

## Các hợp chất thứ cấp từ chủng xạ khuẩn biển *Micromonospora* sp. (G043)

Cao Đức Tuấn<sup>1,3</sup>, Trần Văn Hiệu<sup>1</sup>, Đoàn Thị Mai Hương<sup>1\*</sup>, Vũ Thị Quyên<sup>1</sup>, Lê Thị Hồng Minh<sup>1</sup>,  
Brian Murphy<sup>2</sup>, Châu Văn Minh<sup>1</sup>, Phạm Văn Cường<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Viện Hóa sinh biển, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam

<sup>2</sup>Trường Đại học Illinois, Chicago, Mỹ

<sup>3</sup>Trường Đại học Y dược Hải Phòng

Đến Toà soạn 20-7-2016; Chấp nhận đăng 25-10-2016

### Abstract

Analysis of an antimicrobial extract prepared from culture broth of the marine-derived actinomycete *Micromonospora* sp. (strain G043) led to the isolation of 9 secondary metabolites and identified as Cyclo-(Pro-Leu) (**1**), Cyclo-(Pro-Val) (**2**), Cyclo-(Pro-Trp) (**3**), Cyclo-(Pro-Phe) (**4**), Cyclo-(Pro-Tyr) (**5**), and Cyclo-(Leu-Tyr) (**6**), 2-phenylacetic acid (**7**), N-(4-hydroxyphenylethyl)acetamide (**8**), bis(2-ethylhexyl) adipate (**9**). The structures of **1-9** were determined by analyses of MS and 2D NMR data. All compounds were evaluated for their antimicrobial activity against a panel of clinically significant microorganisms. Compounds **3**, **6** and **7** inhibited *Escherichia coli* with a MIC value of 128, 32 and 32 µg/ml, respectively.

**Keywords.** *Micromonospora* sp. (G043 strain), marine microorganism, cyclodipeptide, antimicrobial activity.

### 1. MỞ ĐẦU

Các bệnh truyền nhiễm chiếm phần lớn trong các bệnh của con người và động vật. Khoảng nửa sau thế kỷ 19, người ta đã phát hiện vi sinh vật chính là nguyên nhân gây ra các bệnh truyền nhiễm. Do đó liệu pháp hóa học nhằm vào các vi sinh vật gây bệnh đã được phát triển thành liệu pháp điều trị chính. Vi sinh vật biển có khả năng thích nghi với các điều kiện môi trường biển luôn bị thay đổi, điều này mở ra các triển vọng phát triển các hợp chất hữu cơ thứ cấp đặc biệt [1-3]. Hiện nay, đã có nhiều loại kháng sinh được chiết xuất từ nấm, vi khuẩn, xạ khuẩn biển [4]. Càng ngày càng nhiều các VSV gây bệnh kháng với các kháng sinh hiện có, do vậy, rất cần phải tiếp tục nghiên cứu, tìm kiếm, phát hiện các loại kháng sinh mới. Tiếp theo những nghiên cứu về các hợp chất thứ cấp có hoạt tính kháng vi sinh vật kiểm định từ xạ khuẩn biển Việt Nam. Trong khuôn khổ bài báo này, chúng tôi công bố về kết quả phân lập và thử hoạt tính kháng vi sinh vật kiểm định và hoạt tính kháng lao của 9 hợp chất thứ cấp từ chủng xạ khuẩn biển *Micromonospora* sp. (G043) phân lập từ mẫu trầm tích tại khu vực biển Cô Tô – Thanh Lân.

### 2. THỰC NGHIỆM

#### 2.1. Thiết bị và nguyên liệu

Điểm nóng chảy được đo trên máy MEL-TEM 3.0. Phổ cộng hưởng từ hạt nhân NMR được ghi trên máy Bruker Avance 400 MHz và 500 MHz với TMS là chất chuẩn nội. Phổ khối lượng (ESI-MS) được đo trên máy sắc ký lỏng ghép khối phổ với đầu dò MSD (LC/MSD Agilent series 1100), sử dụng đầu dò DAD. Sắc ký lớp mỏng (TLC) được thực hiện trên bản mỏng silica gel Merck 60 F<sub>254</sub>. Sắc ký cột được tiến hành với silica gel cỡ hạt 40-63 µm và sephadex LH-20 (Aldrich).

