

## NGHIÊN CỨU ỨNG DỤNG SẮC KÝ LỎNG HIỆU NĂNG CAO (HPLC) ĐỂ XÁC ĐỊNH SƠ BỘ THÀNH PHẦN HOÁ HỌC CỦA VI NẤM BIỂN

Bùi Hải Ninh<sup>1</sup>, Nguyễn Thị Thùy Khuê<sup>1</sup>, Hoàng Thị Hồng Liên<sup>2</sup>,  
Khổng Trọng Quân<sup>3</sup>, Phạm Giang Nam<sup>3</sup>, Min-kyun Na<sup>3</sup>,  
Lê Thị Hồng Minh<sup>4</sup>, Đoàn Thị Mai Hương<sup>4</sup>,  
Phạm Văn Cường<sup>4</sup>, Nguyễn Văn Hùng<sup>1</sup>, Cao Đức Tuấn<sup>1,2</sup>

### TÓM TẮT

Trong số các vi sinh vật biển, vi nấm đóng vai trò quan trọng, là nguồn sản xuất nhiều hợp chất thứ cấp có cấu trúc hóa học và hoạt tính sinh học đa dạng. Thời gian gần đây, có nhiều nghiên cứu về vi nấm biển được thực hiện, dẫn đến số lượng các công bố về vi nấm biển tăng nhanh. Một trong những khó khăn thường gặp khi nghiên cứu thành phần hóa học cũng như hoạt tính sinh học của vi nấm biển là tỷ lệ phân lập các hợp chất đã biết khá cao, dẫn đến tốn kém về thời gian và nguồn lực. Trong nghiên cứu này, chúng tôi bước đầu ứng dụng kỹ thuật sắc ký lỏng hiệu năng cao (HPLC) để xác định sơ bộ thành phần hóa học của một số chủng vi nấm biển phân lập từ trầm tích biển thành phố Hải Phòng. Kết quả cho thấy kỹ thuật HPLC có thể giúp định hướng, lựa chọn chủng vi nấm biển tiềm năng để thực hiện nghiên cứu sâu hơn về thành phần hóa học cũng như hoạt tính sinh học.

**Từ khóa:** HPLC, sàng lọc hóa học, vi nấm biển

<sup>1</sup>Trường Đại học Y Dược Hải Phòng

<sup>2</sup>Trường Đại học Buôn Ma Thuột

<sup>3</sup>Đại học Dược, Đại học Quốc Gia Chung nam, Hàn Quốc

<sup>4</sup>Viện Hóa Sinh Biển, Viện Hàn lâm & Khoa học Công nghệ Việt Nam

Chịu trách nhiệm chính: Cao Đức Tuấn

Email: cdtuan@hpmu.edu.vn

Ngày nhận bài: 18.3.2021

Ngày phản biện khoa học: 19.4.2021

Ngày duyệt bài: 21.5.2021

### SUMMARY

#### PRELIMINARY CHEMICAL SCREENING OF MARINE FUNGI BY HIGH PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY (HPLC)

Marine fungi play a very important role, providing many secondary metabolites with diverse structures and biological activities. Recently, many research groups all over the world direct their attention to marine fungi and the number of marine fungi publications increase rapidly. However, there are not many studies on the secondary metabolites from marine fungi in Vietnam yet. One of the bottle neck in this type of study is the high chance of repeat isolations of known compounds, thus wasting many research time and resources. In the course of our screening program, together with guided bioassay screening, high performance liquid chromatography (HPLC) was utilized to preliminary assess the chemical profile of selected marine fungi strains isolated from Hai Phong sea's sediment. Result shown that HPLC is a valuable tool to guide and select promising marine fungi strains for further studies on their chemical and biological characteristics.

**Keywords:** Marine fungi, chemical screening, HPLC

### I. ĐẶT VẤN ĐỀ

Vi nấm biển là nguồn sản xuất dồi dào các hợp chất có cấu trúc và hoạt tính sinh học đa

dạng [1]. Trong những năm gần đây, vi nấm biển đã được nghiên cứu ngày càng nhiều hơn, số lượng các hợp chất mới từ vi nấm biển tăng nhanh, chiếm khoảng 30% các hợp chất có nguồn gốc từ vi sinh vật biển. Nhiều hợp chất trong số này đang được thử nghiệm sâu hơn nhằm đưa vào ứng dụng trong y học, dược học [2].

