

ĐIỀU CHẾ AXIT ALGINIC GIÀU CÁC HỢP PHẦN AXIT POLYMANNURONIC VÀ AXIT POLYGULURONIC BẰNG PHƯƠNG PHÁP THỦY PHÂN

Đến Tòa soạn 16-1-2007

CHU ĐÌNH KÍNH, TRẦN VĂN THIÊN², TRẦN THÁI HOÀ³, ĐÌNH QUANG KHIẾU³

¹*Viện Hóa học, Viện Khoa học và Công nghệ Việt Nam*

²*Khoa Hóa-Sinh, Trường Cao đẳng Sư phạm Phú Yên*

³*Khoa Hóa học, Trường Đại học Khoa học, Đại Học Huế*

SUMMARY

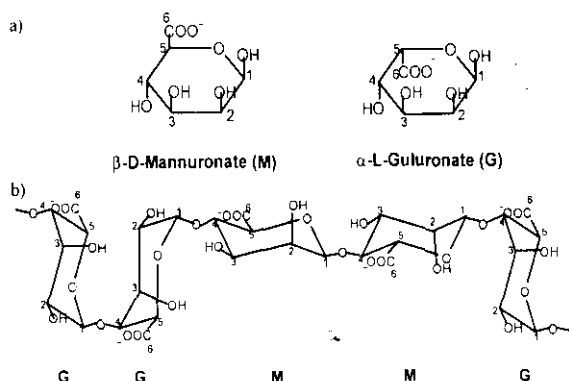
The alginic acids with rich polymannuronic (MM) and rich polyguluronic (GG) composition have been prepared from Thua Thiên Hue brown seaweeds by pH adjust method. The alginates were hydrolyzed by hydrochloride acid under hydrothermal treatment. The alginic acid fractions enriched in polymannuronic acid and polyguluronic acid were obtained by adjusting pH from 7 to 2. The obtained alginic acids were characterized by ¹H-NMR and XRD. The obtained alginic acid with controllable structure has been expected feasible applications in medicine and agriculture.

I - LỜI NÓI ĐẦU

Alginate, muối của axit alginic, một polysaccharit tự nhiên được điều chế từ rong mơ [1]. Về mặt cấu trúc, alginate là một co-polymer mạch thẳng của các uronat: β -D-mannuronat (M) và α -L-guluronat (G) qua 4 kiểu liên kết 1-4 glycosit: diequatorial (MM), diaxial (GG), equatorial-axial (MG), và axial-equatorial (GM). Hai gốc uronat phân bố trong mạch alginate theo 3 loại khối: poly-G (G-G-G-G), poly-M (M-M-M-M) và khối luân hợp của poly-G và poly-M (poly-GM, G-M-G-M) liên kết ngẫu nhiên trong chuỗi mạch. Cấu trúc của một đoạn phân tử alginate được đưa ra tại hình 1. Tính chất của alginate ngoài sự phụ thuộc vào độ dài mạch polymer (thể hiện ở khối lượng phân tử) còn phụ thuộc vào thành phần cấu trúc của phân tử alginate (tỉ số giữa axit mannuronic và guluronic M/G, tần suất của các gốc guluronat và mannuronat) [2]. Những nghiên cứu gần đây cho thấy, các oligosaccharit điều chế từ alginate

(oligoalginate) có những tính chất quý như thúc đẩy tăng trưởng vi khuẩn đường ruột *bifidobacteria*, thúc đẩy quá trình nảy mầm hạt giống và phát triển rễ, thân, lá của cây [3], có khả năng kháng virus [4]. Tuy nhiên hầu hết các nghiên cứu đều tập trung vào sự phụ thuộc của tính chất của alginate vào khối lượng phân tử và việc tạo ra oligoalginate có khối lượng phân tử thích hợp. Trong khi đó, theo một số nghiên cứu, axit alginic với cấu trúc giàu M hoặc giàu G sẽ có nhiều tính chất khác nhau như khả năng tạo gel, trao đổi ion [2], khả năng kháng virus khác nhau [3] ... nên có rất nhiều ứng dụng khác nhau trong công nghiệp thực phẩm, mỹ phẩm, dược phẩm, nông nghiệp [2, 3]... Vì vậy việc nghiên cứu điều chế axit alginic với cấu trúc thích hợp có thể kiểm soát được sẽ góp phần mở ra những hướng ứng dụng mới của sản phẩm này. Ở các bài báo trước [4 - 6], chúng tôi đã dùng phương pháp qui hoạch hóa thực nghiệm để đưa ra qui trình điều chế natri alginate có khối lượng phân tử mong muốn từ rong mơ tỉnh Thừa Thiên Huế. Trong bài viết này, chúng

