

BỘ GIÁO DỤC  
VÀ ĐÀO TẠO

VIỆN HÀN LÂM KHOA HỌC  
VÀ CÔNG NGHỆ VIỆT NAM

HỌC VIỆN KHOA HỌC VÀ CÔNG NGHỆ



**Nguyễn Hoàng Nam**

**NGHIÊN CỨU PHÂN LẬP, XÁC ĐỊNH CẤU TRÚC VÀ HOẠT TÍNH  
ỨC CHẾ NO CỦA CÁC HỢP CHẤT THỨ CẤP TỪ CHỦNG VI NẤM  
BIẾN *Aspergillus* sp. CL251**

**LUẬN VĂN THẠC SĨ KHOA HỌC VẬT CHẤT**

*Hà Nội - 2025*

BỘ GIÁO DỤC  
VÀ ĐÀO TẠO

VIỆN HÀN LÂM KHOA HỌC  
VÀ CÔNG NGHỆ VIỆT NAM

HỌC VIỆN KHOA HỌC VÀ CÔNG NGHỆ



**Nguyễn Hoàng Nam**

**NGHIÊN CỨU PHÂN LẬP, XÁC ĐỊNH CẤU TRÚC VÀ HOẠT TÍNH  
ỨC CHẾ NO CỦA CÁC HỢP CHẤT THỨ CẤP TỪ CHỦNG VI NẤM  
BIẾN *Aspergillus* sp. CL251**

**LUẬN VĂN THẠC SĨ KHOA HỌC VẬT CHẤT**

**Chuyên ngành: Hóa hữu cơ**

**Mã số: 8 44 01 14**

**NGƯỜI HƯỚNG DẪN KHOA HỌC :**

A handwritten signature in blue ink, appearing to read 'TH', is written over a horizontal line.

**TS. Trần Hồng Quang**

*Hà Nội - 2025*

## LỜI CAM ĐOAN

*Tôi xin cam đoan đề tài nghiên cứu trong luận văn này là công trình nghiên cứu của tôi dưới sự hướng dẫn khoa học của TS. Trần Hồng Quang. Các kết quả nghiên cứu đảm bảo tính trung thực và khách quan nhất. Đồng thời các kết quả trong luận văn này là trung thực, không sao chép từ bất kỳ một nguồn nào và dưới bất kỳ hình thức nào. Việc tham khảo các nguồn tài liệu đã được thực hiện trích dẫn và ghi nguồn tài liệu tham khảo đúng quy định. Các số liệu, kết quả nêu trong luận văn là trung thực nếu sai tôi hoàn chịu trách nhiệm trước pháp luật.*

**Tác giả**



**Nguyễn Hoàng Nam**

## LỜI CẢM ƠN

Lời đầu tiên, tôi xin gửi lời cảm ơn chân thành đến các giảng viên trong khoa Hóa học của Học Viện Khoa học và Công nghệ Việt Nam đã tận tình giảng dạy, truyền đạt kiến thức, kinh nghiệm quý báu trong suốt quá trình tôi học tập và nghiên cứu.

Tôi xin bày tỏ lời cảm ơn sâu sắc đến TS. Trần Hồng Quang – người thầy đã tận tình hướng dẫn, chỉ bảo cho tôi về chuyên môn, đồng thời động viên, khích lệ và tạo điều kiện thuận lợi nhất cho tôi trong suốt thời gian thực hiện luận văn tại Viện Hóa sinh biển.

Tôi xin cảm ơn lãnh đạo và các đồng nghiệp phòng Công nghệ Hóa dược đã tạo điều kiện giúp đỡ, truyền kinh nghiệm, đưa ra những lời khuyên bổ ích và góp ý quý báu trong suốt thời gian tôi làm việc tại phòng.

Tôi xin trân trọng cảm ơn ban lãnh đạo và các cán bộ đang công tác tại Viện Hóa sinh biển, Viện Công nghệ sinh học, Viện Hóa học và Học viện Khoa học và Công nghệ đã giúp đỡ tôi trong việc học tập và thực hiện luận văn.

Sau cùng, tôi xin bày tỏ lòng biết ơn chân thành tới bố, mẹ, những người thân và bạn bè đã luôn bên cạnh quan tâm, khích lệ, hỗ trợ tôi về mặt tinh thần để tôi có thể hoàn thành luận văn tốt nghiệp này.

Luận văn được giúp đỡ về mặt kinh phí và thực hiện trong khuôn khổ Đề tài cơ sở chọn lọc mã số CSCL38.01/25-26.

Học viên



**Nguyễn Hoàng Nam**

## MỤC LỤC

LỜI CAM ĐOAN .....	3
LỜI CẢM ƠN .....	4
MỞ ĐẦU .....	1
CHƯƠNG 1. TỔNG QUAN.....	3
1.1. Vi nấm biển và tầm quan trọng của việc nghiên cứu các hợp chất tự nhiên từ vi nấm biển.....	3
1.1.1. Tổng quan về vi nấm biển.....	3
1.1.2. Tầm quan trọng của việc nghiên cứu các hợp chất từ vi nấm biển .....	4
1.2. Giới thiệu chung về chi <i>Aspergillus</i> .....	8
1.3. Tình hình nghiên cứu trong và trên thế giới .....	9
1.3.1. Tình hình nghiên cứu trên thế giới.....	9
1.3.2. Tình hình nghiên cứu trong nước.....	18
CHƯƠNG 2. ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU.....	20
2.1. Nguyên liệu, hóa chất và thiết bị nghiên cứu.....	20
2.1.1. Nguyên liệu và hóa chất.....	20
2.1.2. Thiết bị nghiên cứu .....	21
2.2. Phương pháp nghiên cứu.....	21
2.2.1. Phương pháp tạo dịch chiết vi nấm biển.....	21
2.2.2. Các phương pháp phân lập hợp chất.....	21
2.2.3. Phương pháp nuôi cấy tế bào và đánh giá hoạt tính sinh học.....	25
CHƯƠNG 3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN.....	27
3.1. Nhân sinh khối lượng lớn và tạo cao chiết tổng chủng <i>Aspergillus</i> sp. CL251.....	27
3.2. Phân lập các hợp chất.....	27
3.3. Xác định cấu trúc hóa học của các hợp chất .....	28
3.3.1. Hợp chất CL251.1: (aS)-Asperpyrone A.....	29
3.3.2. Hợp chất CL251.2: (aS)-Fonsecinone A .....	34
3.3.3. Hợp chất CL251.3: (aS)-Dianhydro-aurasperone C.....	39
3.3.4. Hợp chất CL251.4: (aS)-Aurasperone A .....	44
3.3.5. Hợp chất CL251.5: Asperazine .....	48
3.3.6. Hợp chất CL251.6: Asperazine A .....	54
3.3.7. Hợp chất CL251.7: WIN 64821 .....	58
3.4. Xác định cấu trúc các hợp chất .....	63
3.5. Đánh giá hoạt tính ức chế nitric oxide của các hợp chất .....	63
KẾT LUẬN VÀ KIẾN NGHỊ.....	65

## DANH MỤC HÌNH

Hình 1.1. Một số loại kháng sinh được phân lập từ vi nấm biển .....	7
Hình 1.2. Một số loài vi nấm biển thuộc chi <i>Aspergillus</i> .....	9
Hình 1.3. Cấu trúc hóa học của các hợp chất được phân lập từ vi nấm biển <i>Aspergillus</i> sp. ZL0-1b14.....	10
Hình 1.4. Cấu trúc hóa học của các hợp chất được phân lập từ vi nấm biển <i>Aspergillus flocculosus</i> .....	11
Hình 1.5. Cấu trúc hóa học của các hợp chất <b>10-15</b> .....	12
Hình 1.6. Cấu trúc hóa học của hợp chất được phân lập từ vi nấm biển <i>Aspergillus</i> sp. SF-6354 .....	12
Hình 1.7. Cấu trúc hóa học của các hợp chất được phân lập từ vi nấm biển <i>Aspergillus</i> sp. SF-5974 và <i>Aspergillus</i> sp. SF-5976 .....	13
Hình 1.8. Cấu trúc hóa học của các hợp chất được phân lập từ vi nấm biển <i>Aspergillus terreus</i> .....	14
Hình 1.9. Cấu trúc hóa học của các hợp chất được phân lập từ vi nấm biển <i>Aspergillus europaeus</i> WZXY-SX-4-1 .....	15
Hình 1.10. Cấu trúc hóa học của các hợp chất được phân lập từ vi nấm biển <i>Aspergillus rugulosa</i> .....	16
Hình 1.11. Cấu trúc hóa học của các hợp chất các hợp chất được phân lập từ vi nấm biển <i>Aspergillus terreus</i> GZU-31-1 .....	17
Hình 1.12. Cấu trúc hóa học của các hợp chất các hợp chất được phân lập từ vi nấm biển <i>Aspergillus</i> sp. FS 445.....	18
Hình 1.13. Cấu trúc hóa học của các hợp chất các hợp chất được phân lập từ vi nấm biển <i>Aspergillus</i> sp. IMBC-FP2.05 .....	19
Hình 2.1. Sơ đồ nguyên lý hoạt động máy phổ khối .....	23
Hình 3.1. Sơ đồ phân lập các hợp chất từ loài <i>Aspergillus</i> sp. CL251 .....	27
Hình 3.2. Cấu trúc hóa học và tương tác HMBC ( $\rightarrow$ ) của hợp chất <b>CL251.1</b> .....	129
Hình 3.3. Phổ HRESIMS của hợp chất <b>CL251.1</b> .....	32
Hình 3.4. Phổ $^1\text{H}$ NMR ( $\text{CDCl}_3$ , 600 MHz) của hợp chất <b>CL251.1</b> .....	32
Hình 3.5. Phổ $^{13}\text{C}$ NMR ( $\text{CDCl}_3$ , 150 MHz) của hợp chất <b>CL251.1</b> .....	33
Hình 3.6. Phổ HSQC ( $\text{CDCl}_3$ , 600 MHz) của hợp chất <b>CL251.1</b> .....	33
Hình 3.7. Phổ HMBC ( $\text{CDCl}_3$ , 600 MHz) của hợp chất <b>CL251.1</b> .....	34
Hình 3.8. Cấu trúc hóa học và tương tác HMBC ( $\rightarrow$ ) của hợp chất <b>CL251.2</b> .....	234
Hình 3.9. Phổ HRESIMS của hợp chất <b>CL251.2</b> .....	36
Hình 3.10. Phổ $^1\text{H}$ NMR ( $\text{CDCl}_3$ , 600 MHz) của hợp chất <b>CL251.2</b> .....	37
Hình 3.11. Phổ $^{13}\text{C}$ NMR ( $\text{CDCl}_3$ , 150 MHz) của hợp chất <b>CL251.2</b> .....	37
Hình 3.12. Phổ HSQC ( $\text{CDCl}_3$ , 600 MHz) của hợp chất <b>CL251.2</b> .....	38
Hình 3.13. Phổ HMBC ( $\text{CDCl}_3$ , 600 MHz) của hợp chất <b>CL251.2</b> .....	38
Hình 3.14. Cấu trúc hóa học và tương tác HMBC ( $\rightarrow$ ) của hợp chất <b>CL251.3</b> .....	39
Hình 3.15. Phổ HRESIMS của hợp chất <b>CL251.3</b> .....	41
Hình 3.16. Phổ $^1\text{H}$ NMR ( $\text{CDCl}_3$ , 600 MHz) của hợp chất <b>CL251.3</b> .....	42

Hình 3.17. Phổ $^{13}\text{C}$ NMR ( $\text{CDCl}_3$ , 150 MHz) của hợp chất <b>CL251.3</b> .....	42
Hình 3.18. Phổ HSQC ( $\text{CDCl}_3$ , 600 MHz) của hợp chất <b>CL251.3</b> .....	43
Hình 3.19. Phổ HMBC ( $\text{CDCl}_3$ , 600 MHz) của hợp chất <b>CL251.3</b> .....	43
Hình 3.20. Cấu trúc hóa học và tương tác HMBC ( $\rightarrow$ ) của hợp chất <b>CL251.4</b> .....	44
Hình 3.21. Phổ HRESIMS của hợp chất <b>CL251.4</b> .....	46
Hình 3.22. Phổ $^1\text{H}$ NMR ( $\text{CDCl}_3$ , 600 MHz) của hợp chất <b>CL251.4</b> .....	46
Hình 3.23. Phổ $^{13}\text{C}$ NMR ( $\text{CDCl}_3$ , 150 MHz) của hợp chất <b>CL251.4</b> .....	47
Hình 3.24. Phổ HSQC ( $\text{CDCl}_3$ , 600 MHz) của hợp chất <b>CL251.4</b> .....	47
Hình 3.25. Phổ HMBC ( $\text{CDCl}_3$ , 600 MHz) của hợp chất <b>CL251.4</b> .....	48
Hình 3.26. Cấu trúc hóa học và tương tác HMBC ( $\rightarrow$ ) của hợp chất <b>CL251.5</b> .....	48
Hình 3.27. Phổ HRESIMS của hợp chất <b>CL251.5</b> .....	51
Hình 3.28. Phổ $^1\text{H}$ NMR ( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 600 MHz) của hợp chất <b>CL251.5</b> .....	52
Hình 3.29. Phổ $^{13}\text{C}$ NMR ( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 150 MHz) của hợp chất <b>CL251.5</b> .....	52
Hình 3.30. Phổ HSQC ( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 600 MHz) của hợp chất <b>CL251.5</b> .....	53
Hình 3.31. Phổ HMBC ( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 600 MHz) của hợp chất <b>CL251.5</b> .....	53
Hình 3.32. Cấu trúc hóa học và tương tác HMBC ( $\rightarrow$ ) của hợp chất <b>CL251.6</b> .....	54
Hình 3.33. Phổ HRESIMS của hợp chất <b>CL251.6</b> .....	56
Hình 3.34. Phổ $^1\text{H}$ NMR ( $\text{DMSO-d}_6$ , 600 MHz) của hợp chất <b>CL251.6</b> .....	56
Hình 3.35. Phổ $^{13}\text{C}$ NMR ( $\text{DMSO-d}_6$ , 150 MHz) của hợp chất <b>CL251.6</b> .....	57
Hình 3.36. Phổ HSQC ( $\text{DMSO-d}_6$ , 600 MHz) của hợp chất <b>CL251.6</b> .....	57
Hình 3.37. Phổ HMBC ( $\text{DMSO-d}_6$ , 600 MHz) của hợp chất <b>CL251.6</b> .....	58
Hình 3.38. Cấu trúc hóa học và tương tác HMBC ( $\rightarrow$ ) của hợp chất <b>CL251.7</b> .....	58
Hình 3.39. Phổ HRESIMS của hợp chất <b>CL251.7</b> .....	60
Hình 3.40. Phổ $^1\text{H}$ NMR ( $\text{DMSO-d}_6$ , 600 MHz) của hợp chất <b>CL251.7</b> .....	61
Hình 3.41. Phổ $^{13}\text{C}$ NMR ( $\text{DMSO-d}_6$ , 150 MHz) của hợp chất <b>CL251.7</b> .....	61
Hình 3.42. Phổ HSQC ( $\text{DMSO-d}_6$ , 600 MHz) của hợp chất <b>CL251.7</b> .....	62
Hình 3.43. Phổ HMBC ( $\text{DMSO-d}_6$ , 600 MHz) của hợp chất <b>CL251.7</b> .....	62
Hình 3.44. Cấu trúc hóa học của các hợp chất <b>CL251.1–CL251.7</b> .....	63

## DANH MỤC BẢNG

-Bảng 3.1. Số liệu phổ $^1\text{H}$ và $^{13}\text{C}$ NMR của hợp chất <b>CL251.1</b> .....	31
Bảng 3.2. Số liệu phổ $^1\text{H}$ và $^{13}\text{C}$ NMR của hợp chất <b>CL251.2</b> .....	35
Bảng 3.3. Số liệu phổ $^1\text{H}$ và $^{13}\text{C}$ NMR của hợp chất <b>CL251.3</b> .....	40
Bảng 3.4. Số liệu phổ $^1\text{H}$ và $^{13}\text{C}$ NMR của hợp chất <b>CL251.4</b> .....	45
Bảng 3.5. Phổ $^1\text{H}$ và $^{13}\text{C}$ NMR của hợp chất <b>CL251.5</b> .....	50
Bảng 3.6. Phổ $^1\text{H}$ và $^{13}\text{C}$ NMR của hợp chất <b>CL251.6</b> .....	55
Bảng 3.7. Phổ $^1\text{H}$ và $^{13}\text{C}$ NMR của hợp chất <b>CL251.7</b> .....	59
Bảng 3.8. Hoạt tính ức chế NO của các hợp chất <b>CL251.5 – CL251.7</b> .	64

**DANH MỤC KÝ HIỆU, CHỮ VIẾT TẮT**

<b>Ký hiệu</b>	<b>Tiếng Anh</b>	<b>Tiếng Việt</b>
<sup>13</sup> C-NMR	Carbon-13 Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy	Phổ cộng hưởng từ hạt nhân carbon 13
<sup>1</sup> H-NMR	Proton Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy	Phổ cộng hưởng từ hạt nhân proton
HR-ESI-MS	High Resolution Electrospray Ionization Mass Spectrometry	Khối phổ phân giải cao
HMBC	Heteronuclear Multiple Bond Correlation	Phổ tương tác dị hạt nhân qua nhiều liên kết
HPLC	High Performance Liquid Chromatography	Sắc ký lỏng hiệu năng cao
HSQC	Heteronuclear Single Quantum Coherence	Phổ tương tác dị hạt nhân qua một liên kết
TLC	Thin layer chromatography	Sắc ký bản mỏng
CC	Column Chromatography	Sắc kí cột
CD	Circular Dichroism spectrum	Phổ lưỡng sắc tròn
DMSO	Dimethylsulfoxide	Dimethylsulfoxide
t <sub>R</sub>	Retention time	Thời gian lưu
IC <sub>50</sub>	half-maximal inhibitory concentration	Nồng độ ức chế 50%
MIC	Minimum Inhibitory Concentration	Nồng độ ức chế tối thiểu
PDA	Potato Dextrose Agar	Agar khoai tây đường
PDB	Potato Dextrose Broth	Dịch nuôi cấy khoai tây – dextrose
LPS	Lipopolysaccharide	Lipopolysaccharide màng ngoài
THP-1	Tamm-Horsfall Protein 1	Dòng tế bào đại thực bào từ người

## MỞ ĐẦU

Trong những thập kỷ gần đây, nghiên cứu về vi nấm biển đã thu hút sự quan tâm đặc biệt của các nhà khoa học trên thế giới nhờ vào tiềm năng sinh học phong phú và ứng dụng rộng rãi trong nhiều lĩnh vực, đặc biệt là y dược. Vi nấm biển là một nhóm vi sinh vật đặc biệt sống trong môi trường biển, có khả năng tổng hợp nhiều hợp chất thứ cấp với hoạt tính sinh học mạnh. Các nghiên cứu cho thấy vi nấm biển sản sinh nhiều hợp chất có khả năng kháng khuẩn, kháng nấm, chống ung thư, chống oxy hóa và kháng virus, mở ra cơ hội lớn trong việc phát triển dược phẩm mới, đặc biệt trong bối cảnh các bệnh truyền nhiễm do vi khuẩn kháng kháng sinh đang gia tăng [1]

Trên thế giới, các quốc gia có nền khoa học phát triển như Hoa Kỳ, Nhật Bản, Trung Quốc và Đức đã có nhiều công trình nghiên cứu chuyên sâu về vi nấm biển. Nhiều hợp chất hoạt tính sinh học được phân lập từ vi nấm biển đã được công bố với tiềm năng ứng dụng trong điều trị ung thư và các bệnh truyền nhiễm. Chẳng hạn, một số hợp chất từ chi vi nấm biển *Aspergillus* và *Penicillium* có hoạt tính kháng khuẩn mạnh chống lại vi khuẩn Gram dương và Gram âm, trong khi các hợp chất polyketide từ chi *Talaromyces* được chứng minh có tác dụng ức chế tế bào ung thư [2, 3]. Đặc biệt, các nghiên cứu đã phát hiện ra nhiều hợp chất chống oxy hóa từ vi nấm biển có khả năng bảo vệ tế bào khỏi tổn thương do stress oxy hóa, mở ra hướng đi mới trong phát triển thực phẩm chức năng và mỹ phẩm sinh học [4].

Tại Việt Nam, nghiên cứu về vi nấm biển tuy còn khá mới mẻ nhưng đã có những bước tiến đáng kể trong những năm gần đây. Các nhà khoa học Việt Nam đã tập trung vào việc phân lập, định danh các chủng vi nấm biển từ môi trường tự nhiên như vùng ven biển miền Trung, Vịnh Nha Trang, quần đảo Trường Sa và Hoàng Sa. Một số nghiên cứu ban đầu đã ghi nhận nhiều chủng vi nấm biển thuộc các chi phổ biến như *Aspergillus*, *Penicillium*, *Chaetomium* và *Talaromyces*, trong đó có các chủng có khả năng sinh tổng hợp hợp chất có hoạt tính kháng khuẩn và chống ung thư [5]. Ngoài ra, việc ứng dụng công nghệ sinh học để tối ưu hóa điều kiện nuôi cấy nhằm tăng cường sản xuất các hợp chất sinh học từ vi nấm biển cũng đang được triển khai tại một số viện nghiên cứu và trường đại học trong nước. Việc nghiên cứu vi nấm biển mở ra

nhiều cơ hội ứng dụng trong dược phẩm và bảo vệ sức khỏe con người. Các nghiên cứu đã chỉ ra rằng vi nấm biến đóng vai trò quan trọng trong việc phát triển các loại kháng sinh mới chống lại các bệnh nhiễm trùng do vi khuẩn, đặc biệt là các loại vi khuẩn kháng kháng sinh đang nổi lên hiện nay [6].

#### **Mục tiêu của luận văn**

- Phân lập, xác định được cấu trúc hóa học của một số hợp chất từ chủng vi nấm biến *Aspergillus* sp. CL251
- Đánh giá hoạt tính ức chế nitric oxide của các hợp chất phân lập được.

#### **Nội dung luận văn bao gồm:**

1. Tạo cao chiết tổng chủng vi nấm biến *Aspergillus* sp. CL251
2. Phân lập một số hợp chất từ cao chiết tổng của chủng vi nấm biến *Aspergillus* sp. CL251
3. Xác định cấu trúc hóa học của các hợp chất phân lập được.
4. Đánh giá hoạt tính ức chế nitric oxide của một số hợp chất phân lập được.

## CHƯƠNG 1. TỔNG QUAN

### 1.1. Vi nấm biển và tầm quan trọng của việc nghiên cứu các hợp chất tự nhiên từ vi nấm biển

#### 1.1.1. Tổng quan về vi nấm biển

Vi nấm biển là một nhóm vi sinh vật nhân chuẩn đặc biệt, sinh sống trong môi trường biển và có khả năng tổng hợp nhiều hợp chất thứ cấp với hoạt tính sinh học mạnh. Không giống như nấm trên cạn, vi nấm biển phát triển và thích nghi với điều kiện đặc biệt của đại dương, bao gồm độ mặn cao, áp suất lớn, nhiệt độ biến đổi và sự cạnh tranh sinh học khốc liệt. Điều này giúp chúng có khả năng sinh tổng hợp các hợp chất hóa học độc đáo, có tiềm năng ứng dụng trong y dược, công nghệ sinh học và nhiều lĩnh vực khác. Nấm sinh sản theo hai hình thức là hữu tính hoặc vô tính, chủ yếu thông qua bào tử được tạo ra trên các cấu trúc đặc biệt. Một số loài không có khả năng hình thành các cấu trúc sinh sản đặc biệt mà sinh sản theo hình thức sinh dưỡng.

Vi nấm biển thuộc nhóm nấm sợi hoặc nấm men, có kích thước từ vài micromet đến vài trăm micromet và được bao bọc bởi thành tế bào chứa chitin. Các loài vi nấm biển phổ biến thuộc các chi như *Aspergillus*, *Penicillium*, *Cladosporium*, *Chaetomium*, *Talaromyces* và *Phoma*. Trong đó, *Aspergillus* và *Penicillium* là hai chi có số lượng loài lớn nhất, được nghiên cứu nhiều nhất về hoạt tính sinh học. Vi nấm biển có thể tồn tại dưới dạng tự do trong nước biển hoặc cộng sinh với sinh vật biển như san hô, rong biển, bọt biển và động vật không xương sống khác. Chúng phát triển bằng cách hấp thụ các chất dinh dưỡng từ môi trường sống, đồng thời sản sinh nhiều hợp chất hóa học để tự vệ hoặc tương tác với các sinh vật khác.

Vi nấm biển đóng vai trò quan trọng trong hệ sinh thái, góp phần phân hủy vật chất hữu cơ và tham gia vào chu trình trao đổi chất. Nhiều loài có lợi, chẳng hạn như các vi sinh vật phân giải trong đất, thường không thể quan sát bằng mắt thường. Vi nấm biển cũng được coi là một trong những nguồn thực phẩm của con người, góp phần vào quá trình lên men các loại thực phẩm như rượu, bia, bánh mì, nước tương... Chúng là nguồn cung cấp enzym phong phú

cho ngành công nghiệp thực phẩm và đóng vai trò quan trọng trong sản xuất thuốc kháng sinh, thuốc trừ sâu, cũng như các chế phẩm diệt côn trùng. Bên cạnh đó, vi nấm biển còn tạo ra nhiều hợp chất tự nhiên có giá trị dược tính cao.

Vi nấm biển có tầm quan trọng lớn trong hệ sinh thái đại dương [7]. Nhiều nghiên cứu chỉ ra rằng chúng đóng vai trò quan trọng trong các chu trình dinh dưỡng gồm phân hủy các chất hữu cơ trong hệ sinh thái biển và tái tạo chất dinh dưỡng [8]. Ngoài việc sản sinh các hợp chất tự nhiên có giá trị dược tính, vi nấm biển còn đóng vai trò quan trọng trong hệ sinh thái với nhiều chức năng sinh thái khác nhau, bao gồm ký sinh và cộng sinh với các sinh vật biển [9] cũng như tham gia vào quá trình khử nitơ trong trầm tích biển [10]. Điều này cho thấy vi nấm biển không chỉ cần thiết cho sự cân bằng của hệ sinh thái đại dương mà còn ảnh hưởng đến sự tồn tại của nhiều nhóm sinh vật khác [11]. Tuy nhiên, bên cạnh những lợi ích sinh học, một số loài vi nấm biển có thể sản sinh độc tố vi nấm biển (mycotoxin), gây ảnh hưởng đến sức khỏe con người và động vật. Các chi vi nấm biển như *Penicillium*, *Aspergillus* và *Neurospora* thường gây hư hỏng thực phẩm như trái cây và bánh mì, làm giảm chất lượng và ảnh hưởng đến quá trình bảo quản. Mặc dù vậy, nhiều loài vi nấm biển cũng có giá trị thương mại cao, được ứng dụng trong sản xuất kháng sinh, dược phẩm và enzyme. Ngày nay, một số loại nấm còn được sử dụng trong hỗ trợ điều trị và phòng ngừa các bệnh nghiêm trọng như viêm gan, mỡ máu, đột quỵ và ung thư. Tuy nhiên, một số hợp chất hoạt tính sinh học do vi nấm biển tạo ra, bao gồm alkaloid và polyketide, có thể gây độc đối với con người và động vật nếu tích lũy ở mức độ cao. Ngoài ra, một số loài vi nấm biển còn là tác nhân gây bệnh cho động vật, cây trồng và con người, có khả năng dẫn đến dịch bệnh, ảnh hưởng nghiêm trọng đến an ninh lương thực và nền kinh tế.

### **1.1.2. Tầm quan trọng của việc nghiên cứu các hợp chất từ vi nấm biển**

Vi nấm biển là một nguồn tài nguyên sinh học phong phú với tiềm năng lớn trong việc cung cấp các hợp chất tự nhiên có hoạt tính sinh học cao. Các nghiên cứu gần đây đã chỉ ra rằng vi nấm biển có khả năng sản sinh nhiều hợp

chất thứ cấp với cấu trúc hóa học đa dạng và có giá trị trong nhiều lĩnh vực khác nhau, bao gồm y học, công nghiệp dược phẩm và công nghệ sinh học.

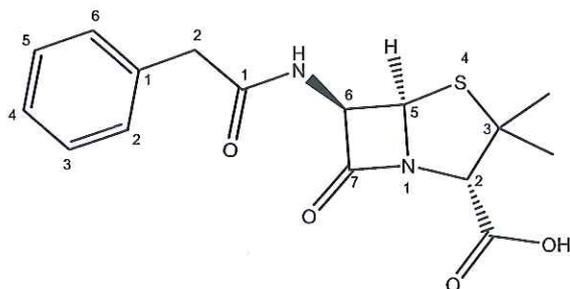
Trước hết, các hợp chất từ vi nấm biển đóng vai trò quan trọng trong nghiên cứu và phát triển dược phẩm. Nhiều hợp chất có nguồn gốc từ vi nấm biển đã được chứng minh có hoạt tính kháng khuẩn, kháng vi rút, kháng ung thư và kháng viêm mạnh mẽ. Ví dụ như hợp chất Dideoxyverticillin A có nguồn gốc từ chi vi nấm biển *Penicillium* có tác dụng ức chế kinase EGFR cực mạnh ( $IC_{50} = 0,14$  nM), chống tạo mạch và chống tế bào ung thư. Trong bối cảnh gia tăng tình trạng kháng kháng sinh, việc phát hiện các hợp chất mới từ vi nấm biển có thể mở ra hướng đi đầy triển vọng cho ngành y học hiện đại.

Bên cạnh đó, nghiên cứu các hợp chất từ vi nấm biển còn có ý nghĩa lớn trong ngành công nghệ sinh học và công nghiệp thực phẩm. Một số enzyme do vi nấm biển sản xuất, chẳng hạn như lipase và protease, được ứng dụng rộng rãi trong chế biến thực phẩm, sản xuất dược phẩm cũng như trong xử lý môi trường. Ngoài ra, các hợp chất có hoạt tính chống oxy hóa từ vi nấm biển cũng đang được quan tâm trong lĩnh vực mỹ phẩm và thực phẩm chức năng nhằm bảo vệ tế bào khỏi tổn thương do stress oxy hóa.

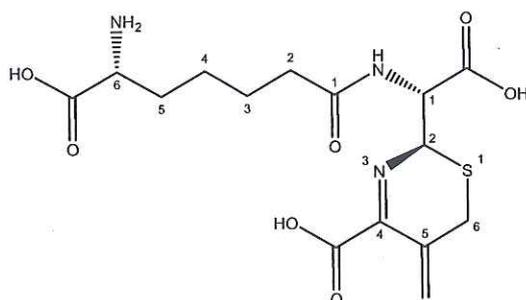
Không chỉ có giá trị về mặt y dược, nghiên cứu hợp chất từ vi nấm biển còn đóng góp quan trọng vào bảo vệ hệ sinh thái biển. Việc hiểu rõ cơ chế sinh tổng hợp và chức năng của các hợp chất do vi nấm biển sản sinh có thể giúp các nhà khoa học phát triển các phương pháp kiểm soát sinh học để bảo vệ rạn san hô, kiểm soát sự phát triển của các loài sinh vật gây hại và duy trì sự cân bằng của hệ sinh thái biển.

Griseofulvin là một hợp chất kháng nấm có nguồn gốc từ vi nấm biển, được phân lập lần đầu tiên từ chủng nấm *Penicillium griseofulvum* vào năm 1939 [12]. Sau đó, hợp chất này cũng được tìm thấy ở một số loài *Penicillium* khác như *Penicillium patulum* và *Penicillium nigricans*. Griseofulvin thuộc nhóm polyketide và có tác dụng ức chế sự phát triển của nấm bằng cách liên kết với protein tubulin, làm gián đoạn quá trình hình thành vi ống (microtubules) trong tế bào nấm, từ đó cản trở quá trình phân bào. Do cơ chế này, griseofulvin chủ yếu được sử dụng trong điều trị các bệnh nhiễm nấm da, móng và tóc do các loài nấm thuộc nhóm *Dermatophytes* gây ra, chẳng hạn như *Trichophyton*, *Microsporum* và *Epidermophyton*.

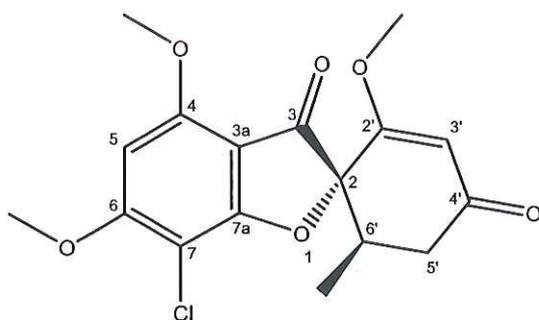
Fusidic acid là một kháng sinh tự nhiên được phân lập từ *Fusidium coccineum*, một loại vi nấm biển thuộc nhóm *Ascomycota* [13]. Hợp chất này lần đầu tiên được phát hiện vào năm 1960 bởi Gottlieb và cộng sự. Fusidic acid thuộc nhóm steroid kháng sinh và có cấu trúc hóa học độc đáo, khác biệt so với các nhóm kháng sinh thông thường như  $\beta$ -lactam hay aminoglycoside. Cơ chế tác dụng của fusidic acid là ức chế yếu tố kéo dài EF-G (elongation factor G), một protein thiết yếu trong quá trình tổng hợp protein của vi khuẩn, từ đó ngăn chặn sự phát triển của vi khuẩn [14]. Fusidic acid có phổ tác dụng hẹp, chủ yếu chống lại vi khuẩn Gram dương, đặc biệt là *Staphylococcus aureus*, bao gồm cả các chủng kháng methicillin (MRSA) [15]. Hiện nay, fusidic acid được sử dụng rộng rãi trong điều trị các bệnh nhiễm khuẩn da, viêm xương tủy và nhiễm khuẩn hệ hô hấp do vi khuẩn Gram dương nhạy cảm gây ra.



