



Original Article

## Exploring the Potential of MPC-A5K,A8K Analog Derived from Mastoparan C as an Alternative to Preservatives

Le Huy Binh<sup>1,2</sup>, Bui Thi Phuong Hai<sup>3</sup>, Dang Thi Ngan<sup>4</sup>, Nguyen Thanh Hai<sup>4</sup>,  
Luong Xuan Huy<sup>3</sup>, Hoang Viet Dung<sup>5</sup>, Vu Dinh Hoang<sup>2</sup>, Nguyen Thi Thanh Binh<sup>4,\*</sup>

<sup>1</sup>*Center for High Technology Research and Development,  
Vietnam Academy of Science and Technology, 18 Hoang Quoc Viet, Cau Giay, Hanoi, Vietnam*

<sup>2</sup>*School of Chemistry and Life Science, Hanoi University of Science and Technology,  
1 Dai Co Viet, Hai Ba Trung, Hanoi, Vietnam*

<sup>3</sup>*Phenikaa University, Nguyen Trac, Yen Nghia, Hanoi, Vietnam*

<sup>4</sup>*VNU University of Medicine and Pharmacy, 144 Xuan Thuy, Cau Giay, Hanoi, Vietnam*

<sup>5</sup>*Medzavy Joint Stock Company, Van Lam, Hung Yen, Vietnam*

Received 30 August 2024

Revised 9 November 2024; Accepted 10 December 2024

**Abstract:** Antimicrobial peptides, renowned for their diverse biological properties, hold significant potential as sources for developing new pharmaceutical agents and food preservatives. A recent study investigating various derivatives of the natural peptide Mastoparan C revealed that the peptide MPC-A5K,A8K exhibited strong antimicrobial activity with low toxicity to human red blood cells. In this study, MPC-A5K,A8K's antimicrobial effectiveness was compared to several antibiotics, and its preservative potential in oral formulations was preliminarily evaluated. The peptide MPC-A5K,A8K was synthesized through solid-phase peptide synthesis, with alanine residues at positions 5 and 8 in Mastoparan C replaced by lysine. The product achieved a purity of 98.1%, with an overall synthesis efficiency of 31.2%. This MPC-A5K,A8K derivative demonstrated broad-spectrum antimicrobial activity, including Gram-positive and Gram-negative bacteria as well as the fungus *Candida albicans*, with minimum inhibitory concentrations (MICs) ranging from 4 to 64  $\mu$ M. In preliminary preservative efficacy tests, incorporating 10 ppm of MPC-A5K,A8K in formulations allowed for a reduction in sodium benzoate and potassium sorbate concentrations to 0.1% each while maintaining effective preservative properties. These promising findings lay a foundation for further research into the potential applications of MPC-A5K,A8K as a dual antimicrobial and preservative agents.

**Keywords:** Antimicrobial peptide, Mastoparan C, MPC-A5K,A8K derivative, antimicrobial activity, preservative properties.

\* Corresponding author.

E-mail address: binhnguyen.smp@gmail.com

<https://doi.org/10.25073/2588-1132/vnumps.4698>

# Khảo sát tiềm năng thay thế chất bảo quản của dẫn xuất MPC-A5K,A8K có nguồn gốc từ peptid kháng khuẩn Mastoparan C

Lê Huy Bình<sup>1,2</sup>, Bùi Thị Phương Hải<sup>3</sup>, Đặng Thị Ngân<sup>4</sup>, Nguyễn Thanh Hải<sup>4</sup>, Lương Xuân Huy<sup>3</sup>, Hoàng Việt Dũng<sup>5</sup>, Vũ Đình Hoàng<sup>2</sup>, Nguyễn Thị Thanh Bình<sup>4,\*</sup>

<sup>1</sup>Trung tâm Nghiên cứu và Phát triển Công nghệ cao,

Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam, 18 Hoàng Quốc Việt, Cầu Giấy, Hà Nội, Việt Nam

<sup>2</sup>Trường Hoá và Khoa học sự sống, Đại học Bách khoa Hà Nội,

1 Đại Cồ Việt, Hai Bà Trưng, Hà Nội, Việt Nam

<sup>3</sup>Trường Đại học Phenikaa, Nguyễn Trác, Yên Nghĩa, Hà Nội, Việt Nam

<sup>4</sup>Trường Đại học Y Dược, Đại học Quốc gia Hà Nội, 144 Xuân Thủy, Cầu Giấy, Hà Nội, Việt Nam

<sup>5</sup>Công ty Cổ phần Dược phẩm Medzavy, Văn Lâm, Hưng Yên, Việt Nam

Nhận ngày 30 tháng 8 năm 2024

Chỉnh sửa ngày 09 tháng 11 năm 2024; Chấp nhận đăng ngày 10 tháng 12 năm 2024

**Tóm tắt:** Các peptid kháng khuẩn, được biết đến với nhiều hoạt tính sinh học đa dạng, có tiềm năng lớn trong việc khám phá ra thuốc và các chất bảo quản mới. Trong công bố gần đây của nhóm tác giả về một số dẫn xuất của peptid tự nhiên Mastoparan C đã phát hiện dẫn xuất MPC-A5K,A8K có hoạt tính kháng khuẩn mạnh cùng với độc tính thấp trên tế bào hồng cầu người. Trong nghiên cứu này, hiệu quả kháng khuẩn của MPC-A5K,A8K đã được so sánh với một số loại kháng sinh, đồng thời tiềm năng sử dụng làm chất bảo quản trong chế phẩm đường uống cũng được đánh giá sơ bộ. Peptid MPC-A5K,A8K được tổng hợp thông qua phương pháp tổng hợp peptid pha rắn, trong đó các gốc alanin ở vị trí 5 và 8 của Mastoparan C được thay thế bằng lysin. Sản phẩm đạt độ tinh khiết 98,1%, với hiệu suất tổng hợp chung là 31,2%. Dẫn xuất MPC-A5K,A8K này cho thấy phổ hoạt tính rộng, bao gồm các vi khuẩn Gram dương và Gram âm cũng như nấm *Candida albicans*, với nồng độ ức chế tối thiểu dao động từ 4 đến 64  $\mu$ M. Trong các thử nghiệm bước đầu đánh giá hiệu quả bảo quản, việc bổ sung 10 ppm MPC-A5K,A8K vào công thức cho phép giảm nồng độ natri benzoat và kali sorbat xuống còn 0,1% mỗi loại mà vẫn duy trì được hiệu quả bảo quản. Những kết quả đầy hứa hẹn này đặt nền móng cho các nghiên cứu tiếp theo về tiềm năng ứng dụng của MPC-A5K,A8K như một tác nhân kháng khuẩn và bảo quản.