tôi đề cập đến việc điều chế axit alginic giàu các hợp phần axit mannuronic (MM), và axit guluronic (GG). Đặc trưng các sản phẩm điều chế được khảo sát bằng $^1\text{H-NMR}$, và XRD.



Hình 1: Cấu trúc phân tử alginat: (a) cấu trúc các monome, (b) cấu hình dạng chuỗi

II - THỰC NGHIỆM

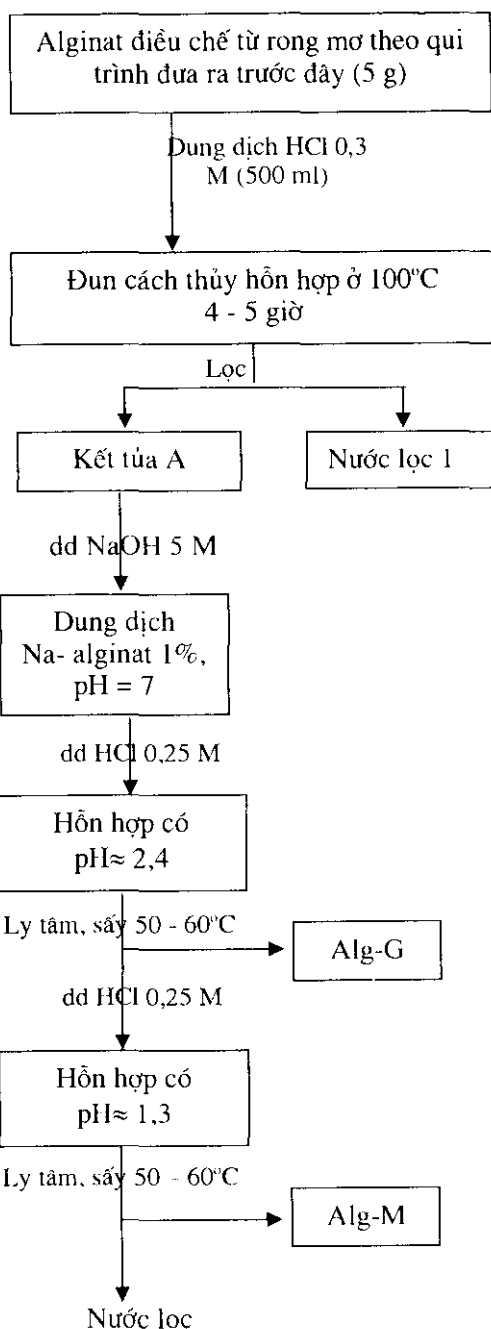
1. Nguyên liệu

Rong mơ thu được ở ven biển phía Bắc đèo Hải Vân vào tháng 5/2004 là khoảng thời gian rong mơ ở đây có hàm lượng và chất lượng alginat cao [7]. Rong sau khi thu hoạch được trộn đều, rửa nước ngọt, phơi khô dưới ánh nắng mặt trời, đóng gói và bảo quản nơi khô ráo.

Các loại hóa chất được dùng gồm NaOH, HCl thuộc loại tinh khiết phân tích (PA, TQ).

