Tạp chí Hóa học, T. 48 (4), Tr. 469 - 474, 2010

ACTINOMYCIN X_2, CHẤT KHÁNG SINH ĐƯỢC PHÂN LẬP TỪ QUÁ TRÌNH LÊN MEN SINH TỔNG HỢP *STREPTOMYCES MICROFLAVUS*

Đến Tòa soạn 25-10-2009

CAO VĂN THU[1], PHAN VĂN KIỆM[2*], BÙI VIỆT HÀ[3]

[1]*Trường Đại học Dược Hà Nội*

[2]*Viện Hóa học các Hợp chất thiên nhiên-Viện KHCNVN*

[3]*Viện Công nghiệp Thực Phẩm*

ABSTRACT

From the ethyl acetate extract of the antibiotic biosynthesis fermentation by Streptomyces 15.29 (Streptomyces microflavus), actinomycin X_2 was isolated by various chromatography methods. The chemical structure was determined from its spectral data in comparison with previous literature. This is the first report of NMR data of actinomycin X_2.

Key words: *Streptomyces, Streptomyces microflavus, actinomycin X_2.*

I - ĐẶT VẤN ĐỀ

Streptomyces là chi xạ khuẩn gồm nhiều loài có khả năng sinh tổng hợp kháng sinh đa dạng về cấu trúc và đặc tính kháng sinh, một số loài trong chi này còn có khả năng sinh tổng hợp các kháng sinh chữa ung thư và điều trị HIV/AIDS. Trong số các *Streptomyces* mà chúng tôi phân lập được từ cơ chất Việt Nam có *Streptomyces* 15,29 là chủng xạ khuẩn có độ ổn định di truyền học tốt, có khả năng sinh tổng hợp kháng sinh phổ rộng và có tiềm năng ứng dụng trong lĩnh vực phòng bệnh và chữa bệnh. Bằng phương pháp lên men chủng *Streptomyces* 15,29 (Kết quả giải trình tự gen là *Streptomyces microflavus*), từ dịch chiết etyl axetat của dịch lên men này, đã phân lập và xác định cấu trúc hóa học của chất kháng sinh chính là actinomycin X_2. Cấu trúc hóa học của nó được xác định bằng phương pháp phổ NMR và MS. Bài báo này giới thiệu quá trình phân lập và xác định cấu trúc hóa học của kháng sinh chính actinomycin X_2. Đây là thông báo đầu tiên về các dữ kiện phổ NMR 1D và 2D của actinomycin X_2.

II - NGUYÊN LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

1. Nguyên liệu

Chủng *Streptomyces* 15,29 (*Streptomyces microflavus*) được phân lập từ cơ chất Việt Nam tại phòng thí nghiệm Vi sinh vật học, Bộ môn Vi sinh và Sinh học, trường Đại học Dược Hà Nội. Tên khoa học đã được xác định chính xác bằng giải trình tự gen 16s rDNA.

2. Phương pháp nghiên cứu

a) Phương pháp phân lập các hợp chất

Sắc ký lớp mỏng (TLC): Sắc ký lớp mỏng được thực hiện trên bản mỏng tráng sẵn DC-Alufolien 60 F_{254} (Merck 1,05715), RP_{18} F_{254s} (Merck). Phát hiện chất bằng đèn tử ngoại ở hai bước sóng 254 nm và 365 nm hoặc dùng thuốc thử là dung dịch H_2SO_4 10% được phun đều lên bản mỏng, sấy khô rồi hơ nóng trên bếp điện từ từ đến khi hiện màu.

Sắc ký cột (CC): Sắc ký cột được tiến hành với chất hấp phụ là Silica gel pha thường và pha đảo. Silica gel pha thường có cỡ hạt là 0,040-0,063 mm (240-430 mesh). Silica gel pha đảo YMC (30-50 µm, Fujisilisa Chemical Ltd.).

Phương pháp xác định cấu trúc hoá học các hợp chất

Điểm nóng chảy đo trên máy Kofler micro-hotstage

Phổ khối lượng phun mù điện tử được đo trên máy AGILENT 1100 LC-MSD Trap.