**Từ khóa:** Peptid kháng khuẩn, Mastoparan C, dẫn xuất MPC-A5K,A8K, hoạt tính kháng sinh, hiệu quả bảo quản.

## 1. Mở đầu

Chất bảo quản là những chất được thêm vào thực phẩm, dược phẩm, mỹ phẩm và các sản phẩm khác để ngăn chặn sự phát triển của vi sinh

vật có sẵn trong chế phẩm hay nhiễm vào chế phẩm trong quá trình sử dụng. Chất bảo quản cũng được thêm vào các chế phẩm vô trùng đa liều để ức chế sự phát triển của vi sinh vật nhiễm

\* Tác giả liên hệ.

Địa chỉ email: binhnguyen.smp@gmail.com

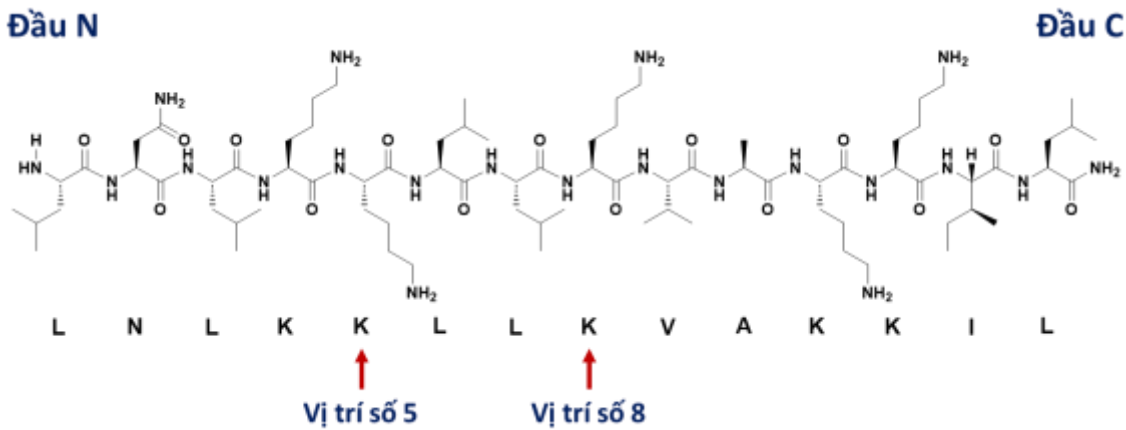
<https://doi.org/10.25073/2588-1132/vnumps.4170>

vào chế phẩm sau khi mở ra sử dụng [1]. Như vậy, chất bảo quản đóng vai trò quan trọng đối với việc duy trì hiệu quả và độ ổn định của chế phẩm trong suốt quá trình bảo quản và sử dụng. Tuy nhiên, đa số các chất bảo quản đều mang độc tính, có thể gây kích ứng, dị ứng, ô nhiễm môi trường hoặc tương tác với các thành phần có trong chế phẩm làm giảm hiệu quả, thậm chí phản ứng sinh ra những hợp chất có hại cho cơ thể. Do đó, khi sử dụng các chất bảo quản cần phải cân nhắc một cách kỹ lưỡng để đảm bảo tính tương thích đồng thời kiểm soát chặt chẽ nồng độ của các thành phần này.

Cùng với sự phát triển của ngành công nghiệp dược phẩm và thực phẩm là yêu cầu ngày càng cao về độ an toàn từ phía cơ quan quản lý và người tiêu dùng. Bên cạnh đó, sự gia tăng khả năng thích nghi và mức độ đề kháng của vi sinh vật đối với các chất bảo quản truyền thống cũng là một tình trạng đáng lo ngại. Chính vì thế, nhu cầu cấp thiết hiện nay là cần phải nghiên cứu, phát triển các chất bảo quản mới. Trong bối cảnh đó, các peptid kháng khuẩn (AMP - antimicrobial peptide) với nhiều ưu điểm như phổ tác dụng rộng, hiệu lực cao, khả năng chọn lọc tốt, ít gây đề kháng [2] có thể trở thành một

giải pháp quan trọng. Các AMP còn sở hữu đặc tính đáng lưu ý là dễ bị thủy phân bởi men tiêu hóa [3], vì vậy thời gian tồn tại trong cơ thể ngắn, kỳ vọng ít gây ảnh hưởng đến đối tượng sử dụng.

Một trong những AMP đang ngày càng thu hút được sự quan tâm của các nhà khoa học là Mastoparan C (MP-C). Đây là peptid tự nhiên được tìm thấy đầu tiên trong nọc ong bắp cày châu Âu (*Vespa crabro*). Hợp chất này có chiều dài 14 acid amin với trình tự Leu-Asn-Leu-Lys-Ala-Leu-Leu-Ala-Val-Ala-Lys-Lys-Ile-Leu-NH<sub>2</sub> (hay H-LNLKALLAVAKKIL-NH<sub>2</sub>). Nhóm amino ở đầu N tồn tại dưới dạng tự do còn nhóm carboxyl ở đầu C được amid hoá [4]. Trong công bố mới đây của nhóm tác giả, MP-C và một số dẫn xuất thế lysin đã được chứng minh là có phổ kháng khuẩn rộng, tác dụng trên nhiều vi sinh vật, bao gồm cả Gram dương, Gram âm và vi nấm. Kết quả nghiên cứu cũng cho thấy, ở những nồng độ thấp (dưới 16 µM hay 26 ppm), những hợp chất này hầu như không thể hiện độc tính đối với hồng cầu người. Trong số đó, dẫn xuất MPC-A5K, A8K mà trong cấu trúc, hai acid amin alanin tại vị trí số 5 và số 8 của MP-C được thay thế bằng lysin (Hình 1) được xác định là có độc tính thấp nhất [5].