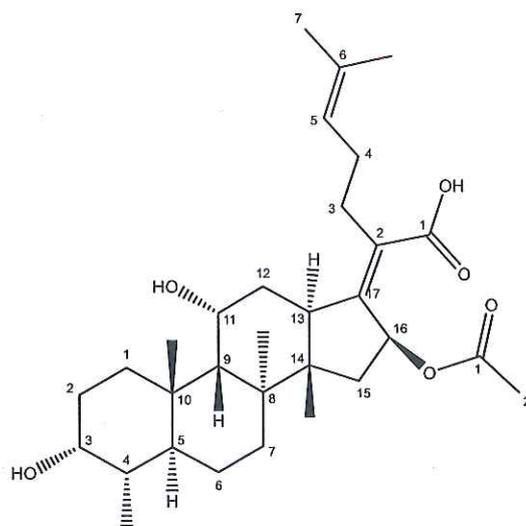
Penicillium G



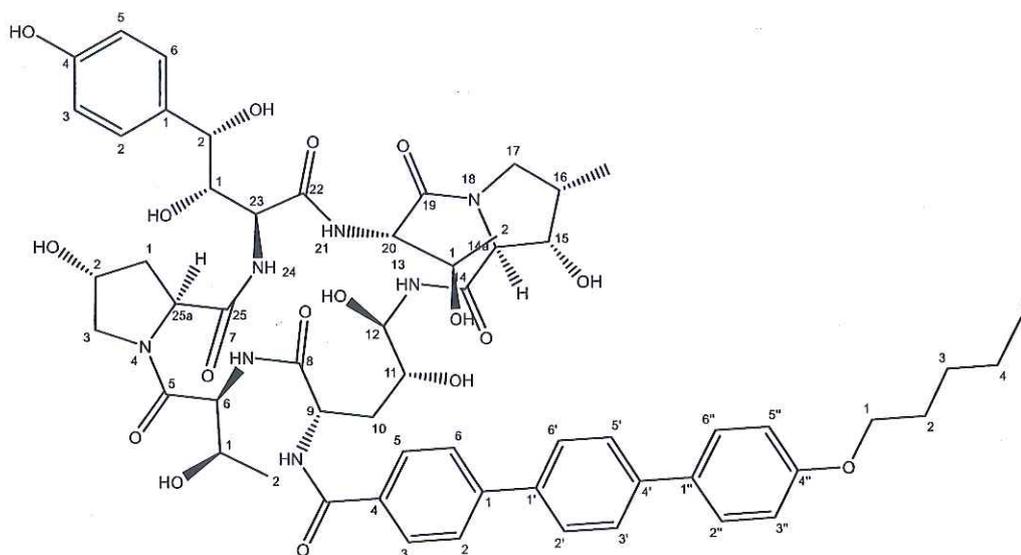
Cephalosporin



Griseofulvin



Fusidic acid



Anidulafungin

### Hình 1.1. Một số loại kháng sinh được phân lập từ vi nấm biển

Ngoài các hợp chất quen thuộc có nguồn gốc từ vi nấm biển như fusidic acid và griseofulvin, nhiều loại thuốc kháng nấm mới đã được phát triển dựa trên các hợp chất có nguồn gốc từ vi nấm biển. Tiêu biểu trong số đó là anidulafungin (Eraxis), được tổng hợp bán phần để tối ưu hóa hiệu quả điều trị [16, 17]. Bên cạnh đó, nhóm statin, vốn đóng vai trò quan trọng trong điều trị bệnh mạch vành, cũng có nguồn gốc từ các hợp chất tự nhiên. Cụ thể, mevastatin và lovastatin – hai statin điển hình – lần đầu tiên được phân lập từ vi nấm biển *Penicillium citrinum* và *Aspergillus terreus*, mở ra hướng đi quan trọng trong nghiên cứu và phát triển dược phẩm từ vi nấm biển.

Vi nấm biển đã được chứng minh khả năng cung cấp phong phú các hợp chất tự nhiên mới. Nhờ vào môi trường sống đặc trưng với các yếu tố như nhiệt độ, hàm lượng dinh dưỡng, sự cạnh tranh sinh học và độ mặn, các loài vi nấm biển này đã tiến hóa để phát triển các con đường trao đổi chất thứ cấp, từ đó tạo ra nhiều hợp chất tự nhiên độc đáo với giá trị sinh học cao [18]. Một số chi và loài vi nấm biển đã được ghi nhận có khả năng sinh tổng hợp các hoạt chất quan trọng, cho thấy tiềm năng lớn trong nghiên cứu và ứng dụng y học [19].

Tuy nhiên, dù có nhiều tiềm năng, việc nghiên cứu vi nấm biển vẫn gặp nhiều thách thức. Một trong số đó là khó khăn trong việc nuôi cấy vi nấm

biển trong điều kiện phòng thí nghiệm để thu nhận đủ lượng hợp chất cần thiết cho nghiên cứu. Bên cạnh đó, quy trình chiết tách, xác định cấu trúc và thử nghiệm hoạt tính sinh học cũng đòi hỏi công nghệ hiện đại và sự đầu tư lớn về nhân lực, tài chính.

Tóm lại, nghiên cứu hợp chất từ vi nấm biển không chỉ mang lại tiềm năng lớn trong phát triển dược phẩm, công nghệ sinh học mà còn có ý nghĩa quan trọng đối với bảo vệ môi trường và hệ sinh thái. Việc tiếp tục đẩy mạnh nghiên cứu trong lĩnh vực này sẽ góp phần tìm ra những hợp chất mới có giá trị, đồng thời mở rộng hiểu biết của con người về hệ sinh thái biển giàu có và đầy tiềm năng này.

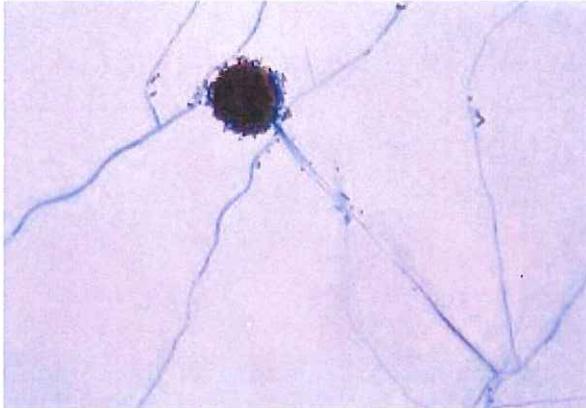
## 1.2. Giới thiệu chung về chi *Aspergillus*

Trong số tất cả các loại vi nấm có nguồn gốc từ biển, chi *Aspergillus* được biết đến nhiều nhất vì nó chiếm khoảng 31% các sản phẩm vi nấm biển tự nhiên từ năm 2010 đến năm 2013. Các vi nấm biển thuộc chi *Aspergillus* tạo ra các chất chuyển hóa có cấu trúc hóa học khác nhau, bao gồm acid béo, polyketide, sterol, alkaloid, terpenoid, peptide, butenolide và các loại khác, với nhiều hoạt tính sinh học, bao gồm hoạt tính kháng khuẩn, gây độc tế bào, diệt côn trùng, bảo vệ thần kinh và chống oxy hóa. Đánh giá các tài liệu hiện có liên quan đến các chất chuyển hóa có nguồn gốc từ biển thuộc chi *Aspergillus*, một nghiên cứu đã được tìm thấy chứng minh hoạt tính sinh học và cấu trúc hóa học của 512 chất chuyển hóa có nguồn gốc từ chi *Aspergillus*.

Chi *Aspergillus* rất phong phú về loài và những loài này có khả năng sản xuất một số lượng lớn extrolites, bao gồm các chất chuyển hóa thứ cấp, peptide/protein hoạt tính sinh học, lectin, enzyme, hydrophobin và aegerolysin. Extrolites là các hợp chất hóa học từ các sinh vật được tiết ra hoặc bám vào thành tế bào, trong màng tế bào, bám vào thành tế bào hoặc trong màng tế bào và được tích lũy lại. Bởi vì việc sản xuất các extrolite đa dạng như vậy, nhiều loài *Aspergillus* khác nhau đã được sử dụng trong công nghệ sinh học, cả cho sản xuất hóa chất số lượng lớn [20] và cũng dùng để sản xuất exoenzym. Có thể kể đến như: *Aspergillus niger*, *Aspergillus versicolor*, *Aspergillus oryzae*, *Aspergillus terreus*, *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus flavus*, ...

Có khoảng 250 loài được đặt tên trong chi *Aspergillus*, bao gồm cả những các loài đã được khai thác công nghiệp như: *A. niger*, *A. oryzae*, *A. awamori*, *A. sojae*, *A. terreus* và các loài gây hại, gây bệnh cho động thực vật (ví dụ: *A. fumigatus*, *A. parasiticus*, *A. flavus*) [21].

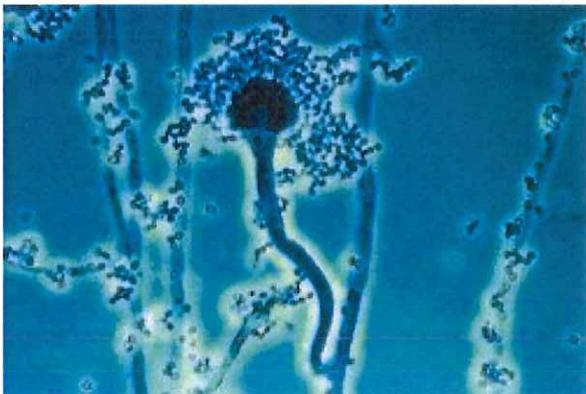
Một số hình ảnh về vi nấm biển thuộc chi *Aspergillus*:



*Aspergillus niger*



*Aspergillus oryzae*



*Aspergillus fumigatus*



*Aspergillus flavus*

Hình 1.2. Một số loài vi nấm biển thuộc chi *Aspergillus*

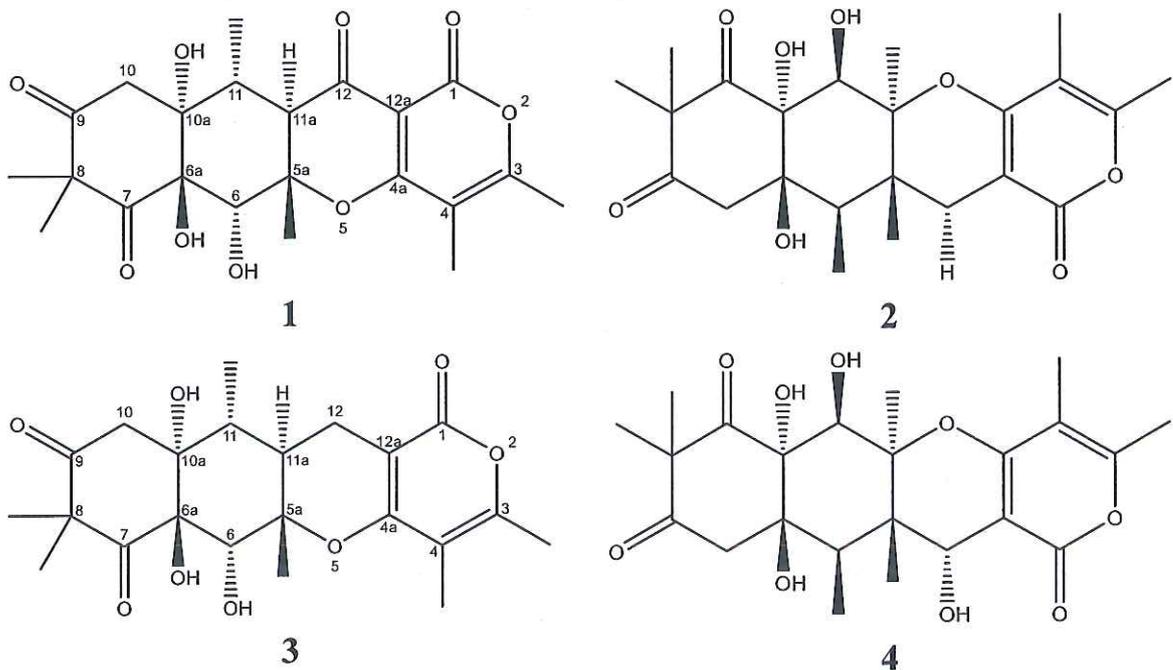
### 1.3. Tình hình nghiên cứu trong và trên thế giới

#### 1.3.1. Tình hình nghiên cứu trên thế giới

Nghiên cứu về các hợp chất có hoạt tính sinh học từ vi nấm biển từ lâu đã thu hút được sự quan tâm của các nhà khoa học trên thế giới, với số lượng các hợp chất mới, chất có hoạt tính sinh học gia tăng nhanh chóng, trong đó có nhiều hợp chất có hoạt tính kháng viêm. Những hợp chất này được phân lập chủ yếu từ các loài vi nấm biển thuộc chi *Penicillium*, *Aspergillus* và một

số loài nấm thuộc các chi ít phổ biến như *Acremonium*, *Emericella*, *Epicoccum*, *Exophiala*, *Paraphaeospora*, *Phomopsis* và *Halarosellinia*. Các hợp chất có hoạt tính kháng viêm đáng chú ý phân lập từ vi nấm biển *Aspergillus* được mô tả như sau:

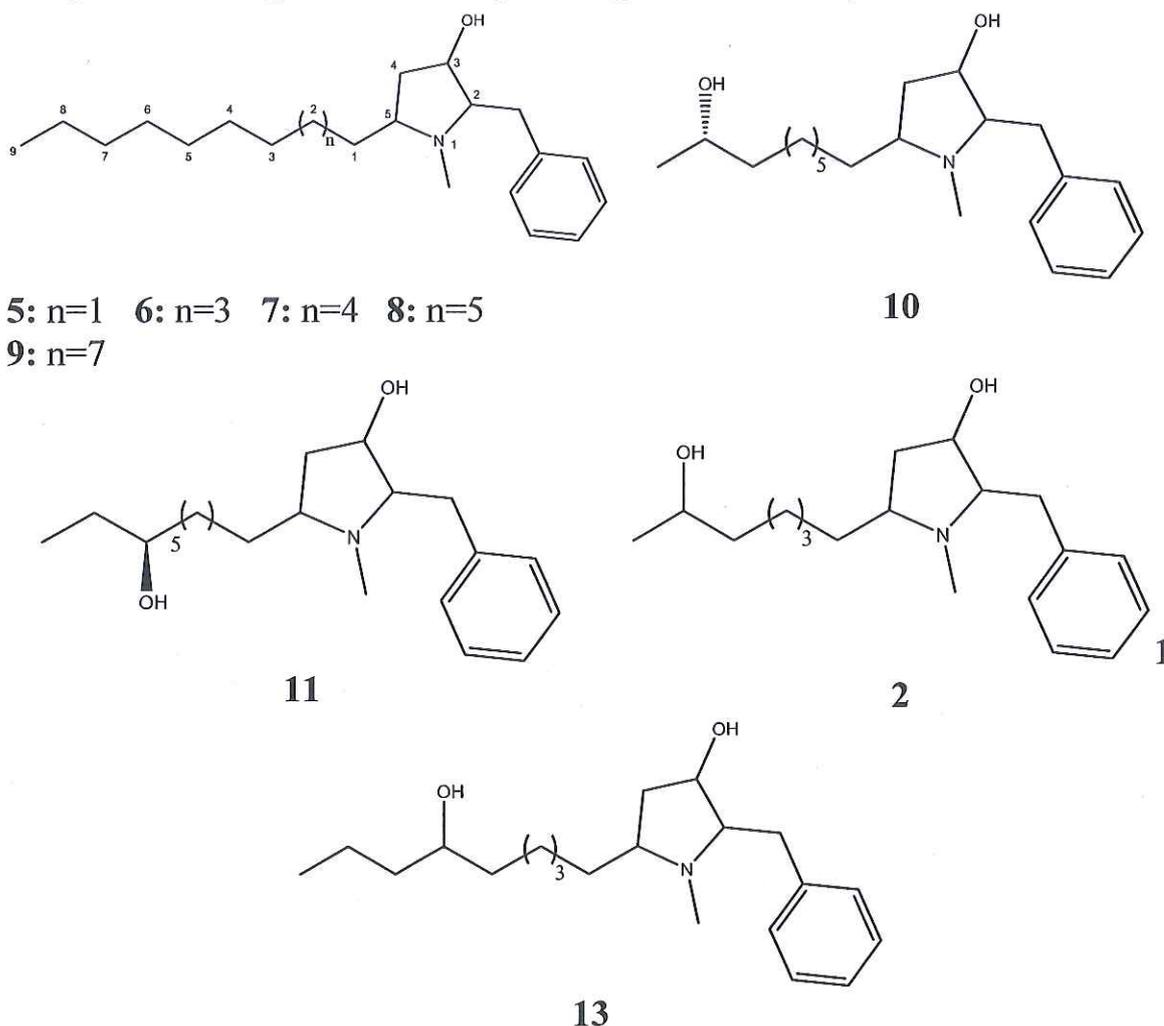
Vào năm 2015, Wang, Y và cộng sự đã phân lập được chủng nấm *Aspergillus* sp. ZL0-1b14 từ loài tảo xanh *Enteromorpha* (Phúc Kiến, Trung Quốc) và dịch chiết chủng vi nấm biển này thể hiện hoạt tính kháng viêm. Nghiên cứu thành phần hóa học. Dịch chiết này cho kết quả phân lập và xác định được một nhóm bốn hợp chất meroterpenoid triketide sesquiterpenoid mới là aspertetranone A–D (1–4) (Hình 1.3). Các hợp chất này thể hiện các hoạt động kháng viêm khác nhau, trong đó đáng chú ý là hợp chất aspertetranone A (1) và D (4) thể hiện khả năng ức chế sản sinh IL-6 ở đại thực bào RAW264.7 kích thích bằng LPS, với giá trị ức chế lần lượt là 43% và 69% ở nồng độ 40  $\mu\text{M}$  [22].



Hình 1.3. Cấu trúc hóa học của các hợp chất được phân lập từ vi nấm biển *Aspergillus* sp. ZL0-1b14

Gu, B. và cộng sự đã phân lập các alkaloid pyrrolidine mới là preussin C-I (5–11) (Hình 1.4) và (11R)-preussin J (12) và (11S)-preussin K (13) từ chủng vi nấm biển *Aspergillus flocculosus* 16D (đảo Yongxing, Trung Quốc). Hợp chất 10 và 11 cho thấy tác dụng kháng viêm đáng chú ý thông qua ức chế sản sinh interleukin (IL)-6 ở tế bào THP-1 kích thích bởi lipopolysaccharide (LPS), với giá trị  $\text{IC}_{50}$  lần lượt là 0.11  $\mu\text{M}$  và 0.19  $\mu\text{M}$ , mạnh hơn đối chứng

dương corylifol A ( $IC_{50} = 0,67 \mu M$ ). Các hợp chất khác thể hiện tác dụng ức chế yếu hơn, với giá trị  $IC_{50}$  trong khoảng từ 2,3 đến 22  $\mu M$  [23].

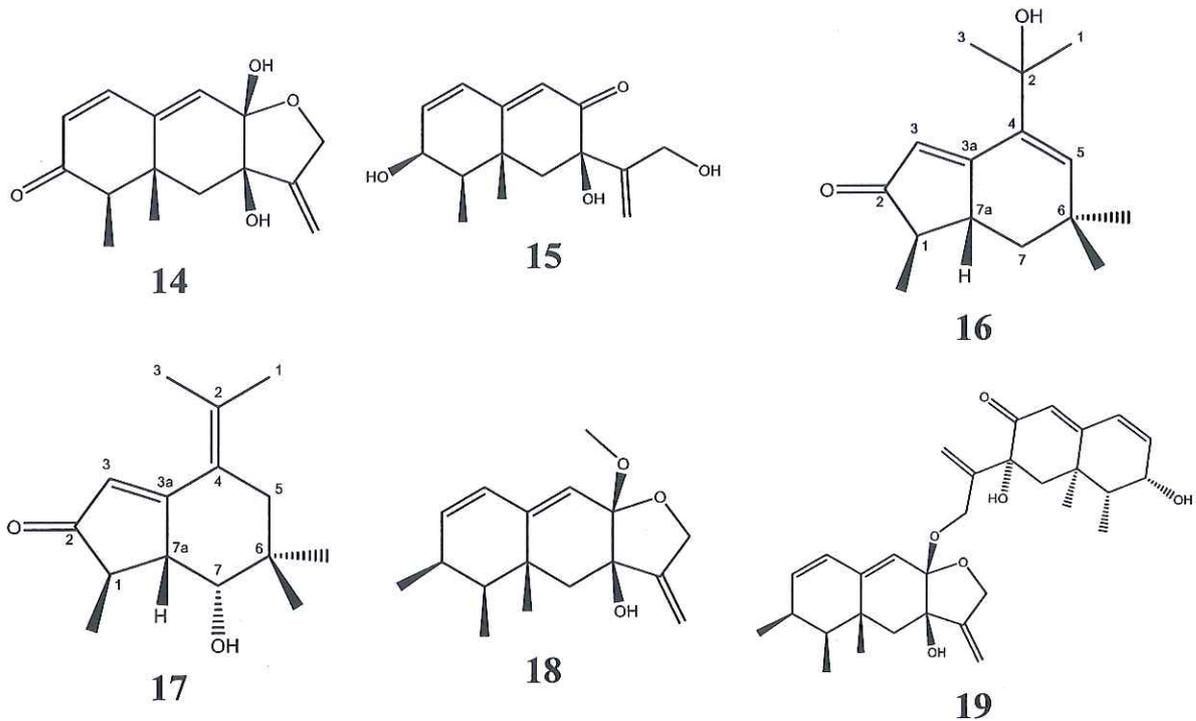


Hình 1.4. Cấu trúc hóa học của các hợp chất được phân lập từ vi nấm biển *Aspergillus flocculosus*

Liyan Wang và cộng sự (2016) đã phân lập được ba hợp chất sesquiterpenoid eremophilane mới là dihydrobipolaroxin B–D (14–16), (Hình 1.4) và một hợp chất sesquiterpene đã biết là dihydrobipolaroxin (17) từ chủng vi nấm biển *Aspergillus* sp. SCSHOW2 từ mẫu trầm tích biển sâu ở độ sâu 2439 m [24]. Tất cả các hợp chất đều thể hiện tác dụng kháng viêm thông qua ức chế sự sản sinh NO kích thích bởi LPS/INF- $\gamma$ .

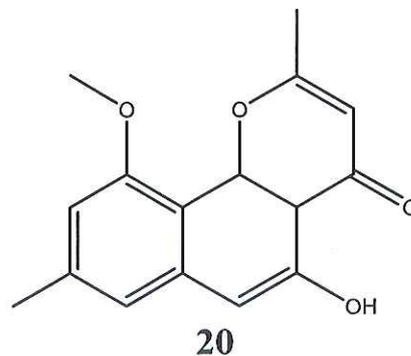
Hai hợp chất sesquiterpenoid khung brasilane mới là brasilanone A (18) và E (19) (Hình 1.5), được Wu cùng cộng sự (2018) phân lập từ dịch chiết của chủng vi nấm biển *Aspergillus terreus* CFCC 81836 thể hiện hoạt tính ức chế

sản sinh NO, với tỷ lệ ức chế lần lượt là 47,7% và 37,3% ở nồng độ 40  $\mu\text{M}$  ở tế bào RAW264.7 kích thích bởi LPS [25].



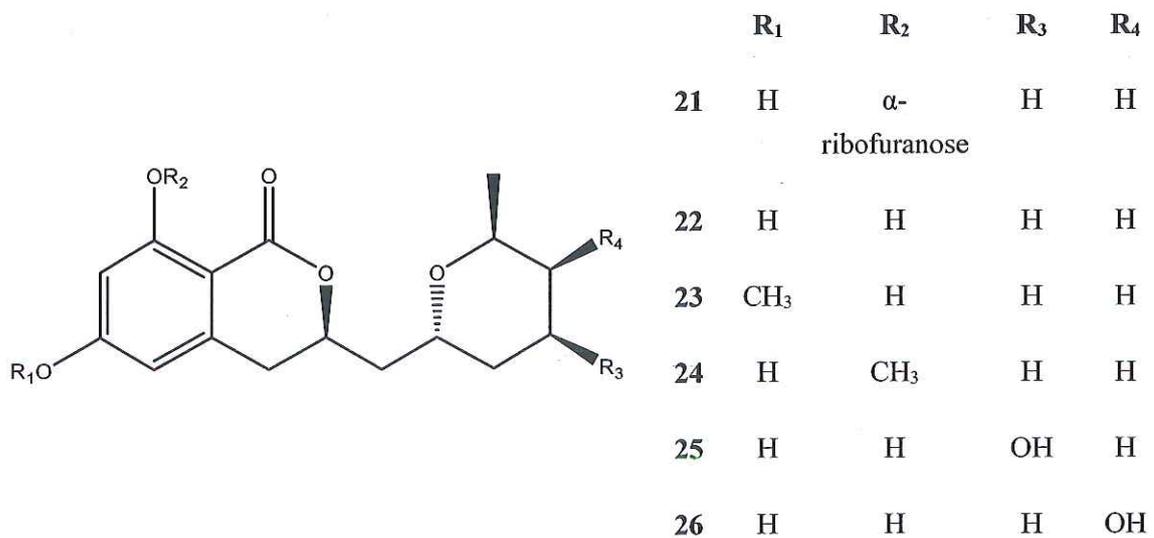
Hình 1.5. Cấu trúc hóa học của các hợp chất 10-15

Nghiên cứu của Kim và cộng sự (2016) cho thấy hợp chất TMC-256C1 (20, Hình 1.6) phân lập từ chủng vi nấm biển *Aspergillus* sp. SF-6354 thể hiện hoạt tính kháng viêm thần kinh tiềm năng thông qua ức chế biểu hiện mRNA của TNF- $\alpha$ , IL-6 và IL-12 ở dòng tế bào BV2 kích thích bởi LPS. Hợp chất này cũng thể hiện hoạt tính ức chế sự sản sinh NO và PGE<sub>2</sub> thông qua ức chế sự biểu hiện protein iNOS và COX-2 [26].



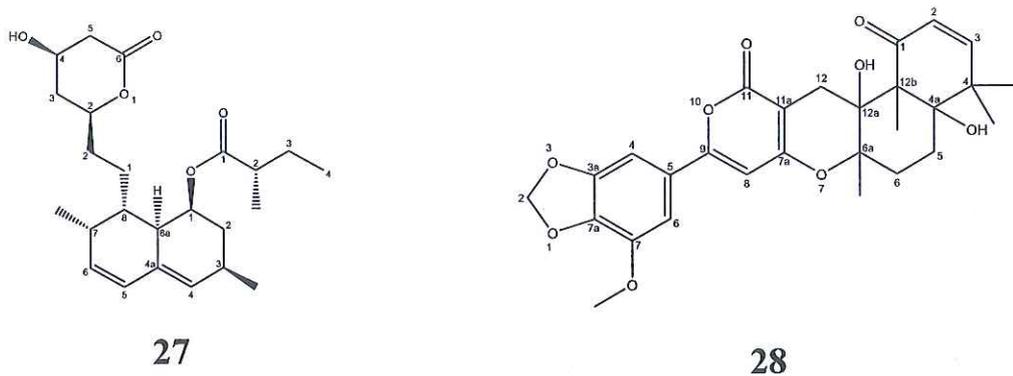
Hình 1.6. Cấu trúc hóa học của hợp chất chất được phân lập từ vi nấm biển *Aspergillus* sp. SF-6354

Kim và cộng sự (2016) đã phân lập được một dẫn xuất dihydroisocoumarin mới, cladosporin 8-O- $\alpha$ -D-ribofuranoside (21) cùng với năm hợp chất tương tự đã biết, cladosporin (22), asperentin 6-O-methyl ether (23), cladosporin 8-O-methyl ether (24), 4-hydroxyasperentin (25) và 5-hydroxyasperentin (26) (Hình 1.7) từ chủng vi nấm biển *Aspergillus* sp. SF-5974 và *Aspergillus* sp. SF-5976 phân lập từ một loại tảo đỏ ở độ sâu 300 m tại Biển Ross. Các hợp chất này thể hiện khả năng ức chế sản sinh NO và PGE2 ở dòng tế bào BV2 kích thích bằng LPS, với giá trị IC<sub>50</sub> nằm trong khoảng từ 20 đến 65  $\mu$ M. Hơn nữa, các hợp chất này đều thể hiện hoạt tính ức chế sự biểu hiện của iNOS và COX-2. Nghiên cứu cơ chế phân tử tác dụng kháng viêm của hợp chất 21 (20–80  $\mu$ M) cho thấy hợp chất này ức chế quá trình phosphoryl hóa của I $\kappa$ B- $\alpha$ , qua đó ngăn chặn quá trình di chuyển vào nhân tế bào của NF- $\kappa$ B, cuối cùng làm giảm quá trình kích hoạt protein p38 mitogen-activated protein kinase (MAPK) [27].



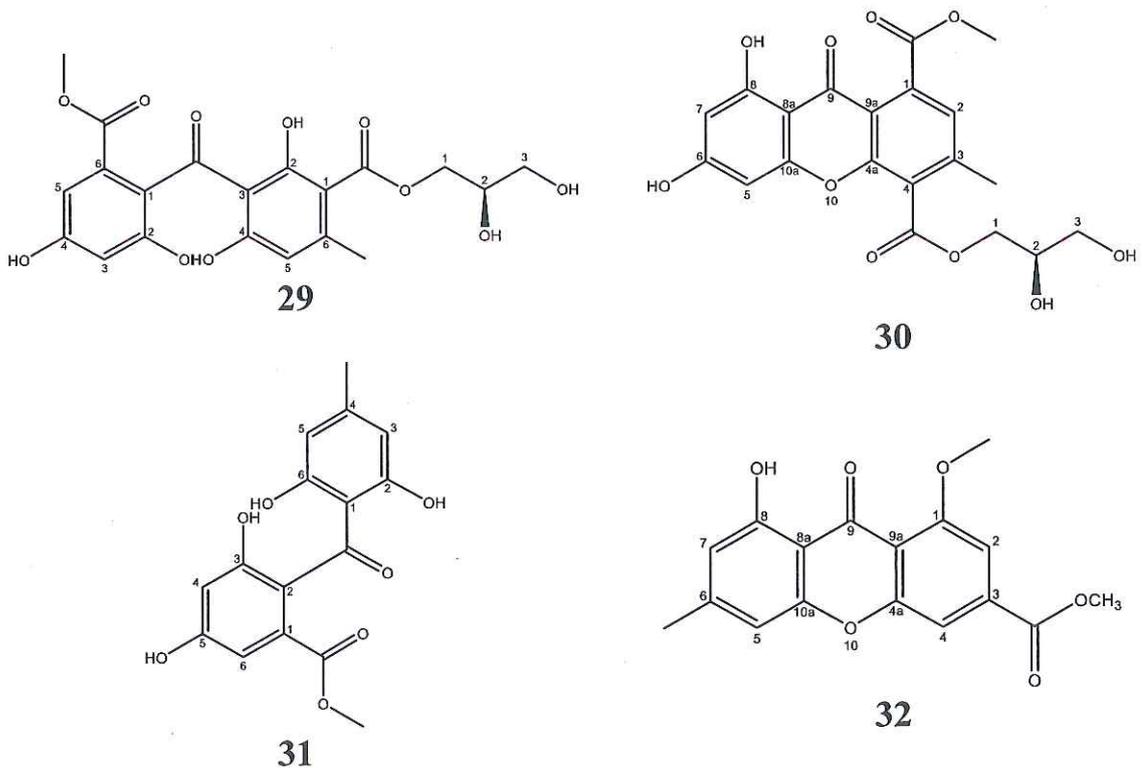
Hình 1.7. Cấu trúc hóa học của các hợp chất được phân lập từ vi nấm biển *Aspergillus* sp. SF-5974 và *Aspergillus* sp. SF-5976

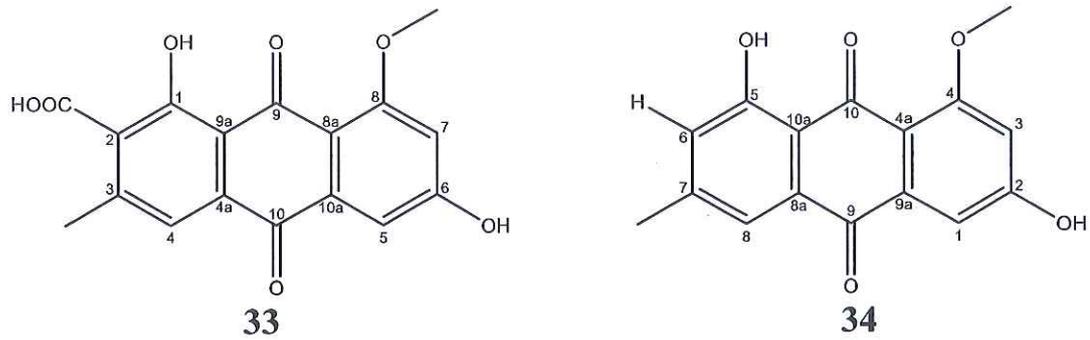
Theo nghiên cứu bởi Liu và cộng sự (2018), hợp chất lovastatin (27) (Hình 1.7) phân lập vi nấm biển *A. terreus* phân lập từ san hô *S. subviride* thể hiện hoạt tính ức chế sản sinh NO ở tế bào RAW264.7 kích thích bởi LPS, với giá trị IC<sub>50</sub> là 17,45  $\mu$ M. Quá trình phân lập phát hiện thêm hợp chất chuyển hóa bất thường là territrem A (32). Hợp chất này thể hiện hoạt tính ức chế NO, với giá trị IC<sub>50</sub> là 29,34  $\mu$ M [28].



Hình 1.8. Cấu trúc hóa học của các hợp chất được phân lập từ vi nấm biển *Aspergillus terreus*

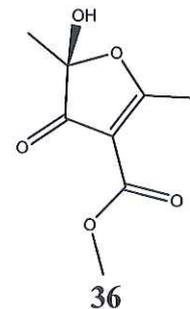
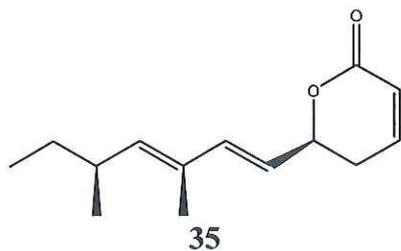
Du và cộng sự (2018) đã phân lập được hai dẫn xuất polyketide mới, eurobenzophenone B (29), xanthone A (30), cùng với bốn hợp chất đã biết, 3-de-*O*-methylsulochrin (31), yicathin B (32), dermolutein (33), và methylemodin (34) (Hình 5) từ chủng vi nấm biển *Aspergillus europaeus* WZXY-SX-4-1. Các hợp chất eurobenzophenone B, xanthone A, yicathin B, dermolutein và methylemodin thể hiện tác dụng ức chế yếu sản sinh NO và ức chế con đường truyền tín hiệu NF- $\kappa$ B ở dòng tế bào SW480 kích thích bằng LPS [29].

