

MỘT SỐ HỢP CHẤT CÓ HOẠT TÍNH KHÁNG SINH PHÂN LẬP TỪ CHŨNG VI NẤM BIỂN CÁT BÀ, HẢI PHÒNG, VIỆT NAM

Cao Đức Tuấn¹, Hoàng Thị Hồng Liên², Đỗ Anh Duy³,
Lê Thị Hồng Minh⁴, Đoàn Thị Mai Hương⁴, Phạm Văn Cường⁴,
Yong-Ho Kim⁵, Đặng Văn Chức¹, Nguyễn Văn Hùng¹

TÓM TẮT

Trong chương trình tìm kiếm các hợp chất có hoạt tính kháng sinh từ vi nấm biển, căn chiết ethyl acetate của chủng vi nấm biển *Aspergillus* sp. M445, phân lập từ trầm tích thu nhận ở vùng biển Cát Bà thành phố Hải Phòng, thể hiện hoạt tính ức chế sự phát triển 2 chủng vi khuẩn Gram dương (*Enterococcus faecalis* ATCC29212, *Bacillus cereus* ATCC14579) và 1 chủng nấm (*Candida albicans* ATCC10231). Bài báo này báo cáo kết quả phân lập, xác định cấu trúc và hoạt tính kháng vi sinh vật 6 hợp chất từ chủng vi nấm biển M445 là germicidine A (1), 2-phenylacetic acid (2), indole-3-carboxylic acid (3), 3-indolecarbaldehyde (4), N-[2-(1H-indol-3-yl)-2-oxo-ethyl] acetamide (5) và 1H-indole-3-ethanol (6). Hợp chất 2 và 6 ức chế chọn lọc *Escherichia coli* ATCC25922 với giá trị MIC tương ứng là 32 và 8 µg/mL và hợp chất 1 ức chế 5/7 chủng vi sinh vật thử nghiệm với giá trị MIC 32-128 µg/mL; các hợp chất còn lại không thể

hiện hoạt tính. Kết quả cho thấy tiềm năng sản xuất chất kháng sinh germicidine A của chủng vi nấm M445.

Từ khóa: *Aspergillus*, Cát Bà, germicidine A, indole, kháng vi sinh vật, vi nấm biển.

SUMMARY

ANTIMICROBIAL METABOLITES FROM MARINE DERIVED FUNGUS ISOLATED FROM CAT BA SEA, HAI PHONG, VIETNAM

In the course of our screening program, the ethyl acetate extract of an *Aspergillus* sp. (strain M445), from marine sediment collected in the sea of Cat Ba (Hai Phong, Viet Nam), exhibited antimicrobial activities against two gram positive bacteria (*Enterococcus faecalis* ATCC29212, *Bacillus cereus* ATCC14579) and one yeast strain (*Candida albicans* ATCC10231). This paper reported the isolation, structural elucidation and antimicrobial activities of 6 compounds including germicidine A (1), 2-phenylacetic acid (2), indole-3-carboxylic acid (3), 3-indolecarbaldehyde (4), N-[2-(1H-indol-3-yl)-2-oxo-ethyl] acetamide (5) và 1H-indole-3-ethanol (6). Compound 2 and 6 selectively inhibited the growth of *Escherichia coli* ATCC25922 with MIC values of 32 và 8 µg/mL, respectively. Compound 1 shown inhibition activities against 5/7 tested microorganisms with MIC values of 32-128 µg/mL while other isolated compounds were inactive. Obtained