Một trong những điểm hạn chế lớn nhất của các chương trình nghiên cứu phát triển thuốc từ nguồn tự nhiên nói chung, bao gồm phát triển thuốc từ vi sinh vật là sự phát hiện các hợp chất đã biết [3]. Điều này đã dẫn đến dự đoán tốc độ phát hiện các lớp chất từ vi sinh vật của các chương trình phát triển thuốc rất khác nhau [4]. Dự đoán này dựa vào giả thuyết, hầu hết các hợp chất dễ phân lập đã được phát hiện, chỉ còn ít các hợp chất thử cấp chưa biết có thể phát hiện, trừ khi thực hiện các chương trình sàng lọc quy mô lớn [5, 6].

Trong bài báo này, chúng tôi trình bày kết quả nghiên cứu ứng dụng kỹ thuật sắc ký lỏng hiệu năng cao (HPLC) trong việc xác định sơ bộ thành phần hóa học của một số chủng vi nấm biển có hoạt tính kháng vi sinh vật phân lập từ trầm tích biển thành phố Hải Phòng. Kết quả cho thấy, bên cạnh việc sử dụng hoạt tính sinh học dẫn đường, kỹ thuật HPLC có thể giúp định hướng, lựa chọn chủng vi nấm biển tiềm năng để thực hiện nghiên cứu sâu hơn về thành phần hóa học cũng như hoạt tính sinh học.

## II. ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

### 1. Đối tượng nghiên cứu

Đối tượng nghiên cứu là 05 chủng vi nấm biển phân lập từ mẫu trầm tích thu nhận ở vùng biển Cát Bà thành phố Hải Phòng năm 2019 [7].

### 2. Vật liệu và thiết bị nghiên cứu

Các hóa chất sử dụng được cung cấp từ các hãng Hidia (Ấn Độ), Sigma-Aldrich (Mỹ), Đức Giang (Việt Nam) ...

Thành phần hóa học sơ bộ được xác định bằng hệ thống HPLC Shimadzu, đầu dò UV ở bước sóng 205 nm và 254 nm, cột Phenomenex C18 150 x 4.6 mm

Các chủng vi sinh vật kiểm định dùng trong thử nghiệm hoạt tính kháng vi sinh vật cung cấp bởi trung tâm mô và tế bào, Mỹ (ATCC) là: 3 chủng vi khuẩn gram dương (*Enterococcus faecalis* ATCC29212 (E.f), *Staphylococcus aureus* ATCC25923 (S.a), *Bacillus cereus* ATCC13245 (B.c); 3 chủng vi khuẩn gram âm (*Escherichia coli* ATCC25922 (E.c), *Pseudomonas aeruginosa* ATCC27853 (P.a), *Salmonella enterica* ATCC13076 (S.e)) và nấm *Candida albicans* ATCC10231 (C.a).

## 3. Phương pháp nghiên cứu

### Phương pháp nuôi cấy lượng nhỏ (500 mL) và tạo cặn chiết

Ống lưu giữ các chủng vi nấm ở - 80 °C được đem rã đông từ từ trên đá, sau đó cấy chầm vào đĩa petri chứa môi trường tương ứng với môi trường phân lập [7], nuôi tĩnh ở 28 °C trong 7 ngày. Từ đĩa petri, tiến hành nhân giống cấp 1 bằng cách cấy khuẩn lạc từ đĩa petri vào bình tam giác chứa 10 mL môi trường nuôi cấy dạng lỏng tương ứng, sau đó nuôi lắc với tốc độ 100 vòng/phút ở nhiệt độ 28 °C trong 10 đến 14 ngày để thu được dịch nhân giống cấp 1. Từ dịch nhân giống cấp 1, tiến hành nuôi cấy lượng nhỏ bằng cách bổ sung dịch nhân giống cấp 1 vào bình tam giác chứa 500 mL môi trường nuôi cấy dạng lỏng tương ứng, sau đó nuôi lắc với tốc độ 100 vòng/phút ở nhiệt độ 28 °C trong 10 đến 14 ngày. Dịch nuôi cấy (500 mL) các chủng vi nấm sau đó được thu nhận và chiết với dung môi etyl acetate (EtOAc; 300 mL x 5

lần). Dịch chiết được làm khô dưới áp suất giảm thu được cặn chiết tương ứng.