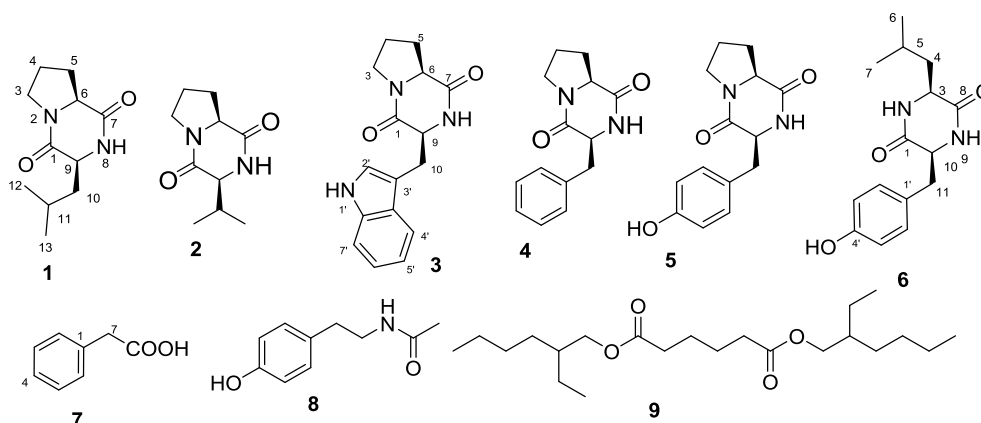
Mẫu bùn biển được lấy tại vùng biển Cô Tô – Thanh Lân vào tháng 4-2014 và được bảo quản trong điều kiện mát cho tới khi xử lý mẫu trong vòng 24 giờ.

#### 2.2. Phân lập, nuôi cấy và lên men chủng xạ khuẩn

Cân 0,5 g trầm tích hoà trong 4,5 ml nước cất vô trùng, dùng thanh inox cho qua ngọn lửa đèn cồn khử trùng, chờ nguội để đảo đều mẫu, sốc nhiệt ở nhiệt độ 65 °C trong 8 phút, dùng máy vortex trộn

đều mẫu, hút 50 µl dịch trong ống đã được sốc nhiệt vào một ống eppendorf khác có chứa 450 µl nước cất đã khử trùng, trộn mẫu đều rồi hút 50 µl dịch cấy chài vào các đĩa có chứa môi trường phân lập. Các đĩa được nuôi trong tủ ẩm ở 28-30 °C trong 7 ngày, lựa chọn các khuẩn lạc cấy chuyển làm sạch sang môi trường A1. Các chủng vi sinh vật sau khi được làm thuần được giữ giống trong thạch nghiêng và trong glycerol bảo quản -80 °C. Tiếp giống chủng vi

sinh vật phân lập nuôi trên máy lắc rung ở 37 °C, 200 rpm thu dịch nuôi cấy sau 30 ngày. Dịch nuôi cấy sau đó được ly tâm 12000 vòng trong 10 phút, thu dịch bỏ cặn tế bào. Sau đó hoạt hoá chủng ở -80 °C trong môi trường lỏng A1 và kiểm tra độ thuần khiết các chủng nghiên cứu trên đĩa thạch A1 rồi nhân giống cấp 1, cấp 2 để tiến hành lên men lượng lớn trên môi trường A1+ thu được 30 lít dịch lên men sau 14 ngày.



Hình 1: Cấu trúc của các hợp chất 1-9 từ chủng xạ khuẩn biển *Micromonospora* sp. (G043)

### 2.3. Xử lý mẫu và phân lập các hợp chất thứ cấp

Cho 30 L dịch nuôi cấy của chủng *Micromonospora* sp. (G043) vào bình chứa 5 kg amberlite đã được hoạt hóa, khuấy đều nhẹ trong 2 giờ, ở nhiệt độ phòng. Sau đó thêm 6 lít MeOH vào bình và khuấy nhẹ trong 1 giờ, ở nhiệt độ phòng, rồi lọc hút chân không và cất loại dung môi (quá trình này được lặp lại 5 lần) thu được 50 gam cặn tổng. Tiếp đó, hòa cặn tổng này trong 500 ml nước, rồi chiết phân bố lần lượt với dung môi EtOAc, *n*-butanol (5 lần, ở nhiệt độ phòng), cất loại dung môi dưới áp suất giảm thu được cặn chiết EtOAc (2,86 g), *n*-BuOH (22,4 g) tương ứng.

Cặn chiết EtOAc (2,86 g) được tiến hành sắc ký cột silica gel với hệ dung môi *n*-hexan/EtOAc gradient thu được 6 phân đoạn ký hiệu từ F1-F6. Từ phân đoạn F4, sau khi tinh chế bằng sắc ký cột silica gel với hệ dung môi *n*-hexan/axeton thu được 4 phân đoạn nhỏ, ký hiệu từ F4.1- F4.4. Tinh chế phân đoạn F4.3 bằng cột sắc ký cột silica gel với hệ dung môi *n*-hexan/axeton tỷ lệ 93/7 thu được 6 mg chất 1. Phân đoạn F5 sau khi tinh chế bằng sắc ký cột silica gel với hệ dung môi *n*-hexan/EtOAc gradient thu được 6 phân đoạn nhỏ, ký hiệu từ F5.1- F5.6. Tinh chế phân đoạn F5.3 bằng sắc ký cột silica gel với hệ dung môi *n*-hexan/axeton thu được 7 mg chất được ký hiệu là 2. Tinh chế phân đoạn F5.4 bằng sắc ký cột silica gel với hệ dung môi CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/EtOAc gradient và kết tinh bằng hệ

*n*-hexan/axeton 9/1 thu được 5 mg chất 3. Phân đoạn F5.6 tinh chế bằng cột Sephadex với dung môi metanol thu được 3 phân đoạn nhỏ F5.6.1-F5.6.3. Kết tinh phân đoạn F5.6.2 bằng hệ *n*-hexan/axeton thu được 5 mg chất 4. Phân đoạn F6 sau khi tinh chế bằng sắc ký cột silica gel với hệ dung môi *n*-hexane/acetone gradient thu được 5 phân đoạn nhỏ, ký hiệu từ F6.1-F6.5. Tinh chế phân đoạn F6.3 bằng cột sắc ký cột silica gel với hệ dung môi *n*-hexan/EtOAc gradient thu được 6 mg chất 5.