2. Phương pháp điều chế

Sơ đồ qui trình điều chế các phân đoạn axit alginic dựa vào khả năng tạo kết tủa dạng gel khác nhau của các hợp phần M và G ở các giá trị pH khác nhau được đưa ra trong hình 2. Natri alginat được điều chế từ rong mơ Thừa Thiên Huế theo qui trình đã được đề cập trước [4, 6]. Cân 5 g natri alginat (sau khi sấy đến khối lượng không đổi) cho vào 500 ml dung dịch HCl 0,3 M, khuấy đều. Đun cách thủy hỗn hợp thu được trong 4 - 5 giờ ở 100°C . Để nguội hỗn hợp ở nhiệt độ phòng. Lọc, rửa kết tủa được nước lọc 1 và kết tủa A. Hòa tan kết tủa A trong một lượng dung dịch NaOH 5 M đến pH = 7, pha loãng bằng nước cất để được dung dịch chứa khoảng



Hình 2: Sơ đồ quy trình điều chế các phân đoạn axit alginic

1% natri alginat. Dùng dung dịch HCl 0,25 M điều chỉnh pH dung dịch đến pH $\approx 2,4$. Ly tâm hỗn hợp, rửa kết tủa nhiều lần bằng nước cất, sấy khô ở 50 - 60°C thu được nước lọc 2 và kết tủa Alg-G. Thêm dung dịch HCl 0,25 M vào

phần nước lọc 2 đến pH $\approx 1,3$. Ly tâm hỗn hợp và rửa, sấy kết tủa ở 50 - 60°C thu được nước lọc 3 và kết tủa Alg-M.

3. Phân tích các đặc trưng của các sản phẩm

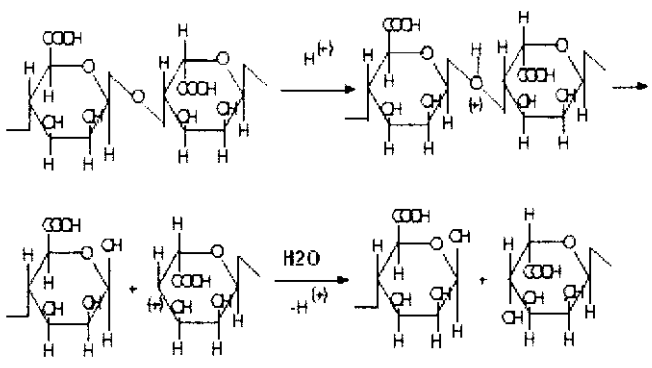
Phổ $^1\text{H-NMR}$ được ghi bằng máy phổ cộng hưởng từ hạt nhân hiệu Bruker, 500 MHz, nhiệt độ 353 K, dung môi NaOD 1% trong D_2O để xác định cấu trúc chuỗi của các sản phẩm điều chế được. Giảm độ nhiễu xạ tia X (XRD) của các mẫu alginat rắn được dùng để nghiên cứu thành phần pha của sản phẩm được ghi bằng máy D8 Advance, Bruker-Germany, dùng tia bức xạ CuK_α ở chế độ quét: vùng quét 5 - 50°; bước nhảy góc 0,01°. Khối lượng phân tử các sản phẩm alginat được tính toán theo phương trình Mark-Houwink, $[\eta] = K \cdot \overline{M}^\alpha$, trong đó $[\eta]$ là độ nhớt đặc trưng, $K = 6,9 \times 10^{-6}$ và $\alpha = 1,13$ đối với alginat giàu G; $K = 7,3 \times 10^{-5}$ và $\alpha = 0,92$ đối với alginat giàu M [8]. Việc đo độ nhớt được tiến hành mỗi nồng độ ba lần ở các nồng độ khác

nhau bằng cách ghi thời gian chảy của các mẫu natri alginat trong dung dịch NaCl 0,1 M qua nhớt kế Ubbelohde 0,8 mm đặt trong máy ổn nhiệt, nhiệt độ $25 \pm 0,2^\circ\text{C}$.

III - KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

1. Hiệu suất và phân tử lượng của các sản phẩm điều chế

Bảng 1 trình bày hiệu suất và phân tử lượng trung bình của alginat giàu M, giàu G điều chế được từ rong mơ Thừa Thiên Huế. Kết quả cho thấy hiệu suất và phân tử lượng trung bình của alginat giàu G cao hơn alginat giàu M. Điều này có thể được lý giải dựa trên cơ chế của phản ứng cắt mạch alginat được đưa ra ở hình 3. Do liên kết C-O-C glycosit giữa các gốc $\alpha\text{-L-gulonat}$ bền vững hơn so với giữa các gốc $\beta\text{-D-manuronat}$ [5] nên khả năng bị cắt mạch của các block GG là thấp hơn so với MM.



