

PHÂN LẬP VÀ ĐẶC ĐIỂM CỦA FUCOIDAN TỪ NĂM LOÀI RONG MƠ Ở MIỀN TRUNG

Đến Tòa soạn 21-12-2006

NGUYỄN DUY NHÚT¹, BUI MINH LÝ¹, NGUYỄN MẠNH CƯỜNG², TRẦN VĂN SUNG²

¹Phân viện Khoa học Vật liệu tại Nha Trang, Viện Khoa học và Công nghệ Việt Nam

²Viện Hóa học, Viện Khoa học và Công nghệ Việt Nam

SUMMARY

The comparative study of the content and structure characteristics of fucoidans from five *Sargassum* brown seaweed species in the south provinces of Vietnam was conducted. The yield of fucoidans was ca. 4% (w/w) based on dry seaweed. The percentage of sulfate and uronic acid content was determined by Scott method. Fucoidans were hydrolyzed with trifluoroacetic acid, acetylated and their L-fucose, D-xylose, D-rhamnose, D-mannose, D-glucose, and D-galactose contents were identified by gas chromatography. All polysaccharides isolated from *Sargassum polycystum* C. Agardh, *S. mcclurei* Setchell, *S. swartzii* (Turn.) C. Ag., *S. oligocystum* Mont. and *S. denticarpum* T. Ajisaka are high-sulfated L-fucoidans with sulfate content in range of 20 - 33%, and uronic acid content fluctuated from 14 to 23%. Fucose was the predominant monosaccharide in fucoidan from *S. mcclurei* (ca. 51% total carbohydrates), while all four species *S. polycystum*, *S. swartzii*, *S. oligocystum* and *S. denticarpum* were enriched with both fucose (ca. 29 - 35%) and galactose (26 - 33%).

Keywords: Fucoidans, carbohydrates, sargassum, NMR, IR.

I - MỞ ĐẦU

Ấn Độ, Philipin và Việt Nam là ba nước có phân bố rong nâu có chứa fucoidan đáng kể nhất thế giới [1]. Cơ sở dữ liệu Species 2000 phiên bản 2006 liệt kê chi rong mơ *Sargassum* thuộc ngành rong nâu-Phaeophyta có tới 691 loài và dưới loài [2]. ở nước ta, trước đây Phạm Hoàng Hộ liệt kê có khoảng 36 loài *Sargassum*, chủ yếu tập trung ở các tỉnh phía nam [3]. Hiện nay, số loài rong mơ ở nước ta theo thống kê có 78 loài, nhiều loài có giá trị kinh tế cao như *S. oligocystum*, *S. polycystum* (rong mơ nhiều phao), và *S. mcclurei* (rong mơ McClure). Các loài rong mơ chủ yếu phân bố ở vùng miền trung Trung bộ, được thu hoạch từ tháng 4 đến tháng 6 mỗi năm, sản lượng chung khoảng 4.000 tấn khô tương ứng với khoảng 120 tấn

fucoidan sạch, trị giá ước chừng vài chục ngàn tỉ VND theo giá cả hiện nay trên thế giới. Trong đó có 5 loài rong phổ biến là: *Sargassum polycystum* C. Agardh, *S. mcclurei* Setchell, *S. swartzii* (Turn.) C. Ag., *S. oligocystum* Mont. và *S. denticarpum* T. Ajisaka [4].

Từ trước đến nay việc nghiên cứu hóa học fucoidan từ rong mơ hầu như chưa được thực hiện tại Việt Nam. Trong khuôn khổ bài báo này, chúng tôi công bố kết quả xác định thành phần và hàm lượng các đường, axit uronic và sunfat của fucoidan phân lập từ năm loài rong mơ phổ biến trên ở Việt Nam.