Cặn chiết *n*-butanol (22,4 g) được tiến hành chạy cột sắc ký pha đảo RP-18 với hệ dung môi rửa giải là MeOH/H<sub>2</sub>O gradient thu được 6 phân đoạn ký hiệu từ F1-F6. Từ phân đoạn F6, sau khi tinh chế bằng sắc ký cột silica gel với hệ dung môi CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH gradient thu được 6 phân đoạn nhỏ, ký hiệu từ F6.1-F6.6. Phân đoạn F6.1 được tinh chế trên cột silica gel hệ dung môi *n*-hexan/axeton gradient và kết tinh lại thu được 6 mg chất 7. Tinh chế phân đoạn F6.3 bằng cột sắc ký Sephadex với dung môi MeOH thu được 4 phân đoạn nhỏ, ký hiệu từ F6.3.1-F6.3.4. Phân đoạn F6.3.4 tiếp tục tinh chế bằng sắc ký cột silica gel với hệ dung môi là EtOAc/MeOH gradient thu được 9 mg chất 6. Tinh chế phân đoạn F6.4 bằng cột sắc ký Sephadex với dung môi MeOH thu được 8 mg chất 8. Phân đoạn F6.5 tinh chế trên cột silica gel hệ dung môi EtOAc/MeOH thu được 5 phân đoạn nhỏ từ F6.4.1 đến F6.4.5, sau đó kết tinh phân đoạn F6.4.3 trong hệ CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH thu được 9 mg chất 9.

**Cylo-(Leu-Pro) (1):** Chất rắn màu trắng, điểm nóng chảy 147-148 °C; ESI-MS:  $m/z$  249 [M+K]<sup>+</sup>; <sup>1</sup>H-NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ<sub>H</sub> (ppm) 0,94 (3H, d,  $J = 6,5$  Hz, CH<sub>3</sub>-13); 0,99 (3H, d,  $J = 6,5$  Hz, CH<sub>3</sub>-12); 1,52 (1H, m, H<sub>a</sub>-10); 1,76 (1H, m, H-11); 1,89 (1H, m, H<sub>a</sub>-4); 2,02 (1H, m, H<sub>b</sub>-4); 2,05 (1H, m, H<sub>b</sub>-10); 2,13 (1H, m, H<sub>a</sub>-5); 2,34 (1H, m, H<sub>b</sub>-5); 3,55 (2H, m, CH<sub>2</sub>-3); 4,00 (1H, dd,  $J = 3,0; 9,0$  Hz, H-9); 4,10 (1H, t,  $J = 8,5$  Hz, H-6); <sup>13</sup>C-NMR (125 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ<sub>C</sub> (ppm) 21,2 (C-13); 22,7 (C-4); 23,3 (C-12); 24,7 (C-11); 28,1 (C-5); 38,7 (C-10); 45,5 (C-3); 53,4 (C-9); 59,0 (C-6); 166,2 (C-1); 170,2 (C-7).

**Cylo-(Pro-Val) (2):** Chất rắn vô định hình màu trắng; ESI-MS:  $m/z$  197,1 [M+H]<sup>+</sup>; <sup>1</sup>H-NMR (500 MHz, CD<sub>3</sub>OD): δ<sub>H</sub> (ppm) 0,95 (3H, d,  $J = 6,8$  Hz, CH<sub>3</sub>-11); 1,11 (3H, d,  $J = 6,8$  Hz, CH<sub>3</sub>-12); 1,94-2,05 (3H, m, CH<sub>2</sub>-4, H<sub>a</sub>-5); 2,33 (1H, m, H<sub>b</sub>-5); 2,50 (1H, m, H-10); 3,54 (2H, m, CH<sub>2</sub>-3); 4,05 (1H, m, H-6); 4,22 (1H, m, H-9); <sup>13</sup>C-NMR (125 MHz, CD<sub>3</sub>OD): δ<sub>C</sub> (ppm) 15,2 (C-11); 17,4 (C-12); 21,8 (C-4); 28,1 (C-5); 28,5 (C-10); 44,8 (C-3); 58,6 (C-9); 60,1 (C-6); 166,2 (C=O); 171,2 (C=O).