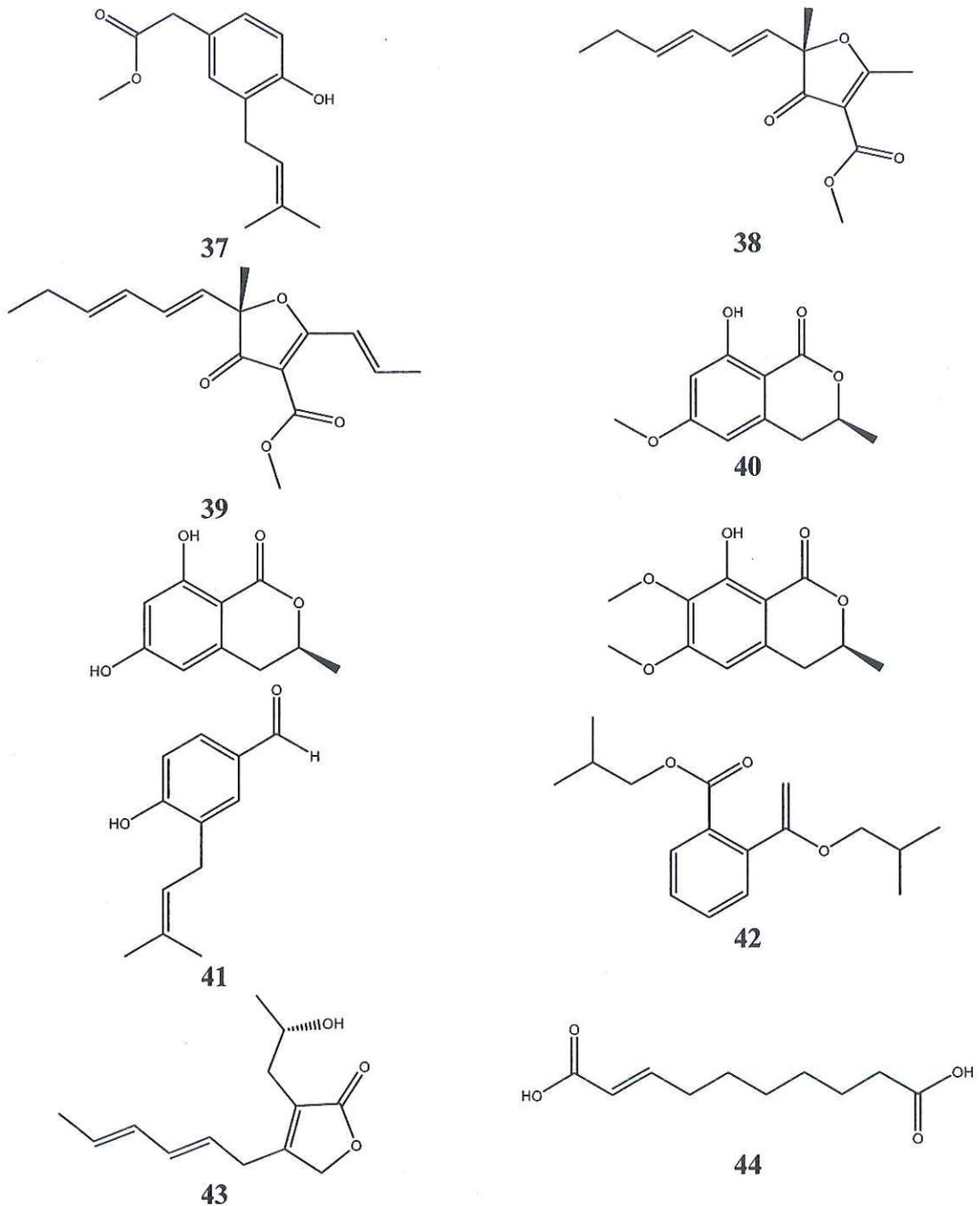




Hình 1.9. Cấu trúc hóa học của các hợp chất được phân lập từ vi nấm biển *Aspergillus europaeus* WZXY-SX-4-1

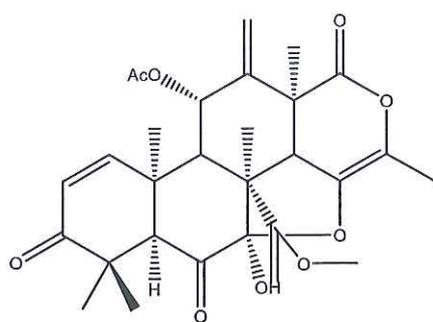
Hai hợp chất polyketide mới, asperulosin A và B (35–36) (Hình 1.10), cùng với một hợp chất prenyl hóa mới, asperulosin C (37), và chín hợp chất đã biết (38–46), đã được Xu và cộng sự (2021) phân lập và xác định cấu trúc từ vi nấm biển *Aspergillus rugulosa*. Cấu trúc của chúng được làm sáng tỏ dựa trên phân tích HR-ESI-MS, NMR một chiều (1D) và hai chiều (2D). Cấu hình tuyệt đối của các hợp chất mới được xác định bằng cách so sánh phổ lưỡng sắc tròn điện tử (ECD). Về hoạt tính sinh học, hợp chất 35 và 39 cho thấy tác dụng kháng viêm mạnh trên tế bào RAW264.7 được kích thích bởi LPS, với giá trị  $IC_{50}$  lần lượt là  $1,49 \pm 0,31$  và  $3,41 \pm 0,85$   $\mu$ M. Ngoài ra, hợp chất 36 và 39 làm tăng đáng kể sự tiết cytokine kháng viêm IL-10, đồng thời ức chế sự tiết các cytokine tiền viêm như IL-6, TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , MCP-1 và IL-12. Hơn nữa, hợp chất 35 và 39 làm giảm mức phiên mã của các dấu ấn đại thực bào tiền viêm (IL-6, IL-1 $\beta$  và TNF- $\alpha$ ), đồng thời tăng đáng kể yếu tố kháng viêm IL-10 và các dấu ấn đại thực bào M2 (ARG1 và CD206). Kết quả này gợi ý rằng các hợp chất 35 và 39 có triển vọng phát triển thành tác nhân kháng viêm, với hiệu quả ngang bằng hoặc tốt hơn dexamethasone [30].



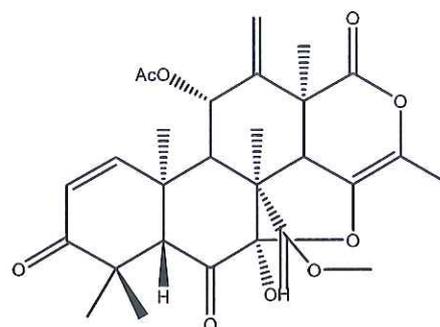


Hình 1.10. Cấu trúc hóa học của các hợp chất được phân lập từ vi nấm biển *Aspergillus rugulosa*

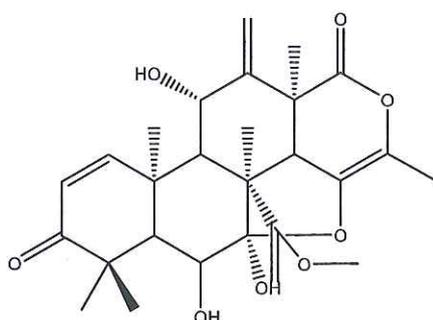
Trong nghiên cứu của Guihua Yang và cộng sự (2024), từ chủng nấm biển *Aspergillus terreus* GZU-31-1, năm meroterpenoid mới đã được phân lập, bao gồm aspermeroterpenes D–H (45–49) (Hình 1.11). Các hợp chất này thể hiện khả năng ức chế sản sinh nitric oxide (NO) trong tế bào RAW 264.7 được kích thích bởi lipopolysaccharide (LPS), với giá trị  $IC_{50}$  lần lượt là  $6,7 \pm 0,8 \mu\text{M}$ ,  $29,6 \pm 3,9 \mu\text{M}$ ,  $22,2 \pm 0,9 \mu\text{M}$ ,  $25,9 \pm 3,1 \mu\text{M}$  và  $26,5 \pm 1,0 \mu\text{M}$ .



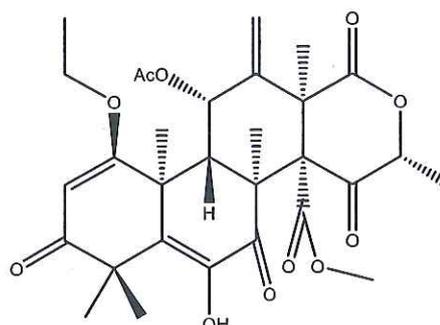
45



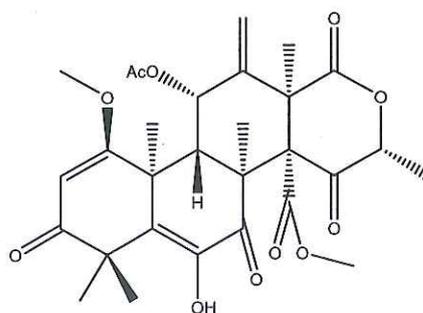
46



47



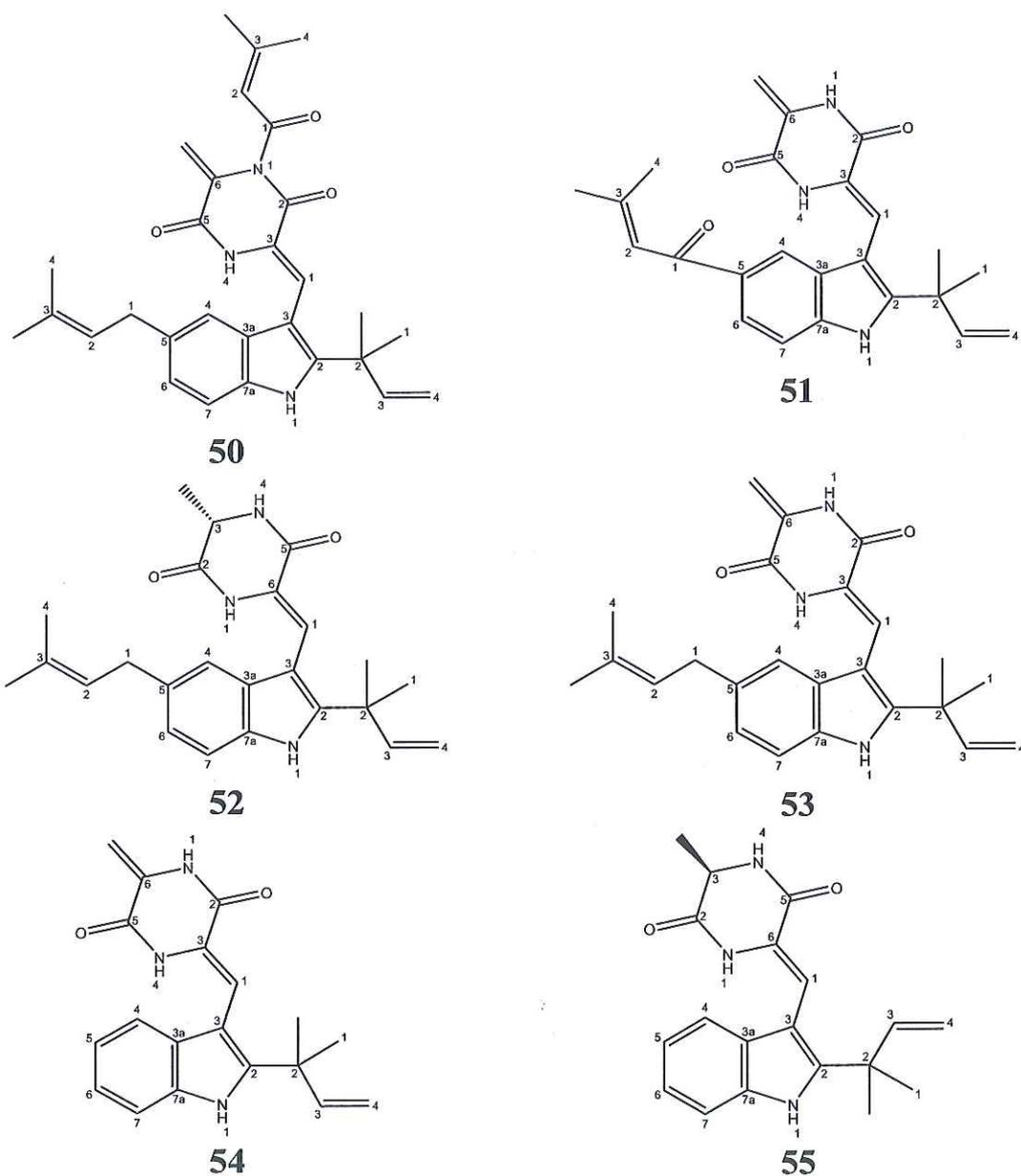
48



49

Hình 1.11. Cấu trúc hóa học của các hợp chất các hợp chất được phân lập từ vi nấm biển *Aspergillus terreus* GZU-31-1

Ngoài ra, từ nấm biển *Aspergillus* sp. FS 445, hai hợp chất mới là aspechinulins B và C (50-51) (Hình 1.12), cùng với bốn hợp chất đã biết là isoechinulins A và B (52-53), neocheinulin B (54), và cryptoechinuline G (55), đã được phân lập. Các hợp chất này cho thấy hoạt tính ức chế sản sinh NO với giá trị  $IC_{50}$  trong khoảng 20 đến 90  $\mu$ M. Những phát hiện này nhấn mạnh tiềm năng của các hợp chất từ loài *Aspergillus* trong việc phát triển các liệu pháp kháng viêm mới [31].



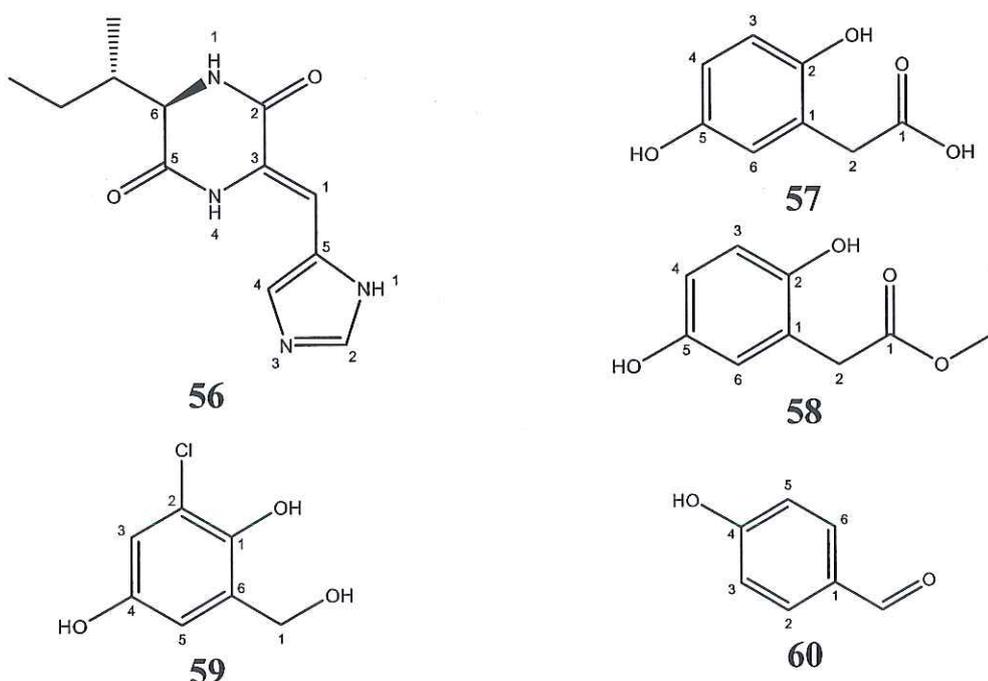
Hình 1.12. Cấu trúc hóa học của các hợp chất các hợp chất được phân lập từ vi nấm biển *Aspergillus* sp. FS 445

### 1.3.2. Tình hình nghiên cứu trong nước

Mặc dù chi *Aspergillus* có tính đa dạng cao về thành phần loài, phạm vi phân bố rộng và là nguồn cung cấp phong phú các hợp chất thứ cấp có cấu trúc đa dạng, nhưng tại Việt Nam, nghiên cứu về vi nấm biển thuộc chi này vẫn còn hạn chế. Một nghiên cứu được thực hiện tại Viện Hóa sinh biển đã phân lập và xác định thành phần các hợp chất thứ cấp từ chủng vi nấm biển *Aspergillus* sp. IMBC-FP2.05, được thu thập từ hải miên tại vùng biển Quảng Nam. Kết quả nghiên cứu đã xác định được năm hợp chất, bao gồm JBIR74 (56), homogentisic acid (57), methyl (2,5-dihydroxyphenyl) acetate (58), 3-

chloro-2,5-dihydroxybenzyl alcohol (**59**) và *p*-hydroxybenzaldehyde (**60**) (Hình 1.13).

Đánh giá hoạt tính kháng viêm *in vitro* của các hợp chất này thông qua khả năng ức chế sự sản sinh NO trên dòng tế bào RAW264.7 kích thích bằng LPS cho thấy hai hợp chất 2,5-dihydroxyphenylacetic acid, gồm homogentisic acid (**57**) và methyl (2,5-dihydroxyphenyl) acetate (**58**), có tác dụng ức chế NO mạnh nhất với giá trị  $IC_{50}$  lần lượt là 28,2 và 14,2  $\mu$ M. Hợp chất 3-chloro-2,5-dihydroxybenzyl alcohol (**59**) cũng thể hiện hoạt tính ức chế NO đáng kể ( $IC_{50} = 41,8 \mu$ M), tương đương với chất đối chứng dương  $N^G$ -Monomethyl-L-arginine (L-NMMA) ( $IC_{50} = 44,5 \mu$ M). Trong khi đó, hai hợp chất JBIR74 (**56**) và *p*-hydroxybenzaldehyde (**60**) có mức độ ức chế trung bình, với giá trị  $IC_{50}$  lần lượt là 79,7 và 62,4  $\mu$ M [32]. Những kết quả này cho thấy tiềm năng khai thác các hợp chất từ vi nấm biển chi *Aspergillus* trong nghiên cứu và phát triển các chất kháng viêm có nguồn gốc tự nhiên.



Hình 1.13. Cấu trúc hóa học của các hợp chất các hợp chất được phân lập từ vi nấm biển *Aspergillus* sp. IMBC-FP2.05

Ngoài ra, trong một nghiên cứu phối hợp giữa Viện Hóa sinh biển và Viện Hóa học Các hợp chất thiên nhiên, ba hợp chất dibenzospiroketal mới, được đặt tên là aspermicrone A-C đã được phân lập từ cao chiết EtOAc của chủng vi nấm biển *Aspergillus micronesiensis* thu được từ rong đỏ *Kappaphycus alvarezii*. Trong số đó, aspermicrone B cho thấy hoạt tính gây độc tế bào chọn lọc đối với dòng tế bào ung thư gan HepG2 với giá trị  $IC_{50}$  là

9,9  $\mu\text{M}$ , trong khi hai hợp chất aspermicrone B và aspermicrone C có tác dụng kháng *Staphylococcus aureus*, với giá trị MIC đạt 123,2  $\mu\text{M}$  [33].

Ngoài các hợp chất trên, từ chủng vi nấm biển *Aspergillus micronesiensis*, các nhà nghiên cứu cũng phân lập được một số hợp chất thuộc nhóm polyoxygenated polyketide. Trong đó, epicoccolide A, epicoccolide B và NC3B thể hiện khả năng ức chế mạnh đối với các dòng tế bào ung thư HepG2, LU-1 và Vero, với giá trị  $\text{IC}_{50}$  dao động từ 3,97 đến 4,71  $\mu\text{g}/\text{mL}$  [34]. Những phát hiện này góp phần làm phong phú thêm nguồn hợp chất có hoạt tính sinh học từ vi nấm biển, mở ra tiềm năng ứng dụng trong nghiên cứu phát triển dược phẩm và liệu pháp điều trị ung thư.

## CHƯƠNG 2. ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

### 2.1. Nguyên liệu, hóa chất và thiết bị nghiên cứu

#### 2.1.1. Nguyên liệu và hóa chất

##### a. Đối tượng nghiên cứu:

Chủng vi nấm biển *Aspergillus* sp. CL251 được phân lập từ Vịnh Phan Rang, tỉnh Ninh Thuận. Tên khoa học của chủng vi nấm biển đã được xác định bằng kỹ thuật PCR kết hợp với giải trình tự Sanger sử dụng cặp môi ITS1 và ITS4. Chủng vi nấm biển hiện đang được lưu trữ và bảo quản ở Viện Hóa học, Viện Hàn lâm KH&CN Việt Nam.

##### b. Vật tư, hóa chất:

Các hóa chất và vật tư được sử dụng trong nghiên cứu bao gồm bột silica gel (*Kieselgel 60*, 230–400 mesh, Merck), bột pha đảo C18 (*ODS-A*, 12 nm, S-150  $\mu\text{m}$ , YMC Co.), bản mỏng silica gel 60 F254 (Merck) và RP-18 F254S plates (Merck). Các dung môi sử dụng trong quá trình tinh sạch và xác định cấu trúc hợp chất bao gồm  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , MeOH, EtOAc, *n*-hexane, acetone và acetonitrile. Ngoài ra, môi trường nuôi cấy như PDB, thạch agar-agar cùng các hóa chất và vật tư khác cũng được sử dụng trong nghiên cứu.

Các hóa chất dùng trong thí nghiệm sinh học bao gồm lipopolysaccharides (LPS) từ *Escherichia coli* (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA), môi trường nuôi cấy *Dulbecco's Modified Eagle's Medium*

(DMEM) và *fetal bovine serum* (FBS) từ Life Technologies, Inc. (Gaithersburg, MD, USA). Ngoài ra, các hóa chất như sodium nitrite, sulphanilamide, *N*-1-naphthylethylenediamine dihydrochloride và Dimethyl Sulfoxide (DMSO) được cung cấp bởi Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA). Các hóa chất khác cần thiết trong nghiên cứu được mua từ các hãng Sigma, GIBCO, Invitrogen, Promega, v.v.

FBS của GIBCO, Invitrogen, TCA (Sigma), SRB (Sigma). Đĩa 96 giếng nhựa (Corning, USA), pipette (Eppendorf), máy đọc ELISA 96 giếng (Bio-rad).

### 2.1.2. Thiết bị nghiên cứu

Các thiết bị nghiên cứu được sử dụng cho các nội dung của luận văn bao gồm: máy JASCO P-2000 polarimeter (Tokyo, Japan); hệ thống LC-MS X500 QTOF mass spectrometer (Sciex, USA), hệ thống AVANCE NEO 600 FT-NMR spectrometer (Bruker, Germany), hệ thống sắc ký lỏng hiệu năng cao Agilent 1200 (Agilent Technologies, USA), tủ cấy an toàn sinh học cấp II (Esco, UK), tủ nuôi cấy tế bào (Sanyo, Nhật Bản), nồi khử trùng (Nhật Bản), tủ sấy, và các thiết bị nghiên cứu chuyên dụng khác.

## 2.2. Phương pháp nghiên cứu

### 2.2.1. Phương pháp tạo dịch chiết vi nấm biển

Chủng vi nấm biển *Aspergillus* sp. CL251 được nuôi cấy với quy mô lớn trên môi trường PDA trong bình tam giác 2L nhằm thu nhận lượng sinh khối đủ để nghiên cứu thành phần hóa học. Sau khi thu hoạch, sinh khối vi nấm biển được chiết xuất bằng dung môi EtOAc dưới điều kiện siêu âm (30 phút x 3 lần) ở nhiệt độ phòng. Dịch chiết thu được được lọc qua giấy lọc và cô lập dung môi dưới áp suất giảm để thu cặn chiết tổng.

### 2.2.2. Các phương pháp phân lập hợp chất

#### 2.2.2.1. Sắc ký lớp mỏng (TLC)

Thực hiện trên bản mỏng tráng sẵn DC-Alufolien 60 F254 (Merck 1.05715) và RP18 F254s (Merck). Các hợp chất được phát hiện bằng đèn tử

ngoại ở hai bước sóng 254 nm và 368 nm hoặc thông qua phun dung dịch  $\text{H}_2\text{SO}_4$  10%, sau đó sấy khô và hơi nóng để hiện màu.

#### **2.2.2.2. Sắc ký cột (CC)**

Sắc ký cột (Column Chromatography – CC) là phương pháp tách chất dựa trên nguyên lý tương tự sắc ký bản mỏng nhưng phù hợp với lượng mẫu lớn hơn. Phương pháp sử dụng một cột thủy tinh thẳng đứng chứa pha tĩnh (thường là silica gel kích thước 50–150  $\mu\text{m}$ ) và hoạt động dưới áp suất khí quyển. Mẫu được đặt lên đầu cột, dung môi giải ly được cho chảy qua nhờ trọng lực để tách các chất.

#### **2.2.2.3. Sắc ký lỏng hiệu năng cao (HPLC)**

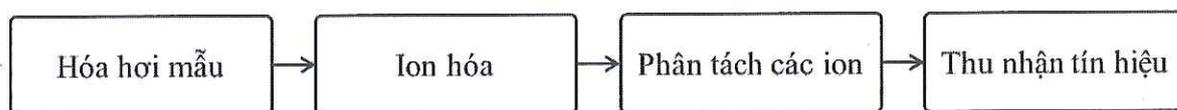
Sắc ký lỏng hiệu năng cao HPLC (High Performance Liquid Chromatography - HPLC) là một phương pháp tách, xác định và định lượng từng thành phần của hỗn hợp. Nguyên lý của quá trình dựa trên hệ thống bơm đẩy dung môi có chứa hỗn hợp mẫu dưới áp suất cao. Cột sắc ký chứa chất hấp phụ rắn, mỗi thành phần của hỗn hợp mẫu tương tác khác nhau với chất hấp phụ dẫn đến sự phân tách các chất thành từng phần khi chúng chảy ra khỏi cột.

Hệ thống HPLC bao gồm các bộ phận sau: bình chứa dung môi giải ly cột, máy bơm, bộ phận tiêm mẫu vào máy, cột sắc ký, detector, hệ thống điều khiển.- Phổ khối lượng (MS): Phổ khối lượng phun mù điện tử (Electron Spray Ionization mass spectra) phân giải cao được đo trên máy X500 QTOF mass spectrometer (Sciex, USA), Viện Hóa học

#### **2.2.2.4. Phương pháp phổ khối lượng**

Phổ khối lượng hay còn gọi là khối phổ (Mass Spectrometry - MS) là phương pháp nghiên cứu các chất bằng cách đo chính xác khối lượng phân tử chất đó. Nguyên tắc của phương pháp: hợp chất cần nghiên cứu được chuyển thành trạng thái hơi, sau đó được ion hóa. Các ion tạo thành được đưa vào bộ phận phân tích của máy khối phổ, chỉ những ion dương mới đến được bộ phận phân tích, các ion âm sẽ bị giữ lại ở buồng ion hóa.

Máy phổ khối lượng thực hiện ba nhiệm vụ cơ bản: chuyển chất nghiên cứu thành thể khí, tạo ra các ion từ các phân tử khí đó, phân tách các ion rồi ghi lại tín hiệu theo tỉ số khối lượng/điện tích ( $m/z$ ) của chúng. Nguyên lý hoạt động của máy phổ khối được thể hiện ở hình 2.1.



Hình 2.1. Sơ đồ nguyên lý hoạt động máy phổ khối

**Hóa hơi mẫu:** mẫu được đốt nóng tới 200 - 300°C ở áp suất thấp, do đó có thể bay hơi những chất không chứa các nhóm phân cực (phân tử khối <1000) và những chất phân cực vừa phải (phân tử khối <300). **Ion hóa:** mẫu hóa hơi được phóng vào buồng ion hóa và bị bắn phá bởi chùm tia electron. **Phân tách các ion:** các ion được phân tách sao cho bộ phận tiếp theo có thể thu nhận được tín hiệu của từng loại để ghi lại thành phổ. **Thu nhận tín hiệu:** sử dụng các thiết bị khác nhau, thông tin được đưa vào máy tính ghi lại phổ của mẫu phân tích.

Kết quả phổ khối lượng phản ánh số lượng các ion với các khối lượng khác nhau. Phổ đồ gồm: trục x miêu tả khối lượng của ion thể hiện trên phổ dưới dạng một tín hiệu gọi là pic, vị trí của pic cho biết số khối của ion tương ứng; trục y miêu tả cường độ của pic, là hàm lượng của ion đó.

Từ phổ khối lượng cho biết các thông tin để xác định khối lượng nguyên tử, khối lượng phân tử và dự đoán cấu trúc phân tử của hợp chất.

#### 2.2.2.5. Phổ cộng hưởng từ hạt nhân một chiều (1D-NMR)

Hai phương pháp cộng hưởng từ hạt nhân một chiều được sử dụng nhiều nhất là phổ  $^1\text{H-NMR}$  và  $^{13}\text{C-NMR}$ .

Phổ  $^1\text{H-NMR}$  cho biết có bao nhiêu loại proton trong phân tử và mỗi loại proton đó có bao nhiêu nguyên tử H. Trong phổ  $^1\text{H-NMR}$ , mỗi loại proton trong phân tử cho một pic cộng hưởng hoặc bị tách thành nhiều pic cộng hưởng. Sự tách pic cộng hưởng này được gọi là sự ghép cặp, là hiện tượng có nhiều pic hấp thụ khác nhau do các proton ở kề bên đã tương tác lên proton

đang khảo sát. Các tín hiệu trong phổ  $^1\text{H-NMR}$  thường xuất hiện trong phạm vi từ 0 - 12ppm.

Phổ  $^{13}\text{C-NMR}$  cho thông tin quan trọng về khung cacbon của hợp chất hữu cơ. Vì hàm lượng đồng vị C-13 rất thấp nên độ nhạy trong phổ  $^{13}\text{C-NMR}$  so với phổ  $^1\text{H-NMR}$  khoảng 1/5700. Trong phổ  $^{13}\text{C-NMR}$ , các tín hiệu thường xuất hiện trong khoảng chia độ từ 0 - 240ppm. Khác với phổ  $^1\text{H-NMR}$ , phổ  $^{13}\text{C-NMR}$  có các đặc điểm sau: mỗi cacbon riêng biệt chỉ cho một tín hiệu pic đơn duy nhất, không có sự tách pic, trong bốn loại cacbon  $-\text{CH}_3$ ,  $-\text{CH}_2-$ ,  $>\text{CH}-$  và  $>\text{C}<$  thì cacbon  $-\text{CH}_3$ ,  $-\text{CH}_2-$  cho pic có cường độ mạnh hơn hai loại còn lại.

#### 2.2.2.6. Phổ cộng hưởng từ hạt nhân hai chiều (2D-NMR)

Sử dụng phổ  $^1\text{H-NMR}$  và  $^{13}\text{C-NMR}$  có thể xác định được các hợp chất hữu cơ có cấu trúc đơn giản. Đối với các chất có cấu trúc phức tạp, phải sử dụng phổ NMR hai chiều để giải đoán các tín hiệu cộng hưởng và xác định chính xác cấu tạo hóa học.

Phổ NMR hai chiều có trục hoành và trục tung đều là trục tần số; chiều thứ ba là cường độ tín hiệu. Hiện nay, các loại phổ NMR hai chiều được sử dụng phổ biến là: HSQC và HMBC.

Phổ HSQC (Heteronuclear single-quantum correlation) là phổ tương tác dị hạt nhân qua một liên kết, cho thông tin về tương quan một liên kết giữa proton và cacbon. Phổ cho tín hiệu là một đỉnh trên mỗi cặp hạt nhân liên kết, có hai tọa độ là sự chuyển dịch hóa học của hai nguyên tử ghép đôi.

Phổ HMBC (Heteronuclear multiple-bond correlation) phổ tương tác dị hạt nhân qua nhiều liên kết, cho thông tin về tương quan hai, ba, đôi khi là bốn liên kết giữa proton và cacbon. Phổ HMBC cho tín hiệu tương tự phổ HSQC.

#### 2.2.2.7. Độ quay cực

Trong hóa học, độ quay cực (còn gọi là góc quay quang học – optical rotation hoặc specific rotation) là đại lượng mô tả khả năng làm quay mặt

phẳng ánh sáng phân cực của một chất quang hoạt (chất có tính đối quang học, thường là các hợp chất hữu cơ có carbon bất đối).

Vì góc quay ( $\alpha$ ) phụ thuộc vào nồng độ, chiều dài ống đo và nhiệt độ, nên người ta định nghĩa góc quay riêng để so sánh giữa các chất. Trong đó:

$$[\alpha]_{\lambda}^T = \frac{\alpha}{l \cdot c}$$

$[\alpha]_{\lambda}^T$  góc quay riêng tại nhiệt độ T ( $^{\circ}\text{C}$ ), bước sóng ánh sáng  $\lambda$  (thường là D của Na, tức 589 nm).

$\alpha$ : góc quay đo được ( $^{\circ}$ ).

l: chiều dài ống đo (dm – decimet).

c: nồng độ dung dịch (g/mL nếu là dung dịch; % nếu là dung dịch ethanol hoặc nước).

### 2.2.3. Phương pháp nuôi cấy tế bào và đánh giá hoạt tính sinh học

#### 2.2.3.1. Nuôi cấy tế bào *in vitro*

Dòng tế bào RAW264.7 được nuôi cấy trong môi trường DMEM có bổ sung 2 mM L-glutamine, 10 mM HEPES, 1,0 mM sodium pyruvate và 10% fetal bovine serum (FBS, GIBCO). Quá trình cấy chuyển được thực hiện sau 3-5 ngày với tỷ lệ 1:3, trong điều kiện tủ ấm CO<sub>2</sub> duy trì ở 37 $^{\circ}\text{C}$  với nồng độ CO<sub>2</sub> là 5%.

#### 2.2.3.2. Phương pháp MTT

Phương pháp MTT được sử dụng để xác định mức độ ảnh hưởng của các hợp chất thử nghiệm đối với sự sống sót của tế bào RAW264.7. Mỗi hợp chất thử (20  $\mu\text{L}$ ) được cho vào giếng của khay 96 giếng để đạt nồng độ mong muốn. Sau đó, 180  $\mu\text{L}$  tế bào được thêm vào các giếng chứa chất thử. Đối chứng âm được thiết lập với giếng không có mẫu thử, chỉ chứa dung môi DMSO 10%. Các tế bào được ủ trong tủ CO<sub>2</sub> ở 37 $^{\circ}\text{C}$ , 5% CO<sub>2</sub> trong 72 giờ.

Sau thời gian ủ, 10  $\mu\text{L}$  dung dịch MTT (nồng độ cuối 5 mg/mL) được thêm vào mỗi giếng và tiếp tục ủ trong 4 giờ. Sau đó, môi trường nuôi cấy được loại bỏ và tinh thể formazan hình thành được hòa tan bằng 50  $\mu\text{L}$

DMSO 100%. Giá trị độ hấp thụ quang (OD) được đo ở bước sóng 540 nm bằng máy quang phổ. Tỷ lệ tế bào sống sót được tính theo công thức:

$$\% \text{ tế bào sống sót} = \frac{\text{OD (chất thử)} - \text{OD (đối chứng trắng)}}{\text{OD (DMSO)} - \text{OD (đối chứng trắng)}} \times 100\%$$

### 2.2.3.3. Phương pháp đánh giá khả năng ức chế sản sinh NO bằng phương pháp Griess.

Phương pháp Griess được sử dụng để xác định khả năng ức chế sản sinh NO của các hợp chất thử nghiệm. Tế bào RAW264.7 được cấy vào đĩa 96 giếng với mật độ  $2 \times 10^5$  tế bào/giếng và ủ trong tủ CO<sub>2</sub> ở 37°C, 5% CO<sub>2</sub> trong 24 giờ. Tiếp theo, môi trường nuôi cấy được thay thế bằng DMEM không chứa FBS và ủ trong 3 giờ. Sau đó, các mẫu thử được thêm vào với các nồng độ 100, 20, 4 và 0,8 μM, ủ trong 2 giờ trước khi kích thích sản sinh NO bằng LPS (1 μg/mL) trong 24 giờ. Đối chứng âm là các giếng chỉ chứa dung môi pha mẫu, trong khi đối chứng dương là dexamethasone (Sigma) với các nồng độ tương tự mẫu thử.

Hàm lượng nitrite (NO<sub>2</sub><sup>-</sup>), chỉ thị cho quá trình tạo NO, được xác định thông qua bộ Griess Reagent System (Promega Cooperation, WI, USA). Cụ thể, 100 μL môi trường nuôi tế bào từ giếng thử nghiệm được chuyển sang đĩa 96 giếng mới và trộn với 100 μL thuốc thử Griess, bao gồm 50 μL dung dịch 1% (w/v) sulfanilamide trong 5% (v/v) acid phosphoric và 50 μL dung dịch 0,1% (w/v) N-1-naphthylethylenediamine dihydrochloride trong nước. Hỗn hợp được ủ ở nhiệt độ phòng trong 10 phút, sau đó đo độ hấp thụ quang ở bước sóng 540 nm bằng máy đọc microplate. Môi trường DMEM không chứa FBS được sử dụng làm giếng trắng (blank).

Hàm lượng nitrite trong từng mẫu thử được xác định bằng đường chuẩn NaNO<sub>2</sub> và so sánh với mẫu chứng âm (LPS). Khả năng ức chế sản sinh NO được tính theo công thức:

$$\% \text{ ức chế} = 100\% - [\text{hàm lượng NO}_{\text{sample}} / \text{hàm lượng NO}_{\text{LPS}}] \times 100$$

Thí nghiệm được lặp lại ba lần và giá trị  $IC_{50}$  (nồng độ ức chế 50% sự hình thành NO) được tính toán bằng phần mềm TableCurve 2Dv4.

