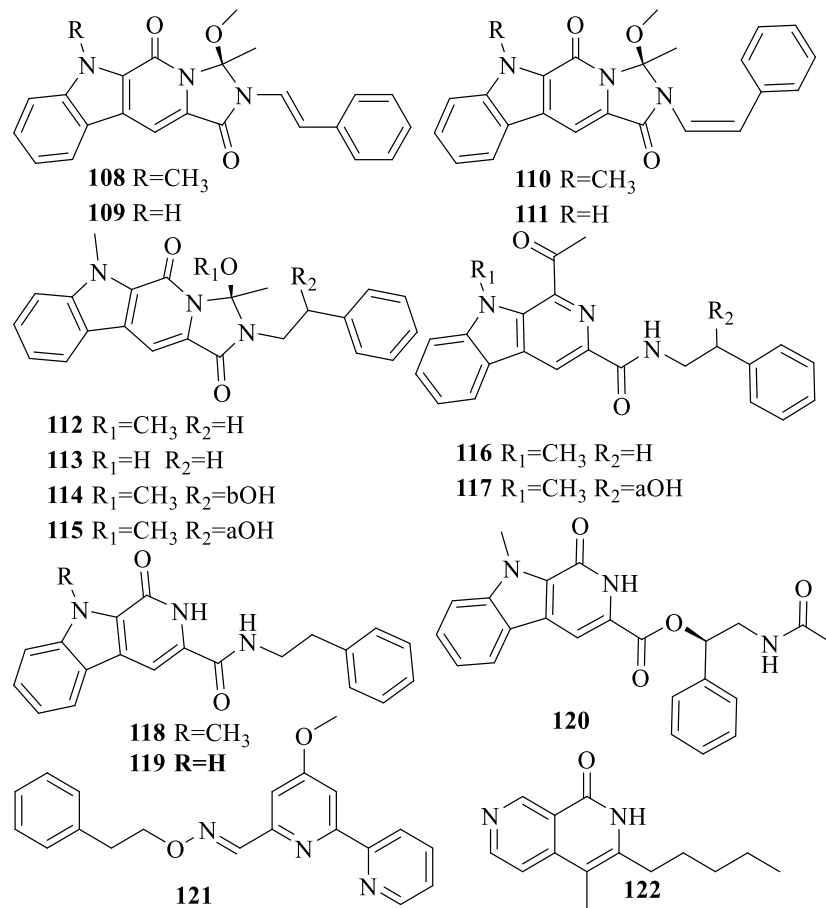


Năm 2013, Mei và các cộng sự đã phân lập được 42 hợp chất caerulomycin (các alkaloid có khung 2,2'-bipyridine) từ chủng *Actinoalloteichus cyanogriseus* WH1-2216-6 đột biến, trong đó có 8 hợp chất mới so với chủng *Actinoalloteichus cyanogriseus* WH1-2216-6 được công bố trong tài liệu năm 2011 [54-56], bao gồm (+)-caerulomycin T (**98-99**), caerulomycin U (**100**), caerulomycin V (**101**), caerulomycin W (**102**), cyanogriside K (**103**), cyanogriside L (**104**), cyanogriside M (**105**), cyanogriside N (**106**). Hợp chất **98-99** có hoạt tính gây độc tế bào tốt và chọn lọc lên dòng tế bào ung thư ruột kết (HCT-116) với giá trị IC_{50} bằng $0,7 \mu M$ [59].

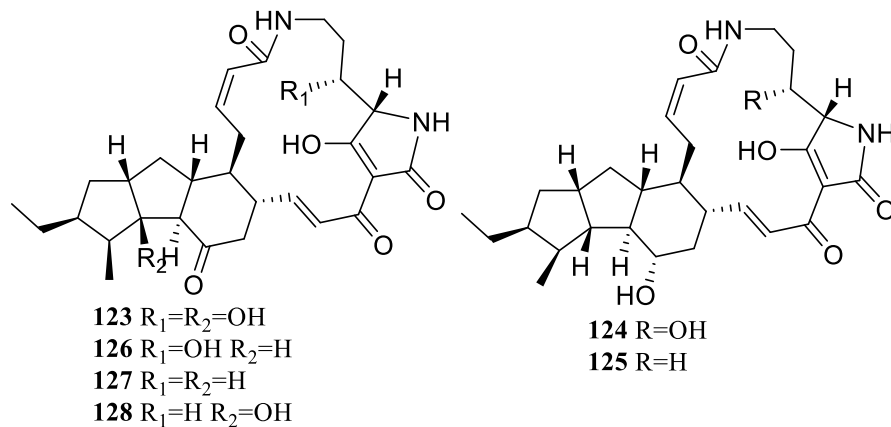


Năm 2014, Fu và các cộng sự đã phân lập được hợp chất cyanogramide (**106**) từ chủng xạ khuẩn biển *Actinoalloteichus cyanogriseus* WH1-2216-6. Hợp chất **106** là một alkaloid có khung spirocyclic pyrrolo [1,2-c] imidazole và cho tới năm 2022 chỉ có một nghiên cứu duy nhất báo cáo về dạng khung này. Hợp chất **106** có hoạt tính yếu lên các dòng tế bào K562, MCF-7, KB, K562/A02, MCF-7/Adr và KB/VCR với các giá trị IC_{50} lần lượt là 12,9; 18,5; 16,8; 10,2; 36,0 và 25,6 μM . Hợp chất **106** cũng được khảo sát về khả năng ngăn chặn sự kháng thuốc do adriamycin (Adr) của các dòng tế bào K562/A02; MCF-7/Adr và khả năng kháng vincristine (VCR) của tế bào KB/VCR, kết quả cho thấy hợp chất **106** có thể ngăn chặn tình trạng đa kháng thuốc của các dòng tế bào K562/A02, MCF-7/Adr, KB/VCR ở nồng độ 5 μM [60].

Năm 2020, Qin và các cộng sự đã phân lập được 13 hợp chất từ chủng xạ khuẩn biển *Actinoalloteichus* sp. ZZ1866 có cùng khung tetracyclic indole-pyridone-imidazole đó là các hợp chất marinacarboline E–N (**108-117**), marinacarboline O–Q (**118-120**), caerulomycin N (**121**) và actinoallonaphthyridine A (**122**). Khi được khảo sát hoạt tính gây độc tế bào, các hợp chất **107**, **109**, **112**, **116** có hoạt tính gây độc tế bào mạnh lên dòng tế bào U87MG với giá trị IC_{50} trong khoảng từ 2,3-8,9 μM . Từ các dữ liệu về cấu trúc và hoạt tính của các chất trên cho thấy tiềm năng nghiên cứu về các hợp chất thứ cấp từ loài xạ khuẩn *Actinoalloteichus* là rất lớn [61].

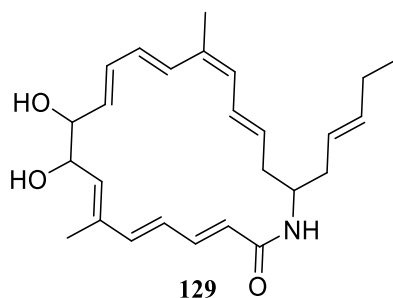


1.3.2.2. Các hợp chất macrolactam



Năm 2017, từ dịch lên men của chủng *Actinoalloteichus cyanogriseus* WH1-2216-6 Xiangui và cộng sự đã phân lập được các hợp chất polycyclic tetramate macrolactam, bao gồm 16-hydroxymaltophilin (**123**), dihydromaltophilin (**124**), 4-deoxydihydromaltophilin (**125**), maltophilin (**126**), xanthobaccin C (**127**) and FI-2 (**128**). Hợp chất **123-128** có hoạt tính gây độc tế bào lên 7 dòng tế bào ung thư phổi ở người (A549), ung thư vú (MCF-7), ung thư ruột kết (HCT-116), ung thư tuyến tụy (PANC-1 và BXPC-3), ung thư bạch cầu dòng tủy mãn tính (K562), ung thư bạch

cầu nguyên bào lympho T cấp tính (Jurkat) và tế bào gan bình thường của con người (L-02) với các giá trị IC_{50} trong khoảng từ 0,1 đến 9,5 μM [54].

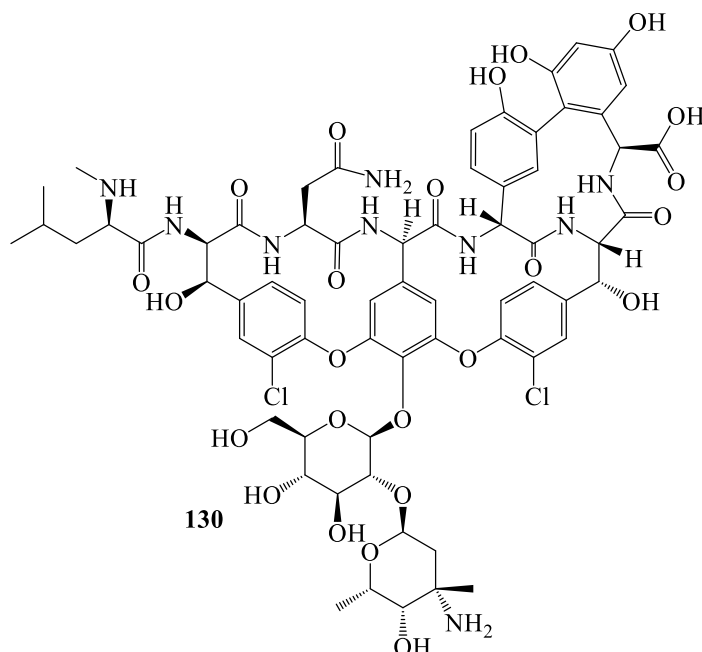


Năm 2016, hợp chất BE-14106 (**129**) – một hợp chất macrolactam vòng-20 đã được Fujita và cộng sự phân lập từ chủng *Actinoalloteichus cyanogriseus* IFM 11549 có trong đất của đảo Chiba, Nhật Bản. Hợp chất **129** trước đó đã từng được phân lập từ chủng *Streptomyces* sp. A14106 và có hoạt tính kháng nấm *Candida albicans* IFO1270 với giá trị MIC 25 $\mu\text{g/mL}$ [55, 62]

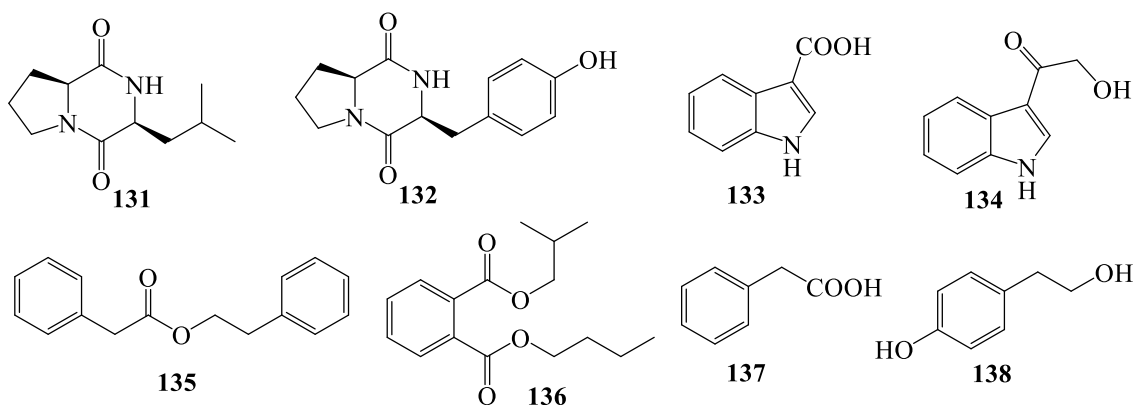
1.4. Các nghiên cứu ở Việt Nam về thành phần hóa học của xạ khuẩn biển thuộc chi *Streptomyces* và chi *Actinoalloteichus*

Như đã trình bày ở trên, Việt Nam là một trong những quốc gia có hệ sinh thái biển đa dạng và phong phú nhất trên thế giới. Với vị trí địa lý là điểm giao thoa giữa các luồng sinh vật đã cho thấy tiềm năng nghiên cứu về nguồn vi sinh vật biển của nước ta rất lớn, tuy nhiên, ở nước ta chưa có nhiều nghiên cứu về các hợp chất thứ cấp từ VSV biển nói chung và xạ khuẩn biển nói riêng. Trong công trình công bố của nhóm nghiên cứu GS. Phạm Quốc Long và PGS. Lê Mai Hương về vi sinh vật phân lập từ biển Việt Nam, từ 12 loài sinh vật biển khác nhau nhóm tác giả đã phân lập được 195 chủng nấm, 45 chủng vi khuẩn và 11 chủng xạ khuẩn trong đó có 11/50 chủng nấm kháng 3/8 chủng VSV KĐ, 6/50 chủng nấm kháng 4/8 VSV KĐ, 5/50 chủng nấm kháng 5/8 chủng VSV KĐ, 10 chủng vi khuẩn biển kháng được ít nhất 1 VSVKĐ trở lên và 3-27 chủng kháng được 3 VSV KĐ với hoạt tính tương đối mạnh. Hầu hết các chủng xạ khuẩn đều có khả năng kháng ít nhất 1 VSVKĐ trở lên [63].

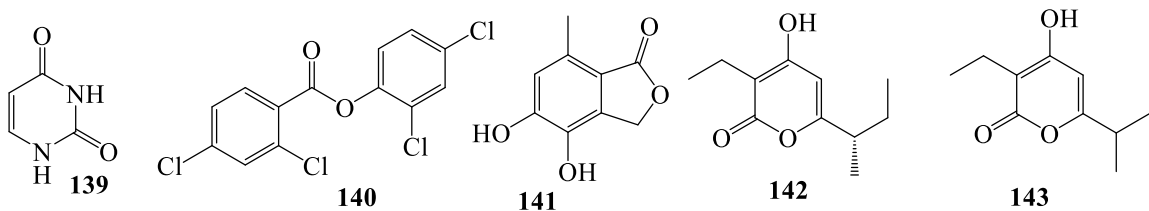
Năm 2012, nhóm tác giả Lê Gia Hy đã phân lập được chủng xạ khuẩn *Streptomyces orientalis* 4912 từ các mẫu ven biển đồng thời nghiên cứu hoàn thiện quy trình nuôi cấy lên men lượng lớn để sản xuất vancomycin (**130**), một hợp chất kháng sinh nhóm aminoglycosid đang được sử dụng đặc trị đối với một số bệnh nhiễm khuẩn, nhất là các bệnh kháng lại kháng sinh nhóm penicillin [64].



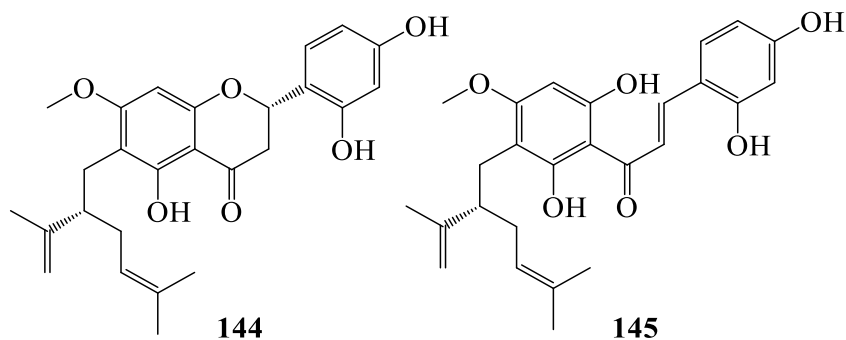
Năm 2015, trong khuôn khổ hợp tác nghiên cứu giữa Viện Hóa sinh biển và Trường Đại học Illinois tại Chicago (UIC) về tìm kiếm các hợp chất có hoạt tính sinh học từ nguồn xạ khuẩn thuộc các vùng biển của Việt Nam, từ chủng xạ khuẩn *Streptomyces* sp.G039 có nguồn gốc từ vịnh Hạ Long, Quảng Ninh, Việt Nam, 9 hợp chất đã được phân lập, gồm cylo-(Leu-Pro) (**131**), cyclo-(Pro-Tyr) (**132**), indole-3-carboxylic acid (**133**), 3-hydroxyacetylindole (**134**), 2-phenylacetic acid (**135**), phenethyl 2-phenyl acetate (**136**), *n*-butyl-isobutyl phthalate (**137**), 4-(2-hydroxyethyl) phenol (**138**), uracil (**139**).



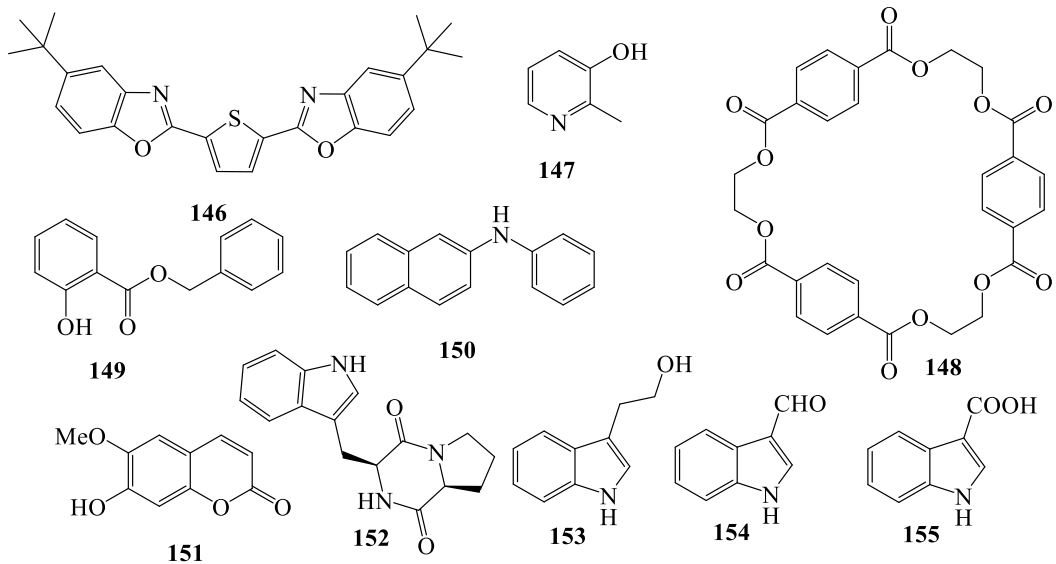
Cũng trong khuôn khổ dự án này, từ chủng xạ khuẩn *Streptomyces* sp. G212 có nguồn gốc từ mẫu trầm tích tại vùng biển Quảng Bình đã phân lập được bốn hợp chất 2,4-dichlorophenyl 2,4-dichlorobenzoate (**140**), 4,5-dihydroxy-7-methyl phthalide (**141**); 2 loại kháng sinh germicidine A (**142**) và germicidine B (**143**). Đây là phát hiện rất thú vị, có thể hỗ trợ cho việc nghiên cứu dùng chủng xạ khuẩn này cho việc sản xuất kháng sinh germicidine A và germicidine B [65].



Năm 2018, nhóm nghiên cứu của PGS. TS. Phạm Văn Cường đã nghiên cứu thành phần hóa học của chủng xạ khuẩn *Streptomyces* sp. G246 nuôi cấy ở dạng lỏng có nguồn gốc từ hải miên *Halichondria panicea* (Pallas, 1766). Từ dịch ngoại bào của chủng xạ khuẩn biển *Streptomyces* sp. G246 đã phân lập được 2 hợp chất là (2*S*,2''*S*)-6-lavandulyl-7-methoxy-5,2',4'-trihydroxyl flavanone (**144**) và (2''*S*)-5'-lavandulyl-4'-methoxy-2,4,2',6'-tetrahydroxylchalcone (**145**). Hai hợp chất này có hoạt tính kháng các chủng vi sinh vật kiểm định với giá trị MIC từ 1-128 $\mu\text{g/ml}$. Hợp chất **145** thể hiện hoạt tính kháng lao tốt đối với chủng *M. tuberculosis* H37Rv với giá trị MIC 6,00 $\mu\text{g/ml}$ [66].

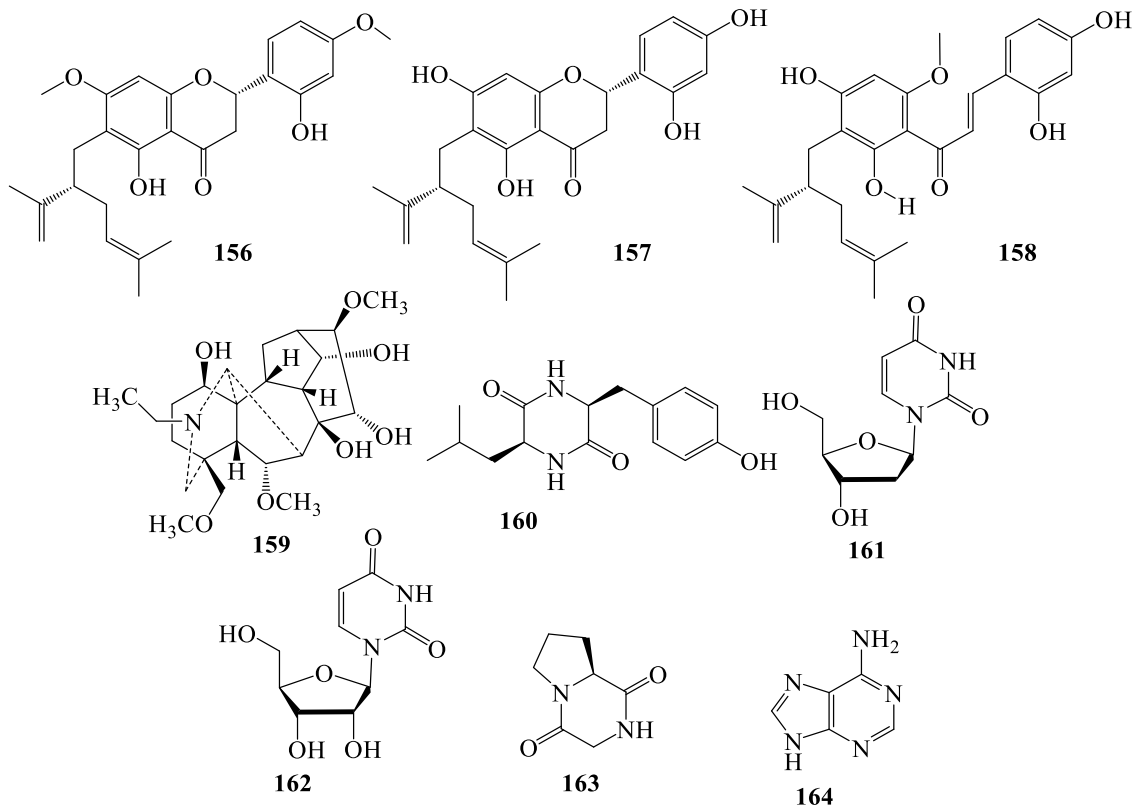


Năm 2018, từ cao chiết dịch ngoại bào của chủng xạ khuẩn *Streptomyces* sp. G278, nhóm nghiên cứu của Viện Hóa sinh biển đã phân lập được 10 hợp chất trong đó có 2 hợp chất lần đầu phân lập từ tự nhiên là 2,5-bis(5-*tert*-butyl-2-benzoxazolyl) thiophene (**146**) và 3-hydroxyl-2-methylpyridine (**147**); cùng với 8 hợp chất đã biết là polyethylene terephthalate (**148**), benzyl salicylate (**149**), *N*-phenylnaphthalen-2-amine (**150**), scopoletin (**151**), cyclo-(*L*-Pro-*L*-Trp) (**152**), tryptophol (**153**), indole-3-carbaldehyde (**154**), indole-3-carboxylic acid (**155**). Hợp chất **147** và **148** có hoạt tính ức chế chọn lọc lên chủng VK *Enterococcus faecalis* (MIC 256 $\mu\text{g/mL}$), hợp chất **147** có hoạt tính kháng khuẩn và kháng nấm với các chủng *Escherichia coli* (MIC 64 $\mu\text{g/mL}$), *Salmonella enterica* (MIC 256 $\mu\text{g/mL}$), *Staphylococcus aureus* (MIC 256 $\mu\text{g/mL}$), *Enterococcus faecalis* (MIC 256 $\mu\text{g/mL}$) và *Candida albicans* (MIC 64 $\mu\text{g/mL}$) [67].



Từ chủng *Streptomyces* sp. G248 có nguồn gốc từ loài hải miên *Halichondria panicea*, 3 hợp chất là (2*S*,2''*S*)-6-lavandulyl-7,4'-dimethoxy-5,2'-dihydroxyl flavanone (**156**), (2*S*,2''*S*)-6-lavandulyl-5,7,2',4'-tetrahydroxyl flavanone (**157**) và (2''*S*)-5'-lavandulyl-2'-methoxy-2,4,4',6'-tetrahydroxyl chalcone (**158**) đã được phân lập và xác định cấu trúc hóa học. Các hợp chất trên có hoạt tính với các chủng *E. faecalis* (ATCC13124), *S. aureus* (ATCC25923), *B. cereus* (ATCC13245), *E. coli* (ATCC25922), *P. aeruginosa* (ATCC27853), *S. enterica* (ATCC12228), *C. albicans* (ATCC1023), hợp chất **158** có phổ kháng khuẩn rộng khi tác động lên hầu hết các chủng vi sinh vật kiểm định, giá trị IC₉₀ trong khoảng 4-16 µg/mL, hai hợp chất còn lại phổ kháng khuẩn hẹp hơn nhưng có hoạt tính mạnh hơn điển hình là hợp chất **157** có IC₉₀ trong khoảng 1-8 µg/mL [68].

Năm 2022, trong một nghiên cứu tìm kiếm các hợp chất có hoạt tính kháng lao và hoạt tính kháng VSVKĐ từ nguồn vi sinh vật đáy biển ở Khu vực Nam Trung Bộ, cặn chiết của chủng *Streptomyces fradiae* G650, phân lập từ một loài thân mềm *Pinna muricata* thu thập ở biển Vân Phong – Khánh Hòa, có hoạt tính kháng VSVKĐ tốt. Từ dịch chiết EtOAc ngoại bào của chủng xạ khuẩn G650, PGS.TS Phạm Văn Cường và cộng sự đã phân lập và xác định cấu trúc của 6 hợp chất, bao gồm 15α-hydroxyneoline (**159**), cyclo-(Leu-Tyr) (**160**), cyclo-(Pro-Gly) (**161**), 2'-deoxyuridine (**162**), uridine (**163**), adenine (**164**), trong đó hợp chất 15α-hydroxyneoline lần đầu tiên được phân lập từ VSV [69].



Như vậy, phân tổng quan trên đây đã tập hợp một số các nghiên cứu điển hình của các nhà khoa học trong và ngoài nước, nhìn chung việc nghiên cứu các hợp chất thứ cấp có nguồn gốc từ xạ khuẩn biển chi *Streptomyces* và chi *Actinoalloteichus* trên thế giới nói chung đã đạt được nhiều thành tựu vượt bậc. Riêng đối với Việt Nam, vốn là một đất nước có tiềm năng sinh học biển vô cùng phong phú và đa dạng, cần được tiếp tục nghiên cứu và khai thác có hiệu quả nhằm phát triển sản phẩm phục vụ cuộc sống. Ngoài ra, việc ứng dụng các thành tựu khoa học kỹ thuật tiên tiến vào nghiên cứu khai thác nguồn tài nguyên thiên nhiên biển, công bố kết quả nghiên cứu trên các tạp chí khoa học uy tín còn góp phần khẳng định chủ quyền vùng biển đảo của nước ta đối với cộng đồng quốc tế.

CHƯƠNG 2 ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Đối tượng nghiên cứu

Sau khi sàng lọc hoạt tính kháng vi sinh vật kiểm định cho thấy ba chủng xạ khuẩn có hoạt tính kháng VSVKĐ tốt được chọn để nghiên cứu (**Bảng 2.1**) bao gồm:

- Cặn chiết ethyl acetate của chủng xạ khuẩn *Actinoalloteichus cyanogriseus* G631 có hoạt tính đối với 5/7 chủng VSV kiểm định thử nghiệm bao gồm 3 chủng VK Gram dương *E. faecalis*, *S. aureus*, *B. cereus*; một chủng VK Gram âm *S. enterica* và 1 chủng nấm *C. albicans* với giá trị MIC tương ứng lần lượt là 64, 2, 16, 256 và 2 µg/mL.

- Cặn chiết ethyl acetate của chủng xạ khuẩn *Streptomyces* sp. G666 có hoạt tính kháng VSVKĐ đối với 5/7 chủng vi sinh vật kiểm định thử nghiệm bao gồm 3 chủng VK Gram dương *E. faecalis*, *S. aureus*, *B. cereus*; một chủng VK Gram âm *S. enterica* và 1 chủng nấm *C. albicans* với giá trị MIC tương ứng là 32, 8, 64, 128 và 16 µg/mL.

- Cặn chiết ethyl acetate của chủng xạ khuẩn *Streptomyces* sp. G246 có hoạt tính kháng khuẩn đối với 1 chủng VK Gram dương *E. Faecalis*, một chủng VK Gram âm *B. cereus* và 1 chủng nấm *C. albicans* với giá trị MIC tương ứng là 64, 128, và 32 µg/mL.

Bảng 2.1. Giá trị MIC của cặn chiết ethyl acetate của 3 chủng xạ khuẩn

Chủng	Gram dương			Gram âm			Nấm
	<i>E. faecalis</i> ATCC29212	<i>S. aureus</i> ATCC25923	<i>B. cereus</i> ATCC13245	<i>E. coli</i> ATCC25922	<i>P. aeruginosa</i> ATCC27853	<i>S. enterica</i> ATCC13076	<i>C. albicans</i> ATCC10231
	MIC (µg/ml)						
G666	32	8	8	-	-	128	16
G631	64	2	16	-	-	256	2
G246	64	-	128	-	-	-	32
S	256	256	128	32	256	128	
C							32

*S: streptomycin *C: cycloheximide, (-): MIC >256 µg/ml

2.1.1. Chủng xạ khuẩn *Actinoalloteichus cyanogriseus* G631

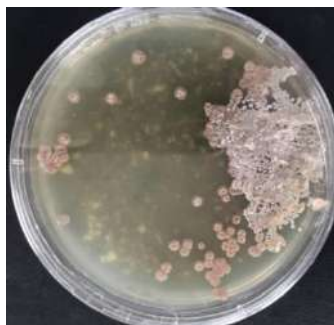
Chủng xạ khuẩn *Actinoalloteichus cyanogriseus* G631 được phân lập từ mẫu san hô mềm (*Sarcophyton infundibuliforme* Tixier-Durivault, 1958) thu được ở độ sâu 8m từ bờ biển Phú Quý - Bình Thuận vào tháng 4/2021 và được GS.TS. Đỗ Công Thung, Viện Tài nguyên và Môi trường biển, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam (VAST) định danh. Mẫu tiêu bản được lưu giữ tại Viện Tài nguyên - Môi trường biển. Chủng xạ khuẩn *Actinoalloteichus cyanogriseus* G631 được định danh bằng phương pháp sinh học phân tử bởi TS. Lê Thị Hồng Minh - Viện Hóa sinh biển, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam.



Hình 2.3: Hình ảnh khuẩn lạc của chủng *Actinoalloteichus cyanogriseus* G631

2.1.2. Chủng xạ khuẩn *Streptomyces* sp. G666

Chủng xạ khuẩn *Streptomyces* sp. G666 được phân lập từ mẫu sên biển *Phyllidia varicosa* (Lamarck 1801) do GS.TS. Đỗ Công Thung, Viện Tài nguyên và Môi trường biển - Viện Khoa học và Công nghệ Việt Nam định danh, thu thập ở độ sâu 4 m từ bờ biển Vân Phong - Khánh Hòa, Việt Nam vào tháng 5 năm 2020, điểm lấy mẫu 190a, tên mẫu HP03/20-VP01-TM03. Mẫu tiêu bản được lưu trữ tại Viện Tài nguyên Môi trường biển, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam (VAST). Chủng xạ khuẩn *Streptomyces* sp. G666 được định danh bằng phương pháp sinh học phân tử bởi TS. Lê Thị Hồng Minh - Viện Hóa sinh biển, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam.



Hình 2.4. Hình ảnh khuẩn lạc của chủng xạ khuẩn *Streptomyces* sp. G666

2.1.3. Chủng xạ khuẩn *Streptomyces* sp. G246

Chủng xạ khuẩn *Streptomyces* sp. G246 được phân lập từ mẫu Hải miên *Halichondria panicea* (Pallas, 1766) được thu thập ở độ sâu 10m tại bán đảo Sơn Trà (Đà Nẵng) - Việt Nam vào tháng 8 năm 2016, được GS. Đỗ Công Thung, Viện Tài nguyên và Môi trường biển - Viện Khoa học và Công nghệ Việt Nam (VAST) định danh. Mẫu tiêu bản được lưu giữ tại Viện Hóa sinh biển, Viện Tài nguyên và Môi trường biển, Viện Hàn lâm KHCNVN. Chủng xạ khuẩn *Streptomyces* sp. G246 được định danh bằng phương pháp sinh học phân tử bởi TS. Lê Thị Hồng Minh - Viện Hóa sinh biển, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam.



Hình 2.5: Hình ảnh khuẩn lạc của chủng xạ khuẩn *Streptomyces* sp. G246

2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Hóa chất, thiết bị và phương pháp nuôi cấy nhân sinh khối lượng lớn

Quá trình nuôi cấy nhân sinh khối lượng lớn của ba chủng xạ khuẩn được thực hiện bởi TS. Lê Thị Hồng Minh và các cán bộ nghiên cứu phòng Công nghệ sinh học – Viện Hóa sinh biển - Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam.

* **Hóa chất**

Tinh bột khoai tây, dextrose, casitone (Sigma), bột mạch nha (Sigma), cao nấm men (Sigma), peptone (Sigma), muối biển, CaCO₃, NZSG, tinh bột tan, agar ...

* **Thiết bị và dụng cụ**

Máy móc thiết bị được sử dụng trong nghiên cứu này bao gồm: Box cấy Class II; tủ nuôi cấy (Sanyo, nhật); Cân phân tích (Sartorius, Đức); Máy đo pH Meter Delta 320 (Mettler Toledo, Thụy sỹ); Lò vi sóng; Máy nuôi lắc; Nồi khử trùng; cân điện tử; máy nuôi lắc Stuart (Bibby) của Anh; nồi khử trùng (Wise clave, Hàn Quốc); tủ ấm nuôi lắc (Daihan Scientific, liên doanh Hàn Quốc); Hệ thống lên men 50 Lít của Yuni-Hàn Quốc. Các dụng cụ dùng cho nghiên cứu vi sinh thông thường như que cấy; đĩa

petri; bình tam giác 125 ml, 250 ml, 100 ml; 5000 ml que ria; pipetman các loại, pipet paster của Đức.

*** Môi trường**

Bảng 2.2: Thành phần môi trường nuôi cấy

Môi trường	Thành phần	g/L
A1	tinh bột tan	10
	cao nấm men	4
	peptone	2
	muối biển	30
A1⁺	tinh bột tan	10
	cao nấm men	4
	peptone	2
	CaCO ₃	1
	FeSO ₄ : 8mg/ml	5
	KBr 20mg/ml	5
	muối biển	30
	Nước cất	1000

Nếu là môi trường đặc thì bổ sung 15 g agar/1000 mL.

*** Chứng giống**

Ba chủng xạ khuẩn được lấy ra từ tủ âm sâu -80°C, tiến hành hoạt hóa cấy ria trên đĩa thạch để kiểm tra độ sạch của các chủng nghiên cứu, lấy 3-5 khuẩn lạc cấy chuyển sang bình tam giác 125 mL khác có chứa 25 mL môi trường A1 đã khử trùng 121°C trong 30 phút, nuôi lắc sau 4 - 7 ngày (tùy thuộc tốc độ phát triển của từng chủng) trên máy lắc 150 vòng/phút. Tiếp theo chuyển toàn bộ phần tế bào đã phát triển vào các đĩa petri có chứa môi trường A1⁺ để nuôi tĩnh 10-25 ngày [70-72].

Bảng 2.3: Điều kiện nuôi cấy nhân sinh khối lượng lớn 3 chủng xạ khuẩn *Actinoalloteichus cyanogriseus* G631, *Streptomyces* sp. G666, *Streptomyces* sp. G246

STT	Ký hiệu	Tên định danh	Điều kiện nuôi cấy
1	G631	<i>Actinoalloteichus cyanogriseus</i> G631	Sinh khối trong 20 ngày, nhiệt độ 30°C, nồng độ muối 3%, pH = 7,2
2	G666	<i>Streptomyces</i> sp. G666	Sinh khối trong 25 ngày, nhiệt độ 30°C, nồng độ muối 3%, pH = 7,2
3	G246	<i>Streptomyces</i> sp. G246	Sinh khối trong 10 ngày, nhiệt độ 28°C, nồng độ muối 3%, pH = 7,0

Các chủng xạ khuẩn được nuôi cấy nhân sinh khối lượng lớn quy mô 50 kg theo phương pháp Nguyễn Văn Cách 2004 [73].

- + Chuẩn bị môi trường nuôi cấy thích hợp cho 3 chủng vi sinh vật.
- + Hoạt hoá lại các chủng từ tủ -80°C trong môi trường lỏng.
- + Kiểm tra độ thuần khiết các chủng nghiên cứu trên đĩa thạch.
- + Nhân giống mỗi chủng cấp 1, cấp 2 để tiến hành nhân sinh khối lượng lớn.

2.2.2. Phương pháp tạo cặn chiết từ sản phẩm nuôi cấy nhân sinh khối các chủng xạ khuẩn

Đối với lên men lượng lớn: Sau thời gian nhân sinh khối lượng lớn, môi trường nuôi cấy dạng rắn (50 kg) được thu nhận, cắt nhỏ và cho vào các bình lớn, chiết lần lượt bằng dung môi ethyl acetate và methanol, siêu âm trong 5 lần, mỗi lần 30 phút. Dịch chiết được cất loại dung môi dưới áp suất giảm thu cặn tổng tương ứng [74, 75].

2.2.3. Phương pháp phân lập các hợp chất thứ cấp

Trong quá trình phân lập các hợp chất thứ cấp từ cặn chiết của các chủng xạ khuẩn, các phương pháp sắc ký đã được sử dụng bao gồm: sắc ký lớp mỏng (TLC, dùng để khảo sát, định tính), sắc ký cột thường (CC), sắc ký cột pha đảo RP-18 và sắc ký rây phân tử Sephadex LH-20.

Sắc ký lớp mỏng được thực hiện trên bản mỏng đế nhôm tráng sẵn silica gel 60 F₂₅₄ của hãng Merck có độ dày 0,25 mm. Dung môi triển khai sắc ký là hệ dung môi với những tỷ lệ khác nhau của: *n*-hexane, dichloromethane, ethyl acetate, acetone, methanol, ethanol, acetone nitril..., bản mỏng được kiểm tra bằng đèn tử ngoại bước sóng 254 và 365 nm, sau đó hiện màu bằng thuốc thử vanillin/ H₂SO₄ và thuốc thử cerisunfat/ H₂SO₄.

Sắc ký cột dùng cột thường với pha tĩnh là silica gel 60, cỡ hạt 0,063-0,200 μm (70-230 Mesh) của hãng Merck, rửa giải bằng các hệ dung môi *n*-hexane/dichloromethane, *n*-hexane/ethyl acetate, *n*-hexane/acetone, dichloromethane/methanol, dichloromethane/ethyl acetate ... với các tỷ lệ khác nhau.

Sắc ký Cột pha đảo với pha tĩnh là RP-18 và hệ dung môi rửa giải là methanol /nước, acetone nitril /nước....

Sắc ký cột sử dụng LH-20 làm pha tĩnh thường được rửa giải bằng methanol hoặc hệ methanol/dichloromethan (9/1 hoặc 8/2), methanol/nước (9/1 hoặc 8/2).

Sử dụng máy sắc ký lỏng trung áp MPLC Isolera, Biotage, 4 kênh dung môi, bơm mẫu tự động, detector DAD, máy sắc ký lỏng hiệu năng cao HPLC Agilent 1200, 4 kênh dung môi, bơm mẫu tự động, detector DAD để nâng cao hiệu suất làm việc phân lập các hợp chất trong cao chiết.

2.2.4. Phương pháp xác định cấu trúc hóa học của các hợp chất phân lập được

Sử dụng các phương pháp phân tích thông số vật lý và phân tích phổ hiện đại kết hợp với tra cứu tài liệu tham khảo để chứng minh cấu trúc hóa học của các chất sạch phân lập được.

Sử dụng các phương pháp và thiết bị sau:

- *Thiết bị siêu âm, phá mẫu:*

Quá trình chiết sử dụng máy siêu âm Digital Ultrasonic Cleaner.

- *Điểm nóng chảy*

Điểm nóng chảy được đo trên máy Boetius.

- *Phổ khối ESI-MS*

Được đo trên máy Agilent LC-MSD-Trap SL tại viện Hóa học, viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam.

- *Phổ khối lượng phân giải cao HR-ESI-MS*

Phổ khối phân giải cao HR-ESI-MS được đo trên máy AGILENT 6530 Accurate Mass QTOF LC/MS của Viện Hóa sinh biển, viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam.

- *Phổ cộng hưởng từ hạt nhân NMR*

Phổ NMR đo trên máy: Bruker Avance 500 MHz, và Bruker NEO 600 MHz của Viện Hoá học- Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam. Chất nội chuẩn là TMS (Tetrametyl Silan).

- *Các kỹ thuật phổ cộng hưởng từ hạt nhân được sử dụng bao gồm*

+ Phổ cộng hưởng từ hạt nhân một chiều: $^1\text{H-NMR}$, $^{13}\text{C-NMR}$ và DEPT.

+ Phổ cộng hưởng từ hạt nhân hai chiều: HSQC, HMBC, COSY và NOESY.

+ Dung môi được sử dụng bao gồm các dung môi $\text{DMSO-}d_6$, CD_3OD và CDCl_3 . Việc lựa chọn dung môi đo phụ thuộc vào bản chất của từng mẫu, trên nguyên tắc là dung môi phải hòa tan hoàn toàn mẫu đo và không che khuất các tín hiệu phân tích.

- *Phổ lưỡng sắc tròn (CD):*

Phổ CD được đo trên máy Chirascan™ CD spectrometer (Applied Photophysics Ltd., Surrey, UK) tại Viện Hóa sinh biển - Viện Hàn lâm KH và CN Việt Nam.

- Độ quay cực $[\alpha]_D$:

Độ quay cực được đo trên máy JASCO P-2000 Polarimeter của Viện Hóa sinh biển, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam.

2.2.5. Phương pháp thử hoạt tính kháng vi sinh vật kiểm định

- Hoạt tính kháng vi sinh vật kiểm định được thực hiện dựa trên phương pháp pha loãng đa nồng độ của Andrews (2001) [76]. Đây là phương pháp thử hoạt tính kháng vi sinh vật kiểm định và nhằm đánh giá mức độ kháng khuẩn mạnh yếu của mẫu thử thông qua các giá trị thể hiện hoạt tính MIC (nồng độ ức chế tối thiểu).

- Mẫu ban đầu được pha loãng trong DMSO thành một dãy 08 nồng độ thích hợp theo yêu cầu và mục đích thử. Nồng độ thử cao nhất là 256 $\mu\text{g/ml}$, tiếp theo là 128 $\mu\text{g/ml}$, 64 μg , 32 $\mu\text{g/ml}$, 16 $\mu\text{g/ml}$ 8 μg /ml, 4 μg , 2 μg /ml với số thí nghiệm lặp lại $N = 3$.

- Chuẩn bị dung dịch vi khuẩn hoặc nấm với nồng độ 5.10^5 CFU/ml khi tiến hành thử: Lấy 5,12 μl dung dịch mẫu thử có nồng độ 10 mg/ml vào hàng đầu tiên có chứa 100 μl môi trường LB rồi pha loãng nối tiếp giảm $\frac{1}{2}$ nồng độ vào các hàng có chứa 50 μl cho đến khi đạt được nồng độ là 2 $\mu\text{g/ml}$, thêm 50 μl dung dịch vi khuẩn và nấm ở nồng độ 5.10^{-5} CFU/ml, ủ ở 37°C. Sau 24h, đọc giá trị MIC bằng mắt thường. Giá trị MIC được xác định tại giếng có nồng độ chất thử thấp nhất gây ức chế hoàn toàn sự phát triển của vi sinh vật sau 24 giờ nuôi cấy và được xác định chính xác dựa trên số liệu đo độ đục tế bào bằng máy quang phổ Bioteck và phần mềm GraphPad Prism data. Chất đối chứng là kháng sinh streptomycin cho các chủng vi khuẩn và cycloheximide cho nấm được chuẩn bị ở dải nồng độ tương tự mẫu thử nghiệm (2 - 256 $\mu\text{g/mL}$).

Các chủng vi sinh vật kiểm định được cung cấp bởi ATCC bao gồm 3 chủng vi khuẩn Gram âm: *Escherichia coli* ATCC25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC27853, *Salmonella enterica* ATCC13076; 3 chủng vi khuẩn Gram dương: *Enterococcus faecalis* ATCC29212, *Staphylococcus aureus* ATCC25923, *Bacillus cereus* ATCC 14579 và 1 chủng nấm *Candida albicans* ATCC10231.

CHƯƠNG 3 THỰC NGHIỆM

3.1. Nuôi cấy nhân nuôi sinh khối lượng lớn 3 chủng xạ khuẩn

Các chủng xạ khuẩn *Actinoalloteichus cyanogriseus* G631, *Streptomyces* sp. G666 và *Streptomyces* sp. 246 đã được lựa chọn sẽ được nhân nuôi sinh khối lượng lớn, địa điểm thực hiện nuôi cấy tại phòng Công nghệ sinh học – Viện Hóa sinh biển - Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam.

3.1.1. Nhân nuôi sinh khối dạng rắn quy mô 50 kg của chủng *Actinoalloteichus cyanogriseus* G631

Bước 1: Chuẩn bị môi trường

+/ Chuẩn bị môi trường A1 cho hoạt hóa, nhân giống: pha khoảng 1700 ml môi trường A1

- Cân, đong chính xác từng thành phần môi trường

- Hòa tan các chất vào nước, đun và khuấy cho tan, kiểm tra thể tích và pH

- Rót môi trường vào: 1 bình tam giác loại 250ml có chứa 150ml môi trường, bổ sung 1,8g agar để đổ đĩa petri cho quá trình kiểm tra sự thuần khiết chủng; 2 bình tam giác loại 50ml có chứa 15ml môi trường để dành cho nhân giống cấp 1; 3 bình tam giác loại 1000ml, mỗi bình có chứa 500ml môi trường để nhân giống cấp 2. Các bình môi trường sau khi chuẩn được khử trùng ở nồi hấp áp lực hơi nước (0,8 – 1,0 atm) ở 121°C trong 30 phút.

+/ Chuẩn bị môi trường (A1+Bfe+C) đặc: chuẩn bị 50 lít để lên men lượng lớn trong các đĩa petri có đường kính 15 cm.

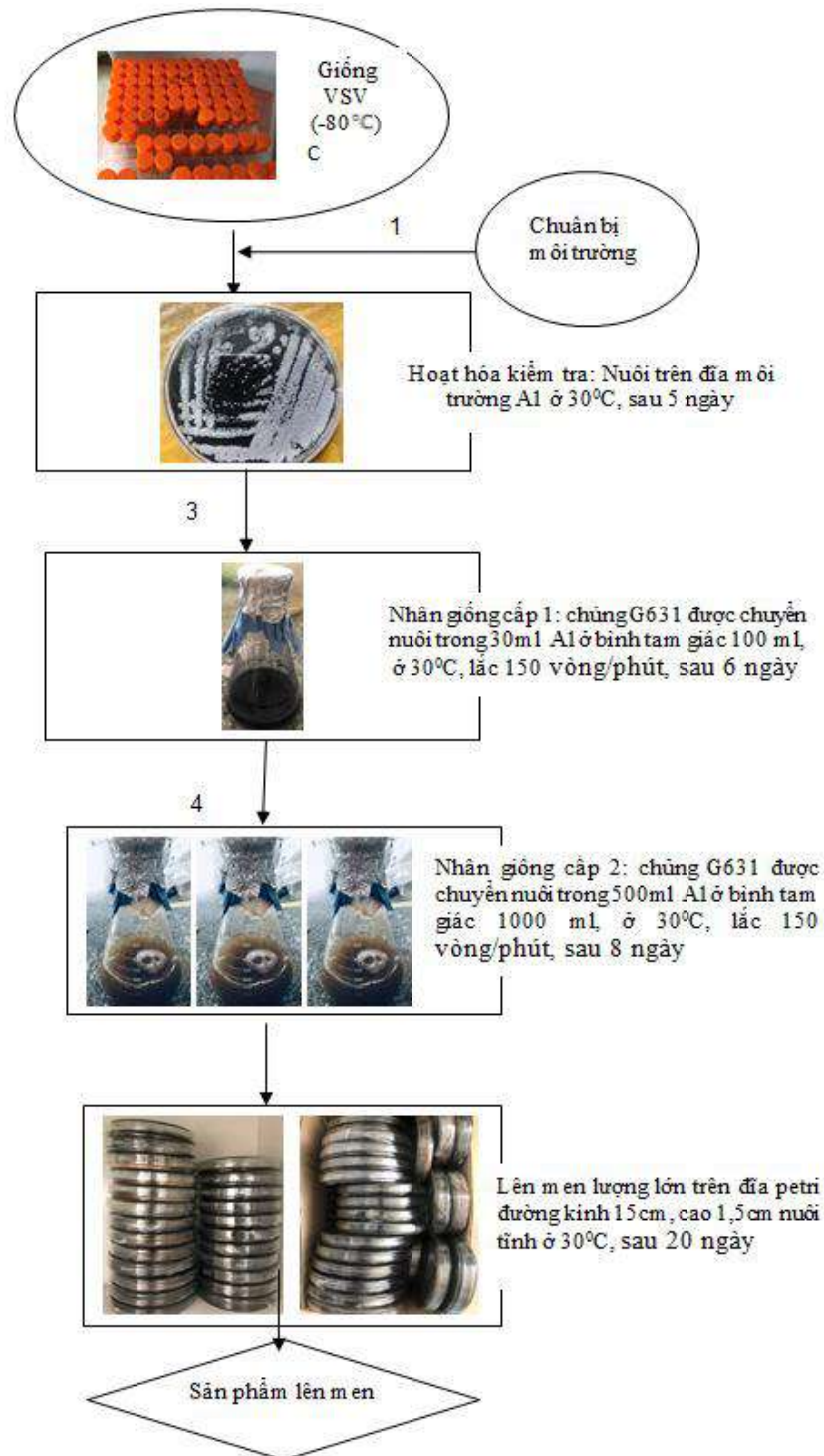
Tiến hành tương tự, cân đong chính xác các thành phần, hòa tan, chỉnh pH khoảng 7, và rót môi trường vào dụng cụ (chai tam giác, chai pyrex). Sau đó khử trùng ở 121°C trong nồi hấp áp lực hơi nước (0,8 – 1,0 atm/30 phút). Môi trường đặc sau khử trùng để nguội đến khoảng 50°C, đổ ra đĩa Petri vô trùng, để nguội.

Bước 2: Hoạt hóa và kiểm tra sự thuần khiết của chủng giống

Chủng giống sau khi được lấy từ tủ lạnh âm sâu được hoạt hóa và kiểm tra sự thuần khiết của chủng nghiên cứu trong quá trình bảo.

- Nung đỏ đầu que cấy vòng, làm nguội trong không khí khoảng 15s. Cho vòng que cấy chấm vào dịch nuôi có chứa vi nấm đã lưu giữ trong tủ - 80°C.

- Tay trái hé mở nắp đĩa thạch petri, đặt đầu que cấy vào 1 góc đĩa petri, chấm nhẹ trên bề mặt thạch. Đậy nắp hộp, dán paraffin xung quanh nắp. Khử trùng que cấy trước khi cắm vào giá.



Hình 3.6: Sơ đồ nhân nuôi sinh khối dạng rắn 50 kg chủng xạ khuẩn *Actinoalloteichus cyanogriseus* G631

- Các thao tác phải nhanh tay và làm trên ngọn lửa đèn cồn đặt trong tủ cấy, đảm bảo vô trùng.

- Đĩa cấy được nuôi ở tủ ấm ở 30°C, sau 5 ngày kiểm tra độ thuần khiết của các khuẩn lạc: Khuẩn lạc có màu sắc, bề mặt, hình dạng đặc trưng giống như khuẩn lạc chủng mẫu, không có các màu sắc và sắc tố lạ.

Bước 3: Nhân giống cấp 1

Dùng que cấy lấy một số khuẩn lạc riêng rẽ cấy vào bình tam giác 100 ml chứa 30 ml môi trường A1 (cần nuôi 2 bình). Nuôi lắc ở 30°C (150 vòng/phút) trong 6 ngày.

Bước 4: Nhân giống cấp 2

Chuyển 15 ml giống cấp 1 vào mỗi bình tam giác 1000 ml chứa 500 ml môi trường mới A1 (với tỉ lệ bổ sung giống khoảng 3%). Cần 3 bình tam giác nuôi cấy để đạt 1500 ml giống cho lên men lượng lớn. Chế độ nuôi như bước 4.

Bước 5: Nuôi cấy nhân sinh khối

Môi trường đặc A1+Bfe+C được cân chính xác các thành phần, hòa tan và khử trùng ở 121°C trong 30 phút (như đã nêu ở bước 1). Môi trường đặc sau khử trùng để nguội đến khoảng 50°C, đổ ra đĩa Petri vô trùng (mỗi đĩa đổ khoảng 200ml môi trường thạch x 250 đĩa) và để nguội.

Dịch nhân giống cấp 2 được để lắng và loại bớt dịch nuôi thu tế bào. Đợi bề mặt đĩa môi trường khô, tiến hành hút 0,5 ml dịch tế bào cấy chải lên bề mặt đĩa thạch. Các đĩa nuôi cấy sau đó được quấn paraffin và nuôi tĩnh trong tủ ấm ở nhiệt độ 30°C trong 20 ngày.

Bước 6: Thu sản phẩm nuôi cấy nhân sinh khối.

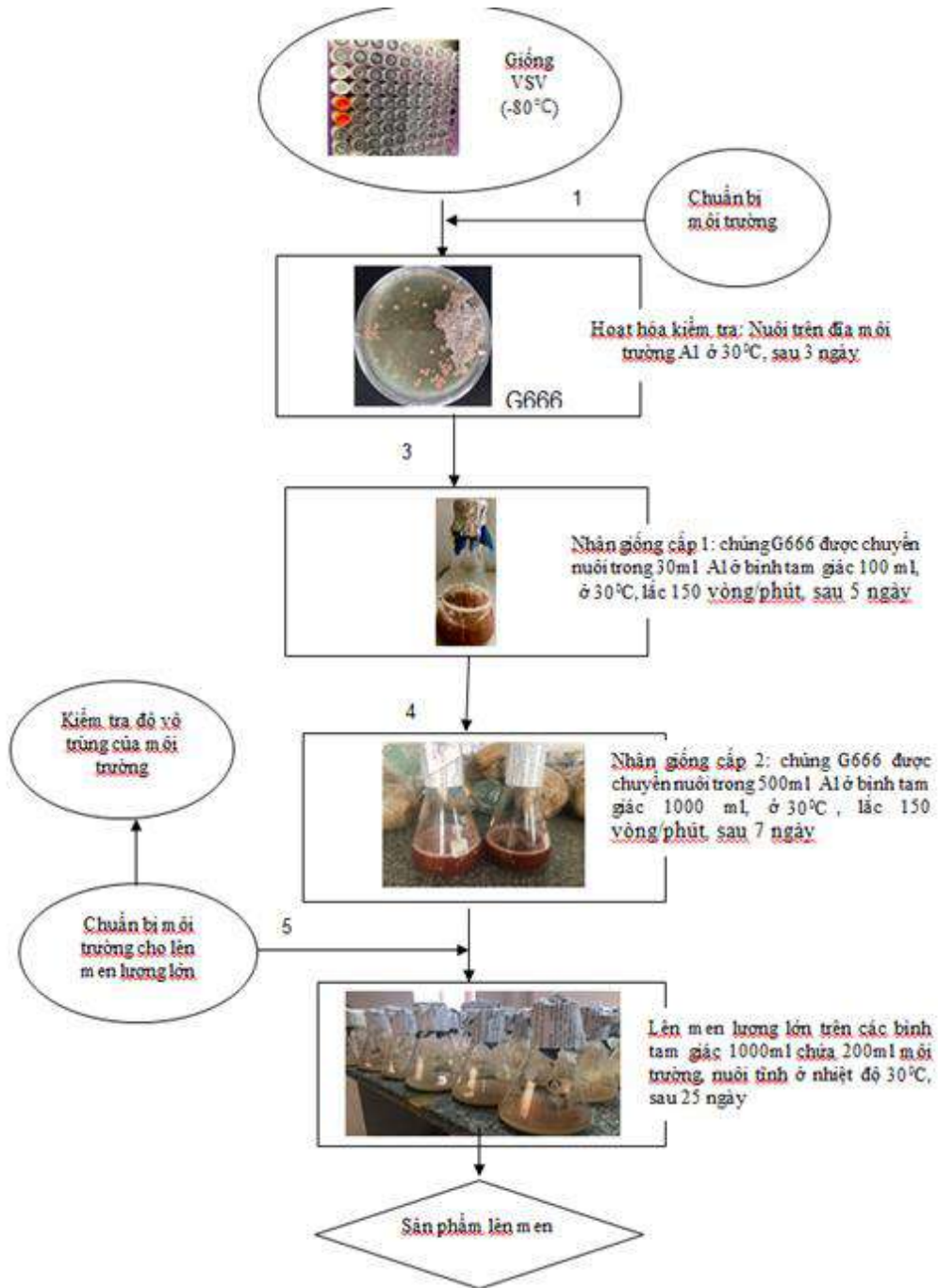
Từ các bước đã thực hiện, đã nuôi sinh khối được 50 kg chủng *Actinoalloteichus cyanogriseus* G631 ở nồng độ muối 3%, nhiệt độ 30°C, pH 7,2 thời gian nuôi cấy là 20 ngày. Sản phẩm lên men thu được, được chuyển đến công đoạn tiếp theo phục vụ cho quá trình tách chiết các chất có hoạt tính sinh học (Hình 3.6).

3.1.2. Nhân nuôi sinh khối dạng rắn quy mô 50kg của chủng xạ khuẩn *Streptomyces* sp. G666

Bước 1: Chuẩn bị môi trường; hoạt hóa giống và kiểm tra sự thuần khiết của chủng G666 như phần phương pháp đã nêu.

Bước 2: Nhân giống cấp 1

Dùng que cấy lấy một số khuẩn lạc riêng rẽ cấy vào bình tam giác 100 ml chứa 30 ml môi trường A1 (cần nuôi 2 bình). Nuôi lắc ở 30°C (150 vòng/phút) trong 5 ngày.



Hình 3.7: Sơ đồ nhân nuôi sinh khối dạng rắn 50 Kg chủng *Streptomyces* sp. G666

Bước 3: Nhân giống cấp 2

Chuyển 15 ml giống cấp 1 vào mỗi bình tam giác 1000 ml chứa 500 ml môi trường mới A1 (với tỉ lệ bổ sung giống khoảng 3%). Cần 3 bình tam giác nuôi cấy để đạt 1500 ml giống cho lên men lượng lớn. Chế độ nuôi như bước 2.

Bước 4: Chuẩn bị lên men lượng lớn

- Cân các thành phần môi trường A1⁺ với tỷ lệ như sau: Tinh bột tan (500g); Cao nấm men (200g); Pepton (100g); CaCO₃ (50g); FeSO₄: 8mg/ml (250ml); KBr 20mg/ml (250ml); Muối biển nhân tạo (1500g), agar (750g).

- Hòa tan các thành phần môi trường rồi chỉnh pH 7,2; sau đó đổ 200ml môi trường các bình tam giác 1000ml (chuẩn bị 250 bình). Đặt chế độ khử trùng trong điều kiện 121⁰C thời gian 30 phút ở 1 atm. Môi trường đặc sau khử trùng được để trên mặt phẳng tránh làm nghiêng bề mặt thạch.

Bước 5: Tiến hành nuôi cấy nhân sinh khối

Dịch nhân giống cấp 2 được để lắng và loại bớt dịch nuôi thu tế bào. Đợi bề mặt thạch môi trường khô, tiến hành hút 2ml dịch tế bào lắng lên bề mặt thạch. Các bình sau đó được nuôi tĩnh trong tủ ẩm ở nhiệt độ 30⁰C trong 25 ngày.

Bước 6: Thu sản phẩm nuôi cấy nhân sinh khối.

Từ các bước đã thực hiện đã nuôi cấy nhân sinh khối được 50kg chủng *Streptomyces sp. G666* ở nồng độ muối 3%, nhiệt độ 30⁰C, pH 7,2 thời gian nuôi cấy là 25 ngày. Sản phẩm lên men thu được, được chuyển đến công đoạn tiếp theo phục vụ cho quá trình tách chiết các chất có hoạt tính sinh học (**Hình 3.7**).

3.1.3. Nhân nuôi sinh khối dạng rắn quy mô 50 kg chủng *Streptomyces sp. G246*

Bước 1: Chuẩn bị môi trường; hoạt hóa giống và kiểm tra sự thuần khiết của chủng G246 như phần phương pháp đã nêu.

Bước 2: Nhân giống cấp 1

Dùng que cấy lấy một số khuẩn lạc riêng rẽ cấy vào bình tam giác 100 ml chứa 30 ml môi trường A1 (cần nuôi 2 bình). Nuôi lắc ở 28⁰C (150 vòng/phút) trong 5 ngày.

Bước 3: Nhân giống cấp 2

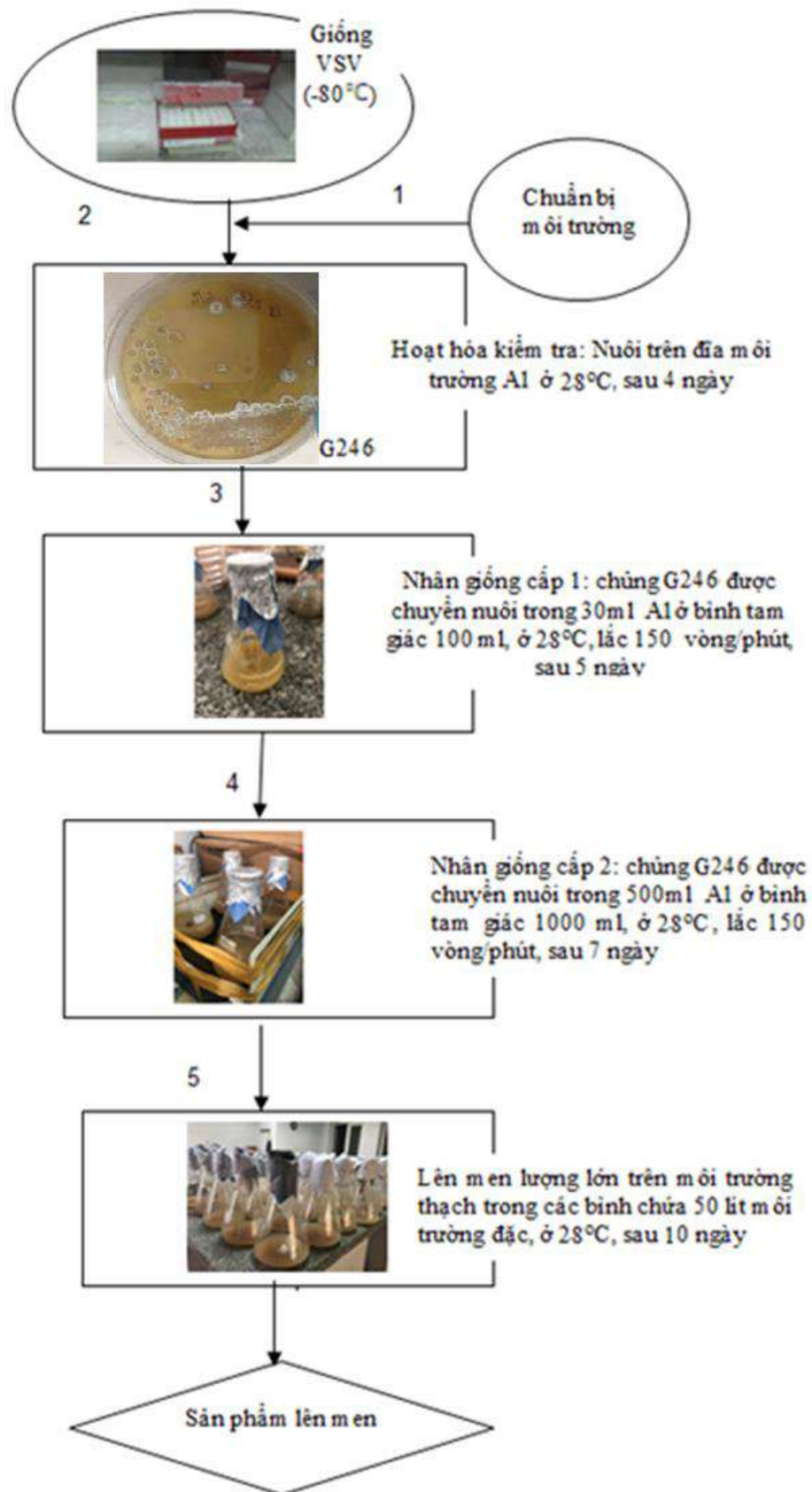
Chuyển 15 ml giống cấp 1 vào mỗi bình tam giác 1000 ml chứa 500 ml môi trường mới A1 (với tỉ lệ bổ sung giống khoảng 3%). Cần 3 bình tam giác nuôi cấy để đạt 1500 ml giống cho lên men lượng lớn. Chế độ nuôi như bước 2.

Bước 4: Chuẩn bị lên men lượng lớn

- Cân các thành phần môi trường A1⁺ với tỷ lệ như sau: Tinh bột tan (500g); Cao nấm men (200g); Pepton (100g); CaCO₃ (50g); FeSO₄: 8mg/ml (250ml); KBr 20mg/ml (250ml); Muối biển nhân tạo (1500g), agar (750g).

- Hòa tan các thành phần môi trường rồi chỉnh pH 7,0; sau đó đổ 200 ml môi trường các bình tam giác 1000 ml (cần 250 bình). Đặt chế độ khử trùng trong điều kiện 121⁰C

thời gian 30 phút ở 1 atm. Môi trường đặc sau khử trùng được để trên mặt phẳng tránh làm nghiêng bề mặt thạch.



Hình 3.8: Sơ đồ nhân nuôi sinh khối dạng rắn chủng *Streptomyces* sp. G246

Bước 5: Tiến hành lên men

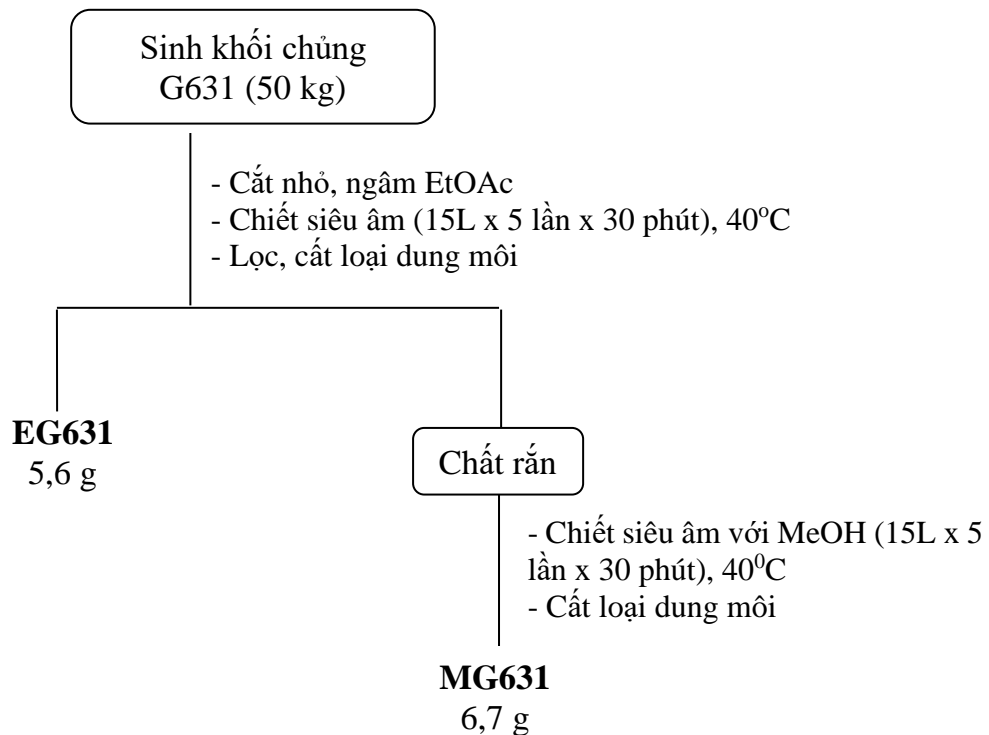
Dịch nhân giống cấp 2 được để lắng và loại bớt dịch nuôi thu tế bào. Đợi bề mặt thạch môi trường khô, tiến hành hút 5ml dịch tế bào lắng lên bề mặt thạch. Các bình sau đó được nuôi tĩnh trong tủ ấm ở nhiệt độ 28°C trong 10 ngày.

Bước 6: Thu sản phẩm lên men.

Từ các bước đã thực hiện, đã nhân nuôi sinh khối dạng rắn được 50 kg chủng *Streptomyces* sp. G246 ở nồng độ muối 3%, nhiệt độ 28°C, pH 7, thời gian nuôi cấy là 10 ngày. Sản phẩm lên men thu được, được chuyển đến công đoạn tiếp theo phục vụ cho quá trình tách chiết các hợp chất thứ cấp (**Hình 3.8**).

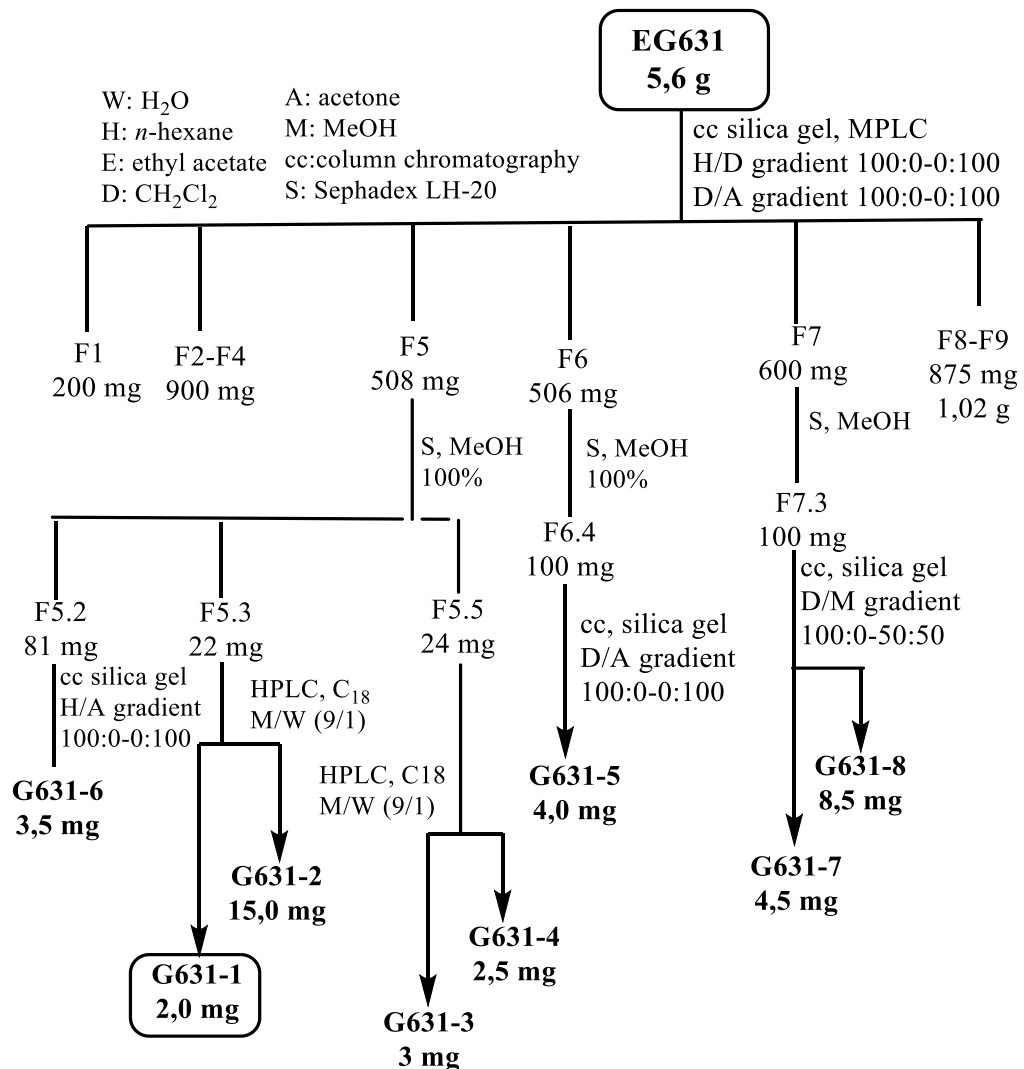
3.2. Phân lập các hợp chất từ chủng *Actinoalloteichus cyanogriseus* G631**3.2.1. Xử lý mẫu, tạo cặn chiết và phân lập chủng *Actinoalloteichus cyanogriseus* G631**

Sản phẩm nuôi cấy nhân sinh khối của chủng xạ khuẩn *Actinoalloteichus cyanogriseus* G631 (50 kg) được cắt nhỏ và chiết lần lượt bằng EtOAc và MeOH (15 L mỗi lần x 5 lần) trong điều kiện siêu âm 30 phút ở 40°C. Dịch chiết EtOAc và MeOH được lọc nhiều lần qua vải bông, giấy lọc để loại những phần không tan và muối vô cơ rồi cất quay trong điều kiện áp suất giảm để thu được cao chiết EtOAc (**EG631** 5,6 g) và cao chiết MeOH (**MG631** 6,7 g) (**Hình 3.9**).



Hình 3.9: Sơ đồ tạo cặn chiết chủng *Actinoalloteichus cyanogriseus* G631

Cặn chiết **EG631** (5,6 g) được hòa tan với một lượng tối thiểu dichloromethane sau đó tẩm với 6 g silica gel, cất quay cho đến khi bột tơi khô. Tiến hành phân tách hỗn hợp này bằng cột silica gel pha thường, rửa giải gradient bằng hệ dung môi với độ phân cực tăng dần *n*-hexane/dichloromethane (100:0→0:100) và dichloromethane/acetone (100:0-0:100) trên máy MPLC để thu được chín phân đoạn nhỏ (F1-F9). Phân đoạn F5 (508 mg) được xử lý bằng sắc ký cột Sephadex LH-20 với methanol làm dung môi rửa giải, thu được năm phân đoạn nhỏ, F5.1 - F5.5.



Hình 3.10: Sơ đồ phân lập cặn chiết EtOAc *Actinoalloteichus cyanogriseus* G631

Phân đoạn F5.2 (81 mg) được phân tách cột sắc ký silica gel với hệ dung môi *n*-hexane/acetone gradient (100:0→0:100), thu được hợp chất **G631-6** (3,5 mg). Phân đoạn F5.3 (22 mg) được tinh chế trên máy HPLC bằng cột C18 bán điều chế, rửa giải bằng hệ dung môi methanol/nước (9/1), tốc độ dòng 3 ml/phút thu được hợp chất **G631-1** (2 mg, $t_R = 32$ phút) và **G631-2** (15 mg, $t_R = 27$ phút). Phân đoạn F5.5 (24 mg) được phân tách trên máy HPLC với cột C18 YMC ODS bán điều chế, hệ dung

môi sử dụng là methanol/nước (9/1), tốc độ dòng 3 ml/phút) thu được hợp chất **G631-3** (3 mg, $t_R = 31$ phút) và hợp chất **G631-4** (2,5 mg, $t_R = 36$ phút).

Phân đoạn F6 (506 mg) được xử lý bằng sắc ký cột Sephadex LH-20 (100 % methanol) thu được 5 phân đoạn nhỏ từ F6.1 – F6.5; sau đó, phân đoạn F6.4 được đưa lên sắc ký cột silica gel với hệ dung môi dichloromethane/acetone gradient (100:0→0:100) thu được hợp chất **G631-5** (4 mg). Tinh chế phân đoạn F7 (600 mg) trên cột sephadex LH-20 với dung môi rửa giải methanol thu được 6 phân đoạn kí hiệu F7.1 – F7.6. Tinh chế phân đoạn F7.3 (100 g) trên cột silica gel với hệ dung môi dichloromethane/methanol gradient (100:0→50:50) thu được 4,5 mg hợp chất **G631-7** và 3,0 mg hợp chất **G631-8**. (Hình 3.10).

3.2.2. Hằng số vật lý và dữ liệu phổ của các hợp chất phân lập từ chủng *Actinoalloteichus cyanogriseus* G631.

3.2.2.1. Hợp chất isocyanogramide (**G631-1**) (hợp chất mới):

Chất dầu màu vàng.

Độ quay cực riêng: $[\alpha]_D^{26} = -59,3^0$ (c 0,2; CH_2Cl_2).

Công thức phân tử: $\text{C}_{24}\text{H}_{21}\text{N}_3\text{O}_4$

Khối lượng phân tử : 415

Phổ khối HR-ESI-MS m/z 438,1436 $[\text{M}+\text{Na}]^+$

Tính toán lý thuyết cho công thức $[\text{C}_{24}\text{H}_{21}\text{N}_3\text{NaO}_4]^+$ ($M = 438,1424$).

R_f : 0,5 ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{EtOAc}$, 6:4)

Số liệu phổ $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 600 MHz), $^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3 , 150 MHz): Bảng 4.4

3.2.2.2. Hợp chất cyanogramide (**G631-2**):

Chất dầu màu vàng.

Công thức phân tử: $\text{C}_{24}\text{H}_{21}\text{N}_3\text{O}_4$

Khối lượng phân tử : 415

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 600 MHz), $^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3 , 150 MHz): Xem Bảng 4.5

3.2.2.3. Hợp chất marinacarboline F (**G631-3**):

Chất bột màu vàng nhạt.

Công thức phân tử: $\text{C}_{23}\text{H}_{19}\text{N}_3\text{O}_3$

Khối lượng phân tử: 385

ESI-MS: m/z 386,1 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

Số liệu phổ $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 600 MHz), $^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3 , 150 MHz): Bảng 4.6

3.2.2.4. *Hợp chất marinacarboline H (G631-4):*

Chất bột màu vàng nhạt.

Công thức phân tử: $C_{23}H_{19}N_3O_3$

Khối lượng phân tử : 385

ESI-MS: m/z 386,1 $[M+H]^+$.

Số liệu phổ 1H -NMR ($CDCl_3$, 600 MHz), ^{13}C -NMR ($CDCl_3$, 150 MHz): Bảng 4.7

3.2.2.5. *Hợp chất caerulomycinonitril (G631-5):*

Chất rắn màu vàng.

Công thức phân tử: $C_{12}H_9N_3O$

Khối lượng phân tử: 211

Phổ khối HR-ESI-MS: m/z 212,0820 $[M+H]^+$ tương ứng với công thức $[C_{12}H_{10}N_3O]^+$.

Số liệu phổ 1H -NMR ($CDCl_3$, 600 MHz), ^{13}C -NMR ($CDCl_3$, 150 MHz): Bảng 4.8

3.2.2.6. *Hợp chất caerulomycinamide (G631-6):*

Chất rắn màu vàng.

Công thức phân tử: $C_{12}H_{11}N_3O_2$

Khối lượng phân tử: 229

ESI-MS: m/z 230,1 $[M+H]^+$.

Số liệu phổ 1H -NMR ($CDCl_3$, 600 MHz), ^{13}C -NMR ($CDCl_3$, 150 MHz): Bảng 4.9.

3.2.2.7. *Hợp chất 5'-deoxyuridine (G631-7):*

Chất rắn dạng vảy màu nâu.

Công thức phân tử: $C_9H_{12}N_2O_5$

Độ quay cực riêng $[\alpha]_D^{26} = +8,9^0$ (c 0,1; $CHCl_3$).

Điểm nóng chảy 185^0 - 186^0C

ESI-MS: m/z 229,1 $[M+H]^+$.

Số liệu phổ 1H -NMR (CD_3OD , 600 MHz), ^{13}C -NMR (CD_3OD , 150 MHz): Bảng 4.10

3.2.2.8. *Hợp chất uracil (G631-8):*

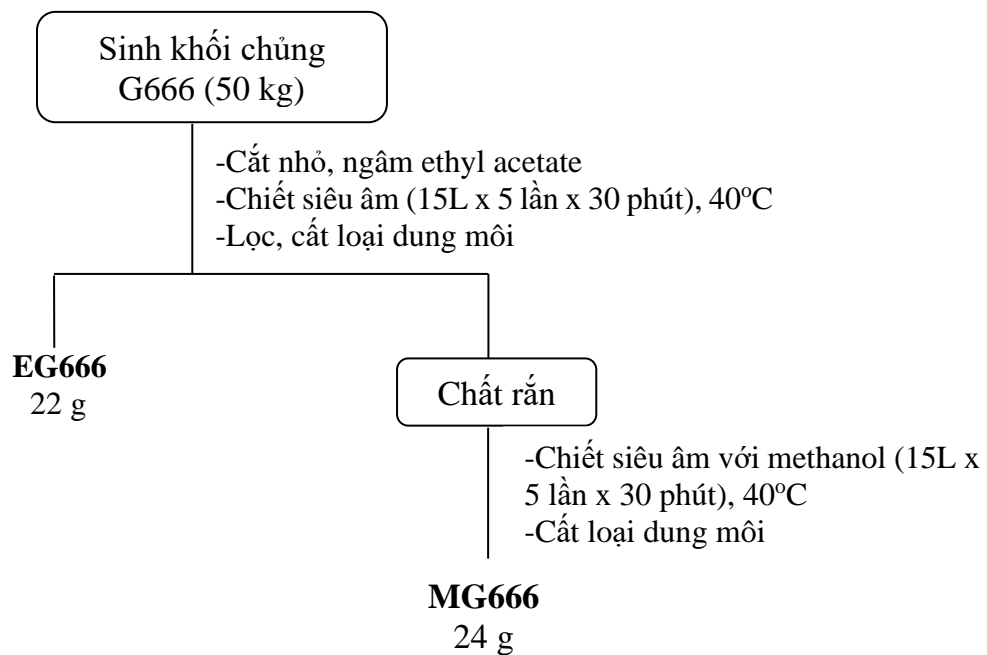
Chất rắn màu trắng.

R_f : 0,5 (CH_2Cl_2 /EtOAc, 5:5)

Số liệu phổ 1H -NMR (DMSO, 500 MHz), ^{13}C -NMR (DMSO, 125 MHz): Bảng 4.11

V3.3. Phân lập các hợp chất thứ cấp từ chủng *Streptomyces* sp. G666

3.3.1. Xử lý mẫu, tạo cặn chiết và phân lập chủng *Streptomyces* sp. G666



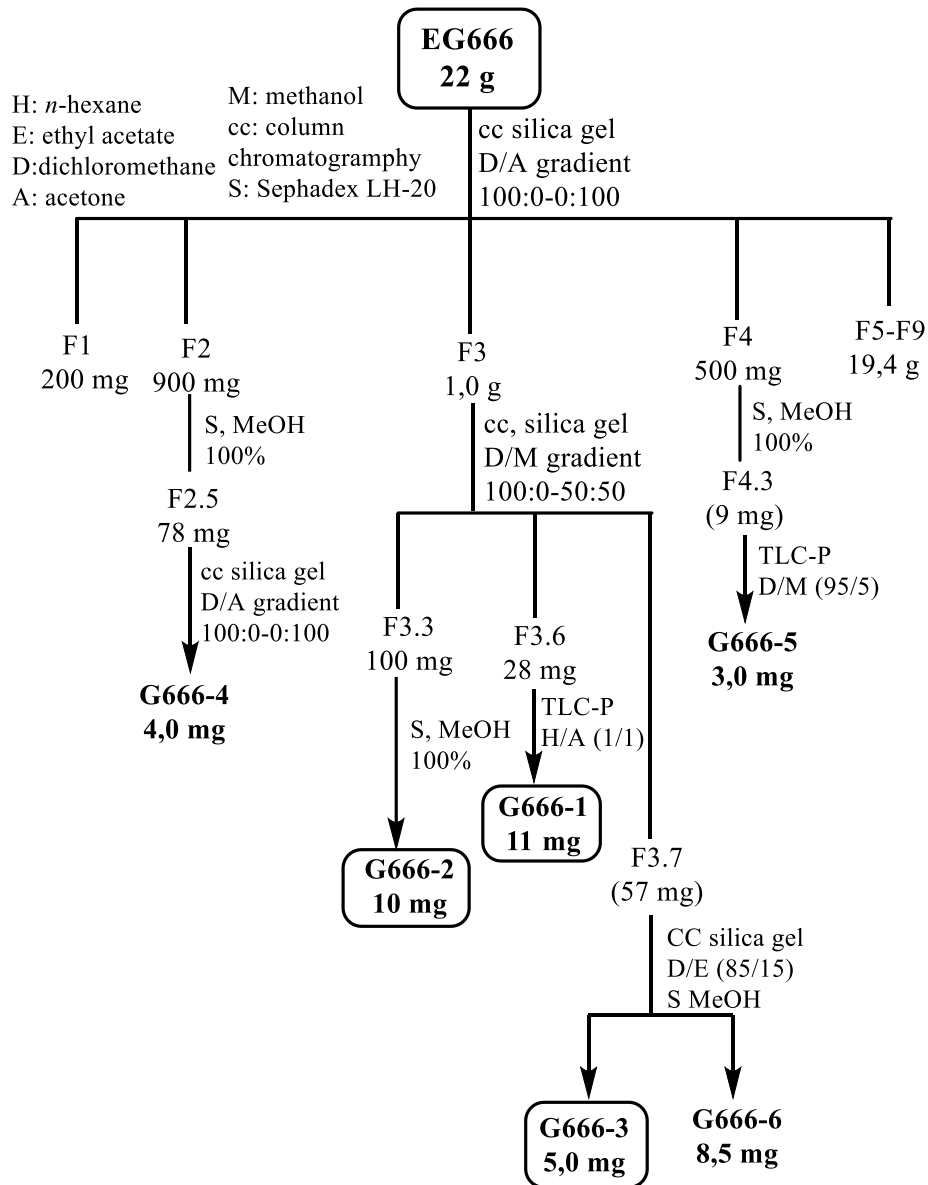
Hình 3.11: Sơ đồ tạo cặn chiết chủng *Streptomyces* sp. G666

Chủng xạ khuẩn biến *Streptomyces* sp. G666 được nuôi cấy trên môi trường rắn (50 kg) được cắt nhỏ rồi chiết bằng siêu âm lần lượt với các dung môi ethyl acetate; methanol ở 40 °C, mỗi loại dung môi chiết 5 lần với thời gian 30 phút cho 1 lần chiết. Lọc loại bỏ cặn tế bào, cất loại dung môi thu được 22 g cặn chiết ethyl acetate (**EG666**) và 24 g cặn chiết methanol (**MG666**) (**Hình 3.11**).

Cặn chiết **EG666** (22 g) được hòa tan với một lượng tối thiểu dichloromethane sau đó tẩm với 22 g silica gel, cất quay cho đến khi bột tơi khô. Tiến hành phân tách hỗn hợp này bằng cột silica gel pha thường, rửa giải gradient bằng hệ dung môi với độ phân cực tăng dần dichloromethane/acetone gradient (100:0→0:100) thu được 9 phân đoạn kí hiệu từ F1-F9. Phân đoạn F2 (900 mg) được tinh chế trên trên cột Sephadex LH-20 với dung môi methanol thu được 10 phân đoạn nhỏ kí hiệu từ F2.1-F2.10. Phân đoạn F2.5 (200 mg) được tinh chế bằng cột silica gel với hệ dung môi dichloromethane/acetone gradient (100:0→0:100) thu được hợp chất **G666-4** (4,0 mg).

Phân đoạn F3 (1,0 g) được tinh chế trên cột silica gel pha thường với hệ dung môi dichloromethane/methanol gradient (100:0→50:50) thu được 9 phân đoạn nhỏ kí hiệu từ F3.1 đến F3.9. Tinh chế phân đoạn F3.3 (100 mg) trên cột Sephadex LH-20 với dung môi rửa giải là methanol thu được hợp chất **G666-2** (10 mg). Hợp chất

G666-1 (10 mg) thu được sau khi tinh chế phân đoạn F3.6 (28 mg) bởi sắc kí bản mỏng điều chế với hệ dung môi *n*-hexan/acetone (1/1). Phân đoạn F3,7 (57 mg) được chạy trên cột silica gel, rửa giải với hệ dung môi dichloromethane/ethyl acetate (85/15) thu được hợp chất **G666-3** (5 mg) và hợp chất **G666-6** (8,5 mg).

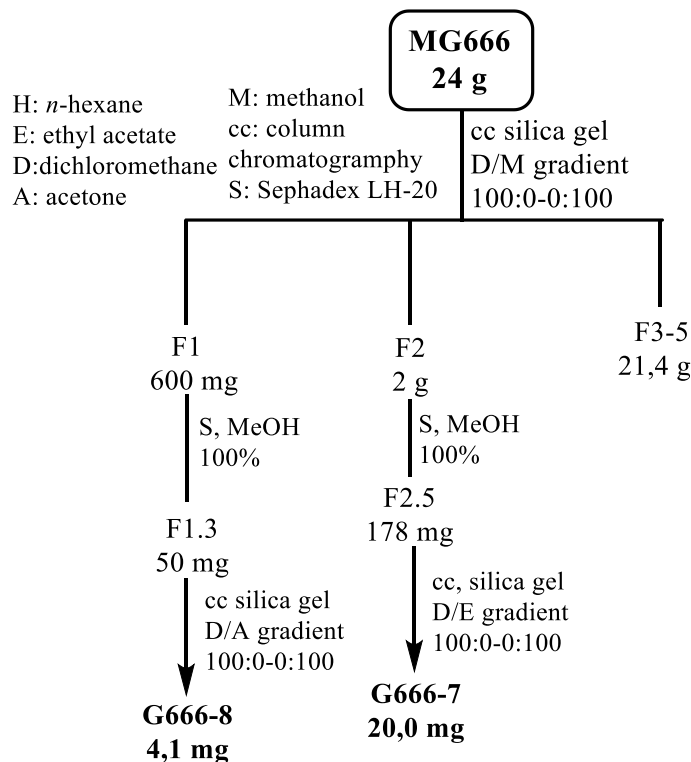


Hình 3.12: Sơ đồ phân lập cận chiết **EG666** chủng *Streptomyces* sp. G666

Phân đoạn F4 (0,5 g) được tinh chế trên cột Sephadex LH-20 với dung môi methanol thu được 5 phân đoạn nhỏ ký hiệu từ F4.1-F4.5. Phân đoạn F4,3 (9,0 mg) được tinh chế bởi sắc kí bản mỏng điều chế với hệ dung môi dichloromethane/methanol (95:5) thu được 3,0 mg hợp chất **G666-5** (Hình 3.12).