**Phương pháp thử hoạt tính kháng vi sinh vật kiểm định**

Hoạt tính kháng vi sinh vật kiểm định được xác định theo phương pháp đã công bố [8]. Các cặn chiết được pha loãng trong DMSO và các chất đối chứng được pha trong nước cất vô trùng ở dải nồng độ giảm dần: 256µg/ml, 128µg/ml, 64µg/ml, 32µg/ml, 16µg/ml, 8 µg/ml, 4µg/ml và 2 µg/ml với số thí nghiệm lặp lại N=3. Bổ sung 50µl dung dịch vi khuẩn và nấm kiểm định ở nồng độ 5.10<sup>5</sup> CFU/ml vào mỗi giếng, ủ ở 37°C với cặn chiết ở các nồng độ khác nhau. Sau 24h, đọc giá trị MIC là giá trị tại giếng có nồng độ chất thử thấp nhất ức chế hoàn toàn sự phát triển của vi sinh vật kiểm định. Đối chứng là kháng sinh streptomycin cho các chủng vi khuẩn và cycloheximide cho nấm men.

**Phương pháp xác định sơ bộ thành phần hóa học bằng HPLC**

Cặn chiết các chủng vi nấm được hòa tan trong MeOH ở nồng độ 5 mg/mL, lọc bằng màng lọc (0,45µm). 10 µL mẫu được đưa lên hệ thống HPLC Shimadzu, cột Phenomenex C18 150 × 4.6 mm, thực hiện phân tích theo quy trình (Bảng 1) với pha động

MeOH/nước, tốc độ dòng 1 mL/phút. Sắc ký đồ được ghi nhận ở bước sóng 205 nm. Phương pháp này cũng được sử dụng để xác định thời gian lưu đối với một số chất đối chứng.

**Bảng 1:** Chương trình chạy phân tích bằng HPLC

TT	Thời gian	Tỷ lệ MeOH (%)
1	0	5
2	40	100
3	50	100
4	51	5
5	60	5

**III. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU**

**1. Kết quả nuôi cấy, tạo cặn chiết và thử hoạt tính kháng vi sinh vật kiểm định các chủng vi nấm biển**

Đầu tiên, các chủng vi nấm biển được hoạt hóa và nuôi cấy ở quy mô 500 mL theo phương pháp đã mô tả. Dịch nuôi cấy được chiết bằng dung môi EtOAc, loại dung môi dưới áp suất giảm thu được cặn chiết tương ứng. Thử nghiệm hoạt tính kháng vi sinh vật cho thấy các mẫu cặn chiết có hoạt tính ức chế ít nhất 1 chủng vi sinh vật kiểm định thử nghiệm (Bảng 2).