Hình 1. Cấu trúc của dẫn xuất MPC-A5K, A8K.

Từ những kết quả khả quan đó, nghiên cứu được tiến hành nhằm tổng hợp và khảo sát khả năng thay thế chất bảo quản của dẫn xuất MPC-A5K, A8K. Cụ thể, hoạt tính kháng khuẩn và kháng nấm của MPC-A5K, A8K tiếp tục được so

sánh với một số kháng sinh. Đồng thời hiệu quả của peptid này trong việc thay thế một phần hoặc toàn bộ hai chất bảo quản thông dụng trong chế phẩm dạng uống là natri benzoat và kali sorbat cũng được khảo sát.

## 2. Đối tượng và phương pháp nghiên cứu

### 2.1. Nguyên liệu

Các dung môi, hóa chất chính sử dụng trong tổng hợp hóa học đạt tiêu chuẩn AR hoặc RG, bao gồm xúc tác COMU (Angene Chemical), *N,N*-diisopropylethylamin (DIPEA), *N*-metyl-2-pyrrolidon (NMP), dimethylformamid (DMF), acid trifluoroacetic (TFA), triisopropylsilan (TIS), dicloromethan (DCM) (Daejung Chemicals), các acid amin được bảo vệ như Fmoc-Ala-OH, Fmoc-Asn-OH, Fmoc-Ile-OH, Fmoc-Leu-OH, Fmoc-Lys-OH, Fmoc-Val-OH và pha rắn Rink amide MBHA resin (AK Chemicals). Dung môi acetonitril (ACN) sử dụng trong sắc ký lỏng (LC), sắc ký lỏng hiệu năng cao (HPLC) đạt tiêu chuẩn HPLC (Daejung Chemicals). Nước được tinh chế bằng thiết bị Thermo Scientific GenPure UV - TOC đạt điện trở suất 18,2 MΩ.m.

Các dung môi, hóa chất chủ yếu sử dụng trong thử nghiệm sinh học như chiết xuất nấm men, pepton, nước tương đậu nành trypton, cao thịt, chiết xuất mạch nha (Himedia, Ấn độ); natri clorid, glucose (Xilong, Trung Quốc, tiêu chuẩn USP38); agar (Việt Nam, tiêu chuẩn TCVN 3591:2017). Các chủng vi sinh vật thử nghiệm được mua từ Ngân hàng gen của Mỹ ATCC (American Type Culture Collection). Các nguyên liệu bào chế chế phẩm thử nghiệm gồm collagen bò thủy phân (Amicogen, Hàn Quốc, TCCS), vitamin C, natri hyaluronat, đường kính, natri benzoat, kali sorbat (Luwei Pharmaceutical, Trung Quốc, tiêu chuẩn USP38), nước cất đạt tiêu chuẩn vi sinh dưới 100 CFU/g.

### 2.2. Thiết bị, dụng cụ

Các thiết bị chính sử dụng trong quá trình tổng hợp là bộ tổng hợp pha rắn VM20 vacuum manifold Sigma và phụ kiện chạc ba; hệ thống sắc ký lỏng hiệu năng cao ghép bộ phận phát hiện đa sóng (HPLC-DAD) Agilent 1260 và cột sắc ký silica gel pha đảo C<sub>18</sub> Zorbax column - Agilent, 5 μm, kích thước 9,4 x 250 mm; hệ thống sắc ký lỏng ghép khối phổ (LC-MS)

Agilent 6400 Series Triple Quadrupole B.08.00 LC/MS System và cột C<sub>18</sub> Agilent 959961-902, kích thước 3,5 μm, 4,6 x 100 mm. Các thiết bị khác như bơm chân không, máy thổi N<sub>2</sub>, thiết bị siêu âm, máy ly tâm, vortex mixer, tủ hút, máy quay cát chân không, máy lắc.

Các thiết bị chính sử dụng trong thử nghiệm sinh học như tủ an toàn sinh học cấp 2 Bio II Advance Plus, Telstar; Máy quang phổ định lượng vi khuẩn WPA CO8000, Biochrom; tủ âm LIB-080M, LabTech; tủ âm lạnh LSI-3016A, LabTech.

Dụng cụ thủy tinh cơ bản, pipet và tip các loại, ống polypropylen, đĩa 96 giếng.

### 2.3. Phương pháp nghiên cứu

#### 2.3.1. Phương pháp tổng hợp dẫn xuất MPC-A5K,A8K

Dẫn xuất MPC-A5K,A8K của MP-C có công thức phân tử C<sub>78</sub>H<sub>149</sub>N<sub>21</sub>O<sub>15</sub>, trình tự chuỗi H-LNLKLLKLVAKKIL-NH<sub>2</sub> với đầu N tự do và đầu C amid hoá được tổng hợp bằng phương pháp tổng hợp hữu cơ pha rắn, sử dụng Rink amide MBHA resin [5]. Quy mô lý thuyết mỗi mẻ là 60 μmol peptid, quy trình như sau:

- Bước 1: hoạt hóa resin. Rink Amide MBHA resin được ngâm trong NMP 10 phút rồi đưa vào cột phản ứng của bộ Vacuum manifold. Hoạt hóa lần lượt với các dung môi DCM (10 ml, 5 phút) - DMF (10 ml, 10 phút) - DMF (10 ml, 5 phút). Sau mỗi lần rửa, hút dung môi ra khỏi cột bằng bơm chân không.

- Bước 2: loại nhóm bảo vệ Fmoc khỏi resin. Thực hiện hai lần, mỗi lần 10 phút với 1,2 ml piperidin 20% trong DMF.

- Bước 3: gắn acid amin-Fmoc. Acid amin gắn nhóm bảo vệ Fmoc đầu tiên được pha trong DMF rồi gắn vào resin bằng xúc tác COMU với sự hiện diện của DIEA trong DMF. Sau phản ứng, rửa cột lần lượt bằng các dung môi DCM (10 ml) - DMF (10 ml) - DCM (10 ml) - DMF (10 ml) - DMF (10 ml) - DMF (10 ml), mỗi lần 2 phút.