Cận chiết **MG666** (24 g) được hòa tan với một lượng tối thiểu methanol sau đó tẩm với 24 g silica gel, cất quay cho đến khi bột tơi khô. Tiến hành phân tách hỗn hợp này bằng cột silica gel pha thường, rửa giải gradient bằng hệ dung môi với độ

phân cực tăng dần dichloromethane/methanol gradient (100:0→0:100) thu được 5 phân đoạn kí hiệu từ F1-F5. Phân đoạn F1 (600 mg) được tinh chế trên trên cột Sephadex LH-20 với dung môi methanol thu được 5 phân đoạn nhỏ kí hiệu từ F1.1-F1.5. Phân đoạn F1.3 (50 mg) được tinh chế bằng cột silica gel với hệ dung môi dichloromethane/acetone gradient (100:0→0:100) thu được hợp chất **G666-8** (4,1 mg). Phân đoạn nhỏ F2 (2 g) được tinh chế trên cột Sephadex LH-20 với dung môi methanol thu được 8 phân đoạn nhỏ ký hiệu F2.1 đến F2.8, tinh chế phân đoạn F2.5 (178 mg) trên cột silica gel với hệ dung môi dichloromethane/ethyl acetate gradient thu được 20,0 mg hợp chất **G666-7**.



Hình 3.13: Sơ đồ phân lập cận chiết **MG666** chủng *Streptomyces* sp. G666

3.3.2. Hằng số vật lý và dữ liệu phổ của các hợp chất phân lập từ chủng *Streptomyces* sp. G666.

3.3.2.1. Hợp chất streptomine A (**G666-1**) (hợp chất mới):

Chất rắn hình kim màu trắng.

Điểm nóng chảy: 212-213°C.

Độ quay cực riêng: $[\alpha]_D^{26} = -38,2^\circ$ (*c* 0,6; CHCl₃).

Công thức phân tử: C₁₈H₂₉NO₇

Khối lượng phân tử: 371

Phổ khối HR-ESI-MS *m/z* 372,2026 [M+H]⁺

Tính toán lý thuyết cho công thức $[C_{18}H_{30}NO_7]^+$ (372,2022).

R_f: 0,5 (CH₂Cl₂/MeOH, 9:1).

IR (KBr): 3429, 2956, 1649, 1375, 1242, 1129, 1080, 957, 832 cm⁻¹.

¹H-NMR (CDCl₃, 500 MHz), ¹³C-NMR (CDCl₃, 125 MHz): Xem **Bảng 4.12**

3.3.2.1. *Hợp chất streptomine B (G666-2) (hợp chất mới):*

Chất rắn hình kim màu trắng.

Điểm nóng chảy: 172–173°C.

Độ quay cực riêng: $[\alpha]_D^{26} = -50,1^\circ$ (c 0,25; CHCl₃).

Công thức phân tử: C₂₃H₃₀ClNO₇

Khối lượng phân tử: 467

Phổ khối HR-ESI-MS *m/z* 468,1801; 470,1776 [M+H]⁺

Tính toán lý thuyết cho công thức $[C_{23}H_{31}^{35}ClNO_7]^+$ (468,1789); $[C_{23}H_{31}^{37}ClNO_7]^+$ (470,1760).

R_f: 0,46 (CH₂Cl₂/MeOH, 9:1).

IR (KBr): 3453, 2964, 1645, 1287, 1119, 1044, 970, 832, 751 cm⁻¹.

Số liệu phổ ¹H-NMR (CDCl₃, 500 MHz), ¹³C-NMR (CDCl₃, 125 MHz): **Bảng 4.13**

3.3.2.3. *Hợp chất streptomine C (G666-3) (hợp chất mới):*

Chất rắn hình kim màu trắng.

Điểm nóng chảy: 122–123°C.

Độ quay cực riêng: $[\alpha]_D^{26} = +65,9^\circ$ (c 0,5; CHCl₃).

Công thức phân tử: C₁₆H₂₅NO₆

Khối lượng phân tử: 327

Phổ khối HR-ESI-MS: *m/z* 328,1763 [M+H]⁺

Tính toán lý thuyết cho công thức $[C_{16}H_{26}NO_6]^+$ (328,1763).

R_f: 0,55 (CH₂Cl₂/MeOH, 9:1).

IR (KBr): 3444, 2920, 2852, 1643, 1416, 1378, 1270, 1128, 1072, 1221 cm⁻¹.

Số liệu phổ ¹H-NMR (CDCl₃, 500 MHz), ¹³C-NMR (CDCl₃, 125 MHz): **Bảng 4.14**

3.3.2.4. *Norharman (G666-4):*

Chất rắn màu trắng.

Điểm nóng chảy: 198–199°C.

Công thức phân tử: C₁₁H₈N₂

Khối lượng phân tử: 168

ESI-MS: m/z 169,1 [M+H]⁺.

Số liệu phổ ¹H-NMR (CD₃OD, 500 MHz), ¹³C-NMR (CDCl₃, 125 MHz): **Bảng 4.15**

3.3.2.5. Hợp chất 3-acetyl-4-hydroxycinnoline (**G666-5**):

Chất rắn màu vàng.

Công thức phân tử: C₁₀H₈N₂O₂

Khối lượng phân tử: 188

HR-MS-ESI: m/z 189,0727 [M+H]⁺

Số liệu phổ ¹H-NMR (CDCl₃, 500 MHz), ¹³C-NMR (CDCl₃, 125 MHz): **Bảng 4.16**

3.3.2.6. Hợp chất xanthone (**G666-6**):

Chất rắn màu trắng.

Công thức phân tử: C₁₃H₈O₂

Khối lượng phân tử: 196

ESI-MS: m/z 197,1 [M+H]⁺.

Số liệu phổ ¹H-NMR (CDCl₃, 500 MHz), ¹³C-NMR (CDCl₃, 125 MHz): **Bảng 4.17**

3.3.2.7. Hợp chất cyclo-(Pro-Leu) (**G666-7**):

Chất rắn màu trắng.

Điểm nóng chảy: 147- 148°C

Độ quay cực riêng $[\alpha]_D^{25}$ -83,8° (c 0,18; MeOH)

Công thức phân tử: C₁₁H₁₈N₂O₂

Khối lượng phân tử: 210

ESI-MS: m/z 211,1 [M+H]⁺.

Số liệu phổ ¹H-NMR (CDCl₃, 500 MHz), ¹³C-NMR (CDCl₃, 125 MHz): **Bảng 4.18.**

3.3.2.8. Hợp chất cyclo (Pro-Gly) (**G666-8**):

Chất rắn màu trắng.

Điểm nóng chảy: 210-211°C.

Độ quay cực riêng: $[\alpha]_D^{25} = -142,5^\circ$ (c 0,40; MeOH).

Công thức phân tử: C₇H₁₀N₂O₂

Khối lượng phân tử: 154

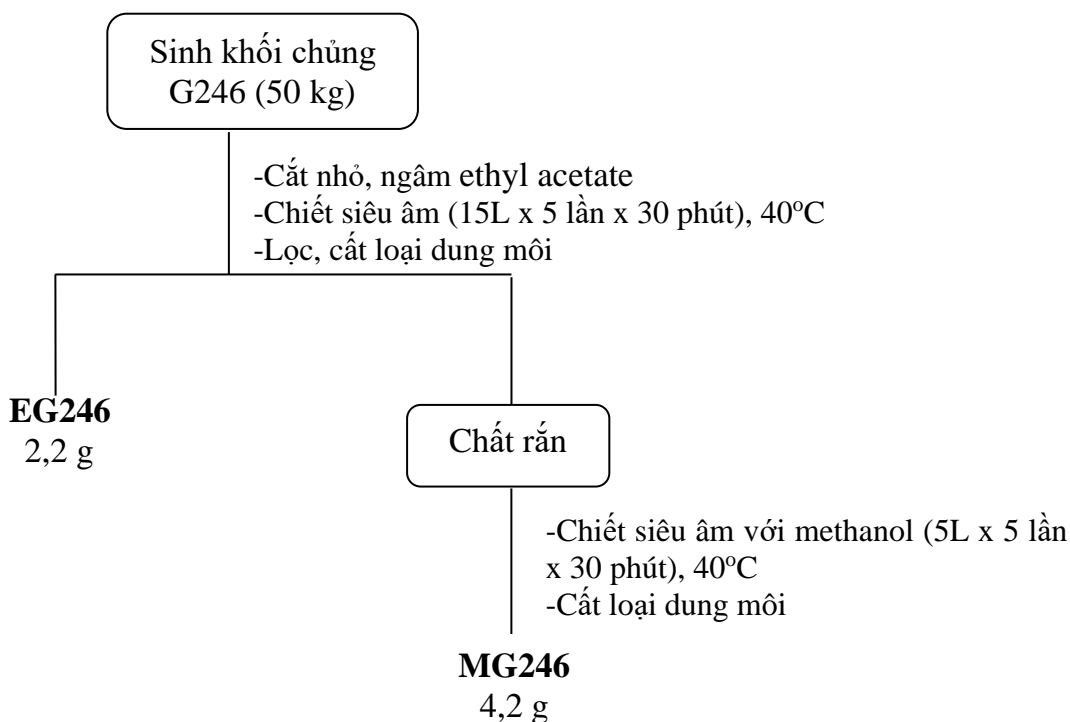
ESI-MS: m/z 155,1 [M+H]⁺ [C₇H₁₁N₂O₂]⁺.

Số liệu phổ ¹H-NMR (CD₃OD, 500 MHz), ¹³C-NMR (CD₃OD, 125 MHz): **Bảng 4.19.**

3.4. Phân lập các hợp chất từ chủng *Streptomyces* sp. G246

3.4.1. Xử lý mẫu, tạo cặn chiết từ chủng *Streptomyces* sp. G246

Sản phẩm nuôi cấy nhân sinh khối của chủng *Streptomyces* sp. G246 được cắt nhỏ và chiết siêu âm lần lượt bằng ethyl acetate và methanol (15L x 5 lần x 30 phút) ở 40°C, dịch chiết được lọc kỹ phần không tan và cất quay dưới áp suất giảm để thu được các cao chiết xuất tương ứng gồm ethyl acetate (**EG246** 2,2 g) và methanol (**MG246** 4,2 g). Khi kiểm tra bằng TLC không có sự khác biệt giữa **EG246** và **MG246** nên chúng tôi đã gộp thành một cao chiết duy nhất (**S246**) (**Hình 3.14**).

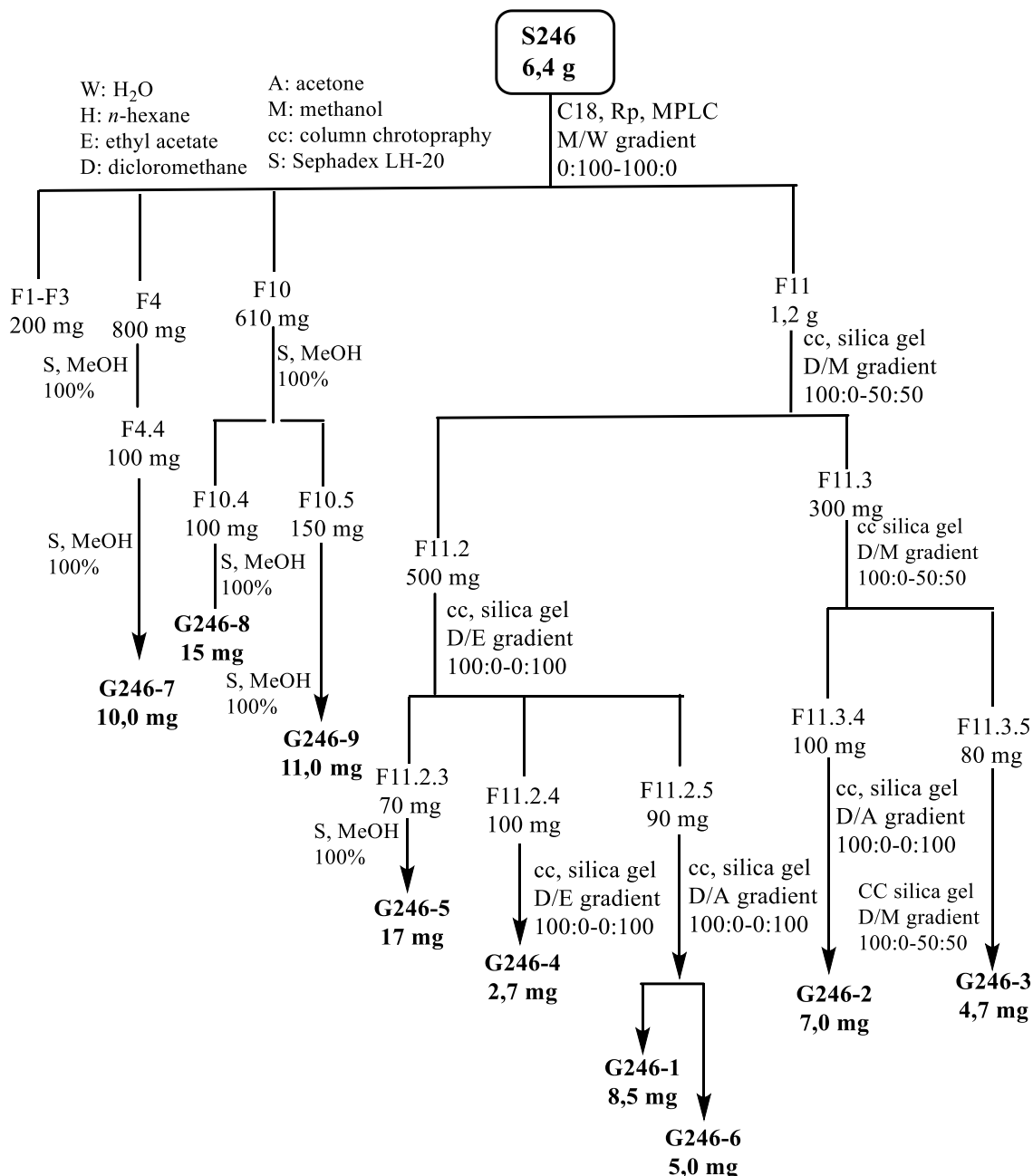


Hình 3.14: Sơ đồ tạo cặn chiết từ sinh khối lượng lớn chủng *Streptomyces* sp. G246

Cặn chiết **S246** (6,4 g) được đưa lên máy MPLC phân tách bằng sắc ký cột C18 pha đảo (RP), dung môi rửa giải methanol/nước gradient (0:100→100:0), thu được mười một phân đoạn (F1-F11). Phân đoạn F4 (800 mg) được đưa lên cột Sephadex LH-20 sử dụng dung môi rửa giải methanol thu được 6 phân đoạn nhỏ từ F4.1–F4.6. Tinh chế F4.4 (100 mg) bằng cột Sephadex LH-20, dung môi methanol để thu được hợp chất **S246-7** (10 mg). Tinh chế phân đoạn F10 (610 mg) trên cột Sephadex LH-20 sử dụng dung môi methanol để thu được sáu phân đoạn nhỏ từ F10.1 - F10.6. Phân đoạn F10.4 (100 mg) được phân tách trên cột Sephadex LH-20 với MeOH là pha động để phân lập được hợp chất **G246-8** (15 mg). Phân đoạn F10.5

(150 mg) được phân tách trên cột Sephadex LH-20, rửa giải bằng MeOH để thu được hợp chất **G246-9** (11 mg).

Phân đoạn F11 (1,2 g) được đưa lên cột silica gel sử dụng dung môi rửa giải dichloromethane/methanol gradient (100:0-50:50) để thu được bốn phân đoạn nhỏ từ F11.1 - F11.4. Phân đoạn F11.2 (500 mg) được tinh chế thêm bằng cột silica gel pha thường, rửa giải bằng dichloromethane/ethyl acetate gradient (100:0→0:100) thu được năm phân đoạn từ F11.2.1 - F11.2.5.



Hình 3.15: Sơ đồ phân lập từ cặn chiết chủng *Streptomyces* sp. G246

Phân đoạn F11.2.3 (70 mg) được phân tách tiếp trên cột Sephadex LH-20 bằng cách sử dụng dung môi rửa giải methanol để thu được hợp chất **G246-5** (17 mg). Phân

đoạn F11.2.4 (100 mg) được tinh chế trên cột silica gel pha thường, rửa giải bằng dung môi dichloromethane/ethyl acetate gradient (100:0→0:100) thu được hợp chất **G246-4** (2,7 mg). Phân đoạn F11.2.5 (90 mg) được đưa lên cột silica gel pha thường, rửa giải bằng dichloromethane/acetone gradien thu được hợp chất **G246-1** (8,5mg) và hợp chất **G246-6** (5 mg). Phân đoạn F11.3 (300 mg) được phân tách trên cột silica gel pha thường, rửa giải gradient bằng hệ dung môi dichloromethane/methanol (0-50% MeOH) thu được năm phân đoạn nhỏ từ F11.3.1.1 - F11.3.5). Tinh chế phân đoạn F11.3.4 (100 mg) bằng cột silica gel pha thường, rửa giải gradient bằng hệ dung môi dichloromethane/acetone thu được hợp chất **G246-2** (7,0 mg). Phân đoạn F11.3.5 (80 mg) được tách tiếp trên gel silica pha thường, rửa giải gradient bằng hệ dung môi dichloromethane/methanol để thu được hợp chất **G246-3** (4,7 mg) (**Hình 3.15**).

3.4.2. Hằng số vật lý và dữ kiện phổ của các hợp chất phân lập từ chủng

Streptomyces sp. **G246**

3.4.2.1. Hợp chất spirotryprostatin A (**G246-1**):

Chất rắn màu trắng.

Công thức phân tử: $C_{22}H_{25}N_3O_4$

Khối lượng phân tử: 395

Độ quay cực riêng: $[\alpha]_D^{29} = -29,5^\circ$ (c 0,1 MeOH).

ESI-MS: m/z 396,1 $[M+H]^+$.

Số liệu phổ 1H -NMR (500 MHz, CD_3OD), ^{13}C -NMR (125 MHz, CD_3OD): **Bảng 4.20**

3.4.2.2. Hợp chất cyclo-(Pro-Met) (**G246-2**):

Chất rắn màu trắng.

Công thức phân tử: $C_{10}H_{16}O_2N_2S$

Khối lượng phân tử: 228

ESI-MS: m/z 229 $[M+H]^+$.

Số liệu phổ 1H -NMR (500 MHz, $CDCl_3$), ^{13}C -NMR (125 MHz, $CDCl_3$): **Bảng 4.21**

3.4.2.3. Hợp chất phenol A acid (**G246-3**):

Chất rắn màu trắng.

Độ quay cực riêng: $[\alpha]_D^{29} = -45,5^\circ$ (c 0,1 MeOH).

Công thức phân tử: $C_{12}H_{16}O_5$

Khối lượng phân tử: 240

HR-ESI-MS: m/z 263,0883 $[M+Na]^+$

Tính toán lý thuyết cho công thức $[C_{12}H_{16}NaO_5]^+$ (263,0890).

Số liệu phổ 1H -NMR (500 MHz, CD_3OD), ^{13}C -NMR (125 MHz, CD_3OD): **Bảng 4.22**

3.4.2.4. *Hợp chất 3,4-dihydroxy-6,7-dimethyl-quinoline-2-carboxylic (G246-4):*

Chất rắn màu vàng.

Công thức phân tử: $C_{16}H_{11}NO_4$

Khối lượng phân tử: 233

Điểm nóng chảy: 153–154°C.

ESI-MS: m/z 234,1 $[M+H]^+$.

Số liệu phổ 1H -NMR (500 MHz, DMSO-*d*6), ^{13}C -NMR: **Bảng 4.23**

3.4.2.5. *Hợp chất cyclo-(Pro-Gly) (G246-5):*

Chất rắn màu trắng.

Điểm nóng chảy: 210–211°C

Công thức phân tử: $C_7H_{10}N_2O_2$

Khối lượng phân tử: 154

Số liệu phổ 1H -NMR (500 MHz, CD_3OD).

R_f: 0,5 $CH_2Cl_2/MeOH$ (9/1), so sánh TLC với **G666-8**

3.4.2.6. *Hợp chất xanthone (G246-6):*

Chất rắn màu trắng.

Công thức phân tử: $C_{13}H_8O_2$

Khối lượng phân tử: 196

Số liệu phổ 1H -NMR (500 MHz, $CDCl_3$):

R_f: 0,4 $CH_2Cl_2/EtOAc$ (8/2) so sánh TLC với **G666-6**

3.4.2.7. *Hợp chất guanosine (G246-7):*

Chất rắn màu trắng.

Công thức phân tử: $C_{10}H_{13}N_5O_5$

Khối lượng phân tử: 283

ESI-MS: m/z 284,1 $[M+H]^+$.

Số liệu phổ 1H -NMR (500 MHz, DMSO), ^{13}C -NMR (DMSO, 125MHz): **Bảng 4.24**

3.4.2.8. *Hợp chất adenosine (G246-8):*

Chất rắn màu trắng.

Công thức phân tử: $C_{10}H_{13}N_5O_4$

Khối lượng phân tử: 267

R_f: 0,5 CH₂Cl₂/MeOH (8/2) so sánh TLC chất chuẩn phòng thí nghiệm

Số liệu phổ ¹H-NMR (500 MHz, CD₃OD): **Bảng 4.25**

3.4.2.9. *Hợp chất 2'-deoxyadenosine (G246-9):*

Chất rắn màu trắng.

Công thức phân tử: C₁₀H₁₃N₅O₃

Khối lượng phân tử: 251

R_f: 0,4 CH₂Cl₂/MeOH (85/15) so sánh TLC chất chuẩn phòng thí nghiệm

Số liệu phổ ¹H-NMR (500 MHz, CD₃OD): **Bảng 4.26**

3.5. Hoạt tính sinh học của các hợp chất phân lập được

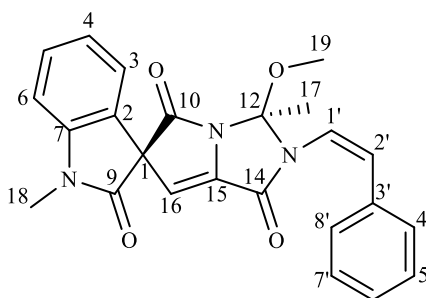
Tất cả các hợp chất phân lập được từ ba chủng xạ khuẩn G666, G631 và G246 hợp được tiến hành thử hoạt tính kháng vi sinh vật kiểm định đối với 7 chủng VSVKĐ bao gồm 3 chủng vi khuẩn Gram âm: *E. coli* ATCC25922, *P. aeruginosa* ATCC27853, *S. enterica* ATCC13076; 3 chủng vi khuẩn Gram dương: *E. faecalis* ATCC29212, *S. aureus* ATCC25923, *B. cereus* ATCC13245 và 1 chủng nấm *C. albicans* ATCC10231. Nồng độ ức chế tối thiểu (MIC) của các hợp chất phân lập được đối với các chủng VSVKĐ thử nghiệm được trình bày ở **Bảng 4.27-4.29**

CHƯƠNG 4 THẢO LUẬN VÀ KẾT QUẢ

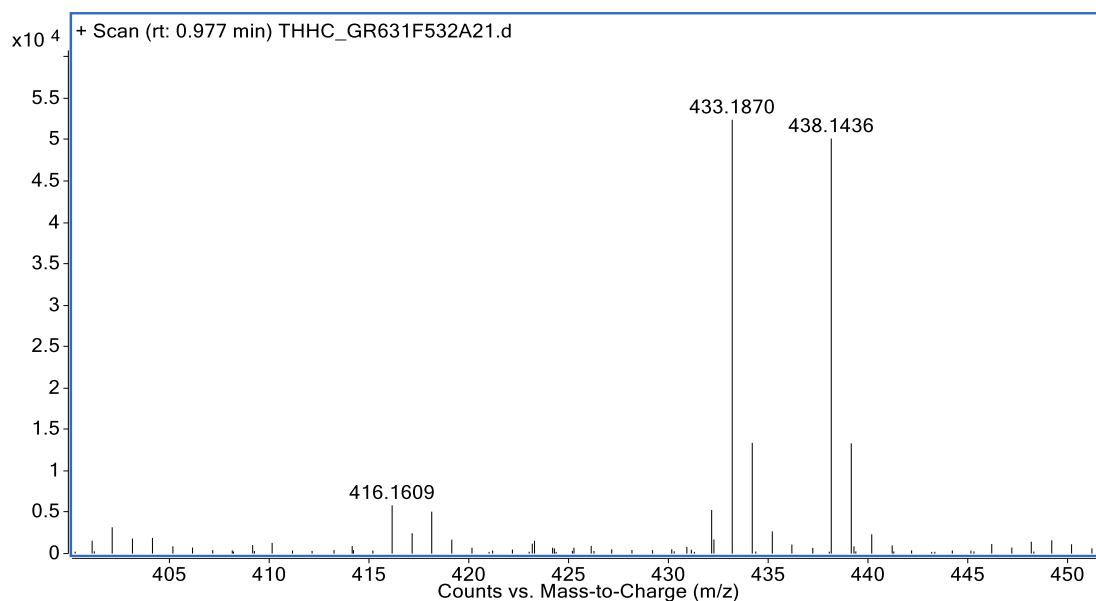
4.1. Xác định cấu trúc hóa học của các hợp chất phân lập từ chủng *Actinoalloteichus cyanogriseus* G631

Từ các cặn chiết của môi trường lên nuôi cấy nhân sinh khối lượng lớn của chủng xạ khuẩn *Actinoalloteichus cyanogriseus* G631, 8 hợp chất đã được phân lập. Cấu trúc của các hợp chất được xác định bằng các phương pháp phổ MS, CD, 1D-NMR và 2D-MNR, cụ thể như sau:

4.1.1. Hợp chất isocyanogramide (G631-1) (hợp chất mới)



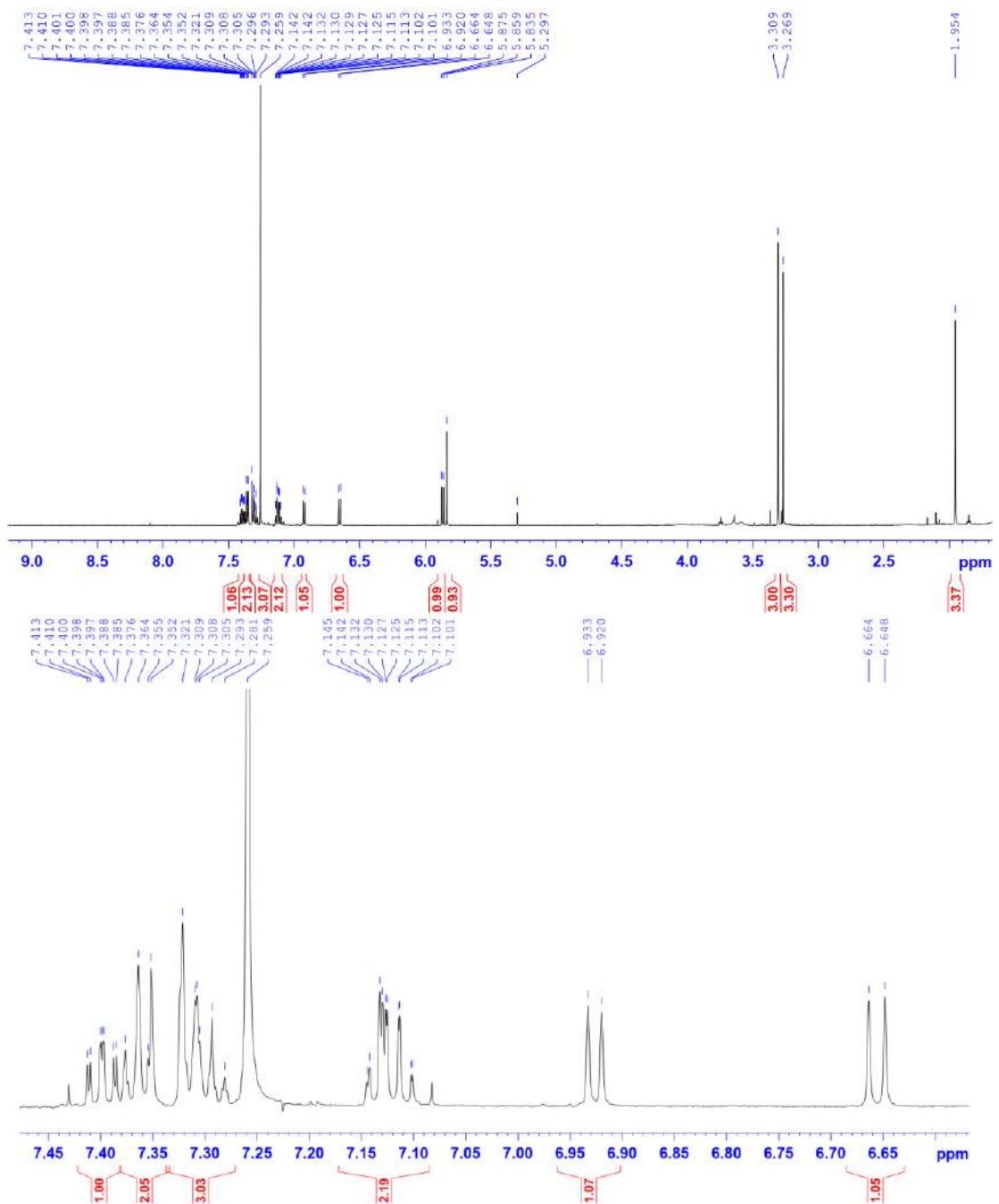
Hợp chất **G631-1** được phân lập từ cặn chiết ethyl acetate có dạng dầu màu vàng, độ quay cực riêng $[\alpha]_D^{26} = -59,3$ (c 0,2; CH_2Cl_2). Phổ khối phân giải cao HR-ESI-MS cho pic ion giả phân tử ở m/z $[\text{M}+\text{Na}]^+$ 438,1436 (tính toán lý thuyết cho công thức $[\text{C}_{24}\text{H}_{21}\text{N}_3\text{NaO}_4]^+$ 438,1424), độ bất bão hòa bằng 16 (**Hình 4.16**). Kết hợp với phổ ^{13}C -NMR, HSQC cho phép xác định CTPT của hợp chất là $\text{C}_{24}\text{H}_{21}\text{N}_3\text{O}_4$.



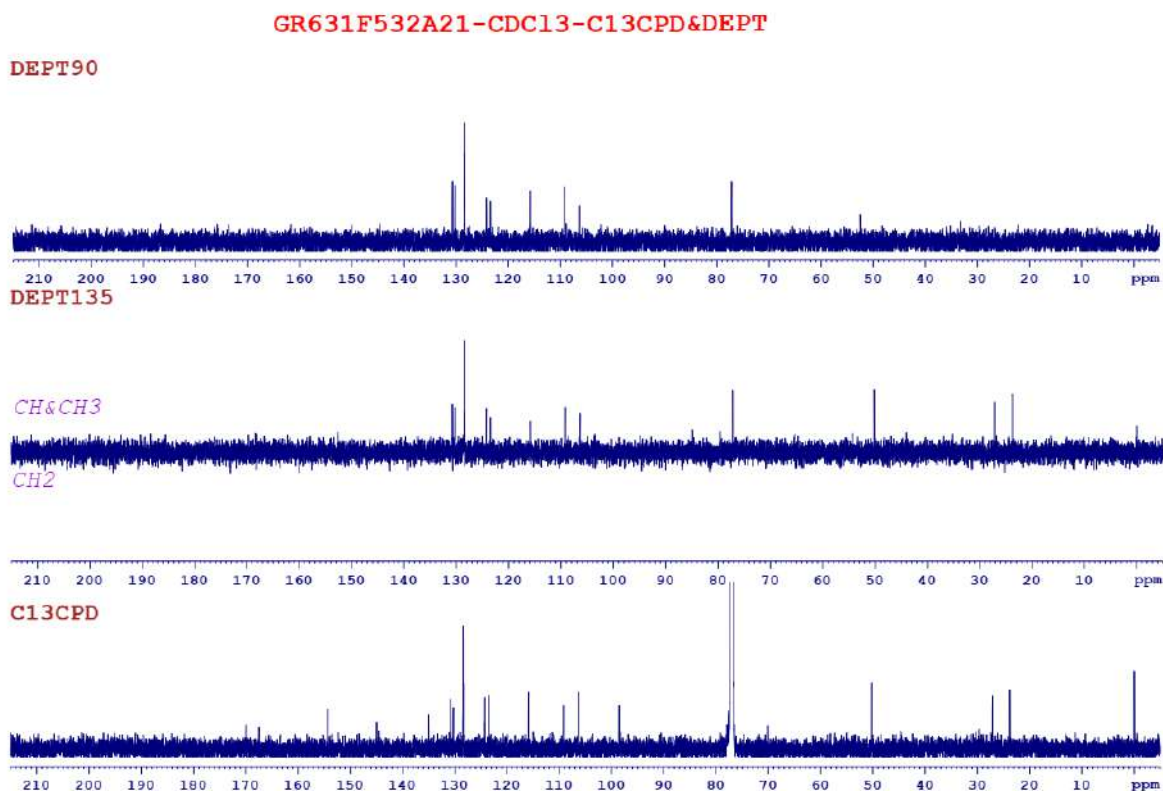
Hình 4.16: Phổ HR-ESI-MS của hợp chất **G631-1**

Phổ ^1H -NMR của **G631-1** cho tín hiệu của 5 proton vòng thơm ở δ_{H} 7,28 (1H,

d, $J = 7,2$ Hz, H-6'); 7,32 (2H, d, $J = 7,2$ Hz, H-4'/H-8') và 7,37 (2H, t, $J = 7,2$ Hz, H-5'/H-7'), cho phép xác định sự có mặt của 1 vòng thơm thế ở 1 vị trí, 4 proton vòng thơm ở δ_H 6,93 (1H, d, $J = 7,8$ Hz, H-6); 7,11 (1H, dd, $J = 7,2; 7,8$ Hz, H-4); 7,14 (1H, d, $J = 7,8$ Hz, H-3) và 7,40 (1H, dd, $J = 7,2; 7,8$ Hz, H-5), cho phép xác định sự có mặt của một vòng thơm thế 1,2. Ngoài ra, trên phổ $^1\text{H-NMR}$ còn có tín hiệu của 2 proton olefinic của một liên kết đôi có cấu hình *cis* ở δ_H 5,86 (1H, d, $J = 9,6$ Hz, H-1'); 6,65 (1H, d, $J = 9,6$ Hz, H-2'); 1 proton olefinic dưới dạng singlet ở δ_H 5,84 (1H, s, H-16) và 3 nhóm methyl ở δ_H 1,95 (3H, s, H-17); 3,27 (3H, s, H-18); 3,31 (3H, s, H-19).

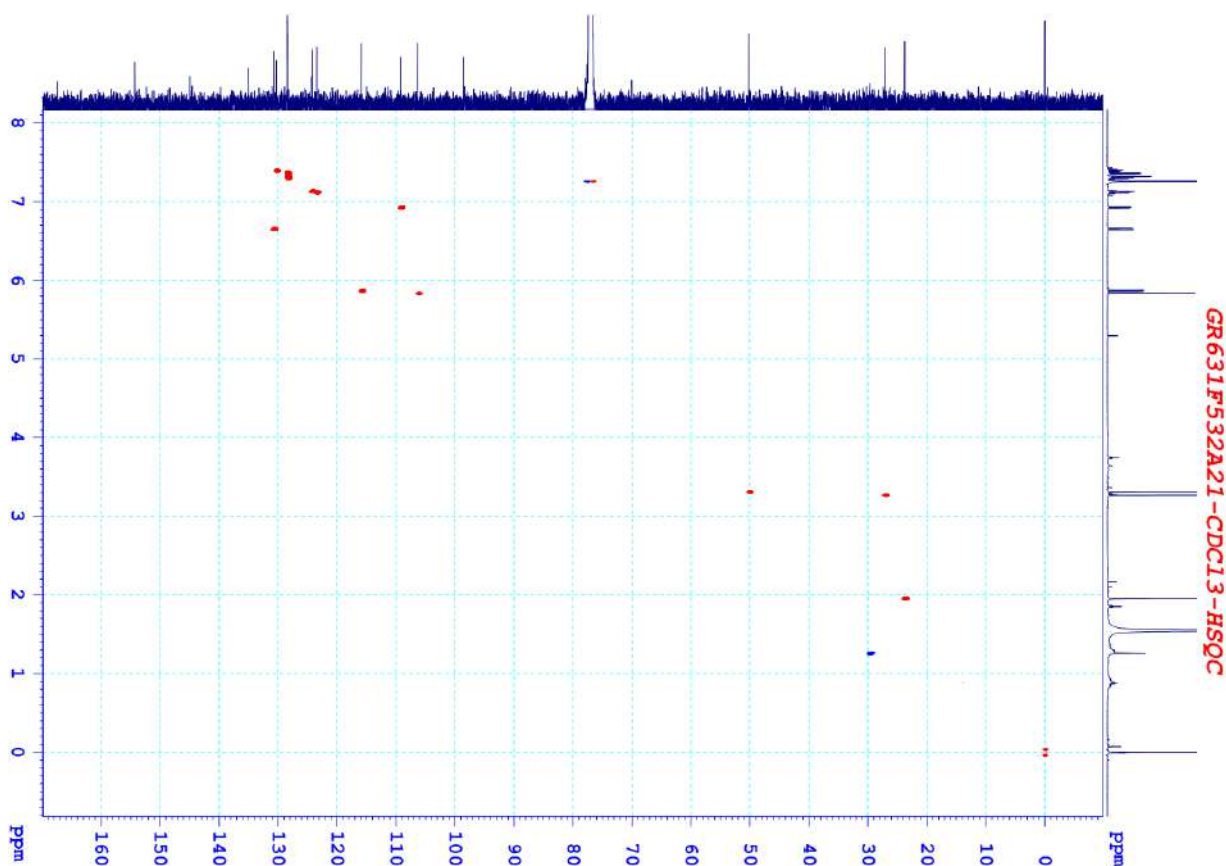


Hình 4.17: Phổ $^1\text{H-NMR}$ của hợp chất G631-1



Hình 4.18: Phổ DEPT của hợp chất **G631-1**

Phân tích phổ ^{13}C -NMR, DEPT và HSQC của hợp chất **G631-1** cho thấy tín hiệu cộng hưởng của 24 nguyên tử carbon trong đó có 1 nhóm methyl ở δ_{C} 23,8 (C-17), 1 nhóm N-CH₃ ở δ_{C} 27,1 (C-18), 1 nhóm O-CH₃ ở δ_{C} 50,2 (C-19); 12 nhóm methine ở δ_{C} 106,4 (C-16); 109,2 (C-6); 115,9 (C-1'); 123,5 (C-4); 124,3 (C-3); 128,3 (C-6'); 128,4 (C-4',8'); 128,5 (C-5',7'); 130,3 (C-5); 130,8 (C-2'); 06 carbon không liên kết trực tiếp với hydro ở δ_{C} 70,2 (C-1); 98,6 (C-12); 124,4 (C-2); 135,0 (C-3'); 140,2 (C-15); 144,9 (C-7) và 03 carbon carbonyl ở δ_{C} 154,3 (C-14); 167,5 (C-10); 170,0 (C-9). Dựa trên độ dịch chuyển hóa học của C-14 (δ_{C} 154,3), C-10 (δ_{C} 167,5) và C-9 (δ_{C} 170,0) gợi ý chúng là các nhóm carbonyl amide. Phân tích dữ liệu ^1H và ^{13}C -NMR của hợp chất **G631-1** gợi ý đến các tín hiệu của khung spirocyclic pyrrolo[1,2-c]imidazole đã được phân lập từ cùng loài xạ khuẩn *Actinoalloteichus cyanogriseus* [60]. Điều này được khẳng định thông qua việc phân tích chi tiết trên phổ cộng hưởng từ hạt nhân hai chiều. Trên phổ ^1H - ^1H COSY xuất hiện 3 hệ tương tác spin-spin, bao gồm: i) H-3 (δ_{H} 7,14)/ H-4 (δ_{H} 7,11)/ H-5 (δ_{H} 7,40)/ H-6 (δ_{H} 6,93) (tương tác của hệ vòng thiom thế 1,2); ii) H-4' (δ_{H} 7,32)/H-5' (δ_{H} 7,37)/H-6' (δ_{H} 7,28)/H-7' (δ_{H} 7,37)/H-8' (δ_{H} 7,32) (tương tác của hệ vòng phenyl); iii) H-1' (δ_{H} 5,86)/H-2' (δ_{H} 6,65) (tương tác của nối đôi olefinic).

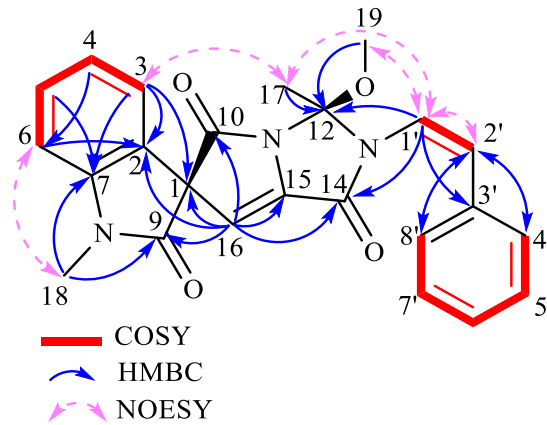


Hình 4.19: Phổ HSQC của hợp chất **G631-1**

Phân tích phổ HMBC cho thấy các tương tác xa giữa proton H-16 (δ_{H} 5,84) với C-1 (δ_{C} 70,2)/C-2 (δ_{C} 124,4)/C-10 (δ_{C} 167,5)/C-14 (δ_{C} 154,3)/C-15 (δ_{C} 140,2); tương tác giữa proton H-18 (δ_{H} 3,27) với C-7 (δ_{C} 144,9)/C-9 (δ_{C} 170,0) cho thấy sự hiện diện vòng spiro ở vị trí C-1 và các nhóm carbonyl ở C-9, C-10. Vòng thơm thế 1,2 *ortho* ở vị trí C-2/C-7 được xác định qua các tương tác HMBC giữa H-3 (δ_{H} 7,14) với C-1 (δ_{C} 70,2)/C-2 (δ_{C} 124,4)/C-7 (δ_{C} 144,9); tương tác giữa H-6 (δ_{H} 6,93) với C-2 (δ_{C} 124,4)/C-7 (δ_{C} 144,9). Điều này cũng được khẳng định bằng các tương tác ^1H - ^1H trên phổ COSY giữa H-3/H-4/H-5/H-6. Tương tự, sự có mặt của nhóm phenyl ethenyl cũng được khẳng định bằng các tương tác trên phổ HMBC giữa H-2' (δ_{H} 6,65) với C-1' (δ_{C} 115,9)/C-3' (δ_{C} 135,0)/C-4' (8') (δ_{C} 128,4) và tương tác trên phổ COSY giữa H-4'/H-5'/H-6'/H-7'/H-8' và H-1'/H-2'.

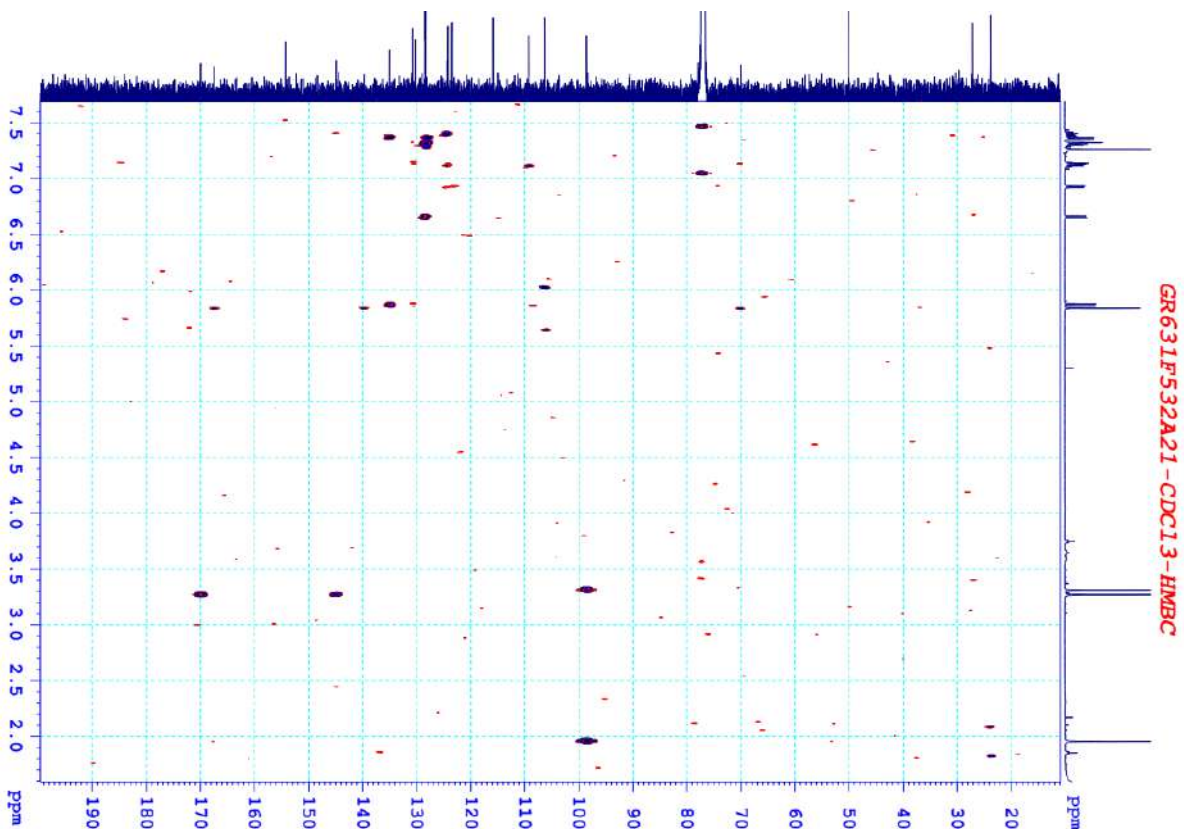
Thông qua các phân tích phổ trên, có thể dự đoán được cấu trúc của hợp chất **G631-1** như **Hình 4.20**, cấu trúc này tương tự như hợp chất cyanoramide [60], tuy nhiên, hợp chất **G631-1** có cấu hình nối đôi dạng *cis* ở vị trí C-1' và C-2' khác với dạng *trans* trong cấu trúc hợp chất cyanoramide. Thêm vào đó, hằng số tương tác của H-1' (δ_{H} 5,86) và H-2' (δ_{H} 6,65) có giá trị là $J = 9,6$ Hz và tương tác trên phổ NOESY

giữa H-1' và H-2' cho phép xác định cấu hình liên kết đôi giữa C-1' và C-2' là Z [77].

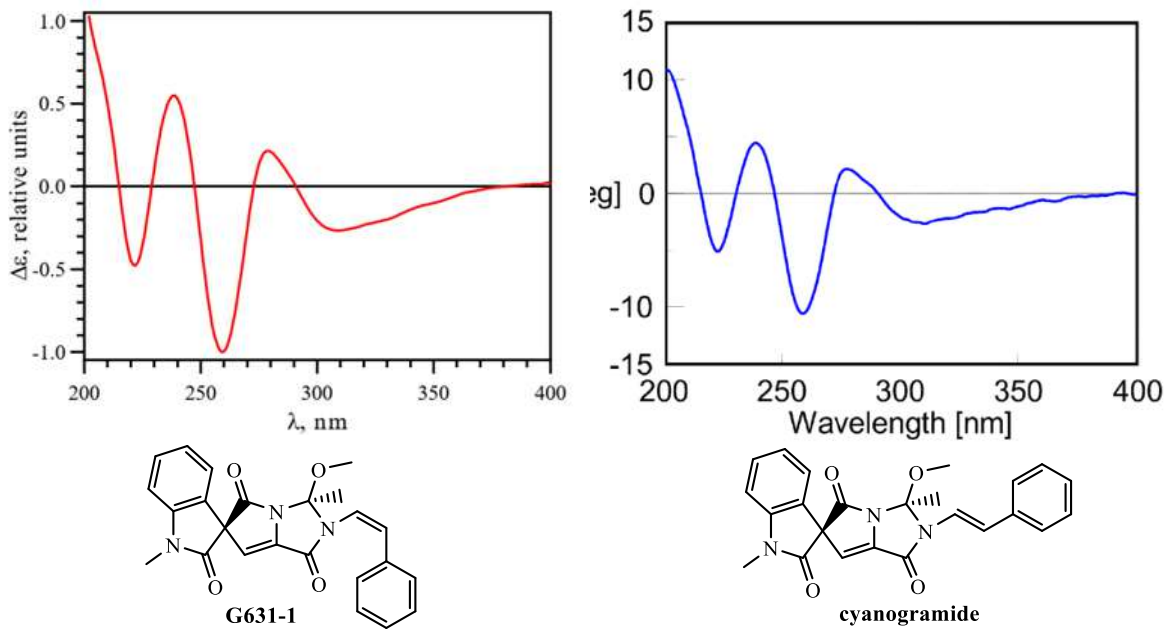


Hình 4.20: Một số tương tác phổ COSY, HMBC, NOESY của hợp chất **G631-1**

Vị trí nguyên tử N-13 thuộc khung tetrahydroimidazole được xác định bằng tương tác HMBC giữa H-1' (δ_H 5,86) với C-12 (δ_C 98,6)/C-14 (δ_C 154,3). Nhóm methyl và nhóm methoxy ở vị trí C-12 cũng được xác định bằng các tương tác giữa H-17 (δ_H 1,95) và H-19 (δ_H 3,31) với C-12 (δ_C 98,6) trên phổ HMBC.



Hình 4.21: Phổ HMBC của hợp chất **G631-1**



Hình 4.22: Phổ CD thực nghiệm (trái) của hợp chất **G631-1** và phổ CD tham khảo của hợp chất cyanogranamide [60]

Bảng 4.4 : Dữ liệu phổ ^1H và ^{13}C -NMR của hợp chất **G631-1**

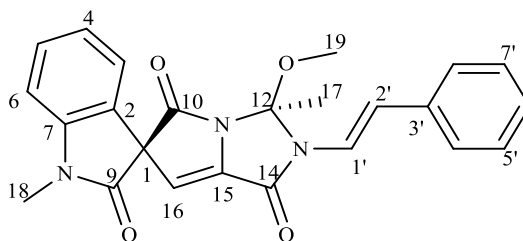
C	$\delta_C^{a,b}$ (ppm)	DEPT	$\delta_H^{a,c}$ độ bội (J, Hz)
1	70,2	C	-
2	124,4	C	-
3	124,3	CH	7,14 d (7,8)
4	123,5	CH	7,11 dd (7,2; 7,8)
5	130,3	CH	7,40 dd (7,2; 7,8)
6	109,2	CH	6,93 d (7,8)
7	144,9	C	-
9	170,0	C	-
10	167,5	C	-
12	98,6	C	-
14	154,3	C	-
15	140,2	C	-
16	106,4	CH	5,84 s
17	23,8	CH ₃	1,95 s
18	27,1	CH ₃	3,27 s
19	50,2	CH ₃	3,31 s
1'	115,9	CH	5,86 d (9,6)
2'	130,8	CH	6,65 d (9,6)
3'	135,0	C	-
4', 8'	128,4	2CH	7,32 d (7,2)
5', 7'	128,5	2CH	7,37 t (7,2)
6'	128,3	CH	7,28 t (7,2)

^a CDCl_3 , ^b150 MHz, ^c600 MHz

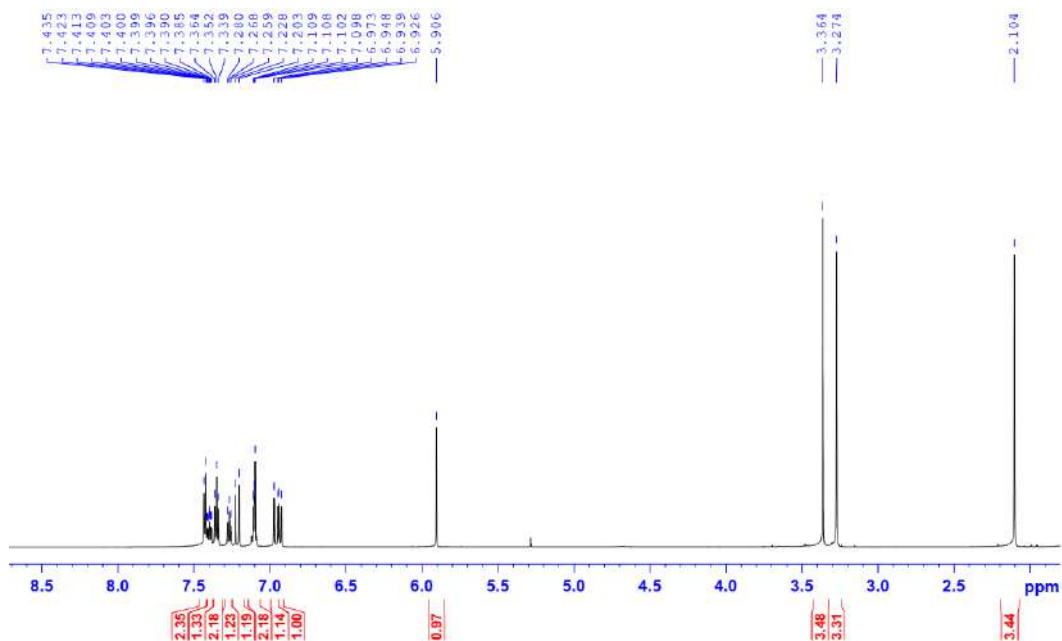
Hợp chất **G631-1** có 2 trung tâm bất đối ở C-1 và C-12. Cấu hình tuyệt đối

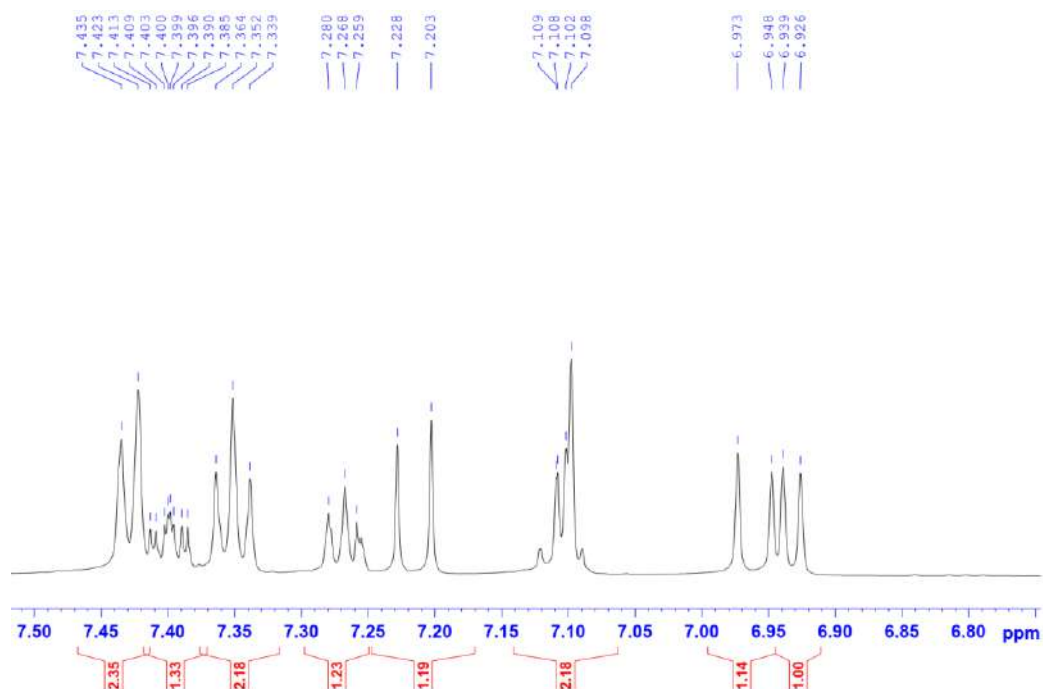
của hợp chất này được xác định bằng cách so sánh phổ ECD thực nghiệm với phổ ECD của hợp chất cyanogramide, hợp chất **G631-1** có hiệu ứng Cotton (-) ở 221, 259 và 309 nm; hiệu ứng Cotton (+) tại 238 và 278 nm (**hình 4.22**), tương tự như hợp chất cyanogramide trong tài liệu tham khảo [60]. Điều đó cho thấy rằng cấu hình tuyệt đối của hai trung tâm lập thể tại C-1 và C-12 lần lượt là *R* và *S*. Như vậy, cấu trúc của hợp chất **G631-1** có dạng spirocyclic pirrolo[1,2-*c*]imidazole, đây là một chất mới, được đặt tên là isocyanogramide.

4.1.2. Hợp chất cyanogramide (G631-2)



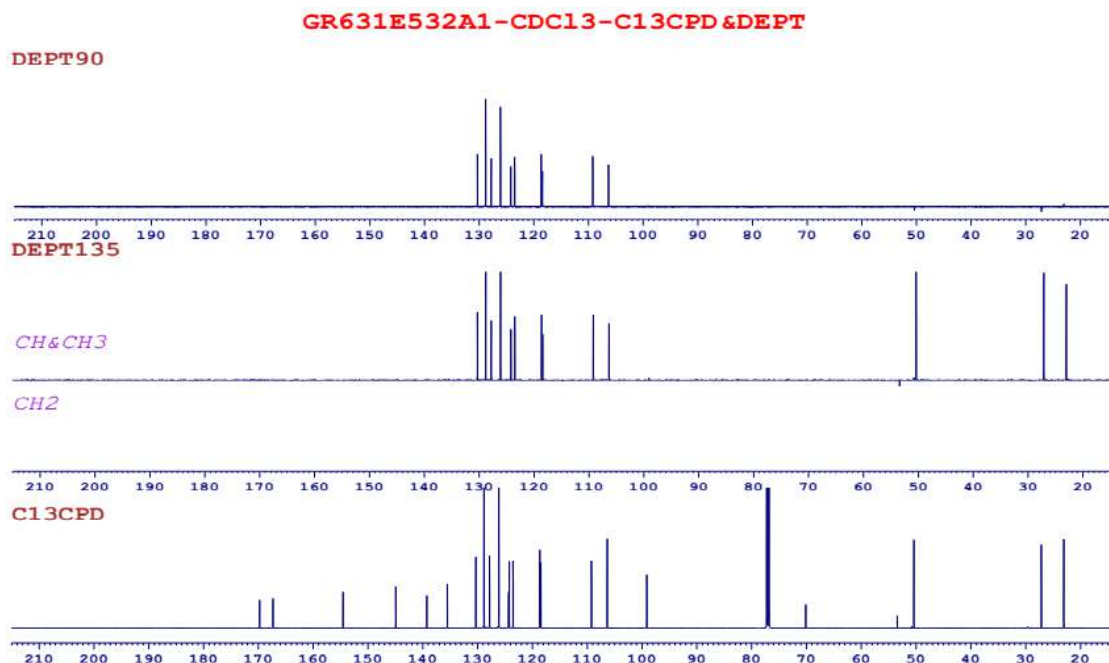
Hợp chất **G631-2** được phân lập dưới dạng chất dầu màu vàng. Giống với hợp chất **G631-1**, trên phổ proton của hợp chất **G631-2** cũng xuất hiện tín hiệu của 3 nhóm methyl ở δ_H 2,10 (3H, s); 3,27(3H, s) và 3,36 (3H, s); các tín hiệu của vòng thơm thế một vị trí tại δ_H 7,42 (2H, d, $J = 7,5$ Hz, H-4', 8'); 7,35 (2H, t, $J = 7,5$ Hz, H-5', 7'); 7,27 (1H, t, $J = 7,5$ Hz, H-6'); một vòng thơm thế 1,2 ở δ_H 6,93 (1H, d, $J = 7,5$ Hz, H-6); 7,10 (1H, m, H-3); 7,11 (1H, m, H-4); 7,40 (1H, dd, $J = 7,5; 7,5$ Hz, H-5); sự khác biệt so với hợp chất **G631-1** là tín hiệu của 2 proton olefinic có cấu hình *trans* ở δ_H 7,22 (1H, d, $J = 15,0$ Hz, H-1'); 6,96 (1H, d, $J = 15,0$ Hz, H-2') dựa vào hằng số tương tác lớn ($J = 15,0$ Hz) so với cấu hình *cis* ($J = 9,6$ Hz) ở chất **G631-1**.





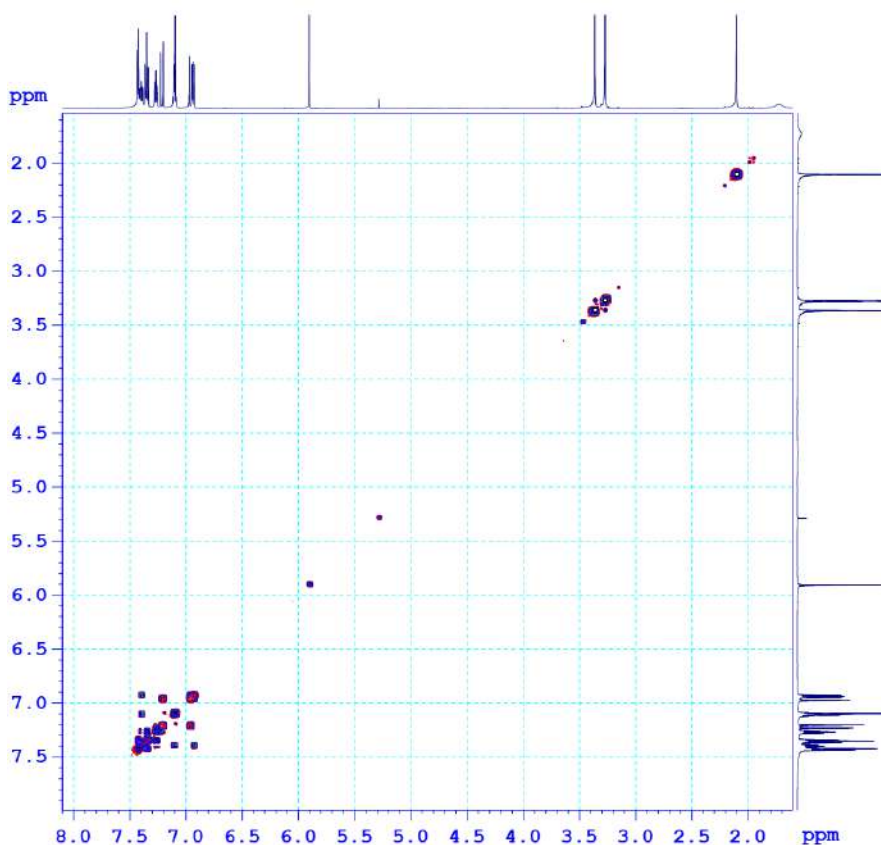
Hình 4.23: Phổ $^1\text{H-NMR}$ của hợp chất **G631-2**

Trên phổ $^{13}\text{C-NMR}$, DEPT và HSQC của hợp chất **G631-2** thấy tín hiệu của 24 carbon trong đó có 2 nhóm methyl ở δ_c 23,0 (C-17); 27,2 (C-18) và một nhóm methoxy ở δ_c 50,4 (C-19), 12 nhóm methine sp^2 ở δ_c 106,4 (C-16); 109,2 (C-6); 118,5 (C-1'); 118,7 (C-2'); 123,5 (C-4); 124,3 (C-3); 126,1 (C-4', C-8'); 127,8 (C-6'); 128,8 (C-5', C-7'); 130,3 (C-5); 06 carbon không liên kết với hydro ở δ_c 70,1 (C-1); 99,1 (C-12); 124,4 (C-2); 135,5 (C-3'); 139,3 (C-15) và 144,9 (C-7) cùng 3 nhóm carbonyl ở δ_c 169,8 (C-9); 167,4 (C-10) và 154,6 (C-14).



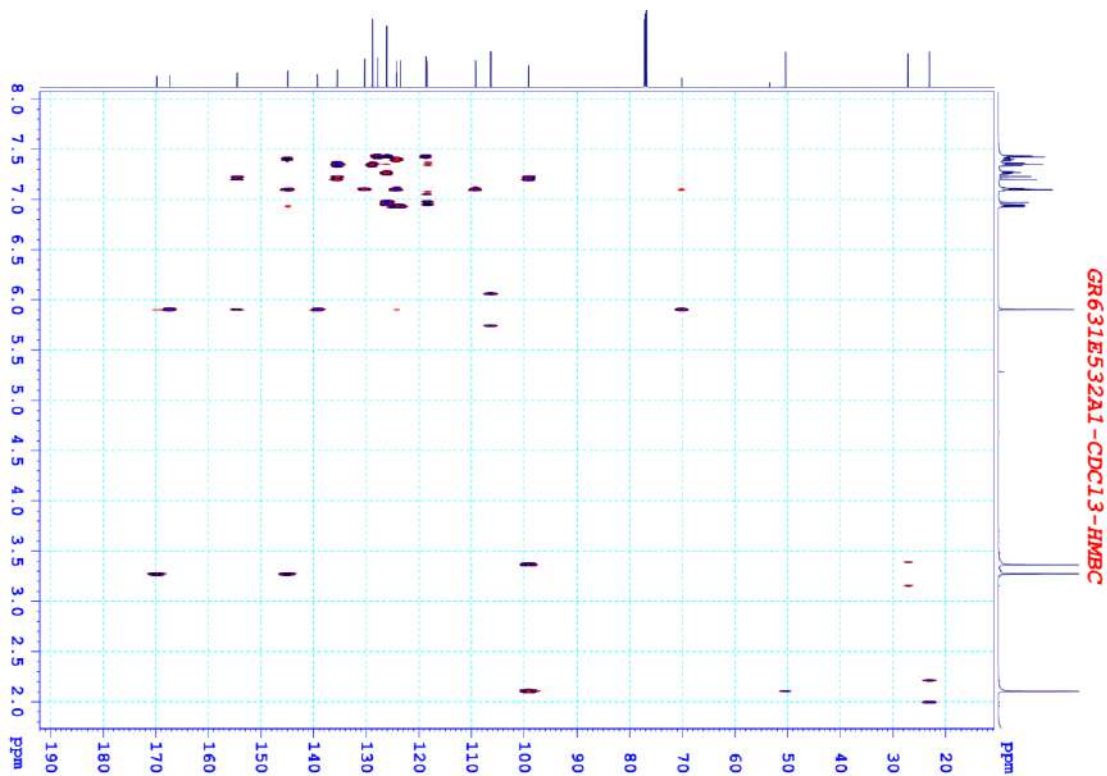
Hình 4.24: Phổ DEPT của hợp chất **G631-2**

Phân tích phổ ^1H - ^1H COSY của hợp chất **G631-2** xuất hiện 3 hệ tương tác spin-spin tương tự như hợp chất **G631-1**, bao gồm: tương tác của hệ vòng thơm thế 1,2 [H-3 (δ_{H} 7,10)/ H-4 (δ_{H} 7,11)/ H-5 (δ_{H} 7,40)/ H-6 (δ_{H} 6,93)], tương tác của các proton vòng phenyl [$\text{H-4}'$ (δ_{H} 7,50)/ $\text{H-5}'$ (δ_{H} 7,35)/ $\text{H-6}'$ (δ_{H} 7,27)/ $\text{H-7}'$ (δ_{H} 7,35)/ $\text{H-8}'$ (δ_{H} 7,50) và tương tác của nối đôi olefinic [$\text{H-1}'$ (δ_{H} 7,22)/ $\text{H-2}'$ (δ_{H} 6,96)]. Trên phổ HMBC cho thấy các tương tác xa giữa proton H-16 (δ_{H} 5,90) với C-1 (δ_{C} 70,1)/ C-2 (δ_{C} 124,4)/ C-10 (δ_{C} 167,4)/ C-14 (δ_{C} 154,6)/ C-15 (δ_{C} 139,3); tương tác giữa proton H-18 (δ_{H} 3,27) với C-7 (δ_{C} 144,9)/ C-9 (δ_{C} 170,0) cho thấy sự hiện diện vòng spiro ở vị trí C-1 và các nhóm carbonyl ở C-9 , C-10 . Vòng thơm thế 1,2 *ortho* ở vị trí C-2/C-7 được xác định qua các tương tác HMBC giữa H-3 (δ_{H} 7,10) với C-1 (δ_{C} 70,1)/ C-2 (δ_{C} 124,4)/ C-7 (δ_{C} 144,9); tương tác giữa H-6 (δ_{H} 6,93) với C-2 (δ_{C} 124,4)/ C-7 (δ_{C} 144,9). Điều này cũng được khẳng định bằng các tương tác ^1H - ^1H trên phổ COSY giữa H-3/H-4/H-5/H-6 . Tương tự, sự có mặt của nhóm phenyl ethenyl cũng được khẳng định bằng các tương tác trên phổ HMBC giữa $\text{H-2}'$ (δ_{H} 6,65) với $\text{C-1}'$ (δ_{C} 115,9)/ $\text{C-3}'$ (δ_{C} 135,0)/ $\text{C-4}'$ (δ_{C} 128,4) và tương tác trên phổ COSY giữa $\text{H-4}'/\text{H-5}'/\text{H-6}'/\text{H-7}'/\text{H-8}'$ và $\text{H-1}'/\text{H-2}'$.

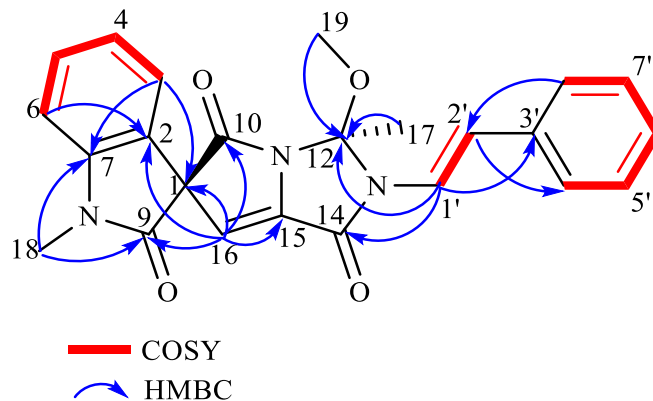


Hình 4.25: Phổ COSY của hợp chất **G631-2**

Các dữ liệu phổ 1D, 2D-NMR của hợp chất **G631-2** có cấu trúc tương tự như hợp chất **G631-1**, đồng thời phù hợp với hợp chất cyanogramide [60] đây là một alkaloid có khung spirocyclic pyrrolo[1,2-c]imidazole và đã được phân lập từ chủng xạ khuẩn *Actinoalloteichus cyanogriseus* WH1-2216-6. Hợp chất cyanogramide được đề cập trong tài liệu tham khảo có hoạt tính yếu lên các dòng tế bào K562, MCF-7, KB cùng các dòng tế bào MDR của chúng bao gồm (K562/A02, MCF-7/Adr và KB/VCR) có khả năng ngăn chặn sự kháng thuốc do adriamycin (Adr) của các dòng K562/A02 và MCF-7/Adr và khả năng kháng vincristine (VCR) của tế bào KB/VCR [60].



Hình 4.26: Phổ HMBC của hợp chất **G631-2**



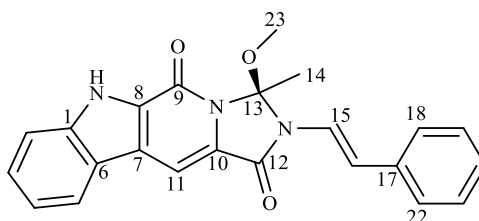
Hình 4.27: Một số tương tác COSY, HMBC của hợp chất **G631-2**

Bảng 4.5: Dữ liệu phổ ^1H và ^{13}C -NMR của hợp chất **G631-2** và hợp chất tham khảo

C	G631-2			Cyanogramide
	$\delta_{\text{C}}^{a,b}$	DEPT	$\delta_{\text{H}}^{a,c}$ độ bội (J, Hz)	$\delta_{\text{C}}^{b\#,d}$
1	70,1	C	-	69,8
2	124,4	C	-	124,6
3	124,2	CH	7,10 d (7,5)	124,5
4	123,5	CH	7,11*	123,1
5	130,3	CH	7,40 dd (7,5; 7,5)	130,1
6	109,2	CH	6,93 d (7,5)	109,6
7	144,9	C	-	144,8
9	169,8	C	-	169,5
10	167,4	C	-	167,4
12	99,1	C	-	98,7
14	154,6	C	-	154,6
15	139,3	C	-	138,6
16	106,4	CH	5,90 s	107,2
17	23,0	CH ₃	2,10 s	21,8
18	27,2	CH ₃	3,27 s	26,9
19	50,4	CH ₃	3,36 s	49,4
1'	118,5	CH	7,22 d (15,0)	118,9
2'	118,7	CH	6,96 d (15,0)	118,0
3'	135,5	C	-	135,5
4', 8'	126,1	2CH	7,42 d (7,5)	126,1
5', 7'	128,8	2CH	7,35 t (7,5)	128,8
6'	127,8	CH	7,27 t (7,5)	127,6

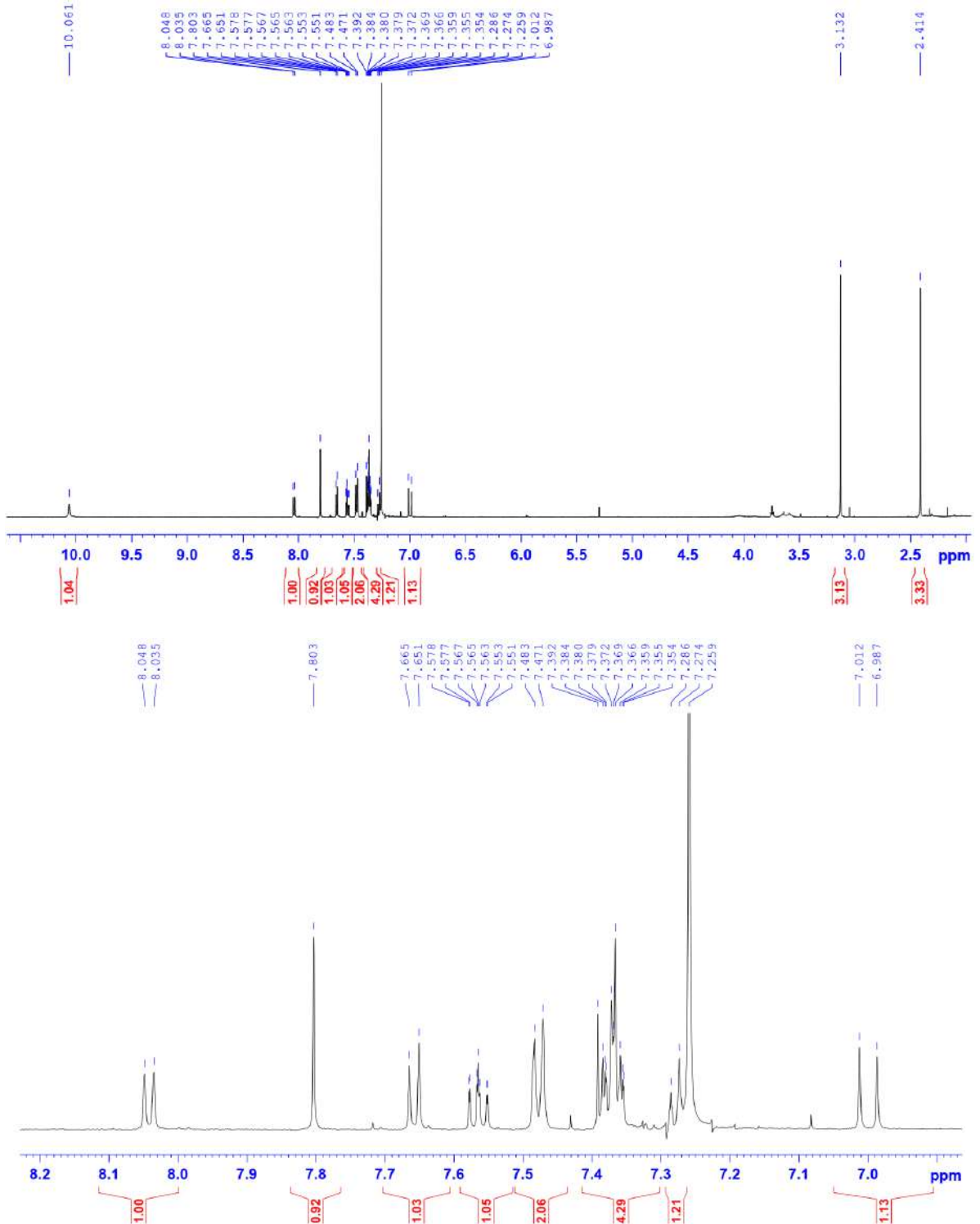
^aCDCl₃ ^b150 MHz ^c600 MHz ^d125 MHz ^{b#}DMSO [60], *tín hiệu chồng chập

4.1.3. Hợp chất marinacarboline F (G631-3)



Hợp chất **G631-3** được phân lập dưới dạng chất vô định hình màu vàng nhạt. Phổ khối ESI-MS của **G631-3** cho pic ion giả phân tử tại m/z 386,1 $[\text{M}+\text{H}]^+$. Trên phổ ^1H -NMR của **G631-3** xuất hiện tín hiệu của các proton gần giống như ở hợp chất **G631-2**, đó là sự có mặt của 01 vòng benzyl ở δ_{H} 7,27 (1H, t, $J = 7,2$ Hz, H-20); 7,37 (2H, m, H-19, H-21); 7,48 (2H, d, $J = 7,2$ Hz, H-18, H-22); 01 vòng thơm thế 1,2 ở δ_{H} 7,35 (1H, m, H-4); 7,56 (1H, dt, $J = 1,2; 7,2$ Hz, H-3); 7,65 (1H, d, $J = 8,4$ Hz, H-2); 8,26 (1H, d, $J = 7,8$ Hz, H-5), 2 proton olefine có cấu hình *trans* ở δ_{H} 6,99 (1H, d,

$J = 15,0$ Hz; H-15); 7,37 (1H, d, $J = 15,0$ Hz; H-16); 01 nhóm methoxy ở δ_H 3,13 (3H, s, H-23), và 01 nhóm methyl ở 2,41 (3H, s, H-14). Trên phổ $^1\text{H-NMR}$ của hợp chất **G631-3** thấy thiếu đi 1 nhóm methyl và có sự thay đổi đáng kể về độ chuyển dịch hóa học của proton singlet δ_H 5,90 (1H, s, H-16) trên phổ $^1\text{H-NMR}$ của chất **G631-2** dịch chuyển thành δ_H 7,80 (1H, s, H-11) ở hợp chất **G631-3**.



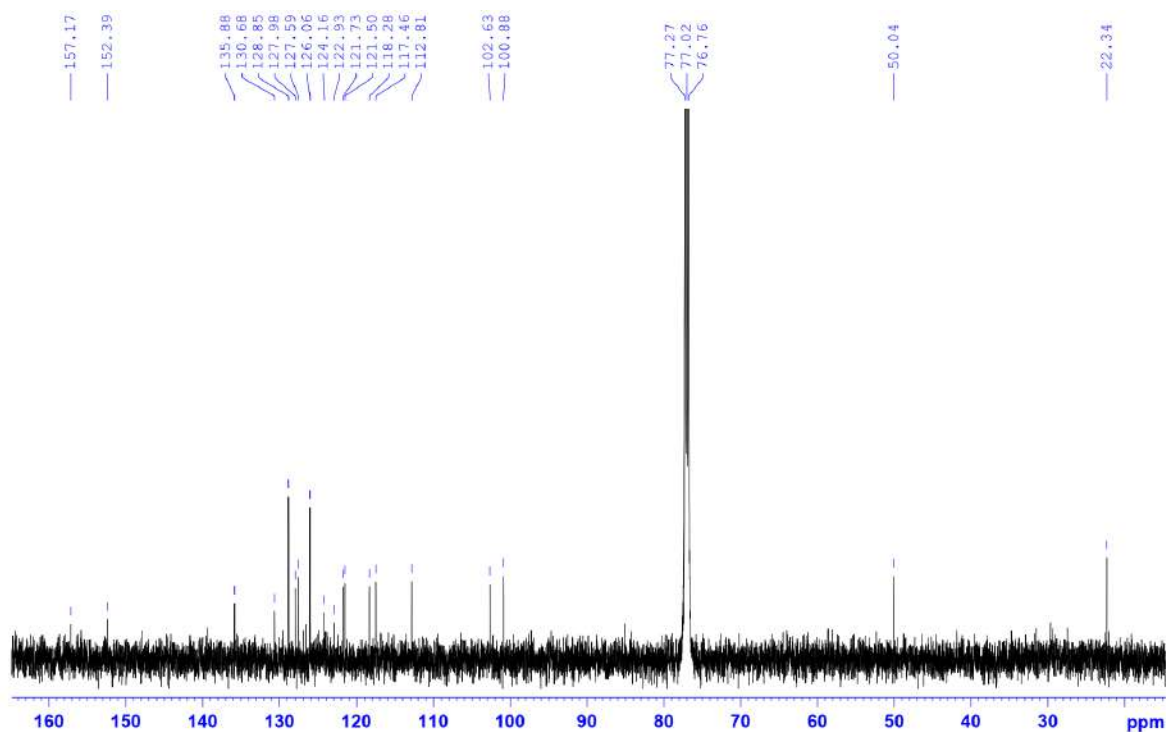
Hình 4.28: Phổ $^1\text{H-NMR}$ của hợp chất **G631-3**

Phổ ^{13}C -NMR và DEPT của hợp chất **G631-3** xuất hiện tín hiệu của 23 carbon trong đó có một nhóm methyl ở δ_{C} 22,3, một nhóm methoxy δ_{C} 50,0; 12 nhóm methine và 7 carbon không liên kết với hydro cùng 2 nhóm carbonyl amide ở δ_{C} 157,1 và 152,4. Dựa vào các dữ liệu phổ MS, 1D-NMR kết hợp so sánh số liệu phổ với tài liệu tham khảo xác định được **G631-3** là chất marinacarboline F, đây là hợp chất alkaloid có khung indole-pyridone-imidazole tetracyclic hiếm gặp trong tự nhiên [61].

Bảng 4.6: Dữ liệu phổ ^1H và ^{13}C -NMR của hợp chất **G631-3**

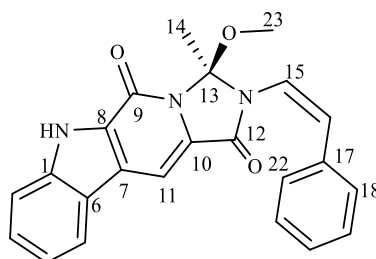
C	G631-3			Marinacarboline F
	$\delta_{\text{C}}^{a,b}$	DEPT	$\delta_{\text{H}}^{a,c}$ độ bội(J, Hz)	$\delta_{\text{C}}^{b\#}$
1	139,7	C	-	139,5
2	112,8	CH	7,65 d (8,4)	112,8
3	127,6	CH	7,56 dt (1,2; 7,2)	127,0
4	121,5	CH	7,35 m	120,7
5	121,7	CH	8,04 d (7,8)	121,6
6	122,9	C	-	122,4
7	124,2	C	-	122,7
8	130,7	C	-	130,5
9	152,4	C	-	151,5
10	126,8	C	-	126,1
11	100,9	CH	7,80 s	100,2
12	157,1	C	-	157,6
13	102,6	C	-	101,9
14	22,3	CH ₃	2,41 s	21,4
15	118,3	CH	6,99 d (15,0)	118,6
16	117,5	CH	7,37 d (15,0)	116,8
17	135,8	C	-	135,7
18	126,1	CH	7,48 d (7,2)	125,8
19	128,8	CH	7,37 m	128,6
20	127,9	CH	7,27 t (7,2)	127,1
21	128,9	CH	7,37 m	128,6
22	126,1	CH	7,48 d (7,2)	125,8
23	50,0	OCH ₃	3,13 s	49,1

^aCDCl₃ ^b150 MHz ^c600 MHz ^{b#}DMSO [61]

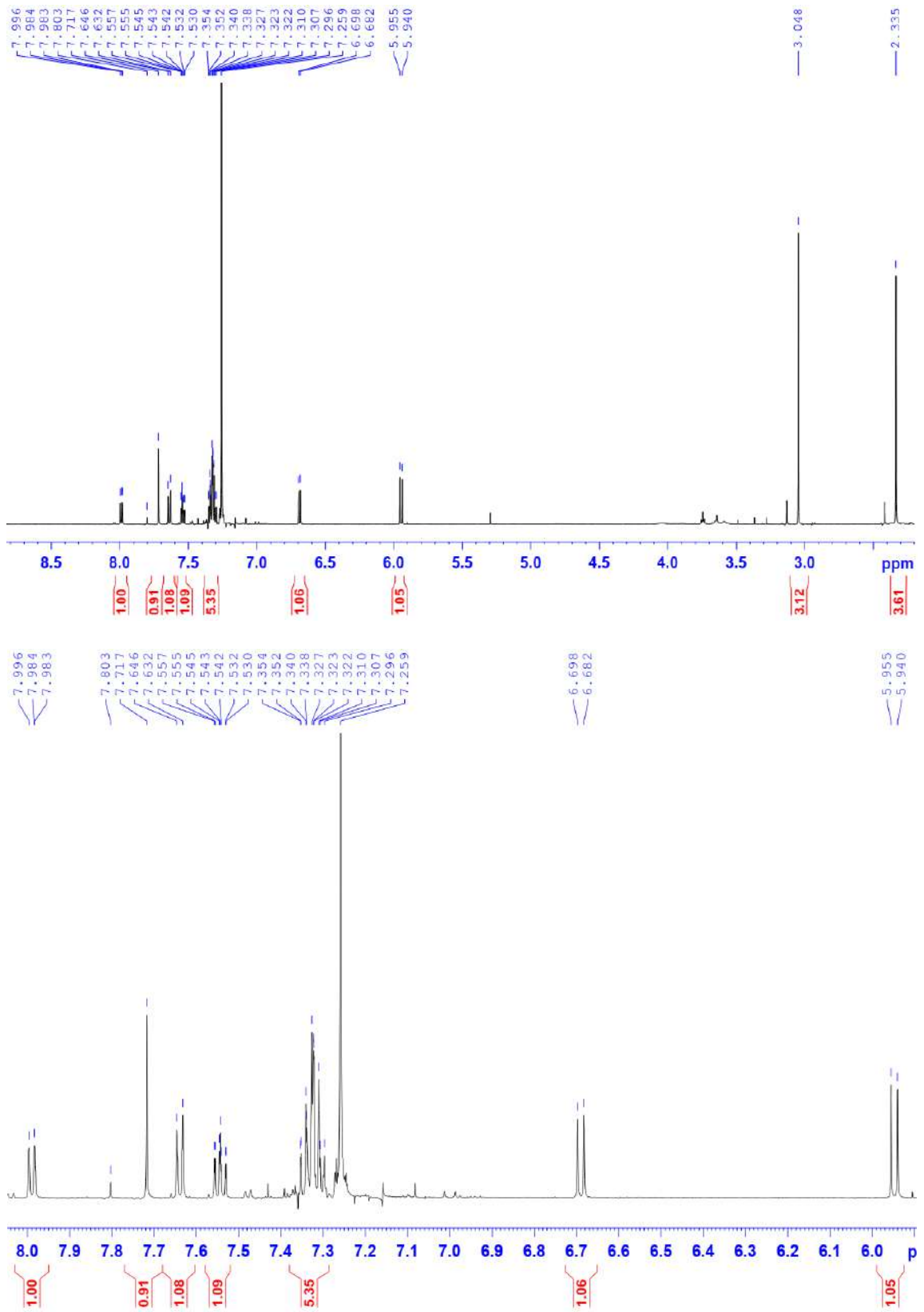


Hình 4.29: Phổ ^{13}C -NMR của hợp chất **G631-3**

4.1.4. Hợp chất marinacarboline H (**G631-4**)



Hợp chất **G631-4** được phân lập dưới dạng chất vô định hình màu vàng nhạt. Phổ khối ESI-MS của **G631-4** xuất hiện pic ion giả phân tử tại m/z 386,1 $[\text{M}+\text{H}]^+$. Phổ ^{13}C -NMR và DEPT của hợp chất **G631-4** xuất hiện tín hiệu của 23 carbon trong đó có 1 nhóm methyl ở δ_{C} 22,3; 1 nhóm methoxy ở δ_{C} 50,0; 12 nhóm methine sp^2 và 7 carbon không liên kết với hydro cùng 2 nhóm carbonyl amide ở δ_{C} 157,1 và 152,4. Phổ 1D-NMR của chất **G631-4** tương tự so với chất **G631-3** ngoại trừ tín hiệu của 2 proton olefine có cấu hình *cis* trên phổ của chất **G631-4** [δ_{H} 5,95 (1H, d, $J = 9,6$ Hz, H-15)/ δ_{C} 115,8 (C-15); 6,69 (1H, d, $J = 9,6$ Hz, H-16)/ δ_{C} 130,5 (C-16)] còn trên phổ của **G631-3** có cấu hình *trans* ở [δ_{H} 6,99 (1H, d, $J = 15,0$ Hz, H-15)/ δ_{C} 118,3 (C-15); 7,37 (1H, d, $J = 15,0$ Hz, H-16)/ δ_{C} 117,5 (C-16)]. Dựa vào các số liệu phổ 1D-NMR phân tích ở trên kết hợp so sánh với số liệu phổ của chất đã công bố, hợp chất **G631-4** được xác định là marinacarboline H [61] (Bảng 4.7).