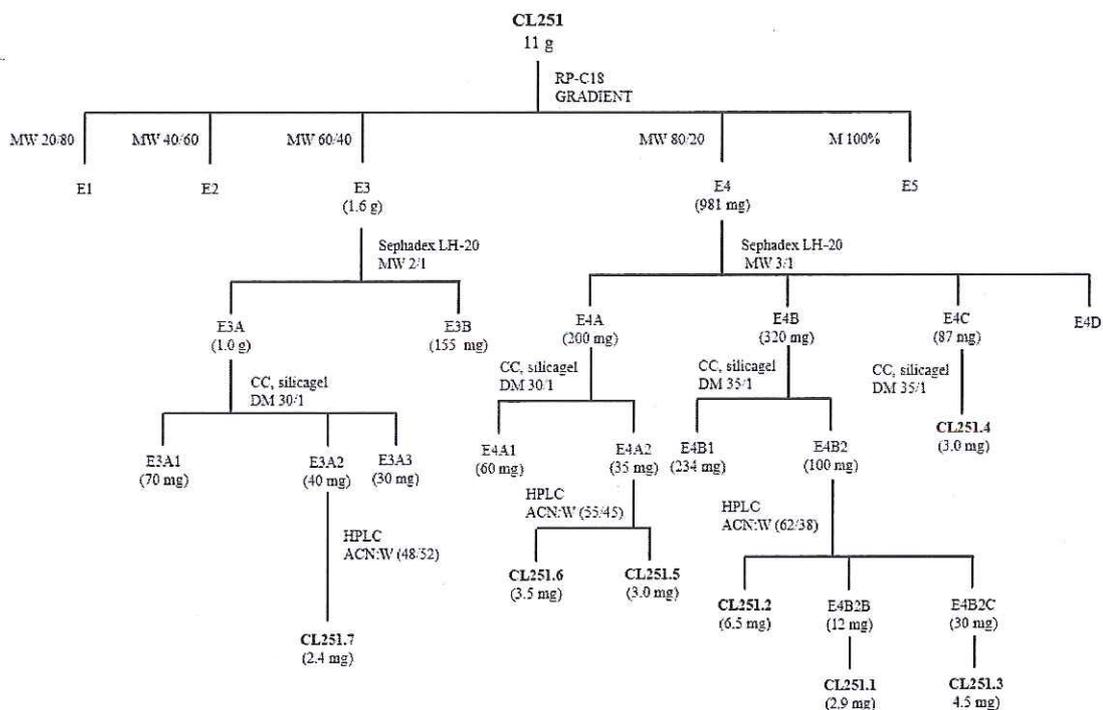
### CHƯƠNG 3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

#### 3.1. Nhân sinh khối lượng lớn và tạo cao chiết tổng chủng *Aspergillus sp.* CL251

Chủng *Aspergillus sp.* CL251 được lên men nhân sinh khối trong 100 bình tam giác 2 L, mỗi bình chứa 200 mL môi trường PDA trong 25 ngày ở nhiệt độ phòng.

Sinh khối và sợi nấm được ngâm chiết với EtOAc (1L x 3 lần) trong điều kiện siêu âm (30 phút/ lần) ở nhiệt độ phòng. Dịch chiết được gộp lại, lọc qua giấy lọc và cất loại dung môi dưới áp suất giảm thu được 11 g cao chiết.

#### 3.2. Phân lập các hợp chất



Hình 3.1. Sơ đồ phân lập các hợp chất từ chủng *Aspergillus sp.* CL251

Cao chiết ethyl acetate (EtOAc, 11 g) từ chủng vi nấm biển *Aspergillus sp.* CL251 được phân tách sơ bộ bằng sắc ký cột pha đảo (RP-CC) sử dụng silica gel C18 làm chất hấp phụ, với hệ dung môi rửa giải methanol trong

nước theo gradient tăng dần. Quá trình phân tách thu được năm phân đoạn chính, ký hiệu là E1–E5.

Phân đoạn E3 được tiếp tục xử lý bằng sắc ký cột sử dụng pha tĩnh Sephadex LH-20 và hệ dung môi MeOH–H<sub>2</sub>O (2:1, v/v), thu được hai phân đoạn nhỏ là E3A và E3B. Phân đoạn E3A (1,0 g) được phân tách tiếp bằng sắc ký cột silica gel pha thường, sử dụng hệ dung môi dichloromethane–methanol (30:1, v/v), thu được ba phân đoạn thứ cấp: E3A1–E3A3. Trong đó, phân đoạn E3A2 (40 mg) được tinh chế bằng sắc ký lỏng hiệu năng cao điều chế (HPLC), sử dụng hệ dung môi 48% acetonitrile (CH<sub>3</sub>CN) trong nước chứa 0,1% acid formic, thu được hợp chất tinh khiết CL251.7 (2,4 mg).

Tương tự, phân đoạn E4 (981 mg) được phân tách bằng sắc ký cột Sephadex LH-20 với hệ dung môi MeOH–H<sub>2</sub>O (3:1, v/v), thu được bốn phân đoạn nhỏ: E4A–E4D. Phân đoạn E4A (200 mg) tiếp tục được phân tách bằng sắc ký cột silica gel pha thường với hệ dung môi dichloromethane–methanol (30:1, v/v), thu được hai phân đoạn: E4A1 và E4A2. Phân đoạn E4A2 (35 mg) sau đó được tinh chế bằng HPLC với hệ dung môi 55% CH<sub>3</sub>CN trong H<sub>2</sub>O chứa 0,1% acid formic, thu được hai hợp chất tinh khiết: CL251.5 (3,0 mg) và CL251.6 (3,5 mg).

Phân đoạn E4B (320 mg) được xử lý bằng sắc ký cột pha thường sử dụng hệ dung môi dichloromethane–methanol (35:1, v/v), thu được hai phân đoạn E4B1 và E4B2. Phân đoạn E4B2 (100 mg) tiếp tục được tinh chế bằng prep-HPLC với pha động gồm 62% CH<sub>3</sub>CN trong nước chứa 0,1% acid formic, thu được hợp chất CL251.2 (6,5 mg) cùng hai phân đoạn thứ cấp: E4B2B (12 mg) và E4B2C (30 mg). Các phân đoạn này tiếp tục được tinh chế bằng HPLC sử dụng hệ dung môi 72% MeOH trong H<sub>2</sub>O chứa 0,1% acid formic, thu được lần lượt hai hợp chất tinh khiết: CL251.1 (2,9 mg) và CL251.3 (4,5 mg).

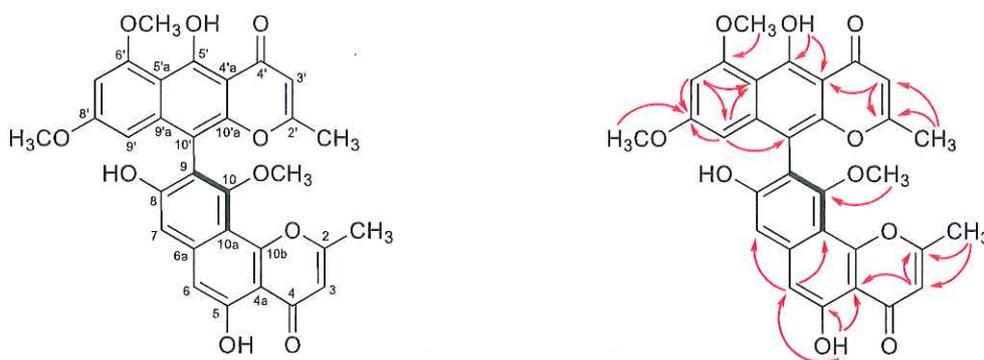
Cuối cùng, phân đoạn E4C (87 mg) được xử lý bằng sắc ký cột silica gel pha thường với hệ dung môi dichloromethane–methanol (35:1, v/v), thu được hợp chất tinh khiết CL251.4 (3,0 mg).

### 3.3. Xác định cấu trúc hóa học của các hợp chất

Từ cao chiết tổng của chủng vi nấm biển *Aspergillus* sp. CL251, 7 hợp chất đã được phân lập và xác định cấu trúc hóa học. Cấu trúc của các hợp chất

được xác định thông qua phân tích phổ cộng hưởng từ nhân (NMR) 1 chiều và 2 chiều, phổ khối lượng phun mù điện tử phân giải cao (HRESIMS) và góc quay cực riêng, kết hợp với so sánh với số liệu của các hợp chất đã công bố.

### 3.3.1. Hợp chất CL251.1: (aS)-Asperpyrone A



Hình 3.2. Cấu trúc hóa học và tương tác HMBC ( $\rightarrow$ ) của hợp chất CL251.1

Hợp chất **CL251.1** có công thức phân tử là  $C_{31}H_{24}O_{10}$ , tương ứng với 20 độ bất bão hòa, được xác định thông qua sự xuất hiện của tín hiệu ion giả phân tử tại  $m/z$  557.1420  $[M+H]^+$  (tính toán lý thuyết cho công thức  $C_{31}H_{25}O_{10}^+$ , 557.1442) trên phổ HRESIMS và kết hợp với phân tích dữ liệu phổ  $^1H$  và  $^{13}C$  NMR (Bảng 3.1). Tiến hành phân tích phổ  $^{13}C$  NMR và phổ HSQC cho thấy 31 tín hiệu carbon, bao gồm hai carbon methyl, ba carbon methoxy, sáu carbon methine  $sp^2$  và 20 carbon  $sp^2$  không liên kết với proton [trong đó có 2 carbon carbonyl tại  $\delta_C$  182.9 (C-4) và 184.2 (C-4')]. Các dữ kiện phổ này gợi ý hợp chất **CL251.1** có dạng khung hexacyclic. Phổ  $^1H$  NMR ghi nhận tín hiệu của hai methyl dạng singlet tại  $\delta_H$  2.46 (2- $CH_3$ ) và 2.14 (2'- $CH_3$ ), ba nhóm methoxy tại  $\delta_H$  3.44 (10- $OCH_3$ ), 3.98 (6'- $OCH_3$ ), và 3.65 (8'- $OCH_3$ ), hai proton thơm ở vị trí *meta* với nhau tại  $\delta_H$  6.42 (d,  $J = 2.4$  Hz, H-7') và 6.27 (d,  $J = 2.4$  Hz, H-9'), bốn proton thơm hoặc olefin tại  $\delta_H$  6.30 (s, H-3), 6.99 (s, H-6), 7.13 (br s, H-7), và 6.00 (s, H-3') cùng với ba proton của các nhóm phenolic hydroxyl [trong đó hai proton có liên kết hydro nội phân tử tại 12.66 (s, 5-OH) và 15.21 (s, 5'-OH)].

Những dữ liệu phổ này gợi ý hợp chất **CL251.1** có dạng naphtho- $\gamma$ -pyrone dimer, bao gồm một flavasperone và một rubrofusarin B [35]. Điều

này cũng được khẳng định bởi sự có mặt của hai proton hydroxyl tại  $\delta_H$  12.66 (s, 5-OH) và 15.21 (s, 5'-OH) đặc trưng cho phần cấu trúc của tiểu phân flavasperone và tiểu phân rubrofusarin B tương ứng [36]. Trên phổ HMBC, H-6 ( $\delta_H$  6.99) thể hiện tương tác với C-5 ( $\delta_C$  156.5), C-7 ( $\delta_C$  106.0) và C-10a ( $\delta_C$  108.7). Cùng với đó, các tương tác HMBC của proton hydroxyl tại  $\delta_H$  12.66 (s, 5-OH) với C-4a, C-5 và C-6 và của H-3 ( $\delta_H$  6.30) với C-2 ( $\delta_C$  166.7), và C-4a (109.5) cũng được ghi nhận, cùng với sự có mặt của một nhóm carbonyl tại  $\delta_C$  182.9 (C-4), khẳng định phần cấu trúc naphtho- $\gamma$ -pyrone góc chứa nhóm hydroxyl liên kết hydro nội phân tử tại C-5.

Ngoài ra, tương tác HMBC của tín hiệu  $\delta_H$  3.44 với  $\delta_C$  157.2 (C-10) khẳng định vị trí của một nhóm methoxy tại vị trí C-10. Hai nhóm methoxy còn lại được xác định vị trí ở C-6' và C-8' trên đơn vị monome còn lại trên cơ sở phân tích phổ HMBC, với tương tác được ghi nhận lần lượt từ tín hiệu  $\delta_H$  3.98 đến  $\delta_C$  161.3 (C-6') và từ  $\delta_H$  3.65 đến  $\delta_C$  162.6 (C-8'). Vị trí của 2 nhóm methyl tại  $\delta_H$  2.46/  $\delta_C$  20.5 và  $\delta_H$  2.14/  $\delta_C$  20.7 được xác định lần lượt tại C-2 và C-2' thông qua các tương tác HMBC của tín hiệu proton tại  $\delta_H$  2.46 với  $\delta_C$  166.7 (C-2) và 110.8 (C-3) và của tín hiệu proton tại  $\delta_H$  2.14 với  $\delta_C$  167.9 (C-2') và 107.6 (C-3').

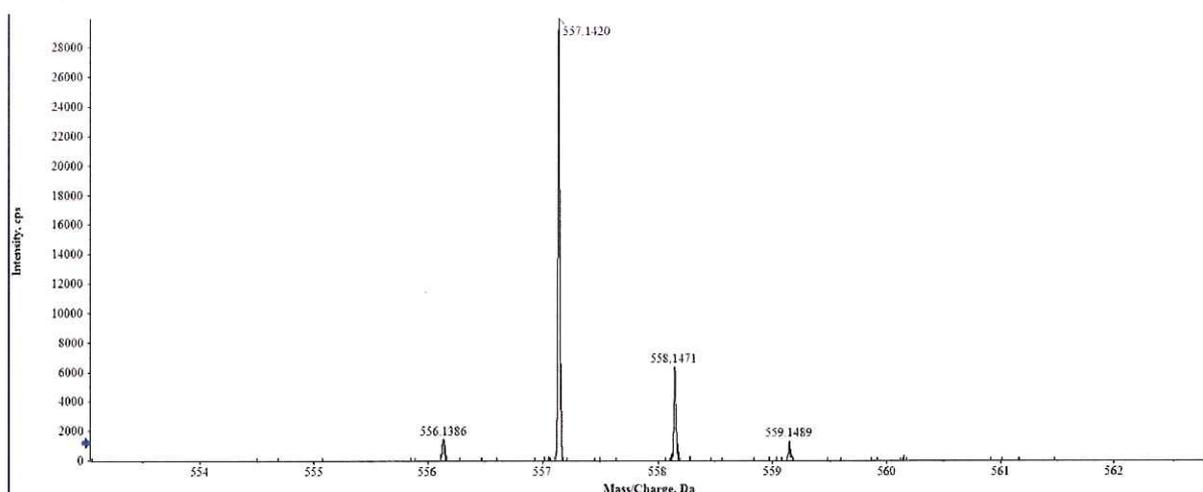
Trên cơ sở các phân tích phổ nêu trên, cấu trúc của hợp chất **CL251.1** được xác định là có dạng dimeric naphtho- $\gamma$ -pyrone cấu thành bởi tiểu phân 8-*O*-desmethylated flavasperone và tiểu phân rubrofusarin B tuyến tính, với cầu liên kết lần lượt ở vị trí C-9 và C-10'. Điều này được khẳng định thông qua sự tương đồng hoàn toàn với số liệu phổ của hợp chất dimeric naphtho- $\gamma$ -pyrone đã được công bố [37]. Hơn nữa, cấu hình *aS* của hợp chất **CL251.1** được khẳng định thông qua sự phù hợp về giá trị góc quay cực riêng của 2 hợp chất [hợp chất **CL251.1**:  $[\alpha]_D^{26} = -94.6$  ( $c = 0.1$ ,  $\text{CHCl}_3$ ) so với hợp chất (*aS*)-asperpyrone A tham khảo:  $[\alpha]_D^{25} = -117.3$  ( $c = 0.06$ ,  $\text{CHCl}_3$ )]. Như vậy, với các phân tích dữ liệu phổ NMR và góc quay cực riêng, kết hợp với so sánh với các số liệu đã công bố, hợp chất **CL251.1** được xác định là (*aS*)-asperpyrone A.

**Thông số hóa lý:** dạng bột màu vàng.  $[\alpha]_D^{26} = -94.6$  ( $c = 0.1$ ,  $\text{CHCl}_3$ ).  
 Công thức phân tử:  $\text{C}_{31}\text{H}_{24}\text{O}_{10}$ . HRESIMS:  $m/z$  557.1420  $[\text{M}+\text{H}]^+$  (tính toán lý thuyết cho công thức  $\text{C}_{31}\text{H}_{25}\text{O}_{10}^+$ , 557.1442)  $^1\text{H}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ , 600 MHz) và  $^{13}\text{C}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ , 150 MHz): trình bày ở bảng 3.1.

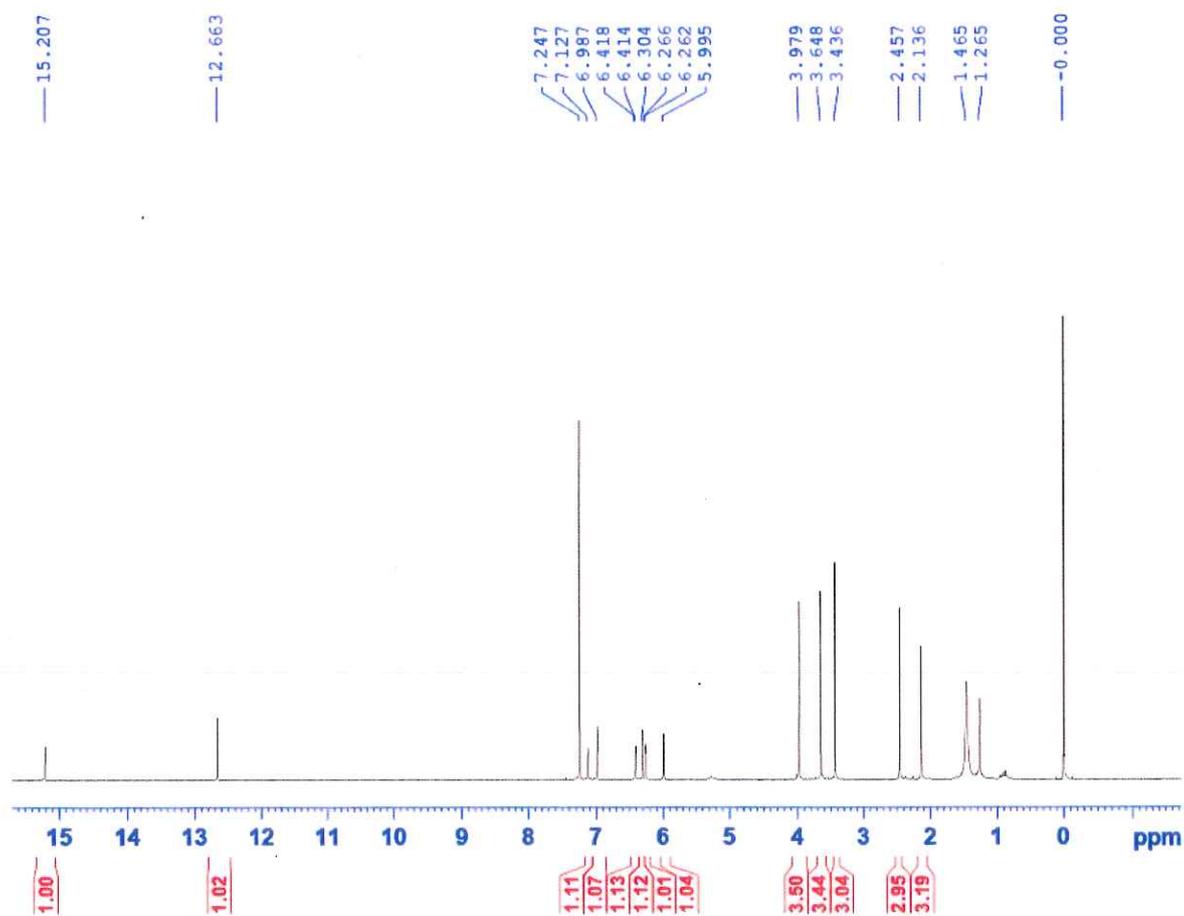
Bảng 3.1. Số liệu phổ  $^1\text{H}$  và  $^{13}\text{C}$  NMR của hợp chất CL251.1

Vị trí	$\delta_{\text{C}}^*$ [37]	$\delta_{\text{C}}^{\text{a,b}}$	$\delta_{\text{H}}^{\text{a,c}}$ (độ bội, $J = \text{Hz}$ )
2	167.9	166.7	
3	109.9	110.8	6.30 (s)
4	182.3	182.9	
4a	108.0	109.5	
5	155.4	156.5	
6	104.3	105.7	6.99 (s)
6a	140.0	140.9	
7	105.1	106.0	7.13 (br s)
8	158.3	156.2	
9	116.1	115.2	
10	156.8	157.2	
10a	106.5	108.7	
10b	154.6	155.3	
2-CH3	19.8	20.5	2.46 (s)
5-OH			12.66 (s)
10-OCH3	60.9	61.4	3.44 (s)
2'	168.4	167.9	
3'	106.7	107.6	6.00 (s)
4'	183.9	184.2	
4'a	103.2	104.2	
5'	161.9	164.0	
5'a	107.5	108.0	
6'	160.7	161.3	
7'	96.3	97.5	6.42 (d, 2.4)
8'	161.0	162.6	
9'	96.7	95.7	6.27 (d, 2.4)
9'a	140.0	140.7	
10'	105.1	101.4	
10'a	150.1	152.1	
2'-CH3	20.1	20.7	2.14 (s)
5'-OH			15.21 (s)
6'-OCH3	56.0	56.2	3.98 (s)
8'-OCH3	55.0	55.4	3.65 (s)

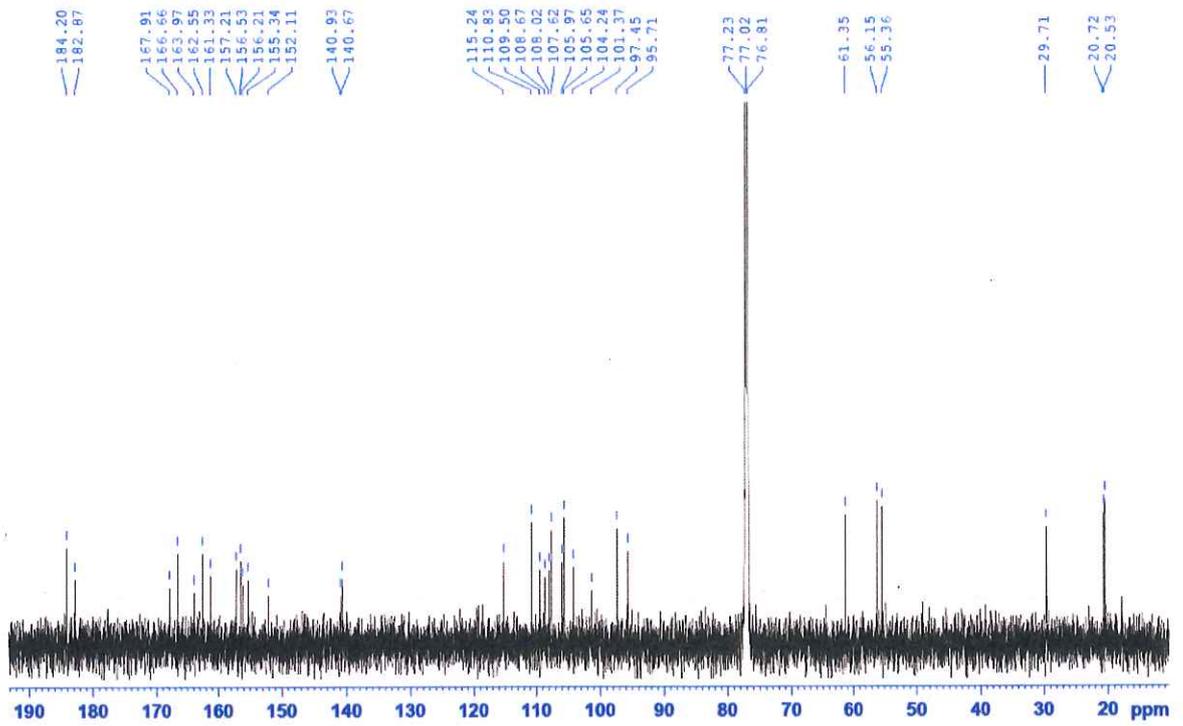
\* $\delta_{\text{C}}$  của hợp chất tham khảo đo trong  $\text{DMSO-d}_6$  [37], <sup>a</sup>  $\text{CDCl}_3$ , <sup>b</sup> 150 MHz, <sup>c</sup> 600 MHz



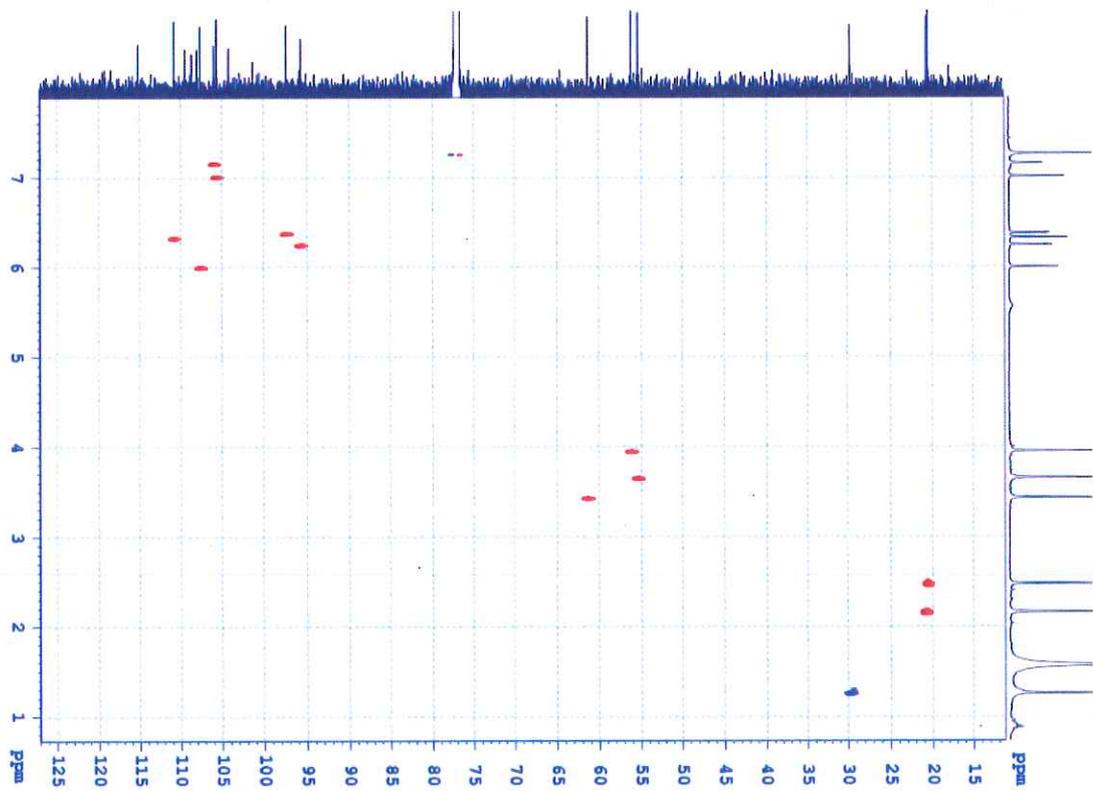
Hình 3.3. Phổ HRESIMS của hợp chất CL251.1



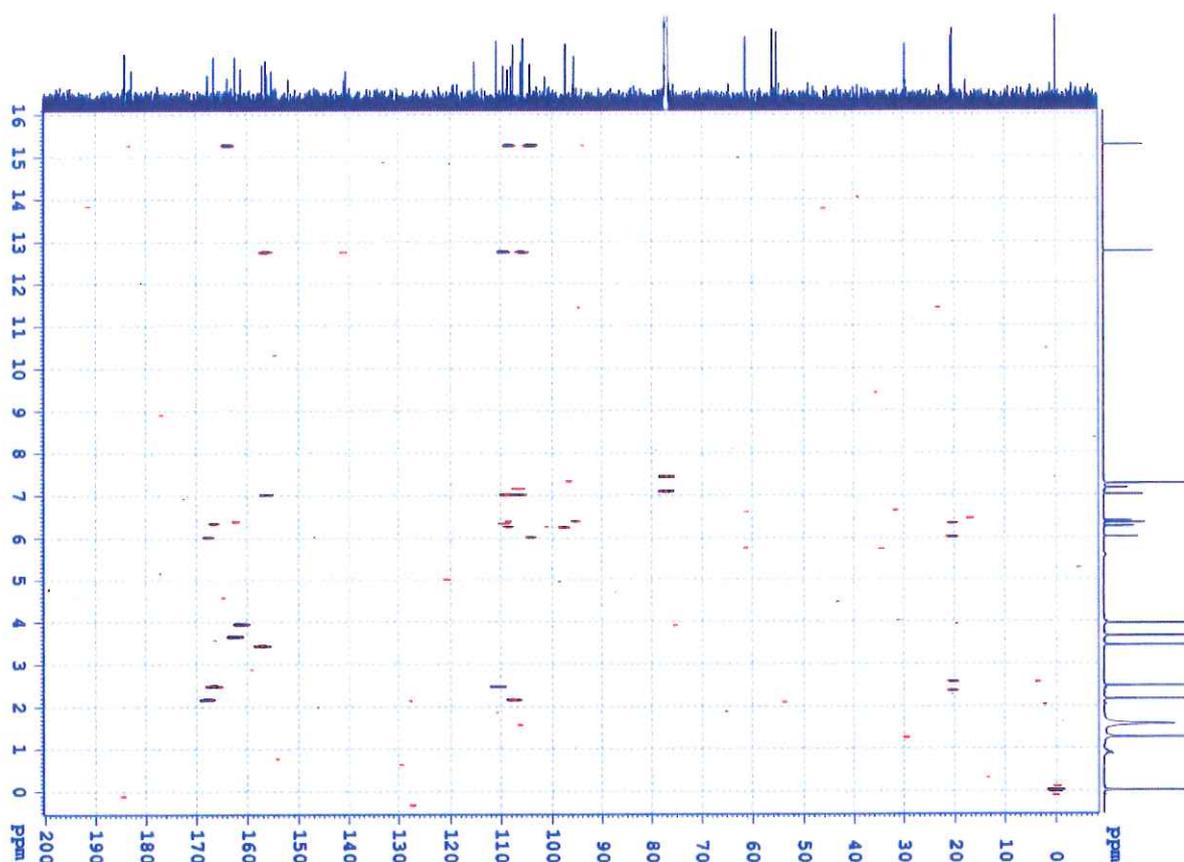
Hình 3.4. Phổ  $^1\text{H}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ , 600 MHz) của hợp chất CL251.1



Hình 3.5. Phổ  $^{13}\text{C}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ , 150 MHz) của hợp chất CL251.1

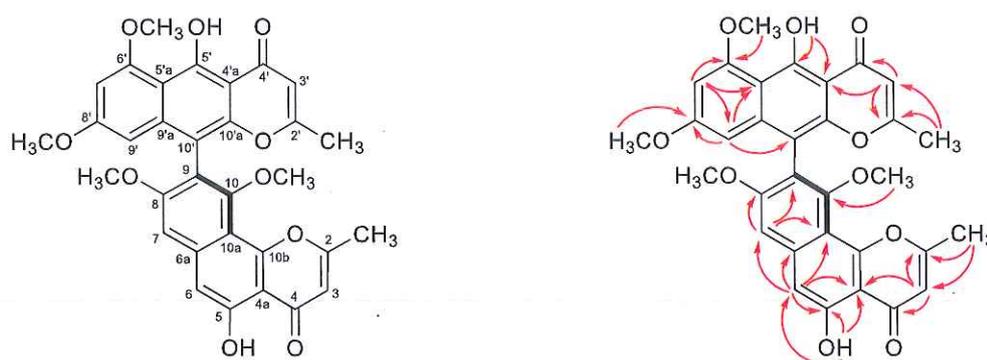


Hình 3.6. Phổ HSQC ( $\text{CDCl}_3$ , 600 MHz) của hợp chất CL251.1



Hình 3.7. Phổ HMBC ( $\text{CDCl}_3$ , 600 MHz) của hợp chất **CL251.1**

### 3.3.2. Hợp chất **CL251.2**: (*aS*)-Fonsecinone A



Hình 3.8. Cấu trúc hóa học và tương tác HMBC ( $\rightarrow$ ) của hợp chất **CL251.2**

Hợp chất **CL251.2** được xác định có công thức phân tử là  $\text{C}_{32}\text{H}_{26}\text{O}_{10}$ , được xác định thông qua sự xuất hiện của tín hiệu ion giả phân tử tại  $m/z$  571.1584  $[\text{M}+\text{H}]^+$  (tính toán lý thuyết cho công thức  $\text{C}_{32}\text{H}_{27}\text{O}_{10}^+$ , 571.1599) trên phổ HRESIMS và kết hợp với phân tích dữ liệu phổ  $^1\text{H}$  và  $^{13}\text{C}$  NMR

(Bảng 1), tương ứng với 20 độ bất bão hòa. Phổ  $^{13}\text{C}$  NMR ghi nhận tín hiệu của 32 carbon, bao gồm 2 carbon carbonyl, 6 carbon methine  $\text{sp}^2$ , 18 carbon  $\text{sp}^2$  không liên kết với proton, và 6 carbon methyl. Các dữ kiện phổ này cho thấy sự tương đồng về cấu trúc của hợp chất **CL251.2** so với hợp chất **CL251.1**, điểm khác biệt là hợp chất **CL251.2** có khối lượng phân tử nhiều hơn hợp chất **CL251.1** là 14 Da. Điều này được khẳng định với sự xuất hiện thêm của một nhóm methoxy tại  $\delta_{\text{H}}$  3.78 (s)/  $\delta_{\text{C}}$  56.0 trên phổ  $^1\text{H}$  và  $^{13}\text{C}$  NMR của hợp chất **CL251.2** so với hợp chất **CL251.1**, và gợi ý sự thay thế nhóm hydroxy ở vị trí C-8 của hợp chất **CL251.1** bằng nhóm methoxy ở hợp chất **CL251.2**. Giả thuyết này được khẳng định bởi tương tác HMBC giữa  $\delta_{\text{H}}$  3.78 với  $\delta_{\text{C}}$  160.1 (C-8). Tiến hành so sánh số liệu phổ NMR và góc quay cực riêng của hợp chất **CL251.2** với hợp chất (*aS*)-fonsecinone A đã biết thấy hoàn toàn tương đồng [**CL251.2**:  $[\alpha]_{\text{D}}^{26} = -127.0$  ( $c = 0.1$ ,  $\text{CHCl}_3$ )] so với hợp chất tham khảo:  $[\alpha]_{\text{D}}^{25} = -20.1$  ( $c = 0.01$ ,  $\text{CHCl}_3$ )]. Trên cơ sở các phân tích phổ nêu trên, hợp chất **CL251.2** được xác định là (*aS*)-fonsecinone A.