Phổ cộng hưởng từ nhân NMR được đo trên máy Bruker AM500 FT-NMR Spectrometer.

3. Phân lập hợp chất

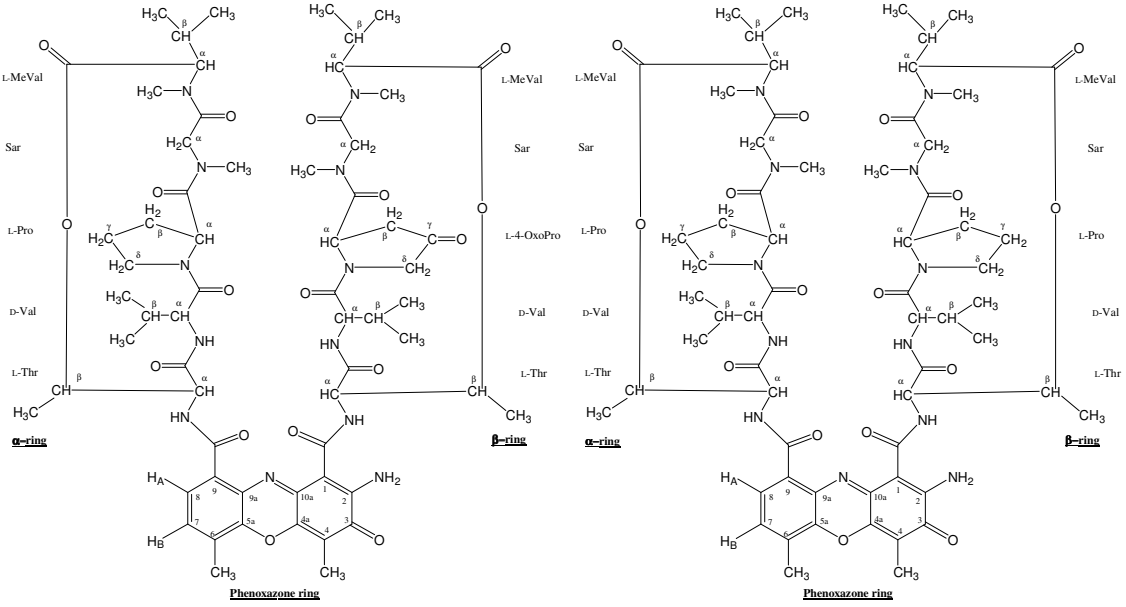
Dịch chiết etyl axetat của dịch lên men kháng sinh *Streptomyces microflavus* được loại dung môi (5,0 gam cặn chiết) và phân lập bằng các phương pháp sắc ký kết hợp sử dụng chất hấp phụ là silica gel pha thường, pha đảo, YMC với các hệ dung môi thích hợp thu được chất kháng sinh chính **1** (1,0 g).

Actinomycin X_2 (**1**): Chất rắng có màu hồng sẫm, Phổ khối lượng ESI-MS *m/z* 1292 $[M+Na]^+$ $C_{62}H_{84}N_{12}O_{17}$.

Nhiệt độ nóng chảy: 249 - 250ºC.

Độ quay cực: $[\alpha]^{22}_D$ -360º (c, 0,5 trong MeOH).

^{1}H-NMR (500 MHz, $CDCl_3$) và ^{13}C-NMR (125 MHz, $CDCl_3$), xem bảng 1.