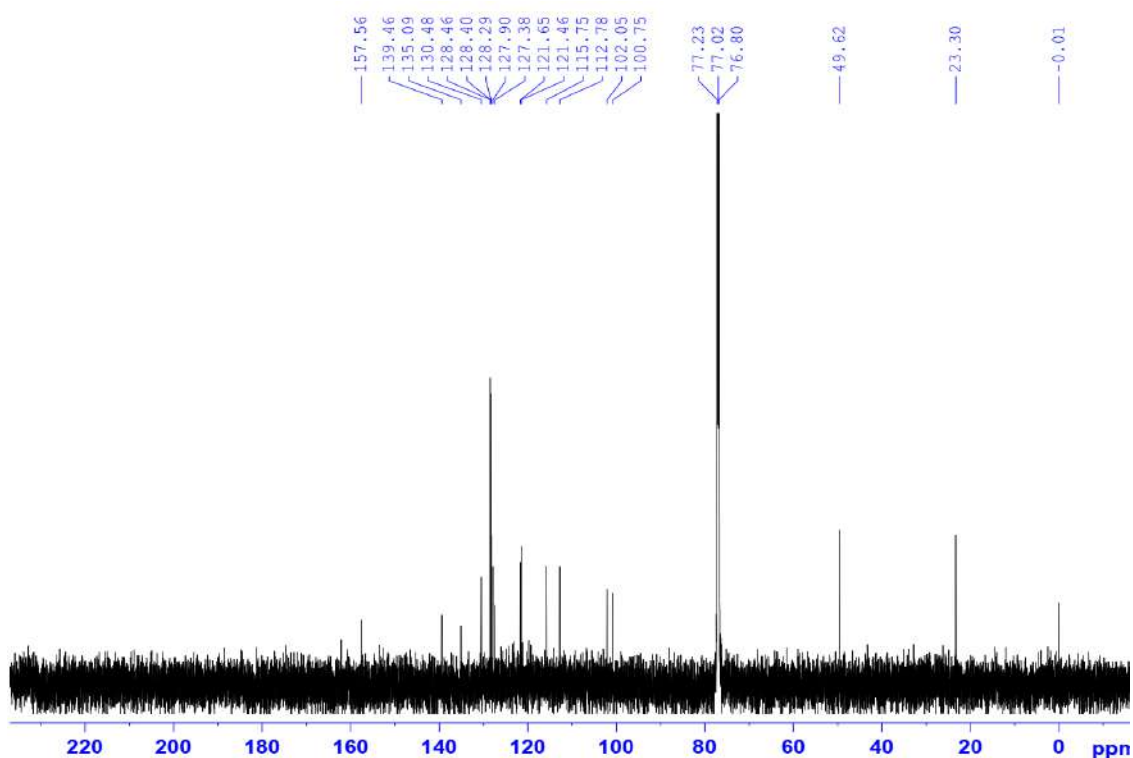


Hình 4.30: Phổ $^1\text{H-NMR}$ của hợp chất **G631-4**

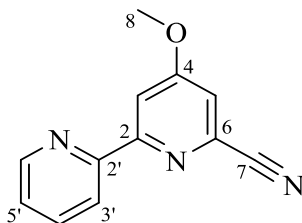
Bảng 4.7: Dữ liệu phổ ^1H và ^{13}C -NMR của hợp chất **G631-4**

C	G631-4			Marinacarboline H
	$\delta_{\text{C}}^{a,b}$	DEPT	$\delta_{\text{H}}^{a,c}$ độ bội (J, Hz)	$\delta_{\text{C}}^{b,a\#}$
1	139,5	C	-	139,8
2	112,8	CH	7,64 d (7,2)	113,1
3	127,9	CH	7,54 dt (1,2; 7,2)	127,0
4	121,5	CH	7,30 m	120,7
5	121,7	CH	7,98 d (7,8)	121,7
6	121,1	C	-	122,5
7	123,1	C	-	122,7
8	130,8	C	-	130,7
9	153,1	C	-	152,0
10	127,4	C	-	126,8
11	100,8	CH	7,72 s	100,2
12	157,6	C	-	157,8
13	102,1	C	-	101,3
14	22,3	CH ₃	2,34 s	22,5
15	115,8	CH	5,95 d (9,6)	116,2
16	130,5	CH	6,69 d (9,6)	128,9
17	135,1	C	-	135,2
18	128,5	CH	7,23-7,35 m	128,6
19	128,4	CH		128,2
20	127,3	CH		127,8
21	128,4	CH		128,2
22	126,1	CH		125,6
23	50,0	CH ₃	3,05 s	49,0

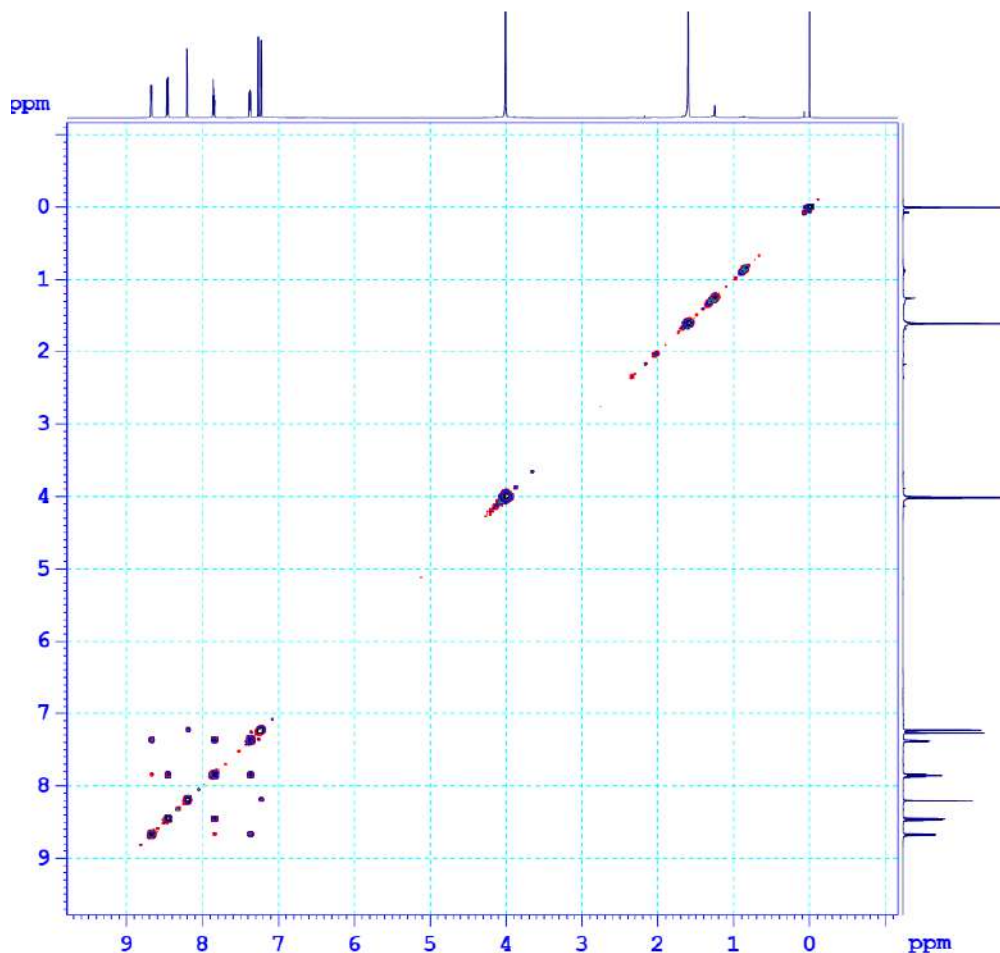
^aCDCl₃ ^b150 MHz ^c600 MHz ^{b#}DMSO

**Hình 4.31:** Phổ ^{13}C -NMR của hợp chất **G631-4**

4.1.5. Hợp chất caerulomycinonitril (G631-5)

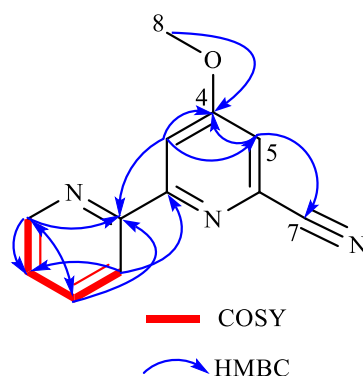


Hợp chất **G631-5** được phân lập dưới dạng chất rắn màu vàng với công thức phân tử $C_{12}H_9N_3O$ được xác định bằng phổ khối lượng phân giải cao HR-ESI-MS với pic ion phân tử tại m/z 212,0820 $[M+H]^+$. Phổ ^{13}C -NMR và DEPT của hợp chất **G631-5** xuất hiện tín hiệu của 12 carbon trong đó có 1 nhóm methoxy, 6 nhóm methine sp^2 và 5 carbon không liên kết với hydro. Trên phổ 1H -NMR của **G631-5** xuất hiện tín hiệu 4 proton đặc trưng cho sự có mặt của vòng piridine thế một vị trí ở δ_H 7,35 (1H, ddd, $J = 5,0; 7,5; 1,5$ Hz, H-5'); 7,85 (1H, td, $J = 2,0; 8,0$ Hz, H-4'); 8,45 (1H, d, $J = 8,0$ Hz, H-3'); 8,67 (1H, d, $J = 5,0$ Hz, H-6') và 2 tín hiệu proton tương tác meta ở δ_H 7,25 (1H, d, $J = 2,5$ Hz, H-5) và 8,20 (1H, d, $J = 2,5$ Hz, H-3), ngoài ra còn có tín hiệu singlet của một nhóm methoxy ở δ_H 4,00 (s, OCH_3).

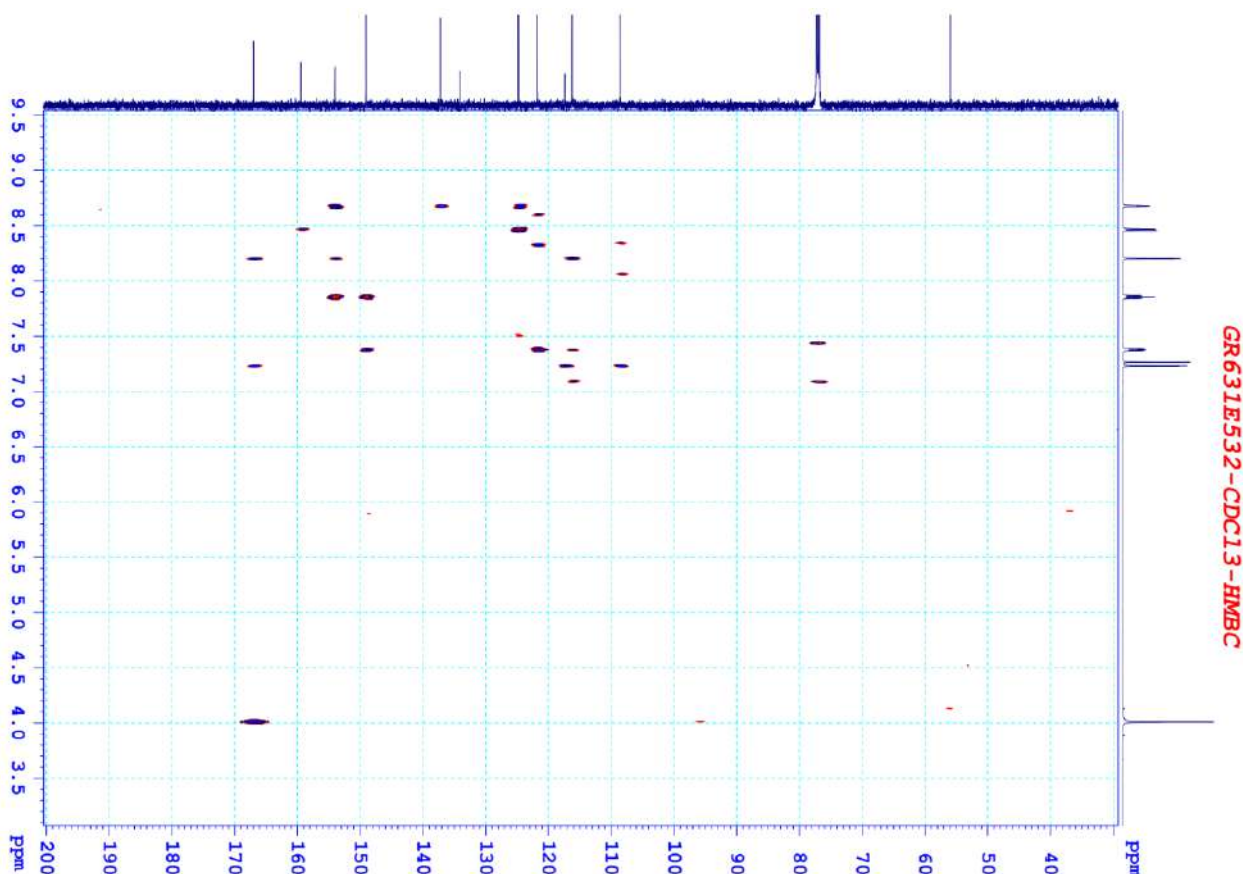


Hình 4.32: Phổ COSY của hợp chất **G631-5**

Trên phổ ^1H - ^1H COSY của hợp chất **G631-5** xuất hiện một hệ tương tác spin-spin của vòng pyridine thể một vị trí giữa H3' (δ_{H} 8,45)/H4' (δ_{H} 7,85)/H5' (δ_{H} 7,35)/H6' (δ_{H} 8,67). Trên phổ HMBC thấy có tương tác giữa H-3' (δ_{H} 8,45) với C-2 (δ_{C} 159,5) và H-3 (δ_{H} 8,20) với C-2' (δ_{C} 154,0) xác định được cấu trúc khung bipiridine của hợp chất **G631-5**. Thêm vào đó, trên phổ HMBC còn có tương tác của proton của nhóm methoxy ở δ_{H} 4,00 với C-4 (δ_{C} 167,0) xác định được vị trí của nhóm methoxy ở vị trí C-4. Kết hợp các phương pháp phổ HR-MS, 1D, 2D-NMR và so sánh với tài liệu tham khảo [56] hợp chất **G631-5** được xác định là một bipiridine có tên gọi caerulomycinonitril.



Hình 4.33: Một số tương tác COSY, HMBC của hợp chất **G631-5**



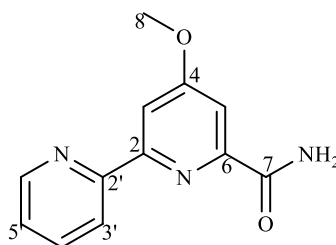
Hình 4.34: Phổ HMBC của hợp chất **G631-5**

Bảng 4.8: Dữ liệu phổ ^1H và ^{13}C -NMR của hợp chất **G631-5**

C	G631-5		
	$\delta_{\text{C}}^{a,b}$	DEPT	$\delta_{\text{H}}^{a,c}$ độ bội (J , Hz)
2	159,5	C	-
3	108,6	CH	8,20 d (2,5)
4	167,0	C	-
5	116,2	CH	7,25 d (2,5)
6	134,1	C	-
7	117,4	C	-
8	56,0	CH ₃	4,00 s
2'	154,0	C	-
3'	121,8	CH	8,45 d (8,0)
4'	137,2	CH	7,85 td (2,0; 8,0)
5'	124,8	CH	7,35 ddd (5,0; 7,5; 1,5)
6'	149,1	CH	8,67 d (5)

^aCDCl₃ ^b150 MHz ^c600 MHz

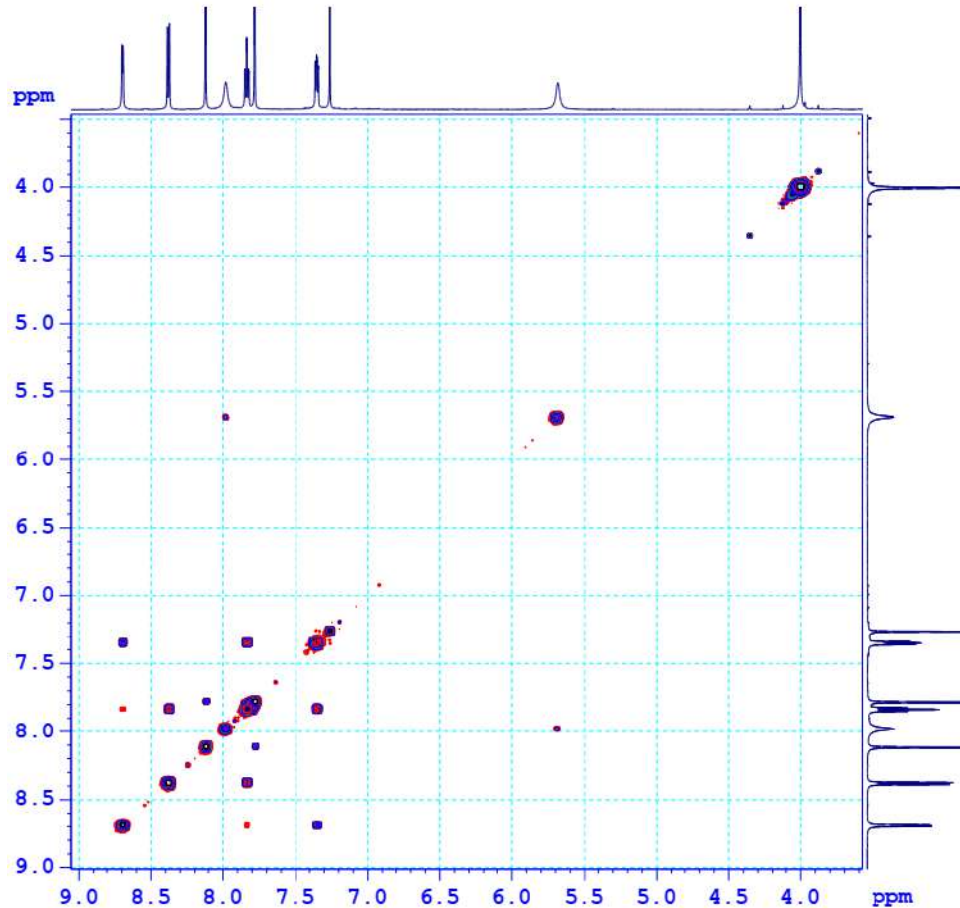
4.1.6. Hợp chất caerulomycinamide (**G631-6**)



Hợp chất **G631-6** được phân lập dưới dạng chất rắn, màu vàng. Phổ khối ESI-MS của **G631-6** xuất hiện pic ion giả phân tử ở m/z 230 $[\text{M}+\text{H}]^+$. Trên phổ ^{13}C -NMR và DEPT thấy xuất hiện tín hiệu của 12 carbon trong đó có 1 nhóm methoxy ở δ_{C} 55,8, sáu nhóm methine sp^2 , 4 carbon không liên kết với hydro và một nhóm carbonyl amide ở δ_{C} 168,1 (**Bảng 4.9**). Phổ ^1H -NMR của **G631-6** tương tự so với phổ của chất **G631-5** trong đó có tín hiệu của của 1 hệ vòng pyridine thể *mono* ở δ_{H} 7,35 (1H, dd, $J = 4,8; 7,8$ Hz, H-5'); 7,83 (1H, t, $J = 7,8$ Hz, H-4'); 8,38 (1H, d, $J = 8,4$ Hz, H-3'); 8,69 (1H, d, $J = 4,2$ Hz, H-6') và 2 proton tương tác meta ở δ_{H} 7,78 (1H, d, $J = 2,4$ Hz, H-5); 8,12 (1H, d, $J = 2,4$ Hz, H-3).

Trên phổ COSY xuất hiện tín hiệu hệ tương tác spin-spin giữa H-3' (δ_{H} 8,38)/H-4' (δ_{H} 7,83)/H-5' (δ_{H} 7,35)/H-6' (δ_{H} 8,69). Ngoài ra trên phổ HMBC thấy tương tác của proton H-3 (δ_{H} 8,12) với C-4 (δ_{C} 166,7)/C-2' (δ_{C} 155,1); tương tác giữa H-3' (δ_{H} 8,38) với C-2 (δ_{C} 156,8)/C-5' (δ_{C} 124,2) cho thấy cấu trúc của **G631-6** cũng có một hệ vòng bipyridine giống với **G631-5**. Tương tác giữa H-5 (δ_{H} 7,78) với C-7 (δ_{C} 168,1)/C-3 (δ_{C} 109,5) chứng tỏ nhóm amide liên kết với C-6. Tương tự nhóm

methoxy gắn ở vị trí C-4 dựa vào tương tác của proton của nhóm methoxy (δ_H 4,0) với C-4 (δ_C 166,7). Hợp chất **G631-6** là một alkaloid có khung bi-piridine được xác định là caerulomycinamide dựa và các số liệu phổ MS, 1D-NMR, 2D-NMR và so sánh số liệu phổ với tài liệu đã công bố [56].

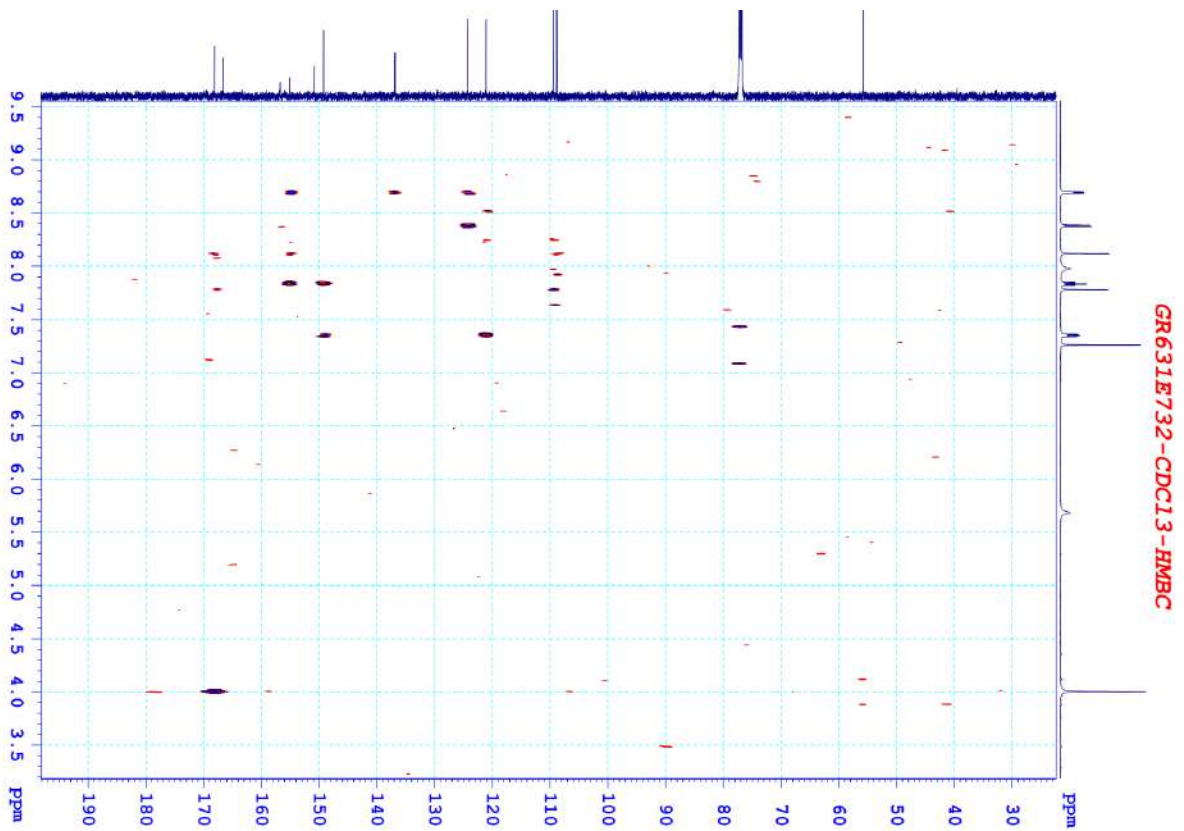


Hình 4.35: Phổ COSY của hợp chất **G631-6**

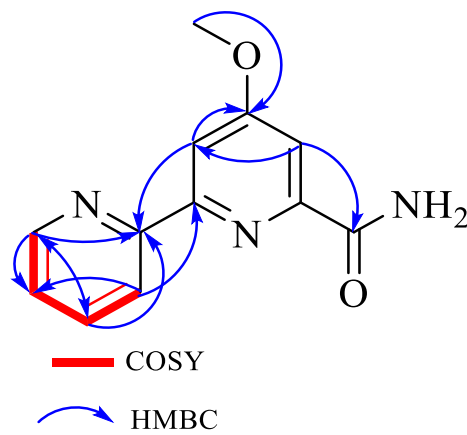
Bảng 4.9: Dữ liệu phổ ^1H và ^{13}C -NMR của hợp chất **G631-6**

C	G631-6		
	$\delta_C^{a,b}$	DEPT	$\delta_H^{a,c}$ độ bội (J, Hz)
2	156,8	C	-
3	109,5	CH	8,12 d (2,4 Hz)
4	166,7	C	-
5	108,9	CH	7,78 d (2,4)
6	150,9	C	-
7	168,1	C	-
8	55,8	CH ₃	4,0 s
2'	155,1	C	-
3'	121,1	CH	8,38 d (8,4)
4'	136,9	CH	7,83 t (7,8)
5'	124,2	CH	7,35 dd (4,8; 7,8)
6'	149,3	CH	8,69 d (4,2)

^aCDCl₃ ^b125 MHz ^c600 MHz

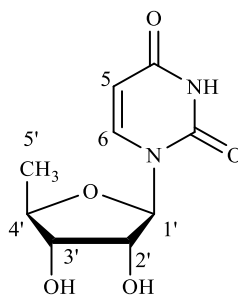


Hình 4.36: Phổ HSQC của hợp chất **G631-6**



Hình 4.37: Một số tương tác COSY, HMBC của hợp chất **G631-6**

4.1.7. Hợp chất 5'-deoxyuridine (G631-7)



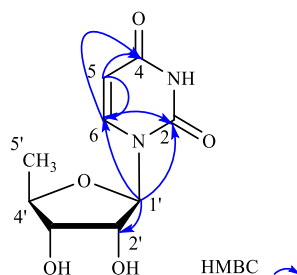
Hợp chất **G631-7** được phân lập dưới dạng chất rắn màu nâu. Độ quay cực riêng $[\alpha]_D^{26} = +8,9^0$ (c 0,1; CHCl_3). Điểm nóng chảy 185^0 - 186^0C . Phổ khối ESI-MS cho pic ion giả phân tử ở m/z 229,1 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

Bảng 4.10: Dữ liệu phổ ^1H và ^{13}C -NMR của hợp chất **G631-7**

C	G631-7		
	$\delta_C^{a,b}$	DEPT	$\delta_H^{a,c}$ độ bội (J , Hz)
2	167,3	C	-
4	166,2	C	-
5	142,5	CH	7,61 d (8,4)
6	102,9	CH	5,74 d (8,4)
1'	92,0	CH	5,79 d (4,2)
2'	75,3	CH	4,18 dd (4,2; 5,4)
3'	80,9	CH	3,80 t (5,4)
4'	76,1	CH	4,02 t (6,5)
5'	18,7	CH ₃	1,40 d (6,0)
NH			

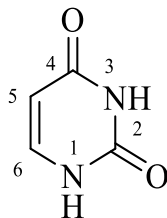
^a CD_3OD ^b150 MHz ^c600 MHz

Trên phổ ^1H -NMR và ^{13}C NMR của chất **G631-7** có tín hiệu đặc trưng của một khung uridine tại δ_H 7,61 (1H, d, $J = 8,4$ Hz; H-5); 5,74 (1H, d, $J = 8,4$ Hz; H-6)/ 2 carbon nhóm methine sp^2 tại δ_C 142,5 (C-5); 102,9 (C-6); 2 nhóm carbonyl ở δ_C 167,3 (C-2); 166,2 (C-4), cùng với một phân tử đường ribofuranose [một nhóm methyl tại δ_H 1,40 (1H, d, $J = 6,0$ Hz, H-5'), và các proton của đường ở δ_H 4,18 (1H, dd, $J = 4,2$; 5,4 Hz, H-2'); 3,80 (1H, t, $J = 5,4$ Hz, H-3'); 4,02 (1H, t, $J = 6,5$ Hz, H-4'); 5,79 (1H, d, $J = 4,2$ Hz, H-1')]. Dựa vào phổ HSQC xác định được các nhóm methyl và methine của đường ở δ_C 18,7 (H-5'); 75,3 (C-2'); 80,9 (C-3'); 76,1 (C-4'); 92,0 (C-1'). Tương tác giữa H-1' (δ_H 5,79) với C-6 (δ_C 102,9) và C-2 (δ_C 167,3) trên phổ HMBC cho phép xác định đường ribose gắn với khung uridine tại vị trí 1-N. Kết hợp các dữ liệu phổ trên và so sánh với tài liệu tham khảo [78] xác định được cấu trúc của chất **G631-7** là 5'-deoxyuridine.



Hình 4.38: Một số tương tác HMBC của hợp chất **G631-7**

4.1.8. Hợp chất uracil (G631-8)



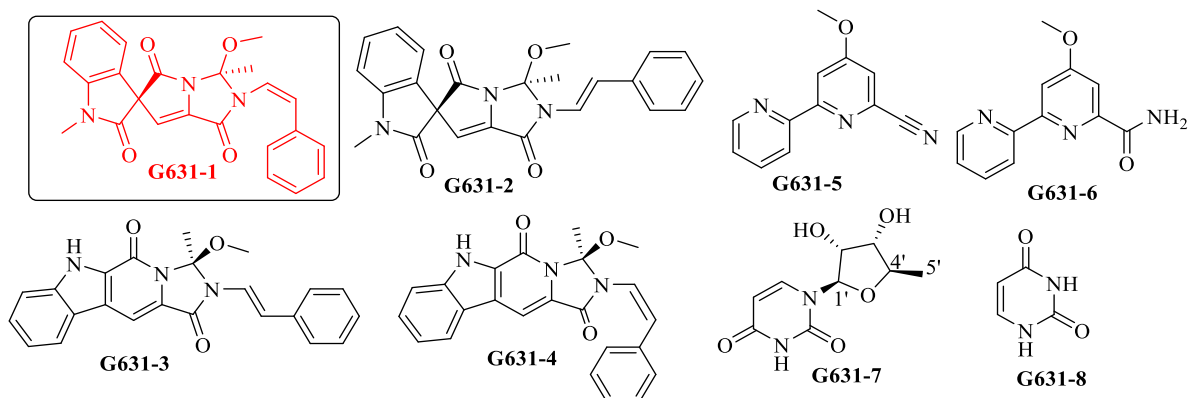
Hợp chất **G631-8** được phân lập dưới dạng chất rắn màu trắng, đnc. 320-323°C. Trên phổ $^1\text{H-NMR}$ xuất hiện tín hiệu của 2 proton methine olefinic ở δ_{H} 7,38 (1H, d, $J = 7,5$ Hz; H-6); 5,45 (1H, d, $J = 7,5$ Hz; H-5). Trên phổ $^{13}\text{C-NMR}$ và DEPT của **G631-8** cho tín hiệu của 2 carbon nhóm methine olefin tại δ_{C} 142,2 (C-6); 100,3 (C-5) và 2 carbon bậc 4 ở δ_{C} 164,4 (C-4); 151,6 (C-2). Từ các dữ liệu phổ NMR (**Bảng 4.11**) và so sánh với dữ liệu phổ của uracil cho phép xác định chất **G631-8** là uracil [79].

Bảng 4.11: Dữ liệu phổ ^1H và $^{13}\text{C-NMR}$ của hợp chất **G631-8**

C	G631-8		Uracil	
	$\delta_{\text{H}}^{\text{a,b}}$ độ bội (J , Hz)	$\delta_{\text{C}}^{\text{a,c}}$	$\delta_{\text{H}}^{\text{a,b\#}}$ độ bội (J , Hz)	$\delta_{\text{C}}^{\text{a,c\#}}$
2	-	151,6	-	151,5
4	-	164,5	-	164,4
5	5,45 d (7,5)	100,3	5,44 d (7,6)	100,2
6	7,38 d (7,5)	142,3	7,38 d (7,6)	142,2

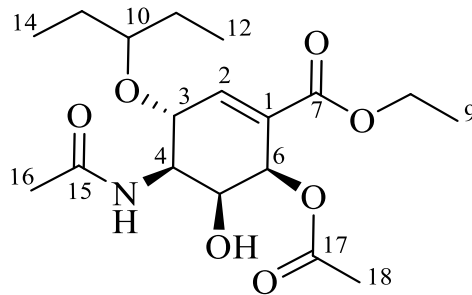
^aDMSO-d₆ ^b500 MHz ^c125 MHz, $\delta_{\text{H}}^{\#}$ $\delta_{\text{C}}^{\#}$ của chất tham khảo [79]

Như vậy, từ cặn chiết sinh khối của chủng xạ khuẩn *Actinoalloteichus cyanogriseus* G631, đã phân lập và xác định cấu trúc của 8 hợp chất, gồm isocyanogramide (**G631-1**) (chất mới), cyanogramide (**G631-2**), marinacarboline F (**G631-3**), marinacarboline H (**G631-4**), caerulomycinonitril (**G631-5**), caerulomycinamide (**G631-6**), 5'-deoxyuridine (**G631-7**), uracil (**G631-8**).

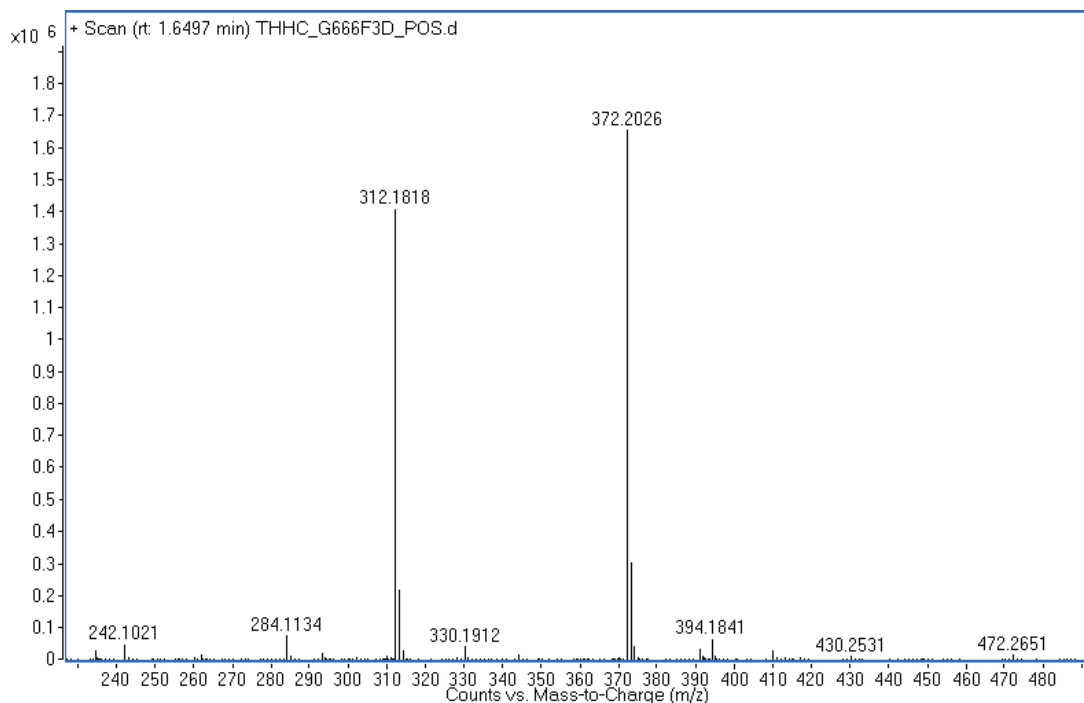


4.2. Xác định cấu trúc hóa học của các hợp chất phân lập từ chủng *Streptomyces* sp. G666

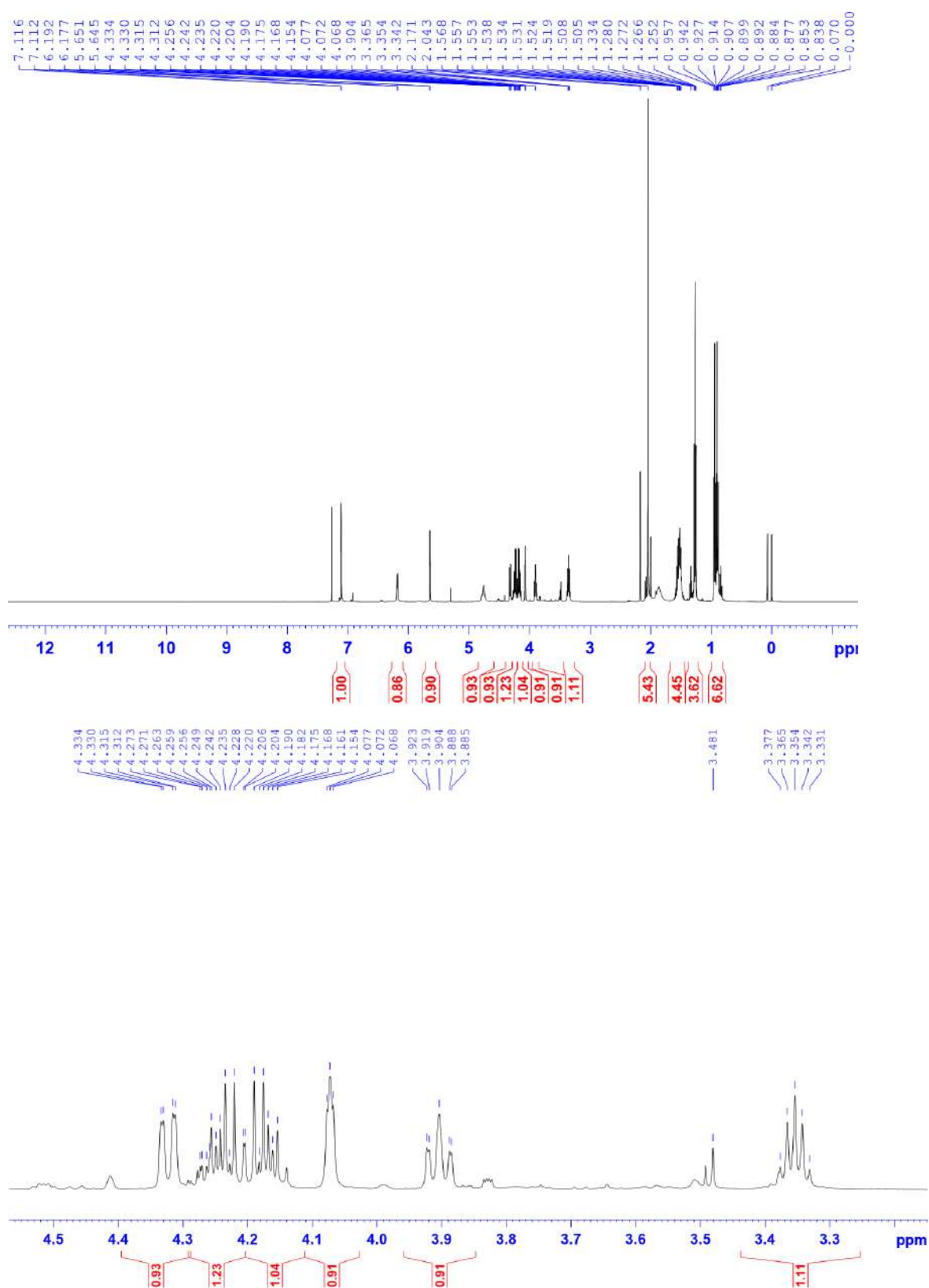
4.2.1. Hợp chất streptomine A (G666-1) (chất mới)



Hợp chất **G666-1** được phân lập ở dạng chất rắn hình kim màu trắng, độ quay cực riêng $[\alpha]_D^{26} = -38,2$ (c 0,6; CHCl_3). Trên phổ khối lượng phân giải cao HR-ESI-MS của hợp chất **G666-1** cho pic ion giả phân tử tại m/z 372,2026 $[\text{M}+\text{H}]^+$ (tính toán lý thuyết cho công thức $[\text{C}_{18}\text{H}_{30}\text{NO}_7]^+$ có m/z 372,2022), kết hợp với dữ liệu phổ ^{13}C -NMR, HSQC xác định được công thức của **G666-1** là $\text{C}_{18}\text{H}_{29}\text{NO}_7$, độ bất bão hòa bằng 5. Trên phổ IR cho thấy đỉnh hấp thụ của nhóm hydroxyl và carbonyl ở 3429 cm^{-1} và 1649 cm^{-1} tương ứng.



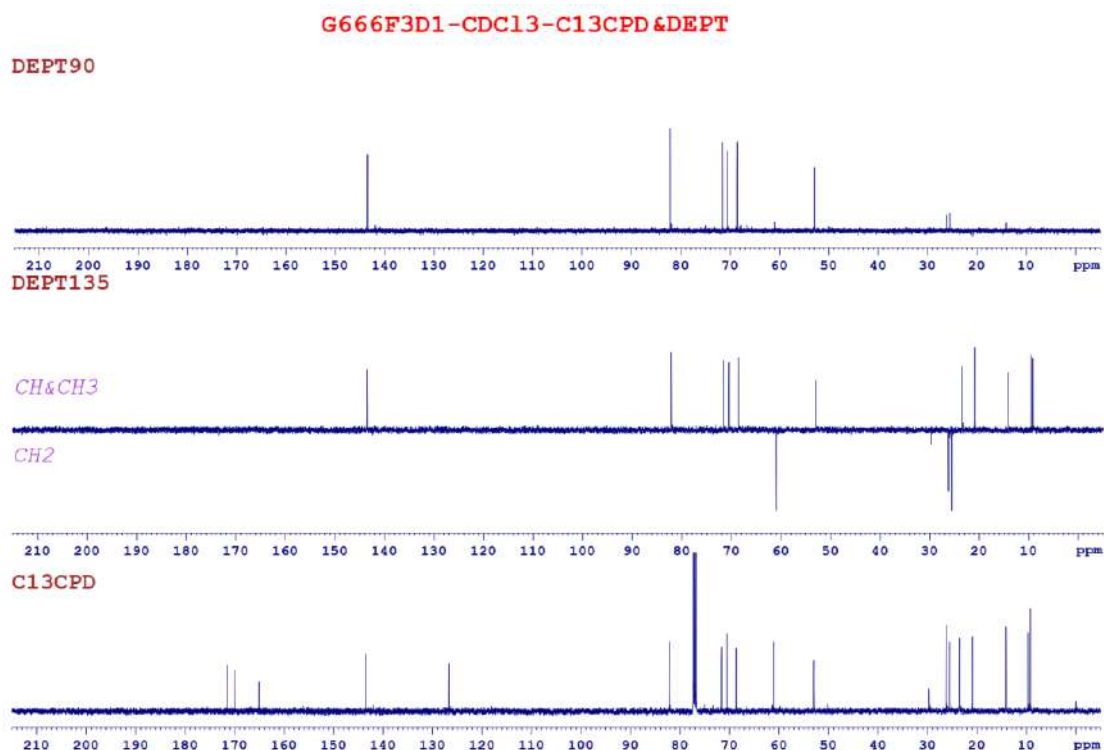
Hình 4.39: Phổ HR-ESI-MS của hợp chất **G666-1**



Hình 4.40: $^1\text{H-NMR}$ của hợp chất **G666-1**

Phổ $^1\text{H-NMR}$ của hợp chất **G666-1** cho thấy tín hiệu của năm nhóm methine lai hóa sp^3 ở δ_{H} 4,32 (1H, dd, $J = 2,0; 9,5$ Hz, H-3); 3,90 (1H, ddd, $J = 2,0; 7,5; 9,5$ Hz, H-4); 4,07 (1H, dd, $J = 2,0; 2,5$ Hz, H-5); 5,65 (1H, d, $J = 3,0$ Hz, H-6); 3,35 (1H, quint, $J = 6,0$ Hz, H-10); một proton olefinic ở δ_{H} 7,11 (1H, d, $J = 2,0$ Hz, H-2); một

tín hiệu proton doublet ở δ_H 6,18 (1H, d, $J = 7,5$ Hz, NH); tín hiệu singlet của hai nhóm methyl ở δ_H 2,04 (6H, s, CH₃-16, CH₃-18), tín hiệu triplet của ba nhóm methyl ở δ_H 0,89 (3H, t, $J = 7,5$ Hz, CH₃-12); 0,94 (3H, t, $J = 7,5$ Hz, CH₃-14); 1,27 (3H, t, $J = 7,0$ Hz, CH₃-9). Ba nhóm methylene ở δ_H 1,52 (2H, m, CH₂-11); 1,55 (2H, m, CH₂-13); 4,18 (1H, m, Ha-8) và 4,25 (1H, m, Hb-8) cũng được quan sát thấy trên phổ ¹H-NMR.



Hình 4.41: Phổ DEPT của hợp chất **G666-1**

Từ dữ liệu phổ ¹³C-NMR, DEPT và HSQC cho phép xác định hợp chất **G666-1** có mười tám nguyên tử carbon bao gồm ba nhóm carbonyl ở δ_C 165,1 (C-7); 170,1 (C-17); 171,5 (C-15); năm nhóm methyl ở δ_C 9,3 (C-12); 9,7 (C-14); 14,1 (C-9); 20,9 (C-18); 23,5 (C-16); ba nhóm methylene tại δ_C 25,6 (C-11); 26,3 (C-13); 61,0 (C-8); năm nhóm methine sp^3 tại δ_C 53,0 (C-4); 68,6 (C-6); 70,6 (C-5); 71,6 (C-3); 82,2 (C-10); một nhóm methine sp^2 tại δ_C 143,5 (C-2) và một carbon không liên kết trực tiếp với hydro ở δ_C 126,7 (C-1). Độ chuyển dịch hóa học của các nguyên tử carbon của C-3; C-8; C-4; C-5 và C-6 cho thấy chúng có liên kết với nguyên tử oxy hoặc nitơ.

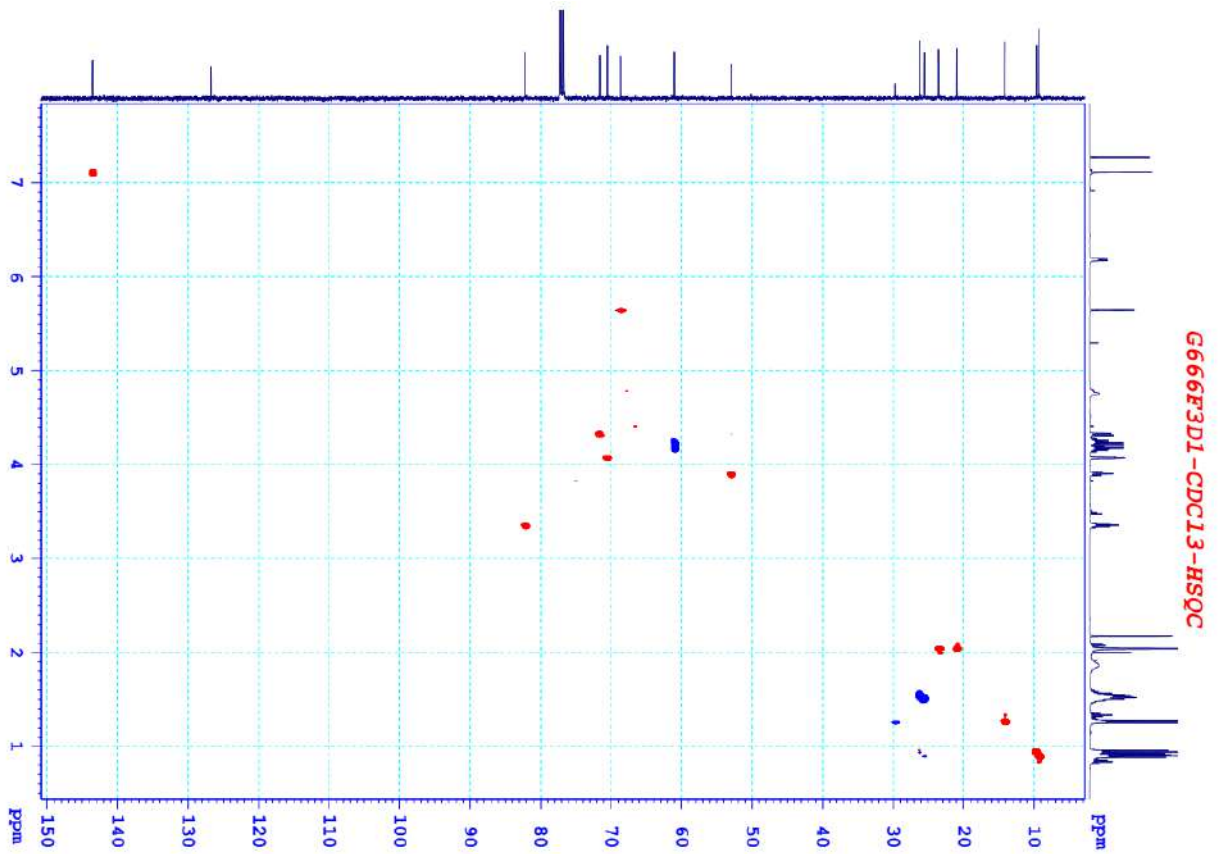
Phân tích phổ COSY của hợp chất **G666-1** cho thấy có ba hệ tương tác *spin-spin* bao gồm: CH₃-12 (δ_H 0,89)/CH₂-11 (δ_H 1,52)/H-10 (δ_H 3,35)/CH₂-13 (δ_H 1,55)/CH₃-14 (δ_H 0,94); H-2 (δ_H 7,11)/H-3 (δ_H 4,32)/H-4 (δ_H 3,90)/H-5 (δ_H 4,07)/H-

6 (δ_{H} 5,65) và CH_2 -8 (δ_{H} 4,18 và 4,25)/ CH_3 -9 (δ_{H} 1,27). Các phân tích dữ liệu phổ 2D-NMR, đặc biệt là phổ HMBC cho thấy sự hiện diện của vòng cyclohexene thế *penta*, tương tác của proton nhóm methyl H-16 (δ_{H} 2,04) với nhóm carbonyl C-15 (δ_{C} 171,5) và tương tác proton methyl H-18 (δ_{H} 2,04) với nhóm carbonyl C-17 (δ_{C} 170,1) chứng tỏ có 2 nhóm acetyl. Tương tác giữa H-4 (δ_{H} 3,90) với C-5 (δ_{C} 70,6)/C-15 (δ_{C} 171,5)/C-3 (δ_{C} 71,6) và tương tác giữa NH (δ_{H} 6,18) với C-15 (δ_{C} 171,5) chứng tỏ sự kết nối của nhóm NH-acetyl với C-4. Ngoài ra, các tương tác HMBC giữa proton nhóm methyl H-12 (δ_{H} 0,89) với C-11 (δ_{C} 25,6)/C-10 (δ_{C} 82,2); proton nhóm methyl H-14 (δ_{H} 0,94) với C-13 (δ_{C} 26,3)/C-10 (δ_{C} 82,2), tương tác HMBC giữa H-3 (δ_{H} 4,32) với C-10 (δ_{C} 82,2); H-10 (δ_{H} 3,35) với C-3 (δ_{C} 71,6)/C-12 (δ_{C} 9,3)/C-14 (δ_{C} 9,7) cho phép xác định có một nhóm pentan-3-yloxy tại C-3 trong cấu trúc của hợp chất **G666-1**. Sự có mặt của nhóm ethyl ester ở C-1 được khẳng định bằng các tương tác HMBC của H-8 với C-7 (δ_{C} 165,1)/C-9 (δ_{C} 14,1), tương tác của H-2 với C-1 (δ_{C} 126,7)/C-7 (δ_{C} 165,1). Vị trí của nhóm *O*-acetyl tại C-6 được xác định bởi các tương tác HMBC giữa H-6 với C-1/C-2/C-4/C-5/C-17.

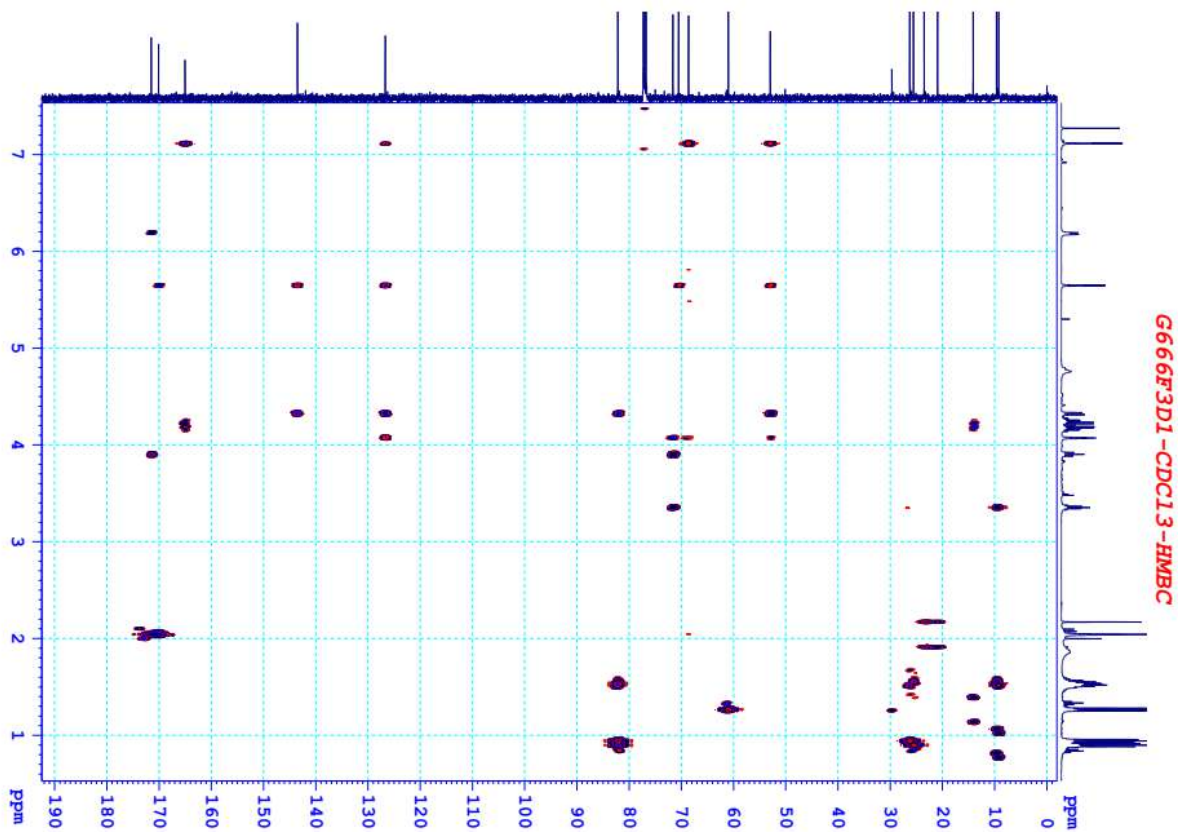
Bảng 4.12: Dữ liệu phổ ^1H -NMR và ^{13}C -NMR, DEPT của hợp chất **G666-1**

TT	G666-1		DEPT
	$\delta_{\text{C}}^{\text{a,b}}$	$\delta_{\text{H}}^{\text{a,c}}$ độ bội (<i>J</i> , Hz)	
1	126,7	-	C
2	143,5	7,11 d (2,0)	CH
3	71,6	4,32 dd (2,0; 9,5)	CH
4	53,0	3,90 ddd (2,0; 7,5; 9,5)	CH
5	70,6	4,07 dd (2,0; 2,5)	CH
6	68,6	5,65 d (3,0)	CH
7	165,1	-	C
8	61,0	4,18 m 4,25 m	CH_2
9	14,1	1,27 t (7,0)	CH_3
10	82,2	3,35 quint (6,0)	CH
11	25,6	1,52 m	CH_2
12	9,3	0,89 t (7,5)	CH_3
13	26,3	1,55 m	CH_2
14	9,7	0,94 t (7,5)	CH_3
15	171,5	-	C
16	23,5	2,04 s	CH_3
17	170,1	-	C
18	20,9	2,04 s	CH_3
NH		6,18 d (7,5)	

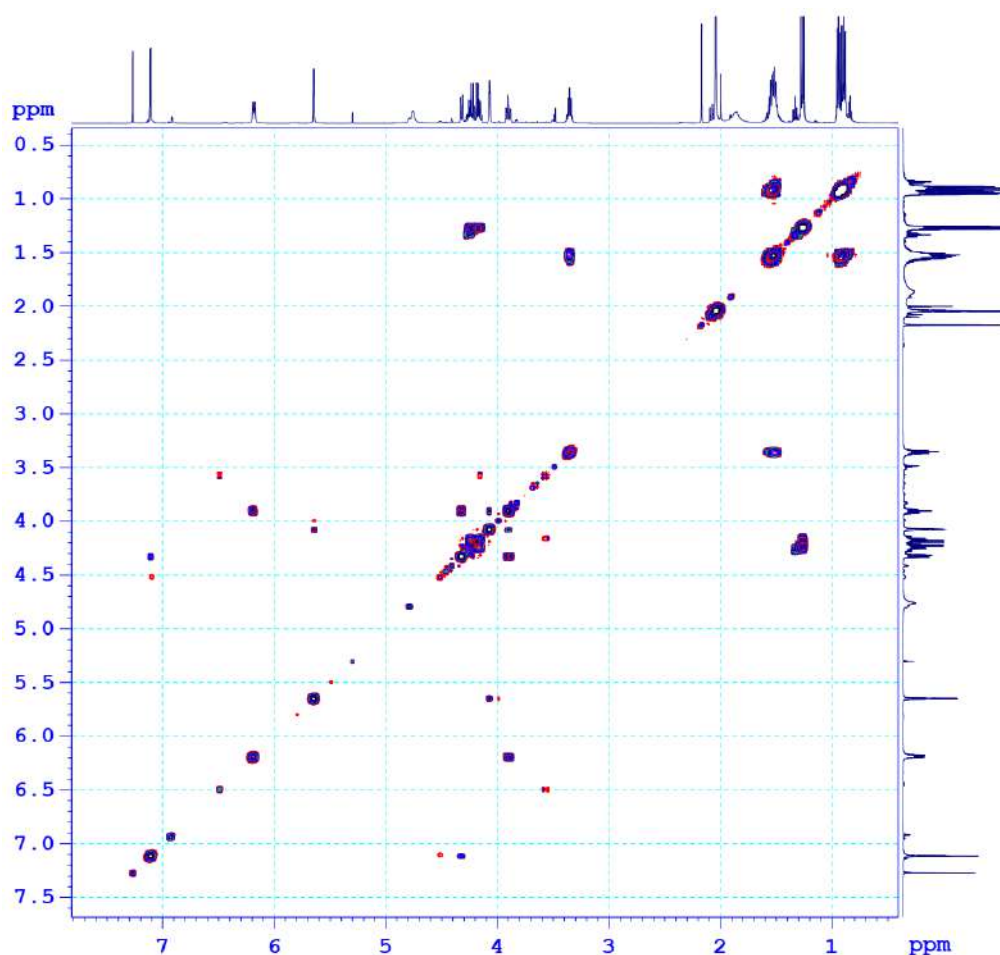
^a CDCl_3 ^b125 MHz ^c500 MHz



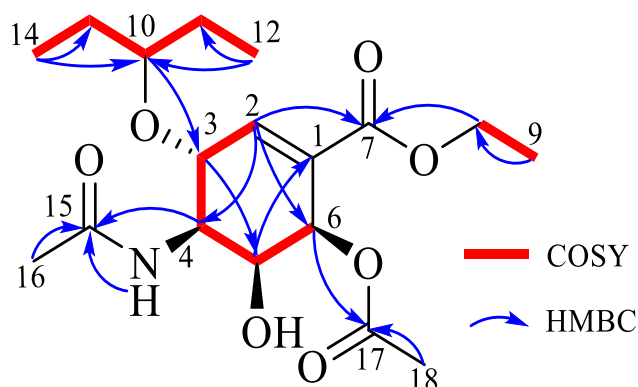
Hình 4.42: Phổ HSQC của hợp chất G666-1



Hình 4.43: Phổ HMBC của hợp chất G666-1



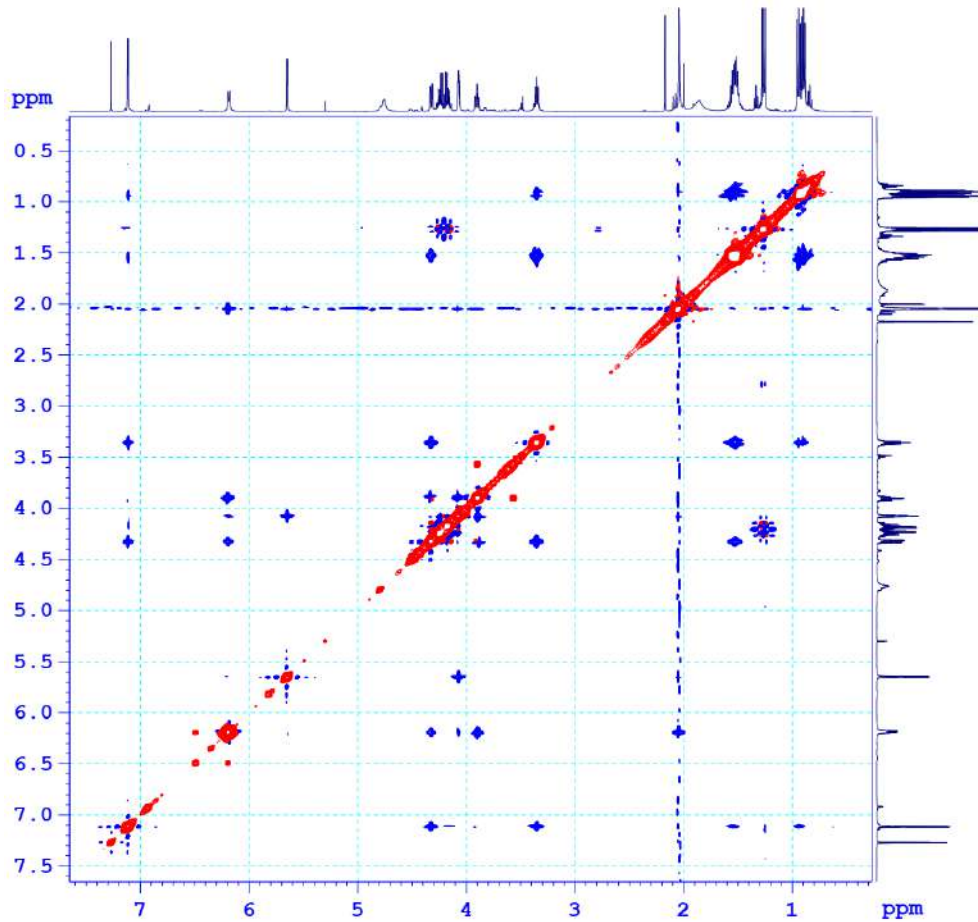
Hình 4.44: Phổ COSY của hợp chất **G666-1**



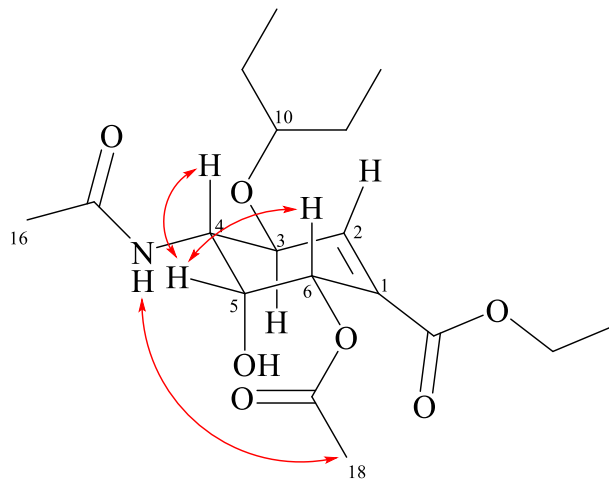
Hình 4.45: Một số tương tác chính trên phổ COSY, HMBC của hợp chất **G666-1**

Cấu hình tương đối của hợp chất **G666-1** được xác định dựa trên các hằng số tương tác và các dữ liệu của phổ NOESY. Proton H-3 có một hằng số tương tác *anti* ($J_{3,4} = 9,5$ Hz) và một hằng số tương tác *gauche* ($J_{2,3} = 2,0$ Hz) điều này cho thấy H-3 và H-4 có định hướng axial. Tương tác NOESY của H-5 với H-4 và H-6 và hằng số tương tác của proton H-4 với H-5 ($J_{4,5} = 2,0$ Hz), hằng số tương tác của H-5 với H-6 ($J_{5,6} = 2,5$ Hz) gợi ý rằng H-5 ở vị trí *cis* đối với H-4 và H-6 và proton H-5 được

dự đoán ở vị trí equatorial. Do vậy, các proton H-4, H-5, H-6 nằm trên cùng một phía của vòng cyclohexene. Ngoài ra, tương tác NOESY giữa H-3 với NH chỉ ra rằng H-3 và nhóm NH-acetyl nằm trên cùng một phía của vòng cyclohexene. Dẫn xuất cyclohexene mới này được đặt tên là streptomine A.

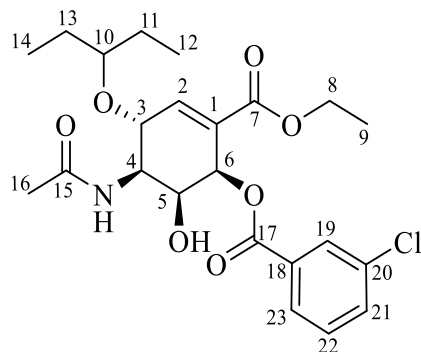


Hình 4.46: Phổ NOESY của hợp chất **G666-1**

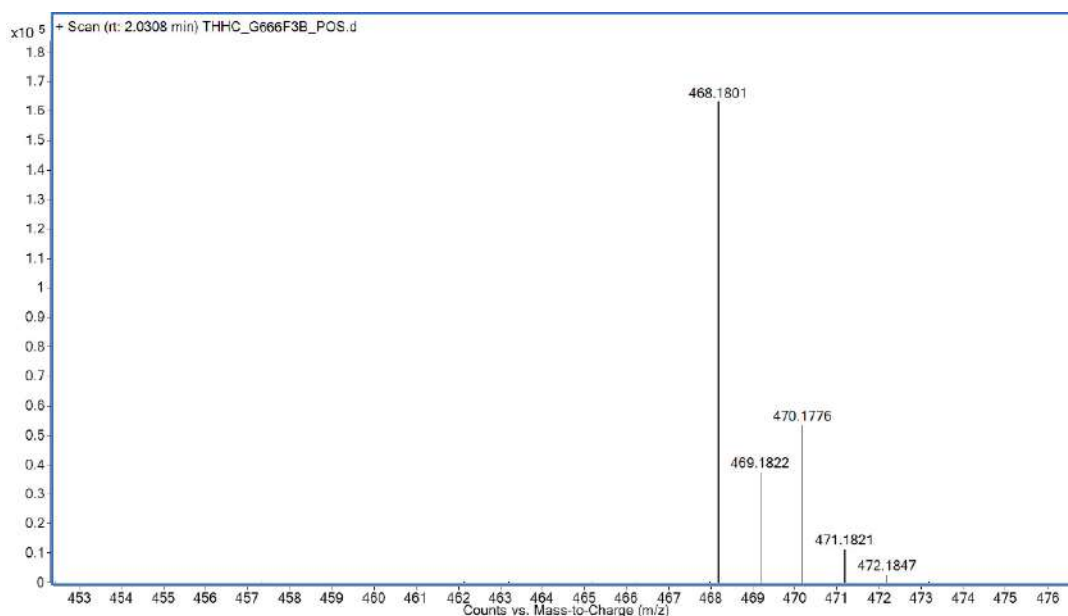


Hình 4.47: Tương tác NOESY của hợp chất **G666-1**

4.2.2. Hợp chất streptomine B (G666-2) (chất mới)



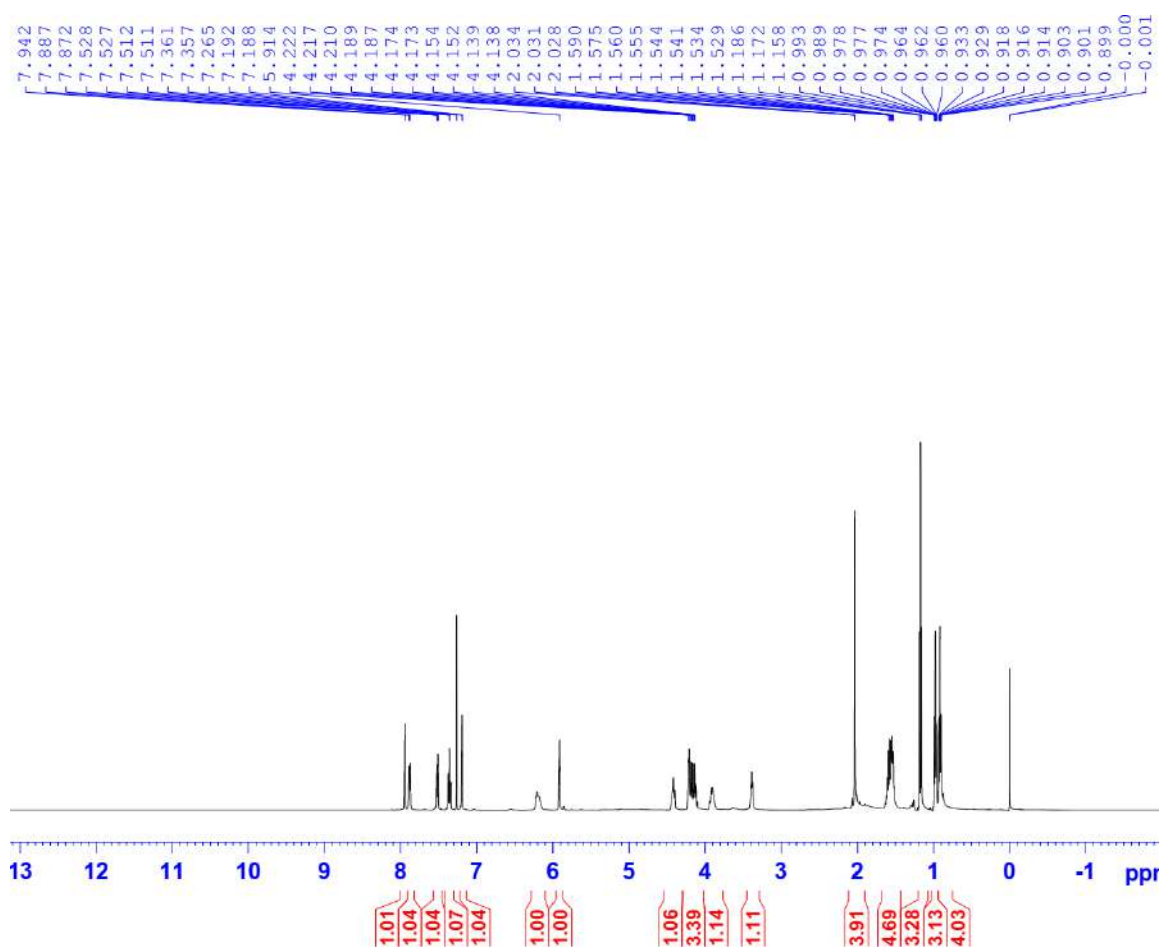
Hợp chất **G666-2** được phân lập dưới dạng chất rắn hình kim màu trắng, độ quay cực riêng là $[\alpha]_D^{26} = -50,1$ (c 0,25; CHCl_3). Phổ khối phân giải cao xuất hiện các pic ion giả phân tử ở m/z 468,1801; 470,1776 $[\text{M}+\text{H}]^+$ (tính toán lý thuyết cho công thức phân tử $[\text{C}_{23}\text{H}_{31}^{35}\text{ClNO}_7]^+$ m/z 468,1789; $[\text{C}_{23}\text{H}_{31}^{37}\text{ClNO}_7]^+$ m/z 470,1760), kết hợp với các dữ liệu phổ ^{13}C -NMR xác định được công thức phân tử của **G666-2** là $\text{C}_{23}\text{H}_{30}\text{ClNO}_7$. Trên phổ IR cho thấy đỉnh hấp thụ của nhóm hydroxyl và carbonyl ở 3453 cm^{-1} và 1645 cm^{-1} tương ứng.



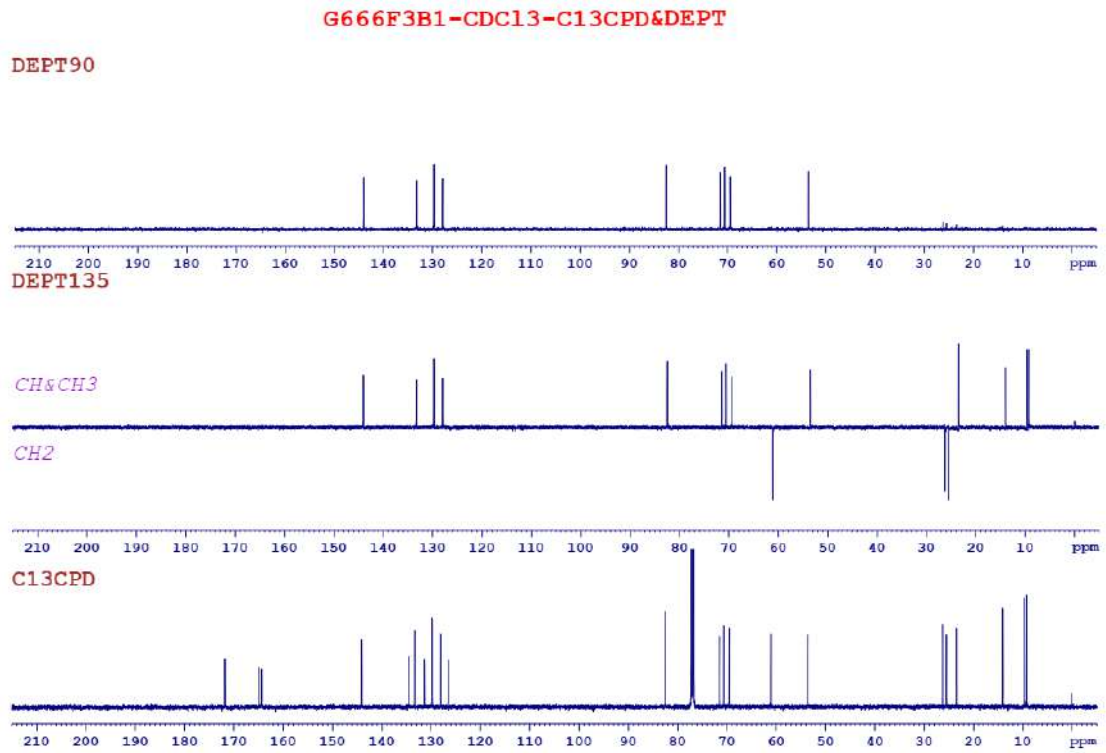
Hình 4.48: Phổ HR-ESI-MS của hợp chất **G666-2**

Phổ 1D-NMR của **G666-2** gần giống với phổ của **G666-1**, sự khác biệt giữa **G666-1** và **G666-2** là tín hiệu của nhóm benzoyl thế ở **G666-2** thay vì nhóm acetyl ở **G666-1**. Trên phổ COSY quan sát thấy bốn hệ tương tác *spin-spin* được thể hiện bằng các hình in đậm trong **Hình 4.51** bao gồm: $\text{CH}_3\text{-}12/\text{CH}_2\text{-}11/\text{H-}10/\text{CH}_2\text{-}13/\text{CH}_3\text{-}14$; $\text{H-}2/\text{H-}3/\text{H-}4/\text{H-}5/\text{H-}6$; $\text{CH}_2\text{-}8/\text{CH}_3\text{-}9$ và $\text{H-}21/\text{H-}22/\text{H-}23$. Các mối liên kết của nhóm acetamide ở C-4 và pentanyloxy ở C-3 được xác định bằng tương tác HMBC của C-

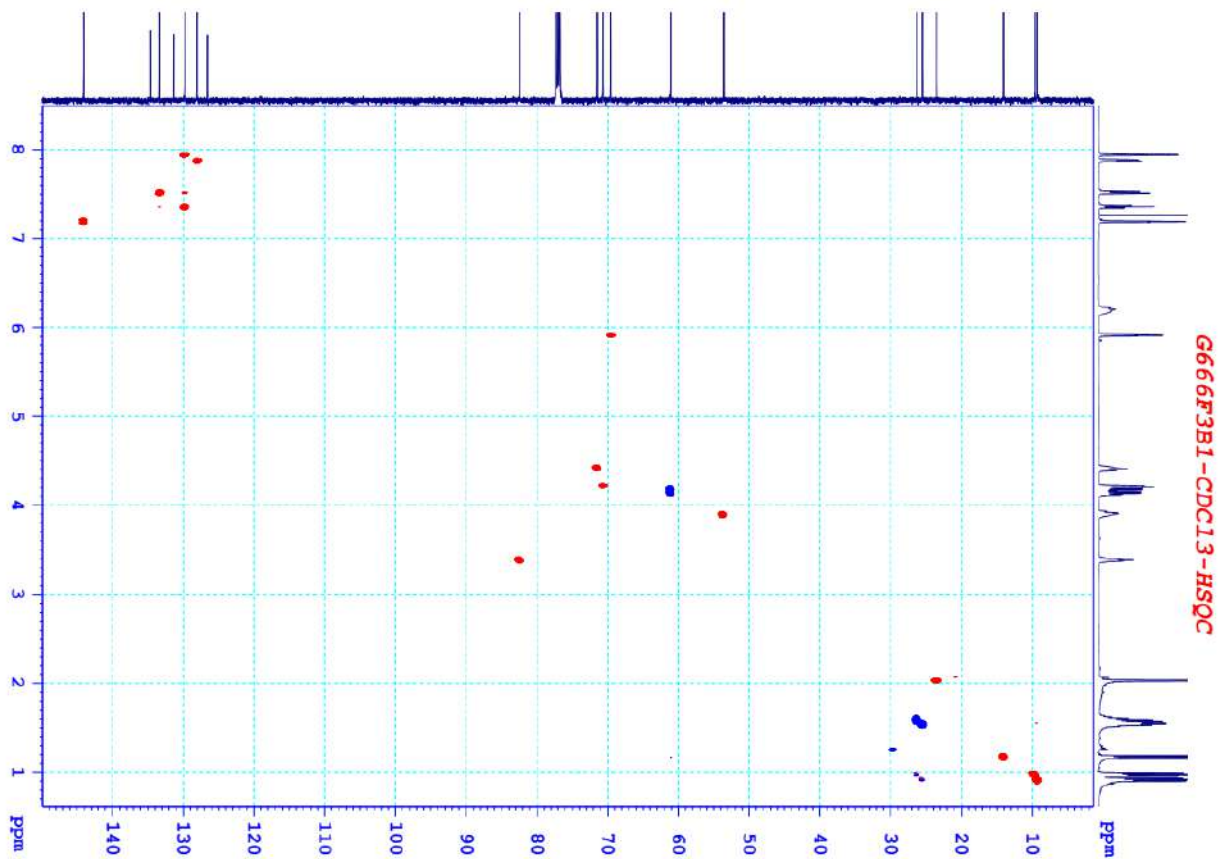
15 (δ_C 171,8) với H-4 (δ_H 3,91)/NH (δ_H 6,21) và tương tác của C-3 (δ_C 71,5) với H-10 (δ_H 3,39), tương ứng. Như trong cấu trúc của **G666-1**, nhóm ethyl este của **G666-2** được xác định dựa vào tương tác HMBC của C-7 (δ_C 165,0) với CH₂-8 (δ_H 4,15 và 4,18) và H-2 (δ_H 7,19). Nhóm benzoyloxy thế được gắn tại C-6 dựa vào tương tác HMBC của C-17 (δ_C 164,4) với H-6 (δ_H 5,91)/H-19 (δ_H 7,94)/H-23 (δ_H 7,88). Dựa vào độ chuyển dịch của C-5 (δ_C 70,6) chứng tỏ C-5 liên kết với oxy và dựa vào độ chuyển dịch của C-20 (δ_C 134,6) xác định được clo liên kết với C-20 của vòng benzen. Cấu hình tương đối của **G666-2** tương tự như cấu hình của **G666-1**, được thiết lập bằng các phân tích hằng số tương tác proton (**Bảng 4.12**) và tương tác NOESY. Phân tích chi tiết các tương tác trên phổ HMBC, COSY và NOESY (**hình 4.55**) cho phép xác định chính xác cấu trúc của **G666-2**, đây là một chất mới được đặt tên là streptomine B.



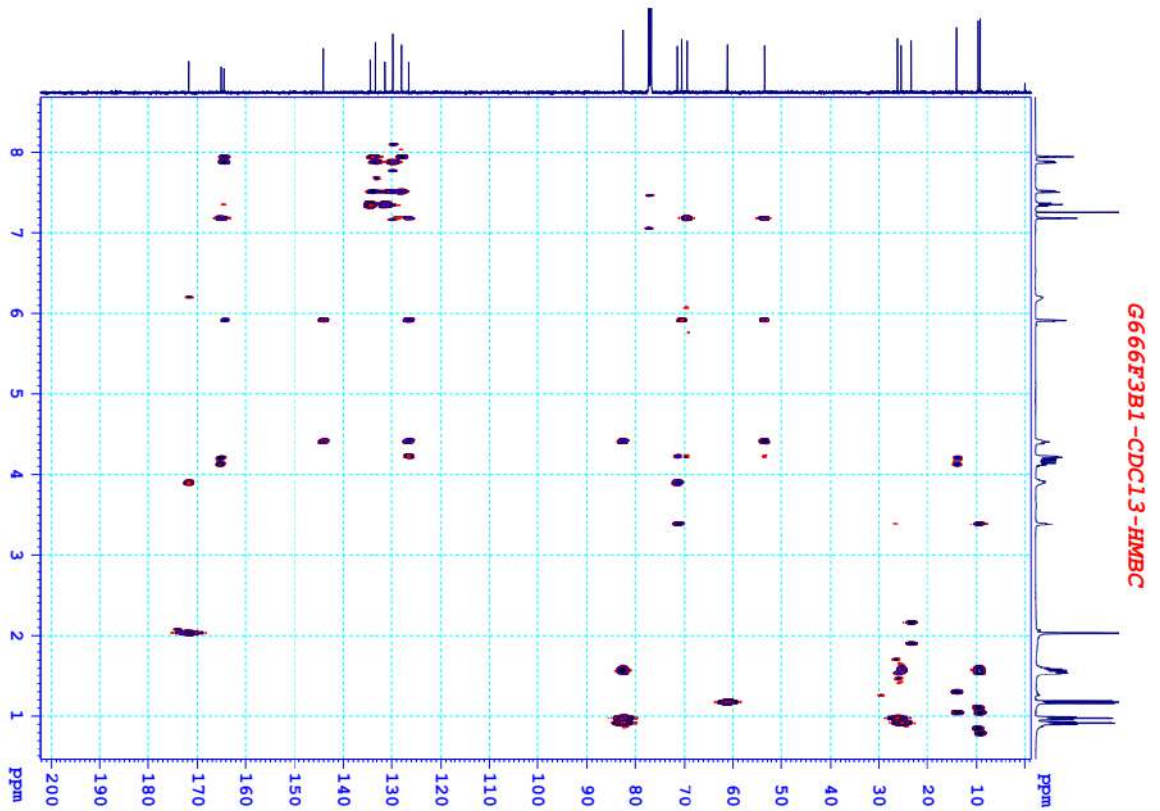
Hình 4.49: Phổ ¹H-NMR của hợp chất **G666-2**



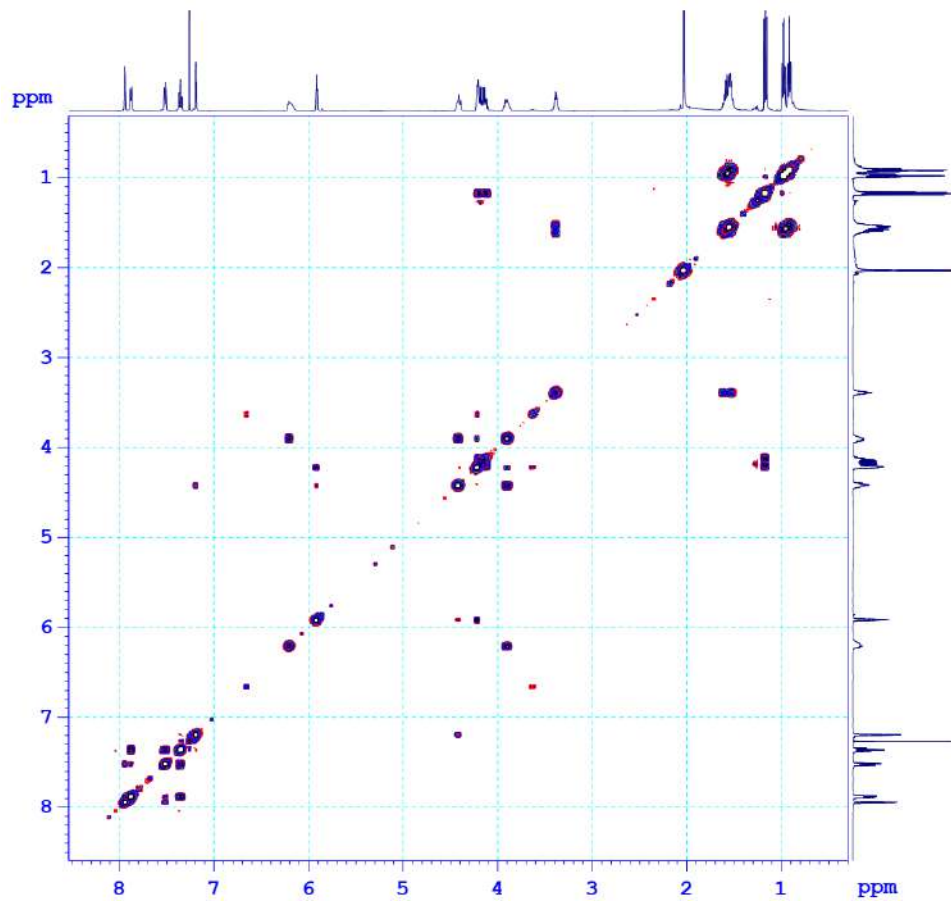
Hình 4.50: Phổ DEPT của hợp chất **G666-2**



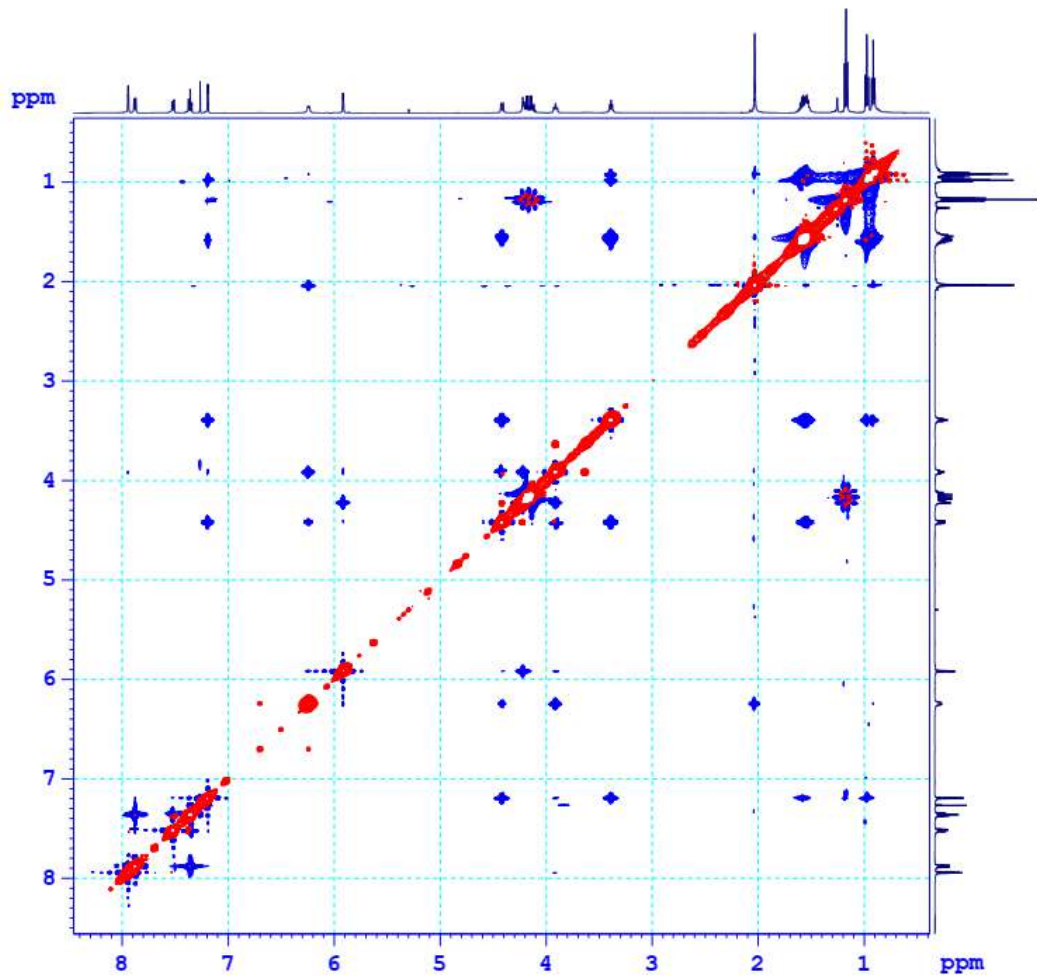
Hình 4.51: Phổ HSQC của hợp chất **G666-2**



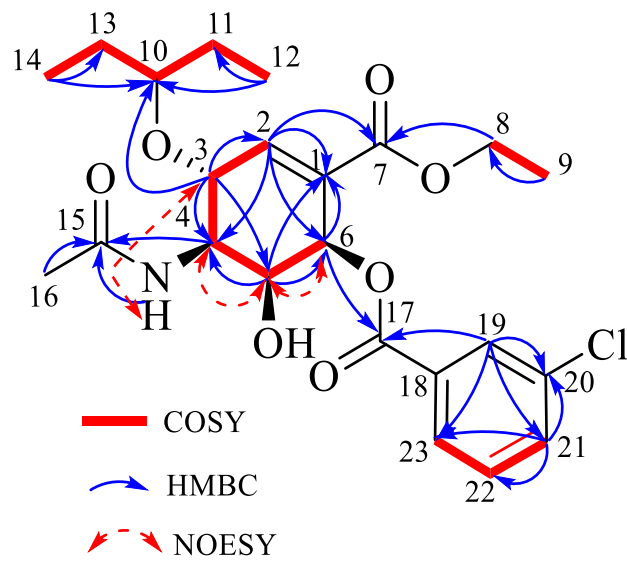
Hình 4.52: Phổ HMBC của hợp chất **G666-2**



Hình 4.53: Phổ COSY của hợp chất **G666-2**



Hình 4.54: Phổ NOESY của hợp chất **G666-2**



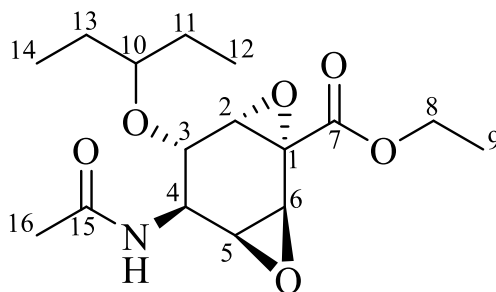
Hình 4.55: Một số tương tác COSY, HMBC, NOESY của hợp chất **G666-2**

Bảng 4.13: Dữ liệu phổ ^1H và ^{13}C -NMR, DEPT của hợp chất **G666-2**

TT	$\delta_{\text{C}}^{\text{a,b}}$	$\delta_{\text{H}}^{\text{a,c}}$ độ bội (J, Hz)	DEPT
1	126,6	-	C
2	144,1	7,19 d (1,0)	CH
3	71,5	4,39 br d (9,5)	CH
4	53,6	3,91 m	CH
5	70,6	4,22 br d (2,5)	CH
6	69,5	5,91 br d (3,5)	CH
7	165,0	-	C
8	61,1	4,15m 4,18 m	CH ₂
9	14,1	1,17 t (7,0)	CH ₃
10	82,5	3,39 m	CH
11	25,5	1,54 m	CH ₂
12	9,3	0,91 t (7,5)	CH ₃
13	26,3	1,57 m	CH ₂
14	9,7	0,97 t (7,5)	CH ₃
15	171,8	-	C
16	23,5	2,03 s	CH ₃
17	164,4	-	C
18	131,4	-	C
19	129,8	7,94 d (1,0)	CH
20	134,6	-	C
21	133,3	7,52 dd (2,0; 8,0)	CH
22	129,8	7,36 td (2,0; 8,0)	CH
23	128,0	7,88 dd (2,0; 8,0)	CH
HN		6,21 br d (7,5)	

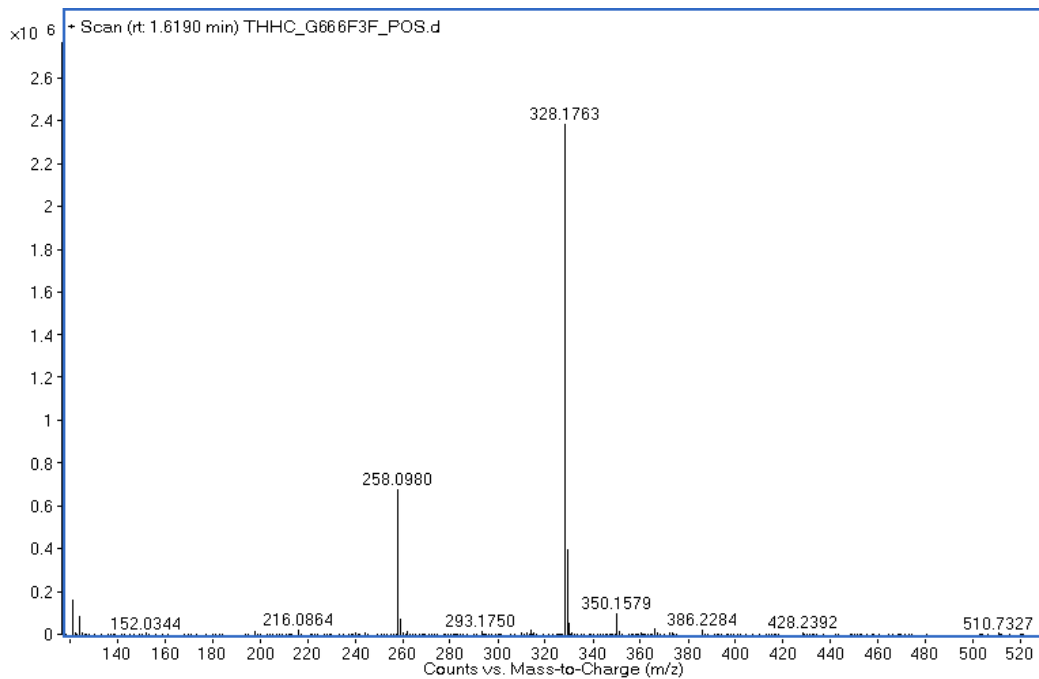
a) CDCl₃ b) 125 MHz c) 500 MHz

4.2.3. Hợp chất streptomine C (**G666-3**) (chất mới)



Hợp chất **G666-3** được phân lập dưới dạng chất rắn hình kim màu trắng, độ quay cực riêng $[\alpha]_{\text{D}}^{26} = +65,9$ (c 0,5; CHCl_3). Trên phổ khối lượng phân giải cao HR-ESI-MS của hợp chất **G661-3** cho pic ion giả phân tử tại m/z 328,1763 $[\text{M}+\text{H}]^+$ (tính toán lý thuyết cho công thức $[\text{C}_{16}\text{H}_{26}\text{NO}_6]^+$ có m/z 328,1763), kết hợp với dữ liệu phổ ^{13}C -NMR, HSQC xác định được công thức của **G666-3** là $\text{C}_{16}\text{H}_{25}\text{NO}_6$, DBE = 5. Trên

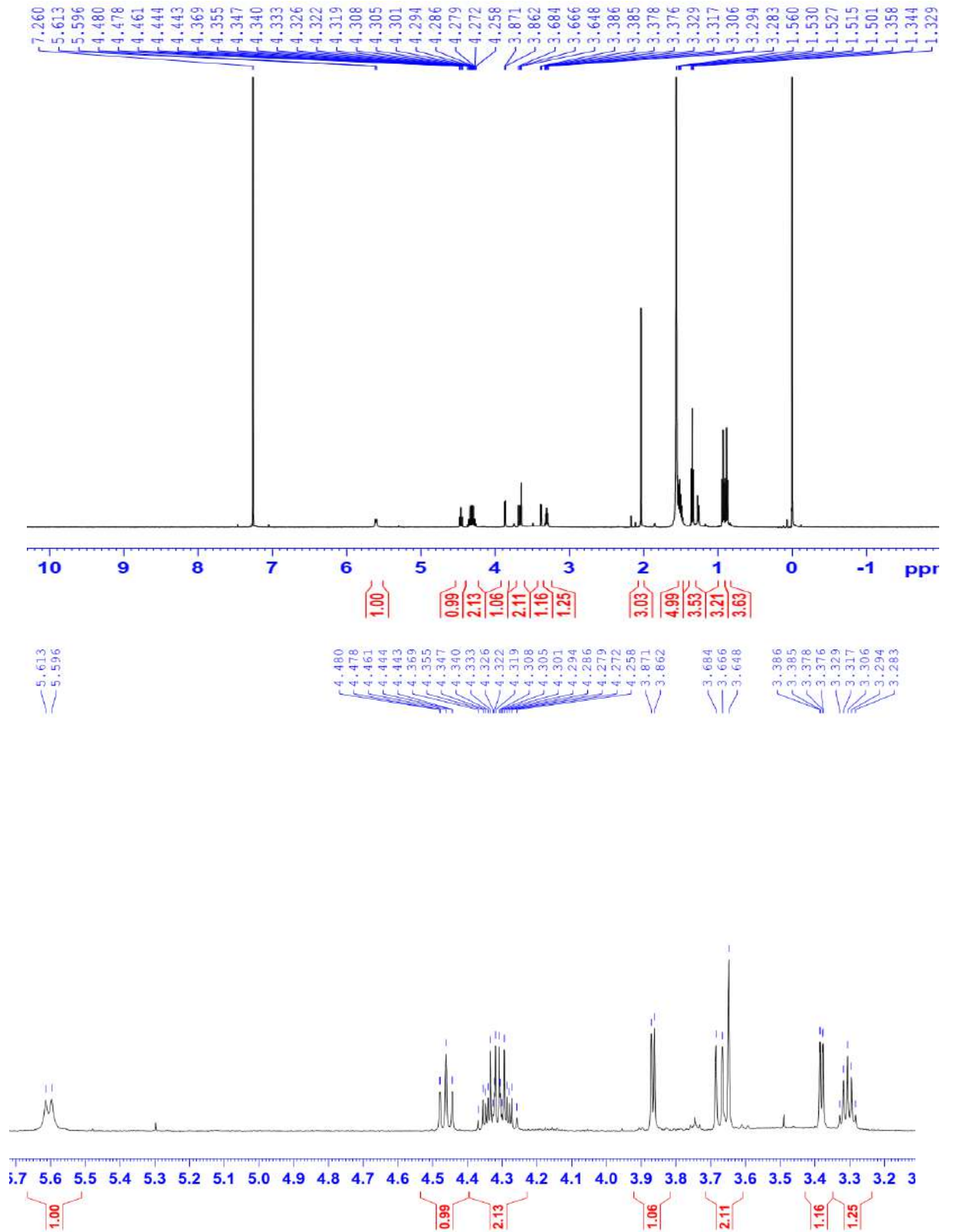
phổ IR cho thấy đỉnh hấp thụ của nhóm hydroxyl và carbonyl ở 3444 cm^{-1} và 1643 cm^{-1} tương ứng.