¹Trường Đại học Y Dược Hải Phòng

²Trường Đại học Buon Ma Thuot

³Viện nghiên cứu Hải sản

⁴Viện Hóa Sinh Biển, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam

⁵College of Pharmacy, Chungnam National University, Daejeon, Republic of Korea

Chịu trách nhiệm chính: Cao Đức Tuấn

Email: cdtuan@hpmu.edu.vn

Ngày nhận bài: 23.9.2021

Ngày phản biện khoa học: 02.11.2021

Ngày duyệt bài: 11.11.2021

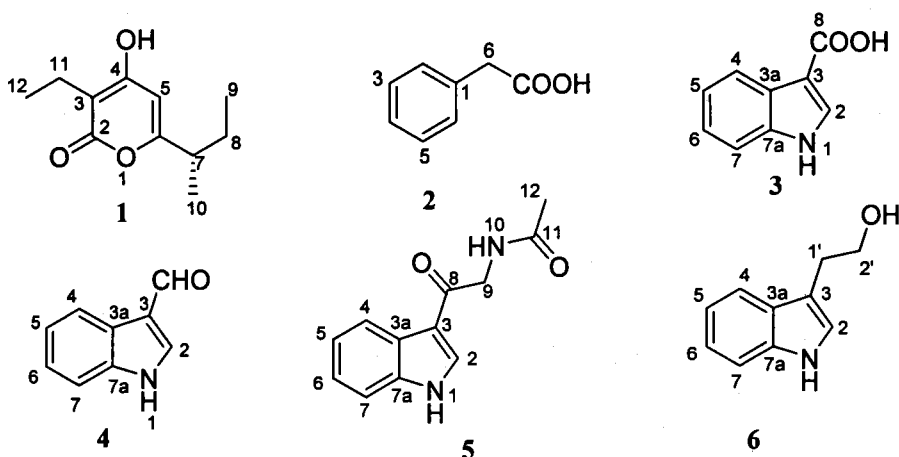
results suggested that the strain M445 could be a potential source for germicidine A antibiotic.

Keywords: *Aspergillus*, Cat Ba, germicidine A, indole, antimicrobial, marine fungus.

I. ĐẶT VẤN ĐỀ

Vi nấm biển được biết là nguồn quan trọng sản xuất các hợp chất có hoạt tính sinh học [1]. Thời gian gần đây, số lượng các hợp chất mới từ vi nấm biển được công bố tăng hàng năm, chiếm hơn 20% số lượng các hợp chất mới có nguồn gốc từ biển [2] và chi *Aspergillus* là một trong những chi vi nấm biển có khả năng sinh kháng sinh hiệu quả [3]. Trong nghiên cứu thực hiện năm 2019, từ một mẫu trầm tích biển Cát Bà - Hải Phòng, 5 chủng vi nấm biển đã được phân

lập với màu sắc và hình thái khuẩn lạc khác nhau [4]. Bước đầu đánh giá khả năng kháng vi sinh vật (VSV) của các chủng vi nấm đã phân lập cho thấy, cặn chiết ethyl acetate (EtOAc) của chủng vi nấm biển *Aspergillus* sp. M445 có hoạt tính tốt nhất, ức chế sự phát triển của 3 trên 7 chủng VSV thử nghiệm bao gồm 2 chủng vi khuẩn Gram dương (*Enterococcus faecalis* ATCC29212, *Bacillus cereus* ATCC14579) và nấm (*Candida albicans* ATCC10231) với nồng độ ức chế tối thiểu (MIC) tương ứng là 128, 128 và 16 $\mu\text{g/mL}$. Bài báo này báo cáo kết quả phân lập, xác định cấu trúc và thử nghiệm hoạt tính kháng VSV kiểm định sáu hợp chất 1 - 6 (Hình 1) từ chủng vi nấm biển M445.



Hình 1: Cấu trúc các hợp chất 1 – 6 phân lập từ chủng M445

II. ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Đối tượng nghiên cứu

Đối tượng nghiên cứu là chủng vi nấm biển *Aspergillus* sp. M445 phân lập từ trầm tích thu nhận ở vùng biển Cát Bà thành phố Hải Phòng năm 2019.

2.2. Thiết bị và hoá chất

Điểm nóng chảy được đo trên máy MEL-TEM 3.0 và phổ khối lượng được đo trên

máy sắc ký lỏng ghép khối phổ Agilent series 1100, sử dụng phương pháp ion hóa phun mù điện tử (ESI) tại Viện Hoá Sinh Biển, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam. Phổ NMR được ghi trên máy Bruker Avance 500 MHz với TMS làm chất nội chuẩn tại Trung tâm các phương pháp phổ ứng dụng, Viện Hoá học, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam. Sắc ký

lớp mỏng được thực hiện trên bản mỏng silica gel Merck 60 F₂₅₄. Sắc ký cột được tiến hành với silica gel cỡ hạt 40-63 μm (Merck) và Sephadex LH-20 (Aldrich). Dung môi, hoá chất dùng trong nghiên cứu được mua của hãng Merck và Sigma-Aldrich.