**Cylo-(Pro-Trp) (3):** Chất rắn vô định hình màu trắng; ESI-MS:  $m/z$  284 [M+H]<sup>+</sup>; <sup>1</sup>H-NMR (500 MHz, CD<sub>3</sub>OD): δ<sub>H</sub> (ppm) 1,00 (1H, m, H<sub>a</sub>-5); 1,51 (1H, m, H<sub>a</sub>-4); 1,71 (1H, m, H<sub>b</sub>-4); 2,00 (1H, m, H<sub>b</sub>-5); 3,29 (1H, m, H<sub>a</sub>-3); 3,32 (2H, m, CH<sub>2</sub>-10); 3,48 (1H, m, H<sub>b</sub>-3); 4,02 (1H, m, H-6); 4,43 (1H, m, H-9); 7,03 (1H, t,  $J = 7,5$  Hz, H-5'); 7,11 (1H, t,  $J = 7,5$  Hz, H-6'); 7,12 (1H, s, H-2'); 7,35 (1H, d,  $J = 7,5$  Hz, H-7'); 7,59 (1H, d,  $J = 7,5$  Hz, H-4'); <sup>13</sup>C-NMR (150 MHz, CD<sub>3</sub>OD): δ<sub>C</sub> (ppm) 22,6 (C-4); 29,1 (C-10); 29,1 (C-5); 45,9 (C-3); 57,2 (C-9); 60,0 (C-6); 109,6 (C-3'); 112,3 (C-7'); 119,7 (C-4'); 119,9 (C-5'); 122,6 (C-6'); 125,6 (C-2'); 128,6 (C-3'a); 138,0 (C-7'a); 167,4 (C=O); 170,7 (C=O).

**Cylo-(Pro-Phe) (4):** Chất rắn vô định hình màu trắng; ESI-MS:  $m/z$  245 [M+H]<sup>+</sup>; <sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, CD<sub>3</sub>OD): δ<sub>H</sub> (ppm) 1,60 (2H, m, H<sub>a</sub>-4, H<sub>a</sub>-5); 1,91-2,07 (3H, m, H<sub>b</sub>-4, H<sub>b</sub>-5, H<sub>a</sub>-10); 2,64 (1H, m, H<sub>b</sub>-10); 3,02 (1H, dd,  $J = 4,8; 13,6$  Hz, H<sub>a</sub>-3); 3,22 (1H, dd,  $J = 4,4; 13,6$  Hz, H<sub>b</sub>-3); 3,59 (1H, m, H-6); 4,22 (1H, t,  $J = 4,8$  Hz, H-9); 7,20-7,33 (5H, Ph); <sup>13</sup>C-NMR (100 MHz, CD<sub>3</sub>OD): δ<sub>C</sub> (ppm) 21,1 (C-4); 28,4 (C-5); 39,6 (C-10); 44,7 (C-3); 57,7 (C-9); 58,4 (C-6); 127,1-129,9 (CH, Ph); 135,3 (C-1'), 166,0 (C=O), 170,0 (C=O).

**Cylo-(Pro-Tyr) (5):** Chất rắn vô định hình màu trắng; ESI-MS:  $m/z$  261,1 [M+H]<sup>+</sup>; <sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, CD<sub>3</sub>OD): δ<sub>H</sub> (ppm) 1,25 (1H, m, H<sub>a</sub>-4); 1,81 (2H, m, H<sub>b</sub>-4, H<sub>a</sub>-5); 2,13 (1H, m, H<sub>b</sub>-5); 3,07 (2H, m, H-10); 3,40 (1H, m, H<sub>a</sub>-3); 3,57 (1H, m, H<sub>b</sub>-3); 4,06 (1H, m, H-6); 4,38 (1H, m, H-9); 6,73 (2H, d,  $J = 8,5$  Hz, H-2', 6'); 7,05 (2H, d,  $J = 8,5$  Hz, H-3', 5'); <sup>13</sup>C-NMR (100 MHz, CD<sub>3</sub>OD): δ<sub>C</sub> (ppm) 21,3

(C-4); 28,0 (C-5); 36,3 (C-10); 44,5 (C-3); 56,5 (C-9); 58,7 (C-6); 126,4 (C-1'); 130,7 (C-2', C-6'); 114,8 (C-3', C-5'); 156,3 (C-4'); 165,6 (C=O); 169,4 (C=O).

**Cylo-(Leu-Tyr) (6):** Chất rắn vô định hình màu trắng; <sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, DMSO): δ<sub>H</sub> (ppm) 0,62 (3H, d,  $J = 7,5$  Hz, CH<sub>3</sub>); 0,64 (3H, d,  $J = 7,5$  Hz, CH<sub>3</sub>); 0,11 (1H, m, H<sub>a</sub>-4); 0,74 (1H, m, H<sub>b</sub>-4); 1,40 (1H, m, H-5); 2,70 (1H, dd,  $J = 4,5, 13,5$  Hz, H<sub>a</sub>-11); 3,02 (1H, dd,  $J = 4,5, 13,5$  Hz, H<sub>b</sub>-11); 3,59 (1H, m, H-3); 4,02 (1H, m, H-10); 6,63 (2H, d,  $J = 8,5$  Hz, H-2', H-6'); 6,89 (2H, d,  $J = 8,5$  Hz, H-3', H-5'); <sup>13</sup>C-NMR (100 MHz, DMSO): δ<sub>C</sub> (ppm) 21,4 (C-6); 22,9 (C-7); 23,1 (C-5); 39,0 (C-11); 43,8 (C-4); 52,4 (C-10); 55,8 (C-3); 115,0 (C-3', C-5'); 125,9 (C-1'); 131,4 (C-2', C-6'); 156,5 (C-4'); 166,5 (C=O); 167,7 (C=O).