L-Meval: *N*-metyl-L-valine; Sar: sarcosine; L-Pro: L-proline; L-4-oxoPro: L-4-oxo-proline; D-Val: D-valine; L-Thr: L-threoline

Hình 1: Cấu trúc hóa học của actinomycin X_2 (1) và actinomycin D (1a)

III - KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Phổ ^{13}C-NMR của **1** xuất hiện 14 tín hiệu tại vùng trường thấp (δ_C 166,1; 166,3; 2 x 166,5; 2 x 167,6; 168,5; 168,9; 3 x 173,3; 173,7, 179,1, 208,79) trong đó có 12 tín hiệu tại δ 166,1; 166,3; 2 x 166,5; 2 x 167,6; 168,5; 168,9; 3 x 173.3 và 173,7 điển hình cho sự có mặt của 12 nhóm C=O trong liên kết peptid và một nhóm C=O trong vòng tại δ 179,1 và một nhóm C=O

khác dịch chuyển mạnh hơn về phía trường thấp tại δ 208,79. Bốn tín hiệu của bốn nhóm metyl dịch chuyển về phía trường thấp hơn so với các tín hiệu metyl thông thường khác tại δ 39,41, 39,32, 34,92 và 34,37 điển hình cho sự có mặt của 4 nhóm metyl có nối trực tiếp với nguyên tử nitơ. Sự có mặt của 4 nhóm N-Me này còn được khẳng định bằng sự xuất hiện tín hiệu tương tác của các proton của 4 nhóm metyl tại δ 2,95 (3H), 2,62 (3H) và 2,89 (6H) dưới dạng các singlet, đồng thời có tương tác của các proton này lần lượt với các cacbon tại δ 39,41, 39,32, 34,92 và 34,37 trên phổ HSQC.

Bảng 1: Dữ kiện phổ NMR của **1** và actinomycin D

Vị trí	**1a**		**1**			
	α-ring	β-ring	α-ring		β-ring	
	δ_C	δ_C	δ_C	δ_H	δ_C	δ_H
(1)	(2)	(3)	(4)	(5)	(6)	(7)
L-Meval						
C=O	#	#	167,52	-	167,52	-
α-CH	71,3/71,4		71,54	2,70*	71,36	2,70*
β-CH	26,9	26,9	26,99	2,66*	26,91	2,66*
N-CH_3	39,2	39,2	39,41	2,95 s	39,23	2,92 s
2 x CH_3	&	&	$	@	$	@
Sar						
C=O	#	#	166,51	-	166,35	-
CH_2	51,4	51,4	52,89	4,60 (d, 18Hz) 3,98 (d, 18Hz)	51,38	4,72* 4,62*
N-CH_3	34,9	34,9	34,92	2,89 s	34,77	2,89 s
L-Pro	**L-Pro**	**L-Pro**	**L-Pro**		**(L-4-oxo)**	
C=O	#	#	173,62	-	173,19	-
α-CH	56,3	56,3	56,43	5,58 m	54,31	6,60 m
β-CH_2	31,0/31,3		31,05	1,82 m	41,96	2,37/3,86 m
γ- CH_2/C	22,9/23,1		23,00	2,15-2,30 m	208,79	-
δ- CH_2	47,3/47,5		47,46	3,72-3,90 m	51,38	3,60 (d, 18 Hz) 4,60 (d, 18 Hz)
D-Val						
C=O	#	#	174,09	-	172,78	-
α-CH	58,7	58,7	58,57	3,59 m	57,21	3,70 m
β-CH	31,5/31,7		31,90	2,78/3,20	31,75	2,15/2,20
2 x CH_3	&	&	$	@	$	@

(1)	(2)	(3)	(4)	(5)	(6)	(7)
L-Thr						
C=O	#	#	168,99	-	168,71	-
α-CH	54,9/55,3		54,85	4,63*	55,06	4,53*
β-CH	75,0	75,0	74,78	5,23*	74,69	5,23*
CH_3	17,8	17,4	17,74	1,27 s	17,19	1,27 s
Phenoxazone						
	1a		**1**			
	δ_C		δ_C		δ_H	
C=O	#		165,96/166,02		-	
1	101,6		101,82		-	
2	146,0		146,00		-	
3	#		179,11		-	
4	113,5		113,63		-	
4a	145,1		145,08		-	
5a	140,5		140,55		-	
6	127,5		127,82		-	
7	130,2		130,34		7,36 (d, 9,0 Hz)	
8	125,9		126,23		7,62 (d, 9,0 Hz)	
9	132,6		132,19		-	
9a	129,1		129,22		-	
4-CH_3	7,7		7,76		2,25 s	
6-CH_3	15,0		15,04		2,25 s	