2.3. Phương pháp nghiên cứu

Phương pháp nuôi cấy và tạo cặn chiết

Quá trình nuôi cấy và tạo cặn chiết được thực hiện theo phương pháp đã công bố [5]. Đầu tiên, chủng vi nấm M445 trong điều kiện bảo quản được hoạt hóa và kiểm tra độ thuần chủng bằng cách cấy ria trên đĩa thạch môi trường PDMA rắn (Potato extract: 30 g/L; Malt extract: 10 g/L; Dextrose: 20 g/L; Agar: 14 g/L; Instant ocean: 30 g/L) ở nhiệt độ 28 °C trong 7 ngày. Các khuẩn lạc thuần chủng được cấy chuyển vào 10 bình tam giác chứa 2.000 mL/bình môi trường PDMA lỏng, bao gồm Potato extract: 30 g/L; Malt extract: 10 g/L; Dextrose: 20 g/L; Instant ocean: 30 g/L, pH 7,0, nuôi lắc trong 14 ngày ở 28 °C với tốc độ lắc 100 vòng/phút. Sau 14 ngày, dịch trong các bình nuôi cấy được lọc qua màng lọc để thu nhận dịch nuôi. Dịch nuôi cấy (20L) sau đó được chiết với dung môi EtOAc (3 lần x 15L), loại bỏ dung môi dưới áp suất giảm thu được cặn chiết EM445 (12,8 g).

Phương pháp phân lập hợp chất

Cặn chiết EM445 (12,8g) được khảo sát sắc ký bản mỏng với các hệ dung môi khác nhau. Sau đó được tinh chế trên sắc ký cột silica gel pha thường với hệ dung môi rửa giải $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ gradient thu được 7 phân đoạn, ký hiệu từ EF1- EF7.

Phân đoạn EF1 (0,97g) được phân tách bằng sắc ký cột silica gel với hệ dung môi n-hexan/acetone gradient thu được 5 phân đoạn nhỏ (EF1.1-EF1.5). Tinh chế phân đoạn EF1.3 (56 mg) bằng sắc ký cột với hệ dung

môi n-hexan/EtOAc gradient thu được hợp chất 1 (4 mg).

Phân đoạn EF2 (0,98 g) được phân tách thành 6 phân đoạn nhỏ (EF2.1-EF2.6) bằng sắc ký cột silica gel, hệ dung môi n-hexan/EtOAc gradient. Tiếp tục phân tách phân đoạn nhỏ EF2.5 (196 mg) bằng sắc ký cột silica gel, hệ dung môi n-hexan/EtOAc gradient thu được 38 mg phân đoạn EF2.5.6. Kết tinh lại phân đoạn EF2.5.6 với hệ dung môi n-hexane/acetone thu được 5 mg chất sạch, ký hiệu là 2.

Phân đoạn EF3 (1,81 g) được tinh chế bằng cột silica gel với hệ dung môi rửa giải $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ gradient thu được 7 phân đoạn ký hiệu từ EF3.1 đến EF3.7. Tinh chế phân đoạn EF3.4 (0,34 g) trên cột Sephadex LH-20 rửa giải với dung môi MeOH thu được 7 phân đoạn, kí hiệu từ EF3.4.1 đến EF3.4.7. Tinh chế phân đoạn EF3.4.7 (99 mg) trên cột Sephadex LH-20 rửa giải với MeOH thu 4 phân đoạn, kí hiệu từ EF3.4.7.1 đến EF3.4.7.4. Phân đoạn EF3.4.7.4 (15 mg) được tinh chế bằng sắc ký lớp mỏng điều chế TLC với hệ dung môi $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ (9/1) thu được hợp chất 3 (3 mg).

Phân đoạn EF4 (1,26 g) được tinh chế trên cột silica gel với hệ dung môi $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ gradient thu được 6 phân đoạn, kí hiệu từ EF4.1 đến EF4.6. Phân đoạn EF4.2 (125 mg) được tinh chế trên cột Sephadex LH-20 rửa giải với MeOH thu được hợp chất 6 (3 mg). Phân đoạn EF4.5 (0,125 g) được tinh chế trên cột Sephadex LH-20 dung môi MeOH thu được 5 phân đoạn, kí hiệu từ EF4.5.1 đến EF4.5.5. Tinh chế phân đoạn EF4.5.1 (14 mg) bằng sắc ký lớp mỏng điều chế TLC với hệ dung môi $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ (9/1) thu được hợp chất 5 (6 mg).

Phân đoạn EF5 (2,98 g) được tinh chế trên cột Sephadex LH-20 dung môi MeOH thu được 5 phân đoạn ký hiệu DF5.1 đến DF5.5, phân đoạn DF5.4 (0,56 g) được tinh chế trên cột sắc ký silica gel hệ dung môi CH₂Cl₂/MeOH gradient thu được 4 mg chất rắn màu trắng ký hiệu là 4.