- Bước 4: loại nhóm bảo vệ Fmoc khỏi chuỗi. Thực hiện hai lần, mỗi lần với 1,2 ml piperidin 20% trong DMF, 10 phút. Sau phản ứng, rửa cột bằng các dung môi tương tự như ở bước 3.

- Bước 5: kéo dài chuỗi. Lặp lại các bước 3 và 4 lần lượt đối với từng acid amin theo đúng trình tự của chuỗi. Riêng đối với acid amin cuối cùng, sau phản ứng loại nhóm bảo vệ Fmoc thì rửa cột bằng các dung môi: DCM (10 ml) - NMP (10 ml) - DCM (10 ml) - DCM (10 ml) - DCM (10 ml), mỗi lần 2 phút.

- Bước 6: cắt peptid khỏi resin. Cho peptid gắn resin vào lọ thủy tinh, thêm 1,5 ml TFA/TIS/H<sub>2</sub>O, rung, siêu âm sau đó tiếp tục lắc trong 120 phút. Kết tủa bằng cách thêm hỗn hợp *n*-pentan và diethyl ete theo tỷ lệ 1 : 1. Thu tủa bằng cách ly tâm. Thêm hỗn hợp ACN và nước theo tỷ lệ 1 : 4 để hòa tan peptid, lọc bỏ resin. Làm khô bằng máy thổi N<sub>2</sub> qua đêm. Bảo quản trong lọ thủy tinh nút kín, để ở ngăn đông tủ lạnh.

### 2.3.2. Phương pháp theo dõi quá trình tổng hợp

Quá trình tổng hợp được theo dõi bằng phản ứng tạo màu với thuốc thử Kaiser. Thuốc thử này có thành phần là (A) phenol 80% trong ethanol, (B) KCN trong H<sub>2</sub>O/ pyridin và (C) Ninhydrin 6% trong ethanol. Nguyên tắc hoạt động như sau: dung dịch thuốc thử ban đầu có màu vàng nhạt. Ninhydrin phản ứng với các amin bậc 1 tự do tạo ra sản phẩm màu xanh đậm, làm đổi màu dung dịch. Thuốc thử không tạo màu xanh đậm đặc trưng với serin, asparagin, acid aspartic và prolin. Thử nghiệm được ứng dụng trong tổng hợp peptid pha rắn và hữu cơ pha rắn để theo dõi sự hoàn thiện của bước gắn acid amin vào chuỗi (màu vàng) và bước loại nhóm bảo vệ để giải phóng nhóm amino -NH<sub>2</sub> bậc 1 tự do (màu xanh đậm). Nếu hỗn hợp chỉ có màu xanh nhạt nghĩa là phản ứng chưa hoàn toàn. Tiến hành như sau: Lấy một ít resin ra khỏi bình phản ứng, rửa 3 lần bằng ethanol rồi cho vào 1 ống nghiệm thủy tinh. Thêm 3 giọt mỗi dung dịch Kaiser A, B, C rồi đun nóng ống nghiệm ở khoảng 120 °C trong vòng 5 phút. Quan sát màu dung dịch và các hạt resin.

### 2.3.3. Phương pháp tinh chế peptid

Peptid được tinh chế bằng hệ thống HPLC-DAD Agilent 1260 với cột silica gel pha đảo C18 Zorbax Agilent, 5 μm, kích thước 9,4 x 250 mm. Hệ dung môi A: 0,1% TFA/H<sub>2</sub>O, B: 0,1% TFA/ACN. Gradient nồng độ: 5 - 65% B trong

12 phút; 65-100% B trong 1 phút; 100% B trong 5 phút; 100-5% B trong 2 phút; 5% B trong 1 phút. Tốc độ dòng 3 mL/phút. Thể tích tiêm mẫu 5-900 μL. Phát hiện tại bước sóng hấp thụ 220 nm của liên kết amid.

Sản phẩm sau tinh chế được phân tích lại bằng HPLC-DAD với cùng hệ thống. Gradient nồng độ: 5 - 100% B trong 8 phút; 100% B trong 1 phút; 100 - 5% B trong 2 phút; 5% B trong 1 phút. Tốc độ dòng 1 mL/phút. Thể tích tiêm mẫu 30 μL. Độ tinh khiết của peptid được tính bằng phần trăm diện tích peak chính so với tổng diện tích các peak trên sắc ký đồ không tính các peak tạp hệ thống. Hiệu suất tổng hợp được tính sau khi tinh chế theo công thức: Hiệu suất toàn quá trình (%) = (Khối lượng cân thực tế : Khối lượng thu được theo lý thuyết) x 100%.

### 2.3.4. Phương pháp định tính peptid

Tiến hành phân tích sản phẩm thu được sau tinh chế bằng hệ thống LC-MS Agilent 6400 Series Triple Quadrupole B.08.00 LC/MS System. Sử dụng cột C<sub>18</sub> Agilent 959961-902, kích thước 3,5 μm, 4,6 x 100 mm. Hệ dung môi A: 0,1% TFA/H<sub>2</sub>O, B: 0,1% TFA/ACN. Tốc độ dòng 1 mL/phút. Gradient nồng độ: 30 - 80% B trong 2 phút; 80-30% B trong 2 phút. Thể tích tiêm mẫu 1-20 μL. Chế độ chạy Positive. Vùng khối quan sát 400-2000 (Dalton). So sánh giá trị *m/z* thực nghiệm với lý thuyết để định tính peptid.