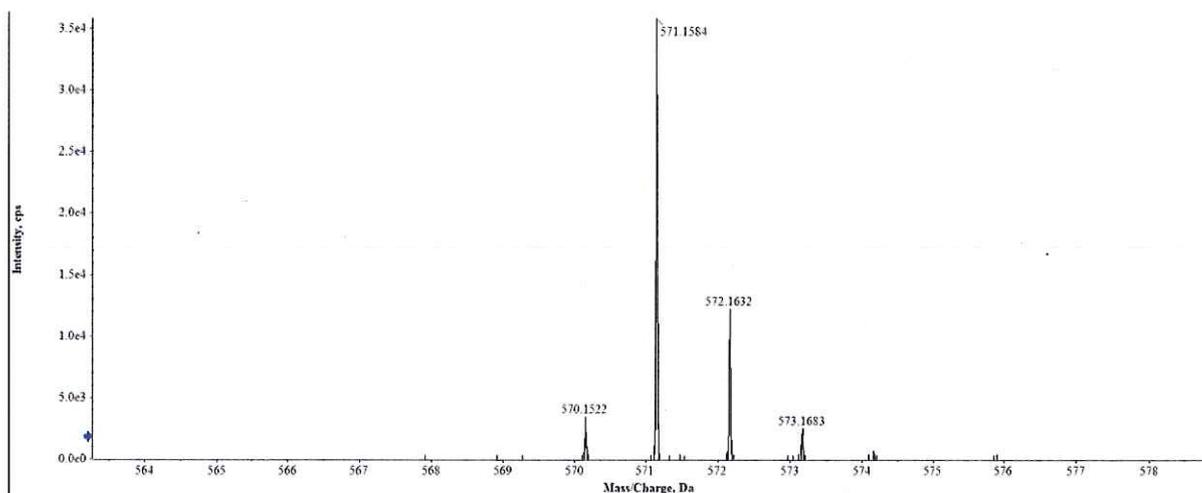
**Thông số hóa lý:** dạng bột màu vàng.  $[\alpha]_{\text{D}}^{26} = -127.0$  ( $c = 0.1$ ,  $\text{CHCl}_3$ ). Công thức phân tử:  $\text{C}_{32}\text{H}_{26}\text{O}_{10}$ . HRESIMS:  $m/z$  571.1584  $[\text{M}+\text{H}]^+$  (tính toán lý thuyết cho công thức  $\text{C}_{32}\text{H}_{27}\text{O}_{10}^+$ , 571.1599).  $^1\text{H}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ , 600 MHz) và  $^{13}\text{C}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ , 150 MHz): trình bày ở bảng 3.2.

Bảng 3.2. Số liệu phổ  $^1\text{H}$  và  $^{13}\text{C}$  NMR của hợp chất **CL251.2**

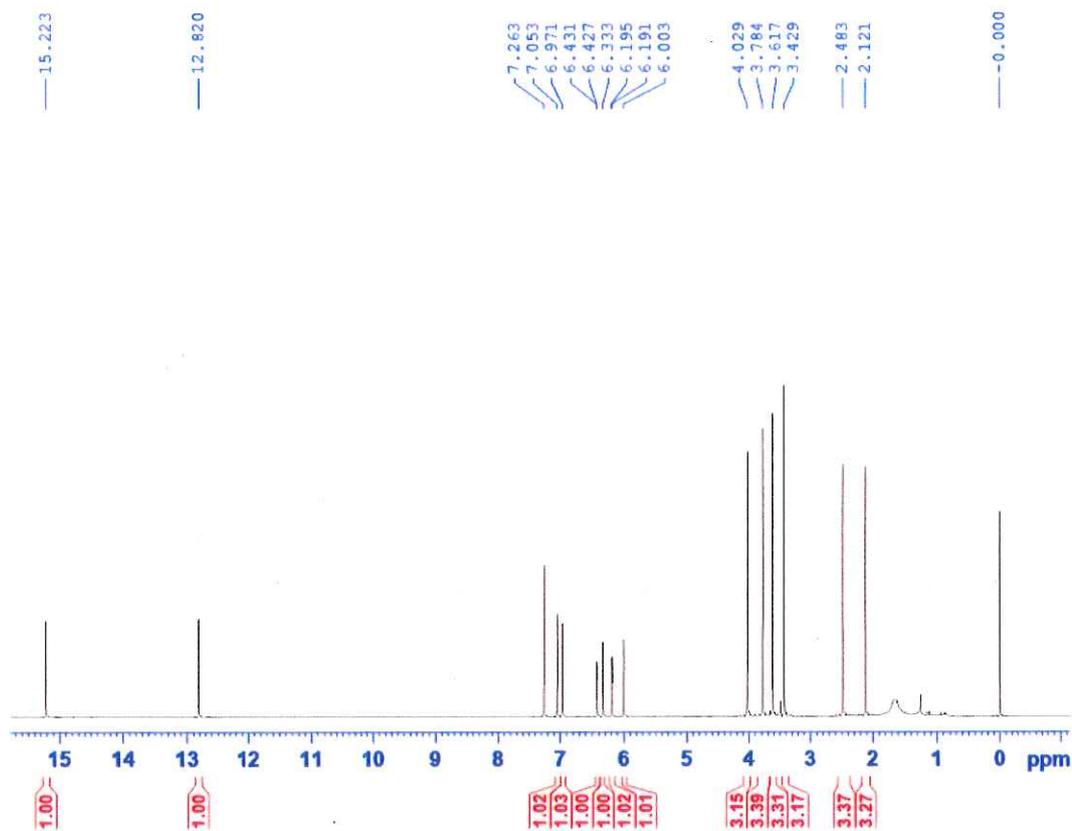
Vị trí	$\delta_{\text{C}}^{*[\text{37}]}$	$\delta_{\text{C}}^{\text{a,b}}$	$\delta_{\text{H}}^{\text{a,c}}$ (độ bội, $J = \text{Hz}$ )
2	167.5	166.9	
3	110.7	110.7	6.33 (s)
4	182.9	183.0	
4a	109.4	109.4	
5	156.7	156.7	
6	106.0	106.1	7.05 (s)
6a	140.8	140.8	
7	101.6	101.6	6.97 (s)
8	160.0	160.1	
9	117.1	117.2	
10	156.9	157.0	
10a	108.0	108.0	
10b	155.1	155.1	

2-CH3	20.7	20.6	2.48 (s)
5-OH			12.82 (s)
8-OCH3	56.0	56.0	3.78 (s)
10-OCH3	61.2	61.2	3.43 (s)
2'	166.8	167.5	
3'	107.4	107.4	6.00 (s)
4'	184.5	184.6	
4'a	104.2	104.3	
5'	162.8	162.9	
5'a	108.6	108.7	
6'	161.1	161.2	
7'	97.0	97.0	6.43 (d, 2.4)
8'	161.5	161.6	
9'	96.2	96.4	6.20 (d, 2.4)
9'a	140.6	140.7	
10'	105.0	105.1	
10'a	150.8	150.9	
2'-CH3	20.6	20.7	2.12 (s)
5'-OH			15.22 (s)
6'-OCH3	56.2	56.3	4.03 (s)
8'-OCH3	55.2	55.2	3.62 (s)

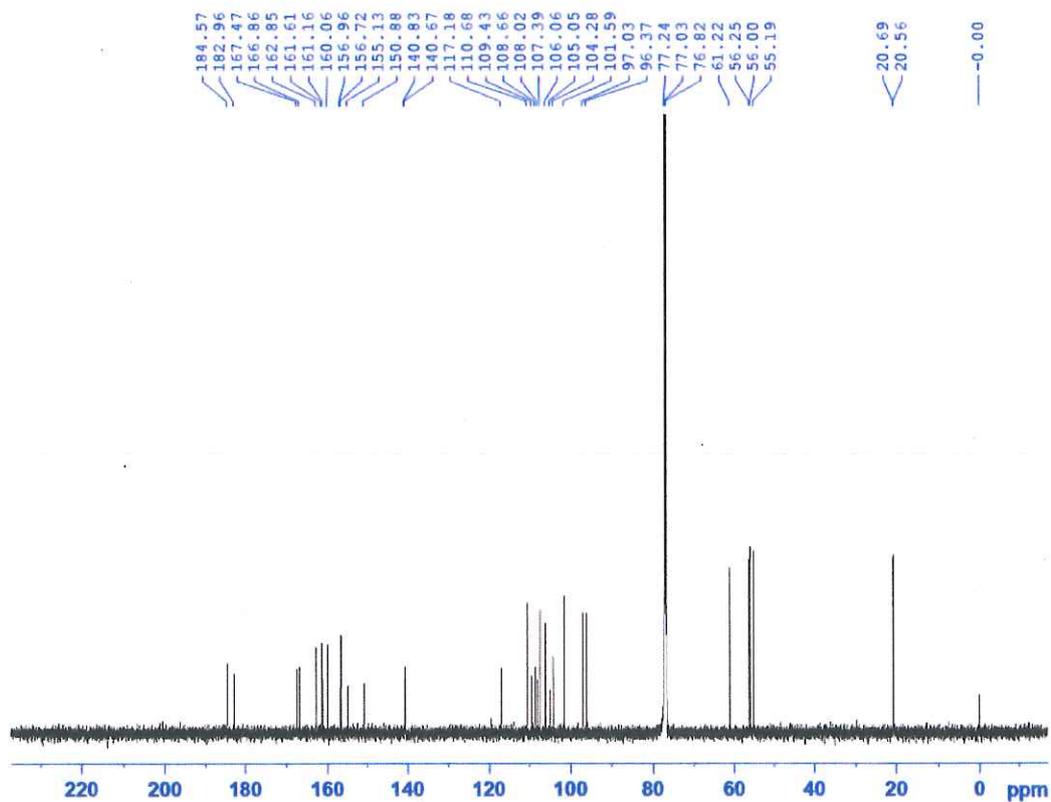
\*  $\delta_c$  của hợp chất tham khảo đo trong DMSO- $d_6$ , <sup>a</sup> CDCl<sub>3</sub>, <sup>b</sup> 150 MHz, <sup>c</sup> 600 MHz



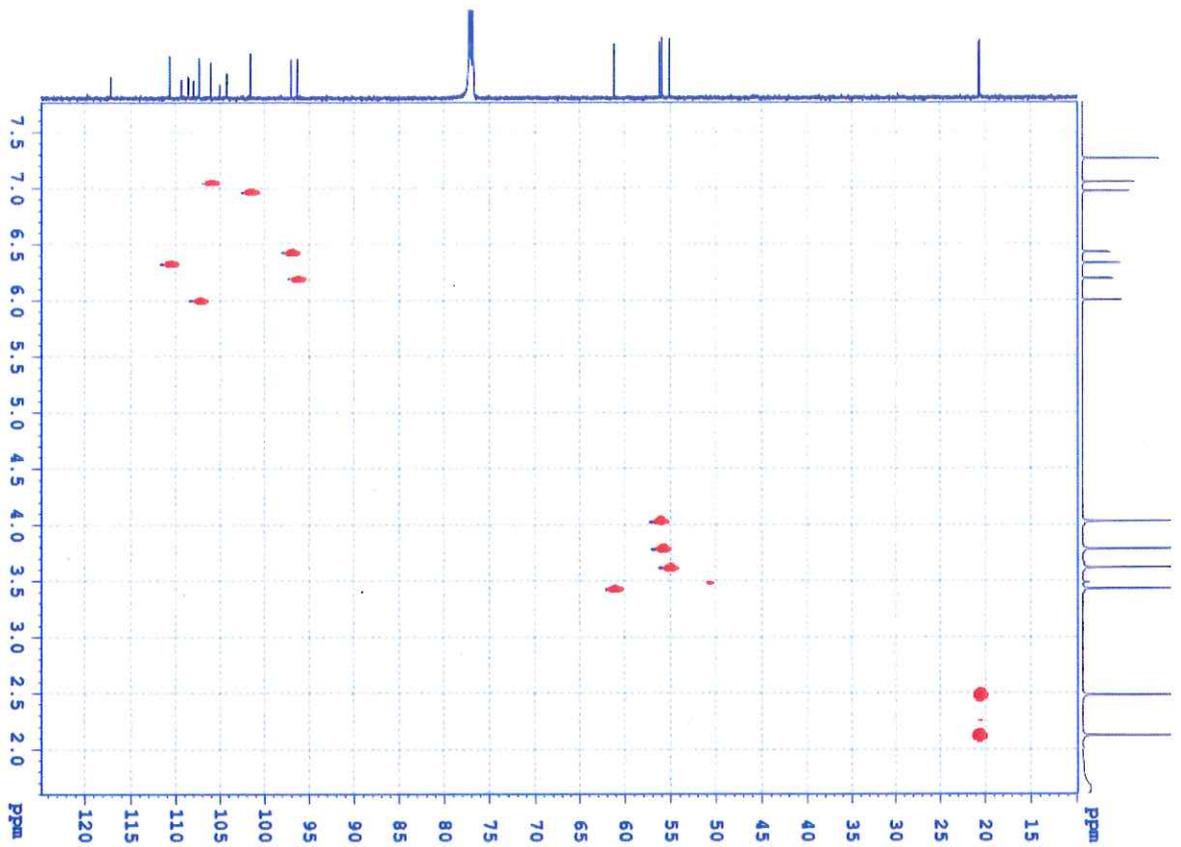
Hình 3.9. Phổ HRESIMS của hợp chất CL251.2



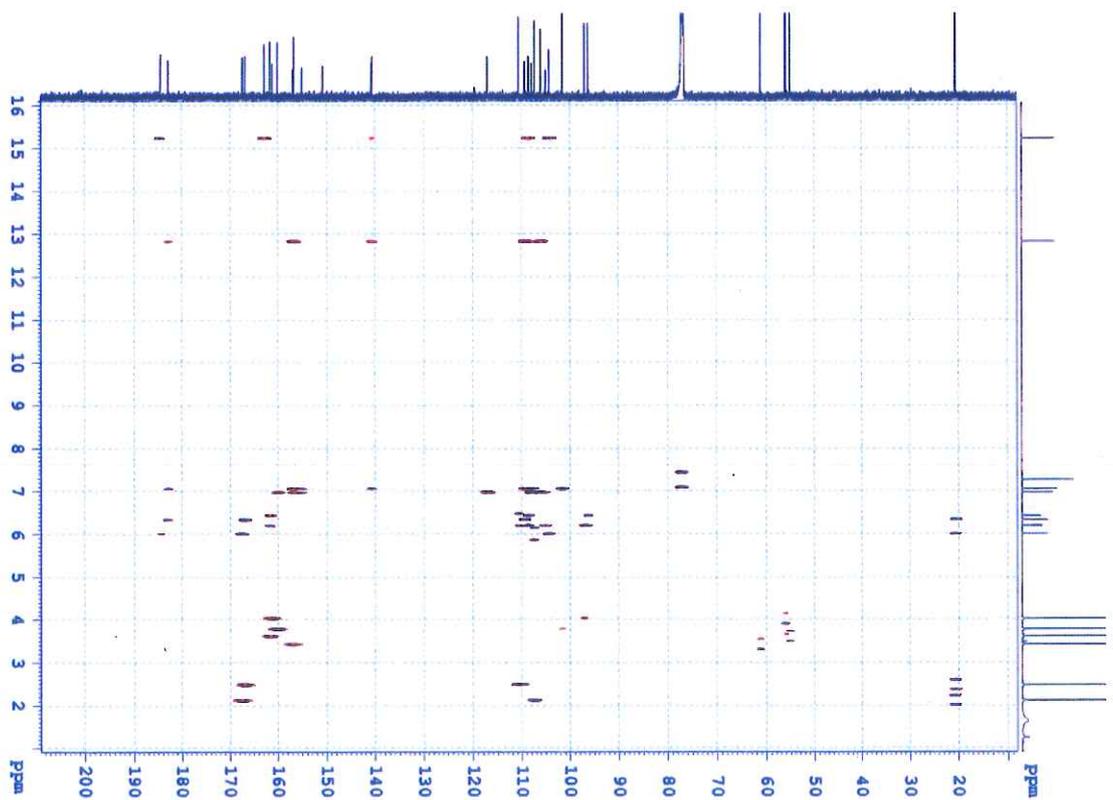
Hình 3.10. Phổ  $^1\text{H}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ , 600 MHz) của hợp chất **CL251.2**



Hình 3.11. Phổ  $^{13}\text{C}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ , 150 MHz) của hợp chất **CL251.2**

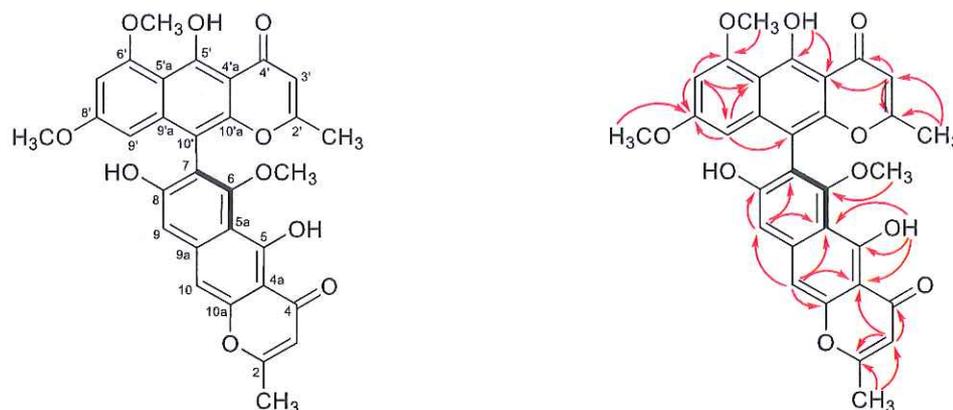


Hình 3.12. Phổ HSQC (CDCl<sub>3</sub>, 600 MHz) của hợp chất CL251.2



Hình 3.13. Phổ HMBC (CDCl<sub>3</sub>, 600 MHz) của hợp chất CL251.2

### 3.3.3. Hợp chất CL251.3: (aS)-Dianhydro-aurasperone C



Hình 3.14. Cấu trúc hóa học và tương tác HMBC ( $\rightarrow$ ) của hợp chất **CL251.3**

Công thức phân tử của hợp chất **CL251.3** được xác định là  $C_{31}H_{24}O_{10}$  thông qua sự xuất hiện của tín hiệu ion giả phân tử tại  $m/z$  557.1451  $[M+H]^+$  (tính toán lý thuyết cho công thức  $C_{31}H_{25}O_{10}^+$ , 557.1442) trên phổ HRESIMS, tương ứng với 20 độ bất bão hòa. Trên phổ  $^1H$  NMR của hợp chất **CL251.3** xuất hiện tín hiệu singlet của 6 proton thơm hoặc olefin tại  $\delta_H$  6.02 (H-3), 7.19 (H-9), 7.12 (H-10), 5.93 (H-3'), và 6.27 (H-7' và H-9'), 2 tín hiệu singlet của nhóm methyl tại  $\delta_H$  2.40 (2- $CH_3$ ) và 2.16 (2'- $CH_3$ ), và 3 nhóm methoxy tại  $\delta_H$  3.45 (s, 6-O $CH_3$ ), 3.85 (s, 6'-O $CH_3$ ), và 3.66 (s, 8'-O $CH_3$ ) (Bảng 3.3). Phân tích phổ  $^{13}C$  NMR và HSQC ghi nhận 31 carbon, bao gồm 2 carbon carbonyl tại  $\delta_C$  184.5 (C-4) và 184.2 (C-4'), 24 carbon  $sp^2$  trong đó có 18 carbon không liên kết với proton và 6 carbon methine  $sp^2$ , cùng với 2 nhóm  $CH_3$  và 3 nhóm methoxy. Các dữ kiện phổ này cho gợi ý hợp chất **CL251.3** cũng thuộc lớp chất dimeric naphtho- $\gamma$ -pyrone, tương tự như hợp chất **CL251.1** và **CL251.2**. Theo đó, so sánh số liệu phổ của hợp chất **CL251.3** với hợp chất **CL251.1** và **CL251.2** cho thấy sự tương đồng hoàn toàn đối với tiểu phân rubrofusarin B tuyến tính (mảnh phân tử từ C-2'-C-10'a). Các số liệu phổ  $^1H$  và  $^{13}C$  NMR của tiểu phân còn lại cho thấy sự tương đồng với rubrofusarin B, ngoại trừ mất đi tín hiệu của một nhóm methoxy. Điều này được khẳng định thông qua các tương tác chi tiết trên phổ HMBC, với tương tác của proton của nhóm hydroxyl có liên kết hydro nội phân tử đặc trưng tại  $\delta_H$  14.90 (s) với C-4a, C-

5, và C-5a, tương tác của H-3 với C-2. C-4, C-4a, của H-10 với C-4a, C-5a, C-9 và C-10a, của H-9 với C5a, C-7, C-8, của nhóm methyl với C-2 và C-3, và tương tác của nhóm methoxy với C-6. Cầu liên kết của 2 phần monomer tại C-7/C-10' được xác định thông qua sự phù hợp hoàn toàn khi so sánh số liệu phổ NMR của **CL251.3** với hợp chất (aS)-dianhydro-aurasperone C đã biết, kết hợp với các tương tác trên phổ HMBC [38]. Cấu hình của hợp chất **CL251.3** cũng được xác định là (aS) thông qua sự phù hợp hoàn toàn khi so sánh góc quay cực với hợp chất (aS)-dianhydro-aurasperone C đã biết [**CL251.3**:  $[\alpha]_D^{26} = -139.9$  ( $c = 0.09$ ,  $\text{CHCl}_3$ ) so với hợp chất tham khảo:  $[\alpha]_D^{22} = -180.8$  ( $c 0.08$ ,  $\text{MeOH}$ )]. Với các phân tích phổ nêu trên, hợp chất **CL251.3** được xác định là (aS)-dianhydro-aurasperone C.

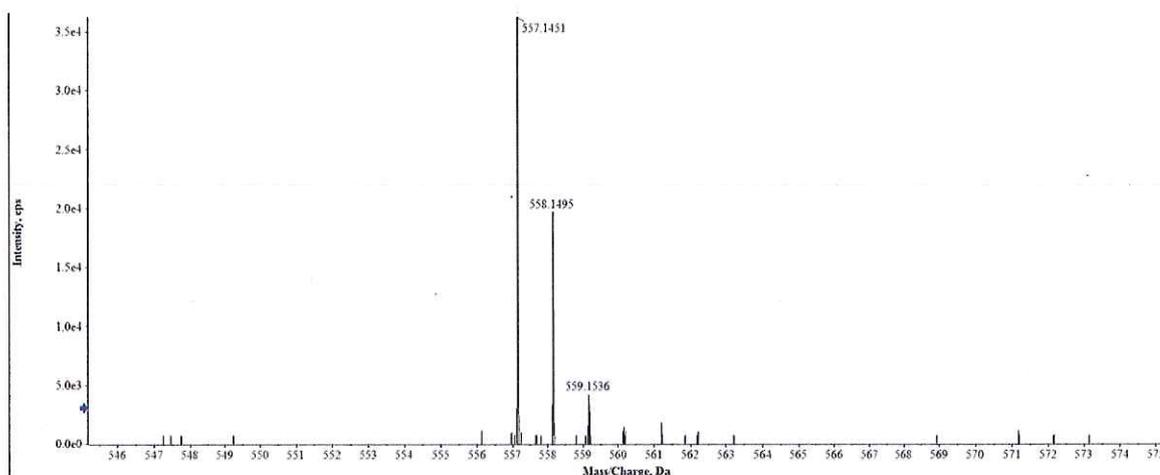
**Thông số hóa lý:** dạng bột màu vàng.  $[\alpha]_D^{26} = -139.9$  ( $c = 0.09$ ,  $\text{CHCl}_3$ ). Công thức phân tử:  $\text{C}_{31}\text{H}_{24}\text{O}_{10}$ . HRESIMS:  $m/z$  557.1451  $[\text{M}+\text{H}]^+$  (tính toán lý thuyết cho công thức  $\text{C}_{31}\text{H}_{25}\text{O}_{10}^+$ , 557.1442).  $^1\text{H}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ , 600 MHz) và  $^{13}\text{C}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ , 150 MHz): trình bày ở bảng 3.

Bảng 3.3. Số liệu phổ  $^1\text{H}$  và  $^{13}\text{C}$  NMR của hợp chất **CL251.3**

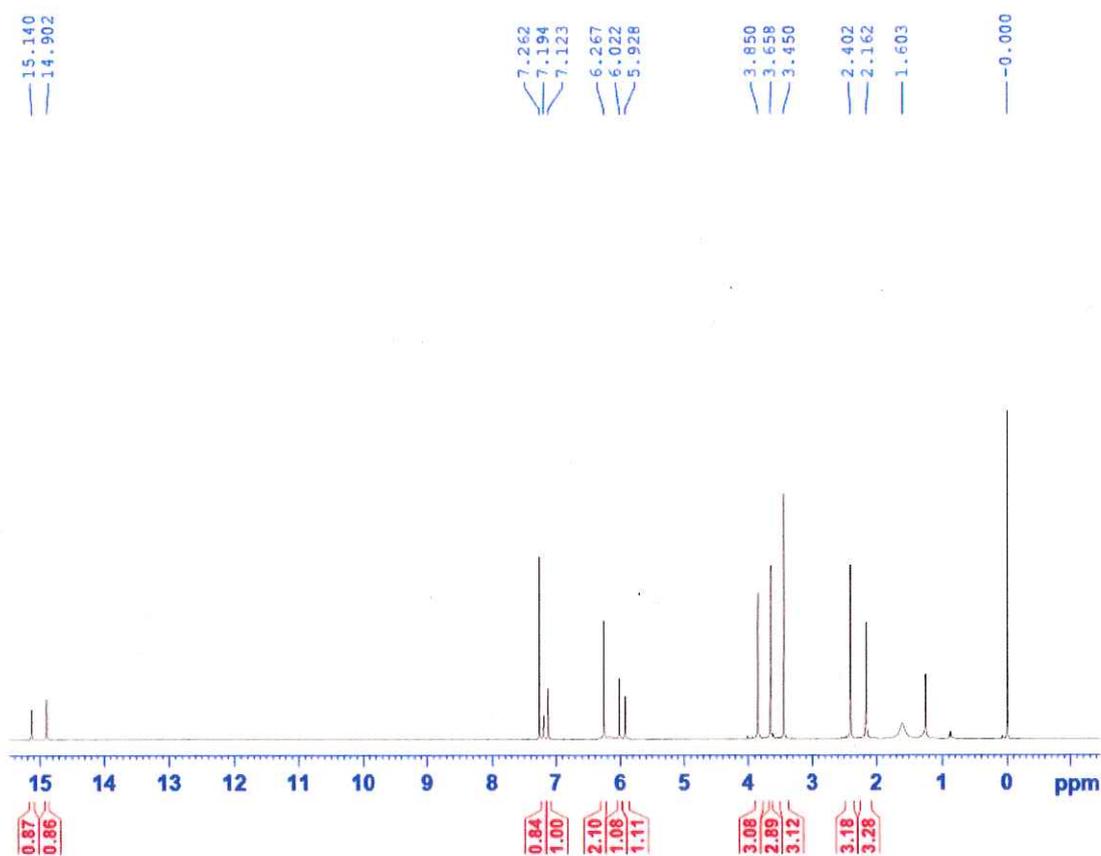
Vị trí	$\delta_C^{*[38]}$	$\delta_C^{a,b}$	$\delta_H^{a,c}$ (độ bội, $J = \text{Hz}$ )
2	169.3	167.7	
3	107.2	107.2	6.02 (s)
4	184.4	184.5	
4a	103.8	104.4	
5	161.7	162.3	
5a	110.2	111.3	
6	158.7	158.9	
7	117.2	115.9	
8	159.1	156.7	
9	105.7	105.9	7.19 (br s)
9a	140.7	140.7	
10	100.8	100.9	7.12 (s)
10a	152.9	153.2	
2-CH3	20.7	20.8	2.40 (s)
5-OH			14.90 (s)

6-OCH3	62.0	62.2	3.45 (s)
2'	169.0	168.2	
3'	107.1	107.4	5.93 (s)
4'	184.5	184.2	
4'a	103.8	104.2	
5'	162.5	163.5	
5'a	108.1	108.5	
6'	161.3	161.0	
7'	96.9	97.2	6.27 (s)
8'	161.6	162.2	
9'	97.2	96.0	6.27 (s)
9'a	140.6	140.7	
10'	105.9	101.9	
10'a	150.7	152.1	
2'-CH3	20.6	20.7	2.16 (s)
5'-OH			15.14 (s)
6'-OCH3	56.6	55.9	3.85 (s)
8'-OCH3	55.5	55.3	3.66 (s)

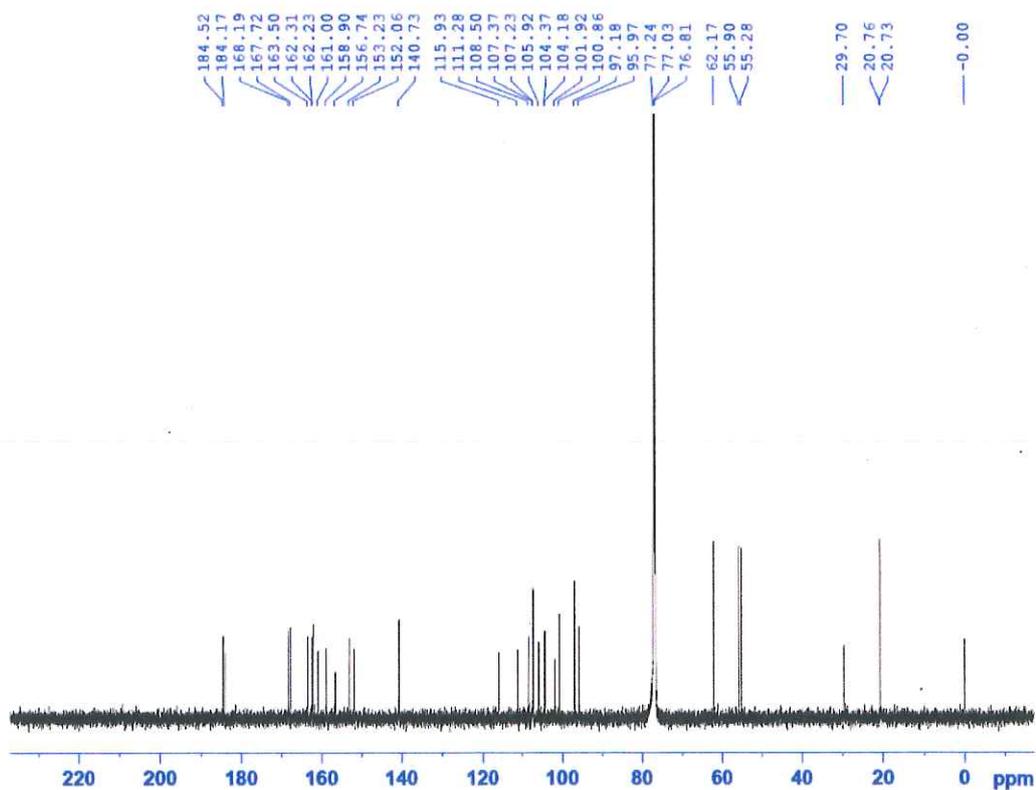
\*  $\delta_C$  của hợp chất tham khảo được đo trong DMSO-d<sub>6</sub>, <sup>a</sup> CDCl<sub>3</sub>, <sup>b</sup> 150 MHz, <sup>c</sup> 600 MHz



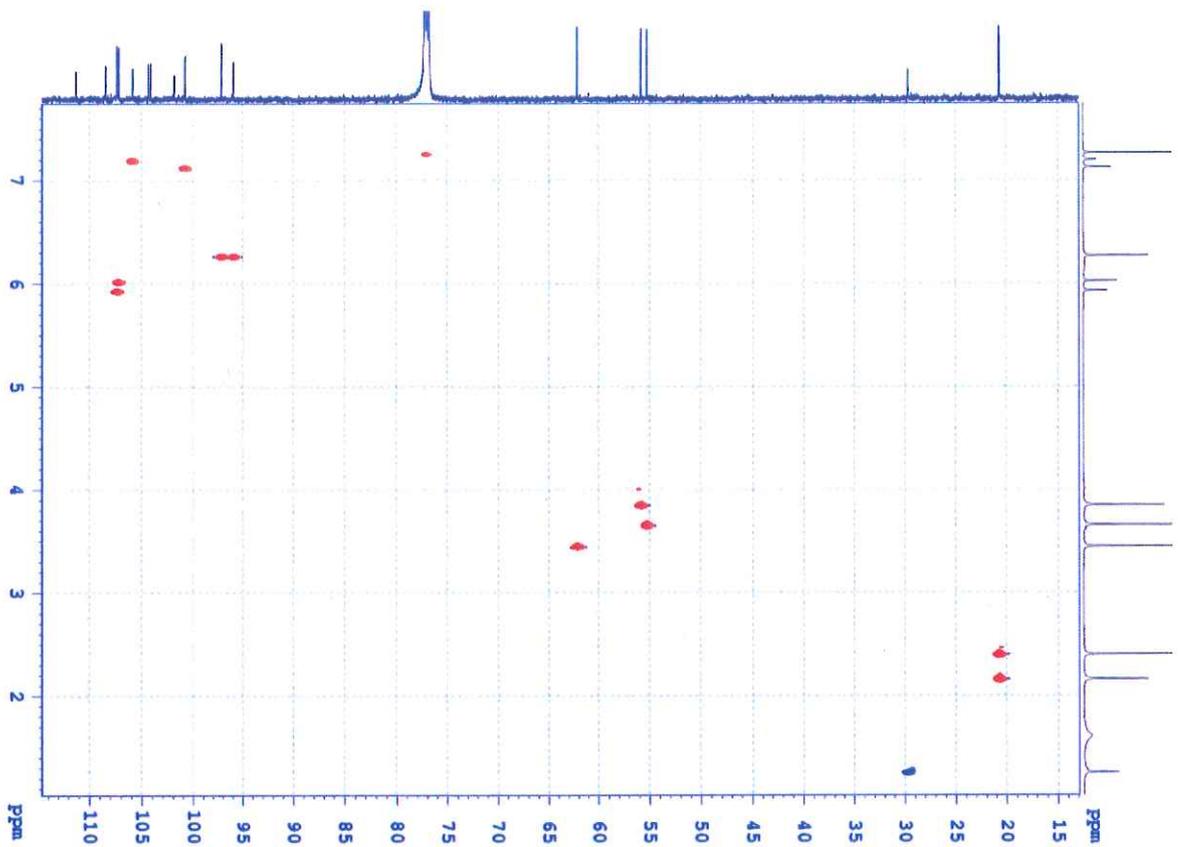
Hình 3.15. Phổ HRESIMS của hợp chất CL251.3



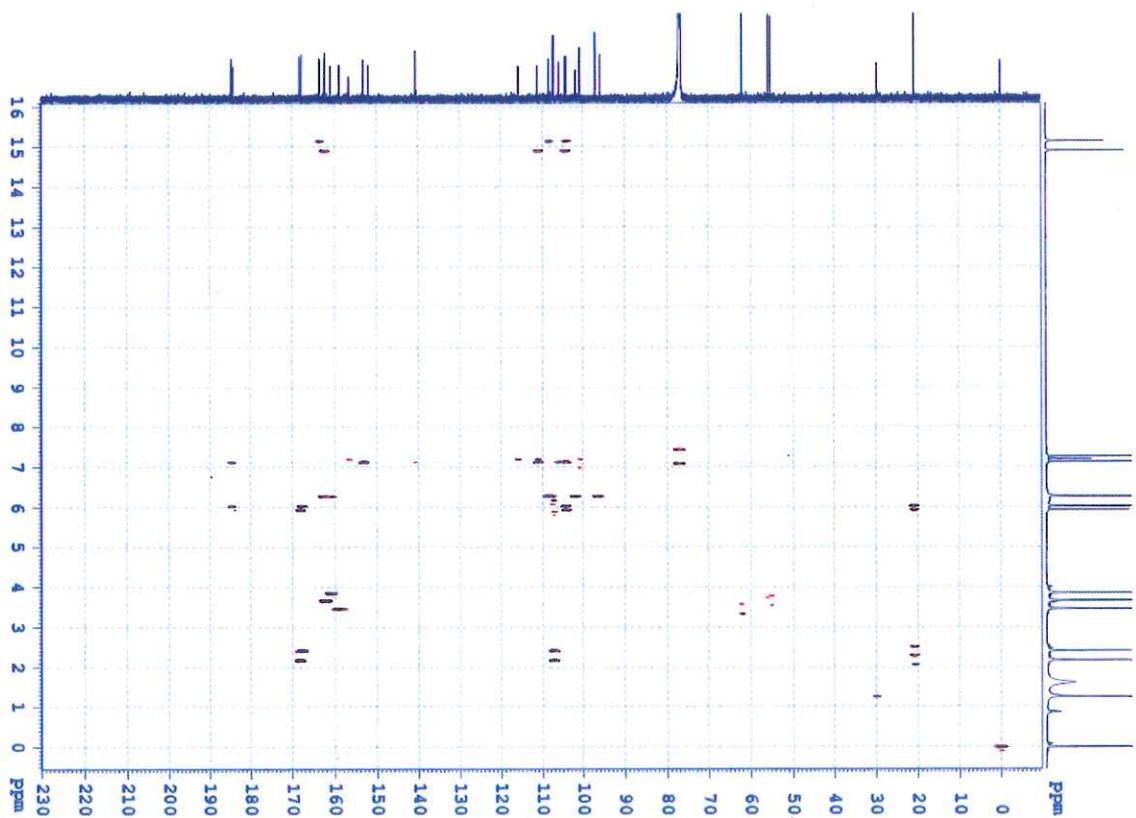
Hình 3.16. Phổ <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>, 600 MHz) của hợp chất CL251.3