Phương pháp thử hoạt tính kháng vi sinh vật kiểm định

Các thử nghiệm về hoạt tính kháng VSV kiểm định được thực hiện trên các chủng VSV thuần chủng cung cấp bởi trung tâm American Type Culture Collection – ATCC, bao gồm: ba chủng vi khuẩn Gram âm (*Escherichia coli* ATCC25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC27853, *Salmonella enterica* ATCC13076), ba chủng vi khuẩn Gram dương (*Enterococcus faecalis* ATCC29212, *Staphylococcus aureus* ATCC25923, *Bacillus cereus* ATCC13245) và một chủng nấm *Candida albicans* ATCC10231. Dung dịch thử nghiệm được chuẩn bị bằng cách pha loãng hợp chất thử nghiệm trong Dimethyl sulfoxide (DMSO) ở nồng độ 256 µg/mL, 128 µg/mL, 64 µg/mL, 32 µg/mL, 16 µg/mL, 8 µg/mL, 4 µg/mL và 2 µg/mL, Streptomycin và Cyclohexamide được sử dụng làm đối chứng dương, đối chứng âm là môi trường nuôi có thêm lượng DMSO tương ứng. Các chủng VSV thử nghiệm được nuôi trên đĩa 96 giếng, môi trường LB lỏng và thử nghiệm với các hợp chất sạch ở dải nồng độ đã chuẩn bị, với số thí nghiệm lặp lại N=3. Nồng độ ức chế tối thiểu (Minimum Inhibition Concentration - MIC (µg/mL) dựa vào độ đục đo ở 610 nm bằng máy quang phổ Biotek và số liệu được xử lý bằng phần mềm GraphPadPrism Data [6].

III. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU

3.1. Đặc điểm hoá lý của 6 hợp chất

phân lập từ chủng vi nấm biển M445

Hợp chất germicidine A (1): Chất rắn màu vàng nhạt; ESI-MS m/z: 197 [M+H]⁺, ¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃): δ_H (ppm) 0,87 (3H, t, J = 7,5 Hz, H-9); 1,09 (3H, t, J = 7,5 Hz, H-12); 1,17 (3H, d, J = 7,0 Hz, H-10); 1,49 (1H, m, H-8a); 1,68 (1H, m, H-8b); 2,44 (1H, m, H-7); 2,48 (2H, q, J = 7,0 Hz, H-11); 6,17 (1H, s, H-5). ¹³C-NMR (125 MHz, CDCl₃): δ_C (ppm) 11,5 (C-9); 12,5 (C-12); 16,4 (C-11); 17,7 (C-10); 27,4 (C-8); 39,7 (C-7); 100,2 (C-5); 104,6 (C-3); 167,2 (C-4); 167,3 (C-6); 168,3 (C-2).

Hợp chất 2-phenylacetic acid (2): Chất rắn màu, m.p 76-77°C; ESI-MS: m/z 137 [M+H]⁺; ¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃): δ_H (ppm) 3,59 (2H, s, CH₂); 7,25-7,33 (5H, m, Ph-H). ¹³C NMR (125 MHz, CDCl₃): δ_C (ppm) 41,4 (CH₂); 127,2 (C-4); 128,6 (C-2; C-6); 129,4 (C-3; C-5); 123,6 (C-6); 133,8 (C-1); 175,2 (COOH).

Hợp chất indole-3-carboxylic acid (3): Bột màu nâu nhạt; đnc. 231-232°C; ESI-MS: m/z 162 [M+H]⁺; ¹H- NMR (500 MHz, CD₃OD): δ_H (ppm) 7,17 (1H, dd, J = 1,5; 7,0 Hz, H-5); 7,22 (1H, dd, J = 1,5; 7,0 Hz, H-6); 7,45 (1H, dd, J = 1,0; 7,0 Hz, H-7); 7,96 (1H, s, H-2); 8,08 (1H, dd, J = 1,5; 7,0 Hz, H-4). ¹³C- NMR (125 MHz, CD₃OD): δ_C (ppm) 108,6 (C-3a); 112,9 (C-7); 122,0 (C-4); 122,4 (C-5); 123,6 (C-6); 127,5 (C-3a); 133,4 (C-2); 138,2 (C-7a); 169,2 (COOH).

Hợp chất 3-indolecarbaldehyde (4): Chất rắn màu nâu, m.p 195 - 198°C; ESI-MS: m/z 146 [M+H]⁺, ¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃): δ_H (ppm) 7,32-7,33 (2H, m, H-5, H-6); 7,45 (1H, m, H-7); 7,85 (1H, d, J = 3,0 Hz, H-2); 8,32 (1H, m, H-4); 10,1 (-CHO), ¹³C-NMR (125 MHz, CDCl₃): δ_C (ppm) 111,5 (C-7); 119,8 (C-7a); 122,0 (C-4);

123,1 (C-5); 123,7 (C-3); 124,5 (C-6); 131,4 (C-2); 136,7 (C-3a); 185,1 (CHO).