**Axit 2-phenylacetic (7):** Chất rắn vô định hình màu trắng; Chất rắn vô định hình màu trắng, mp. 76-77 °C; ESI-MS:  $m/z$  138 [M+H]<sup>+</sup>; <sup>1</sup>H-NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>): 3,59 (2H, s, CH<sub>2</sub>); 7,25-7,33 (5H, m, Ph-H); <sup>13</sup>C-NMR (125 MHz, CDCl<sub>3</sub>): 41,4 (CH<sub>2</sub>); 127,2 (C-4); 128,6 (C-2, C-6); 129,4 (C-3, C-5); 123,6 (C-4); 133,8 (C-1); 175,2 (COOH).

**N-(4-hydroxyphenyletyl)axetamid (8):** Chất rắn vô định hình màu trắng; ESI-MS ( $m/z$ ): 178,1 [M-H]<sup>-</sup>; <sup>1</sup>H-NMR (500 MHz, CD<sub>3</sub>OD): δ (ppm) 1,95 (3H, s, CH<sub>3</sub>C=O); 2,73 (2H, t,  $J = 7,5$  Hz, CH<sub>2</sub>-Ar); 3,45 (2H, m, CH<sub>2</sub>-N); 6,80 (2H, d,  $J = 7,0$  Hz, H-3, H-5); 7,04 (2H, d,  $J = 7,0$  Hz, H-2, H-6); <sup>13</sup>C-NMR (125 MHz, CD<sub>3</sub>OD): δ<sub>C</sub> (ppm) 21,9 (CH<sub>3</sub>); 34,1 (CH<sub>2</sub>-Ar); 40,7 (CH<sub>2</sub>-NH); 114,9 (C-3, C-5); 129,2 (C-2, C-6); 129,6 (C-1); 154,9 (C-4); 171,3 (C=O).

**Bis(2-ethylhexyl) adipate (9):** Chất rắn vô định hình màu trắng; ESI-MS:  $m/z$  371 [M+H]<sup>+</sup>; <sup>1</sup>H-NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ<sub>H</sub> (ppm) 0,88 (6H, m, CH<sub>3</sub>-7, CH<sub>3</sub>-11); 1,28 (6H, m, CH<sub>2</sub>-8, CH<sub>2</sub>-9, CH<sub>2</sub>-10); 1,34 (1H, quint,  $J = 7,0$  Hz, CH<sub>2</sub>-6); 1,56 (1H, m, H-5); 1,67 (2H, m, CH<sub>2</sub>-1); 2,32 (2H, m, CH<sub>2</sub>-2); 3,98 (2H, dd,  $J = 6,0; 3,5$  Hz, CH<sub>2</sub>-4); <sup>13</sup>C-NMR (125 MHz, CD<sub>3</sub>OD): δ<sub>C</sub> (ppm) 10,9 (C-11); 14,0 (C-7); 22,9 (C-8); 23,8 (C-6); 24,5 (C-1); 28,9 (C-9); 30,4 (C-10); 34,0 (C-2); 38,7 (C-5); 66,8 (C-4); 173,5 (C=O).

### 3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Hợp chất **1** được phân lập dưới dạng chất rắn màu trắng, đnc. 147-148 °C. Phổ khối ESI-MS cho pic ion giả phân tử ở  $m/z$  249 [M+K]<sup>+</sup>. Phổ <sup>13</sup>C-NMR và DEPT của **1** cho tín hiệu của 11 nguyên tử cacbon, trong đó có 3 nhóm metin lai hóa sp<sup>3</sup>, 4 nhóm metylen trong đó có 1 nhóm liên kết trực tiếp với nitơ, 2 nhóm metyl và 2 nhóm cacbonyl. Phổ <sup>1</sup>H-NMR xuất hiện tín hiệu của 2

nhóm methyl ở  $\delta_H$  0,94 (3H, d,  $J = 6,5$  Hz, CH<sub>3</sub>-13), 0,99 (3H, d,  $J = 6,5$  Hz, CH<sub>3</sub>-12), 2 nhóm metin gắn với nitơ ở  $\delta_H$  4,00 (1H, dd,  $J = 3,0; 9,0$  Hz, H-9); 4,10 (1H, t,  $J = 8,5$  Hz, H-6) và 1 nhóm metylen gắn với nitơ ở  $\delta_H$  3,55 (2H, m, CH<sub>2</sub>-3). Từ các dữ liệu phổ <sup>1</sup>H-NMR, <sup>13</sup>C-NMR, và so sánh với tài liệu tham khảo [5] cho phép xác định chất **1** là Cyclo-(Leu-Pro). Đây là một hợp chất dipetit vòng thường gặp trong nhóm xạ khuẩn biển.