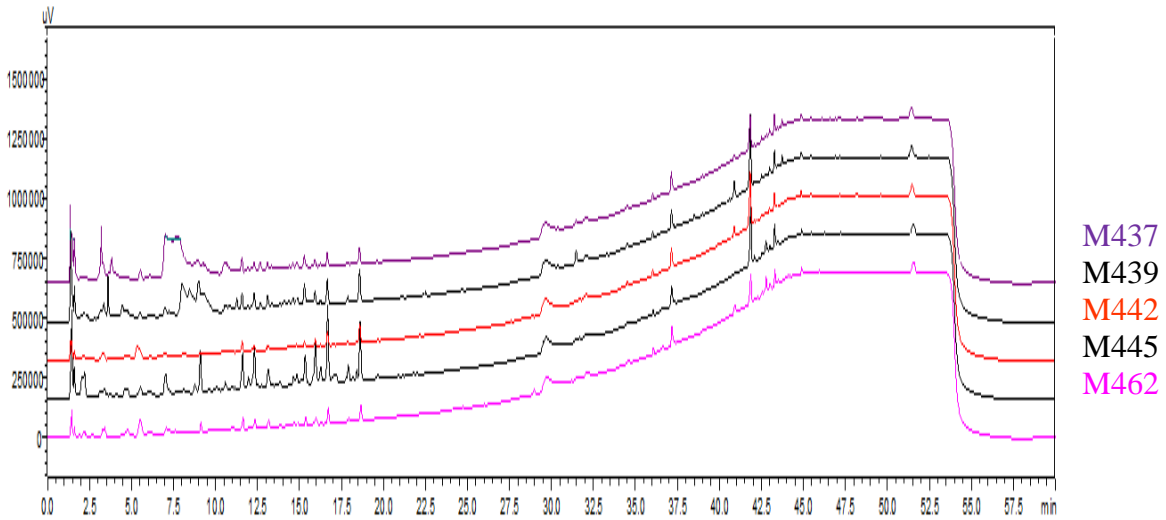
**Bảng 2:** Kết quả tạo cặn chiết và hoạt tính kháng vi sinh vật các chủng vi nấm biển

TT	Mẫu	Cặn EtOAc (mg)	MIC (µg/ml)						
			Gram +			Gram -			Nấm
			E. faecalis	S. aureus	B. cereus	E. coli	P. aeruginosa	S. enterica	C. albicans
1	M437	0,4402	128	-	-	-	-	-	-
2	M439	1,0998	64	-	-	-	-	8	-
3	M442	0,5518	256	-	-	-	-	-	8
4	M445	0,3505	128	-	128	-	-	-	16
5	M462	0,2768	32	-	-	-	-	-	32
	S		256	256	128	32	256	128	
	C								32

(S: Streptomycine; C: Cyclohexamide;  $->256 \mu\text{g/ml}$ )

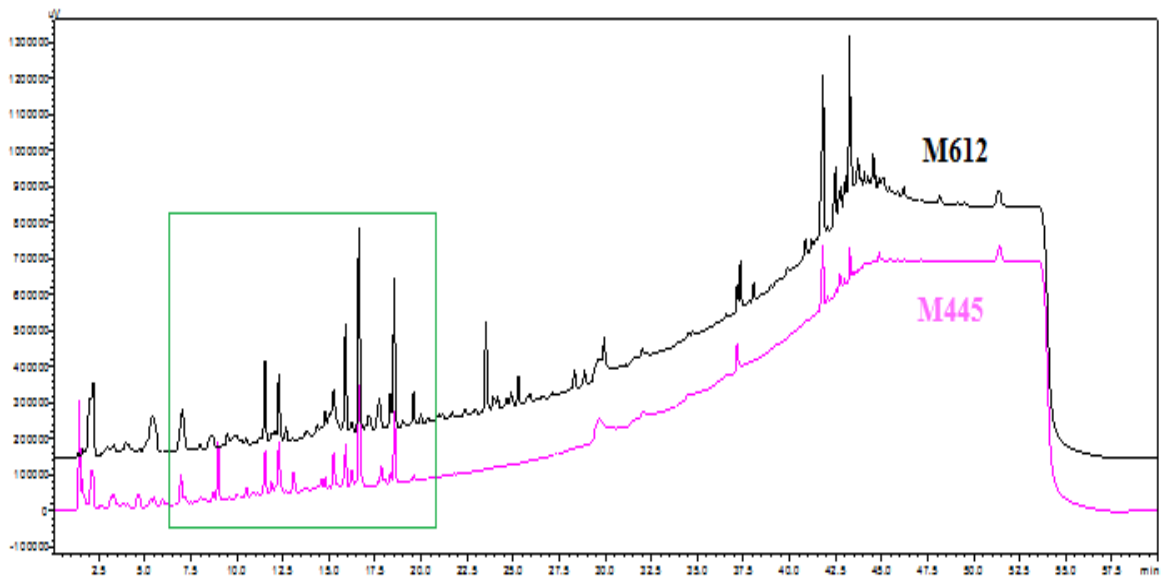
## 2. Kết quả xác định thành phần hóa học sơ bộ các chủng vi nấm biển

Thành phần hóa học sơ bộ của các chủng vi nấm biển được xác định bằng HPLC theo phương pháp đã mô tả, kết quả cho thấy, các chủng có thành phần hóa học tương đối giống nhau (Hình 1).