Hợp chất N-[2-(1H-Indol-3-yl)-2-oxoethyl] acetamide (5): Chất rắn màu trắng; ESI-MS: m/z 217,11 [M+H]⁺; ¹H-NMR (500 MHz, CD₃OD): δ_H (ppm) 2,09 (3H, s, COCH₃); 4,61 (2H, s, -CH₂-); 7,25-8,22 (4H, m, H vòng thơm); 8,24 (1H, s, H-2); ¹³C-NMR (125 MHz, CD₃OD): δ_C (ppm) 22,5 (COCH₃); 44,8 (-COCH₂N-); 112,9-138,3 (C vòng thơm, C-2); 173,7 (C=O); 191,9 (C=O).

Hợp chất indole-3-ethanol (6): Chất rắn màu nâu, m.p 99 °C, ESI-MS: m/z 162 [M+H]⁺, ¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃): δ_H (ppm) 3,04 (2H, t, J = 6,5 Hz, CH₂-8); 3,92

(2H, t, J = 6,5 Hz, CH₂-9); 7,08 (1H, d, J = 2,0 Hz, H-2); 7,13 (1H, dt, J = 1,5; 8,0 Hz, H-5); 7,22 (1H, dt, J = 1,5; 8,0 Hz, H-6); 7,37 (1H, d, J = 8,0 Hz, H-7); 7,62 (1H, J = 8,0 Hz, H-4); ¹³C-NMR (125 MHz, CD₃OD): δ_C (ppm) 28,7 (C-8); 62,6 (C-9); 111,3 (C-7); 112,2 (C-3); 118,8 (C-4); 119,4 (C-5); 122,2 (C-6); 122,6 (C-2); 127,5 (C-3a); 136,5 (C-7a).

3.2 Hoạt tính sinh học của các hợp chất phân lập được

Các hợp chất 1-6 được thử hoạt tính kháng VSV kiểm định theo phương pháp đã mô tả. Kết quả thử hoạt tính của các hợp chất này được thể hiện ở Bảng 1.

Bảng 1: Nồng độ ức chế tối thiểu (MIC: µg/mL) của hợp chất 1-6

Hợp chất	MIC (µg/mL)						
	Vi khuẩn Gram dương			Vi khuẩn Gram âm			Nấm
	<i>E. faecalis</i>	<i>S. aureus</i>	<i>B. cereus</i>	<i>E. coli</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>S. enterica</i>	<i>C. albicans</i>
1	16	64	32	-	-	64	128
2	-	-	-	32	-	-	-
3	-	-	-	-	-	-	-
4	-	-	-	-	-	-	-
5	-	-	-	-	-	-	-
6	-	-	-	8	-	-	-
S	256	256	128	32	256	128	
C							32

S: Streptomycin; C: Cycloheximide; -: MIC > 256 µg/mL

IV. BÀN LUẬN

Hợp chất 1 được phân lập dưới dạng chất rắn màu vàng nhạt. Phổ khối ESI-MS xuất hiện pic ion giả phân tử ở m/z 197 [M+H]⁺. Trên phổ ¹H-NMR của hợp chất này xuất hiện các tín hiệu của 3 nhóm methyl ở δ_H 0,87 (3H, t, J = 7,5 Hz, H-9); 1,09 (3H, t, J = 7,5 Hz, H-12); 1,17 (3H, d, J = 7,0 Hz, H-

10). Tín hiệu singlet của 1 proton ở vùng trường thấp δ_H 6,17 (1H, s, H-5) và các proton aliphatic ở δ_H từ 1,49- 2,48 ppm. Trên phổ ¹³C-NMR và DEPT của 1 thấy xuất hiện tín hiệu của 11 nguyên tử cacbon trong đó có 3 nhóm methyl ở δ_C 11,5 (C-9), 12,5 (C-12), 17,7 (C-10), 2 nhóm methylen ở δ_C 16,4 (C-11), 27,4 (C-8); 1 nhóm methine sp³ ở δ_C