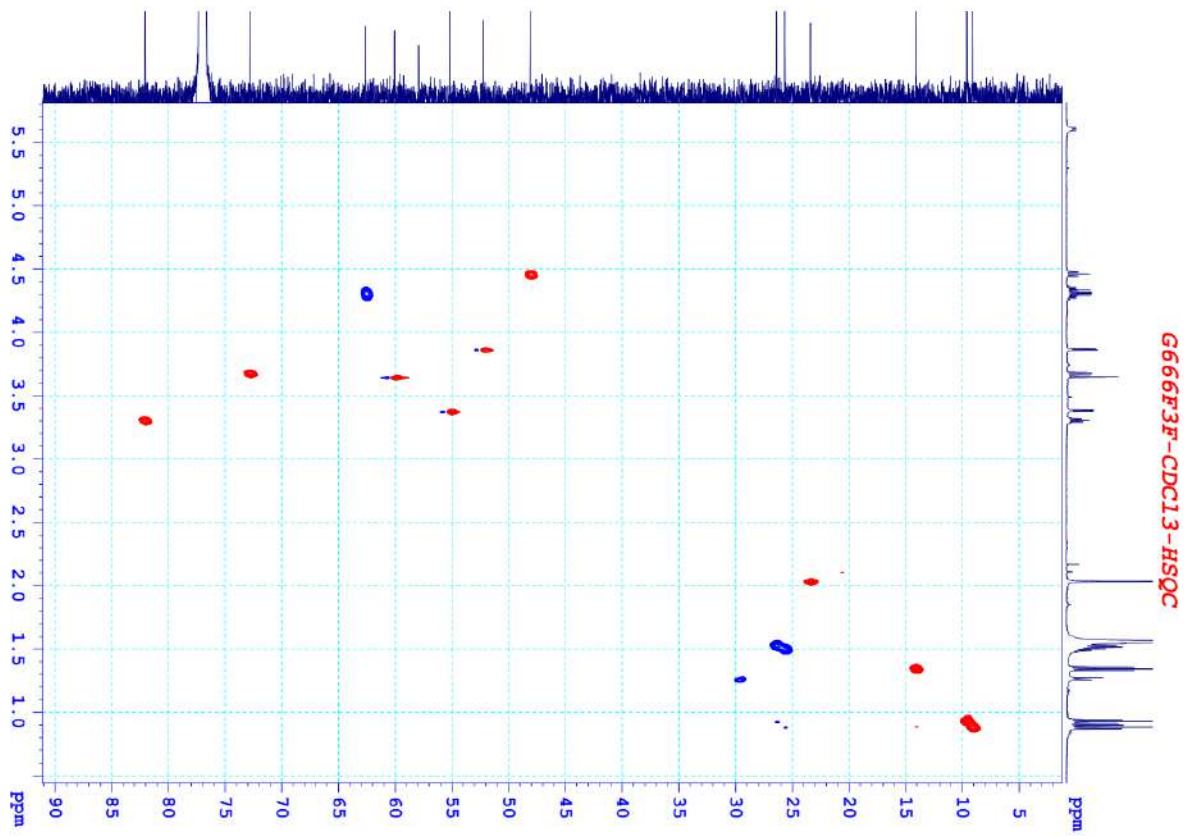
Hình 4.56: Phổ HR-ESI-MS của hợp chất **G666-3**

Phổ ^{13}C -NMR, DEPT và HSQC của **G666-3** cho thấy tín hiệu của mười sáu nguyên tử carbon bao gồm hai nhóm carbonyl ở δ_{C} 168,0 (C-7); 170,1 (C-15); bốn nhóm methyl có độ chuyển dịch hóa học ở δ_{C} 14,1 (C-9); 9,3 (C-12); 9,6 (C-14); 23,4 (C-16); ba nhóm methylene tại δ_{C} 62,6 (C-8); 25,7 (C-11); 26,4 (C-13); sáu nhóm methine tại δ_{C} 60,1 (C-2); 72,8 (C-3); 48,1 (C-4); 55,2 (C-5); 52,3 (C-6); 82,1 (C-10). Độ chuyển dịch hóa học của các nguyên tử carbon ở δ_{C} C-3, C-8, C-4, C-5 và C-6 cho phép xác định chúng có liên kết với oxy hoặc nitơ.

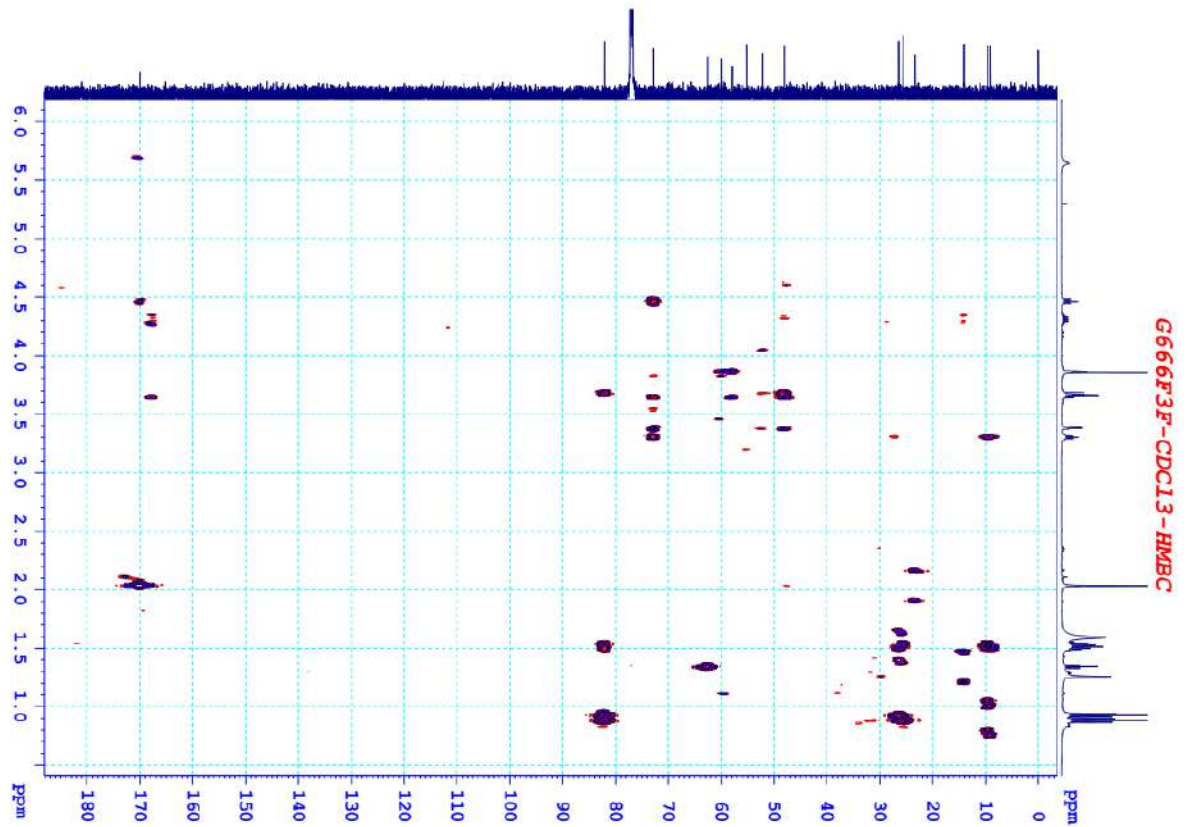
Phổ ^1H -NMR của hợp chất **G666-3** phù hợp với dữ liệu phổ ^{13}C -NMR với tín hiệu 4 nhóm methyl ở δ_{H} 0,88 (3H, t, $J = 7,5$ Hz, CH_3 -12); 0,96 (3H, t, $J = 7,5$ Hz, CH_3 -14); 1,34 (3H, t, $J = 7,0$ Hz, CH_3 -9) và 2,03 (3H, s, H-16), tín hiệu của ba nhóm methylene ở δ_{H} 1,51 (2H, m, CH_2 -11); 1,53 (2H, m, CH_2 -13); 4,25-4,36 (2H, m, CH_2 -8). Tín hiệu của sáu nhóm methine sp^3 ở δ_{H} 3,65 (1H, s, H-2); 3,67 (1H, d, $J = 9,0$ Hz, H-3); 4,47 (1H, dt, $J = 1,0; 9,0$ Hz, H-4); 3,37 (1H, dd, $J = 1,0; 4,5$ Hz, H-5); 3,87 (1H, d, $J = 4,5$ Hz, H-6); 3,31 (1H, quint, $J = 5,5$ Hz, H-10) và 1 nhóm NH dưới dạng doublet ở δ_{H} 5,6 (1H, d, $J = 8,5$ Hz, NH) cũng được quan sát thấy trên phổ ^1H -NMR.



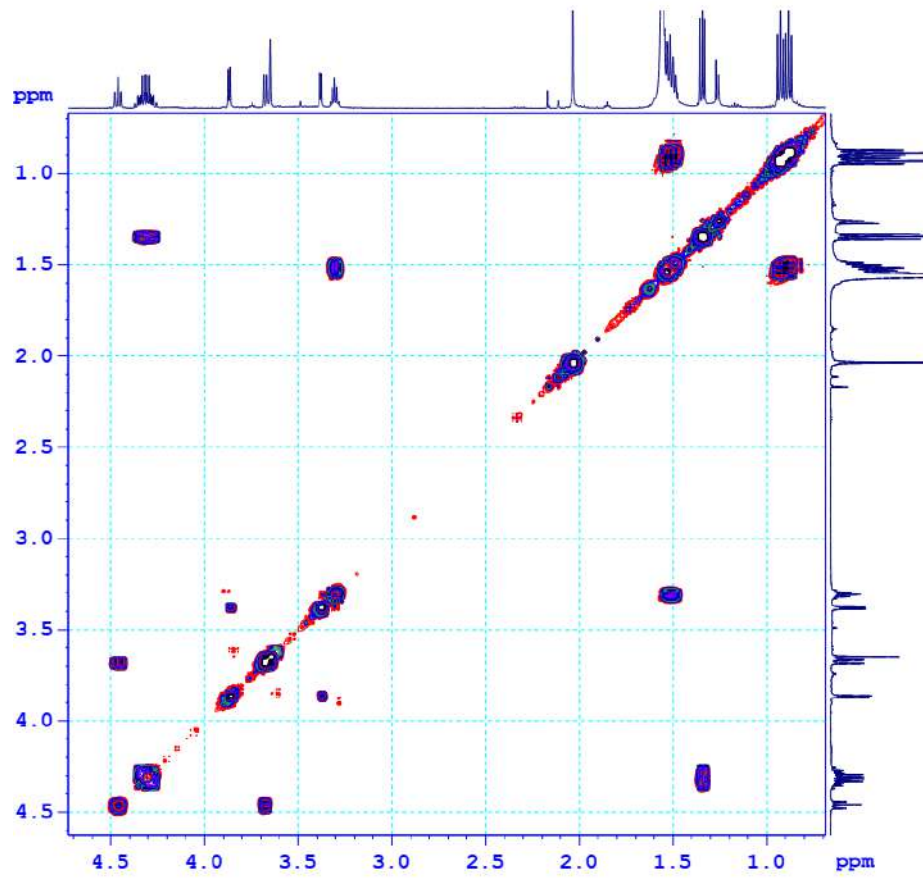
Hình 4.57: Phổ $^1\text{H-NMR}$ của hợp chất G666-3



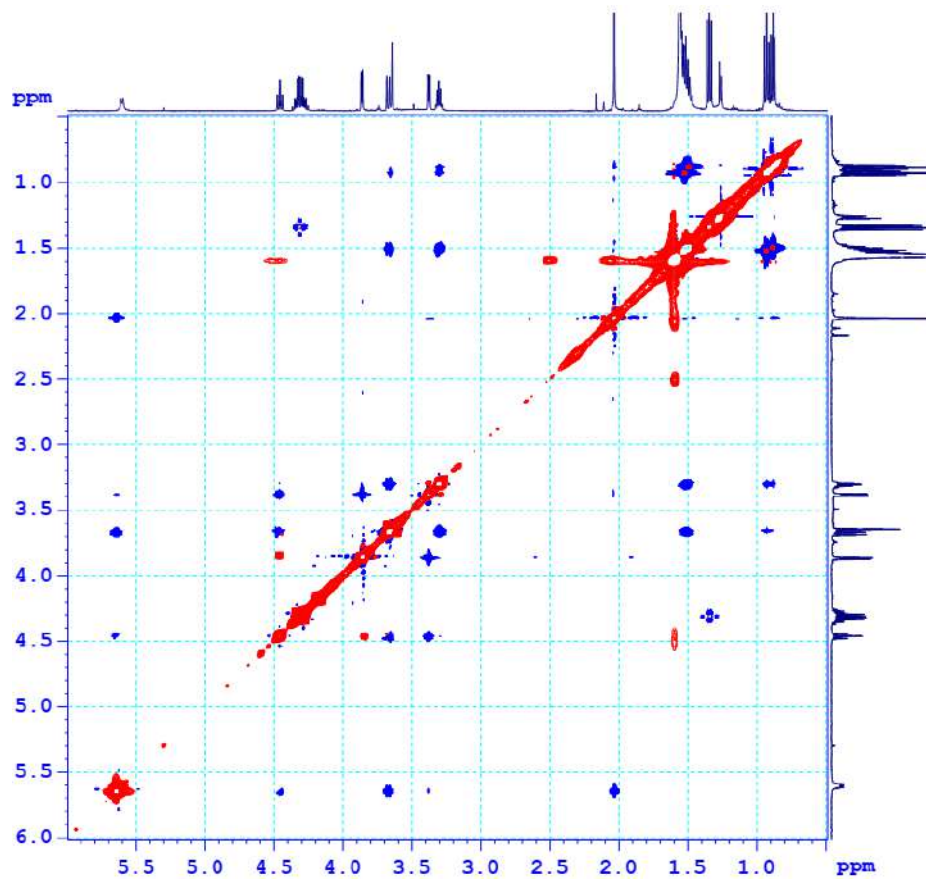
Hình 4.58: Phổ HSQC của hợp chất G666-3



Hình 4.59: Phổ HMBC của hợp chất G666-3



Hình 4.60: Phổ COSY của hợp chất G666-3



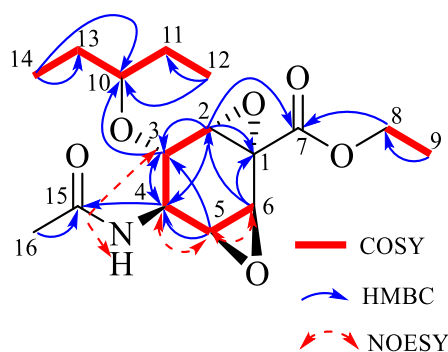
Hình 4.61: Phổ NOESY của hợp chất G666-3

Dữ liệu phổ NMR hợp chất **G666-3** có sự tương đồng với **G666-1**, nhưng khác với hợp chất **G666-1**, trên phổ của hợp chất **G666-3** cho thấy sự đóng vòng epoxy ở vị trí C1-C2 [C-1 (δ_C 57,9); C-2 (δ_C 60,1)] thay cho liên kết đôi và đóng vòng epoxy ở vị trí C5-C6 [C-5 (δ_C 55,2); C-6 (δ_C 52,3)] thay cho nhóm OH và *O*-acetyl. Trên phổ COSY xuất hiện chuỗi tương tác spin-spin của H-2 (δ_H 3,65)/H-3 (δ_H 3,67)/H-4 (δ_H 4,47)/H-5 (δ_H 3,37)/H-6 (δ_H 3,87). Tương tác HMBC của C-1 (δ_C 57,9) với proton H-2/H-6 cho thấy sự có mặt của vòng cyclohexane. Nhóm pentanyloxy được xác định gắn ở C-3 và nhóm acetamide gắn ở C-4 dựa vào tương tác HMBC của H-3 với C-10 (δ_C 82,1) và tương tác của H-4 với C-15 (δ_C 170,0). Nhóm ethyl este được xác định bằng các tương tác của CH₂-8 (δ_H 4,32) với C-7 (δ_C 168,0) trên phổ HMBC. Hơn nữa, tương tác NOE của H-4 với H-5 và H-6 cho thấy sự định hướng của chúng trên cùng một phía của vòng cyclohexane. Các phân tích chi tiết về phổ 2D-NMR đã xác nhận cấu trúc của hợp chất **G666-3** (**Hình 4.62**) đây là một chất mới và được đặt tên là streptomine C.

Bảng 4.14: Dữ liệu phổ ¹H và ¹³C-NMR của hợp chất **G666-3**

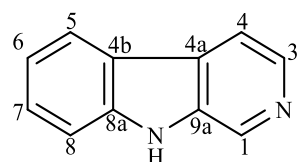
C	$\delta_C^{a,b}$	$\delta_H^{a,c}$ độ bội (J, Hz)	DEPT
1	57,9	-	C
2	60,1	3,65 s	CH
3	72,8	3,67 d (9,0)	CH
4	48,1	4,47 dt (1,0; 9,0)	CH
5	55,2	3,37 dd (1,0; 4,5)	CH
6	52,3	3,87 d (4,5)	CH
7	168,0	-	C
8	62,6	4,32 m	CH ₂
9	14,1	1,34 t (7,0)	CH ₃
10	82,1	3,31 quint (5,5)	CH
11	25,7	1.51 m	CH ₂
12	9,1	0,88 t (7,5)	CH ₃
13	26,4	1,53 m	CH ₂
14	9,6	0,93 t (7,5)	CH ₃
15	170,0	-	C
16	23,4	2,03 s	CH ₃
NH	-	5,6 d (8,5)	-

^aCDCl₃ ^b125 MHz ^c500 MHz



Hình 4.62: Một số tương tác chính trên phổ COSY, HMBC của hợp chất **G666-3**

4.2.4. Hợp chất norharman (G666-4)



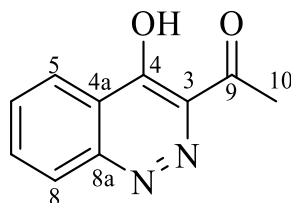
Hợp chất **G666-4** được phân lập dưới dạng chất rắn màu trắng, điểm nóng chảy 198°-199°C. Phổ khối ESI-MS của **G666-4** xuất hiện pic ion giả phân tử ở m/z 169,1 $[M+H]^+$. Phổ $^1\text{H-NMR}$ xuất hiện tín hiệu của 07 proton vùng trường thơm gồm có 1 hệ ABX thuộc vòng có chứa nitơ ở δ_{H} 8,11 (1H, d, $J = 5,5$ Hz, H-4); 8,31 (1H, d, $J = 5,5$ Hz, H-3); 8,81 (1H, s, H-1) và 04 proton thuộc hệ vòng aromatic thế 1,2 ở δ_{H} 7,29 (1H, t, $J = 8,0$ Hz, H-6); 7,56-7,59 (2H, br.s, H-7-8); 8,21 (1H, d, $J = 8,0$ Hz, H-5). Phổ $^{13}\text{C-NMR}$ thấy tín hiệu của 11 nguyên tử carbon (**bảng 4.15**), trong đó có 07 nhóm methine aromatic và 04 carbon bậc 4 không liên kết trực tiếp với hydro. Từ các dữ liệu phổ ESI-MS, $^1\text{H-NMR}$, $^{13}\text{C-NMR}$ và so sánh với tài liệu tham khảo [80] cho phép xác định chất **G666-4** là 9H-pyrido[3,4-b]indole, hay còn gọi là norharman.

Bảng 4.15: Dữ liệu phổ ^1H và $^{13}\text{C-NMR}$ của hợp chất **G666-4**

TT	G666-4		DEPT	Norharman
	$\delta_{\text{C}}^{a,b}$	$\delta_{\text{H}}^{a,c}$ độ bội (J , Hz)		
1	134,2	8,81 s	CH	134,1
3	138,2	8,31 d (5,5)	CH	138,4
4	116,1	8,13 d (5,5)	CH	116,1
4a	130,4	-	C	130,5
4b	122,2	-	C	122,2
5	122,6	8,23 d (8,0)	CH	122,7
6	120,8	7,29 t (8,0)	CH	120,8
7	129,6	7,56-7,59 m	CH	129,8
8	112,7		CH	112,8
8a	142,9	-	C	142,8
9a	137,7	-	C	137,8

^a CD_3OD ^b125 MHz ^c500 MHz [#] δ_{C} của chất tham khảo [80]

4.2.5. Hợp chất 3-acetyl-4-hydroxycinnoline (G666-5)



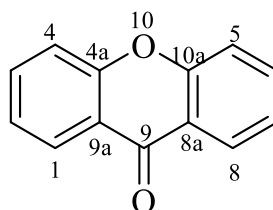
Hợp chất **G666-5** được phân lập dưới dạng chất rắn màu vàng. Phổ khối phân giải cao HR-MS cho pic ion phân tử proton hóa ở m/z 189,0727 $[M+H]^+$, trên phổ ^{13}C -NMR và DEPT (**bảng 4.16**) cho thấy sự có mặt của 10 nguyên tử carbon trong đó có 1 nhóm keton ở δ_{C} 194,1 (C-9); 1 nhóm methyl ở δ_{C} 24,0 (CH₃-10); 4 nhóm methine vòng thơm và 4 carbon bậc 4 ở δ_{C} 123,5 (C-4a), 145,3 (C-3), 147,7 (C-8a), 160,6 (C-4), dựa vào độ chuyển dịch hóa học cho thấy carbon bậc 4 ở C-4 liên kết với oxy. Trên phổ ^1H -NMR cho tín hiệu của 4 nhóm methine vòng thơm thế dạng 1,2 ở δ_{H} [7,89 (d, $J = 8,0$ Hz, H-8); 7,84 (t, $J = 7,5$ Hz, H-7); 7,63 (t, $J = 7,5$ Hz, H-6); 8,36 (d, $J = 8,0$ Hz, H-5)]; 1 nhóm methyl ở δ_{H} 2,77 (s, CH₃-10) và 1 proton của nhóm OH ở δ_{H} 9,95 (br.s, OH). Kết hợp các dữ liệu phổ MS, 1D-NMR và so sánh với tài liệu tham khảo [81] cho phép xác định chất **G666-5** là 3-acetyl-4-hydroxycinnoline. Hợp chất này đã được tổng hợp vào năm 1991 [81, 82].

Bảng 4.16 : Dữ liệu phổ ^1H và ^{13}C -NMR của hợp chất **G666-5**

TT	G666-5		DEPT	3-acetyl-4-hydroxycinnoline
	$\delta_{\text{C}}^{a,b}$	$\delta_{\text{H}}^{a,b}$ độ bội (J , Hz)		$\delta_{\text{C}}^{a,b\#}$
3	145,3	-	C	145,2
4	160,6	-	C	160,6
4a	123,5	-	C	123,4
5	126,9	8,36 d (8,0)	CH	126,8
6	129,4	7,63 t (7,5)	CH	129,4
7	134,9	7,84 t (7,5)	CH	134,9
8	129,2	7,89 d (8,0)	CH	129,2
8a	147,7	-	C	147,7
9	194,2	-	C	194,1
10	23,9	2,77 s	CH ₃	24,0

^aCDCl₃ ^b125 MHz ^c500 MHz $\delta_{\text{C}}^{\#}$ của chất tham khảo [81]

4.2.6. Hợp chất xanthone (G666-6)



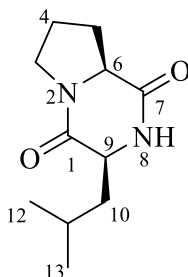
Hợp chất **G666-6** được phân lập dưới dạng chất rắn màu trắng, điểm nóng chảy 173-174°C. Phổ khối ESI-MS cho pic ion giả phân tử ở m/z 197,1 $[M+H]^+$. Phổ $^1\text{H-NMR}$ xuất hiện tín hiệu của 4 proton vòng thơm ở δ_{H} 7,92 (1H, d, $J = 7,5$ Hz, H-1); 7,30 (1H, t, $J = 7,5$ Hz, H-3); 6,67 (2H, m, H-2, H-4). Trên phổ $^{13}\text{C-NMR}$ và DEPT xuất hiện tín hiệu 4 nhóm methine vòng thơm ở δ_{C} 123,9 (C-2, C-7); 117,8 (C-4, C-5); 126,5 (C-1, C-8); 135,0 (C-3, C-6); 1 nhóm carbonyl ở δ_{C} 174,9 (C-9) (**Bảng 4.17**). Kết hợp với phổ khối có thể dự đoán rằng hợp chất **G666-6** có cấu trúc đối xứng. Dựa vào tín hiệu trên phổ khối có thể dự đoán rằng hợp chất **G666-6** có cấu trúc đối xứng. Từ các dữ liệu phổ MS, 1D-NMR và so sánh với tài liệu tham khảo cho phép xác định chất là **G666-6** là xanthone [83, 84].

Bảng 4.17: Dữ liệu phổ ^1H và $^{13}\text{C-NMR}$ của hợp chất **G666-6**

TT	G666-6			Xanthone
	$\delta_{\text{C}}^{a,b}$	DEPT	$\delta_{\text{H}}^{a,b}$ độ bội (J , Hz)	$\delta_{\text{C}}^{a,d\#}$
1, 8	126,5	CH	7,92 d (7,5)	125,9
2, 7	123,9	CH	6,67 m	124,3
3, 6	135,0	CH	7,30 t (7,5)	135,4
4, 5	117,8	CH	6,67 m	118,1
4a, 10a	155,1	C	-	155,6
8a, 9a	120,8	C	-	121,1
9	174,9	C	-	175,9

^a CDCl_3 ^b125 MHz ^c500 MHz ^dDMSO-d₆ $\delta_{\text{C}}^{\#}$ của chất tham khảo [84]

4.2.7. Hợp chất cyclo-(Pro-Leu) (G666-7)



Hợp chất **G666-7** được phân lập dưới dạng chất rắn màu trắng, đnc. 147-148°C, độ quay cực riêng $[\alpha]_{\text{D}}^{25} = -83,8^\circ$ (c 0,18; MeOH). Phổ khối ESI-MS cho pic

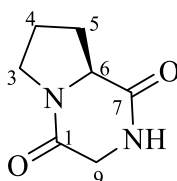
ion giả phân tử ở m/z 211,1 $[M+H]^+$. Phổ ^{13}C -NMR và DEPT cho thấy phân tử có 11 nguyên tử carbon, trong đó có 2 nhóm methyl ở δ_{C} 22,7 (C-12) và 21,2 (C-13); 2 nhóm carbonyl ở 166,2 (C-1); 170,2 (C-7); 4 nhóm methylen trong đó có 1 nhóm methylen liên kết trực tiếp với nitơ ở δ_{C} 45,5 (C-3). Phổ ^1H -NMR xuất hiện tín hiệu của 2 nhóm methine gắn với nitơ ở δ_{H} 4,11 (1H, t, $J = 8,0$ Hz, H-9); 4,02 (1H, dd, $J = 3,5; 9,5$ Hz, H-6); 2 nhóm methyl ở δ_{H} 0,99 (3H, d, $J = 6,5$ Hz, CH_3 -12); 1,01 (3H, d, $J = 6,5$ Hz, CH_3 -13); tín hiệu nhóm methylene ở δ_{H} 3,53-3,59 (2H, m, CH_2 -3) và 7 tín hiệu proton khác ở vùng trường cao. Từ các dữ liệu phổ ^1H -NMR, ^{13}C -NMR (bảng 4.18) và so sánh với tài liệu tham khảo cho phép xác định chất **G666-7** là cyclo-(Leu-Pro) [85-87].

Bảng 4.18: Dữ liệu NMR của hợp chất **G666-7** và hợp chất tham khảo

TT	G666-7		DEPT	Cyclo-(Pro-Leu)	
	$\delta_{\text{H}}^{\text{a,b}}$ độ bội (J, Hz)	$\delta_{\text{C}}^{\text{a,c}}$		$\delta_{\text{H}}^{\text{a,d,\#}}$ độ bội (J, Hz)	$\delta_{\text{C}}^{\text{a,e,\#}}$
1	-	166,2	C	-	166,1
3	3,53 m 3,59 m	45,5	CH_2	3,54 m 3,61 m	45,5
4	1,90 m 2,04 m	22,2	CH_2	1,91 m 2,05 m	22,8
5	2,13 m 2,35 m	28,1	CH_2	2,12 m 2,35 m	28,2
6	4,02 dd (3,5; 9,5)	59,0	CH	4,01 dd (4,2; 9,2)	59,0
7	-	170,2	C	-	170,1
9	4,11 t (8,0)	53,4	CH	4,13 dt (8,0; 1,0)	53,4
10	1,52 m 2,14 m	38,7	CH_2	1,52 m 2,07 m	38,7
11	1,73 m	24,7	CH	1,69-1,76 m	24,8
12	0,96 d (6,5)	22,7	CH_3	0,94 d (6,3)	22,8
13	1,01 d (6,5)	21,2	CH_3	1,00 d (6,3)	21,2

^a CDCl_3 , ^b500 MHz, ^c125 MHz, ^d400 MHz, ^e100 MHz, $\delta_{\text{H}}^{\#}$, $\delta_{\text{C}}^{\#}$ của chất tham khảo [87]

4.2.8. Hợp chất cyclo-(Pro-Gly) (G666-8)



Hợp chất **G666-8** được phân lập dưới dạng chất rắn màu trắng, đnc. 210-211°C; $[\alpha]_{\text{D}}^{25}$ -142,5° (c 0,40; MeOH). Phổ khối ESI-MS cho pic ion phân tử proton hóa ở m/z 155,1 $[M+H]^+$. Phân tích phổ ^{13}C -NMR và DEPT của chất **G666-8** cho

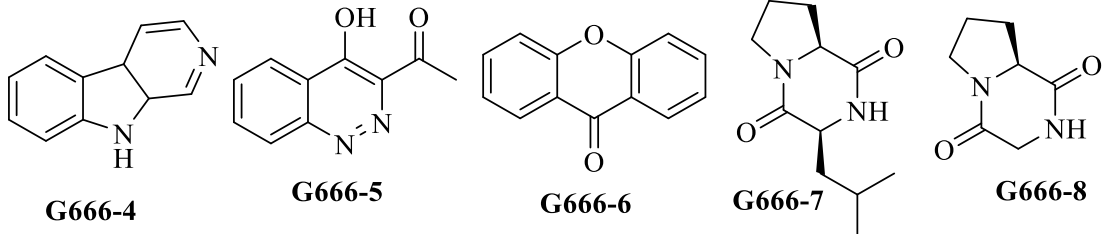
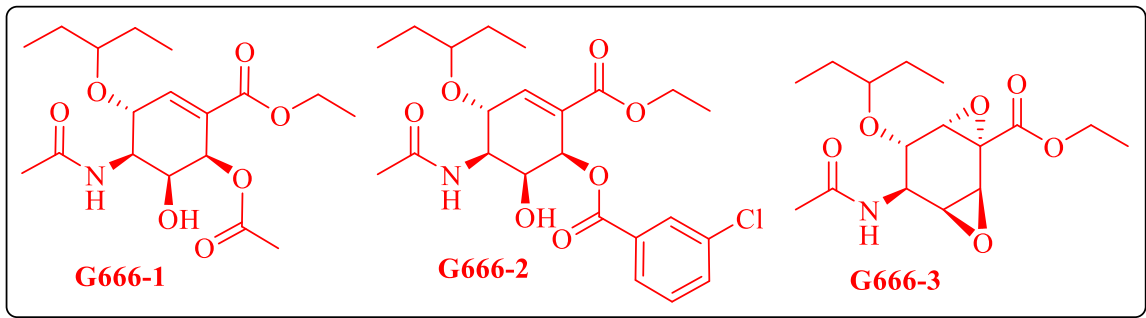
thấy phân tử có 7 carbon bao gồm 04 nhóm methylen ở δ_C 23,3 (C-4); 29,4 (C-5); 46,3 (C-3); 46,9 (C-9). Độ chuyển dịch hoá học của 02 nhóm methylene ở δ_C 46,3 (C-3); 46,9 (C-9) cho phép xác định 2 nhóm methylene này có liên kết với nguyên tử nitơ; 01 nhóm methine sp^3 liên kết với nitơ ở δ_C 59,8 (C-6); 2 nhóm carbonyl tại δ_C 166,5 (C-1); 172,0 (C-7). Phổ $^1\text{H-NMR}$ xuất hiện tín hiệu của 1 nhóm methine gắn với nitơ ở δ_H 4,25 (1H, dt, $J = 9,0; 2,0$ Hz; H-6), 2 nhóm methylen gắn với nitơ δ_H ở 3,56 (2H, m, CH_2 -3); 3,76 (1H, d, $J = 16,5$ Hz; H α -9); 4,12 (1H, dt, $J = 16,5; 1,0$ Hz; H β -9) và tín hiệu của 4 proton aliphatic khác nằm trong khoảng ở δ_H 1,95-2,35. Từ các dữ liệu phổ ESI-MS, $^1\text{H-NMR}$ và $^{13}\text{C-NMR}$, độ quay cực, kiểm tra sắc kí bản mỏng TLC với hợp chất cyclo-(Pro-Gly) có sẵn trong phòng thí nghiệm và so sánh với tài liệu tham khảo cho phép xác định chất **G666-8** là cyclo-(Pro-Gly) [88, 89].

Bảng 4.19: Dữ liệu phổ ^1H và $^{13}\text{C-NMR}$ của hợp chất **G666-8**

TT	G666-8		DEPT	Cyclo-(Pro-Gly)
	$\delta_H^{a,b}$ độ bội (J, Hz)	$\delta_C^{a,c}$		$\delta_H^{a,b\#}$ độ bội (J, Hz)
1	-	166,5	C	-
3	3,56 m	46,9	CH_2	3,57 m
4	2,01 m	23,3	CH_2	2,00 m
5	2,01 m 2,35 m	29,4	CH_2	2,00 m 2,35 m
6	4,25 dt (9,0; 2,0)	59,8	CH	4,24 dt (9,0; 2,0)
7	-	172,0	C	-
9	3,76 d (16,5) 4,12 dt (16,5; 1,0)	46,3	CH_2	3,75 d (17,0) 4,11 dt (17,0; 1,0)

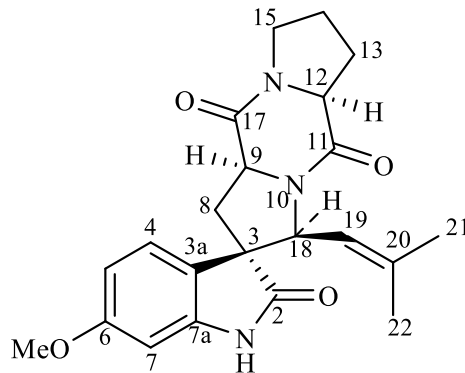
^a CD_3OD ^b125 MHz ^c500 MHz $\delta_H^\#$ của chất tham khảo [88]

Như vậy, từ sinh khối của chủng vi sinh vật *Streptomyces* sp. G666, cấu trúc của 8 hợp chất đã được xác định, đó là streptomine A (**G666-1**), streptomine B (**G666-2**), streptomine C (**G666-3**), 9H-pyrido[3,4-b]indole (**G666-4**), 3-acetyl-4-hydroxycinnoline (**G666-5**), xanthone (**G666-6**), cyclo-(leu-Pro) (**G666-7**), cyclo-(Pro-Gly) (**G666-8**). Trong đó, ba hợp chất **G666-2**, **G666-2** và **G666-3** là các hợp chất mới.



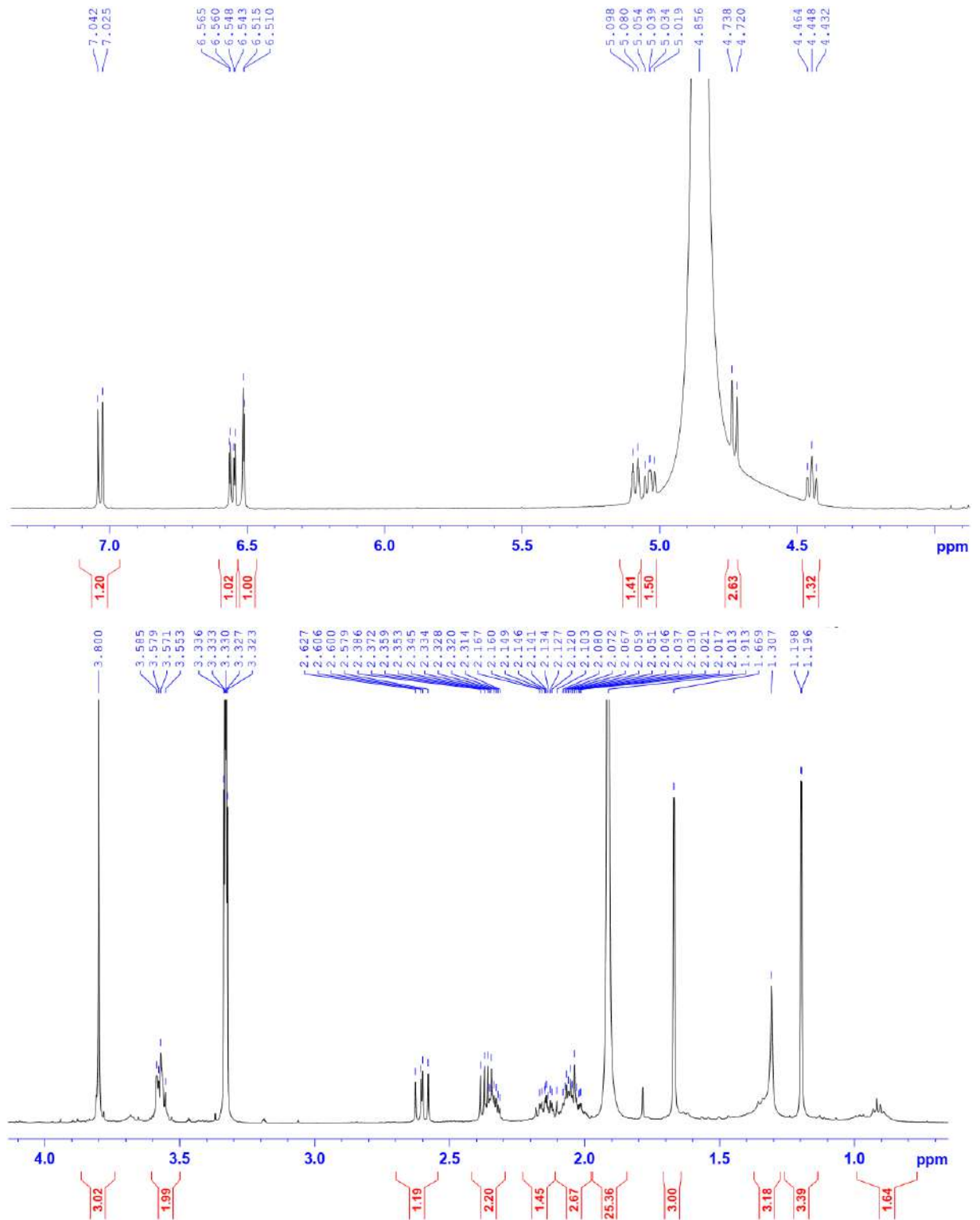
4.3. Xác định cấu trúc hóa học của các hợp chất phân lập từ chủng *Streptomyces* sp. G246

4.3.1. Hợp chất spirotryprostatin A (G246-1)



Hợp chất **G246-1** được phân lập dưới dạng chất rắn màu trắng, độ quay cực $[\alpha]_D^{29} -29,5^\circ$ (c 0,1; MeOH). Phổ khối ESI-MS của **G246-1** cho pic ion giả phân tử tại m/z 396 $[M+H]^+$.

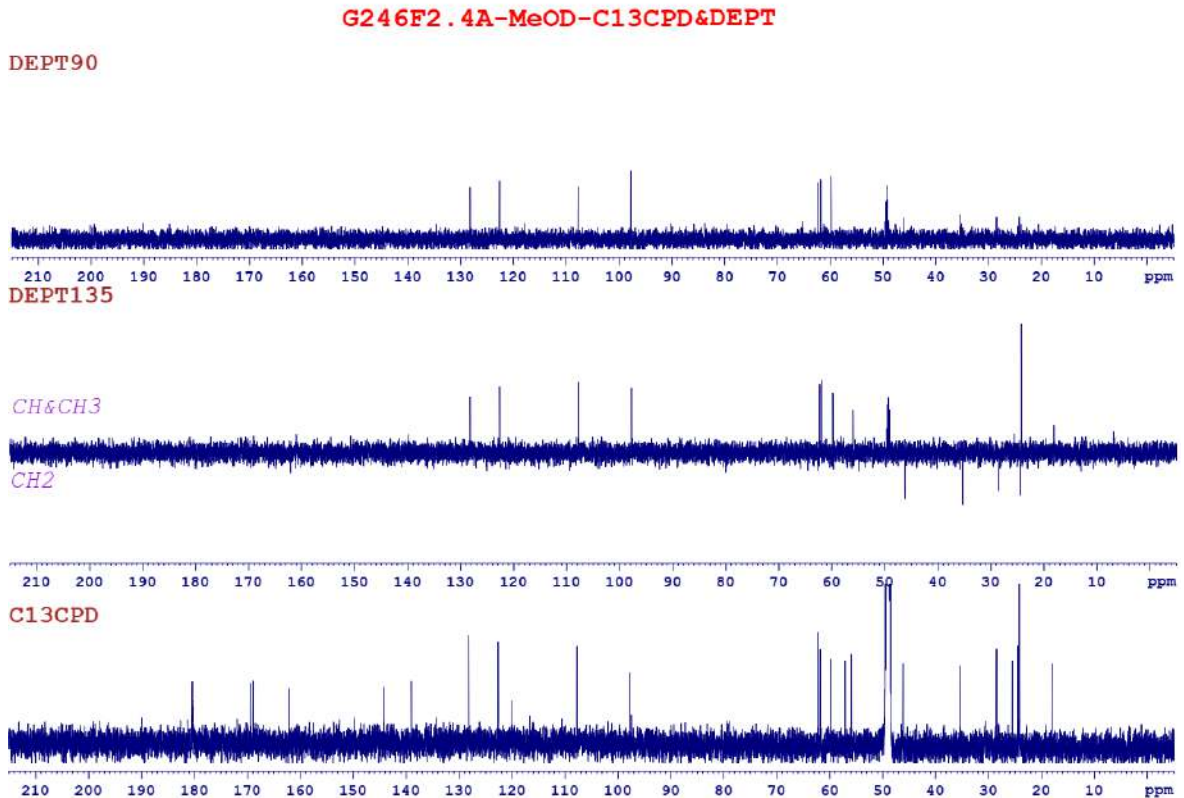
Trên phổ $^1\text{H-NMR}$ của hợp chất **G246-1** xuất hiện tín hiệu của 3 proton thuộc hệ ABX ở δ_{H} 6,51 (1H, d, $J = 2,5$ Hz, H-7); 6,56 (1H, dd, $J = 2,5; 8,5$ Hz, H-5); 7,03 (1H, d, $J = 7,5$ Hz, H-4); một proton olefinic ở δ_{H} 5,09 (1H, d, $J = 9,0$ Hz, H-19); một nhóm methoxy ở δ_{H} 3,80 (3H, s, OCH_3); hai nhóm methyl singlet ở δ_{H} 1,20 (3H, d, $J = 1,0$ Hz, H-21); 1,67 (3H, s, H-22) và tín hiệu của các proton vùng aliphatic nằm trong khoảng δ_{H} 2,01-5,04.



Hình 4.63: Phổ $^1\text{H-NMR}$ của hợp chất **G246-1**

Phân tích phổ $^{13}\text{C NMR}$ và DEPT của **G246-1** xuất hiện tín hiệu cộng hưởng của 22 nguyên tử carbon, dựa trên các tương tác trực tiếp trên phổ HSQC cho thấy đó là 3 nhóm carbonyl tại δ_{C} 168,0 (C-17); 169,1 (C-11); 180,4 (C-2) (trong đó độ chuyển dịch hóa học của carbon ở δ_{C} 168,0; 169,1 gợi ý đến sự xuất hiện của hệ diketopiperazin); 4 nhóm methine sp^2 ở δ_{C} 97,4 (C-7); 107,4 (C-5); 121,9 (C-19);

128,2 (C-4); 3 nhóm methine sp^3 ở δ_C 59,81 (C-9); 60,0 (C-18); 61,9 (C-12); 4 nhóm methylene sp^3 ở δ_C 24,2 (C-14); 28,1 (C-13); 35,3 (C-8); 46,1 (C-15); 1 nhóm methoxy ở δ_C 55,9; hai nhóm methyl ở δ_C 18,1 (C-22); 25,5 (C-21) và 5 carbon không liên kết trực tiếp với hydro ở δ_C 57,7 (C-3); 119,5 (C-3a); 139,1 (C-20); 142,3 (C-7a); 160,7 (C-6) (**Bảng 4.20**).



Hình 4.64: Phổ DEPT của hợp chất **G246-1**

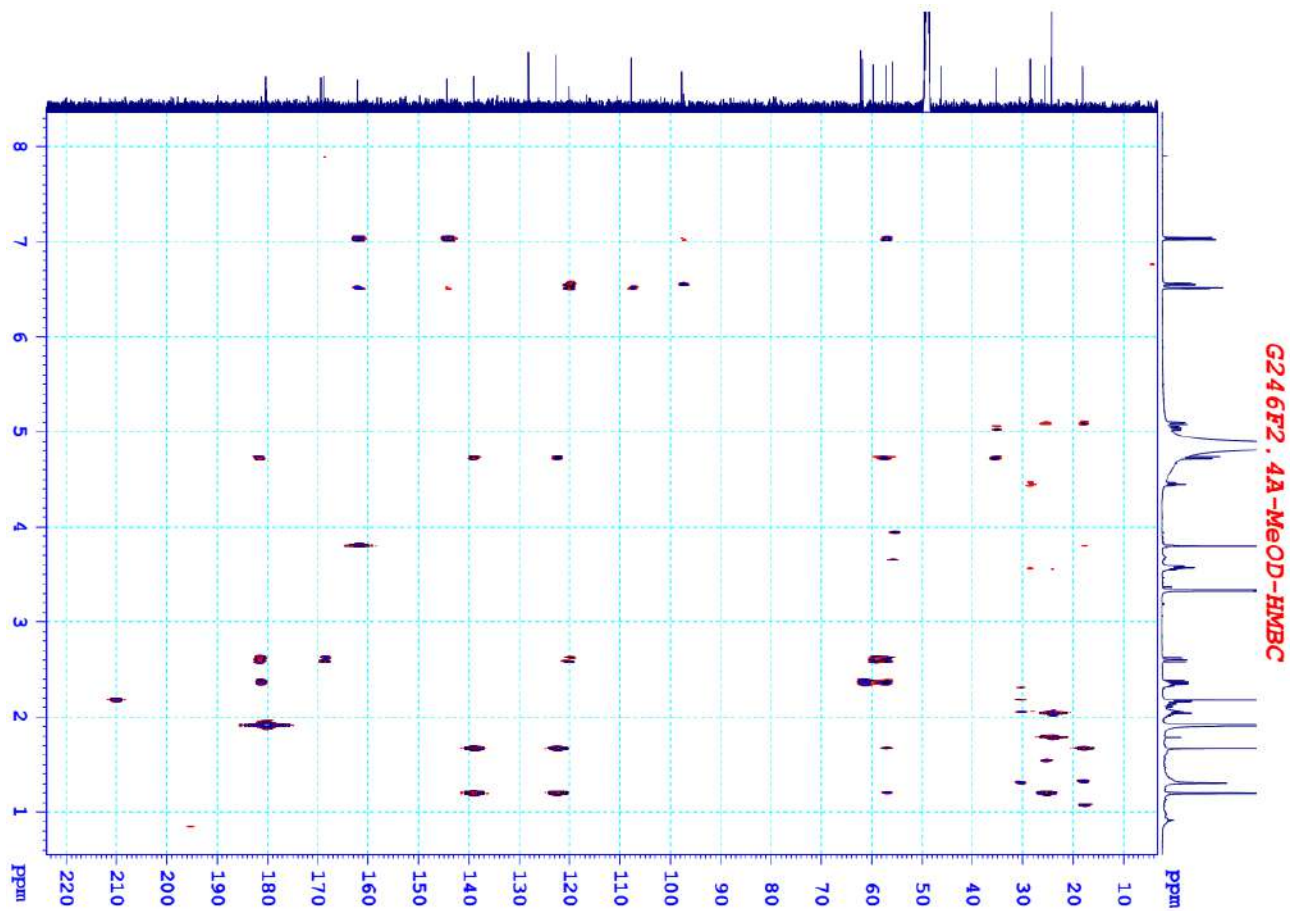
Trên phổ COSY của **G246-1** cho thấy, ngoài hệ ABX aromatic còn xuất hiện ba hệ tương tác spin-spin bao gồm: i) H-12 (δ_H 4,45)/H-13 (δ_H 2,15 và 2,32)/H-14 (δ_H 2,14 và 2,03)/H-15 (δ_H 3,57); ii) H-8 (δ_H 2,61 và 2,37)/H-9 (δ_H 5,04); iii) H-18 (δ_H 4,73)/H-19 (δ_H 5,09), các phân tích này kết hợp với phổ ^{13}C NMR, DEPT, HSQC gợi ý đến mảnh proline của hệ diketopiperazin thuộc hệ spin thứ nhất. Phân tích phổ HMBC của **G246-1** có các tương tác giữa proton H-12 (δ_H 4,45) và H-13 (δ_H 2,15 và 2,32) với C-11 (δ_C 169,1); giữa H-15 (δ_H 3,57) với C-17 (δ_C 168,0); điều này chứng minh sự tồn tại của khung proline trong cấu trúc phân tử cyclodipeptide. Tiếp theo, trên phổ HMBC, proton thuộc nhóm methoxy ở δ_H 3,80 tương tác với C-6 (δ_C 160,7) của hệ aromatic chứng tỏ vị trí của nhóm methoxy tại C-6, hai nhóm methyl ở δ_H 1,20; 1,65 cùng tương tác với C-19 (121,9)/C-20 (δ_C 139,1) chứng tỏ vị trí của hai nhóm này tại C-20 và tương tác của H-8 (δ_H 2,37 và 2,61) với C-2 (δ_C 180,4)/C-3 (δ_C

57,7)/C-3a (δ_C 119,5)/C-9 (δ_C 59,8)/C-17 (δ_C 168,0)/C-18 (δ_C 60,0), tương tác của H-18 (δ_H 4,73) với C-2 (δ_C 180,4)/ C-3 (δ_C 57,7)/C-8 (δ_C 35,3)/C-9 (δ_C 59,8)/C-19 (δ_C 121,9) thiết lập nên mảnh cấu trúc thứ 2 của hệ diketopiperazin với hệ vòng spiro như hình vẽ. Từ các dữ liệu phổ 1D, 2D-NMR và so sánh với tài liệu tham khảo của hợp chất spirotryprostatins A được phân lập lần đầu tiên từ dịch lên men của chủng nấm *Aspergillus fumigatus* và được tổng hợp toàn phần bởi William và cộng sự năm 2003 [90, 91] cho phép xác định hợp chất **G246-1** là spirotryprostatin A.

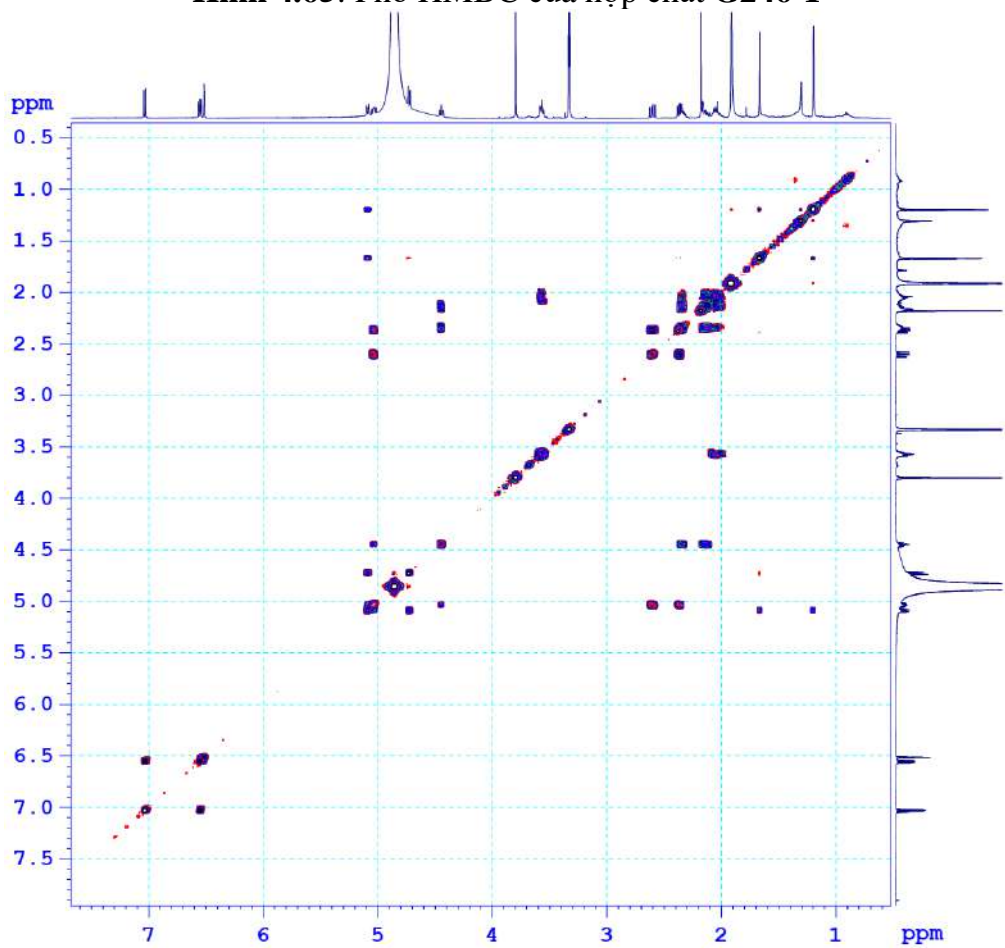
Bảng 4.20: Dữ liệu phổ ^1H và ^{13}C -NMR của hợp chất **G246-1**

C	G246-1			Spirotryprostatin A
	$\delta_C^{a,b}$	DEPT	$\delta_H^{a,c}$ độ bội (J, Hz)	$\delta_C^{b,d\#}$
2	180,4	C	-	180,5
3	57,7	C	-	58,5
3a	119,5	C	-	118,7
4	128,2	CH	7,03 d (7,5)	127,3
5	107,4	CH	6,56 dd (2,5; 8,5)	106,7
6	160,7	C	-	160,4
7	97,4	CH	6,51 d (2,5)	96,6
7a	142,3	C	-	141,6
8	35,3	CH ₂	2,37 dd (7,0; 13,5) 2,61 dd (10,5; 13,5)	34,4
9	59,8	CH	5,04 dd (10,0; 7,5)	60,2
11	169,1	C	-	168,2
12	61,9	CH	4,45 t (8,0)	61,0
13	28,1	CH ₂	2,15 m 2,32 m	27,4
14	24,2	CH ₂	2,03 m 2,13 m	23,7
15	46,1	CH ₂	3,57 m	45,2
17	168,0	C	-	167,1
18	61,0	CH	4,73 d (9,0)	60,2
19	121,9	CH	5,09 d (9,0)	121,4
20	139,1	C	-	138,4
21	25,5	CH ₃	1,20 d (1,0)	25,5
22	18,1	CH ₃	1,67 s	18,0
OCH ₃	55,9	CH ₃	3,8 s	55,5

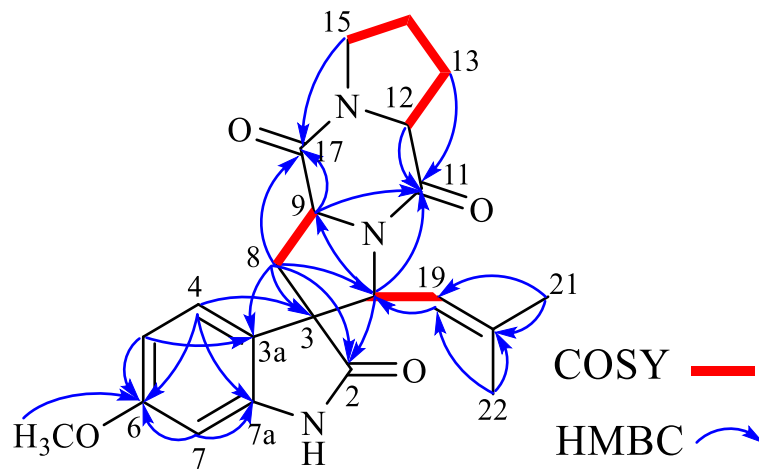
^aCD₃OD, ^b125 MHz, ^c500 MHz, ^dCDCl₃ $\delta_C^\#$ của hợp chất tham khảo [91]



Hình 4.65: Phổ HMBC của hợp chất G246-1

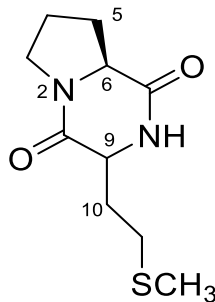


Hình 4.66: phổ COSY của hợp chất G246-1



Hình 4.67: Một số tương tác chính trên phổ COSY, HMBC của hợp chất **G246-1**

4.3.2. Hợp chất cyclo-(Pro-Met) (**G246-2**)



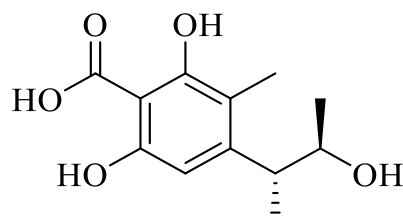
Hợp chất **G246-2** được phân lập dưới dạng chất rắn màu trắng. Phổ khối ESI-MS của **G246-2** cho pic ion giả phân tử tại m/z 229 $[M+H]^+$, độ quay cực riêng $[\alpha]^{26}_D$ -61,3 (c 0,12 MeOH). Phổ 1H -NMR của **G246-2** cho thấy các tín hiệu của nhóm methyl singlet ở δ_H 2,12 (3H, s, CH_3 -S); tín hiệu của nhóm methylene liên kết với lưu huỳnh ở δ_H 2,68 (2H, t, $J = 6,5$ Hz, CH_2 -S); tín hiệu của 3 nhóm methylene ở δ_H 1,88-2,14 (4H, m, CH_2 -4, CH_2 -5); 2,32-2,43 (2H, m, CH_2 -10); tín hiệu của 2 nhóm methine sp^3 ở δ_H 4,10 (1H, m, H-6); 4,42 (1H, m, H-9). Phổ ^{13}C -NMR và DEPT của **G246-2** (**Bảng 4.21**) chỉ ra các tín hiệu của 10 carbon, bao gồm các tín hiệu của 1 nhóm methyl ở δ_C 15,3; các tín hiệu của 4 nhóm methylene ở δ_C 22,7-45,5; tín hiệu của 2 nhóm methine có liên kết với nitơ ở δ_C 54,6 (C-9); 59,0 (C-6) và cuối cùng là tín hiệu của 2 nhóm carbonyl amide ở δ_C 165,4 (C=O); 170,3 (C=O). Từ những phân tích về phổ NMR cho thấy đây là một hợp chất diketopiperazine, hợp phần của amino acid là proline và methionine, so sánh với tài liệu tham khảo có thể khẳng định **G246-2** là Cyclo-(Pro-Met) [92].

Bảng 4.21: Dữ liệu phổ NMR của **G246-2** và hợp chất tham khảo

C	G246-2		DEPT	Cyclo-(Pro-Met)	
	$\delta_{\text{H}}^{\text{a,b}}$ độ bội (J, Hz)	$\delta_{\text{C}}^{\text{a,c}}$		$\delta_{\text{H}}^{\text{d,b\#}}$ độ bội (J, Hz)	$\delta_{\text{C}}^{\text{d,c\#}}$
1	-	165,4	C	-	165,6
3	3,57 m	45,5	CH ₂	3,57 m	45,7
4	2,14 m	22,7	CH ₂	2,43 m	22,9
5	1,88 m	28,2	CH ₂	1,92 m	28,4
6	4,10 t (8,0)	59,0	CH	4,12 t (7,6)	59,2
7	-	170,3	C	-	170,4
9	4,20 m	54,7	CH	4,24 t (5,2)	54,9
10	2,32 m 2,43 m	30,3	CH ₂	2,38 m 2,05 m	30,5
11	2,68 t (7,0)	28,9	CH ₂	2,69 t (7,0)	29,1
S-Me	2,12 s	15,3	CH ₃	2,14 s	15,5
NH	6,77 brs	-		6,55 brs	-

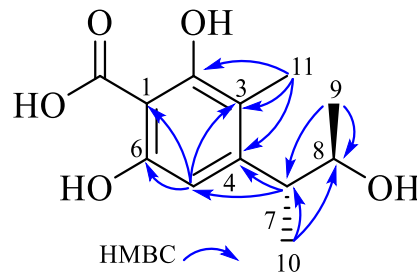
^aCDCl₃, ^b500 MHz, ^c125MHz; ^dCD₃OD [#] $\delta_{\text{H,C}}$ của chất tham khảo [92]

4.3.3. Hợp chất phenol A acid (G246-3)



Hợp chất **G246-3** được phân lập dưới dạng chất rắn màu trắng. Độ quay cực $[\alpha]_{\text{D}}^{29}$ -45,5 (c 0,1 MeOH). Công thức phân tử của **G246-3** được xác định là C₁₂H₁₆O₅ nhờ dữ liệu phổ HR-ESI-MS cho pic ion phân tử ở m/z 263,0883 [M+Na]⁺ (tính toán lý thuyết cho công thức phân tử [C₁₂H₁₆NaO₅]⁺, m/z 263,0890). Phân tích phổ ¹H-NMR của **G246-3** xuất hiện tín hiệu dạng singlet của proton aromatic tại δ_{H} 6,25 điều này cho thấy vòng benzene đã bị thế 5 vị trí; một tín hiệu nhóm methyl dạng singlet ở δ_{H} 2,11; hai tín hiệu nhóm methyl dạng doublet ở δ_{H} 1,59 (3H, d, $J = 6,5$ Hz) và 1,67 (3H, d, $J = 6,5$ Hz); hai tín hiệu nhóm methine ở δ_{H} 3,10 (1H, q, $J = 7,0$ Hz, H-7) và 3,91 (1H, q, $J = 7,0$ Hz, H-8). Phổ ¹³C-NMR (**Bảng 4.22**) và HSQC chỉ ra các tín hiệu của 12 carbon bao gồm 1 nhóm methine aromatic tại δ_{C} 104,69; 5 carbon aromatic không liên kết trực tiếp với hydro ở δ_{C} 103,51; 114,15; 149,72; 160,32; 160,80; 1 nhóm carboxyl ở δ_{C} 173,04; 3 nhóm methyl ở δ_{C} 10,60; 16,37; 19,81; 2 nhóm methine *sp*³ liên kết trực tiếp với oxy ở δ_{C} 71,87. Trên phổ ¹H-¹H COSY cho thấy có 1 hệ tương tác spin-spin giữa H9 và H8/H8 và H7/H7 với H10. Ngoài ra, trên

phổ HMBC có các tương tác giữa H-7 (δ_H 3,10) với C-4 (δ_C 149,72)/C-3 (δ_C 114,2)/C-5 (δ_C 104,69); giữa H-11 (δ_H 2,11) với C-2 (δ_C 160,80)/C-3 (δ_C 114,15)/C-4 (δ_C 149,72); giữa H-9 (δ_H 1,59) với C-7 (δ_C 43,41)/C-8 (δ_C 71,87) (**hình 4.67**). Dựa trên phổ NMR và so sánh với tài liệu tham khảo số [93] hợp chất **G246-3** được xác định là phenol A acid.



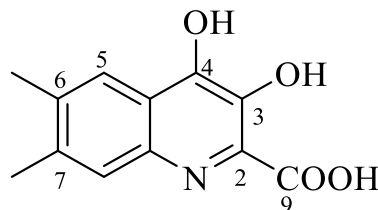
Hình 4.68: Một số tương tác HMBC của hợp chất **G246-3**

Bảng 4.22: Dữ liệu phổ NMR của **G246-3**

C	G246-3		DEPT
	$\delta_H^{a,b}$ độ bội (J, Hz)	$\delta_C^{a,c}$	
1	-	103,5	C
2	-	160,8	C
3	-	114,2	C
4	-	149,2	C
5	6,25 s	104,7	CH
6	-	160,3	C
7	3,10 q (7,0)	43,4	CH
8	3,91 q (7,0)	71,9	CH
9	1,16 d (6,5)	19,8	CH ₃
10	1,17 d (6,5)	16,4	CH ₃
11	2,11 s	10,6	CH ₃
COOH		173,0	

^aCD₃OD, ^b500 MHz, ^c125MHz

4.3.4. Hợp chất 3,4-dihydroxy-6,7-dimethyl-quinoline-2-carboxylic (G246-4)



Hợp chất **G246-4** được phân lập dưới dạng chất rắn màu vàng. Phổ khối ESI-MS cho pic ion phân tử proton hóa ở m/z 234,1 [M+H]⁺. Trên phổ ¹H-NMR cho tín hiệu của 2 nhóm methyl ở δ_H 2,48 (3H, s, CH₃-11) và 2,45 (3H, s, CH₃-10); 2 nhóm methine vòng thơm dưới dạng singlet ở δ_H 7,68 (1H, s, H-8) và 7,89 (1H, s, H-5). Dựa

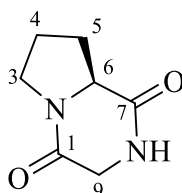
vào phổ ^{13}C -NMR, DEPT cho phép xác định hợp chất **G246-4** có 12 nguyên tử carbon trong đó có 2 nhóm methyl ở δ_{C} 19,4 (CH₃-10) và 20,0 (CH₃-11); 1 nhóm carbonyl ở δ_{C} 160,5 (COOH) và 9 carbon vòng thơm ở δ_{C} 125,8 (C-8); 128,6 (C-5); 129,8 (C-4a); 138,5 (C-8a); 144,8 (C-7); 146,3 (C-2); 149,9 (C-3) (**Bảng 4.23**). Độ chuyển dịch hóa học của 4 carbon bậc 4 về phía trường thấp là C-8a, C-2, C-3 và C-4 cho phép xác định 4 carbon này gắn với nitơ hoặc oxy. Các carbon này cũng tương đồng như hợp chất 3,4-dihydroxy-quinolin-2-carboxylic được phân lập từ một số loài Hải miên. Kết hợp các dữ kiện phổ MS, 1D-NMR cho phép xác định chất **G246-4** là 3,4-dihydroxy-6,7-dimethyl-quinolin-2-carboxylic [94].

Bảng 4.23: Dữ liệu phổ NMR của **G246-4** và hợp chất tham khảo

C	G246-4		3,4-dihydroxy-6,7-dimethyl-quinolin-2-carboxylic	
	$\delta_{\text{H}}^{\text{a,b}}$ độ bội (J, Hz)	$\delta_{\text{C}}^{\text{a,c}}$	$\delta_{\text{H}}^{\text{b,c\#}}$ độ bội (J, Hz)	$\delta_{\text{C}}^{\text{b,d\#}}$
2	-	146,2	-	146,3
3	-	149,8	-	149,9
4	-	141,6	-	141,7
4a	-	129,8	-	129,8
5	7,89 s	128,7	7,89 s	128,6
6	-	139,1	-	139,0
7	-	144,9	-	144,8
8	7,89 s	125,8	7,86 s	125,8
8a	-	138,4	-	138,5
9	-	160,5	-	160,5
10	2,46 s	19,4	2,45 s	19,4
11	2,48 s	20,0	2,48s	20,0
OH	11,54 brs	-	11,52 brs	-

^aDMSO-d₆, ^b500 MHz, ^c125MHz; $\delta_{\text{H}}^{\#}$, $\delta_{\text{C}}^{\#}$ của chất tham khảo [94]

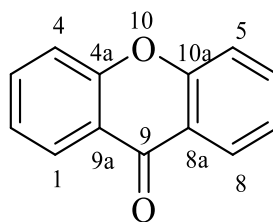
4.3.5. Hợp chất cyclo-(Pro-Gly) (**G246-5**)



Hợp chất **G246-5** được phân lập dưới dạng chất rắn màu trắng, điểm nóng chảy mp. 210-211°C; $[\alpha]_{\text{D}}^{25}$ -142,5° (c 0,40; MeOH). Phân tích phổ ^1H -NMR của chất **G246-5** cho thấy phân tử có 4 nhóm methylene, 1 nhóm methine, 2 nhóm carbonyl giống như chất **G666-8**. Kết hợp các dữ liệu phổ và so sánh với tài liệu tham khảo

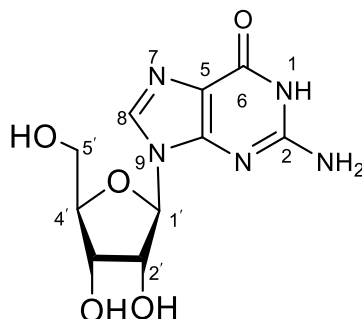
cho phép xác định chất **G246-5** là cyclo-(Pro-Gly) [92].

4.3.6. Hợp chất xanthone (G246-6)



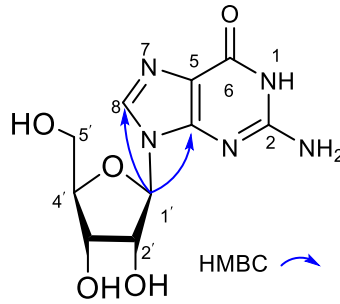
Hợp chất **G246-6** được phân lập dưới dạng chất rắn màu trắng, điểm nóng chảy 174°C . Phổ $^1\text{H-NMR}$ xuất hiện tín hiệu của 4 proton vòng thơm ở δ_{H} 6,67 (2H, m, H-2+ H-4); 7,30 (1H, t, $J = 7,5$ Hz, H-3); 7,92 (1H, d, $J = 7,5$ Hz, H-1), giống như chất **G666-6**. Từ các dữ liệu phổ $^1\text{H-NMR}$ và khảo sát TLC so sánh với chất chuẩn có sẵn trong phòng thí nghiệm và tài liệu tham khảo cho phép xác định chất là **G246-6** là xanthone [83].

4.3.7. Hợp chất guanosine (G246-7)



Hợp chất **G246-7** dưới dạng chất rắn màu trắng. Phổ khối ESI-MS cho pic ion giả phân tử ở m/z 284,1 $[\text{M}+\text{H}]^+$. Phổ $^1\text{H-NMR}$ xuất hiện tín hiệu của một proton thơm dạng singlet ở δ_{H} 7,92; tín hiệu doublet của 01 proton ở δ_{H} 5,69 (1H, d, $J = 6,0$ Hz) và các tín hiệu của các proton thuộc vùng đường trong khoảng δ_{H} 3,50 - δ_{H} 4,39 ppm. Trên phổ $^{13}\text{C-NMR}$ và DEPT (**bảng 4.27**) của hợp chất **G246-7** có tín hiệu của 10 carbon, bao gồm một nhóm methine thơm ở δ_{C} 135,5; 4 carbon thơm không liên kết trực tiếp với hydro ở δ_{C} 116,7; 151,3; 153,7; 156,7; 4 nhóm oxymethine sp^3 ở δ_{C} 70,4; 73,7; 85,2; 86,4 và một nhóm oxymethylene sp^3 ở δ_{C} 61,4. Các dữ liệu phổ 1D-NMR và HSQC gợi ý rằng hợp chất **G246-7** là một hợp chất dạng purine nucleoside, hình thành từ guanine liên kết với một phân tử đường ribofuranose. Phân tích phổ HMBC, tương tác giữa H-1' (δ_{H} 5,69) với C-8 (δ_{C} 135,5)/C-4 (δ_{C} 151,3), cho thấy guanine liên kết với phân tử đường thông qua liên kết ở vị trí β -N $_{\circ}$. Từ các dữ liệu phổ MS, 1D và 2D NMR cùng với so sánh với tài liệu tham khảo cho phép xác định

chất **G246-7** là guanosine [79].



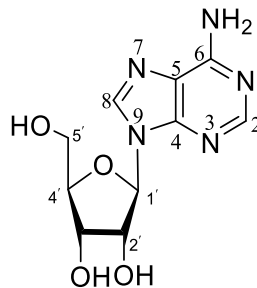
Hình 4.69: Một số tương tác phổ HMBC của hợp chất **G246-7**

Bảng 4.24: Dữ liệu phổ NMR của **G246-7** và hợp chất tham khảo

C	G246-7		Guanosine	
	$\delta_{\text{H}}^{\text{a,c}}$ độ bội (J, Hz)	$\delta_{\text{C}}^{\text{a,d}}$	$\delta_{\text{H}}^{\text{b,c\#}}$ độ bội (J, Hz)	$\delta_{\text{C}}^{\text{b,d\#}}$
2	-	153,6	-	153,7
4	-	151,3	-	151,3
5	-	116,7	-	116,7
6	-	156,7	-	156,8
8	7,92 s	135,8	7,94 s	135,7
1'	5,69 d (6,0)	86,4	5,12 d (4,7)	86,4
2'	4,39 m	73,7	4,41 m	73,7
3'	4,08 brs	70,4	4,08 m	70,4
4'	3,87 dt (4,0; 3,5)	85,2	3,87 m	85,2
5'	3,52 dt (4,0; 12,0) 3,62 dt (4,5; 12,0)	61,4	3,62 m 3,52 m	61,4
2-OH	-	-	5,70 d (6,0) 5,40 d (6,1)	-
5'-OH	-	-	5,04 t (5,5)	-
NH ₂	-	-	6,47 s	-

^aCD₃OD, ^bDMSO-d₆, ^c500 MHz, ^d125 MHz, [#] $\delta_{\text{H,C}}$ của chất tham khảo [79]

4.3.8. Hợp chất adenosine (G246-8)



Chất **G246-8** được phân lập ở dạng chất rắn màu trắng, ít tan trong các dung môi hữu cơ thường như CH₂Cl₂, MeOH. Phân tích phổ ¹H-NMR của **G246-8** đo trong CD₃OD nhận thấy ở vùng trường thấp xuất hiện tín hiệu của 02 proton dạng singlet ở δ_{H} 8,33 (1H, s, H-2); 8,21 (1H, s, H-8); tiếp đó là các tín hiệu của đường ribose có

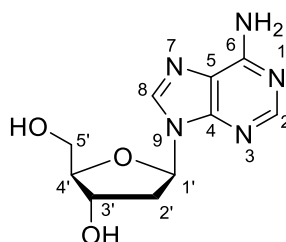
độ chuyển dịch hóa học ở δ_H 3,92 (1H, dd, $J = 2,5; 12,5$ Hz, Hb-5'); 3,78 (1H, dd, $J = 3,0; 12,5$ Hz, Ha-5'); 4,76 (1H, dd, $J = 5,0; 6,5$ Hz, H-2'); 5,99 (1H, d, $J = 6,0$ Hz, H-1'); 4,35 (1H, dd, $J = 3,0; 5,0$ Hz, H-3'); 4,19 (1H, m, H-4'). Các tín hiệu phổ trên gợi ý cho biết hợp chất **G246-8** là adenosine, một hợp chất rất phổ biến trong vi sinh vật biển. Kết hợp các dữ liệu $^1\text{H-NMR}$, kiểm tra trên sắc kí bản mỏng TLC với hợp chất adenoside chuẩn trong phòng thí nghiệm và so sánh với công bố tham khảo đã có (bảng 4.25) [95] chứng tỏ hợp chất **G246-8** là adenoside.

Bảng 4.25: Số liệu phổ NMR của hợp chất **G246-8** và hợp chất tham khảo

C	G246-8	Adenosine	
	$\delta_H^{a,c}$ độ bội (J, Hz)	$\delta_H^{b,c\#}$ độ bội (J, Hz)	$\delta_C^{b,d\#}$
2	8,20 s	8,13 s	152,4
4	-	-	149,1
5	-	-	119,4
6	-	-	156,1
8	8,32 s	8,34 s	140,1
1'	5,99 d (6,0)	5,87 d (6,0)	88,0
2'	4,76 dd (5,5; 6,0)	4,60 dd (5,0; 6,0)	73,5
3'	4,36 dd (3,0; 5,0)	4,14 ddd (3,0; 4,5; 5,0)	70,7
4'	4,19 m	3,96 ddd (3,0; 3,5; 4,5)	85,9
5'	3,77 dd (2,5; 12,5) 3,91 dd (2,5; 12,5)	3,67 ddd (3,5; 4,5; 12,0) 3,55 ddd (3,5; 7,0; 12,0)	61,7

^a CD_3OD , ^b DMSO-d_6 , ^c500 MHz; ^d125 MHz # δ_H của chất tham khảo [95]

4.3.9. Hợp chất 2'-deoxyadenosine (G246-9)



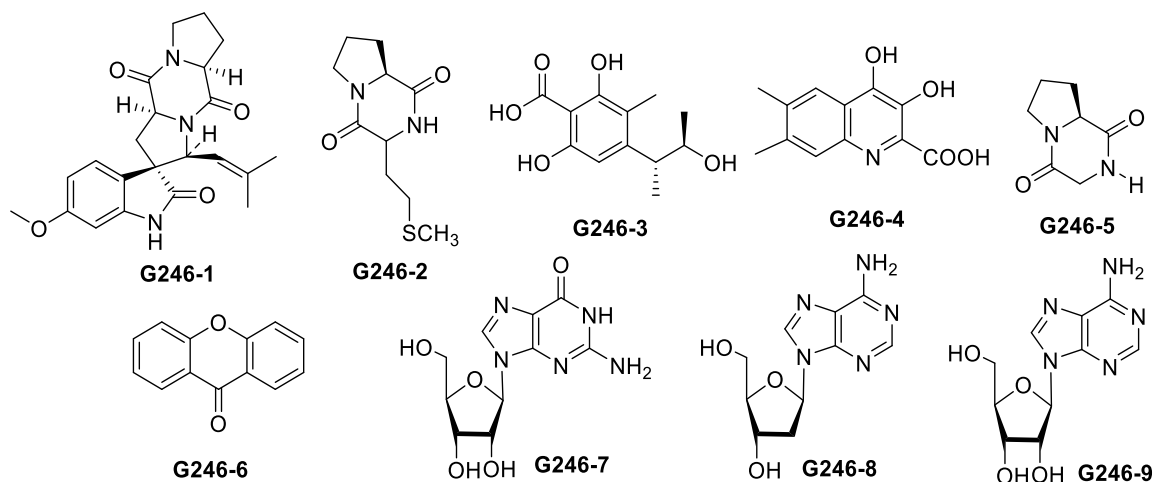
Chất **G246-9** thu được dưới dạng chất rắn vô định hình, màu nâu. Các tín hiệu của phổ 1D-NMR được ghi nhận giống như các tín hiệu của 2-deoxy-arabionoside như trong cấu tạo của **G246-8**. Tuy nhiên, trong vùng trường thơm, chất **G246-8** còn có tín hiệu của các proton và carbon của adenin δ_C 120,8 (C-5); δ_C 141,5; δ_H 8,20 (CH-8); δ_C 149,9 (C-4); δ_C 153,6; δ_H 8,34 (CH-2) và δ_C 157,5 (C-6). Phân tích chi tiết của phổ NMR, cấu trúc của **G246-9** được xác định là 2'-deoxyadenosine. Các số liệu này phù hợp với công bố trong tài liệu tham khảo [96].

Bảng 4.26: Dữ liệu NMR của hợp chất **G246-9** và hợp chất tham khảo

C	G246-9		DEPT	2'-deoxyadenosine	
	$\delta_{\text{H}}^{\text{a,b}}$ độ bội (J, Hz)	$\delta_{\text{C}}^{\text{a,c}}$		$\delta_{\text{H}}^{\text{a,b\#}}$ độ bội (J, Hz)	$\delta_{\text{C}}^{\text{a,c\#}}$
2	8,34 s	153,6	CH	8,33 s	153,5
4	-	149,9	C	-	150,1
5	-	120,8	C	-	120,1
6	-	157,5	C	-	157,6
8	8,20 s	141,5	CH	8,19 s	141,6
1'	6,45 dd (6,0; 8,0)	89,9	CH	6,45 t (6,2)	90,1
2'	2,84 m 2,43 m	41,6	CH ₂	2,83 m 2,43 m	41,6
3'	4,09 m	73,1	CH	4,09 m	73,1
4'	4,60 m	87,4	CH	4,59 m	87,2
5'	3,87 dd (3,0; 12,5) 3,76 dd (3,5; 12,5)	63,6	CH ₂	3,86 dd (3,0; 12,0) 3,76 dd (3,3; 12,0)	63,7

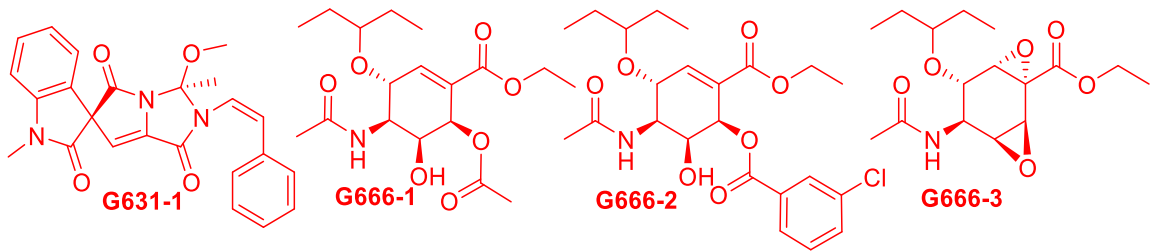
^aCD₃OD, ^b500 MHz, ^c125 MHz, $\delta_{\text{H}}^{\#}$ $\delta_{\text{C}}^{\#}$ của chất tham khảo [96]

Như vậy, từ sản phẩm sinh khối của chủng vi sinh vật *Streptomyces* sp. G246, cấu trúc của 9 hợp chất đã được phân lập và xác định, bao gồm spirotryprostatin A (**G246-1**), cyclo-(Pro-Met) (**G246-2**), phenol A acid (**G246-3**), 3,4-dihydroxy-6,7-dimethyl-quinoline-2-carboxylic (**G246-4**), cyclo-(Pro-Gly) (**G246-5**), xanthone (**G246-6**), guanosine (**G246-7**), adenosine (**G246-8**), 2'-deoxyadenosine (**G246-9**).



Tóm lại: Từ sản phẩm sinh khối của ba chủng xạ khuẩn *Actinoalloteichus cyanogriseus* G631, *Streptomyces* sp. G666 và *Streptomyces* sp. G246 đã phân lập được 25 hợp chất (gồm 23 hợp chất khác nhau). Trong đó có 4 chất mới là streptomine A (**G666-1**), streptomine B (**G666-2**), streptomine C (**G666-3**) và isocyanogramide (**G631-1**). Cấu trúc hóa học của các hợp chất được khẳng định bằng phương pháp phổ vật lý hiện đại và so sánh với tài liệu tham khảo. Các hợp chất phân lập được

thuộc lớp chất cyclodipeptide, indole, coumarin, các hợp chất phenolic, alkaloid phù hợp với lớp chất đã được phân lập được từ chi *Streptomyces* và chi *Actinoalloteichus*.