### 2.3.5. Phương pháp đánh giá hoạt tính kháng vi sinh vật

Hoạt tính kháng khuẩn và kháng nấm của MPC-A5K, A8K được đánh giá thông qua nồng độ ức chế tối thiểu (MIC - Minimum Inhibitory Concentration), bằng phương pháp pha loãng vi lượng trong môi trường canh thang tiêu chuẩn với một vài điều chỉnh nhỏ [6]. Thử nghiệm được tiến hành trên tám chủng vi sinh vật bao gồm bốn chủng Gram dương *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) ATCC 25923, *Bacillus cereus* (*B. cereus*) ATCC 11778, *Enterococcus faecalis* (*E. faecalis*) ATCC 29212, *Listeria monocytogenes* (*L. monocytogenes*) ATCC 15313, ba chủng Gram âm *Escherichia coli* (*E. coli*) ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* (*P. aeruginosa*) ATCC 27853,

*Salmonella enterica* (*S. enterica*) ATCC 13076 và một chủng vi nấm *Candida albicans* (*C. albicans*) ATCC 10231. Các chủng vi khuẩn được nuôi cấy trước với 5 ml môi trường canh thang Lysogeny Broth (10 g/L polypepton, 5 g/L chiết xuất men bacto và 10 g/L NaCl) qua đêm ở 37 °C. Đối với thử nghiệm trên vi nấm, *C. albicans* được nuôi cấy trong môi trường YM (10 g/L glucose, 3 g/L chiết xuất mạch nha, 5 g/L pepton, 3 g/L chiết xuất nấm men) ở 37 °C.

Các peptid được hòa tan trong dung dịch đệm PBS tiệt trùng được chuẩn bị với các nồng độ cuối cùng là 2 μM, 4 μM, 8 μM, 16 μM, 32 μM, 64 μM và 128 μM trong các đĩa microtiter đáy tròn 96 giếng. Sau đó, dịch nuôi cấy được pha loãng trong môi trường nuôi cấy tương ứng đã khử trùng để đạt được mật độ 10<sup>6</sup> CFU/ml rồi thêm vào các giếng chứa peptid. Mật độ cuối cùng trong các giếng là 0,9 x 10<sup>6</sup> CFU/mL. Sau 24 giờ ủ ở 37 °C, các đĩa microtiter 96 giếng được kiểm tra để xác định MIC, nồng độ hoạt chất thấp nhất ức chế hoàn toàn sự phát triển của vi sinh vật. Mỗi nồng độ thử nghiệm được lặp lại

trong ba giếng độc lập. So sánh với các kháng sinh ampicilin, streptomycin và gentamycin.

### 2.3.6. Phương pháp đánh giá sơ bộ khả năng bảo quản

Khả năng bảo quản của dẫn xuất MPC-A5K,A8K đối với chế phẩm dạng uống được đánh giá theo phương pháp mô tả tại phụ lục 13.8 Dược điển Việt Nam V [1] có điều chỉnh để phù hợp với mức độ của thử nghiệm sơ bộ và điều kiện sẵn có của phòng thí nghiệm. Cụ thể là bốn loại vi sinh vật chỉ thị được cấy đồng thời vào chế phẩm thay vì cấy riêng lẻ. Lặp lại trong ba thí nghiệm độc lập.

Các mẫu thử nghiệm có thành phần công thức như mô tả trong Bảng 1 được bào chế trong phòng sạch cấp D, theo quy trình như sau: cho khoảng 60 ml nước cất vào cốc có chân. Thêm lần lượt từng nguyên liệu, khuấy tan hoàn toàn rồi mới cho nguyên liệu kế tiếp vào. Bổ sung nước cất vừa đủ 100 ml. Đựng trong lọ thủy tinh có nắp, đã tiệt trùng.

Bảng 1. Thành phần công thức các mẫu chế phẩm thử nghiệm

STT	Nguyên liệu	Mẫu			
		M1	M2	M3	M4
1	Collagen bò thủy phân (g)	10	10	10	10
2	Vitamin C (g)	0,1	0,1	0,1	0,1
3	Natri hyaluronat (g)	0,2	0,2	0,2	0,2
4	Đường kính (g)	20	20	20	20
5	MPC-A5K,A8K (g)		0,001	0,001	
6	Natri benzoat (g)			0,1	0,2
7	Kali sorbat (g)			0,1	0,2
8	Nước cất	Vừa đủ 100 ml			

Các hỗn dịch vi sinh vật chỉ thị *S. aureus* ATCC 6538, *P. aeruginosa* ATCC 9027, *C. albicans* ATCC 10231, *Aspergillus niger* ATCC 16404 được chuẩn bị theo hướng dẫn trong Dược điển. Cấy đồng thời bốn hỗn dịch này với mật độ tương đương nhau vào các mẫu M1-M4. Nồng độ vi sinh vật chỉ thị tổng cộng trong chế phẩm ngay sau khi cấy (R<sub>0</sub>) khoảng từ 10<sup>5</sup> – 10<sup>6</sup> CFU/ml. Tổng thể tích hỗn dịch đem cấy từ 0,5 – 1% thể tích chế phẩm thử. Lưu trữ các mẫu đã

cấy vi sinh vật chỉ thị ở nhiệt độ 20 °C – 25 °C, tránh ánh sáng, theo dõi cảm quan các mẫu thử trong quá trình ủ.

Tại các thời điểm 14 và 28 ngày, lấy 1 ml mỗi chế phẩm, xác định số lượng vi sinh vật (R<sub>t</sub>) bằng phương pháp đĩa thạch, dùng môi trường TSA, nhiệt độ 30 °C- 35 °C, thời gian ủ 5 ngày. Tính lượng giảm đi của vi sinh vật chỉ thị tại thời điểm đó (R):

$$\text{Log}_{10}\text{Reduction} = \text{Log}_{10}R_0 - \text{Log}_{10}R_t.$$

### 3. Kết quả và bàn luận

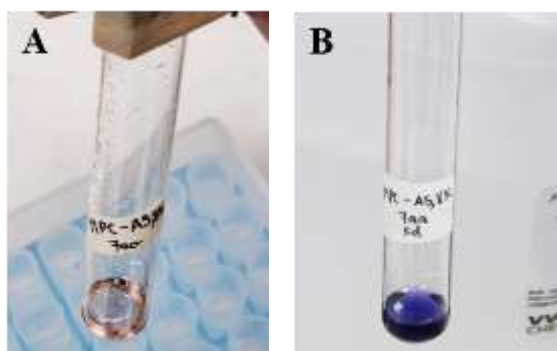
#### 3.1. Tổng hợp dẫn xuất MPC-A5K,A8K

Tiến hành tổng hợp dẫn xuất MPC-A5K,A8K ( $C_{78}H_{149}N_{21}O_{15}$ , MW = 1621,18) theo phương pháp được mô tả, sử dụng các nguyên liệu như trong Bảng 2. Quy mô tổng hợp lý

thuyết là 60  $\mu\text{mol}$  peptid/mẻ. Khả năng tải của resin là 0,65 mmol/g nên mỗi mẻ cần 92 mg resin. Sử dụng lượng dư acid amin với tỷ lệ gấp 5 lần khả năng tải của resin, tương đương 300  $\mu\text{mol}$  acid amin/lần cân. Tỷ lệ mol acid amin : COMU là 1,05 : 1, như vậy mỗi bước gắn acid amin cần 285  $\mu\text{mol}$  xúc tác COMU. Tỷ lệ mol acid amin : DIEA là 1 : 2.