Hợp chất **2** được phân lập dưới dạng chất rắn vô định hình màu trắng. Phổ khối HRESI-MS cho pic ion phân tử proton hóa ở  $m/z$  197,1 [M+H]<sup>+</sup>. Trên phổ <sup>1</sup>H-NMR, <sup>13</sup>C-NMR và DEPT của **2** gần giống với chất **1**, chỉ thấy mất đi tín hiệu của 1 nhóm metylen. Từ các dữ liệu phổ MS, <sup>13</sup>C-NMR, DEPT và <sup>1</sup>H-NMR và so sánh với tài liệu tham khảo [6] cho phép xác định hợp chất **2** là Cyclo-(Pro-Val).

Hợp chất **3** được phân lập dưới dạng chất rắn màu trắng. Phổ khối ESI-MS cho pic ion phân tử proton hóa ở  $m/z$  284 [M+H]. Phổ <sup>1</sup>H-NMR thấy xuất hiện 5 proton vòng thơm ở  $\delta_H$  7,03 (1H, t,  $J = 7,5$  Hz, H-5'); 7,11 (1H, t,  $J = 7,5$  Hz, H-6'); 7,12 (1H, s, H-2'), 7,35 (1H, d,  $J = 7,5$  Hz, H-7'); 7,59 (1H, d,  $J = 7,5$  Hz, H-4') và 10 proton ở vùng trường cao. Phân tích phổ <sup>13</sup>C-NMR và DEPT với sự hỗ trợ của phổ HSQC cho thấy phân tử có 16 nguyên tử cacbon, trong đó có 4 nhóm metylen sp<sup>3</sup>, 2 nhóm metin sp<sup>3</sup>, 8 cacbon aromatic trong đó có 5 nhóm metin và 2 nhóm cacbonyl ở  $\delta_C$  167,4 (C=O), 170,7 (C=O). Phân tích phổ COSY cho phép xác định 3 chuỗi tương tác spin-spin của các proton: CH<sub>2</sub>-3/CH<sub>2</sub>-4/CH<sub>2</sub>-5/H-6; H-9/CH<sub>2</sub>-10 và H-4'/H-5'/H-6'/H-7'. Phổ HMBC cho tương tác của proton H-10 ( $\delta_H$  3,32) với C-3' ( $\delta_C$  109,6), C-9 ( $\delta_C$  57,2), C-2' ( $\delta_C$  125,6) và C-3'a ( $\delta_C$  128,6) và C=O ( $\delta_C$  167,4) cho phép xác định mối liên kết giữa C2' và C-3a' với C-3', C-10, C-9 và C=O. Tương tác của H-5 ( $\delta_H$  1,00) với C-3 ( $\delta_C$  45,9), C-4 ( $\delta_C$  22,6), C-6 ( $\delta_C$  60,0) và cacbon cacbonyl C=O ( $\delta_C$  170,7) cũng được quan sát thấy trên phổ HMBC. Từ các dữ liệu phổ MS, 1D-NMR, 2D-NMR và so sánh với tài liệu tham khảo [7] cho phép xác định chất **3** là Cyclo-(Pro-Trp).

Hợp chất **4** được phân lập dưới dạng chất rắn vô định hình màu trắng. Phổ khối ESI-MS cho pic ion phân tử proton hóa ở  $m/z$  245 [M+H]<sup>+</sup>. Phổ <sup>13</sup>C-NMR, DEPT cho tín hiệu của 14 nguyên tử cacbon, trong đó có 2 nhóm metin lai hóa sp<sup>3</sup>, 4 nhóm metylen trong đó có 1 nhóm liên kết trực tiếp với nitơ, 6 cacbon vòng thơm và 2 nhóm cacbonyl. Phổ <sup>1</sup>H-NMR xuất hiện tín hiệu của 5 nhóm metin vòng thơm nằm trong khoảng  $\delta_H$  7,20-7,33, 2 nhóm metin gắn với nitơ ở  $\delta_H$  3,59 (1H, m, H-6); 4,22 (1H, t,  $J = 4,8$  Hz, H-9), 1 nhóm metylen gắn với nitơ ở  $\delta_H$  3,02 (1H, dd,  $J = 4,8; 13,6$  Hz, H<sub>a</sub>-3); 3,22 (1H, dd,  $J = 4,4; 13,6$  Hz, H<sub>b</sub>-3) và tín hiệu của 6 proton nằm

trong khoảng  $\delta_H$  1,60-2,64. Kết hợp các dữ liệu phổ và so sánh với tài liệu tham khảo [8] cho phép xác định chất **4** là Cyclo-(Pro-Phe).

Hợp chất **5** được phân lập dưới dạng chất rắn vô định hình màu trắng. Phổ khối ESI-MS cho pic ion phân tử proton hóa ở  $m/z$  261 [M+H]<sup>+</sup>. Phổ <sup>1</sup>H-NMR, <sup>13</sup>C-NMR, DEPT của hợp chất **5** gần giống chất **4**, chỉ thấy mất đi tín hiệu của 1 nhóm metin vòng thơm, thay vào đó là 1 cacbon gắn với oxy. Kết hợp các dữ liệu phổ và so sánh với tài liệu tham khảo [9] cho phép xác định chất **5** là Cyclo-(Pro-Tyr).