II - THỰC NGHIỆM

Thiết bị và hóa chất

Phổ ^1H -NMR (500 MHz) và ^{13}C -NMR (125 MHz) đo trên máy Bruker AVANCE 500 tại Viện Hóa học. Tetrametylsilan (TMS) (cho ^1H) hoặc tín hiệu dung môi (cho ^{13}C) được dùng làm nội chuẩn. Các mẫu fucoidan được đo với $\text{D}_2\text{O}/0,1\% \text{CF}_3\text{COOD}$. Phổ hồng ngoại đo trên máy IMPACT 410 của hãng NICOLET (Mỹ).

Xác định thành phần đường bằng sắc ký khí trên máy GC-17A Shimadzu FID với cột không phân cực. Chế độ nhiệt: 160°C , giữ 2 phút. Tăng đến 280°C , $10^\circ\text{C}/\text{phút}$, giữ 20 phút để rửa cột. Các pic đường sẽ ra hết sau khoảng 7 phút, glucosamin nếu có sẽ ra ở hơn 8 phút.

Thu và xử lý mẫu rong mơ

Năm loài rong trên được thu ở khu vực trong vịnh Nha Trang, rửa nhanh bằng nước ngọt và phơi khô tự nhiên, trung bình 10 kg rong tươi cho 1,3 kg rong khô tự nhiên với độ ẩm thường vào khoảng 25 - 28%. Các mẫu rong được thu và xác định bởi CVC. Huỳnh Quang Năng và TS. Nguyễn Hữu Dinh (Phân viện Khoa học Vật liệu, Nha Trang).

Tách chiết và tinh chế fucoidan

Rong nâu khô được cắt nhỏ cỡ 1 - 3 mm, 1 kg rong được khuấy trộn đều với 10 lít dung dịch HCl 0,1 N, ngâm 24 giờ ở nhiệt độ phòng, thỉnh thoảng có khuấy trộn. Dịch chiết được tách ra khỏi bã rong và cô đặc bằng màng siêu lọc 1 kDa đến còn khoảng 1 lít.

Dung dịch Cetavlon 10% trong nước được cho vào dịch trên đến khi không còn tạo kết tủa. Kết tủa được lọc, rửa với nước để tách bỏ laminaran và mannitol.

Sau đó dung dịch CaCl_2 3 M, NaCl 3 M được đưa vào và đun nóng ở 60°C khuấy liên tục trong 2 h và để yên qua đêm, muối cetavlon-fucoidan, cetavlon-alginic bị phá hủy giải phóng ra fucoidan, đồng thời canxi alginat được tách ra dưới dạng kết tủa.

Ly tâm để thu dịch có chứa fucoidan. Hai lần thể tích EtOH so với thể tích dịch lọc được đưa vào và khuấy trộn trong 30 phút. Để yên qua đêm, kết tủa fucoidan được tạo thành.

Gạn lọc thu kết tủa và tiếp tục rửa bằng EtOH 80% (v/v) đến khi không còn ion Cl^- trong nước rửa, hút chân không đến khan nước

và sấy kết tủa ở 45°C , áp suất 1 bar trong 18 giờ thu được hỗn hợp fucoidan sạch. Hiệu suất trung bình khoảng 40 g/kg rong khô.

Các sản phẩm này được phân tích bằng phổ ^1H - và ^{13}C -NMR, xác định hàm lượng đường, sunfat và axit uronic.

Phân tích thành phần đường của fucoidan sạch

1. Mẫu fucoidan khô (0,2 mg) cho vào ống nghiệm có nút vặn, thêm vào 0,02 mg inositol, 0,3 ml TFA 2 M, thủy phân trong 2 h ở 120°C . Cho bay hơi đến khô trong dòng khí argon ở nhiệt độ 40°C rồi thêm 0,5 ml MeOH cho bay hơi, lặp lại hai lần.

2. Cho vào trong ống nghiệm, có chứa sản phẩm fucoidan đã thủy phân, 0,3 ml NaBH_4 0,25 M vừa pha trong NH_4OH 1 M rồi để yên 30 phút ở 20°C . Thêm vào hỗn hợp phản ứng 0,5 ml axit axetic 10% trong metanol, cho bay hơi đến khô, lặp lại lần nữa. Cho vào ống nghiệm 0,5 ml MeOH bay hơi đến khô, lặp lại hai lần.