Bảng 2. Nguyên liệu tổng hợp MPC-A5K,A8K

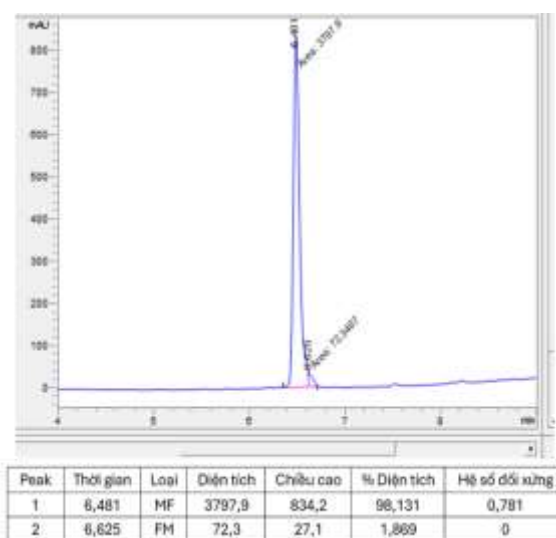
Nguyên liệu	Khối lượng mol phân tử (g/mol)	Số lần cân/đong	Mỗi lần cân/đong	Tổng cộng
Resin	732,86	1	92 mg	92 mg
L-Fmoc	353,4	5	106 mg	530 mg
I-Fmoc	353,4	1	106 mg	106 mg
K-Fmoc	468,5	5	141 mg	705 mg
A-Fmoc	311,3	1	93 mg	93 mg
V-Fmoc	339,4	1	102 mg	102 mg
N-Fmoc	596,7	1	179 mg	179 mg
COMU	428,27	14	122 mg	1708 mg
DIEA	129,25	14	0,27 ml	3,78 ml



Hình 2. Theo dõi phản ứng tổng hợp MPC-A5K,A8K bằng thuốc thử Kaiser: sau khi gắn acid amin mới, chưa loại Fmoc (A) và đã loại Fmoc (B).

Theo dõi phản ứng bằng thuốc thử Kaiser cho thấy sau phản ứng gắn acid amin-Fmoc mới, hỗn hợp có màu vàng nhạt của thuốc thử (Hình 2A). Chứng tỏ acid amin được bảo vệ bằng nhóm Fmoc đã kết nối vào chuỗi, không còn đầu  $-NH_2$  tự do của chuỗi peptid trước đó nữa. Như vậy bước gắn acid amin đã thành công. Sau khi xử lý với piperidin/DMF 20%, hỗn hợp có màu xanh đậm (Hình 2B). Chứng tỏ nhóm bảo vệ Fmoc bị cắt ra khỏi chuỗi peptid để giải phóng đầu  $-NH_2$  tự do. Như vậy phản ứng giải bảo vệ đã thành công.

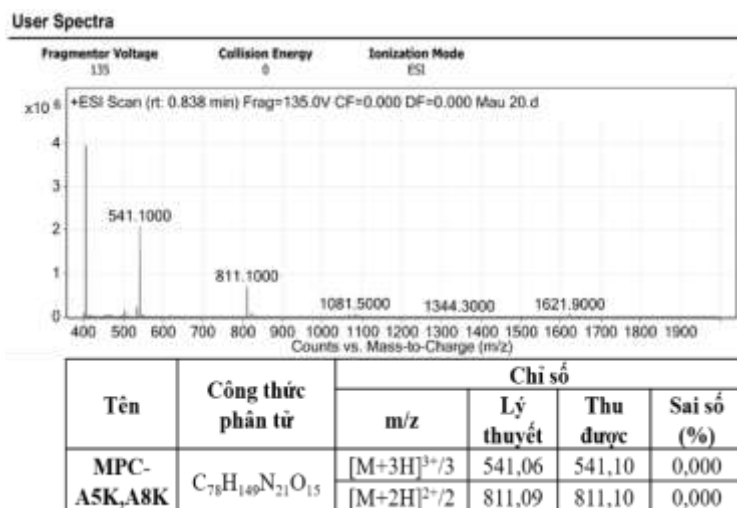
Sau khi tinh chế bằng HPLC trong các điều kiện như đã mô tả thu được 29,2-31,5 mg peptid. Hiệu suất tổng hợp toàn quy trình đạt 31,2% sau 14 cặp bước gắn acid amin - giải bảo vệ và 1 bước cắt peptid khỏi resin. Độ tinh khiết của sản phẩm tinh theo tỷ lệ diện tích peak trên sắc ký đồ là 98,1% (Hình 3).



Hình 3. Sắc ký đồ của peptid sau tinh chế ở bước sóng 220 nm.

So với tổng hợp hữu cơ truyền thống, tổng hợp peptid pha rắn là phương pháp được phát triển với tính ổn định và độ chính xác cao. Quá trình phản ứng được theo dõi liên tục bằng thuốc thử đặc trưng. Vì vậy định tính sản phẩm căn cứ vào tỷ lệ giữa khối lượng m và điện tích z bằng

kỹ thuật LC-MS được áp dụng phổ biến. Phân tích cho thấy giữa giá trị m/z thực nghiệm so với tính toán lý thuyết khác biệt không quá 0,02% (Hình 4), cho phép khẳng định sản phẩm thu được là MPC-A5K,A8K.



Hình 4. Phân tích phổ khối của sản phẩm sau tinh chế.