39,7 (C-7); 3 carbon không liên kết trực tiếp với hydro ở δ_C 104,6 (C-3); 167,2 (C-4); 167,3 (C-6) và 1 nhóm cacbonyl ở phía trường thấp δ_C 168,3 (C-2). Phân tích các tín hiệu tương tác trên phổ COSY của **1** nhận thấy hợp chất **1** có 2 hệ tương tác spin H-12/H-11 và H-9/H-8/H-7/H-10 (Hình 2). Trên phổ HMBC của **1** cho tương tác xa giữa H-7 (δ_H 2,44) với C-5 (δ_C 100,2)/ C-6 (δ_C 167,3)/ C-8 (δ_C 27,4)/ C-9 (δ_C 11,5) và C-10 (δ_C 17,7). Tương tác giữa proton của nhóm methyl CH₃-10 (δ_H 1,17) với C-6 (δ_C 167,3)/ C-7 (δ_C 39,7) và C-8 (δ_C 27,4). Tương tác giữa proton của nhóm methyl CH₃-9 (δ_H 0,87) với C-7 (δ_C 39,7) và C-8 (δ_C 27,4), tương tác giữa proton của nhóm methylene CH₂-8 (δ_H 1,49 và 1,68) với C-6 (δ_C 167,3)/ C-9 (δ_C 11,5) và C-10 (δ_C 17,7) cho phép xác định sự có mặt của nhóm thế butyl và nhóm thế này gắn ở vị trí C-6. Ngoài ra, tương tác giữa proton của nhóm methylene CH₂-11 (δ_H 2,48) với C-4 (δ_C 167,2)/ C-3 (δ_C 104,6)/ C-2 (δ_C 168,3), tương tác giữa proton của nhóm methyl CH₃-12 (δ_H 1,09) với C-3 (δ_C 104,6)/ C-11 (δ_C 16,4), chứng tỏ vị trí của nhóm thế ethyl gắn với carbon C-3. Như vậy, bằng việc kết hợp phân tích phổ 1 chiều và 2 chiều NMR của **1**, kết hợp với việc so sánh tài liệu tham khảo giúp xác định hợp chất **1** là germicidin A [7].

Hợp chất **2** được phân lập dưới dạng chất rắn màu trắng. Phổ khối ESI-MS xuất hiện pic ion giả phân tử ở m/z 137 [M+H]⁺. Trên phổ ¹H-NMR của **2** thấy xuất hiện tín hiệu của 5 proton vòng thơm ở δ_H 7,24-7,34 (5H, m, H-aromatic) và 1 nhóm methylen ở δ_H 3,64 (2H, s, H-6). Dựa trên dữ liệu phổ MS, ¹H-NMR và so sánh với tài liệu tham khảo cho phép xác định hợp chất **2** là 2-phenylacetic acid [8].

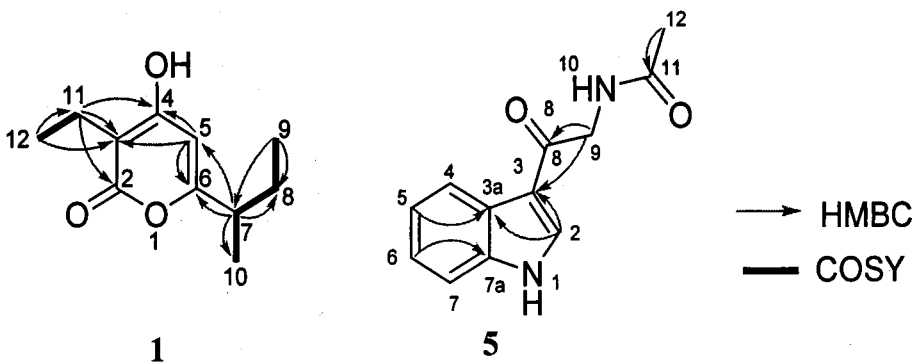
Hợp chất **3** được phân lập dưới dạng chất rắn màu nâu nhạt. Phổ khối ESI-MS xuất hiện pic ion giả phân tử ở m/z 162 [M+H]⁺. Phổ ¹H-NMR và ¹³C-NMR của **3** xuất hiện các tín hiệu đặc trưng cho hợp chất khung indol. Trên phổ ¹H-NMR của **3** xuất hiện tín hiệu của 5 proton vòng thơm ở δ_H 7,15 (1H, dt, J = 1,5; 7,5 Hz, H-5); 7,17 (1H, dt, J = 1,5; 7,5 Hz, H-6); 7,45 (1H, dd, J = 1,5; 7,0 Hz, H-7); 7,92 (1H, s, H-2); 8,15 (1H, dd, J = 1,5; 7,0 Hz, H-4). Trên phổ ¹³C-NMR và DEPT của **3** cho tín hiệu của 9 nguyên tử carbon, bao gồm 5 nhóm methin sp² ở δ_C 133,4 (C-2), 123,6 (C-4), 122,0 (C-5), 122,4 (C-6), 112,9 (C-7), 1 nhóm cacboxylic ở δ_C 169,2 (C-8) và 3 carbon sp² không liên kết trực tiếp với hydro ở δ_C 108,6 (C-3), 127,5 (C-3a) và 138,2 (C-7a). Dựa trên các dữ liệu phổ ¹H-NMR và ¹³C-NMR, so sánh với tài liệu tham khảo cho phép kết luận hợp chất **3** là indole-3-carboxylic acid [9].