4.4. Kết quả thử hoạt tính kháng vi sinh vật kiểm định của các hợp chất thứ cấp phân lập được

Các hợp chất sạch từ chủng xạ khuẩn được thử hoạt tính đối với 7 chủng VSVKĐ bao gồm 3 chủng vi khuẩn Gram âm: *Escherichia coli* ATCC25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC27853, *Salmonella enterica* ATCC13076; 3 chủng vi khuẩn Gram dương: *Enterococcus faecalis* ATCC29212, *Staphylococcus aureus* ATCC25923, *Bacillus cereus* ATCC14579 và 1 chủng nấm *Candida albicans* ATCC10231.

Bảng 4.27: Kết quả thử hoạt tính kháng vi sinh vật kiểm định của của các hợp chất thứ cấp phân lập được từ chủng *Actinoalloteichus cyanogriseus* G631

TT	Hợp chất	MIC ($\mu\text{g/ml}$)						
		Gram dương			Gram âm			Nấm
		<i>E. faecalis</i>	<i>S. aureus</i>	<i>B. cereus</i>	<i>E. coli</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>S. enterica</i>	
1	G631-1	128	64	-	-	-	-	128
2	G631-2	128	128	-	32	64	-	32
3	G631-3	64	128	-	256	-	-	64
4	G631-4	64	128	16	-	64	-	128
5	G631-5	128	64	128	-	-	-	32
6	G631-6	128	128	-	-	-	-	128
7	G631-7	64	256	128	-	-	-	64
8	G631-8	-	-	-	-	-	-	-
9	*S	256	256	128	32	256	128	
10	*C							32

*Chất đối chứng dương S: streptomycin, C: cycloheximide; (-) Không có hoạt tính

8 hợp chất thứ cấp phân lập từ chủng *Actinoalloteichus cyanogriseus* G631 được thử hoạt tính kháng 7 chủng vi sinh vật kiểm định, kết quả cho thấy hợp chất mới **G631-1** thể hiện hoạt tính đối với 2 chủng Gram (+) *E. faecalis*, *S. aureus* và 1 chủng nấm *C. albicans* với giá trị MIC lần lượt là 128, 64 và 128 $\mu\text{g/ml}$. Hợp chất **G631-5** và **G631-7** cùng thể hiện hoạt tính đối với 4 chủng vi sinh vật kiểm định là *E. faecalis*, *S. aureus*, *B. cereus*, *C. albicans* với giá trị MIC từ 32-256 $\mu\text{g/ml}$. Hợp chất **G631-4**

thể hiện hoạt tính đối với 5 chủng vi sinh vật kiểm định là *E. faecalis*, *S. aureus*, *B. cereus*, *aeruginosa*, *C. albicans* với giá trị MIC nằm trong khoảng 16-128 µg/ml, hợp chất này thể hiện hoạt tính tốt nhất đối với chủng *B. cereus* với giá trị MIC = 16 µg/ml. Hợp chất **G631-6** thể hiện hoạt tính chọn lọc đối với 2 chủng *E. faecalis*, *S. aureus* với giá trị MIC = 128 µg/ml. Hợp chất **G631-2** thể hiện hoạt tính đối với 5 chủng vi sinh vật kiểm định, hợp chất này có hoạt tính tốt với 2 chủng *E. coli* và *C. albicans* với giá trị MIC = 32 µg/ml. Hợp chất **G631-8** không thể hiện hoạt tính đối với 7 chủng vi sinh vật kiểm định thử nghiệm.

Bảng 4.28: Kết quả thử hoạt tính kháng vi sinh vật kiểm định của của các hợp chất thứ cấp phân lập được từ chủng *Streptomyces* sp. G666

TT	Hợp chất	MIC (µg/ml)						
		Gram dương			Gram âm			Nấm
		<i>E. faecalis</i>	<i>S. aureus</i>	<i>B. cereus</i>	<i>E. coli</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>S. enterica</i>	
1	G666-1	64	64	64	-	-	-	16
2	G666-2	64	-	-	-	-	-	16
3	G666-3	32	64	-	-	-	-	16
4	G666-4	-	-	-	128	-	-	-
5	G666-5	64	256	256	-	-	-	128
6	G666-6	128	256	256	64	256	128	-
7	G666-7	-	-	-	-	-	-	-
8	G666-8	-	-	-	-	-	-	-
9	*S	256	256	128	32	256	128	
10	*C							32

*Chất đối chứng dương S: streptomycin, C: cycloheximide; (-) Không có hoạt tính

Cả 3 hợp chất mới phân lập từ chủng *Streptomyces* sp. G666 đều thể hiện hoạt tính kháng vi sinh vật kiểm định tốt, trong đó hợp chất **G666-2** thể hiện hoạt tính chọn lọc đối với 2 chủng vi sinh vật kiểm định là *E. faecalis* và *C. albicans* với giá trị MIC lần lượt là 64 và 16 µg/ml. Hợp chất mới **G666-1** thể hiện hoạt tính đối với 3 chủng Gram (+) *E. faecalis*, *S. aureus*, *B. cereus* và 1 chủng nấm *C. albicans* với giá trị MIC lần lượt là 64, 64, 64 và 16 µg/ml. Hợp chất mới **G666-3** thể hiện hoạt tính đối với 2 chủng Gram (+) *E. faecalis*, *S. aureus* và 1 chủng nấm *C. albicans* với giá trị MIC lần lượt là 32, 64 và 16 µg/ml. Cả 3 hợp chất mới từ chủng G666 (**G666-1**, **G666-2**, **G666-3**) thể hiện hoạt tính kháng nấm đối với chủng *Candida albicans* cao hơn đối chứng dương là hợp chất cycloheximide. Hợp chất **G666-4** thể hiện hoạt tính chọn lọc đối với chủng *E. coli* với giá trị MIC = 128 µg/ml. Hợp chất **G666-6** thể hiện hoạt tính đối với 6/7 chủng vi sinh vật kiểm định thử nghiệm.

Bảng 4.29: Kết quả thử hoạt tính kháng vi sinh vật kiểm định của của các hợp chất thứ cấp phân lập được từ chủng *Streptomyces* sp. G246

TT	Hợp chất	MIC ($\mu\text{g/ml}$)						
		Gram dương			Gram âm			Nấm
		<i>E. faecalis</i>	<i>S. aureus</i>	<i>B. cereus</i>	<i>E. coli</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>S. enterica</i>	
1	G246-1	64	-	128	-	-	-	128
2	G246-2	32	-	-	-	-	-	-
3	G246-3	-	-	-	-	-	-	-
4	G246-4	128	-	-	32	256	64	-
5	G246-7	-	-	-	-	-	-	-
6	G246-8	32	-	-	-	-	-	64
7	G246-9	-	-	-	-	-	-	-
8	*S	256	256	128	32	256	128	
9	*C							32

*Chất đối chứng dương S: streptomycin, C: cycloheximide; (-) Không có hoạt tính

Trong số 7 hợp chất thứ cấp phân lập từ chủng *Streptomyces* sp. G246 thử nghiệm thì có 4 hợp chất thể hiện hoạt tính kháng vi sinh vật kiểm định trong đó hợp chất **G246-1** thể hiện hoạt tính đối với 2 chủng Gram (+) *E. faecalis*, *B. cereus* và 1 chủng nấm *C. albicans* với giá trị MIC lần lượt là 64, 128 và 128 $\mu\text{g/ml}$. Hợp chất **G246-2** thể hiện hoạt tính chọn lọc đối với chủng *E. faecalis* với giá trị MIC = 32 $\mu\text{g/ml}$. Hợp chất **G246-4** thể hiện hoạt tính đối với cả 3 chủng Gram (-) *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella enterica* với giá trị MIC lần lượt là 32, 256 và 64 $\mu\text{g/ml}$. Hợp chất **G246-8** thể hiện hoạt tính tốt đối với chủng Gram (+) *E. faecalis* và chủng nấm *C. albicans* với giá trị MIC lần lượt là 32 và 64 $\mu\text{g/ml}$.

Kết luận chung: như vậy, trong số 23 hợp chất thử hoạt tính có 17 hợp chất có hoạt tính ức chế từ 1 đến 7 chủng VSVKĐ với giá trị MIC bằng và thấp hơn giá trị MIC của các kháng sinh đối chứng, trong đó có 16 hợp chất có hoạt tính lên các chủng vi khuẩn Gram dương, 6 hợp chất có hoạt tính lên các chủng vi khuẩn Gram âm và 13 hợp chất có hoạt tính lên chủng nấm kiểm định. Hợp chất **G666-6** thể hiện hoạt tính kháng VSVKĐ phổ rộng với khả năng tác động lên 6/6 chủng vi khuẩn kiểm định nhưng không có hoạt tính lên chủng nấm kiểm định. Ba hợp chất **G631-2**, **G631-4**, **G246-4** có hoạt tính lên 4/6 chủng vi khuẩn kiểm định với các giá trị MIC thấp hơn hoặc bằng với MIC của chất đối chứng dương, hợp chất **G246-4** không có hoạt tính lên chủng nấm kiểm định còn đối với hợp chất **G631-2** và **G631-4** có giá trị MIC thấp hơn hoặc bằng với chất đối chứng cycloheximide. Năm hợp chất **G666-1**, **G631-5**, **G631-3**, **G631-5**, **G631-7** kháng 3/6 chủng vi khuẩn kiểm định và cả 5 chất đều có

hoạt tính lên chủng nấm kiểm định, trong đó hợp chất **G666-1** thể hiện hoạt tính kháng nấm tốt nhất với giá trị MIC là 16 $\mu\text{g/mL}$ thấp hơn so với chất đối chứng cycloheximide. Bốn hợp chất **G666-3**, **G631-1**, **G631-6**, **G246-1** thể hiện hoạt tính với 2/6 chủng vi khuẩn kiểm định tốt với giá trị MIC thấp hơn đối chứng dương streptomycin, chúng đều có hoạt tính lên chủng nấm kiểm định và hợp chất **G666-3** có hoạt tính mạnh nhất với giá trị MIC 16 $\mu\text{g/mL}$. Ba hợp chất **G666-2**, **G246-2**, **G246-8** có tác dụng chọn lọc lên chủng vi khuẩn kiểm định *Enterococcus faecalis* với giá trị MIC lần lượt là 64, 32, 32 $\mu\text{g/mL}$ thấp hơn rất nhiều so với chất đối chứng dương streptomycin, chúng đều có hoạt tính lên chủng nấm kiểm định, trong đó hợp chất **G666-2** có hoạt tính cao nhất với giá trị MIC 16 $\mu\text{g/mL}$. Nhiều chất thể hiện hoạt tính kháng nấm tốt đối với chủng nấm kiểm định *Candida albicans* ATCC10231 điển hình là **G666-1**, **G666-2**, **G666-3**.

KẾT LUẬN

1. Đã tiến hành nuôi cấy nhân sinh khối lượng lớn quy mô 50 kg của ba chủng xạ khuẩn gồm *Actinoalloteichus cyanogriseus* G631, *Streptomyces* sp. G666 và *Streptomyces* sp. G246. Đây là các chủng có hoạt tính kháng VSVKĐ tốt, kháng từ 3-5 chủng VSV kiểm định thử nghiệm.

2. Đã tiến hành nghiên cứu phân lập và xác định cấu trúc hóa học của 25 hợp chất thứ cấp từ 3 chủng xạ khuẩn *Streptomyces* sp. G666, *Actinoalloteichus cyanogriseus* G631 và *Streptomyces* sp. G246 (gồm 23 hợp chất khác nhau), trong đó có 4 hợp chất mới là streptomine A (**G666-1**), streptomine B (**G666-2**), streptomine C (**G666-3**) và isocyanogramide (**G631-1**). Cấu trúc hóa học của các hợp chất mới được khẳng định bằng kết hợp các phương pháp phổ vật lý hiện đại và so sánh với tài liệu tham khảo.

3. Các hợp chất phân lập được đã được khảo sát hoạt tính kháng VSVKĐ trong đó cả 4 hợp chất mới đều thể hiện hoạt tính tốt, kháng từ 2-4 chủng vi sinh vật kiểm định thử nghiệm với giá trị MIC từ 16-128 $\mu\text{g/ml}$, 3 hợp chất mới từ chủng G666 là **G666-1**, **G666-2**, **G666-3** thể hiện hoạt tính kháng nấm đối với chủng *Candida albicans* cao hơn đối chứng dương là hợp chất cycloheximide. Hợp chất **G666-6** kháng 6/7 chủng VSVKĐ, 2 hợp chất là **G631-2**, **G631-4** kháng 5/7 chủng VSVKĐ, 6 hợp chất là **G666-1**, **G666-5**, **G631-3**, **G631-5**, **G631-7**, **G246-4** kháng 4/7 chủng VSVKĐ, 4 hợp chất **G666-3**, **G631-1**, **G631-6**, **G246-1** kháng 3/7 chủng VSVKĐ, 2 hợp chất **G666-2**, **G246-8** kháng 2/7 chủng VSVKĐ, 2 hợp chất **G666-4**, **G246-2** kháng 1/7 chủng VSVKĐ. Đặc biệt là có 6 hợp chất có hoạt tính đối với các chủng Gram (-) thử nghiệm.

ĐÓNG GÓP MỚI CỦA LUẬN ÁN

1. Từ kết quả sàng lọc hoạt tính kháng vi sinh vật kiểm định, đã tiến hành nuôi cấy nhân sinh khối lượng lớn quy mô 50 kg/m³ của ba chủng xạ khuẩn là *Actinoalloteichus cyanogriseus* G631, *Streptomyces* sp. G666 và *Streptomyces* sp. 246.
2. Từ 3 chủng xạ khuẩn *Actinoalloteichus cyanogriseus* G631, *Streptomyces* sp. G666 và *Streptomyces* sp. 246, đã phân lập và xác định cấu trúc hóa học của 25 hợp chất thứ cấp (gồm 23 hợp chất khác nhau), trong đó có 4 hợp chất mới là streptomine A (**G666-1**), streptomine B (**G666-2**), streptomine C (**G666-3**) và isocyanogramide (**G631-1**).
3. Kết quả khảo sát hoạt tính kháng VSVKĐ của 23 hợp chất thứ cấp phân lập được cho thấy 17/23 hợp chất thể hiện hoạt tính kháng VSVKĐ. Cả 4 hợp chất mới đều thể hiện hoạt tính tốt, kháng từ 2-4 chủng vi sinh vật kiểm định thử nghiệm với giá trị MIC từ 16-128 µg/ml, 3 hợp chất mới từ chủng G666 là **G666-1**, **G666-2**, **G666-3** thể hiện hoạt tính kháng nấm đối với chủng *Candida albicans* cao hơn đối chứng dương là hợp chất cycloheximide. Đặc biệt là có 6 hợp chất có hoạt tính đối với các chủng Gram (-) thử nghiệm.

KIẾN NGHỊ

1. Các hợp chất đã được phân lập từ các chủng xạ khuẩn nên tiếp tục tiến hành nghiên cứu về các hoạt tính sinh học khác, ví dụ như hoạt tính gây độc tế bào, hoạt tính kháng viêm, chống oxy hóa, nhằm hướng đến khả năng ứng dụng vào thực tế trong tương lai. Đặc biệt là đối với những chất mới có cấu trúc hóa học độc đáo như hợp chất isocyanogranide **G631-1**, streptomine A **G666-1**, streptomine B **G666-2**, streptomine C **G666-3**.

2. Ba chủng xạ khuẩn đã được nghiên cứu trong luận án cần được nhân sinh khối lượng lớn trong các môi trường khác nhằm phân lập được các hợp chất thứ cấp có tiềm năng về hoạt tính sinh học cũng như cấu trúc hóa học độc đáo. Bên cạnh đó, việc tiếp cận các nguồn xạ khuẩn biển Việt Nam đang ngày càng dễ dàng nhờ sự phát triển mạnh mẽ của khoa học kỹ thuật, chúng ta nên mở rộng tìm kiếm, thu thập thêm các chủng xạ khuẩn khác ở các vùng biển còn lại nhằm phục vụ nghiên cứu và củng cố chủ quyền biển đảo.

DANH MỤC CÔNG TRÌNH CỦA TÁC GIẢ

1. **Do Thi Quynh**, Trinh Thi Thanh Van, Nguyen Thuy Linh, Le Thi Hong Minh, Vu Thi Quyen, Brian T. Murphy, Doan Thi Mai Huong and Pham Van Cuong. *A New Alkaloid from Marine-Derived Actinomycete Actinoalloteichus cyanogriseus G631*, Records of Natural Products, 2023, 17(6), 1024-1030, doi.org/10.25135/rnp.412.2305.2776.
2. **Do Thi Quynh**, Doan Thi Mai Huong, Tran Van Hieu, Truong Bich Ngan, Le Thi Hong Minh, Vu Thi Quyen, Nguyen Thi Hoang Anh, Brian T. Murphy, Pham Van Cuong. *Secondary metabolites produced by marine actinomycete Streptomyces sp. G246*, Vietnam Journal of Chemistry, 2021, 59(1), 1-8, doi.org/10.15625/2525-2518/58/6/15176.
3. Phạm Văn Cường, Đoàn Thị Mai Hương, **Đỗ Thị Quỳnh**, Lê Thị Hồng Minh, Trịnh Thị Thanh Vân, Vũ Thị Quyên, Vũ Thị Thu Huyền. Hợp chất streptomine G666A và phương pháp tách chiết hợp chất này từ chủng xạ khuẩn biển *Streptomyces sp. G666*. Quyết định thông báo kết quả thẩm định nội dung số 77040/SHTT-SC.IP ngày 05/08/2024, số đơn 1-2022-01427.
4. **Thi Quynh Do**, Thanh Van Trinh Thi, Thi Dao Phi, Thuy Linh Nguyen, Thi Quyen Vu, Hong Minh Le Thi, Brian T. Murphy, Thi Mai Huong Doan, Van Cuong Pham. *New shikimic acid derivatives from the marine-derived actinomycete Streptomyces sp. G666 and their antimicrobial activities*, Chemistry & Biodiversity, 2024 (submitted).

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. M. Ventura, C. Canchaya, A. Tauch, G. Chandra, G.F. Fitzgerald, K.F. Chater, D. Van Sinderen, *Genomics of Actinobacteria: tracing the evolutionary history of an ancient phylum*, Microbiology molecular biology reviews, 2007, 71, 495-548.
2. E.A. Barka, P. Vatsa, L. Sanchez, N. Gaveau-Vaillant, C. Jacquard, H.-P. Klenk, C. Clément, Y. Ouhdouch, G.P. van Wezel, *Taxonomy, physiology, and natural products of Actinobacteria*, Microbiology molecular biology reviews, 2016, 80, 1-43.
3. I.L. Pepper, T.J. Gentry, *Chapter 4 - Earth Environments*, in *Environmental Microbiology (Third Edition)*, I.L. Pepper, C.P. Gerba, and T.J. Gentry, Editors. 2015, Academic Press: San Diego. p. 59-88.
4. R.M. Atlas, *Principles of microbiology*, Mosby, 1995.
5. M. Ventura, C. Canchaya, G.F. Fitzgerald, R.S. Gupta, D. van Sinderen, *Genomics as a means to understand bacterial phylogeny and ecological adaptation: the case of bifidobacteria*, Antonie Van Leeuwenhoek, 2007, 91, 351-372.
6. W. Ludwig, O. Strunk, R. Westram, L. Richter, H. Meier, Yadhukumar, A. Buchner, T. Lai, S. Steppi, G. Jobb, W. Forster, I. Brettske, S. Gerber, A.W. Ginhart, O. Gross, S. Grumann, S. Hermann, R. Jost, A. König, T. Liss, R. Lussmann, M. May, B. Nonhoff, B. Reichel, R. Strehlow, A. Stamatakis, N. Stuckmann, A. Vilbig, M. Lenke, T. Ludwig, A. Bode, K.H. Schleifer, *ARB: a software environment for sequence data*, Nucleic. Acids. Res., 2004, 32, 1363-1371.
7. W. Whitman, M. Goodfellow, P. Kämpfer, H.-J. Busse, M. Trujillo, W. Ludwig, K.-i. Suzuki, A. Parte, *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, Springer-Verlag New York, 2012, New York.
8. A. Basilio, I. Gonzalez, M. Vicente, J. Gorrochategui, A. Cabello, A. Gonzalez, O. Genilloud, *Patterns of antimicrobial activities from soil actinomycetes isolated under different conditions of pH and salinity*, Journal of applied microbiology, 2003, 95, 814-823.
9. J.R. Cole, Q. Wang, E. Cardenas, J. Fish, B. Chai, R.J. Farris, A. Kulam-Syed-Mohideen, D.M. McGarrell, T. Marsh, G.M. Garrity, *The Ribosomal Database Project: improved alignments and new tools for rRNA analysis*, Nucleic acids research, 2009, 37, D141-D145.
10. S. Das, P.S. Lyla, S.A. Khan, *Marine microbial diversity and ecology: importance and future perspectives*, Current Science, 2006, 90, 1325-1335.
11. E. Pruesse, C. Quast, K. Knittel, B.M. Fuchs, W. Ludwig, J. Peplies, F.O. Glöckner, *SILVA: a comprehensive online resource for quality checked and aligned ribosomal RNA sequence data compatible with ARB*, Nucleic acids research, 2007, 35, 7188-7196.
12. F.D. Ciccarelli, T. Doerks, C. Von Mering, C.J. Creevey, B. Snel, P. Bork, *Toward automatic reconstruction of a highly resolved tree of life*, science, 2006, 311, 1283-1287.
13. A.R. Carroll, B.R. Copp, R.A. Davis, R.A. Keyzers, M.R. Prinsep, *Marine natural products*, Natural Product Reports, 2020, 37, 175-223.
14. T. Weber, K. Welzel, S. Pelzer, A. Vente, W. Wohlleben, *Exploiting the genetic potential of polyketide producing streptomycetes*, Journal of biotechnology, 2003, 106, 221-232.
15. F. Zhang, D.R. Braun, G.E. Ananiev, F.M. Hoffmann, I.-W. Tsai, S.R. Rajski, T.S. Bugni, *Biemamides A–E, Inhibitors of the TGF- β Pathway That Block the Epithelial to Mesenchymal Transition*, Organic letters, 2018, 20, 5529-5532.
16. Q. Ma, W. Ding, Z. Chen, Z. Ma, *Bisamides and rhamnosides from mangrove actinomycete Streptomyces sp. SZ-A15*, Natural product research, 2018, 32, 761-766.

17. J. Sun, J. Shao, C. Sun, Y. Song, Q. Li, L. Lu, Y. Hu, C. Gui, H. Zhang, J. Ju, *Borrelidins F–I, cytotoxic and cell migration inhibiting agents from mangrove-derived Streptomyces rochei SCSIO ZJ89*, Bioorganic & medicinal chemistry, 2018, 26, 1488-1494.
18. A. Hamed, A.S. Abdel-Razek, M. Frese, D. Wibberg, A.F. El-Haddad, T.M. Ibrahim, J. Kalinowski, N. Sewald, M. Shaaban, *N-Acetylborrelidin B: a new bioactive metabolite from Streptomyces mutabilis sp. MII*, Zeitschrift für Naturforschung C, 2018, 73, 49-57.
19. B. Zhang, K.B. Wang, W. Wang, S.F. Bi, Y.N. Mei, X.Z. Deng, R.H. Jiao, R.X. Tan, H.M. Ge, *Discovery, biosynthesis, and heterologous production of streptoseomycin, an anti-microaerophilic bacteria macrodilactone*, Organic letters, 2018, 20, 2967-2971.
20. A.M. Socha, K.L. LaPlante, D.C. Rowley, *New bisanthraquinone antibiotics and semi-synthetic derivatives with potent activity against clinical Staphylococcus aureus and Enterococcus faecium isolates*, Bioorganic medicinal chemistry, 2006, 14, 8446-8454.
21. L. Buedenbender, L.P. Robertson, L. Lucantoni, V.M. Avery, D.I. Kurtböke, A.R. Carroll, *Hsqc-tocsy fingerprinting-directed discovery of antiplasmodial polyketides from the marine ascidian-derived Streptomyces sp.(USC-16018)*, Marine drugs, 2018, 16, 189.
22. B.E. Leach, K.M. Calhoun, L.E. Johnson, C.M. Teeters, W.G. Jackson, *Chartreusin, a new antibiotic produced by Streptomyces chartreusis, a new species*, Journal of the American Chemical Society, 1953, 75, 4011-4012.
23. Z. Xu, K. Jakobi, K. Welzel, C. Hertweck, *Biosynthesis of the antitumor agent chartreusin involves the oxidative rearrangement of an anthracyclic polyketide*, Chemistry & biology, 2005, 12, 579-588.
24. Z. Lai, J. Yu, H. Ling, Y. Song, J. Yuan, J. Ju, Y. Tao, H. Huang, *Grincamycins I–K, cytotoxic angucycline glycosides derived from marine-derived actinomycete Streptomyces lusitanus SCSIO LR32*, Planta medica, 2018, 84, 201-207.
25. J.C. Sacchetti, C.D. Poulter, *Creating isoprenoid diversity*, science, 1997, 277, 1788-1789.
26. L.R. McEwen, *Towards a Digital IUPAC*, Chemistry International, 2020, 42, 15-17.
27. I.H. Hardt, P.R. Jensen, W. Fenical, *Neomarinone, and new cytotoxic marinone derivatives, produced by a marine filamentous bacterium (actinomycetales)*, Tetrahedron Letters, 2000, 41, 2073-2076.
28. V.R. Macherla, J. Liu, C. Bellows, S. Teisan, B. Nicholson, K.S. Lam, B.C. Potts, *Glaciapyrroles A, B, and C, pyrrolsesquiterpenes from a Streptomyces sp. isolated from an Alaskan marine sediment*, Journal of natural products, 2005, 68, 780-783.
29. J.Y. Cho, H.C. Kwon, P.G. Williams, P.R. Jensen, W. Fenical, *Azamerone, a terpenoid phthalazinone from a marine-derived bacterium related to the genus Streptomyces (Actinomycetales)*, Organic letters, 2006, 8, 2471-2474.
30. J.-S. Park, H.C. Kwon, *New naphthoquinone terpenoids from marine actinobacterium, Streptomyces sp. CNQ-509*, Marine Drugs, 2018, 16, 90.
31. D. Kim, E.J. Lee, J. Lee, A.S. Leutou, Y.-H. Shin, B. Choi, J.S. Hwang, D. Hahn, H. Choi, J. Chin, *Antartin, a cytotoxic zizaane-type sesquiterpenoid from a Streptomyces sp. isolated from an antarctic marine sediment*, Marine Drugs, 2018, 16, 130.
32. Z.K. Guo, R. Wang, F.X. Chen, T.M. Liu, M.Q. Yang, *Bioactive aromatic metabolites from the sea urchin-derived actinomycete Streptomyces spectabilis strain HDa1*, Phytochemistry Letters, 2018, 25, 132-135.
33. N.E. Chadwick, K.M. Morrow, *Competition among sessile organisms on coral reefs*, Coral reefs: an ecosystem in transition, 2011, 347-371.

34. A.-S. De Rop, J. Rombaut, T. Willems, M. De Graeve, L. Vanhaecke, P. Hulpiau, S.L. De Maeseneire, M.L. De Mol, W.K.J.M.d. Soetaert, *Novel Alkaloids from Marine Actinobacteria: Discovery and Characterization*, 2021, 20, 6.
35. W.-Y. Lu, H.-J. Li, Q.-Y. Li, Y.-C.J.B. Wu, M. Chemistry, *Application of marine natural products in drug research*, 2021, 35, 116058.
36. J.-N. Wang, H.-J. Zhang, J.-Q. Li, W.-J. Ding, Z.-J. Ma, *Bioactive Indolocarbazoles from the marine-derived Streptomyces sp. DT-A61*, *Journal of Natural Products*, 2018, 81, 949-956.
37. B. Zhou, L.-L. Qin, W.-J. Ding, Z.-J. Ma, *Cytotoxic indolocarbazoles alkaloids from the streptomyces sp. A65*, *Tetrahedron*, 2018, 74, 726-730.
38. L.-L. Qin, B. Zhou, W. Ding, Z. Ma, *Bioactive metabolites from marine-derived Streptomyces sp. A68 and its Rifampicin resistant mutant strain R-M1*, *Phytochemistry Letters*, 2018, 23, 46-51.
39. Q. Che, L. Qiao, X. Han, Y. Liu, W. Wang, Q. Gu, T. Zhu, D. Li, *Anthranosides A-C, anthranilate derivatives from a sponge-derived Streptomyces sp. CMN-62*, *Organic letters*, 2018, 20, 5466-5469.
40. L.-Y. Chen, X.-Q. Wang, Y.-M. Wang, X. Geng, X.-N. Xu, C. Su, Y.-L. Yang, Y.-J. Tang, F.-W. Bai, X.-Q. Zhao, *Genome mining of Streptomyces xinghaiensis NRRL B-24674 T for the discovery of the gene cluster involved in anticomplement activities and detection of novel xiamycin analogs*, *Applied microbiology biotechnology*, 2018, 102, 9549-9562.
41. C. Wang, A. Monger, L. Wang, P. Fu, P. Piyachaturawat, A. Chairoungdua, W. Zhu, *Precursor-directed generation of indolocarbazoles with topoisomerase IIa inhibitory activity*, *Marine drugs*, 2018, 16, 168.
42. Y. Song, J. Yang, J. Yu, J. Li, J. Yuan, N.-K. Wong, J. Ju, *Chlorinated bis-indole alkaloids from deep-sea derived Streptomyces sp. SCSIO 11791 with antibacterial and cytotoxic activities*, *The Journal of Antibiotics*, 2020, 73, 542-547.
43. I.A. Shaikh, F. Johnson, A.P. Grollman, *Streptonigrin. I. Structure-activity relationships among simple bicyclic analogs. Rate dependence of DNA degradation on quinone reduction potential*, *Journal of medicinal chemistry*, 1986, 29, 1329-1340.
44. X. Xu, J. Han, R. Lin, S.W. Polyak, F. Song, *Two new piperazine-triones from a marine-derived Streptomyces sp. strain SMS636*, *Marine Drugs*, 2019, 17, 186.
45. Y.-J. Jiang, J.-Q. Li, H.-J. Zhang, W.-J. Ding, Z.-J. Ma, *Cyclizidine-type alkaloids from streptomyces sp. hna39*, *Journal of Natural Products*, 2018, 81, 394-399.
46. C. Zhang, Z. Yang, X. Qin, J. Ma, C. Sun, H. Huang, Q. Li, J. Ju, *Genome mining for mycemycin: discovery and elucidation of related methylation and chlorination biosynthetic chemistries*, *Organic Letters*, 2018, 20, 7633-7636.
47. F.J. Ortiz-López, E. Alcalde, A. Sarmiento-Vizcaíno, C. Díaz, B. Cautain, L.A. García, G. Blanco, F. Reyes, *New 3-Hydroxyquinaldic acid derivatives from cultures of the marine derived actinomycete Streptomyces cyaneofuscatus M-157*, *Marine Drugs*, 2018, 16, 371.
48. J. Liu, B. Wang, H. Li, Y. Xie, Q. Li, X. Qin, X. Zhang, J. Ju, *Biosynthesis of the anti-infective marformycins featuring pre-NRPS assembly line N-formylation and O-methylation and post-assembly line C-hydroxylation chemistries*, *Org. Lett.*, 2015, 17, 1509-1512.
49. M. Chen, W. Chai, T. Song, M. Ma, X.-Y. Lian, Z. Zhang, *Anti-glioma Natural Products Downregulating Tumor Glycolytic Enzymes from Marine Actinomycete Streptomyces sp. ZZ406*, *Scientific Reports*, 2018, 8, 72.
50. W.-H. Jiao, W. Yuan, Z.-Y. Li, J. Li, L. Li, J.-B. Sun, Y.-H. Gui, J. Wang, B.-P. Ye, H.-W. Lin, *Anti-MRSA actinomycins DI-D4 from the marine sponge-associated Streptomyces sp. LHW52447*, *Tetrahedron*, 2018, 74, 5914-5919.

51. D. Thirumurugan, R. Vijayakumar, C. Vadivalagan, P. Karthika, M.K.A. Khan, *Isolation, structure elucidation and antibacterial activity of methyl-4, 8-dimethylundecanate from the marine actinobacterium Streptomyces albogriseolus ECR64*, Microbial pathogenesis, 2018, 121, 166-172.
52. J. Hou, J. Liu, L. Yang, Z. Liu, H. Li, Q. Che, T. Zhu, D. Li, W. Li, *Discovery of an unusual fatty acid amide from the ndgRyo gene mutant of marine-derived Streptomyces youssoufiensis*, Marine drugs, 2018, 17, 12.
53. T. Tamura, L. Zhiheng, Z. Yamei, K. Hatano, *Actinoalloteichus cyanogriseus gen. nov., sp. nov.*, International journal of systematic and evolutionary microbiology, 2000, 50, 1435-1440.
54. M. Xiangui, W. Liping, W. Dongyang, F. Jie, Z. Weiming, *Polycyclic Tetramate Macrolactams from the Marine-Derived Actinoalloteichus cyanogriseus WH1-2216-6*, Youji Huaxue/Chinese Journal of Organic Chemistry, 2017, 37, 2352-2360.
55. K. Fujita, R. Sugiyama, S. Nishimura, N. Ishikawa, M.A. Arai, M. Ishibashi, H. Kakeya, *Stereochemical assignment and biological evaluation of BE-14106 unveils the importance of one acetate unit for the antifungal activity of polyene macrolactams*, Journal of Natural Products, 2016, 79, 1877-1880.
56. P. Fu, S. Wang, K. Hong, X. Li, P. Liu, Y. Wang, W. Zhu, *Cytotoxic bipyridines from the marine-derived actinomycete Actinoalloteichus cyanogriseus WH1-2216-6*, Journal of Natural Products, 2011, 74, 1751-1756.
57. M. Saratha, K. Angappan, S. Karthikeyan, S. Marimuthu, K. Chozhan, *Actinoalloteichus cyanogriseus: a broad spectrum bio-agent against mulberry root rot pathogens*, Egyptian Journal of Biological Pest Control, 2022, 32, 33.
58. P. Fu, P. Liu, X. Li, Y. Wang, S. Wang, K. Hong, W. Zhu, *Cyclic bipyridine glycosides from the marine-derived actinomycete Actinoalloteichus cyanogriseus WH1-2216-6*, Organic letters, 2011, 13, 5948-5951.
59. X. Mei, M. Lan, G. Cui, H. Zhang, W. Zhu, *Caerulomycins from Actinoalloteichus cyanogriseus WH1-2216-6: isolation, identification and cytotoxicity*, Organic Chemistry Frontiers, 2019, 6, 3566-3574.
60. P. Fu, F. Kong, X. Li, Y. Wang, W. Zhu, *Cyanogramide with a new spiro [indolinone-pyrroloimidazole] skeleton from Actinoalloteichus cyanogriseus*, Organic Letters, 2014, 16, 3708-3711.
61. L. Qin, W. Yi, X.-Y. Lian, Z. Zhang, *Bioactive alkaloids from the actinomycete Actinoalloteichus sp. ZZ1866*, Journal of Natural Products, 2020, 83, 2686-2695.
62. K. Kojiri, S. Nakajima, H. Suzuki, H. Kondo, H. Suda, *a new macrocyclic lactam antibiotic, BBE-14106, taxonomy, isolation, biological activity and structural elucidation*, The Journal of Antibiotics, 1992, 45, 868-874.
63. C.n.G.P.Q. Long, *Báo cáo tổng kết Dự án Hợp tác Việt Nam – CHLB Nga về điều tra khảo sát nguồn hoạt chất và đa dạng sinh học biển Việt Nam, Viện Hóa học các HCTN.*
64. N.V.H. Nguyễn Thị Hồng Liên, Lê Gia Hy *Nghiên cứu tách chiết chất kháng sinh Vancomycin từ dịch lên men chủng Streptomyces orientalis 4912*, Tạp chí Hóa học, 2012, 50, 122 – 125.
65. D.-T. Cao, T.-L. Nguyen, V.-H. Tran, H. Doan-Thi-Mai, Q. Vu-Thi, M.-A. Nguyen, H.-M. Le-Thi, V.-M. Chau, V.-C. Pham, *Synthesis, structure and antimicrobial activity of novel metabolites from a marine actinomycete in Vietnam's East Sea*, Natural Product Communications, 2019, 14, 1934578X1901400132.
66. D.D. Cao, T.Q. Do, H. Doan Thi Mai, Q. Vu Thi, M.A. Nguyen, H.M. Le Thi, D.T. Tran, V.M. Chau, D. Cong Thung, V.C. Pham, *Antimicrobial lavandulylated flavonoids from a sponge-derived actinomycete*, Natural product research, 2020, 34, 413-420.

67. D.T. Cao, V.H. Tran, V.N. Vu, H.D.T. Mai, T.H.M. Le, T.Q. Vu, H.H. Nguyen, V.M. Chau, V.C. Pham, *Antimicrobial metabolites from a marine-derived Actinomycete Streptomyces sp. G278*, Natural product research, 2019, 33, 3223-3230.
68. D.D. Cao, T.T.V. Trinh, H. Doan Thi Mai, V.N. Vu, H.M. Le, Q. Vu Thi, M.A. Nguyen, T.T. Duong, D.T. Tran, V.M. Chau, *Antimicrobial lavandulylated flavonoids from a sponge-derived Streptomyces sp. G248 in East Vietnam Sea*, Marine drugs, 2019, 17, 529.
69. N.T. Hue, N.T. Linh, V.T.T. Huyen, D.T.M. Huong, P. Van Cuong, *Chemical constituents of marine-derived cctinomycete Streptomyces fradiae G650*, Vietnam Journal of Science and Technology, 2022, 60, 974-981.
70. V.T.M. Đức, *Thực tập Vi sinh Vật học*, Nhà xuất bản Đại học Quốc gia Hà Nội, Hà Nội., 2001.
71. N.L. Dũng, N.Đ. Quyên, P.V. Ty, *Vi sinh vật học tập II*, Nhà xuất bản Đại học và Trung học chuyên nghiệp, Hà Nội., 1997.
72. Đ.X.M. Nguyễn Lâm Dũng, Nguyễn Phùng Tiên, Đặng Đức Trạch và Phạm Văn Ty, *Một số phương pháp nghiên cứu vi sinh vật học. Tập 3*, Nxb Khoa học Kỹ thuật, Hà Nội., 2003.
73. N.V. Cách, *Công nghệ lên men cách chất kháng sinh*, nhà xuất bản khoa học kỹ thuật Hà Nội, 2004.
74. S. Carlson, U. Tanouye, S. Omarsdottir, B.T. Murphy, *Phylum-specific regulation of resistomycin production in a Streptomyces sp. via microbial coculture*, Journal of natural products, 2015, 78, 381-387.
75. J.G. Holt, S.T. Williams, *Holt: Bergey's manual of systematic bacteriology. vol. 4*. 1989, Lippincott Williams & Wilkins.
76. A.J. M, *Determination of minimum inhibitory concentrations*, J Antimicrob Chemother, 2001, 48 5-16.
77. N. Peerakam, P. Phoowiang, S. Chansakaow, C. Thongpoon, S.J. Hadpech, *Chemical profiling revealed a dominant compound trans-anethole and biological evaluation of an edible plant Clausena harmandiana containing essential oil*, Rec Nat Products, 2021, 16, 1-10.
78. T. Bavaro, S. Rocchietti, D. Ubiali, M. Filice, M. Terreni, M. Pregnotato, *A Versatile Synthesis of 5'-Functionalized Nucleosides Through Regioselective Enzymatic Hydrolysis of Their Peracetylated Precursors*. 2009, Wiley Online Library.
79. C.-Y. Wang, L. Han, K. Kang, C.-L. Shao, Y.-X. Wei, C.-J. Zheng, H.-S. Guan, *Secondary metabolites from green algae Ulva pertusa*, Chemistry of natural compounds, 2010, 46, 828-830.
80. T.T.T. Hoa, V. Van Nam, D.T.M. Huong, P.T. Dao, N.N. Phuong, L.T.H. Minh, V.T. Quyen, N.M. Anh, B.T. Murphy, H.T.M.L. Ly, *Flavonoids and Alkaloids from Marine-Derived Actinomycete Streptomyces sp. C011*, Vietnam Journal of Chemistry, 2020, 58, 610-614.
81. Q.V. Thi, V.H. Tran, H.D.T. Mai, C.V. Le, M.L.T. Hong, B.T. Murphy, V.M. Chau, V.C. Pham, *Secondary metabolites from an Actinomycete from Vietnam's East Sea*, Natural Product Communications, 2016, 11, 1934578X1601100320.
82. F. Lingens, W. Goebel, *Zur biosynthese des tryptophans in Saccharomyces cerevisiae I. Nachweis von bekannten und unbekanntem akkumulierten bei verschiedenartig blockierten trp--mutanten*, Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects, 1967, 148, 60-69.
83. O. Gottlieb, *Biogenetic proposals regarding aucuparins and xanthones*, Phytochemistry, 1968, 7, 411-421.
84. N. Tchamo Diderot, N. Silvere, T. Etienne, *Xanthones as therapeutic agents: chemistry and pharmacology*, in *Advances in Phytomedicine*, M.T.H. Khan and A. Ather, Editors. 2006, Elsevier. p. 273-298.

85. S. Nishanth Kumar, C. Mohandas, J.V. Siji, K.N. Rajasekharan, B. Nambisan, *Identification of antimicrobial compound, diketopiperazines, from a Bacillus sp. N strain associated with a rhabditid entomopathogenic nematode against major plant pathogenic fungi*, J. Appl. Microbiol., 2012, 113, 914-924.
86. M. Adamczeski, A.R. Reed, P. Crews, *New and Known Diketopiperazines from the Caribbean Sponge, Calyx cf. podatypa*, J. Nat. Prod., 1995, 58, 201-208.
87. S. Ren, W. Ma, T. Xu, X. Lin, H. Yin, B. Yang, X.-F. Zhou, X.-W. Yang, L. Long, K.J. Lee, *Two novel alkaloids from the South China Sea marine sponge Dysidea sp.*, The Journal of Antibiotics, 2010, 63, 699-701.
88. V.V.N. Phi Thi Dao, Doan Thi Mai Huong, Brian Murphy, Chau Van Minh, Pham Van Cuong, *Compounds from culture broth of marine bacterium Oceanisphaera sp.*, Vietnam J. Chem., 2015, 52, 120-123.
89. D. Farran, D. Echaliier, J. Martinez, G. Dewynter, *Regioselective and sequential reactivity of activated 2, 5-diketopiperazines*, Journal of Peptide Science: An Official Publication of the European Peptide Society, 2009, 15, 474-478.
90. C.-B. Cui, H. Kakeya, H. Osada, *Novel mammalian cell cycle inhibitors, spirotryprostatins A and B, produced by Aspergillus fumigatus, which inhibit mammalian cell cycle at G2/M phase*, Tetrahedron, 1996, 52, 12651-12666.
91. T. Onishi, P.R. Sebahar, R.M. Williams, *Concise, Asymmetric Total Synthesis of Spirotryprostatin A*, Organic Letters, 2003, 5, 3135-3137.
92. G.S. Jayatilake, M.P. Thornton, A.C. Leonard, J.E. Grimwade, B.J. Baker, *Metabolites from an Antarctic sponge-associated bacterium, Pseudomonas aeruginosa*, Journal of Natural Products, 1996, 59, 293-296.
93. T. Rödel, H.G. Gerlach, *Enantioselective synthesis of the polyketide antibiotic (3R, 4S)-(-)-citrinin*, Liebigs Annalen, 1995, 1995, 885-888.
94. Q.V. Thi, V.H. Tran, H.D.T. Mai, C.V. Le, M.L.T. Hong, B.T. Murphy, V.M. Chau, V.C.P. Pham, *Antimicrobial metabolites from a marine-derived actinomycete in Vietnam's East Sea*, Natural Product Communications, 2016, 11, 1934578X1601100116.
95. S.G. Patching, S.A. Baldwin, A.D. Baldwin, J.D. Young, M.P. Gallagher, P.J. Henderson, R.B. Herbert, *The nucleoside transport proteins, NupC and NupG, from Escherichia coli: specific structural motifs necessary for the binding of ligands*, Organic & biomolecular chemistry, 2005, 3, 462-470.
96. R. Huang, X. Zhou, Y. Peng, X. Yang, T. Xu, Y. Liu, *Nucleosides from the marine sponge Callyspongia SP*, Chemistry of natural compounds, 2011, 46, 1010-1011.

MỤC LỤC PHỤ LỤC

PHỤ LỤC I. PHỔ CỦA CÁC HỢP CHẤT PHÂN LẬP TỪ CHỦNG *ACTINOALLOTEICHUS CYANOGRISEUS* G631..... PL 1

I.1. Phổ của hợp chất isocyanogramide..... PL 1

I.2. Hợp chất cyanogramide (G631-2)..... PL 6

I.3. Hợp chất marinacarboline F (G631-3) PL 9

I.4. Hợp chất marinacarboline H (G631-4)..... PL11

I.5. Hợp chất caerulomycinamide (G631-5)..... PL 13

I.6. Hợp chất caerulomycinonitril (G631-6)..... PL 13

I.7. Hợp chất 5'-deoxyuridine (G631-7) PL 19

I.8. Hợp chất uracil (G631-8)..... PL 22

PHỤ LỤC II. PHỔ CỦA CÁC HỢP CHẤT PHÂN LẬP TỪ CHỦNG *STREPTOMYCES* SP. G666..... PL 24

II.1. Phổ của hợp chất streptomine A (G666-1) PL 24

II.2. Phổ của hợp chất streptomine B (G666-2) PL 29

II.3. Phổ của hợp chất streptomine C (G666-3) PL 34

II.4. Phổ của hợp chất 9H-pyrido[3,4-b]indole (G666-4)..... PL 38

II.5. Phổ của hợp chất 3-acetyl-4-hydroxycinnoline (G666-5) PL 39

II.6. Phổ của hợp chất xanthone (G666-6) PL 41

II.7. Phổ của hợp chất cyclo-(Pro-Leu) (G666-7) PL 42

II.8. Phổ của hợp chất cyclo-(Pro-Gly) (G666-8) PL 44

PHỤ LỤC III. PHỔ CỦA CÁC HỢP CHẤT PHÂN LẬP TỪ CHỦNG *STREPTOMYCES* SP. G246..... PL 47

III.1. Hợp chất spirotryprostatin A (G246-1) PL 47

III.2. Hợp chất cyclo-(Pro-Met) (G246-2)..... PL 50

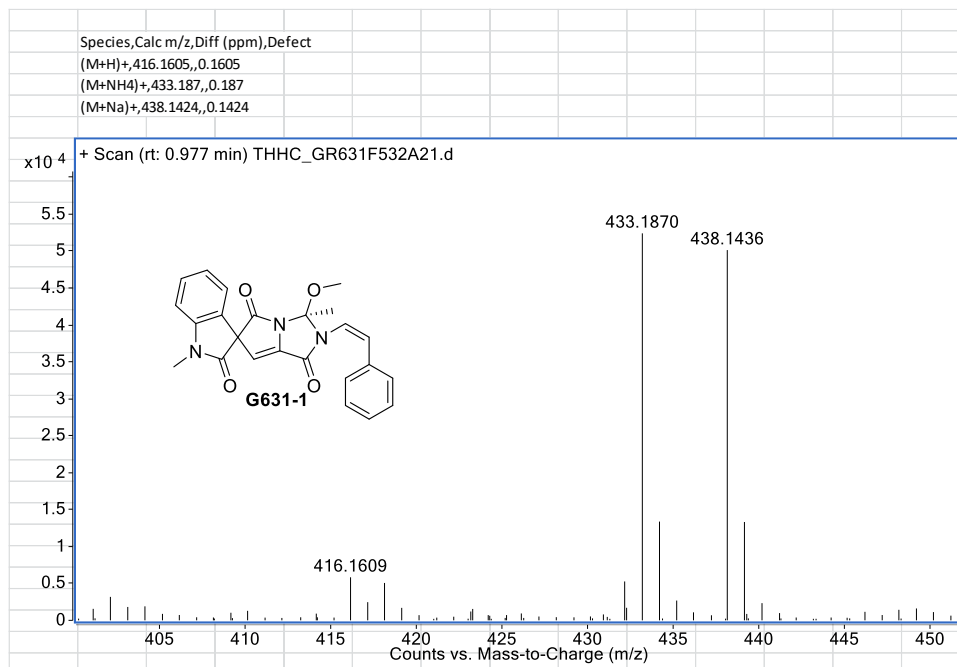
III.3. Hợp chất phenol A acid (G246-3)..... PL 52

<i>III.4. Hợp chất 3,4-dihydroxy-6,7-dimethyl-quinoline-2-carboxylic (G246-4)</i> ..	PL 54
<i>III.5. Hợp chất cyclo-(Pro-Gly) (G246-5)</i>	PL 56
<i>III.6. Hợp chất xanthone (G246-6)</i>	PL 57
<i>III.7. Hợp chất guanosine (G246-7)</i>	PL 57
<i>III.8. Hợp chất adenosine (G246-8)</i>	PL 61
<i>III.9. Hợp chất 2'-deoxyadenosine (G246-9)</i>	PL 62

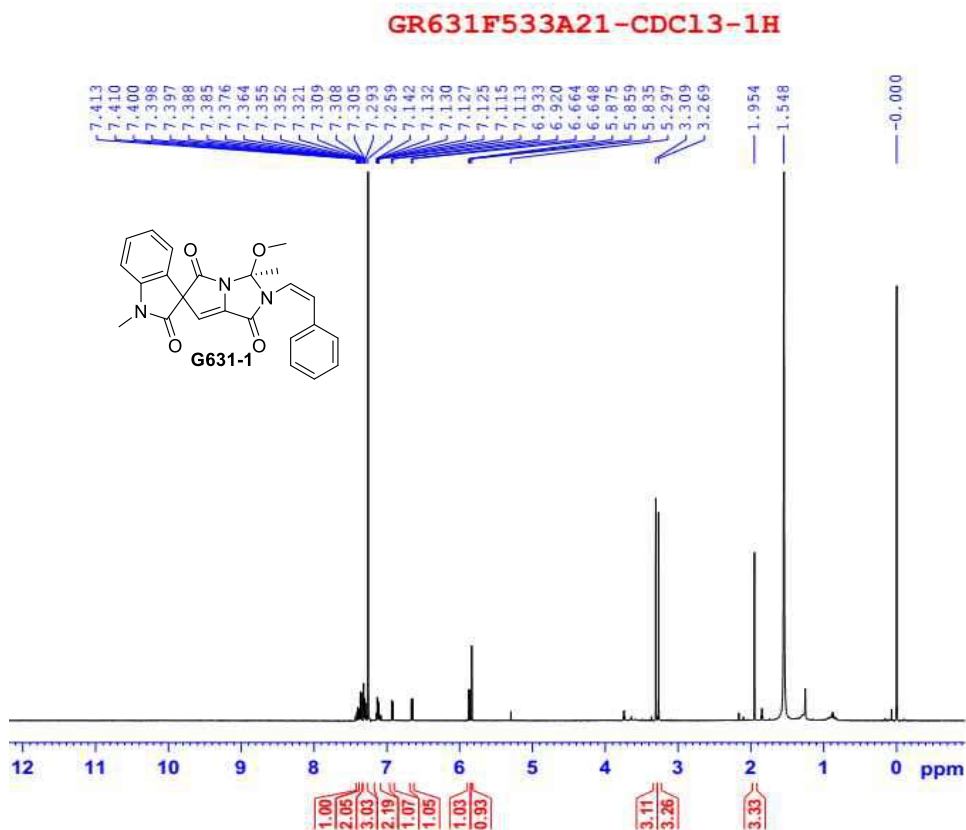
PHỤ LỤC

PHỤ LỤC I. PHỔ CỦA CÁC HỢP CHẤT PHÂN LẬP TỪ CHỦNG *ACTINOALLOTEICHUS CYANOGRISEUS* G631

I.1. Phổ của hợp chất isocyanogramide

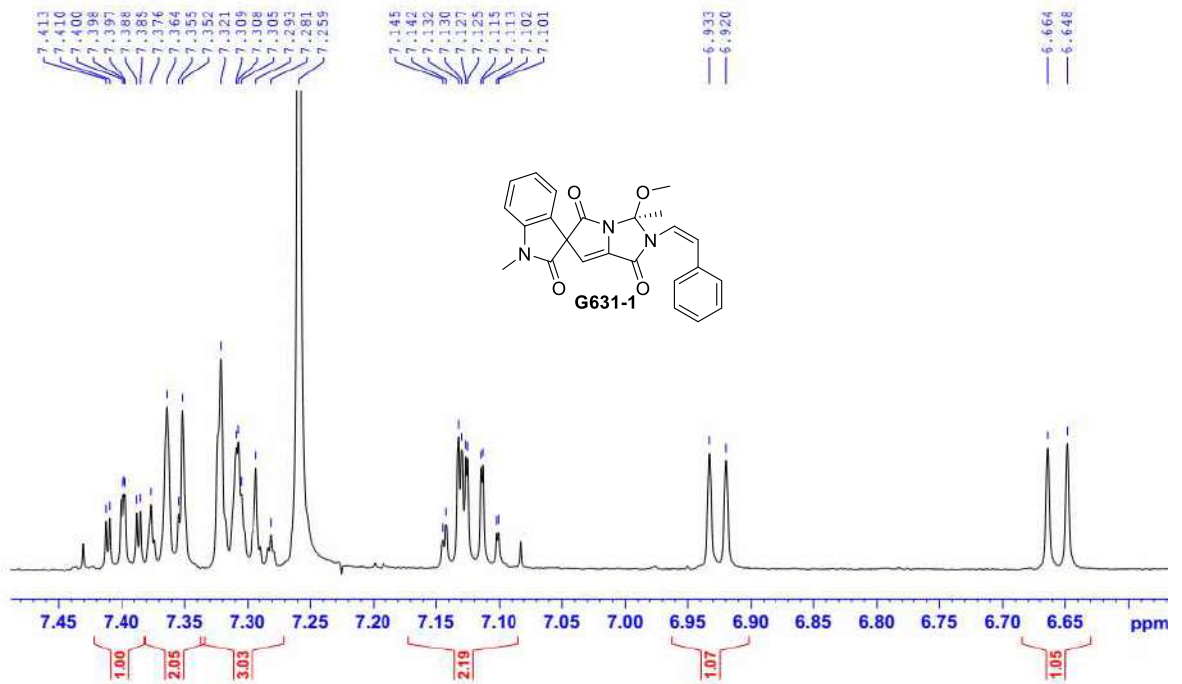


Phổ HR-MS của hợp chất **G631-1**



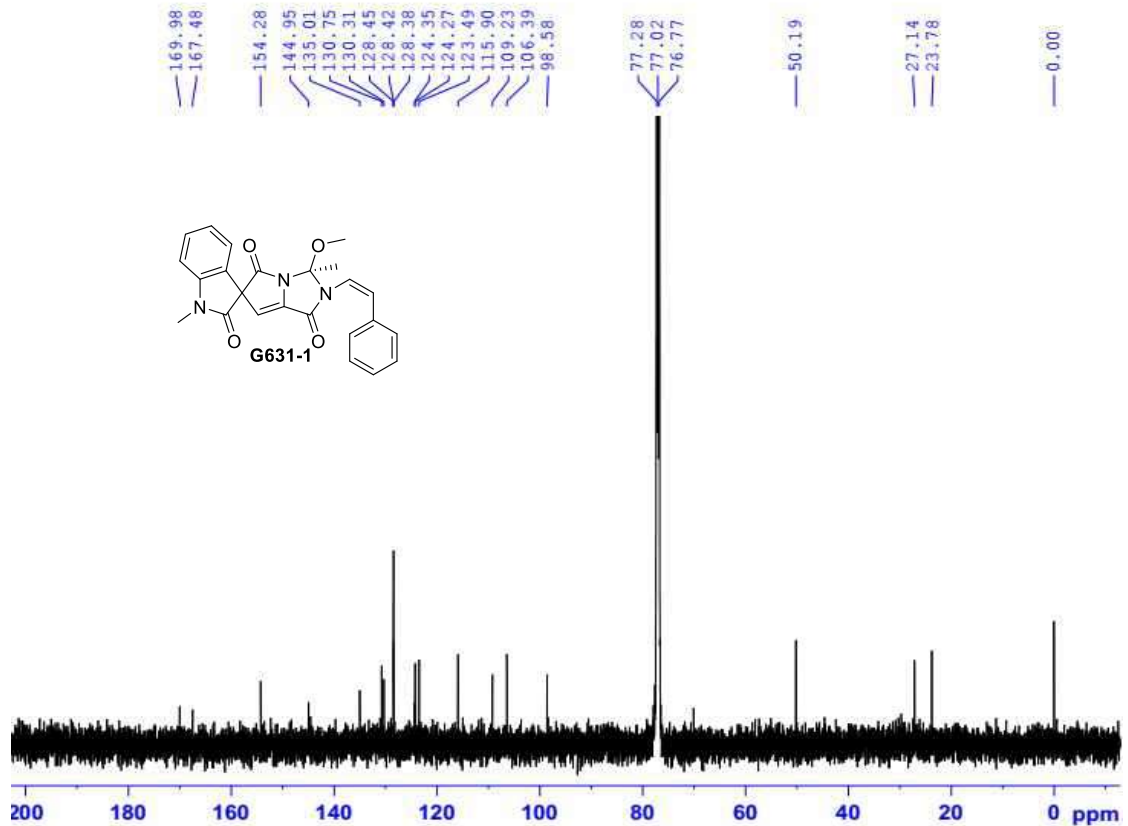
Phổ giãn ¹H NMR của hợp chất **G631-1**

GR631F533A21-CDC13-1H



Phổ giãn ^1H NMR của hợp chất G631-1

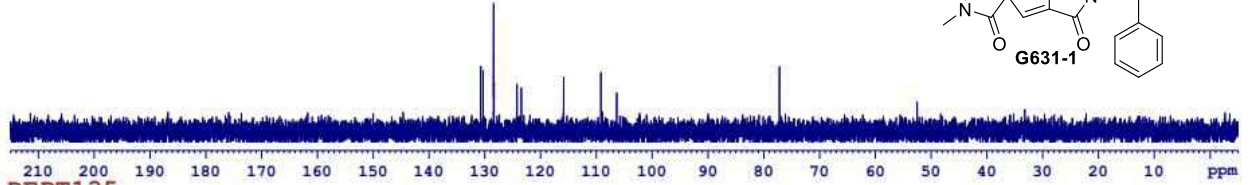
GR631F532A21-CDC13-C13CPD



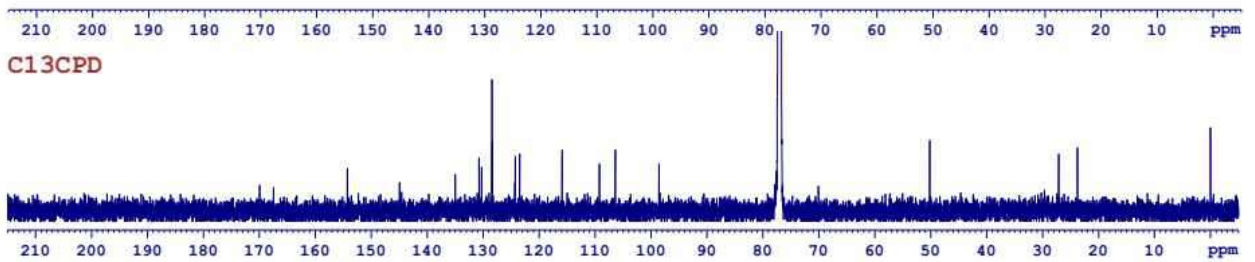
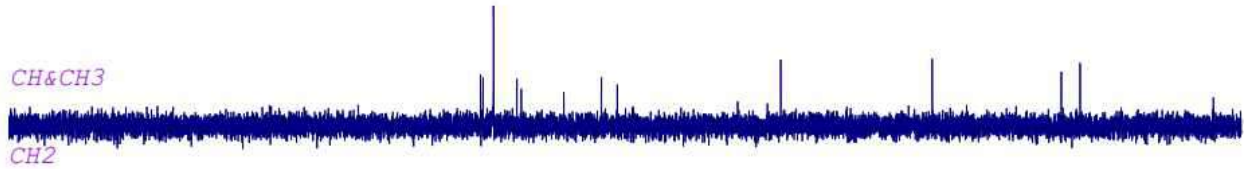
Phổ ^{13}C -NMR của hợp chất G631-1

GR631F532A21-CDC13-C13CPD&DEPT

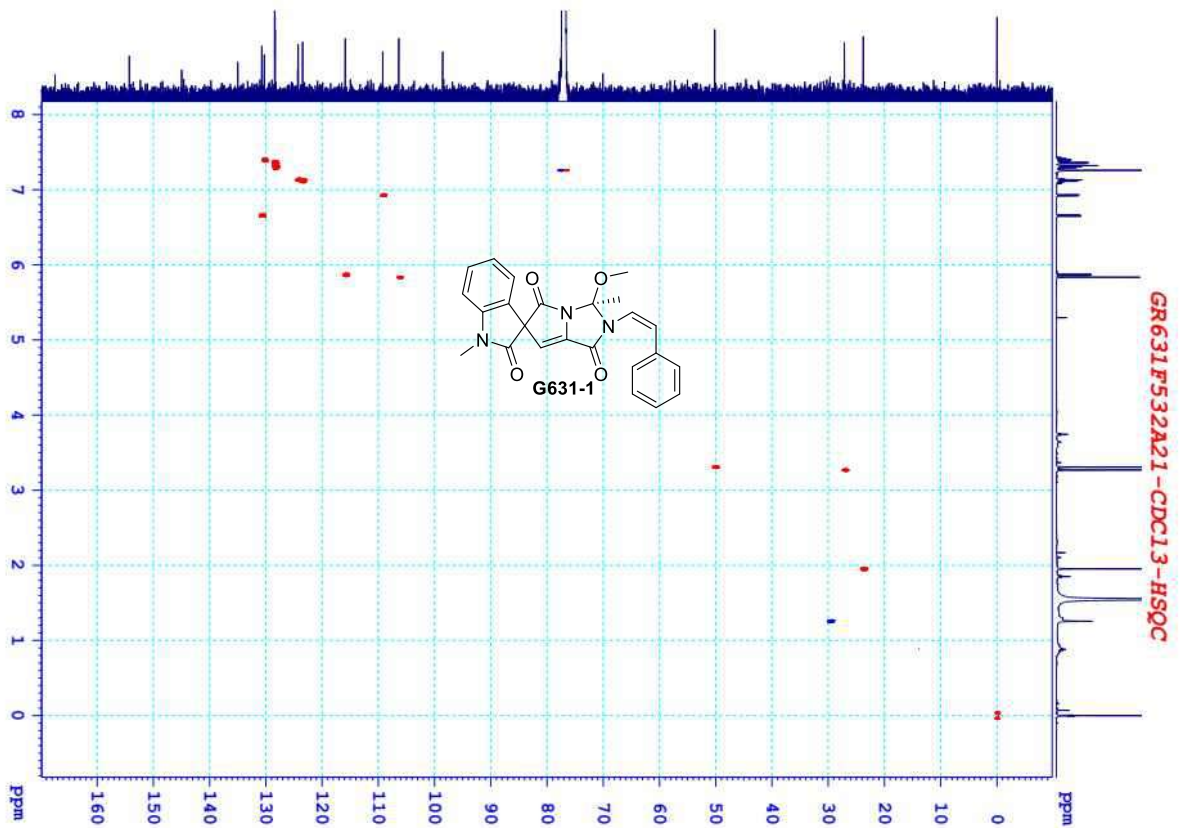
DEPT90



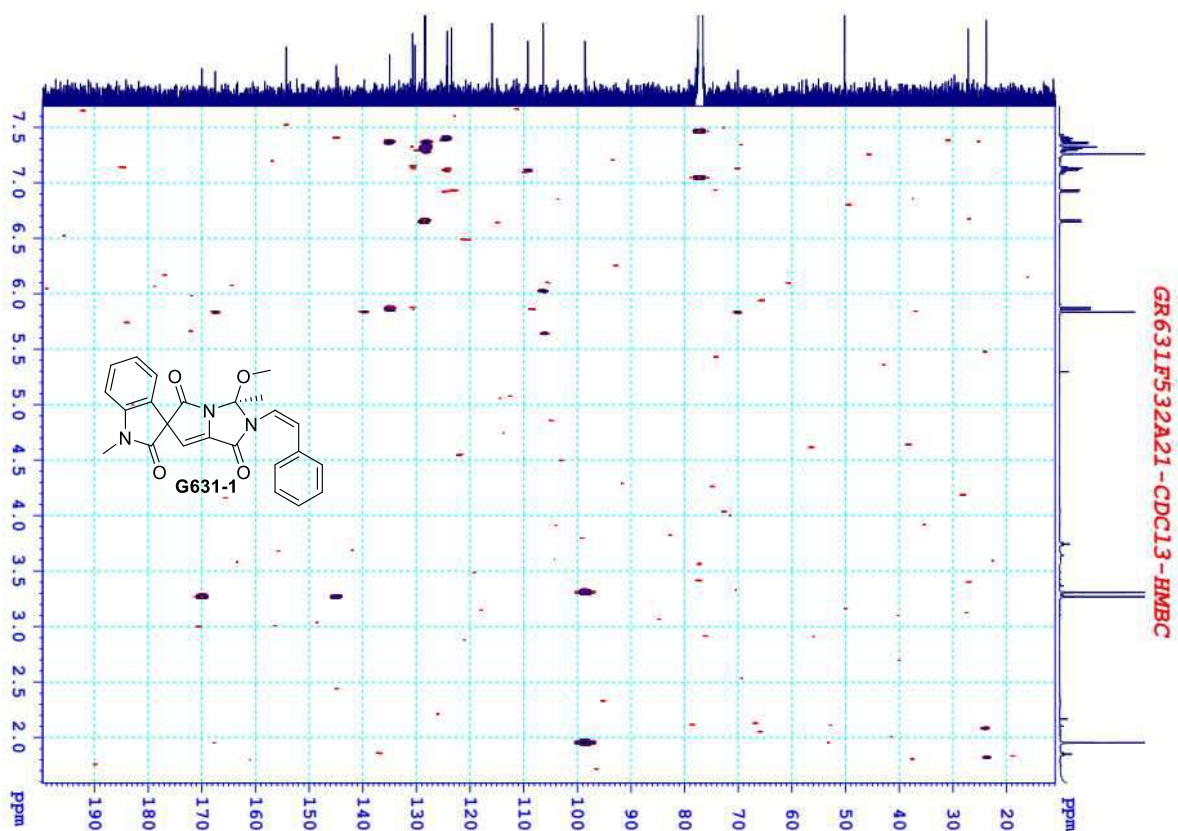
DEPT135



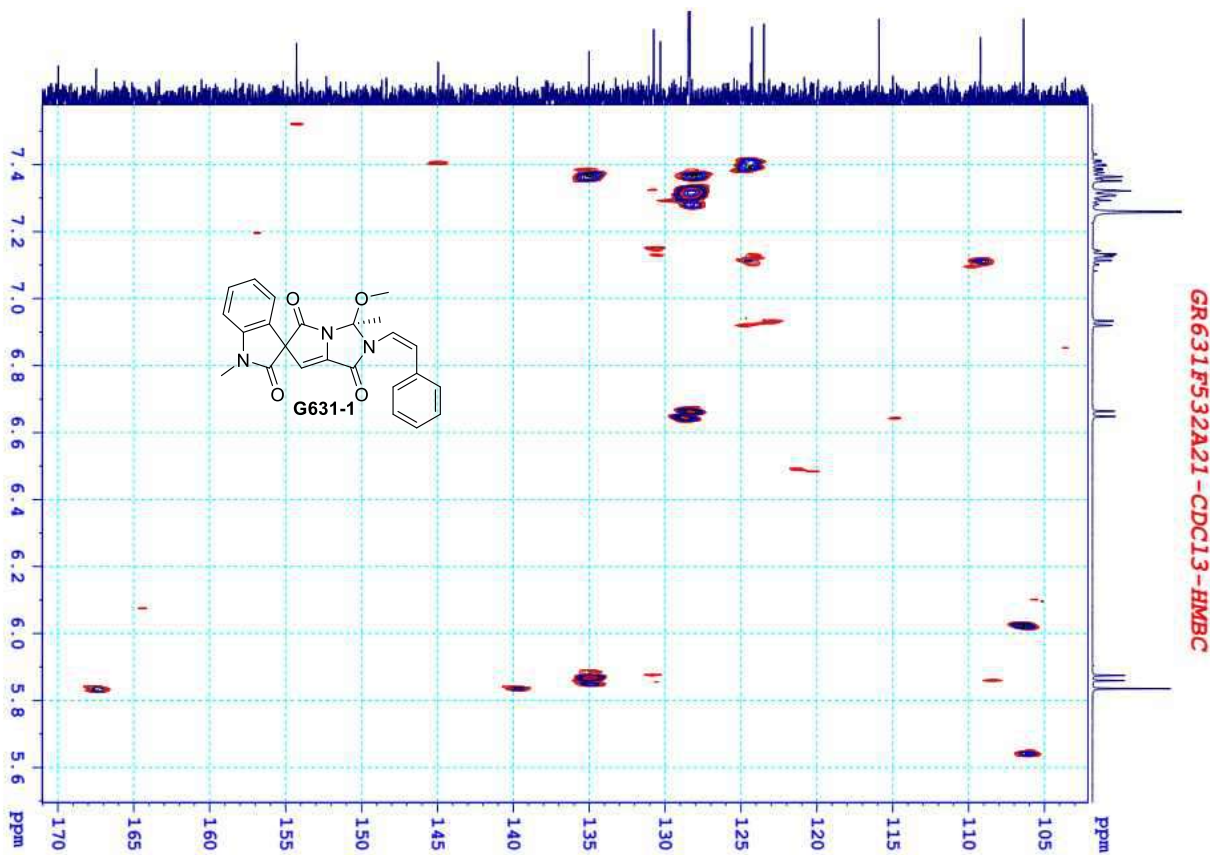
Phổ DEPT của hợp chất G631-1



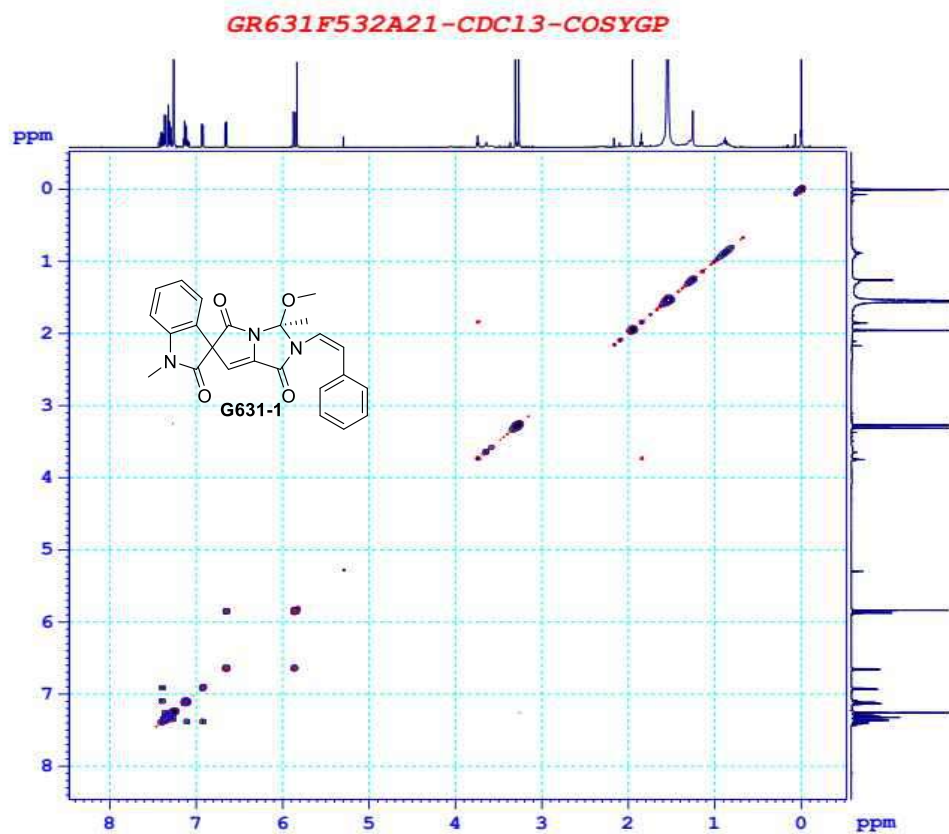
Phổ HSQC của hợp chất G631-1



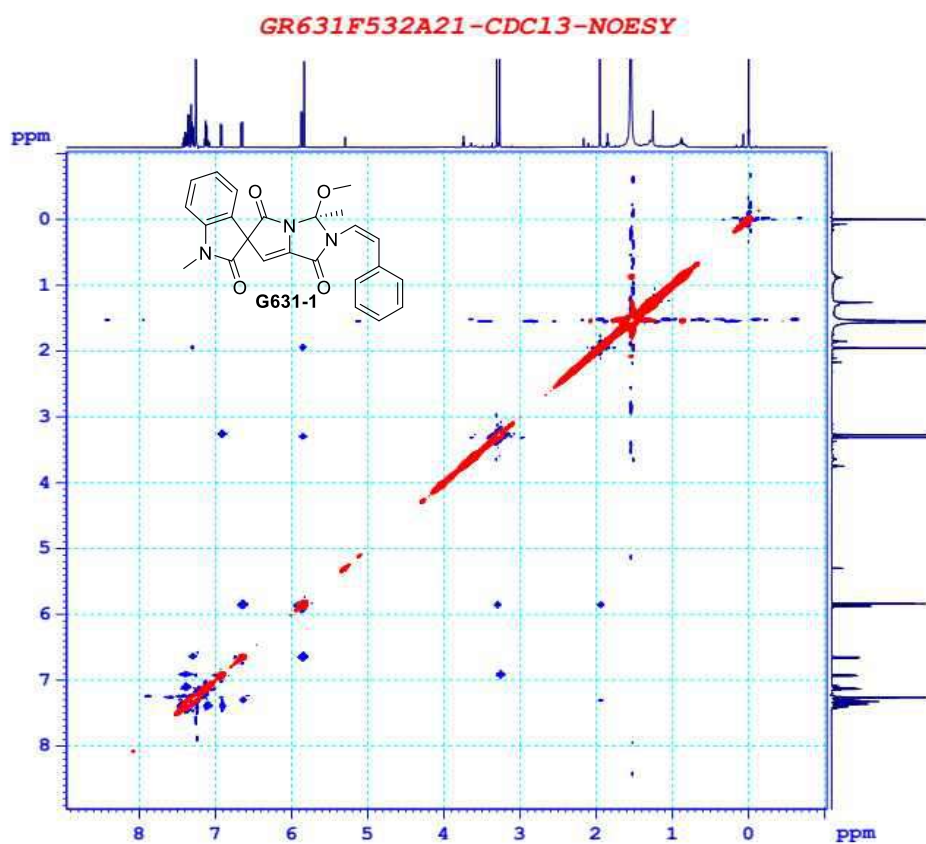
Phổ HMBC của hợp chất G631-1



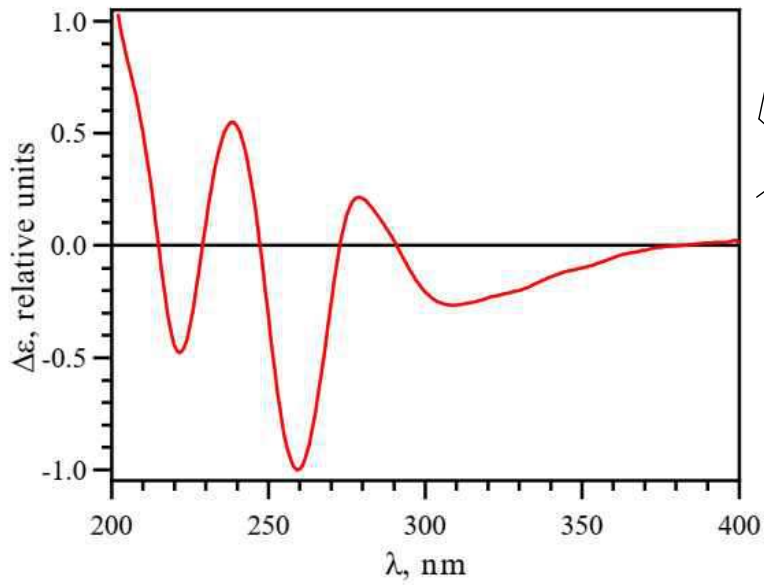
Phổ giãn HMBC của hợp chất G631-1



Phổ COSY của hợp chất **G631-1**



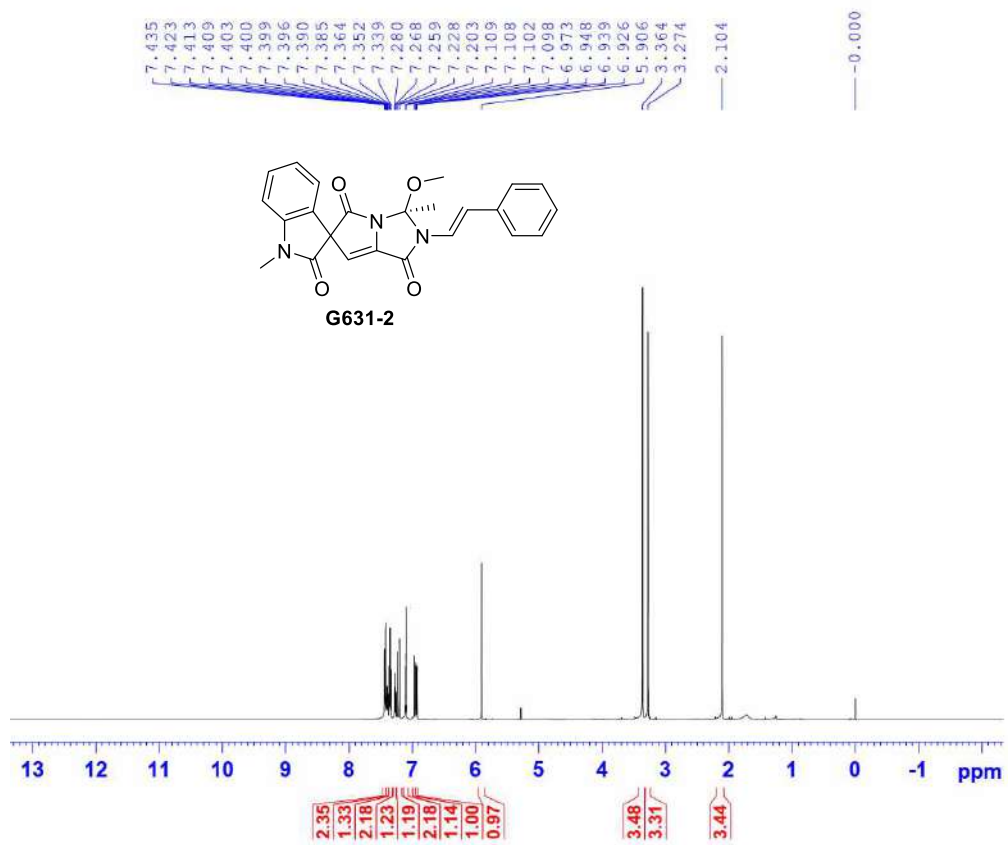
Phổ NOESY của hợp chất **G631-1**



Phổ CD của hợp chất **G631-1**

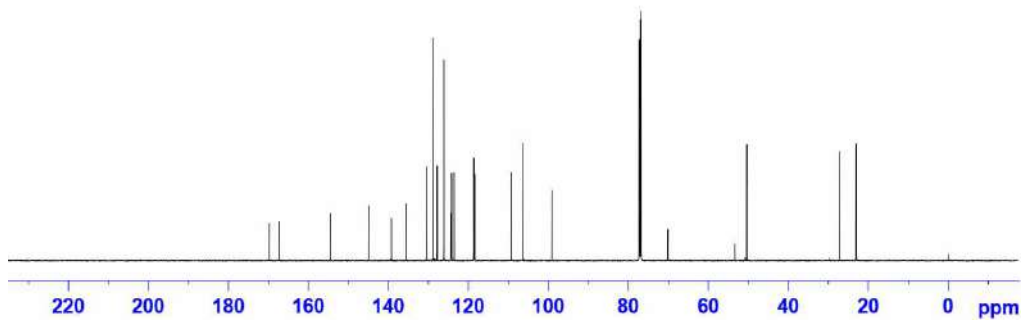
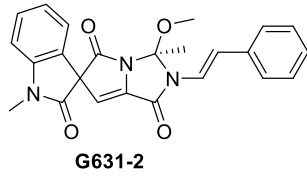
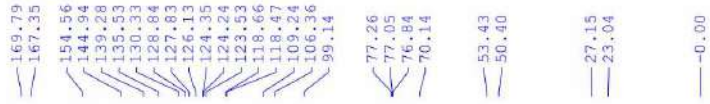
I.2. Hợp chất cyanogranamide (G631-2)

GR631E532A1-CDC13-1H



Phổ ^1H NMR của hợp chất **G631-2**

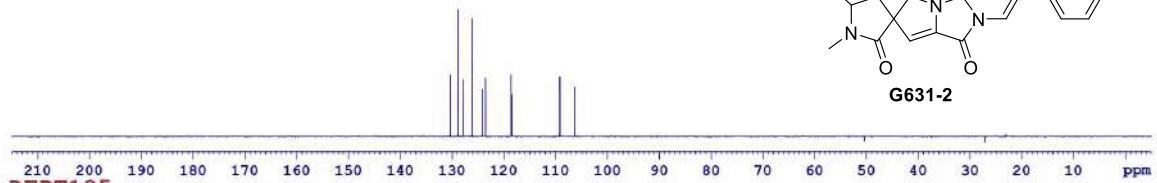
GR631E532A1-CDC13-C13CPD



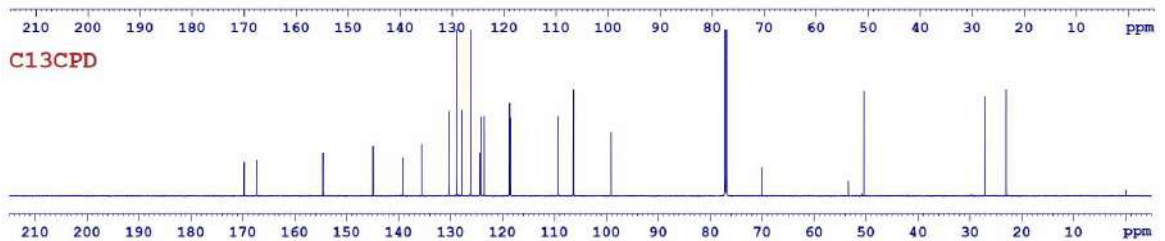
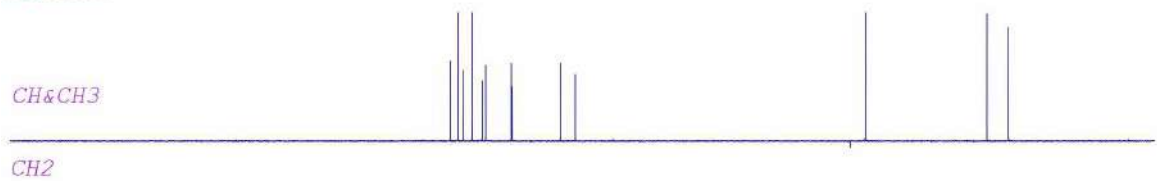
Phổ ¹³C-NMR của hợp chất G631-2

GR631E532A1-CDC13-C13CPD&DEPT

DEPT90

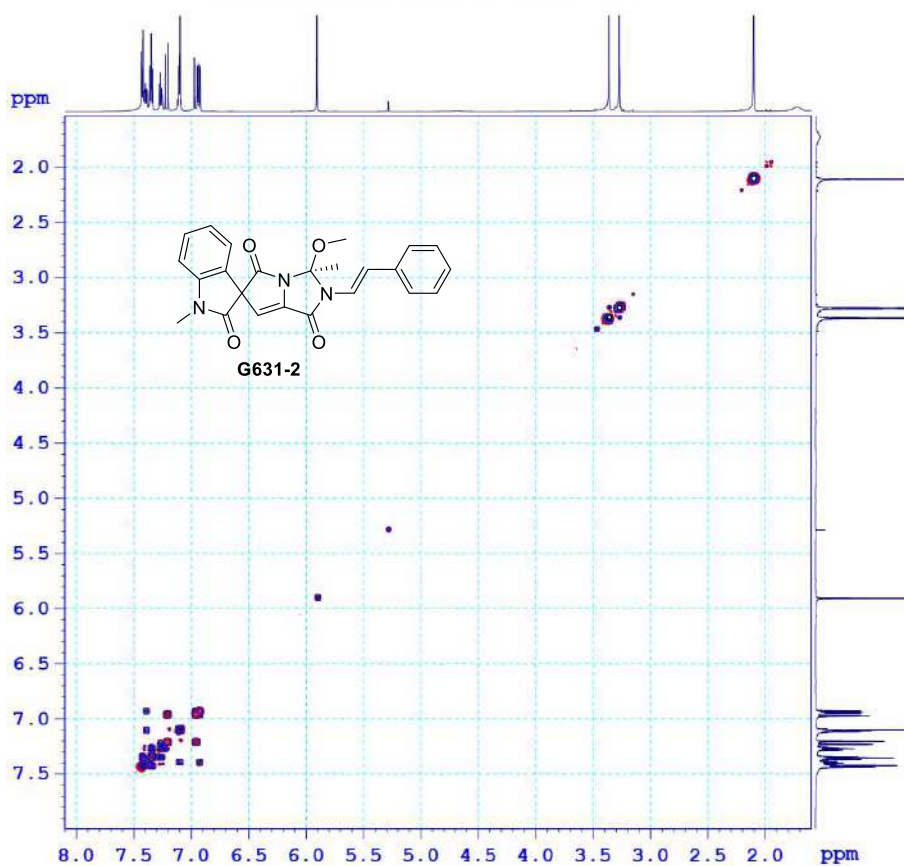


DEPT135

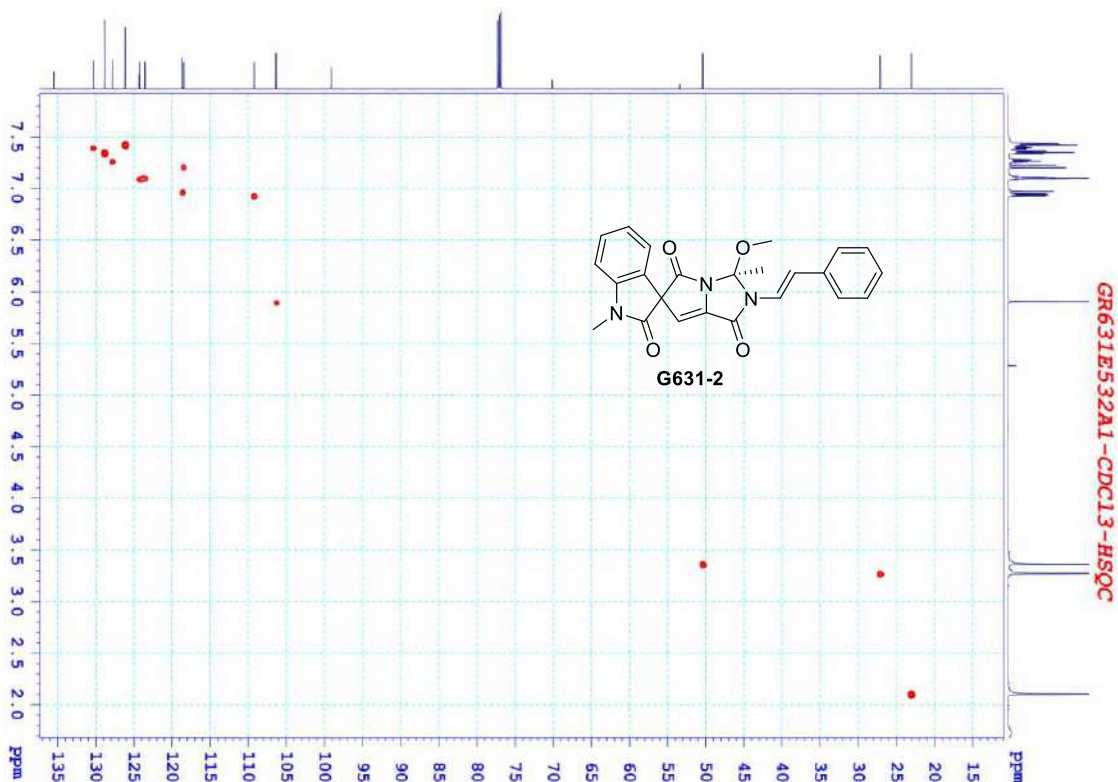


Phổ DEPT của hợp chất G631-2

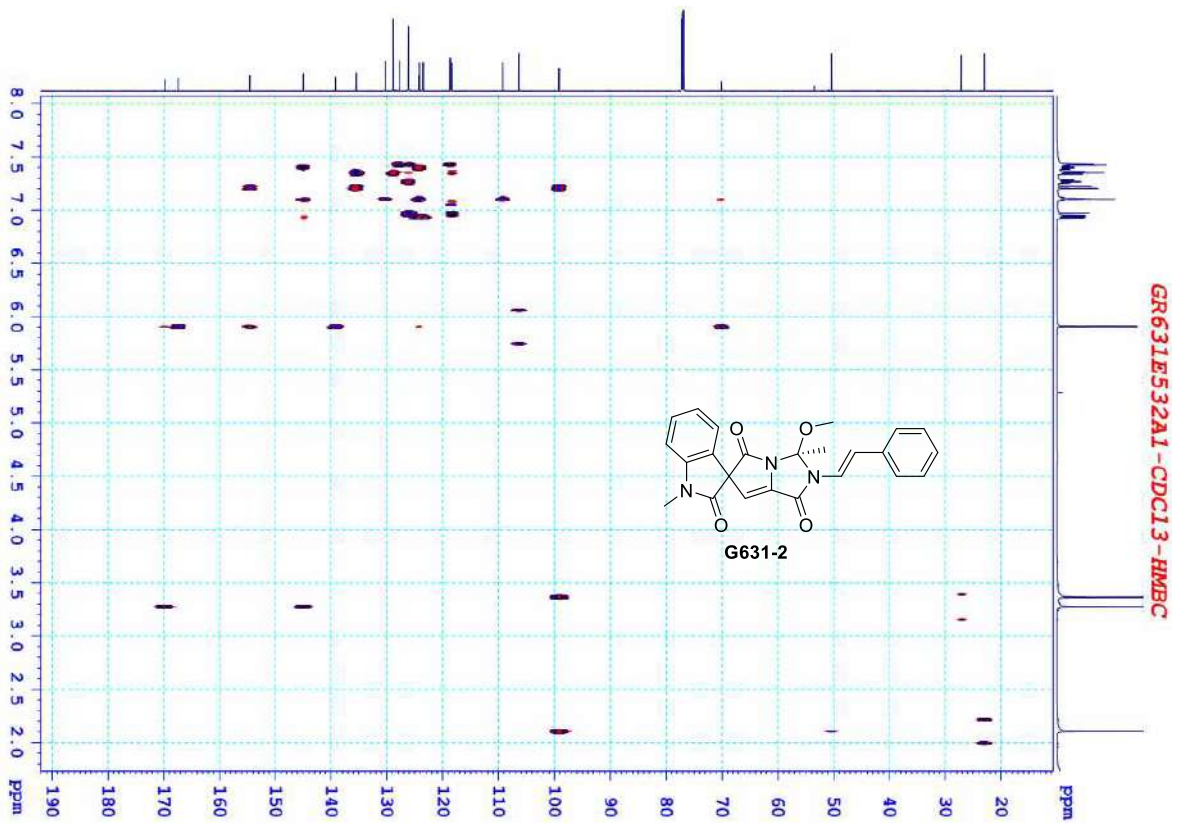
GR631E532A1-CDCl3-COSYGP



Phổ COSY của hợp chất G631-2

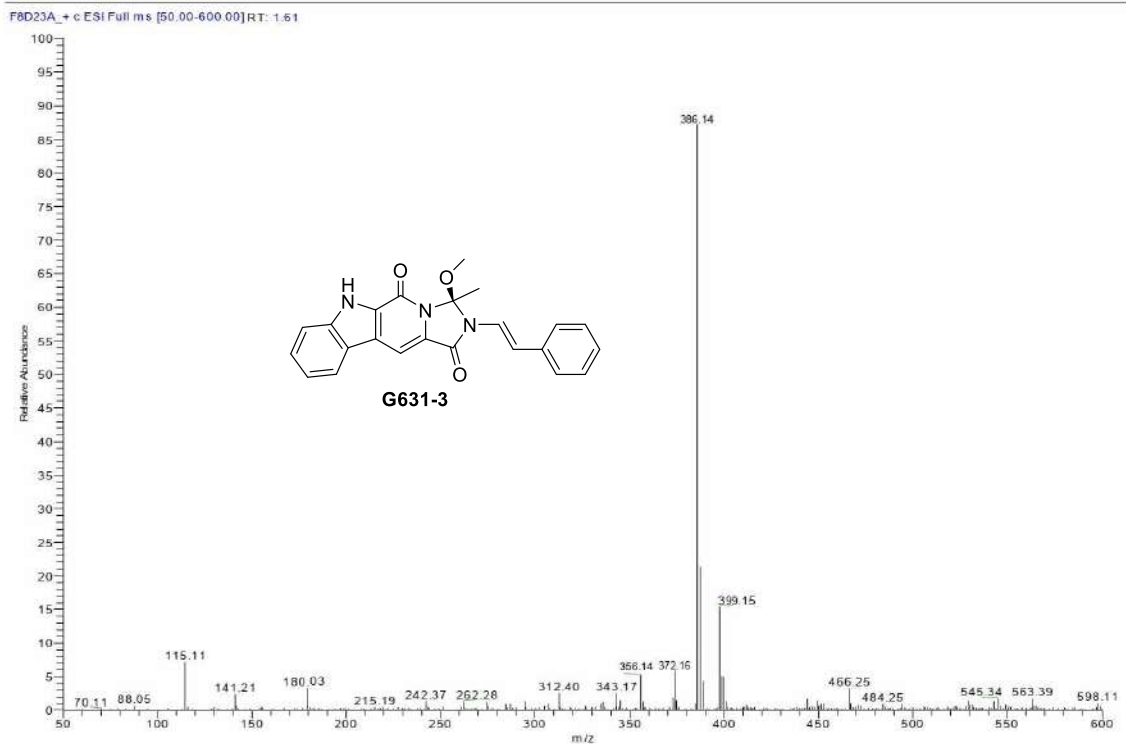


Phổ HSQC của hợp chất G631-2



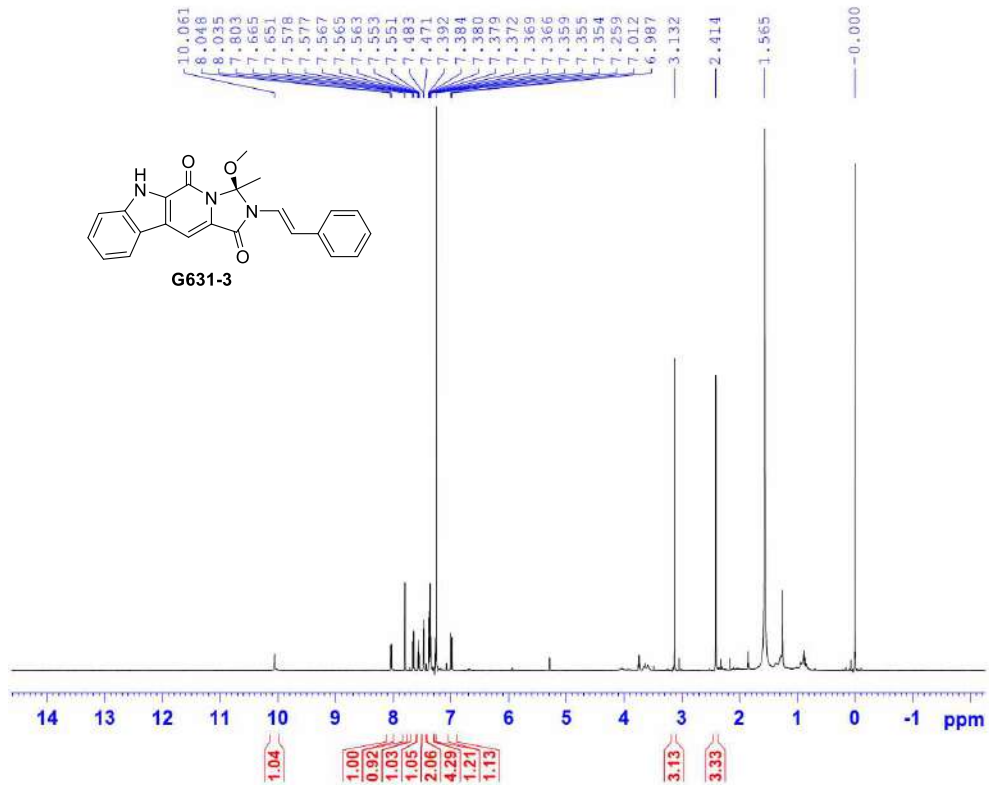
Phổ HMBC của hợp chất **G631-2**

I.3. Hợp chất marinacarboline F (G631-3)