### 3.2. Đánh giá tác dụng kháng vi sinh vật

Giá trị MIC của MPC-A5K,A8K và các kháng sinh ampicilin, streptomycin và

gentamycin trên một số chủng vi sinh vật thử nghiệm được trình bày trong Bảng 3.

Bảng 3. Nồng độ ức chế tối thiểu của MPC-A5K,A8K, ampicilin, streptomycin và gentamycin trên một số chủng vi sinh vật

Vi sinh vật		Nồng độ ức chế tối thiểu (µM)			
		MPC-A5K,A8K	Ampicilin	Streptomycin	Gentamycin
Vi khuẩn Gram dương	<i>S. aureus</i> ATCC 25923	32	16	128	16
	<i>B. cereus</i> ATCC 11778	16	>128	16	16
	<i>E. faecalis</i> ATCC 29212	4	128	>128	>128
	<i>L. monocytogenes</i> ATCC 15313	4	16	16	16
Vi khuẩn Gram âm	<i>E. coli</i> ATCC 25922	8	128	64	16
	<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	64	>128	128	4
	<i>S. enterica</i> ATCC 13076	32	32	32	16
Vi nấm	<i>C. albicans</i> ATCC 10231	16	>128	>128	>128

Các kháng sinh thông dụng ampicilin, streptomycin và gentamycin được chọn làm đối chứng. Trong đó, hai kháng sinh đầu có phổ rộng

trên cả vi khuẩn Gram dương và Gram âm còn gentamycin có tác dụng mạnh trên vi khuẩn Gram âm và được dùng phổ biến trong các



trường hợp nhiễm khuẩn nặng. Kết quả cho thấy dẫn xuất MPC-A5K,A8K có phổ kháng sinh rộng, tác dụng trên cả tám chủng vi sinh vật thử nghiệm bao gồm cả Gram dương, Gram âm và vi nấm với MIC từ 4-64  $\mu\text{M}$ . Kết quả này tương đồng với báo cáo trước đó [5] chứng tỏ tính ổn định và độ tin cậy của quy trình đánh giá. Có thể nhận thấy tác dụng của peptid này trên vi khuẩn Gram dương có phần mạnh hơn so với vi khuẩn Gram âm. Phần lớn các giá trị MIC của MPC-A5K,A8K đều nhỏ hơn hoặc bằng 16  $\mu\text{M}$ . Trong khi đó, cả ampicilin, streptomycin và gentamycin đều chỉ tác dụng trên tối đa 6 trong tổng số 8 chủng, đồng thời không thể hiện hoạt tính đáng kể trên vi nấm *C. albicans*. Hơn nữa, hầu hết các giá trị MIC của ba kháng sinh này đều lớn hơn hoặc bằng 16  $\mu\text{M}$ . Điều này khẳng định ưu điểm về hoạt tính tốt và phổ rộng của MPC-A5K, qua đó cho thấy tiềm năng ứng dụng trong việc kiểm soát sự phát triển của các vi sinh vật gây bệnh.

### 3.3. Bước đầu đánh giá hiệu quả bảo quản

Nhu cầu sử dụng các sản phẩm bổ sung collagen dạng dung dịch uống nhằm bảo vệ sức khỏe và chăm sóc sắc đẹp đang ngày càng trở

nên phổ biến. Tuy nhiên, để duy trì độ ổn định và kéo dài thời hạn sử dụng, chế phẩm cần được bổ sung chất bảo quản, điều này đôi khi ảnh hưởng đến hương vị sản phẩm và tiềm ẩn rủi ro sức khỏe khi sử dụng dài hạn. Trong nghiên cứu, chúng tôi đã đánh giá sơ bộ hiệu quả bảo quản của dẫn xuất MPC-A5K,A8K đối với chế phẩm dạng này. Lựa chọn nồng độ MPC-A5K,A8K thử nghiệm đầu tiên là 10 ppm (tương đương 6,17  $\mu\text{M}$ ), bằng khoảng 40% so với đa số các giá trị MIC của hợp chất này, cũng chính là nồng độ không thể hiện độc tính với hồng cầu người đã được xác định trước đó (16  $\mu\text{M}$ ). Sử dụng riêng lẻ (M2) hoặc kết hợp với hai chất bảo quản thông dụng là natri benzoat 0,1% và kali sorbat 0,1% (M3). So sánh với hỗn hợp natri benzoat 0,2% và kali sorbat 0,2% (M4).

Sau khi bào chế, các mẫu M1-M4 đều có màu vàng nhạt, trong suốt, không có cặn vẩn lơ lửng, pH từ 5-5,5. Theo dõi trong quá trình bảo quản cho thấy chỉ sau từ 5-7 ngày, ở mẫu không có chất bảo quản (M1) đã bắt đầu xuất hiện đám vi sinh vật. Các mẫu M2-M4 không có biến đổi về mặt cảm quan. Vì vậy tiến hành đến số lượng vi sinh vật đối với các mẫu M2-M4 sau 14 và 28 ngày. Kết quả được trình bày trong Bảng 4.

Bảng 4. Hiệu quả bảo quản của peptid MPC-A5K,A8K đối với chế phẩm collagen dạng uống

Mẫu	Đánh giá vi sinh				
	Ban đầu	Sau 14 ngày		Sau 28 ngày	
	R <sub>0</sub> (CFU/mL)	R <sub>14</sub> (CFU/mL)	Log <sub>10</sub> Reduction	R <sub>28</sub> (CFU/mL)	Log <sub>10</sub> Reduction
M2	4,0x10 <sup>6</sup>	6,4x10 <sup>6</sup>	0,20	15,5x10 <sup>6</sup>	0,59
M3	2,2x10 <sup>6</sup>	1,8x10 <sup>6</sup>	-0,09	1,1x10 <sup>6</sup>	-0,30
M4	3,4x10 <sup>6</sup>	2,0x10 <sup>6</sup>	-0,23	2,6x10 <sup>6</sup>	-0,12

Kết quả cho thấy, khi sử dụng riêng lẻ ở nồng độ 10 ppm, dẫn xuất MPC-A5K,A8K chưa đủ hiệu lực bảo quản, với mật độ vi sinh vật trong mẫu M2 tăng gần 4 lần sau 28 ngày. Trong khi đó, hỗn hợp natri benzoat và kali sorbat ở nồng độ 0,2% mỗi chất (mẫu M4) có khả năng ức chế hoàn toàn vi sinh vật, nhưng hàm lượng này vượt mức được sử dụng tối đa đối với hầu hết thực phẩm [7]. Đặc biệt, việc giới hạn hàm lượng benzoat trong các sản phẩm có vitamin C là rất

cần thiết vì hai chất này có thể phản ứng với nhau tạo ra benzen, không có lợi cho sức khỏe. Việc kết hợp đồng thời với 10 ppm MPC-A5K,A8K cho phép giảm hàm lượng natri benzoat và kali sorbat trong chế phẩm xuống còn 0,1% mỗi chất trong khi vẫn duy trì được hiệu lực bảo quản (M3).