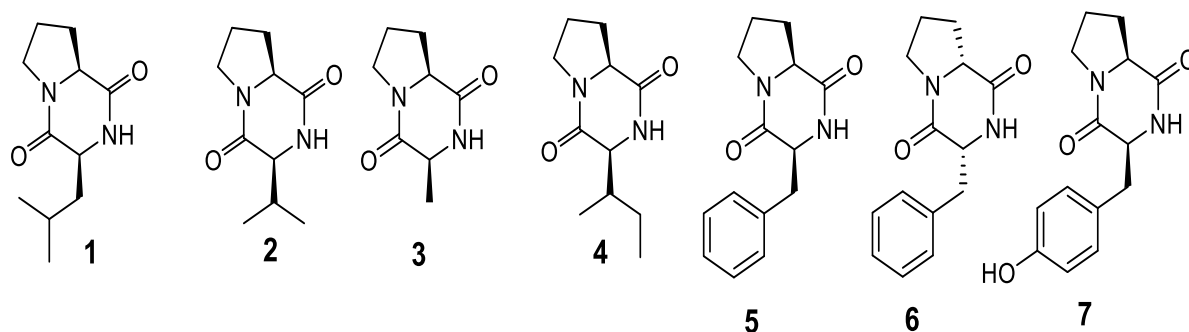


**Hình 1: Sắc ký đồ (205 nm) cận chiết các chủng vi nấm biển nghiên cứu**

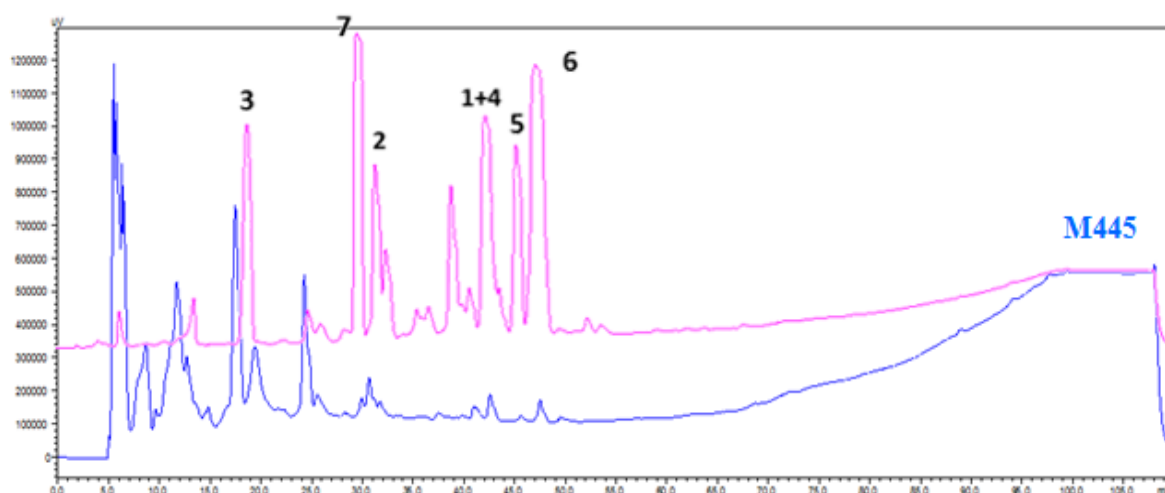
Thành phần hóa học sơ bộ của các chủng vi nấm biển nghiên cứu cũng được so sánh với chủng vi nấm biển M612 phân lập từ vùng biển Cô Tô, Thanh Lân (Hình 2). Đối chiếu với kết quả nghiên cứu thành phần hóa học chủng vi nấm M612 [9] cho phép xác định sơ bộ thành phần chủ yếu của các chủng vi nấm nghiên cứu là cyclodipeptides (Hình 3 và 4).