Hình 3: Cơ chế phản ứng cắt mạch alginat trong môi trường axit

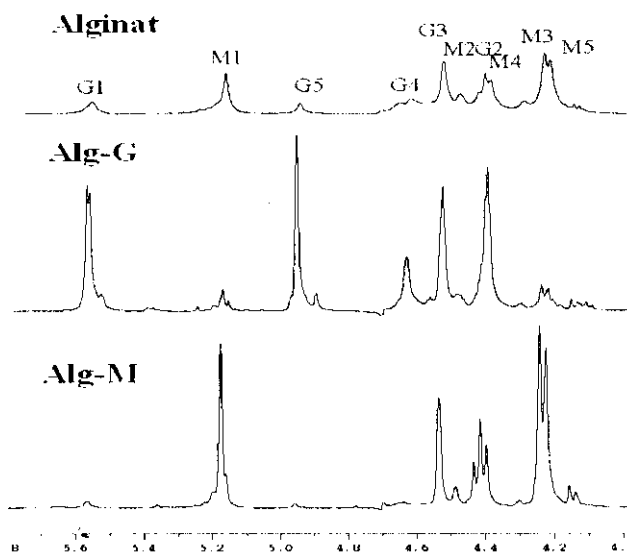
Bảng 1: Hiệu suất và phân tử lượng trung bình của alginat giàu M, giàu G

Sản phẩm	Hiệu suất, %	$\overline{M}$, kDa
Alginat		77,75
Alg-M	6,9	14,863
Alg-G	29,0	22,177

2. Phổ $^1\text{H-NMR}$

Các nguyên tử hydro của liên kết C-H trong gốc guluronat và mannuronat được ký hiệu lần

lượt là G1, G2, G3, G4, G5 và M1, M2, M3, M4, M5 được chỉ ra ở hình 1. Phổ $^1\text{H-NMR}$ của alginat và của các alginat giàu M và alginat giàu G đưa ra ở hình 4. Theo các kết quả phân tích của chúng tôi đã được đưa ra trong bài báo trước [9], các pic đặc trưng của các proton C-H với các độ chuyển dịch hóa học tương ứng được trình bày trong bảng 2. Việc xác định tỉ lệ M/G có thể được thực hiện dựa theo tỉ lệ cường độ các pic ứng với các proton M1 và G1 trong phổ $^1\text{H-NMR}$, theo đó alginat điều chế được từ rong mơ Thừa Thiên Huế chứa nhiều gốc mannuronat hơn guluronat.



Hình 4: Phổ ^1H -NMR của alginat, alginat giàu M và alginat giàu G

Bảng 2: Độ chuyển dịch hóa học (ppm) của các proton của alginat

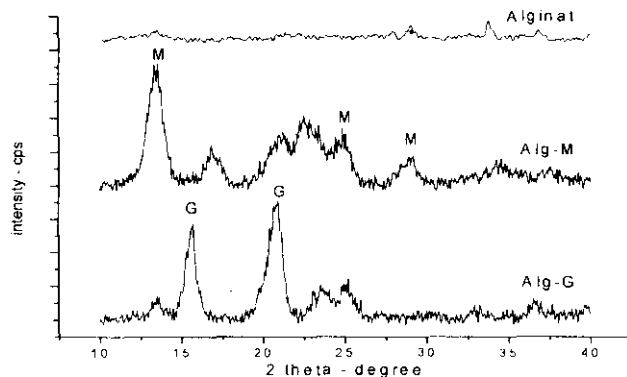
Gốc axit	H1	H2	H3	H4	H5
β -D-manuronat (M)	5,155	4,514	4,204	4,378	4,136
α -L-guluronat (G)	5,548	4,394	4,514	4,611	4,939