Kết quả thu được tương đối khả quan, tuy vậy đây mới chỉ là thử nghiệm sơ bộ ban đầu, được tiến hành với một số điều chỉnh nhằm phù hợp quy mô của thử nghiệm sơ bộ và điều kiện

thực tế của phòng thí nghiệm như trình bày trong mục 2.3.6. Vì vậy, trong những nghiên cứu tiếp theo, cần tiến hành trên các chủng vi sinh vật được cấy riêng lẻ theo hướng dẫn trong Dược điển Việt Nam V, đồng thời khảo sát thang nồng độ và đánh giá tác dụng của các phối hợp khác nhau. Bên cạnh đó cần lưu ý đến tương quan giữa nồng độ có hiệu quả và ngưỡng an toàn của hợp chất. Nhiều thử nghiệm phải được tiến hành một cách cẩn trọng trước khi một hợp chất có thể được đưa vào ứng dụng trong thực tế.

#### 4. Kết luận

Như vậy dẫn xuất MPC-A5K,A8K mà trong cấu trúc, hai acid amin alanin tại vị trí số 5 và số 8 của MP-C được thay thế bằng lysin đã được tổng hợp bằng phương pháp tổng hợp hữu cơ pha rắn. Hiệu suất toàn quy trình đạt 31,2%. Sản phẩm có độ tinh khiết 98,1%. Đã đánh giá được tác dụng kháng khuẩn và kháng nấm của MPC-A5K,A8K trên tám chủng vi sinh vật. Peptid này thể hiện hoạt tính tốt hơn so với ampicilin, streptomycin và gentamycin. Kết quả thử nghiệm bước đầu cho thấy sử dụng peptid MPC-A5K,A8K có thể giúp duy trì khả năng bảo quản chế phẩm collagen dạng uống trong điều kiện giảm hàm lượng hai chất bảo quản truyền thống là natri benzoat và kali sorbat, qua đó mở ra hướng ứng dụng mới của hợp chất này trong tương lai.

#### Lời cảm ơn

Nghiên cứu này được tiến hành trong khuôn khổ đề tài QG.22.67 “Tổng hợp pha rắn, đánh giá tác dụng kháng khuẩn và độ bền đối với enzyme tiêu hóa của một số peptid cải tiến từ Mastoparan C” của Đại học Quốc gia Hà Nội.

Lê Huy Bình được tài trợ bởi Chương trình học bổng đào tạo thạc sĩ, tiến sĩ trong nước của Quỹ Đổi mới sáng tạo Vingroup (VINIF), mã số VINIF.2023.TS.012

#### Tài liệu tham khảo

- [1] The Committee of Vietnam Pharmacopoeia V, Ministry of Health, Appendix 13.8. Determination of Antimicrobial Effectiveness of Preservatives, Volume 2, Fifth Edition, Medical Publishing House, Hanoi, 2017, pp. PL316-PL318 (in Vietnamese).
- [2] M. Magana, M. Pushpanathan, A. L. Santos, L. Leanse, M. Fernandez, A. Ioannidis, M. A. Giulianotti, Y. Apidianakis, S. Bradfute, A. L. Ferguson, A. Cherkasov, M. N. Seleem, C. Pinilla, C. D. L. F. Nunez, T. Lazaridis, T. Dai, R. A. Houghten, R. E. W. Hancock, G. P. Tegos, The Value of Antimicrobial Peptides in the Age of Resistance, the Lancet Infectious Diseases, Vol. 20, Iss. 9, 2020, pp. e216-e230, [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(20\)30327-3](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(20)30327-3).
- [3] N. Zhu, C. Zhong, T. Liu, Y. Zhu, S. Gou, H. Bao, J. Yao, J. Ni, Newly Designed Antimicrobial Peptides with Potent Bioactivity and Enhanced Cell Selectivity Prevent and Reverse Rifampin Resistance in Gram-Negative Bacteria, European Journal of Pharmaceutical Sciences, Vol. 158, Article No. 105665, 2021, pp. 1-16, <https://doi.org/10.1016/j.ejps.2020.105665>.
- [4] A. Argiolas, J. J. Pisano, Isolation and Characterization of Two New Peptides, Mastoparan C and Crabrolin, from the Venom of the European Hornet, *Vespa Crabro*, Journal of Biological Chemistry, Vol. 259, Iss. 16, 1984, pp. 10106-10111, [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(18\)90935-X](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(18)90935-X).
- [5] B. T. P. Hai, L. H. Binh, N. V. Khanh, D. T. Ngan, B. T. Thuong, N. T. H. Yen, B. T. Tung, L. Huy, N. T. T. Binh, Reducing Self-Assembly by Increasing Net Charge: Effect on Biological Activity of Mastoparan C, ACS Medicinal Chemistry Letters, Vol. 15, No. 1, 2024, pp. 69-75, <https://doi.org/10.1021/acsmchemlett.3c00385>.
- [6] European Committee for Antimicrobial Susceptibility Testing of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases, Determination of Minimum Inhibitory Concentrations (Mics) of Antibacterial Agents by Broth Dilution, Clinical Microbiology and Infection, Vol. 9, No. 8, 2003, pp. PIX-XV, <https://doi.org/10.1046/j.1469-0691.2003.00790.x>.
- [7] Ministry of Health, Circular No. 24/2019/TT-BYT on Regulations for the Management and Use of Food Additives (in Vietnamese).