**Hình 2: Sắc ký đồ (205 nm) cận chiết các chủng vi nấm biển M445 và M612**



**Hình 3:** Cấu trúc các hợp chất phân lập từ chủng vi nấm biển M612 [9].



**Hình 4:** Đối chiếu sắc ký đồ (205 nm) cận chiết chủng vi nấm biển M445 và các hợp chất phân lập từ chủng vi nấm M612

#### IV. BÀN LUẬN

Hiện nay, có ba phương pháp sàng lọc chính đang được sử dụng trong nghiên cứu phát triển thuốc mới. (1) Phương pháp thường quy, được sử dụng khá phổ biến, trong đó các cận chiết thô, được sàng lọc theo các hoạt tính sinh học, chủ yếu sử dụng các phép thử trên tế bào, mà không quan tâm đến đích tác dụng của chất thử. Dựa vào kết quả thử nghiệm hoạt tính, các nhóm nghiên cứu lựa chọn đối tượng, đầu tư vào phân lập xác định đích cấu trúc hóa học, tác dụng cũng như cơ chế tác dụng của hợp chất. Phương pháp này thường được gọi là sàng

lọc theo định hướng hoạt tính sinh học hay phát triển thuốc bề mặt (phenotyping drug discovery). (2) Phương pháp thứ hai, thường được gọi là sàng lọc hóa học. Mục tiêu của phương pháp này là tìm kiếm các hợp chất mới mà không quan tâm đến hoạt tính sinh học của nó. Để thực hiện, cần có công cụ mạnh về hóa phân tích, ví dụ như HPLC, khối phổ (MS) hay cộng hưởng từ hạt nhân (NMR). (3) Phương pháp thứ 3 là sàng lọc theo đích tác dụng được sử dụng để tìm kiếm các hợp chất có thể can thiệp vào một cơ chế đã biết của tế bào. Ở đây, cơ chế có thể ở cấp độ tế bào hoặc phân tử gây ra bệnh, tức là

tìm kiếm các hợp chất có khả năng tác động, ảnh hưởng đến các cơ chế này [10].

Ở Việt Nam, phần lớn các nghiên cứu về vi sinh vật biển đã công bố sử dụng phương pháp sàng lọc theo định hướng hoạt tính sinh học với tỷ lệ phát hiện các hợp chất đã biết khá cao [11]. Theo tra cứu của chúng tôi từ cơ sở dữ liệu của Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam [12], các nghiên cứu về vi sinh vật biển ở Việt đã đạt được thành tựu quan trọng, phát hiện được một số hợp chất mới, tuy nhiên, vẫn còn một tỷ lệ nhất định các chất cũ đã biết.

Kết quả của nghiên cứu cho thấy, mặc dù 5 chủng vi nấm thử nghiệm có hoạt tính kháng vi sinh vật khác nhau, các chủng vi nấm này có thành phần hóa học sơ bộ tương đối giống nhau. Do đó, thay vì nghiên cứu thành phần hóa học của cả 5 chủng vi nấm biển này, có thể chỉ cần lựa chọn nghiên cứu 1 chủng đại diện (ví dụ chủng M445). Ứng dụng kỹ thuật HPLC dự đoán có khả năng giúp giảm được tỷ lệ trùng lặp trong phân lập và xác định cấu trúc các hợp chất. Do đó, sử dụng HPLC trong xác định sơ bộ thành phần hóa học của mẫu nghiên cứu, từ đó định hướng cho việc lựa chọn mẫu tiềm năng có thể là một lựa chọn khác trong quá trình nghiên cứu vi nấm biển.