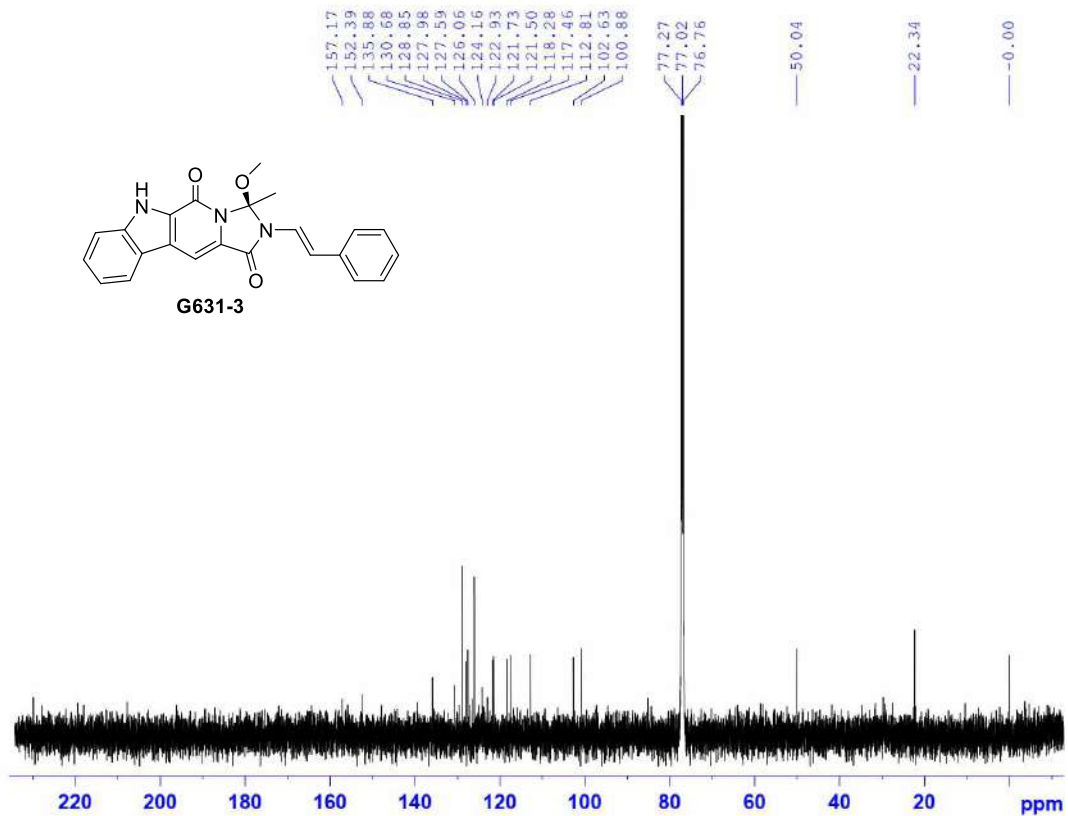
Phổ ESI-MS của hợp chất **G631-3**

GR631F555A1-CDC13-1H



Phổ ¹H NMR của hợp chất G631-3

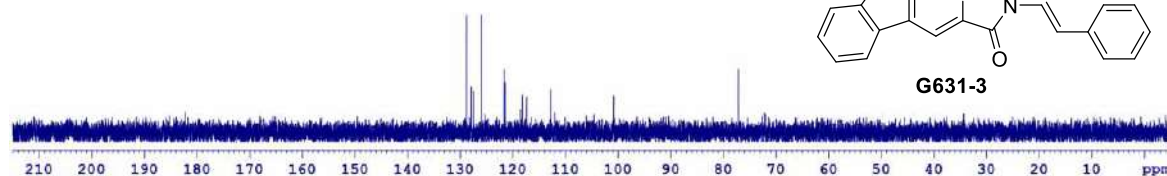
GR631F555A1-CDC13-C13CPD



Phổ ¹³C-NMR của hợp chất G631-3

GR631F555A1-CDC13-C13CPD&DEPT

DEPT90

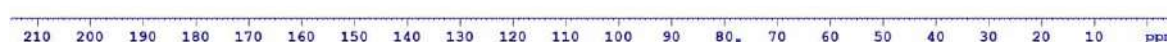


DEPT135

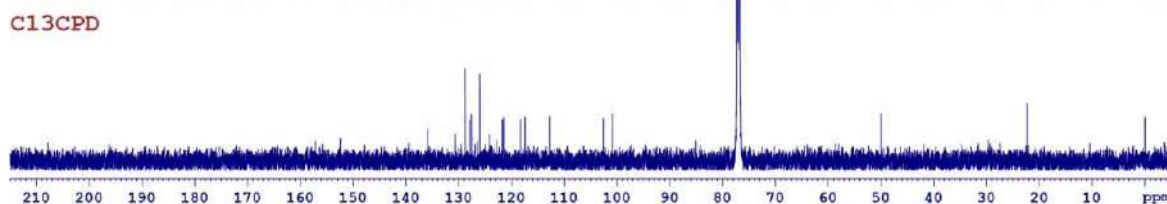


CH&CH3

CH2



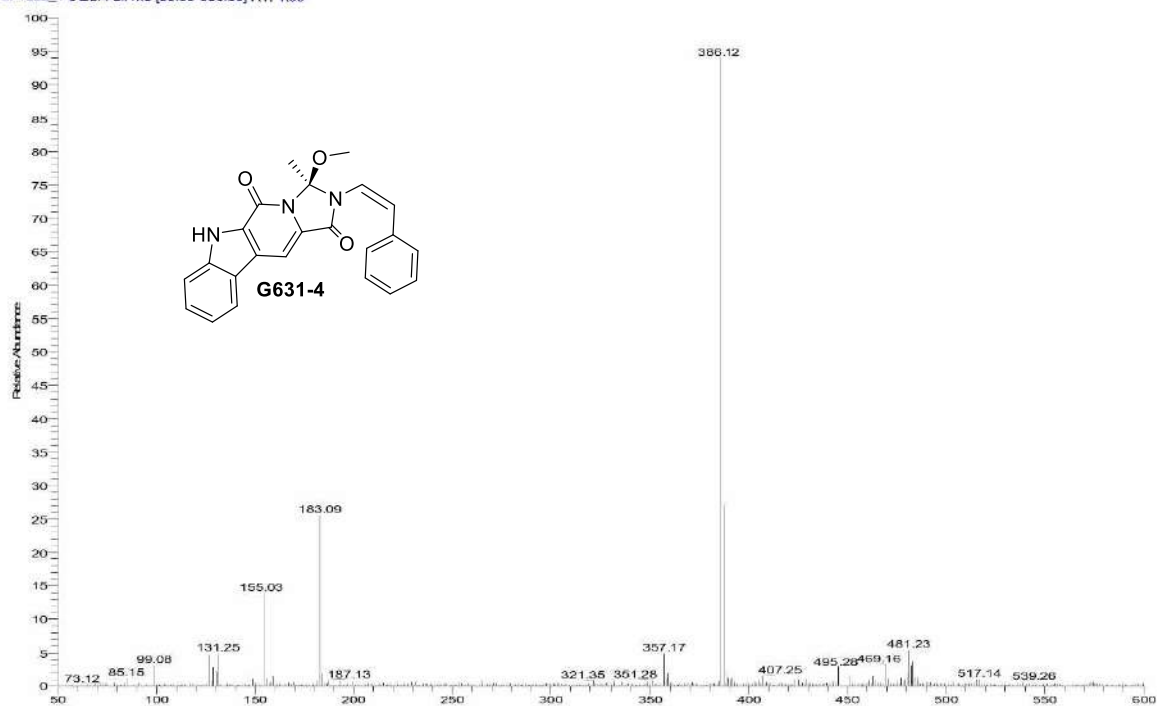
C13CPD



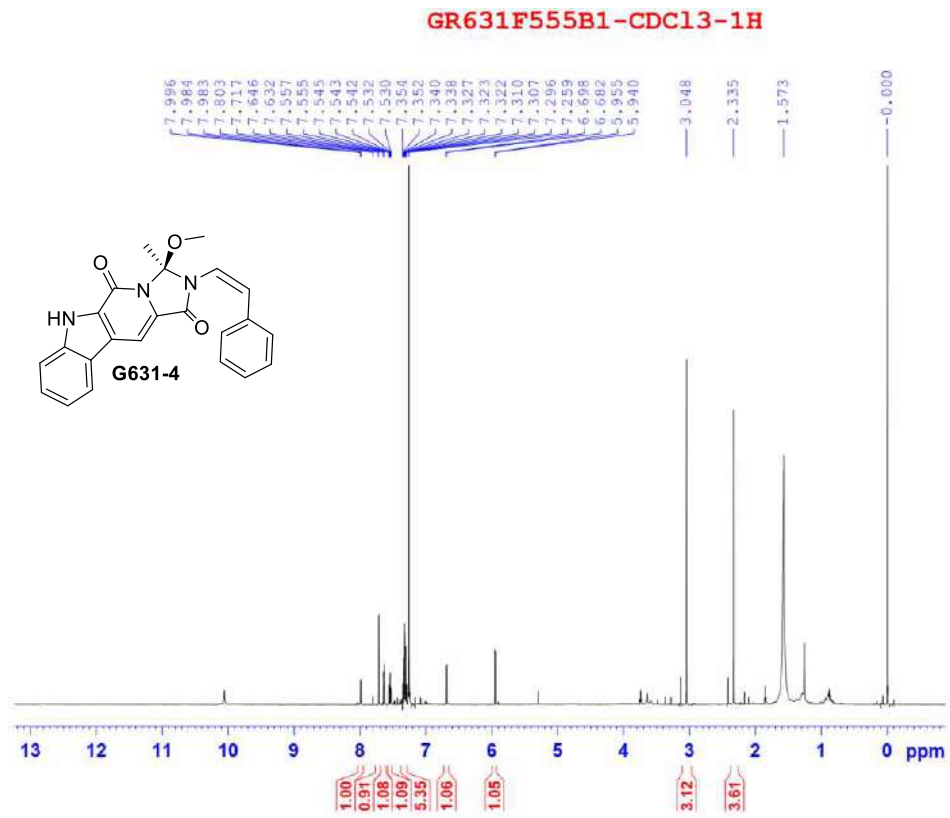
Phổ DEPT của hợp chất G631-3

I.4. Hợp chất marinacarboline H (G631-4)

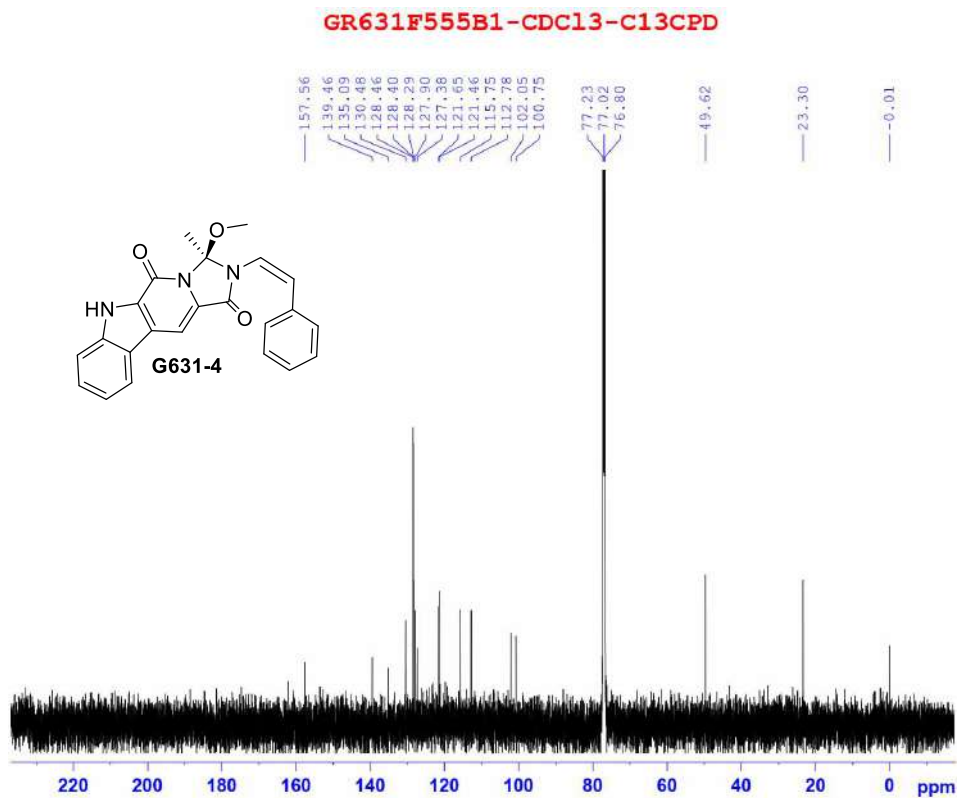
GF12L2_+ c ESI Full ms [50.00-600.00] RT: 1.99



Phổ ESI-MS của hợp chất G631-4



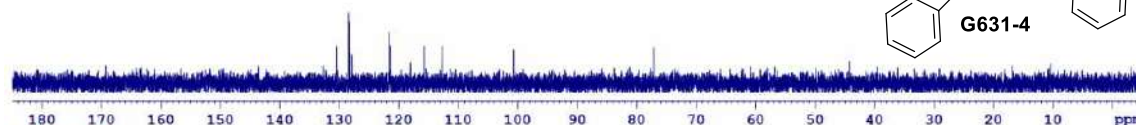
Phổ ^1H NMR của hợp chất **G631-4**



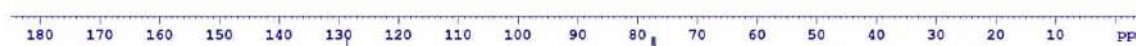
Phổ ^{13}C -NMR của hợp chất **G631-4**

GR631F555B1-CDC13-C13CPD&DEPT

DEPT90



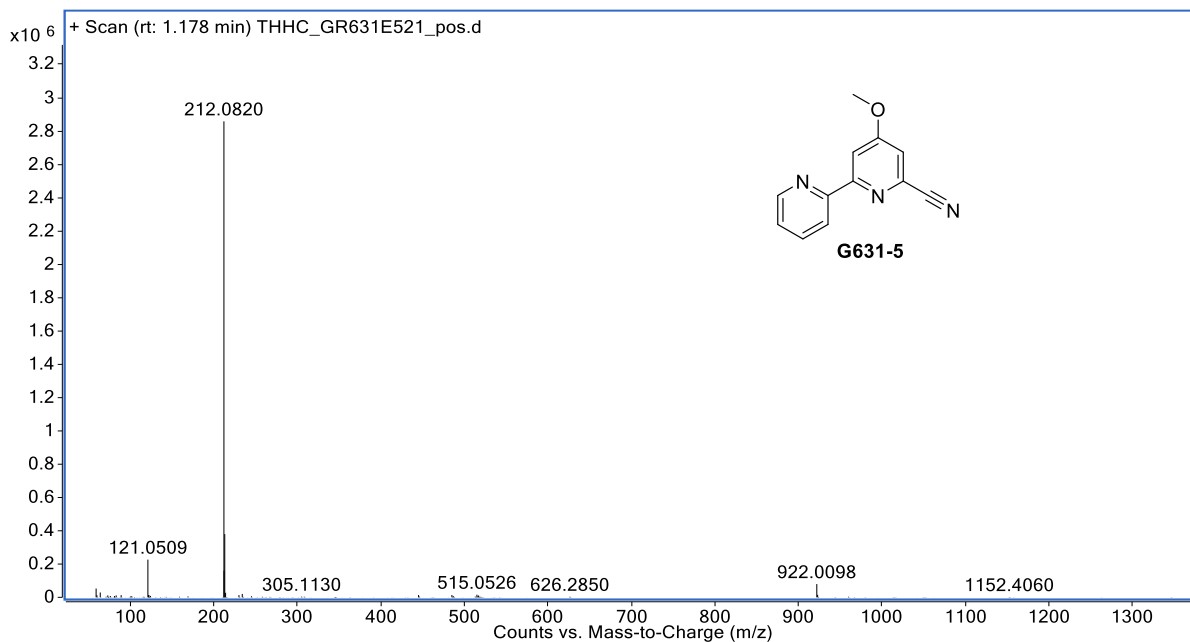
DEPT135



C13CPD

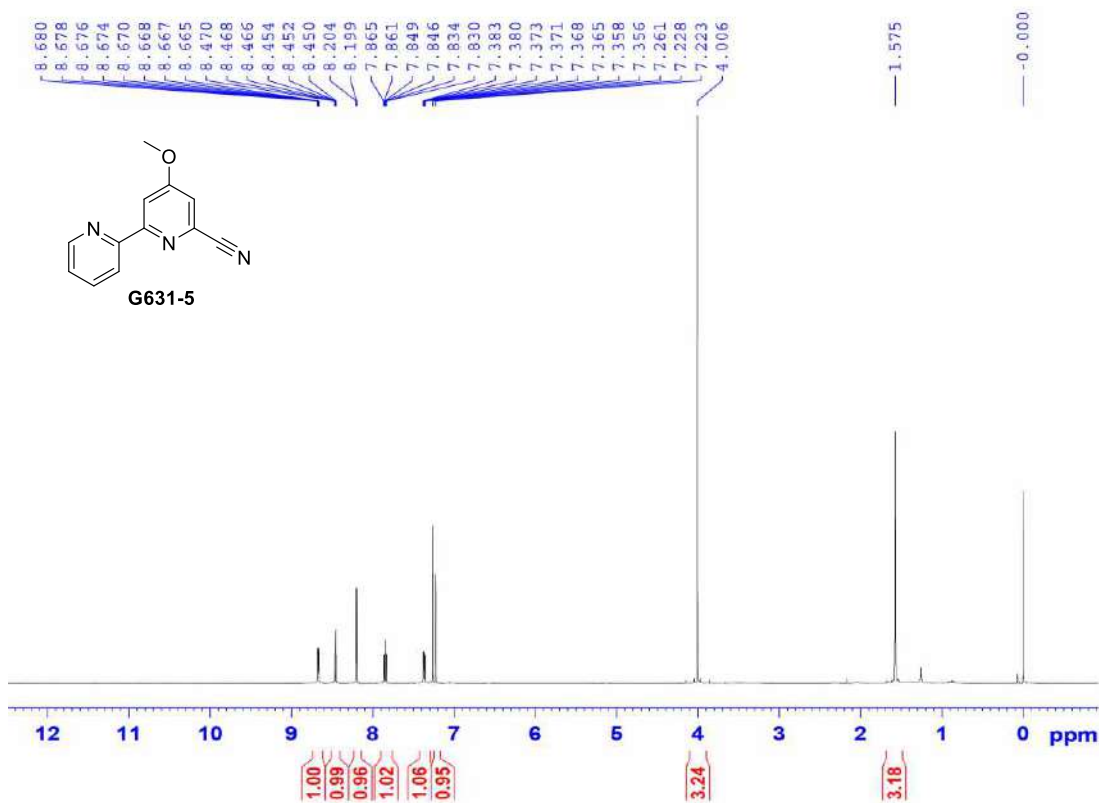
Phổ DEPT của hợp chất G631-4

I.5. Hợp chất caerulomycinonitril (G631-5)



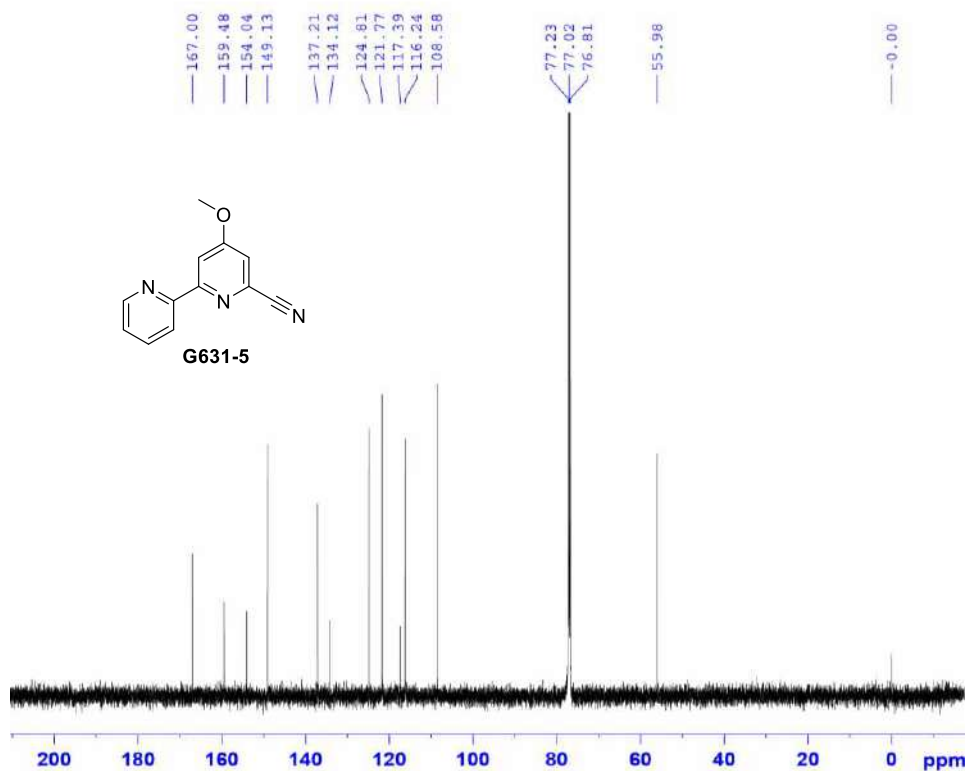
Phổ HR-MS của hợp chất G631-5

GR631E532-CDC13-1H

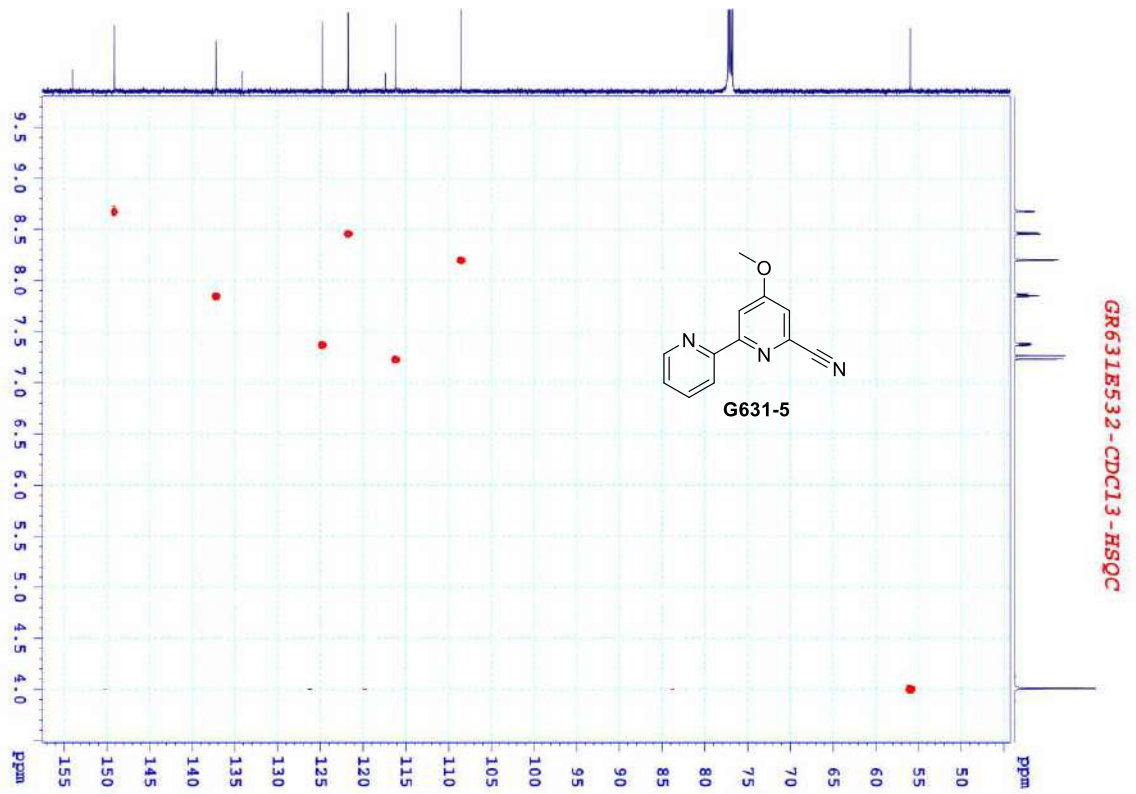


Phổ ¹H NMR của hợp chất G631-5

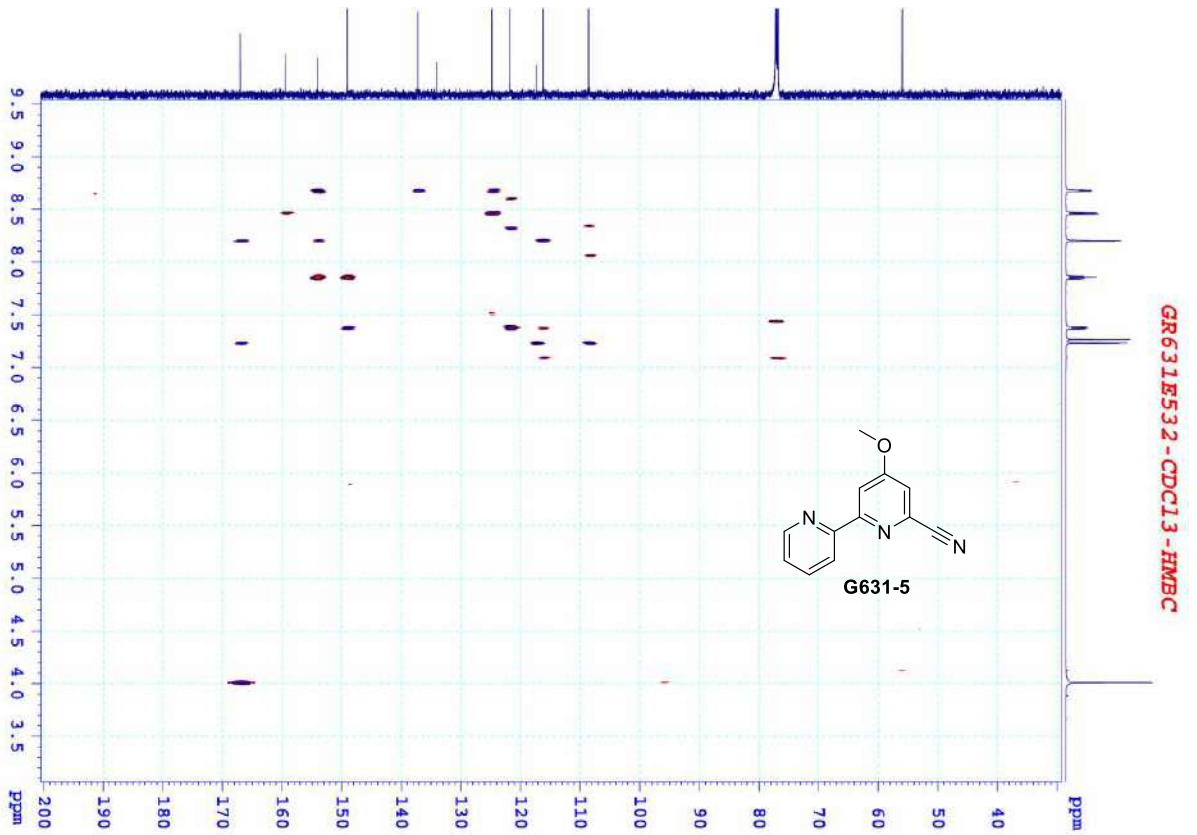
GR631E532-CDC13-C13CPD



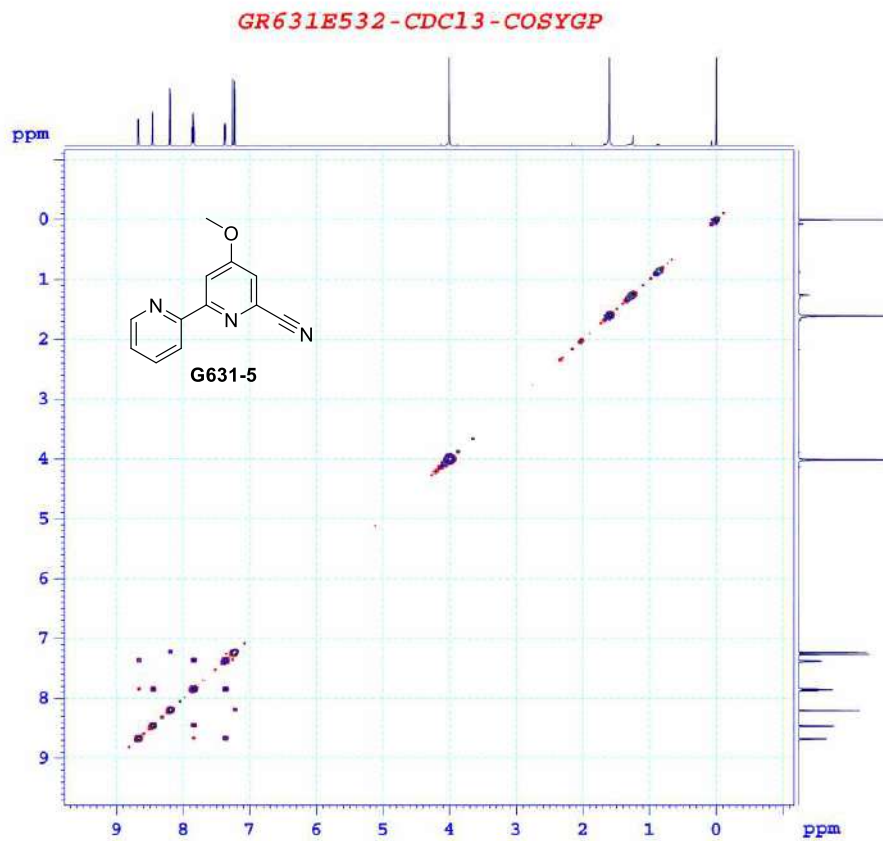
Phổ ¹³C-NMR của hợp chất G631-5



Phổ HSQC của hợp chất **G631-5**

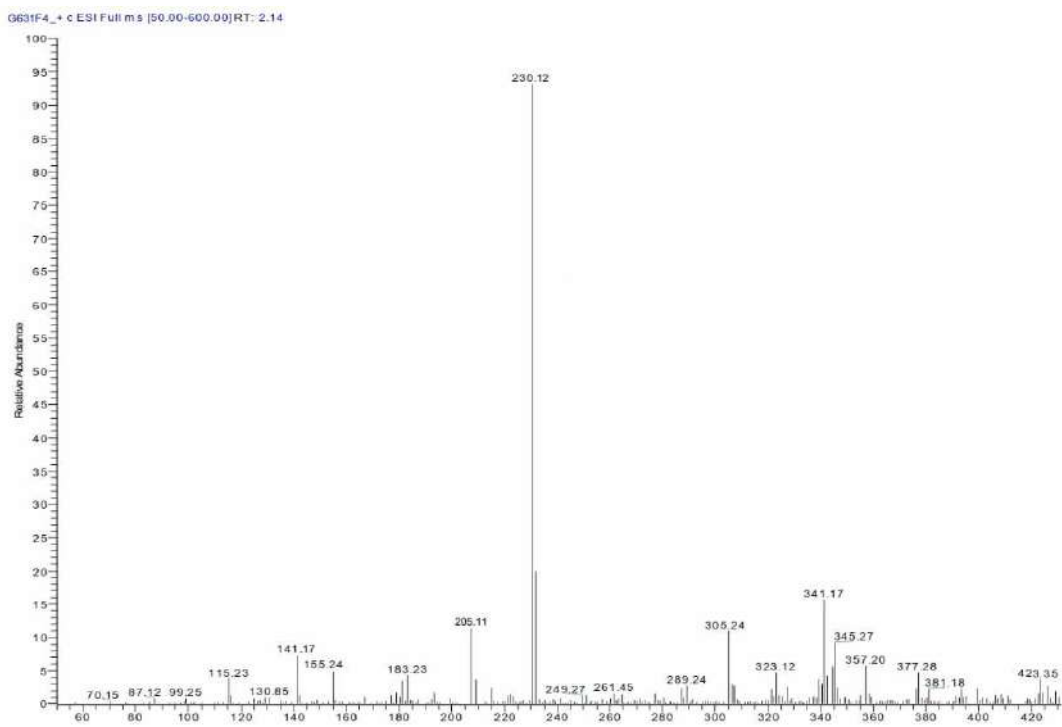


Phổ HMBC của hợp chất **G631-5**



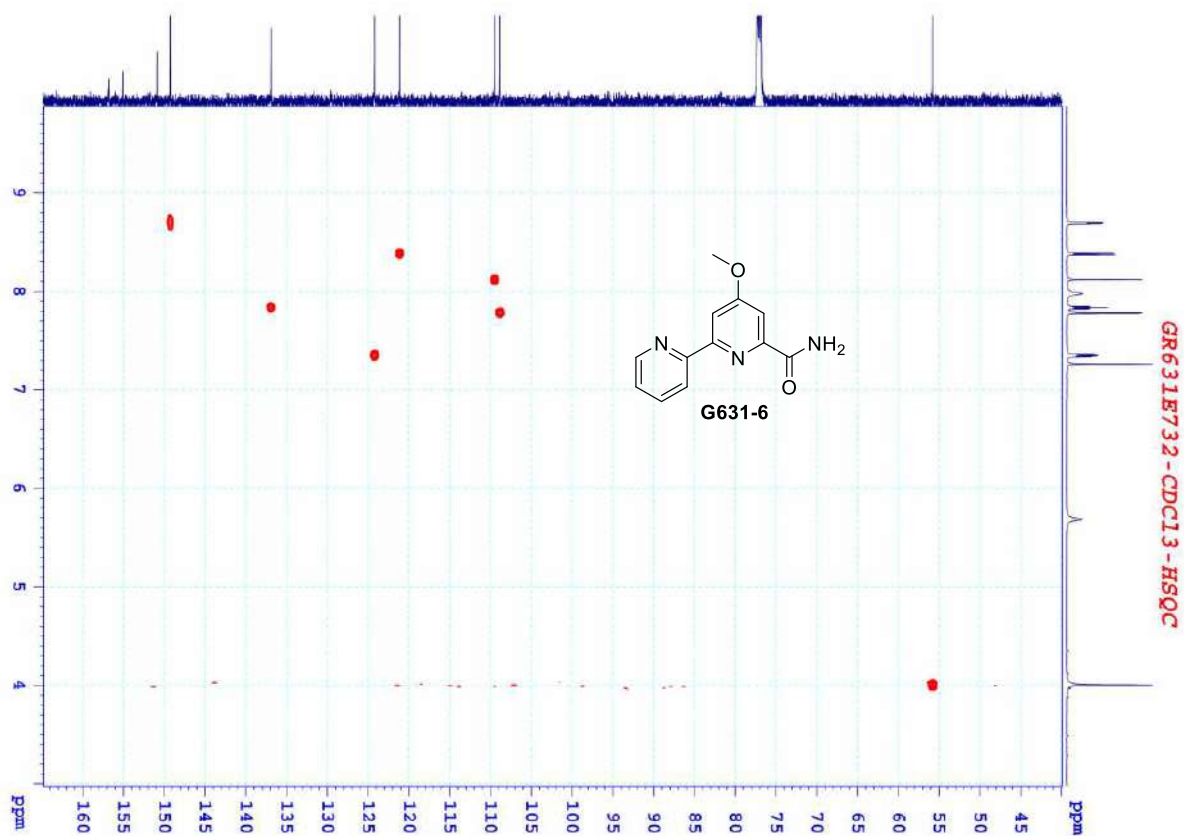
Phổ COSY của hợp chất **G631-5**

I.6. Hợp chất caerulomycinamide (**G631-6**)

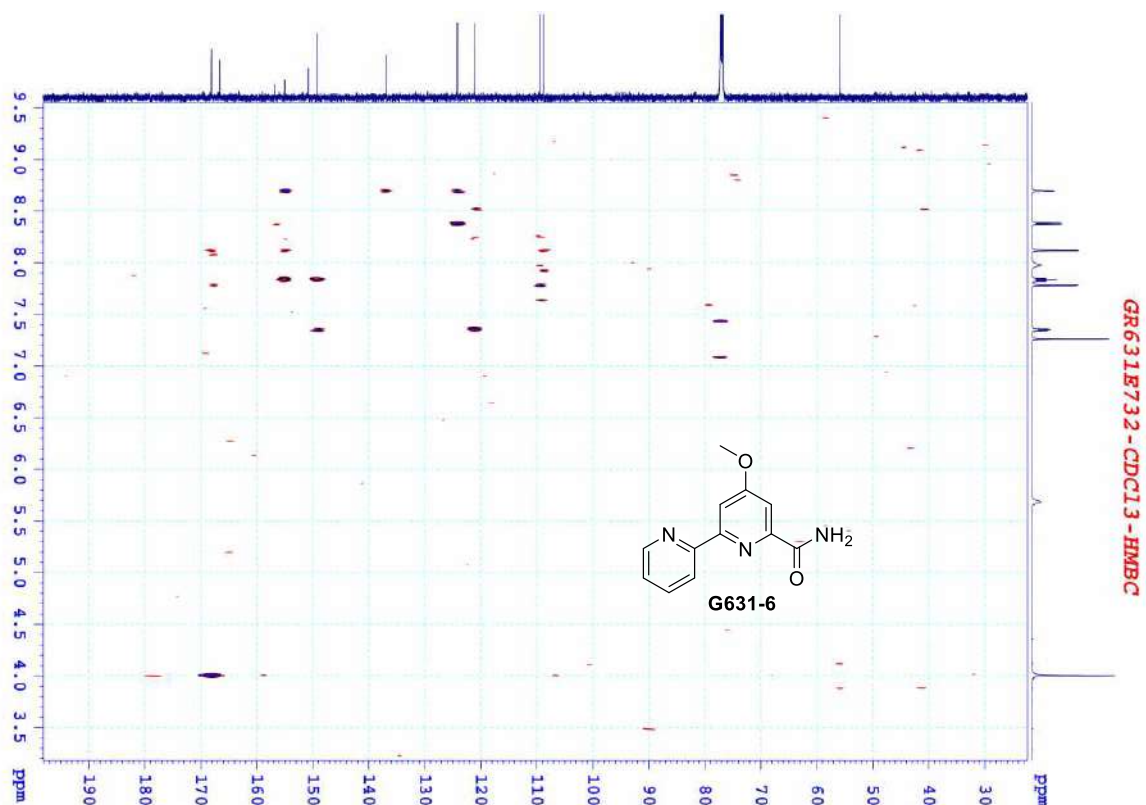


Phổ ESI-MS của hợp chất **G631-6**

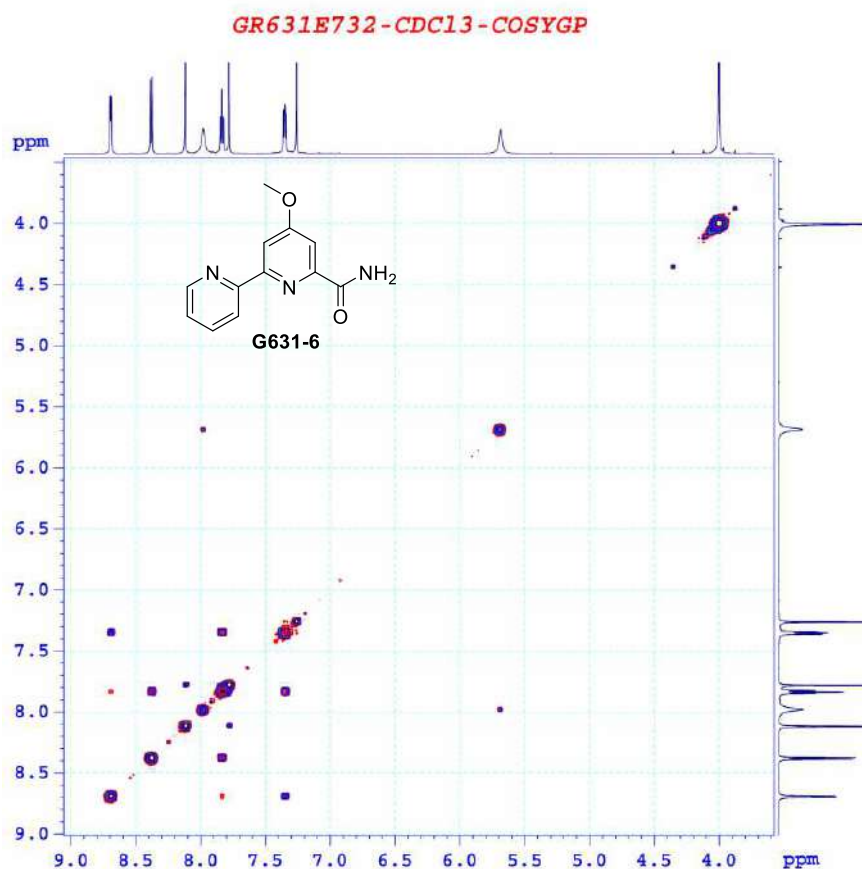
Phổ ^{13}C -NMR của hợp chất **G631-6**



Phổ HSQC của hợp chất **G631-6**

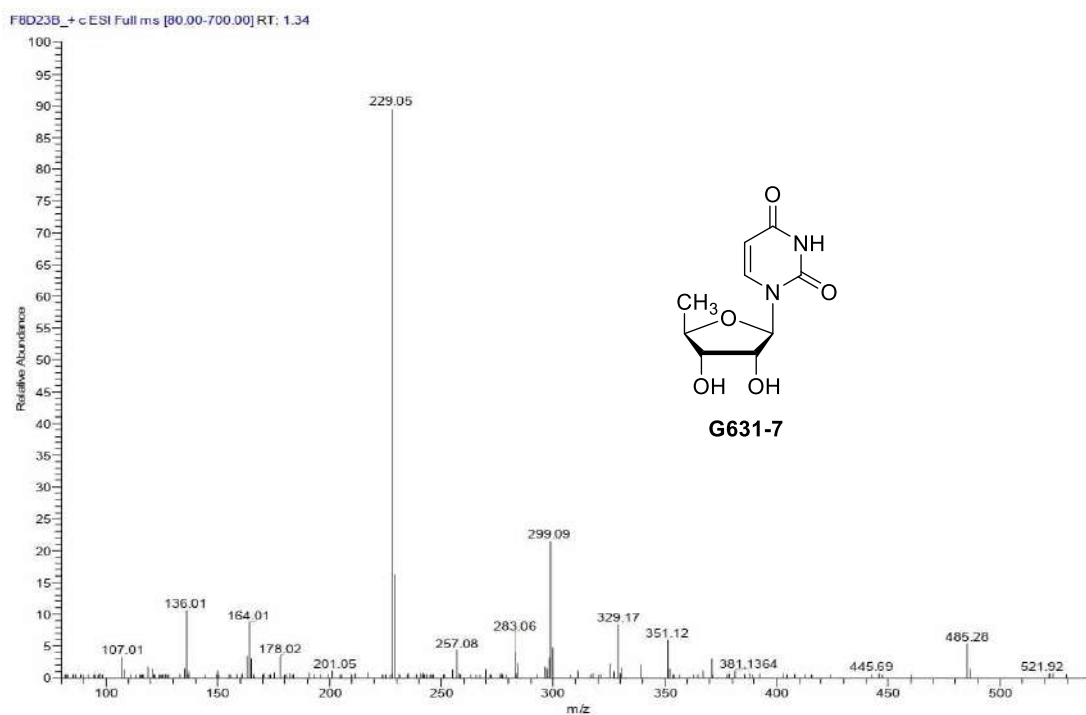


Phổ HMBC của hợp chất G631-6

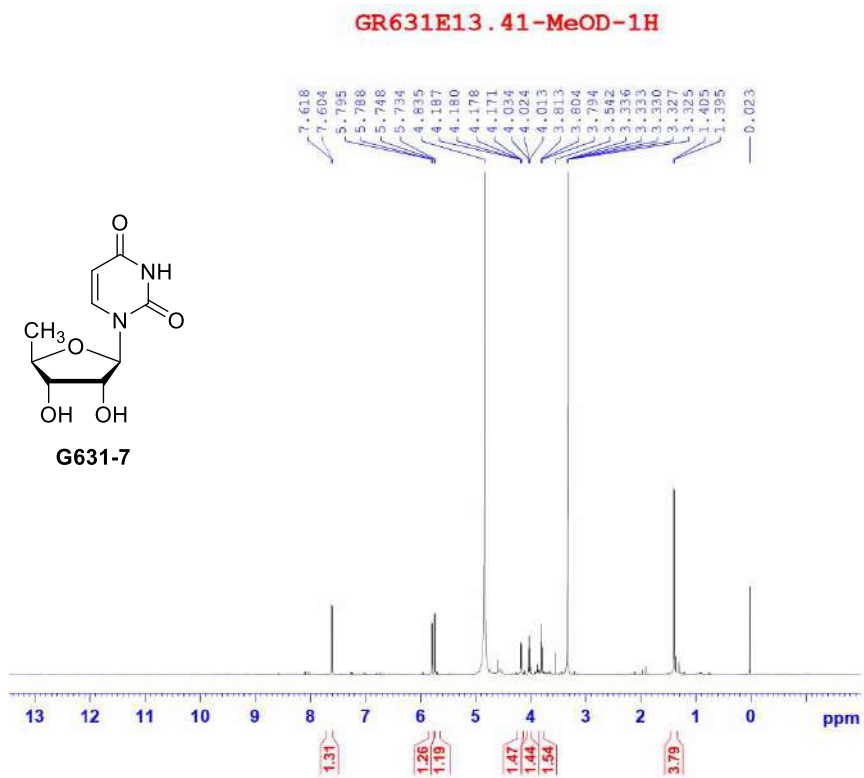


Phổ COSY của hợp chất G631-6

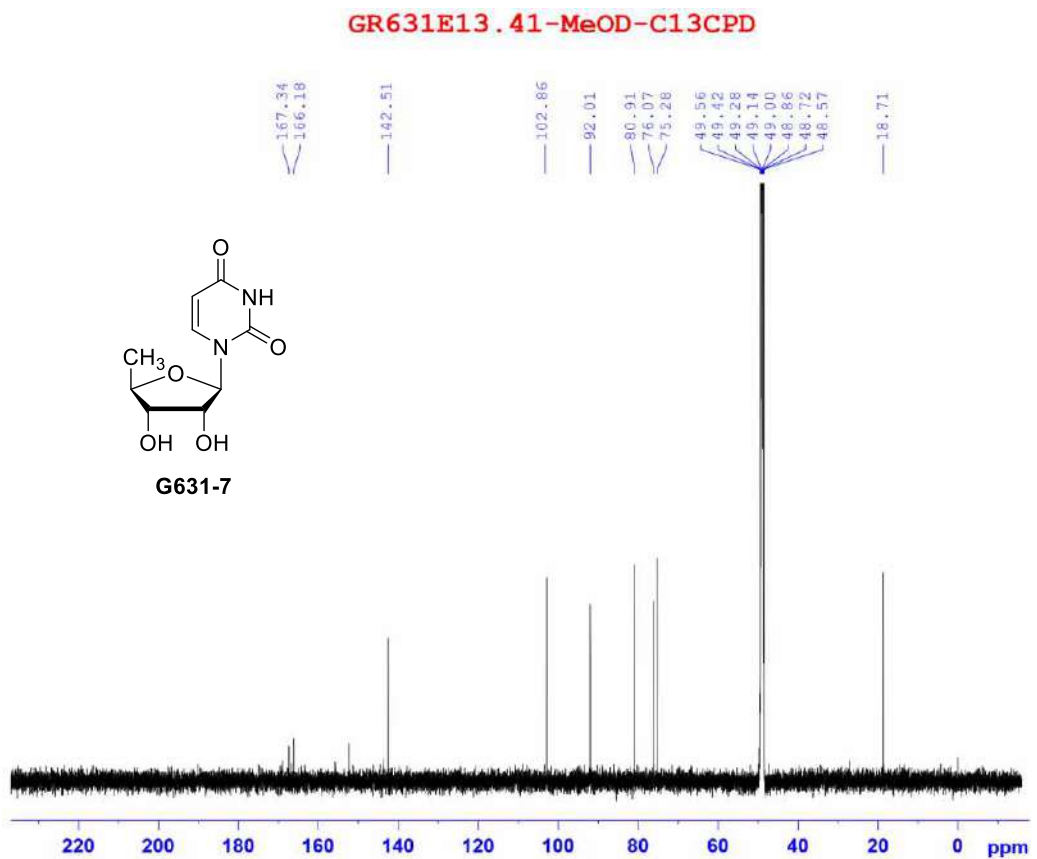
1.7. Hợp chất 5'-deoxyuridine (G631-7)



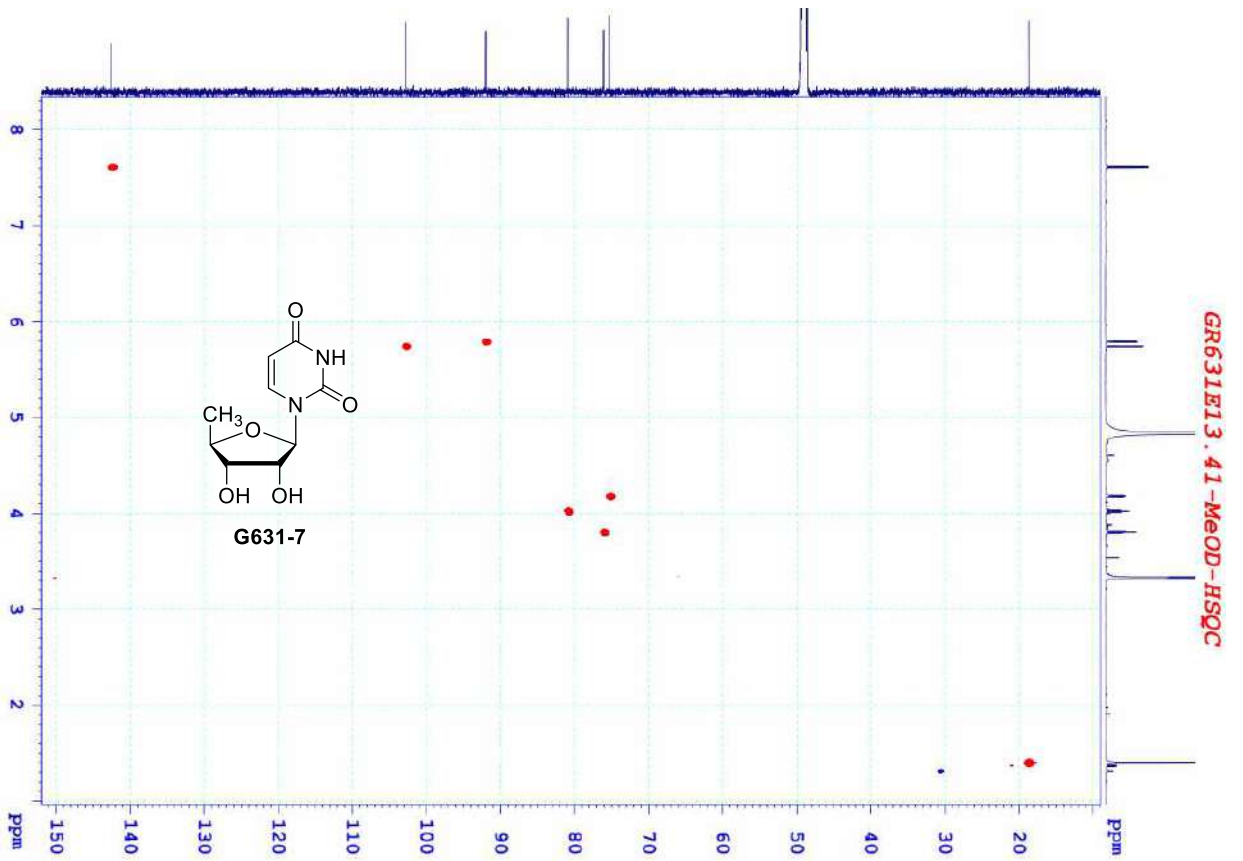
Phổ ESI-MS của hợp chất G631-7



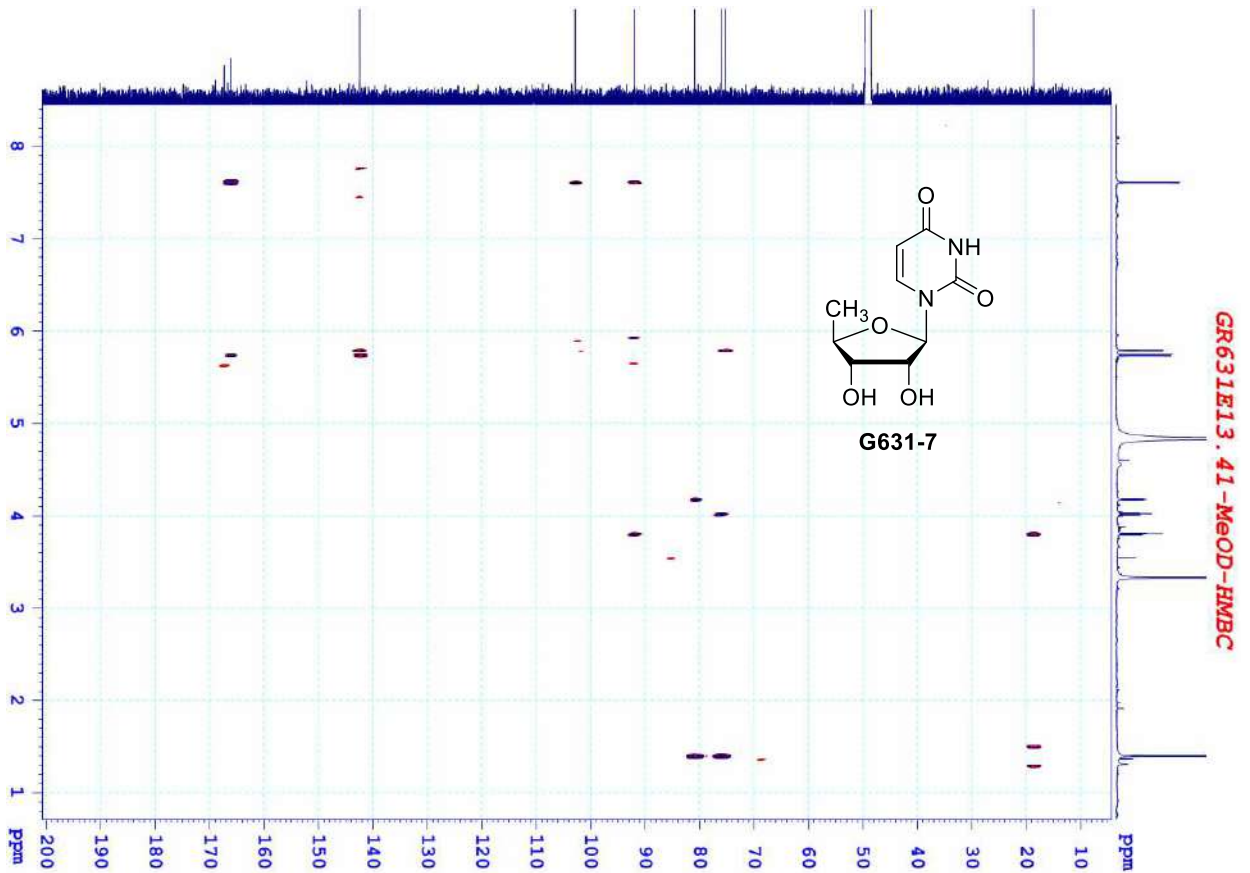
Phổ ^1H -NMR của hợp chất **G631-7**



Phổ ^{13}C -NMR của hợp chất **G631-7**

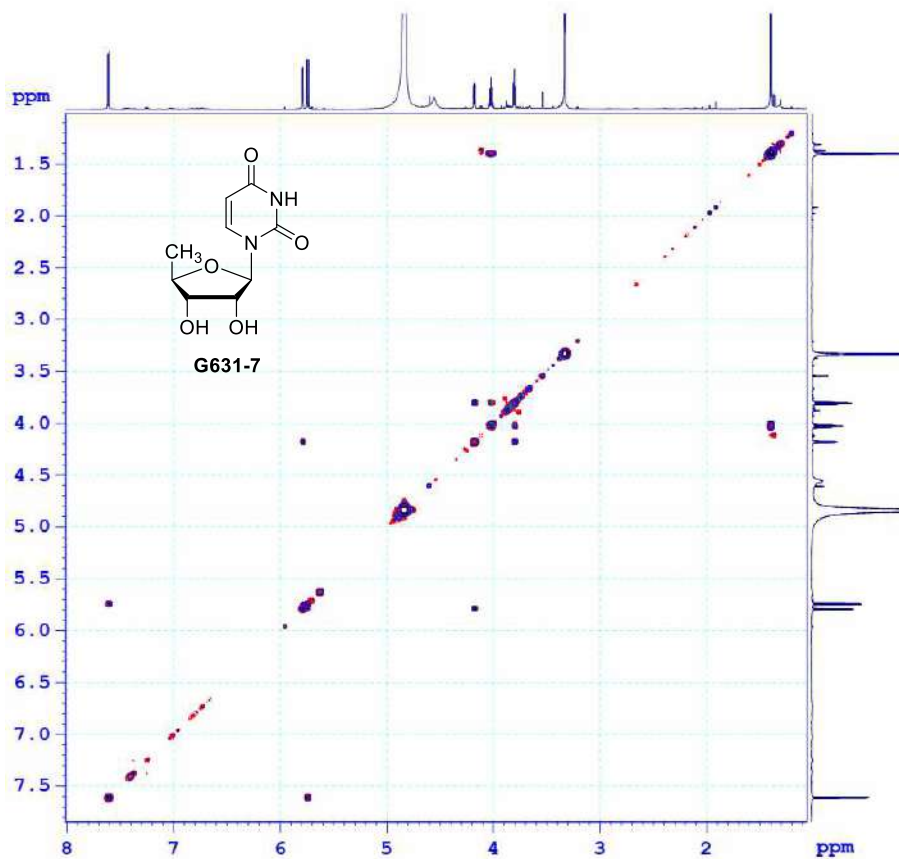


Phổ HSQC của hợp chất **G631-7**



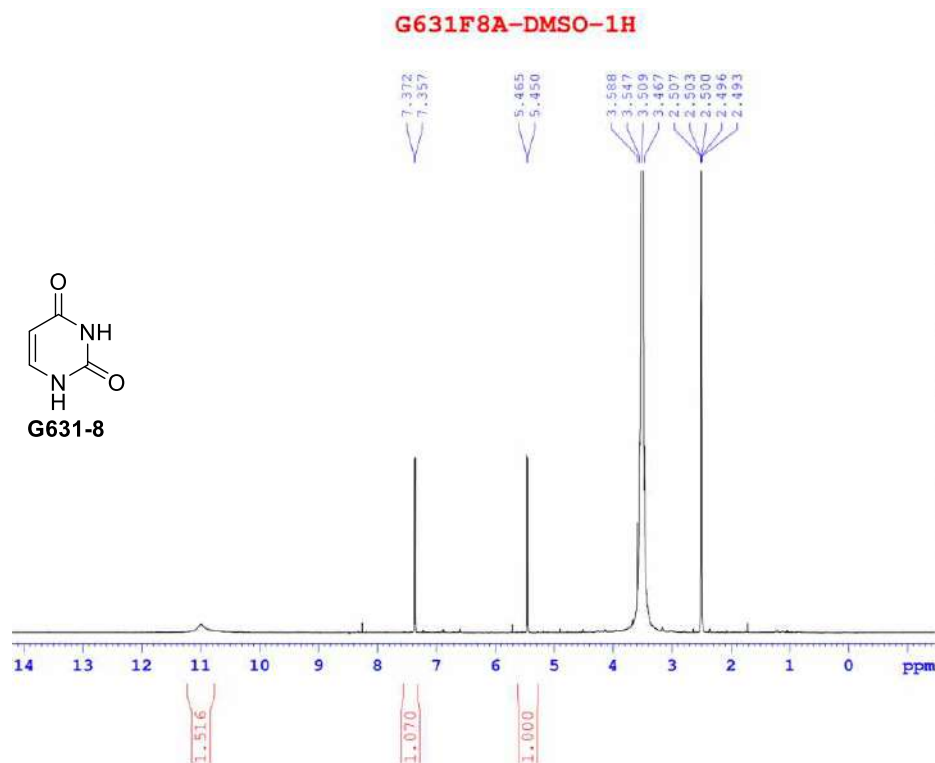
Phổ HMBC của hợp chất **G631-7**

GR631E13.41-MeOD-COSYGP

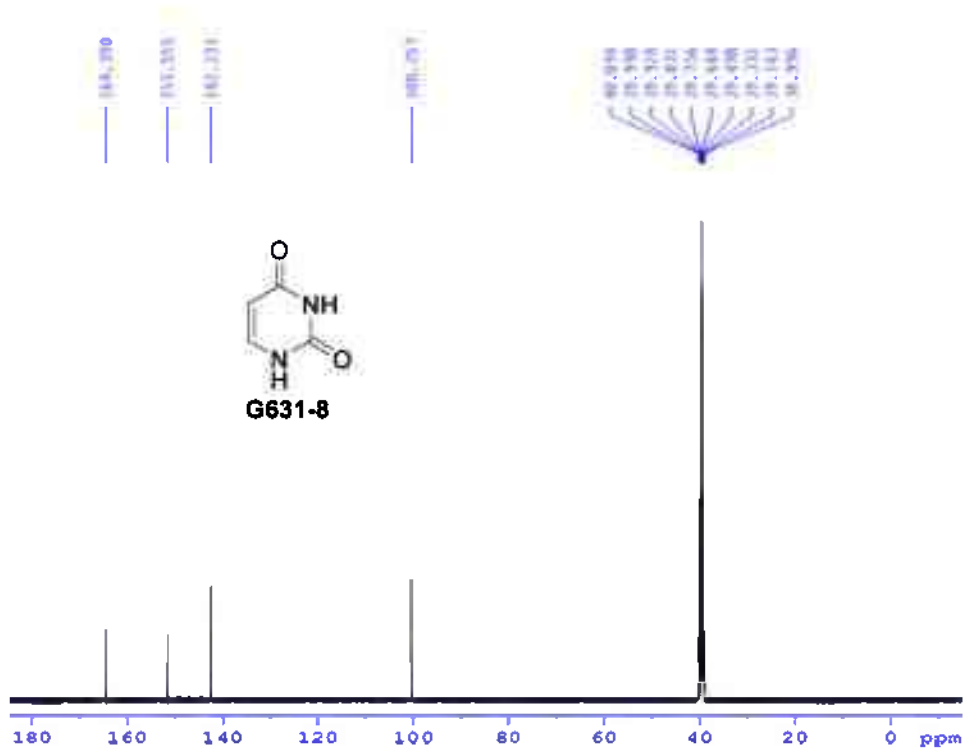


Phổ COSY của hợp chất **G631-7**

1.8. Hợp chất uracil (G631-8)



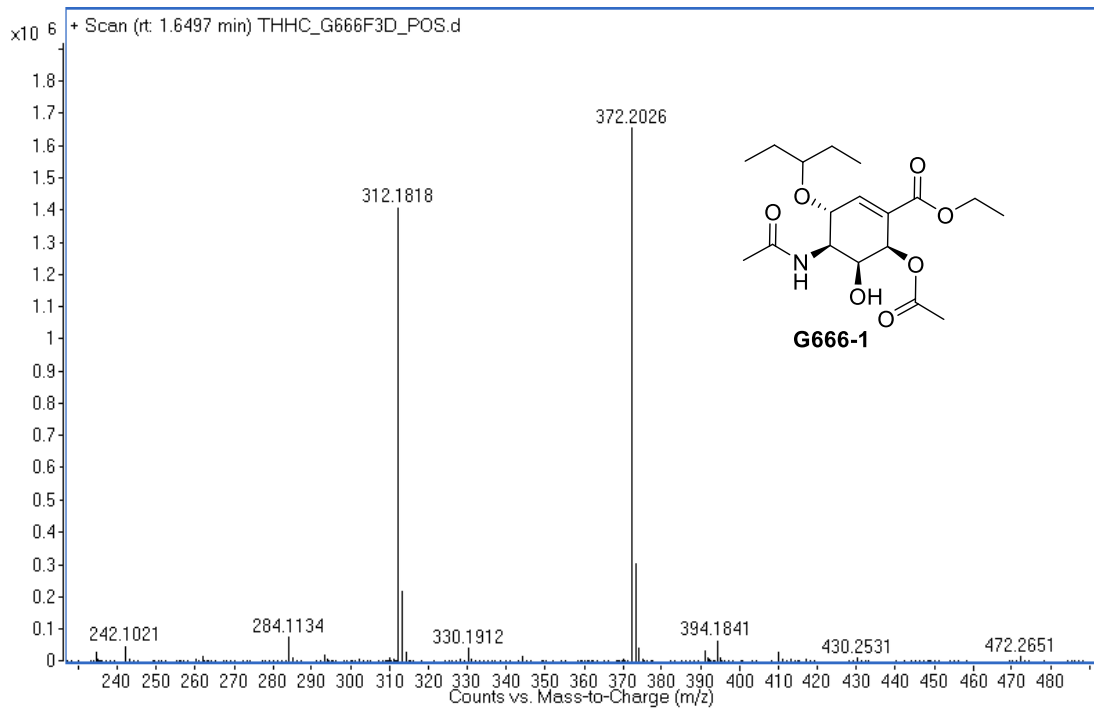
Phổ $^1\text{H-NMR}$ của hợp chất **G631-8**



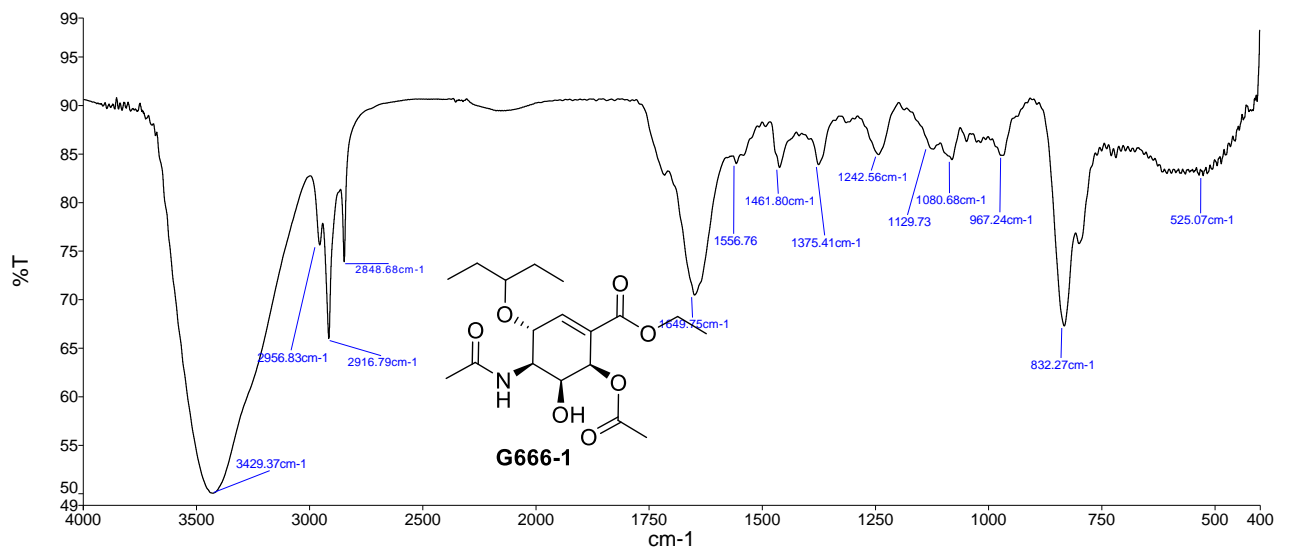
Phổ $^{13}\text{C-NMR}$ của hợp chất G631-8

PHỤ LỤC II. PHỔ CỦA CÁC HỢP CHẤT PHÂN LẬP TỪ CHỦNG *STREPTOMYCES SP. G666*

II.1. Phổ của hợp chất streptomine A (G666-1)

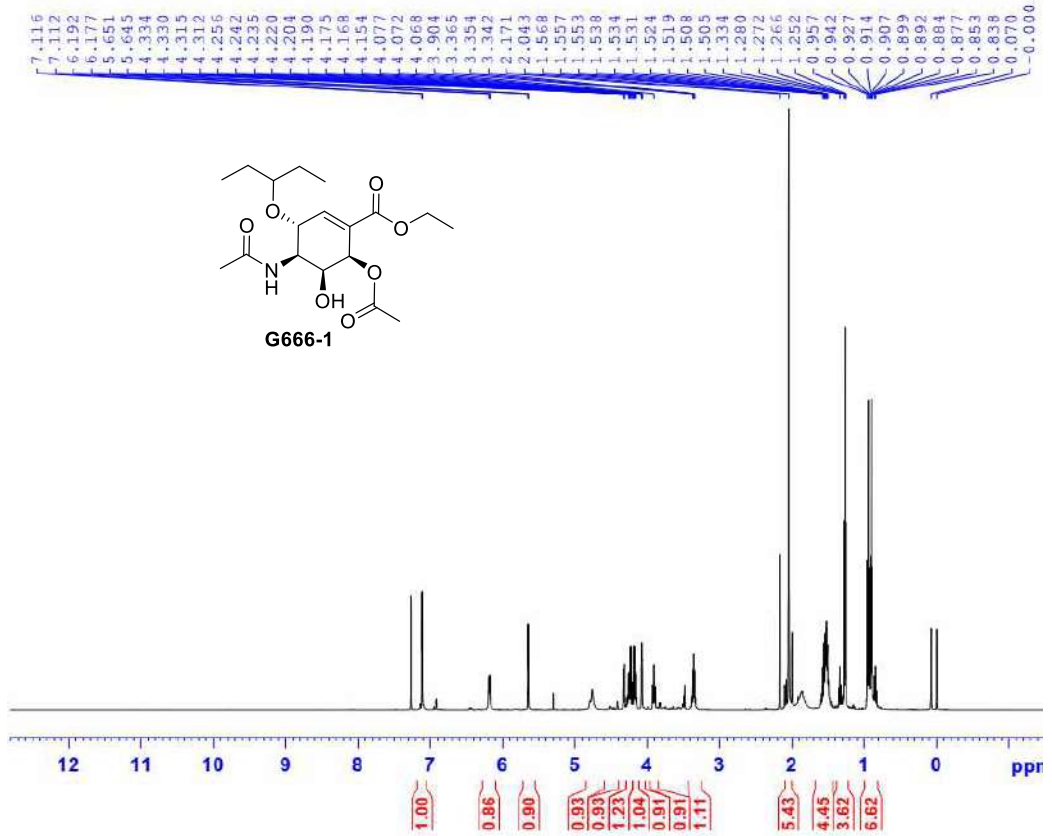


Phổ HR-ESI-MS của hợp chất **G666-1**



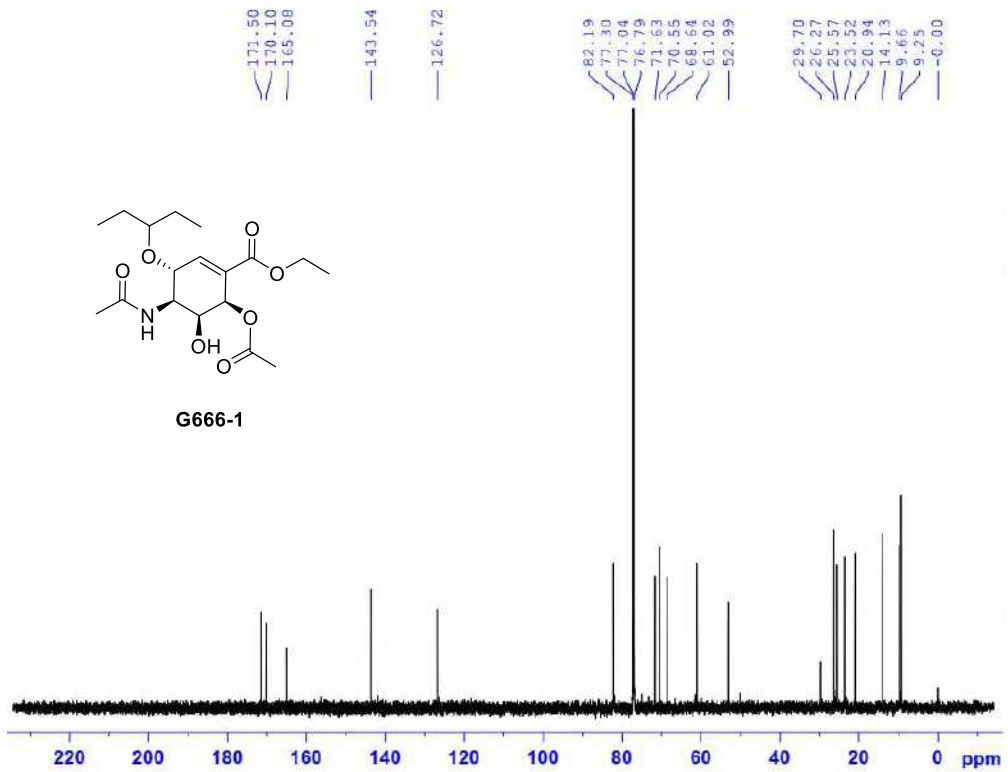
Phổ IR của hợp chất **G666-1**

G666F3D1-CDC13-1H



¹H-NMR của hợp chất G666-1

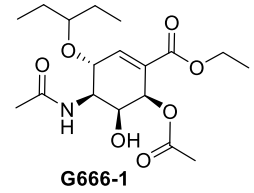
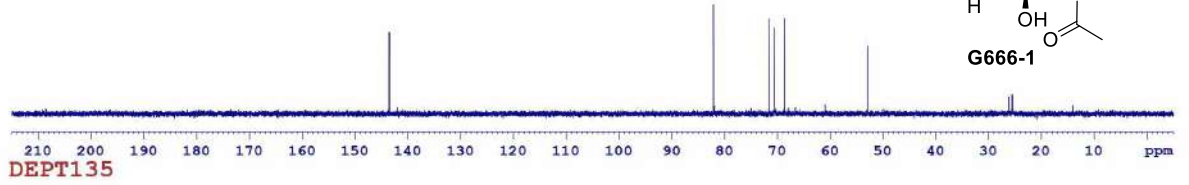
G666F3D1-CDC13-C13CPD