Trong phổ ^1H -NMR của alginat giàu G (kí hiệu Alg-G), các pic có độ dịch chuyển hóa học 5,155 ppm; 4,20 ppm; 4,14 ppm lần lượt ứng với proton M1, M3, M5 gần như biến mất, chứng tỏ trong sản phẩm alginat giàu G điều chế được hầu như không hoặc chứa rất ít gốc mannuronat. Ngược lại trong phổ của alginat giàu M (Alg-M), các pic có độ dịch chuyển hóa học 5,548 ppm; 4,939 ppm; 4,611 ppm lần lượt ứng với các proton G1, G5 và G4 gần như biến mất, chứng tỏ trong sản phẩm alginat giàu M điều chế được hầu như không hoặc chứa rất ít gốc guluronat. Như vậy dựa vào kết quả phân tích phổ ^1H -NMR có thể nói, các sản phẩm alginat giàu M và alginat giàu G chúng tôi điều chế được khá thuần nhất về thành phần monome.

3. Giảm độ nhiễu xạ tia X

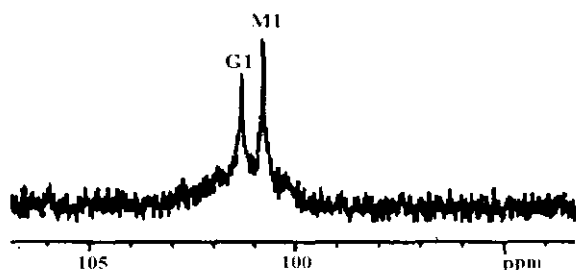
Giảm độ nhiễu xạ tia X của alginat, alginat

giàu M (Alg-M) và alginat giàu G (Alg-G) được trình bày ở hình 5. Alginat như là một hỗn hợp M và G như đã được xác nhận từ phổ ^1H -NMR. Các pic nhiễu xạ của nó ở dạng tù chứng tỏ alginat thu được có cấu trúc tinh thể kém và có khuynh hướng vô định hình. Ngược lại các pic nhiễu xạ của các mẫu Alg-M và Alg-G hẹp chứng tỏ chúng có độ kết tinh cao. Theo kết quả từ phổ ^1H -NMR, các mẫu Alg-M và Alg-G gần như chỉ chứa các block-M và các block-G, do đó nhiễu xạ tia X của Alg-M và Alg-G chính là các nhiễu xạ đặc trưng của block M và G tương ứng. Từ kết quả phân tích các pic phản xạ tia X đặc trưng của các sản phẩm có thể qui kết các góc phản xạ $13,60^\circ$; $16,84^\circ$; $22,57^\circ$; $29,2^\circ$; $34,01^\circ$ là đặc trưng cho các block M. Các góc $15,67^\circ$; $23,65^\circ$ là đặc trưng cho các block G. Kết quả này có thể đóng góp thêm dữ liệu cho JCPDS vốn không có đối với alginat.

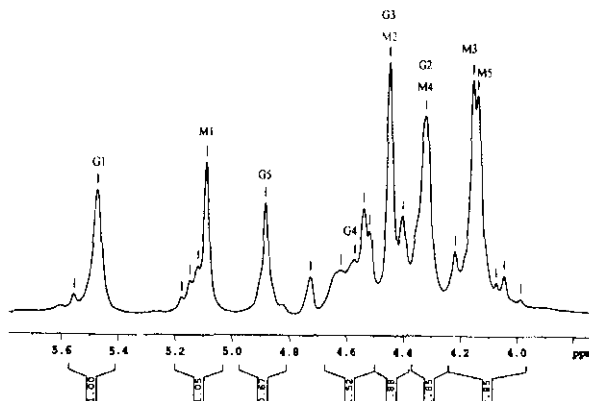


Hình 5: XRD của alginat , Alg-G và Alg-M

Giả thiết rằng trong alginat mức độ kết tinh của các block như nhau, hàm lượng của các block M và G tỉ lệ với diện tích pic 13,6° đối với M và 15,67° đối với G. Từ giả thiết mức độ kết tinh như nhau nên độ rộng bán phổ như nhau, vì thế tỉ lệ cường độ của pic ở 13,6° và pic ở 15,67° chính là tỉ lệ của M/G. So sánh kết quả này với kết quả xác định theo tỉ lệ diện tích các pic M1, G1 trong phổ $^1\text{H-NMR}$ và $^{13}\text{C-NMR}$ được đưa ra ở hình 6 và hình 7 [9], kết quả được trình bày trong bảng 3.