Tuy nhiên, phương pháp ứng dụng HPLC đã mô tả chỉ thực hiện đối với cặn chiết từ dịch nuôi cấy vi nấm biển lượng nhỏ (500 mL). Phương pháp này có hạn chế là chưa phát hiện được các chất có hàm lượng nhỏ, do tín hiệu tương ứng với các chất này có cường độ thấp, dễ lẫn với tạp chất hay đường nền trong sắc ký đồ. Đối với những chủng vi nấm biển có hoạt tính kháng vi sinh vật

và/hoặc thành phần hóa học sơ bộ tiềm năng, cần nghiên cứu nuôi cấy ở quy mô lớn hơn, ví dụ từ 20 L đến 50 L dịch nuôi. Kết hợp với các phương pháp chiết thích hợp để tăng hàm lượng các hợp chất tiềm năng trong cặn chiết, tránh bỏ sót các chất này.

## V. KẾT LUẬN

Ứng dụng kỹ thuật Sắc ký lỏng hiệu năng cao cho phép xác định sơ bộ thành phần hóa học của một số chủng vi nấm phân lập từ trầm tích biển Cát Bà, Hải Phòng. So với sàng lọc theo định hướng hoạt tính kháng vi sinh vật, ứng dụng HPLC có thể giúp định hướng, lựa chọn chủng vi nấm biển tiềm năng để thực hiện nghiên cứu sâu hơn về thành phần hóa học cũng như hoạt tính sinh học và giảm khả năng phân lập trùng lặp các hợp chất đã biết.

**Lời cảm ơn:** Kinh phí thực hiện nghiên cứu này từ đề tài mã số HNQT/SPĐP/11.19 của Bộ Khoa học và Công nghệ Việt Nam và Đề tài cấp cơ sở mã số 128 năm 2020 của Trường Đại học Y Dược Hải Phòng.

## TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. **Tran Hong Quang, Pham Thi Mai Huong, et al.**, Secondary metabolites from a marine sponge-associated fungus *Xenomyrothecium* sp. IMBC-FP2.11. *Vietnam Journal of Chemistry*, 2020. **58**(6): p. 752-758.
2. **Anthony R. Carroll, Brent R. Copp, et al.**, Marine natural products. *Natural Product Reports*, 2019. **36**(1): p. 122-173.
3. **Olga Genilloud, Ignacio González, et al.**, Current approaches to exploit actinomycetes as a source of novel natural products. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 2011. **38**(3): p. 375-89.

4. **Richard Baltz, Antimicrobials from actinomycetes: Back to the future.** *Microbe*, 2007. **2**: p. 125-131.
5. **Paolo Monciardini, Marianna Iorio, et al.,** Discovering new bioactive molecules from microbial sources. *Microbial Biotechnology*, 2014. **7**(3): p. 209-20.
6. **Karsten Zengler, Gerardo Toledo, et al.,** Cultivating the uncultured. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2002. **99**(24): p. 15681-6.
7. **Cao Đức Tuấn, Trần Thị Thu Hiền, 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*, 2019. **484**: p. 570-576.
8. **Jennifer M. Andrews,** Determination of minimum inhibitory concentrations. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 2001. **48**(1): p. 5-16.
9. **Bach Thi Nhu Quynh, Cao Duc Tuan, et al.** Cyclodipeptides Isolated From a Marine-derived Fungus *Penicillium chrysogenum* M612 of Bai Tu Long Sea, Quang Ninh, Vietnam in 8<sup>th</sup> International Conference on the Development of Biomedical Engineering in Vietnam, 2022. DOI: 10.1007/978-3-030-75506-5 Springer International Publishing.
10. **Wolfgang Wohlleben, Yvonne Mast, et al.,** Antibiotic drug discovery. *Microbial biotechnology*, 2016. **9**(5): p. 541-548.
11. **Nguyễn Xuân Cường, Nguyễn Xuân Nhiệm, et al.,** Điềm lại các nghiên cứu hóa học và hoạt tính sinh học một số loài sinh vật biển Việt Nam trong giai đoạn 2013-2017. *Vietnam Journal of Chemistry*, 2018. **56**(1): p. 1-19.
12. **Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam.** Các đề tài KHCN&PTCN. 30/01/2021; Available from: <https://www.vast.gov.vn/web/guest/cac-e-tai-nckh-ptcn>.