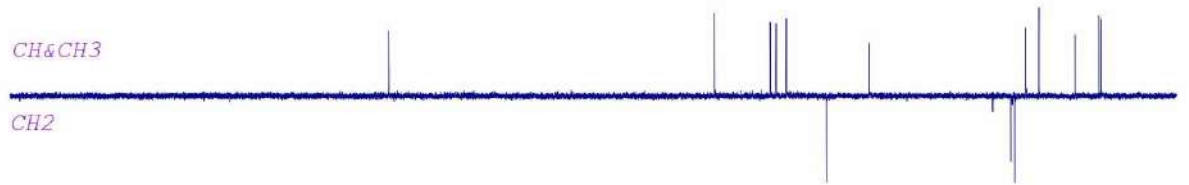
Phổ ¹³C-NMR của hợp chất G666-1

G666F3D1-CDC13-C13CPD&DEPT

DEPT90

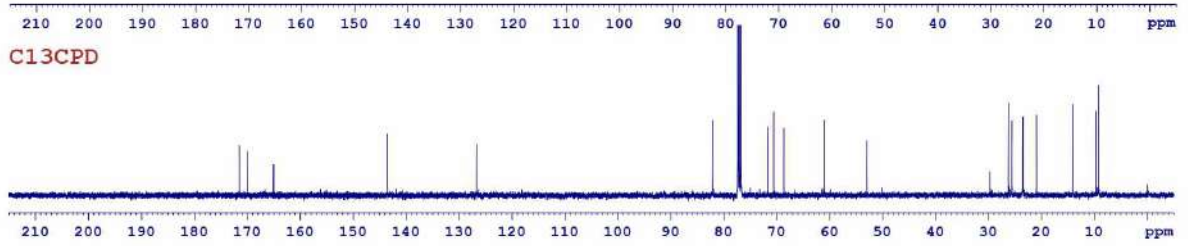


DEPT135



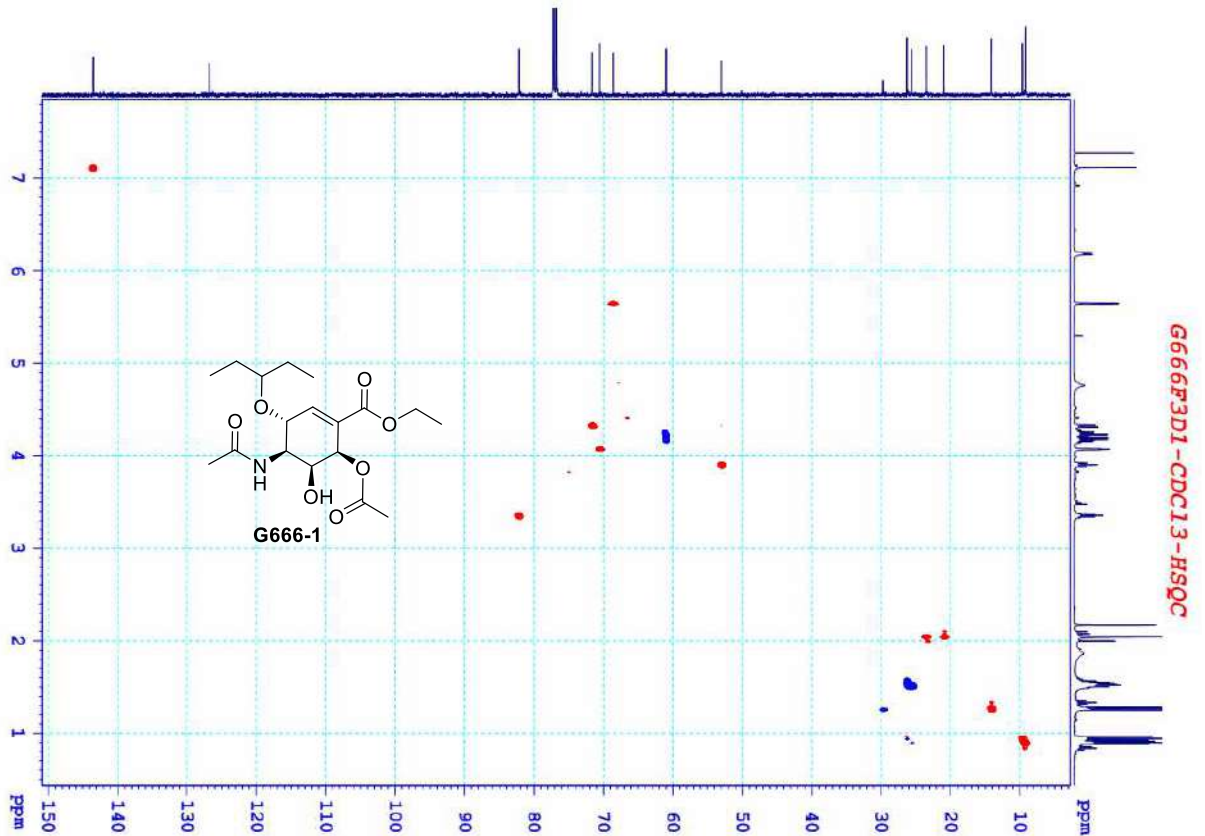
CH&CH3

CH2

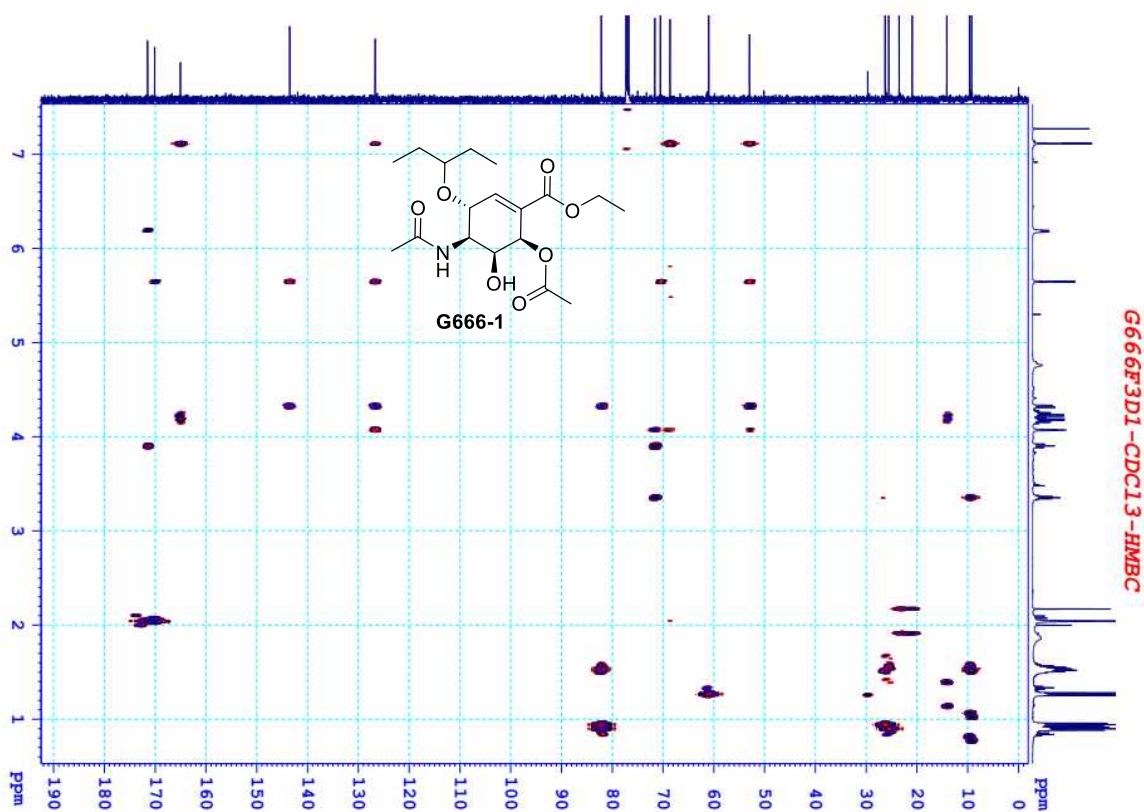


C13CPD

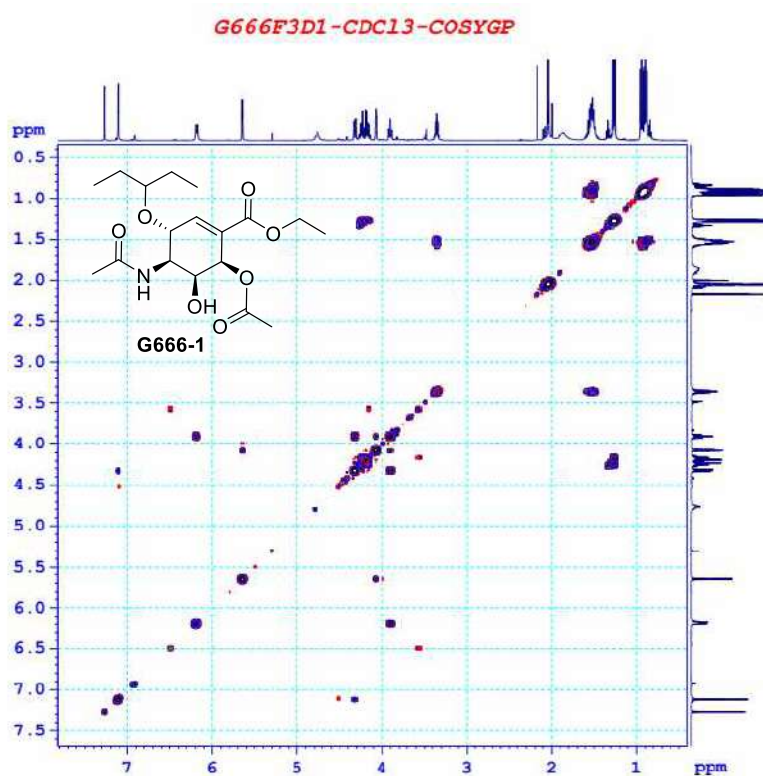
Phổ DEPT của hợp chất G666-1



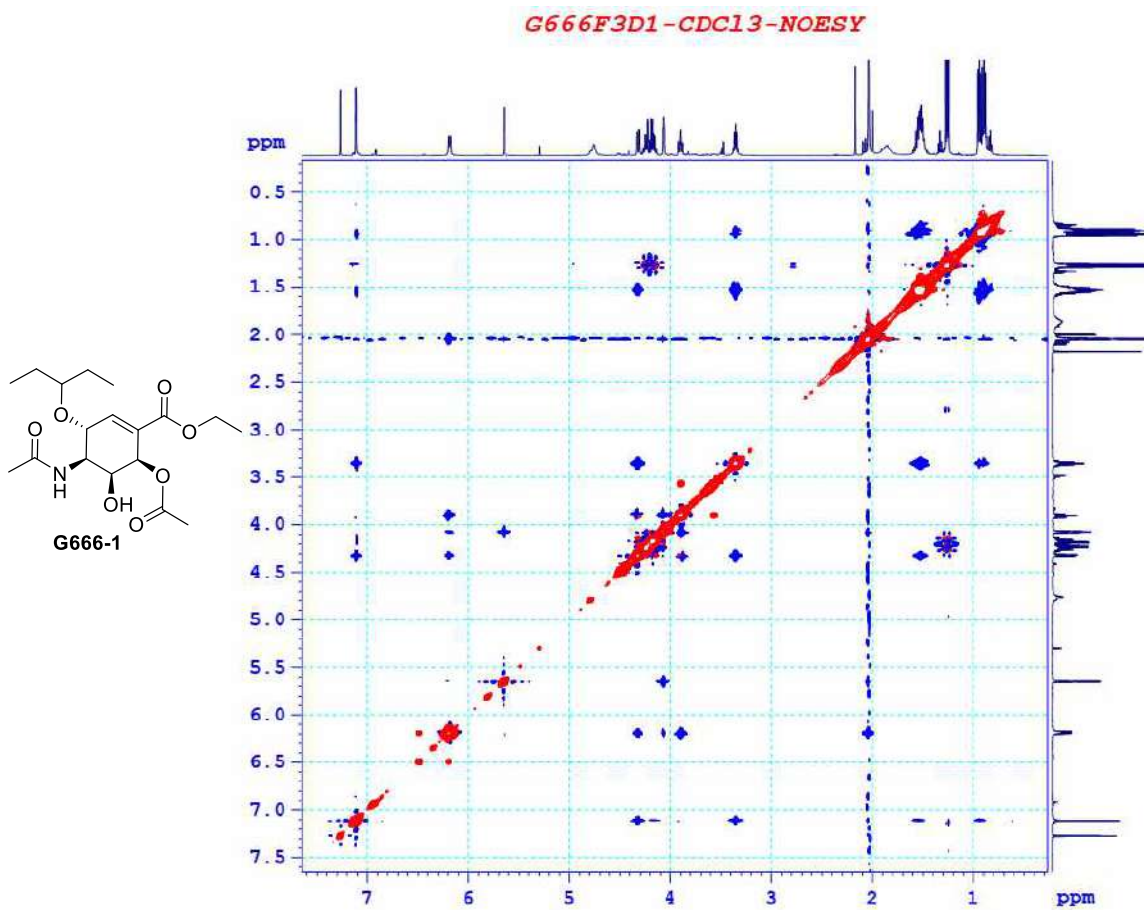
Phổ HSQC của hợp chất G666-1



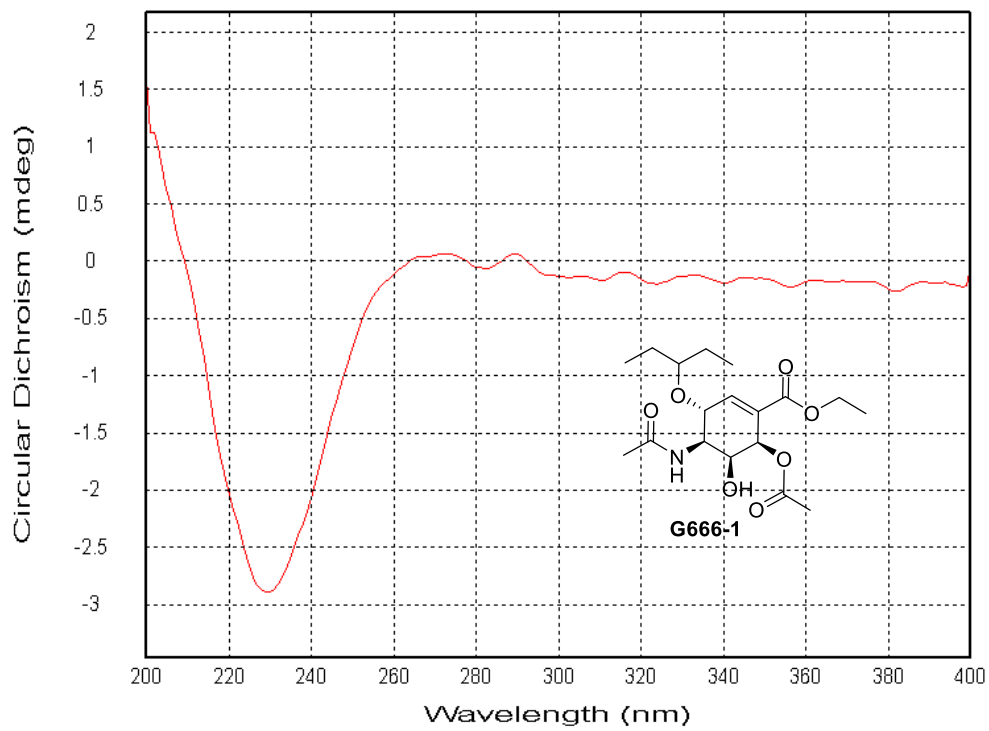
Phổ HMBC của hợp chất **G666-1**



Phổ COSY của hợp chất **G666-1**

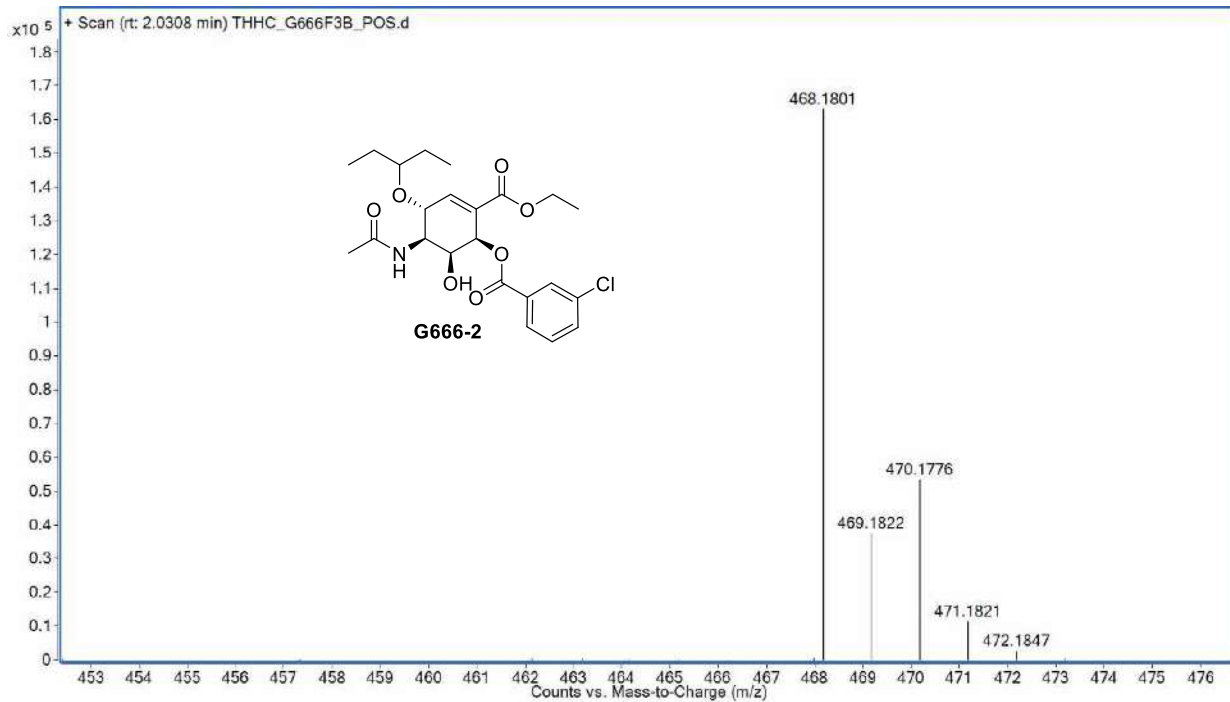


Phổ NOESY của hợp chất **G666-1**

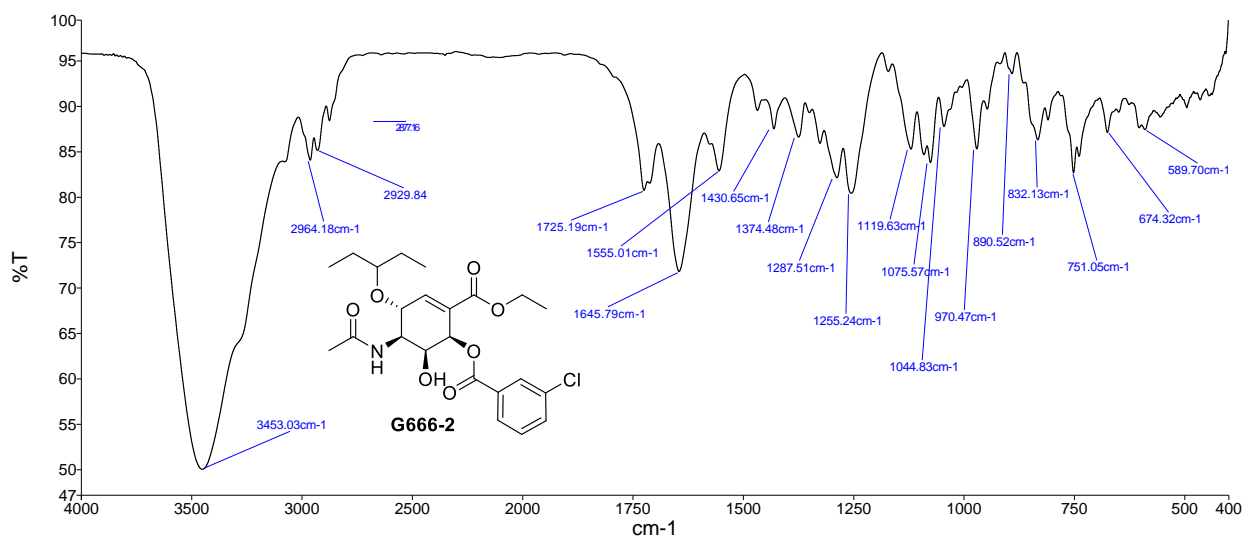


Phổ CD của hợp chất **G666-1**

II.2. Phổ của hợp chất streptomine B (G666-2)

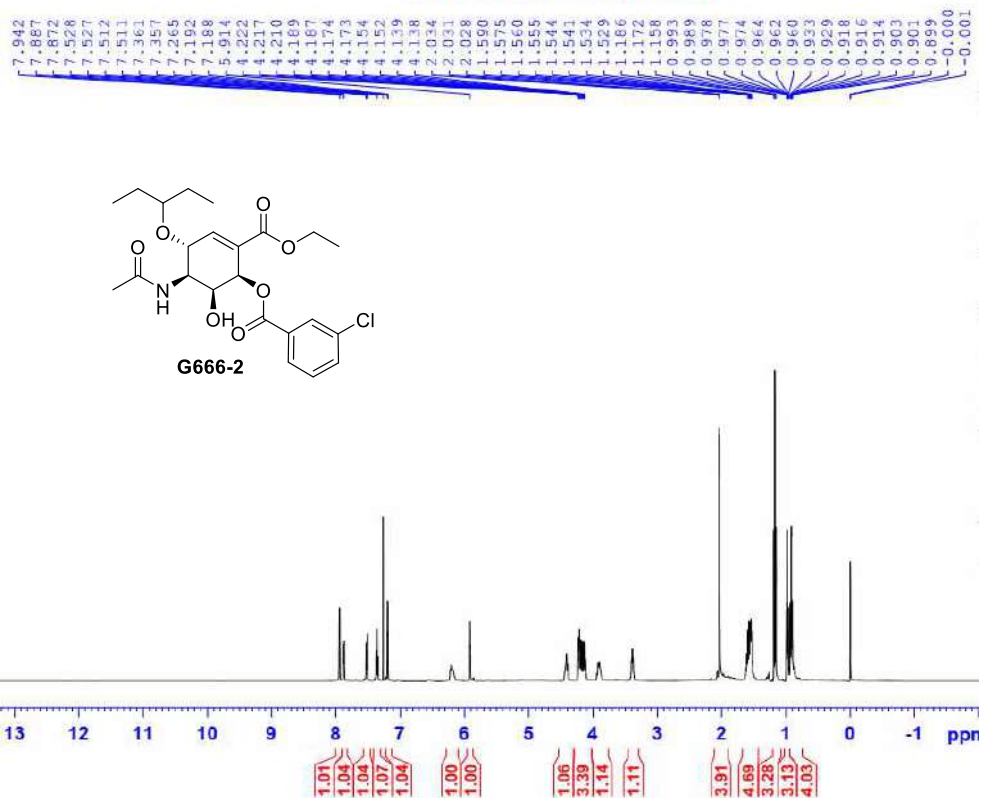


Phổ HR-MS của hợp chất **G666-2**



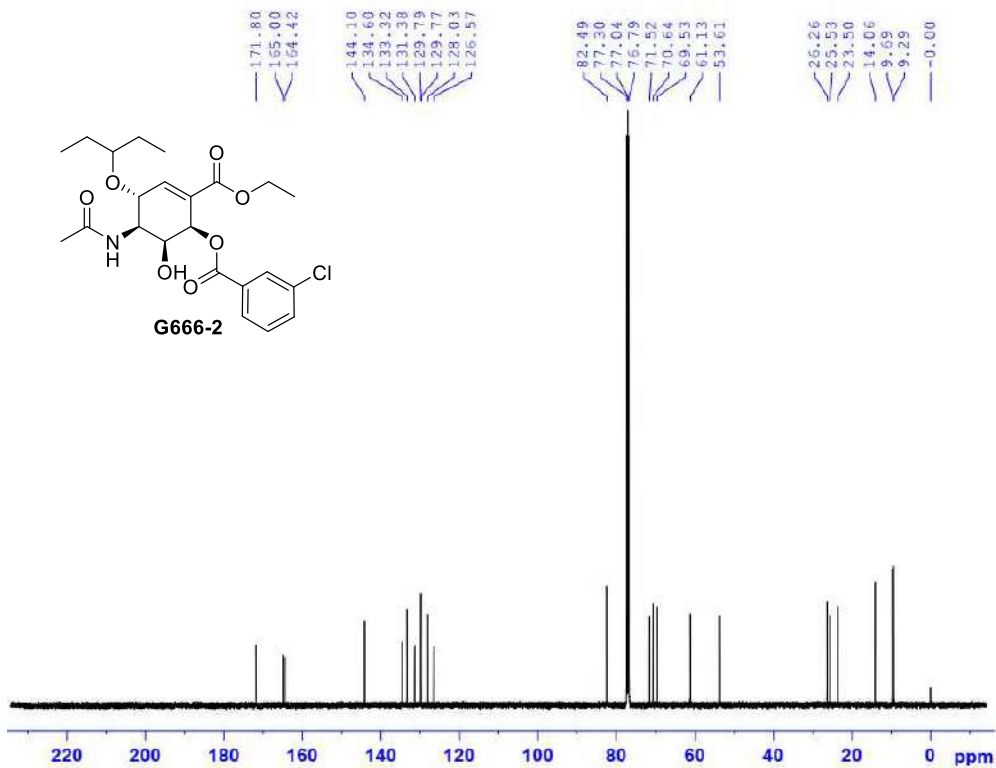
Phổ IR của hợp chất **G666-2**

G666F3B1-CDC13-1H



Phổ ¹H-NMR của hợp chất G666-2

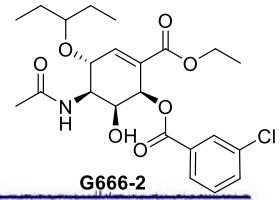
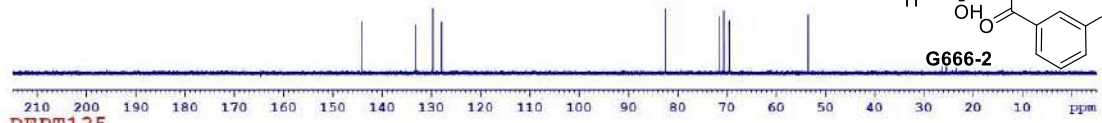
G666F3B1-CDC13-C13CPD



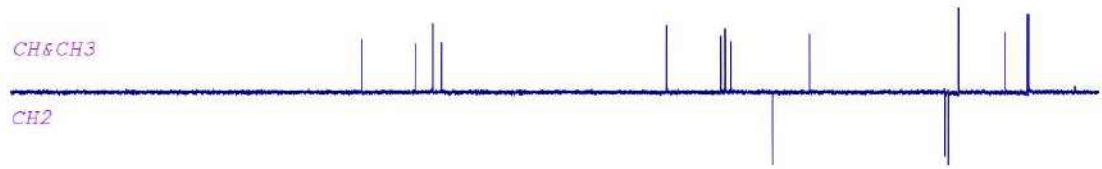
Phổ ¹³C-NMR của hợp chất G666-2

G666F3B1-CDC13-C13CPD&DEPT

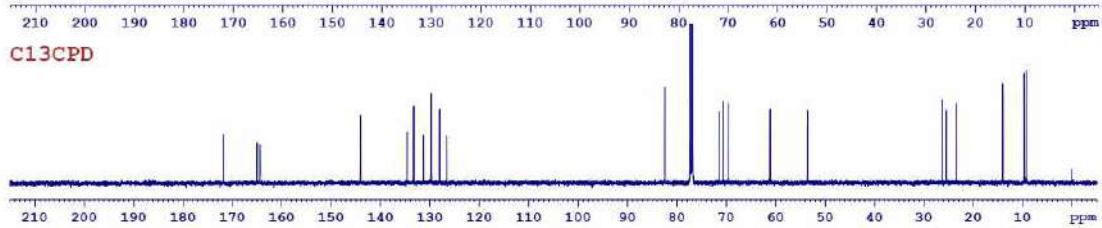
DEPT90



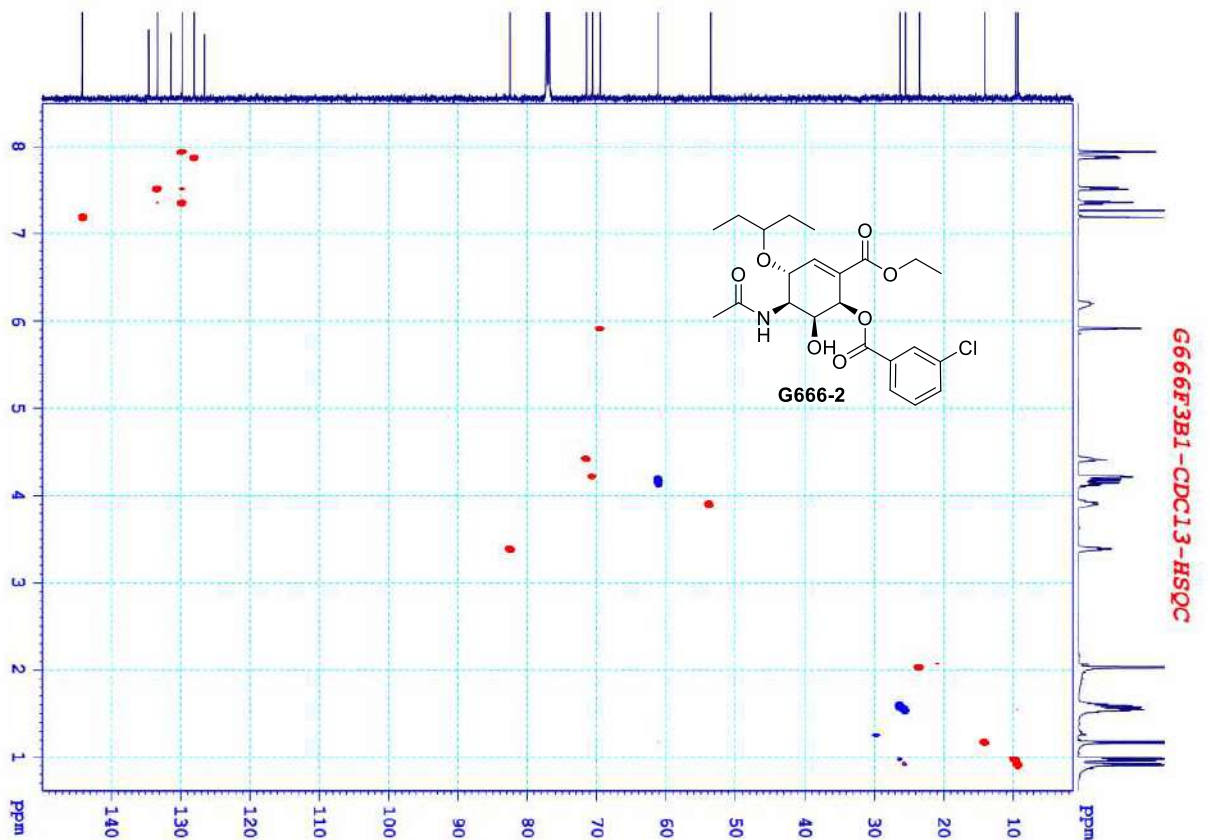
DEPT135



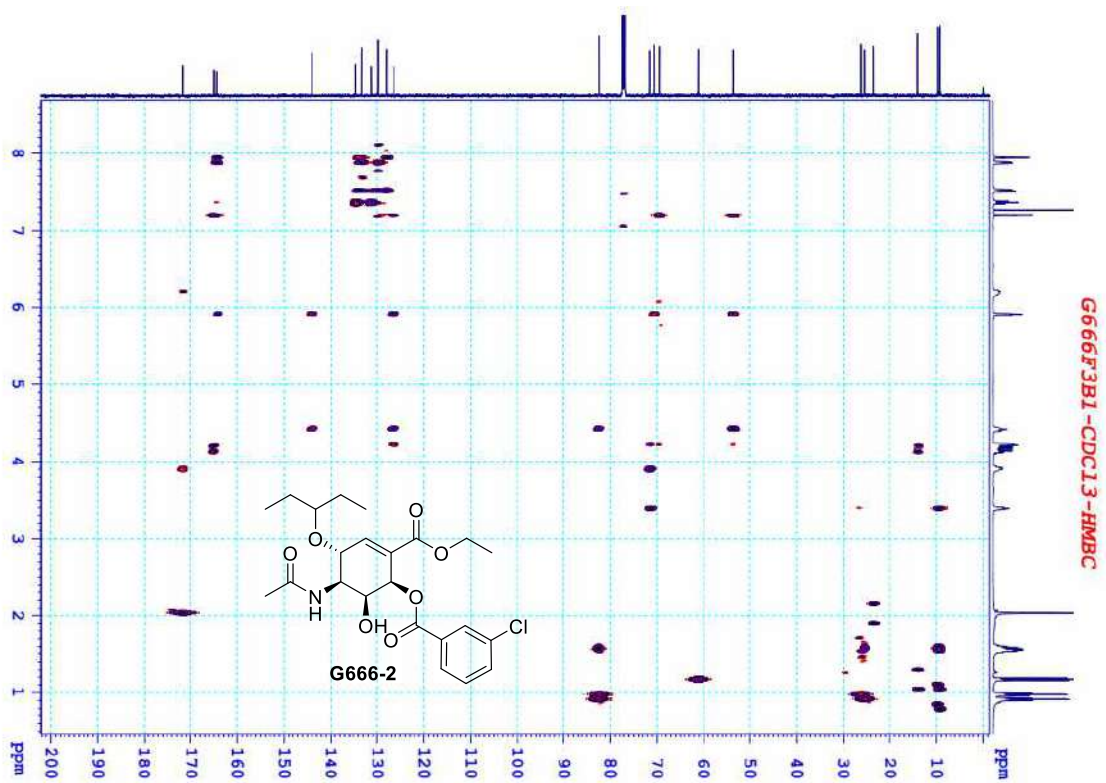
C13CPD



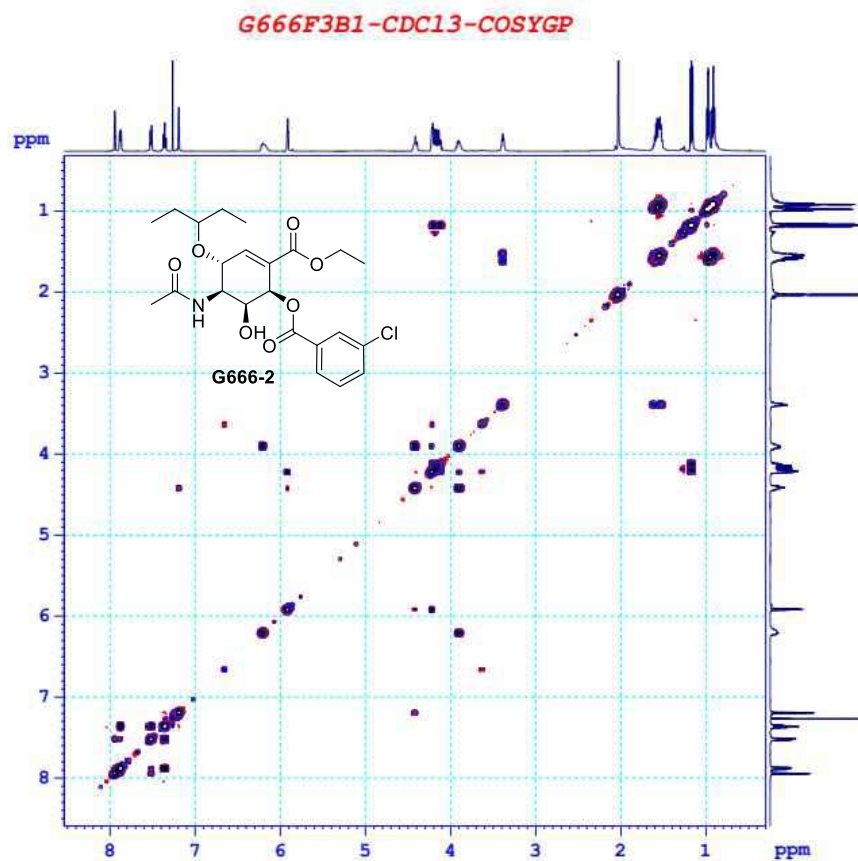
Phổ DEPT của hợp chất G666-2



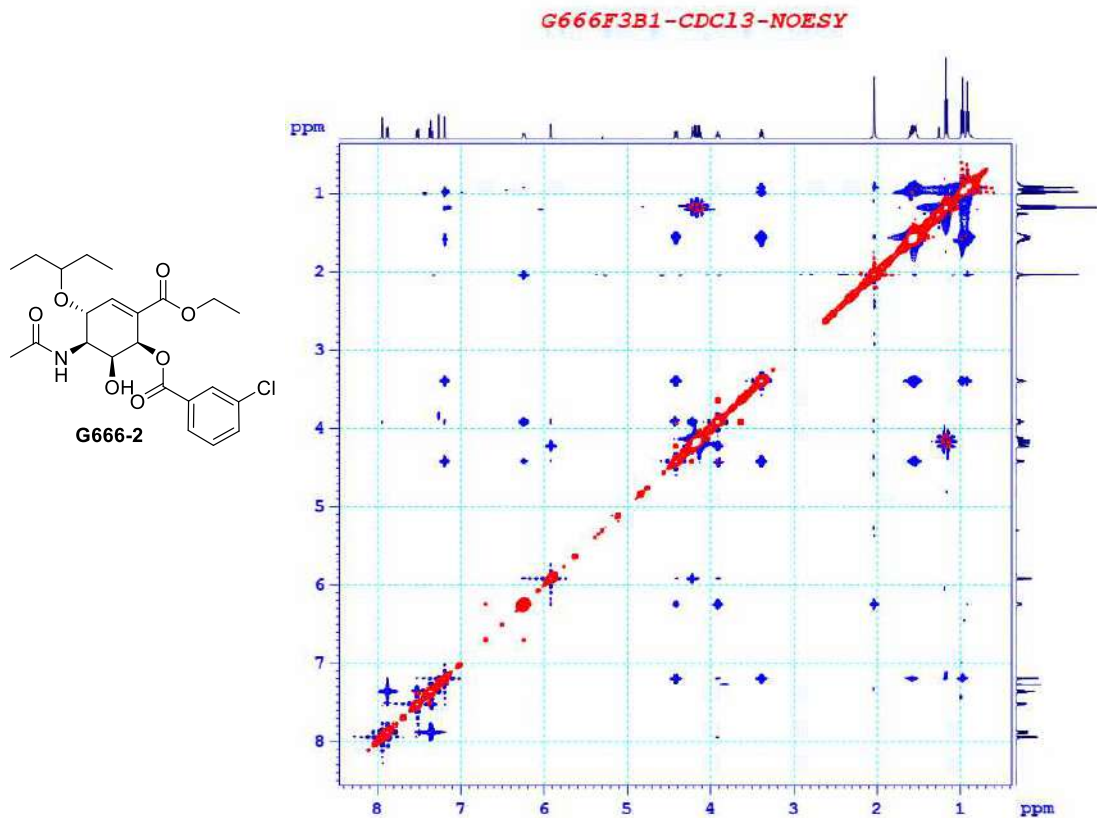
Phổ HSQC của hợp chất G666-2



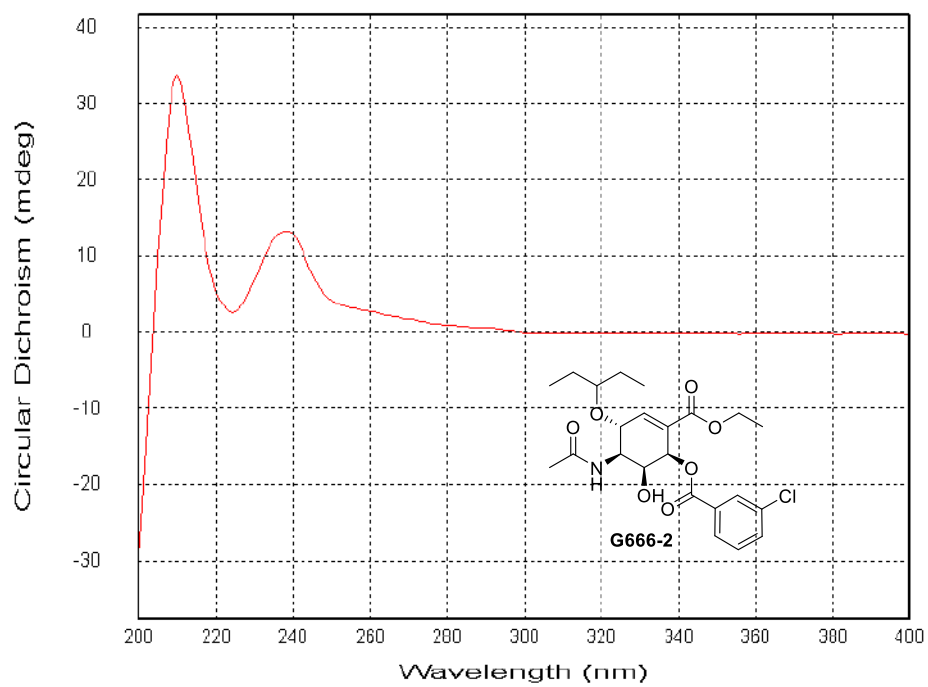
Phổ HMBC của hợp chất **G666-2**



Phổ COSY của hợp chất **G666-2**

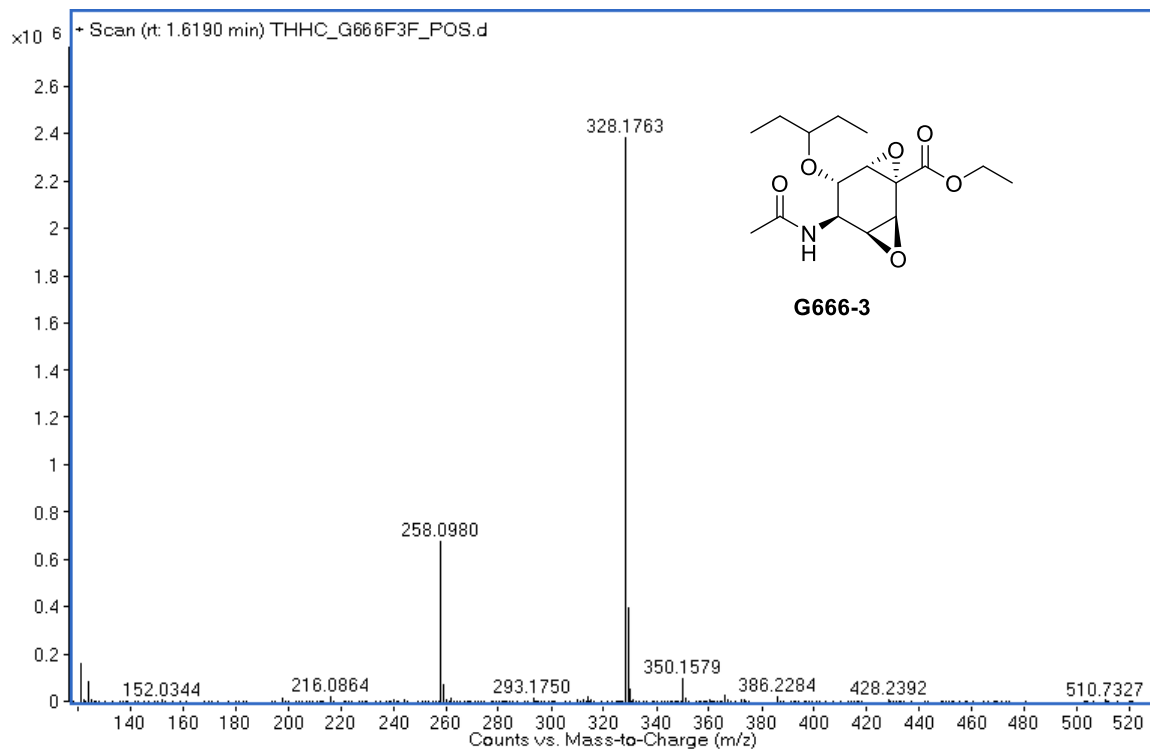


Phổ NOESY của hợp chất **G666-2**

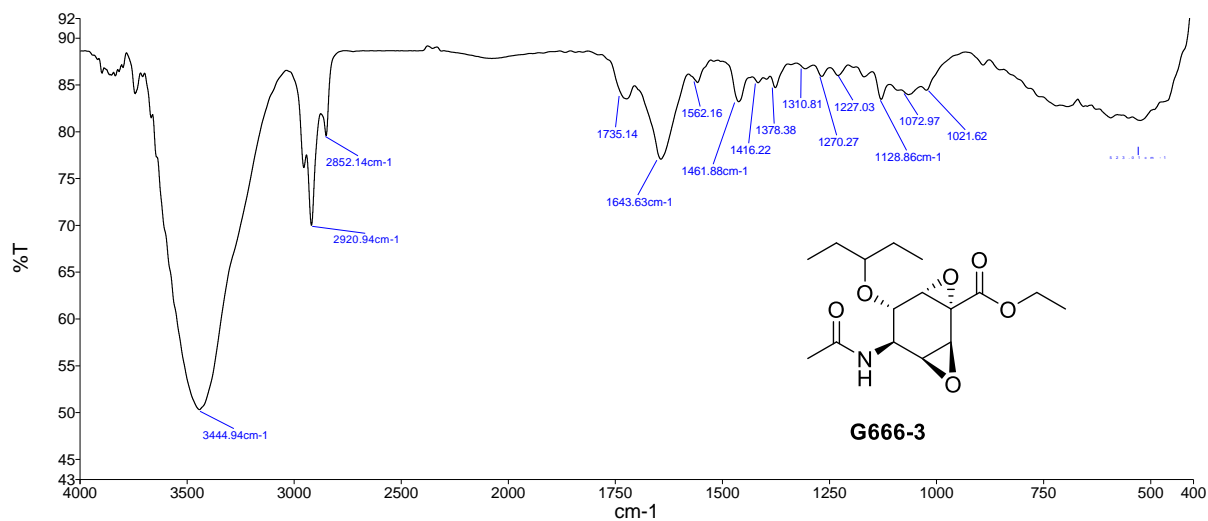


Phổ CD của hợp chất **G666-2**

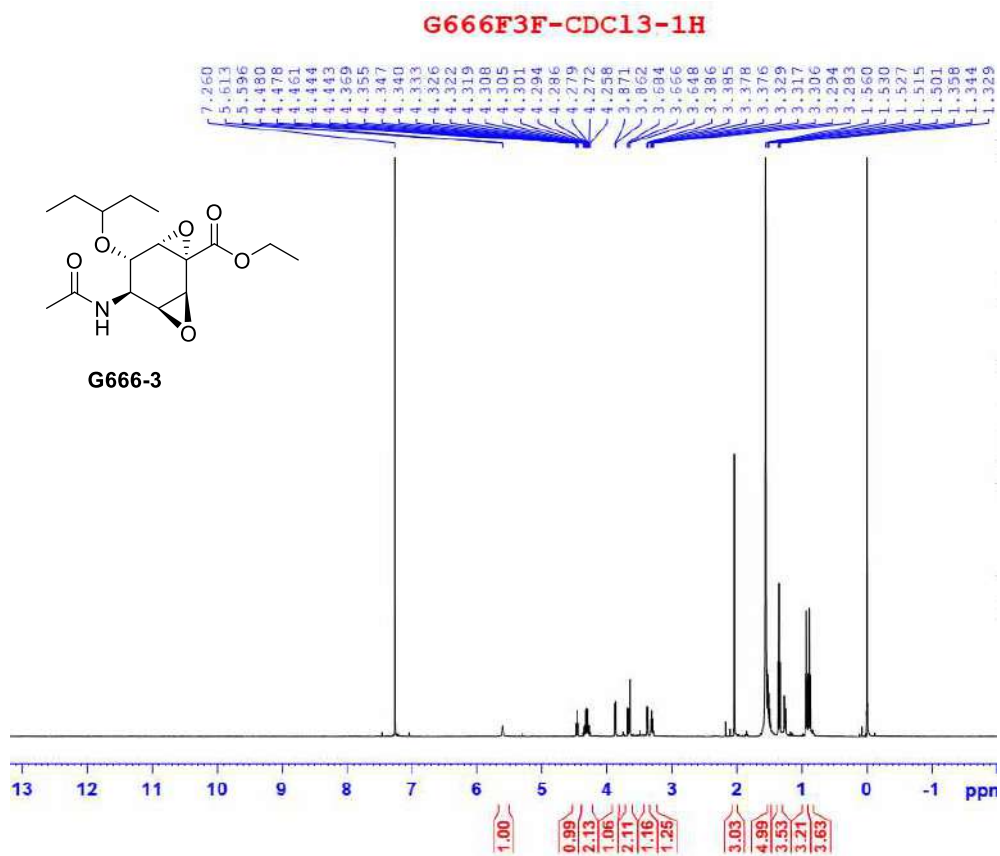
II.3. Phổ của hợp chất streptomine C (G666-3)



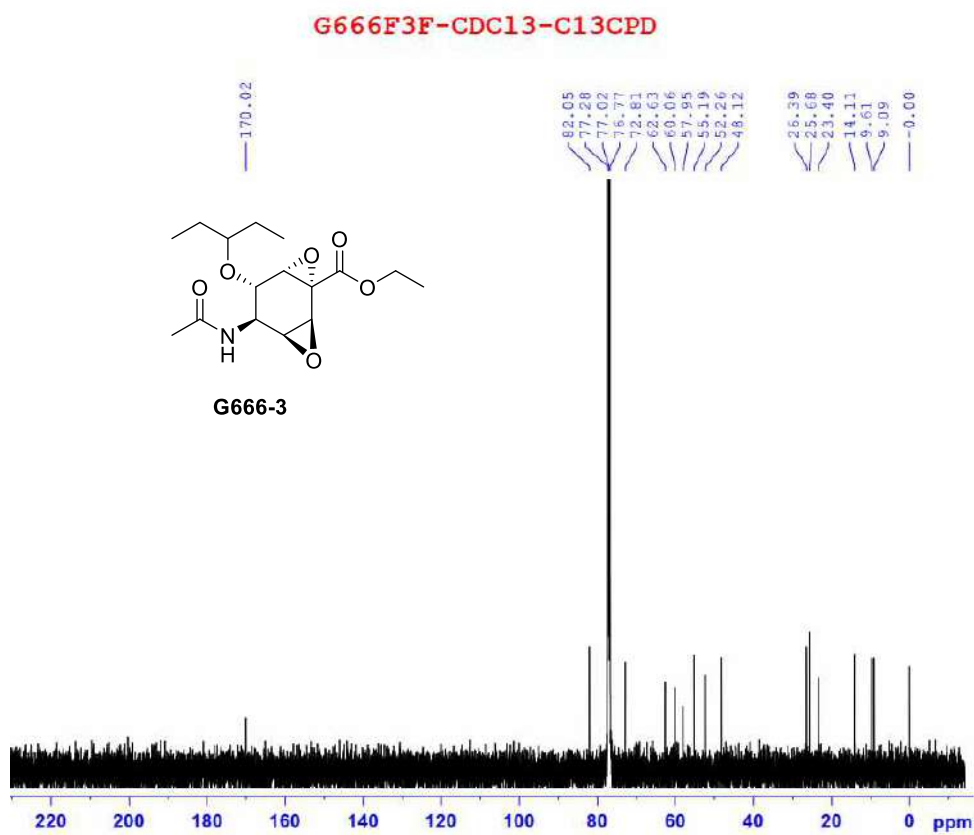
Phổ HR-MS của hợp chất G666-3



Phổ IR của hợp chất G666-3

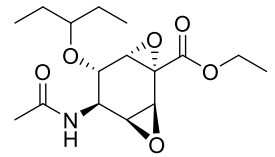


Phổ ^1H -NMR của hợp chất **G666-3**



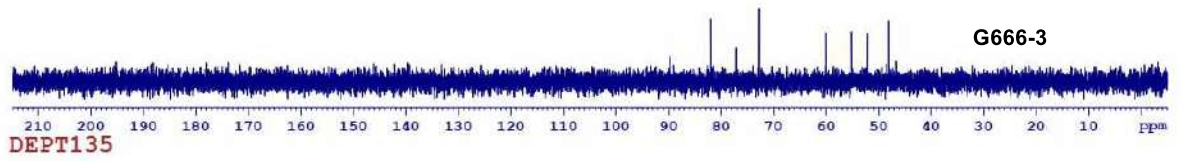
Phổ ^{13}C -NMR của hợp chất **G666-3**

G666F3F-CDCl3-C13CPD&DEPT



G666-3

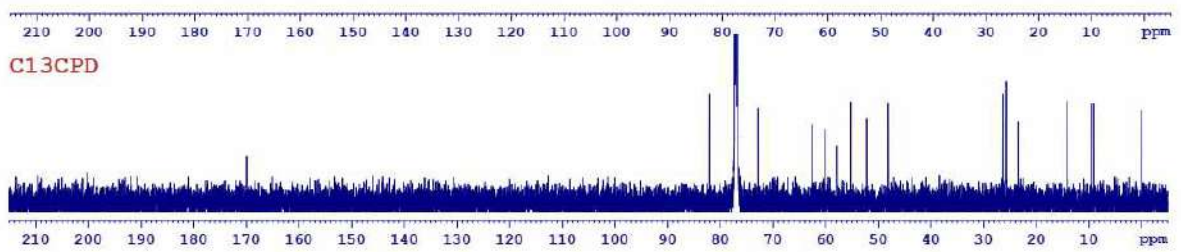
DEPT90



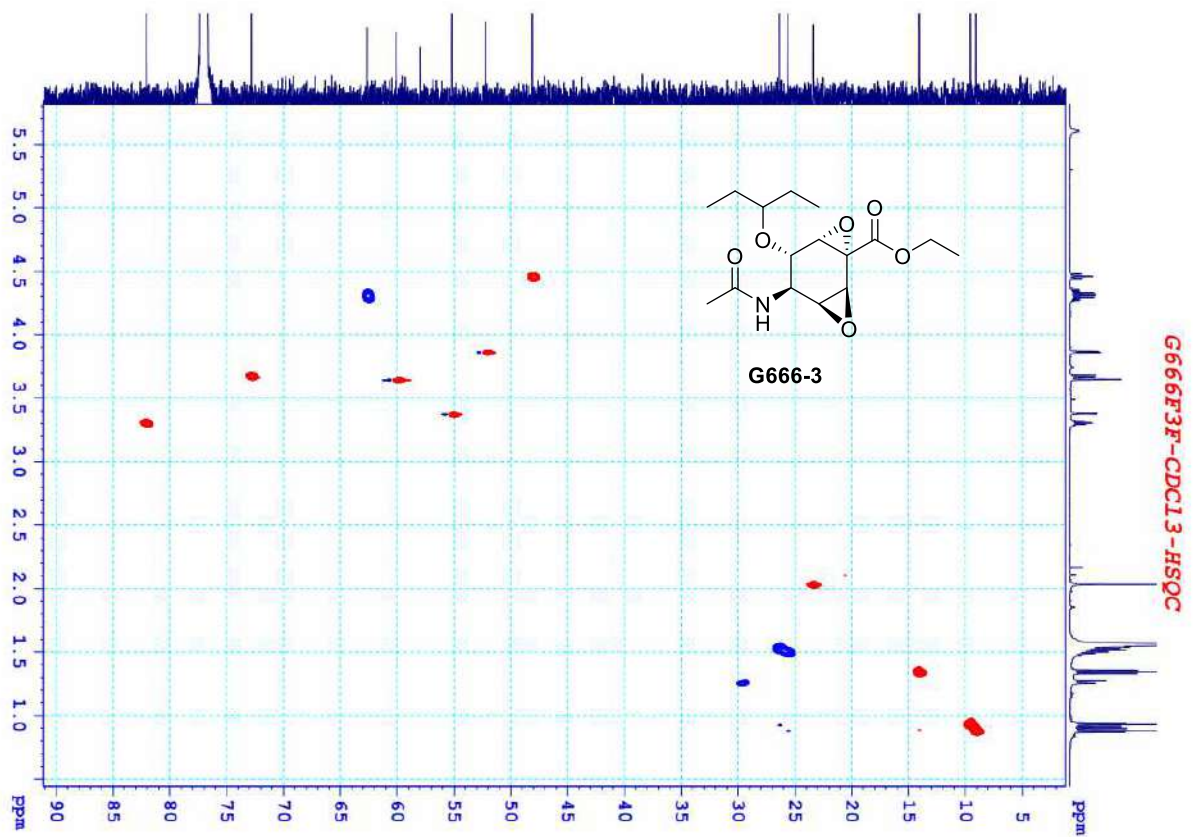
DEPT135



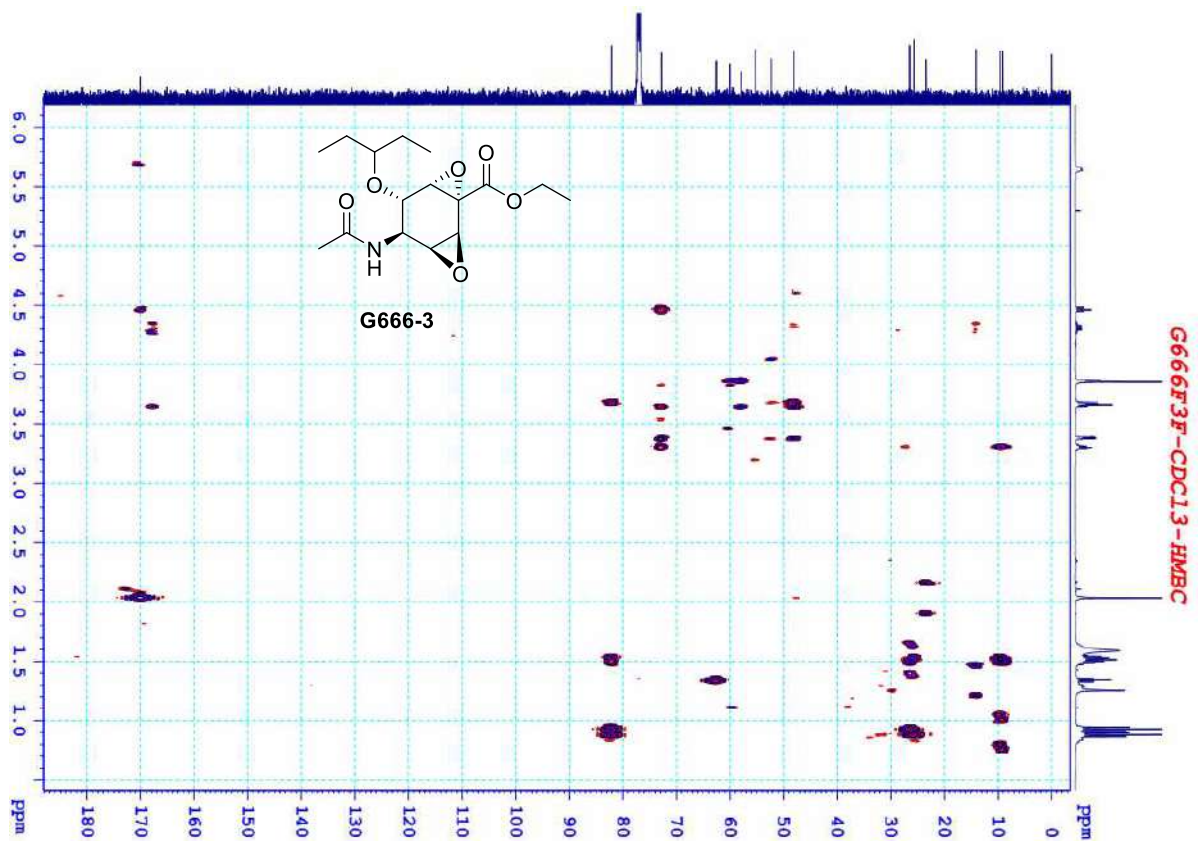
C13CPD



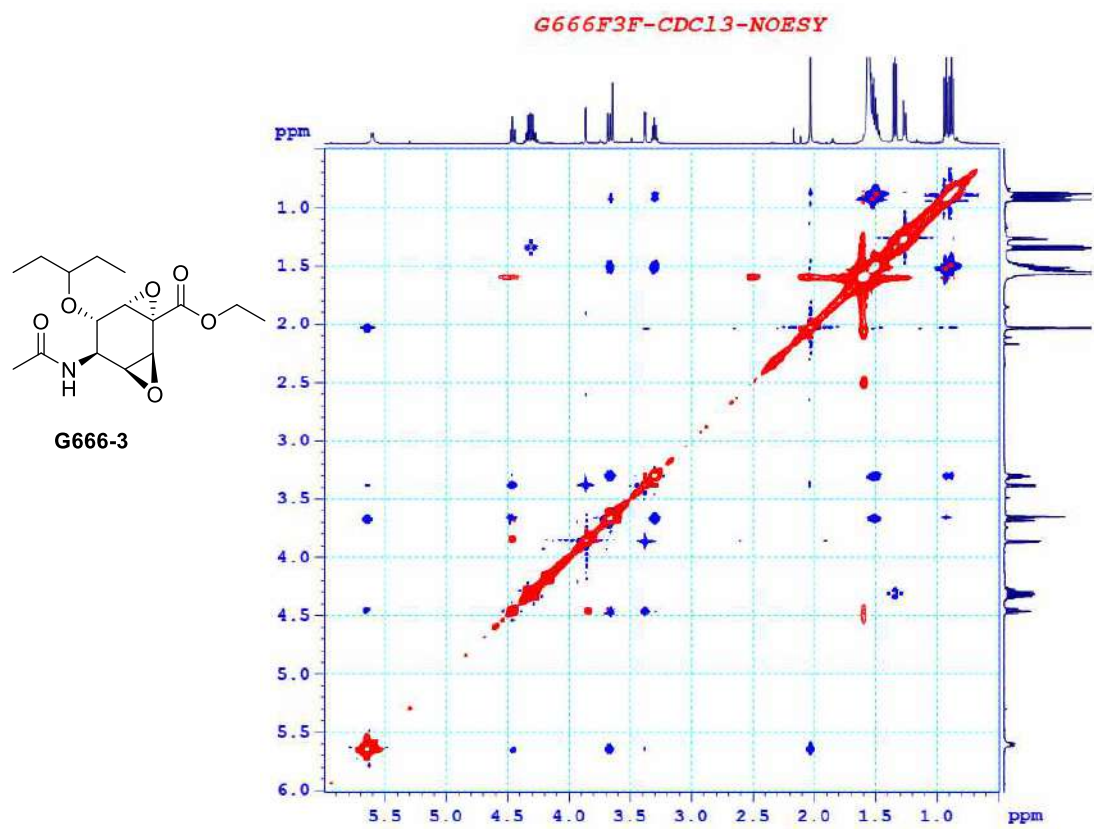
Phổ DEPT của hợp chất G666-3



Phổ HSQC của hợp chất G666-3

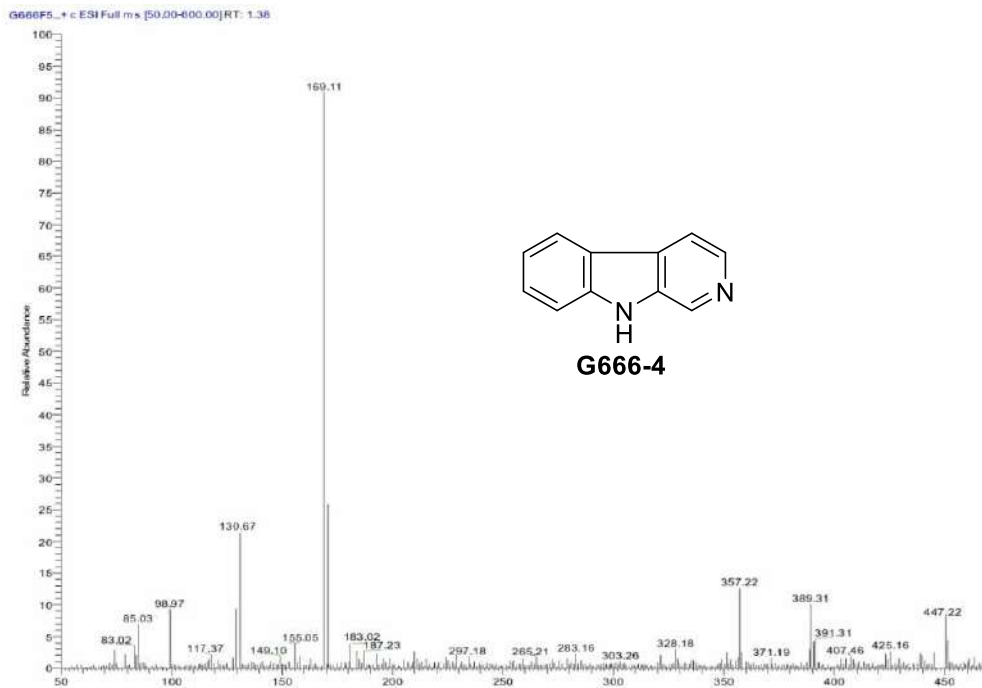


Phổ HMBC của hợp chất **G666-3**



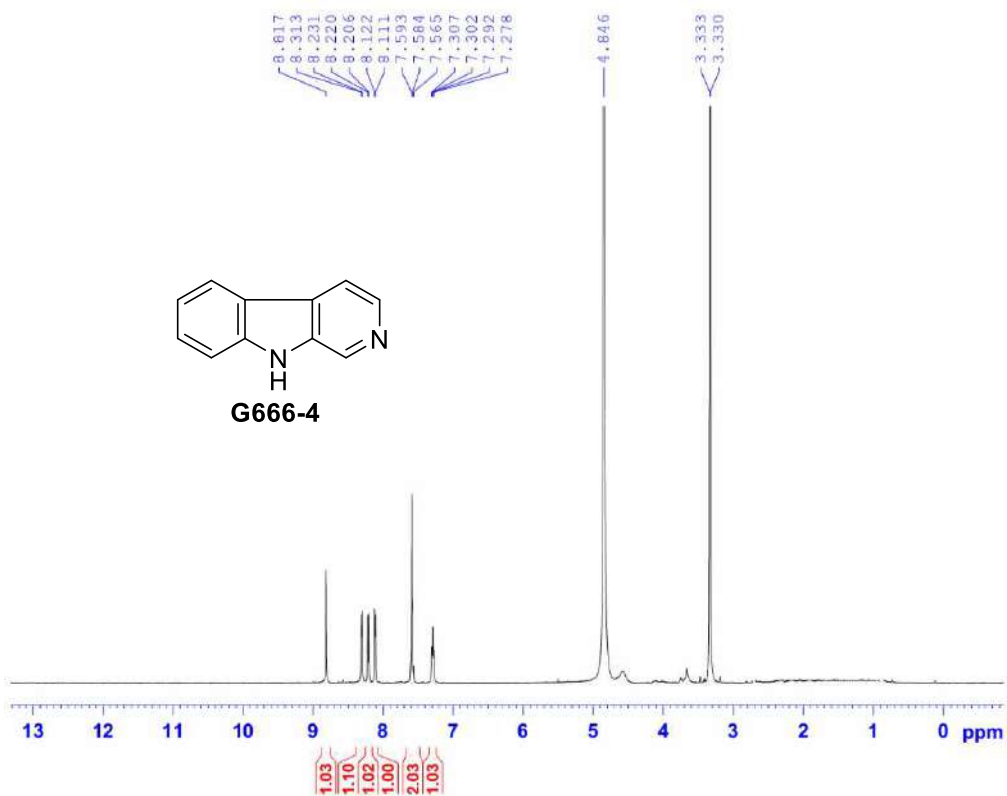
Phổ NOESY của hợp chất **G666-3**

II.4. Phổ của hợp chất 9H-pyrido[3,4-b]indole (G666-4)



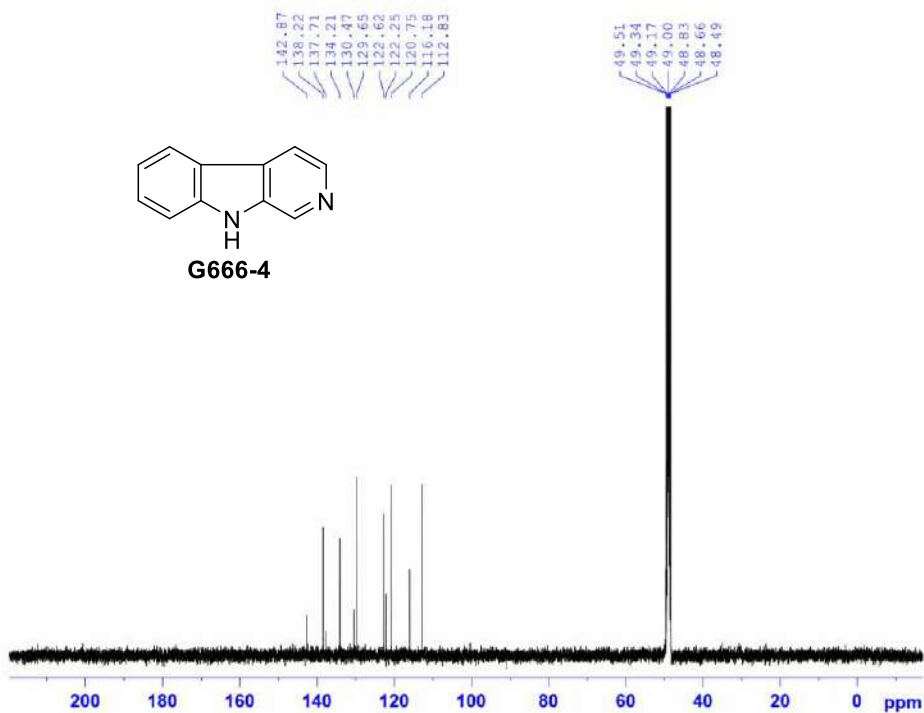
Phổ ESI-MS của hợp chất **G666-4**

G666F2A1-MeOD-1H



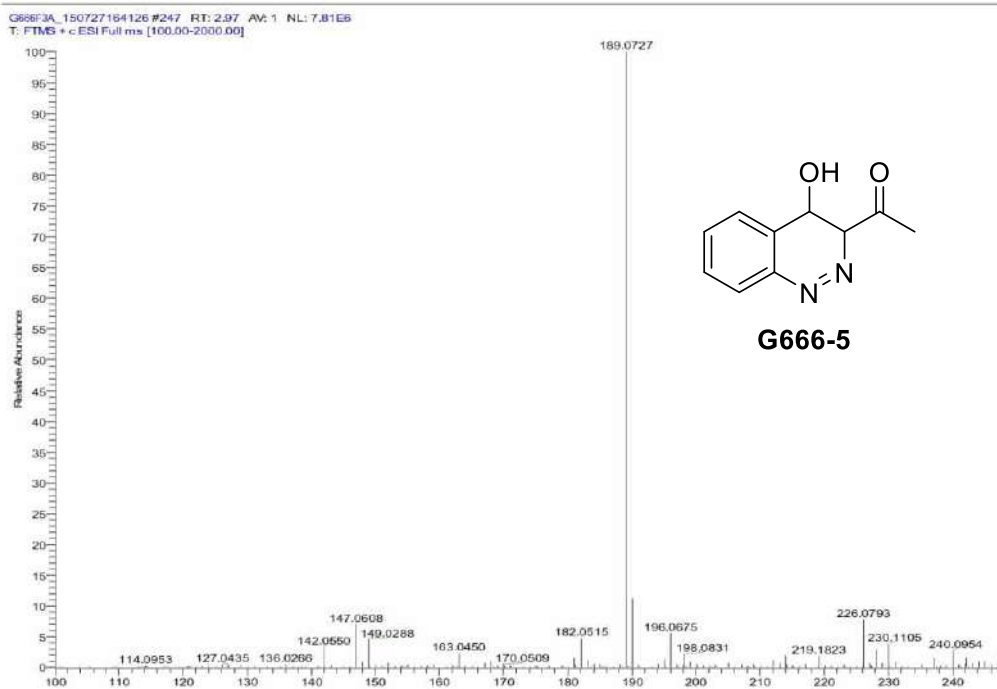
Phổ $^1\text{H-NMR}$ của hợp chất **G666-4**

G666F2A1-MeOD-C13CPD



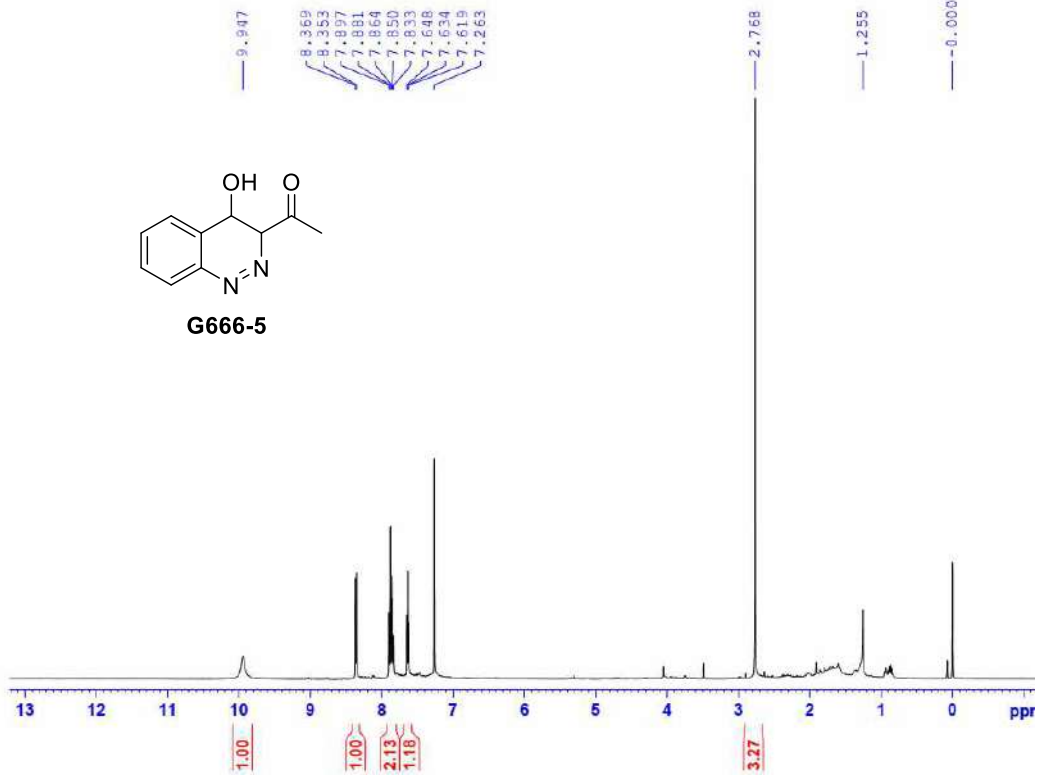
Phổ ^{13}C -NMR của hợp chất G666-4

II.5. Phổ của hợp chất 3-acetyl-4-hydroxycinnoline (G666-5)



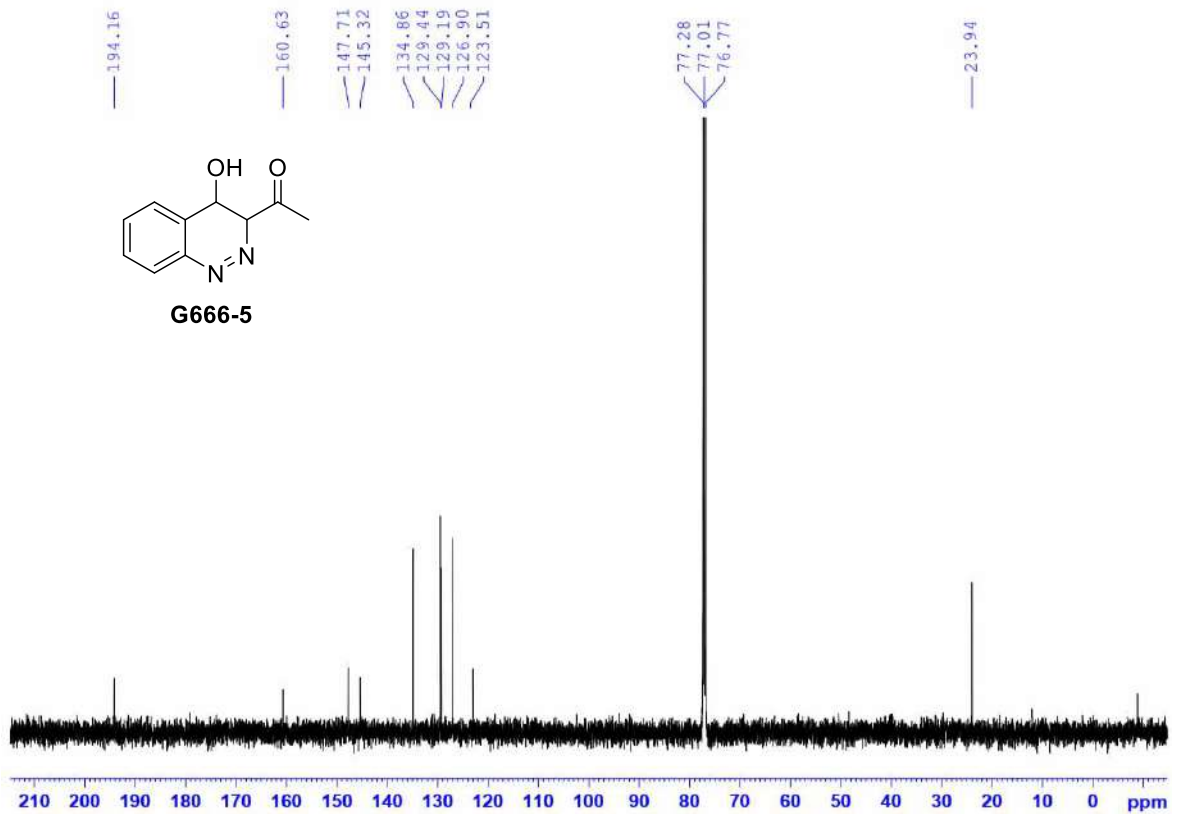
Phổ HR-MS của hợp chất G666-4

G666F3A-CDC13-1H



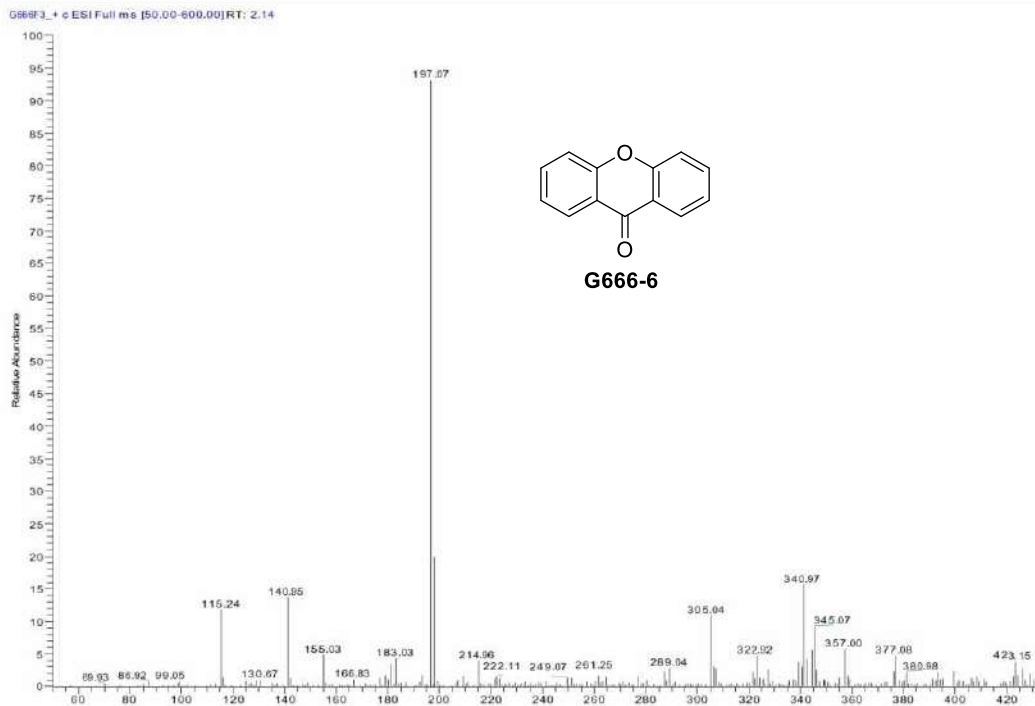
Phổ $^1\text{H-NMR}$ của hợp chất G666-5

G666R3-CDC13-C13CPD



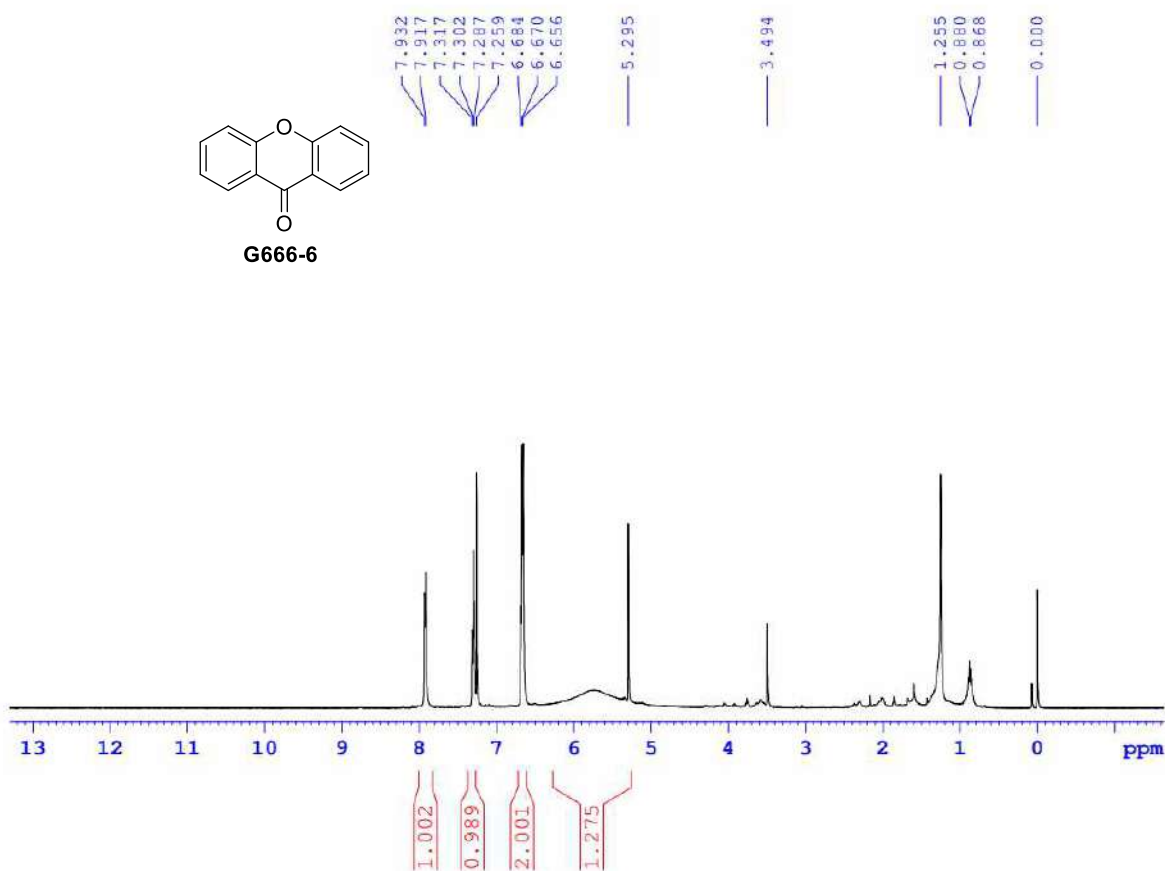
Phổ $^{13}\text{C-NMR}$ của hợp chất G666-5

II.6. Phổ của hợp chất xanthone (G666-6)

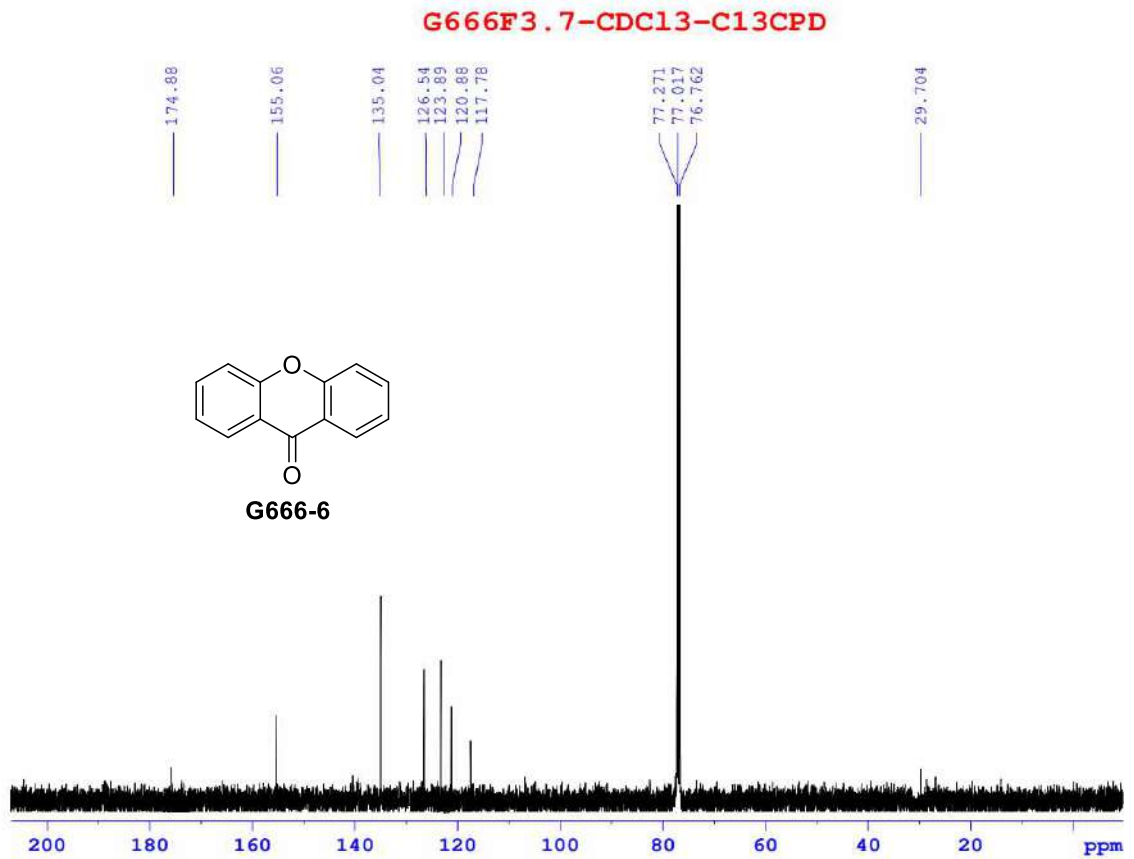


Phổ ESI-MS của hợp chất G666-6

G666F3.7-CDCl3-1H

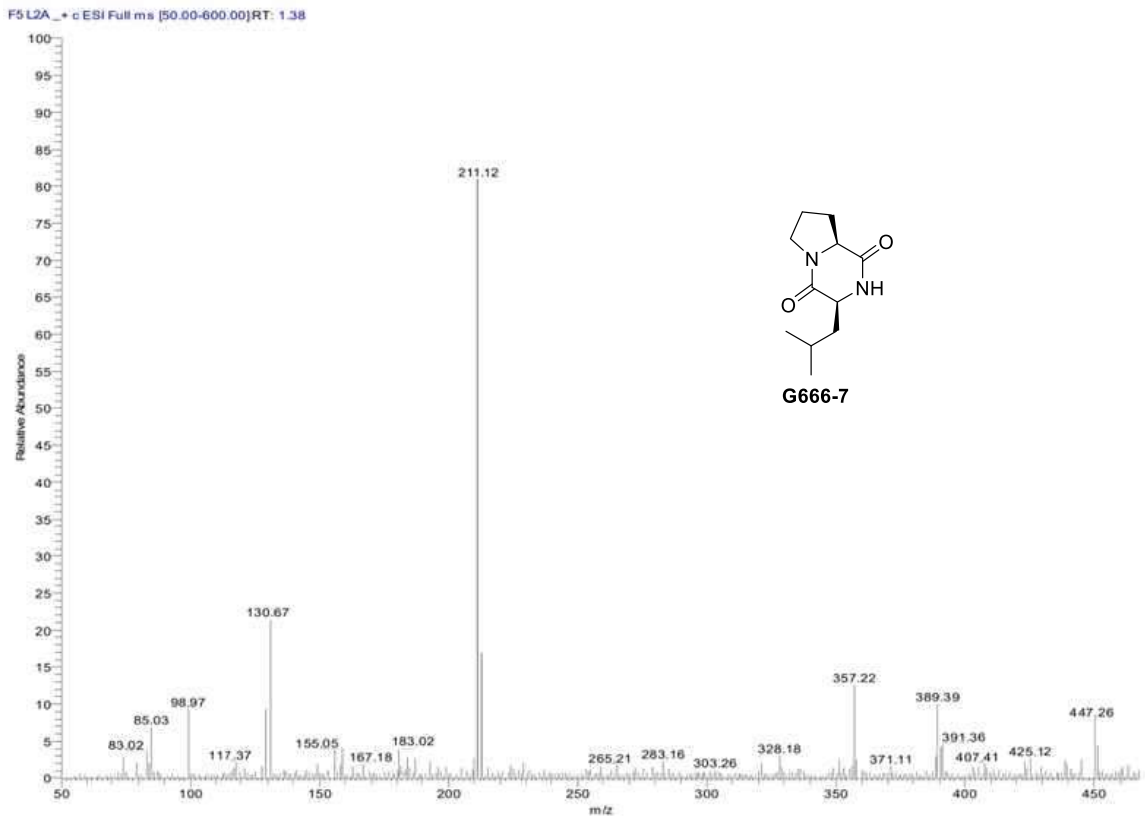


Phổ $^1\text{H-NMR}$ của hợp chất G666-6

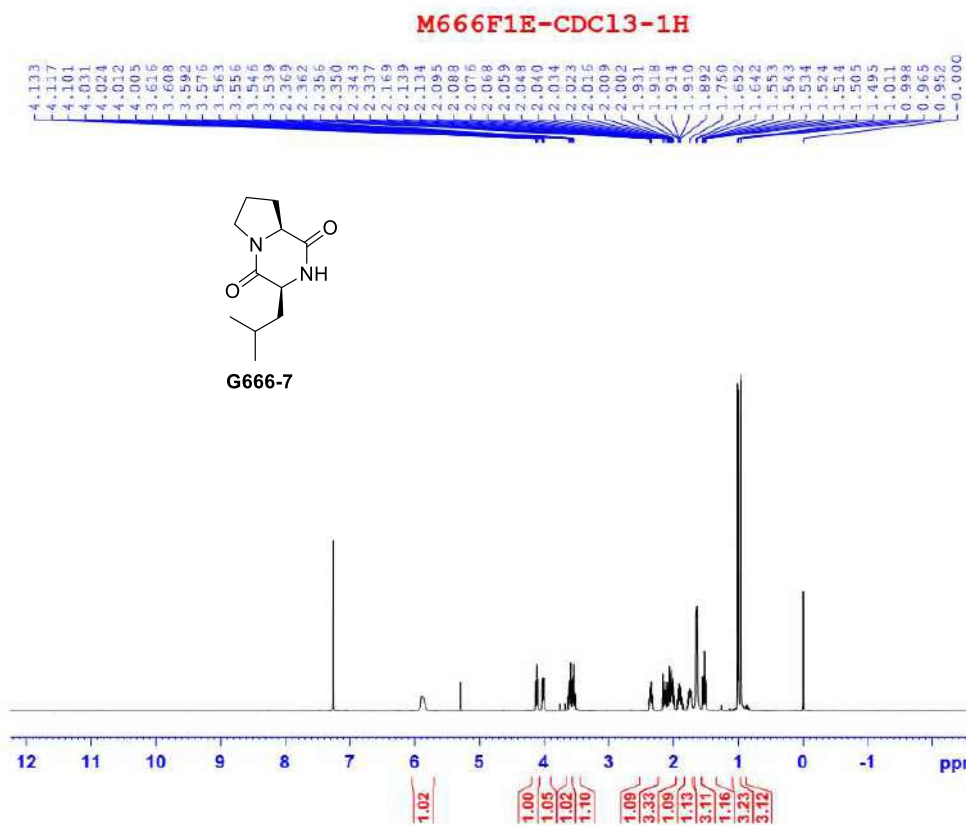


Phổ $^{13}\text{C-NMR}$ của hợp chất **G666-6**

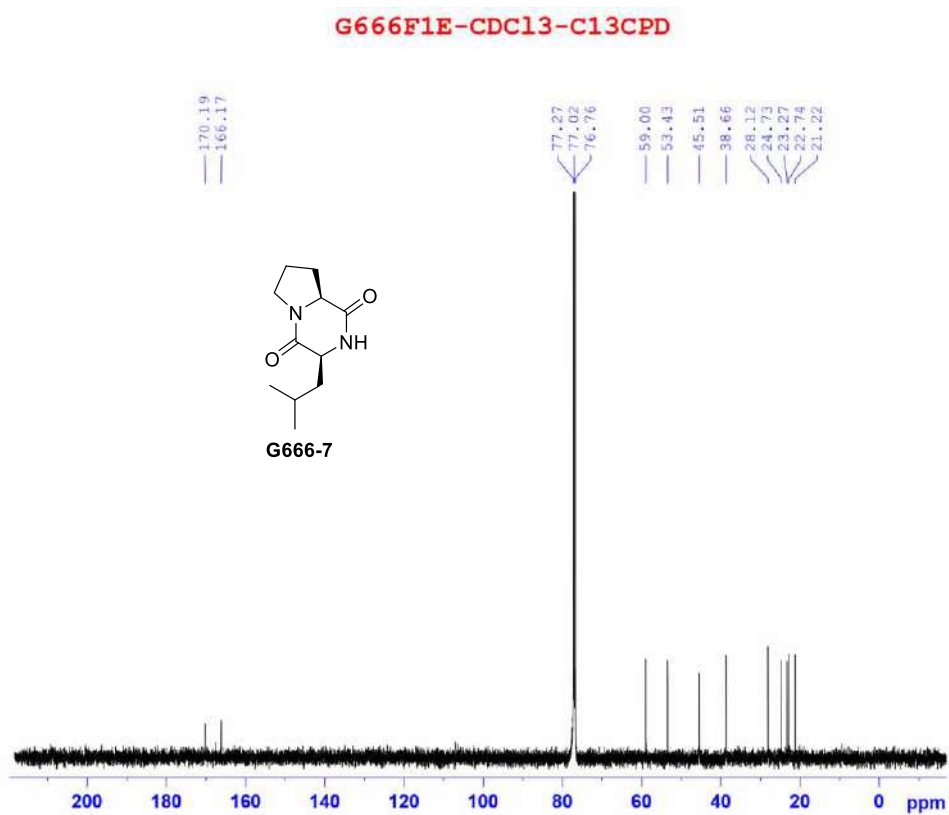
II.7. Phổ của hợp chất cyclo-(Pro-Leu) (G666-7)



Phổ ESI-MS của hợp chất **G666-7**



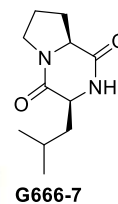
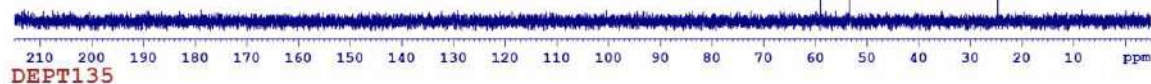
Phổ ^1H -NMR của hợp chất **G666-7**



Phổ ^{13}C -NMR của hợp chất **G666-7**

G666F1E-CDC13-C13CPD&DEPT

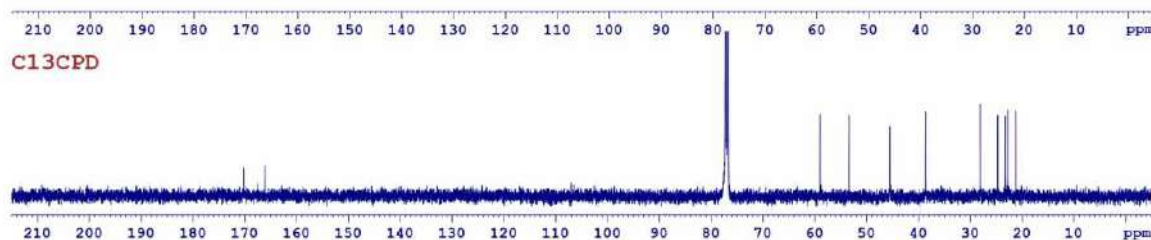
DEPT90



DEPT135

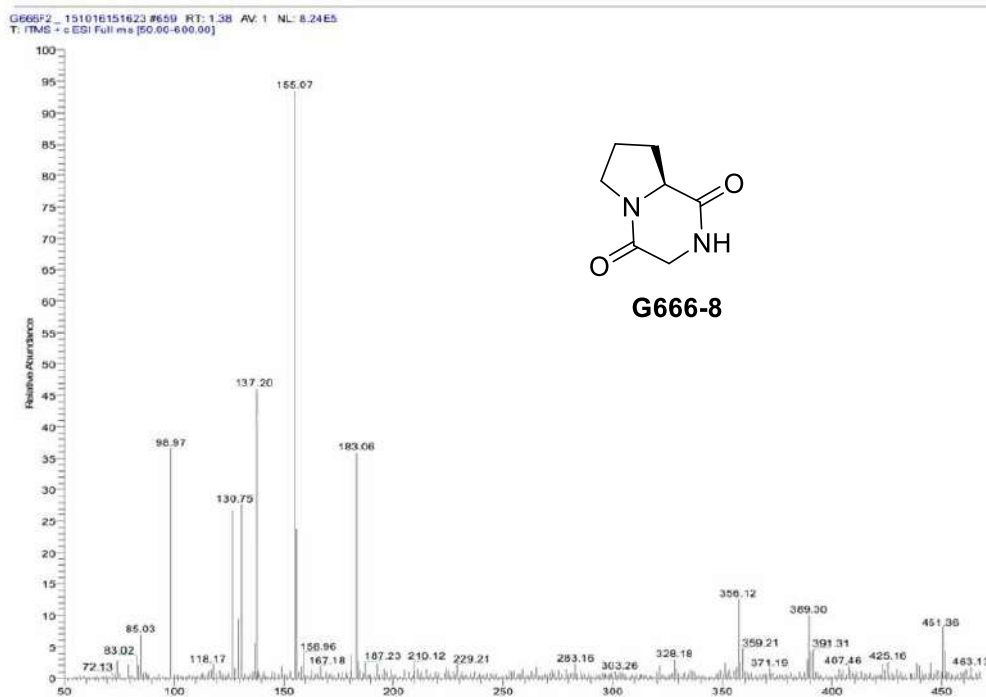


C13CPD



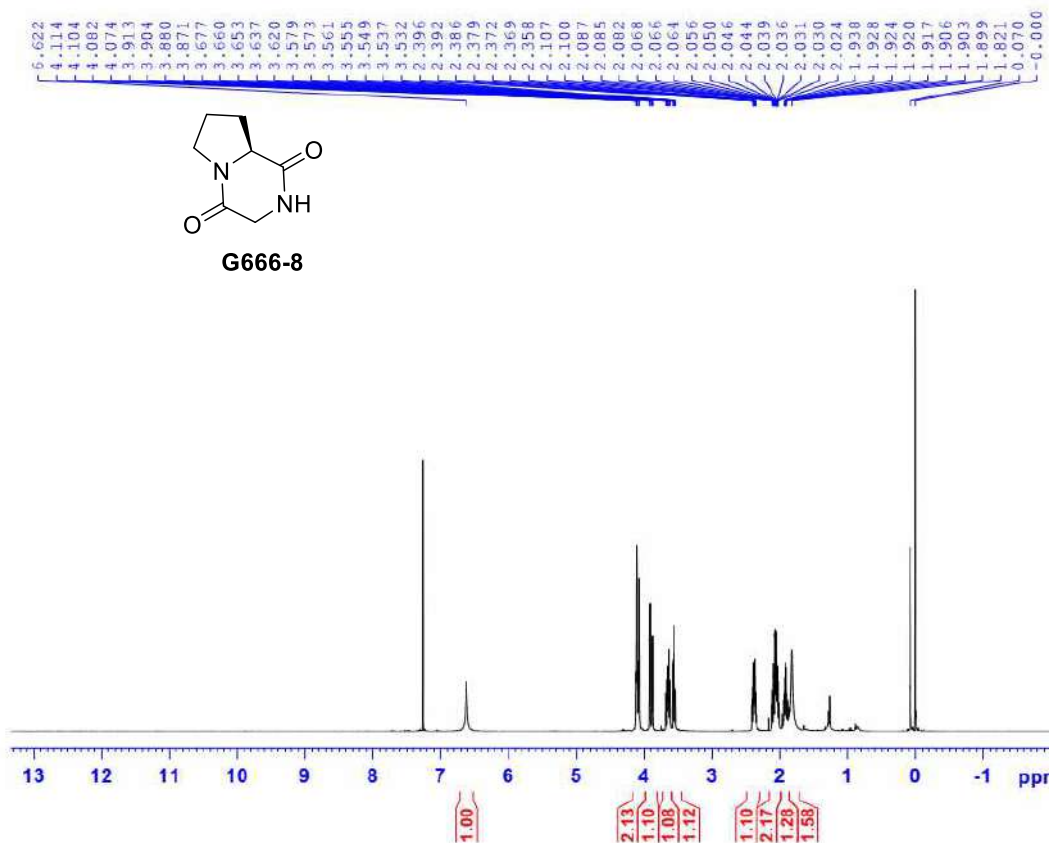
Phổ DEPT của hợp chất G666-7

II.8. Phổ của hợp chất cyclo-(Pro-Gly) (G666-8)