Hình 6: Phổ $^{13}\text{C-NMR}$ vùng anome của alginat



Hình 7: Phổ $^1\text{H-NMR}$ của alginat

Bảng 3: So sánh kết quả xác định tỉ lệ M/G bằng XRD, $^1\text{H-NMR}$ và $^{13}\text{C-NMR}$

Tỉ lệ	Phương pháp xác định		
	XRD	$^1\text{H-NMR}$	$^{13}\text{C-NMR}$
M/G	1,036	1,05	1,16

Các kết quả tính được bằng phương pháp XRD tương đối gần với kết quả tính bằng phương pháp phổ $^1\text{H-NMR}$ được xem là rất tin cậy trong phân tích định lượng và tương đối xa so với kết quả tính bằng phương pháp phổ $^{13}\text{C-NMR}$.

NMR được xem là có độ chính xác kém hơn do hàm lượng đồng vị ^{13}C trong tự nhiên tương đối thấp (1%), cho thấy có thể sử dụng XRD để xác định tỉ lệ M/G. Mặc dù chưa được kiểm chứng nhiều lần bằng thực nghiệm nhưng phương pháp này mở ra khả năng có thể xác định tỉ lệ hàm lượng M và G (M/G) đơn giản hơn phương pháp cộng hưởng từ không luôn sẵn có trong phòng thí nghiệm.

IV - KẾT LUẬN

Lần đầu tiên điều chế được các phân đoạn

alginat giàu M, giàu G từ alginat tách từ rong mơ Thừa Thiên Huế bằng phương pháp điều chỉnh pH để kết tủa phân đoạn. Các sản phẩm điều chế được khảo sát bằng phương pháp đo độ nhớt, phổ $^1\text{H-NMR}$, phép nhiễu xạ tia X. Kết quả cho thấy các sản phẩm điều chế được là khá thuần nhất về thành phần monome, hiệu suất và phân tử lượng trung bình của alginat giàu G cao hơn so với alginat giàu M. Hy vọng rằng các kết quả này sẽ mở ra một hướng ứng dụng mới cho alginat từ rong mơ.

Quá trình khảo sát các đặc trưng của sản phẩm bằng nhiễu xạ tia X cũng mở ra việc có thể áp dụng phương pháp XRD này để xác định tỉ lệ M/G, một chỉ số quan trọng giúp cho việc sử dụng một cách hợp lý các sản phẩm alginat.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Nguyễn Hữu Đại. Rong mơ Việt Nam - nguồn lợi và sử dụng, Nxb. Nông nghiệp Tp Hồ Chí Minh (1997).
2. Alistair M. Stephen. Food and Technology, Vol. 67, 245 - 248 (1995).
3. Yoh Sano. Carbohydrate Polymers 38, 183 - 186 (1999).
4. Trần Thái Hoà, Trần Vĩnh Thiện. Proceedings of 4th National chemistry conference, Vol. 1, 318 - 325, Hà Nội (2003).
5. Trần Thái Hoà, Trần Vĩnh Thiện. Journal of Research and Development, No. 1(44), 70 - 76 (2004).
6. Tran Thai Hoa, Tran Vinh Thien, and Dinh Quang Khieu. The 2nd International Symposium on Advanced Materials in Asia-Pacific Rim, April 1-4, 74 - 77 (2005).
7. Võ Thị Mai Hương. Tạp chí Sinh học, 22(3B), 73 - 76 (2000).
8. Anita Martinsen, Gudmund Skjåk-Bræk, Olav Smidsrød. Carbohydrate Polymers 15, 71 - 193 (1991)
9. Tran Vinh Thien, Chu Dinh Kinh, Tran Thai Hoa, and Dinh Quang Khieu. Characterization of alginate prepared from brown seaweeds in Thua Thien-Hue province. Asean Journal on Science & Technology for Development (submitted).