Hình 3.17. Phổ <sup>13</sup>C NMR (CDCl<sub>3</sub>, 150 MHz) của hợp chất CL251.3

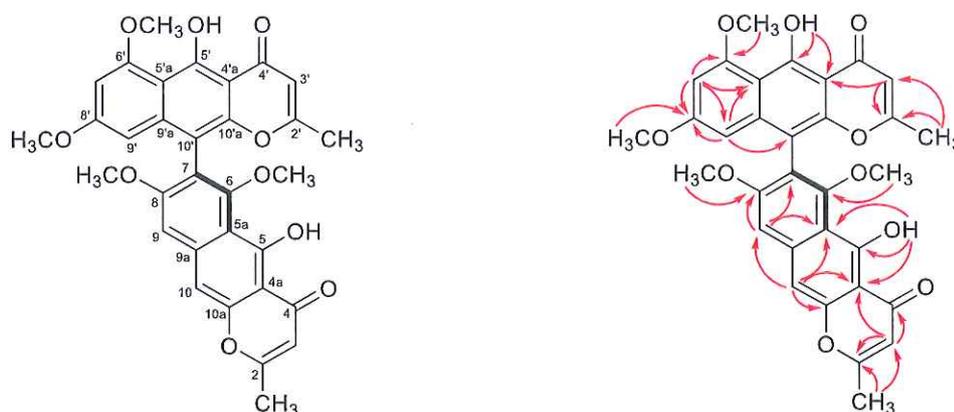


Hình 3.18. Phổ HSQC (CDCl<sub>3</sub>, 600 MHz) của hợp chất **CL251.3**



Hình 3.19. Phổ HMBC (CDCl<sub>3</sub>, 600 MHz) của hợp chất **CL251.3**

### 3.3.4. Hợp chất CL251.4: (aS)-Aurasperone A



Hình 3.20. Cấu trúc hóa học và tương tác HMBC ( $\rightarrow$ ) của hợp chất **CL251.4**

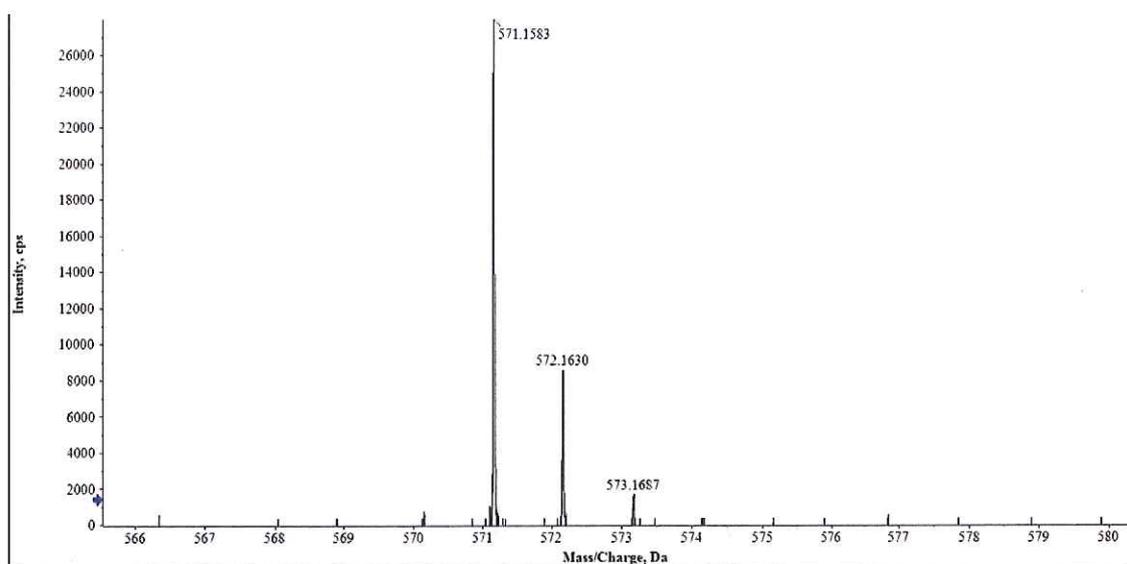
Hợp chất **CL251.4** có các số liệu phổ  $^1\text{H}$  và  $^{13}\text{C}$  NMR tương đồng với hợp chất **CL251.3** cho thấy đây là một hợp chất dimeric naphtho- $\gamma$ -pyrone, với cả hai tiểu đơn vị rubrofusarin B ở dạng tuyến tính. Điểm khác biệt giữa 2 hợp chất này là sự xuất hiện thêm của một nhóm methoxy cộng hưởng tại  $\delta_{\text{H}}$  3.78 (s)/  $\delta_{\text{C}}$  55.9 trên phổ  $^1\text{H}$  và  $^{13}\text{C}$  NMR của hợp chất **CL251.4** so với hợp chất **CL251.3**. Vị trí của nhóm methoxy này được xác định tại C-8 thông qua tương tác HMBC giữa  $\delta_{\text{H}}$  3.78 với  $\delta_{\text{C}}$  160.2 (C-8). Cấu trúc của hợp chất **CL251.4** được khẳng định thông qua sự phù hợp hoàn toàn khi so sánh với số liệu phổ của hợp chất naphtho- $\gamma$ -pyrone dimer đã biết [39], kết hợp với phân tích phổ HSQC và HMBC và sự xuất hiện của tín hiệu ion giả phân tử tại  $m/z$  571.1583  $[\text{M}+\text{H}]^+$  (tính toán lý thuyết cho công thức  $\text{C}_{32}\text{H}_{27}\text{O}_{10}^+$ , 571.1599) trên phổ HRESIMS. Cuối cùng, cấu hình của hợp chất **CL251.4** được khẳng định là (aS) khi so sánh với hợp chất (aS)-aurasperone A đã công bố [**CL251.4**:  $[\alpha]_{\text{D}}^{26} = -86.2$  ( $c = 0.08$ ,  $\text{CHCl}_3$ ) so với hợp chất tham khảo:  $[\alpha]_{\text{D}} -86.7$  ( $c = 0.3$ ,  $\text{MeOH}$ ). Như vậy, hợp chất **CL251.4** được xác định là (aS)-aurasperone A.

**Thông số hóa lý:** dạng bột màu vàng.  $[\alpha]_{\text{D}}^{26} = -86.2$  ( $c = 0.08$ ,  $\text{CHCl}_3$ ). Công thức phân tử:  $\text{C}_{32}\text{H}_{26}\text{O}_{10}$ . HRESIMS:  $m/z$  571.1583  $[\text{M}+\text{H}]^+$  (tính toán lý thuyết cho công thức phân tử  $\text{C}_{32}\text{H}_{27}\text{O}_{10}^+$ , 571.1599).  $^1\text{H}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ , 600 MHz) và  $^{13}\text{C}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ , 150 MHz): trình bày ở bảng 3.4.

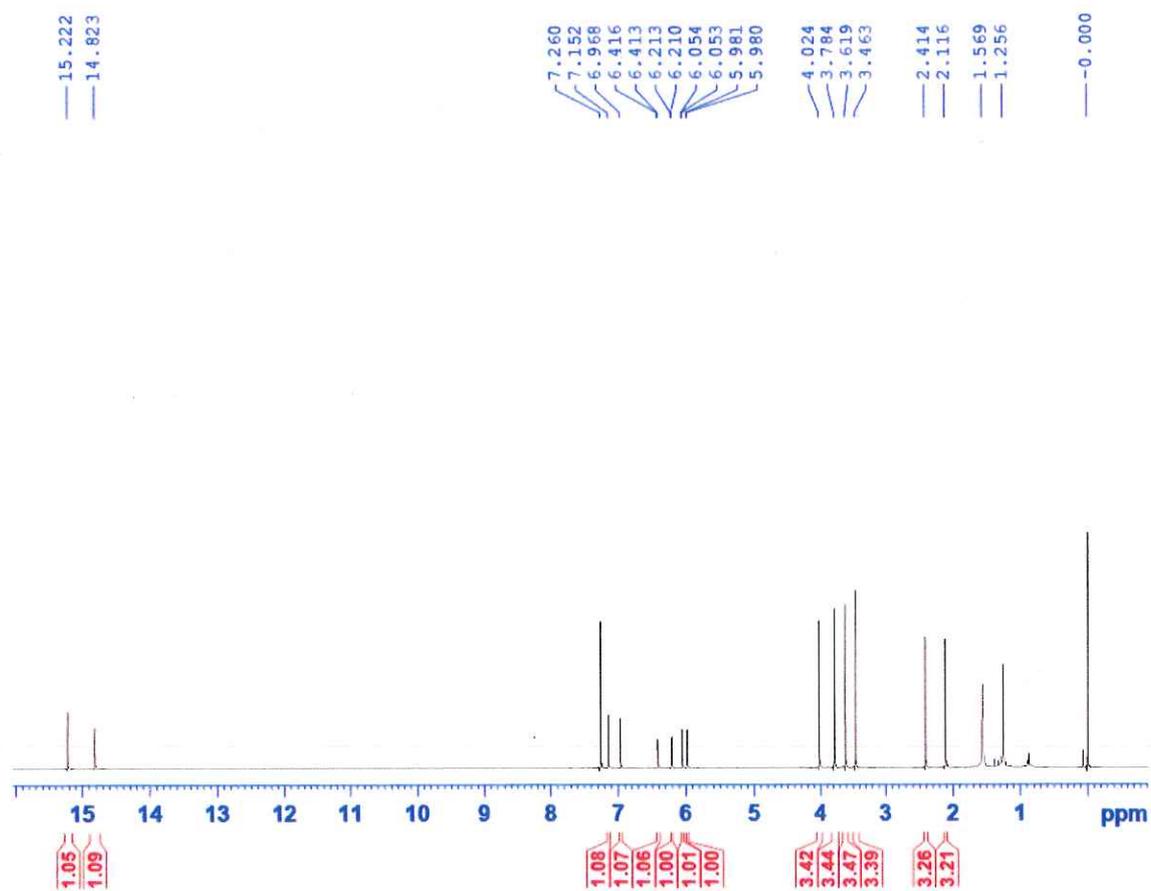
Bảng 3.4. Số liệu phổ  $^1\text{H}$  và  $^{13}\text{C}$  NMR của hợp chất CL251.4

Vị trí	$\delta_{\text{C}}^* [39]$	$\delta_{\text{C}}^{\text{a,b}}$	$\delta_{\text{H}}^{\text{a,c}}$ (độ bội, $J = \text{Hz}$ )
2	167.8	167.6	
3	107.5	107.5	6.05 (d, 0.6)
4	184.6	184.6	
4a	104.8	104.7	
5	162.1	162.0	
5a	111.5	111.5	
6	158.7	158.6	
7	117.7	117.6	
8	160.3	160.2	
9	101.5	101.4	6.97 (s)
9a	140.8	140.6	
10	101.4	101.2	7.15 (s)
10a	153.5	153.4	
2-CH <sub>3</sub>	20.9	20.7	2.41 (s)
5-OH			14.82 (s)
6-OCH <sub>3</sub>	62.2	62.0	3.46 (s)
8-OCH <sub>3</sub>	56.0	55.9	3.78 (s)
2'	167.7	167.5	
3'	107.4	107.3	5.98 (d, 0.6)
4'	184.7	184.4	
4'a	104.4	104.3	
5'	162.8	162.7	
5'a	108.7	108.6	
6'	161.1	161.1	
7'	97.0	96.9	6.42 (d, 1.8)
8'	161.5	161.4	
9'	96.6	96.6	6.21 (d, 1.8)
9'a	140.7	140.7	
10'	105.3	105.2	
10'a	150.9	150.9	
2'-CH <sub>3</sub>	20.8	20.7	2.12 (s)
5'-OH			15.22 (s)
6'-OCH <sub>3</sub>	56.3	56.2	4.02 (s)
8'-OCH <sub>3</sub>	55.3	55.1	3.62 (s)

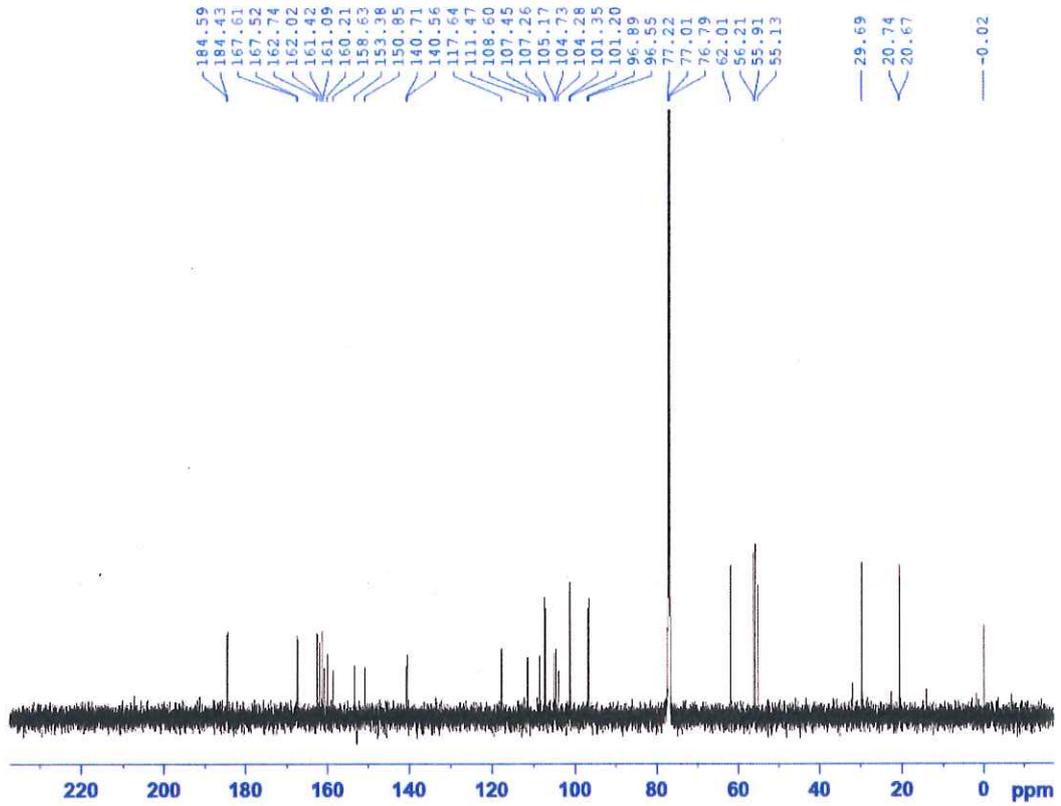
\*  $\delta_{\text{C}}$  của hợp chất tham khảo đo trong  $\text{CDCl}_3$ , <sup>a</sup>  $\text{CDCl}_3$ , <sup>b</sup> 150 MHz, <sup>c</sup> 600 MHz



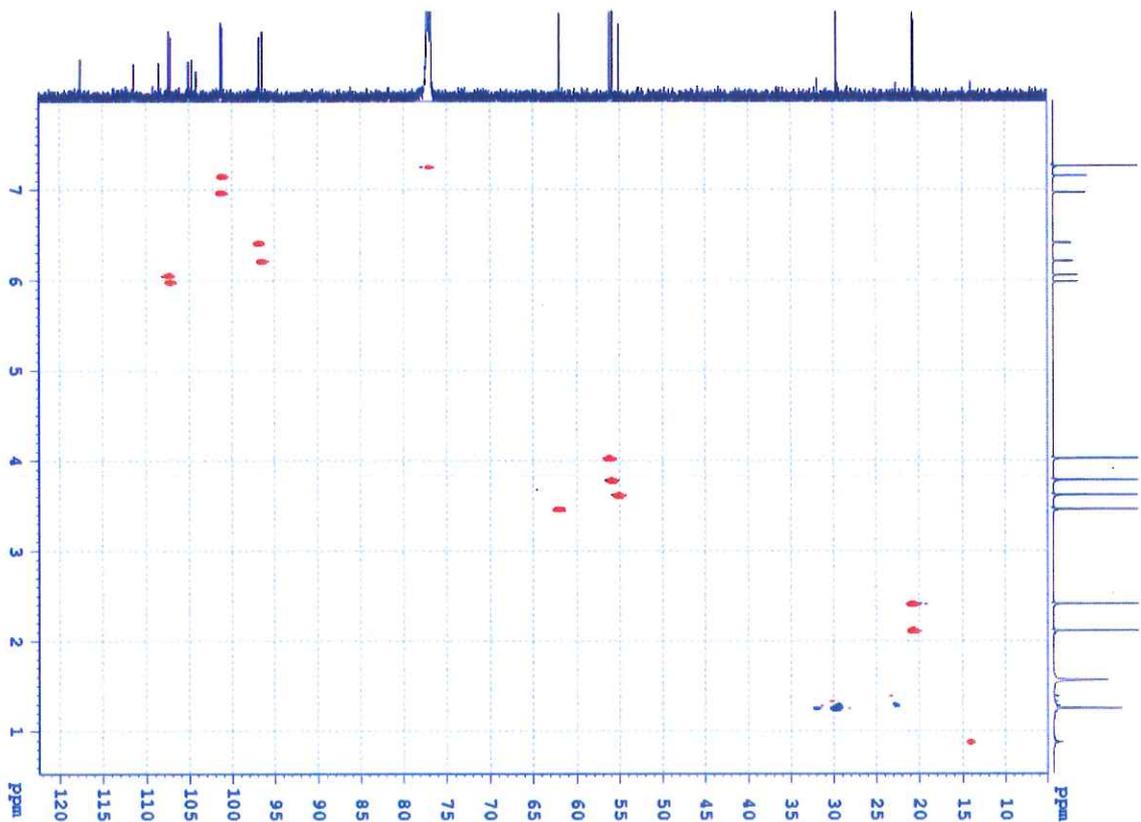
Hình 3.21. Phổ HRESIMS của hợp chất **CL251.4**



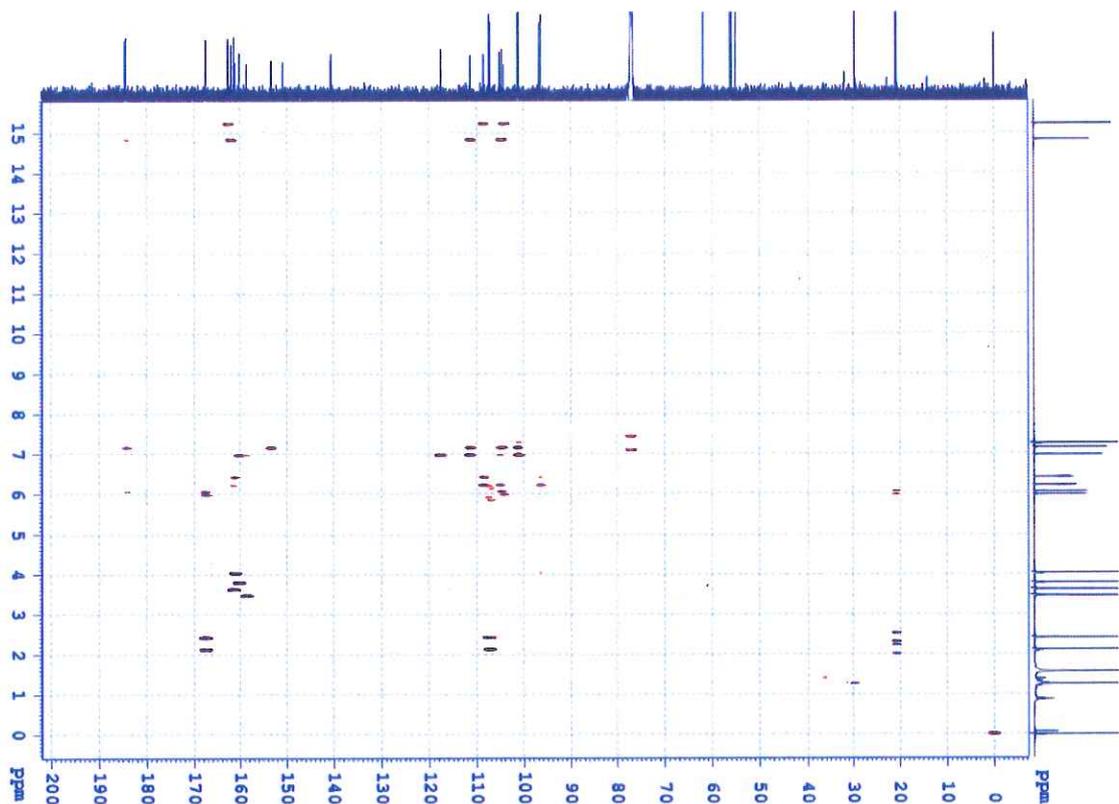
Hình 3.22. Phổ <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>, 600 MHz) của hợp chất **CL251.4**



Hình 3.23. Phổ  $^{13}\text{C}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ , 150 MHz) của hợp chất **CL251.4**

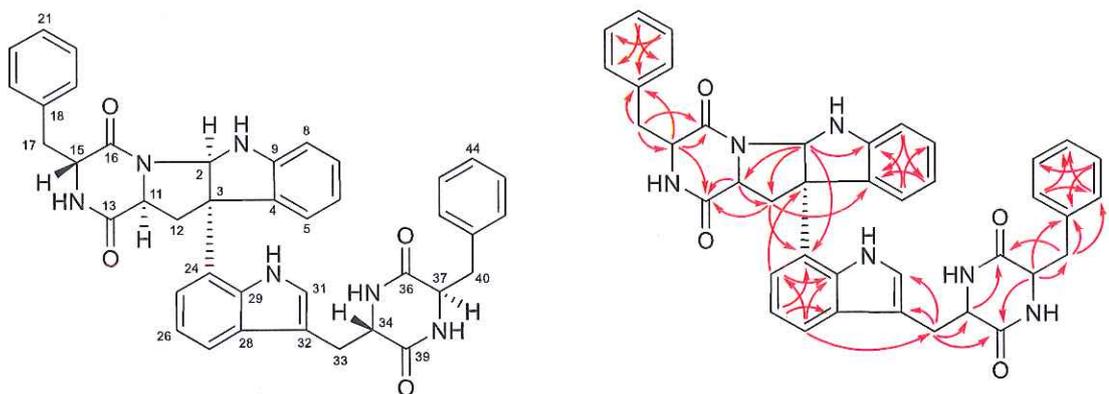


Hình 3.24. Phổ HSQC ( $\text{CDCl}_3$ , 600 MHz) của hợp chất **CL251.4**



Hình 3.25. Phổ HMBC ( $\text{CDCl}_3$ , 600 MHz) của hợp chất **CL251.4**

### 3.3.5. Hợp chất CL251.5: Asperazine



Hình 3.26. Cấu trúc hóa học và tương tác HMBC ( $\rightarrow$ ) của hợp chất **CL251.5**

Công thức phân tử của hợp chất **CL251.5** được xác định là  $\text{C}_{40}\text{H}_{36}\text{N}_6\text{O}_4$  thông qua phổ HRESIMS ( $m/z$  665.2865  $[\text{M}+\text{H}]^+$  (tính toán lý thuyết cho công thức phân tử  $\text{C}_{40}\text{H}_{37}\text{N}_6\text{O}_4^+$ , 665.2871), tương ứng với 26 độ bất bão hòa. Tiến hành phân tích phổ  $^{13}\text{C}$  và HSQC cho thấy 40 carbon, bao gồm 4 carbon amide, 26 carbon thơm hoặc olefin trong đó 18 carbon liên kết với proton,

một carbon  $sp^3$  không liên kết với proton, năm methine  $sp^3$  và bốn methylene  $sp^3$ . Với sự xuất hiện của các tín hiệu carbon của bốn carbonyl amide tại  $\delta_C$  171.3 (C-13), 169.0 (C-16), 169.6 (C-36) và 170.5 (C-39) và các tín hiệu cho bốn nhóm  $\alpha$ -CH của các amino acid tại  $\delta_H$  2.79 (dd,  $J = 6.0, 12.0$  Hz)/  $\delta_C$  58.1 (C-11),  $\delta_H$  4.26 (t,  $J = 4.2$  Hz)/  $\delta_C$  60.0 (C-15),  $\delta_H$  3.50 (t,  $J = 4.2$  Hz)/  $\delta_C$  56.4 (C-34),  $\delta_H$  3.46 (t,  $J = 4.2$  Hz)/  $\delta_C$  56.7 (C-37), hợp chất **CL251.5** được dự đoán có cấu trúc diketopiperazine dimer. Tiến hành phân tích chi tiết phổ  $^1H$  và  $^{13}C$  NMR, kết hợp với phổ HSQC và HMBC, cho thấy sự hiện diện của hai nhóm benzyl tại  $\delta_C$  136.5 (C-18),  $\delta_H$  7.03 (br d,  $J = 6.6$  Hz)/  $\delta_C$  131.0 (C-19, 23),  $\delta_H$  6.92/  $\delta_C$  129.7 (C-20, 22),  $\delta_H$  7.15 (t,  $J = 7.8$  Hz)/  $\delta_C$  128.8 (C-21), 136.4 (C-41),  $\delta_H$  7.12/  $\delta_C$  131.3 (C-42, 46),  $\delta_H$  7.24/  $\delta_C$  129.4 (C-43, 45),  $\delta_H$  7.24/  $\delta_C$  128.2 (C-44), một nhóm indole tại [ $\delta_C$  124.4 (C-24),  $\delta_H$  6.93/  $\delta_C$  119.8 (C-25),  $\delta_H$  7.11/  $\delta_C$  120.4 (C-26),  $\delta_H$  7.59 (d,  $J = 8.4$  Hz)/  $\delta_C$  120.2 (C-27), 130.4 (C-28), 135.2 (C-29),  $\delta_H$  6.90/  $\delta_C$  126.0 (C-31), 110.0 (C-32), một nhóm indoline tại  $\delta_H$  5.81 (s)/  $\delta_C$  84.5 (C-2), 58.5 (C-3), 133.5 (C-4),  $\delta_H$  6.65 (dd,  $J = 1.2, 7.8$  Hz)/  $\delta_C$  124.3 (C-5),  $\delta_H$  6.61 (td,  $J = 0.6, 7.2$  Hz)/  $\delta_C$  120.7 (C-6),  $\delta_H$  7.11/  $\delta_C$  130.0 (C-7),  $\delta_H$  6.78 (d, 7.8 Hz)/  $\delta_C$  111.6 (C-8), 148.5 (C-9), cùng với bốn carbon methylene tại  $\delta_C$  39.7 (C-12), 40.8 (C-17), 29.9 (C-33), và 39.7 (C-40). Trên cơ sở phân tích trên, hợp chất **CL251.5** được dự đoán được cấu thành bởi hai đơn vị phenylalanine và hai đơn vị tryptophan. Tuy nhiên các số liệu phổ này mới chỉ tương ứng với 25 độ bất bão hòa, do đó gợi ý sự có mặt của thêm một vòng nội trong phân tử. Điều này được chứng minh bởi tương tác từ  $\delta_H$  5.81 (H-2) đến  $\delta_C$  58.1 (C-11) trên phổ HMBC, qua đó khẳng định liên kết trực tiếp từ vị trí C-2 của phần tryptophan với vị trí N-10. Dựa trên dữ liệu đã đề cập ở trên, hợp chất **CL251.1** được xác định có cấu trúc dạng heterodimer diketopiperazine bất đối xứng. Từ những phân tích trên, tiến hành so sánh các dữ liệu phổ NMR của **CL251.5** với hợp chất diketopiperazine dimer đã biết cho kết quả hoàn toàn tương đồng, qua đó khẳng định cấu trúc của hợp chất **CL251.5** [40]. Cầu liên kết giữa 2 tiểu phân

diketopiperazine ở vị trí C-3/C-24 được khẳng định thông qua tương tác HMBC giữa H-2 với C-3, C-24, giữa H-12 với C-24, và giữa H-24 với C-3. Cuối cùng, cấu hình của hợp chất **CL251.5** được xác định tương tự như hợp chất asperazine đã công bố thông qua sự tương đồng về giá trị góc quay cực riêng [ $\alpha$ ]<sub>D</sub><sup>27</sup> = +135.6 (*c* = 0.1, DMSO) so với hợp chất tham khảo: [ $\alpha$ ]<sub>D</sub> = +53 (*c*, 0.2, CH<sub>3</sub>OH). Do đó, hợp chất **CL251.5** được xác định là asperazine.

**Thông số hóa lý:** dạng bột màu trắng. [ $\alpha$ ]<sub>D</sub><sup>27</sup> = +135.6 (*c* = 0.1, DMSO). Công thức phân tử: C<sub>40</sub>H<sub>36</sub>N<sub>6</sub>O<sub>4</sub>. HRESIMS: *m/z* 665.2865 [M+H]<sup>+</sup> (tính toán lý thuyết cho công thức phân tử C<sub>40</sub>H<sub>37</sub>N<sub>6</sub>O<sub>4</sub><sup>+</sup>, 665.2871). <sup>1</sup>H NMR (CD<sub>3</sub>OD, 600 MHz) và <sup>13</sup>C NMR (CD<sub>3</sub>OD, 150 MHz): trình bày ở bảng 3.5.

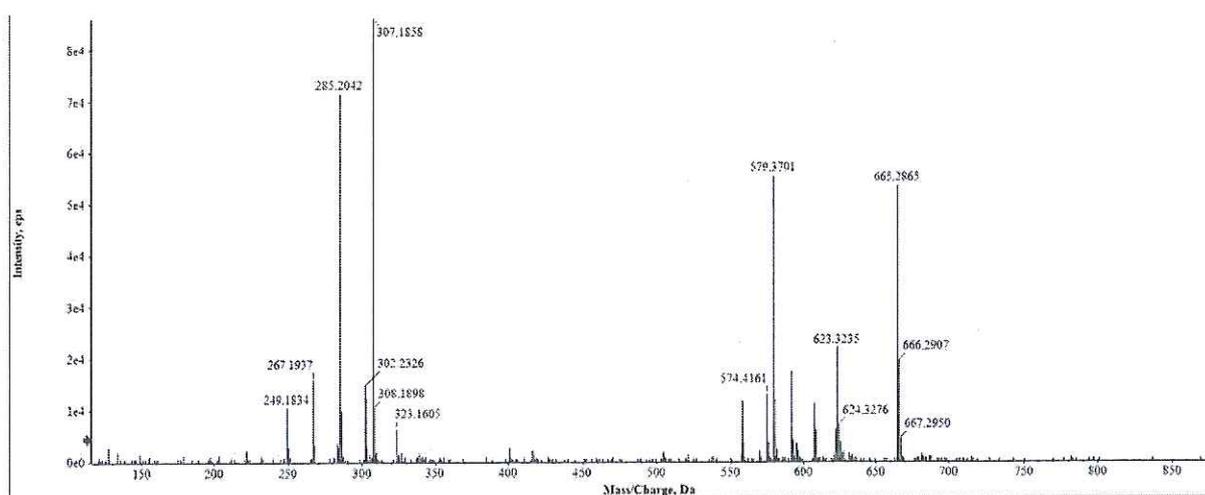
Bảng 3.5. Phổ <sup>1</sup>H và <sup>13</sup>C NMR của hợp chất **CL251.5**

Vị trí	$\delta_C^{#401}$	$\delta_C^{a,b}$	$\delta_H^{a,c}$ (độ bội., <i>J</i> = Hz)
2	84.2	84.5	5.81 (s)
3	59.228	58.5	
4	134.16	133.5	
5	121.48	124.3	6.65 (dd, 1.2, 7.8)
6	120.93	120.7	6.61 (td, 0.6, 7.2)
7	130.45	130.0	7.11*
8	112.41	111.6	6.78 (d, 7.8)
9	148.57	148.5	
11	57.79	58.1	2.79 (dd, 6.0, 12.0)
12	39.55	39.7	3.19* 2.05 (dd, 12.0, 13.2)
13	169.98	171.3	
15	57.14	60.0	4.26 (t, 4.2)
16	168.89	169.0	
17	40.40	40.8	3.20* 2.95 (dd, 4.8, 13.8)
18	137.72	136.5	
19, 23	131.46	131.0	7.03 (br d, 6.6)
20, 22	130.09	129.7	6.92*
21	128.98	128.8	7.15 (t, 7.8)

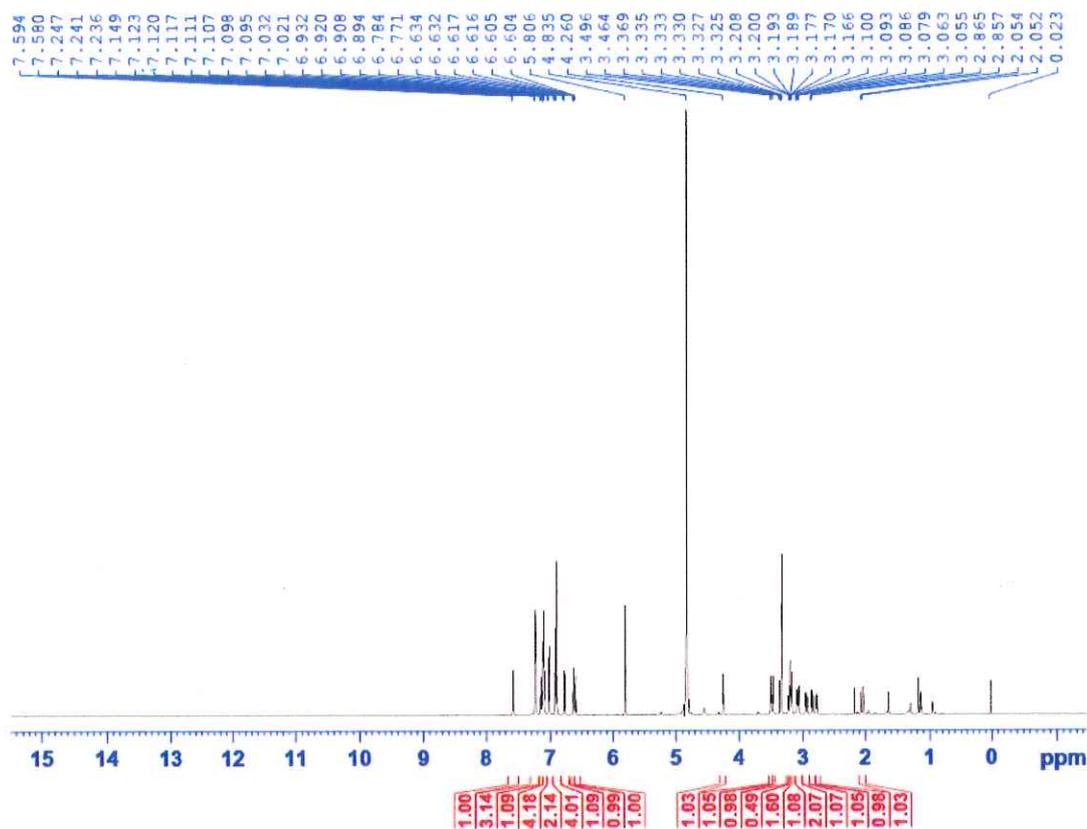
Vị trí	$\delta_C^{\#[40]}$	$\delta_C^{a,b}$	$\delta_H^{a,c}$ (độ bội., $J = \text{Hz}$ )
24	126.31	124.4	
25	120.24	119.8	6.93*
26	120.61	120.4	7.11*
27	119.02	120.2	7.59 (d, 8.4)
28	130.45	130.4	
29	135.45	135.2	
31	125.20	126.0	6.90*
32	111.15	110.0	
33	30.20	29.9	3.21* 3.09 (dd, 4.2, 8.4)
34	56.36	56.4	3.50 (t, 4.2)
36	169.64	169.6	
37	60.46	56.7	3.46 (t, 4.2)
39	168.84	170.5	
40	40.72	39.7	3.07 (dd, 4.8, 7.8) 2.86 (dd, 4.8, 13.8)
41	137.72	136.4	
42, 46	131.63	131.3	7.12*
43, 45	130.15	129.4	7.24*
44	128.72	128.2	7.24*