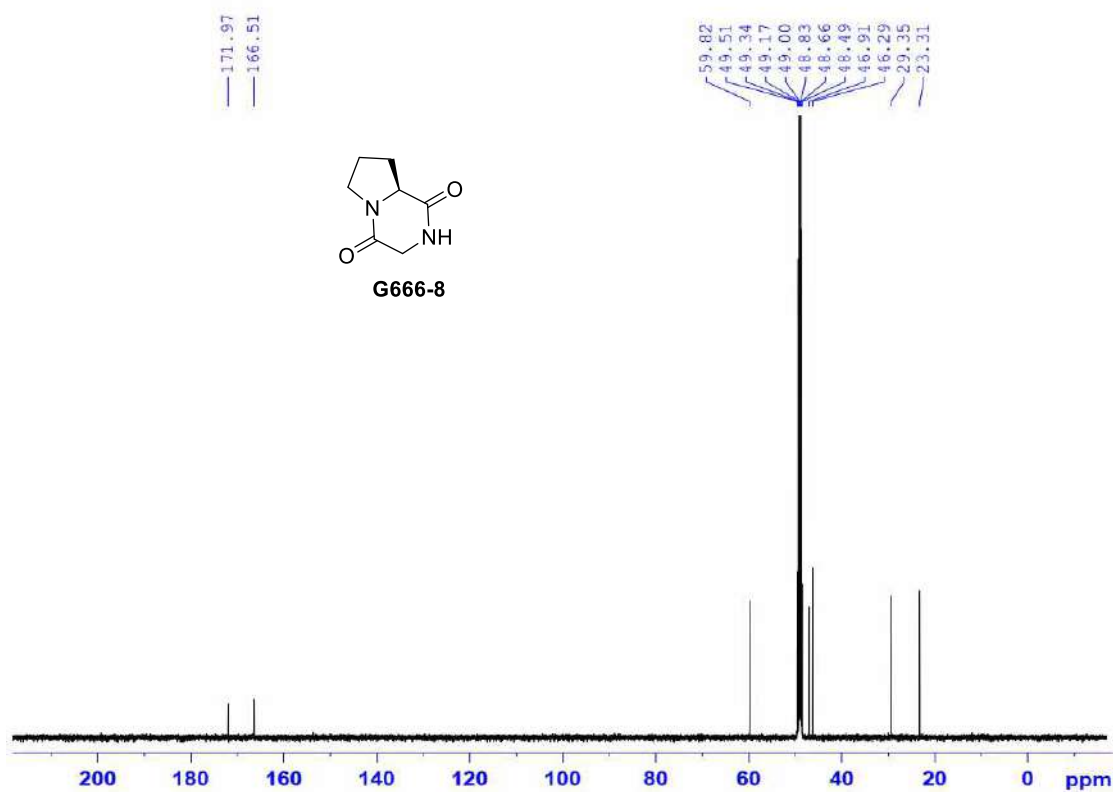
Phổ ESI-MS của hợp chất G666-8

EAG666F2I-CDC13-1H



Phổ ^1H NMR của hợp chất **G666-8**

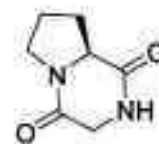
G666F3.4-MeOD-C13CPD



Phổ ^{13}C NMR của hợp chất **G666-8**

G666F3.4-MeOD-C13CPD&DEPT

DEPT90



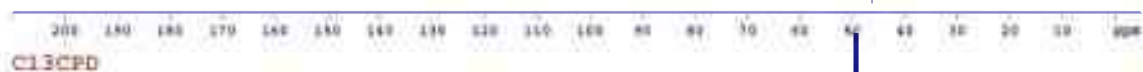
G666-8



DEPT135

CH&CH3

CH2



C13CPD

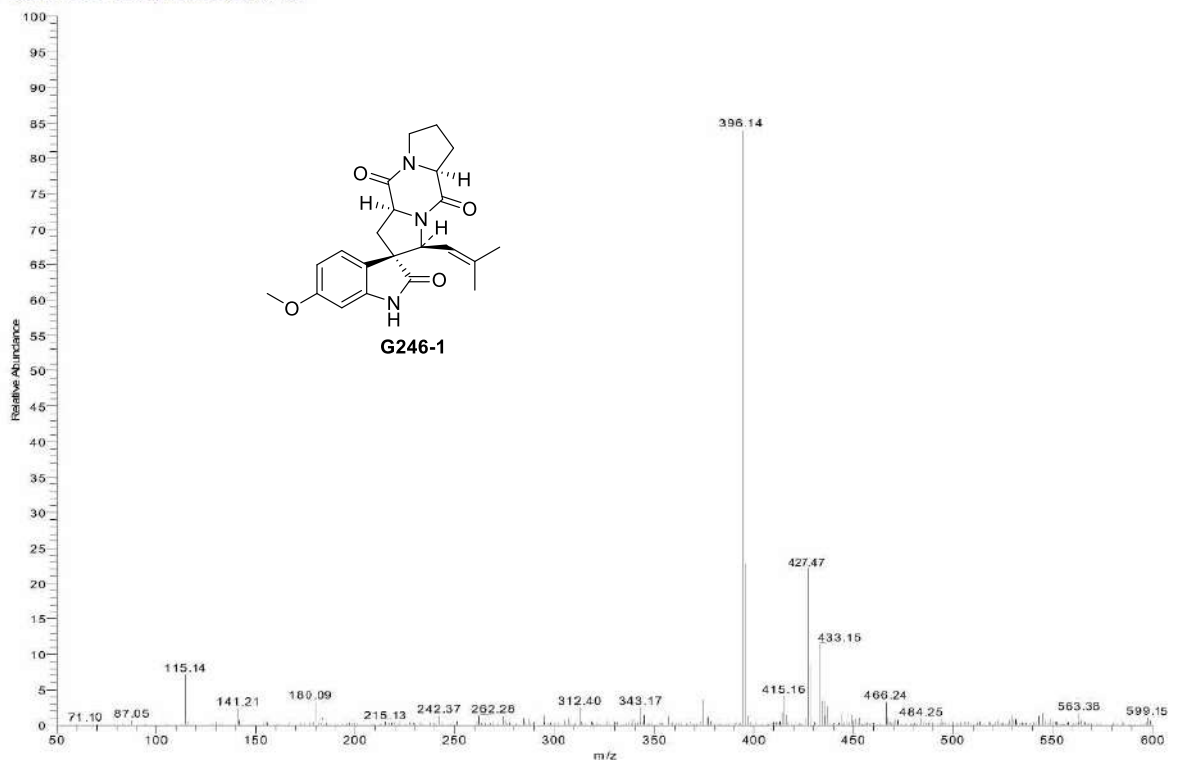


Phổ DEPT của hợp chất G666-8

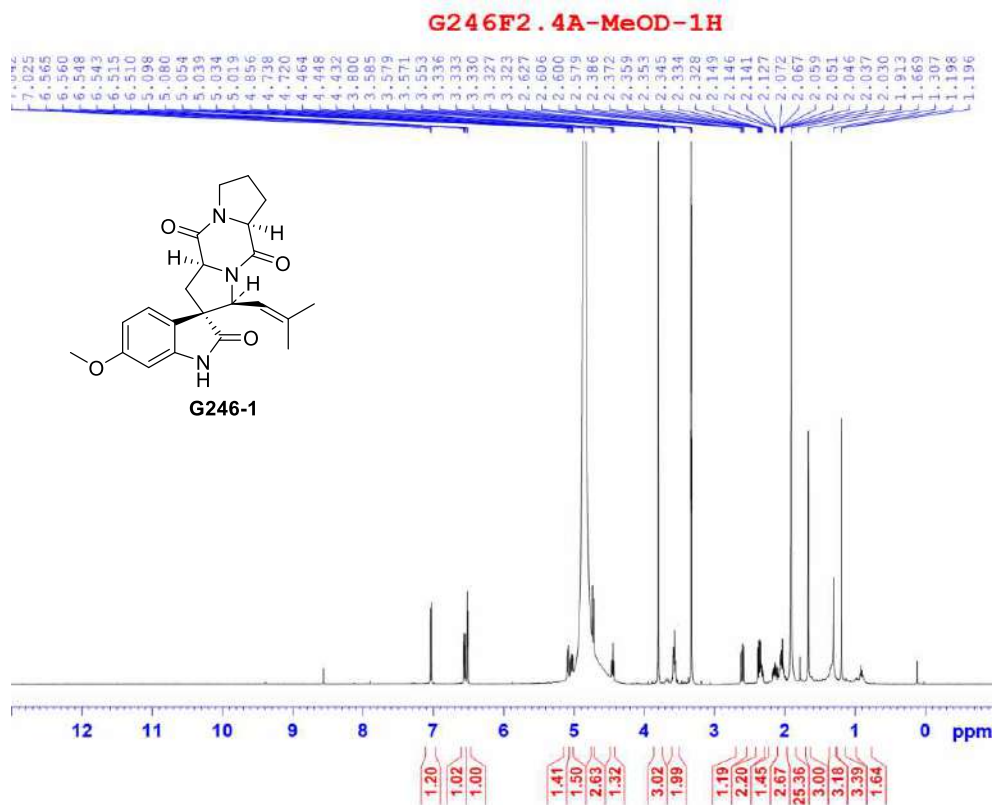
PHỤ LỤC III. PHỔ CỦA CÁC HỢP CHẤT PHÂN LẬP TỪ CHỦNG *STREPTOMYCES* SP. G246

III.1. Hợp chất spirotryprostatin A (G246-1)

G246A_+ c ESI Full m/z [50.00-600.00] RT: 1.61

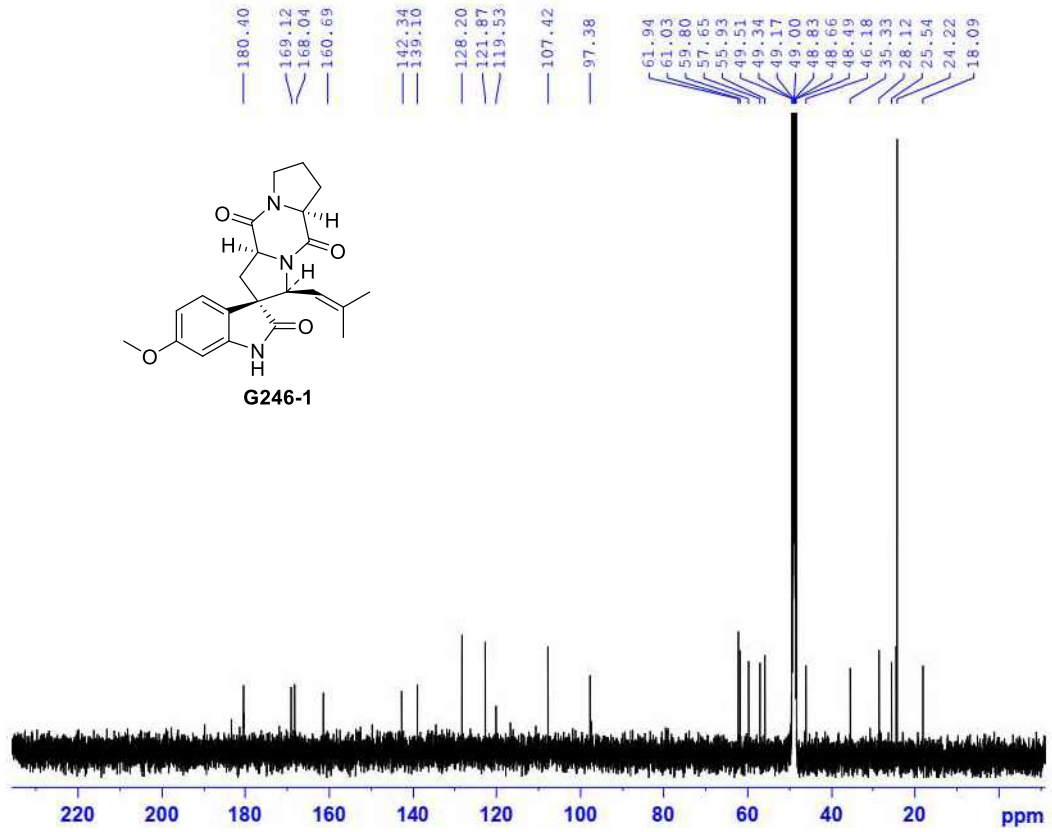


Phổ ESI-MS của hợp chất G246-1



Phổ ^1H NMR của hợp chất G246-1

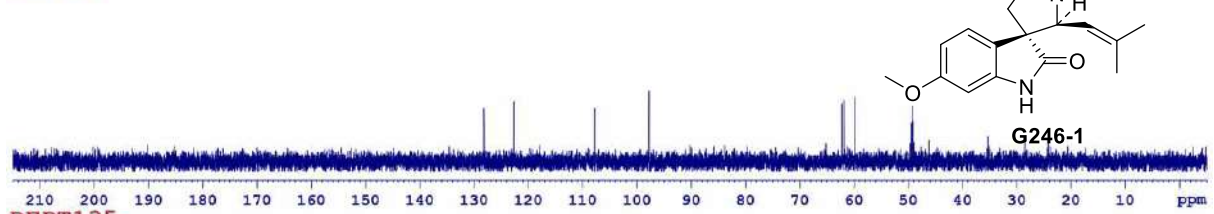
G246F2. 4A-MeOD-C13CPD



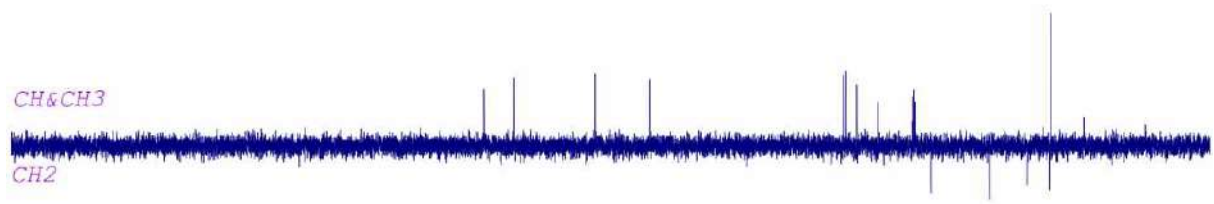
Phổ ^{13}C -NMR của hợp chất G246-1

G246F2. 4A-MeOD-C13CPD&DEPT

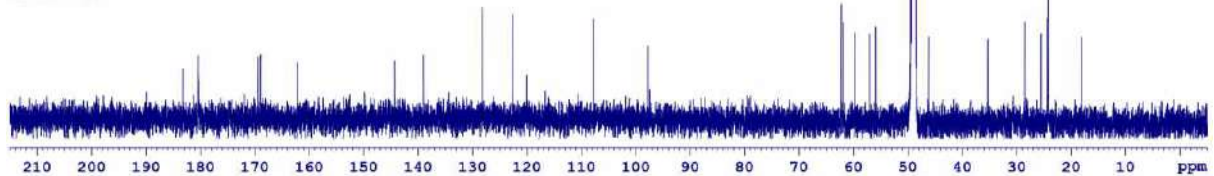
DEPT90



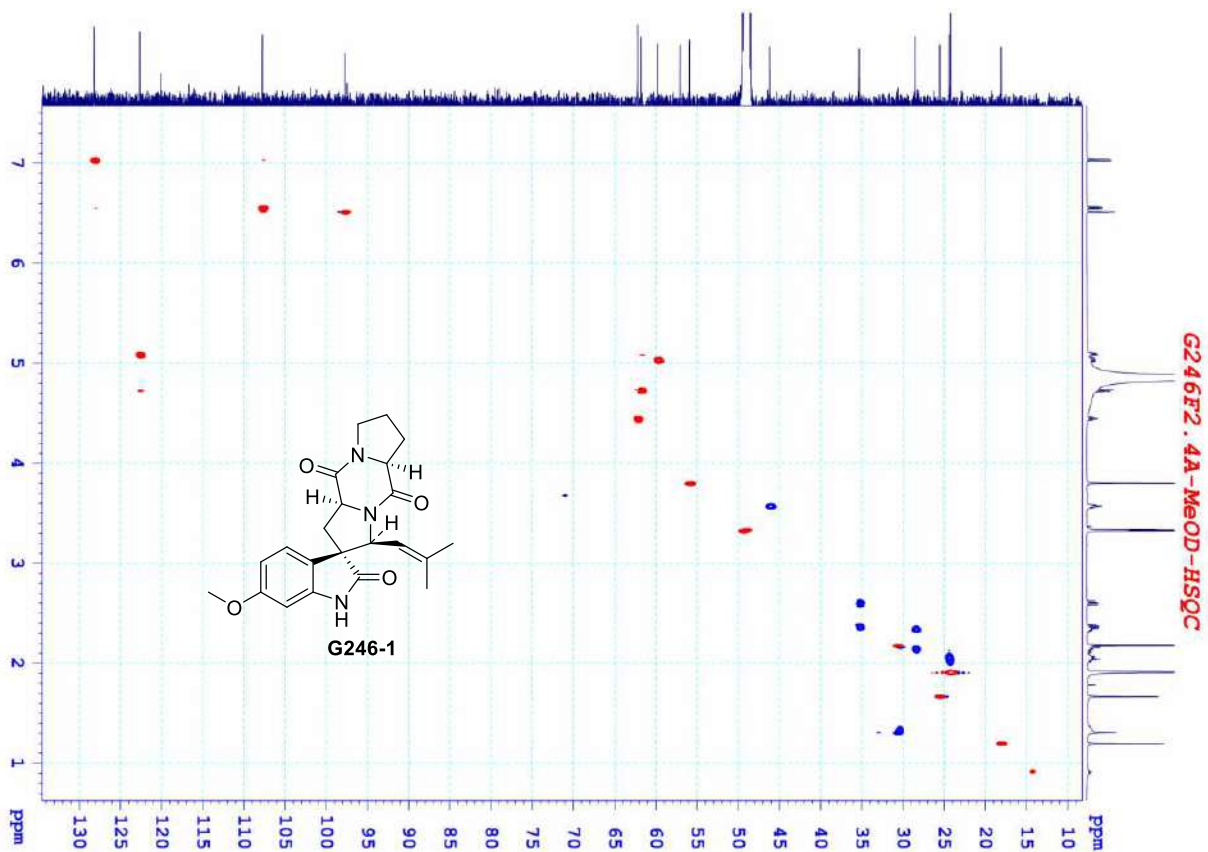
DEPT135



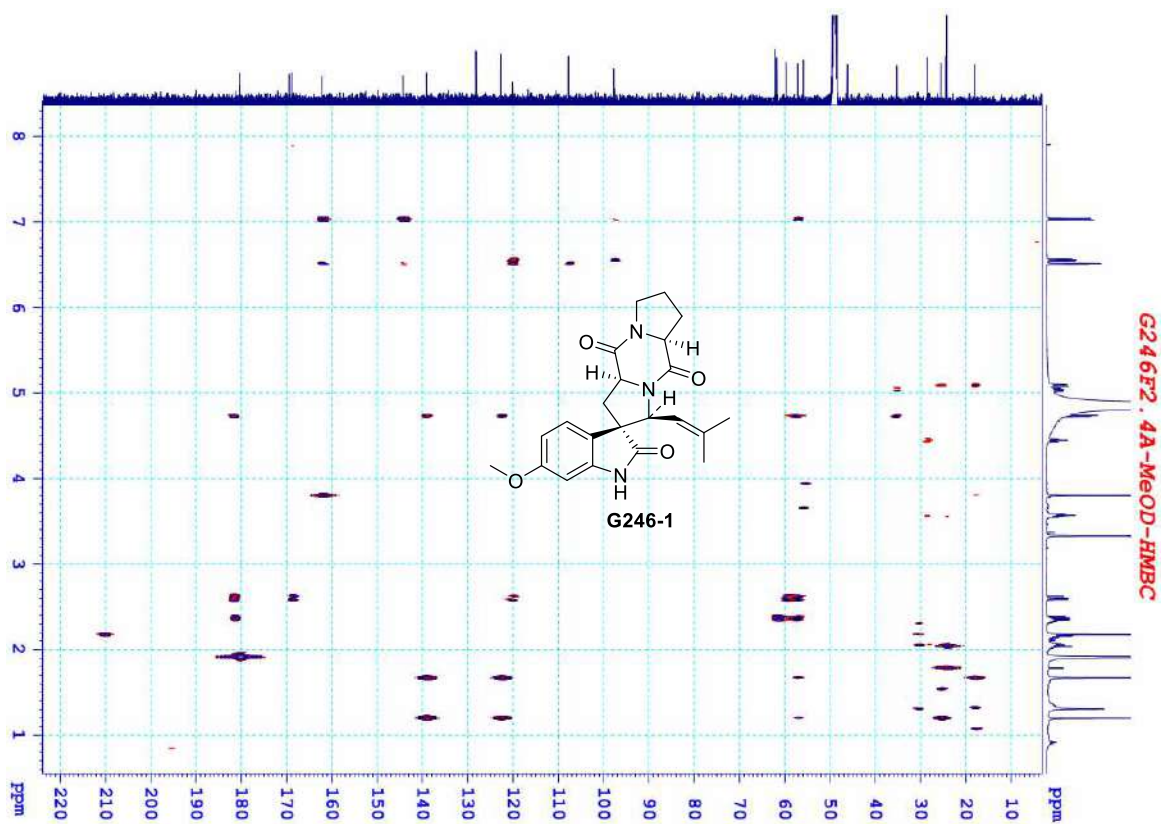
CH&CH3
CH2
C13CPD



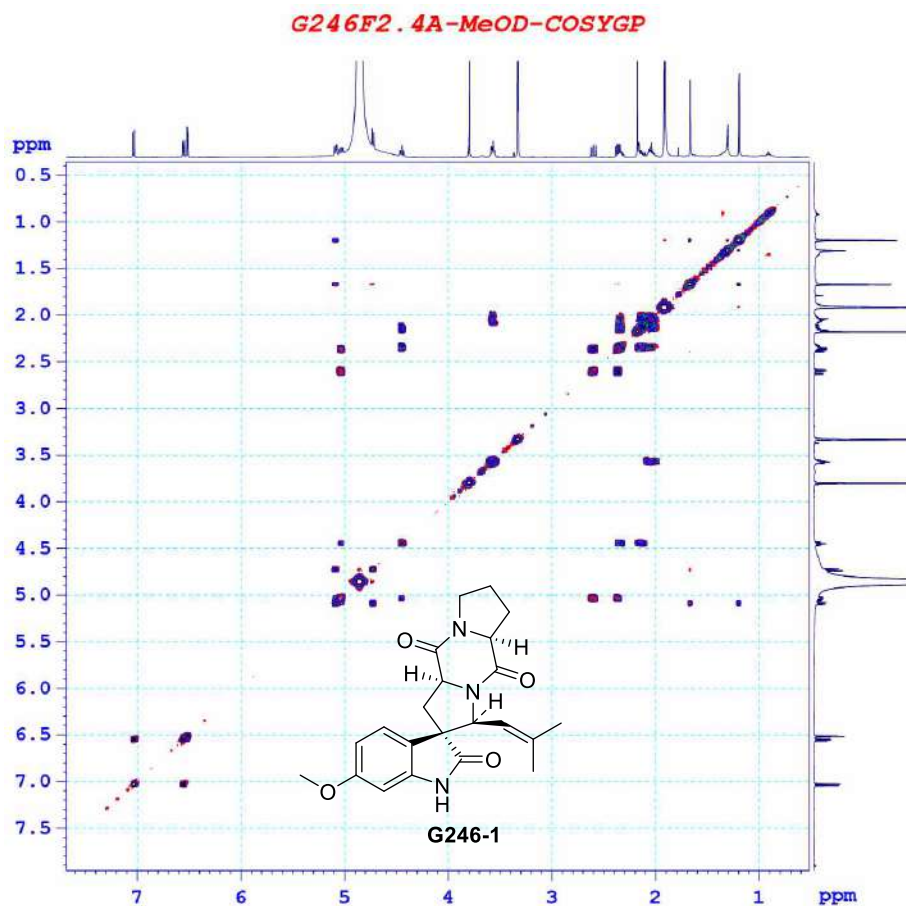
Phổ DEPT của hợp chất G246-1



Phổ HSQC của hợp chất G246-1

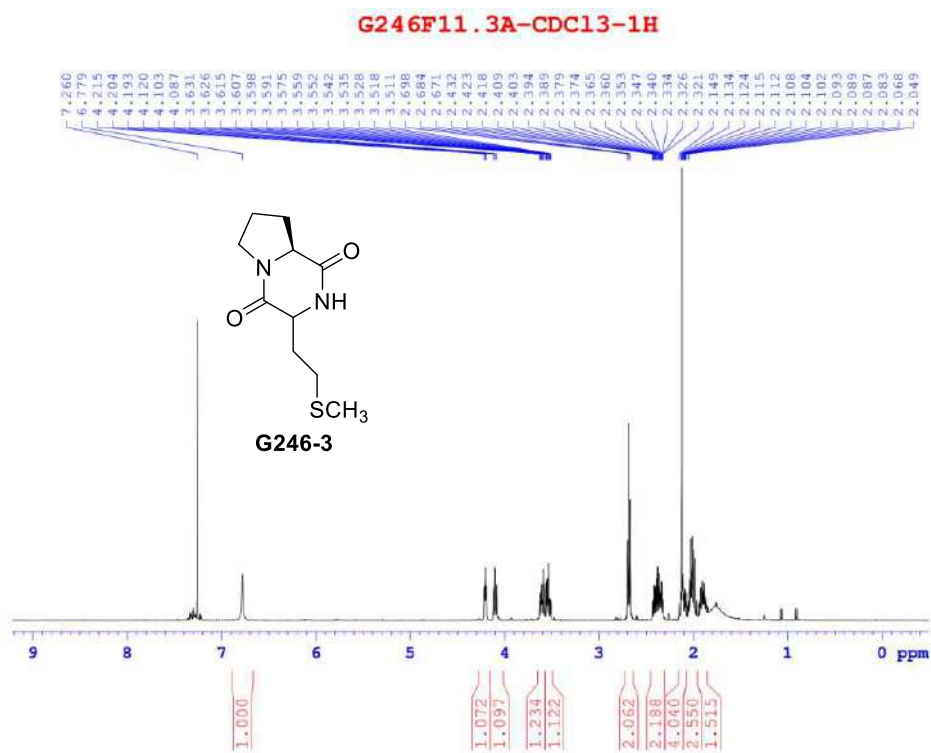


Phổ HMBC của hợp chất G246-1



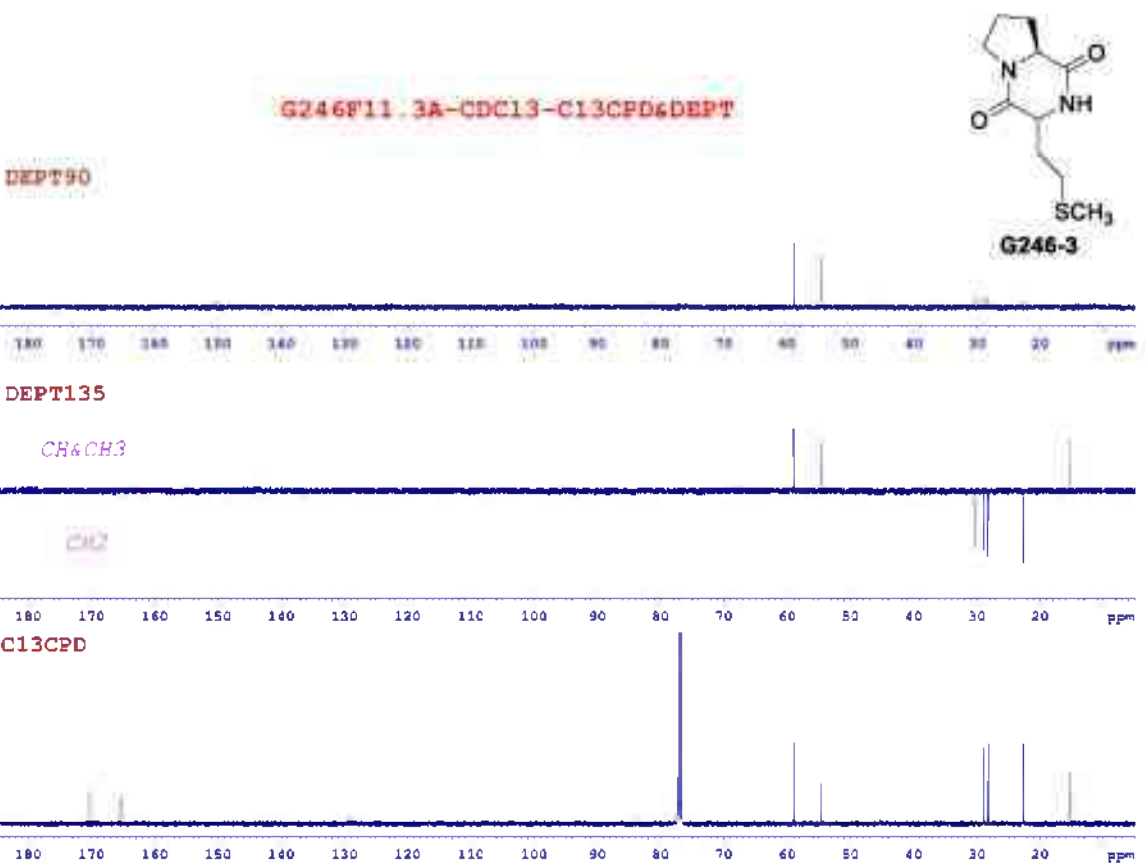
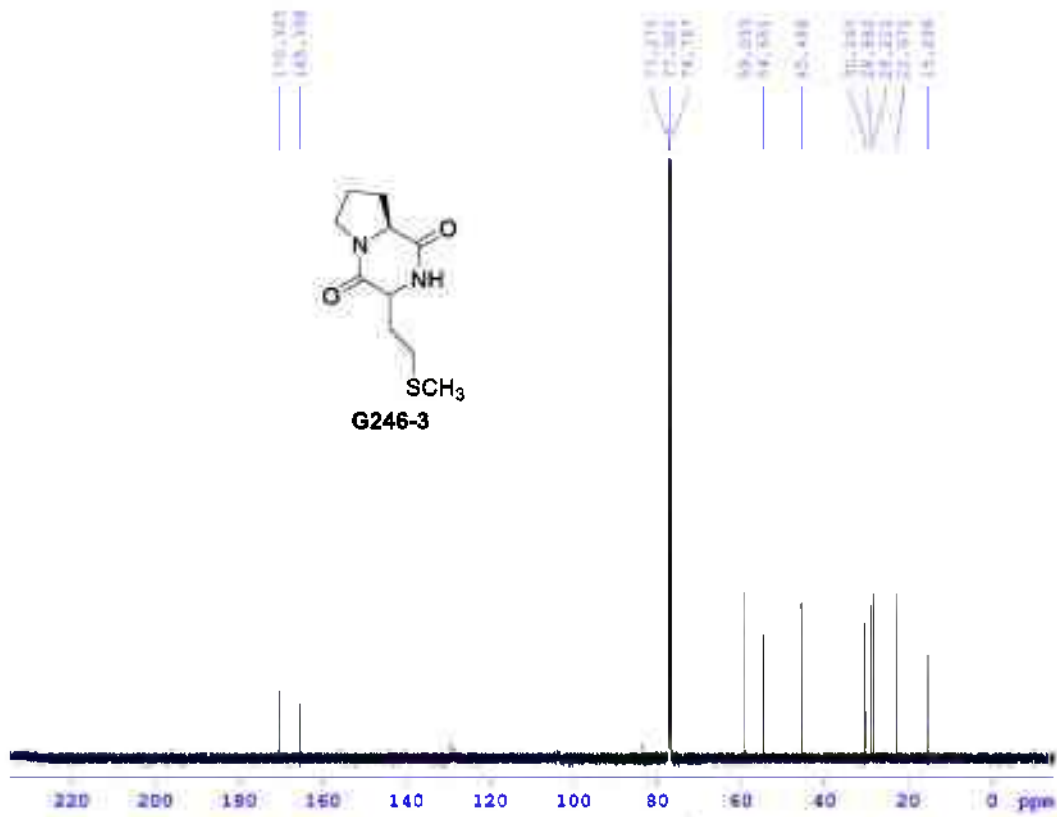
Phổ COSY của hợp chất **G631-4**

III.2. Hợp chất cyclo-(Pro-Met) (**G246-2**)



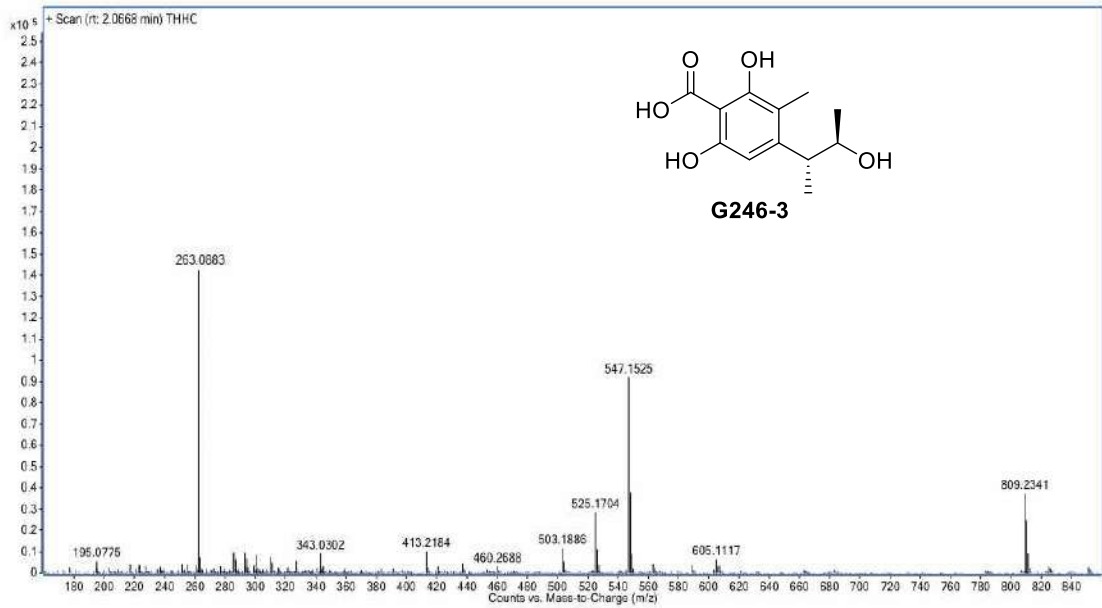
Phổ ^1H NMR của hợp chất **G246-2**

G246F11.3A-CDC13-C13CPD

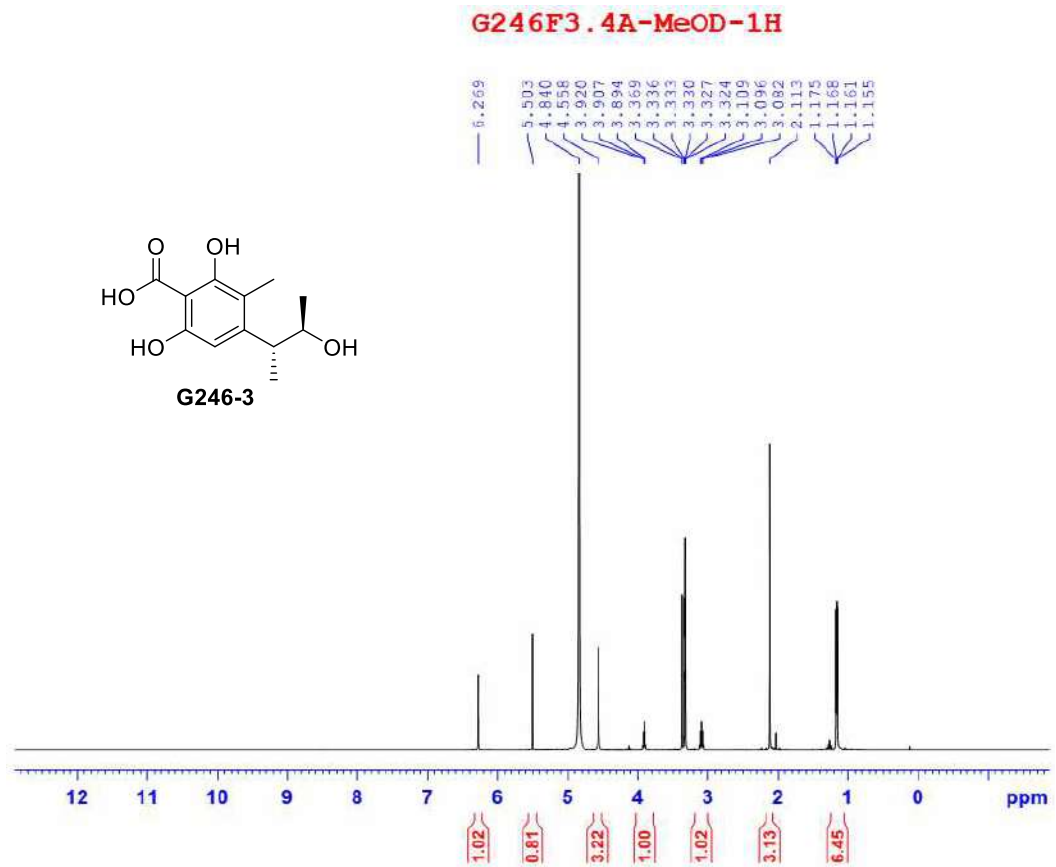


Phổ DEPT của hợp chất **G246-2**

III.3. Hợp chất phenol A acid (**G246-3**)

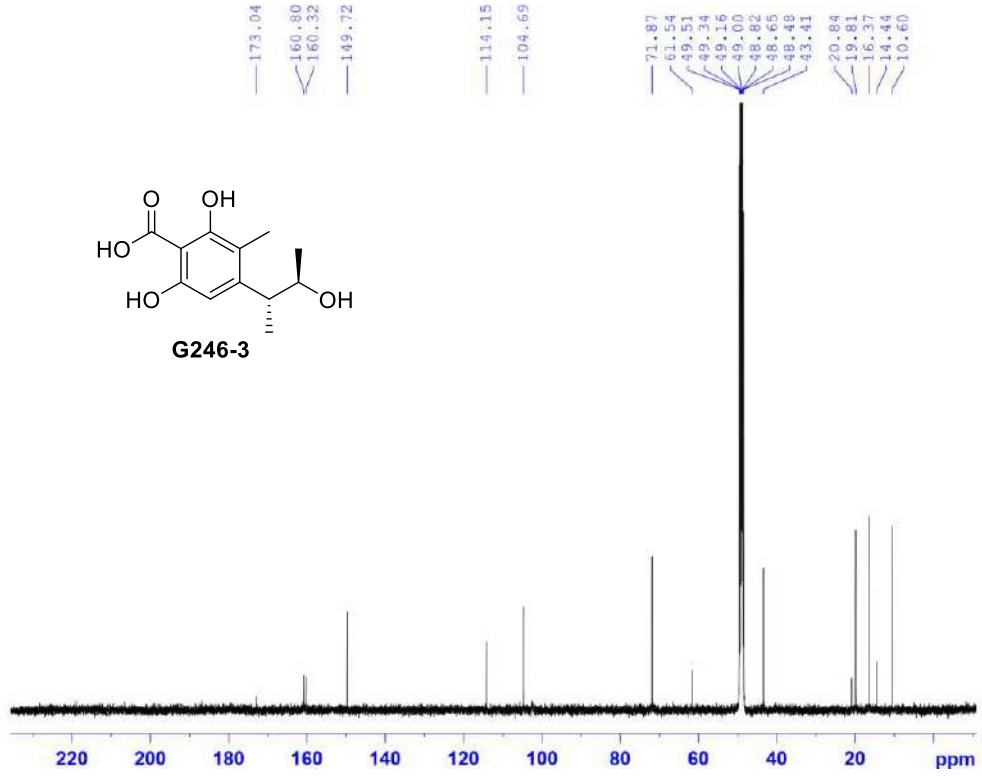


Phổ HR-MS của hợp chất **G246-3**

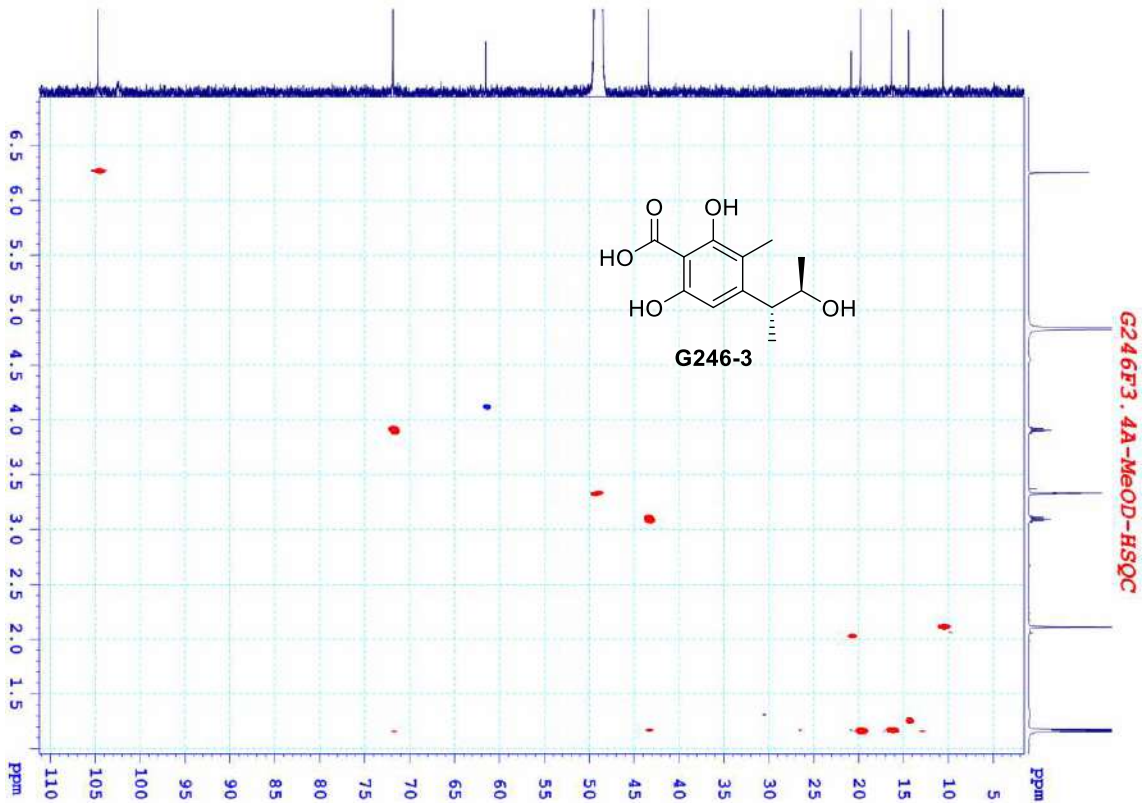


Phổ ¹H-NMR của hợp chất **G246-3**

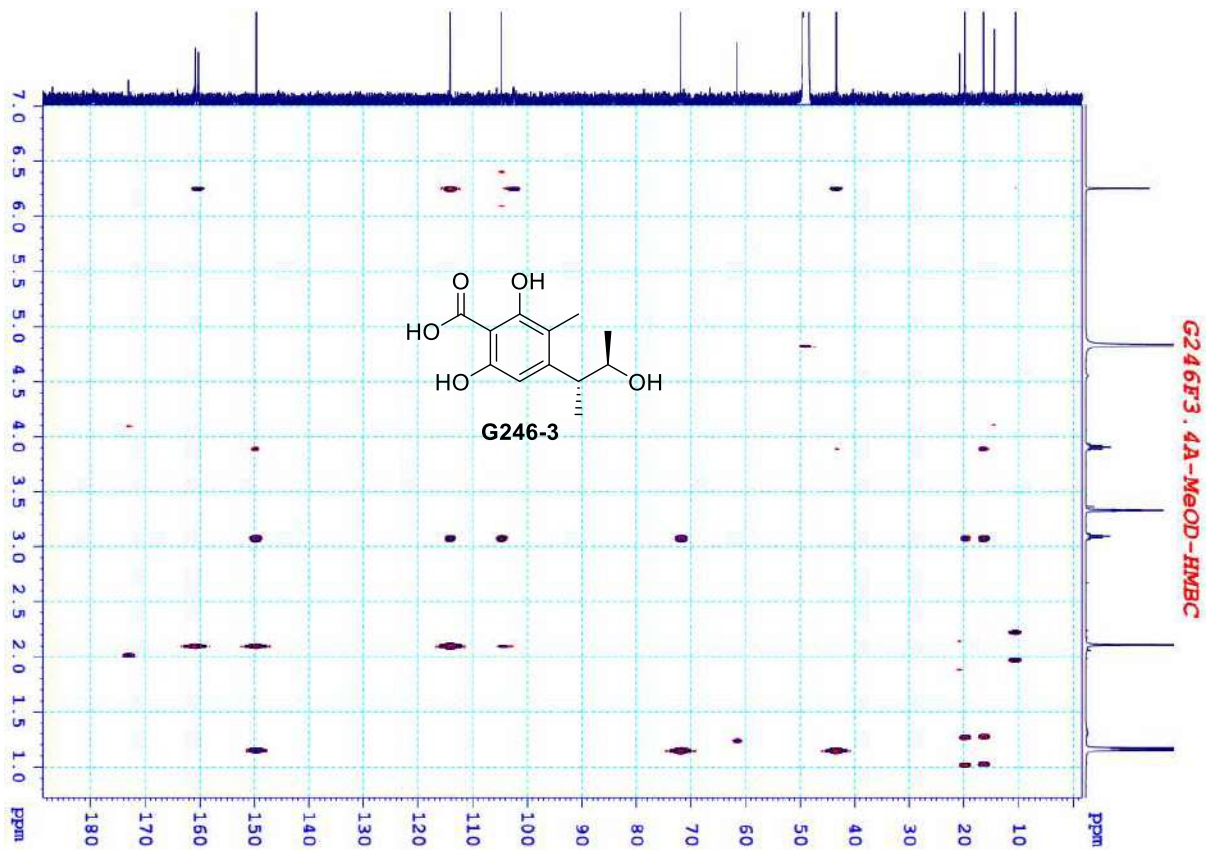
G246F3. 4A-MeOD-C13CPD



Phổ ^{13}C -NMR của hợp chất G246-3

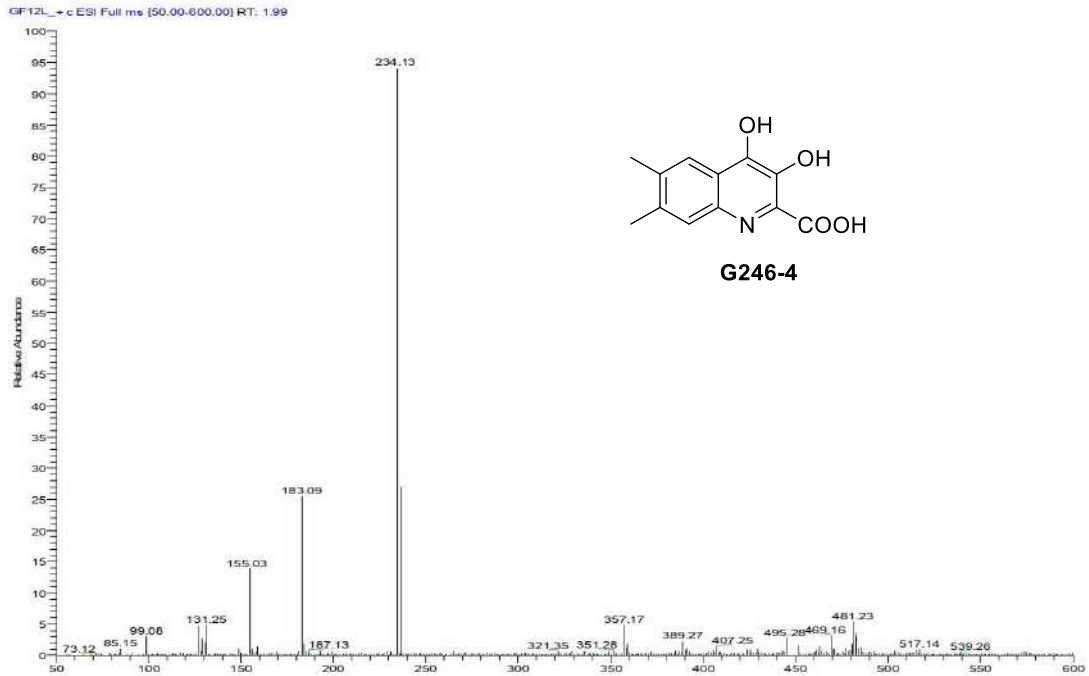


Phổ HSQC của hợp chất G246-3



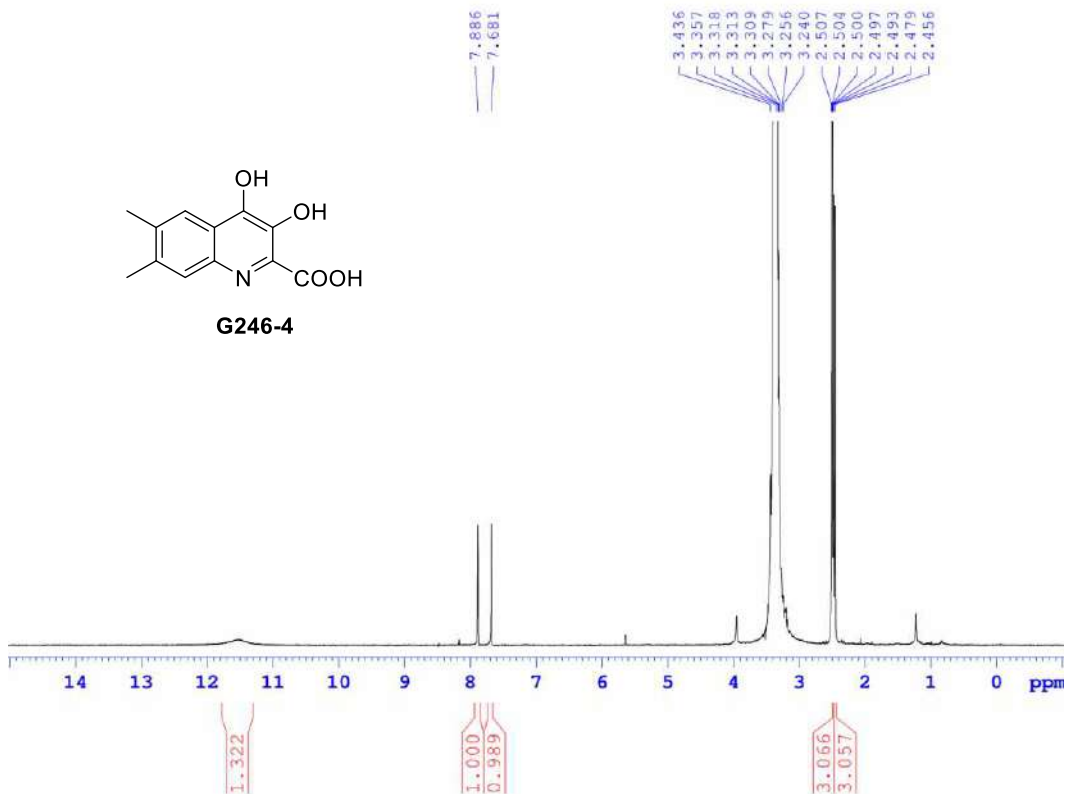
Phổ HMBC của hợp chất **G246-3**

III.4. Hợp chất 3,4-dihydroxy-6,7-dimethyl-quinoline-2-carboxylic (G246-4)



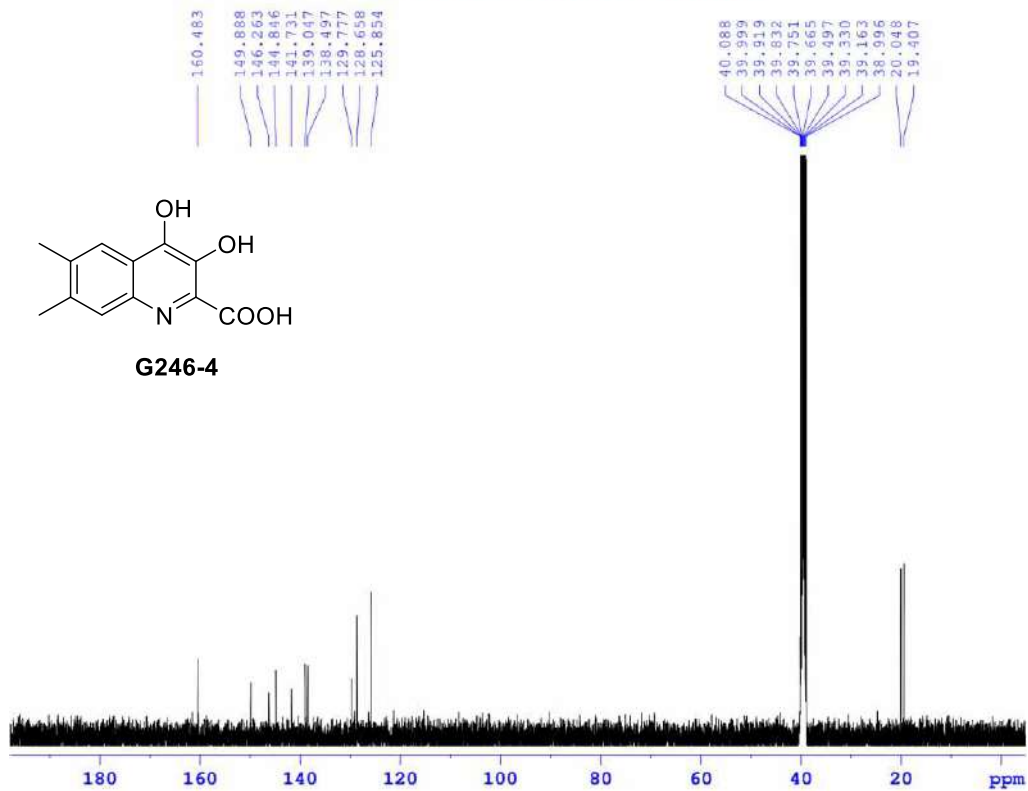
Phổ ESI-MS của hợp chất **G246-4**

G246F1.2L-DMSO-1H



Phổ ¹H-NMR của hợp chất G246-4

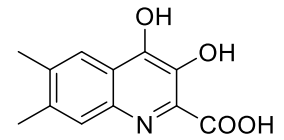
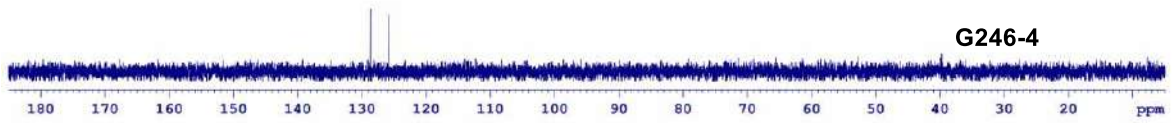
G246F1.2L-DMSO-C13CPD



Phổ ¹³C-NMR của hợp chất G246-4

G246F1 . 2L-DMSO-C13CPD&DEPT

DEPT90



G246-4

DEPT135

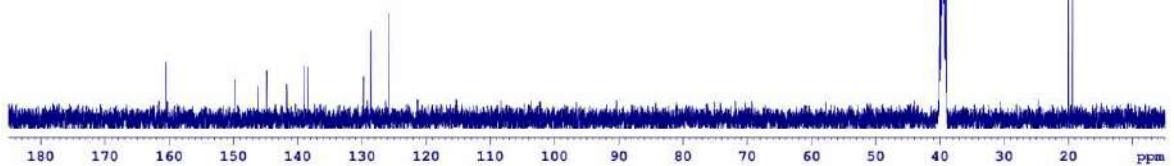


CH&CH3

CH2



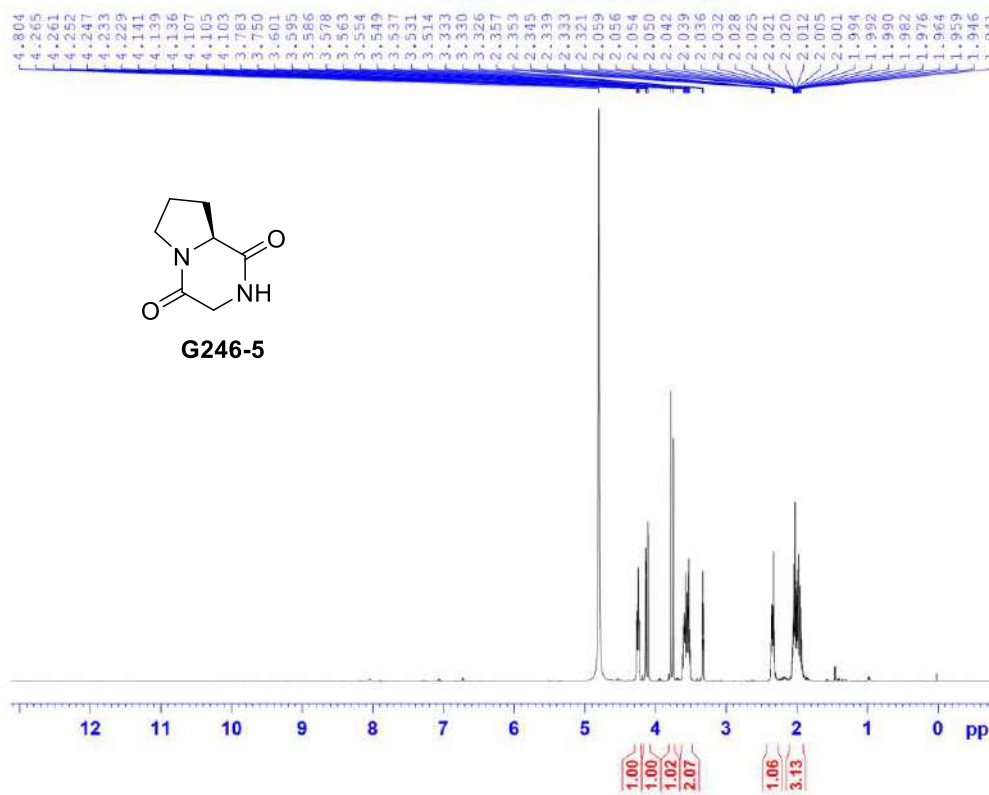
C13CPD



Phổ DEPT của hợp chất G246-4

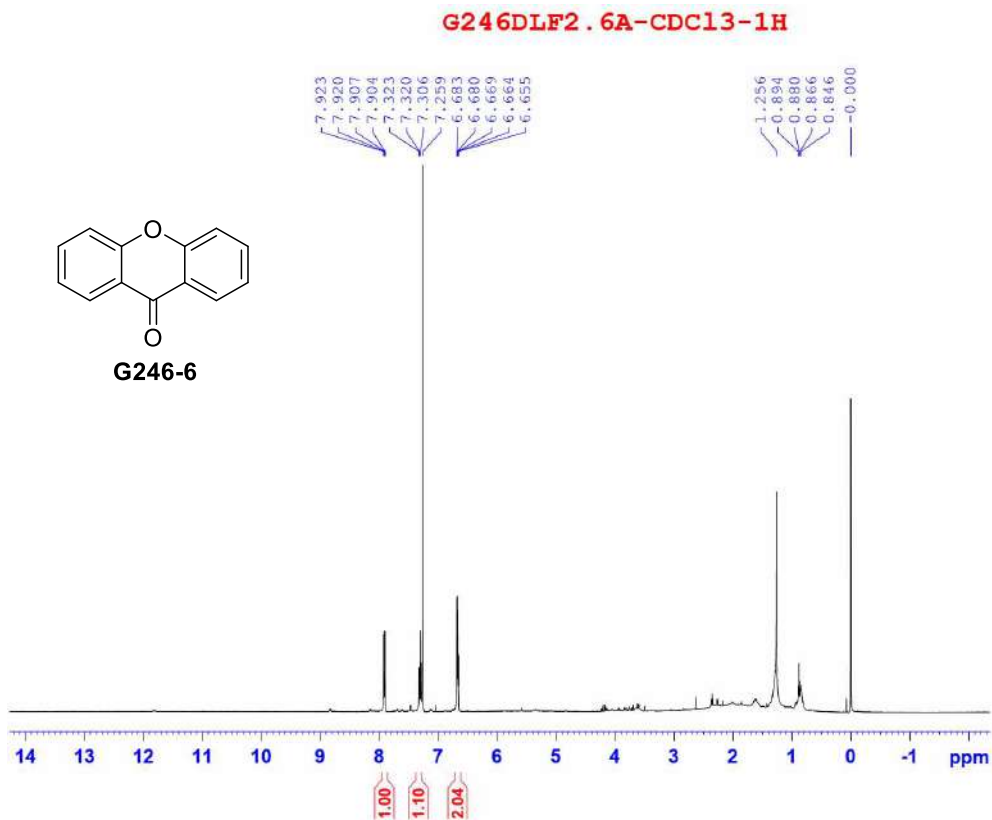
III.5. Hợp chất cyclo-(Pro-Gly) (G246-5)

G246F2 . 3A-MeOD-1H



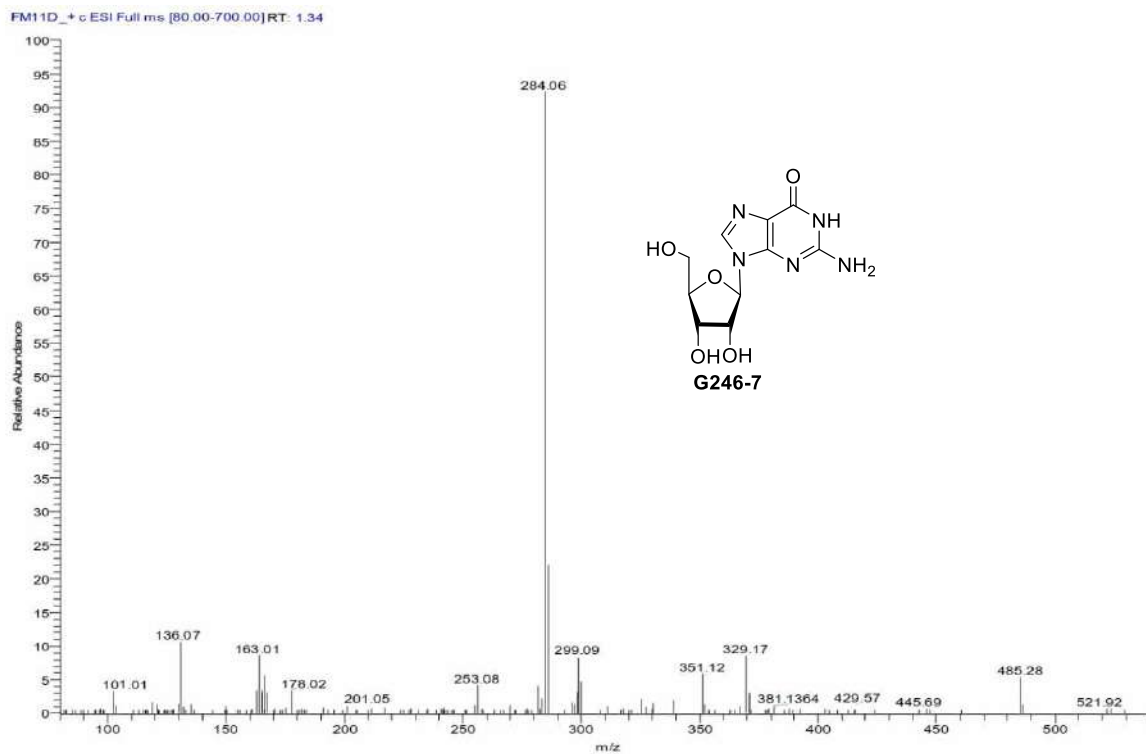
Phổ ¹H-NMR của hợp chất G246-5

III.6. Hợp chất xanthone (G246-6)



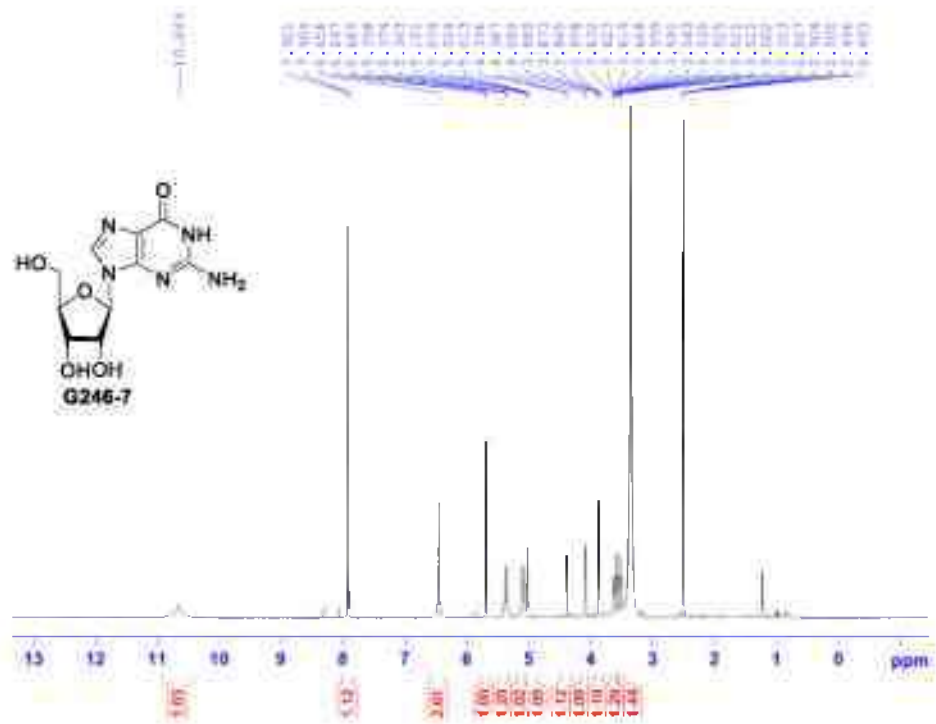
Phổ ¹H-NMR của hợp chất **G246-6**

III.7. Hợp chất guanosine (G246-7)



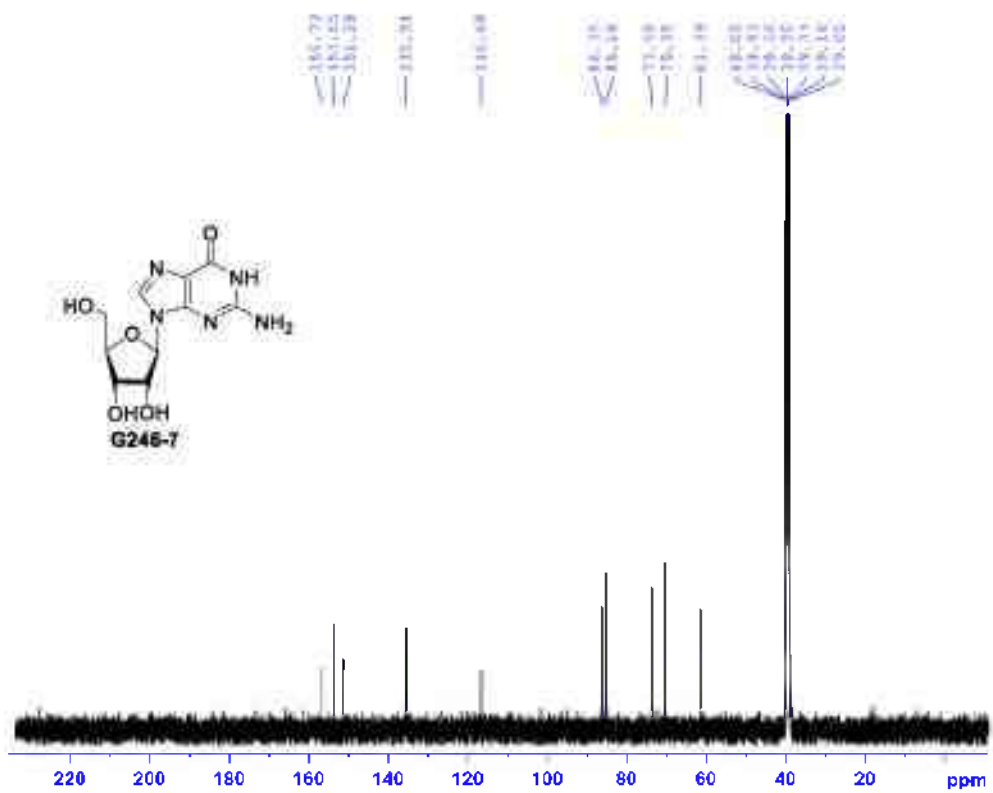
Phổ ESI-MS của hợp chất **G246-7**

G246D4-DMSO-1H



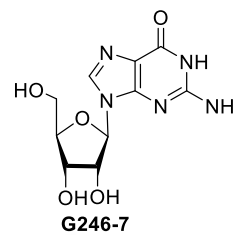
Phổ ¹H-NMR của hợp chất G246-7

G246D4-DMSO-C13CPD

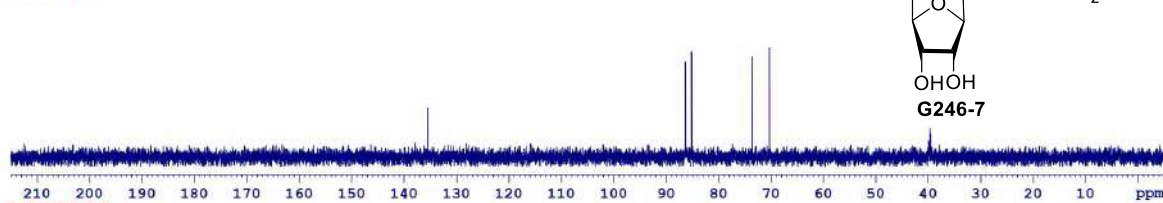


Phổ ^{13}C -NMR của hợp chất **G246-7**

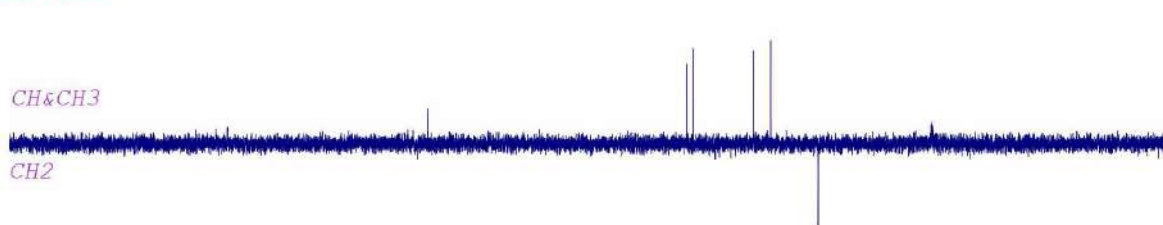
G246D4-DMSO-C13CPD &DEPT



DEPT90

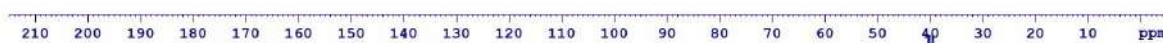


DEPT135

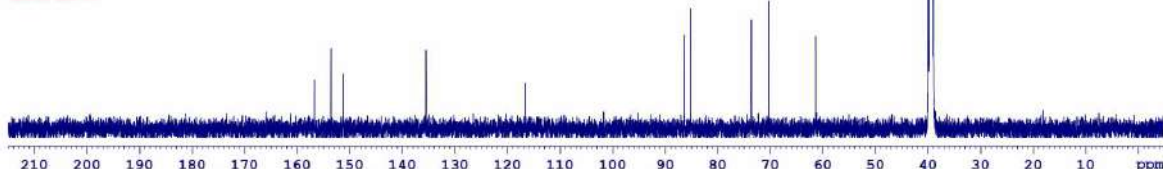


CH&CH3

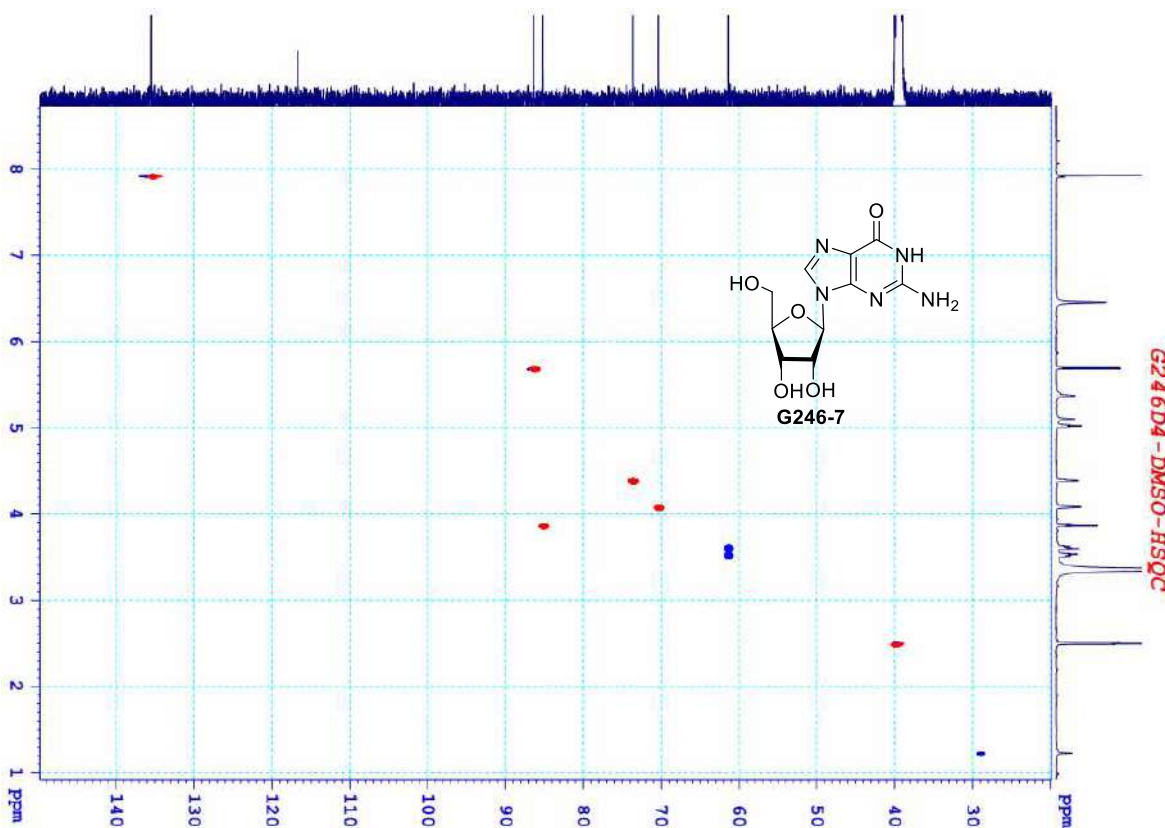
CH2



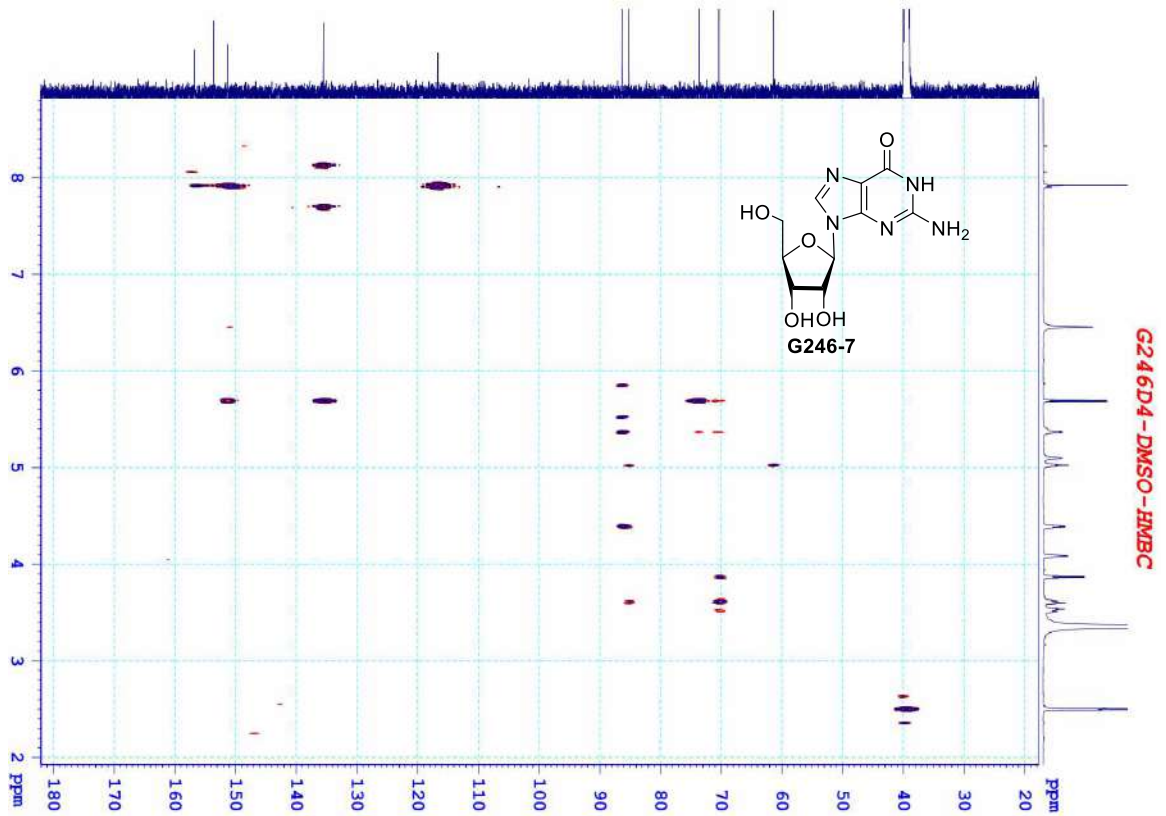
C13CPD



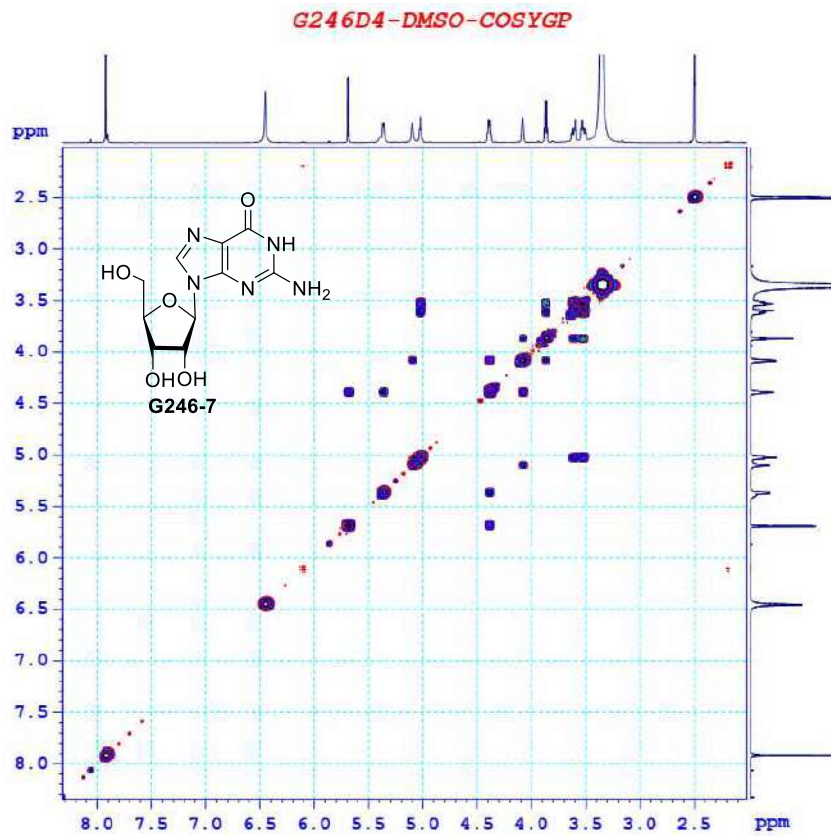
Phổ DEPT của hợp chất **G246-7**



Phổ HSQC của hợp chất G246-7

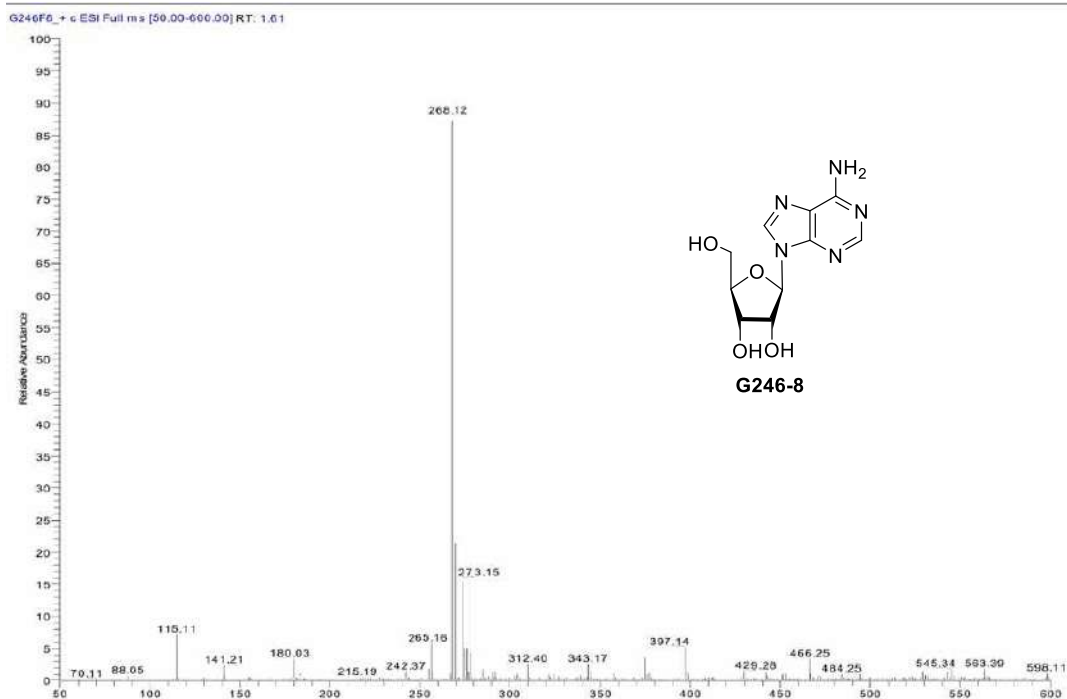


Phổ HMBC của hợp chất G246-7



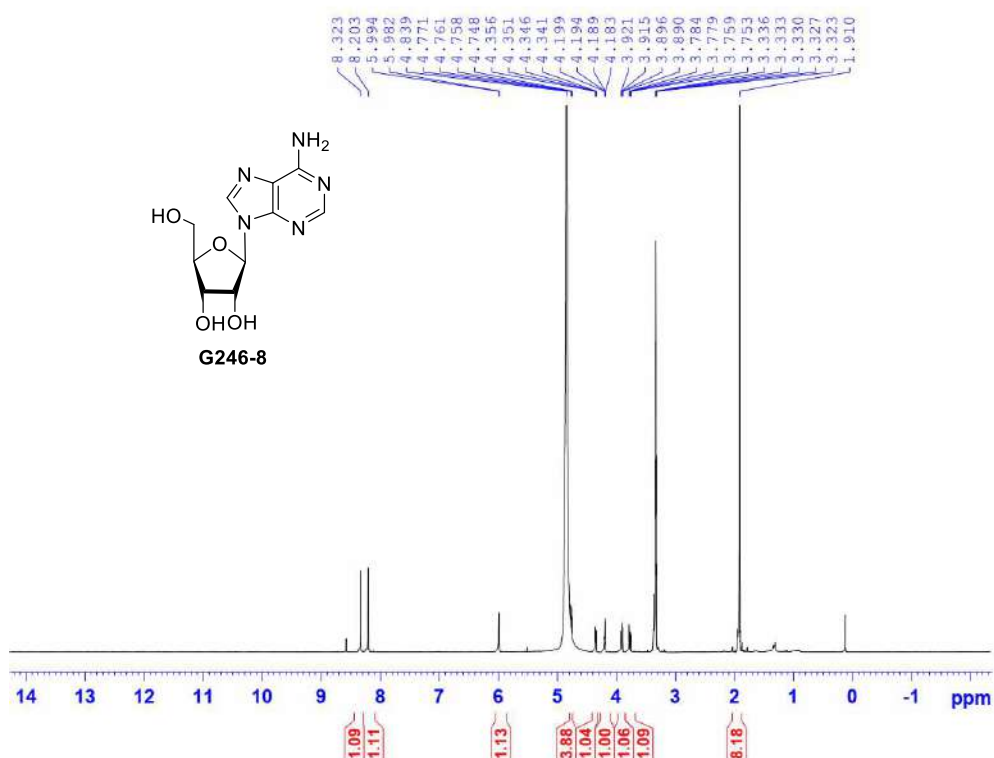
Phổ COSY của hợp chất G246-7

III.8. Hợp chất adenosine (G246-8)



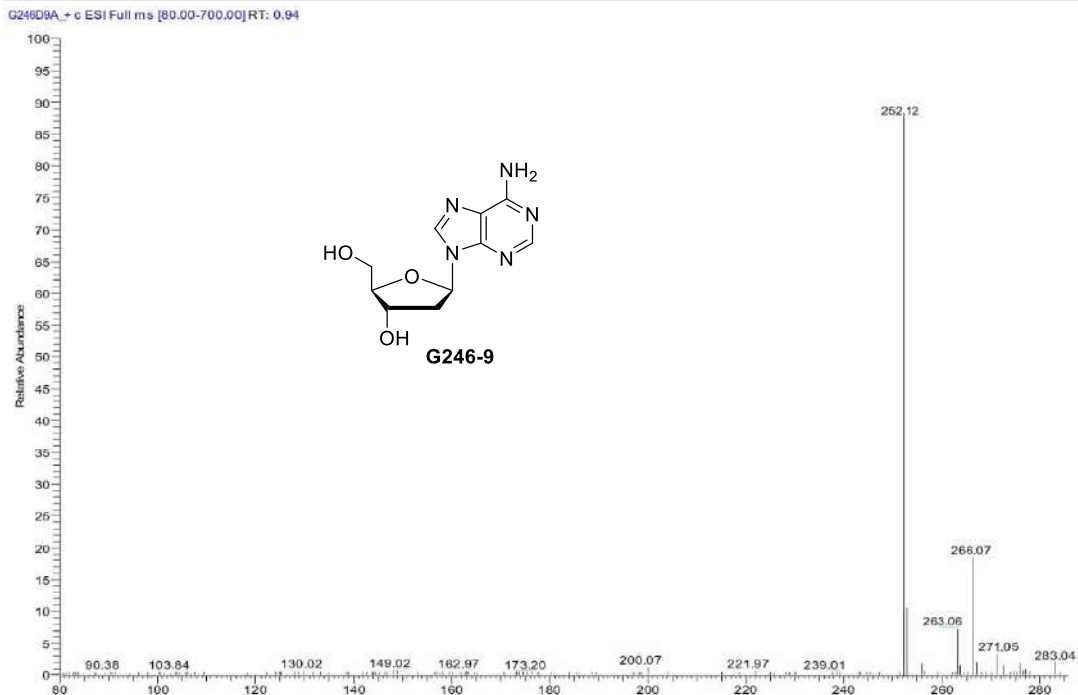
Phổ ESI-MS của hợp chất G246-8

G246D10A2-MeOD-1H



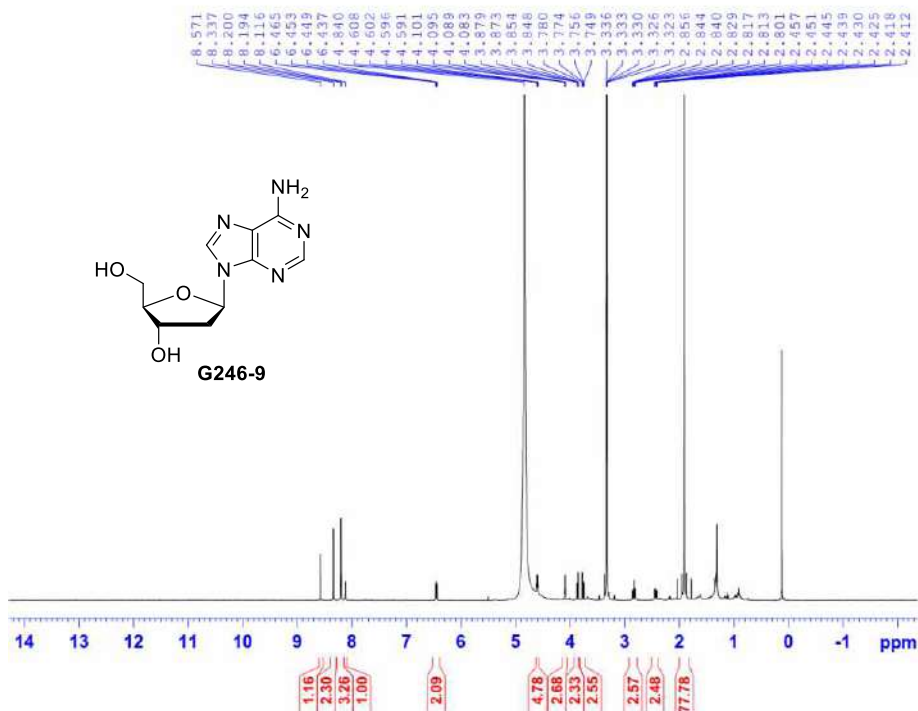
Phổ $^1\text{H-NMR}$ của hợp chất G246-8

III.9. Hợp chất 2'-deoxyadenosine (G246-9)



Phổ ESI-MS của hợp chất G246-9

G241D10A1-MeOD-1H



Phổ $^1\text{H-NMR}$ của hợp chất G246-9