Hợp chất **6** được phân lập dưới dạng chất rắn vô định hình màu trắng. Phổ <sup>13</sup>C-NMR và DEPT cho tín hiệu của 15 nguyên tử cacbon bao gồm 2 nhóm cacbonyl ở 166,5 (C=O), 167,7 (C=O), 4 nhóm metin vòng thơm ở  $\delta_C$  115,0 (C3', C-5'); 131,4 (C2', C-6'), 2 nhóm metylen ở  $\delta_C$  39,0 (C-11); 43,8 (C-4), 3 nhóm metin ở  $\delta_C$  23,1 (C-5); 52,4 (C-10); 55,8 (C-3), 2 nhóm methyl ở  $\delta_C$  21,4 (CH<sub>3</sub>), 22,9 (CH<sub>3</sub>) và 2 cacbon không gắn với hydro. Phổ <sup>1</sup>H-NMR cũng cho tín hiệu phù hợp với các tín hiệu trên phổ <sup>13</sup>C-NMR, đặc trưng cho 1 hợp chất dipeptid vòng bao gồm 2 nhóm methyl dưới dạng doublet ở  $\delta_H$  0,61 (3H, d,  $J = 7,5$  Hz, CH<sub>3</sub>), 0,62 (3H, d,  $J = 7,5$  Hz, CH<sub>3</sub>), 3 nhóm metin, 4 nhóm metin vòng thơm và 2 nhóm metylen. Kết hợp các dữ liệu phổ và so sánh với tài liệu tham khảo [10] cho phép xác định chất **6** là Cyclo-(Leu-Tyr).

Hợp chất **7** được phân lập dưới dạng chất rắn vô định hình màu trắng. Phổ khối ESI-MS cho pic ion phân tử proton hóa ở  $m/z$  138 [M+H]<sup>+</sup>. Phổ <sup>1</sup>H-NMR, <sup>13</sup>C-NMR, DEPT của hợp chất **7** cho tín hiệu của 5 nhóm metin vòng thơm, 1 nhóm metylen, 1 nhóm cacbonyl. So sánh với tài liệu tham khảo [11], cho phép xác định chất **7** chính là axit 2-phenylacetic.

Hợp chất **8** được phân lập dưới dạng chất rắn vô định hình màu trắng. Phổ khối ESI-MS của **8** cho pic ion phân tử deproton hóa ở  $m/z$  178,1 [M-H]<sup>-</sup>. Phổ <sup>1</sup>H-NMR cho tín hiệu của 1 nhóm methyl ở  $\delta_H$  1,95 (3H, s, CH<sub>3</sub>C=O), 2 nhóm metylen ở  $\delta_H$  2,73 (2H, t,  $J = 7,5$  Hz, CH<sub>2</sub>-Ar), 3,45 (2H, m, CH<sub>2</sub>-N) và 4 proton vòng thơm tương tác kiểu A<sub>2</sub>B<sub>2</sub> ở  $\delta_H$  6,80 (2H, d,  $J = 7,0$  Hz, H-3, H-5), 7,04 (2H, d,  $J = 7,0$  Hz, H-2, H-6). Các dữ liệu phổ <sup>13</sup>C-NMR và DEPT phù hợp với dữ liệu phổ <sup>1</sup>H-NMR. Kết hợp các dữ liệu phổ và so sánh với tài liệu tham khảo [12] cho phép xác định chất **8** là N-(4-hydroxyphenyletyl)acetamid. Hợp chất này có hoạt tính hạ đường huyết [13].

Hợp chất **9** được phân lập dưới dạng chất rắn vô định hình màu trắng. Phổ khối ESI-MS của **9** cho pic ion phân tử proton hóa ở  $m/z$  371 [M+H]<sup>+</sup>. Phổ <sup>1</sup>H-

NMR cho tín hiệu của 2 nhóm methyl dưới dạng triplet ở 0,88 (6H, m, CH<sub>3</sub>-7, CH<sub>3</sub>-11). Trên phổ <sup>1</sup>H-NMR còn có tín hiệu của 1 nhóm metylen gắn với oxy ở 3,98 (2H, dd, *J* = 6,0; 3,5 Hz, CH<sub>2</sub>-4) và các tín hiệu của các proton aliphatic. Phân tích phổ <sup>13</sup>C-NMR, DEPT cho tín hiệu của 11 nguyên tử cacbon trong đó có 1 nhóm cacbonyl ở δ<sub>C</sub> 173,5 (C=O), 1 nhóm metin ở 38,7 (C-5), 1 nhóm metylen gắn với oxi ở 66,8 (C-4) và 6 nhóm metylen. Dựa vào kết quả phổ khối và phổ <sup>1</sup>H-NMR, <sup>13</sup>C-NMR, DEPT cho phép xác định hợp chất này có cấu trúc đối xứng. Kết hợp các dữ liệu phổ COSY, HSQC, HMBC cho phép xác định chất này là bis(2-ethylhexyl) adipat.