3. Axetyl hóa các gốc đường bằng 0,2 ml dung dịch Ac_2O : pyridin = 1 : 1 (v/v) ở 100°C trong 20 phút. Cho bay hơi hỗn hợp phản ứng, thêm vào 0,5 ml toluen, cho bay hơi đến khô, lặp lại hai lần.

4. Chiết sản phẩm đã axetyl hóa bằng etyl axetat. Xác định thành phần đường bằng sắc ký khí trên máy GC-17A Shimadzu.

Xác định hàm lượng sunfat và axit uronic

Phương pháp chuẩn độ đơn giản của Scott rất hữu dụng trong phân tích hàm lượng sunfat trong các polysaccharit [5]. Phương pháp xác định được tiến hành như sau: fucoidan (0,5 mg) được hoà tan trong nước khử ion, chuẩn độ bằng dung dịch xetyl pyridium clorit (xpc) 1% với microburet và quan sát trên nền đen. Độ đục của dung dịch tăng dần lên đến khi kết tủa xuất hiện đột ngột. Chuẩn độ song song hai mẫu: với fucoidan (0,5 mg) hoà tan trong dung dịch nước ta cần A ml dung dịch xpc, với fucoidan (0,5 mg) hoà tan trong dung dịch H_2SO_4 0,025 M ta cần B ml cpc. Hàm lượng sunfat (% mol) được tính theo B và hàm lượng axit uronic được tính theo hiệu A-B.

III - KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Các mẫu rong khô được chiết bằng dung dịch HCl 0,1 N, sau đó chiết bằng Cetavlon và xử lý với CaCl_2 , NaCl như đã mô tả trong phần thực nghiệm để được các fucoidan sạch. Sau khi thủy phân và axetyl hóa, hàm lượng đường các mẫu fucoidan được xác định bằng sắc ký khí cho kết quả được trình bày trong bảng 1.

Các đường L-fucose, D-xylose, D-rhamnose, D-mannose, D-glucose, D-galactose được xác định trên cơ sở so sánh với mẫu chuẩn. Bảng 1 cho thấy tất cả các polysacarit từ các loài rong mơ trên đều có tỉ lệ đáng kể L-fucose, chiếm khoảng 28 - 50% tổng cacbohydrat. Trong đó fucoidan từ loài *S. mcclurei* có hàm lượng đường fucose lớn nhất

với 50,51%. Hàm lượng D-galactose chiếm tỉ lệ gần bằng của L-fucose trong bốn loài *S. polycystum*, *S. swartzii*, *S. oligocystum* and *S. denticarpum*, trừ mẫu fucoidan từ rong *S. mcclurei*. Các đường D-xylose và D-glucose chiếm tỉ lệ nhỏ hơn (2 - 9%) so với đường D-rhamnose và D-mannose với khoảng 9 - 17%. Hàm lượng đường D-xylose lớn nhất ở loài *S. denticarpum* (9,24%), nhỏ nhất ở *S. mcclurei* (2,53%). Đường D-rhamnose lớn nhất ở *S. mcclurei* (25,25%), nhỏ nhất ở *S. polycystum* (9,71%). Đường D-mannose nhiều nhất ở loài *S. oligocystum* (17,76%), và ít nhất ở loài *S. polycystum* (9,71%). Hàm lượng đường D-glucose dao động không nhiều, lớn nhất ở *S. denticarpum* (9,83%), nhỏ nhất ở *S. mcclurei* (4,04%).