Hợp chất **4** được phân lập dưới dạng tinh thể hình kim màu vàng nhạt. Phổ khối ESI-MS cho pic ion giả phân tử ở m/z 146 [M+H]⁺. Trên phổ ¹H-NMR ở vùng aromatic xuất hiện các tín hiệu đặc trưng của khung indol ở δ_H 7,32 (1H, m, H-5); 7,33 (1H, m, H-6); 7,45 (1H, m, H-7); 7,85 (1H, d, J = 3,0 Hz, H-2); 8,32 (1H, m, H-4); còn ở vùng trường thấp cũng có tín hiệu ở δ_H 10,1 đặc trưng cho nhóm aldehyd. Phổ ¹³C-NMR và DEPT xuất hiện các tín hiệu tương ứng với các nguyên tử carbon thuộc nhân indol ở δ_C 111,4 (C-7); 120,1 (C-7a); 122,0 (C-4); 123,1 (C-5); 124,0 (C-3); 124,5 (C-6); 135,1 (C-2) cùng với tín hiệu của carbon của nhóm cacbonyl ở δ_C 185,1. Như vậy, kết hợp phổ khối MS, phổ ¹H-NMR, ¹³C-NMR và tham khảo tài liệu [10] đi đến kết luận hợp chất **4** là 3-indolecarbadehyde.

Hợp chất **5** được phân lập dưới dạng chất bột màu trắng. Phổ ESI-MS của **5** cho pic ion giả phân tử ở m/z 217 $[M+H]^+$. Trên phổ $^1\text{H-NMR}$ của **5** xuất hiện các tín hiệu của 5 proton ở vùng thơm ở δ_{H} 7,24 (2H, m, H-5 + H-6); 7,48 (1H, d, $J = 1,0$; 7,5 Hz, H-7); 8,23 (1H, dd, $J = 1,0$; 8,0 Hz, H-4) và 8,24 (1H, s, H-2). Ngoài ra phổ $^1\text{H-NMR}$ cũng ghi nhận các tín hiệu singlet của 1 nhóm methyl ở δ_{H} 2,09 (3H, s, CH_3 -12) và 1 nhóm methylen ở δ_{H} 4,62, (2H, s, CH_2 -9). Trên phổ $^{13}\text{C-NMR}$, DEPT của **5** thấy xuất hiện tín hiệu của 11 nguyên tử cacbon trong đó có 2 nhóm carbonyl ở δ_{C} 173,7 và 191,9 và 3 carbon không liên kết trực tiếp với hydro ở vùng thơm, 5 nhóm methine, 1 nhóm methylene và 1 nhóm methyl. Độ chuyển dịch hóa học của nhóm methylen (δ_{C} 44,8, δ_{H} 4,62) gợi ý nhóm này được liên kết trực tiếp với nguyên tử nitơ. Phân tích phổ HMBC của **5** (Hình 2) cho phép xác định hợp chất này có khung indol gắn với 1 mạch nhánh. Tương tác trên phổ HMBC của proton thuộc nhóm methylen CH_2 -9 (δ_{H} 4,62) với carbon carbonyl (δ_{C} 191,9) và C-3 (δ_{C} 115,8) cho

phép xác định mạch nhánh gắn với khung indol ở vị trí C-3. Kết hợp các dữ liệu phổ và so sánh với tài liệu tham khảo [11] cho phép kết luận hợp chất **5** là N-[2-(1H-indol-3-yl)-2-oxo-ethyl] acetamide.

Hợp chất **6** được phân lập dưới dạng chất rắn màu trắng. Phổ khối ESI của hợp chất **6** cho pic ion giả phân tử ở m/z 162 $[M+H]^+$. Phổ $^1\text{H-NMR}$ của hợp chất **6** xuất hiện các tín hiệu của 1 vòng benzen thế 1,2 ở δ_{H} 7,15 (1H, dt, $J = 1,0$; 8,0 Hz, H-5); 7,23 (1H, dt, $J = 1,0$; 8,0 Hz, H-6), 7,36 (1H, d, $J = 8,0$ Hz, H-7), 7,64 (1H, d, $J = 8,0$ Hz, H-4), tín hiệu singlet của 1 proton vòng thơm ở δ_{H} 7,05 (1H, s, H-2) và tín hiệu triplet của 2 nhóm methylen ở δ_{H} 3,05 (2H, t, $J = 6,5$ Hz, CH_2 -1'), 3,92 (2H, t, $J = 6,5$ Hz, CH_2 -2'). Phổ $^{13}\text{C-NMR}$ và DEPT cho tín hiệu của 10 nguyên tử cacbon trong đó có 5 nhóm methin sp^2 , 2 nhóm methylen sp^3 và 3 carbon không liên kết trực tiếp với hydro. Kết hợp dữ liệu phổ MS, 1D-NMR và so sánh với các dữ liệu phổ từ tài liệu tham khảo chỉ ra rằng hợp chất **6** là 1H-indole-3-ethanol [12].