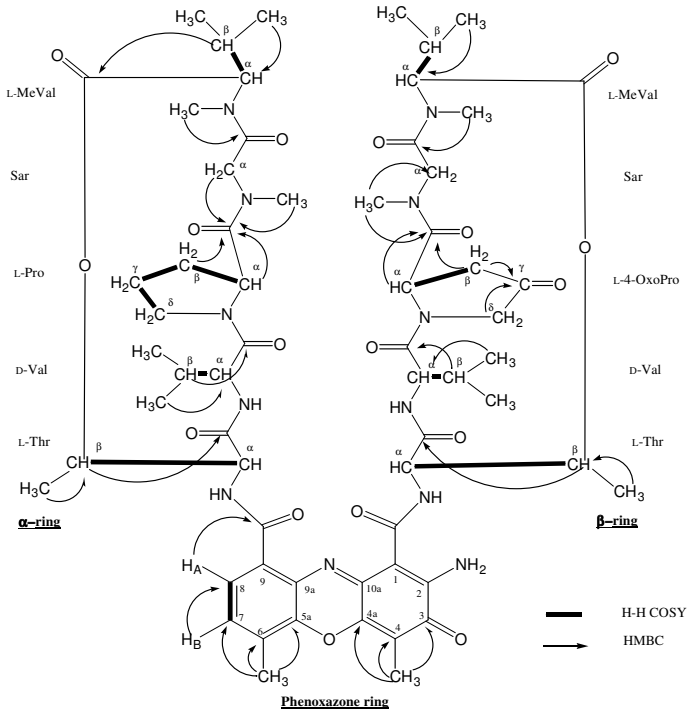
#: 13 nhóm C=O của actinomycin D [1] δ_C = 166,1; 166,3; 2 x 166,5; 2 x 167,6; 168.5; 168,9; 3 x 173,3; 173,7, 179,1.

&: 8 nhóm CH_3 của actinomycin D [1] δ_C = 6 x 19,1; 2 x 21,6.

$: 8 nhóm CH_3 của **1** δ_C = 18,86; 18,95; 2 x 19,07; 19,10; 19,25; 21,26; 21,73.

@: 8 nhóm CH_3 của **1** δ_H = 0,75 (6H); 0.96 (12H); và 1,02 (6H).

Cũng trên phổ ^{13}C-NMR còn xuất hiện tín hiệu của 7 nhóm metylen tại δ 23,00, 29,69, 31,05, 41,96, 47,46, 51,38 và 52,89, trong đó ngoại trừ hai tín hiệu tại δ 23,00, 29,69, còn lại 5 tín hiệu khác đều đã bị dịch chuyển mạnh về phía trường thấp hơn các nhóm metylen thông thường. Điều này chứng tỏ 5 nhóm metylen này đều có liên kết với các nhóm hút điện tử mạnh như Nitơ và C=O. Phổ ^{13}C-NMR cũng xuất hiện tín hiệu của 10 cacbon metin tại δ 74,78, 74,69, 71,59, 71,36, 56,43, 54,31, 58,57, 57,81, 54,85 và 55,06. Các nhóm metin này cũng chịu ảnh hưởng của hiệu ứng thuận từ nên cộng hưởng ở vùng trường thấp hơn so với các tín hiệu metin khác thông thường. Đặc biệt, trên phổ NMR còn xuất hiện các tín hiệu của khung phenoxazone tại δ_c 165,96 và 166,02 (2 x C=O), 101,82, 146,00, 179,11 (C=O), 113,63 (C), 145,08 (C), 140,55 (C), 127,82 (C), 130,34 (CH), 126,23 (CH), 132,19 (C), 129,22 (C), 15,04 (CH_3) và 7,76 (CH_3); hai proton olefin vị trí octo tại δ_H 7,62 (d, *J* = 9,0 Hz), 7,36 (d, *J* = 9,0 Hz) và tín