Bảng 1: Hàm lượng đường, sunfat và axit uronic theo tỷ lệ mol của fucoidan

Loài rong	Thành phần mol đường trung tính						SO_3Na (%) w/w	Axit Uronic (%)w/w
	Fuc	Xyl	Rha	Man	Glu	Gal		
<i>S. denticarpum</i>	1	0,24	0,44	0,39	0,34	1,05	25,69	21,20
	28,9%	6,94%	12,72%	11,27%	9,83%	30,35%		
<i>S. mcclurei</i>	1	0,05	0,5	0,24	0,08	0,11	33,15	17,87
	50,51%	2,53%	25,25%	12,12%	4,04%	5,56%		
<i>S. oligocystum</i>	1	0,15	0,36	0,54	0,18	0,81	22,46	21,54
	32,89%	4,93%	11,84%	17,76%	5,92%	26,64%		
<i>S. polycystum</i>	1	0,19	0,27	0,27	0,13	0,92	25,6	23,74
	35,97%	6,83%	9,71%	9,71%	4,68%	33,09%		
<i>S. swartzii</i>	1	0,19	0,48	0,54	0,22	1	20,40	14,28
	29,15%	5,54%	13,99%	15,74%	6,41%	29,15%		

Hàm lượng sunfat dao động trong khoảng 20 - 33% (w/w) so với tổng lượng mẫu phân tích, lớn nhất ở *S. mcclurei* (33%), nhỏ nhất ở *S. swartzii* (20,4%). Hàm lượng axit uronic dao động trong khoảng 14 - 23%.

Như vậy, fucoidan từ năm loài rong mơ trên đều có tỉ lệ sunfat và axit uronic khá cao. Thành phần đường có bốn loại đường chính với tỉ lệ khác nhau, trong đó đường fucose chiếm ưu thế. Cũng chính vì đặc điểm này mà việc xác định đặc điểm cấu trúc fucoidan từ rong mơ

Sargassum là khá phức tạp và khó khăn.

Phổ hồng ngoại của các fucoidan trên cũng có đặc điểm tương đồng như các tài liệu đã công bố. Dải hấp thụ từ, mạnh của nhóm hydroxyl ở 3400 cm^{-1} , của nhóm sunfat ở 1150 cm^{-1} [6]. Tất cả các mẫu đều có hấp thụ mạnh ở khoảng $1610 - 1625\text{ cm}^{-1}$, đặc trưng cho cấu trúc carbonyl. Trong vùng từ $1500 - 500\text{ cm}^{-1}$, 1030 đến 1167 cm^{-1} là do dao động kéo C-O của hemiacetal, 820 cm^{-1} là vùng của C-O-S equatorial, 840 cm^{-1} là vùng của C-O-S axial. Trên phổ hồng ngoại

của cả 5 mẫu fucoidan đều có hấp thụ ở giữa 840 và 820 cm^{-1} chứng tỏ trong các polysacarit đó đều hiện diện cả hai vị trí thế của sunfat là equatorial và axial. Rong mơ *S. swartzii* và *S. oligocystum* có dạng phổ “bảy đỉnh” khá giống nhau, gợi ý sự tương đồng về cấu trúc và thành phần của mạch oligosacarit. Bảng 1 cũng cho thấy hai loài rong trên có tỉ lệ, thành phần đường, sunfat và axit uronic rất gần nhau. Như vậy có thể dùng phổ hồng ngoại để góp phần đánh giá định tính chất lượng fucoidan.

Hình dáng vân phổ IR của các loài *S. mcclurei*, *S. polycystum* và *S. denticarpum* có dạng giống nhau. Do phổ IR được đo từ mẫu nguyên nên có thể thấy rằng fucoidan từ ba loài rong trên có dạng cấu trúc, phân nhánh, và vị trí thế gốc sunfat tương tự nhau.