#  $\delta_C$  của hợp chất tham khảo đo trong  $\text{CD}_3\text{CN}$ , <sup>a</sup>  $\text{CD}_3\text{OD}$ , <sup>b</sup> 150 MHz, <sup>c</sup> 600 MHz

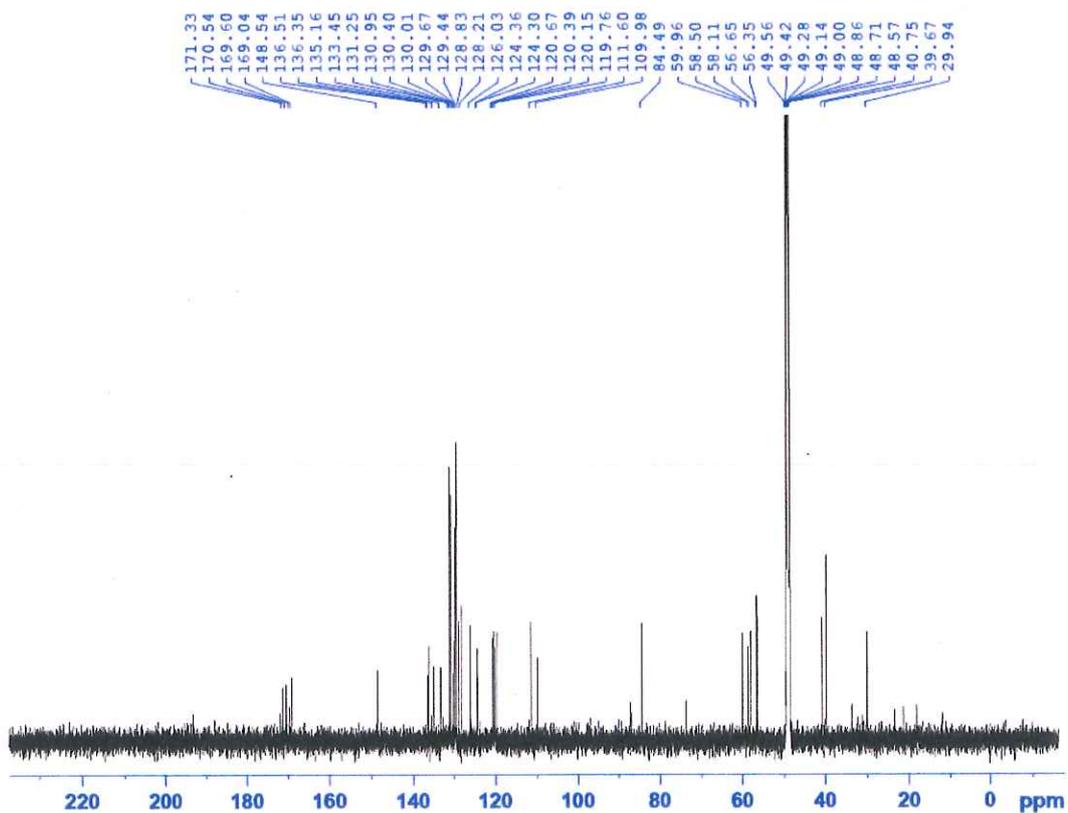
\* Tín hiệu bị chồng lấp



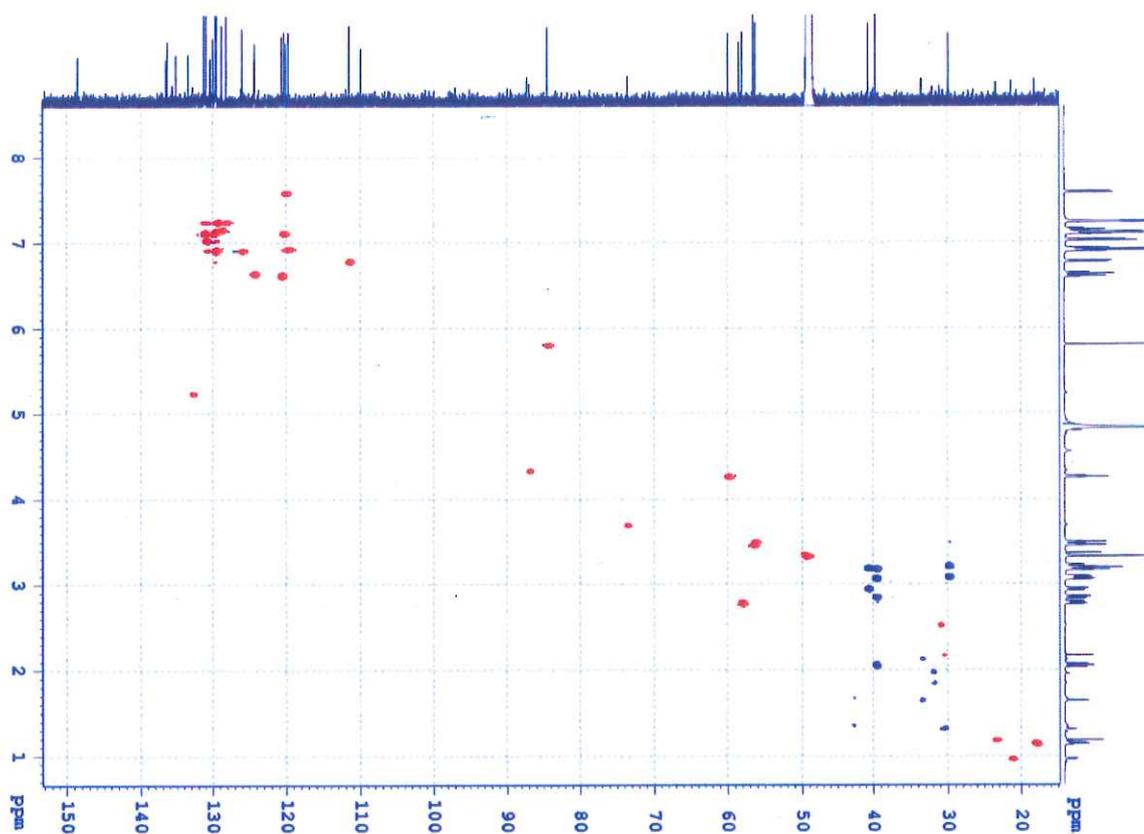
Hình 3.27. Phổ HRESIMS của hợp chất CL251.5



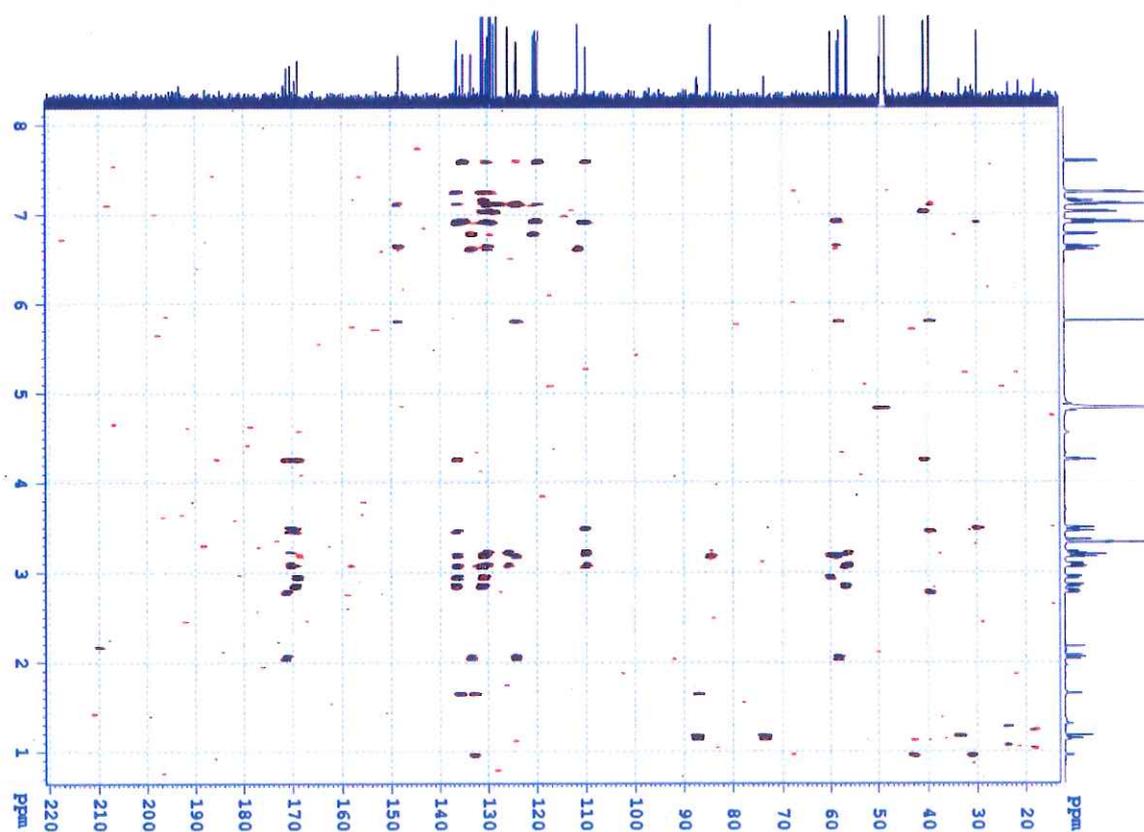
Hình 3.28. Phổ  $^1\text{H}$  NMR ( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 600 MHz) của hợp chất CL251.5



Hình 3.29. Phổ  $^{13}\text{C}$  NMR ( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 150 MHz) của hợp chất CL251.5

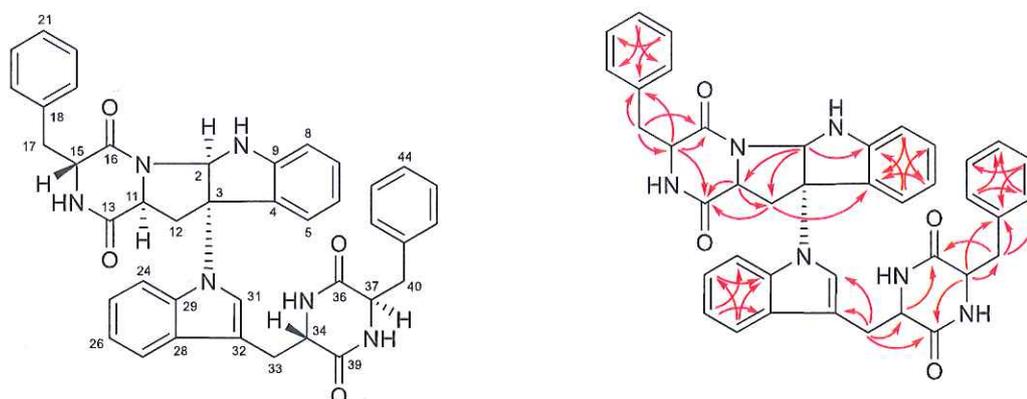


Hình 3.30. Phổ HSQC ( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 600 MHz) của hợp chất **CL251.5**



Hình 3.31. Phổ HMBC ( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 600 MHz) của hợp chất **CL251.5**

### 3.3.6. Hợp chất CL251.6: Asperazine A



Hình 3.32. Cấu trúc hóa học và tương tác HMBC ( $\rightarrow$ ) của hợp chất **CL251.6**

Công thức phân tử của hợp chất **CL251.6** được xác định là  $C_{40}H_{36}N_6O_4$  thông qua phổ HRESIMS ( $m/z$  665.2865  $[M+H]^+$  (tính toán lý thuyết cho công thức phân tử  $C_{40}H_{37}N_6O_4^+$ , 665.2871). Phổ  $^{13}C$  và HSQC ghi nhận tín hiệu của 40 carbon, bao gồm 4 carbon amide, 26 carbon thơm hoặc olefin trong đó 19 carbon liên kết với proton, một carbon  $sp^3$  không liên kết với proton, năm methine  $sp^3$  và bốn methylene  $sp^3$ . Các số liệu phổ NMR này khá tương đồng với phổ của hợp chất **CL251.5**, cho gợi ý hai hợp chất này có cấu trúc heterodimer diketopiperazine bất đối xứng gần như tương tự nhau. Tiến hành phân tích so sánh chi tiết phổ NMR, bao gồm phổ HSQC và HMBC của 2 hợp chất **CL251.5** và **CL251.6** cho thấy sự khác biệt ở vị trí của cầu liên kết giữa hai đơn vị diketopiperazine. Cụ thể, phổ  $^1H$  và  $^{13}C$  NMR của hợp chất **CL251.6** cho thấy sự xuất hiện của một carbon methine  $sp^2$  tại  $\delta_H$  6.55 (d,  $J = 8.4$  Hz)/  $\delta_C$  111.4 (C-24) thay vì một carbon  $sp^2$  không liên kết với proton ở hợp chất **CL251.5**. Bên cạnh đó, độ dịch chuyển hóa học của vị trí C-3 của hợp chất **CL251.6** dịch chuyển xa về phía trường dưới tại  $\delta_C$  72.7 so với ở hợp chất **CL251.5** ( $\delta_C$  58.5), cho gợi ý cầu liên kết giữa 2 tiểu phân ở vị trí C-3/N-30. Điều này được khẳng định bởi sự tương đồng hoàn toàn khi so sánh số liệu phổ của **CL251.6** với hợp chất asperazine A đã biết [41], kết hợp với các tương tác phổ HMBC chi tiết. Hơn nữa, sự phù hợp về giá trị góc quay cực của hợp chất **CL251.6** với hợp chất asperazine A đã biết  $[[\alpha]_D^{26} = +119.0$  ( $c = 0.1$ , DMSO) so với hợp chất tham khảo:  $[\alpha]_D +135$  ( $c = 0.11$ ; MeOH)] cho thấy sự tương đồng về cấu hình của hai hợp chất. Trên cơ sở đó, hợp chất **CL251.6** được xác định là asperazine A.

**Thông số hóa lý:** dạng bột màu trắng. Công thức phân tử:  $C_{40}H_{36}N_6O_4$ .  $[\alpha]_D^{26} = +119.0$  ( $c = 0.1$ , DMSO). HRESIMS:  $m/z$  665.2865  $[M+H]^+$  (tính toán lý thuyết cho công thức phân tử  $C_{40}H_{37}N_6O_4^+$ , 665.2871.  $^1H$  NMR (DMSO- $d_6$ , 600 MHz) và  $^{13}C$  NMR (DMSO- $d_6$ , 150 MHz): trình bày ở bảng 6.

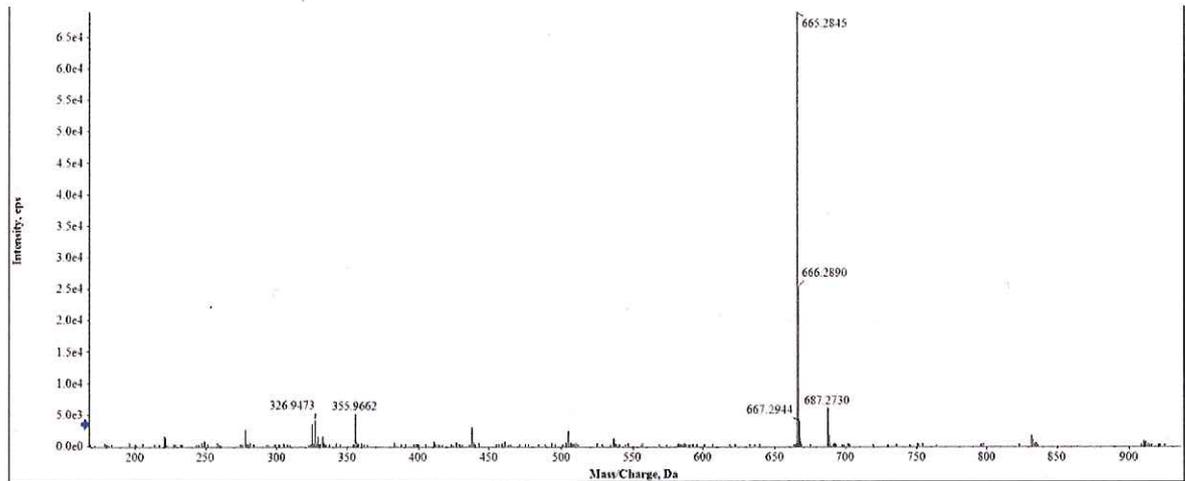
Bảng 3.6. Phổ  $^1H$  và  $^{13}C$  NMR của hợp chất CL251.6

Vị trí	$\delta_C^{#(41)}$	$\delta_C^{a,b}$	$\delta_H^{a,c}$ (độ bội, $J = Hz$ )
2	81.8	81.8	5.74 (d, 3.6)
3	72.7	72.7	
4	128.4	128.4	
5	122.2	122.2	6.74 (d, 8.4)
6	118.4	118.3	6.59 (t, 7.8)
7	129.7	129.5	7.12*
8	110.1	110.1	6.74 (d, 8.4)
9	148.0	147.9	
11	55.4	55.4	3.40 (dd, 6.6, 12.0)
12	40.2	40.1	3.30* 2.07 (dd, 12.6, 15.0)
13	167.7	167.7	
14			8.35 (d, 4.2)
15	58.1	58.1	4.12 (q, 6.0)
16	166.8	166.8	
17	39.3	39.0	3.09 (dd, 6.6, 13.8) 2.91 (dd, 4.8, 13.8)
18	136.0	136.0	
19, 23	129.6	129.6	7.10*
20, 22	127.9	127.9	7.21*
21	126.9	126.9	7.20*
24	111.4	111.4	6.55 (d, 8.4)
25	121.3	121.3	6.92 (t, 7.8)
26	119.4	119.35	6.99 (t, 7.8)
27	119.3	119.42	7.54 (d, 8.4)
28	129.5	129.7	
29	134.6	134.7	
31	125.5	125.6	7.19*
32	108.3	108.3	
33	29.1	29.0	3.25 (dd, 4.8, 14.4) 3.02 (dd, 4.2, 14.4)
34	54.5	54.5	3.61 (br t, 6.0)
35			7.94 (s)
36	167.6	167.6	
37	54.4	54.4	3.30*
38			7.99 (d, 1.8)
39	167.9	167.9	
40	37.1	37.1	3.03 (m) 2.74 (dd, 4.8, 13.8)

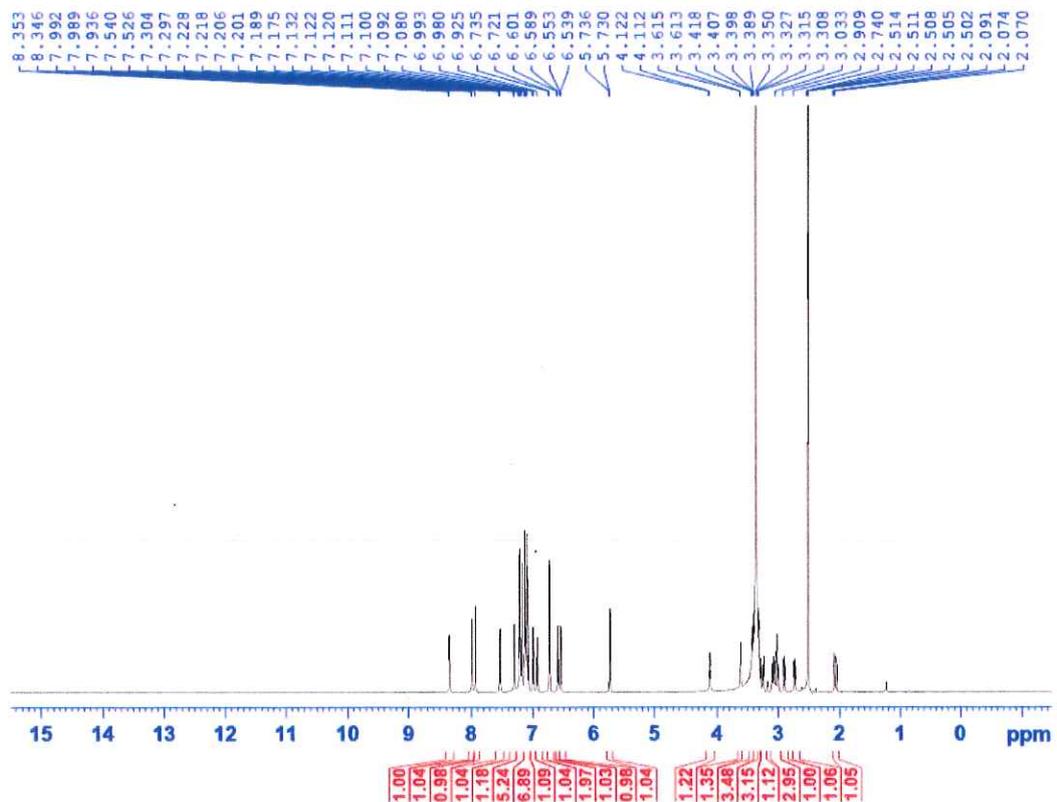
Vị trí	$\delta_C^{#141}$	$\delta_C^{a,b}$	$\delta_H^{a,c}$ (độ bội, $J = Hz$ )
41	136.0	136.0	
42, 46	130.1	130.1	7.12*
43, 45	128.3	128.3	7.08 (t, 7.8)
44	126.5	126.5	7.20*

#  $\delta_C$  của hợp chất tham khảo đo trong DMSO- $d_6$ , <sup>a</sup> DMSO- $d_6$ , <sup>b</sup> 150 MHz, <sup>c</sup> 600 MHz

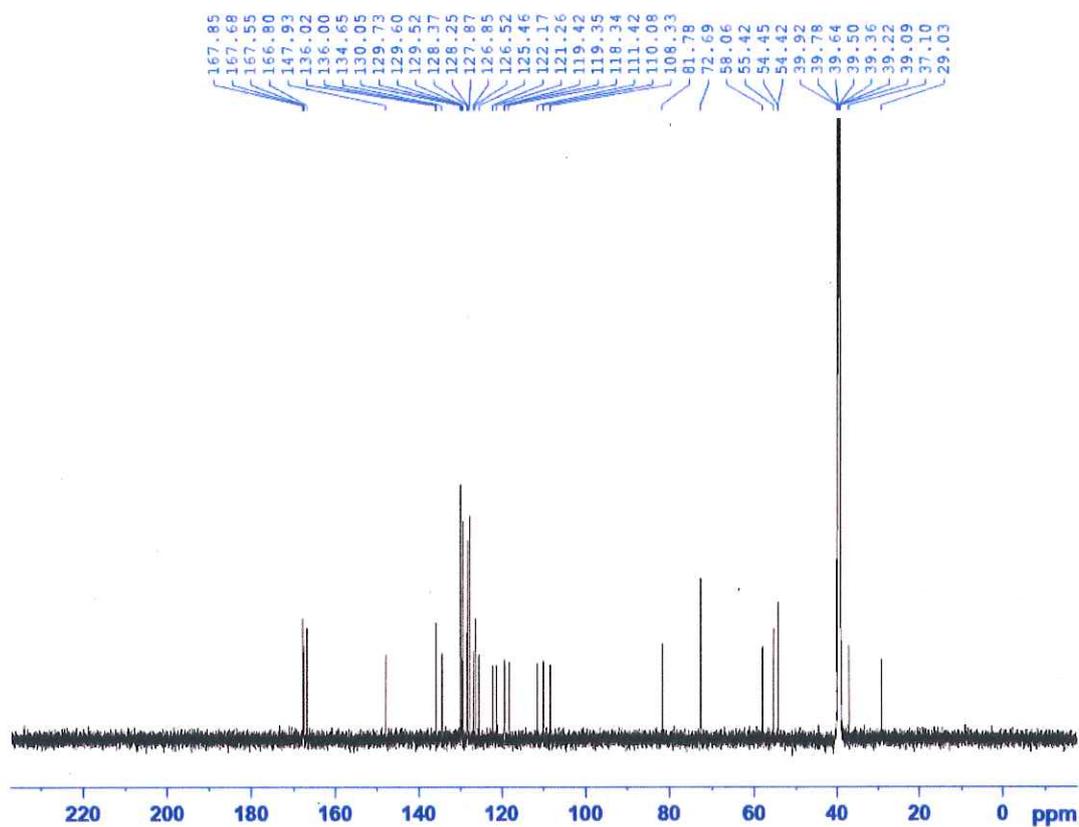
\* Tín hiệu bị chồng lấp



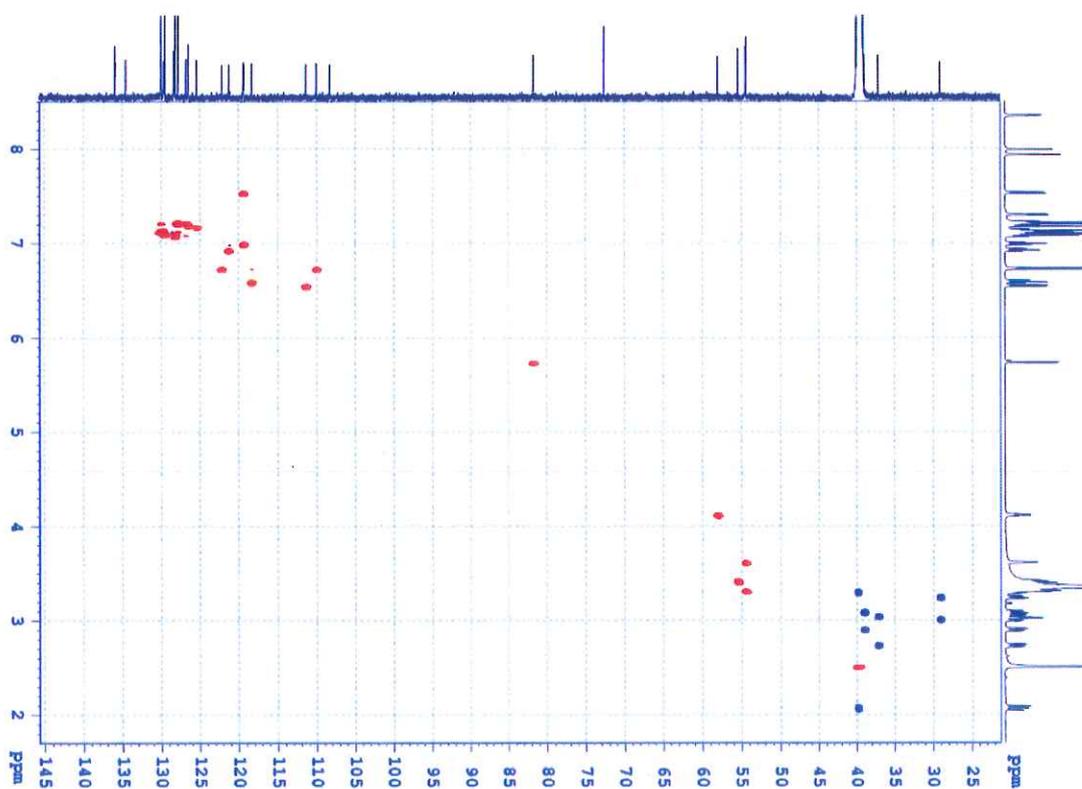
Hình 3.33. Phổ HRESIMS của hợp chất CL251.6



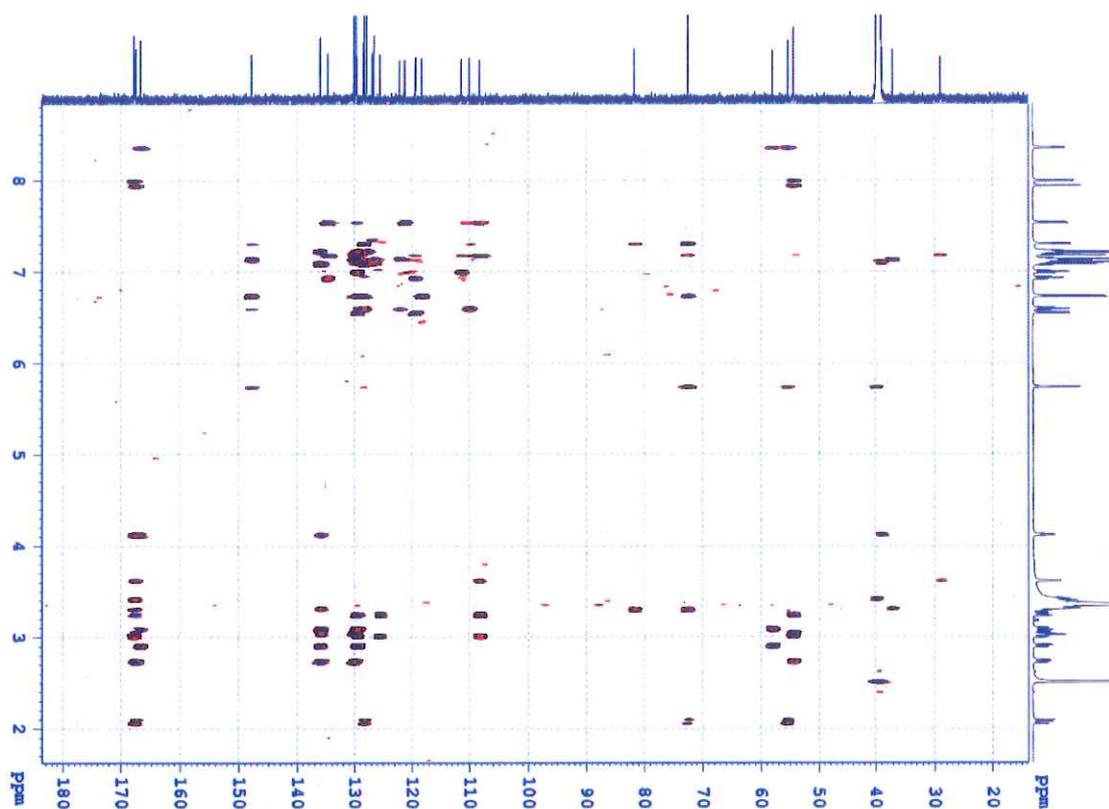
Hình 3.34. Phổ  $^1H$  NMR (DMSO- $d_6$ , 600 MHz) của hợp chất CL251.6



Hình 3.35. Phổ  $^{13}\text{C}$  NMR (DMSO- $d_6$ , 150 MHz) của hợp chất CL251.6

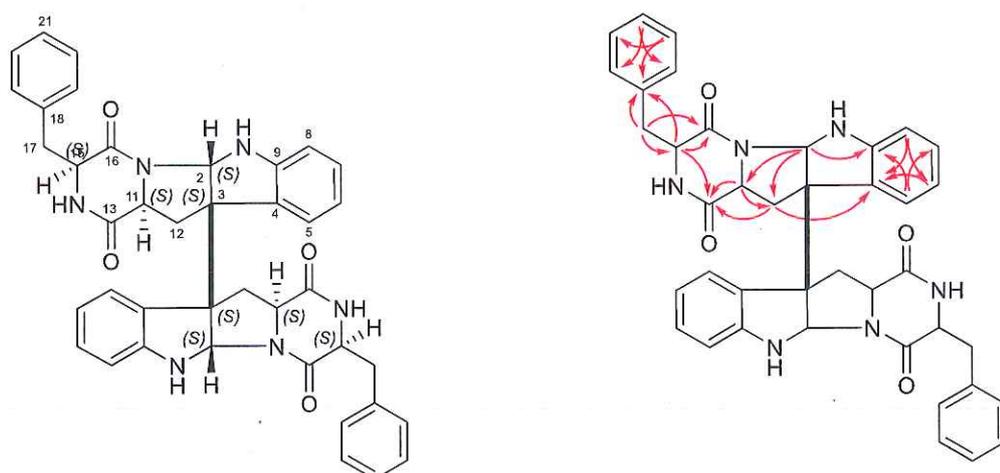


Hình 3.36. Phổ HSQC (DMSO- $d_6$ , 600 MHz) của hợp chất CL251.6



Hình 3.37. Phổ HMBC (DMSO- $d_6$ , 600 MHz) của hợp chất **CL251.6**

### 3.3.7. Hợp chất **CL251.7**: WIN 64821



Hình 3.38. Cấu trúc hóa học và tương tác HMBC ( $\rightarrow$ ) của hợp chất **CL251.7**

Công thức phân tử của hợp chất **CL251.7** được xác định là  $C_{40}H_{36}N_6O_4$  thông qua tín hiệu ion giả phân tử tại  $m/z$  665.2868  $[M+H]^+$  (tính toán lý thuyết cho công thức phân tử  $C_{40}H_{37}N_6O_4^+$ , 665.2871) trên phổ HRESIMS, tương ứng với 26 độ bất bão hòa. Tiến hành phân tích phổ  $^{13}C$  và HSQC cho

thấy có 20 tín hiệu carbon, bao gồm 2 carbon amide tại  $\delta_C$  167.9 (C-13, 13') và 167.3 (C-16, 16'), tín hiệu của nhóm  $\alpha$ -CH của 2 amino acid tại  $\delta_H$  2.39 (m)/  $\delta_C$  54.3 (C-11, 11') và  $\delta_H$  4.00 (br d,  $J = 3.6$  Hz)/  $\delta_C$  57.7 (C-15, 15'), gợi ý hợp chất **CL251.5** có cấu trúc diketopiperazine. Kết hợp phân tích chi tiết phổ  $^1\text{H}$  và  $^{13}\text{C}$  NMR với phân tích phổ HSQC và HMBC, ghi nhận sự có mặt của một nhóm benzyl tại  $\delta_C$  135.4 (C-18, 18'),  $\delta_H$  6.97 (br)/  $\delta_C$  129.3 (C-19, 23, 19', 23'),  $\delta_H$  7.11/  $\delta_C$  128.4 (C-20, 22, 20', 22'), 7.25 (br t, 7.2)/  $\delta_C$  127.3 (C-21, 21'), và một nhóm indoline tại  $\delta_H$  4.54 (br)/  $\delta_C$  78.7 (C-2, 2'), 58.6 (C-3, 3'), 130.4 (C-4, 4'),  $\delta_H$  7.05 (d, 7.2)/  $\delta_C$  124.3 (C-5, 5'),  $\delta_H$  6.64/  $\delta_C$  118.8 (C-6, 6'),  $\delta_H$  7.11/  $\delta_C$  128.5 (C-7, 7'),  $\delta_H$  6.66/  $\delta_C$  108.9 (C-8, 8'), 148.7 (C-9, 9'), cùng với 2 carbon methylene tại  $\delta_C$  37.0 (C-12, 12'), 38.7 (C-17, 17'). Các số liệu này cho thấy hợp chất **CL251.7** cũng được cấu thành bởi đơn vị phenylalanine và đơn vị tryptophan, tương tự như hợp chất **CL251.5**. Tuy nhiên các số liệu phổ này mới chỉ đáp ứng được 13 độ bất bão hòa, như vậy cấu trúc của hợp chất **CL251.7** được dự đoán có dạng heterodimer diketopiperazine đối xứng. Trên cơ sở đó, tiến hành so sánh các số liệu phổ NMR cũng như giá trị góc quay cực riêng của hợp chất **CL251.7** với hợp chất diketopiperazine dimer đã biết là WIN 64821 cho kết quả hoàn toàn tương đồng, qua đó khẳng định cấu trúc toàn bộ phân tử dimer của hợp chất **CL251.7**. Với những phân tích phổ nêu trên, hợp chất **CL251.7** được xác định là WIN 64821.