Cả 9 hợp chất (**1-9**) được thử hoạt tính kháng vi sinh vật kiểm định đối với 7 chủng vi sinh vật kiểm định bao gồm 3 chủng vi khuẩn Gram âm (-): *Escherichia coli* ATCC25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC27853, *Salmonella enterica* ATCC13076; 3 chủng vi khuẩn Gram dương (+): *Enterococcus faecalis* ATCC29212, *Staphylococcus aureus* ATCC25923, *Bacillus cereus* ATCC 13245 và 1 chủng nấm *Candida albicans* ATCC10231 và 8 hợp chất (**1-6**, **8-9**) được thử hoạt tính kháng lao đối với vi khuẩn lao *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv. Kết quả cho thấy hợp chất **3**, **6** và **7** thể hiện hoạt tính đối với chủng Gram (-) *E. coli* với giá trị MIC lần lượt là 128, 32 và 32 µg/ml. Hợp chất **9** thể hiện hoạt tính kháng lao trung bình với giá trị MIC = 46 µg/ml.

**Lời cảm ơn.** Công trình này được thực hiện trong khuôn khổ đề tài nghiên cứu trọng điểm Nghiên cứu tiềm năng về dược liệu biển vùng biển Đông Bắc Việt Nam, mã số VAST.TĐ.ĐAB.04/13-15.

#### TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. W. Fenical, P. R. Jensen. *Developing a new resource for drug discovery: marine actinomycete bacteria*, Nature Chemical Biology, **2**, 666-673 (2006).
2. A. Debbab, A. H. Aly, W. H. Lin, P. Proksch, *Bioactive compounds from marine bacteria and fungi*, Microb. Biotechnol., **3(5)**, 544-563 (2010).
3. J. W. Blunt, B. R. Copp, M. H. G. Munro, P. T. Northcote, M. R. Prinsep. *Marine natural products*, Natural Product Report, **23**, 26-78 (2006).
4. T. Shouzheng, Y. Yabin; L. Kai, X. Zijun, X. Lihua, Z. Lixing, *Antimicrobial metabolites from a novel halophilic actinomycete Nocardioopsis terrae YIM 90022*, Nat. Prod. Res., **28(5)**, 344-346 (2014).
5. F. Fdhila, V. Vazquez, J. L. Sanchez, R. Riguera, *DD-Diketopiperazines. Antibiotics active against Vibrio anguillarum isolated from marine bacteria associated with cultures of Pecten maximus*, J. Nat. Prod., **66(10)**, 1299-1301 (2003).
6. C Y. Wang, L. Han, K. Kang, C-L. Shao, Y-X Wei, C-J. Zheng and H-S. Guan. *Secondary metabolites from green algae Ulva pertusa*, Chem. Nat. Compd., **68(5)**, 828-830 (2010).
7. Y. M. Ying, W. G. Shan, W. H. Liu, Z. J. Zhan, *Alkaloids and nucleoside derivatives from a fungal endophyte of Huperzia serrata*, Chem. Nat. Compd., **49(1)**, 184-186 (2013).
8. G. Wang, S. Dai, M. Chen, H. Wu, L. Xie, X. Luo, X. Li, *Two diketopiperazine cyclo(Pro-Phe) isomers from marine bacterium Bacillus subtilis sp. 13-2*, Chem. Nat. Compd., **46(4)**, 583-585 (2010).
9. M. Mitova, G. Tommonaro, U. Hentschel, W. E. G. Muller, S. De Rosa, *Exocellular cyclic dipeptides from a Ruegeria strain associated with cell cultures of Suberites domuncula*, Mar. Biotechnol., **6(1)**, 95-103 (2004).
10. N. Kumar, J. N. Gorantla, C. Mohandas, B. Nambisan, R. S. Lankalapalli. *Isolation and antifungal properties of cyclo(Tyr-Leu) diketopiperazine isolated from Bacillus sp. associated with rhabditid entomopathogenic nematode*, Nat Prod Res. **27(23)**, 2168-2172 (2013).
11. M. C. Vanessa, L. Z. Maria, H. L. Loanis, H. S. Geraldo, S. B. Vanderlan, M. Y. Maria, H. P. Ludwig, R. A. Angela, *Compounds Produced by Colletotrichum gloeosporioides, an Endophytic Fungus from Michelia champaca.*, Molecules, **19**, 19243-19252 (2014).
12. M. P. Sobolevskaya, V. A. Denisenko, A. S. Moiseenko, L. S. Shevchenko, N. I. Menzorova, Y. T. Sibirtsev, N. Y. Kim and T. A. Kuznetsova, *Bioactive metabolites of the marine actinobacterium Streptomyces sp. KMM7210*, Russ. Chem. Bull., Int. Ed., **56(4)**, 838-840 (2007).
13. W-S. Sun, H-S. Lee, J-M. Park, S-H. Kim, J-H. Yu and J-H. Kim, *YUA001, a novel aldose reductase inhibitor isolated from alkalophilic Corynebacterium sp. YUA25*, J. Antibiot., **54(10)**, 827-830 (2011).

Liên hệ: **Đoàn Thị Mai Hương**

Viện Hóa sinh biển

Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam

Số 18, Hoàng Quốc Việt, Cầu Giấy, Hà Nội

E-mail: doanhuong7@yahoo.com.