Phổ ^{13}C -NMR của fucoidan của 5 loại rong trên đều có các đặc điểm cấu trúc đặc trưng cho các α -L-fucoidan sunfat. Các pic chính ở khoảng 93 và 97 ppm là của các cacbon anomeric (C-1) đặc trưng cho mảnh cấu trúc đường liên kết (1 $\rightarrow$ 3) [7]. Riêng loài *S. mcclurei* tương ứng ở 92 và 96 ppm. Tín hiệu rõ ở 16 ppm đặc trưng cho nhóm methyl (C-6) của vòng fucose [7]. Các tín hiệu 77 ppm (C-3), 80 ppm (C-4) xác định sự có mặt của fucose thế sunfat. Vùng pic vào khoảng 172 ppm là của axit uronic, 102 ppm là của β -D-galactose, khoảng 99 - 101 ppm là của mannose và uronic, vùng từ 74 ppm đến 83 ppm là vùng C có liên kết với sunfat hoặc liên kết với một nhóm đường khác, 66 ppm đến 71 ppm là vùng cacbon chỉ liên kết với OH. Các tín hiệu ở vùng 105 - 106 ppm đặc trưng cho D-glucose thấy với tỉ lệ nhỏ ở cả năm mẫu fucoidan trên [3].

Phổ ^1H -NMR của 5 mẫu polysacarit trên cũng cho thấy các pic đặc trưng cho fucoidan. Tín hiệu từ 1,3 đến 1,5 ppm là vùng H-6 của fucoidan, vùng 3,7 đến 4,0 ppm là vùng của H-2, 4,15 đến 4,35 ppm là vùng của H-3, 4,2 đến 4,7 ppm là vùng của H-5, 5,0 đến 5,2 ppm là vùng của proton anomeric H-1 (H- α), vùng 4,8 ppm là vùng của H-4 có nhóm thế sunfat, đồng thời sự có mặt của tín hiệu vùng 3,7 ppm cho ta thấy sự có mặt của H-4 không có nhóm thế

sunfat [8].

Phổ ^1H -NMR của fucoidan từ loài *S. mcclurei* có đặc điểm, hình dạng đơn giản hơn cả so với các mẫu còn lại, điều này có thể là do tỉ lệ đường fucose chiếm ưu thế (50%), rhamnose (25%), và có tỉ lệ sunfat cao nhất (33%). Các dữ kiện trên cho phép dự đoán dạng mạch cấu trúc không quá phân nhánh và phức tạp của fucoidan từ *S. mcclurei*.

Như vậy, fucoidan từ năm loài rong mơ đã được phân lập và tinh chế. Thành phần đường, sunfat và axit uronic của chúng đã được phân tích. Đặc điểm cấu trúc của mạch polysacarit được khảo sát và bàn luận dựa trên các dữ kiện phổ NMR, IR và kết quả phân tích hóa học.

Lời cảm ơn: Công trình này được sự hỗ trợ tài chính từ đề tài trọng điểm cấp Viện Khoa học và Công nghệ Việt Nam và đề tài nghiên cứu cơ bản cấp Nhà nước, mã số 518806.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. W. L. Zemke-White, and M. Ohno. J. Appl. Phycol., 11, 369 - 376 (1999).
2. [Http://annual.sp.2000.org/2006](http://annual.sp.2000.org/2006), Species 2000, Catalogue of Life: 2006 Checklist
3. Phạm Hoàng Hộ. Rong biển Việt Nam, Trung tâm Học liệu (1969).
4. Ajisaka, T., Huynh, Q. N., Nguyen, H. D., Japanese Journal of Phycology, 42, 394 - 400 (1994).
5. P. Dey, J. B. Harborne. Methods in plant biochemistry, Vol. 2, P. 527, Academic Press Limited, 1990.
6. R. Shiroma, S. Uechi, T. Taira, M. Ishihara, S. Tawata, M. Tako. J. Appl. Glycosci., 50, 361 - 365 (2003).
7. M. F. Marais, J. P. Joseleau. Carbohydr. Res., 336, P. 155 - 159 (2001).
8. R. Daniel, O. Berteau, J. Jozefonvicz and N. Nicole Goasdoue. Carbohydr. Res., 322, 291 - 297 (1999).