Hình 2: Một số tương tác chính trên phổ HMBC và COSY của 1 và 5

Các hợp chất 1-6 được thử hoạt tính kháng VSV đối với 7 chủng VSV kiểm định. Kết quả cho thấy hợp chất 2 và 6 ức chế chọn lọc E. coli với giá trị MIC tương ứng là

32 và 8 $\mu\text{g/mL}$, tốt hơn chứng dương, và hợp chất 1 ức chế 5/7 chủng VSV với giá trị MIC 32-128 $\mu\text{g/mL}$ (Bảng 1). Bên cạnh đó, hợp chất 3 đã được báo cáo có hoạt tính kháng

khảo [9] nhưng không thể hiện hoạt tính đối với các chủng VSV thử nghiệm trong nghiên cứu này.

V. KẾT LUẬN

Sáu hợp chất đã được phân lập từ cặn chiết kháng VSV của chủng vi nấm biển *Aspergillus* sp. M445 phân lập từ trầm tích biển Cát Bà, Hải Phòng. Bằng các phương pháp phổ và so sánh với tài liệu tham khảo cho phép xác định cấu trúc của các hợp chất này là germicidine A (1), 2-phenylacetic acid (2), indole-3-carboxylic acid (3), 3-indolecarbaldehyde (4), N-[2-(1H-indol-3-yl)-2-oxo-ethyl] acetamide (5) và 1H-indole-3-ethanol (6). Hợp chất 2 và 6 ức chế chọn lọc *E. coli* với giá trị MIC tương ứng là 32 và 8 µg/mL và hợp chất 1 ức chế 5/7 chủng VSV thử nghiệm với giá trị MIC 32-128 µg/mL; các hợp chất còn lại không thể hiện hoạt tính. Đây là phát hiện quan trọng định hướng sử dụng chủng vi nấm này sản xuất chất kháng sinh germicidine A.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Biabani, M.A.F. and H. Laatsch: Advances in chemical studies on low-molecular weight metabolites of marine fungi. 340(7), 589-607 (1998).
2. Carroll, A.R., et al.: Marine natural products. Natural Product Reports 36(1), 122-173 (2019).
3. Lee, Y.M., et al.: Marine-derived *Aspergillus* species as a source of bioactive secondary metabolites. Mar Biotechnol (NY) 15(5), 499-519 (2013).
4. Cao Đức Tuấn, et al.: Nghiên cứu phân lập vi nấm biển từ trầm tích khu vực biển Cát Bà, thành phố Hải Phòng, Việt nam. Tạp chí Y học Việt Nam 484, 570-576 (2019).
5. Le Thi Hong Minh, et al.: Isolation, screening antimicrobial activity and identification of fungi from marine sediments of the area Thanh Lan, Co To, Vietnam. Vietnam Journal of Biotechnology 16, 721-728 (2018).
6. Hadacek, F. and H. Greger: Testing of antifungal natural products: methodologies, comparability of results and assay choice. Phytochem. Anal. 11(3), 137-147 (2000).
7. Petersen, F., et al.: Germicidin, an autoregulative germination inhibitor of *Streptomyces viridochromogenes* NRRL B-1551. J. Antibiot. (Tokyo) 46(7), 1126-38 (1993).
8. Centre, T.M.I. 1H NMR Spectrum (HMDB0000209). [cited 2021; Available from: https://hmdb.ca/spectra/nmr_one_d/1195#conditions].
9. Tian, S., et al.: Antimicrobial metabolites from a novel halophilic actinomycete *Nocardiosis terrae* YIM 90022. Nat. Prod. Res. 28(5), 344-346 (2014).
10. Chowdhury, B.K. and D.P. Chakraborty: 3-formylindole from *Murraya exotica*. Phytochem. 10(2), 481-483 (1971).
11. Iakovou, K., et al.: Design, synthesis and biological evaluation of novel beta-substituted indol-3-yl ethylamido melatoninergic analogues. J. Pharm. Pharmacol. 54(1), 147-56 (2002).
12. Guzmán-López, O., et al.: Tyrosol and tryptophol produced by *Ceratocystis adiposa*. World J. Microbiol. Biotechnol. 23(10), 1473-1477 (2007).