**Thông số hóa lý:** dạng bột màu trắng. Công thức phân tử:  $\text{C}_{40}\text{H}_{36}\text{N}_6\text{O}_4$ .  $[\alpha]_D^{27} = +71.9$  ( $c = 0.08$ , DMSO). HRESIMS:  $m/z$  665.2868  $[\text{M}+\text{H}]^+$  (tính toán lý thuyết cho công thức phân tử  $\text{C}_{40}\text{H}_{37}\text{N}_6\text{O}_4^+$ , 665.2871).  $^1\text{H}$  NMR (DMSO- $d_6$ , 600 MHz) và  $^{13}\text{C}$  NMR (DMSO- $d_6$ , 150 MHz): trình bày ở bảng 3.7.

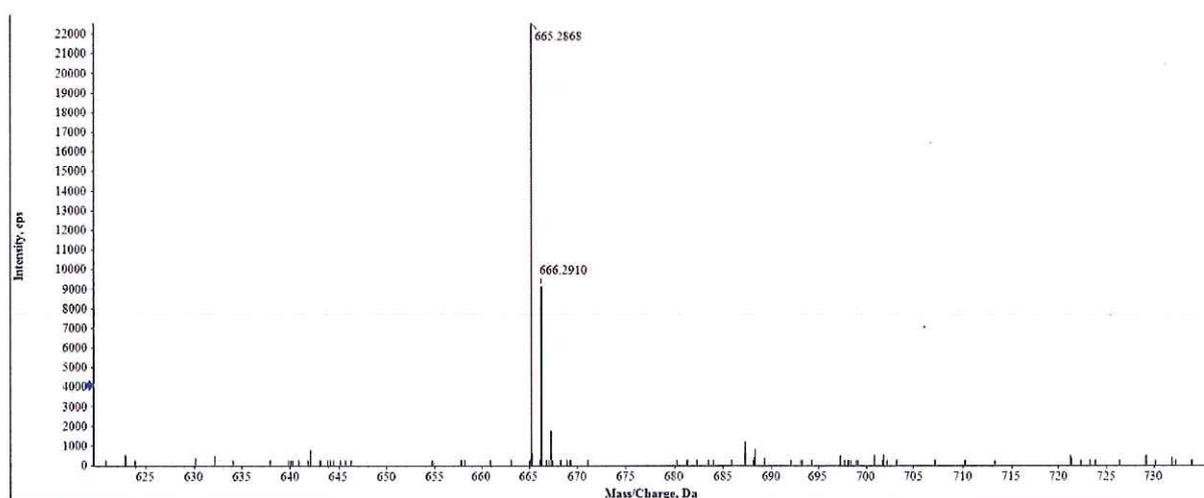
Bảng 3.7. Phổ  $^1\text{H}$  và  $^{13}\text{C}$  NMR của hợp chất **CL251.7**

Vị trí	$\delta_C^{\#}$	$\delta_C^{a,b}$	$\delta_H^{a,c}$ (độ bội., $J = \text{Hz}$ )
2, 2'	80.82	78.7	4.54 (br s)
3, 3'	61.14	58.6	
4, 4'	131.9	130.4	

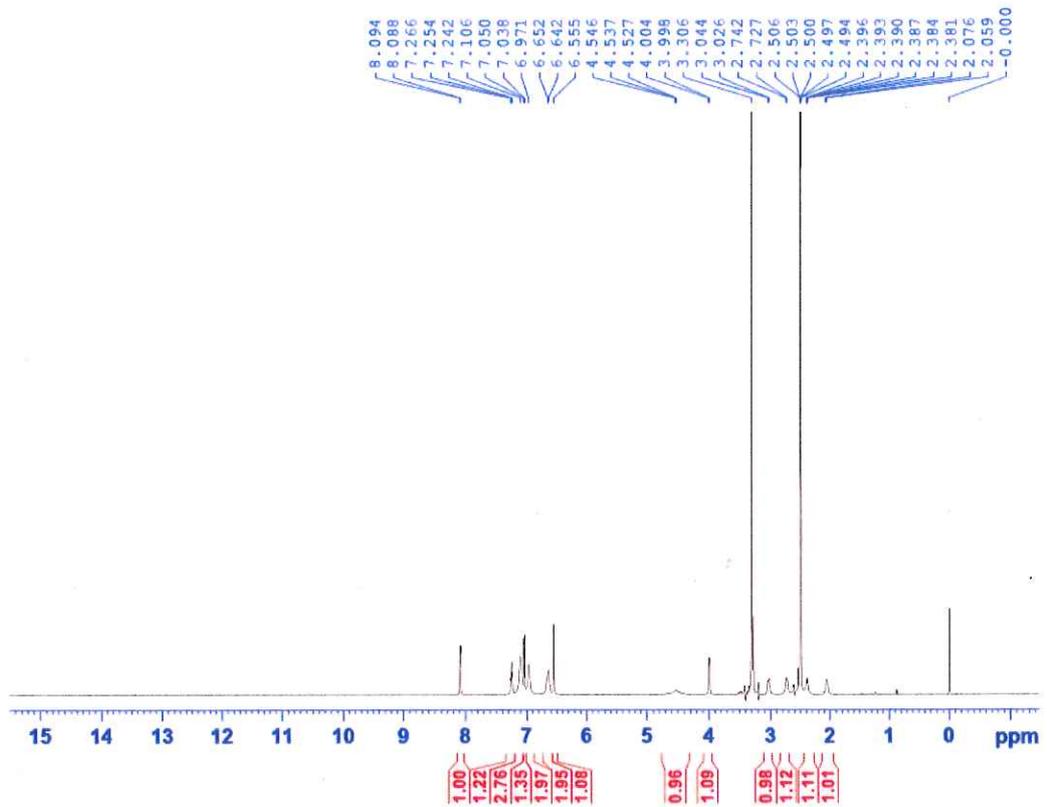
Vị trí	$\delta_C^{\#}$	$\delta_C^{a,b}$	$\delta_H^{a,c}$ (độ bội., $J = \text{Hz}$ )
5, 5'	126.53	124.3	7.05 (d, 7.2)
6, 6'	120.86	118.8	6.64*
7, 7'	130.60	128.5	7.11*
8, 8'	110.82	108.9	6.66*
9, 9'	150.56	148.7	
11, 11'	57.93	54.3	2.39 (m)
12, 12'	36.88	37.0	2.08 (br t, 10.2)
13, 13'	170.36	167.9	
15, 15'	57.17	57.7	4.00 (br d, 3.6)
16, 16'	169.55	167.3	
17, 17'	36.17	38.7	3.04 (br d, 10.8) 2.74 (br d, 10.8)
18, 18'	137.88	135.4	
19, 23, 19', 23'	130.82	129.3	6.97 (br s)
20, 22, 20', 22'	129.84	128.4	7.11*
21, 21'	128.11	127.3	7.25 (br t, 7.2)

#  $\delta_C$  của hợp chất tham khảo đo trong  $\text{CD}_3\text{CN}$ , <sup>a</sup>  $\text{DMSO-d}_6$ , <sup>b</sup> 150 MHz, <sup>c</sup> 600 MHz

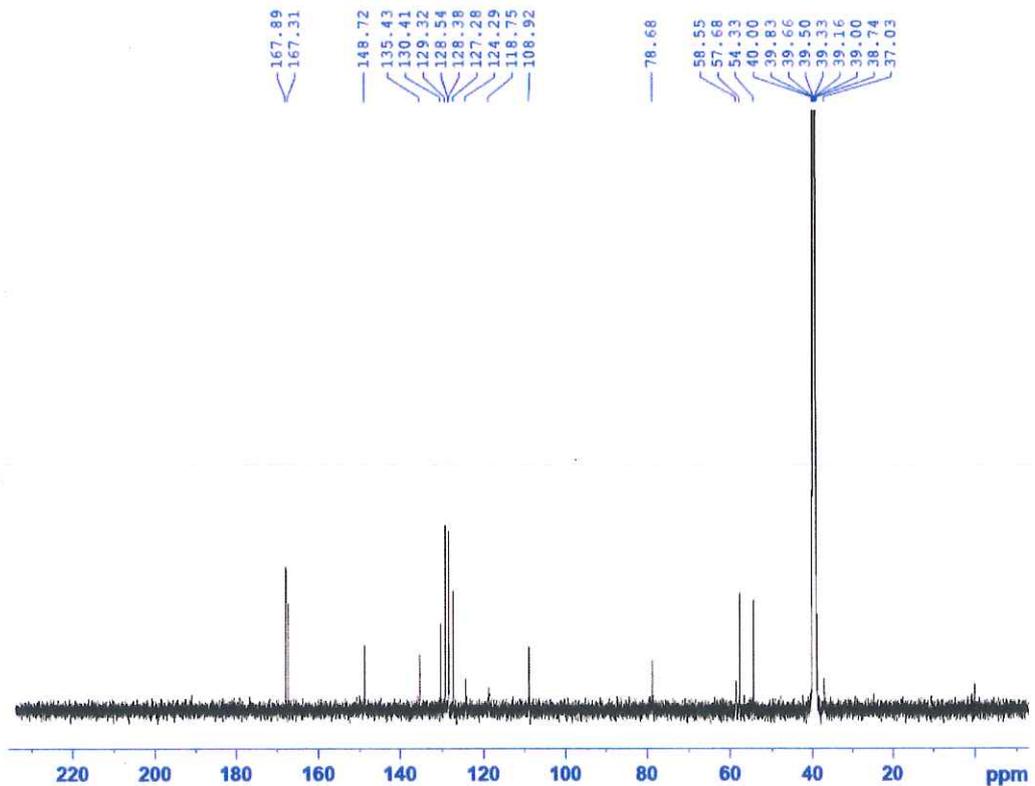
\* Tín hiệu bị chồng lấp



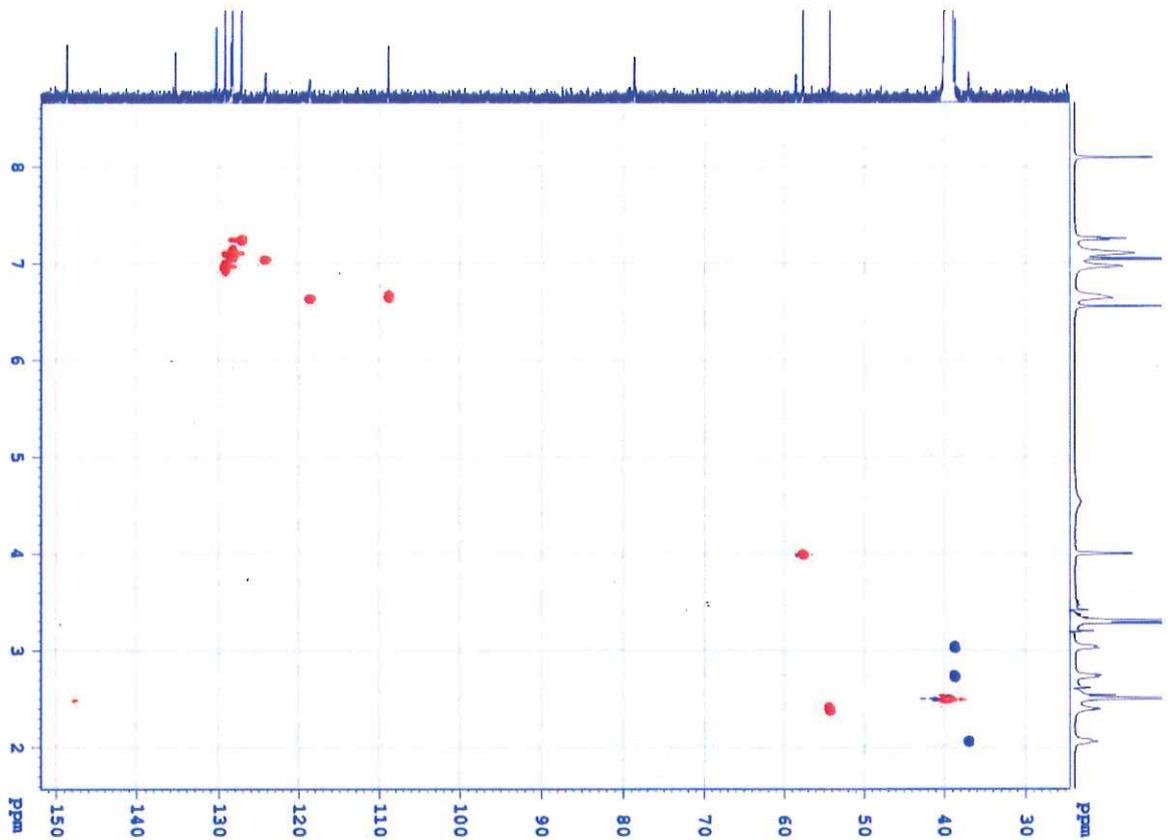
Hình 3.39. Phổ HRESIMS của hợp chất **CL251.7**



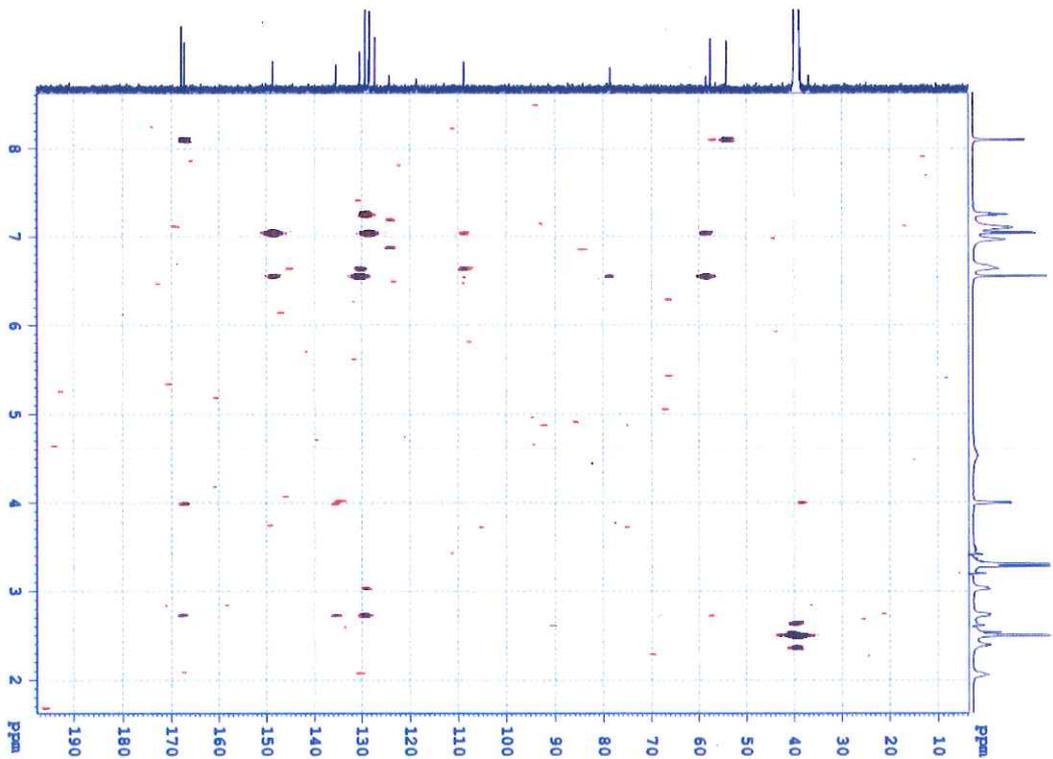
Hình 3.40. Phổ  $^1\text{H}$  NMR (DMSO- $d_6$ , 600 MHz) của hợp chất **CL251.7**



Hình 3.41. Phổ  $^{13}\text{C}$  NMR (DMSO- $d_6$ , 150 MHz) của hợp chất **CL251.7**



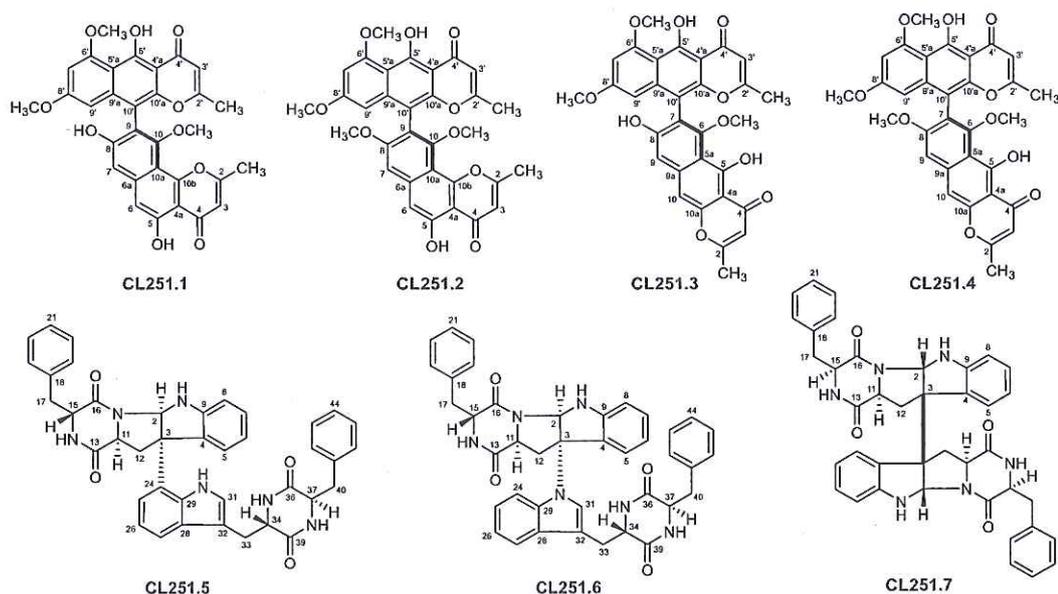
Hình 3.42. Phổ HSQC (DMSO-d<sub>6</sub>, 600 MHz) của hợp chất **CL251.7**



Hình 3.43. Phổ HMBC (DMSO-d<sub>6</sub>, 600 MHz) của hợp chất **CL251.7**

### 3.4. Xác định cấu trúc các hợp chất

Bằng các phương pháp phân tích phổ NMR, phổ khối lượng phân giải cao, và so sánh góc quay cực, cấu trúc hóa học của 7 hợp chất phân lập từ chủng vi nấm biển *Aspergillus* sp. CL251 đã được xác định là: (*aS*)-asperpyrone A (CL251.1), (*aS*)-fonsecinone A (CL251.2), (*aS*)-dianhydro-aurasperone C (CL251.3), (*aS*)-aurasperone A (CL251.4), asperazine (CL251.5), asperazine A (CL251.6), và WIN 64821 (CL251.7).



Hình 3.44. Cấu trúc hóa học của các hợp chất CL251.1–CL251.7

### 3.5. Đánh giá hoạt tính ức chế nitric oxide của các hợp chất

Trên cơ sở các dữ liệu đã công bố về hoạt tính sinh học của các hợp chất CL251.1–CL251.7, các hợp chất CL251.3–CL251.7 vẫn chưa được thử nghiệm hoạt tính ức chế NO của các hợp chất. Do đó, các hợp chất này được lựa chọn để tiến hành đánh giá hoạt tính ức chế sản sinh NO ở tế bào RAW264.7 được kích thích bởi LPS.

Các hợp chất CL251.3–CL251.7 được thử nghiệm độc tính đối với dòng tế bào RAW264.7 được kích thích bởi LPS. Kết quả cho thấy tất cả các hợp chất đều ít gây độc đối với dòng tế bào RAW264.7 được kích thích bởi LPS ở nồng độ thử nghiệm cao nhất (100  $\mu$ M), với % tế bào sống sót trên 97.33%. Do đó, các hợp chất được tiến hành thử nghiệm với nồng độ từ cao xuống

thấp ở các mức 100, 20, 4, và 0.8  $\mu\text{M}$  nhằm xác định giá trị  $\text{IC}_{50}$  của các hợp chất có hoạt tính sinh học.

Kết quả cho thấy các hợp chất **CL251.5 – CL251.7** thể hiện hoạt tính ức chế sản sinh NO ở mức từ trung bình đến yếu, với giá trị  $\text{IC}_{50}$  lần lượt là  $98.92 \pm 4.74$ ,  $71.03 \pm 5.40$ ,  $80.02 \pm 7.14$   $\mu\text{M}$ . So sánh cấu trúc và hoạt tính của các hợp chất thử nghiệm cho thấy, hợp chất **CL251.6** có cầu liên kết ở vị trí C-3/N-10 thể hiện hoạt tính ức chế sản sinh NO tốt hơn so với hợp chất **CL251.5**, với cầu liên kết ở vị trí C-3/C-24. Hai hợp chất dimeric naphtho- $\gamma$ -pyrone **CL251.3** và **CL251.4**, với cấu trúc chỉ khác nhau nhóm hydroxyl/methoxy ở vị trí C-8, thể hiện hoạt tính ức chế tương đương như nhau.

Bảng 3.8. Hoạt tính ức chế NO của các hợp chất **CL251.5 – CL251.7**

Hợp chất	$\text{IC}_{50}$ ( $\mu\text{M}$ ) <sup>a</sup>
<b>CL251.3</b>	> 100 <sup>b</sup>
<b>CL251.4</b>	> 100 <sup>b</sup>
<b>CL251.5</b>	$98.92 \pm 4.74$
<b>CL251.6</b>	$71.03 \pm 5.40$
<b>CL251.7</b>	$80.02 \pm 7.14$
Dexamethasone <sup>c</sup>	$12.64 \pm 1.28$

<sup>a</sup> Giá trị  $\pm$  SD (n = 3); <sup>b</sup> Không có hoạt tính (> 100  $\mu\text{M}$ ); <sup>c</sup> Đối chứng dương

## KẾT LUẬN VÀ KIẾN NGHỊ

### Kết luận

- Đã tạo được 11 g cao chiết tổng từ sinh khối lên men của chủng vi nấm biến *Aspergillus* sp. CL251.

- Đã phân lập và xác định cấu trúc hóa học của 7 hợp chất, bao gồm: (*aS*)-asperpyrone A (CL251.1), (*aS*)-fonsecinone A (CL251.2), (*aS*)-dianhydro-aurasperone C (CL251.3), (*aS*)-aurasperone A (CL251.4), asperazine (CL251.5), asperazine A (CL251.6), và WIN 64821 (CL251.7) từ chủng vi nấm biến *Aspergillus* sp. CL251.

- Các hợp chất CL251.5 – CL251.7 ức chế sản sinh NO ở tế bào RAW264.7 được kích thích bởi LPS, với giá trị  $IC_{50}$  lần lượt là  $98.92 \pm 4.74$ ,  $71.03 \pm 5.40$ ,  $80.02 \pm 7.14$   $\mu$ M. Hợp chất CL251.2 và CL251.3 ức chế sản sinh NO ở nồng độ 100  $\mu$ M, với phần trăm ức chế lần lượt là  $47.16 \pm 1.39$  và  $42.86 \pm 2.26$  %.

### Kiến nghị

- Cần mở rộng nghiên cứu sàng lọc thêm các hoạt tính khác của các hợp chất phân lập được.

## TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] C. Pan, S.S.u. Hassan, I. Muhammad, H.J.F.i.M.S. Jin, 2025, Marine fungi as a goldmine for novel antibiotics: a 2024 perspective, 11, pp. 1538136.
- [2] R. Nicoletti, F.J.M.d. Vinale. Bioactive compounds from marine-derived *Aspergillus*, *Penicillium*, *Talaromyces* and *Trichoderma* species. MDPI; 2018. p. 408.
- [3] S. Shams ul Hassan, M. Ishaq, W.-d. Zhang, H.-Z.J.C.P.D. Jin, 2021, An overview of the mechanisms of marine fungi-derived anti-inflammatory and anti-tumor agents and their novel role in drug targeting, 27, pp. 2605-2614.
- [4] G.A. Vitale, D. Coppola, F. Palma Esposito, C. Buonocore, J. Ausuri, E. Tortorella, D.J.A. de Pascale, 2020, Antioxidant molecules from marine fungi: Methodologies and perspectives, 9, pp. 1183.
- [5] N.T.H.A.N. Thi, H. Anh, T.T.H. Vu, M.A. Nguyen, T.M.H. Doan, V.C. Pham, T.X. Dam, D.T. Cao, T.H.M.J.V.J.o.M.S. Le, Technology, 2024, Antimicrobial activity assessment of crude broth fermented extracts of marine-derived fungi collected from Bai Tu Long Bay (North Vietnam), 24, pp. 89-97.
- [6] T.N.Q. Bach, D.T. Cao, T.H.L. Hoang, A.D. Do, M.A. Nguyen, T.Q. Vu, T.D. Phi, T.H.M. Le, T.M.H. Doan, V.C. Pham. Cyclodipeptides Isolated from a Marine-Derived Fungus *Penicillium chrysogenum* M612 of Bai Tu Long Sea, Quang Ninh, Vietnam. 8th International Conference on the Development of Biomedical Engineering in Vietnam: Proceedings of BME 8, 2020, Vietnam: Healthcare Technology for Smart City in Low-and Middle-Income Countries: Springer; 2022. p. 527-537.
- [7] G.C. Varese, E. Bovio, L. Garzoli, G. Gnani, A. Poli, V.J.P.P. Prigione, 2018, Marine Fungi: the missing tile in the Ocean Biodiversity mosaic, pp.
- [8] W.D. Orsi, V.P. Edgcomb, G.D. Christman, J.F.J.N. Biddle, 2013, Gene expression in the deep biosphere, 499, pp. 205-208.
- [9] O.J.F.i.M. Yarden, 2014, Fungal association with sessile marine invertebrates, 5, pp. 228.
- [10] C.S. Jebaraj, C. Raghukumar, A. Behnke, T.J.F.M.E. Stoeck, 2010, Fungal diversity in oxygen-depleted regions of the Arabian Sea revealed by

targeted environmental sequencing combined with cultivation, 71, pp. 399-412.

[11] K.H. Tisthammer, G.M. Cobian, A.S.J.F.E. Amend, 2016, Global biogeography of marine fungi is shaped by the environment, 19, pp. 39-46.

[12] A.E. Oxford, H. Raistrick, P.J.B.J. Simonart, 1939, Studies in the biochemistry of micro-organisms: griseofulvin, C<sub>17</sub>H<sub>17</sub>O<sub>6</sub>Cl, a metabolic product of *Penicillium griseo-fulvum* Dierckx, 33, pp. 240.

[13] W. Godtfredsen, S. Jahnsen, H. Lorck, K. Roholt, L.J.N. Tybring, 1962, Fusidic acid: a new antibiotic, 193, pp.

[14] U. Johanson, A. Ævarsson, A. Liljas, D.J.J.o.m.b. Hughes, 1996, The dynamic structure of EF-G studied by fusidic acid resistance and internal revertants, 258, pp. 420-432.

[15] P. Collignon, J.J.I.j.o.a.a. Turnidge, 1999, Fusidic acid *in vitro* activity, 12, pp. S45-S58.

[16] W. Abramovits, A. Gupta, M.J.S. Gover, 2007, Altabax (retapamulin ointment), 1%, 6, pp. 239-240.

[17] M.S.J.J.o.n.p. Butler, 2004, The role of natural product chemistry in drug discovery, 67, pp. 2141-2153.

[18] S. Hasan, M.I. Ansari, A. Ahmad, M.J.B. Mishra, 2015, Major bioactive metabolites from marine fungi: A Review, 11, pp. 176.

[19] F. Ameen, S. AlNadhari, A.A.J.P.o. Al-Homaidan, 2022, Marine fungi showing multifunctional activity against human pathogenic microbes and cancer, 17, pp. e0276926.

[20] V. Meyer, B. Wu, A.F.J.B.I. Ram, 2011, *Aspergillus* as a multi-purpose cell factory: current status and perspectives, 33, pp. 469-476.

[21] D. Geiser, M. Klich, J.C. Frisvad, S. Peterson, J. Varga, R.A.J.S.i.m. Samson, 2007, The current status of species recognition and identification in *Aspergillus*, 59, pp. 1-10.

[22] Y. Wang, S. Qi, Y. Zhan, N. Zhang, A.-a. Wu, F. Gui, K. Guo, Y. Yang, S. Cao, Z.J.J.o.N.P. Hu, 2015, Aspertetranones A–D, putative meroterpenoids from the marine algal-associated fungus *Aspergillus* sp. ZL0-1b14, 78, pp. 2405-2410.

- [23] B.-B. Gu, F.-R. Jiao, W. Wu, W.-h. Jiao, L. Li, F. Sun, S.-P. Wang, F. Yang, H.-W.J.J.o.N.P. Lin, 2018, Preussins with inhibition of IL-6 expression from *Aspergillus flocculosus* 16D-1, a fungus isolated from the marine sponge *Phakellia fusca*, 81, pp. 2275-2281.
- [24] L. Wang, M. Li, J. Tang, X.J.M. Li, 2016, Eremophilane sesquiterpenes from a deep marine-derived fungus, *Aspergillus* sp. SCSIW2, cultivated in the presence of epigenetic modifying agents, 21, pp. 473.
- [25] Z. Wu, D. Li, F. Zeng, Q. Tong, Y. Zheng, J. Liu, Q. Zhou, X.-N. Li, C. Chen, Y.J.P. Lai, 2018, Brasilane sesquiterpenoids and dihydrobenzofuran derivatives from *Aspergillus terreus* [CFCC 81836], 156, pp. 159-166.
- [26] D.-C. Kim, K.-H. Cho, W. Ko, C.-S. Yoon, J.H. Sohn, J.H. Yim, Y.-C. Kim, H.J.I.J.o.M.S. Oh, 2016, Anti-inflammatory and cytoprotective effects of TMC-256C1 from marine-derived fungus *Aspergillus* sp. SF-6354 via up-regulation of heme oxygenase-1 in murine hippocampal and microglial cell lines, 17, pp. 529.
- [27] D.-C. Kim, T.H. Quang, N.T.T. Ngan, C.-S. Yoon, J.H. Sohn, J.H. Yim, Y. Feng, Y. Che, Y.-C. Kim, H.J.J.o.n.p. Oh, 2015, Dihydroisocoumarin derivatives from marine-derived fungal isolates and their anti-inflammatory effects in lipopolysaccharide-induced BV2 microglia, 78, pp. 2948-2955.
- [28] M. Liu, W. Sun, J. Wang, Y. He, J. Zhang, F. Li, C. Qi, H. Zhu, Y. Xue, Z.J.B.C. Hu, 2018, Bioactive secondary metabolites from the marine-associated fungus *Aspergillus terreus*, 80, pp. 525-530.
- [29] X. Du, D. Liu, J. Huang, C. Zhang, P. Proksch, W.J.F. Lin, 2018, Polyketide derivatives from the sponge associated fungus *Aspergillus europaeus* with antioxidant and NO inhibitory activities, 130, pp. 190-197.
- [30] Q. Xu, Y. Qiao, Z. Zhang, Y. Deng, T. Chen, L. Tao, Q. Xu, J. Liu, W. Sun, Y.J.F.i.P. Ye, 2021, New polyketides with anti-inflammatory activity from the fungus *Aspergillus rugulosa*, 12, pp. 700573.
- [31] G. Yang, M. Lin, K. Kaliaperumal, Y. Lu, X. Qi, X. Jiang, X. Xu, C. Gao, Y. Liu, X.J.M.D. Luo, 2024, Recent advances in anti-inflammatory compounds from marine microorganisms, 22, pp. 424.
- [32] T.H. Quang, L.T. Vien, L.N. Anh, N.T.T. Ngan, T.T.H. Hanh, N.X. Cuong, N.H. Nam, C.J.V.J.o.C. Van Minh, 2021, Anti-inflammatory

metabolites from a marine sponge-associated fungus *Aspergillus* sp. IMBC-FP2. 05, 59, pp. 52-56.

[33] N.D. Luyen, L.M. Huong, T. Thi Hong Ha, L.H. Cuong, D. Thi Hai Yen, N.X. Nhiem, B.H. Tai, A. Gardes, G. Kopprio, P.J.T.J.o.A. Van Kiem, 2019, *Aspermicrones AC*, novel dibenzospiroketal from the seaweed-derived endophytic fungus *Aspergillus micronesiensis*, 72, pp. 843-847.

[34] N.D. Luyen, L.M. Huong, T.T.H. Ha, L.H. Cuong, D.T.H. Yen, B.H. Tai, N.X. Nhiem, P.J.V.J.o.C. Van Kiem, 2019, Polyoxygenated polyketides from the marine-derived fungus *Aspergillus micronesiensis*, 57, pp. 654-660.

[35] The enzymatic measurement of nitrate and nitrite, *Methods in Molecular Biology* 100, pp.

[36] K. Akiyama, S. Teraguchi, Y. Hamasaki, M. Mori, K. Tatsumi, K. Ohnishi, H.J.J.o.n.P. Hayashi, 2003, New Dimeric Naphthopyrones from *Aspergillus niger*, 66, pp. 136-139.

[37] H.J.T. Priestap, 1984, New naphthopyrones from *Aspergillus fonsecaeus*, 40, pp. 3617-3624.

[38] M.J. Kim, D.-C. Kim, J. Kwon, S.M. Ryu, H. Kwon, Y. Guo, S.-B. Hong, Y.-C. Kim, H. Oh, D.J.J.o.N.P. Lee, 2020, Anti-inflammatory metabolites from *Chaetomium nigricolor*, 83, pp. 881-887.

[39] Y.-W. Hu, Y. Liu, E.-Y. Guo, Y.-Y. Wang, W.-Q. Xu, Y. Gao, X.-Y. Jiang, F. Feng, J. Xu, W.-Y.J.J.o.N.P. Liu, 2021, Naphtho- $\gamma$ -pyrone dimers from an endozoic *Aspergillus niger* and the effects of coisolated monomers in combination with cisplatin on a cisplatin-resistant A549 cell line, 84, pp. 1889-1897.

[40] X. Gou, J. Jia, Y. Xue, W. Ding, Z. Dong, D. Tian, M. Chen, H. Bi, K. Hong, J.J.A.M. Tang, *Biotechnology*, 2020, New pyrones and their analogs from the marine mangrove-derived *Aspergillus* sp. DM94 with antibacterial activity against *Helicobacter pylori*, 104, pp. 7971-7978.

[41] M. Varoglu, T.H. Corbett, F.A. Valeriote, P.J.T.J.o.o.c. Crews, 1997, *Asperazine*, a selective cytotoxic alkaloid from a sponge-derived culture of *Aspergillus niger*, 62, pp. 7078-7079.

## PHỤ LỤC



Lên men nhân sinh khối lượng lớn vi nấm *Aspergillus* sp. CL251



Tạo dịch chiết tổng của sinh khối chủng vi nấm *Aspergillus* sp. CL251