Hình 2: Một số tương tác chính trên phổ HMBC và H-H COSY của **1**

hiệu của hai nhóm metyl gắn vào vòng thơm tại δ_H 2,25 (6H, s) [1]. Các dữ kiện phổ NMR nêu trên cho thấy đây là một hợp chất có cấu trúc bao gồm một chuỗi 10 axit amin gắn với khung phenoxazone. Gợi ý bước đầu cho thấy, hợp chất **1** có các giá trị phổ NMR gần tương tự như các giá trị phổ của actinomycin D, một hợp chất đã được biết đến từ *Streptomyces* spp. Kết quả so sánh các giá trị phổ của hai hợp chất này cho thấy chúng khá tương tự nhau, ngoại trừ sự xuất hiện thêm 3 tín hiệu cacbon metylen và đặc biệt là tín hiệu của nhóm cacbonyl ở vùng trường rất thấp tại δ 208,79 (Bảng 1 [1]). Điều này gợi ý sự xuất hiện nhóm cacbonyl tại vị trí γ của vòng L-proline thuộc nhánh β-ring, tức là L-4-oxoproline. Sự có mặt của nhóm cacbonyl này cũng được chứng minh bằng sự dịch chuyển mạnh về khía trường thấp của cả hai tín hiệu của hai nhóm metylen tại 41,96 và 51,38 bởi hiệu ứng thuận từ do chúng đều nằm cạnh nhóm cacbonyl. Hơn nữa, trên phổ HSQC, tín hiệu cacbon tại δ 54,31 (CH) tương tác với tín hiệu proton δ 6,60, tín hiệu cacbon tại δ 41,96 tương tác với proton tại δ 2,37 và 3,86, tín hiệu cacbon tại δ 51,38 tương tác với proton tại δ 3,60 và 4,60, đồng thời trên phổ HMBC, tương tác giữa proton tại δ 2,37/3,86 và 3,60/4,60 với cacbon cacbonyl tại δ 208,79, tương tác HMBC của nhóm metin tại δ 6,60 với cacbon cacbonyl tại δ 208,79, cũng như tương tác của proton tại δ 2,37/3,86 với nhóm C=O tại δ 173,19 chứng tỏ sự có mặt của nhóm cacbonyl tại vị trí γ của vòng L-proline thuộc nhánh β-ring. Tất cả các giá trị phổ NMR của **1** được xác định đầu tiên bằng sự so sánh các giá trị phổ của **1** với các giá trị phổ của actinomycin D [1] [2], sau đó được xác định bằng việc phân tích các tương tác trên phổ HSQC, HMBC và H-H COSY. Những phân tích nêu trên cho thấy, so với công thức phân tử của actinomycon D ($C_{62}H_{86}N_{12}O_{17}$) thì hợp chất **1** mất đi hai proton và do đó có công thức phân

tử là $C_{62}H_{84}N_{12}O_{17}$. Trên phổ khối lượng ESIMS xuất hiện pic ion với cường độ rất cao tại *m/z* 1292 $[M+Na]^+$. Như vậy, hợp chất **1** được xác định là actinomycin X_2, một hợp chất cũng được phân lập từ chủng *Streptomyces* spp. và có hoạt tính chống ung thư cũng như hoạt tính kháng sinh rất mạnh. Đây là lần đầu tiên dữ kiện phổ NMR của actinomycin X_2 được thông báo.

Liên hệ: **Phan Văn Kiệm**
Viện Khoa học và Công nghệ Việt Nam
18 Hoàng Quốc Việt, Cầu Giấy, Hà Nội
Email: phankiem@yahoo.com

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. A. B. Mauger and W. J. Rzeszotarski. Organic Magnetic Resonance, Vol. 8, 219 - 223 (1976).
2. Livia Inbar and Aviva Lapidot. Journal of Biologycal Chemistry, Vol. 263, 16014 - 16022 (1988).